

ハイブリダイゼーション自動化装置の開発

株式会社カケンジェネックス（共同研究員）田代一也

（専務取締役）後藤征人（社長）吉岡弘料

【目的】

本研究では、DNA・抗体マイクロアレイにおけるハイブリダイゼーション操作を自動化し、検出系の高度な再現性を実現することを目的とし、且つプローブ使用量を最小化できる装置を目指す。

【背景】

地域結集型共同研究事業 テーマ3において展開してきた研究課題「DNA・抗体マイクロアレイの作成技術開発及びその作製・評価」で生み出されるcDNAマイクロアレイ及び抗体マイクロアレイの商品化にはハイブリダイゼーション装置の自動化とプローブの最小化というハード面で補助する装置の開発が必須である。市販のハイブリダイゼーション装置で目的にかなう装置はなく本研究ではその装置の開発を目指す。

【5年間の研究成果】

1. フェーズI

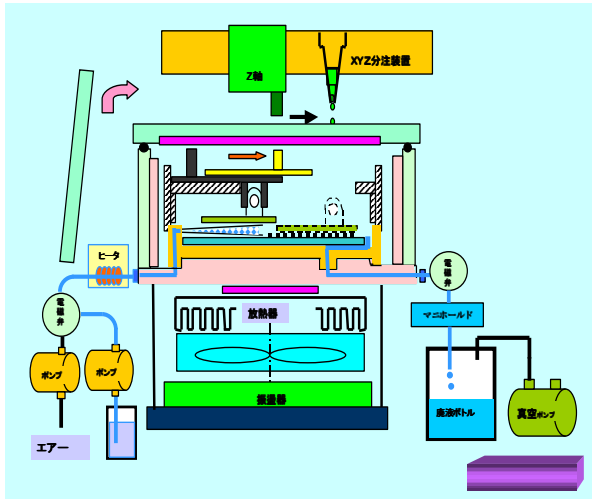
開発着手当時の市販されているハイブリダイゼーション装置には下記問題点があることが把握された。

- ① 一連のハイブリダイゼーションに要する時間が18時間以上と長い。
- ② プローブ使用量が120 μ L以上必要。
- ③ チャンバー内アレイの位置による反応品質のばらつきが大きい。（市販品はチャンバー内の両端に真空・加圧を交互にかけ、プローブをわずかに揺動させているのみ）
- ④ チャンバー内プローブ液の蒸発減量が多い。（ハイブリのばらつきの一因）

今回の研究はこれら問題点を解決するターゲット目標とその達成のための具体的な設計コンセプトを以下のように設定した。

- ① ハイブリ時間目標を4時間に設定。
 - ・ 自動化のし易い構造の開発
 - ・ プローブ自動微量分注による短縮
 - ・ チャンバー加熱方式改善による短縮
 - ・ プローブミキシング方式改善による短縮
 - ・ 洗浄方式改善による短縮
 - ・ プローブ蒸発減量防止による短縮
- ② 蛍光検出法によるバックグラウンド50以下、3倍以上データの相関係数0.99、プローブ使用量10 μ L以下（検出器：GenePix4000B、レーザー強度：100%、PMT：600）
 - ・ カバーガラス方式の採用
 - ・ チャンバー内（カバーガラス内）プローブミキシング方式の改善
 - ・ 装置の気密性改善及び蒸発防止チャンバーの開発
 - ・ 均一加熱方式の改善
 - ・ スライドガラス表面処理の改善

このコンセプトによる装置の概念図を以下に示す。この特徴はプローブ自動分注、カバーガラス自動揺動、自動洗浄をひとつの密閉されたチャンバー内で行うものである。



フェーズ I では上記設計コンセプトの妥当性を検証するため、手動のハイブリダイゼーション装置とハイブリチャンバーを自作し、さらに自社独自仕様のスライドガラス (KGスライド) を開発、他 2 社の市販スライドガラスと併せて 3 種のガラスについて諸々の検討を行った。スライド配置条件、プローブミキシング条件、洗浄条件などハイブリ条件を個別に研究した。その結果、バックグラウンド、相関係数は KGスライドが圧倒的に良い結果が得られた。一方、スライドガラスを水平にする限りプローブ溶液中の微細気泡が移動せず、ハイブリ結果にばらつきを生じたのに対し、垂直近くにすると気泡が抜けやすく、ハイブリ結果も良好であった。これらのことから上記装置概念図の設計構想は大きく方向転換を迫られることとなった。なお、フェーズ I の数値目標に対する結果はプローブ使用量 $100\mu\text{L}$ 、バックグラウンド 50、3 倍以上の相関係数 0.93 を得た。

(いずれも KGスライド使用時)

2. フェーズ II

フェーズ I の結果を受け、新しい仕様に基づく装置を初めて製作した。ハイブリダイゼーション反応の均一性、再現性が全てに優先するとの認識から、プローブミキシングはフェーズ I の結果より気泡が移動しやすく、プローブ全体がミキシングできるチャンバー回転揺動方式を採用した。この結果、微細気泡の移動を容易にすると同時にプローブがチャンバー内で完全ミキシングが行われ、アレイとの接触回数も大きくでき、ハイブリ反応が短時間で促進されることとなった。一方でこれにより、カバーガラスによる局所揺動が使えなくなり、且つ加熱はペルチェ方式の採用が難しくなり、これに代わる加熱方式として最も熱容量の大きな水を伝熱媒体とした循環攪拌温水浴浸漬方式に変更した。これにより 12 枚のチャンバーを容易に同一温度に制御できることとなり、また、従来問題であったプローブの蒸発減量も抑えることが可能となった。

この装置による性能は

- ① プローブ使用量 $100\mu\text{L}$
- ② ハイブリ時間 4 時間
- ③ バックグラウンド 50
- ④ 相関係数 0.985

となり、プローブ使用量の目標は未達となったが、他は当初目標をほぼ達成できた。

(基板はいずれも KG グラス使用時)

試作 1 号機





(チャンバー回転式温水加熱ハイブリ装置)

試作 2 号機



(チャンバー回転揺動式温水循環ハイブリ装置)

ただ、フェーズⅡで設計コンセプトを変更したため、当初目論んだプローブ自動分注や装置内洗浄が機能として割愛され、ハイブリダイゼーション自動化という研究テーマにはそぐわない結果となったことは遺憾である。また、伝熱媒体に水を使用したことに伴う別の煩わしさが付加されたのも当初の想定外である。

【今後の展開】

フェーズⅡまでの研究ではプローブ使用量の削減が目標値に届かなかったが、これはチャンバー内のプローブを保有するハイブリエリアのスライドガラスとカバーガラスの隙間を一定以上小さくしすぎるとチャンバーをたとえ回転揺動してもプローブ液のミキシングや移動が極端に遅くなるという理由による。これはガラスとプローブ間の表面張力がプローブの移動重力を上回るためと考えられる。今後はこの打開策としてプローブ液に比重の大きなミキシング担体（例えば数十 μm 程度のマイクロ金属粒子をプラスチックで表面コーティングしたようなもの）を多数混入してチャンバー回転揺動の動きに追従し易くするなどの工夫をしてミキシングとアレイ面との接触を増加させることでプローブ使用量の削減を図りたい。また、別の方法として上記ミキシング担体とチャンバーの間に磁力を働かせ、チャンバー内の担体をアレイ表面上で外部より磁力移動させるアイデアも発案しており、興味深い。いずれにしてもプローブ使用量を削減することは抗体やタンパクのように増幅できないプローブにはますます重要性が増すと思われるので、自社研究として継続開発を続けたい。

一方、伝熱媒体に水を採用したことによる功罪は前記したとおりであるが、このマイナス面を回避でき、且つ水以上の伝熱係数が期待できる媒体として 100°C以下の減圧蒸気を使用した加熱方式も研究に値すると思われる。これも今後の研究課題としたい。