

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-130006

(P2007-130006A)

(43) 公開日 平成19年5月31日(2007.5.31)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 3
	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 1 書面 (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願2005-356904 (P2005-356904)
 (22) 出願日 平成17年11月11日 (2005.11.11)

(71) 出願人 596077776
 渡邊 剛太郎
 山形県寒河江市大字柴橋 3 3 8 1
 (72) 発明者 渡邊 剛太郎
 山形県寒河江市大字柴橋 3 3 8 1 番地
 Fターム(参考) 4B024 AA20 CA05 CA09 HA14 HA19
 4B063 QA13 QQ42 QR32 QR55 QR62
 QS25 QS34 QX02

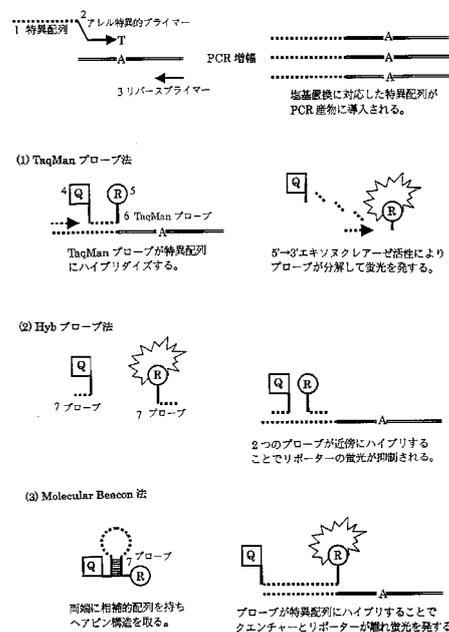
(54) 【発明の名称】 遺伝子の塩基置換のリアルタイム検査法

(57) 【要約】

【課題】 遺伝子の特定部位を識別するアレル特異的プライマーに組み込んだ特異配列と蛍光標識プローブとを反応させ、発した蛍光の種類によって遺伝子の塩基置換をリアルタイムに検査する方法。

【解決手段】 遺伝子の各塩基置換に対応したアレル特異的プライマーの5'側に特定の塩基配列をしたオリゴヌクレオチドを結合させ、同じ塩基配列を持つ蛍光標識プローブを混合してポリメラーゼ連鎖反応(PCR反応)を行い、蛍光標識プローブのFRET効果によって発した蛍光を検出することで、遺伝子の塩基置換をリアルタイムに検査する方法。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項1】

遺伝子の各塩基置換に対応したアレルト異的プライマーの5'側に特異な塩基配列を持つオリゴヌクレオチドを結合させ、同じ塩基配列を持つ蛍光標識プローブを混合してポリメラーゼ連鎖反応(PCR反応)を行い、蛍光標識プローブのFRET効果によって発した蛍光を検出することで、遺伝子の塩基置換をリアルタイムに検査する方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

10

【0001】

この発明は、特定のプローブ配列を組み込んだアレルト異的プライマーと、同じ塩基配列を持つ蛍光標識プローブとを混合物し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR反応)することで、FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)効果で発する蛍光を検出し、遺伝子の塩基置換をリアルタイムに検査する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

従来、2種類の蛍光物質の間に生じるFRET効果を用いて、遺伝子の塩基置換をリアルタイムに検出する方法は広範囲に実施されている。しかし、それらはいずれも、特殊な蛍光標識プローブ(Taq Manプローブ、Hybプローブ、Molecular Beacon)が塩基置換部位にハイブリダイズすることで発生する蛍光を検出するものであり、特定のプローブ配列を組み込んだアレルト異的プライマーを用いてPCR反応を行うものではなかった。

20

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

従来法には次のような欠点があった。

(イ) ハイブリダイゼーションプローブを用いて一塩基の違いを厳密に識別することは困難であり、置換している塩基の組み合わせによっては、非特異反応のため測定結果が不正確になる。

30

(ロ) ハイブリダイゼーションを基本とした方法では、反応強度がサイクル数に一次比例して増加するため、サイクル回数を多くするか、事前にPCR増幅した試料を用いないと明瞭な結果が得られ難い。

(ハ) 多数の一塩基置換を検出するには、検査する部位ごとに、各アレルト異的配列を持った2つの特殊な蛍光標識プローブ(Taq Manプローブ、Hybプローブ、Molecular Beacon)が必要であり、検査個所の2倍の数の蛍光標識プローブを用意しなくてはならない。

(ニ) ハイブリダイゼーション反応を良好に行うには、反応温度と時間を適正に設定する必要があり、検査個所が増加すると、その都度反応条件を検討しなければならないため煩雑である。

40

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、これらの欠点を除くために次のような手段で検査を行う。

遺伝子の塩基置換に対応した2種類のアレルト異的プライマーの、5'末端に本来の塩基配列とは異なる2種類の特殊な塩基配列を持つオリゴヌクレオチドを別々に結合させる。

それぞれが、この特殊な塩基配列の何れか一方と同じ配列を持ち、蛍光色素の異なる2種類の蛍光標識プローブ(Taq Manプローブ、Hybプローブ、Molecular Beacon)を合成し、2種類のアレルト異的プライマーおよびリバースプライマーと一緒に混合してPCR反応を行う。

50

アレル特異的プライマーとリバースプライマーから増幅されたPCR産物には特殊な塩基配列が導入され、この特異配列部位に、対応する蛍光標識プローブがハイブリダイズすることで蛍光を発する。

この蛍光を測定することで塩基置換を検出する。

【作用】

【0005】

本検査法では、対応するアレル特異的プライマーによって、塩基置換を厳密に識別することができる。アレル特異的PCR反応によって得られる増幅産物には、塩基置換の種類によって特定の配列が組み込まれるので、組み込む塩基配列を大きく変えることで、対応する蛍光標識プローブのみが特異的にハイブリダイズするように設定できる。

10

その際、組み込まれる塩基配列が大きく異なれば、蛍光標識プローブのハイブリダイズに厳密な反応条件（温度や時間）を必要としない。

さらに、蛍光標識プローブの塩基配列を、予め標識蛍光物質ごとに特徴的なものに決めておけば、検査に必要となるのは、これらの特徴的な塩基配列を組み込んだアレル特異的プライマーだけなので、多数の塩基置換部位を検査する場合でも、新たに蛍光標識プローブを用意する必要はない。

本検査法では、利用する蛍光物質の数は、必要に応じて増減できるため、多数の蛍光物質を用いることで、複数の多型部位を同時に安価で検査することができる。

【実施例】

【0006】

ヒトのグライコフォリンA遺伝子座にある点変異部位（エクソン2の塩基番号34番のグアニンとアデニンの塩基置換と、塩基番号35番のチミンとグアニンの置換部位）に対応した2つのアレル特異的プライマー（1、2）とリバースプライマー（3）を合成した。

20

各プライマーの塩基配列は、プライマー1；5' - a g a a g c a c t t g a t g c a c a a c a t g t G a c t T g a c c t G a A c t g a c G C A T C A A G T A C C A C T G G T - 3'、プライマー2；5' - a g a a g c a c t t g a t g c a c a a t g c a c t g c t g a t g a c G a c T c a g A G C A T T A A G T A C C A C T G A G - 3'、プライマー3；5' - T c A A a t G G G T T A C A T C A C A A G A A T G - 3'である（小文字は非相補的な塩基配列を表している）。

30

さらに、2つのアレル特異的プライマーの5'末端に付けた特異配列と同じ配列を持ち、別々の蛍光物質（TETとFAM）で標識した2種類のTaq Manプローブ（A、B）および共通するフォワードプライマー4を合成した。

各塩基配列は、Taq ManプローブA；5' TET - G A C T T G A C C T G A A C T G A C - T A M R A 3'、Taq ManプローブB；5' FAM - A C T G C T G A T G A C G A C T C A - T A M R A 3'、プライマー4；5' - A G A A G C A C T T G A T G C A C A A - 3'である。

プライマー1～4とTaq ManプローブA、Bを各20ピコモルずつ混合したPCR反応液を作り、血液型がM型、N型、MN型のヒトDNAを用いてリアルタイムPCR反応を行った。

40

遺伝子型が、M型ではTETの蛍光が検出され、N型ではFAMの蛍光が検出され、MN型ではTETとFAMの蛍光が検出された。

同様にして、ABO式血液型遺伝子、アメロゲニン遺伝子における塩基置換部位の検出を行った。

この方法で、アレル特異的プライマーによって識別できる遺伝子上のすべての塩基置換をリアルタイムに検査することができる。

また、複数の蛍光物質を用いることで、多数の塩基置換部位を同時に検査することができる。

さらに、蛍光物質ごとに対応する特異配列を決めて蛍光標識プローブを合成しておけば、検査部位を変えることで必要となるのは蛍光標識していないアレル特異的プライマーだ

50

けであり、新たに蛍光標識プローブを合成する必要はない。

【発明の効果】

【0007】

この発明によれば、様々な生物のDNAから複数の塩基置換部位を正確に、しかも安価で迅速に検査できるので、各個体の遺伝子の違いによる薬剤効果の違いや副作用の有無を知ることができるし、高い精度で個体識別を行うことが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本考案の説明図である。

【符号の説明】

- 1 特異配列
- 2 アレル特異的プライマー
- 3 リバースプライマー
- 4 Qはクエンチャー物質の略
- 5 Pはリポーター蛍光物質の略
- 6 TaqManプローブ
- 7 蛍光標識プローブ

10

【図1】

