

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7618208号  
(P7618208)

(45)発行日 令和7年1月21日(2025.1.21)

(24)登録日 令和7年1月10日(2025.1.10)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 Q	1/6876(2018.01)	C 1 2 Q	1/6876
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686
C 1 2 N	9/22 (2006.01)	C 1 2 N	9/22

請求項の数 3 (全33頁)

(21)出願番号	特願2020-529301(P2020-529301)	(73)特許権者	518292162 ヌリバイオ カンパニー リミテッド NURIBIO CO., LTD. 大韓民国 30121 セジョンシ カル ム口 232 エー 505ホ 5F
(86)(22)出願日	令和2年4月10日(2020.4.10)	(74)代理人	100090398 弁理士 大淵 美千栄
(65)公表番号	特表2023-523477(P2023-523477 A)	(74)代理人	100090387 弁理士 布施 行夫
(43)公表日	令和5年6月6日(2023.6.6)	(72)発明者	ナム ヨン ヒャン 大韓民国 16243 キョンギド スウ オンシ バルダルグ セジロ 339ボン ギル 19 ナンバー 202
(86)国際出願番号	PCT/KR2020/004946	審査官	藤澤 雅樹
(87)国際公開番号	WO2021/172653		
(87)国際公開日	令和3年9月2日(2021.9.2)		
審査請求日	令和5年2月17日(2023.2.17)		
(31)優先権主張番号	10-2020-0024728		
(32)優先日	令和2年2月28日(2020.2.28)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		
前置審査			

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 単一標的遺伝子の遺伝的変異のリアルタイム検出用の一本鎖核酸及びこれを用いた検出方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

単一標的遺伝子の遺伝的変異のリアルタイム検出用キットであって、  
前記標的遺伝子が、A p o Eであり、  
前記キットは、

( i ) 配列番号 1 及び 2 のプライマーセット、配列番号 3 乃至 6 の一本鎖核酸、並びに酵素、又は、

( i i ) 配列番号 1 1 乃至 1 4 の一本鎖核酸、及び酵素、  
を含み、

前記酵素は、R N a s e H、R N a s e I I、R N a s e I I I、R N a s e I V又は R N a s e T 2 のRNA加水分解酵素 ( r i b o n u c l e a s e , R N a s e ) である、キット。

【請求項2】

単一標的遺伝子の遺伝的変異検出方法であって、  
前記標的遺伝子が、A p o Eであり、

a ) 生物学的試料から検出しようとする遺伝的変異を含む標的核酸を得る段階であって、  
前記遺伝的変異が一塩基多型である段階と、

b ) ( i ) 配列番号 1 及び 2 のプライマーセット並びに配列番号 3 乃至 6 の一本鎖核酸、  
又は、( i i ) 配列番号 1 1 乃至 1 4 の一本鎖核酸、を製造する段階と、

c ) 上記 ( i ) の場合、前記段階 a ) で得られた標的核酸、及び、前記段階 b ) で製造さ

れた配列番号3乃至6の一本鎖核酸、前記段階a)で得られた標的核酸と相補的な塩基配列を有する配列番号1及び2のプライマーセット、並びに切断試薬と混合した後、伸長反応により遺伝的変異を含む標的核酸 - 一本鎖核酸複合体を増幅させる段階、又は、

上記(ii)の場合、前記段階a)で得られた標的核酸、及び、前記段階b)で製造された配列番号11乃至14の一本鎖核酸、並びに切断試薬と混合した後、伸長反応により遺伝的変異を含む標的核酸 - 一本鎖核酸複合体を増幅させる段階と、

d)前記段階c)で増幅された遺伝的変異を含む標的核酸 - 一本鎖核酸複合体から分離された一本鎖核酸断片の量を測定する段階と、を含み、

前記段階c)の切断試薬は、RNase H、RNase II、RNase III、RNase IV又はRNase T2のRNA加水分解酵素(ribo nuclease, RNase)である、単一標的遺伝子の遺伝的変異検出方法。

10

#### 【請求項3】

前記段階a)の遺伝的変異を含む標的核酸は、試料から検出しようとするRNA若しくはDNAであり、又は前記RNAを逆転写ポリメラーゼにより増幅して得られたcDNAである、請求項2に記載の単一標的遺伝子の遺伝的変異検出方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

本発明は、単一標的遺伝子の遺伝的変異のリアルタイム検出用の一本鎖核酸及びこれを用いた検出方法に関する。さらに詳しくは、X-Y-Zの構造を有し、一塩基多型、点突然変異、又はmiRNAアイソフォーム(isoform)のような遺伝的変異が含まれた単一標的遺伝子の塩基配列の一部又は全部に相補的結合が可能な塩基配列で構成された一本鎖核酸を用いて、単一標的遺伝子の遺伝的変異をリアルタイムで検出する方法及びそのためのキットに関する。

20

#### 【背景技術】

#### 【0002】

遺伝子組換えにおいて、一塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP)による変異は、最も一般的な形態であり、様々な疾病を引き起こす原因として作用する(Barreiro LB, et al., Methods

Mol. Biol., 578:255-276, 2009; Beaudet L. et al., Genome Res., 11(4):600-608, 2001)

30

。よって、遺伝子組換えによる様々な疾病を早期に診断するために、SNPの検出による診断方法は、極めて効率的であり、速い診断が可能である。したがって、SNPを正確に検出するための多くの方法が提示されており、今でも、これに関連した多くの研究が進行されている(Ermini ML, et al., Biosen. & Bioele.

, 61:28-37, 2014; K. Chang et al., Biosen. & Bioele., 66:297-307, 2015)。

#### 【0003】

具体的に、多数の遺伝子分析のための最も普通に用いる方法としては、ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction、PCR)を用いる方法、多重ポリメラーゼ連鎖反応(multiplex polymerase chain reaction、Multiplex PCR)方法が挙げられる。

40

#### 【0004】

前記ポリメラーゼ連鎖反応は、テンプレート(template)DNAと結合することができ、蛍光物質と消光物質が結合されたプライマー又はプローブを任意で設計することにより、検出しようとする遺伝子の所望の部位のみを正確に増幅することができるという長所がある。しかし、一度の反応で、一つの関心遺伝子のみを増幅させることができるので、増幅しようとする関心遺伝子が多数である場合は、同じ作業を繰り返さなければならないことがあった。

#### 【0005】

50

前記多重ポリメラーゼ連鎖反応は、数個のポリメラーゼ連鎖反応を一つのチューブで行うことにより、多数の遺伝子領域を同時に分析することができるという長所があった。しかし、数個のプライマー又はプローブを一つのチューブで同時に使用することにより、プライマー又はプライマー間の交差反応が発生してしまうので、一度に増幅可能な遺伝子領域の数が限られる。また、反応条件を見い出すための多大な労力と時間を要し、敏感度及び特異度において良好な結果が得られないという短所があった (Hardenbol P. et al., Nat. Biotechnol., 21(6):673-678, 2003)。

#### 【0006】

近年、多重ポリメラーゼ連鎖反応を利用せず、共通プライマーを用いて多数の遺伝子領域を同時に増幅し、大量分析を可能にする研究が盛んに行われており、代表的な技術としては、同時にいくつかの遺伝子領域の一塩基多型 (SNP) を分析することができる SNPlex、ゴールドゲートアッセイ (Goldengate assay)、分子反転プローブ (molecular inversion probes (MIPs)) などがあ

10

#### 【0007】

前記SNPlexは、OLA (oligonucleotide ligation assay) 以降、エクソヌクレアーゼ (exonuclease) を用いた精製過程を行い、プローブの両端にある共通のプライマー塩基配列でポリメラーゼ連鎖反応増幅を行って

20

#### 【0008】

ゴールドゲートアッセイは、固体表面に固定化したゲノムDNA (genomic DNA) に、アップストリーム (upstream) プローブで、対立遺伝子特異的なプライマー伸長反応を行った後、ダウンストリーム (downstream) プローブとのDNA連結反応を行い、洗浄過程を経て、DNA連結反応されなかったプローブを除去して

30

#### 【0009】

分子反転プローブ (molecular inversion probes (MIPs)) は、パドロックプローブ (Padlock probe) を用いてギャップライゲーション (gap ligation) を行った後、DNAが連結されなかったプローブとゲノムDNAをエクソヌクレアーゼ (exonuclease) を用いて除去し、ウラシル-N-グリコシラーゼ (uracil-N-glycosylase) を用いてパドロックプローブを線形化させた後、プローブに含まれた共通のプライマー塩基配列を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行い、GenFlex Tag Array (アフィメトリクス社) にハイブリダイズさせて一塩基多型を分析する方法である (Hardenbol P. et al., Nat. Biotechnol., 21(6):673-678, 2003)。

40

#### 【0010】

しかしながら、これらの方法は、一番目のチューブで反応させた生成物の一部を、二番目のチューブに移して反応を行わなければならないので、異なるサンプル間の汚染が発生し、実験方法が複雑であるという問題点があった。しかも、蛍光標識されたプローブの個数だけの一塩基多型のみが検出できるので、分析しようとする一塩基多型の個数が増えるほど、分析費用が高くなるという問題点があった。

#### 【0011】

50

点突然変異 (point mutation) は、一般に、DNA複製中に発生することが知られている。DNA複製は、一つの二本鎖DNA分子が、二つの一本鎖DNAを生成するときに発生し、それぞれの鎖は、相補鎖の生成のためのテンプレートとして用いられる。単一点突然変異は、全DNA配列を変化させることができ、一つのプリン (purine) 又はピリミジン (pyrimidine) を変更すれば、ヌクレオチドがコードするアミノ酸が変更され得る。

【0012】

点突然変異は、DNAを複製する間、自然突然変異から発生し、突然変異率は、そのような原因により上昇され得る。

【0013】

1959年、エルンスト・フリーセ (Ernst Freese) は、「転移 (transitions)」又は「転換 (transversions)」との用語を作り出し、異なる種類の点突然変異を分類した。転移は、プリン塩基を他のプリンに代替し、又はピリミジンを他のピリミジンに代替することである。転換は、プリンをピリミジンに、又は、それとは逆に代替することである。転移 (Alpha) 及び転換 (Beta) への突然変異率は異なり、通常、転移突然変異は、転換よりも約10倍も多いことが知られている。

【0014】

点突然変異の機能的分類は、ナンセンス突然変異と同様に、ストップゲイン (stop-gain) 及びスタートロス (start-loss) のように、蛋白質の生成が非正常的に短縮又は追加されると、ミスセンス突然変異と同様に、他のアミノ酸をコードする場合 (BRAF遺伝子におけるバリン (valine) をグルタミン酸 (glutamic acid) に変化させる場合、これは、癌細胞における無制限増殖信号を引き起こすRAF蛋白質の活性化につながる。)、サイレント突然変異と同様に、同じアミノ酸をコードすることがあり、通常、研究者に公知されている事項である。

【0015】

このような点突然変異は、特定疾病の原因としても知られている。多重腫瘍抑制蛋白質における点突然変異は、癌を引き起こし、神経線維腫症 (Neurofibromatosis) は、ニューロフィブロミン (Neurofibromin) 1又はニューロフィブロミン2遺伝子の点突然変異により発生する。鎌状赤血球貧血 (Sickle-cell anemia) は、ヘモグロビンの  $\beta$ -グロビン鎖における点突然変異により引き起こされ、6番目の位置における親水性アミノ酸グルタミン酸が疎水性アミノ酸バリンに代替される。それ以外にも、テイ・サックス病 (Tay-Sachs disease) や色覚異常でも見い出される。

【0016】

このような点突然変異の分析は、特に癌を診断し、治療剤の選択に重要な要素として作用している。同伴診断は、癌突然変異による最適化した抗がん剤の選択又は特定の抗がん剤を排除するにあたって重要な判断の根拠として活用されており、近年、特定突然変異をターゲットとした抗がん剤の開発は、増加し続けている。

【0017】

このような突然変異の分析方法は、PCR、NGS (next-generation sequencing)、ddPCR (Droplet Digital PCR) などにより行われており、液体生検への需要度と関心は、増加し続けており、さらに精密な測定方法が要求されている。しかし、現在知られている方法は、十分な分析機能を保有しておらず、又は分析機能を満たす場合は、高価の別途の装備と複雑な分析過程を要求しているので、さらに簡単な分析が可能な方法の開発が要求されている。

【0018】

よって、本発明者等は、SNP、点突然変異 (point mutation)、miRNAアイソフォーム (isoform) などの遺伝子組換えをリアルタイムで検出するにあたり、低い感受度と特異度を増加させ、癌を簡単かつ正確に診断することができる方法について、長い間研究しているうち、本発明者等の一本鎖核酸を活用するとき、高い敏感

10

20

30

40

50

度及び高い特異性を示し、癌をはじめとして癌のような遺伝子組換えによる様々な疾患の診断に極めて有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本発明の一つの目的は、i) X - Y - Zの構造を有し、ii) 遺伝的変異を含む単一標的遺伝子の塩基配列の一部又は全部に相補的結合を行い、iii) 両末端又は内部に同一であり又は少なくとも二つの異なる探知可能なマーカーが付されており、前記Yは、単一標的遺伝子に位置する一つ又は二つの塩基配列で構成されたRNAであることを特徴とする、単一標的遺伝子の遺伝的変異検出用の一本鎖核酸を提供することである。

10

【0020】

本発明の他の一つの目的は、単一標的遺伝子の遺伝的変異が、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) である場合、前記一本鎖核酸は、(a) 前記Xは、4 ~ 20個の塩基配列で構成されるDNAであり、(b) 前記Zは、4 ~ 20個の塩基配列で構成されるDNAであることを特徴とする、単一標的遺伝子の遺伝的変異検出用の一本鎖核酸を提供することである。

【0021】

本発明のまた他の一つの目的は、単一標的遺伝子の遺伝的変異が、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) 又は点突然変異 (point mutation) 又はmiRNAアイソフォーム (isoform) である場合、(c) 前記Xは、10 ~ 30個の塩基配列で構成されるDNAであり、(d) 前記Zは、1 ~ 5個の塩基配列で構成されるDNAであることを特徴とする、単一標的遺伝子の遺伝的変異検出用の一本鎖核酸を提供することである。

20

【0022】

本発明のまた他の一つの目的は、前記一本鎖核酸を含む、単一標的遺伝子の遺伝的変異のリアルタイム検出用キットを提供することである。

【0023】

本発明のまた他の一つの目的は、a) 生物学的試料から検出しようとする遺伝的変異を含む標的核酸を得る段階と、b) 前記単一標的遺伝子の遺伝的変異検出用の一本鎖核酸を製造する段階と、c) 前記段階a) で得られた標的核酸、前記段階b) で製造された一本鎖核酸、前記段階a) で得られた標的核酸と相補的な塩基配列を有するプライマーセット、及び切断試薬と混合した後、伸長反応により遺伝的変異を含む標的核酸 - 一本鎖核酸複合体を増幅させる段階と、d) 前記段階c) で増幅された遺伝的変異を含む標的核酸 - 一本鎖核酸複合体から分離された一本鎖核酸断片の量を測定する段階と、を含む、単一標的遺伝子の遺伝的変異検出方法を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0024】

上記目的を達成するための本発明は、単一標的遺伝子の遺伝的変異検出用の一本鎖核酸を提供する。

【0025】

詳しくは、前記一本鎖核酸は、i) X - Y - Zの構造を有し、ii) 遺伝的変異を含む単一標的遺伝子の塩基配列の一部又は全部に相補的結合を行い、iii) 両末端又は内部に同一であり又は少なくとも二つの異なる探知可能なマーカーが付されており、前記Yは、単一標的遺伝子に位置する一つ又は二つの塩基配列で構成されたRNAであって、単一標的遺伝子とハイブリダイズするときに切断試薬により切断される。

40

【0026】

このとき、前記一本鎖核酸は、単一標的遺伝子の遺伝的変異が、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) である場合、前記一本鎖核酸は、(a) 前記Xは、4 ~ 20個の塩基配列で構成されるDNAであり、(b) 前記Zは、4 ~ 20個の塩基配列で構成されるDNAであることを特徴とし、又は、単一標的

50

遺伝子の遺伝的変異が、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP)、点突然変異 (point mutation) 又は miRNA アイソフォーム (isoform) である場合、(c) 前記 X は、10 ~ 30 個の塩基配列で構成される DNA であり、(d) 前記 Z は、1 ~ 5 個の塩基配列で構成される DNA であることを特徴とする。

【0027】

また、前記一本鎖核酸は、単一標的遺伝子の遺伝的変異が、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) である場合、単一標的遺伝子とハイブリダイズした後、切断試薬により前記 Y が切断されると、前記 X 及び Z も、単一標的遺伝子から分離され、プローブとして作動することを特徴とし、又は、単一標的遺伝子の遺伝的変異が、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP)、点突然変異 (point mutation) 又は miRNA アイソフォーム (isoform) である場合、単一標的遺伝子とハイブリダイズした後、切断試薬により前記 Y が切断されると、前記 Z は、単一標的遺伝子から分離されるが、前記 X は分離されず、プライマー及びプローブとして同時に作動することを特徴とする。

10

【0028】

また、本発明は、前記一本鎖核酸を含む、単一標的遺伝子の遺伝的変異のリアルタイム検出用キットを提供する。

【0029】

さらに、本発明は、a) 生物学的試料から検出しようとする遺伝的変異を含む標的核酸を得る段階と、b) 前記単一標的遺伝子の遺伝的変異検出用の一本鎖核酸を製造する段階と、c) 前記段階 a) で得られた標的核酸、前記段階 b) で製造された一本鎖核酸、前記段階 a) で得られた標的核酸と相補的な塩基配列を有するプライマーセット、及び切断試薬と混合した後、伸長反応により遺伝的変異を含む標的核酸 - 一本鎖核酸複合体を増幅させる段階と、d) 前記段階 c) で増幅された遺伝的変異を含む標的核酸 - 一本鎖核酸複合体から分離された一本鎖核酸断片の量を測定する段階と、を含む、単一標的遺伝子の遺伝的変異検出方法を提供する。

20

【発明の効果】

【0030】

本発明に係る一本鎖核酸を用いた単一標的遺伝子の遺伝的変異をリアルタイムで検出する方法は、従来、qPCR を用いた SNP 及び点突然変異 (point mutation) 分析方法と比べて、リアルタイムの確認のための別途位置のプローブを必要とせず、SNP 及び点突然変異のような遺伝的変異をさらに正確に測定することができる利点がある。すなわち、本発明に係る一本鎖核酸は、切断試薬によってのみ切断され、従来、プローブを利用した遺伝的変異検出方法に比べてさらに正確に測定することができる。

30

【0031】

また、本発明に係る一本鎖核酸を用いて SNP 及び点突然変異のような遺伝的変異の分析時、溶融温度 (melting temperature) 分析のような別途の突然変異確認過程を要せず、直ちに突然変異の区別が可能である。

【0032】

したがって、本発明の一本鎖核酸及びこれを用いた単一標的遺伝子の遺伝的変異のリアルタイム検出方法は、KRAS、EGFR など発生する様々な点突然変異を迅速かつ正確に区別することができ、癌をはじめとした様々な疾病の診断、治療剤の選択及び予後診断に有用に用いられる。

40

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】本発明の一実施例に係る一本鎖核酸を用いて ApoE 遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、ApoE 一本鎖核酸 1 型 (配列番号 3 乃至 6) を用いて、ApoE 遺伝子の 6 種の表現型の E2/E2、E3/E3、E4/E4、E2/E3、E2/E4、E3/E4 の区別が可能であることを確認した PCR 結果である。

50

【図2】本発明の一実施例に係るG13D一本鎖核酸1型を用いてKRAS遺伝子のG13D突然変異遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、G13D突然変異細胞株であるHCT-15細胞株のゲノムDNA(gDNA)を濃度別に希釈した後、gDNAの濃度によるG13D突然変異遺伝子の発現有無を、G13D一本鎖核酸1型(配列番号7)を用いて確認したPCR結果である。

【図3】本発明の一実施例に係るKRAS野生型一本鎖核酸を用いて野生型KRAS遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、KRAS野生型細胞株であるNCI-H1975細胞株のgDNAを濃度別に希釈した後、gDNAの濃度による野生型KRAS遺伝子の発現有無を、KRAS野生型一本鎖核酸1型(配列番号8)を用いて確認したPCR結果である。

10

【図4】本発明の一実施例に係るKRAS野生型一本鎖核酸1型を用いて野生型KRAS遺伝子の発現有無を確認した図である。詳しくは、HCT-15細胞株のゲノムDNA(gDNA)を濃度別に希釈した後、gDNAの濃度による野生型KRAS遺伝子の発現有無を、KRAS野生型一本鎖核酸1型(配列番号8)を用いて確認したPCR結果であって、HCT-15細胞株は、ヘテロ接合型(heterozygous type)の遺伝子として、G13D突然変異及びKRAS野生型の遺伝子を同時に保有している細胞株であることを確認した図である。

【図5】本発明の一実施例に係るKRAS野生型一本鎖核酸1型を用いて野生型KRAS遺伝子と混合されたKRAS遺伝子のG13D突然変異遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、HCT-15細胞株のゲノムDNA(gDNA)を、NCI-H1975細胞株のゲノムDNA(gDNA)の濃度に対して10~0.01%となるように希釈し、これらの細胞株のゲノムDNA(gDNA)を混合した後、G13D一本鎖核酸1型(配列番号7)を用いて確認したPCR結果である。

20

【図6】本発明の一実施例に係る一本鎖核酸2型を用いてApoE遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、ApoE一本鎖核酸2型(配列番号11乃至14)を用いて、ApoE遺伝子の6種の表現型のE2/E2、E3/E3、E4/E4、E2/E3、E2/E4、E3/E4の区別が可能であることを確認したPCR結果である。

【図7】本発明の一実施例に係る一本鎖核酸2型を用いてKRAS遺伝子のG12V突然変異遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、G12V突然変異細胞株であるSW620細胞株のゲノムDNA(gDNA)を濃度別に希釈した後、gDNAの濃度によるG12V突然変異遺伝子の発現有無を、G12V一本鎖核酸2型(配列番号15)を用いて確認したPCR結果である。

30

【図8】本発明の一実施例に係る一本鎖核酸2型を用いてKRAS遺伝子のG12C突然変異遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、G12C突然変異細胞株であるMIA-Paca2細胞株のgDNAを濃度別に希釈した後、gDNAの濃度によるG12C突然変異遺伝子の発現有無を、G12C一本鎖核酸2型(配列番号16)を用いて確認したPCR結果である。

【図9】本発明の一実施例に係る一本鎖核酸2型を用いてKRAS遺伝子のG12S突然変異遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、G12S突然変異細胞株であるA549細胞株のgDNAを濃度別に希釈した後、gDNAの濃度によるG12S突然変異遺伝子の発現有無を、G12S一本鎖核酸2型(配列番号17)を用いて確認したPCR結果である。

40

【図10】本発明の一実施例に係る一本鎖核酸2型を用いてEGFR遺伝子アクソン20のT790M突然変異遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、T790M突然変異細胞株であるH1975細胞株及び野生型細胞株であるA549細胞株のgDNAをそれぞれ濃度別に希釈した後、gDNAの濃度によるT790M突然変異遺伝子の発現有無を、T790M一本鎖核酸2型(配列番号24)を用いて確認したPCR結果である。

【図11】本発明の一実施例に係る一本鎖核酸2型を用いてlet-7amiRNA遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、RT-PCRによりlet-7amiRNAから合成して得られたlet-7acDNAを濃度別に希釈した後、cDNA

50

の濃度による *let-7a* miRNA 遺伝子の発現有無を、*let-7a* 一本鎖核酸 2 型 (配列番号 21) を用いて確認した PCR 結果である。

【図 12】本発明の一実施例に係る一本鎖核酸 2 型を用いて *let-7d* miRNA 遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、RT-PCR により *let-7d* miRNA から合成して得られた *let-7d* cDNA を濃度別に希釈した後、cDNA の濃度による *let-7d* miRNA 遺伝子の発現有無を、*let-7d* 一本鎖核酸 2 型 (配列番号 24) を用いて確認した PCR 結果である。

【図 13】本発明の一実施例に係る一本鎖核酸 2 型を用いて *let-7* miRNA 遺伝子の特異的検出能を確認した図であって、詳しくは、*let-7d* cDNA (1 pM 濃度) の存在下で、*let-7a* cDNA を濃度別に希釈した後、cDNA の濃度による *let-7a* miRNA 遺伝子の発現有無、すなわち、*let-7d* cDNA の存在下での *let-7a* miRNA 遺伝子に対する特異的検出の有無を、*let-7a* 一本鎖核酸 2 型 (配列番号 21) を用いて確認した PCR 結果である。

10

【図 14】本発明の一実施例に係る一本鎖核酸 2 型を用いて miRNA 34a 遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、RT-PCR により miRNA 34a から合成して得られた miRNA 34a cDNA を濃度別に希釈した後、cDNA の濃度による miRNA 34a 遺伝子の発現有無を、miRNA 34a 一本鎖核酸 2 型 (配列番号 27) を用いて確認した PCR 結果である。

【図 15】本発明の一実施例に係る一本鎖核酸 2 型を用いて miRNA 34b 遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、RT-PCR により miRNA 34b から合成して得られた miRNA 34b cDNA を濃度別に希釈した後、cDNA の濃度による miRNA 34b 遺伝子の発現有無を、miRNA 34b 一本鎖核酸 2 型 (配列番号 30) を用いて確認した PCR 結果である。

20

【図 16】本発明の一実施例に係る一本鎖核酸 2 型を用いて miRNA 34c 遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、RT-PCR により miRNA 34c から合成して得られた miRNA 34c cDNA を濃度別に希釈した後、cDNA の濃度による miRNA 34c 遺伝子の発現有無を、miRNA 34c 一本鎖核酸 2 型 (配列番号 33) を用いて確認した PCR 結果である。

【図 17】本発明の一実施例に係る一本鎖核酸 2 型を用いて miRNA 34 遺伝子の特異的検出能を確認した図であって、詳しくは、miRNA 34a cDNA (100 pM 濃度) の存在下で、miRNA 34c cDNA を濃度別に希釈した後、cDNA の濃度による miRNA 34c 遺伝子の発現有無、すなわち、miRNA 34a cDNA の存在下での miRNA 34c 遺伝子に対する特異的検出の有無を、miRNA 34c 一本鎖核酸 2 型 (配列番号 33) を用いて確認した PCR 結果である。

30

【図 18】本発明の一実施例に係る一本鎖核酸 2 型を用いて miRNA 34 遺伝子の特異的検出能を確認した図であって、詳しくは、miRNA 34b cDNA (100 pM 濃度) の存在下で、miRNA 34c cDNA を濃度別に希釈した後、cDNA の濃度による miRNA 34c 遺伝子の発現有無、すなわち、miRNA 34b cDNA の存在下での miRNA 34c 遺伝子に対する特異的検出の有無を、miRNA 34c 一本鎖核酸 2 型 (配列番号 33) を用いて確認した PCR 結果である。

40

【図 19】本発明の一実施例に係る DNA オリゴ (DNA oligo) - DNA - RNA - 突然変異 - DNA オリゴ類型の KRAS 遺伝子 G12D の一本鎖核酸 2 型 (G12D - R1DrMR2) を用いて、KRAS 遺伝子の G12D 突然変異遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、G12D 突然変異細胞株である AspC-1 細胞株及び KRAS 野生型細胞株である HT-29 細胞株の gDNA を、それぞれ濃度別に希釈した後、gDNA の濃度による G12D 突然変異遺伝子の発現有無を、G12D 一本鎖核酸 2 型 (配列番号 36) を用いて確認した PCR 結果である。

【図 20】本発明の一実施例に係る DNA オリゴ - RNA - DNA - 突然変異 - DNA オリゴ類型の KRAS 遺伝子 G12D の一本鎖核酸 2 型 (G12D - R1rDMR2) を用いて、KRAS 遺伝子の G12D 突然変異遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳し

50

くは、G12D突然変異細胞株であるAspc-1細胞株及びKRAS野生型細胞株であるHT-29細胞株のgDNAを、それぞれ濃度別に希釈した後、gDNAの濃度によるG12D突然変異遺伝子の発現有無を、G12D一本鎖核酸2型(配列番号37)を用いて確認したPCR結果である。

【図21】本発明の一実施例に係るDNAオリゴ-DNA-突然変異-RNA-DNA-DNAオリゴタイプのKRAS遺伝子G12Dの一本鎖核酸2型(G12D-R1DMrDR2)を用いて、KRAS遺伝子のG12D突然変異遺伝子の発現有無を確認した図であって、詳しくは、G12D突然変異細胞株であるAspc-1細胞株及びKRAS野生型細胞株であるHT-29細胞株のgDNAを、それぞれ濃度別に希釈した後、gDNAの濃度によるG12D突然変異遺伝子の発現有無を、G12D一本鎖核酸2型(配列番号38)を用いて確認したPCR結果である。

10

【発明を実施するための形態】

【0034】

本発明は、単一標的遺伝子の遺伝的変異のリアルタイム検出用の一本鎖核酸及びこれを用いた検出方法に関する。さらに詳しくは、X-Y-Zの構造を有し、一塩基多型(SNP)、点突然変異、又はmiRNAアイソフォーム(isoform)のような遺伝的変異が含まれた単一標的遺伝子の塩基配列の一部又は全部に相補的結合が可能な塩基配列で構成された一本鎖核酸を用いて、単一標的遺伝子の遺伝的変異をリアルタイムで検出する方法及びそのためのキットに関する。

【0035】

一つの態様によれば、本発明は、単一標的遺伝子の遺伝的変異検出用の一本鎖核酸を提供する。

20

【0036】

本発明において、前記一本鎖核酸は、i) X-Y-Zの構造を有し、ii) 遺伝的変異を含む単一標的遺伝子の塩基配列の一部又は全部に相補的結合を行い、iii) 両末端又は内部に同一であり又は少なくとも二つの異なる探知可能なマーカーが付されていることを特徴とする。

【0037】

このとき、付される探知可能なマーカーの位置は、特定の部位に限定されず、切断試薬によるY部位の切断時に探知可能なマーカーが分離される位置であればどこでも可能である。

30

【0038】

また、前記一本鎖核酸は、リアルタイムの検出を目的とする遺伝的変異を含む単一標的遺伝子の塩基配列の一部又は全部に相補的結合して複合体を形成し、増幅させることを特徴とする。

【0039】

本発明において、前記一本鎖核酸は、遺伝的変異の検出時、一塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP)、点突然変異(point mutation)又はmiRNAアイソフォーム(isoform)の存在を探知する核酸を意味する。ここで、一塩基多型(SNP)の存在を探知する一本鎖核酸は、「1型一本鎖核酸」又は「一本鎖核酸1型」と称され、一塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP)又は点突然変異又はmiRNAアイソフォームの存在を探知する一本鎖核酸は、「2型一本鎖核酸」又は「一本鎖核酸2型」と称される。前記1型一本鎖核酸は、2型一本鎖核酸とは異なり、プローブ(probe)として作動可能であり、2型一本鎖核酸は、1型一本鎖核酸とは異なり、プライマー(primer)及びプローブ(probe)として同時に使用可能である。

40

【0040】

具体的に、1型一本鎖核酸が単一標的遺伝子とハイブリダイズした後、切断試薬により、前記Yが切断されると、前記X及びZも、単一標的遺伝子から分離され、プローブとして作動可能であり、2型一本鎖核酸が単一標的遺伝子とハイブリダイズした後、切断試薬により、前記Yが切断されると、前記Zは、単一標的遺伝子から分離されるが、前記Xは分

50

離されず、プライマー及びプローブとして同時に作動することを特徴とする。

【0041】

本発明の一本鎖核酸は、X - Y - Zの構造を有し、それぞれのX、Y及びZは、多様な個数のヌクレオチド ( n u c l e o t i d e ) を有してもよい。

【0042】

前記Yは、単一標的遺伝子に位置する一つ又は二つの塩基配列で構成されたRNAであり、切断試薬により切断される部位である。

【0043】

ここで、切断試薬としては、DNase、RNase、ヘリカーゼ ( h e l i c a s e ) 、エクソヌクラーゼ、及びエンドヌクラーゼのような酵素による切断が行われることが好ましいが、その他の公知された切断試薬が用いられても構わない。

10

【0044】

前記Xは、一塩基多型 ( s i n g l e n u c l e o t i d e p o l y m o r p h i s m ; S N P ) の存在を探知する場合、4 ~ 20個、好ましくは4 ~ 19個、より好ましくは4 ~ 18個、さらにより好ましくは5 ~ 18個、さらにより好ましくは6 ~ 18個、さらにより好ましくは6 ~ 17個、さらにより好ましくは6 ~ 16個、最も好ましくは6 ~ 15個の塩基配列で構成されるDNAである。これによるXは、1型一本鎖核酸に属する。

【0045】

また、前記Xは、一塩基多型 ( s i n g l e n u c l e o t i d e p o l y m o r p h i s m ; S N P ) 又は点突然変異 ( p o i n t m u t a t i o n ) 又はmiRNAアイソフォーム ( i s o f o r m ) の存在を探知する場合、10 ~ 30個、好ましくは11 ~ 30個、より好ましくは12 ~ 30個、さらにより好ましくは13 ~ 30個、さらにより好ましくは14 ~ 30個、さらにより好ましくは15 ~ 30個、さらにより好ましくは15 ~ 29個、さらにより好ましくは15 ~ 28個、さらにより好ましくは15 ~ 27個、さらにより好ましくは15 ~ 26個、さらにより好ましくは15 ~ 25個、さらにより好ましくは15 ~ 24個、さらにより好ましくは15 ~ 23個、さらにより好ましくは15 ~ 22個、さらにより好ましくは15 ~ 21個、最も好ましくは15 ~ 20個の塩基配列で構成されるDNAである。これによるXは、2型一本鎖核酸に属する。

20

【0046】

前記Zは、一塩基多型 ( s i n g l e n u c l e o t i d e p o l y m o r p h i s m ; S N P ) の存在を探知する場合、4 ~ 20個、好ましくは4 ~ 19個、より好ましくは4 ~ 18個、さらにより好ましくは5 ~ 18個、さらにより好ましくは6 ~ 18個、さらにより好ましくは6 ~ 17個、さらにより好ましくは6 ~ 16個、最も好ましくは6 ~ 15個の塩基配列で構成されるDNAである。これによるZは、1型一本鎖核酸に属する。

30

【0047】

また、前記Zは、点突然変異 ( p o i n t m u t a t i o n ) 又はmiRNAアイソフォーム ( i s o f o r m ) の存在を探知する場合、1 ~ 5個、好ましくは2 ~ 5個、より好ましくは2 ~ 4個、さらにより好ましくは2 ~ 3個で構成されるDNAである。これによるZは、2型一本鎖核酸に属する。

40

【0048】

本発明において、前記遺伝的変異の検出は、一塩基多型 ( S N P ) 、点突然変異 ( p o i n t m u t a t i o n ) 又はmiRNAアイソフォーム ( i s o f o r m ) の存在を探知するものであって、上述した一本鎖核酸中のX及びZを構成する塩基の個数により、これらのそれぞれの遺伝的変異の検出を特異的かつ敏感に探知することができる。

【0049】

本発明の一実施例において、ApoE一本鎖核酸 ( 配列番号3乃至6 ) を用いて、ApoE遺伝子の6種の表現型のE2 / E2、E3 / E3、E4 / E4、E2 / E3、E2 / E4、E3 / E4が正確に区別できることを、リアルタイムPCRにより確認した ( 図1 ) 。

【0050】

50

本発明の一実施例において、K R A S 遺伝子の G 1 2 V 突然変異細胞株である S W 6 2 0 細胞株のゲノム DNA ( g D N A ) を濃度別に希釈した後、g D N A の濃度による G 1 2 V 突然変異遺伝子の発現有無を、G 1 2 V 一本鎖核酸 ( 配列番号 1 5 ) を用いて、リアルタイム P C R により確認した ( 図 7 ) 。

【 0 0 5 1 】

本発明の一実施例において、K R A S 遺伝子の G 1 2 C 突然変異細胞株である M I A - P a c a 2 細胞株の g D N A を濃度別に希釈した後、g D N A の濃度による G 1 2 C 突然変異遺伝子の発現有無を、G 1 2 C 一本鎖核酸 ( 配列番号 1 6 ) を用いて、リアルタイム P C R により確認した ( 図 8 ) 。

【 0 0 5 2 】

本発明の一実施例において、K R A S 遺伝子の G 1 2 S 突然変異細胞株である A 5 4 9 細胞株の g D N A を濃度別に希釈した後、g D N A の濃度による G 1 2 S 突然変異遺伝子の発現有無を、G 1 2 S 一本鎖核酸 ( 配列番号 1 7 ) を用いて、リアルタイム P C R により確認した ( 図 9 ) 。

【 0 0 5 3 】

本発明の一実施例において、E G F R 遺伝子アクソン 2 0 の T 7 9 0 M 突然変異細胞株である H 1 9 7 5 細胞株及び野生型細胞株である A 5 4 9 細胞株の g D N A をそれぞれ濃度別に希釈した後、g D N A の濃度による T 7 9 0 M 突然変異遺伝子の発現有無を、T 7 9 0 M 一本鎖核酸 ( 配列番号 1 9 ) を用いて、リアルタイム P C R により確認した ( 図 1 0 ) 。

【 0 0 5 4 】

本発明の一実施例において、l e t - 7 a c D N A を濃度別に希釈した後、c D N A の濃度による l e t - 7 a m i R N A 遺伝子の発現有無を、l e t - 7 a 一本鎖核酸 ( 配列番号 2 1 ) を用いて、リアルタイム P C R により確認した ( 図 1 1 ) 。

【 0 0 5 5 】

本発明の一実施例において、l e t - 7 d c D N A を濃度別に希釈した後、c D N A の濃度による l e t - 7 d m i R N A 遺伝子の発現有無を、l e t - 7 d 一本鎖核酸 ( 配列番号 2 4 ) を用いて、リアルタイム P C R により確認した ( 図 1 2 ) 。

【 0 0 5 6 】

本発明の一実施例において、1 p M 濃度の l e t - 7 d c D N A 2  $\mu$  l に、1 / 1 0 ずつ 1 0 0 f M から 1 a M の濃度まで希釈した l e t - 7 a c D N A 2  $\mu$  l ずつを添加した実験群から、1 0 0 f M から 1 f M の濃度まで l e t - 7 a c D N A を探知することができることを確認した ( 図 1 3 ) 。

【 0 0 5 7 】

本発明の一実施例において、m i R N A 3 4 a c D N A を濃度別に希釈した後、c D N A の濃度による m i R N A 3 4 a 遺伝子の発現有無を、m i R N A 3 4 a 一本鎖核酸 ( 配列番号 2 7 ) を用いて、リアルタイム P C R により確認した ( 図 1 4 ) 。

【 0 0 5 8 】

本発明の一実施例において、m i R N A 3 4 b c D N A を濃度別に希釈した後、c D N A の濃度による m i R N A 3 4 b 遺伝子の発現有無を、m i R N A 3 4 b 一本鎖核酸 ( 配列番号 3 0 ) を用いて、リアルタイム P C R により確認した ( 図 1 5 ) 。

【 0 0 5 9 】

本発明の一実施例において、m i R N A 3 4 c c D N A を濃度別に希釈した後、c D N A の濃度による m i R N A 3 4 c 遺伝子の発現有無を、m i R N A 3 4 c 一本鎖核酸 ( 配列番号 3 3 ) を用いて、リアルタイム P C R により確認した ( 図 1 6 ) 。

【 0 0 6 0 】

本発明の一実施例において、m i R N A 3 4 a c D N A 又は m i R N A 3 4 b c D N A に、m i R N A 3 4 c c D N A を濃度別に希釈した後、m i R N A 3 4 c 一本鎖核酸 ( 配列番号 3 3 ) を用いて、リアルタイム P C R により、m i R N A 3 4 c 遺伝子の発現有無を、微細濃度でも確認することができた ( 図 1 7 及び図 1 8 ) 。

10

20

30

40

50

## 【0061】

本発明において、前記探知可能なマーカーとしては、一本鎖核酸に共有結合又は非共有結合によって結合する蛍光物質、又は蛍光物質及び消光物質からなる蛍光ペアを用いることができる。

## 【0062】

前記蛍光物質は、例えば、Cy3、Cy5、Cy5.5、Bodipy、Alexa 488、Alexa 532、Alexa 546、Alexa 568、Alexa 594、Alexa 660、ローダミン(Rhodamine)、TAMRA、FAM、FITC、Fluor X、ROX、Texas Red、ORNAge green 488X、ORNAge green 514X、HEX、TET、JOE、Oyster 556、Oyster 645、Bodipy 630/650、Bodipy 650/665、Calfluor ORNAge 546、Calfluor red 610、Quasar 670及びビオチンからなる群より選ばれるいずれか1つであり得るが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

10

## 【0063】

また、前記消光物質は、例えば、DDQ-1、Dabcyl、Eclipse、6-TAMRA、BHQ-1、BHQ-2、BHQ-3、Iowa Black RQ-Sp、QSY-7、QSY-2及びMGBNFQからなる群より選ばれるいずれか1つであり得るが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

## 【0064】

本発明で探知可能なマーカーとして蛍光ペアを用いる場合、蛍光物質及び消光物質の位置は、X又はZであってもよく、Y部位であってもよく、これらのうちいずれか1箇所に限定されるものではない。例えば、蛍光物質はXに位置し、消光物質はY又はZに位置してもよい。

20

## 【0065】

本発明の一本鎖核酸は、単一標的遺伝子の遺伝的変異として、点突然変異(point mutation)又はmiRNAアイソフォーム(isoform)の存在を検出するにあたり、i)核酸のうちRNAからcDNAを合成するためのRTプライマー；ii)核酸(DNA又はRNA)から合成されたcDNAを増幅するための順方向プライマー；iii)核酸(DNA又はRNA)から合成されたcDNAを増幅するための逆方向プライマー；iv)核酸(DNA又はRNA)から合成されたcDNAを増幅するための順方向プライマー及び逆方向プライマー；又はv)検出しようとする核酸(DNA又はRNA)をリアルタイムで確認するためのプローブ；として使用できる。

30

## 【0066】

特に、本発明の一本鎖核酸を、RNA(miRNAなどを含む)からcDNAを合成及び増幅するためのRTプライマー；又は順方向プライマー及びプローブ；又は逆方向プライマー及びプローブ；として使用する場合、cDNA合成時にRTプライマーをループ状に形成する過程や、ポリAを形成する過程が不要であり、検出しようとするRNAとハイブリダイズしてcDNAを合成し、探知しようとするRNA(miRNAなどを含む)を増幅及びリアルタイムで検出することができる。

40

## 【0067】

他の一つの態様によれば、本発明は、前記一本鎖核酸を含む、単一標的遺伝子の遺伝的変異のリアルタイム検出用キットを提供する。

## 【0068】

本発明の一本鎖核酸を、単一標的遺伝子の遺伝的変異を検出するためのキットとして使用する場合、前記キットは、本発明の一本鎖核酸の他に、一本鎖核酸のY部位を切断できる酵素をさらに含むことが好ましい。

## 【0069】

本発明において、前記一本鎖核酸のY部位を切断できる酵素は、一本鎖核酸のY部位を特異的に切断できるものであればいかなるものであってもよい。例えば、Y部位がDNAで

50

ある場合は、DNAヌクレアーゼ (DNA nuclease、DNase)、具体的には、DNase I、DNase II、S1核酸加水分解酵素、核酸加水分解酵素P1、APエンドヌクレアーゼ、又はUvrABSC核酸加水分解酵素などを使用することが好ましく、Y部位がRNAである場合は、RNA加水分解酵素 (ribonuclease、RNase)、具体的には、RNase II、RNase III、RNase IV、RNase H、又はRNase T2等を使用することが好ましい。

【0070】

本発明の一本鎖核酸を、単一標的遺伝子の遺伝的変異を検出するためのキットとして使用する場合、前記キットは、本発明の一本鎖核酸と一本鎖核酸のY部位を切断できる酵素と他に、DNAの増幅反応に必要な試薬をさらに含むことができる。

10

【0071】

前記増幅反応に必要な試薬としては、例えば、適量のDNAポリメラーゼ (例えば、テルムス・アクウァーティクス (Thermusaquaticus) (Taq)、サーマス・サーモフィルス (Thermusthermophilus) (Tth)、サーマス・フィリフォルミス (Thermusfiliformis)、サーマス・フラブス (Thermisflavus)、サーモコッカス・リトラリス (Thermococcus litoralis) 又はピュロコックス・フリオス (Pyrococcus furiosus) (Pfu) から得られた熱安定性DNAポリメラーゼ)、DNAポリメラーゼ助因子 (Mg<sup>2+</sup>)、緩衝液、dNTPs (dATP、dCTP、dGTP及びdTTP) 及び水 (H<sub>2</sub>O) が挙げられる。また、前記緩衝液としては、適量のトリトンX-100 (Triton X-100)、ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide、DMSO)、ツイーン20 (Tween20)、ノニデットP40 (nonidet P40)、PEG 6000、ホルムアミド及びウシ血清アルブミン (BSA) などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0072】

また他の一つの態様によれば、本発明は、a) 生物学的試料から検出しようとする遺伝的変異を含む標的核酸を得る段階と、b) 上述した一本鎖核酸を製造する段階と、c) 前記段階a) で得られた標的核酸、前記段階b) で製造された一本鎖核酸、前記段階a) で得られた標的核酸と相補的な塩基配列を有するプライマーセット、及び切断試薬と混合した後、伸長反応により遺伝的変異を含む標的核酸 - 一本鎖核酸複合体を増幅させる段階と、d) 前記段階c) で増幅された遺伝的変異を含む標的核酸 - 一本鎖核酸複合体から分離された一本鎖核酸断片の量を測定する段階と、を含む、単一標的遺伝子の遺伝的変異検出方法を提供する。

30

【0073】

本発明に係る単一標的遺伝子の遺伝的変異をリアルタイムで検出する方法について、各段階に応じて具体的に説明すると、次の通りである。

【0074】

a) 生物学的試料から検出しようとする遺伝的変異を含む標的核酸を得る段階である。

【0075】

本発明において、前記遺伝的変異を含む標的核酸は、試料から検出しようとするRNA又はDNAであり、又は前記RNAを逆転写ポリメラーゼにより増幅して得られたcDNAであり得る。

40

【0076】

前記試料は、生物学的試料であり、又は生物学的試料から分離されたRNA、DNA又はこれらの断片であり得る。具体的には、前記試料は、血液、唾液、尿、糞便、組織、細胞及び生検標本からなる群より選ばれるいずれか1つ以上であり、又は保存された生物学的試料から分離されたRNA、DNA又はこれらの断片であり得るが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

【0077】

前記保存された生物学的試料は、当業界に公知の通常の保存方法に基づいて1週間以上、

50

1年以上、例えば、1年乃至10年間保存、冷凍保存、又はホルマリンで固定された組織を常温で保存した組織から由来したものであり得る。

【0078】

本発明において、試料からのRNA又はDNAの抽出には、当業界に公知の様々な方法を用いることができる。

【0079】

b) 前記一本鎖核酸を製造する段階である。

【0080】

本発明において、一本鎖核酸は、上述した通りであり、詳しくは、i) X - Y - Zの構造を有し、ii) 遺伝的変異を含む単一標的遺伝子の塩基配列の一部又は全部に相補的結合を行い、iii) 両末端又は内部に同一であり又は少なくとも二つの異なる探知可能なマーカが付されていることを特徴とする。

10

【0081】

本発明において、前記探知可能なマーカとしては、一本鎖核酸に共有結合又は非共有結合によって結合する蛍光物質、又は蛍光物質及び消光物質からなる蛍光ペアを用いることができる。

【0082】

前記蛍光物質は、例えば、Cy3、Cy5、Cy5.5、Bodipy、Alexa 488、Alexa 532、Alexa 546、Alexa 568、Alexa 594、Alexa 660、ローダミン(Rhodamine)、TAMRA、FAM、FITC、Fluor X、ROX、Texas Red、ORNAge green 488X、ORNAge green 514X、HEX、TET、JOE、Oyster 556、Oyster 645、Bodipy 630/650、Bodipy 650/665、Calfluor ORNAge 546、Calfluor red 610、Quasar 670及びビオチンからなる群より選ばれるいずれか1つであり得るが、必ずしもこれらに限定されるものではない。また、前記消光物質は、例えば、DDQ-1、Dabcyl、Eclipse、6-TAMRA、BHQ-1、BHQ-2、BHQ-3、Iowa Black RQ-Sp、QSY-7、QSY-2及びMGBNFQからなる群より選ばれるいずれか1つであり得るが、必ずしもこれらに限定されるものではない。

20

【0083】

c) 遺伝的変異を含む標的核酸 - 一本鎖核酸複合体を増幅させる段階である。

30

【0084】

本発明において、前記遺伝的変異を含む標的核酸 - 一本鎖核酸複合体の増幅は、前記得られた標的核酸、前記製造された一本鎖核酸、前記得られた標的核酸と相補的な塩基配列を有するプライマーセット、及び切断試薬と混合した後、伸長反応により行われる。

【0085】

本発明において、前記切断試薬は、酵素を介した切断が行われることが好ましいが、その他、公知の切断試薬が用いられてもよい。このとき、DNase、RNase、ヘリカーゼ(helicase)、エクソヌクラーゼ、及びエンドヌクラーゼのような酵素により触媒されるRNA又はDNAの切断の表示のため、「酵素媒介の切断(enzyme-mediated cleavage)」との用語を用いる。本発明の好適な実施例において、ハイブリダイズしたプローブの切れ目(nick)の生成及び切断は、エンドヌクラーゼ又はエクソヌクラーゼであるリボヌクラーゼによって行われることがさらに好ましい。リボヌクラーゼは、二本鎖DNA-RNAのハイブリダイゼーション鎖からリボ核酸(ribonucleic acid)の切れ目を生成し、切断させる二本鎖リボヌクラーゼであることがさらに好ましい。

40

【0086】

本発明において、前記切断試薬は、RNase H、RNase II、RNase III、RNase IV又はRNase T2のRNA加水分解酵素(ribonuclease、RNase)であり得るが、これに限定されるものではない。

50

## 【 0 0 8 7 】

d) 前記増幅された遺伝的変異を含む標的核酸 - 一本鎖核酸複合体から分離された一本鎖核酸断片の量を測定する段階である。

## 【 0 0 8 8 】

本発明において、一本鎖核酸断片の量の測定は、様々な検出方法を用いて行うことができる。具体的には、本発明により分離された一本鎖核酸断片の量の測定は、リアルタイム又は反応が終了した後に行うことが好ましく、蛍光光度の変化又は化学発光の測定により行うことができる。

## 【 0 0 8 9 】

前記蛍光光度の変化又は化学発光の測定装置としては、当業界に公知の蛍光マーカーの検出が可能な装置であればいかなる装置でも使用可能であり、例えば、TRIADマルチモード検出器 (TRIAD Multimode Detector)、Wallac Victor 蛍光 (Wallac/Victor fluorescence) 又はパーキンエルマー社のLB50Bルミネセンス分光計 (Perkin-Elmer LB50B luminescence spectrometer)、ライトサイクラー96 (Light Cycler 96)、アプライドバイオシステムズ7500 (Applied Biosystems 7500)、又はバイオラッド社のCFX96リアルタイムPCRサーモサイクラー (Biorad CFX96 real-time PCR thermocycler) などが使用できるが、これらに限定されない。

## 【 0 0 9 0 】

本発明により切断された一本鎖核酸断片の量の測定及び検出方法は、一本鎖核酸又は反応液に流入した標識又は探知可能なマーカーの種類に応じて変わることができる。

## 【 0 0 9 1 】

本発明における一本鎖核酸は、Y部位が切断された後、増幅する段階によって、Y部位の遺伝的変異を区別し易くするので、以降の核酸増幅反応によって突然変異の確認を可能にする。すなわち、本発明の一本鎖核酸において、Y部位と標的核酸の遺伝的変異部位との間にハイブリダイゼーションが形成された場合、Y部位が遺伝的変異部位と正確に相補的結合を行ったときのみ切断され、以降、増幅反応が行われるので、遺伝的変異の有無を明確に確認することができる。具体的に、本発明の一本鎖核酸において、Y部位と標的核酸の遺伝的変異部位がハイブリダイゼーションを形成するようにしたにもかかわらず、Y部位が相補的結合を行わなかった場合は、Y部位が切断されないので、増幅反応が引き起こされず、これは、標的核酸に測定しようとする遺伝的変異がないことを意味する。これに対して、本発明の一本鎖核酸におけるY部位と、突然変異されなかった、標的核酸の遺伝的変異が発生する部位とが、ハイブリダイゼーションを形成するようにしたにもかかわらず、Y部位が相補的結合を行わなかった場合は、Y部位が切断されないので、増幅反応が引き起こされず、これは、標的核酸に遺伝的変異があったことを意味する。

## 【 0 0 9 2 】

本発明において、前記遺伝的変異の検出は、一塩基多型 (SNP)、点突然変異 (point mutation) 又はmiRNAアイソフォーム (isoform) の存在を探知することを意味する。

## 【 0 0 9 3 】

本発明の一実施例において、G12D突然変異細胞株であるAspc-1細胞株及びKRAS野生型細胞株であるHT-29細胞株のgDNAを、それぞれ濃度別に希釈した後、gDNAの濃度によるG12D突然変異遺伝子の発現有無を、DNAオリゴ (DNA oligo) - DNA - RNA - 突然変異 - DNAオリゴ類型のKRAS遺伝子G12Dの一本鎖核酸 (G12D-R1DrMR2; 配列番号36) を用いてリアルタイムPCRによって確認した (図19)。

## 【 0 0 9 4 】

本発明の一実施例において、G12D突然変異細胞株であるAspc-1細胞株及びKRAS野生型細胞株であるHT-29細胞株のgDNAを、それぞれ濃度別に希釈した後、

10

20

30

40

50

g DNAの濃度によるG12D突然変異遺伝子の発現有無を、DNAオリゴ-RNA-DNA-突然変異-DNAオリゴタイプのKRAS遺伝子G12Dの一本鎖核酸(G12D-R1rDMR2;配列番号37)を用いてリアルタイムPCRによって確認した(図20)。

【0095】

本発明の一実施例において、G12D突然変異細胞株であるAspc-1細胞株及びKRAS野生型細胞株であるHT-29細胞株のgDNAを、それぞれ濃度別に希釈した後、gDNAの濃度によるG12D突然変異遺伝子の発現有無を、DNAオリゴ-DNA-突然変異-RNA-DNA-DNAオリゴタイプのKRAS遺伝子G12Dの一本鎖核酸(G12D-R1DMrDR2;配列番号38)を用いてリアルタイムPCRによって確認した(図21)。

10

【0096】

本発明に用いられやすい伸長反応、すなわち、核酸の増幅反応は、本発明が属する技術分野における通常の知識を有する者に公知されている。すなわち、前記標的核酸の増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction;PCR)、ローリングサークル増幅(rolling circle amplification;RCA)、鎖置換増幅(strand displacement amplification;SDA)又は核酸配列ベースの増幅(nucleic acid sequence based amplification;NASBA)を含むが、これらに限定されるものではない。前記核酸増幅の産物は、DNA又はRNAである。

20

【0097】

一般に、標的核酸の増幅及び上述した一本鎖核酸の切断による探知を同時に行えるように、反応混合液に標的核酸、一本鎖核酸、核酸増幅反応の構成物、及び切断酵素が含まれる。各増幅反応は、緩衝液条件、プライマー、反応温度、及び一本鎖核酸の切断条件などを、それぞれ個別に最適化させることが必要である。核酸増幅反応と併用して、本発明の検出方法を使用すれば、標的核酸を探知する敏感度と速度が顕著に向上され得る。

【0098】

一方、本発明の単一標的遺伝子の遺伝的変異のリアルタイム検出用の一本鎖核酸が、癌と関連したKRAS、EGFRなどの点突然変異の遺伝子を迅速かつ正確に検出及び探知できることが確認されたところ、前記一本鎖核酸は、癌診断用キット又は癌診断用組成物に適用可能であり、リアルタイムで癌を診断して癌発生有無の情報を提供するのにも有用に用いられる。

30

【実施例】

【0099】

以下、実施例を挙げて本発明の構成及び効果についてさらに詳細に説明する。これらの実施例は、専ら本発明を例示するためのものであって、本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されないものではない。

【0100】

実施例1：1型一本鎖核酸を用いたApoEの分析

1型一本鎖核酸を、アポリポタンパク質E(Apolipoprotein E, ApoE)遺伝子の6種の表現型のE2/E2、E3/E3、E4/E4、E2/E3、E2/E4、E3/E4を分析するために用いた。

40

【0101】

ヒト19番染色体に位置したApoE遺伝子は、心血管疾患及びアルツハイマー病と関連した遺伝子である。ApoE遺伝子は、コドン(codon)112(cys/arg)、コドン158(cys/arg)のDNAの一塩基多型(SNP)[ゲノムDNAの位置586(T/C)、724(T/C)番目]により、三つの対立遺伝子アイソフォーム(isoform)であるApoE<sub>2</sub>、ApoE<sub>3</sub>、ApoE<sub>4</sub>を有し、この対立遺伝子の組合せにより、6種の表現型(E2/E2、E3/E3、E4/E4、E2/E3、E2/E4、E3/E4)を有するようになる。前記ApoE遺伝子の各6種の表現

50

型を区別するために、5' - 末端を、それぞれの蛍光染料 ( d y e ) が付着された4種の改善した形態の1型一本鎖核酸を用いて、4 - p l e xで分析するようにした。既存の分析法では、通常、4 - p l e xによる分析法の感度及び特異度を満たし難かったが、本発明では、これについて満たすべき結果を示した。

【0102】

詳しくは、A p o E 遺伝子のコドン112及びコドン158の対立遺伝子型に対するS N Pの有無を測定するために、本発明に係る1型一本鎖核酸とプライマー ( p r i m e r ) を、下記表1に示すように、I D T ( I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s , U S A ) に依頼して製造した。ここで、1型一本鎖核酸は、X - Y - Zの構造を有するプローブであって、5' - 末端には、それぞれ6 - F A M、H E X、T e x a s R e d、C y 5を、また各3' - 末端にはI A B k F Qを付着した。また、リボヌクレオチド ( R N A ) は、デオキシリボヌクレオチド ( D N A ) との区別のために、配列の前に添え字「r」で表示した。

10

【0103】

【表1】

A p o E 特異的プライマーセット及び4種のA p o E 一本鎖核酸

プライマー名又は プローブ名	配列	配列番号
A p o E _ _ F プライマー	5' - G A A G G C C T A C A A A T C G G A A C T - 3'	1
A p o E _ _ R プライマー	5' - G C C A C C T G C T C C T T C A C - 3'	2
A p o E 一本鎖核酸1	56 - F A M / - G A G G A C G T G r U G C G G C C - / 3 I A B k F Q	3
A p o E 一本鎖核酸2	5 - H E X / - G A G G A C G T G r C G C G G C C - / 3 I A B k F Q	4
A p o E 一本鎖核酸3	5 - T e x R d / - C T G C A G A A G r U G C C T G G C A - / 3 I A B k F Q	5
A p o E 一本鎖核酸4	5 - C y 5 / - G C A G A A G r C G C C T G G C A - / 3 I A B k F Q	6

20

30

【0104】

分析のため、韓国細胞株バンクからヒト細胞株P C 3 ( E 2 / E 2 )、A 5 4 9 ( E 3 / E 3 )、U 9 3 7 ( E 4 / E 4 ) を分譲され、これからゲノムDNA ( g e n o m i c D N A ) を得た。6種の表現型に対する分析のため、ホモ接合型の表現型は、P C 3 ( E 2 / E 2 )、A 5 4 9 ( E 3 / E 3 )、U 9 3 7 ( E 4 / E 4 ) を用い、ヘテロ接合型の表現型は、各ゲノムDNAの混合型であるP C 3 + A 5 4 9 ( E 2 / E 3 )、P C 3 + U 9 3 7 ( E 2 / E 4 )、A 5 4 9 + U 9 3 7 ( E 3 / E 4 ) を、高濃度で、反応当たり32ng ( 約104コピー ) で含ませて分析に供した。

40

【0105】

前記表1におけるA p o E 一本鎖核酸1、2、3、4のそれぞれの0.2μM、0.15μM、0.15μM、及び0.075μM、及びA p o E の順方向及び逆方向プライマーのそれぞれの0.35μMの最終濃度の存在下で、前記定量したゲノムDNA、0.5U R N a s e - H、A p t a T a q DNAマスタ ( R o c h e 社 ) 4μl、G C リッチ溶液 ( R o c h e 社 ) 3μl、ヌクレアーゼフリー水で、全体積が20μlとなるように調整した後、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P o l y m e r a s e C h a i n R e a c t i o n ; P C R ) を行った。このとき、P C R 反応条件は、95 で5分、95 で15秒、65 で70秒で、45サイクルを行った。これについての結果を、図1に示した。

【0106】

50

その結果、一つの反応ウェルにおいて、A p o E の各対立遺伝子の組合せの6種に対する分析が可能であることが確認された。これから、先天的突然変異 ( m u t a t i o n ) のように、全体又は半分だけが突然変異 ( m u t a t i o n ) された場合、改善したプローブの形態を使用すれば、区別能力に優れたことが確認された。

【 0 1 0 7 】

実施例 2 : 1 型一本鎖核酸を用いた K R A S 突然変異の分析

【 0 1 0 8 】

実施例 2 - 1 : 本発明に係る一本鎖核酸を用いたリアルタイムの K R A S 遺伝子の G 1 3 D 突然変異の分析

本発明に係る 1 型一本鎖核酸を用いて、K R A S 遺伝子の G 1 3 D 突然変異 ( m u t a n t ) の有無を測定するために、I D T に依頼して、K R A S 遺伝子の G 1 3 D 突然変異の一本鎖核酸 ( 1 型 )、K R A S 野生型 ( w i l d t y p e ) 一本鎖核酸 ( 1 型 )、K R A S 遺伝子の G 1 3 D 突然変異の順方向及び逆方向プライマーを、下記表 2 に示すように製造した。このとき、製造された一本鎖核酸は、5 ' - 末端には H E X、F A M を、また、3 ' - 末端には I A B k F Q を付着した。また、リボヌクレオチド ( R N A ) は、デオキシリボヌクレオチド ( D N A ) との区別のために、配列の前に添え字「 r 」で表示した。

10

【 0 1 0 9 】

【表 2】

K R A S 遺伝子の G 1 3 D 突然変異、野生型一本鎖核酸、及び G 1 3 D 突然変異に特異的なプライマーセット

20

プライマー名又は プローブ名	配列	配列番号
G 1 3 D 一本鎖核酸	H E X / - A G C T G G T G r A C G T A G G C - / 3 I A B k F Q	7
野生型一本鎖核酸	F A M / - A G C T G G T G r G C G T A G G C - / 3 I A B k F Q	8
G 1 3 D _ _ F プライマ ー	5 ' - C C T G C T G A A A A T G A C T G A A T A T A A A C T - 3 '	9
G 1 3 D _ _ R プライマ ー	5 ' - T C G T C C A C A A A A T G A T T C T G A A T T A G - 3 '	10

30

【 0 1 1 0 】

測定しようとする K R A S 遺伝子は、一定期間培養した H C T - 1 5 細胞株及び N C I - H 1 9 7 5 細胞株から抽出した全ゲノム DNA ( t o t a l g e n o m i c D N A ) から検出した。全ゲノム DNA は、P u r e L i n k G e n o m i c D N A M i n i K i t ( サーマフィッシャーサイエンティフィック社、C a t N o . K 1 8 2 0 - 0 0 ) を用いて、各細胞株の 5 x 1 0 6 細胞から抽出し、N a n o D r o p O n e ( サーマフィッシャーサイエンティフィック社 ) を用いて定量した。定量した全ゲノム DNA は、1 5 n g / μ l で希釈し、1 / 1 0 ずつ段階希釈 ( s e r i a l d i l u t i o n ) を進行し、1 5 n g / μ l ~ 1 . 5 p g / μ l 濃度のゲノム DNA を 2 μ l ずつ用いた。H C T - 1 5 細胞株は、G 1 3 D 突然変異細胞株であり、N C I - H 1 9 7 5 は、K R A S 野生型細胞株であることが知られている。

40

【 0 1 1 1 】

以降、前記製造した配列番号 7 の 1 0 μ M 濃度の G 1 3 D 一本鎖核酸 0 . 3 μ l を準備し、配列番号 9 及び 1 0 の 1 0 μ M 濃度のプライマーは、それぞれ 0 . 5 μ l ずつ準備した。ここに、0 . 5 U R N a s e - H、A p t a T a q D N A マスター ( R o c h e 社 ) 4 μ l、N C I - H 1 9 7 5 細胞株から抽出した全ゲノム DNA 3 0 n g に、H C T - 1 5 細胞株から抽出した全ゲノム DNA 3 0 n g、3 n g、3 0 0 p g、3 0 p g を、それぞれ添加した後、3 次蒸留水で全体積が 2 0 μ l となるように調整した後、ポリメラーゼ

50

連鎖反応 (polymerase chain reaction) を行い、G13D突然変異 (mutant) を測定した。このとき、反応条件は、95 で10分間、初期変性後、95 で10秒、64 で60秒を40サイクル行い、サイクル毎にリアルタイムでシグナル (HEX) を測定し、結果を導出した。それについての結果を、図2に示した。

#### 【0112】

実施例2-2：本発明に係る一本鎖核酸を用いたリアルタイムのKRAS野生型遺伝子の分析

前記実施例2-1と同じ条件で、配列番号8のKRAS遺伝子の野生型一本鎖核酸及び配列番号9及び10のプライマーの存在下で、NCI-H1975細胞株から抽出した全ゲノムDNA 30ng、3ng、300pg、30pg及びHCT-15細胞株から抽出した全ゲノムDNA 30ng、3ng、300pg、30pgを、それぞれ添加した後、KRAS野生型遺伝子を測定した。このときの結果は、図3に示した。HCT-15細胞株は、ヘテロ接合型 (heterozygous type) の遺伝子であり、G13D突然変異 (図2の結果参照) 及びKRAS野生型遺伝子を同時に保有している細胞株であって、野生型を半分だけ有するときも、図4のような結果が得られる。

#### 【0113】

実施例2-3：本発明に係る一本鎖核酸を用いたリアルタイムのKRAS野生型遺伝子と混合されたG13D突然変異の分析

測定しようとするKRAS遺伝子は、一定期間培養したHCT-15細胞株及びNCI-H1975細胞株から抽出した全ゲノムDNA (total genomic DNA) から検出した。全ゲノムDNAは、PureLink Genomic DNA Mini Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、Cat No. K1820-00) を用いて、各細胞株の $5 \times 10^6$ 細胞から抽出し、NanoDrop One (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて定量した。定量したNCI-H1975 DNAは、30ng/ $\mu$ lで希釈し、HCT-15 DNAは、30ng/ $\mu$ lで希釈した後、1/10ずつ段階希釈 (serial dilution) を進行し、3ng/ $\mu$ l ~ 3pg/ $\mu$ l濃度のNCI-H1975ゲノムDNA及びHCT-15ゲノムDNAを得た。その後、それぞれのゲノムDNA 2 $\mu$ lずつを混合し、HCT-15の濃度がNCI-H1975の濃度に対して10~0.01%となるようにして実験に供した。HCT-15細胞株は、G13D突然変異細胞株であり、NCI-H1975は、KRAS野生型細胞株であることが知られている。

#### 【0114】

以降、前記製造した配列番号7の10 $\mu$ M濃度のG13D一本鎖核酸0.3 $\mu$ lを使用し、配列番号9及び10の10 $\mu$ M濃度のプライマーは、それぞれ0.5 $\mu$ lずつ準備した。ここに、0.5U RNase-H、AptaTaq DNAマスター (Roche社) 4 $\mu$ l、10~0.01%で希釈したDNAを、それぞれ添加した後、3次蒸留水で全体積 (total volume) が20 $\mu$ lとなるように調整した後、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction) を行い、G13D突然変異 (mutant) を測定した。このとき、反応条件は、95 で10分間、初期変性後、95 で10秒、64 で60秒を40サイクル行い、サイクル毎にリアルタイムでシグナル (HEX) を測定し、結果を導出した。それについての結果を、図5に示した。

#### 【0115】

図2乃至図5に示すように、G13D一本鎖核酸 (1型) を用いて、G13D突然変異の検出反応時、NCI-H1975野生型ゲノムDNAとの交差反応が引き起こされず、特異性は優れるが、HCT-15ゲノムDNA 600pg以下では、不正確に検出されたところ、野生型及び点突然変異 (point mutation) 遺伝子が含まれた分析の場合、点突然変異 (point mutation) が10%未満で含まれた分析は、困難であることが確認された。

#### 【0116】

実施例3：2型一本鎖核酸を用いたApoEの分析

ApoE 遺伝子のコドン (codon) 112 及びコドン 158 の対立遺伝子型に対する SNP の有無を測定するために、本発明に係る 2 型一本鎖核酸を用いた。下記表 3 に示すように、IDT (Integrated DNA Technologies、USA) に依頼して、2 型一本鎖核酸を製造した。

【0117】

ここで、2 型一本鎖核酸の場合、X - Y - Z の構造を有するプライマー及びプローブであって、5' - 末端には、それぞれ FAM、HEX、Texas Red を、また、3' - 末端には IABkFQ を付着した。また、リボヌクレオチド (RNA) は、デオキシリボヌクレオチド (DNA) との区別のために、配列の前に添え字「r」で表示した。

【0118】

【表 3】

4 種の ApoE 一本鎖核酸 (2 型)

一本鎖核酸名	配列	配列番号
ApoE 一本鎖核酸 1	56-FAM/-CGGTCATGGAGGACGTGrUGC-/3IABkFQ	11
ApoE 一本鎖核酸 2	5TexRd-XN/-GCGGATATGGAGGACGrGCG-/3IABkFQ	12
ApoE 一本鎖核酸 3	56-FAM/-CTGGTACACTGCCAGGCArCTT-/3IABkFQ	13
ApoE 一本鎖核酸 4	5HEX/-CTGGTACACTGCCAGGCrGATTC-/3IABkFQ	14

【0119】

分析のため、韓国細胞株バンクからヒト細胞株 PC3 (E2/E2)、A549 (E3/E3)、U937 (E4/E4) を分譲され、これからゲノム DNA を得た。6 種の表現型に対する分析のため、ホモ接合型の表現型は、PC3 (E2/E2)、A549 (E3/E3)、U937 (E4/E4) を用い、ヘテロ接合型の表現型は、各ゲノム DNA の混合型である PC3 + A549 (E2/E3)、PC3 + U937 (E2/E4)、A549 + U937 (E3/E4) を、高濃度で、反応当たり 32 ng (約 104 コピー) で含ませて分析に供した。

【0120】

前記表 3 における ApoE 一本鎖核酸 1、2、3、4 のそれぞれの 0.375 μM、0.1 μM、0.25 μM、及び 0.25 μM の最終濃度の存在下で、前記ゲノム DNA、0.1 ng の耐熱性 RNase H、AptaTaq DNA マスター w/o MgCl2 (Roche 社) 4 μl、GC リッチ溶液 (Roche 社) 4 μl、2.75 mM MgCl2、62.5 nM Low ROX に、ヌクレアーゼフリー水で、全体積が 20 μl となるように調整した後、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。このとき、PCR 反応条件は、95 で 10 分、95 で 15 秒、64 で 55 秒で、40 サイクルを行った。これについての結果を、図 6 に示した。

【0121】

その結果、本発明に係る 2 型一本鎖核酸を用いた ApoE の各対立遺伝子の組合せの 6 種に対する分析において、コドン 112 の 586 T 変異及びコドン 158 の 724 T 変異は、蛍光染料の差による分析ではなく、同じ蛍光染料による終点 (end point) における蛍光値の差により区別できるという制限があった。このような制限により、各 DNA サンプルの濃度に基づく分析結果の判読に問題がある可能性がある。これは、先天的突然変異である ApoE の場合、実施例 1 に示したように、2 型一本鎖核酸を用いるよりも、1 型一本鎖核酸を用いることが、さらに容易に分析されることを示す。

【0122】

実施例 4 : 2 型一本鎖核酸を用いた K R A S 突然変異の分析

【 0 1 2 3 】

実施例 4 - 1 : 本発明に係る 2 型一本鎖核酸を用いたリアルタイムの G 1 2 V、G 1 2 C、G 1 2 S 突然変異の分析

2 型一本鎖核酸を用いて、K R A S 遺伝子の 1 2 コドン突然変異における 3 種 ( G 1 2 V、G 1 2 C、G 1 2 S ) の突然変異 ( mutant ) の有無を測定した。I D T に依頼して、本発明に係る一本鎖核酸及びユニバーサル逆方向プライマー ( Uni - r e v e r s e p r i m e r ) を、下記表 4 に示すように製造した。一本鎖核酸は、5 ' - 末端には、H E X、F A M、C y 5 を、また、3 ' - 末端には、I A B k F Q を付着した。また、リボヌクレオチド ( R N A ) は、デオキシリボヌクレオチド ( D N A ) との区別のために、配列の前に添え字「 r 」で表示した。

10

【 0 1 2 4 】

【表 4】

K R A S 突然変異の分析に用いた一本鎖核酸及びプライマー

一本鎖核酸名又はプライマー名	配列	配列番号
G 1 2 V 一本鎖核酸	H E X / - A C T T G T G G T A G T T G G A G C T G r U T G - / 3 I A B k F Q	1 5
G 1 2 C 一本鎖核酸	C y 5 / - A A C T T G T G G T A G T T G G A G C T r U G T - / 3 I A B k F Q	1 6
G 1 2 S 一本鎖核酸	F A M / - A A C T T G T G G T A G T T G G A G C T r A G T - / 3 I A B k F Q	1 7
ユニバーサル逆方向プライマー	5 ' - C A T A T T C G T C C A C A A A A T G A T T C T G - 3 '	1 8

20

【 0 1 2 5 】

前記合成した一本鎖核酸を用いて、K R A S 点突然変異 ( p o i n t m u t a t i o n ) の検出能を確認するために、それぞれ野生型細胞株及び突然変異細胞株を培養し、全ゲノム DNA は、P u r e L i n k G e n o m i c D N A M i n i K i t (サーモフィッシャーサイエンティフィック社、C a t N o . K 1 8 2 0 - 0 0 ) を用いて、各細胞株の 5 × 1 0 6 細胞から抽出した。一方、N a n o D r o p O n e (サーモフィッシャーサイエンティフィック社) を用いて定量した後、テンプレート ( t e m p l a t e ) として使用した。使用した細胞株は、下記表 5 の通りである。

30

【 0 1 2 6 】

【表 5】

K R A S 遺伝子の 1 2 コドン突然変異の 3 種 ( G 1 2 V、G 1 2 C、G 1 2 S ) の突然変異細胞株

突然変異細胞株	細胞株名	タイプ
G 1 2 V 突然変異細胞株	S W 6 2 0	ホモ接合型 ( h o m o z y g o u s )
G 1 2 C 突然変異細胞株	M I A - P a c a 2	ホモ接合型
G 1 2 S 突然変異細胞株	A 5 4 9	ホモ接合型

40

【 0 1 2 7 】

50

以降、前記製造した配列番号15のG12V一本鎖核酸及び配列番号18のプライマーは、10 μM濃度の0.5 μlを使用し、5x AptaTaq DNAマスター (Roche社) 3.6 μl及び耐熱性RNase H0.2 μlに、Colo201 (KRAS野生型細胞株) 30 ng及びSW620 (G12V突然変異) 細胞株から抽出した全ゲノムDNA 3 ng、300 pg、30 pg、3 pgを、それぞれ添加した後、3次蒸留水で全体積が20 μlとなるように調整した後、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行い、G12V突然変異を測定した。このとき、反応条件は、95 で10分間、初期変性後、95 で15秒、66 で30秒を40サイクル行って、1次PCR反応を行った後、85 で15秒、64 で40秒を40サイクル行って、2次PCR反応を行い、サイクル毎にリアルタイムでシグナル (HEX) を測定し、結果を導出した。それについての結果を、図7に示した。

10

#### 【0128】

また、前記製造した配列番号16のG12C一本鎖核酸及び配列番号18のプライマーは、10 μM濃度の0.5 μlを使用し、5x AptaTaq DNAマスター (Roche社) 2.8 μl、5x AptaFast buffer 1.2 μl、1U/μlの耐熱性RNase H0.4 μl、25mM MgCl<sub>2</sub> 0.5 μlに、Colo201 (KRAS野生型細胞株) 70 ng及びMIA-Paca2 (G12C突然変異) 細胞株から抽出した全ゲノムDNA 7 ng、700 pg、70 pg、7 pgを、それぞれ添加し、3次蒸留水で全体積が20 μlとなるように調整した後、ポリメラーゼ連鎖反応を行い、G12C突然変異を測定した。このとき、反応条件は、95 で10分間、初期変性後、95 で10秒、64 で60秒を40サイクル行い、サイクル毎にリアルタイムでシグナル (Cy5) を測定し、結果を導出した。それについての結果を、図8に示した。

20

#### 【0129】

また、前記製造した配列番号17のG12S一本鎖核酸及び配列番号18のプライマーは、10 μM濃度の0.5 μlを使用し、5x AptaTaq DNAマスター (Roche社) 3.6 μl及び10 ng/μlの耐熱性RNase H0.2 μlに、Colo201 (KRAS野生型細胞株) 30 ng及びA549 (G12S突然変異) 細胞株から抽出した全ゲノムDNA 3 ng、300 pg、30 pg、7 pgを、それぞれ添加し、3次蒸留水で全体積が20 μlとなるように調整した後、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction) を行い、G12S突然変異を測定した。このとき、反応条件は、95 で10分間、初期変性後、95 で10秒、64 で60秒を40サイクル行い、サイクル毎にリアルタイムでシグナル (FAM) を測定し、結果を導出した。それについての結果を、図9に示した。

30

#### 【0130】

前記図7乃至図9から分かるように、本発明に係る一本鎖核酸は、点突然変異 (point mutation) 遺伝子が0.01%未満で含まれた場合も、優れた特異性及び感受度で突然変異遺伝子を分析することができた。

#### 【0131】

実施例5：2型一本鎖核酸を用いたEGFR突然変異の分析方法

EGFR (Epidermal growth factor receptor) は、非小細胞肺癌で過剰発現され、EGFRチロシンキナーゼ (tyrosine kinase; TKI) の標的となる。このEGFR遺伝子のエクソン (Exon) 18、19、20、21に該当するチロシンキナーゼ領域 (tyrosine kinase domain) で発生する突然変異を分析することにより、非小細胞肺癌患者の治療剤への薬剤反応性が予測できるので、突然変異の分析が患者の薬剤処方と治療に役立つ。このうち、最も使用頻度の高いT790M (C2369T) 突然変異に対して突然変異の有無を分析した。

40

#### 【0132】

本発明に係る2型一本鎖核酸及びプライマー (primer) を、下記表6に示すように、IDT (Integrated DNA Technologies, USA) に依頼して製造した。ここで、T790M一本鎖核酸は、5' - 末端にはFAMを、また、3' - 末

50

端には I A B k F Q を付着した。一方、リボヌクレオチド ( R N A ) は、デオキシリボヌクレオチド ( D N A ) との区別のために、配列の前に添え字「 r 」で表示した。

【 0 1 3 3 】

【 表 6 】

E G F R 突然変異の分析に用いた一本鎖核酸及びプライマー

一本鎖核酸又はプライマー名	配列	配列番号
T 7 9 0 M 一本鎖核酸	5 6 - F A M / - C C G T G C A G C T C A T C A r U G C - / 3 I A B k F Q	1 9
T 7 9 0 M プライマー	5 ' - C C T T G T G T T A A A G G A C A T A G T C C A G - 3 '	2 0

10

【 0 1 3 4 】

分析のため、T 7 9 0 M 突然変異細胞株である H 1 9 7 5 及び野生型細胞株である A 5 4 9 からゲノム DNA を得た。H 1 9 7 5 及び A 5 4 9 ゲノム DNA は、3 0 n g ( 約 1 × 1 0 4 コピー ) で定量後、1 0 倍ずつ希釈して使用した。

【 0 1 3 5 】

前記表 6 における T 7 9 0 M 一本鎖核酸 0 . 2 5 μ M 、 T 7 9 0 M プライマー 0 . 2 5 μ M の最終濃度の存在下で、前記ゲノム DNA 、 0 . 5 u n i t の耐熱性 R N a s e H 、 5 × A p t a T a q DNA マスター ( R o c h e 社 ) 3 . 6 μ l を、ヌクレアーゼフリー水で、全体積が 2 0 μ l となるように調整した後、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) を行った。このとき、P C R 反応条件は、9 5 ° C で 1 0 分、9 5 ° C で 1 5 秒、6 4 ° C で 6 0 秒で、4 5 サイクルを行った。これについての結果を、図 1 0 に示した。

20

【 0 1 3 6 】

その結果、本発明に係る一本鎖核酸を用いた E G F R 突然変異の分析において、それぞれの突然変異型を野生型と比較すれば、0 . 1 % 以下まで区別が可能であることが確認された。これから、上述した通り、癌の点突然変異のような後天的な突然変異の場合は、2 型一本鎖核酸を用いた探知が有利であることが確認された。

30

【 0 1 3 7 】

実施例 6 : 2 型一本鎖核酸を用いた l e t - 7 m i R N A 及び m i R N A 3 4 アイソフォームの分析

【 0 1 3 8 】

実施例 6 - 1 : 本発明に係る 2 型一本鎖核酸を用いたリアルタイムの l e t - 7 m i R N A の分析

l e t - 7 m i R N A は、m i R N A のうち、アイソフォーム ( i s o f o r m ) が最も多いことが知られている。このような l e t - 7 のアイソフォームを区別することは、相当難しい分析であり、通常、1 % 未満の特異度の区別は、特に難しいことが知られている。本実験は、なかでも、l e t - 7 a ( 5 ' - U G A G G U A G U A G G U U G U A U A G U U ) 及び l e t - 7 d ( 5 ' - A G A G G U A G U A G G U U G C A U A G U U ) の遺伝子発現の有無を測定するために、本発明に係る 2 型一本鎖核酸、プライマー ( p r i m e r ) 、 R T - プライマーを、下記表 7 に示すように、I D T ( I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s 、 U S A ) に依頼して製造した。また、正確な定量のため、前記 l e t - 7 の m i R N A を I D T に依頼して製造した。ここで、一本鎖核酸は、5 ' 末端には F A M ( f l u o r e s c e i n s u c c i n i m i d y l e s t e r ) を、また、3 ' 末端には 3 I A B k F G を付着した。一方、リボヌクレオチド ( R N A ) は、デオキシリボヌクレオチド ( D N A ) との区別のために、配列の前に添え字「 r 」で表示した。

40

【 0 1 3 9 】

50

【表 7】

l e t - 7 miRNAアイソフォームの区別に用いた一本鎖核酸及びプライマー

一本鎖核酸又は プライマー名	配列	配列番 号
l e t - 7 a 一本鎖核酸	FAM / -GCTGCTTGAGGTA GTAGGTTGrUAT- / 3IAB kFQ	2 1
l e t - 7 a Rプライマー	5' -GCCGCTGAGGTAGTA GGT-3'	2 2
l e t - 7 a RTプライマ ー	5' -GCTAACGTCTGTACT TCGTCA (TTT) nAACT- 3'	2 3
l e t - 7 d 一本鎖核酸	FAM / -GCTGCTAGAGGTA GTAGGTTGrCAT- / 3IAB kFQ	2 4
l e t - 7 d Rプライマー	5' -GCCGCTGAGGTAGTA GGT-3'	2 5
l e t - 7 d RTプライマ ー	5' -GCTAACGTCTGTACT TCGTCA (TTT) nAACT- 3'	2 6

10

20

## 【0140】

合成したそれぞれの20 pM濃度のmiRNA 1 μl、Ambion社のポリ-(A) テーリングキット、Roche社のNxtscript RT kit (全20 μl)を用いて、45 °Cで、前記表7におけるそれぞれのRTプライマー10 μM濃度の1 μlの存在下で、30分間反応してcDNAを合成した。

## 【0141】

前記合成したcDNAを100 fMから1 aMの濃度まで希釈した。

## 【0142】

前記表7における一本鎖核酸及びプライマーの、それぞれ10 μM濃度の0.5 μlの存在下で、前記合成後、希釈したそれぞれのcDNA 2 μl、1U耐熱性RNase H、AptaTaq DNAマスター (Roche社) 4 μlを入れ、3次蒸留水で全体積が20 μlとなるように調整した後、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。このとき、PCR反応条件は、95 °Cで5分、63~64 °Cで60秒、95 °Cで10秒であり、45サイクルを行った。これについての結果を、図11及び図12に示した。

30

## 【0143】

その結果、miRNA 1 aM濃度の希釈したcDNA 2 μl (約1コピー) だけを用いて、それぞれのmiRNAの分析が可能であることが確認された。

## 【0144】

実施例6-2: 本発明に係る2型一本鎖核酸を用いたリアルタイムのl e t - 7 miRNAの特異度の検出

40

前記表7における一本鎖核酸及びプライマーの、それぞれ10 μM濃度の0.5 μlの存在下で、1 pM濃度のl e t - 7 d cDNA 2 μlに、1/10ずつ100 fMから1 aMの濃度まで希釈したl e t - 7 a cDNA 2 μlを添加し、1U耐熱性RNase H、AptaTaq DNAマスター (Roche社) 4 μlを入れ、3次蒸留水で全体積が20 μlとなるように調整した後、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。このとき、PCR反応条件は、95 °Cで5分、63~64 °Cで60秒、95 °Cで10秒であり、45サイクルを行った。これについての結果を、図13に示した。

## 【0145】

その結果、1 pM濃度のl e t - 7 d cDNA 2 μlに、1/10ずつ100 fMから

50

1 a Mの濃度まで希釈したlet - 7 a c DNA 2 μ lずつを添加した実験群において、1 0 0 f Mから1 f Mの濃度までは、安定的に分析できることが確認された。これは、アイソフォーム ( i s o f o r m ) のmiRNAを、0 . 1 %まで特異度を維持しながら分析できることを示す。

【 0 1 4 6 】

実施例 6 - 3 : 本発明に係る 2 型一本鎖核酸を用いたリアルタイムのmiRNA 3 4 a、miRNA 3 4 b、及びmiRNA 3 4 cの分析

miRNA 3 4 は、3 種のアイソフォーム ( i s o f o r m ) があるが、これらのアイソフォームを区別することが、相当難しいことが知られている。本実施例では、miRNA 3 4 a、miRNA 3 4 b、及びmiRNA 3 4 cの遺伝子発現の有無を測定するために、表 8 に示すように、IDTに依頼して、一本鎖核酸、プライマー、RT - プライマーを合成及び製造した。一本鎖核酸は、5 ' 末端にはFAM ( f l u o r e s c e i n s u c c i n i m i d y l e s t e r ) 及びHEX ( h e x a c h l o r o - f l u o r e s c e i n ) を、また、3 ' 末端には3 I A B k F Q を付着した。また、リボヌクレオチド ( RNA ) は、デオキシリボヌクレオチド ( DNA ) との区別のために、配列の前に添え字「r」で表示した。

【 0 1 4 7 】

【表 8】

miRNA 3 4 a、miRNA 3 4 b、及びmiRNA 3 4 cの分析に用いた一本鎖核酸及びプライマー

一本鎖核酸又は プライマー名	配列	配列番号
miRNA 3 4 a 一本鎖核酸	5 6 FAM / - T T G G C A G T G T C T T A G C T G r G T T - / 3 I A B k F Q	2 7
miRNA 3 4 a プライマー	5 ' - G T C T C G A C G T T C T T T T T T T T T T T T T A C - 3 '	2 8
miRNA 3 4 a RT プライマー	5 ' - G T C T C G A C G T T C T T T T T T T T T T T T T A C - 3 '	2 9
miRNA 3 4 b 一本鎖核酸	5 HEX / - G T C T A G G C A G T G T C A T T A G C T G r A T T - / 3 I A B k F Q	3 0
miRNA 3 4 b プライマー	5 ' - G T C T C G A C G T T C T T T T T T T T T T T T T C - 3 '	3 1
miRNA 3 4 b RT プライマー	5 ' - G T C T C G A C G T T C T T T T T T T T T T T T T C - 3 '	3 2
miRNA 3 4 c 一本鎖核酸	5 6 FAM / - C C A G G C A G T G T A G T T A G C T G r A T T - / 3 I A B k F Q	3 3
miRNA 3 4 c プライマー	5 ' - G T C T C G A C G T T C T T T T T T T T T T T T T G C - 3 '	3 4
miRNA 3 4 c RT プライマー	5 ' - G T C T C G A C G T T C T T T T T T T T T T T T T G C - 3 '	3 5

【 0 1 4 8 】

それぞれのmiRNAは、Invitrogen社のポリ - ( A ) テーリングキット、Roche社のNxtscript RT kit ( 全 2 0 μ l ) を用いて、4 0 ° C で、RTプライマー 1 0 μ M 濃度の 1 μ l の存在下で、6 0 分間反応してcDNAを合成し、合成したcDNAを 1 p M から 1 a M の濃度 ( 約 1 0 6 ~ 1 0 0 コピー ) まで、7 つの濃度を 1 / 1 0 ずつ希釈し、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) を行った。P C R は、それぞれ

の合成cDNA、耐熱性RNase H、AptaTaq DNAマスター（Roche社）、一本鎖核酸、プライマーを入れ、3次蒸留水で全体積が20 $\mu$ lとなるように調整した後、反応条件は、95 $^{\circ}$ Cで5分、95 $^{\circ}$ Cで10秒、65 $^{\circ}$ Cで1分で、45サイクルを行った。

【0149】

その結果、miRNA 34a、miRNA 34b、及びmiRNA 34cはいずれも、1pMから10aMの濃度（約10<sup>6</sup>~10<sup>1</sup>コピー）まで、正常のPCR効率で測定が可能であることが確認された。これについての結果は、図14乃至図16に示した。

【0150】

実施例6-4：本発明に係る2型一本鎖核酸を用いたリアルタイムのmiRNA 34a、miRNA 34b、及びmiRNA 34cの特異度の検出

上記した実施例6-3において、miRNA 34a、miRNA 34b、及びmiRNA 34cの一本鎖核酸が、それぞれのアイソフォーム（isoform）を区別できることが確認され、本実施例では、増幅しようとするmiRNAが、他のアイソフォームのmiRNAと混ぜているとき、どんな割合で、所望のアイソフォームを区別することができるかを確認した。10<sup>8</sup>（100pM）miRNA 34a又はmiRNA 34bのアイソフォームに、10<sup>7</sup>から10<sup>4</sup>又は10<sup>3</sup>（10pM~10fM又は10pM~1fM）の濃度まで、1/10ずつ希釈したmiRNA 34cを混合し、miR-34cの一本鎖核酸及びプライマーを用いて、特異度の検出をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で進行した。

【0151】

PCRは、それぞれの合成cDNA、耐熱性RNase H、AptaTaq DNAマスター（Roche社）、一本鎖核酸、プライマーを入れ、3次蒸留水で全体積が20 $\mu$ lとなるように調整し、反応条件は、95 $^{\circ}$ Cで5分、95 $^{\circ}$ Cで10秒、65 $^{\circ}$ Cで1分で、45サイクルを行った。

【0152】

これについての結果は、図17乃至図18に示した。

【0153】

その結果、miRNA 34cが、アイソフォームを、最大で0.001%まで特異度を維持して、区別が可能であることが確認された。

【0154】

実施例7：一本鎖核酸の構造による分析方法

本発明に係る一本鎖核酸（2型）の突然変異の検出時、特異性を高くするために、G12Dの三つの類型、具体的に一本鎖核酸のリボヌクレオチド（RNA）の位置に応じて、突然変異（mutant）の検出能を調べるために、R1DrMR2、R1rDMR2、R1DMrDR2の類型を、下記表9に示すように、IDT（Integrated DNA Technologies、USA）に依頼して製造した。それぞれの一本鎖核酸の5'-末端にはFAMを、また、3'-末端には3IABkFQを付着した。また、リボヌクレオチド（RNA）は、デオキシリボヌクレオチド（DNA）との区別のために、配列の前に添え字「r」で表示した。

【0155】

10

20

30

40

50

## 【表 9】

KRAS 遺伝子 G12D の三つの類型 (R1DrMR2、R1rDMR2、R1DMrDR2) に対する一本鎖核酸

一本鎖核酸	配列	配列番号
G12D-R1DrMR2	FAM / -CTTGTGGTAGTTG GAGCTGrATG- / 3IABkFQ	36
G12D-R1rDMR2	FAM / -CTTGTGGTAGTTG GAGCTrGAT- / 3IABkFQ	37
G12D-R1DMrDR2	FAM / -CTTGTGGTAGTTG GAGCTGARtGG- / 3IABkFQ	38

\* R1及びR2 : DNAオリゴ (DNAoligo)、D : DNA、r : RNA、M : 突然変異 (mutation)

## 【0156】

実施例 7 - 1 : G12D 一本鎖核酸の類型 (G12D-R1DrMR2、G12D-R1rDMR2、G12D-R1DMrDR2) による G12D 突然変異遺伝子及び KRAS 野生型遺伝子の分析

一本鎖核酸の配列番号 36 乃至 38 及びプライマー配列番号 18 を、10 μM 濃度の 0.5 μl ずつ準備し、0.5 U RNase H、AptaTaq マスター (Roche 社製) 3.6 μl、Aspc-1 (G12D 突然変異型) 及び HT-29 (KRAS 野生型) から抽出した全ゲノム DNA 30 ng を添加した後、3 次蒸留水で全体積が 20 μl となるように調整した後、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。このとき、反応条件は、95 で 10 分間、初期変性後、95 で 10 秒、64 で 60 秒を 45 サイクル反応し、サイクル毎にリアルタイムでシグナル (FAM) を測定し、結果を導出した。それについての結果を、図 19 乃至図 21 に示した。

## 【0157】

一本鎖核酸の三つの構造に応じて、KRAS 野生型遺伝子に対する特異性において異なる結果を示すが、三つの構造はいずれも、点突然変異 (point mutation) の区別が可能であることが確認された。

10

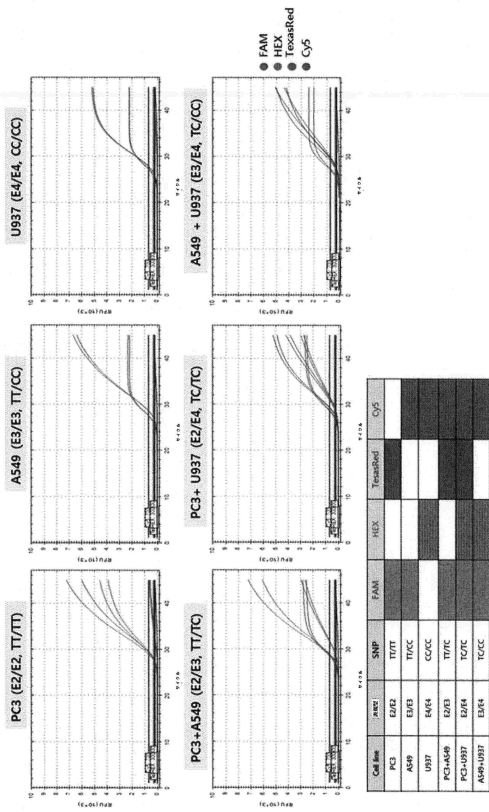
20

30

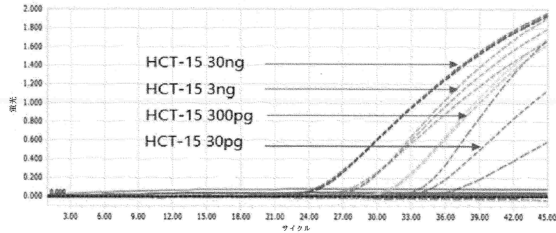
40

50

【 図 面 】  
【 図 1 】



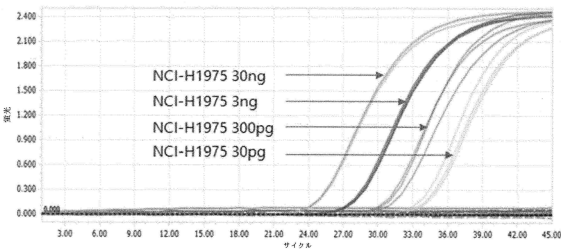
【 図 2 】



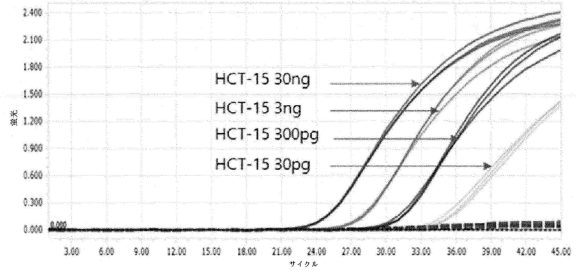
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

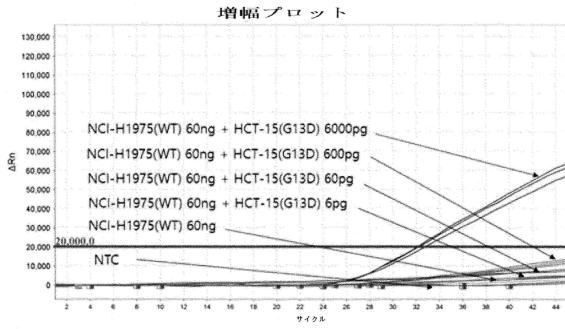


30

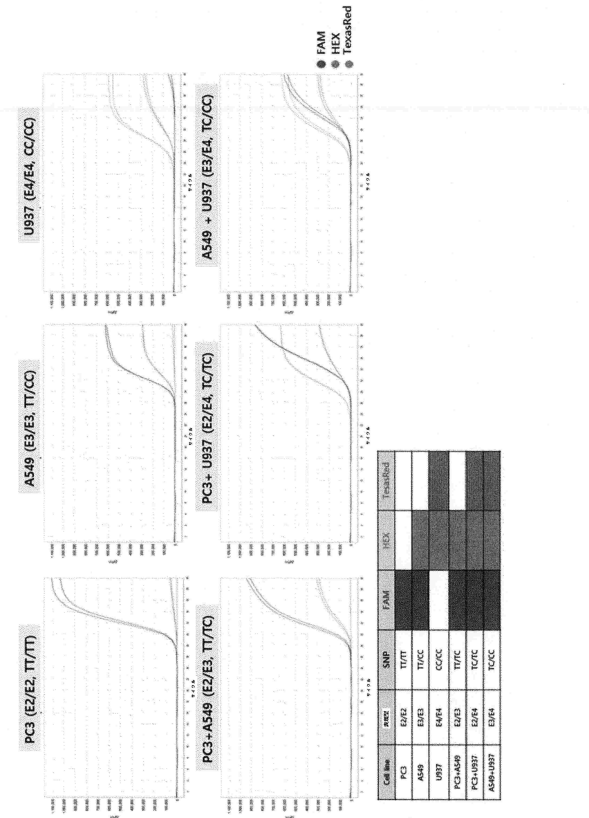
40

50

【 図 5 】



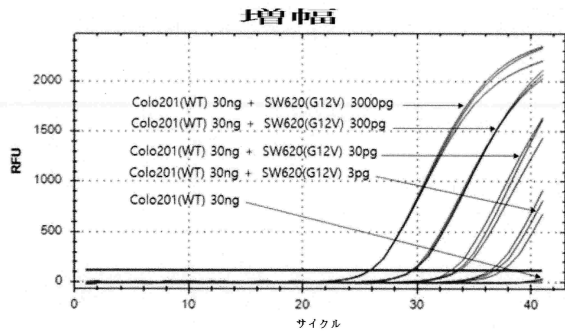
【 図 6 】



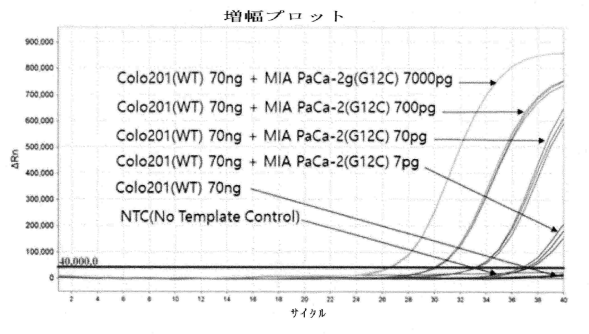
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】

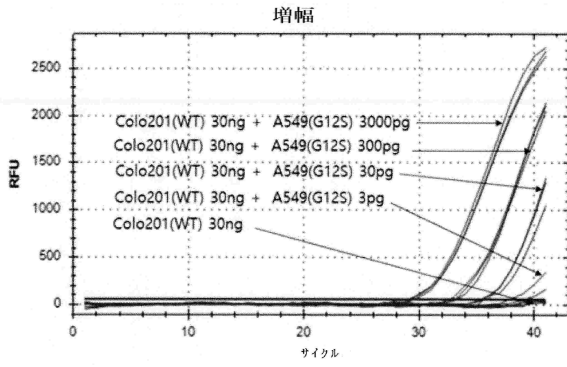


30

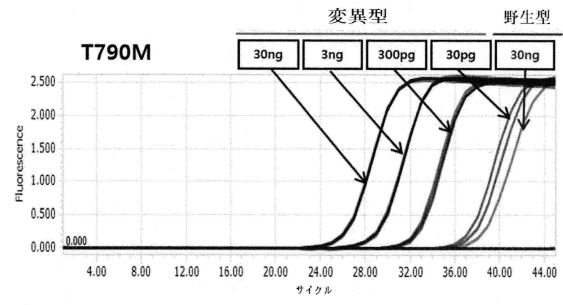
40

50

【 図 9 】

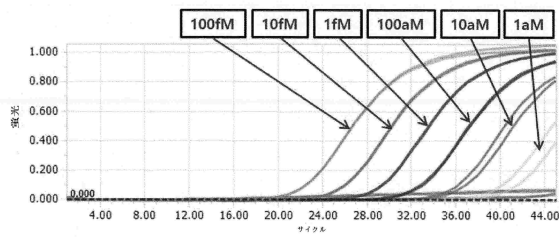


【 図 10 】

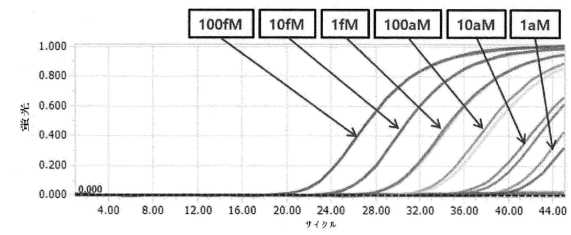


10

【 図 11 】

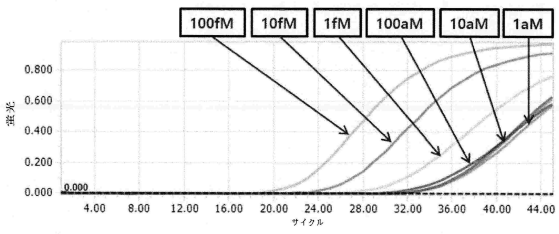


【 図 12 】

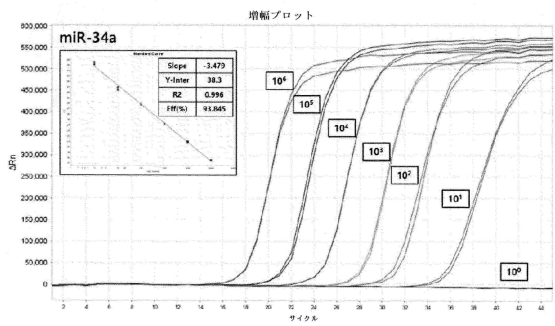


20

【 図 13 】



【 図 14 】

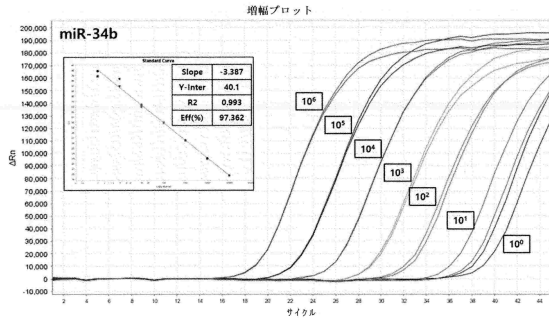


30

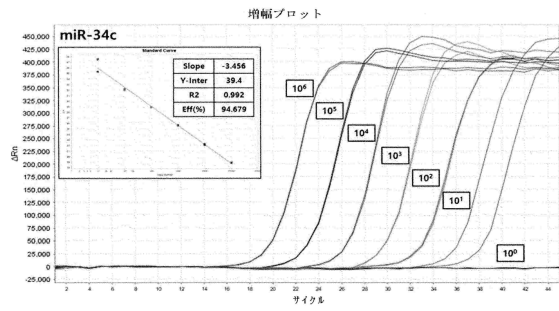
40

50

【 図 1 5 】

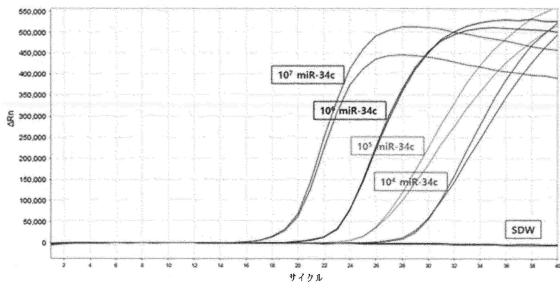


【 図 1 6 】

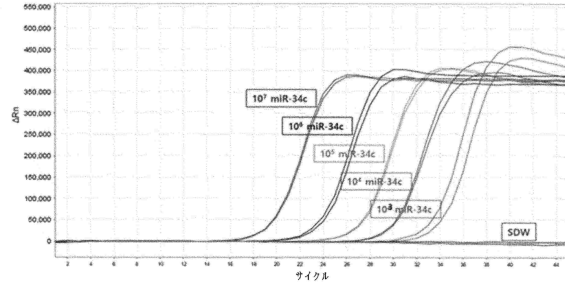


10

【 図 1 7 】

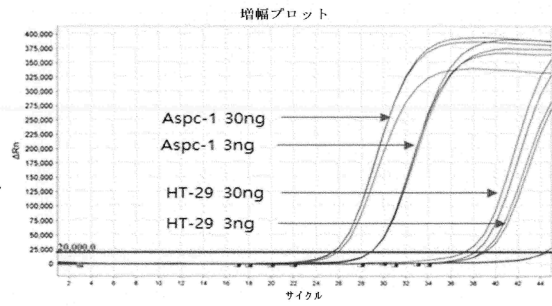


【 図 1 8 】

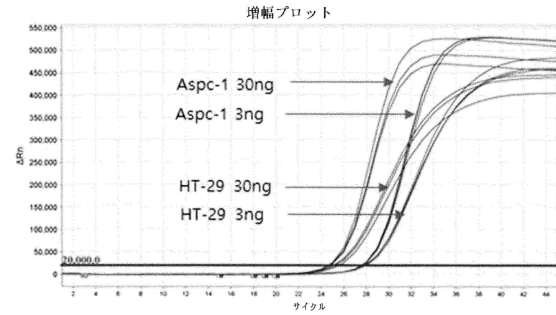


20

【 図 1 9 】



【 図 2 0 】

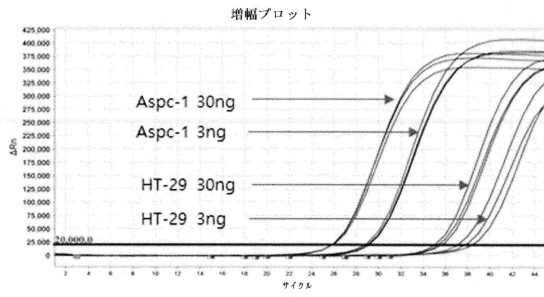


30

40

50

【図 2 1】



10

【配列表】

0007618208000001.app

20

30

40

50

---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特表2019-512214(JP,A)  
特表2019-536435(JP,A)  
米国特許出願公開第2005/0214809(US,A1)  
韓国公開特許第10-2018-0033911(KR,A)  
特表2011-521624(JP,A)  
Analytical Biochemistry, 2004年, Vol.333, pp.246-255
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
C12Q 1/68  
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)