

# D113

## マルチプレックス蛍光リボヌクレアーゼプロテクション法を用いた

### 一塩基多型の同時判別

(九大院工) ○ (学) 中川 真希\*・北岡 桃子・(正) 神谷 典穂・(正) 後藤 雅宏

#### 【緒言】

個体間で一ヶ所の塩基が異なる一塩基多型 (SNP; Single nucleotide polymorphism) は、ゲノム DNA 上で数百から千塩基対に一ヶ所の割合で発生し、生体機能との関連性が研究されている。一方で、SNP をベースとしたテーラーメイド医療・農水畜産物の品種鑑定等、産業分野への応用が期待されており、迅速で簡便な診断技術の開発が進められている。

本研究では、リボヌクレアーゼ (RNase) 及び蛍光標識 DNA を利用する FRIP 法 (Fluorogenic Ribonuclease Protection assay) をベースに、2つの異なる遺伝子座に座乗する SNPs を同時に判別するマルチプレックスな技術を提案する。FRIP 法について Figure 1 に示した。まず、対象サンプルから調製した RNA に、5'蛍光標識 DNA および 3'消光標識 DNA をハイブリッドさせて二本鎖を形成させる。サンプル中に SNP を含む場合は、RNA/DNA は完全な二本鎖を形成しないため、一本鎖 RNA に特異的な RNase A を加えると、色素間の FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) が解消される。このように、FRIP 法はサンプル中の SNP の有無を蛍光強度変化により迅速に判別する手法である。判別対象として食品検査で最も需要が多い水稻を選択し、食品分野における遺伝子解析技術の応用を目指した。

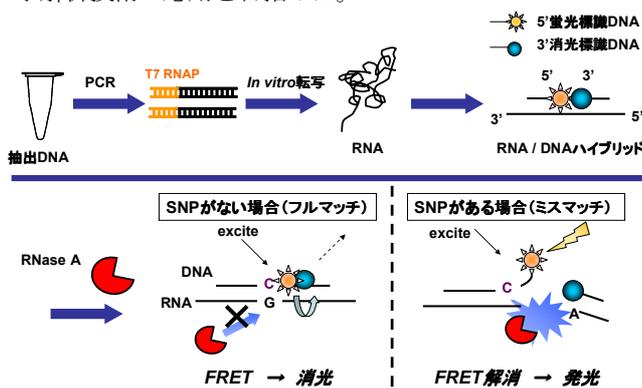


Figure 1. FRIP 法の概念図

#### 【実験】

##### ターゲット RNA の調製

2つの異なる遺伝子座を増幅する為に、対象物の抽出 DNA を加え、PCR により T7 プロモーターを付与した2種の DNA を増幅した。この DNA を鋳型として *In vitro* 転写を行い、2種の RNA を調製した。

##### SNP 判別

調製した RNA に、2つの異なる 5'蛍光標識 DNA と 3'

消光標識 DNA をそれぞれハイブリダイゼーションさせた。この溶液に RNase A を添加して酵素反応を行い、FRET を観測した。SNPs 判別は、反応溶液の消光率を算出することで評価した。

#### 【結果と考察】

PCR で SNP1 と SNP2 を含む2つの異なる DNA を増幅した。増幅 DNA のポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果 (Figure 2) から、目的の塩基長を持つ2種の DNA を増幅したことを確認した。この増幅 DNA を鋳型として、*In vitro* 転写を行い、SNPs の同時判別を行った。

2つの SNPs 同時判別の結果を Figure 3 に示した。SNP1 と SNP2 のどちらも、サンプル中の SNP の有無に応答した消光率が得られ、良好な同時判別の結果を示した。SNP マーカーによる消光率の違いは、RNA/DNA ハイブリッドの塩基配列が影響することが考えられる。また、高濃度の RNA/DNA 溶液で UV 照射による同時判別を行った結果、目視での SNPs 同時判別も示唆された。

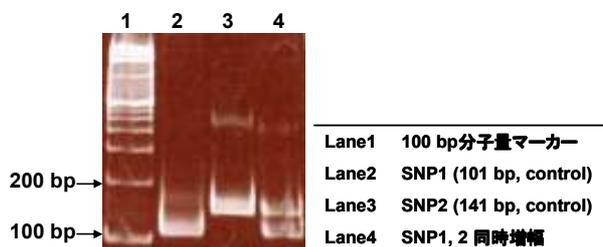


Figure 2. PCR 後のポリアクリルアミドゲル電気泳動

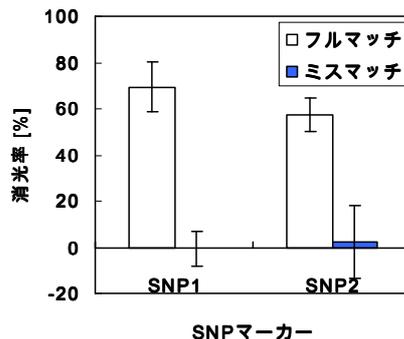


Figure 3. SNPs 同時判別の消光率

標識色素: SNP1 (5'FAM-DNA, 3'BHQ1-DNA)  
SNP2 (5'TAMRA-DNA, 3'BHQ2-DNA)

#### 【結言】

マルチプレックスな FRIP 法により、水稻ゲノム上の2つの異なる SNPs を同時に判別することに成功した。

Tel.092-802-2808 / Fax.092-802-2810

E-mail.m-nakagawa@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp