

等温遺伝子増幅法におけるマルチプレックス検出に向けたグアニン四重鎖結合性蛍光色素の検討

(日大院総合基) ○藤田 博仁・田村 美雪・栞原 正靖

Guanine-quadruplex binding fluorescent dyes for multiplex detection in isothermal gene amplifications (*Graduate School of Integrated Basic Science, Nihon University*) ○Hiroto Fujita, Miyuki Tamura, Masayasu Kuwahara

To date, rolling circle amplification (RCA) methods using molecular beacons (MBs) have been developed for simultaneous detections of plural targets. However, in the system using MBs, the requirement of high probe concentrations tends to lead to high background signals. Meanwhile, methods for detecting RCA products without using MB have also been reported (e.g., fluorescence detection of RCA products containing multiple guanine quadruplexes (G4s) with zinc (II)-protoporphyrin IX (ZnPPIX)¹, and fluorescence detection of RCA products containing multiple DFHBI-binding aptamers with DFHBI²).

Previously, we modified RCA and developed a simple gene detection method using isothermal signal amplifications³. In this method, thioflavin T derivative specifically binds to multiple G4s contained in the RCA products and emits fluorescence, and thereby the target can be detected. In this study, we further investigated G4 binding fluorescent dyes in order to enable multiple target detections based on the principle of isothermal signal amplifications.

Keywords : *Isothermal Amplification; Guanine-quadruplex; Rolling Circle Amplification; Multiplex Detection*

これまでに、複数の標的を同時に検出する Rolling Circle Amplification (RCA) 法として、モレキュラービーコン (MB) を用いる方法が開発されている。しかし、MB を用いる系では比較的高い濃度でそれを使用する必要があり、バックグラウンドが高くなる傾向がある。一方、MB を使用せずに RCA 産物を検出する方法も報告されている。例えば、グアニン四重鎖 (G4) を多数含む RCA 産物を zinc(II)-protoporphyrin IX (ZnPPIX) で蛍光検出する方法や、DFHBI アプタマーを多数含む RCA 産物を DFHBI で蛍光検出する方法などである。

これまでに我々は、RCA を改変した等温シグナル増幅による遺伝子検出法を開発した。この方法では、生成鎖に多数含まれる G4 とチオフラビン T 誘導体とが特異的に結合し、蛍光発光することで検出を行う。本研究では、当該等温シグナル増幅原理を用いた簡便遺伝子検出法において、多重検出を可能にするために、G4 結合性蛍光色素の検討を行った。

- 1) L. Q. Liu, F. Yin, Y. Lu, X. L. Yan, C. C. Wu, X. Li, C. Li *Nanomedicine*. **2021**, 32, 102339.
- 2) X. Tang, R. Deng, Y. Sun, X. Ren, M. Zhou, J. Li *Anal. Chem.* **2018**, 90, 10001.
- 3) H. Fujita, Y. Kataoka, S. Tobita, M. Kuwahara, N. Sugimoto *Anal. Chem.* **2016**, 88, 7173.

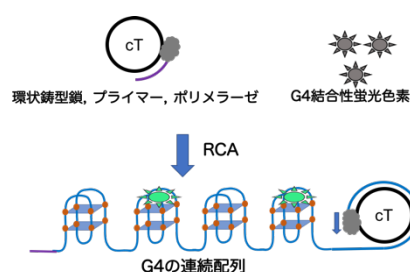


図1 RCAによるG4生成と特異的蛍光染色