

報 文

インターラーコン試薬を用いる蛍光検出高速液体クロマト
グラフィーによるポリメラーゼ連鎖反応産物の定量新川 高志^{®*}, 山崎 俊介*, 柿島 博*Determination of polymerase chain-reaction products by fluorescence detection
HPLC using an intercalation reagent

Takashi SHINKAWA, Shunsuke YAMAZAKI and Hiroshi KAKISHIMA*

*Cosmetics Laboratory, Kanebo, Ltd., 5-3-28, Kotobuki-cho, Odawara-shi, Kanagawa 250-0002

(Received 30 November 1999, Accepted 14 March 2000)

The determination of the polymerase chain-reaction (PCR) products by fluorescence detection HPLC which using a post-column reaction was developed. The optimum conditions were; reactive solution, 0.5 M NaCl-20 mM Tris-HCl(pH 9.0) containing SYBR Green(1/25000); flow rate of a reactive solution, 0.3 ml/min. A reactive solution was stable for 24 hours. Under the optimized analytical conditions, the peak intensity of DNA was proportional not to the size of the base-pair, but to the concentration. The calibration curve was linear over the range 10 pg ~ 50 ng. The relative standard deviation for 10 standard DNA solutions (500 bp - 100 pg) was 1.01%. The PCR products made from mice, which sensitized with 2,4-dinitro-1-fluorobenzene(DNFB), was measured, and we succeeded in a high-sensitivity determination analysis.

Keywords : determination of PCR products; HPLC; post-column reaction; SYBR Green.

1 緒 言

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は微量のDNAを大量に増幅することができるため、感染症や遺伝性疾患の診断法として利用されている。また、近年ではアレルギーや皮膚疾患の作用機構解明に、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）が有効な手法の一つとして利用されている^{1)~4)}。これらのPCRにより生成されるDNA断片は主に100から1000塩基対の大きさである。この検出にはアクリルアミドやアガロース等を用いる従来型のゲル電気泳動や、近年目覚しい進歩を遂げたキャピラリー電気泳動（CE）などが一般的に用いられている。しかし、ゲル電気泳動法は操作が煩雑である上、再現性や定量性に問題がある。CEはここ数年の技術的な進歩により、定量性においてはかなり精度が高くなったが、多くは検出器として紫外吸光検出器（UV）を使用しているため、微量成分の高感度定量分

析に用いるには限度がある。このように、一般的に利用されているゲル電気泳動やCEには、それぞれ定量性や感度の面において問題がある。一方、定量性及び再現性において高い信頼性を持つ高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によるDNAの分析例も近年数多く報告されているが^{5)~8)}、いずれも検出器としてUVを使用しているため、感度の面において問題があった。ところが、1998年にArakawaら⁹⁾は、蛍光誘導体化試薬としてビスベンズイミドを用いる高感度なDNA分析法について報告している。しかしこの試薬は、DNA中のA-T塩基に結合したときに強い蛍光を発するという特徴があるため、定量を行う場合はA-T含量による補正が必要となる。そのため目的とするDNAの全塩基配列が分かっていない場合、なんらかの方法でA-T含量を求めなければならないというデメリットを有している。今回著者らは、二本鎖DNAにインターラーコンして蛍光を発する試薬であるSYBR Greenを用いることにより、簡便で高感度に定量できる分析法を検討したので報告する。

* 鐘紡(株)化粧品研究所: 250-0002 神奈川県小田原市寿町
5-3-28

2 実験

2・1 試薬及び装置

DNA 標準品の 50~1000bp DNA マーカーは FMC 製, DNA Quantitation kit (200, 500 及び 1000bp) は Gensura Labo, Inc. 製, 蛍光発色試薬の SYBR Green I 核酸ゲル染料は FMC 製, ビスベンズイミドは和光純薬製を使用した. RT-PCR に使用した M-MLV-逆転写酵素は Gibco BRL 製, Taq DNA ポリメラーゼは Promega 製, β -アクチン, インターロイキン (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α), インターフェロン- γ (IFN- γ) の各プライマーは Clontec 製のものを用いた. 接触皮膚炎の誘導に使用した 2,4-ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) は和光純薬製, 4M グアニジンチオシアン酸塩緩衝液は Fluka 製のものを用いた. ゲル電気泳動に使用したアガロースゲルは FMC 製, DNA MW マーカー 4 はニッポンジーン製, トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンはナカライテスク製, ホウ酸は和光純薬製, 0.5M EDTA (pH 8.0) はニッポンジーン製のものを用いた. HPLC 用分離カラムは東ソー製の TSK-gel DNA-NPR 及びガードカラムを使用した. HPLC 装置は Hewlett Packard 製の HP1100 に島津製の蛍光検出器を組み合わせ, 反応液合流後に内径 0.3 mm, 長さ 3 m のコイルを用いて蛍光反応を行う構成とした. PCR 装置は Perkin Elmer 製の DNA Thermal Cycler を使用した. ゲル電気泳動装置はコスマ・バイオ製の Mupid-2 を使用した.

2・2 試料調製及び RT-PCR 法

2・2・1 DNFB 塗布個体の調製 アセトンとオリーブ油の 4:1 混合物 (A/O) を溶媒とし, 0.5% DNFB-A/O 溶液 25 μ l をてい (剃) 毛したマウスの背部に 1 回のみ塗布することによって感作誘導を行った. 検体 1 は感作の 5 日目に 0.2% DNFB-A/O 溶液 20 μ l を, 検体 2 は 0.4% DNFB-A/O 溶液 20 μ l をマウスの耳介に塗布することによって反応惹起を行った.

2・2・2 RT-PCR RT-PCR 法は Yamazaki¹⁾ らの方法に準じて行った. 処置 24 時間後の耳介部を採取し, 4M グアニジンチオシアン酸塩緩衝液を 1.0 ml 加えて組織をホモジナイズ後, 常法に従い total RNA を抽出し, 続いて RNA 2 μ g を鋳型として, M-MLV-逆転写酵素を用いて相補的 DNA (cDNA) を合成した. PCR は以下に示す各プライマーを用い, 94°C 1 分, 60°C 2 分, 72°C 3 分の条件下で, 30 サイクル増幅を行った.

β -actin: (5' primer) 5'-TCCAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3', (3' primer) 5'-TAAAACGCGAGCTCAGTAACAGTCCG-3'; IL-1 β : (5' primer) 5'-TCATGGGATGATGATGATAACCTGCT-3', (3' primer) 5'-CCCATACTTTAGGAAGACACGGATT-3'; IL-2: (5' primer) 5'-ATGTACAGCATGCAGCT

Table 1 HPLC conditions for the assay

Column	TSK-gel DNA-NPR (75 mm × 4.6 mm i.d.)
Mobile phase	A: 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) B: 1.0 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 9.0)
Gradient	A/B: 90/10 → 75/25 (20 min)
Flow rate	0.5 ml/min
Column temperature	30°C
Reagent	B + 1/25000 SYBR Green
Flow rate	0.3 ml/min
Reaction coil	3 m × 0.3 mm i.d.
Detector	ex: 495 nm, em: 520 nm
Injection volume	5 μ l
Post time	15 min

CGCATC-3', (3' primer) 5'-GGCTTGGTGGAGATGATGCTTGACA-3'; IL-4 (5' primer) 5'-ATGGGTCTCAACCCCCAGCTAGT-3', (3' primer) 5'-GCTCTTAGGCTTCCAGGAAGTC-3'; IL-6 (5' primer) 5'-ATGAAGTCCTCTCTGCAAGAGACT-3', (3' primer) 5'-CACTAGGTTGCCGAGTAGATCTC-3'; IFN- γ (5' primer) 5'-TGAACGCTACACACTGCATCTGG-3', (3' primer) 5'-CGACTCCTTCGCTCCAGTCATTGG-3'; TNF α (5' primer) 5'-GGCAGGTCTACTTGGAGTCATTGG-3', (3' primer) 5'-ACATTGAGGCTCCAGTGAATTGG-3'

2・3 ゲル電気泳動法

1.5% アガロースゲルを含む TBE (0.45M トリス, 0.45M ホウ酸, 0.01M EDTA, pH 8.0) でゲルを調製し, 分子量マーカーとして DNA MW マーカー 4 を用いる. PCR 増幅後の試料 8 μ l を使用し, 50 V で 1 時間泳動を行う. 泳動後, 水で 5 倍に希釈した TBE 溶液に 1/10000 になるように SYBR Green を添加し, 約 1 時間染色する.

2・4 HPLC 条件

HPLC の分析条件は, “核酸分離用イオン交換クロマトグラフィー用カラム TSK-gel DNA-NPR による DNA フラグメントの分離” (Tosoh Separation Report No.090) を参考に, Table 1 のように設定した.

3 結果と考察

SYBR Green は二本鎖 DNA にインタークレートすることにより蛍光を発する試薬である. この試薬は, これまで一般的に用いられてきたエチジウムプロミドに比べ, ゲル電気泳動法で約 25 倍の高感度が得られ, 変異原性も低く, 安全面においても優れている. また, Arakawa ら⁹⁾の報告にあるビスベンズイミドは, HPLC 法での検出限界 ($S/N = 5$) が 1078 bp で 2.2 fmol であるのに比べ, SYBR Green の検出限界 ($S/N = 6.1$) は 1000 bp で 7.6 amol と約 290 倍の高感度が得られている. 更に, データは示していないが, 同じ重量濃度の DNA 標準品 (200, 500 及

Table 2 Effect of amount on the SYBR Green

Concentration of SYBR Green	Detection limit/ pg
1/100000	250
1/50000	25
1/25000	5
1/10000	5

び 1000bp) のそれぞれに蛍光試薬を添加して蛍光強度を測定したところ、ビスベンズイミドでは各サイズ間で最大 27% の強度差が見られたが、SYBR Green では 3.2% であった。このように SYBR Green は、エチジウムプロミドやビスベンズイミドに比べて高感度であり、塩基配列に影響を受けないため、定量分析を行うのに有効な試薬であると考え、幾つかの検討を行った。

3・1 反応溶液の検討

ポストカラム反応における反応溶液の組成について、DNA 標準品 (500bp) を水で 100 pg/μl に希釈した標準溶液を用いて検討を行った。まず、反応溶液を水、20 mM Tris-HCl (pH 9.0)、0.5 M 及び 1 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) とし、それぞれに SYBR Green を添加して測定を行った。その結果、水及び 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) では、DNA のピークは検出されず、NaCl を加えたもののみピークが検出された。また、0.5 M と 1 M では検出ピーク面積にはほとんど差はなかったので、反応溶液としては 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) を使用することにした。何故 NaCl を添加すると DNA のピークが検出されるようになるのかについては分かっておらず、今後の課題とするところである。次に、反応溶液に添加する SYBR Green の量について検討を行った。通常のゲル電気泳動において使用する濃度である 1/10000 から 1/100000 まで濃度を変化させ、検出感度についての検討を行った。その結果、1/100000 の検出限界 ($S/N > 2$) は 250 pg、1/50000 では 25 pg であり、1/25000 及び 1/10000 では共に 5 pg であった (Table 2)。このことから SYBR Green の量は 1/25000 とした。

3・2 反応溶液の流量と検出ピーク面積

反応溶液の流量を 0.1~0.5 ml/min と変化させ、検出ピーク面積と分離度の変化について 50~1000bp DNA マーカーを用いて検討した。その結果、各ピークの分離度については大きな変化は見られなかつたが、検出ピーク面積は 0.3 ml/min のときが最も大きく、 S/N も最高であった。このことから、反応溶液の流量を 0.3 ml/min とした (Fig. 1)。

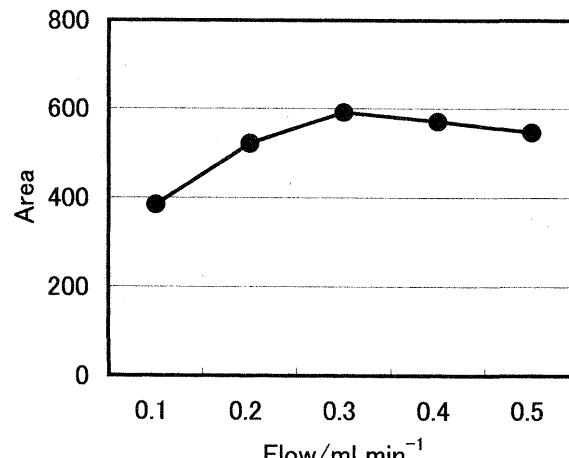


Fig. 1 Effect of flow rate on the reactive solution

3・3 SYBR Green の経時安定性の検討

エチジウムプロミドや SYBR Green など DNA にインターカレートして蛍光を発する試薬は、時間とともに退色することが知られている。そこで反応溶液に添加する SYBR Green の経時での安定性について検討を行った。反応溶液を褐色瓶に入れて送液を行い、標準溶液につき一定時間をおいて測定し、その検出ピーク面積の変化を測定して安定度を見た。その結果、24 時間までのピーク面積値の相対標準偏差は 3.06% であり、経時により検出ピーク面積に大きな変化は見られず、安定であることが確認された。

3・4 DNA 濃度と検出ピーク面積

蛍光強度においては、塩基対の違いにより差が生じないことを既に確認している。ここでは HPLC での検出ピーク面積について検討を行う。

DNA 標準品 (200, 500 及び 1000bp) を水で 100 pg/μl に希釈した標準溶液を用いて検討を行った。その結果、200bp の面積値を 100 とすると、500bp は 98.4, 1000bp は 100.9 という結果が得られた。このことから、DNA の塩基対の大きさが異なっても、濃度が同じであれば検出ピーク面積に差は見られないことが確認された。

3・5 検量線と精度

DNA 標準品 (200, 500 及び 1000bp) を用いて 50 pg~50 ng の濃度範囲で検量線を作成した結果、いずれの塩基対においても $r^2 = 0.9999$ 以上の直線性の良い検量線が得られた。また、500bp の標準溶液 (100 pg/μl) について 10 回の繰り返し測定を行った結果、相対標準偏差は 1.01% であり、満足すべき結果であった。

3・6 PCR 産物の測定

DNFB 塗布個体から調製した PCR 産物の測定結果を

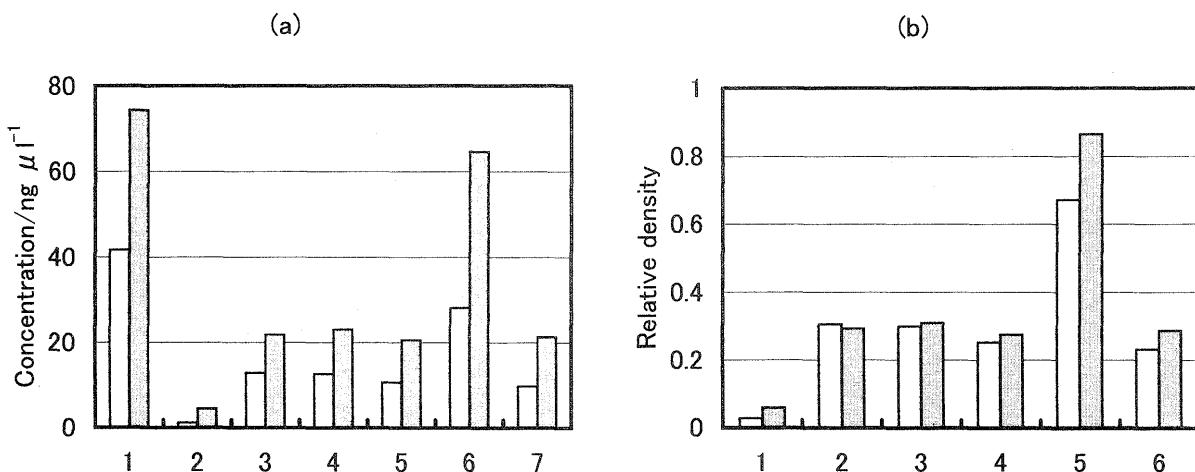


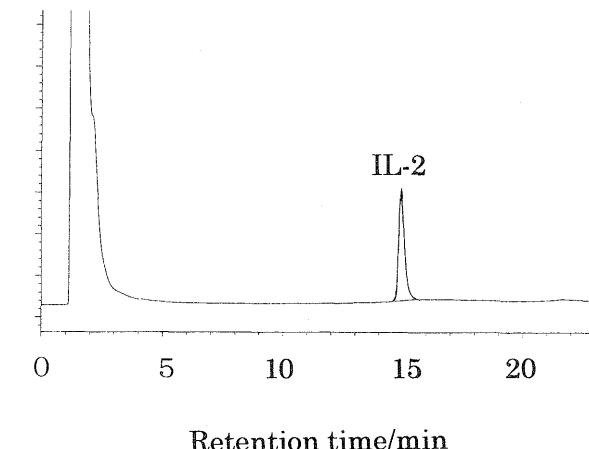
Fig. 2 Analytical results of PCR products obtained by fluorescence detection HPLC method

(a) Concentration of PCR products: □, sample 1; ■, sample 2; 1, β -actin; 2, IL-2; 3, IFN- γ ; 4, IL-4; 5, IL-6; 6, IL-1 β ; 7, TNF- α . (b) Ratio to β -actin: □, sample 1; ■, sample 2; 1, IL-2; 2, IFN- γ ; 3, IL-4; 4, IL-6; 5, IL-1 β ; 6, TNF- α



Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products

Sample: PCR products made from mice (sample 1).
M: marker; Lane 1: β -actin; 2: IL-2; 3: IFN- γ ; 4: IL-4; 5: IL-6; 6: IL-1 β ; 7: TNF- α



Retention time/min

Fig. 4 HPLC chromatogram of IL-2

Sample: PCR products made from mice (sample 1). Dilution sample (1 → 10) was injected.

Fig. 2 に示す。Fig. 2(a) は DNA 標準品を用いて作成した検量線を元にして、定量値を求めたものである。(b) は、(a) の値を元に、従来のゲル電気泳動法で用いられている評価法と同じく、各サイトカインと β -アクチンの PCR 産物量比で表したものである。このように、本法で測定を行った場合、PCR 産物を絶対量で表すこともできるようになる。次に、検体 1 のゲル電気泳動の結果を Fig. 3 に、またゲル電気泳動では検出できなかった IL-2 の PCR 産物のクロマトグラムを Fig. 4 に示す。(Fig. 3 において中央やや上に見える細いバンドが各サイトカインである。その下に見える太めのバンドについては、試料由来のものと考えられるが、不明である)。このように、ゲル電気泳動では検出できないものについても本法で定量できる

ことが確認された。また、ここでは示していないが、CE よりも高感度に定量できることを確認している。以上のように、本法は従来のゲル電気泳動法や CE 及び HPLC 法に比べ高感度の定量分析が可能であり、更に定量値を絶対量で表すことも可能であることから、これまでアレルギーの研究で行われてきた β -アクチンと各サイトカインの比による評価以外にも、新しい視点から評価を行うこともできるようになり、今後の研究に新たな可能性をもたらす分析法であると考えられる。

(1999年9月、日本化学会
会第77秋季年会で発表)

文 献

- 1) 山崎俊介, 桑原裕史, 柿島 博: 薬学雑誌, **117**, 155 (1997).
- 2) 山崎俊介, 桑原裕史, 柿島 博: 薬学雑誌, **117**, 162 (1997).
- 3) 山崎俊介, 鈴木恵子, 池本毅, 柿島 博: 薬学雑誌, **118**, 324 (1998).
- 4) 山崎俊介, 三宅里歌子, 鈴木恵子, 柿島 博: 日本皮膚科学会雑誌, **108**, 9 (1998).

- 5) Y. Kato, M. Sasaki, T. Hashimoto, T. Murotsu, S. Fukushige, K. Matsubara: *J. Chromatogr.*, **265**, 342 (1983).
- 6) Y. Kato, T. Kitamura, A. Mitsui, Y. Yamasaki, T. Hashimoto: *J. Chromatogr.*, **447**, 212 (1988).
- 7) Y. Kato, Y. Yamasaki, A. Onaka, T. Kitamura, T. Hashimoto: *J. Chromatogr.*, **478**, 264 (1989).
- 8) H. Yamakawa, K. Higashio, O. Ohara: *Anal. Biochem.*, **240**, 242 (1996).
- 9) H. Arakawa, S. Nakashiro, A. Tsuji, M. Maeda: *J. Chromatogr. B*, **716**, 119 (1998).

要 旨

ポストカラム反応を用いた、蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによる PCR 産物の高感度定量分析について検討を行った。反応液は 0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) に 1/25000 になるように SYBR Green を添加した組成とし、流量を 0.3 ml/min とした。この条件で検量線を作成したところ、10 pg から 50 ng の濃度範囲で良好な直線性が得られた。また、10 回の繰り返し測定を行ったときの相対標準偏差は 1.01% であった。次に、感作物質を塗布したマウスから調製した PCR 産物について測定を行ったところ感度良く定量分析を行うことができた。