

ミスマッチ塩基対と金属イオンの特異的結合に基づく一塩基多型検出法の開発

○関谷洸星¹・小野晶²・鳥越秀峰¹ (¹東京理科大院理、²神奈川大院工)

Development of single nucleotide polymorphism detection method based on the specific binding between mismatched base pair and metal ion (Graduate School of Science, Tokyo University of Science¹, Graduate School of Engineering, Kanagawa University²) SEKIYA, Kohsei¹; ONO, Akira²; TORIGOE, Hidetaka¹

2本鎖DNAのT-Tミスマッチ塩基対に Hg^{2+} が特異的に結合し、C-Cミスマッチ塩基対に Ag^+ が特異的に結合することを見出している¹⁾²⁾。本研究は、これらのミスマッチ塩基対と金属イオンの特異的結合を用いて一塩基多型(SNP)を検出する方法を開発することを目的とした。

標的配列として5'-d(CTCAGATCCTGCXCTTCAAAAACAA)-3' (X=A, C, G, T)を用いて、5'末端を蛍光色素FAMで、3'末端を消光色素TAMRAで標識したTプローブ: 5'-FAM-d(GGGAAAAATGAAGTGCAGGATTTCCC)-TAMRA-3'と、Cプローブ: 5'-FAM-d(GGAAAAATGAAGCGCAGGATTTCCC)-TAMRA-3'を調製した。斜線部は標的配列と結合し、標的配列のXとプローブのT, Cが塩基対を形成する。下線部は自己相補的であるため、プローブ単独ではヘアピンを形成し、TAMRAの消光でFAMの蛍光強度は低かった。X=AではTプローブが強く結合するため、ヘアピンが解消し、蛍光強度は顕著に増加したが、 Hg^{2+} を添加しても蛍光強度は変化しなかった。X=C, G, TではTプローブが結合しないため、蛍光強度は低かった。 Hg^{2+} を添加してもX=C, Gでは蛍光強度は低かったが、X=TではT-Hg-T形成でTプローブが強く結合するため、ヘアピンが解消し、蛍光強度は顕著に増加した(図1)。一方、X=GではCプローブが強く結合するため、ヘアピンが解消し、蛍光強度は顕著に増加したが、 Ag^+ を添加しても蛍光強度は変化しなかった。X=A, C, TではCプローブが結合しないため、蛍光強度は低かった。

Ag^+ を添加してもX=A, Tでは蛍光強度は低かったが、X=CではC-Ag-C形成でCプローブが強く結合するため、ヘアピンが解消し、蛍光強度は顕著に増加した(図1)。以上のように、Tプローブでは Hg^{2+} 添加時に蛍光強度が顕著に増加するため、X=Tを特異的に検出でき、Cプローブでは Ag^+ 添加時に蛍光強度が顕著に増加するため、X=Cを特異的に検出できた。

1) H. Torigoe, A. Ono, T. Kozasa, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 13218-13225; 2) H. Torigoe, I. Okamoto, T. Dairaku, Y. Tanaka, A. Ono, T. Kozasa, *Biochimie*, **2012**, *94*, 2431-2440.

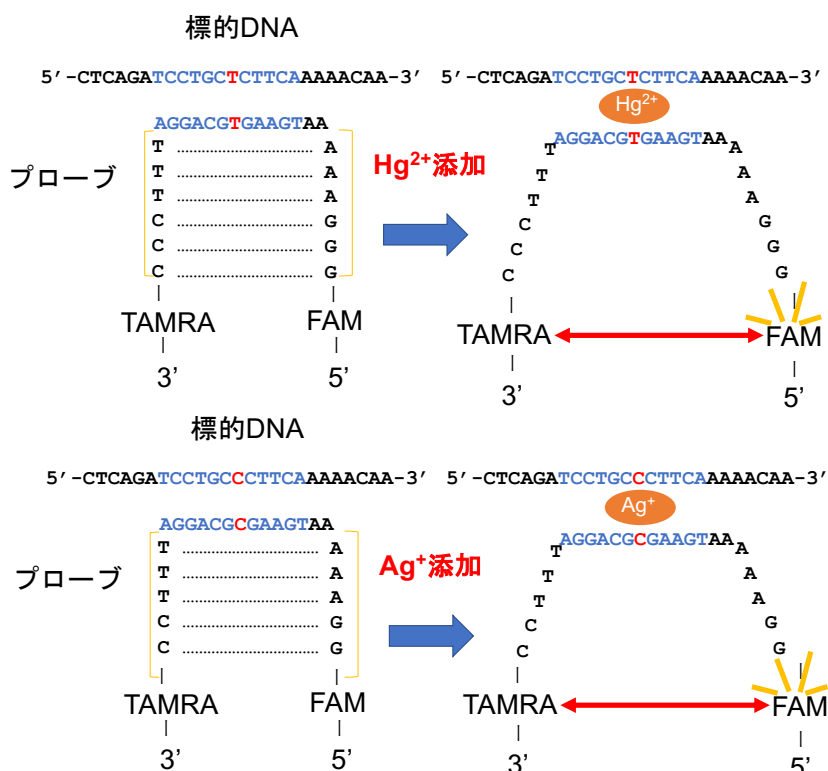


図1: T-T ミスマッチ塩基対と Hg^{2+} の特異的結合と、C-C ミスマッチ塩基対と Ag^+ の特異的結合に基づく一塩基多型検出法