

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5207355号
(P5207355)

(45) 発行日 平成25年6月12日(2013.6.12)

(24) 登録日 平成25年3月1日(2013.3.1)

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

請求項の数 55 (全 51 頁)

(21) 出願番号	特願2008-63247 (P2008-63247)	(73) 特許権者	000003193
(22) 出願日	平成20年3月12日(2008.3.12)		凸版印刷株式会社
(65) 公開番号	特開2009-213445 (P2009-213445A)		東京都台東区台東1丁目5番1号
(43) 公開日	平成21年9月24日(2009.9.24)	(73) 特許権者	304024430
審査請求日	平成23年2月4日(2011.2.4)		国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学
			石川県能美市旭台一丁目1番地
		(74) 代理人	100064908
			弁理士 志賀 正武
		(74) 代理人	100108578
			弁理士 高橋 詔男
		(74) 代理人	100089037
			弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人	100094400
			弁理士 鈴木 三義

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法、プローブセット、及び核酸の識別方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

核酸サンプル中の1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出する方法であって、

(a) 核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得るプライマーを用いて、PCR (polymerase chain reaction) を行うことにより、1種又は2種以上の二本鎖核酸を増幅する工程と、

(b) 前記工程(a)において得られた二本鎖核酸を一本鎖化し、一本鎖核酸を得る工程と、

(c) 標的ヌクレオチド配列ごとに、下記の(I)～(III)を充足する上流側プローブ及び下流側プローブを準備する工程と、

(d) 前記工程(b)において得られた一本鎖核酸に対して、前記工程(c)において準備した上流側プローブ及び下流側プローブをハイブリダイズさせることにより、一本鎖核酸とプローブとの複合体を形成する工程と、

(e) 前記工程(d)により形成された複合体に光を照射する工程と、

(f) 前記工程(e)の後に、前記複合体中の一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させる工程と、

(g) 前記工程(f)の後に、前記工程(e)において連結されたプローブを検出する工程と、

10

20

(h) 前記工程 (g) において、連結されたプローブが検出された場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されており、連結されたプローブが検出されなかった場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されていないと判断する工程と、
を有することを特徴とする、標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

(I) 標的ヌクレオチド配列を上流側標的ヌクレオチド配列と下流側標的ヌクレオチド配列に2分割し、前記上流側プローブは、前記上流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであり、前記下流側プローブは、前記下流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであること。

(I I) 前記上流側プローブ及び前記下流側プローブは、3'末端がPCR阻害物質により修飾されていること。

10

(I I I) 前記上流側プローブの5'末端が光応答性物質により修飾されていること。

【請求項2】

前記工程 (a) におけるPCRが、多段階PCRであることを特徴とする、請求項1記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項3】

前記上流側プローブ及び前記下流側プローブが、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、及びこれらの修飾体からなる群より選択される1以上がリン酸ジエステル結合により連結したものであることを特徴とする請求項1又は2記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

20

【請求項4】

前記上流側プローブ及び前記下流側プローブが、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、及びこれらの修飾体からなる群より選択される1以上がリン酸ジエステル結合により、6～100分子連結したものであることを特徴とする請求項1又は2記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項5】

前記光応答性物質は、光照射によって開裂する共役二重結合部位を有することを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項6】

前記光応答性物質は、カルボキシビニル基、ビニル基、ベンジルトリアゾールビニル基、フェニルトリアゾールビニル基、メトキシフェニルトリアゾールビニル基、シアノフェニルトリアゾールビニル基、及びナフチルトリアゾールビニル基からなる群より選択される1以上を有することを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

30

【請求項7】

前記工程 (e) において照射される光が、紫外光であることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項8】

前記工程 (e) において照射される光が、320～400nmの波長の光の照射であることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

40

【請求項9】

前記上流側プローブの5'末端が、カルボキシビニル基により修飾されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログであることを特徴とする請求項1～8のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項10】

前記工程 (e) において、前記複合体を形成するプローブのT_m値以下の温度において光を照射することを特徴とする請求項1～9のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項11】

50

前記工程（e）において、前記複合体を形成するプローブの T_m 値 -5°C 以上 T_m 値以下の温度において光を照射することを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項 1 2】

前記上流側プローブの 3' 末端及び／又は前記下流側プローブの 3' 末端が、アミノ基により修飾されたヌクレオチド、リン酸基により修飾されたヌクレオチド、及びダイデオキシヌクレオチドからなる群より選択される 1 であることを特徴とする請求項 1 ～ 1 1 のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項 1 3】

前記上流側プローブの 5' 末端及び／又は前記下流側プローブの 5' 末端が、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性阻害物質により修飾されていることを特徴とする請求項 1 ～ 1 2 のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

10

【請求項 1 4】

前記上流側プローブの 5' 末端及び／又は前記下流側プローブの 5' 末端が、メチル基により 2-O-メチル化修飾されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログであることを特徴とする請求項 1 ～ 1 2 のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項 1 5】

前記上流側プローブ及び／又は前記下流側プローブの、5' 末端と 5' 末端から 2 番目のヌクレオチド又はヌクレオチドアナログを連結するリン酸ジエステル結合中のリン酸基が、ホスホロチオエート化されていることを特徴とする請求項 1 ～ 1 2 のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

20

【請求項 1 6】

前記上流側プローブ及び／又は前記下流側プローブが、標識分子により標識されていることを特徴とする請求項 1 ～ 1 5 のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項 1 7】

前記上流側プローブを標識する標識分子と、前記下流側プローブを標識する標識分子とが、異なる種類の発色基分子であり、
前記工程（g）における連結されたプローブの検出が、前記上流側プローブを標識する標識分子と前記下流側プローブを標識する標識分子のうち、いずれか一方をドナー分子とし、他方をアクセプター分子とする蛍光共鳴エネルギー転移による、蛍光の発光又は消光の検出であることを特徴とする請求項 1 6 記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

30

【請求項 1 8】

前記上流側プローブを標識する標識分子と、前記下流側プローブを標識する標識分子とのうち、いずれか一方が発色基分子、他方が発色抑制分子であり、
前記工程（g）における連結されたプローブの検出が、前記発色基分子の消光の検出であることを特徴とする請求項 1 6 記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項 1 9】

40

前記ドナー分子が Alexa Fluor（登録商標、インビトロジェン社製）488 又は ATTO 488 であり、前記アクセプター分子が Alexa Fluor（登録商標）594 又は ROX（Carboxy-X-rhodamine）であることを特徴とする請求項 1 7 記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項 2 0】

前記発色基分子が Alexa Fluor（登録商標）488、ATTO 488、Alexa Fluor（登録商標）594、及び ROX（Carboxy-X-rhodamine）からなる群より選択される 1 であり、前記発色抑制分子が BHQ（登録商標、Black hole quencher）-1 又は BHQ（登録商標）-2 であることを特徴とする請求項 1 8 記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

50

【請求項 2 1】

前記標識分子が、前記上流側プローブ及び／又は前記下流側プローブの、5'末端又は3'末端から19分子以内のヌクレオチド又はヌクレオチドアナログに標識されていることを特徴とする請求項16～20のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項 2 2】

前記上流側プローブにおける標識分子により標識されているヌクレオチド又はヌクレオチドアナログから5'末端までの分子数と、前記下流側プローブにおける標識分子により標識されているヌクレオチド又はヌクレオチドアナログから3'末端までの分子数との和が20以下であることを特徴とする請求項16～20のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

10

【請求項 2 3】

前記PCRに用いられるプライマーが、ヌクレオチド及びヌクレオチドアナログからなる群より選択される1以上がリン酸ジエステル結合により連結したものであることを特徴とする請求項1～22のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項 2 4】

前記PCRに用いられるプライマーが、ヌクレオチド及びヌクレオチドアナログからなる群より選択される1以上がリン酸ジエステル結合により、10～100分子連結したものであることを特徴とする請求項1～22のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

20

【請求項 2 5】

前記工程(b)において、前記工程(a)において得られた二本鎖核酸の一本鎖化を、前記二本鎖核酸に熱エネルギーを加えることにより行うことを特徴とする請求項1～24のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項 2 6】

前記工程(b)において、前記工程(a)において得られた二本鎖核酸の一本鎖化を、前記二本鎖核酸を80～105℃に加熱することにより行うことを特徴とする請求項1～24のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項 2 7】

前記工程(b)において、前記工程(a)において得られた二本鎖核酸の一本鎖化を、前記二本鎖核酸に、水酸化ナトリウム、ホルムアルデヒド、及び尿素からなる群より選択される1以上の化学物質を添加することにより行うことを特徴とする請求項1～24のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

30

【請求項 2 8】

前記工程(b)において、前記工程(a)において得られた二本鎖核酸の一本鎖化を、前記二本鎖核酸に、標的ヌクレオチド配列を有する一本鎖核酸を添加することにより行うことを特徴とする請求項1～24のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項 2 9】

前記工程(f)において、前記複合体を37～105℃に加熱することにより、一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させることを特徴とする請求項1～28のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

40

【請求項 3 0】

1又は2以上の、標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出するためのプローブのセットであって、
標的ヌクレオチド配列の種類ごとに下記の(I)～(III)を充足する上流側プローブ及び下流側プローブを有することを特徴とするプローブセット。

(I) 標的ヌクレオチド配列を上流側標的ヌクレオチド配列と下流側標的ヌクレオチド配

50

列に2分割し、前記上流側プローブは、前記上流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであり、前記下流側プローブは、前記下流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであること。

(I I) 前記上流側プローブ及び前記下流側プローブは、3'末端がPCR阻害物質により修飾されていること。

(I I I) 前記上流側プローブの5'末端が光応答性物質により修飾されていること。

【請求項31】

前記上流側プローブ及び前記下流側プローブが、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、及びこれらの修飾体からなる群より選択される1以上がリン酸ジエステル結合により連結したものであることを特徴とする請求項30記載のプローブセット。

10

【請求項32】

前記上流側プローブ及び前記下流側プローブが、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、及びこれらの修飾体からなる群より選択される1以上がリン酸ジエステル結合により、6～100分子連結したものであることを特徴とする請求項30記載のプローブセット。

【請求項33】

前記光応答性物質は、光反応官能基として、光照射によって開裂する共役二重結合部位を有することを特徴とする請求項30～32のいずれかに記載のプローブセット。

【請求項34】

前記光応答性物質は、カルボキシビニル基、ビニル基、ベンジルトリアゾールビニル基、フェニルトリアゾールビニル基、メトキシフェニルトリアゾールビニル基、シアノフェニルトリアゾールビニル基、及びナフチルトリアゾールビニル基からなる群より選択される1以上を有することを特徴とする請求項30～32のいずれかに記載のプローブセット。

20

【請求項35】

前記上流側プローブの5'末端が、カルボキシビニル基により修飾されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログであることを特徴とする請求項30～34のいずれかに記載のプローブセット。

【請求項36】

前記上流側プローブの3'末端及び／又は前記下流側プローブの3'末端が、アミノ基により修飾されたヌクレオチド、リン酸基により修飾されたヌクレオチド、及びダイデオキシヌクレオチドからなる群より選択される1であることを特徴とする請求項30～35のいずれかに記載のプローブセット。

30

【請求項37】

前記上流側プローブの5'末端又は前記下流側プローブの5'末端が、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性阻害物質により修飾されていることを特徴とする請求項30～36のいずれかに記載のプローブセット。

【請求項38】

前記上流側プローブの5'末端及び／又は前記下流側プローブの5'末端が、メチル基により2-O-メチル化修飾されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログであることを特徴とする請求項30～36のいずれかに記載のプローブセット。

40

【請求項39】

前記上流側プローブ及び／又は前記下流側プローブの、5'末端と5'末端から2番目のヌクレオチド又はヌクレオチドアナログを連結するリン酸ジエステル結合中のリン酸基が、ホスホロチオエート化されていることを特徴とする請求項30～36のいずれかに記載のプローブセット。

【請求項40】

前記上流側プローブ及び／又は前記下流側プローブが、標識分子により標識されていることを特徴とする請求項30～39のいずれかに記載のプローブセット。

【請求項41】

前記上流側プローブを標識する標識分子と、前記下流側プローブを標識する標識分子と

50

が、異なる種類の発色基分子であることを特徴とする請求項40記載のプローブセット。

【請求項42】

前記上流側プローブを標識する標識分子と、前記下流側プローブを標識する標識分子とのうち、いずれか一方が発色基分子、他方が発色抑制分子であることを特徴とする請求項40記載のプローブセット。

【請求項43】

前記上流側プローブを標識する標識分子と前記下流側プローブを標識する標識分子のいずれか一方がAlexa Fluor（登録商標、インビトロジェン社製）488又はATTO 488であり、他方がAlexa Fluor（登録商標）594又はROX（Carboxy-X-rhodamine）であることを特徴とする請求項41記載のプローブセット。

10

【請求項44】

前記発色基分子がAlexa Fluor（登録商標）488、ATTO 488、Alexa Fluor（登録商標）594、及びROX（Carboxy-X-rhodamine）からなる群より選択される1であり、前記発色抑制分子がBHQ（登録商標、Black hole quencher）-1又はBHQ（登録商標）-2であることを特徴とする請求項42記載のプローブセット。

【請求項45】

前記標識分子が、前記上流側プローブ及び／又は前記下流側プローブの、5'末端又は3'末端から19分子以内のヌクレオチド又はヌクレオチドアナログに標識されていることを特徴とする請求項40～44のいずれかに記載のプローブセット。

20

【請求項46】

前記上流側プローブにおける標識分子により標識されているヌクレオチド又はヌクレオチドアナログから5'末端までの分子数と、前記下流側プローブにおける標識分子により標識されているヌクレオチド又はヌクレオチドアナログから3'末端までの分子数との和が20以下であることを特徴とする請求項40～44のいずれかに記載のプローブセット。

【請求項47】

標的ヌクレオチド配列に、1又は2以上のヌクレオチドの置換、挿入、又は欠失からなるミスマッチ部位を有する非標的ヌクレオチド配列を有する核酸と、標的ヌクレオチド配列を有する核酸とを識別する方法であって、

30

（a''）核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得るプライマーを用いて、PCRを行うことにより、二本鎖核酸を増幅する工程と、

（b''）前記工程（a''）において得られた二本鎖核酸を一本鎖化し、一本鎖核酸を得る工程と、

（c''）下記の（I）～（III）を充足する上流側プローブ及び下流側プローブを準備する工程と、

（d''）前記工程（b''）において得られた一本鎖核酸に対して、前記工程（c''）において準備した上流側プローブ及び下流側プローブをハイブリダイズさせることにより、一本鎖核酸とプローブとの複合体を形成する工程と、

40

（e''）前記工程（d''）により形成された複合体に光を照射する工程と、

（f''）前記工程（e''）の後に、前記複合体中の一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させる工程と、

（g''）前記工程（f''）の後に、前記工程（e''）において連結されたプローブを検出する工程と、

（h''）前記工程（g''）において、連結されたプローブが検出された場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されており、連結されたプローブが検出されなかった場合には、前記核酸サンプル中に前記非標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されていると判断する工程と、

50

を有することを特徴とする、核酸の識別方法。

(I) 標的ヌクレオチド配列を上流側標的ヌクレオチド配列と下流側標的ヌクレオチド配列に2分割し、前記上流側プローブは、前記上流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであり、前記下流側プローブは、前記下流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであること。

(I I) 前記上流側プローブ及び前記下流側プローブは、3'末端がPCR阻害物質により修飾されていること。

(I I I) 前記上流側プローブの5'末端が光応答性物質により修飾されていること。

【請求項48】

前記ミスマッチ部位が、前記上流側標的ヌクレオチド配列の3'末端から10分子以内又は前記下流側標的ヌクレオチド配列の5'末端から10分子以内にあることを特徴とする請求項47記載の核酸の識別方法。

【請求項49】

前記ミスマッチ部位は、1又は2箇所以上の、1のヌクレオチド又は2以上の連続したヌクレオチドが、置換、挿入、又は欠失していることを特徴とする請求項47又は48記載の核酸の識別方法。

【請求項50】

前記標的ヌクレオチド配列が遺伝子多型のうちの一多型に相同的なヌクレオチド配列であり、前記非標的ヌクレオチド配列が前記遺伝子多型の他の一多型に相同的なヌクレオチド配列であり、前記ミスマッチ部位が前記遺伝子多型の多型部位であり、前記工程(h")が、

(h"2) 前記工程(g")において検出された連結されたプローブ量に基づき、前記核酸サンプル中の核酸が、前記標的ヌクレオチド配列を有するアレルのホモ接合体、前記非標的ヌクレオチド配列を有するアレルのホモ接合体、及び前記標的ヌクレオチド配列を有するアレルと前記非標的ヌクレオチド配列を有するアレルのヘテロ接合体のいずれであるかを識別する工程、
であることを特徴とする請求項47～49のいずれかに記載の核酸の識別方法。

【請求項51】

核酸サンプル中の1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出する方法であって、

(a') 核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得るプライマーを用いて、非対称PCR(Asymmetrical polymerase chain reaction)を行うことにより、1種又は2種以上の一本鎖核酸を増幅する工程と、

(c') 標的ヌクレオチド配列ごとに、下記の(I)～(I I I)を充足する上流側プローブ及び下流側プローブを準備する工程と、

(d') 前記工程(a')において得られた一本鎖核酸、前記上流側プローブ、及び前記下流側プローブをハイブリダイズさせることにより、一本鎖核酸とプローブとの複合体を形成する工程と、

(e') 前記工程(d')により形成された複合体に光を照射する工程と、

(f') 前記工程(e')の後に、前記複合体中の一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させる工程と、

(g') 前記工程(f')の後に、前記工程(e')において連結されたプローブを検出する工程と、

(h') 前記工程(g')において、連結されたプローブが検出された場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されており、連結されたプローブが検出されなかった場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されていないと判断する工程と、

を有することを特徴とする、標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

(I) 標的ヌクレオチド配列を上流側標的ヌクレオチド配列と下流側標的ヌクレオチド配

10

20

30

40

50

列に2分割し、前記上流側プローブは、前記上流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであり、前記下流側プローブは、前記下流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであること。

(I I) 前記上流側プローブ及び前記下流側プローブは、3'末端がPCR阻害物質により修飾されていること。

(I I I) 前記上流側プローブの5'末端が光応答性物質により修飾されていること。

【請求項52】

前記工程(a')が、

(a'1) 核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、1段階又は多段階のPCRを行い、核酸を増幅する工程と、

(a'2) 前記工程(a'1)において増幅された核酸を鋳型とし、非対称PCRを行うことにより、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含む領域が一本鎖核酸である1種又は2種以上の核酸を増幅する工程と、

を有する工程であることを特徴とする請求項51記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項53】

前記工程(a')が、

(a'3) 核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、PCRと非対称PCRを同時に行うことにより、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含む領域が一本鎖核酸である1種又は2種以上の核酸を増幅する工程、

であることを特徴とする請求項51記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項54】

前記工程(a')が、

(a'4) 核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得る3種類のプライマーを用いて、PCRを行うことにより、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含む領域が一本鎖核酸である1種又は2種以上のループ状構造を有する核酸を増幅する工程、

であり、

前記3種類のプライマーが、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列の5'側末端領域と相同的なヌクレオチド配列を有するフォワードプライマーと、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列の3'側末端領域と相補的なヌクレオチド配列を有するリバースプライマーと、3'末端側に前記フォワードプライマーよりも3'側であって、標的ヌクレオチド配列よりも5'側にある領域と相同的なヌクレオチド配列を有するループ形成用プライマーとであり、

前記ループ形成用プライマーの5'末端には、当該プライマーを起点としてPCRにより伸長されるヌクレオチド配列領域のうち、標的ヌクレオチド配列よりも3'末端側であり、かつ前記リバースプライマーと相補的なヌクレオチド配列よりも5'末端側にあるヌクレオチド配列領域と、ハイブリダイズし得るヌクレオチド配列が付加されていることを特徴とする請求項51記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

【請求項55】

核酸サンプル中の1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出する方法であって、

(1) 標的ヌクレオチド配列ごとに、下記の(I)～(I I I)を充足する上流側プローブ及び下流側プローブを準備する工程と、

(2) 核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得るプライマーを準備する工程と、

(3) 前記核酸サンプル、前記工程(1)において準備した上流側プローブ及び下流側プローブ、前記工程(2)において準備したプライマー、並びに耐熱性DNAポリメラーゼを有する反応溶液を調製する工程と、

(4) 前記工程(3)において調製した反応溶液中の二本鎖核酸を、一本鎖核酸に変性させる工程と、

(5) 前記工程(4)において得られた一本鎖核酸を鋳型として、前記プライマーを用いて、DNAポリメラーゼによる伸長反応を行う工程と、

(6) 前記工程(5)の後、反応溶液中の二本鎖核酸を、一本鎖核酸に変性させる工程と、

(7) 前記工程(6)において得られた一本鎖核酸に対して、反応溶液中の上流側プローブ及び下流側プローブをハイブリダイズさせることにより、一本鎖核酸とプローブとの複合体を形成する工程と、

(8) 前記工程(7)により形成された複合体に光を照射する工程と、

10

(9) 前記工程(8)の後に、前記複合体中の一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させる工程と、

(10) 前記工程(9)の後に、前記工程(8)において連結されたプローブを検出する工程と、

(11) 前記工程(10)の後、前記工程(4)～(10)を繰り返す工程と、
を有し、

前記工程(10)及び(11)において、連結されたプローブが検出された場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されており、連結されたプローブが検出されなかった場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されていないと判断することの特徴とする、標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法。

20

(I) 標的ヌクレオチド配列を上流側標的ヌクレオチド配列と下流側標的ヌクレオチド配列に2分割し、前記上流側プローブは、前記上流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであり、前記下流側プローブは、前記下流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであること。

(II) 前記上流側プローブ及び前記下流側プローブは、3'末端がPCR阻害物質により修飾されていること。

(III) 前記上流側プローブの5'末端が光応答性物質により修飾されていること。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、PCR(polymerase chain reaction、ポリメラーゼ連鎖反応)と光応答性塩基による光連結反応とを組み合わせた標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法、該検出方法に好適なプローブセット、及び該検出方法を用いた核酸の識別方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、細胞や微生物等の生物の遺伝子や、特定のヌクレオチド配列を有する核酸を検出し解析する技術の開発が盛んに行われている。例えば、一塩基多型(SNP)等の遺伝子多型の解析等を行う場合には、解析対象である核酸サンプルは通常微量であるため、核酸サンプル中の核酸を増幅しつつ、ヌクレオチド配列を解析することが一般的である。

40

【0003】

汎用されている核酸増幅方法として、PCR法がある。PCR法は、核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、解析の目的である標的ヌクレオチド配列を挟んだ2種類のプライマーを起点として、DNAポリメラーゼによるDNAポリメラーゼ反応を繰り返すことにより、標的ヌクレオチド配列を有する核酸を増幅する方法である。PCR法は基本的に、(i)二本鎖核酸を一本鎖化する変性工程、(ii)鋳型となる一本鎖核酸とプライマーをハイブリダイズさせるアニーリング工程、及び(iii)DNAポリメラーゼにより、プライマーを起点としてヌクレオチド鎖を伸長させる伸長工程の3つの工程を1サイクルとし、該サイクルを25～30回繰り返すことにより特定の標的ヌクレオチド配列を有する核酸を増

50

幅していく方法である。

【0004】

また、標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出には、PCR法の他にも、例えば、該標的ヌクレオチド配列を有する核酸と特異的にハイブリダイズすることができる人工合成したヌクレオチド鎖からなるプローブを用いて、ハイブリダイゼーションの有無により、核酸サンプル中の標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出するハイブリダイゼーション法が汎用されている。ハイブリダイゼーション法による標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法として、例えば、(1) エクサイプレックス蛍光又はエキシマー蛍光を用いたハイブリダイゼーションに基づく標的ヌクレオチド配列を有する核酸の識別法等がある(例えば、特許文献1参照)。該方法では、まず、標的ヌクレオチド配列部分と完全に相補的なヌクレオチド配列を有する2種類以上からなる非放射性のヌクレオチドプローブを用意する。各プローブの5'又は3'末端には、各プローブが該標的ヌクレオチド配列とハイブリダイズした際に、プローブが隣接し、エキシマー等を形成できる適当な空間的配置をとれるよう発色基分子を標識する。これにより、標的ヌクレオチド配列を有する核酸とプローブとが完全に相補的となり、ハイブリダイズした場合にのみエキシマー蛍光等が誘起され、極めて高い認識性を有することができる。該方法においては、各プローブに標識する分子は、極めて広い種類の分子から選択することができ、また、検出感度においてもバックグラウンドノイズを著しく減少させることが可能である。

10

【0005】

その他、PCRによる核酸増幅とハイブリダイゼーション法を組み合わせた方法として、例えば、(2) PCRとLDR(ligase detection reaction、リガーゼ検出法)とを組み合わせたPCR-LDR法がある(例えば、特許文献1参照)。該(2)方法は、PCRにより増幅した核酸を鋳型として、該鋳型に隣り合ってハイブリダイズする2種類のヌクレオチドプローブを、リガーゼを用いて連結し、連結反応の有無を検出することにより、標的ヌクレオチド配列を有する核酸を識別し検出する方法である。

20

【特許文献1】特許第3992079号公報

【特許文献2】特表2000-511060号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0006】

上記(1)の方法は、プローブを用いて、解析対象である標的ヌクレオチド配列を直接解析する方法であり、SNP等の、標的ヌクレオチド配列とそれ以外の非標的ヌクレオチド配列が1ヌクレオチド程度しか異なる場合であっても、精度よく標的ヌクレオチド配列を検出することができる。しかしながら、ハイブリダイゼーション法のみによる方法では、標的ヌクレオチド配列の検出感度は必ずしも十分ではないという問題がある。また、標的ヌクレオチド配列の識別には、通常、ハイブリダイゼーション条件を厳密に制御するシステムが必要であり、高度な温度制御と巧みなプローブの配列設計が要求されるため、特に多種類の標的ヌクレオチド配列を有する核酸を同時に高精度に識別検出することは極めて困難であった。

40

【0007】

一方、上記(2)の方法は、PCRとLDRを組み合わせており、標的ヌクレオチド配列の検出感度は良好であるが、PCRとLDRを同一の反応系で実行した場合には、リガーゼにより連結されるべきプローブが、PCRのプライマーとして消費されてしまう結果、プローブ本来の機能を果たせなくなるばかりか、標的ヌクレオチド配列を有する核酸領域のPCRによる増幅効率の減少にもつながる。また、プローブにDNAポリメラーゼ活性を阻害するように修飾を施した場合には、該修飾によりリガーゼの活性も阻害されてしまうため、好ましくない。このため、該方法により標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出を効率的に実行するためには、第一反応をPCR、第二反応をLDRとする2段階反応とし、PCR後には、LDR反応においてDNAポリメラーゼ活性を抑制するために、

50

P C R後の反応溶液に対して、失活処理、希釈処理、又は反応溶液置換等を行った後に、第二反応であるL D Rを行うことが必要である。このように、2段階反応とすることにより、操作が煩雑になり、装置やシステムの簡素化にも限界が生じるという問題がある。

【0008】

また、酵素は、溶液組成、濃度、温度の影響を受け易く、通常、P C Rに用いられる耐熱性D N Aポリメラーゼトリガーゼでは、最適な反応条件が異なる。このため、P C RとL D Rを同一反応系にて実行させるためには、どちらかの酵素にとって不十分な反応条件にて実行させるか、もしくは両酵素にとって妥協的な条件にて反応を実行させることとなり、反応の効率や精度の向上においても限界があるという問題もある。

【0009】

本発明は、P C R法とハイブリダイゼーション法を組み合わせた方法であって、P C R後にD N Aポリメラーゼ活性の抑制処理を要さず、簡便に、かつ感度及び精度良く標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出し得る方法、該方法に好適に用いられるプローブセット、及び該検出方法を用いた核酸の識別方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、P C R－L D R法において、P C Rにより増幅した核酸を鋳型として、該鋳型に隣り合ってハイブリダイズする2種類のプローブを連結させる方法として、L D Rに代えて、光連結（P h o t o n l i g a t t i o n）反応を用いることにより、P C Rの反応系と同一の反応系においてプローブ同士を連結させることができること、及び、該プローブの3'末端を、D N Aポリメラーゼによるヌクレオチド鎖の伸長を阻害するように修飾することにより、該プローブが、P C Rのプライマーとして消費されることを効果的に抑制し得ることを見出し、本発明を完成させた。

【0011】

（1）本発明は、核酸サンプル中の1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出する方法であって、（a）核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得るプライマーを用いて、P C R（p o l y m e r a s e c h a i n r e a c t i o n）を行うことにより、1種又は2種以上の二本鎖核酸を増幅する工程と、（b）前記工程（a）において得られた二本鎖核酸を一本鎖化し、一本鎖核酸を得る工程と、（c）標的ヌクレオチド配列ごとに、下記の（I）～（I I I）を充足する上流側プローブ及び下流側プローブを準備する工程と、（d）前記工程（b）において得られた一本鎖核酸に対して、前記工程（c）において準備した上流側プローブ及び下流側プローブをハイブリダイズさせることにより、一本鎖核酸とプローブとの複合体を形成する工程と、（e）前記工程（d）により形成された複合体に光を照射する工程と、（f）前記工程（e）の後に、前記複合体中の一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させる工程と、（g）前記工程（f）の後に、前記工程（e）において連結されたプローブを検出する工程と、（h）前記工程（g）において、連結されたプローブが検出された場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されており、連結されたプローブが検出されなかった場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されていないと判断する工程と、を有することを特徴とする、標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供する。

（I）標的ヌクレオチド配列を上流側標的ヌクレオチド配列と下流側標的ヌクレオチド配列に2分割し、前記上流側プローブは、前記上流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであり、前記下流側プローブは、前記下流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであること。

（I I）前記上流側プローブ及び前記下流側プローブは、3'末端がP C R阻害物質により修飾されていること。

（I I I）前記上流側プローブの5'末端が光応答性物質により修飾されていること。

10

20

30

40

50

(2) 本発明は、前記工程 (a) における PCR が、多段階 PCR であることを特徴とする、前記 (1) 記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(3) 本発明は、前記上流側プローブ及び前記下流側プローブが、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、及びこれらの修飾体からなる群より選択される 1 以上がリン酸ジエステル結合により連結したものであることを特徴とする前記 (1) 又は (2) 記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(4) 本発明は、前記上流側プローブ及び前記下流側プローブが、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、及びこれらの修飾体からなる群より選択される 1 以上がリン酸ジエステル結合により、6 ～ 100 分子連結したものであることを特徴とする前記 (1) 又は (2) 記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

10

(5) 本発明は、前記光応答性物質は、光照射によって開裂する共役二重結合部位を有することを特徴とする前記 (1) ～ (4) のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(6) 本発明は、前記光応答性物質は、カルボキシビニル基、ビニル基、ベンジルトリアゾールビニル基、フェニルトリアゾールビニル基、メトキシフェニルトリアゾールビニル基、シアノフェニルトリアゾールビニル基、及びナフチルトリアゾールビニル基からなる群より選択される 1 以上を有することを特徴とする前記 (1) ～ (4) のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(7) 本発明は、前記工程 (e) において照射される光が、紫外光であることを特徴とする前記 (1) ～ (6) のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

20

(8) 本発明は、前記工程 (e) において照射される光が、320 ～ 400 nm の波長の光の照射であることを特徴とする前記 (1) ～ (6) のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(9) 本発明は、前記上流側プローブの 5' 末端が、カルボキシビニル基により修飾されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログであることを特徴とする前記 (1) ～ (8) のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

。

(10) 本発明は、前記工程 (e) において、前記複合体を形成するプローブの T_m 値以下の温度において光を照射することを特徴とする前記 (1) ～ (9) のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

30

(11) 本発明は、前記工程 (e) において、前記複合体を形成するプローブの T_m 値 - 5℃ 以上 T_m 値以下の温度において光を照射することを特徴とする前記 (1) ～ (9) のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

。

(12) 本発明は、前記上流側プローブの 3' 末端及び／又は前記下流側プローブの 3' 末端が、アミノ基により修飾されたヌクレオチド、リン酸基により修飾されたヌクレオチド、及びダイデオキシヌクレオチドからなる群より選択される 1 であることを特徴とする前記 (1) ～ (11) のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

40

(13) 本発明は、前記上流側プローブの 5' 末端及び／又は前記下流側プローブの 5' 末端が、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性阻害物質により修飾されていることを特徴とする前記 (1) ～ (12) のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(14) 本発明は、前記上流側プローブの 5' 末端及び／又は前記下流側プローブの 5' 末端が、メチル基により 2-O-メチル化修飾されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログであることを特徴とする前記 (1) ～ (12) のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(15) 本発明は、前記上流側プローブ及び／又は前記下流側プローブの、5' 末端と

50

5'末端から2番目のヌクレオチド又はヌクレオチドアナログを連結するリン酸ジエステル結合中のリン酸基が、ホスホロチオエート化されていることを特徴とする前記(1)～(12)のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(16) 本発明は、前記上流側プローブ及び／又は前記下流側プローブが、標識分子により標識されていることを特徴とする前記(1)～(15)のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(17) 本発明は、前記上流側プローブを標識する標識分子と、前記下流側プローブを標識する標識分子とが、異なる種類の発色基分子であり、前記工程(g)における連結されたプローブの検出が、前記上流側プローブを標識する標識分子と前記下流側プローブを標識する標識分子のうち、いずれか一方をドナー分子とし、他方をアクセプター分子とする蛍光共鳴エネルギー転移による、蛍光の発光又は消光の検出であることを特徴とする前記(16)記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(18) 本発明は、前記上流側プローブを標識する標識分子と、前記下流側プローブを標識する標識分子とのうち、いずれか一方が発色基分子、他方が発色抑制分子であり、前記工程(g)における連結されたプローブの検出が、前記発色基分子の消光の検出であることを特徴とする前記(16)記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(19) 本発明は、前記ドナー分子がAlexa Fluor(登録商標、インビトロジェン社製)488又はATTO 488であり、前記アクセプター分子がAlexa Fluor(登録商標)594又はROX(Carboxy-X-rhodamine)であることを特徴とする前記(17)記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(20) 本発明は、前記発色基分子がAlexa Fluor(登録商標)488、ATTO 488、Alexa Fluor(登録商標)594、及びROX(Carboxy-X-rhodamine)からなる群より選択される1であり、前記発色抑制分子がBHQ(登録商標、Black hole quencher)-1又はBHQ(登録商標)-2であることを特徴とする前記(18)記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(21) 本発明は、前記標識分子が、前記上流側プローブ及び／又は前記下流側プローブの、5'末端又は3'末端から19分子以内のヌクレオチド又はヌクレオチドアナログに標識されていることを特徴とする前記(16)～(20)のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(22) 本発明は、前記上流側プローブにおける標識分子により標識されているヌクレオチド又はヌクレオチドアナログから5'末端までの分子数と、前記下流側プローブにおける標識分子により標識されているヌクレオチド又はヌクレオチドアナログから3'末端までの分子数との和が20以下であることを特徴とする前記(16)～(20)のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(23) 本発明は、前記PCRに用いられるプライマーが、ヌクレオチド及びヌクレオチドアナログからなる群より選択される1以上がリン酸ジエステル結合により連結したものであることを特徴とする前記(1)～(22)のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(24) 本発明は、前記PCRに用いられるプライマーが、ヌクレオチド及びヌクレオチドアナログからなる群より選択される1以上がリン酸ジエステル結合により、10～100分子連結したものであることを特徴とする前記(1)～(22)のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(25) 本発明は、前記工程(b)において、前記工程(a)において得られた二本鎖核酸の一本鎖化を、前記二本鎖核酸に熱エネルギーを加えることにより行うことを特徴とする前記(1)～(24)のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

10

20

30

40

50

(26) 本発明は、前記工程 (b) において、前記工程 (a) において得られた二本鎖核酸の一本鎖化を、前記二本鎖核酸を 80～105℃に加熱することにより行うことを特徴とする前記 (1)～(24) のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(27) 本発明は、前記工程 (b) において、前記工程 (a) において得られた二本鎖核酸の一本鎖化を、前記二本鎖核酸に、水酸化ナトリウム、ホルムアルデヒド、及び尿素からなる群より選択される 1 以上の化学物質を添加することにより行うことを特徴とする前記 (1)～(24) のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(28) 本発明は、前記工程 (b) において、前記工程 (a) において得られた二本鎖核酸の一本鎖化を、前記二本鎖核酸に、標的ヌクレオチド配列を有する一本鎖核酸を添加することにより行うことを特徴とする前記 (1)～(24) のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

10

(29) 本発明は、前記工程 (f) において、前記複合体を 37～105℃に加熱することにより、一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させることを特徴とする前記 (1)～(28) のいずれかに記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(30) 本発明は、1又は2以上の、標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出するためのプローブのセットであって、標的ヌクレオチド配列の種類ごとに下記の (I)～(III) を充足する上流側プローブ及び下流側プローブを有することを特徴とするプローブセットを提供するものである。

20

(I) 標的ヌクレオチド配列を上流側標的ヌクレオチド配列と下流側標的ヌクレオチド配列に 2 分割し、前記上流側プローブは、前記上流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであり、前記下流側プローブは、前記下流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであること。

(II) 前記上流側プローブ及び前記下流側プローブは、3'末端がPCR阻害物質により修飾されていること。

(III) 前記上流側プローブの 5'末端が光応答性物質により修飾されていること。

(31) 本発明は、前記上流側プローブ及び前記下流側プローブが、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、及びこれらの修飾体からなる群より選択される 1 以上がリン酸ジエステル結合により連結したものであることを特徴とする前記 (30) 記載のプローブセットを提供するものである。

30

(32) 本発明は、前記上流側プローブ及び前記下流側プローブが、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、及びこれらの修飾体からなる群より選択される 1 以上がリン酸ジエステル結合により、6～100分子連結したものであることを特徴とする前記 (30) 記載のプローブセットを提供するものである。

(33) 本発明は、前記光応答性物質は、光反応官能基として、光照射によって開裂する共役二重結合部位を有することを特徴とする前記 (30)～(32) のいずれかに記載のプローブセットを提供するものである。

(34) 本発明は、前記光応答性物質は、カルボキシビニル基、ビニル基、ベンジルトリアゾールビニル基、フェニルトリアゾールビニル基、メトキシフェニルトリアゾールビニル基、シアノフェニルトリアゾールビニル基、及びナフチルトリアゾールビニル基からなる群より選択される 1 以上を有することを特徴とする前記 (30)～(32) のいずれかに記載のプローブセットを提供するものである。

40

(35) 本発明は、前記上流側プローブの 5'末端が、カルボキシビニル基により修飾されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログであることを特徴とする前記 (30)～(34) のいずれかに記載のプローブセットを提供するものである。

(36) 本発明は、前記上流側プローブの 3'末端及び／又は前記下流側プローブの 3'末端が、アミノ基により修飾されたヌクレオチド、リン酸基により修飾されたヌクレオチド、及びダイデオキシヌクレオチドからなる群より選択される 1 であることを特徴とす

50

る前記(30)～(35)のいずれかに記載のプローブセットを提供するものである。

(37) 本発明は、前記上流側プローブの5'末端又は前記下流側プローブの5'末端が、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性阻害物質により修飾されていることを特徴とする前記(30)～(36)のいずれかに記載のプローブセットを提供するものである。

(38) 本発明は、前記上流側プローブの5'末端及び／又は前記下流側プローブの5'末端が、メチル基により2-O-メチル化修飾されたヌクレオチド又はヌクレオチドアナログであることを特徴とする前記(30)～(36)のいずれかに記載のプローブセットを提供するものである。

(39) 本発明は、前記上流側プローブ及び／又は前記下流側プローブの、5'末端と5'末端から2番目のヌクレオチド又はヌクレオチドアナログを連結するリン酸ジエステル結合中のリン酸基が、ホスホロチオエート化されていることを特徴とする前記(30)～(36)のいずれかに記載のプローブセットを提供するものである。

(40) 本発明は、前記上流側プローブ及び／又は前記下流側プローブが、標識分子により標識されていることを特徴とする前記(30)～(39)のいずれかに記載のプローブセットを提供するものである。

(41) 本発明は、前記上流側プローブを標識する標識分子と、前記下流側プローブを標識する標識分子とが、異なる種類の発色基分子であることを特徴とする前記(40)記載のプローブセットを提供するものである。

(42) 本発明は、前記上流側プローブを標識する標識分子と、前記下流側プローブを標識する標識分子とのうち、いずれか一方が発色基分子、他方が発色抑制分子であることを特徴とする前記(40)記載のプローブセットを提供するものである。

(43) 本発明は、前記上流側プローブを標識する標識分子と前記下流側プローブを標識する標識分子のいずれか一方がAlexa Fluor(登録商標、インビトロジェン社製)488又はATTO 488であり、他方がAlexa Fluor(登録商標)594又はROX(Carboxy-X-rhodamine)であることを特徴とする前記(41)記載のプローブセットを提供するものである。

(44) 本発明は、前記発色基分子がAlexa Fluor(登録商標)488、ATTO 488、Alexa Fluor(登録商標)594、及びROX(Carboxy-X-rhodamine)からなる群より選択される1であり、前記発色抑制分子がBHQ(登録商標、Black hole quencher)-1又はBHQ(登録商標)-2であることを特徴とする前記(42)記載のプローブセットを提供するものである。

(45) 本発明は、前記標識分子が、前記上流側プローブ及び／又は前記下流側プローブの、5'末端又は3'末端から19分子以内のヌクレオチド又はヌクレオチドアナログに標識されていることを特徴とする前記(40)～(44)のいずれかに記載のプローブセットを提供するものである。

(46) 本発明は、前記上流側プローブにおける標識分子により標識されているヌクレオチド又はヌクレオチドアナログから5'末端までの分子数と、前記下流側プローブにおける標識分子により標識されているヌクレオチド又はヌクレオチドアナログから3'末端までの分子数との和が20以下であることを特徴とする前記(40)～(44)のいずれかに記載のプローブセットを提供するものである。

(47) 本発明は、標的ヌクレオチド配列に、1又は2以上のヌクレオチドの置換、挿入、又は欠失からなるミスマッチ部位を有する非標的ヌクレオチド配列を有する核酸と、標的ヌクレオチド配列を有する核酸とを識別する方法であって、(a")核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得るプライマーを用いて、PCRを行うことにより、二本鎖核酸を増幅する工程と、(b")前記工程(a")において得られた二本鎖核酸を一本鎖化し、一本鎖核酸を得る工程と、(c")下記の(I)～(III)を充足する上流側プローブ及び下流側プローブを準備する工程と、(d")前記工程(b")において得られた一本鎖核酸に対して、前記工程(c")において準備した上流側プローブ及び下流側プローブをハイブリダイズさせることにより

10

20

30

40

50

、一本鎖核酸とプローブとの複合体を形成する工程と、(e'')前記工程(d'')により形成された複合体に光を照射する工程と、(f'')前記工程(e'')の後に、前記複合体中の一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させる工程と、(g'')前記工程(f'')の後に、前記工程(e'')において連結されたプローブを検出する工程と、(h'')前記工程(g'')において、連結されたプローブが検出された場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されており、連結されたプローブが検出されなかった場合には、前記核酸サンプル中に前記非標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されていると判断する工程と、を有することを特徴とする、核酸の識別方法を提供するものである。

(I) 標的ヌクレオチド配列を上流側標的ヌクレオチド配列と下流側標的ヌクレオチド配列に2分割し、前記上流側プローブは、前記上流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであり、前記下流側プローブは、前記下流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであること。

(II) 前記上流側プローブ及び前記下流側プローブは、3'末端がPCR阻害物質により修飾されていること。

(III) 前記上流側プローブの5'末端が光応答性物質により修飾されていること。

(48) 本発明は、前記ミスマッチ部位が、前記上流側標的ヌクレオチド配列の3'末端から10分子以内又は前記下流側標的ヌクレオチド配列の5'末端から10分子以内にあることを特徴とする前記(47)記載の核酸の識別方法を提供するものである。

(49) 本発明は、前記ミスマッチ部位は、1又は2箇所以上の、1のヌクレオチド又は2以上の連続したヌクレオチドが、置換、挿入、又は欠失していることを特徴とする前記(47)又は(48)記載の核酸の識別方法を提供するものである。

(50) 本発明は、前記標的ヌクレオチド配列が遺伝子多型のうちの一多型に相同的なヌクレオチド配列であり、前記非標的ヌクレオチド配列が前記遺伝子多型の他の一多型に相同的なヌクレオチド配列であり、前記ミスマッチ部位が前記遺伝子多型の多型部位であり、前記工程(h'')が、(h'')前記工程(g'')において検出された連結されたプローブ量に基づき、前記核酸サンプル中の核酸が、前記標的ヌクレオチド配列を有するアレルのホモ接合体、前記非標的ヌクレオチド配列を有するアレルのホモ接合体、及び前記標的ヌクレオチド配列を有するアレルと前記非標的ヌクレオチド配列を有するアレルのヘテロ接合体のいずれであるかを識別する工程、であることを特徴とする前記(47)～(49)のいずれかに記載の核酸の識別方法を提供するものである。

(51) 本発明は、核酸サンプル中の1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出する方法であって、(a')核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得るプライマーを用いて、非対称PCR(Asymmetrical polymerase chain reaction)を行うことにより、1種又は2種以上の一本鎖核酸を増幅する工程と、(c')標的ヌクレオチド配列ごとに、下記の(I)～(III)を充足する上流側プローブ及び下流側プローブを準備する工程と、(d')前記工程(a')において得られた一本鎖核酸、前記上流側プローブ、及び前記下流側プローブをハイブリダイズさせることにより、一本鎖核酸とプローブとの複合体を形成する工程と、(e')前記工程(d')により形成された複合体に光を照射する工程と、(f')前記工程(e')の後に、前記複合体中の一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させる工程と、(g')前記工程(f')の後に、前記工程(e')において連結されたプローブを検出する工程と、(h')前記工程(g')において、連結されたプローブが検出された場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されており、連結されたプローブが検出されなかった場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されていないと判断する工程と、を有することを特徴とする、標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(I) 標的ヌクレオチド配列を上流側標的ヌクレオチド配列と下流側標的ヌクレオチド配

列に2分割し、前記上流側プローブは、前記上流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであり、前記下流側プローブは、前記下流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであること。

(I I) 前記上流側プローブ及び前記下流側プローブは、3'末端がPCR阻害物質により修飾されていること。

(I I I) 前記上流側プローブの5'末端が光応答性物質により修飾されていること。

(5 2) 本発明は、前記工程(a')が、(a' 1)核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、1段階又は多段階のPCRを行い、核酸を増幅する工程と、(a' 2)前記工程(a' 1)において増幅された核酸を鋳型とし、非対称PCRを行うことにより、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含む領域が一本鎖核酸である1種又は2種以上の核酸を増幅する工程と、を有する工程であることを特徴とする前記(5 1)記載の核酸の検出方法を提供するものである。

10

(5 3) 本発明は、前記工程(a')が、(a' 3)核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、PCRと非対称PCRを同時に行うことにより、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含む領域が一本鎖核酸である1種又は2種以上の核酸を増幅する工程、であることを特徴とする前記(5 1)記載の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(5 4) 本発明は、前記工程(a')が、(a' 4)核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得る3種類のプライマーを用いて、PCRを行うことにより、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含む領域が一本鎖核酸である1種又は2種以上のループ状構造を有する核酸を増幅する工程であり、前記3種類のプライマーが、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列の5'側末端領域と相同的なヌクレオチド配列を有するフォワードプライマーと、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列の3'側末端領域と相補的なヌクレオチド配列を有するリバースプライマーと、3'末端側に前記フォワードプライマーよりも3'側であって、標的ヌクレオチド配列よりも5'側にある領域と相同的なヌクレオチド配列を有するループ形成用プライマーとであり、前記ループ形成用プライマーの5'末端には、当該プライマーを起点としてPCRにより伸長されるヌクレオチド配列領域のうち、標的ヌクレオチド配列よりも3'末端側であり、かつ前記リバースプライマーと相補的なヌクレオチド配列よりも5'末端側にあるヌクレオチド配列領域と、ハイブリダイズし得るヌクレオチド配列が付加されていることを特徴とする前記(5 1)記載の核酸の検出方法を提供するものである。

20

30

(5 5) 本発明は、核酸サンプル中の1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出する方法であって、(1)標的ヌクレオチド配列ごとに、下記の(I)～(I I)を充足する上流側プローブ及び下流側プローブを準備する工程と、(2)核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得るプライマーを準備する工程と、(3)前記核酸サンプル、前記工程(1)において準備した上流側プローブ及び下流側プローブ、前記工程(2)において準備したプライマー、並びに耐熱性DNAポリメラーゼを有する反応溶液を調製する工程と、(4)前記工程(3)において調製した反応溶液中の二本鎖核酸を、一本鎖核酸に変性させる工程と、(5)前記工程(4)において得られた一本鎖核酸を鋳型として、前記プライマーを用いて、DNAポリメラーゼによる伸長反応を行う工程と、(6)前記工程(5)の後、反応溶液中の二本鎖核酸を、一本鎖核酸に変性させる工程と、(7)前記工程(6)において得られた一本鎖核酸に対して、反応溶液中の上流側プローブ及び下流側プローブをハイブリダイズさせることにより、一本鎖核酸とプローブとの複合体を形成する工程と、(8)前記工程(7)により形成された複合体に光を照射する工程と、(9)前記工程(8)の後に、前記複合体中の一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させる工程と、(10)前記工程(9)の後に、前記工程(8)において連結されたプローブを検出する工程と、(11)前記工程(10)の後、前記工程(4)～(10)を繰り返す工程と、を有し、前記工程(10)及び(1

40

50

1)において、連結されたプローブが検出された場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されており、連結されたプローブが検出されなかった場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されていないと判断することを特徴とする、標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法を提供するものである。

(I) 標的ヌクレオチド配列を上流側標的ヌクレオチド配列と下流側標的ヌクレオチド配列に2分割し、前記上流側プローブは、前記上流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであり、前記下流側プローブは、前記下流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであること。

(I I) 前記上流側プローブ及び前記下流側プローブは、3'末端がPCR阻害物質により修飾されていること。

(I I I) 前記上流側プローブの5'末端が光応答性物質により修飾されていること。

【発明の効果】

【0012】

本発明の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法及び核酸の識別方法は、PCR法とハイブリダイゼーション法を組み合わせた方法であるため、より高精度かつ高感度に標的ヌクレオチド配列を識別し検出することができる。また、LDRに代えて、光連結反応を用いていることにより、従来のPCR-LDR法とは異なり、一つの反応系でPCRとプローブ連結反応を同時に進行させることも可能となり、ヌクレオチド配列の識別や検出の精度のみならず、反応効率の向上にも資する。さらに、反応系を簡素化することが可能となるため、本発明を実施するシステムや装置において、装置の小型化、装備の単純化、しいては製品のコストダウン等の多種のメリットを生みだすことができる。さらに、反応の開始・停止は光照射の有無で制御できるため、任意のタイミングで連結反応を誘導することができ、反応条件をより厳密に制御することが可能となる。

また、本発明のプローブセットを用いることにより、従来法よりも簡便かつ高精度に、標的ヌクレオチド配列を有する核酸を識別し検出することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明において、核酸とは、DNA又はRNAであれば特に限定されるものではなく、天然のものであってもよく、合成されたものであってもよい。天然の核酸として、例えば、生物から回収されたゲノムDNA、mRNA、tRNA、rRNA、hnRNA等がある。また、合成された核酸として、β-シアノエチルホスフォロアミダイト法DNA固相合成法等の公知の化学的合成法により合成されたDNAや、PCR等の公知の核酸増幅法により合成された核酸、逆転写反応により合成されたcDNA等がある。

【0014】

本発明において核酸サンプルとは、核酸を含有するサンプルであれば、特に限定されるものではないが、動物、植物、微生物、培養細胞等から核酸を抽出したサンプルであることが好ましい。なお、動物等からの核酸の抽出は、フェノール/クロロホルム法等の公知の手法により行うことができる。

【0015】

本発明において標的ヌクレオチド配列は、PCR法やハイブリダイゼーション法等により検出が可能な程度に塩基配列が明らかになっているものであれば、特に限定されるものではない。本発明の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法や核酸の識別方法においては、標的ヌクレオチド配列として、遺伝子上に存在する特定の領域のヌクレオチド配列であることが好ましく、遺伝子多型を含む領域のヌクレオチド配列であることがより好ましい。本発明の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法や核酸の識別方法は、標的ヌクレオチド配列を有する核酸の識別・検出能が高く、相同性の高いヌクレオチド配列同士を高精度に識別し得るためである。

【0016】

ここで、遺伝子多型とは、ある生物種の集団内において、個体ごとに遺伝子のヌクレオ

10

20

30

40

50

チド配列が異なるものを意味する。遺伝子多型としては、例えば、一塩基多型（SNP）、マイクロサテライト多型等がある。本発明の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法や核酸の識別方法において、標的ヌクレオチド配列が含む遺伝子多型として、SNPであることが好ましい。

【0017】

その他、本発明における標的ヌクレオチド配列としては、遺伝子多型のように先天的な多型のみならず、後天的な遺伝子変異等を含む領域のヌクレオチド配列であってもよい。後天的な遺伝子変異として、紫外線等の物理的刺激や発がん性物質等による化学的刺激により誘発される体細胞変異等が挙げられる。後述するように、本発明においては、標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出を、連結されたプローブ量を測定することにより検出するため、定量的な解析が可能となり得るため、体細胞変異等を定量的に解析する場合にも用いることができる。

10

【0018】

本発明においてヌクレオチドアナログとは、非天然のヌクレオチドであり、天然のヌクレオチドであるデオキシリボヌクレオチド（DNA）やリボヌクレオチド（RNA）と同様の機能を有するものをいう。すなわち、ヌクレオチドアナログは、ヌクレオチドと同様にリン酸ジエステル結合により鎖を形成することができ、かつ、ヌクレオチドアナログを用いて形成されたプライマーやプローブは、ヌクレオチドのみを用いて形成されたプライマーやプローブと同様に、PCRやハイブリダイゼーションに用いることができる。このようなヌクレオチドアナログとして、例えば、PNA（ポリアミドヌクレオチド誘導体）、LNA（BNA）、ENA（2'-O, 4'-C-ethylene-bridged nucleic acids）、及びこれらの複合体等がある。ここで、PNAは、DNAやRNAのリン酸と5炭糖からなる主鎖をポリアミド鎖に置換したものである。また、LNA（BNA）は、リボヌクレオチドの2'部位の酸素原子と4'部位の炭素原子がメチレンを介して結合している2つの環状構造を持つ化合物である。

20

【0019】

本発明の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法（以下、本発明の検出方法ということがある。）は、核酸サンプル中の1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出する方法であって、（a）核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得るプライマーを用いて、PCRを行うことにより、1種又は2種以上の二本鎖核酸を増幅する工程と、（b）前記工程（a）において得られた二本鎖核酸を一本鎖化し、一本鎖核酸を得る工程と、（c）標的ヌクレオチド配列ごとに、下記の（I）～（III）を充足する上流側プローブ及び下流側プローブを準備する工程と、（d）前記工程（b）において得られた一本鎖核酸に対して、前記工程（c）において準備した上流側プローブ及び下流側プローブをハイブリダイズさせることにより、一本鎖核酸とプローブとの複合体を形成する工程と、（e）前記工程（d）により形成された複合体に光を照射する工程と、（f）前記工程（e）の後に、前記複合体中の一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させる工程と、（g）前記工程（f）の後に、前記工程（e）において連結されたプローブを検出する工程と、（h）前記工程（g）において、連結されたプローブが検出された場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されており、連結されたプローブが検出されなかった場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されていないと判断する工程と、を有することを特徴とする。

30

40

（I）標的ヌクレオチド配列を上流側標的ヌクレオチド配列と下流側標的ヌクレオチド配列に2分割し、前記上流側プローブは、前記上流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであり、前記下流側プローブは、前記下流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであること。

（II）前記上流側プローブ及び前記下流側プローブは、3'末端がPCR阻害物質により修飾されていること。

50

(I I I) 前記上流側プローブの 5 ' 末端及び／又は前記下流側プローブの 3 ' 末端が光応答性物質により修飾されていること。

【 0 0 2 0 】

本発明の検出方法は、主に、工程 (a) ～ (b) の P C R による増幅段階と、工程 (c) ～ (h) の光連結反応を用いたハイブリダイゼーションによる検出段階の 2 段階に分けられる。以下、工程ごとに説明する。

【 0 0 2 1 】

まず、工程 (a) において、核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、 1 又は 2 以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得るプライマーを用いて、 P C R を行うことにより、 1 種又は 2 種以上の二本鎖核酸を増幅する。核酸サンプルに含まれている全核酸のうち、標的ヌクレオチド配列を含むことが期待される領域のみを増幅することにより、核酸サンプルとして、標的ヌクレオチドを有する核酸が微量にしか存在していない遺伝子サンプル等を用いた場合であっても、高感度に標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出することができる。ここで、鋳型とする核酸サンプル中の核酸は、 D N A 又は R N A のいずれでもあってよく、一本鎖でもあって二本鎖でもよい。なお、核酸サンプル中の核酸が R N A である場合には、逆転写反応により得られた c D N A を鋳型とすることができる。

10

【 0 0 2 2 】

工程 (a) において用いられるプライマーは、 1 又は 2 以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列 (増幅用ヌクレオチド配列) を P C R により増幅し得るプライマーであり、増幅用ヌクレオチド配列を挟む 2 種類のプライマーである。例えば、増幅用ヌクレオチド配列の上流端領域と相同的なヌクレオチド配列を有するフォワードプライマーと、増幅用ヌクレオチド配列の下流端領域と相補的なヌクレオチド配列を有するリバースプライマーとからなる 2 種類のプライマーであってもよい。なお、 P C R において用いられる該 2 種類のプライマーの各濃度は、 P C R 産物として二本鎖核酸を得ることができる濃度比であれば特に限定されるものではないが、等濃度で用いることが好ましい。

20

【 0 0 2 3 】

増幅用ヌクレオチド配列、すなわち、 P C R により増幅される領域は、少なくとも 1 の標的ヌクレオチド配列を含む領域であればよく、 2 以上の標的ヌクレオチド配列を含む領域を一の P C R により増幅してもよい。つまり、 P C R により得られる二本鎖核酸は、 1 の標的ヌクレオチド配列を含む核酸であってもよく、 2 以上の標的ヌクレオチド配列を含む核酸であってもよい。

30

【 0 0 2 4 】

また、工程 (a) において P C R により得られる二本鎖核酸は、 1 種類であってもよく、複数種類であってもよい。ここで、 P C R により得られる二本鎖核酸が複数種類であるとは、 P C R により増幅される領域が、核酸サンプル中の核酸の 1 の領域ではなく、 2 以上の領域であることを意味する。例えば、工程 (a) における P C R をマルチプレックス P C R とすることにより、複数種類の二本鎖核酸 (P C R 産物) を得ることができる。また、二本鎖核酸の種類ごとに別個独立に P C R を行い、得られた P C R 産物を混合してもよい。

40

【 0 0 2 5 】

このように、 2 以上の標的ヌクレオチド配列を含むと期待し得る核酸領域をまとめて増幅することにより、 2 以上の標的ヌクレオチド配列の検出、すなわち多重解析における作業工程を減少させることができる。

【 0 0 2 6 】

工程 (a) における P C R は、多段階 P C R であってもよい。ここで、多段階 P C R とは、前段階目の P C R 後の P C R 溶液に、前段階目の P C R とは異なるプライマーを添加して、後段階目の P C R を行うことを意味する。後段階目の P C R は、前段階目の P C R 産物を鋳型として用いるものであってもよく、核酸サンプル中に元々含まれていた核酸を鋳型として用いるものであってもよい。工程 (a) における P C R 増幅を複数回繰り返す

50

ことにより、後のハイブリダイゼーションによる検出段階において、より高い検出シグナルを得ることができる。

【0027】

次に、工程（b）として、工程（a）において得られた二本鎖核酸を一本鎖化し、一本鎖核酸を得る。一本鎖化することにより、工程（a）において増幅した標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を有する核酸を、後の工程のハイブリダイゼーションにおける鋳型として用いることができるようになる。

【0028】

工程（b）において、二本鎖核酸を一本鎖化する方法は、特に限定されるものではなく、公知の手法で行うことができる。例えば、二本鎖核酸に熱エネルギーを加えることや、塩基同士の水素結合を弱めるような化学物質を添加すること等により、二本鎖核酸を一本鎖化することができる。具体的には、例えば、PCR後のPCR溶液を、80～105℃に加熱することや、該PCR溶液に、水酸化ナトリウム、ホルムアルデヒド、及び尿素等を添加することにより、PCR溶液中の二本鎖核酸を一本鎖化することができる。その他、該PCR溶液に、一本鎖化させたい領域のヌクレオチド配列、すなわち標的ヌクレオチド配列と相同的な配列を有する一本鎖核酸を添加することによっても、一本鎖化することができる。

【0029】

二本鎖核酸を一本鎖化するために添加される一本鎖核酸は、ヌクレオチド又はヌクレオチドアナログがリン酸ジエステル結合することにより形成されたものであることが好ましい。特に、ヌクレオチドアナログとして、LNA（BNA）、ENA、PNA等のT_m値が比較的高いヌクレオチドアナログを構成分子として形成された一本鎖核酸であることが好ましい。

【0030】

本発明の検出方法においては、工程（b）における一本鎖化は、熱エネルギーを加える方法であることが好ましく、PCR後のPCR溶液を、80～105℃に加熱することがより好ましく、95～100℃に加熱することがさらに好ましく、95℃に加熱することが特に好ましい。PCR溶液の組成を変更する必要がないため、後の工程に対する影響を抑えることができるためである。

【0031】

工程（a）におけるPCRを、非対称PCRとすることにより、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を有する一本鎖核酸を増幅させることができる。具体的には、核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得るプライマーを用いて、非対称PCRを行うことにより、1種又は2種以上の一本鎖核酸を増幅する。このようにして得られた一本鎖核酸は、一本鎖化することなく、後の工程のハイブリダイゼーションにおける鋳型として用いることができる。

【0032】

本発明において、非対称PCRとは、前記二本鎖核酸を得る場合とは異なり、PCRに用いられる増幅用ヌクレオチド配列を挟む2種類のプライマーのうち、1種類のプライマーのみを用いて行うPCRや、1種類のプライマーを他方のプライマーよりも高濃度に用いて行うPCRを意味する。鋳型である二本鎖核酸を構成する二本の鎖が非対称的に増幅される結果、より高濃度に添加したプライマーを起点として伸長される鎖が、一本鎖核酸の状態を得ることができる。ここで、1種類のプライマーのみを用いてPCRを行った場合には、一本鎖核酸は増幅されるものの、指数関数的な増幅は行われませんが、プライマーの量比を変えてPCRを行った場合には、通常のPCRのように二本鎖核酸が指数関数的に増幅しつつ、一本鎖核酸も増幅される。

【0033】

その他、一部分に一本鎖のループ構造を有するPCR産物を得る方法を用いることにより、標的ヌクレオチド配列領域を一本鎖核酸として得ることができる（例えば、特開20

05-102502号公報参照。)。具体的には、3種類のプライマー、すなわち、通常のPCRに用いられる前述のフォワードプライマーとリバースプライマーの2種類のプライマーに加えて、5'末端には、当該プライマーを起点としてPCRにより伸長されるヌクレオチド配列領域のうち、標的ヌクレオチド配列よりも3'末端側であり、かつ前記リバースプライマーと相補的なヌクレオチド配列よりも5'末端側にあるヌクレオチド配列領域と、ハイブリダイズし得るヌクレオチド配列が付加されており、3'末端側に前記フォワードプライマーよりも3'側であって、標的ヌクレオチド配列よりも5'側にある領域と相同的なヌクレオチド配列を有するループ形成用プライマーとを用いてPCRを行うことにより、一本鎖のループ構造部分に標的ヌクレオチド配列領域を有するPCR産物を得ることができる。該方法により得られたPCR産物も、非対称PCR産物と同様に、一本鎖化することなく、後の工程のハイブリダイゼーションにおける鋳型として用いることができる。

10

【0034】

なお、PCR産物として二本鎖核酸を得るPCRと、一本鎖核酸を得るPCRとを組み合わせてもよい。例えば、1段階のPCR又は多段階PCRを行った後に、非対称PCRを行ってもよい。

【0035】

また、工程(a)におけるPCRは、PCRと非対称PCRを同時に行うものであってもよい。例えば、第一段階目のPCRを通常のPCRとし、第二段階目のPCRを非対称PCRとして、第二段階目の非対称PCRにより目的の増幅ヌクレオチド配列を有する一本鎖核酸を増幅させるNested PCRを行う場合に、第一段階目のPCRを行うためのプライマーと、第二段階目の非対称PCRを行うためのプライマーとを、予め反応溶液に入れておくことにより、第一段階目のPCRと第二段階目の非対称PCRを同時に行うことができる。

20

なお、PCRや非対称PCRを同時に行うとは、同一の反応溶液中で、同一の反応サイクル(変性工程、アニール工程、伸長工程)で反応を行うことを意味する。

【0036】

PCRに用いられるこれらのプライマーは、標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列の配列情報、PCRに用いるDNAポリメラーゼの種類等を考慮して、常法により設計し合成することができる。

30

【0037】

本発明においては、PCRに用いられるこれらのプライマーのT_m値が、上流側プローブや下流側プローブのT_m値よりも高くなるように設計することが好ましい。プローブのT_m値よりもプライマーのT_m値を高くすることにより、プローブの存在下でプライマーを用いてPCRを行う場合にも、PCRに対するプローブの影響を抑えることができる。

【0038】

PCRに用いられるこれらのプライマーは、ヌクレオチド及びヌクレオチドアナログからなる群より選択される1以上がリン酸ジエステル結合により連結したものである。プライマーの長さは、プライマーのT_m値、増幅ヌクレオチド配列の種類等を考慮して適宜決定することができるが、10~100分子連結したものであることが好ましい。

40

【0039】

本発明の検出方法においては、PCRは、通常用いられる試薬を通常用いられる量で用いて、通常使用されるプロトコールに基づき、常法により行うことができる。なお、PCRに用いられるDNAポリメラーゼは、通常PCRにおいて用いられるDNAポリメラーゼであれば特に限定されるものではないが、耐熱性ポリメラーゼであることが好ましい。PCRの変性工程では、通常90℃以上の高温処理が行われるためである。

【0040】

また、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを用いることもできる。通常のPCRと同様に、PCRの精度を向上させることができるためである。但し、上流側プローブや下流側プローブの5'末端が、後述するように5'→3'エキソヌ

50

クレアーゼ活性阻害物質により修飾されていない場合等、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により上流側プローブ等が損なわれるおそれがある場合には、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有さないDNAポリメラーゼを用いることが好ましい。

【0041】

その他、例えば、標的ヌクレオチド配列中に、遺伝子多型部位等の特に高精度に識別して検出したい標的ヌクレオチドが存在する場合であって、上流側プローブや下流側プローブ中の該標的ヌクレオチドとハイブリダイズするヌクレオチドが、各プローブの3'末端領域に存在する場合には、該プローブの3'末端を後述するように3'→5'エキソヌクレアーゼ活性阻害物質により修飾しておくことが好ましく、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性阻害物質により修飾されていない場合には、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有さないDNAポリメラーゼを用いることが好ましい。3'→5'エキソヌクレアーゼ活性により、各プローブ中の該標的ヌクレオチドとハイブリダイズするヌクレオチドが、削られてしまうおそれがあるためである。

10

【0042】

また、本発明の検出方法においては、工程(c)として、標的ヌクレオチド配列ごとに、上記の3要件(I)～(III)を充足する上流側プローブ及び下流側プローブを準備する。なお、工程(c)は、工程(d)の前であればいつ行ってもよく、工程(a)及び(b)とは独立して行うことができる。例えば、工程(a)の前に予め工程(c)を行ってもよい。

【0043】

20

上流側プローブ及び下流側プローブは、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、及びこれらの修飾体からなる群より選択される1以上がリン酸ジエステル結合により連結したものである。ここで、修飾体としては、例えば、修飾デオキシリボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、修飾ホスフェート糖-骨格オリゴヌクレオチド、修飾PNA、修飾LNA(BNA)、修飾ENA等がある。ここで、ヌクレオチドやヌクレオチドアナログの修飾に用いられる物質は、本発明の効果を損なわない限り、特に限定されるものではなく、ヌクレオチド等の修飾に通常用いられる物質を用いることができる。修飾ヌクレオチドや修飾ヌクレオチドアナログとして、例えば、アミノ基、カルボキシビニル基、リン酸基、メチル基等の官能基により修飾されたヌクレオチド等、メチル基により2-O-メチル化修飾されたヌクレオチド等、ホスホロチオエート化修飾されたヌクレオチド等、蛍光物質等の後述する標識分子により修飾されたヌクレオチド等がある。

30

【0044】

上流側プローブ及び下流側プローブの長さは、特に限定されるものではなく、標的ヌクレオチド配列の長さや種類、Tm値等を考慮して適宜決定することができる。本発明における上流側プローブ又は下流側プローブとしては、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、及びこれらの修飾体(以下、ヌクレオチド等ということがある。)が、6~100分子連結したものであることが好ましい。特に、プローブのTm値が、核酸増幅工段階であるPCRにおいて用いられるプライマーのTm値よりも低くなるように、長さを調整することが好ましい。

【0045】

40

標的ヌクレオチド配列を上流側標的ヌクレオチド配列と下流側標的ヌクレオチド配列に2分割した場合に、前記上流側プローブは、前記上流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであり、前記下流側プローブは、前記下流側標的ヌクレオチド配列を有する核酸とハイブリダイズし得るプローブであることを要する(要件(I))。なお、本発明においては、上流とは、ヌクレオチド配列やプローブ、プライマー等の5'側を意味し、下流とは、3'側を意味する。

【0046】

図1は、標的ヌクレオチド配列1、上流側プローブ2、及び下流側プローブ3の関係を模式的に示した図である。上流側プローブ2は、標的ヌクレオチド配列1の上流側標的ヌクレオチド配列1aにハイブリダイズし得るプローブであり、下流側プローブ3は、下流

50

側標的ヌクレオチド配列 1 b にハイブリダイズし得るプローブである。つまり、標的ヌクレオチド配列 1 を有する核酸を鋳型とし、各プローブがハイブリダイズした場合には、上流側プローブ 2 の 5' 末端と、下流側プローブ 3 の 3' 末端が隣接することになる。

【0047】

また、前記上流側プローブ及び前記下流側プローブは、3' 末端が PCR 阻害物質により修飾されているプローブであることを要する（要件（I I））。DNA ポリメラーゼによる伸長反応は、ヌクレオチドの 5' 側から 3' 側へと進行するため、各プローブの 3' 末端を PCR 阻害物質により修飾することにより、DNA ポリメラーゼ活性が存在する場合であっても、各プローブはプライマーとして消費され難い。このため、DNA ポリメラーゼの失活処理をすることなく、PCR 溶液をそのまま工程（d）以降の処理に用いることができる。

10

【0048】

ここで、各プローブにおいて、3' 末端とは、各プローブの 3' 末端を構成するヌクレオチド等を、5' 末端とは、各プローブの 5' 末端を構成するヌクレオチド等を、それぞれ意味する。

【0049】

各プローブの 3' 末端を修飾する PCR 阻害物質は、該物質により修飾された 3' 末端が、DNA ポリメラーゼ活性による伸長反応の起点となることができない物質であれば、特に限定されるものではなく、DNA ポリメラーゼ活性阻害作用を有する公知の物質を適宜用いることができる。本発明においては、特に、上流側プローブの 3' 末端や下流側プローブの 3' 末端が、アミノ基により修飾されたヌクレオチド、リン酸基により修飾されたヌクレオチド、及びダイデオキシヌクレオチドからなる群より選択される 1 であることが好ましい。

20

【0050】

さらに、前記上流側プローブの 5' 末端及び／又は前記下流側プローブの 3' 末端が光応答性物質により修飾されていることを要する（要件（I I I））。図 1 に示すように、ハイブリダイズした場合には、上流側プローブと下流側プローブは、上流側プローブの 5' 末端と下流側プローブの 3' 末端において隣接するため、少なくともいずれか一方のプローブ末端が光応答性物質により修飾されていることにより、光連結反応により両プローブを連結させることができる。なお、上流側プローブの 5' 末端と下流側プローブの 3' 末端の両末端が光応答性物質により修飾されていてもよい。なお、本発明においては、下流側プローブの 3' 末端ではなく、上流側プローブの 5' 末端が光応答性物質により修飾されていることが好ましい。

30

【0051】

本発明において、光応答性物質とは、光エネルギーにより分子構造が変化し、隣接する分子を互いに連結し得る光反応官能基を有する物質を意味する。上流側プローブの 5' 末端や下流側プローブの 3' 末端を修飾する光応答性物質は、このような光反応官能基を有する物質であれば、特に限定されるものではないが、光照射によって開裂する共役二重結合部位を有する物質であることが好ましい。例えば、光照射により、光応答性物質に存在する共役二重結合部位が開裂することにより、隣接する分子、具体的には隣接するプローブの末端の共役二重結合部位の開裂を促される。これらの開裂された共役二重結合部位同士により環状結合が形成される結果、隣接するプローブ同士が連結される。

40

【0052】

本発明における上流側プローブの 5' 末端や下流側プローブの 3' 末端を修飾する光応答性物質としては、紫外光、好ましくは 320～400 nm、より好ましくは 365 nm 付近の光に応答し得る物質であることが好ましい。このような波長の光の照射によって開裂する共役二重結合部位を有する物質としては、例えば、カルボキシビニル基、ビニル基、ベンジルトリアゾールビニル（BTV）基、フェニルトリアゾールビニル（PTV）基、メトキシフェニルトリアゾールビニル（MPTV）基、シアノフェニルトリアゾールビニル（CPTV）基、及びナフチルトリアゾールビニル（NPTV 基）等を有する物質等

50

がある。特に、上流側プローブの5'末端が、カルボキシビニル基により修飾されたヌクレオチド等であることが好ましい。具体的には、カルボキシビニルデオキシアデノシン、カルボキシビニルデオキシシチジン、カルボキシビニルデオキシグアノシン、カルボキシビニルデオキシウリジン等がある。

【0053】

上流側プローブの5'末端や下流側プローブの5'末端は、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性阻害物質により修飾されていることが好ましい。各プローブの5'末端が5'→3'エキソヌクレアーゼ活性阻害物質により修飾されていることにより、工程(a)におけるPCRにおいて5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを用いた場合であっても、工程(d)以降の工程における該活性の影響を効果的に抑制することができる。各プローブの5'末端のヌクレオチド等と5'末端から2番目のヌクレオチド等との間に位置するリン酸が5'→3'エキソヌクレアーゼ活性阻害物質により修飾されていることがより好ましい。

10

【0054】

このような5'→3'エキソヌクレアーゼ活性阻害物質による修飾として、本発明においては、特に、上流側プローブの5'末端や下流側プローブの5'末端がメチル基により2-O-メチル化修飾されたヌクレオチド等や、ホスホロチオエート化修飾されたヌクレオチド等であることが好ましい。ここで、プローブの5'末端が2-O-メチル化修飾されたヌクレオチド等であるとは、各プローブの5'末端のヌクレオチド等の炭糖の2位がメチル化(2-O-メチル化)されていることを意味する。また、プローブの5'末端がホスホロチオエート化修飾されたヌクレオチド等であるとは、各プローブの5'末端と5'末端から2番目のヌクレオチド等を連結するリン酸ジエステル結合中のリン酸基がホスホロチオエート化されていることを意味する。

20

【0055】

その他、上流側プローブの3'末端や下流側プローブの3'末端は、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性阻害物質により修飾されていてもよい。本発明において、各プローブの3'末端の3'→5'エキソヌクレアーゼ活性阻害物質により修飾されたヌクレオチドとしては、2-O-メチル化修飾されたヌクレオチド等や、ホスホロチオエート化修飾されたヌクレオチド等が挙げられる。ここで、プローブの3'末端が2-O-メチル化修飾されたヌクレオチド等であるとは、各プローブの3'末端のヌクレオチド等の炭糖の2位がメチル化(2-O-メチル化)されていることを意味する。また、プローブの3'末端がホスホロチオエート化修飾されたヌクレオチド等であるとは、各プローブの3'末端と3'末端から2番目のヌクレオチド等を連結するリン酸ジエステル結合中のリン酸基がホスホロチオエート化されていることを意味する。

30

【0056】

標的ヌクレオチド配列が2以上ある場合には、標的ヌクレオチド配列ごとに上流側プローブと下流側プローブを準備する。ここで、標的ヌクレオチド配列は、互いに別個独立のものであってもよく、互いに重複するものであってもよい。また、遺伝子のセンス鎖とアンチセンス鎖の一方にのみ複数の標的ヌクレオチド配列を有していてもよく、センス鎖とアンチセンス鎖の両方に標的ヌクレオチド配列を有するものであってもよい。

40

【0057】

2以上の標的ヌクレオチド配列が互いに重複する場合には、例えば、図2に示すように、1のプローブが、ある標的ヌクレオチド配列に対する上流側プローブであると同時に、別の標的ヌクレオチド配列に対する下流側プローブであってもよい。図2においては、プローブ5aは、標的ヌクレオチド配列4aに対する下流側プローブであり、プローブ5bは、標的ヌクレオチド配列4aに対する上流側プローブであると同時に、標的ヌクレオチド配列4bに対する下流側プローブである。プローブ5cは、標的ヌクレオチド配列4bに対する上流側プローブであると同時に、標的ヌクレオチド配列4cに対する下流側プローブである。プローブ5dは、標的ヌクレオチド配列4cに対する上流側プローブであると同時に、標的ヌクレオチド配列4dに対する下流側プローブである。プローブ5eは、

50

標的ヌクレオチド配列 4 d に対する上流側プローブである。各プローブの 3' 末端を PCR 阻害物質 6 により修飾し、各上流側プローブ（プローブ 5 b ~ 5 e）の 5' 末端を光応答性物質 7 により修飾することにより、上記要件（I）～（III）を充足することができる。

【0058】

ヌクレオチド配列は、基本的に、A T G C の 4 種のヌクレオチドの組み合わせからなるものにすぎないため、標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出するためには、該標的ヌクレオチド配列を、該標的ヌクレオチド配列と相同性が高い該標的ヌクレオチド配列以外のヌクレオチド配列から高精度に識別して検出する必要がある。一般的には、標的ヌクレオチド配列が有しており、かつ該標的ヌクレオチド配列と相同性が高い他のヌクレオチド配列にはない特徴的な 1 又は 2 以上のヌクレオチド（以下、標的ヌクレオチドということがある。）を指標として、標的ヌクレオチド配列を有する核酸を他のヌクレオチド配列を有する核酸から識別して検出することができる。

10

【0059】

ここで、標的ヌクレオチドを含む領域のヌクレオチド配列情報が公知である場合には、標的ヌクレオチド配列は、任意に設定することができる。例えば、図 3 のように、遺伝子のある領域に、2 つの標的ヌクレオチド 9 が存在していた場合に、図 3（a）のように、2 つの標的ヌクレオチドが含まれる比較的長い領域を標的ヌクレオチド配列 10_{A+B} としてもよく、図 3（b）のように、標的ヌクレオチドごとに別個独立した標的ヌクレオチド配列 10_A と標的ヌクレオチド配列 10_B としてもよく、図 3（c）のように、2 つの標的ヌクレオチド配列が互いに重複するように設定してもよい。どのように標的ヌクレオチド配列を設定するかは、標的ヌクレオチド配列に依存して決定される上流側プローブや下流側プローブの T_m 値や、標的ヌクレオチドにハイブリダイズするヌクレオチドが各プローブ中のどこに配置されることになるかを考慮して、適宜決定することができる。なお、標的ヌクレオチド 9 にハイブリダイズするヌクレオチドが、後述する塩基識別可能領域内となるように各プローブを設計することが好ましく、このように各プローブの設計を可能とするように標的ヌクレオチド配列を設定することが好ましい。

20

【0060】

例えば、図 3（c）のように 2 の標的ヌクレオチド配列 10_3 と 10_5 を決定した場合には、図 4 に示すように、標的ヌクレオチド配列 10_3 の下流側プローブであるプローブ 11 a、標的ヌクレオチド配列 10_3 の上流側プローブでありかつ標的ヌクレオチド配列 10_5 の下流側プローブであるプローブ 11 b、標的ヌクレオチド配列 10_5 の上流側プローブであるプローブ 11 c を設計することができる。この場合、プローブ 11 a とプローブ 11 b とプローブ 11 c の 3 つのプローブの連結体が検出された場合には、核酸サンプル中に、標的ヌクレオチド配列 10_3 と標的ヌクレオチド配列 10_5 の両方を有する核酸が存在することが分かる。一方、いずれのプローブ連結体も検出されない場合には、核酸サンプル中に、標的ヌクレオチド配列 10_3 を有する核酸と標的ヌクレオチド配列 10_5 を有する核酸のいずれも存在していないことが分かる。その他、例えば、プローブ 11 a とプローブ 11 b のプローブ連結体と、プローブ 11 b とプローブ 11 c のプローブ連結体は検出されたものの、プローブ 11 a とプローブ 11 b とプローブ 11 c の 3 つのプローブの連結体が検出されなかった場合には、核酸サンプル中の核酸においては、標的ヌクレオチド配列 10_3 と標的ヌクレオチド配列 10_5 が重複していないことが分かる。つまり、本発明の検出方法を応用することにより、染色体転座等の遺伝子変異の有無を検出し得ることが期待できる。

30

40

【0061】

次に、工程（d）として、工程（b）において得られた一本鎖核酸、又は非対象 PCR 等により得られた一本鎖核酸に対して、工程（c）において準備した上流側プローブ及び下流側プローブをハイブリダイズさせることにより、一本鎖核酸とプローブとの複合体（以下、一本鎖核酸-プローブ複合体ということがある。）を形成する。具体的には、一本鎖化処理後又は PCR 後の反応溶液に、上流側プローブ及び下流側プローブを添加し、混

50

合することにより、該反応溶液中の一本鎖核酸の標的ヌクレオチド配列領域に、各プローブをハイブリダイズさせ、一本鎖核酸-プローブ複合体を形成することができる。既に述べたように、各プローブはDNAポリメラーゼ活性の影響を受けないよう修飾されているため、一本鎖化処理後又はPCR後の反応溶液は、失活処理等を行うことなく用いることができる。

【0062】

本発明の検出方法においては、工程(d)は、一本鎖化処理後又はPCR後の反応溶液に、上流側プローブ及び下流側プローブを添加してもよく、PCR前の反応溶液に予め上流側プローブ及び下流側プローブを添加しておくてもよい。PCR前の反応溶液に予め上流側プローブ及び下流側プローブを添加しておくことにより、一本鎖化処理後又はPCR後に速やかに一本鎖核酸-プローブ複合体を形成することができ、また、操作工程を少なくすることができる。

10

【0063】

さらに、工程(e)として、工程(d)により形成された一本鎖核酸-プローブ複合体に光を照射した後、工程(f)として、該一本鎖核酸-プローブ複合体中の一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させる。一本鎖核酸が標的ヌクレオチド配列を有する場合には、該標的ヌクレオチド配列に対応する上流側プローブと下流側プローブが互いに隣接してハイブリダイズして一本鎖核酸-プローブ複合体が形成されている。このため、光を照射することにより、光連結反応が誘導される結果、隣接するプローブ同士が連結される。

20

【0064】

工程(e)において照射される光の波長は、各プローブに修飾されている光応答性物質の種類に応じて適宜決定することができる。より十分な光エネルギーを与えることができるため、照射される光は、紫外光であることが好ましく、320~400nmの波長の光であることがより好ましく、365nm付近の波長の光であることがさらに好ましい。

【0065】

光連結反応の反応効率は、連結反応に必要とされる波長域の光の照度と照射時間との積に相関する。このため、工程(e)において照射される光の照度や照射時間を調整することにより、光連結反応効率を良好に維持することができる。また、光によって誘導される反応であるため、光を照射するタイミングを調整することにより、連結反応を任意のタイミングで実施することができる。さらに、光連結反応は、従来の酵素を用いた連結法に比べ、温度による影響を受け難い。このため、例えば0~80℃といった幅広い温度域で反応を行うことができる。また、反応溶液が所望の反応温度に達した時点で、単に光を照射することにより光連結反応を行うことができるため、従来の酵素法に比べて非常に厳密な反応温度制御も可能である。

30

【0066】

特に、工程(e)においては、光を照射する温度を適宜調整することにより、上流側プローブや下流側プローブの、標的ヌクレオチド配列に対する特異性を高めることができ、標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出精度を向上させることができる。本発明の検出方法においては、一本鎖核酸-プローブ複合体に、該一本鎖核酸-プローブ複合体を形成するプローブのT_m値以下の温度において光を照射することが好ましい。より好ましくは、(T_m値-20℃)以上T_m値以下の温度であり、さらに好ましくは(T_m値-10℃)以上T_m値以下の温度であり、さらに好ましくは(T_m値-5℃)以上T_m値以下の温度である。

40

【0067】

なお、「一本鎖核酸-プローブ複合体を形成するプローブのT_m値」とは、該一本鎖核酸-プローブ複合体を形成する複数のプローブのT_m値の中で、最も低いT_m値を意味する。例えば、一の一本鎖核酸中に一の標的ヌクレオチド配列領域のみが存在している場合には、一本鎖核酸-プローブ複合体は、該一本鎖核酸と、1の上流側プローブと1の下流側プローブとから形成される。したがって、この場合には、「一本鎖核酸-プローブ複合

50

体を形成するプローブのT_m値」とは、該上流側プローブのT_m値と該下流側プローブのT_m値のうちいずれか低い方である。また、図2や図4に示すように標的ヌクレオチド配列が重複している場合等、複数の標的ヌクレオチド配列に対する上流側プローブと下流側プローブとが互いに連結する場合には、これらの複数のプローブのT_m値のうち、最も低いT_m値が「一本鎖核酸-プローブ複合体を形成するプローブのT_m値」となる。

【0068】

このように、標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出精度が、光連結反応時の温度に影響を受ける理由は明らかではないが、各プローブのハイブリダイゼーション効率が温度に影響を受けるためではないかと推察される。例えば、光を照射する温度が、各プローブのT_m値よりも高い場合には、各プローブと標的ヌクレオチド配列を有する一本鎖核酸とのハイブリダイゼーション効率が低下するため、光連結反応効率も低下してプローブ連結体が形成されず、核酸サンプルが標的ヌクレオチド配列を有する核酸を含んでいた場合であっても、該核酸サンプル中には標的ヌクレオチド配列を有する核酸は含まれていないと判断される恐れが高い。一方で、光を照射する温度が、各プローブのT_m値よりもはるかに低い場合には、各プローブのヌクレオチド配列識別能が低下し、標的ヌクレオチド配列以外のヌクレオチド配列に対してもハイブリダイズしやすくなるため、核酸サンプルが標的ヌクレオチド配列を有する核酸を含んでいない場合であっても、該核酸サンプル中には標的ヌクレオチド配列を有する核酸は含まれていると判断される恐れが高い。

【0069】

工程(f)において、該一本鎖核酸-プローブ複合体中の一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させる方法は、特に限定されるものではなく、二本鎖核酸を一本鎖化する方法において挙げられた方法と同様の方法により行うことができる。特に、該一本鎖核酸-プローブ複合体を37～105℃に加熱することが好ましく、60～95℃に加熱することがより好ましい。

【0070】

その後、工程(g)として、工程(e)において連結されたプローブ(プローブ連結体)を検出し、工程(h)として、プローブ連結体を検出された場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されており、プローブ連結体を検出されなかった場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されていないと判断することにより、核酸サンプル中の標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出することができる。

【0071】

工程(g)におけるプローブ連結体の検出方法は、特に限定されるものではなく、PCR産物等の核酸を検出する場合に通常行われる方法を用いて行うことができる。また、プローブ連結体の検出を容易にするために、工程(c)において準備した各プローブは、予め適当な標識分子によって標識されていることが好ましい。このような標識分子は、一本鎖核酸-プローブ複合体の形成を阻害しない限り、特に限定されるものではなく、ヌクレオチド等を標識する場合に通常用いられる分子を使用することができる。

【0072】

例えば、未連結の各プローブよりもプローブ連結体のほうが、分子量が大きいことを利用して、電気泳動法、カラムクロマトグラフィー法等により、各プローブを標識した標識分子を指標として、プローブ連結体を検出することができる。

【0073】

各プローブは、一の標識分子により標識されていてもよく、同一種類の複数の標識分子により標識されていてもよく、複数種類の標識分子により標識されていてもよい。また、上流側プローブと下流側プローブは同一種類の標識分子により標識されていてもよく、異なる種類の標識分子により標識されていてもよい。その他、上流側プローブと下流側プローブのいずれか一方のみに標識分子を標識し、他方は非標識のプローブとしてもよい。例えば、複数の標的ヌクレオチド配列を検出する多重解析を行う場合には、一の標的ヌクレオチド配列対応する上流側プローブと下流側プローブを同一種類の標識分子により標識し

、かつ標的ヌクレオチド配列の種類ごとに異なる種類の標識分子を用いて標識することにより、多重解析を容易に行うこともできる。

【0074】

本発明においては、上流側プローブと下流側プローブを標識し得る標識分子としては、通常核酸の標識に用いられ得る分子であれば、特に限定されるものではない。このような標識分子として、例えば、発色基分子、発色抑制分子、蛍光分子、色素、燐光発光性分子、放射活性物質、化学発光性分子、酵素、抗原、重金属、ユーロピウム錯体、磁性分子、及び電気化学的検出分子等がある。ここで、発色基分子とは、少なくとも1の発色基を含み、他の発色基分子又は発色抑制分子と、空間的に適切な位置にて接近することにより、蛍光を発光又は消光することができる分子を意味する。また、発色抑制分子とは、空間的に適切な位置に配置されている他の発色基分子の発色を抑制することができる分子を意味する。なお、各標識分子のプローブへの標識は、一般的な有機合成方法等を用いることにより行うことができる。

10

【0075】

未連結のプローブとプローブ連結体を区別して検出する方法として、大きさによる区別以外に、上流側プローブを標識する標識分子と下流側プローブを標識する標識分子との相互反応を検出する方法がある。このように、標識分子の相互反応を利用する場合には、上流側プローブを標識する標識分子と下流側プローブを標識する標識分子の空間的な距離が適当であることが必要である。このため、標識分子は、上流側プローブや下流側プローブにおいて、5'末端又は3'末端から19分子以内のヌクレオチド又はヌクレオチドアナログに標識されていることが好ましく、5'末端又は3'末端から6分子以内のヌクレオチド又はヌクレオチドアナログに標識されていることがより好ましい。また、上流側プローブにおける標識分子により標識されているヌクレオチド又はヌクレオチドアナログから5'末端までの分子数と、下流側プローブにおける標識分子により標識されているヌクレオチド又はヌクレオチドアナログから3'末端までの分子数との和が20以下であることが好ましく、12以下であることがより好ましい。

20

【0076】

このような標識分子の相互反応を利用する検出方法として、例えば、上流側プローブと下流側プローブを同一種類の発色基分子により標識することにより、上流側プローブと下流側プローブを連結させた場合に、上流側プローブを標識する発色基分子と下流側プローブを標識する発色基分子とによってエクサイプレックス又はエキシマーが形成される結果、発光されるエクサイプレックス蛍光又はエキシマー蛍光を検出することにより、上流側プローブと下流側プローブのプローブ連結体を検出することが可能となる（例えば、特許文献1参照。）。エクサイプレックス又はエキシマーは、各発色基分子が空間的に近接することにより形成されるため、一本鎖核酸に正しくハイブリダイズし、光照射により連結されたプローブのみを検出することができる。このため、未連結のプローブが過剰に共存する場合であっても、発色基分子単量体自体に由来する蛍光に干渉されることなく、プローブ連結体を検出することができる。

30

【0077】

上流側プローブと下流側プローブを標識する発色基分子としては、上記定義を充足するものであれば特に限定されるものではないが、エクサイプレックス又はエキシマーを形成しやすい分子であることが好ましい。このような発色基分子としては、例えば、ピレン、ナフタレン、アントラセン、ペリレン、スチルベン、ベンゼン、トルエン、フェニルアントラセン、ジフェニルアントラセン、ベンツピレン、ベンツアントラセン、テトラセン、フェナントレン、ペンタセン、トリフェニレン、及びクリセン等の、芳香族性の発色基を含む分子であることが好ましく、ピレン骨格を有する発色基を含む分子であることがより好ましい。

40

【0078】

また、上流側プローブと下流側プローブを異なる種類の発色基分子により標識することにより、上流側プローブを標識する標識分子と下流側プローブを標識する標識分子のうち

50

、いずれか一方をドナー分子とし、他方をアクセプター分子とする蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET; Fluorescence Resonance Energy Transfer) を起こすことができ、この際に生じる蛍光の発光又は消光を検出することによっても、上流側プローブと下流側プローブのプローブ連結体を検出することができる。FRETも、エクサイプレックス又はエキシマーの形成と同様に、ドナー分子とアクセプター分子とが空間的に近接することにより起こるため、光照射により連結されたプローブのみを検出することが可能となる。

【0079】

ドナー分子やアクセプター分子として機能し得る発色基分子は、FRET法を行う場合に通常用いられている発色基分子を適宜使用することができる。本発明の検出方法においては、ドナー分子がAlexa Fluor (登録商標) 488 (インビトロジェン社製) 又はATTO 488 (ATTO-TEC GmbH社製) であり、前記アクセプター分子がAlexa Fluor (登録商標) 594 (インビトロジェン社製) 又はROX (Carboxy-X-rhodamine) であることが好ましい。

【0080】

例えば、図4に示すように、標的ヌクレオチド配列及び各プローブを設計した場合に、プローブ11aに低波長で励起する発色基分子を標識し、プローブ11bに中波長で励起する発色基分子を標識し、プローブ11cに高波長で励起する発色基分子を標識しておく。これらのプローブを用いて鋳型となる一本鎖核酸にハイブリダイズさせ、光連結反応を行った場合に、核酸サンプル中に標的ヌクレオチド配列10_Aと標的ヌクレオチド配列10_Bの両方を有する、図4に示す核酸が存在していた場合には、プローブ11aとプローブ11bとプローブ11cの3つのプローブの連結体が形成されるため、低波長の励起光を照射すると、各プローブの標識に用いた3種類の発色基分子が連鎖的にFRETを起こす結果、プローブ11cを標識した高波長で励起する発色基分子の発光が検出される。

【0081】

その他、上流側プローブを標識する標識分子と、前記下流側プローブを標識する標識分子とのうち、いずれか一方が発色基分子、他方が発色抑制分子とすることにより、上流側プローブと下流側プローブを連結させた場合に、FRETとは異なる熱エネルギー放出により発色基分子の発光を消光させることができる。したがって、発色基分子の発光の変化を測定し、生じた消光を検出することにより、上流側プローブと下流側プローブのプローブ連結体を検出することが可能となる。この発色基分子の消光も、エクサイプレックス又はエキシマーの形成と同様に、発色基分子と発色抑制分子とが空間的に近接することにより起こるため、光照射により連結されたプローブのみを検出することが可能となる。

【0082】

該検出方法では、2以上の標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出する場合であって、各2以上の標的ヌクレオチド配列の上流側プローブに発色基分子を、各下流側プローブに発色抑制分子を、それぞれ標識する場合に、各発色基分子と各発色抑制分子は標的ヌクレオチド配列ごとに異なる種類としてもよいが、発色基分子は、標的ヌクレオチド配列ごとに異なる種類とし、発色抑制分子は、使用する全ての発色基分子の発色波長をカバーし得る1の種類の発色抑制分子を共通して使用することもできる。例えば、標的ヌクレオチド配列Aの上流側プローブに発色基分子Aを標識し、標的ヌクレオチド配列Bの上流側プローブに発色基分子Bを標識し、標的ヌクレオチド配列Aと標的ヌクレオチド配列Bの双方の下流側プローブに、発色基分子Aと発色基分子Bの両方の発色波長を抑制し得る同一の発色抑制分子Cを標識し、これらのプローブを一つの反応溶液中に混在させることにより、各発色分子の発色波長をそれぞれ検出して、反応溶液中の標的ヌクレオチド配列Aを有する核酸の有無と、標的ヌクレオチド配列Bを有する核酸の有無を、一つの反応溶液中で解析することができる。

【0083】

発色基分子の消光の検出により連結されたプローブを検出する場合に用いられる発色基分子や発色抑制分子としては、近接させた場合に熱エネルギーの放出が生じる組み合わせ

10

20

30

40

50

の分子であれば特に限定されるものではないが、発色基分子がAlexa Fluor（登録商標）488（インビトロジェン社製）、ATTO 488（ATTO-TEC GmbH社製）、Alexa Fluor（登録商標）594（インビトロジェン社製）、及びROX（Carboxy-X-rhodamine）からなる群より選択される1であり、発色抑制分子がBHQ（登録商標、Black hole quencher）-1又はBHQ（登録商標）-2であることが好ましい。

【0084】

その他、本発明の検出方法においては、上記のように、全ての核酸増幅段階が終了した後に光連結反応による検出段階を行ってもよく、核酸増幅段階と検出段階を交互に行ってもよい。つまり、PCRは、変性工程、アニーリング工程、及び伸長工程の3つの工程を1サイクルとし、該サイクルを繰り返すことにより標的ヌクレオチド配列を有する核酸を増幅していくが、このPCRのサイクルごとに、光連結反応を行い、プローブ連結体を検出してもよい。このように、1サイクルを終了する度に検出反応を行い、増幅された標的ヌクレオチド配列を有する核酸を経時的に検出することにより、リアルタイムPCRのように、半定量的な検出が可能となる。

【0085】

また、核酸増幅段階と検出段階を交互に行う場合において、核酸増幅段階におけるPCRは、変性工程、アニーリング工程、及び伸長工程の3つの工程からなるサイクルを繰り返すものであれば、特に限定されるものではなく、通常のPCRであってもよく、非対称PCRであってもよく、一本鎖のループ構造部分に標的ヌクレオチド配列領域を有するPCR産物を得ることができるPCRであってもよい。

【0086】

具体的には、核酸サンプル中の1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を有する核酸を検出する方法であって、下記の工程（1）～（11）を有し、工程（10）及び（11）において、連結されたプローブが検出された場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されており、連結されたプローブが検出されなかった場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されていないと判断することを特徴とする、標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法であってもよい。

（1）標的ヌクレオチド配列ごとに、上記要件（I）～（III）を充足する上流側プローブ及び下流側プローブを準備する工程と、

（2）核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得るプライマーを準備する工程と、

（3）前記核酸サンプル、前記工程（1）において準備した上流側プローブ及び下流側プローブ、前記工程（2）において準備したプライマー、並びに耐熱性DNAポリメラーゼを有する反応溶液を調製する工程と、

（4）前記工程（3）において調製した反応溶液中の二本鎖核酸を、一本鎖核酸に変性させる工程と、

（5）前記工程（4）において得られた一本鎖核酸を鋳型として、前記プライマーを用いて、DNAポリメラーゼによる伸長反応を行う工程と、

（6）前記工程（5）の後、反応溶液中の二本鎖核酸を、一本鎖核酸に変性させる工程と、

（7）前記工程（6）において得られた一本鎖核酸に対して、反応溶液中の上流側プローブ及び下流側プローブをハイブリダイズさせることにより、一本鎖核酸とプローブとの複合体を形成する工程と、

（8）前記工程（7）により形成された複合体に光を照射する工程と、

（9）前記工程（8）の後に、前記複合体中の一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させる工程と、

（10）前記工程（9）の後に、前記工程（8）において連結されたプローブを検出する工程と、

10

20

30

40

50

(11) 前記工程(10)の後、前記工程(4)～(10)を繰り返す工程。

【0087】

工程(1)は、前記工程(b)と同様である。

また、工程(2)において準備されるプライマーは、前記工程(a)においてPCRに用いるプライマーと同様である。

そして、工程(3)において、核酸サンプルと、前工程において準備した上流側プローブ、下流側プローブ、プライマー、耐熱性DNAポリメラーゼを有する反応溶液を調製する。ここで調製される反応溶液は、前記工程(a)においてPCRを行う反応溶液に、上流側プローブと下流側プローブとを添加したものであり、DNAポリメラーゼのみならず、ヌクレオチド、塩類等のPCRのために必要な試薬を適量含むものである。該反応溶液に添加される、工程(2)において準備された1又は2以上の標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得るプライマーは、通常のPCRと同様に増幅ヌクレオチド配列を挟む2種類のプライマーであってもよく、このうちの1種類のみであってもよく、前記工程(a'4)において用いられるような3種類のプライマーであってもよい。

10

【0088】

次に、工程(4)として、工程(3)において調製した反応溶液中の二本鎖核酸を、一本鎖核酸に変性させ、工程(5)として、変性により得られた一本鎖核酸を鋳型として、前記プライマーを用いて、DNAポリメラーゼによる伸長反応を行う。この工程(4)が、PCRの1サイクルにおける変性工程に相当し、工程(5)が、アニール工程及び伸長工程に相当する。

20

【0089】

その後、工程(6)として、反応溶液中の二本鎖核酸を、一本鎖核酸に変性させる。該工程は、前記工程(b)に相当する工程であり、変性方法は、工程(b)と同様に行うことができる。また、工程(3)～(4)におけるPCRが非対称PCR等であって、増幅された標的ヌクレオチド配列を有する核酸が一本鎖核酸である場合には、省略することができる。

【0090】

さらに工程(7)～(10)により、PCRにより増幅された一本鎖核酸を鋳型として、上流側プローブと下流側プローブをハイブリダイズさせた後、光連結反応を行い、得られたプローブ連結体を検出する。具体的には、工程(7)は前記工程(d)と、工程(8)は前記工程(e)と、工程(9)は前記工程(f)と、工程(10)は前記工程(g)と、それぞれ同様に行うことができる。

30

【0091】

なお、このようにPCRの各サイクル終了時に光連結反応を行い、得られたプローブ連結体を検出する方法は、リアルタイムPCRに通常用いられている装置に、光連結反応に適した波長の光を照射し得る装置を組み込んだ装置を用いることにより、簡便に実施することができる。

【0092】

本発明の検出方法を利用することにより、標的ヌクレオチド配列に、1又は2以上のヌクレオチドの置換、挿入、又は欠失からなるミスマッチ部位を有する非標的ヌクレオチド配列を有する核酸と、標的ヌクレオチド配列を有する核酸とを識別することができる。具体的には、本発明の核酸の識別方法は、標的ヌクレオチド配列に、1又は2以上のヌクレオチドの置換、挿入、又は欠失からなるミスマッチ部位を有する非標的ヌクレオチド配列を有する核酸と、標的ヌクレオチド配列を有する核酸とを識別する方法であって、(a")核酸サンプル中の核酸を鋳型とし、標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列を増幅し得るプライマーを用いて、PCRを行うことにより、二本鎖核酸を増幅する工程と、(b")前記工程(a")において得られた二本鎖核酸を一本鎖化し、一本鎖核酸を得る工程と、(c")上記の(I)～(III)を充足する上流側プローブ及び下流側プローブを準備する工程と、(d")前記工程(b")において得られた一本鎖核酸に対して、前記工程(c")において準備した上流側プローブ及び下流側プローブをハイブリダイズ

40

50

させることにより、一本鎖核酸－プローブ複合体を形成する工程と、（e''）前記工程（d''）により形成された一本鎖核酸－プローブ複合体に光を照射する工程と、（f''）前記工程（e''）の後に、前記一本鎖核酸－プローブ複合体中の一本鎖核酸を、前記上流側プローブ、前記下流側プローブ、及びこれらが連結されたプローブから解離させる工程と、（g''）前記工程（f''）の後に、前記工程（e''）において連結されたプローブを検出する工程と、（h''）前記工程（g''）において、連結されたプローブが検出された場合には、前記核酸サンプル中に前記標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されており、連結されたプローブが検出されなかった場合には、前記核酸サンプル中に前記非標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されていると判断する工程と、を有することを特徴とする。

10

【0093】

本発明の核酸の識別方法において、工程（a''）～（g''）は、本発明の検出方法の工程（a）～（g）と同様である。特に工程（a''）におけるPCRは、本発明の検出方法の工程（a）と同様に非対象PCRであってもよい。工程（a''）におけるPCRを非対称PCRとする場合には、工程（b）と同様に工程（b''）は省略してもよい。

【0094】

本発明の核酸の識別方法において、標的ヌクレオチド配列と非標的ヌクレオチド配列との相違部位であるミスマッチ部位は、1又は2以上のヌクレオチドが置換、挿入、又は欠失されている部位である。例えば、1又は2箇所以上の、1のヌクレオチド又は2以上の連続したヌクレオチドが置換、挿入、又は欠失されている部位であってよい。つまり、2

20

【0095】

標的ヌクレオチド配列において、ミスマッチ部位は、上流側プローブと下流側プローブの連結部位の近隣に存在していることが好ましい。なお、本発明においては、上流側プローブと下流側プローブの連結部位の近隣10分子を、「塩基識別可能領域」という。ミスマッチ部位は塩基識別可能領域にあることが好ましい。該領域にあることにより、たった一塩基のみ相違する標的ヌクレオチド配列同士をより高精度に識別することができるため

30

【0096】

なお、標的ヌクレオチド配列を上流側標的ヌクレオチド配列と下流側標的ヌクレオチド配列に2分割する際に、ミスマッチ部位が該上流側標的ヌクレオチド配列の3'末端から10分子以内、又は該下流側標的ヌクレオチド配列の5'末端から10分子以内となるように、標的ヌクレオチド配列を2分割することにより、ミスマッチ部位が上流側プローブ

40

【0097】

図5は本発明の核酸の識別方法の一態様を模式的に示した図である。標的ヌクレオチド配列と非標的ヌクレオチド配列は、ミスマッチ部位（図中の「変異部位」に相当）以外は相同的なヌクレオチド配列を有しており、相同性が高い。このため、上流側プローブと下流側プローブは、非標的ヌクレオチド配列に対しても、ミスマッチ部位以外の領域でハイ

50

ブリダイズし得る場合が多い。この場合であっても、ミスマッチ部位が連結部位近隣、特に塩基識別可能領域に有る場合には、連結部位近隣において、少なくともいずれか一方のプロープが一本鎖核酸と完全にハイブリダイズしていないため、図5に示すように、上流側プロープと下流側プロープが光連結反応による連結のために十分なほど近接することができず、プロープ連結体の形成が阻害される。この結果、連結されたプロープが検出された場合には、核酸サンプル中に標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されており、連結されたプロープが検出されなかった場合には、核酸サンプル中に非標的ヌクレオチド配列を有する核酸が含有されていると判断することができ、核酸サンプル中の核酸が、標的ヌクレオチド配列を有する核酸であるか、又は非標的ヌクレオチド配列を有する核酸であるかを識別することができる。

10

【0098】

本発明の核酸の識別方法は、特に遺伝子多型のタイピングに好適に用いることができる。工程（g”）において検出された連結されたプロープ量は、核酸サンプル中に存在していた標的ヌクレオチド配列を有する核酸の量と相関するため、連結されたプロープ量から、核酸サンプル中の標的ヌクレオチド配列を有する核酸と、非標的ヌクレオチド配列を有する核酸との相対的な量比を算出し得るためである。

【0099】

具体的には、ミスマッチ部位が遺伝子多型の多型部位とし、標的ヌクレオチド配列が遺伝子多型のうちの一多型に相同的なヌクレオチド配列とし、非標的ヌクレオチド配列が該遺伝子多型の他の一多型に相同的なヌクレオチド配列として、工程（a”）～（g”）を行なった後、工程（g”）において検出されたプロープ連結体量に基づき、前記核酸サンプル中の核酸が、前記標的ヌクレオチド配列を有するアレルのホモ接合体、前記非標的ヌクレオチド配列を有するアレルのホモ接合体、及び前記標的ヌクレオチド配列を有するアレルと前記非標的ヌクレオチド配列を有するアレルのヘテロ接合体のいずれであるかを識別することができる。

20

【0100】

例えば、A/GタイプのSNPをタイピングする場合において、Aアレルに相同的なヌクレオチド配列を標的ヌクレオチド配列とし、Gアレルに相同的なヌクレオチド配列を非標的ヌクレオチド配列として、本発明の核酸の識別方法を用いて検出対象である核酸サンプルのタイピングを行なった場合に、検出されたプロープ連結体量が、Aアレルのホモ接合体を核酸サンプルとして用いた場合のプロープ連結体量とほぼ同程度であれば、検出対象核酸サンプルはAアレルのホモ接合体であり、Gアレルのホモ接合体を核酸サンプルとして用いた場合のプロープ連結体量とほぼ同程度であれば、検出対象核酸サンプルはGアレルのホモ接合体であり、Aアレルのホモ接合体を核酸サンプルとして用いた場合のプロープ連結体量とGアレルのホモ接合体を核酸サンプルとして用いた場合のプロープ連結体量との中間的な量であれば、AアレルとGアレルのヘテロ接合体であるとタイピングすることができる。

30

【0101】

その他、本発明の検出方法を利用することにより、配列情報が未知のヌクレオチド配列を決定することもできる。例えば、配列情報が不明であるヌクレオチド配列領域において、該領域のヌクレオチド配列として推定されるヌクレオチド配列を標的ヌクレオチド配列とし、該標的ヌクレオチド配列を有する核酸が検出された場合には、該領域のヌクレオチド配列が、該標的ヌクレオチド配列と同一の配列であると決定することができる。

40

【0102】

本発明のプロープセットは、本発明の検出方法や、本発明の核酸の識別方法において用いることができる上流側プロープと下流側プロープをセットとしたものである。標的ヌクレオチド配列が2以上ある場合には、一の標的ヌクレオチド配列に対する上流側プロープと下流側プロープのみを一のプロープセットとしてもよく、全ての標的ヌクレオチド配列に対する上流側プロープと下流側プロープを一のプロープセットとしてもよい。

【実施例】

50

【0103】

次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0104】

[参考例1] 各種蛍光色素の紫外線耐性の検討

本発明における上流側プローブ又は下流側プローブの標識（修飾）に用いられる蛍光色素の紫外線耐性について検討した。

具体的には、200 μ Lのマイクロチューブ（Applied Biosystems社製）に、表1に示した各種蛍光色素修飾プローブを、終濃度1.0 pmol/ μ Lに、また、10×PCRバッファー（タカラバイオ社製）を終濃度1×（説明書に記載の標準濃度）になるように添加し、純水でメスアップして全量40 μ Lのサンプルを調製した。なお、表1中、「p」は3'末端ヌクレオチドのリン酸基修飾を、「cv-U」は5-カルボキシビニル-デオキシウリジンを、「Alexa Fluor 568」、「Alexa Fluor 594」、「Alexa Fluor 488」、「ATTO 550」、「ATTO 565」、「ATTO 465」、「ATTO 488」、「Hilyte Fluor 555」、「Hilyte Fluor 488」、「TAMRA（Tetramethylrhodamine）」、「ROX」は各種蛍光色素の種類と修飾部位を、それぞれ示す。例えば、「wL14-Ale568」は、配列番号3のヌクレオチド配列を有するプローブであって、3'末端がリン酸基で修飾されており、5'末端から10番目のヌクレオチドがAlexa Fluor 568で修飾されているプローブである。また、「wL25-Ale594」は、配列番号5のヌクレオチド配列を有するプローブであって、3'末端がリン酸基で修飾されており、5'末端から21番目のヌクレオチドがAlexa Fluor 594で修飾されているプローブであり、「mL25-Ale594」は、配列番号6のヌクレオチド配列を有するプローブであって、3'末端がリン酸基で修飾されており、5'末端から21番目のヌクレオチドがAlexa Fluor 594で修飾されているプローブである。また、「R12-Ale488」は、配列番号7のヌクレオチド配列を有するプローブであって、3'末端がリン酸基で修飾されており、5'末端ヌクレオチドが5-カルボキシビニル-デオキシウリジンであり、さらに5'末端から6番目のヌクレオチドがAlexa Fluor 488で修飾されているプローブである。「R21-At488」は、配列番号8のヌクレオチド配列を有するプローブであって、3'末端がリン酸基で修飾されており、5'末端ヌクレオチドが5-カルボキシビニル-デオキシウリジンであり、さらに5'末端から6番目のヌクレオチドがAlexa Fluor 488で修飾されているプローブである。

【0105】

10

20

30

【表 1】

名称	種類	塩基配列と修飾
F24	primer	GTTTGGATACCTTCATGATTCATA
R22	primer	CTGGAAACAAGAGAAAGTCCAG
wL14-Ale568	下流側 probe	Acceptor GTCCAGAGA(T-Alexa Fluor 568)ACA(T-p)
wL14-Ale594	下流側 probe	Acceptor GTCCAGAGA(T-Alexa Fluor 594)ACA(T-p)
wL14-Ato550	下流側 probe	Acceptor GTCCAGAGA(T-ATTO 550)ACA(T-p)
wL14-Ato565	下流側 probe	Acceptor GTCCAGAGA(T-ATTO 565)ACA(T-p)
wL14-Hil555	下流側 probe	Acceptor GTCCAGAGA(T-Hilyte Fluor 555)ACA(T-p)
wL14-TAMRA	下流側 probe	Acceptor GTCCAGAGA(T-TAMRA)ACA(T-p)
wL14-Rox	下流側 probe	Acceptor GTCCAGAGA(T-ROX)ACA(T-p)
mL14-TAMRA	下流側 probe	Acceptor GTCCAGAGA(T-TAMRA)ACC(T-p)
wL25-Ale488	下流側 probe	Acceptor or Donor TGGTGCACGAGGTCCAGAGA(T-Alexa Fluor 488)ACA(T-p)
wL25-Ale594	下流側 probe	Acceptor TGGTGCACGAGGTCCAGAGA(T-Alexa Fluor 594)ACA(T-p)
mL25-Ale594	下流側 probe	Acceptor or Donor TGGTGCACGAGGTCCAGAGA(T-Alexa Fluor 594)ACC(T-p)
R12-Ale488	上流側 probe	Donor (cv-U)GACC(T-Alexa Fluor 488)TCTCC(C-p)
R12-Ato465	上流側 probe	Donor (cv-U)GACC(T-ATTO 465)TCTCC(C-p)
R12-Ato488	上流側 probe	Donor (cv-U)GACC(T-ATTO 488)TCTCC(C-p)
R12-Hil488	上流側 probe	Donor (cv-U)GACC(T-Hilyte Fluor 488)TCTCC(C-p)
R21-Ato488	上流側 probe	Donor (cv-U)GACC(T-ATTO 488)TCTCCGACGAGCC(T-p)
R23-BHQ2	上流側 probe	Quencher (cv-U)GACC(T-BHQ-2)TCTCCCGACGAGCTG(C-p)
wT39	target	CTGGTGGGGAGAAGGTCAATGTATCTCTGGACCTCGTG
mT39	target	CTGGTGGGGAGAAGGTCAAGGTATCTCTGGACCTCGTG
wT50	target	GCAGGCTGGTGGGGAGAAGGTCAATGTATCTCTGGACCTC GTGCACCACA
mT50	target	GCAGGCTGGTGGGGAGAAGGTCAAGGTATCTCTGGACCTC GTGCACCACA

【0106】

チューブに透明キャップを装着した後、紫外線照射器（オムロン社製、UV-LED）及び紫外線照射コントローラ（オムロン社製、ZUV-H30M）を使用して、透明キャップを通して、365nmの紫外線（強度：約900mW/cm²）を室温下にて、0分、30分間、60分間照射し、その際の蛍光強度劣化との関係を調べた。蛍光強度測定は、リアルタイムPCR7300（Applied Biosystems社製）にて計測した。その際、下流側プローブ（長波長励起のAcceptor色素）は、励起光465nm、蛍光580～610nmのフィルタを、また、上流側プローブ（低波長励起のDo

n o r 色素) は励起光 465 nm、蛍光 520～550 nm のフィルタを、それぞれ用いて計測した。

【0107】

各種蛍光色素修飾プローブの紫外線照射後における蛍光強度変化を図6～図16に示す。

この結果、wL14-Ale 594、wL14-Hil 555、wL14-Rox の3種については、紫外線照射によっても蛍光強度に大きな変化は見られなかった。

一方で、R12-Ale 488、R12-At o 488、wL14-At o 550 の3種については、照射時間が長くなるほど蛍光強度に若干の減少が認められた。

また、wL14-At o 565、wL14-TAMRA の2種については、照射時間が長くなるほど見かけ上、蛍光強度が増加する傾向を示し、R12-At o 465、R12-Hil 488、wL14-Ale 568 の3種については、照射時間が長くなるについて、蛍光強度は激減する結果となった。

以上のことから、上流側プローブとしては、R12-Ale 488、R12-At o 488 の2種、また、下流側プローブとしては、wL14-Ale 594、wL14-Hil 555、wL14-Rox、wL14-At o 550 の4種が紫外線に対して比較的強い耐性を有することが明らかとなった。

【0108】

[参考例2] 各種蛍光色素修飾プローブにおけるFRET効果

表1に示した各種蛍光色素修飾プローブのうち、低波長励起色素と長波長励起色素とを組み合わせ、鋳型DNA (wT39、配列番号10) とハイブリダイゼーションさせた際のFRET効果における蛍光強度比較を行った。

具体的には、表1に記載の各種蛍光修飾プローブの上流側プローブと下流側プローブを、それぞれ終濃度 $1.0 \text{ pmol} / \mu\text{L}$ 、鋳型DNA (wT39) を終濃度 $1.0 \text{ pmol} / \mu\text{L}$ 、 $10 \times \text{PCR}$ バッファーを $1 \times$ の濃度として、dNTP Mixture (2.5 mM each) を終濃度 0.25 mM となるように添加し、純水でメスアップして全量 $40 \mu\text{L}$ のサンプルを調製した。また、ネガティブコントロールとしては、鋳型DNA (wT39) を添加しないサンプルを調製した。

蛍光強度測定にはリアルタイムPCR7300を使用し、サンプルを 20.0°C から 80.3°C まで昇温させる間の蛍光強度を計測した。その際、励起光は465 nm、蛍光は580～610 nm のフィルタにて測光した。

鋳型存在下におけるFRET光と、鋳型非存在下におけるFRET光 (ネガティブコントロール) の蛍光強度比を算出した。図17～23は、算出された各種蛍光色素の強度比を重ねてプロットした図である。

この結果、表1記載の蛍光修飾プローブのうち、下流側プローブのwL14-Hil 555及びwL14-TAMRAを除いた全ての色素の組み合わせにおいて、顕著なFRETが認められた。中でも本検出器では、上流側プローブのR12-Ale 488及びR12-465が高いFRET効果を引き出すことが分かった。

【0109】

[参考例3] 各種蛍光色素修飾プローブの光連結反応後のFRET効果

表1に示した各種蛍光色素修飾プローブのうち、低波長励起色素と長波長励起色素とを組み合わせ、鋳型DNA (wT39) とをハイブリダイゼーションさせ、さらに光連結反応を行った際のFRET強度について比較した。

具体的には、 $200 \mu\text{L}$ チューブに、表1に記載の上流側プローブ及び下流側プローブの各種組み合わせた蛍光修飾プローブをそれぞれ終濃度 $1.0 \text{ pmol} / \mu\text{L}$ 、鋳型DNA (wT39) を終濃度 $1.0 \text{ pmol} / \mu\text{L}$ 、 $10 \times \text{PCR}$ バッファーを $1 \times$ の濃度として、dNTP Mixture (2.5 mM each) を終濃度 0.25 mM となるように添加し、純水でメスアップして全量 $40 \mu\text{L}$ のサンプルを調製した。また、ネガティブコントロールには、鋳型DNA (wT39) を添加しないサンプルとして調製した。なお、R12-At o 465及びR12-Hil 488は、紫外線耐性が低かったこ

とから（参考例1の結果）、本実験では用いなかった。

上記調製サンプルの入った容器に透明キャップを装着し、紫外線照射器（オムロン社製、UV-LED）及び紫外線照射コントローラ（オムロン社製、ZUV-H30M）を使用して、透明キャップを通して、365nmの紫外線（強度：約900mW/cm²）を0℃下にて、10分間照射し、プローブ間の光連結反応を試みた。

FRET強度測定にはリアルタイムPCR7300を使用し、励起光は465nm、蛍光は580～610nmのフィルタを用いて、サンプルを20.1℃から77.3℃まで昇温させた際の蛍光を計測した。

鋳型存在下における各種蛍光色素修飾プローブの光連結反応後のFRET光と、鋳型非存在下におけるFRET光（ネガティブコントロール）の蛍光強度比を算出した。図24～30は、算出された各種蛍光色素の強度比を重ねてプロットした図である。

連結反応後の上・下流側プローブの連結体のT_m値（55℃付近）よりも高い温度領域（各図24～30の点線枠内）でのFRETは、単に上流側プローブと下流側プローブの隣接により生じたFRETではなく、連結されたプローブのみによるFRETである。点線枠内のFRET強度比の結果より、wL14-Hil555とwL14-TAMRAを除く蛍光修飾プローブでは、光連結反応による顕著なFRET効果が認められた。また、この結果から、プローブに修飾されている蛍光色素の位置が、光連結反応を阻害する位置ではないことが分かると同時に、光連結反応が蛍光色素のFRET反応を阻害しないことも確認できた。さらに、上流側プローブの3'末端にリン酸基が修飾されてもプローブ間の光連結反応が起こることが明らかとなった。なお、通常の酵素（リガーゼ）反応では連結反応は阻害される。

【0110】

[参考例4] 光連結反応の最適反応温度の検討1

光連結反応におけるヌクレオチド識別特異性と温度との関係について検討した。

具体的には、200μLのマイクロチューブの中に、表1記載の下流側プローブwL14-TAMRA又はmL14-TAMRAを終濃度が各5pmol/μLになるように、表1記載の上流側プローブR12を終濃度が各5pmol/μLになるように、表1の鋳型DNAであるwT39又はmT39（配列番号11）を終濃度が5pmol/μLになるよう加え、10×PCRバッファーを1×の濃度として、dNTP Mixture（2.5mM each）を終濃度0.25mMとなるよう試薬を添加して、反応溶液の全量が40μLとなるよう純水でメスアップした。サンプルは、wL14とR12とwT39（フルマッチ）、mL14とR12とmT39（フルマッチ）、mL14とR12とwT39（シングルヌクレオチドミスマッチ）、wL14とR12とmT39（シングルヌクレオチドミスマッチ）の4通りの組合せとなるように調製した。マイクロチューブに透明キャップを装着した後、各サンプルをそれぞれ0℃、10℃、18℃、26℃、31℃、37℃、48℃、60℃となるようサーマルサイクラーにて温調制御し、紫外線照射器（オムロン社製、UV-LED）及び紫外線照射コントローラ（オムロン社製、ZUV-H30M）を使用して、透明キャップを通して、365nmの紫外線を約900mW/cm²の強度で10分間照射した。

上記の条件で紫外線照射したサンプルについて下記条件にてHPLC分析を行った。各反応温度におけるプローブ連結体量の測定結果を図31に示す。

溶離液[A]：100mM 酢酸トリエチルアミン水溶液

溶離液[B]：50% 100mM酢酸トリエチルアミン水溶液 / 50%アセトニトリル

グラジエント[B]：0min, 10%→22min, 45.5%

インジェクション：20μL

検出波長：254nm

流速：1mL/min

カラム温度：60℃

カラム / 充填材：ChemcoPak Chemcobond 5-ODS-H (Lot# G7A62)

【0111】

この結果、光連結反応温度が高温になるに従って、光連結反応の効率低下が認められた。また、48℃以上では光連結反応産物の生成を認めることはできなかった。一方、0℃下における光連結反応では、シングルヌクレオチドミスマッチ配列であっても比較的高い光連結反応産物が認められたが、反応温度が高くなるにつれて、その非特異的な連結反応産物は減少する傾向にあり、37℃下での光連結反応が最も高い精度（高いS/N比）にてヌクレオチドミスマッチを識別できていることが分かった。

【0112】

[参考例5] 光連結反応の最適反応温度の検討2

下流側プローブとしてwL25-TAMRA又はmL25-TAMRAを、上流側プローブとしてR21を、鋳型DNAとしてwT50（配列番号12）又はmT50（配列番号13）をそれぞれ用いた以外は、参考例4と同様にして、各反応温度におけるプローブ連結量を測定した。測定結果を図32に示す。

この結果、参考例4と同様に、光連結反応温度が高温になるに従って、光連結反応の効率低下が認められた。また、0℃下における光連結反応では、シングルヌクレオチドミスマッチ配列であっても比較的高い光連結反応産物が認められたが、反応温度が高くなるにつれて、その非特異的な連結反応産物は減少する傾向にあり、60℃下での光連結反応が最も高い精度（高いS/N比）にてヌクレオチドミスマッチを識別できていることが分かった。

本実験結果を参考例4の結果と比較すると、ヌクレオチドミスマッチを高精度に識別できる至適反応温度は、プローブが長鎖となる本実験では高くなっていた（37℃→48℃）。以上より、光連結反応によるヌクレオチド配列の識別特異性は、プローブの長さに依存する、すなわち、プローブのTm値にも深く関与していることが示唆された。

【0113】

[参考例6] オリゴDNAとプローブとの複合体を形成するプローブのTm値の測定1

参考例4で用いたオリゴDNAと標識分子のみが異なるプローブを用いて、オリゴDNAとプローブとの複合体を形成するプローブのTm値を測定した。

具体的には、200μLのマイクロチューブの中に、表1記載の下流側プローブwL14-Ale594又はmL14-Ale594を終濃度が各0.5pmol/μLになるように、表1記載の上流側プローブR12-Atc488を終濃度が各0.5pmol/μLになるように、表1記載の鋳型DNAであるwT39又はmT39を終濃度が各0.5pmol/μLになるよう加え、10×PCRバッファーを1×の濃度として、dNTP Mixture（2.5mM each）を終濃度0.25mMとなるよう試薬を添加して、反応溶液の全量が40μLとなるよう純水でメスアップした。サンプルは、wL14とR12とwT39（フルマッチ）、mL14とR12とmT39（フルマッチ）、mL14とR12とwT39（シングルヌクレオチドミスマッチ）、wL14とR12とmT39（シングルヌクレオチドミスマッチ）の4通りの組合せとなるように調製した。また、ネガティブコントロールとしては、鋳型DNAを添加しないサンプルを調製した。

蛍光強度測定にはリアルタイムPCR7300を使用し、サンプルを15.0℃から91.9℃まで昇温させる間の蛍光強度を計測した。その際、励起光は465nm、蛍光は580～610nmのフィルタにて測光した。

図33は、上記実験より得られた融解曲線である。この結果、本実験で使用したプローブの上記4通りの組合せにおけるTm値は、34～37℃の範囲であることが示された。

【0114】

[参考例7] オリゴDNAとプローブとの複合体を形成するプローブのTm値の測定2

参考例5で用いたオリゴDNAと標識分子のみが異なるプローブを用いて、オリゴDNAとプローブとの複合体を形成するプローブのTm値を測定した。

下流側プローブとしてwL25-Ale594又はmL25-Ale594を、上流側プローブとしてR21-Atc488を、鋳型DNAとしてwT50又はmT50をそれぞれ用いた以外は、参考例6と同様にして、Tm値の測定を行った。

図34は、上記実験より得られた融解曲線である。この結果、本実験で使用したプローブの上記4通りの組合せにおける T_m 値は、 $55 \sim 58^\circ\text{C}$ の範囲であることが示された。

【0115】

参考例4及び5において得られた各プローブのヌクレオチド配列の識別特異性と光連結反応温度との関係に関する結果と、参考例6及び7において得られた各プローブの T_m 値の結果から、光連結反応温度を、鋳型となる一本鎖核酸とプローブとの複合体を形成するプローブの T_m 値 -5°C 以上 T_m 値以下の範囲にすることにより、各プローブのヌクレオチド配列の識別能（各プローブのヌクレオチド配列に対する特異性）が向上し、標的ヌクレオチド配列を有する核酸を、高精度に検出し得ることが明らかである。

【0116】

[参考例8] オリゴDNAを鋳型とした光連結反応のヌクレオチド識別特異性評価

光連結反応におけるヌクレオチド識別特異性と定量性について検討した。

具体的には、 $200\mu\text{L}$ のマイクロチューブの中に、表1記載の下流側プローブwL14又はmL14を終濃度が $0.5\text{pmol}/\mu\text{L}$ になるように、また、表1記載の上流側プローブR12を終濃度が $0.5\text{pmol}/\mu\text{L}$ になるように、表1記載の鋳型DNAwT39又はmT39を終濃度が $0.5\text{pmol}/\mu\text{L}$ 、あるいはwT39とmT39を混合し、それぞれの終濃度が $0.25\text{pmol}/\mu\text{L}$ になるよう加え、 $10\times\text{PCR}$ バッファーを $1\times$ の濃度として、dNTP Mixture (2.5mM each)を終濃度 0.25mM となるよう試薬を添加して、反応溶液の全量が $40\mu\text{L}$ となるよう純水でメスアップした。サンプルは、wL14とR12とwT39（マッチ）、mL14とR12とmT39（マッチ）、mL14とR12とwT39（シングルヌクレオチドミスマッチ）、wL14とR12とmT39（シングルヌクレオチドミスマッチ）、mL14とR12とwT39とmT39（ハーフマッチ）、wL14とR12とwT39とmT39（ハーフマッチ）、mL14とR12（ネガティブコントロール）、wL14とR12（ネガティブコントロール）の全8通りの組合せとなるように調製した。マイクロチューブに透明キャップを装着した後、反応温度が 37°C となるようサーマルサイクラーにて温調制御し、紫外線照射器（オムロン社製、UV-LED）及び紫外線照射コントローラ（オムロン社製、ZUV-H30M）を使用して、透明キャップを通して、 365nm の紫外線を約 $900\text{mW}/\text{cm}^2$ の強度で10分間照射した。

FRET強度測定にはリアルタイムPCR7300を使用し、励起光は 465nm 、蛍光は 610nm のフィルタを用いて、サンプルを 21.2°C から 92.5°C まで昇温させた際の蛍光を計測した。図33～40は、Acceptor色素のFRET値をDonor色素のFRET値で除した値を重ねてプロットした図である。

図33から図40において、光連結反応したプローブの T_m 値（ 55°C 付近）よりも高い温度領域での蛍光強度比を比較すると、ターゲットが含まれないネガティブコントロールの蛍光強度比に対して、ミスマッチ、ハーフマッチ、マッチの順に蛍光強度比は高くなることが分かった。このことから、光連結反応がターゲットのヌクレオチド配列を識別検出できていることが明らかとなった。また同時に、ハーフマッチがミスマッチとマッチのほぼ中間値となる蛍光強度比を示していることから、本光連結反応は、定量性も有していることが示唆される。よって、検出対象である核酸が、野生型アレルホモ体、変異型アレルと野生型アレルのヘテロ体、野生型アレルのホモ体のいずれのタイプを呈する場合であっても、本発明の方法を用いることにより、容易にその多型を識別できることが明らかである。

【0117】

[実施例1]

CYP2C9遺伝子のヒトSNP（A/C）の、3タイプ（AA、AC、CC）のゲノムDNAをそれぞれPCR増幅し、合成された二本鎖核酸を鋳型として、上流側及び下流側プローブを用いて光連結反応を行い、遺伝子型を識別した。方法の詳細を以下に示す。

増幅ヌクレオチド配列領域内に3種類の多型をそれぞれ持つヒトゲノムDNA（AA：ワイルド、AC：ミュータントヘテロ、CC：ミュータントホモ）を鋳型として、表1記

10

20

30

40

50

載のF24プライマーとR22プライマーを用いて、PCR反応にて増幅ヌクレオチド配列を有する二本鎖核酸を増幅した。PCR反応には、ホットスタート式Taqポリメラーゼを5 unit、10×PCRバッファーを1×の濃度として、dNTP Mixture (2.5 mM each)を終濃度0.25 mMとなるよう添加して、反応溶液の全量が40 μLとなるよう純水でメスアップした。PCR温調サイクルは、95℃3分間を1サイクル、次に95℃30秒間－58℃30秒間－72℃30秒間を40サイクル、その後72℃5分間とした。次に、得られたPCR産物から18 μLを分取し、表1記載の下流側プローブwL25-A1e 594 (ワイルド検出用)又はmL25-A1e 594 (ミュータント検出用)と、表1記載の上流側プローブR21-At0488を各々0.5 pmol/μLになるように加え、全量を20 μLとする光連結反応準備溶液を調製した。また、ネガティブコントロール溶液は、PCR産物の代わりに水で置き換えたものを準備した。

10

サンプルをLight Cycler-350S専用キャピラリーに装填し、Light Cycler-350Sにて、95℃1分、次いで、20℃/secの速度で40℃まで温度低下し、PCR産物である二本鎖核酸と各種プローブセットとのハイブリダイゼーション反応を促した。その後直ちに、Light Cycler-350Sからキャピラリーを取り出し、紫外線照射器(オムロン社製、UVLED)及び紫外線照射コントローラ(オムロン社製、ZUV-H30M)を使用して、キャピラリーの外側から内部のサンプル溶液に向けて、室温下で365 nmの紫外線を10分間照射した。

20

上記のサンプル溶液(キャピラリー)を再び、Light Cycler-350Sにセットし、95℃にてサンプル溶液のFRET解析を行った。F2(640 nm)、F1(530 nm)のフィルタで測定した蛍光強度値の比、F2/F1の値を算出した。図41及び図42は、各種プローブセットにおいて検出されたFRET強度比から、ネガティブコントロールのFRET強度比を差し引いた値と、各種ゲノムDNAのタイプとの関係について示した図である。

図41、図42はともに、検出用である下流側プローブとゲノムDNAのタイプが一致する場合(マッチ)には、FRET強度比が高くなり、一致しない場合(ミスマッチ)には、そのFRET強度比は小さくなり、半分のみ一致するヘテロ接合体である場合(ハーフマッチ)では、タイプが一致する場合と一致しない場合の中間のFRET強度比を示した。これらの結果から、本発明の核酸識別方法により、SNP等の遺伝子多型をタイプ

30

【0118】

現在、臨床分野や研究分野においては、遺伝子検査の安定性、コストダウン、簡素化が求められているが、従来法では、検査反応に酵素を用いるということで、保存性や安定性の面で問題解決に限界があり、それに伴い、コストダウンや検査反応の簡素改良も困難となっている。本発明の標的ヌクレオチド配列を有する核酸の検出方法及び核酸の識別方法は、光連結反応を用いることにより、酵素を用いずに変異を識別することが可能となるため、安定性及びコスト面での改善、また、反応系の簡素化も容易となり、今後産業価値の高い技術として広く活用されることが期待できる。

【0119】

40

[参考例9] 紫外線照射に伴うBHQ2のクエンチング能力減衰評価

BHQ2の紫外線耐性、すなわち、BHQ2のクエンチング能力に対する紫外線照射の影響を、経時的に紫外線を照射したBHQ2による、蛍光色素の消光度合いについて解析し、評価した。

具体的には、200 μLのマイクロチューブの中に、表1記載の下流側プローブwL25-A1e488又はwL25-A1e594を終濃度が各1 pmol/μLになるように、表1記載の上流側プローブR23-BHQ2を終濃度が1 pmol/μLになるように、表1の鋳型DNAであるwT50を終濃度が1 pmol/μLになるように加え、10×PCRバッファーを1×の濃度として、dNTP Mixture (2.5 mM each)を終濃度0.25 mMとなるよう試薬を添加して、反応溶液の全量が40 μLとな

50

るよう純水でメスアップした。なお、ポジティブコントロールとして、R 2 3 - B H Q 2 に代えて純水を添加した反応溶液を調製した。

これらのチューブに透明キャップを装着した後、紫外線照射器（オムロン社製、U V - L E D）及び紫外線照射コントローラ（オムロン社製、Z U V - H 3 0 M）を使用して、透明キャップを通して、3 6 5 n mの紫外線（強度：約 9 0 0 m W / c m ²）を室温下にて、0 分、3 0 分間、6 0 分間照射し、各下流側プローブを標識している蛍光色素の蛍光強度を測定した。なお、蛍光強度測定は、リアルタイム P C R 7 3 0 0 を用いて行った。

図 4 5 及び図 4 6 は、各種蛍光色素修飾プローブの紫外線照射後における蛍光強度変化を示した図である。また、図中、「P C」は、紫外線照射 0 分のポジティブコントロールを示している。

【0 1 2 0】

【表 2】

		BHQ2のクエンチング能力	
下流側プローブ		wL25-Alex488	wL25-Alex594
紫外線照射時間	0分間	100.0%	100.0%
	30分間	85.5%	87.4%
	60分間	79.4%	37.8%
	PC	0.0%	0.0%

【0 1 2 1】

表 2 は、測定された蛍光強度に基づき、B H Q 2 のクエンチング能力を評価した表である。表中の「P C」は図 4 5 及び 4 6 と同様である。具体的には、紫外線照射 0 分間のサンプルにおける B H Q 2 のクエンチング能力を 1 0 0 % とし、紫外線照射 0 分のポジティブコントロールにおける B H Q 2 のクエンチング能力を 0 % とし、紫外線照射 3 0 分間と 6 0 分間の各サンプルにおける B H Q 2 のクエンチング能力を算定した。

表 2 の結果から、いずれの蛍光色素であっても、紫外線照射 3 0 分間では、B H Q 2 のクエンチング能力はおよそ 1 3 % 程度の減衰しか認められなかった。したがって、これらの結果から、少なくとも 3 0 分間程度の紫外線照射による光連結反応であれば、B H Q 2 のクエンチング能力を活かした蛍光検出によるプローブ連結体の検出が可能であることが明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0 1 2 2】

【図 1】標的ヌクレオチド配列 1、上流側プローブ 2、及び下流側プローブ 3 の関係を模式的に示した図である。

【図 2】複数の標的ヌクレオチド配列と、上流側プローブ及び下流側プローブの関係を模式的に示した図である。

【図 3】標的ヌクレオチド 8 及び標的ヌクレオチド配列 9 の関係を模式的に例示した図である。

【図 4】標的ヌクレオチド 8、標的ヌクレオチド配列 9、プローブ 1 0 の関係を模式的に例示した図である。

【図 5】本発明の核酸の識別方法の一態様を模式的に示した図である。

【図 6】参考例 1 における A l e x a F l u o r 5 6 8 の蛍光強度変化を示した図である。

【図 7】参考例 1 における A l e x a F l u o r 5 9 4 の蛍光強度変化を示した図である。

【図 8】参考例 1 における A T T O 5 5 0 の蛍光強度変化を示した図である。

【図 9】参考例 1 における A T T O 5 6 5 の蛍光強度変化を示した図である。

【図 1 0】参考例 1 における H i l y t e F l u o r 5 5 5 の蛍光強度変化を示した図である。

【図 1 1】参考例 1 における T A M R A の蛍光強度変化を示した図である。

【図12】参考例1におけるROX--の蛍光強度変化を示した図である。

【図13】参考例1におけるAlexa Fluor 488の蛍光強度変化を示した図である。

【図14】参考例1におけるATTO 465の蛍光強度変化を示した図である。

【図15】参考例1におけるATTO 488の蛍光強度変化を示した図である。

【図16】参考例1におけるHilyte Fluor 488の蛍光強度変化を示した図である。

【図17】参考例2におけるDonor色素3種それぞれとAcceptor色素Alexa Fluor 568とのFRET強度比相対比較を示した図である。

【図18】参考例2におけるDonor色素3種それぞれとAcceptor色素Alexa Fluor 594とのFRET強度比相対比較を示した図である。 10

【図19】参考例2におけるDonor色素3種それぞれとAcceptor色素ATTO 550とのFRET強度比相対比較を示した図である。

【図20】参考例2におけるDonor色素3種それぞれとAcceptor色素ATTO 565とのFRET強度比相対比較を示した図である。

【図21】参考例2におけるDonor色素3種それぞれとAcceptor色素Hilyte Fluor 555とのFRET強度比相対比較を示した図である。

【図22】参考例2におけるDonor色素3種それぞれとAcceptor色素TAMRAとのFRET強度比相対比較を示した図である。

【図23】参考例2におけるDonor色素3種それぞれとAcceptor色素ROX 20とのFRET強度比相対比較を示した図である。

【図24】参考例3におけるDonor色素2種それぞれとAcceptor色素Alexa Fluor 568とのFRET強度比相対比較を示した図である。

【図25】参考例3におけるDonor色素2種それぞれとAcceptor色素Alexa Fluor 594とのFRET強度比相対比較を示した図である。

【図26】参考例3におけるDonor色素2種それぞれとAcceptor色素ATTO 550とのFRET強度比相対比較を示した図である。

【図27】参考例3におけるDonor色素2種それぞれとAcceptor色素ATTO 565とのFRET強度比相対比較を示した図である。

【図28】参考例3におけるDonor色素2種それぞれとAcceptor色素Hilyte Fluor 555とのFRET強度比相対比較を示した図である。 30

【図29】参考例3におけるDonor色素2種それぞれとAcceptor色素TAMRAとのFRET強度比相対比較を示した図である。

【図30】参考例3におけるDonor色素2種それぞれとAcceptor色素ROXとのFRET強度比相対比較を示した図である。

【図31】参考例4におけるヌクレオチド識別特異性と光連結反応温度との関係を示した図である。

【図32】参考例5におけるヌクレオチド識別特異性と光連結反応温度との関係を示した図である。

【図33】参考例6における光連結プローブの融解曲線解析の結果を示した図である。 40

【図34】参考例7における光連結プローブの融解曲線解析の結果を示した図である。

【図35】参考例8におけるALEXA Fluor 488とALEXA Fluor 594のFRETプローブ(Wt)を用いた光連結反応によるヌクレオチド配列の識別及び定量結果を示した図である。

【図36】参考例8におけるALEXA Fluor 488とALEXA Fluor 594のFRETプローブ(Mt)を用いた光連結反応によるヌクレオチド配列の識別及び定量結果を示した図である。

【図37】参考例8におけるATTO 488とALEXA Fluor 594のFRETプローブ(Wt)を用いた光連結反応によるヌクレオチド配列の識別及び定量結果を示した図である。 50

【図38】参考例8におけるATTO 488とALEXA Fluor 594のFRETプローブ(Mt)を用いた光連結反応によるヌクレオチド配列の識別及び定量結果を示した図である。

【図39】参考例8におけるALEXA Fluor 488とROXのFRETプローブ(Wt)を用いた光連結反応によるヌクレオチド配列の識別及び定量結果を示した図である。

【図40】参考例8におけるALEXA Fluor 488とROXのFRETプローブ(Mt)を用いた光連結反応によるヌクレオチド配列の識別及び定量結果を示した図である。

【図41】参考例8におけるATTO 488とROXのFRETプローブ(Wt)を用いた光連結反応によるヌクレオチド配列の識別及び定量結果を示した図である。 10

【図42】参考例8におけるATTO 488とROXのFRETプローブ(Mt)を用いた光連結反応によるヌクレオチド配列の識別及び定量結果を示した図である。

【図43】実施例1におけるFRETプローブ(Wt)を用いた光連結反応によるCYP2C9の変異解析結果を示した図である。

【図44】実施例1におけるFRETプローブ(Mt)を用いた光連結反応によるCYP2C9の変異解析結果を示した図である。

【図45】参考例9におけるATTO 488の蛍光強度変化を示した図である。

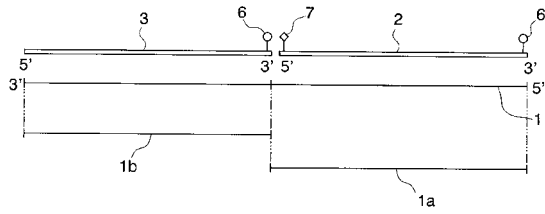
【図46】参考例9におけるAlexa Fluor 594の蛍光強度変化を示した図である。 20

【符号の説明】

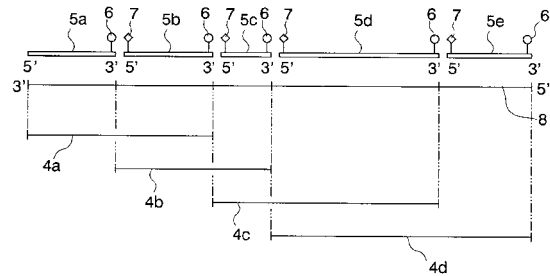
【0123】

1…標的ヌクレオチド配列、1a…標的ヌクレオチド配列1の上流側標的ヌクレオチド配列、1b…標的ヌクレオチド配列1の下流側標的ヌクレオチド配列、2…上流側プローブ、3…下流側プローブ、4a～4d…標的ヌクレオチド配列、5a～5e…プローブ、6…PCR阻害物質、7…光応答性物質、8…標的ヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列、9…標的ヌクレオチド、10…標的ヌクレオチド配列、11a～11c…プローブ。

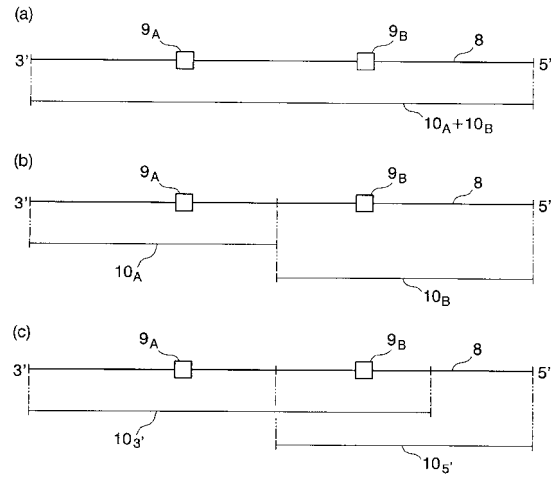
【図 1】



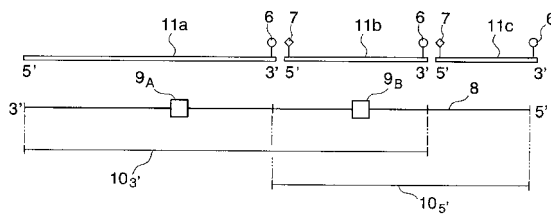
【図 2】



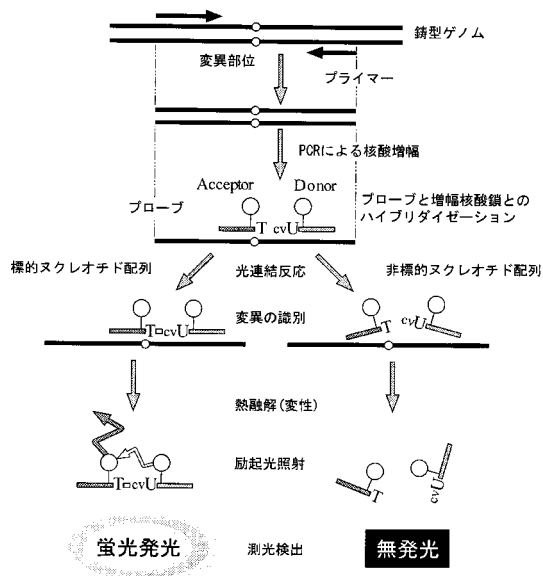
【図 3】



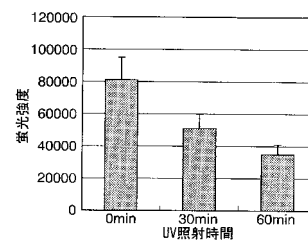
【図 4】



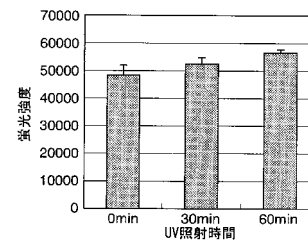
【図 5】



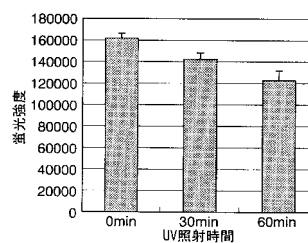
【図 6】



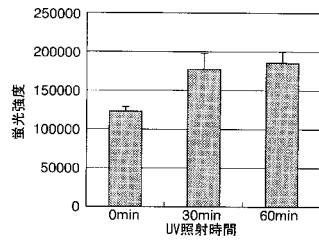
【図 7】



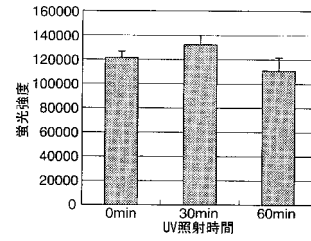
【図 8】



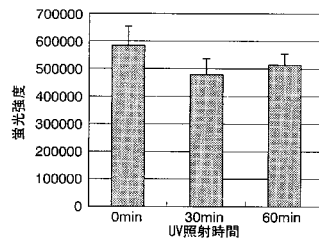
【図 9】



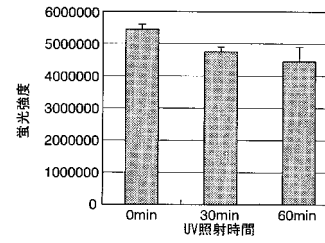
【図 12】



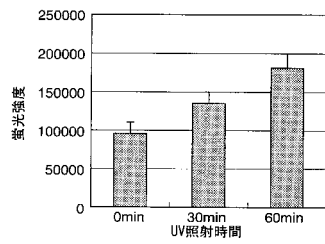
【図 10】



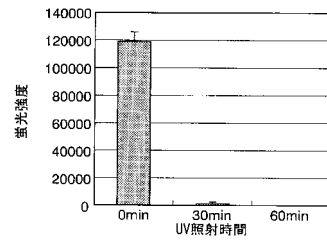
【図 13】



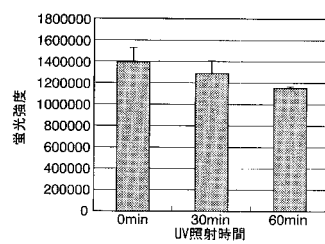
【図 11】



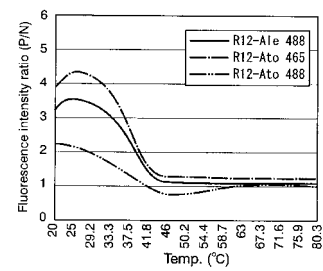
【図 14】



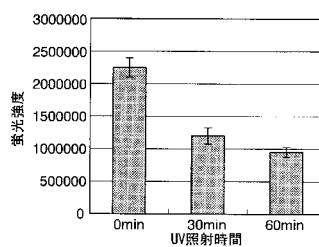
【図 15】



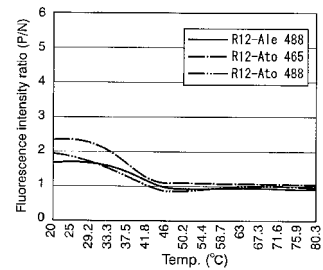
【図 18】



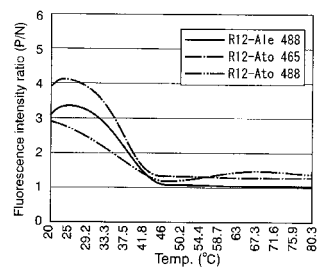
【図 16】



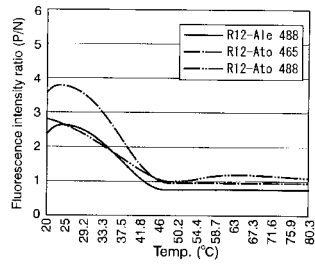
【図 19】



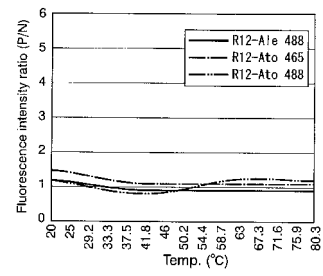
【図 17】



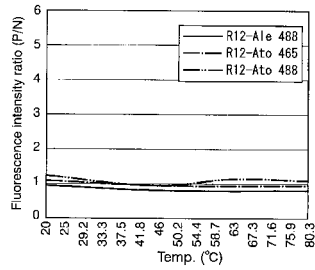
【図 20】



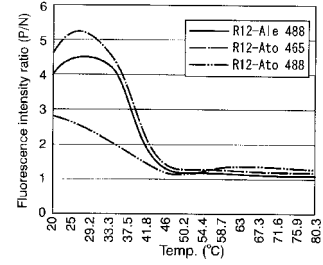
【図 22】



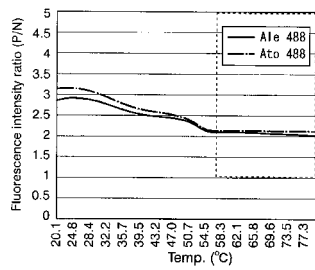
【図 21】



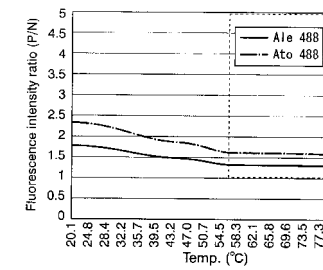
【図 23】



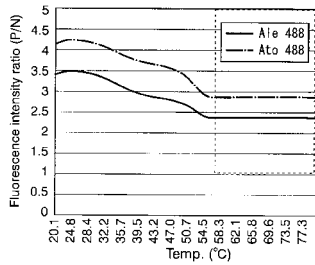
【図 24】



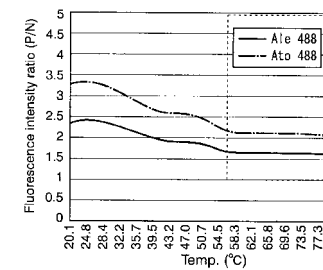
【図 26】



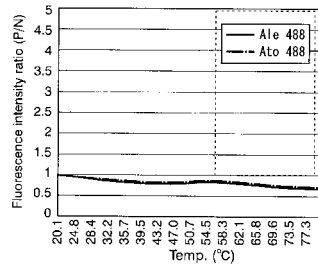
【図 25】



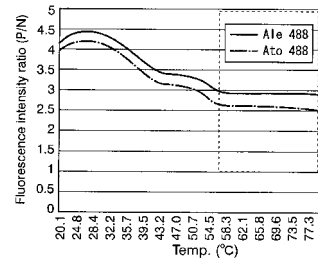
【図 27】



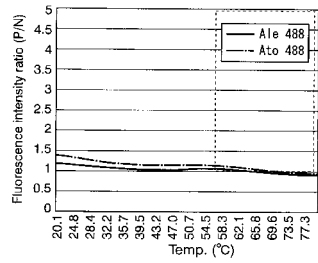
【図 28】



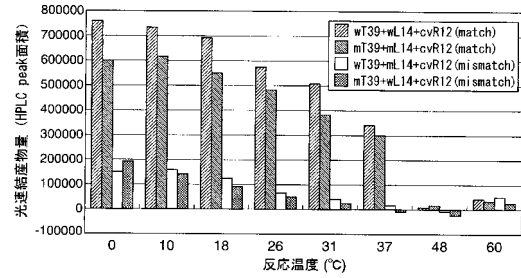
【図 30】



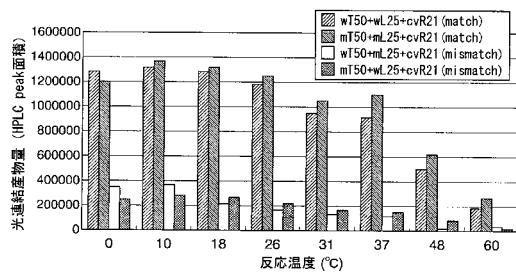
【図 29】



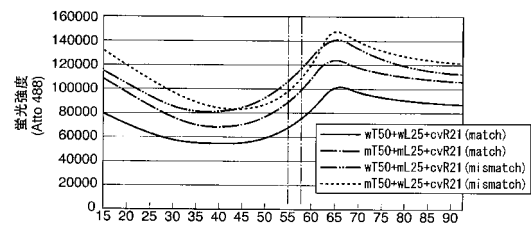
【図 31】



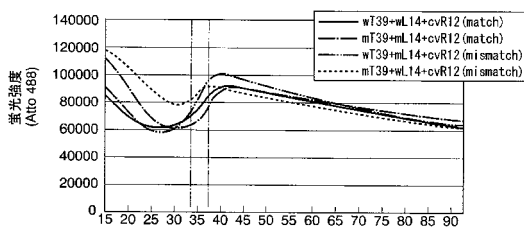
【図 32】



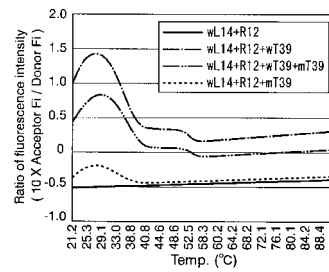
【図 34】



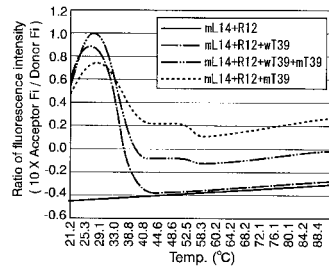
【図 33】



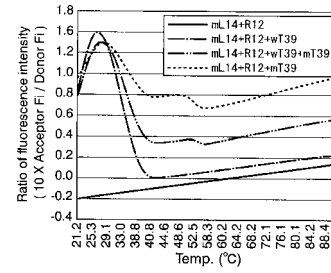
【図 35】



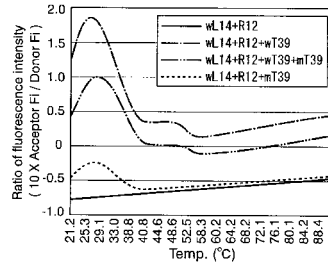
【図 36】



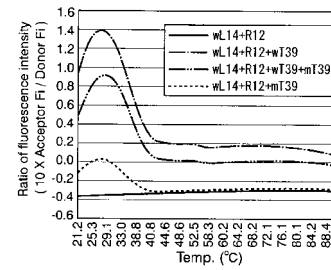
【図 38】



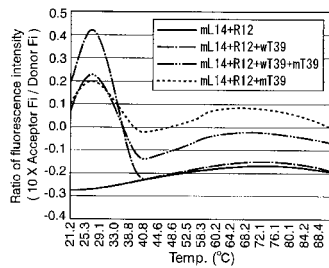
【図 37】



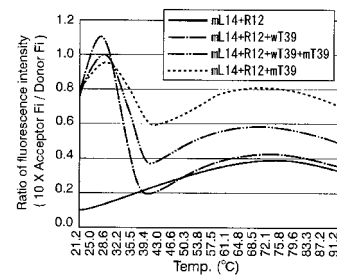
【図 39】



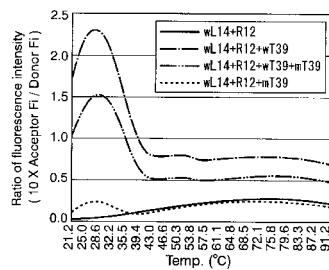
【図 40】



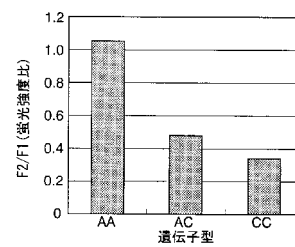
【図 42】



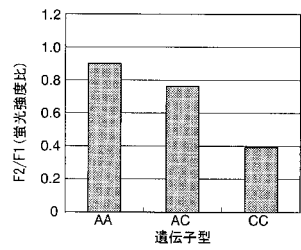
【図 41】



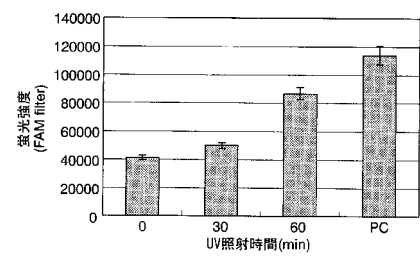
【図 43】



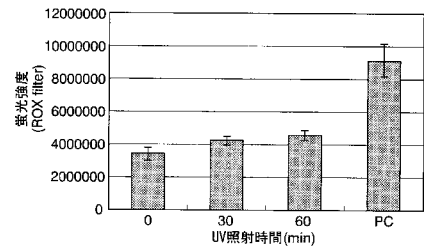
【図 4 4】



【図 4 6】



【図 4 5】



【配列表】

0005207355000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦
- (72)発明者 中山 雅人
東京都台東区台東1丁目5番1号 凸版印刷株式会社内
- (72)発明者 山根 明男
東京都台東区台東1丁目5番1号 凸版印刷株式会社内
- (72)発明者 高屋 智行
東京都台東区台東1丁目5番1号 凸版印刷株式会社内
- (72)発明者 藤本 健造
石川県能美市旭台一丁目50番地 大学宿舍A-22

審査官 清水 晋治

- (56)参考文献 特開2005-350386 (JP, A)
国際公開第2007/058326 (WO, A1)
Organic letters, 2008 Feb, Vol.10, No.3, p.397-400
Chemistry letters, 2008(Epub 2007), Vol.37, No.2, p.134-135
Nucleosides & Nucleotides, 1997, Vol.16, No.5&6, p.643-652
藤本健造, 光応答性人工核酸を用いた遺伝子操作および遺伝子解析, 有機合成化学協会誌, 2007, Vol.65, No.7, p.709-714
吉村嘉永、外3名, 配列特異的光クロスリンク反応を用いた高感度一塩基多型解析, 日本分析化学会第56年会講演要旨集, 2007, p.61(講演番号:C 1026)
藤本健造、外1名, 光ライゲーションを用いた高感度遺伝子解析法の開発, 日本分析化学会第56年会講演要旨集, 2007, p.371(講演番号:Y1049)
Oncogene, 1999, Vol.18, No.1, p.27-38
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C12Q 1/68
PubMed
JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII)
医学・薬学予稿集全文データベース
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq