(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2004 年2 月5 日 (05.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/011646 A1

(51) 国際特許分類[7]: C12N 15/11, C12Q 1/68, C12M 1/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009692

(22) 国際出願日: 2003 年7 月30 日 (30.07.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-222133 2002 年7 月30 日 (30.07.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ＴＵＭジーン (TUM GENE,INC.) [JP/JP]; 〒261-7105 千葉県 千葉市 美浜区中瀬２－６ Chiba (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中山 雅人 (NAKAYAMA,Masato) [JP/JP]; 〒292-0818 千葉県 木更津市 かずさ鎌足２－１－４ 株式会社ＴＵＭジーン かずさラボラトリー内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA,Yoshiyuki et al.); 〒106-6123 東京都 港区 六本木6-10-1 六本木ヒルズ森タワー23階 TMI総合法律事務所 Tokyo (JP).

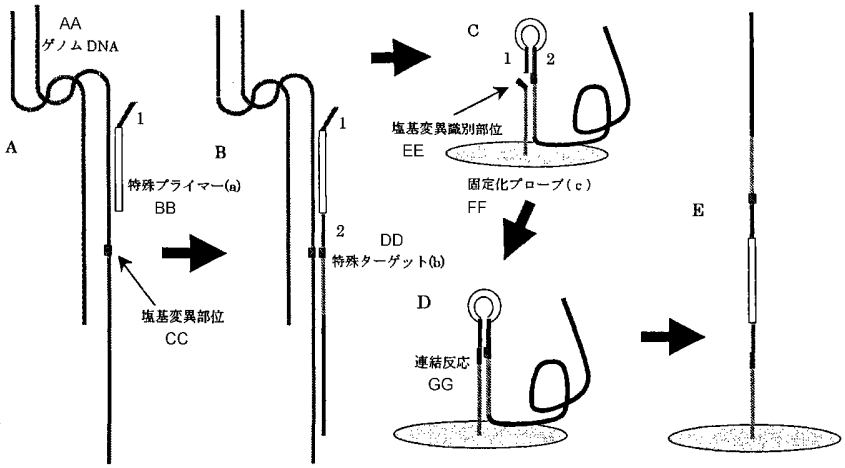
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF DETECTING BASE MUTATION

(54) 発明の名称: 塩基変異の検出法



AA...GENOMIC DNA
BB...SPECIFIC PRIMER (a)
CC...BASE MUTATION SITE
DD...SPECIFIC TARGET b)

EE...BASE MUTATION IDENTIFYING SITE
FF ..IMMOBILIZED PROBE (c)
GG...LIGATION REACTION

(57) Abstract: It is intended to provide a method of detecting a base mutation characterized by comprising, to provide the base site corresponding to a mutation site of a nucleic acid having the base mutation to be detected in the base sequence formed in the 3' side after the extension, forming a primer having a base sequence complementary to a part of the above-described nucleic acid and a base sequence, which is complementary to the base sequence immediately upstream the base site corresponding to the mutation site in the above-described base sequence formed in the 3' -side, added to the 5' -terminal side; forming a target by subjecting the primer to an extension reaction with the use of a polymerase or Klenow enzyme; converting the target into a single-stranded one by denaturation; and hybridizing the target with a probe having a base complementary to the mutation site of the above-described nucleic

[続葉有]

WO 2004/011646 A1

AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

acid in the 3'-terminal region followed by ligation for the detection. Thus, a base species at a specific position in a base sequence can be determined and quantified, thereby quickly analyzing various mutations such as a single base mutation, a mutation in a repetitive sequence, a base defect mutation, a base insert mutation, a translocation mutation and so on.

(57) 要約:

本発明は、塩基変異を有する検出対象の核酸の変異部位に相当する塩基部位が伸長後に３'側に形成される塩基配列内に位置するように、前記核酸の一部と相補的な塩基配列を有し且つ３'側に形成される前記塩基配列のうち変異部位に相当する前記塩基部位の直ぐ上流側の塩基配列と相補的な塩基配列が５'末端側に付加されたプライマーを作成し、該プライマーをポリメラーゼ又はクレノー酵素による伸長反応によってターゲットを作成した後、変性により該ターゲットを１本鎖とし、このターゲットを前記核酸の変異部位と相補的な塩基が３'末端領域に存在するプローブとハイブリダイゼーションさせ、次いでライゲーションさせることにより検出することを特徴とする塩基変異の検出法を提供することにより、塩基配列の特定位置にある塩基種を決定、定量でき、一塩基変異、繰り返し塩基配列変異、塩基欠損変異、塩基挿入変異、転座変異等の種々の変異解析を迅速に行う。

明　細　書

塩基変異の検出法

技術分野

本発明は、ＤＮＡやＲＮＡ等の塩基配列で、特定位置にある塩基種を決定し且つ定量することにより、一塩基変異、繰り返し塩基配列変異、塩基欠損変異、塩基挿入変異、転座変異等の種々の変異解析を迅速に行う技術に関するものである。

背景技術

現在、ＤＮＡの塩基配列の変異を定量する方法の代表例としては、ＳＳＣＰ法やＤＮＡシーケンシング等がある。

ＳＳＣＰ法は、１９８９年にＯｒｉｔａ　M. 等が開発したもので、一本鎖ＤＮＡが塩基配列に依存した高次構造を取る（Single-strand conformation polymorphism）ことを利用した多型解析手法の一つで、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により移動度の差として検出する。ＰＣＲで増幅したＤＮＡ断片を用いることが多く、ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法とも呼ばれている。

しかし、この手法は電気泳動法を用いるため、定量分析には向いておらず、また、一度に多くのサンプルを迅速に解析することは困難である。

また、ＤＮＡシーケンシングは、その種類が数種あるが、基礎となっている方法の一つに 1975 年に開発されたサンガー法がある。サンガー法は、次のようにして行われる方法である。即ち、対象のＤＮＡ断片を１本鎖とし、調査したい部位の５’側上流の塩基配列を認識し、蛍光標識したプライマーと、４種類（塩基にそれぞれアデニン・チミン・グアニン・シトシンを持つ）のデオキシヌクレオチド（ｄＮＴＰ）と、１種

類のダイデオキシヌクレオチド（ｄｄＮＴＰ）との存在下で、ＤＮＡポリメラーゼによって相補鎖を伸長させる。このとき、ＤＮＡの構成要素であるｄＮＴＰを取り込んだ場合には、次々にＤＮＡの伸長が進む。一方、ｄｄＮＴＰを取り込んだ場合には、予めヌクレオチドとの結合部位に水酸基が付加されていて重合反応が阻害されるため、ＤＮＡはそれ以上伸長することが出来ない。これにより、特定の塩基を末端に持つ複数のＤＮＡ断片が生成される。この方法においては、４種類のｄｄＮＴＰを用いて４つのサンプルを作製し、電気泳動を行い得られた DNA バンドを順に読んでいくことで、塩基配列を解析することが出来る。

しかし、この方法は、DNA 断片の広範囲の塩基配列を分析したい場合には向いているが、特定の部位の変異のみを検査したい場合には簡便さに欠ける。

また、塩基変異の検出法としてＤＯＬ法がある。ＤＯＬ法は、2 つのオリゴヌクレオチドをＤＮＡリガーゼで結合することを利用する。すなわち、５’末端にフルオレセイン標識したＳＮＰ部位の一塩基上流までの配列に相補的なオリゴプローブと、３’’末端に蛍光標識し、ＳＮＰ部位を含み、それより下流の配列に相補的なオリゴプローブを用意する。後者は、ＳＮＰ部位の相補塩基の違いにより、標識する蛍光基をＲＯＸとＴＡＭＲＡと言う風に変えておく。これらのプローブとＤＮＡリガーゼをＰＣＲ反応溶液に同時に加えておくと、ＳＮＰ部位を含むＰＣＲ産物の増幅に伴い、リガーゼにより結合したプローブが生成してくる。その際、結合されるプローブはＳＮＰ部位に相補的なものに限られるから、フルオレセインの励起波長で励起すると、ＦＲＥＴの結果増加する蛍光波長がいずれのものであるかによりＳＮＰが判定できる。ＤＯＬassay では、全ての反応が１つのチューブ内で一度に行え、非常に簡単であるが、多検体処理には向かないことが欠点である。

また、塩基変異の検出法としてライゲーション反応（塩基の連結）を利用したライゲーション法が開発されている。例えば、Genespector（登録商標；Variom Biotechnology AG の解析キット）を用いる方法がある。これは、ＤＮＡのＰＣＲ産物、シグナルプローブ（signal probe）、及びアレル特異的検出プローブ（allele-specific detection probe）を用い、ハイブリダイゼーション反応させた後、ライゲーション反応させ、検出するものである。

しかし、この方法では、塩基変異の検出感度や変異解析の迅速性の点で問題がある。

従って、本発明は、ＤＮＡやＲＮＡ等の塩基配列で、特定位置にある塩基種を決定、定量することができ、一塩基変異、繰り返し塩基配列変異、塩基欠損変異、塩基挿入変異、転座変異等の種々の変異解析を迅速に行う方法を提供することを課題とする。

発明の開示

本発明は、次の（Ａ）～（Ｄ）の工程を含むことを特徴とする塩基変異の検出法であって、（Ａ）下記プライマー（伸張可能なプライマー）を作成する工程。

①塩基変異を有する検出対象の核酸の一部と相補的な塩基配列を有し、且つ

②伸長後に３’側に形成される塩基配列のうち変異部位に相当する塩基部位の直ぐ上流側の塩基配列と相補的な塩基配列が、５’末端側に付加されたもの。

③プライマーの作成は、塩基変異を有する検出対象の核酸の変異部位に相当する塩基部位が、伸長後に３’側に形成される塩基配列内に位置するように行う。

（B）該プライマーを（ポリメラーゼ又はクレノー酵素を用いて）伸長反応させることにより、ターゲットを作成する工程。（C）その後、変性により該ターゲットを１本鎖とし、このターゲットを、３’末端領域に（前記核酸の変異部位と相補的な塩基が）存在するプローブとハイブリダイゼーション反応させる工程。からなる塩基変異の検出法を提供することにより、前記課題を解決したものである。

また、本発明は、前記検出法を使用することを特徴とする塩基変異の検出システムを提供するものである。

図面の簡単な説明

図１は、本発明の検出法の基本原理を説明するための概念図である。

図２は、本発明の検出法における特殊ターゲットの作成方法の例を示す図である。

図３は、本発明の検出法により一塩基変異の解析を行う場合の説明図である。

図４は、本発明の検出法により繰り返し塩基配列変異の解析を行う場合の説明図である。

図５は、本発明の検出法により塩基欠損変異・塩基挿入変異の解析を行う場合の説明図である。

図６は、本発明の検出法により転座変異の解析を行う場合の説明図である。

図７は、本発明の検出法における特殊プライマー、カウンタープライマー及びプローブそれぞれの設計を説明するための概念図である。

図８は、実施例１の測定結果を示すグラフである。

図９は、実施例２の測定結果を示すグラフである。

図１０は、実施例３の測定結果を示すグラフである。

図１１は、実施例４の測定結果を示すグラフである。

図１２は、実施例５の測定結果を示すグラフである。

図１３は、実施例６の測定結果を示すグラフである。

図１４は、実施例７の測定結果を示すグラフである。

図１５は、実施例８の測定結果を示すグラフである。

図１６は、インターカレータを用いた解析を行う場合の説明図である。

発明を実施するための最良の形態

〔塩基変異の検出法〕

以下、本発明の塩基変異の検出法を、その好ましい実施形態に基づいて詳細に説明する。

本発明の検出法の基本原理は、図１に示すように、〔Ａ〕特殊プライマーの作成、〔Ｂ〕特殊プライマーの伸長反応、〔Ｃ〕変性及び固定化プローブとのハイブリダイゼーション、〔Ｄ〕ライゲーション反応及び〔Ｅ〕洗浄及び検出により、ゲノムＤＮＡ等の核酸における塩基変異を検出するものである。以下、これらの各ステップについて詳述する。

〔Ａ〕特殊プライマーの作成

検出対象のゲノムに相補的なプライマー（以下、特殊プライマー（ａ）という）を合成する。この特殊プライマー（ａ）には、ゲノムへ結合するための相補配列の他に、伸長後に形成される配列２と相補的な配列１が、プライマーの５’末端側に付加されている。

この際、ゲノムの変異部位に相当する塩基部位が、後述の伸長反応による伸長後に３’側に形成される塩基配列内に位置するように特殊プライマー（ａ）を作成する。得られる特殊プライマー（ａ）は、検出対象のゲノムの一部と相補的な塩基配列を有し且つ３’側に形成される塩基配列のうち変異部位に相当する塩基部位の直ぐ上流側の塩基配列と相補

的な塩基配列が５’末端側に付加されたものとなる。

特殊プライマー（ａ）は、一つの塩基変異を検出するごとに一つ設計し、これらの各特殊プライマー（ａ）を用いて後述の伸長反応によりターゲット（検出対象とする核酸のコピー）（以下、特殊ターゲット（ｂ）ともいう）を作成し、そのコピー配列内には、検出対象とする核酸の塩基変異部位を認識するサイトおよび自己内で相補的塩基配列となる領域を有し、プローブとハイブリダイゼーション反応およびライゲーション反応の両反応を担うことができる塩基配列を形成するものである。

〔Ｂ〕特殊プライマーの伸長反応

上記の特殊プライマー（ａ）を使い、酵素〔ポリメラーゼ（ＤＮＡポリメラーゼ又はＲＮＡ依存型ＤＮＡポリメラーゼ）あるいはクレノー酵素〕による伸長反応を行う。これにより特殊ターゲット（ｂ）を作成できる。このとき、特殊ターゲット（ｂ）は、任意の方法、例えば、下記１）～３）の方法等で作成することができる。

１）温度を固定し、一回の伸長反応でターゲットを作成する。

２）ＰＣＲ法にてカウンタープライマーを用いてターゲットを増幅作成する（図２参照）。

３）Asymmetrical-PCR（以下、Ａ－ＰＣＲと呼ぶ）で目的ターゲットを作成する（図２参照）。

特に、ＰＣＲ法及びＡ－ＰＣＲ法を利用すれば、特殊ターゲットの分子数及び塩基鎖長を任意にコントロールできるので、検出感度の向上及びゲノムの非特異的結合による影響の抑制を図り、検出効率を高めることができる。この際、カウンタープライマーを適宜に設計することによって、特殊ターゲットの長さをコントロールし、ハイブリダイゼーション効率の向上や、非特異的結合の抑制などを図ることができる。

特殊ターゲットは、自己内相補結合によりループを形成し、長塩基鎖

であっても非特異的結合が抑制されるように設計でき、ハイブリダイゼーション反応の特異性を高めることができる。特に、特殊ターゲットの長さを長くすることで、高感度が得られる。また、特殊ターゲットの自己内相補結合によるループ領域に対し、第２ターゲット（エンハンサー・ターゲット）を作用（エンハンスィング・ハイブリダイゼーション）させる新たな反応ステップを設けることで、識別感度を向上させることができる。

（特殊プライマーの設計）

本発明においては、下記のように特殊プライマーを設計することが好ましい（図７参照）。

ア）オリゴヌクレオチド／全配列長３３塩基以上

イ）５’末端塩基部／燐酸基付加

ウ）構造／特殊プライマーは２種の構造領域からなり、ゲノムＤＮＡに対し優先的にハイブリダイズする領域Ａの部位とその特殊プライマーの伸長反応後に得られる直ぐ３’下流領域Ｂと相補的な配列を有する領域Ｂ’の部位で構成されている。

エ）領域Ｂ’の配列長は、１３塩基以上が望ましく、Ｔｍ設定では５０℃（±１０℃）前後が望ましい。

オ）領域Ａの配列長は、２０塩基以上が望ましく、Ｔｍ設定では６０℃以上が望ましい。

カ）特殊ターゲット内の領域Ｂ’の部位と領域Ａの部位のＴｍ格差設定は、常に〔領域Ｂ’の部位 ＜領域Ａの部位〕の関係下におき、５℃以上の差を設けることが望ましい（このＴｍ格差によりゲノムＤＮＡからの伸長反応において、領域Ｂ’の部位よりも領域Ａの部位のハイブリダイズを優先化させることが可能になる）。

キ）特殊プライマーの伸長反応後に得られる直ぐ３’下流領域Ｂと領

域Ｂ’の部位とでハイブリダイズが行われた際には、領域Ａの部位は、折り返し状のループを形成する（領域Ｂ’の部位と伸長後の３’領域Ｂの部位が良好にハイブリダイズされていれば、折り返し内で相補結合が存在しても構わない)。このとき、ＤＮＡに対する塩基鎖長に相関した非特異的結合を抑制できる。

ク）前記キ）で形成されるハイブリ領域の直ぐ下流に隣り合う伸長後新たに形成される塩基部位が、変異を起こす塩基部位に相当するように配置設定する。

ケ）前記キ）で形成されるハイブリ領域から下流に新たに形成される伸長領域（領域Ｃ）は、プローブと相補的な関係にあり、少なくとも２０塩基以上を有する。

（カウンタープライマーの設計）

本発明においては、下記のようにカウンタープライマーを設計してＰＣＲ法、Ａ－ＰＣＲ法にて伸長反応を行うことが好ましい（図７参照)。

ア）オリゴヌクレオチド／配列長２０塩基以上

イ）Ｔｍ設定では６０℃以上が望ましい。

ウ）カウンタープライマーのＴｍ設定は、常に、〔特殊プライマーにおける領域Ａの部位 ＞ カウンタープライマーに係る部位＞ 特殊プライマーにおける領域Ｂ’の部位〕の関係にある（このＴｍ格差により、ゲノムＤＮＡから得たＰＣＲ産物を鋳型にＡ－ＰＣＲを行う際に、カウンタープライマーのＴｍよりも高い温度設定にすることで特殊プライマーのみを優先的に伸長反応させることができる)。

エ）カウンタープライマーをハイブリダイズさせる設定位置は、プローブの３’末端側から１３塩基以上離れた塩基部位に、カウンタープライマーの５’末端塩基が配置されるように設定する（特殊ターゲット構築工程でこれらカウンタープライマーを排除する工程を含まない場合に

は、プローブとカウンタープライマーがハイブリダイズし、目的の特殊ターゲットのハイブリダイズを阻害する可能性があるため、特殊ターゲットとプローブのハイブリダイゼーションに最低限必要とされる塩基長（１３塩基）の領域を確保している)。なお、カウンタープライマーの配置は、必ずしもプローブ領域内に存在させる必要はなく、プローブの５’末端よりもさらに上流に位置する領域で配置設定を行ってもよい。

オ）特殊ターゲットとプローブがハイブリダイズする領域Ｃとカウンタープライマーとプローブがハイブリダイズする領域ＤのＴｍ設定は、〔領域Ｃ ≧ 領域Ｄ〕にすることが望ましい（カウンタープライマーがプローブ領域内に相補的領域を有する場合には、プローブとカウンタープライマーとのハイブリダイズにより、特殊ターゲットのハイブリダイズが阻害される可能性があるので、特殊ターゲットは、プローブに対して、カウンタープライマーよりも、より安定なハイブリダイズができるようにＴｍを高く設定しておくことが望ましいからである)。

〔Ｃ〕変成及び固定化プローブとのハイブリダイゼーション

伸長反応後に作成した特殊ターゲット（ｂ）を含む反応液を熱変性させ、１本鎖にする。次に、特殊ターゲット（ｂ）を固定化プローブ（ｃ）〔３’末端にミューテーション部位（変異部位）と相補的な塩基が存在する〕とハイブリダイゼーションさせる。すると、同時に特殊ターゲット（ｂ）の元プライマー部分はループを形成し、５’末端側の鎖（配列1）と伸長反応後に形成された鎖（配列２）の間でのハイブリダイゼーションも起こり、分子内ループ形成反応を起こす。その結果、プローブの３’末端とハイブリダイズした特殊ターゲットの５’末端の塩基は、隣り合わせの配置となる。

（プローブの設計）

プローブは、塩基変異を有するゲノムの当該変異部分の３’末端側（上

流側）に隣接する塩基配列（変異部分より上流部の塩基配列）に対し、該塩基配列それぞれと相補的なオリゴヌクレオチド部を有するプローブを合成することにより得ることができる。

プローブは、より多くの塩基種を同時に決定、定量できるように、その種類が二種以上からなることが好ましい。このように複数種のプローブを合成することで、検出の目的となる、複数のゲノム中の特定位置にある各塩基変異（複数種）を同時に決定、定量することができることになる。

プローブのオリゴヌクレオチド部は、その目的の認識部位を特異的に認識できるだけの配列長の範囲内で任意に選択できる。

また、プローブは、電極への固定を容易に行なえるように、電極固定部を有することが好ましい。尚、この電極固定部は、後工程の連結反応が行なわれる側に存することはできないので、オリゴヌクレオチド部の塩基配列の５’末端側のみに結合される。

電極固定部は、前記電極の表面と反応により結合し得るものであることが好ましい。電極固定部の具体例としては、チオール基、ビオチン残基、アミノ基、又はこれらを含む基等が挙げられ、それぞれプローブを固定するための電極表面に応じて適宜選択される。

また、プローブは、オリゴヌクレオチド部と電極固定部との間にリンカー部を有することが好ましい。このようなリンカー部を有することにより、ハイブリダイゼーションの際に、オリゴヌクレオチド部の自由度が増加し、ハイブリダイゼーション効率を高めることにより、高精度な検出が可能となる。

このようなリンカー部としては、例えば、炭化水素鎖、脱塩基ヌクレオチド鎖等が好適である。

本発明においては、特に、下記のようにプローブを設計することが、

特殊ターゲットとのハイブリダイゼーション効率およびＤＮＡリガーゼ酵素との結合効率がそれぞれ良好な点で好ましい。

ア）オリゴヌクレオチド部／配列長２０塩基以上

イ）電極固定部／チオール基

ウ）リンカー部／炭素数６のアルカン鎖

エ）３’末端塩基部位にミューテーションが起こる部位を設定

本発明の検出法に好適に用いられるプローブは、前記のように設計したプローブを、一の電極に一種類のプローブが対応するように電極に固定することで得ることができる。特に、プローブの複数種を、その種類毎に複数の電極に固定して集積させることにより、同一サンプル内の複数の塩基配列における変異を一度の操作で検出することが可能となる。

プローブを固定するための電極は、プローブにおける電極固定部が反応により結合し得るものを用いることが好ましい。ここで、電極と電極固定部との好ましい組み合わせを示すと、次の①～③等である。

①（電極）少なくともその表面が金（Ａｕ）からなるもの

（電極固定部）チオール基（—ＳＨ）を含むもの

②（電極）少なくともその表面がアビジン又はストレプトアビジンからなるもの

（電極固定部）ビオチン残基を含むもの

③（電極）少なくともその表面がカルボキシル基（—ＣＯＯＨ）を有するもの

（電極固定部）アミノ基（$-NH_2$）を含むもの

電極としての、少なくともその表面が金からなるものとしては、電極全体が金からなる金電極や、金以外の材質からなる基材の表面周囲を金でメッキしたもの等が用いられる。また、電極としての、少なくともその表面がアビジン又はストレプトアビジンからなるもの、カルボキシル

基を有するものとしては、任意の基材の表面周囲を、アビジン又はストレプトアビジンや、カルボキシル基を有する樹脂等によって被覆したもの等が用いられる。

〔D〕ライゲーション反応

ミューテーションを識別するステップである。連結方法は、合成酵素及びバッファーからなる合成酵素溶液を用いて行なう。

合成酵素溶液としては、定性反応（１工程反応）の場合は、ＤＮＡがハイブリダイゼーションできるだけの塩とＤＮＡリガーゼと該ＤＮＡリガーゼバッファー溶液を用いる。

一方、定量反応（洗浄工程を含む３工程反応）の場合は、１工程目のハイブリダイゼーションにおいては、ハイブリダイズできるだけの塩を含んだ溶液を用い、３工程目の連結反応では、ハイブリダイゼーションにより形成された２本鎖ＤＮＡを解離（変性）させない程度の塩が含まれ、且つＤＮＡリガーゼと該ＤＮＡリガーゼバッファー溶液を用いる。

尚、ハイブリダイゼーション反応は、核酸がハイブリダイゼーションできるだけの塩を少なくとも含む溶液を用いてライゲーション反応と別に行うこともできる。また、ハイブリダイゼーション反応は、ＤＮＡリガーゼ及び該ＤＮＡリガーゼバッファー溶液を少なくとも含む合成酵素溶液を用いてライゲーション反応と同時に行ってもよい。

この工程において、塩基変異識別部位の塩基（図１Ｃ参照）がハイブリダイズして向かい合う特殊ターゲットの塩基と相補であれば連結され、非相補であれば連結されない。また、塩基変異識別部位（プローブの３’末端）が一塩基でも短ければ、それも連結反応されない。

〔E〕洗浄及び検出

連結反応後は、固相表面や固定化ＤＮＡに非特異的に結合したゲノムや特殊ターゲット等を除去するために、変性剤を用いて洗浄（変性）す

る。

また、変性剤を用いずに、熱変性させることも可能である。

洗浄処理の後に、固相表面に残存するＤＮＡ量を測定する。ＤＮＡ量の測定方法には特に制限されない。固相に固定化したまま測定することも出来るし、固相からはずし溶液状にして濃度を測定することも出来る。固相のまま測定するには、ＤＮＡに化学結合する試薬を作用させる方法等を採用できる。また、固相にはあらかじめ電極を使用し、電気化学的レスポンスを示す試薬を用いて、電気信号の量でＤＮＡの固定量を測定することもできる。

本発明の検出法は、定量、定性の両目的に使用することが出来る。サンプルＤＮＡが１種類しかない場合（すべてのＤＮＡの塩基変異部位が１種類の塩基からなっている場合）、定性的測定をするだけでよい。このとき、前記ステップ〔Ｃ〕と前記ステップ〔Ｄ〕は、一つの工程として行っても同じ結果が得られる。

一方、定量分析の場合（サンプル中に塩基変異部位の塩基が異なるゲノムが存在する場合）、前記ステップ〔Ｃ〕と前記ステップ〔Ｄ〕間で洗浄工程を追加し、未反応の分子を除去することで、サンプル中に存在する変異ＤＮＡの割合を測定することが出来る。

本発明の検出法によれば、種々の変異解析（一塩基変異、繰り返し塩基配列変異、塩基欠損変異、塩基挿入変異、転座変異等）を行うことができ、また、これら多種の変異解析を同一アレー上で同時に行うこともできる。

本発明の検出法による一塩基変異の解析について、図３を参照しつつ説明する。

一塩基変異を有する特殊ターゲットでは、変異プローブ側のみで連結反応が行われ、特殊ターゲットが付加される。これにより、連結する前

のプローブのシグナルよりも大きなシグナルが得られる。一方、正常プローブ側では、連結部位の塩基が非相補であるため連結反応が起こらず、元のプローブと同じシグナルが得られるだけである。このシグナルの相違より、一塩基変異の有無を認識することができる。

正常の塩基を有する特殊ターゲットでは、その逆の反応が起こることにより、一塩基変異の存在有無を認識することができる。

本発明の検出法による繰り返し塩基配列変異の解析について、図４を参照しつつ説明する。

繰り返し塩基配列変異を有する特殊ターゲットでは、変異プローブ側のみで連結反応が行われ、特殊ターゲットが付加される。これにより、連結する前のプローブのシグナルよりも大きなシグナルが得られる。一方、正常プローブ側では、変異プローブよりも繰り返し配列数が少ない分だけ、連結部位の塩基が欠損した形となるため連結反応が起こらず、元のプローブと同じシグナルが得られるだけである。このシグナルの相違より、繰り返し塩基配列変異の有無を認識することができる。

正常の塩基を有する特殊ターゲットでは、その逆の反応が起こり、変異プローブ側では、特殊ターゲットの繰り返し配列数が少なくなる分、変異プローブの３’近傍塩基と特殊ターゲットの５’近傍の塩基が隣り合わせにならずオーバーラップしてしまうので、連結反応が起こらない。一方、正常プローブ側では連結による大きなシグナルを得ることができるので、それより変異を認識することができる。

また、本発明の検出法による塩基欠損変異・塩基挿入変異の解析について、図５を参照しつつ説明する。

塩基欠損変異を有する特殊ターゲットでは、変異プローブ側のみで連結反応が行われ、特殊ターゲットが付加される。これにより、連結する前のプローブのシグナルよりも大きなシグナルが得られる。一方、正常

プローブ側では、変異プローブよりも欠損した塩基分プローブが長くなっているため、正常プローブの３’近傍塩基と特殊ターゲットの５’近傍の塩基が隣り合わせにならずオーバーラップしてしまうので、連結反応が起こらない。これより変異を認識することができる。

正常の塩基を有する特殊ターゲット側では、その逆の反応が起こり、正常プローブ側では、連結が行われるが、変異プローブ側では、特殊ターゲットの塩基欠損がない分だけ、変異プローブの３’近傍塩基と特殊ターゲットの５’近傍の塩基が離れることになり、連結反応が起こらない。これより変異を認識することができる。

塩基挿入変異の識別については、同様の原理を用い、変異プローブは正常プローブよりも塩基挿入変異分だけ３’側に長くなり、塩基欠損変異の逆のパターンとして識別検出されることとなる。

また、本発明の検出法による転座変異の解析について、図６を参照しつつ説明する。

転座変異を有する特殊ターゲットでは、変異プローブ側のみで連結反応が行われ、特殊ターゲットが付加される。これにより、連結する前のプローブのシグナルよりも大きなシグナルが得られる。一方、正常プローブ側では、特殊ターゲットとハイブリする領域を所有していないため、ハイブリダイゼーションが起こらず、連結反応に至らない。よって、元のプローブと同じシグナルが得られるだけである。このシグナルの相違より、転座変異の有無を認識することができる。

転座変異を起こしていない正常の塩基配列を鋳型として特殊ターゲットが形成される場合には、正常プローブとハイブリダイゼーションを起こし、連結反応が起こる。変異プローブ側では、ハイブリダイゼーションが起こらないため、連結も起こらずシグナルに変化は現れない。また、特殊プライマーが鋳型にハイブリできない場合には、特殊ターゲット自

身が形成されないため、その後の反応には関与せず、正常／変異の両プローブにおいてシグナル変化は現れないので無視することができる。以上のようにして、転座変異を認識することができる。

本発明の検出法によれば、室温でも検出が可能であり、また解析測定を短時間で行うことができる。

また、本発明の検出法によれば、サンプル核酸として調製した特殊ターゲットを変異検出反応系に投入してから、２ステップ反応で解析測定ができる。

そして、本発明の検出法による検出結果に基づいて、生物学、医学分野での遺伝子、表現形質との相関の解析が可能となる。

また、本発明の検出法によって、薬剤代謝酵素、がん抑制遺伝子などの特定の遺伝子を検出・解析することにより、遺伝子診断の分野にも利用できる。さらに、癌、高血圧等の成人病の予防等に役立てることもできる。

〔検出システム〕

本発明によれば、前述した塩基変異の検出法を使用する、塩基変異の検出チップ、検出装置その他の検出システムが提供される。具体的には、一の電極に一種類のプローブが対応するように固定される複数の電極を集積させた基板又はチップ等が挙げられ、これらを用いることで、複数種の塩基変異の同時検出を実現できる。

本発明の検出システムは、前述の塩基変異の検出法を使用するものであるため、ＤＮＡやＲＮＡ等の塩基配列で、特定位置にある塩基種を決定、定量することができ、一塩基変異、繰り返し塩基配列変異、塩基欠損変異、塩基挿入変異、転座変異等の種々の変異解析を迅速且つ高感度に行うことができるものである。

以上、本発明の塩基変異の検出法及び検出システムを、これらの好ま

しい実施形態によって説明したが、本発明は、特にこのような実施形態に限定されることはなく、更にその他の実施形態があることは言うまでもない。

本発明の検出法における前記実施形態では、固定化プローブを使用する場合のプローブの固着先として電極を用いているが、固着先は電極に限らず、例えば、ガラス（ガラス板、ガラスビーズなど）、樹脂（樹脂ビーズ、メンブレン、糸など）、ゲル等の固相を使用することもできる。このような電極以外の固相を使用する場合には、ガラスなどでは金電極同様にアビジンーストレプトアビジン、カルボキシル基ーアミノ基を固定部として使用することができ、また、樹脂、ゲルなどであれば、ＤＮＡに反応基がなくても、物理的性質で吸着固定できる。特に樹脂などではＵＶ光を照射することでＤＮＡとの強固な固定化を図ることも可能である。このような固定化法を用いることで電極以外の固相にプローブを固定化することができる。

本発明の検出法は、前述のような電気化学法による場合のみならず、固定化したプローブで検出する場合は、ＤＮＡの蛍光染色剤（エチレンブロマイドや SYBR-Green（市販商品名））などを使えば蛍光検出器での検出・定量が可能である。また、予め蛍光標識を特殊プローブに付加しておく方法や、予め特定の物質が結合すると発光する物質（例えば蛍光を発するアダプタ物質）をＤＮＡに付加しておく方法による検出・定量が可能である。

測定時に固相からプローブを外す場合には、例えば、電気泳動法を用いて、分離定量することが可能である。また、検出ＤＮＡ量が多い場合には、吸光度にて定量することも可能である。

また、検出対象としてゲノムの塩基変異を例に挙げて説明したが、本発明の検出法における検出対象はこれに限らず、例えば、他のＤＮＡ、

ＲＮＡ等の核酸の塩基変異を挙げることができる。

ここで、本発明の検出法を電気化学的検出以外の方法によって行う場合の一実施形態を示すと、次の通りである。

1.特殊プライマー毎に予め発光波長の異なる蛍光色素を標識しておく。

2．サンプルゲノムと蛍光標識特殊プライマーおよび必要に応じてカウンタープライマーを用いて、ＰＣＲあるいはA-ＰＣＲを行い、蛍光標識特殊ターゲットを作成する。

3．２の蛍光標識特殊ターゲットと固相に一定量固定化されたプローブ各々とをハイブリダイズ・ライゲーション反応させる。

4．非特異的ＤＮＡを排除した後、蛍光検出器にて連結反応した特殊ターゲットを検出・定量する。

また、本発明の検出法を固定化しないプローブによって行う場合の実施形態を示すと、次の（１）又は（２）の通りである。下記のようなプロセスを踏むことで、固定化しないプローブでの検出も可能になる。

（１）

１．プローブに精製用タグを付けておく。

２．液層でハイブリダイズ、ライゲーションなどの反応を行う。

３．カラム等でタグの付いたＤＮＡのみを精製する。

４．ＤＮＡを SDS-PAGE にかけて、もとのプローブより長鎖のＤＮＡを検出・定量する。

（２）

１．プローブ毎に予め発光波長の異なる蛍光色素を標識しておく。

２．液層でハイブリダイズ、ライゲーションなどの反応を行う。

３．反応溶液を SDS-PAGE にかけて、蛍光標識されたプローブより長鎖の蛍光発光ＤＮＡを検出・定量する。

さらに、インターカレータを用いた場合の本発明の検出法について、

図１６を参照しながら従来の検出法と対比しつつ説明する。

従来のライゲーション法による検出法では、図１６（ａ）に示すように、ターゲットと固定化プローブとをハイブリダイゼーションした後、セカンドプローブと連結反応を行い、次いで、当該固定化プローブがセカンドプローブの連結によって伸長することになるが、非特異的に結合したターゲットやゲノムを除去するための変性・洗浄処理によって、ターゲットが解離することになり、伸長した一本鎖プローブのみが残ることになる。したがって、従来の検出法では、二本鎖特異的インターカレータ（たとえば、蛍光修飾インターカレータや電気化学的インターカレータ）を有効に利用した検出をすることができない。

これに対し、本発明の検出法によれば、図１６（ｂ）に示すように、既述の特殊ターゲットを作成し、これを用いてハイブリダイゼーションする際にループが形成される。このため、ハイブリダーゼーション反応、連結伸長反応後、洗浄・変性処理を行っても、特殊ターゲット自身が固定化プローブと連結しており、特殊ターゲットが洗い流されてしまうことがなく、再びハイブリダイゼーションできる環境下におけば、二本鎖を形成することができる。

このように、本発明の検出法では、二本鎖特異的インターカレータ（例えば、蛍光修飾インターカレータや電気化学的インターカレータ）を用いることによって、極めて有効に検出することができる。

本発明の塩基変異の検出法は、検出系が多様性に富んでいるという顕著な効果を有する。

実施例

以下、実施例を挙げて、本発明の塩基変異の検出法について、更に具体的に説明する。しかしながら、本発明は、これらの実施例により何等

限定されるものではない。

実施例１；

（一塩基変異検出）

（１）アレー金電極（計２４本を４本一組でＡ～Ｆにグループ分け）を用い、このうちＡ～Ｃの電極ピン先端には１０ｐｍｏｌ／μＬの下記正常プローブを１μＬ乗せ、Ｄ～Ｆの電極ピン先端には同濃度の下記一塩基変異プローブを１μＬ乗せ、固定化処理を行った。

正常プローブ：

ア）構造／HS-$(CH_2)_6$-gaattagctgtatcgtcaaggcactcttgcctacgccacc

イ）オリゴヌクレオチド部／配列長４０塩基

ウ）電極固定部／チオール基

エ）リンカー部／炭素数６のアルカン鎖

オ）３’末端塩基に正常型塩基を有する（Ｃ）

一塩基変異プローブ：

ア）構造／HS-$(CH_2)_6$-gaattagctgtatcgtcaaggcactcttgcctacgccacg

イ）オリゴヌクレオチド部／配列長４０塩基

ウ）電極固定部／チオール基

エ）リンカー部／炭素数６のアルカン鎖

オ）３’末端塩基に変異型塩基を有する（Ｇ）

（２）電気化学的試薬が含まれない測定用電解バッファー（酢酸カリウム、塩化カリウムの混合バッファー）中にアレー電極を浸漬させて洗浄を行った。これらによって、非特異的結合ＤＮＡの除去を行った。

（３）この段階で金電極表面に固定化されたプローブ量を確かめるために、１回目のＤＰＶ測定を行なった。即ち、金電極に固定されたプローブ（一本鎖ＤＮＡの状態のもの）について、二本鎖特異的電気化学的試薬溶液を用いて、プローブ固定化後のＤＰＶレスポンスを測定（i1）し

た。

（４）ハイブリダイゼーション及び連結反応を同時に行うための反応溶液を調製した。反応溶液には、Ｔ4ＤＮＡリガーゼ、1ＸＴ4ＤＮＡリガーゼバッファー、ハイブリダイゼーションできるだけの塩、そして、10pmol/uL の各特殊ターゲット（正常、正常と一塩基変異の混合（各々５pmol/uL)、一塩基変異）が含まれている。

＜特殊ターゲット＞

本オリゴ合成による特殊ターゲットは、ゲノムＤＮＡから伸長反応(酵素伸長反応、PCR 法反応、A-PCR 法反応）によって得られる産物を想定して構築。

正常特殊ターゲット：

ア）　構造；

(P)-agctccaactaccacggcctgctgaaaatgactgaatataaacttgtggtagttggagctggtggcgtaggcaagagtgc

イ）オリゴヌクレオチド／配列長８０塩基

ウ）５’末端塩基部／燐酸基付加

エ）５’末端塩基から数えて６１番目に正常型塩基を有する（G）

オ）５’末端塩基から数えて１～１５番目の塩基は、特殊プライマーの５’末端に付加される特別領域

カ）５’末端塩基から数えて１６～４５番目の塩基配列はループ形成(折り返し）領域、同時にこの領域はゲノムＤＮＡから特殊ターゲットを構築する際に、ゲノムＤＮＡとハイブリダイズするプライマー領域（Ｔm設定８５℃前後）

キ）５’末端塩基から数えて１～１５番目と４６～６０番目の塩基は、ループ形成時に相補的配列となる領域（Ｔm設定５０℃前後）

ク）特殊ターゲット内のＴm設定は、(カ)＞（キ)の関係で、その差は２

５℃以上離れている。

ケ）本特殊ターゲットの（キ）で形成されるハイブリ領域の下流直ぐに隣り合う塩基は、変異を起こす塩基部位に相当する配置設定。

コ）本特殊ターゲットの（キ）で形成されるハイブリ領域の下流には、２０塩基存在し、プローブに対して２０塩基の相補的配列を所有するよう構築（Ｔｍ設定６６℃前後）。

一塩基変異特殊ターゲット：

基本的には前記の正常特殊ターゲットと同様の内容である。相違点については以下に記す。

ア）　構造

(P)-agctccaactaccacggcctgctgaaaatgactgaatataaacttgtggtagttggagctcgtggcgtaggcaagagtgc

イ）５’末端塩基から数えて６１番目に正常型塩基を有する（Ｃ）

（５）特殊ターゲットは、電極Ａ、Ｄに対して正常特殊ターゲット、Ｂ、Ｅに対して正常および一塩基変異特殊ターゲットの混合物、Ｃ、Ｆに対して一塩基変異特殊ターゲットを用い、各電極ピンに1uLずつアプライし、固定化プローブとのハイブリダイゼーション反応及び連結反応を試みた。反応は、室温で２時間行った。

（６）前記（２）で用いたものと同様の洗浄方法で、非特異的結合ＤＮＡの除去を行った。

（７）ハイブリダイゼーション・連結反応後のＤＰＶレスポンスを測定（i2）した。（この時、プローブ固定化時のレスポンスにハイブリダイズした特殊ターゲット分のレスポンスが加算されて高いＤＰＶ値を示す。）

（８）前記（７）でハイブリダイズしていた特殊ターゲットのうち、連結反応していないものを除去するため、前記（２）で用いた電解バッファーに変性剤を含ませて、浸漬洗浄を行った。

（９）連結反応におけるＤＰＶレスポンス測定(i3)を行った。（この時、ハイブリダイゼーション後のレスポンスよりは低下するが、プローブの固定化レスポンスよりは高いレスポンスが得られる。）

以上の測定結果を表１及び図８に示す。

〔表１〕

Group	i1 (nA)	i2 (nA)	i3 (nA)	ΔCRV (%)		i1 (nA)	i2 (nA)	i3 (nA)	ΔCRV (%)
A	1308	2746	1879	43.7	平均値	1085.8	2233.0	1520.0	39.8
	942	1986	1324	40.6	標準偏差	156.1	346.7	245.7	3.3
	1045	2122	1455	39.2	変動係数	14.4%	15.5%	16.2%	8.3%
	1048	2078	1422	35.7					
B	890	1775	1280	43.8	平均値	890.5	1799.8	1299.5	46.6
	763	1612	1133	48.5	標準偏差	151.2	222.4	173.9	6.1
	806	1694	1242	54.1	変動係数	17.0%	12.4%	13.4%	13.1%
	1103	2118	1543	39.9					
C	1311	2270	1328	1.3	平均値	861.3	1518.5	929.0	9.4
	790	1332	851	7.7	標準偏差	315.9	530.9	284.6	6.3
	571	1028	654	14.5	変動係数	36.7%	35.0%	30.6%	66.4%
	773	1444	883	14.2					
D	796	1401	868	9.0	平均値	755.8	1404.3	844.5	11.9
	810	1475	889	9.8	標準偏差	62.0	82.8	46.9	3.2
	744	1452	840	12.9	変動係数	8.2%	5.9%	5.5%	26.9%
	673	1289	781	16.0					
E	526	1094	725	37.8	平均値	603.8	1210.3	821.0	36.7
	510	1024	698	36.9	標準偏差	196.3	371.8	246.3	2.9
	482	961	672	39.4	変動係数	32.5%	30.7%	30.0%	8.0%
	897	1762	1189	32.6					
F	633	1270	960	51.7	平均値	563.5	1128.3	799.8	42.0
	730	1439	987	35.2	標準偏差	155.0	288.8	219.1	6.9
	522	1027	733	40.4	変動係数	27.5%	25.6%	27.4%	16.5%
	369	777	519	40.7					

注釈: ΔCRV は、coupling reaction value の意（算出式ΔCRV＝i3-i1/i1X100）。

表 1、図８に見られるように、正常プローブを用いた場合には、正常および一塩基変異特殊ターゲットとの連結反応値において、特異的な顕著な有意差（正常３９．８％、一塩基変異９．４％）が見られ、また、一塩基変異プローブを用いた場合にも、上記ターゲットとの連結反応値において、特異的な顕著な差（一塩基変異４２．０％、正常１１．９％）が現れたことから、ホモタイプの一塩基変異を識別できていることが分かる。さらに、それぞれのプローブを用いて、両特殊ターゲットを１：１で混在化し(ヘテロタイプ)、作用させたときの連結反応値をみると、各々のプローブに対して、ターゲットが完全マッチした場合のレスポンスとほぼ同様の高い値が得られていることから、両プローブの連結反応が行われたということを示しており、ヘテロタイプの変異も識別できること

が分かる。以上のことから、本検出システムは、一塩基変異および正常用の２種のプローブを設け、特殊ターゲットに対する連結反応値を比較することで、ホモおよびヘテロのそれぞれに対する一塩基変異を識別することができる。

実施例２；

（多種変異同時検出）

（１）プローブの固定化における操作工程は、実施例１と同様にして行った。即ち、アレー金電極（計１５本を５本一組でＡ～Ｃにグループ分け）を用い、このうちＡの電極ピン先端に１０pmol/μＬの下記正常プローブを１μＬ、Ｂには同濃度の下記一塩基欠損プローブを１μＬ、Ｃには同濃度の下記一塩基変異プローブを１μＬそれぞれ乗せ、固定化処理を行った。

＜固定化プローブ＞

正常プローブ：実施例１で用いたものと同一オリゴのプローブ

一塩基変異プローブ：実施例１で用いたものと同一オリゴのプローブ

一塩基欠損プローブ：

ア）構造／HS-$(CH_2)_6$-tgaattagctgtatcgtcaaggcactcttgcctacgccac

イ）オリゴヌクレオチド部／配列長４０塩基

ウ）電極固定部／チオール基

エ）リンカー部／炭素数６のアルカン鎖

オ）３’末端塩基よりもさらに１塩基下流側に隣り合う部位がミューテーション部位に一致するように配置設計されている

（２）電気化学的試薬が含まれない測定用電解バッファー（酢酸カリウム、塩化カリウムの混合バッファー）中にアレー電極を浸漬させて洗浄を行った。これらによって、非特異的結合ＤＮＡの除去を行った。

（３）プローブ固定化後のＤＰＶレスポンスを測定（i1）した。

（４）ハイブリダイゼーション及び連結反応を同時に行うための反応溶液を調製した。反応溶液には、最終濃度でＴ4ＤＮＡリガーゼ３５units/μＬ、1ＸＴ4ＤＮＡリガーゼバッファー、ハイブリダイゼーションできるだけの塩、そして、１０pmol/μＬの一塩基変異特殊ターゲット（実施例１で用いたものと同一オリゴの一塩基変異特殊ターゲット）が含まれている。

（５）特殊ターゲットは、Ａ～Ｃの各電極ピンに１μＬずつアプライし、固定化プローブとのハイブリダイゼーション反応および連結反応を試みた。反応は、室温で２時間行った。

（６）連結反応していない特殊ターゲットを除去するため、前記（２）で用いた電解バッファーに変性剤を含ませて、浸漬洗浄を行った。

（７）連結反応におけるＤＰＶレスポンス測定（i2）を行った。

以上の測定結果を表２及び図９に示す。

〔表２〕

Group	i1 (nA)	i2 (nA)	ΔCRV (%)		i1 (nA)	i2 (nA)	ΔCRV (%)
	688	678	-1.5	平均値	688.4	688.5	0.6
	637	656	3.0	標準偏差	144.6	121.2	3.6
A	910	873	-4.0	変動係数	21.0%	17.6%	619.1%
	697	700	0.4				
	510	536	5.1				
	648	693	6.9	平均値	590.4	610.5	3.4
	500	537	7.3	標準偏差	77.0	88.9	5.1
B	683	721	5.5	変動係数	13.0%	14.6%	151.5%
	591	562	-5.0				
	530	541	2.0				
	926	1180	27.4	平均値	797.6	1081.2	35.7
	795	1103	38.8	標準偏差	122.4	157.0	5.3
C	611	818	33.9	変動係数	15.3%	14.5%	14.7%
	770	1084	40.8				
	886	1220	37.7				

注釈:ΔCRV は、coupling reaction value の意（算出式ΔCRV＝i2-i1/i1X100）

表２、図９に見られるように、正常プローブでは、一塩基変異特殊タ

ーゲットとのハイブリダイゼーションにおいて、プローブの３’末端に非相補的塩基が一つ存在することから、その部位でのプローブと一塩基変異特殊ターゲットとの連結反応は行われず、連結反応値は０．６％と低い（０％にならない理由は、バックグラウンドノイズである）。また一塩基欠損プローブでも、一塩基変異特殊ターゲットとのハイブリダイゼーションにおいて、プローブの３’末端塩基が特殊ターゲットの５’末端連結部位に対して一つ欠損したかたちとなるため、連結反応が起こらず、連結反応値は３．４％と先の正常プローブの値とほぼ同様の低い値を示している。一方、一塩基変異プローブでは、一塩基変異特殊ターゲットとのハイブリダイゼーションにおいて、完全な相補塩基対を形成することから、連結反応が良好に行われ、３５．７％と高い連結反応値が得られている。これらのことから、プローブの３’末端塩基の非相補状況および欠損状況を認識していることが明らかであり、同一アレー電極上にて、同時に多種の変異を検出できていることが分かる。

実施例３；

（塩基変異定量）

（１）プローブの固定化における操作工程は、実施例１と同様にして行った。即ち、アレー金電極（計１５本を５本一組でＡ～Ｃにグループ分け）を用い、Ａ～Ｃの全ての電極ピン先端に１０pmol/μＬの一塩基変異プローブ（実施例１で用いたものと同一オリゴの一塩基変異プローブ）を１μＬ乗せ、固定化処理を行った。

（２）電気化学的試薬が含まれない測定用電解バッファー（酢酸カリウム、塩化カリウムの混合バッファー）中にアレー電極を浸漬させて洗浄を行った。これらによって、非特異的結合ＤＮＡの除去を行った。

（３）プローブ固定化後のＤＰＶレスポンスを測定（i1）した。

（４）ハイブリダイゼーション反応を行うため反応溶液を調製した。反応溶液には、最終濃度で1ＸＴ4ＤＮＡリガーゼバッファー、ハイブリダイゼーションできるだけの塩、１０pmol/μＬの各特殊ターゲット(正常、正常と一塩基変異の混合（各々５pmol/μＬ)、一塩基変異）が含まれている。

（５)特殊ターゲットは、Ａ～Ｃの各電極ピンに１μＬずつアプライし、固定化プローブとのハイブリダイゼーション反応を室温で１時間行った。

（６）前記（２）で用いた電解バッファーを用いて、室温で５分間、電極ピンの浸漬洗浄を行った。この工程により、ハイブリしないで残存している特殊ターゲットを排除することができる。

（７）連結反応を行うため連結反応溶液を調製した。反応溶液には、最終濃度でＴ4ＤＮＡリガーゼ３５units/μＬ、1ＸＴ4ＤＮＡリガーゼバッファー、ハイブリダイゼーションにより形成されたＤＮＡのハイブリッド（２本鎖ＤＮＡ）を解離させない程度の塩が含まれている。

（８）連結反応用溶液をＡ～Ｃの各電極ピンに１μＬずつアプライし、固定化プローブとの連結反応を行った。反応は、室温で１時間行った。

（９）連結反応していない特殊ターゲットを除去するため、前記（２）で用いた電解バッファーに変性剤を含ませて、浸漬洗浄を行った。

（１０）連結反応におけるＤＰＶレスポンス測定（i2）を行った。

以上の測定結果を表３及び図１０に示す。

〔表３〕

Group	i1 (nA)	i2(nA)	ΔCRV (%)		i1 (nA)	i2 (nA)	ΔCRV (%)
A	1201	1595	32.8	平均値	710.0	988.8	41.1
	575	875	52.2	標準偏差	329.3	409.9	8.5
	569	776	36.4	変動係数	46.4%	41.5%	20.7%
	495	709	43.2				
B	1066	1407	32.0	平均値	1129.8	1415.0	26.6
	596	783	31.4	標準偏差	404.7	461.2	5.9
	1538	1865	21.3	変動係数	35.8%	32.6%	22.2%
	1319	1605	21.7				
C	1423	1476	3.7	平均値	1366.0	1438.8	6.2
	1734	1734	0.0	標準偏差	288.4	230.6	5.5
	1052	1184	12.5	変動係数	21.1%	16.0%	88.6%
	1255	1361	8.4				

注釈：ΔCRVは、coupling reaction valueの意（ΔCRV＝i2-i1/i1X100）。

表３、図１０に見られるように、一塩基変異プローブを用いて、一塩基変異特殊ターゲット（１０pmol/μＬ）、一塩基変異特殊ターゲット（５pmol/μＬ）および正常特殊ターゲット（５pmol/μＬ）の混合ターゲット、また、正常特殊ターゲット（１０pmol/μＬ）の３種について変異検出測定を行った結果、一塩基変異特殊ターゲットが存在しない正常特殊ターゲットでは、６．２％（ノイズレスポンス）程度の連結反応値が検出されている。一方、一塩基変異特殊ターゲットでは、４１．１％の大きな連結反応値が得られ、また、混合特殊ターゲットでは、その約半分量の連結反応値が得られている。上記ノイズレスポンス分を差し引くと、これらの連結反応値と検出ターゲット濃度との間には正の相関関係が成り立っており、この検出システムが、定量分析としての機能を備えていることが分かる。

実施例４；

（一塩基変異検出）

（１）プローブの固定化における操作工程は、実施例１と同様にして行った。即ち、アレー金電極（計２４本を４本一組でＡ～Ｆにグループ分

け）を用い、このうちＡ～Ｃの電極ピン先端に１０pmol/μＬの下記正常プローブを1μＬ、Ｄ～Ｆには同濃度の下記一塩基変異プローブを1μＬ乗せ、固定化処理を行った。

＜固定化プローブ＞

正常プローブ：実施例１で用いたものと同一オリゴのプローブ

一塩基変異プローブ：実施例１で用いたものと同一オリゴのプローブ

（２）プローブ固定化後のＤＰＶレスポンスを測定（i1）した。

（３）ハイブリダイゼーション及び連結反応を同時に行うための反応溶液３種類（オリゴ特殊ターゲット、ＰＣＲ特殊ターゲット、Ａ-ＰＣＲ特殊ターゲット）を調製し、電極Ａ及びＤに対してはオリゴ合成による特殊ターゲット、Ｂ及びＥには、ゲノムサンプルから調整したＰＣＲ産物としての特殊ターゲット（カラム精製済み)、そして、Ｃ及びＦには、ゲノムサンプルから調整したＡ-ＰＣＲ産物としての特殊ターゲット(カラム精製済み）を各電極ピンに 1μＬずつアプライし、固定化プローブとのハイブリダイゼーション反応および連結反応を行った。反応溶液は、各特殊ターゲットと最終濃度でＴ4ＤＮＡリガーゼ３５units/μＬ、1Ｘ Ｔ4ＤＮＡリガーゼバッファー、ハイブリダイゼーションできるだけの塩になるように混合調製した。

＜特殊ターゲット＞３種

あ）オリゴ特殊ターゲット：(実施例１と同一オリゴのターゲット)

い）ＰＣＲ産物としての特殊ターゲット：

特殊プライマー：agctccaactaccacggcctgctgaaaatgactgaatataaacttg（４６mer)

カウンタープライマー：ttctgaattagctgtatcgtcaag （２４mer)

上記２種のプライマーを用い、テンプレートには精製ヒトゲノムＤＮＡを使用して下記の条件でＰＣＲを行った。

１．９５℃, 5 min

２．９５℃，３０sec

３．６５℃，３０sec

４．７２℃，１５sec

５．２．～４．を３０回

６．０℃，３min

上記条件の下合成されたＰＣＲ産物をカラム精製し、ＰＣＲ特殊ターゲットとして使用した。

う）Ａ-ＰＣＲ産物としての特殊ターゲット：

特殊プライマー：agctccaactaccacggcctgctgaaaatgactgaatataaacttg (46mer)

上記１種類の特殊プライマーと（い）で得られたＰＣＲ産物特殊ターゲットをテンプレートとして下記の条件でＡ-ＰＣＲを行った。

１．９５℃, 5 min

２．９５℃，３０sec

３．７０℃，３０sec

４．７２℃，１５sec

５．２．～４．を３０回

６．０℃，３min

上記条件の下合成されたＡ-ＰＣＲ産物をカラム精製し、Ａ-ＰＣＲ特殊ターゲットとして使用した。

（４）反応溶液の残液を除去した。

（５）ハイブリダイゼーション・連結反応後のＤＰＶレスポンスを測定(i2)した。

以上の測定結果を表４及び図１１に示す。

〔表４〕

Group	i1 (nA)	i2 (nA)	ΔCRV (%)		i1 (nA)	i2 (nA)	ΔCRV (%)
A	899	1279	42.3	平均値	898.8	1303.0	45.5
	770	1134	47.3	標準偏差	153.2	184.9	5.2
	812	1234	52.0	変動係数	17.0%	14.2%	11.4%
	1114	1565	40.5				
B	912	1199	31.5	平均値	974.3	1275.8	31.0
	923	1276	38.2	標準偏差	85.5	111.3	5.8
	1098	1433	30.5	変動係数	8.8%	8.7%	18.8%
	964	1195	24.0				
C	891	1187	33.2	平均値	893.3	1213.3	36.2
	763	1099	44.0	標準偏差	149.4	179.1	5.2
	816	1093	33.9	変動係数	16.7%	14.8%	14.4%
	1103	1474	33.6				
D	786	856	8.9	平均値	757.0	818.0	8.0
	791	871	10.1	標準偏差	70.9	83.7	1.8
	800	852	6.5	変動係数	9.4%	10.2%	22.8%
	651	693	6.5				
E	1254	1328	5.9	平均値	849.8	932.8	10.6
	789	852	8.0	標準偏差	285.5	282.2	4.4
	582	660	13.4	変動係数	33.6%	30.3%	41.2%
	774	891	15.1				
F	1118	1246	11.4	平均値	819.5	911.3	11.1
	793	869	9.6	標準偏差	215.6	244.9	2.5
	604	657	8.8	変動係数	26.3%	26.9%	22.7%
	763	873	14.4				

注釈: ΔCRV は、coupling reaction value の意（算出式 ΔCRV＝i2-i1/i1X100）。

表４、図１１に見られるように、正常ヒトゲノムにおける一塩基変異識別能テストでは、オリゴ正常特殊ターゲットの認識結果と同様に、ＰＣＲ産物の正常特殊ターゲット及びＡ－ＰＣＲ産物の正常特殊ターゲットは供に、正常プローブ側で高いレスポンス（ＰＣＲ／３１％、Ａ－ＰＣＲ／３６．２％）を示し、一塩基変異プローブ側では、オリゴ正常特殊ターゲットとほぼ同程度の小さいレスポンス（ＰＣＲ／１０．６％、Ａ－ＰＣＲ／１１．１％）しか検出されなかった。これらのことから、本発明の検出法・検出システムにおいて、ＰＣＲ及びＡ－ＰＣＲ産物を用いても塩基変異識別能は良好であることが証明されると同時に、精製ゲノムＤＮＡを出発サンプルとしての塩基変異検出も可能であることが実証された。

実施例５；

（一塩基変異検出）

（１）アレー金電極（計２４本を６本一組でＡ～Ｄにグループ分け。１ピンＮはコントロール）を用い、このうちＡ及びＣの電極ピン先端には０．８pmol／μＬの下記正常プローブを２μＬ乗せ、Ｂ及びＤの電極ピン先端には同濃度の下記一塩基変異プローブを２μＬ乗せ、固定化処理を行った。

＜固定化プローブ＞

正常プローブ：

ア）構造／HS-$(CH_2)_6$-gttgtcctagcacctgacgcctcgttgtacatcagagacg

イ）オリゴヌクレオチド部／配列長４０塩基

ウ）電極固定部／チオール基

エ）リンカー部／炭素数６のアルカン鎖

オ）３’末端塩基に正常型塩基を有する（Ｇ）

一塩基変異プローブ：

ア）構造／HS-$(CH_2)_6$-gttgtcctagcacctgacgcctcgttgtacatcagagaca

イ）オリゴヌクレオチド部／配列長４０塩基

ウ）電極固定部／チオール基

エ）リンカー部／炭素数６のアルカン鎖

オ）３’末端塩基に変異型塩基を有する（Ａ）

（２）変性剤にアレー電極を浸漬させて洗浄を行った。その後さらに純水にてアレー電極の洗浄を行った。これらによって、非特異的結合ＤＮＡの除去を行った。

（３）この段階で金電極表面に固定化されたプローブ量を確かめるために、１回目のＤＰＶ測定を行った。即ち、金電極に固定されたプローブ

（一本鎖ＤＮＡの状態のもの）について、二本鎖特異的電気化学的試薬溶液を用いて、プローブ固定化後のＤＰＶレスポンスを測定（i1）した。

（４）ハイブリダイゼーション及び連結反応を同時に行うための反応溶液を調製した。反応溶液には、Ｔ４ＤＮＡリガーゼ、１×Ｔ４ＤＮＡリガーゼバッファー、ハイブリダイゼーションできるだけの塩、そして、10pmol/μＬの各ターゲット（特殊ターゲット・従来型 1st/2nd ターゲット 10pmol/μＬずつ）が含まれている。

＜特殊ターゲット＞

本オリゴ合成による特殊ターゲットは、ゲノムＤＮＡから伸長反応（酵素伸長反応、ＰＣＲ法反応、Ａ－ＰＣＲ法反応）によって得られる産物を想定して構築。

特殊ターゲット：

ア）構造；

(P)-gagcattttacaccttgaagaccctccctttggaatggcacagggtacgtcttcaaggtgtaaaatgctccgtctctgatgtacaacgaggcgtcaggtgctaggaca

イ）オリゴヌクレオチド／配列長１０８塩基

ウ）５’末端塩基部／燐酸基付加

エ）５’末端塩基から数えて２３～４８番目の塩基配列はループ形成（折り返し）領域

オ）５’末端塩基から数えて１～２２番目と４９～７０番目の塩基はループ形成時に相補的配列となる領域

カ）５’末端塩基から数えて７１番目、本特殊ターゲットの（オ）で形成されるハイブリ領域の下流直ぐに隣り合う塩基は、変異を起こす塩基部位に相当する配置設定（正常型塩基　Ｃ）

キ）本特殊ターゲットの（オ）で形成されるハイブリ領域の下流には、３８塩基存在し、プローブに対して３８塩基の相補的配列を所有するよ

う構築。

従来型 1st/2nd ターゲット：

ア）構造（従来型 1st ターゲット）；

cctccctttggaatggcacagggtacgtcttcaaggtgtaaaatgctccgtctctgatgtacaac

gaggcgtcaggtgctaggaca

イ）オリゴヌクレオチド／配列長８６塩基

ウ）５’末端塩基から数えて４９番目、本特殊ターゲットの（オ）で形成されるハイブリ領域の下流直ぐに隣り合う塩基は、変異を起こす塩基部位に相当する配置設定（正常型塩基　C）

エ）５’末端塩基から数えて１～２６番目の塩基配列は、特殊ターゲットにおけるループ形成（折り返し）領域と同一塩基・同一長の配列

オ）５’末端塩基から数えて２７～４８番目塩基と 2nd ターゲットはハイブリダイゼーション時に相補的配列となり二本鎖を形成する領域

カ）本特殊ターゲットの（オ）で形成されるハイブリ領域の下流には、３８塩基存在し、プローブに対して３８塩基の相補的配列を所有するよう構築。

ア）構造（従来型 2nd ターゲット）；

(P)-gagcattttacaccttgaagac

イ）オリゴヌクレオチド／配列長２２塩基

ウ）５’末端塩基部／燐酸基付加

エ）2nd ターゲットと、1st ターゲットの５’末端塩基から数えて２７～４８番目塩基は、ハイブリダイゼーション時に相補的配列となり二本鎖を形成する領域

（６）ターゲットは、電極Ａ、Ｂに対して特殊ターゲット、電極Ｃ、Ｄに対して従来型 1st/2nd ターゲットの混合物を用い、各電極ピンに１μＬずつアプライし、固定化プローブとのハイブリダイゼーション反応及

び連結反応を試みた。反応は、室温で２時間行った。

（７）前記（３）で行ったものと同様の洗浄方法で、非特異的結合ＤＮＡの除去を行った。

（８）ハイブリダイゼーション及び連結反応後のＤＶＰレスポンスを測定（i2）した。（この時、プローブ固定化時のレスポンスにハイブリダイズした特殊ターゲット分のレスポンスが加算されて高いＤＰＶ値を示す。）　以上の測定結果を表５及び図１２に示す。

〔表５〕

Pin No.	group		i1 (nA)	i2 (nA)	ΔCRV (%)
1	N				-23.1
2 3	A	平均値	477.8	589.7	23.5
4 5		標準偏差	43.2	54.4	5.4
6 7		変動係数	0.1	0.1	0.2
8 9	B	平均値	393.3	405.5	3.1
10 11		標準偏差	24.1	29.9	4.6
12 13		変動係数	0.1	0.1	1.5
14 15	C	平均値	433.5	454.5	4.6
16 17		標準偏差	29.4	51.6	6.0
18 19		変動係数	0.1	0.1	1.3
20 21	D	平均値	296.8	294.8	1.1
22 23		標準偏差	64.8	45.1	10.1
24 25		変動係数	0.2	0.2	9.3

表５、図１２に見られるように、特殊ターゲットを用いた場合には、正常および一塩基変異プローブとの連結反応値において、特異的であり顕著な有意差（正常２０．５％、一塩基変異２．３％）が見られたことから、一塩基変異を識別できていることが分かる。

一方、従来型 1st/2nd ターゲットでは、有意差はあるもののその違いは大きくなく（正常９．１％、一塩基変異１．４％）、二本鎖特異的インターカレータでの検出には向いていないことが示された。従来型 1st/2nd ターゲットに見られるレスポンスは、インターカレータの一本鎖非特異的結合によるものと思われる。このことから、本発明の検出法は、二本鎖特異的インターカレータを用いた解析において、従来方法より検出感度において優れていることが分かった。

実施例６；

（一塩基変異検出）

（Ａ）蛍光マイクロアレイスライド作製

（１）蛍光マイクロアレイ用スライドガラスを用い、この表面に正常プローブ、ヘテロプローブ（正常プローブと一塩基変異プローブを１：１混合したもの）、並びに一塩基変異プローブをスポッティングし、プローブの５’末端アミノ基をガラス表面に固定化した。スポッティングには、２５μＭの各プローブ溶液を用い、各プローブ１１スポットずつ、直径２００μｍの円形になるようスポッティングした。

正常プローブ：

ア）構造／NH_2-gaatt agctg tatcg tcaag gcact cttgc ctacg ccacc

イ）オリゴヌクレオチド部／配列長４０塩基

ウ）ガラス表面固定部／アミノ基

エ）３’末端塩基に正常型塩基を有する（Ｃ）

一塩基変異プローブ：

ア）構造／NH_2-gaatt agctg tatcg tcaag gcact cttgc ctacg ccacg

イ）オリゴヌクレオチド部／配列長４０塩基

ウ）ガラス表面固定部／アミノ基

エ）３’末端塩基に変異型塩基を有する（G）

（２）マイクロアレイスライドに、固定化後処理及び洗浄を施した。即ち、０．２％ＳＤＳで２分間洗浄、超純水で２回洗浄、０．３Ｎ NaOHで５分間洗浄、超純水で２回洗浄、沸騰した超純水中で２分間煮沸、冷エタノールに３分間浸漬、圧縮窒素ガスで乾燥、の各工程を行った。

（Ｂ）蛍光標識特殊ターゲット調製

（３）本発明の検出法に用いる、蛍光標識特殊ターゲットを調製した。即ち、鋳型ＤＮＡ、特殊プライマー、並びにカウンタープライマーを用いてＰＣＲ及びＡｓｙｍｍｅｔｒｉｃａｌ－ＰＣＲを行い、新たに合成されるオリゴＤＮＡにアミノアリルｄＵＴＰを取り込ませ、蛍光物質Ｃｙ３とカップリングさせるアミノアリル法に準拠して、変異型ターゲット（蛍光標識特殊ターゲット）を調製した。

＜蛍光標識特殊ターゲット＞

変異型ターゲット：

ア）構造；

(P)-**agctc caact accac** ggcct gctga aaatg actga atata aactt **gtggt agttg gagct cgtgg cgtag gcaag agtgc c**

イ）オリゴヌクレオチド／配列長８２塩基、ただしＴ残基のうち一部がアミノアリルｄＵＴＰに置換し、そのアミノアリル部に蛍光物質Ｃｙ３が付加したもの

ウ）５’末端塩基部／燐酸基付加

エ）５’末端塩基から数えて１６～４５番目の塩基配列はループ形成（折

り返し）領域

オ）５’末端塩基から数えて１～１５番目と４６～６０番目の塩基はループ形成時に相補的配列となる領域

カ）５’末端塩基から数えて６１番目、本特殊ターゲットの（オ）で形成されるハイブリ領域の下流直ぐに隣り合う塩基は、変異を起こす塩基部位に相当する配置設定（変異型塩基　C）

キ）本特殊ターゲットの（オ）で形成されるハイブリ領域の下流には、２０塩基存在し、プローブに対して２０塩基の相補的配列を所有するよう構築

＜蛍光標識特殊ターゲット調製＞

（４）変異型ターゲットの調製は、まず変異型鋳型ＤＮＡ、特殊プライマー、及びカウンタープライマーを用いたＰＣＲ反応を行った。反応溶液は、１×Ｔａｑ Ｂｕｆｆｅｒ（Hot Start 用）、ｄＮＴＰ 各２５０μＭ、特殊プライマー １ｐｍｏｌ／μｌ、カウンタープライマー １ｐｍｏｌ／μｌ、鋳型ＤＮＡ ０．２ｐｍｏｌ／μｌ、Ｔａｑ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ０．０５ｕｎｉｔ／μｌ にて、９５℃で２．５分反応後、９５℃３０秒・５８℃３０秒・７２℃１０秒の反応を４０サイクル繰り返した。

変異型鋳型ＤＮＡ：

ア）構造；

agctc caact accac ggcct gctga aaatg actga atata aactt gtggt agttg gagct cgtgg cgtag gcaag agtgc

イ）オリゴヌクレオチド／配列長８１塩基

ウ）５’末端塩基部／燐酸基付加

特殊プライマー：

ア）構造；

(P)-agctc caact accac ggcct gctga aaatg actga atata aactt g

イ）オリゴヌクレオチド／配列長４６塩基

ウ）５’末端塩基部／燐酸基付加

カウンタープライマー：

ア）構造；

ggcac tcttg cctac gccac

イ）オリゴヌクレオチド／配列長２０塩基

（５）（４）にて得られたＰＣＲ産物と特殊プライマーを用い、Ａｓｙｍｍｅｔｒｉｃａｌ－ＰＣＲを行って、アミノアリルｄＵＴＰ標識されたターゲットを得た。反応溶液は、１×Ｔａｑ Ｂｕｆｆｅｒ (Hot Start用）、ｄＧＴＰ・ｄＣＴＰ・ｄＡＴＰ 各２５０μＭ、ｄＴＴＰ １５０μＭ、アミノアリルｄＵＴＰ １００μＭ、特殊プライマー １ｐｍｏｌ／μｌ、ＰＣＲ産物１／１０容、Ｔａｑ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ０．０５ｕｎｉｔ／μｌ にて、９５℃で２．５分反応後、９５℃３０秒・６８．４℃３０秒・７２℃１０秒の反応を４０サイクル繰り返した。

（６）（５）にて得られたアミノアリルｄＵＴＰ標識されたターゲットに、蛍光物質Ｃｙ３をカップリングさせた。即ち、Ａｓｙｍｍｅｔｒｉｃａｌ－ＰＣＲ産物をＭｉｃｒｏｃｏｎ－１０カラムにて脱塩、濃縮したものを、ｓｐｅｅｄ ｖａｃにて乾燥させ、０．１Ｍ $NaHCO_3$ Ｂｕｆｆｅｒ（ｐＨ９．０）に再溶解させた後、ＤＭＳＯにて溶解後ｓｐｅｅｄ ｖａｃにて乾燥させたＣｙ３と混合し、CY3の取り込み反応を室温にて１時間行った。反応後は４Ｍ Ｈｙｄｒｏｘｙｌａｍｉｎｅを加え、Cy3 の不活性化反応を室温にて１５分行い、再びＭｉｃｒｏｃｏｎ－１０カラムにて未反応ｄＮＴＰと不活性化 Cy3 を除去し、濃縮して蛍光標識特殊ターゲットを得た。

（Ｃ）ハイブリダイゼーション、連結反応

（７）ハイブリダイゼーション及び連結反応を同時に行うための反応溶液を調製した。反応溶液には、最終濃度でＴ４ＤＮＡリガーゼ 35units/μL、１×Ｔ４ＤＮＡリガーゼバッファー、ハイブリダイゼーションできるだけの塩、そして、０．７倍容の蛍光標識特殊ターゲットが含まれている。

（８）マイクロアレイスライドのスポット上を覆うようにカバーグラスを載せ、間隙に（７）の反応溶液を入れ、固定化プローブとのハイブリダイゼーション反応及び連結反応を試みた。反応は、室温で２時間行った。

（９）純水中にてカバーグラスを除去した後、超純水にて流水洗浄、N_2ガスにて乾燥、０．１Ｍ ＮａＯＨ １．５Ｍ ＫＣｌにて１０分浸漬洗浄して、非特異的結合ＤＮＡの除去を行った。その後、再び超純水にて流水洗浄、N_2ガスにて乾燥した後、アレイ解析を行った。

（１０）マイクロアレイスライドのスキャンには、マイクロアレイスキャナーＧｅｎｅＰｉｘ２５０５Ｂを用いスキャン画像を得て、ＧｅｎｅＰｉｘ Ｐｒｏにて数値化した。

（１１）数値化されたデータより、（シグナルのメディアン－バックグラウンドのメディアン）を計算し、平均と標準偏差を算出し、実験結果とした。（この時、固定化されたプローブに連結した蛍光標識特殊ターゲット分の蛍光強度が示される。）

以上の測定結果を、表６及び図１３に示す。

表６および図１３に見られるように、変異型ターゲットと完全に相補的な一塩基変異 Ｋ－ｒａｓ Ｍ プローブのスポットにおいては、特異的で強い蛍光強度が測定されている一方で、正常プローブ Ｋ－ｒａｓ Ｗ のスポットではバックグラウンド以下の蛍光強度しか観察されなかった。このことから、本発明の検出法は、蛍光マイクロアレイスライドを用い

た解析においても一塩基置換を検出することが可能であることが分かった。また、ヘテロプローブ K－ｒａｓ H においても、その蛍光強度は正常プローブと一塩基変異プローブのおよそ中間の値を示しており、ヘテロ解析においてもその有効性が示され、このことからも、本発明の SMMD 法が優れていることが分かった。

〔表６〕

検出プローブ種	蛍光強度平均値	標準偏差
K-ras W	-3666	723
K-ras H	3587	859
K-ras M	9297	680

プローブ説明：K-ras W／正常遺伝子検出用プローブ、
K-ras H／ヘテロ変異遺伝子検出用プローブ、
K-ras M／ホモ変異遺伝子検出用プローブ。

実施例７；

（一塩基欠損検出）

（A）蛍光マイクロアレイスライド作製

（１）蛍光マイクロアレイ用スライドガラスを用い、この表面に正常プローブ、ヘテロプローブ（正常プローブと一塩基欠損プローブを１：１混合したもの）、及び一塩基欠損プローブをスポッティングし、プローブの５’末端アミノ基をガラス表面に固定化した。スポッティングには、２５μMの各プローブ溶液を用い、各プローブ１１スポットずつ、直径２００μｍの円形になるようスポッティングした。

正常プローブ：

ア）構造／NH_2-tggaggtacttttcagccaggatgtaacattggagaag

イ）オリゴヌクレオチド部／配列長３８塩基

ウ）ガラス表面固定部／アミノ基

エ）３’末端塩基に正常型塩基を有する（Ｇ）

一塩基欠損プローブ：

ア）構造／NH_2-atggaggtacttttcagccaggatgtaacattggagaa

イ）オリゴヌクレオチド部／配列長３８塩基

ウ）ガラス表面固定部／アミノ基

エ）３’末端塩基に、正常プローブに比して一塩基の欠損を有する

（２）マイクロアレイスライドに、固定化後処理及び洗浄を施した。即ち、０．２％ＳＤＳで２分間洗浄、超純水で２回洗浄、０．３Ｎ NaOHで５分間洗浄、超純水で２回洗浄、沸騰した超純水中で２分間煮沸、冷エタノールに３分間浸漬、圧縮窒素ガスで乾燥、の各工程を行った。

（Ｂ）蛍光標識特殊ターゲット調製

（３）本発明の検出法に用いる、蛍光標識特殊ターゲットを調製した。即ち、鋳型ＤＮＡ・特殊プライマー・カウンタープライマーを用いてＰＣＲ及びＡｓｙｍｍｅｔｒｉｃａｌ－ＰＣＲを行い、新たに合成されるオリゴＤＮＡにアミノアリルｄＵＴＰを取り込ませ、蛍光物質Ｃｙ３とカップリングさせるアミノアリル法に準拠して、正常型ターゲット（蛍光標識特殊ターゲット）を調製した。

＜蛍光標識特殊ターゲット＞

正常型ターゲット：

ア）構造；

(P)-ctatc cgcgt gattg cctaa ataat attta cctcc aagtc ctctc tctgc aatca cgcgg atagc ttctc caatg ttaca tcctg gc

イ）オリゴヌクレオチド／配列長８７塩基、ただしＴ残基のうち一部がアミノアリルｄＵＴＰに置換し、そのアミノアリル部に蛍光物質Ｃｙ３が付加したもの

ウ）５’末端塩基部／燐酸基付加

エ）５’末端塩基から数えて１７～４８番目の塩基配列はループ形成（折り返し）領域

オ）５’末端塩基から数えて１～１６番目と４９～６４番目の塩基はループ形成時に相補的配列となる領域

カ）５’末端塩基から数えて６５番目、本特殊ターゲットの（オ）で形成されるハイブリ領域の下流直ぐに隣り合う塩基は、欠損を起こす塩基部位に相当する配置設定（正常型塩基　C）

キ）本特殊ターゲットの（オ）で形成されるハイブリ領域の下流には、２２塩基存在し、プローブに対して２２塩基の相補的配列を所有するよう構築

＜蛍光標識特殊ターゲット調製＞

（４）正常型ターゲットの調製は、まずそれぞれ正常型鋳型ＤＮＡ、特殊プライマー、カウンタープライマーを用いたＰＣＲ反応を行った。反応溶液は、１×Ｔａｑ　Ｂｕｆｆｅｒ（HOT START 用）、ｄＮＴＰ 各２５０μM、特殊プライマー　１ｐｍｏｌ／μｌ、カウンタープライマー　１ｐｍｏｌ／μｌ、鋳型ＤＮＡ　０．２ｐｍｏｌ／μｌ、Ｔａｑ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　０．０５ｕｎｉｔ／μｌ にて、９５℃で２．５分反応後、９５℃３０秒・５８℃３０秒・７２℃１０秒の反応を４０サイクル繰り返した。

正常型鋳型ＤＮＡ：

ア）構造；

ctatc cgcgt gattg cctaa ataat attta cctcc aagtc ctctc tctgc aatca cgcgg atagc ttctc caatg ttaca tcctg gc

イ）オリゴヌクレオチド／配列長８７塩基

ウ）５’末端塩基部／燐酸基付加

特殊プライマー：

ア）構造；

(P)-ctatc cgcgt gattg cctaa ataat attta cctcc aagtc ctctc tct

イ）オリゴヌクレオチド／配列長４８塩基

ウ）５’末端塩基部／燐酸基付加

カウンタープライマー：

ア）構造；

gccag gatgt aacat tggag aa

イ）オリゴヌクレオチド／配列長２２塩基

（５）（４）にて得られたＰＣＲ産物と特殊プライマーを用い、Ａｓｙｍｍｅｔｒｉｃａｌ－ＰＣＲを行って、アミノアリルｄＵＴＰ標識されたターゲットを得た。反応溶液は、１×Ｔａｑ Ｂｕｆｆｅｒ（HOT START用）、ｄＧＴＰ・ｄＣＴＰ・ｄＡＴＰ 各２５０μＭ、ｄＴＴＰ １５０μＭ、アミノアリルｄＵＴＰ １００μＭ、特殊プライマー １ｐｍｏｌ／μｌ、ＰＣＲ産物１／１０容、Ｔａｑ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ０．０５ｕｎｉｔ／μｌ にて、９５℃で２．５分反応後、９５℃３０秒・７０℃３０秒・７２℃１０秒の反応を４０サイクル繰り返した。

（６）（５）にて得られたアミノアリルｄＵＴＰ標識されたターゲットに、蛍光物質Ｃｙ３をカップリングさせた。即ち、Ａｓｙｍｍｅｔｒｉｃａｌ－ＰＣＲ産物をＭｉｃｒｏｃｏｎ－１０カラムにて脱塩、濃縮したものを、ｓｐｅｅｄ ｖａｃにて乾燥させ、０．１Ｍ $NaHCO_3$ Ｂｕｆｆｅｒ（ｐＨ９．０）に再溶解させた後、ＤＭＳＯにて溶解後ｓｐｅｅｄ ｖａｃにて乾燥させたＣｙ３と混合し、CY3の取り込み反応を室温にて１時間行った。反応後は４Ｍ Ｈｙｄｒｏｘｙｌａｍｉｎｅを加え、Cy3 の不活性化反応を室温にて１５分行い、再びＭｉｃｒｏｃｏｎ－１０カラムにて未反応ｄＮＴＰと不活性化 Cy3 を除去し、濃縮して蛍光標

識特殊ターゲットを得た。

（C）ハイブリダイゼーション、連結反応

（7）ハイブリダイゼーション及び連結反応を同時に行うための反応溶液を調製した。反応溶液には、最終濃度でＴ４ＤＮＡリガーゼ 35units/μL、１×Ｔ４ＤＮＡリガーゼバッファー、塩、そして、０．７倍容の蛍光標識特殊ターゲットが含まれている。

（8）マイクロアレイスライドのスポット上を覆うようにカバーグラスを載せ、間隙に（7）の反応溶液を入れ、固定化プローブとのハイブリダイゼーション反応及び連結反応を試みた。反応は、室温で２時間行った。

（9）純水中にてカバーグラスを除去した後、超純水にて流水洗浄、N_2ガスにて乾燥、０．１Ｍ ＮａＯＨ １．５Ｍ ＫＣｌにて１０分浸漬洗浄して、非特異的結合ＤＮＡの除去を行った。その後、再び超純水にて流水洗浄、N_2ガスにて乾燥した後、アレイ解析を行った。

（１０）マイクロアレイスライドのスキャンには、マイクロアレイスキャナーＧｅｎｅＰｉｘ２５０５Ｂを用いスキャン画像を得て、ＧｅｎｅＰｉｘ Ｐｒｏにて数値化した。

（１１）数値化されたデータより、（シグナルのメディアン－バックグラウンドのメディアン）を計算し、外れ値を除いたものについて平均と標準偏差を算出し、実験結果とした。（この時、固定化されたプローブに連結した蛍光標識特殊ターゲット分の蛍光強度が示される。）

以上の測定結果を表７及び図１４に示す。

〔表７〕

検出プローブ種	蛍光強度平均値	標準偏差
LPL W	9042	664
LPL+arita H	5704	761
arita M	2570	670

プローブ説明：LPL W／正常遺伝子検出用プローブ、
LPL+arita H／ヘテロ変異遺伝子検出用プローブ、
arita M／ホモ変異遺伝子検出用プローブ。

表７および図１４に見られるように、正常型ターゲットと完全に相補的な正常プローブ ＬＰＬ Ｗ のスポットにおいては、特異的で強い蛍光強度が測定されている一方で、一塩基欠損プローブ ａｒｉｔａ Ｍ のスポットではそれに比して弱い蛍光強度しか観察されなかった。このことから、本発明の検出法は、蛍光マイクロアレイスライドを用いた解析においても一塩基欠損を検出することが可能であることが分かった。また、ヘテロプローブ ＬＰＬ＋ａｒｉｔａ Ｈ においても、その蛍光強度は正常プローブと一塩基変異プローブのおよそ中間の値を示しており、ヘテロ解析においてもその有効性が示され、このことからも、本発明の検出法が優れていることが分かった。

実施例８；

（転座検出）

（Ａ）蛍光マイクロアレイスライド作製

（１）蛍光マイクロアレイ用スライドガラスを用い、この表面に転座検出プローブ・正常プローブをスポッティングし、プローブの５’末端アミノ基をガラス表面に固定化した。スポッティングには、２５μＭの各プローブ溶液を用い、各プローブ１１スポットずつ、直径２００μｍの

円形になるようスポッティングした。

転座検出プローブ：

ア）構造／NH_2-catcg tccac tcagc cactg gattt aagca gagtt caa

イ）オリゴヌクレオチド部／配列長３８塩基

ウ）ガラス表面固定部／アミノ基

エ）BCRABL 転座スポットより直ぐ上流を 3’末端とする BCR 塩基配列

正常プローブ：

ア）構造／NH_2-gaagg ggctg tcctc gtcct ccagc tgtta tctgg aag

イ）オリゴヌクレオチド部／配列長３８塩基

ウ）ガラス表面固定部／アミノ基

エ）正常 ABL 塩基配列のうち、BCRABL 転座スポットより直ぐ上流を 3’末端とする ABL 塩基配列

（２）マイクロアレイスライドに、固定化後処理及び洗浄を施した。即ち、０．２％ＳＤＳで２分間洗浄、超純水で２回洗浄、０．３N NaOH で５分間洗浄、超純水で２回洗浄、沸騰した超純水中で２分間煮沸、冷エタノールに３分間浸漬、圧縮窒素ガスで乾燥、の各工程を行った。

（Ｂ）蛍光標識特殊ターゲット調製

（３）本発明の検出法に用いる、蛍光標識特殊ターゲットを調製した。即ち、鋳型ＤＮＡ、特殊プライマー、及びカウンタープライマーを用いてＰＣＲ及びＡｓｙｍｍｅｔｒｉｃａｌ－ＰＣＲを行い、新たに合成されるオリゴＤＮＡにアミノアリルｄＵＴＰを取り込ませ、蛍光物質Ｃｙ３とカップリングさせるアミノアリル法に準拠して、転座型ターゲット（蛍光標識特殊ターゲット）を調製した。

＜蛍光標識特殊ターゲット＞

転座型ターゲット：

ア）構造；

(P)-aagcc cttca gcggc cctga ggctc aaagt cagat gctac tggcc tctga agggc ttttg aactc tgctt aaatc cagtg

イ）オリゴヌクレオチド／配列長８０塩基、ただしＴ残基のうち一部がアミノアリルｄＵＴＰに置換し、そのアミノアリル部に蛍光物質Ｃｙ３が付加したもの

ウ）５’末端塩基部／燐酸基付加

エ）５’末端塩基から数えて１７～４１番目の塩基配列はループ形成（折り返し）領域

オ）５’末端塩基から数えて１～１６番目と４２～５７番目の塩基はループ形成時に相補的配列となる領域

カ）５’末端塩基から数えて５８番目、本特殊ターゲットの（オ）で形成されるハイブリ領域の下流直ぐに隣り合う塩基は、転座を起こす塩基部位に相当する配置設定（転座型塩基　Ｔ）

キ）本特殊ターゲットの（オ）で形成されるハイブリ領域の下流には、２２塩基存在し、転座検出プローブに対して２２塩基の相補的配列を所有するよう構築

＜蛍光標識特殊ターゲット調製＞

（４）転座型ターゲットの調製は、まず転座型鋳型ＤＮＡ、特殊プライマー、カウンタープライマーを用いたＰＣＲ反応を行った。反応溶液は、１×Ｔａｑ Ｂｕｆｆｅｒ（HOT START 用）、ｄＮＴＰ 各２５０μＭ、特殊プライマー １ｐｍｏｌ／μｌ、カウンタープライマー １ｐｍｏｌ／μｌ、鋳型ＤＮＡ ０．２ｐｍｏｌ／μｌ、Ｔａｑ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ０．０５ｕｎｉｔ／μｌ にて、９５℃で２．５分反応後、９５℃３０秒・５８℃３０秒・７２℃１０秒の反応を４０サイクル繰り返した。

転座型鋳型ＤＮＡ：

ア）構造；

aagcc cttca gcggc cctga ggctc aaagt cagat gctac tggcc tctga agggc ttttg aactc tgctt aaatc cagtg gctga gtgga cgatg acatt cagaa accca tagag cc

イ）オリゴヌクレオチド／配列長１１７塩基

ウ）５’末端塩基部／燐酸基付加

特殊プライマー：

ア）構造；

(P)-aagcc cttca gcggc cctga ggctc aaagt cagat gctac tg

イ）オリゴヌクレオチド／配列長４２塩基

ウ）５’末端塩基部／燐酸基付加

カウンタープライマー：

ア）構造；

cactg gattt aagca gagtt ca

イ）オリゴヌクレオチド／配列長２２塩基

（５）（４）にて得られたＰＣＲ産物と特殊プライマーを用い、Ａｓｙｍｍｅｔｒｉｃａｌ－ＰＣＲを行って、アミノアリルｄＵＴＰ標識されたターゲットを得た。反応溶液は、１×Ｔａｑ Ｂｕｆｆｅｒ（HOT START用）、ｄＧＴＰ・ｄＣＴＰ・ｄＡＴＰ 各２５０μＭ、ｄＴＴＰ １５０μＭ、アミノアリルｄＵＴＰ １００μＭ、特殊プライマー １ｐｍｏｌ／μｌ、ＰＣＲ産物１／１０容、Ｔａｑ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ０．０５ｕｎｉｔ／μｌ にて、９５℃で２．５分反応後、９５℃３０秒・７０℃３０秒・７２℃１０秒の反応を４０サイクル繰り返した。

（６）（５）にて得られたアミノアリルｄＵＴＰ標識されたターゲットに、蛍光物質Ｃｙ３をカップリングさせた。即ち、Ａｓｙｍｍｅｔｒｉｃａｌ－ＰＣＲ産物をＭｉｃｒｏｃｏｎ－１０カラムにて脱塩、濃縮したものを、ｓｐｅｅｄ ｖａｃにて乾燥させ、０．１Ｍ $NaHCO_3$ Ｂ

ｕｆｆｅｒ（ｐＨ９．０）に再溶解させた後、ＤＭＳＯにて溶解後ｓｐｅｅｄ ｖａｃにて乾燥させたＣｙ３と混合し、CY3の取り込み反応を室温にて１時間行った。反応後は４Ｍ Ｈｙｄｒｏｘｙｌａｍｉｎｅを加え、Cy3 の不活性化反応を室温にて１５分行い、再びＭｉｃｒｏｃｏｎ－１０カラムにて未反応ｄＮＴＰと不活性化 Cy3 を除去し、濃縮して蛍光標識特殊ターゲットを得た。

（Ｃ）ハイブリダイゼーション、連結反応

（７）ハイブリダイゼーション及び連結反応を同時に行うための反応溶液を調製した。反応溶液には、最終濃度でＴ４ＤＮＡリガーゼ 35units/μL、１×Ｔ４ＤＮＡリガーゼバッファー、塩、そして、０．７倍容の蛍光標識特殊ターゲットが含まれている。

（８）マイクロアレイスライドのスポット上を覆うようにカバーグラスを載せ、間隙に（７）の反応溶液を入れ、固定化プローブとのハイブリダイゼーション反応及び連結反応を試みた。反応は、室温で２時間行った。

（９）純水中にてカバーグラスを除去した後、超純水にて流水洗浄、N_2ガスにて乾燥、０．１Ｍ ＮａＯＨ １．５Ｍ ＫＣｌにて１０分浸漬洗浄して、非特異的結合ＤＮＡの除去を行った。その後、再び超純水にて流水洗浄、N_2ガスにて乾燥した後、アレイ解析を行った。

（１０）マイクロアレイスライドのスキャンには、マイクロアレイスキャナーＧｅｎｅＰｉｘ２５０５Ｂを用いスキャン画像を得て、ＧｅｎｅＰｉｘ Ｐｒｏにて数値化した。

（１１）数値化されたデータより、（シグナルのメディアン－バックグラウンドのメディアン）を計算し、外れ値を除いたものについて平均と標準偏差を算出し、実験結果とした。（この時、固定化されたプローブに連結した蛍光標識特殊ターゲット分の蛍光強度が示される。）

以上の測定結果を表８及び図１５に示す。

〔表８〕

検出プローブ種	蛍光強度平均値	標準偏差
BCRABL	16585	1364
ABL	-688	202

プローブ説明：BCRABL／:転座変異検出用プローブ、
ABL／正常 ABL 遺伝子検出用プローブ。

表８および図１５に見られるように、転座型ターゲットと完全に相補的な転座検出プローブ ＢＣＲＡＢＬ のスポットにおいては、特異的で強い蛍光強度が測定されている一方で、正常型プローブ ＡＢＬ のスポットではバックグラウンドとほとんど変わらない蛍光強度しか観察されなかった。このことから、本発明の検出法は、蛍光マイクロアレイスライドを用いた解析においても転座を検出することが可能であることが分かった。

産業上の利用可能性

本発明の検出法によれば、ＤＮＡやＲＮＡ等の塩基配列で、特定位置にある塩基種を決定、定量することができ、一塩基変異、繰り返し塩基配列変異、塩基欠損変異、塩基挿入変異、転座変異等の種々の変異解析を迅速に行うことができる。

請　求　の　範　囲

1．次の（A）～（D）の工程を含むことを特徴とする塩基変異の検出法。

（A）下記の伸張可能なプライマーを作成する工程。

①塩基変異を有する検出対象の核酸の一部と相補的な塩基配列を有し、且つ

②伸長後に3’側に形成される塩基配列のうち変異部位に相当する塩基部位の直ぐ上流側の塩基配列と相補的な塩基配列が、5’末端側に付加されたもの。

③プライマーの作成は、塩基変異を有する検出対象の核酸の変異部位に相当する塩基部位が、伸長後に3’側に形成される塩基配列内に位置するように行う。

（B）該プライマーを、ポリメラーゼ又はクレノー酵素を用いて伸長反応させることにより、ターゲットを作成する工程。

（C）その後、変性により該ターゲットを1本鎖とし、このターゲットを、3’末端領域に前記核酸の変異部位と相補的な塩基が存在するプローブとハイブリダイゼーション反応させる工程。

（D）次いで、ライゲーション反応させる工程。

2．　前記プライマーを、オリゴヌクレオチドの全配列長が33塩基以上で、前記核酸の一部と相補的な前記塩基配列の配列長が20塩基以上でTmが60℃以上、5’末端側に付加された前記塩基配列の配列長が13塩基以上でTmが40～60℃となるように設計する、請求項1記載の塩基変異の検出法。

３．　前記プローブは、その一種が一の固相に対応するように固相に固定されてなる、請求項１又は２記載の塩基変異の検出法。

４．　前記プローブが、配列長が２０塩基以上のオリゴヌクレオチド部とチオール基からなる固相固定部とそれら両部間にアルカン鎖からなるリンカー部とを有する、請求項３記載の塩基変異の検出法。

５．　前記固相として電極を使用し、電気化学法により検出を行う、請求項３又は４記載の塩基変異の検出法。

６．　前記ライゲーション反応後に、電気化学的試薬を反応させ、その際の電気化学的応答を検出する、請求項５記載の塩基変異の検出法。

７．　前記電気化学的試薬は、電気化学的インターカレータである、請求項６記載の塩基変異の検出法。

８．　１本鎖とした前記ターゲットを蛍光標識し、当該蛍光標識ターゲットを用いて前記ハイブリダイゼーション反応及び前記ライゲーション反応させる、請求項１記載の塩基変異の検出法。

９．　前記プローブとして、正常型塩基配列を有するプローブと塩基変異を有するプローブとを混合したヘテロプローブを用いる、請求項８記載の塩基変異の検出法。

１０．　前記ハイブリダイゼーション反応は、核酸がハイブリダイゼーションできるだけの塩を少なくとも含む溶液を用いて行なう、請求項１

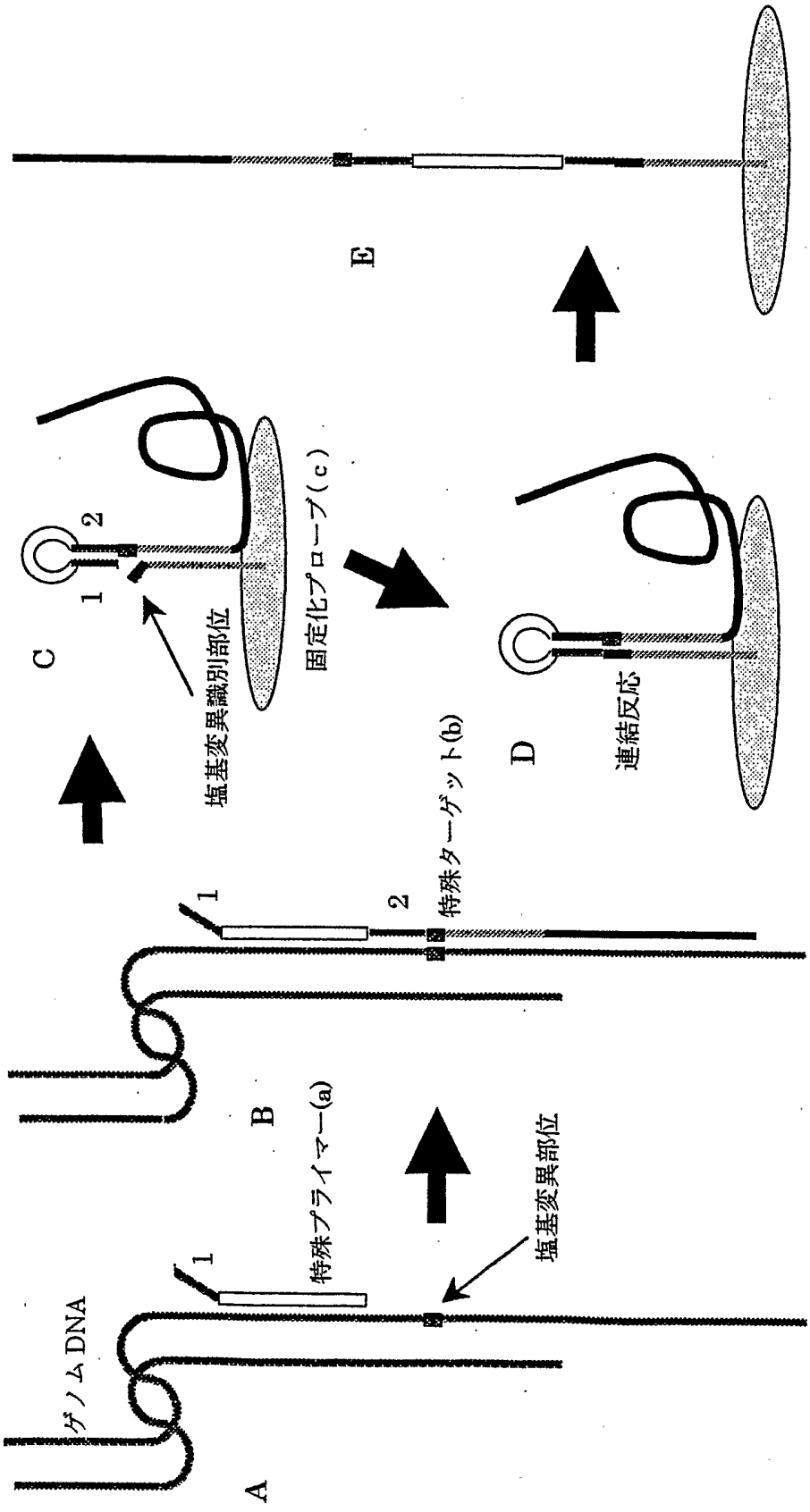
記載の塩基変異の検出法。

１１．　前記ライゲーション反応は、ハイブリダイゼーションにより形成された２本鎖核酸を解離させない程度の塩と、ＤＮＡリガーゼと、該ＤＮＡリガーゼバッファー溶液とを少なくとも含む合成酵素溶液を用いて行なう、請求項１記載の塩基変異の検出法。

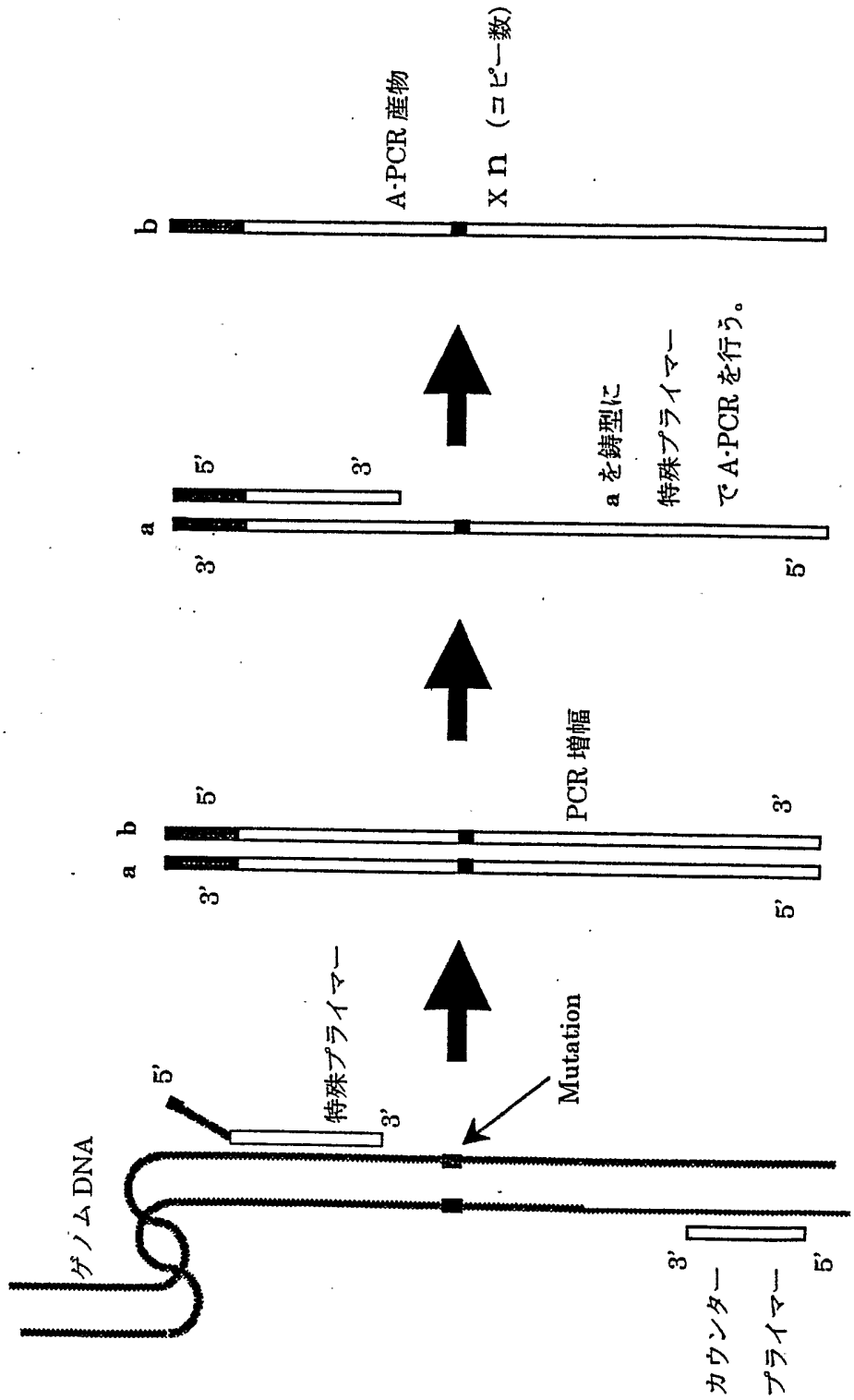
１２．　前記ハイブリダイゼーション反応と前記ライゲーション反応とを、ＤＮＡリガーゼ及び該ＤＮＡリガーゼバッファー溶液を少なくとも含む合成酵素溶液を用いて同時に行う、請求項１記載の塩基変異の検出法。

１３．　請求項１記載の検出法を使用することを特徴とする塩基変異の検出システム。

第 1 図

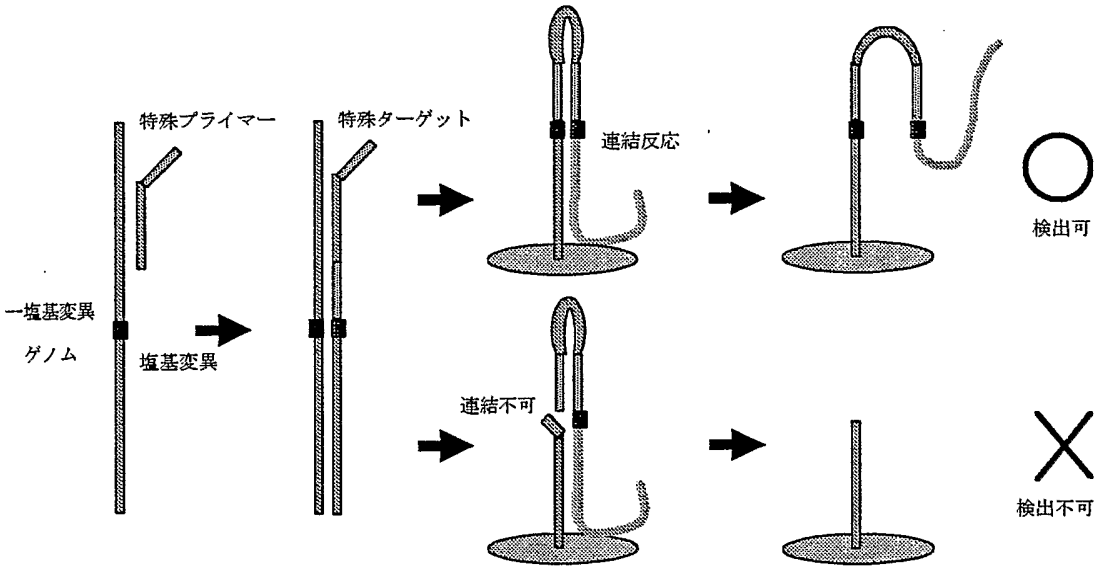

ゲノムDNA
特殊プライマー(a)
塩基変異部位
特殊ターゲット(b)
固定化プローブ(c)
塩基変異識別部位
連結反応
A
B
C
D
E
1
2

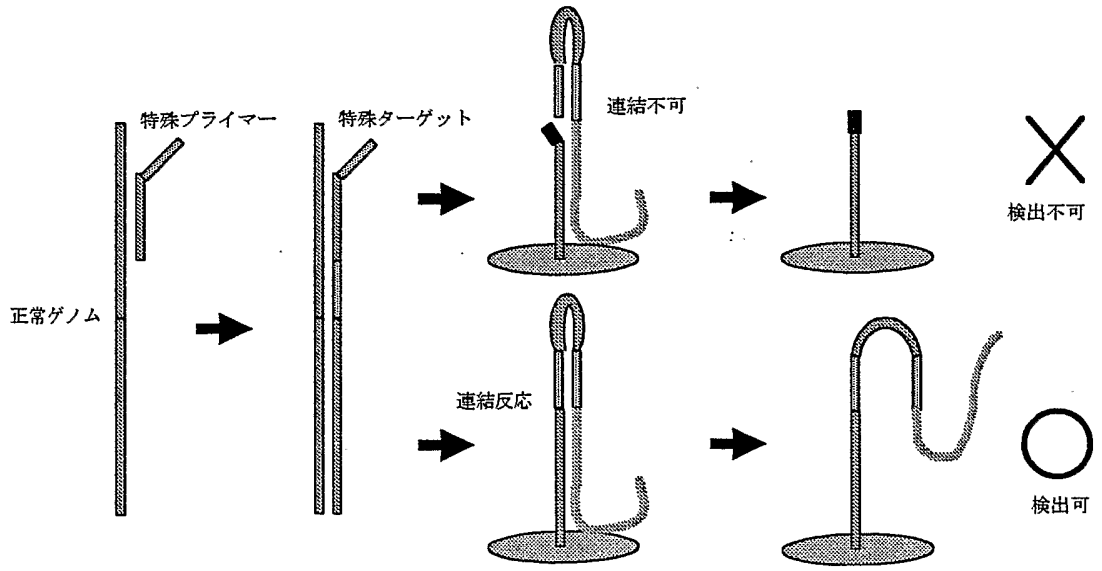
第 2 図


ゲノム DNA
5'
特殊プライマー
3'
Mutation
a b
5'
3'
3'
5'
PCR 増幅
a
5'
3'
3'
5'
a を鋳型に
特殊プライマー
で A-PCR を行う。
b
A-PCR 産物
X n （コピー数）
3'
5'
カウンター
プライマー

第 3 図

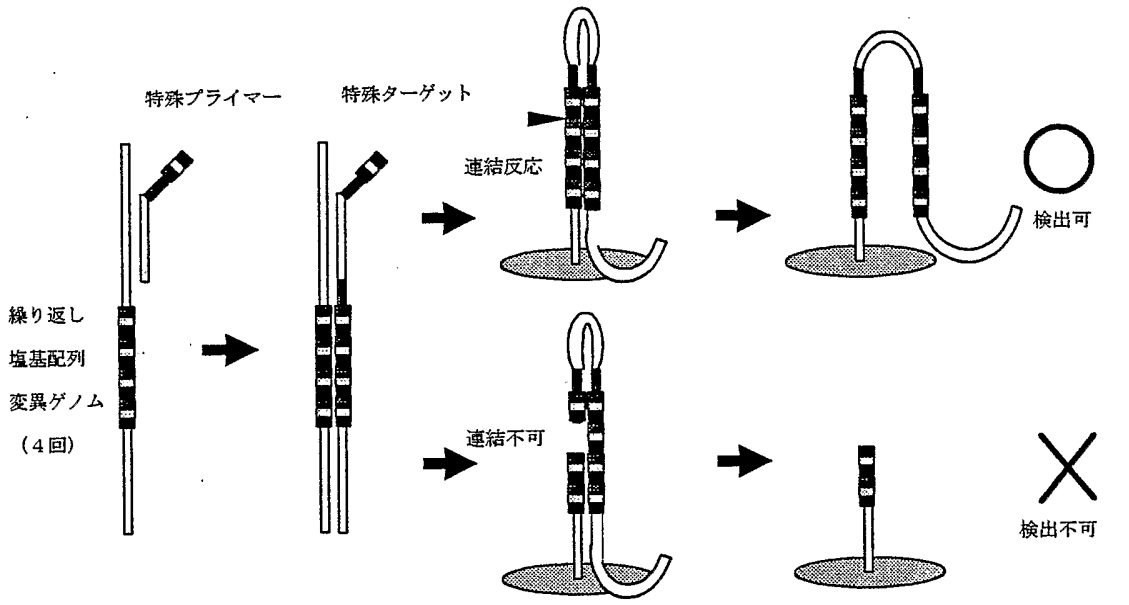
一塩基変異：

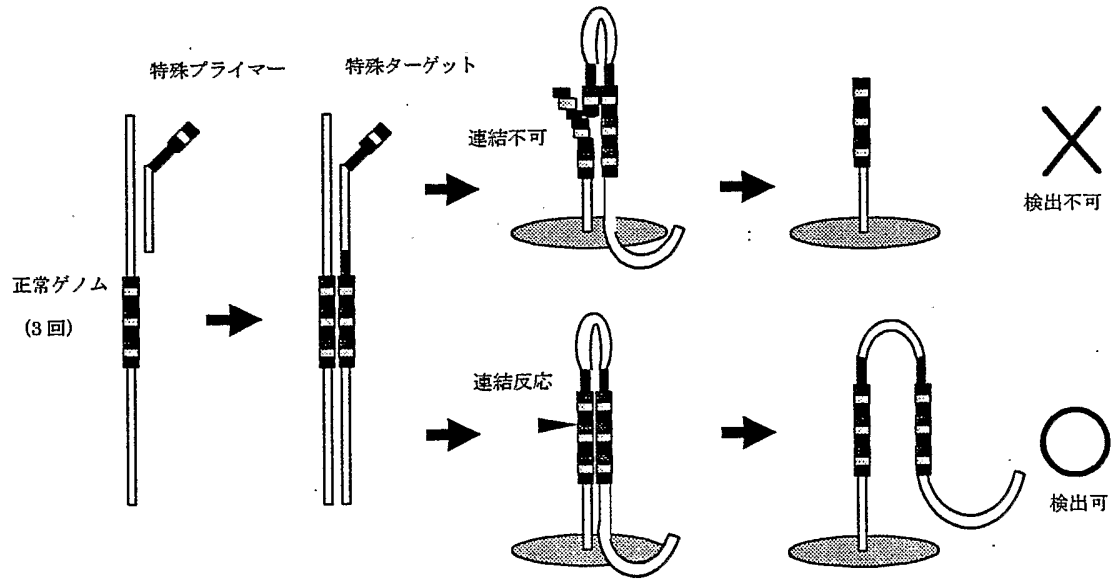

特殊プライマー
特殊ターゲット
連結反応
検出可
一塩基変異
ゲノム
塩基変異
連結不可
検出不可


特殊プライマー
特殊ターゲット
連結不可
検出不可
正常ゲノム
連結反応
検出可

第 4 図

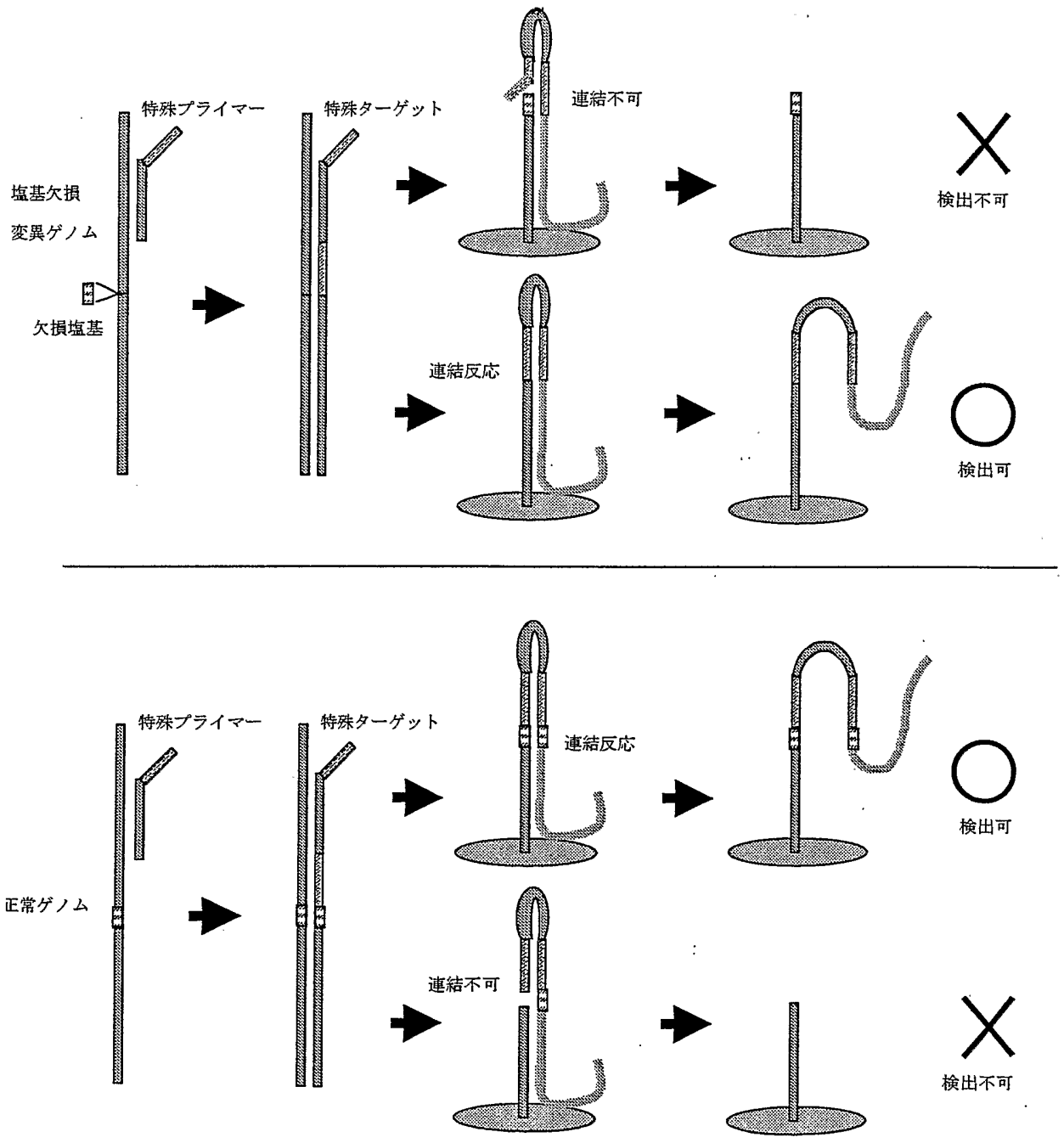
繰り返し塩基配列変異：





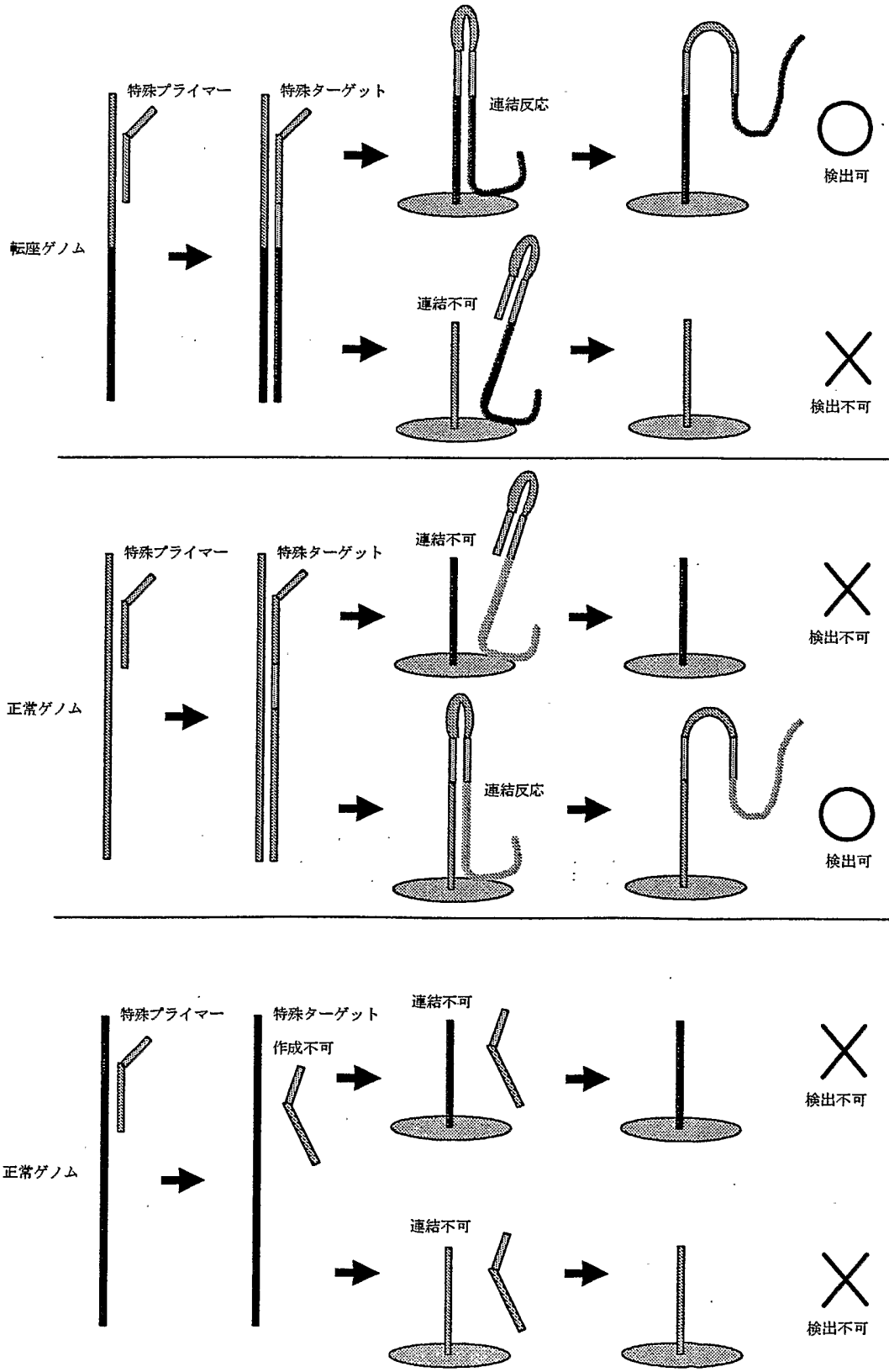
塩基欠損変異：

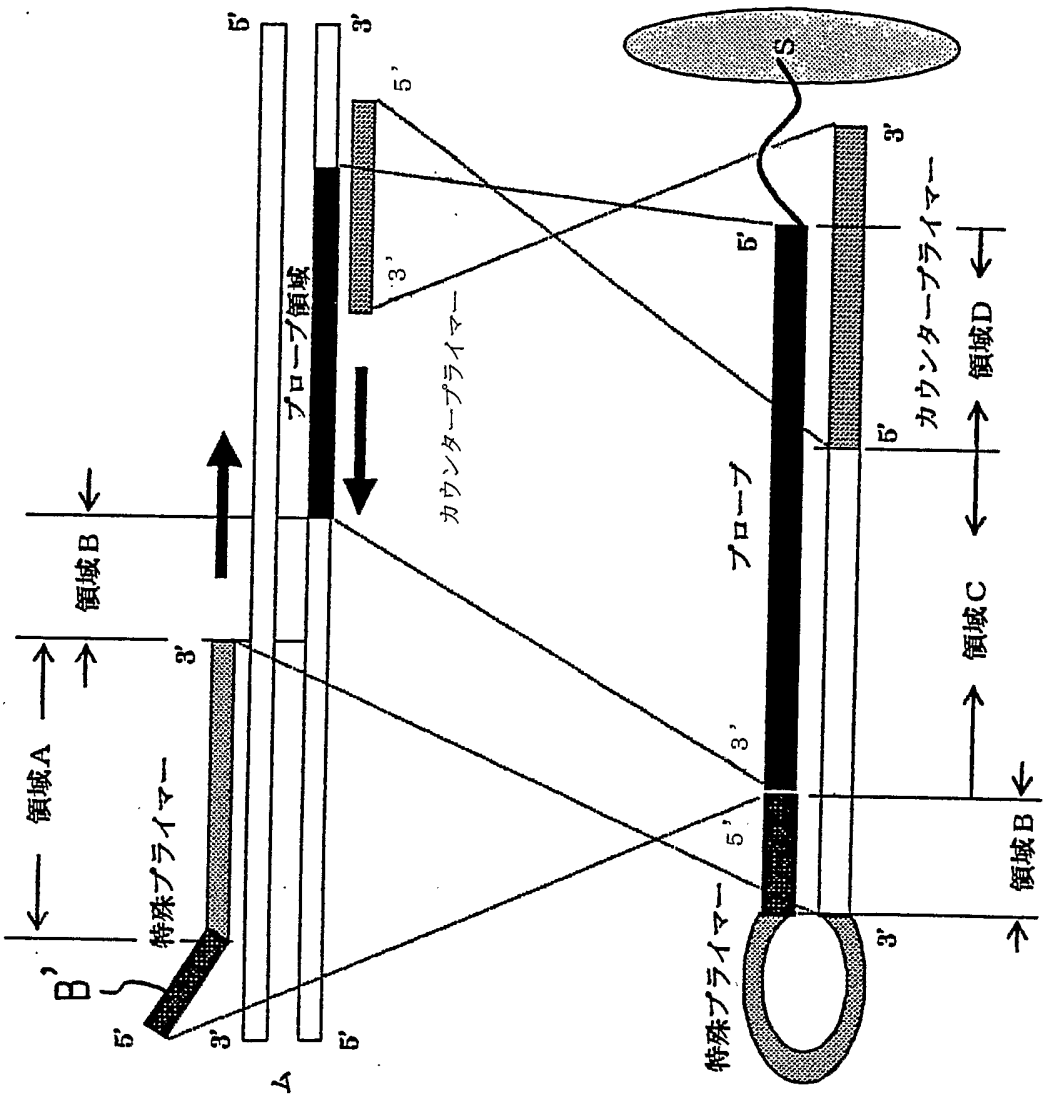
第 5 図


特殊プライマー
特殊ターゲット
連結不可
塩基欠損
変異ゲノム
欠損塩基
検出不可
連結反応
検出可
特殊プライマー
特殊ターゲット
連結反応
検出可
正常ゲノム
連結不可
検出不可

第 6 図

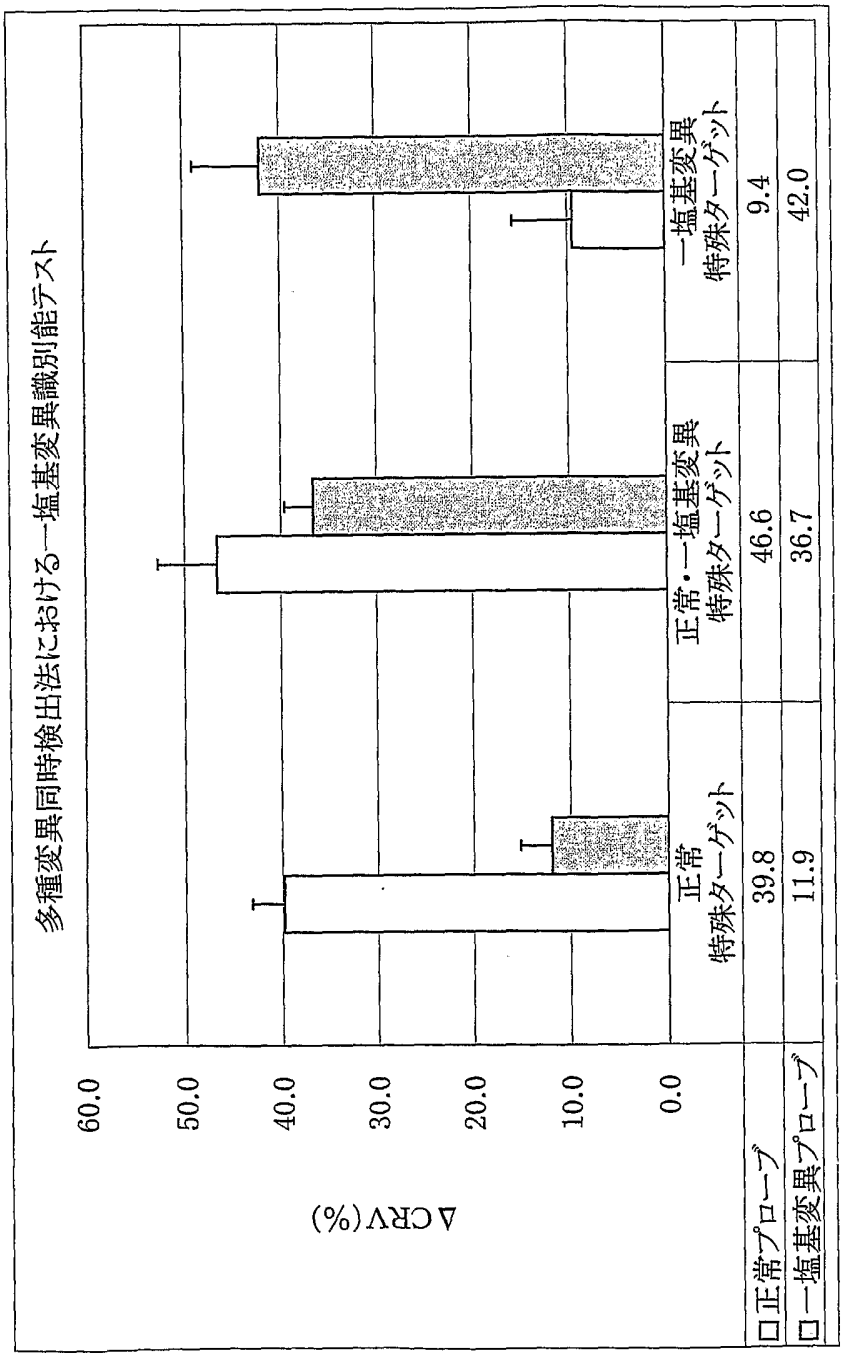
転座変異検出：


特殊プライマー
特殊ターゲット
連結反応
検出可
転座ゲノム
連結不可
検出不可
特殊プライマー
特殊ターゲット
連結不可
検出不可
正常ゲノム
連結反応
検出可
特殊プライマー
特殊ターゲット
作成不可
連結不可
検出不可
正常ゲノム
連結不可
検出不可

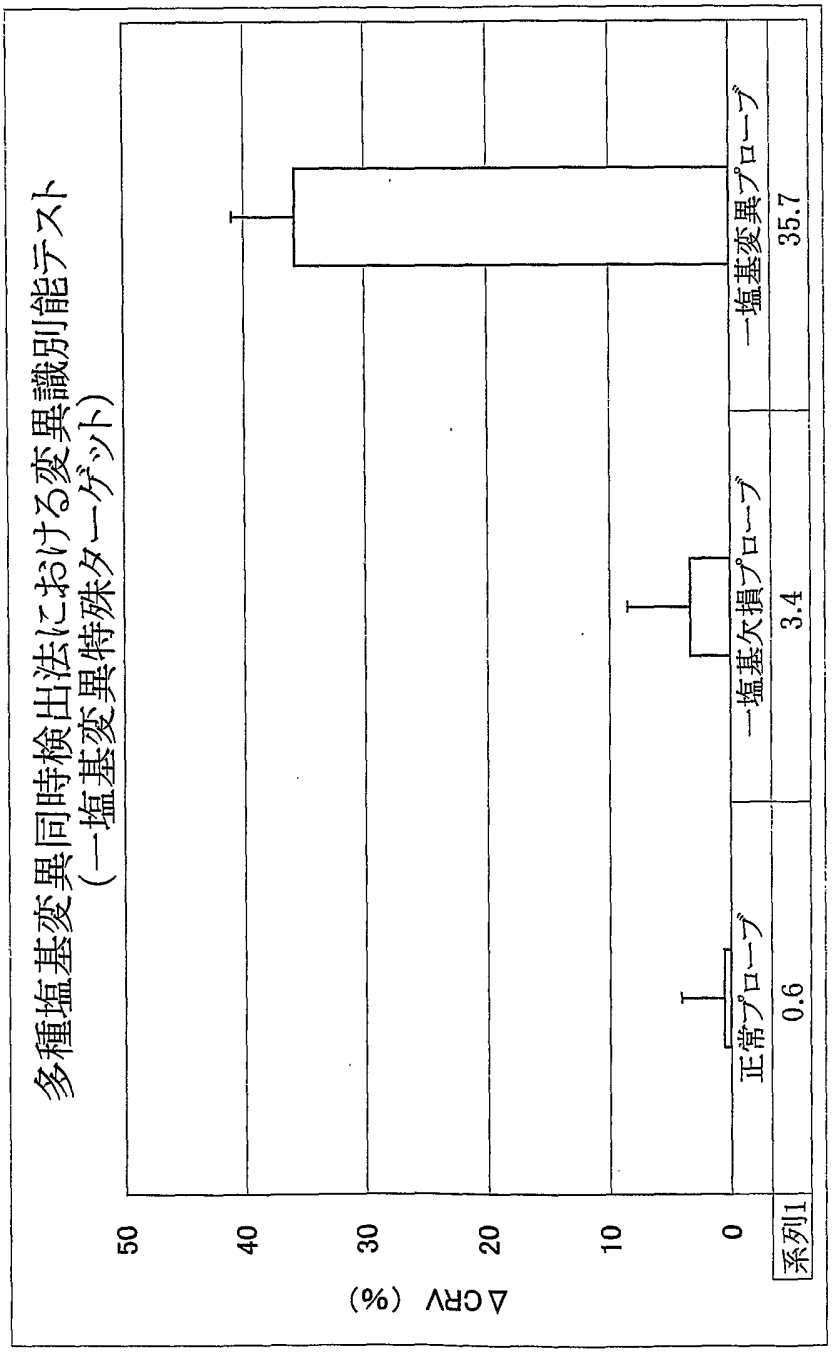

5'
3'
5'
3'
S
プローブ領域
カウンタープライマー
プローブ
カウンタープライマー
領域B
領域A
特殊プライマー
B'
領域C
領域D
領域B
特殊プライマー
ゲノム

第 7 図

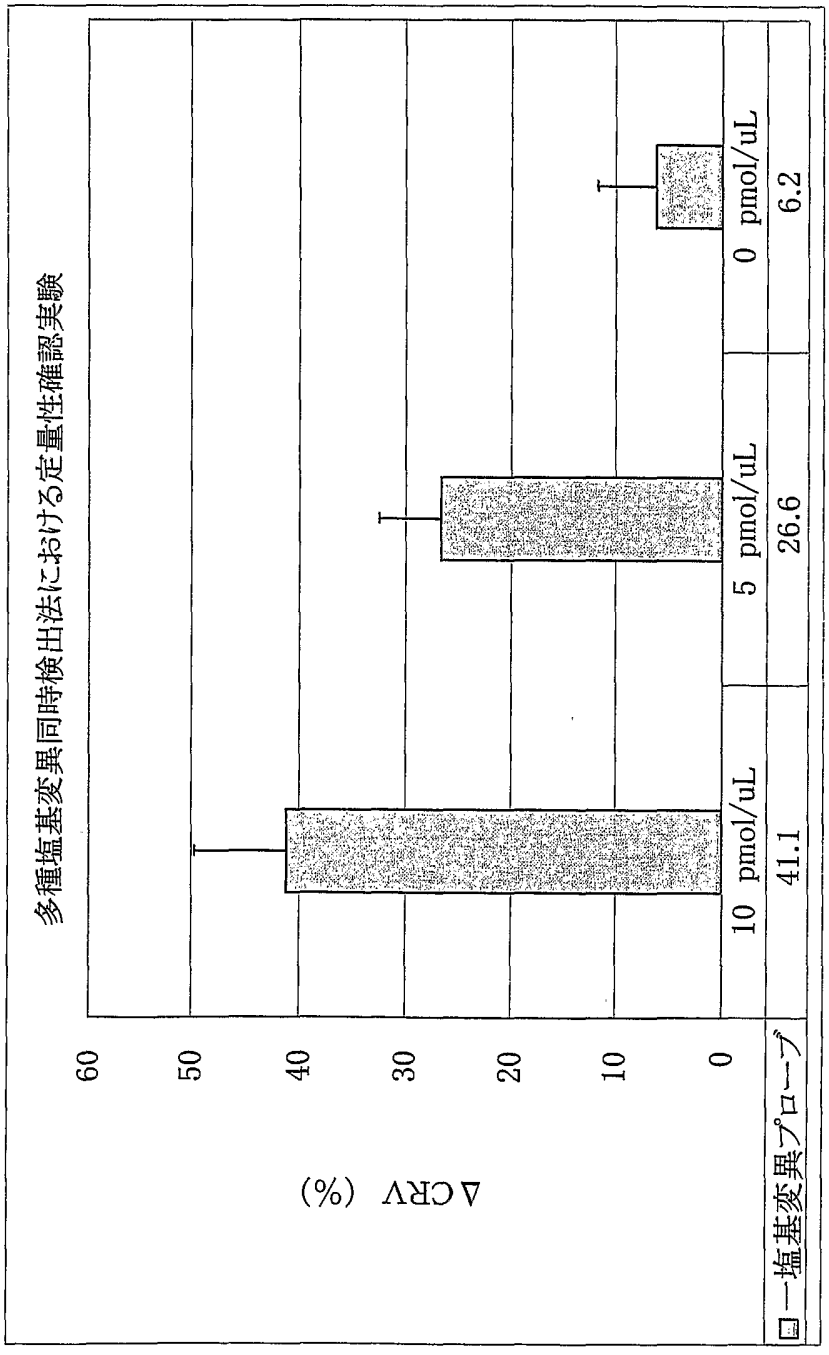
第 8 図


多種変異同時検出法における一塩基変異識別能テスト
ΔCRV(%)
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
正常
特殊ターゲット
正常・一塩基変異
特殊ターゲット
一塩基変異
特殊ターゲット
□正常プローブ
□一塩基変異プローブ
39.8
11.9
46.6
36.7
9.4
42.0

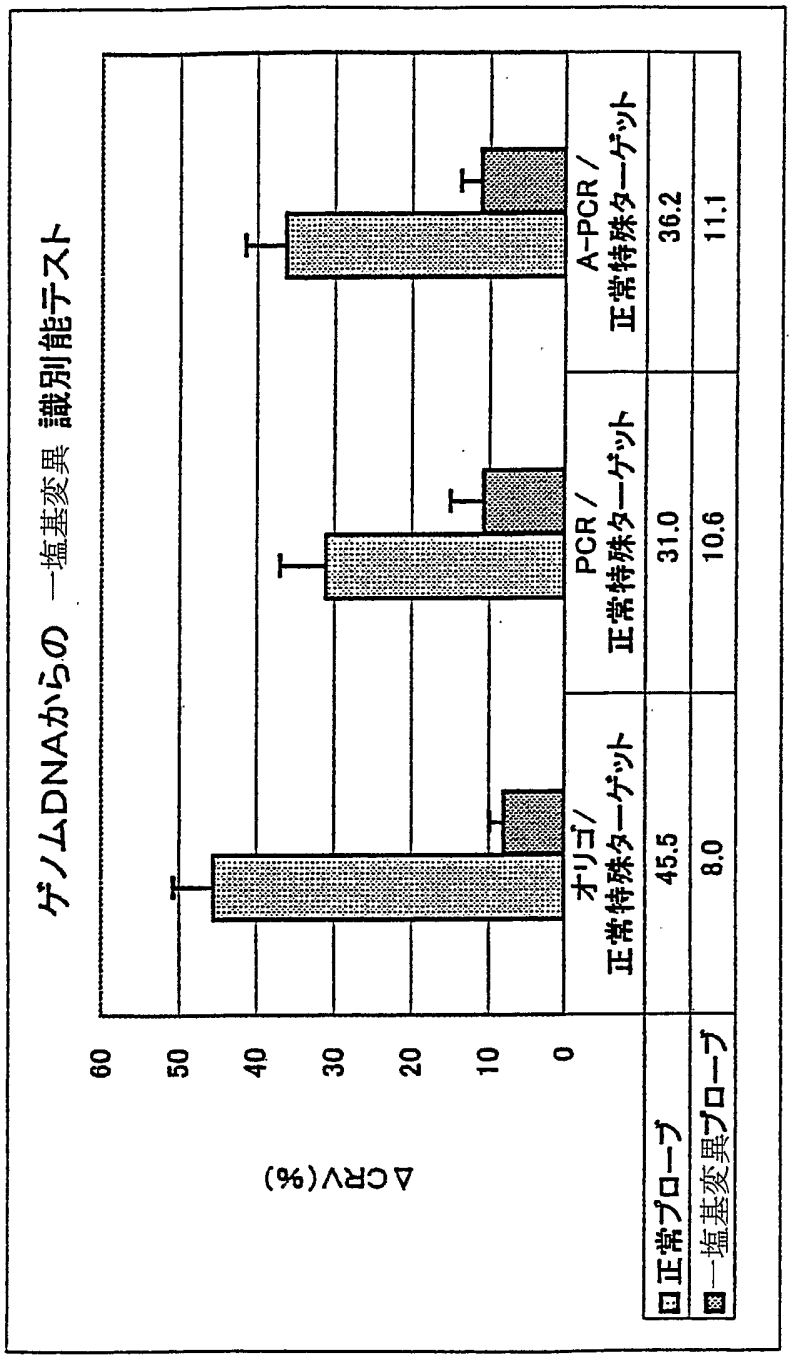
第 9 図


多種塩基変異同時検出法における変異識別能テスト
(一塩基変異特殊ターゲット)
ΔCRV (%)
50
40
30
20
10
0
正常プローブ
一塩基欠損プローブ
一塩基変異プローブ
系列1
0.6
3.4
35.7

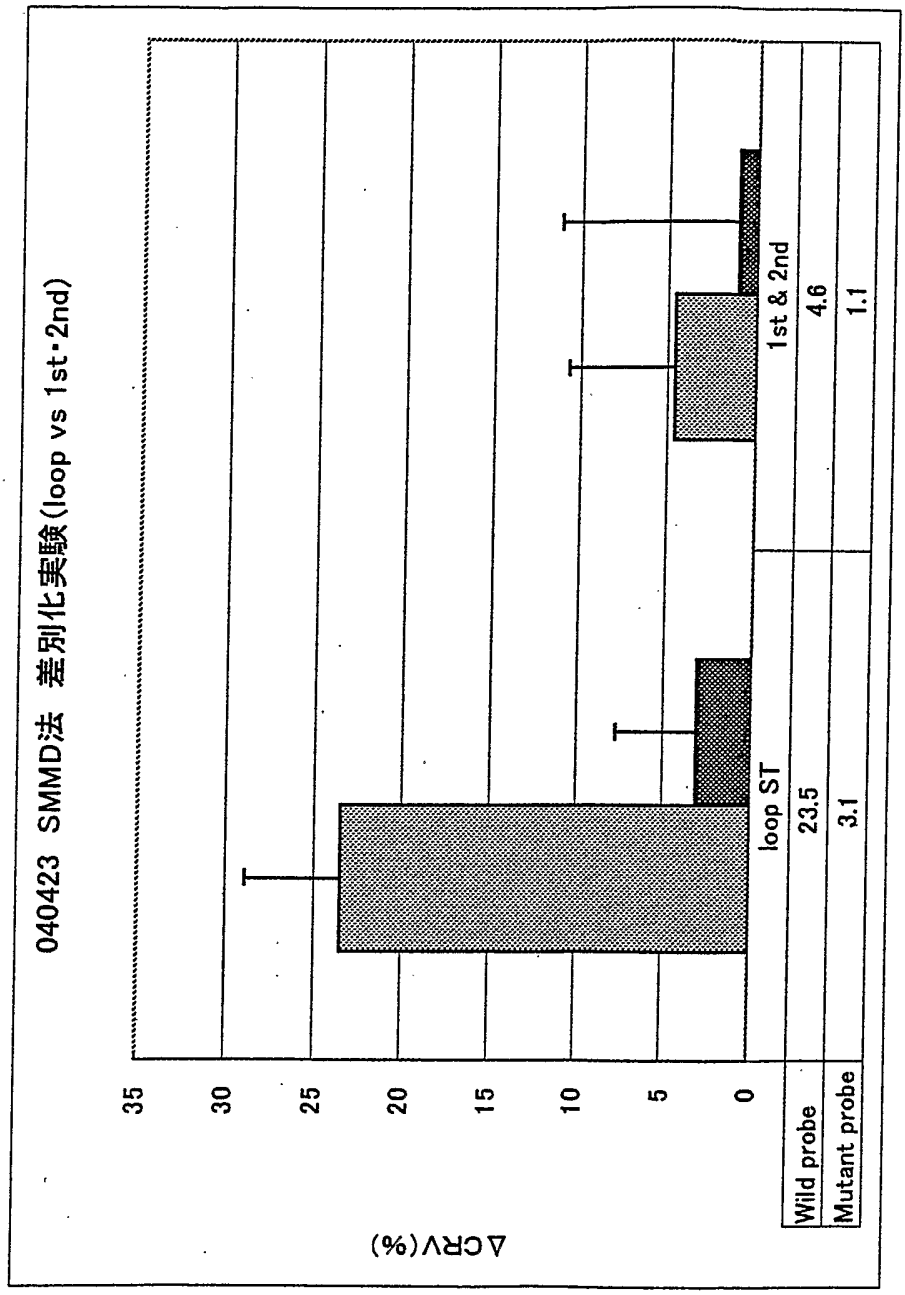
第 10 図

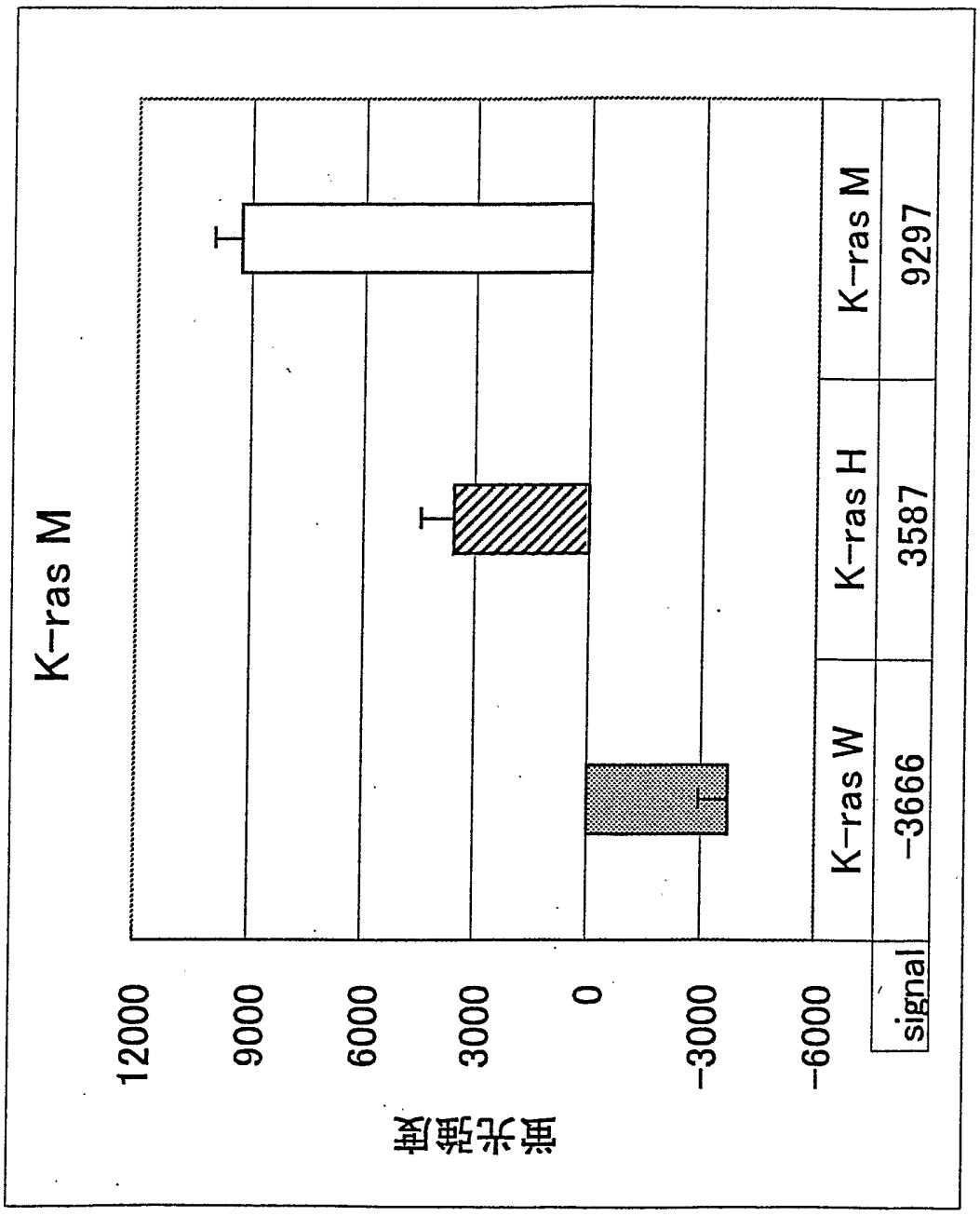

多種塩基変異同時検出法における定量性確認実験
ΔCRV (%)
60
50
40
30
20
10
0
□一塩基変異プローブ
10 pmol/uL
41.1
5 pmol/uL
26.6
0 pmol/uL
6.2

第 11 図


ゲノムDNAからの 一塩基変異 識別能テスト
ΔCRV(%)
60
50
40
30
20
10
0
オリゴ/
正常特殊ターゲット
PCR /
正常特殊ターゲット
A-PCR /
正常特殊ターゲット
正常プローブ
一塩基変異プローブ
45.5
8.0
31.0
10.6
36.2
11.1

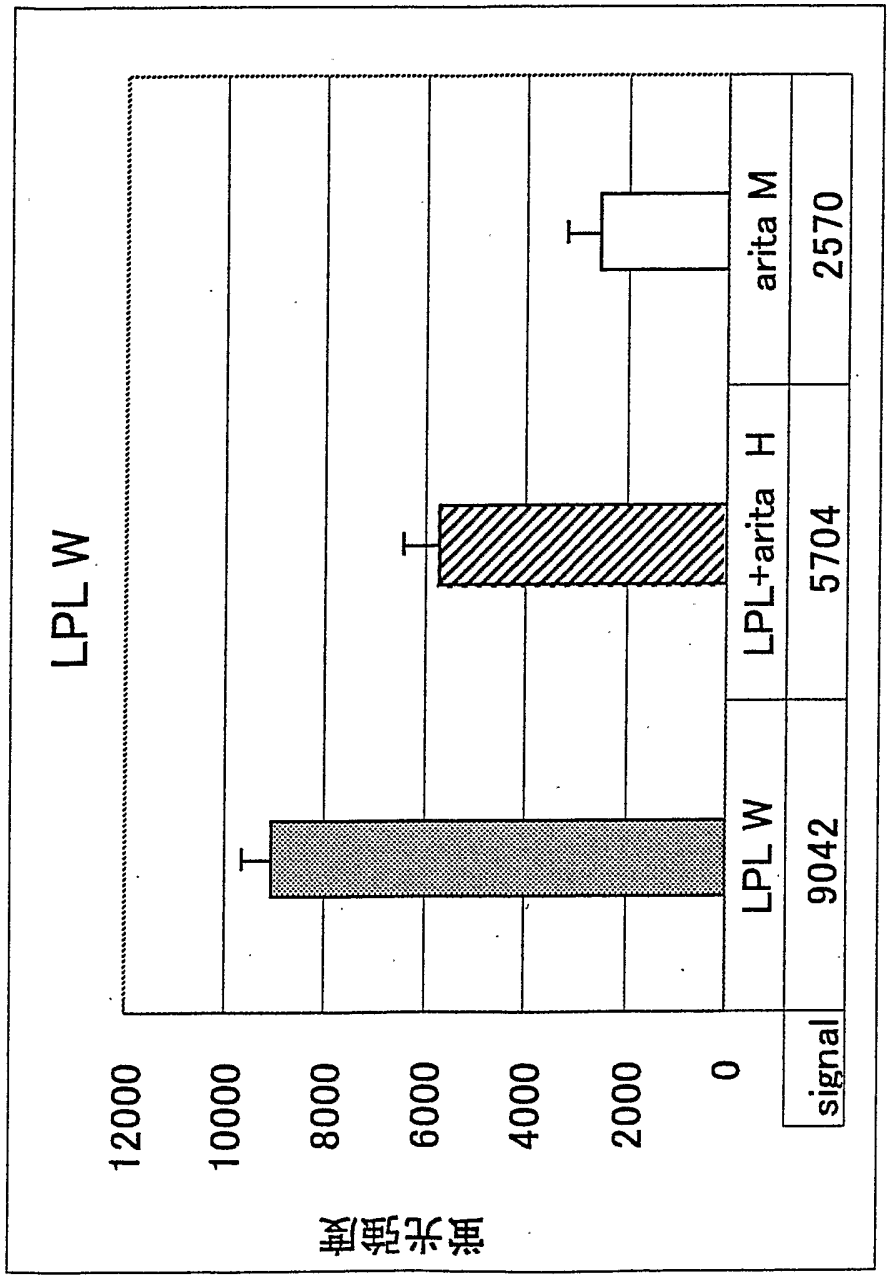
第 12 図


040423 SMMD法 差別化実験(loop vs 1st・2nd)
ΔCRV(%)
35
30
25
20
15
10
5
0
loop ST
1st & 2nd
Wild probe
23.5
4.6
Mutant probe
3.1
1.1

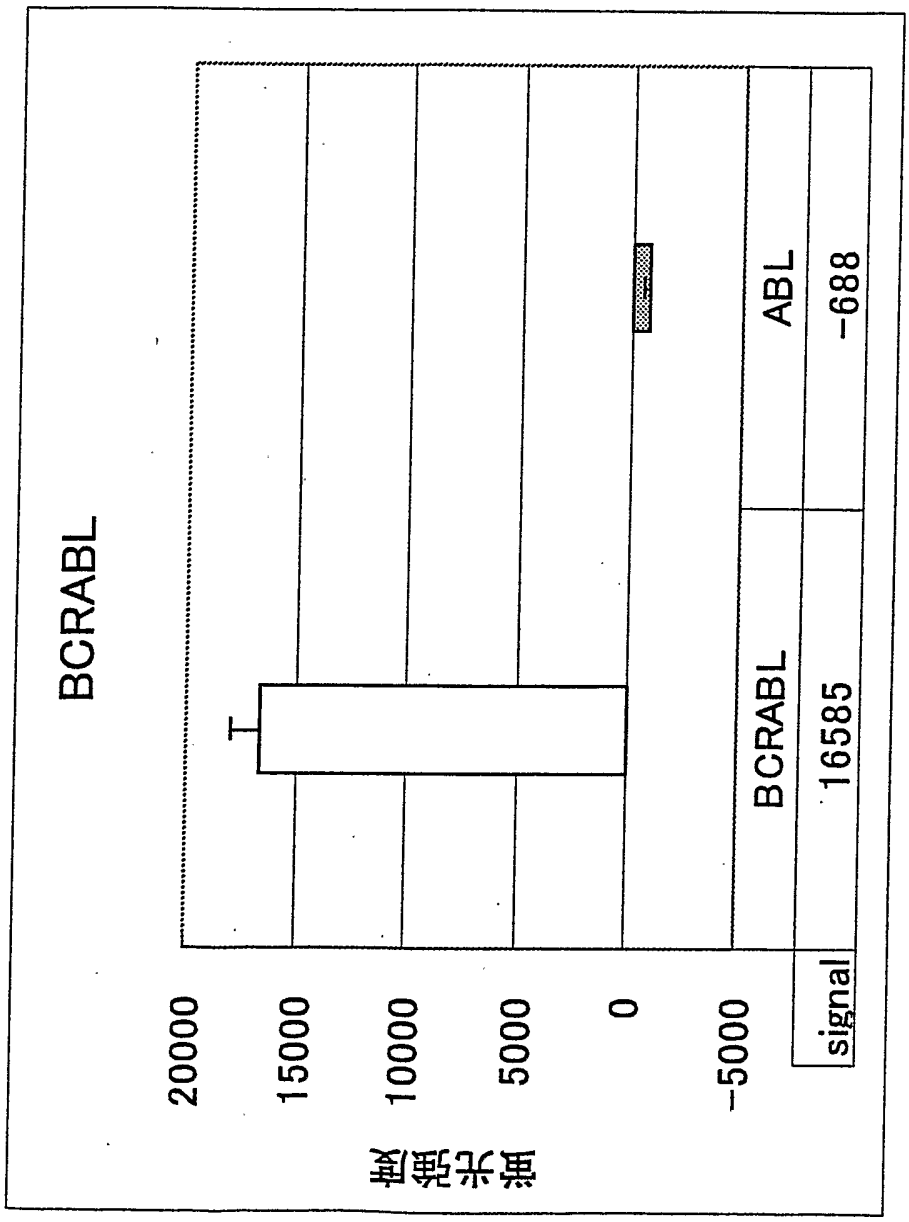

K-ras M
蛍光強度
12000
9000
6000
3000
0
-3000
-6000
signal
K-ras W
-3666
K-ras H
3587
K-ras M
9297

第 13 図

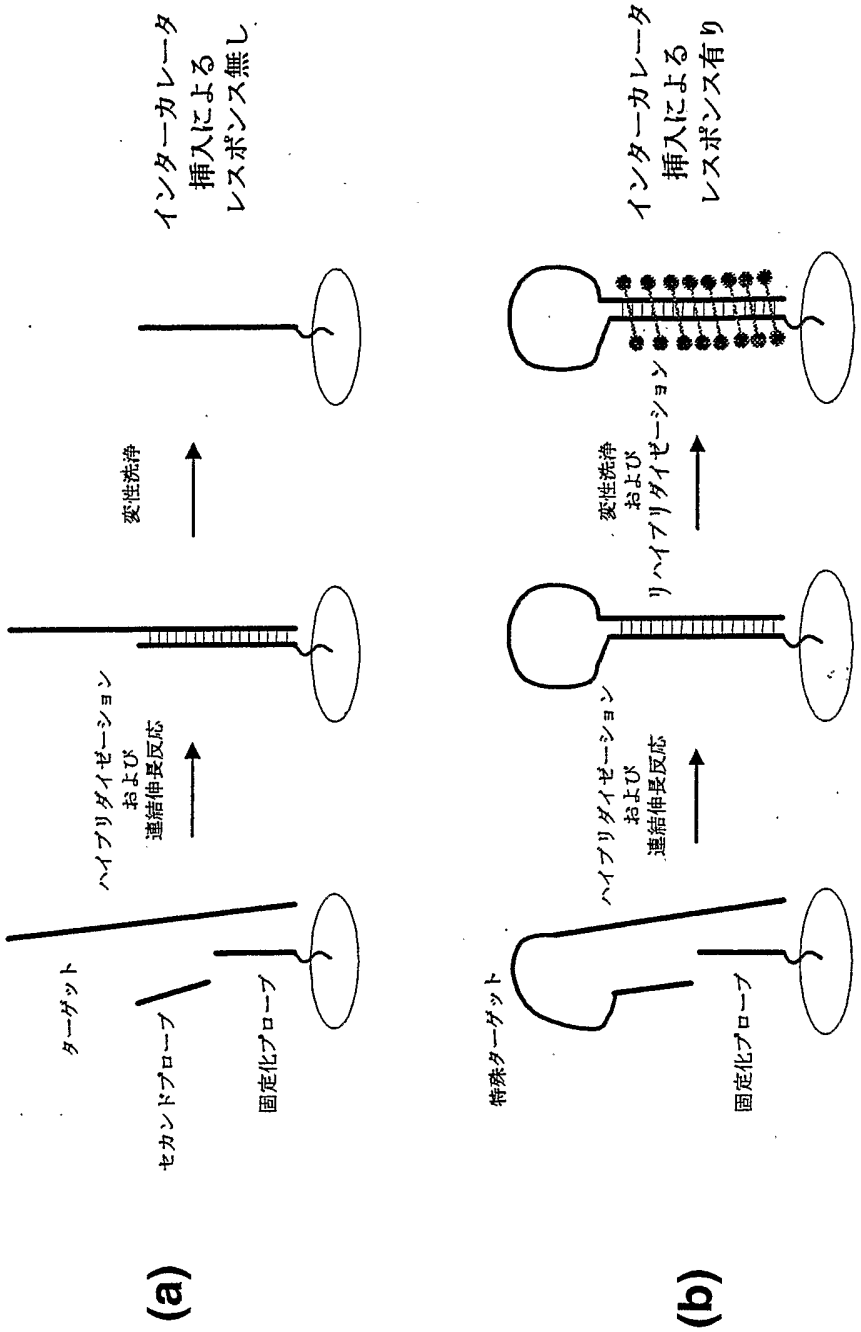
第14図


LPL W
蛍光強度
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
signal
LPL W
LPL+arita H
arita M
9042
5704
2570

第15図


BCRABL
蛍光強度
20000
15000
10000
5000
0
-5000
signal
BCRABL
16585
ABL
-688

第 16 図


(a)
ターゲット
セカンドプローブ
固定化プローブ
ハイブリダイゼーション
および
連結伸長反応
変性洗浄
インターカレータ
挿入による
レスポンス無し
(b)
特殊ターゲット
固定化プローブ
ハイブリダイゼーション
および
連結伸長反応
変性洗浄
および
リハイブリダイゼーション
インターカレータ
挿入による
レスポンス有り

SEQUENCE LISTING

＜110＞TUM Gene. Inc

＜120＞塩基変異の検出法

＜160＞

＜210＞1

＜211＞40

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞1

gaattagctg tatcgtcaag gcactcttgc ctacgccacc

＜210＞2

＜211＞40

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞2

gaattagctg tatcgtcaag gcactcttgc ctacgccacg

＜210＞3

＜211＞80

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞3

agctccaact accacggcct gctgaaaatg actgaatata aacttgtggt agttggagct ggtggcgtag gcaagagtgc

＜210＞4

＜211＞80

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞4

agctccaact accacggcct gctgaaaatg actgaatata aacttgtggt agttggagct cgtggcgtag gcaagagtgc

＜210＞5

＜211＞４０

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞5

tgaattagct gtatcgtcaa ggcactcttg cctacgccac

＜210＞6

＜211＞４６

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞6

agctccaact accacggcct gctgaaaatg actgaatata aacttg

＜210＞7

＜211＞２４

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞7

ttctgaatta gctgtatcgt caag

＜210＞8

＜211＞４６

＜212＞ＤＮＡ

<213>ヒト

<400>8

agctccaact accacggcct gctgaaaatg actgaatata aacttg

<210>9

<211>40

<212>DNA

<213>ヒト

<400>9

gttgtcctag cacctgacgc ctcgttgtac atcagagacg

<210>10

<211>40

<212>DNA

<213>ヒト

<400>10

gttgtcctag cacctgacgc ctcgttgtac atcagagaca

<210>11

<211>108

<212>DNA

<213>ヒト

<400>11

gagcatttta caccttgaag accctccctt tggaatggca cagggtacgt

cttcaaggtg taaaatgctc cgtctctgat gtacaacgag gcgtcaggtg

ctaggaca

<210>12

<211>86

<212>DNA

＜213＞ヒト

＜400＞１２

cctccctttg gaatggcaca gggtacgtct tcaaggtgta aaatgctccg

tctctgatgt acaacgaggc gtcaggtgct aggaca

＜210＞１３

＜211＞２２

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞１３

gagcatttta caccttgaag ac

＜210＞１４

＜211＞４０

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞１４

gaattagctg tatcgtcaag gcactcttgc ctacgccacc

＜210＞１５

＜211＞４０

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞１５

gaattagctg tatcgtcaag gcactcttgc ctacgccacg

＜210＞１６

＜211＞８２

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞１６

agctccaact accacggcct gctgaaaatg actgaatata aacttgtggt agttggagct cgtggcgtag gcaagagtgc c

＜210＞１７

＜211＞８１

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞１７

agctccaact accacggcct gctgaaaatg actgaatata aacttgtggt agttggagct cgtggcgtag gcaagagtg

＜210＞１８

＜211＞４６

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞１８

agctccaact accacggcct gctgaaaatg actgaatata aacttg

＜210＞１９

＜211＞２０

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞１９

ggcactcttg cctacgccac

＜210＞２０

＜211＞３８

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞２０

tggaggtact tttcagccag gatgtaacat tggagaag

＜210＞２１

＜211＞３８

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞２１

atggaggtac ttttcagcca ggatgtaaca ttggagaa

＜210＞２２

＜211＞８７

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞２２

ctatccgcgt gattgcctaa ataatattta cctccaagtc ctctctctgc aatcacgcgg atagcttctc caatgttaca tcctggc

＜210＞２３

＜211＞８７

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞２３

ctatccgcgt gattgcctaa ataatattta cctccaagtc ctctctctgc aatcacgcgg atagcttctc caatgttaca tcctggc

＜210＞２４

＜211＞４８

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞２４

ctatccgcgt gattgcctaa ataatattta cctccaagtc ctctctct

＜210＞２５

＜211＞３８

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞２５

catcgtccac tcagccactg gatttaagca gagttcaa

＜210＞２６

＜211＞３８

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞２６

gaaggggctg tcctcgtcct ccagctgtta tctggaag

＜210＞２７

＜211＞８０

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞２７

aagcccttca gcggccctga ggctcaaagt cagatgctac tggcctctga

agggcttttg aactctgctt aaatccagtg

＜210＞２８

＜211＞１１７

＜212＞ＤＮＡ

＜213＞ヒト

＜400＞２８

aagcccttca gcggccctga ggctcaaagt cagatgctac tggcctctga agggcttttg aactctgctt aaatccagtg gctgagtgga cgatgacatt cagaaaccca tagagcc

<210> 29

<211> 42

<212> DNA

<213> ヒト

<400> 29

aagcccttca gcggccctga ggctcaaagt cagatgctac tg

<210> 30

<211> 22

<212> DNA

<213> ヒト

<400> 30

cactggattt aagcagagtt ca

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/09692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/11, C12Q1/68, C12M1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C12N15/00-15/90, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPI(DIALOG), JSTPlus(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6114121 A (Aisin Cosmos R & D Co., Ltd.), 05 September, 2000 (05.09.00), & JP 10-146190 A	1-13
A	WO 98/03673 A1 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.), 29 January, 1998 (29.01.98), & EP 956359 A1 & US 6312892 B1 & US 6576453 B2	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* 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 document 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	Date of mailing of the international search report
21 August, 2003 (21.08.03)	02 September, 2003 (02.09.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／０９６９２

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl⁷　C12N 15/11, C12Q 1/68, C12M 1/00

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl⁷　C12N 15/00-15/90, C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS/WPI(DIALOG), JSTPlus(JOIS)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	US 6114121 A (Aisin Cosmos R&D Co.,Ltd.) 2000.09.05 & JP 10-146190 A	1-13
A	WO 98/03673 A1 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION,INC.) 1998.01.29 & EP 956359 A1 & US 6312892 B1 & US 6576453 B2	1-13

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日　２１．０８．０３	国際調査報告の発送日　02.09.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　２９３７ 三原　健治 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８