

# 等温 PCR を用いたトロンбин検出法の開発

## Development of recombinase polymerase amplification-based aptasensor for thrombin detection

黒田 直希<sup>1)</sup>

指導教員 吉田 亘<sup>1,2)</sup>

1) 東京工科大学大学院 バイオ情報メディア研究科 バイオニクス専攻 エピジェネティック工学研究室

2) 東京工科大学 応用生物学部 応用生物学科 エピジェネティック工学研究室

キーワード : RPA, アプタマー, グアニン四重鎖構造, トロンбин

### 1. 背景・目的

本研究では Recombinase Polymerase Amplification (RPA) とアプタマーを用いた新規標的分子検出法を開発することを目的とした。RPA とは等温かつ 20 分程度で DNA を増幅させる方法であり、PCR に比べより簡便かつ迅速に DNA を増幅することが出来る(Fig. 1)。RPA では、まずリコンビナーゼとプライマーが複合体を形成し、プライマーが鑄型 DNA に結合する。その後、一本鎖 DNA 結合タンパク質によって鑄型 DNA が一本鎖になり、それと一緒に DNA ポリメラーゼが増幅反応を行い、DNA が増幅される。

アプタマーとは標的分子に特異的に結合する核酸である。アプタマーは抗体と同定の親和性で標的分子に結合することから、抗体と同様、治療薬や診断薬として利用することが可能である。アプタマーは核酸であることから、DNA ポリメラーゼにより増幅されるが、アプタマーに標的分子が結合していると DNA ポリメラーゼによる増幅反応が阻害されることが想定される。つまり、このアプタマーを RPA で増幅し、その増幅効率を測定すれば標的分子を簡便に検出できると想定した。

そこで、本研究はモデル系としてトロンビンアプタマーを用い、RPA による DNA 増幅効率を指標にトロンビンを検出する方法を開発することを目指す。

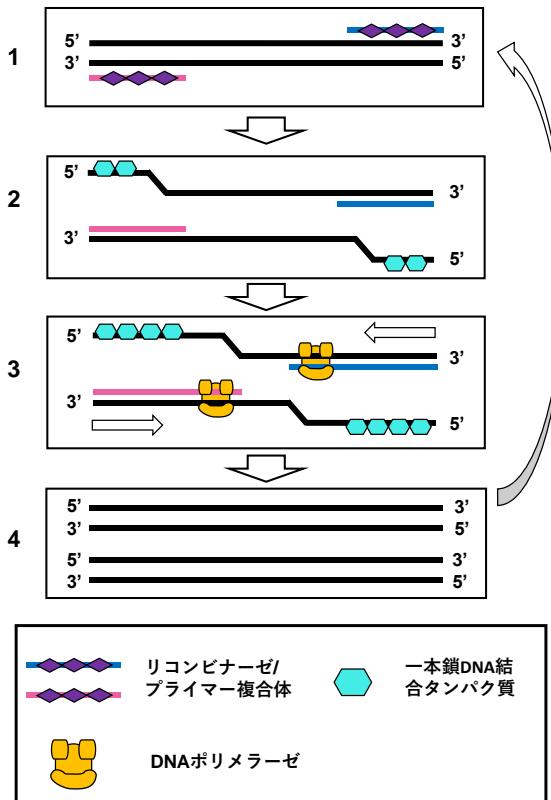


Fig. 1 RPA の増幅原理

とした。トロンビンアプタマーはグアニン四重鎖(G-quadruplex: G4)構造を形成して、トロンビンに結合する。本研究室では RPA によって増幅される鑄型 DNA 中に G4 構造形成配列が存在すると、その G4 構造の安定性に依存して RPA が阻害されることを示している。そのため、トロンビンアプタマーを含む鑄型 DNA にトロンビンが結合すると RPA による増幅が阻害されると想定した(Fig. 2)。

つまり、RPA 増幅効率を測定するだけでトロンビンを定量できると考えた。

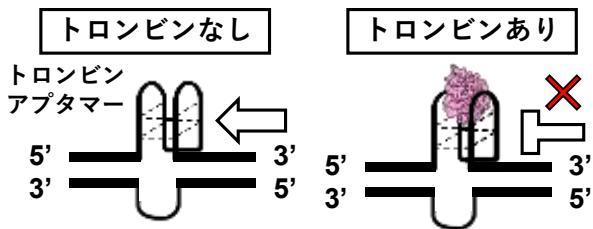


Fig. 2 RPA を用いたトロンビン検出法の原理

## 2. 方法

130 mer のトロンビンアプタマーを含む鋳型 DNA とプライマーを化学合成した。RPA 酵素溶液(終濃度 200  $\mu\text{M}$  dNTP mix, 50 mM Sodium Creatine Phosphate Hydrate, 3 mM ATP, 2 mM DTT, 5% w/v PEG20000, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 14 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 40000-fold diluted SYBR Green I, 500-fold diluted Rox Reference Dye, 67 ng/ $\mu\text{L}$  freeze-dried RPA pellets)を調製した。次に RPA 鋳型溶液(1.0×10<sup>8</sup> copies/10  $\mu\text{L}$  鋳型 DNA, 65 mM KCl, 120 nM プライマー, 1 $\mu\text{M}$  トロンビン)を調製した。最後に、RPA 酵素溶液と RPA 鋳型溶液を混合し、39°C で 30 分間反応させ、20 秒ごとに SYBR Green I の蛍光強度を QuantStudio1 で測定した。

## 3 結果

トロンビン存在下または非存在下におけるトロンビンアプタマーを含む鋳型 DNA を RPA で増幅した結果、トロンビン存在下では RPA の増幅効率が減少した(Fig. 3)。SYBR Green I の蛍光強度が 2.5 における Threshold time は、トロンビン非存在下では 23.6±1.9 分であったのに対し、トロンビン存在下では 26.6 ± 0.8 分であった(Table)。つまり、トロンビンアプタマーを含む鋳型 DNA の RPA 効率を測定するだけで、簡便にトロンビンを測定できることが示された。

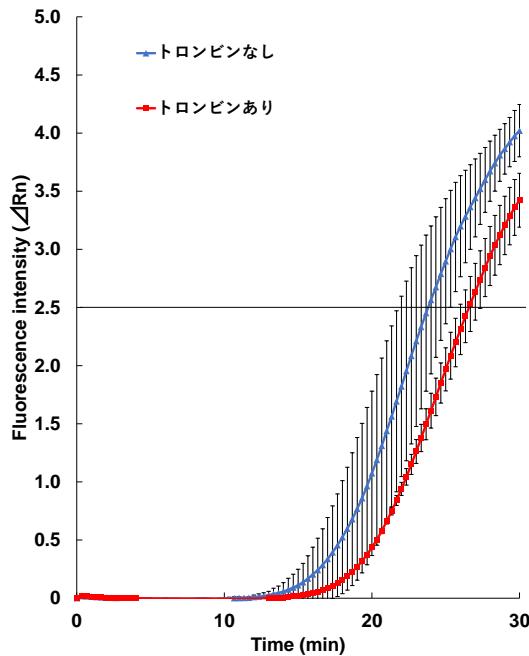


Fig. 3 鋳型 DNA の増幅曲線

Table トロンビンの有無による Threshold time の変化

	Threshold time (分)	△Threshold time (分)
トロンビンなし	23.6 ± 1.9	
トロンビンあり	26.6 ± 0.8	3.0

## 4. 結論

トロンビンアプタマーを含む鋳型 DNA の RPA 効率を測定した結果、トロンビン存在下では RPA 効率が減少することが示された。つまり、トロンビンがトロンビンアプタマー部位に結合することにより、DNA ポリメラーゼの伸長反応が阻害されることが示唆された。本手法は使用するアプタマーを変更するだけで、その標的分子を RPA の増幅効率を指標に定量することが可能になる。つまり、種々のマーカー分子を同一のプラットフォームで定量することができるようになり、種々の疾患の簡易診断法への展開が期待できる。