(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 25 871 T2** 2006.10.05

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 092 782 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 25 871.8**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 122 440.1**
(96) Europäischer Anmeldetag: **13.10.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.04.2001**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **08.02.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.10.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12Q 1/68*** (2006.01)
G01N 27/447 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
29425799 15.10.1999 JP

(73) Patentinhaber:
Hitachi, Ltd., Tokio/Tokyo, JP; National Cancer Center, Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:
Strehl, Schübel-Hopf & Partner, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, GB

(72) Erfinder:
Tomita, Ltd., Hiroyuki,łc/o Hitachi, Chiyoda-ku,łTokyo 100-8220, JP; Murakawa, Ltd., Katsuji,łc/o Hitachi, Chiyoda-ku,łTokyo 100-8220, JP; Miyahara, Ltd., Yuji,łc/o Hitachi, Chiyoda-ku,łTokyo 100-8220, JP; Murakami, Cancer Res., Yoshinori,łNat., Tokyo 104-0045, JP; Sekiya, Cancer Res., Takao łNat., Tokyo 104-0045, JP

(54) Bezeichnung: **Genetisches Screening Verfahren und Vorrichtung**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein genetisches Screeningverfahren zum einfachen und kostengünstigen Nachweis eines Unterschiedes (oder eines Ungleichgewichts) in der Menge der Genexpression einer Genmutation, die mit Krebs oder einer anderen Störung in Verbindung steht, unter Verwendung einer Nucleinsäure (DNA, RNA), die aus den Zellen des Urins, von Auswurf, von Fäkalien, von einem Abstrichtupfer, des Gesamtbluts, des Plasmas, eines Biopsiegewebes, des Knochenmarks, von Eiter, einer Waschflüssigkeit aus dem betroffenen Bereich oder dergleichen des Patienten extrahiert wurden.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Herkömmliche Verfahren zum Nachweisen einer Genmutation, insbesondere einer Insertion, Deletion und dergleichen, umfassen das Amplifizieren eines Gens durch die Polymerasekettenreaktion und das anschließende Nachweisen der Anwesenheit oder Abwesenheit des Genfragments durch Hybridisierung (beispielsweise durch Southern- oder Northern-Hybridisierung) und das Vergleichen der Größe der Fragmente. Bei den Hybridisierungsverfahren ist jedoch eine ausreichende Probenmenge für den Nachweis erforderlich, sodass seit kurzem Verfahren, wie das SSCP (Einzelstrangkonformationspolymorphismus)-Verfahren, das APO (Allele-spezifisches Oligonucleotid)-Verfahren, das RNase-A-Fehlpaarungsspaltungsverfahren, das DGGE (Denaturierungsgradienten-Gelelektrophorese)-Verfahren und das Nucleotidsequenzierungsverfahren weit verbreitet eingesetzt werden.

[0003] Es ist bekannt, dass die Substitution, Deletion oder Addition eines einzelnen Nucleotids der Faktor oder die Ursache von Krebs sein kann, sodass der Nachweis einer Punktmutation erforderlich ist. Bei dem Einzelstrangkonformationspolymorphismus (SSCP)-Verfahren wird die Veränderung der Konformation, die von einem denaturierten einzelsträngigen DNA-Fragment in einem nicht-denaturierenden Gel als Ergebnis eines einzelnen unterschiedlichen Nucleotids angenommen wird, als ein Unterschied in der Mobilität in der Polyacrylamid-Elektrophorese nachgewiesen (Orita et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 86, 2766–2779 (1989)). Bei dem APO-Verfahren wird eine Mutation durch Ausnutzen der Unfähigkeit zur Bildung von Hybriden aufgrund eines einzigen fehlerhaften Nucleotidpaares nachgewiesen (Wallace et al., Nucleic Acid Res., Vol. 9, 879–895 (1981)). Bei dem RNase-A-Fehlstellenspaltungsverfahren wird eine Mutation durch Spalten einer RNA-Sonde mit dem Enzym RNase A an der Position nachgewiesen, an der ein fehlerhaftes RNA-DNA- oder RNA-RNA-Hybrid auftritt (Myers, Nature, Vol. 313, 495–498 (1985)). Das DGGE-Verfahren erlaubt den Nachweis einer Mutation unter Ausnutzung der Tatsache, dass DNA-Fragmente mit einer fehlerhaften Paarbildung und DNA-Fragmente, die keine fehlerhafte Paarbildung aufweisen, ein unterschiedliches Maß an Mobilität in einem denaturierenden Gradientengel zeigen (Fischer & Lerman, Cell, Vol. 16, 191–200 (1979)).

[0004] Bei dem Nucleotidsequenzierungsverfahren wird die Nucleotidsequenz des isolierten DNA-Fragments direkt durch das Deoxyterminationsverfahren bestimmt (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 7, 5463–5467 (1977)). Die Menge der erhaltenen Information ist am größten bei dem Nucleotidsequenzierungsverfahren, dieses Verfahren ist jedoch mit dem Problem behaftet, dass es komplex und zeitaufwendig ist.

[0005] Bei dem SSCP-Verfahren ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gut, sodass die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Mutation rasch bestimmt werden kann. Folglich ist dieses Verfahren in den letzten Jahren weit verbreitet eingesetzt worden. Da normalerweise die Menge der aus einer Probe erhältlichen DNA gering ist, wird das PCR-SSCP-Verfahren eingesetzt, wobei die zu analysierende Region zunächst durch PCR amplifiziert wird und die so erhaltenen DNA-Fragmente einer SSCP-Analyse unterworfen werden (Orita et al., Genomics, Vol. 5, 874–879 (1989)). Das PCR-SSCP-Verfahren ist in der genetischen Diagnose bei Darmkrebs und Blasenkrebs eingesetzt worden (Sugano et al., Int. J. Cancer, Vol. 74, 403–406 (1997)). In den letzten Jahren ist das RT-PCR-SSCP-Verfahren eingesetzt worden, welches das Extrahieren von mRNA aus einer Probe, das Bereitstellen von komplementärer DNA (cDNA) aus der mRNA durch Reverse-Transcriptase-Reaktion und das anschließende Durchführen einer PCR-SSCP umfasst, wobei dieses Verfahren eingesetzt wurde, um die Anwesenheit oder Abwesenheit der Genexpression nachzuweisen und die Expressionsmenge zu quantifizieren (Murakami et al., Oncogene, Vol. 6, 37–42 (1991)).

[0006] Es sollte angemerkt werden, dass die Menge der Genexpression als die Anzahl einer mRNA in einer Gesamt-RNA oder einer Poly(A)-RNA pro Masseneinheit definiert ist, ausgedrückt beispielsweise pro 1 μg der Gesamt-RNA oder Poly(A)-RNA. Es ist möglich, DNA mit einer Mutation in der Nucleotidsequenz eines genomischen DNA-Gens durch PCR-SSCP zu isolieren. Andererseits ist es möglich, eine Mutation in der Nucleo-

tidsequenz eines Gens und eine Genexpressionsstörung durch das RT-PCR-SSCP-Verfahren unter Einsatz einer aus mRNA erhaltenen cDNA nachzuweisen. Eine Genexpressionsstörung kann beispielsweise durch eine Mutation in der Nucleotidsequenz einer Expressionskontrollregion stromaufwärts des Gens oder durch eine Abnormalität der Methylierung oder dergleichen verursacht werden. Es ist möglich, Informationen unter Verwendung des RT-PCR-SSCP-Verfahrens zu erhalten, die durch das PCR-SSCP-Verfahren nicht erhalten werden kann.

[0007] Eine ausreichende Menge der DNA kann durch PCR, RT-PCR-SSCP aus einer kleinen Probenmenge amplifiziert werden. Es ist jedoch bekannt, dass die Amplifizierungseffizienz der PCR häufig aufgrund von Unterschieden in den Typen der Reaktionsinstrumente und der hitzebeständigen DNA-Polymerase variieren. Wenn $0 \leq r \leq 1$ ist und n die Anzahl der PCR-Zyklen ist, wird die Amplifizierungsrate C durch die PCR als $C = (1 + r)^n$ beschrieben. Theoretisch ist r = 1, der Wert für r variiert jedoch häufig aufgrund verschiedener Faktoren, wie das thermische Profil der PCR-Reaktion, die Eigenschaften der DNA-Polymerase (beispielsweise die Reproduzierbarkeit des Enzyms), die Sequenzlänge der DNA, die Primersequenz, das Verhältnis der Primerkonzentration zu der DNA-Konzentration und dergleichen. In Abhängigkeit von den Umständen kann r einen Wert zwischen 0,6 und 0,8 annehmen, und da n im Allgemeinen ein Wert um 30 ist, kann der geringste Unterschied in dem Wert von r zu einem Wert C der PCR führen, der sich um mehrere Größenordnungen unterscheidet.

[0008] Außerdem ist es bekannt, dass die Effizienz der Produktion von cDNA aus mRNA durch die Reverse-Transcriptase-Reaktion sich in Abhängigkeit von dem Typ der Reverse-Transkriptase, der Reaktionstemperatur, der Matrizen-RNA-Sequenz und dergleichen unterscheidet.

[0009] Als Verfahren zur quantitativen Analyse unter Verwendung von PCR wurden die kompetitive PCR (Gilliard et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 87, 2725–2729, 1990), die kinetische PCR (Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 86, 9717–9721, 1989), die TagMan-PCR (Gelfand et al., USP 5210015 (1993)) entwickelt. Bei der kompetitiven PCR wird, um die DNA-Menge zu messen, DNA einer bekannten Konzentration als innerer Standard eingesetzt, und die DNA des inneren Standards wird systematisch verdünnt und dann zugegeben, und dann gleichzeitig mit der Proben-DNA amplifiziert. Die PCR-Produkte werden durch Gelelektrophorese aufgetrennt, und die Anzahl der Kopien der Proben-DNA und der DNA des inneren Standards werden unter Einsatz der Ethidiumbromid-Färbungstechnik verglichen. Die Genauigkeit der Quantifikation der DNA-Menge steigt mit der Anzahl der Verdünnungen. Es gibt jedoch das Problem, dass die Menge der erforderlichen Probe und der Arbeitsaufwand proportional mit der Anzahl der Verdünnungen steigt. Bei der kinetischen PCR wird die PCR in der logarithmischen Amplifikationsphase angehalten. In der logarithmischen Amplifikationsphase ist die Anzahl der PCR-Amplifikationsprodukte vermutlich so, dass sie mit der Anzahl der Proben-DNA korreliert. Zuerst wird eine Vielzahl von DNA einer bekannten Konzentration unter Einsatz von PCR amplifiziert und die Mengen der erhaltenen PCR-Amplifikationsprodukte werden aufgetragen, und es wird eine Eichkurve (eine gerade Linie) erzeugt. Unter denselben Bedingungen wie zur Erzeugung der Eichkurve wird eine DNA einer unbekannten Konzentration unter Einsatz von PCR amplifiziert, und die Menge der Proben-DNA wird unter Verwendung der Eichkurve quantifiziert. Da in der kinetischen PCR die Anzahl der PCR-Zyklen verringert ist, sodass die PCR nicht zur Sättigung kommt, besteht das Problem, dass die Endkonzentration des PCR-Amplifikationsprodukts gering ist. Durch die Verwendung eines Fluoreszenz-markierten Primers und eines Laserfluoreszenz-DNA-Sequenziergeräts werden jedoch geringe Mengen der PCR-Amplifikationsprodukte nachgewiesen. Die TagMan-PCR ist ein Verfahren, welches die kinetische PCR und einen Fluoreszenz-markierten Primer kombiniert, wodurch die Menge eines Amplifikationsprodukts für jeden Zyklus während der PCR-Amplifikation überwacht werden kann. Bei dem TaqMan-PCR-Verfahren kann eine Eichkurve gleichzeitig erzeugt werden, und es ist nicht erforderlich, im Vorfeld eine Eichkurve zu erstellen. Die Enzyme, wie die hitzebeständige Polymerase, sind jedoch teuer, und da ein Apparat eingesetzt wird, bei dem eine optische Faser in jede Reaktionskammer der PCR-Reaktion eingeführt wird, sind die laufenden Kosten hoch.

[0010] Die kompetitive PCR, die kinetische PCR und die TagMan-PCR sind hervorragende Verfahren. Es ist jedoch erforderlich, zuerst eine Vielzahl von DNA-Proben einer bekannten Konzentration als inneren Standard herzustellen. Die Präparation mehrerer DNAs als innerer Standard für jede Probe führt zu erhöhten Kosten und Aufwand bei der Untersuchung. Bei der kompetitiven PCR, der negativen PCR und der TagMan-PCR variiert die Effizienz der PCR-Amplifikation aufgrund der Unterschiede im Typ der hitzebeständigen DNA-Polymerase, und es gibt eine Fehlerabweichung bei der Menge der gewünschten Genexpression. Simulationen haben gezeigt, dass bei der kompetitiven PCR ein Fehlerbereich von 7% bis 300% auftreten kann (Raeyaekers, Anal. Biochem., Vol. 214, 582–585 (1993)). Bei den herkömmlichen Verfahren der kompetitiven PCR kommt es im Allgemeinen zu einer Streuung von 30%–50% bei den Messergebnissen für die Menge der Genexpression.

[0011] Bei einem Individuum (Träger) mit einer reproduktiven zellulären Mutation in einem der zwei Allele ei-

nes Krebsunterdrückungsgens oder eines DNA-Reparaturenzymgens steigt die Häufigkeit des Auftretens eines Tumors und das Auftreten einer Krankheit steigt etwas an, und eine Erhöhung multipler Primärkrebsarten und multipler Krebsarten ist bekannt, sodass Bedarf besteht, die Nachweiseffizienz zu erhöhen. Um dieses Problem mit den herkömmlichen Techniken zu lösen, ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein genetisches Screeningverfahren, das für die Automation geeignet ist und eine höhere Quantifizierung und Reproduzierbarkeit aufweist, und einen Apparat zum genetischen Screening bereitzustellen.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0012] Autosomen normaler menschlicher Zellen sind diploid, und es gibt zwei Allele, die von Vater und Mutter abgeleitet sind. Wenn die zwei Allele unterschiedliche Sequenzen haben und polymorph sind, spricht man von einem heterozygoten Gen. Die zwei Allele können durch diesen Polymorphismus unterschieden werden. In Krebszellen, in denen das gesamte Chromosom oder ein Teil davon fehlt, und ein Allel, das sich entweder vom Vater oder der Mutter ableitet, verloren gegangen ist, wird Heterozygotie, die in der DNA normaler Zellen auftritt, in Krebszellen nicht gefunden (Verlust der Heterozygotie, Loss of heterozygosity: LOH). Tatsächlich ist die LOH an chromosomen Stellen, an denen Tumorsuppressoren, wie p53 und APC, vorhanden sind, mit hoher Häufigkeit bei verschiedenen Krebsarten erkannt worden. Die hohe Häufigkeit von Krebs ergibt sich aus der Unfähigkeit, die Zellverkrebsung zu unterdrücken, was auf das Nicht-Vorhandensein des korrespondierenden normalen Gens zurückzuführen ist. Die LOH-Analyse ist bereits bei der Aufklärung der molekularen Mechanismus der Krebsentstehung und bei der DNA-Diagnose von Krebs angewandt worden.

[0013] Wenn ein Nucleotidsequenzpolymorphismus in einem Exon eines Gens vorhanden ist, können die von den zwei Allelen abgeleiteten mRNAs unterschieden werden. Messenger RNAs, bei denen eine genomische Unterscheidung und dergleichen nicht auftritt, werden vermutlich von den zwei Allelen in gleichen Mengen transkribiert. Aufgrund der stromaufwärtigen Nucleotidsequenzpolymorphismen oder Mutationen, welche die Kontrolle der Genexpression beeinflussen, und der Unterschiede in der 3'-terminalen Sequenz von mRNA, welche die Stabilität der mRNA-Moleküle verändert, geht man jedoch davon aus, dass ein "Unterschied in der Genexpression zwischen Allelen" bewirkt wird. Deshalb geht man davon aus, dass der Nachweis dieses "Unterschied in der Genexpression zwischen Allelen" ein völlig neuer Ansatz zur Aufklärung physiologischer und ätiologischer Signifikanz von Nucleotidsequenzpolymorphismen und Mutationen ist. Bislang gibt es keine Versuche, diese "Differenz in der Genexpression zwischen Allelen" zufriedenstellend aufzuklären. Im Zuge des Fortschritts des Human Genome Project ist jedoch die Informationsmenge in Bezug auf die Nucleotidsequenzpolymorphismen angestiegen, sodass eine statistische Analyse dieses "Unterschiedes in der Genexpression zwischen Allelen" erwartet werden kann. Insbesondere sind Proteine mit unklarer pathologischer Signifikanz, die aus Falschsinnmutationen entstehen und zu Aminosäuresubstitutionen führen, durch die Analyse zahlreicher Krebsarten und genetischer Störungen entdeckt worden. Der vorliegende Ansatz kann möglicherweise zur Aufklärung von Falschsinnmutationen, die zu Aminosäuresubstitutionen führen, beitragen.

[0014] Es ist außerdem bekannt, dass wenn ein Terminationscodon in der Mitte eines kodierenden Bereichs eines Gens als Ergebnis einer Punktmutation oder einer Leserahmenmutation auftritt, die mRNA-Expression abnimmt. Deshalb wird davon ausgegangen, dass wenn ein auffälliger Unterschied in der Genexpression von mRNA zwischen Allelen gefunden wird, dieses Ergebnis ethiologische Zustände, einschließlich die Inaktivierung des Gens, deutlich widerspiegelt, sodass dieses Phänomen für ein einfaches Verfahren zum Nachweisen der Anwesenheit oder Abwesenheit von Genmutationen eingesetzt werden kann. Es ist bekannt, dass es verschiedene Unterschiede in der Nucleotidsequenz zwischen Allelen, zwischen Individuen und zwischen Populationen von menschlicher genomischer DNA gibt. Da der größere Anteil dieser Sequenzunterschiede nicht pathologisch ist, werden sie als Nucleotidsequenzpolymorphismus und nicht als Mutationen bezeichnet. Unter Nucleotidsequenzpolymorphismen sind Einzelnucleotidpolymorphismen (SNP), die sich aus der Substitution eines einzigen Nucleotidpaars ergeben, Mikrosatellitenpolymorphismen aufgrund der Unterschiede in der Anzahl der Wiederholungen von kurzen Wiederholungssequenzen von etwa 2–4 Basenpaaren und VNTR (Variable Number of Tandem Repeat)-Polymorphismen bekannt, die hinsichtlich der Anzahl der Wiederholungen und der Nucleotidsequenz in mehreren 10 Basenpaaren unterschiedlich sind. Es wird vorhergesagt, dass Einzelnucleotidpolymorphismen im Durchschnitt in mehr als einem Basenpaar pro 1 000 Basenpaaren in menschlicher DNA auftritt und dass die Polymorphismen eine signifikante Bedeutung als Marker haben, welche das gesamte menschliche Genom abdecken. Besonders in letzter Zeit ist Einzelnucleotidpolymorphismen, die in den Exonregionen von Genen vorkommen (SNP in cDNA: cSNP), als einer Ursache individueller Unterschiede in Zusammenhang mit der Anfälligkeit für verschiedene Krankheiten und der Empfindlichkeit gegen Arzneimittel Beachtung geschenkt worden. Bei dem Einzelstrangkonformationspolymorphismus (SSCP)-Verfahren werden doppelsträngige DNA-Fragmente, die durch PCR oder dergleichen amplifiziert worden sind, in einzelsträngige DNA-Fragmente in Anwesenheit von Formamid denaturiert. Wenn danach die Fragmente durch nicht-de-

naturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt werden, zeigt, da die einzelsträngigen DNA-Fragmente eine spezielle Konformation in der Nucleotidsequenz jedes DNA-Fragments annehmen, das komplementäre einzelsträngige DNA-Fragment eine andere Mobilität als ein anderes Fragment. Nicht nur die Substitution eines einzelnen Nucleotids, sondern auch die Nucleotiddeletion oder Nucleotidinsertion ändert die Konformation und die Mobilität des einzelsträngigen DNA-Fragments, wodurch der Nachweis der Substitution, Deletion und Insertion durch Gelelektrophorese und das Abtrennen der abnormalen DNA-Fragmente ermöglicht wird.

[0015] Somit werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Screenen von Genen (1) genomische DNA-Fragmente und RNA-Fragmente aus einer aus einem Subjekt entnommenen Probe erhalten; (2) cDNA-Fragmente aus den RNA-Fragmenten durch Reverse-Transcriptase-Reaktion erhalten; (3) eine PCR-Amplifikationsreaktion unter Verwendung der genomischen DNA-Fragmente und der komplementären DNA-Fragmente als Matrizen durchgeführt, und es werden ein erstes PCR-Amplifikationsprodukt, abgeleitet von der Zielregion der genomischen DNA-Fragmente, und ein zweites PCR-Amplifikationsprodukt, abgeleitet von der Zielregion der komplementären DNA-Fragmente, erhalten; (4) die Mengen des ersten PCR-Amplifikationsprodukts und des zweiten PCR-Amplifikationsprodukts bezüglich jedes Allels, von dem die genomischen DNA-Fragmente und die komplementären DNA-Fragmente abgeleitet sind, gemessen; (5) die Unterschiede in der Genexpression zwischen den Allelen auf der Grundlage der Messergebnisse nachgewiesen; und (6) die Anwesenheit oder Abwesenheit einer genetischen Anomalie auf der Grundlage der Ergebnisse dieses Nachweises bestimmt.

[0016] Mit anderen Worten ist das erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass es eine erste Stufe, in der genomische DNA-Fragmente und RNA-Fragmente aus einer aus einem Subjekt entnommenen Probe erhalten werden; eine zweite Stufe, in der DNA-Fragmente, die zu den RNA-Fragmenten komplementär sind, durch Reverse-Transcriptase-Reaktion erhalten werden; eine dritte Stufe, in der unter Verwendung der genomischen DNA-Fragmente und der komplementären DNA-Fragmente als Matrizen eine PCR-Amplifikation durchgeführt wird, wobei ein erstes PCR-Amplifikationsprodukt, das von der Zielregion des genomischen DNA-Fragments abgeleitet ist, um ein zweites PCR-Amplifikationsprodukt, das von der Zielregion des zweiten komplementären DNA-Fragments abgeleitet ist, erhalten werden; eine vierte Stufe, in der die Menge des ersten PCR-Amplifikationsprodukts und des zweiten PCR-Amplifikationsprodukts für jedes Allel gemessen werden, aus dem die genomischen DNA-Fragmente und die komplementären DNA-Fragmente abgeleitet sind, eine fünfte Stufe, in der der Unterschied in der Genexpression zwischen den Allelen ausgehend von den Messergebnissen nachgewiesen wird; und eine sechste Stufe umfasst, in der das Vorhandensein oder dergleichen einer genetischen Anomalie auf der Grundlage der Messergebnisse bestimmt wird.

[0017] Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst weiterhin eine Stufe, in der die 3'-Enden des ersten PCR-Amplifikationsprodukts und des zweiten PCR-Amplifikationsprodukts abgestumpft werden.

[0018] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfordert, dass die Bedingungen der PCR-Amplifikationsreaktion im Hinblick sowohl auf die Matrizen des genomischen DNA-Fragments als auch des komplementären DNA-Fragments identisch sind.

[0019] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die vierte Stufe durch das Einzelstrangkonformationspolymorphismusverfahren durchgeführt.

[0020] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet die PCR-Amplifikationsreaktion in der dritten Stufe einen Fluoreszenz-markierten Primer, und das erste PCR-Amplifikationsprodukt und das zweite PCR-Amplifikationsprodukt, die in der dritten Stufe erhalten werden, werden einer Elektrophorese unterworfen, und die Messung in der vierten Stufe wird durch Nachweisen der Fluoreszenz der Fluoreszenzmarkierungen durchgeführt.

[0021] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird jede Signalintensität der elektrophoretischen Bande des ersten PCR-Amplifikationsprodukts (Peakhöhe oder Peakfläche) für jedes der Allele, aus denen die als Matrizen eingesetzten genomischen DNA-Fragmente abgeleitet sind, als "A1(DNA)" beziehungsweise "A2(DNA)" bezeichnet, und jede Signalintensität der elektrophoretischen Bande des zweiten PCR-Amplifikationsprodukts (Peakhöhe oder Peakfläche) für jedes der Allele, aus denen die als Matrize eingesetzten komplementären DNA-Fragmente abgeleitet sind, als "B1(cDNA)" beziehungsweise "B2(cDNA)" bezeichnet. Außerdem wird der Unterschied in der Genexpression zwischen den zwei Allelen durch Vergleichen eines ersten Indikators und eines zweiten Indikators nachgewiesen, wobei der erste Indika-

tor von der folgenden Formel abgeleitet wird:

k = A2 (DNA)/A1 (DNA)

oder von der folgenden Formel:

k' = A1 (DNA)/A2 (DNA)

und der zweite Indikator wird von der folgenden Formel abgeleitet:

B2 (cDNA)/B1 (cDNA)

oder von der folgenden Formel:

B1 (cDNA)/B2 (cDNA).

[0022] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Unterschied in der Genexpression zwischen den Allelen durch Vergleichen eines ersten Indikators und eines zweiten Indikators nachgewiesen; der erste Indikator und der zweite Indikator sind die "Differenz in der Genexpression zwischen den Allelen" beziehungsweise "das Verhältnis der Genexpression zwischen den Allelen"; wobei die "Differenz in der Genexpression zwischen den Allelen" durch die folgende Formel definiert ist:

α = |(B2(cDNA)/B1(cDNA) – A2(DNA)/A1(DNA))|

oder durch die folgende Formel:

α' = |(B1(cDNA)/B2(cDNA) – A1(DNA)/A2(DNA))|

und das "Verhältnis der Genexpression zwischen den Allelen" wird durch die folgende Formel definiert:

(1 + (α/k)) = (B2 (cDNA)/B1 (cDNA))/(A2 (DNA)/A1 (DNA))

oder durch die folgende Formel:

(1 + (α'/k')) = (B1 (cDNA)/B2 (cDNA))/(A1 (DNA)/A2 (DNA)).

[0023] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst eine Stufe, bei der der erste Indikator und der zweite Indikator numerisch oder grafisch dargestellt werden.

[0024] Die erfindungsgemäße Vorrichtung zum Screenen von Genen umfasst eine Vielzahl von Elektrophoresebahnen für die Elektrophorese von Nucleinsäurefragmenten, die mit einer Fluoreszenzmarkierung markiert sind; ein Mittel zum Strahlen eines Lasers auf die Vielzahl von Elektrophoresebahnen; ein Mittel zum Nachweisen der Fluoreszenz, die durch Bestrahlung mit einem Laser aus der Fluoreszenzmarkierung abgegeben wird; ein Mittel zum Analysieren des Elektrophoresemusters von Nucleinsäurefragmenten, die durch die Elektrophorese aufgetrennt werden; und eine Anzeigevorrichtung zum Anzeigen der Analyseergebnisse.

[0025] In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung zeigt die Anzeigevorrichtung entweder als Buchstaben, Zahlen oder als Abbildungen einen oder mehrere Parameter, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus den Namen einer Zielgenstelle, Nucleotidsequenzen von Primern, Nucleotidsequenzen von Allelen, Unterschied in der Nucleotidsequenz zwischen den Allelen, den Signalintensitäten der Elektrophoresebanden von genomischen DNA-Fragmenten, die von jedem der Allele abgeleitet sind, den Signalintensitäten von Elektrophoresebanden von cDNA-Fragmenten, die von jedem der Allele abgeleitet sind, einem Verhältnis der Signalintensitäten der Elektrophoresebanden von genomischen DNA-Fragmenten, die von jedem der Allele abgeleitet sind, einem Verhältnis der Signalintensitäten von Elektrophoresebanden von cDNA-Fragmenten, die von jedem der Allele abgeleitet sind, dem Unterschied in der Genexpression zwischen den Allelen, einem Verhältnis der Genexpression zwischen den Allelen und einem statistisch signifikanten Unterschied der Differenzen und/oder Verhältnisse der Genexpression zwischen den Allelen besteht.

[0026] Das erfindungsgemäße Verfahren kann als neues Screeningverfahren zum Screenen eines Trägers eines familiären Tumors eingesetzt werden, wenn periphere Blutlymphozyten als Testprobe und als Ziel, ein

Tumorsuppressor (beispielsweise p53, BRCA1 oder BRCA2) oder ein DNA-Fragment, das in einem Exon eines DNA-Fehlpaarungsreparaturenzymgens (beispielsweise hMSH2 oder hMLH1) einen Polymorphismus hat, eingesetzt werden. Dieses Verfahren kann deshalb erheblich zu genauen Untersuchungen beitragen. Außerdem kann in diesem Verfahren mit guter Reproduzierbarkeit rasch gescreent werden, ob in einem spezifischen Gen eine Anomalie vorhanden ist. Ein Patient, bei dem diese Anomalie festgestellt wird, wird einer genaueren Untersuchung unterzogen werden, beispielsweise der Bestimmung der Gensequenz und der Identifikation der Mutation. Für klinische Fälle, bei denen die physiologische Signifikanz einer Mutation aus der Identifikation der Mutation allein nicht geklärt werden kann, ermöglicht es dieses Verfahren, dessen Signifikanz aus dem Ungleichgewicht der Genexpression aufzuklären. Das erfindungsgemäße Screeningverfahren ist bislang nicht bekannt. Dieses Verfahren kann zum Screenen von Mutationen von Genen eingesetzt werden, die mit dem Ausbruch von Krebs und verschiedenen lebensbedrohlichen Krankheiten assoziiert sind, und es kann für Studien über die Unterschiede zwischen Individuen auf der Grundlage von umfangreichen Nucleotidsequenzpolymorphismen eingesetzt werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0027] Fig. 1 ist ein Fließdiagramm, welches die erfindungsgemäßen Verfahren zum Screenen von Genen beschreibt.

[0028] Die Fig. 2(A) und Fig. 2(B) zeigen ein Screeningbeispiel eines normalen Gens beim Screenen einer genetischen Anomalie unter Einsatz eines Einzelnucleotidpolymorphismus gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

[0029] Die Fig. 3(A) und Fig. 3(B) zeigen ein Screeningbeispiel eines anormalen Gens beim Screenen einer genetischen Anomalie unter Verwendung eines Einzelnucleotidpolymorphismus gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

[0030] Die Fig. 4(A) bis Fig. 4(D) zeigen ein Screeningbeispiel, welches das erfindungsgemäße Verfahren auf Krebszellen anwendet, die keinen Nucleotidsequenzpolymorphismus, sondern eine Mutation in einem Allel aufweisen.

[0031] Die Fig. 5(A) und Fig. 5(B) zeigen elektrophoretische Muster, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten werden. Fig. 5(A) ist ein Elektropherogramm einer normalen Probe, und Fig. 5(B) ist ein Elektropherogramm einer anormalen Probe.

[0032] Die Fig. 6(A) und Fig. 6(B) zeigen die Auswirkung der PCR-Zyklusanzahl in dem erfindungsgemäßen Verfahren.

[0033] Fig. 7 zeigt die Auswirkung der PCR-Temperaturprofile in dem erfindungsgemäßen Verfahren.

[0034] Fig. 8 zeigt die Streuung der Ergebnisse, die durch drei unterschiedliche RT-PCRs in dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten werden.

[0035] Fig. 9 zeigt die Streuung der Ergebnisse, die für drei unterschiedliche Proben nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten werden.

[0036] **Fig.** 10 ist ein Anzeigebeispiel, welches die Screeningergebnisse zeigt, die in einer medizinischen Untersuchung eines Individuums nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten werden.

[0037] **Fig.** 11 ist ein Anzeigebeispiel, welches die Screeningergebnisse zeigt, die in einer gruppenmedizinischen Untersuchung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhalten werden.

[0038] Fig. 12 ist ein Beispiel der Anwendung einer Sondenhybridisierung auf das erfindungsgemäße Verfahren.

Beschreibung der Bezugszeichen:

[0039] **1**, paternales Allel mit einem Einzelnucleotidpolymorphismus; **1'**, maternales Allel mit einem Einzelnucleotidpolymorphismus; **2**, Stelle des Ungleichgewichts (in der Transkriptionsinitiations-/Kontrollregion); **3**, Krebs-spezifische Mutation; **41**, elektrophoretische Bande eines genomischen DNA-Fragments aus Allel **1**; **42**,

elektrophoretische Bande eines genomischen DNA-Fragments aus Allel **1'**; **43**, elektrophoretische Bande eines cDNA-Fragments aus Allel **1**; **44**, elektrophoretische Bande eines cDNA-Fragments aus Allel **1'**; **51**, exponentielle Amplifikationsphase; **52**, Sättigungsphase; **53**, S2(DNA)/S1(DNA) oder S2(cDNA)/S1(cDNA); **54**, P2(DNA)/P1(DNA) oder P2(cDNA)/P1(cDNA); **110-1**, PCR-Reaktionsröhrchen; **110-2**, PCR-Reaktionsröhrchen; **111**, PCR-Puffer; **112**, DNA-Sonde, die mit Allel **1** der genomischen DNA spezifisch hybridisiert; **113**, DNA-Sonde, die mit Allel **1'** der genomischen DNA spezifisch hybridisiert; **114**, genomisches DNA-Fragment; **115**, DNA-Sonde, die mit Allel **1** der cDNA spezifisch hybridisiert; **116**, DNA-Sonde, die mit Allel **1'** der cDNA spezifisch hybridisiert; **117**, cDNA-Fragment.

Eingehende Beschreibung der Erfindung

[0040] Das erfindungsgemäße Verfahren zum Screenen von Genen wird im Folgenden eingehend beschrieben. Es sei angemerkt, dass DNA-Fragmente, die unter Verwendung von genomischer DNA als Matrize amplifiziert worden sind, als "genomische DNA-Fragmente" bezeichnet werden können, und dass DNA-Fragmente, die unter Verwendung von komplementärer DNA als Matrize amplifiziert worden sind, als "komplementäre DNA-Fragmente" oder "cDNA-Fragmente" in der Beschreibung bezeichnet werden können.

[0041] In der ersten Stufe werden DNA-Fragmente und RNA-Fragmente aus einer einem Subjekt entnommenen Probe erhalten. Die aus einem Subjekt entnommenen Proben umfassen, wobei sie jedoch nicht darauf beschränkt sind, Urin, Auswurf, Fäkalien, Abstriche, Gesamtblut, Serum, Biopsiegewebe, Knochenmark, Eiter und Waschflüssigkeiten aus den betroffenen Flächen. Die genomischen DNA-Fragmente und die RNA-Fragmente werden aus derselben Probe entnommen. Das Verfahren zum Gewinnen der genomischen DNA-Fragmente und der RNA-Fragmente aus der Probe ist nicht besonders eingeschränkt, wobei herkömmliche Verfahren geeignet sind. Verfahren zum Gewinnen von DNA umfassen DNA-Extraktionsverfahren, wie das Proteinase-K-Phenol-Chloroform-Verfahren. Außerdem können Verfahren zur Herstellung amplifizierter DNA mittels PCR direkt unter Verwendung von Blut oder Biopsieproben eingesetzt werden (Mercier et al., Nucleic Acid Res., Vol. 18, 5908, 1990, oder Panaccio et al., Nucleic Acid Res., Vol. 21, 4656, 1993). RNA-Gewinnungsverfahren umfassen RNA-Extraktionsverfahren, wie das Guanidin-thiocyanat-Verfahren. Die gewonnene RNA kann entweder die gesamte zelluläre RNA oder Poly(A)-RNA sein.

[0042] In der zweiten Stufe werden die komplementären DNA-Fragmente der RNA durch Reverse-Transcriptase-Reaktion erhalten. Die Reverse-Transcriptase-Reaktion kann nach herkömmlichen Techniken durchgeführt werden. Als Enzym, das in der Reversen-Transcriptase-Reaktion eingesetzt werden kann, sind Enzyme mit hoher optimaler Reaktionstemperatur bevorzugt, beispielsweise Superscript II Reverse-Transcriptase oder Tth DNA-Polymerase, wobei jedoch auch AMV Reverse-Transcriptase oder MoMuLV Reverse-Transcriptase eingesetzt werden können. Als Primer, der in der Reversen-Transcriptase-Reaktion eingesetzt werden kann, kann jeder Oligo-dT-Primer, ein statistischer Primer von etwa 6 Nucleotiden oder ein spezifischer Primer von etwa 20–30 Nucleotiden oder beliebige zwei oder mehrere dieser in Kombination eingesetzt werden.

[0043] In der dritten Stufe wird die PCR unter Verwendung der genomischen DNA-Fragmente und der komplementären DNA-Fragmente als Matrizen durchgeführt. Es werden ein erstes PCR-Amplifikationsprodukt, das von der Zielregion der genomischen DNA-Fragmente abgeleitet ist, und ein zweites PCR-Amplifikationsprodukt erhalten, das von der Zielregion der komplementären DNA-Fragmente abgeleitet ist. In dieser Beschreibung bedeutet "Zielregion" die durch PCR zu amplifizierende Region, und die Zielregion des genomischen DNA-Fragments und die Zielregion des komplementären DNA-Fragments sind im Wesentlichen dieselbe Region. Als Zielregion kann jede beliebige Region innerhalb der Exons des genomischen DNA-Fragments ausgewählt werden, es ist jedoch bevorzugt, eine Region auszuwählen, die Polymorphismus zeigt. Als eine Region, die Polymorphismus zeigt, kann beispielsweise eine Region eingesetzt werden, die einen Einzelnucleotidpolymorphismus (SNP) aufweist. Das erste PCR-Amplifikationsprodukt, das von der Zielregion des genomischen DNA-Fragments abgeleitet ist, kann durch Durchführen der PCR mit dem genomischen DNA-Fragment als Matrize und unter Einsatz eines Primers erhalten werden, der mit jedem Terminus der Zielregion hybridisieren kann. Das zweite PCR-Amplifikationsprodukt, das von der Zielregion des komplementären DNA-Fragments abgeleitet ist, kann durch Durchführen der PCR mit dem komplementären DNA-Fragment als Matrize und einem Primer erhalten werden, der mit jedem Terminus der Zielregion hybridisieren kann. Es ist bevorzugt, dass der in der PCR einzusetzende Primer markiert ist (beispielsweise mit einer fluoreszierenden Markierung), um den Nachweis des Elektrophoresemusters in der vierten Stufe einfach und genau durchführen zu können. Es ist bevorzugt, dass die PCR-Bedingungen (beispielsweise die Temperaturen und die Zeiträume für die Denaturierung, das Annealing und die Verlängerungsreaktion, die Anzahl der PCR-Zyklen, und dergleichen) identisch sind, wenn das "genomische DNA-Fragment" und das "komplementäre DNA-Fragment" erhalten werden, und üblicherweise wird die PCR in demselben Amplifikationsreaktionsapparat durchgeführt. Es ist

bevorzugt, dass die Anzahl der PCR-Zyklen soweit wie möglich identisch ist, wenn jedoch die Matrizenkonzentrationen vor der Amplifikation zwischen der genomischen DNA und der komplementären DNA deutlich unterschiedlich sind (beispielsweise weniger als 1/10 oder mehr als das 10-fache), dann kann die Anzahl der PCR-Zyklen, die eingesetzt werden, wenn das "genomische DNA-Fragment" erhalten wird, von der Anzahl der PCR-Zyklen, wenn das "komplementäre DNA-Fragment" erhalten wird, sich um einige Zyklen unterscheiden. Es sollte angemerkt werden, dass in der dritten Stufe andere Amplifikationsverfahren als PCR, beispielsweise LCR, NASBA oder andere solche bekannte Verfahren zur Amplifikation eingesetzt werden können.

[0044] Es ist bevorzugt, die Termini des PCR-Amplifikationsprodukts abzustumpfen. Während dieses Abstumpfen nicht essentiell ist, ist es im Hinblick auf die Erhöhung der Genauigkeit des erfindungsgemäßen genetischen Screeningverfahrens bevorzugt. Das Abstumpfen kann beispielsweise durch Verarbeiten mit einem Enzym mit einer 3'→5'-Exonucleaseaktivität, wie dem Klenow-Fragment, durchgeführt werden.

[0045] In der Stufe 4 werden die Mengen des ersten PCR-Amplifikationsprodukts und des zweiten PCR-Amplifikationsprodukts bezüglich jedes Allels gemessen, aus dem das genomische DNA-Fragment und das komplementäre DNA-Fragment abgeleitet sind. Beispiele für Verfahren zur Messung der Menge des PCR-Amplifikationsprodukts für jedes Allel ein Messverfahren auf der Grundlage des Elektrophoresemusters, das durch elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produkts erhalten wird, und ein Messverfahren durch Sondenhybridisierung unter Verwendung von Oligonucleotid-Chips und dergleichen. Ein bevorzugtes Messverfahren ist SSCP. Mit dem SSCP-Verfahren kann ein Unterschied in einem einzelnen Nucleotid innerhalb eines DNA-Fragments nachgewiesen werden. Wenn in der dritten Stufe ein Fluoreszenz-markierter Primer eingesetzt wird, kann durch Elektrophorese der PCR-Amplifikationsprodukte und durch Nachweisen der Fluoreszenz aus der Fluoreszenzmarkierung und durch Auftragen der Elektrophoresezeit (Minuten) als X-Achse und der Fluoreszenzintensität (relativer Wert) als Y-Achse ein in **Fig.** 5 gezeigtes Elektrophoresemuster erhalten werden. Wenn die Nucleotidsequenzen der PCR-Produkte sich unterscheiden, werden sich auch die Elektrophoresemuster unterscheiden (**Fig.** 5). Somit werden PCR-Produkte, die von den jeweiligen Allelen eines Gens, das heterozygot ist, abgeleitet sind, unterschiedliche Elektrophoresemuster zeigen. Somit ist es möglich, für jedes Allel die Menge des PCR-Amplifikationsprodukts auf der Grundlage dieses Elektrophoresemusters zu messen. Bei der Analyse der genomischen DNA nach dem SSCP-Verfahren, das in den **Fig.** 2 bis 4 gezeigt ist, entsprechen die Elektrophoresemuster des "genomischen DNA-Fragments" des paternal abgeleiteten Allels und des maternal abgeleiteten Allels den Elektrophoresemustern der genomischen DNA-Allele, während die Elektrophoresemuster des "komplementären DNA-Fragments", das von dem paternal abgeleiteten Allel und dem maternal abgeleiteten Allel transkribiert worden ist, dem Elektrophoresemuster entsprechen, welches das Expressionsmuster von RNA zeigt.

[0046] In der fünften Stufe wird der Unterschied der Genexpression zwischen Allelen auf der Grundlage der Messergebnisse nachgewiesen. Wenn die Menge des PCR-Amplifikationsprodukts des komplementären DNA-Fragments für jedes Allel unterschiedlich ist, geht man davon aus, dass dieser Unterschied durch einen Unterschied in der Genexpression zwischen den Allelen verursacht wird. Da die PCR-Amplifikationsprodukte der komplementären DNA-Fragmente, die von jedem Allel abgeleitet sind, einer PCR-Amplifikationsreaktion unter denselben Bedingungen unterworfen wurden, ergibt sich der Unterschied in der Menge des PCR-Amplifikationsprodukts aus einem Unterschied in der Menge des komplementären DNA-Fragments einer Matrize, das heißt aus einem Unterschied in der Menge der exprimierten mRNA zwischen den Allelen. Da im Gegensatz dazu angenommen wird, dass die Menge des genomischen DNA-Fragments einer Matrize zwischen den Allelen in normalen Zellen ohne LOH identisch ist, wird davon ausgegangen, dass die Menge des PCR-Amplifikationsprodukts des genomischen DNA-Fragments zwischen den Allelen identisch ist. Deshalb kann unter Verwendung des Verhältnisses der "genomischen DNA-Fragmente" zwischen den Allelen das Verhältnis der "komplementären DNA-Fragmente" für jedes Allel genau berechnet werden.

[0047] In der sechsten Stufe wird die Anwesenheit oder Abwesenheit einer genetischen Anomalie auf der Grundlage der Nachweisergebnisse bestimmt. Wenn ein Unterschied in der Expression zwischen den Allelen nachgewiesen wird, deutet dies daraufhin, dass eine genetische Anomalie vorhanden ist, wenn kein Unterschied in der Expression zwischen den Allelen nachgewiesen wird, deutet dies daraufhin, dass keine genetische Anomalie vorhanden ist.

[0048] Wenn das Signalintensitätsverhältnis der elektrophoretischen Bandensignale für das "genomische DNA-Fragment", das von jedem Allel abgeleitet ist, und das Signalintensitätsverhältnis der elektrophoretischen Bandensignale für das "komplementäre DNA-Fragment", das von jedem Allel abgeleitet ist, sich um mehr als einen vorgegebenen Wert unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass im Hinblick auf die Genexpression der zwei Allele eine Störung vorhanden ist. Wenn diese Verhältnisse nicht um mehr als einen vorge-

gebenen Wert unterschiedlich sind, kann davon ausgegangen werden, dass im Hinblick auf die Genexpression der zwei Allele keine Störung vorhanden ist.

[0049] Nachstehend wird das erfindungsgemäße Verfahren unter Bezugnahme auf die Figuren eingehend beschrieben.

[0050] Fig. 1 ist ein Fließdiagramm, das ein Beispiel der Stufen des erfindungsgemäßen Verfahrens angibt.

[0051] **Fig.** 2 und 3 sind Figuren, die ein Screeningbeispiel erklären, bei dem eine genetische Anomalie unter Verwendung eines Einzelnucleotidpolymorphismus getestet wird. **Fig.** 2 erklärt ein Screeningbeispiel, bei dem das Gen normal ist, und **Fig.** 3 erklärt ein Screeningbeispiel, bei dem eine Genanomalie angenommen wird.

[0052] Fig. 2(A) ist eine Figur, welche die Beziehung zwischen einem normalen Gen und dem Transkript des normalen Gens aufzeigt.

[0053] Fig. 2(B) ist eine Figur, welche die Signalintensität der elektrophoretischen Banden eines "genomischen DNA-Fragments" und eines "komplementären DNA-Fragments" zeigt. Wenn in der genomischen DNA die DNA-Fragmente eines paternal abgeleiteten Allels **1** und eines maternal abgeleiteten Allels **1'** Einzelnucleotidpolymorphismen zeigen, wie beispielsweise in **Fig.** 2 gezeigt, wo das Nucleotidpaar des paternalen Allels **1** ein AT-Paar ist, und das korrespondierende Nucleotidpaar des maternalen Allels **1'** ein GC-Paar ist, dann ist, da in einem normalen Chromosomenpaar einer normalen Zelle ein Chromosom von jeweils dem Vater und der Mutter vererbt wird, das Verhältnis zwischen Allel **1** und Allel **1'** 1:1. In einer normalen Zelle bedeutet dies keinen Verlust der Heterozygotie (LOH). Wenn Allel **1** und Allel **1'** gleichermaßen exprimieren, wird das Verhältnis von mRNA, die von Allel **1** abgeleitet ist, und mRNA, die von Allel **1'** abgeleitet ist, 1:1 sein. In der Reaktion, bei der das "cDNA-Fragment", das von Allel **1** abgeleitet ist, und das "cDNA-Fragment", das von Allel **1'** abgeleitet ist, erhalten werden, wobei die Reverse-Transcriptions-Reaktion und die Effizienz der PCR identisch sind, wird das Verhältnis des von Allel **1** abgeleiteten "cDNA-Fragments" 1 zu dem von Allel **1'** abgeleiteten "cDNA-Fragment" 2 ebenfalls 1:1 sein.

[0054] Fig. 3(A) ist eine Figur, welche die Beziehung zwischen einem Gen, bei dem eine Unausgewogenheit der Genexpression vorhanden ist, was auf eine Genanomalie hindeutet, und dem Transkriptionsprodukt des Gens zeigt. Fig. 3(B) ist eine Figur, welche die Signalintensitäten der Elektrophoresebanden des "genomischen DNA-Fragments" und des "cDNA-Fragments" zeigt. Fig. 3(A) zeigt, dass bei einer Mutation **2** in dem maternal abgeleiteten Allel **1'** oft ein Unterschied in der Genexpression zwischen den Allelen auftritt. Mutation **2** zeigt eine Mutation in der Nucleotidsequenz der Expressionskontrollregion stromaufwärts des Gens, eine Mutation, die von einem Terminationscodon in der kodierenden Region des Gens herrührt, eine Anomalie in der Nucleotidsequenz der nicht-translatierten Region des mRNA-3'-Terminus oder dergleichen.

[0055] Für Diagnosezwecke ist es im Allgemeinen extrem schwierig, die Methylierung in Bezug auf die gesamte Expressionskontrollregion eines Gens zu sequenzieren oder deren Vorhandensein oder Abwesenheit nachzuweisen, und somit die Signifikanz der genetischen Mutation festzustellen. Wenn die Expression eines Allels im Vergleich zu der Expression des anderen Allels deutlich niedriger ist, kann jedoch unabhängig davon davon ausgegangen werden, dass als Ergebnis eine genetische Inaktivierung stattgefunden hat. Anders ausgedrückt kann damit das Verhältnis des Allels **1** zu Allel **1'** bezüglich des "cDNA-Fragments" und das Verhältnis des Allels **1** zu Allel **1'** bezüglich des "genomischen DNA-Fragments" vorhergesagt werden. Im Fall eines normalen Gens, wie in Fig. 2(B) gezeigt, ist das Verhältnis von Allel **1** zu Allel **1'** gleich dem Verhältnis des "cDNA-Fragments" abgeleitet von Allel **1**, zu dem "cDNA-Fragment", abgeleitet von Allel **1'**. Wenn jedoch das Vorhandensein eines anormalen Gens angenommen wird, wie in Fig. 3(B) gezeigt, ist das Verhältnis von Allel **1** zu Allel **1'** nicht gleich dem Verhältnis des "cDNA-Fragments", abgeleitet von Allel **1**, zu dem "cDNA-Fragment", abgeleitet von Allel **1'**, sodass der Nachweis der Genanomalie als Ungleichgewicht der Genexpression ermöglicht wird. Bei der Bestimmung des Verhältnisses des "cDNA-Fragments", abgeleitet von Allel **1**, zu dem "cDNA-Fragment", abgeleitet von Allel **1'**, kann die Verwendung des herkömmlichen RT-PCR-SSCP-Verfahrens ins Auge gefasst werden. Bei dem herkömmlichen RT-PCR-SSCP-Verfahren können die Messergebnisse in Abhängigkeit von den Unterschieden der eingesetzten Reaktionsvorrichtungen und den Unterschieden der Typen der DNA-Polymerasen variieren. Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass die zu untersuchende Zelle eine Krebszelle ist und LOH auftritt. Wenn deshalb ein Ergebnis erhalten worden ist, das anzeigt, dass das Verhältnis des "cDNA-Fragments", abgeleitet von Allel **1**, zu dem "cDNA-Fragment", abgeleitet von Allel **1'**, nicht 1:1 ist, ist es nicht möglich zu bestimmen, ob dieses Ergebnis das Ungleichgewicht einer genetischen Expression wiederspiegelt oder es ein Ergebnis der Unterschiede in der PCR-Reaktion ist, oder aus LOH aufgrund der Verkrebsung der Zelle zurückzuführen ist, oder das Ergebnis auf eine Kombination dieser Faktoren

zurückzuführen ist. Bei der kompetitiven PCR wird eine Korrelation allein in Bezug auf den Unterschied gemacht, der auf die Variation in der PCR-Reaktion zurückzuführen ist. Bei der kompetitiven PCR werden DNA in der Probe und innere Standard-DNA-Fragmente bekannter Konzentrationen während der Amplifikation mit einem identischen Satz Primer als Konkurrenten eingesetzt, und es wird eine Korrelation der Unterschiede aufgrund der Reaktionsbedingungen gemacht.

[0056] In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden während der Amplifikation Fragmente, die Polymorphismus-1 beziehungsweise Polymorphismus-2 enthalten, miteinander als Konkurrenten eingesetzt, wie in den **Fig.** 2 und 3 gezeigt wird. Die Kettenlängen beider DNA-Fragmente sowie ihre Nucleotidsequenzen sind bis auf ein Nucleotid jedoch identisch. Deshalb ist die Genauigkeit gleich oder höher als diejenige bekannter kompetitiver PCR-Verfahren. Bei genomischer DNA normaler Zellen, in denen kein LOH auftritt, ist das Verhältnis von Allel **1** zu Allel **1'** 1:1. Somit kann mit dem Verhältnis des Allels **1** zu dem Allel **1'**, das aus der Analyse erhalten wird, als Standard (ein Verhältnis von 1:1) das Verhältnis der "cDNA-Fragmente", abgeleitet von Allel **1**, zu den "cDNA-Fragmenten", abgeleitet von Allel **1'**, genau berechnet werden. Das heißt, dass im Hinblick auf die Tatsache, dass kein Bedarf daran besteht, eine innere Standard-DNA einer bekannten Konzentration herzustellen, und dass die zwei Allele als idealer innerer Standard eingesetzt werden können, das erfindungsgemäße Verfahren gegenüber bekannten kompetitiven PCR-Verfahren überlegen ist.

[0057] In dem Elektrophoresemuster wird die Signalintensität der elektrophoretischen Bande des "genomischen DNA-Fragments", abgeleitet von Allel **1**, als A1 bezeichnet; die Signalintensität der elektrophoretischen Bande des "genomischen DNA-Fragments", abgeleitet von Allel **1'**, wird als A2 bezeichnet; die Signalintensität der elektrophoretischen Bande des "komplementären DNA-Fragments", abgeleitet von Allel **1**, wird als B1 bezeichnet; und die Signalintensität der elektrophoretischen Bande des "komplementären DNA-Fragments", abgeleitet von Allel **1'**, wird als B2 bezeichnet. Als A1 wird die Peakhöhe P1(DNA) und die Peakfläche P1(DNA) eingesetzt; als A2 wird die Peakhöhe P2(DNA) und die Peakfläche P2(DNA) eingesetzt; als B1 wird die Peakhöhe P1(cDNA) und die Peakfläche P1(cDNA) eingesetzt; und als B2 wird die Peakhöhe P2(cDNA) und die Peakfläche P2(cDNA) eingesetzt. Das Verhältnis von A1 zu A2 wird als k (Formel I) bezeichnet. Der Unterschied in der PCR-Kettenverlängerungseffizienz und dergleichen in Bezug auf beide Allele ist in k enthalten. In normalen Zellen, in denen die Kettenverlängerungseffizienzen während der PCR für beide Allele gleich sind, gilt k = 1. Es wird angenommen, dass der Wert von k im Wesentlichen identisch ist für die Amplifikation, bei der "komplementäre DNA-Fragmente" erhalten werden.

[0058] Wenn somit α als die Änderung der Signalintensität, abgeleitet von dem "Unterschied in der Genexpression zwischen Allelen", definiert ist, kann B2 aus der Formel II vorhergesagt werden.

$$k = (A2/A1) \quad \text{...(I)}$$

$$B2 = B1\,(\alpha + k) \quad \text{...(II)}$$

[0059] In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird (A2/A1) mit (B2/B1) verglichen. Aus dem Unterschied zwischen (A2/A1) und (B2/B1) kann der "Unterschied in der Genexpression zwischen Allelen" berechnet werden (Formel (III)). Aus dem Verhältnis von (A2/A1) zu (B2/B1) kann das "Genexpressionsungleichgewicht" als (1 + (α/k)) berechnet werden (Formel (IV)).

$$\alpha = |(B2/B1) - (A2/A1) \quad \text{...(III)}$$

$$(1 + (\alpha/k)) = (B2/B1)/(A2/A1) \quad \text{...(IV)}$$

[0060] Das erfindungsgemäße Verfahren ist dahingehend einzigartig, dass der Nachweis des "Unterschiedes in der Genexpression zwischen Allelen" (α) genau geführt werden kann, dass ermöglicht wird, die Daten k abzuleiten, die für die Untersuchung signifikant sind, und dass das "Genexpressionsverhältnis zwischen den Allelen", 1 + (α/k), nachgewiesen werden kann, sodass das erfindungsgemäße Verfahren den bekannten kompetitiven PCR-Verfahren überlegen ist. Es sollte angemerkt werden, dass k', α' und (1 + (α'/k')), abgeleitet von (Formel (V)–Formel (VIII)) durch Umkehren von A2 und A1, und B2 und B1 in Formel (I) zu Formel (IV) anstelle von k, α, (1 + (α/k)) eingesetzt werden können.

$$k' = (A1/A2) \quad \text{...(I)}$$

$$B1 = B2(\alpha' + k') \quad \text{...(II)}$$

$$\alpha' = |(B1/B2) - (A1/A2)| \quad ...(III)$$

$$(1 + (\alpha'/k')) = (B1/B2)/(A1/A2) \quad ...(IV)$$

[0061] Wenn die Signalstärke, bei der beide Allele exprimiert werden, als 100 festgelegt wird, ist die Signalstärke, bei der nur eines der zwei Allele exprimiert wird, theoretisch 50, und wenn beide Allele nicht exprimiert werden, ist die Signalstärke 0. Bei den Messergebnissen für die Mengen der Genexpression, die durch herkömmliche Verfahren erhalten werden, wie beispielsweise durch kompetitive PCR, kommt es zu einer Streuung von etwa 30% bis 50%. Bei einer Streuung von 30% bis 50% ist es jedoch schwierig, genau zwischen dem Fall, bei dem zwei Allele exprimiert werden, und dem Fall zu unterscheiden, bei dem nur ein Allel exprimiert wird, aber auch zwischen dem Fall, bei dem nur ein Allel exprimiert wird, und dem Fall zu unterscheiden, bei dem keines der Allele exprimiert wird. Mit der Ausnahme von Spezialfällen, bei denen nur eines der zwei Allele aufgrund des Phänomens der genomischen Prägung exprimiert wird, gibt es bislang keine Berichte über statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen Allelen. Abgesehen von Spezialfällen ist ein Grund dafür, dass es keine Berichte über statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen Allelen gibt, darin zu sehen, dass keine ausreichende Nachweisgenauigkeit zur Verfügung stand. Es sollte angemerkt werden, dass die Streuung beim Nachweis in dem erfindungsgemäßen Verfahren unter 10% ist, im Durchschnitt mehrere % (wie nachstehend beschrieben). Das erfindungsgemäße Verfahren kann nicht nur auf Einzelnucleotidpolymorphismen, sondern auch auf Gene mit Krebsspezifischen Mutationen angewandt werden.

[0062] **Fig.** 4 ist eine Figur, die ein Screeningbeispiel für Krebszellen mit einer Mutation eines der Allele erklärt, ohne dass ein Einzelnucleotidpolymorphismus vorliegt. **Fig. 4(A)** ist eine Figur, die die Beziehung zwischen einem normalen Gen und dem Transkript des normalen Gens beschreibt. **Fig. 4(B)** ist eine Figur, welche die Beziehung zwischen einem anormalen Gen einer Krebszelle oder dergleichen und dem Transkript des anormalen Gens beschreibt. **Fig. 4(C)** ist eine Figur, welche die Menge des "genomischen DNA-Fragments" und des "komplementären DNA-Fragments" anzeigt, die im Fall eines normalen Gens vorhanden ist. **Fig. 4(D)** ist eine Figur, die die Menge des "genomischen DNA-Fragments" und des "komplementären DNA-Fragments" angibt, die im Fall eines anormalen Gens vorhanden ist. Da in dem normalen Gen kein Einzelnucleotidpolymorphismus vorliegt, können die zwei Allele nicht unterschieden werden. Wo jedoch eine Krebs-spezifische Mutation **3** in einer Zielregion vorhanden ist, kommt es bei der Genexpression oft zu Abnormalitäten und zu einer Verringerung der Menge der mRNA, sodass eine Verringerung der Menge der cDNA durch die Reverse-Transcriptase-Reaktion erzielt werden kann. Aus dem Elektrophoresemuster des "genomischen DNA-Fragments" und dem Elektrophoresemuster des "komplementären DNA-Fragments" zeigt das Verhältnis des "genomischen DNA-Fragments" zu dem "komplementären DNA-Fragment" einen signifikanten Unterschied, sodass die Signifikanz der Mutation bestätigt werden kann. Da die Analyse mit genomischer DNA und RNA, die von der Screeningprobe gewonnen wurde, wenn sie unter Verwendung einer genomischen DNA oder RNA als Probe verglichen wird, durchgeführt wird, zeigt sich in dieser Ausführungsform kein Unterschied im Einfluss auf das Screeningsubjekt.

[0063] Das Elektrophoreseverfahren wird durch die Gelzusammensetzung, den Gelgefrierpunkt, die Dauer und dergleichen beeinflusst, wenn jedoch wie in der vorliegenden Ausführungsform die Verhältnisse der Peakhöhe und der Peakfläche der zwei Allele als Indikatoren eingesetzt werden, ist die Varianz der erhaltenen Daten sehr gering. Eine Untersuchung unter Verwendung der Ergebnisse der vorliegenden Ausführungsform ist den herkömmlichen Untersuchungsverfahren dahingehend überlegen, dass weniger Fehldiagnosen gestellt werden. Wenn das "genomische DNA-Fragment" und das "komplementäre DNA-Fragment" mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen markiert werden und in derselben Spur elektrophoretisch aufgetrennt werden, kann die Varianz zwischen den Spuren verringert werden und somit die Messgenauigkeit erhöht werden.

[0064] Das erfindungsgemäße genetische Screeningverfahren wird mit einer Fluoreszenz nachweisenden Screeningvorrichtung durchgeführt, welche eine Vielzahl von Elektrophoresebahnen für die Elektrophorese von Nucleinsäurefragmenten, die mit einem Fluoreszenzmarker markiert sind; ein Mittel zum Strahlen von Laserlicht auf die Vielzahl von Elektrophoresebahnen; ein Mittel zum Nachweisen der aufgrund der Bestrahlung mit einem Laser emittierten Fluoreszenz aus den Fluoreszenzmarkierungen; ein Mittel zum Analysieren der Elektrophoresemuster der Nucleinsäurefragmente, die durch Elektrophorese aufgetrennt werden; und eine Anzeigevorrichtung zum Anzeigen der Analyseergebnisse umfasst, wobei auf der Anzeige die Ergebnisse vorzugsweise entweder als Buchstaben, Zahlen, Abbildungen oder als eines oder mehr der Folgenden angezeigt werden: der Name der Zielgenstelle, die Nucleotidsequenz des Primers, die Nucleotidsequenzen der Allele (Allel **1** und Allel **1'**), die Differenz in der Nucleotidsequenz zwischen den Allelen (Allel **1** und Allel **1'**), die Signalintensität der elektrophoretischen Bande des "genomischen DNA-Fragments", abgeleitet von dem jeweiligen

Allel (Allel **1** und Allel **1'**), die Signalintensität der elektrophoretischen Bande des "komplementären DNA-Fragments", abgeleitet von dem jeweiligen Allel (Allel **1** und Allel **1'**), das Verhältnis der Signalintensitäten der elektrophoretischen Banden der "genomischen DNA-Fragmente", abgeleitet von dem jeweiligen Allel (Allel **1** und Allel **1'**) (d. h. das Verhältnis der Signalintensität der elektrophoretischen Bande des "genomischen DNA-Fragments", abgeleitet von Allel **1** zu der Signalintensität der elektrophoretischen Bande des "genomischen DNA-Fragments", abgeleitet von Allel **1'**), das Verhältnis der Signalintensitäten der elektrophoretischen Banden der "komplementären DNA-Fragmente", abgeleitet von dem jeweiligen Allel (Allel **1** und Allel **1'**) (d. h. das Verhältnis der Signalintensität der elektrophoretischen Bande des "komplementären DNA-Fragments", abgeleitet von Allel **1** zu der Signalintensität der elektrophoretischen Bande des "komplementären DNA-Fragments", abgeleitet von Allel **1'**), und der statistisch signifikante Unterschied des Genexpressionsverhältnisses/Unterschied zwischen den Allelen (beispielsweise der Unterschied in der Genexpression zwischen den Allelen: (α (Formel III)), Genexpressionsverhältnis: ((1 + (α/k), (Formel IV)). Die Peakhöhe und die Peakfläche der elektrophoretischen Bande des DNA-Fragments können als Signalintensität angenommen werden.

Beispiele

[0065] Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung durch die experimentellen Beispiele eingehender beschrieben.

1. Isolierung der DNA-Probe

1.1 Isolierung der DNA-Probe aus Blut

[0066] Eine DNA-Probe wurde durch die folgenden Verfahren isoliert:

(1) Zu 5 ml Gesamtblut aus einem Subjekt wurden 0,5% NaCl in Wasser gegeben, und die Erythrozyten wurden in dem Gesamtblut unter niederosmotischem Druck aufgebrochen.

(2) Die Lösung aus (1) wurde zentrifugiert, um die Erythrozyten zu entfernen und Leukozyten zu erhalten.

(3) Zu den erhaltenen Leukozyten wurden 5 ml eines Lysepuffers (10 mM Tris, 0,01 mM EDTA, 0,5% SDS, und 100 µg/ml RNase, alle als Endkonzentration angegeben) gegeben, und der Puffer wurde bei einer Temperatur von 37°C während 1 Stunde gehalten.

(4) Protease K (Endkonzentration: 50 µg/ml) wurde zu dem Lysepuffer gegeben, und danach wurde über Nacht bei 55°C eine Reaktion durchgeführt.

(5) Zu der Lösung aus (4) wurde ein gleiches Volumen gesättigtes Phenol gegeben, und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur geschüttelt und 10 min bei 3 000 UpM zentrifugiert.

(6) Nach der Zentrifugation wurde die obere Schicht gewonnen.

(7) Phenolchloroform wurde dann in einem Volumen, das gleich demjenigen der oberen Schicht von (6) war, zugegeben, und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur geschüttelt und 10 min bei 3 000 UpM zentrifugiert, um die obere Schicht zu gewinnen.

(8) Chloroform wurde in einem Volumen zugegeben, das demjenigen der oberen Schicht von (7) entsprach, und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur geschüttelt und 10 min bei 3 000 UpM zentrifugiert, um die obere Schicht zu gewinnen.

(9) Die obere Schicht, die in (8) gewonnen wurde, wurde einer Ethanolausfällung unterzogen, um DNA zu erhalten.

1.2 Isolierung einer DNA-Probe aus Gewebe

[0067] Nach dem Entfernen eines Gewebes wurde dieses mit flüssigem Stickstoff rasch eingefroren und gelagert. Es wurde kurz vor Verwendung zerstört, und die DNA wurde gemäß den Schritten (3)–(9) des vorstehenden Punkts 1.1 erhalten.

2. Isolierung von RNA

[0068] RNA wurde durch die folgenden Verfahren isoliert:

(1) Zu 5 ml Gesamtblut aus einem Subjekt wurden 0,5% NaCl in Wasser gegeben, und die Erythrozyten in dem Gesamtblut wurden unter niederosmotischem Druck aufgebrochen.

(2) Erythrozyten wurden aus der Lösung von (1) entfernt, wobei Leukozyten erhalten wurden.

(3) 500 µl einer cytolytischen Lösung D (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat (pH 7,0), 0,5% Sarcosyl, und 0,1 M 2-Mercaptoethanol) wurden pro 50 mg Gewebe zugegeben und gemischt.

(4) 50 µl 2 M Natriumacetat (pH 4,0) wurden zu der Lösung von (3) gegeben und gemischt, und das Gemisch wurde wiederholt zentrifugiert.

(5) Zu der Lösung von (4) wurden 500 µl RNA-freies gesättigtes Phenol und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) gegeben.
(6) Nach dem Mischen wurde das Gemisch 15 min auf Eis stehen gelassen.
(7) Die Lösung von (6) wurde 20 min bei 10 000 UpM bei 4°C zentrifugiert.
(8) Die obere Schicht wurde gewonnen.
(9) 1 ml Ethanol wurde zu der in (8) gewonnenen oberen Schicht gegeben, um bei 20°C eine Ausfällung während 1 Std. durchzuführen.
(10) Die Lösung von (9) wurde 20 min bei 4°C und 10 000 UpM zentrifugiert.
(11) Die obere Schicht wurde dekantiert, und der erhaltene Niederschlag wurde in 300 µl cytolytischer Lösung D lysiert.
(12) 1 ml Ethanol wurde zu der Lysatlösung von (11) gegeben, um während 1 Std. bei 20°C umzufällen.
(13) Die Lösung von (12) wurde 20 min bei 10 000 UpM bei 4°C zentrifugiert.
(14) Nach dem Dekantieren der oberen Schicht wurde der Niederschlag mit 75% eiskaltem Ethanol gewaschen und 5 min zentrifugiert.
(15) 0,1% Diethylpyrocarbonatlösung (50 µl) wurden zu dem Niederschlag von (14) gegeben, um die RNA aufzulösen.
(16) Die aufgelöste DNA wurde bei –70°C gelagert.

2.2 Isolierung von RNA aus Gewebe

[0069] Nach dem Entfernen eines Gewebes wurde dieses mit flüssigem Stickstoff rasch eingefroren und gelagert. Es wurde kurz vor dem Einsatz durch Homogenisieren zerstört, und die RNA wurde gemäß den Schritten (3)–(16) des vorstehenden Punkts 2.1 isoliert.

3. Reverse-Transcriptase (RT)-Reaktion

[0070] Die RT-Reaktion wurde wie folgt durchgeführt.
(1) Die folgenden Komponenten (1A)–(1D) wurden gemischt, um eine Mischlösung (insgesamt 10 µl) herzustellen:
(1A), RNA-Lösung (1 µg/1 µl) 1,0 µl;
(1B), RT-Primer (50 nM) 1,0 µl;
(1C), 10 × Reverse-Transcriptase-Puffer 1,4 µl;
(1D), ionenausgetauschtes Wasser 6,6 µl.
(2) Die Mischlösung wurde 2 min bei 95°C erhitzt.
(3) Die Mischlösung wurde 1 Std. bei 55°C umgesetzt.
(4) Das erhaltene Gemisch wurde zentrifugiert.
(5) Die folgenden Komponenten (5A)–(5E) wurden gemischt, um eine Mischlösung (insgesamt 14,0 µl) herzustellen:
(5A), das Gemisch 1 von (4) 10,0 µl;
(5B), Dithiothreitol (100 mM) 1,4 µl;
(5C), dNTPs (worin N = A, T, G oder C)-Gemisch (jeweils 5 mM) 1,4 µl;
(5D), RNasin (40 U/µl, Gibco BRL) 0,7 µl;
(5E), Reverse-Transcriptase Superscript II (200 U/µl, Gibco BRL).
(6) Die Mischlösung wurde 1 Std. bei 37°C gehalten.
(7) Die Mischlösung wurde 5 min bei 80°C gehalten.
(8) Das erhaltene Gemisch 2 wurde zentrifugiert und auf Eis stehen gelassen.

4. PCR

[0071] Die PCR wurde wie folgt durchgeführt.
(1) Die folgenden Komponenten (1A)–(1H) wurden gemischt, um eine Mischlösung (insgesamt 10 µl) herzustellen:
(1A), genomische DNA oder cDNA (0,5 µg/µl) 1 µl;
(1B), PCR-Primer (vorwärts, 10 nmol/ml) 0,25 µl;
(1C), Fluoreszenz-markierter PCR-Primer (umgekehrt, 10 nmol/ml) 0,25 µl;
(1D), $MgCl_2$ (25 mM) 0,4 µl;
(1E), dNTPs (worin N = A, T, G oder C)-Gemisch (2,5 µmol/ml) 0,8 µl;
(1F), Taq-Polymerase (5 U/µl) 0,05 µl;
(1G), 10 × PCR-Puffer 1 µl;
(1H), umdestilliertes Wasser 6,25 µl,

wobei als Fluoreszenzmarkierung für den Primer Cy 5 (Amersham Pharmacia) eingesetzt wurde.
(2) Die Mischlösung wurde unter den nachstehend beispielhaft genannten Bedingungen einer PCR-Amplifikation unterworfen:
Denaturierung, 94°C während 5 min;
30 PCR-Zyklen von 94°C während 30 sec, 60°C während 30 sec, und 72°C während 1 min, wobei das Gen amplifiziert wurde; und
Verlängerungsreaktion, 72°C während 8 min.

[0072] Durch dieses Verfahren wurde ein PCR-Amplifikationsprodukt (insgesamt 10 µl) erhalten.

5. Abstumpfungsbehandlung

[0073] Zu 10 µl des PCR-Amplifikationsprodukts wurde 1,0 U Klenow-Fragment gegeben, und dann wurde die Reaktion 30 min bei 37°C durchgeführt.

6. Nachweis des Einzelstrangkonformationspolymorphismus (SSCP)

(1) Zu dem abgestumpften PCR-Amplifikationsprodukt wurde eine Formamidfärbelösung (90% Formamid, 20mM EDTA, 0,05 Bromphenol blau) in einem 5–10-fachen Volumen gegeben.
(2) Für die Hitzedenaturierung wurde die Lösung aus (1) 5 min bei 90°C erhitzt.
(3) Das PCR-Amplifikationsprodukt wurde durch Elektrophorese auf einem nicht-denaturierenden 15% Acrylamidgel, unter Verwendung eines DNA-Sequenzierers vom Fluoreszenznachweistyp aufgetrennt (ALF Express, Amersham Pharmacia). Der eingesetzte Elektrophoresepuffer war Tris-glycinpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin). Die Elektrophorese wurde bei 20°C bei einer festgelegten elektrischen Leistung von 30 W während 6 Stunden durchgeführt. Das "genomische DNA-Fragment" und das "cDNA-Fragment" wurden gleichzeitig auf demselben Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fluoreszenz, die durch Anregen des Fluoreszenzmarkers mit einem Laser emittiert wurde, wurde mit einem Fotosensor nachgewiesen, und die Beziehung der Zeit nach Beginn der Elektrophorese (Elektrophoresedauer) zu der Menge des mit dem Fotosensor nachgewiesenen Lichts wurde aufgenommen.

7. Vergleich der Elektropherogramme zwischen dem "genomischen DNA-Fragment" und dem "cDNA-Fragment"

[0074] **Fig.** 5 zeigt ein Beispiel der Elektropherogramme, die durch das erfindungsgemäße Verfahren zum Screenen von Genen bestimmt wurden. Die Fig. 5(A) und Fig. 5(B) zeigen die Elektropherogramme von normalen beziehungsweise anormalen Proben. In dem Beispiel der **Fig.** 5 war das Ziel ein Einzelnucleotidpolymorphismus des Exons 11 des BRCA-1-Gens, welches systemisch exprimiert wird, beispielsweise im Blut, und von DNA oder RNA, die aus Leukozyten von Patienten mit familiärem Brustkrebs extrahiert wurde, präpariert werden kann. In den Fig. 5(A) und Fig. 5(B) gibt die X-Achse die Elektrophoresedauer an, und die Y-Achse gibt die Menge des Fluoreszenzlichts aus dem Fluoreszenz-markierten Primer (in Zählern) an. Die Fläche der elektrophoretischen Bande **41** des "genomischen DNA-Fragments" aus Allel **1** ist S1(DNA), und der Peakwert der Bande ist P1(DNA); die Fläche der elektrophoretischen Bande **42** des "genomischen DNA-Fragments" aus Allel **1'** ist S2 (DNA), und der Peakwert der Bande ist P2(DNA); die Fläche der elektrophoretischen Bande **43** des "cDNA-Fragments" aus Allel **1** ist S1(cDNA), und der Peakwert der Bande ist P1(cDNA); und die Fläche der elektrophoretischen Bande **44** des "cDNA-Fragments" aus Allel **1'** ist S1(cDNA), und der Peakwert der Bande ist P2(cDNA). Die Fläche und der Peakwert jeder DNA-Bande wurden unter Verwendung eines Peaknachweissatzes mit Hilfe einer analytischen Software (Allele Link), die in ALF Express enthalten ist, bestimmt. In der normalen Probe in Fig. 5(A) ist S2(DNA)/S1(DNA) mit S2(cDNA)/S1(cDNA) konsistent, wobei der Fehler im Bereich von ± 8% liegt, während in der anormalen Probe in Fig. 5(B), von der angenommen wird, dass zwischen den Allelen ein Unterschied in der Genexpression besteht, die beiden offensichtlich nicht miteinander übereinstimmen. Aus den Ergebnissen der Fig. 5(A) und Fig. 5(B) wurden beim Vergleich von P2(DNA)/P1(DNA) mit P2(cDNA)/P1(cDNA) ähnliche Ergebnisse erhalten. In dem Beispiel in Fig. 5(B) wird angenommen, dass zwischen den Allelen ein Unterschied in der Genexpression besteht, wie im Beispiel der **Fig.** 3 gezeigt wird. Die Primer, die eingesetzt wurden, um Fig. 5(A) und Fig. 5(B) zu erhalten, sind in den SEQ ID NOS:1 und 2 gezeigt, wobei diese Primer einen Teil des Exons 11 von BRCA1 amplifizieren können. Ähnliche Ergebnisse konnten auch durch die Verwendung der Primer der SEQ ID NOS:3 und 4 usw. erhalten werden, welche eine andere Region des Exons 11 des BRCA1-Gens amplifizieren können. Die SEQ ID NOS: 1 bis 4 sind wie folgt:

TTGTCAATCCTAGCCTTCCAAGAG (SEQ ID NO:1)

TTTTGCCTTCCCTAGAGTGCTAAC (SEQ ID NO:2)

GCAACTGGAGCCAAGAAGAGTAAC (SEQ ID NO:3)

TTTGCAAAACCCTTTCTCCACTTA (SEQ ID NO:4)

8. Auswirkungen der PCR-Bedingungen auf die Ergebnisse

[0075] **Fig.** 6 zeigt die Auswirkung der Anzahl der PCR-Zyklen in dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Screenen von Genen, wobei Fig. 6(A) die Beziehung der Anzahl der PCR-Zyklen zu der Anzahl der DNA-Kopien aufzeigt, und Fig. 6(B) die Beziehung der Anzahl der PCR-Zyklen zu dem "Genexpressionsungleichgewicht von zwei Allelen" aufzeigt. Das Ziel war ein Einzelnucleotidpolymorphismus des Exons 4 des p53-Gens, welches systemisch exprimiert wird, beispielsweise im Blut, und aus DNA oder RNA hergestellt werden kann, die aus Leukozyten von gesunden Personen extrahiert wurde. Die in den Beispielen der Fig. 6(A) und Fig. 6(B) eingesetzten Primer sind durch die SEQ ID NOS:5 und 6 dargestellt:

AGCTCCCAGAATGCCAGAG (SEQ ID NO:5); und

CTGGGAAGGGACAGAAGATG (SEQ ID NO:6).

[0076] In den in Fig. 6(A) und Fig. 6(B) gezeigten Beispielen wurde eine Probe aus einer gesunden Person (d. h. DNA, cDNA) als Matrize eingesetzt und 5 min bei 94°C denaturiert und danach einer PCR-Amplifikation (94° C während 30 sec, 60°C während 30 sec, und 72°C während 1 min) mit 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 und 36 Zyklen unterworfen. In Fig. 6(A) ist die X-Achse ein PCR-Zyklus, während die Y-Achse die Fluoreszenzmenge ist, die von einem Fluoreszenz-markierten Primer emittiert wird (in Zählern). Da die Anzahl der DNA-Kopien zu den Fluoreszenzzählern proportional ist, stellt die Y-Achse die Anzahl der DNA-Kopien dar. Bei 22–28 PCR-Zyklen war die exponentielle Amplifikationsphase **51**, und bei 30 oder mehr PCR-Zyklen wurde die Sättigungsphase **52**. In Fig. 6(B) zeigt ein geschlossener Kreis **53** einen Wert von (S2(cDNA)/S1(cDNA))/(S2(DNA)/S1(DNA)), und das Symbol x 54 bedeutet einen Wert von (P2(cDNA)/P1(cDNA))/(P2(DNA)/P1(DNA)). In dieser Figur sind alle Punkte im Bereich von 0,93 bis 1,10. Für die normale Probe ist der Unterschied in der Genexpression zwischen den Allelen nicht so groß, und das Genexpressionsverhältnis von zwei Allelen ist wahrscheinlich in der Nähe von 1, sodass die Ergebnisse in Fig. 6(B) plausibel sind. Während in herkömmlichen Verfahren, wie bei der kompetitiven PCR und der kinetischen PCR, das quantitative Profil allein bei der exponentiellen Amplifikationsphase **51** sichergestellt wird, kann in dem vorliegenden Beispiel, bei dem beide Allele verglichen werden, ein vernünftiges Screeningergebnis selbst in der Sättigungsphase **52** erhalten werden. Wenn somit die Menge einer DNA- oder cDNA-Probe gering ist, kann die Anzahl der PCR-Zyklen erhöht werden, sodass eine empfindlichere Messung selbst bei einer kleinen Probenmenge möglich wird. Wenn außerdem die cDNA-Probe sich hinsichtlich ihrer Menge von der DNA-Probe unterscheidet, wenn beispielsweise die Menge der cDNA-Probe 10-fach kleiner ist als diejenige der DNA-Probe, zeigen die Ergebnisse in der Fig. 6(B), dass die Anzahl der PCR-Zyklen der cDNA so festgelegt werden kann, dass sie zwei oder drei Zyklen höher sind als diejenige der DNA-Probe. Die Ergebnisse in Fig. 6(B) zeigen zudem, dass jedes Ergebnis, das durch das erfindungsgemäße Verfahren zum Screenen von Genen erhalten wird, durch die Anzahl der PCR-Zyklen fast nicht beeinflusst wird. Somit wird das Genexpressionsungleichgewicht von zwei Allelen (d. h. 1 + (α/k), angegeben als Formel IV) fast ausgeglichen, wobei die Streuung unter wenigen liegt, selbst wenn die Anzahl der PCR-Zyklen variiert wird.

[0077] Fig. 7 zeigt die Wirkung eines PCR-Temperaturprofils in dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Screenen von Genen. Die Ergebnisse, die in dieser Figur gezeigt sind, wurden unter Verwendung derselben Probe wie in den Fig. 6(A) und Fig. 6(B) erhalten. Die PCR-Temperaturprofile (d. h. die Kombinationen von Temperatur und Zeit bei der Denaturierung, dem Annealing und der Kettenverlängerung) 1 bis 4 sind Folgende.
PCR-Temperaturprofil 1: Denaturierung bei 94°C während 5 min; dann 30 PCR-Zyklen bei 94°C während 30 sec, 60°C während 30 sec und 72°C während 1 min.
PCR-Temperaturprofil 2: Denaturierung bei 94°C während 5 min; dann 30 PCR-Zyklen bei 94°C während 30 sec, 60°C während 30 sec und 72°C während 30 sec.
PCR-Temperaturprofil 3: Denaturierung bei 94°C während 5 min; dann 30 PCR-Zyklen bei 94°C während 30 sec, 55°C während 30 sec und 72°C während 1 min.
PCR-Temperaturprofil 4: Denaturierung bei 94°C während 5 min; dann 30 PCR-Zyklen bei 94°C während 30 sec, 55°C während 30 sec und 72°C während 30 sec.

[0078] In Fig. 7 wird das Verhältnis der Genexpression zwischen Allelen (d. h. 1 + (α/k), angegeben als For-

mel IV) durch H2/H1 = (S2(cDNA)/S1(cDNA))/(S2(DNA)/S1(DNA)) und durch A2/A1 = (P2(cDNA)/P1(cDNA))/(P2(DNA)/P1(DNA)) dargestellt. Fig. 7 zeigt außerdem die mittleren Werte (1 + α/k) und die Standardabweichungen (die Zahlen nach ±), die durch mehrfache Messungen erhalten wurden. In den PCR-Temperaturprofile 1 bis 4 war (S2(cDNA)/S1(cDNA))/(S2(DNA)/S1(DNA)) im Bereich von 0,96 bis 1,08, und (P2(cDNA)/P1(cDNA))/(P2(DNA)/P1(DNA)) war 0,95 bis 1,09. Zusätzlich waren die Streuungen von (1 + α/k) in den PCR-Temperaturprofilen 1 bis 4 6,1%, 6,2%, 9,2% beziehungsweise 9,5%, festgestellt unter Verwendung jeder Fläche, und die maximale Streuung der Werte (1 + α/k) = 1 war 9%. Die Ergebnisse in Fig. 7 deuten an, dass die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhaltenen Ergebnisse durch die PCR-Temperaturprofile unter den Bedingungen, bei denen DNA oder cDNA als Matrize amplifiziert wird, fast nicht beeinflusst wurden; das heißt, die Streuung war bis zu 10%.

9. Streuung der Ergebnisse zwischen den RT-PCRs und zwischen den Proben

[0079] Fig. 8 zeigt die Streuung von drei Ergebnissen, die durch RT-PCR in den erfindungsgemäßen Verfahren zum Screenen von Genen einzeln erhalten wurden. In jeder RT-PCR, die in Fig. 8 gezeigt ist, wurde Reverse-Transcriptase (Superscript II Reverse-Transcriptase) aus unterschiedlichen Röhrchen eingesetzt, und das Ziel war ein Einzelnucleotidpolymorphismus des Exons 4 des p53-Gens. Die eingesetzten Primer sind die in den SEQ ID NOS:5 und 6 gezeigten, welche eine Region des Exons 4 des p53-Gens amplifizieren. In dem in Fig. 8 gezeigten Beispiel wurde das PCR-Temperaturprofil 1 eingesetzt. Außerdem wurde das Verhältnis der Genexpression zwischen den Allelen (d. h. 1 + (α/k), angegeben als Formel IV) auf dieselbe Weise wie in Fig. 7 dargestellt. Die in Fig. 8 eingesetzte Probe war identisch zu derjenigen in Fig. 7. Fig. 8 zeigt, dass die Streuungen der Ergebnisse, die einzeln in den Durchgängen 1, 2 und 3 erhalten wurden, 2,8%, 2,0% beziehungsweise 6,1%, bestimmt unter Verwendung der Flächen, waren, wobei die Werte mehrere % oder weniger waren. Die maximale Streuung von (1 + α/k) = 1 war 9%. Die Streuung von nicht mehr als mehrere %, die durch die jeweiligen Durchgänge unter Verwendung derselben Probe erhalten wurden, war kleiner als die maximale Streuung von 10%, die auf den Unterschied zwischen den PCR-Temperaturprofilen zurückzuführen ist.

[0080] Fig. 9 zeigt die Streuungen der Ergebnisse, die für drei unterschiedliche Proben durch das erfindungsgemäße Verfahren zum Screenen von Genen erhalten wurden. Das Verhältnis der Genexpression zwischen Allelen, (1 + α/k) der Formel IV, ist in derselben Weise wie in Fig. 7 dargestellt. Die in den **Fig.** 6, Fig. 7 und Fig. 8 eingesetzten Proben waren identisch zu der Probe Nr. 1 in Fig. 9. Als PCR-Temperaturprofil wurde das Profil Nr. 1 eingesetzt. Fig. 9 zeigt, dass die Streuungen der Ergebnisse, die in den Proben Nrn. 1, 2 und 3 einzeln erhalten wurden, waren 2,0%, 5,7% beziehungsweise 6,3%, bestimmt unter Verwendung der Fläche, wobei jeder Wert mehrere % oder weniger war, was darauf hindeutet, dass alle erhaltenen Ergebnisse plausibel waren. Die **Fig.** 6 bis Fig. 9 zeigen, dass die Streuung unter den Bedingungen desselben PCR-Temperaturprofils im Fall des erfindungsgemäßen Verfahrens mehrere % oder weniger war.

10. Anzeigebeispiel der Screeningergebnisse

[0081] **Fig.** 10 ist ein Anzeigebeispiel, welches die Screeningergebnisse, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten werden, bei der medizinischen Untersuchung von Individuen zeigt. Fig. 10(A) ist ein Anzeigebeispiel, das ein Elektrophoresemuster (oder Elektropherogramm) für jeden Ort eines getesteten Individuums zeigt, wobei die X-Achse die Elektrophoresedauer ist und die Y-Achse die Fluoreszenzintensität angibt. Fig. 10(B) ist ein Anzeigebeispiel, das die Peakwerte der Elektrophoresebanden (H1, H2), die berechneten Flächen (A1, A2) und die Verhältnisse (H2/H1, A2/A1) durch Zahlen angibt. Diese Werte wurden durch Analysieren der Elektrophoresebanden auf dem Elektrophoresemuster jedes in Fig. 10(A) gezeigten Ortes bestimmt. In dem Anzeigebeispiel der Fig. 10(B) wird von der linken Reihe der ersten Zeile in der Anzeige zu der rechten Reihe derselben Zeile der Ort 1 in der folgenden Reihenfolge angegeben: H1 = P1(DNA); H2 = P2(DNA); H2/H1 = P2(DNA)/P1(DNA); A1 = S1(DNA); A2 = S2 (DNA); und A2/A1 = S2(DNA)/S1(DNA); und von der linken Reihe der zweiten Zeile in der Anzeige zu der rechten Reihe derselben Zeile wird der Ort 1 in der folgenden Reihenfolge angegeben: H1 = P1(cDNA); H2 = P2(cDNA); H2/H1 = P2(cDNA)/P1(cDNA); A1 = S1(cDNA); A2 = S2(cDNA); und A2/A1 = S2(cDNA)/S1(cDNA). Die Orte 2 und 3 werden auf dieselbe Weise angegeben.

[0082] Fig. 10(c) ist ein Anzeigebeispiel, welches H2/H1 = P2(DNA)/P1(DNA), A2/A1 = S2 (DNA)/S1(DNA), H2/H1 = P2(cDNA)/P1(cDNA), und A2/A1 = S2(cDNA)/S1(cDNA) für jeden Ort mittels Histogramm anzeigt. Wenn die Genexpression normal ist, ist jedes der vorstehend genannten vier Verhältnisse 1,0. In dieser Figur stellt die Y-Achse jedes der vier Verhältnisse dar. Auf der Grundlage der Ergebnisse, die beispielsweise durch eine gruppenmedizinische Untersuchung erhalten wurden, wird, wenn vorher bekannt ist, dass in gesunden Personen jedes Verhältnis im Bereich von 0,8 bis 1,2 ist, die Grenze zwischen normal und anormal durch eine

gepunktete Linie dargestellt. In den Orten 1 und 3 der Fig. 10(C) ist, da die Balken die Grenze überschreiten, offensichtlich eine anormale Genexpression in den Orten 1 und 3 vorhanden. In Fig. 10(D) werden der Unterschied in der Genexpression zwischen Allelen (α, als Formel III) und das Genexpressionsungleichgewicht von zwei Allelen (1 + (α/k) als Formel IV) für jeden Ort durch Zahlenwerte dargestellt.

[0083] **Fig.** 11 ist ein Anzeigebeispiel, das die Screeningergebnisse anzeigt, die bei einer gruppenmedizinischen Untersuchung durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten werden. Die Anzeige in Fig. 11(A) ist derjenigen in Fig. 10(B) ähnlich und basiert auf den Screeningergebnissen für einen bestimmten Ort in einer Vielzahl von Subjekten (oder Proben). In Fig. 11(B) stellt die X-Achse H2/H1 = P2(DNA)/P1(DNA) oder A2/A1 = S2(DNA)/S1(DNA) dar, und die Y-Achse stellt H2/H1 = P2(cDNA)/P1(cDNA) oder A2/A1 = S2(cDNA)/S1(cDNA) dar. Diese Verhältnisse, die durch Screenen jeder Probe erhalten wurden, sind durch Punkte dargestellt. Wenn die Genexpression normal ist, ist die Koordinate jedes Punkts idealerweise (1,0, 1,0). Viele Punkte, die durch dieses Screening erhalten wurden, sind in der Nähe von (1,0, 1,0). Wenn eine Probe mit einer Anomalie der Genexpression unter den zu testenden Proben vorhanden ist, werden Punkte für eine Probe mit einer solchen Anomalie an Positionen fern von (1,0, 1,0) angezeigt, wodurch man die anomalen Proben leicht identifizieren kann. Wenn beispielsweise ein solcher Punkt mit einem Markierungsmittel, wie einer Maus, angeklickt wird, können eingehendere Screeningergebnisse bezüglich der anomalen Probe angezeigt werden.

[0084] Fig. 11(C) ist ein Anzeigebeispiel, das die statistische Signifikanz zwischen einer anomalen Probe, die an einer Position fern von (1,0, 1,0) angezeigt wird und durch Anklicken mit einem Markierungsmittel ausgewählt wird, und einer Population, die keine anomalen Proben einschließt, wobei die statistische Signifikanz beispielsweise durch einen t-Test berechnet wird (d. h. ein Test auf Gleichheit zwischen zwei Mittelwerten) oder durch den F-Test berechnet wird (d. h. ein Test der Gleichheit von Varianzen). Somit ist diese Figur ein Anzeigebeispiel, das die Ergebnisse aus einer statistischen Behandlung einer Vielzahl von Testproben angibt. Es werden der Mittelwert, die Varianz, die Standardabweichung und der Standardfehler bezüglich der anomalen Proben und einer Population angezeigt. Zusätzlich werden bei dem t-Test der Unterschied in zwei Mittelwerten, ein Verhältnis von zwei Variationen, der Grad der Freiheit (DF), ein t-Wert und ein p-Wert angezeigt, während bei dem F-Test das Verhältnis von zwei Variationen, DF, F-Wert und p-Wert angegeben werden. Es kann der t-Test oder der F-Test bezüglich der jeweiligen Ergebnisse angezeigt werden.

11. Beispiel der Anwendung der Sondenhybridisierung auf das erfindungsgemäße Verfahren zum Screenen von Genen

[0085] Fig. 12 zeigt ein Beispiel der Anwendung der DNA-DNA-Hybridisierung auf das erfindungsgemäße Verfahren zum Screenen von Genen. Zuerst werden genomische DNA und cDNA in Röhrchen **110-1** und **110-2**, die einen PCR-Puffer enthalten, amplifiziert. Beispielsweise wird die Amplifikation der genomischen DNA und der cDNA in Röhrchen **110-1** beziehungsweise **110-2** durchgeführt. Dann werden das "genomische DNA-Fragment" **114** und das "cDNA-Fragment" **117** getrennt voneinander in einen Einzelstrang durch Hitzebehandlung oder dergleichen denaturiert. Nach der Denaturierung werden zu dem Röhrchen **110-1** eine DNA-Sonde **112**, die spezifisch mit dem Allel **1** der genomischen DNA hybridisiert, und eine DNA-Sonde **113** gegeben, die spezifisch mit dem Allel **1'** der genomischen DNA hybridisiert. Die DNA-Sonden **112** und **113** wurden jeweils vorher mit einem Fluoreszenzmittel markiert, wobei die Fluoreszenzmittel einen Unterschied von 10 nm oder mehr in der Emissionswellenlänge aufweisen, wenn sie miteinander verglichen werden. Das Röhrchen **110-1** wird mit Licht einer Wellenlänge angeregt, die in der Nähe der Anregungswellenlänge des Fluoreszenzmittels liegt. Die erzeugte Fluoreszenz wird mit Hilfe eines Detektors nachgewiesen. Die Fluoreszenzintensitäten aus den DNA-Sonden **112** und **113** entsprechen S1(DNA) beziehungsweise S2(DNA). Auf ähnliche Weise werden in das Röhrchen **110-2** eine DNA-Sonde **115**, die spezifisch mit dem Allel **1** der cDNA hybridisiert, und eine DNA-Sonde **116** gegeben, die spezifisch mit dem Allel **1'** der cDNA hybridisiert. Die DNA-Sonden **115** und **116** wurden jeweils vorher mit einem Fluoreszenzmittel markiert, wobei die Fluoreszenzmittel sich hinsichtlich ihrer Emissionswellenlänge um 10 nm oder mehr unterscheiden, wenn sie miteinander verglichen werden. Das Röhrchen **110-2** wird mit Licht einer Wellenlänge in der Nähe der Anregungswellenlänge des Fluoreszenzmittels bestrahlt. Die erzeugte Fluoreszenz wird mit Hilfe eines Detektors nachgewiesen. Die Fluoreszenzintensitäten aus den DNA-Sonden **115** und **116** entsprechen S1(cDNA) beziehungsweise S2(cDNA), sodass S2(DNA)/S1(DNA) und S2(cDNA)/S1(cDNA) verglichen werden können. Alternativ dazu kann das erfindungsgemäße Verfahren auch durch Sondenhybridisierung durchgeführt werden.

[0086] Wie vorstehend beschrieben wurde, basiert das erfindungsgemäße Verfahren zum Screenen von Genen auf einem neuen Ansatz, der es ermöglicht, die Anwesenheit oder Abwesenheit eines anomalen Gens nachzuweisen oder die Signifikanz eines Nucleotidpolymorphismus aufzuklären, indem ein "Unterschied in der Genexpression zwischen Allelen" oder ein "Verhältnis der Genexpression zwischen Allelen" als Indikator ein-

gesetzt wird. In diesem Verfahren wird mRNA aus jedem heterozygoten Allel abgetrennt, und der Unterschied der Menge zwischen den mRNAs wird durch RT-PCR-SSCP unter Ausnutzen des Nucleotidsequenzpolymorphismus in einer Exonregion der genomischen DNA gemessen. Außerdem wird in diesem Verfahren die Heterozygotie der DNA unter Einsatz desselben Verfahrens untersucht und mit dem quantitativen Unterschied der mRNA verglichen. Wenn die Heterozygotie der DNA und der quantitative Unterschied der mRNA sich signifikant voneinander unterscheiden, wird dies als Anomalie angenommen. Da das Verhältnis der Flächen oder der Peakhöhen in einem Elektrophoresemuster als Vergleichsindikator eingesetzt wird, wird die Streuung der erhaltenen Daten extrem gering, was zu einer Reduzierung von Fehldiagnosen führt. Zusätzlich ermöglicht es dieses Verfahren, auf der Grundlage der Unterschiede in der Genexpression zwischen heterozygoten Allelen eine Diagnose zu erstellen, weil die Streuung in einem Bereich von nicht mehr als einigen % unter denselben PCR-Temperaturprofilbedingungen liegt.

Vorteil der Erfindung

[0087] Das erfindungsgemäße Verfahren zum Screenen von Genen ermöglicht es, die Anwesenheit oder Abwesenheit eines anormalen Gens nachzuweisen oder die Signifikanz einer genetischen Anomalie aufzuklären, die durch DNA-Sequenzieren allein nicht bestimmt werden kann, wobei als Indikator ein "Unterschied in der Genexpression zwischen Allelen" oder ein "Verhältnis der Genexpression zwischen Allelen" eingesetzt wird. Da überdies die durch die Probenherstellung und die PCR-Amplifikation bewirkte Streuung gering wird, ist dieses Verfahren den herkömmlichen Verfahren hinsichtlich der Quantifizierung und der Reproduzierbarkeit überlegen, wodurch das Verfahren oder der Apparat zum Screenen der Gene, der für eine Automatisierung geeignet ist, bereitgestellt werden kann.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> HITACH,LTD.

National Cancer Center

<120> Genetisches Screening-Verfahren und Vorrichtung zum genetischen Screenen

<130> PH-1080

<140>

<141>

<150> JP 294257/1999

<151> 15-OCT-1999

<160> 6

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Für die PCR eingesetzter DNA-Primer

<400> 1

ttgtcaatcc tagccttcca agag 24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Für die PCR eingesetzter DNA-Primer

<400> 2

ttttgccttc cctagagtgc taac 24

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Für die PCR eingesetzter DNA-Primer

<400> 3

gcaactggag ccaagaagag taac 24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Für die PCR eingesetzter DNA-Primer

<400> 4

tttgcaaaac cctttctcca ctta 24

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Für die PCR eingesetzter DNA-Primer

<400> 5

agctcccaga atgccagag 19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Für die PCR eingesetzter DNA-Primer

<400> 6

ctgggaaggg acagaagatg 20

Patentansprüche

1. Verfahren zum Analysieren von Nucleinsäuren, umfassend:
einen ersten Schritt des Gewinnens von genomischen DNA-Fragmenten und RNA-Fragmenten aus einer aus einem Subjekt entnommenen Probe;
einen zweiten Schritt des Gewinnens von zu den RNA-Fragmenten komplementären DNA-Fragmenten mittels einer Reverse-Transcriptase-Reaktion;
einen dritten Schritt des Durchführens einer PCR-Amplifikation unter Verwendung dieser genomischen DNA-Fragmente und der komplementären DNA-Fragmente als Matrizen, wobei ein erstes, von dem Zielbereich der genomischen DNA-Fragmente abgeleitetes PCR-Amplifizierungsprodukt und ein zweites, von dem Zielbereich der komplementären DNA-Fragmente abgeleitetes PCR-Amplifizierungsprodukts gewonnen wird;
einen vierten Schritt des Messens einer Menge des ersten PCR-Amplifizierungsprodukts und einer Menge des zweiten PCR-Amplifizierungsprodukts in jeweils einem Paar von vom Vater abgeleiteten und von der Mutter abgeleiteten Allelen, von welchen die genomischen DNA-Fragmente und die komplementären DNA-Fragmente abgeleitet sind;
einen fünften Schritt des Bestimmens eines ersten Verhältnisses der Menge des ersten PCR-Amplifizierungsprodukts eines der Allele gegenüber der Menge des ersten PCR-Amplifizierungsprodukts des anderen der Allele, und eines zweiten Verhältnisses der Menge des zweiten PCR-Amplifizierungsprodukts eines der Allele gegenüber der Menge des zweiten PCR-Amplifizierungsprodukts des anderen der Allele; und
einen sechsten Schritt des Bestimmens der Gegenwart oder Abwesenheit einer genetischen Abnormalität, basierend auf einem dritten Verhältnis des ersten Verhältnisses zu dem zweiten Verhältnis oder einer Differenz zwischen dem ersten Verhältnis und dem zweiten Verhältnis.

2. Verfahren nach Anspruch 1, welches weiterhin einen Schritt des Abstumpfens des ersten PCR-Amplifizierungsprodukts und des zweiten PCR-Amplifizierungsprodukts umfasst.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die PCR-Amplifizierung unter identischen Bedingungen bezüglich der Matrizen sowohl der genomischen DNA-Fragmente als auch der komplementären DNA-Fragmente durchgeführt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der vierte Schritt durchgeführt wird, indem die Menge des ersten PCR-Amplifizierungsprodukts und des zweiten PCR-Amplifizierungsprodukt für jedes Allel, welches durch ein Einzelstrangkonformationspolymorphismusverfahren nachgewiesen wird, gemessen wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei in der PCR-Amplifizierungsreaktion in dem dritten Schritt ein Fluoreszenz-markierter Primer verwendet wird, das erste PCR-Amplifizierungsprodukt und das zweite PCR-Amplifizierungsprodukt einer Elektrophorese unterzogen werden und die Messungen in dem vierten Schritt durch Detektieren der Fluoreszenz des Fluoreszenzmarkers durchgeführt werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Messung in dem vierten Schritt basierend auf einem ersten Indikator durchgeführt wird, der durch mindestens eines von S1(DNR)/S2(DNA) und S2(DNA)/S1(DNA), wobei S1(DNA) und S2(DNA) jeweils eine Peakfläche der Signalintensität einer elektrophoretischen Bande des ersten PCR-Amplifizierungsprodukts für jedes der Allele, aus welchem die genomischen DNA-Fragmente abgleitet sind, darstellen; und
mindestens eines von S1(cDNA)/S2(cDNA) und S2(cDNA)/S1(cDNA) dargestellt ist, wobei S1(cDNA) und S2(cDNA) jeweils eine Peakläche der Signalintensität einer elektrophoretischen Bande des zweiten PCR-Amplfizierungsprodukts für jedes der Allele darstellen, aus welchen die komplementären DNA-Fragmente abgeleitet sind,
wobei der Unterschied der Genexpression zwischen Allelen durch einen Vergleich des ersten Indikators und des zweiten Indikators in dem fünften Schritt nachgewiesen wird.

7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Messung in dem vierten Schritt basierend auf einem ersten Indikator, der durch mindestens eines von P1(DNA)/P2(DNA) und P1(cDNA)/P2(cDNA) dargestellt wird, wobei P1(DNR) und P2(DNA) jeweils eine Peakhöhe der Signalintensität einer elektrophoretischen Bande des ersten PCR-Amplifizierungsprodukts für jedes der Allele darstellt, aus welchem die genomischen DNA-Fragmente abgeleitet sind; und
einem zweiten Indikator durchgeführt wird, der durch mindestens eines von P1(cDNA)/P2(cDNA) und P2(cDNA)/P1(cDNA) dargestellt ist, wobei P1(cDNA) und P2(cDNA) jeweils eine Peakhöhe der Signalintensität einer elektrophoretischen Bande des zweiten PCR-Amplifizierungsprodukts für jedes der Allele darstellt, aus welchen die komplementären DNA-Fragmente abgeleitet sind,
wobei der Unterschied der Genexpression zwischen Allelen durch einen Vergleich des ersten Indikators und des zweiten Indikators in dem fünften Schritt nachgewiesen wird.

8. Verfahren nach Anspruch 6, welches weiter einen Schritt der numerischen oder graphischen Darstellung des ersten Indikators und des zweiten Indikators umfaßt.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

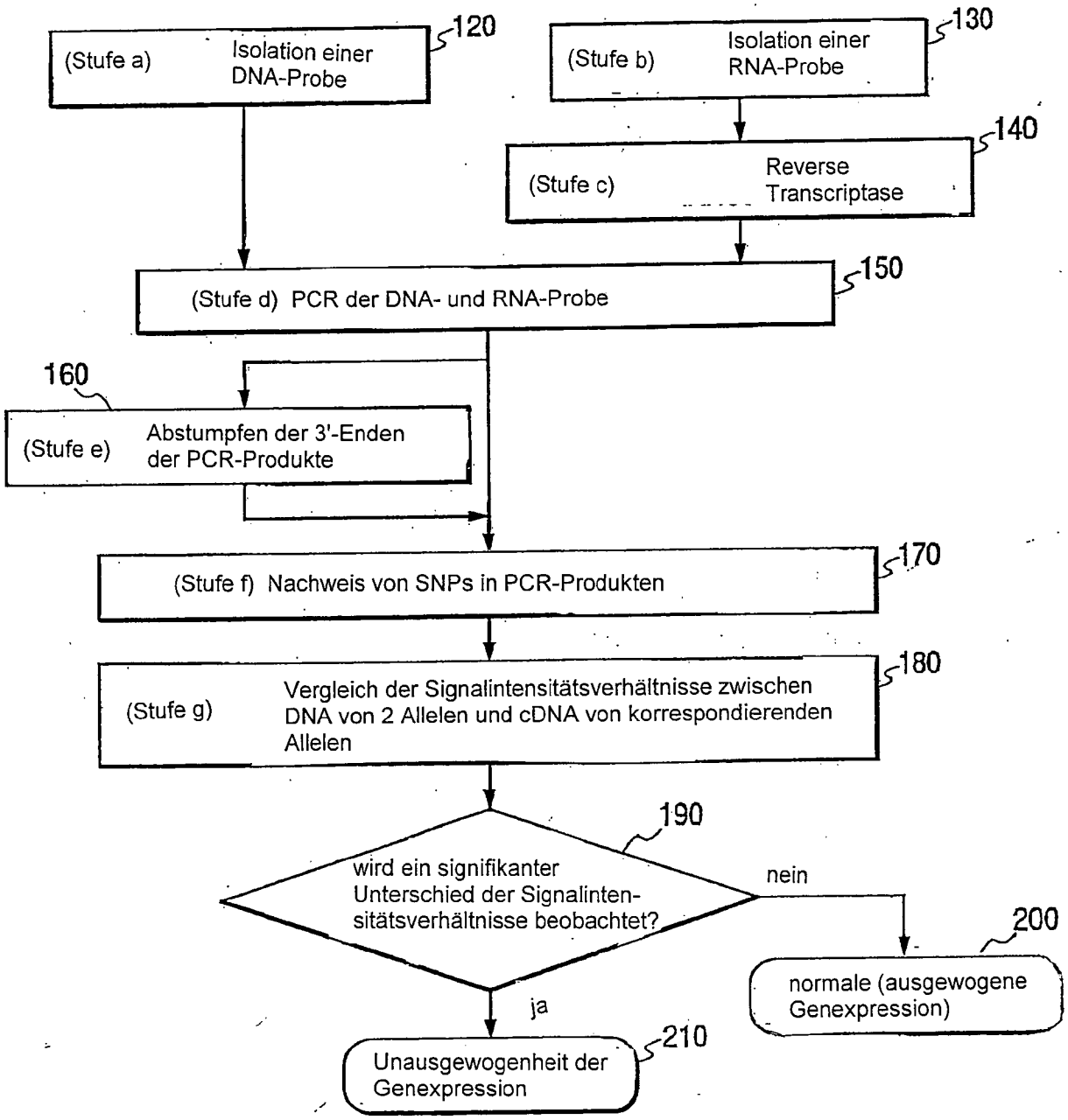


FIG. 2(A)

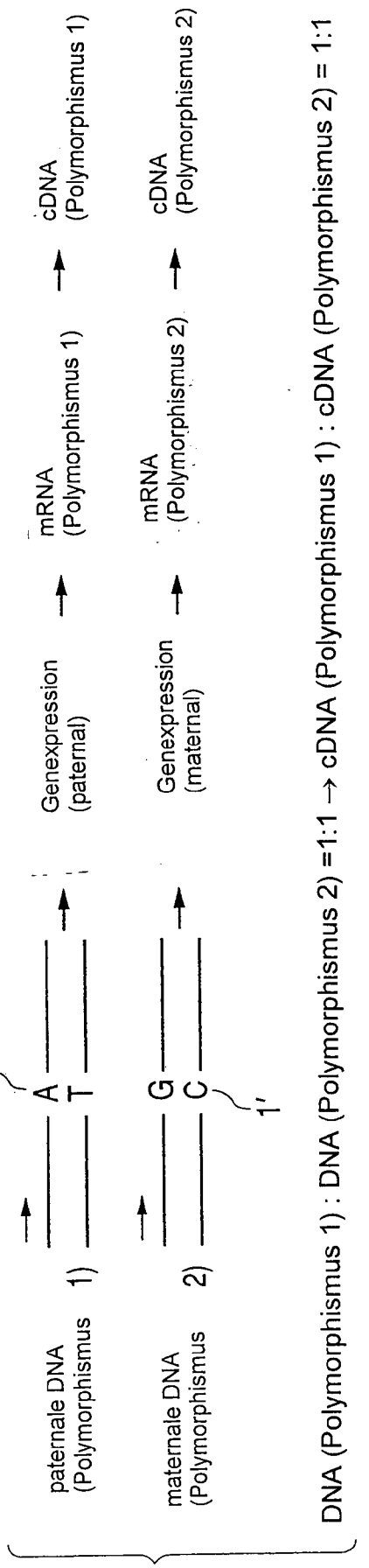

paternale DNA (Polymorphismus 1)
1)
A
T
1
Genexpression (paternal)
mRNA (Polymorphismus 1)
cDNA (Polymorphismus 1)
maternale DNA (Polymorphismus 2)
2)
G
C
1'
Genexpression (maternal)
mRNA (Polymorphismus 2)
cDNA (Polymorphismus 2)
DNA (Polymorphismus 1) : DNA (Polymorphismus 2) =1:1 → cDNA (Polymorphismus 1) : cDNA (Polymorphismus 2) = 1:1

FIG. 2(B)

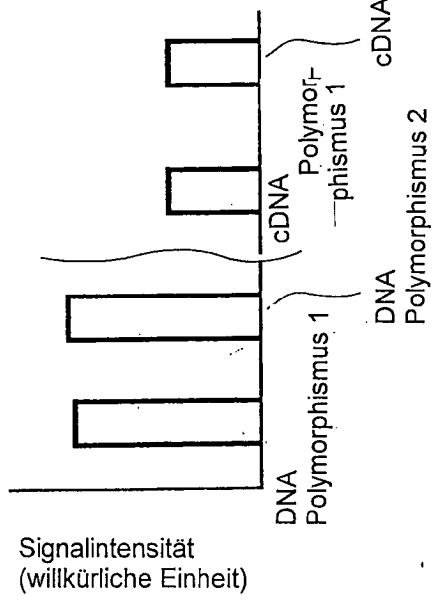

Signalintensität (willkürliche Einheit)
DNA Polymorphismus 1
DNA Polymorphismus 2
cDNA
Polymor-phismus 1
cDNA
Polymorphismus 2

FIG. 3(A)

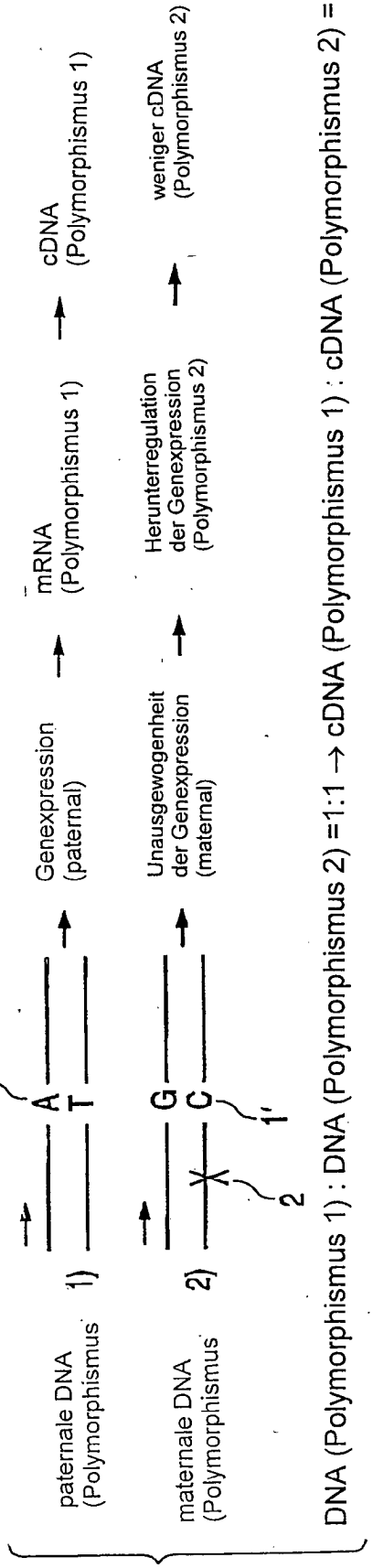

paternale DNA (Polymorphismus 1)
maternale DNA (Polymorphismus 2)
1)
2)
A
T
G
C
1
1'
2
Genexpression (paternal)
Unausgewogenheit der Genexpression (maternal)
mRNA (Polymorphismus 1)
Herunterregulation der Genexpression (Polymorphismus 2)
cDNA (Polymorphismus 1)
weniger cDNA (Polymorphismus 2)
DNA (Polymorphismus 1) : DNA (Polymorphismus 2) =1:1 → cDNA (Polymorphismus 1) : cDNA (Polymorphismus 2) = 1:1

FIG. 3(B)

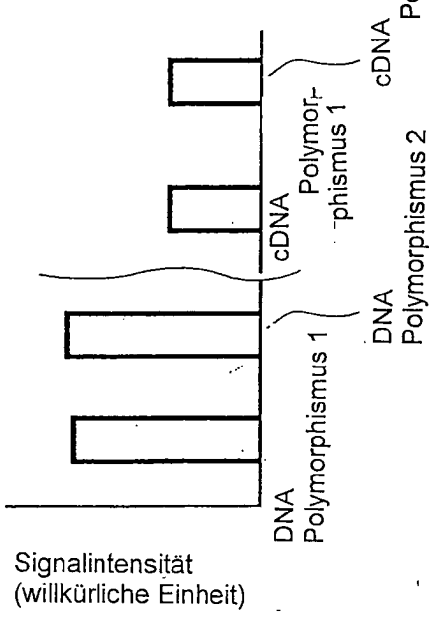

Signalintensität (willkürliche Einheit)
DNA Polymorphismus 1
DNA Polymorphismus 2
cDNA Polymorphismus 1
cDNA Polymorphismus 2

FIG. 4(A)

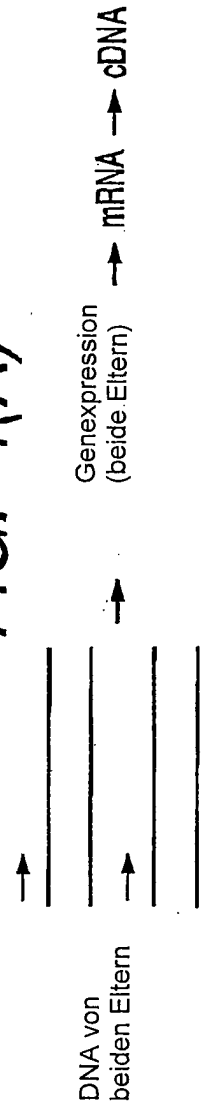


FIG. 4(B)

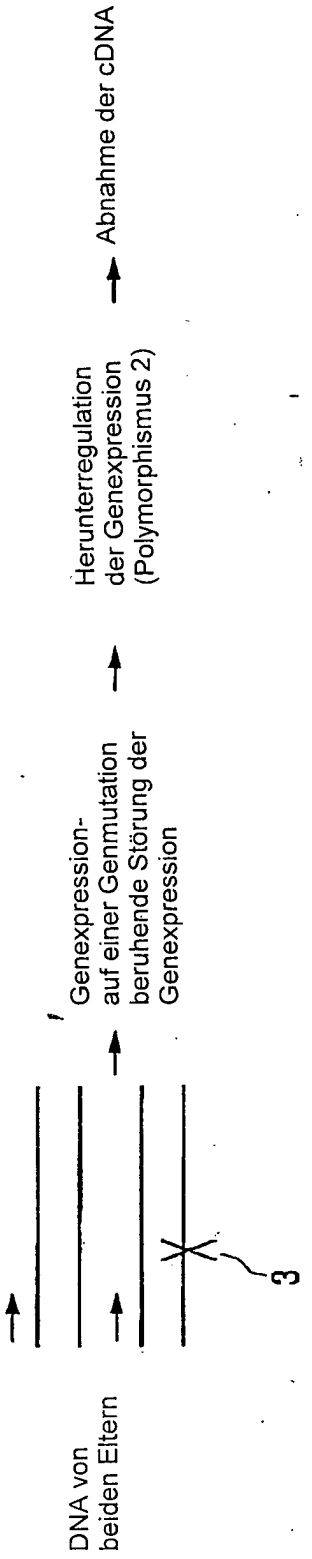


FIG. 4(C)

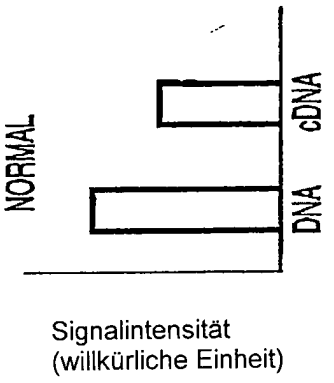


FIG. 4(D)

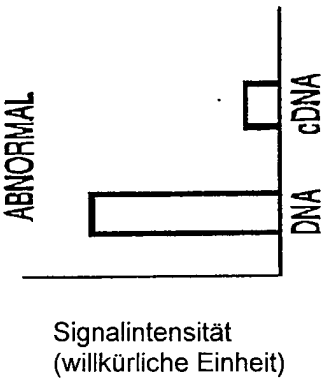


FIG. 5(A)

Elektropherogramm (normale Probe)

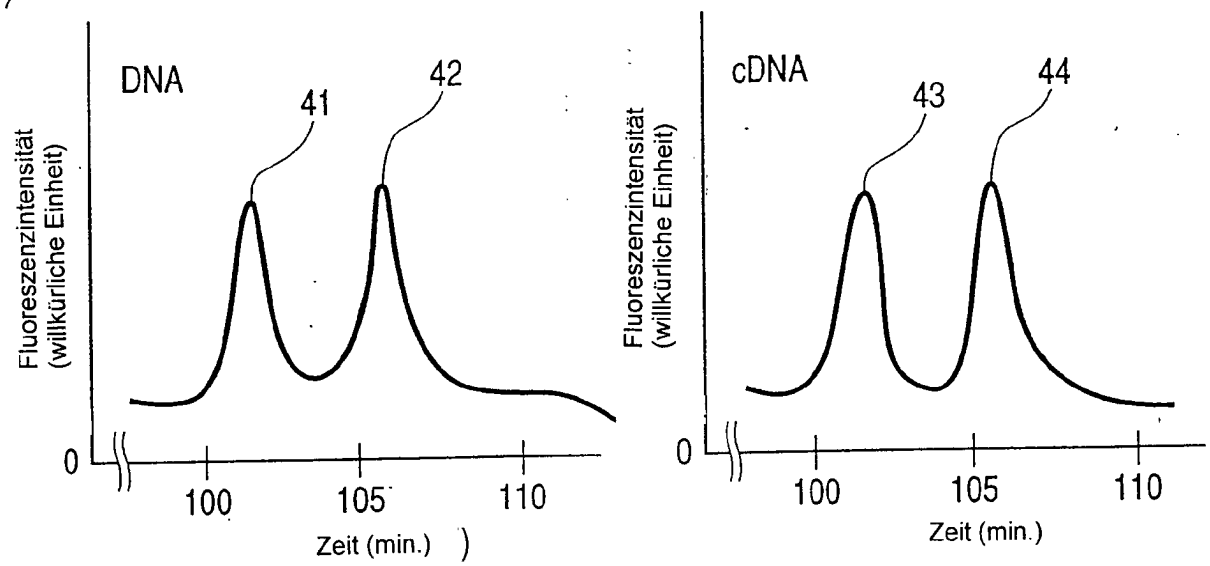


FIG. 5(B)

Elektropherogramm (abnormale Probe)

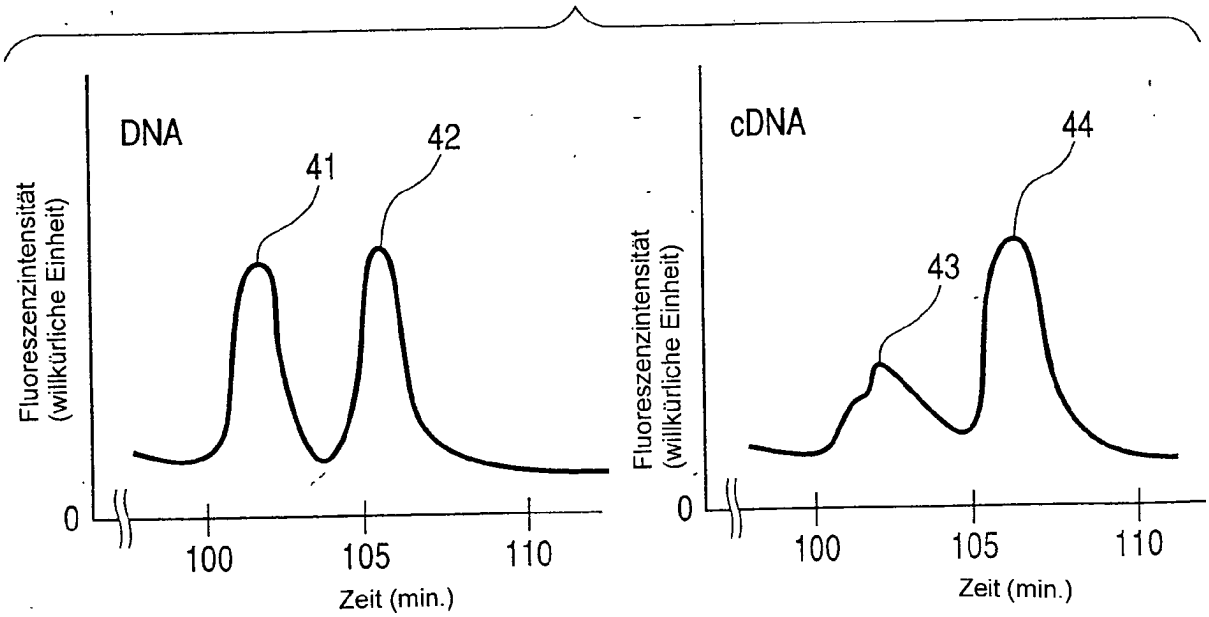


FIG. 6(A)

Gemessenes PCR-Amplifikationsprofil

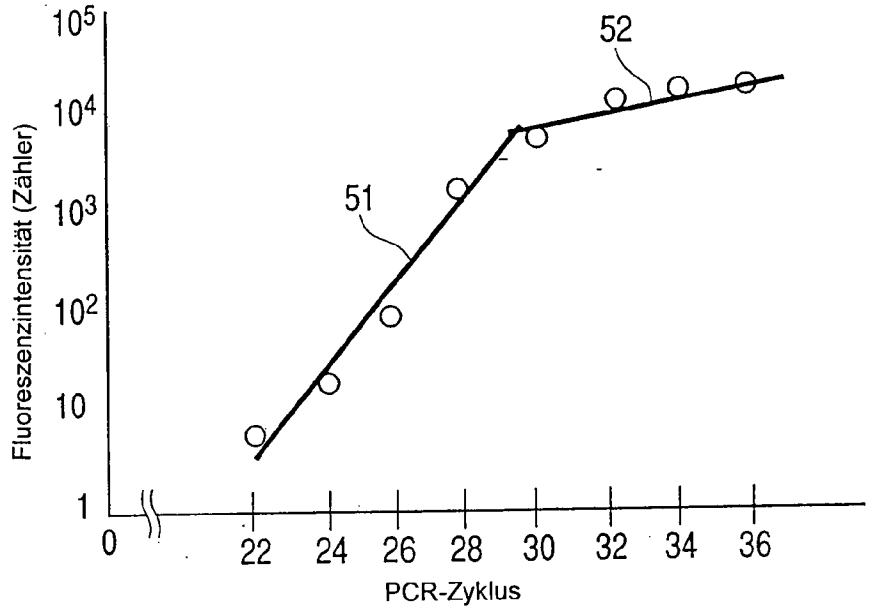


FIG. 6(B)

Unausgewogenheit der Genexpression zwischen 2 Allelen

(Peakfläche ●, Peakhöhe ×)

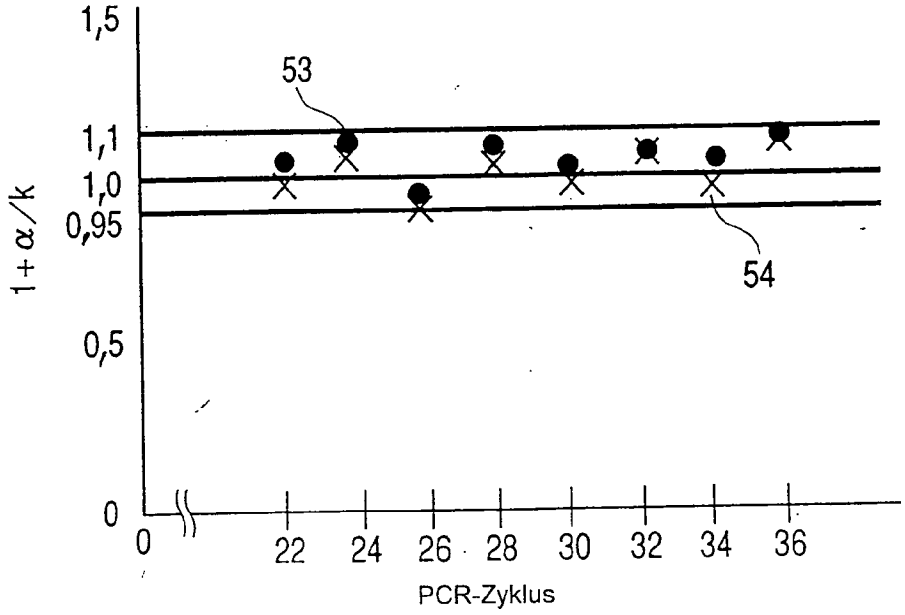


FIG. 7

Unausgewogenheit der Genexpression (1+α/k) wurde von unterschiedlichen PCR-Temperaturprofilen nicht beeinflußt*

	1+α/k	
PCR-Temperatur-profil	Peakhöhe	Peakfläche
1	1,01±0,09	0,99±0,06
2	0,98±0,08	0,97±0,06
3	1,08±0,09	1,09±0,10
4	0,96±0,08	0,95±0,09

* Die Ergebnisse wurden für Probe Nr. 1 erhalten

FIG. 8

Unausgewogenheit der Genexpression (1+α/k) war in 3 RT-PCR-Experimenten stabil *

	1+α/k	
RT-PCR	Peakhöhe	Peakfläche
EXPERIMENT 1	1,08±0,01	1,09±0,03
EXPERIMENT 2	0,96±0,04	0,98±0,02
EXPERIMENT 3	1,01±0,01	0,99±0,06

* Die Ergebnisse wurden für Probe Nr. 1 unter PCR-Temperaturprofil 1 erhalten

FIG. 9

Unausgewogenheit der Genexpression (1+α/k) wurde in 3 normalen Individuen nicht verändert *

	1+α/k	
Individuum	Peakhöhe	Peakfläche
Nr. 1	0,96±0,04	0,98±0,02
Nr. 2	1,07±0,04	1,06±0,06
Nr. 3	0,98±0,08	0,95±0,06

* Die Ergebnisse wurden unter PCR-Temperaturprofil 1 erhalten

FIG. 10(A)

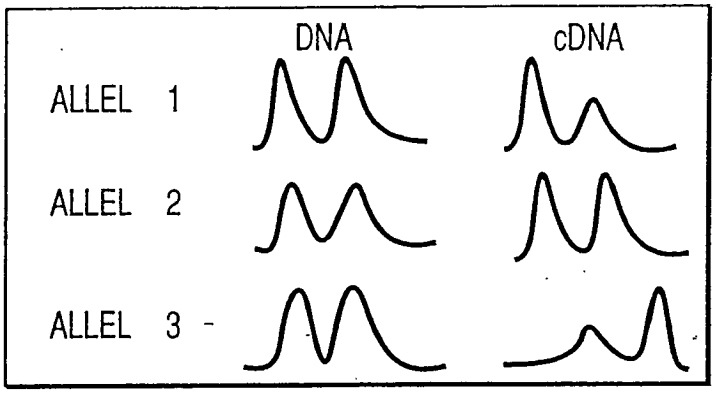


FIG. 10(B)

	Peakwert			Peakfläche		
	H1	H2	H2/H1	A1	A2	A2/A1
DNA	78,1	78,2	1,00	4358	4398	1,01
cDNA	78,1	35,5	0,45	4427	2004	0,45
DNA	40,1	40,2	1,00	3526	3499	0,99
cDNA	36,2	36,4	1,01	3838	3921	1,02
DNA	95,3	96,0	1,01	5010	5019	1,00
cDNA	15,1	60,2	3,99	800	3150	3,94

FIG. 10(C)

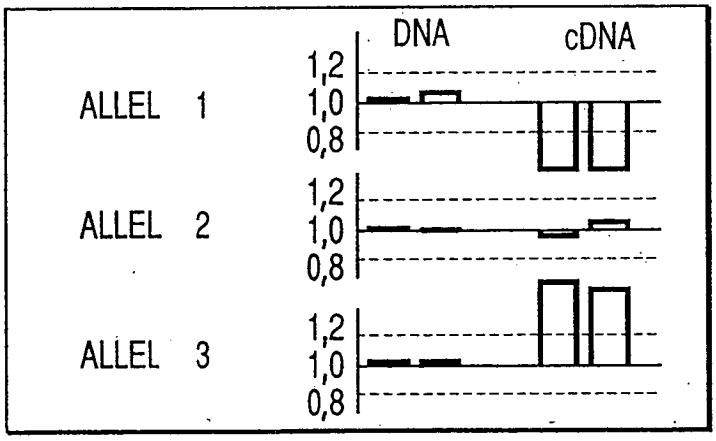


FIG. 10(D)

	α	$1+\alpha/k$
ALLEL 1	0,56	0,45
ALLEL 2	0,03	1,03
ALLEL 3	2,93	3,93

FIG. 11(A)

Probe Nr.		Peakwert			Peakfläche		
		H1	H2	H2/H1	A1	A2	A2/A1
1	DNA	78,1	78,2	1,00	4358	4398	1,01
	cDNA	78,1	35,5	0,45	4427	2004	0,45
2	DNA	40,1	40,2	1,00	3526	3499	0,99
	cDNA	36,2	36,4	1,01	3838	3921	1,02
3	DNA	95,3	96,0	1,01	5010	5019	1,00
	cDNA	15,1	60,2	3,99	800	3150	3,94

FIG. 11(B)

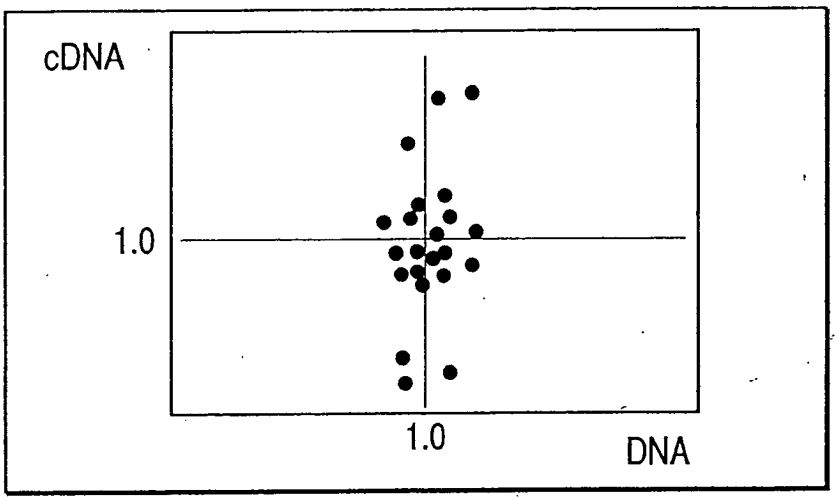


FIG. 11(C)

statistische Information	Mittel	Streuung	Standard-abweichung	Standard-fehler
Probe-1	○○	××	○○○	×××
Gruppe	○○	××	○○○	×××

Test auf die Gleichheit der Streuungen	Unterschied in 2 Variationen (Verhältnis)	Freiheitsgrad (DF)	F-Wert	p-Wert
	○○	×××	○○	××

Test auf die Gleichheit zweier Mittel	Unterschied zweier Mittel	Freiheitsgrad (DF)	t-Wert	p-Wert
	○○○	××	○○	××

FIG. 12

