

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年10月2日 (02.10.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/117782 A1

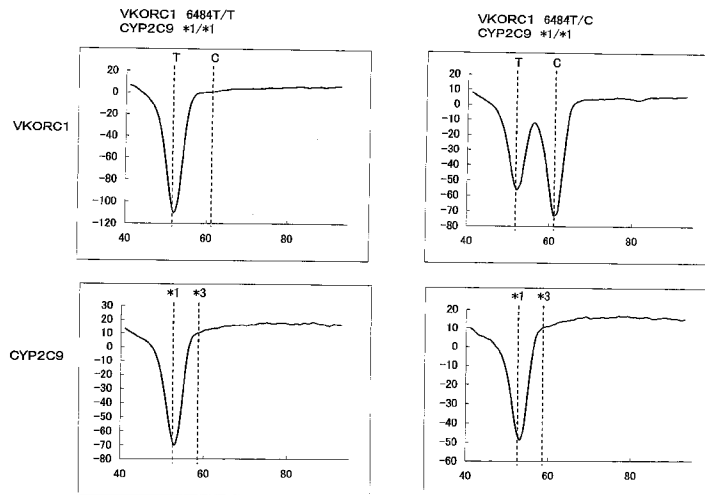
- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/055469
- (22) 国際出願日: 2008年3月24日 (24.03.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-079403 2007年3月26日 (26.03.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平井光春 (HIRAI, Mitsuharu). 間嶋智史 (MAJIMA, Satoshi).
- (74) 代理人: 辻丸光一郎, 外(TSUJIMARU, Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町134 京都リサーチパーク1号館301号室 Kyoto (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,

[続葉有]

(54) Title: PRIMER SET FOR GENE AMPLIFICATION, GENE AMPLIFICATION REAGENT CONTAINING THE SAME AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 遺伝子増幅用プライマーセット、それを含む遺伝子増幅用試薬およびその用途

[図1]



(57) Abstract: It is intended to provide a primer set for amplifying two genes (CYP2C9 gene and VKORC1 gene) by the gene amplification method whereby the individual target regions of these two genes can be specifically and efficiently amplified simultaneously in a single reaction system. Use is made of two pairs of primer sets respectively containing forward primers comprising the base sequences of SEQ ID NOS:5 and 29 and reverse primers comprising the base sequences of SEQ ID NOS:18 and 38. By using these primer sets, it is possible to specifically amplify the target regions including the sites at which polymorphisms to be detected arise in CYP2C9 gene and VKORC1 gene simultaneously in a single liquid reaction mixture.

(57) 要約: 遺伝子増幅法により、2つの遺伝子 (CYP2C9 遺伝子およびVKORC1 遺伝子) を増幅するためのプライマーセットであって、同一反応系において、同時に、前記3つの遺伝子の各目的領域を特異的に効率良く増幅することができるプライマーセットを提供する。 配列番号5および配列番号29の塩基配

[続葉有]

WO 2008/117782 A1



CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

列からなるフォワードプライマーと、配列番号18および配列番号38の塩基配列からなるリバースプライマーとをそれぞれ含む2対のプライマーセットを使用する。このプライマーセットを使用することにより、同一反応液において、同時に、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子において検出目的の多型が生じる部位を含む目的領域を、特異的に増幅することができる。

明 細 書

遺伝子増幅用プライマーセット、それを含む遺伝子増幅用試薬およびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子を同時に増幅するためのプライマーセット、それを含む遺伝子増幅用試薬およびその用途に関する。

背景技術

[0002] 心筋梗塞や脳梗塞の患者に対して、血液の凝固を防止する薬剤として、ワーファリンが広く使用されている。ワーファリンの適量は、人種によって大きく異なり、さらに、同じ人種であっても、個人間で差が見られる。ワーファリンを大量に投与すると、例えば、鼻血や皮膚の内出血が生じたり、時には、脳内出血等の副作用を生じたりするおそれがある。このため、治療においてワーファリンの適切な量を患者ごとに決定することは極めて重要となっている。

[0003] このようなワーファリンの適量値を決定するにあたって、近年、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の多型がワーファリンの薬効に関係していることが報告されている(非特許文献1および非特許文献2)。CYP2C9遺伝子は、ワーファリン代謝酵素を作るチトクロームP450をコードする遺伝子である。VKORC1遺伝子は、血液の凝固に関与するビタミンKに作用するタンパク質をコードする遺伝子である。したがって、これら二つの遺伝子の多型を検出することは、患者に応じてワーファリンの適量を決定し、副作用を低減させるためにも非常に重要である。

[0004] 他方、あらゆる疾患の原因や、個体間の疾患易罹患性(疾患のかかり易さ)、個体間における薬効の違い等を遺伝子レベルで解析する方法として、点突然変異、いわゆる一塩基多型(SNP)の検出が広く行われている。点突然変異の一般的な検出方法としては、(1)試料の標的DNAについて、検出対象配列に相当する領域をPCR(Polymerase chain reaction)により増幅させ、その全遺伝子配列を解析するDirect Sequencing法、(2)試料の標的DNAについて、検出対象配列に相当する領域をPCRにより増幅させ、その増幅産物を検出対象配列における目的の変異の有

無により切断作用が異なる制限酵素により切断し、電気泳動を行うことによりタイピングを行うRFLP解析、(3)3'末端領域に目的の変異が位置するプライマーを用いてPCRを行い、増幅の有無によって変異を判断するASP-PCR法等があげられる。

[0005] しかしながら、これらの方法は、例えば、試料から抽出したDNAの精製、電気泳動、制限酵素処理等が必須であるため、手間やコストがかかってしまう。また、PCRを行った後、反応容器を一旦開封する必要があるため、前記増幅産物が次の反応系に混入し、解析精度が低下するおそれがある。さらに、自動化が困難であるため、大量のサンプルを解析することができない。また、前記(3)のASP-PCR法については、特異性が低いという問題もある。

[0006] このような問題から、近年、点突然変異の検出方法として、標的核酸とプローブとから形成される二本鎖核酸の融解温度(T_m :melting temperature)を解析する方法が実用化されている。このような方法は、例えば、 T_m 解析、または、前記二本鎖の融解曲線の解析により行われることから、融解曲線解析と呼ばれている。これは、以下のような方法である。すなわち、まず、検出目的の点突然変異を含む検出対象配列に相補的なプローブを用いて、検出試料の標的一本鎖DNAと前記プローブとのハイブリッド(二本鎖DNA)を形成させる。続いて、このハイブリッド形成体に加熱処理を施し、温度上昇に伴うハイブリッドの解離(融解)を、吸光度等のシグナルの変動によって検出する。そして、この検出結果に基づいて T_m 値を決定することにより、点突然変異の有無を判断する方法である。 T_m 値は、ハイブリッド形成体の相同性が高い程高く、相同性が低い程低くなる。このため、点突然変異を含む検出対象配列とそれに相補的なプローブとのハイブリッド形成体について予め T_m 値(評価基準値)を求めておき、検出試料の標的一本鎖DNAと前記プローブとの T_m 値(測定値)を測定し、測定値が評価基準値と同程度であれば、マッチ、すなわち標的DNAに点突然変異が存在すると判断でき、測定値が評価基準値より低ければ、ミスマッチ、すなわち標的DNAに点突然変異が存在しないと判断できる。そして、この方法によれば、遺伝子解析の自動化も可能である。

[0007] しかしながら、このような T_m 解析を利用した検出方法によっても、前述の(1)~(3)の解析方法と同様に、一つの反応液において、複数の配列を解析することはできな

いという問題がある。前述のように、ワーファリンの効果には、CYP2C9遺伝子の多型とVKORC1遺伝子の多型とが関連しているため、両方の遺伝子について多型を解析し、それらの結果に基づいて、総合的にワーファリンの処方を判断することが望まれる。しかしながら、各遺伝子には、アインザイムが存在するため、PCRにおいて、目的の遺伝子以外に、アインザイムのコード遺伝子までもが増幅されるおそれがある。このため、従来の方法では、例えば、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の各多型を調べるには、各遺伝子の目的領域を別個の反応系において各々増幅させ、得られた増幅産物を別個に解析する必要があった。このように、従来の方法では、これら2つの遺伝子のみを鋳型とし、且つ、各遺伝子の各目的領域のみを特異的に増幅させることは極めて困難である。そして、このように、一つのサンプルを解析するにも多大な労力を伴うため、大量のサンプルを解析することは実用的ではないという問題がある。

- [0008] 非特許文献1: Simone Rost et al., Nature Vol.427 2004 letters to nature
非特許文献2: Mark J. Rieder et al., The New England Journal of Medicine
352; 22, 2005

発明の開示

- [0009] そこで、本発明は、遺伝子増幅法により、2種類の遺伝子(CYP2C9、VKORC1遺伝子)を増幅するためのプライマーセットであって、同一反応系において、同時に、前記2種類の遺伝子の各目的領域を特異的に効率良く増幅することができるプライマーセットの提供を目的とする。
- [0010] 前記目的を達成するために、本発明のプライマーセットは、遺伝子増幅法により2種類の遺伝子を同時に増幅するためのプライマーセットであって、前記2種類の遺伝子が、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子であり、下記(1)および(2)の2種類のプライマーセットを含むことを特徴とする。

プライマーセット(1)

下記(F1)のオリゴヌクレオチドからなるフォワードプライマーおよび下記(R1)のオリゴヌクレオチドからなるリバースプライマーを含む一対のプライマーセット

(F1)配列番号1の塩基配列における466番目のアデニン塩基(A)を一塩基目とし

て5'方向に向かって14～18塩基目までの領域と同じ配列である少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであって、前記アデニン塩基(A)を3'末端とするオリゴヌクレオチド(R1)配列番号1の塩基配列における631番目のチミン塩基(T)を1塩基目として3'方向に向かって19～36塩基目までの領域に相補的な少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであって、前記631番目のチミン塩基(T)に相補的なアデニン塩基(A)を3'末端とするオリゴヌクレオチド

プライマーセット(2)

下記(F2)のオリゴヌクレオチドからなるフォワードプライマーおよび下記(R2)のオリゴヌクレオチドからなるリバースプライマーを含む一対のプライマーセット

(F2)配列番号2の塩基配列における440番目のアデニン塩基(A)を一塩基目として5'方向に向かって21～27塩基目までの領域と同じ配列である少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであって、前記シトシン塩基(A)を3'末端とするオリゴヌクレオチド

(R2)配列番号2の塩基配列における541番目のアデニン塩基(A)を1塩基目として3'方向に向かって18～25塩基目までの領域に相補的な少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであって、前記541番目のアデニン塩基(A)に相補的なチミン塩基(T)を3'末端とするオリゴヌクレオチド

[0011] また、本発明の遺伝子増幅用試薬は、遺伝子増幅法により2種類の遺伝子を増幅するための試薬であって、前記2種類の遺伝子が、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子であり、前記本発明の遺伝子増幅用プライマーセットを含むことを特徴とする。

[0012] 本発明の増幅産物の製造方法は、遺伝子増幅法により2種類の遺伝子の増幅産物を製造する方法であって、前記2種類の遺伝子が、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子であり、下記(I)工程を含むことを特徴とする。

(I) 試料中の核酸を鋳型として、本発明の遺伝子増幅用プライマーセットを用いて、同一反応液中で同時に、前記CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の増幅を行う工程

[0013] 本発明の多型解析方法は、遺伝子における検出対象部位の多型を解析する方法であって、

前記遺伝子がCYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子であり、下記(i)～(iv)工程を含むことを特徴とする。

(i) 本発明の増幅産物の製造方法により、同一反応液中で同時に、CYP2C9遺伝子における検出対象部位を含む領域およびVKORC1遺伝子における検出対象部位を含む領域を増幅させる工程

(ii) 前記(i)工程におけるCYP2C9遺伝子の増幅産物およびVKORC1遺伝子の増幅産物と、前記各遺伝子の各検出対象部位にそれぞれハイブリダイズ可能なプローブとを含む反応液を準備する工程

(iii) 前記反応液の温度を変化させ、前記各増幅産物と前記各プローブとの各ハイブリッド形成体の融解状態を示すシグナル値を測定する工程

(iv) 温度変化に伴う前記シグナル値の変動から、前記各検出対象部位の多型を決定する工程

[0014] 本発明のプライマーセットによれば、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子のそれぞれの目的領域(検出目的の多型が存在する部位を含む領域)を、同一反応液において、同時且つ特異的に増幅することができる。このため、前述のような従来法とは異なり、目的領域の増幅にかかる手間やコストを低減することが可能となる。また、このように同一反応液において2種類の遺伝子の各目的領域が、それぞれ特異的に増幅されることから、例えば、各目的領域における検出対象配列に相補的なプローブを使用することで、前記反応液を用いてそのままT_m解析を行い、各遺伝子の多型をタイピングすることが可能となる。また、一つの反応液で増幅やタイピングが可能であることから、操作の自動化も可能になる。さらに、本発明のプライマーセットを用いれば、例えば、夾雑物が含まれる試料(例えば、全血や口腔粘膜等)であっても、前処理を省略できるため、より迅速且つ簡便に増幅反応を行うことができる。また、本発明のプライマーセットを用いれば、従来よりも優れた増幅効率で増幅反応が行えるため、増幅反応も短縮化が可能である。したがって、本発明のプライマーセットやこれを含む試薬、ならびにこれらを用いた増幅産物の製造方法によれば、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子のそれぞれの多型を迅速かつ簡便に解析できることから、本発明は、医療分野において極めて有効といえる。

図面の簡単な説明

- [0015] [図1]図1は、本発明の実施例におけるTm解析の結果を示すグラフである。
- [図2]図2は、本発明のその他の実施例におけるTm解析の結果を示すグラフである。
- [図3]図3は、本発明のさらにその他の実施例におけるTm解析の結果を示すグラフである。
- [図4]図4は、本発明のさらにその他の実施例におけるTm解析の結果を示すグラフである。
- [図5]図5は、本発明のさらにその他の実施例におけるTm解析の結果を示すグラフである。
- [図6]図6は、本発明のさらにその他の実施例におけるTm解析の結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0016] < 遺伝子増幅用プライマーセット >

本発明の遺伝子増幅用プライマーセットは、前述のように2種類のプライマーセット(1)および(2)を含むことを特徴とする。本発明のプライマーセットにより増幅される領域は、後述するが、CYP2C9遺伝子は、多型の検出目的部位(配列番号1における521番目)を含む領域であり、VKORC1遺伝子は、多型の検出目的部位(配列番号2における484番目)を含む領域である。このため、本発明のプライマーセットを用いて各遺伝子の目的領域を増幅すれば、従来よりも効率良く、この2種類の遺伝子の多型を解析することができる。なお、以下、フォワードプライマーをFプライマー、リバースプライマーをRプライマーともいう。

- [0017] まず、CYP2C9遺伝子を増幅するためのプライマーセット(1)について説明する。プライマーセット(1)は、前述のように、下記(F1)のオリゴヌクレオチドからなるフォワードプライマーおよび下記(R1)のオリゴヌクレオチドからなるリバースプライマーを含む一対のプライマーセットである(以下、「CYP2C9遺伝子用プライマーセット」ともいう)。

(F1)配列番号1の塩基配列における466番目のアデニン塩基(A)を一塩基目とし

て5'方向に向かって14~18塩基目までの領域と同じ配列である少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであって、前記アデニン塩基(A)を3'末端とするオリゴヌクレオチド(R1)配列番号1の塩基配列における631番目のチミン塩基(T)を1塩基目として3'方向に向かって19~36塩基目までの領域に相補的な少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであって、前記631番目のチミン塩基(T)に相補的なアデニン塩基(A)を3'末端とするオリゴヌクレオチド

- [0018] 配列番号1に示す塩基配列は、ヒトチトクロームP450ファミリー2サブファミリーCポリペプチド9(CYP2C9)の完全長配列における部分配列である。前記塩基配列は、具体的には、例えば、NCBIアクセッション:No. AY702706に登録されているCYP2C9の完全長配列における52,001-53,000の領域にあたる。
- [0019] 前記CYP2C9遺伝子用プライマーセットは、配列番号1における467番目~630番目の領域を含むDNA鎖ならびにその相補鎖を増幅させるためのプライマーセットである。この領域内の521番目の塩基(配列番号1における521番目の塩基)および522番目の塩基(配列番号1における522番目の塩基)は、CYP2C9の機能に影響を与える点突然変異(A521C、T522C)の存在が知られている。
- [0020] 521Cの多型は、CYP2C9^{*3}と呼ばれているのに対して、野生型の配列は、一般的にCYP2C9^{*1}と呼ばれている。521番目の塩基がAであれば、CYP2C9遺伝子がタンパク質に翻訳された際、アミノ酸359位はイソロイシン(Ile)となり、521番目の塩基がCであれば、アミノ酸359位はロイシン(Leu)となる多型を示す。本発明において、この部位の多型は、ホモ接合体の場合、CYP2C9^{*1}/^{*1}(521A/A)、CYP2C9^{*3}/^{*3}(521C/C)、ヘテロ接合体の場合、CYP2C9^{*1}/^{*3}(521A/C)で表すことができる。また、522Cの多型は、CYP2C9^{*4}と呼ばれているのに対して、野生型の配列は、一般的にCYP2C9^{*1}と呼ばれている。522番目の塩基がTであれば、CYP2C9遺伝子がタンパク質に翻訳された際、アミノ酸359位はイソロイシン(Ile)となり、522番目の塩基がCであれば、アミノ酸359位はスレオニン(Thr)となる多型を示す。本発明において、この部位の多型は、ホモ接合体の場合、CYP2C9^{*1}/^{*1}(522T/T)、CYP2C9^{*4}/^{*4}(522C/C)、ヘテロ接合体の場合、CYP2C9^{*1}/^{*4}(522T/C)で表すことができる。以下、このプライマーセット(1)を、「CY

P2C9用プライマーセット」ともいう。

[0021] 本発明において、プライマーセット(1)のF1プライマーおよびR1プライマーは、DNAポリメラーゼによる増幅の開始点を決定する役割を果たす3'末端の塩基が、前述の条件を満たしていればよい。このように各プライマーの3'末端の塩基を固定することによって、プライマーセット(1)が、例えば、類似する他のアイソザイムの遺伝子(例えば、CYP2C8、CYP2C17、CYP2C18、CYP2C19遺伝子等)に結合することを十分に防止することができる。

[0022] このように、F1プライマーおよびR1プライマーは、その3'末端の塩基が固定されていればよいことから、各プライマーの長さ自体は特に制限されず、一般的な長さに適宜調整することができる。プライマーの長さの一例としては、例えば、13~50merの範囲であり、好ましくは14~45merであり、より好ましくは15~40merである。具体例として、前記F1プライマーは、配列番号1の塩基配列における466番目のアデニン塩基(A)を一塩基目として5'方向に向かって14~18塩基目(好ましくは、14~17塩基目、より好ましくは15~17塩基目)までの領域と同じ配列である少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであることが好ましい。また、前記R1プライマーは、配列番号1の塩基配列における631番目のチミン塩基(T)を一塩基目として3'方向に向かって19~36塩基目(好ましくは、22~30塩基目、より好ましくは23~29塩基目)までの領域に相補的な少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであることが好ましい。なお、F1プライマーとR1プライマーの3'末端が固定されていることから、プライマーから伸長する領域は、例えば、前述のように配列番号1における467番目~630番目の領域であるが、得られる増幅産物の全体の長さは使用するプライマーの長さに応じて変化する。

[0023] また、R1プライマーは、配列番号1に示す塩基配列に対して、F1プライマーは、前記塩基配列の相補鎖の塩基配列に対して、それぞれ完全に相補なオリゴヌクレオチドでなくともよい。すなわち、各プライマーにおける3'末端の塩基を除く部分において、例えば、完全に相補なオリゴヌクレオチドと1個~5個の塩基が異なってもよい。

[0024] 以下に、F1プライマーとR1プライマーの具体例を示すが、本発明は、これには限

定されない。また、これらのF1プライマーとR1プライマーとの組み合わせは何ら制限されないが、これらの中でも、配列番号5のオリゴヌクレオチドからなるF1'プライマーと配列番号18のオリゴヌクレオチドからなるR1'プライマーとを含むプライマーセット(1')が特に好ましい。なお、下記表における「Tm(°C)」は、下記表の配列と完全に相補的な配列とがハイブリッドした場合のTm(°C)であり、MELTCALCソフトウェア(<http://www.meltcalc.com/>)により、パラメーターをオリゴヌクレオチド濃度0.2 μM、ナトリウム当量(Na eq.)50mMとして算出した値である(以下、同様)。前記Tm値は、例えば、従来公知のMELTCALCソフトウェア(<http://www.meltcalc.com/>)等により算出でき、また、隣接法(Nearest Neighbor Method)によって決定することもできる(以下、同様)。

[0025] [表1]

プライマー	配列	Tm(°C)	配列番号
Fプライマー	5'-cggagcccctgcatgcaa-3'	59.4	3
	5'-ggagcccctgcatgcaa-3'	56.5	4
	5'-gagcccctgcatgcaa-3'	53.6	5
	5'-agcccctgcatgcaa-3'	52.1	6
	5'-gcccctgcatgcaa-3'	50.2	7
Rプライマー	5'-gttataaatgatactatgaatttggggacttcgaa-3'	58.1	8
	5'-ttataaatgatactatgaatttggggacttcgaa-3'	57.5	9
	5'-tataaatgatactatgaatttggggacttcgaa-3'	57.2	10
	5'-ataaatgatactatgaatttggggacttcgaa-3'	56.9	11
	5'-aaaatgatactatgaatttggggacttcgaa-3'	57.2	12
	5'-aaatgatactatgaatttggggacttcgaa-3'	56.9	13
	5'-aatgatactatgaatttggggacttcgaa-3'	56.6	14
	5'-atgatactatgaatttggggacttcgaa-3'	56.3	15
	5'-tgatactatgaatttggggacttcgaa-3'	55.9	16
	5'-gatactatgaatttggggacttcgaa-3'	55.7	17
	5'-atactatgaatttggggacttcgaa-3'	54.5	18
	5'-tactatgaatttggggacttcgaa-3'	53.6	19
	5'-actatgaatttggggacttcgaa-3'	53.3	20
	5'-atgaatttggggacttcgaa-3'	53.5	21
	5'-ctatgaatttggggacttcgaa-3'	52	22
	5'-tatgaatttggggacttcgaa-3'	50.9	23
	5'-atgaatttggggacttcgaa-3'	51	24
	5'-tgaatttggggacttcgaa-3'	50.5	25

[0026] つぎに、VKORC1遺伝子を増幅するためのプライマーセット(2)について説明する。前記プライマーセット(2)は、前述のように、下記(F2)のオリゴヌクレオチドからなるフォワードプライマーおよび下記(R2)のオリゴヌクレオチドからなるリバースプライマーを含む一対のプライマーセットである。以下、このプライマーセット(2)を、「VKO

RC1遺伝子用プライマーセット」ともいう。

(F2)配列番号2の塩基配列における440番目のアデニン塩基(A)を一塩基目として5'方向に向かって21~27塩基目までの領域と同じ配列である少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであって、前記シトシン塩基(A)を3'末端とするオリゴヌクレオチド

(R2)配列番号2の塩基配列における541番目のアデニン塩基(A)を一塩基目として3'方向に向かって18~25塩基目までの領域に相補的な少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであって、前記541番目のアデニン塩基(A)に相補的なチミン塩基(T)を3'末端とするオリゴヌクレオチド

[0027] 配列番号2に示す塩基配列は、ヒトビタミンKエポキシドリダクターゼ複合体のサブユニット1(Homo sapiens vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1:VKORC1)をコードするVKORC1遺伝子の完全長配列の部分配列である。前記塩基配列は、具体的には、NCBIアクセッション:No. AY587020に登録されているVKORC1遺伝子の完全長配列における6001番目~7000番目の領域にあたる。

[0028] 前記VKORC1遺伝子用プライマーセットは、配列番号2における441~540番目の領域を含むDNA鎖ならびにその相補鎖を増幅させるためのプライマーセットである。この領域内の484番目の塩基(配列番号2における484番目の塩基)は、点突然変異の存在が知られている(484C、484T)。これらの多型は、ホモ接合体の場合、例えば、484C/Cまたは484T/T、ヘテロ接合体の場合、484C/Tで表すことができる。また、これらの多型は、ホモ接合体の場合、例えば、完全長における塩基の番号に基づいて6484C/C、6484T/T、6484C/Tで表すことができる(以下、このように表記する)。なお、一般的に、6484塩基の多型に関して、欧米人はCが多く、日本人はTが多いと報告されている。

[0029] VKORC1遺伝子用プライマーセットのF2プライマーおよびR2プライマーは、前記CYP2C9遺伝子用プライマーセットと同様の理由から、DNAポリメラーゼによる増幅の開始点を決定する役割を果たす3'末端の塩基が、前述の条件を満たしていればよい。このため、F2プライマーおよびR2プライマーの長さ自体は特に制限されず、前述と同様の長さが例示できる。具体例として、前記F2プライマーは、配列番号2の塩基配列における440番目のアデニン塩基(A)を一塩基目として5'方向に向かって2

1～27塩基目(好ましくは、22～26塩基目、より好ましくは23～25塩基目)までの領域と同じ配列である少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであることが好ましい。また、前記R2プライマーは、配列番号2の塩基配列における541番目のアデニン塩基(A)を1塩基目として3'方向に向かって18～25塩基目(好ましくは、18～23塩基目、より好ましくは19～22塩基目)までの領域に相補的な少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであることが好ましい。なお、F2プライマーとR2プライマーの3'末端が固定されていることから、プライマーから伸長する領域は、例えば、前述のように配列番号2における441～540番目の領域であるが、得られる増幅産物の全体の長さは、使用するプライマーの長さに応じて変化する。

[0030] また、R2プライマーは、配列番号2に示す塩基配列に対して、F2プライマーは、前記塩基配列の相補鎖の塩基配列に対して、それぞれ完全に相補なオリゴヌクレオチドでなくともよい。すなわち、各プライマーにおける3'末端の塩基を除く部分において、例えば、完全に相補なオリゴヌクレオチドと1個～5個の塩基が異なってもよい。

[0031] 以下に、F2プライマーとR2プライマーの具体例を示すが、本発明は、これには限定されない。また、これらのF2プライマーとR2プライマーとの組み合わせは何ら制限されないが、これらの中でも、配列番号29のオリゴヌクレオチドからなるF2'プライマーと配列番号38のオリゴヌクレオチドからなるR2'プライマーとを含むプライマーセット(2')が特に好ましい。

[0032] [表2]

プライマー	配列	T _m (°C)	配列番号
Fプライマー	5'-gggaggatagggtcagtgacatggaa-3'	62.2	26
	5'-gggaggatagggtcagtgacatggaa-3'	60.6	27
	5'-ggaggatagggtcagtgacatggaa-3'	58.9	28
	5'-gaggatagggtcagtgacatggaa-3'	57	29
	5'-aggatagggtcagtgacatggaa-3'	56.2	30
	5'-ggatagggtcagtgacatggaa-3'	55	31
	5'-gatagggtcagtgacatggaa-3'	52.8	32
Rプライマー	5'-ttgaccctgcccgagaaaggtgat-3'	63.2	33
	5'-tggaccctgcccgagaaaggtgat-3'	63.1	34
	5'-ggaccctgcccgagaaaggtgat-3'	62	35
	5'-gaccctgcccgagaaaggtgat-3'	60.1	36
	5'-accctgcccgagaaaggtgat-3'	59.4	37
	5'-ccctgcccgagaaaggtgat-3'	57.9	38
	5'-cctgcccgagaaaggtgat-3'	55.6	39
	5'-ctgcccgagaaaggtgat-3'	53	40

[0033] また、前述したプライマーセット(1)および(2)の各プライマーは、例えば、反応時間を短縮するために、従来公知の任意の配列を5'末端に付加したものでよい。

[0034] このようなプライマーセット(1)および(2)を含む本発明の遺伝子増幅用プライマーセットは、全血試料等の生体試料におけるCYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子を同時に増幅させる際に使用することが好ましい。特に、後述するような多型の検出用プローブとともに使用する際には、遺伝子増幅用反応液における全血試料の添加割合が0.1~0.5体積%である遺伝子増幅法に使用することが好ましい。この点については、後述する。

[0035] <遺伝子増幅用試薬>

本発明の遺伝子増幅用試薬は、前述のように、遺伝子増幅法により2種類の遺伝子を増幅するための試薬であって、前記2種類の遺伝子がCYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子であり、本発明の遺伝子増幅用プライマーセットを含むことを特徴とする。本発明の遺伝子増幅用試薬は、本発明のプライマーセットを含むことが特徴であり、これ以外の組成等については何ら制限されない。

[0036] 本発明の遺伝子増幅用試薬は、例えば、本発明のプライマーセットを用いた遺伝子増幅法により得られる増幅産物を検出するために、さらに、CYP2C9遺伝子の検出対象部位にハイブリダイズするプローブおよびVKORC1遺伝子の検出対象部位にハイブリダイズするプライマーの少なくとも一方を含んでもよい。特に、両方のプローブを含むことが好ましい。前述のように本発明のプライマーセットによれば、遺伝子

増幅法によって2種類の遺伝子(CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子)のそれぞれの目的領域を、特異的に増幅することができる。このため、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の目的領域における検出対象配列に相補的な2種類のプローブを共存させることによって、例えば、各目的領域の増幅の有無や、検出目的の多型等を、後述する方法によって検出することが可能である。このようなプローブやその利用方法に関しては、後の多型の解析方法において説明する。また、本発明の遺伝子増幅用試薬は、全血等の生体試料における前記2種類の遺伝子を増幅させる際に使用することが好ましく、特に、前述のようなプローブとともに使用する際には、遺伝子増幅用反応液における全血試料の添加割合が0.1~0.5体積%である遺伝子増幅法に使用することが好ましい。なお、本発明において、「検出対象配列」とは、多型が存在する部位(検出対象部位)を含む配列を意味する。

[0037] 本発明の遺伝子増幅用試薬の形態は、特に制限されず、例えば、本発明の遺伝子増幅用プライマーセットを含有する液体試薬でもよいし、使用前に溶媒で懸濁する乾燥試薬であってもよい。また、本発明の遺伝子増幅用プライマーセットの含有量も、特に制限されない。

[0038] <増幅産物の製造方法>

本発明の増幅産物の製造方法は、前述のように、遺伝子増幅法により2種類の遺伝子の増幅産物を製造する方法であって、前記2種類の遺伝子が、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子であり、下記(I)工程を含むことを特徴とする。

(I) 試料中の核酸を鋳型として、本発明の遺伝子増幅用プライマーセットを用いて、同一反応液中で同時に、前記CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の増幅を行う工程

[0039] このように本発明のプライマーセットを用いて増幅反応を行うことによって、前述のように、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子のそれぞれの目的領域を、同一反応液において、同時且つ特異的に増幅させることができる。本発明により増幅させる2つの目的領域は、前述のように、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子における目的の多型が存在する検出対象部位をそれぞれ含む領域である。なお、本発明の増幅産物の製造方法においては、本発明のプライマーセットを使用することが特

徴であって、遺伝子増幅法の種類や条件等は何ら制限されない。

[0040] 前記遺伝子増幅法としては、前述のように特に制限されず、例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法、NASBA (Nucleic acid sequence based amplification) 法、TMA (Transcription-mediated amplification) 法、SDA (Strand Displacement Amplification) 法等があげられるが、PCR法が好ましい。なお、以下、PCR法を例にあげて、本発明を説明するが、これには制限されない。

[0041] 本発明を適用する試料としては、例えば、鋳型となる核酸を含んでいればよく、特に制限されないが、例えば、夾雑物が含まれる試料に適用することが好ましい。前記夾雑物が含まれる試料としては、例えば、全血、口腔内細胞(例えば、口腔粘膜)、爪や毛髪等の体細胞、生殖細胞、喀痰、羊水、パラフィン包埋組織、尿、胃液(例えば、胃洗浄液)等や、それらの懸濁液等があげられる。本発明のプライマーセットを用いた増幅産物の製造方法によれば、例えば、様々な夾雑物が含まれる試料(特に、全血や口腔内細胞等の生体試料)であっても、その影響を受け難く、2種類の遺伝子(CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子)のそれぞれの目的領域を特異的に増幅することができる。このため、本発明によれば、従来法では困難であった夾雑物の多い試料であっても、例えば、精製等の前処理を行うことなく、そのまま使用することが可能である。したがって、試料の前処理の観点からも、従来法よりさらに迅速に増幅産物を調製することが可能といえる。

[0042] 前記反応液における試料の添加割合は、特に制限されない。具体例として、前記試料が生体試料(例えば、全血試料)の場合、前記反応液における添加割合の下限が、例えば、0.01体積%以上であることが好ましく、より好ましくは0.05体積%以上、さらに好ましくは0.1体積%以上である。また、前記添加割合の上限も、特に制限されないが、例えば、2体積%以下が好ましく、より好ましくは1体積%以下、さらに好ましくは0.5体積%以下である。

[0043] また、後述するような光学的検出を目的とする場合、特に、標識化プローブを用いた光学的検出を行う場合、全血試料のような生体試料の添加割合は、例えば、0.1~0.5体積%に設定することが好ましい。PCR反応においては、通常、DNA変性(一本鎖DNAへの解離)のために熱処理が施されるが、この熱処理によって試料に含

まれる糖やタンパク質等が変性し、不溶化の沈殿物や濁り等が発生するおそれがある。このため、増幅産物の有無や検出対象部位の遺伝子型(多型)を光学的手法により確認する場合、このような沈殿物や濁りの発生が、測定精度に影響を及ぼす可能性がある。しかしながら、反応液における全血試料の添加割合を前述の範囲に設定すれば、メカニズムは不明であるが、例えば、変性による沈殿物等の発生を十分に防止することができるため、光学的手法による測定精度を向上できる。また、全血試料中の夾雑物によるPCRの阻害も十分に抑制されるため、増幅効率をより一層向上することができる。したがって、本発明のプライマーセットの使用に加えて、さらに、全血試料等の試料の添加割合を前述の範囲に設定することによって、より一層、試料の前処理の必要性を排除できる。

[0044] また、前記反応液中の全血試料の割合は、前述のような体積割合(例えば、0.1～0.5体積%)ではなく、ヘモグロビン(以下、「Hb」という)の重量割合で表すこともできる。この場合、前記反応液における全血試料の割合は、Hb量に換算して、例えば、0.565～113g/Lの範囲が好ましく、より好ましくは2.825～56.5g/Lの範囲、さらに好ましくは5.65～28.25g/Lの範囲である。なお、前記反応中における全血試料の添加割合は、例えば、前記体積割合とHb重量割合の両方を満たしてもよいし、いずれか一方を満たしてもよい。

[0045] 全血としては、例えば、溶血した全血、未溶血の全血、抗凝固全血、凝固画分を含む全血等のいずれであってもよい。

[0046] 本発明において、試料に含まれる標的核酸は、例えば、DNAである。前記DNAは、例えば、生体試料等の試料に元来含まれるDNAでもよいし、遺伝子増幅法により増幅させた増幅産物DNAであってもよい。後者の場合、前記試料に元来含まれているRNA(トータルRNA、mRNA等)から逆転写反応(例えば、RT-PCR(Reverse Transcription PCR))により生成させたcDNAがあげられる。

[0047] 本発明の増幅産物の製造方法において、遺伝子増幅反応の開始に先立ち、前記反応液にアルブミンを添加することが好ましい。このように、アルブミンを添加すれば、例えば、前述のような沈殿物や濁りの発生をより一層低減することができ、且つ、増幅効率もさらに向上することができる。具体的には、DNAポリメラーゼによる伸長鎖

の合成工程(増幅工程)や、一本鎖DNAへの解離工程前に、アルブミンを添加することが好ましい。

- [0048] 前記反応液におけるアルブミンの添加割合は、例えば、0.01~2重量%の範囲であり、好ましくは0.1~1重量%であり、より好ましくは0.2~0.8重量%である。前記アルブミンとしては、特に制限されず、例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)、ヒト血清アルブミン、ラット血清アルブミン、ウマ血清アルブミン等があげられ、これらはいずれか1種類でもよいし2種類以上を併用してもよい。
- [0049] つぎに、本発明の増幅産物の製造方法に関し、全血試料について、DNAを標的核酸とし、PCRにより、2種類の遺伝子、すなわち、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の各増幅産物を、同一反応液において同時に製造する例をあげて説明する。なお、本発明は、本発明のプライマーセットを使用することが特徴であり、他の構成ならびに条件は何ら制限されない。
- [0050] まず、PCR反応液を調製する。本発明のプライマーセットの添加割合は、特に制限されないが、プライマーセット(1)および(2)のFプライマーを、それぞれ0.1~2 $\mu\text{mol/L}$ となるように添加することが好ましく、より好ましくは0.25~1.5 $\mu\text{mol/L}$ であり、特に好ましくは0.5~1 $\mu\text{mol/L}$ である。また、プライマーセット(1)および(2)のRプライマーを、それぞれ0.1~2 $\mu\text{mol/L}$ となるように添加することが好ましく、より好ましくは0.25~1.5 $\mu\text{mol/L}$ であり、特に好ましくは0.5~1 $\mu\text{mol/L}$ である。各プライマーセットにおけるFプライマーとRプライマーとの添加割合(F:R、モル比)は、特に制限されないが、例えば、1:0.25~1:4が好ましく、より好ましくは1:0.5~1:2である。
- [0051] 反応液における全血試料の割合は、特に制限されないが、前述の範囲が好ましい。全血試料は、そのまま反応液に添加してもよいし、予め、水や緩衝液等の溶媒で希釈してから反応液に添加してもよい。全血試料を予め希釈する場合、その希釈率は特に制限されず、例えば、反応液での最終的な全血添加割合が前記範囲となるように設定できるが、例えば、100~2000倍であり、好ましくは200~1000倍である。
- [0052] 前記反応液における他の組成成分は、特に制限されず、従来公知の成分があげられ、その割合も特に制限されない。前記組成成分としては、例えば、DNAポリメラー

ぜ、ヌクレオシド三リン酸および溶媒があげられる。また、前述のように前記反応液はさらにアルブミンを含有することが好ましい。なお、前記反応液において、各組成成分の添加順序は何ら制限されない。

[0053] 前記DNAポリメラーゼとしては、特に制限されず、例えば、従来公知の耐熱性細菌由来のポリメラーゼが使用できる。具体例としては、テルムス・アクアティカス(Thermus aquaticus)由来DNAポリメラーゼ(米国特許第4, 889, 818号および同第5, 079, 352号)(商品名Taqポリメラーゼ)、テルムス・テルモフィラス(Thermus thermophilus)由来DNAポリメラーゼ(WO 91/09950)(rTth DNA polymerase)、ピロコッカス・フリオサス(Pyrococcus furiosus)由来DNAポリメラーゼ(WO 92/9688)(Pfu DNA polymerase: Stratagene社製)、テルモコッカス・リトラリス(Thermococcus litoralis)由来DNAポリメラーゼ(EP-A 455 430)(商標Vent: Biolab New England社製)等が商業的に入手可能であり、中でも、テルムス・アクアティカス(Thermus aquaticus)由来の耐熱性DNAポリメラーゼが好ましい。

[0054] 前記反応液中のDNAポリメラーゼの添加割合は、特に制限されないが、例えば、1~100U/mLであり、好ましくは5~50U/mLであり、より好ましくは20~30U/mLである。なお、DNAポリメラーゼの活性単位(U)は、一般に、活性化サケ精子DNAを鋳型プライマーとして、活性測定用反応液(25mM TAPS buffer(pH9.3、25°C)、50mM KCl、2mM MgCl₂、1mMメルカプトエタノール、200 μM dATP、200 μM dGTP、200 μM dTTP、100 μM「α-³²P」dCTP、0.25mg/mL活性化サケ精子DNA)中、74°Cで、30分間に10nmolの全ヌクレオチドを酸不溶性沈殿物に取り込む活性が1Uである。

[0055] 前記ヌクレオシド三リン酸としては、通常、dNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)があげられる。前記反応液中のdNTPの添加割合は、特に制限されないが、例えば、0.01~1mmol/Lであり、好ましくは0.05~0.5mmol/Lであり、より好ましくは0.1~0.3mmol/Lである。

[0056] 前記溶媒としては、例えば、Tris-HCl、Tricine、MES、MOPS、HEPES、CAPS等の緩衝液があげられ、市販のPCR用緩衝液や市販のPCRキットの緩衝液等が使用できる。

- [0057] また、前記PCR反応液は、さらに、グリセロール、ヘパリン、ベタイン、KCl、MgCl₂、MgSO₄、グリセロール等を含んでもよく、これらの添加割合は、例えば、PCR反応を阻害しない範囲で設定すればよい。
- [0058] 反応液の全体積は、特に制限されず、例えば、使用する機器(サーマルサイクラー)等に応じて適宜決定できるが、通常、1~500 μLであり、好ましくは10~100 μLである。
- [0059] つぎに、PCRを行う。PCRのサイクル条件は特に制限されないが、例えば、(1)全血由来二本鎖DNAの1本鎖DNAへの解離、(2)プライマーのアニーリング、(3)プライマーの伸長(ポリメラーゼ反応)は、それぞれ以下の通りである。また、サイクル数も特に制限されないが、下記(1)~(3)の3ステップを1サイクルとして、例えば、30サイクル以上が好ましい。上限は特に制限されないが、例えば、合計100サイクル以下、好ましくは70サイクル以下、さらに好ましくは50サイクル以下である。各ステップの温度変化は、例えば、サーマルサイクラー等を用いて自動的に制御すればよい。本発明のプライマーセットを使用した場合、前述のように増幅効率に優れるため、従来の方法によれば50サイクルに3時間程度を要していたのに対して、本発明によれば、約1時間程度(好ましくは1時間以内)で50サイクルを完了することも可能である。

[0060] [表3]

	温度 (°C) および時間 (秒)
(1) 1本鎖DNAの解離	例えば、90~99°C、1~120秒
	好ましくは、92~95°C、1~60秒
(2) プライマーのアニーリング	例えば、40~70°C、1~300秒
	好ましくは、50~70°C、5~60秒
(3) 伸長反応	例えば、50~80°C、1~300秒
	好ましくは、50~75°C、5~60秒

[0061] 以上のようにして、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の各目的領域の増幅産物を、同一反応液において同時に製造することができる。

[0062] 本発明の増幅産物の製造方法は、さらに、前述の増幅反応によって得られた増幅

産物を検出する工程を含んでもよい。これによって、増幅産物の有無や、各遺伝子の各目的領域における遺伝子型を検出することもできる。増幅産物の有無は、従来公知の方法により確認できる。具体的には、例えば、前記(I)工程において、前記反応液に、さらに、CYP2C9遺伝子またはVKORC1遺伝子の検出対象部位にハイブリダイズ可能なプローブ(例えば、蛍光標識化プローブ)を添加しておき、さらに、(II)工程として、前記反応液について、前記プローブにおける蛍光標識の蛍光強度を測定することによって確認できる。また、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の両方について増幅産物の有無を確認する場合は、各遺伝子に対するプローブをそれぞれ添加しておき、前記(II)工程において、前記反応液について、各プローブにおける各蛍光標識の蛍光強度を測定することによって確認できる。他方、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子における多型の検出については、本発明の一形態として、以下に説明する。

[0063] <CYP2C9遺伝子多型およびVKORC1遺伝子多型の解析方法>

本発明の遺伝子多型の検出方法は、遺伝子が、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子であり、各遺伝子における検出対象部位の多型を、同一反応液を用いて解析する方法であって、下記(i)～(vi)工程を含むことを特徴とする。

(i) 本発明の増幅産物の製造方法により、同一反応液中で同時に、CYP2C9遺伝子における検出対象部位を含む領域およびVKORC1遺伝子における検出対象部位を含む領域を増幅させる工程

(ii) 前記(i)工程におけるCYP2C9遺伝子の増幅産物およびVKORC1遺伝子の増幅産物と、前記各遺伝子の各検出対象部位にそれぞれハイブリダイズ可能なプローブとを含む反応液を準備する工程

(iii) 前記反応液の温度を変化させ、前記各増幅産物と前記各プローブとの各ハイブリッド形成体の融解状態を示すシグナル値を測定する工程

(iv) 温度変化に伴う前記シグナル値の変動から、前記各検出対象部位の多型を決定する工程

[0064] このように本発明のプライマーセットを用いて増幅産物の製造することによって、前述のように、2種類の遺伝子、すなわち、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子

における多型の目的部位を含む領域を増幅することができる。

- [0065] 前記(ii)工程におけるプローブは、特に制限されないが、例えば、CYP2C9遺伝子の検出対象配列に相補的なプローブ(以下、「CYP2C9遺伝子用プローブ」ともいう)およびVKORC1遺伝子の検出対象配列に相補的なプローブ(以下、「VKORC1遺伝子用プローブ」ともいう)があげられる。プローブは、いずれか1種類でもよいが、各遺伝子の多型を同一反応液を用いて決定できることから、CYP2C9遺伝子用プローブとVKORC1遺伝子用プローブの両方を併用することが好ましい。
- [0066] 前記CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子のそれぞれに対するプローブは、特に制限されず、従来公知の方法によって設定でき、例えば、多型の検出目的部位を含む検出対象配列として、各遺伝子のセンス鎖の配列に基づいて設計してもよいし、アンチセンス鎖の配列に基づいて設計してもよい。また、多型の検出目的部位の塩基は、各多型の種類に応じて適宜決定できる。
- [0067] すなわち、CYP2C9遺伝子の場合、配列番号1の521番目の塩基において、A(CYP2C9*1)およびC(CYP2C9*3)の多型が知られていることから、例えば、521番目がAである検出対象配列、および、521番目がCである検出対象配列のいずれかに相補的なプローブ(センス鎖の検出用プローブ)や、そのアンチセンス鎖の配列に相補的なプローブ(アンチセンス鎖の検出用プローブ)があげられる。また、配列番号1の522番目の塩基において、T(CYP2C9*1)およびC(CYP2C9*4)の多型が知られていることから、例えば、522番目がTである検出対象配列、および、522番目がCである検出対象配列のいずれかに相補的なプローブ(センス鎖の検出用プローブ)や、そのアンチセンス鎖の配列に相補的なプローブ(アンチセンス鎖の検出用プローブ)があげられる。
- [0068] また、VKORC1遺伝子の場合、配列番号2における484番目の塩基に「C」および「T」の多型が知られていることから、例えば、484番目がCである検出対象配列、および、484番目がTである検出対象配列のいずれかに相補的なプローブ(センス鎖の検出用プローブ)や、そのアンチセンス鎖の配列に相補的なプローブ(アンチセンス鎖の検出用プローブ)があげられる。このように、多型が生じる検出目的部位の塩基を前述のようないずれの塩基に設定してプローブを設計しても、後述するような方

法により、各遺伝子の検出目的部位においてどのような多型を示すかを判断することが可能である。なお、プローブは、例えば、人種間における多型の傾向を考慮して設計することが好ましい。例えば、日本人の場合、配列番号2における484番目の塩基にCの多型が少ないことから、例えば、484番目のCとパーフェクトマッチになるプローブとし、他方、欧米人の場合、484番目の塩基にCの多型が多いことから、例えば、484番目のTとパーフェクトマッチになるプローブとするという手法をとることも可能である。

[0069] なお、各プローブは、各遺伝子の目的領域について増幅反応を行った後に反応液に添加することもできるが、容易且つ迅速に解析を行えることから、例えば前記(i)工程の増幅反応に先立って、予め反応液に添加しておくことが好ましい。

[0070] 前記(i)工程において、前記反応液におけるプローブの添加割合は、特に制限されないが、例えば、各プローブを10~400nmolの範囲となるように添加することが好ましく、より好ましくは20~200nmolである。また、プローブの標識として蛍光色素を用いている場合、例えば、検出する蛍光強度を調整するために、標識化プローブと同じ配列である未標識プローブを併用してもよく、この未標識プローブは、その3'末端にリン酸が付加されてもよい。この場合、標識化プローブと非標識プローブのモル比は、例えば、1:10~10:1が好ましい。前記プローブの長さは、特に制限されず、例えば、5~50merであり、好ましくは10~30merである。

[0071] T_m 値について説明する。二本鎖DNAを含む溶液を加熱していくと、260nmにおける吸光度が上昇する。これは、二本鎖DNAにおける両鎖間の水素結合が加熱によってほどけ、一本鎖DNAに解離(DNAの融解)することが原因である。そして、全ての二本鎖DNAが解離して一本鎖DNAになると、その吸光度は加熱開始時の吸光度(二本鎖DNAのみの吸光度)の約1.5倍程度を示し、これによって融解が完了したと判断できる。この現象に基づき、融解温度 T_m とは、一般に、吸光度が、吸光度全上昇分の50%に達した時の温度と定義される。

[0072] 前記(iii)工程において、前記増幅産物と前記プローブとのハイブリッド形成体の融解状態を示すシグナルの測定は、前述した、260nmの吸光度測定でもよいが、標識物質のシグナル測定であってもよい。具体的には、前記プローブとして、標識物質で

標識化された標識化プローブを使用し、前記標識物質のシグナル測定を行うことが好ましい。前記標識化プローブとしては、例えば、単独でシグナルを示し且つハイブリッド形成によりシグナルを示さない標識化プローブ、または、単独でシグナルを示さず且つハイブリッド形成によりシグナルを示す標識化プローブがあげられる。前者のようなプローブであれば、検出対象配列とハイブリッド(二本鎖DNA)を形成している際にはシグナルを示さず、加熱によりプローブが遊離するとシグナルを示す。また、後者のプローブであれば、検出対象配列とハイブリッド(二本鎖DNA)を形成することによってシグナルを示し、加熱によりプローブが遊離するとシグナルが減少(消失)する。したがって、この標識によるシグナルをシグナル特有の条件(吸収波長等)で検出することによって、前記260nmの吸光度測定と同様に、ハイブリッド形成体の融解の進行ならびにT_m値の決定等を行うことができる。

[0073] 本発明においては、2つの遺伝子についてそれぞれの多型を確認するため、2種類のプローブは、それぞれ異なる条件で検出される異なる標識(例えば、蛍光標識)によって標識化されていることが好ましい。このように異なる標識を使用することによって、同一反応液であっても、検出条件を変えることによって、各増幅産物を別個に解析することが可能となる。

[0074] 前記標識化プローブにおける標識物質の具体例としては、例えば、蛍光色素(蛍光団)があげられる。前記標識化プローブの具体例としては、例えば、蛍光色素で標識され、単独で蛍光を示し且つハイブリッド形成により蛍光が減少(例えば、消光)するプローブが好ましい。このような蛍光消光現象(Quenching phenomenon)を利用したプローブは、一般に、蛍光消光プローブと呼ばれる。中でも、前記プローブとしては、オリゴヌクレオチドの3'末端もしくは5'末端が蛍光色素で標識化されていることが好ましく、標識化される前記末端の塩基は、Cであることが好ましい。この場合、前記標識化プローブがハイブリダイズする検出対象配列において、前記標識化プローブの末端塩基Cと対をなす塩基もしくは前記対をなす塩基から1~3塩基離れた塩基がGとなるように、前記標識化プローブの塩基配列を設計することが好ましい。このようなプローブは、一般的にグアニン消光プローブと呼ばれ、いわゆるQProbe(登録商標)として知られている。このようなグアニン消光プローブが検出対象配列にハイブ

リダイズすると、蛍光色素で標識化された末端のCが、前記検出対象DNAにおけるGに近づくことによって、前記蛍光色素の発光が弱くなる(蛍光強度が減少する)という現象を示す。このようなプローブを使用すれば、シグナルの変動により、ハイブリダイズと解離とを容易に確認することができる。

[0075] 前記蛍光色素としては、特に制限されないが、例えば、フルオレセイン、リン光体、ローダミン、ポリメチン色素誘導体等があげられ、市販の蛍光色素としては、例えば、BODIPY FL(商品名、モレキュラー・プローブ社製)、FluorePrime(商品名、アマシヤムファルマシア社製)、Fluoredite(商品名、ミリポア社製)、FAM(商品名、ABI社製)、Cy3およびCy5(商品名、アマシヤムファルマシア社製)、TAMRA(商品名、モレキュラープローブ社製)等があげられる。2種類のプローブに使用する蛍光色素の組み合わせは、例えば、異なる条件で検出できればよく、特に制限されないが、例えば、Pacific Blue(検出波長450~480nm)、TAMRA(検出波長585~700nm)およびBODIPY FL(検出波長515~555nm)のいずれか2種類の組み合わせ等があげられる。

[0076] 以下に、前述したCYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の各多型を解析(検出)するためのプローブの配列の具体例を示す。なお、本発明は、これには制限されない。

[0077] CYP2C9遺伝子用プローブとしては、例えば、下記プローブ(1)があげられる。下記プローブ(1)は、センス鎖を検出するためのプローブであり、配列番号1において521番目がCである領域に相補的な配列からなる。また、本発明におけるプローブの具体例としては、例えば、前述のように、以下に示すオリゴヌクレオチドの相補鎖であってもよい。

プローブ(1)

配列番号1における516番目のグアニン塩基(G)を一塩基目として3'方向に向かって17~22塩基目までの領域に相補的な配列である少なくとも1つのオリゴヌクレオチドであって、前記グアニン塩基に相補的なシトシン塩基を3'末端とするオリゴヌクレオチド

[0078] プローブ(1)の具体例を、下記表に示す。

[表4]

プローブ	配列	T _m (°C)	配列番号
プローブ(P1)	5'-gtggggagaaggtcaAGgtatc-3'	55.7	41
	5'-tggggagaaggtcaAGgtatc-3'	54.4	42
	5'-ggggagaaggtcaAGgtatc-3'	52.8	43
	5'-gggagaaggtcaAGgtatc-3'	50.2	44
	5'-ggagaaggtcaAGgtatc-3'	47.3	45
	5'-gagaaggtcaAGgtatc-3'	44.1	46

[0079] また、前述のCYP2C9遺伝子用プローブを用いて、配列番号1における522番目の多型(CYP2C9*4)を検出することも可能である。例えば、CYP2C9遺伝子用プローブは、配列番号1において、521番目がCであり522番目がTである領域に相補的な配列である。つまり、このプローブに完全にマッチすれば、CYP2C9*3(A521C)であり、一塩基異なるミスマッチの場合は、CYP2C9*1(野生型)、二塩基異なるミスマッチの場合は、CYP2C9*4(T522C)であると判断できる。

[0080] 前記表の各プローブにおける大文字の塩基Gは、kに置き換えることができ、前記kは、GおよびTのいずれでもよい。また、大文字のAは、rに置き換えることができ、前記rは、AおよびGのいずれでもよい。

[0081] VKORC1遺伝子用プローブとしては、例えば、下記プローブ(2-1)および(2-2)があげられる。下記プローブ(2-1)は、アンチセンス鎖を検出するためのプローブであり、配列番号2において484番目がCである領域と同じ配列からなる。他方、下記プローブ(2-2)は、センス鎖を検出するためのプローブであり、配列番号2において484番目がCである領域に相補的な配列からなる。また、本発明におけるプローブの具体例としては、例えば、前述のように、以下に示すオリゴヌクレオチドの相補鎖であってもよい。

プローブ(2-1)

配列番号2における477番目のシトシン塩基(C)を一塩基目として3'方向に向かって18~24塩基目までの領域と同じ配列である少なくとも1つのオリゴヌクレオチドであって、前記シトシン塩基を5'末端とするオリゴヌクレオチド

プローブ(2-1)

配列番号2における472番目のグアニン塩基(G)を一塩基目として3'方向に向かっ

て15～24塩基目までの領域に相補的な配列である少なくとも1つのオリゴヌクレオチドであって、前記グアニン塩基に相補的なシトシン塩基を3'末端とするオリゴヌクレオチド

[0082] プローブ(2-1)の具体例を、下記表の配列番号47～53に、プローブ(2-2)の具体例を、下記表の配列番号54～63に、それぞれ示す。

[表5]

プローブ	配列	T _m (°C)	配列番号
プローブ(P2)	5'-catcgacCcttgactaggatggg-P-3'	59.7	47
	5'-catcgacCcttgactaggatgg-P-3'	57.9	48
	5'-catcgacCcttgactaggatg-P-3'	55.8	49
	5'-catcgacCcttgactaggat-P-3'	54.6	50
	5'-catcgacCcttgactaggga-P-3'	54.3	51
	5'-catcgacCcttgactagg-P-3'	52.9	52
	5'-catcgacCcttgactag-P-3'	50.2	53
	5'-cctagtccaagGgtcgatgatctc-3'	57.5	54
	5'-ctagtccaagGgtcgatgatctc-3'	55.5	55
	5'-tagtccaagGgtcgatgatctc-3'	54.6	56
	5'-agtccaagGgtcgatgatctc-3'	54.9	57
	5'-gtccaagGgtcgatgatctc-3'	53.6	58
	5'-tccaagGgtcgatgatctc-3'	52.1	59
	5'-ccaagGgtcgatgatctc-3'	50.6	60
	5'-caagGgtcgatgatctc-3'	47.6	61
	5'-aagGgtcgatgatctc-3'	45.4	62
	5'-agGgtcgatgatctc-3'	44.0	63

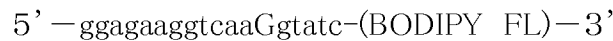
[0083] 前記表の配列番号47～53の各プローブにおいて、大文字の塩基Cは、yに置き換えることができ、前記yは、CおよびTのいずれでもよい。他方、前記表の配列番号54～63の各プローブにおいて、大文字の塩基Gは、rに置き換えることができ、前記rは、GおよびAのいずれでもよい。

[0084] そして、これらのプローブは、前述のように、それぞれ異なる蛍光色素(異なる波長で検出される蛍光色素)で標識化することが好ましい。例えば、前記表に示すプローブを消光プローブとする場合、CYP2C9遺伝子用プローブ(1)は、3'末端のシトシンを前述のような蛍光色素(例えば、BODIPY FL等)で標識化し、VKORC1遺伝子用プローブは、(2-1)の場合、5'末端のシトシンを、(2-2)の場合、3'末端のシトシンを、前述のような蛍光色素(例えば、Pacific Blue等)で標識化することが好ましい。また、5'末端に蛍光色素を標識化したプローブは、例えば、プローブ自体が伸長することを予防するために、その3'末端に、さらにリン酸基が付加されてもよい。

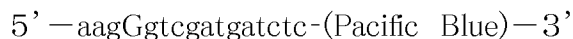
[0085] 前記プローブは、一例であって、本発明は、これには何ら限定されないが、CYP2C9遺伝子用プローブとしては、前記配列番号44の塩基配列からなるプローブ、配列番号45の塩基配列からなるプローブが好ましく、VKORC1遺伝子用プローブとしては、前記配列番号51の塩基配列からなるプローブ、前記配列番号62の塩基配列からなるプローブが好ましい。

[0086] 次に、本発明の解析方法について、一例として、下記プローブを用いて、CYP2C9遺伝子の多型(CYP2C9*3、配列番号1における521番目の塩基の多型)およびVKORC1遺伝子の多型(C6484T、配列番号2における484番目の塩基の多型)を検出する方法を説明する。なお、本発明はこれには制限されない。

[0087] (P1)配列番号44の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、または、配列番号45の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド



(P2)配列番号51の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、または、配列番号62の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド



[0088] まず、前記2種類の標識化プローブを添加した反応液を用いて、前述のようにPCRを行い、同一反応液中で、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の各目的領域を同時に増幅させる。前記反応液は、例えば、本発明のプライマーセット、DNAポリメラーゼ、dNTP、鋳型となる核酸を含む試料、および、前記プローブを含む。この他に、核酸増幅に使用できる種々の添加剤を含んでもよい。

[0089] 次に、得られた増幅産物の解離、および、解離により得られた一本鎖DNAと前記標識化プローブとのハイブリダイズを行う。これは、例えば、前記反応液の温度変化によって行うことができる。

[0090] 前記解離工程における加熱温度は、前記増幅産物が解離できる温度であれば特に制限されないが、例えば、85～95℃である。加熱時間も特に制限されないが、通常、1秒～10分であり、好ましくは1秒～5分である。

- [0091] 解離した一本鎖DNAと前記標識化プローブとのハイブリダイズは、例えば、前記解離工程の後、前記解離工程における加熱温度を低下させることによって行うことができる。温度条件としては、例えば、40～50℃である。
- [0092] そして、前記反応液の温度を変化させ、前記増幅産物と前記標識化プローブとのハイブリッド形成体の融解状態を示すシグナル値を測定する。具体的には、例えば、前記反応液(前記一本鎖DNAと前記標識化プローブとのハイブリッド形成体)を加熱し、温度上昇に伴うシグナルの変動を測定する。前述のように、例えば、末端のC塩基が標識化されたプローブ(グアニン消光プローブ)を使用した場合、一本鎖DNAとのハイブリダイズした状態では、蛍光が減少(または消光)し、解離した状態では、蛍光を発する。したがって、例えば、蛍光が減少(または消光)しているハイブリッド形成体を徐々に加熱し、温度上昇に伴う蛍光強度の増加を測定すればよい。
- [0093] 蛍光強度の変動を測定する際の温度範囲は、特に制限されないが、例えば、開始温度が室温～85℃であり、好ましくは25～70℃であり、終了温度は、例えば、40～105℃である。また、温度の上昇速度は、特に制限されないが、例えば、0.1～20℃/秒であり、好ましくは0.3～5℃/秒である。
- [0094] 次に、前記シグナルの変動を解析して T_m 値として決定する。具体的には、得られた蛍光強度から各温度における単位時間当たりの蛍光強度変化量($-d$ 蛍光強度増加量/ dt)を算出し、最も低い値を示す温度を T_m 値として決定できる。また、単位時間当たりの蛍光強度増加量(蛍光強度増加量/ t)が最も高い点を T_m 値として決定することもできる。なお、標識化プローブとして、消光プローブではなく、単独でシグナルを示さず且つハイブリッド形成によりシグナルを示すプローブを使用した場合には、反対に、蛍光強度の減少量を測定すればよい。
- [0095] 本発明においては、2つの遺伝子の各多型を検出するため、2種類のプローブの各標識に応じた条件で、それぞれの T_m 値を決定する。CYP2C9遺伝子用プローブのBODIPY FLは、例えば、検出波長515～555nm、VKORC1遺伝子用プローブのPacific Blueは、例えば、検出波長450～480nmで検出することができる。
- [0096] そして、これらの T_m 値から、各遺伝子の検出対象部位における遺伝子型を決定する。 T_m 解析において、完全に相補であるハイブリッド(マッチ)は、一塩基が異なるハ

イブリッド(ミスマッチ)よりも、解離を示すT_m値が高くなるという結果が得られる。したがって、予め、前記プローブについて、完全に相補であるハイブリッドのT_m値と、一塩基が異なるハイブリッドのT_m値とを決定しておくことにより、前記検出対象部位における遺伝子型を決定することができる。例えば、検出対象配列における目的部位の塩基を変異型(例えば、配列番号1における521番目の塩基がC)と仮定し、それを含む検出対象配列に相補的なプローブを使用した場合、形成したハイブリッドのT_m値が、完全に相補なハイブリッドのT_m値と同じであれば、前記増幅産物の多型は、変異型と判断できる。また、形成したハイブリッドのT_m値が、一塩基異なるハイブリッドのT_m値と同じ(完全に相補なハイブリッドのT_m値より低い値)であれば、前記増幅産物の多型は、野生型(例えば、配列番号1における521番目の塩基がA)と判断できる。さらに、両方のT_m値が検出された場合には、ヘテロ接合体と決定できる。このようにして、各標識化プローブに対する2つのT_m値から、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の各多型を判断することができる。

[0097] 具体例として、前述のようなプローブ(P1、P2)を使用した場合、以下のように判断できる。CYP2C9遺伝子検出用プローブとして例示した前記P1は、配列番号1における521番目の塩基と対応する塩基をGに設定している。したがって、形成したハイブリッドのT_m値が、完全に相補なハイブリッドのT_m値と同じであれば、前記増幅産物の多型は、変異型(CYP2C9*3)と判断できる。また、形成したハイブリッドのT_m値が、一塩基異なるハイブリッドのT_m値と同じ(完全に相補なハイブリッドのT_m値より低い値)であれば、前記増幅物の多型は、野生型(CYP2C9*1)と判断できる。さらに、両方のT_m値が検出された場合には、ヘテロ接合体を決定できる。他方、VKORC1遺伝子検出用プローブとして例示した前記P2は、VKORC1の完全長配列の6484番目の塩基(配列番号2における484番目の塩基)をCに設定している。したがって、形成したハイブリッドのT_m値が、完全に相補なハイブリッドのT_m値と同じであれば、前記増幅産物の多型は、野生型(C6484C)と判断できる。また、形成したハイブリッドのT_m値が、一塩基異なるハイブリッドのT_m値と同じ(完全に相補なハイブリッドのT_m値より低い値)であれば、前記増幅物の多型は、変異型(C6484T)と判断できる。さらに、両方のT_m値が検出された場合には、ヘテロ接合体を決定できる。

[0098] また、本発明においては、前述のように、ハイブリッド形成体を加熱して、温度上昇に伴うシグナル変動を測定する方法に代えて、例えば、ハイブリッド形成時におけるシグナル変動の測定を行ってもよい。すなわち、前記プローブを含む反応液の温度を降下させてハイブリッド形成体を形成する際に、前記温度降下に伴うシグナル変動を測定してもよい。

[0099] 具体例として、単独でシグナルを示し且つハイブリッド形成によりシグナルを示さない標識化プローブ(例えば、グアニン消光プローブ)を使用した場合、一本鎖DNAとプローブとが解離している状態では蛍光を発しているが、温度の降下によりハイブリッドを形成すると、前記蛍光が減少(または消光)する。したがって、例えば、前記反応液の温度を徐々に降下して、温度下降に伴う蛍光強度の減少を測定すればよい。他方、単独でシグナルを示さず且つハイブリッド形成によりシグナルを示す標識化プローブを使用した場合、一本鎖DNAとプローブとが解離している状態では蛍光を発していないが、温度の降下によりハイブリッドを形成すると、蛍光を発するようになる。したがって、例えば、前記反応液の温度を徐々に降下して、温度下降に伴う蛍光強度の増加を測定すればよい。

[0100] つぎに、本発明の実施例について、説明する。ただし、本発明は下記の実施例により制限されない。

実施例 1

[0101] 被検者2名からへパリンリチウム採血管を用いて採血を行った(サンプル1、2)。得られた血液0.1 μ Lを下記組成のPCR反応液50 μ Lに添加し、サーマルサイクラーを用いてPCRを行った。PCRの条件は、95°Cで60秒処理した後、95°C1秒および58°C15秒を1サイクルとして50サイクル繰り返し、さらに95°Cで1秒、40°Cで60秒処理した。そして、続けて、温度の上昇速度を1°C/3秒として、前記PCR反応液を40°Cから95°Cに加熱していき、経時的な蛍光強度の変化を測定した。測定波長は、450~480nm(蛍光色素Pacific Blueの検出)および515~555nm(蛍光色素BODIPY FLの検出)とした。なお、50サイクルのPCRに要した時間は、約1時間であった。

[0102] [表6]

(PCR反応液)	
蒸留水	23.25
5% NaN ₃	0.5
20% BSA	1
40%グリセロール	12.5
10x Gene Taq buffer*	5
2.5mM dNTPs	4
5uM CYP2C9用プローブ	1
100μM CYP2C9 F1プライマー	0.5
100μM CYP2C9 R1プライマー	0.25
5uM VKORC1用プローブ	1
100μM VKORC1 F2プライマー	0.25
100μM VKORC1 R2プライマー	0.5
5U/μl Gene Taq FP*	0.25
Total 50μL	

* 商品名Gene Taq FP : ニッポンジーン社製 (以下同じ)

[0103] (プローブ)

CYP2C9用プローブ (配列番号44)

5' - gggagaaggtcaaGgtatc - (BODIPY FL) - 3'

VKORC1遺伝子用プローブ (配列番号51)

5' - (Pacific Blue) - catcgacCcttgactagga - P - 3'

[0104] (プライマーセット)

CYP2C9 F1プライマー (配列番号5)

5' - gagcccctgcatgcaa - 3'

CYP2C9 R1プライマー (配列番号18)

5' - gatactatgaatttgggacttcgaa - 3'

VKORC1遺伝子 F2プライマー (配列番号29)

5' - gaggatagggtcagtgacatgaa - 3'

VKORC1遺伝子 R2プライマー (配列番号38)

5' - ccctgcccagaaaagtgat - 3'

[0105] CYP2C9用プローブとマッチするハイブリッドのT_m値は59°C (以下の各図におい

て*3)、ミスマッチのハイブリッドのT_m値は54°C(以下の各図において*1)である。VKORC1遺伝子用プローブとマッチするハイブリッドのT_m値は61.0°C(以下の各図においてC)、ミスマッチのハイブリッドのT_m値は53.0°C(以下の各図においてT)である。

[0106] サンプル1およびサンプル2の結果をそれぞれ図1に示す。これらの図は、温度上昇に伴う蛍光強度の変化を示すT_m解析のグラフであり、縦軸の微分値は「-d蛍光強度増加量/dt」を示し、横軸は温度を示す(以下、同様)。同図に示すように、シグナルのピークから、各サンプルにおけるCYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の各多型を決定した。これらの実施例の結果を裏付けるために、前記被検者2人について、RFLP法によって、CYP2C9およびVKORC1遺伝子の各多型を確認した結果、実施例と同じ結果が得られた。このように、本発明のプライマーセットを使用することにより、前処理を施していない全血試料を使用して、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子を同一反応液中で同時に増幅し、且つ、前記同一反応液を用いて前記遺伝子のそれぞれの多型を解析することができた。

実施例 2

[0107] 被検者2名から綿棒により口腔細胞を採取し、滅菌蒸留水500 μLに懸濁した(サンプル3および4)。この懸濁液2.5 μLを下記組成のPCR反応液47.5 μLに添加し、前記実施例1と同様にしてPCRならびに経時的な蛍光強度の変化を測定した。測定波長は、450~480nm(蛍光色素Pacific Blueの検出)および515~555nm(蛍光色素BODIPY FLの検出)とした。なお、50サイクルのPCRに要した時間は、約1時間であった。

[0108] [表7]

(PCR反応液)	
蒸留水	20.75
5% NaN ₃	0.5
20% BSA	1
40%グリセロール	12.5
10x Gene Taq buffer*	5
2.5mM dNTPs	4
5uM CYP2C9用プローブ	1
100μM CYP2C9 F1プライマー	0.5
100μM CYP2C9 R1プライマー	0.25
5uM VKORC1用プローブ	1
100μM VKORC1 F2プライマー	0.25
100μM VKORC1 R2プライマー	0.5
5U/μl Gene Taq FP*	0.25
Total 47.5μL	

[0109] サンプル3およびサンプル4の結果を図2にそれぞれ示す。同図に示すように、シグナルのピークから、各サンプルにおけるCYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の各多型を決定した。これらの実施例の結果を裏付けるために、前記被検者2人について、RFLP法によって、CYP2C9およびVKORC1遺伝子の各多型を確認した結果、実施例と同じ結果が得られた。このように、本発明のプライマーセットを使用することにより、前処理を施していない口腔細胞試料を使用して、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子を同一反応液中で同時に増幅し、且つ、前記同一反応液を用いて前記遺伝子のそれぞれの多型を解析することができた。

実施例 3

[0110] 配列番号1における521番目の塩基がCYP2C9*1/*3(521A/521C)のヘテロ接合体を示し、VKORC1遺伝子の6484番目(配列番号2における484番目)の塩基が6484T/Tのホモ接合体を示すヒトの精製ゲノムを準備した。この精製ゲノム1μLを下記組成のPCR反応液49μLと混合し、前記実施例1と同様にして、同様にしてPCRならびに経時的な蛍光強度の変化を測定した。測定波長は、450~480nm(蛍光色素Pacific Blueの検出)および515~555nm(蛍光色素BODIPY FL

の検出)とした。なお、50サイクルのPCRに要した時間は、約1時間であった。

[0111] [表8]

(PCR反応液)	
蒸留水	22.25
5% NaN ₃	0.5
20% BSA	1
40%グリセロール	12.5
10x Gene Taq buffer*	5
2.5mM dNTPs	4
5uM CYP2C9用プローブ	1
100μM CYP2C9 F1プライマー	0.5
100μM CYP2C9 R1プライマー	0.25
5uM VKORC1用プローブ	1
100μM VKORC1 F2プライマー	0.25
100μM VKORC1 R2プライマー	0.5
5U/μl Gene Taq FP*	0.25
Total 49μL	

[0112] この結果を、図3に示す。同図に示すように、CYP2C9について、2つのピークが得られたことから、配列番号1の521番目の塩基を区別して検出することが可能であることがわかった。同図に示すように、シグナルのピークから、各サンプルにおけるCYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の各多型を決定した。これらの実施例の結果は、ゲノムの情報と一致した。このように、本発明のプライマーセットを使用することにより、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子を同一反応液中で同時に増幅し、且つ、前記同一反応液を用いて前記遺伝子のそれぞれの多型を解析することができた。

実施例 4

[0113] 配列番号1に示す522番目のTがCに変異したVKORC遺伝子(CYP2C9*4)を挿入したプラスミドを調製した。このプラスミド1μLを実施例3と同じPCR反応液49μLと混合し、前記実施例1と同様にして、同様にしてPCRならびに経時的な蛍光強度の変化を測定した。測定波長は、450~480nm(蛍光色素Pacific Blueの検出)

および515～555nm(蛍光色素BODIPY FLの検出)とした。なお、50サイクルのPCRに要した時間は、約1時間であった。

[0114] CYP2C9用プローブとマッチするハイブリッドのT_m値は60. 0°C(以下の各図において*3)、1個の塩基がミスマッチのハイブリッドのT_m値は54. 0°C(以下の各図において*1)、2個の塩基がミスマッチのハイブリッドのT_m値は49. 0°C(以下の各図において*4)である。

[0115] この結果を、図4に示す。同図に示すように、49. 0°Cにピークが得られたことから、PCR増幅物は、CYP2C9遺伝子用プローブに対して、配列番号1における521番目の塩基がミスマッチ(すなわち521番目がA)であり、522番目の塩基がミスマッチ(すなわち522番目がC)であることがわかる。したがって、PCRに供したサンプルの多型は、CYP2C9*4であり、プラスミドの情報と合致していた。

実施例 5

[0116] 配列番号1における521番目の塩基がCYP2C9*1/*1(521A/521A)のホモ接合体を示し、VKORC1遺伝子の6484番目(配列番号2における484番目)の塩基が6484T/Tもしくは6484C/Cのホモ接合体、6484T/Cのヘテロ接合体を示すヒトの精製ゲノムを準備した。これらの精製ゲノム1 μLを下記組成のPCR反応液46 μLと混合し、前記実施例1と同様にして、同様にしてPCRならびに経時的な蛍光強度の変化を測定した。測定波長は、450～480nm(蛍光色素Pacific Blueの検出)および515～555nm(蛍光色素BODIPY FLの検出)とした。なお、50サイクルのPCRに要した時間は、約1時間であった。

[0117] また、配列番号1における521番目の塩基がCYP2C9*1/*1(521A/521A)のホモ接合体を示し、VKORC1遺伝子の6484番目(配列番号2における484番目)の塩基が6484T/Cのヘテロ接合体を示す患者からEDTA採血管により血液を採取した。血液10 μLと下記検体希釈液1 70 μLとを混合し、さらに、前記混合液10 μLと下記検体希釈液2 70 μLとを混合した。この混合液17 μLを95°Cで10分間加熱処理してから、下記PCR反応液46 μLと混合し、前記実施例1と同様にして、PCR反応ならびに経時的な蛍光強度の変化の測定を行った。

(検体希釈液1)

10mM Tris-HCl(pH8)、0.1mM EDTA、0.3% SDS、0.5%アジ化ナトリウム
(検体希釈液2)

10mM Tris-HCl(pH8)、0.1mM EDTA、0.5%アジ化ナトリウム

[0118] [表9]

(PCR反応液)	
蒸留水	20.52
5% Na ₂ N ₃	0.23
20% BSA	0.5
50%グリセロール	10
10x Gene Taq buffer*	5
2.5mM dNTPs	4
5uM CYP2C9用プローブ	2
100μM CYP2C9 F1プライマー	0.5
100μM CYP2C9 R1プライマー	0.25
5uM VKORC1用プローブ	2
100μM VKORC1 F2プライマー	0.5
100μM VKORC1 R2プライマー	0.25
5U/μl Gene Taq FP*	0.25
Total 46μL	

[0119] (プローブ)

CYP2C9用プローブ (配列番号45)

5' - ggagaaggtcaaGgtatc-(BODIPY FL)-3'

VKORC1遺伝子用プローブ (配列番号62)

5' - aagGgtc gatgatctc-(Pacific Blue)-3'

[0120] (プライマーセット)

CYP2C9 F1プライマー (配列番号5)

5' - gagcccctgcatgcaa-3'

CYP2C9 R1プライマー (配列番号18)

5' - gatactatgaatttggggacttcgaa-3'

VKORC1遺伝子 F2プライマー (配列番号29)

5' - gaggatagggtcagtgacatggaa-3'

VKORC1遺伝子 R2プライマー (配列番号38)

5' - ccctgccccgagaaaggtgat - 3'

[0121] この結果を、図5および図6に示す。図5は、試料として精製ゲノムを使用した結果であり、図6は、試料として血液を使用した結果である。図5に示すように、シグナルのピークから、各サンプルにおけるCYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の各多型を決定した。これらの実施例の結果は、ゲノムの情報と一致した。また、図5に示すように、ホモ接合体のVKORC1遺伝子に関して、6484T/Tと6484C/Cとで、異なる位置にピークが得られたことから、6484番目の塩基を区別して検出できることがわかった。ヘテロ接合体についても、前述の2種類のホモ接合体に対応する2つのピークが得られたことから、両者を区別できることがわかった。さらに、図6に示すように、血液試料を使用した場合においても、精製ゲノムを使用した場合と同様に、各遺伝子を増幅し、且つ、各多型に応じたピークが得られることがわかった。このように、本発明のプライマーセットを使用することにより、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子を同一反応液中で同時に増幅し、且つ、前記同一反応液を用いて前記遺伝子のそれぞれの多型を解析することができた。

産業上の利用可能性

[0122] 以上のように、本発明のプライマーセットによれば、ワーファリンの効果に関与するCYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の検出目的の多型が生じる部位をそれぞれ含む領域を、同一反応液において、同時且つ特異的に増幅することができる。このため、前述のような従来法とは異なり手間やコストを低減することが可能となる。また、このように同一反応液において2つの遺伝子の目的領域を特異的に増幅できることから、例えば、それぞれの目的領域における検出対象配列に相補的な2種類のプローブを使用することで、前記反応液を用いてそのままT_m解析を行い、前記2種類の多型をそれぞれタイピングすることが可能となる。また、一つの反応液で増幅やタイピングが可能であることから、操作の自動化も可能になる。さらに、本発明のプライマーセットを用いれば、例えば、夾雑物が含まれる試料(例えば、全血や口腔粘膜等)であっても、前処理を省略できるため、より迅速且つ簡便に増幅反応を行うことができる。また、本発明のプライマーセットを用いれば、従来よりも優れた増幅効率で増幅反応

が行えるため、増幅反応も短縮化が可能である。したがって、本発明のプライマーセットやこれを含む試薬、ならびにこれらを用いた増幅産物の製造方法によれば、各遺伝子の各多型を迅速かつ簡便に解析できることから、医療分野においてきわめて有効といえる。

請求の範囲

[1] 遺伝子増幅法により2種類の遺伝子を同時に増幅するためのプライマーセットであって、

前記2種類の遺伝子が、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子であり、

下記(1)および(2)の2種類のプライマーセットを含むことを特徴とする遺伝子増幅用プライマーセット。

プライマーセット(1)

下記(F1)のオリゴヌクレオチドからなるフォワードプライマーおよび下記(R1)のオリゴヌクレオチドからなるリバースプライマーを含む一対のプライマーセット

(F1)配列番号1の塩基配列における466番目のアデニン塩基(A)を一塩基目として5'方向に向かって14~18塩基目までの領域と同じ配列である少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであって、前記アデニン塩基(A)を3'末端とするオリゴヌクレオチド

(R1)配列番号1の塩基配列における631番目のチミン塩基(T)を一塩基目として3'方向に向かって19~36塩基目までの領域に相補的な少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであって、前記631番目のチミン塩基(T)に相補的なアデニン塩基(A)を3'末端とするオリゴヌクレオチド

プライマーセット(2)

下記(F2)のオリゴヌクレオチドからなるフォワードプライマーおよび下記(R2)のオリゴヌクレオチドからなるリバースプライマーを含む一対のプライマーセット

(F2)配列番号2の塩基配列における440番目のアデニン塩基(A)を一塩基目として5'方向に向かって21~27塩基目までの領域と同じ配列である少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであって、前記シトシン塩基(A)を3'末端とするオリゴヌクレオチド

(R2)配列番号2の塩基配列における541番目のアデニン塩基(A)を一塩基目として3'方向に向かって18~25塩基目までの領域に相補的な少なくとも一つのオリゴヌクレオチドであって、前記541番目のアデニン塩基(A)に相補的なチミン塩基(T)を3'末端とするオリゴヌクレオチド

[2] 前記(1)および(2)のプライマーセットが、それぞれ下記(1')および(2')のプライマーセットである、請求の範囲1記載の遺伝子増幅用プライマーセット。

プライマーセット(1')

下記(F1')のオリゴヌクレオチドからなるフォワードプライマーおよび下記(R1')のオリゴヌクレオチドからなるリバースプライマーを含む一対のプライマーセット

(F1')配列番号5の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド

(R1')配列番号18の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド

プライマーセット(2')

下記(F2')のオリゴヌクレオチドからなるフォワードプライマーおよび下記(R2')のオリゴヌクレオチドからなるリバースプライマーを含む一対のプライマーセット

(F2')配列番号29の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド

(R2')配列番号38の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド

- [3] 前記遺伝子増幅用プライマーセットが、生体試料中のCYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子を増幅するためのプライマーセットである、請求の範囲1記載の遺伝子増幅用プライマーセット。
- [4] 前記生体試料が、全血である、請求の範囲3記載の遺伝子増幅用プライマーセット。
- [5] 遺伝子増幅法により2種類の遺伝子を増幅するための試薬であって、前記2種類の遺伝子が、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子であり、請求の範囲1記載の遺伝子増幅用プライマーセットを含むことを特徴とする遺伝子増幅用試薬。
- [6] さらに、下記(P1)および(P2)に示すオリゴヌクレオチドからなる蛍光標識化プローブを含む、請求の範囲5記載の遺伝子増幅用試薬。
(P1)配列番号44の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、および、配列番号45の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド
(P2)配列番号51の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、および、配列番号62の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド
- [7] 遺伝子増幅法により2種類の遺伝子の増幅産物を製造する方法であって、前記2種類の遺伝子が、CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子であり、下記(I)工程を含むことを特徴とする増幅産物の製造方法。

(I) 試料中の核酸を鋳型として、請求の範囲1記載の遺伝子増幅用プライマーセットを用いて、同一反応液中で同時に、前記CYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子の増幅を行う工程

[8] 前記(I)工程において、前記反応液に、さらに、CYP2C9遺伝子の検出対象部位にハイブリダイズするプローブおよびVKORC1遺伝子の検出対象部位にハイブリダイズするプライマーの少なくとも一方を添加する、請求の範囲7記載の増幅産物の製造方法。

[9] 前記プローブが、下記(P1)および(P2)に示すオリゴヌクレオチドからなる群から選択された少なくとも一つのプローブである、請求の範囲8記載の増幅産物の製造方法。

(P1) 配列番号44の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、および、配列番号45の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド

(P2) 配列番号51の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、および、配列番号62の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド

[10] 前記プローブが、蛍光標識化プローブである、請求の範囲8記載の増幅産物の製造方法。

[11] さらに、下記(II)工程を含む、請求の範囲10記載の増幅産物の製造方法。

(II) 前記反応液について、前記蛍光標識化プローブにおける蛍光標識の蛍光強度を測定する工程

[12] 前記試料が、生体試料である、請求の範囲7記載の増幅産物の製造方法。

[13] 前記生体試料が、全血である、請求の範囲12記載の増幅産物の製造方法。

[14] 前記反応液における全血試料の添加割合が、0.1～0.5体積%である、請求の範囲13記載の増幅産物の製造方法。

[15] 遺伝子における検出対象部位の多型を解析する方法であって、前記遺伝子がCYP2C9遺伝子およびVKORC1遺伝子であり、下記(i)～(iv)工程を含むことを特徴とする多型解析方法。

(i) 請求の範囲7記載の増幅産物の製造方法により、同一反応液中で同時に、CYP2C9遺伝子における検出対象部位を含む領域およびVKORC1遺伝子における検

出対象部位を含む領域を増幅させる工程

(ii)前記(i)工程におけるCYP2C9遺伝子の増幅産物およびVKORC1遺伝子の増幅産物と、前記各遺伝子の各検出対象部位にそれぞれハイブリダイズ可能なプローブとを含む反応液を準備する工程

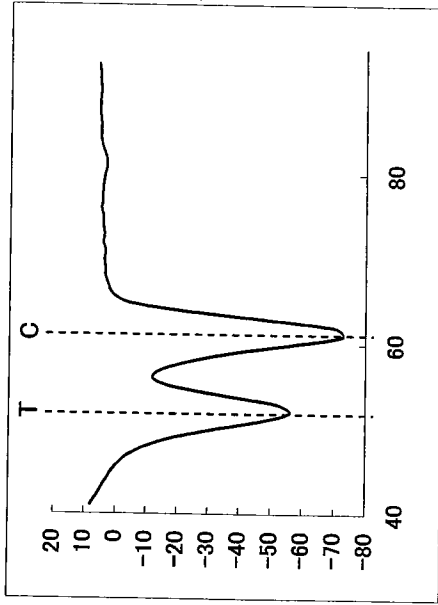
(iii)前記反応液の温度を変化させ、前記各増幅産物と前記各プローブとの各ハイブリッド形成体の融解状態を示すシグナル値を測定する工程

(iv)温度変化に伴う前記シグナル値の変動から、前記各検出対象部位の多型を決定する工程

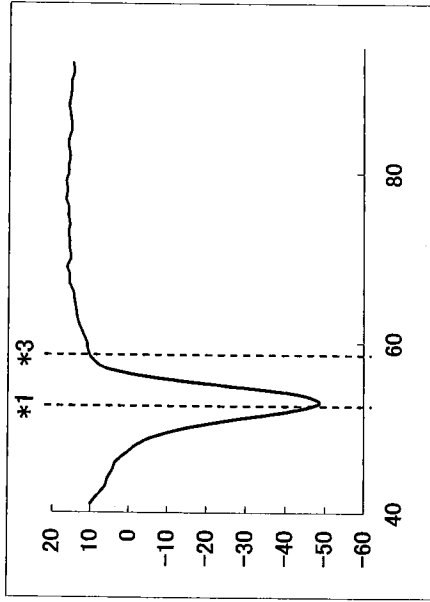
- [16] 前記(i)工程において、増幅反応に先立って、前記反応液に、前記各検出対象部位にそれぞれハイブリダイズ可能なプローブを添加する、請求の範囲15記載の多型解析方法。

[図1]

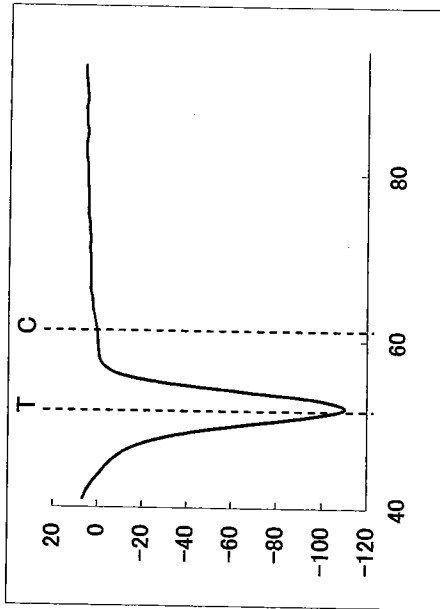
VKORC1 6484T/C
CYP2C9 *1/*1



*1 *3

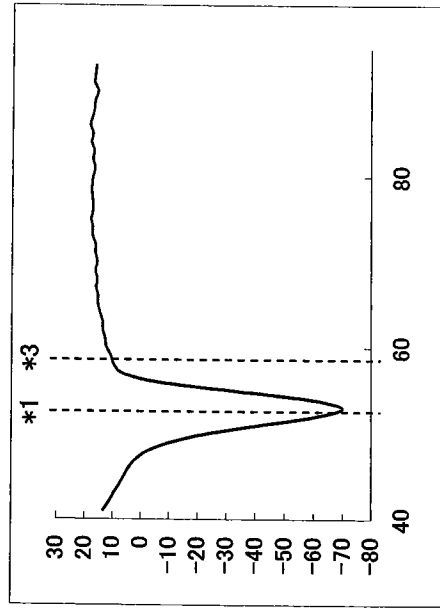


VKORC1 6484T/T
CYP2C9 *1/*1



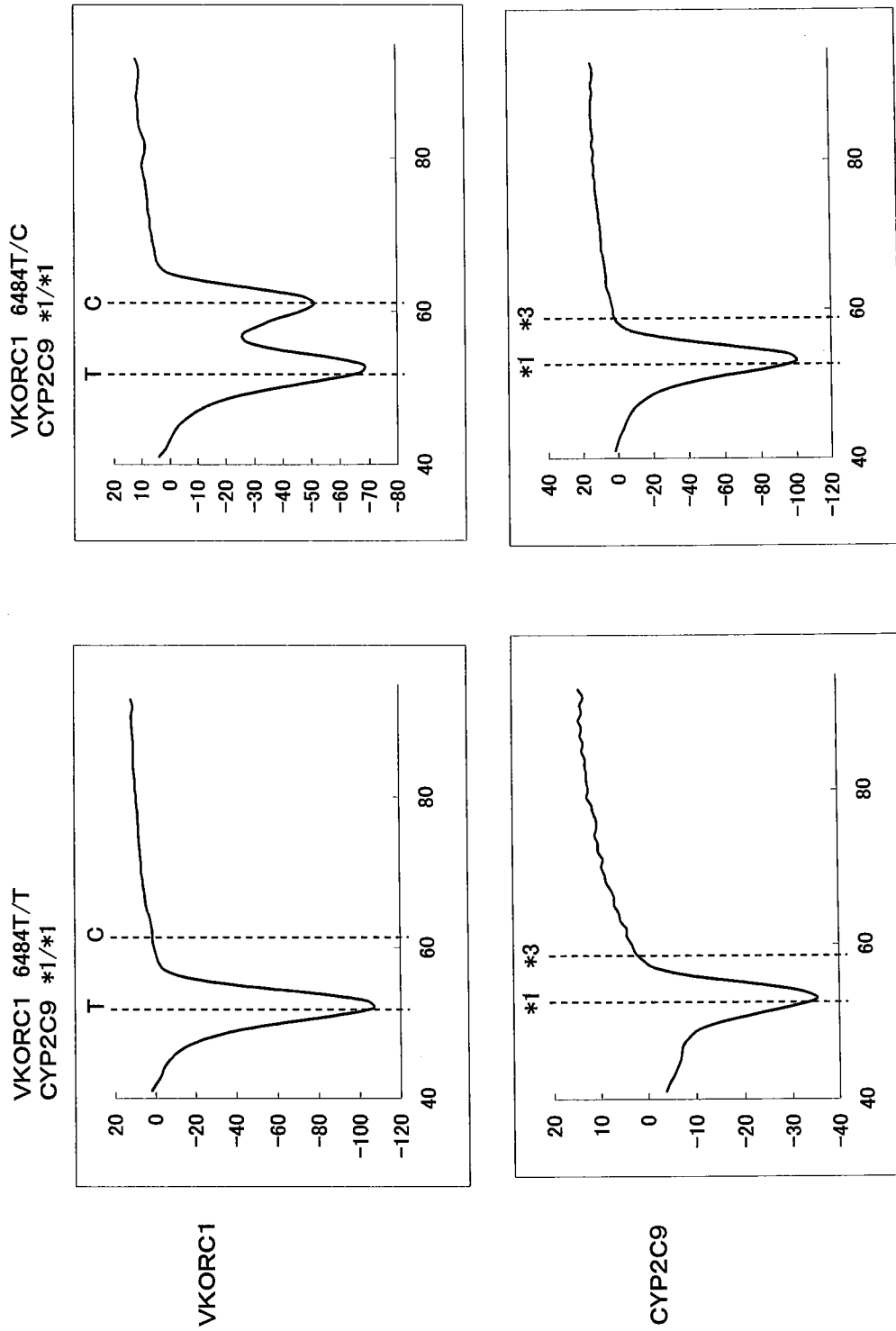
VKORC1

*1 *3

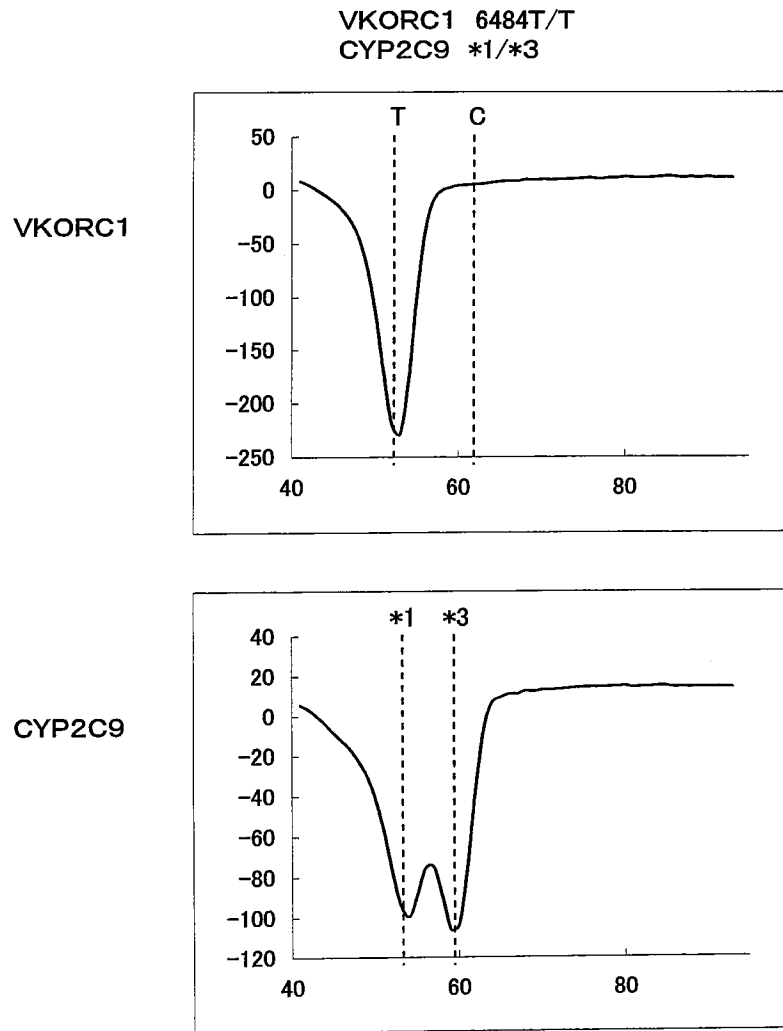


CYP2C9

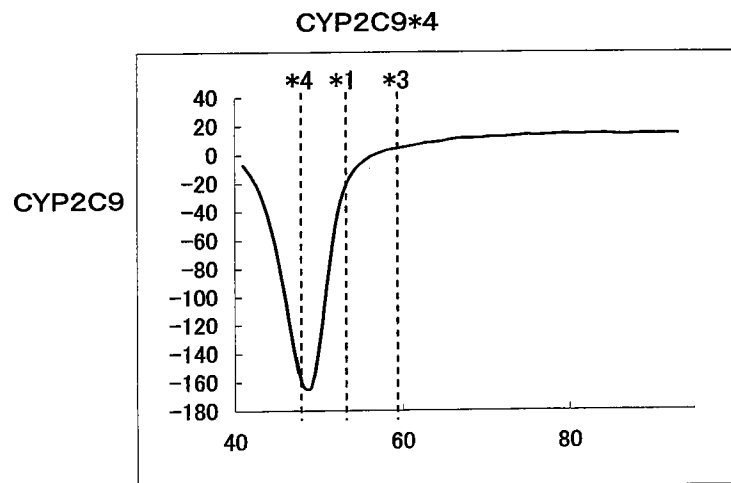
[図2]



[図3]

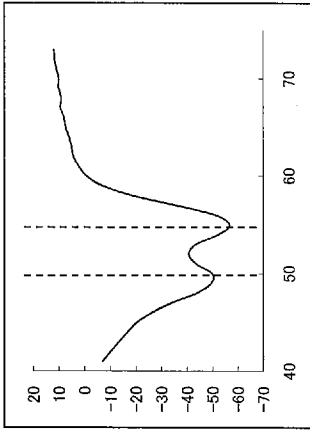


[図4]

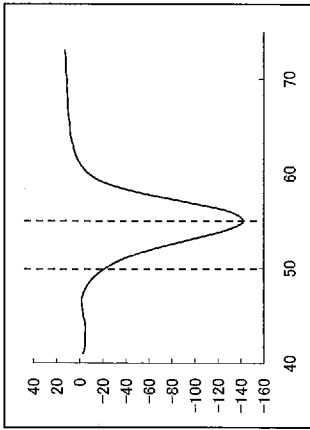


[図5]

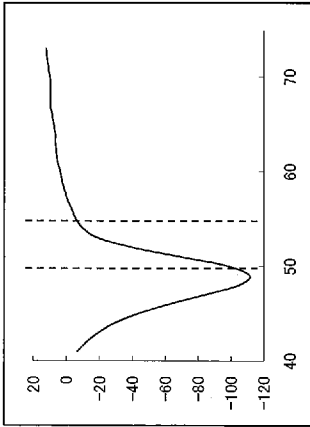
VKORC1 6484 T/C
CYP2C9 *1/*1



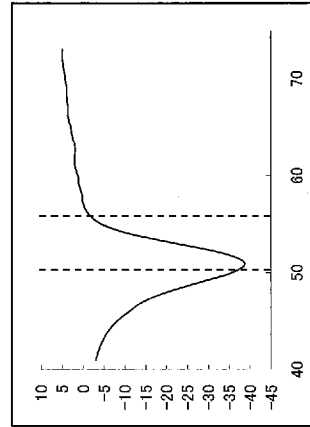
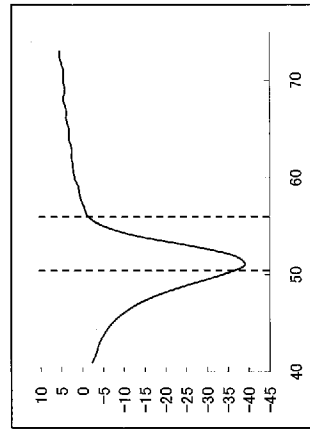
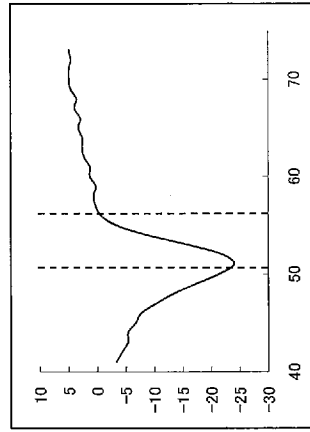
VKORC1 6484 C/C
CYP2C9 *1/*1



VKORC1 6484 T/T
CYP2C9 *1/*1



VKORC1

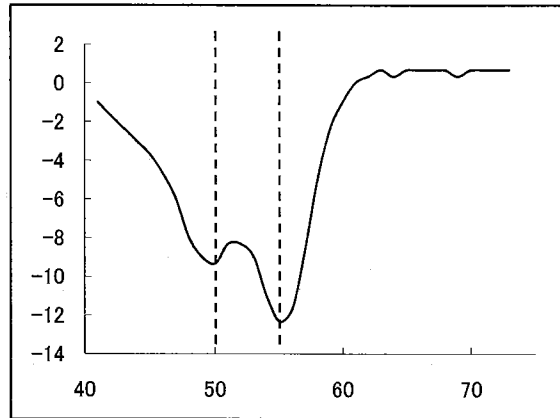


CYP2C9

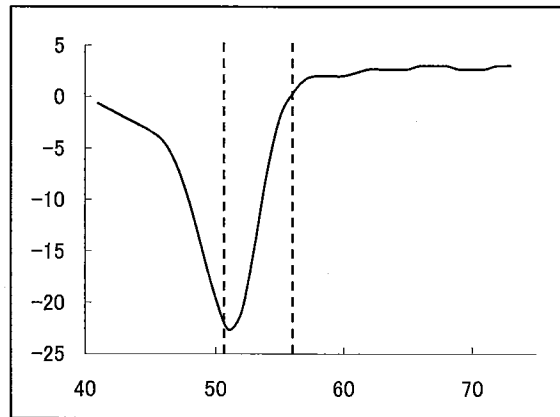
[図6]

VKORC1 6484 T/C
CYP2C9 *1/*1

VKORC1



CYP2C9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/055469

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2006.01) i, C12N15/09 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12N15/09

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed,
JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Harumi TAKAHASHI, "Warfarin Toyoryo no Kojinsa ni Kakawaru Idenshi Kensa", Kensa to Gijutsu, 2006, Vol.34, No.10, pages 984 to 986, full text	1-16

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 April, 2008 (22.04.08)Date of mailing of the international search report
13 May, 2008 (13.05.08)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	高橋晴美, ワルファリン投与量の個人差にかかわる遺伝子検査, 検査と技術, 2006, Vol. 34, No. 10, p. 984-986, 全文	1-16
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 22.04.2008	国際調査報告の発送日 13.05.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 柴原 直司 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 3 5 3 4