

CycleavePCR 法を用いたラット系統の遺伝子判定について

○中西 聡、庫本高志

京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設

CycleavePCR 法は、サイクリングプローブ法を使用したリアルタイム PCR で、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせにより、遺伝子断片の一塩基置換 (SNP) の検出を行うことが可能である。プローブは RNA 部分を挟んで 3'末端に蛍光物質、5'末端にクエンチャーが標識されており、SNP サイトあるいはその 3'側隣とハイブリダイズする塩基を RNA に設定する。プローブが PCR 増幅産物中の相補的な配列と結合しプローブの RNA とターゲットの DNA がハイブリットを形成すると RNA の 5'側が RNaseH により切断され、プローブが遊離し蛍光を発する。一方、ミスマッチのため RNA-DNA ハイブリッドが形成されなければ、RNaseH により切断されないため、蛍光を発しない。この蛍光の有無をリアルタイム PCR で検出することで、SNP を正確に検出できる。今回、CycleavePCR 法によりミュータントラットの点変異の遺伝子判定を試みた。

【材料と方法】

家族性大腸腺腫症の原因遺伝子 Adenomatous polyposis coli(*Apc*)にナンセンス変異 (S2523X) を持つ KAD ラットを用いた。*Apc* 遺伝子の点変異を含んだターゲット領域を増幅するプライマーとサイクリングプローブの設計・合成は、タカラバイオの Double-Dye プローブ合成サービスに依頼した。テンプレートは、PCR ダイレクトシーケンスにより遺伝子型が確定している個体のゲノム DNA を用いた。サイクリングプローブの検出には、Thermal Cycler Dice® Real Time System を用いた。

【結果と考察】

KAD ラットのミュータントホモ型、ヘテロ型、野生型を明確に判別することができた。その結果は、ダイレクトシーケンス法より得られた結果と一致した。遺伝子判定に要する時間は、PCR を行っている時間と等しく、極めて短時間に遺伝子判定を行う事ができた。これらの結果から、CycleavePCR 法は、ラット系統の点変異の遺伝子判定において非常に有用な方法であると考えられた。