(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3855492号

(P3855492)

(45)発行日　平成18年12月13日(2006.12.13)　(24)登録日　平成18年9月22日(2006.9.22)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	P
G01N 33/566	(2006.01)	G01N	33/566	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA

請求項の数 11　(全 17 頁)

(21)出願番号　特願平10-286286
(22)出願日　平成10年10月8日(1998.10.8)
(65)公開番号　特開2000-106900(P2000-106900A)
(43)公開日　平成12年4月18日(2000.4.18)
審査請求日　平成14年12月17日(2002.12.17)

(73)特許権者　000005108
株式会社日立製作所
東京都千代田区丸の内一丁目６番６号
(74)代理人　100100310
弁理士　井上　学
(72)発明者　植松　千宗
東京都国分寺市東恋ケ窪一丁目２８０番地
株式会社日立製作所中央研究所内
(72)発明者　神原　秀記
東京都国分寺市東恋ケ窪一丁目２８０番地
株式会社日立製作所中央研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】混合核酸断片分析法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

複数の試料に由来する複数の核酸断片の群を用意する工程と、

複数の塩基からなる複数のサブユニット配列を有し、前記サブユニット配列の並びが各々に異なる複数の種類のプライマーを用意する工程と、

前記プライマーの少なくとも一部と相補結合するオリゴマーとを用意する工程と、

前記オリゴマーを、前記核酸断片の群ごとに前記核酸断片に結合させる工程と、

前記オリゴマーが結合した前記核酸断片の群を混合する工程と、

前記プライマーを用いて、前記オリゴマーが結合した前記複数の核酸断片を各々増幅する工程と、

前記増幅する工程で得た増幅産物を検出する工程とを有することを特徴とする混合核酸断片分析法。

【請求項２】

前記プライマーを用意する工程では、同じ長さを有する前記プライマーを用意することを特徴とする請求項１に記載の混合核酸断片分析法。

【請求項３】

前記プライマーは、４塩基～６塩基からなる複数のサブユニット配列を有し、前記複数のサブユニット配列の並びの順番は、前記核酸断片の群に対応して異なることを特徴とする請求項１に記載の混合核酸断片分析法。

【請求項４】

前記サブユニット配列は、３'末端の塩基種と５'末端の塩基種とが同一であることを特徴とする請求項１に記載の混合核酸断片分析法。

【請求項５】

前記群に対応する前記プライマーは、前記群毎に前記プライマーに共通する１０塩基～２５塩基からなる共通塩基配列と、１塩基～３塩基からなり前記群の前記核酸断片を識別する選択用塩基配列とを有し、前記共通塩基配列部分は、４塩基～６塩基からなる複数のサブユニット配列の異なる並びを前記群毎に前記プライマーに共通して含むことを特徴とする請求項１に記載の混合核酸断片分析法。

【請求項６】

前記オリゴマーは、前記群毎に共通する塩基配列を有し、前記群毎に対応する前記プライマーの前記複数のサブユニット配列の異なる並びの塩基配列に相補な塩基配列を含むことを特徴とする請求項１に記載の混合核酸断片分析法。

【請求項７】

前記増幅する工程は、前記複数の核酸断片の群と、前記群に対応する前記プライマーとを１つの容器に収めて行うことを特徴とする請求項１に記載の混合核酸断片分析法。

【請求項８】

前記プライマーを用意する工程では、前記群に対応して異なる蛍光体で標識されている前記プライマーを用意し、前記検出する工程では、前記増幅する工程で得た、前記蛍光体で標識された前記増幅産物を、電気泳動して検出することを特徴とする請求項１に記載の混合核酸断片分析法。

【請求項９】

前記プライマーを用意する工程では、前記群に対応して異なる蛍光体で標識されている前記プライマーを用意し、前記検出する工程では、前記群の前記核酸断片に相補な塩基配列を持つ核酸プローブを複数種類固定した核酸プローブアレイを用いて、前記増幅産物を検出することを特徴とする請求項１に記載の混合核酸断片分析法。

【請求項１０】

複数の塩基からなる複数のサブユニット配列を有し、前記サブユニット配列の並びが各々に異なる複数の種類のプライマーを有する混合核酸断片分析プライマーキット。

【請求項１１】

共通する１０塩基～２５塩基からなり、４塩基～６塩基からなる複数のサブユニット配列を含む共通塩基配列と、試料核酸から得た核酸断片を識別する選択用塩基配列とを有し、かつ反応効率を揃えられた、複数のプライマーからなるプライマーセットを複数有するキットであって、前記サブユニット配列は、前記プライマーセット毎に並びが異なるものであることを特徴とするプライマーセットキット。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸増幅法、混合ＤＮＡ断片分析法、混合ＲＮＡ断片分析法、発現している遺伝子群を調べる遺伝子発現パターンの分析法に関し、特に蛍光標識を利用したゲル電気泳動によるＤＮＡ断片分析法に関する。

【０００２】

【従来の技術】

遺伝子、又はＤＮＡの塩基配列の比較を行なうには、遺伝子やＤＮＡの塩基配列を決定して比較すれば良いが、長いＤＮＡの塩基配列決定や多数のＤＮＡ断片の混合物からなる試料の塩基配列決定は困難である。そのため、長いＤＮＡを調べる場合には、ＤＮＡを断片化し生成した断片のゲル電気泳動パターンを調べることが行なわれる。最近、種々計測法、及び装置の発展に伴い、非常に多数の遺伝子の発現計測の同時検出が可能になってきている。

【０００３】

遺伝子発現の測定法の例として、ゲル電気泳動に基づくスキャニング法と呼ばれる方法が

ある。スキャニング法には、ＦＤＤ（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ Ｄｉｓｐｌａｙ）（ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ３５１、２３１－２３６（１９９４））、末端識別プライマーを用いた方法（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、２４、２６１６－２６１７（１９９６）、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ Ｓｅｒｉｅｓ、Ｎｏ．３５、２５７－２５８（１９９６））が含まれる。

【０００４】

スキャニング法は何れも、複数のＤＮＡ断片に共通に作用する複数のプライマーを用いて試料ｃＤＮＡ、又はｍＲＮＡを鋳型としてＰＣＲを行ない、得られたＰＣＲ産物の電気泳動パターンから遺伝子の発現情報を得る方法である。スキャニング法では、遺伝子に対応した特異なプローブがなくても発現状態を検出できるため、塩基配列未知の遺伝子の発現情報を得ることができる利点がある。

【０００５】

例えば、末端識別プライマーを用いる方法では、２本鎖ｃＤＮＡを制限酵素で切断し、ＤＮＡ断片末端の切断部に既知の塩基配列を持つオリゴヌクレオチドを導入する。ｃＤＮＡの３’末端には通常ポリＡ鎖が存在している。ｃＤＮＡの３’末端のポリＡ鎖と導入されたオリゴヌクレオチドとで挟まれた塩基配列は、各々のｃＤＮＡに特異的であると考えらるため、挟まれた塩基配列の部分を持つＤＮＡ断片を、ｃＤＮＡを代表する（、又は識別する）代表断片として計測する。

【０００６】

生体内では数千から数万種の遺伝子が発現しているため、ｃＤＮＡを代表する代表断片の種類は非常に多く、１つの電気泳動レーンでは区別して計測できない。このため、全ての代表断片を複数のグループに分け、１つのグループ内のＤＮＡ断片数を充分分離計測できる程度に減らしてからゲル電気泳動を行なう。全ての代表断片を複数のグループに分ける際に、ＰＣＲプライマーの３’末端に２塩基からなる選択塩基配列を付加したプライマーを用いる。ＰＣＲでは、断片の末端２塩基が選択塩基配列に相補な断片だけが増幅される。２塩基の選択塩基配列を持つプライマーセット２組からそれぞれ１つのプライマーを選択し、任意の２つのプライマーの組み合わせからなるグループを構成する。

【０００７】

各グループのプライマーを用いてＰＣＲを行ない、増幅産物を電気泳動で分析する。各グループの電気泳動パターンに現れるＤＮＡ断片を合わせると全ての発現している遺伝子に関する情報が得られる。その結果、発現している各ｃＤＮＡの種類と量を知ることができる。

【０００８】

断片を計測する場合には、オリゴｄＴプライマーと、ＤＮＡ断片末端の切断部に導入されたオリゴマーに相補的なプライマーのうち少なくとも何れかのプライマーを蛍光標識し、蛍光標識されたプライマーを用いてＰＣＲ（Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ）により、ＤＮＡの断片数を装置の検出感度以上に増幅した後、蛍光式ＤＮＡシーケンサー等の装置を用いて計測する。

【０００９】

【発明が解決しようとする課題】

従来技術の電気泳動に基づいた遺伝子発現モニター方法は、実用面では以下に説明する種々の問題がある。電気泳動に基づく方法では、ＰＣＲ増幅の再現性が低い場合には、得られる比較結果に大きな誤差が生じる。

【００１０】

複数の試料に於ける遺伝子発現状態の差を比較する場合には、各々の試料について独立にＰＣＲを行ない、ＰＣＲ産物を電気泳動分析して得られる結果を比較する。複数の試料を同一種類の蛍光体で標識した場合には、別々の反応チューブで調製したＰＣＲ産物を別々の電気泳動レーンで分析する。複数の試料を異なる種類の蛍光体で標識した場合は、試料毎に別々のチューブでＰＣＲを行なった後に、同じ電気泳動レーンで分析する。従来技術では、電気泳動のサンプル調製時に、別々のチューブでＰＣＲを行なわなければならない

ため、ＰＣＲの再現性が、ＰＣＲ産物の電気泳動分析の結果の比較の精度に影響を与えるが、現状では、ＰＣＲの再現性は充分ではないという問題がある。

【００１１】

本発明の目的は、ＰＣＲを、同じ反応チューブで行なうことにより、ＰＣＲの再現性の影響を受けず、複数の試料を比較する遺伝子発現モニター方法を可能とする混合ＤＮＡ断片分析法を提供することにある。

【００１２】

【課題を解決するための手段】

本発明の混合ＤＮＡ断片分析法では、ＰＣＲに於いて試料毎に、異なる塩基配列を持ち、長さ、及び溶解温度T_m値が同であるプライマーを用い、同一チューブ内で複数の試料の反応を行なう。複数の試料毎に対応する各プライマーは、それぞれ独立に機能し、お互いの反応に影響を与えない様に、プライマー同士で二次構造を形成しない塩基配列を有している。反応チューブ内に複数の試料ＤＮＡを入れ、同一反応チューブでＰＣＲを行ない反応毎のばらつきをなくす。

【００１３】

第１の試料ＤＮＡは第１のプライマーセットのプライマーで増幅され、第２の試料ＤＮＡは第２のプライマーセットのプライマーで増幅される様に、各々のプライマーに相補な塩基配列をもつオリゴヌクレオチドを結合させておく。また、何れのプライマーセットのプライマーで増幅されたかを識別するため、第１のプライマーセットのプライマーと、第２のプライマーセットのプライマーとは、異なる蛍光体で標識しておく。同一チューブ内で複数のプライマーセットのプライマーを用いて複数の試料ＤＮＡを増幅するので、ＰＣＲの再現性の問題は生じない。

【００１４】

複数のプライマーセットのプライマーによって増幅されたＤＮＡ断片を比較するには、プライマーによる反応性の違いをなくすことが必要である。プライマーのT_m値、試料ＤＮＡのT_m値、ＰＣＲ増幅産物のT_m値が、ＰＣＲの反応効率を決定している。

【００１５】

複数の試料ＤＮＡで同じ遺伝子が発現している場合には、その遺伝子に関連する試料ＤＮＡ、及びＰＣＲ増幅産物は同じであるから、T_m値も同じ値をとる。従ってＰＣＲの反応効率は、プライマーのT_m値に依存しており、複数のプライマーのT_m値を揃えることでＰＣＲの反応効率を揃えることができる。

【００１６】

ＤＮＡのT_m値は、塩基配列を構成する塩基の種類によって大まかに計算でき（Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ、３、１９５－２０８（１９６５））。このT_m値の計算では、塩基種による隣接塩基とのスタッキングの差を利用している。着目塩基とその隣接１塩基を考慮した２塩基からなる塩基配列を用いてT_mを、より正確に計算することが提案されている（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８３、３７４６－３７５０（１９８６））。

【００１７】

複数のプライマーのT_m値を揃えるために、プライマーの塩基配列に、４塩基～６塩基からなるサブユニットを含ませて、数種類のサブユニットでプライマーの塩基配列を構成する。例えば、４塩基からなる５種類のサブユニット（Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ）を、Ａ－Ｂ－Ｃ－Ｄ－Ｅの順番で並べた塩基配列を持つプライマーと、Ｃ－Ｄ－Ｂ－Ａ－Ｅの順番で並べた塩基配列を持つプライマーを用いる。ここで、各サブユニットの両末端の塩基種は同じにしておく。サブユニットの順番を入れ替えても、サブユニットの両末端の塩基は同じなので、サブユニット－サブユニット連結部の塩基配列は変化しない。従って、サブユニット同士の順番の入れ替えによるT_m値への影響はない。

【００１８】

また、プライマー全体を構成する塩基組成は、サブユニット同士の順番を入れ替えただけであるため変化しない。以上説明したように、サブユニットを入れ替えたプライマー同士

のＴ$_m$値は殆ど差がなく、ＰＣＲでの反応効率も同じである。また、サブユニットを入れ替えたプライマーは、お互いに相補な塩基配列でないので、プライマー同士で２本鎖を形成してＰＣＲを妨げることはない。

【００１９】

このように、両末端が同じ塩基で構成されるサブユニットを数種類並べ変えることで、ＰＣＲの反応効率に差がないプライマーを複数種構成できる。また、同一反応チューブでＰＣＲを行なうので、ＰＣＲの反応効率のばらつきをなくすことができる。

【００２０】

本発明の混合ＤＮＡ断片分析法では、異なる塩基配列を持ち、長さ、及び溶解温度Ｔ$_m$値が同であるプライマーを用いて、同一チューブ内で複数の試料の反応を行なうので、ＰＣＲの反応効率のばらつきの影響を受けることなく、複数の試料に含まれるＤＮＡ断片の存在比を定量的に比較できる。

【００２１】

本発明の混合ＤＮＡ断片分析法は、ａ）ＤＮＡ断片群の各群のＤＮＡ断片に、同じ溶解温度と同じ長さを持つプライマーと相補結合するオリゴマーを、前記各群毎に異ならせて結合する工程と、ｂ）前記オリゴマーが結合した前記各群の前記ＤＮＡ断片を混合する工程と、ｃ）前記オリゴマーに相補な前記各群に対応する前記プライマーを用いて、前記オリゴマーが結合した前記各群の前記ＤＮＡ断片を、同一容器で同時にＰＣＲする工程、ｄ）ＰＣＲ増幅されたＤＮＡ断片を検出する工程とを有することに特徴を有し、（１）前記各群に対応する前記プライマーは、前記各群に対応して異なる蛍光体で標識されており、前記ＰＣＲ増幅されたＤＮＡ断片を電気泳動し、前記蛍光体で標識されたＤＮＡ断片を検出すること、（２）前記各群の前記ＤＮＡ断片に相補な塩基配列を持つＤＮＡプローブを複数種類固定したＤＮＡプローブアレイを用いて、前記ＰＣＲ増幅されたＤＮＡ断片を検出すること、（３）前記各群に対応する前記プライマーは、前記各群に対応して異なる蛍光体で標識されていること、（４）前記プライマーは、４塩基～６塩基からなる複数のサブユニット配列を有し、該複数のサブユニット配列の並びの順番は、前記各群に対応して異なり、前記サブユニット配列の３’末端の塩基種と５’末端の塩基種とが同一であること、（５）前記各群に対応する前記プライマーは、前記各群毎に前記プライマーに共通する１０塩基～２５塩基からなる共通塩基配列と、１塩基～３塩基からなり前記各群の前記ＤＮＡ断片を識別する選択用塩基配列とを有し、前記共通塩基配列部分は、４塩基～６塩基からなる複数のサブユニット配列の異なる並びを前記各群に対応して含み、前記選択用塩基配列は、前記１塩基～３塩基の組合せの可能な全ての塩基配列を含むこと、等にも特徴がある。

【００２２】

本発明のプライマーは上記の混合ＤＮＡ断片分析法に使用されるプライマーであり、該プライマーは、４塩基～６塩基からなる複数のサブユニット配列を有し、該複数のサブユニット配列の並びの順番は、前記各群に対応して異なり、前記サブユニット配列の３’末端の塩基種と５’末端の塩基種とが同一であることに特徴がある。

【００２３】

また、本発明のプライマーは上記の混合ＤＮＡ断片分析法に使用されるプライマーであり、前記各群に対応する前記プライマーは、前記各群毎に前記プライマーに共通する１０塩基～２５塩基からなる共通塩基配列と、１塩基～３塩基からなり前記各群の前記ＤＮＡ断片を識別する選択用塩基配列とを有し、前記共通塩基配列部分は、４塩基～６塩基からなる複数のサブユニット配列の異なる並びを前記各群に対応して含み、前記選択用塩基配列は、前記１塩基～３塩基の組合せの可能な全ての塩基配列を含み、前記サブユニット配列の３’末端の塩基種と５’末端の塩基種とが同一であることに特徴がある。

【００２４】

更に、本発明のプライマーはＰＣＲに使用される異なる塩基配列を持つ複数のプライマーであり、該プライマーは、複数の塩基からなる複数のサブユニット配列の並びを有し、前記複数のプライマーは、前記並びが異なり同じ溶解温度を持ち、前記サブユニット配列の

３’末端の塩基種と５’末端の塩基種とが同一であることに特徴がある。
【００２５】
また、本発明のプライマーセットはＰＣＲに使用される異なる塩基配列を持つ複数のプライマーを有する複数のプライマーセットであり、該各プライマーセット毎に前記プライマーに共通する１０塩基～２５塩基からなる共通塩基配列と、１塩基～３塩基からなり試料ＤＮＡから得たＤＮＡ断片を識別する選択用塩基配列とを有し、前記共通塩基配列部分は、４塩基～６塩基からなる複数のサブユニット配列の異なる並びを前記プライマーセットに対応して含み、前記選択用塩基配列は、前記１塩基～３塩基の組合せの可能な全ての塩基配列を含むことに特徴があり、前記サブユニット配列の３’末端の塩基種と５’末端の塩基種とが同一であること、前記複数のプライマーセットの前記複数のプライマーは、同じ溶解温度を持つこと、等の特徴がある。
【００２６】
【発明の実施の形態】
以下、本発明を実施例を用いて説明する。
【００２７】
（第１の実施例）
図１は、本発明の第１の実施例の発現遺伝子モニターの手順を示すフローチャートである。試料ｃＤＮＡとして、ラット肝臓、及びラット腎臓から抽出したＲＮＡから作製したｃＤＮＡを用いた。定法によりホモジナイズした細胞からグアニジンチオシアネート法によりＲＮＡを抽出した。抽出したＲＮＡを逆転写酵素を用いてｃＤＮＡに変換し、試料ｃＤＮＡ（ラット肝臓由来ｃＤＮＡ、ラット腎臓由来ｃＤＮＡ）とした。
【００２８】
図１に示すように、ラット肝臓由来の試料ｃＤＮＡ１（種々のｃＤＮＡ混合物であり、図では１種のみ示す。）を、反応チューブ２７でクラスＩＩ制限酵素により切断して、ｃＤＮＡ断片３を得る。同様にして、別の反応チューブ２８でラット腎臓由来の試料ｃＤＮＡ２を、試料ｃＤＮＡ１の切断に用いた同じ制限酵素で切断し、ｃＤＮＡ断片４（種々のｃＤＮＡ混合物であり、図では１種のみ示す。）を得る。クラスＩＩ制限酵素として、塩基配列５’－ＧＡＴＣ－３’を認識して、↓ＧＡＴＣの位置を切断するＳａｕ３Ａ　Ｉを用いた。クラスＩＩ制限酵素としては、Ｎｌａ　ＩＩＩ、Ｈｈａ　Ｉ等４塩基認識の酵素が望ましいが、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩ、ＥｃｏＲ　Ｉ等６塩基認識の酵素でも良い。
【００２９】
ｃＤＮＡ断片３の切断部に、既知の塩基配列を持つ既知塩基配列オリゴヌクレオチド１１をライゲーション反応により導入し、３’末端に既知塩基配列オリゴヌクレオチド１１が導入されたｃＤＮＡ断片５を得る。同様に、別の反応チューブ２８でｃＤＮＡ断片４の切断部に、既知の塩基配列を持つ既知塩基配列オリゴヌクレオチド１２をライゲーション反応により導入し、３’末端に既知塩基配列オリゴヌクレオチド１２が導入されたｃＤＮＡ断片６を得る。
【００３０】
次に、ｃＤＮＡ断片５とｃＤＮＡ断片６を混合し、混合液の一部を、ＰＣＲ用チューブ２９に入れてＰＣＲでの鋳型ＤＮＡ断片とする。
【００３１】
ＰＣＲでのプライマーとして、４つのサブユニットの配列（Ｉ）ＴＣＡＴ、（ＩＩ）ＣＡＣＣ、（ＩＩＩ）ＴＴＣＴ、（ＩＶ）ＣＣＡＣ、制限酵素認識塩基配列ＧＡＴＣ、２塩基からなり制限酵素認識塩基配列ＧＡＴＣの５’末端（Ｇ）に続く２塩基を識別する選択用塩基配列ＮＮ（ＮＮは、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｔの何れかの塩基である）１５から構成されるプライマー２１を用意する。
【００３２】
各サブユニットの配列を構成している塩基のうち、サブユニットの両末端の塩基種はサブユニットの順番を変えてもサブユニット連結部分の塩基配列が変わらないように、同じ塩基種で構成されている。プライマー２１の塩基配列（配列番号１）は、（Ｉ）－（ＩＩ）

－（ＩＩＩ）－（ＩＶ）の順番に並ぶ４つのサブユニットの配列と、制限酵素認識塩基配列ＧＡＴＣとからなる共通塩基配列１３と、２塩基からなる選択用塩基配列ＮＮ１５から構成される。

【００３３】

（配列番号１）

５’－ＴＣＡＴＣＡＣＣＴＴＣＴＣＣＡＣＧＡＴＣＮＮ－３’

ＮＮはＡ、Ｃ、Ｇ、Ｔの何れかの塩基であり、プライマー２１は、１６種のプライマーからなるプライマーセット２３を構成する。

【００３４】

更に、（ＩＩＩ）－（ＩＶ）－（Ｉ）－（ＩＩ）の順番に並ぶ４つのサブユニットの配列と、制限酵素認識塩基配列ＧＡＴＣからなる共通塩基配列１４と、２塩基からなる選択用塩基配列ＮＮ（ＮＮは、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｔの何れかの塩基）１６から構成され、配列番号２の塩基配列を持つプライマー２２を用意する。ＮＮはＡ、Ｃ、Ｇ、Ｔの何れかの塩基であり、プライマー２２も、プライマー２１と同様に１６種のプライマーからなるプライマーセット２４を構成する。

【００３５】

（配列番号２）

５’－ＴＴＣＴＣＣＡＣＴＣＡＴＣＡＣＣＧＡＴＣＮＮ－３’）

既知の塩基配列を持つ既知塩基配列オリゴヌクレオチド１１は、プライマーセット２３に属するプライマー２１の、（Ｉ）－（ＩＩ）－（ＩＩＩ）－（ＩＶ）の順番で並ぶ４つのサブユニットの配列と相補な塩基配列である。塩基配列５’－ＧＡＴＣ－３’を認識して、↓ＧＡＴＣの位置を切断する制限酵素Ｓａｕ３ＡＩにより切断されたｃＤＮＡ断片３の切断部に、オリゴヌクレオチド１１が導入される。オリゴヌクレオチド１１は、ｃＤＮＡ断片３の－鎖の３’末端の４塩基の配列５’－ＧＡＴＣ－３’の３’側、及びｃＤＮＡ断片３の＋鎖の３’末端の４塩基の配列５’－ＧＡＴＣ－３’の３’側にそれぞれ導入される。

【００３６】

プライマーセット２３は、ｃＤＮＡ断片３の－鎖の３’末端の制限酵素認識配列とオリゴヌクレオチド１１、及びｃＤＮＡ断片３の＋鎖の３’末端の制限酵素認識配列とオリゴヌクレオチド１１に相補鎖結合する。従って、プライマーセット２３は３’末端に既知塩基配列オリゴヌクレオチド１１が導入されたＤＮＡ断片５を増幅する。

【００３７】

既知の塩基配列を持つ既知塩基配列オリゴヌクレオチド１２は、プライマーセット２４に属するプライマー２２の、（ＩＩＩ）－（ＩＶ）－（Ｉ）－（ＩＩ）の順番で並ぶ４つのサブユニットの配列と相補な塩基配列である。塩基配列５’－ＧＡＴＣ－３’を認識して、↓ＧＡＴＣの位置を切断する制限酵素Ｓａｕ３ＡＩによって切断されたｃＤＮＡ断片４の切断部に、オリゴヌクレオチド１２が導入される。オリゴヌクレオチド１２は、ｃＤＮＡ断片４の－鎖の３’末端の４塩基の配列５’－ＧＡＴＣ－３’の３’側、及びｃＤＮＡ断片４の＋鎖の３’末端の４塩基の配列５’－ＧＡＴＣ－３’の３’側にそれぞれ導入される。

【００３８】

プライマーセット２４は、ｃＤＮＡ断片４の－鎖の３’末端の制限酵素認識配列とオリゴヌクレオチド１２、及びｃＤＮＡ断片４の＋鎖の３’末端の制限酵素認識配列とオリゴヌクレオチド１２に相補鎖結合する。従ってプライマーセット２４は３’末端に既知塩基配列オリゴヌクレオチド１２が導入されたＤＮＡ断片６を増幅する。

【００３９】

なお、プライマーセット２３、２４の各プライマーは、それぞれ蛍光体ＦＡ２５、蛍光体ＦＢ２６で標識されている。

【００４０】

図２は、本発明の第１の実施例のプライマー、及び既知塩基配列オリゴヌクレオチドの構

造を示す図である。

【００４１】

図２（ａ）は、プライマー４１の構造を示す。プライマー４１は、４塩基からなるサブユニットの配列３１、３２、３３、３４が５’末端から順に並ぶ４つのサブユニットの配列（Ｉ）－（ＩＩ）－（ＩＩＩ）－（ＩＶ）、制限酵素認識塩基配列３５、２塩基からなる選択塩基配列３６から構成される。図２（ｂ）は、プライマー４２の構造を示す。プライマー４２は、４塩基からなるサブユニットの配列３３、３４、３１、３２が５’末端から順に並ぶ４つのサブユニットの配列（ＩＩＩ）－（ＩＶ）－（Ｉ）－（ＩＩ）、制限酵素認識塩基配列３５、２塩基からなる選択塩基配列３６が並んだ塩基配列構造である。

【００４２】

図２（ｃ）は、プライマー４１とＤＮＡ断片４５との結合状態、図２（ｄ）は、プライマー４２とＤＮＡ断片４６との結合状態を示す。図２（ｃ）、図２（ｄ）に於いて、サブユニット３１、３２、３３、３４による塩基配列はオリゴヌクレオチド４３に相補であり、サブユニット３３、３４、３１、３２による塩基配列はオリゴヌクレオチド４４に相補である。プライマー４１、４２は同じサブユニットの配列３１、３２、３３、３４、及び制限酵素認識塩基配列３５、２塩基からなる選択塩基配列３６から構成されており、サブユニットの配列の順番が異なるだけであるため、同じT_m値を持つ。プライマー４１は、制限酵素切断部位４８の３’末端に、プライマー４１に相補なオリゴヌクレオチド４３を結合したＤＮＡ断片４５にハイブリダイズする。プライマー４２は、制限酵素切断部位４８の３’末端に、プライマー４２に相補なオリゴヌクレオチド４４を結合したＤＮＡ断片４６にハイブリダイズする。

【００４３】

プライマー４１、４２は同じT_m値を持つため、それぞれ同じ反応効率で既知塩基配列オリゴヌクレオチド４３、４４と相補鎖結合するが、相補でない相手同士とはハイブリダイズせず、お互いの反応を阻害することはない。従って、同一反応チューブでのＰＣＲが可能になる。プライマー４１、４２は、それぞれ異なる蛍光体３７、３８で標識されており、プライマー４１、４２によってＰＣＲ増幅されるＤＮＡ断片４５、４６は異なる蛍光体で標識され、電気泳動解析に於いて蛍光波長の差を区別して検出できる。

【００４４】

図１に於いて、プライマーセット２３から、ＤＮＡ断片５を増幅するためのフォワードプライマーとリバースプライマーを選び、プライマーセット２４からは、ＤＮＡ断片６を増幅するためのフォワードプライマーとリバースプライマーを選ぶ。選ばれた計４種類のプライマーを、試料ＤＮＡ断片５、６が分注された反応チューブに入れ、耐熱性ＤＮＡポリメラーゼ、基質ｄＮＴＰ、反応緩衝液からなる反応溶液をチューブに加え、ＰＣＲを行なう。ＰＣＲでは反応液は熱変性、再会合、伸長の３ステップからなる温度サイクルによって増幅反応が行なわれる。

【００４５】

熱変性ステップでは、反応液は９４°Ｃ程度に加熱されてｃＤＮＡ断片５、及び６（２本鎖ＤＮＡ）は、それぞれｃＤＮＡ断片＋鎖７、８とｃＤＮＡ断片－鎖９、１０に分離され、１本鎖ＤＮＡ断片となる。再会合ステップでは、反応液は６０°Ｃ程度に保たれる。ｃＤＮＡ断片＋鎖７、８、ｃＤＮＡ断片－鎖９、１０よりも、プライマーの濃度が高いため、ｃＤＮＡ断片＋鎖７とｃＤＮＡ断片－鎖９、又は、ｃＤＮＡ断片＋鎖８とｃＤＮＡ断片－鎖１０が再会合するよりも優先的にプライマーとｃＤＮＡ断片が会合する。プライマー２１とｃＤＮＡ断片＋鎖７が会合し、プライマー２１とｃＤＮＡ断片－鎖９が会合して２本鎖ＤＮＡを形成し、プライマー２２とｃＤＮＡ断片＋鎖８が会合し、プライマー２２とｃＤＮＡ断片－鎖１０が会合して、それぞれ２本鎖ＤＮＡを形成する。ｃＤＮＡ断片と２本鎖を形成したプライマー２１、２２は、伸長ステップでＤＮＡポリメラーゼにより伸長されてＤＮＡ断片が増幅される。ＰＣＲでは、オリゴヌクレオチドがｃＤＮＡ断片の両末端から伸長した場合に増幅が起こる。ＤＮＡ断片の＋鎖、又は－鎖だけしか伸長しない場合には、熱サイクルをｎ回行なってもｎ倍にしか増幅されず、検出感度に満たないためで

ある。＋鎖、－鎖両方の伸長があった場合に２^{n}倍に増幅される。

【００４６】

プライマー２１、２２は蛍光標識されているので、プライマー２１、２２によって増幅されたＰＣＲ増幅産物１７、１８も蛍光標識される。従って、ＰＣＲ増幅産物１７、１８の分析は、蛍光検出型の電気泳動装置等を用いて行なう。電気泳動分離されたＰＣＲ増幅産物はレーザー照射され、蛍光体２５、２６は蛍光を発し、異なる波長の蛍光は、像分割プリズム、フィルターを通して２次元検出器によって検出され、何れの蛍光体による発光であるかを区別する。測定の結果、得られるシグナルは、試料ｃＤＮＡを制限酵素切断して得たｃＤＮＡ断片のＰＣＲ増幅産物に基づく。このため、増幅ＤＮＡ断片の断片長とその蛍光強度を測定して、種々ｍＲＮＡの種類を知ることができる。

【００４７】

図３は、本発明の第１の実施例のプライマーを用いて発現遺伝子モニターを行ない得られるエレクトロフェログラム（電気泳動分離パターン）の一部５１、５２を塩基長５３に対応させて示す図である。第１の実施例では、ラット肝臓、及び腎臓に発現している遺伝子の比較を行なった。

【００４８】

エレクトロフェログラム５１は、プライマー２１によって増幅されたＰＣＲ産物を電気泳動して得られ、エレクトロフェログラム５２は、プライマー２２によって増幅されたＰＣＲ産物を電気泳動して得られる。

【００４９】

エレクトロフェログラム５１、５２のピークの大部分は同じ位置に検出されており、両組織間で共通に発現している遺伝子であることがわかる。両組織間で発現状態が異なり、特異的に発現している遺伝子に由来するピーク５５が片方のエレクトロフェログラム５２に検出されている。両組織で共通に発現している遺伝子は２つのエレクトロフェログラム５１、５２で再現性よく検出されている。各プライマーセットのプライマーを用いて別々にＰＣＲを行なうのではなく、同一反応チューブで複数のプライマーセットのプライマーを用いてＰＣＲを行なうことにより、ＰＣＲ産物の比較を容易に、正確にできる。

【００５０】

（第２の実施例）

第２の実施例は、遺伝子配列に相補な塩基配列を持つｃＤＮＡプローブを多数の種類固定したプローブアレイを用いて、ＰＣＲ産物の解析を行なう例である。図４は本発明の第２の実施例の、発現遺伝子モニターを行なう手順を示すフローチャートを示す図である。第１の実施例と同様にして、異なる株の酵母から抽出したＲＮＡから合成した試料であるｃＤＮＡ混合物（図４には１種のみ示す）６１、６２をそれぞれ別の反応チューブ９１、９２に入れ、クラスＩＩ制限酵素で切断する。クラスＩＩ制限酵素として配列５’－ＧＡＴＣ－３’を認識して↓ＧＡＴＣの位置を切断するＭｂｏ　Ｉを用いた。得られたｃＤＮＡ断片６３、６４にオリゴマー７１、７２を結合し、末端にオリゴマー７１、７２の導入されたｃＤＮＡ断片６５、６６を得る。次に、ｃＤＮＡ断片６５、６６を混合し、混合液の一部をＰＣＲ用チューブ９３に入れてＰＣＲでの鋳型ＤＮＡ断片とする。

【００５１】

ＰＣＲでのプライマーとして、４つのサブユニット配列（Ｉ）ＡＣＡＡ、（ＩＩ）ＧＡＣＧ、（ＩＩＩ）ＡＴＣＡ、（ＩＶ）ＧＣＡＧ、及び制限酵素認識塩基配列ＧＡＴＣを持つ共通塩基配列７３と、２塩基からなり制限酵素認識配列ＧＡＴＣの５’末端に続く２塩基を識別する選択用塩基配列ＮＮ（ＮＮは、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｔの何れかの塩基）７５から構成され、配列番号３の塩基配列を持つプライマー８１を用意する。

【００５２】

（配列番号３）

５’－ＡＣＡＡＧＡＣＧＡＴＣＡＧＣＡＧＧＡＴＣＮＮ－３’

ＮＮはＡ、Ｃ、Ｇ、Ｔは何れかの塩基であり、プライマー８１は１６種のプライマーからなるプライマーセット８３を構成する。更に、（Ｉ）－（ＩＶ）－（ＩＩＩ）－（ＩＩ）

の順番に並ぶ４つのサブユニットの配列と、制限酵素認識配列ＧＡＴＣからなる共通塩基配列７４と、２塩基からなる選択用塩基配列ＮＮ（ＮＮは、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｔの何れかの塩基）７６から構成され、配列番号４の塩基配列を持つプライマー８２を用意する。ＮＮはＡ、Ｃ、Ｇ、Ｔ何れかの塩基であり、プライマー８２は、プライマー８１と同様に、１６種からなるプライマーセット８４を構成する。

【００５３】

（配列番号４）

５’－ＡＣＡＡＧＣＡＧＡＴＣＡＧＡＣＧＧＡＴＣＮＮ－３’

既知配列オリゴマー７１は、プライマーセット８３に属するプライマー８１の、（Ｉ）－（ＩＩ）－（ＩＩＩ）－（ＩＶ）の順番で並ぶ４つのサブユニットの配列と相補な配列であり、既知配列オリゴマー７２は、プライマーセット８４に属するプライマー８２の（Ｉ）－（ＩＶ）－（ＩＩＩ）－（ＩＩ）の順番で並ぶ４つのサブユニットの配列と相補な配列である。従って、プライマーセット８３は３’末端に既知配列オリゴマー７１が導入されたＤＮＡ断片６５を増幅し、プライマーセット８４は３’末端に既知配列オリゴマー７２が導入されたＤＮＡ断片６６を増幅する。なお、プライマーセット８３、８４の各プライマーはそれぞれ蛍光体ＦＡ８５、蛍光体ＦＢ８６で標識されている。

【００５４】

プライマーセット８３からＤＮＡ断片６５を増幅するためのフォワードプライマーとリバースプライマーを選び、プライマーセット８４からＤＮＡ断片６６を増幅するためのフォワードプライマーとリバースプライマーを選ぶ。選ばれた合計４種類のプライマーを、試料ＤＮＡ断片６５、６６が分注された反応チューブ９３に加え、更に、耐熱性ＤＮＡポリメラーゼ、基質ｄＮＴＰ、反応緩衝液からなる反応溶液をチューブ９３に加えて、ＰＣＲ反応を行なう。その後、ガラス基板上にｃＤＮＡプローブを多数の種類固定したＤＮＡプローブアレイを用いて、ＰＣＲ産物６７、６８の解析を行なう。

【００５５】

図５は、本発明の第２の実施例に於いて、発現遺伝子の比較をＤＮＡプローブアレイを用いて行なう手順を示す図である。図５に於いて、１９１はガラス基板、１９２、１９３はそれぞれガラス基板上に固定したＤＮＡプローブである。ガラス基板１９１上には、数平方センチメートルの範囲に、数十～数百種類のＤＮＡプローブが種類毎に二次元状に固定されている。ガラス基板１９１に蛍光体ＦＡ１１１、ＦＢ１１２で標識されたＰＣＲ産物１０１、１０２をのせ、ＤＮＡプローブと相補鎖結合させる。その後、洗浄して相補鎖結合しなかったＰＣＲ産物を洗い流す。ＤＮＡプローブ１９２が固定されているガラス基板上の区画では、ＰＣＲ産物（混合物）のうち、ＤＮＡプローブ１９２に相補でないＰＣＲ産物は洗い流され、相補なＰＣＲ産物１０３、１０４はＤＮＡプローブ１９２に相補鎖結合する。同様に、ＤＮＡプローブ１９３が固定されているガラス基板上の区画では、ＤＮＡプローブ１９３に相補でないＰＣＲ産物は洗い流され、相補なＰＣＲ反応産物１０５はＤＮＡプローブ１９３に相補鎖結合する。ＰＣＲ産物１０３、１０５はＰＣＲ産物１０１のうち、ＤＮＡプローブアレイ上のＤＮＡプローブ１９２、１９３にそれぞれ相補鎖結合したＤＮＡ断片であり、蛍光体ＦＡ１１１で標識されている。一方、ＰＣＲ産物１０４はＤＮＡプローブアレイ上のＤＮＡプローブ１９２に相補鎖結合したＤＮＡ断片であり、蛍光体ＦＢ１１２で標識されている。

【００５６】

図６は、本発明の第２の実施例に於いて、ＤＮＡプローブアレイ上の試料を検出するための蛍光顕微鏡の構成を示す図である。図６に示すレーザー顕微鏡を用いてＤＮＡプローブアレイ上に相補鎖結合したＰＣＲ産物を検出する。レーザー光源１３１から出たレーザービーム１３２はダイクロイックミラー１３４で反射され、顕微鏡ステージ１３３上に置かれているＤＮＡプローブアレイ１３５を照射する。ＤＮＡプローブアレイ上の蛍光体から発する蛍光１３６はフィルター１３７を通して検出器１３８で検出される。第２の実施例では２種類の蛍光体ＦＡ、ＦＢを使用したので、透過波長の異なるフィルターを２種類用意して、それぞれの蛍光波長を検出する。

【００５７】
図７は、本発明の第２の実施例のプライマーを用いて、発現遺伝子モニターを行ない、ＤＮＡプローブアレイを用いて得られる蛍光強度を示すグラフの一部を示す図である。図７に示すように、ＤＮＡプローブアレイ上のそれぞれのＤＮＡプローブが固定された位置から検出される蛍光強度を比較することにより、複数種のＤＮＡ断片の比較を行なう。図７の縦軸１４１、１４２は、それぞれ異なる蛍光体で標識されたＰＣＲ産物からの蛍光強度を示している。横軸はＤＮＡプローブアレイ上でのＤＮＡプローブが固定された位置を示すナンバリングである。ＤＮＡプローブアレイ上の同じＤＮＡプローブの位置で、それぞれの波長の蛍光強度を比較することにより、複数の試料から抽出して得られたＤＮＡ断片の比較を行なう。ｃＤＮＡ断片を同一の反応チューブで同時にＰＣＲ増幅するため、ＰＣＲの再現性の問題を考慮することなく、容易に比較解析ができる。
【００５８】
本発明では、少なくとも２組以上のプライマーを用いて、同じ反応チューブでＰＣＲを行なう。各々のプライマーは、異なる蛍光体で標識されており、それぞれ独立に機能する。一方の試料ＤＮＡは第１の組のプライマーで増幅され、他方の試料ＤＮＡは第２の組のプライマーで増幅される様に、各々のプライマーに相補な塩基配列を持つオリゴヌクレオチドを各々の試料ＤＮＡに結合させておき、複数の試料ＤＮＡを同じ反応チューブに入れて、同一反応チューブ内でＰＣＲを行なう。ＰＣＲで用いる複数のプライマーのT_m値を揃え、各プライマーによる反応効率の差をなくしておく。複数のプライマーのT_m値を揃えるために、各プライマーの塩基配列に、４塩基～６塩基からなる複数のサブユニットを含ませて、サブユニット同士の順番を入れ替えることにより、複数のプライマーを構成する。サブユニットの順番を入れ替えても、サブユニットとサブユニットが連結する部分の塩基配列が変化しないように、サブユニットの両末端の塩基種は同じにしておく。このように、T_m値がほぼ同じ値をとり、ＰＣＲの反応効率に差がない複数のプライマーを用いて、複数の試料ＤＮＡを同一反応チューブでＰＣＲを行なうことにより反応毎のばらつきをなくすことができる。
【００５９】
【発明の効果】
本発明によれば、複数のサブユニットの配列の順序を変化させたプライマーを複数使用することにより、T_m値が同じ複数のプライマーの調製が可能になる。その結果、複数の試料ＤＮＡをＰＣＲによって増幅しその増幅産物を比較する際に、複数の試料から抽出したＤＮＡ、又はＲＮＡを同一反応チューブでＰＣＲ増幅でき、ＰＣＲ産物を同じ電気泳動レーンで分析できる。反応の手間を低減し、反応チューブ毎のＰＣＲのばらつきがなくなるため、従来技術での再現性の問題を考慮する必要がなく、比較の精度を向上させることができる。
【００６０】
【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 HITACH, LTD.

〈120〉 Analysis Method for Mixture of DNA Fragments

〈130〉 H98022681A1

〈160〉 4

〈210〉 1
〈211〉 22
〈212〉 DNA
〈213〉 artificial Sequence

〈220〉
〈221〉 unsure
〈222〉 (21)-(22)
〈223〉 DNA primer used for PCR (n is a or c or g or t).

〈400〉 1
tcatcacctt ctccacgatc nn 22

〈210〉 2
〈211〉 22
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈221〉 unsure

〈222〉 (21)-(22)
〈223〉 DNA primer used for PCR (n is a or c or g or t).

〈400〉 2
ttctccactc atcaccgatc nn 22

〈210〉 3
〈211〉 14
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈221〉 unsure
〈222〉 (21)-(22)
〈223〉 DNA primer used for PCR (n is a or c or g or t).

〈400〉 3
acaagacgat cagcaggatc nn 22

〈210〉 4
〈211〉 22
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉
〈221〉 unsure
〈222〉 (21)-(22)
〈223〉 DNA primer used for PCR (n is a or c or g or t).

〈400〉 4
acaagcagat cagacggatc nn 22

配列表フリーテキスト
（１）配列番号１の配列に関する他の関連する情報の記載
ＰＣＲに使用されるＤＮＡプライマー（ｎは、ａ、ｃ、ｇ、ｔの何れか）。
【００６１】

（２）配列番号２の配列に関する他の関連する情報の記載
ＰＣＲに使用されるＤＮＡプライマー（ｎは、ａ、ｃ、ｇ、ｔの何れか）。
【００６２】
（３）配列番号３の配列に関する他の関連する情報の記載
ＰＣＲに使用されるＤＮＡプライマー（ｎは、ａ、ｃ、ｇ、ｔの何れか）。
【００６３】
（４）配列番号４の配列に関する他の関連する情報の記載
ＰＣＲに使用されるＤＮＡプライマー（ｎは、ａ、ｃ、ｇ、ｔの何れか）。
【図面の簡単な説明】
【図１】本発明の第１の実施例の、発現遺伝子モニターの手順を示すフローチャート。
【図２】本発明の第１の実施例のプライマー、及び既知塩基配列オリゴヌクレオチドの構造を示す図。
【図３】本発明の第１の実施例のプライマーを用いて発現遺伝子モニターを行ない得られるエレクトロフェログラムの一部を示す図。
【図４】図４は本発明の第２の実施例の、発現遺伝子モニターを行なう手順を示すフローチャート。
【図５】本発明の第２の実施例に於いて、発現遺伝子の比較をＤＮＡプローブアレイを用いて行なう手順を示す図。
【図６】本発明の第２の実施例に於いて、ＤＮＡプローブアレイ上の試料を検出するための蛍光顕微鏡の構成を示す図。
【図７】本発明の第２の実施例のプライマーを用いて、発現遺伝子モニターを行ない、ＤＮＡプローブアレイを用いて得られる蛍光強度を示すグラフの一部を示す図。
【符号の説明】
１、２、６１、６２…試料ｃＤＮＡ混合物、３、４、６３、６４…ｃＤＮＡ制限酵素断片、５、６…末端に既知塩基配列オリゴヌクレオチドを導入したｃＤＮＡ断片、７、８…ｃＤＮＡ断片＋鎖、９、１０…ｃＤＮＡ断片－鎖、１１、１２…既知塩基配列オリゴヌクレオチド、１３、１４、７３、７４…共通塩基配列、１５、１６、３６、７５、７６…選択塩基配列、１７、１８、６７、６８、１０１、１０２…ＰＣＲ増幅産物、２１、２２、４１、４２、８１、８２…プライマー、２３、２４、８３、８４…プライマーセット、２５、２６、３７、３８、８５、８６、１１１、１１２…蛍光体、２７、２８、２９、９１、９２、９３…反応チューブ、３１、３２、３３、３４…サブユニットの配列、３５…制限酵素認識塩基配列、４３、４４…オリゴヌクレオチド、４５、４６…ＤＮＡ断片、４８…制限酵素切断部位、５１、５２、…エレクトロフェログラム、５３…塩基長、５５…特異的に発現している遺伝子に由来するピーク、６５、６６…末端に既知塩基配列オリゴマーを導入したｃＤＮＡ断片、７１、７２…既知塩基配列オリゴマー、１０３、１０４、１０５…ＤＮＡプローブに結合したＰＣＲ産物、１３１…レーザー光源、１３２…レーザービーム、１３３…顕微鏡ステージ、１３４…ダイクロイックミラー、１３５…ＤＮＡプローブアレイ、１３６…蛍光、１３７…フィルター、１３８…検出器、１４１、１４２…ＰＣＲ産物からの蛍光強度、１９１…ガラス基板、１９２、１９３…ＤＮＡプローブ。

【図１】

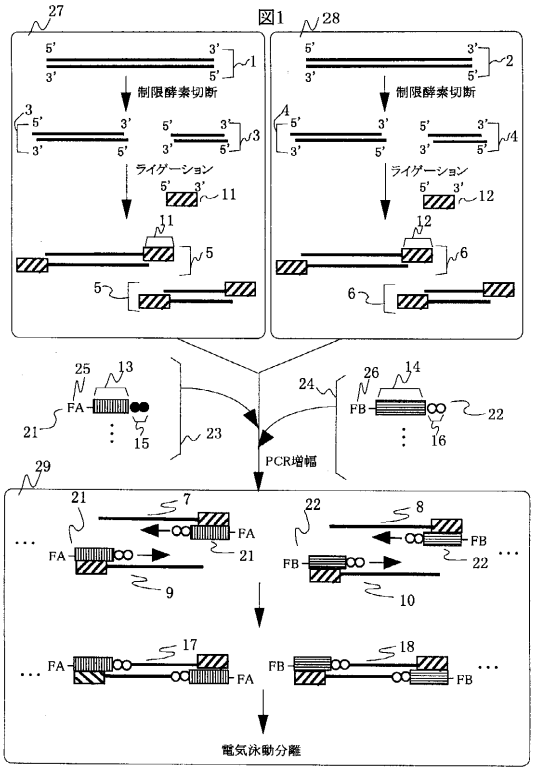


図1
制限酵素切断
ライゲーション
PCR増幅
電気泳動分離

【図２】

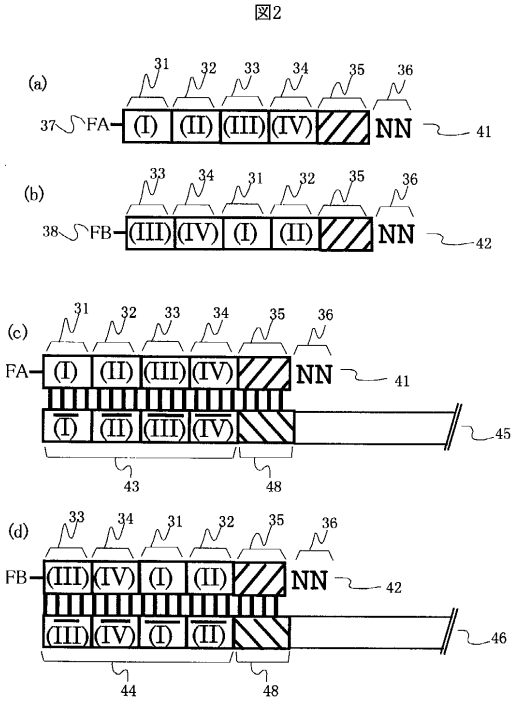


図2
(a)
(b)
(c)
(d)
FA
FB
NN

【図３】

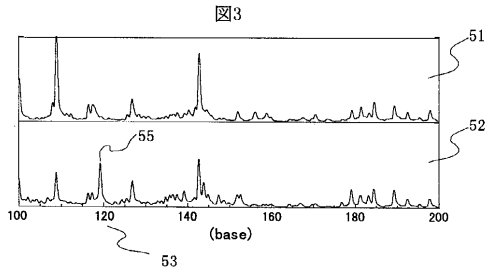


図3
100
120
140
160
180
200
(base)

【図４】

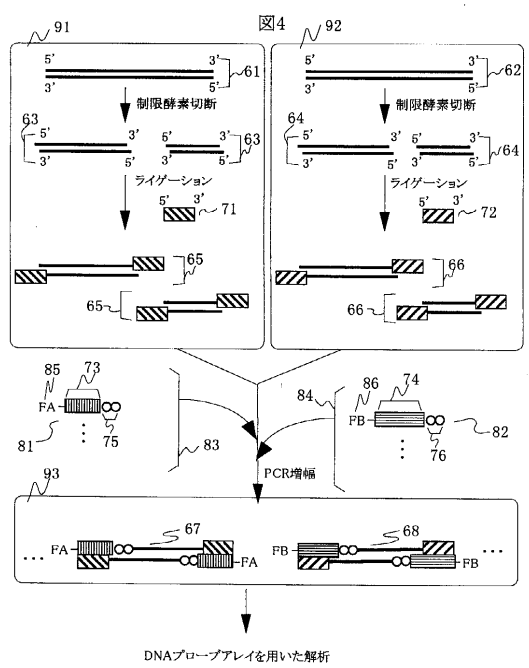
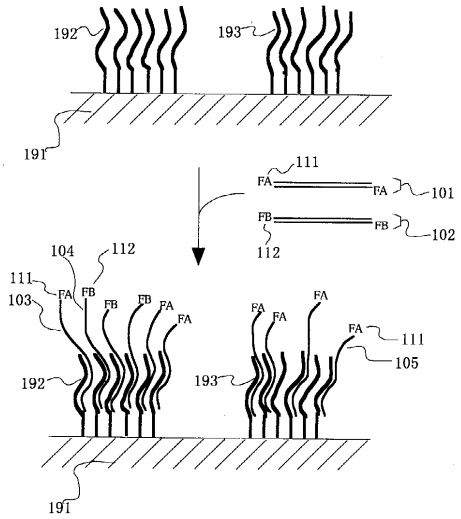


図4
制限酵素切断
ライゲーション
PCR増幅
DNAプローブアレイを用いた解析

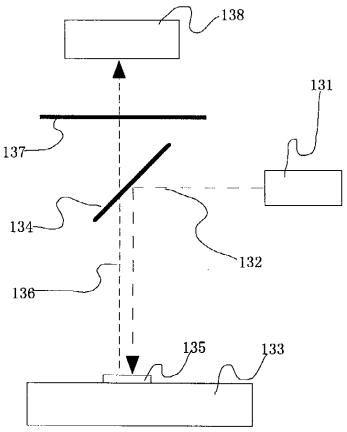
【図５】

図5



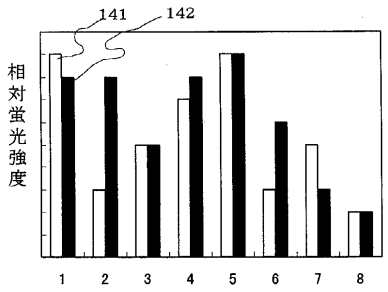
【図６】

図6



【図７】

図7



フロントページの続き

(72)発明者　岡野　和宣
東京都国分寺市東恋ケ窪一丁目２８０番地　株式会社日立製作所中央研究所内

審査官　森井　隆信

(56)参考文献　特開平０５－１１１３９９（ＪＰ，Ａ）
特開平０８－２５２０９９（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12Q 1/68
G01N 33/00
C12N 15/00
CA/BIOSIS/WPIDS(STN)