

伸張固定 DNA の局所加熱による部位特異的 PCR

東京大学工学部機械工学科 東 隆平

1. 本研究の背景・目的

DNA の塩基配列解析の手法として、電気泳動法を用いた DNA シークエンスの方法が挙げられる。この方法では、塩基配列を調べたい長鎖 DNA を、解析が可能な程度の短い DNA 断片に切断し、解析後に全体をつなぎ合わせる必要があり、このつなぎ合わせの作業に膨大な手間が必要なことが問題として挙げられる。このような問題から、DNA 分子の一部分を、全体における位置が分かる形で取得する手法の開発が求められている。このための一つの案として、DNA 分子の任意の一部分を複製して回収することができれば、DNA 分子の任意の部位の取得が可能になる。このような背景から、本研究では DNA の増幅手法である PCR 法のプロセスを応用した、DNA の任意の部位の複製操作（図 1）を行なうことを目的とし、この操作に必要な DNA の局所部位の加熱手法について検討した。

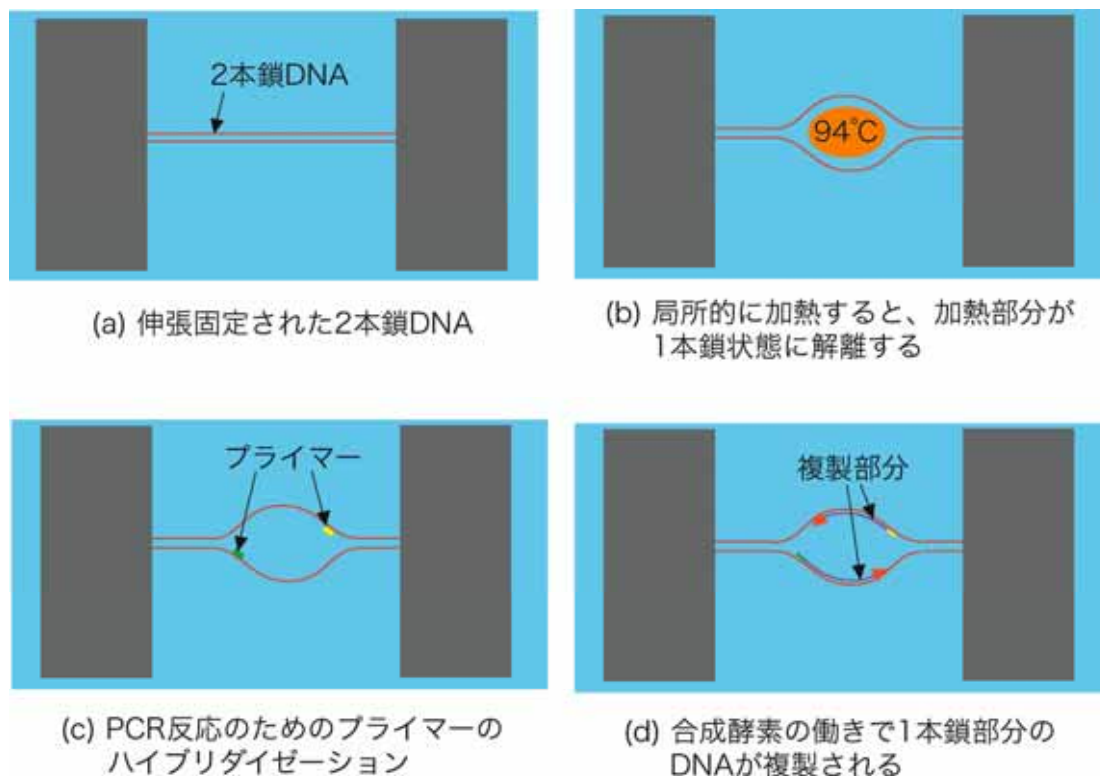


図 1: 本研究の目的

2. 赤外線レーザーを用いた DNA の局所加熱

・実験

DNA 分子の特定部位の複製を実現するには、DNA を電極上に伸張固定し、複製したい部位に対して加熱と冷却のプロセスを実現する必要がある。本研究では溶媒の水を局所的に、高温まで加熱できるという理由から、赤外線レーザー（波長：1455 μm ）を用いた加熱の手法により、伸張固定された DNA を局所的に加熱することにした。

まず、DNA サイズの微小ギャップを持つ電極を作製し、電極に展開された DNA 溶液に高周波電界（1MHz、1.2MV/m）をかけて DNA を電極基板上に伸張固定した（図 2(a)）。さらに、伸張固定された DNA に 1/30 秒程度レーザーを照射し、照射部分を局所加熱した。この結果、照射部の DNA の蛍光が退色し（図 2(b)）、退色部分の DNA の蛍光が両端から中央部分に向かって徐々に回復（図 2(c)）する現象が見られた。

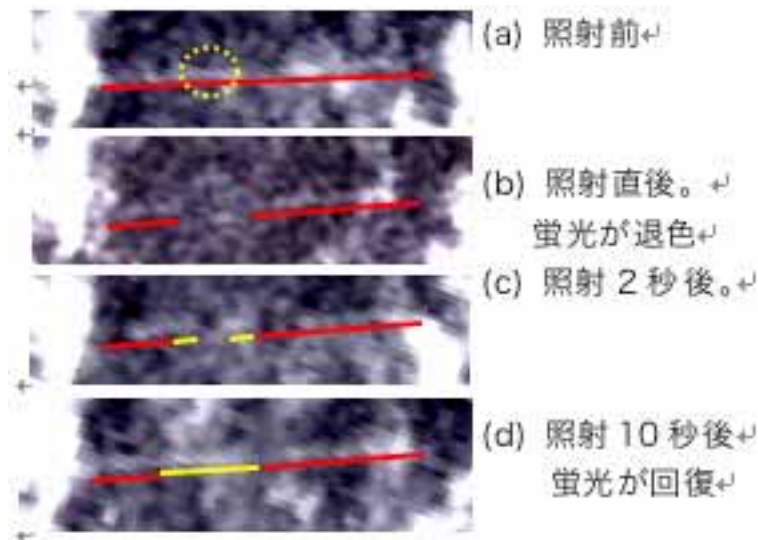


図 2：レーザー照射時の DNA の蛍光の退色と回復

・考察

実験の現象を以下のように考察した。本研究で用いた蛍光色素は DNA の 2 本鎖部分を染色して可視化する性質があるため、DNA にレーザーを照射して局所的な加熱を行なうと、加熱部分が局所的に 1 本鎖に解離し、1 本鎖部分の蛍光が見えなくなる（図 3(a)）。加熱時間は

短時間にすぎないので、その後の冷却で DNA の 1 本鎖部分が周辺部から 2 本鎖化し (図 3(b)) やがて元の状態に復元した (図 3(c)) ののではないかと考えられる。

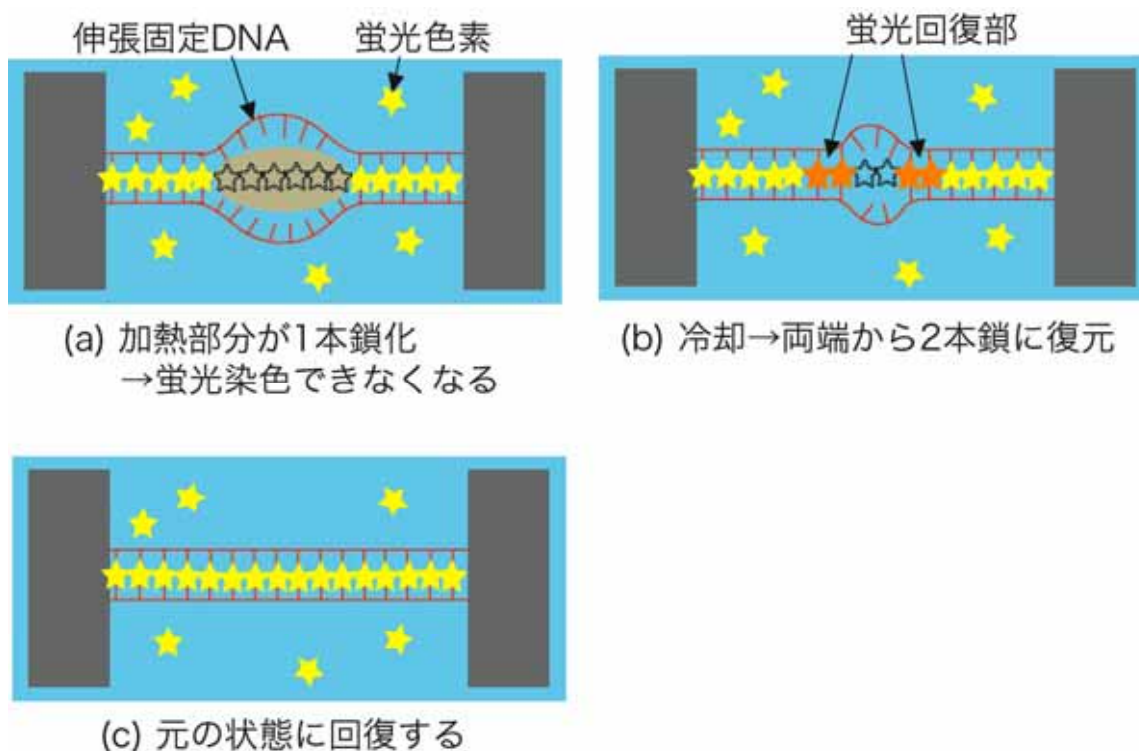


図 3 : 加熱の結果についての考察

3. 結論

DNA 分子に対する部位特異的な増幅反応を実現するため、伸張固定された DNA の局所加熱に関する研究を行った。その結果、

- ・ 加熱部分の DNA 分子が局所的に 1 本鎖に解離し、
- ・ 1 本鎖化した DNA の加熱部分が 2 本鎖状態に復元する

という変化を可視化することができた。つまり、DNA 分子を加熱部分のみ 1 本鎖状態に変性できることが示されたと考えられる。本研究から得られた知見に加え、加熱部位の温度変化を適切に制御する技術を開発することで、DNA の局所部位の複製が行なえるであろう。