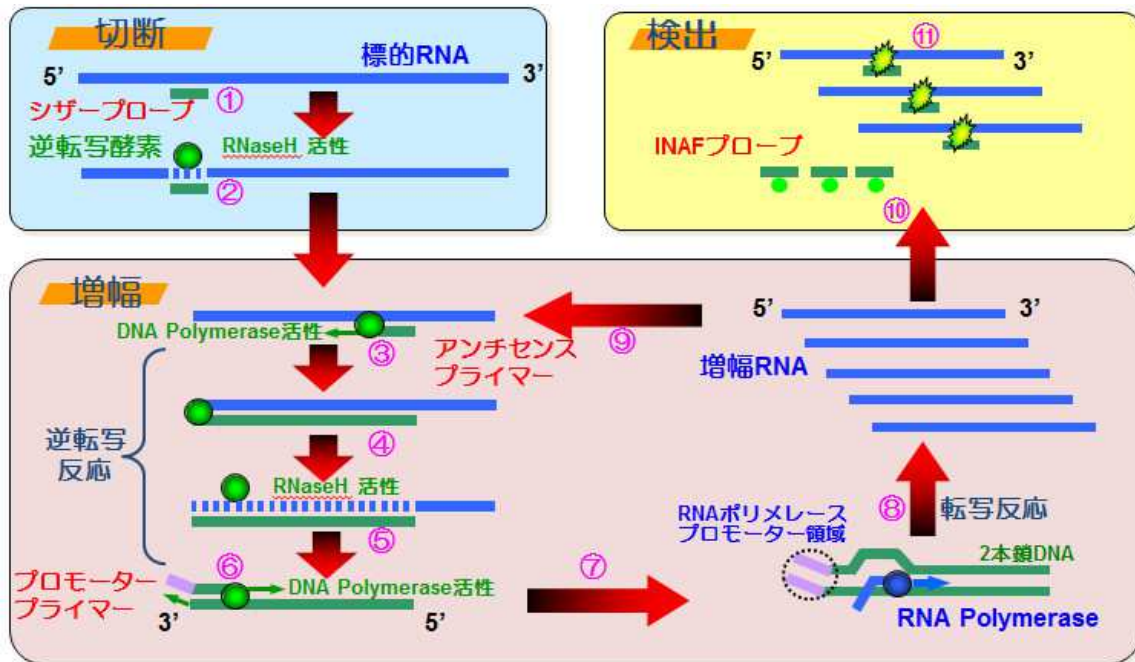


# TRC の原理

TRC 法について、遺伝子（RNA）増幅および検出方法についてご説明します。

## 1. 遺伝子増幅→検出のスキーム



- ① 標的 RNA の 5' 側に DNA オリゴマーであるシザープローブが結合します。
- ② AMV 逆転写酵素の RNaseH 活性で標的 RNA のシザープローブが結合した部分を分解します。
- ③ アンチセンスプライマーが結合します。
- ④ AMV 逆転写酵素の RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性により cDNA を合成します。
- ⑤ RNA と cDNA の 2 本鎖は RNaseH 活性により RNA 部分が分解します。 6
- ⑥ T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を持ったプロモータープライマーが結合します。
- ⑦ AMV 逆転写酵素の DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性により 2 本鎖 DNA を合成します。
- ⑧ T7 RNA ポリメラーゼがプロモーター領域を認識し、転写反応によって RNA を増幅します。
- ⑨ 増幅した RNA は最初に切断した RNA と同じ配列なので、再び同じ増幅系に入り RNA が蓄積していきます。
- ⑩ 増幅した RNA は検出系に入り、蛍光検出用プローブである「INAF プローブ」と結合します。
- ⑪ 標的核酸と相補結合を形成したもののみが蛍光増感し、これを検出します。

## 2. INAF プローブとその特徴

INAF プローブ : **I**ntercalation **A**ctivating **F**luorescence probe

図 1 : INAF プローブの構造

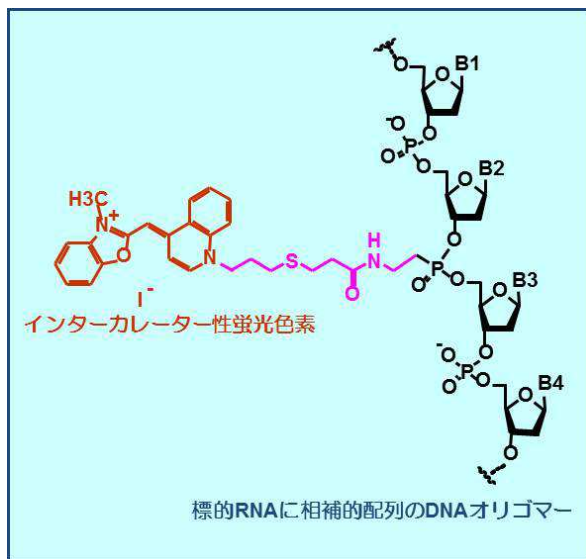
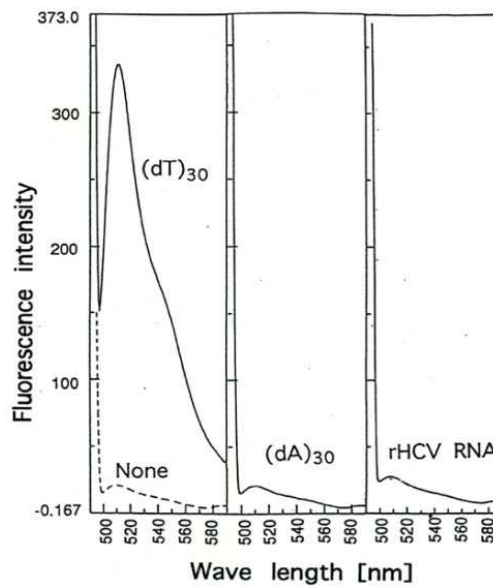


図 2 : ターゲット特異性



INAF プローブの構造は、検出したい標的 RNA に相補的な配列を持つ DNA オリゴマー（図 1 の黒色部分）にインターカレーター性蛍光色素（茶色部分）を、リンカー（桃色部分）を介して結合させたものです。

INAF プローブは標的とする RNA のみと結合し、蛍光が増加するため、標的 RNA を単離する必要がなく、ホモジニアス検出が可能となります。また、非特異的反応の影響も受けにくくなっています。

図 2 は、13mer の dA にインターカレーター性蛍光色素を結合させた INAF プローブを合成し、これに左から相補 DNA、非相補 DNA、非相補 RNA を加えて蛍光強度を測定した結果です。相補 DNA が存在する場合のみ、蛍光強度が顕著に増加していることがわかります。