

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 8 月 2 日(02.08.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/102260 A1

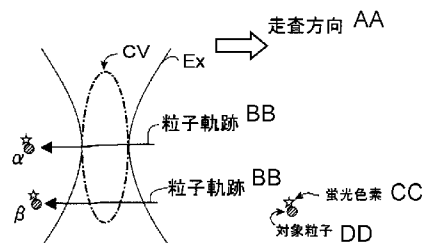
- (51) 国際特許分類:
G01N 21/64 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/542* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/051416
- (22) 国際出願日: 2012 年 1 月 24 日(24.01.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-014063 2011 年 1 月 26 日(26.01.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): オリ
ンパス株式会社 (OLYMPUS CORPORATION)
[JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4
3 番 2 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中田 秀孝
(NAKATA Hidetaka) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷
区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリパス株式会
社内 Tokyo (JP). 西川 和孝(NISHIKAWA Kazu-
taka) [JP/JP]; 〒1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁
目 4 3 番 2 号 オリパス株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 棚井 澄雄, 外(TANAI Sumio et al.); 〒
1006620 東京都千代田区丸の内一丁目 9 番 2 号
Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING POLYMORPHISM OF NUCLEIC ACID MOLECULE

(54) 発明の名称: 核酸分子の多型識別方法

[図4A]



- AA Scanning direction
BB Particle trajectory
CC Fluorescent colouring
DD Particle of interest

(57) Abstract: The present invention provides a method for identifying polymorphism of nucleic acid in a sample solution in which the concentration or the number density of the nucleic acid under observation is lower than with prior photometric analysis techniques. In other words, the present invention relates to a method for identifying polymorphism of a nucleic acid molecule, said method comprising: a step in which a sample solution, which includes a nucleic acid being analysed and a first nucleic acid probe that is labelled with a fluorescent substance and hybridizes specifically with a single-strand nucleic acid molecule having a first type of base sequence among polymorphic sequences, is prepared and the nucleic acid molecules in this sample solution are brought together after denaturation; a step in which a sample solution, which includes the nucleic acid being analysed and a second nucleic acid probe that is labelled with a fluorescent substance and has a base sequence different from that of the first nucleic acid probe, is prepared and the nucleic acid molecules in this sample solutions are brought together; a step in which the number of aggregate molecules that include the first nucleic acid probe and the number of aggregate molecules that include the second nucleic acid probe in each of the sample solutions is calculated by means of a scanning molecular counting method; and a step in which polymorphism of the nucleic acid being analysed is identified on the basis of the calculation results.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2012/102260 A1



ロツパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

本発明は、観測対象である核酸の濃度又は数密度が従来の光分析技術よりも低い試料溶液中の核酸の多型を識別する方法を提供する。すなわち、本発明は、蛍光物質により標識されており、かつ多型配列中の第 1 の型の塩基配列を有する 1 本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズする第 1 の核酸プローブと、解析対象の核酸とを含む試料溶液を調製し、当該試料溶液中の核酸分子を変性させた後、会合させる工程と、蛍光物質により標識されており、かつ第 1 の核酸プローブとは塩基配列が異なる第 2 の核酸プローブと、前記解析対象の核酸とを含む試料溶液を調製し、当該試料溶液中の核酸分子を会合させる工程と、各試料溶液中の、第 1 の核酸プローブを含む会合体の分子数及び第 2 の核酸プローブを含む会合体の分子数を、走査分子計数法により算出する工程と、算出結果に基づき、解析対象の核酸の多型を識別する工程と、を有する核酸分子の多型識別方法に係る。

明 細 書

発明の名称：核酸分子の多型識別方法

技術分野

[0001] 本発明は、共焦点顕微鏡や多光子顕微鏡の光学系などの溶液中の微小領域からの光が検出可能な光学系を用いて、体細胞変異や一塩基多型などの遺伝子多型のような、塩基配列が類似する核酸を識別する方法に関する。

本願は、2011年1月26日に日本国に出願された特願2011-014063号に基づく優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 特定の塩基配列を有する核酸を検出する方法として、プローブやプライマー等の人工合成した短鎖のオリゴヌクレオチドを用いて核酸の塩基配列を調べる方法が多数報告されている。特に、体細胞変異や一塩基多型などの遺伝子解析では、検出感度に優れていることから、蛍光を用いた様々な手法が開発されている。

[0003] FRETプローブを用いた核酸の識別方法の1つとして、例えば、5'末端側と3'末端側が互いに相補的な塩基配列を有しており、かつ両末端が蛍光物質と消光物質によってそれぞれラベルされている1本鎖核酸（分子ビーコンプローブ）を用いる、いわゆる分子ビーコン法がある（例えば、非特許文献1参照。）。分子ビーコンは、単独で存在している場合には、両末端が会合して分子内ループを形成しているため消光状態であるが、標的核酸分子とハイブリダイズすることにより、分子内ループが解消されて蛍光を発する。遺伝子多型のうち特定の遺伝子型と特異的にハイブリダイズする分子ビーコンを用いることによって、遺伝子多型を識別することができる（例えば、非特許文献2参照。）。

[0004] その他にも、蛍光性インターカレーターと蛍光プローブによるFRETを用いて核酸を検出する方法がある（例えば、非特許文献3参照。）。蛍光物質で標識されている蛍光プローブが他の1本鎖核酸とハイブリダイズすると

、形成された2本鎖核酸の塩基対間に蛍光性インターカレーターが入りこむ。この蛍光性インターカレーターと蛍光プローブを標識する蛍光物質との間に起こるFRETを利用して、単独で存在している蛍光プローブと、2本鎖核酸を形成している蛍光プローブを識別することができる。この原理を利用して、例えば、遺伝子多型のうちの特定の遺伝子型と特異的にハイブリダイズするプローブと、別の遺伝子型と特異的にハイブリダイズするプローブとを、それぞれ異なる蛍光物質で標識し、それぞれの蛍光物質と蛍光性インターカレーターとの間に起こるFRETを検出することにより、遺伝子多型を識別することができる（例えば、非特許文献4参照。）。

[0005] 一方で、近年の光計測技術の発展により、共焦点顕微鏡の光学系とフォトンカウンティング（1光子検出）可能な超高感度の光検出技術とを用いて、一光子又は蛍光一分子レベルの微弱光の検出・測定が可能となった。そのような微弱光の計測技術を用いて、生体分子等の分子間相互作用又は結合・解離反応の検出を行う装置又は方法が種々提案されている。例えば、蛍光相関分光分析（Fluorescence Correlation Spectroscopy：FCS。例えば、特許文献1、2、非特許文献5～7参照。）に於いては、レーザ共焦点顕微鏡の光学系とフォトンカウンティング技術を用いて、試料溶液中の微小領域（顕微鏡のレーザ光が集光された焦点領域。コンフォーカル・ボリュームと称される。）内に入出入りする蛍光分子又は蛍光標識された分子からの蛍光強度が測定される。その測定された蛍光強度の自己相関関数の値から決定される微小領域内に於ける蛍光分子等の平均の滞留時間（並進拡散時間）及び滞留する分子の数の平均値に基づいて、蛍光分子等の運動の速さ又は大きさ、濃度といった情報が取得されたり、分子の構造又は大きさの変化や分子の結合・解離反応又は分散・凝集といった種々の現象が検出される。また、蛍光強度分布分析（Fluorescence-Intensity Distribution Analysis：FIDA。例えば、特許文献3参照。）やフォトンカウンティングヒストグラム（Photon Counting Histogram：PCH。例えば、特許文献4参照。）では、FCSと同様に計測されるコンフォーカル・ボリューム内に入出入りする蛍光分子等の蛍光

強度のヒストグラムが生成され、そのヒストグラムの分布に対して統計的なモデル式をフィッティングすることにより、蛍光分子等の固有の明るさの平均値とコンフォーカル・ボリューム内に滞留する分子の数の平均値が算定される。これらの情報に基づいて、分子の構造又は大きさの変化、結合・解離状態、分散・凝集状態などが推定される。更に、特許文献5、6に於いては、共焦点顕微鏡の光学系を用いて計測される試料溶液の蛍光信号の時間経過に基づいて蛍光性物質を検出する方法が提案されている。特許文献7では、フローサイトメータに於いて流通させられた蛍光微粒子又は基板上に固定された蛍光微粒子からの微弱光を、フォトンカウンティング技術を用いて計測して、フロー中又は基板上の蛍光微粒子の存在を検出するための信号演算処理技術が提案されている。

[0006] 特に、FCS、FIDA等の共焦点顕微鏡の光学系とフォトンカウンティング技術とを用いた微小領域の蛍光測定技術を用いる方法によれば、測定に必要な試料は、従前に比して極めて低濃度かつ微量でよく（一回の測定で使用する量は、たかだか数十 μ L程度である。）、測定時間も大幅に短縮される（一回の測定で秒オーダーの時間の計測が数回繰り返される。）。従って、これらの技術は、特に、医学・生物学の研究開発の分野でしばしば使用される希少な或いは高価な試料について分析を行う場合や、病気の臨床診断や生理活性物質のスクリーニングなどのように検体数が多い場合に、従前の生化学的方法に比して、低廉に、或いは迅速に実験又は検査が実行できる強力なツールとなることが期待されている。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：特開2005-098876号公報
特許文献2：特開2008-292371号公報
特許文献3：特許第4023523号公報
特許文献4：国際公開第2008/080417号
特許文献5：特開2007-20565号公報

特許文献6：特開2008-116440号公報

特許文献7：特開平4-337446号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：タヤギ (Tyagi)、他1名、ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnology)、1996年、第14巻、第303～308ページ。

非特許文献2：ジッセンドルフ (Giesendorf)、他5名、クリニカル・ケミストリー (Clinical Chemistry)、1998年、第44巻、第3号、482～486ページ。

非特許文献3：ハウエル (Howell)、他2名、ゲノム・リサーチ (Genome Research)、2002年、第12巻、第1401～1407ページ。

非特許文献4：タカツ (Takatsu)、他3名、ヌクレイック・アシッズ・リサーチ (Nucleic Acid Research)、2004年、第32巻、第19号、e156。

非特許文献5：金城政孝、「蛋白質 核酸 酵素」、1999年、第44巻、第9号、第1431～1438ページ。

非特許文献6：メイヤー・アルムス (Meyer-Alms)、フルオレセンス・コリレーション・スペクトロスコピー (Fluorescence Correlation Spectroscopy)、アール・リグラー編 (R. Rigler)、スプリンガー (Springer)、ベルリン、2000年、第204～224ページ。

非特許文献7：加藤則子、他4名、「遺伝子医学」、2002年、第6巻、第2号、第271～277ページ。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 上記のFCS、FIDA、PCHなどの光分析技術では、概して述べれば、計測された蛍光強度の時間的なゆらぎの大きさが統計的処理により算出され、そのゆらぎの大きさに基づいて試料溶液中の微小領域内に出入りする蛍光分子等の種々の特性が決定される。従って、上記の光分析技術に於いて有

意な結果を得るためには、試料溶液中の観測対象となる蛍光分子等の濃度又は数密度は、平衡状態に於いて、一回の秒オーダーの長さの計測時間のうちに統計的処理が可能な数の蛍光分子等が微小領域内を入出するように、好適には、微小領域内に常に一個程度の蛍光分子等が存在しているように調製されていることが好ましい（典型的には、コンフォーカル・ボリウム（*confocal volume*）の体積は、 1 fL 程度となるので、蛍光分子等の濃度は、 1 nM 程度若しくはそれ以上であることが好ましい。）。換言すれば、試料溶液中の観測対象粒子の濃度又は数密度が、統計的処理の可能な程度よりも大幅に下回るときには（例えば、 1 nM を大幅に下回るときには）、上記の如き蛍光強度の統計的なゆらぎに基づく光分析技術では、有意な又は精度の良い分析結果を望むことができなくなる。観測対象物が微小領域内に計測時間中に稀にしか進入しない状態が発生し、蛍光強度の計測結果に於いて、観測対象物が微小領域内に全く存在していない状態が長期間に亘って含まれると共に、有意な蛍光強度の観測量が少なくなるためである。

[0010] 特許文献5、6に記載された共焦点顕微鏡の光学系を用いた蛍光性物質の検出方法では、上記の如き蛍光強度のゆらぎに関する統計的処理を行うことなく、数秒間に亘る計測時間に於ける有意な強度の蛍光信号の発生の有無により、試料中に於ける観測対象となる蛍光分子等の有無が特定でき、有意な強度の蛍光信号の頻度と試料中の蛍光分子等の粒子数とに相関が得られることが開示されている。特に、特許文献6では、試料溶液中を攪拌するランダムな流れを発生させると、検出感度が向上することが示唆されている。しかしながら、これらの方法に於いても、拡散により又はランダムな流れにより確率的に微小領域内に進入する蛍光分子等の存在を検出することに留まっており、微小領域内の蛍光分子等の粒子の振る舞いを把握することができず、例えば、粒子のカウンティングや粒子の濃度又は数密度を定量的に算出するといったことは達成されていない。また、特許文献7に記載された技術は、フローサイトメータに於けるフロー中の蛍光微粒子又は基板上に固定された蛍光微粒子の存在を個別に検出するものであり、試料溶液中に通常の状態で

溶解又は分散している分子やコロイドなどの粒子、即ち、試料溶液中でランダムに運動している粒子の検出を行うための技術ではないので、試料溶液中に溶解又は分散した粒子の濃度又は数密度を定量的に算出することは達成されていない。また、特許文献7の技術は、フローサイトメータに於ける計測或いは基板上への蛍光粒子の固定化处理といった過程を含むため、検査に必要な試料量は、FCS、FIDA、PCHなどの光分析技術の場合に比して大幅に多くなると共に、複雑で高度な操作技術が実施者に要求されると考えられる。

[0011] 一方で、遺伝子多型を検出する対象となるゲノム試料は、臨床検査における検体等のように、微量である場合が多い。このため、試料中に非常に微量しか含有されていない核酸を識別する方法の開発が望まれている。一般的に、遺伝子型の識別は、特定の遺伝子型を特異的に認識する核酸プローブを用い、検査対象であるゲノムDNAが当該核酸プローブと会合体を形成するかどうかを調べることにより行われる。試料溶液中の核酸プローブとゲノムDNAとの会合体の濃度が極薄い場合でも、当該会合体を高精度に検出可能な方法は、臨床検査に非常に有益である。

[0012] しかしながら、例えば非特許文献2において実施されている遺伝子変異解析では、分子ビーコンを300 nMで用いており、希薄な状態での計測とは言えない。

また、非特許文献4においても、数十～数百 nM程度の比較的高濃度の核酸について塩基配列の識別が行われている。このように、一般的に、pMオーダーの比較的低濃度の核酸検体に対して多型を識別するには至っていない。

[0013] かくして、本発明は、FCS、FIDA、PCHなどの光分析技術にて実行されているような統計的処理を含まず、従って、観測対象粒子の濃度又は数密度がそれらの光分析技術で取り扱われるレベルよりも低い試料溶液中の観測対象粒子の状態又は特性を検出することが可能な新規な光分析技術により、遺伝子多型等の多型配列を有する核酸を識別する方法を提供することを

目的とする。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、多型配列のうちの1の型の核酸分子と特異的にハイブリダイズする核酸プローブを用いて、当該核酸プローブとの会合体の形成の有無により試料中の核酸分子の多型を識別する方法において、互いに異なる塩基配列を有する2種類の標識された核酸プローブを用い、かつ、核酸プローブを含む会合体の検出を走査分子計数法を用いて行うことにより、試料中の解析対象の核酸分子の濃度が非常に低い場合であっても、精度よく多型を識別することができることを見出し、本発明を完成させた。

ここで、走査分子計数法は、特願2010-044714に於いて、本願出願人により提案されている新規な光分析技術である。

[0015] すなわち、本発明の核酸分子の多型識別方法は下記(1)～(19)である。

(1) (a) 蛍光物質により標識されており、かつ多型配列中の第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズする第1の核酸プローブと、解析対象の核酸分子とを含む試料溶液を調製する工程と、

(b) 前記工程(a)において調製された試料溶液中の核酸分子を会合させる工程と、

(c) 前記工程(b)の後、前記工程(a)において調製された試料溶液中の、第1の核酸プローブを含む会合体の分子数を、

共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて、前記試料溶液内において前記光学系の光検出領域の位置を移動する工程と、

前記試料溶液内において前記光学系の光検出領域の位置を移動させながら、

当該光検出領域中の前記会合体から放出される蛍光を検出する工程と、

前記検出された光から、個々の会合体からの光信号を個別に検出して、会合体を個別に検出する工程と、

前記個別に検出された会合体の数を計数して前記光検出領域の位置の移動中

に検出された前記粒子の数を計数する工程と、

により算出する工程と、

(d) 蛍光物質により標識されており、かつ前記第1の核酸プローブとは塩基配列が異なる第2の核酸プローブと、前記解析対象の核酸分子とを含む試料溶液を調製する工程と、

(e) 前記工程(d)において調製された試料溶液中の核酸分子を会合させる工程と、

(f) 前記工程(e)の後、前記工程(d)において調製された試料溶液中の、第2の核酸プローブを含む会合体の分子数を、

共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて、前記試料溶液内において前記光学系の光検出領域の位置を移動する工程と、

前記試料溶液内において前記光学系の光検出領域の位置を移動させながら、

当該光検出領域中の前記会合体から放出される蛍光を検出する工程と、

前記検出された光から、個々の会合体からの光信号を個別に検出して、会合体を個別に検出する工程と、

前記個別に検出された会合体の数を計数して前記光検出領域の位置の移動中に検出された前記粒子の数を計数する工程と、

により算出する工程と、

(g) 前記工程(c)及び(f)の結果に基づき、前記解析対象の核酸分子の多型を識別する工程と、

を有することを特徴とする核酸分子の多型識別方法。

(2) 前記光検出領域の位置を移動する工程に於いて、前記光検出領域の位置が所定の速度にて移動されることを特徴とする前記(1)の核酸分子の多型識別方法。

(3) 前記光検出領域の位置を移動する工程に於いて、前記光検出領域の位置が、前記会合体の拡散移動速度よりも速い速度にて移動されることを特徴とする前記(1)又は(2)の核酸分子の多型識別方法。

(4) 前記検出された光から、個々の会合体からの光信号を個別に検出し

て、会合体を個別に検出する工程に於いて、検出された時系列の光信号の形状に基づいて、1つの会合体が前記光検出領域に入ったことが検出されることを特徴とする前記(1)～(3)のいずれかの核酸分子の多型識別方法。

(5) 前記試料溶液が、界面活性剤、ホルムアミド、ジメチルスルホキシド、及び尿素からなる群より選択される1種以上を含むことを特徴とする前記(1)～(4)のいずれかの核酸分子の多型識別方法。

(6) 前記第1の核酸プローブと前記第2の核酸プローブの少なくとも一方は、単独で存在している状態では蛍光エネルギー移動が起こり、かつ他の1本鎖核酸分子と会合体を形成した状態では蛍光エネルギー移動が起こらないように、エネルギー・ドナーと成る蛍光物質とエネルギー・アクセプターと成る物質とが結合されており、
当該核酸プローブを含む会合体から放出される蛍光は、前記エネルギー・ドナーと成る蛍光物質から放出される蛍光であることを特徴とする前記(1)～(5)のいずれかの核酸分子の多型識別方法。

(7) 前記工程(a)において、前記試料溶液中に、蛍光性2本鎖核酸結合物質がさらに含まれており、
前記第1の核酸プローブを標識している蛍光物質と前記蛍光性2本鎖核酸結合物質とのいずれか一方が、蛍光エネルギー移動現象におけるエネルギー・ドナーと成る蛍光物質であり、他方が前記蛍光エネルギー移動現象におけるエネルギー・アクセプターと成る物質であり、
前記工程(c)において、前記第1の核酸プローブを含む会合体から放出される蛍光は、前記第1の核酸プローブを標識している蛍光物質と前記蛍光性2本鎖核酸結合物質との間に起こった蛍光エネルギー移動現象により放出される蛍光であることを特徴とする前記(1)～(6)のいずれかの核酸分子の多型識別方法。

(8) 前記工程(d)において、前記試料溶液中に、蛍光性2本鎖核酸結合物質がさらに含まれており、
前記第2の核酸プローブを標識している蛍光物質と前記蛍光性2本鎖核酸結

合物質とのいずれか一方が、蛍光エネルギー移動現象におけるエネルギー・ドナーと成る蛍光物質であり、他方が前記蛍光エネルギー移動現象におけるエネルギー・アクセプターと成る物質であり、

前記工程（f）において、前記第2の核酸プローブを含む会合体から放出される蛍光は、前記第2の核酸プローブを標識している蛍光物質と前記蛍光性2本鎖核酸結合物質との間に起こった蛍光エネルギー移動現象により放出される蛍光であることを特徴とする前記（1）～（7）のいずれかの核酸分子の多型識別方法。

（9） 第1の核酸プローブを含む会合体から放出される光と、第2の核酸プローブを含む会合体から放出される光とが、互いに光学的特性が異なることを特徴とする前記（1）～（8）のいずれかの核酸分子の多型識別方法。

（10） 前記工程（a）において、前記試料溶液に、前記多型配列のうちの前記第1の型以外の型の塩基配列と相補的な塩基配列を有する核酸分子を添加することを特徴とする前記（1）～（9）のいずれかの核酸分子の多型識別方法。

（11） 前記第2の核酸プローブが、前記多型配列中の第2の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズすることを特徴とする前記（1）～（10）のいずれか一つに記載の核酸分子の多型識別方法、

（12） 前記工程（d）において、前記試料溶液に、前記多型配列のうちの前記第2の型以外の型の塩基配列と相補的な塩基配列を有する核酸分子を添加することを特徴とする前記（11）に記載の核酸分子の多型識別方法、

（13） 前記工程（a）及び（d）を一の試料溶液中で行うことを特徴とする前記（1）～（12）のいずれかの核酸分子の多型識別方法。

（14） 前記第2の核酸プローブが、前記多型配列中の第2の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズし、

前記工程（a）及び（d）を一の試料溶液中で行い、

前記試料溶液に、前記第1の型の塩基配列と相補的な塩基配列を有する核酸分子、及び前記第2の型の塩基配列と相補的な塩基配列を有する核酸分子を

添加することを特徴とする前記（１）～（９）のいずれかの核酸分子の多型識別方法。

（１５） 前記第２の核酸プローブが、前記第１の型の塩基配列を含む１本鎖核酸分子、又は前記１本鎖核酸分子と相補的な塩基配列を有する１本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズし、
前記工程（ａ）及び（ｄ）を一の試料溶液中で行うことを特徴とする前記（１）～（１０）のいずれかの核酸分子の多型識別方法。

（１６） 前記工程（ｂ）又は（ｅ）を、
前記工程（ａ）又は（ｄ）において調製された試料溶液の温度を７０℃以上にするによって当該試料溶液中の核酸分子を変性させた後、当該試料溶液の液温を０．０５℃／秒以上の降温速度で低下させることによって当該試料溶液中の核酸分子を会合させることにより行うことを特徴とする前記（１）～（１５）のいずれかの核酸分子の多型識別方法。

（１７） 前記第１の核酸プローブ及び前記第２の核酸プローブが、ＤＮＡ、ＲＮＡ、及び核酸類似物質からなる群より選択される２以上の分子が結合して構成されていることを特徴とする前記（１）～（１６）のいずれかの核酸分子の多型識別方法。

（１８） 前記多型配列が、遺伝子多型の多型部位を含む塩基配列、又は体細胞変異の変異部位を含む塩基配列であることを特徴とする前記（１）～（１７）のいずれかの核酸分子の多型識別方法。

（１９） 前記体細胞変異がＫ－ｒ ａ ｓ 遺伝子の変異であることを特徴とする前記（１８）の核酸分子の多型識別方法。

発明の効果

[0016] 本発明の核酸分子の多型識別方法において用いられる走査分子計数法は、蛍光強度のゆらぎを算出するといった統計的处理が実行されない。このため、本発明の核酸分子の多型識別方法により、解析対象である多型配列を有する核酸分子が、試料中に極微量にしか存在していない場合であっても、多型を識別することができる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1A]図 1 Aは、走査分子計数法のための光分析装置の内部構造の模式図である。

[図1B]図 1 Bは、コンフォーカル・ボリューム（共焦点顕微鏡の観察領域）の模式図である。

[図1C]図 1 Cは、ミラー 7 の向きを変更して試料溶液内において光検出領域の位置を移動する機構の模式図である。

[図2A]図 2 Aは、走査分子計数法のための光分析技術による光検出の原理を説明する模式図である。

[図2B]図 2 Bは、走査分子計数法のための光分析技術により計測される光強度の時間変化の模式図である。

[図3A]図 3 Aは、観測対象粒子がブラウン運動をしながら光検出領域を横切る場合のモデル図である。

[図3B]図 3 Bは、観測対象粒子がブラウン運動をしながら光検出領域を横切る場合のフォトンカウント（光強度）の時間変化の例を示す図である。

[図4A]図 4 Aは、試料溶液内の光検出領域の位置を観測対象粒子の拡散移動速度よりも速い速度にて移動することにより観測対象粒子が光検出領域を横切る場合のモデル図である。

[図4B]図 4 Bは、試料溶液内の光検出領域の位置を観測対象粒子の拡散移動速度よりも速い速度にて移動することにより観測対象粒子が光検出領域を横切る場合のフォトンカウント（光強度）の時間変化の例を示す図である。

[図5]図 5 は、走査分子計数法により計測されたフォトンカウント（光強度）の時間変化から粒子のカウンティングをするための処理手順をフローチャートの形式で表した図である。

[図6A]図 6 Aは、走査分子計数法により計測されたフォトンカウント（光強度）の時間変化を模式的に示した図である。

[図6B]図 6 Bは、走査分子計数法により計測されたフォトンカウント（光強度）の時間変化から粒子のカウンティングをするための処理手順における検

出信号の信号処理工程の例を説明する図である。

[図7]図7は、走査分子計数法により計測されたフォトンカウントデータの実測例（棒グラフ）と、データをスムージングして得られる曲線（点線）と、ピーク存在領域にてフィッティングされたガウス関数（実線）を示している。図中、「ノイズ」と付された信号は、ノイズ又は異物による信号であるとして無視される。

[図8]多型と会合体の分子数によるクラスタリングの一例を模式的に示した図である。

[図9]参考例1において、試料溶液に添加した解析対象の核酸分子中のGTT変異率ごとに、計数されたピーク数の値を示した図である。

[図10A]図10Aは、参考例2において、デコイ核酸を添加しなかった試料溶液に添加した解析対象の核酸分子中のGTT変異率ごとに、計数されたピーク数の値を示した図である。

[図10B]図10Bは、参考例2において、デコイ核酸を添加した試料溶液に添加した解析対象の核酸分子中のGTT変異率ごとに、計数されたピーク数の値を示した図である。

[図11]実施例1において、縦軸を変異型（GTT）分子ビーコンプローブを含む会合体の分子数（変異型（GTT）ピーク数）、横軸を野生型（GGT）分子ビーコンプローブを含む会合体の分子数（野生型（GGT）ピーク数）として、試料溶液に添加した解析対象の核酸分子中の変異率ごとに、計数されたピーク数の値を示した図である。

[図12]実施例2において、縦軸を変異型（GTT）分子ビーコンプローブを含む会合体の分子数（変異型（GTT）ピーク数）、横軸を野生型（GGT）分子ビーコンプローブを含む会合体の分子数（野生型（GGT）ピーク数）として、試料溶液に添加した解析対象の核酸分子中の変異率ごとに、計数されたピーク数の値を示した図である。

[図13A]図13Aは、実施例3において、試料溶液に添加した解析対象の核酸分子中のGTT変異率ごとに、変異型（GTT）分子ビーコンプローブを含

む会合体の計数されたピーク数の値を示した図である。

[図13B]図13Bは、実施例3において、試料溶液に添加した解析対象の核酸分子中のGTT変異率ごとに、共通分子ビーコンプローブを含む会合体の計数されたピーク数の値を示した図である。

[図14]参考例3において、試料溶液に添加した解析対象の核酸分子中の変異率ごとに、計数されたピーク数の値を示した図である。

[図15]実施例4において、試料溶液に添加した解析対象の核酸分子の変異率ごとに、変異型（GTT）プローブを含む会合体及び野生型（GGT）プローブを含む会合体の計数されたピーク数の値を示した図である。

発明を実施するための形態

[0018] まず、走査分子計数法について説明する。走査分子計数法は、微小領域により試料溶液内を走査しながら、試料溶液中に分散してランダムに運動する光を発する粒子（以下、「発光粒子」と称する。）が微小領域内を横切るときに、微小領域中の発光粒子から発せられる光を検出し、これにより、試料溶液中の発光粒子の一つ一つを個別に検出して、発光粒子のカウンティングや試料溶液中の発光粒子の濃度又は数密度に関する情報の取得を可能にする技術である。FIDA等のような光分析技術と同様に、測定に必要な試料が微量（例えば、数十 μ L程度）であってもよく、測定時間も短い。しかも、FIDA等の光分析技術の場合に比して、より低い濃度又は数密度の発光粒子について、その濃度又は数密度等の特性を定量的に検出することが可能である。

[0019] 発光粒子は、観測対象となる粒子と発光プローブとが結合又は会合した粒子を意味する。「発光プローブ」とは、観測対象となる粒子に結合又は会合する性質を有し、且つ、光を発する物質（通常、分子又はそれらの凝集体）であり、典型的には、蛍光性粒子であるが、りん光、化学発光、生物発光、光散乱等により光を発する粒子であってもよい。本発明の核酸分子の多型識別方法において用いられる第1の核酸プローブ及び第2の核酸プローブは、発光プローブに相当する。

[0020] 本発明及び本願明細書において、共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系の「光検出領域」とは、それらの顕微鏡において光が検出される微小領域であり、対物レンズから照明光が与えられる場合には、その照明光が集光された領域に相当する。なお、かかる領域は、共焦点顕微鏡においては、特に対物レンズとピンホールとの位置関係により確定される。

[0021] 試料溶液内において光検出領域の位置を移動しながら、即ち、試料溶液内を光検出領域により走査しながら、逐次的に、光の検出が行われる。移動する光検出領域が、ランダムに運動している粒子に結合又は会合した発光プローブを包含したときには、発光プローブからの光が検出され、これにより、一つの粒子の存在が検出される（実験の態様によっては、発光プローブは、検出したい粒子と一旦結合した後、光の検出時には、粒子から解離している場合もあり得る。）。そして、逐次的に検出された光において発光プローブからの光信号を個別に検出して、これにより、（発光プローブと結合した）粒子の存在を一つずつ個別に逐次的に検出し、粒子の溶液内での状態に関する種々の情報が取得される。具体的には、例えば、上記の構成において、個別に検出された粒子を計数して光検出領域の位置の移動中に検出された粒子の数を計数するようになっていてよい（粒子のカウンティング）。かかる構成によれば、粒子の数と光検出領域の位置の移動量と組み合わせることにより、試料溶液中の粒子の数密度又は濃度に関する情報が得られる。特に、任意の手法により、例えば、所定の速度にて光検出領域の位置を移動するなどして、光検出領域の位置の移動軌跡の全体積を特定すれば、粒子の数密度又は濃度が具体的に算定できる。勿論、絶対的な数密度値又は濃度値を直接的に決定するのではなく、複数の試料溶液又は濃度若しくは数密度の基準となる標準試料溶液に対する相対的な数密度若しくは濃度の比を算出するようになっていてもよい。また、走査分子計数法においては、光学系の光路を変更して光検出領域の位置を移動するよう構成されていることにより、光検出領域の移動は、速やかであり、且つ、試料溶液において機械的振動や流体力学的な作用が実質的に発生しない。このため、検出対象となる粒子が力学的な

作用の影響を受けることなく安定した状態にて、光の計測が可能である（試料溶液中に振動や流れが作用すると、粒子の物性的性質が変化する可能性がある。）。そして、試料溶液を流通させるといった構成は必要ないため、FCS、FIDA等の場合と同様に微量（1～数十 μ L程度）の試料溶液にて計測及び分析が可能である。

[0022] 上記の粒子を個別に検出する工程において、逐次的に検出される光信号から、1つの粒子に結合した発光プローブ（1つの発光プローブが1つの粒子に結合している場合、複数の発光プローブが1つの粒子に結合している場合、及び、実験態様によって1つの粒子に結合した後粒子から解離した発光プローブである場合を含む。以下同様。）が光検出領域に入ったか否かの判定は、時系列に検出される光信号の形状に基づいて為されてよい。実施の形態において、典型的には、所定の閾値より大きい強度を有する光信号が検出されたときに、1つの粒子に結合した発光プローブが光検出領域に入ったと検出されるようになってよい。

[0023] また、上記の光検出領域の位置を移動する工程において、試料溶液内での光検出領域の位置の移動速度は、粒子に結合した発光プローブの特性又は試料溶液中の数密度又は濃度に基づいて適宜変更されてよい。当業者において理解される如く、粒子に結合した発光プローブから検出される光の態様は、その特性又は試料溶液中の数密度又は濃度によって変化し得る。特に、光検出領域の移動速度が速くなると、1つの粒子に結合した発光プローブから得られる光量は低減することとなるので、1つの粒子に結合した発光プローブからの光が精度よく又は感度よく計測できるように、光検出領域の移動速度は、適宜変更されることが好ましい。

[0024] 更に、上記の光検出領域の位置を移動する工程において、試料溶液内での光検出領域の位置の移動速度は、好適には、検出対象となる粒子に結合した発光プローブ（即ち、本発明の核酸分子の多型識別方法においては、第1の核酸プローブを含む会合体や、第2の核酸プローブを含む会合体）の拡散移動速度（ブラウン運動による粒子の平均の移動速度）よりも高く設定される

。上記に説明されている如く、走査分子計数法では、光検出領域が1つの粒子に結合した発光プローブの存在位置を通過したときにその発光プローブから発せられる光を検出して、発光プローブを個別に検出する。しかしながら、粒子に結合した発光プローブが溶液中でブラウン運動することによりランダムに移動して、光検出領域に複数回出入りする場合には、（検出したい粒子の存在を表す）光信号が1つの発光プローブから複数回検出されてしまい、検出された光信号と1つの検出したい粒子の存在とを対応させることが困難となる。そこで、上記の如く、光検出領域の移動速度を粒子に結合した発光プローブの拡散移動速度よりも高く設定し（具体的には、第1の核酸プローブを含む会合体や、第2の核酸プローブを含む会合体の拡散移動速度よりも速い速度にて移動するように設定し）、これにより、1つの粒子に結合した発光プローブを、1つの（粒子の存在を表す）光信号に対応させることが可能となる。なお、拡散移動速度は、粒子に結合した発光プローブによって変わるため、上記の如く、粒子に結合した発光プローブの特性（特に、拡散定数）に応じて、光検出領域の移動速度は適宜変更されることが好ましい。

[0025] 光検出領域の位置の移動のための光学系の光路の変更は、任意の方式で為されてよい。例えば、レーザ走査型光学顕微鏡において採用されているガルバノミラーを用いて光路を変更して光検出領域の位置が変更されるようになっていてよい。光検出領域の位置の移動軌跡は、任意に設定されてよく、例えば、円形、楕円形、矩形、直線及び曲線のうちから選択可能であってよい。

[0026] 走査分子計数法は、その光検出機構自体については、F I D A等の光分析技術の場合と同様に、共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光検出領域からの光を検出するよう構成されているので、試料溶液の量は、同様に微量であってよい。さらに、走査分子計数法においては、蛍光強度のゆらぎを算出するといった統計的処理が実行されないため、走査分子計数法の光分析技術は、粒子の数密度又は濃度がF I D A等の光分析技術に必要であったレベルよりも大幅に低い試料溶液に適用可能である。

[0027] また、走査分子計数法では、溶液中に分散又は溶解した各々の粒子を個別に検出するようになっていたため、その情報を用いて、定量的に、粒子のカウンティングや、試料溶液中の粒子の濃度又は数密度の算定、濃度又は数密度に関する情報の取得が可能となる。すなわち、走査分子計数法によれば、光検出領域を通過する粒子と検出された光信号とを1対1に対応させて粒子を一つずつ検出するため、溶液中に分散してランダムに運動する粒子のカウンティングが可能となり、従前に比して、精度よく試料溶液中の粒子の濃度又は数密度を決定することが可能となる。実際に、第1の核酸プローブを含む会合体等を個別に検出しその数を計数して粒子濃度を決定する本発明の核酸分子の多型識別方法によれば、試料溶液中のこれらの会合体の濃度が、蛍光分光光度計やプレートリーダーにより計測された蛍光強度に基づいて決定可能な濃度よりも更に低い濃度であっても、多型核酸を識別することが可能である。

[0028] また、例えば、試料に流れを発生させる場合には、常に一様な流速を与えることは困難である上に装置構成が複雑となり、必要な試料量が大幅に増大する。更に、流れによる流体力学的作用によって溶液中の粒子、発光プローブ若しくは結合体又はその他の物質が変質又は変性してしまう可能性がある。これに対して、走査分子計数法では、光学系の光路を変更して試料溶液中を光検出領域にて走査する態様によれば、試料溶液に対して機械的振動や流体力学的作用を与えずに、試料溶液内を一様に或いは試料溶液が機械的に安定した状態で観測できる。このため、試料に流れを発生させる場合に比して、定量的な検出結果の信頼性が向上し、また、試料溶液中の検出対象となる粒子（本発明においては、第1の核酸プローブを含む会合体等）に対して力学的な作用による影響又はアーティファクトの無い状態で計測が行える。

[0029] <走査分子計数法のための光分析装置の構成>

走査分子計数法は、基本的な構成に於いて、図1Aに模式的に例示されている如き、FCS、FIDA等が実行可能な共焦点顕微鏡の光学系と光検出器とを組み合わせる光分析装置により実現可能である。同図を参照して

、光分析装置 1 は、光学系 2 ～ 17 と、光学系の各部の作動を制御すると共にデータを取得し解析するためのコンピュータ 18 とから構成される。光分析装置 1 の光学系は、通常の共焦点顕微鏡の光学系と同様であってよく、そこに於いて、光源 2 から放射されシングルモードファイバー 3 内を伝播したレーザ光 (E_x) が、ファイバーの出射端に於いて固有の NA にて決まった角度にて発散する光となって放射され、コリメーター 4 によって平行光となり、ダイクロイックミラー 5、反射ミラー 6、7 にて反射され、対物レンズ 8 へ入射される。対物レンズ 8 の上方には、典型的には、1 ～ 数十 μL の試料溶液が分注される試料容器又はウェル 10 が配列されたマイクロプレート 9 が配置されており、対物レンズ 8 から出射したレーザ光は、試料容器又はウェル 10 内の試料溶液中で焦点を結び、光強度の強い領域（励起領域）が形成される。試料溶液中には、観測対象物である粒子と、かかる粒子と結合する発光プローブ、典型的には、蛍光色素等の発光標識が付加された分子が分散又は溶解されており、発光プローブと結合又は会合した粒子（実験の態様によっては、粒子と一旦結合した後に粒子から解離した発光プローブ）が励起領域に進入すると、その間、発光プローブが励起され光が放出される。放出された光 (E_m) は、対物レンズ 8、ダイクロイックミラー 5 を通過し、ミラー 11 にて反射してコンデンサーレンズ 12 にて集光され、ピンホール 13 を通過し、バリアフィルター 14 を透過して（ここで、特定の波長帯域の光成分のみが選択される。）、マルチモードファイバー 15 に導入されて、光検出器 16 に到達し、時系列の電気信号に変換された後、コンピュータ 18 へ入力され、後に説明される態様にて光分析のための処理が為される。なお、当業者に於いて知られている如く、上記の構成に於いて、ピンホール 13 は、対物レンズ 8 の焦点位置と共役の位置に配置されており、これにより、図 1 B に模式的に示されている如きレーザ光の焦点領域、即ち、励起領域内から発せられた光のみがピンホール 13 を通過し、励起領域以外からの光は遮断される。図 1 B に例示されたレーザ光の焦点領域は、通常、1 ～ 10 f L 程度の実効体積を有する本光分析装置に於ける光検出領域であり（

典型的には、光強度が領域の中心を頂点とするガウス型分布又はローレンツ型分布となる。実効体積は、光強度が $1/e^2$ となる面を境界とする略楕円球体の体積である。）、コンフォーカル・ボリュームと称される。また、走査分子計数法では、1つの粒子及び発光プローブの結合体又は発光プローブからの光、例えば、一個又は数個の蛍光色素分子からの微弱光が検出されるので、光検出器16としては、好適には、フォトンカウンティングに使用可能な超高感度の光検出器が用いられる。また、顕微鏡のステージ（図示せず）には、観察すべきウェル10を変更するべく、マイクロプレート9の水平方向位置を移動するためのステージ位置変更装置17aが設けられていてよい。ステージ位置変更装置17aの作動は、コンピュータ18により制御されてよい。かかる構成により、検体が複数在る場合にも、迅速な計測が達成可能となる。

[0030] 更に、上記の光分析装置の光学系においては、光学系の光路を変更して試料溶液内を光検出領域により走査する、即ち、試料溶液内において焦点領域（即ち、光検出領域）の位置を移動するための機構が設けられる。かかる光検出領域の位置を移動するための機構としては、例えば、図1Cに模式的に例示されている如く、反射ミラー7の向きを変更するミラー偏向器17が採用されてよい。かかるミラー偏向器17は、通常のレーザ走査型顕微鏡に装備されているガルバノミラー装置と同様であってよい。また、所望の光検出領域の位置の移動パターンを達成するべく、ミラー偏向器17は、コンピュータ18の制御の下、光検出器16による光検出と協調して駆動される。光検出領域の位置の移動軌跡は、円形、楕円形、矩形、直線、曲線又はこれらの組み合わせから任意に選択されてよい（コンピュータ18におけるプログラムにおいて、種々の移動パターンが選択できるようになっていてよい。）。なお、図示していないが、対物レンズ8を上下に移動することにより、光検出領域の位置が上下方向に移動されるようになっていてもよい。上記の如く、試料溶液を移動するのではなく、光学系の光路を変更して光検出領域の位置を移動する構成によれば、試料溶液内に機械的な振動や流体力学的な作

用が実質的に発生することがなくなり、観測対象物に対する力学的な作用の影響を排除することが可能となり、安定的な計測が達成される。

[0031] 粒子及び発光プローブの結合体又は発光プローブが多光子吸収により発光する場合には、上記の光学系は、多光子顕微鏡として使用される。その場合には、励起光の焦点領域（光検出領域）のみで光の放出があるので、ピンホール 13 は、除去されてよい。また、粒子及び発光プローブの結合体又は発光プローブが化学発光や生物発光現象により励起光によらず発光する場合には、励起光を生成するための光学系 2～5 が省略されてよい。粒子及び発光プローブの結合体又は発光プローブがりん光又は散乱により発光する場合には、上記の共焦点顕微鏡の光学系がそのまま用いられる。更に、光分析装置 1 においては、図示の如く、複数の励起光源 2 が設けられていてよく、粒子及び発光プローブの結合体又は発光プローブを励起する光の波長によって適宜、励起光の波長が選択できるようになっていてよい。同様に、光検出器 16 も複数個備えられていてよく、試料中に波長の異なる複数種の粒子及び発光プローブの結合体又は発光プローブが含まれている場合に、それらからの光を波長によって別々に検出できるようになっていてよい。

[0032] <走査分子計数法の光分析技術の原理>

F I D A 等の分光分析技術は、従前の生化学的な分析技術に比して、必要な試料量が極めて少なく、且つ、迅速に検査が実行できる点で優れている。しかしながら、F I D A 等の分光分析技術では、原理的に、観測対象粒子の濃度や特性は蛍光強度のゆらぎに基づいて算定されるため、精度のよい測定結果を得るためには、試料溶液中の観測対象粒子の濃度又は数密度が、蛍光強度の計測中に常に一個程度の観測対象粒子が光検出領域 C V 内に存在するレベルであり、計測時間中に常に有意な光強度（フォトンカウント）が検出されることが要求される。もし観測対象粒子の濃度又は数密度がそれよりも低い場合、例えば、観測対象粒子が稀にしか光検出領域 C V 内へ進入しないレベルである場合には、有意な光強度（フォトンカウント）が計測時間の一部にしか現れず、光強度のゆらぎを精度よく算定することが困難となる。ま

た、観測対象粒子の濃度が、計測中に常に一個程度の観測対象粒子が光検出領域内に存在するレベルよりも大幅に低い場合には、光強度のゆらぎの演算において、バックグラウンドの影響を受けやすく、演算に十分な量の有意な光強度データを得るために、計測時間が長くなる。これに対して、走査分子計数法では、観測対象粒子の濃度がF I D A等の分光分析技術にて要求されるレベルよりも低い場合でも、観測対象粒子の数密度又は濃度等の特性の検出が可能である。

[0033] 走査分子計数法の光分析技術において実行される処理としては、端的に述べれば、光検出領域の位置を移動するための機構（ミラー偏向器17）を駆動して光路を変更し、図2にて模式的に描かれているように、試料溶液内において光検出領域C Vの位置を移動しながら、即ち、光検出領域C Vにより試料溶液内を走査しながら、光検出が実行される。そうすると、例えば、図2 Aの如く、光検出領域C Vが移動する間（図中、時間 $t_0 \sim t_2$ ）において1つの粒子（図中、発光プローブとして蛍光色素が結合している。）の存在する領域を通過する際（ t_1 ）には、図2 Bに描かれている如く有意な光強度（ E_m ）が検出されることとなる。かくして、上記の光検出領域C Vの位置の移動と光検出を実行し、その間に出現する図2 Bに例示されている如き有意な光強度を一つずつ検出することによって、発光プローブの結合した粒子が個別に検出され、その数をカウントすることにより、計測された領域内に存在する粒子の数、或いは、濃度若しくは数密度に関する情報が取得できる。かかる走査分子計数法の光分析技術の原理においては、蛍光強度のゆらぎの算出の如き、統計的な演算処理は行われず、粒子が一つずつ検出されるため、F I D A等では十分な精度で分析できないほど、観測されるべき粒子の濃度が低い試料溶液でも、粒子の濃度若しくは数密度に関する情報が取得可能であることは理解されるべきである。

[0034] また、走査分子計数法のように、試料溶液中の粒子を個別に検出し計数する方法によれば、蛍光分光光度計やプレートリーダーにより計測される蛍光強度から蛍光標識された粒子の濃度を測定する場合よりも、より低い濃度ま

で測定することが可能である。蛍光分光光度計やプレートリーダーによって蛍光標識された粒子の濃度を測定する場合、通常、蛍光強度は蛍光標識された粒子の濃度に比例すると仮定される。しかしながら、蛍光標識された粒子の濃度が十分に低くなると、蛍光標識された粒子から発せられた光による信号の量に対するノイズ信号の量が大きくなり（S／N比の悪化）、蛍光標識された粒子の濃度と光信号量との間の比例関係が崩れ、決定される濃度値の精度が悪化することとなる。他方、走査分子計数法では、検出された光信号から個々の粒子に対応する信号を検出する工程で、検出結果からノイズ信号が排除され、個々の粒子に対応する信号のみを計数して濃度を算出するため、蛍光強度が蛍光標識された粒子の濃度に比例すると仮定して濃度を検出する場合よりも低い濃度まで検出できる。

[0035] 更にまた、観測対象粒子の1つに複数の発光プローブが結合する場合には、走査分子計数法のように試料溶液中の粒子を個別に検出し計数する方法によれば、蛍光強度が蛍光標識された粒子の濃度に比例するとの仮定の下に濃度を決定する従前の方法よりも、粒子濃度の高い側での粒子濃度の測定精度も向上する。観測対象粒子の一つに複数の発光プローブが結合する場合に、或る量の発光プローブが試料溶液に添加されているとき、観測対象粒子の濃度が高くなると、相対的に粒子に結合する発光プローブの数が低減する。その場合、一つの観測対象粒子当たりの蛍光強度が低減するために、蛍光標識された粒子の濃度と光量との間の比例関係が崩れ、決定される濃度値の精度が悪化する。他方、走査分子計数法では、検出された光信号から個々の粒子に対応する信号を検出する工程で、一つの粒子当たりの蛍光強度の低減の影響は少なく、粒子数から濃度を算出するため、蛍光強度が蛍光標識された粒子の濃度に比例すると仮定して濃度を検出する場合よりも高い濃度まで検出できることとなる。

[0036] <走査分子計数法による試料溶液の光強度の測定>

走査分子計数法の光分析における光強度の測定は、測定中にミラー偏向器17を駆動して、試料溶液内での光検出領域の位置の移動（試料溶液内の走

査)を行う他は、FCS又はFIDAにおける光強度の測定工程と同様の態様にて実行されてよい。操作処理において、典型的には、マイクロプレート9のウェル10に試料溶液を注入して顕微鏡のステージ上に載置した後、使用者がコンピュータ18に対して測定の開始の指示を入力すると、コンピュータ18は、記憶装置(図示せず)に記憶されたプログラム(試料溶液内において光検出領域の位置を移動するべく光路を変更する手順と、光検出領域の位置の移動中に光検出領域からの光を検出する手順)に従って、試料溶液内の光検出領域における励起光の照射及び光強度の計測が開始される。かかる計測中、コンピュータ18のプログラムに従った処理動作の制御下、ミラー偏向器17は、ミラー7(ガルバノミラー)を駆動して、ウェル10内において光検出領域の位置の移動を実行し、これと同時に光検出器16は、逐次的に検出された光を電気信号に変換してコンピュータ18へ送信し、コンピュータ18では、任意の態様にて、送信された光信号から時系列の光強度データを生成して保存する。なお、典型的には、光検出器16は、一光子の到来を検出できる超高感度光検出器であるので、光の検出は、所定時間に亘って、逐次的に、所定の単位時間毎(BIN TIME)に、例えば、10 μ 秒毎に光検出器に到来するフォトン数を計測する態様にて実行されるフォトンカウンティングであり、時系列の光強度のデータは、時系列のフォトンカウントデータであってよい。

[0037] 光強度の計測中の光検出領域の位置の移動速度は、任意に、例えば、実験的に又は分析の目的に適合するよう設定された所定の速度であってよい。検出された観測対象粒子の数に基づいて、その数密度又は濃度に関する情報を取得する場合には、光検出領域の通過した領域の大きさ又は体積が必要となるため、移動距離が把握される態様にて光検出領域の位置の移動が実行される。なお、計測中の経過時間と光検出領域の位置の移動距離とが比例関係にある方が測定結果の解釈が容易となるため、移動速度は、基本的に一定速度であることが好ましいが、これに限定されない。

[0038] ところで、光検出領域の位置の移動速度に関して、計測された時系列の光

強度データからの観測対象粒子の個別の検出、或いは、観測対象粒子の数のカウンティングを、定量的に精度よく実行するためには、かかる移動速度は、観測対象粒子（より厳密には、粒子と発光プローブとの結合体又は粒子との結合後分解され遊離した発光プローブ）のランダムな運動、即ち、ブラウン運動による移動速度よりも速い値に設定されることが好ましい。走査分子計数法の光分析技術の観測対象粒子は、溶液中に分散又は溶解されて自由にランダムに運動する粒子であるため、ブラウン運動によって位置が時間と共に移動する。従って、光検出領域の位置の移動速度が粒子のブラウン運動による移動に比して遅い場合には、図3Aに模式的に描かれている如く、粒子が領域内をランダムに移動し、これにより、光強度が図3Bの如くランダムに変化し（既に触れた如く、光検出領域の励起光強度は、領域の中心を頂点として外方に向かって低減する。）、個々の観測対象粒子に対応する有意な光強度の変化を特定することが困難となる。そこで、好適には、図4Aに描かれている如く、粒子が光検出領域を略直線に横切り、これにより、時系列の光強度データにおいて、図4Bに例示の如く、個々の粒子に対応する光強度の変化のプロファイルが略一様となり（粒子が略直線的に光検出領域を通過する場合には、光強度の変化のプロファイルは、励起光強度分布と略同様となる。）、個々の観測対象粒子と光強度との対応が容易に特定できるように、光検出領域の位置の移動速度は、粒子のブラウン運動による平均の移動速度（拡散移動速度）よりも速く設定される。

[0039] 具体的には、拡散係数Dを有する観測対象粒子（より厳密には、粒子と発光プローブとの結合体又は粒子との結合後分解され遊離した発光プローブ）がブラウン運動によって半径 W_0 の光検出領域（コンフォーカルボリューム）を通過するときに要する時間 Δt は、平均二乗変位の関係式

$$(2W_0)^2 = 6D \cdot \Delta t \quad \cdots (1)$$

から、

$$\Delta t = (2W_0)^2 / 6D \quad \cdots (2)$$

となるため、観測対象粒子がブラウン運動により移動する速度（拡散移動速

度) V_{dif} は、概ね、

$$V_{dif} = 2W_o / \Delta t = 3D / W_o \quad \dots (3)$$

となる。そこで、光検出領域の位置の移動速度は、かかる V_{dif} を参照して、それよりも十分に早い値に設定されてよい。例えば、観測対象粒子の拡散係数が、 $D = 2.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 / \text{s}$ 程度であると予想される場合には、 W_o が、 $0.62 \mu\text{m}$ 程度だとすると、 V_{dif} は、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ m} / \text{s}$ となるため、光検出領域の位置の移動速度は、その略10倍の $15 \text{ mm} / \text{s}$ と設定されてよい。なお、観測対象粒子の拡散係数が未知の場合には、光検出領域の位置の移動速度を種々設定して光強度の変化のプロファイルが、予想されるプロファイル（典型的には、励起光強度分布と略同様）となる条件を見つけるための予備実験を繰り返し実行して、好適な光検出領域の位置の移動速度が決定されてよい。

[0040] <走査分子計数法による光強度の分析>

上記の処理により試料溶液の時系列の光強度データが得られると、コンピュータ18において、記憶装置に記憶されたプログラムに従った処理により、下記の如き光強度の分析が実行されてよい。

[0041] (i) 一つの観測対象粒子の検出

時系列の光強度データにおいて、一つの観測対象粒子の光検出領域を通過する際の軌跡が、図4Aに示されている如く略直線状である場合、その粒子に対応する光強度の変化は、図6Aに模式的に描かれている如く、（光学系により決定される）光検出領域の光強度分布を反映したプロファイル（通常、略釣鐘状）を有する。そこで、観測対象粒子の検出の一つの手法において、光強度に対して閾値 I_o が設定され、その閾値を超える光強度が継続する時間幅 $\Delta \tau$ が所定の範囲にあるとき、その光強度のプロファイルが一つの粒子が光検出領域を通過したことに対応すると判定され、一つの観測対象粒子の検出が為されるようになってよい。光強度に対する閾値 I_o 及び時間幅 $\Delta \tau$ に対する所定の範囲は、光検出領域に対して所定の速度にて相対的に移動する観測対象粒子と発光プローブとの結合体（又は粒子との結合後分解

され遊離した発光プローブ) から発せられる光の強度として想定されるプロファイルに基づいて定められるところ、具体的な値は、実験的に任意に設定されてよく、また、観測対象粒子と発光プローブとの結合体 (又は粒子との結合後分解され遊離した発光プローブ) の特性によって選択的に決定されてよい。

[0042] また、観測対象粒子の検出の別の手法として、光検出領域の光強度分布が

、

ガウス分布：

$$I = A \cdot \exp(-2t^2/a^2) \quad \dots (4)$$

であると仮定できるときには、有意な光強度のプロファイル (バックグラウンドでないと明らかに判断できるプロファイル) に対して式 (4) をフィッティングして算出された強度 A 及び幅 a が所定の範囲内にあるとき、その光強度のプロファイルが一つの観測対象粒子が光検出領域を通過したことに対応すると判定され、一つの観測対象粒子の検出が為されてよい (強度 A 及び幅 a が所定の範囲外にあるときには、ノイズ又は異物として分析において無視されてよい。)。

[0043] (ii) 観測対象粒子のカウンティング

観測対象粒子のカウンティングは、上記の観測対象粒子の検出の手法により検出された粒子の数を、任意の手法により、計数することにより為されてよい。粒子の数が大きい場合には、例えば、図 5 及び図 6 B に例示された処理により為されてよい。

[0044] 図 5 及び図 6 B を参照して、時系列の光強度 (フォトンカウント) データから粒子のカウンティングを行う手法の一つの例においては、上記に説明された光強度の測定、即ち、光検出領域による試料溶液内の走査及びフォトンカウンティングを行って時系列光信号データ (フォトンカウントデータ) が取得された後 (ステップ 100)、かかる時系列光信号データ (図 6 B、最上段「検出結果 (未処理)」) に対して、スムージング (平滑化) 処理が為される (ステップ 110、図 6 B 中上段「スムージング」)。粒子及び発光

プローブの結合体又は発光プローブの発する光は、確率的に放出されるものであり、微小な時間においてデータ値の欠落が生じ得るため、かかるスムージング処理によって、前記の如きデータ値の欠落を無視できる。スムージング処理は、例えば、移動平均法により為されてよい。なお、スムージング処理を実行する際のパラメータ、例えば、移動平均法において一度に平均するデータ点数や移動平均の回数などは、光信号データ取得時の光検出領域の位置の移動速度（走査速度）、BIN TIME に応じて適宜設定されてよい。

[0045] 次いで、スムージング処理後の時系列光信号データにおいて、有意な信号が存在する時間領域（ピーク存在領域）を検出するために、スムージング処理後の時系列光信号データの時間についての一次微分値が演算される（ステップ120）。時系列光信号データの時間微分値は、図6B中下段「時間微分」に例示されている如く、信号値の変化時点における値の変化が大きくなるため、かかる時間微分値を参照することによって、有意な信号（ピーク信号）の始点と終点を有利に決定することができる。

[0046] しかる後、時系列光信号データ上において、逐次的に有意な信号（ピーク信号）を検出し、検出されたピーク信号が観測対象粒子に対応する信号であるか否かが判定される。具体的には、まず、時系列光信号データの時系列の時間微分値データ上にて、逐次的に時間微分値を参照して、一つのピーク信号の始点と終点とが探索され決定され、ピーク存在領域が特定される（ステップ130）。一つのピーク存在領域が特定されると、そのピーク存在領域におけるスムージングされた時系列光信号データに対して、釣鐘型関数のフィッティングが行われ（図6B下段「釣鐘型関数フィッティング」）、釣鐘型関数のピーク強度 I_{max} 、ピーク幅（半値全幅） w 、フィッティングにおける（最小二乗法の）相関係数等のパラメータが算出される（ステップ140）。なお、フィッティングされる釣鐘型関数は、典型的には、ガウス関数であるが、ローレンツ型関数であってもよい。そして、算出された釣鐘型関数のパラメータが、一つの粒子及び発光プローブの結合体又は発光プローブが光検出領域を通過したときに検出される光信号が描く釣鐘型のプロファ

イルのパラメータについて想定される範囲内にあるか否か、即ち、ピーク強度、ピーク幅、相関係数が、それぞれ、所定範囲内にあるか否か等が判定される（ステップ150）。かくして、図7左に示されている如く、算出された釣鐘型関数のパラメータが一つの粒子及び発光プローブの結合体又は発光プローブに対応する光信号において想定される範囲内にあると判定された信号は、一つの観測対象粒子に対応する信号であると判定され、これにより、一つの観測対象粒子が検出されたこととなり、一つの粒子としてカウントされる（粒子数がカウントアップされる。ステップ160）。一方、図7右に示されている如く、算出された釣鐘型関数のパラメータが想定される範囲内になかったピーク信号は、ノイズとして無視される。

[0047] 上記のステップ130～160の処理におけるピーク信号の探索及び判定は、時系列光信号データの全域に渡って繰り返し実行され、一つの観測対象粒子が検出される毎に、粒子としてカウントされる。そして、時系列光信号データの全域のピーク信号の探索が完了すると（ステップ170）、それまで得られた粒子のカウント値が時系列光信号データにおいて検出された観測対象粒子の数とされる。

[0048] (iii) 観測対象粒子の数密度又は濃度の決定

観測対象粒子のカウンティングが為されると、時系列光信号データの取得の間に光検出領域の通過した領域の総体積を用いて、観測対象粒子の数密度又は濃度が決定される。しかしながら、光検出領域の実効体積は、励起光又は検出光の波長、レンズの開口数、光学系の調整状態に依存して変動するため、設計値から算定することは一般に困難であり、従って、光検出領域の通過した領域の総体積を算定することも簡単ではない。そこで、典型的には、粒子の濃度が既知の溶液（参照溶液）について、検査されるべき試料溶液の測定と同様の条件にて、上記に説明した光強度の測定、粒子の検出及びカウンティングを行い、検出された粒子の数と参照溶液の粒子の濃度とから、光検出領域の通過した領域の総体積、即ち、観測対象粒子の検出数と濃度との関係が決定されるようになっていてよい。参照溶液の粒子としては、好まし

くは、観測対象粒子が形成する粒子及び発光プローブ結合体（又は観測対象粒子に結合後遊離した発光プローブ）と同様の波長特性を有する発光標識（蛍光色素等）であってよい。具体的には、例えば、粒子の濃度 C の参照溶液について、その粒子の検出数が N であったとすると、光検出領域の通過した領域の総体積 V_t は、

$$V_t = N / C \quad \dots (5)$$

により与えられる。また、参照溶液として、複数の異なる濃度の溶液が準備され、それぞれについて測定が実行されて、算出された V_t の平均値が光検出領域の通過した領域の総体積 V_t として採用されるようになってよい。そして、 V_t が与えられると、粒子のカウンティング結果が n の試料溶液の粒子の数密度 c は、

$$c = n / V_t \quad \dots (6)$$

により与えられる。なお、光検出領域の体積、光検出領域の通過した領域の総体積は、上記の方法によらず、任意の方法にて、例えば、FCS、FIDAを利用するなどして与えられるようになってよい。また、本実施形態の光分析装置においては、想定される光検出領域の移動パターンについて、種々の標準的な粒子についての濃度 C と粒子の数 N との関係（式（５））の情報をコンピュータ 18 の記憶装置に予め記憶しておき、装置の使用者が光分析を実施する際に適宜記憶された関係の情報を利用できるようになってよい。

[0049] <核酸分子の多型識別方法>

本発明の核酸分子の多型識別方法は、多型配列のうちの特定の型（第 1 の型）の核酸分子と特異的に結合する核酸プローブと、当該核酸プローブとは塩基配列が異なる核酸プローブの少なくとも 2 種類の核酸プローブを用いて、各核酸プローブと解析対象の核酸分子とをそれぞれハイブリダイズさせ、形成された会合体の量に基づいて、解析対象の核酸分子の型を識別する方法である。さらに本発明においては、会合体の検出を、上記の走査分子計数法により測定する。走査分子計数法は、分子が離散的な状況において、蛍光を

有する粒子を一粒子毎に測定することができる測定方法であることから、 pM オーダー以下の比較的低濃度の核酸分子に対しても測定が可能である。このため、本発明の核酸分子の多型識別方法により、試料溶液中の解析対象の核酸分子の濃度が非常に低い場合であっても、形成された会合体を高感度に計数することができる。

[0050] 本発明及び本願明細書において、「多型配列」とは、2以上の互いに類似する塩基配列が存在する塩基配列であり、多型配列を有する核酸分子を多型核酸という。ここで、「塩基配列が類似する」とは、例えば、10～20個中、1～数個の核酸塩基が置換、欠損、挿入、又は重複することにより相違していることを意味する。また、「多型を識別する」とは、多型配列中の特定の型の塩基配列を有する核酸分子と、当該多型配列中の当該特定の型以外の型の塩基配列を有する核酸分子とを区別することを意味する。

[0051] 本発明の核酸分子の多型識別方法において解析対象とされる多型配列は、一遺伝子多型（SNP）等のような遺伝子上の塩基配列であってもよく、人工的な塩基配列であってもよい。本発明においては、先天的な多型である遺伝子多型の多型部位や、後天的に生ずる多型である体細胞変異の変異部位を識別することが好ましい。体細胞変異としては、K-ras 遺伝子の変異等が挙げられる。

[0052] 本発明において、「核酸プローブが、多型配列中の特定の型を有する1本鎖核酸分子と特異的に結合する」とは、当該核酸プローブが、当該多型配列を有する1本鎖核酸分子のうち、当該特定の型以外の型の1本鎖核酸分子よりも、当該特定の型の1本鎖核酸分子と優先的にハイブリダイズすることを意味する。このため、核酸プローブは、特定の型の塩基配列と完全に相補的な塩基配列を有していてもよく、多型配列間で塩基が異なる多型部位以外にミスマッチを有する塩基配列を有していてもよい。

[0053] 本発明においては、少なくとも、蛍光物質により標識されており、かつ多型配列中の第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズする第1の核酸プローブ（以下、第1核酸プローブ）と、蛍光物質に

より標識されており、かつ前記第1核酸プローブとは塩基配列が異なる第2の核酸プローブ（以下、第2核酸プローブ）との2種類の核酸プローブを用いる。

[0054] 例えば、野生型と変異型の2つの型が知られている一遺伝子多型を識別する場合には、変異型を第1の型とし、変異型の1本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズするように第1核酸プローブを設計し、野生型の1本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズするように第2核酸プローブを設計することにより、解析対象の核酸分子が変異型か野生型かを識別することができる。解析対象の核酸分子が変異型の場合には、第1核酸プローブと優先的に会合体を形成するため、第1核酸プローブを含む会合体の分子数のほうが、第2核酸プローブを含む会合体よりも有意に多くなる。

[0055] また、変異型を第1の型とし、変異型の1本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズするように第1核酸プローブを設計し、当該変異型（第1の型）の塩基配列を含む1本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズするように第2核酸プローブを設計することもできる。第2核酸プローブは、変異型の1本鎖核酸分子と、多型配列以外の領域において会合する。このため、試料溶液中に存在する解析対象の核酸分子が変異型の場合には、当該試料溶液に第1核酸プローブと第2核酸プローブの両方を添加し、以降に述べる工程（a）、（b）、（d）、及び（e）を行うことにより、当該試料溶液中に、第1核酸プローブ及び第2核酸プローブを含む会合体が形成される。一方で、野生型の1本鎖核酸分子は、第1核酸プローブとは会合体を形成しないが、第2核酸プローブと会合する。このように設計された第2核酸プローブは、多型配列を有する核酸分子に多型配列以外の領域で結合するため、多型配列のうちの第1の型以外の遺伝子型を有する核酸分子とも会合体を形成するためである。つまり、解析対象の核酸分子が野生型の場合には、当該試料溶液には、第2核酸プローブを含む会合体は形成されるものの、第1核酸プローブ及び第2核酸プローブを含む会合体は形成されない。したがって、試料溶液中に、第1核酸プローブ及び第2核酸プローブを含む会合体が形成された場合

には、解析対象の核酸分子は第1の型（この場合は、変異型）であり、第2核酸プローブは含むが第1核酸プローブは含まない会合体が形成された場合には、解析対象の核酸分子は、多型配列中の第1の型以外の型（この場合は、野生型）であると識別することができる。

[0056] 解析対象の核酸分子が、ゲノムDNAのように2本鎖核酸分子を形成している場合には、第2核酸プローブを、前述のように、第1の型の塩基配列を含む1本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズするように設計することもでき、第1の型の塩基配列を含む1本鎖核酸分子と相補的な塩基配列を有する1本鎖核酸分子（すなわち、多型配列を有する1本鎖核酸分子と会合する1本鎖核酸分子。以下、多型配列を有する1本鎖核酸分子の相補鎖ということがある。）と特異的にハイブリダイズするように設計することもできる。後者の場合にも、第2核酸プローブは、多型配列を有する1本鎖核酸分子の相補鎖と、多型核酸の間で塩基配列が共通する領域において会合する。つまり、第2核酸プローブは、多型配列の型に関わらず、多型配列を有する1本鎖核酸分子の相補鎖と、会合体を形成する。このため、第1の型の塩基配列を含む1本鎖核酸分子が、当該1本鎖核酸分子の相補鎖との2本鎖核酸分子（会合体）として存在している試料溶液中に、第1核酸プローブと第2核酸プローブの両方を添加し、以降に述べる工程（a）、（b）、（d）、及び（e）を行うことにより、第1の型の塩基配列を含む1本鎖核酸分子は第1核酸プローブと会合し、当該1本鎖核酸分子の相補鎖は第2核酸プローブと会合する。一方で、解析対象の核酸分子が多型配列中の第1の型以外の型であった場合には、同様の処理によって、第2核酸プローブを含む会合体のみが形成され、第1核酸プローブを含む会合体は形成されない。したがって、試料溶液中に、第1核酸プローブを含む会合体と第2核酸プローブを含む会合体の両方が形成された場合には、解析対象の核酸分子は第1の型であり、第2核酸プローブを含む会合体は形成されたが、第1核酸プローブを含む会合体は形成されなかった場合には、解析対象の核酸分子は、多型配列中の第1の型以外の型であると識別することができる。

[0057] 第2核酸プローブを、多型配列の型に関わらず、多型配列を有する1本鎖核酸分子又は当該1本鎖核酸分子の相補鎖と会合体を形成するように設計することにより、試料溶液中に存在する多型核酸中に占める、第1の型の塩基配列を含む1本鎖核酸分子の割合を算出することができる。例えば、野生型と変異型の2型を有するSNPを多型配列とし、変異型を第1の型とし、被験者のゲノムDNAを含む試料溶液に対して本発明の核酸分子の多型識別方法を行った場合に、第1核酸プローブを含む会合体の数と、第2核酸プローブを含む会合体の数がほぼ等しかった場合には、当該被験者の遺伝子型は変異型ホモである、と識別することができる。第1核酸プローブを含む会合体の数が、第2核酸プローブを含む会合体の数よりも有意に少ない場合には、当該被験者の遺伝子型はヘテロであり、第1核酸プローブを含む会合体がほとんど検出されなかった場合には、当該被験者の遺伝子型は野生型ホモである、と識別することができる。

[0058] また、第2核酸プローブを、多型配列の型に関わらず、多型配列を有する1本鎖核酸分子又は当該1本鎖核酸分子の相補鎖と会合体を形成するように設計することにより、測定系の精度評価にも用いることができる。例えば、第2核酸プローブを含む会合体がほとんど検出されなかった場合には、用いた試料溶液中に、測定のために十分な量の多型核酸が含まれていないか、測定系が上手く機能していない可能性があり、信頼できる結果が得られていないことが示唆される。

[0059] 本発明においては、予め蛍光物質により標識された核酸プローブを用いて、核酸プローブと他の1本鎖核酸分子とにより形成された会合体を、蛍光を指標として走査分子計数法により測定する。蛍光物質としては、特定の波長の光を放射することにより蛍光を放出する物質であれば特に限定されるものではなく、FCSやFIDA等で使用されている蛍光色素の中から適宜選択して用いることができる。また、核酸プローブの蛍光物質による標識は、常法により行うことができる。

[0060] また、本発明においては、核酸プローブが単独で存在している状態と、他

の1本鎖核酸分子と会合体を形成している状態とで蛍光強度を異ならせることにより、走査分子計数法において両者を区別して検出する。

[0061] 例えば、分子ビーコンプローブを、第1核酸プローブや第2核酸プローブとして用いることができる。分子ビーコンプローブは、1本鎖核酸分子の状態の際に分子内構造体を形成するオリゴヌクレオチドであり、蛍光エネルギー移動（FRET）においてエネルギー・ドナーと成る蛍光物質と、エネルギー・アクセプターと成る物質（蛍光物質や消光物質）とを、1本鎖核酸分子の状態ではFRETが起こり、他の1本鎖核酸分子とハイブリダイズして形成された会合体の状態ではFRETが起こらないように結合させたプローブである。単独で存在している第1核酸プローブや第2核酸プローブからは、エネルギー・ドナーと成る蛍光物質から放出される蛍光は検出されないか、もしくは減弱している。そこで、エネルギー・ドナーと成る蛍光物質から放出される蛍光を検出することにより、第1核酸プローブや第2核酸プローブを含む会合体を、単独で存在している核酸プローブとは区別して検出することができる。

[0062] 第1核酸プローブや第2核酸プローブとして用いる分子ビーコンプローブとしては、多型配列の特定の型とハイブリダイズし得る塩基配列を有しており、かつ3'末端側の領域及び5'末端側の領域に互いに相補的な塩基配列を有しているオリゴヌクレオチドが挙げられる。本発明においては、3'末端側にエネルギー・ドナーと成る蛍光物質又はエネルギー・アクセプターと成る物質が結合されており、5'末端側に残る一方が結合されており、かつ3'末端側の領域と5'末端側とに互いに相補的な塩基配列を有し、これらの塩基配列において塩基対を形成することによって、分子内構造体（いわゆるステムループ構造）を形成するものが好ましい。なお、分子ビーコンプローブの分子内塩基対を形成する互いに相補的な領域は、多型配列のうちの特定の型の核酸分子と特異的に結合する領域（例えば、多型配列と相補的な塩基配列からなる領域）を挟むようにして存在していればよく、3'末端側の領域及び5'末端側の領域は、それぞれ、3'末端又は5'末端を含んで

いる領域であってもよく、含まない領域であってもよい。また、塩基対を形成する領域の塩基数や塩基配列は、形成された塩基対の安定性が、標的とする多型配列を有する核酸分子との会合体の安定性よりも低く、且つ測定条件下で塩基対を形成し得る程度であればよい。

[0063] 第1核酸プローブを、FRETにおいてエネルギー・ドナーと成る蛍光物質とエネルギー・アクセプターと成る物質を結合させた分子ビーコンプローブとした場合、第2核酸プローブは、第1核酸プローブと同種の2つの蛍光物質を結合させた分子ビーコンプローブとしてもよく、第1核酸プローブとは異なる組み合わせのエネルギー・ドナーと成る蛍光物質とエネルギー・アクセプターと成る物質を結合させた分子ビーコンプローブとしてもよい。第2核酸プローブを標識するエネルギー・ドナーと成る蛍光物質及びエネルギー・アクセプターと成る物質を、第1核酸プローブとは異なる組み合わせとすることにより、第1核酸プローブを含む会合体から放出される光と、第2核酸プローブを含む会合体から放出される光の光学的特性を、互いに異なるようにし、放出される光によって、第1核酸プローブを含む会合体と第2核酸プローブを含む会合体とを区別して検出することができる。

[0064] また、2本鎖構造に特異的に結合する蛍光性2本鎖核酸結合物質を用い、当該蛍光性2本鎖核酸結合物質と核酸プローブを標識した蛍光物質との間にFRETを起こすことによっても、単独で存在している核酸プローブと会合体とを区別することができる。すなわち、蛍光性2本鎖核酸結合物質と核酸プローブを標識する蛍光物質のいずれか一方がFRETのエネルギー・ドナーと成り、他方が当該FRETのエネルギー・アクセプターと成る。単独で存在している第1核酸プローブや第2核酸プローブからは、当該核酸プローブを標識する蛍光物質から放出される蛍光が検出される。これに対して、会合体には蛍光性2本鎖核酸結合物質が結合するため、会合体からは、FRETにより放出される蛍光が検出される結果、単独で存在している核酸プローブとは区別して検出することができる。

[0065] 2本鎖構造に特異的に結合する蛍光性2本鎖核酸結合物質としては、蛍光

性インターカレーターや、蛍光物質を結合させたグروبバインダー等が挙げられる。なお、会合体の塩基対の間に入り込む蛍光性インターカレーターの量が多すぎる場合には、FRETにより放出される蛍光を検出する際のバックグラウンドが高くなりすぎ、検出精度に影響を及ぼすおそれがある。このため、会合体中の2本鎖を形成している領域が、400bp以下となるように、第1核酸プローブや第2核酸プローブを設計することが好ましい。

[0066] 蛍光性2本鎖核酸結合物質との間に起こるFRETにおいてエネルギー・ドナーと成る蛍光物質により第1核酸プローブを標識した場合、第2核酸プローブは、第1核酸プローブと同種の蛍光物質により標識してもよく、当該蛍光性2本鎖核酸結合物質との間に起こるFRETにおいてエネルギー・ドナーと成るが、第1核酸プローブとは種類が異なる蛍光物質により標識してもよく、当該蛍光性2本鎖核酸結合物質との間に起こるFRETにおいてエネルギー・アクセプターと成る蛍光物質により標識してもよい。

[0067] また、第1核酸プローブと第2核酸プローブのいずれか一方を分子ビーコンプローブとし、他方を、蛍光性2本鎖核酸結合物質とFRETを起こす蛍光物質により標識されたプローブとしてもよい。

[0068] その他、第2核酸プローブを、第1の型の塩基配列を含む1本鎖核酸分子と、第1の核酸プローブと隣接する状態で特異的にハイブリダイズするように設計し、かつ第1核酸プローブを標識している蛍光物質と、第2核酸プローブを標識している蛍光物質とのいずれか一方が、FRETにおけるエネルギー・ドナーと成る蛍光物質であり、他方が当該FRETにおけるエネルギー・アクセプターと成る物質とすることもできる。この場合、第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子に、第1核酸プローブと第2核酸プローブは互いに隣接してハイブリダイズするため、これら3者からなる会合体では、第1核酸プローブを標識している蛍光物質と第2核酸プローブを標識している蛍光物質との間にFRETが起こる。このため、当該FRETにより放出される蛍光を検出することにより、第1核酸プローブ及び第2核酸プローブを含む会合体を検出することができる。

[0069] 本発明において用いられる第1核酸プローブ及び第2核酸プローブは、DNAからなるオリゴヌクレオチドであってもよく、RNAからなるオリゴヌクレオチドであってもよく、DNAとRNAとからなるキメラオリゴヌクレオチドであってもよく、天然の核酸塩基と同様にヌクレオチド鎖や塩基対を形成することが可能な核酸類似物質を一部又は全部に含むものであってもよい。核酸類似物質としては、DNAやRNAのような天然型ヌクレオチド（天然に存在するヌクレオチド）の側鎖等がアミノ基等の官能基により修飾されたものや、タンパク質や低分子化合物等で標識されたもの等が挙げられる。より具体的には、例えば、Bridged nucleic acid（BNA）や、天然型ヌクレオチドの4'位酸素原子が硫黄原子に置換されているヌクレオチド、天然型リボヌクレオチドの2'位水酸基がメトキシ基に置換されているヌクレオチドやHexitol Nucleic Acid（HNA）、ペプチド核酸（PNA）等が挙げられる。また、解析対象とする核酸も、DNAであってもよく、RNAであってもよく、cDNAのように、人工的に増幅させたものであってもよい。

[0070] 本発明の核酸分子の多型識別方法は、具体的には、下記の工程を有する。

（a）蛍光物質により標識されており、かつ多型配列中の第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズする第1の核酸プローブ（第1核酸プローブ）と、解析対象の核酸分子とを含む試料溶液を調製する工程と、

（b）前記工程（a）において調製された試料溶液中の核酸分子を会合させる工程と、

（c）前記工程（b）の後、前記工程（a）において調製された試料溶液中の、第1核酸プローブを含む会合体の分子数を算出する工程と、

（d）蛍光物質により標識されており、かつ前記第1核酸プローブとは塩基配列が異なる第2の核酸プローブ（第2核酸プローブ）と、前記解析対象の核酸分子とを含む試料溶液を調製する工程と、

（e）前記工程（d）において調製された試料溶液中の核酸分子を会合させ

る工程と、

(f) 前記工程 (e) の後、前記工程 (d) において調製された試料溶液中の、第2核酸プローブを含む会合体の分子数を算出する工程と、

(g) 前記工程 (c) 及び (f) の結果に基づき、前記解析対象の核酸分子の多型を識別する工程。

[0071] まず、工程 (a) として、第1核酸プローブと解析対象の核酸分子とを含む試料溶液を調製する。具体的には、第1核酸プローブと解析対象の核酸分子を適当な溶媒に添加して、試料溶液を調製する。該溶媒は、第1核酸プローブから放出される蛍光の検出、及び、走査分子計数法による会合体の検出を阻害しない溶媒であれば、特に限定されるものではなく、当該技術分野において一般的に用いられているバッファーの中から、適宜選択して用いることができる。該バッファーとして、例えば、PBS (リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4) 等のリン酸バッファーやトリスバッファー等がある。

[0072] 次に、工程 (b) として、工程 (a) において調製された試料溶液中の核酸分子を会合させる。試料溶液中の核酸分子が2本鎖核酸分子である場合には、会合させる前に、変性させることが好ましい。本発明において、「核酸分子を変性させる」とは、塩基対を解離させることを意味する。例えば、分子ビーコンプローブ中の互いに相補的な塩基配列によって形成された塩基対を解離させ、分子内構造を解いて1本鎖構造にすることや、2本鎖核酸分子を1本鎖核酸分子とすることを意味する。なお、核酸プローブがPNA等の核酸類似物質を含むオリゴヌクレオチドである場合、核酸分子が二本鎖核酸分子であったとしても、特段の変性処理を行わずとも、当該核酸プローブを含む会合体を形成することができる場合がある。

[0073] 本発明においては、蛍光物質への影響が比較的小さいことから、高温処理による変性 (熱変性) 又は低塩濃度処理による変性を行うことが好ましい。中でも、操作が簡便であるため、熱変性を行うことが好ましい。具体的には、熱変性は、当該試料溶液を、高温処理をすることにより、当該試料溶液中の核酸分子を変性することができる。一般的には、DNAで90℃、RNA

では70℃で数秒間から2分間程度、保温することによって変性させることができるが、核酸分子の塩基の長さ等により変性する温度は千差万別であり、変性することが可能であれば、この温度に限定するものではない。一方、低塩濃度処理による変性は、例えば、精製水等により希釈することによって、当該試料溶液の塩濃度が十分に低くなるように調整することによって行うことができる。

[0074] 必要に応じて変性させた後、前記試料溶液中の核酸分子を会合させる。熱変性を行った場合には、高温処理後、当該試料溶液の温度を、第1核酸プローブと、第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子とが特異的にハイブリダイズできる温度にまで低下させることにより、当該試料溶液中の核酸分子を適宜会合させることができる。また、低塩濃度処理による変性を行った場合には、塩溶液を添加する等により、当該試料溶液の塩濃度を、第1核酸プローブと、第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子とが特異的にハイブリダイズできる濃度にまで上昇させることによって、当該試料溶液中の核酸分子を適宜会合させることができる。

[0075] なお、第1核酸プローブと、第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子とが特異的にハイブリダイズできる温度は、第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子と核酸プローブとからなる会合体の融解曲線から求めることができる。融解曲線は、例えば、第1核酸プローブと第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子のみを含有する溶液の温度を、高温から低温へと変化させ、当該溶液の吸光度や蛍光強度を測定することにより求めることができる。得られた融解曲線から、変性した第1核酸プローブと第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子が会合体を形成し始めた温度から、ほぼ全てが会合体となった温度までの範囲の温度を、第1核酸プローブと、第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子とが特異的にハイブリダイズできる温度とすることができる。温度に代えて、溶液中の塩濃度を低濃度から高濃度への変化させることによっても、同様にして融解曲線を決定し、第1核酸プローブと、第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子とが特異的にハイブリダイズ

できる濃度を求めることができる。

[0076] 第1核酸プローブと、第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子とが特異的にハイブリダイズできる温度は、一般には T_m 値（融解温度）で代用することができる。例えば、汎用されているプライマー／プローブ設計ソフトウェア等を用いることにより、第1核酸プローブの塩基配列情報から、第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子とハイブリダイズする領域の T_m 値（2本鎖DNAの50%が1本鎖DNAに解離する温度）を算出することができる。本発明においては、好ましくは、試料溶液の温度を、第1核酸プローブ中の第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子と相補的な塩基配列を有する領域の T_m 値 $\pm 3^\circ\text{C}$ の温度程度まで低下させる。

[0077] また、非特異的なハイブリダイゼーションを抑制するために、会合体を形成させる際に、試料溶液の温度を比較的ゆっくりと低下させることが好ましい。例えば、試料溶液の温度を 70°C 以上にして核酸分子を変性させた後、当該試料溶液の液温を、 $0.05^\circ\text{C}/\text{秒}$ またはそれより遅い降温速度で低下させることができる。

[0078] その後、工程（c）として、試料溶液中の、第1核酸プローブを含む会合体の分子数を、走査分子計数法により算出する。具体的には、会合体を形成させた後の試料溶液を、前記の走査分子計数法のための光分析装置に設置し、前記の手法により、会合体から放出される蛍光を検出し解析することにより、会合体の分子数を算出する。

[0079] なお、走査分子計数法による会合体の検出を、多型配列を有する核酸分子と核酸プローブとが特異的にハイブリダイズし得る温度よりも低い温度で行う場合には、非特異的なハイブリダイゼーションを抑制するために、予め試料溶液中に、解析対象の多型配列のうち、核酸プローブが特異的にハイブリダイズする型以外の型の塩基配列と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを添加しておくことが好ましい。その他の型を有する核酸分子と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが過剰量存在していることにより、添加した核酸プローブとその他の型の核酸分子との非特異的なハイブリ

ダイゼーションを効果的に抑制することができる。例えば、野生型と変異型とが有る体細胞変異を識別するために、第1の型を変異型とした場合には、第1核酸プローブを添加した試料溶液には、野生型の塩基配列と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを添加することが好ましい。同様に、第2核酸プローブを、野生型の1本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズするように設計した場合には、第2核酸プローブを添加した試料溶液には、変異型の塩基配列と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを添加することが好ましい。なお、当該オリゴヌクレオチドは、会合体形成前に試料溶液に添加されていればよく、第1核酸プローブや第2核酸プローブとともに試料溶液に添加してもよく、変性処理を行う場合には、変性後に添加してもよい。

[0080] その他、非特異的なハイブリダイゼーションを抑制するために、予め試料溶液中に、界面活性剤、ホルムアミド、ジメチルスルホキシド、又は尿素等を添加しておくことも好ましい。これらの化合物は、1種のみを添加してもよく、2種類以上を組み合わせで添加してもよい。これらの化合物を添加しておくことにより、比較的低い温度環境下において、非特異的なハイブリダイゼーションを起こりにくくすることができる。

[0081] 工程(d)～(f)は、第1核酸プローブに代えて第2核酸プローブを用いた以外は、前記工程(a)～(c)と同様にして行うことができる。なお、解析対象の多型配列に、3種以上の型が存在している場合には、第1の型及び第2の型以外の型に対しても、それぞれ、各型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子と特異的に結合する核酸プローブを用いて前記工程(a)～(c)と同様に行うことにより、全ての型を識別することができる。

[0082] 工程(a)～(c)と工程(d)～(f)は、実質的に同時に行ってもよく、別個独立に行ってもよい。例えば、第1核酸プローブと解析対象の核酸分子とを添加した試料溶液と、第2核酸プローブと解析対象の核酸分子とを添加した試料溶液とを調製した後、両試料溶液の温度を同時に上昇させた後、徐々に低下させることにより、溶液内の核酸分子の会合体形成を同時に行

った後、各試料溶液を光分析装置に設置し、順次、解析することができる。

[0083] その他、前記工程（a）及び（d）を一の試料溶液中で行うこともできる。具体的には、一の試料溶液に、第1核酸プローブと第2核酸プローブと解析対象の核酸分子とを添加した試料溶液を調製した後、当該試料溶液中の核酸分子を会合させる。その後、当該試料溶液中の、第1核酸プローブを含む会合体の分子数及び第2核酸プローブを含む会合体の分子数を、走査分子計数法により算出する。

[0084] 特に、第2核酸プローブを、第1の型の塩基配列を含む1本鎖核酸分子、又は当該1本鎖核酸分子と相補的な塩基配列を有する1本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズするように設計した場合には、一の試料溶液に、第1核酸プローブと第2核酸プローブと解析対象の核酸分子とを添加した試料溶液を調製した後、当該試料溶液中の核酸分子を会合させる。その後、当該試料溶液中の、第1核酸プローブ及び第2核酸プローブを含む会合体の分子数を、走査分子計数法により算出する。

[0085] 最後に工程（g）として、第1核酸プローブを含む会合体の分子数の計数結果と、第2核酸プローブを含む会合体を含む分子数の計数結果とに基づいて、解析対象の核酸分子が、解析対象の多型のうちの第1の型であったのか、その他の型（例えば、第2の型）であったのかを識別する。

[0086] 例えば、一塩基多型を識別する場合には、解析対象の核酸分子に代えて多型配列が既知である対照用1本鎖核酸分子を用いて、野生型の核酸分子と特異的にハイブリダイズする野生型プローブ（W_tプローブ）を添加した場合に形成された野生型プローブを含む会合体の分子数と、変異型の核酸分子と特異的にハイブリダイズする変異型プローブ（M_tプローブ）を添加した場合に形成された変異型プローブを含む会合体の分子数とを算出する。対照用1本鎖核酸分子として、野生型の核酸分子、変異型の核酸分子、又は野生型の核酸分子と変異型の核酸分子を等モル量ずつ混合したものをそれぞれ用い、さらにネガティブコントロールとして核酸プローブのみを添加する。各測定の結果から、対照用1本鎖核酸分子の多型と会合体の分子数との関係をク

ラスタリングするために必要な情報を得ることができる。

[0087] 図8に、多型と会合体の分子数によるクラスタリングの一例を模式的に示す。核酸プローブのみを添加した試料溶液では、野生型プローブを含む会合体と変異型プローブを含む会合体のいずれも少ない（図8中、クラスター1）。これに対して、野生型の核酸分子を添加した試料溶液では、野生型プローブを含む会合体の分子数が、変異型プローブを含む会合体の分子数よりも明らかに多くなる（図8中、クラスター2）。逆に、変異型の核酸分子を添加した試料溶液では、変異型プローブを含む会合体の分子数が、野生型プローブを含む会合体の分子数よりも明らかに多くなる（図8中、クラスター3）。野生型の核酸分子と変異型の核酸分子を等モル量ずつ混合したものを添加した試料溶液では、野生型プローブを含む会合体の分子数と変異型プローブを含む会合体の分子数とは両方とも多くなる（図8中、クラスター4）。クラスタリングの結果と、解析対象の核酸分子を添加した場合の結果とを比較し、解析対象の核酸分子がどの多型に当てはまるかを識別することができる。

実施例

[0088] 次に実施例等を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0089] [参考例1]

1種類の分子ビーコンプローブを用いて、走査分子計数法により、K-ras遺伝子のコドン12__GTT変異を識別可能であることを検証した。

変異型（GTT）分子ビーコンプローブとして、5'末端にTAMRAが付加され、3'末端にBHQ-2が付加された表1に記載の塩基配列（配列番号1）を有する核酸分子を用いた。また、解析対象の核酸分子として、同じく表1に記載の塩基配列を有する野生型（GGT）核酸（配列番号2）のみ（変異率：0%）、野生型（GGT）核酸と変異型（GTT）核酸（配列番号3）を9：1のモル比で混合したもの（変異率：10%）、及び変異型（GTT）核酸のみ（変異率：100%）を用いた。さらに、非特異的なハイ

ブリダイゼーションを抑制するために、野生型（G G T）核酸と相補的な塩基配列を有する非蛍光標識プローブ（野生型（G G T）デコイ核酸）（配列番号4）を用いた。これらのオリゴヌクレオチドは、シグマジェノシス株式会社に依頼して合成した。表1中、右欄には配列番号を示す。また、表1中、太字の塩基が変異部位又は変異部位と塩基対を形成する塩基である。さらに、変異型（G T T）分子ビーコンプローブ中の下線が付された塩基は、分子内構造体を形成する際に互いにハイブリダイズする領域である。

[0090] [表1]

	塩基配列	
変異型（GTT）分子ビーコンプローブ	TAMRA- <u>CCTACGCC</u> AAC AGCTCCAACTAC GT <u>AGG</u> -BHQ2	1
野生型（GGT）核酸	TGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT GGT GGCGTAGGCA	2
変異型（GTT）核酸	TGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCT GTT GGCGTAGGCA	3
野生型（GGT）デコイ核酸	CCTACGCC ACC AGCTCCAACTAC	4

[0091] 上記の変異型（G T T）分子ビーコンプローブ、解析対象の核酸分子、野生型デコイ核酸を、それぞれ、100 pM、100 nM（野生型と変異型を合計した濃度）、500 nMとなるように、トリス緩衝液（10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、400 mM NaCl、pH 8.0）に溶解することにより、試料溶液を調製した。

調製された試料溶液を、95℃で5分間加熱することにより変性させた後、20℃まで徐々に液温を低下させて会合体を形成させた。具体的には、降温速度を0.1℃/秒とし、90℃で5分間、80℃で10分間、70℃で10分間、60℃で10分間、50℃で10分間、40℃で10分間、30℃で10分間の降温処理を行った。

[0092] 降温処理後の試料溶液中の会合体の分子数を、走査分子計数法により計数した。具体的には、計測に於いては、光分析装置として、共焦点蛍光顕微鏡

の光学系とフォトンカウンティングシステムを備えた1分子蛍光測定装置MF20（オリンパス株式会社）を用い、上記の各試料溶液について、時系列のフォトンカウントデータを取得した。その際、励起光は、543 nmのレーザ光を用いて300 μ Wで照射し、検出光波長は、バンドパスフィルターを用いて560～620 nmとした。試料溶液中に於ける光検出領域の位置の移動速度は、15 mm/秒とし、BIN TIMEを10 μ 秒とし、測定時間は、2秒間とした。また測定は各試料5回行い、その平均と標準偏差を算出した。光強度の測定後、各試料溶液について取得された時系列のフォトンカウントデータから時系列データ中にて検出された光信号を計数した。データの移動平均法によるスムージングに於いては、一度に平均するデータ点は9個とし、移動平均処理を5回繰り返した。また、フィッティングに於いては、時系列データに対してガウス関数を最小二乗法によりフィッティングし、（ガウス関数に於ける）ピーク強度、ピーク幅（半値全幅）、相関係数を決定した。更に、ピークの判定処理では、下記の条件：

20 μ 秒<ピーク幅<400 μ 秒

ピーク強度>1（フォトン/10 μ 秒）

相関係数>0.95

を満たすピーク信号のみを観測対象核酸分子に対応する光信号であると判定する一方、上記の条件を満たさないピーク信号はノイズとして無視し、観測対象核酸分子に対応する光信号であると判定された信号の数を「ピーク数」として計数した。

[0093] 図9に、試料溶液に添加した解析対象の核酸分子中のGTT変異率ごとに、計数されたピーク数の値を示した。この結果、GTT変異率依存的にピーク数が増加していることから、変異型（GTT）分子ビーコンプローブがGTT変異配列特異的にハイブリダイゼーションしていることが確認された。

[0094] [参考例2]

試料溶液中に、核酸プローブが特異的に結合する型以外の型の多型配列と相補的な塩基配列を有する核酸分子を添加することによる、当該核酸プローブ

ブを含む会合体の検出精度を調べた。

具体的には、参考例1で用いた変異型（GTT）分子ビーコンプローブ、解析対象の核酸分子、野生型（GGT）デコイ核酸を、それぞれ、100 pM、100 nM（野生型と変異型を合計した濃度）、1 μMとなるように、トリス緩衝液（10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、100 mM NaCl、pH 8.0）に溶解することにより、野生型（GGT）デコイ核酸を含有する試料溶液を調製した。一方、野生型（GGT）デコイ核酸を添加しない以外は同様にして、野生型（GGT）デコイ核酸を含有しない試料溶液を調製した。

これらの試料溶液に対して、参考例1と同様に、液温を上昇及び下降させて試料溶液中の核酸分子を変性させた後会合体を形成し、さらに、参考例1と同じ条件で、当該試料溶液中の変異型（GTT）分子ビーコンプローブを含む会合体の分子数を計数した。

[0095] 図10に、試料溶液に添加した解析対象の核酸分子中のGTT変異率ごとに、計数されたピーク数の値を示した。図10Aは野生型（GGT）デコイ核酸を添加しなかった試料溶液の、図10Bは野生型（GGT）デコイ核酸を添加した試料溶液の結果である。この結果、図10Aに示すように、野生型（GGT）デコイ核酸非存在下では、変異率が0%のときにピーク数がすでに増加していた。これは、変異型（GTT）分子ビーコンプローブが野生型（GGT）核酸にも非特異的にハイブリダイゼーションしたことを示唆している。一方、図10Bに示すように、野生型（GGT）デコイ核酸存在下では、変異率依存的にピーク数が増加したことから、変異型（GTT）分子ビーコンプローブが変異型（GTT）核酸に特異的にハイブリダイゼーションしたことを示唆している。これらの結果から、デコイ核酸を試料溶液中に添加することにより、分子ビーコンプローブの非特異的なハイブリダイゼーションを抑制できることが明らかである。

[0096] [実施例1]

参考例1で用いた変異型（GTT）分子ビーコンプローブと、野生型（G

G T) 分子ビーコンプローブとを用いて、各遺伝子型を識別した。

野生型 (G G T) 分子ビーコンプローブとして、5' 末端に T A M R A が付加され、3' 末端に B H Q - 2 が付加された表 2 に記載の塩基配列 (配列番号 5) を有する核酸分子を用いた。

[0097] また、解析対象の核酸分子として、参考例 1 で用いた野生型 (G G T) 核酸のみ (変異率: 0%)、変異型 (G T T) 核酸のみ (G T T 変異率: 1 0 0%) に加えて、野生型 (G G T) 核酸と変異型 (G T T) 核酸を 1 : 1 のモル比で混合したもの (G T T 変異率: 5 0%) を用いた。さらに、非特異的なハイブリダイゼーションを抑制するために、参考例 1 で用いた野生型 (G G T) デコイ核酸と、変異型 (G T T) 核酸と相補的な塩基配列を有する非蛍光標識プローブ (変異型 (G T T) デコイ核酸) (配列番号 6) を用いた。表 2 に、変異型 (G T T) デコイ核酸の配列を示す。表 2 中、右欄には配列番号を示し、太字の塩基が変異部位又は変異部位と塩基対を形成する塩基であり、下線が付された塩基は、分子内構造体を形成する際に互いにハイブリダイズする領域である。なお、本実施例で用いたオリゴヌクレオチドは、シグマジェノシス株式会社に依頼して合成した。

[0098] [表2]

	塩 基 配 列	
野生型 (G G T) 分子ビーコンプローブ	TAMRA- <u>CCTACGCC</u> ACC AGCTCCAACTAC GT <u>AGG</u> -BHQ2	5
変異型 (G T T) デコイ核酸	CCTACGCC AAC AGCTCCAACTAC	6

[0099] 具体的には、変異型 (G T T) 分子ビーコンプローブ、解析対象の核酸分子、野生型 (G G T) デコイ核酸を、それぞれ、1 0 0 p M、1 0 0 n M (野生型と変異型を合計した濃度)、5 0 0 n M となるように、トリス緩衝液 (1 0 m M T r i s - H C l、1 m M E D T A、4 0 0 m M N a C l、p H 8. 0) に溶解することにより、変異型 (G T T) 分子ビーコンプローブと野生型 (G G T) デコイ核酸を含有する試料溶液を調製した。また、解析対象の核酸分子を添加しなかった以外は同様にして対照用試料溶液を調

製した。

一方、野生型（G G T）分子ビーコンプローブ、解析対象の核酸分子、変異型（G T T）デコイ核酸を、それぞれ、1 0 0 p M、1 0 0 n M（野生型と変異型を合計した濃度）、5 0 0 n Mとなるように、前記トリス緩衝液に溶解することにより、野生型（G G T）分子ビーコンプローブと変異型（G T T）デコイ核酸を含有する試料溶液を調製した。また、解析対象の核酸分子を添加しなかった以外は同様にして対照用試料溶液を調製した。

[0100] これらの試料溶液に対して、それぞれ、参考例 1 と同様に、液温を上昇及び下降させて試料溶液中の核酸分子を変性させた後会合体を形成し、さらに、参考例 1 と同じ条件で、当該試料溶液中の変異型（G T T）分子ビーコンプローブを含む会合体の分子数及び野生型（G G T）分子ビーコンプローブを含む会合体の分子数をそれぞれ計数した。

[0101] 図 1 1 に、縦軸を変異型（G T T）分子ビーコンプローブを含む会合体の分子数（変異型（G T T）ピーク数）（図中、「ピーク数（G T T）」）、横軸を野生型（G G T）分子ビーコンプローブを含む会合体の分子数（野生型（G G T）ピーク数）（図中、「ピーク数（G G T）」）として、試料溶液に添加した解析対象の核酸分子中の変異率ごとに、計数されたピーク数の値を示した。この結果、解析対象の核酸分子が存在していなかった対照用試料溶液（図中、「N. C.」）では、変異型（G T T）ピーク数と野生型（G G T）ピーク数のいずれも非常に少なかった。一方で、G T T 変異率 0 % の試料溶液（図中、「0 %」）では、変異型（G T T）ピーク数は対照用試料溶液とほぼ同程度しかなかったが、野生型（G G T）ピーク数は非常に多かった。逆に、G T T 変異率 1 0 0 % の試料溶液（図中、「1 0 0 %」）では、野生型（G G T）ピーク数は対照用試料溶液とほぼ同程度しかなかったが、変異型（G T T）ピーク数は非常に多かった。これに対して、G T T 変異率 5 0 % の試料溶液（図中、「5 0 %」）では、野生型（G G T）ピーク数と変異型（G T T）ピーク数のいずれも多かった。このように、野生型（G G T）ピーク数と変異型（G T T）ピーク数から、G T T 変異率の異なる

3種類の試料溶液は、互いに区別することができた。これらの結果から、本発明の核酸分子の多型識別方法を用いて遺伝子変異を識別することにより、解析対象の核酸分子を、変異率ごとに識別可能であること、特に、一塩基多型等の解析において、解析対象のゲノムDNAの遺伝子型が、野生型ホモなのか、ヘテロなのか、変異型ホモなのかを、容易にタイピング可能であることがわかった。

[0102] [実施例2]

本発明の核酸分子の多型識別方法において、工程(a)と工程(d)を一つの試料溶液中で行うことにより、K-ras遺伝子のコドン12__GTT変異を識別した。

変異型(GTT)分子ビーコンプローブとして、表1に記載の変異型(GTT)分子ビーコンプローブと同じ塩基配列(配列番号1)からなるオリゴヌクレオチドの5'末端にATTO(登録商標)647Nを付加し、3'末端にBHQ-3を付加したものをを用いた。野生型(GGT)分子ビーコンプローブ、及び解析対象の核酸分子は、実施例1で用いたものをを用いた。また、表3に記載されている野生型(GGT)デコイ核酸(配列番号7)及び変異型(GTT)デコイ核酸(配列番号8)を用いた。なお、本実施例で用いたオリゴヌクレオチドは、シグマジェノシス株式会社に依頼して合成した。

[0103] [表3]

	塩基配列	
野生型(GGT)デコイ核酸	CCTACGCC ACC AGCTCCA ACTA	7
変異型(GTT)デコイ核酸	CCTACGCC AAC AGCTCCA ACTA	8

[0104] 具体的には、変異型(GTT)分子ビーコンプローブ、野生型(GGT)分子ビーコンプローブ、解析対象の核酸分子、野生型(GGT)デコイ核酸、及び変異型(GTT)デコイ核酸を、それぞれ、100 pM、100 pM、100 nM(野生型と変異型を合計した濃度)、500 nM、500 nMとなるように、トリス緩衝液(10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、400 mM NaCl、pH 8.0)に溶解することにより試料溶

液を調製した。また、解析対象の核酸分子を添加しなかった以外は同様にして対照用試料溶液を調製した。

[0105] これらの試料溶液に対して、それぞれ、参考例 1 と同様に、液温を上昇及び下降させて試料溶液中の核酸分子を変性させた後に会合体を形成した。降温処理後の試料溶液中の会合体の分子数を、走査分子計数法により計数した。具体的には、TAMRA 標識された野生型 (GGT) 分子ビーコンプローブを励起するために、励起光は、543 nm のレーザ光を用いて 300 μ W で照射し、検出光波長は、バンドパスフィルターを用いて 565 ~ 595 nm とした。ATTO 647N 標識された変異型 (GTT) 分子ビーコンプローブを励起するために、励起光は 633 nm のレーザ光を用いて 300 μ W で照射し、検出光波長は、バンドパスフィルターを用いて 650 ~ 690 nm とした。それ以外は、実施例 1 と同様の条件で走査分子計数法にて計測を行い、解析を行った。

[0106] 図 12 に、縦軸を変異型 (GTT) 分子ビーコンプローブを含む会合体の分子数 (変異型 (GTT) ピーク数) (図中、「ピーク数 (GTT)」)、横軸を野生型 (GGT) 分子ビーコンプローブを含む会合体の分子数 (野生型 (GGT) ピーク数) (図中、「ピーク数 (GGT)」) として、試料溶液に添加した解析対象の核酸分子中の変異率ごとに、計数されたピーク数の値を示した。この結果、解析対象の核酸分子が存在していなかった対照用試料溶液では、変異型 (GTT) ピーク数と野生型 (GGT) ピーク数のいずれも非常に少なかった。一方で、GTT 変異率 0 % の試料溶液では、変異型 (GTT) ピーク数は対照用試料溶液とほぼ同程度しかなかったが、野生型 (GGT) ピーク数は非常に多かった。逆に、GTT 変異率 100 % の試料溶液では、野生型 (GGT) ピーク数は対照用試料溶液とほぼ同程度しかなかったが、変異型 (GTT) ピーク数は非常に多かった。これに対して、GTT 変異率 50 % の試料溶液では、野生型 (GGT) ピーク数と変異型 (GTT) ピーク数のいずれも多かった。このように、本実施例においても、実施例 1 の場合と同様に、野生型 (GGT) ピーク数と変異型 (GTT) ピー

ク数から、G T T 変異率の異なる 3 種類の試料溶液は、互いに区別することができた。これらの結果から、本発明の核酸分子の多型識別方法において、工程（a）と工程（d）を別個の試料溶液中で行った実施例 1 と同様に、工程（a）と工程（d）を一の試料溶液中で行った場合でも、解析対象の核酸分子を、変異率ごとに識別可能であることが明らかである。

[0107] [実施例 3]

第 2 核酸プローブとして、第 1 核酸プローブとは異なる塩基配列を有し、かつ、解析対象の多型配列からなる多型部位を認識しない核酸プローブを用いて、K-ras 遺伝子のコドン 12 _ G T T 変異を識別した。

具体的には、第 2 核酸プローブとして、K-ras 遺伝子中の領域であって、コドン 12 を含まず、野生型と変異型に共通する領域の塩基配列（共通配列）（配列番号 9）と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド（配列番号 10）に対して、5' 末端に A T T O（登録商標）6 4 7 N を付加し、3' 末端に B H Q - 3 を付加した共通分子ビーコンプローブを用いた。また、前記共通配列からなるオリゴヌクレオチドを、共通核酸として用いた。表 4 に、共通分子ビーコンプローブ及び共通配列の塩基配列を示す。表 4 中、右欄には配列番号を示す。また、共通分子ビーコンプローブ中の下線が付された塩基は、分子内構造体を形成する際に互いにハイブリダイズする領域である。

[0108] [表 4]

	塩 基 配 列	
共 通 配 列	TCTGAATTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCTTG CCTAC	9
共 通 分 子 ビーコンプローブ	ATTO647N- <u>GCCTTGACGATACAGCTAATTCAA</u> <u>GGC</u> -BHQ3	10

[0109] その他、第 1 核酸プローブとして、参考例 1 で用いた変異型（G T T）分子ビーコンプローブを用いた。また、解析対象の核酸分子として、参考例 1 で用いた野生型（G G T）核酸のみ（変異率：0%）、変異型（G T T）核

酸のみ（G T T変異率：100%）を用いた。さらに、非特異的なハイブリダイゼーションを抑制するために、参考例1で用いた野生型（G G T）デコイ核酸を用いた。なお、本実施例で用いたオリゴヌクレオチドは、シグマジェノシス株式会社に依頼して合成した。

[0110] 具体的には、変異型（G T T）分子ビーコンプローブ、共通分子ビーコンプローブ、野生型（G G T）核酸又は変異型（G T T）核酸、共通核酸、野生型（G G T）デコイ核酸を、それぞれ、100 pM、100 pM、100 nM、100 nM、500 nMとなるように、トリス緩衝液（10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、400 mM NaCl、pH 8.0）に溶解することにより、試料溶液を調製した。また、野生型（G G T）核酸と変異型（G T T）核酸のいずれも添加しなかった以外は同様にして対照用試料溶液を調製した。

[0111] これらの試料溶液に対して、それぞれ、参考例1と同様に、液温を上昇及び下降させて試料溶液中の核酸分子を変性させた後会合体を形成し、さらに、実施例2と同じ条件で、当該試料溶液中の変異型（G T T）分子ビーコンプローブを含む会合体の分子数及び野生型（G G T）分子ビーコンプローブを含む会合体の分子数をそれぞれ計数した。

[0112] 図13に、試料溶液に添加した解析対象の核酸分子中のG T T変異率ごとに、計数されたピーク数の値を示した。図13Aは変異型（G T T）分子ビーコンプローブを含む会合体の計数結果であり、図13Bは共通分子ビーコンプローブを含む会合体の計数結果である。543 nmで励起してTAMRAの蛍光を検出した場合、変異率0%（野生型（G G T）核酸のみ添加）と変異率100%（変異型（G T T）核酸のみ添加）とで、計数された変異型（G T T）分子ビーコンプローブを含む会合体の数に有意に差が出ており、両者を識別できた。また、633 nmで励起してATT0647Nの蛍光を検出した場合、変異率0%と変異率100%は、解析対象の核酸分子を添加しなかった対照試料溶液（図中、「N. C.」）の結果と比べて有意に差が出ていた。

[0113] 本実施例では、野生型（G G T）核酸や変異型（G T T）核酸とは別個に、共通核酸を試料溶液中へ添加したが、解析対象の核酸分子がゲノムDNAである場合や、ゲノムDNAからPCR等によって増幅したDNAである場合には、共通配列及び多型配列は、同一の1本鎖核酸分子又は当該1本鎖核酸分子の相補鎖上に存在している。このため、本実施例のように、第2核酸プローブを、多型核酸間で共通する領域にハイブリダイズするプローブとした場合には、当該第2核酸プローブを含む会合体の有無により、試料溶液中に解析対象の多型配列を含む核酸分子が存在しているか否かを確認することができる。また、第2核酸プローブを含む会合体の検出量により、PCRの増幅量のばらつきによる核酸分子の量を補正し、多型識別の精度を向上することができる。

[0114] [参考例3]

1種類の核酸プローブと蛍光性インターカレーターを用いて、走査分子計数法により、K-ras遺伝子のコドン12__GTT変異を識別可能であることを検証した。

変異型（G T T）プローブとして、5'末端にROXが付加された表5に記載の塩基配列（配列番号11）を有する核酸分子を用いた。表5中、右欄には配列番号を示し、太字の塩基が変異部位又は変異部位と塩基対を形成する塩基である。さらに、解析対象の核酸として、参考例1で用いた野生型（G G T）核酸と変異型（G T T）核酸を、それぞれ用いた。

[0115] [表5]

	塩基配列	
変異型(GTT)プローブ	ROX- CCTACGCC AAC AGCTCCA ACTAC	11

[0116] 具体的には、変異型（G T T）プローブ、野生型（G G T）核酸又は変異型（G T T）核酸、野生型（G G T）デコイ核酸を、それぞれ、100 pM、100 pM、1 nMとなるように、トリス緩衝液（10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、100 mM NaCl、pH 8.0）に溶解することにより、野生型（G G T）デコイ核酸を含有する試料溶液を調製し

た。一方、野生型（GGT）デコイ核酸を添加しない以外は同様にして、野生型（GGT）デコイ核酸を含有しない試料溶液を調製した。

調製された試料溶液を、94℃で5分間加熱することにより変性させた後、0.1℃/秒で降温させ、68.8℃で5分間恒温処理させて会合体を形成させた。

これらの濃縮試料溶液に、それぞれ、PicoGreen（Molecular Probe社製）を前記トリス緩衝液で1000倍希釈した溶液を添加し、当該濃縮試料溶液の10倍希釈を調製し、これらの試料溶液とした。

これらの試料溶液を、PicoGreen希釈液添加後30分間以上放置した。

[0117] その後、試料溶液中の会合体の分子数を、走査分子計数法により計数した。具体的には、計測に於いては、光分析装置として、共焦点蛍光顕微鏡の光学系とフォトンカウンティングシステムを備えた1分子蛍光測定装置MF20（オリンパス株式会社）を用い、上記の各試料溶液について、時系列のフォトンカウントデータを取得した。その際、励起光は、488nmのレーザー光を用いて、回転速度6,000rpm、100μWで照射し、検出光波長は、バンドパスフィルターを用いて560～620nmとした。アバランシェフォトダイオードから得られるシグナルを、BIN TIMEを10μ秒とし、測定時間は、2秒間とした。

測定によって得られた時系列データをSavitzky-Golayのアルゴリズムでスムージングした後、微分によりピークの検出を行った。ピークとみなされた領域のうち、ガウス関数に近似できる領域をシグナルとして抽出した。野生型（GGT）デコイ核酸を加えた試料溶液と加えない試料とで得られるピーク数を比較した。

[0118] 図14に、試料溶液に添加した解析対象の核酸分子ごとに、計数されたピーク数の値を示した。この結果、変異型（GTT）核酸を添加した試料溶液（図中、「GTT核酸」）では、野生型（GGT）デコイ核酸の添加の有無

によるピーク数にあまり相違はなかったが、野生型（GGT）核酸を添加した試料溶液（図中、「GGT核酸」）では、野生型（GGT）デコイ核酸を添加した試料溶液よりも、野生型（GGT）デコイ核酸を添加しなかった試料溶液のほうが、ピーク数が明らかに多かった。この結果は、野生型（GGT）デコイ核酸が野生型（GGT）核酸と特異的に結合したことにより、変異型（GTT）プローブとが野生型（GGT）核酸との非特異的な結合を阻害し、配列特異的な結合が促されたためと考えられる。すなわち、これらの結果から、多型配列のうちの、核酸プローブが特異的に結合する型以外の型の塩基配列と相補的な塩基配列を有する核酸分子を試料溶液に添加することにより、核酸プローブの識別精度を向上させられることが明らかである。

[0119] [実施例4]

参考例3で用いた変異型（GTT）プローブと、野生型（GGT）プローブと、蛍光性インターカレーターを用いて、走査分子計数法により、K-ras遺伝子のコドン12__GTT変異を識別した。

野生型（GGT）プローブとして、5'末端にROXが付加された表6に記載の塩基配列（配列番号12）を有する核酸分子を用いた。表6中、右欄には配列番号を示し、太字の塩基が変異（多型）部位又は変異部位と塩基対を形成する塩基である。また、解析対象の核酸分子として、表1に記載の塩基配列を有する野生型（GGT）核酸（配列番号2）のみ（変異率：0%）、野生型（GGT）核酸と変異型（GTT）核酸（配列番号3）を9：1のモル比で混合したもの（変異率：10%）、野生型（GGT）核酸と変異型（GTT）核酸（配列番号3）を1：1のモル比で混合したもの（変異率：50%）、及び変異型（GTT）核酸のみ（変異率：100%）を用いた。さらに、非特異的なハイブリダイゼーションを抑制するために、実施例1で用いた変異型（GTT）デコイ核酸を用いた。

[0120] [表6]

	塩基配列	
野生型(GGT)プローブ	ROX- CCTACGCC ACC AGCTCCAACTAC	12

[0121] 具体的には、変異型（GTT）プローブ、解析対象の核酸分子、野生型（GGT）デコイ核酸を、それぞれ、100 pM、100 pM、1 nMとなるように、トリス緩衝液（10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、100 mM NaCl、pH 8.0）に溶解することにより、変異型（GTT）プローブと野生型（GGT）デコイ核酸を含有する試料溶液を調製した。一方、野生型（GGT）プローブ、解析対象の核酸分子、変異型（GTT）デコイ核酸を、それぞれ、100 pM、100 pM、1 nMとなるように、前記トリス緩衝液に溶解することにより、野生型（GGT）プローブと変異型（GTT）デコイ核酸を含有する試料溶液を調製した。

調製された試料溶液を、94℃で5分間加熱することにより変性させた後、0.1℃/秒で降温させ、68.8℃で5分間恒温処理させて会合体を形成させた。

これらの濃縮試料溶液に、それぞれ、PicoGreen（Molecular Probe社製）を前記トリス緩衝液で1000倍希釈した溶液を添加し、当該濃縮試料溶液の10倍希釈を調製し、これらの試料溶液とした。

これらの試料溶液を、PicoGreen希釈液添加後30分間以上放置した。

[0122] これらの試料溶液に対して、参考例3と同じ条件で、当該試料溶液中の変異型（GTT）プローブを含む会合体又は野生型（GGT）プローブを含む会合体の分子数を計数した。図15に、試料溶液に添加した解析対象の核酸分子の変異率ごとに、変異型（GTT）プローブを含む会合体の計数されたピーク数（図中、「GTTプローブ」）及び野生型（GGT）プローブを含む会合体の計数されたピーク数（図中、「GGTプローブ」）の値を示した。この結果、変異型（GTT）プローブと野生型（GGT）デコイ核酸を含有する試料溶液では、変異率が高いほど（すなわち、試料溶液中の変異型（GTT）核酸濃度が高いほど）、得られるピーク数が多くなり、変異型（GTT）プローブを含む会合体量が多くなることがわかった。同様に、野生型

(GGT) プローブと変異型 (GTT) デコイ核酸を含有する試料溶液では、変異率が低いほど（すなわち、試料溶液中の野生型 (GGT) 核酸濃度が高いほど）、得られるピーク数が多くなり、野生型 (GGT) プローブを含む会合体量が多くなることがわかった。これらの結果から、本発明の核酸分子の多型識別方法により、一塩基のみ異なる極めて類似した核酸分子であるにも関わらず、多型の識別できることが明らかである。

[0123] [参考例 4]

核酸プローブと蛍光性インターカレーターを用いて、当該核酸プローブを含む会合体を走査分子計数法により計数する場合における、会合体中の 2 本鎖構造の塩基対長が与える影響を調べた。

まず、プラスミド pUC19（タカラバイオ社製）を鋳型とし、5' 末端を R o x で修飾したオリゴヌクレオチド、非標識のオリゴヌクレオチド、及び A m p l i T a q G o l d（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、100bp、200bp、400bp、800bp、及び 1.5kbp の鎖長の異なる PCR 産物を調製した。これらの PCR 産物から W i z a r d V G e l a n d P C R C l e a n - U p S y s t e m（P r o m e g a 社製）を用いてプライマー除去し、B i o a n a l y z e r（A g i l e n t 社製）を用いた電気泳動により、PCR 産物の有無及び濃度を測定した。これらの PCR 産物（蛍光標識）は、5' 末端が R o x で標識された 1 本鎖核酸分子と、非標識の 1 本鎖核酸分子との会合体である。

上記で用いた 5' 末端を R o x で修飾したオリゴヌクレオチドに代えて、5' 末端が修飾されていないオリゴヌクレオチドを用いた以外は、上記と同様にして、非標識の 1 本鎖核酸分子同士の会合体である PCR 産物（非標識）を得た。

その後、トリス緩衝液（10 mM T r i s - H C l、1mM E D T A、100mM N a C l、pH8.0）を用いて、各 PCR 産物が 100pM となるように調製した。この調製された PCR 産物の溶液を、前記トリス緩衝液で 10000 倍希釈した P i c o G r e e n（i n v i t r o g e

n社製)溶液に任意の濃度で加え、試料溶液とした。

これらの試料溶液を、P i c o G r e e n希釈液添加後30分間以上放置した。

[0124] その後、試料溶液中のPCR産物の分子数を、参考例3と同じ条件で、走査分子計数法により計数した。この結果、PCR産物の鎖長によって、蛍光標識されたPCR産物から測定されたピーク数と、非標識のPCR産物から測定されたピーク数との間に差が生じた。PCR産物の鎖長が長くなるに連れ、得られるピーク数差が小さくなっていた。この結果は、鎖長が長いほどインターカレーターのパルス強度が強まり、本来のインターカレーターの蛍光波長より長波長領域でも非特異的なシグナルとしてピークが発生することによると考えられる。逆に言えば、鎖長が短い方が、非特異的なシグナルが少ない事となる。これらの結果より、およそ400bp程度の鎖長以下であれば、十分な非特異シグナルの低減が成されていると見ることができる。

産業上の利用可能性

[0125] 本発明の核酸分子の多型識別方法により、試料溶液中の非常に低濃度にしか存在していない多型核酸を、蛍光標識された核酸プローブを用いて識別し、走査分子計数法により計数することができるため、遺伝子多型や体細胞変異等を識別するような臨床検査等の分野で利用が可能である。

符号の説明

- [0126] 1…光分析装置（共焦点顕微鏡）
2…光源
3…シングルモードオプティカルファイバー
4…コリメータレンズ
5…ダイクロイックミラー
6、7、11…反射ミラー
8…対物レンズ
9…マイクロプレート
10…ウェル（試料溶液容器）

- 1 2…コンデンサーレンズ
- 1 3…ピンホール
- 1 4…バリアフィルター
- 1 5…マルチモードオプティカルファイバー
- 1 6…光検出器
- 1 7…ミラー偏向器
- 1 7 a…ステージ位置変更装置
- 1 8…コンピュータ

請求の範囲

[請求項1]

(a) 蛍光物質により標識されており、かつ多型配列中の第1の型の塩基配列を有する1本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズする第1の核酸プローブと、解析対象の核酸分子とを含む試料溶液を調製する工程と、

(b) 前記工程(a)において調製された試料溶液中の核酸分子を会合させる工程と、

(c) 前記工程(b)の後、前記工程(a)において調製された試料溶液中の、第1の核酸プローブを含む会合体の分子数を、

共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて、前記試料溶液内において前記光学系の光検出領域の位置を移動する工程と、

前記試料溶液内において前記光学系の光検出領域の位置を移動させながら、当該光検出領域中の前記会合体から放出される蛍光を検出する工程と、

前記検出された光から、個々の会合体からの光信号を個別に検出して、会合体を個別に検出する工程と、

前記個別に検出された会合体の数を計数して前記光検出領域の位置の移動中に検出された前記粒子の数を計数する工程と、

により算出する工程と、

(d) 蛍光物質により標識されており、かつ前記第1の核酸プローブとは塩基配列が異なる第2の核酸プローブと、前記解析対象の核酸分子とを含む試料溶液を調製する工程と、

(e) 前記工程(d)において調製された試料溶液中の核酸分子を会合させる工程と、

(f) 前記工程(e)の後、前記工程(d)において調製された試料溶液中の、第2の核酸プローブを含む会合体の分子数を、

共焦点顕微鏡又は多光子顕微鏡の光学系を用いて、前記試料溶液内において前記光学系の光検出領域の位置を移動する工程と、

前記試料溶液内において前記光学系の光検出領域の位置を移動させながら、当該光検出領域中の前記会合体から放出される蛍光を検出する工程と、

前記検出された光から、個々の会合体からの光信号を個別に検出して、会合体を個別に検出する工程と、

前記個別に検出された会合体の数を計数して前記光検出領域の位置の移動中に検出された前記粒子の数を計数する工程と、

により算出する工程と、

(g) 前記工程(c)及び(f)の結果に基づき、前記解析対象の核酸分子の多型を識別する工程と、

を有することを特徴とする核酸分子の多型識別方法。

[請求項2] 前記光検出領域の位置を移動する工程に於いて、前記光検出領域の位置が所定の速度にて移動されることを特徴とする請求項1に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項3] 前記光検出領域の位置を移動する工程に於いて、前記光検出領域の位置が、前記会合体の拡散移動速度よりも速い速度にて移動されることを特徴とする請求項1又は2に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項4] 前記検出された光から、個々の会合体からの光信号を個別に検出して、会合体を個別に検出する工程に於いて、検出された時系列の光信号の形状に基づいて、1つの会合体が前記光検出領域に入ったことが検出されることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項5] 前記試料溶液が、界面活性剤、ホルムアミド、ジメチルスルホキシド、及び尿素からなる群より選択される1種以上を含むことを特徴とする請求項1～4のいずれか一項に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項6] 前記第1の核酸プローブと前記第2の核酸プローブの少なくとも一方は、単独で存在している状態では蛍光エネルギー移動が起こり、かつ他の1本鎖核酸分子と会合体を形成した状態では蛍光エネルギー移

動が起こらないように、エネルギー・ドナーと成る蛍光物質とエネルギー・アクセプターと成る物質とが結合されており、
当該核酸プローブを含む会合体から放出される蛍光は、前記エネルギー・ドナーと成る蛍光物質から放出される蛍光であることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項7] 前記工程（a）において、前記試料溶液中に、蛍光性 2 本鎖核酸結合物質がさらに含まれており、
前記第 1 の核酸プローブを標識している蛍光物質と前記蛍光性 2 本鎖核酸結合物質とのいずれか一方が、蛍光エネルギー移動現象におけるエネルギー・ドナーと成る蛍光物質であり、他方が前記蛍光エネルギー移動現象におけるエネルギー・アクセプターと成る物質であり、
前記工程（c）において、前記第 1 の核酸プローブを含む会合体から放出される蛍光は、前記第 1 の核酸プローブを標識している蛍光物質と前記蛍光性 2 本鎖核酸結合物質との間に起こった蛍光エネルギー移動現象により放出される蛍光であることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項8] 前記工程（d）において、前記試料溶液中に、蛍光性 2 本鎖核酸結合物質がさらに含まれており、
前記第 2 の核酸プローブを標識している蛍光物質と前記蛍光性 2 本鎖核酸結合物質とのいずれか一方が、蛍光エネルギー移動現象におけるエネルギー・ドナーと成る蛍光物質であり、他方が前記蛍光エネルギー移動現象におけるエネルギー・アクセプターと成る物質であり、
前記工程（f）において、前記第 2 の核酸プローブを含む会合体から放出される蛍光は、前記第 2 の核酸プローブを標識している蛍光物質と前記蛍光性 2 本鎖核酸結合物質との間に起こった蛍光エネルギー移動現象により放出される蛍光であることを特徴とする請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項9] 第 1 の核酸プローブを含む会合体から放出される光と、第 2 の核酸

プローブを含む会合体から放出される光とが、互いに光学的特性が異なることを特徴とする請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項10] 前記工程（a）において、前記試料溶液に、前記多型配列のうちの前記第 1 の型以外の型の塩基配列と相補的な塩基配列を有する核酸分子を添加することを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項11] 前記第 2 の核酸プローブが、前記多型配列中の第 2 の型の塩基配列を有する 1 本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズすることを特徴とする請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項12] 前記工程（d）において、前記試料溶液に、前記多型配列のうちの前記第 2 の型以外の型の塩基配列と相補的な塩基配列を有する核酸分子を添加することを特徴とする請求項 11 に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項13] 前記工程（a）及び（d）を一の試料溶液中で行うことを特徴とする請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項14] 前記第 2 の核酸プローブが、前記多型配列中の第 2 の型の塩基配列を有する 1 本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズし、
前記工程（a）及び（d）を一の試料溶液中で行い、
前記試料溶液に、前記第 1 の型の塩基配列と相補的な塩基配列を有する核酸分子、及び前記第 2 の型の塩基配列と相補的な塩基配列を有する核酸分子を添加することを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項15] 前記第 2 の核酸プローブが、前記第 1 の型の塩基配列を含む 1 本鎖核酸分子、又は前記 1 本鎖核酸分子と相補的な塩基配列を有する 1 本鎖核酸分子と特異的にハイブリダイズし、
前記工程（a）及び（d）を一の試料溶液中で行うことを特徴とする

請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項16]

前記工程 (b) 又は (e) を、

前記工程 (a) 又は (d) において調製された試料溶液の温度を 7 0 °C 以上にすることによって当該試料溶液中の核酸分子を変性させた後、当該試料溶液の液温を 0 . 0 5 °C / 秒以上の降温速度で低下させることによって当該試料溶液中の核酸分子を会合させることにより行うことを特徴とする請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の核酸分子の多型識別方法。

[請求項17]

前記第 1 の核酸プローブ及び前記第 2 の核酸プローブが、DNA、RNA、及び核酸類似物質からなる群より選択される 2 以上の分子が結合して構成されていることを特徴とする請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の核酸分子の多型識別方法。

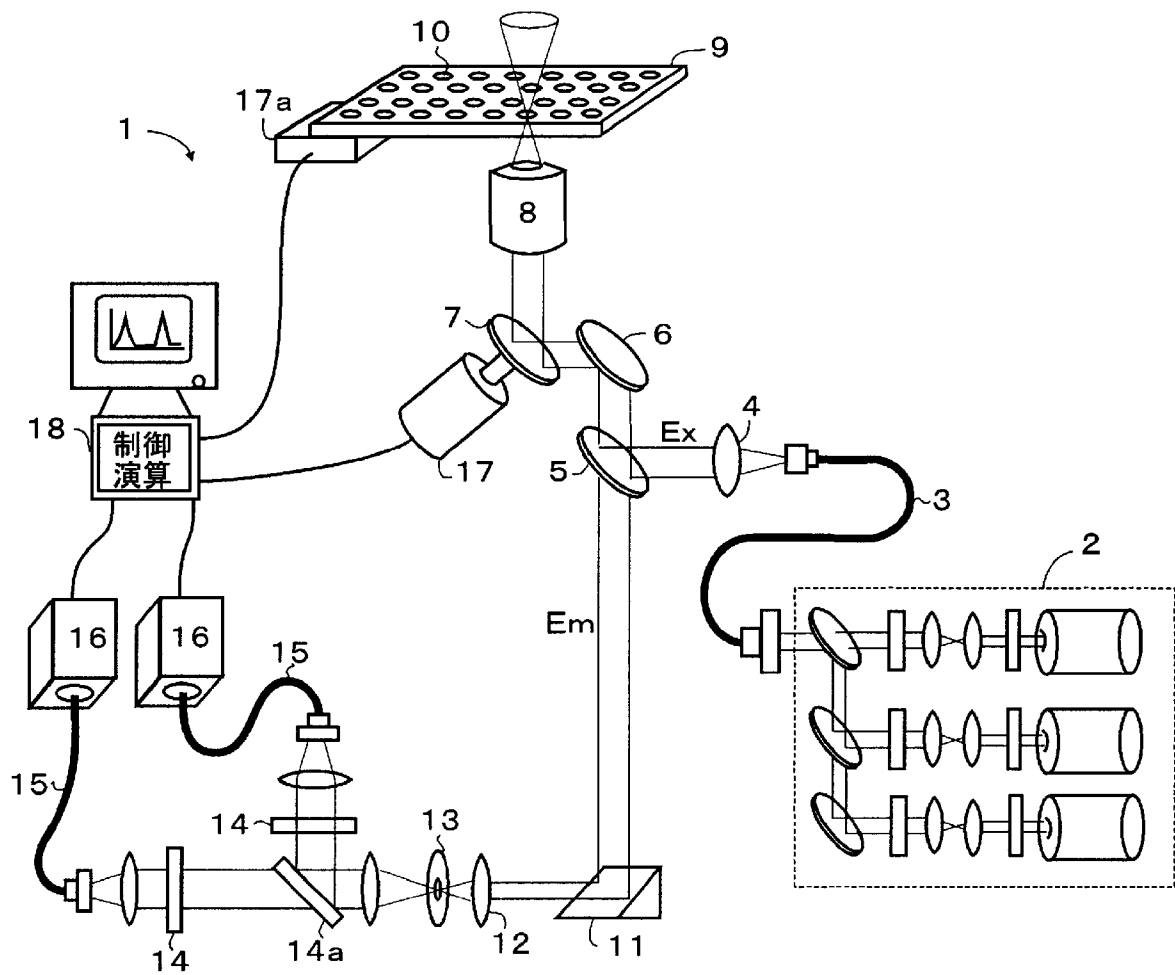
[請求項18]

前記多型配列が、遺伝子多型の多型部位を含む塩基配列、又は体細胞変異の変異部位を含む塩基配列であることを特徴とする請求項 1 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の核酸分子の多型識別方法。

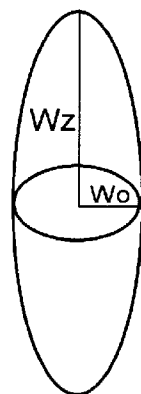
[請求項19]

前記体細胞変異が K - r a s 遺伝子の変異であることを特徴とする請求項 1 8 に記載の核酸分子の多型識別方法。

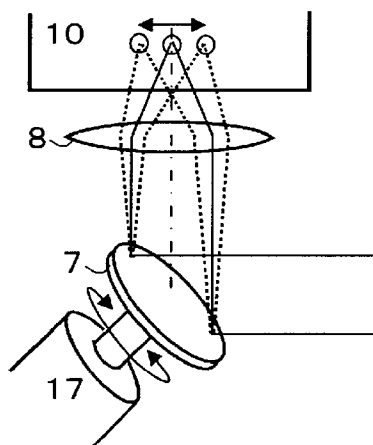
[図1A]



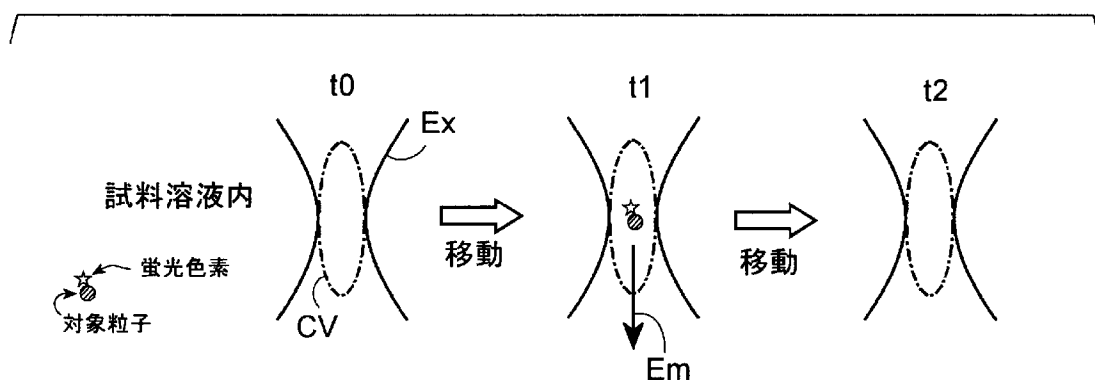
[図1B]



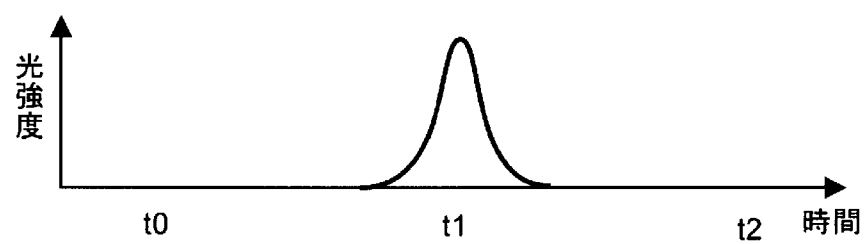
[図1C]



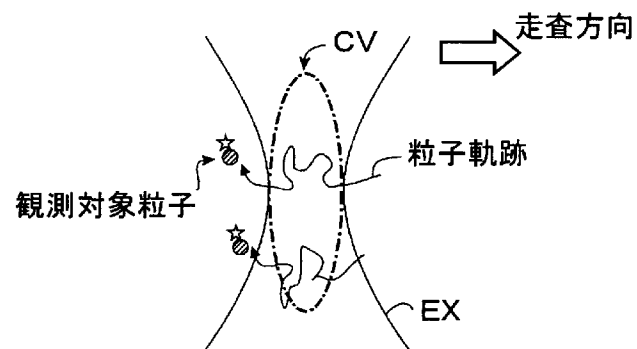
[図2A]



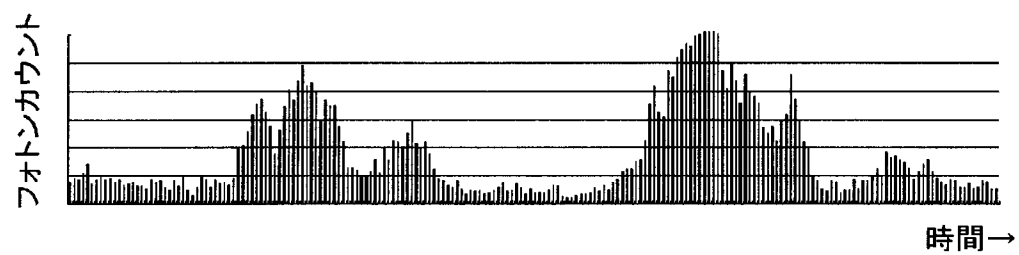
[図2B]



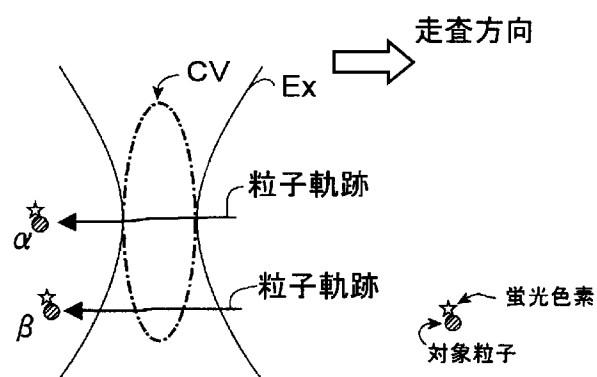
[図3A]



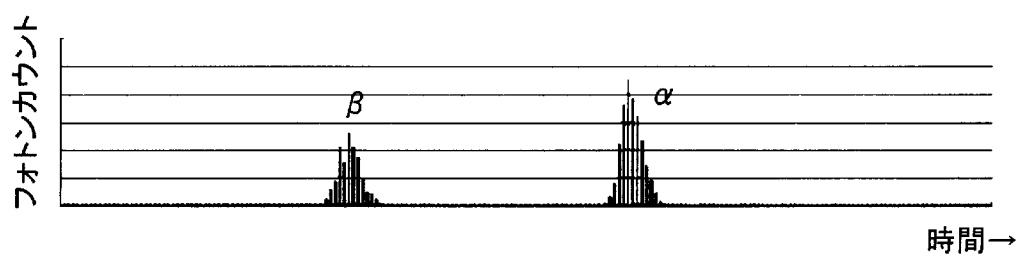
[図3B]



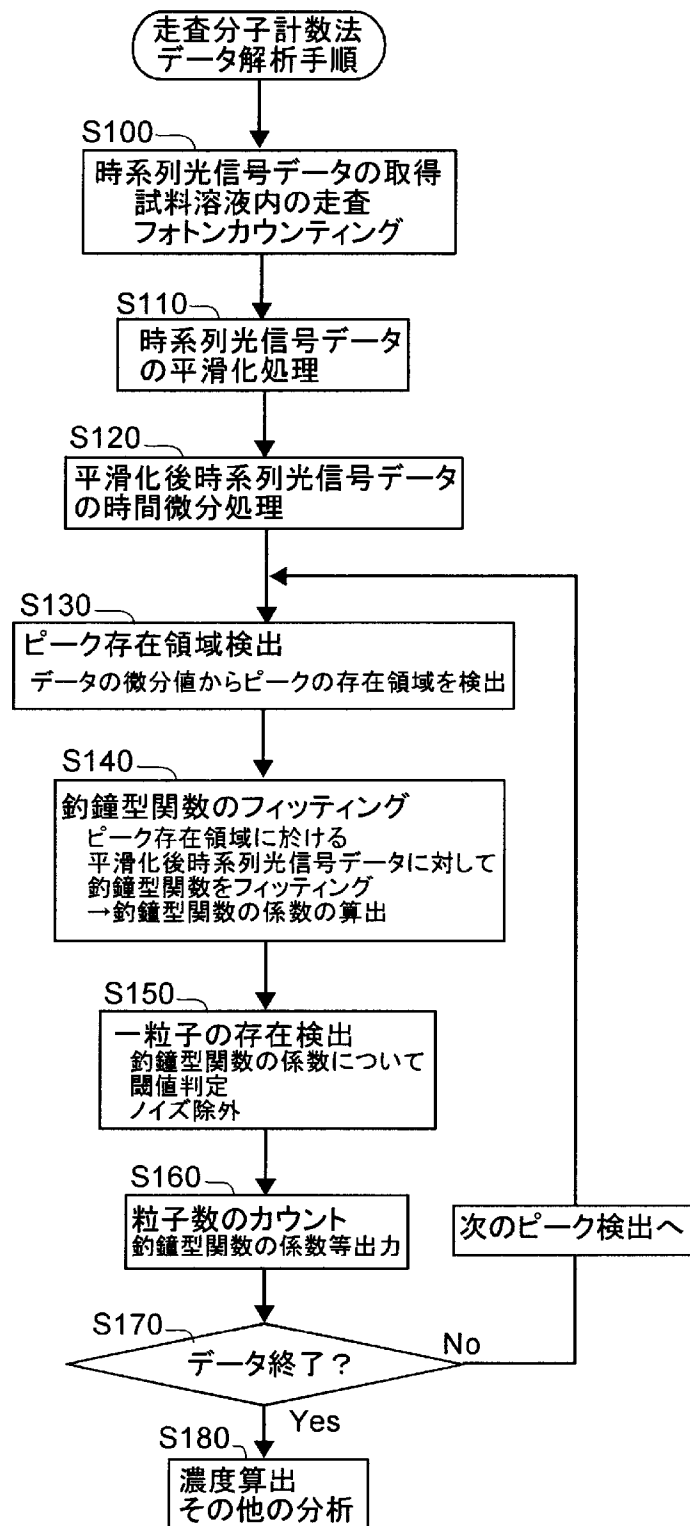
[図4A]



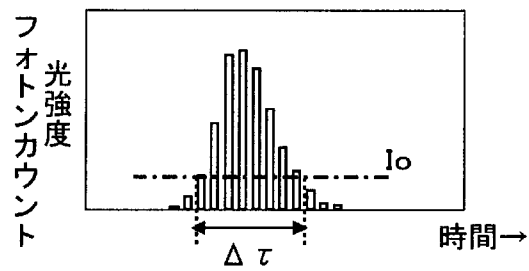
[図4B]



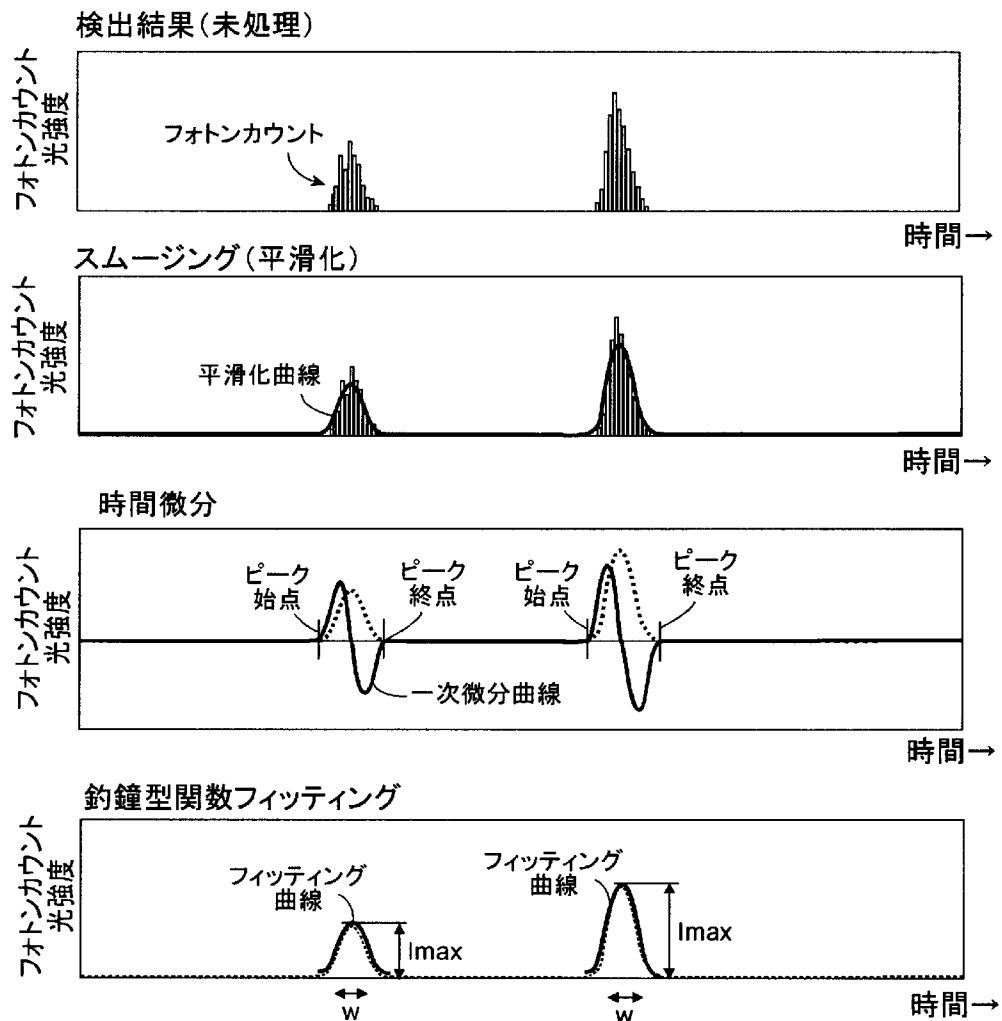
[図5]



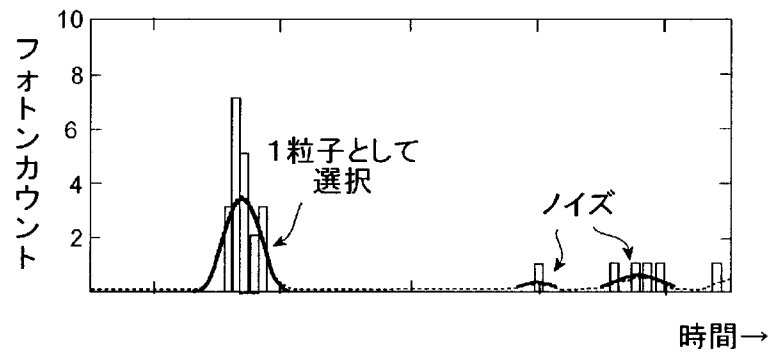
[図6A]



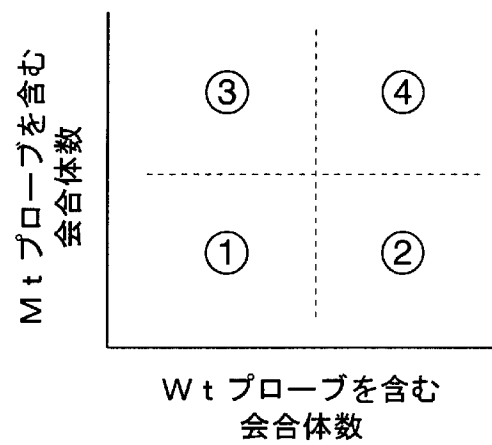
[図6B]



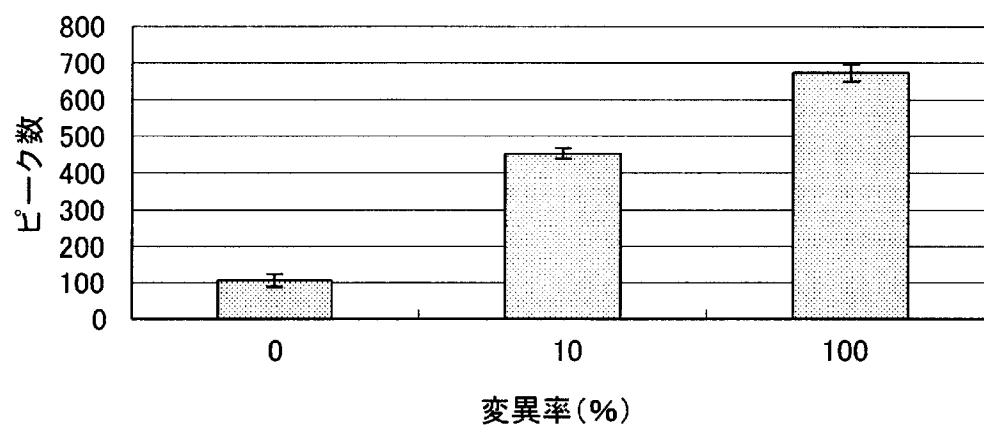
[図7]



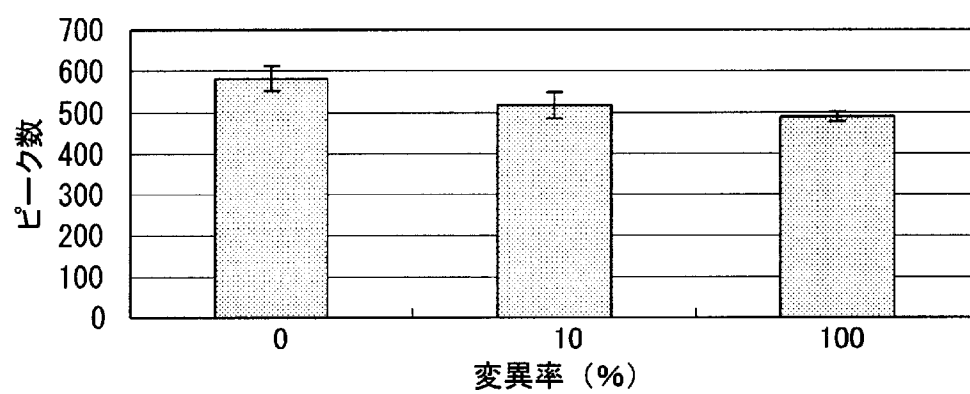
[図8]



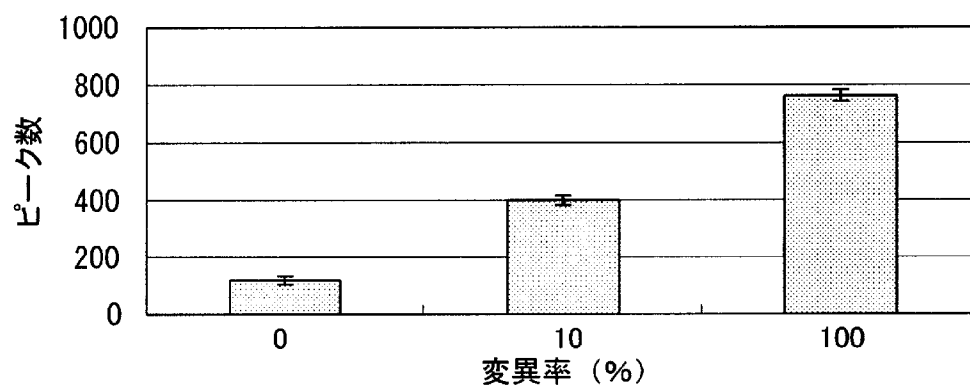
[図9]



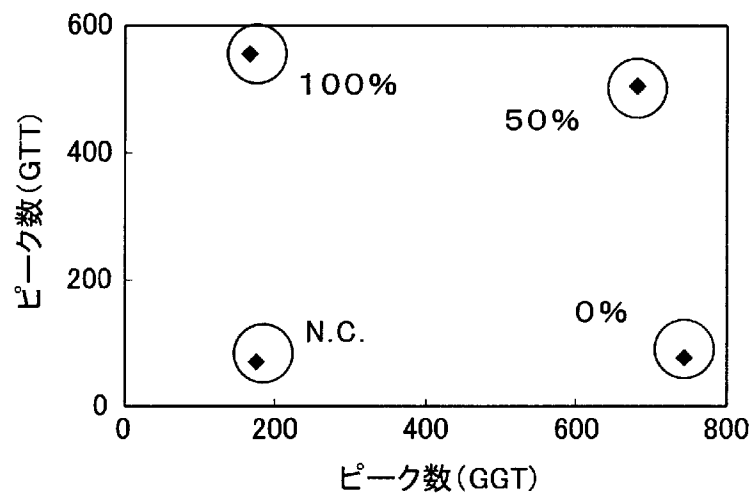
[図10A]



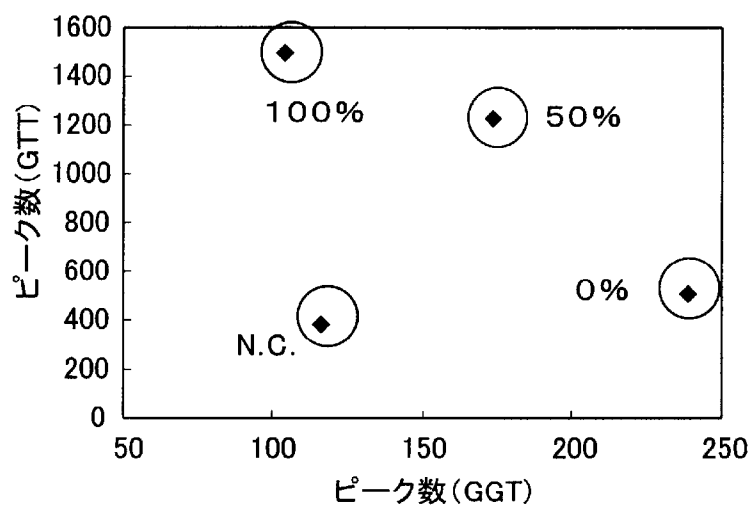
[図10B]



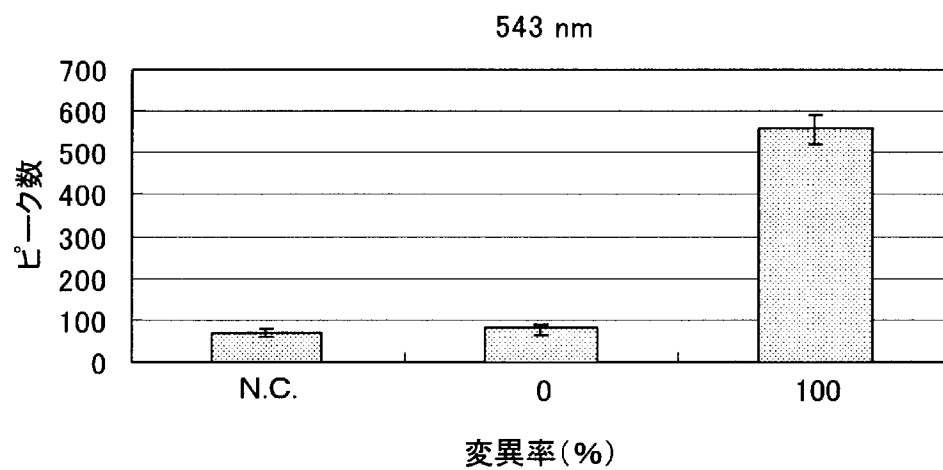
[図11]



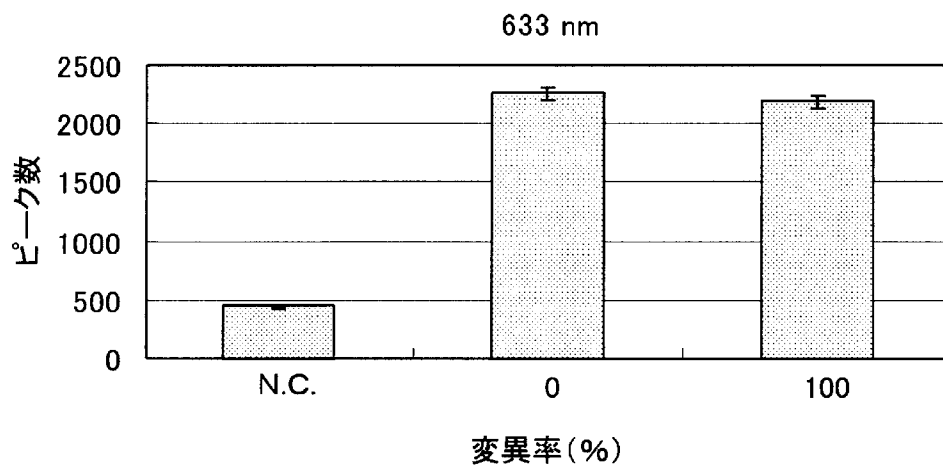
[図12]



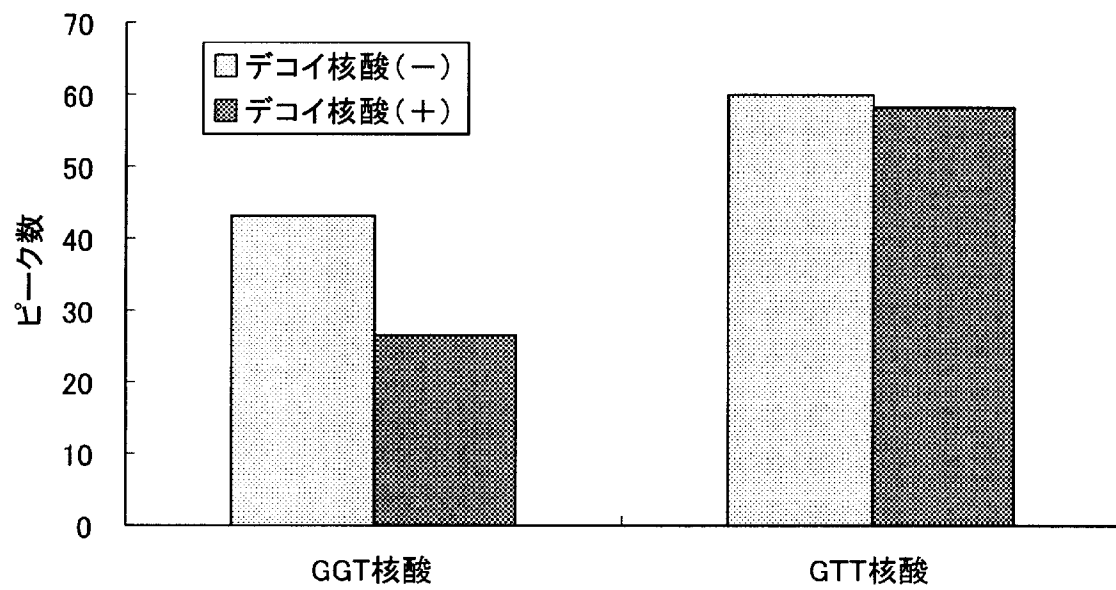
[図13A]



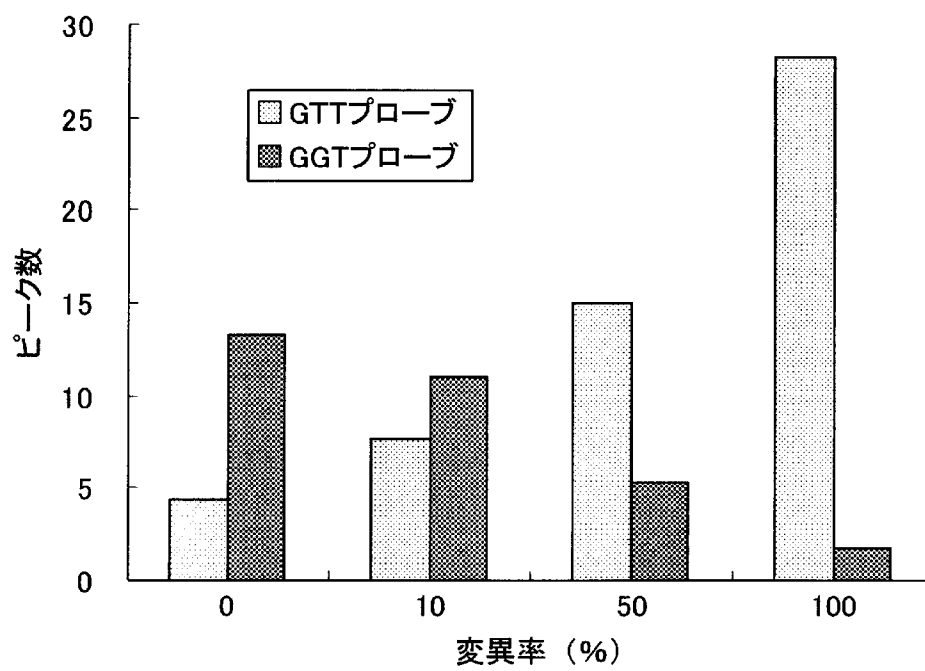
[図13B]



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/051416

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/64(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/542(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N21/64, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/542

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2003-506068 A (THE SECRETARY OF STATE FOR DEFENCE IN HER BRITANNIC MAJESTY'S GOVERNMENT OF THE UNETED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND), 18 February 2003 (18.02.2003), entire text; all drawings & US 7015018 B1 & GB 9918237 D & EP 1198593 A & WO 2001/011078 A1	1-19
A	WO 01/73120 A1 (Olympus Optical Co., Ltd.), 04 October 2001 (04.10.2001), entire text; all drawings & JP 2001-269198 A & JP 2001-269199 A & JP 2001-272404 A & US 2003/0008296 A1 & EP 1180549 A1	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 March, 2012 (29.03.12)Date of mailing of the international search report
10 April, 2012 (10.04.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/051416

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-187581 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 08 July 2004 (08.07.2004), entire text; all drawings (Family: none)	1-19
A	JP 2008-173015 A (Osaka University), 31 July 2008 (31.07.2008), entire text; all drawings (Family: none)	1-19
A	WO 2009/117033 A2 (SINGULEX, INC.), 02 July 2009 (02.07.2009), entire text; all drawings & JP 2011-508219 A & US 2009/0159812 A1 & EP 2232271 A	1-19
A	JP 2008-116440 A (Shiga-Ken), 22 May 2008 (22.05.2008), paragraphs [0001] to [0006] (Family: none)	1-19

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N21/64(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/542(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N21/64, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/542

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2003-506068 A (THE SECRETARY OF STATE FOR DEFENCE IN HER BRITANNIC MAJESTY'S GOVERNMENT OF THE UNETED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND) 2003.02.18, 全文全図 & US 7015018 B1 & GB 9918237 D & EP 1198593 A & WO 2001/011078 A1	1-19
A	WO 01/73120 A1 (オリンパス光学工業株式会社) 2001.10.04, 全文全図 & JP 2001-269198 A & JP 2001-269199 A & JP 2001-272404 A & US 2003/0008296 A1 & EP 1180549 A1	1-19

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 9 . 0 3 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

1 0 . 0 4 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 裕美

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 9 2

2 W

9 5 1 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2004-187581 A (オリンパス光学株式会社) 2004.07.08, 全文全図 (ファミリーなし)	1-19
A	JP 2008-173015 A (国立大学法人大阪大学) 2008.07.31, 全文全図 (ファミリーなし)	1-19
A	WO 2009/117033 A2 (SINGULEX, INC.) 2009.07.02, 全文全図 & JP 2011-508219 A & US 2009/0159812 A1 & EP 2232271 A	1-19
A	JP 2008-116440 A (滋賀県) 2008.05.22, [0001]-[0006] (ファミリーなし)	1-19