

(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2007-74967
(P2007-74967A)

(43) 公開日 平成19年3月29日(2007.3.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 22 O L (全 14 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2005-266021 (P2005-266021)</p> <p>(22) 出願日 平成17年9月13日 (2005.9.13)</p>	<p>(71) 出願人 000001007 キヤノン株式会社 東京都大田区下丸子3丁目30番2号</p> <p>(74) 代理人 100123788 弁理士 宮崎 昭夫</p> <p>(74) 代理人 100106138 弁理士 石橋 政幸</p> <p>(74) 代理人 100120628 弁理士 岩田 慎一</p> <p>(74) 代理人 100127454 弁理士 緒方 雅昭</p> <p>(72) 発明者 高濱 慎一郎 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内</p>
--	---

最終頁に続く

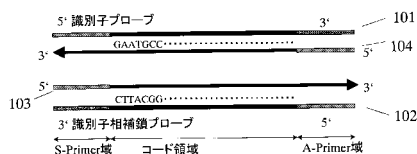
(54) 【発明の名称】 識別子プローブ及びそれを用いた核酸増幅方法

(57) 【要約】

【課題】 検体を特定する情報を、その増幅プロセス、特異的配列の検出プロセスに至るまで一貫して保持できる識別技術を提供することにある。

【解決手段】 検体に付与した個別コードをデコード可能な情報として組み込んだ塩基配列を増幅可能領域内に配置して識別子プローブを形成し、この識別子プローブを検体と一緒に増幅させて増幅産物中における識別子プローブの存在を検出することで、増幅産物中の検体の個別コードを認識することができ、増幅産物がどの検体由来するかを容易に確認でき、更に、増幅が良好に行われたかどうかを同時に検査することもできる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

DNAまたはRNAからなる検体に付与した個別コードにデコード可能な情報が組み込まれている塩基配列を、前記検体の増幅のための2本のプライマーを用いて増幅可能な領域に有することを特徴とする識別子プローブ。

【請求項 2】

前記個別コードが、数字、文字及び記号から選択された少なくとも1以上からなる文字列、あるいは塩基配列である請求項1記載の識別子プローブ。

【請求項 3】

前記個別コードが暗号化され、デコード可能な情報として前記塩基配列に組み込まれている請求項1または2記載の識別子プローブ。

【請求項 4】

前記個別コードが、前記検体に特有の塩基配列である請求項1～3のいずれかに記載の識別子プローブ。

【請求項 5】

前記検体に特有の塩基配列が、前記検体に固有の多型の1つを含む塩基配列、もしくはその多型の2以上の組み合わせ塩基配列である請求項1～4のいずれかに記載の識別子プローブ。

【請求項 6】

DNAまたはRNAからなる検体の所定部を増幅させるための2本のプライマーからなるプライマーセットにおいて、

請求項1～5のいずれかに記載の識別子プローブを更に有することを特徴とするプライマーセット。

【請求項 7】

DNAまたはRNAからなる検体を該検体に付与した個別コードで管理しつつ保管する方法において、

請求項1～5のいずれかに記載の識別子プローブを前記検体とともに、同一のコンテナ内に収めて保管することを特徴とするDNAまたはRNA検体の保管方法。

【請求項 8】

前記検体と前記識別子プローブとが混合された状態で保管される請求項7に記載の保管方法。

【請求項 9】

前記識別子プローブは、前記検体と混合される前に前記コンテナに予め備蓄されているか、もしくは混合された後に前記コンテナに収められている請求項8に記載の保管方法

【請求項 10】

前記コンテナが、マイクロチューブ、マイクロタイタープレート、ウェルプレート、または分析用バイアルである請求項7～9に記載の保管方法。

【請求項 11】

前記コンテナが、前記識別子プローブのデコードする個別コードと一致する識別コードを有する請求項7～10のいずれかに記載の保管方法。

【請求項 12】

前記コンテナの識別コードが、数字、文字及び記号から選択された少なくとも1以上からなる文字列、バーコードまたは2次元マトリックスコードとして書き込まれている請求項11に記載の保管方法。

【請求項 13】

識別コードを有するコンテナ内にDNAまたはRNAからなる検体を保管する際に該検体に混合して用いられる検体保管用の識別子プローブであって、

前記検体に付与した個別コードにデコード可能な情報が組み込まれている塩基配列を、前記検体の増幅のための2本のプライマーを用いて増幅可能な領域に有し、かつ該個別コードが前記コンテナの識別コードと一致している

10

20

30

40

50

ことを特徴とする検体保管用の識別子プローブ。

【請求項 14】

前記コンテナの識別コードが、ラベル、バーコードまたは 2 次元マトリックスコードでの形態で前記コンテナに記録されている請求項 13 に記載の検体保管用の識別子プローブ。

【請求項 15】

個別コードを付与した、所定の配列を有する DNA または RNA からなる検体の所定部分を 2 本のプライマーを用いて増幅する核酸増幅方法であって、

前記 2 本のプライマーを用いて増幅可能な識別子プローブの共存下で、前記検体の所定部分の増幅を行う工程を有し、

該識別子プローブは、前記 2 本のプライマーを用いた増幅によって増幅可能な領域にある所定の塩基配列が前記個別コードと関連付けられたものであることを特徴とする核酸増幅方法。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の核酸増幅方法によって得られた増幅産物中の前記識別子プローブに由来する増幅産物の有無の検出若しくは該増幅産物の検出及び定量を行う工程を有することを特徴とする増幅結果の検査方法。

【請求項 17】

前記プローブ由来の増幅産物の検出または定量が、該増幅産物に標識を取り込ませ、該増幅産物に特異的に結合する相補配列を有する識別子プローブ捕獲用プローブへの該増幅産物のハイブリダイゼーションを該標識を利用して検出することにより行なわれる請求項 16 に記載の検査方法。

【請求項 18】

前記識別子プローブ由来の増幅産物と前記識別子プローブ捕獲用プローブとのハイブリダイゼーションが未検出の場合に検体の増幅に失敗したことを示すエラー情報とする請求項 16 または 17 に記載の検査方法。

【請求項 19】

前記検体とそれに対応する識別子プローブのセットが複数あり、各識別子プローブの捕獲用プローブを用意しておき、1つの検体とそれに対応する識別子プローブとから得られた増幅産物を各識別子プローブの捕獲用プローブと反応させた際に、少なくとも 2 つの識別子プローブ捕獲用プローブとの反応が得られた際に、増幅エラーや検体の汚染を示すエラー情報とする請求項 16 ~ 18 のいずれかに記載の検査方法。

【請求項 20】

前記識別子プローブの捕獲用プローブを固相担体に固定して前記識別子プローブ由来の増幅産物と反応させる請求項 16 ~ 19 のいずれかに記載の検査方法。

【請求項 21】

前記固相担体に、前記識別子プローブの捕獲用プローブを固定した識別用の領域と、前記検体分析用のプローブが固定された検出用の領域とが互いに区分されて配置されている請求項 20 に記載の検査方法。

【請求項 22】

前記識別用の領域におけるハイブリダイゼーションの有無を画像として取り込み、検出用の領域におけるハイブリダイゼーションの有無を画像として取り込み、これらの画像に基づいて検体の個別コードと検体の分析データを関連づけて処理する請求項 21 に記載の検査方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、検体の所定部分を増幅して分析等を行う際に検体の識別を容易とする検体とは別個に作製された識別子プローブ及びそれを用いたプライマーセットに関する。本発明はまた、この識別子プローブを用いた検体保管方法、核酸増幅方法及び増幅結果の検査方

10

20

30

40

50

法に関する。

【背景技術】

【0002】

ゲノムDNA試料の確認方法として、ショートタンデムリピートやミニサテライト等の特定繰り返し配列を指標とした確認手法が知られている（特許文献1参照）。また、検体処理プロセスの中でシステムティックに検体番号を管理する方法もプロセスを自動化することで実現されていた（特許文献2参照）。

【0003】

たとえば、最近ファーマコゲノミクスのターゲットにした疾患関連遺伝子、薬物代謝関連遺伝子の検査においてシングルヌクレオチドポルモルフィズム（SNPs）を検定するジェノタイピング技術が注目されている。ここでは、多型を含む一部配列の増幅し、その多型を含む配列と相補的なプローブとをハイブリダイゼーションさせその成否を確認する手法や、多型部位への一塩基伸長反応を利用した多型のジェノタイピングが主流になっている。したがって、検体としてゲノムDNA自体を管理するためには、一部配列の増幅や遺伝子を決定する最終検査プロセスまで一貫した、管理コードを常に保持している必要がある。更に、検体DNAの一部を増幅してそれを検定する場合、検体から、いつも同様の箇所が増幅するとは限らず、また、所望とする部分の増幅に成功しない場合もあり、所望の増幅が得られたかどうかを常に確認する必要もあった。

10

【特許文献1】特開平6-205700号公報

【特許文献2】特開平5-288754号公報

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

ジェノタイピング等を行うために、検体ゲノムDNAから多型を含む断片をその後の処理過程（たとえば増幅、精製、検出プロセス）で処理する際には、この断片の供給元としての元検体がどれであったかを常に確認しておく必要がある。また、菌に感染した検体を検査するために菌種を判別のために菌ゲノムDNAに特有の断片を同様の処理過程で処理する必要があるが元検体（感染元）がどれであったかを確定することは特に重要である。この確認のためには、元検体の識別用コードを、プロセス単位で引き継いで管理しなくてはならない。ところが、複数の検体を同時に検査するような場合には、元検体コードの混同というリスクをはらんでいて、最終プロセス後にその信頼性を保証することは困難な場合があった。

30

【0005】

背景技術にあるように指標となる一部塩基配列等すべてのゲノムの塩基配列を管理することは実用的ではないし、自動化したとしても検体自体の逐次検査ではないので増幅の成否までは確認できない問題があった。一般的には、検体を識別する手法と、検体の一部増幅を確認する手法とは別物である。前者の検体の識別は、検体ゲノムDNAの有するユニークな配列部位を識別用のコードとして利用するにより行うことができる。

【0006】

後者の検体の一部増幅確認には、厳密には標準検体を使用した増幅検査を必要とする。簡易法では、対象物が適度に増幅したかどうかを確認する程度とし、たとえば、適切なプライマーが使用されなかった、または、プライマーを投入し損なった等の人為的なミスの有無を確認する。この確認には、ゲル電気泳動による方法、増幅時に標識化し、たとえば蛍光標識化された増幅後の産物をレーザーで確認する方法が利用されている。しかしながら、すべての検体について増幅を確認するこれらの手法は、検査効率の向上を図る上ではなお課題を有するものであった。

40

【0007】

本発明の目的は、検体を特定する情報を、その増幅プロセス、特異的配列の検出プロセスに至るまで一貫して保持できる識別技術を提供することにある。本発明の他の目的は、増幅プロセスにおいて所望の増幅が行われたことも併せて確認できる技術を提供すること

50

にある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の識別子プローブは、DNAまたはRNAからなる検体に付与した個別コードにデコード可能な情報が組み込まれている塩基配列を、前記検体の増幅のための2本のプライマーを用いて増幅可能な領域に有することを特徴とする識別子プローブである。

【0009】

本発明のプライマーセットは、DNAまたはRNAからなる検体の所定部を増幅させるための2本のプライマーからなるプライマーセットにおいて、上記構成の識別子プローブを更に有することを特徴とするプライマーセットである。

10

【0010】

本発明のDNAまたはRNA検体の保管方法は、DNAまたはRNAからなる検体を該検体に付与した個別コードで管理しつつ保管する方法において、請求項1～5のいずれかに記載の識別子プローブを前記検体とともに、同一のコンテナ内に収めて保管することを特徴とするDNAまたはRNA検体の保管方法である。

【0011】

本発明の検体保管用の識別子プローブは、識別コードを有するコンテナ内にDNAまたはRNAからなる検体を保管する際に該検体に混合して用いられる検体保管用の識別子プローブであって、前記検体に付与した個別コードにデコード可能な情報が組み込まれている塩基配列を、前記検体の増幅のための2本のプライマーを用いて増幅可能な領域に有し、かつ該個別コードが前記コンテナの識別コードと一致していることを特徴とする検体保管用の識別子プローブである。

20

【0012】

本発明の核酸増幅方法は、個別コードを付与した、所定の配列を有するDNAまたはRNAからなる検体の所定部分を2本のプライマーを用いて増幅する核酸増幅方法であって、前記2本のプライマーを用いて増幅可能な識別子プローブの共存下で、前記検体の所定部分の増幅を行う工程を有し、該識別子プローブは、前記2本のプライマーを用いた増幅によって増幅可能な領域にある所定の塩基配列が前記個別コードと関連付けられたものであることを特徴とする核酸増幅方法である。

【0013】

本発明の増幅結果の検査方法は、上記の核酸増幅方法によって得られた増幅産物中の前記識別子プローブに由来する増幅産物の有無の検出若しくは該増幅産物の検出及び定量を行う工程を有することを特徴とする増幅結果の検査方法である。

30

【発明の効果】

【0014】

本発明にかかる識別子プローブは、ゲノムDNA等の検体の管理手法として、検体の個別コードをデコード可能な情報として組み込んだ塩基配列を検体増幅用の2本のプライマー（ユニバーサルプライマー）で増幅可能な領域内に有するものである。この識別子プローブを検体と混合し同一のコンテナに保管し、2本のプライマーを用いて増幅させた際に、増幅産物中にこの識別子プローブの有する検体個別コードに関する情報を含む塩基配列の存在を確認することで増幅産物の元になった検体の特定を行うことができる。更に、コンテナにも検体個別コードを付与しておくことで、検体の供給元であるコンテナを容易に特定することが可能となる。これにより、検体の取り違いなどの人為的なミスによる分析結果のエラーを最小限にする効果を期待できる。また、識別子プローブを検体もしくは検体の一部を同一のユニバーサルプライマーで増幅することが出来ることは、識別子プローブを検出できるか否かで、増幅の成否を確認する指標になる。検体の遺伝子分析において検体の個別コードと、その識別子プローブが十分に検出出来ることを確認することは、大量に用意された検体とその分析結果の関連づけにおいてデータの信頼性を得るに効果的な手法である。

40

【0015】

50

また、検体の処理プロセスにおいて他の検体とコンタミネーションを引き起こした場合には、その両者の識別子プローブを検出するために、問題を引き起こしたことを検出時に確認できるために、検体の分析データの信憑性においてその裏づけをとることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明は、検体個別コードを取り込んだ識別子プローブに関し、識別子プローブと検体とを混合し同一コンテナで保管管理することによって該混合物を同時増幅、同時ハイブリダイゼーションすることでその検体と工程を管理できるようにしたものである。識別子プローブの有するデコード可能な情報を含む塩基配列の部分は、化学合成されたものでも、常在菌ゲノム、ヒトゲノムからユニークな配列を切り出して得たものでもよい。

10

【0017】

以下に本発明の実施形態について説明する。

〔第1の実施形態〕

本発明の第1の実施形態を図1～図3を用いて以下に説明する。この実施態様は、検体を識別する個別コードをデコード可能な情報として書き込んだ塩基配列を有する識別子プローブをデザインすることに関する。また、この実施態様は、検体と識別子プローブを同一コンテナ（容器）内に一緒に、好ましくは混合して保管管理する検体保管方法も含む。

【0018】

識別子プローブは、検体を識別のために付与した個別コードをデコード（読み替え）可能な情報として組み込んだ塩基配列を有する。すなわち、この塩基配列をデコードする（読み替える）ことで検体の個別コードを得ることができる。この識別子プローブは、検体に対してユニークに予め定義された塩基配列を有しており、検体もしくは検体の一部を増幅する上で必要な一対のプライマーと同一のプライマーで同時に増幅できるようにデザインされる。識別子プローブは、検体検出のためのプローブとは別個の識別子プローブ捕獲用のプローブとハイブリダイゼーションさせることで識別子プローブの有する検体個別コードに関する情報を特定して、それをデコードし検体個別コードを確認することができる。

20

【0019】

一般的には、検体検出用のプローブや識別子プローブ捕獲用のプローブは、ガラス、プラスチック、ビーズ等の固相担体上に固定して上述したハイブリダイゼーションに用いる

30

【0020】

各プローブの固相担体への固定方法、各プローブの合成方法、固相担体へのスポットティング方法、これらの方法に用いる製造装置は公知のものが利用できる。ハイブリダイゼーションの有無の検出方法としては、蛍光法、ラジオアイソトープ（RI）法、電気・化学的方法、表面プラズモン共鳴法、水晶振動子法、その多岐にわたる公知の方法から目的に応じて選択された方法を利用することができる。以下、一般的な蛍光検出法を用いる場合についての実施形態を説明する。

【0021】

図1は、検体に特別に付与した個別コードをデコード可能な情報として組み込んだ塩基配列を中央領域に配置した識別子プローブの構成の一例を模式的に示す図である。この識別子プローブ101は、その中央領域に塩基配列「G A A T G C C」を有し、更にその3'及び5'末端領域に増幅用プライマーの結合領域S-Primer域及びA-Primer域を有する。図1に示したヌクレオチド鎖102は、識別子プローブ101に対する相補鎖であり、ヌクレオチド鎖103及び104は識別子プローブ101を鋳型としてプライマーを起点に伸長したヌクレオチド鎖を示す。識別子プローブ101の5'、3'側のプライマー領域に挟まれた中央部はコード領域と定義する。このコード領域に、検体個別コードがデコード可能な情報として組み込まれている。

40

【0022】

50

識別子プローブ101の3'末端領域にアンチセンス方向のプライマー(A-Primer)をアニールし、識別子プローブ101を鋳型としてDNAポリメラーゼによりヌクレオチド鎖を伸長させることで、識別子プローブ101の相補鎖104が得られる。この相補鎖104の3'側の領域にセンス方向のプライマー(S-Primer)をアニールさせて、この相補鎖104を鋳型としてDNAポリメラーゼによりヌクレオチド鎖を伸長させることで、識別子プローブ101のコピー103が得られる。更に、このコピー103の3'側にプライマー(A-Primer)をアニールし、コピー103を鋳型としてDNAポリメラーゼによりヌクレオチド鎖を伸長させることで、識別子プローブ101の相補鎖のコピー102が得られる。以上の2本のプライマーを用いた伸長反応を繰り返すことで識別子プローブ101のコピーを大量に得ることができる。すなわち、識別子プローブ101のコード領域が指数的に増幅する。この増幅工程は、PCR(ポリメラーゼチェーンリアクション)のプロセスを検体の個別コードにデコード可能な情報を有する識別子プローブに応用したもので、プライマー領域を検体増幅用と統一しておけば同一の増幅プロセスで検体の増幅対象領域と識別子プローブを同時に増やすことが可能である。

10

【0023】

本実施形態では、表1のような検体、および識別子プローブを用いて実験を行った。

【0024】

【表1】

表1

検体配列例 CYP2D6 C100T領域179bp	5'-TTGGTAGTGAGGCAGGTATggggctagaagcactgggtgccctggccgt gatagtgcccacttccctgctccctggaggaccgatgcaccggcgccaac gctgggctgcaagctacaccagggccccctgccactgccccggctgggc aacctgctgcATGTGGACTCCAGAACACA-3'
識別子プローブ配列	5'-TTGGTAGTGAGGCAGGTATgaatgccATGTGGACTCCAGAACACA-3'
Forward Primer(S-Primer)	5'-TTGGTAGTGAGGCAGGTAT-3'
Riverse Primer(A-Primer)	5'-GTGTTCTGGAAGTCCACAT-3'

20

30

【0025】

Primerは5'末端にCy3を標識したものをを用いた。

検体を増幅する1対のプライマーにより識別子プローブも増幅できて中央小文字表記の識別コードgaatgccを含む領域を増幅できることを確認した。

ここでは、反応を高速化するためにLightCycler2.0(Roche Diagnostics)を使い、下記の表2のプロトコルに従って40サイクルのPCR(ポリメラーゼチェーンリアクション)反応を行った。酵素(DNAポリメラーゼ)と基質はFastStart DNA MasterHybridization Probes(Roche Diagnostics)を使用した。

【0026】

【表2】

表2

温度(°C)	95	60	72
継続時間(秒)	10	15	7

40

【0027】

図1に提示した識別コード「GAATGCC」を中央に塩基配列として保持する識別子プローブで検体の増幅プライマと同一のプライマで増幅できるように構成されている。

50

【0028】

図2は、識別子プローブの検体個別コード領域のデコード例を示す。この例は、検体とその個別コードとして14桁のコード「10111100100101」を付与した場合について、A（アデニン）、G（グアニン）、C（シトシン）、T（チミン）の塩基を順に11、10、01、00と4ビットのコードに置換するだけのシンプルなデコード方式であり、検体個別コードをデコード可能な情報として塩基配列に置き換える場合を示したものである。すなわち、識別子プローブ101のコード領域に配置した「GAATGCC」の配列が上記の増幅により得られた増幅産物に確認された場合に、この塩基配列をデコードすることで検体に特別に付与した個別コード「10111100100101」を認識可能となり、識別子プローブ101が増幅したことを確認できる。この検体個別コードは上記のような数字の配列に限定されず、数字、文字（日本語の文字やアルファベット等）及び記号から選択された1以上からなる文字列が利用できる。

10

【0029】

識別子プローブ101の塩基長として50bpであれば、100ビットの個別コードを定義できることを意味し、検体識別の個別コードを冗長に暗号化することも技術的に可能である。

暗号化技術は、セキュリティ強化のためのコンピュータコードの暗号化に関するもの、画像等のデータを圧縮するためのコードシュリンクに関するものなどを適用できる。

【0030】

図3に、検体個別コードに関する情報を有する識別子プローブの利用方法の一例を図示する。検体試料を保管するコンテナ、ここでは、マイクロチューブやマイクロタイタープレートのウェルのような容器内に、検体とその個別コードに関する情報を有する識別子プローブを混合して配置しておく。識別子プローブは、予めコンテナ内に仕込んであってもよいし検体投入時に同時に識別子プローブを投入してこれらを混合してもよい。

20

【0031】

この検体と識別子プローブの混合時に、コンテナに検体個別コードを付与しておくことで、確実な保管管理が可能となる。例えば、コンテナの検体投入容器に検知個別コードをラベル、バーコード、2次元コードなどの形態で記録しておく。また、コンテナの識別コードについても検体個別コードと同様に暗号化しておいてもよい。

【0032】

次に、この検体個別コードで特定された容器内にこの検体個別コードに関する情報を有する識別子プローブとこの個別コードを有する検体との混合物を調製する。このように、検体とコンテナのコードの関連づけを記録しておくことで、提供元のコンテナの特定及びその混合物にどの検体が含まれているかの確認を確実に行うことができる。例えば、この混合物が、以降の各種プロセスにおいて、初期のコンテナから離れてもこれらが混合物として処理される限りは、提供元のコンテナと関連付けて検体に付与した個別コードで検体の管理を確実に行うことができる。この場合、検体と識別子プローブが特異的にアニールしその後の反応に影響を与えないように、識別子プローブの配列を選択しておくことが必要となる。図示する検体301と識別子プローブ302は、初期状態では混合された状態で保管されている。検体の遺伝子検査をするために検体もしくはその一部配列を増幅する。増幅用のプライマーとして、検体301の増幅部位の増幅と識別子プライマーの増幅に共通して使用できるユニバーサルプライマーが用いられる。こうすることで、プライマーの投入ミスや増幅プロセスに問題がある場合には識別子プローブを検出できるか否かでその確証を得ることが出来る。すなわち、識別子プローブは増幅検査用プローブとして用いることもできる。

30

40

【0033】

識別子プローブの検出は、その配列が予めデザインされたものであるため、その相補鎖プローブとのハイブリダイゼーション法を適用することで容易に行うことができる。複数の検体を検査する際には、各検体に対応する識別子プローブ捕獲用のプローブを固相担体上に配列固定しておくことで検査効率の向上を図ることができる。多種の検体に対応した識別

50

子プローブを用いて検査を行う場合には、マイクロアレイのようなプローブ固定形態が好適である。

【0034】

識別子プローブ捕獲用のプローブを固定した領域を、検体の遺伝子検査に用いられる担体に設けてもよい。この場合、検体とその解析結果が、同一担体上の識別子プローブの個別コードとともに検出できるように、検体の取り違いや分析データの登録ミスなどのヒューマンエラーを回避する効果も期待できる。図4は、マイクロアレイとして固相担体を模式的に図示したものである。検体検査用のプローブの配置された分析エリア401と検体の個別コードに関する情報を含む識別子プローブ捕獲用のプローブを検体管理数だけ配置した識別コードエリア402からなる。この2つのエリアは別個の固相担体に用意しても

10

【0035】

マイクロアレイ上に配置した識別コードエリア402には、検査対象の検体の数に応じた数の識別子プローブ捕獲用のプローブが各プローブ毎にプロットされている。この識別子プローブ捕獲用のプローブに識別子プローブ(増幅産物)がハイブリダイズした状態を蛍光標識を利用して検出する。蛍光標識は、識別子プローブの増幅時に増幅産物中に取り込まれるようにしておく。識別子プローブが識別コードエリア402に固定された識別子プローブ捕獲用プローブに結合していれば、そこに励起光を照射することで蛍光を得ることができる。この蛍光を、蛍光検出装置、蛍光スポットの解析装置などによって検出する

20

。本実施形態で増幅した検体及び識別子プローブは前記のマイクロアレイとハイブリ後、GenePix4000(Inter Medical Co., Ltd.)を用いてCy3標識の検体及び識別子プローブを検出した。検体を混合したか否かで分析エリア401と識別コードエリア402の該当スポットが検出できるか否かを判定した。

【0036】

【表3】

表3

	増幅物A 識別子捕獲プローブ	増幅物B 識別子捕獲プローブ
(1) 増幅候補物なし	×	×
(2) 増幅候補物Aのみ	○	×
(3) 増幅候補物Bのみ	×	○
(4) 増幅候補物AとB	○	○

○・・・輝度あり、×・・・輝度なし

30

【0037】

識別子プローブは、前記載のように合成されたオリゴヌクレオチドであり、1対の増幅プライマと酵素DNAポリメラーゼおよび基質があれば表3のように輝度を確認できる。これは検体の増幅状態には依存しない。これは、識別コードエリア402にある識別子捕獲プローブの輝度で確認できる。表3で(2)増幅候補物Aのみの場合、分析エリアが表4のようになっていると想定する。

40

【0038】

【表 4】

表4

	増幅物 A 捕獲プローブ	増幅物 B 捕獲プローブ
分析エリア例 1	×	×
分析エリア例 2	○	×
分析エリア例 3	×	○
分析エリア例 4	○	○

○・・・輝度あり、×・・・輝度なし

10

【0039】

例 1 では、識別子は確認できるが増幅物を確認できないため、増幅に失敗していることを示し、例 2 では、想定通り増幅物 A が確認できていることを示す、例 3、4 では、増幅物 B がコンタミネーションしていることを示している。

【0040】

蛍光が検出された箇所に固定された識別子プローブ捕獲用のプローブの配列からそこに結合した識別子プローブの配列を特定し、増幅産物中に含まれる検体の個別コードをデコードすることができる。すなわち、蛍光の測定により、検体の個別コードを表示し、その検体の増幅に問題がないことを通知することが可能になる。識別コードエリアでの蛍光の検出とその解析、結果の通知処理は、検出装置、画像解析装置の ROM / RAM 上に記録されたプログラムコードによって制御することができる。更に、蛍光強度等を用いて識別子プローブの増幅量を測定することで、検体の増幅量を見積もることも可能である。

20

【0041】

また、画像を取り込めるマイクロプロセッサ搭載の情報処理装置に、励起光を照射して蛍光が得られる状態となっている識別コードエリア 402 全体を蛍光画像として取り込ませて、この画像データを予め組み込まれたプログラムに処理させることで上記の判定を行なわせることもできる。この場合、プログラムコードは、ハードディスク、フラッシュメモリ、CD、DVD、FD 等の外部記録メディアに保存されていてもよい。解析後のエラーは、例えば PC の表示装置に検体のコード表示として検体試料調整失敗・判読不明等を出力することで注意を喚起してもよい。本発明は、検体の管理システムとして、その識別子プローブの検出データからそれを検体の ID コードとして採用することも可能である。すなわち、検体の分析データに識別子プローブの解析結果を含めておけば、検体 ID とその分析結果のデータをリンクして、例えばデータベースシステムに直接記録することができる。検体の調製、増幅、精製、分析、結果抽出、分析データの登録と一貫したプロセスを自動化するのにも役立つ。このとき、検体の登録ミス、調整ミス等のヒューマンエラーを最小限にするシステムを構築することができる。

30

【0042】

この実施形態においては、検体個別データを付したコンテナ内に、この個別データに関する情報を有する識別子プローブを配置した検体検査用のキットを提供することができる。更には、このキットにおいてコンテナ内に検体とそれに対応する識別子プローブを混合しておくことで個別コードで管理された検体のライブラリを作製することも可能である。更に、このキットには、識別子プローブ捕獲用のプローブを固相担体に固定した識別子プローブ検出用の担体を追加してもよい。更に、この識別子プローブ検出用の担体に検体検査用のプローブを固定した固相担体をそれぞれ別部品として、あるいは一体型として提供してもよい。

40

【0043】

上記した識別子プローブを用いて検体の識別と増幅検査を行う方法は、ゲノムライブラリーなどの多数の保管検体の品質のチェックにも利用できる。例えば、定期的に識別子プローブと混合状態にある検体の一部をサンプリングして、これを増幅させて識別子プロー

50

ブ由来の増幅産物のみが検出されるという結果を得ることで、検体が他の検体に汚染されずに良好に保管されていることを確認できる。

【0044】

〔第2の実施形態〕

本発明の第2実施形態を図5を用いて以下に説明する。本実施形態は、検体にユニークな（固有の）塩基配列を抽出しそれを個別コードとして採用して、識別子プローブをデザインすることに関する。

【0045】

検体にユニークな塩基配列とは、ゲノムにある特異的な反復配列、たとえばショートタ
ンデムリピートやミニサテライトのようなものがある。サンプルコードとしてこれらの情
報を使用するゲノムの確認方法は公知である（特開平6-205700号公報）。ここでは、それ
らのゲノムの反復領域や多型領域を検体から抽出し、増幅用プライマーに対応する配列の
プローブとライゲーションさせて識別子プローブをデザインすることを述べる。

10

【0046】

図5は、検体ゲノムの多型部位を抽出し識別子プローブを合成する工程を模式的に示す
図である。ゲノムとは検体自体のヒトゲノムであっても、常在菌のゲノムであってもよい。
ここではヒトゲノム検体のユニークな多型部位を増幅後抽出し検体の分析用プライマー
と相補鎖になっている配列を有するアダプタを両端にライゲーションして識別子プローブ
を合成するプロセスを示す。この場合、検体の個別コードに関する情報を有する領域とし
て、特定の任意の配列を選択することはできないが、検体の分析領域とはクロス配列して
いない箇所を意図的にセレクトできる利点がある。多型部位としてユニークな配列を複数
種抽出し対応する識別子プローブを複数本作製してもよい。

20

【0047】

この実施態様の場合には、検体の多型を含む領域から検体個別コードとして利用可能な
配列をその都度選択して識別子プローブを合成するので、検体個別コードを予め固定して
おくことができない。そこで、識別子プローブとハイブリダイゼーションさせるマイクロア
レイ上の識別子捕獲用のプローブを、識別子プローブを合成するたびにライブラリに追加
する必要がある。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】本発明の識別子プローブの構造とその増幅プロセスを模式的に説明する図である。

【図2】本発明の識別子プローブにおける検体個別コードに関する情報が書き込まれた塩
基配列の一例とそのデコードデータを示す図である。

【図3】本発明の識別子プローブの利用方法の一例を示した図である。

【図4】本発明の識別子プローブ及び検体（もしくはその一部）とのハイブリダイゼー
ションを行う検出側のプローブを搭載した固相担体の一例を模式的に示す平面図である。

【図5】本発明の第2の実施態様におけるゲノムの多型部位を抽出する工程を模式的に示
す図である。

30

【符号の説明】

40

【0049】

101：識別子プローブ

102：識別子相補鎖プローブ

103：識別子相補鎖プローブの3'側にプライマーを配しコピーする識別子プローブ

104：識別子プローブの3'側にプライマーを配しコピーする識別子相補鎖プローブ

301：検体または検体の特定部位

302：識別子プローブ

401：マイクロアレイの検体分析エリア

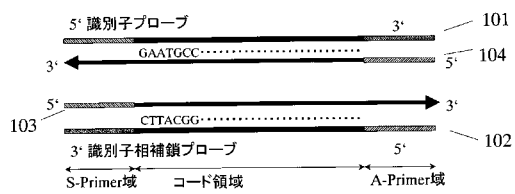
402：マイクロアレイの検体の個別コードエリア

501：検体の多型部位抽出・増幅用プライマー（センス方向のプライマー）

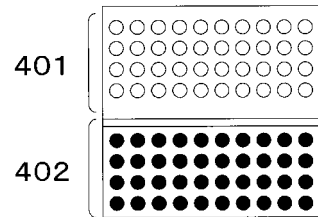
50

- 5 0 2 : 検体の多型部位抽出・増幅用プライマー (アンチセンス方向のプライマー)
- 5 0 3 : 識別子プローブ増幅用プライマー (センス方向のプライマー)
- 5 0 4 : 識別子プローブ増幅用プライマー (アンチセンス方向のプライマー)

【 図 1 】



【 図 4 】

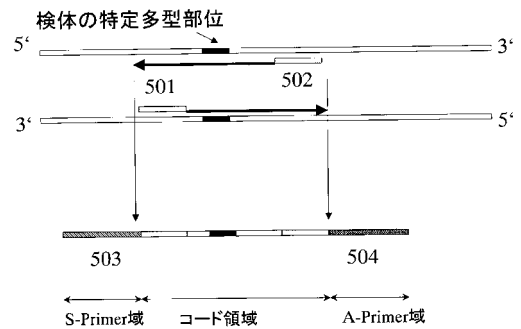


【 図 2 】

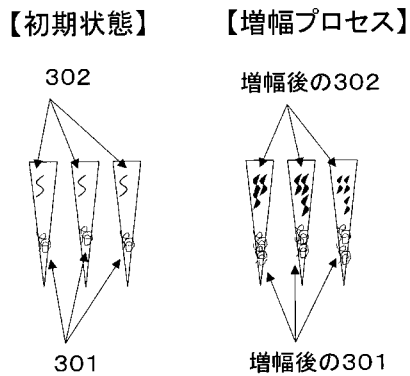
検体個別コード
(デコードデータ)
10111100100101

10 11 11 00 10 01 01
G A A T G C C

【 図 5 】



【 図 3 】



【配列表】

2007074967000001.app

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA05 CA09 HA12 HA14 HA19
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ52 QR32 QR55 QR62 QS24 QS32