

遺伝子検査前処理デバイス
DnaCapture 使用例集

BEL

一般社団法人 生命科学教育研究所

説明及びキーワード

サンプル : 全血、血清、血漿、唾液、鼻ぬぐい液など液体検体

対象 : 細胞、白血球、ウイルス、微生物など

遺伝子 : DNA / RNA

サンプリング方法 : 滴下または塗布

試料保存方法 : 乾燥後、室温保存可能 (数ヶ月)

ウイルス・微生物の不活化 : 加熱 (70℃、20 分間)

遺伝子抽出精製不要 : Without Extraction and Purification for DNA / RNA

ダイレクト PCR : Direct-to-PCR

ダイレクトリアルタイム PCR : Direct-to-real time PCR

ダイレクト逆転写 PCR : Direct-to-reverse transcription PCR

前処理方法① : 2 mmΦディスク (を 100 μ L-DW 中で 95℃
5 分間加熱処理した溶液をテンプレート (鋳型) として使用する。

前処理方法② : 1 mmΦディスクを 20 μ L-PCR マスターミックス中に添加して
PCR 検査を開始する。

サンプルディスク採取方法 : 生検トレパン (貝印) 使用

DnaCapture 素材 : 水溶紙 (Water Soluble Paper)

水溶紙 : カルボキシメチルセルロース 配合製紙

カルボキシメチルセルロース : Carboxy Methyl Cellulose (CMC)

一塩基多型解析:SNP

–アルコール代謝 ALDH2, ADH1B–

1. 新規な遺伝子検査プロトコール開発とアルコール代謝関連遺伝子多型への応用

https://www.jstgate.jst.go.jp/article/yakushi/139/8/139_19-00016/_pdf/-char/ja

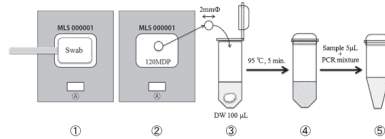


Fig. 3. Dried Saliva Sampling Process and Genetic Test Flow

要 旨：水溶性紙に付着させた乾燥唾液試料から一般的な DNA 抽出・精製工程を経ずに、生体試料を直接 TaqMan PCR のテンプレートとして用いる新しい一塩基多型 (SNP) 遺伝子型判定法を開発・検証した。この方法は、簡単にセットアップでき、データ解釈を含む PCR 解析を 2 時間以内に完了することができ、さらに低コストで大規模な臨床研究、診断、疫学研究に適用できる利点がある。具体的には、乾燥唾液を用いた TaqMan PCR 法により、アルコール代謝関連遺伝子 ADH1B (rs1229984) と ALDH2 (rs671) の SNP ジェノタイピングを実証した。このプロトコールでは、実験操作の簡略化・効率化、時間と手間にかかる DNA 精製工程の省略・簡略化により、実験時間の短縮とコンタミネーション等のヒューマンエラーのリスクを低減することが可能である。さらに、大幅なコストダウンも可能になりました。市販のリアルタイム TaqMan PCR 用マスターミックス試薬による SNP ジェノタイピングの判定率、精度を飛躍的に向上させることに成功した。また、反応系に安定的に鋳型 DNA を導入することが可能となり、TaqMan プローブ法によるコピー数変動 (CNV) への応用が可能となる。この最適化された水溶性紙を用いた SNP 解析プロセスは、薬物代謝酵素遺伝子 CYP の遺伝子多型解析などに応用され、個別化医療の実現に貢献することが期待される。

2. 女子大学生におけるエタノールパッチテストの反応性と ALDH2 および ADH1B 遺伝子多型との関連

https://www.jstgate.jst.go.jp/article/jjih/70/2/70_134/_pdf



3. Direct Detection of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) by the TaqMan PCR Assay Using Dried Saliva on Water-soluble Paper and Hair-roots, without DNA Extraction

https://www.jstgate.jst.go.jp/article/analsci/30/3/30_427/_pdf/-char/en



4. Genotyping of Polymorphisms in Alcohol and Aldehyde Dehydrogenase Genes by Direct Application of PCR-RFLP on Dried Blood without DNA Extraction

https://www.jstgate.jst.go.jp/article/analsci/26/4/26_4_503/_pdf/-char/en



5. 飲酒と健康 —アルコール体質検査と飲酒の功罪—

https://www.jstgate.jst.go.jp/article/jbrewsocjapan/109/1/109_2/_pdf/-char/en



6. Single-Tube Genotyping from a Human Hair Root by Direct PCR

7. 乾燥唾液を用いたアルコール代謝関連遺伝子 ADH1B および ALDH2 の SNP タイピング解析法の検証実験と妥当性確認。臨床病理 63(11): 1253-1258 2015

—薬物代謝 CYPs—

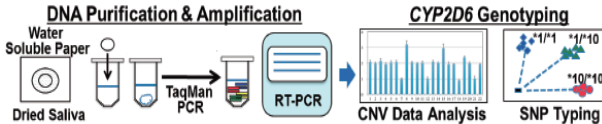
8. Combination Analysis in Genetic Polymorphisms of Drug-Metabolizing Enzymes CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A5 in the Japanese Population

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4278879/pdf/ijmsv12p0078.pdf>



9. Unique Genotyping Protocol of CYP2D6 Allele Frequency Using Real Time Quantitative PCR from Japanese Healthy Women

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/43/5/43_b19-00512/_pdf-char/ja



要 旨: CYP2D6 は、一般に処方される薬物の 20-25% の代謝に関与する重要な薬物代謝酵素である。CYP の遺伝子多型は、患者の薬物代謝能に関与する臨床的に重要な遺伝子多型と考えられています。CYP2D6 遺伝子はコピー数変異 (CNV) や塩基多型 (SNP) が多く、CYP2D6 の活性は特に遺伝的要因に依存すると考えられています。本研究では、日本人女性健常者 216 名を対象に、CYP2D6 遺伝子型の頻度を調査することを目的とした。日本人女性健常者 216 名を対象に、CNV Exon 9 および 4 つの CYP2D6 遺伝子変異 (*2、*5、*10、*14、*41) について TaqMan® genotyping assay による遺伝子型判定を行い、CYP2D6 遺伝子変異を判定した。コピー数多型 (CNV) のアレル頻度は、2 コピーで 82.9%、1 コピーで 11.6%、3 コピーで 4.6%、0 コピーで 0.9% であった。CYP2D6*1、*2、*5、*10、*14、*41 の頻度は、それぞれ 38.7、16.7、6.3、34.7、0.2、1.2% であった。一般に、ジェノタイプングは労力、時間、コストがかかる。我々は、新規に CYP2D6 遺伝子の CNV と SNP を TaqMan プローブを応用したリアルタイム PCR 装置を用いた最適化されたプロトコルを報告する。これにより、コストを下げ、CYP2D6 遺伝子の CNV と SNP を正確に判定し、大規模な疫学的サンプルにおける疾患予測の信頼性の高い推定を可能にすることができた。

10. 薬物代謝酵素 CYP2C9 およびビタミン K エポキシド還元酵素複合体 1 VKORC1 の高効率な塩基遺伝子多型解析法の開発

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphcs/40/7/40_402/_pdf



11. 唾液中カフェイン薬物動態に薬物代謝酵素 CYP1A2 遺伝子多型が及ぼす影響に関する研究 武庫川女子大紀要 65, 1-5, 2017

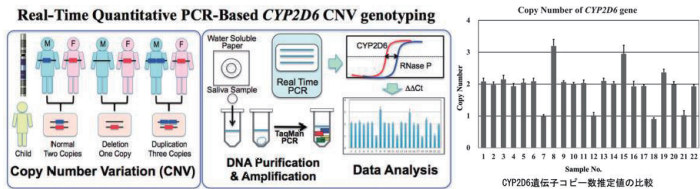
コピー数多系: Copy Number Variation (CNV)

12. Development of an Inexpensive and Rapid Operation Device for High-Throughput Real-Time Quantitative PCR-Based CYP2D6 CNV Genotyping

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/42/10/42_b19-00120/_pdf-char/ja



要 旨: CYP2D6 遺伝子は、薬物代謝に関与する最もよく知られた遺伝子であり、遺伝子重複型と欠失型の両方の変異があることが知られています。我々は、CYP2D6 遺伝子のコピー数変異 (CNV) を、リアルタイム定量 PCR のための新しい精製プロセスによって最適化した方法を報告する。この方法は、CYP2D6 遺伝子の CNV を正確に測定することができ、大規模な疫学的サンプルにおける疾患予測の信頼性の高い推定を可能にするものである。



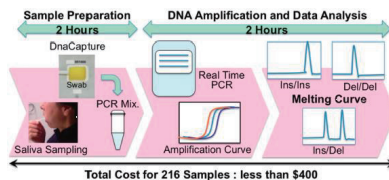
結論: 乾燥唾液サンプルを使用し、液体処理プラットフォーム DnaCapture を組み合わせた場合、ジェノタイピングプロセス全体をさらに迅速化できることが分かった。この方法を用いることで、現在のジェノタイピング法を簡略化し、TaqMan® コピー数アッセイによるリアルタイム定量 PCR を用いて毎日多くのサンプルを分析する診断現場でのさらなる利用を可能にする。今回の結果は、本技術が CNV ジェノタイピングの低コスト化に有効であることを示した。この新しい方法論がハイスループットなジェノタイピングに応用されることを期待している。

13. Long PCR-based Genotyping for a Deleted *CYP2D6* Gene without DNA Extraction
https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmpk/29/3/29_DMPK-13-NT-116/_pdf-char/ja



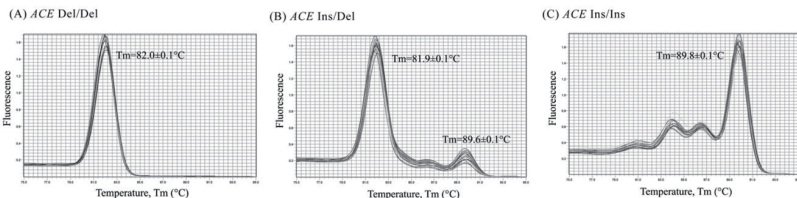
熱融解分析: Melting Curve Analysis

14. Rapid and Cost-Effective Genotyping Protocol for Angiotensin- Converting Enzyme Insertion/Deletion (Ins/Del) Polymorphism from Saliva
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/42/8/42_b19-00110/_pdf-char/ja



要旨: 一般に、PCR アッセイには DNA の抽出・精製が必要とされている。我々は、生体試料を直接テンプレートとして使用し、融解曲線解析を伴うリアルタイム PCR を行う新しいプロトコルを実証した。特にアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 遺伝子の挿入/欠失 (Ins/Del) 多型の同定に融解曲線解析が適していることが確認された。私たちが開発した新しいプロトコルは、データの解釈を含む簡単な PCR 解析で 4 時間以内にセットアップでき、さらに低コストで大規模な臨床研究、診断、疫学研究に適用できる利点がある。

結果:



エンドポイント融解曲線解析による ACE 遺伝子挿入/欠失多型のジェノタイピング

アルコール体質検査プロトコル

ALDH2&ADH1B

1. 唾液サンプリング

① サンプリングキットを受け取る。

DnaCapture、スワブ、簡易滅菌パウチ

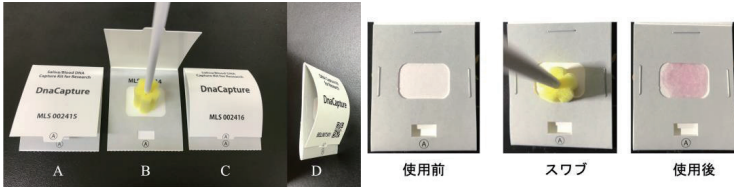
② 唾液を口腔ケア用スワブを使用してサンプリングする。

③ 唾液をスワブから下図のように DnaCapture に塗布する。

④ 簡易滅菌パウチ内に DnaCapture を入れ提出する。

⑤ 使用済のスワブは被験者自らオートクレープバッグに捨てる。

⑥ サンプルは室温で自然乾燥（一昼夜）させる。



サンプリングプロセス

2. PCR 検査用試薬の調製（10 μL 系：48 名分）

ALDH2/ADH1B

Hot Start TTx DNA Polymerase（東洋紡社製）	6
ALDH2 or ADH1B Master Mix (TTx Buffer+TaqMan Probe & Primer+ROX)	474
Total	480

ALDH2 or ADH1B Master Mix (TTx Buffer+TaqMan Probe & Primer+ROX) μL

2×Buffer for rTth/TTx (DNA)	240
50× ROX reference dye（東洋紡社製）ABI RT-PCR 装置使用の場合	9.6
20× ALDH2 TaqMan Probe & ALDH2 Primer Mix (ABI 社製:C_11703892_10)	24
DW	200.4
Total	474

96ウェルの場合

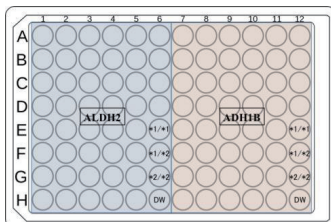
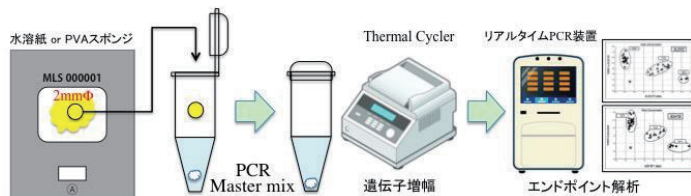


Table 2. Phenotype Frequencies for Alcohol-related Gene Types

ADH1B	ALDH2	Type	N	%
*1/*1	*1/*1	A	3	1.5
*1/*2	*1/*1	B	46	46.6
*2/*2	*1/*1		50	
*1/*1	*1/*2	C	4	1.9
*1/*2	*1/*2	D	41	45.6
*2/*2	*1/*2		53	
*1/*1	*2/*2		0	
*1/*2	*2/*2	E	2	4.4
*2/*2	*2/*2		7	

3. サンプル前処理及びPCR反応

乾燥したサンプルを生検トレパン（貝印；BPP-20F 2.0mmΦ、20本 10,000円）でパンチする。48名分のパンチ片を48穴PCRプレートの2ヶ所に投入する。PCRマスターミックスを各ウェルに分注して、PCR反応を開始する。なお、サンプルパンチ作業は、人数分連続で行ってもコンタミネーションは起こさない（参考文献参照）。

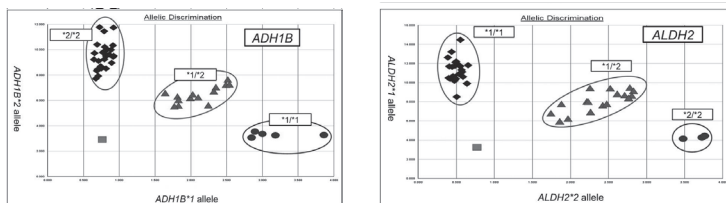


4. PCR検査

装置： Thermal Cycler 9700同等機種

反応条件： PCR酵素の初期化50°C 5分、熱変性95°C 10分後、50サイクルの熱変性95°C 15秒，アニーリング及び伸長反応60°C 30秒にて実施する。

SNPタイピング： リアルタイムPCR装置にて**エンドポイント**解析で実施する。



5. PCR検査費用（1名分）10μL系

ホットスタート TTx DNA Polymerase 20 μL系 1回	96円
Taqman Probe & Primers mix ABI (375回分 73400円)	392円
口腔ケアスワブ	30円
DnaCapture 水溶紙 (販売予定価格)	200円
その他	20円

合計 738円

参考文献：新規な遺伝子検査プロトコル開発とアルコール代謝関連遺伝子多型への応用
https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/139/8/139_19-00016/_pdf/-char/ja

DnaCapture 使用例集

2022年3月1日発行

BEL 一般社団法人 生命科学教育研究所

出版元／一般社団法人 生命科学教育研究所

〒533-0033

大阪府大阪市東淀川区東中島1-21-33 俵ビル702号室

印刷所／print 工芸

■本書の一部あるいは全部を無断で複製・複写・転載することを禁じます。