

吸引吐出方式による核酸抽出技術の開発と製品展開

Development of Nucleic Acid Extraction Technology and Its Product Strategy

桜井 智也 *Toshinari Sakurai* 久野 範人 *Norihito Kuno*
 内田 憲孝 *Kenkō Uchida* 長岡 嘉浩 *Yoshihiro Nagaoka*



注：略語説明 LOH(Loss of Heterozygosity ; ヘテロ接合性の欠失), HLA(Human Leukocyte Antigen ; ヒト白血球抗原), DNA(Deoxyribonucleic Acid ; デオキシリボ核酸)

血液からのゲノムDNA抽出の流れと研究・検査目的

血液には生命の設計図であるゲノムDNAが含まれる。血液からゲノムDNAを抽出することにより、遺伝子解析や遺伝子検査が行える。

ヒトゲノム塩基配列の読み取り完了に伴い 今後は、ゲノム上に存在する遺伝子の機能や個人差などを明らかにする遺伝子解析研究や、臨床分野での遺伝子検査が活発になっていくと予想される。遺伝子を対象とした研究・検査を行うためには、血液などの試料から核酸抽出を簡単に、かつ高効率で行うことが必要不可欠となる。

日立製作所と株式会社日立ハイテクノロジーズは、シリカを利用した核酸の抽出方法として、吸引吐出法を新たに開発した。シリカ担体を接液可能な状態で固

定化し、特定の条件下で核酸を含む試料の吸引と吐出を繰り返すことで、核酸を効率よく抽出する方法である。これに基づいて製品化した「全血ゲノム抽出キット」では、1~10 mLの血液から、白血球を分離することなく、直接核酸抽出が行え、平均抽出率は91%に達する。抽出した核酸は、以後の遺伝子解析と遺伝子検査に直接利用できた。また、抽出効率の低下が懸念される凍結血液からの抽出でも、効率の低下は認められなかった。

1 はじめに

ヒトゲノムの塩基配列読み取り完了に伴い、今後は、ゲノムの機能や個人差などを明らかにする遺伝子解析研究や、臨床分野での遺伝子検査が活発になることが予想される。しかし、遺伝子を対象とした研究・検査を行うためには、その前処理として、試料からの核酸抽出が必要不可欠となる。

核酸を抽出する方法としては、フェノールなどの有機溶媒

を利用した手法が古くから用いられてきているが、近年、さらに簡便、迅速な方法として、シリカを使用した手法が広く利用されている。

シリカと核酸の特異的な結合は昔から知られており、1979年にはVogelsteinらによって、電気泳動後のゲルからDNA (Deoxyribonucleic Acid : デオキシリボ核酸) を抽出する方法が開発されている¹⁾。その後、試薬とシリカの両面で技術的な改良が進められ、現在では、種々のキットや自動装置が販売されている²⁾。

ここでは、シリカを利用した核酸の抽出方法として、新規に開発した吸引吐出法と、製品化した「全血ゲノム抽出キット」の特徴、および今後の展開について述べる。

2 吸引吐出法

新たに開発した吸引吐出法は、ピペットチップあるいはシリンジ内部にシリカ質を含んだ担体を固定化し、吸引と吐出を複数回行うことによって高効率にシリカへ核酸を結合させ、洗浄し、溶離する方法である。ここで得られる核酸を含む溶離液は、以後の遺伝子解析と遺伝子検査に直接使用することができる。吸引吐出法の概要を図1に示す。

吸引吐出法では、まず、核酸を含む試料を溶解し、次いで担体と核酸の結合を促進させる溶液を添加し、混合する。その後、シリカ質の担体を内包するシリンジ以下、抽出シリンジと言う。を用い、ピストンの上方への移動により、核酸を含んだ前記の混合液を吸引する。この際に、混合液と担体との接触により、核酸が特異的に担体部分に結合する。吸引後、抽出シリンジ内の混合液をピストンの下方への移動によって吐出する。この際にも、混合液と担体との接触により、核酸が特異的に担体部分に結合する。そのため、ピストンの移動による吸引と吐出操作を繰り返すことで、担体への核酸の結合再現性を安定化できる。また、結合後の混合液は、吐出動作だけで廃棄操作を行うことができる。

結合に続いて、洗浄液による洗浄、溶離液による溶離を行う。ここでもピストンの上下動作により、抽出シリンジ内に、洗浄液あるいは溶離液を吸引、吐出することで、安定した洗浄と溶離ができる。

3 全血ゲノム抽出キット

3.1 キットの特徴

吸引吐出法に基づいて製品化した「全血ゲノム抽出キット」では、1～10 mLの血液から白血球を分離することなく、直接核酸を抽出することができる。キットは、核酸を結合、洗浄、溶離するための抽出シリンジと、専用試薬から構成する(図1参照)。

吸引吐出法を安定に実施するうえで注目すべき点は、抽出シリンジ内に設置するシリカ質の担体である。多孔質の担体でも繊維質の担体でも、細孔の大きさが重要であった。このキットでは、血液中のゲノムDNAを抽出の主対象とし、最適化を図っている。また、キットとして使用する専用試薬とプロトコルに関しても、血液から簡便かつ高効率にDNAを抽出できるように工夫を凝らした。

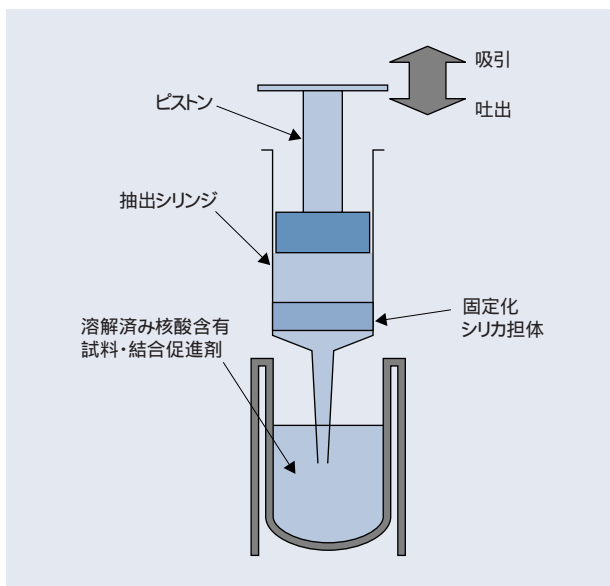


図1 吸引吐出法の概要

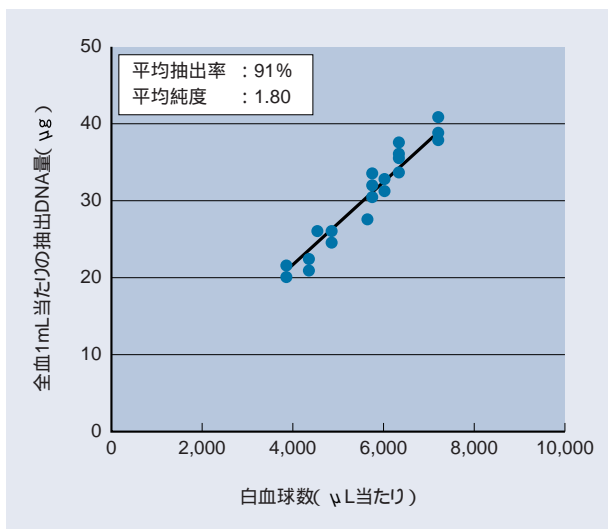
シリンジ内部にシリカ質を含む担体を固定化し、吸引と吐出を複数回行うことにより、高効率、高安定にシリカへ核酸を結合する。

3.2 血液からの核酸抽出結果

複数の血液を試料として、「全血ゲノム抽出キット」によって核酸を抽出した結果を図2に示す。血液は、EDTA-2Naを抗凝固剤とする7 mL真空採血管と、EDTA-2Kを抗凝固剤とする2 mL真空採血管により、同一人から各1本ずつ採血した。7 mL採血管に採取した血液は核酸抽出に、2 mL採血管に採血した血液は白血球の測定にそれぞれ使用した。抽出はキットの標準プロトコルによって行い、白血球の分離操作なしに血液から直接核酸を抽出した。

抽出後の核酸溶液は、PicoGreen[®]によるDNA量の定量、

) PicoGreenは、Molecular Probes, Inc.の登録商標である。



注：略語説明 DNA(Deoxyribonucleic Acid)

図2 血液からのDNA抽出結果

白血球数の異なる血液を試料として核酸抽出を実施(n=40)した結果を示す。抽出後のDNA量は、PicoGreenによって定量した。

および分光光度計での吸光度測定による純度(波長260 nmと280 nmの吸光度比)によって評価した。

血液1 mL当たりの抽出DNA量は、試料血液中の白血球数に比例した。これは、血液中に存在する核酸の大部分が白血球に含まれるゲノムDNAに由来するため、白血球に含まれるゲノムDNA量から算出した平均抽出率は91%と高い値が得られた(図2参照)。

また、抽出核酸の純度を示す指標である分光光度計による吸光度比は、平均1.80と高い純度を示し、抽出後の核酸溶液はPCR(Polymerase Chain Reaction)などの実験に直接使用できた。

3.3 血液の保存状態

抽出試料となる血液は、保存状態として非凍結と凍結が想定される。全血ゲノム抽出キットの開発に際しては、どちらの状態からも核酸抽出ができるように、溶解に関する試薬条件とプロトコルの最適化を図った。

非凍結条件下で血液を保存した場合、血液中に存在する各種の酵素の働きにより、血液中のゲノムDNAは分解することが予想される。また、抽出原理や抽出キットの特性などにより、凍結した血液からの核酸抽出ができないもの、あるいは抽出効率が著しく低下するものがある。そのため、試料の劣化や保存期間の制限問題から、凍結血液から安定に抽出を行えるキットが切望されている。

EDTA-2Naを抗凝固剤とする7 mL真空採血管に同一人から複数本の採血を行い、さまざまな温度で保存した後、全血ゲノム抽出キットの標準プロトコルによってDNAを抽出した。抽出後の核酸溶液ではPicoGreenによってDNA量を定量し、保存日数0の採血直後の血液を100%として収率を算出した。その結果を図3に示す。

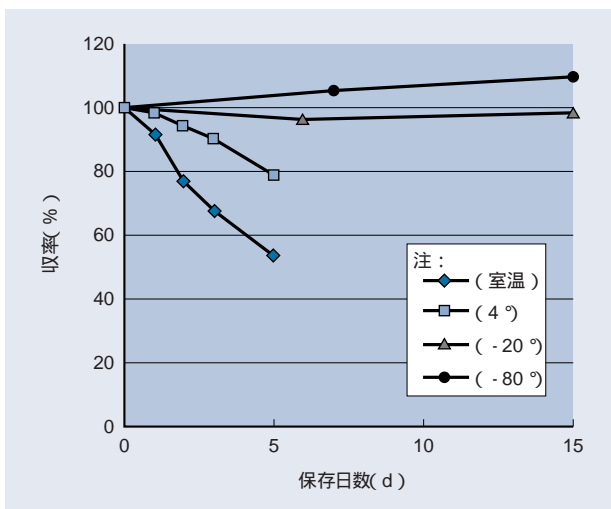


図3 保存状態の影響評価

同一人から複数本の採血を行い、室温、4、-20、-80の各温度で所定の期間保存した後、標準プロトコルで抽出(各n=2)した結果を示す。抽出後のDNA量は、PicoGreenによって定量した。収率は、保存日数0の血液を100%として算出した。

室温や4の非凍結保存では、保存日数の経過とともに収率の低下が認められた。これに対し、-20や-80の凍結状態では、保存日数の経過に伴う収率の低下は認められなかった。これは、凍結保存によって血中DNAの劣化が防げることを表すとともに、このキットの使用により、凍結血液でも核酸抽出が適切に行えることを示している。

4 今後の展開

4.1 多様化

上述した血液からのDNA抽出のほかに、核酸抽出を必要とする試料は多種多様で、さまざまな試料からの核酸抽出が望まれている。特に各種の細胞や組織からのRNA(Ribonucleic Acid: リボ核酸)抽出は、遺伝子の発現状態を研究するうえできわめて重要である。しかし、試料中に混在するゲノムDNAが抽出RNAに混入した場合、その後の発現解析において問題となる。

日立グループは、吸引吐出法を開発する過程で、RNAだけを選択的に結合する試薬条件を見いだすことに成功した。今後は、血液あるいは細胞などからRNAだけを選択的に抽出するキットの製品化を図っていく。

また、必要とされる試料の容量に応じて、抽出シリンジの形状を最適化する予定である。例えば、試料量が微小な場合、ピペットチップタイプが有効であることがわかっている。

4.2 自動化

今回開発した吸引吐出法による核酸抽出では、抽出シリンジのピストン制御により、複雑な機構を用いることなく作業の自動化を実現した。さらに、ピペットチップタイプの場合でも、分注器のような圧力機構の採用により、自動化を図っていく考えである。

4.3 微細化

近年、微細加工技術のバイオテクノロジー分野への応用が進展し、機能の集積化やハイスループット化などで成果を上げている。日立グループは、核酸抽出工程の集積化、簡素化を目指して、複数のデバイスを開発中である。微細加工技術によって試作したデバイスの例を図4に示す。この微小デバイスは、血液から血清分離を経て血清中の核酸を抽出するプロセスを名刺サイズに集積化したものである。

このデバイスでは、遠心力と毛細管力の組み合わせにより、全プロセスを1試料ごとに独立した密閉流路内で行うことができる。そのため、コンタミネーションフリーの抽出デバイスを提供できるものとする。

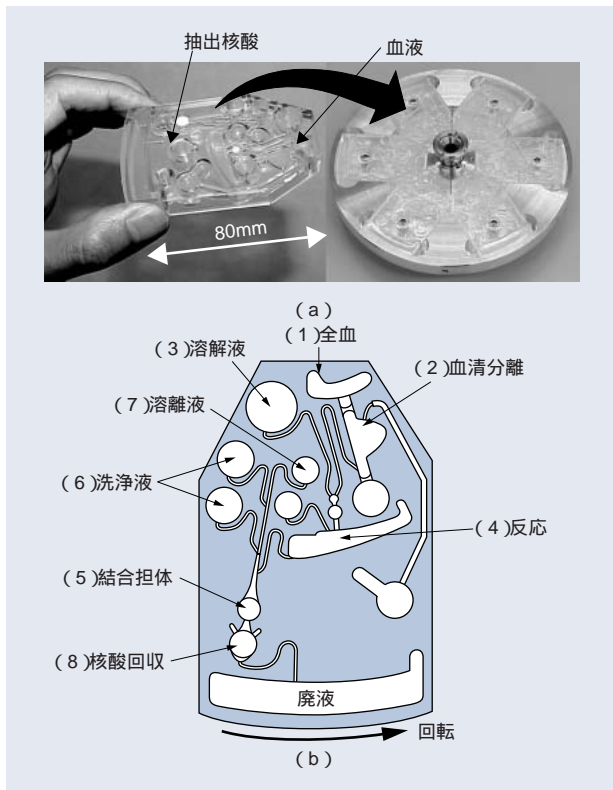


図4 微小核酸抽出デバイスの外観とRNA抽出工程

微細加工技術を活用して試作した微小デバイス(a)を用い、遠心力とマイクロ流体制御によって、(1)から(8)の工程を順次進め、デバイスに滴下した血液からRNA(リボ核酸)を抽出する。

4.4 システム化

核酸抽出は、遺伝子解析や遺伝子検査などの入口であり、

適切な検出系と組み合わせたシステムを構築することにより、高効率な解析、検査の提供へとつなげることができる。例えば、同一人の血液と組織からゲノムDNAを抽出し、得られたゲノムDNAを比較することにより、がんの遺伝子検査システムを構築することができる。

5 おわりに

ここでは、新たに開発した吸引吐出法による核酸抽出と、この技術に基づいて製品化した全血ゲノム抽出キットの特徴、および今後の展開について述べた。

吸引吐出法による全血ゲノム抽出キットの使用により、安定して、かつ効率よく血液からゲノムDNAを抽出することができた。このキットは、遺伝子解析などの前処理として、研究現場で役立つことが期待される。

今後、試料の多様化、操作の自動化などにより、適応分野を広げていく考えである。

参考文献

- 1) B. Vogelstein, et al. : Preparative and Analytical Purification of DNA from Agarose, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76(2), 615-619 (1979)
- 2) 東田 元, 外 : 核酸の抽出と精製, 遺伝子医学, 1(1), 112-119 (1997)

執筆者紹介



桜井 智也

1991年日立製作所入社, 株式会社日立ハイテクノロジーズ ナノテクノロジー製品事業部 研究開発本部 所属
現在, 核酸抽出とその周辺技術の開発に従事
日本分子生物学会会員, 日本臨床検査自動化学会会員
E-mail : sakurai-tomoya @ naka. hitachi-hitec. com



久野 範人

1990年日立製作所入社, 基礎研究所 健康システムラボ 所属
現在, 再生医療応用に向けた遺伝子発現解析技術の研究開発に従事
日本分子生物学会会員
E-mail : kuno @ rd. hitachi. co. jp



内田 憲孝

1986年日立製作所入社, 中央研究所 ライフサイエンス研究センター 所属
現在, 遺伝子およびタンパク質などの生体分子の解析方法の開発に従事
日本分子生物学会会員, 日本農芸化学会会員, 日本植物生理学会会員
E-mail : uchida @ harl. hitachi. co. jp



長岡 嘉浩

1986年日立製作所入社, 機械研究所 MEMSプロジェクト 所属
現在, 小型流体デバイスの研究開発に従事
日本機械学会会員, 日本流体力学会会員, ターボ機械協会会員
E-mail : blcnaga @ merl. hitachi. co. jp