

マラカイトグリーン結合性 DNA アプタマーのセレクションおよび蛍光特性評価

(日大院総合基) ○田村 美雪・藤田 博仁・栗原 正靖

Selection of malachite green-binding DNA aptamers and their fluorescence properties
(Graduate School of Integrated Basic Science, Nihon University) ○Miyuki Tamura, Hiroto Fujita, Masayasu Kuwahara

Although thioflavin T (ThT) as a free form emits little fluorescence in solution, it emits blue fluorescence (ca. 445~492 nm) with high intensity when bound to targets such as amyloid fibrils and guanine quadruplex (G4). Therefore, it has been used for fluorescence imaging. So far, we have synthesized various ThT derivatives and used them as fluorescent probes to develop detection systems for targets (e.g., genes, cortisol, etc.)^{1,2}. Whereas, malachite green (MG) is known to bind to RNA and DNA (aptamers and G4s) with particular sequences and emit red fluorescence (ca. 650 nm)³. Therefore, it is expected to construct a system that can simultaneously detect two types of targets, if MG can be used together with ThT derivatives. However, MG have insufficient water solubility and low emission intensity, so improvement by its derivatization is necessary. In this study, we newly synthesized a MG derivative with improved water solubility and attempted to acquire MG-binding DNA aptamers by SELEX methods. In addition, we performed the conventional selection using Sepharose gels, and thereafter screening using a cell sorter. Furthermore, we investigated the fluorescence properties of the MG derivative for obtained DNA aptamer candidates.

Keywords : Malachite green; Fluorescence dye; SELEX method; Fluorescence imaging; Biomarker

チオフラビン T (ThT) は、溶液中に遊離して存在するとき、ほとんど蛍光を発しないが、アミロイド線維やグアニン四重鎖 (G4) 等の標的に結合すると非常に強い青色蛍光 (約 445~492 nm) を発する。そのため、蛍光イメージング等に利用されている。これまでに我々は、種々の ThT 誘導体を合成し、それらを蛍光プローブとして用いることで、遺伝子やコルチゾール等の検出系を開発している。一方、マラカイトグリーン (MG) は特定の配列をもつ RNA や DNA (アプタマーや G4) と結合し、赤色蛍光 (約 650nm) を発することが知られている。よって、MG を ThT 誘導体と共に用いることができれば、2種類の標的を同時に検出する系の構築が期待できる。しかし、MG は水溶性や発光強度が十分でないため、誘導化による改良が必要である。そこで本研究では、水溶性を向上させた MG 誘導体を新たに合成し、それを標的とした SELEX 法により MG 結合性 DNA アプタマーの取得を検討した。通常セファロース・ゲルを用いたセレクションに加え、セルソーターを用いたスクリーニングを行った。さらに、得られた DNA アプタマー候補に対する MG 誘導体の蛍光特性を評価した。

- 1) Fujita H et al. *Anal Chem.* **2016**, 88, 7137-7144.
- 2) Kataoka Y et al. *Biochemistry* **2019**, 58, 493-498.
- 3) Babendure JR et al. *J Am Chem Soc.* **2003**, 125, 14716-14717.