

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5165936号
(P5165936)

(45) 発行日 平成25年3月21日(2013.3.21)

(24) 登録日 平成24年12月28日(2012.12.28)

(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A F
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A

請求項の数 7 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2007-162155 (P2007-162155)	(73) 特許権者	000004064
(22) 出願日	平成19年6月20日 (2007.6.20)		日本碍子株式会社
(65) 公開番号	特開2009-24 (P2009-24A)		愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号
(43) 公開日	平成21年1月8日 (2009.1.8)	(74) 代理人	110000110
審査請求日	平成22年2月19日 (2010.2.19)		特許業務法人快友国際特許事務所
		(74) 代理人	100105728
			弁理士 中村 敦子
		(74) 代理人	100139480
			弁理士 日野 京子
		(72) 発明者	川瀬 三雄
			愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号
			日本碍子株式会社内
		(72) 発明者	山田 和成
			愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号
			日本碍子株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的核酸中の変異の検出方法及びアレイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

固相担体上に固定化されたキャプチャプローブを用いて標的核酸中の少なくとも一つの変異を検出する方法であって、

前記変異を構成する変異構成要素のそれぞれに関連付けられており、前記変異構成要素をそれぞれ含んだ特定部分配列に相補的な塩基配列を3'末端に有する第1のクエリ配列と、前記変異構成要素を識別するための標識物質又はキャプチャプローブに関する識別情報を含む識別情報用タグ配列とを有する2種類以上の第1のプローブと、前記特定部分配列に隣接する部分配列に相補的な塩基配列を5'末端に有する第2のクエリ配列と、前記第1のプローブが保持する前記識別情報に基づいて前記固相担体上で前記一つの変異構成要素を検出するためのキャプチャプローブ又は標識物質に関する検出情報を含む検出情報用タグ配列とを有する1種類又は2種類以上の第2のプローブとを準備し、これらのプローブと前記標的核酸とをハイブリダイズ可能に接触させる第1の接触工程と、

前記標的核酸にハイブリダイズした前記第1のプローブと前記第2のプローブとを連結して連結分子を取得する連結工程と、

前記連結分子が備える前記識別情報用タグ配列又は検出情報用タグ配列を用いて前記連結分子を所定の標識物質で標識して標識済み連結分子を取得する標識工程と、

前記識別情報及び前記検出情報に基づいて、前記固相担体上で前記キャプチャプローブと前記標識済み連結分子とをハイブリダイズ可能に接触させる第2の接触工程と、

ハイブリダイズ後の前記固相担体上において検出される前記識別情報及び前記検出情報

に基づく前記所定の標識物質のシグナル強度情報を取得するシグナル強度情報取得工程と、

前記シグナル強度情報に基づいて前記標的核酸中の前記変異を検出する工程と、
を備え、

前記第1のプロープが、さらに前記変異に近接又は隣接して存在する可能性のある他の変異を構成する他の変異構成要素のそれぞれにも関連付けられており、前記変異構成要素と前記他の変異構成要素を組み合わせた前記特定部分配列に相補的である前記第1のクエリ配列の種類に応じて準備される、及び/又は、

前記第2のプロープが、前記変異に近接又は隣接して存在する可能性のある他の変異を構成する他の変異構成要素のそれぞれに関連付けられており、前記他の変異構成要素を組み合わせた前記部分配列に相補的である前記第2のクエリ配列の種類に応じて準備され、

前記識別情報は、前記変異構成要素を識別するために前記変異構成要素にそれぞれ関連付けられた所定の標識物質を前記連結分子に付加するための配列情報を含み、

前記検出情報は、前記標識済み連結分子を共通の前記キャプチャープロープのキャプチャー配列にハイブリダイズさせるための配列情報を含む、検出方法。

【請求項2】

前記識別情報は、前記変異構成要素を識別するために前記変異構成要素に関連付けられた前記キャプチャープロープのキャプチャー配列に前記標識済み分子をハイブリダイズさせるための配列情報を含み、

前記検出情報は、前記連結分子に共通の所定の標識物質を付加するための配列情報を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記変異及び前記他の変異のうちの少なくとも一つを含んだ複数の変異を検出対象とし、

前記他の変異を構成する他の変異構成要素のそれぞれに関連付けられており、これらの他の変異構成要素の一つを含んだ他の特定部分配列に相補的なクエリ配列であって前記他の変異構成要素に相補的な塩基配列を3'末端に有する他の第1のクエリ配列と、前記他の変異の一つの前記他の変異構成要素を識別するための標識物質又はキャプチャープロープに関する他の識別情報を含む他の識別情報用タグ配列と、をそれぞれ有する2種類以上の他の第1のプロープと、

前記他の特定部分配列に隣接する他の部分配列に相補的な塩基配列を5'末端に有する他の第2のクエリ配列と、前記他の第1のプロープが保持する前記他の識別情報に基づいて前記固相担体上で一つの前記他の変異構成要素を検出するためのキャプチャープロープ又は標識物質に関する他の検出情報を含む他の検出情報用タグ配列と、をそれぞれ有する1種類又は2種類以上の他の第2のプロープと、を準備し、

これらの他のプロープと前記標的核酸とをハイブリダイズ可能に接触させる第1の接触工程と、

前記標的核酸にハイブリダイズした前記他の第1のプロープと前記他の第2のプロープとを連結して他の連結分子を取得する連結工程と、

前記他の連結分子が備える前記他の識別情報用タグ配列又は前記他の検出情報用タグ配列を用いて前記他の連結分子を所定の標識物質で標識して他の標識済み連結分子を取得する標識工程と、

前記他の識別情報及び前記他の検出情報に基づいて前記固相担体上で前記他のキャプチャープロープと前記他の標識済み連結分子とをハイブリダイズ可能に接触させる第2の接触工程と、

ハイブリダイズ後の前記固相担体上において検出される前記他の識別情報及び前記他の検出情報に基づく前記標識物質の他のシグナル強度情報を取得するシグナル強度情報取得工程と、

前記他のシグナル強度情報に基づいて前記標的核酸中の前記他の変異を検出する工程と、

10

20

30

40

50

を備える、

前記他の第1のプローブが、さらに前記変異の変異構成要素のそれぞれにも関連付けられており、前記変異構成要素と前記他の変異構成要素を組み合わせた前記他の特定部分配列に相補的である前記他の第1のクエリ配列の種類に応じて準備される、及び/又は、

前記他の第2のプローブが、前記変異を構成する変異構成要素のそれぞれに関連付けられており、前記変異構成要素を組み合わせた前記他の部分配列に相補的である前記他の第2のクエリ配列の種類に応じて準備され、

前記他の識別情報は、前記他の変異構成要素を識別するために前記他の変異構成要素にそれぞれ関連付けられた所定のほかの標識物質を前記他の連結分子に付加するための他の配列情報を含み、

前記他の検出情報は、前記他の標識済み連結分子を共通の前記他のキャプチャープローブのキャプチャー配列にハイブリダイズさせるための他の配列情報を含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記第1のプローブ、前記第2のプローブ、前記他の第1のプローブ及び前記他の第2のプローブにつき、前記第1の接触工程、前記連結工程、前記標識工程、前記第2の接触工程、前記シグナル強度情報取得工程及び検出工程を前記固相担体上において同時に実施する、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記固相担体は、前記標的核酸について用いる複数の前記キャプチャープローブがその融解温度に基づく順序で配列された配列状態を備えるアレイである、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

前記変異と前記他の変異との間の塩基数は30塩基以下である、請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

固相担体上に固定化されたキャプチャープローブを用いて標的核酸中の少なくとも一つの変異を検出するのに用いるプローブセットであって、

前記変異を構成する変異構成要素のそれぞれに関連付けられており、これらの変異構成要素の一つを含んだ特定部分配列に相補的なクエリ配列であって前記変異構成要素に相補的な塩基配列を3'末端に有する第1のクエリ配列と、前記変異の前記一つの変異構成要素の識別するための標識物質又はキャプチャープローブに関する識別情報を含む識別情報用タグ配列と、をそれぞれ有する2種類以上の第1のプローブと、

前記標的核酸中の前記特定部分配列に隣接する部分配列に相補的な塩基配列を5'末端に有する第2のクエリ配列と、前記第1のプローブが保持する前記識別情報に基づいて前記固相担体上で前記一つの変異構成要素を検出するためのキャプチャープローブ又は標識物質に関する検出情報を含む検出情報用タグ配列と、

をそれぞれ有する1種類又は2種類以上の第2のプローブと、
を備え、

前記第1のプローブが、さらに前記変異に近接又は隣接して存在する可能性のある他の変異を構成する他の変異構成要素のそれぞれにも関連付けられており、前記変異構成要素と前記他の変異構成要素を組み合わせた前記特定部分配列に相補的である前記第1のクエリ配列の種類に応じて準備される、及び/又は、

前記第2のプローブが、前記変異に近接又は隣接して存在する可能性のある他の変異を構成する他の変異構成要素のそれぞれに関連付けられており、前記他の変異構成要素を組み合わせた前記部分配列に相補的である前記第2のクエリ配列の種類に応じて準備され、

前記識別情報は、前記変異構成要素を識別するために前記変異構成要素にそれぞれ関連付けられた所定の標識物質を前記連結分子に付加するための配列情報を含み、

前記検出情報は、前記標識済み連結分子を共通の前記キャプチャープローブのキャプチャー配列にハイブリダイズさせるための配列情報を含む、プローブセット。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標的核酸中の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms) を含む遺伝子上の変異を検出する技術に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトなどにおけるSNPを含む遺伝子変異は体質や遺伝病のみならず、特定疾患についての罹患率、疾患診断、治療予後、薬剤や治療の選択等にも関連していることがわかっている。SNPや遺伝子変異は、通常、複数個が関連しているとともに、個別化医療の促進のためには、できるだけ多くのSNPや変異を網羅的に検出又は定量することが求められている。

10

【0003】

そこで、SNP等を効率的に検出又は定量する方法として、DNAコンピュータ技術を利用した方法が提案されている(非特許文献1)。この方法では、図7に示すように、標識用タグ配列とSNPの特定塩基を含む特定部分配列に相補的なクエリ配列とを有する2種類の5'クエリプローブと、前記特定部分配列に隣接する共通部分配列に相補的なクエリ配列とキャプチャーに相補的な識別用タグ配列とを有する一つの3'クエリプローブとを用いる。2種類の5'クエリプローブの各標識用タグ配列1、2は、それぞれのクエリ配列を区別可能に、例えば、Cy3とCy5等の異なる標識物質で標識可能に形成されている。

20

【0004】

この方法は、これらのプローブと標的核酸とのハイブリダイゼーション反応及びライゲーション反応によって、5'クエリプローブと3'クエリプローブとを連結させる(エンコード)。次いで、得られた連結分子の標識用タグ配列を利用してPCRでラベリングする。こうした連結及びラベリングにより、SNPの特定塩基に関連付けた標識物質を備え、かつ一種類の識別用タグ配列を備える連結分子を得る。さらに、ラベリングした連結分子を識別用タグ配列に相補的なキャプチャープローブが固定化されたアレイで検出するというものである。

30

【0005】

この方法では、2種類の異なる標識物質を有する連結分子が識別用タグ配列を介して一つのキャプチャープローブにハイブリダイズしたときの、それぞれの標識物質に基づくシグナル強度のプロットに基づいてSNPのタイプ(2種類のホモと1種類のヘテロ)を検出する。

【非特許文献1】Analytical Biochemistry364(2007)78-85

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記非特許文献1に記載の方法は、標的核酸中の特定部分配列に応じたキャプチャープローブを固定化した固相担体を準備することなく、特定塩基を含む部分配列とは無関係に設定した塩基配列を有するキャプチャープローブを固定化したユニバーサルな固相担体を利用できるという利点がある。また、SNPを構成する2種類の塩基置換を2種類の標識物質を用いて一つのキャプチャープローブで検出するため、網羅的に多数のSNPを検出できるという利点もある。

40

【0007】

しかしながら、一つの標的核酸中において検出しようとする変異の近傍に他の変異がある場合、こうした他の変異の存在により、検出対象たる変異の検出ができなくなるおそれがある。すなわち、上記方法では、通常、検出対象たる特定塩基を5'クエリプローブの3'末端に配置するが、特定塩基の5'末端側に他の変異がある場合には、この変異の存

50

在により、クエリ配列の特定部分配列にハイブリダイゼーション効率が変化してしまう。一方、特定塩基の3'末端側に他の変異があった場合には、この変異の存在により3'クエリプローブのクエリ配列が共通ではなくなり、5'クエリプローブと同様、ハイブリダイゼーション効率が変化してしまう。このようなハイブリダイゼーション効率の変化により、標的核酸中の特定塩基の存在比に基づいた連結分子の取得が困難になってしまい、結果として、多型の検出が不可能になってしまう。

【0008】

そこで、本発明は、標的核酸中において検出対象の変異の近傍の他の変異の存在に関わらず、検出対象たる変異を検出することができる変異の検出方法及びアレイを提供することを一つの目的とする。また、本発明は、標的核酸中において近接する二つの変異をそれぞれ検出することができる変異の検出方法及びアレイを提供することを他の一つの目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、標的核酸中の変異を検出するのにあたり、5'クエリプローブのクエリ配列や3'クエリプローブのクエリ配列について、検出対象となる変異以外の他の変異の構成変異要素に応じたバリエーションを備えさせる一方、検出対象となる変異の構成変異要素に応じて得られる連結分子を識別し検出することで、確実に検出対象たる変異を検出できることを見出し、本発明を完成した。すなわち、本発明によれば、以下の手段が提供される。

【0010】

本発明によれば、固相担体上に固定化されたキャプチャープローブを用いて標的核酸中の少なくとも一つの変異を検出する方法であって、前記変異を構成する変異構成要素のそれぞれに関連付けられ、これらの変異構成要素の一つを含んだ特定部分配列に相補的なクエリ配列であって前記変異構成要素に相補的な塩基を3'末端に有する第1のクエリ配列と、前記変異の前記一つの変異構成要素の識別するための標識物質又はキャプチャープローブに関する識別情報を含む識別情報用タグ配列と、をそれぞれ有する複数の第1のプローブと、前記標的核酸中の前記特定部分配列に隣接する部分配列に相補的な第2のクエリ配列と、前記第1のプローブが保持する前記識別情報に基づいて前記固相担体上で前記一つの変異構成要素を検出するためのキャプチャープローブ又は標識物質に関する検出情報を含む検出情報用タグ配列と、をそれぞれ有する第2のプローブと、を準備し、これらのプローブと前記標的核酸とをハイブリダイズ可能に接触させる第1の接触工程と、前記標的核酸にハイブリダイズした前記第1のプローブと前記第2のプローブとを連結して連結分子を取得する連結工程と、前記連結分子が備える前記識別情報用タグ配列又は検出情報用タグ配列を用いて前記連結分子を所定の標識物質で標識して標識済み連結分子を取得する標識工程と、前記識別情報及び前記検出情報に基づいて、前記固相担体上で前記キャプチャープローブと前記標識済み連結分子とをハイブリダイズ可能に接触させる第2の接触工程と、ハイブリダイズ後の前記固相担体上において検出される前記識別情報及び前記検出情報に基づく前記所定の標識物質のシグナル強度情報を取得するシグナル強度情報取得工程と、前記シグナル強度情報に基づいて前記標的核酸中の前記変異を検出する工程と、を備え、前記第1のプローブ及び/又は前記第2のプローブは、前記変異の変異構成要素と前記変異部位に近接又は隣接して存在する未検出の他の変異を構成する変異構成要素との組み合わせに基づいて、前記第1のプローブにおける特定部分配列に相補的な第1のクエリ配列及び/又は前記第2のプローブにおける前記部分配列に相補的な第2のクエリ配列を有する、方法が提供される。

【0011】

この発明は、前記識別情報は、前記変異構成要素を識別するために前記変異構成要素に関連付けられた所定の標識物質を前記連結分子に付加するための配列情報を含み、前記検出情報は、前記標識済み連結分子を共通の前記キャプチャープローブのキャプチャー配列にハイブリダイズさせるための配列情報を含んでいてもよい。また、前記識別情報は、前

10

20

30

40

50

記変異構成要素を識別するために前記変異構成要素に関連付けられた前記キャプチャープローブのキャプチャー配列に前記標識済み分子をハイブリダイズさせるための配列情報を含み、前記検出情報は、前記連結分子に共通の所定の標識物質を付加するための配列情報を含んでいてもよい。

【0012】

本発明の方法は、前記変異及び前記他の変異のうちの少なくとも一つを含んだ複数の変異を検出対象とし、前記他の変異を構成する変異構成要素のそれぞれに関連付けられ、これらの変異構成要素の一つを含んだ他の特定部分配列に相補的なクエリ配列であって前記変異構成要素に相補的な塩基を3'末端に有する他の第1のクエリ配列と、前記他の変異の前記一つの変異構成要素の識別するための標識物質又はキャプチャープローブに関する他の識別情報を含む他の識別情報用タグ配列と、をそれぞれ有する2種類以上の他の第1のプローブと、

10

前記他の特定部分配列に隣接する他の部分配列に相補的な他の第2のクエリ配列と、前記第1のプローブが保持する前記他の識別情報に基づいて前記固相担体上で前記一つの変異構成要素を検出するためのキャプチャープローブ又は標識物質に関する他の検出情報を含む他の検出情報用タグ配列と、をそれぞれ有する1種類又は2種類以上の他の第2のプローブと、

を準備し、

これらの他のプローブと前記標的核酸とをハイブリダイズ可能に接触させる第1の接触工程と、前記標的核酸にハイブリダイズした前記第1のプローブと前記第2のプローブとを連結して他の連結分子を取得する連結工程と、前記他の連結分子が備える前記他の識別情報用タグ配列又は前記他の検出情報用タグ配列を用いて前記他の連結分子を所定の標識物質で標識して他の標識済み連結分子を取得する標識工程と、前記他の識別情報及び前記他の検出情報に基づいて前記固相担体上で前記他のキャプチャープローブと前記他の標識済み連結分子とをハイブリダイズ可能に接触させる第2の接触工程と、ハイブリダイズ後の前記固相担体上において検出される前記他の識別情報及び前記他の検出情報に基づく前記標識物質の他のシグナル強度情報を取得するシグナル強度情報取得工程と、前記他のシグナル強度情報に基づいて前記標的核酸中の前記他の変異を検出する工程と、を備え、前記他の第1のプローブ及び/又は前記他の第2のプローブは、前記変異を構成する変異構成要素との組み合わせに基づいて、前記他の第1のプローブにおける他の特定部分配列に相補的な他の第1のクエリ配列及び/又は前記他の第2のプローブにおける他の前記部分配列に相補的な他の第2のクエリ配を有していてもよい。

20

30

【0013】

さらに、本発明方法は、前記第1のプローブ、前記第2のプローブ、前記他の第1のプローブ及び前記他の第2のプローブにつき、前記第1の接触工程、前記連結工程、前記標識工程、前記第2の接触工程、前記シグナル強度情報取得工程及び検出工程を前記固相担体上において同時に実施するものであってもよい。

【0014】

さらにまた、本発明方法は、前記固相担体は、前記標的核酸について用いる複数の前記キャプチャープローブがその融解温度に基づく順序で配列された配列状態を備えるアレイであってもよい。また、前記変異と前記他の変異との間の塩基数は30塩基以下であってもよい。

40

【0015】

本発明によれば、固相担体上に固定化されたキャプチャープローブを用いて標的核酸中の少なくとも一つの変異を検出するのに用いるプローブセットであって、前記変異を構成する変異構成要素のそれぞれに関連付けられこれらの変異構成要素の一つを含んだ特定部分配列に相補的なクエリ配列であって前記変異構成要素に相補的な塩基を3'末端に有するクエリ配列と、前記変異の前記一つの変異構成要素の識別するための標識物質又はキャプチャープローブに関する識別情報を含む識別情報用タグ配列と、をそれぞれ有する2種類以上の第1のプローブと、

50

前記標的核酸中の前記特定部分配列に隣接する部分配列に相補的な第2にクエリ配列と、前記第1のプローブが保持する前記識別情報に基づいて前記固相担体上で前記一つの変異構成要素を検出するためのキャプチャープローブ又は標識物質に関する検出情報を含む検出情報用タグ配列と、
をそれぞれ有する1種類又は2種類以上の第2のプローブと、
を備え、

前記第1のプローブ及び/又は前記第2のプローブは、前記変異の変異構成要素と前記変異部位に近接又は隣り合って存在する未検出の他の変異を構成する変異構成要素との組み合わせに基づいて、前記第1のプローブにおける特定部分配列に相補的な第1のクエリ配列及び/又は前記第2のプローブにおける前記部分配列に相補的な第2のクエリ配列を有する、プローブセットが提供される。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明は、標的核酸中の変異の検出方法及び標的核酸を検出するためのアレイに関する。本発明の標的核酸の検出方法によれば、上記のとおり第1のプローブと第2のプローブとを備えるため、検出しようとする変異の近傍に他の変異があった場合でも、その変異構成要素のバリエーションに応じた第1のクエリ配列及び第1のプローブを準備したり、変異構成要素のバリエーションに応じた第2のクエリ配列及び第2のプローブを準備することで、他の変異が存在していても検出しようとする特定の変異構成要素を含んでいれば確実に標的核酸中の特定部分配列又は部分配列にハイブリダイズさせることができる。このため、近傍に存在する他の変異の有無や変異構成要素に関わらず、確実に特定の変異構成要素に対応する連結分子を得ることができる。また、連結分子は、他の変異の変異構成要素ではなく、検出対象とする変異の一つの変異構成要素を固相担体上で識別し検出するための識別情報及び検出情報を保持しているため、クエリ配列のバリエーションに関わらず、正確に検出対象たる変異を検出することができる。

20

【0017】

この方法は、他の変異に関わらず検出対象たる変異を確実に検出することができるほか、近傍にある変異の双方を確実に検出することができる方法としても用いることができる。すなわち、他の変異についても検出対象たる変異と同様のコンセプトで第1のプローブ及び第2にプローブを準備し、同様の工程を実施することで他の変異を確実に検出できる。また、この方法は、こうした近接する2種類以上の変異を同時に検出することもできる。近接する2種類以上の変異を確実に及び/又は同時に検出できることは、多数のSNPをくまなく同時に検出するのに極めて都合がよい。特に、平板状のチップを用いたアレイにより多数のSNPをくまなく検出するのに都合がよい。なお、近傍の2種以上の変異の検出にあたっては、第1の接触工程から検出工程までの同時に(同一反応系内で)行ってもよいし、別々に行ってもよい。また、連結工程までの別個に行ってもその後同時に行ってもよい。

30

【0018】

以下、本発明の実施形態について適宜図面を参照しながら説明する。図1は、本発明の検出方法の原理を模式的に表す図である。

40

【0019】

なお、本明細書において「核酸」とは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、mRNA、全RNA、hnRNAおよび合成RNAを含む全てのDNAおよびRNA、並びにペプチド核酸、モルホリノ核酸、メチルフォスフォネート核酸およびS-オリゴ核酸などの人工合成核酸を含む。また、1本鎖であっても2本鎖であってもよい。また、本明細書において「標的核酸」とは、任意の配列を有する任意の核酸である。典型的には、体質、遺伝病、癌などの特定疾患についての発症、疾患診断、治療予後、薬剤や治療の選択などのヒトや非ヒト動物における遺伝子上の指標となる塩基配列を有する可能性のある核酸が挙げられる。指標としては、SNPなどの多型や先天的又は後天的変異が挙げられる。また、病原菌やウイルスなどの微生物由来の核酸なども標的核酸に含まれる。

50

【 0 0 2 0 】

標的核酸は、後述する試料又はその核酸画分をそのまま用いることもできるが、好ましくは、PCRによる増幅反応、より好ましくはマルチプレックスPCRによる増幅反応により、複数の標的核酸の全てが増幅された増幅産物を用いることが好ましい。

【 0 0 2 1 】

本明細書において「試料」とは、標的核酸を含む可能性のある試料をいう。試料としては、細胞、組織、血液、尿、唾液等が含まれ、核酸を含む任意の試料を用いることができる。こうした各種の試料からの核酸を含む画分は当業者であれば適宜従来技術を参照して取得することができる。

【 0 0 2 2 】

本明細書において「変異」とは、遺伝子上の1又は2以上の塩基の置換、欠失、挿入及び付加のいずれか1種以上を含む変化をいう。「変異」には、一塩基多型及びそれ以外の多型を含む広い意味で使用するものとする。「多型」としては、典型的には一塩基多型が挙げられる。本明細書において「変異構成要素」とは、一つの変異における正常型及び変異型を構成する塩基をいう。本明細書において「特定部分配列」とは、多型や変異を構成する少なくとも1個の変異構成要素(塩基)を含む配列をいう。したがって、例えばAがGに置換される一塩基多型にあつては、特定部分配列は2種類存在することになる。

【 0 0 2 3 】

[標的核酸中の変異を検出する方法]

本発明の検出方法は、第1のプローブと、第2のプローブと、標的核酸とを接触させる第1の接触工程と、第1のクエリプローブと第2のクエリプローブとの連結工程と、標識工程と、標識済み連結分子とキャプチャープローブとを接触させる第2の接触工程と、シグナル強度情報取得工程と、検出工程と、を備えている。本発明の検出方法は、1種又2種以上の標的核酸を適用対象とし、これらの標的核酸中の多型又は変異に関する特定部分配列を検出対象とする。以下、一種の標的核酸についての一連の工程を説明するが、以下の工程は、複数又は多数の標的核酸を同時に検出する場合にも適用される。また、以下の工程は、一つの標的核酸の複数の変異を検出する場合において、個々の変異に適用される。

【 0 0 2 4 】

図1には、本発明の検出方法の概要を示し、図2には、本発明に用いるプローブセットの例の概要を示し、図3には、本発明に用いるプローブセットの他の例の概要を示し、図4には、識別情報用タグ配列及びキャプチャープローブの融解温度についての説明図を示す。なお、図1～図3は、SNPの1塩基置換を検出するための検出方法及びプローブセットについての一例である。

【 0 0 2 5 】

第1の接触工程

第1の接触工程は、第1のプローブと第2のクエリプローブと標的核酸とをハイブリダイズ可能に接触させる工程である。まず、本工程で用いる第1のプローブと第2のプローブについて説明する。第1のプローブは、図1及び図2に示すように、第1のクエリ配列と識別情報用タグ配列とを備えることができる。

【 0 0 2 6 】

(第1のプローブ)

第1のプローブは、2種類以上準備される。第1のプローブは、第1のクエリ配列をその3'側に有しており、識別情報用タグ配列をその5'側に有することができる。

【 0 0 2 7 】

(第1のクエリ配列)

第1のプローブは、検出しようとする変異構成要素の種類の数に応じて準備される。第1のプローブは、存在する可能性のある変異構成要素の種類に応じた第1のクエリ配列を備えることができる。第1のクエリ配列は、標的核酸中の検出対象たる変異を構成する変異構成要素のそれぞれに関連付けられ、これらの変異構成要素(塩基)の一つを含んだ特

10

20

30

40

50

定部分配列に相補的なクエリ配列であって前記変異構成要素に相補的な塩基を3'末端に有することができる。

【0028】

第1のクエリ配列は、少なくとも、検出対象の変異の変異構成要素の種類に基づいてその数だけ準備される。一つの変異は少なくとも二つの変異構成要素から構成されるため、第1のクエリ配列は2種類以上準備され、この結果、第1のプロープも2種類以上準備される。標的核酸が検出対象変異の5'側に近接して又は隣接して他の変異を備えていない場合には、第1のクエリ配列は、検出対象変異の変異構成要素の種類に応じ、各変異構成要素を含む特定部分配列に相補的な配列であればよい。

【0029】

一方、検出対象変異の5'側に近接して未検出の他の変異を有する場合には、他の変異を構成する変異構成要素との組み合わせに基づいて、第1のクエリ配列が準備される。すなわち、検出対象の変異の変異構成要素の種類とこの他の変異の変異構成要素の種類からなる組み合わせに応じて準備される。この他の変異のさらに5'側に他の変異を備える場合には、この他の変異における変異構成要素の種類を組み合わせ得られる順列に応じてそれぞれ準備される。

【0030】

ここで、検出対象変異の5'側に近接して他の変異を備えるとは、例えば、検出対象変異と他の変異(1塩基)との間の塩基数が30塩基以下であることが好ましい。30塩基以下であると第1のプロープの第1のクエリ配列中に他の変異塩基が存在するおそれがあるためである。

【0031】

例えば、検出対象たる変異がSNPsであり変異構成要素が2種類存在し、5'側にある他の変異もSNPsであり変異構成要素が2種類存在する場合は、第1のクエリ配列は図2に示すように、3'末端に検出対象たる2種類の変異構成要素をそれぞれ備え、さらにその5'側において他の変異の2種類の変異構成要素に基づく合計4種類のバリエーションを有することになる。検出対象たる変異が正常塩基に対して3種類の塩基置換の可能性のある場合、変異構成要素が4種類存在することになり、このとき他の変異の変異構成要素が2種類存在する場合には、第1のクエリ配列は4種類の変異構成要素を3'末端にそれぞれ備え、さらにその5'側に他の変異の2種類の変異構成要素に基づく合計8種類のバリエーションを有することになる。

【0032】

第1のプロープは、こうした第1のクエリ配列をそれぞれ1種類有することができる。第1のクエリ配列は、検出対象たる変異又はこの変異に加えた他の変異の各変異構成要素の組み合わせ得られる各種の可能性ある特定部分配列と高い選択性でハイブリダイズ可能な程度に相補的に設定される。好ましくは完全に相補的に設定される。第1のクエリ配列は、プロープ3'末端を構成するように配置されることが好ましく、例えば、図1及び図2に示すように、変異構成要素に対応する塩基が、そのまま3'末端を形成していることが好ましい。変異構成要素に対応する塩基が3'末端を構成することで、高い選択性で標的核酸とハイブリダイズ及び連結が可能である。

【0033】

第1のクエリ配列は、例えば、連続一致長、Nearest-Neighbor法による融解温度予測、ハミング距離、二次構造予測の計算を行うことにより設計される。また、クエリ配列の長さは特に限定されないが、たとえば10塩基長以上であることが好ましい。

【0034】

(識別情報用タグ配列)

第1のクエリプロープは、検出しようとする変異の変異構成要素を識別するための標識物質又はキャプチャープロープに関する識別情報用タグ配列を有している。識別情報用タグ配列は、検出対象変異を構成する1つの変異構成要素の一つずつ設定される。

【0035】

10

20

30

40

50

識別情報用タグ配列の一つの形態は、図2に示すように、変異構成要素を異なる標識物質で検出する場合の識別情報を含んでいる。すなわち、この場合の識別情報は、変異構成要素を識別するために変異構成要素に関連付けられた所定の標識物質を後述する連結分子に付加するための配列情報（以下、標識物質関連配列情報ともいう。）を含んでいる。識別情報としてこうした配列情報を用いることで、結果として、一つの検出対象たる変異の変異構成要素をそれぞれ異なる標識物質に対応させて、同時に一つのキャプチャープローブで検出できるため、極めてハイスループットである。こうした配列情報としては、特に限定しないで標識物質の付加に都合のよい配列を適宜設定し又は公知の配列から選択して用いればよい。

【0036】

識別情報用タグ配列の一つの形態は、図3に示すように、変異構成要素を異なるキャプチャープローブにハイブリダイズさせて検出するための識別情報を含んでいる。この場合の識別情報は、変異構成要素を識別するために前記変異構成要素に関連付けられた所定のキャプチャープローブのキャプチャー配列に後述する標識済み連結分子をハイブリダイズさせるための配列情報（以下、キャプチャープローブ関連配列情報ともいう。）を含んでいる。識別情報としてこうした配列情報を用いることで、検出対象たる変異の変異構成要素を異なるキャプチャープローブで共通の標識物質により検出するため、異なる標識物質を用いることの誤差等を排除して精度の高い検出が可能となる。また、変異構成要素を異なるキャプチャープローブに割り当てるため、3種類以上の変異構成要素を内包する変異について好ましい。標識物質による識別は3種類以上の変異構成要素を内包する変異につ

【0037】

キャプチャープローブに関する識別情報用タグに用いる配列情報は、標的核酸の塩基配列、すなわち、特定部分配列と無関係に設定することができる。特定部分配列と無関係に設定することで、配列情報として、検出に都合のよい配列を用いることができるほか、所定の配列情報に予め対応させたキャプチャープローブを用いることでどのような特定部分配列であってもキャプチャープローブと識別情報用タグ配列との組み合わせによって検出することができる。

【0038】

また、キャプチャープローブ関連識別情報に用いられる配列と、後述する固相担体に固定化されるキャプチャープローブのキャプチャー配列とは相同的又は相補的であり、好ましくは完全に相同な配列又は完全に相補的な配列である。キャプチャー配列に対して相同的とするか相補的とするかは、標識工程におけるプライマーの設計等に応じて適宜決定されればよく、標識工程後にキャプチャー配列に対して選択的にハイブリダイズ可能な相補性を有していればよい。なお、以下の説明において、キャプチャープローブのキャプチャー配列を基準としてこれと相同的な配列を有する識別情報用タグ配列を（+）を付加して記載し、これと相補的な配列を有する識別情報用タグ配列を（-）を付加して記載するものとする。識別用タグ配列（+）及びキャプチャー配列としては、例えば、配列番号：1～配列番号：100に記載の塩基配列又はこの塩基配列に相補的な塩基配列を用いることができる。これらの塩基配列は全て同一塩基長であり、融解温度（ T_m ）が40以上80以下、好ましくは50以上70以下であって、同一条件でのハイブリダイゼーションにおいて均質なハイブリダイゼーション結果が得られることが期待される。

【0039】

2種類以上の第1のプローブの識別情報用タグ配列（+）及びキャプチャー配列の融解温度は、できるだけ近いことが好ましい。より好ましくは、同時に網羅的に複数の標的核酸の複数の特定部分配列を検出しようとする場合には、一つの標的核酸に対して使用する複数の第1のクエリプローブの複数の識別情報用タグ配列（+）とキャプチャー配列との融解温度は互いに最も近似するように組み合わせられていることが好ましい。例えば、図4に示すように、識別情報用タグ配列（+）及びキャプチャー配列を融解温度の順に配列したとき、一つの標的核酸に対する2種類以上の第1のクエリプローブにおける識別情報用

10

20

30

40

50

タグ配列 (+) 及びキャプチャー配列は、当該順列において隣り合う 2 種類以上の塩基配列から選択することができる。また、他の標的核酸に対応する第 1 のクエリプローブセットの識別情報用タグ配列 (+) 及びキャプチャー配列は、図 4 に示すように、既に選択した塩基配列にすぐ隣の一連の塩基配列から選択してもよいし、離れた一連の塩基配列から選択してもよい。同時に検出しようとする標的核酸に対応する全ての第 1 のクエリプローブセットで使用される識別情報用タグ配列 (+) 及びキャプチャー配列の融解温度が前記融解温度の順列において一連の塩基配列を用いることが好ましい。なお、融解温度は、G C % 法、Wallace 法、Current

Protocols in Molecular Biology に準拠した方法(秀潤社刊バイオ実験イラストレイテッド 3 本 増える PCR p 25 に記載)等により算出したものを採用できるが、本発明における融解温度の範囲および塩基配列濃度の影響を加味できる Nearest-Neighbor 法によって算出されることが好ましい。Nearest-Neighbor 法による融解温度は、例えば、Visual OMP (トミーデジタルバイオロジー株式会社製) とのソフトウェアや日本遺伝子研究所 (<http://www.ngrl.co.jp/>) が提供するソフトウェア (Oligo Calculator ; http://www.ngrl.co.jp/tool/ngrl_tool.html) により容易に取得できる。

なお、配列番号 : 1 ~ 配列番号 : 100 は、Visual OMP によって算出される融解温度 (0.1 M プローブ濃度、50 mM Na⁺イオン及び 1.5 mM Mg⁺イオン) の高い順に配列されている。

【0040】

このような識別情報用タグ配列 (+) 及びキャプチャー配列 (+) は、正規直交化配列ともいい、たとえば乱数から得られた所定塩基長の DNA 配列に対して連続一致長、Nearest-Neighbor 法による融解温度予測、ハミング距離、二次構造予測の計算を行うことにより設計される。正規直交化配列は、核酸の塩基配列であって、その融解温度が均一であるもの、即ち融解温度が一定範囲内に揃うように設計された配列であって、核酸自身が分子内 (intramolecular) で構造化して、相補的な配列とのハイブリッド形成を阻害することのない配列であり、尚且つこれに相補的な塩基配列以外とは安定したハイブリッドを形成しない塩基配列を意味する。1 つの正規直交化配列群に含まれる配列は、所望の組み合わせ以外の配列間および自己配列内において反応が生じ難いか、または反応が生じない。また、正規直交化配列は、PCR において増幅させると、たとえば上述のクロスハイブリダイゼーションのような問題に影響されずに、当該正規直交化配列を有する核酸の初期量に応じた量の核酸が定量的に増幅される性質を有している。上記のような正規直交化配列は、H. Yshida

and A. Suyama, "Solution to 3-SAT by breadth first search", DIMACS Vol. 54 9-20 (2000) および特願 2003-108126 に詳細が記載されている。これらの文献に記載の方法を使用して正規直交化配列を設計することができる。

【0041】

第 1 のプローブを、標的核酸中に存在可能性のある検出対象変異の変異構成要素にそれぞれ対応するとともに、存在可能性のある他の変異の変異構成要素にもそれぞれ対応した第 1 のクエリ配列とすることで、特定部分配列中に他の変異を有する場合であっても、確実に検出対象変異の変異構成要素を検出することができる。従来法の第 1 のクエリ配列では、検出対象としない他の変異の変異構成要素には対応付けがなされていなかったため、ハイブリダイゼーション効率が低下していたおそれがあるが、本発明によればそのようなおそれはないものとなっている。

【0042】

また、本発明によれば、他の変異の変異構成要素に対してこれを識別するための識別情報を第 1 のクエリ配列にも第 1 のプローブにも付与しないため、手法等が複雑化されないで再現性を確保できる。なお、こうした他の変異のアッセイには、別に第 1 のプローブを

10

20

30

40

50

作製すればよい。

【 0 0 4 3 】

(第 2 のプローブ)

第 2 のプローブは、第 2 のクエリ配列と、検出情報用タグ配列と、をそれぞれ備えることができる。第 2 のプローブは、その第 2 のクエリ配列をその 5 ' 側に備えることができる。また、検出情報用タグ配列をその 3 ' 側に備えることができる。

【 0 0 4 4 】

(第 2 のクエリ配列)

第 2 のクエリ配列は、標的核酸中の特定部分配列に隣接する部分配列に相補的な配列である。第 2 のクエリ配列は、第 1 のクエリプローブが有する第 1 のクエリ配列に対応する特定部分配列に隣接する部分配列と高い選択性でハイブリダイズ可能な程度に相補的な配列とすることができる。好ましくは完全に相補的とすることができる。第 2 のクエリ配列は、後述する連結工程において、第 1 のクエリ配列とリガーゼ反応により連結される。このため、クエリ配列の 5 ' 末端側はリガーゼ反応可能にリン酸エステル化されていることが好ましい。

10

【 0 0 4 5 】

第 2 のクエリ配列は、検出対象たる変異の 3 ' 側に有していない場合には、標的核酸中において特定部分配列の 3 ' 側に隣接して保存されている配列に相補的な配列とすることができる。一方、第 2 のクエリ配列は、標的核酸中の検出対象たる変異の 3 ' 側に近接して他の変異を有する可能性がある場合には、当該他の変異の変異構成要素に応じて得られる各種の可能性ある部分配列と高い選択性でハイブリダイズ可能な程度に相補的に設定される。好ましくは完全に相補的に設定される。

20

【 0 0 4 6 】

ここで、検出対象変異の 3 ' 側に近接して他の変異を備えるとは、例えば、検出対象変異とその 3 ' 側の他の変異 (1 塩基) との間の塩基数が 3 0 塩基以下であることが好ましい。3 0 塩基以下であると第 2 のプローブの第 2 のクエリ配列中に他の変異塩基が存在するおそれがあるためである。

【 0 0 4 7 】

なお、検出対象たる変異の 3 ' 側の他の変異は 2 種類以上あってもよい。2 種類以上の場合であっても、これらの他の変異における変異構成要素の種類の組み合わせに基づいて得られる各種の可能性ある部分配列と高い選択性でハイブリダイズ可能な程度に相補的、好ましくは完全に相補的に設定すればよい。

30

【 0 0 4 8 】

このような他の変異の変異構成要素毎に特異的な第 2 のクエリ配列を備えることで、検出対象たる変異の 3 ' 側に変異がある場合であっても標的核酸に確実に第 2 のプローブをハイブリダイズさせることができるため、第 1 のプローブと確実に連結させて、変異の存在の有無や比率に応じて正確に連結分子を得ることができる。

【 0 0 4 9 】

こうした第 2 のクエリ配列は、第 1 のクエリプローブにおけるクエリ配列と同様にして設計することができる。

40

【 0 0 5 0 】

(検出情報用タグ配列)

第 2 のクエリプローブは、第 1 のプローブが保持する識別情報に基づいて固相担体上で一つの変異構成要素を検出するためのキャプチャー又は標識物質に関する配列情報を含む検出情報用タグ配列を備えることができる。検出情報用タグ配列の形態は、第 1 のプローブが保持する識別情報に基づいて決定することができる。

【 0 0 5 1 】

第 1 のプローブの識別情報用タグ配列が標識物質の付加に関する配列情報を含む場合には、検出情報用タグ配列は、キャプチャーに関する配列情報を含む。すなわち、識別情報が、検出対象たる変異構成要素を異なる所定の標識物質を用いて検出しようとする場合に

50

は、最終的にこれらの所定の標識物質で標識された標識済みの連結分子を共通のキャプチャープローブのキャプチャー配列にハイブリダイズさせるための配列情報を検出情報として含んでいる。このような識別情報と検出情報との組み合わせで、連結分子において検出対象たる変異の変異構成要素を異なる標識物質で標識して識別することができる。そして、これらの標識済み連結分子を固相担体上の一つのキャプチャープローブにハイブリダイズさせて標識物質によるシグナル強度情報を取得し、シグナル強度のプロット等から変異を検出できるようになる。

【0052】

キャプチャープローブのキャプチャー配列にハイブリダイズさせるための配列情報に関して、キャプチャー配列やこの配列にハイブリダイズさせるための配列については第1のプローブのキャプチャー関連配列情報において既に説明した内容をそのまま適用できる。なお、第2のプローブの検出情報用タグ配列に含まれるキャプチャー関連配列情報は、第1のプローブで識別した異なる標識物質によって標識された共通のキャプチャープローブのキャプチャー配列とハイブリダイズさせるものである点において相違している。

【0053】

また、第1のプローブの識別情報用タグ配列が、キャプチャープローブに関する配列情報を含む場合には、検出情報用タグ配列は、所定の標識物質に関する配列情報を含む。すなわち、識別情報が、変異構成要素を識別するために変異構成要素に関連付けられたキャプチャープローブのキャプチャー配列に前記標識済み連結分子をハイブリダイズさせるための配列情報を含むときには、最終的に標識済み連結分子を得るための連結分子に共通の所定の標識物質を付加するための配列情報を検出情報として含んでいる。このような識別情報と検出情報との組み合わせで、連結分子において検出対象たる変異の変異構成要素を異なるキャプチャープローブに対応付けて識別することができる。そして、連結分子を共通の標識物質で標識した標識済み連結分子を固相担体上の所定の異なるキャプチャープローブにハイブリダイズさせることで、変異構成要素毎に異なるキャプチャープローブ(部位)で共通の標識物質によるシグナル強度情報を取得することで、シグナル強度比や比率等により変異を検出又は変異率を定量できるようになる。

【0054】

所定の標識物質を付加するための配列情報は、第1のプローブに関して説明したのと同様にして適宜設定することができる。

【0055】

第1の接触工程によれば、これらの第1及び第2のプローブと標的核酸とを接触させることで、標的核酸中に第1のプローブ及び第2のプローブが相補的配列を有する所定の特定部分配列及び部分配列が存在するときには、特定部分配列に対応する第1のクエリ配列を有する第1のクエリプローブと部分配列に対応する第2のクエリ配列を有する第2のプローブとがコンカテマー状(タンデム状)にそれぞれ標的核酸にハイブリダイズすることになる。

【0056】

第1のクエリ配列が、他の変異に応じた変異構成要素に応じたバリエーションを有している場合、検出対象変異の変異構成要素に対応する塩基及び他の変異の変異構成要素に応じた塩基を持っているときに選択的に標的核酸にハイブリダイズする。他の変異の変異構成要素の種類に応じたバリエーションの第1のクエリ配列を有していれば、変異構成要素を確実に検出できる。

【0057】

また、第2のクエリ配列が、他の変異に応じた変異構成要素に応じたバリエーションを有している場合、こうした変異構成要素に相補的な塩基を所定位置に備える場合には選択的に標的核酸にハイブリダイズする。

【0058】

(連結工程)

連結工程は、標的核酸にハイブリダイズした第1のプローブと第2のプローブとを連結

10

20

30

40

50

して連結分子を取得する工程である。第1の接触工程において説明したように標的核酸中に検出しようとする所定の変異構成要素を含む特定部分配列が存在するとき、その特定部分配列に対応する第1のクエリ配列を有する第1のプローブと第2のプローブとが標的核酸にハイブリダイズする。図1及び図2に示すように、この状態で第1のプローブの5'末端と第2のプローブの3'末端とを連結する。

【0059】

これらプローブの連結手法は特に限定しない。DNAリガーゼ等のリガーゼを用いる酵素反応を用いることもできるし、化学的な反応を用いることもできる。好ましくは、DNAリガーゼによりこれらのプローブのライゲーション反応を行う。連結するために使用することができるリガーゼには、サーマス・アクアティカス(Thermusaquaticus)のTaqDNAリガーゼが含まれるが、これに限定されず、標的核酸やプローブの種類に応じて任意のDNAリガーゼ又はRNAリガーゼを使用し得る。

10

【0060】

本連結工程によれば、第1のプローブと第2のプローブとを連結することで、標的核酸中に存在する変異構成要素を含む特定部分配列を選択的にかつ網羅的に抽出した連結分子を得ることができる。すなわち、第1のプローブと第2のプローブとを用いることで選択性が高まる。一方、第1のプローブにも第2のプローブにも必要に応じて検出対象変異に近接する5'側の他の変異及び/又は3'側の他の変異をそれぞれ構成する変異構成要素の種類に応じた組み合わせで検出対象変異の変異構成要素以外の他の変異についてパリエーションあるクエリ配列を準備することで、他の変異構成要素に多型や変異がある場合であっても検出対象変異の変異構成要素を有する特定部分配列をもれなく抽出した連結分子を得ることができる。

20

【0061】

また、連結分子には、第1のプローブに由来する識別情報用タグ配列と第2のプローブに由来する検出情報用タグ配列とを備えている。これらの2種類のタグ配列によれば、変異構成要素を識別して固相担体上に固定化されたキャプチャープローブとのハイブリダイゼーションによる検出が可能となる。なお、ハイスループット性を重視する場合には、識別情報として標識物質関連配列情報を用い、検出情報としてキャプチャープローブ関連検出情報を用いることができる。また、検出精度や変異率の定量には、識別情報として、キャプチャープローブ関連情報を用い、検出情報としてキャプチャープローブ関連検出情報を用いることができる。

30

【0062】

なお、上記第1の接触工程及び本連結工程は、特に連結工程を酵素反応を用いて行う場合など、前記第1の接触工程は、連結工程に先立つハイブリダイゼーション工程として、本連結工程と連続若しくは実質的に一つの工程(エンコード工程ともいう。)として実施することができる。

【0063】

第1のプローブと第2のプローブとを連結した連結分子は、そのみを回収することなく、次工程へと移行することができる。また、標的核酸とともに適当な方法で回収することができ、例えば、カラム等精製器具等によって連結分子を回収してもよい。また、後段の標識工程に先立って、標的核酸から連結分子を解離させる。解離は、例えば、化学的変性及び熱的変性を含む変性処理によって達成することができる。たとえば、化学的変性によって連結されたオリゴヌクレオチドを解離させる場合には、アルカリ変性などの当業者に周知の処理を行えばよい。熱的変性により連結オリゴヌクレオチドを解離させる場合には、生理的条件下では、85以上、好ましくは90以上の温度にすればよいが、当業者であれば、適切な解離方法を選択することができる。

40

【0064】

(標識工程)

標記工程は、連結分子が備える識別情報又は検出情報としての標識物質関連配列情報を利用して連結分子を単一の又は2種類以上の標識物質で標識して標識済み連結分子を取得

50

する工程である。

【 0 0 6 5 】

標識工程は、標識物質関連配列情報を用いて標識物質で標識する公知の方法を採用して実施することができる。好ましくは、PCR増幅反応を利用する。プライマーは採用するPCR手法に応じて適宜設計することができる。このとき、通常のPCRによる増幅を行ってもよいし、1本鎖の増幅産物が得られる増幅方法として、アシンメトリックPCRによる増幅を行ってもよい。アシンメトリックPCRを用いる場合には、用いるプライマーにより、標識前と同一配列を維持した標識済み連結分子を得ることもできるし、標識前の配列に対して相補的な配列に変換した標識済み連結分子を得ることもできる。いずれにしても、最終的に得られる産物において所定のキャプチャープローブに対してハイブリダイズ可能な程度に相補的なキャプチャープローブ関連配列情報を備えているようにする。

10

【 0 0 6 6 】

標識物質としては従来公知のものを適宜選択して用いることができる。それ自体励起されると蛍光シグナルを発する蛍光物質などの各種色素であってもよいし、さらに酵素反応や抗原抗体反応により第2成分と組み合わせて各種シグナルを発する物質であってもよい。典型的には、Cy3、Alexa555、Cy5、Alexa647等の蛍光標識物質を用いることができる。また、ビオチンとストレプトアビジンHRとを組み合わせて基質による処理等による発色による検出を用いてもよい。

【 0 0 6 7 】

後段の第2の接触工程に先だって、増幅により標識物質を付与した標識済み連結分子分離し、1本鎖としておくことが好ましい。分離は、ビオチンで被覆した磁気ビーズ等の固相担体を用いること等の公知の方法を採用することができ、1本鎖化は、上述した化学的変性又は熱的変性を施す手法等を採用できる。

20

【 0 0 6 8 】

(第2の接触工程)

第2の接触工程は、標識済み連結分子中の識別情報又は検出情報としてのキャプチャープローブ関連配列情報(-)に相補的なキャプチャー配列を有する2種類以上のキャプチャープローブを固定化した固相担体上でこれらのキャプチャープローブと標識済み連結分子とをハイブリダイズ可能に接触させる工程である。この工程によれば、標識済み連結分子中のキャプチャープローブ関連配列(-)がキャプチャープローブ中のキャプチャー配列と一定条件下において選択的にハイブリダイズ可能な程度に相補的であるとき、これらはハイブリダイズし固相担体上の所定のキャプチャープローブにおいて二重鎖を形成する。第1の接触工程後において、適宜洗浄工程をさらに含んでもよい。

30

【 0 0 6 9 】

(キャプチャープローブが固定化された固相担体)

第2の接触工程では、2種類以上のキャプチャープローブを固定化した固相担体を用いることができる。こうした固相担体は、例えばビーズであってもよいし平板であってもよく、材質は特に限定されないが、ガラス製又はプラスチック製の固相担体を用いることができる。好ましくは、固相担体は平板状であり、2種類以上のキャプチャープローブが一定の配列で固定されたアレイである。アレイは、多数個のキャプチャープローブを固定でき、同時に網羅的に各種の多型や変異を検出するのに都合がよい。また、アレイは、一つの固相担体上に複数個の区画された個別のアレイ領域を備えていてもよい。これらの個別のアレイ領域は、それぞれ同一のセットのキャプチャープローブが固定化されていてもよいし、それぞれ別のセットのキャプチャープローブが固定化されていてもよい。

40

【 0 0 7 0 】

また、好ましい固相担体は、2種類以上のキャプチャープローブがその融解温度に基づく順序で配列された配列状態を備えるアレイである。例えば、こうしたアレイを用いて、このキャプチャープローブの順序に沿って、各標的核酸に対応する2種類以上のキャプチャープローブを割り当てることで、キャプチャー配列の融解温度の差に由来するハイブリダイゼーションのバラツキを抑制して、精度よく標的核酸中の変異構成要素を含む特定部

50

分配列を検出することができる。好ましいアレイの一例を図3に示す。

【0071】

第2の接触工程で用いる固相担体は、一つの標的核酸に用いるキャプチャーが互いに隣接する配置状態を備えるアレイであることが好ましい。これらが隣接していることにより、アレイ上におけるハイブリダイゼーションのキャプチャープローブの固定化位置に由来するバラツキを抑制して、精度よく変異構成要素を含む標的核酸中の特定部分配列を検出することができる。

【0072】

さらに好ましい固相担体は、一つの標的核酸に用いるキャプチャープローブが互いに隣接する配置状態を備え、かつこれらの隣接するキャプチャープローブ間の融解温度の最大温度差（絶対値）が5以下好ましくは0.2以下となるように配置されているアレイである。こうしたアレイを用いることで、アレイ上でキャプチャープローブの固定化位置及びキャプチャープローブの融解温度の差に基づくハイブリダイゼーションのバラツキを抑制できる。典型的には、多数のキャプチャープローブを融解温度に基づく順序で配列したとき連続して配列されているキャプチャープローブを一つの標的核酸の特定部分配列を検出するための2種類以上のキャプチャープローブとして採用すればよい。

【0073】

固相担体に固定化される複数のキャプチャープローブは、それぞれ配列番号：1～配列番号：100から選択されるキャプチャー配列を有することができる。なお、これらの塩基配列は既に説明したように、一定条件で設計された正規直交化配列である。

【0074】

キャプチャープローブの固定化形態は特に限定されない。共有結合性であってもよいし非共有結合性であってもよい。キャプチャープローブは、従来公知の各種の方法で固相担体表面に固定化することができる。また、固相担体表面に対しては適当なリンカー配列を備えていてもよい。リンカー配列は、好ましくはキャプチャープローブ間において同一塩基長で同一配列とする。

【0075】

（シグナル強度情報取得工程）

シグナル強度情報取得工程は、ハイブリダイズ後の固相担体上の標識物質に基づく標的核酸についてのシグナル強度情報を取得する工程である。本件シグナル強度情報取得工程によれば、標識済み連結分子の識別情報又は検出情報としてのキャプチャープローブ配列情報（-）がキャプチャープローブとハイブリダイズすることで当該キャプチャープローブに関連付けされた状態で所定の標識物質に基づきシグナル強度情報を得ることができる。

【0076】

こうしたキャプチャープローブに関連付けされたシグナル強度情報は、標的核酸中に存在する変異構成要素の数だけ得ることができる。すなわち、変異要素酵素が異なる標識物質で識別され標識されていても、変異構成要素が異なるキャプチャープローブで識別され同じ標識物質で検出されていても同様である。また、異なる標識物質で標識された標識済み連結分子が一つのキャプチャープローブにハイブリダイズしても同様である。

【0077】

標的核酸中の変異構成要素は、所定の標識物質及び所定のキャプチャープローブに予め関連付けされているので、所定の標識物質の所定のキャプチャープローブの位置で検出することにより、所定のキャプチャープローブに関連付けされたシグナル強度情報を取得することで、標的核酸中の特定部分配列の有無やその量等を定量することができる。

【0078】

シグナル強度情報取得工程は、用いた固相担体の形態や標識物質の種類に応じて、従来公知の手法を適宜選択して採用すればよい。典型的には、固相担体からハイブリダイズしなかったオリゴヌクレオチド等を洗浄操作等によって除去した後、付加した標識物質の蛍光シグナルをアレイスキャナ等により検出したり、標識物質に対して化学発光反応を実施

10

20

30

40

50

したりすることができる。固相担体にビーズを用いた場合には、フローサイトメーターによる検出方法が挙げられる。

【0079】

(検出工程)

検出工程は、識別情報及び検出情報に基づいて所定の標識物質及び所定のキャプチャープローブに関連付けられた変異構成要素についてのシグナル強度情報に基づいて、変異構成要素の有無や比率等を検出する工程である。すなわち、変異の有無、多型のタイプ及び変異率を検出することができる。本発明方法によれば、検出対象変異の変異構成要素に近接して他の変異があっても、確実に検出対象変異を検出することができる。他の変異に基づくバリエーションを採用しつつも検出対象の変異構成要素固有の識別情報及び検出情報を維持することで、こうした確実な検出が可能となっている。

10

【0080】

標的核酸中の多型又は変異を検出するには、例えば、一つの変異を構成する変異構成要素を異なる標識物質で識別し、共通のキャプチャープローブで検出した場合には、共通の一つのキャプチャープローブから検出される変異構成要素毎、すなわち、標識物質毎のシグナル強度をプロットし、その分布により多型のタイプ(メジャーホモ、マイナーホモ及びヘテロ)を検出することができる。この検出工程によれば、特に、SNPsを効率的にハイスループットで検出するのに適している。

【0081】

また、一つの変異を構成する変異構成要素を異なるキャプチャープローブで識別し、同一標識物質で異なるキャプチャープローブで検出した場合には、異なるキャプチャープローブから検出される同一標識物質によるシグナル強度の比に基づいて、検出しようとする多型又は変異の有無を検出する工程としてもよい。この検出工程によれば、上記のように、本検出方法によれば、一つが多型や変異に対応する各キャプチャープローブ間の単なるシグナル強度の比に基づいても多型の有無(タイプ)や変異の有無を精度よく検出することができる。

20

【0082】

さらに、2種以上のキャプチャープローブに対応して得られる一つのシグナル強度に対する2種以上のキャプチャープローブに対応して得られる全てのシグナル強度の和の割合に基づいて、前記一つの標的核酸中の前記多型のタイプ判別又は前記変異の比率を求めるとしてもよい。すなわち、式：一つの特定部分配列に対応するキャプチャープローブに関して得られるシグナル強度 / (標的核酸に存在する可能性のある変異構成要素にそれぞれ対応する2種類以上のキャプチャープローブに関して得られるシグナル強度の和)を用いることで、標的核酸中の前記一つの変異の変異構成要素の存在比率を求めることができる。この存在比率により、多型の有無及びタイプ並びに変異の有無及び変異率を得ることができる。こうした検出工程によれば、精度よく変異のタイプや変異率を求めることができる。しかも、一つの標的核酸中の存在可能性のある変異構成要素が3種類以上であっても、その数に応じて識別情報用タグ配列を備える第1のプローブを設定すれば、容易に同時にこれらの特定部分配列を検出しその比率を定量できる。

30

【0083】

また、必要に応じて、標識物質に基づく誤差を補正するために、固相担体上に準備されたコントロールキャプチャープローブに対して相補的な補正用のオリゴヌクレオチドであって異なる標識物質を備える参照用オリゴヌクレオチドを1種又は複数種の同一濃度で供給して、一点補正又は各標識物質毎に検量線を作成してもよい。

40

【0084】

なお、補正にあたっては、標的核酸の識別及び検出に用いたのと同様の標識物質とキャプチャープローブとの関係を選択すればよい。例えば、標的核酸につき、一つのコントロールキャプチャープローブに異なる標識物質を備える標識済み連結分子をハイブリダイズさせるときには、同様の形態で補正を行うことが好ましい。以下の補正用オリゴヌクレオチド及び参照用オリゴヌクレオチドの使用にあたっては同様とする。

50

【0085】

さらに、遺伝子変異を検出及び変異率を定量するときには、例えば、標的核酸に替えて準備した、検出しようとする前記変異について所定の比率を備える1種又は2種以上の参照用オリゴヌクレオチドにつき、前記第1の接触工程、前記連結工程、前記標識工程、前記第2の接触工程及び前記シグナル強度情報取得工程を実施して、前記参照用オリゴヌクレオチドについて取得した参照用シグナル強度情報を利用して前記検出工程を実施することができる。好ましくは、2種類以上の前記参照用オリゴヌクレオチドについて取得した参照用シグナル強度情報に基づいて検量線を作製し、この検量線を利用して試料中の標的核酸中の多型や変異などを検出し変異率を定量することができる。検量線を用いることで精度の高い検出及び定量が可能となる。なお、参照用シグナル強度情報の取得及び検量線の作製は予め行っておいてもよいし、標的核酸の検出時に同時に行ってもよい。

10

【0086】

また、標的核酸中の変異構成要素を異なるキャプチャープローブで検出する場合、キャプチャープローブは融解温度に近いものを採用しているものの融解温度及びその他の事情によりキャプチャープローブ間におけるハイブリダイズ量にバイアスが生じる可能性があるが、以下のように各工程を実施することでこれを抑制又は回避することができる。

【0087】

例えば、第2の接触工程で、標識済み連結分子とともに、第1のプローブの各識別情報用タグ配列(-)と標的核酸について用いたのとは異なる標識物質とを備え相互に同一濃度で準備した2種類以上の補正用オリゴヌクレオチドとを、固相担体上で前記キャプチャープローブとハイブリダイズ可能に接触させるようにし、シグナル強度情報取得工程で標的核酸についてのシグナル強度情報を取得する。同時に、補正用オリゴヌクレオチドについての他の標識物質に基づく補正用シグナル強度情報を取得し、検出工程で、補正用シグナル強度情報を利用するようにしてもよい。こうした補正で、他の標識物質を同一濃度で用いたとき、キャプチャープローブ間で得られたシグナル強度に差が生じた場合には、そのようなシグナル強度の差が連結分子にも存在するとして補正する。こうした補正用シグナル強度情報を利用した補正は、多型の有無(タイプ)並びに変異の有無及び変異率のいずれを得る場合にも適用できるとともに、既に説明した参照用シグナル強度情報に基づく補正と併用することができる。

20

【0088】

なお、補正に関して用いる参照用オリゴヌクレオチド及び補正用オリゴヌクレオチドは、必ずしも1本鎖で準備される必要はなく、2本鎖であってもよい。

30

【0089】

(標的核酸中の近接する2種類以上の変異を検出する方法)

本発明の検出方法は、近接する他の変異に関わらず検出対象たる変異を検出できることから、標的核酸中の近接する1種類又は2種類以上の他の変異を検出するのに適している。変異が近接するというとき、既に説明したように、検出対象変異と他の変異(1塩基)との間の塩基数が30塩基以下であることが好ましい。

【0090】

他の変異を検出するには、既に説明した検出対象たる変異と同様にして第1のプローブ及び第2のプローブを準備すればよい。近接する他の変異を新たな検出対象とするとき、既に説明した検出対象変異は、新たな検出対象からみて他の変異に相当することになる。

40

【0091】

近接する2種類以上の変異を検出対象とするとき、それぞれの変異の変異構成要素を識別し検出するのに用いる識別情報及び検出情報は、それぞれ個別に設定することができる。例えば、1つの変異につき、識別情報としてキャプチャープローブ関連配列情報を用い、検出情報として標識物質関連配列情報を用い、他の変異についても、同様の組み合わせとしてもよい、識別情報として標識物質関連配列情報を用い、検出情報としてキャプチャープローブ関連配列情報を用いてもよい。精度等の向上の観点からは、同時に検出する2種類以上の変異については、同様の組み合わせの識別情報及び検出情報を用いることが好

50

ましい。

【0092】

どのような組み合わせによるにしろ、プローブの設計にあたっては、標識物質関連配列情報は、変異間で一部又は全部共通化することができ、キャプチャープローブ関連配列情報は、変異毎あるいは変異構成要素毎に異なるものを用いる。例えば、2種類以上の変異について、識別情報として標識物質関連配列情報を用い、検出情報としてキャプチャープローブ関連配列情報を用いるとき、図2に示すように、各変異につき、一部又は全部共通の標識物質を用いるが、異なるキャプチャープローブを用いることになる。また、識別情報としてキャプチャープローブ関連配列情報を用い、検出情報として標識物質関連配列情報を用いるとき、図3に示すように、各変異につき、異なるキャプチャープローブを使用するが、一部又は全部共通する標識を用いることになる。なお、一つの標的核酸中の3種類以上の検出対象変異を検出するのにあたっても同様に識別情報及び検出情報を用いることでそれぞれに必要なプローブを設計することができる。

10

【0093】

また、近接する2種類以上の変異を検出対象とするとき、それぞれの変異に対して第1のプローブ及び第2のプローブを準備する。これらのプローブは、標的核酸の二重鎖のセンス鎖及びアンチセンス鎖うち一方をターゲットとしてもよいが、一部をセンス鎖をターゲットとし、他の一部をアンチセンス鎖をターゲットとしてもよい。2種類以上の変異を検出対象とするときには、少なくとも1種類の変異について、他の変異と異なる鎖をターゲットとするのが好ましい。近接する2つの変異について、一方の変異につき、センス鎖をターゲットとしてプローブセットを準備し、他方の変異につき、アンチセンス鎖をターゲットとしてプローブセットを準備することで、多種類のプローブを一つの鎖に対してハイブリダイズさせる際の問題を回避又は抑制できる。より好ましくは、2種類以上の変異中、好ましくはより近接する2種類の変異について、標的核酸の異なる鎖をターゲットとして第1及び第2のプローブを準備する。

20

【0094】

こうした標識物質関連配列情報及びキャプチャープローブ関連配列情報の構成によれば、2種類以上の変異について得られる連結分子の構成が、標識工程、第2の接触工程、シグナル強度情報取得工程及び検出工程の実施を妨げることはなく、2種類以上の変異につきこれらの工程を同時に実施することができる。

30

【0095】

また、2種類以上の変異を検出対象とするとき、効率性の観点からは、これらの変異につき準備した全てのプローブを用いて同時に第1の接触工程及び連結工程を実施することが好ましいが、独立して第1の接触工程及び連結工程を実施してもよい。最も好ましくは、全ての工程を同時に実施することが好ましい。

【0096】

(プローブセット)

本発明のプローブセットは、固相担体上に固定化されたキャプチャープローブを用いて標的核酸中の少なくとも一つの変異を検出するのに用いるプローブセットである。本発明のプローブセットは、既に説明した2種類以上の第1のプローブと1種又は2種類以上の第2のプローブとを含んでいる。こうしたプローブを用いることで、検出対象変異に近接して未検出の他の変異(変異自体は既知)があるときであっても、これらの他の変異に関わらず検出対象変異を確実に検出することができる。このプローブセットは、標的核酸中の近接する他の変異を検出対象変異とする第1のプローブ及び第2のプローブを含めることもできる。こうしたプローブセットは、一つの標的核酸中の2種類以上の近接する変異を検出する(好ましくは同時に)のに用いることができる。2種類以上の変異を対象とするとき、異なる変異を対象とするプローブセットは、標的核酸の同一の鎖を異なる鎖をターゲットとしていてもよい。

40

【0097】

本発明のプローブセットは、既に説明したキャプチャープローブが固定化されたアレイ

50

などの固相担体とキット化されていてもよい。固相担体には、第1のプローブ又は第2のプローブに含まれるキャプチャプローブ関連配列情報を介して関連付けられたキャプチャプローブを予め固定化されている。

【0098】

以下、本発明を、実施例を挙げて具体的に説明するが、以下の実施例は本発明を限定するものではない。以下の実施例では、本発明の検出方法による遺伝子変異(SNP)の検出を次の手順で行った。以下、これらの順序に従って説明する。

- (1) 変異遺伝子検出用DNAマイクロアレイの作製
- (2) サンプル遺伝子の増幅
- (3) ハイブリダイズ及び連結(エンコード反応)
- (4) ラベル化反応
- (5) DNAマイクロアレイを用いた検出
- (6) データ解析

【実施例1】

【0099】

- (1) 遺伝子変異(SNP)検出用DNAマイクロアレイの作製

東洋鋼板社製 gene

slide ガラス基板に、5'末端をアミノ基で修飾した合成オリゴDNA(株式会社日本遺伝子研究所製)を溶かした水溶液をキャプチャプローブとして、日本ガイシ株式会社にてGENESHOT(登録商標である)スポットターを用いてスポットした。表1に示すように、使用した合成オリゴDNA配列は、文献(Analytical Biochemistry 364(2007)78-85)のSupplementary

Table1記載のD1_1からD1_100のうちTmが高い順に、D1_52, D1_71, D1_93, D1_74, D1_41, の5種とした。スポットの後、80℃、1時間のベークを行った。なお、これらのTmは、Visual

OMPによって算出される融解温度(0.1Mプローブ濃度、50mM Na⁺イオン及び1.5mM

Mg⁺イオン)の高い順に配列されている。

【表1】

プローブ名	配列(5'→3')	長さ/mer	Tm°C
D1_52	GCCTATATGAACCAAGCCACTGC	23	60.7
D1_71	GAGACAGGTAACCCCTCAGAGCA	23	60.7
D1_93	GTCCCAAAGCTTCTTACGGACG	23	60.6
D1_74	CGATCAGCTCTATTTCCCTCCA	23	60.6
D1_41	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCA	23	60.4

【0100】

さらに、以下に記載した手順で、合成オリゴDNAの固定化を行った。すなわち、2×SSC/0.2%SDSで15分洗浄後、95℃の2×SSC/0.2%SDSで5分洗浄し、その後、滅菌水で洗浄(10回上下振とう)を3回繰り返した。その後、遠心(1000rpm×3分)により脱水した。

【実施例2】

【0101】

- (2) 遺伝子変異を有する標的核酸の調製と増幅

検出対象とする遺伝子変異を含む塩基配列は、以下の表2に示す変異の周辺配列である150bp程度とし、これらの塩基配列からなる人工遺伝子を標的核酸とした。合計4組の標的核酸を合成した。

【表 2】

検出変	タイプ	対象塩基	変異遺伝子部位を含んだ人工合成遺伝子配列(5'-3')
SNP1/2	メジャー	A/G	aagcgcaacaagcccactgictaiggtgtgtcccccaactacgacaagtgaggagatggaacgcacgg acatcacc a tgaagcacaagctgggcccggggccagtagcgggaggtgtacgagggcgtgtggaag aaatacagcctgacg
	マイナー	G/A	aagcgcaacaagcccactgictaiggtgtgtcccccaactacgacaagtgaggagatggaacgcacgg acatcacc g tgaagcacaagctgggcccggggccagtagcgggaggtgtacgagggcgtgtggaag aaatacagcctgacg
SNP3/4	メジャー	C/T	tgaagagatcaaacaccctaacctagtcagctccttggggtctgcacccgggagccccgttctat atcatca C tgagt t catgaactacgggaacctcctggactacctgagggagtgcacccggcaggagg tgaacgccgtggt
	マイナー	T/C	tgaagagatcaaacaccctaacctagtcagctccttggggtctgcacccgggagccccgttctat atcatca t gagt c catgaactacgggaacctcctggactacctgagggagtgcacccggcaggagg tgaacgccgtggt

10

【0102】

次に、これらのサンプルを以下のように増幅した。なお、サンプル増幅用試薬として、Takara Bio社のTakara Ex Taq (カタログ#RR001B)を使用した。サーマルサイクラーとして、Applied Biosystems社のGeneAmp PCR System 9700を使用した。なお、用いたPCRプライマーについては $T_m = 58.90 \pm 0.75$ の範囲となるよう設計を行った。各プライマー配列を表3に示す。なお、 T_m は、日本遺伝子研究所 (<http://www.ngrl.co.jp/>) が提供するソフトウェア (Oligo

20

Calculator; http://www.ngrl.co.jp/tool/ngrl_tool.html) を利用して以下の式に基づいて算出した。

$T_m = ((H * 1000 / (S + 41.3)) - 273.15 - 21.5971)$ (ただし、塩濃度: 0.05 M、プライマー濃度: 250 pmol であり、Sはハイブリッドにおける所定の最近接エントロピー変化の合計(cal/mol・K)を表し、Hはハイブリッドにおける所定の最近接エントロピー変化の合計(kcal/mol)を表す。)

【表 3】

検出変異	プライマー名	長さ	配列(5'-3')
SNP1/2	SNP1/2-F	23	AGCGCAACAAGCCCCTGTCTAT
	SNP1/2-R	23	GCTGTATTTCTTCCACACGCCCT
SNP3/4	SNP3/4-F	28	AAGAGATCAAACACCCTAACCTAGTGCA
	SNP3/4-R	19	ACGGCGTTCACCTCCTGCC

30

【0103】

まず、以下に示す試薬を個々のサンプルごとに調製した。なお、サンプルDNAは、SNPのタイプごとに、メジャー:マイナー比を1:0(メジャーホモ)、0.5:0.5(ヘテロ)及び0:1(マイナーホモ)の3通りとした。

(試薬調製)

プライマーミックス:F,R混合(20 μ M, each) 0.5 μ l

Ex Taq バッファ (10x) 1.0 μ l

Ex Taq ポリメラーゼ(5 Unit/ μ l) 0.1 μ l

dNTP mix (2.5 nM) 0.8 μ l

dH₂O 7.1 μ l

小計 9.5 μ l

サンプルDNA(10ng/ μ l) 0.5 μ l

合計 10.0 μ l

40

【0104】

次に、サーマルサイクル反応(94 で30秒後; 94 で40秒、66 で40秒、72 で2分を40サイクル;その後4 に下げる)を行った。そして、個々に増幅した産物を各3.0 μ lずつ(計4変異種)を変異遺伝子割合ごとにチューブに混ぜ、PCR産物とした。結果として、SNPの各タイプ(メジャーホモ、ヘテロ及びマイナーホモ)

50

につき5サンプルのPCR産物を調製した。

【実施例3】

【0105】

(3) エンコード反応

実施例2で得たPCR産物についてのエンコード反応を以下のようにして行った。エンコード反応にはNew England Biolabs社のTaq DNA Ligase(Catalog # M0208S)を使用した。加熱にはサーマルサイクラーとして、Applied Biosystems社のGeneAmp PCR System 9700を使用した。なお、サンプルDNAの5'側に相補的なクエリ配列(検出塩基を含む)と識別情報用タグ配列とを備える5'クエリプローブ(本発明方法における第1のプローブ)の配列を表4に示す。5'クエリプローブは、その5'側に標識物質を付加するための識別情報用タグ配列を備えており、その3'側にクエリ配列を備えている。また、サンプルDNAの3'側に相補的なクエリ配列(検出塩基を含まない)と検出情報用タグ配列とを備える3'クエリプローブ(本発明方法における第2のプローブ)の配列を表5に示す。3'クエリプローブは、その5'側に5'クエリプローブのクエリ配列に隣接するクエリ配列を有し、3'側に表1に示すキャプチャープローブ配列と相同である検出情報用タグ配列を有している。なお、3'クエリプローブの5'末端はリン酸化されている。

【表4】

検出SNP	タイプ	対象塩基	長さ	配列(5'→3')
SNP1	Major allele	A	42	CCGTGTCCACTCTAGAAAAACCTGAACGCACGGACATC <u>ICCA</u>
	Minor allele	G	41	ACCACCGCTTGAATACAAAACATAACGCACGGACATC <u>ICCG</u>
SNP2	Major allele	G	39	CCGTGTCCACTCTAGAAAAACCTAGCACAAAGCTGG <u>C</u> CGG
	Minor allele	A	40	ACCACCGCTTGAATACAAAACATAAGCACAAAGCTGG <u>C</u> CGA
SNP3	Major allele	C	45	CCGTGTCCACTCTAGAAAAACCTAGCCCCGTTCTATATCA <u>ACA</u> C
	Minor allele	T	45	ACCACCGCTTGAATACAAAACATAGCCCCGTTCTATATCA <u>ACA</u> T
SNP4	Major allele	T	47	CCGTGTCCACTCTAGAAAAACCTCCCGTTCTATATCATCACTGTGTT
			47	CCGTGTCCACTCTAGAAAAACCTCCCGTTCTATATCATCATTGTGTT
	Minor allele	C	47	ACCACCGCTTGAATACAAAACATCCCGTTCTATATCATCACTGTGTC
			47	ACCACCGCTTGAATACAAAACATCCCGTTCTATATCATCAITGTGTC

【表5】

検出変異	長さ	配列(5'→3')
SNP1	45	TGAAGCACAAAGCTGGGCGGGGGCAGTGGCTTGGTTCATATAGGC
	46	TGAAGCACAAAGCTGGGCGAGGGCGCAGTGGCTTGGTTCATATAGG
SNP2	49	GGGCCAGTACGGGGAGGTGTACGAGGTGCTCTGAGGGTTTACCTGT
SNP3	52	TGAGTTCATGACCTACGGGAACCTCCTGGCGTCCGTAAGAAGCTTTTGGGAC
	52	TGAGTCCATGACCTACGGGAACCTCCTGGCGTCCGTAAGAAGCTTTTGGGAC
SNP4	54	CATGACCTACGGGAACCTCCTGGACTACCTGTGGGAGGGAAATAGAGCTGATCG

【0106】

エンコード反応では、まず、以下の試薬を調製した。試薬は、実施例2で調製した各SNPタイプ別に3種類調製した(各5サンプル)。次に、加熱を行うことでエンコード反応を行った。エンコード反応では、95℃で5分、50℃で1分及び58℃で60分加熱し、その後10℃に下げた。最終的に15サンプルの5種類のライゲーション産物を得た。

(試薬調製)

5'クエリプローブ2種/3'クエリプローブMix (2.5 μM, each)
0.300 μl
Taq DNA リガーゼバッファ (10×) 1.500 μl

10

20

30

40

50

dH ₂ O	1.075 μ l
Taq DNA リガーゼ(40 Units/ μ l)	0.125 μ l
小計	3.000 μ l
PCR産物(変異遺伝子割合ごとに調製)	12.000 μ l
合計	15.000 μ l

【実施例4】

【0107】

(4) ラベル化反応

実施例3で得たライゲーション産物のラベル化反応を以下のとおり行った。ラベル化反応には、TAKARA

Bio社のTAKARA Ex Taq (Catalog # RR001B)を使用した。サーマルサイクラーとして、Applied Biosystems社のGeneAmp PCR System 9700を使用した。ラベル化にはアシメトリーPCRを用い、表1に示す配列と同一配列の各種D1プライマーと、識別情報用タグ配列に相補的であり、5'側がAlexa555又はAlexa647で標識されたプライマーとを用いた(表6)。

【表6】

プライマー名	配列(5'---3')	長さ
Alexa555-ED-1	CCGTGTCCACTCTAGAAAAACCT	23
Alexa647-ED-2	ACCACCGCTTGAATACAAAACAT	23

【0108】

ラベル化反応は、まず、以下の試薬をSNPタイプあたり5種類のライゲーション産物につき調製した。次いで、調製した試薬につきサーマルサイクル反応を行った。すなわち、95℃で1分後；95℃で30秒、55℃で6分、72℃で30秒を30サイクル行い；その後10℃に下げた。3つの変異種あたり5種類のラベル化済み産物を得た。

【0109】

(試薬調製)

D1_プライマーMix (50 μM, each)	0.12 μ l
Alexa555-ED-1(200M)	0.24 μ l
Alexa647-ED-2(200M)	0.24 μ l
Ex Taqバッファ (10×)	1.20 μ l
dNTP mix (2.5 nM)	0.96 μ l
Ex taq リメラーゼ(5 Unit/ μ l)	0.12 μ l
ミリQ水	8.12 μ l
小計	11.00 μ l
ライゲーション産物	1.00 μ l
合計	12.00 μ l

【実施例5】

【0110】

(5) DNAマイクロアレイを用いた検出

ラベル化済み産物を用いたDNAマイクロアレイへの反応及びその検出手順は以下の通りとした。

【0111】

(ハイブリダイズ用標識サンプル溶液の調製)

まず、ハイブリダイズ補正用液及びハイブリダイズ用液を以下の組成で調製した。

【0112】

(ハイブリダイズ用標識サンプル溶液の組成)

ハイブリダイズ補正用液	1.5 μ l
ハイブリダイズ用液	9.0 μ l

小計	10.5 μ l
ラベル化済み産物	7.5 μ l
合計	18.0 μ l

【 0 1 1 3 】

(ハイブリダイズ参照用液組成 (2.5nM, each))

Alexa555-rD1_41(100nM)	10 μ l
Alexa647-rD1_71(100nM)	10 μ l
TE (pH8.0)	380 μ l
	400 μ l

【 0 1 1 4 】

なお、ハイブリダイズ参照用液に使用したAlexa555及び647標識オリゴDNAは、表1のキャプチャープローブ配列 (D1_41) に相補な配列の5'末端にそれぞれAlexa555及び647で標識したものである。

【 0 1 1 5 】

(ハイブリダイズ用液組成 (x 2))

20 x SSC	2.0ml
10% SDS	0.8ml
100% Formamide	12.0ml
100	
mM EDTA	0.8ml
ミリQ水	24.4ml
合計	40.0ml

【 0 1 1 6 】

(ハイブリダイズ)

次いで、調製した標識サンプル溶液を、Applied Biosystems社のGeneAmp PCR System 9700を使用し、90 で1分加熱した後、ヒートブロック(TAITEC社DTU-N)を使用し80 で1分加熱した。上記サンプル溶液を各9 μ lずつ、DNAマイクロアレイのスポットエリアにかけ、乾燥防止のためコンフォート/プラス用サーモブロックスライド(エッペンドルフ社製)を使用し、37 で60分間静置することによりハイブリダイズ反応を行った。

【 0 1 1 7 】

(洗浄)

ハイブリダイズ後、以下の組成の洗浄液を満たしたガラス染色バットに、ハイブリダイズ反応終了後のガラス基板を浸漬し、5分間上下振とうし、滅菌水を入れたガラス染色バットにガラス基板を移し、1分間上下振とうし、2000rpmで1分間遠心乾燥し、ガラス基板表面に残った水分を除去した。

(洗浄液の組成)

ミリ Q水	188.0ml
20 x SSC	10.0ml
10% SDS	2.0ml
合計	200.0ml

【 0 1 1 8 】

(スキャナーによる蛍光検出)

Applied Precision社ArrayWoRxを使用して適宜、露光時間を調節し、蛍光画像を取得した。さらにGenePix Proを使用し、得られた画像の蛍光シグナルの数値化を行った。

【 実施例 6 】

【 0 1 1 9 】

(6) データ解析

各SNPについて数値化した結果のうちSNP3の結果を表7にSNP4の結果を表8に示す。また、表7及び表8の結果に基づいて横軸をAlexa555のシグナル強度とし、縦軸にAlexa647のシグナル強度をプロットした。これらの結果を、図5及び

10

20

30

40

50

図 6 に示す。

【表 7】

サンプルNo.	メジャーホモ		ヘテロ		マイナーホモ	
	555	647	555	647	555	647
1	7990	460	4380	3010	750	7420
2	8510	430	3570	3510	640	6870
3	7350	480	4630	3340	340	9120
4	7940	590	3990	4010	490	8470
5	6580	530	5510	3450	520	6430

10

【表 8】

サンプルNo.	メジャーホモ		ヘテロ		マイナーホモ	
	555	647	555	647	555	647
1	4570	220	3480	2570	200	7240
2	6570	130	5090	4210	340	9100
3	9040	170	4490	3980	160	8380
4	10200	110	4710	2780	410	6030
5	5330	180	3610	3480	290	8950

【0120】

20

表 7 及び表 8 並びに図 5 及び図 6 に示すように、SNP 3 及び SNP 4 の各変異に着目すると、近接する変異があっても、変異のタイプ（メジャーホモ、ヘテロ、マイナーホモ）を正確に検出することができることがわかった。また、二つの変異である SNP 3 及び SNP 4 に着目すると、変異が近接していても、各 SNP につき、全てのタイプを正確に検出できることがわかった。

【図面の簡単な説明】

【0121】

【図 1】本発明の検出方法の一例の概要を模式的に示す図である。

【図 2】本発明に用いる第 1 のプローブ及び第 2 のプローブの一例を説明する図である。

【図 3】本発明に用いる第 1 のプローブ及び第 2 のプローブの他の一例を説明する図である。

30

【図 4】本発明において用いる識別用タグ配列及びキャプチャー配列の一例を示す図である。

【図 5】実施例 6 で作成したプロット（SNP 3）を示す図である。

【図 6】実施例 6 で作成したプロット（SNP 4）を示す図である。

【図 7】従来の変異検出方法の一例を示す図である。

【配列表フリーテキスト】

【0122】

配列番号 1 ~ 105 : キャプチャープローブ、配列番号 106 ~ 109 : 人工合成遺伝子、配列番号 110 ~ 113 : プライマー、配列番号 114 ~ 123 : 5'クエリプローブ、配列番号 124 ~ 129 : 3'クエリプローブ、配列番号 130、131 : プライマー

40

【図4】

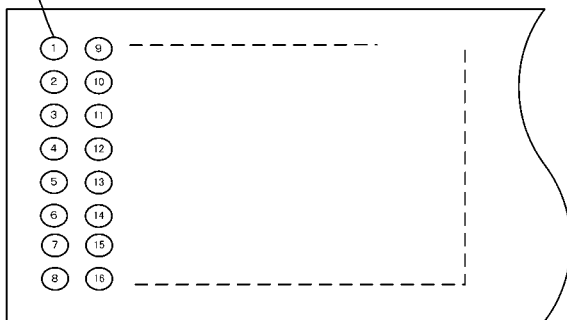
識別情報用タグ配列(+)及びキャプチャー配列

番号	配列	融解温度
1	56.2
2	56.3
3	56.3
4	56.4
5	56.5
6	56.6
.
.
.
95	58.1
96	58.2
97	58.3
98	58.5
100	58.6

} 標的核酸1
} 標的核酸2
} 標的核酸2

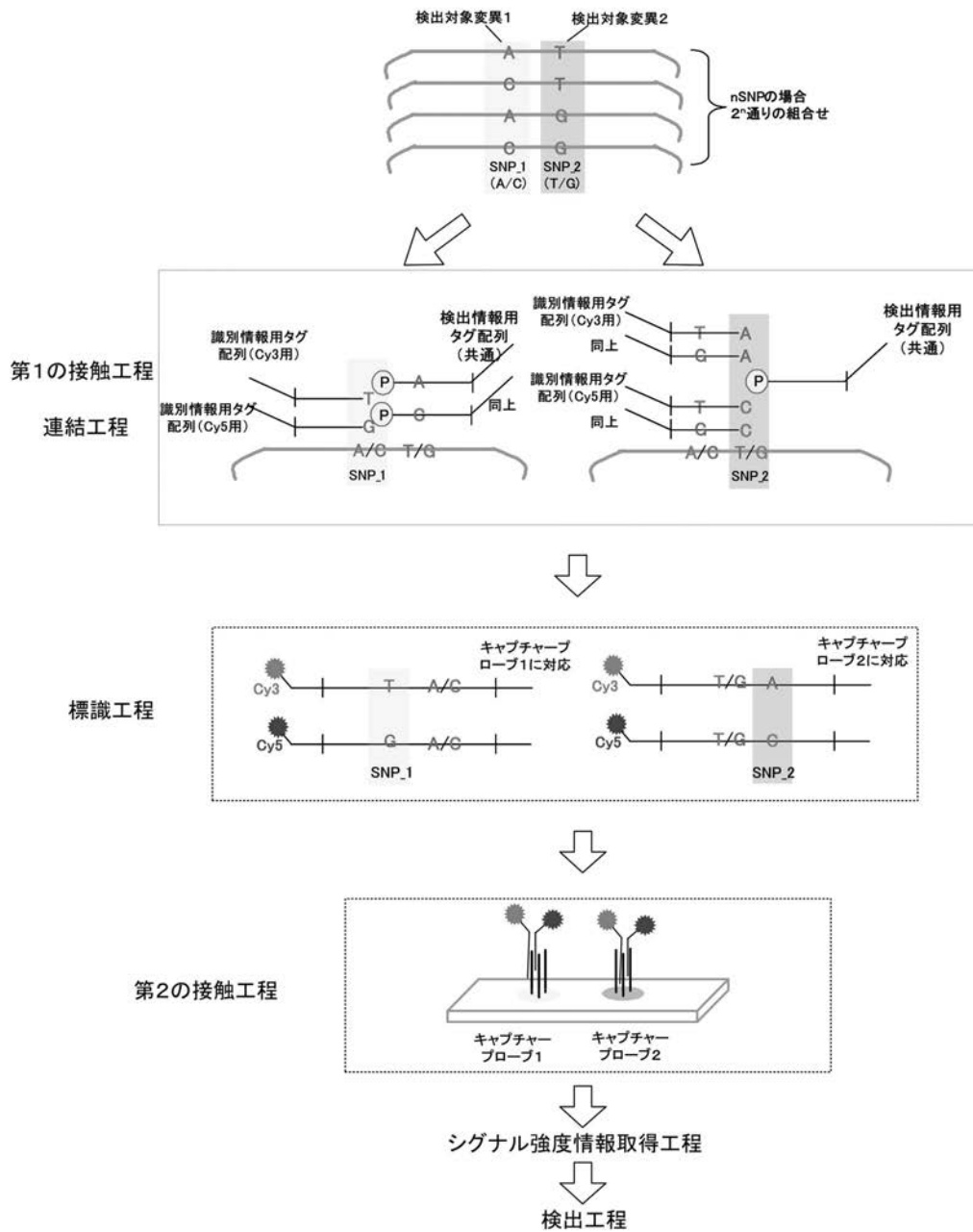
キャプチャープローブをキャプチャー配列の融解温度の順序に配列したアレイの一例

キャプチャー
プローブ

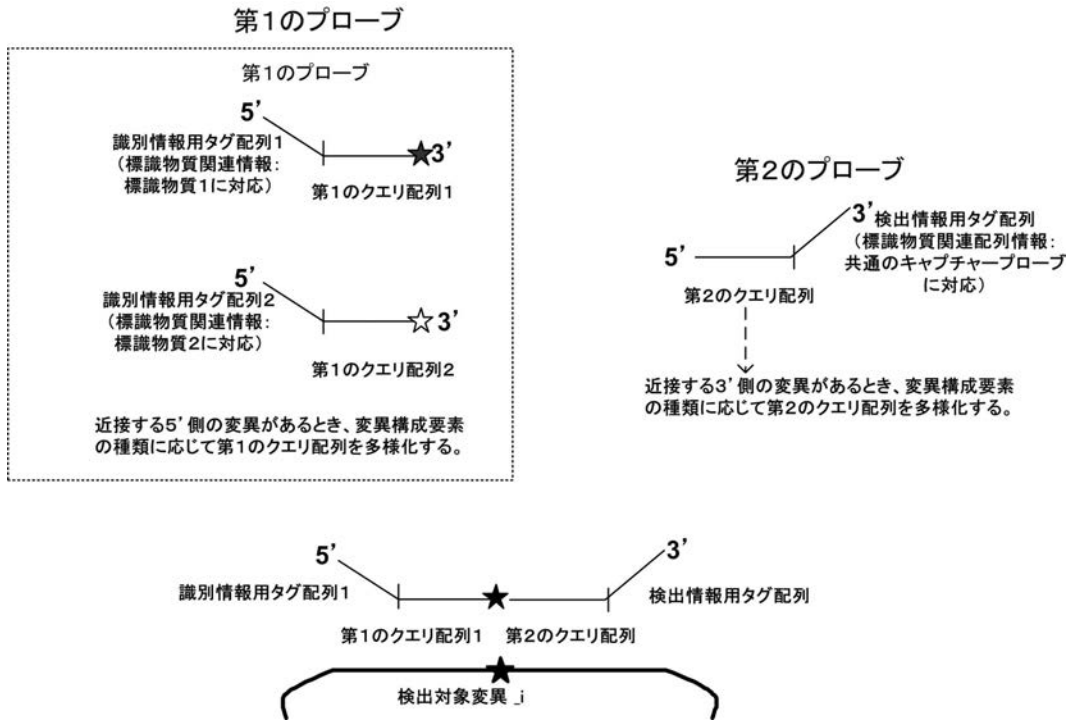


【図1】

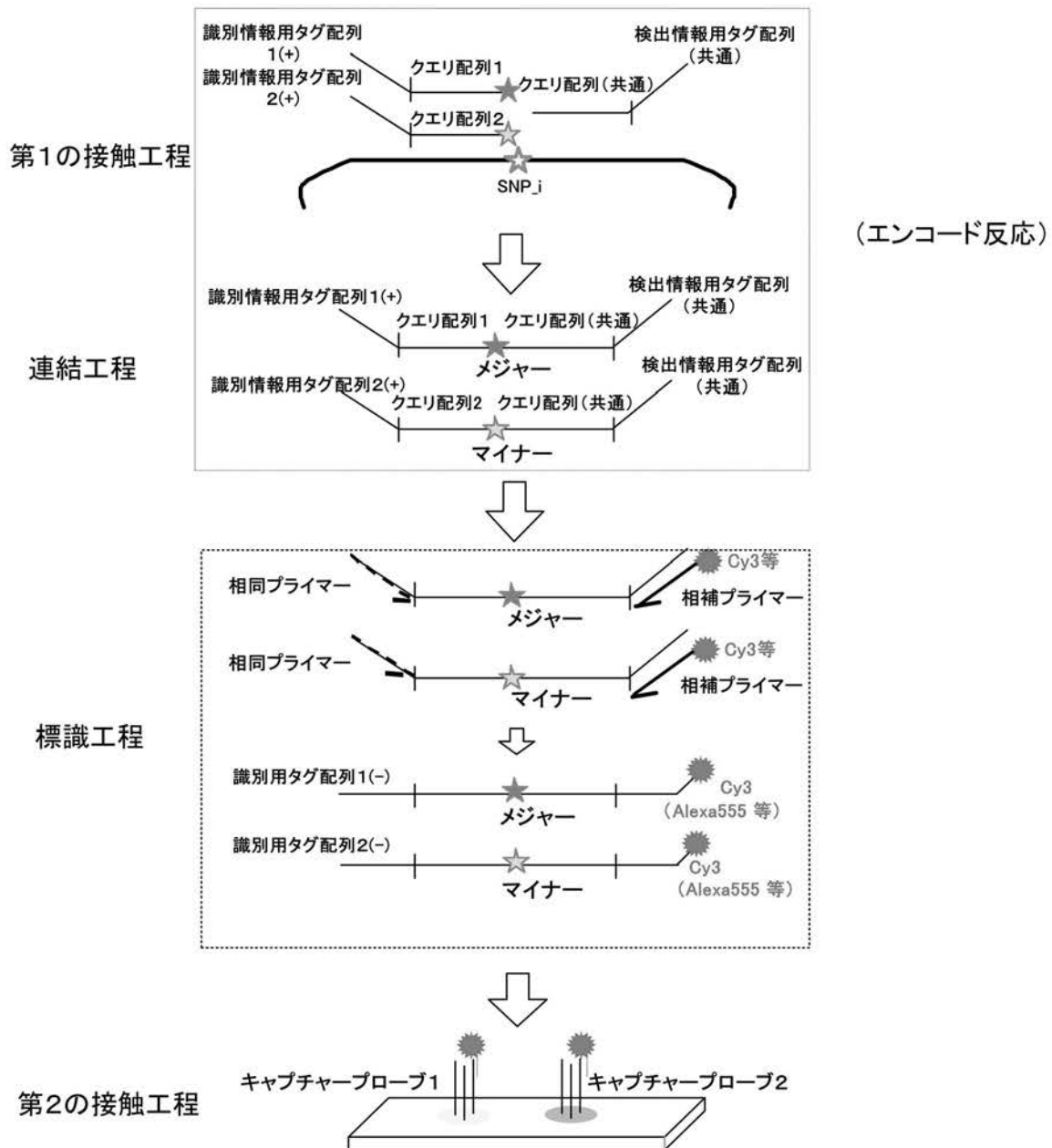
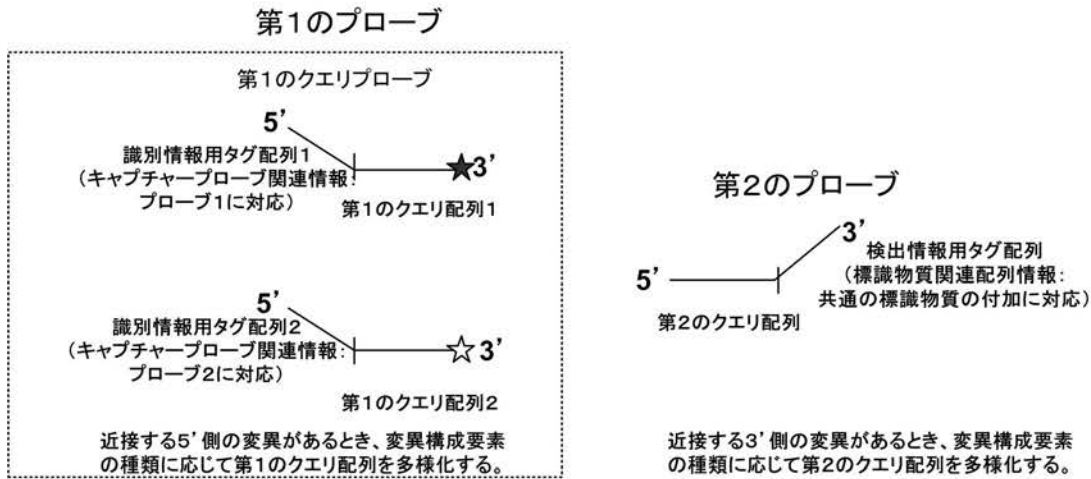
近接して存在する2つのSNPを有する標的核酸



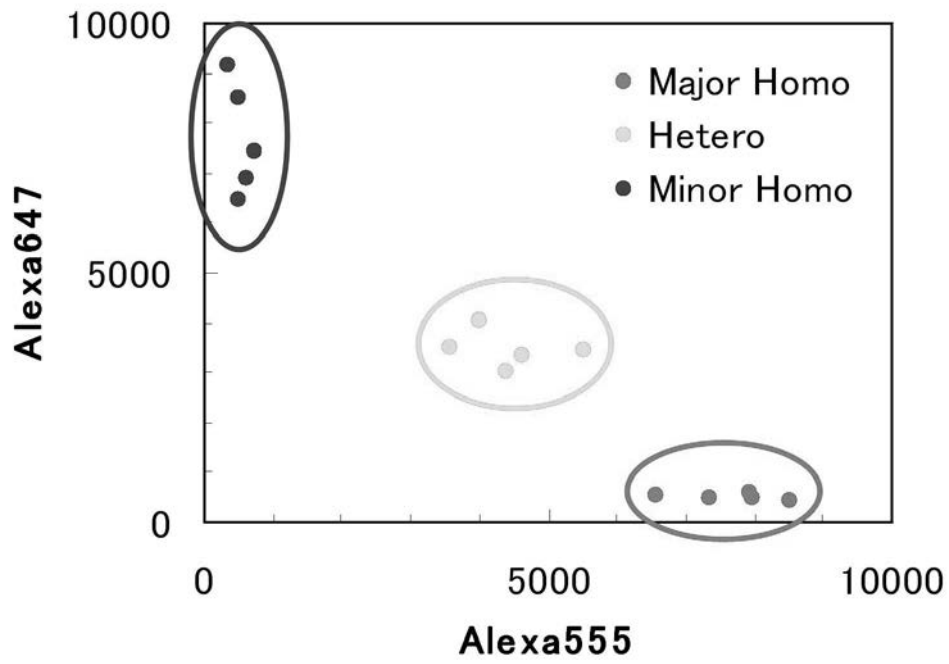
【図2】



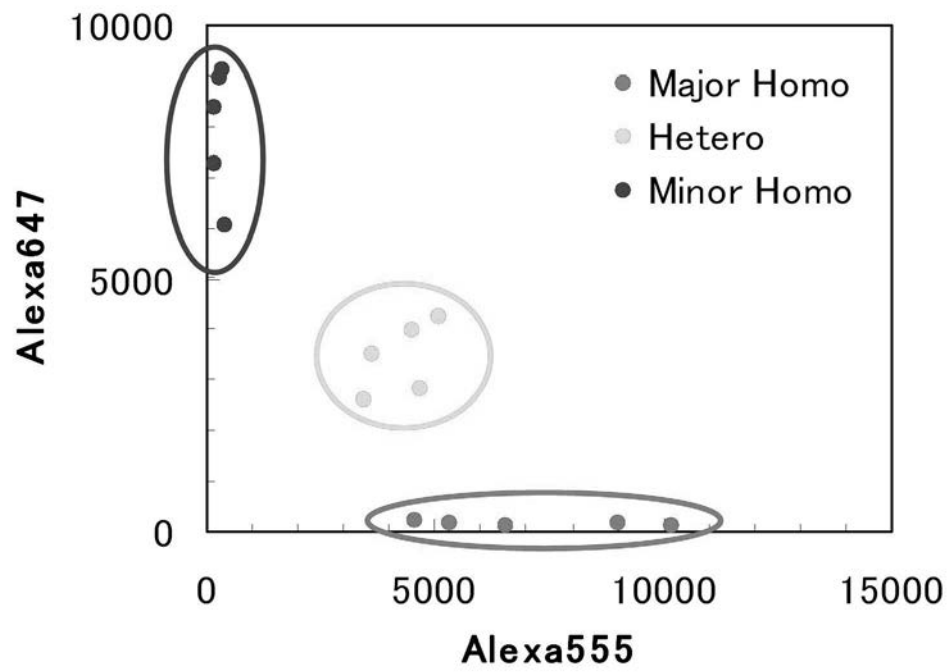
【図3】



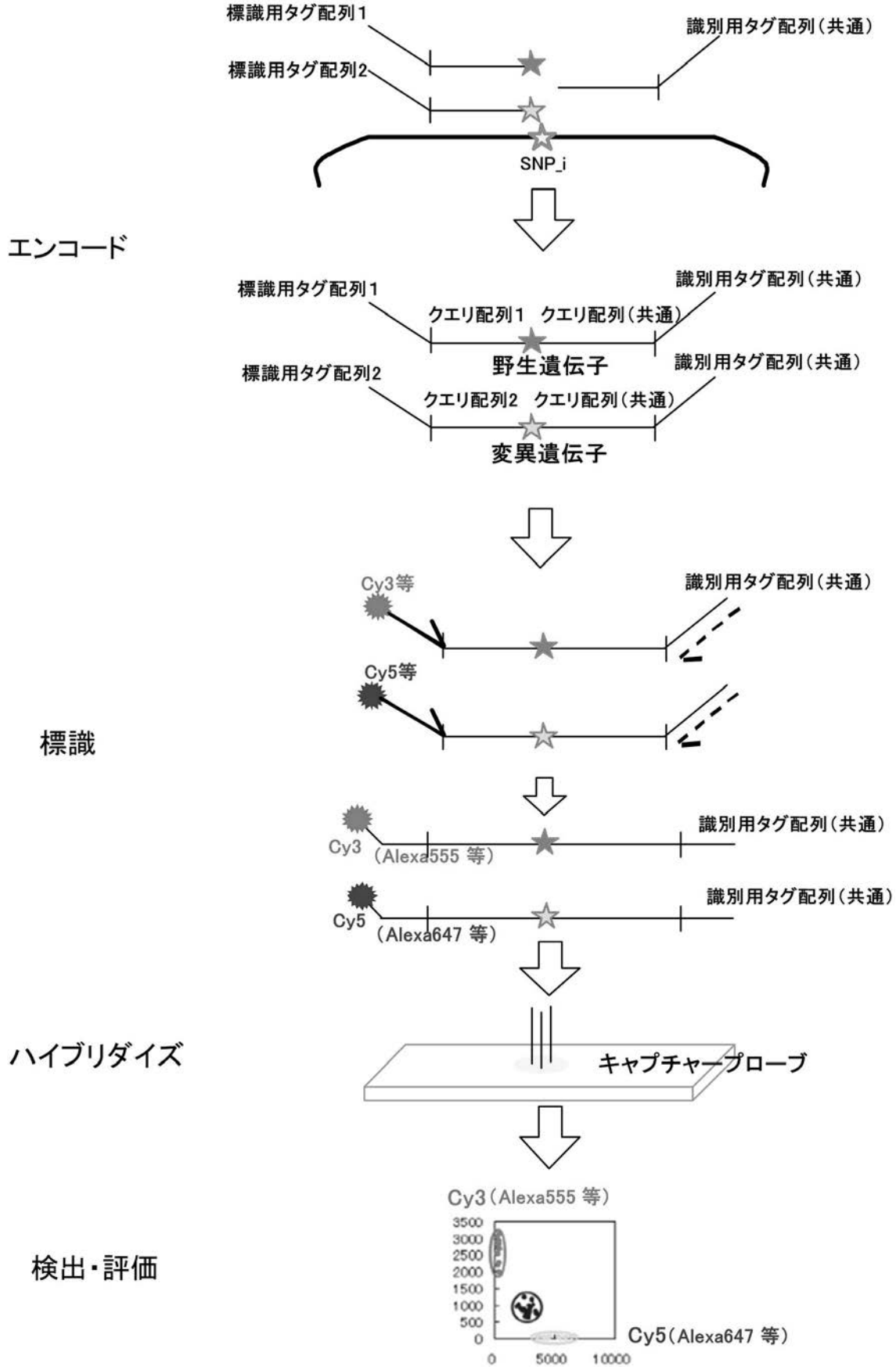
【 図 5 】



【 図 6 】



【図7】



【配列表】

0005165936000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 丹羽 孝介

愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番 56号 日本碍子株式会社内

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 特表2004-526402(JP,A)

特表2005-518819(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)