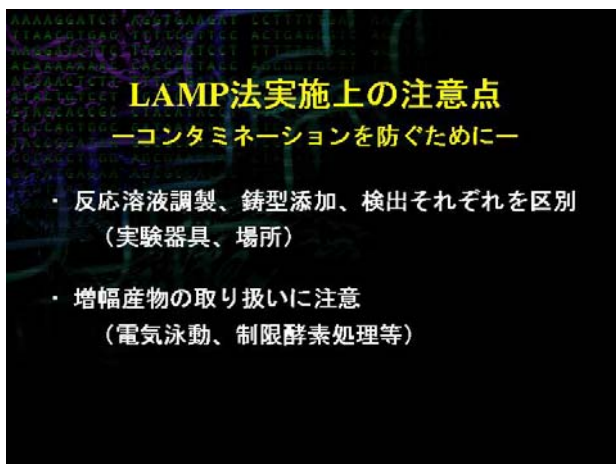


研究の進め方とテクニック

研究の進め方とテクニック

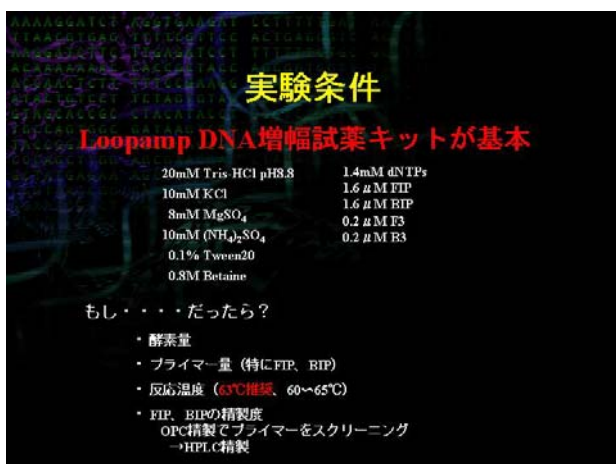




LAMP 法実施上の注意点はコンタミネーションを防ぐということが最も重要です。

その対策の1つは、反応溶液の調製、鑄型の添加、検出をそれぞれ区別して別々に行います。これは、実験器具や、実験する場所を区別します。もしも別々の実験場所を準備できない場合には、反応溶液の調製と鑄型の添加を別のクリーンベンチで行うことで同じ部屋で実験することが可能です。ただし、検出は必ず別の部屋で行って下さい。

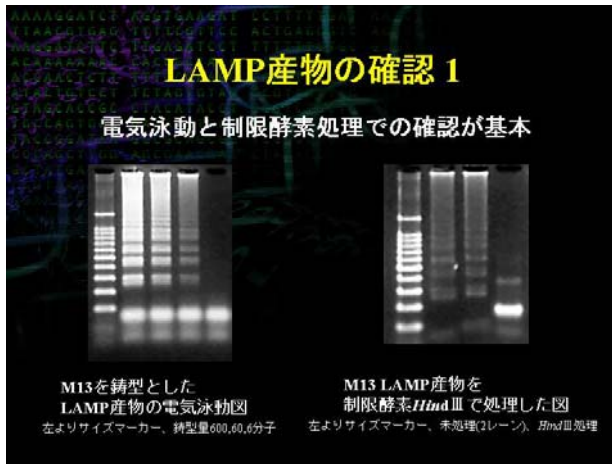
また、増幅産物の取り扱い時が最もコンタミネーションを起こしやすいので、電気泳動や制限酵素で目的の増幅産物を確認する際には十分に注意を払って下さい。



LAMP 法の実施条件は Loopamp DNA 増幅試薬キットに示されている条件が基本です。

さらに増幅速度、感度を上げる場合は以下のような検討をしてください。

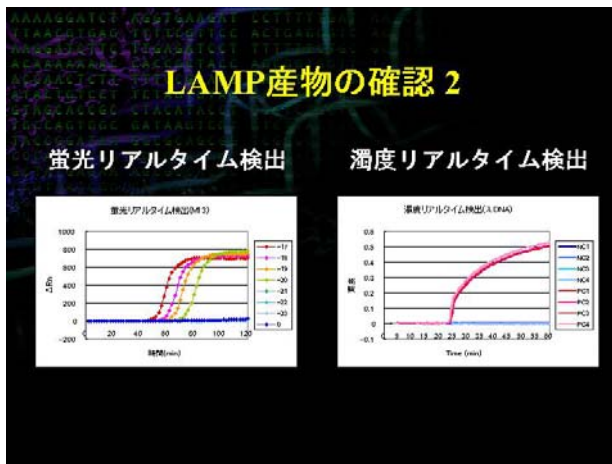
- ・ 酵素量、プライマー量 (特に Inner primer の量)
- ・ 反応温度 (63℃を推奨していますが、60~65℃で検討して下さい)
- ・ Inner primer の精製度 (はじめにプライマーセットをスクリーニングする際は OPC 精製で十分ですが、それ以後の検討では HPLC で精製されたものを使用して下さい)



LAMP 産物の確認の基本は、電気泳動と制限酵素での処理です。

左側の図が M13 を鋳型とした LAMP 産物の電気泳動図です。左から順にサイズマーカー、鋳型量 600 分子、60 分子、6 分子、ネガティブコントロールとなっています。

Target の M13 配列上には *Hind*III サイトが二ヶ所存在します。右側の図は左から順にサイズマーカー、未処理の 2 レーン、*Hind*III で処理したのとなっています。*Hind*III によりきれいに消化されており、目的のものが増えていることが確認されました。



LAMP 産物の確認は電気泳動による方法が基本ですが、これは反応終了後にチューブのフタを開けなければいけないため、コンタミネーションの危険が高くなります。そこで、はじめに電気泳動による確認を実施した後は、閉鎖系での検出をお奨めします。例えば蛍光リアルタイム検出や濁度リアルタイム検出が挙げられます。

左側の図は M13 を鋳型として蛍光リアルタイム検出をした結果です。鋳型量を 10^{-17} mol/tube から 10^{-23} mol/tube としていますが、鋳型量依存的に増幅速度が変化しました。

右側の図は λ DNA を鋳型として濁度リアルタイム検出をした結果です。NC1 から NC4 がネガティブコントロール、PC1 から PC4 がポジティブコントロールですが、非常に再現性の良い結果が得られました。

試薬の取り扱い

- ・ PCRでの一般的注意とほぼ同じ
- ・ 試薬は-20℃保存
- ・ プライマーは原液を-80℃保存
- ・ dNTPも徐々に劣化するので注意
- ・ 鋳型およびプライマーなどのDNAはTE等で保存 (pH8~9)
- ・ 低濃度ものは劣化しやすいので注意

LAMP 法の検討を進めていくと、はじめは反応が非常に上手くいっていたが、途中から上手くいけなくなるという現象にあうことがあります。そのような場合には試薬の劣化が疑われますので、試薬の取り扱いに注意して下さい。一般的な注意は PCR による実験時のものとほぼ同じで、試薬はすべて -20°C 保存、プライマーは原液を -80°C で保存して下さい。基質の dNTP も徐々に劣化するので注意が必要です。鋳型やプライマーなどの DNA を水などで調製した場合は劣化が速くなる可能性がありますので、できれば TE などの Buffer 中で保存して下さい。特にターゲットの鋳型 DNA については低濃度ものは非常に劣化しやすいので注意が必要です。

用語集

用語集

ATリッチ、GCリッチ:

核酸のGC含量は生物により、また細胞の核と核以外由来によっても異なるが、GC含量が少ないものをATリッチ、GC含量が多いものをGCリッチという。

bp:

base pair(塩基対)の略語。核酸の塩基のうち定まった組み合わせの2個が互いに水素結合によって対合したもの。核酸の複製、転写、mRNAとtRNAの相互作用に重要な役割を果たす。DNAではアデニン(A)とチミン(T)、グアニン(G)とシトシン(C)、RNAではAとウラシル(U)、GとCが対合する。2本鎖DNAの長さは、しばしば塩基対の長さ(bp)で表される。

dNTP:

dATP、dTTP(あるいはdUTP)、dGTP、dCTPを等量ずつ含む溶液で、核酸合成では基質として使われる。核酸合成の際、反応液中のdNTP濃度が高ければ、合成の際のヌクレオチド取り込みの間違いが多くなると言われている。

FASTA形式:

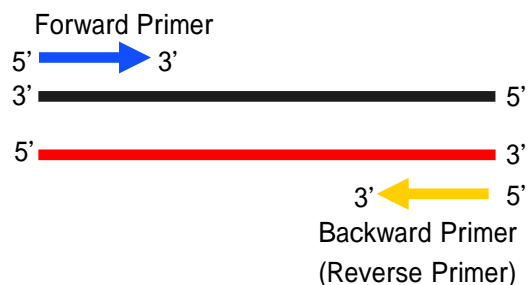
FASTAはデータベース検索により遺伝子やタンパク質の配列の類似性を調べることのできるコンピュータプログラムである。長い配列で類似性を保っているものを検索するのに適している。FASTA形式は配列解析プログラムで最もよく使われる形式であり、以下のようなフォーマットである。

```
>AA987701(genbank-upd)      先頭行は、>で始まるコメント(配列の名前や由来など)
taaagaagtaagcctttatttccttggtttgca    2行以降が配列データ
tggttcaaccttagctggggctgcagcagcac
>AA987701(genbank-upd)      複数の配列の場合は、続けて記入
taaagaagtaagcctttatttccttggtttgca
tggttcaaccttagctggggctgcagcagcac
```

Forward側、Backward側:

DNAの複製開始にはプライマーが必須で、PCRでは最低2種類、またLAMP法では最低4種類のプライマーが必要となるが、それらはDNA2本鎖に対して以下に示すように注目する遺伝子のコード領域の5'側を左に3'側を右に示した場合、5'→3'方向がForward側およびその逆がBackward側のものである。

PCRの場合



LAMP法の場合

⇨ p.51 LAMP法 図説(1)へ

GC 含量:

核酸の塩基組成を表す時、G と C が全体の中で占める割合(パーセント)をいう。プライマーの GC 含量は Target 遺伝子との結合を安定にさせるためには AT リッチにならないようにする。また、2 重らせん状態の核酸の場合、塩基対の組み合わせは決まっているため、全体の中で(G + C)がどれだけの割合になるかを示す GC 含量はその核酸の性質を表す指標の一つとなる。DNA の GC 含量は生物ごとに異なり、高等動物では 42%を中心とした狭い範囲の値をとるが、細菌では 75 ~ 25%までの広範囲に渡る。

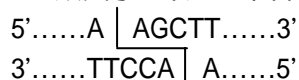
GenBank 形式:

GenBank は米国 NCBI(National Center for Biotechnology Information)で構築されている国際的な公的 DNA データベースである。GenBank では、データベースエントリの形式は以下のようになっている。

LOCUS	遺伝子座の名前、配列の長さの種類、生物分類、登録の日付
DEFINITION	エントリの記述
ACCESSION	もともとのアクセッション番号
KEYWORDS	このエントリを相互参照するためのキーワード
SOURCE	DNA が由来する生物
ORGANISM	生物の記述
REFERENCE	文献情報
COMMENT	生物学的機能やデータベースの情報
FEATURES	位置あるいは領域ごとの配列についての情報
source	配列の範囲、もとの生物
misc_signal	配列の範囲、機能やシグナルの種類
mRNA	配列の範囲、mRNA
CDS	配列の範囲、タンパク質のコード領域
intron	配列の範囲、イントロンの場所
Mutation	配列中の位置、変異による配列の変化
BASE COUNT	A、C、G、T、そのほかの記号の数
ORIGIN	配列の始まりを示す文字列
	1 gaattcgata aatctctggt ttattgtgca gtttatggtt ccaaaatcgc
	51 atatactcac agcataactg tatatacacc cagggggcgg aatgaaagcg
//	配列の終わりを示す記号

Hind :

制限酵素の一種。遺伝子操作の実験によく用いられる。*Haemophilus influenzae* Rd から調製されるため、その頭文字を取って命名されている。認識・切断塩基配列は以下の通りである。



HPLC 精製:

合成オリゴヌクレオチドの精製グレードの一つ。

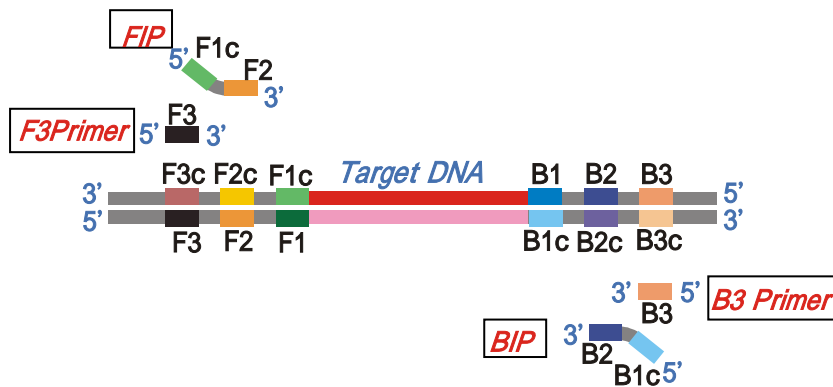
LAMP 法:

LAMP 法(Loop mediated isothermal Amplification)は、栄研化学(株)が独自に開発した簡易、迅速、精確、安価な増幅として遺伝子増幅技術である。遺伝子技術法では PCR 法と比べると、特異性、増幅

効率が高く、65 付近の一定温度で増幅を行えるという利点がある。

等温での増幅を可能とした大きな特徴は、2本鎖をはがしながら合成を進める鎖置換型 DNA ポリメラーゼによって温度変化サイクルによる2本鎖変性 アニールング - DNA 合成というステップ無しに合成が進む 独自の4種の(Target 遺伝子上の6箇所の領域を認識する)プライマーによって増幅される遺伝子の末端に形成されるループ構造を介して、自己の構造を鋳型としてDNA合成が進む、という2点。以下の図に増幅の流れを大まかに示す。

(1)

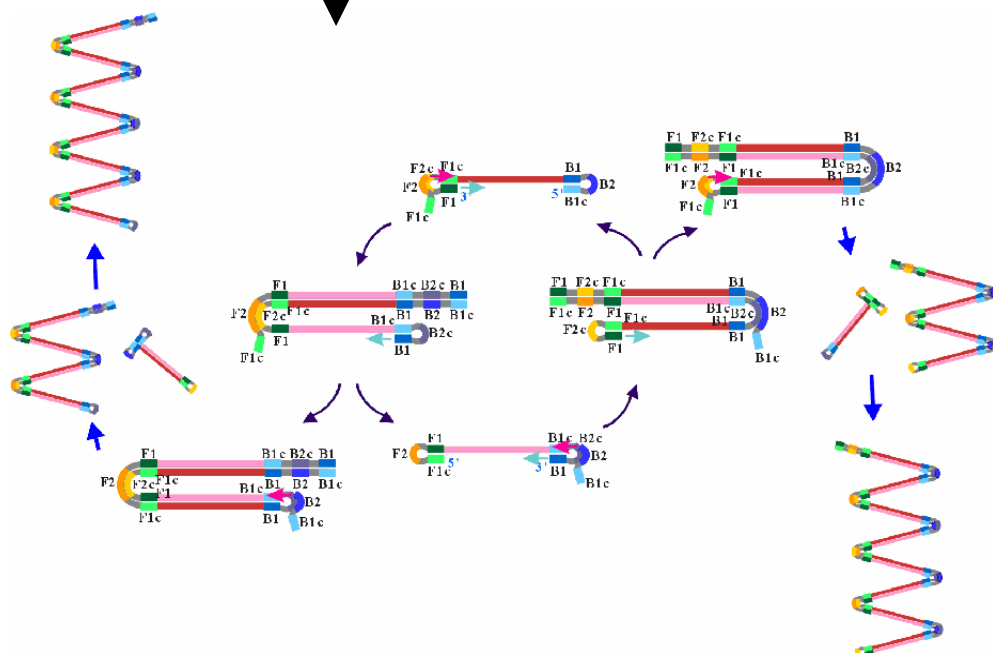


鎖置換型 DNA ポリメラーゼの働きにより 65 付近の定温で複数段階の反応が起こる

(2)



(3)



6種類のプライマーを加えて(1)、何段階かの反応を経ると両端にループ構造を持った1本鎖ができる。(2)これが起点となって、様々な部分にプライマーが結合して増幅反応が進展し、同一鎖上にループ領域を挟んで互いに相補的な配列を繰り返す構造をもつ様々なサイズの増幅産物が合成される。

Loopamp DNA 増幅試薬キット:

LAMP法の原理を用いた研究用試薬製品である。中味としては、buffer、基質、鎖置換型DNAポリメラーゼがセットになっており、ユーザーが調べたいサンプルとそのターゲット遺伝子用に設計されたLAMP用プライマーを用意することによりあらゆる分野での利用が可能である。WebSERVE/e Genome Orderにて購入できる。

Loop primer/ループプライマー:

LAMP法において、増幅反応の起点構造であるダンベル様構造及び増幅途上産物に形成されるループ構造領域の内、5末端側のLoopの1本鎖部分(B1領域とB2領域の間、あるいはF1領域とF2領域の間)に相補的な配列を持つプライマー(それぞれLoop primerB、Loop primerF)。ループプライマーを用いることによりDNA合成の起点が増え、増幅反応時間の短縮、特異性の向上が可能となる。

M13 ファージ:

繊維状の1本鎖DNAファージ。大腸菌のF繊維を介して宿主に感染し、菌体内に取り込まれる。宿主内で1本鎖DNAは、2本鎖の複製型となり、それを鋳型として1本鎖DNAが合成され、新しくつくられた子ファージ粒子内に組み込まれた後、宿主大腸菌を溶菌することなく菌体外に放出される。このファージはクローニングベクターとしても有用であり、ジデオキシ法を用いた塩基配列の決定に際し1本鎖DNAの調製用に広く用いられている。

Nearest-Neighbor 法:

遺伝子のT_m値を予測する方法の一つで、現在主流になっているものである。すべての隣接塩基に関する熱力学的な因子を基に以下の式によりT_m値を求める。

$$T_m = H \times 1000 / (S + R \ln(C/4)) - 273.15 + 16.6 \log[Na^+]$$

R: 気体定数 = 1.987 cal / (mol °K)
H: エンタルピー (kcal / mol)
S: エントロピー (eu)
C: オリゴヌクレオチド濃度 (M)
[Na⁺]: ナトリウムイオン濃度

OPC 精製:

合成オリゴヌクレオチドの精製グレードの一つ。ただし、オリゴヌクレオチドメーカーにより同グレードでも名称が異なる。

PCR:

PCR (polymerase chain reaction) は、特定のDNA領域をはさんだ2種類のプライマーとDNA合成反応の試験管内における繰り返して、その特定DNA領域を数十万倍に増幅する方法である。複製反応のプライマーとしては増幅部両端の塩基配列を含む合成オリゴヌクレオチドを用いるのが普通で、反応は1)DNA2本鎖の解離、2)オリゴヌクレオチドとのアニーリング、3)DNAポリメラーゼによる相補鎖合成、の3反応の繰り返し(通常20回~30回)から成る。1985年に米国Cetus社が開発。

TE buffer:

核酸溶解用buffer(10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA)。2価の金属イオン(Mg²⁺など)をキレートす

る作用をもつ EDTA (ethylenediamine-N,N,N',N' -Tetraacetic acid,キレート剤; 試料中に存在する微量金属除去剤)を含むため、2 価の金属イオンを必要とするヌクレアーゼ(核酸分解酵素)の活性を阻害し、核酸を保存させる効果をもつ。

Tm 値:

生体高分子の融解温度のこと。核酸を含む溶液の場合は、温度上昇によって塩基対間の水素結合の切断による 2 重らせん核酸構造が 50%失われ、2 本鎖 DNA の 50%が 1 本鎖 DNA になる温度をいう。GC 間では 3 つ、AT 間では 2 つの水素結合をもつため、GC 塩基対に富む DNA の方が熱変性に対して抵抗性があり Tm 値が高い。プライマーの結合能は一般的に Tm 値で表される。

アニーリング:

2 本鎖の DNA を 1 本鎖に解離させた後、解離した 1 本鎖 DNA を再び 2 本鎖 DNA に会合させること。DNA 特有の 2 重らせん構造が回復するので、アニーリングを再生 (renaturation)ともいう。2 本鎖 DNA は、加熱やアルカリ処理を加えると 1 本鎖 DNA に解離する。解離した 2 本の DNA は条件を整えてやると再び水素結合を形成し、完全に元の 2 重らせんになる。

オリゴ濃度:

本文 p.5 上段のスライド中のオリゴ濃度とは、オリゴヌクレオチドの濃度、つまりプライマー濃度のことである。

5' 末端、3' 末端:

核酸の各ヌクレオチドは、五炭糖の 5 番目の炭素の隣の 3 番目の炭素の間でリン酸ジエステル結合しているが、両端では -OH 基のままで存在する。それぞれを 5' 末端、3' 末端といい、1 本の核酸では通常左側が 5' 末端で上流とよび、右側が 3' 末端となり下流とよぶ。

クローニング:

遺伝子のクローニングは、不特定多数の DNA 断片をベクターに挿入した組み換え体 DNA を宿主に導入して得られたコロニー又はプラークから目的の DNA 断片をもつものを検出し、その DNA を単離すること。

自由エネルギー:

熱力学状態関数の 1 つ。通常の実験室条件下における熱力学的平衡の基準を表す。状態が変化可能な系は自由エネルギー極小の方向へと変化する。化学反応においても同様で、化学平衡状態では系の自由エネルギーが極小となる。現在実用されているものとしてはギブスの自由エネルギーとヘルムホルツの自由エネルギーがある。

制限酵素:

特定の配列を認識し DNA を切断する酵素の総称。酵素活性に必要な因子と切断様式により、I 型、II 型、III 型に分けられる。細菌類に広く分布しており、酵素の種類や認識配列は菌種によって異なるので、種類はきわめて多い。

濁度リアルタイム検出:

LAMP 法により遺伝子増幅を行いながら、同時に増幅副産物であるピロリン酸マグネシウムの白濁を検出することにより、遺伝子増幅反応をリアルタイムに検出すること。このピロリン酸マグネシウムの白濁度検出は LAMP の増幅効率の高さと特異性の高さにより可能となったものである。

電気泳動:

電圧をかけることによって物質が、その荷電に応じ、正負いずれかの電極へ移動する現象を利用した分析・分離法。電界をかける対象に、溶液、ろ紙、ゲル状物質、両性担体などを用いる。

核酸の電気泳動法で、比較的大きな分子量(60~100kbp)のDNAを分離する際はアガロース・ゲル、小さな分子量(1kbp以下)のDNAを分離する際はアクリルアミド・ゲルが担体として用いられる。

二次構造:

プライマーの二次構造とは、プライマー自身の相補配列部分が結合して形成するヘアピン構造のこと。プライマー配列によりヘアピン構造の形成されやすさは大きく異なる。プライマー自身がヘアピン構造を形成してしまうと Target 遺伝子に結合できなくなってしまうたり、他の予期していない遺伝子と結合してしまい、偽陽性の原因になることがある。

プライマー:

一般に DNA ポリメラーゼに伸長反応を開始させるために Target 遺伝子と 2 本鎖を形成し 3 末端 -OH を供給するオリゴヌクレオチドをプライマーという。DNA ポリメラーゼの作用によりプライマーの 3 末端-OH 部分に、鋳型 DNA 配列に相補的なヌクレオチドを付加しながら 5 側から 3 側への伸長反応が進む。

プライマーダイマー:

プライマー同士がハイブリダイズして形成する構造のこと。試験管内で DNA 合成反応を行う遺伝子増幅法では、反応液中のプライマー濃度は Target 遺伝子の濃度に比べて圧倒的に多くする必要があるので、プライマー同士がハイブリダイズしやすい構造を持っているとプライマーダイマーを形成し、Target 遺伝子とのハイブリダイゼーションが大幅に抑制されてしまう。

ブレンテキスト形式:

配列情報のみを以下のように記述する形式。

```
ctcaggact ggggaccctg caccgaacat ggagaacaca acatcaggat tcctaggacc
cctgctcgtg ttacagggcg ggtttttctt gttgacaaga atcctcacia taccacagag
tctagactcg tggtagactt ctctcaattt tctaggggga gcaccacgt gtcctggccc
```

変異:

突然変異のこと。遺伝子の塩基配列に変化が生じたためにもたらされる遺伝形質の変化。突然変異の単位は大きさの点からゲノム、染色体、染色体の一部、遺伝子、ヌクレオチドなどに分類される。また遺伝子の変化の仕方による分類からは点変異、欠失、重複、逆位、挿入、転座などと区別される。突然変異の起こりうる単位はさまざまであるから、その表現効果も著しい変化を伴うものから統計的な処理をして初めて検出されるものまでである。

末端安定性:

プライマーと鋳型遺伝子が形成する 2 本鎖 DNA における各プライマーの 3 末端および 5 末端の 2 本鎖形成度合い(形成され易さ)のこと。LAMP 法プライマー設計支援ソフトでは Nearest-Neighbor 法により G(自由エネルギー変化)を計算し、安定性を見ている。

