

核酸合成用試薬

フルオレセインアミダイトと固相合成用支持担体

蛍光色素標識の核酸合成

- 核酸への蛍光標識には、さまざまな方法がありますが、溶液中の反応で標識して精製する操作を行うより、蛍光色素のアミダイトを用いれば、DNA/RNAの自動合成機での核酸合成により容易に標識核酸を得ることができます。
- 分子の中での環境の変化によって、蛍光色素の発光の強さの変化が生じますので、標的の受容体、タンパク質、核酸との結合や特異性を評価することに利用できます。
- 蛍光色素標識した核酸は、遺伝子解析、DNAシーケンシング、PCRなどの診断アッセイ、法医学的なDNA鑑定など、定性的および定量的にも様々なアプリケーションで使用されています。
- 蛍光検出アッセイは検出感度が高く、面倒な洗浄作業や分離の作業を伴わず、自動化装置も開発されています。
- 殆どの合成オリゴヌクレオチドは配列解析やPCRなどの増幅する実験用に設計されていますので、プローブは、5'末端を標識します。
- 蛍光色素標識された核酸を高収率で得るため、高効率でカップリングを行うことが重要です。そのため、高純度で高品質の蛍光色素のアミダイト、またはその固相合成用支持担体が必要です。

FAM 標識

FAM は、核酸の標識の中で最も一般的に使用されている蛍光色素です。ChemGenes では、5 または 6-FAM アミダイトと固相合成用支持担体を、図 1 に示すいろいろな長さのリンカーで販売しています。FAM アミダイト(CLP-9777, CLP-4282, CLP-9780, CLP-9789)を用いて、核酸の 5'末端に FAM を導入します。一方、FAM の固相合成用支持担体(N-9985-05 and N-9969-05)を用いれば、核酸の 3'末端に FAM 標識することができます

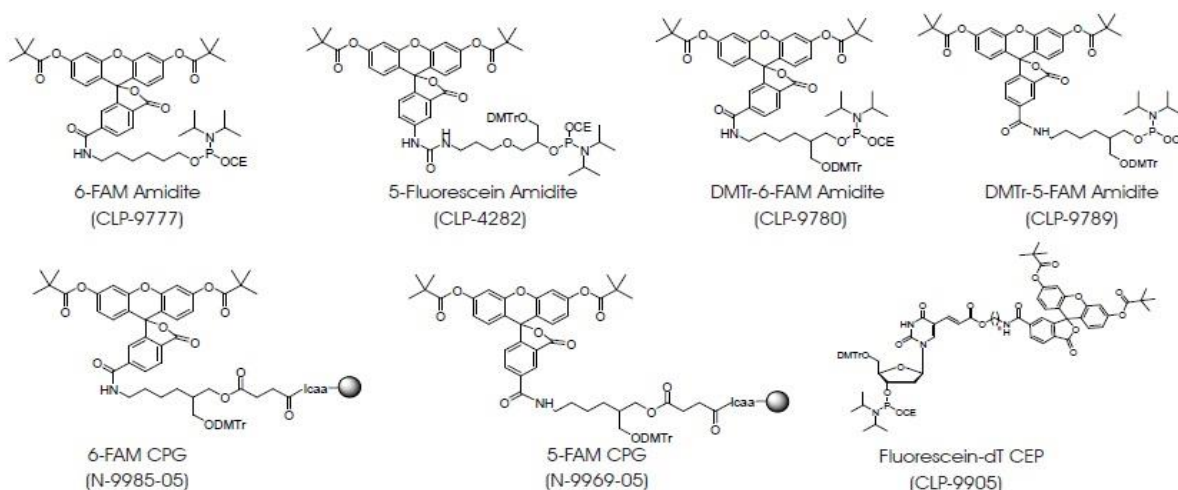


図 1 FAM の固相合成用支持担体と、フルオレセイン dT アミダイト

FAM のアプリケーション

- FAM は、最大の吸光度 λ 494 nm で、 λ 521 nm で発光します。
- 5'-FAM 修飾オリゴヌクレオチドは、リアルタイム PCR のためのダブル標識の蛍光プローブなど幅広く使われています¹。
- FAM は可視スペクトル領域でグリーンの蛍光を発生し、その蛍光は BHQ-1 色素によって効果的に消光されます
- フルオレセインは、DNA オリゴを標識して、*in vivo* ならびに *in vitro* での研究や様々な診断への応用のためのハイブリダイゼーションのプローブとして、または DNA や RNA とタンパク質との複合体の構造解析にも使われます。
- 5'末端をフルオレセインで標識したオリゴは、PCR やシーケンシングのプライマーとして使用します。
- 6-FAM 標識されたプライマーは、allele-specific なリアルタイム PCR による細菌の SNP ジェノタイピングに有用です²。

フルオレセイン-dT アミダイト

- フルオレセイン-dT は、最大の吸光度 λ 494 nm で、 λ 521 nm で発光します。
- フルオレセイン-dT は、スパーサーを介して 6-FAM (6-カルボキシルフルオレセイン) で誘導体化されたデオキシチミジンヌクレオチドです。(図 1 : CLP-9905)
- フルオレセイン-dT は、オリゴヌクレオチドの配列中の dT の部分に標識するために使用されます。
- フルオレセイン-dT は、FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer) のための DNA オリゴヌクレオチドプローブに有用です。
- 核酸の標識化して効率的に機能させるためには、消光剤と蛍光剤の距離を適切に設定する必要があります。フルオレセインは、一般的にはダーククエンチャー(BHQ-1)との組み合わせで用います。
- フルオレセイン-dT で内部標識した核酸は、蛍光標識した PCR 用のプライマーや、DNA シーケンシング用のプライマーとして使用することができます。

参考文献

1. Nazarenko, I. et. al. *Nucl. Acids Res.* **2002**, 30, e37.
2. Huygens, F. et. al. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, 44, 3712-3718.