

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4557014号
(P4557014)

(45) 発行日 平成22年10月6日(2010.10.6)

(24) 登録日 平成22年7月30日(2010.7.30)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G O 1 N 33/58	(2006.01)	G O 1 N 33/58	A
G O 1 N 21/78	(2006.01)	G O 1 N 21/78	C

請求項の数 2 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2008-33164 (P2008-33164)	(73) 特許権者	000002185 ソニー株式会社 東京都港区港南1丁目7番1号
(22) 出願日	平成20年2月14日(2008.2.14)	(74) 代理人	100112874 弁理士 渡邊 薫
(65) 公開番号	特開2009-189296 (P2009-189296A)	(72) 発明者	岸本 拓哉 東京都港区港南1丁目7番1号 ソニー株式会社内
(43) 公開日	平成21年8月27日(2009.8.27)	審査官	北村 悠美子
審査請求日	平成21年3月27日(2009.3.27)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチド、及び該核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチドを用いた二本鎖形成に関わる情報を得る方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

検出対象核酸鎖に対し相補的な塩基配列を有し、前記検出対象核酸鎖との二本鎖形成によって蛍光特性が変化する蛍光標識オリゴヌクレオチドを、濃度未知の前記検出対象核酸鎖を含むPCR反応液に添加し、前記蛍光標識オリゴヌクレオチドの蛍光に係る情報を検出することによって、前記蛍光標識オリゴヌクレオチドと前記検出対象核酸鎖との二本鎖形成に関わる情報を得て、前記検出対象核酸鎖の濃度を求める検出対象核酸鎖の定量方法であって、

蛍光共鳴エネルギー移動現象のドナーとなるインターカレーター性蛍光色素と、前記蛍光共鳴エネルギー移動現象のアクセプターとなる非インターカレーター性蛍光色素とが、同一末端に標識された前記蛍光標識オリゴヌクレオチドを、前記PCR反応液に添加し、前記蛍光標識オリゴヌクレオチドを前記検出対象核酸鎖のプライマーとしてPCR反応を行い、前記PCR反応のアニールリング反応中において、励起光EX₁の照射によって発生する蛍光EM₂の強度I₁、及び、励起光EX₂の照射によって発生する蛍光EM₂の強度I₂を検出し、下記式(1)、(2)により、前記検出対象核酸鎖の濃度を算出する定量方法。

$$Conc = Kb \cdot (R - Ri) / (Ra - R) \quad \dots \text{式(1)}$$

$$R = (I_1 - B_1) / (I_2 - B_2) \quad \dots \text{式(2)}$$

(上記式(1)中、「Conc」は前記検出対象核酸鎖の濃度(mol/l)、「Kb」は前記蛍光標識オリゴヌクレオチドの結合定数、「Ri」は反応溶液中に前記検出対象核酸鎖

がない状態のR、「Ra」は前記検出対象核酸鎖を蛍光標識オリゴヌクレオチドに対して過剰量投入したときのRを示す。上記式(2)中、「I₁」は前記励起光EX₁による蛍光EM₂の強度、「B₁」は前記励起光EX₁によるバックグラウンド値、「I₂」は励起光EX₂による蛍光EM₂の強度、「B₂」は励起光EX₂によるバックグラウンド値であり、「バックグラウンド値」とは、反応溶液中に前記蛍光標識オリゴヌクレオチドがない状態において、励起光EX₁、EX₂の照射により得られる蛍光EM₂の強度である。)

【請求項2】

検量線を作成せずに、前記検出対象核酸鎖の濃度を測定する請求項1記載の定量方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチド、及び該核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチドを用いた二本鎖形成に関わる情報を得る方法に関する。より詳しくは、検出対象核酸鎖との二本鎖形成によって蛍光特性が変化する核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチドなどに関する。

【背景技術】

【0002】

現在、各種疾患の分子メカニズムの解明や診断方法の確立、さらには創薬ターゲットの探索等を目的として、細胞や組織内の遺伝子発現を定量的に解析する技術が開発されている。

20

【0003】

このような遺伝子定量解析では、検出対象核酸鎖に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(以下、「プローブ」ともいう)と各種の蛍光色素を用いて、検出対象核酸鎖を光学的に検出し、定量を行う方法が主流となっている。

【0004】

一例として、二本鎖核酸の塩基対間に結合または挿入された状態で、励起光を照射されることにより蛍光を発するインターカレーター性の蛍光色素を用いた方法がある。

【0005】

インターカレーター性蛍光色素の存在下で、検出対象核酸鎖とプローブとのハイブリダイズ(二本鎖形成)反応を行うと、生成した二本鎖核酸鎖の塩基対間にインターカレーター性蛍光色素が結合する。この際、励起光の照射によってインターカレーター性蛍光色素から発せられる蛍光を検出することで、その強度から二本鎖核酸鎖の生成量、さらには検出対象核酸鎖の量を測定することが可能となる。

30

【0006】

また別法として、プローブの5'末端を蛍光色素で、3'末端をクエンチャー物質で修飾したTaqManプローブ(登録商標、以下同じ)を用いる方法がある。この方法は、特にリアルタイムPCR法に用いられている。

【0007】

TaqManプローブは、PCR反応のアニーリングステップで、検出対象DNAに特異的にハイブリダイズする。このとき、プローブ上にはクエンチャーが存在しているため、励起光を照射しても蛍光色素からの蛍光の発生は抑制されている。しかし、エクステンションステップにおいて、Taq DNAポリメラーゼのもつ5'→3'エキソヌクレアーゼ活性によって検出対象DNAにハイブリダイズしたプローブが分解されると、蛍光色素がプローブから遊離し、クエンチャーによる抑制が解除され蛍光が発せられる。この蛍光を検出することで、PCR増幅産物の生成量、さらには検出対象DNA量をリアルタイムに測定することができる。

40

【0008】

特許文献1には、インターカレーター性蛍光色素を用いたハイブリダイゼーション検出方法が開示されている。また、特許文献2には、TaqManプローブを用いたリアルタイムPCR法により、ヒトディフェンシン2 mRNAを定量的に検出する方法が記載されている。

50

【特許文献1】特開2006-296279号公報

【特許文献2】特開2004-248676号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

上述した従来のインターカレーター性蛍光色素やTaqManプローブを用いた遺伝子定量解析では、インターカレーター性蛍光色素等の投入量のばらつきや分光蛍光光度計の光源の不安定さなどに起因して測定誤差が生じる問題があった。

【0010】

このような測定誤差は、測定毎に、濃度既知の標準サンプルを用いて、検出された蛍光強度とサンプル濃度を対応させた検量線を作成することによって回避することが可能である。

【0011】

しかしながら、測定の都度検量線を作成することは非常に手間がかかる作業であった。また、遺伝子定量解析をマルチプレートで行うような場合には、一定のウェルを標準サンプルの測定に費やすことになるため、一度に解析可能なサンプル数が制限され、解析効率を低下させる要因となっていた。

【0012】

そこで、本発明は、検量線を作成する必要がなく、簡便であって、解析効率に優れた遺伝子定量解析を可能とする核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチド、及びこの核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチドを用いた二本鎖形成に関わる情報を得る方法を提供することを主な目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

上記課題解決のため、本発明は、まず、検出対象核酸鎖に対し相補的な塩基配列を有する核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチドであって、前記検出対象核酸鎖との二本鎖形成によって蛍光特性が変化することを特徴とする核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチドを提供する。

【0014】

この核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチドは、その蛍光特性に基づいて、結合又は非結合状態にある蛍光標識オリゴヌクレオチドの比率を測定することが可能である。

【0015】

核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチドは、インターカレーター性蛍光色素と、非インターカレーター性蛍光色素と、を標識することにより得ることができる。

【0016】

さらに、インターカレーター性蛍光色素が、光吸収により得た励起エネルギーを記非インターカレーター性蛍光色素に与えることで、非インターカレーター性蛍光色素が、励起エネルギーを受け取って発光するように構成してもよい。

【0017】

次に、本発明は、上記核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチドを用い、核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチドの蛍光に係る情報を検出することによって、核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチドと検出対象核酸鎖との二本鎖形成に関わる情報を得る方法を提供する。

【0018】

この方法によれば、結合又は非結合状態にある核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチドの比率を測定することが可能であるため、特に、検出対象核酸鎖の量に関わる情報を得ることができる。

【0019】

ここで、本発明において、「核酸鎖」には一本鎖及び二本鎖のDNA及びRNAが含まれる。

【0020】

10

20

30

40

50

「インターカレーター性蛍光色素」とは、二本鎖核酸の塩基対間に結合または挿入された状態で、励起光を照射されることにより蛍光を発する蛍光色素をいうものとする。具体的には、SYBR Green、Pico Green（登録商標、以下同じ）、TOTO-1、POPO-1等のインターカレーター性蛍光色素がある。

【0021】

また、「非インターカレーター性蛍光色素」とは、上記のようなインターカレーター性を有しない蛍光色素をいうものとする。「非インターカレーター性蛍光色素」は、通常使用されるCy3、Cy5等やAlexa Fluor（登録商標、以下同じ）などがある。

【発明の効果】

【0022】

本発明により、検量線を作成する必要がなく、簡便であって、解析効率に優れた遺伝子定量解析を可能とする核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチド、及びこの核酸検出用オリゴヌクレオチドの二本鎖形成に関わる情報を得る方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

以下、本発明を実施するための好適な形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

【0024】

本発明に係る核酸検出用蛍光標識オリゴヌクレオチド（以下、単に「蛍光標識オリゴヌクレオチド」という）は、検出対象核酸鎖に対し相補的な塩基配列を有し、検出対象核酸鎖との二本鎖形成によって蛍光特性が変化することを特徴とする。

【0026】

このように二本鎖形成によって蛍光特性が変化するように構成したことにより、本発明に係る蛍光標識オリゴヌクレオチドでは、結合又は非結合状態にある蛍光標識オリゴヌクレオチドの比率を測定することが可能である。

【0027】

さらに、本発明に係る蛍光標識オリゴヌクレオチドによれば、この結合又は非結合状態にある蛍光標識オリゴヌクレオチドの比率に基づいて、検出対象核酸鎖を定量することが可能となる。

【0028】

従来のインターカレーター性蛍光色素やTaqManプローブを用いた核酸鎖の検出では、プローブが検出対象核酸鎖と結合した結果生じる蛍光を検出していた。このため、非結合状態にあるプローブを検出することはできず、結合又は非結合状態にあるプローブの比率を測定することはできなかった。

【0029】

例えば、インターカレーター性蛍光色素とプローブを用いる方法では、二本鎖核酸の塩基対間に結合、挿入されたインターカレーター性蛍光色素から発せられる蛍光を検出するため、非結合状態にあるプローブを検出することはできない。また、TaqManプローブを用いる方法では、非結合状態にあるプローブはクエンチャーによって蛍光が抑制されるため、非結合状態にあるプローブを検出することはできない。

【0030】

そのため、従来は、プローブと検出対象核酸鎖との結合の結果生じた蛍光の強度と、検出対象核酸鎖量と、を対応させて、検出対象DNA量を算出しており、そのためには、予め濃度既知の標準サンプルを用いて蛍光強度とサンプル濃度を対応させた検量線を作成しておく必要があった。

【0031】

これに対して、本発明に係る蛍光標識オリゴヌクレオチドによれば、結合又は非結合状態にある蛍光標識オリゴヌクレオチドの比率に基づいて、検量線を作成することなく、検出対象核酸鎖を定量することが可能である。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 2 】

以下、図を参照しながら、本発明に係る蛍光標識オリゴヌクレオチドの構成と、この蛍光標識オリゴヌクレオチドを用いた二本鎖形成に関わる情報を得る方法について具体的に説明する。

【 0 0 3 3 】

図 1 は、本発明に係る蛍光標識オリゴヌクレオチドの第一実施形態を示す模式図である。(A) は非結合状態の蛍光標識オリゴヌクレオチド、(B) は結合状態の蛍光標識オリゴヌクレオチドを示す。

【 0 0 3 4 】

図 1 中、符号 P_1 で示す蛍光標識オリゴヌクレオチドは、検出対象核酸鎖 T ((B) 参照) に対し相補的な塩基配列を有し、インターカレーター性蛍光色素 1 と、非インターカレーター性蛍光色素 2 によって標識されている。

10

【 0 0 3 5 】

図中、符号 Ex_1 はインターカレーター性蛍光色素 1 の励起波長に対応する励起光、符号 Ex_2 は非インターカレーター性蛍光色素 2 の励起波長に対応する励起光を示す。また、図中 K_b は、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 の結合定数を表す (結合定数 K_b については後述する) 。

【 0 0 3 6 】

図 1 (A) に示す非結合状態において、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 に励起光 Ex_1 及び励起光 Ex_2 を照射すると、非インターカレーター性蛍光色素 2 のみから蛍光 Em_2 が発せられ、インターカレーター性蛍光色素 1 からは蛍光が発せられない。インターカレーター性蛍光色素 1 の蛍光は、二本鎖核酸の塩基対間に結合または挿入された状態においてのみ発せられるためである。

20

【 0 0 3 7 】

従って、非結合状態における蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 は、蛍光 Em_2 の波長によって特徴付けられる蛍光特性を有することとなる。

【 0 0 3 8 】

これに対して、図 1 (B) に示す検出対象核酸鎖 T との結合状態においては、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 と検出対象核酸鎖 T が形成する二本鎖間にインターカレーター性蛍光色素 1 が結合または挿入される。これにより、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 は、励起光 Ex_1 及び励起光 Ex_2 の照射によって、非インターカレーター性蛍光色素 2 からの蛍光 Em_2 に加えて、インターカレーター性蛍光色素 1 からの蛍光 Em_1 を発するようになる。

30

【 0 0 3 9 】

すなわち、結合状態における蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 の蛍光特性は、蛍光 Em_1 及び蛍光 Em_2 の両波長によって特徴付けられる。

【 0 0 4 0 】

このように、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 は、非結合状態 (図 1 (A)) では蛍光 Em_2 、結合状態 (同 (B)) では蛍光 Em_1 及び蛍光 Em_2 という異なる蛍光特性を示す。これにより、蛍光 Em_1 によって結合状態の蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 を、そして蛍光 Em_2 によって結合及び非結合状態 (すなわち、全量の) 蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 を検出することができる。

40

【 0 0 4 1 】

従って、励起光 Ex_1 及び励起光 Ex_2 を照射によって発生する蛍光 Em_1 の強度 I_1 及び蛍光 Em_2 の強度 I_2 を検出し、その比率を得ることで、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 の全量に対する、結合状態の蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 の量の比率を得ることが可能となる。

【 0 0 4 2 】

ここで、結合状態又は非結合状態にある蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 の比率を測定するためには、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 に標識される各蛍光色素は一定の分子数である必要がある。仮に、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 分子に標識される蛍光色素分子数にばらつきが存在すると、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 分子あたりの蛍光強度が一定

50

せず、蛍光強度に基づいて蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 の比率を測定することができなくなるためである。

【0043】

図1では、インターカレーター性蛍光色素1及び非インターカレーター性蛍光色素2をそれぞれ1分子標識した場合を示した。各蛍光色素はそれぞれ2以上であってよいが、例えば、インターカレーター性蛍光色素1を3分子かつ非インターカレーター性蛍光色素2を2分子というように、それぞれ所定の分子数を標識する必要がある。

【0044】

インターカレーター性蛍光色素1には、SYBR Green、Pico Green、TOTO-1、POPO-1等の一般に用いられるインターカレーター性蛍光色素を使用することができ、インターカレーター性を有する蛍光色素であれば特に限定されず採用することができる。

10

【0045】

非インターカレーター性蛍光色素2には、通常使用されるCy3、Cy5等やAlexa Fluor（登録商標、以下同じ）など、インターカレーター性を有しない蛍光色素を特に限定されず用いることができる。

【0046】

また、図1では、インターカレーター性蛍光色素1及び非インターカレーター性蛍光色素2をそれぞれ1種類ずつ標識した場合を示したが、標識する各蛍光色素はそれぞれ2種以上であってよく、この場合には必要に応じて3波長以上の励起光を用いて各蛍光色素の蛍光検出を行う。

20

【0047】

インターカレーター性蛍光色素1及び非インターカレーター性蛍光色素2の蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 への標識方法は、従来公知の方法で行うことができる。インターカレーター性蛍光色素1及び非インターカレーター性蛍光色素2の標識は、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 の5'末端又は3'末端に直接行うことができる。また、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 にチミンが存在するときは、インナー蛍光標識用チミンを用いて、インターカレーター性蛍光色素1又は非インターカレーター性蛍光色素2蛍光色素の一方を蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 中に導入することもできる。なお、インナー蛍光標識用ヌクレオチドとしては、現在チミンしか提供されていないが、入手が可能であるならば、インナー蛍光標識用ヌクレオチドはチミンに限定されず、どのヌクレオチドでもよい。

30

【0048】

なお、図1では、インターカレーター性蛍光色素1を5'末端、非インターカレーター性蛍光色素2を3'末端に標識した場合を示したが、これに限定されず、各蛍光色素の標識部位は任意に設定することができる。

【0049】

蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 の配列塩基数（長さ）は、検出対象核酸鎖Tの塩基配列に応じて任意に設定することができる。通常は、15~30bpsの長さを標準とする。また、塩基配列は検出対象核酸鎖Tに対して完全に相補的である必要はなく、所望のハイブリダイゼーション反応温度において検出対象核酸鎖Tと二本鎖形成が可能な限りにおいて、1塩基以上のミスマッチ（非相補的塩基）を設けてもよい。

40

【0050】

図2は、本発明に係る蛍光標識オリゴヌクレオチドの第二実施形態を示す模式図である。（A）は非結合状態の蛍光標識オリゴヌクレオチド、（B）は結合状態の蛍光標識オリゴヌクレオチドを示す。

【0051】

図2中、符号 P_2 で示す蛍光標識オリゴヌクレオチドは、図1で示した蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 と同様に、検出対象核酸鎖Tに対し相補的な塩基配列を有し、インターカレーター性蛍光色素1と、非インターカレーター性蛍光色素2によって標識されている。

【0052】

ただし、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 と異なり、インターカレーター性蛍光色素1と

50

非インターカレーター性蛍光色素2が同一末端(図では、5'末端)に標識されている。さらに、インターカレーター性蛍光色素1が光吸収により得た励起エネルギーを記非インターカレーター性蛍光色素2に与えることで、非インターカレーター性蛍光色素2が励起エネルギーを受け取って発光するように構成されている。

【0053】

このインターカレーター性蛍光色素1から非インターカレーター性蛍光色素2へ励起エネルギーが遷移する現象は、一般に「蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence resonance energy transfer: FRET)」と呼ばれる。FRETは、ドナーとなる蛍光色素とアクセプターとなる蛍光色素との間の距離が1~10nm程度の近傍にある場合、ドナーを励起すると励起エネルギーがアクセプターへ移動し、アクセプターが励起される現象をいう。FRETの発生は、ドナーの発光スペクトルとアクセプターの励起スペクトルに重なりがあり、ドナーとアクセプターがある程度近くに存在して、適切な配行を取っていることが条件となる。

10

【0054】

蛍光標識オリゴヌクレオチドP₂では、インターカレーター性蛍光色素1をドナー(励起対象蛍光色素)、非インターカレーター性蛍光色素2をアクセプター(検出対象蛍光色素)として構成している。

【0055】

インターカレーター性蛍光色素1の発光スペクトルと非インターカレーター性蛍光色素2の励起スペクトルは互いに重複している。インターカレーター性蛍光色素1及び非インターカレーター性蛍光色素2としては、例えば「表1」に示すような組合せを採用できる。

20

【0056】

【表1】

	インターカレーター性 蛍光色素1	非インターカレーター性 蛍光色素2
1	SYBR Green	TET
2	PicoGreen	Cy3
3	SYBR Green	Alexa532
4	PicoGreen	Alexa546

30

【0057】

図2(A)に示す非結合状態において、励起光Ex₂を蛍光標識オリゴヌクレオチドP₂に照射すると、非インターカレーター性蛍光色素2から蛍光Em₂が発せられる。ここで励起光Ex₁を照射したとしても、インターカレーター性蛍光色素1からは蛍光が発せられない。

【0058】

従って、非結合状態における蛍光標識オリゴヌクレオチドP₁の蛍光特性は、励起光Ex₂の照射による蛍光Em₂の発生によって特徴付けられる。

【0059】

図2(B)に示す検出対象核酸鎖Tとの結合状態では、蛍光標識オリゴヌクレオチドP₂に対し励起光Ex₁を照射すると、インターカレーター性蛍光色素1が励起され、FRET(図中、白抜き矢印参照)により励起エネルギーが非インターカレーター性蛍光色素2に移動し、非インターカレーター性蛍光色素2から蛍光Em₂が発せられる。

40

【0060】

さらに、励起光Ex₂を照射した場合には、非インターカレーター性蛍光色素2が直接励起され、蛍光Em₂が発せられる。

【0061】

すなわち、結合状態における蛍光標識オリゴヌクレオチドP₂は、励起光Ex₁及び励起光Ex₂の照射によって、とも蛍光Em₂を発する蛍光特性を有する。

【0062】

このように、蛍光標識オリゴヌクレオチドP₂は、非結合状態(図2(A))では励起光E

50

x_2 の照射による蛍光 Em_2 の発生、結合状態(同(B))では励起光 Ex_1 及び励起光 Ex_2 の照射による蛍光 Em_2 の発生という異なる蛍光特性を示す。これにより、励起光 Ex_1 の照射で発生する蛍光 Em_2 によって結合状態の蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 を、そして励起光 Ex_2 の照射で発生する蛍光 Em_2 によって結合及び非結合状態(すなわち、全量の)蛍光標識オリゴヌクレオチド P_2 を検出することができる。

【0063】

従って、励起光 Ex_1 の照射によって発生する蛍光 Em_2 の強度 I_1 、及び、励起光 Ex_2 の照射によって発生する蛍光 Em_2 の強度 I_2 を検出し、その比率を得ることで、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_2 の全量に対する、結合状態の蛍光標識オリゴヌクレオチド P_2 の量の比率を得ることが可能となる。

10

【0064】

蛍光標識オリゴヌクレオチド P_2 では、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 に比べ、測定対象となる蛍光が1波長(Em_2)のみでよく、測定機器の構成を簡略化することが可能となる。

【0065】

蛍光標識オリゴヌクレオチド P_2 において、標識する各蛍光色素を所定の一定分子数とする点、及び、標識するインターカレーター性蛍光色素1及び非インターカレーター性蛍光色素2をそれぞれ2種以上とできる点、塩基配列(長さ及びミスマッチの有無)を任意に設定可能な点は、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 で説明したのと同様である。

【0066】

インターカレーター性蛍光色素1及び非インターカレーター性蛍光色素2の標識方法についても、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 と同様の方法によって行うことができるが、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_2 では、図2に示したように、インターカレーター性蛍光色素1と非インターカレーター性蛍光色素2が同一末端(図では、5'末端)に標識することで、両蛍光色素をFRETの発生条件を満たす距離間隔(1~10nm)に位置させることが必要となる。このためには、例えば、インターカレーター性蛍光色素1と非インターカレーター性蛍光色素2を、3分岐したスペーサーの二端に結合し、残る一端に5'又は3'末端に対し結合性を有する反応基を導入し、標識を行う方法を採用できる。また、インナー蛍光標識用チミンを用いて、インターカレーター性蛍光色素1又は非インターカレーター性蛍光色素2蛍光色素の一方を蛍光標識オリゴヌクレオチド P_2 中に導入することもできる。この場合、5'又は3'末端に結合した一方の蛍光色素と、他方の蛍光色素が標識されたチミンは、1~5ヌクレオチド離れた位置がとすることが望ましい。

20

30

【0067】

次に、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 を用いる場合を例に、検出対象核酸鎖Tの量に関する情報を得る方法について説明する。

【0068】

上述の通り、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 では、蛍光 Em_1 によって結合状態の蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 を、そして蛍光 Em_2 によって結合及び非結合状態(すなわち、全量の)蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 を検出することができ、蛍光 Em_1 の強度 I_1 及び蛍光 Em_2 の強度 I_2 の比率から、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 の全量に対する、結合状態の蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 の量の比率を得ることが可能である。

40

【0069】

これにより、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_1 では、以下の式に基づいて検出対象核酸鎖Tを定量することができる。

【0070】

【数1】

$$\text{Conc} = K_b \cdot (R - R_i) / (R_a - R) \quad \dots \text{式(1)}$$

【0071】

【数2】

$$R = (I_1 - B_1) / (I_2 - B_2) \cdots \text{式(2)}$$

【0072】

ここで、「Conc」は検出対象核酸鎖Tの濃度 (mol/l)、「Kb」は蛍光標識オリゴヌクレオチドP₁の結合定数を示す。

【0073】

「I₁」は励起光Ex₁による蛍光Em₁の強度、「B₁」はそのバックグラウンド値 (反応溶液中に蛍光標識オリゴヌクレオチドP₁がない状態において、励起光Ex₁の照射により得られる蛍光Em₁の強度)を表す。また、「I₂」は励起光Ex₂による蛍光Em₂の強度、「B₂」はそのバックグラウンド値を表す。

10

【0074】

また、「R_i」は反応溶液中に検出対象核酸鎖Tがない状態のR、「R_a」は検出対象核酸鎖Tを蛍光標識オリゴヌクレオチドP₁に対して過剰量投入したときのRを示す。「R_a」、「R_i」は予め同じ測定系を用いて求めておくことが望ましい。

【0075】

結合定数Kbは、蛍光標識オリゴヌクレオチドP₁の塩基配列から算出される融解温度 (T_m) から、以下の式 (3) により求めることができる。式 (3) 中、「a」は係数である。

【0076】

【数3】

$$Kb = a \cdot Tm \cdots \text{式(3)}$$

20

【0077】

また、結合定数Kbは、濃度既知の標準サンプルを用いれば、予め求めておくこともできる。

【0078】

蛍光標識オリゴヌクレオチドP₁によれば、蛍光Em₁の強度I₁及び蛍光Em₂の強度I₂を検出し、式 (1) 及び式 (2) に当てはめることで、測定の都度測定の都度検量線を引くことなく、検出された蛍光強度から直接、検出対象核酸の濃度を測定することが可能となる。

【0079】

また、この方法では、式 (2) に示されるように、バックグラウンド補正後の蛍光強度I₁を蛍光強度I₂で除するため、インターカレーター性蛍光色素等の投入量のばらつきや分光蛍光度計の光源の不安定さなどに起因した誤差が相殺され、測定誤差を生じることがない。

30

【0080】

次に、蛍光標識オリゴヌクレオチドP₂を用いたリアルタイムPCRを例に、検出対象核酸鎖Tの量に関わる情報を得る方法について、図3を用いさらに具体的に説明する。

【0081】

まず、検出対象核酸鎖Tに対して相補的な塩基配列を有する蛍光標識オリゴヌクレオチドP₂を複数設計する。各蛍光標識オリゴヌクレオチドP₂の5'末端にインターカレーター性蛍光色素1としてSYBR Green (中心励起波長: 494nm、発光中心波長: 521nm)、非インターカレーター性蛍光色素2としてCy3 (中心励起波長: 540nm、発光中心波長: 563nm) を標識する。

40

【0082】

各蛍光標識オリゴヌクレオチドP₂について、その塩基配列から融解温度T_m及び所定温度 (例えば、50) での結合定数Kbを求める (上記式 (3) 参照)。

【0083】

また、結合定数Kbは、各蛍光標識オリゴヌクレオチドP₂に相補的な塩基配列を有する濃度既知の標準サンプルから結合定数Kbを求めてもよい。具体的には、濃度0 μM、0.5 μM、1 μM、2 μM、5 μM、10 μM、10mMの標準サンプルの希釈系列を作製し、蛍光標識オリゴヌ

50

クレオチド P_2 及び通常用いられるPCR試薬と混合する。そして、標準サンプルを90 程度に加熱し、一本鎖にディネーチャー（変性）させた後、所定の温度（例えば、50 ）に降温した上、SYBR Greenを波長494nmの励起光 Ex_1 で励起し、発生する波長563nmの蛍光 Em_2 の強度 I_1 を検出する。同時に、Cy3を波長540nmの励起光 Ex_2 で励起し、蛍光 Em_2 の強度 I_2 を検出する。図4に、各濃度で検出される蛍光強度 I_1 及び I_2 の一例を示す。図中、(A)は各濃度における蛍光強度 I_1 を、(B)は蛍光強度 I_2 を示す。各濃度の標準サンプルについて得られた蛍光強度 I_1 及び I_2 を、上記式(1)及び式(2)に当てはめれば、最小2乗法により、式に最適となる結合定数 K_b を算出することができる。

【0084】

なお、式(1)及び式(2)において、「Conc」は標準サンプルの濃度(mol/l)、「 K_b 」は蛍光標識オリゴヌクレオチド P_2 の結合定数である。「 I_1 」は励起光 Ex_1 494nmによる蛍光 Em_2 563nmの強度、「 B_1 」はそのバックグラウンド値(0 μ Mでの蛍光 Em_2 の強度)であり、「 I_2 」は励起光 Ex_2 540nmによる蛍光 Em_2 563nmの強度、「 B_2 」はそのバックグラウンド値である。「 R_i 」は0 μ MでのR、「 R_a 」は10mMでのRである。

10

【0085】

次に、式(3)を用いて、または式(1)及び(2)を用いて、算出された結合定数 K_b に基づいて、複数設計した蛍光標識オリゴヌクレオチド P_2 から結合定数 K_b が数 μ Mとなるものを選択する。

【0086】

濃度未知の検出対象核酸鎖Tを含むPCR反応液に、選択された蛍光標識オリゴヌクレオチド P_2 を添加し(通常、終濃度200 μ M程度)、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_2 をプライマーとして、定法によりPCR反応を行なう。

20

【0087】

PCR反応のアニーリング温度は、結合定数 K_b の算出の際に設定した所定の温度(上記の例であれば、50)とし、このアニーリング反応中において以下のように蛍光強度の検出を行う。検出は、PCR反応による検出対象核酸鎖Tの増幅が指数関数的に進行しているサイクル数にて行う。

【0088】

すなわち、検出対象核酸鎖Tが入っていない溶液を励起光 Ex_1 494nmで励起し、蛍光 Em_2 563nmの強度 B_1 を取得する。検出対象核酸鎖Tが入っていない溶液を励起光 Ex_2 540nmで励起し、蛍光 Em_2 563nmの強度 B_2 を取得する。

30

【0089】

検出対象核酸鎖Tが入っている溶液を励起光 Ex_1 494nmで励起し、蛍光 Em_2 563nmの強度 I_1 を取得する。測定対象が入っている溶液を励起光 Ex_2 540nmで励起し、蛍光 Em_2 563nmの強度 I_2 を取得する。

【0090】

そして、得られた蛍光強度を、上記式(1)及び式(2)に当てはめることにより、濃度未知の検出対象核酸鎖Tの濃度を算出する。

【0091】

このように、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_2 を用いたリアルタイムPCRでは、蛍光強度 I_1 及び蛍光強度 I_2 を検出し、式(1)及び式(2)に当てはめることで、測定の都度検量線を引くことなく、検出された蛍光強度から直接、検出対象核酸の濃度を測定することが可能となる。

40

【0092】

なお、上述した標準サンプルを用いた結合定数 K_b の算出は、測定の都度行うものではなく、一旦結合定数 K_b を求めた後は測定の都度算出する必要はない。さらに、標準サンプルを用いることなく、蛍光標識オリゴヌクレオチド P_2 の塩基配列から上記式(3)に基づいて結合定数 K_b を算出することも当然に可能である。

【0093】

また、この方法では、式(2)に示されるように、バックグラウンド補正後の蛍光強度 I_1

50

を蛍光強度 I_2 で除するため、インターカレーター性蛍光色素等の投入量のばらつきや分光蛍光光度計の光源の不安定さなどに起因した誤差が相殺され、測定誤差を生じることがない。

【産業上の利用可能性】

【0094】

本発明に係る蛍光標識オリゴヌクレオチド、及びこのオリゴヌクレオチドの二本鎖形成に関わる情報を得る方法は、核酸鎖の検出のために用いることができ、特に核酸鎖の定量のために好適に用いられる。

【0095】

このため、各種疾患の分子メカニズムの解明や診断方法の確立、さらには創薬ターゲットの探索等を目的としたリアルタイムPCR等の細胞や組織内の遺伝子発現を定量的に解析する技術に応用が可能である。

10

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図1】本発明に係る蛍光標識オリゴヌクレオチドの第一実施形態を示す模式図である。

【図2】本発明に係る蛍光標識オリゴヌクレオチドの第二実施形態を示す模式図である。

【図3】インターカレーター性蛍光色素1としてSYBR Green、非インターカレーター性蛍光色素2としてCy3を標識した第二実施形態に係る蛍光標識オリゴヌクレオチドを示す模式図である。

【図4】標準サンプルを用いて取得された蛍光スペクトルを示す図である。

20

【符号の説明】

【0097】

P_1 蛍光標識オリゴヌクレオチド（第一実施形態）

P_2 蛍光標識オリゴヌクレオチド（第二実施形態）

T 検出対象核酸鎖

1 インターカレーター性蛍光色素

2 非インターカレーター性蛍光色素

Ex_1 励起光（インターカレーター性蛍光色素）

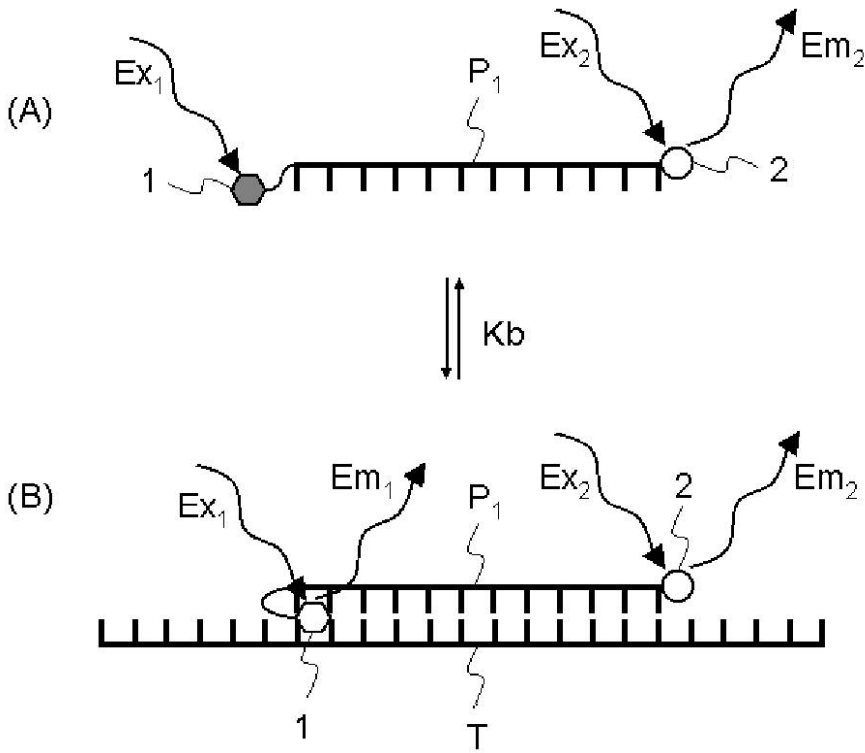
Ex_2 励起光（非インターカレーター性蛍光色素）

Em_1 蛍光（インターカレーター性蛍光色素）

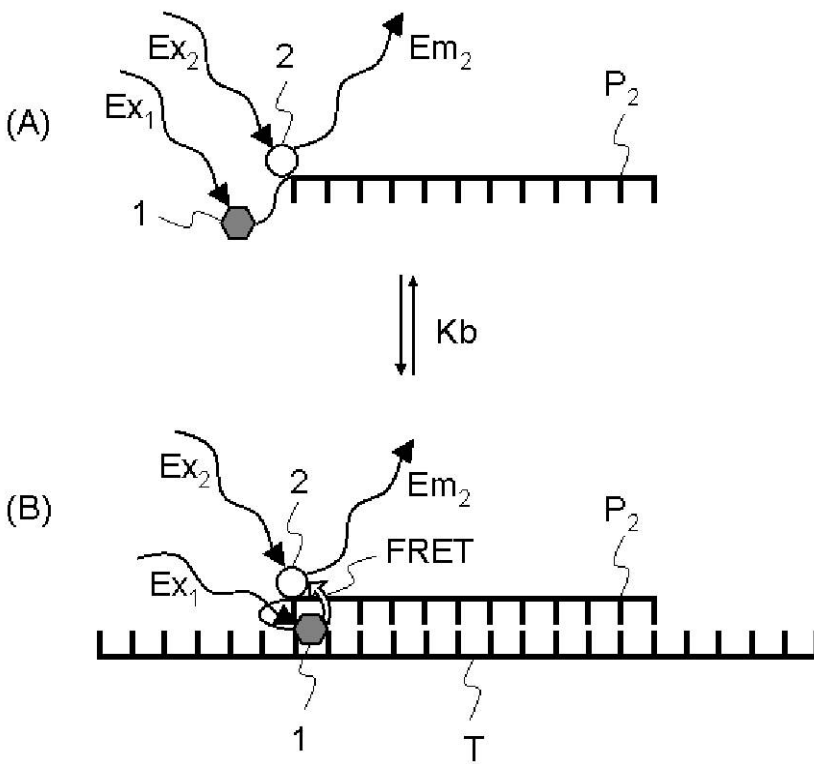
Em_2 蛍光（非インターカレーター性蛍光色素）

30

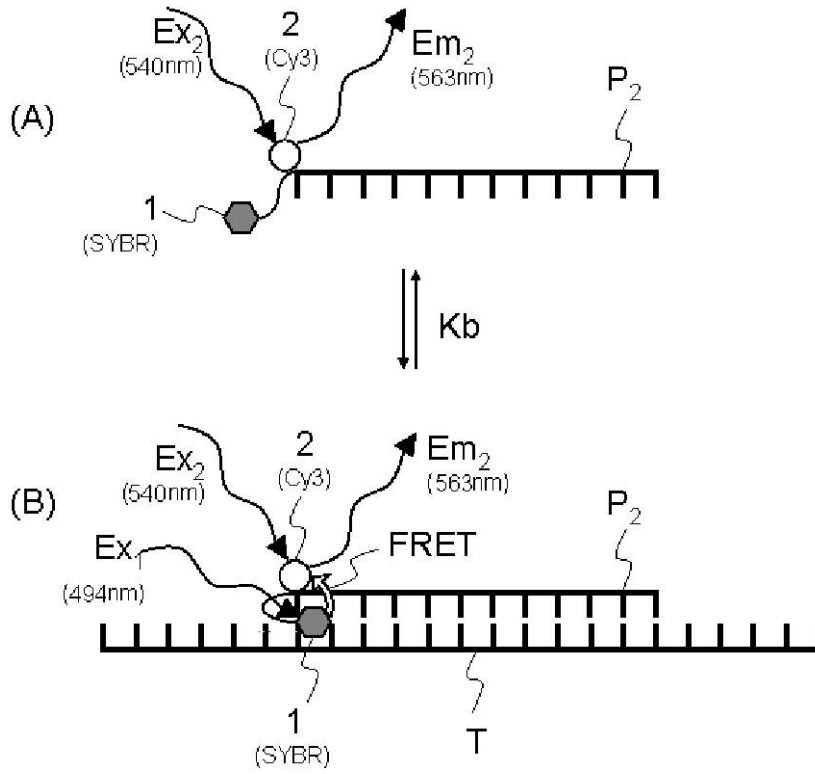
【 図 1 】



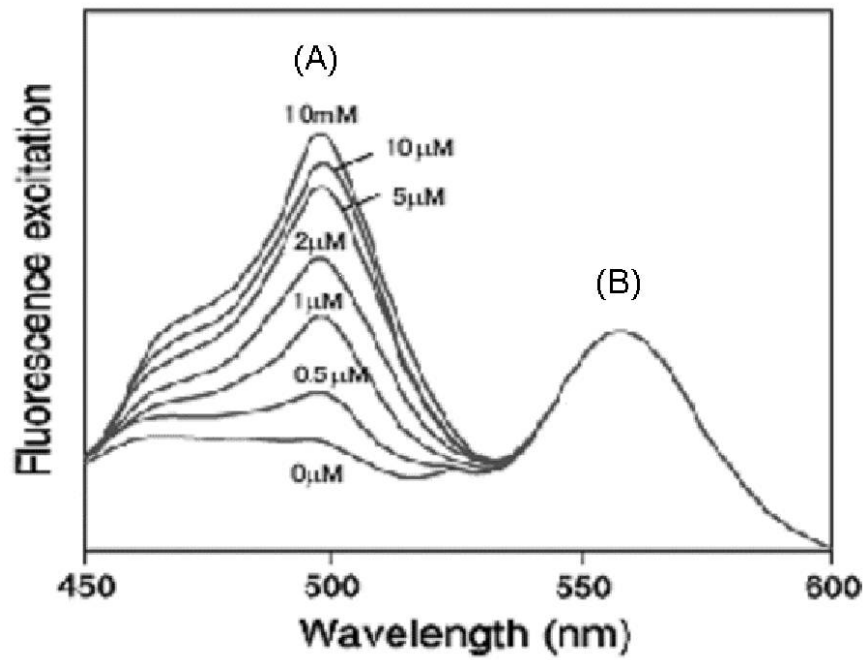
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開平10-127300(JP,A)
特表2000-508660(JP,A)
特開2002-355084(JP,A)
特開平10-332701(JP,A)
特開2006-340663(JP,A)
特開2007-116999(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-1/70

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)