**＜抄録用紙　記入例＞**

|  |  |
| --- | --- |
|  | コイ組換え体ゲノムにおけるソウギョ由来成長ホルモン遺伝子のコピー数定量法の開発  （明朝体、14ポイントで記入してください） |
| ○大原一郎、馬久地みゆき、尾島信彦、小林正裕、清水昭男  国立研究開発法人水産総合研究センター中央水産研究所  （明朝体・12ポイントで記入してください） |
| （明朝体・12ポイントで記入してください）  【目的】近年、中国において、ソウギョ由来の成長ホルモン（GH）遺伝子を導入したコイが開発されている。プロモーター情報が得られない場合、これら近縁種の組換え体では組み換えられた遺伝子のゲノムあたりコピー数を算出することが、組換え体であることを立証する手段のひとつとなる。そこで我々はコイ組換え体におけるソウギョGH遺伝子のゲノムあたりコピー数の定量法を開発することとした。特に今回は両種のわずかな塩基配列の違いを利用して、ソウギョGH特異的に組換え遺伝子のコピー数を算出できる方法を考案した。  【材料と方法】ソウギョGH遺伝子のExon-2内部にPCRプライマーを設計し、プライマーに挟まれる位置にTaqManプローブを設計した。PCRプライマーは、3’末端でソウギョGH遺伝子とはマッチするが、コイGH遺伝子とはミスマッチを起こす位置に設計した。このようにすることによって、コイの内在性GH遺伝子はPCR増幅されず、導入されたソウギョGH遺伝子由来のシグナルのみが検出されることになるので、内在性コイGH遺伝子の干渉を受けずに定量PCRが実行できる。ソウギョGH遺伝子断片（140 bp）は人工合成したものを用い、組換え体DNAの模擬試料として20 ngのコイゲノムDNAに様々な比でソウギョGH遺伝子断片を加えて用いた。定量PCRの装置として、Thermal Cycler Dice TP800（タカラバイオ社）を用いた。ゲノムあたりコピー数を求める際のレファレンスDNAには、コイのsGnRH (salmon-type gonadotropin releasing hormone) 遺伝子を用いた。  【結果】20 ngのコイDNAにゲノムあたり0.5コピーのソウギョGH遺伝子断片を加えて定量PCRを行ったところ、ゲノムあたり0.492±0.051コピーという実測値が得られた。片方の半数体のみ1コピーの組換え遺伝子が導入されている場合が理論的に最小の組換え体含有コピー数(0.5)となることから、当該方法はソウギョGH遺伝子組換えコイを検出する方法として有効であることが示された。コイゲノムあたり1.0コピー、2.0コピー、4.0コピーでも同様にｂｖ、コイゲノムに加えられたソウギョGH遺伝子を検出可能であった。 | |