

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-141202
(P2006-141202A)

(43) 公開日 平成18年6月8日(2006.6.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	2G060
GO1N 27/02 (2006.01)	GO1N 27/02 D	4B024
GO1N 27/22 (2006.01)	GO1N 27/22 C	4B063
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	
GO1N 27/416 (2006.01)	GO1N 27/46 336M	

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2004-331367 (P2004-331367)	(71) 出願人	000002369 セイコーエプソン株式会社 東京都新宿区西新宿2丁目4番1号
(22) 出願日	平成16年11月16日(2004.11.16)	(74) 代理人	100079108 弁理士 稲葉 良幸
		(74) 代理人	100080953 弁理士 田中 克郎
		(74) 代理人	100093861 弁理士 大賀 真司
		(72) 発明者	廣島 真一 長野県諏訪市大和3丁目3番5号 セイコーエプソン株式会社内
		(72) 発明者	瀧口 宏志 長野県諏訪市大和3丁目3番5号 セイコーエプソン株式会社内

最終頁に続く

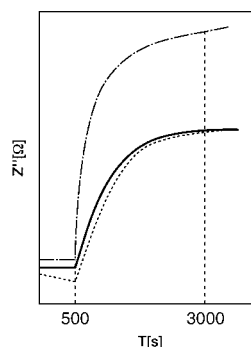
(54) 【発明の名称】 特定塩基配列の検出方法及びプライマーの伸長反応検出方法

(57) 【要約】

【課題】 標的となる核酸中に特定の塩基配列が存在するか否かを簡便な方法によって精度良く検出することができる技術を提供する。

【解決手段】 標的となる核酸と、特定の塩基配列を増幅するためのプライマーであって末端にチオール基が付加されているプライマーと、ヌクレオチドを含む試料溶液を調製する。その後、この試料溶液をPCR反応させ、反応終了後の試料溶液を用いてインピーダンスの容量成分Z'を測定する。そして、この容量成分Z'の測定結果に基づいて、標的となる核酸中に特定の塩基配列が含まれているか(一点鎖線部分参照)、特定の塩基配列が含まれていないか(点線部分参照)を判断する。

【選択図】 図5



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的とする核酸と、特定の塩基配列を増幅するためのプライマーであって末端に電極結合部位を有するプライマーと、ヌクレオチドを含む試料溶液を調製する調製工程と、

前記試料溶液を前記プライマーの伸長反応が生じる条件下におくことで、前記核酸中に前記特定の塩基配列が存在する場合に当該プライマーを伸長させる伸長反応工程と、

前記伸長反応工程終了後の試料溶液を含む測定溶液中に電極を浸漬させ、電氣的測定を行う測定工程と、

電氣的測定結果に基づいて前記核酸中に前記特定の塩基配列が存在するか否かを検出する検出工程と

10

を具備することを特徴とする特定塩基配列の検出方法。

【請求項 2】

前記プライマーは、前記特定の塩基配列に相補的に結合する相補結合配列によって構成されていることを特徴とする請求項 1 に記載の特定塩基配列の検出方法。

【請求項 3】

前記検出工程では、電氣的測定結果に基づいて前記プライマーが伸長したか否かを検出し、この検出結果に基づいて前記特定の塩基配列が存在するか否かを検出することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の特定塩基配列の検出方法。

【請求項 4】

前記プライマーは、上流プライマーと下流プライマーの 2 種類のプライマーからなり、上流プライマー、下流プライマーの少なくともいずれか 1 種類のプライマーの末端に前記電極結合部位が設けられていることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 の請求項に記載の特定塩基配列の検出方法。

20

【請求項 5】

前記電極結合部位は、チオール基、アミノ基、ビオチンのいずれかであることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 の請求項に記載の特定塩基配列の検出方法。

【請求項 6】

前記電氣的測定は、前記電極のインピーダンスの測定、電流の測定、電荷量の測定のいずれかであることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 の請求項に記載の特定塩基配列の検出方法。

30

【請求項 7】

標的とする核酸と、特定の塩基配列を増幅するためのプライマーであって末端に電極結合部位を有するプライマーと、ヌクレオチドを含む試料溶液を調製する調製工程と、

前記試料溶液を前記プライマーの伸長反応が生じる条件下におくことで、前記核酸中に前記特定の塩基配列が存在する場合に当該プライマーを伸長させる伸長反応工程と、

前記伸長反応工程終了後の試料溶液を含む測定溶液中に電極を浸漬させ、電氣的測定を行う測定工程と、

電氣的測定結果に基づいて前記プライマーが伸長したか否かを検出する検出工程とを具備することを特徴とするプライマーの伸長反応検出方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特定塩基配列の検出方法及びプライマーの伸長反応検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

特定の塩基配列を有する核酸の有無を調べる技術は非常に重要な技術である。例えば、遺伝病の診断、細菌およびウイルス等による食品の汚染検査、細菌およびウイルス等の人体への感染検査などにおいて必須の技術である。

【0003】

50

重症複合型免疫不全症、家族性高コレステロール血症等の遺伝病は、特定の遺伝子の欠損が原因で起こることが明らかになっている。このため、上記遺伝病の原因となる特定の塩基配列を有する遺伝子の有無を調べることによって、遺伝病の有無を診断できる。

【0004】

近年、大腸菌O157等による食品汚染が社会的問題となっている。このような細菌およびウイルス等による食品の汚染検査は、汚染が疑われる細菌あるいはウイルスに特有のDNAまたはRNAの塩基配列の有無を解析することによって汚染の有無を判断することができる。人体への感染検査に関しても同様である。

【0005】

このような核酸の塩基配列の検出においては、試料である特定の塩基配列を含む核酸が微量である場合が多いため、検出感度が高いことが求められる。かかる検出感度を高めるために、DNAポリメラーゼを用いてプライマーの伸長反応を繰り返しながら特定の塩基配列を有する核酸を増幅させるPCR法などが広く利用されている（例えば、特許文献1参照）。

【0006】

【特許文献1】特開平4-346800号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、増幅された特定の塩基配列を有する核酸を検出する方法には幾つか問題がある。例えば、増幅された特定の塩基配列を有する核酸を検出する最も汎用的な方法の1つとして電気泳動法があるが、この電気泳動法は臭化エチジウムなどの発ガン物質を蛍光インターカレート剤として用いるため、取り扱いに非常に注意を要するといった問題がある。また、この電気泳動法は、検出のために長時間を要するといった問題もある。

【0008】

本発明は、以上説明した事情を鑑みてなされたものであり、標的となる核酸中に特定の塩基配列が存在するか否かを簡便な方法によって精度良く検出することができる技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記目的を達成するため、本発明に係る塩基配列の検出方法は、標的とする核酸と、特定の塩基配列を増幅するためのプライマーであって末端に電極結合部位を有するプライマーと、ヌクレオチドを含む試料溶液を調製する調製工程と、前記試料溶液を前記プライマーの伸長反応が生じる条件下におくことで、前記核酸中に前記特定の塩基配列が存在する場合に当該プライマーを伸長させる伸長反応工程と、前記伸長反応工程終了後の試料溶液を含む測定溶液中に電極を浸漬させ、電気的測定を行う測定工程と、電気的測定結果に基づいて前記核酸中に前記特定の塩基配列が存在するか否かを検出する検出工程とを具備することを特徴とする。

【0010】

かかる構成によれば、反応終了後の試料溶液について電気的測定（インピーダンスの容量成分Z'の測定など）を行うことで、標的とする核酸中に特定の塩基配列が存在するか否かを精度良く検出することが可能となり、SNPタイピングに基づいた薬の投与といったテーラーメイド医療等に活用することができる。

ここで、前記プライマーは、前記特定の塩基配列に相補的に結合する相補結合配列によって構成されていることが好ましい。また、前記検出工程では、電気的測定結果に基づいて前記プライマーが伸長したか否かを検出し、この検出結果に基づいて前記特定の塩基配列が存在するか否かを検出する態様が好ましい。

【0011】

また、前記プライマーは、上流プライマーと下流プライマーの2種類のプライマーからなり、上流プライマー、下流プライマーの少なくともいずれか1種類のプライマーの末端

に前記電極結合部位が設けられている態様が好ましい。

さらに、前記電極結合部位は、チオール基、アミノ基、ビオチンのいずれかであることが好ましく、また、前記電氣的測定は、前記電極のインピーダンスの測定、電流の測定、電荷量の測定のいずれかであることが好ましい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本実施形態では、試料中の標的となるDNAのSNP (single nucleotide polymorphism) 部位に特定の塩基配列が存在するか否かをプライマーの伸長反応を利用して検出(すなわちSNPタイピング)する場合について説明する。なお、SNP部位とは、DNA配列約1000個程度に1つの割合で存在する塩基配列の異なる部位であって、個々人の病気のなり易さ、薬物に対する応答性など、個人間の遺伝的な差異そのものをあらわす部位をいう。

10

【0013】

このようなSNPタイピングを行う際、まず、SNP部位を有する標的となるゲノムDNAと、上流プライマー及び下流プライマーからなる一对のプライマーと、Taqポリメラーゼと、バッファと、dNTPsを含む試料溶液を調製する(詳細は下記参照)。この試料溶液に含まれる上流プライマー及び下流プライマーのいずれか1種類のプライマーの末端にはチオール基(電極結合部位)が付加されている。なお、以下の説明では下流プライマーの末端にチオール基が付加されている場合を想定する。

20

< 試料溶液の組成 >

dNTPs	(終濃度 0.2 mM)
上流プライマー	(終濃度 1.0 μ M)
下流プライマー(20塩基)	(終濃度 1.0 μ M)
10xバッファ	(終濃度 1xバッファ)
Taqポリメラーゼ	(終濃度 2 unit)
ゲノムDNA	(終濃度 0.1 ~ 0.2 μ g)

【0014】

試料溶液を調製すると、当該試料溶液をPCR反応(各プライマーの伸長反応)が生じる条件下におく。図1は、ゲノムDNAと各プライマーが相補的な場合(野生型ゲノムDNAを用いた場合)のPCR反応を説明するための図である。PCR反応を生じさせるためには、以下に示す3段階の温度変化をn(例えば30~35)サイクル繰り返し実行する必要がある。具体的には、まず、第1段階(熱変性)の温度変化(例えば94~96)によって標的となるSNP部位10を有するゲノムDNA100を熱変性し、一本鎖DNA110、120を得る(図1に示すA、B参照)。ここで、一本鎖DNA110、120のうち、遺伝子情報を有するものをターゲットDNA110と呼び、遺伝子情報を有しないものを相補鎖DNA120と呼ぶ。

30

【0015】

次に、第2段階(アニーリング)の温度変化(例えば55~60)によって上流プライマー130はターゲットDNA110にアニーリングし、末端にチオール基150が付加された下流プライマー140は相補鎖DNA120にアニーリングする(図1に示すC参照)。そして、第3段階(伸長反応)の温度変化(例えば72~74)によって上流プライマー130、下流プライマー140は共に伸長される(図1に示すD参照)。このようなサイクルがnサイクル繰り返されることにより、ターゲットDNA110、相補鎖DNA120は共に2n倍に増幅される。

40

【0016】

一方、図2は、ゲノムDNAと両プライマーの少なくともいずれか一方が非相補的な場合(突然変異型ゲノムDNAを用いた場合)のPCR反応を説明するための図である。なお、本実施形態では、ゲノムDNAと下流プライマーが非相補的な場合を説明するが、ゲノムDNAと上流プライマーが非相補的な場合も同様である。

【0017】

50

まず、上記と同様、第1段階の温度変化によって標的となるSNP部位10を有するゲノムDNA100を熱変性し、ターゲットDNA110、相補鎖DNA120を得る(図2に示すA、B参照)。次に、第2段階の温度変化によって上流プライマー120はターゲットDNA110にアニーリングするが、下流プライマー140は端部においてミスマッチ(具体的には、図2のCに示す下流プライマー140の塩基「G」と相補鎖DNA120の塩基「T」)が生じているため、相補鎖DNA120に完全な形でアニーリングすることはない。

【0018】

このような形でアニーリングが行われる結果、第3段階の温度変化によって上流プライマー130は伸長されるものの、下流プライマー140は伸長されない(図2に示すD参照)。このようなサイクルがnサイクル繰り返されることにより、ターゲットDNA110が2n倍に増幅される一方、相補鎖DNA120は増幅されない。

10

【0019】

以上の説明から明らかなように、プライマーが特定の塩基配列と相補的に結合する相補結合配列によって構成されている場合には、伸長反応が起きる一方、プライマーが上記相補結合配列によって構成されていない場合(言い換えれば、特定の塩基配列と相補的に結合しない非相補結合配列によって構成されている場合)には、伸長反応が起こらず、鎖長は伸びない。

【0020】

上記サイクルを繰り返すことによってPCR反応を終了すると、下記組成の測定溶液にPCR反応終了後の試料溶液を投入し、インピーダンス測定を開始する。

20

<測定溶液の組成>

PBS (pH 7.0) (50 mM)

NaCl (1 M)

MgCl₂ (10 mM)

【0021】

図3は、伸長反応が起きた試料溶液(以下、既反応試料溶液)を用いてインピーダンス測定を行う場合の説明図、図4は、伸長反応が起こらなかった試料溶液(以下、未反応試料溶液)を用いてインピーダンス測定を行う場合の説明図である。

【0022】

まず、上記測定溶液10mlを調製した後、測定溶液に電極基板(本実施形態では電極面積3mm程度の金電極基板)を5分程度浸漬させる。そして、図3(a)、図4(a)に示すように電極基板Aに接続されたインピーダンス測定装置50を利用してインピーダンスの容量成分Z''(イメージナリーパート)の測定を開始する。測定開始から500秒経過後、測定溶液中に各試料溶液(1μM、100μl)を投入し(図3(b)、図4(b)参照)、3000秒経過するまでの間、100Hzで10秒に1回の割合でインピーダンスの容量成分Z''の測定を行う。

30

【0023】

前述したように、各試料溶液には末端にチオール基150が結合された下流プライマー140が多数含まれている。このチオール基150の機能により、下流プライマー140は電極基板Aの表面に固定化される。具体的には、既反応試料溶液については鎖長が伸びた下流プライマー140が電極基板Aの表面に固定化される一方(図3(c)参照)、未反応試料溶液については鎖長が伸びていない下流プライマー140が電極基板Aの表面に固定化される(図4(c)参照)。

40

【0024】

図5は、インピーダンスの容量成分Z''の測定結果を示す図である。なお、図5では伸長反応が起こった場合の測定結果を一点鎖線で示し、伸長反応が起こらなかった場合の測定結果を点線で示している。また、比較のため、オリゴDNAの鎖長が20塩基のプロープを電極基板に固定化し、上記と同じ条件でインピーダンスの容量成分Z''の測定(比較実験)を行ったときの測定結果を太実線で示している。

50

【0025】

図5に示すように、伸長反応が起こらなかった場合のインピーダンスの容量成分 Z'' と伸長反応が起こった場合のインピーダンスの容量成分 Z'' は大きく異なっている。具体的には、伸長反応が起こらなかった場合は比較実験とほぼ同様な結果が得られるのに対し(図5に示す点線、太実線参照)、伸長反応が起こった場合は比較実験と大きく異なる結果が得られる(図5に示す一点鎖線、太実線参照)。このように、得られるインピーダンスの容量成分 Z'' の大きさを適宜比較することで、伸長反応が起こったか否か(ここでは特定の塩基配列が存在するか否か)を精度良く検出することができる。なお、比較実験においては、構成が異なる20塩基のプローブを複数種類用意し(詳細は下記参照)、これら各プローブについて上記と同じ条件でインピーダンスの容量成分 Z'' を測定したが、その測定結果に大きな差異はみとめられなかった。従って、塩基数が同じプローブについて比較するのであれば、プローブの構成(塩基配列)が異なっても同様の結果(同程度のインピーダンスの容量成分 Z'')が得られる。また、20塩基のプローブに限らず、5塩基のプローブ、49塩基のプローブなど様々な数の塩基によって構成されたプローブにも適用可能である。

10

<プローブの構成(20塩基)>

5'HS-C₆H₁₂-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'
 5'HS-C₆H₁₂-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
 5'HS-C₆H₁₂-GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG 3'
 5'HS-C₆H₁₂-CCACACTCACAGTTTTCACT 3'
 5'HS-C₆H₁₂-TTTTCACTTCAGTGTATGCG 3'

20

【0026】

以上説明したように、上記方法によれば、インピーダンスの容量成分 Z'' を測定するといった簡便な方法によって伸長反応が生じたか否か(本実施形態ではSNP部位に特定の塩基配列が存在するか否か)を精度良く検出することができるため、SNPタイピングに基づいた薬の投与といったテーラーメイド医療に活用することができる。

また、本実施形態では、標的となるDNAとしてSNP部位を有するDNAを例示したが、抽出動物組織、菌体、培養細胞などから抽出したSNP部位を有していないDNAを標的としても良い。これらの検体に適用することで、遺伝病の診断、細菌及びウイルスなどによる食品の汚染検査、細菌及びウイルスなどの人体への感染検査に活用することができる。

30

【0027】

また、本実施形態では、電極基板として金電極基板を使用した。他の金属によって形成された電極を用いても良い。かかる場合には、例えばアミノ基やビオチンなど、電極基板の種類等に応じて固定化に必要な官能基(電極結合部位)をプライマーの末端に付加すれば良い。

【0028】

また、本実施形態では、インピーダンスの容量成分 Z'' を測定(電気的測定)することで伸長反応が生じたか否か(SNP部位に特定の塩基配列が存在するか否か)を検出したが、インピーダンスに限らず、電流測定(電気的測定)によって得られる電流値や電荷量測定(電気的測定)によって得られる電荷量を比較することによって伸長反応が生じたか否か等を検出するようにしても良い。なお、PCR反応時に蛍光分子を取り込ませれば蛍光観察によって伸長反応が生じたか否か等を検出することも可能である。

40

【0029】

また、本実施形態では、特定の塩基配列と相補的に結合する相補結合配列によって構成されているプライマーを例示したが、例えば東洋紡績(株)によって開発されたASP(A l l e l e Specific Primer)のように、一部に非相補的配列を含むプライマーについても適用可能である。このASPは、プライマーの3'末端から2番目の塩基がSNP部位に対応しており、さらに3'末端から3番目の塩基が標的となる塩基に対して必ず非相補的になるように設計されたプライマーである。かかるASPの末端に電極結合部位を付加してお

50

くことで、煩雑な処理作業等を行うことなく、伸長反応が生じたか等を検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】本実施形態に係るゲノムDNAと各プライマーが相補的な場合のPCR反応を説明するための図である。

【図2】同実施形態に係るゲノムDNAと両プライマーのいずれか一方が非相補的な場合のPCR反応を説明するための図である。

【図3】同実施形態に係るインピーダンス測定を行う場合の説明図である。

【図4】同実施形態に係るインピーダンス測定を行う場合の説明図である。

【図5】同実施形態に係るインピーダンスの容量成分Z'の測定結果を示す図である。

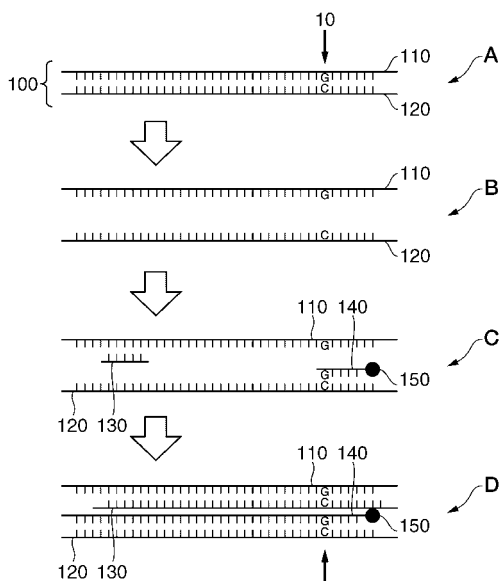
【符号の説明】

【0031】

10・・・SNP部位、100・・・ゲノムDNA、110・・・ターゲットDNA、120・・・相補鎖DNA、130・・・上流プライマー、140・・・下流プライマー、150・・・チオール基、50・・・インピーダンス測定装置、A・・・電極基板。

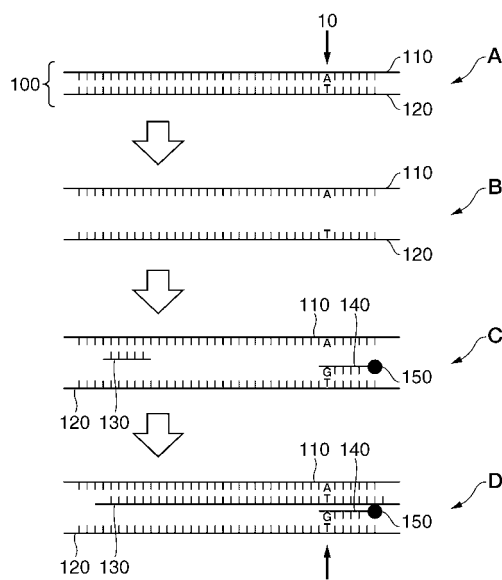
【図1】

<野生型ゲノムDNA>

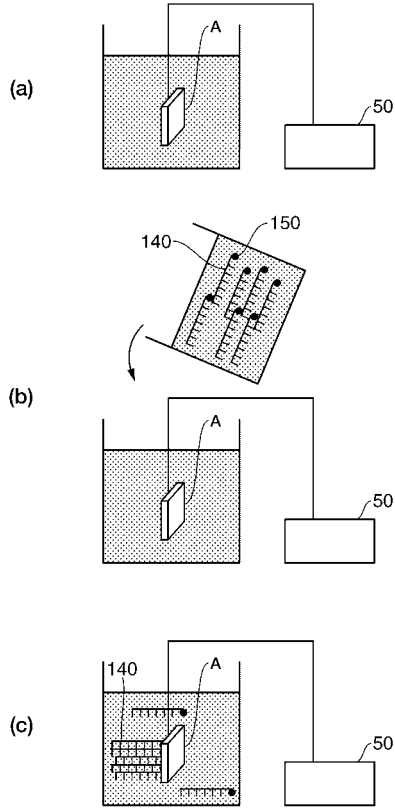


【図2】

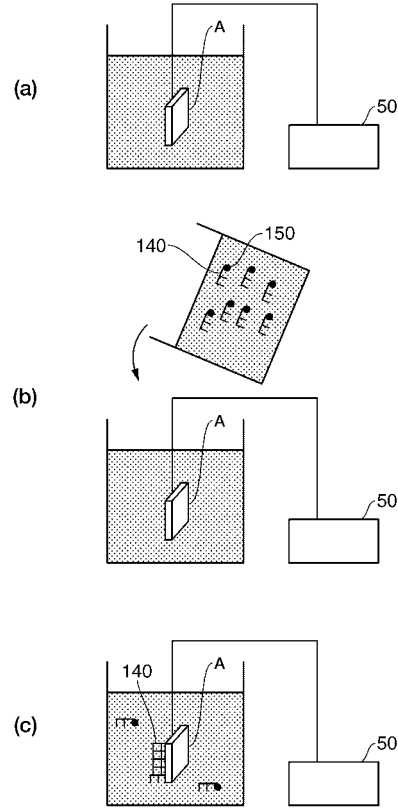
<突然変位型ゲノムDNA>



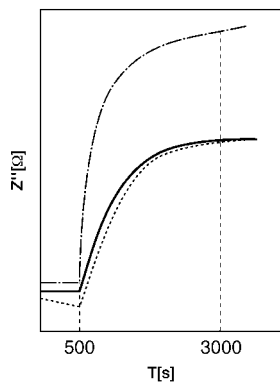
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

2006141202000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 福島 均

長野県諏訪市大和3丁目3番5号 セイコーエプソン株式会社内

(72)発明者 横川 忍

長野県諏訪市大和3丁目3番5号 セイコーエプソン株式会社内

Fターム(参考) 2G060 AA15 AC10 AF06 AF10 AF20 AG08 FA05 GA04 JA10 KA09

4B024 AA11 CA01 CA20 HA11

4B063 QA01 QA12 QQ02 QQ05 QQ42 QR32 QR41 QR62 QR81 QS25

QS36 QX04