

# 検出シグナルの発色を妨げるビオチン 付加プライマーの阻害作用とその対策

2021年1月6日

(株)TBA



## 1. はじめに

PCR 増幅系であれ、LAMP 等の等温増幅系であれ、弊社の STH-PAS 検出系においては、標的遺伝子が増幅しているにもかかわらず C-PAS の陽性検出ラインが薄くなる、あるいはまったく発色しないことがある。この現象は多くの場合、増幅反応後も過剰に存在する未反応のビオチン付加プライマーが、アビジンコート青色ラテックスの表面をマスクし、ビオチン付加標的遺伝子増幅断片と青色ラテックスの結合が阻害されることにより、同増幅断片が検出ライン上にトラップされても発色されない為と考えられる。

対策としては、①使用するラテックス量を増やす、②過剰量のビオチン付加プライマーを除去する等が考えられるが、ここでは、市販のストレプトアビジンコート粒子を用いて過剰のビオチン付加プライマーを除去し、本来のシグナル強度を回復させた例を紹介する。なお、検討には、エビ病原体検出系を用いた。

## 2. 試験材料と試験に使用した検出系

### ○本試験で使用したストレプトアビジンコート粒子

- ・商品名 : Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles (Promega 社製)
- ・粒子径 : 1  $\mu\text{m}$  (クロマト展開させないために、1  $\mu\text{m}$  以上を推奨する)
- ・濃度 : 1 mg/mL
- ・ビオチン結合能 : >0.75 nmol Biotin/m.

### ○エビ病原体検出系

- ・標的 : AHPND, IHHNV, WSSV, EHP + エビ遺伝子 (弊社製エビ病原体検査キット)
- ・総ビオチン付加プライマー量 : 13 pmol/assay(10  $\mu\text{L}$  PCR 溶液)
- ・鑄型 :
  - 1) AHPND, WSSV 陽性コントロール 各 40 copies/ $\mu\text{L}$
  - 2)WSSV 感染エビの熱水抽出検体

## 3. 試験方法

### ○PCR 反応

- ・上記鑄型を含んだ検体を複数本作成し、GenePasQ 検査キットのプロトコルに従い PCR(10  $\mu\text{l}$ ) 反応を実施して増幅産物を得た。その後、全ての PCR 産物溶液を混和し、所定本数に分注(10  $\mu\text{l}$ ) した。

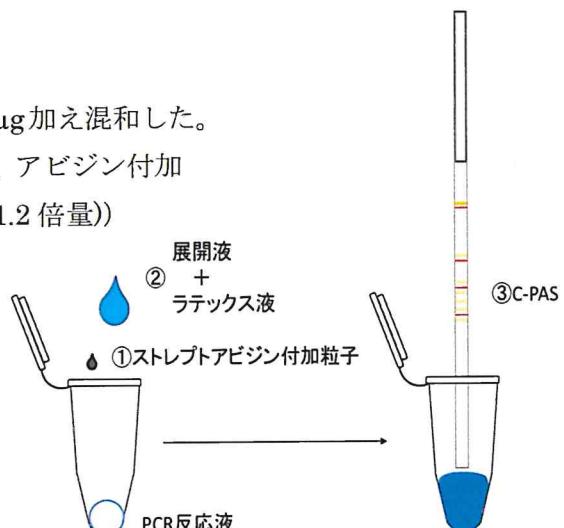
### ○クロマト展開試験

- ①PCR 反応液 10  $\mu\text{L}$  にストレプトアビジン付加粒子を 5~20  $\mu\text{g}$  加え混和した。

(1 テストでの総ビオチン付加プライマー 13 pmol に対して、アビジン付加粒子のビオチン結合能 3.8~15 pmol に相当する(モル比 0.3~1.2 倍量))

- ②上記の PCR チューブに「展開液 10  $\mu\text{l}$  + ラテックス 0.8  $\mu\text{l}$ (4.2pmol のビオチン結合能)」を加え混和した。

- ③C-PAS を挿入し 10 分後に目視にて検出ラインの呈色を確認した。

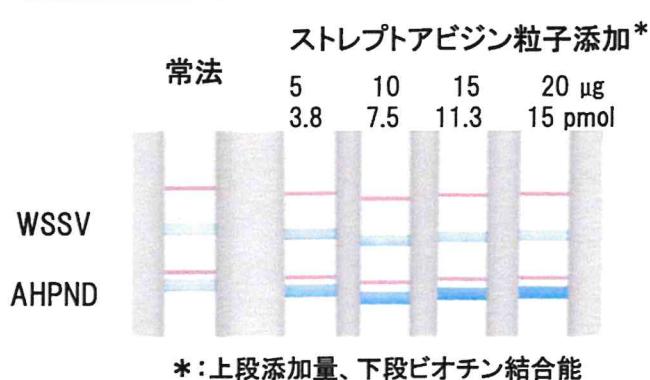


#### 4. 試験結果と考察

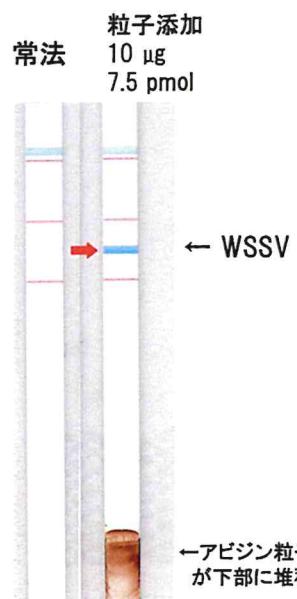
##### ○試験結果

AHPND, WSSV 陽性コントロールを用いての試験結果を図・2に WSSV 感染エビからの抽出検体を用いた試験結果を図・3に、それぞれ常法と比較して示した。

**図-2. 陽性コントロール(AHPND+WSSV)での試験結果**



**図-3. 感染(WSSV)エビでの試験結果**



##### ○考察

- ・ストレプトアビジンコート粒子の添加により、陽性ラインの呈色が強くなることが確認できた。
- ・展開開始後 10 分以内(湿潤時)では、乾燥後と比較して、呈色強度向上効果が大きかった(試験データは割愛)。
- ・特に、検出限界付近(図・3 の WSSV 感染エビ検体試験結果)での呈色強度向上効果は大きい。
- ・アビジン付加粒子の添加効果は、検出系の総ビオチン付加プライマー量に対してビオチン結合能モル比 0.3~1.2 倍量の全てで確認できた(2.5 倍量以上は逆に検出を阻害する可能性がある)。
- ・PCR 系に限定されず、総ビオチンプライマー量の多い等温增幅系でも同様の検出向上効果が期待できる。(LAMP 反応系でその効果を確認済み)。
- ・未反応ビオチン付加プライマーのマスク効果に対抗するため、ラテックス添加量を増加させることも考えられるが、その場合は、どうしても C-PAS のバックグラウンドが高くなり陽性ラインとのコントラストが下がることが懸念される。

#### 5. まとめ

弊社の STH-PAS 法は、簡易な多項目同時遺伝子検査法として、多方面での活用が期待される。ところが、本法では、各ターゲットの一方のプライマーをビオチンで共通ラベル化する為、使用される総ビオチン付加プライマーの絶対量はどうしても多くなる。この多量のビオチン付加プライマーが未反応のまま残存し、アビジンコートラッテックスの表面をマスクし、陽性検出ラインの青色着色を阻害する場合がある。ここでは、PCR 反応後にアビジンコート粒子を添加し過剰のビオチンプライマーを除去して、陽性検出ラインの青色着色を回復させる方法を検討し、狙い通りの効果を確認した。なお、上述したように本法は PCR に限らず LAMP 等のプライマー使用量の多い全ての遺伝子増幅反応系に広く適用が可能と考えられる。