

(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2004-147501

(P2004-147501A)

(43) 公開日 平成16年5月27日(2004.5.27)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
<b>C 1 2 Q 1/68</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 2 4
<b>G O 1 N 33/53</b>	G O 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
<b>G O 1 N 33/566</b>	G O 1 N 33/566	
<b>G O 1 N 33/58</b>	G O 1 N 33/58 A	
審査請求 未請求 請求項の数 25 O L (全 34 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2000-204177 (P2000-204177)	(71) 出願人	591038141 宝ホールディングス株式会社 京都府京都市下京区四条通烏丸東入長刀鉾町20番地
(22) 出願日	平成12年7月5日(2000.7.5)	(72) 発明者	エディ メイヤント 奈良県生駒市高山町8916-5 奈良先端科学技術大学院大学内
		(72) 発明者	石田 教弘 奈良県生駒市高山町8916-5 奈良先端科学技術大学院大学内
		(72) 発明者	竹家 達夫 奈良県生駒市高山町8916-5 奈良先端科学技術大学院大学内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 DNAの高感度検出法

(57) 【要約】

【課題】 検出しようとする核酸の鎖長に影響されない標識プローブを調製し、該標識プローブを用いた高感度検出方法を提供すること。

【解決手段】 ポリアデニンヌクレオチド部分にハイブリダイズすることを特徴とする標識ポリヌクレオチドプローブ、該プローブの調製方法、該プローブを用いた標的核酸の検出方法及び該プローブを用いた発現遺伝子の解析方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ポリアデニンヌクレオチド部分にハイブリダイズすることを特徴とする標識ポリヌクレオチドプローブ。

## 【請求項 2】

鎖長が 50ヌクレオチド以上であることを特徴とする請求項 1 記載の標識ポリヌクレオチドプローブ。

## 【請求項 3】

デオキシウラシルヌクレオチド及び / 又はデオキシチミンヌクレオチドからなるポリヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 又は請求項 2 に記載の標識ポリヌクレオチドプローブ 10

## 【請求項 4】

標識デオキシウラシルヌクレオチド及び / 又は標識デオキシチミンヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の標識ポリヌクレオチドプローブ。

## 【請求項 5】

標識ヌクレオチドが、放射性同位元素、化学発光物質、蛍光物質、リガンドあるいはレセプターで標識されたヌクレオチドのいずれかから選択されることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の標識ポリヌクレオチドプローブ。

## 【請求項 6】

標識がフルオレセイン、カスケードブルー、オレゴングリーン、BODIPY、ローダミングリーン、Alexa、テキサスレッド、Cy3 あるいは Cy5 のいずれかから選択される標識ヌクレオチドであることを特徴とする請求項 5 記載の標識ポリヌクレオチドプローブ。 20

## 【請求項 7】

mRNA のポリ A 部分にハイブリダイズすることを特徴とする標識ポリヌクレオチドプローブの調製方法。

## 【請求項 8】

ポリリボアデニンヌクレオチドあるいはポリデオキシアデニンヌクレオチドを鋳型とし、オリゴdT をプライマーとしたヌクレオチド伸長反応により調製することを特徴とする請求項 7 記載の標識ポリヌクレオチドプローブの調製方法。 30

## 【請求項 9】

ヌクレオチド伸長反応がポリリボアデニンヌクレオチドを鋳型とした逆転写反応であることを特徴とする請求項 8 記載の標識ポリヌクレオチドプローブの調製方法。

## 【請求項 10】

鋳型となるポリリボアデニンヌクレオチドあるいはポリデオキシアデニンヌクレオチドの鎖長が 50ヌクレオチド以上であることを特徴とする請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載の標識ポリヌクレオチドプローブの調製方法。

## 【請求項 11】

ヌクレオチド伸長反応が、デオキシヌクレオチド重合反応であることを特徴とする請求項 8 記載の標識ポリヌクレオチドプローブの調製方法。 40

## 【請求項 12】

鎖長が 50ヌクレオチド以上であることを特徴とする請求項 7 ~ 11 のいずれかに記載の標識ポリヌクレオチドプローブの調製方法。

## 【請求項 13】

ヌクレオチド伸長反応が少なくとも標識デオキシウラシルヌクレオチド及び / 又は標識デオキシチミンヌクレオチドを用いて行われることを特徴とする請求項 7 ~ 12 のいずれかに記載の標識ポリヌクレオチドプローブの調製方法。

## 【請求項 14】

ヌクレオチド伸長反応液中のデオキシウラシルヌクレオチドとデオキシチミンヌクレオチドの含有モル比が 1 : 1 ~ 1 : 3 であることを特徴とする請求項 13 記載の標識ポリヌク 50

レオチドプローブの調製方法。

【請求項 15】

標識ヌクレオチドが、放射性同位元素、化学発光物質、蛍光物質、リガンドあるいはレセプターで標識されたヌクレオチドのいずれかから選択されることを特徴とする請求項 7 ~ 14 のいずれかに記載の標識ポリヌクレオチドプローブの調製方法。

【請求項 16】

標識がフルオレセイン、カスケードブルー、オレゴングリーン、BODIPY、ローダミングリーン、Alexa、テキサスレッド、Cy3あるいはCy5のいずれかから選択される標識ヌクレオチドであることを特徴とする請求項 15 記載の標識ポリヌクレオチドプローブの調製方法。

10

【請求項 17】

ポリアデニンヌクレオチド部分に標識ポリヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせることを特徴とする標的核酸の検出方法。

【請求項 18】

ポリアデニンヌクレオチド部分が、mRNAのポリAテールであることを特徴とする請求項 17 に記載の標的核酸の検出方法。

【請求項 19】

標識ポリヌクレオチドプローブが少なくとも標識デオキシウラシルヌクレオチド及び/又は標識デオキシチミンヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項 17 又は請求項 18 のいずれかに記載の標的核酸の検出方法。

20

【請求項 20】

標識ヌクレオチドが、放射性同位元素、化学発光物質、蛍光物質、リガンドあるいはレセプターで標識されたヌクレオチドのいずれかから選択されることを特徴とする請求項 17 ~ 19 のいずれかに記載の標的核酸の検出方法。

【請求項 21】

標識がフルオレセイン、カスケードブルー、オレゴングリーン、BODIPY、ローダミングリーン、Alexa、テキサスレッド、Cy3あるいはCy5のいずれかから選択される標識ヌクレオチドであることを特徴とする請求項 20 記載の標的核酸の検出方法。

【請求項 22】

ポリアデニンヌクレオチド部分にハイブリダイズすることを特徴とする少なくとも2種類の異なる標識を有する標識ポリヌクレオチドプローブを用い、異なる2種類の試料中の多種類の遺伝子の発現を比較することを特徴とする発現遺伝子の解析方法。

30

【請求項 23】

標識がフルオレセイン、カスケードブルー、オレゴングリーン、BODIPY、ローダミングリーン、Alexa、テキサスレッド、Cy3あるいはCy5のいずれかから選択される標識ヌクレオチドであることを特徴とする請求項 22 記載の発現遺伝子の解析方法。

【請求項 24】

ポリアデニンヌクレオチド部分にハイブリダイズすることを特徴とする標識ポリヌクレオチドプローブとcDNA標識ポリヌクレオチドプローブを組み合わせることを特徴とする発現遺伝子の解析方法。

40

【請求項 25】

標識がフルオレセイン、カスケードブルー、オレゴングリーン、BODIPY、ローダミングリーン、Alexa、テキサスレッド、Cy3あるいはCy5のいずれかから選択される標識ヌクレオチドであることを特徴とする請求項 24 記載の発現遺伝子の解析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子工学分野において有用な標識化プローブの調製方法並びに該プローブを用いた高感度検出方法に関する。

【0002】

50

**【従来の技術】**

ハイブリダイゼーション法は、細胞や組織において発現する mRNA の種類を同定するために、あるいは各 mRNA 分子量を定量するために通常よく利用される方法である。それゆえ、mRNA の同定、定量のためのハイブリダイゼーション技術は、生物学ならびに医学の分野において非常に重要である。

上記ハイブリダイゼーション法として例えば、全 RNA または精製された RNA をナイロン膜のような多孔性の担体上に固定化し、蛍光物質あるいは放射性同位元素 (RI) 等で標識した、検出しようとする遺伝子 (RNA) に相補的なプローブと混合してハイブリダイズさせる方法がある。このカテゴリーに属する技術としてノーザン・ハイブリダイゼーション法が挙げられる。

10

また、別法としては、検出しようとする遺伝子 (RNA) を含む混合物、若しくは該混合物から精製した RNA を蛍光物質あるいは放射性同位元素等で標識し、これを膜上に固定されたプローブとハイブリダイズさせる方法がある。このカテゴリーの属する技術としては、逆ドットプロット法が挙げられる。これら 2 法は、遺伝子工学分野の研究の様々な実験で使用されている。

**【0003】**

従来のハイブリダイゼーション法では通常、膜上に固定化された核酸が使用されてきたが、最近、上記のハイブリダイゼーション技術について、ガラスのような非多孔性の硬質の担体上に、主として既知の DNA 断片を固定化して使用するハイブリダイゼーション技術が開発されている。この技術においては、担体表面上のあらかじめ定められた領域に数多くの種類の DNA 断片を極めて高密度に固定することができる。このような高密度に DNA 断片が固定化された担体は、一般に DNA マイクロアレイ (DNA チップ) と呼ばれている。当該 DNA マイクロアレイを使用することにより、少量の試料中の多種類の mRNA の同定、定量を一度に実施することが可能になった。

20

**【0004】**

上記 DNA マイクロアレイを使用する場合には、試料中の核酸を、例えば蛍光物質を用いて標識し、担体上に固定化された DNA 断片とハイブリダイズさせて検出するのが一般的である。すなわち、試料中の mRNA を DNA マイクロアレイで検出する場合には、例えば、以下のような方法で試料を標識することができる。

1. 試料中の mRNA を鋳型とした cDNA 合成の際に蛍光標識ヌクレオチドを添加して蛍光標識 cDNA を作成する方法、あるいは

30

2. 試料中の mRNA から cDNA を合成した後、蛍光標識ヌクレオチド存在下に該 cDNA を鋳型として RNA ポリメラーゼで転写反応を行い、蛍光標識 RNA プローブを作成する方法。

上記方法によって作製された標識 DNA あるいは RNA は、試料中の mRNA 由来の塩基配列、若しくはこれに相補的な塩基配列を有しており、適切な DNA 断片が固定されたマイクロアレイ上で検出することができる。

**【0005】**

しかしながら、上記のような方法で試料中の mRNA 由来の塩基配列を有する標識核酸を作製する場合には、該標識核酸に取り込まれる標識化合物の数が当該核酸の鎖長に比例するため、短い鎖長の標識核酸は長鎖長のものに比較して 1 分子当りに取り込まれる標識ヌクレオチドの数が少なくなるという欠点がある。従って、同一分子数の標識核酸が担体、例えばマイクロアレイ上に固定化された DNA 断片とハイブリダイズしている場合、各アレイについて得られる標識化合物由来の標識シグナルの強度はハイブリダイズする核酸の鎖長に大きく影響されることになる。このことは、定量性を求められる実験においては、非常に重要な問題となる。

40

**【0006】**

一方、標識する核酸の鎖長に影響されない核酸標識方法として、米国特許第 6004755 号公報記載の末端標識方法が挙げられる。しかしながら、該方法は、末端標識したオリゴ dT プライマーを使用して cDNA を合成する方法であり、プライマーに付加される標

50

識化合物の数は限られている。従って、検出しようとする遺伝子由来の mRNA が微量であった場合、シグナル強度が弱く検出できない可能性がある。

【0007】

細胞内では非常に多くの種類の遺伝子が発現されており、各遺伝子にコードされているポリペプチドはその構造、機能がそれぞれ異なるため、これらのポリペプチドに対応する mRNA の鎖長も広い範囲に分布している。従って、これらの mRNA をできるだけ正確に、また高い再現性で検出、定量するための定量性に優れたシグナルを与えるような mRNA、若しくは mRNA 由来の塩基配列を有する核酸の検出方法が求められていた。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、検出しようとする核酸の鎖長に影響されない標識核酸を調製し、該標識核酸を用いた高感度検出方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らはハイブリダイゼーション法による mRNA の検出、定量法について鋭意研究を行い、固定されたプローブとハイブリダイズする mRNA を、該 mRNA の 3' 末端に存在しているポリ A 配列を利用して検出することによって定量性及び検出感度に優れた mRNA の検出が可能なる方法を見出し、本発明を完成させた。

【0010】

本発明を概説すれば、本発明の第 1 の発明は、ポリアデニンヌクレオチド部分にハイブリダイズすることを特徴とする標識ポリヌクレオチドプローブに関する。本発明において標識ポリヌクレオチドプローブは、該プローブの鎖長が 50 ヌクレオチド以上であるものが好適に使用できる。また、該プローブは、デオキシウラシルヌクレオチド及び/又はデオキシチミンヌクレオチドからなるものが好適であり、標識デオキシウラシルヌクレオチド及び/又は標識デオキシチミンヌクレオチドを含有することが好ましい。さらに、該標識ヌクレオチドは、放射性同位元素、化学発光物質、蛍光物質、リガンドあるいはレセプターで標識されたヌクレオチドのいずれもが好適に使用できる。特に限定はされないが、例えば蛍光標識としては、フルオレセイン、カスケードブルー、オレゴングリーン、BODIPY、ローダミングリーン、Alexa、テキサスレッド、Cy3 あるいは Cy5 のいずれかの標識を有するヌクレオチドが好適に使用でき、特に好ましくは、上記標識を有する dUTP あるいは dTTP が例示される。

【0011】

本発明の第 2 の発明は、mRNA のポリ A 部分にハイブリダイズすることを特徴とする第 1 の発明の標識ポリヌクレオチドプローブの調製方法に関する。該標識ポリヌクレオチドプローブは、ポリリボアデニンヌクレオチドあるいはポリデオキシアデニンヌクレオチドを鋳型とし、オリゴ dT をプライマーとしたヌクレオチド伸長反応により調製することができる。該ヌクレオチド伸長反応は、ポリリボアデニンヌクレオチドを鋳型とした逆転写反応であってもよく、鋳型となるポリリボアデニンヌクレオチドの鎖長は、50 ヌクレオチド以上であることが好ましい。また、上記ヌクレオチド伸長反応べつの態様としては、デオキシヌクレオチド重合反応であってもよい。この場合、該プローブの鎖長が 50 ヌクレオチド以上であることが好ましい。上記ヌクレオチド伸長反応のいずれの場合においても、少なくとも標識デオキシウラシルヌクレオチド及び/又は標識デオキシチミンヌクレオチドを用いることができ、該反応液中でのデオキシウラシルヌクレオチドとデオキシチミンヌクレオチドの含有モル比が 1 : 1 ~ 1 : 3 の範囲であるものが本発明の標識ポリヌクレオチドプローブの調製方法に使用できる。また、標識ヌクレオチドは、放射性同位元素、化学発光物質、蛍光物質、リガンドあるいはレセプターで標識されたヌクレオチドから選択することができ、特に限定はされないが蛍光物質、例えば、フルオレセイン、カスケードブルー、オレゴングリーン、BODIPY、ローダミングリーン、Alexa、テキサスレッド、Cy3 あるいは Cy5 のいずれかから選択される標識を有するヌクレオチドが好適に使用できる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 2 】

本発明の第3の発明は、ポリアデニンヌクレオチド部分に標識ポリヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせることを特徴とする標的核酸の検出方法に関する。本発明の第3の発明において、ポリアデニンヌクレオチド部分は、人工的に後からポリAテールを付加させたものでもよく、mRNAのポリAテールであってもよい。すなわち、本発明の第1の発明の標識ポリヌクレオチドプローブが効率良く、特異的にハイブリダイズするものであれば、特に限定はされない。本発明の第3の発明において、標識ポリヌクレオチドプローブは、少なくとも標識デオキシウラシルヌクレオチド及び/又は標識デオキシチミンヌクレオチドを含むものが好適に使用できる。該標識ヌクレオチドは、放射性同位元素、化学発光物質、蛍光物質、リガンドあるいはレセプターで標識されたヌクレオチドのいずれかから選択されるものが好ましく、特に限定はされないが例えば、標識がフルオレセイン、カスケードブルー、オレゴングリーン、BODIPY、ローダミンググリーン、Alexa、テキサスレッド、Cy3あるいはCy5のいずれかから選択される標識ヌクレオチドが挙げられる。

10

## 【 0 0 1 3 】

本発明の第4の発明は、ポリアデニンヌクレオチド部分にハイブリダイズすることを特徴とする少なくとも2種類の異なる標識を有する標識ポリヌクレオチドプローブを用い、異なる2種類の試料中の多種類の遺伝子の発現を比較することを特徴とする発現遺伝子の解析方法に関する。本発明の第4の発明において標識は、フルオレセイン、カスケードブルー、オレゴングリーン、BODIPY、ローダミンググリーン、Alexa、テキサスレッド、Cy3あるいはCy5のいずれかから選択される標識ヌクレオチドが好適に使用できる。

20

## 【 0 0 1 4 】

本発明の第5の発明は、ポリアデニンヌクレオチド部分にハイブリダイズすることを特徴とする標識ポリヌクレオチドプローブとcDNA標識ポリヌクレオチドプローブを組み合わせることを特徴とする発現遺伝子の解析方法に関する。本発明の第5の発明において標識は、フルオレセイン、カスケードブルー、オレゴングリーン、BODIPY、ローダミンググリーン、Alexa、テキサスレッド、Cy3あるいはCy5のいずれかから選択される標識ヌクレオチドが好適に使用できる。

30

## 【 0 0 1 5 】

## 【 発明の実施の形態 】

以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書においてヌクレオチドとは、デオキシリボヌクレオチドあるいはリボヌクレオチドのことをいい、例えばデオキシリボヌクレオチドの場合、糖部分がD-2-デオキシリボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、例えば、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシルを有するものが挙げられる。また、リボヌクレオチドの場合、糖部分がD-リボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルを有するものが挙げられる。さらに、当該ヌクレオチドには修飾デオキシリボヌクレオチドあるいは修飾リボヌクレオチドのいずれもが含まれる、例えば 位のリン酸基の酸素原子を硫黄原子に置き換えた修飾リボヌクレオチド〔( - S )リボヌクレオチド、( - S )Nとも記載する〕やこの他の誘導体等も含まれる。本明細書において、ポリアデニンヌクレオチドとは、リボアデニンヌクレオチドあるいはデオキシアデニンヌクレオチドの重合体のことをいう。該ポリマーは、人工的に調製したものあるいは天然に存在するもの、特に限定はされないが真核生物由来のmRNAのポリAテールのいずれもが含まれる。

40

本明細書において標識ヌクレオチドとは、標識物質で標識されたヌクレオチドのことをいう。該標識物質は、上記デオキシヌクレオチドあるいはリボヌクレオチドに直接、又はリンカー等を介して結合しているもののいずれもが含まれる。

本明細書において標識ポリヌクレオチドとは、上記ヌクレオチドのポリマーのことをいい、該ポリマーは、標識ヌクレオチド及び/又は非標識ヌクレオチドで構成される重合体が

50

好ましい。

本明細書においてヌクレオチド伸長反応とは、上記ヌクレオチドを伸長させる反応であれば特に限定はなく、逆転写反応、DNAポリメラーゼ反応あるいは、末端デオキシヌクレオチド転移反応のいずれもが好適に使用できる。

本明細書において標的核酸とは、検出しようとする核酸配列、例えば任意の遺伝子の核酸配列のことをいう。

#### 【0016】

##### (1) 本発明の標識ポリヌクレオチドプローブ

本発明の標識ポリヌクレオチドプローブは、ポリアデニンヌクレオチド部分にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドプローブであればよく、特に限定はされないが、デオキシウリジンヌクレオチド(dUTP)のポリマー、デオキシチミンヌクレオチド(dTTP)のポリマー、あるいはdUTPとdTTPの混合ポリマーのいずれもが好適に使用できる。本発明の標識ポリヌクレオチドプローブは、該プローブの鎖長が特に限定はされないが、好ましくは、50ヌクレオチド以上、さらに好ましくは、100ヌクレオチド以上であるものが好適に使用できる。本発明の標識ヌクレオチドプローブは、プローブ1分子当りにほぼ一定量の標識化合物を含むものであれば、特に限定はされないが例えば、標識化合物が付加されたヌクレオチドを含有するものであることができる。特に限定されるものではないが例えば、標識デオキシウラシルヌクレオチド又は標識デオキシチミンヌクレオチドが好適であり、これらを混合して使用してもよい。

さらに、該標識ヌクレオチドは、放射性同位元素、化学発光物質、蛍光物質、リガンドあるいはレセプターで標識されたヌクレオチドのいずれもが好適に使用できる。特に限定はされないが、例えば<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>Pのような放射性同位元素、AMPDPのような化学発光物質、フルオレセイン、カスケードブルー、オレゴングリーン、BODIPY、ローダミンググリーン、Alexa、テキサスレッド、Cy3あるいはCy5のような蛍光物質、ビオチン、アビジン、ディゴキシゲニン等のリガンドあるいはレセプターで標識されたヌクレオチドのいずれもが好適に使用できる。本発明においては、好ましくは蛍光物質、特に好ましくはAlexaで標識されたdUTPが好適に使用できる。

#### 【0017】

本発明の標識ポリヌクレオチドプローブは、特に限定はされないがストリンジントな条件においてポリアデニンヌクレオチド部分にハイブリダイズするものが好ましい。該ストリンジントな条件としては、例えば、モレキュラー クローニング、アラボラトリー マニュアル(Molecular cloning, Laboratory manual)、第2版(1989)記載の条件が好適に使用できる。

#### 【0018】

本発明の標識ポリヌクレオチドプローブを使用するmRNAの検出において得られるシグナル強度は、mRNAの大きさに関係なく、唯一各々のmRNAのコピー数に依存する。また、検出しようとするmRNAごとにプローブを作製する必要がなく、プローブは異なる試料にも共通して使うことができる。

さらに、本発明のプローブは、そのヌクレオチド中に複数箇所ラベルされており、エンドラベルされたポリヌクレオチドやcDNAプローブよりも強いシグナルを与える。従って、標識されたdUTPの連続した結合がヌクレオチド伸長反応に影響しない、あるいは伸長産物において立体障害を生じないとするならば、本発明の標識ポリヌクレオチドプローブは、1種類のヌクレオチド標識により同じ長さのcDNAプローブよりも約4倍強いシグナルを得ることができる。

#### 【0019】

##### (2) 本発明の標識ポリヌクレオチドプローブの調製方法

本発明の標識ポリヌクレオチドプローブの調製方法は、例えば、mRNAのポリA部分にハイブリダイズできる標識ポリヌクレオチドプローブを調製できる方法であればいずれでもよい。特に限定はされないが例えば、ポリリボアデニンヌクレオチドあるいはポリデオキシアデニンヌクレオチドを鋳型とし、オリゴdTをプライマーとしたヌクレオチド伸長

10

20

30

40

50

反応により調製することができる。該ヌクレオチド伸長反応は、ポリリボアデニンヌクレオチドを鋳型とした逆転写反応が好適に使用できる。さらに、該ヌクレオチド伸長反応は、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成反応であってもよい。該逆転写反応には、AMV、MMLV等の市販の逆転写酵素が好適に使用できる。上記鋳型となるポリリボアデニンヌクレオチドの鎖長は、好ましくは50ヌクレオチド以上、さらに好ましくは100ヌクレオチド以上である。該鋳型を使用した場合、調製される標識ポリヌクレオチドの範囲は、50ヌクレオチド以上である。さらに、上記ヌクレオチド伸長反応のべつの態様としては、デオキシヌクレオチド重合反応であってもよい。この場合、末端デオキシヌクレオチド転移酵素(TdT)等の市販の修飾酵素が好適に使用できる。この場合において、該プローブの鎖長が50ヌクレオチド以上になるように反応条件を設定することが好ましい。

10

**【0020】**

上記ヌクレオチド伸長反応のいずれの場合において、少なくとも標識デオキシウラシルヌクレオチド及び/又は標識デオキシチミンヌクレオチドの存在下に反応を実施することにより容易に標識ポリヌクレオチドを調製することができる。上記のヌクレオチド伸長反応において、反応液中での標識(デオキシウラシル)ヌクレオチド3リン酸と非標識(デオキシチミン)ヌクレオチド3リン酸の含有モル比は、好ましくは1:1~1:3の範囲、特に好ましくは1:2である。また、本発明の調製方法で使用する標識ヌクレオチドは、放射性同位元素、化学発光物質、蛍光物質、リガンドあるいはレセプターで標識されたヌクレオチドから選択することができ、上記ヌクレオチド伸長反応を阻害しない標識ヌクレオチドあるいは該標識ヌクレオチドのアナログであってもよい。

20

**【0021】**

さらに、本発明の標識ポリヌクレオチドプローブの調製方法としては、上記標識化合物が付加された標識ヌクレオチドをヌクレオチド伸長反応の際に取り込ませる方法が例示されるが、別の態様として非標識のヌクレオチドをヌクレオチド伸長反応に使用し、反応終了後にさらに、酵素化学的あるいは化学的に標識化合物を導入する方法であってもよく、最終的に本発明の標識化されたポリヌクレオチドプローブを調製することができる標識導入方法のいずれもが好適に使用できる。

**【0022】**

本発明において、鋳型そしてプライマーとして示されたポリリボアデニンヌクレオチド及びオリゴデオキシチミンヌクレオチドの存在下において逆転写反応によって蛍光標識されたポリデオキシウラシルヌクレオチドを調製することができる。本発明の方法によって調製された、標識デオキシウラシルヌクレオチド及び非標識デオキシチミンヌクレオチドを含有する本発明の標識ポリヌクレオチドプローブは、膜またはガラス表面(DNAチップ)上にスポットされたDNA配列とハイブリするmRNAを検出するために使用することができる。

30

**【0023】****(3) 本発明の標的核酸の検出方法及び発現遺伝子の解析方法**

本発明の標的核酸の検出方法において標的核酸のポリアデニンヌクレオチド部分に標識ポリヌクレオチドプローブをハイブリダイズさせることにより検出することができる。標的核酸のポリアデニンヌクレオチド部分は、人工的に後からポリAテールを付加させたものでもよく、天然のmRNAのポリAテールであってもよい。すなわち、本発明の標識ポリヌクレオチドプローブが効率良く、特異的にハイブリダイズするものであれば、該標識ヌクレオチドは、放射性同位元素、化学発光物質、蛍光物質、リガンドあるいはレセプターで標識されたヌクレオチドのいずれかから選択されるものが好ましく、特に限定はされないが例えば、標識がフルオレセイン、カスケードブルー、オレゴングリーン、BODIPY、ローダミンググリーン、Alexa、テキサスレッド、Cy3あるいはCy5のいずれかから選択される標識ヌクレオチドが挙げられる。

40

**【0024】**

本発明の検出方法の別の態様としては、発現遺伝子の解析方法が挙げられる。該方法においては、少なくとも2種類の異なる標識を有する標識ポリヌクレオチドプローブを用いる

50

ことにより、異なる2種類の試料中の多種類の遺伝子の発現を比較することができる。標識ポリヌクレオチドプローブは特に限定はされないが、例えば、それぞれCy3及びCy5で標識されたポリヌクレオチドプローブが好適に使用できる。

#### 【0025】

さらに発現遺伝子の解析方法の別の態様としては、ポリアデニンヌクレオチド部分にハイブリダイズする標識ポリヌクレオチドプローブとcDNA標識ポリヌクレオチドプローブを組み合わせることができる。この方法は、例えば、3'末端のポリアデニル化又は脱アデニル化によって制御されている特定遺伝子の発現において使用することができ、前述の制御を検出することができる。

また、本発明の検出方法において標識ポリヌクレオチドプローブは、共通で使用することができるので、従来の標的核酸に合わせてcDNAプローブを調製する必要がなく、低コストで短時間で検出を行うことができる。

#### 【0026】

##### 【実施例】

本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

#### 【0027】

##### 実施例1

##### (1) 標識ポリヌクレオチドプローブの調製

逆転写/標識反応を用いて標識ポリヌクレオチドプローブを調製した。該反応は、以下の反応液組成で行った。すなわち、100 pmolの合成テンプレート-プライマーのPoly(rA)·p(dT)<sub>12-18</sub>(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)を鋳型とし、各0.5 mMのdATP、dCTP、dGTP、40 μMのdTTP及び20 μMのAlexa-dUTP(モレキュラープローブ社製)、10 mM DTT、25 U リボヌクレオチドインヒビター(ギブコBRL社製)、1.5 Uのスーパースク립ト逆転写酵素(ギブコBRL社製)を加え、反応液容量を50 μlにした。該反応混合溶液を30℃で60分間保持し、次に94℃で3分間加熱して酵素を失活させ、氷浴上で冷却した。該反応溶液をマイクロスピンス-300 HRカラム(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)を用いて精製した。次に精製物を37℃、20分間、0.3 NのNaOHで処理し、鋳型ポリ(rA)を分解後、塩酸及びトリス塩酸緩衝液(pH 7.0)で中和した。この溶液を蛍光標識ポリdUプローブ溶液として使用した。

#### 【0028】

##### (2) 細胞培養、RNA抽出、cDNAプローブの調製

ヒトHeLa細胞とWI38細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンク(Human Science Research Resources Bank: HSRRB)から入手し、10% fetal calf 血清を含むDulbecco's modified Eagle mediumで培養した。全RNAは、上記培養細胞からグアニジウム-フェノール-クロロホルム法で抽出した。混入した可能性のあるゲノムDNAは、RNaseフリーDNase(RQ1 DNase, プロメガ社製)を用いて取り除いた。mRNAは、必要に応じて、mRNA Purification Kit(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)を用いて精製した。cDNAプローブは、上記の600 ngの精製したRNAを鋳型としてCy3-dUTP(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)を用いた逆転写反応によって調製した。反応条件は、37℃、60分間インキュベートした後、10 μlの1 Nの水酸化ナトリウム溶液を加えて10分間、37℃でインキュベートし、鋳型RNAを分解した。反応物に25 μlの1 M トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)を加えて中和した後、エタノールで沈殿させた。沈殿物は、10 μlのハイブリバッファーで再度溶解した。

#### 【0029】

##### (3) DNA固定化メンブレン及びDNAマイクロアレイの調製

ヒトGAPDH、PCNA, p53, Rb, Rasオンコジーン, p130, p14, p

16, p18, p19, p21, p27の遺伝子をターゲットとして、配列表の配列番号1~40記載のプライマー及びTAKARA RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 (宝酒造社製)を用いてRT-PCRを行った。なお、p53、RB、p130、p16、p19、p27、p18、p14の遺伝子については、RT反応後、Nested PCRを行った。鋳型は、上記(2)で得られたRNAを使用した。得られた増幅断片は、精製後、pT7Blue-T クローニングベクター(ノバジェン社製)にサブクローニングし、DNA配列解析を確認した。挿入塩基配列を確認後、前述の挿入断片をBio-Dot (バイオラッド社製)を用いてハイボンドN+ (アマシャム・ファルマシア バイオテック社製)上に固定した。また、DNAマイクロアレイは、市販のTest array (宝酒造社製)を使用した。

10

#### 【0030】

##### (4) ハイブリダイゼーション及び検出

上記ターゲット遺伝子を保持するメンブレンフィルターは、メンブレン1cm<sup>2</sup>あたり1mlのハイブリダイゼーション緩衝液(5×SSC、0.5% BSA、0.1mg/ml サケ精子DNA、0.1% SDS)を使用して、37℃、1時間、プレハイブリダイゼーションを行った。初めに(2)で得られた全RNAもしくは精製RNAのいずれか10μlに上記(1)で調製した標識ポリdUプローブ溶液10μlを添加し、最終容量が200μlになるようにハイブリダイゼーション緩衝液を加え、70℃、10分間加熱後、上記メンブレンフィルターと6~10時間、30℃でハイブリダイズした。メンブレンフィルターは、室温で15分間、洗浄緩衝液I(1×SSC、0.1% SDS)に入れて穏やかに振とうし、次に10分間、洗浄緩衝液II(0.1×SSC、0.1% SDS)に入れて振とうし、洗浄した。洗浄後、メンブレンフィルターは、蛍光イメージアナライザーFMBIO II (宝酒造社製)で検出した。一方、DNAマイクロアレイのハイブリダイゼーションは添付の取り扱い説明書の指示通りにおこなった。すなわち、プレハイブリダイゼーションは、14μlのプレハイブリダイゼーション液(6×SSC、0.1% SDS、5×Denhardt's溶液、0.1μg/μl サケ精子DNA)を用いて1時間、65℃で行った。ポリdUプローブとのハイブリダイゼーションについては、上記(2)で得られた600ngのmRNAに1μlのポリdUを加え、容量を14μlとした。該溶液を70℃、10分間加熱した。また、同量のmRNAを用いて、cDNAプローブの調製を行った。前述の反応液をマイクロアレイに添加し、次いでアレイを65℃、18~20時間インキュベートし、さらに30℃、3時間インキュベートした。ハイブリダイゼーション後、該マイクロアレイを60℃、15分間、2×SSC溶液で、さらに60℃、15分間、洗浄液(2×SSC、0.1% SDS)で洗浄し、最後に室温で2回、2×SSCで洗浄した。マイクロアレイ上のシグナルは、アレイスキャナー418 (アフィメトリックス社製)を用いて検出した。

20

30

#### 【0031】

メンブレンフィルターにおける本発明の標識ポリヌクレオチドプローブの一例として、Alexa-dUTPで標識された標識ポリヌクレオチドプローブのハイブリ特異性について図1-Aに示す。図1-Bは、各ポリヌクレオチドのスポットした位置を示す。図1-Aに示したように該標識ポリヌクレオチドプローブは、ポリリボアデニンヌクレオチド(poly A)に特異的にハイブリダイズし、他のヌクレオチドにはハイブリダイズしないことが確認できた。

40

#### 【0032】

さらに、ポリリボアデニンヌクレオチドを1ng(3fmol)~1000ng(3pmol)の濃度範囲でスポットしたメンブレンを用いて検出感度を検討した。その結果を図2に示す。図2に示したように3fmol(1ng)を12mm<sup>2</sup>に固定化した場合においても明瞭な蛍光シグナルが得られることが確認できた。

#### 【0033】

また、1μgのGAPDH DNA断片及びpUC18 プラスミドDNAを同一メンブレン上にスポットしたフィルターを用いて、HeLa細胞由来の10~40μgの全RN

50

Aに(1)で調製された標識ポリdUプローブ溶液 10 $\mu$ lをアニーリングさせたものをハイブリダイズさせた。その結果を図3に示す。図3に示したようにpUC18DNAではなく、GAPDH DNAをスポットしたもののみシグナルが検出された。

【0034】

次に、(4)で調製したDNA断片をスポットしたメンブレンを使用し、HeLa細胞とWI38細胞由来の20 $\mu$ gの全RNAと(1)で調製したポリdUプローブ溶液 10 $\mu$ lをアニーリングしたものをハイブリダイズした。その結果を図4に示す。図4 1は、HeLa細胞由来、図4 2はWI38由来の試料を用いた結果を示す。図4 3は、スポットした各遺伝子の位置を示す。図4 1及び図4 2より、発現する遺伝子に応じてシグナルが検出されることが確認できた。さらに、従来法のノーザンブロットの結果と比較したところ同じ発現パターンで検出されることが確認できた。

10

【0035】

DNAマイクロアレイ及びWI38細胞由来のmRNAを用いて検討した。その結果を図5に示す。図5Aに示したようにWI38細胞由来のmRNAに本発明の標識ポリヌクレオチドプローブがアニーリングしたものは、哺乳類細胞由来の特異的なターゲットにハイブリダイズすることが示された。一方、シアノバクテリア遺伝子のものは全く検出しなかった。このことから、本発明の標識ポリヌクレオチドプローブは、DNAマイクロアレイにおいても使用できることを確認した。また同じチップを、同じmRNA調製品から従来の方法で調製されたcDNAプローブによって検討した結果を図5Bに示す。図5のA及びBの比較から本発明の検出方法が、従来法と基本的に同様の結果を示すことが確認できた。

20

【0036】

【発明の効果】

本発明により、ハイブリダイゼーションにおいて有用な標識核酸プローブ、該プローブの調製方法及び該プローブを用いた標的核酸の高感度検出方法が提供される。

【0037】

## 配列表フリーテキスト

SEQ ID NO:1

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p53 gene

SEQ ID NO:2

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p53 gene

SEQ ID NO:3

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p53 gene

10

SEQ ID NO:4

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p53 gene

SEQ ID NO:5

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human PRB gene

SEQ ID NO:6

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human PRB gene

SEQ ID NO:7

20

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human PRB gene

SEQ ID NO:8

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human PRB gene

SEQ ID NO:9

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human GAPDH  
gene

SEQ ID NO:10

30

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human GAPDH  
gene

SEQ ID NO:11

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p130  
gene

SEQ ID NO:12

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p130  
gene

40

SEQ ID NO:13

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p130 gene

SEQ ID NO:14

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p130 gene

SEQ ID NO:15

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p16 gene

10

SEQ ID NO:16

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p16 gene

SEQ ID NO:17

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p16 gene

SEQ ID NO:18

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p16 gene

20

SEQ ID NO:19

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p19 gene

SEQ ID NO:20

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p19 gene

SEQ ID NO:21

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p19 gene

SEQ ID NO:22

30

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p19 gene

SEQ ID NO:23

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p27 gene

SEQ ID NO:24

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p27 gene

SEQ ID NO:25

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p27 gene

40

SEQ ID NO:26

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p27 gene  
SEQ ID NO:27

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human PCNA  
gene

SEQ ID NO:28

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human PCNA  
gene

10

SEQ ID NO:29

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human Ras  
oncogene

SEQ ID NO:30

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human Ras  
oncogene

SEQ ID NO:31

20

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p18 gene  
SEQ ID NO:32

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p18 gene  
SEQ ID NO:33

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p18 gene  
SEQ ID NO:34

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p18 gene  
SEQ ID NO:35

30

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p21 gene  
SEQ ID NO:36

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p21 gene  
SEQ ID NO:37

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p14 gene  
SEQ ID NO:38

40

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p14 gene  
SEQ ID NO:39

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p14 gene  
SEQ ID NO:40

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p14 gene  
[ 0 0 3 8 ]

50

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> The efficient and high sensitive method for detecting of the nucleic acid

10

<130> T-1525

<160> 40

<210> 1

<211> 20

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human p53 gene

30

<400> 1

acaigacgga ggttgtgagg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p53 gene

<400> 2

ctctcggaac atctcgaagc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p53 gene

<400> 3

agcagtcaca gcacatgacg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p53 gene

<400> 4

ctctcggaac atctcgaagc 20

10

20

30

40

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of pRB gene

10

<400> 5

agcacaccct gcagaatgag

20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of pRB gene

30

<400> 6

cggtcgctgt tacataccat c

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of pRB gene

<400> 7

ttggatgaacg ccttctgtct g 21

10

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of pRB gene

20

<400> 8

ggtttaggag ggttgcttcc 20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of GAPDH gene

40

<400> 9

aacagccica agatcatcag c

21

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of GAPDH gene

<400> 10

ggctctccag aacatcatcc

20

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p130 gene

30

<400> 11

aagaggatcat gccacctcag

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p130 gene

<400> 12

gggacttgca aagtgttcc

20

10

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p130 gene

<400> 13

aaaccagagt ctccactctg g

21

30

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p130 gene

40

<400> 14

tagtttggca cagagatggg

20

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p16 gene

<400> 15

cctccggatt cggcgcgcg

19

20

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p16 gene

<400> 16

cgcacgtcca gccgcgcc

18

40

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p16 gene

10

<400> 17

gigcgcaggt tcttggtgac

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p16 gene

30

<400> 18

gccaggtagga cgggcagacg

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p19 gene

<400> 19

ggcgaccggc tgaggggcgg 20

10

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p19 gene

20

<400> 20

atgtccacga ggtcctgagc 20

<210> 21

<211> 19

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p19 gene

40

<400> 21

tgctgctgga ggaggttcg

19

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p19 gene

10

<400> 22

atgiggccct gcaggatgg

19

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p27 gene

30

<400> 23

aacgtgagag tgcctaacgg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p27 gene

<400> 24

ggtcgcttc ttattcctgc

20

10

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p27 gene

20

<400> 25

atgtcaaacg igcgagtgc

20

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p27 gene

40

<400> 26

gtctgctcca cagaaccgg

19

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of PCNA gene

<400> 27

ctaaggccg aagataacgc

20

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of PCNA gene

30

<400> 28

tcttcacct cgatcttggg

20

<210> 29

<211> 22

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of Ras oncogene

10

<400> 29

gtacaaactg gtggtggtt gg

22

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of Ras oncogene

30

<400> 30

tccatacaa ccctgagtc c

21

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p18 gene

<400> 31

aatggatttg gaaggactgc

20

<210> 32

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p18 gene

20

<400> 32

cccttatggt ccgatgc

17

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p18 gene

40

<400> 33

aaatggattt ggaaggactg c

21

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p18 gene

<400> 34

attcctccat agagcctgg

19

20

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p21 gene

30

<400> 35

atgtcagaac cggctggg

18

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p21 gene

<400> 36

cttggagaag atcagccgg

19

10

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p14 gene

<400> 37

gccaggagaa caagggcatg

20

30

<210> 38

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p14 gene

40

<400> 38

gctgtgcgca ggtaccctg

19

<210> 39

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p14 gene

<400> 39

atgcgcgagg agaacaagg

19

20

<210> 40

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of p14 gene

<400> 40

cgiggctgtg cgcaggtac

19

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、本発明の標識ポリヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションにおける特異性を示す図である。

【図 2】図 2 は、本発明の標識ポリヌクレオチドプローブの検出感度を示す図である。

【図 3】図 3 は、本発明の標識ポリヌクレオチドプローブを用いた発現遺伝子の検出を示す図である。

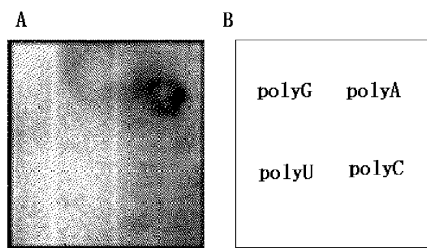
【図 4】図 4 は、本発明の標識ポリヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションにおける特異性を示す図である。

【図 5】図 5 は、DNAチップにおける本発明の標識ポリヌクレオチドプローブを用いた

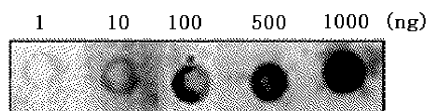
50

検出を示す図である。

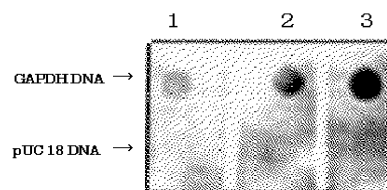
【 図 1 】



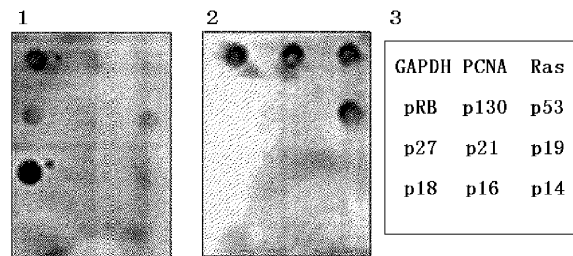
【 図 2 】



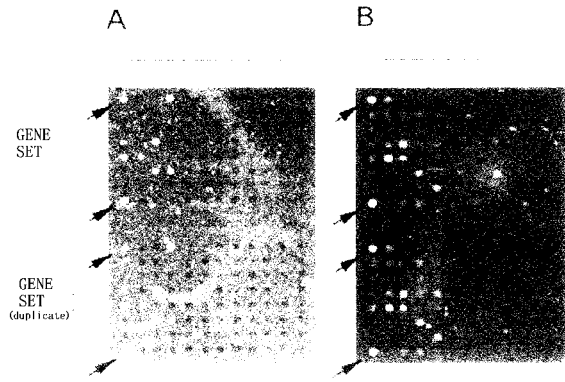
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



---

 フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/60	G 0 1 N 33/60	Z
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2

(72)発明者 峰野 純一

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研究所内

(72)発明者 浅田 起代蔵

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研究所内

(72)発明者 加藤 郁之進

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA35 DA12 DA13 DA14 FB01 FB02 FB07 FB08 FB12 FB13  
 4B024 AA11 AA20 CA04 CA11 HA12  
 4B063 QA01 QQ43 QQ52 QR32 QR35 QR55 QS32 QS34 QS36 QX02