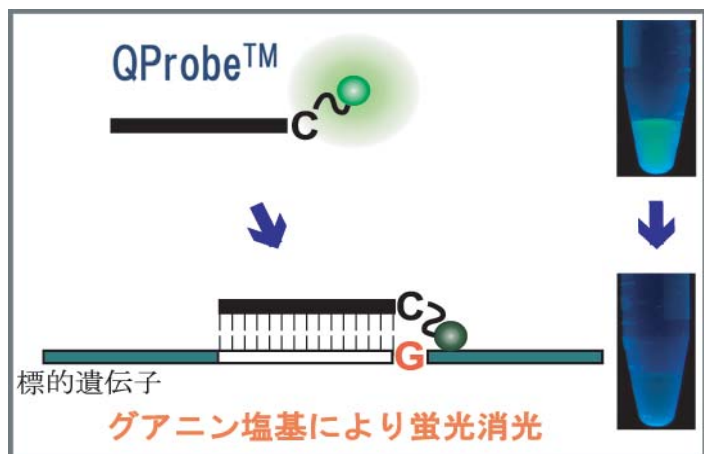
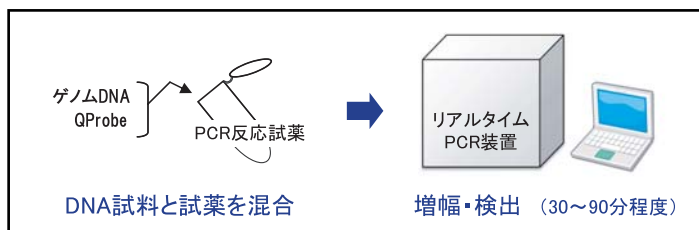


遺伝子検出技術 QP法



Kurata et al., *Nucleic Acids Research*, 2001, Vol. 29, No. 6 e34



◎ 増幅・検出が1ステップ

- 作業は試薬類とサンプルを混合する1工程のみ
- システムの低価格化・自動化が容易

◎ 高精度

- 増幅後の容器開封が不要、増幅産物のコンタミを防止
- プローブ法なので、極めて高い検出特異性
- 臨床検査に耐えられる十分な精度

◎ 低コスト

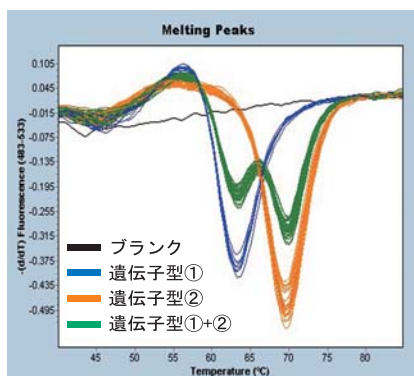
- 標識蛍光色素は1種類、1プローブで1遺伝子を検出
- 反応条件構築が容易

◎ 複数遺伝子の同時検出に対応

- 波長の異なる4種類の蛍光色素を利用したマルチカラー検出が可能

SNPタイピング

- SNP、挿入/欠損多型の判別が1ステップ
- 判定しやすい明瞭な結果
- 複数SNPの同時タイピングが可能

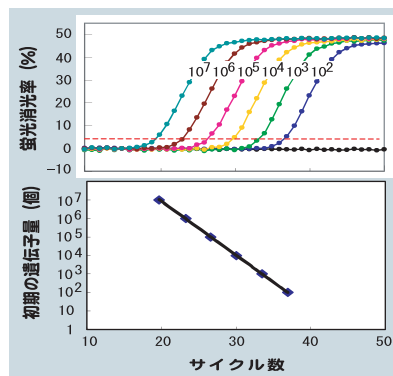


■ 応用例

- ・薬剤感受性の体質検査
- ・生活習慣病の予知検査
- ・作物/家畜のDNAマーカー選抜育種
- ・DNA品種識別

リアルタイム定量PCR

- 低コスト、高精度なリアルタイムPCR
- 配列設計や条件構築が簡単、迅速
- 解離曲線解析で非特異的産物を識別



■ 応用例

- ・病原細菌、ウイルスの検出/定量
- ・環境中の有用微生物モニタリング
- ・遺伝子発現解析
- ・遺伝子組換え作物の検出/定量

QP法による SNPタイピング 原理

SNPタイピングに用いるQProbe™は、SNP部位が中央付近にあり、片方の遺伝子型と完全に相補的な配列にしています（図1）。ゲノムDNAを抽出・精製し、目的SNP部位を含む領域をPCRなどで増幅後に温度を下げると、QProbe™がSNP部位とハイブリッドを形成し、相補鎖のグアニンの作用で蛍光が減少します。

次に、温度を徐々に上げると、QProbe™が解離して蛍光が増加します。QProbe™と相補鎖の塩基配列にミスマッチがあると、ハイブリッド形成力が弱いため低い温度で解離し、蛍光の増加も低い温度で起こります。このように蛍光が増加する温度から、一塩基の違いを判別することができます（図2）。

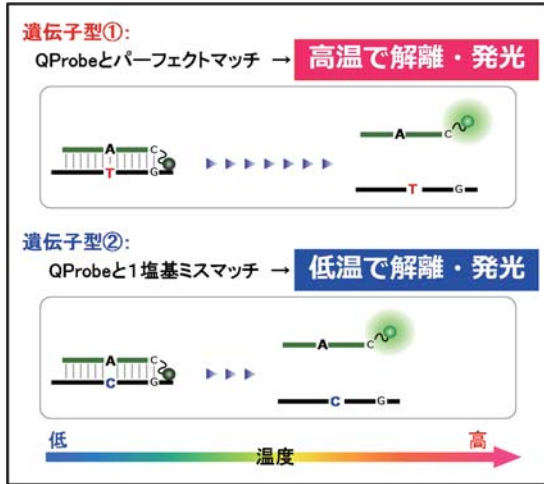


図1 QP法によるSNPタイピングの原理
QProbe™が目的遺伝子から離れて蛍光が増加する温度の違いから遺伝子型を判定します。

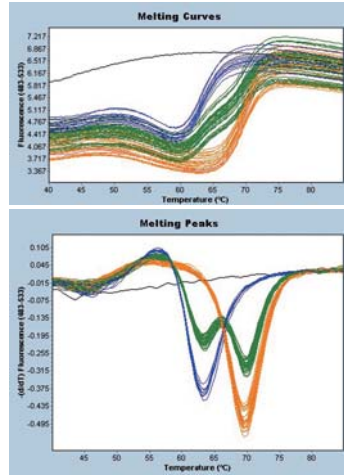


図2 QP法によるSNPタイピング例
上：解離曲線（蛍光値の変化） 下：解離ピーク（解離曲線データの微分値）
解離ピークの頂点温度が、QProbe™が目的遺伝子から離れる温度を示しています。

QP法による リアルタイム定量PCR 原理

リアルタイムPCRにおいて、標的遺伝子の検出にQProbe™(Quenching Primer)または,QPrimer™(Quenching Primer)を使用します。プローブが設計できる場合は、QProbe™-PCR、プローブが設計出来ない場合（ユニバーサルプライマーなど）はQPrimer™-PCR、と用途に応じて選択できます。

QProbe™-PCR法

QProbe™はアニーリング時にPCR増幅産物に結合し、蛍光が減少します。従ってPCR中アニーリング時の蛍光を測定すると、QProbe™の蛍光消光率はPCR増幅産物の増加に伴って増加し、PCR増幅の過程をモニタリングできます。

- ◎ 特異性が高い
プローブを使用することでプライマーダイマーなどの非特異的増幅産物は検出されないため、特異性・感度が高い。

QPrimer™-PCR

QPrimer™が消費されてPCR産物が増加するに伴って蛍光が消光するので、PCR産物の増幅過程をモニタリングできます。また、お手持ちのプライマーの5'末端がCでない場合でも、そのプライマーをQPrimer™-PCRに利用できます。プライマーの5'末端にCを1塩基追加して蛍光標識しておけば、PCR増幅によってそのCの相補位置にはGが取り込まれQPrimer™は消光します。（上図参照）。

- ◎ プローブ設計が不要
ユニバーサルプライマーを使用する場合などプローブの設計が困難な場合に便利。
- ◎ 増幅産物を多型解析に使用可能
生成したPCR増幅産物は末端が蛍光標識されているため、定量PCRを行った増幅産物をそのままT-RFLPなどの多型解析に使用可能。