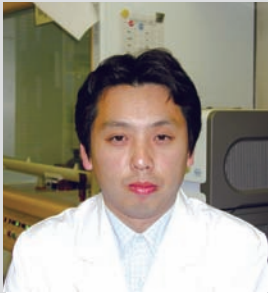


# 遺伝子(DNA)の新たな定量方法を開発

## 簡便・正確・低コストの実現



野田 尚宏

のだ なおひろ

noda-naohiro@aist.go.jp

生物機能工学研究部門  
バイオメジャー研究グループ  
研究員  
(つくばセンター)

2005年の入所以来、蛍光色素のON/OFFを利用した核酸解析技術の研究開発を行っています。特に近年はDNAの定量だけでなく、DNA/RNAと結合したり、DNA/RNAを分解したりする酵素や蛋白質の活性を定量的に評価する技術の開発を行っています。開発した技術の環境、食品、医療などの様々な分野における遺伝子検査への応用に取り組みつつ、他研究機関や企業との共同研究体制の下、早期の実用化を目指しています。

### 関連情報：

#### ● 参考文献

[1] H.Tani et al., Analytical Chemistry, in press

[2] H.Tani et al., Analytical Chemistry, 79, 974-979, 2007

#### ● 共同研究者

蔵田信也 (J-Bio21社)、中村和憲、関口勇地 (産総研)、谷英典、常田聡 (早稲田大学)

#### ● プレス発表

2007年5月29日「遺伝子の新規定量方法を開発」

● この研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構の平成18年度産業技術研究助成事業による支援を受けて行いました。

### DNAを定量する技術

DNAを定量する技術は、ヒトの病気診断などを目的とした遺伝子発現解析、SARS（重症急性呼吸器症候群）や鳥インフルエンザウイルスなどの検出・定量、組換え大豆などの遺伝子組換え食品の混入率検査などに利用されています。

これまで、微生物や動植物に含まれるDNAの定量には、リアルタイムPCR法が用いられてきました。この手法では、PCR（合成酵素連鎖反応）によりDNA増幅を行い、その増幅産物量をPCRの1サイクルごとに測定して標的のDNAを定量します。増幅産物の蛍光を1サイクルごとに測定するため、高価な専用装置が必要などのさまざまな問題点がありました。

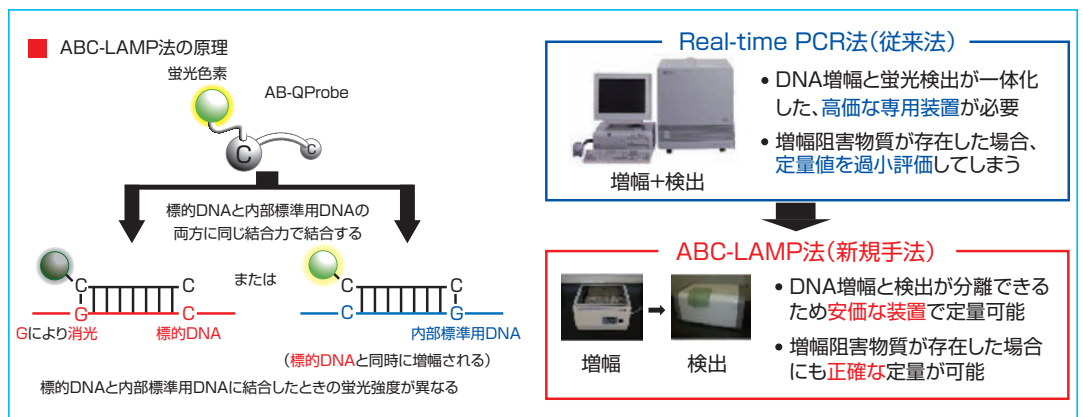
### 簡便・正確・低コストのDNA定量法

私たちは、蛍光消光現象を利用した新しいDNA定量技術の開発に取り組み、グアニン(G)塩基との特異的な相互作用により蛍光が消光する色素で標識したプローブ(Alternately Binding Quenching Probe: AB-QProbe)と内部標準用DNAを用いる方法を見出しました。この方法では、遺伝子増幅反応の前後に蛍光を測定するだけで標的DNAを定量できます。また、蛍光をPCRの1サイクルごとに測定する必要がない、ゲル電気泳動が不要、高価な専用装置が不要、DNA増幅反応を阻害する物質の影響を受けにくく、正確な定量ができるとい

う特徴があります。この方法を等温DNA増幅法であるLAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification)法と組み合わせて、簡便・正確・低コストのDNA定量法(Alternately Binding Probe Competitive-LAMP: ABC-LAMP)を開発しました<sup>[1]</sup>。

AB-QProbeの末端には蛍光標識されたシトシン(C)塩基があり、標的DNAのG塩基に出会うと消光します。一方、内部標準用DNAは、LAMP法で標的DNAと同じ効率で増幅されますが、その増幅産物によってプローブの蛍光が消光されないように、相補部分(プローブが結合する部分)の末端をG塩基ではなくC塩基としたDNA鎖を人工合成したものです。AB-QProbeは標的DNAと内部標準用DNA双方の増幅産物に同じ結合力で競合的に結合しますが、どちらに結合したかによって蛍光の強さが変わります。この蛍光強度の違いを利用して、LAMP反応前後に蛍光を測定して標的DNAの定量を行います。

この技術でアンモニア酸化細菌のアンモニア酸化酵素をコードする遺伝子の一部を定量した結果、従来法と同等の精度と再現性を持つことがわかりました。また、従来法では、DNA増幅反応を阻害するフミン酸や尿素の濃度が増加するにつれて真値よりも低い値を示しましたが、私たちの技術ではフミン酸と尿素の濃度のいずれにも依存せず正確に標的DNAを定量することができました。



ABC-LAMP法の概要と従来法との比較