

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7017246号

(P7017246)

(45)発行日 令和4年2月8日(2022.2.8)

(24)登録日 令和4年1月31日(2022.1.31)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/6827(2018.01)

C 1 2 Q

1/6827

Z Z N A

C 1 2 Q 1/6844(2018.01)

C 1 2 Q

1/6844

Z

C 1 2 Q 1/6816(2018.01)

C 1 2 Q

1/6816

Z

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N

15/09

Z

請求項の数 12 (全51頁)

(21)出願番号 特願2018-529398(P2018-529398)

(86)(22)出願日 平成29年6月1日(2017.6.1)

(86)国際出願番号 PCT/JP2017/020485

(87)国際公開番号 WO2018/020831

(87)国際公開日 平成30年2月1日(2018.2.1)

審査請求日 令和2年6月1日(2020.6.1)

(31)優先権主張番号 特願2016-145839(P2016-145839)

(32)優先日 平成28年7月25日(2016.7.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関

日本国(JP)

(31)優先権主張番号 特願2017-50490(P2017-50490)

(32)優先日 平成29年3月15日(2017.3.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関

日本国(JP)

(73)特許権者 504145364

国立大学法人群馬大学

群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地

(74)代理人 110002860

特許業務法人秀和特許事務所

(72)発明者 桑原 正靖

日本国群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地

国立大学法人群馬大学内

審査官 坂崎 恵美子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子変異を有するポリヌクレオチド配列の簡便検出法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

遺伝子変異の検出方法であって、

第1の領域と、第1の領域の3'側に隣接した変異を含む第2の領域を含む標的ポリヌクレオチドに、一本鎖環状DNAおよびプライマーをハイブリダイズさせる工程、ローリングサークル増幅によって標的ポリヌクレオチドとプライマーと一本鎖環状DNAの複合体形成

に基づく核酸増幅反応を行う工程、および

増幅された核酸を検出試薬によって検出する工程、

を含み、

前記一本鎖環状DNAは、

前記標的ポリヌクレオチドの第1の領域に相補的な配列と、

該配列の5'側に隣接した、7～8塩基のプライマー結合配列と、を含み、

前記オリゴヌクレオチドプライマーは、

前記標的ポリヌクレオチドの第2の領域に相補的な8～15塩基の配列を有する領域と、

該配列の3'側に隣接した、一本鎖環状DNAのプライマー結合配列に相補的な7～8塩基

の配列を有する領域と、

を含み、前記オリゴヌクレオチドプライマーは、標的ポリヌクレオチドの第2の領域に存

在する変異塩基とハイブリダイズする塩基を、前記標的ポリヌクレオチドの第2の領域に

相補的な8～15塩基の配列を有する領域の最も3'側の位置に有する、方法。

【請求項2】

前記一本鎖環状DNAはさらに検出試薬結合配列に相補的な配列を含む、請求項 1 に記載の遺伝子変異の検出方法。

【請求項 3】

遺伝子変異の検出方法であって、

第 1 の領域と、第 1 の領域の 3' 側に隣接した変異を含む第 2 の領域を含む標的ポリヌクレオチドに、第 1 の一本鎖環状DNAおよび第 1 のプライマーをハイブリダイズさせる工程、ローリングサークル増幅によって標的ポリヌクレオチドと第 1 のプライマーと第 1 の一本鎖環状DNAの複合体形成に基づく核酸増幅反応を行う工程、当該核酸増幅反応によって生じた伸長鎖に第 2 の一本鎖環状DNAと第 2 のオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせて当該伸長鎖と第 2 のプライマーと第 2 の一本鎖環状DNAの複合体形成に基づく核酸増幅反応を行う工程および

10

増幅された核酸を検出試薬によって検出する工程、

を含み、

前記第 1 の一本鎖環状DNAは、

前記標的ポリヌクレオチドの第 1 の領域に相補的な配列と、

該配列の 5' 側に隣接した、7～8 塩基の第 1 のプライマー結合配列と、第 2 の一本鎖環状DNA結合配列に相補的な配列と、

を含み、

前記第 1 のオリゴヌクレオチドプライマーは、

前記標的ポリヌクレオチド第 2 の領域に相補的な 8～15 塩基の配列を有する領域と、

20

該配列の 3' 側に隣接した、第 1 の一本鎖環状DNAの第 1 のプライマー結合配列に相補的な 7～8 塩基の配列を有する領域と、

を含み、前記第 1 のオリゴヌクレオチドプライマーは、標的ポリヌクレオチドの第 2 の領域に存在する変異塩基とハイブリダイズする塩基を、前記標的ポリヌクレオチドの第 2 の領域に相補的な 8～15 塩基の配列を有する領域の最も 3' 側の位置に有し、

前記第 2 の一本鎖環状DNAは、

第 1 の一本鎖環状DNAの第 2 の一本鎖環状DNA結合配列に相補的な配列と同一の配列と、

該配列の 5' 側に隣接した、7～8 塩基の第 2 のプライマー結合配列と、を含み、

前記第 2 のオリゴヌクレオチドプライマーは、

第 1 の一本鎖環状DNAの第 2 の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列の 5' 側に隣接した領域と同一の 8～15 塩基の配列と、

30

該配列の 3' 側に隣接した、第 2 の一本鎖環状DNAの第 2 のプライマー結合配列に相補的な 7～8 塩基の配列とを含む、方法。

【請求項 4】

前記第 2 の一本鎖環状DNAはさらに検出試薬結合配列に相補的な配列を含む、請求項 3 に記載の遺伝子変異の検出方法。

【請求項 5】

遺伝子変異の検出方法であって、

第 1 の領域と、その 3' 側の変異を含む第 2 の領域を含むmiRNAに、一本鎖環状DNAおよびキャプチャーポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる工程、ローリングサークル増幅によってキャプチャーポリヌクレオチドとmiRNAと一本鎖環状DNAの複合体形成に基づく核酸増幅反応を行う工程、および増幅された核酸を検出試薬によって検出する工程、を含み、前記一本鎖環状DNAは、

40

miRNAの第 2 の領域に相補的な 7～8 塩基のmiRNA結合領域であってmiRNAの変異塩基と相

補的な塩基を含むmiRNA結合領域とその 3' 側の第 2 の領域と、

を含み、

前記キャプチャーポリヌクレオチドは、

一本鎖環状DNAの第 2 の領域に相補的な配列と

miRNAの第 1 の領域に相補的な 8～15 塩基のmiRNA結合配列を含む、方法。

50

【請求項 6】

前記一本鎖環状DNAはさらに検出試薬結合配列に相補的な配列を含む、請求項 5 に記載の遺伝子変異の検出方法。

【請求項 7】

遺伝子変異の検出方法であって、

第 1 の領域と、第 1 の領域の 3' 側に隣接した変異を含む第 2 の領域を含む miRNA に、第 1 の一本鎖環状DNAおよびキャプチャーポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる工程、ローリングサークル増幅によって miRNA とキャプチャーポリヌクレオチドと第 1 の一本鎖環状DNAの複合体形成に基づく核酸増幅反応を行う工程、当該核酸増幅反応によって生じた伸長鎖に第 2 の一本鎖環状DNAと第 2 のオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせて当該伸長鎖と第 2 のプライマーと第 2 の一本鎖環状DNAの複合体形成に基づく核酸増幅反応を行う工程および

10

増幅された核酸を検出試薬によって検出する工程、

を含み、

前記第 1 の一本鎖環状DNAは、

miRNA の第 2 の領域に相補的な 7 ~ 8 塩基の miRNA 結合領域であって miRNA の変異塩基と相

補的な塩基を含む miRNA 結合領域とその 3' 側の第 2 の領域と、

第 2 の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列と、

を含み、

20

前記キャプチャーポリヌクレオチドは、

一本鎖環状DNAの第 2 の領域に相補的な配列と

miRNA の第 1 の領域に相補的な 8 ~ 15 塩基の配列を含み

前記第 2 の一本鎖環状DNAは、

第 1 の一本鎖環状DNAの第 2 の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列と同一の配列と、

該配列の 5' 側に隣接した、7 ~ 8 塩基の第 2 のプライマー結合配列と、を含み、

前記第 2 のオリゴヌクレオチドプライマーは、

第 1 の一本鎖環状DNAの第 2 の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列の 5' 側に隣接した領域と同一の 8 ~ 15 塩基の配列と、

該配列の 3' 側に隣接した、第 2 の一本鎖環状DNAの第 2 のプライマー結合配列に相補的な 7 ~ 8 塩基の配列とを含む、方法。

30

【請求項 8】

前記第 2 の一本鎖環状DNAはさらに検出試薬結合配列に相補的な配列を含む、請求項 7 に記載の遺伝子変異の検出方法。

【請求項 9】

前記検出試薬結合配列がグアニン四重鎖形成配列であり、前記検出試薬がグアニン四重鎖結合試薬である、請求項 2, 4, 6 または 8 に記載の遺伝子変異の検出方法。

【請求項 10】

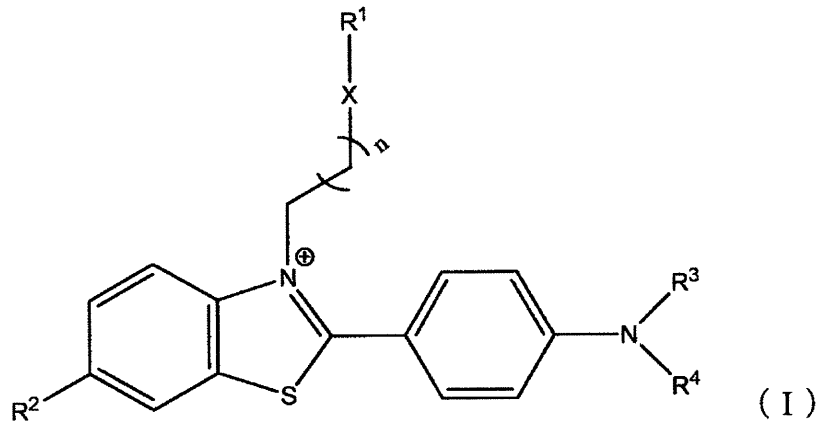
グアニン四重鎖形成配列に相補的な配列が C₃N₁₋₁₀C₃N₁₋₁₀C₃N₁₋₁₀C₃配列を含む、請求項 9 に記載の遺伝子変異の検出方法。

40

【請求項 11】

グアニン四重鎖結合試薬が下記一般式 (I) で表される化合物を含む、請求項 9 または 10 に記載の遺伝子変異の検出方法。

【化 1】



10

R¹は水素、またはO、SおよびNから選ばれる1種類以上を含んでもよい炭化水素基を示し、

R²、R³、R⁴はそれぞれ独立して炭素数1～5の炭化水素基を示し、

nは0～5の整数を示し、

XはO、SまたはNHを示す。

【請求項 1 2】

20

遺伝子変異が一塩基多型である、請求項1～11のいずれか一項に記載の遺伝子変異の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) や塩基挿入、塩基欠失などの遺伝子変異を含むポリヌクレオチドを簡便に効率よく検出するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

30

近年、疾患に関連するSNPなどの遺伝子変異が数多く見出されており、遺伝子変異を解析して疾患のかかりやすさを予測する遺伝子検査や、治療方法を遺伝子変異の種類によって変えたりするオーダーメイド医療が注目を集めている。例えば、SNPの解析方法としては、SNP特異的プライマーやSNP特異的プローブを使用し、増幅やハイブリダイゼーションの有無によってSNPのタイプを調べる方法や、制限酵素による切断の有無によってSNPのタイプを調べる方法や、配列を直接シーケンシングする方法などが知られている。しかしながら、これらの方法はクリニックでの簡易検査やセルフメディケーションに用いるには装置の価格や使用コストが高く、操作も煩雑である。

【0003】

特許文献1ではローリングサークル増幅法によってRNAを検出する方法が開示されているが、アナライトのRNAをプライマーに使用しているため、検出対象にできる配列が3'末端に制約される。また、増幅効率や検出効率の面でも十分ではない。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】特開2012-080871号公報

【非特許文献】

【0005】

【文献】Anal. Chem., 2016, 88 (14), pp 7137-7144

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、標的ポリヌクレオチド上の特定の位置に存在するSNPなどの遺伝子変異や塩基挿入、塩基欠失を簡便な手法で効率よく検出するための方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は上記課題を解決するために鋭意検討を行った。その結果、PCT/JP2016/059262(WO 2016/152936)で既に出願済の一本鎖環状DNA、プライマーおよびグアニン四重鎖結合試薬を用いたポリヌクレオチドの検出方法(非特許文献1)において、SNPなどの遺伝子変異を含む標的ポリヌクレオチドを用い、該遺伝子多型を含む領域にプライマーを設計することにより、増幅の有無によって遺伝子変異のタイプや有無を効率的に判別できることを見出し、本発明を完成させた。

10

【0008】

本発明によれば、

第1の領域と、第1の領域の3'側に隣接した第2の領域を含むキャプチャーポリヌクレオチドに、一本鎖環状DNAおよびオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせる工程、ローリングサークル増幅によってキャプチャーポリヌクレオチドとプライマーと一本鎖環状DNAの複合体形成に基づく核酸増幅反応を行う工程、および増幅された核酸、好ましくは増幅された核酸中に含まれる検出試薬結合配列を検出試薬によって検出する工程、

20

を含む遺伝子変異の検出方法であって、

前記一本鎖環状DNAは、

前記キャプチャーポリヌクレオチドの第1の領域に相補的な10～30塩基の配列と、

該配列の5'側に隣接した、プライマー結合配列と、

好ましくは検出試薬結合配列に相補的な配列と、

を含み、

前記オリゴヌクレオチドプライマーは、

前記キャプチャーポリヌクレオチドの第2の領域に相補的な8～15塩基の配列を有する領域と、

該配列の3'側に隣接した、一本鎖環状DNAのプライマー結合配列に相補的な配列を有する領域と、を含み、

30

前記キャプチャーポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドプライマーは変異を含み、変異特異的にキャプチャーポリヌクレオチドとプライマーと一本鎖環状DNAとがハイブリダイズし、三者複合体を形成したときに核酸増幅反応が起こり、検出試薬によって検出される、方法が提供される。

【0009】

前記キャプチャーポリヌクレオチドの位置に、変異を含む標的ポリヌクレオチドを配置する方法である、本発明の第一の態様によれば、

遺伝子変異の検出方法であって、

第1の領域と、第1の領域の3'側に隣接した変異を含む第2の領域を含む標的ポリヌクレオチドに、一本鎖環状DNAおよびプライマーをハイブリダイズさせる工程、ローリングサークル増幅によって標的ポリヌクレオチドとプライマーと一本鎖環状DNAの複合体形成に基づく核酸増幅反応を行う工程、および

40

増幅された核酸、好ましくは増幅された核酸中に含まれる検出試薬結合配列を検出試薬によって検出する工程、

を含み、

前記一本鎖環状DNAは、

前記標的ポリヌクレオチドの第1の領域に相補的な10～30塩基の配列と、

該配列の5'側に隣接した、プライマー結合配列と、

好ましくは検出試薬結合配列に相補的な配列と、

50

を含み、

前記オリゴヌクレオチドプライマーは、

(ii) 前記標的ポリヌクレオチドの第2の領域に相補的な8～15塩基の配列を有する領域と、

該配列の3'側に隣接した、一本鎖環状DNAのプライマー結合配列に相補的な配列を有する領域と、を含む

方法、が提供される。

【0010】

前記キャプチャーポリヌクレオチドの位置に、変異を含む標的ポリヌクレオチドを配置する方法である、本発明の第二の態様によれば、

10

遺伝子変異の検出方法であって、

第1の領域と、第1の領域の3'側に隣接した変異を含む第2の領域を含む標的ポリヌクレオチドに、第1の一本鎖環状DNAおよび第1のプライマーをハイブリダイズさせる工程、ローリングサークル増幅によって標的ポリヌクレオチドと第1のプライマーと第1の一本鎖環状DNAの複合体形成に基づく核酸増幅反応を行う工程、当該核酸増幅反応によって生じた伸長鎖に第2の一本鎖環状DNAと第2のオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせて当該伸長鎖と第2のプライマーと第2の一本鎖環状DNAの複合体形成に基づく核酸増幅反応を行う工程および

増幅された核酸、好ましくは増幅された核酸中に含まれる検出試薬結合配列を検出試薬によって検出する工程、

20

を含み、

前記第1の一本鎖環状DNAは、

前記標的ポリヌクレオチドの第1の領域に相補的な10～30塩基の配列と、

該配列の5'側に隣接した、プライマー結合配列と、

第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列と、

を含み、

前記第1のオリゴヌクレオチドプライマーは、

(ii) 前記標的ポリヌクレオチドの第2の領域に相補的な8～15塩基の配列を有する領域と、

該配列の3'側に隣接した、第1の一本鎖環状DNAのプライマー結合配列に相補的な配列を有する領域と、

30

を含み

前記第2の一本鎖環状DNAは、

(iii) 第1の一本鎖環状DNAの第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列と同一の配列と、

、

該配列の5'側に隣接した、第2のプライマー結合配列と、

好ましくは検出試薬結合配列に相補的な配列と、

を含み、

前記第2のオリゴヌクレオチドプライマーは、

(iv) 第1の一本鎖環状DNAの第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列の5'側に隣接した領域と同一の配列と、

40

該配列の3'側に隣接した、第2の一本鎖環状DNAの第2のプライマー結合配列に相補的な配列とを含む、方法

が提供される。

【0011】

なお、前記オリゴヌクレオチドプライマー(第二の態様においては第1のオリゴヌクレオチドプライマー)は、標的ポリヌクレオチドの第2の領域に存在する変異塩基とハイブリダイズする塩基を、前記標的ポリヌクレオチドの第2の領域に相補的な8～15塩基の配列を有する領域の最も3'側の位置に有することが好ましい。

【0012】

50

前記オリゴヌクレオチドの位置に、変異を含む標的miRNA（マイクロRNA）を配置する方法である、本発明の第三の態様によれば、
遺伝子変異の検出方法であって、
第1の領域と、その3'側の変異を含む第2の領域を含むmiRNAに、一本鎖環状DNAおよびキャプチャーポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる工程、ローリングサークル増幅によってキャプチャーポリヌクレオチドとmiRNAと一本鎖環状DNAの複合体形成に基づく核酸増幅反応を行う工程、および増幅された核酸、好ましくは検出試薬結合配列を検出試薬によって検出する工程、を含み、前記一本鎖環状DNAは、
miRNAの第2の領域に相補的なmiRNA結合領域とその3'側の第2の領域と、好ましくは検出試薬結合配列に相補的な配列と、
を含み、
前記キャプチャーポリヌクレオチドは、
一本鎖環状DNAの第2の領域に相補的な配列と
miRNAの第1の領域に相補的なmiRNA結合配列を含む、方法が提供される。

【0013】

前記オリゴヌクレオチドの位置に、変異を含む標的miRNA（マイクロRNA）を配置する方法である、本発明の第四の態様によれば、
遺伝子変異の検出方法であって、
第1の領域と、第1の領域の3'側に隣接した変異を含む第2の領域を含むmiRNAに、第1の一本鎖環状DNAおよびキャプチャーポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる工程、
ローリングサークル増幅によってmiRNAとキャプチャーポリヌクレオチドと第1の一本鎖環状DNAの複合体形成に基づく核酸増幅反応を行う工程、当該核酸増幅反応によって生じた伸長鎖に第2の一本鎖環状DNAと第2のオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせて当該伸長鎖と第2のプライマーと第2の一本鎖環状DNAの複合体形成に基づく核酸増幅反応を行う工程および
増幅された核酸、好ましくは増幅された核酸中に含まれる検出試薬結合配列を検出試薬によって検出する工程、
を含み、
前記第1の一本鎖環状DNAは、
miRNAの第2の領域に相補的なmiRNA結合領域とその3'側の第2の領域と、
第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列と、
を含み、
前記キャプチャーポリヌクレオチドは、
一本鎖環状DNAの第2の領域に相補的な配列と
miRNAの第1の領域に相補的な配列を含み
前記第2の一本鎖環状DNAは、
(iii) 第1の一本鎖環状DNAの第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列と同一の配列と、
、
該配列の5'側に隣接した、第2のプライマー結合配列と、
好ましくは検出試薬結合配列に相補的な配列と、
を含み、
前記第2のオリゴヌクレオチドプライマーは、
(iv) 第1の一本鎖環状DNAの第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列の5'側に隣接した領域と同一の配列と、
該配列の3'側に隣接した、第2の一本鎖環状DNAの第2のプライマー結合配列に相補的な配列とを含む、方法
が提供される。

【0014】

また、前記検出用試薬結合配列がグアニン四重鎖形成配列であり、前記検出用試薬がグアニン四重鎖結合試薬であることが好ましく、グアニン四重鎖結合試薬は後述のThT誘導体

10

20

30

40

50

であることが好ましい。

【発明の効果】

【0015】

本発明の一態様によれば、標的ポリヌクレオチド配列が存在すると、一本鎖環状DNAとプライマーがハイブリダイズして、そこから、幾つものグアニン四重鎖含有配列などの検出試薬結合配列が直列に繋がったDNA鎖が生成し、これをThT（誘導体）などの検出試薬で染色することにより、標的ポリヌクレオチド配列を特異的に検出できる。昇温・降温などの温度サイクルを必要とするPCR法ではなく、一定温度で反応が進行するRCA法を用いるため、簡易検出法への応用が可能である。そして、標的ポリヌクレオチド配列における変異塩基とプライマーの塩基が一致しない場合は増幅がほとんど起こらないので、変異のタイプや有無の判別が可能であり、遺伝子診断等の用途に有用である。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】本発明の第一の態様にかかるポリヌクレオチド増幅方法の模式図。星印はSNP部位を示す。

【図2】本発明の第二の態様にかかるポリヌクレオチド増幅方法の模式図。星印はSNP部位を示す。

【図3】実施例1（サンプルb2～b7）の標的ポリヌクレオチド、第1の一本鎖環状DNA、および各種第1のプライマーの複合体形成と、その伸長産物と第2の一本鎖環状DNA、および第2のプライマーの複合体形成を示す図。

20

【図4】実施例1における標的ポリヌクレオチド検出結果を示す図（写真）。

【図5】実施例2（サンプルa2、a4、b2、b4、b5、b6）の標的ポリヌクレオチド、一本鎖環状DNA、および各種プライマーの複合体形成と、その伸長産物と第2の一本鎖環状DNA、および第2のプライマーの複合体形成を示す図。

【図6】実施例2における標的ポリヌクレオチド検出結果を示す図（写真）。

【図7】実施例2における二重鎖DNAと一本鎖DNAをターゲットにした場合の蛍光スペクトルの違いを示す図。

【図8】実施例3（サンプルb2、b3、b4、b5、c2、c3、c4、c5）の標的ポリヌクレオチド、一本鎖環状DNA、および各種プライマーの複合体形成と、その伸長産物と第2の一本鎖環状DNA、および第2のプライマーの複合体形成を示す図。

30

【図9】実施例3における標的ポリヌクレオチド検出結果を示す図（写真）。

【図10】実施例4（サンプルb1、b2、b3、b4、b5）の標的ポリヌクレオチド、一本鎖環状DNA、および各種プライマーの複合体の構造を示す図。

【図11】実施例4における標的ポリヌクレオチド検出結果を示す図（写真）。

【図12】実施例5（左はG636のSNPでプライマーP2、右はG681のSNPでプライマーP4）の標的ポリヌクレオチド、一本鎖環状DNA、および各種プライマーの複合体形成と、その伸長産物と第2の一本鎖環状DNA、および第2のプライマーの複合体形成を示す図。

【図13】実施例5における標的ポリヌクレオチド検出結果を示す図（写真）。

【図14】本発明の第三の態様にかかるポリヌクレオチド増幅方法の模式図。星印はSNP部位を示す。

40

【図15】本発明の第四の態様にかかるポリヌクレオチド増幅方法の模式図。星印はSNP部位を示す。

【図16】実施例6（miR-21-CA）の標的ポリヌクレオチド（miRNA）、一本鎖環状DNA、キャプチャーポリヌクレオチドおよびプライマーの複合体の構造を示す図。

【図17】実施例6における標的ポリヌクレオチド検出結果を示す図（写真）。

【図18】実施例7（miR-13（u））の標的ポリヌクレオチド（miRNA）、一本鎖環状DNA、キャプチャーポリヌクレオチドおよびプライマーの複合体の構造を示す図。

【図19】実施例7における標的ポリヌクレオチド検出結果を示す図（写真）。

【図20】実施例8の標的ポリヌクレオチド（長鎖DNA）、一本鎖環状DNA、キャプチャーポリヌクレオチドおよびプライマーの複合体の構造を示す図。

50

【図 2 1】実施例 8 (PCR 増幅産物を用いた時)における標的ポリヌクレオチド検出結果を示す図 (写真)。

【図 2 2】実施例 8 (抽出物を用いた時)における標的ポリヌクレオチド検出結果を示す図 (写真)。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明によれば、

第 1 の領域と、第 1 の領域の 3' 側に隣接した第 2 の領域を含むキャプチャーポリヌクレオチドに、一本鎖環状 DNA およびオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせる工程、ローリングサークル増幅によってキャプチャーポリヌクレオチドとプライマーと一本鎖環状 DNA の複合体形成に基づく核酸増幅反応を行う工程、および

10

増幅された核酸、好ましくは増幅された核酸中に含まれる検出試薬結合配列を検出試薬によって検出する工程、

を含む遺伝子変異の検出方法であって、

前記一本鎖環状 DNA は、

前記キャプチャーポリヌクレオチドの第 1 の領域に相補的な 10 ~ 30 塩基の配列と、

該配列の 5' 側に隣接した、プライマー結合配列と、

好ましくは検出試薬結合配列に相補的な配列と、

を含み、

前記オリゴヌクレオチドプライマーは、

20

前記キャプチャーポリヌクレオチドの第 2 の領域に相補的な 8 ~ 15 塩基の配列を有する領域と、

該配列の 3' 側に隣接した、一本鎖環状 DNA のプライマー結合配列に相補的な配列を有する領域と、を含み、

前記キャプチャーポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドプライマーは変異を含み、変異特異的にキャプチャーポリヌクレオチドとプライマーと一本鎖環状 DNA とがハイブリダイズし、三者複合体を形成したときに核酸増幅反応が起こり、検出試薬によって検出される、方法が提供される。

ここで、遺伝子変異としては、一塩基多型 (SNP)、塩基欠失、塩基挿入などが挙げられる。

30

【0018】

<キャプチャーポリヌクレオチドを変異を含む標的ポリヌクレオチドとする場合 ~ 第一の態様>

本発明の第一の態様にかかる遺伝子変異の検出方法は、

第 1 の領域と、その 3' 側に隣接した変異を含む第 2 の領域を含む標的ポリヌクレオチドを用い、

(i) 標的ポリヌクレオチドの第 1 の領域に相補的な 10 ~ 30 塩基の配列と、

該配列の 5' 側に隣接した、プライマー結合配列と、

検出試薬結合配列に相補的な配列と、

を含む一本鎖環状 DNA と、

40

(ii) 標的ポリヌクレオチドの、第 1 の領域の 3' 側に隣接した変異を含む第 2 の領域に相補的な 8 ~ 15 塩基の配列と、

該配列の 3' 側に隣接した、一本鎖環状 DNA のプライマー結合配列に相補的な配列と、

を含むオリゴヌクレオチドプライマーと、

(iii) 検出試薬と、

を用いる。

【0019】

<標的ポリヌクレオチド>

標的ポリヌクレオチドは、SNP などの遺伝子変異を含む配列であれば特に限定されず、DNA でも RNA でもよい。DNA は一本鎖 DNA でもよいし、センス鎖とアンチセンス鎖 (相補鎖

50

）からなる二本鎖DNAでもよい。

標的ポリヌクレオチドは、例えば、ゲノムDNAやRNAにおいて、標的の遺伝子変異を含む領域を第2の領域と設定し、その5'側に隣接する領域を第1の領域と設定し、これらを含む配列を標的ポリヌクレオチドとして設定できる。そして、第1の領域と第2の領域の配列に基づいて、下記の本鎖環状DNAとプライマーを設計することができる。

【0020】

標的ポリヌクレオチドは生物種由来の試料から調製または単離されたものでもよい。そのような標的ポリヌクレオチドを含む試料には、ウイルス、原核生物または真核生物の個体そのもの、あるいはその一部が使用できる。例えば、脊椎動物（ヒトを含む）では、糞便、尿、または汗のような排泄物、血液、精液、唾液、胃液、または胆汁のような体液等が挙げられる。また、外科的に生体から取り出した組織、または体毛のように生体から脱落した組織であってもよい。さらに、食品等の加工物から調製したポリヌクレオチド含有調製物であってもよい。また、前記試料をさらに分画して、その一部を取り出したものから調製したRNA含有調製物であってもよい。試料は、標的となるポリヌクレオチドを含有していれば、ポリヌクレオチドが精製されていても、精製されていなくても用いることができる。

10

【0021】

標的ポリヌクレオチドは一本鎖環状DNAおよびプライマーがハイブリダイズできるものであれば、長さも特に限定されない。ステムループ構造のループ部分に一本鎖環状DNAがハイブリダイズしやすいので、ステムループ構造を取るポリヌクレオチドが好ましい。

20

【0022】

<一本鎖環状DNA>

一本鎖環状DNAは、標的ポリヌクレオチドの第1の領域に相補的な10～30塩基の配列と、

該配列の5'側に隣接した、好ましくは7～8塩基のプライマー結合配列と、
グアニン四重鎖形成配列などの検出試薬結合配列に相補的な配列と、を含む。

なお、標的ポリヌクレオチドが二本鎖DNAの場合、図8のc2、c3、c5に示すように、一本鎖環状DNAは、標的ポリヌクレオチドの第1の領域に相補的な10～30塩基の配列の3'側に隣接して、該配列の3'末端側と相補的な配列をさらに含むことが好ましい。これにより、二本鎖DNAの相補鎖がハイブリダイズでき、より複合体が安定化される。

30

【0023】

図1を参照し、例を挙げて説明する。なお、一本鎖環状DNAでは、時計回りに5'→3'である。一本鎖環状DNA10は標的ポリヌクレオチド11の第1の領域111に相補的な配列101と、その5'側に連結したプライマー結合配列102と、グアニン四重鎖形成配列に相補的な配列103を含む。配列101の長さは、通常、10～30塩基であり、好ましくは15～25塩基であり、GC含量は好ましくは30～70%である。配列102の長さは好ましくは7塩基または8塩基であり、配列は特に制限されないが、GC含量は好ましくは30～70%である。

【0024】

グアニン四重鎖形成配列としては、Nat Rev Drug Discov. 2011 Apr; 10(4): 261-275に記載されたような配列が挙げられ、G₃N₁₋₁₀G₃N₁₋₁₀G₃N₁₋₁₀G₃で表されるが、具体的には、配列番号27～32に記載の配列などが例示される。グアニン四重鎖形成配列に相補的な配列としては、C₃N₁₋₁₀C₃N₁₋₁₀C₃N₁₋₁₀C₃が例示される。すなわち、連続する3つのCが、1～10個（好ましくは1～5個）の任意の塩基（N=A, T, GまたはC）からなる配列をスペーサーとして、4回繰り返される配列である。

40

22mer DNA (22AG: 5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3' (配列番号27) および
22Kit: 5'-AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG-3' (配列番号28))、
26mer DNA (26Tel: 5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT-3' (配列番号29))、

27mer DNA (27Myc: 5'-TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGA AGG-3' (配列番号

50

30))、

20mer DNA (20Src: 5'-GGGCGGCGGGCTGGGCGGGG-3' (配列番号31))、
18mer RNA (18Ras: 5'-GGGAGGGGCGGGUCUGGG-3' (配列番号32))。

【0025】

グアニン四重鎖形成配列に相補的な配列はその前後、すなわち、プライマー結合配列102との間および標的ポリヌクレオチドの第1の領域に相補的な配列101との間に任意の配列を含んでもよい。一本鎖環状DNA10全体の長さは、好ましくは35～100塩基である。

【0026】

なお、図1では、検出試薬結合配列がグアニン四重鎖形成配列である場合について説明したが、例えば、検出試薬結合配列をアプタマー配列もしくは分子ビーコン(FRETを生じさせる蛍光基(ドナー)と消光基(アクセプター)を有するヘアピン状のオリゴヌクレオチド)結合配列とし、検出試薬として、アプタマー結合性発色分子もしくは分子ビーコンを用いて検出することも可能である。また、検出試薬結合配列にハイブリダイズする標識プローブを用いて検出することも可能である。

また、本発明の第一の態様においては、配列非特異的にDNAに結合して蛍光を発するCyber Gold(商品名)などの核酸染色試薬を検出試薬として用いて増幅された核酸を検出することも可能であるため、一本鎖環状DNAにおける検出試薬結合配列に相補的な配列の存在は必須ではない。

【0027】

一本鎖環状DNA10は、一本鎖DNA(ssDNA)を環状化することによって得ることができる。一本鎖DNAの環状化は、任意の手段によって行うことができるが、例えば、CircLigase(登録商標)、CircLigase II(登録商標)、ssDNA Ligase(Epicentre社)、ThermoPhage ligase(登録商標) single-stranded DNA(Prokzyme社)を用いて行うことができる。

【0028】

<オリゴヌクレオチドプライマー>

プライマー12は、標的ポリヌクレオチド11の、第1の領域111の3'側に隣接したSNPなどの遺伝子変異(図1の星印)を含む第2の領域112に相補的な8～15塩基の標的ポリヌクレオチド結合配列121と、その3'側に連結された、一本鎖環状DNA10のプライマー結合領域102に相補的な好ましくは7～8塩基の環状DNA結合配列122と、を含む。なお、プライマーは担体に固定化するなどして固相化されてもよい。これにより固相での検出も可能となる。固相化法としては、ビオチンなどでプライマーを標識し、アピジン等との相互作用により固相化する方法などが挙げられる。

【0029】

オリゴヌクレオチドプライマーにおいては、標的ポリヌクレオチドの第2の領域に存在する変異塩基とハイブリダイズする塩基を、標的ポリヌクレオチドの第2の領域に相補的な配列121の最も3'側の位置に有することが好ましい。

例えば、標的ポリヌクレオチドの多型がA/Gの一塩基多型で、Aを検出しようとするときは、Aに対応するTが標的ポリヌクレオチド結合配列の3'末端の位置になるように、オリゴヌクレオチドプライマーを設計することが特に好ましい。

【0030】

<増幅方法>

標的ポリヌクレオチド11に一本鎖環状DNA10およびプライマー12をハイブリダイズさせて三者の複合体を形成させた後、ローリングサークル増幅(RCA)法によって標的ポリヌクレオチドに基づく核酸増幅反応を行う。

【0031】

ハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば、一本鎖環状DNAと標的ポリヌクレオチドとプライマーの組み合わせを検討し、適宜設定できる。

【0032】

10

20

30

40

50

RCA法はLizardi et al., Nature Genet. 19: 225-232 (1998);米国特許第5,854,033号及び同第6,143,495号;PCT出願WO97/19193などに記載されている。RCA法は、例えば、phi29 polymerase、Klenow DNA Polymerase (5'-3', 3'-5' exo minus)、Sequenase (登録商標) Version 2.0 T7 DNA Polymerase (USB社)、Bsu DNA Polymerase, Large Fragment (NEB社)などの中温性の鎖置換型DNA合成酵素や、Bst DNA Polymerase (Large Fragment)、Bsm DNA Polymerase, Large Fragment (Fermentas社)、BcaBEST DNA polymerase (TakaraBio社)、Vent DNA polymerase (NEB社)、Deep Vent DNA polymerase (NEB社)、DisplaceAce (登録商標) DNA Polymerase (Epicentre社)等の耐熱性の鎖置換型DNA合成酵素を用いることで行うことができる。

10

【0033】

RCAによるDNAの伸長反応は、サーマルサイクラーを用いる必要はなく、例えば、25～65の範囲の一定の温度において実施される。反応温度は、酵素の至適温度とプライマー鎖長に基づく変性温度(プライマーが鋳型DNAに結合(アニール)/解離する温度帯)に基づいて通常の手順により適宜設定される。さらに、一定の比較的低温においても実施される。例えば、鎖置換型DNA合成酵素としてphi29 DNAポリメラーゼを使用する場合は、好ましくは25～42、より好ましくは約30～37で反応する。RCAによって、標的ポリヌクレオチド11依存的に、プライマー12から一本鎖環状DNA10に沿ってグアニン四重鎖形成配列(配列103に対応)を含む核酸(増幅産物13)が増幅される。増幅産物13はグアニン四重鎖を含む配列104を含んでおり、グアニン四重鎖検出試薬105によって検出される。

20

【0034】

標的ポリヌクレオチドにおけるSNPなどの遺伝子変異のタイプがプライマーに設定した塩基のタイプと一致するとき、すなわち、標的ポリヌクレオチドの変異塩基がプライマーに含まれる変異部位の塩基の相補塩基に該当するときは、増幅反応が起こり、検出試薬で検出されるが、標的ポリヌクレオチドの変異のタイプがプライマーに設定した塩基のタイプと異なるときは増幅反応がほとんど起こらず、検出試薬で検出されない。したがって、本発明の検出方法により、標的ポリヌクレオチドのSNPなどの遺伝子変異のタイプや遺伝子変異の有無が同定できる。

【0035】

なお、上記第一及び第二の態様においては、標的ポリヌクレオチドの第2の領域に変異が含まれるように設計し、変異に対応する塩基を有するプライマーとのハイブリダイゼーションに基づく複合体の安定性に基づいてプライマーからの伸長反応を解析するが、標的ポリヌクレオチドの第1の領域に変異が含まれるように設計し、変異に対応する塩基を有する一本鎖環状DNAとのハイブリダイゼーションに基づく複合体の安定性に基づいてプライマーからの伸長反応を解析する態様も本発明の方法に含まれる。

30

【0036】

<キャプチャーポリヌクレオチドを変異を含む標的ポリヌクレオチドとする場合～第二の態様>

本発明の第二の態様にかかる遺伝子変異検出方法は、

40

第1の領域と、その3'側に隣接した変異を含む第2の領域を含む標的ポリヌクレオチドを用い、

(i) 標的ポリヌクレオチドの第1の領域に相補的な10～30塩基の配列と、

該配列の5'側に隣接した、第1のプライマー結合配列と、

第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列と、

を含む第1の一本鎖環状DNAと、

(ii) 標的ポリヌクレオチドの、第1の領域の3'側に隣接した変異を含む第2の領域に相補的な8～15塩基の配列と、

該配列の3'側に隣接した、第1の一本鎖環状DNAの第1のプライマー結合領域に相補的な配列と、

50

を含む第 1 のオリゴヌクレオチドプライマーと、
 (iii) 第 1 の一本鎖環状 DNA の第 2 の一本鎖環状 DNA 結合配列の相補配列と同一の配列と、
 該配列の 5' 側に隣接した、第 2 のプライマー結合配列と、
 グアニン四重鎖形成配列などの検出試薬結合配列に相補的な配列と、
 を含む、第 2 の一本鎖環状 DNA と、
 (iv) 第 1 の一本鎖環状 DNA の第 2 の一本鎖環状 DNA 結合配列の相補配列の 5' 側に隣接した領域と同一の配列と、
 該配列の 3' 側に隣接した、第 2 の一本鎖環状 DNA の第 2 のプライマー結合配列に相補的な配列と、
 を含む、第 2 のオリゴヌクレオチドプライマーと、
 (v) グアニン四重鎖結合試薬などの検出試薬、とを用いる。

【0037】

< 標的ポリヌクレオチド >

標的ポリヌクレオチドについては、第一の態様で説明したとおりである。

【0038】

< 第 1 の一本鎖環状 DNA >

第 1 の一本鎖環状 DNA は、標的ポリヌクレオチドの第 1 の領域に相補的な 10 ~ 30 塩基の配列と、

該配列の 5' 側に隣接した、好ましくは 7 ~ 8 塩基のプライマー結合配列と、

第 2 の一本鎖環状 DNA 結合配列の相補配列と、

を含む。

なお、標的ポリヌクレオチドが二本鎖 DNA の場合、図 8 の c 2、c 3、c 5 に示すように、第 1 の一本鎖環状 DNA は、標的ポリヌクレオチドの第 1 の領域に相補的な 10 ~ 30 塩基の配列の 3' 側に隣接して、該配列の 3' 末端側と相補的な配列をさらに含むことが好ましい。これにより、二本鎖 DNA の相補鎖がハイブリダイズでき、より複合体が安定化される。

【0039】

図 2 を参照して説明する。

第 1 の一本鎖環状 DNA 20 は標的ポリヌクレオチド 21 の第 1 の領域 211 に相補的な配列 201 と、

その 5' 側に連結したプライマー結合配列 202 と、第 2 の一本鎖環状 DNA 結合配列の相補配列 203 を含む。

配列 201 の長さは、通常、10 ~ 30 塩基であり、好ましくは 15 ~ 25 塩基であり、GC 含量は好ましくは 30 ~ 70 % である。配列 202 の長さは 7 塩基または 8 塩基であり、配列は特に制限されないが、GC 含量は好ましくは 30 ~ 70 % である。第 1 の一本鎖環状 DNA 20 全体の長さは、好ましくは 35 ~ 100 塩基である。第 1 の一本鎖環状 DNA 20 は上述した方法で、一本鎖 DNA (ssDNA) を環状化することによって得ることができる。

【0040】

< 第 1 のオリゴヌクレオチドプライマー >

第 1 のオリゴヌクレオチドプライマー 22 は、標的ポリヌクレオチド 21 の、第 1 の領域 211 の 3' 側に隣接した遺伝子変異を含む第 2 の領域 212 に相補的な 8 ~ 15 塩基の配列 221 と、その 3' 側に連結された、第 1 の一本鎖環状 DNA 20 のプライマー結合領域 202 に相補的な好ましくは 7 ~ 8 塩基の配列 222 と、を含む。

なお、第 1 のオリゴヌクレオチドプライマーにおいては、標的ポリヌクレオチドの第 2 の領域に存在する変異塩基とハイブリダイズする塩基を、標的ポリヌクレオチドの第 2 の領域に相補的な配列 221 の最も 3' 側の位置に有することが好ましい。

例えば、標的ポリヌクレオチドの遺伝子変異が A/G の一塩基多型で、A を検出しようとするときは、A に対応する T が標的ポリヌクレオチド結合配列 221 の最も 3' 側の位置にな

10

20

30

40

50

るように、第 1 オリゴヌクレオチドプライマーを設計することが好ましい。

【 0 0 4 1 】

< 第 2 の一本鎖環状 DNA >

第 2 の一本鎖環状 DNA 2 4 は、第 1 の一本鎖環状 DNA 2 0 の第 2 の一本鎖環状 DNA 結合配列の相補配列 2 0 3 と同一の配列 2 4 1 と、

該配列の 5' 側に隣接した、第 2 のプライマー結合配列 2 4 2 と、

グアニン四重鎖形成配列に相補的な配列 2 4 3 と、

を含む。

配列 2 4 1 の長さは、通常、10 ~ 30 塩基であり、好ましくは 15 ~ 25 塩基であり、GC 含量は好ましくは 30 ~ 70 % である。配列 2 4 2 の長さは 7 塩基または 8 塩基であり

10

、配列は特に制限されないが、GC 含量は好ましくは 30 ~ 70 % である。グアニン四重鎖形成配列に相補的な配列 2 4 3 については、第一の態様で説明したのと同様である。第 2 の一本鎖環状 DNA 2 4 全体の長さは、好ましくは 35 ~ 100 塩基である。第 2 の一本鎖環状 DNA 2 4 は上述した方法で、一本鎖 DNA (ssDNA) を環状化することによって得ることができる。

【 0 0 4 2 】

なお、図 2 では、検出試薬結合配列がグアニン四重鎖形成配列である場合について説明したが、検出試薬結合配列をアプタマー配列もしくは分子ビーコン (FRET を生じさせる蛍光基 (ドナー) と消光基 (アクセプター) を有するヘアピン状のオリゴヌクレオチド) 結合配列とし、検出試薬として、アプタマー結合性発色分子もしくは分子ビーコンを用いて検

20

出することも可能である (ChemBioChem 2007, 8, 1795-1803 ; J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 7430-7433) 。
また、本発明の第二の態様においては、配列非特異的に DNA に結合して蛍光を発する Cyber Gold (商品名) などの核酸染色試薬を検出試薬として用いて増幅された核酸を検出することも可能であるため、第 2 の一本鎖環状 DNA における検出試薬結合配列に相補的な配列の存在は必須ではない。

【 0 0 4 3 】

< 第 2 のオリゴヌクレオチドプライマー >

第 2 のオリゴヌクレオチドプライマー 2 5 は、第 1 の一本鎖環状 DNA 2 0 の第 2 の一本鎖環状 DNA 結合配列の相補配列 2 0 3 の 5' 側に隣接した領域 2 0 4 と同一の配列 2 5 1 (好ましくは 8 ~ 15 塩基の配列) と、該配列の 3' 側に隣接した、第 2 の一本鎖環状 DNA の第 2 のプライマー結合配列 2 4 2 に相補的な配列 2 5 2 (好ましくは 7 ~ 8 塩基の配列) と、を含む。

30

【 0 0 4 4 】

< 増幅方法 >

図 2 に示されるように、まず、標的ポリヌクレオチド 2 1 に第 1 の一本鎖環状 DNA 2 0 およびプライマー 2 2 をハイブリダイズさせて三者の複合体を形成させた後、ローリングサークル増幅 (RCA) 法によって標的ポリヌクレオチドに基づく核酸増幅反応を行う。反応条件等は第一の態様と同様である。

RCA によって、標的ポリヌクレオチド 2 1 依存的に、プライマー 2 2 から第 1 の一本鎖環状 DNA 2 0 に沿って第 1 増幅産物 2 3 が増幅される。

40

【 0 0 4 5 】

増幅産物 2 3 は、第 1 の一本鎖環状 DNA 2 0 の第 2 の一本鎖環状 DNA 結合配列の相補配列 2 0 3 に相補的な配列 2 3 1 を含むため、この配列 2 0 3 と同一の配列 2 4 1 を含む第 2 の一本鎖環状 DNA 2 4 は、第 1 の増幅産物 2 3 の配列 2 3 1 に、配列 2 4 1 を介してハイブリダイズする。

このようにしてできた、第 1 の増幅産物 2 3 と、第 2 の一本鎖環状 DNA の複合体に、第 2 のオリゴヌクレオチドプライマー 2 5 がハイブリダイズして三者の複合体ができる。

【 0 0 4 6 】

すなわち、第 2 のオリゴヌクレオチドプライマー 2 5 は、第 1 の一本鎖環状 DNA 2 0 の第

50

2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列203の5'側に隣接した領域204と同一の配列251を有するので、第1の増幅産物23の、第1の一本鎖環状DNA20の領域204に相補的な領域232に、配列251を介してハイブリダイズする。

また、第2のオリゴヌクレオチドプライマー25は、配列251の3'側に、第2の一本鎖環状DNA24の第2のプライマー結合配列242に相補的な配列252を有するので、第2の一本鎖環状DNA24にも配列252を介してハイブリダイズする。

【0047】

この第1の増幅産物23と、第2の一本鎖環状DNA24と、第2のオリゴヌクレオチドプライマー25との三者複合体から、RCAにより、第2の増幅産物26（伸長鎖）が増幅される。第2の増幅産物26はグアニン四重鎖を含む配列261を含んでおり、グアニン四重鎖検出試薬262によって検出される。第二の態様では、第1の増幅産物23に含まれる領域231のそれぞれに第2の一本鎖環状DNA24がハイブリダイズしてRCA反応が起こるので、検出感度の著しい向上が達せられる。

10

【0048】

そして、標的ポリヌクレオチドのSNPなどの遺伝子変異のタイプがプライマーに設定した塩基のタイプと一致するときは、増幅反応が起こり、検出試薬で検出されるが、標的ポリヌクレオチドの遺伝子変異のタイプがプライマーに設定した塩基のタイプと異なるときは増幅反応がほとんど起こらず、検出試薬で検出されない。

したがって、本発明の検出方法により、標的ポリヌクレオチドのSNPなどの遺伝子変異のタイプまたは遺伝子変異の有無が同定できる。

20

【0049】

<オリゴヌクレオチドプライマーを変異を含む標的ポリヌクレオチドとする場合～第三の態様>

本発明の第三の態様にかかる遺伝子変異の検出方法は、

第1の領域と、その3'側の変異を含む第2の領域を含むmiRNAを標的ポリヌクレオチドとして用い、

(i) miRNAの第2の領域に相補的なmiRNA結合領域とその3'側の第2の領域とグアニン四重鎖などの検出試薬結合配列に相補的な配列を含む一本鎖環状DNAと、

(ii) 一本鎖環状DNAの第2の領域に相補的な鋳型結合配列と

miRNAの第1の領域に相補的なmiRNA結合配列を含むキャプチャーポリヌクレオチドと、

30

(iii) 検出試薬と、

を用いて反応を行う。

【0050】

<標的ポリヌクレオチド>

標的ポリヌクレオチドは、SNPなどの遺伝子変異を含むmiRNAである。miRNAは3'側に変異を有するもの、すなわち、第1の領域と、その3'側の変異を含む第2の領域を含むものを使用する。変異はmiRNAの3'末端または3'末端から1～3塩基以内の位置に存在することが好ましい。miRNAの長さは好ましくは15～30塩基であり、より好ましくは15～25塩基であり、さらに好ましくは15～23塩基である。

【0051】

40

<一本鎖環状DNA>

一本鎖環状DNAは、miRNAの第2の領域に相補的なmiRNA結合領域とその3'側の第2の領域とグアニン四重鎖形成配列などの検出試薬結合配列に相補的な配列を含む。

【0052】

図14を参照し、例を挙げて説明する。なお、一本鎖環状DNAでは、時計回りに5'→3'である。一本鎖環状DNA30は標的miRNA32の第2の領域322に相補的な配列(miRNA結合領域)301と、その3'側に連結した第2の領域302と、グアニン四重鎖形成配列に相補的な配列303を含む。

配列301の長さは、好ましくは7塩基または8塩基であり、配列は特に制限されないが、GC含量は好ましくは30～70%である。第2の領域302の長さは通常、10～30

50

塩基であり、好ましくは 15 ~ 25 塩基であり、GC 含量は好ましくは 30 ~ 70 % である。

一本鎖環状 DNA 30 の、miRNA 32 の第 2 の領域 322 に相補的な miRNA 結合領域 301 は、miRNA の変異（検出対象変異：図 14 の星印）と相補的な塩基を含んでおり、miRNA の変異が検出対象と異なる場合はハイブリダイズしない。したがって、ハイブリダイズの有無により目的変異の有無の検出が可能である。

【0053】

グアニン四重鎖形成配列に相補的な配列 303 はその前後、すなわち、第 2 の領域 302 との間および miRNA 結合領域 301 との間に任意の配列を含んでもよい。一本鎖環状 DNA 30 全体の長さは、好ましくは 35 ~ 100 塩基である。なお、グアニン四重鎖形成配列は他の検出試薬結合配列に置換され得る。また、本発明の第三の態様においては、配列非特異的に DNA に結合して蛍光を発する Cyber Gold（商品名）などの核酸染色試薬を検出試薬として用いて増幅された核酸を検出することも可能であるため、一本鎖環状 DNA における検出試薬結合配列に相補的な配列の存在は必須ではない。

【0054】

< キャプチャーポリヌクレオチド >

キャプチャーポリヌクレオチドは、一本鎖環状 DNA の第 2 の領域に相補的な鑄型結合配列と miRNA の第 1 の領域に相補的な miRNA 結合配列を含む。

図 14 において、キャプチャーポリヌクレオチド 31 は、一本鎖環状 DNA 30 の第 2 の領域 302 に相補的な配列 311 と、miRNA 32 の第 1 の領域 321 に相補的な miRNA 結合配列 312 を含み、配列 311 の長さは通常、10 ~ 30 塩基であり、好ましくは 15 ~ 25 塩基であり、GC 含量は好ましくは 30 ~ 70 % であり、配列 312 の長さは通常、8 ~ 15 塩基であり、GC 含量は好ましくは 30 ~ 70 % である。なお、非特異的増幅を起こさないために、キャプチャーポリヌクレオチドの 3' 末端はリン酸機などで修飾されていることが好ましい。

【0055】

< 増幅方法 >

標的ポリヌクレオチド（miRNA）32 に一本鎖環状 DNA 30 およびキャプチャーポリヌクレオチド 31 をハイブリダイズさせて三者の複合体を形成させた後、ローリングサークル増幅（RCA）法によって標的ポリヌクレオチドに基づく核酸増幅反応を行う。

【0056】

ハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば、一本鎖環状 DNA と標的ポリヌクレオチドとプライマーの組み合わせを検討し、適宜設定できる。

【0057】

RCA によって、標的ポリヌクレオチド（miRNA）32 から一本鎖環状 DNA 30 に沿って増幅産物 33 が増幅される。増幅産物 33 はグアニン四重鎖を含む配列 331 を含んでおり、グアニン四重鎖検出試薬 34 によって検出される。

【0058】

標的ポリヌクレオチドにおける miRNA の変異のタイプが一本鎖環状 DNA の miRNA 結合領域に設定した塩基のタイプと一致するとき、すなわち、標的ポリヌクレオチドの変異塩基が一本鎖環状 DNA に含まれる変異部位の塩基の相補塩基に該当するときは、増幅反応が起こり、検出試薬で検出されるが、標的ポリヌクレオチドの変異のタイプが一本鎖環状 DNA に設定した塩基のタイプと異なるときは増幅反応がほとんど起こらず、検出試薬で検出されない。したがって、本発明の検出方法により、標的ポリヌクレオチドの SNP などの遺伝子変異のタイプや遺伝子変異の有無が同定できる。

【0059】

< オリゴヌクレオチドプライマーを変異を含む標的ポリヌクレオチドとする場合 ~ 第四の態様 >

本発明の第四の態様にかかる遺伝子変異の検出方法は、

第 1 の領域と、その 3' 側の変異を含む第 2 の領域を含む miRNA を標的ポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

として用い、

(i) miRNAの第2の領域に相補的なmiRNA結合領域とその3'側の第2の領域と、第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列と、を含む第1の一本鎖環状DNA、

(ii) 一本鎖環状DNAの第2の領域に相補的な鑄型結合配列と、miRNAの第1の領域に相補的なmiRNA結合配列を含むキャプチャーポリヌクレオチド、

(iii) 第1の一本鎖環状DNAの第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列と同一の配列と、該配列の5'側に隣接した、第2のプライマー結合配列と、検出試薬結合配列に相補的な配列と、を含む第2の一本鎖環状DNA、

(iv) 第1の一本鎖環状DNAの第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列の5'側に隣接した領域と同一の配列と、該配列の3'側に隣接した、第2の一本鎖環状DNAの第2のプライマー結合配列に相補的な配列とを含む第2のオリゴヌクレオチドプライマー、とを用いる。

10

【0060】

<標的ポリヌクレオチド>

標的ポリヌクレオチドとキャプチャーポリヌクレオチドについては、第三の態様で説明したとおりである。

【0061】

<第1の一本鎖環状DNA>

一本鎖環状DNAは、miRNAの第2の領域に相補的なmiRNA結合領域とその3'側の第2の領域と第2の一本鎖環状DNA結合配列相補配列を含む。

20

miRNAの第2の領域に相補的なmiRNA結合領域はmiRNAの変異部分に相補的な配列を含んでおり、ハイブリダイズの有無により変異の有無の検出が可能である。

【0062】

図15を参照し、例を挙げて説明する。なお、一本鎖環状DNAでは、時計回りに5'→3'である。一本鎖環状DNA40は標的miRNA42の第2の領域422に相補的な配列(miRNA結合領域)401と、その3'側に連結した第2の領域402と、第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列403を含む。

【0063】

配列401の長さは、好ましくは7塩基または8塩基であり、配列は特に制限されないが、GC含量は好ましくは30~70%である。配列402の長さは通常、10~30塩基であり、好ましくは15~25塩基であり、GC含量は好ましくは30~70%である。第1の一本鎖環状DNA40全体の長さは、好ましくは35~100塩基である。第1の一本鎖環状DNA40は上述した方法で、一本鎖DNA(ssDNA)を環状化することによって得ることができる。

30

【0064】

<第2の一本鎖環状DNA>

第2の一本鎖環状DNA44は、第1の一本鎖環状DNA40の第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列403と同一の配列441と、該配列の5'側に隣接した、第2のプライマー結合配列442と、グアニン四重鎖形成配列に相補的な配列443と、を含む。

配列441の長さは、通常、10~30塩基であり、好ましくは15~25塩基であり、GC含量は好ましくは30~70%である。配列442の長さは好ましくは7塩基または8塩基であり、配列は特に制限されないが、GC含量は好ましくは30~70%である。グアニン四重鎖形成配列に相補的な配列443については、第一の態様で説明したのと同様である。第2一本鎖環状DNA44全体の長さは、好ましくは35~100塩基である。第2の一本鎖環状DNA44は上述した方法で、一本鎖DNA(ssDNA)を環状化することによって得ることができる。

40

【0065】

なお、図15では、検出試薬結合配列がグアニン四重鎖形成配列である場合について説明したが、検出試薬結合配列をアプタマー配列もしくは分子ビーコン(FRETを生じさせる蛍光基(ドナー)と消光基(アクセプター)を有するヘアピン状のオリゴヌクレオチド)結

50

合配列とし、検出試薬として、アプタマー結合性発色分子もしくは分子ビーコンを用いて検出することも可能である (ChemBioChem 2007, 8, 1795-1803; J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 7430-7433)。また、上述したとおり、本発明の第四の態様においては、配列非特異的にDNAに結合して蛍光を発するCyber Gold (商品名)などの核酸染色試薬を検出試薬として用いて増幅された核酸を検出することも可能であるため、第2の一本鎖環状DNAにおける検出試薬結合配列に相補的な配列の存在は必須ではない。

【0066】

<第2のオリゴヌクレオチドプライマー>

第2のオリゴヌクレオチドプライマー45は、第1の一本鎖環状DNA40の第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列403の5'側に隣接した領域404と同一の配列451(好ましくは8~15塩基の配列)と、該配列の3'側に隣接した、第2の一本鎖環状DNAの第2のプライマー結合配列442に相補的な配列452(好ましくは7~8塩基の配列)と、を含む。

10

【0067】

<増幅方法>

図15に示されるように、まず、標的ポリヌクレオチド(miRNA)42に、キャプチャーオリゴヌクレオチド41および第1の一本鎖環状DNA40をハイブリダイズさせて三者の複合体を形成させた後、ローリングサークル増幅(RCA)法によって標的ポリヌクレオチドに基づく核酸増幅反応を行う。反応条件等は第一の態様と同様である。

RCAによって、標的ポリヌクレオチド(miRNA)42依存的に、第1の一本鎖環状DNA40に沿って第1増幅産物43が増幅される。

20

【0068】

増幅産物43は、第1の一本鎖環状DNA40の第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列403に相補的な配列431を含むため、この配列403と同一の配列441を含む第2の一本鎖環状DNA44は、第1の増幅産物43の配列431に、配列441を介してハイブリダイズする。

【0069】

このようにしてできた、第1の増幅産物43と、第2の一本鎖環状DNAの複合体に、第2のオリゴヌクレオチドプライマー45がハイブリダイズして三者の複合体ができる。

【0070】

30

すなわち、第2のオリゴヌクレオチドプライマー45は、第1の一本鎖環状DNA40の第2の一本鎖環状DNA結合配列の相補配列403の5'側に隣接した領域404と同一の配列451を有するので、第1の増幅産物43の、第1の一本鎖環状DNA40の領域404に相補的な領域432に、配列451を介してハイブリダイズする。

また、第2のオリゴヌクレオチドプライマー45は、配列451の3'側に、第2の一本鎖環状DNA44の第2のプライマー結合配列442に相補的な配列452を有するので、第2の一本鎖環状DNA44にも配列452を介してハイブリダイズする。

【0071】

この第1の増幅産物43と、第2の一本鎖環状DNA44と、第2のオリゴヌクレオチドプライマー45との三者複合体から、RCAにより、第2の増幅産物46(伸長鎖)が増幅される。第2の増幅産物46はグアニン四重鎖を含む配列461を含んでおり、グアニン四重鎖検出試薬462によって検出される。第四の態様では、第1の増幅産物43に含まれる領域431のそれぞれに第2の一本鎖環状DNA44がハイブリダイズしてRCA反応が起こるので、検出感度の著しい向上が達せられる。

40

【0072】

そして、標的ポリヌクレオチドのSNPなどの遺伝子変異のタイプがプライマーに設定した塩基のタイプと一致するときは、増幅反応が起こり、検出試薬で検出されるが、標的ポリヌクレオチドの遺伝子変異のタイプがプライマーに設定した塩基のタイプと異なるときは増幅反応がほとんど起こらず、検出試薬で検出されない。

したがって、本発明の検出方法により、標的ポリヌクレオチドのSNPなどの遺伝子変異の

50

タイプまたは遺伝子変異の有無が同定できる。

【 0 0 7 3 】

< 検出試薬 >

本発明の方法においては、配列非特異的にDNAに結合して蛍光を発するCyber Gold（商品名）などの核酸染色試薬を検出試薬として用いることもできるが、特異的かつ好感度に検出するためには、特定の核酸配列（検出試薬結合配列）に結合して発光又は発色する分子が好ましい。

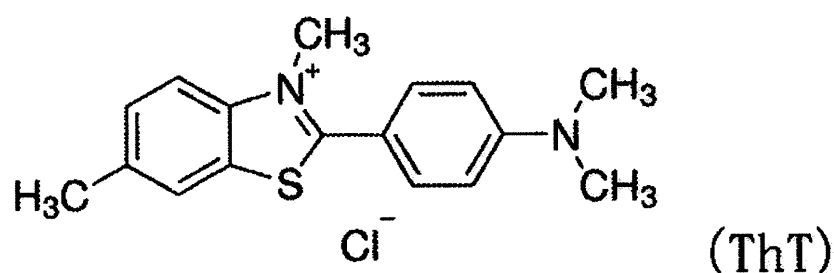
上記の通り、検出試薬結合配列と検出試薬の組み合わせは任意に決定でき、アプタマー配列とアプタマー結合性発色分子の組み合わせ、分子ビーコン結合配列と分子ビーコンの組み合わせ、特異的配列とそれにハイブリダイズする標識プローブの組み合わせなどを用い

10

てもできるが、好ましくはグアニン四重鎖とグアニン四重鎖結合試薬の組み合わせである。グアニン四重鎖結合試薬としては、以下のような試薬が挙げられる。

[1] チオフラビンT (ThT) またはその誘導体

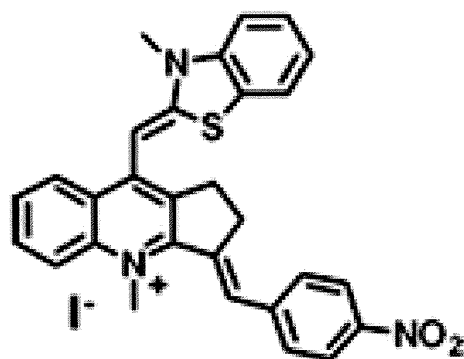
【化1】



20

[2] H-aggregate 『Yan, J. W.; Ye, W. J.; Chen, S. B.; Wu, W. B.; Hou, J. Q.; Ou, T. M.; Tan, J. H.; Li, D.; Gu, L. Q.; Huang, Z. S. Anal. Chem. 2012, 84, 6288-6292.』

【化2】

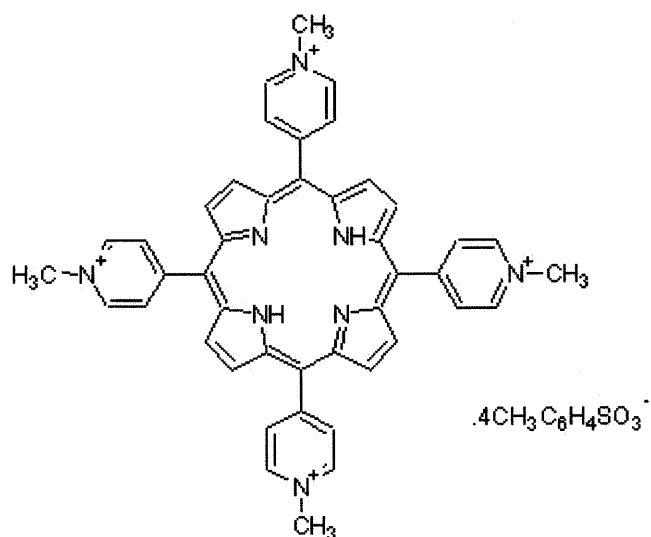


30

[3] TMPyP4 『Yaku, H.; Fujimoto, T.; Murashima, T.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N. Chem. Commun. 2012, 48, 6203-6216.』

40

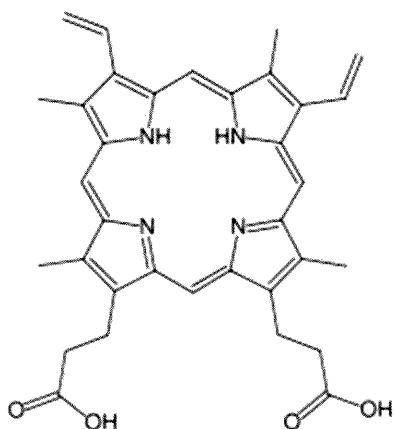
【化 3】



10

[4] PPIX 『Li, T.; Wang, E.; Dong, S. Anal. Chem. 2010, 82, 7576-7580.』

【化 4】



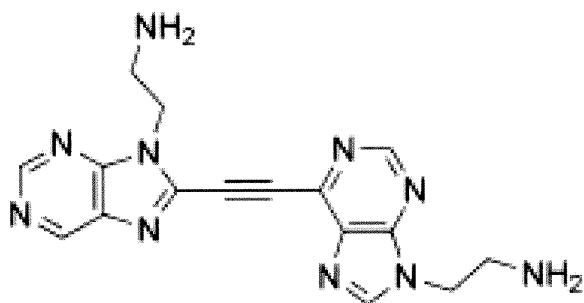
20

30

[5] BPBC 『Jin, B.; Zhang, X.; Zheng, W.; Liu, X.; Qi, C.; Wang, F.; Shangguan, D. Anal. Chem. 2014, 86, 943-952.』

[6] APD 『Nikan, M.; Di Antonio, M.; Abecassis, K.; McLuckie, K.; Balasubramanian, S. Angew. Chem., Int. Ed. 2013, 52, 1428-1431.』

【化 5】



40

[7] チアゾールオレンジ (TO)

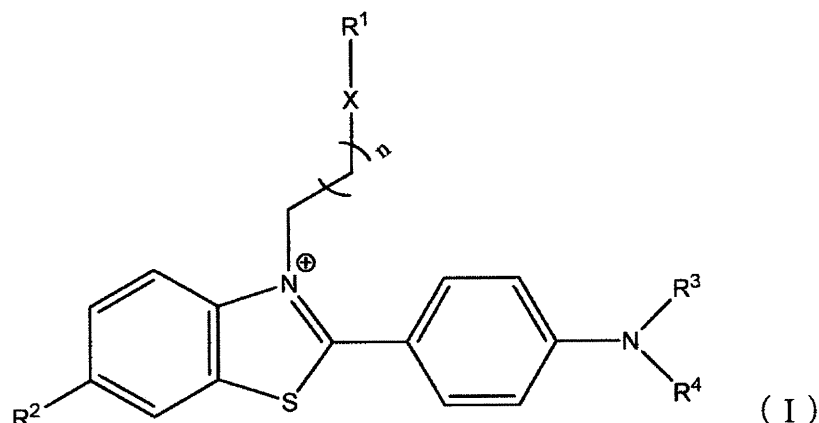
『Nakayama S.; Kelsey I.; Wang J.; Roelofs K.; Stefane B.; Luo Y.; Lee V. T.; Sinti H. O. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 4856-4864.』

50

【 0 0 7 4 】

好ましくは、以下の一般式 (I) で示される T h T 誘導体が使用できる (Anal. Chem. 2014, 86, 12078-12084)。特開2016-079132。

【 化 6 】



ここで、 R^1 は水素、またはO、SおよびNから選ばれる1種類以上を含んでもよい炭素数1～10（好ましくは1～5）の炭化水素基を示す。炭化水素基は直鎖でも分岐鎖でもよいし、飽和でも不飽和でもよく、アルキル基などの脂肪族炭化水素基でもよいし、アリール基やアリールアルキル基などの芳香族炭化水素基でもよい。「O、SおよびNから選ばれる1種類以上を含んでいてもよい」とは、炭化水素基が、アミノ基（ $-NR_2$ ）（Rは独立して水素または炭素数1～5のアルキル基）、ニトロ基（ $-NO_2$ ）、シアノ基（ $-CN$ ）、イソシアネート基（ $-NCO$ ）、ヒドロキシル基（ $-OH$ ）、アルデヒド基（ $-CHO$ ）、カルボキシル基（ $-COOH$ ）、メルカプト基（ $-SH$ ）、スルホン酸基（ $-SO_3H$ ）等の窒素原子、酸素原子、硫黄原子等を含む官能基を含んでいてもよいことを意味するほか、エーテル基（ $-O-$ ）、イミノ基（ $-NH-$ ）、チオエーテル基（ $-S-$ ）、カルボニル基（ $-C(=O)-$ ）、アミド基（ $-C(=O)-NH-$ ）、エステル基（ $-C(=O)-O-$ ）、チオエステル基（ $-C(=O)-S-$ ）等の窒素原子、酸素原子、硫黄原子等を含む連結基が炭化水素基の炭素骨格の内部又は末端に含まれていてもよいことを意味する。

【 0 0 7 5 】

R^2 、 R^3 、 R^4 はそれぞれ独立して炭素数1～5の（脂肪族）炭化水素基を示し、より好ましくは炭素数1～3の炭化水素基を示し、メチル基が特に好ましい。炭素数1～5の炭化水素基は直鎖でも分岐鎖でもよいし、飽和でも不飽和でもよい。

【 0 0 7 6 】

n は0～5の整数を示し、より好ましくは0～3の整数を示し、特に好ましくは1である。 X はO、SまたはNHを示し、より好ましくはOである。

【 0 0 7 7 】

具体的には以下のような化合物が例示される。

10

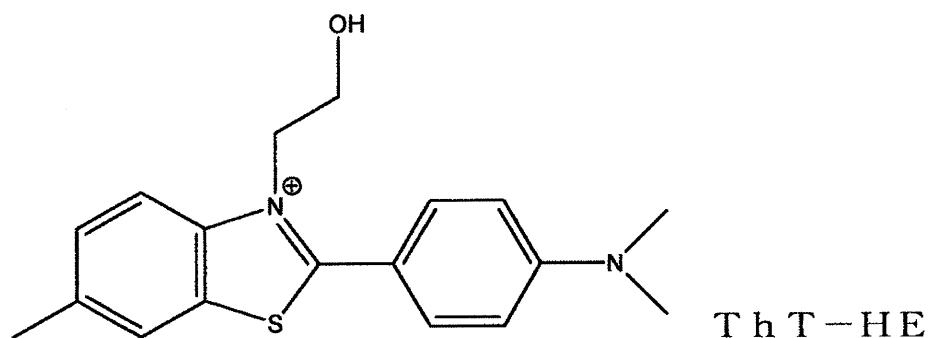
20

30

40

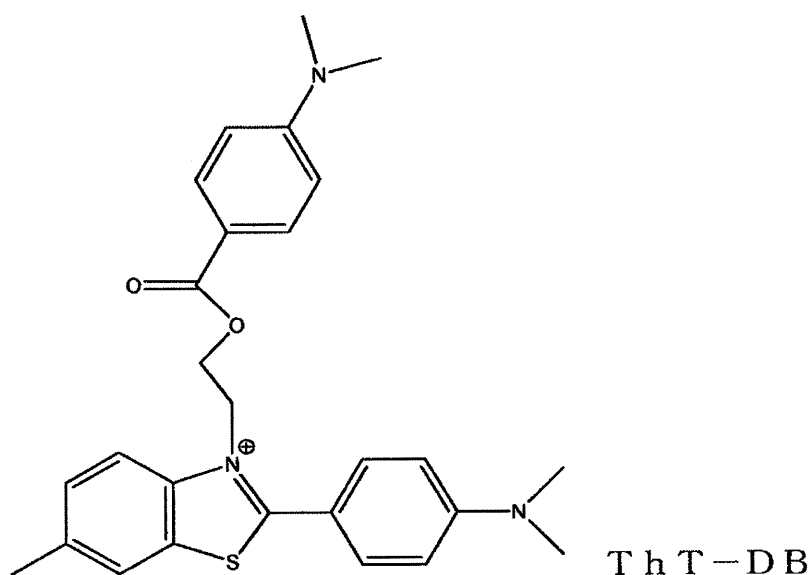
50

【化 7】



10

【化 8】



20

30

【 0 0 7 8】

検出は、例えば、一般式（I）で示される化合物又はその塩と、RCA産物を含む試料を接触させ、グアニン四重鎖構造に結合した化合物を、化合物が発する蛍光に基づいて検出することにより、被検DNA中のグアニン四重鎖構造を検出することができる。検出操作自体は、一般式（I）で示される化合物又はその塩を用いる点を除けば、公知の方法と同様であり、化合物を緩衝液中に溶解した溶液を、被検DNAを含む試料と接触させ、インキュベーション後、洗浄し、洗浄後に被検DNAと結合している蛍光色素の蛍光を検出することにより行うことができる。

【実施例】

【 0 0 7 9】

以下、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明は以下の実施例の態様には限定されない。

【 0 0 8 0】

40

50

【表 1】

表 1. オリゴヌクレオチドの配列表

	鎖長 (mer)	Sequence (5' → 3')
DNA プライマー(1)	18	GGATCAGGCCATTTTGG (配列番号 1)
DNA プライマー(2)	18	GGATCATGCCATTTTGG (配列番号 2)
DNA プライマー(3)	18	GGATCAGTCCATTTTGG (配列番号 3)
DNA プライマー(4)	18	GGATCAGGACATTTTGG (配列番号 4)
DNA プライマー(5)	18	GGATCAGGCAATTTTGG (配列番号 5)
DNA プライマー(6)	18	GGATCAGGCCTTTTGG (配列番号 6)
DNA プライマー(7)	18	GAAGCTGTTGTTACT (配列番号 7)
DNA プライマー(8)	17	GGATCAGGCCATTTTG (配列番号 16)
DNA プライマー(9)	18	GGATCAGGCCATTTTAG (配列番号 17)
DNA プライマー(10)	18	GGATCAGGCCATTTTGG (配列番号 18)
DNA プライマー(11)	18	GGATCAGGCCATTTTGA (配列番号 19)
DNA テンプレート (1)	67	CCCCAAAAGGAGCTTGAGGTTCTCCTTTAAAAAGAAGCTGTTGTATTGTTG TCGAAGAAGAAAAGT (配列番号 8)
DNA テンプレート (2)	62	CCCAACCCTACCCACCCTCAAGAAAAAAGTGATAATTGTTGTCGAAGAAG AAAAAAATT (配列番号 9)
DNA テンプレート (3)	70	CCCCAAAAGGAGCTTGAGGTTCTCCTTTAAAGGAAAGAAGCTGTTGTATTG TTGTCGAAGAAGAAAAGT (配列番号 20)
DNA テンプレート (4)	73	CCCCAAAAGGAGCTTGAGGTTCTCCTTTAAAGGAGAAAAGAAGCTGTTGTA TTGTTGTCGAAGAAGAAAAGT (配列番号 21)
DNA テンプレート (5)	76	CCCCAAAAGGAGCTTGAGGTTCTCCTTTAAAGGAGAACCTAAGAAGCTGTT GTATTGTTGTCGAAGAAGAAAAGT (配列番号 22)
DNA テンプレート (6)	55	CCCTAAAAAGGAGCTTGAGGTTCTCCTTTAAACCTTCCCCACCCTCCCCACCCT (配列番号 23)
DNA テンプレート (7)	55	CCCCAAAAGGAGCTTGAGGTTCTCCTTTAAACCTTCCCCACCCTCCCCACCCT (配列番号 24)
DNA テンプレート (8)	55	CCTCAAAAAGGAGCTTGAGGTTCTCCTTTAAACCTTCCCCACCCTCCCCACCCT (配列番号 25)
DNA テンプレート (9)	55	CCCCAAAAGGAGCTTGAGGTTCTCCTTTAAACCTTCCCCACCCTCCCCACCCT (配列番号 26)
ターゲット RNA(1)	40	GGGUUGGCCAAAGGAGAACCUCAGCUCUGGCCUGAUCC (配列番号 10)
ターゲット RNA(2)	40	GGGUUGGCCAAAGGAGAACCUCAGCUCAGGCCUGAUCC (配列番号 11)
no ターゲット RNA	39	GGCCUGGAGGAGGUCUUUGCAGGUCCCCUCUGGAAA (配列番号 12)
ターゲット DNA(1)	40	GGGTTGGCCAAAGGAGAACCTCAAGCTCCTGGCCTGATCC (配列番号 13)
ターゲット DNA(2)	40	GGGTTGGCCAAAGGAGAACCTCAAGCTCAGGCCTGATCC (配列番号 14)
Complementary DNA	40	GGATCAGGCCAGGAGCTTGAGGTTCTCCTTTGGCCAACCC (配列番号 15)

DNAプライマー(2)は、DNAプライマー(1)の7塩基目のG(7G)をTに変えた配列
 DNAプライマー(3)は、DNAプライマー(1)の8塩基目のG(8G)をTに変えた配列
 DNAプライマー(4)は、DNAプライマー(1)の9塩基目のC(9C)をAに変えた配列
 DNAプライマー(5)は、DNAプライマー(1)の10塩基目のC(10C)をAに変えた配列
 DNAプライマー(6)は、DNAプライマー(1)の11塩基目のA(11A)をTに変えた配列
 DNAテンプレート(1)~(9)は、環状化してある。

ターゲットRNA(2)は、ターゲットRNA(1)の30塩基目のU(30U)をAに変えた配列
 ターゲットDNA(2)は、ターゲットDNA(1)の30塩基目のT(30T)をAに変えた配列
 Complementary DNAは、ターゲットDNA(1)と相補的な配列

【 0 0 8 1 】

[1] DNAテンプレートの環化

(1) 5 μ Mの1本鎖DNA(Cid Pre T : 67mer, Cid Mai T : 62mer)を20 μ L(最終濃度0.5 μ M)、10 $\times$ 添付Bufferを20 μ L、50mM MnCl₂を10 μ L(最終濃度2.5mM)、5M Beati ne 40 μ L(最終濃度1M)、100U/ μ LのCircLigase (Epicentre Technologies, WI, U SA)を10 μ L(最終濃度5U/ μ L)、水100 μ Lを混合した(計200 μ L)。

(2) 60 °で24時間インキュベートさせた。

(3) PAGE精製を行った。

【 0 0 8 2 】

[2] 反応溶液の調製

10

[実施例1]プライマーの1塩基ミスマッチ

a1~a7の調製(表2)

100nMのDNAテンプレート(1) 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート(2) 2 μ L(最終濃度40nM)、水または120nMのDNAプライマー(1)~(6)のいずれか(表2参照) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー(7) 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase (New England Biolabs) 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水4 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【 0 0 8 3 】

b1~b7の調製(表2)

20

100nMのDNAテンプレート(1) 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート(2) 2 μ L(最終濃度40nM)、水または120nMのDNAプライマー(1)~(6)のいずれか(表2参照) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー(7) 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー 2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、10nMターゲットRNA(1) 2 μ L(最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【 0 0 8 4 】

c1~c7の調製(表2)

100nMのDNAテンプレート(1) 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート(2) 2 μ L(最終濃度40nM)、水または120nMのDNAプライマー(1)~(6)のいずれか(表2参照) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー(7) 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー 2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、10nM noターゲットRNA 2 μ L(最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

30

【 0 0 8 5 】

[実施例2]ターゲットのDNA/RNAの違いと1塩基ミスマッチ

a1~a6の調製(表3)

100nMのDNAテンプレート(1) 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート(2) 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのDNAプライマー(1) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー(7)2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水または10nMのRNA 2 μ L(表3参照)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

40

【 0 0 8 6 】

b1~b6およびa2, b1, b2, b4-b6の調製(表3、4)

100nMのDNAテンプレート(1) 10 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート(2) 10 μ L(最終濃度40nM)、120nMのDNAプライマー(1) 10 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー(7) 10 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー 10 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 10 μ L、10mMのdNTPs 10 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 10 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水または10nMのDNA 10 μ L(表3、4参照)、水10 μ L

50

を混合した(計100 μ L)。

なお、b5とb6の二重鎖DNAは事前にDenatureとAnnealingを行って二重鎖を形成した物を使用している。

【0087】

[実施例3]ターゲットが二重鎖DNAにおける環状テンプレートの最適化

a1～a5の調製(表5)

100nMのDNAテンプレート(1)、(3)、(4)または(5)のいずれか(表5参照) 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート(2) 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのDNAプライマー(1) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー(7) 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水4 μ Lを混合した(計20 μ L)。

10

【0088】

b1～b5の調製(表5)

100nMのDNAテンプレート(1)、(3)、(4)または(5)のいずれか(表5参照) 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート(2) 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのDNAプライマー(1) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー(7) 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、10nMターゲットDNA(1)(最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)

20

【0089】

c1～c5の調製(表5)

100nMのDNAテンプレート(1)、(3)、(4)または(5)のいずれか(表5参照) 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート(2) 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのDNAプライマー(1) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー(7) 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、10nM二重鎖DNA(ターゲットDNA(1)とComplementary DNA) 2 μ L(最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)

【0090】

d1～d5の調製(表5)

100nMのDNAテンプレート(1)、(3)、(4)または(5)のいずれか(表5参照) 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート(2) 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのDNAプライマー(1) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー(7) 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、10nM Complementary DNA(最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【0091】

[実施例4]3者複合体のプライマーの最適化

a1～a5の調製(表7)

400nMのDNAテンプレート(6)～(9)のいずれか(表7参照) 2 μ L(最終濃度40nM)、480nMのDNAプライマー(1)、(8)～(11)のいずれか(表7参照) 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水8 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【0092】

b1～b5の調製(表7)

400nMのDNAテンプレート(6)～(9)のいずれか(表7参照) 2 μ L(最終濃度40nM)、480nMのDNAプライマー(1)、(8)～(10)のいずれか(表7参照) 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、800nMターゲットRNA(1) 2

40

50

μL(最終濃度80nM)、水6μLを混合した(計20μL)。

【0093】

c1~c5の調製(表7)

400nMのDNAテンプレート(6)~(9)のいずれか(表7参照) 2μL(最終濃度40nM)、480nMのDNAプライマー(1)、(8)~(10)のいずれか(表7参照) 2μL(最終濃度48nM)、10×添付バッファー2μL、10×添付BSA溶液 2μL、10mMのdNTPs 2μL(最終濃度1mM)、1U/μLのPhi29 Polymerase 2μL(最終濃度0.1U/μL)、800nM no target RNA 2μL(最終濃度80nM)、水6μLを混合した(計20μL)。

【0094】

[3] 反応

上記で調製した溶液を37℃で2時間インキュベートさせた。

【0095】

[4] 検出

視覚的検出

各反応溶液 8μLに5×PBS153NMバッファー(50 mM HPO₄²⁻, 730 mM Cl⁻, 765 mM Na⁺, 13.5 mM K⁺, 12.5 mM Mg²⁺+pH 7.4)を2μL加えた。

・混合溶液10μLと蛍光色素(1×PBS153NMバッファーに溶けた30μM ThT誘導体(THT-HE 特開2016-079132)溶液、最終濃度(5μM))を2μL混合させて25℃で30分インキュベートさせた。

・調製した溶液に410nmのUVランプを照射してカットフィルター(460nmより短波長をカットする)を装着したカメラで撮影した。

【0096】

蛍光分光光度計による測定

・4.の反応液50μLに5×PBS153NMバッファーを20μL、水30μLを加えた。

・混合溶液100μLと蛍光色素(1×PBS153NMバッファーに溶けた30μM ThT誘導体溶液、最終濃度(5μM))を20μL混合させて25℃で30分インキュベートさせた。

・蛍光分光光度計で励起波長412nm, 測定波長430nm-650nmの条件で溶液の蛍光強度を測定した。

【0097】

結果

[実施例1]プライマーの1塩基ミスマッチ

表2の各反応組成にて、DNAプライマー(1)とターゲットRNA(1)がハイブリダイゼーションする箇所を1塩基ずつミスマッチとなるように(図3)して、反応進行の変化を検証した。

結果は、図4に示すように、DNAプライマー(1)、ターゲットRNA(1)、テンプレートDNA(1)の三者複合体の根元に近づくにつれ顕著に反応の進行が妨げられることが分かった。

【0098】

10

20

30

40

50

【表 2】

表2

	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7
ターゲットRNA①	-	-	-	-	-	-	-
No ターゲットRNA	-	-	-	-	-	-	-
DNAプライマー①	-	+	-	-	-	-	-
DNAプライマー②	-	-	+	-	-	-	-
DNAプライマー③	-	-	-	+	-	-	-
DNAプライマー④	-	-	-	-	+	-	-
DNAプライマー⑤	-	-	-	-	-	+	-
DNAプライマー⑥	-	-	-	-	-	-	+
DNAテンプレート①	+	+	+	+	+	+	+
DNAプライマー⑦	+	+	+	+	+	+	+
DNAテンプレート②	+	+	+	+	+	+	+

	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7
ターゲットRNA①	+	+	+	+	+	+	+
No ターゲットRNA	-	-	-	-	-	-	-
DNAプライマー①	-	+	-	-	-	-	-
DNAプライマー②	-	-	+	-	-	-	-
DNAプライマー③	-	-	-	+	-	-	-
DNAプライマー④	-	-	-	-	+	-	-
DNAプライマー⑤	-	-	-	-	-	+	-
DNAプライマー⑥	-	-	-	-	-	-	+
DNAテンプレート①	+	+	+	+	+	+	+
DNAプライマー⑦	+	+	+	+	+	+	+
DNAテンプレート②	+	+	+	+	+	+	+

	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7
ターゲットRNA①	-	-	-	-	-	-	-
No ターゲットRNA	+	+	+	+	+	+	+
DNAプライマー①	-	+	-	-	-	-	-
DNAプライマー②	-	-	+	-	-	-	-
DNAプライマー③	-	-	-	+	-	-	-
DNAプライマー④	-	-	-	-	+	-	-
DNAプライマー⑤	-	-	-	-	-	+	-
DNAプライマー⑥	-	-	-	-	-	-	+
DNAテンプレート①	+	+	+	+	+	+	+
DNAプライマー⑦	+	+	+	+	+	+	+
DNAテンプレート②	+	+	+	+	+	+	+

【 0 0 9 9 】

[実施例2] ターゲットのDNA/RNAの違いと1塩基ミスマッチ

表3の各反応組成にて、ターゲットRNA(1)に三者複合体の根元部分の箇所ミスマッチ(30U→A)に変異させたターゲットを用いて反応の進行を検証した(図5)。また、ターゲットがDNAの場合でも本法で検出できるか検証した。

結果は、ターゲットRNAにミスマッチがある場合(図6 a4)、顕著に反応の進行が阻害されていることが分かった。

また、ターゲットがDNAになった場合でも図6のb3を見ると検出可能であることが分かった。ターゲットRNAで行ったように1塩基ミスマッチがあるターゲットDNA(図6 b4)では、RNA同様に顕著に反応の進行が阻害されることが分かった。一般に体内でDNAは2重鎖で存在することが多い。そのため、ターゲットDNAと相補的な配列を持つComplementary DNAとの二重鎖をターゲットとした場合でも検出可能か検証した(図6 b5)。結果は、1本鎖のDNAと比べて蛍光強度は弱いですが、ターゲットではないDNA(図6 b3)または、ターゲットDNA(2)の1塩基ミスマッチ(図6 b4)に比べて明らかに発光しており、十分検出可能な範囲であることが示唆される。一方で、ターゲットDNA(2)の1塩基ミスマッチとComplementary DNAとの二重鎖をターゲットとした場合(図6 b6)では、反応の進行が阻害

されていることが分かった。

【 0 1 0 0 】

【表 3】

表3

	a1	a2	a3	a4	a5	a6
ターゲットRNA①	-	+	-	-		
No ターゲットRNA	-	-	+	-		
ターゲットRNA②	-	-	-	+		
ターゲットDNA①	-	-	-	-		
ターゲットDNA②	-	-	-	-		
Complementary DNA	-	-	-	-		
DNAプライマー①	+	+	+	+		
DNAテンプレート①	+	+	+	+		
DNAプライマー⑦	+	+	+	+		
DNAテンプレート②	+	+	+	+		

	b1	b2	b3	b4	b5	b6
ターゲットRNA①	-	-	-	-	-	-
No ターゲットRNA	-	-	-	-	-	-
ターゲットRNA②	-	-	-	-	-	-
ターゲットDNA①	-	+	-	-	+	-
Complementary DNA	-	-	+	-	+	+
ターゲットDNA②	-	-	-	+	-	+
DNAプライマー①	+	+	+	+	+	+
DNAテンプレート①	+	+	+	+	+	+
DNAプライマー⑦	+	+	+	+	+	+
DNAテンプレート②	+	+	+	+	+	+

【 0 1 0 1 】

表 4 の各反応組成にて、二重鎖DNAを標的にした際の蛍光と1本鎖DNAを標的とした場合と比較し、同じ性質のものであるか蛍光分光光度計を用いて検討した(図 7)。

結果は、蛍光スペクトルのピークトップはほぼ同じ波長であり、また、反応が進行することで蛍光強度が増大されているので、同様の性質を持つことが示唆される。

【 0 1 0 2 】

【表 4】

表4

	b1	a2	b2	b4	b5	b6
ターゲットRNA①	-	+	-	-	-	-
ターゲットDNA①	-	-	+	-	+	-
ターゲットDNA②	-	-	-	+	-	+
Complementary DNA	-	-	-	-	+	+
DNAプライマー①	+	+	+	+	+	+
DNAテンプレート①	+	+	+	+	+	+
DNAプライマー⑦	+	+	+	+	+	+
DNAテンプレート②	+	+	+	+	+	+

【 0 1 0 3 】

[実施例3]ターゲットが二重鎖DNAにおける環状テンプレートの最適化

二重鎖DNAをターゲットとする場合二重鎖を解離して三者複合体を形成する必要がある。ターゲットDNAとDNAテンプレートの結合を促進するためにDNAテンプレートにターゲットDNAと相補的な配列(表5: Complementary DNA)とハイブリダイゼーションする配列をDNAテンプレート(1)に3塩基ずつ増やしていった(図8)。

これを用いて表5の各反応組成にて反応を行ったところ、図9に示すように、ssDNA(ターゲットDNA(1))では、挿入数が多くなるにつれて反応の進行が妨げられていることが分かった。これは、Complementary DNAが存在しない場合、DNAテンプレート内でステムを組みやすくなりテンプレートとターゲットの結合が阻害されるためと考えられる。

一方で、dsDNAにおいては、挿入数が多くなるごとに反応の進行が促進されていることが分かった。このことから、ターゲットがdsDNAにおいてテンプレート内にComplementary DNAと相補的な配列を適切な数を入れることで反応が促進される。

【 0 1 0 4 】

10

20

30

40

50

【表 5】

表5

	a1	a2	a3	a4	a5
ターゲットDNA①	-	-	-	-	-
Complementary DNA	-	-	-	-	-
DNAプライマー①	+	+	+	+	+
DNAテンプレート①	-	+	-	-	-
DNAテンプレート③	-	-	+	-	-
DNAテンプレート④	-	-	-	+	-
DNAテンプレート⑤	-	-	-	-	+
DNAプライマー⑦	+	+	+	+	+
DNAテンプレート②	+	+	+	+	+

	b1	b2	b3	b4	b5
ターゲットDNA①	+	+	+	+	+
Complementary DNA	-	-	-	-	-
DNAプライマー①	+	+	+	+	+
DNAテンプレート①	-	+	-	-	-
DNAテンプレート③	-	-	+	-	-
DNAテンプレート④	-	-	-	+	-
DNAテンプレート⑤	-	-	-	-	+
DNAプライマー⑦	+	+	+	+	+
DNAテンプレート②	+	+	+	+	+

	c1	c2	c3	c4	c5
ターゲットDNA①	+	+	+	+	+
Complementary DNA	+	+	+	+	+
DNAプライマー①	+	+	+	+	+
DNAテンプレート①	-	+	-	-	-
DNAテンプレート③	-	-	+	-	-
DNAテンプレート④	-	-	-	+	-
DNAテンプレート⑤	-	-	-	-	+
DNAプライマー⑦	+	+	+	+	+
DNAテンプレート②	+	+	+	+	+

	d1	d2	d3	d4	d5
ターゲットDNA①	-	-	-	-	-
Complementary DNA	+	+	+	+	+
DNAプライマー①	+	+	+	+	+
DNAテンプレート①	-	+	-	-	-
DNAテンプレート③	-	-	+	-	-
DNAテンプレート④	-	-	-	+	-
DNAテンプレート⑤	-	-	-	-	+
DNAプライマー⑦	+	+	+	+	+
DNAテンプレート②	+	+	+	+	+

【 0 1 0 5 】

[実施例4]三者複合体のプライマーの最適化

これまでに、DNAプライマーが17mer(DNAプライマー(8))のときは、反応が進行しないことが分かっていた。二重鎖DNAの安定はDNAの長さとその配列に依存する。そこで反応が進行するDNAプライマー(1)(18mer)と反応が進行しないDNAプライマー(8)の中間の安定さを配列を変化させることでDNAプライマーの最適化を行った。

今回は、DNAプライマー(1)をベースに3'末端2残基を変化させた。二重鎖の安定性は、Nearestneighbor thermodynamicsによるとDNAプライマー(1) (11) (10) (9) (8)の順に安定である(表6)。

10

20

30

40

50

表 7 の各反応組成にて反応を行ったところ (図 1 0) 、結果は図 1 1 に示すように、DNA プライマー (9) では、反応が進行しなかったが (10)、(11) では反応が進行した。反応が進行するか否かの境界は DNA プライマー (9) と (10) の間であることが分かった。よって、プライマーとテンプレート二重鎖の ΔG^0_{37} は -3.8 未満が好ましいと考えられた。

【 0 1 0 6 】

【表 6】

表 6 Nearestneighbor thermodynamics から求められたプライマーとテンプレート二重鎖の ΔG^0_{37}

プライマー/テンプレート	ΔG^0_{37} (kcal/mol)
DNA プライマー (8) /DNA テンプレート (9)	-3.1
DNA プライマー (9) /DNA テンプレート (6)	-3.8
DNA プライマー (10) /DNA テンプレート (7)	-4.3
DNA プライマー (11) /DNA テンプレート (8)	-4.6
DNA プライマー (1) /DNA テンプレート (9)	-5.2

10

【 0 1 0 7 】

20

30

40

50

【表 7】

表 7

	a1	a2	a3	a4	a5
ターゲットRNA①	-	-	-	-	-
No ターゲットRNA	-	-	-	-	-
DNAプライマー⑧	+	-	-	-	-
DNAテンプレート⑨	+	-	-	-	+
DNAプライマー⑨	-	+	-	-	-
DNAテンプレート⑥	-	+	-	-	-
DNAプライマー⑩	-	-	+	-	-
DNAテンプレート⑦	-	-	+	-	-
DNAプライマー⑪	-	-	-	+	-
DNAテンプレート⑧	-	-	-	+	-
DNAプライマー①	-	-	-	-	+

	b1	b2	b3	b4	b5
ターゲットRNA①	+	+	+	+	+
No ターゲットRNA	-	-	-	-	-
DNAプライマー⑧	+	-	-	-	-
DNAテンプレート⑨	+	-	-	-	+
DNAプライマー⑨	-	+	-	-	-
DNAテンプレート⑥	-	+	-	-	-
DNAプライマー⑩	-	-	+	-	-
DNAテンプレート⑦	-	-	+	-	-
DNAプライマー⑪	-	-	-	+	-
DNAテンプレート⑧	-	-	-	+	-
DNAプライマー①	-	-	-	-	+

	c1	c2	c3	c4	c5
ターゲットRNA①	-	-	-	-	-
No ターゲットRNA	+	+	+	+	+
DNAプライマー⑧	+	-	-	-	-
DNAテンプレート⑨	+	-	-	-	+
DNAプライマー⑨	-	+	-	-	-
DNAテンプレート⑥	-	+	-	-	-
DNAプライマー⑩	-	-	+	-	-
DNAテンプレート⑦	-	-	+	-	-
DNAプライマー⑪	-	-	-	+	-
DNAテンプレート⑧	-	-	-	+	-
DNAプライマー①	-	-	-	-	+

【 0 1 0 8 】

[実施例5] 長鎖DNAの1塩基多型検出

長鎖DNA中の1塩基多型(SNPs)を検出するために以下の実験を行った。図12に反応スキームを示す。SNPを含む標的配列として、シトクロムP450をコードするCYP2C19遺伝子の636位のSNPまたは681位のSNPを含む部位を含む1kbp(変異箇所前後500bp)の配列をヒト培養細胞(HepG2)ゲノムサンプルからPCR増幅したものを用いた。

以下の試薬を調製し、図13(A)及び(C)では、シトクロムP450をコードするCYP2C19遺伝子の636塩基(G636)の変異(GがAに変異)を、図13(B)及び(D)では、CYP2C19遺伝子の681塩基(G681)の変異(GがAに変異)を検出するために、上記の標的配列を加えて37

で2時間インキュベートさせて伸長反応を行った。各反応溶液 8 μ Lに5 $\times$ PBS153NMバッファ (50 mM HPO_4^{2-} , 730 mM Cl^- , 765 mM Na^+ , 13.5 mM K^+ , 12.5 mM Mg^{2+} pH 7.4) を2 μ L加えた。混合溶液10 μ Lと蛍光色素(1 $\times$ PBS153NMバッファに溶けた30 μ M ThT誘導体 (THT-HE 特開2016-079132) 溶液、最終濃度(5 μ M))を2 μ L混合させて25 $^{\circ}\text{C}$ で30分インキュベートさせた。調製した溶液に410nmのUVランプを照射してカットフィルター(460nmより短波長をカットする)を装着したカメラで撮影した。

【0109】

図13 (A) a1 ~ a5の調製

100nMのDNAテンプレート T2 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのPrimer P2 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP1 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファ2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水又は10nM targetDNA 2 μ L (40mer、2本鎖DNAはあらかじめアニーリングをおこなった 最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

10

【0110】

図13 (A) b1 ~ b5の調製

100nMのDNAテンプレートT2 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのPrimer P3 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP1 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファ2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水又は10nM targetDNA 2 μ L (40mer、2本鎖DNAはあらかじめアニーリングをおこなった 最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

20

【0111】

図13 (B) a1 ~ a5の調製

100nMのDNAテンプレートT3 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのPrimer P4 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP1 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファ2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水又は10nM targetDNA 2 μ L (40mer、2本鎖DNAはあらかじめアニーリングをおこなった 最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

30

【0112】

図13 (B) b1 ~ b5の調製

100nMのDNAテンプレートT3 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのPrimer P5 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP1 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファ2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水又は10nM targetDNA 2 μ L (40mer、2本鎖DNAはあらかじめアニーリングをおこなった 最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【0113】

図13 (C) a1 ~ a5の調製

100nMのDNAテンプレートT2 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのPrimer P2 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP1 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファ2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水又は10nM targetDNA 2 μ L (40merまたはHepG2遺伝子から増幅した2本鎖DNAはあらかじめアニーリングをおこなった 最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

40

【0114】

図13 (C) b1 ~ b5の調製

100nMのDNAテンプレートT2 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2

50

μL(最終濃度40nM)、120nMのPrimer P3 2 μL(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP1 2 μL(最終濃度48nM)、10×添付バッファー2 μL、10×添付BSA溶液 2 μL、10mMのdNTPs 2 μL(最終濃度1mM)、1U/μLのPhi29 Polymerase 2 μL(最終濃度0.1U/μL)、水又は10nM targetDNA 2 μL(40merまたはHepG2遺伝子から増幅した2本鎖DNAはあらかじめアニーリングをおこなった 最終濃度1nM)、水2 μLを混合した(計20 μL)。

【 0 1 1 5 】

図13 (D) a1～a5の調製

100nMのDNAテンプレートT3 2 μL(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μL(最終濃度40nM)、120nMのPrimer P4 2 μL(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP1 2 μL(最終濃度48nM)、10×添付バッファー2 μL、10×添付BSA溶液 2 μL、10mMのdNTPs 2 μL(最終濃度1mM)、1U/μLのPhi29 Polymerase 2 μL(最終濃度0.1U/μL)、水又は10nM targetDNA 2 μL(40merまたはHepG2遺伝子から増幅した2本鎖DNAはあらかじめアニーリングをおこなった 最終濃度1nM)、水2 μLを混合した(計20 μL)。

10

【 0 1 1 6 】

図13 (D) b1～b5の調製

100nMのDNAテンプレートT3 2 μL(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μL(最終濃度40nM)、120nMのPrimer P5 2 μL(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP1 2 μL(最終濃度48nM)、10×添付バッファー2 μL、10×添付BSA溶液 2 μL、10mMのdNTPs 2 μL(最終濃度1mM)、1U/μLのPhi29 Polymerase 2 μL(最終濃度0.1U/μL)、水又は10nM targetDNA 2 μL(40merまたはHepG2遺伝子から増幅した2本鎖DNAはあらかじめアニーリングをおこなった 最終濃度1nM)、水2 μLを混合した(計20 μL)。

20

【 0 1 1 7 】

30

40

50

【表 8】

表 8. オリゴヌクレオチドの配列表

	鎖長 (mer)	Sequence (5' →3')	修飾
DNA プライマー P1	18	GAAGCTGTTGTTATCACT (配列番号 3 3)	
DNA プライマー P2 (野生型)	18	TTACCTGGATCTTTTTTG (配列番号 3 4)	
DNA プライマー P3 (変異型)	18	TTACCTGGATTTTTTTTG (配列番号 3 5)	
DNA プライマー P4 (野生型)	18	TATGGGTTCCCTTTTTTG (配列番号 3 6)	
DNA プライマー P5 (変異型)	18	TATGGGTTCCTTTTTTTG (配列番号 3 7)	
DNA テンプレート T1 (第 2 の一本鎖環 状 DNA)	62	CCCAACCCTACCCACCCTCAAGAAAAAAGTGATAATTGTTG TCGAAGAAGAAAAAATT (配列番号 3 8)	環状化
DNA テンプレート T2 (第 1 の一本鎖環 状 DNA : G636)	73	CAAAAAACAGGGGGTGCTTACAATCCTAGGATTGTATAGAAGC TGTTGTATTGTTGTGAAGAAGAAAAGTCC (配列番号 3 9)	環状化
DNA テンプレート T3 (第 1 の一本鎖環 状 DNA : G681)	73	CAAAAAAGGGAATAATCAATGATAGTACTATCATTAGAAGC TGTTGTATTGTTGTGAAGAAGAAAAGTCC (配列番号 4 0)	環状化

10

20

【 0 1 1 8 】

30

[3]長鎖DNAの1塩基多型検出

最適化条件の検討では、40merの1本鎖及び2本鎖のDNAをターゲットした。CYP2C19遺伝子の636塩基の1本鎖及び2本鎖の野生型(図13 (A) a2, a3)及び変異(図13 (A) b4, b5)を見分けることができた。また、CYP2C19遺伝子の681塩基の野生型(図13 (B) a2, a3)及び変異(図13 (B) b4, b5)を見分けることができた。

ヒト培養細胞(HepG2)ゲノムサンプルは、1kbp(変異箇所前後500bp)をPCRで増幅したものをを用いた。結果は、G636では野生型(図13(C) a4)、G681でも野生型(図13(D) a4)を確認した。このことから、ターゲットが、1kbpの長鎖2重鎖DNAであった場合でも変異を確認することができる。

【 0 1 1 9 】

40

[実施例 6]異なる鎖長の変異miRNAの検出

miRNAの3'末端への2塩基の付加を検出するために以下の実験を行った。図16に反応スキームを示す。表9のmiR-21CAはmiR-21の3'末端にCAの2塩基が付加されている。この変異を検出するために、以下の試薬を調製し、37℃で2時間インキュベートさせて伸長反応を行った。各反応溶液 8μLに5×PBS153NMバッファー(50 mM HPO₄²⁻, 730 mM Cl⁻, 765 mM Na⁺, 13.5 mM K⁺, 12.5 mM Mg²⁺+pH 7.4)を2μL加えた。混合溶液10μLと蛍光色素(1×PBS153NMバッファーに溶けた30μM ThT誘導体(THT-HE特開2016-079132)溶液、最終濃度(5μM))を2μL混合させて25℃で30分インキュベートさせた。調製した溶液に410nmのUVランプを照射してカットフィルター(460nmより短波長をカットする)を装着したカメラで撮影した。

50

【 0 1 2 0 】

図17 a1～a2の調製

100nMのDNAテンプレートT4 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μ L(最終濃度40nM)、水または120nMのCapture Probe(1) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP6 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファ2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水4 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【 0 1 2 1 】

図17 b1～b2の調製

100nMのDNAテンプレートT4 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μ L(最終濃度40nM)、水または120nMのCapture Probe(1) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP6 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファ2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、10nMのmiR-21 2 μ L(最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

10

【 0 1 2 2 】

図17 c1～c2の調製

100nMのDNAテンプレートT4 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μ L(最終濃度40nM)、水または120nMのCapture Probe (1) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP6 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファ2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、10nMのmiR-21CA 2 μ L(最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

20

【 0 1 2 3 】

図17 d1～d2の調製

100nMのDNAテンプレートT4 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μ L(最終濃度40nM)、水または120nMのCapture Probe(1) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP6 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファ2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、10nMのmiR-221 2 μ L(最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

30

【 0 1 2 4 】

[実施例 7] 一塩基置換変異miRNAの検出

miRNAの一塩基置換を検出するために以下の実験を行った。図 1 8 に反応スキームを示す。表 9 のmiR-13aとmiR-13bは互いにc/uの一塩基置換を有する。

この変異を検出するために、以下の試薬を調製し、37 で2時間インキュベートさせて伸長反応を行った。各反応溶液 8 μ Lに5 $\times$ PBS153NMバッファ(50 mM HPO₄²⁻, 730 mM Cl⁻, 765 mM Na⁺, 13.5 mM K⁺, 12.5 mM Mg²⁺+pH 7.4)を2 μ L加えた。混合溶液10 μ Lと蛍光色素(1 $\times$ PBS153NMバッファに溶けた30 μ M ThT誘導体(THT-HE特開2016-079132)溶液、最終濃度(5 μ M))を2 μ L混合させて25 で30分インキュベートさせた。調製した溶液に410nmのUVランプを照射してカットフィルター(460nmより短波長をカットする)を装着したカメラで撮影した。

40

【 0 1 2 5 】

図19 a1～a2の調製

100nMのDNAテンプレートT5 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μ L(最終濃度40nM)、水または120nMのCapture Probe(2) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP6 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファ2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水4 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【 0 1 2 6 】

50

図19 b1～b2の調製

100nMのDNAテンプレートT5 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μ L(最終濃度40nM)、水または120nMのCapture Probe(2) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP6 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、10nMのmiR-13a 2 μ L(最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【 0 1 2 7 】

図19 c1～c2の調製

100nMのDNAテンプレートT5 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μ L(最終濃度40nM)、水または120nMのCapture Probe(2) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP6 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、10nMのmiR-13b 2 μ L(最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【 0 1 2 8 】

図19 d1～d2の調製

100nMのDNAテンプレートT5 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレートT1 2 μ L(最終濃度40nM)、水または120nMのCapture Probe(2) 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマーP6 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、10nMのmiR-221 2 μ L(最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【 0 1 2 9 】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9. オリゴヌクレオチドの配列表

	鎖長 (mer)	Sequence (5' → 3')	修飾
DNA プライマー P6	18	GAAGCTGTTGTTATCACT (配列番号 4 1)	
Capture Probe (1)	34	AAAGGAGAACCTCAAGCTCCTCAGTCTGATAAGC (配列番号 4 2)	3' 末端リン酸
Capture Probe (2)	35	AAAGGAGAACCTCAAGCTCCAAAATGGCTGTGATA (配列番号 4 3)	3' 末端リン酸
DNA テンプレート T4 (第 1 の一本鎖環状 DNA : miR-21)	67	CTGTCAACAGGAGCTTGAGGTTCTCCTTTAAAAAGAAGCT GTTGTATTGTTGTGCGAAGAAGAAAAGT (配列番号 4 4)	環状化
DNA テンプレート T1 (第 2 の一本鎖環状 DNA)	62	CCCAACCCTACCCACCCTCAAGAAAAAAGTGATAATTG TTGTCGAAGAAGAAAAAATT (配列番号 3 8)	環状化
DNA テンプレート T5 (第 1 の一本鎖環状 DNA : miR-13)	66	CACTCATCGGAGCTTGAGGTTCTCCTTTAAAAAGAAGCTG TTGTATTGTTGTGCGAAGAAGAAAAGT (配列番号 4 5)	環状化
miR-21CA	24	uagcuuauacagacugauguugaca (配列番号 4 6)	
miR-21	22	uagcuuauacagacugauguuga (配列番号 4 7)	
miR-13a	22	uauacagccauuuugacgagu (配列番号 4 8)	
miR-13b	22	uauacagccauuuugaugagu (配列番号 4 9)	
miR-221	23	agcuacauugucugcuggguuuc (配列番号 5 0)	

英大文字は DNA、英小文字は RNA

2 本鎖 DNA はそれぞれ相補鎖をアニーリングした物を使用した。

【 0 1 3 0 】

< 結果 >

[1]異なる鎖長の変異miRNAの検出 (実施例 6)

本方法はmiRNAの鎖長の異なる変異を検出法である。テンプレートの設計では、ターゲットRNAとテンプレートのハイブリダイズ部分の熱力学を考慮して作製する。これまでの研究でハイブリダイズ部分の $-\Delta G^\circ$ が4.2kcal/molを超過した場合、反応が進行することが分かっている。これを考慮し、変異体であるmiR-21CAの場合は $-\Delta G^\circ$ が5.7kcal/molで変異がないmiR-21では $-\Delta G^\circ$ が2.7kcal/molと設計した(図16)。

実際の実験結果は、ターゲットがmiR-21CAだった場合、反応は進行してし(図17 c2)、miR-21では、反応の進行は見られなかった(図17 b2)。

また、capture probeなしの場合(図17 a1, b1, c1, d1)や違うターゲットの場合(図17 d2)でも反応の進行は確認できなかった。

【 0 1 3 1 】

[2]1塩基変異miRNAの検出 (実施例 7)

本方法は、miRNAの1塩基違いを検出する方法である。テンプレートの設計では、テンプレートとターゲットであるmiR-13bが相補的になるようにして、また、熱力学安定性を考慮して設計した(図18)。

実験結果は、miR-13aの場合は(図19 b2)、テンプレートとミスマッチとなり反応は進行しなかった。一方で、miR-13bでは(図19 c2)、完全に相補的になるため反応が進行した。

また、capture probeなしの場合(図19 a1, b1, c1, d1)や違うターゲットの場合(図19 d2)でも反応の進行は確認できなかった。

【0132】

[実施例8] 長鎖DNAの1塩基多型検出

長鎖DNA中の1塩基多型検出のために、図20に示すような反応を行い、長鎖DNAに含まれる多型G636とG681の検出を行った。

【0133】

1. 溶液の調製

[1]長鎖DNAの1塩基多型検出 (PCR増幅サンプルを用いた時)

【0134】

図21 (A) a1~a9の調製

100nMのDNAテンプレート t4 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート t2 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのPrimer p2 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー p1 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファ2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水又は10nM targetDNA 2 μ L (40mer、2本鎖DNAはあらかじめアニーリングをおこなった 最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【0135】

図21 (A) b1~b9の調製

100nMのDNAテンプレート t4 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート t2 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのPrimer p3 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー p1 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファ2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水又は10nM targetDNA 2 μ L (40mer、2本鎖DNAはあらかじめアニーリングをおこなった 最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【0136】

図21 (B) a1~a9の調製

100nMのDNAテンプレート t5 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート t2 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのPrimer p4 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー p1 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファ2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水又は10nM targetDNA 2 μ L (40mer、2本鎖DNAはあらかじめアニーリングをおこなった 最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【0137】

図21 (B) b1~b9の調製

100nMのDNAテンプレート t5 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート t2 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのPrimer p5 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー p1 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファ2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ LのPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水又は10nM targetDNA 2 μ L (40mer、2本鎖DNAはあらかじめアニーリングをおこなった 最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【0138】

[2] 長鎖DNAの1塩基多型検出(抽出物を用いた時)

【0139】

(1)細胞抽出液(全DNA)の作製

口腔粘膜を綿棒でこすり取り、ISOHAIR EASY(ニッポンジーン製)150 μ Lに懸濁させた。添付書のプロトコルに従い処理した。その後、スピнкаラム(遠心式限外ろ過フィルターユニット)を用いて20mM Tris-HCl pH7.4に置換した。

【0140】

(2) 検出サンプルの調製

10

20

30

40

50

図22 a1～a3の調製

100nMのDNAテンプレート t4 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート t2 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのPrimer p2 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー p1 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー 2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ L のPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水又は10nM targetDNA 2 μ L (40mer、2本鎖DNAはあらかじめアニーリングをおこなった最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【 0 1 4 1 】

10

図22 b1～b3の調製

100nMのDNAテンプレート p4 2 μ L(最終濃度10nM)、400nMのDNAテンプレート t2 2 μ L(最終濃度40nM)、120nMのPrimer p3 2 μ L(最終濃度12nM)、480nMのDNAプライマー t1 2 μ L(最終濃度48nM)、10 $\times$ 添付バッファー 2 μ L、10 $\times$ 添付BSA溶液 2 μ L、10mMのdNTPs 2 μ L(最終濃度1mM)、1U/ μ L のPhi29 Polymerase 2 μ L(最終濃度0.1U/ μ L)、水又は10nM targetDNA 2 μ L (40mer、2本鎖DNAはあらかじめアニーリングをおこなった 最終濃度1nM)、水2 μ Lを混合した(計20 μ L)。

【 0 1 4 2 】

20

30

40

50

【表 10】

表 10. オリゴヌクレオチドの配列表

	鎖長 (mer)	Sequence (5' →3')
DNA プライマー p1	18	GAAGCTGTTGTTACT (配列番号 33)
DNA プライマー p2	18	TTACCTGGATCTTTTGG (配列番号 34)
DNA プライマー p3	18	TTACCTGGATCTTTTGG (配列番号 35)
DNA プライマー p4	18	TATGGGTTCCCTTTTGG (配列番号 36)
DNA プライマー p5	18	TATGGGTTCCCTTTTGG (配列番号 37)
Positive control	30	AGCTCCTTTTGGGACTTTCTCTCGA (配列番号 51)
DNA テンプレート t2	62	CCCAACCCTACCCACCCTCAAGAAAAAAGTGATAATTGTTGTCGAAGAAG (配列番号 52)
DNA テンプレート t4	73	CAAAAAACAGGGGTGCTTACAATCCTAGGATTGTATAGAAGCTGTTGTTGTCGAAGAAGAA AAGTCC (配列番号 39)
DNA テンプレート t5	73	CAAAAAAGGGAATAATCAATGATAGTACTATCATTAGAAGCTGTTGTTGTCGAAGAAGAA AAGTCC (配列番号 40)
G636	40	GAAACATCAGGATTGTAAGCACCCCTGGATCCAGGTAA (配列番号 53)
G636 相補鎖	40	TTACCTGGATCCAGGGGTGCTTACAATCCTGATGTTTT (配列番号 54)
G636A	40	GAAACATCAGGATTGTAAGCACCCCTGAATCCAGGTAA (配列番号 55)
G636A 相補鎖	40	TTACCTGGATCCAGGGGTGCTTACAATCCTGATGTTTT (配列番号 56)
G681	40	AATTTCCCACTATCATTGATTATTTCCCGGAACCCATA (配列番号 57)
G681 相補鎖	40	TATGGGTTCCCGGAAATAATCAATGATAGTGGGAAATT (配列番号 58)
G681A	40	AATTTCCCACTATCATTGATTATTTCCCGGAACCCATA (配列番号 59)
G681A 相補鎖	40	TATGGGTTCCCGGAAATAATCAATGATAGTGGGAAATT (配列番号 60)
G636 1kbp	1k	変位箇所を中心とし前後 500bp を増幅したサンプル
G681 1kbp	1k	変位箇所を中心とし前後 500bp を増幅したサンプル

2本鎖DNAはそれぞれ相補鎖をアニーリングした物を使用した
 G636及びG681を含んだ1kbp長鎖DNAはヒト口腔粘膜の遺伝子をPCRにより増幅したサ
 ンプルを使用した

【0143】

用いた試薬

ThT(チオフラビンT)誘導体

5 × PBS153NM

50 mM HPO₄²⁻, 730 mM Cl⁻, 765 mM Na⁺, 13.5 mM K⁺, 12.5 mM Mg²⁺pH 7.4

1 × PBS153NM

10 mM HPO_4^{2-} , 146 mM Cl^- , 153 mM Na^+ , 2.7 mM K^+ , 2.5 mM Mg^{2+} pH 7.4
ISOHAIR EASY (ニッポンジーン製)

【0144】

2. ポリメラーゼ反応

- ・1. で調製した溶液を37 で2時間インキュベートさせた。

【0145】

3. 視覚的検出

- ・2.の反応溶液 8 μL に5 $\times$ PBS153NMバッファを2 μL 加えた。
- ・混合溶液10 μL と蛍光色素(1 $\times$ PBS153NMバッファに溶けた30 μM ThT誘導体溶液、最終濃度(5 μM))を2 μL 混合させて25 で30分インキュベートさせた。
- ・調製した溶液に410nmのUVランプを照射してカットフィルター(460nmより短波長をカットする)を装着したカメラで撮影した。

【0146】

結果

[1]長鎖DNAの1塩基多型検出(PCR増幅サンプルを用いた時)

本方法は、ゲノム中の1塩基多型(SNPs)を検出する方法である。図21 (A)では、シトクロムP450をコードするCYP2C19遺伝子の636塩基(G636, Genotype#3)の変異(GがAに変異)を検出し、図21(B)ではCYP2C19遺伝子の681塩基(G681, Genotype#2)の変異(GがAに変異)を検出する。

Primerはそれぞれの野生型、変異型に対応したものを使用している。(図20) ヒト口腔粘膜細胞ゲノムサンプルは、1kbp(変異箇所前後500bp)をPCRで増幅したものを用いた。対象者は6名である。結果は、G636ではEにヘテロ(野生型と変異型の混合)を確認し、G681ではFにヘテロを確認した。

このことから、ターゲットが、1kbpの長鎖2重鎖DNAであった場合でも変異を確認することができる。

【0147】

[2] 長鎖DNAの1塩基多型検出(抽出物を用いた時)

本方法は、細胞抽出液(全ゲノム中)から1塩基多型(SNPs)を検出する方法である。図22では、シトクロムP450をコードするCYP2C19遺伝子の636塩基(G636, Genotype#3)の変異(GがAに変異)を検出する。Primerはそれぞれの野生型、変異型に対応したものを使用している。(図20)

【符号の説明】

【0148】

1 0 . . . 一本鎖環状DNA、1 1 . . . 標的ポリヌクレオチド、1 2 . . . オリゴヌクレオチドプライマー、1 3 . . . 増幅産物(伸長産物)、1 0 1 . . . 第1の領域に相補的な配列、1 0 2 . . . プライマー結合配列、1 0 3 . . . グアニン四重鎖形成配列に相補的な配列、1 0 4 . . . グアニン四重鎖を含む配列、1 0 5 . . . グアニン四重鎖検出試薬、1 1 1 . . . 第1の領域、1 1 2 . . . 第2の領域、1 2 1 . . . 第2の領域に相補的な配列、1 2 2 . . . プライマー結合領域に相補的な配列

【0149】

2 0 . . . 一本鎖環状DNA、2 1 . . . 標的ポリヌクレオチド、2 2 . . . 第1のオリゴヌクレオチドプライマー、2 3 . . . 第1の増幅産物(伸長産物)、2 4 . . . 第2の一本鎖環状DNA、2 5 . . . 第2のオリゴヌクレオチドプライマー、2 6 . . . 第2の増幅産物(伸長産物)、2 0 1 . . . 第1の領域に相補的な配列、2 0 2 . . . 第1のプライマー結合配列、2 0 3 . . . 第2の一本鎖環状DNA結合配列に相補的な配列、2 0 4 . . . 2 0 3の5'側に隣接した領域、2 1 1 . . . 第1の領域、2 1 2 . . . 第2の領域、2 2 1 . . . 第2の領域に相補的な配列、2 2 2 . . . 第1のプライマー結合領域に相補的な配列、2 3 1 . . . 2 0 3の相補領域、2 3 2 . . . 領域2 0 4に相補的な領域、2 4 1 . . . 第2の一本鎖環状DNA結合配列相補配列2 0 3と同一の配列、2 4 2 . . . 第2のプライマー結合配列、2 4 3 . . . グアニン四重鎖形成配列に相補的な配列、2 5 1 .

10

20

30

40

50

・領域 2 0 4 と同一の配列、2 5 2 ・ ・ ・ 第 2 の一本鎖環状DNAの第 2 のプライマー結合配列 2 4 2 に相補的な配列、2 6 1 ・ ・ ・ グアニン四重鎖を含む配列、2 6 2 ・ ・ ・ グアニン四重鎖検出試薬

【 0 1 5 0 】

3 0 ・ ・ ・ 一本鎖環状DNA、3 1 ・ ・ ・ キャプチャーポリヌクレオチド、3 2 ・ ・ ・ miRNA、3 3 ・ ・ ・ 増幅産物（伸長産物）、3 4 ・ ・ ・ グアニン四重鎖検出試薬、3 0 1 ・ ・ ・ miRNAの第 2 の領域に相補的な配列、3 0 2 ・ ・ ・ 一本鎖環状DNAの第 2 の領域、3 0 3 ・ ・ ・ グアニン四重鎖形成配列に相補的な配列、3 1 1 ・ ・ ・ 一本鎖環状DNAの第 2 の領域に相補的な配列、3 1 2 ・ ・ ・ miRNAの第 1 の領域に相補的な配列、3 2 1 ・ ・ ・ miRNAの第 1 の領域、3 2 2 ・ ・ ・ miRNAの変異を含む第 2 の領域、3 3 1 ・ ・ ・ グアニン四重鎖形成配列

10

【 0 1 5 1 】

4 0 ・ ・ ・ 一本鎖環状DNA、4 1 ・ ・ ・ キャプチャーポリヌクレオチド、4 2 ・ ・ ・ miRNA、4 3 ・ ・ ・ 第 1 の増幅産物（伸長産物）、4 4 ・ ・ ・ 第 2 の一本鎖環状DNA、4 5 ・ ・ ・ 第 2 のオリゴヌクレオチドプライマー、4 6 ・ ・ ・ 第 2 の増幅産物（伸長産物）、4 7 ・ ・ ・ グアニン四重鎖検出試薬、4 0 1 ・ ・ ・ miRNAの第 2 の領域に相補的な配列、4 0 2 ・ ・ ・ 一本鎖環状DNAの第 2 の領域、4 0 3 ・ ・ ・ 第 2 の一本鎖環状DNA結合配列相補配列、4 0 4 ・ ・ ・ 4 0 3 の 5 ' 側に隣接した領域、4 1 1 ・ ・ ・ 一本鎖環状DNAの第 2 の領域に相補的な配列、4 1 2 ・ ・ ・ miRNAの第 1 の領域に相補的な配列、4 2 1 ・ ・ ・ miRNAの第 1 の領域、4 2 2 ・ ・ ・ miRNAの変異を含む第 2 の領域、4 3 1 ・ ・ ・ 4 0 3 の相補領域、4 3 2 ・ ・ ・ 領域 4 0 4 に相補的な領域、4 3 3 ・ ・ ・ 配列 4 0 3 に相補的な配列、4 4 1 ・ ・ ・ 第 2 の一本鎖環状DNA結合配列相補配列 4 0 3 と同一の配列、4 4 2 ・ ・ ・ 第 2 のプライマー結合配列、4 4 3 ・ ・ ・ グアニン四重鎖形成配列に相補的な配列、4 5 1 ・ ・ ・ 領域 4 0 4 と同一の配列、4 5 2 ・ ・ ・ 第 2 の一本鎖環状DNAの第 2 のプライマー結合配列 4 4 2 に相補的な配列、4 6 1 ・ ・ ・ グアニン四重鎖形成配列

20

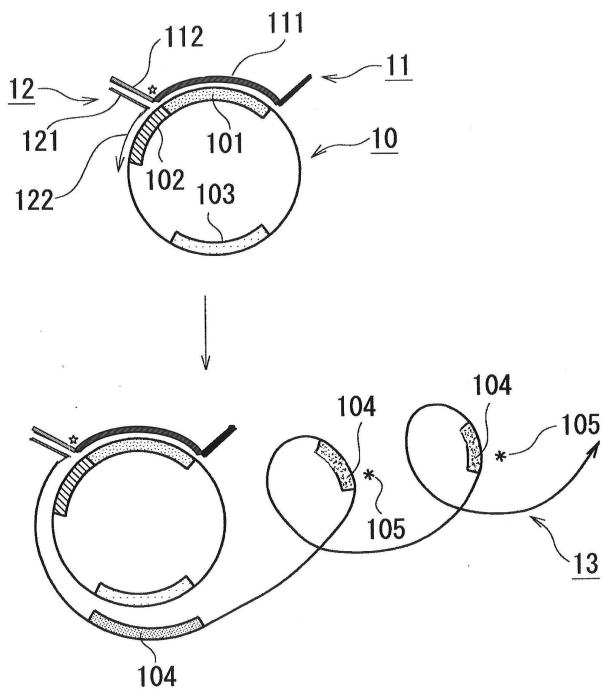
30

40

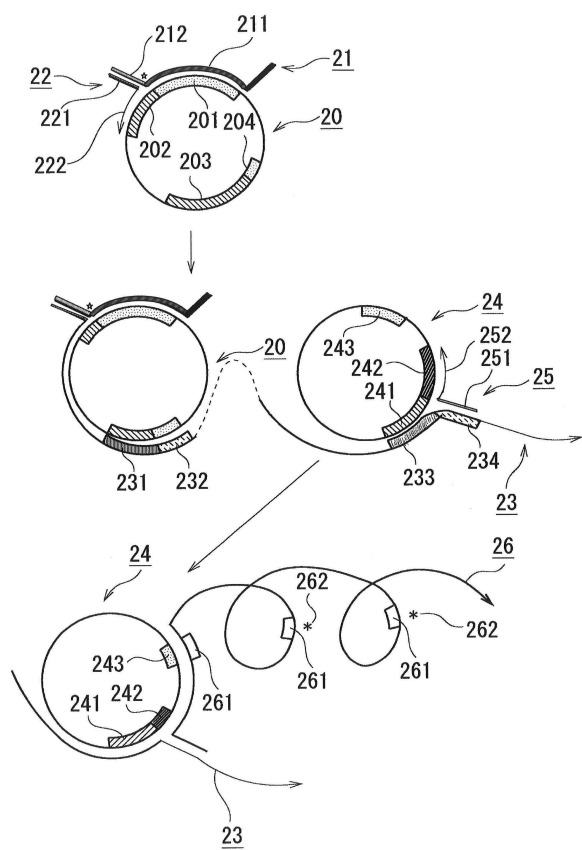
50

【図面】

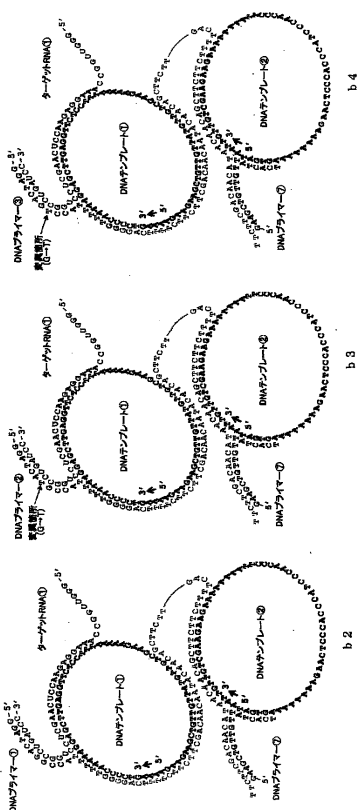
【図 1】



【図 2】

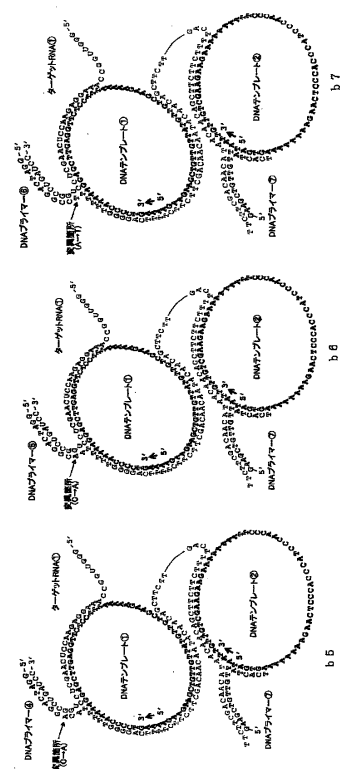


【図 3】



【図 3 - 1】

〔図 3〕の続き



10

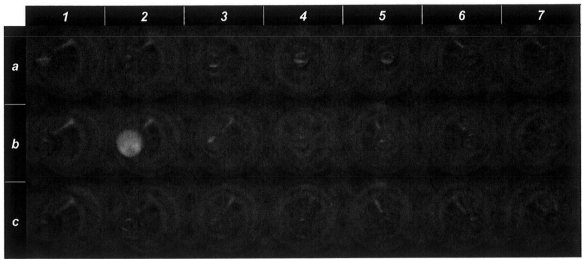
20

30

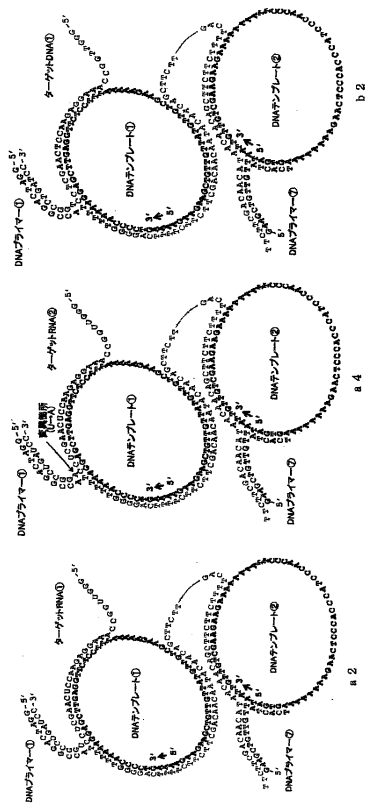
40

50

【図 4】



【図 5】

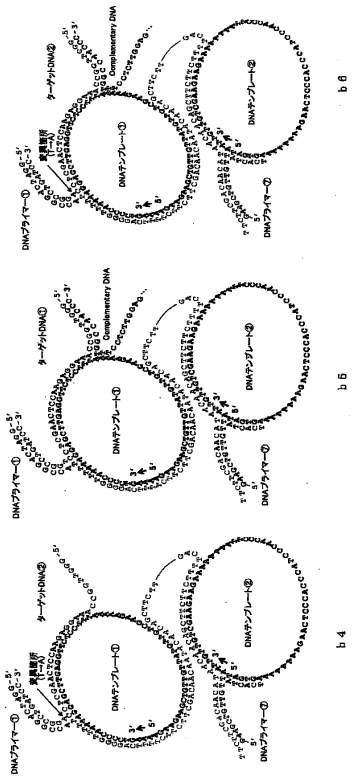


10

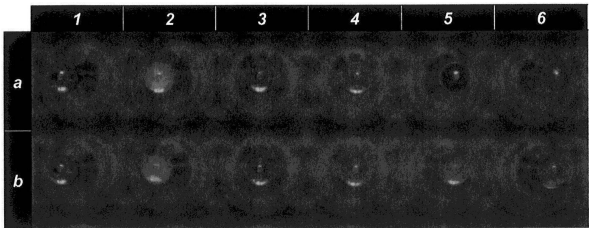
20

【図 5 - 1】

〔図 5〕の続き



【図 6】

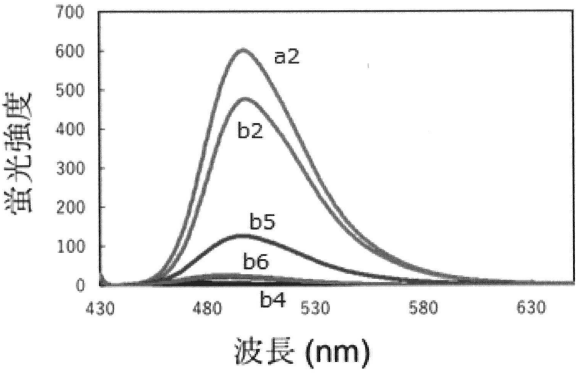


30

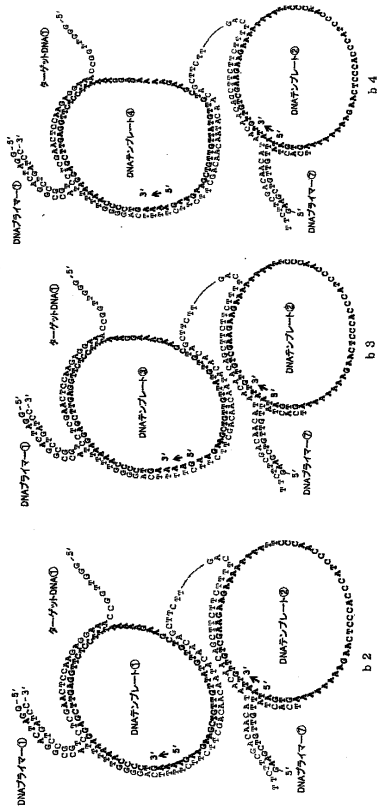
40

50

【図 7】



【図 8】

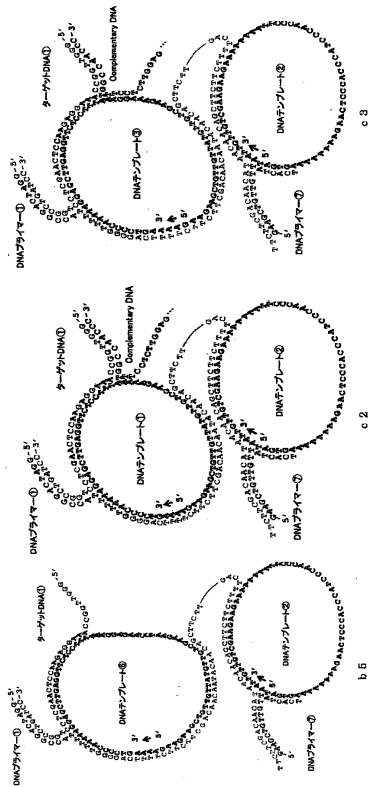


10

20

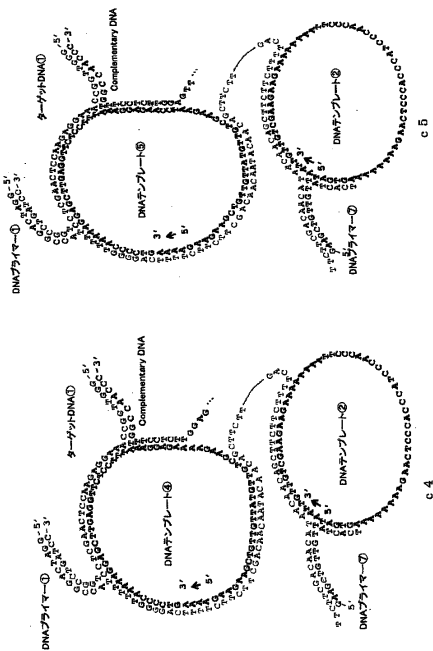
【図 8 - 1】

【図 8】の続き



【図 8 - 2】

【図 8】の続き

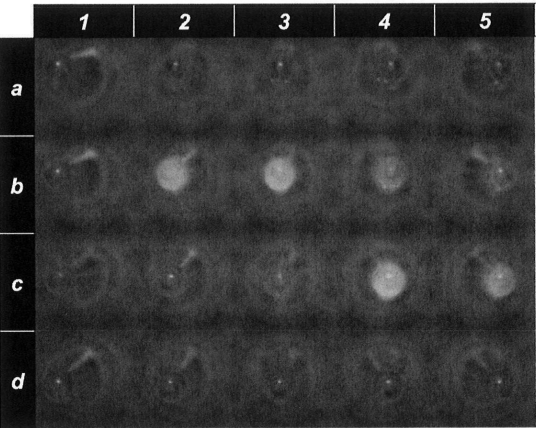


30

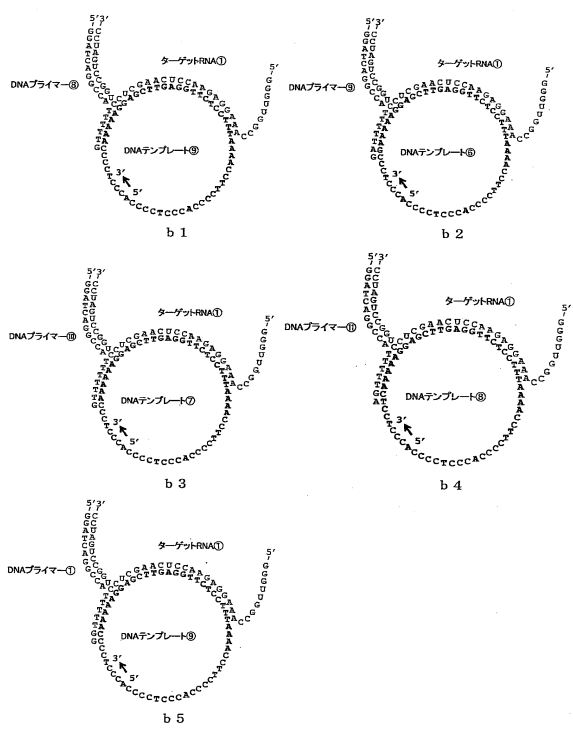
40

50

【図 9】



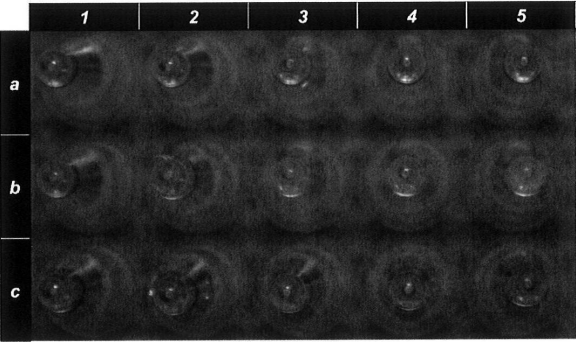
【図 10】



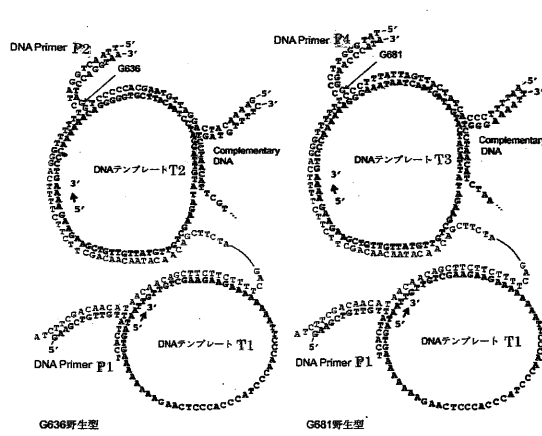
10

20

【図 11】



【図 12】

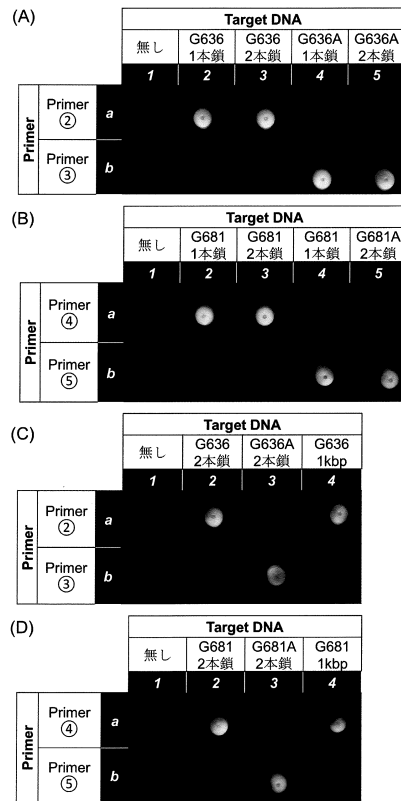


30

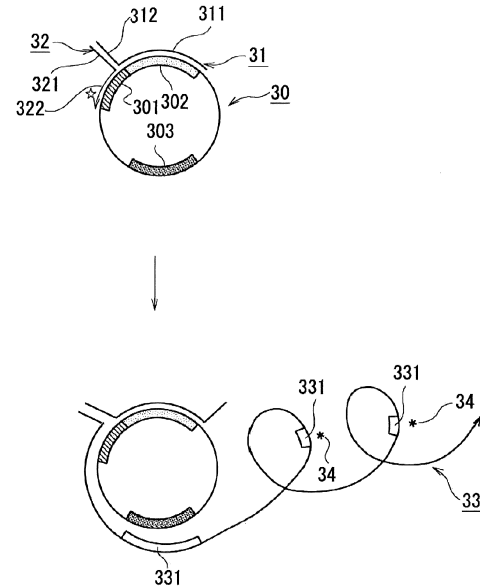
40

50

【 図 1 3 】



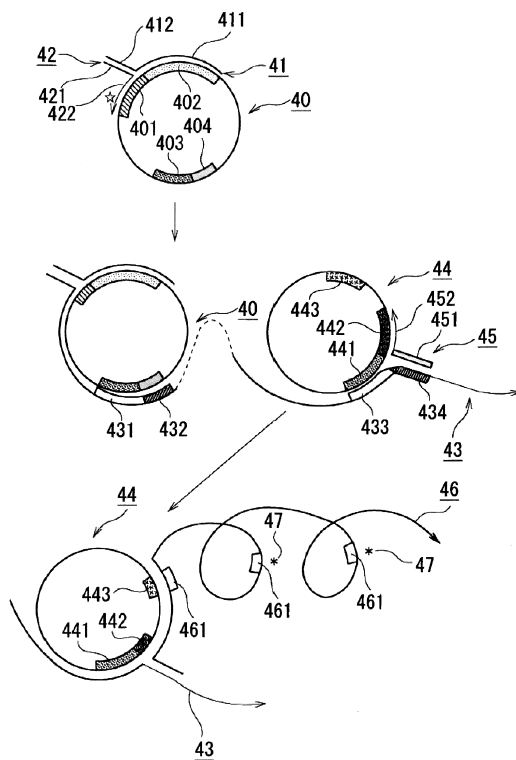
【 図 1 4 】



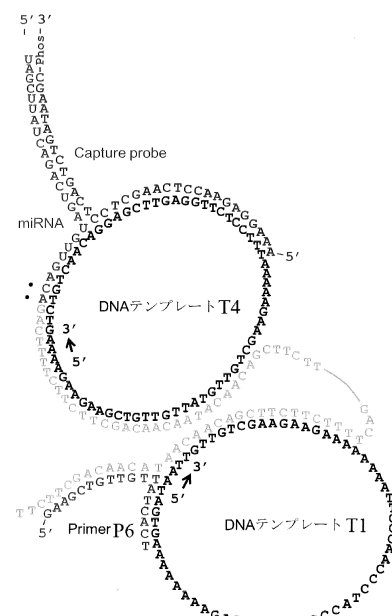
10

20

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

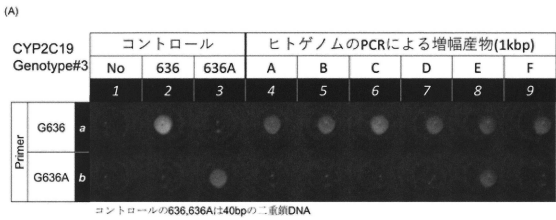


30

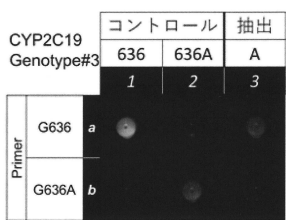
40

50

【 2 1 】



【 2 2 】



10

【 配列表 】

0007017246000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

- (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 1 9 7 8 0 4 (U S , A 1)
国際公開第 2 0 1 6 / 1 5 2 9 3 6 (W O , A 1)
Analytical Chemistry, 2021年06月27日, Vol.88, p.7137-7144
日本化学会第97春季年会講演予稿集, 2017年03月03日, 1 C4-36
- (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)
- C 1 2 Q 1 / 6 8
C 1 2 N 1 5 / 0 9
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)