

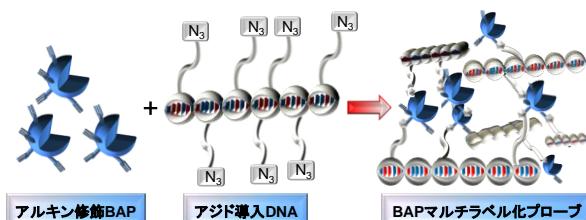
L16**DNA-酵素マルチラベル化プローブを用いた超高感度DNA検出**

(九大工)○多田 裕・(九大院工)(正)神谷 典穂・(正)後藤 雅宏

【緒言】

検体ゲノム中の特定のDNA塩基配列検出を行うゲノムサザンプロットは、遺伝子解析のツールとして重要である。これまでには、ゲノム中の微量な標的DNAを検出するため、高感度検出が可能な放射性同位体(RI)標識DNAプローブが用いられてきた。しかし、RIは安全性や半減期などの問題があり、汎用的な手法とは言い難い。そのため、高感度かつ安全なプローブが求められている。

そこで本研究では、酵素によるシグナル増幅能を利用した超高感度DNAプローブの創製を目的とする。そのDNAプローブの調製スキームをFig. 1に示す。アジド修飾dUTP(N_3 -dUTP)を合成し、PCRによりアジド導入DNA(N_3 -DNA)を調製する。有機化学的にアルキンを修飾した大腸菌由来アルカリホスファターゼ(BAP)を、 N_3 -DNAとクリック反応(Huisgen環化反応)¹⁾により結合させ、BAPマルチラベル化DNA(プローブ)を調製する。今回は N_3 -DNAの調製及びプローブの評価を行った。

**Fig. 1 本研究の概念図****【実験操作】****1. N_3 -DNAの調製**

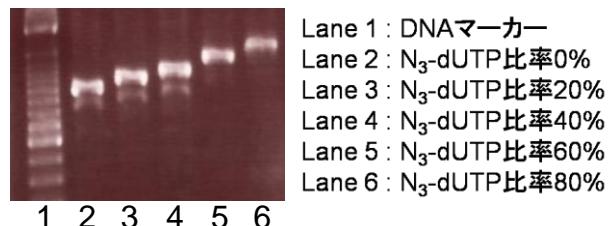
(dTTP + N_3 -dUTP)濃度を一定(0.4 mM)として、 N_3 -dUTPの濃度比を変化させ、PCRを行い N_3 -DNAを調製した。アガロースゲル電気泳動ならびに構成ヌクレオチドを直接定量することによって、DNAへの N_3 -dUTP導入の評価を行った。

2. プローブによる相補鎖特異的な検出

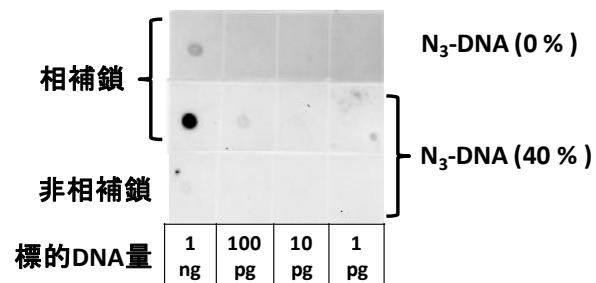
N_3 -dUTP比率が0%、40%の N_3 -DNAに熱処理を施した後、アルキン修飾BAPとクリック反応により架橋してプローブを調製した。異なる濃度で標的DNAを固定したメンブレンにプローブを滴下し、一晩反応させた。酵素の化学発光基質を添加し、15分集光することで、相補鎖検出を行った。

【結果及び考察】**1. N_3 -DNAの調製**

N_3 -dUTP比率を変化させて調製したDNAのアガロースゲル電気泳動の結果をFig. 2に示す。その結果、 N_3 -dUTP導入量の増加に伴い、バンドが高分子量側にシフトしたことから、 N_3 -dUTPが濃度に依存してDNAに取り込まれたことが示唆された。この結果は、プローブを構成するヌクレオチドの直接的な解析によても支持された。

**Fig. 2 N_3 -dUTP 比率変化による N_3 -DNA の調製****2. 相補鎖特異的な遺伝子検出**

調製したプローブによる相補鎖特異的なDNA検出実験を行った結果をFig. 3に示す。 N_3 -DNA(40%)とアルキン修飾BAPをクリック反応させたプローブにより、10 pgの標的DNAの検出に成功した。一方で、非相補鎖DNAを固定したメンブレンでは、シグナルが検出されなかったことから、このプローブの配列特異的な検出が可能であることが示唆された。しかし、 N_3 -DNA(0%)を用いた場合においても、シグナルが観測された。これは、プローブにラベルされたBAPの非特異的な吸着によるものと推察される。

**Fig. 3 BAPマルチラベル化DNAのプローブ能評価****【結言】**

アジド基(N_3)が複数箇所に導入されたDNAを酵素(BAP)と架橋して調製した新規核酸プローブにより、10 pgの標的DNAの検出に成功した。

【参考文献】

- 1) Johannes G. et al., *Org. Lett.*, 8, 3639 (2006)