(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3784162号
(P3784162)
(45)発行日　平成18年6月7日(2006.6.7)　(24)登録日　平成18年3月24日(2006.3.24)

(51)Int.Cl.　　F I
C12Q 1/68 (2006.01)　　C12Q 1/68 A
C12N 15/09 (2006.01)　　C12N 15/00 ZNAA

請求項の数 8　(全 23 頁)

(21)出願番号　特願平10-5399
(22)出願日　平成10年1月14日(1998.1.14)
(65)公開番号　特開平11-196874
(43)公開日　平成11年7月27日(1999.7.27)
審査請求日　平成14年9月26日(2002.9.26)

(73)特許権者　000005108
株式会社日立製作所
東京都千代田区丸の内一丁目６番６号
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(72)発明者　神原　秀記
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目２８０番地
株式会社　日立製作所　中央研究所内
(72)発明者　植松　千宗
東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目２８０番地
株式会社　日立製作所　中央研究所内

審査官　森井　隆信

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＤＮＡ断片分析法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

複数のＤＮＡ断片を増幅して分析するＤＮＡ断片分析方法であって、

前記ＤＮＡ断片の少なくとも一方の鎖の3'末端に共通既知オリゴヌクレオチド配列を付加する工程と、

前記共通既知オリゴヌクレオチド配列に相補的な塩基配列を含む第１共通プライマーと、前記ＤＮＡ断片において前記第１共通プライマーがハイブリダイズする端部と異なる端部に相補的な塩基配列を含む第２共通プライマーと、配列既知な遺伝子の塩基配列の一部を含む前記ＤＮＡ断片に特異的にハイブリダイズする特異プライマーとを用い、前記共通既知オリゴヌクレオチド配列が少なくとも一方の鎖の3'末端に付加された前記ＤＮＡ断片を鋳型として増幅反応を行うことにより増幅産物ＤＮＡを得る工程と、

前記増幅産物ＤＮＡを分析する工程とを有し、かつ、

前記第１共通プライマーと前記特異プライマーとから生成される第１の増幅産物ＤＮＡと、前記第１共通プライマーと前記第２共通プライマーとから生成される第２の増幅産物ＤＮＡとは、各々を区別するように標識され、

前記分析する工程では、前記第１の増幅産物ＤＮＡと前記第２の増幅産物とは、前記標識を用いて分析する

ことを特徴とするＤＮＡ断片分析方法。

【請求項２】

前記ＤＮＡ断片は、

ＲＮＡを鋳型に用いて逆転写することにより２本鎖ＤＮＡを合成し、
前記２本鎖ＤＮＡを制限酵素を用いて断片化して得られる
ことを特徴とする請求項１に記載のＤＮＡ断片分析方法。
【請求項３】
前記ＤＮＡ断片の少なくとも一方の鎖の3'末端に共通既知オリゴヌクレオチド配列を付加する工程は、
２本鎖ＤＮＡを制限酵素で切断して前記ＤＮＡ断片を作成し、
前記ＤＮＡ断片に予め定めた塩基配列を有する前記共通既知オリゴヌクレオチド配列をライゲーション反応で付加する
ことを特徴とする請求項１に記載のＤＮＡ断片分析方法。
【請求項４】
前記増幅反応を行う工程では、
前記第１の増幅産物ＤＮＡが、前記配列既知な遺伝子の塩基配列の少なくとも一部を含む断片となり、
前記第２の増幅産物ＤＮＡが、配列未知な遺伝子の塩基配列の少なくとも一部を含む断片となり、
前記配列既知な遺伝子の塩基配列の少なくとも一部を含む断片と、前記配列未知な遺伝子の塩基配列の少なくとも一部を含む断片を、各々を区別するように標識する
ことを特徴とする請求項１に記載のＤＮＡ断片分析方法。
【請求項５】
分析対象とするＤＮＡ断片の少なくとも一方の鎖の3'末端に共通既知オリゴヌクレオチド配列を付加する試薬と、
前記共通既知オリゴヌクレオチド配列に相補的な塩基配列を含む第１共通プライマーと、
前記ＤＮＡ断片において前記第１共通プライマーがハイブリダイズする端部と異なる端部に相補的な塩基配列を含む第２共通プライマーと、
塩基配列が既知な遺伝子の塩基配列の一部を含む前記ＤＮＡ断片に特異的にハイブリダイズする特異プライマーとを含み、
かつ、前記第２共通プライマーと前記特異プライマーとは、各々異なる標識がされている
ことを特徴とするＤＮＡ断片増幅キット。
【請求項６】
前記第１共通プライマーと前記第２共通プライマーとの両方、もしくはいずれかが、
１個以上４個以下の前記塩基配列からなる選択配列を3'末端に有する
ことを特徴とする請求項５に記載のＤＮＡ断片増幅キット。
【請求項７】
前記選択配列が、前記第１共通プライマーに含まれる場合には、前記第１共通プライマーに含まれる、前記共通既知オリゴヌクレオチド配列に相補的な塩基配列に隣接して位置し、かつ、前記第１共通プライマーに含まれる前記相補的な塩基配列の一部が、前記共通既知オリゴヌクレオチド配列と非相補的になるよう変更されており、そして、
前記選択配列が、前記第２共通プライマーに含まれる場合には、前記第２共通プライマーに含まれる、前記ＤＮＡ断片において前記第１共通プライマーがハイブリダイズする端部と異なる端部に相補的な塩基配列に隣接して位置し、かつ、前記第２共通プライマーに含まれる前記ＤＮＡ断片において前記第１共通プライマーがハイブリダイズする端部と異なる端部に相補的な塩基配列の一部が、前記ＤＮＡ断片において前記第１共通プライマーがハイブリダイズする端部と異なる端部と非相補的になるよう変更されている
ことを特徴とする請求項６に記載のＤＮＡ断片増幅キット。
【請求項８】
前記第２共通プライマーと前記特異プライマーとが、各々異なる蛍光体で標識されていることを特徴とする請求項５に記載のＤＮＡ断片増幅キット。

【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明はDNA断片分析法に関し、特に、DNAの比較あるいは遺伝子発現の分析法（全ての遺伝子が生体内でどのように機能しているか調べる手法）に関する。遺伝子は、まずmRNAに転写され、蛋白質に翻訳されて生体内で機能する。そこで、生体中にあるmRNAの種類と量を調べると、種々遺伝子の活動状況がわかる。mRNAは分解されやすいため、DNA に変換してcDNAとして測定することが多い。本発明は、これら活動中の遺伝子全てを一度に調べる遺伝子発現パターンの分析、種々のDNAあるいはRNA混合物に含まれる各断片の存在比の分析、あるいはペプチドやタンパク質の混合物の分析方法に関するものである。とくに蛍光標識を用いたゲル電気泳動による遺伝子発現の測定法およびDNA断片分析法に関するものである。
【０００２】
【従来の技術】
遺伝子あるいはDNAの配列比較を行うにはそれら遺伝子やDNAの配列を決定して比較すればよいのであるが、長いDNAや多数のDNA断片の混合物からなる試料では配列決定が困難である。長いDNAを調べる場合、DNAを断片化し生成した断片のゲル電気泳動パターンを調べることが行われる。また、遺伝子の機能を調べるには、その遺伝子に関連したmRNAの量的変化を調べ、外部から加えた刺激と相関があるかなどを見ていた。これら遺伝子機能の分析は人手と時間を要しあまり沢山の遺伝子について調べることはできなかった。最近、種々計測法および装置の発展に伴い、非常に多くの遺伝子の発現の様子をモニターできるようになってきた。そのひとつはDNAチップを用いる方法である。DNAチップは種々遺伝子に対応したDNAプローブをプローブの種類ごとに区分けして固体表面に固定した素子である。DNAチップを用いる方法では試料のmRNAの相補鎖（cDNA）を合成し、断片化した後に各断片に蛍光標識をつける。これら蛍光標識断片を固体表面に固定されたプローブにハイブリダイズさせる。配列が相補な蛍光標識断片は固体表面に保持され、配列が相補でない蛍光標識断片は洗浄操作で除去される。蛍光顕微鏡を用いて保持された蛍光標識DNA断片の量と位置すなわち対応するDNAプローブの種類を調べる。この情報を用いて発現遺伝子情報を得る試みが報告されている（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10614-10619, 1996）。此の方法は配列既知の遺伝子の発現をモニターするのに適している。
【０００３】
もう一つの発現プロファイルの測定法は、ゲル電気泳動によるものでスキャニング法と呼ばれる方法である。この中にはFDD (Fluorescent Differential Display) (FEBS Letters 351, 231-236, 1994)や末端識別プライマーを用いた方法(Nucleic Acids Research, 1996, 24, 2616-2617, Nucleic Acids Symposium Series, 1996, No.35, 257-258)が含まれる。この電気泳動パターンを用いる方法は遺伝子に対応した特異なプローブがなくても発現の様子を調べることができる。従って、配列未知の遺伝子の発現情報を得ることができる利点がある。スキャニング法はいずれもいくつかのDNA断片に共通に作用する複数のプライマーを用いて試料cDNAあるいはmRNAを鋳型としてPCR反応を行い（多くの場合蛍光標識プライマーを用いる）、得られたPCR産物の電気泳動パターンから遺伝子の発現情報を得るものである。例えば、末端識別プライマーを用いる方法では全てのcDNAからの発現情報を電気泳動パターンで表示することができる。この方法では、2本鎖cDNAを制限酵素で切断する。DNA断片末端の切断部に既知配列を持つオリゴマーを導入する。cDNAの3'末端には通常ポリA鎖が存在している。このポリA鎖と導入されたオリゴマーとで挟まれる塩基配列はそれぞれのcDNAに特異的であると考えられるので，此の部分のDNA断片をcDNAを代表するあるいは識別する部分として計測する。その結果、発現している各cDNAの種類と量を知ることができる。計測する場合にはオリゴdTプライマーと導入されたオリゴマーに相補的なプライマーを用いてPCR反応(Polymerase Chain Reaction)によりDNAの断片数を装置の検出感度以上に増幅してから行う。このとき、少なくともどちらかのプライマーを蛍光標識しておき、蛍光式DNAシーケンサー等の装置を用いて計測する。実際には、この断

片数は非常に多く、一つの電気泳動レーンでは区別して計測できない。このため、全ての上記代表断片をいくつかのグループに分け、一つのグループ内のDNA断片数を十分分離計測できる程度に減らしてからゲル電気泳動を行う。これには、PCRプライマーの3'末端に2塩基からなる選択配列を付加したプライマーを用いる。断片の末端2塩基がこの選択配列に相補な断片だけが増幅される。2塩基の選択塩基を持つプライマーセット2組から任意の2つのプライマーの組み合わせからなるグループができる。各グループの電気泳動パターンに現れるDNA断片を合わせると全ての発現している遺伝子に関する情報が得られる（特開平9-149799）。

【０００４】

【発明が解決しようとする課題】

以上、現在提案されているDNA断片比較法と遺伝子発現情報取得方法について紹介したが、実用面ではいろいろ問題がある。DNA断片比較法では電気泳動分離パターンを比較する必要があり、厳密な比較が困難である。遺伝子発現情報取得方法のうち、DNAチップを用いる方法では、DNAチップを誰でもが簡単に作れないこと、および、配列既知の遺伝子の発現しかモニターできないことなどが難点である。一方、電気泳動による遺伝子発現モニター方法では，観測されるDNA断片の長さをコントロールできないことや、種々遺伝子をグループ分けする際、遺伝子がどのグループに入るかは遺伝子の種類あるいは発現量の大小により変える事ができない。このため、発現量の大きな遺伝子由来のDNA断片の電気泳動信号の近くに発現量の少ない遺伝子由来のDNA断片があると信号が埋もれて計測できない難点が生じる。また、測定の必要無いDNA断片に由来した信号も観測されるので、得られる電気泳動パターンが複雑になる難点がある。さらに、既知遺伝子に由来した信号も未知遺伝子に由来した信号も区別無く現れるので未知遺伝子に関する情報を得ようとするときに手間がかる難点がある。

【０００５】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記難点を解決するために鋭意努力した結果、試料中の種々のDNA断片を増幅させるための共通プライマーのセットに加えて、配列が既知の遺伝子またはその一部を含むDNA断片に特異的にハイブリダイズする特異プライマーを用いて、DNA断片を増幅するにあたって、前記の共通プライマーのセットによる増幅で得られるべき増幅産物を短断片化するように前記の特異プライマーを設計し、かつ共通プライマーと特異プライマーとを異なる標識体を用いて標識するか、あるいは共通プライマーと特異プライマーのうち片方だけを標識することにより、前記の配列が既知の遺伝子の情報と配列が未知の遺伝子の情報とを区別し、かつ総合的な遺伝子情報をモニターすることに成功し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、複数のＤＮＡ断片を含む試料の分析方法であって、以下の工程：

【０００６】

ＤＮＡ断片の各々の少なくとも一つの末端に、共通の既知オリゴヌクレオチド配列を付加する工程、

前記の共通の既知オリゴヌクレオチド配列あるいは末端に導入したオリゴヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含む第１共通プライマー、前記の複数のＤＮＡ断片のすべてまたはいくつかに共通に存在する既知のヌクレオチド配列あるいは末端に導入したオリゴヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む第２共通プライマー、および配列が既知の遺伝子またはその一部を含むＤＮＡ断片に特異的にハイブリダイズする特異プライマーを用い、前記の共通の既知オリゴヌクレオチド配列が末端に付加されたＤＮＡ断片を鋳型として増幅反応を行って、増幅産物ＤＮＡを得る工程、および

前記の増幅産物ＤＮＡを分析して、前記のＤＮＡ断片に関する情報を得る工程を含み、ここで、

前記の第１共通プライマーおよび第２共通プライマーのセットによる増幅で得られるべき増幅産物ＤＮＡを短断片化するように、前記の特異プライマーが設計されており、かつ

前記の第１共通プライマーおよび第２共通プライマーのセットによる増幅で得られる増幅

産物ＤＮＡと、前記の第１共通プライマーおよび特異プライマーのセットによる増幅で得られる増幅産物ＤＮＡとを区別できるような様式で、これらの増幅産物ＤＮＡを標識することによって、前記の配列が既知の遺伝子またはその一部を含むＤＮＡ断片に関する情報を他のＤＮＡ断片に関する情報と区別できるようにする前記の方法を提供する。

【０００７】

複数のＤＮＡを含む試料としては、脳、肝臓、皮膚、腸、胃、各種ガンなどの組織、肝細胞、白血球、膵臓などの細胞から抽出したmRNAから逆転写反応により作製したcDNAを含む溶液、およびゲノムDNAを切断して断片化した溶液などを挙げることができる。通常、ゲノムDNAは長すぎて直接分析することが困難であるため、切断して断片化した後に分析を行うことが多い。DNAの切断には、制限酵素を用いることができ、利用可能な制限酵素としては、classII およびclassIISの種々エンドヌクレアーゼ、より具体的には文献 Molecular Cloning に記載の種々酵素でEcoRI 、PstI、HhaI、NlaIII、BspMI 、FokI、他、などを挙げることができる。

【０００８】

断片化したDNAの末端には、共通の既知オリゴヌクレオチド配列を付加する。共通の既知オリゴヌクレオチド配列は、塩基数10～30、好ましくは、塩基数15～25の既知の配列であるとよく、このような配列としては、以下のものを用いることができる。

univ.: GTTTTCCCAGTCACGAC（配列番号１）、rev.: CAGGAAACAGCTATGAC （配列番号２）、
T3: ATTAACCCTCACTAAAG （配列番号３）、T7; AATACGACTCACTATAG （配列番号４）、
KS: CGAGGTCGACGGTATCG （配列番号５）、SK: TCTAGAACTAGTGGATC （配列番号６）
PA: TCTCCAAAAAAAAAAAAAAA（配列番号７）、PT: TGTGGTTTTTTTTTTTTTTT（配列番号８）

これらの既知オリゴヌクレオチド配列は、断片化したDNAの二本の鎖の片方または両方の片側または両側の末端に付加する。付加は、ライゲーションにより行うことができる。

【０００９】

DNAの断片化のためにclassIIS制限酵素（FokI、BspMI 、BsmAI 、BsmFIなど）を用いた場合には、この制限酵素による切断で一本鎖DNA末端が生じるので、この末端配列と同じ塩基数かそれより塩基数の１個少ない任意配列（任意の塩基の組み合わせからなる）を末端に付加した共通の既知オリゴヌクレオチド配列を用いてライゲーションを行うとよい。この任意配列が、classIIS制限酵素による切断で生じた一本鎖DNA末端の配列に相補的でなければ、ライゲーションが起こらない。従って、このライゲーションによって、DNA断片のグループ分け（選別）をすることができる。

【００１０】

第１共通プライマーは、前記の共通の既知オリゴヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。

第２共通プライマーは、前記の複数のＤＮＡ断片のすべてまたはいくつかに共通に存在する既知のヌクレオチド配列あるいは末端に導入したオリゴヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む。複数のＤＮＡ断片のすべてまたはいくつかに共通に存在する既知のヌクレオチド配列の典型的な例としては、ポリＡ配列を挙げることができる。このほかにも、ＤＮＡ断片の末端にポリＡ鎖を付加して用いてもよい、また、ライゲーションでＤＮＡ断片の両側にオリゴマーを付加してこの片方を用いてもよい。

【００１１】

第１共通プライマーおよび／または第２共通プライマーは、１～４個、好ましくは、１～３個の塩基からなる選択配列を3'末端に持っていてもよい。選択配列を構成する塩基は、 A、 C、 G、 Tから任意に選ぶことができる。このような選択配列を持つプライマーを用いれば、末端の塩基または塩基配列がこの選択配列に相補的なDNA 断片だけが増幅されるので、その結果、DNA断片をグループ分け（選別）しつつ、増幅させることになる。通常、１つの試料から得られるDNA断片の数は非常に多く、一つの電気泳動レーンで区別して計測することは困難であるので、このようなグループ分けにより、電気泳動の１レーン当たりのDNA断片の数を減らし、分析の分解能を向上させることができる。

【００１２】

また、選択配列によるグループ分けの能力（選別能）を向上させるために、第１共通プライマーにおける選択配列を前記の共通の既知オリゴヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列に隣接させ、該相補的ヌクレオチド配列の一部の塩基を前記の共通の既知オリゴヌクレオチド配列にミスマッチする塩基に変更するとよい。同様に、第２共通プライマーにおける選択配列を前記の複数のＤＮＡ断片のすべてまたはいくつかに共通に存在する既知のヌクレオチド配列あるいは末端に導入したオリゴヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列に隣接させ、該相補的ヌクレオチド配列の一部の塩基が、前記の複数のＤＮＡ断片のすべてまたはいくつかに共通に存在する既知のヌクレオチド配列あるいは末端に導入したオリゴヌクレオチド配列にミスマッチする塩基に変更するとよい。

【００１３】

特異プライマーは、配列が既知の遺伝子またはその一部を含むＤＮＡ断片に特異的にハイブリダイズする。この特異プライマーは、第１共通プライマーおよび第２共通プライマーのセットによる増幅で得られるべき増幅産物ＤＮＡを短断片化するように設計される。第２共通プライマーがハイブリダイズするＤＮＡ鎖と同じＤＮＡ鎖にハイブリダイズし、かつ、第１共通プライマーおよび第２共通プライマーのセットによる増幅で得られる増幅産物ＤＮＡの内部配列にハイブリダイズするように、特異プライマーを設計し、前記の第１共通プライマーおよび第２共通プライマーのセットによる増幅で得られる増幅産物ＤＮＡより鎖長の短い増幅産物ＤＮＡが前記の第１共通プライマーおよび特異プライマーのセットによる増幅で得られるようにするとよい。また、特異プライマーを第２共通プライマーと異なる蛍光体で標識しておくとよい。よく知られているように、PCR増幅では、同じ配列部分を増幅する異なるプライマーセットがあった時、生成物の長さが短い方が優先して生成するので、既知遺伝子に由来するDNA断片が短断片化するように設計された特異的プライマーを加えられたDNA断片は、他のDNA断片と異なる蛍光体で標識されたDNA断片として優先的に生成物中に現れる。配列が既知の遺伝子群としては、ハウスキーピング遺伝子群などをあげる事ができる。

【００１４】

本発明の方法において、１または２種類以上の特異プライマーを用いることができる。２種類以上の特異プライマーを用いる場合には、これらの特異プライマーは互いに異なる遺伝子を含むＤＮＡ断片に特異的にハイブリダイズし、かつ互いに異なる蛍光体で標識されているとよい。

第１共通プライマー、第２共通プライマー、および特異プライマーを用い、共通の既知オリゴヌクレオチド配列が末端に付加されたＤＮＡ断片を鋳型として増幅反応を行って、増幅産物ＤＮＡを得る。

【００１５】

増幅反応は、まず、第１共通プライマーおよび第２共通プライマーのセットを用いて行い、次いで、第１共通プライマーおよび特異プライマーのセットを用いて行ってもよい。増幅反応は、DNAを増幅させることができるいかなる反応であってもよいが、PCRが好ましい。前記のプライマーを蛍光標識して用いて増幅反応を行い、増幅産物ＤＮＡのゲル電気泳動パターンを蛍光検出することにより、ＤＮＡ断片に関する情報を得ることができる。実時間蛍光検出で泳動中のＤＮＡを計測することもできる。

【００１６】

本発明の方法においては、第１共通プライマーおよび第２共通プライマーのセットによる増幅で得られる増幅産物ＤＮＡと、第１共通プライマーおよび特異プライマーのセットによる増幅で得られる増幅産物ＤＮＡとを区別できるような様式で、これらの増幅産物ＤＮＡを標識する。第１共通プライマーおよび第２共通プライマーのセットによる増幅で得られる増幅産物ＤＮＡのみを標識してもよいし、あるいはまた、第１共通プライマーおよび第２共通プライマーのセットによる増幅で得られる増幅産物ＤＮＡと、第１共通プライマーおよび特異プライマーのセットによる増幅で得られる増幅産物ＤＮＡとを、異なる標識体で標識してもよい。後者の場合には、第１共通プライマーおよび第２共通プライマーのセットによる増幅で得られる増幅産物ＤＮＡと、第１共通プライマーおよび特異プライマ

ーのセットによる増幅で得られる増幅産物ＤＮＡとを発光波長の差で識別しながら計測することができる。増幅産物の標識は、プライマーを標識することによって行うことができる。また、発現量の多い遺伝子またはその一部を含むDNA断片は発光強度の小さい蛍光体で標識し、発現量の小さな遺伝子またはその一部を含むDNA断片は発光量の大きな蛍光体で標識して、両者を同時にモニターできるようにするとよい。

【００１７】

別の見地からすると、本発明は、複数のＤＮＡ断片を含む試料から配列が未知の遺伝子を含むＤＮＡ断片を単離する方法であって、以下の工程：

ＤＮＡ断片の各々の少なくとも一つの末端に、共通の既知オリゴヌクレオチド配列を付加する工程、

前記の共通の既知オリゴヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む第１共通プライマー、前記の複数のＤＮＡ断片のすべてまたはいくつかに共通に存在する既知のヌクレオチド配列あるいは末端に導入したオリゴヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む第２共通プライマー、および配列が既知の遺伝子またはその一部を含むＤＮＡ断片に特異的にハイブリダイズする特異プライマーを用い、前記の共通の既知オリゴヌクレオチド配列が末端に付加されたＤＮＡ断片を鋳型として増幅反応を行って、増幅産物ＤＮＡを得る工程、および

前記の増幅産物ＤＮＡから、配列が未知の遺伝子を含む増幅産物ＤＮＡを分離する工程を含み、ここで

前記の第１共通プライマーおよび第２共通プライマーのセットによる増幅で得られるべき増幅産物ＤＮＡを短断片化するように、前記の特異プライマーが設計されており、かつ

前記の第１共通プライマーおよび第２共通プライマーのセットによる増幅で得られる増幅産物ＤＮＡと、前記の第１共通プライマーおよび特異プライマーのセットによる増幅で得られる増幅産物ＤＮＡとを区別できるような様式で、これらの増幅産物ＤＮＡを標識することによって、前記の配列が既知の遺伝子またはその一部を含む増幅産物ＤＮＡと、配列が未知の遺伝子を含む増幅産物ＤＮＡとの分離を容易にする前記の方法を提供する。

【００１８】

本発明の分析方法およびＤＮＡ断片の単離方法を実施するための装置を図１０に示す。この装置は、ゲルをつめたキャピラリーアレー分析部２１８、分離されたＤＮＡ断片をシースフロー中に抜き出してレーザー照射２１０し、蛍光発光を得るシースフローセル部２１９、得られる点線状蛍光像を検出する二次元検出器２０９、およびデータ処理システム２１１からなる。タイタープレート２１７に保持された試料はキャピラリーアレー中に電界により導入される。電気泳動分離されたＤＮＡ断片はシースフローセル中に溶出された後、移送管２０８から排出される。点線状の発光点から出た蛍光２５０は像分割プリズム２２１および色分離フィルター２２２をとおり検出器２０９上に二本の色分解された線状蛍光画像として結像し検出される。この二本の蛍光像はそれぞれ異なる蛍光体からの発光に対応するものであるが、発光波長がこれら蛍光体で重なる領域がある場合には、重なり部分の蛍光強度を差し引き処理して、各蛍光体からの信号強度を得る。ＤＮＡ断片を配列未知のｃＤＮＡからの断片と、配列既知のｃＤＮＡ断片からのものとで異なる蛍光体で標識し、各蛍光体からの信号強度の比を比較計測することで未知遺伝子に関する発現情報だけを抜き出すことなどができる。この種の演算処理は、データ処理装置２１１を用いて実行することができ、さらに、当該演算処理の結果を表示器２１２に表示させることができる。表示器２１２によってＤＮＡ情報がモニターされている様子は図８に示されている。また、この演算処理の結果に基づいて標本採取台２１５を移動させて標本容器２１６を交換し、二つのＤＮＡ断片（例えば、配列未知のｃＤＮＡからのものと配列既知のｃＤＮＡ断片からのもの）を分別して採取することができる。分取の必要がなければ、試料採取部Ｃを除いてもよい。

【００１９】

また、本発明は、１セットの共通プライマー、および該共通プライマーセットによる増幅で得られるべき増幅産物ＤＮＡを短断片化するように設計された特異プライマーを含むこ

とを特徴とする試薬を提供する。
さらに、本発明は、１セットの共通プライマー、および該共通プライマーセットによる増幅で得られるべき増幅産物ＤＮＡを短断片化するように設計された特異プライマーを含むことを特徴とする試薬キットを提供する。この試薬キットにおいて、試薬を構成する要素は、各々あるいは組み合わせてあるいはひとまとめにして、バイアル，チューブなどのような容器に包含されていてもよく、さらに、それらの容器はひとまとめにして納めるための区画化された担持手段に納められていてもよい。
上記のような試薬および試薬キットは、上記のような、複数のＤＮＡ断片を含む試料の分析方法、複数のＤＮＡ断片を含む試料から未知の遺伝子を含むＤＮＡ断片を単離する方法などに利用することができる。

【００２０】
【発明の実施の形態】
以下、本発明を実施例を用いて具体的に説明する。
〔実施例1〕
図1は本発明による発現遺伝子モニターの概念をフローチャートで示したものである。試料mRNA1（mRNA混合物）をポリT配列を持つオリゴマー10を表面に固定化したタイタープレート11などの固相上に捕獲する。その後、オリゴマー10をプライマー、mRNA1をテンプレートとした相補鎖合成反応を行い2本鎖cDNA2を得る。もちろん2本鎖cDNAを得るための操作は液相で行い、その後必要に応じて得られた2本鎖cDNAを固相にトラップしてもよい。2本鎖cDNA2を制限酵素により切断し、切断部にライゲーション反応により既知配列のオリゴマー12を結合する。ポリT配列を持つオリゴマー10を用いて2本鎖cDNA2を合成したため、2本鎖cDNA2はポリT配列に相補なポリA配列9を有している。ポリT配列とこのオリゴマー12で挟まれたcDNA断片4以外のcDNA断片5を洗浄除去する。これにより各cDNA2（mRNA1）を代表するcDNA断片群4を得る。
【００２１】
発現遺伝子モニターは得られたcDNA断片群4の種類と量を調べる事により試料mRNA1に関する情報を得るのが目的である。しかし、これらポリA配列と既知配列オリゴマー12で挟まれたcDNA断片群4は検出感度に満たないことがほとんどであるのでPCR反応(Polymerase Chain Reaction) によりコピー数を増やした後に分析される。分析にはゲル電気泳動が用いられるが、mRNAの種類は非常に多く（数千から数万種が分析対象）、一度に全体の電気泳動エレクトロフェログラムを測定すると、エレクトロフェログラム中に多くのDNA断片に由来するピークがあらわれ、分離できずにエレクトロフェログラムはスメアになってしまう。そこでPCR増幅に用いるプライマーを工夫しDNA断片群をグループ分けして一つのグループ内にあまり多くの断片が含まれないようにする。すなわち、PCR反応に用いるプライマーの3'末端側に2塩基からなる選択配列をつけ、選択配列とハイブリダイズしないDNA断片は増幅されないようにする。既知配列オリゴマー12とハイブリダイズするプライマー13は既知配列オリゴマー12と相補な配列と2塩基からなる選択配列14から構成されている。プライマー13の選択配列14は2塩基からなる全ての配列であるので、プライマー13は4x4=16通りのプライマーから構成されることになる。ポリA配列9とハイブリダイズするプライマー15はポリA配列と相補なポリT配列と2塩基からなる選択配列16から構成されている。プライマーセット15の選択配列16の1塩基目はT以外の塩基を用いるので選択配列16は3x4=12通りとなり、プライマーセット15は12通りのプライマーから構成されることになる。
【００２２】
プライマーセット13、15から選ばれた任意のプライマーは、末端の選択配列部分がハイブリダイゼーションの相手方に完全に相補的でないときには相補鎖合成は起こらないか、僅かしかおこらない。図2は相補鎖合成が起こるか否かを模式的に示した図である。プライマー20はDNA断片24の末端に導入されたオリゴマー23に相補な配列21と、2塩基からなる選択配列22から構成されている。プライマー20と末端にオリゴマー23を導入されたDNA断片24が2本鎖を形成した際に、ミスマッチなくハイブリダイズした状態30では、相補鎖合成反応は進行する。しかし、プライマー20と末端にオリゴマー23を導入されたDNA断片24が2本

鎖を形成した際に、選択配列22にミスマッチがある状態31では相補鎖合成反応は進行しない。プライマーの種類によってはこの選択能を向上させるために、DNA断片24の末端に導入されたオリゴマー23に相補な配列21にミスマッチを形成する塩基25を故意に導入して、末端部分のミスマッチにより敏感に相補鎖伸長の阻害が起こるようにする場合32もある。この特性を利用してDNA断片のグループ分けを行う。

【００２３】

図1においてプライマーセット13、15からそれぞれから1種類ずつのプライマーを選びPCR反応に用いる。このうちポリA配列にハイブリダイズするプライマー15からのプライマーを蛍光体A17で標識しておき、得られた蛍光標識PCR産物6のゲル電気泳動パターンを測定し、観測されるDNA断片の断片長とその蛍光強度から種々mRNAの種類と量を知ることができる。この方法で原理的にはすべてのmRNAに由来するDNA断片を計測する事ができる。

【００２４】

しかし、観測される断片の長さは制限酵素の切断部の位置で決定されてしまう。本発明の特徴は図1のフローに示したようにDNA断片群4に共通のプライマーセット13、15に加えて、各DNA断片に特異的なプライマー19を加えてPCR増幅する事にある。図3に示すようにPCR増幅においては長いDNA断片よりも短いDNA断片が優先的に増幅される。図3において縦軸は相対蛍光強度40、横軸は塩基長41を示している。レーン(a)42は394塩基長のPCR産物が生成するプライマーの組み合わせでPCR反応を行い、電気泳動分離したレーン、レーン(b)43は201塩基長のPCR産物が生成するプライマーの組み合わせでPCR反応を行い、電気泳動分離したレーンである。レーン(c)44は201塩基長と394塩基長の産物が生成するようにプライマーを組み合わせてPCR反応を行い、電気泳動分離したレーンである。レーン(c)では短いPCR産物が優先的に生成している。このためDNA断片の末端にハイブリダイズする2つのプライマーとDNA断片の内部にハイブリダイズするプライマーが共存する条件下でPCR増幅すると、内部にハイブリダイズするプライマーが機能して、短いDNA断片が優先的に生成する。

【００２５】

図1においてDNA断片4の末端にハイブリダイズする2つのプライマー（プライマーセット13と15から選ばれたプライマー）と特定のDNA断片に特異なプライマー19が共存する条件下でPCR増幅する。その結果、短い断片（特異プライマー19とプライマーセット13から選ばれたプライマーで挟まれた領域の断片7）が優先的に生成する。特異なプライマー19を前述の蛍光体A17とは異なる蛍光体B18で標識し、発光波長を分離して計測すると、既知配列を持つ遺伝子に由来するDNA断片と未知配列を持つ遺伝子に由来するDNA断片とを区別しながら計測できる。

【００２６】

図4に得られる結果の一部を示す。50が電気泳動の結果得られたエレクトロフェログラムの一部である。51がPCR反応に用いたプライマーの組み合わせの選択塩基配列、52は塩基長を示している。計測には多色検出可能な実時間蛍光検出型のゲル電気泳動分析装置を用いるが、これには平板ゲルを用いるものとキャピラリー管のなかにゲルをつめて用いるキャピラリーゲル電気泳動、特に多数のキャピラリーを同時に用いるキャピラリーアレーゲル電気泳動が用いられる。ここで得られる電気泳動パターンの中には強度の強いピークや弱いピークがある。この強度が遺伝子発現の大きさに関連しているわけであるが、区別して測定したいピークがたまたま重なったり、大きなピークにかくれて見えないこともある。この場合大きなピークが既知遺伝子に由来するものであれば発光効率の低い蛍光体で標識したり、特異プライマーの配列をずらして他のピークと重ならない様にすることができる。一方、これが未知遺伝子に由来するDNA断片による場合には此の断片は共通配列を持つプライマーによってPCR増幅された断片であるため、長さを変えたり蛍光標識をこの断片だけ変えることはできない。しかし、強度が強い場合にはDNA断片の分取も容易であり、此の断片を分取して配列を決めれば既知遺伝子由来のDNA断片の場合と同様の扱いができる。なお共通プライマーとして2塩基からなる選択配列を用いたが1塩基あるいは3塩基選択のプライマーを用いても良い。

【００２７】
〔実施例2〕
実施例2は未知遺伝子に由来するDNA断片と既知遺伝子に由来するDNA断片を異なる蛍光体で標識し、未知遺伝子に関連するDNA断片のうち、強度がある定められたしきい値より大きな物を分取する例である。実施例1ではDNA断片をグループ分けするために、選択配列を持つPCRプライマーを用いて相補鎖合成反応をコントロールしたが、このグループ分けは他の方法で行っても良い。第２の実施例ではmolecular index法と呼ばれる方法でDNA断片調整した例で説明する。図5に本発明による発現遺伝子モニターの概念をフローチャートで示す。実施例1と同様にして試料mRNA61（mRNA混合物）から二本鎖cDNA62を作製する。2本鎖cDNA62をclass IISの制限酵素を用いて切断する。class IISの制限酵素で切断された2本鎖DNA断片63は4塩基からなる一本鎖DNA末端64を生じる。この1本鎖DNA末端64を糊代として既知配列のオリゴマー70をライゲーション反応で結合する。既知配列オリゴマー70は共通配列部分71と4塩基からなる任意配列部分72から構成されている。このとき糊代となる1本鎖DNA末端64の配列は任意であるから、既知配列オリゴマー70の任意配列部分72は糊代にぴったりと合致するためには、任意の4塩基からなる、4^4=256 通りの任意配列部分72を準備する必要がある。4塩基のうちの3塩基が合致し、残りの1塩基は混合塩基からなる64通りの任意配列部分72を用いてもライゲーション反応は進行するため、この実施例では64通りのオリゴマー70を用意した。

【００２８】
反応液を64分割し、それぞれの反応チューブにそれぞれ64通りのオリゴマーを加えてライゲーション反応を行う。（そのうちの1区分のみを図示している）ライゲーション反応は結合されるDNA同士がミスマッチなく2本鎖を形成していなければ進行しないので、ライゲーション反応が進行するか否かでDNA断片をグループ分けすることができる。こうして得られたDNA断片の中には片側の末端に既知配列オリゴマー70が導入されたDNA断片65と、両末端に既知配列オリゴマー70が導入されたDNA断片66と、片側に既知配列オリゴマー70が導入され、もう一方にはポリA配列を持つDNA断片67とがある。これらの断片65、66、67を鋳型として、共通配列部分71に相補な配列を持つプライマー73と、ポリT配列の先端に1ないし2塩基の選択配列75を持つプライマー74を用いてPCR増幅する。プライマー74には蛍光体A76を標識しておき、PCR産物80が蛍光標識されるようにしておく。得られたPCR産物80のゲル電気泳動分離パターンを測定し、観測されるDNA断片の断片長とその蛍光強度から種々mRNAの種類と量を調べる。この方法で原理的にはすべてのmRNAに由来するDNA断片を計測する事ができる。このとき、実施例1と同様に既知のDNA断片中の配列に相補な配列を持ち蛍光体B78で標識されたプライマー77をPCRプライマーに加えておく。得られたPCR産物の電気泳動分離パターンを測定すると、実施例1の場合と同様に未知配列のDNA断片と既知配列のDNA断片を蛍光で識別検出できる。プライマー77は2本鎖DNA断片のうちプライマー74がハイブリダイズするDNA鎖と同じDNA鎖にハイブリダイズし、かつPCRによりプライマー74で増幅される断片より短い断片を生じるように設計しておく。PCR増幅では短いDNA断片の方が長いDNA断片よりも優先的に増幅されるので、PCR増幅断片80よりも短いDNA断片81が優先的に増幅される。DNA断片81はPCR増幅断片80とは異なる蛍光体78で標識されているので、既知遺伝子由来の断片81とPCR増幅断片80を区別して検出することができる。検出結果から、未知遺伝子に関連するDNA断片のうち、強度がある定められたしきい値より大きな物を分取し、さらなる分析を行うことができる。

【００２９】
〔実施例3〕
実施例3は既知配列からなるDNA断片と未知配列からなるDNA断片を分離した後に電気泳動パターンを得たり、DNAチップを用いて、DNA断片の種類を計測する例である。図6に示すように、実施例1および2と同様にcDNA断片を生成する。すなわち、試料mRNA91（mRNA混合物）から二本鎖cDNA92を作製する。得られた2本鎖cDNA92を制限酵素で切断して、2本鎖DNA断片93を得る。DNA断片93の切断部にライゲーション反応により既知配列オリゴマー100を導入し、末端に既知配列オリゴマー100の導入されたDNA断片94と、片側の末端に既知配

列オリゴマー100もう一方の末端にポリA鎖を持つDNA断片95を得る。

【００３０】

次に、cDNA断片94、95を二つに分け、ひとつは蛍光体101で標識した選択配列102付きオリゴdTプライマー103とビオチン104で標識をした既知遺伝子特異プライマー105を用いてPCR増幅し、cDNA断片94、95のうち既知配列をもつDNA断片を増幅する。PCR増幅後、分子量分画カラムなどによりプライマーを除去し、アビジン付きのビーズ106にPCR合成産物96を捕獲する。熱変性などによりPCR合成産物96を一本鎖とした後、ビーズから遊離する蛍光標識鎖97を種々DNAプローブを固体表面に保持したDNAチップあるいはゲル電気泳動で分析する。これにより、既知配列を持つDNA断片の存在比を知ることができる。

【００３１】

もう半分のcDNA断片94、95をPCR増幅する際、プライマーとして蛍光体101で標識した選択配列102付きオリゴdTプライマー103とビオチン104標識をした既知遺伝子特異プライマー105および既知配列オリゴマー100と相補な配列107と選択配列108からなるプライマー109を用いる。PCR増幅後、分子量分画カラムなどによりプライマーを除去し、プライマー103および105で増幅されたPCR産物96をアビジン付きのビーズ106に捕獲する。残りの溶液中には未知遺伝子由来のDNA断片つまり、プライマー103および109で増幅されたPCR産物111が含まれる（以下未知DNA断片群112と呼ぶ）。ビーズを除去し、ビーズに結合していない未知DNA断片群112を得る。溶液中に存在するDNA断片はほとんどが未知DNA断片群112に由来するものである。この未知DNA断片群112のゲル電気泳動分離パターンを測定する。これにより、未知DNA断片群112の存在比を知ることができる。これら未知配列を持つDNAは分取してその配列を決定し、以後は既知配列のDNA断片として用いる事ができる。これらDNAの分取には先に出願したDNA分取装置（特開平7-181164号）が便利であるが、平板ゲルを用いDNA断片を切り出してとってきても良い。

【００３２】

〔実施例4〕

実施例4は未知DNA断片を自動的に分取してくる例である。本発明の有効な応用例は配列未知の有用な遺伝子断片を自動的に分取することである。遺伝子の発現情報はmRNAの存在比を調べる事で得られる事については既に述べた。活動中の遺伝子に対応するmRNAの量は活動しない時に比べて増加する。従って、どのようなmRNAがどれだけ増えているかを実施例3に記載したような方法によって調べると疾病などに関連する遺伝子の情報を得ることができる。実施例1では活動中の遺伝子のうち既知遺伝子由来のDNA断片だけを発現遺伝子全体から区別して標識したり、未知遺伝子に由来したDNA断片だけを他と区別して標識したりできる事を示した。これをキャピラリーゲル電気泳動と組み合わせて自動的に未知遺伝子断片だけを分取する事ができる。ここで用いる装置は特開平6-174693号および特開平7-181164号等に記載された装置である。

【００３３】

以下発明を図7を用いて説明する。実施例3と同様に試料mRNA121から二本鎖cDNA122を調製し、特定の末端を含むDNA断片群123を作製する。これら小断片には末端に共通のオリゴマー130がついている。この部位にハイブリダイズするプライマー131、132を用いPCR増幅するが二つのプライマー131、132のうち片方のプライマー132に蛍光標識133を付けておくと得られたPCR産物125は蛍光標識されており、蛍光検出装置により容易に検出できる。この生成物中には配列遺伝子に由来する断片と未知遺伝子に由来する断片とがある。ここで得たPCR産物125の一部を取り出し、再度PCR増幅をするが、このとき、既知遺伝子由来のDNA断片に特異的にハイブリダイズし、PCRによりもとのDNA断片よりも短い断片（プライマーの設計によっては同じ長さにもできる）で標識されてない断片を生ずる特異プライマー134を加えておく。このPCRにより既知遺伝子由来のDNA断片からは標識されないもとより短いDNA断片126が生成し、未知遺伝子由来のDNA断片からは元の断片長の蛍光標識された断片125が生成する。（もちろん、既知配列断片を増幅する特異プライマーを異なる蛍光体で蛍光標識しておいてもよい。）これを図8に示した実時間蛍光検出型ゲル電気泳動装置により分離する。この実時間蛍光検出型ゲル電気泳動装置は電気泳動装置140と電気泳動

装置からの信号を処理するためのコンピュータ141、モニター142から構成されている。電気泳動装置140はDNA試料149を分離するゲル分離部145、電気泳動分離されたDNA断片を励起するためのレーザー源146、レーザー源146からのレーザービーム147によって励起されたDNA断片からの蛍光信号を検出するための検出カメラ148から構成されており、検出カメラ148を通して得られた信号はコンピュータ141に送られ、信号処理されモニター142に表示される。

【００３４】

電気泳動分離されたDNA断片は図8に示しているように電気泳動終点近傍ではなく、ゲルから泳動溶液中に溶出された後にレーザー照射してDNA断片を検出しても良い。この場合検出されるのは未知遺伝子に由来したものばかりであり、蛍光信号が定められたしきい値を超えるものを分取する。これは、標準サンプルと検査体とを異なる蛍光体で標識して蛍光信号の差をとるよりも簡単である。以上示したように本実施例の目的は未知遺伝子に由来する断片だけを取り出し配列解析していくこと、あるいは、新しい機能を持った遺伝子を見つけていくことである。

【００３５】

〔実施例5〕

実施例5は異なる複数の試料中に発現している遺伝子の組成の違いを調べる例である。例えば、異なる組織から取り出したcDNA試料などで、組織の違いによる遺伝子発現の違いを調べる例である。以下、図9を用いて説明する。試料調製の時に組織Aから抽出したmRNA151を二本鎖cDNA152に変換し、二本鎖cDNA152を制限酵素で切断してcDNA断片群153を得る。cDNA断片群153に既知配列オリゴマー160を導入して、末端に既知配列をもつcDNA断片群154を得る。また別の組織Bから抽出したmRNA155も同様に二本鎖cDNA156へ変換し、制限酵素で切断してcDNA断片群157を得る。cDNA断片群157には先ほどの既知配列オリゴマー160とは配列の異なる既知配列オリゴマー161を導入し、末端に既知配列を持つcDNA断片群158を得る。次にcDNA断片群154と158を混合し、PCR増幅に用いるテンプレートとする。cDNA断片群154を増幅するプライマーとしてオリゴdT配列と2塩基からなる選択配列162を持つプライマー163と既知配列オリゴマー160に相補な配列164と2塩基からなる選択配列165を持つプライマー166を用意する。cDNA断片群158を増幅するプライマーとしてプライマー163と既知配列オリゴマー161に相補な配列167と2塩基からなる選択配列168を持つプライマー169を用意する。プライマー163、166、169はいずれもPCR増幅産物を電気泳動分離する際に泳動パターンが複雑にならないように、一度に増幅されるDNA断片の種類を少なくするための選択配列を持っている。また、cDNA断片群154と158から増幅される産物を区別するために、プライマー166、169はそれぞれ異なる蛍光体171、172で標識されている。さらに既知遺伝子に由来するDNA断片を増幅するためのプライマー173を用意する。プライマー173は171、172いずれとも異なる蛍光体174で標識されている。プライマーセット163、166、169から選ばれた3つのプライマーとプライマー173を混ぜてPCR反応を行う。得られた増幅産物を電気泳動分離しエレクトロフェログラムを測定するのであるが、測定の際には蛍光波長を識別して計測を行う。種々の選択配列をもつプライマーの組み合わせでPCR増幅してそれぞれの電気泳動分離パターンを調べることでほとんど全ての遺伝子の発現情報を得ることができる。PCR増幅産物181、182、183はそれぞれ異なる蛍光体で標識されるため、それぞれの波長を識別して検出することができる。以上のように、前の実施例と同じように、特異プライマー173をいれることで未知遺伝子に由来するDNA断片と既知遺伝子由来のDNA断片、あるいは注目しているDNA断片とそうでないDNA断片とを区別して調べることができる。また、本発明の方法を用いれば、２種類以上の異なる試料を混合して分析にかけても、それぞれの試料に由来する遺伝子の情報を区別して得ることができるので、２種類以上の異なる試料の遺伝子情報の正確な比較もできる。

【００３６】

図10に本実施例を実施するために用いた装置を示す。装置は試料分析部A、試料検出部B、試料採取部Cからなる。試料供給台217に保持された試料はゲルを詰めたキャピラリーアレー泳動管218に電界注入される。電気泳動分離された試料はシースフローセル219中で励起

用光源204から発せられた励起光210によってレーザー照射され、蛍光250を発光する。蛍光250は像分割プリズム221および色分離フィルター222を通り、二次元検出器209上に2～4つに色分離された蛍光画像として結像し検出される。この色分離された蛍光画像はそれぞれ異なる蛍光体からの発光に対応するものである。シースフローセル219中の試料は、液溜220から緩衝液糟205への緩衝液の流れによってキャピラリー型試料移送管208から試料採取部Cへ移送される。本実施例では異なる組織由来の遺伝子からの信号が異なる蛍光体からの信号として得られる。また未知遺伝子からの信号と既知遺伝子からの信号も異なる蛍光体からの信号として得られる。このため、各蛍光体の信号強度の比を比較検討することで、組織特異的に発現している遺伝子の情報や、未知遺伝子に関する発現情報だけを抜き出すことができる。この比較検討処理は図10に示すデータ処理装置211を用いて実行し、その当該演算処理結果をモニター212に表示させる。この処理結果を採取台制御装置213に転送し、採取台移動装置214を駆動させ、標本採取台215を移動させて標本容器216を交換し、組織特異的に発現している遺伝子由来のDNA断片や、未知遺伝子由来のDNA断片を分取する。

【００３７】

図11に試料としてヒトの肝臓組織細胞、脳細胞から抽出したmRNAを分析して得られた結果の一部を示す。ヒトの肝臓組織細胞、脳細胞から文献Molecular Cloning記載のグアニジンチオシアネート法によってRNAを抽出した。得られたRNAにフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿、オリゴdTカラム精製を順次行い蛋白質画分や塩を除いた後に、mRNAを得た。得られたmRNAからオリゴdTプライマーを用いて文献Molecular Cloning記載のGubler and Hoffman法によりcDNAを調製し、得られたcDNAを制限酵素MboIで切断した。肝臓組織細胞由来のcDNA断片には配列ATTAACCCTCACTAAAG（配列番号２）からなる既知配列オリゴマーT3をライゲーション反応により導入し、脳細胞由来のcDNA断片には配列AATACGACTCACTATAG（配列番号４）からなる既知配列オリゴマーT7をライゲーション反応により導入した。次にこれら既知配列オリゴマーを導入したcDNA断片を混ぜ合わせてPCR反応を行った。PCR反応には、どちらの組織由来のcDNA断片にも共通のプライマーとして配列TTTTTTTTTTTTTTTMN（MはA，C，Gのいずれか、NはA，C，G，Tのいずれかの塩基）（配列番号９）のプライマー、肝臓組織細胞由来のcDNA断片を増幅するプライマーとして配列ATTAACCCTCACTAAAGGATCXY（X，YはA，C，G，Tのいずれかの塩基）（配列番号１０）であり蛍光体JOEで標識したプライマー、脳細胞由来のcDNA断片を増幅するプライマーとして配列AATACGACTCACTATAGGATCXY（X，YはA，C，G，Tのいずれかの塩基）（配列番号１１）であり蛍光体FAMで標識したプライマーを用いた。インシュリンやβアクチンなどの既知遺伝子を増幅するプライマーとして配列TAGTTGCAGTAGTTCTCCAG（配列番号１２）や配列TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA（配列番号１３）でありそれぞれ蛍光体ROXで標識したプライマーを用いた。電気泳動マーカーとして蛍光体TAMRAで標識した分子量マーカーをPCR反応産物に混ぜて、図10に示す装置を用いて分析を行った。図11において、260は電気泳動の結果得られたエレクトロフェログラムの一部である。エレクトロフェログラムの縦軸は相対蛍光強度、横軸は塩基長264を示している。エレクトロフェログラムL261、B262はそれぞれ肝臓(Liver)、脳(Brain)で発現している遺伝子由来の信号、エレクトロフェログラムK263は既知遺伝子(Known)由来の信号である。これらは同じキャピラリーで泳動分離された試料であるが、それぞれ異なる蛍光体で標識されているため像分割プリズム、色分離フィルタによって分離されそれぞれのエレクトロフェログラムとして表示、記録される。

【００３８】

各蛍光体の発光波長が図12に示すように重なる領域がある場合には、図10に示すデータ処理装置211を用いて重なり部分の蛍光強度を差し引く処理を行い、各蛍光体からの信号強度を得る。図12の縦軸271は相対蛍光強度、横軸272は波長を示している。273、274、275、276はそれぞれ異なる蛍光体A、B、C、Dの発光波長曲線である。蛍光体B、Cの蛍光強度と蛍光体Dの蛍光強度は約5倍異なっている。従って、発現量が5倍程度異なる遺伝子をそれぞれ蛍光体B、C、Dなどの蛍光体で標識すれば、同じ検出感度で検出することが可能である。蛍光強度が約10倍異なる蛍光体がモレキュラープローブ社から販売されているため

、蛍光強度の異なる蛍光体で標識することにより1桁ダイナミックレンジを調節することもできる。本実施例では使用したJOE、FAM、TAMRA、ROX各蛍光体の蛍光強度を規格化して使用した。このように、既知遺伝子、未知遺伝子由来の情報を別々のエレクトロフェログラムに分けて表示できるため、得られたエレクトロフェログラムの解析が容易になる。

【００３９】

【発明の効果】

本発明により、既知遺伝子に由来する信号と未知遺伝子に由来する信号を区別して表示できるようになり、その結果として、未知遺伝子に関する情報を容易に得ることができるようになった。また、発現量の多い遺伝子に由来する信号と発現量の小さな遺伝子に由来する信号が同時にモニターできるようになった。さらに、既知の遺伝子に関するDNAはその機能毎に標識蛍光体を変えてモニターすることができるようになった。

【００４０】

【配列表】

配列番号：１

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸　　合成DNA

配列

GTTTTCCCAG TCACGAC　　17

【００４１】

配列番号：２

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸　　合成DNA

配列

CAGGAAACAG CTATGAC　　17

【００４２】

配列番号：３
配列の長さ：17
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成DNA
配列
ATTAACCCTC ACTAAAG　　17

【００４３】
配列番号：４
配列の長さ：17
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成DNA
配列
AATACGACTC ACTATAG　　17

【００４４】
配列番号：５
配列の長さ：17
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成DNA
配列
CGAGGTCGAC GGTATCG　　17

【００４５】

配列番号：6
配列の長さ：17
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列
TCTAGAACTA GTGGATC　17

【００４６】
配列番号：7
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列
TCTCCAAAAA AAAAAAAAAA　20

【００４７】
配列番号：8
配列の長さ：21
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　合成DNA
配列
TGTGGTTTTT TTTTTTTTT T　21

【００４８】

配列番号：９
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成DNA
配列
TTTTTTTTTT TTTTTTTTVN　　20

【００４９】
配列番号：１０
配列の長さ：23
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成DNA
配列
ATTAACCCTC ACTAAAGGAT CNN　　23

【００５０】
配列番号：１１
配列の長さ：23
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成DNA
配列
AATACGACTC ACTATAGGAT CNN　　23

【００５１】

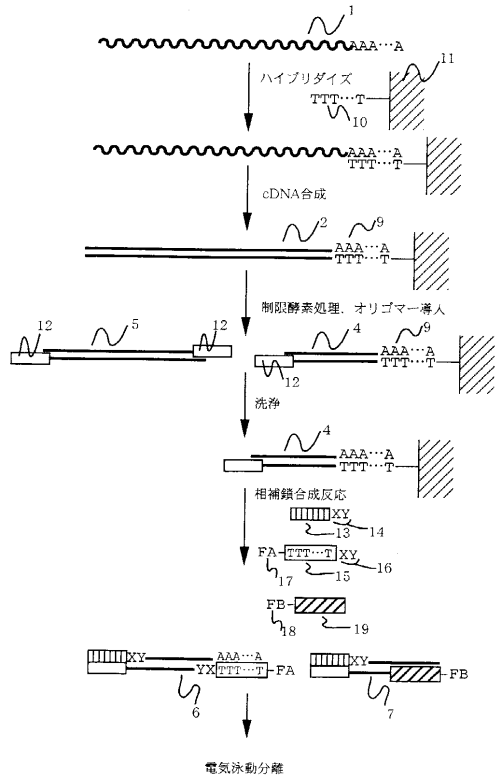
配列番号：１２
配列の長さ：20
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成DNA
配列
TAGTTGCAGT AGTTCTCCAG　　20

【００５２】
配列番号：１３
配列の長さ：21
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸　　合成DNA
配列
TCCTTCTGCA TCCTGTCGGC A　　21

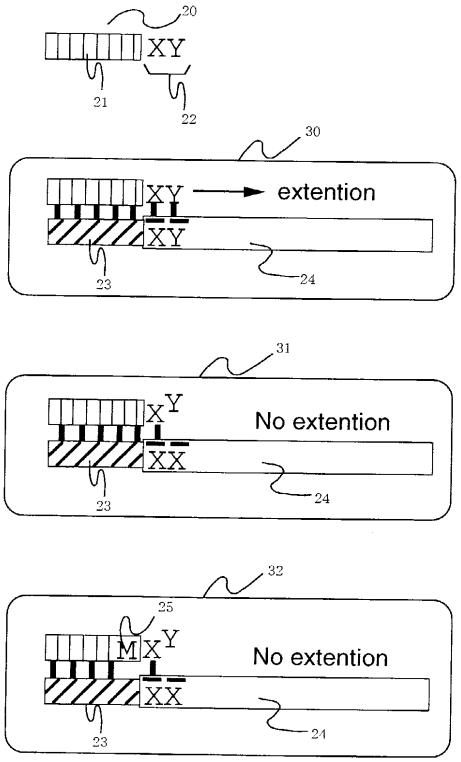
【図面の簡単な説明】
【図１】実施例1に記載のように、発現遺伝子をモニターする手順を示した図。
【図２】相補鎖合成が起こるか否かを模式的に示した図。
【図３】　PCR増幅において、長いDNA断片よりも短いDNA断片が優先的に増幅されることを示した図。
【図４】電気泳動の結果得られたエレクトロフェログラムの一部を示した図。
【図５】実施例2に記載のように、発現遺伝子をモニターする手順を示した図。
【図６】実施例3に記載のように、既知配列からなるDNA断片と未知配列からなるDNA断片を分離した後に、DNA断片の種類を計測する手順を示した図。
【図７】実施例4に記載のように、未知DNA断片を分取してくるための手順を示した図。
【図８】実時間蛍光検出型ゲル電気泳動装置の図。
【図９】実施例5に記載のように、異なる複数の試料中に発現している遺伝子の組成の違いを調べる手順を示した図。
【図１０】本発明を実施するための装置の図。
【図１１】電気泳動の結果得られたエレクトロフェログラムの一部を示した図。
【図１２】異なる4つの蛍光体の蛍光スペクトルを示した図。
【符号の説明】
1…試料mRNA、2…2本鎖cDNA、4…ポリT配列とオリゴマー12で挟まれたcDNA断片、5…cDNA断片4以外のcDNA断片、6…蛍光標識PCR産物、7…蛍光標識PCR産物、9…ポリA配列、10…ポリT配列を持つオリゴマー、11…タイタープレート、12…既知配列オリゴマー、13…オリゴマー12とハイブリダイズするプライマー、14…選択配列、15…ポリA配列9とハイブリダイズするプライマー、16…選択配列、17…蛍光体、18…蛍光体、19…特異的プライマー、20…プライマー、21…オリゴマー23に相補な配列、22…選択配列、23…DNA断片24の末端に導入されたオリゴマー、24…DNA断片、25…ミスマッチを形成する塩基、30…プライ

マー20と末端にオリゴマー23を導入されたDNA断片24がミスマッチなくハイブリダイズした状態、31…プライマー20と末端にオリゴマー23を導入されたDNA断片24がミスマッチを含んでハイブリダイズした状態、32…末端部分のミスマッチにより敏感に相補鎖伸長の阻害が起こるようにする場合、40…相対蛍光強度、41…塩基長、42…レーン(a)、43…レーン(b)、44…レーン(c)、50…得られるエレクトロフェログラムの一部、51…PCR反応に用いたプライマーの選択配列、52…塩基長、61…試料mRNA、62…2本鎖cDNA、63…2本鎖DNA断片、64…一本鎖DNA末端、65…片側の末端に既知配列オリゴマー70が導入されたDNA断片、66…両末端に既知配列オリゴマー70が導入されたDNA断片、67…片側に既知配列オリゴマー70が導入され、もう一方にはポリA配列を持つDNA断片、70…既知配列オリゴマー、71…共通配列部分、72…任意配列部分、73…共通配列部分71に相補な配列を持つプライマー、74…プライマー、75…選択配列、76…蛍光体、77…特異プライマー、78…蛍光体、80…PCR産物、81…DNA断片、91…試料mRNA、92…2本鎖cDNA、93…DNA断片、94…末端に既知配列オリゴマー100の導入されたDNA断片、95…片側の末端に既知配列オリゴマー100もう一方の末端にポリA鎖を持つDNA断片、100…既知配列オリゴマー、101…蛍光体、102…選択配列、103…蛍光体101で標識した選択配列102付きオリゴdTプライマー、104…ビオチン、105…ビオチン104で標識をした既知遺伝子特異プライマー、106…アビジン付きのビーズ、107…オリゴマー100と相補な配列、108…選択配列、109…プライマー、111…PCR産物、112…未知DNA断片群、121…試料mRNA、122…二本鎖cDNA、123…DNA断片群、125…PCR産物、126…DNA断片、130…オリゴマー、131…プライマー、132…プライマー、133…蛍光標識、134…特異プライマー、140…電気泳動装置、141…コンピュータ、142…モニター、145…ゲル分離部、146…レーザー源、147…レーザービーム、148…検出カメラ、149…DNA断片、151…組織Aから抽出したmRNA、152…二本鎖cDNA、153…cDNA断片群、154…末端に既知配列をもつcDNA断片群、155…組織Bから抽出したmRNA、156…二本鎖cDNA、157…cDNA断片群、158…末端に既知配列を持つcDNA断片群、160…既知配列オリゴマー、161…既知配列オリゴマー、162…選択配列、163…プライマー、164…オリゴマー160に相補な配列、165…選択配列、166…プライマー、167…オリゴマー161に相補な配列、168…選択配列、169…プライマー、171…蛍光体、172…蛍光体、173…プライマー、174…蛍光体、181…PCR増幅産物、182…PCR増幅産物、183…PCR増幅産物、Ａ…試料分離部、Ｂ…試料検出部、Ｃ…試料採取部、204…励起用光源、205…緩衝液槽、208…キャピラリー型試料移送管、209…二次元検出器、210…励起光、214…採取台移動装置、215…標本採取台、216…標本容器、217…試料供給台、218…キャピラリー型ゲル泳動管、219…シースフローセル、220…液溜、221…像分割プリズム、222…色フィルタ、250…蛍光、260…得られるエレクトロフェログラムの一部、261…肝臓で発現している遺伝子由来の信号を表示したエレクトロフェログラム、262…脳で発現している遺伝子由来の信号を表示したエレクトロフェログラム、263…既知遺伝子由来の信号を表示したエレクトロフェログラム、264…塩基長、271…相対蛍光強度、272…波長、273…蛍光体Aの蛍光スペクトル曲線、274…蛍光体Bの蛍光スペクトル曲線、275…蛍光体Cの蛍光スペクトル曲線、276…蛍光体Dの蛍光スペクトル曲線

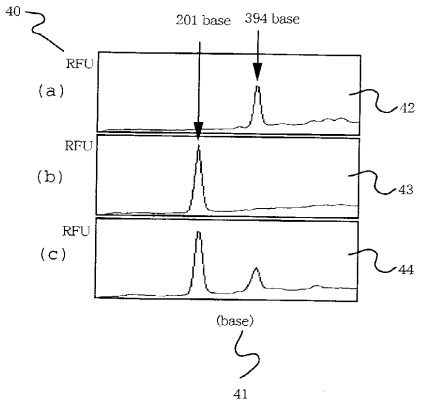
【図１】


AAA…A
ハイブリダイズ
TTT…T
cDNA合成
制限酵素処理，オリゴマー導入
洗浄
相補鎖合成反応
FA
FB
電気泳動分離

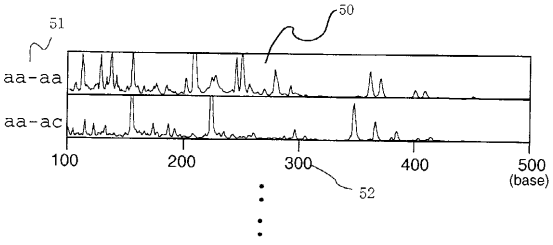
【図２】


XY
extention
No extention
No extention

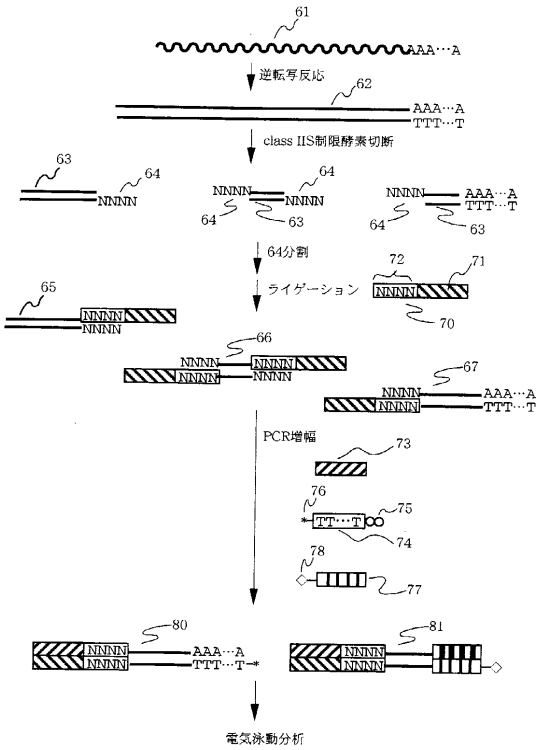
【図３】


201 base
394 base
RFU
(a)
(b)
(c)
(base)

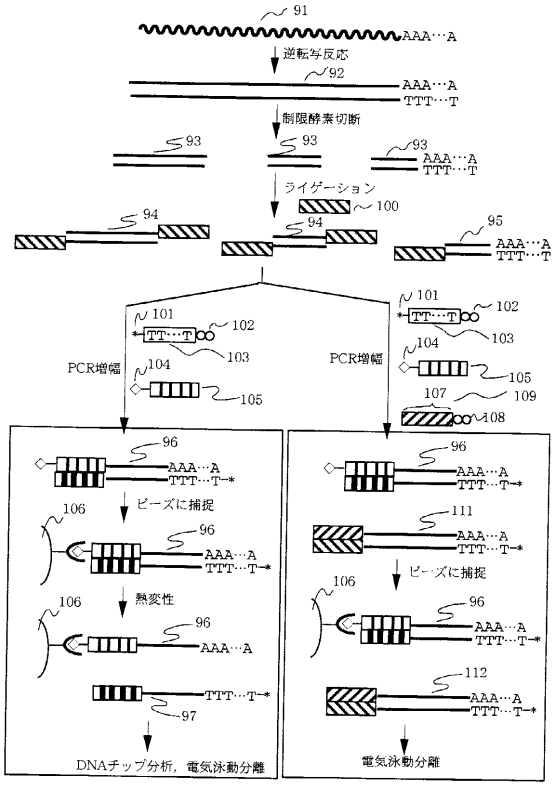
【図４】


aa-aa
aa-ac
100
200
300
400
500
(base)

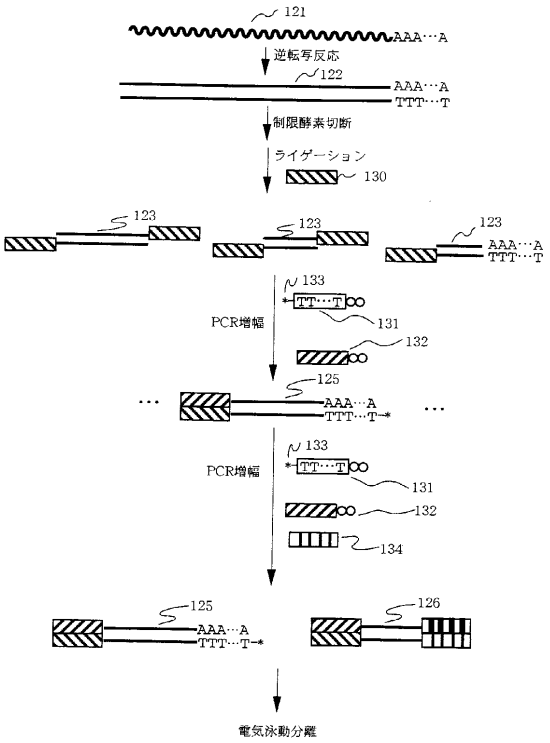
【図５】


AAA…A
逆転写反応
TTT…T
class IIS制限酵素切断
NNNN
64分割
ライゲーション
PCR増幅
電気泳動分析

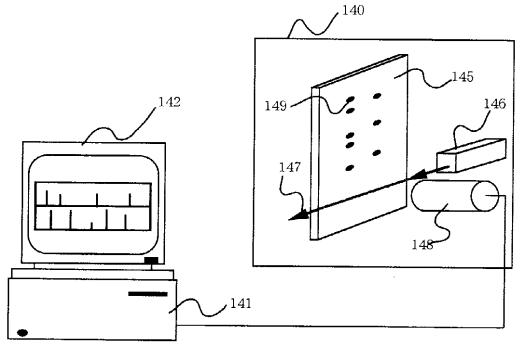
【図６】


逆転写反応
制限酵素切断
ライゲーション
PCR増幅
PCR増幅
ビーズに捕捉
熱変性
ビーズに捕捉
DNAチップ分析，電気泳動分離
電気泳動分離

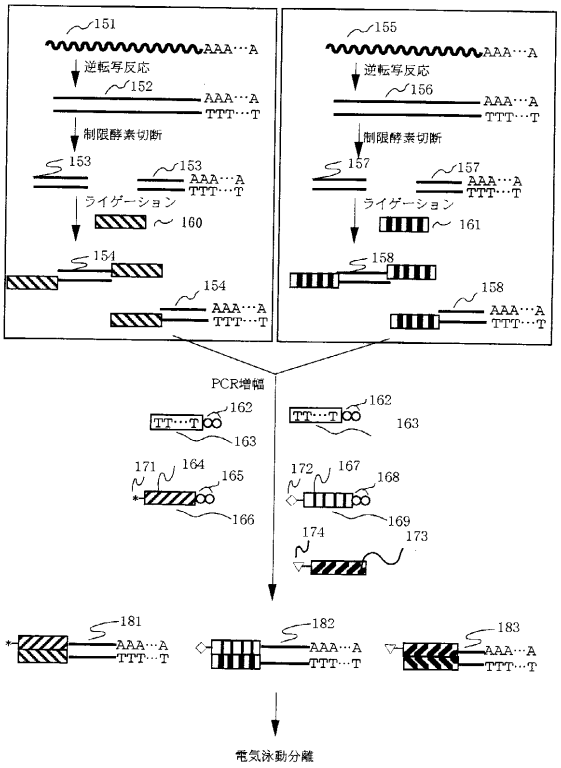
【図７】


逆転写反応
制限酵素切断
ライゲーション
PCR増幅
PCR増幅
電気泳動分離

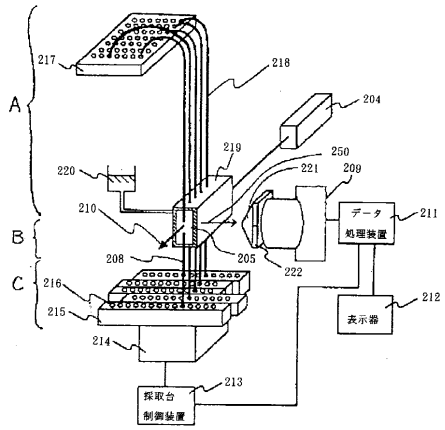
【図８】



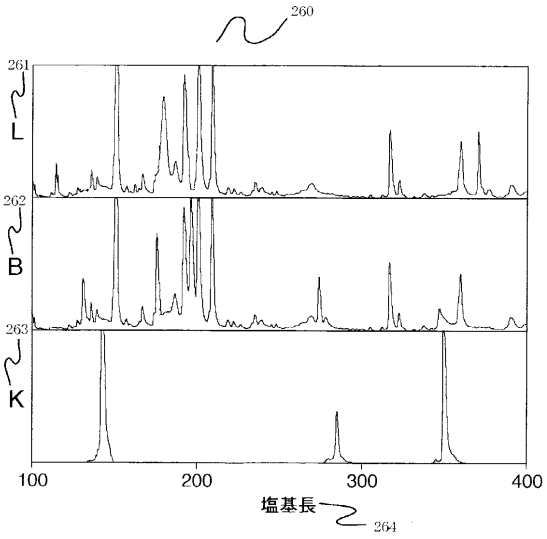
【図９】


逆転写反応
逆転写反応
制限酵素切断
制限酵素切断
ライゲーション
ライゲーション
PCR増幅
電気泳動分離

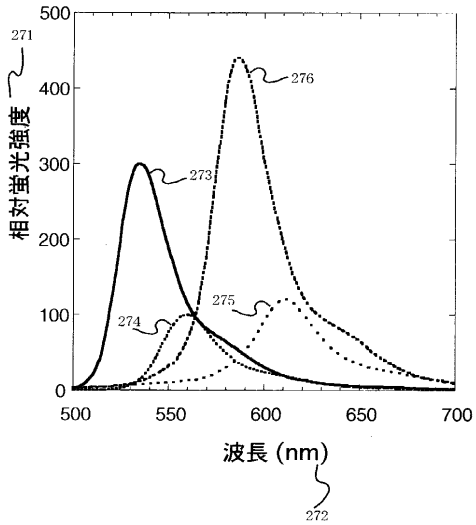
【図１０】


A
B
C
217
218
204
219
250
220
221
209
210
211
データ
処理装置
208
205
222
216
212
215
表示器
214
213
採取台
制御装置

【図１１】


260
261
L
262
B
263
K
100
200
300
400
塩基長
264

【図１２】


271
相対蛍光強度
500
400
300
200
100
0
276
273
275
274
500
550
600
650
700
波長 (nm)
272

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12Q 1/68
C12N 15/09
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)