(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 10 月 2 日(02.10.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/156513 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/055509

(22) 国際出願日: 2014 年 3 月 4 日(04.03.2014)

(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 2013-072897 2013 年 3 月 29 日(29.03.2013) JP

(71) 出願人: 日本碍子株式会社(NGK INSULATORS, LTD.) [JP/JP]; 〒4678530 愛知県名古屋市瑞穂区須田町２番５６号 Aichi (JP).

(72) 発明者: 丹羽　孝介(NIWA Kousuke); 〒4678530 愛知県名古屋市瑞穂区須田町２番５６号　日本碍子株式会社内 Aichi (JP). 織部　晃暢(ORIBE Akinobu); 〒4678530 愛知県名古屋市瑞穂区須田町２番５６号　日本碍子株式会社内 Aichi (JP). 廣田　寿一(HIROTA Toshikazu); 〒4678530 愛知県名古屋市瑞穂区須田町２番５６号　日本碍子株式会社内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人　快友国際特許事務所(KAI-U PATENT LAW FIRM); 〒4516009 愛知県名古屋市西区牛島町６番１号　名古屋ルーセントタワー９階 Aichi (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

(54) **Title**: METHOD FOR DETECTING MUTATION

(54) 発明の名称 : 変異の検出方法

(57) **Abstract**: A method for detecting a mutation, said method comprising steps for: contacting a DNA sample which is likely to have a mutation with a first query probe having a first discrimination sequence, by which the mutation can be discriminated, and a second query probe having a second discrimination sequence, by which a region adjacent to the mutation can be discriminated, and conducting a DNA ligase reaction to give a ligation product that has the first discrimination sequence, the second discrimination sequence, a hybridization sequence which is specifically hybridizable with a sequence for detection of a probe depending on the type of the aforesaid mutation, and a labeling sequence for imparting a label; contacting the ligation product with a first primer having a sequence complementary to the hybridization sequence and a second primer having the labeling sequence, and conducting an amplification reaction using DNA polymerase to give an amplification product that has the labeling sequence and the hybridization sequence; and contacting the amplification product with the probe on a solid phase carrier to give a hybridization product, wherein the total concentration of the second primer is 0.5 (inclusive) to 12.5 (exclusive) times as high as the total concentration of the first primer.

(57) 要約: 変異を有する可能性のあるＤＮＡ試料と、変異を識別する第１の識別用配列を有する第１のクエリプローブと、前記変異に隣接する領域を識別する第２の識別配列を有する第２のクエリプローブと、を接触させて、ＤＮＡリガーゼ反応を行って、第１の識別用配列及び第２の識別配列と、前記変異の種類に応じたプローブの検出用配列と特異的にハイブリダイズするハイブリダイズ用配列と、標識を付与するための標識用配列と、をそれぞれ有する、ライゲーション産物を得て、このライゲーション産物と、前記ハイブリダイズ用配列の相補配列を有する第１のプライマーと、前記標識用配列を有する第２のプライマーと、を接触させてＤＮＡポリメラーゼ増幅反応により、前記標識用配列と前記ハイブリダイズ用配列とを備える増幅産物を取得して、固相担体上のプローブと増幅産物とを接触させて、ハイブリダイズ産物を取得する工程と、を備え、前記第２のプライマーの総濃度は、前記第１のプライマーの総濃度の０．５倍以上１２．５倍未満とする。

WO 2014/156513 A1

明　細　書

発明の名称 ： 変異の検出方法

技術分野

[0001] 本明細書は、ＤＮＡ中の変異の検出方法に関する。

本出願は、２０１３年３月２９日に出願された日本出願である特願２０１３－７２８９７の関連出願であり、この日本出願に基づく優先権を主張するものであり、この日本出願に記載された全ての内容を援用するものである。

背景技術

[0002] 遺伝子などにおけるＳＮＰなどの各種変異の検出は、医学診断等において有用である。従来、この種の変異の一般的な検出方法としては、固相担体に変異特異的なＤＮＡプローブを固定化したＤＮＡアレイを用いる方法がある。この方法では、ＤＮＡアレイ上のＤＮＡプローブと生体試料から取得した変異を含む可能性のある増幅産物とのハイブリダイゼーションによってＤＮＡアレイ上の固有の位置に生じる蛍光シグナルを介して変異を検出する。

[0003] こうしたＤＮＡアレイによる変異の検出をより迅速かつ簡易にするための種々の改良も行われている。例えば、蛍光シグナルでなく目視で特異的ハイブリダイゼーションを検出する方法が開示されている（特許文献１、非特許文献１）。これらの方法では、目視検出のために、公知の着色材料や酵素反応基質などで増幅産物を標識している。

[0004] さらに、変異特異的なＤＮＡプローブの設計や合成を省略するために、ＳＮＰ特異的でなくユニバーサルプローブを固定化したユニバーサルＤＮＡアレイで全てのＳＮを検出しうる手法も開発されている（非特許文献２）。この方法では、予め関連付けられたユニバーサルプローブと特異的にハイブリダイズ可能な塩基配列を有しかつ変異特異的な、ライゲーション産物を得るためのクエリプローブセットを準備し、ライゲーション反応を実施する。そして、このライゲーション産物を標識するためのプライマーセットを準備し、増幅反応を実施する。そして、この標識された増幅産物をユニバーサルプ

ローブが固定化されたＤＮＡアレイに供する。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第WO2013／002185パンフレット

非特許文献

[0006] 非特許文献1：JARMAM Vol.4(1),p.45-50,2003 DNAマイクロアレイを用いた臨床分離結核菌の薬剤耐性判定

非特許文献2：Analytical Biochemistry_364_1_2007_78-85

発明の概要

[0007] 本発明者らによれば、目視による検出とユニバーサルプローブの利用を同時に適用したＤＮＡアレイ法を確立しようとすると、条件によってはＳ／Ｎ比が低下するなど検出感度が低下する場合があることがわかった。

[0008] 本明細書は、目視による検出及びユニバーサルプローブの利用を同時に実現するとともに良好な変異検出能を安定して確保できる変異の検出方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らが、目視による変異の検出及びユニバーサルプローブの利用について種々検討したところ、以下の知見を得た。すなわち、上記したライゲーション反応における特異性あるいはライゲーション効率の低下があること、及び上記した増幅反応における反応効率の低下があることがわかった。さらに、本発明者らの検討によれば、ライゲーション反応や増幅反応を改良することで、上記不具合を解消して、Ｓ／Ｎ比を確保して、良好な検出感度、検出精度及び再現性も確保できることがわかった。本明細書によれば、これらの知見に基づき以下の手段が提供される。

[0010] （１）変異の検出方法であって、

前記変異を有する可能性のあるＤＮＡ試料と、前記変異の少なくとも一部を識別する第１の識別用配列を有する第１のクエリプローブと、前記変異に

隣接する領域を識別する第２の識別配列を有する第２のクエリプローブと、を接触させて、ＤＮＡリガーゼ反応により前記第１のクエリプローブと前記第２のクエリプローブとを連結して、前記変異の種類に応じた第１の識別用配列及び第２の識別配列と、前記変異の種類に応じて予め関連付けられたプローブの検出用配列と特異的にハイブリダイズするハイブリダイズ用配列又は相補配列と、標識を付与するための標識用配列又は相補配列と、をそれぞれ有する、１又は２以上のライゲーション産物を前記変異に関連付けて取得する工程と、

前記１又は２以上のライゲーション産物と、前記ハイブリダイズ用配列の相補配列を有する第１のプライマーと、前記標識用配列を有する第２のプライマーと、を接触させてＤＮＡポリメラーゼ増幅反応により、前記標識用配列と前記ハイブリダイズ用配列とを備える１又は２以上の増幅産物を取得する工程と、

前記プローブが保持された固相担体の前記プローブと前記１又は２以上の増幅産物とを接触させて、前記プローブと前記増幅産物とのハイブリダイズ産物を取得する工程と、

前記ハイブリダイズ産物を前記標識用配列を介して付与された標識に基づいて検出する工程と、

を備え

前記第２のプライマーの総濃度は、前記第１のプライマーの総濃度の０．５倍以上１２．５倍未満である、方法。

（２）前記ライゲーション産物取得工程は、ミスマッチ結合タンパク質の存在下に実施する、（１）に記載の方法。

（３）前記ライゲーション産物取得工程は、前記ＤＮＡリガーゼによる連結反応を複数回繰り返して実施する、（１）又は（２）に記載の方法。

（４）前記第２のプライマーの総濃度は、前記第１のプライマーの総濃度の５倍以下である、（１）～（３）のいずれかに記載の方法。

（５）前記ハイブリダイズ産物取得工程は、クロマトグラフィー形態で実施

する、（１）～（５）のいずれかに記載の方法。

（６）前記第２のプライマーは前記標識を保持するかあるいは前記標識を結合可能な標識結合物質を保持する、（１）～（５）のいずれかに記載の方法。

（７）前記標識は、視認可能な着色材料である、（１）～（６）のいずれかに記載の方法。

（８）前記プローブは、配列番号１～１００で表される塩基配列及びその相補配列からなる群から選択される、（１）～（７）のいずれかに記載の方法。

（９）前記固相担体は、ポリエーテルスルホン、ニトロセルロース、ナイロン、ポリフッ化ビニリデン及びろ紙からなる群から選択されるいずれかである、（１）～（８）のいずれかに記載の検出方法。

（１０）前記変異は、１又は数塩基の置換変異、挿入変異及び欠失変異のいずれかである、（１）～（９）のいずれかに記載の検出方法。

（１１）変異を検出するためのキットであって、

前記変異の少なくとも一部を識別する第１の識別用配列と前記変異の種類に応じて予め関連付けられたプローブの検出用配列と特異的にハイブリダイズするハイブリダイズ用配列又はその相補配列を有する第１のクエリプローブと、前記変異に隣接する領域を識別する第２の識別配列と標識用配列又はその相補配列とを有する第２のクエリプローブのセット又は

前記第１の識別用配列と前記標識用配列又はその相補配列を有する第１のクエリプローブと、前記第２の識別配列と前記ハイブリダイズ用配列又はその相補配列とを有する第２のクエリプローブのセット

のいずれかを含む、クエリプローブセットと、

前記ハイブリダイズ用配列の相補配列を有する第１のプライマーと、前記標識用配列を有する第２のプライマーと、を含むプライマーセットと、

ミスマッチ結合タンパク質と、

を備えるキット。

（１２）さらに、前記第２のプライマーの総濃度は、前記第１のプライマーの総濃度の０．０５倍以上１２．５倍未満である、（１１）に記載のキット。

（１３）前記固相担体は液体の浸透性又は透過性を有するクロマトグラフィー用担体である、（１１）又は（１２）に記載のキット。

（１４）変異に関連付けられるＤＮＡの製造方法であって、

前記変異を有する可能性のあるＤＮＡ試料と、前記変異の少なくとも一部を識別する第１の識別用配列を有する第１のクエリプローブと、前記変異に隣接する領域を識別する第２の識別配列を有する第２のクエリプローブと、を接触させて、ＤＮＡリガーゼ反応により前記第１のクエリプローブと前記第２のクエリプローブとを連結して、前記変異の種類に応じた第１の識別用配列及び第２の識別配列と、前記変異の種類に応じて予め関連付けられたプローブの検出用配列とハイブリダイズするためのハイブリダイズ用配列又はその相補配列と、標識を付与するための標識用配列又は相補配列と、をそれぞれ有する、１又は２以上のライゲーション産物を前記変異に関連付けて取得する工程と、

前記１又は２以上のライゲーション産物と、前記ハイブリダイズ用配列の相補配列を有する第１のプライマーと、前記標識用配列を有する第２のプライマーと、を接触させてＤＮＡポリメラーゼ増幅反応により、前記標識用配列とハイブリダイズ用配列とを有する１又は２以上の増幅産物を取得する工程と、

前記ライゲーション産物取得工程をミスマッチ結合タンパク質の存在下に実施する、方法。

（１５）前記第２のプライマーの総濃度は、前記第１のプライマーの総濃度の０．５倍以上１２．５倍未満である、（１４）に記載の方法。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本明細書に開示される検出方法の概要を示す図である。

[図2A]本明細書に開示される検出方法に用いるクエリプローブセットの一例

を示す図である。

[図2B]本明細書に開示される検出方法におけるライゲーション産物及び増幅産物の一例を示す図である。

[図2C]本明細書に開示される検出方法におけるライゲーション工程の概要を示す図である。

[図2D]本明細書に開示される検出方法の増幅工程の概要を示す図である。

[図3]クエリプローブセットの他の一例を示す図である。

[図4]参考例１における結果を示す図である。

[図5]参考例２で用いたアレイにおけるプローブのスポットパターンを示す図である。

[図6]参考例２及び実施例１における検出結果を示す図である。

[図7]実施例２で用いたクロマトグラフィーにおけるプローブのスポットパターンを示す図である。

[図8]実施例２における検出結果を示す図である。

[図9]実施例３におけるＳＮＰ１及びＳＮＰ２についての検出評価結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] 本明細書は、変異の検出方法に関する。本明細書に開示される検出方法は、良好なＳ／Ｎ比及び検出感度を確保して検出精度の低下を抑制し、再現性を確保して良好な検出能で変異を検出できる。本明細書に開示される検出方法は、検出対象たる変異の配列に関わらず設定されたプローブ（以下、単にユニバーサルプローブともいう。）を用いるとともに、目視可能な標識を用いた目視検出を採用する変異の検出方法に適している。また、本検出方法によれば、簡易に、変異を検出できる。さらに、本検出方法によれば、変異特異的なプローブの設計、製作及び固定化操作を省略し、特別な検出装置を要さずに、簡易にかつ迅速に変異を検出することができる。この結果、装置、アレイ等の設計や製造時間等に係るコストを低減できる。

[0013] 必ずしも本方法を拘束するものではないが、本方法の上記した効果は、本

方法において標識のための第２のプライマーの総濃度を第１のプライマーの総濃度に対して一定範囲とすることで、ミスハイブリダイズその他によるＳ／Ｎ比を低減し、良好な検出感度及び強度を維持して検出精度の低下を抑制できるものと考えられる。

[0014] また、本方法において、ライゲーションに際してミスマッチ結合タンパク質を利用することでライゲーションにおいて誤ったライゲーション産物の生成を抑制して、Ｓ／Ｎ比の抑制及び検出感度の維持等がなされる。

[0015] 本明細書において、変異とは、ＤＮＡなどのポリヌクレオチドにおける天然のあるいは人為的に付与された、生物的なあるいは非生物的な特徴に関連付けられる塩基配列上の特徴を意味している。したがって、変異には、いわゆる正常な、あるいは、天然の、あるいは優勢をなすＤＮＡ上等の塩基配列（２以上の塩基の配列のほか、１つの塩基のみの場合を含む。）に対する異常は、あるいは人為的な、あるいは劣勢をなすＤＮＡ上等の相違が含まれる。また、変異には、何らかの物品に関連付けられたＤＮＡ上等の人工的な塩基配列が含まれる。

[0016] より具体的には、変異には、例えば、体質、遺伝病、癌などの特定疾患についての発症、疾患診断、治療予後に関連付けられるＤＮＡ上等の特徴が含まれる。また、変異には、薬剤や治療の選択などのヒト及び非ヒト動物などの生物における遺伝子上の指標となるＤＮＡ上等の塩基あるいは塩基配列が含まれる。典型的には、ＤＮＡ上等のＳＮＰなどの多型や先天的又は後天的変異が挙げられる。また、病原菌やウイルスなどの微生物由来の微生物の同定あるいは微生物の型の特定に寄与する塩基配列も変異に含まれる。さらに、変異には、製品などの出所や流通経路を特定できるＤＮＡ上等の人工的な塩基配列上の特徴が含まれる。

[0017] なお、変異は、１塩基又は２塩基以上９塩基以下（好ましくは５塩基以下）の置換変異、挿入変異及び欠失変異からなる群から選択されるいずれかとすることができる。

[0018] 本明細書において、ポリヌクレオチドは、ヌクレオチドの重合体を意味し

ており、その数は特に限定しない。したがって、ポリヌクレオチドには、数十程度のヌクレオチドが連結したオリゴヌクレオチドが包含される。

[0019] 以下では、本開示の代表的かつ非限定的な具体例について、適宜図面を参照して詳細に説明する。この詳細な説明は、本発明の好ましい例を実施するための詳細を当業者に示すことを単純に意図しており、本開示の範囲を限定することを意図したものではない。また、以下に開示される追加的な特徴ならびに発明は、さらに改善された糖尿病の予防又は治療用組成物を提供するために、他の特徴や発明とは別に、又は共に用いることができる。

[0020] また、以下の詳細な説明で開示される特徴や工程の組み合わせは、最も広い意味において本開示を実施する際に必須のものではなく、特に本開示の代表的な具体例を説明するためにのみ記載されるものである。さらに、上記及び下記の代表的な具体例の様々な特徴、ならびに、独立及び従属クレームに記載されるものの様々な特徴は、本開示の追加的かつ有用な実施形態を提供するにあたって、ここに記載される具体例のとおりに、あるいは列挙された順番のとおりに組合せなければならないものではない。

[0021] 本明細書及び／又はクレームに記載された全ての特徴は、実施例及び／又はクレームに記載された特徴の構成とは別に、出願当初の開示ならびにクレームされた特定事項に対する限定として、個別に、かつ互いに独立して開示されることを意図するものである。さらに、全ての数値範囲及びグループ又は集団に関する記載は、出願当初の開示ならびにクレームされた特定事項に対する限定として、それらの中間の構成を開示する意図を持ってなされている。

[0022] 以下、本明細書に開示される実施形態について適宜図面を参照しながら説明する。図１には、本明細書に開示される検出方法の概要を例示している。

[0023] （変異の検出方法）

図１に示すように、本明細書に開示される検出方法は、ライゲーション産物を取得する工程（ライゲーション工程）と、増幅産物を取得する工程（ラベル工程又は増幅工程）と、ハイブリダイズ産物を取得する工程（ハイブリ

ダイゼーション工程）と、を備えることができる。

[0024]（ライゲーション産物の取得（ライゲーション）工程）

ライゲーション産物の取得工程は、変異を有する可能性のあるＤＮＡ試料と、変異を識別する第１の識別用配列を有する第１のクエリプローブと、変異に隣接する領域を識別する第２の識別用配列を有する第２のクエリプローブと、を接触させ、ＤＮＡリガーゼ反応により第１のクエリプローブと第２のクエリプローブとを連結する工程である。また、ライゲーション産物の取得工程は、こうした連結により、第１の識別用配列と、第２の識別用配列と、前記変異の種類に応じて予め関連付けられたハイブリダイズ用配列又はその相補配列と、標識を付与するための標識用配列又はその相補配列と、を有する１又は２以上のライゲーション産物を取得する工程である。

[0025] ライゲーション産物の取得工程によれば、変異に対応してライゲーション産物を取得できる。すなわち、変異がＳＮＰであれば、ＳＮＰの多型の種類（多型を構成する塩基の種類）に応じてライゲーション産物を得ることができる。

[0026]（ＤＮＡ試料）

ＤＮＡ試料は、変異を有する可能性のあるＤＮＡを含んでいればその由来、調製方法等は特に限定されない。一般的には、生体などの試料から抽出されたＤＮＡ試料、あるいは当該ＤＮＡ試料に対して、いわゆるＰＣＲやマルチプレックスＰＣＲなどのＤＮＡ増幅反応によって得られる試料が含まれる。また、ｍＲＮＡから逆転写を介して得られたＤＮＡ試料であってもよい。さらには、ＤＮＡを成分として含有するインク等であってもよい。

[0027]（クエリプローブセット）

図２Ａには、クエリプローブセットの一例を示し、図２Ｂには、当該クエリプローブセットを用いた場合のライゲーション産物及び増幅産物を例示する。図２Ａに示すように、クエリプローブセットは、第１のクエリプローブと第２のクエリプローブとの組み合わせである。第１のクエリプローブは、第１の識別用配列を有し、第２のクエリプローブは第２の識別用配列を有す

る。クエリプローブセットは、１又は２以上の第１のクエリプローブと１又は２以上の第２のクエリプローブとの組み合わせである。

[0028] クエリプローブセットは、１つの変異に対して１つ準備される。本検出方法において２以上の変異を検出する場合には、検出しようとする変異の数に応じて２以上のクエリプローブセットが準備される。

[0029] 第１のクエリプローブ及び第２のクエリプローブは、得ようとするライゲーション産物との関係において、５’側を構成していてもよいし、３’側を構成していてもよい。第１のクエリプローブと第２のクエリプローブの第１の識別用配列及び第２の識別用配列は、ライゲーション産物の中央側に配されるように各クエリプローブに配置される。

[0030] 例えば、図２Ａ及び図２Ｂに示すように、第１のクエリプローブがライゲーション産物の５’側を構成する場合、第１の識別用配列は、第１のクエリプローブの３’末端を構成する。また、その場合において、第２のクエリプロープはライゲーション産物の３’側を構成し、第２の識別用配列は、第２のクエリプローブの５’末端を構成する。

[0031] （第１のクエリプローブ）

（第１の識別用配列）

図２Ａ及び図２Ｂに示すように、第１のクエリプローブは、変異を識別する第１の識別用配列を有する。第１の識別用配列は、変異を構成する塩基配列（変異構成配列）に特異的にハイブリダイズするように設計された塩基配列である。すなわち、ストリンジェントな条件下において変異構成配列にハイブリダイズするように設計された塩基配列である。第１の識別用配列は、典型的には、変異構成配列に対して完全に相補的に構成されている。

[0032] 図２Ａ及び図２Ｂに示すように、第１の識別用配列は、例えば、変異がＳＮＰ（一塩基多型）である場合、多型を構成する塩基のバリエーションに応じて２種以上設定される。この結果、第１のクエリプローブも、前記塩基のバリエーションに応じて２種類以上準備される。また、変異が、特定の１つの塩基配列（塩基数が２以上連続する塩基配列）であるときには、この変異

構成配列のバリエーションに応じて第１の識別用配列が２種類以上準備され、第１のクエリプローブも２種類以上準備される。なお、図２Ａには、ＳＮＰがＡ／Ｔである場合に適用される第１のクエリプローブを示している。

[0033] （ハイブリダイズ用配列）

第１のクエリプローブは、ハイブリダイズ用配列又はその相補配列を備えることができる。図２Ａ及び図２Ｂには、第１のクエリプローブがハイブリダイズ用配列の相補配列を備える形態を例示する。第１のクエリプローブがハイブリダイズ用配列又はその相補配列を備えるとき、ハイブリダイズ用配列は、変異が含むバリエーションに応じて予め関連付けられた所定のプローブの検出用配列と特異的にハイブリダイズする塩基配列である。したがって、ハイブリダイズ用配列は、変異を構成するバリエーションの個数に応じて異なる種類の塩基配列からなる。ハイブリダイズ用配列は、典型的には、検出用配列と完全に相補的な塩基配列を有している。第１のクエリプローブが有するハイブリダイズ用配列又は相補配列は、そのままライゲーション産物に備えられることになる。なお、プローブについては後段で詳述する。

[0034] 例えば、図２Ａ及び図２Ｂに示すように、検出しようとする１つの変異がＳＮＰであり、塩基種のバリエーションがＡ／Ｔであるとき、第Ａ型を識別する第１の識別用配列を有する第１のクエリプローブは、１つのプローブに関連付けられた１つのハイブリダイズ用配列（又はその相補配列）を有する。また、Ｔ型を識別する第１の識別配列を有する他の第１のクエリプローブは、他の１つのプローブに関連付けられた他の１つのハイブリダイズ用配列（又はその相補配列）を有する。

[0035] （第２のクエリプローブ）

（第２の識別用配列）

図２Ａ及び図２Ｂに示すように、第２のクエリプローブは、検出しようとする変異に隣接する塩基配列（変異隣接配列）を識別する第２の識別用配列を有する。変異隣接配列は、変異を構成せず、変異を含まない。したがって、通例、１つの変異に対して変異隣接配列は１種であり、第２のクエリプロ

ーブも一種である。

[0036] 例えば、図２Ａ及び図２Ｂに示すように、第２の識別用配列は、変異がＳＮＰ（一塩基多型）である場合、多型を構成する変異に隣接する共通配列に応じて１種類設定される。

[0037] 第２の識別用配列は、変異隣接配列に特異的にハイブリダイズするように設計された塩基配列である。すなわち、ストリンジェントな条件下において変異等の構成配列にハイブリダイズするように設計された塩基配列である。第２の識別用配列は、典型的には、変異隣接配列に対して完全に相補的に構成されている。

[0038] （標識用配列）

標識用配列とは、後述する増幅工程で用いる第２のプライマーが備える標識要素付与のための配列である。また、ハイブリダイズ用配列とは、後述するハイブリダイゼーション工程において用いるプローブと特異的にハイブリダイズする配列である。第２のクエリプローブは、標識用配列又はその相補配列を備えることができる。第２のクエリプローブが標識用配列又はその相補配列を備えるとき、標識用配列は、検出可能なシグナルを発生する標識要素を付与可能であればよい。図２Ａ及び図２Ｂには、第２のクエリプローブが標識用配列の相補配列を備える形態を例示する。変異を構成するバリエーションに応じて付与可能に、当該バリエーションに応じて異なる塩基配列でなくてもよい。したがって、検出対象とする１又は２以上の変異に共通であってもよい。標識用配列又はその相補配列は、そのままライゲーション産物に備えられることになる。

[0039] 例えば、図２Ａ及び図２Ｂに示すように、検出しようとする１つの変異がＳＮＰであり、塩基種のバリエーションがＡ／Ｔであるとき、第２のクエリプローブは、１つの第２の識別用配列と１つの（共通の）標識用配列の相補配列とを有する。

[0040] 第１のクエリプローブ及び第２のクエリプローブに対する、ハイブリダイズ用配列又はその相補配列）及び標識用配列又はその相補配列）の配分は、

ハイブリダイズ産物の検出形態等に応じて適宜決定できるものである。図２Ａ～図２Ｄで説明されるプローブセットは、第１のクエリプローブが第１の識別用配列とハイブリダイズ用配列（又はその相補配列）とを備えており、第２のクエリプローブは、第２の識別用配列と標識用配列（又はその相補配列）とを備えている。この実施形態は、ハイブリダイゼーション工程におけるハイブリダイズ産物をその位置情報に基づいて、好ましくは目視により検出するのに好ましく用いられる。すなわち、プローブセットにおいて、第１のクエリプローブは、第１の識別用配列とハイブリダイズ用配列を有し、第２のクエリプローブは、第２の識別配列とともに、標識用配列を備えていてもよい。

[0041] さらに、ハイブリダイゼーション工程におけるハイブリダイズ産物をその標識要素に基づく情報に基づいて検出するときには、図３に示すプローブセットを好ましく用いることができる。すなわち、プローブセットの第１のクエリプローブは第１の識別用配列と標識用配列又はその相補配列を備え、第２のクエリプローブは第２の識別用配列とハイブリダイズ用配列又はその相補配列を備えることができる。

[0042] こうしたクエリプローブは、通常のＤＮＡ合成法等に従い当業者であれば取得できる。なお、既に説明したように、第１のクエリプローブにおいて、ハイブリダイズ用配列又はその相違配列に替えて、標識用配列又はその相補配列を備えていてもよいし、第２のクエリプローブの標識用配列又はその相補配列に替えて標識用配列又はその相補配列を備えていてもよい。

[0043] ライゲーション工程では、ＤＮＡ試料に対して第１のクエリプローブと第２のクエリプローブとをハイブリダイズ可能な条件下に接触させ、さらに、ＤＮＡリガーゼによりこれらを連結する。第１のクエリプローブと第２のクエリプローブとがＤＮＡ試料に対してハイブリダイズ可能な条件下では、第１のクエリプローブ及び第２のクエリプローブは、それぞれ第１の識別用配列と第２の識別用配列とによって、特異的に変異構成配列及び変異等構成配列とハイブリダイズする。すなわち、変異を検出する。こうした第１のクエ

リプローブと第２のクエリプローブとをＤＮＡリガーゼが連結する。

[0044] なお、ＤＮＡリガーゼとしては、公知のＤＮＡリガーゼを適宜利用できる。また、ハイブリダイズ条件及びリガーゼ反応条件は当業者であれば適宜設定することができる。

[0045] （ミスマッチ結合タンパク質）

ＤＮＡリガーゼによるライゲーションは、より良好な変異検出能を意図して、ミスマッチ結合タンパク質の存在下に実施することができる。図２Ｃに、図２Ａ及び図２Ｂに開示されるプローブセット等を用いたときのライゲーション工程における、ミスマッチ結合タンパク質による作用の概要を示す。なお、図２Ｃは、標的核酸におけるＳＮＰの塩基種がＴの場合を例示しており、塩基種がＡのときも同様の態様が適用される。

[0046] 図２Ｃに示すように、第１のクエリプローブ及び第２のクエリプローブは、それぞれ特異的に変異構成配列及び変異隣接配列にハイブリダイズするが、塩基配列や条件によっては、そのハイブリダイゼーションの特異性が低下する場合もありうる。その場合には、ミスハイブリダイゼーションが生じうる。ミスマッチ結合タンパク質は、このようなミスハイブリダイゼーションを検出して当該ミスハイブリダイゼーション部位に結合する。この結果、ミスハイブリダイゼーション時におけるＤＮＡリガーゼによるライゲーション反応が抑制され、結果として、ミスハイブリダイゼーションに起因するライゲーション産物の生成を抑制できる。

[0047] 本明細書においてミスマッチ結合タンパク質とは、二本鎖核酸におけるミスマッチを認識、結合するタンパク質である。こうしたミスマッチを認識しうる限り特に制限されない。ミスマッチ結合タンパク質は、また、ミスマッチ結合タンパク質は、ミスマッチを認識しうる限りこれらの部分ペプチドであってもよい。さらに、これらのグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ等、他のタンパク質としての結合タンパク質であってもよい。ミスマッチ結合タンパク質としては、例えば、ＭｕｔＳ、ＭＳＨ２、ＭＳＨ６等が挙げられる。

[0048] また、ＤＮＡリガーゼによるライゲーションは、より良好な変異検出能を意図して、複数回繰り返して実施することができる。すなわち、ＤＮＡ試料と第１のクエリプローブ及び第２のクエリプローブとのハイブリダイズを複数回繰り返して実施する温度条件を設定することができる。ライゲーション反応を複数回繰り返し実施することで、適正なハイブリダイゼーションによる適正なライゲーション産物を得られやすくなる。特に、ミスマッチ結合タンパク質の存在下に、ライゲーション反応を繰り返し実施することが効果的である。

[0049] ライゲーション反応を繰り返して実施する温度条件は、当業者であれば、適宜設定することができる。繰り返し回数は、特に限定しないが、１０回以上が好ましく、より好ましくは２０回以上であり、さらに好ましくは３０回以上である。

[0050] （ラベル工程（増幅工程））

幅産工程は、ライゲーション産物と、ハイブリダイズ用配列の相補配列を有する第１のプライマーと、標識用配列を有する第２のプライマーと、を接触させて、ＤＮＡポリメラーゼ増幅反応を実施する工程である。また、この工程は、これにより、標識用配列とハイブリダイズ用配列とを備える１又は２以上の増幅産物を取得することができる。

[0051] すなわち、本工程は、ライゲーション産物又はその相補鎖を鋳型鎖としてハイブリダイズ用鎖をその相補鎖を取得するよりも優位に取得する工程である。このために、ハイブリダイズ用鎖をライゲーション産物又はその相補鎖を鋳型鎖としてより優位に取得できるようにプライマーを設計している。これにより、本工程によれば、効率的に最終的な検出に供するハイブリダイズ用一本鎖の増幅産物を取得できる。この増幅産物は、上記のとおり、検出用配列と特異的にハイブリダイズするハイブリダイズ用配列と、標識要素を備え得る標識用配列とを備えている。このため、固相担体上のプローブとハイブリダイズでき、同時に、標識用配列を介して標識要素が付加されることにもなる。

[0052]（プライマーセット）

第１のプライマーと第２のプライマーとは、第１のクエリプローブ及び第２のクエリプローブが意図している可能性あるライゲーション産物におけるハイブリダイズ用配列又はその相補配列と標識用配列又はその相補配列とに応じて設計される。

[0053] 図２Ｂ及び図２Ｄには、図２Ａに例示するクエリプローブセットを用いた場合のプライマーセットを例示する。このプライマーセットでは、第２のプライマーに、標識要素を予め備えている。なお、図２Ｄは、標的核酸におけるＳＮＰの塩基種がＴの場合を例示しており、塩基種がＡのときも同様の態様が適用される。

[0054] 本検出方法では、１つの変異（変異の種類は１又は２以上でありうる。）に対して１つのクエリプローブセットが準備され、１又は複数のライゲーション産物が生成され、これらのライゲーション産物に対して１つのプライマーセットが準備される。また、２以上の変異を同時に検出する場合には、２以上のクエリプローブセットが準備され、複数のライゲーション産物のセットが生成され、これらのセットに対して複数のプライマーセットが準備される。

[0055]（第１のプライマー）

第１のプライマーは、ライゲーション産物の形態に関わらず、ハイブリダイズ用配列の相補配列を有する。第１のプライマーは、結果として、第２のプライマーに由来するハイブリダイズ用鎖、すなわち、標識用配列とハイブリダイズ用配列を備える増幅産物が得られるように、ライゲーション産物又はその相補鎖を鋳型鎖として増幅するように設計される。第１のプライマーは、このため、ハイブリダイズ用配列の相補配列を有する。

[0056]（第２のプライマー）

第２のプライマーは、標識用配列を有している。第２のプライマーは、標識要素を予め備えるかあるいは標識要素を結合可能となっている。

[0057]（標識要素）

第２のプライマーは、予め標識要素を備えることができる。標識要素は、固相上でプローブに結合した増幅産物を検出するためのものである。標識要素としては従来公知のものを適宜選択して用いることができる。標識は、特に限定しないで、公知の蛍光物質などの発光物質又は発色物質を用いることができる。好ましくは、標識要素は、目視（肉眼で）で検出可能な発光又は発色を提示する発光物質又は発色物質を用いる。簡易及び迅速な検出に有用であるからである。

[0058] また、標識要素は、酵素（例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等）反応、燐光、化学発光、着色などを利用した標識要素物のほか、抗原抗体反応により第２成分と組み合わせて各種発色シグナルを発する物質が含まれる。

[0059] 標識要素としては、また、各種の顔料や染料などの各種の着色剤が挙げられる。また、これに準ずる、金、銀などの貴金属ほか、銅などの各種金属又は合金、あるいは当該金属を含む有機化合物（錯体化合物であってもよい）が挙げられる。また、着色剤に準ずる、マイカ等の無機化合物が挙げられる。

[0060] この種の標識物質としては、典型的には、各種染料、各種顔料、ルミノール、イソルミノール、アクリジニウム化合物、オレフィン、エノールエーテル、エナミン、アリールビニルエーテル、ジオキセン、アリールイミダゾール、ルシゲニン、ルシフェリン及びエクリオンを包含する化学発光物質が挙げられる。また、こうした標識物質でラベルされているラテックス粒子などの粒子も挙げられる。さらに、金コロイド若しくはゾル又は銀コロイド若しくはゾルを包含するコロイド若しくはゾル等が挙げられる。さらにまた、金属粒子、無機粒子等が挙げられる。

[0061] 標識要素は上記のように、その一部に粒子を備えていてもよい。標識物質の一部を構成するラテックス粒子などの粒子の平均粒子径は、特に限定しない。

[0062] 標識用配列は、最終的に標識要素による識別が可能にこれらを結合可能な

分子ないし物質（以下、標識要素結合物質ともいう。）を備えていてもよい。こうした物質等としては、タンパク質－タンパク質相互作用、低分子化合物－タンパク質相互作用等を利用できる。例えば、抗原抗体反応における抗体や、アビジン（ストレプトアビジン）－ビオチンシステムにおけるビオチン、抗ジゴキシゲニン（ＤＩＧ）－ジゴキシゲニン（ＤＩＧ）システムにおけるジゴキシゲニン、又は抗ＦＩＴＣ－ＦＩＴＣシステムにおけるＦＩＴＣ等に代表されるハプテン類などが挙げられる。この場合、最終的な検出のために用いられる標識要素は、標識要素結合物質と相互作用する他方の分子又は物質（例えば、抗原、すなわち、ストレプトアビジン、抗ＦＩＴＣなど）を、標識要素結合物質との結合のための部位として備えるように修飾される。増幅産物が標識要素結合物質を備える場合には、ハイブリダイゼーション工程において、あるいはこの工程に先立って、あるいはこの工程後に、増幅産物の標識要素結合物質と、標識要素結合物質と結合する部位を備える標識要素との複合体を形成させて、標識要素により増幅産物を検出することができる。

[0063] こうした標識要素や標識結合物質は、商業的に入手できるほか、標識要素及び標識要素結合物質の製造及び標識要素物質等を粒子にラベルする方法も公知であり、当業者であれば適宜公知技術を利用して取得することができる。さらに、こうした標識要素又は標識要素でラベル化された粒子や標識要素物質結合物質と、ＤＮＡ等のオリゴヌクレオチドとの結合もアミノ基等の官能基を介して適宜可能であり、それ自体は当該分野において周知である。

[0064] なお、第２のプライマーは、標識用配列にあるいは他の配列に対して、標識要素を備えるプローブが後段のハイブリダイゼーション工程あるいはその後段の工程でハイブリダイズされることで標識されるものであってもよい。

[0065] 図２Ｂに示すように、第１のプライマーと第２のプライマーとは、例えば、変異がＳＮＰであり、塩基のバリエーションがＡ／Ｔの場合、可能性あるライゲーション産物は各塩基種に対応する２種類である。図２Ｂに示す場合、第１のプライマーは、塩基種がＡであるライゲーション産物を検出するた

めの、塩基Ａの型に関連付けられているプローブに対応するハイブリダイズ用配列を有する第１のプライマーと、塩基種がＴのとき予め関連付けられているプローブに対応するハイブリダイズ用配列を有する第１のプライマーと、１つの標識用配列に対応する１つの第２のプライマーとが準備される。

[0066] 第１のプライマー及び第２のプライマーの各濃度は、特に限定しない。良好な検出能を意図する場合には、増幅工程で用いられる第１のプライマー総濃度と第２のプライマーの総濃度を調整することが有用である。例えば、標識工程で用いられる第２のプライマーの総濃度が同じ標識工程で用いられる第１のプライマーの総濃度（第２のプライマー総濃度（総量）／第１のプライマー総濃度（総量））の０．５倍以上１２．５倍未満であることが好ましい。この比率が０．５倍未満であると、効果的に意図した増幅産物が得られなくなってしまう。この結果、発色強度ないし検出感度が低く、しかもＳ／Ｎ比が５倍を下回ってしまい、検出精度も低下するからである。また、１２．５倍以上であっても、効果的に意図した増幅産物が得られなくなってしまう。この結果、発色強度ないし検出感度が低く、しかもＳ／Ｎ比が５倍を下回ってしまい、検出精度も低下するからである。より好ましくは、１０倍以下であり、さらに好ましくは５倍以下であり、一層好ましくは２倍以下であり、さらに好ましくは１倍以下である。

[0067] 第１のプライマーの総濃度は、標識工程に用いられる各種の第１のプライマーの総濃度である。したがって、少なくとも検出しようとする変異に対する第１のプライマーの全てを含んでいる。第２のプライマーの総濃度は、標識工程に用いられる各種の第２のプライマーの総濃度である。なお、第１のプライマー総濃度に替えて、検出しようとする変異の種類に応じたそれぞれの第１のプライマー濃度と第２のプライマーの総濃度とを関連付けることもできる。この場合、第２のプライマー総濃度／第１のプライマーの各濃度は、好ましくは、１６倍以上４００倍未満である。この比率が１６倍未満であると、効果的に意図した増幅産物が得られなくなってしまう。この結果、発色強度ないし検出感度が低く、しかもＳ／Ｎ比が５倍を下回ってしまい、検

出精度も低下するからである。また、４００倍以上であっても、効果的に意図した増幅産物が得られなくなってしまう。この結果、発色強度ないし検出感度が低く、しかもＳ／Ｎ比が５倍を下回ってしまい、検出精度も低下するからである。好ましくは１６０倍以下であり、さらに好ましくは６４倍以下であり、さらに好ましくは３２倍以下である。

[0068] 図２Ｂ及び図２Ｄに示すように、こうした増幅工程によれば、１つのプライマーセットにより１つの増幅産物のセットが得られる。増幅産物のセットは、変異の有無や変異のバリエーションに応じた種類の増幅産物を含んでいる。

[0069] （ハイブリダイズ産物の取得（ハイブリダイゼーション）工程）

ハイブリダイゼーション工程は、検出用配列を有するプローブが保持された固相担体の前記プローブと前記増幅産物とを接触させて、前記プローブと前記増幅産物とのハイブリダイズ産物を取得する工程である。本工程では、固相担体上において、固相担体に固定化されたプローブと増幅産物とのハイブリダイゼーションを実施することで、ハイブリダイズ産物を取得する。

[0070] 本ハイブリダイゼーション工程によれば、増幅工程において、優位にプローブとハイブリダイズしうる特定のハイブリダイズ用配列を有する増幅産物が優位に取得されている。このため、多くのハイブリダイズ産物をミスハイブリダイズが抑制された状態で取得できる。

[0071] ハイブリダイゼーション工程は、固相体全体にハイブリダイゼーション溶液を供給して実施するハイブリダイゼーションの形態（浸漬型ハイブリダイゼーション）及び固相体の一部に移動相でもあるハイブリダイゼーション溶液を供給して、固相体に対して所定の方向性でハイブリダイゼーション溶液を展開するアフィニティークロマトグラフィーの形態（展開型ハイブリダイゼーション）のいずれであってもよい。

[0072] 以下、プローブ及びプローブが固定化された固相担体について説明する。

[0073] （プローブ）

プローブは、それぞれプロービングのための固有の塩基配列である検出用

配列を有している。このような検出用配列は、標的核酸に特徴的な配列、すなわち標的配列と、無関係に設定することができる。標的配列と無関係に設定することで、検出用プローブの検出用配列を、複数の検出用プローブ間での非特異的結合を抑制又は回避できるように、かつ、ハイブリダイゼーションに好適な温度及び時間等のハイブリダイゼーション条件を考慮して設定することができる。また、標的核酸の種類にかかわらず、いつも同じ検出用プローブを用いることができるようになる。こうしたプローブは、全ての変異に対応できるユニバーサルプローブとして利用できる。

[0074] 検出用配列の長さは、特に限定しないが、１０塩基以上５０塩基以下であることが好ましい。この範囲であると、各検出用配列の特異性を確保しつつハイブリダイゼーション効率も確保できるからである。例えば、こうした塩基長の検出用配列は、後述する配列番号１～１００及びその相補配列から選択される各２３塩基長の塩基配列を２つ組み合わせた４６塩基長の配列や、当該組み合わせた塩基配列に対して適宜塩基を付加、欠失などすることにより得ることができる。より好ましくは、１０塩基以上２５塩基以下である。例えば、こうした塩基長の検出用配列は、配列番号１～１００の各２３塩基長の塩基配列及びその相補配列又はこれらの塩基配列に対して適宜塩基を付加、欠失などすることにより得ることができる。なお、第１のプライマーにおけるタグ配列は、検出用配列と対合する塩基配列であるため、タグ配列の塩基長は、検出用配列と同様、１０塩基以上５０塩基以下であることが好ましく、より好ましくは、１０塩基以上２５塩基以下である。

[0075] こうしたプローブの検出用配列としては、例えば、配列番号１～配列番号１００に記載の塩基配列又はこの塩基配列に相補的な塩基配列を用いることができる。

[0076] このようなプローブにおける検出用配列は、正規直交化配列ともいい、たとえば乱数から得られた所定塩基長のＤＮＡ配列に対して連続一致長、Nearest-Neighbor法による融解温度予測、ハミング距離、二次構造予測の計算を行うことにより設計される。正規直交化配列は、核酸の塩基配列であって、そ

の融解温度が均一であるもの、即ち融解温度が一定範囲内に揃うように設計された配列であって、核酸自身が分子内（intramolecular）で構造化して、相補的な配列とのハイブリッド形成を阻害することのない配列であり、尚且つこれに相補的な塩基配列以外とは安定したハイブリッドを形成しない塩基配列を意味する。１つの正規直交化配列群に含まれる配列は、所望の組み合わせ以外の配列間および自己配列内において反応が生じ難いか、または反応が生じない。また、正規直交化配列は、ＰＣＲにおいて増幅させると、たとえば上述のクロスハイブリダイズのような問題に影響されずに、当該正規直交化配列を有する核酸の初期量に応じた量の核酸が定量的に増幅される性質を有している。上記のような正規直交化配列は、H.Yoshida and A.Suyama,“Solution to 3-SAT by breadth first search”,DIMACS Vl.54, 9-20(2000)に詳細が記載されている。これらの文献に記載の方法を使用して正規直交化配列を設計することができる。

[0077]（固相担体）

固相担体としては、固相担体を用いることができる。例えば、担体はプラスチックであってもよいし、ガラスであってもよく、材質は特に限定されない。また、セルロース、ニトロセルロース、ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリフッ化ビニリデン及びろ紙等の多孔質体であってもよい。この種の多孔質担体は、特に、展開型ハイブリダイゼーションにより、固相担体に固定化したプローブと増幅断片とをハイブリダイゼーションさせるのに好適である。

[0078] なお、担体の形状は平板状であってもよいが、ビーズ状であってもよく、形状は特に限定されない。固相体は、好ましくは、担体が固相平板状であり、複数のプローブが一定の配列で固定されたアレイ（特にマイクロアレイ）である。アレイは、多数個の検出用プロー４を固定でき、同時に網羅的に各種の標的核酸を検出するのに都合がよい。また、固相体は、担体上に複数個の区画されたアレイ領域を備えていてもよい。これらの複数のアレイ領域は、それぞれ同一の組み合わせからなるプローブのセットが固定化されていて

もよいし、それぞれ別の組み合わせからなるプローブのセットが固定化されていてもよい。複数のアレイ領域に異なる組み合わせのプローブのセットが固定化されていれば、個々のアレイ領域を、異なる遺伝子における標的核酸の検出のために割り当てることができる。

[0079] 担体の形状は、ハイブリダイゼーションの形態を考慮して設定することもできる。例えば、検査や研究用に汎用されているエッペンドルフチューブ（商標）のようなマイクロチューブ内でハイブリダイゼーションを実施する場合には、浸漬型ハイブリダイゼーションの場合には当該チューブ内に収容したハイブリダイゼーション溶液に担体のアレイ領域が浸漬されるサイズ及び形状であることが好ましい。

[0080] また、展開型ハイブリダイゼーションで実施する形態では、少なくとも、検査や研究用に汎用されているエッペンドルフチューブ（商標）のようなマイクロチューブに供給されるハイブリダイゼーション溶液に対して担体の端部が浸漬可能なサイズ（幅方向）及び形状を備えていることが好ましい。好ましくは、この種のチューブの底部近傍から上端までに収容可能な部位を備える長尺体である。

[0081] プローブの固定化形態は特に限定されない。プローブは、その３’末端が担体に結合されていてもよいし、５’末端が結合されていてもよい。共有結合性であってもよいし非共有結合性であってもよい。プローブは、従来公知の各種の方法で担体の表面に固定化することができる。また、プローブは、担体の表面に対しては適当なリンカー配列を備えていてもよい。リンカー配列は、好ましくはプローブ間において同一塩基長で同一配列とする。

[0082] プローブは、後述するハイブリダイゼーションの形態に応じて所定のパターンで固相担体に供給される。浸漬型ハイブリダイゼーションの場合、典型的には個々の検出用プローブに対応するドットが配列されたパターンとなる。また、展開型ハイブリダイゼーションの場合、典型的には個々の検出用プローブに対応するストリーム（帯状体）が展開方向に添う１又は２以上の展開位置に配列されたパターンとなる。

[0083] ハイブリダイゼーション工程の条件は、プローブの塩基配列やハイブリダイゼーション形態に応じて適宜設定できる。

[0084] 増幅工程において第２のプライマーによって実質的な標識が付与されていないときには、ハイブリダイゼーション工程内において、当該工程に先立って、あるいは当該工程後の検出工程で第２のプライマーによって付与された増幅産物中の標識用配列と特異的にハイブリダイズする配列あるいはそれに結合された標識結合物質を介して標識や標識結合物質を適宜供給するようにする。

[0085] （検出工程）

検出工程は、ハイブリダイズ産物を第２のプライマーを介して付与される標識に基づいて検出し、これにより変異の有無や種類を検出する工程である。標識付与の形態は、種々の形態が公知であり、本検出方法でも、それらを適宜使用できる。

[0086] 本検出工程では、目視で視認可能な標識を用いることが好ましい。こうした標識に基づいて変異を検出することで、検出のための特別な装置がなくてもいつでもどこでも変異を検出できる。なお、標識は、既に述べたように、増幅工程、増幅工程後ハイブリダイゼーション工程前、ハイブリダイゼーション工程、ハイブリダイゼーション工程後検出工程前、検出工程のいずれかの時期において、第２のプライマーを介して付与される。標識は、第２のプライマー又は第２のプライマーに由来して増幅産物が保持する標識用配列に特異的にハイブリダイズする配列に基づいて付与される。

[0087] 例えば、浸漬型ハイブリダイゼーションにおいては、ビオチンで標識された第２のプライマーを用いて得られたビオチン標識増幅産物を固相担体上でハイブリダイゼーションに供し、洗浄後にハイブリダイズ産物とビオチンＨＲＰとストレプトアビジンとを接触させる。これにより、複合体を形成させ、さらに、パーオキシダーゼを介した発色反応を行うことで、ハイブリダイズ産物を発色物質で検出できるようになる。

[0088] また、展開型ハイブリダイゼーションにおいては、ビオチンで標識された

第２のプライマーを用いて得られたビオチン標識増幅産物をストレプトアビジンで被覆した着色ラテックスビーズを含む展開液で展開することで、ハイブリダイズ産物を着色ラテックスビーズで検出できるようになる。

[0089]（キット）

本明細書によれば、上記したクエリプローブセット及びプライマーセットを含む、変異検出のためのキットが提供される。本キットは、ミスマッチ結合タンパク質を備えていてもよい。また、さらに、本キットは、標識のために準備される第２のプライマーの総濃度（総量）が標識の際に適用される第１のプライマーの総濃度（総量）の０．０５倍以上となるように第１のプライマー及び第２のプライマーを備えていてもよい。すなわち、第１のプライマー及び第２のプライマーが、上記濃度比になるようにあるいは上記濃度比で含まれていることが好ましい。さらに、本キットは、関連付けられているプローブが固定化された固相担体を備えていてもよい。この固相担体は、浸透性又は透過性を有するクロマトグラフィー用担体であってもよい。なお、上記比率は、既に説明した本変異の検出方法と同様の態様で好適な範囲を採ることができる。また、第２のプライマーの総濃度／第１のプライマーの各濃度についても、既述のとおりの範囲を採ることができる。

[0090]（変異に関連付けられるＤＮＡの製造方法）

本明細書の開示によれば、変異に関連付けられるＤＮＡの製造方法も提供される。すなわち、本製造方法は、前記変異を有する可能性のあるＤＮＡ試料と、前記変異の少なくとも一部を識別する第１の識別用配列を有する第１のクエリプローブと、前記変異に隣接する領域を識別する第２の識別配列を有する第２のクエリプローブと、を接触させて、ＤＮＡリガーゼ反応により前記第１のクエリプローブと前記第２のクエリプローブとを連結して、前記変異の種類に応じた第１の識別用配列及び第２の識別配列と、前記変異の種類に応じて予め関連付けられたプローブの検出用配列とハイブリダイズするためのハイブリダイズ用配列又はその相補配列と、標識を付与するための標識用配列又は相補配列と、をそれぞれ有する、１又は２以上のライゲーショ

ン産物を前記変異に関連付けて取得する工程と、前記１又は２以上のライゲーション産物と、前記ハイブリダイズ用配列の相補配列を有する第１のプライマーと、前記標識用配列を有する第２のプライマーと、を接触させてＤＮＡポリメラーゼ増幅反応により、前記標識用配列とハイブリダイズ用配列とを有する１又は２以上の増幅産物を取得する工程と、前記ライゲーション産物取得工程をミスマッチ結合タンパク質の存在下に実施するものである。

[0091] 本製造方法によれば、ＤＮＡ試料から、変異に関連付けられる増幅産物を効率的に取得できる。この方法においても、標識工程で用いる第１のプライマーの総濃度及び第２のプライマーの総濃度は、既に述べた比率を有していることが効率的な増幅に好ましい。また、第２のプライマーの総濃度／第１のプライマーの各濃度についても、既述のとおりの範囲を採ることができる。

実施例

[0092] 以下、本開示を実施例のほか対比のために参考例を挙げて具体的に説明するが、以下の実施例は本開示を説明するものであって、本開示の範囲を限定するものではない。

参考例１

[0093] 本参考例では、既存の方法（先行技術文献３ベース）にてＳＮＰ解析を行った。

[0094] （１）ＤＮＡマイクロアレイの作製

東洋鋼鈑社製ｇｅｎｅｓｌｉｄｅガラス基板（プラスチック基板でもよい）に、５’末端をアミノ基で修飾した合成オリゴＤＮＡ（株式会社日本遺伝子研究所製）を溶かした水溶液をキャプチャープローブとし、日本ガイシ株式会社にてＧＥＮＥＳＨＯＴ（登録商標）スポッターを用いてスポットした。スポットの後、８０℃、１時間のベークを行った。さらに、以下に記載した手順で、合成オリゴＤＮＡの固定化を行った。

キャプチャープローブに用いた配列は以下の通りであった。

[0095]

[表1]

Name	Seq
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC
D1-002	TGGAACTGGGAACGCTTTAGATG
D1-003	TTCGCTTCGTTGTAATTTCGGAC
D1-004	AGGCATCCTAAGAAATCGCTACT
D1-005	TAGCCCAGTGATTTATGACATGC
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT
D1-007	TAGCCAACTCTAAATAACGGACG
D1-008	TTCGGTTGTCGATATGAGGATCT
D1-009	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG
D1-013	CATTCGACATAAGCTGTTGATGC
D1-014	TGCTCACTTACATTACGTCCATG
D1-015	TACACCTATCAACTCGTAGAGCA
D1-016	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC
D1-017	TGCACTCTGATATATACAGGCCA
D1-018	GCAGCCCTTATAGATAACGGGAC
D1-019	GAAGCCATGATACTGTTCAGGGT
D1-020	TATTCTACCAACGACATCACTGC
D1-021	CCATCAGTTATTCGGAGGGACTC
D1-022	CCATATCCGATTATTAGCGACGG
D1-023	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA
D1-024	CCGTCGTGTTATTAAAGACCCCT
D1-025	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT
D1-026	CATTTGTCAGGTACAGTCCACTT
D1-027	GCCCACACTCTTACTTATCGACT
D1-028	CGCTGTTACTGTAAGCGTACTAG
D1-029	CGCGATTCCTATTGATTGATCCC
D1-030	CCGTCTGGGTTAAAGATTGCTAG
D1-031	AGTCAGTCCAAATCTCAGGATGG
D1-032	CGCCTAAATGAAACTCACTCTGC
D1-100	TGCAGTGTAAGCAACTATTGTCT

[0096] （２）サンプル遺伝子の増幅・蛍光標識

サンプル遺伝子の増幅および、蛍光標識等前処理については、先行技術文献３記載の手法を参考にして行った。サンプルには、日本人由来B細胞株・ゲノムDNA（財団法人ヒューマンサイエンス振興財団：Health Science Research Resources Bank）50種を使用した。

[0097] 増幅に使用したプライマー配列（表２）、Ｅｎｃｏｄｉｎｇ工程にて使用したプローブ配列（表３）、Ｌａｂｅｌｉｎｇ工程にて使用したプライマー配列（表４）はそれぞれ以下の通りとした。表２において反応時における各プライマー量は２５０ｆｍｏｌであった。表３において、反応時における各プローブ量は５ｆｍｏｌ／Ｃｏｍｍｏｎであり、プローブは５‘末端リン酸化されたものを使用した。また、表４においては、ＥＤ－１はＣｙ３、ＥＤ－２はＣｙ５で５‘末端を標識したものであった。第２のプライマーであるＥＤ－１，２量は各６ｐｍｏｌ，第１のプライマーであるＤ１＿１～３２は各３０ｆｍｏｌであり、第２のプライマー総濃度／第１のプライマー総濃度（Ｐ／Ｃ）＝１２．５（Ｐ＝１２ｐｍｏｌ、Ｃ＝０．９６ｐｍｏｌであった。

[0098]

[表2]

Primer	SEQ (5'→3')
SNP001_F	TCAGCACAGGCCAGTGAAGTGATGAAGTAGTTGGTGA
SNP001_R	GCGAGGGCAGTTCCCCTAAAGTCCTGTGCACATAA
SNP002_F	TAATGGTTGAAGGGTACAATACATGAGTGCCTGAATGCATA
SNP002_R	GTAGAGAAGGGCTTTAGACTGAATAACCTTGGGGATA
SNP003_F	TTGGCGTATAACGAAGCCCAGCAAATGACCGCATA
SNP003_R	GGGTCAACTGCTATGATGTGTTTGGAGCCCAGTCA

[0099] [表3]

Probe	SEQ (5'→3')
SNP001_Query1	CCGTGTCCACTCTAGAAAAACCTTCTTGCTGGCACCCAATA
SNP001_Query2	ACCACCGCTTGAATACAAAACATTGCTGGCACCCAATG
SNP002_Query1	CCGTGTCCACTCTAGAAAAACCTCACGTGGTCATCTGTGT
SNP002_Query2	ACCACCGCTTGAATACAAAACATCACGTGGTCATCTGTGC
SNP003_Query1	CCGTGTCCACTCTAGAAAAACCTGCTGCAGGCATACACTA
SNP003_Query2	ACCACCGCTTGAATACAAAACATGCTGCAGGCATACACTG
SNP001_Common	GAAGCCATGCGCCGGACCACGGCAGATTCATTGGTCAGAGAACA
SNP002_Common	GACAGATTCCTACAGCCACCATCTACAGCATCTAAAGCGTTCCCAGTTCCA
SNP003_Common	AAGTGAAAACTGTGAGTGTGGGACCTGGTCCGAAATTACAACGAAGCGAA

[0100]

[表4]

Primer	SEQ (5'→3')
ED-1	CCGTGTCCACTCTAGAAAAACCT
ED-2	ACCACCGCTTGAATACAAAACAT
D1_1	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC
D1_2	TGGAACTGGGAACGCTTTAGATG
D1_3	TTCGCTTCGTTGTAATTTCGGAC
D1_4	AGGCATCCTAAGAAATCGCTACT
D1_5	TAGCCCAGTGATTTATGACATGC
D1_6	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT
D1_7	TAGCCAACTCTAAATAACGGACG
D1_8	TTCGGTTGTCGATATGAGGATCT
D1_9	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC
D1_10	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA
D1_11	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG
D1_12	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG
D1_13	CATTCGACATAAGCTGTTGATGC
D1_14	TGCTCACTTACATTACGTCCATG
D1_15	TACACCTATCAACTCGTAGAGCA
D1_16	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC
D1_17	TGCACTCTGATATATACAGGCCA
D1_18	GCAGCCCTTATAGATAACGGGAC
D1_19	GAAGCCATGATACTGTTCAGGGT
D1_20	TATTCTACCAACGACATCACTGC
D1_21	CCATCAGTTATTCGGAGGGACTC
D1_22	CCATATCCGATTATTAGCGACGG
D1_23	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA
D1_24	CCGTCGTGTTATTAAAGACCCCT
D1_25	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT
D1_26	CATTTGTCAGGTACAGTCCACTT
D1_27	GCCCACACTCTTACTTATCGACT
D1_28	CGCTGTTACTGTAAGCGTACTAG
D1_29	CGCGATTCCTATTGATTGATCCC
D1_30	CCGTCTGGGTTAAAGATTGCTAG
D1_31	AGTCAGTCCAAATCTCAGGATGG
D1_32	CGCCTAAATGAAACTCACTCTGC

[0101] (ライゲーション工程)

ライゲーション反応手順は以下の通りである。反応にはNew England Biolabs社のTaq DNA Ligase(Catalog # M0208S)を使用し、サーマルサイクラーにはGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems社) を使用した。

(試薬組成)

Queryプローブ (6種混合-表3) /Commonプローブ(3種混合-表3) Mix (50nM, each)

	0.100 μl
Taq DNA Ligase buffer (10×)	1.500 μl
dH_2O	10.275 μl

Taq DNA ligase (40 Units/μl)	0.125 μl
(Subtotal)	(12.00 μl)
PCR products(＊)	3.00 μl
Total	15.00 μl

[0102] 上記試薬を調製後、９５℃で５分の後、５０℃で１分、５８℃で６０分、その後１０℃の条件でライゲーションを実施した。

[0103] (標識工程)

標識工程は、以下のとおり行った。標識には、TaKaRa Bio社のTaKaRa Ex Taq(R) (Catalog# RR001B) を使用し、サーマルサイクラーにはGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems社) を使用した。

[0104] (試薬組成)

D1_iプライマー (32種混合-表４) Mix (0.5 μM, each)	0.06 μl
Cy3標識-ED-1(25 μM)	0.24 μl
Cy5標識-ED-1(25 μM)	0.24 μl
Ex Taq buffer (10×)	1.20 μl
dNTP mix (2.5 nM)	0.96 μl
Ex Taq polymerase (5 Unit/μl)	0.12 μl
milliQ	8.18 μl
(Subtotal)	(11.00 μl)
ligation products	1.00 μl
total	12.00 μl

[0105] 上記試薬を調製後、９５℃で１分後、９５℃で３０秒、５５℃で６分、７２℃で３０秒のサイクルを２５回実施し、その後１０℃とする条件にて標識工程を実施した。

[0106] (3) DNAマイクロアレイを用いた検出

標識済みサンプルを用いたDNAマイクロアレイへの反応・洗浄及びについては、先行技術文献３記載内容に従って行った。

(スキャナーによる蛍光検出)

MolecularDevices社GenePix4000Bを使用してLaserPowerおよびPMTを適宜調節し、蛍光画像を取得した。

[0107] (4) データ解析

画像の数値化ソフトウェアとしてGenePix Proを使用し、得られた画像の蛍光シグナルの数値化した。結果を図４に示す。

[0108] 図４に示すように、今回用いたサンプルに関し、図４に示す分散分析によれば、各ＳＮＰについて、ヘテロとホモとがそれぞれ区別可能であることがわかった。

参考例２

[0109] 本参考例では、浸漬型ハイブリダイゼーションにより変異（ＳＮＰ）を検出した。本参考例では、以下の手順で変異の検出を実施した。なお、対象としたＳＮＰは、ｒｓ１０４２７１３（ＳＮＰ１）、１２２９９８４（ＳＮＰ２）及びｒｓ６７１（ＳＮＰ３）であった。

[0110] （１） メンブレンタイプＤＮＡマイクロアレイの作製

メルクミリポア製Ｈｉ－Ｆｌｏｗ Ｐｌｕｓメンブレンシート（６０ｍｍｘ６００ｍｍ）に以下の表に示す塩基配列からなるキャプチャーＤＮＡプローブ溶液を、特開２００３－７５３０５号公報に記載されている吐出ユニット（インクジェット法）を用いた日本ガイシ株式会社ＧＥＮＥＳＨＯＴ（登録商標）スポッターを用いて、図５に示す配置でスポットした。

[0111] 使用したプローブは、非特許文献２のＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ Ｔａｂｌｅ１記載のＤ１＿１からＤ１＿１００の１００種のうち以下に示す１１種の配列を使用した。なお、プローブは、５’末端（３‘末端も可）をアルブミン（アビジン等のタンパク質も可）で修飾されたものを使用した。スポットの後、４５℃、２時間のベークを行うことで合成オリゴＤＮＡの固定化を行った。

[0112]

[表5]

Probe	SEQ (5'→3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC
D1-002	TGGAACTGGGAACGCTTTAGATG
D1-003	TTCGCTTCGTTGTAATTTCGGAC
D1-005	TAGCCCAGTGATTTATGACATGC
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT
D1-009	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG
D1-012	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG
D1-014	TGCTCACTTACATTACGTCCATG
D1-100	TGCAGTGTAAGCAACTATTGTCT

[0113] （２）サンプル遺伝子の増幅、ライゲーション及び標識

サンプル遺伝子の増幅および、ライゲーション工程、標識工程（ビオチン化）については、非特許文献２記載の手法を参考にして行った。

[0114] （増幅）

サンプルには、日本人由来B細胞株・ゲノムDNA（財団法人ヒューマンサイエンス振興財団：Health Science Research Resources Bank）6種で、検出対象とするSNP型がサンプルごとにあらかじめ分かっているものを使用した。

[0115] なお、サンプ遺伝子の増幅、ライゲーション及び標識に使用したプライマー配列、第１、第２のクエリプローブ（表中のクエリプローブ及びコモンプローブに対応する。）及びプライマー配列はそれぞれ以下の通りとした。プライマーＥＤ-1は５’末端をビオチンで標識した。

[0116] [表6]

SNP No. (検出塩基)	SNP1 (A/G)	SNP2 (A/G)	SNP3 (A/G/C/T)
サンプル1	G/G	A/A	G/G
サンプル2	A/A	A/A	G/G
サンプル3	A/G	A/G	A/A
サンプル4	G/G	A/A	A/G
サンプル5	A/A	G/G	G/G
サンプル6	G/G	G/G	G/G

[0117]

[表7]

Primer	SEQ (5'→3')
SNP001_F	TCAGCACAGGCCAGTGAAGTGATGAAGTAGTTGGTGA
SNP001_R	GCGAGGGCAGTTCCCCTAAAGTCCTGTGCACATAA
SNP002_F	TAATGGTTGAAGGGTACAATACATGAGTGCCTGAATGCATA
SNP002_R	GTAGAGAAGGGCTTTAGACTGAATAACCTTGGGGATA
SNP003_F	TTGGCGTATAACGAAGCCCAGCAAATGACCGCATA
SNP003_R	GGGTCAACTGCTATGATGTGTTTGGAGCCCAGTCA

[0118] [表8]

Probe	SEQ (5'→3')
SNP001_Query1	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGCTCTTGCTGGCACCCAATA
SNP001_Query2	TGGAACTGGGAACGCTTTAGATGTGCTGGCACCCAATG
SNP002_Query1	TAGCCCAGTGATTTATGACATGCCACGTGGTCATCTGTGT
SNP002_Query2	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTTCACGTGGTCATCTGTGC
SNP003_Query1	GGGGGGTACTTCATACAAGATGCGCTGCAGGCATACACTA
SNP003_Query2	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGAGCTGCAGGCATACACTG
SNP003_Query3	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCGGCTGCAGGCATACACTC
SNP003_Query4	AGTCATACAGTGAGGACCAAATGGCTGCAGGCATACACTT
SNP001_Common	GAAGCCATGCGCCGGACCACGCCGTGTCCACTCTAGAAAAACCT
SNP002_Common	GACAGATTCCTACAGCCACCATCTACAGCCGTGTCCACTCTAGAAAAACCT
SNP003_Common	AAGTGAAAACTGTGAGTGTGGGACCTGCCGTGTCCACTCTAGAAAAACCT

[0119]

[表9]

Primer	SEQ (5'→3')
ED-1	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGG
D1_1	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC
D1_2	TGGAACTGGGAACGCTTTAGATG
D1_3	TTCGCTTCGTTGTAATTTCGGAC
D1_4	AGGCATCCTAAGAAATCGCTACT
D1_5	TAGCCCAGTGATTTATGACATGC
D1_6	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT
D1_7	TAGCCAACTCTAAATAACGGACG
D1_8	TTCGGTTGTCGATATGAGGATCT
D1_9	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC
D1_10	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA
D1_11	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG
D1_12	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG
D1_13	CATTCGACATAAGCTGTTGATGC
D1_14	TGCTCACTTACATTACGTCCATG
D1_15	TACACCTATCAACTCGTAGAGCA
D1_16	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC
D1_17	TGCACTCTGATATATACAGGCCA
D1_18	GCAGCCCTTATAGATAACGGGAC
D1_19	GAAGCCATGATACTGTTCAGGGT
D1_20	TATTCTACCAACGACATCACTGC
D1_21	CCATCAGTTATTCGGAGGGACTC
D1_22	CCATATCCGATTATTAGCGACGG
D1_23	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA
D1_24	CCGTCGTGTTATTAAAGACCCCT
D1_25	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT
D1_26	CATTTGTCAGGTACAGTCCACTT
D1_27	GCCCACACTCTTACTTATCGACT
D1_28	CGCTGTTACTGTAAGCGTACTAG
D1_29	CGCGATTCCTATTGATTGATCCC
D1_30	CCGTCTGGGTTAAAGATTGCTAG
D1_31	AGTCAGTCCAAATCTCAGGATGG
D1_32	CGCCTAAATGAAACTCACTCTGC

[0120] なお、増幅反応時における各プライマー量は２５０ｆｍｏｌであった。ライゲーション反応時における各プローブ量は５ｆｍｏｌであり、Ｃｏｍｍｏｎプローブは５‘末端リン酸化されたものを使用した。

[0121] （ライゲーション）

ライゲーションの反応手順は以下の通りとした。反応にはNew England Biolabs社のTaq DNA Ligase(Catalog # M0208S)を使用し、サーマルサイクラーにはGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems社) を使用した。すなわち、以下の試薬を調製し９５℃で５分、５０℃で１分、５８℃で６０分の後、１０℃の条件でライゲーションを実施した。サーマルサイクラーにはGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems社) を使用した。

[0122] （試薬組成）

Ｑｕｅｒｙプローブ／ＣｏｍｍｏｎプローブＭｉｘ（５０ｎＭ，ｅａｃｈ）	０．１００　μｌ
Ｔａｑ　ＤＮＡ　Ｌｉｇａｓｅ　ｂｕｆｆｅｒ　（１０×）	１．５００　μｌ
dH_2O	１０．２７５　μｌ
Ｔａｑ　ＤＮＡ　ｌｉｇａｓｅ　（４０Ｕｎｉｔｓ／μｌ）	０．１２５　μｌ
Ｓｕｂｔｏｔａｌ	１２．０００　μｌ
ＰＣＲ　ｐｒｏｄｕｃｔｓ（＊）	３．０００　μｌ
ｔｏｔａｌ	１５．０００　μｌ

[0123] （標識）

標識では、まず以下の試薬を調製し、９５ｏＣで１分の後、９５℃で３０秒、５５℃で６分、及び７２℃で３０秒を１サイクルとしてこれを２５サイクル実施後、１０℃の条件でＰＣの条件にてＰＣＲを行った。得られた産物をLabeled productsとした。サーマルサイクラーにはGeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems社）を使用しＰＣＲにはTaKaRa Bio社のTaKaRa Ex Taq (R)（Catalog# RR001B）を使用した。以下の試薬組成においては、第２のプライマーであるビオチン標識ＥＤ－１量は１２ｐｍｏｌであり、第１のプライマーであるプライマーＭｉｘ（Ｄ１＿１～３２）は各３０ｆｍｏｌであり、総量で０．９６ｐｍｏｌであった。この結果、第２のプライマー総濃度／第１のプライマー総濃度は、１２．５（Ｐ＝１２ｐｍｏｌ、Ｃ＝０．９６ｐｍｏｌ）であった。

[0124] （試薬組成）

Ｄ１＿ｉプライマーＭｉｘ（０．５μＭ，ｅａｃｈ）	０．０６　μｌ
ビオチン標識－ＥＤ－１（２５μＭ）	０．４８　μｌ
Ｅｘ　Ｔａｑ　ｂｕｆｆｅｒ（１０×）	１．２０　μｌ
ｄＮＴＰ　ｍｉｘ　（２．５ｎＭ）	０．９６　μｌ

ＥｘＴａｑｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（５Ｕｎｉｔ／μｌ）	０．１２　μｌ
ｍｉｌｌｉＱ	８．１８　μｌ
Ｓｕｂｔｏｔａｌ	１１．００　μｌ
ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｐｒｏｄｕｃｔｓ	１．００　μｌ
ｔｏｔａｌ	１２．００　μｌ

[0125] （３）ＤＮＡマイクロアレイを用いた検出

ＤＮＡマイクロアレイへの反応及びその検出手順は以下の通りとした。すなわち、以下のハイブリダイズサンプルを調製し、このハイブリダイズサンプル各２００μｌを０．２ｍｌチューブに入れてヒートブロック温度９０℃で１分、８０℃で１分間反応させた。その後、ＤＮＡマイクロアレイを０．２ｍｌチューブに入る大きさに切断し、上記チューブ内にセットし、ヒートブロック温度３７℃で３０分間反応させた。なお、コントロールは、Ｄ１－１００配列に相補な配列の５’末端をビオチンで標識したオリゴＤＮＡ（２５μＭ）を用いた。

[0126] （ハイブリダイズサンプルの組成）

Ｈｙｂｒｉ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（０．５％Ｔｗｅｅｎ２０－１％ＢＳＡ－ＰＢＳ）

	２００．０　μｌ
コントロール	４．０　μｌ
増幅サンプル	４．０　μｌ
ｔｏｔａｌ	２０８．０　μｌ

[0127] 反応終了後、ＤＮＡマイクロアレイを洗浄液（０．１％Ｔｗｅｅｎ２０－１ｍＭ　ＥＤＴＡ－ＴＢＳ）入り０．２ｍｌチューブに移し、３７℃のヒートブロック内で洗浄作業（３７℃×１ｍｉｎ、３７℃×１０ｍｉｎ、３７℃×１ｍｉｎ）を行った。

[0128] 次いで、洗浄済みアレイをビオチン－ＨＲＰとストレプトアビジンとの混合液が入った０．２ｍｌチューブに移して室温下で２０分間の反応を行った。反応終了後、ＤＮＡマイクロアレイを洗浄液（０．１％Ｔｗｅｅｎ２０－

１ｍＭ ＥＤＴＡ－ＴＢＳ）入り０．２ｍｌチューブに移し、洗浄作業（室温×１ｍｉｎ、室温×１０ｍｉｎ、室温×１ｍｉｎ）を行った。

[0129] 洗浄済みアレイをＶｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ社製ＴＭＢ Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ Ｋｉｔ，３，３’，５，５’－ｔｅｔｒａｍｅｔｈｙｌｂｅｎｚｉｄｉｎｅを用いて室温下で５分程度の発色反応を行った。アレイの乾燥後の発色の有無を目視で確認した。結果を、実施例１と併せて図６に示す。

実施例 １

[0130] 以下、参考例１に準じて、本明細書に開示される検出方法を実施した。以下、参考例２と相違する部分（ライゲーション及び標識）についてのみ説明する。その他の操作は、参考例に準じて実施した。結果を図６に示す。

[0131] ライゲーションに関し、本実施例では、ライゲーションの際の試薬に関し、ミスマッチ結合タンパク質（ニッポンジーン社のＴａｑＭｕｔＳ（３１６－０４０１１））を使用し、異なる熱サイクル条件を採用した以外は、参考例２と同様に実施した。以下に、ライゲーションに用いた試薬組成を示す。また、熱サイクル条件は、９５℃で５分後、９５℃で０．５分、５０℃で１分及び５８℃で４分を１サイクルとしてこれを３０サイクル繰り返し、その後１０℃とした。すなわち、参考例２では、１サイクルのみライゲーションを実施したが、本実施例では、短時間のライゲーションサイクルを３０回実施した。

[0132] （試薬組成）

Ｑｕｅｒｙプローブ／ＣｏｍｍｏｎプローブＭｉｘ（５０ｎＭ，ｅａｃｈ）	０．１００ μｌ
Ｔａｑ ＤＮＡ Ｌｉｇａｓｅ ｂｕｆｆｅｒ （１０×）	１．５００ μｌ
dH_2O	８．２７５ μｌ
Ｔａｑ ＤＮＡ ｌｉｇａｓｅ （４０Ｕｎｉｔｓ／μｌ）	

	０．１２５　μｌ
１０×Ｔａｑ　ＭｕｔＳ　ｂｕｆｆｅｒ	１．５００　μｌ
Ｔａｑ　ＭｕｔＳ（１μｇ／μｌ）	０．５００　μｌ
Ｓｕｂｔｏｔａｌ	１２．０００　μｌ
ＰＣＲ　ｐｒｏｄｕｃｔｓ（＊）	３．０００　μｌ
ｔｏｔａｌ	１５．０００　μｌ

[0133] また、標識に関し、本実施例では、標識時の試薬に関し、以下の組成を採用する以外は、参考例２と同様に実施した。以下に、標識に用いた試薬組成を示す。本実施例では、参考例２よりも以下のプライマーＭｉｘ（第１のプライマー）の総濃度を参考例２よりも増大させた。すなわち、第２のプライマー（ビオチン標識－ＥＤ－１を１２ｐｍｏｌを維持し、Ｄ１＿ｉプライマーＭｉｘの濃度各６２５ｆｍｏｌ合計２０ｐｍｏｌとした。すなわち、第２のプライマー総濃度／第１のプライマー総濃度は、０．６であった。

[0134] （試薬組成）

Ｄ１＿ｉプライマーＭｉｘ（０．５μＭ，ｅａｃｈ）	１．２５　μｌ
ビオチン標識－ＥＤ－１（２５μＭ）	０．４８　μｌ
Ｅｘ　Ｔａｑ　ｂｕｆｆｅｒ（１０×）	１．２０　μｌ
ｄＮＴＰ　ｍｉｘ　（２．５ｎＭ）	０．９６　μｌ
ＥｘＴａｑｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（５Ｕｎｉｔ／μｌ）	０．１２　μｌ
ｍｉｌｌｉＱ	６．９９　μｌ
Ｓｕｂｔｏｔａｌ	１１．００　μｌ
ｌｉｇａｔｉｏｎ　ｐｒｏｄｕｃｔｓ	１．００　μｌ
ｔｏｔａｌ	１２．００　μｌ

[0135] 図６に示すように、参考例では発色すべきスポットの発色強度はコントロールに対して顕著に弱いとともに、発色すべきでないスポットがミスハイブリダイズ様に同様の強度に発色していた。この結果、参考例２では、各サンプルについてＳＮＰの型を判別することが困難であった。これに対して、実

施例１では、発色すべきスポットは参考例２よりも強く発色しほぼコントロールと同等であった。また、発色すべきでないスポットは、ほとんど発色しなかった。この結果、実施例１では、各サンプルについて、ＳＮＰの型を明確に判別することができた。すなわち、実施例１によれば、参考例２に比較して良好な検出感度と精度とを確保することができた。

[0136] また、取得した画像の数値化を行い、Ｓ／Ｎ比を算出（Ｓ：メンブレン上のキャプチャーＤＮＡ領域のサンプル反応部位の強度、Ｎ：メンブレン上のスポットのない領域の強度）したところ、参考例２では概ね５未満であったのに対し、実施例１では概ね５０を超える結果が確認され本発明により少なくとも１０倍に視認性が向上することがわかった。

[0137] 以上の結果から、ライゲーションに際して、ミスマッチ結合タンパク質を用いることで高い発色強度と良好なＳ／Ｎ比が得られることがわかった。また、ライゲーションを短時間のサイクルで複数回実施することで高い発色強度と良好なＳ／Ｎ比が得られることがわかった。さらに、標識要素に際して、試薬中における第２のプライマーの総濃度に対する第１のプライマーの総濃度を高めて、第２のプライマー総濃度／第１のプライマー総濃度を１２．５より小さくし、０．６程度とすることで、高い発色強度と良好なＳ／Ｎ比が得られることがわかった。

実施例 2

[0138] 本実施例では、展開型ハイブリダイゼーションによりＳＮＰを検出した。本実施例において検出対象としたＳＮＰはｒｓ１０４２７１３（ＳＮＰ１）であった。

[0139] （１） メンブレンタイプＤＮＡクロマトグラフィー本体の作製

メルクミリポア製Ｈｉ－Ｆｌｏｗ Ｐｌｕｓ メンブレンシート（６０ｍｍｘ６００ｍｍ）に以下の表に示す塩基配列からなるキャプチャーＤＮＡプローブ溶液を、特開２００３－７５３０５号公報に記載されている吐出ユニット（インクジェット法）を用いた日本ガイシ株式会社ＧＥＮＥＳＨＯＴ（登録商標）スポッターを用いて、図７に示す配置でスポットした。

[0140] 使用したプローブのＤＮＡ配列は、非特許文献２のＳｕｐｐｌｅｍｅｎｔａｒｙ Ｔａｂｌｅ１記載のＤ１＿１からＤ１＿１００の１００種のうち以下の８種とし、スポットに使用したプローブについては、５’末端をアルブミンで修飾されたものを使用した。スポットの後、４５℃、２時間のベークを行うことでプローブの固定化を行った。

[0141] [表10]

Probe	SEQ (5'→3')
D1-001	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC
D1-002	TGGAACTGGGAACGCTTTAGATG
D1-003	TTCGCTTCGTTGTAATTTCGGAC
D1-005	TAGCCCAGTGATTTATGACATGC
D1-006	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT
D1-009	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC
D1-010	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA
D1-011	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG

[0142] （２）サンプル遺伝子の増幅、ライゲーション及び標識

サンプル遺伝子の増幅、ライゲーション及びビオチン標識については、以下のとおり行った。

[0143] サンプルには、日本人由来Ｂ細胞株・ゲノムＤＮＡ（財団法人ヒューマンサイエンス振興財団：Ｈｅａｌｔｈ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ Ｂａｎｋ）から取得した以下の２種で、検出対象とするＳＮＰ型がサンプルごとにあらかじめ分かっているものを使用した。

[0144] [表11]

SNP No. （検出塩基）	SNP1 (A/G)
サンプル1	G/G
サンプル2	A/A

[0145] なお、サンプル遺伝子の増幅に使用したプライマー配列、ライゲーションにて使用したプローブ及び標識にて使用したプライマー配列はそれぞれ以下の通りであった。ＥＤ－１は５’末端をビオチンで標識した。増幅に使用した各プライマー量は２５０ｆｍｏｌとし、各クエリプローブ量は、５ｆｍｏ

Ｉとし、コモンプローブは、５末端をリン酸化したものを使用した。標識用の各Ｄ１プライマーは６２５ｆｍｏｌ（総濃度としては、２０ｐｍｏｌ）とし、ＥＤ－１プライマーは、５’末端をビオチンで標識したものを１２ｐｍｏｌとした。

[0146] [表12]

Primer	SEQ (5'→3')
SNP001_F	TCAGCACAGGCCAGTGAAGTGATGAAGTAGTTGGTGA
SNP001_R	GCGAGGGCAGTTCCCCTAAAGTCCTGTGCACATAA

[0147] [表13]

Probe	SEQ (5'→3')
SNP001_Query1	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGCTCTTGCTGGCACCCAATA
SNP001_Query2	TGGAACTGGGAACGCTTTAGATGTGCTGGCACCCAATG
SNP001_Common	GAAGCCATGCGCCGGACCACGCCGTGTCCACTCTAGAAAAACCT

[0148]

[表14]

Primer	SEQ (5'→3')
ED-1	AGGTTTTTCTAGAGTGGACACGG
D1_1	TGTTCTCTGACCAATGAATCTGC
D1_2	TGGAACTGGGAACGCTTTAGATG
D1_3	TTCGCTTCGTTGTAATTTCGGAC
D1_4	AGGCATCCTAAGAAATCGCTACT
D1_5	TAGCCCAGTGATTTATGACATGC
D1_6	CGCTCTGGTTACTATTGGACGTT
D1_7	TAGCCAACTCTAAATAACGGACG
D1_8	TTCGGTTGTCGATATGAGGATCT
D1_9	GGGGGGTACTTCATACAAGATGC
D1_10	GAGTAGCAGGCAAATACCCTAGA
D1_11	GCCTATTAAGGTCTACGTCATCG
D1_12	AGTCATACAGTGAGGACCAAATG
D1_13	CATTCGACATAAGCTGTTGATGC
D1_14	TGCTCACTTACATTACGTCCATG
D1_15	TACACCTATCAACTCGTAGAGCA
D1_16	AGGTCCGGTAGTAATTTAGGTGC
D1_17	TGCACTCTGATATATACAGGCCA
D1_18	GCAGCCCTTATAGATAACGGGAC
D1_19	GAAGCCATGATACTGTTCAGGGT
D1_20	TATTCTACCAACGACATCACTGC
D1_21	CCATCAGTTATTCGGAGGGACTC
D1_22	CCATATCCGATTATTAGCGACGG
D1_23	CATCTCCAAGAATTGACCCACCA
D1_24	CCGTCGTGTTATTAAAGACCCCT
D1_25	GAAGGATCGCTTTTATCTGGCAT
D1_26	CATTTGTCAGGTACAGTCCACTT
D1_27	GCCCACACTCTTACTTATCGACT
D1_28	CGCTGTTACTGTAAGCGTACTAG
D1_29	CGCGATTCCTATTGATTGATCCC
D1_30	CCGTCTGGGTTAAAGATTGCTAG
D1_31	AGTCAGTCCAAATCTCAGGATGG
D1_32	CGCCTAAATGAAACTCACTCTGC

[0149] （ライゲーション）

ライゲーションの反応手順は、上記したクエリプローブを用いる以外は、実施例１と同様の試薬を用いて同様の条件で行った。なお、ライゲーション試薬には、ミスマッチ結合タンパク質を用いている。

[0150] （標識）

上記したＰＣＲ産物について、実施例１と同様の条件でＰＣＲを実施して標識した。試薬中、第２のプライマーの総濃度／第１のプライマー総濃度は、０．６あった。

[0151] （３）クロマトグラフィー本体を用いた検出

核酸クロマトグラフィーによるハイブリダイゼーション反応及びその検出を行った。すなわち、増幅反応液を、あらかじめヒートブロック温度９０℃

で１分、８０℃で１分間反応させた後、直ちに氷冷したものを使用して、以下の組成の展開液を調製した。なお、ラテックス保存液には、青色系の着色剤を含有するポリスチレン系のラテックスビーズにアビジン（ストレプトアビジン）を被覆させたものを所定の濃度となるようにＰＢＳを用いて調製した。

[0152] （展開液の組成）

ＰＢＳ	３０．０μｌ
ラテックス液	５．０μｌ
増幅反応液	１０．０μｌ
ミリポア水	５．０μｌ
合計	５０．０μｌ

[0153] （ハイブリダイゼーション）

各サンプルについての展開液各５０μｌを０．２ｍｌチューブに加えて、クロマトグラフィー本体の各下端部を差込んでクロマトグラフィーによるハイブリダイゼーション反応を開始した。展開液は約２０分間ですべて吸い上がりクロマトグラフィーによるハイブリダイゼーション反応は完了した。反応終了後、クロマトグラフィー本体を風乾させた後、目視による反応箇所の確認及び画像を撮影した。

[0154] （検出工程）

アレイの乾燥後の発色の有無を目視で確認した。結果を図８に示す。図８に示すように、実施例１と同様のライゲーション及び標識を実施することで、展開型ハイブリダイゼーションにおいても十分にＳＮＰ判別が可能となる結果を確認することができた。

[0155] 以上の結果から、ライゲーションに際して、ミスマッチ結合タンパク質を用いることで高い発色強度と良好なＳ／Ｎ比が得られることがわかった。また、ライゲーションを短時間のサイクルで複数回実施することで高い発色強度と良好なＳ／Ｎ比が得られることがわかった。さらに、標識に際して、試薬中における第２のプライマーの総濃度に対する各変異を検出するための第

１のプライマーセットの総濃度を高めて、第２のプライマー総濃度／第１のプライマーの総濃度を０．６程度とすることで、展開型ハイブリダイゼーションにおいても、高い発色強度と良好なＳ／Ｎ比が得られることがわかった。

[0156] さらにまた、本実施例によれば、クロマトグラフィー形態での実施により、ハイブリダイゼーション工程を０．３時間以内程度で完了でき、変異の検出全体に係る時間を大幅に短縮できることがわかった。

実施例 3

[0157] 本実施例では、標識工程における、標識試薬中における第１のプライマー（本実施例ではD1_iプライマー）の総濃度と第２のプライマー（本実施例では標識用プライマー（Ｃｙ３，Ｃｙ５標識ＥＤ－１、２プライマー）の総濃度の比率が、検出工程に及ぼす影響を調べた。

[0158] 本実施例では、サンプルとして表６のサンプル１（ＳＮＰ１（Ｇ／Ｇ）、ＳＮＰ２（Ａ／Ａ）のみを使用し、そのほか、標識工程以外は、参考例１に従い行った。すなわち、第２のプライマー濃度を固定するとともに、標識試薬の組成中、第１のプライマー（Ｄ１＿ｉプライマー）の濃度を変動させた。こうした標識試薬を用いて得られたサンプルの評価脚気を表１５及び図９に示す。

[0159] [表15]

条件	①	②	③ (実施例1)	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
プライマー量比(P/C)	50	25	12.5	5	2	1	0.5	0.25	0.12	0.05
P:第２のPrimer総量=12pmol C:第１のPrimer総量(pmol)	⟺ P>C					P=C	⟺ P<C			
各第1のプライマー (D1_i) の量	7.5fmol	15fmol	30fmol	75fmol	187.5fmol	375fmol	750fmol	1.5pmol	3.125pmol	7.5pmol

[0160] 図９に示すように、従来のプライマー量比の第２のプライマー総濃度／第１プライマー＝１２．５（条件３）よりも小さくすることで、より好ましくは同５（条件４）よりも小さくしすることで、よりHomoタイプの検出性能が

高まり、同０．５（条件７）において最も良い結果が得られた。すなわち、第２のプライマー総濃度／第１のプライマー総濃度を一定範囲内（０．０５以上１２．５未満、好ましくは、１０以下、より好ましくは５以下、さらに好ましくは２以下、一層好ましくは１以下程度）に調節することで識別能が高まることを確認した。一方で、第２のプライマー総濃度／第１のプライマー総濃度をより低減させると、シグナル強度そのものが大幅低下する結果となることも確認した。

[0161] なお、上記実施例では第２のプライマー総濃度（P）を一定としての実施例となっているが、サンプル検出感度によっては、第２のプライマー総濃度を増減するなど、検出系に応じた最適化が好ましい。

配列表フリーテキスト

[0162] 配列番号１～１２９：合成ＤＮＡ

請求の範囲

[請求項1] 変異の検出方法であって、

前記変異を有する可能性のあるＤＮＡ試料と、前記変異の少なくとも一部を識別する第１の識別用配列を有する第１のクエリプローブと、前記変異に隣接する領域を識別する第２の識別配列を有する第２のクエリプローブと、を接触させて、ＤＮＡリガーゼ反応により前記第１のクエリプローブと前記第２のクエリプローブとを連結して、前記変異の種類に応じた第１の識別用配列及び第２の識別配列と、前記変異の種類に応じて予め関連付けられたプローブの検出用配列と特異的にハイブリダイズするハイブリダイズ用配列又は相補配列と、標識を付与するための標識用配列又は相補配列と、をそれぞれ有する、１又は２以上のライゲーション産物を前記変異に関連付けて取得する工程と、

前記１又は２以上のライゲーション産物と、前記ハイブリダイズ用配列の相補配列を有する第１のプライマーと、前記標識用配列を有する第２のプライマーと、を接触させてＤＮＡポリメラーゼ増幅反応により、前記標識用配列と前記ハイブリダイズ用配列とを備える１又は２以上の増幅産物を取得する工程と、

前記プローブが保持された固相担体の前記プローブと前記１又は２以上の増幅産物とを接触させて、前記プローブと前記増幅産物とのハイブリダイズ産物を取得する工程と、

前記ハイブリダイズ産物を前記標識用配列を介して付与された標識に基づいて検出する工程と、

を備え

前記第２のプライマーの総濃度は、前記第１のプライマーの総濃度の０．５倍以上１２．５倍未満である、方法。

[請求項2] 前記ライゲーション産物取得工程は、ミスマッチ結合タンパク質の存在下に実施する、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記ライゲーション産物取得工程は、前記ＤＮＡリガーゼによる連結反応を複数回繰り返して実施する、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] 前記第２のプライマーの総濃度は、前記第１のプライマーの総濃度の５倍以下である、請求項１～３のいずれかに記載の方法。

[請求項5] 前記ハイブリダイズ産物取得工程は、クロマトグラフィー形態で実施する、請求項１～５のいずれかに記載の方法。

[請求項6] 前記第２のプライマーは前記標識を保持するかあるいは前記標識を結合可能な標識結合物質を保持する、請求項１～５のいずれかに記載の方法。

[請求項7] 前記標識は、目視で視認可能である、請求項１～６のいずれかに記載の方法。

[請求項8] 前記プローブの検出用配列は、配列番号１～１００で表される塩基配列及びその相補配列からなる群から選択される、請求項１～７のいずれかに記載の方法。

[請求項9] 前記固相担体は、ポリエーテルスルホン、ニトロセルロース、ナイロン、ポリフッ化ビニリデン及びろ紙からなる群から選択されるいずれかである、請求項１～８のいずれかに記載の検出方法。

[請求項10] 前記変異は、１又は数塩基の置換変異、挿入変異及び欠失変異のいずれかである、請求項１～９のいずれかに記載の検出方法。

[請求項11] 変異を検出するためのキットであって、

前記変異の少なくとも一部を識別する第１の識別用配列と前記変異の種類に応じて予め関連付けられたプローブの検出用配列と特異的にハイブリダイズするハイブリダイズ用配列又はその相補配列を有する第１のクエリプローブと、前記変異に隣接する領域を識別する第２の識別配列と標識用配列又はその相補配列とを有する第２のクエリプローブのセット又は

前記第１の識別用配列と前記標識用配列又はその相補配列を有する第１のクエリプローブと、前記第２の識別配列と前記ハイブリダイズ

用配列又はその相補配列とを有する第２のクエリプローブのセットのいずれかを含む、クエリプローブセットと、

前記ハイブリダイズ用配列の相補配列を有する第１のプライマーと、前記標識用配列を有する第２のプライマーと、を含むプライマーセットと、

ミスマッチ結合タンパク質と、

を備える、キット。

[請求項12] さらに、前記第２のプライマーの総濃度は、前記第１のプライマーの総濃度の０．０５倍以上１２．５倍未満である、請求項１１に記載のキット。

[請求項13] 前記固相担体は液体の浸透性又は透過性を有するクロマトグラフィー用担体である、請求項１１又は１２に記載のキット。

[請求項14] 変異に関連付けられるＤＮＡの製造方法であって、

前記変異を有する可能性のあるＤＮＡ試料と、前記変異の少なくとも一部を識別する第１の識別用配列を有する第１のクエリプローブと、前記変異に隣接する領域を識別する第２の識別配列を有する第２のクエリプローブと、を接触させて、ＤＮＡリガーゼ反応により前記第１のクエリプローブと前記第２のクエリプローブとを連結して、前記変異の種類に応じた第１の識別用配列及び第２の識別配列と、前記変異の種類に応じて予め関連付けられたプローブの検出用配列とハイブリダイズするためのハイブリダイズ用配列又はその相補配列と、標識を付与するための標識用配列又は相補配列と、をそれぞれ有する、１又は２以上のライゲーション産物を前記変異に関連付けて取得する工程と、

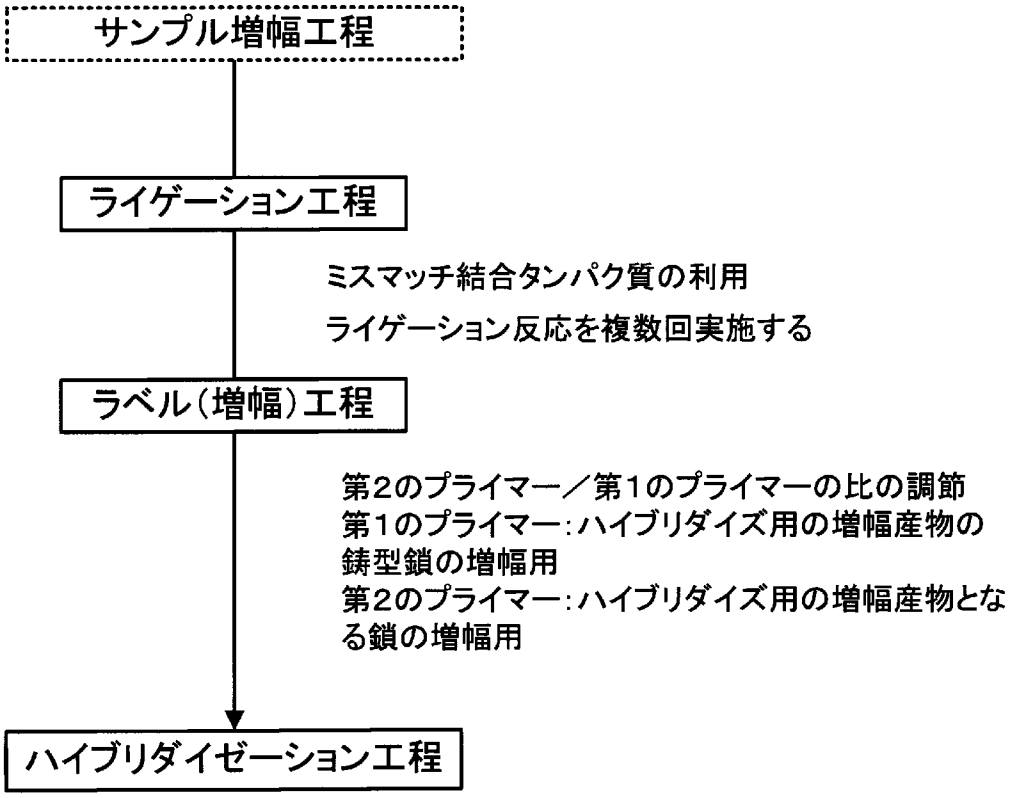
前記１又は２以上のライゲーション産物と、前記ハイブリダイズ用配列の相補配列を有する第１のプライマーと、前記標識用配列を有する第２のプライマーと、を接触させてＤＮＡポリメラーゼ増幅反応により、前記標識用配列とハイブリダイズ用配列とを有する１又は２以

上の増幅産物を取得する工程と、

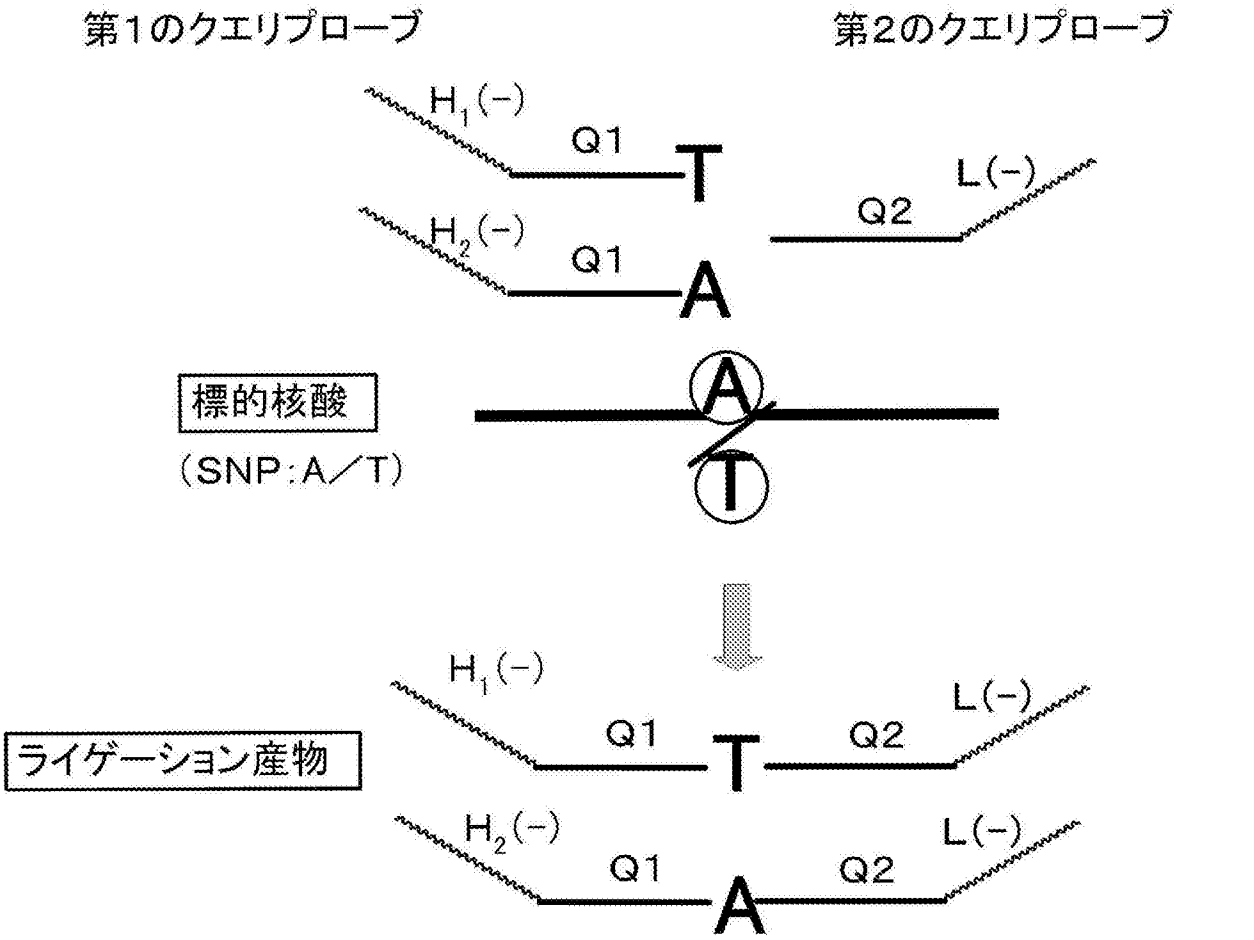
前記ライゲーション産物取得工程をミスマッチ結合タンパク質の存在下に実施する、方法。

[請求項15] 前記第２のプライマーの総濃度は、前記第１のプライマーの総濃度の０．５倍以上１２．５倍未満である、請求項１４に記載の方法。

[図1]

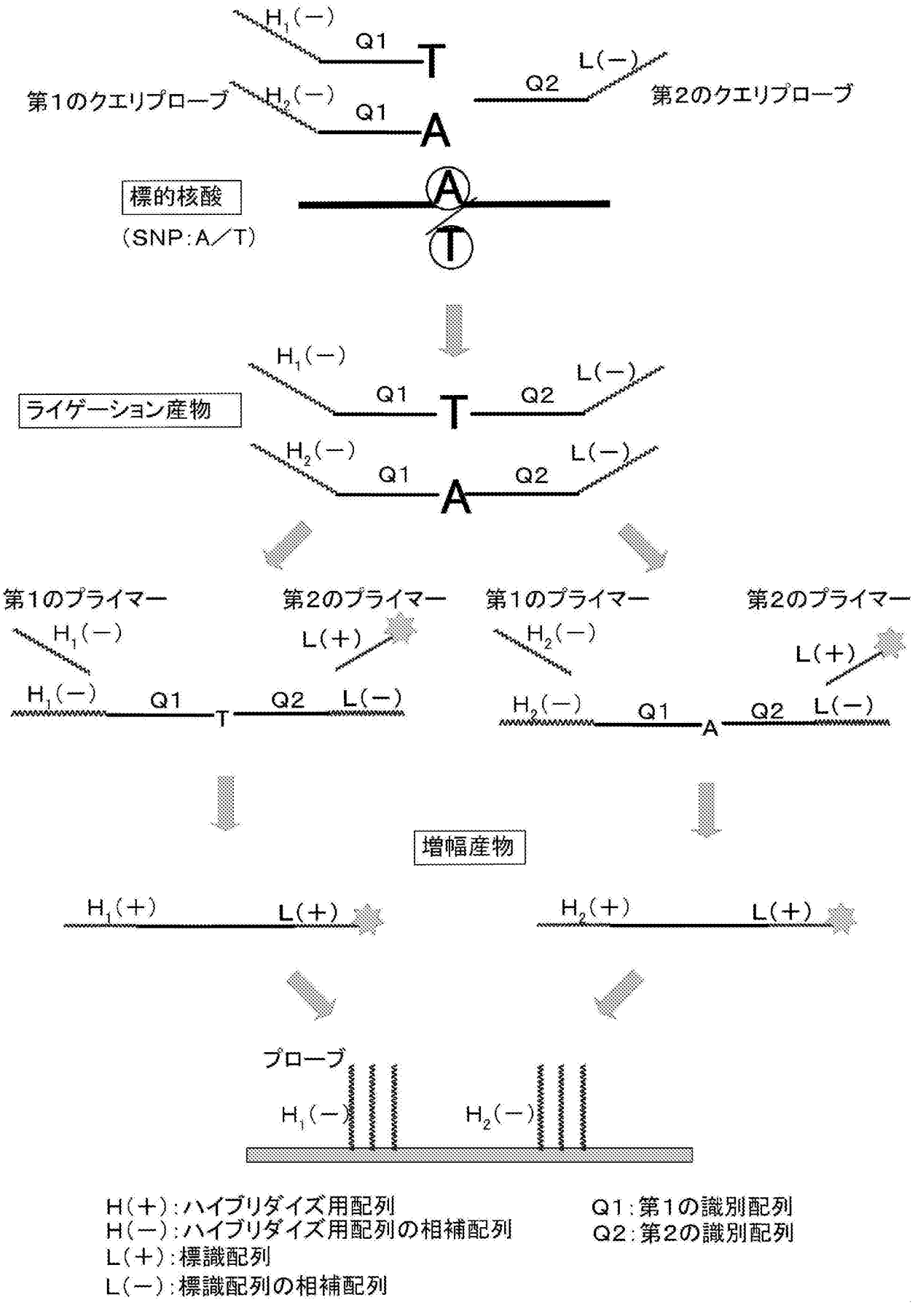

サンプル増幅工程
ライゲーション工程
ミスマッチ結合タンパク質の利用
ライゲーション反応を複数回実施する
ラベル(増幅)工程
第2のプライマー／第1のプライマーの比の調節
第1のプライマー:ハイブリダイズ用の増幅産物の鋳型鎖の増幅用
第2のプライマー:ハイブリダイズ用の増幅産物となる鎖の増幅用
ハイブリダイゼーション工程

[図2A]



H(＋):ハイブリダイズ用配列
H(−):ハイブリダイズ用配列の相補配列
L(＋):標識配列
L(−):標識配列の相補配列
Q1:第1の識別配列
Q2:第2の識別配列

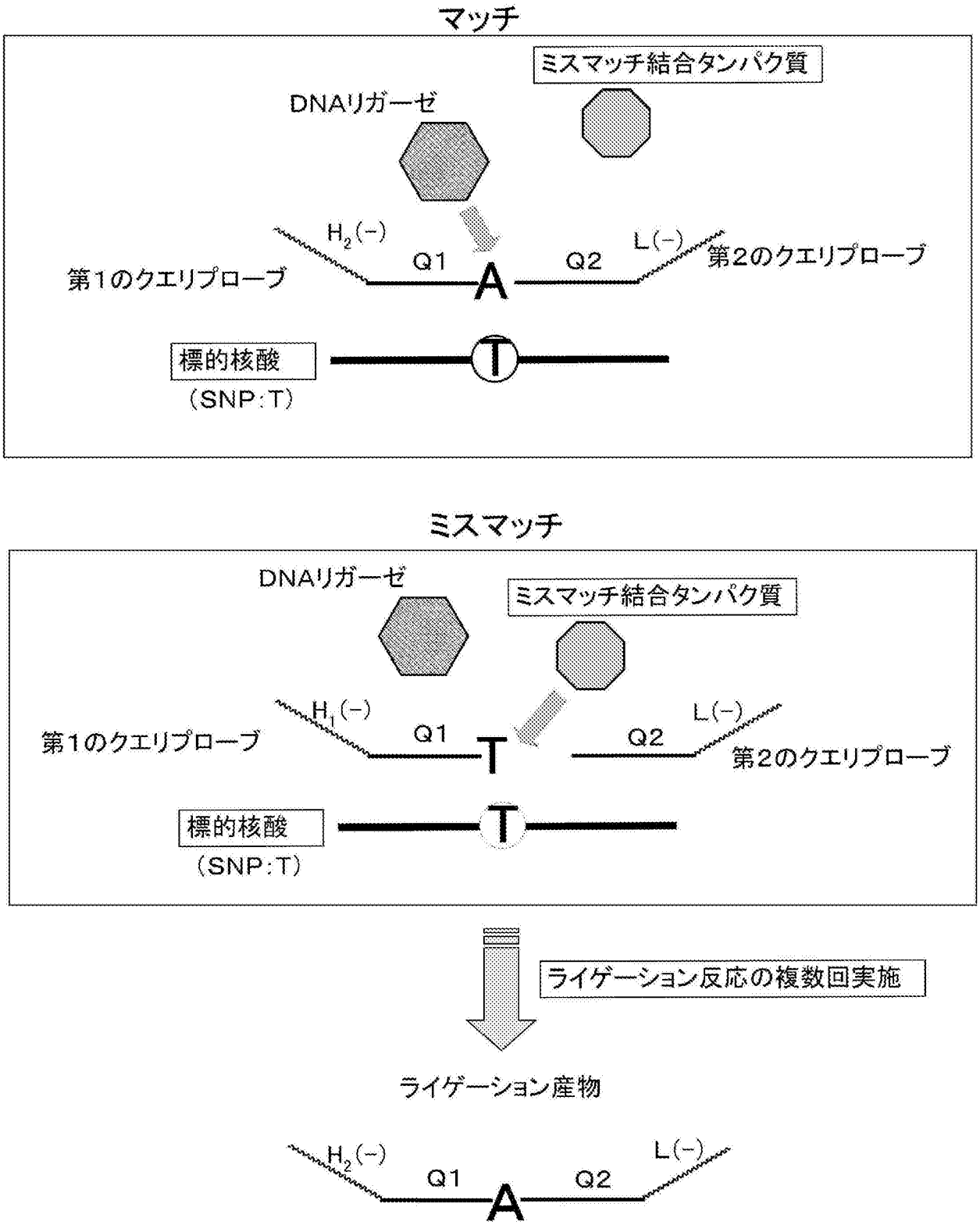
[図2B]



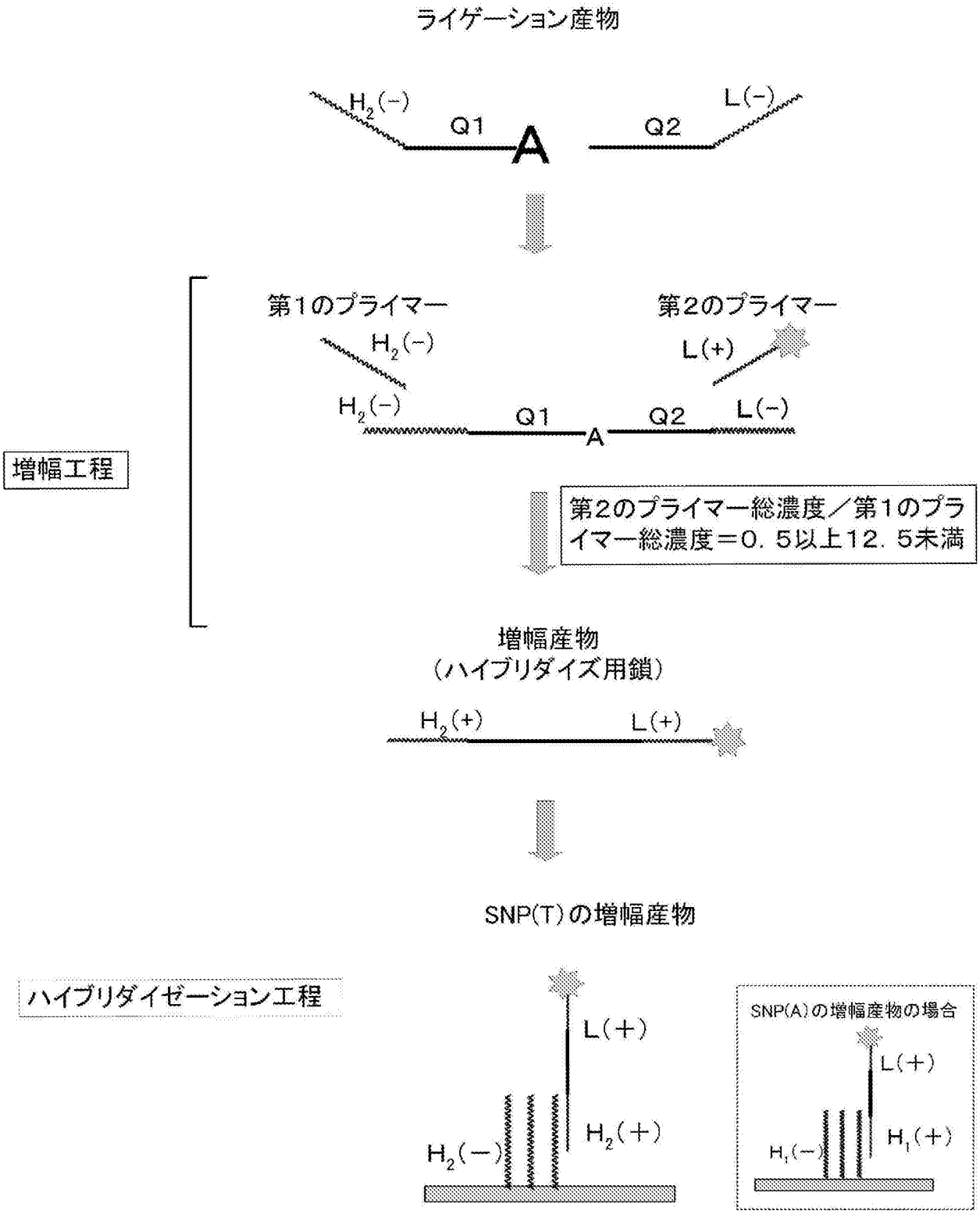
H(+):ハイブリダイズ用配列
H(−):ハイブリダイズ用配列の相補配列
L(+):標識配列
L(−):標識配列の相補配列

Q1:第1の識別配列
Q2:第2の識別配列

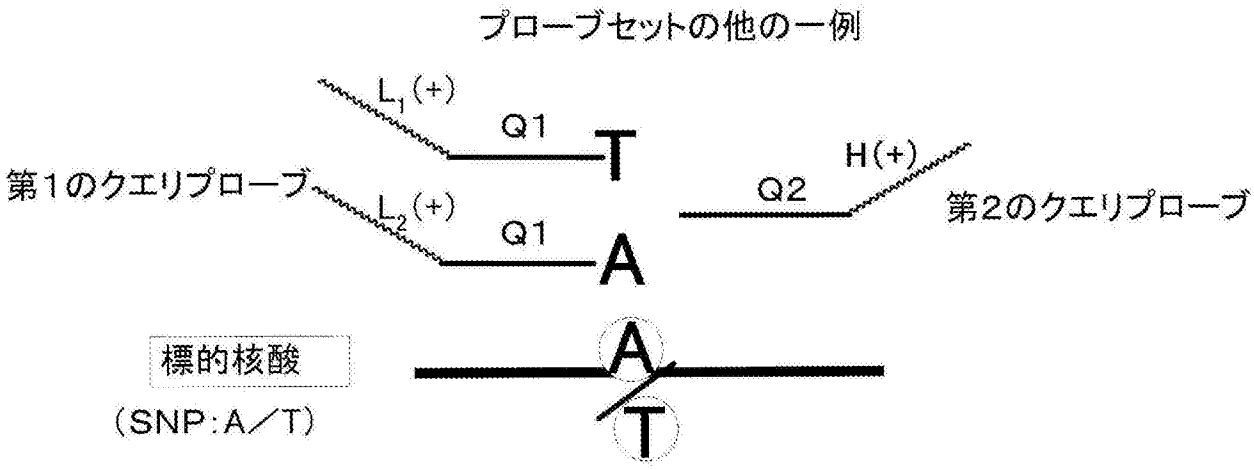
[図2C]


マッチ
ミスマッチ結合タンパク質
DNAリガーゼ
H2(−)
Q1
A
Q2
L(−)
第1のクエリプローブ
第2のクエリプローブ
標的核酸
（SNP：T）
ミスマッチ
DNAリガーゼ
ミスマッチ結合タンパク質
H1(−)
Q1
T
Q2
L(−)
第1のクエリプローブ
第2のクエリプローブ
標的核酸
T
（SNP：T）
ライゲーション反応の複数回実施
ライゲーション産物
H2(−)
Q1
A
Q2
L(−)

[図2D]

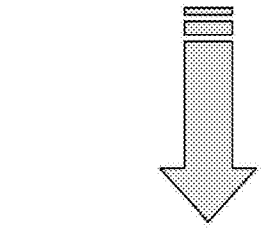

ライゲーション産物
H2(−)
Q1
A
Q2
L(−)
増幅工程
第1のプライマー
第2のプライマー
H2(−)
L(+)
H2(−)
Q1
A
Q2
L(−)
第2のプライマー総濃度／第1のプライマー総濃度＝0．5以上12．5未満
増幅産物
（ハイブリダイズ用鎖）
H2(+)
L(+)
SNP(T)の増幅産物
ハイブリダイゼーション工程
L(+)
H2(+)
H2(−)
SNP(A)の増幅産物の場合
L(+)
H1(+)
H1(−)

[図3]

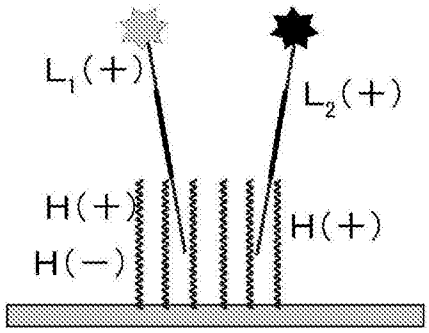


H(＋):ハイブリダイズ用配列
H(－):ハイブリダイズ用配列の相補配列
L(＋):標識配列
L(－):標識配列の相補配列

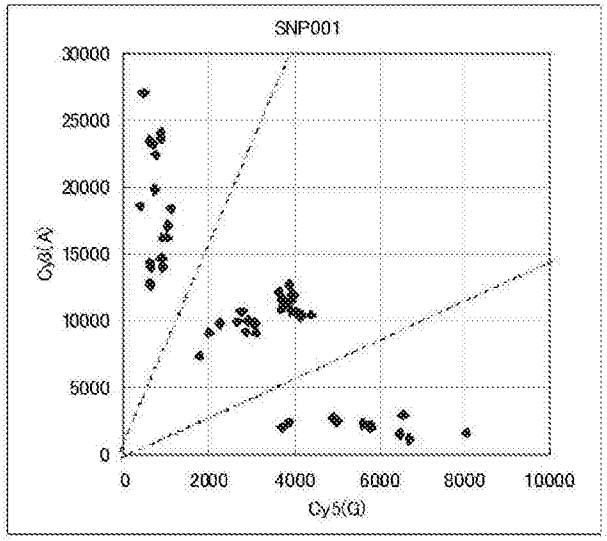
Q1:第1の識別配列
Q2:第2の識別配列

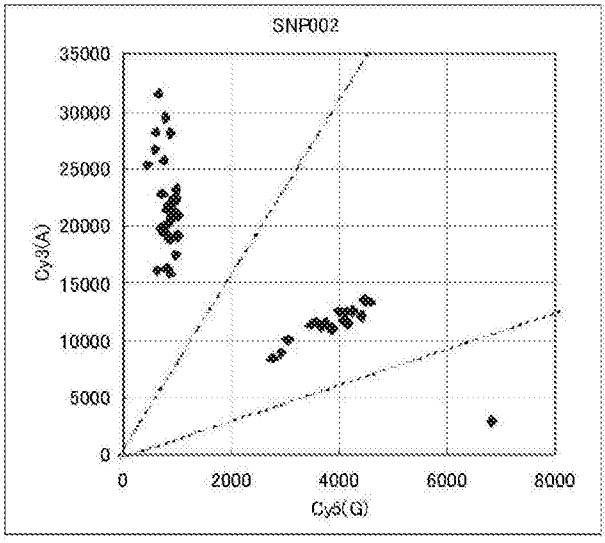


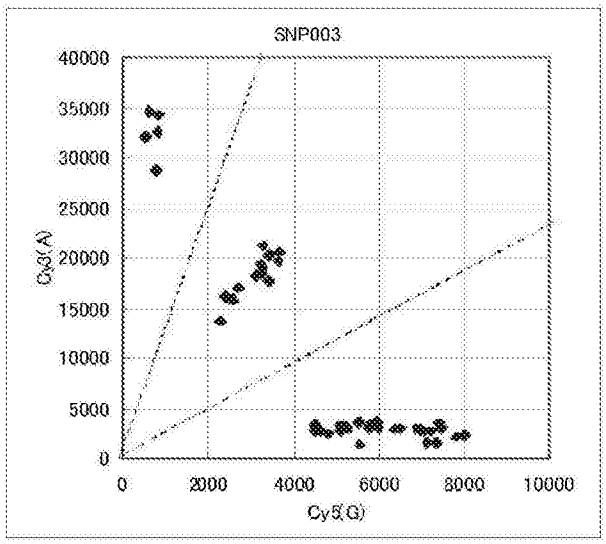
適用される検出形態



[図4]



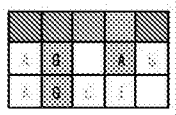
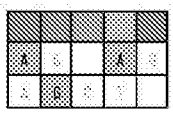
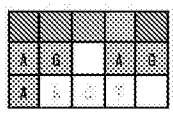
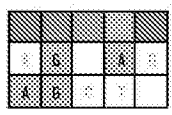
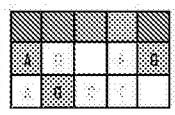
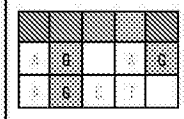
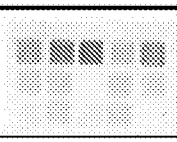
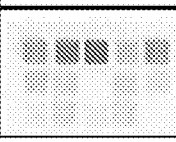
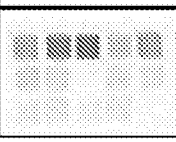
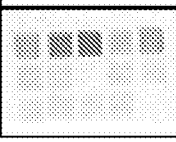
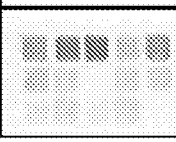
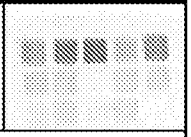
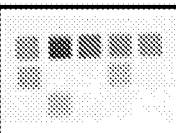
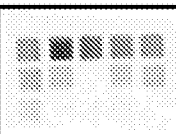
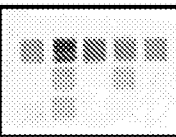
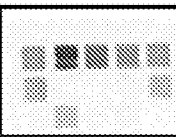
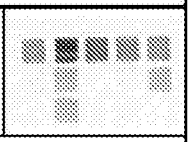




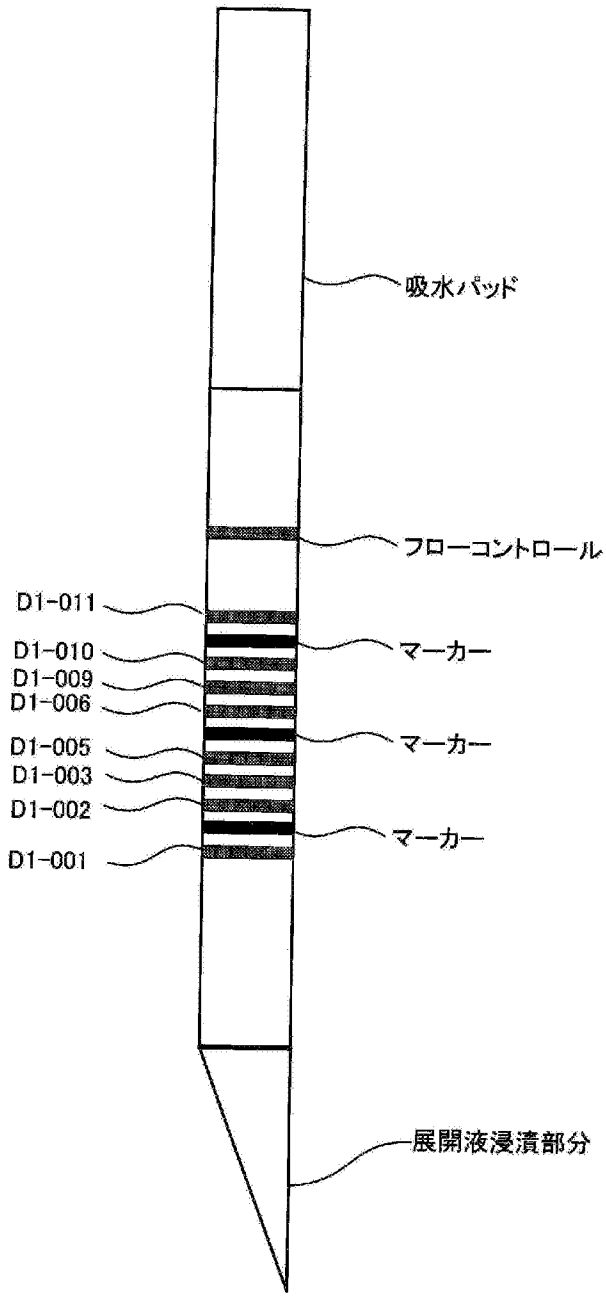
[図5]

D1-100	マーカー1	マーカー2	マーカー3	D1-100
D1-001	D1-002	D1-003	D1-005	D1-006
D1-009	D1-010	D1-011	D1-012	D1-014

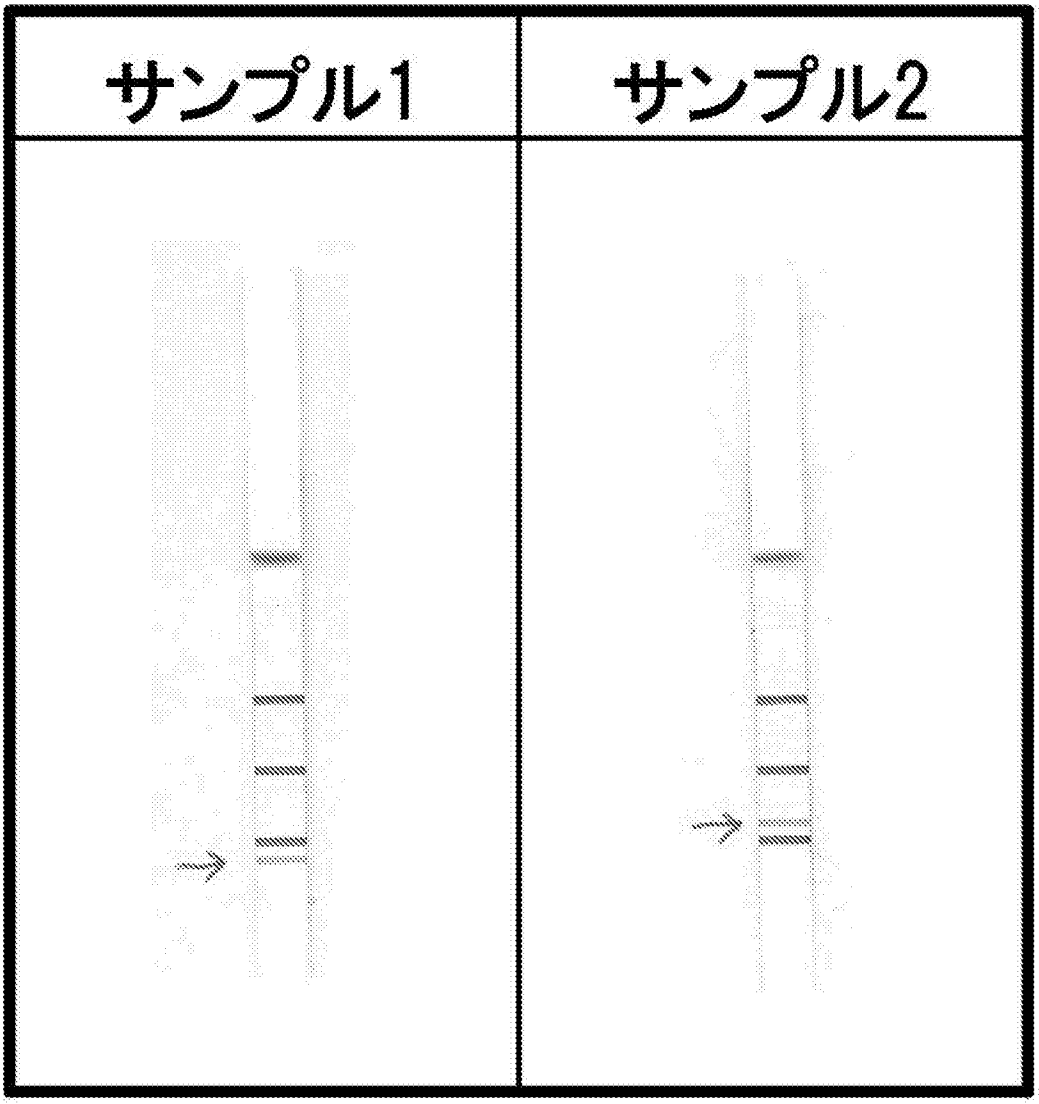
[図6]

サンプル	1	2	3	4	5	6
発色位置						
参考例2 結果画像						
参考例2 S/N	＜5					
実施例1 結果画像						
実施例1 S/N	＞50					

[図7]

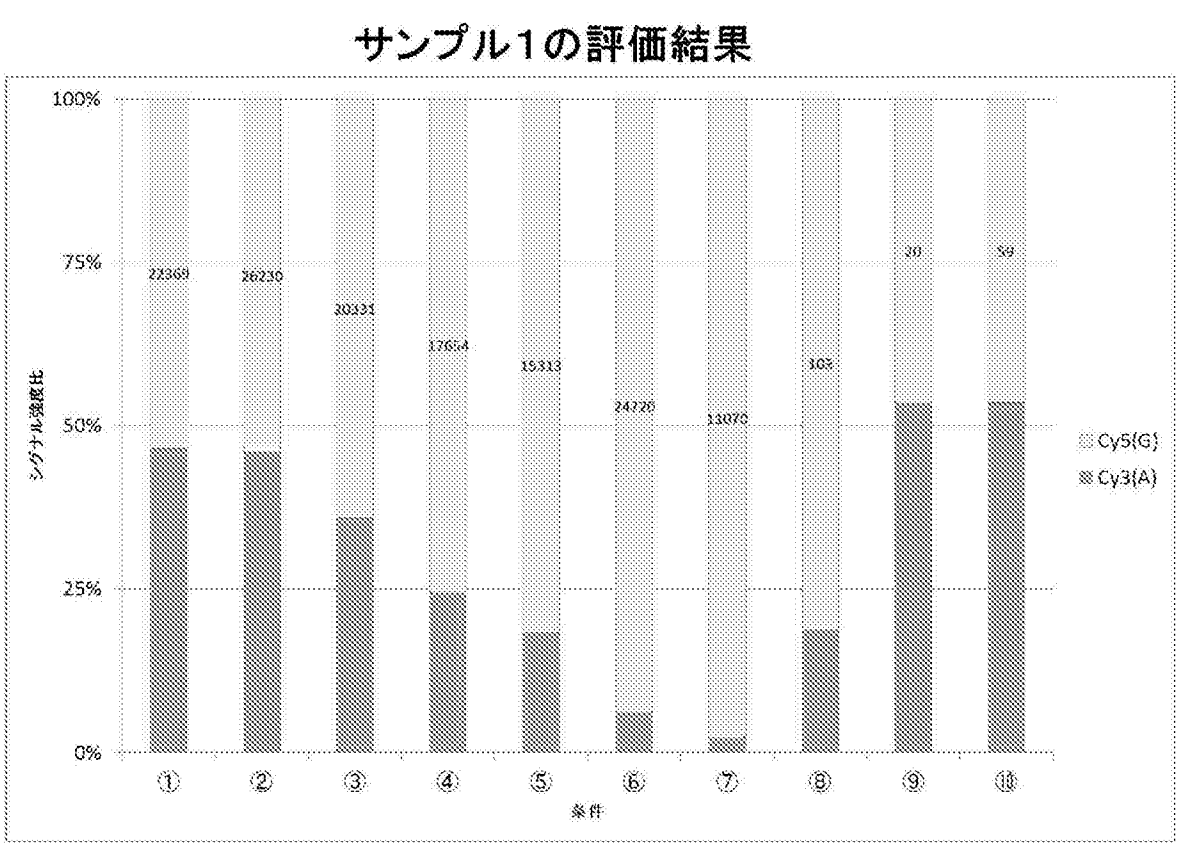

吸水パッド
フローコントロール
D1-011
D1-010
D1-009
D1-006
D1-005
D1-003
D1-002
D1-001
マーカー
マーカー
マーカー
展開液浸漬部分

[図8]

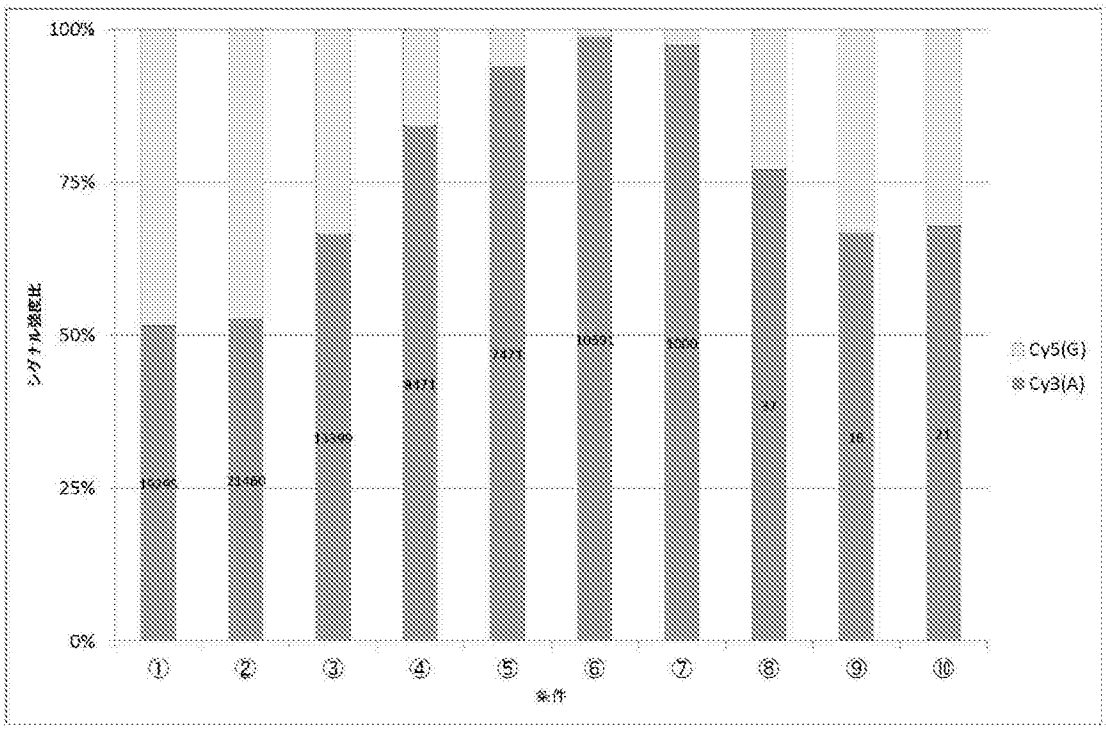


[図9]

(a)


サンプル1の評価結果
100%
75%
50%
25%
0%
シグナル強度比
22369
26230
30331
17654
15313
24220
13070
163
30
59
Cy5(G)
Cy3(A)
①
②
③
④
⑤
⑥
⑦
⑧
⑨
⑩
条件

(b)


サンプル2の評価結果
100%
75%
50%
25%
0%
シグナル強度比
Cy5(G)
Cy3(A)
①
②
③
④
⑤
⑥
⑦
⑧
⑨
⑩
条件

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/055509

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *C12Q1/68*(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)
C12N15/09, C12Q1/68

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed, ScienceDi, rect, CiNii

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	NISHIDA, N. et al., "Further development of multiplex single nucleotide polymorphism typing method, the DigiTag2 assay.", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 2007.05.01, Vol.364, No.1, P.78-85	1,4,6,10 1-15
X Y	NISHIDA, N. et al., "Highly parallel and short-acting amplification with locus-specific primers to detect single nucleotide polymorphisms by the DigiTag2 assay.", PLOS ONE, 2012.01.13, Vol.7, No.1, e29967(P.1-7)	1,4,6,10 1-15

☒ 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	Date of mailing of the international search report
26 May, 2014 (26.05.14)	03 June, 2014 (03.06.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/055509

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 11-511010 A (The Mount Sinai Medical Center of the City University of New York), 28 September 1999 (28.09.1999), entire text & US 5877280 A & EP 832240 A1 & WO 1996/039525 A1	1-15
A	WO 2001/061033 A2 (SCHOUTEN, J.P.), 23 August 2001 (23.08.2001), entire text & US 2003/0108913 A1 & EP 1130113 A1	1-15

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０５５５０９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(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（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１４年

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）

ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ），ＰｕｂＭｅｄ，Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｄｉｒｅｃｔ，ＣｉＮｉｉ

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	関連する請求項の番号
X Y	NISHIDA, N. et al., "Further development of multiplex single nucleotide polymorphism typing method, the DigiTag2 assay.", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 2007.05.01, Vol.364, No.1, P.78-85	1,4,6,10 1-15
X Y	NISHIDA, N. et al., "Highly parallel and short-acting amplification with locus-specific primers to detect single nucleotide polymorphisms by the DigiTag2 assay.", PLOS ONE, 2012.01.13, Vol.7, No.1, e29967(P.1-7)	1,4,6,10 1-15

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

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

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２６．０５．２０１４	０３．０６．２０１４

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　４１５５
野村　英雄
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

C（続き）．　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	関連する請求項の番号
Y	JP 11-511010 A（ザ・マウント・シナイ・メデイカル・センター・オブ・ザ・シテイ・ユニバーシテイ・オブ・ニユーヨーク）1999.09.28, 全文 & US 5877280 A & EP 832240 A1 & WO 1996/039525 A1	1-15
A	WO 2001/061033 A2 (SCHOUTEN, J.P.) 2001.08.23, 全文 & US 2003/0108913 A1 & EP 1130113 A1	1-15