

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-530624  
(P2014-530624A)

(43) 公表日 平成26年11月20日(2014.11.20)

(51) Int.Cl.

C 12Q 1/68  
C 12N 15/09  
(2006.01)  
(2006.01)

F 1

C 12Q 1/68  
C 12N 15/00Z N A A  
A

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4  
4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2014-537282 (P2014-537282)  
 (86) (22) 出願日 平成24年10月19日 (2012.10.19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年6月11日 (2014.6.11)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2012/061000  
 (87) 國際公開番号 WO2013/059578  
 (87) 國際公開日 平成25年4月25日 (2013.4.25)  
 (31) 優先権主張番号 61/550,170  
 (32) 優先日 平成23年10月21日 (2011.10.21)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 501035309  
 ダウ アグロサイエンシズ エルエルシ  
 ー  
 アメリカ合衆国 インディアナ州 462  
 68, インディアナポリス, ジオナス  
 ヴィレ ロード, 9330  
 (74) 代理人 100092783  
 弁理士 小林 浩  
 (74) 代理人 100120134  
 弁理士 大森 規雄  
 (74) 代理人 100126354  
 弁理士 藤田 尚  
 (74) 代理人 100104282  
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】キャノーラにおいて FAD3 遺伝子の接合性を決定する方法

## (57) 【要約】

本開示は、キャノーラにおける fad-3c 遺伝子の、検出のためのエンドポイント P C R アッセイおよび高処理能力の接合性解析に部分的に関する。本開示はさらに、部分的には、接合性の決定に使用される参照としての野生型 DNA の使用に関する。これらおよび他の関連する手順は、対象遺伝子を含むキャノーラ系統の接合性および変種を独自に同定するのに使用することができる。本開示は、例えば、キャノーラの植物または種子の試料から接合性を決定するための関連するキットも提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

f a d - 3 c 遺伝子を含むキャノーラ植物の接合性を決定するための方法であって、前記キャノーラ植物からゲノムDNA試料を得るステップと、

前記ゲノムDNA試料を第1のプライマーおよび第2のプライマーと接触させることによって接触試料を作製するステップであり、前記第1のプライマーが、目的の一塩基多型の位置の上流の前記f a d - 3 c 遺伝子の領域に優先的に結合し、前記第2のプライマーが、目的の一塩基多型の下流の前記f a d - 3 c 遺伝子の領域に優先的に結合し、前記第1のプライマーおよび前記第2のプライマーが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）条件にかけられたときにアンプリコンを生成するステップと、

前記接触試料をPCR条件にかけるステップであり、前記アンプリコンが生成されるステップと、

第1の蛍光プローブおよび第2の蛍光プローブのそれぞれが、50～70摂氏度の間の温度で一定時間アンプリコンとハイブリッド形成するのを可能にするステップであり、目的の前記一塩基多型が前記アンプリコン中に存在しないときに、前記第1の蛍光プローブが前記アンプリコンと優先的にハイブリッド形成し、目的の前記一塩基多型が前記アンプリコン中に存在するときに、前記第2の蛍光プローブが前記アンプリコンと優先的にハイブリッド形成するステップと、

可能にするステップにおいて指定された時間の後に前記温度を上昇させるステップと、上昇させるステップ中に前記第1および第2のプローブのそれぞれによって生じる前記蛍光を捕捉するステップと、

前記キャノーラ植物の接合性を決定するステップであり、決定するステップが、第1および第2のプローブのそれぞれによって生じる蛍光の比較を含み、ホモ接合性SNP陽性対照試料において生じた蛍光を優性に反映している第1および第2のプローブの蛍光は、目的の前記一塩基多型の存在を示し、ホモ接合性SNP陰性対照試料において生じた蛍光を優性に反映している第1および第2のプローブの蛍光は、目的の前記一塩基多型の存在の欠如を示し、ヘテロ接合性SNP陽性対照試料において生じた蛍光を優性に反映している第1および第2のプローブの蛍光は、前記キャノーラ植物が、目的の前記一塩基多型を含む第1のアレルと、目的の前記一塩基多型を欠いている第2のアレルとを含むことを示すステップと

を含む、方法。

**【請求項 2】**

前記アンプリコンが、91-154塩基対からなる、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記一塩基多型が、GからAへの多型からなる、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記野生型配列が、前記位置でグリシンを含む、請求項3に記載の方法。

**【請求項 5】**

異種交配させたキャノーラ植物の育種の遺伝子移入の検証に使用される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記プライマーが配列番号2および配列番号3を含み、前記第1および第2のプローブが配列番号5および4を含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記第1および第2のプローブが、蛍光色素およびクエンチャーの双方で標識されている、請求項1に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記第1のプローブが、前記第1のプローブの5'末端に前記蛍光色素としてFAMを含み、前記第1のプローブの3'末端上にMGBクエンチャーを含む、請求項7に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 9】**

前記第2のプローブが、前記第2のプローブの5'末端にVICで標識され、前記第2のプローブの3'末端にMGBクエンチャーで標識されている、請求項7に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記第2のプローブが配列番号4を含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記方法の蛍光結果が、プレートリーダー内で直接に読み取られる、請求項1に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記DNA試料が、畑のキャノーラ植物から得られる、請求項1に記載の方法。

10

**【請求項 13】**

上昇させるステップが、一定時間あたり実質的に均一な温度上昇で前記温度を上昇させることを含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 14】**

上昇させるステップ中に前記第1および第2のプローブのそれぞれによって生じる前記蛍光が、捕捉するステップにおいて、上昇させるステップの各上昇中に捕捉される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 15】**

請求項1に記載の方法を行うためのキットであって、前記第1のプライマーと、前記第2のプライマーと、前記第1のプローブと、前記第2のプローブとを含むキット。

20

**【請求項 16】**

前記第1のプライマーが配列番号2からなり、前記第2のプライマーが配列番号3からなり、前記第1のプローブが配列番号5からなり、前記第2のプローブが配列番号4からなる、請求項15に記載のキット。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****関連出願の相互参照**

本出願は、参照により本明細書にその全体が組み込まれている、2011年10月21日に出願された、米国仮出願第61/550,170号の優先権を主張する。

30

**【背景技術】****【0002】**

アブラナ属(*Brassica*)は、世界で最も重要な油料種子作物のうちの1つであり、かつ温暖な地理において栽培される重要な油料種子作物である、キャノーラを含む。キャノーラは、エルカ酸およびグルコシノレートが、従来の育種を通して排除または大幅に減少されている、セイヨウアブラナ(*Brassica napus L.*) ( ブラッシカ・ラバ (*Brassica rapa*) )とヤセイカンラン (*Brassica oleracea*)との種間交配の結果として得られた種)として従来特徴付けられてきた。キャノーラ油の大半は、人間の消費用に生産される植物油の形態にある。工業用途におけるキャノーラ油の使用に向けた市場も拡大している。

**【0003】**

アブラナ属(*Brassica*)は、Aゲノム、Bゲノム、またはCゲノムのいずれかとして分類される固有のゲノムをそれぞれ有する3種の二倍体の種からなる。ブラッシカ・ラバ (*Brassica rapa*)植物は、二倍体のAゲノムを有する。クロガラシ (*Brassica nigra*)植物は、二倍体のBゲノムを有する。ヤセイカンラン (*Brassica oleracea*)植物は、二倍体のCゲノムを有する。これらの種の雑種は、2種の二倍体の種間での交配を介して作製することができる。キャノーラは、二倍体のCゲノムを有するヤセイカンラン (*Brassica oleracea*)と、二倍体のAゲノムを有するブラッシカ・ラバ (*Brassica rapa*)との交雑から生じたと考えられている複二倍体種である。細胞遺伝学的研究より、AAおよびCCゲノムはある程度の関連性を示すことが明らかにされ、互いに部分的に相同であるので共通祖先のゲノムに由来していると考えられた(PrakashおよびHinata、1980)。技術的に

40

50

は二倍体に分類されるが、双方の原種のゲノムは、互いに重複した領域を高い百分率で含有する（Songら、1991）。遺伝子解析により、セイヨウアブラナ（Brassica napus）は、プラッシカ・ラバ（Brassica rapa）のAAゲノムから10対の染色体を与えられ、母性ドナーとしてヤセイカンラン（Brassica oleracea）のそのCCゲノムから9対の染色体を与えられたことが明らかにされた（Songら、1992）。

#### 【0004】

脂肪酸不飽和の型および量は、食事および工業の用途の双方に対する意味を有するので、特定の変種のキャノーラ種子から得られる食用および工業用の油の質は、その構成脂肪酸によって決定される。従来のキャノーラ油は、約60%のオレイン酸（C18:1）、20%のリノール酸（C18:2）および10%のリノレン酸（18:3）を含有する。  
従来のキャノーラに典型的な多価不飽和リノレン酸のレベルは、油が酸化しやすいので望ましくなく、酸化の速度は、酸素の存在、光および熱への曝露、ならびに油中の天然のまたは添加された酸化防止剤および酸化促進剤の存在を含む、いくつかの因子によって影響される。酸化は、繰り返して揚げること（誘導酸化）または長期の保存（自動酸化）の結果として異臭および酸敗を引き起こす。酸化は、キャノーラ油の潤滑性および粘性の特性も変化させうる。

#### 【0005】

従来のキャノーラ油に対して低下したレベルの多価不飽和脂肪酸および上昇したレベルの一価不飽和オレイン酸を示すキャノーラ油プロファイルは、より高い酸化安定性に関連する。個々の脂肪酸の酸化に対する感受性は、それらの不飽和の程度に依存する。したがって、3つの炭素-炭素二重結合を有するリノレン酸の酸化の速度は、1つのみの炭素-炭素二重結合を有するオレイン酸の速度の25倍であり、2つの炭素-炭素二重結合を有するリノール酸の速度の2倍である。リノール酸およびリノレン酸は、ヒドロペルオキシドを容易に形成するので、香りおよび匂いに対して最も大きい影響力も有する。高オレイン酸油（オレイン酸70%以上）は、保存中、揚げ物中および精製中の酸化をより受けにくく、発煙なくより高温に加熱することができ、料理油としてより好適とされる。

#### 【0006】

キャノーラ油の質は、その構成脂肪酸、例えば、オレイン酸（C18:1）、リノール酸（C18:2）およびリノレン酸（C18:3）などによって決定される。大部分のキャノーラ栽培品種は、通常、約55～65%のオレイン酸および8～12%のリノレン酸を有する油を生じる。高濃度のリノレン酸は、油の不安定性および異型の香りをもたらすのに対し、高レベルのオレイン酸は、油の酸化安定性および栄養価を高める。したがって、オレイン酸が増加してリノレン酸が減少しているキャノーラ栽培品種の開発は、キャノーラ油の質のためにきわめて望ましい。

#### 【0007】

オレイン酸量が増加してリノレン酸量が減少しているキャノーラ栽培品種から2つの遺伝子座が同定され、それらのゲノム位置がマッピングされた。増加したオレイン酸および減少したリノール酸の生成に対して、1つの遺伝子座は主要な効果を有し、2つめの遺伝子座は副次的な効果を有する。高オレイン酸（C18:1）のための主要な遺伝子座は、脂肪酸デサチュラーゼ-2（fad-2）遺伝子であると決定され、それは、連鎖群N5上に位置する。2つめの遺伝子座は、連鎖群N1上に位置する。リノレン酸（C18:3）についての1つの主要な量的形質遺伝子座（QTL）は、ゲノムCの脂肪酸デサチュラーゼ-3遺伝子（fad-3c）であり、これは連鎖群N14上に位置する。第2の主要なQTLはN4連鎖群上に存在し、ゲノムAの脂肪酸デサチュラーゼ-3遺伝子（fad-3a）である。fad-2およびfad-3c遺伝子のゲノム配列は、エチルメタンスルホン酸（EMS）誘導変異体および野生型のキャノーラ栽培品種の双方から增幅されて配列決定された。fad-2およびfad-3c遺伝子の変異体および野生型のアレル配列の比較により、EMSで変異された植物からの遺伝子における一塩基多型（SNP）が明らかにされた。変異体および野生型のアリル間の配列の相違に基づき、fad-2およびfad-3c遺伝子変異に対応する、2種のSNPマーカーが開発された。（Huら、

10

20

30

40

50

2006)。

#### 【0008】

第1代雑種のアブラナ属( *Brassica* )の種子を作製するための現在の方法は、コストおよび種子の純度の点で限界がある。一般に、これらの方法は、安定で同胞不和合性および自家不和合性であるホモ接合性に近い親の育種系統を必要とし、この親の育種系統は、近交系を作り出すために繰り返し自家受粉させて初めて利用できる。さらに、親の系統を開発および維持するための同系交配は、つぼみ受粉のような、労働集約的な技術によって達成され、アブラナ属( *Brassica* )雑種種子产生システムが自家不和合性形質に基づいているので、自家不和合性の強い植物を利用しなければならない。育種プロセス中の環境条件、例えば、温度および湿気などは、典型的には、植物の脂質代謝に影響を及ぼし、したがって、脂肪酸の含有量レベルにも影響する(Harwood, 1999)。したがって、環境の変動は、植物の表現型選択の信頼性を低下させる。DengおよびScarth( 1998 )は、開花後の温度の上昇により、C 18 : 3のレベルが有意に低下してC 18 : 1が増加することを見出した。同様の結果が、他の研究で報告された(YermanosおよびGoodin, 1965; Canvin, 1965)。

10

#### 【0009】

低リノレン酸変種のための育種は、C 18 : 3含有量が多遺伝子の形質であって相対的に低い遺伝率を有する劣性の様式で遺伝するので、特に難しい。(低いC 18 : 3含有量(3%)を有する)「ステラー(Stellar)」と(「従来の」C 18 : 3レベル(9~10%)を有する)「ドラッカー(Drakkar)」との間の交配から得られる個体群の遺伝子解析により、低いC 18 : 3の形質は、相加効果を有する、L 1およびL 2と呼ばれる2つの主要な遺伝子座によって調節されていることが示された(Jourdrenら、1996b)。C 18 : 3含有量を調節しているこれらの2つの主要な遺伝子座は、2つのfad-3(脂肪酸デサチュラーゼ-3)遺伝子に該当することが見出された; 1つは、(ブラッシカ・ラバ( *Brassica rapa* )に由来する)Aゲノム上に、もう1つは、(ブラッシカ・オレセラ( *Brassica oleacea* )に由来する)Cゲノム上に位置していた(Jourdrenら、1996; Barréら、1999)。

20

#### 【0010】

遺伝(相加性、優性、および上位性)および環境の影響によって継続して変化する形質は、一般に「量的形質」と呼ばれる。量的形質は、表現型の連続的分布を生じる遺伝子発現に対する環境の影響と、多遺伝子遺伝によって生じる複雑な分離パターンとの2つの因子に基づいて「質的」または「分離」形質と区別される。量的形質の発現と連鎖した1つまたは複数のゲノム領域の同定は、量的形質遺伝子座(「QTL」)の発見をもたらした。Thormannら( 1996 )は、リノレン酸含有量について60%の差異を説明する2つのQTLをマッピングしたのに対して、Somersら( 1998 )は、C 18 : 3含有量について合わせて51%の表現型の変化を説明する3つのQTLを同定した。ChenおよびBeversdorf( 1990 )によって3遺伝子座相加モデルも報告された。RuckerおよびRobbelin( 1996 )は、いくつかの副次的な遺伝子が、不飽和化ステップに関与している見込みが最も高いことを示した。

30

#### 【0011】

C 18 : 3含有量の遺伝率は、26~59%であると推定された(KondraおよびThomas、1975)(ここで、遺伝率の変動は、環境因子とはまったく異なり、遺伝学的作用である)。リノレン酸の遺伝の複雑性は、リノレン酸が、C 18 : 2の不飽和化またはC 16 : 3の伸長のいずれからも合成されうるという事実に起因しうる(Thompson, 1983)。

40

#### 【0012】

リノレン酸とは対照的に、オレイン酸の遺伝はより単純であり、オレイン酸の遺伝率は比較的高い。高オレイン酸含有量は、オレイン酸をリノール酸(C 18 : 2)に不飽和化する役割を果たしている酵素をコードしているfad-2(脂肪酸デサチュラーゼ2)遺伝子と呼ばれる主要な遺伝子座によって調節されることが報告されている(Tanhuanpaaら、1998; Schierholtら、2001)。これまでのところ報告およびマッピングされているfad

50

d - 2 遺伝子の機能的な遺伝子コピーのすべては、Aゲノム由来の連鎖群N5上に位置する (Schefflerら、1997; Schierholtら、2000)。ChenおよびBeversdorff (1990) は、オレイン酸の蓄積が2つの分離遺伝子系で調節されており、一方は鎖伸長の働きをし、他方は不飽和化に関与していることを報告した。C18:1含有量の遺伝率は、それぞれ53%から78% (KondraおよびThomas 1975) および94% (SchierholtおよびBecker、1999) であると推定された。遺伝率がより高いため、C18:1含有量の発現は、環境的に影響を受けにくく、相対的に安定である (SchierholtおよびBecker、1999)。

## 【0013】

Nexera (商標) キャノーラ生殖質において、1つから2つの遺伝子がC18:1含有量を調節することが見出され、少なくとも3つの遺伝子がC18:3発現に関与する (Nexera (商標) は、Dow AgroSciences、LLCの商標である)。分離している後代において、種子のC18:3含有量の分布は連続的であり、それにより、望ましいC18:3レベルを有する遺伝型クラスを同定するのを困難にさせている。さらに、温室 (GH) および畑で栽培された植物間での脂肪酸含有量における相関が低く、望ましいレベルのC18:3を有するGH植物を確実に選択するのをさらに難しくさせている。

10

## 【0014】

多様な方法を使用して、植物組織の試料において特定の遺伝子の存在を検出することができる。1つの例は、Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18~24、2000) によって記載されているピロシーケンシング技術である。この方法において、オリゴヌクレオチドは、挿入されたDNA配列およびそれに隣接したゲノムDNAとオーバーラップするように設計される。オリゴヌクレオチドは、目的の領域 (すなわち、挿入配列内の1種のプライマーおよび隣接ゲノム配列内の1種) からの一本鎖PCR産物 (「アンプリコン」) とハイブリッド形成され、DNAポリメラーゼ、ATP、スルフリラーゼ、ルシフェラーゼ、アピラーゼ、アデノシン5'ホスホスルフェートおよびルシフェリンの存在下でインキュベートされる。dNTPは、個別に添加され、その取り込みは、測定される光シグナルをもたらす。光シグナルは、增幅、ハイブリダイゼーション、および一塩基または多塩基の伸張の成功による、導入遺伝子挿入 / 隣接配列の存在を示す。(この技術は、それが既知のときには、特定の遺伝子の検出用ではなく、通常、最初のシーケンシングに使用される。)

20

## 【0015】

蛍光偏光法は、アンプリコンの検出に使用されるもう1つの方法である。この方法に従って、オリゴヌクレオチドは、ゲノム隣接DNAと挿入DNAとのジャンクションにオーバーラップするように設計される。オリゴヌクレオチドは、目的の領域 (挿入DNA内の1種のプライマーおよび隣接ゲノムDNA配列内の1種) からの一本鎖PCR産物とハイブリッド形成され、DNAポリメラーゼおよび蛍光標識されたddNTPの存在下でインキュベートされる。一塩基の伸張は、ddNTPの組み込みをもたらす。組み込みは、蛍光光度計を使用して偏光における変化として測定することができる。偏光の変化は、増幅、ハイブリダイゼーション、および一塩基伸張の成功による、導入遺伝子挿入 / 隣接配列の存在を示す。

30

## 【0016】

分子ビーコンは、配列検出における使用について記載されている。簡単に説明すると、分子ビーコンは、FRETプローブが隣接ゲノムと挿入DNAとのジャンクションにオーバーラップするように設計されうるFRET (蛍光共鳴エネルギー移動) オリゴヌクレオチドプローブを含む。FRETプローブの固有の構造により、それが、蛍光部分およびクエンチング部分をすぐ近くに保つ二次構造を含有する結果となる。FRETプローブおよびPCRプライマー (挿入DNA配列内の1種のプライマーおよび隣接ゲノム配列内の1種) を、耐熱性ポリメラーゼおよびdNTPの存在下でサイクルにかける。好結果のPCR増幅後、標的配列へのFRETプローブのハイブリダイゼーションは、プローブ二次構造の除去および蛍光部分とクエンチング部分との空間的な分離をもたらす。蛍光シグナルは、増幅およびハイブリダイゼーションの成功による、隣接ゲノム / 導入遺伝子挿入配列

40

50

の存在を示す。

【0017】

加水分解プローブアッセイは、TaqMan（登録商標）PCRとしても知られ（TaqMan（登録商標）は、Roche Molecular Systems, Inc. の登録商標である）、DNA配列の存在を検出および定量する方法を提供する。簡単に説明すると、TaqMan（登録商標）PCRは、事象特異的検出のために、導入遺伝子内のオリゴの一部と、隣接ゲノム配列内のオリゴの他の一部とを有するように設計されているFRETオリゴヌクレオチドプローブを利用する。FRETプローブおよびPCRプライマー（挿入DNA配列内の1種のプライマーおよび隣接ゲノム配列内の1種）を、耐熱性ポリメラーゼおよびdNTPの存在下でサイクルにかける。FRETプローブのハイブリダイゼーション、およびその後のPCR增幅段階中のTaqポリメラーゼの5'エキソヌクレアーゼ活性による消化により、蛍光部分がFRETプローブ上のクエンチング部分から離されて切断および放出される結果となる。蛍光シグナルは、ハイブリダイゼーションおよび増幅の成功による、隣接／導入遺伝子挿入配列の存在を示す。

10

【0018】

分子マーカーもDNAの配列特異的同定に有用である。分子マーカー選択は、遺伝子型に基づき、したがって、環境の影響に依存しない。分子マーカーは、温室で栽培された植物と畠で栽培された植物との間の脂肪酸含有量における低い相関に起因しうる、温室における植物の信頼できない選択の問題を軽減するのを助ける。意義深いことに、C18:1およびC18:3の含有量を調整している遺伝子と密接に連鎖する分子マーカーは、高C18:1および低C18:3のための遺伝子を有する植物の早期の選択を促進することができる。早期段階でのマーカー利用選抜は、温室空間の節約、温室使用効率の向上、および畠における育種作業負荷の減少に役立つ。

20

【0019】

より一般に、分子マーカーは以下の点において形態学的マーカーを超える利点を有する：分子マーカーは高度に多型でありうるのに対して形態学的マーカーは厳密に表現型依存性である点；形態学的マーカーは特定の量的表現型の採点において干渉しうるのに対して分子マーカーは遺伝子型と表現型との間で1:1の関係を示す（したがって、所与の遺伝子座のすべての可能な遺伝子型の明確な採点を可能にする）点；および上位性の相互作用は個体群において有用な形態学的マーカーの数を制限する傾向があるのに対して分子マーカーは上位性に相互作用しない点。

30

【0020】

様々な型の分子マーカー、例えば、RAPD（ランダム増幅多型DNA）マーカー（Tanhuanpaaら、1995；Huら、1995；Rajcanら、1999；Jourdrenら、1996）、RFLP（制限断片長多型）マーカー（Thormannら、1996）およびSCAR（配列特徴的増幅領域）マーカー（Huら、1999）などが、セイヨウアブラナ（Brassica napus）において、低いC18:3レベルに関連すると同定されている。分子マーカーは、高C18:1含有量についても同定されている。RAPDマーカーは、春のアブラナ（ナタネ（B. rapa ssp. oleifera））において、QTLに影響を及ぼしているオレイン酸濃度と連鎖すると同定され、後に、SCARマーカーに転換された（Tanhuanpaaら、1996）。Schierholtら（2000）は、冬のアブラナ（セイヨウアブラナ（B. napus L.））において、高オレイン酸変異と連鎖した3種のAFLP（増幅断片長多型）マーカーを同定した。Tanhuanpaaら（1998）は、春のアブラナ（ナタネ（B. rapa ssp. oleifera））において、fad-2遺伝子座の野生型および高オレイン酸のアレルを比較することによってオレイン酸のアレル特異的PCRマーカーを開発した。しかし、これらのマーカーの大部分は、RAPD、AFLPおよびRFLPのように低い処理能力のマーカーであり、自動化を通じた大規模スクリーニングに好適でない。

40

【発明の概要】

【0021】

本開示は、キャノーラにおけるfad-3c遺伝子の、検出のためのエンドポイントT

50

a q M a n (登録商標) P C R アッセイ、および高処理能力の接合性解析に部分的に関する。本開示はさらに、部分的には、接合性の決定に使用される参照としての、キャノーラにおける野生型 f a d - 3 c 遺伝子の使用に関する。これらおよび他の関連する手順は、対象遺伝子を含むキャノーラ系統の接合性および変種を独自に同定するのに使用することができる。

#### 【0022】

本開示は、(例えば、キャノーラの)試料から接合性および変種を決定するための関連するキットも提供する。

#### 【0023】

したがって、本開示の一実施形態は、高処理能力の接合性および育種の解析用の可変的なプラットフォームである、T a q M a n (登録商標) P C R に関する。本開示によって示されるエンドポイント T a q M a n (登録商標) P C R 適用法の利用は、キャノーラの f a d - 3 c 接合性および育種の解析用の、信頼性が高く、正確で、高処理能力の適用法を提供する。10

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0024】

【図1】Huら(2006)(矢印)によって同定された f a d - 3 c 変異の位置を例示している f a d - 3 c 遺伝子配列(配列番号1)の一部分を示した図である。イントロン6はより薄い色の文字列中にあり、2つめの多型はアスタリスクで示されている。

【図2】エンドポイント T a q M a n (登録商標) アッセイに従って3種の f a d - 3 c 遺伝子型を示している、(キャノーラの)接合性解析結果の例を示した図である(結果は、A p p l i e d B i o s y s t e m s、F o s t e r C i t y、C A、U S A を通じて入手可能なS D S 2 . 4 ソフトウェアを使用して作製した)。[配列の簡単な説明]20

#### 【0025】

配列番号1は、f a d - 3 c 変異の位置を例示する f a d - 3 c 遺伝子配列の一部分を提供する。

#### 【0026】

配列番号2は、フォワードプライマーD - C L - F A D 3 C - F を提供する(これは、隣接ゲノム配列に結合する)。

#### 【0027】

配列番号3は、リバースプライマーD - C L - F A D 3 C - R 2 を提供する(これは、挿入配列に結合する)。30

#### 【0028】

配列番号4は、GからAへの一塩基多型を有する変異 f a d - 3 c 遺伝子の優先的な結合用のプローブD - C L - F A D 3 C - F A M を提供する。

#### 【0029】

配列番号5は、野生型 f a d - 3 c 遺伝子の検出用のプローブD - C L - 3 C - V I C を提供する。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0030】

本開示は、キャノーラにおける f a d - 3 c 遺伝子の、検出のためのエンドポイント T a q M a n (登録商標) P C R アッセイおよび高処理能力の接合性解析に部分的に関する。本開示は、部分的には、接合性の決定に使用される参照としての、キャノーラにおける野生型 f a d - 3 c 遺伝子の使用にさらに関する。これらおよび他の関連する手順は、対象遺伝子を含むキャノーラ系統の接合性および変種を独自に同定するのに使用することができる。本開示は、(例えば、キャノーラの)試料から接合性および変種を決定するための関連するキットも提供する。したがって、本開示の一実施形態は、高処理能力の接合性および育種の解析用の可変的なプラットフォームである、T a q M a n (登録商標) P C R に関する。本開示によって示されるエンドポイント T a q M a n (登録商標) P C R 適用法の利用は、キャノーラの f a d - 3 c 接合性および育種の解析用の、信頼性が高く、40

正確で、高処理能力の適用法を提供する。

【0031】

本発明の新規なアッセイは、Huら(2006)によって報告された fad-3c アレルの一塩基多型(SNP)変異に部分的に基づいて開発された。このアッセイは、変異体および野生型の fad-3c アレルを検出するために 2 つのプライマー領域および 2 種の MGB プローブを利用する(表 1 を参照されたい)。この SNP 変異を検出するための TaqMan(登録商標) プライマーおよびプローブは、fad-3c 遺伝子配列を使用して、プライマー明示ソフトウェア(Applied Biosystems、Austin、TX)によって部分的に設計された。fad-3c 遺伝子についてホモ接合性、ヘミ接合性および野生型(変異なし)であるキャノーラ植物から抽出された DNA を使用して、この新しい fad-3c TaqMan(登録商標) アッセイの有効性が検証された。fad-3c TaqMan(登録商標) アッセイは、速い PCR 熱サイクル条件を使用して、96 ウェルまたは 384 ウェルの双方の形式上で Applied Biosystems 7900 HT リアルタイム PCR システムを部分的に用いた性能について最適化もされた。

10

【0032】

【表 1】

表1. fad-3c TaqMan(登録商標)アッセイにおいて使用されるプライマーおよびプローブの配列

20

配列番号	名称	説明	配列(5'-3')
配列番号2	D-CL-FAD3c-F	フォワードプライマー	ACGATGATAAGCTGCCTTGGT
配列番号3	D-CL-FAD3c-R	リバースプライマー	TCAACAGTTGTTAACCTCCACGT
配列番号4	D-CL-FAD3c-FAM	fad-3c変異体を検出するためのプローブ	6FAM-CAGAGGCAAGATAAGT-MGB
配列番号5	D-CL-FAD3c-VIC	fad-3c野生型を検出するためのプローブ	VIC-ACAGAGGCAAGGTAAGT-MGB

30

40

【0033】

NE828 およびクアンタム(Quantum)の葉の試料をアッセイに使用した。キャノーラ育種個体群からの DNA を使用して、このアッセイの有効性を検証した。

【0034】

本開示の態様は、本明細書中に例示および / または示唆されている診断用核酸分子を設計および / または作製するための方法を含む。特異的な TaqMan(登録商標) プライマーおよびプローブは、本明細書中に詳述されているように、fad-3c 遺伝子内の本明細書中で同定されている特異的な SNP に位置する DNA 配列に部分的に従って、またはその上流もしくは下流に近接して、設計された。

50

## 【0035】

したがって、いくつかの実施形態において、本開示は、キャノーラ油生成植物の接合性を決定することに関する。本開示は、有性交配の後代が目的のS N P を含有しているかどうかおよび後代の接合性を決定するために、本明細書中で同定されているS N P の存在を検出することに部分的にに関する。さらに、接合性を検出するための方法が含まれ、これは、例えば、市販前の認可を必要とする規制を満たすために、および組換え作物植物に由來した食物を標識するために役立つ。

## 【0036】

本開示は、キャノーラ植物の高処理能力の接合性解析のために、内因性の非変異体 f a d - 3 c 遺伝子を対照として利用する、蛍光に基づいたエンドポイント T a q M a n (登録商標) P C R アッセイに部分的にに関する。10

## 【0037】

本開示は、キャノーラ接合性解析のためのエンドポイント T a q M a n (登録商標) 2 重P C R の開発にも部分的にに関する。さらに、本開示は、キャノーラ f a d - 3 c 遺伝子育種試験キットの開発に部分的にに関する。

## 【0038】

一般に、エンドポイント T a q M a n (登録商標) アッセイは、正 / 負の戦略に基づいており、これにより、「正」は、試料が、アッセイした遺伝子について陽性であることを表し、「負」は、試料が、アッセイした遺伝子について陰性であることを表す。これらのアッセイは、典型的には 1 セットのオリゴヌクレオチドプライマーおよび 2 種のオリゴヌクレオチドプローブを利用し、それぞれ、1 種のプローブは、変異された f a d - 3 c S N P を優先的にハイブリッド形成し、もう 1 種のプローブは、野生型 f a d - 3 c 配列を優先的にハイブリッド形成する。20

## 【0039】

本開示に関連した利点としては、D N A の質および量に対する依存の低下などが挙げられる。さらに、本開示は、適切に扱われない場合、他のS N P 検出アッセイを不成功にしうることが多い、長い最初の変性ステップを必要としない。さらに、本開示は、市販用の設定の範囲内で高処理能力の様式で多数のキャノーラ試料を効率良く解析するための方法を提供する。本開示のもう 1 つの利点は、時間を節約することである。キャノーラの接合性および育種の解析のための本エンドポイント T a q M a n (登録商標) 解析は、特に、多数の試料を解析するときに、他の適用形式を超える利点を提供する。30

## 【0040】

本開示は、植物育種解析に部分的にに関する。本開示は、対象植物におけるオレイン酸およびリノレン酸レベルに影響を及ぼす、キャノーラ植物のS N P の方法を含む。

## 【0041】

さらに、本明細書中に記載の核酸プローブを使用して、P C R または D N A ハイブリダイゼーションなどの、他の既知の核酸検出法によって対象 S N P の存在を検出することもできる。事象 - 特異的 P C R アッセイについては、本明細書中で述べている。(Windelsら (Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent 64/5b:459462, 1999も参照されたい。)

## 【0042】

本明細書中で使用される場合、「後代」という用語は、親植物のいずれの世代の子孫をも意味する。

## 【0043】

本開示の検出技術は、植物育種に関連して、例えば、目的のS N P を含む親植物がもう 1 種の植物と交配された後に後代植物の接合性を決定するために、特に有用である。本出願および方法は、キャノーラ育種プログラムならびに品質管理プロセスに恩恵を与える。本明細書中に開示の方法およびアッセイを使用する、キャノーラ系統用のP C R 検出キットは、現在、作製および使用することができる。さらに、本開示は、製品登録および製品管理に恩恵を与える。

## 【0044】

望ましい f a d - 3 c 遺伝子組成を含むキャノーラ植物は、本明細書中に言及されている系統のうちの任意の 1 種の種子から栽培されたキャノーラ植物からなる第 1 の親キャノーラ植物と、第 2 の親キャノーラ植物とを最初に有性交配させ、それによって複数の第 1 の後代植物を作製し、次いで、本開示によって開示されているような望ましい f a d - 3 c 遺伝子を有する第 1 の後代植物を選択し、第 1 の後代植物を自家受粉させ、それによって複数の第 2 の後代植物を作製し、次いで、第 2 の後代植物から本開示による望ましい f a d - 3 c 遺伝子を有する植物を選択することによって育種することができる。これらのステップは、第 2 の親キャノーラ植物または第 3 の親キャノーラ植物に対する第 1 の後代植物または第 2 の後代植物の戻し交配をさらに含みうる。次いで、本開示のキャノーラ種子を含むキャノーラ作物、またはその後代を植えることができる。

10

## 【 0 0 4 5 】

本開示は、望ましい f a d - 3 c 遺伝子組成を含むキャノーラ植物を少なくとも一方の親として使用して交配させるプロセスをさらに含む。例えば、本開示は、望ましい f a d - 3 c 遺伝子組成を含む任意のキャノーラ植物を一方または双方の親として有する第 1 代雑種植物を含む。本開示の範囲内にさらにあるのは、こうした第 1 代雑種によって產生された種子である。本開示は、本開示の方法を使用して、例示されている植物を異なる（例えば、近交系親）植物と交配させ、結果として得られる雑種種子を収穫およびアッセイすることによって第 1 代雑種種子を同定するための方法を含む。第 1 代雑種を作製するために使用されるキャノーラ植物は、雌親または雄親のいずれであってもよい。

20

## 【 0 0 4 6 】

トランスジェニック植物は、本明細書中に開示の f a d - 3 c 遺伝子を含有するように作製されうることも理解されたい。さらに、本明細書中に開示の f a d - 3 c 遺伝子特性を含むトランスジェニック植物を、異なる遺伝子組成を含む植物と掛け合わせ、それによって独立に分離した外因性遺伝子を含有する子孫を作製することもできる。適切な後代の自家受粉により、追加された外因性遺伝子についてホモ接合性である植物を作製することができる。親植物への戻し交配および非トランスジェニック植物との他配も意図され、栄養繁殖も同様である。異なる形質および作物に一般的に使用される他の育種法は、当技術分野において知られている。戻し交配育種は、簡単に浸透性交雑される高度に遺伝性の形質の遺伝子を、反復親である、望ましいホモ接合性栽培品種または近交系へ移入するために使用されてきた。移入される形質の供給源は、ドナー親と呼ばれる。結果として得られる植物は、反復親（例えば、栽培品種）の性状およびドナー親から移入された望ましい形質を有すると予想される。最初の交配後、ドナー親の表現型を有する個体が選択され、反復親に繰り返し交配される（戻し交配される）。結果として得られる親は、反復親（例えば、栽培品種）の性状およびドナー親から移入された望ましい形質を有すると予想される。本開示の方法は、後代植物において f a d - 3 c 導入遺伝子を検出するためおよび後代植物の接合性レベルを決定するための、高処理能力の、蛍光に基づいたエンドポイント T a q M a n (登録商標) P C R アッセイを提供する。

30

## 【 0 0 4 7 】

本開示の方法、例えば、オリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブは、マーカー利用育種 (M A B) 法に使用することができる。本開示の方法、例えば、オリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブは、当技術分野において知られている一般公開されたプロトコルを使用して、S N P または単純配列反復 (S S R) の検出によって、遺伝的に連鎖した農学的に有用な形質を同定する、関連するアッセイ、增幅断片長多型アッセイ (A F L P) 、制限断片長多型アッセイ (R F L P) 、ランダム増幅多型 D N A アッセイ (R A P D) ) と共に使用することができる。本明細書中に開示の S N P は、M A B 法を使用して、本開示のキャノーラ植物（またはそれらの後代および他のあらゆるキャノーラ栽培品種もしくは変種）を用いた交配の後代において追跡することができる。D N A 分子は、この形質のマーカーとして使用することができ、当技術分野においてよく知られている M A B 法は、本開示の少なくとも 1 種のキャノーラ植物、またはその後代、が親または祖先であった、キャノーラ植物において S N P を追跡するために使用することができる。本開示の

40

50

方法は、本明細書中に開示の対象 S N P を有するあらゆるキャノーラ変種の同定に使用することができる。

【 0 0 4 8 】

本開示の方法は、本明細書中で同定されている S N P の組合せを含むキャノーラ植物を作製する方法を含み、ここで、前記方法は、本開示の植物を用いた育種を含む。より詳細には、前記方法は、本開示の 2 種の植物を交配することを含んでいてもよい、または本開示の 1 種の植物と他の任意の植物とを交配することを含んでいてもよい。例示的な方法は、本開示によって検出可能な、本開示の S N P について前記交配の後代を解析することによって前記後代を選択することをさらに含んでいてもよい。例えば、本開示は、他の望ましい形質、例えば、農業形質、例えば、多様な実施例において本明細書中で試験されているものなどを含む植物との育種サイクルを通してキャノーラ植物の接合性を追跡するために使用することができる。対象 S N P および所望の形質を含む植物は、例えば、検出、同定、選択されて、さらなる回の育種においてすぐに使用されてもよい。対象 S N P / 形質は、他の形質、例えば、可能な昆虫耐性形質（単数または複数）および / または除草剤耐性形質などと、育種を通して組み合わせることもでき、本開示によって追跡される。後者の一実施形態は、グリフォセートなどの除草剤に対する耐性をコードしている遺伝子と組み合わされた、1 種または複数の対象 S N P を含有する植物である。

10

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態において、本開示は、1 種または複数の f a d - 3 c キャノーラ植物のための診断用のアンプリコン産物の生成のためのプライマー配列として有用な連続断片を含む D N A 配列を含む。

20

【 0 0 5 0 】

関連実施形態は、本明細書中で同定されている D N A 配列の一部の少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 個、またはそれより多くの連続したヌクレオチド、またはそれらの相補鎖を含む D N A 配列に関する。こうした配列は、D N A 増幅法において D N A プライマーとして有用でありうる。これらのプライマーを使用して生成されるアンプリコンは、本明細書中に言及されている f a d - 3 c キャノーラ変種のいかなる組合せおよび接合性の診断用であってもよい。したがって、本開示は、こうした D N A プライマーおよび相同なプライマーによって生成されたアンプリコンも含む。

30

【 0 0 5 1 】

なおさらなる実施形態において、本開示は、本開示の f a d - 3 c S N P を作製する方法を含み、前記方法は、以下のステップを含む：( a ) 本明細書中に開示の S N P のうちの 1 種を含み、ここに開示のオレイン酸および / またはリノレン酸の形質のうちの 1 つを与える) 第 1 の親のキャノーラ系統と (これらの S N P を欠いている) 第 2 の親のキャノーラ系統とを有性交配して、それにより、複数の後代植物を作製するステップ；ならびに ( b ) 分子マーカーを使用することによって後代植物を選択するステップ。こうした方法は、前記 f a d - 3 c 形質を含む純粋種またはホモ接合性のキャノーラ植物を作製するために、場合により、後代植物を第 2 の親のキャノーラ系統に戻し交配するさらなるステップを含んでいてもよい。

40

【 0 0 5 2 】

本開示の他の一態様によれば、前記 f a d - 3 c キャノーラ植物との交配の後代の接合性を決定する方法が提供される。前記方法は、キャノーラ D N A を含む、試料を本開示のプライマーセットと接触させることを含みうる。前記プライマーは、少なくとも 1 種の前記 f a d - 3 c キャノーラ植物からのゲノム D N A を用いた核酸増幅反応において使用されるときには、少なくとも 1 種の前記キャノーラ S N P または野生型遺伝子の診断用である第 1 のアンプリコンを生成する。こうした方法は、核酸増幅反応を行い、それによって第 1 のアンプリコンを生成し、本明細書中に開示の f a d - 3 c の S N P および野生型遺伝子に特異的なプローブで第 1 のアンプリコンを検出することをさらに含む。該方法は、それにアニーリングされる開示のプローブを有するアンプリコンのアレル識別融解適用法

50

を行い、アレル識別融解適用法において使用されるプローブの相対蛍光を比較することをさらに含む。プローブの相対蛍光は、試料が目的のSNPを含有するかどうかを示し、そうである場合には、試料がSNPについてヘテロ接合性であるかまたはホモ接合性であるかどうかを示す。

#### 【0053】

DNA検出の技術分野においてよく知られている方法と共に、本明細書中に開示の組成物を使用して、DNA検出キットを開発することもできる。キットは、試料中の対象キャノーラSNPの同定に有用であり、このDNAを含有するキャノーラ植物の育種のための方法に適用されうる。キットは、例えば本明細書中に開示の、アンブリコンと相同または相補的なDNA配列を含有する。これらのDNA配列は、DNA增幅反応において、またはDNAハイブリダイゼーション法におけるプローブとして、使用することができる。キットは、検出法の性能に必要な試薬および物質を含有していてもよい。

10

#### 【0054】

「プローブ」は、従来の検出可能な標識またはレポーター分子（放射性同位体、リガンド、化学発光剤、または酵素など）が付加されている単離された核酸分子である。こうしたプローブは、標的核酸の鎖に相補的であり、本開示の場合には、キャノーラ植物からかまたはその事象からのDNAを含む試料からかどうかにかかわらず、目的のfad-3c遺伝子を含む前記キャノーラ植物のうちの1種からのゲノムDNAの鎖に相補的である。本開示によるプローブは、デオキシリボ核酸またはリボ核酸だけでなく、ポリアミドおよび他のプローブ物質であって標的DNA配列に特異的に結合してその標的DNA配列の存在の検出に使用されうるものも含む。

20

#### 【0055】

PCRプライマー間で標的DNAとハイブリッド形成する蛍光レポーター（フルオロフォア）およびクエンチャーを含む特異的プローブが設計された。フルオロフォア分子は、オリゴヌクレオチドプローブの合成中にオリゴヌクレオチドプローブに付加され、それによってオリゴヌクレオチドプローブを標識化する。クエンチャー分子などの、他の分子をオリゴヌクレオチドプローブに付加することもできる。オリゴヌクレオチドプローブへのこれらの分子の付加は、一本鎖DNAとハイブリッドを形成するときおよび増幅プロセスを介してDNAの新しい鎖を生成するときに、オリゴヌクレオチドプローブの機能を損なわない。

30

#### 【0056】

特定の波長で励起される多数のフルオロフォアが開発されており、当技術分野において知られている。フルオロフォアの励起は、フルオロフォアのすぐ近くに位置するクエンチャーによってクエンチされうる、フルオロフォアによる蛍光シグナルの放出をもたらす。クエンチャーがフルオロフォアから離されるときに、蛍光シグナルは、もはやクエンチされず、蛍光シグナルの蓄積は、標的DNAの量と直接に相関し、自動蛍光光度計を用いてリアルタイムで検出することができる。フルオロフォアは、組み合わせて使用されてもよく、このとき、2種以上のフルオロフォアの多重検出を可能にするように励起スペクトルおよび発光スペクトルは有意に異なる。フルオロフォアのいくつかの好ましい実施形態は、HEX蛍光色素、TET蛍光色素、Cy3蛍光色素、Cy3.5蛍光色素、Cy5蛍光色素、Cy5.5蛍光色素、Cy7蛍光色素、またはROX蛍光色素を含む。本発明のFRETを使用したPCRプロセスのための同種のアッセイ検出システムからなる方法と共に使用するためのフルオロフォアの好ましい実施形態は、JOE蛍光色素のFAM蛍光色素を含む。

40

#### 【0057】

特定の波長のフルオロフォアをクエンチするためにクエンチャーが開発されており、当技術分野において知られている。クエンチャーがフルオロフォアのすぐ近くにあるとき、フルオロフォアは、クエンチャーにエネルギーを移動する。クエンチャーは、発光減衰を通してまたは無放射的に、このエネルギーを移動して自然の基底状態に戻る。無放射または暗減衰において、フルオロフォアから移動されたエネルギーは、分子振動として放出さ

50

れる。より広範囲にわたるフルオロフォアの使用を可能にすることができるクエンチャーを提供するために、クエンチャーの選択では、低いバックグラウンド蛍光、高い感度、および最大スペクトルの重なりなどの質が考慮される。クエンチャーのいくつかの好ましい実施形態としては、D a b c y l クエンチャー、T a m r a クエンチャー、Q x l クエンチャー、I o w a b l a c k F Q クエンチャー、I o w a b l a c k R Q クエンチャー、またはI R 色素Q C - 1 クエンチャーなどが挙げられる。クエンチャーの特に好ましい実施形態は、F A M 標識オリゴヌクレオチドに対してアンチセンスに設計されたオリゴヌクレオチドプライマー上で標識されたB l a c k h o l e クエンチャーを含むはずである。

## 【0058】

10

「プライマー」は、核酸ハイブリダイゼーションによって相補的な標的DNA鎖にアニーリングされ、それによってプライマーと標的DNA鎖との間でハイブリッドを形成し、次いでポリメラーゼ、例えば、DNAポリメラーゼによって標的DNA鎖に沿って伸長される、単離／合成された核酸である。本開示のプライマー対は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）または他の従来の核酸增幅法による、標的核酸配列の増幅のためのそれらの使用に関する。

## 【0059】

プローブおよびプライマーは、一般に、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、4010、4011、4012、4013、4014、4015、4016、4017、4018、4019、4020、4021、4022、4023、4024、4025、4026、4027、4028、4029、4030、4031、4032、4033、4034、4035、4036、4037、4038、4039、4040、4041、4042、4043、4044、4045、4046、4047、4048、4049、4050、4051、4052、4053、4054、4055、4056、4057、4058、4059、4060、4061、4062、4063、4064、4065、4066、4067、4068、4069、4070、4071、4072、4073、4074、4075、4076、4077、4078、4079、4080、4081、4082、4083、4084、4085、4086、4087、4088、4089、4090、4091、4092、4093、4094、4095、4096、4097、4098、4099、40100、40101、40102、40103、40104、40105、40106、40107、40108、40109、40110、40111、40112、40113、40114、40115、40116、40117、40118、40119、40120、40121、40122、40123、40124、40125、40126、40127、40128、40129、40130、40131、40132、40133、40134、40135、40136、40137、40138、40139、40140、40141、40142、40143、40144、40145、40146、40147、40148、40149、40150、40151、40152、40153、40154、40155、40156、40157、40158、40159、40160、40161、40162、40163、40164、40165、40166、40167、40168、40169、40170、40171、40172、40173、40174、40175、40176、40177、40178、40179、40180、40181、40182、40183、40184、40185、40186、40187、40188、40189、40190、40191、40192、40193、40194、40195、40196、40197、40198、40199、40200、40201、40202、40203、40204、40205、40206、40207、40208、40209、40210、40211、40212、40213、40214、40215、40216、40217、40218、40219、40220、40221、40222、40223、40224、40225、40226、40227、40228、40229、40230、40231、40232、40233、40234、40235、40236、40237、40238、40239、40240、40241、40242、40243、40244、40245、40246、40247、40248、40249、40250、40251、40252、40253、40254、40255、40256、40257、40258、40259、40260、40261、40262、40263、40264、40265、40266、40267、40268、40269、40270、40271、40272、40273、40274、40275、40276、40277、40278、40279、40280、40281、40282、40283、40284、40285、40286、40287、40288、40289、40290、40291、40292、40293、40294、40295、40296、40297、40298、40299、40300、40301、40302、40303、40304、40305、40306、40307、40308、40309、403010、403011、403012、403013、403014、403015、403016、403017、403018、403019、403020、403021、403022、403023、403024、403025、403026、403027、403028、403029、403030、403031、403032、403033、403034、403035、403036、403037、403038、403039、403040、403041、403042、403043、403044、403045、403046、403047、403048、403049、403050、403051、403052、403053、403054、403055、403056、403057、403058、403059、403060、403061、403062、403063、403064、403065、403066、403067、403068、403069、403070、403071、403072、403073、403074、403075、403076、403077、403078、403079、403080、403081、403082、403083、403084、403085、403086、403087、403088、403089、403090、403091、403092、403093、403094、403095、403096、403097、403098、403099、4030100、4030101、4030102、4030103、4030104、4030105、4030106、4030107、4030108、4030109、4030110、4030111、4030112、4030113、4030114、4030115、4030116、4030117、4030118、4030119、4030120、4030121、4030122、4030123、4030124、4030125、4030126、4030127、4030128、4030129、4030130、4030131、4030132、4030133、4030134、4030135、4030136、4030137、4030138、4030139、4030140、4030141、4030142、4030143、4030144、4030145、4030146、4030147、4030148、4030149、4030150、4030151、4030152、4030153、4030154、4030155、4030156、4030157、4030158、4030159、4030160、4030161、4030162、4030163、4030164、4030165、4030166、4030167、4030168、4030169、4030170、4030171、4030172、4030173、4030174、4030175、4030176、4030177、4030178、4030179、4030180、4030181、4030182、4030183、4030184、4030185、4030186、4030187、4030188、4030189、4030190、4030191、4030192、4030193、4030194、4030195、4030196、4030197、4030198、4030199、4030200、4030201、4030202、4030203、4030204、4030205、4030206、4030207、4030208、4030209、4030210、4030211、4030212、4030213、4030214、4030215、4030216、4030217、4030218、4030219、4030220、4030221、4030222、4030223、4030224、4030225、4030226、4030227、4030228、4030229、4030230、4030231、4030232、4030233、4030234、4030235、4030236、4030237、4030238、4030239、4030240、4030241、4030242、4030243、4030244、4030245、4030246、4030247、4030248、4030249、4030250、4030251、4030252、4030253、4030254、4030255、4030256、4030257、4030258、4030259、4030260、4030261、4030262、4030263、4030264、4030265、4030266、4030267、4030268、4030269、4030270、4030271、4030272、4030273、4030274、4030275、4030276、4030277、4030278、4030279、4030280、4030281、4030282、4030283、4030284、4030285、4030286、4030287、4030288、4030289、4030290、4030291、4030292、4030293、4030294、4030295、4030296、4030297、4030298、4030299、4030300、4030301、4030302、4030303、4030304、4030305、4030306、4030307、4030308、4030309、40303010、40303011、40303012、40303013、40303014、40303015、40303016、40303017、40303018、40303019、40303020、40303021、40303022、40303023、40303024、40303025、40303026、40303027、40303028、40303029、40303030、40303031、40303032、40303033、40303034、40303035、40303036、40303037、40303038、40303039、403030310、403030311、403030312、403030313、403030314、403030315、403030316、403030317、403030318、403030319、403030320、403030321、403030322、403030323、403030324、403030325、403030326、403030327、403030328、403030329、403030330、403030331、403030332、403030333、403030334、403030335、403030336、403030337、403030338、403030339、403030340、403030341、403030342、403030343、403030344、403030345、403030346、403030347、403030348、403030349、403030350、403030351、403030352、403030353、403030354、403030355、403030356、403030357、403030358、403030359、403030360、403030361、403030362、403030363、403030364、403030365、403030366、403030367、403030368、403030369、403030370、403030371、403030372、403030373、403030374、403030375、403030376、403030377、403030378、403030379、403030380、403030381、403030382、403030383、403030384、403030385、403030386、403030387、403030388、403030389、403030390、403030391、403030392、403030393、403030394、403030395、403030396、403030397、403030398、403030399、4030303100、4030303111、4030303122、4030303133、4030303144、4030303155、4030303166、4030303177、4030303188、4030303199、4030303200、4030303211、4030303222、4030303233、4030303244、4030303255、4030303266、4030303277、4030303288、4030303299、4030303300、4030303311、4030303322、4030303333、4030303344、4030303355、4030303366、4030303377、4030303388、4030303399、4030303400、4030303411、4030303422、4030303433、4030303444、4030303455、4030303466、4030303477、4030303488、4030303499、4030303500、4030303511、4030303522、4030303533、4030303544、4030303555、4030303566、4030303577、4030303588、4030303599、4030303600、4030303611、4030303622、4030303633、4030303644、4030303655、4030303666、4030303677、4030303688、4030303699、4030303700、4030303711、4030303722、4030303733、4030303744、4030303755、4030303766、4030303777、4030303788、4030303799、4030303800、4030303811、4030303822、4030303833、4030303844、4030303855、4030303866、4030303877、4030303888、4030303899、4030303900、4030303911、4030303922、4030303933、4030303944、4030303955、4030303966、4030303977、4030303988、4030303999、40303031000、40303031111、40303031222、40303031333、40303031444、40303031555、40303031666、40303031777、40303031888、40303031999、40303032000、40303032111、40303032222、40303032333、40303032444、40303032555、40303032666、40303032777、40303032888、40303032999、40303033000、40303033111、40303033222、40303033333、40303033444、40303033555、40303033666、40303033777、40303033888、40303033999、40303034000、40303034111、40303034222、40303034333、40303034444、40303034555、40303034666、40303034777、40303034888、40303034999、40303035000、40303035111、40303035222、40303035333、40303035444、40303035555、40303035666、40303035777、40303035888、40303035999、40303036000、40303036111、40303036222、40303036333、40303036444、40303036555、40303036666、40303036777、40303036888、40303036999、40303037000、40303037111、40303037222、40303037333、40303037444、40303037555、40303037666、40303037777、40303037888、40303037999、40303038000、40303038111、40303038222、40303038333、40303038444、40303038555、40303038666、40303038777、40303038888、40303038999、40303039000、40303039111、40303039222、40303039333、40303039444、40303039555、40303039666、40303039777、40303039888、40303039999、403030310000、403030311111、403030312222、403030313333、403030314444、403030315555、403030316666、403030317777、403030318888、403030319999、403030320000、403030321111、403030322222、403030323333、403030324444、403030325555、403030326666、403030327777、403030328888、403030329999、403030330000、403030331111、403030332222、403030333333、403030334444、403030335555、403030336666、403030337777、403030338888、403030339999、403030340000、403030341111、403030342222、403030343333、403030344444、403030345555、403030346666、403030347777、403030348888、403030349999、403030350000、403030351111、403030352222、403030353333、403030354444、403030355555、403030356666、403030357777、403030358888、403030359999、403030360000、403030361111、403030362222、403030363333、403030364444、403030365555、403030366666、403030367777、403030368888、403030369999、403030370000、403030371111、403030372222、403030373333、403030374444、403030375555、403030376666、403030377777、403030378888、403030379999、403030380000、403030381111、403030382222、403030383333、403030384444、403030385555、403030386666、403030387777、403030388888、403030389999、403030390000、403030391111、403030392222、403030393333、403030394444、403030395555、403030396666、403030397777、403030398888、403030399999、4030303100000、4030303111111、4030303122222、4030303133333、4030303144444、4030303155555、4030303166666、4030303177777、4030303188888、4030303199999、4030303200000、4030303211111、4030303222222、4030303233333、4030303244444、4030303255555、4030303266666、4030303277777、4030303288888、4030303299999、4030303300000、4030303311111、4030303322222、4030303333333、4030303344444、4030303355555、4030303366666、4030303377777、4030303388888、4030303399999、4030303400000、4030303411111、4030303422222、4030303433333、4030303444444、4030303455555、4030303466666、4030303477777、4030303488888、4030303499999、403030

5 5、3 5 6、3 5 7、3 5 8、3 5 9、3 6 0、3 6 1、3 6 2、3 6 3、3 6 4、3  
 6 5、3 6 6、3 6 7、3 6 8、3 6 9、3 7 0、3 7 1、3 7 2、3 7 3、3 7 4、3  
 7 5、3 7 6、3 7 7、3 7 8、3 7 9、3 8 0、3 8 1、3 8 2、3 8 3、3 8 4、3  
 8 5、3 8 6、3 8 7、3 8 8、3 8 9、3 9 0、3 9 1、3 9 2、3 9 3、3 9 4、3  
 9 5、3 9 6、3 9 7、3 9 8、3 9 9、4 0 0、4 0 1、4 0 2、4 0 3、4 0 4、4  
 0 5、4 0 6、4 0 7、4 0 8、4 0 9、4 1 0、4 1 1、4 1 2、4 1 3、4 1 4、4  
 1 5、4 1 6、4 1 7、4 1 8、4 1 9、4 2 0、4 2 1、4 2 2、4 2 3、4 2 4、4  
 2 5、4 2 6、4 2 7、4 2 8、4 2 9、4 3 0、4 3 1、4 3 2、4 3 3、4 3 4、4  
 3 5、4 3 6、4 3 7、4 3 8、4 3 9、4 4 0、4 4 1、4 4 2、4 4 3、4 4 4、4  
 4 5、4 4 6、4 4 7、4 4 8、4 4 9、4 5 0、4 5 1、4 5 2、4 5 3、4 5 4、4  
 5 5、4 5 6、4 5 7、4 5 8、4 5 9、4 6 0、4 6 1、4 6 2、4 6 3、4 6 4、4  
 6 5、4 6 6、4 6 7、4 6 8、4 6 9、4 7 0、4 7 1、4 7 2、4 7 3、4 7 4、4  
 7 5、4 7 6、4 7 7、4 7 8、4 7 9、4 8 0、4 8 1、4 8 2、4 8 3、4 8 4、4  
 8 5、4 8 6、4 8 7、4 8 8、4 8 9、4 9 0、4 9 1、4 9 2、4 9 3、4 9 4、4  
 9 5、4 9 6、4 9 7、4 9 8、4 9 9、または 5 0 0 ポリヌクレオチドまたはそれを超  
 える長さである。こうしたプローブおよびプライマーは、高ストリンジエンシーハイブリ  
 ダイゼーション条件下で標的配列と特異的にハイブリッド形成する。好ましくは、本開示  
 によるプローブおよびプライマーは、標的配列と完全な配列類似性を有するが、標的配列  
 とは異なっていて標的配列にハイブリッド形成する能力を保持しているプローブが従来法  
 によって設計されてもよい。  
 20

## 【0060】

プローブおよびプライマーを調製および使用するための方法は、例えば、Molecular Cloning : A Laboratory Manual、第2版、1~3巻、Sambrookら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、1989などにおいて記載されている。PCR-  
 プライマー対は、例えば、その目的が意図されたコンピュータプログラムを使用すること  
 により、既知の配列から導き出すことができる。

## 【0061】

本明細書中に開示のSNPの上流および下流のDNA配列に基づいたプライマーおよび  
 プローブは、開示の配列を、従来法によって、例えば、こうした配列を再クローニングお  
 よびシーケンシングすることによって、確認（および、必要であれば、修正）するのに使  
 用することができる。

30

## 【0062】

本開示の核酸プローブおよびプライマーは、ストリンジエント条件下で標的DNA配列  
 とハイブリッド形成する。一般に、いかなる従来の核酸ハイブリダイゼーション法または  
 増幅法も、f a d - 3 c 試料からDNAの存在を同定するために使用することができる。  
 核酸分子またはそれらの断片は、特定の状況下で他の核酸分子と特異的にハイブリッド形  
 成する能力がある。本明細書中で使用される場合、2種の核酸分子は、2種の分子が逆平行  
 の二本鎖核酸構造を形成する能力がある場合、互いに特異的にハイブリッド形成する能  
 力があると言われる。1種の核酸分子は、それらが完全な相補性を示す場合、もう1種の  
 核酸分子の「相補鎖」であると言われる。本明細書中で使用される場合、分子は、1種の  
 分子のうちのすべてのヌクレオチドがもう1種のヌクレオチドに相補的であるときに、「  
 完全な相補性」を示すと言われる。2種の分子は、それらが、少なくとも従来の「低スト  
 リンジエンシー」条件下で、互いにアニーリングされた状態を維持するのを可能にする  
 に十分な安定性で互いにハイブリッド形成できる場合、「最小限に相補的」であると言わ  
 れる。同様に、これらの分子は、従来の「高ストリンジエンシー」条件下で、互いにアニ  
 ーリングされた状態を維持するのを可能にするに十分な安定性で互いにハイブリッド形  
 成できる場合、「相補的」であると言われる。従来のストリンジエンシー条件は、Sambro  
 okら、1989によって記載されている。したがって、完全な相補性からの逸脱は、そうした  
 逸脱が、二本鎖構造を形成するための分子の能力を完全に排除しない限り、許容され  
 る。核酸分子がプライマーまたはプローブとして役割を果たすには、用いられる特定の溶媒お  
 40

50

より塩濃度の下で安定な二本鎖構造を形成することができるように、配列において十分に相補的であることだけが必要とされる。

#### 【0063】

本明細書中で使用される場合、実質的に相同な配列は、高ストリンジエンシー条件下で比較されている核酸配列の相補鎖と特異的にハイブリッド形成することになる核酸配列である。「ストリンジエント条件」という用語は、Sambrookら、1989、9.52～9.55で述べられている特異的ハイブリダイゼーションの手順による、標的核酸への（すなわち、目的の特定の核酸配列への）核酸プローブのハイブリダイゼーションについて機能的に定義される。Sambrookら、1989の9.47～9.52および9.56～9.58も参照されたい。したがって、本開示のスクレオチド配列は、DNA断片の相補的なストレッチと選択的に二重鎖分子を形成するそれらの能力のために使用されてもよい。

10

#### 【0064】

想定される用途に依存して、標的配列に対するプローブの多様な程度の選択性を達成するために、多様な条件のハイブリダイゼーションを使用することができる。高い選択性が必要とされる用途の場合、ハイブリッドを形成するために、典型的には、相対的にストリンジエントな条件を用いることになり、例えば、約0.50 mMから約0.2.00 mMのMgCl<sub>2</sub>によって約50から約75の温度でもたらされるような、比較的低塩および/または高温の条件を選択することになる。温度および塩の双方が変更されてもよく、または温度もしくは塩濃度のいずれかが一定に保持されたままもう一方の変数が変更されてもよい。こうした選択的条件が、プローブと鋳型または標的鎖との間のミスマッチを許容することは、たとえあるとしても、ほんのわずかである。ハイブリダイゼーションを介したDNA配列の検出は、当業者によく知られており、米国特許第4,965,188号および第5,176,995号の教示は、ハイブリダイゼーション解析の方法の好例である。

20

#### 【0065】

例示的な一実施形態において、本開示の核酸は、高ストリンジエンシー条件下で、それらの相補鎖および断片を含む、本明細書中に例示または示唆した1種または複数のプライマー（またはアンプリコンもしくは他の配列）と特異的にハイブリッド形成することになる。本開示の一態様において、本開示のマーカー核酸分子は、例示されている配列のうちの1つ、またはそれらの相補鎖および/もしくは断片において、本明細書中に記載のような核酸配列を有する。

30

#### 【0066】

本開示の他の一態様において、本開示のマーカー核酸分子は、こうした核酸配列と、80%と100%または90%と100%との間の配列同一性を共有する。本開示のさらなる一態様において、本開示のマーカー核酸分子は、こうした配列と、95%、96%、97%、98%、および/または99%ならびに100%の間の配列同一性を共有する。こうした配列は、遺伝的交配の後代を同定するための植物育種法におけるマーカーとして使用されてもよい。標的DNA分子へのプローブのハイブリダイゼーションは、当業者に知られているいくつの方法によっても検出することができ、これらとしては、蛍光タグ、放射性タグ、抗体に基づいたタグ、および化学発光タグなどが挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0067】

特定の増幅プライマー対を使用した（例えば、PCRによる）標的核酸配列の増幅に関して、「ストリンジエント条件」とは、プライマー対が、主にそれらの標的核酸配列と、高い優先度で、ハイブリッド形成するのを可能にし、それによってプライマー対の結合を可能にして、好ましくは、固有のアンプリコンを生成する条件である。

#### 【0068】

「（標的配列に）特異的」という用語は、ストリンジエントハイブリダイゼーション条件下で、プローブまたはプライマーが、主に、標的配列を含む試料中の核酸配列と、高い優先度で、ハイブリッド形成することを示す。

50

【 0 0 6 9 】

本明細書中で使用される場合、「増幅されたDNA」または「アンプリコン」とは、核酸鑄型の一部である標的核酸配列の核酸増幅の産物を指す。例えば、有性交配から結果として生じたキャノーラ植物が、本明細書中に開示のような目的のSNPを含有するかどうかを決定するためにある。キャノーラ植物組織試料から抽出されたDNAは、SNP部位に隣接したキャノーラ植物のゲノムにおいて上流または下流配列に由来する1種のプライマーおよびSNP部位に隣接したキャノーラ植物のゲノムにおいて上流または下流配列の他の末端に由来する第2のプライマーを含むプライマー対を使用して核酸増幅法にかけられてもよく、それにより、SNPの存在の診断用のアンプリコンを生成する。アンプリコンは、一定の長さであり、野生型または変異された遺伝子の診断用でもある配列を有する。アンプリコンは、長さにおいて、プライマー対に1ヌクレオチド塩基対を加えての合計の長さから、および/またはプライマー対に約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499、500。

4 1 3、4 1 4、4 1 5、4 1 6、4 1 7、4 1 8、4 1 9、4 2 0、4 2 1、4 2 2、  
 4 2 3、4 2 4、4 2 5、4 2 6、4 2 7、4 2 8、4 2 9、4 3 0、4 3 1、4 3 2、  
 4 3 3、4 3 4、4 3 5、4 3 6、4 3 7、4 3 8、4 3 9、4 4 0、4 4 1、4 4 2、  
 4 4 3、4 4 4、4 4 5、4 4 6、4 4 7、4 4 8、4 4 9、4 5 0、4 5 1、4 5 2、  
 4 5 3、4 5 4、4 5 5、4 5 6、4 5 7、4 5 8、4 5 9、4 6 0、4 6 1、4 6 2、  
 4 6 3、4 6 4、4 6 5、4 6 6、4 6 7、4 6 8、4 6 9、4 7 0、4 7 1、4 7 2、  
 4 7 3、4 7 4、4 7 5、4 7 6、4 7 7、4 7 8、4 7 9、4 8 0、4 8 1、4 8 2、  
 4 8 3、4 8 4、4 8 5、4 8 6、4 8 7、4 8 8、4 8 9、4 9 0、4 9 1、4 9 2、  
 4 9 3、4 9 4、4 9 5、4 9 6、4 9 7、4 9 8、4 9 9、または5 0 0、7 5 0、1  
 0 0 0、1 2 5 0、1 5 0 0、1 7 5 0、2 0 0 0、またはそれよりも多いヌクレオチド

10

塩基対を加えての（上に挙げたいずれかの增加分を加えたまたは引いた）合計の長さの範囲に及びうる。植物ゲノム配列由来であるプライマー対のメンバーは、S N P 配列から一定の距離に位置していてもよい。この距離は、1 ヌクレオチド塩基対から最大約 2 万ヌクレオチド塩基対までの範囲に及びうる。「アンプリコン」という用語の使用は、D N A 熱增幅反応において形成されうるプライマーダイマーを特別に除外する。

#### 【 0 0 7 0 】

核酸増幅は、当技術分野において知られている、P C R などの、多様な核酸増幅法のいずれによって達成されてもよい。多様な増幅法が、当技術分野において知られており、なかでも、米国特許第 4 , 6 8 3 , 1 9 5 号および米国特許第 4 , 6 8 3 , 2 0 2 号に、記載されている。P C R 増幅法は、最長 2 2 k b のゲノム D N A を増幅するために開発されてきた。これらの方針ならびに D N A 増幅の技術分野において知られている他の方法は、本開示の実施において使用されうる。f a d - 3 c S N P の配列は、本明細書に記載の配列に由来するプライマーを使用してこうした配列を増幅して、その後、P C R アンプリコンのまたはクローニング D N A の標準的 D N A シーケンシングによって検証されうる。

20

#### 【 0 0 7 1 】

これらの方法によって生成されるアンプリコンは、複数の技術によって検出されうる。アガロースゲル電気泳動および臭化エチジウムでの染色は、D N A アンプリコンを検出する一般的なよく知られた方法である。もう 1 つのこうした方法は、近くの隣接ゲノム D N A 配列および挿入 D N A 配列の双方にオーバーラップする D N A オリゴヌクレオチドが設計される遺伝子ビット解析である。オリゴヌクレオチドは、マイクロウェルプレートのウェル内に固定される。（挿入配列内の 1 種のプライマーおよび近くの隣接ゲノム配列内の 1 種を使用した）目的の領域のP C R 後に、一本鎖P C R 産物は、固定されたオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成することができ、D N A ポリメラーゼおよび予想される次の塩基に特異的な標識d d N T P を使用した一塩基伸張反応のための鑄型としての役割を果たす。読み出しへは、蛍光またはE L I S Aベースのものであってもよい。シグナルは、増幅、ハイブリダイゼーション、および一塩基伸張の成功による、挿入 / 隣接配列の存在を示す。

30

#### 【 0 0 7 2 】

T a q M a n (登録商標) P C R は、D N A 配列の存在を検出および定量する方法である。簡単に説明すると、F R E T オリゴヌクレオチドプローブは、目的のS N P とオーバーラップするように設計される。F R E T プローブおよびP C R プライマー（目的のS N P の上流の少なくとも 1 種および下流の少なくとも 1 種）を、耐熱性ポリメラーゼおよびd N T P の存在下でサイクルにかける。

40

#### 【 0 0 7 3 】

増幅後、目的のS N P の存在および試料の接合性を決定するために、（上記のT a q M a n (登録商標) 加水分解プローブを使用して）アレル識別解析を行うこともできる。アレル識別解析中に、異なる 2 種のハイブリダイゼーションプローブ（S N P 配列に相補的なヌクレオチドを含む 1 種のプローブおよび野生型配列に相補的なヌクレオチドを有するもう 1 種のプローブ）は、アンプリコンとハイブリッド形成して消化され、それにより、t a q ポリメラーゼの 5 ' エキソヌクレアーゼ活性によってプローブからクエンチャー部

50

分を放出して蛍光をもたらす。野生型遺伝子に特異的なプローブ対 S N P に特異的なプローブの相対蛍光の比較により、目的の S N P の存在および接合性の指標が得られる。

#### 【 0 0 7 4 】

本明細書中に言及または引用されているすべての特許、特許出願、仮出願、および出版物は、参照によりその全体が、それらが本明細書の明示された教示と矛盾しない程度まで組み込まれている。

#### 【 0 0 7 5 】

以下の実施例は、本開示を実施するための手順を例示するためおよび本開示の特定の好みしい実施形態を実証するために含まれているものである。これらの実施例は、限定するものとして解釈されるべきではない。以下の実施例において開示されている技術が、その実施のための好みしい様式を例示するために使用される特定のアプローチを表していることは、当業者によって理解されるはずである。しかし、当業者は、本開示に鑑み、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく、依然として類似または同様の結果を得ながら、これらの特定の実施形態において多くの変更がなされうることを理解するはずである。他に示されていない限り、すべての百分率は重量によるものであり、すべての混合溶媒の割合は、特に明記されていない限り、容量によるものである。

10

#### 【 0 0 7 6 】

特に明記されていない限り、以下の略語を使用する。

b p 塩基対

20

摂氏度

D N A デオキシリボ核酸

F R E T 蛍光共鳴エネルギー移動

D I G ジゴキシゲニン

E D T A エチレンジアミン四酢酸

k b キロベース

$\mu$  g マイクログラム

$\mu$  L マイクロリットル

m L ミリリットル

M モル質量

O L P 重複プローブ

30

P C R ポリメラーゼ連鎖反応

P T U 植物転写単位

S D S ドデシル硫酸ナトリウム

S N P 一塩基多型

S O P 標準操作手順

S S C 塩化ナトリウムおよびクエン酸ナトリウムの混合物を含有する緩衝溶液、p H

7 . 0

T B E T r i s ベース、ホウ酸およびE D T A の混合物を含有する緩衝溶液、p H 8 . 3

40

V ボルト

#### 【実施例】

#### 【 0 0 7 7 】

#### 【実施例 1 】

F A D - 3 c エンドポイント T A Q M A N (登録商標) アッセイ

エンドポイント T a q M a n (登録商標) アッセイは、f a d - 3 c の一塩基多型変異を検出するためおよび育種個体群の中で f a d - 3 c 遺伝子変異を含有するキャノーラ植物の接合性の状態を決定するために開発された。f a d - 3 c 遺伝子のエキソン 6 および 7 に位置する高度に保存された D N A 配列に結合するように 2 種のプライマーを設計した。これらのプライマーは、変異したキャノーラ植物および変異していないキャノーラ植物において、f a d - s 3 c の一塩基多型を含む 1 5 4 b p の D N A 断片を增幅した。キャ

50

ノーラにおける f a d - 3 c 変異は、Huら（2006）によって記載されており、遺伝子のエキソン 6 およびイントロン 6 のスプライス部位のジャンクション中に位置する（図 1）。野生型 f a d - 3 c 遺伝子および変異した f a d - 3 c 遺伝子（一塩基多型、S N P からなる）の存在を検出するためのレポーター色素としてそれぞれ F A M および V I C を用いて、2 種の T a q M a n （登録商標）副溝結合型非蛍光性クエンチャー（M G B N F Q）プローブを設計した。これらの 2 種のプローブは、イントロン 6 上に位置する近隣の多型を回避するために特別な考慮をして f a d - 3 c の一塩基多型（図 1）のすぐ近くに設計された。別の多型を回避することにより、f a d - 3 c 変異体植物の検出用のプローブの特異性を高める結果となった。f a d - 3 c S N P を含有するキャノーラ植物用の T a q M a n （登録商標）検出法を、キャノーラ変種「N E X 8 2 8」（f a d - 3 c S N P を含有する）、対照キャノーラ変種「クアンタム（Quantum）」（f a d - 3 c S N P を含有しない）、および f a d - 3 c S N P についてヘテロ接合性であることが知られている植物から単離された D N A 試料に対して試験した。エンドポイント T a q M a n （登録商標）アッセイを使用して、高処理能力の適用法、例えば、96 ウェルおよび 384 ウェルのプレート形式で試験される、f a d - 3 c S N P の存在を決定し、植物の接合性も決定した。10

## [ 実施例 1 . 1 ]

## 【 0 0 7 8 】

## g D N A 单離

f a d - 3 c 変異および対照キャノーラ植物を含有する異なる 156 種のキャノーラ植物のゲノム D N A（g D N A）試料をこの試験において試験した。改変した Q i a g e n M a g A t t r a c t 植物 D N A キット（Q i a g e n、V a l e n c i a、C A）を使用してゲノム D N A を抽出した。新鮮なキャノーラリーフディスクを、1 試料あたり 4 枚、g D N A 抽出に使用した。販売会社の説明書（M o l e c u l a r P r o b e s、E u g e n e、O R）に従って P i c o G r e e n 法を用いて、g D N A を定量した。試料を、D N a s e を含まない水で希釈して、この試験の目的のために結果として 5 n g / μ L の濃度にした。20

## [ 実施例 1 . 2 ]

## 【 0 0 7 9 】

## T a q M a n （登録商標）アッセイおよび結果

T a q M a n （登録商標）エンドポイントアッセイにおける使用のために、特定の T a q M a n （登録商標）プライマーおよびプローブを設計した。これらのプライマーおよびプローブは、目的の S N P を含む f a d - 3 c 遺伝子の領域を增幅および検出するように設計した。これらの試薬は、キャノーラ植物中の変異した f a d - 3 c 遺伝子を検出するために、下の一覧に示されている条件で使用することができる。表 1 は、キャノーラ植物における f a d - 3 c S N P の検出用に特別に開発されたプライマーおよびプローブの配列の一覧である。30

## 【 0 0 8 0 】

## 【表2】

表1. Taqman PCRプライマーおよびプローブ

配列番号	名称	説明	配列
配列番号 2	D-CL-FA D3c-F	フォワードプライマー	ACGATGATAAGCTGCCTTGGT
配列番号 3	D-CL-FA D3c-R	リバースプライマー	CAAGTACCTCAACAACCCTTGGTCAACAGT TGTAACTCCTCCACGT
配列番号 4	D-CL-FA D3c-FAM	fad-3c変異体を検出するためのプローブ	6FAM-CAGAGGCAAGATAAGT-MGB
配列番号 5	D-CL-FA D3c-VIC	fad-3c野生型を検出するためのプローブ	VIC-ACAGAGGCAAGGTAAGT-MGB

10

20

30

40

## 【0081】

増幅用のPCR反応混合物は、以下の通りである：6 μl の全反応物中、1 × TaqMan (登録商標) GTE express マスター・ミックス、0.9 μM のフォワードプライマー（配列番号2）、0.9 μM のリバースプライマー（配列番号3）、0.2 μM の FAD-3C 変異体プローブ（配列番号4）、0.2 μM の野生型プローブ（配列番号5）、15 ng の gDNA。この反応混合物を、以下の熱サイクル条件を使用して増幅した：最初の2段階は 50 を2分間および 95 を30秒間；次の40サイクルは 95 で3秒間および 62 で30秒間。次いで、反応物を、サーマルサイクラーから取り出すまで 10 で維持した。PCR 熱サイクルは、ABI - Applied Biosystems 7900 HT リアルタイム PCR システムまたは Applied Biosystems Verity サーマルサイクラー（Life Technologies, Carlsbad, CA）のいずれかを使用して行うことができる。試料プレートは、fad-3c 変異体（「NEX 828」）についてホモ接合性、fad-3c 変異体についてヘテロ接合性、または fad-3c 野生型（「クアンタム（Quantum）」）についてホモ接合性であったキャノーラ植物からの対照 DNA から構成されていた。さらに、DNA を含有していない鑄型なしの対照を含めた。増幅後、製造業者によって記載されているようなアレル識別プレート読み取り手順に従って Applied Biosystems 7900 HT リアルタイム PCR システムを使用してエンドポイント蛍光シグナル（VIC および FAM）を読み取った。次いで、このデータを、SDS 2.4 ソフトウェア（Life Technologies, Carlsbad, CA）を使用して解析し、各試料の相対蛍光を決定した（図2）。

## 【0082】

キャノーラにおける fad-3c 変異についての TaqMan (登録商標) 検出法を、既知のホモ接合性、ヘミ接合性、および野生型の試料に対して試験した。（試料の反応物

50

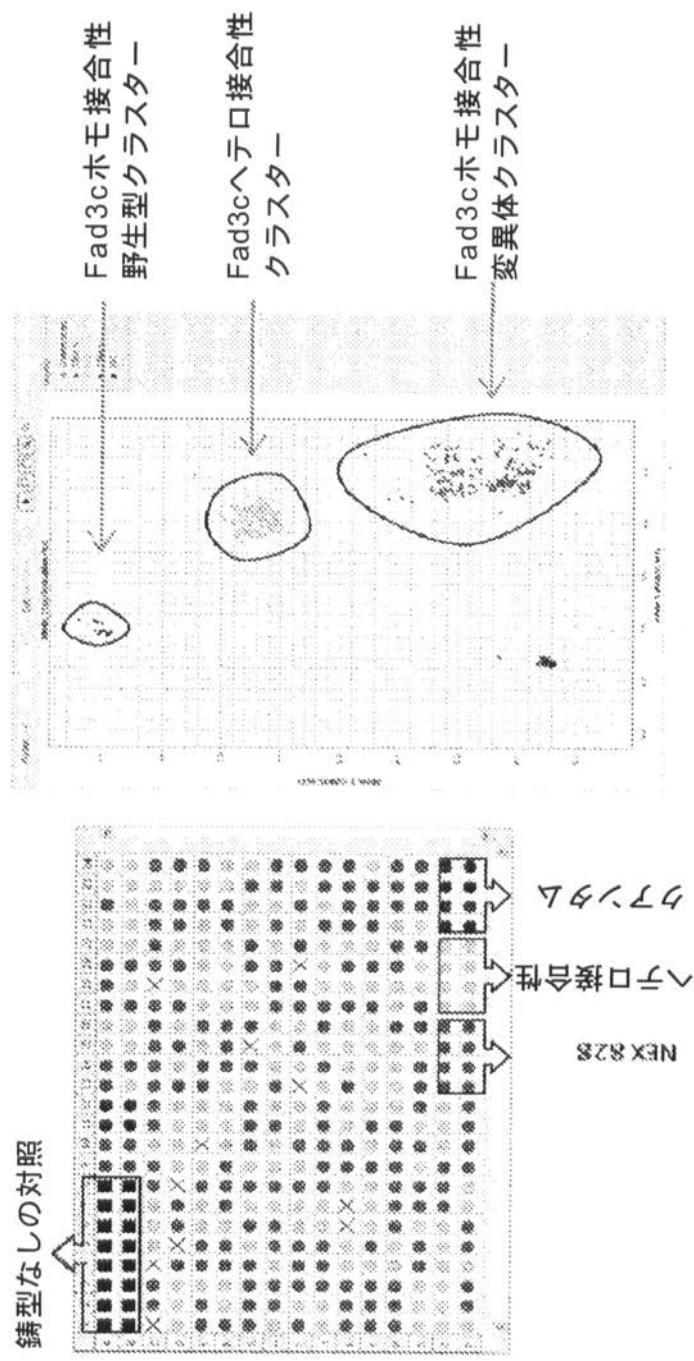
の)各プローブから生じた蛍光を、対照のプローブによって生じた蛍光と共に解析することにより、各試料の接合性の決定が補助される。このアッセイは、キャノーラにおける f a d - 3 c 変異および野生型一塩基多型の検出について高い特異性を実証し、対照から結果として生じるいかなる検出可能な偽陽性の生成も増幅もしなかった。イベント特有のプライマーおよびプローブは、キャノーラにおける f a d - 3 c 変異および f a d - 3 c 野生型遺伝子の検出用に使用することができ、これらの条件および試薬は、接合性アッセイに適用可能である。

【図1】

エキソン 6  
 ATCTTGTAAATGTTGGACGGCTGTCACGTACTTGCATCATGTCACCGATGATAAG  
 イントロン 6  
 CTGCCTTGGTACAGAAGGCAAGGTTAGATCAGCATTATTAAAGGAAATTAATGATGAT  
 \*  
 エキソン 7  
 Fad3c変異(GからA)  
 TAGTAGTTGAAATAATCTGAATTGATGTTTTGATACAAATATAAGGAATGGAGTTATTAC  
 TAGGAGGATTAAACAACTGTTGATAGAGATTACGGGATCTTCAAACACATTCAACGGATA  
 TTGGAACTCACGTGATCCATCATCTTTCACAAATCCC

【図2】

Fad3c遺伝子変異の3クラスターへの分別 - SDS2.4 出力



【配列表】

2014530624000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/61000
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/68; C07H 21/04 (2012.01) USPC - 435/6.11, 435/6.12, 536/24.3; 435/6.1, 536/23.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12Q 1/68; C07H 21/04 (2012.01) USPC: 435/6.11, 435/6.12, 536/24.3; 435/6.1, 536/23.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/6.1, 536/23.1		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST, PatBase, Google Scholar: Determine, identify, zygosity, canola, fad-3c, fad3c, primer, probe, fluorescent, fluorescent, amplicon, single nucleotide polymorphism, SNP, mutation		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011/0151441 A1 (CHEN et al.) 23 June 2011 (23.06.2011); para [0030], [0037], [0057], [0072], [0118], [0122]-[0125], claim 2, claim 22	1-16
Y	WO 2004/072259 A2 (HU et al.) 26 August 2004 (26.08.2004); para [0016], [0021], [0030], [0044], [0047] SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9	1-16
Y	US 2008/0227663 A1 (TISONE et al.) 18 September 2008 (18.09.2008); para [0354], [0359]	8-9
Y	US 7,081,564 B2 (SOMERS et al.) 25 July 2006 (25.07.2006); Col 3, In 22-23; SEQ ID NO: 7	6, 16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
**T** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention **X** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone **Y** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art **&** document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  27 December 2012 (27.12.2012)	Date of mailing of the international search report  <b>18 JAN 2013</b>	
Name and mailing address of the ISA/US  Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer:  Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(72)発明者 ウバヤセナ , ラサンザ , チャンダナ

アメリカ合衆国 インディアナ州 47906 , ウェスト ラファイエット , ウェストモアランド  
ドライブ 3712

(72)発明者 エイラト , ゾエ

カナダ国 エス7エヌ 4ティ2 , サスカチュワン州 サスカトゥーン , ケンデルダイン ロード  
1114

(72)発明者 チャナバサヴァラディヤ , チャンドラ シエカラ , エー .

アメリカ合衆国 インディアナ州 46074 , カーメル , ウイニングス レーン 3147

(72)発明者 グブタ , マンジュ

アメリカ合衆国 インディアナ州 46032 , カーメル , ウィナマック コート 13463

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 CA20 HA12 HA14

4B063 QA01 QA05 QA12 QA17 QQ09 QQ42 QR32 QR56 QR62 QR66  
QS25 QS34 QS36 QX02