



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0124033
 (43) 공개일자 2012년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01)
 (21) 출원번호 **10-2012-0044464**
 (22) 출원일자 **2012년04월27일**
 심사청구일자 **없음**
 (30) 우선권주장
 JP-P-2011-102987 2011년05월02일 일본(JP)
 (뒷면에 계속)

(71) 출원인
아크레이 가부시카가이사
 일본국 교토후 교토시 미나미쿠 히가시쿠조 니시 아케타초 57
 (72) 발명자
히라이 미츠하루
 일본국 교토후 교토시 가미교쿠 간스인초 59 요우스이엔나이 아크레이 가부시카가이사 내
구로세 가오루
 일본국 교토후 교토시 가미교쿠 간스인초 59 요우스이엔나이 아크레이 가부시카가이사 내
이구치 아키
 일본국 교토후 교토시 가미교쿠 간스인초 59 요우스이엔나이 아크레이 가부시카가이사 내
 (74) 대리인
문두현, 문기상

전체 청구항 수 : 총 13 항

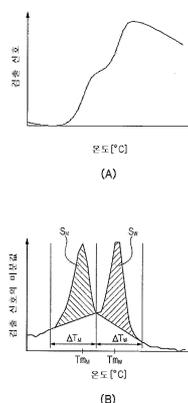
(54) 발명의 명칭 **유전자 변이 검출용 프로브, 유전자 변이 검출 방법 및 유전자 변이 검출용 시약 키트**

(57) 요약

[과제] 유전자를 코드하는 염기 서열이 복수의 유전자 변이를 포함하고 있었다고 해도, 검출 대상 외의 유전자 변이의 영향을 받지 않고, 검출 대상으로 되는 특정의 유전자 변이를 특이적으로 검출하는 것을 가능하게 하는 유전자 변이 검출용 프로브를 제공한다.

[해결 수단] (P1) 상기 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 상보적인 염기를 갖고, 상기 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기를 가지며, 상기 대상 유전자를 코드하는 염기 서열의 일부 또는 전체에 상보적인 염기 서열에 대하여 적어도 80% 이상의 동일성을 갖는 올리고뉴클레오타이드 등이며, 목적 유전자 변이와 비목적 유전자 변이를 포함하는 대상 유전자를 코드하는 염기 서열에 있어서의 그 목적 유전자 변이를 검출하기 위한 유전자 변이 검출용 프로브.

대표도 - 도1



(30) 우선권주장

JP-P-2011-218114 2011년09월30일 일본(JP)

JP-P-2012-082391 2012년03월30일 일본(JP)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 P1, P1-1, P1' 및 P1'-1로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드이며, 목적 유전자 변이와 비목적 유전자 변이를 포함하는 대상 유전자를 코딩하는 염기 서열에 있어서의 상기 목적 유전자 변이를 검출하기 위한 유전자 변이 검출용 프로브:

(P1) 상기 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 상보적인 염기를 갖고, 상기 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기를 가지며, 상기 대상 유전자를 코딩하는 염기 서열의 일부 또는 전체에 상보적인 염기 서열에 대하여 적어도 80% 이상의 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드;

(P1-1) 상기 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 상보적인 염기를 갖고, 상기 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기를 가지며, 상기 대상 유전자를 코딩하는 염기 서열과 동일한 염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드에 대하여 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오티드;

(P1') 상기 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 동일한 염기를 갖고, 상기 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기를 가지며, 상기 대상 유전자를 코딩하는 염기 서열의 일부 또는 전체에 대하여 적어도 80% 이상의 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드; 및

(P1'-1) 상기 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 동일한 염기를 갖고, 상기 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기를 가지며, 상기 대상 유전자를 코딩하는 염기 서열에 상보적인 염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드에 대하여 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오티드.

청구항 2

제1항에 있어서,

하기 (a)-(f) 중의 어느 하나의 관계를 만족시키는 유전자 변이 검출용 프로브:

(a) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 A 또는 T의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 A 또는 T의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기 또는 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 C 또는 G이다.

(b) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 C 또는 G의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 C 또는 G의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기 또는 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 A 또는 T이다.

(c) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 A 또는 C의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 A 또는 C의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기는 A 또는 C이며, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 T 또는 G이다.

(d) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 A 또는 G의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 A 또는 G의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기는 A 또는 G이며, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 T 또는 C이다.

(e) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 T 또는 C의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 T 또는 C의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기는 T 또는 C이며, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 A 또는 G이다.

(f) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 T 또는 G의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 T 또는 G의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기는 T 또는 G이며, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 A 또는 C이다.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 올리고뉴클레오티드는, 형광 표지 올리고뉴클레오티드인 유전자 변이 검출용 프로브.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 형광 표지 올리고뉴클레오티드는, 3' 말단 또는 5' 말단의 염기가 시토신이며, 그 시토신이 형광 색소로 표지되어 있는 유전자 변이 검출용 프로브.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 형광 표지 올리고뉴클레오티드는, 3' 말단 또는 5' 말단으로부터 세어서 1?3번째 염기 중의 어느 것에 위치하는 유전자 변이 검출용 프로브.

청구항 6

제1항에 있어서,

융해 곡선 분석용의 프로브인 유전자 변이 검출용 프로브.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 형광 표지 올리고뉴클레오티드는, 표적 서열에 하이브리다이즈하고 있지 않을 때의 형광 강도에 비하여, 표적 서열에 하이브리다이즈하고 있을 때의 형광 강도가 감소 또는 증가하는 유전자 변이 검출용 프로브.

청구항 8

제3항에 있어서,

상기 형광 표지 올리고뉴클레오티드는, 표적 서열에 하이브리다이즈하고 있지 않을 때의 형광 강도에 비하여, 표적 서열에 하이브리다이즈하고 있을 때의 형광 강도가 감소하는 유전자 변이 검출용 프로브.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브를 사용함으로써, 검출 대상으로 되는 목적 유전자 변이를 검출하는 유전자 변이 검출 방법.

청구항 10

(I) 제3항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브 및 시료 중의 1분쇄 핵산을 접촉시켜서, 하이브리드를 얻는 것과,

(II) 상기 하이브리드를 포함하는 시료의 온도를 변화시킴으로써, 상기 하이브리드를 해리시켜, 상기 하이브리드의 해리에 의거하는 형광 시그널의 변동을 측정하는 것과,

(Ⅲ) 상기 형광 시그널의 변동에 의거하여 하이브리드의 해리 온도인 T_m 값을 얻는 것과,

(Ⅳ) 상기 T_m 값에 의거하여, 상기 시료 중의 1분쇄 핵산에 있어서의, 목적 유전자 변이의 존재를 검출하는 것을 포함하는 목적 유전자 변이 검출 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 (Ⅰ)의 하이브리드를 얻기 전 또는 상기 (Ⅰ)의 하이브리드를 얻는 것과 동시에, 핵산을 증폭하는 것을 더 포함하는 목적 유전자 변이 검출 방법.

청구항 12

제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브를 포함하는 유전자 변이 검출용 시약 키트.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중의 어느 한 항에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브가 하이브리다이징하는 영역을 갖는 염기 서열을 증폭 가능한 프라이머를 더 포함하는 유전자 변이 검출용 시약 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은, 유전자 변이 검출용 프로브에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 「유전자 변이」이란 유전자를 코딩하는 염기 서열 중의 염기가, 어떤 집단의 대다수의 형질과는 다른 염기로 되는 것을 가리키며, 예를 들면 단일 염기 치환, 결실, 삽입, 유전자 융합 등의 유전자 구조(염기 서열)의 차이가 발생하여 있는 것이다.

[0003] 한편, 「유전자 다형」이란, 「유전자 변이」의 일부로서, 어떤 집단에 있어서 가장 빈도가 높은 변이 혹은 알렐(대립 유전자)이 99% 이하의 상태, 바꿔 말하면, 빈도가 낮은 변이나 알렐의 합계 빈도가 1% 이상 있는 상태의 것을 가리킨다. 이 1%라고 하는 값은 편의적이지만, 의미를 가진다. 매 세대 발생하는 새로운 돌연 변이의 대부분은 자연선택에 의해 집단 내로부터 제거되는 것으로부터, 그 평형 빈도가 이론적으로 계산된다. 이 평형 빈도보다 높은 값, 1%을 「다형」의 기준으로 하고 있다. 즉, 다형 현상이 나타난다는 것은, 어떠한 메커니즘에 의해 집단 중에서 그것들의 변이의 빈도가 높아지고, 수세대나 걸쳐 유지되어 온 것을 의미한다.

[0004] 유전자 변이와, 각종 질환의 이환율이나 약제 투여에 의한 부작용 발생 빈도와와의 관련성이 지적되고 있으며, 유전자 다형을 검출함으로써, 각종 질환 발생 빈도나, 약제 내성 등의 예측이 가능하게 되는 것으로 여겨지고 있다. 그 때문에 유전자 변이를 정확하게 또한 단시간, 저비용으로 간편하게 측정하는 방법이 요망되고 있었다.

[0005] 유전자 다형 및 유전자 변이의 종류에는, 염기 서열 중의 염기가 하나 치환함으로써 생기는 단일 염기 치환이나, 하나 이상의 염기가 결손된 결실형 변이, 하나 이상의 염기가 삽입된 삽입형 변이, 또 유전자 융합 등이 존재한다. 이하, 유전자 다형과 유전자 변이를 합하여, 유전자 변이라고 부른다.

[0006] 현재, 유전자 변이를 측정하는 방법으로서, 변이를 포함하는 영역을 PCR법으로 증폭한 후, 형광 색소로 표지된 핵산 프로브를, 표적 핵산에 하이브리다이제이션시켜, 형광 색소의 발광의 감소량을 측정하고, 용해 곡선 분석의 결과에 의거하여 염기 서열의 변이를 해석하는 방법이 알려져 있다(특허문헌 1 참조).

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 일본국 공개특허공보 특개2002-119291호 공보

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 그러나, 상기 핵산 프로브를 사용하는 방법에 의해, 유전자 변이를 검출하려면, 변이마다 적절한 서열을 갖는 핵산 프로브를 사용할 필요가 있다. 또한 핵산 프로브를 사용하여 융해 곡선 분석을 할 때에, 핵산 프로브 내에, 검출 대상으로 되는 유전자 변이 이외의 변이가 존재하면, 유전자 변이 검출 대상 외의 유전자 변이의 영향을 받음으로써, 융해 온도(T_m 값)에 불균일이 생기기 때문에, 검출 대상으로 되는 유전자 변이를 특이적으로 검출하는 것이 곤란하게 된다.

[0009] 이들 현상을 감안하여, 유전자를 코드하는 염기 서열이 복수의 유전자 변이를 포함하고 있었다고 해도, 유전자 변이 검출 대상 외의 유전자 변이의 영향을 받지 않고, 검출 대상으로 되는 특정의 유전자 변이를 정밀도 좋게 검출하기 위한 새로운 기술 개발이 요망되고 있었다.

[0010] 본 발명은, 유전자를 코드하는 염기 서열에 포함되는 복수의 유전자 변이로부터, 비목적 유전자 변이의 염기형의 영향을 받지 않고, 검출 대상으로 되는 특정의 유전자 변이만을 특이적으로 검출하는 것을 가능하게 하는 유전자 변이 검출용 프로브, 이것을 사용하는 유전자 변이 검출 방법을 제공하는 것을 과제로 한다. 또한 본 발명은, 당해 유전자 변이 검출용 프로브를 사용한 유전자 변이 검출용 시약 키트를 제공하는 것을 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 이하와 같다.

[0012] <1> 하기 P1, P1-1, P1' 및 P1'-1로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드이며, 목적 유전자 변이와 비목적 유전자 변이를 포함하는 대상 유전자를 코드하는 염기 서열에 있어서의 상기 목적 유전자 변이를 검출하기 위한 유전자 변이 검출용 프로브:

[0013] (P1) 상기 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 상보적인 염기를 갖고, 상기 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기를 가지며, 상기 대상 유전자를 코드하는 염기 서열의 일부 또는 전체에 상보적인 염기 서열에 대하여 적어도 80% 이상의 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드;

[0014] (P1-1) 상기 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 상보적인 염기를 갖고, 상기 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기를 가지며, 상기 대상 유전자를 코드하는 염기 서열과 동일한 염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드에 대하여 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오티드;

[0015] (P1') 상기 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 동일한 염기를 갖고, 상기 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기를 가지며, 상기 대상 유전자를 코드하는 염기 서열의 일부 또는 전체에 대하여 적어도 80% 이상의 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드; 및

[0016] (P1'-1) 상기 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 동일한 염기를 갖고, 상기 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기를 가지며, 상기 대상 유전자를 코드하는 염기 서열에 상보적인 염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드에 대하여 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오티드.

[0017] <2> 하기 (a)-(f) 중의 어느 하나의 관계를 만족시키는 <1>에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브:

[0018] (a) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 A 또는 T의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변

이의 변이형 염기가 A 또는 T의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기 또는 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 C 또는 G이다.

- [0019] (b) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 C 또는 G의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 C 또는 G의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기 또는 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 A 또는 T이다.
- [0020] (c) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 A 또는 C의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 A 또는 C의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기는 A 또는 C이며, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 T 또는 G이다.
- [0021] (d) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 A 또는 G의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 A 또는 G의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기는 A 또는 G이며, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 T 또는 C이다.
- [0022] (e) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 T 또는 C의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 T 또는 C의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기는 T 또는 C이며, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 A 또는 G이다.
- [0023] (f) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 T 또는 G의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 T 또는 G의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기는 T 또는 G이며, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 A 또는 C이다.
- [0024] <3> 상기 올리고뉴클레오티드는, 형광 표지 올리고뉴클레오티드인 <1> 또는 <2>에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브.
- [0025] <4> 상기 형광 표지 올리고뉴클레오티드는, 3' 말단 또는 5' 말단의 염기가 시토신이며, 그 시토신이 형광 색소로 표지되어 있는 <3>에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브.
- [0026] <5> 상기 형광 표지 올리고뉴클레오티드는, 3' 말단 또는 5' 말단으로부터 세어서 1?3번째 염기 중의 어느 것에 위치하는 <3> 또는 <4>에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브.
- [0027] <6> 용해 곡선 분석용의 프로브인, <1> ? <5> 중의 어느 하나에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브.
- [0028] <7> 상기 형광 표지 올리고뉴클레오티드는, 표적 서열에 하이브리다이즈하고 있지 않을 때의 형광 강도에 비하여, 표적 서열에 하이브리다이즈하고 있을 때의 형광 강도가 감소 또는 증가하는, <3> ? <6> 중의 어느 하나에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브.
- [0029] <8> 상기 형광 표지 올리고뉴클레오티드는, 표적 서열에 하이브리다이즈하고 있지 않을 때의 형광 강도에 비하여, 표적 서열에 하이브리다이즈하고 있을 때의 형광 강도가 감소하는, <3>?<7> 중의 어느 하나에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브.
- [0030] <9> <1> ? <8> 중의 어느 하나에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브를 사용함으로써, 검출 대상으로 되는 목적 유전자 변이를 검출하는 유전자 변이 검출 방법.
- [0031] <10> (I) <3> ? <8> 중의 어느 하나에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브 및 시료 중의 1본쇄 핵산을 접촉시켜서, 하이브리드를 얻는 것과, (II) 상기 하이브리드를 포함하는 시료의 온도를 변화시킴으로써, 상기 하이브리드를 해리시켜, 상기 하이브리드의 해리에 의거하는 형광 시그널의 변동을 측정하는 것과, (III) 상기 형광 시그널의 변동에 의거하여 하이브리드의 해리 온도인 T_m 값을 얻는 것과, (IV) 상기 T_m 값에 의거하여, 상기 시료 중의 1본쇄 핵산에 있어서의, 목적 유전자 변이의 존재를 검출하는 것을 포함하는 목적 유전자 변이 검출 방법.
- [0032] <11> 상기 (I)의 하이브리드를 얻기 전 또는 상기 (I)의 하이브리드를 얻는 것과 동시에, 핵산을 증폭하는 것을

더 포함하는, <10>에 기재된 목적 유전자 변이 검출 방법.

[0033] <12> <1> ? <8> 중의 어느 하나에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브를 포함하는 유전자 변이 검출용 시약 키트.

[0034] <13> <1> ? <8> 중의 어느 하나에 기재된 유전자 변이 검출용 프로브가 하이브리다이징하는 영역을 갖는 염기 서열을 증폭 가능한 프라이머를 더 포함하는, <12>에 기재된 유전자 변이 검출용 시약 키트.

발명의 효과

[0035] 본 발명에 의하면, 유전자를 코딩하는 염기 서열이 복수의 유전자 변이를 포함하고 있었다고 해도, 검출 대상 외의 유전자 변이의 영향을 받지 않고, 검출 대상으로 되는 특정의 유전자 변이를 특이적으로 검출하는 것을 가능하게 하는 유전자 변이 검출용 프로브, 이것을 사용하는 유전자 변이 검출 방법을 제공할 수 있다. 또한 본 발명에 의하면, 당해 유전자 변이 검출용 프로브를 사용한 유전자 변이 검출용 시약 키트를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1의 (A)는 핵산 혼합물의 용해 곡선의 일례이며, (B)는 미분 용해 곡선의 일례.

도 2의 (A)?(P)은, 본 발명의 실시예 1에 의한 시료의 미분 용해 곡선.

도 3의 (A)?(H)은, 본 발명의 실시예 2에 의한 시료의 미분 용해 곡선.

도 4의 (A)?(P)은, 본 발명의 비교예 1에 의한 시료의 미분 용해 곡선.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 본 발명에 의한 유전자 변이 검출용 프로브는, P1, P1-1, P1' 및 P1'-1로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드이며, 목적 유전자 변이와 비목적 유전자 변이를 포함하는 대상 유전자를 코딩하는 염기 서열에 있어서의 그 목적 유전자 변이를 검출하기 위한 유전자 변이 검출용 프로브이다.

[0038] 이에 따라 본 발명에 의한 유전자 변이 검출용 프로브는, 유전자를 코딩하는 염기 서열이 복수의 유전자 변이를 포함하고 있었다고 해도, 검출 대상 외의 유전자 변이의 영향을 받지 않고, 검출 대상으로 되는 특정의 유전자 변이를 특이적으로 검출한다.

[0039] 본 발명에 의한 유전자 변이 검출 방법은, 상기 유전자 변이를 검출하기 위한 유전자 변이 검출용 프로브를 적어도 1종 사용하고, 유전자를 코딩하는 염기 서열이 복수의 유전자 변이를 포함하고 있었다고 해도, 유전자 변이 검출 대상 외의 유전자 변이의 영향을 받지 않고, 검출 대상으로 되는 목적 유전자 변이를 검출하는 것을 포함하는 방법이다.

[0040] 본 발명에 의한 유전자 변이 검출용 시약 세트는, 목적 유전자 변이를 검출하기 위한 상기 유전자 변이 검출용 프로브를 포함하는 것이다.

[0041] 본 발명에 있어서, 검출 대상으로 되는 시료 중의 시료 핵산, 유전자 변이 검출용 프로브 또는 프라이머의 개개의 서열에 관하여, 이들 서로의 상보적인 관계에 의거하여 기술된 사항은, 특히 언급하지 않는 한, 각각의 염기 서열과, 각 염기 서열에 대하여 상보적인 염기 서열에 관해서도 적용된다. 각 염기 서열에 대하여 상보적인 당해 염기 서열에 관하여 본 발명의 사항을 적용하는 때는, 당해 상보적인 염기 서열이 인식하는 염기 서열은, 당업자에 있어서의 기술 상식의 범위 내에서, 대응하는 본 명세서에 기재된 서열에 상보적인 서열로, 명세서 전체를 바꾸어 읽는 것으로 한다.

[0042] 본 발명에 있어서, 「Tm값」이란, 2분쇄 핵산이 해리하는 온도(해리 온도: Tm)이며, 일반적으로, 260nm에 있어서의 흡광도가, 흡광도 전상승분의 50%에 달했을 때의 온도로 정의된다. 즉 2분쇄 핵산, 예를 들면 2분쇄 DNA를 포함하는 용액을 가열해 가면, 260nm에 있어서의 흡광도가 상승한다. 이것은, 2분쇄 DNA에 있어서의 양 사슬간의 수소 결합이 가열에 의해 풀어져, 1분쇄 DNA로 해리(DNA의 용해)하는 것이 원인이다. 그리고, 모든 2분쇄 DNA가 해리하여 1분쇄 DNA로 되면, 그 흡광도는 가열 개시 시의 흡광도(2분쇄 DNA만의 흡광도)의 약 1.5배 정도를 나타내고, 이것에 의해 용해가 완료했다고 판단할 수 있다. Tm값은, 이 현상에 의거하여 설정된다.

[0043] 본 발명에 있어서, 올리고뉴클레오티드의 서열에 관하여 「3' 말단으로부터 세어서 1?3번째 염기」라고 하는 경우는, 올리고뉴클레오티드 쇠의 3' 말단 염기를 1번째로서 센다. 마찬가지로 「5' 말단으로부터 세어서 1?3번

제 염기」라고 하는 경우는, 올리고뉴클레오티드 쇠의 5' 말단 염기를 1번째 염기로서 센다.

- [0044] 본 명세서에 있어서 「공정」이라는 용어는, 독립한 공정뿐만 아니라, 다른 공정과 명확하게 구별할 수 없는 경우이어도 본 공정의 소기의 작용이 달성되면, 본 용어에 포함된다.
- [0045] 본 명세서에 있어서 「?」 을 사용하여 나타낸 수치범위는, 「?」의 전후에 기재되는 수치를 각각 최소값 및 최대값으로서 포함하는 범위를 나타낸다.
- [0046] 또한 본 발명에 있어서, 조성물 중의 각 성분의 양은, 조성물 중에 각 성분에 해당하는 물질이 복수 존재하는 경우는, 특히 언급하지 않는 한, 조성물 중에 존재하는 당해 복수의 물질의 합계량을 의미한다.
- [0047] 이하, 본 발명에 관하여 설명한다.
- [0048] <유전자 변이 검출용 프로브>
- [0049] 본 발명에 의한 유전자 변이 검출용 프로브는, 하기 P1, P1-1, P1' 및 P1'-1로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 올리고뉴클레오티드이며, 목적 유전자 변이와 비목적 유전자 변이를 포함하는 대상 유전자를 코드하는 염기 서열에 있어서의 상기 목적 유전자 변이를 검출하기 위한 유전자 변이 검출용 프로브이다.
- [0050] 이에 따라 본 발명에 의한 유전자 변이 검출용 프로브는, 유전자를 코드하는 염기 서열이 복수의 유전자 변이를 포함하고 있었다고 해도, 검출 대상 외의 유전자 변이의 영향을 받지 않고, 검출 대상으로 되는 특정의 유전자 변이를 특이적으로 검출한다.
- [0051] (P1) 상기 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 상보적인 염기를 갖고, 상기 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기를 가지며, 상기 대상 유전자를 코드하는 염기 서열의 일부 또는 전체에 상보적인 염기 서열에 대하여 적어도 80% 이상의 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드;
- [0052] (P1-1) 상기 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 상보적인 염기를 갖고, 상기 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기를 가지며, 상기 대상 유전자를 코드하는 염기 서열과 동일한 염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드에 대하여 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오티드;
- [0053] (P1') 상기 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 동일한 염기를 갖고, 상기 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기를 가지며, 상기 대상 유전자를 코드하는 염기 서열의 일부 또는 전체에 대하여 적어도 80% 이상의 동일성을 갖는 올리고뉴클레오티드; 및
- [0054] (P1'-1) 상기 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 동일한 염기를 갖고, 상기 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치에 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기를 가지며, 상기 대상 유전자를 코드하는 염기 서열에 상보적인 염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드에 대하여 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징하는 올리고뉴클레오티드.
- [0055] 본 발명에서 "목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치"란, 올리고뉴클레오티드의 염기 서열과 시료 염기 서열이 정렬하여 서로 가장 잘 매치할 때 목적 유전자 변이와 비목적 유전자 변이를 포함하는 시료 염기 서열에서 목적 유전자 변이의 염기 위치에 대응하는 올리고뉴클레오티드 내의 염기 위치를 말한다. 마찬가지로, 본 발명에서 "비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치"란, 올리고뉴클레오티드의 염기 서열과 시료 염기 서열이 정렬하여 서로 가장 잘 매치할 때 목적 유전자 변이와 비목적 유전자 변이를 포함하는 시료 염기 서열에서 비목적 유전자 변이의 염기 위치에 대응하는 올리고뉴클레오티드 내의 염기 위치를 말한다. 목적 유전자 변이의 야생형 염기란 목적 유전자 변이의 염기 위치(즉, 목적 유전자 변이의 변이형 염기로의 변이가 일어날 수 있는 염기 위치)의 야생형 염기를 말한다.
- [0056] 아데닌(A) 및 티민(T)과, 구아닌(G) 및 시토신(C)과는 각각 수소 결합을 형성한다. AT쌍이 2개의 수소 결합을 형성하는 것에 대해, GC쌍은 3개의 수소 결합을 형성한다. 즉 「A-T간」, 「G-C간」에서 수소 결합이 형성되어, 이중나선 구조가 유지된다. 이들 이외의 염기의 조합에서는 이중나선 구조를 유지하는데 충분한 수소 결합

을 형성할 수 없다.

- [0057] 예를 들면 시료 핵산에 포함되는 비목적 유전자 변이의 염기 위치에 있어서의 야생형 염기와 변이형 염기와의 조합이, A 및 T의 조합일 경우에, 유전자 변이 검출용 프로브에 있어서의 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기를 C 또는 G로 하면, 비목적 유전자 변이의 염기 위치에서의 야생형 염기 및 변이형 염기(A 및 T에서 선택되는 염기)와, 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기(C 또는 G)는 수소 결합하지 않고, 그 유전자 변이 검출용 프로브의 T_m값은 비목적 유전자 변이의 영향을 받을 일이 없다. 한편, 유전자 변이 검출용 프로브에 있어서의 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기를 A로 하면, 시료 핵산에 포함되는 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 염기가 A인 경우는 수소 결합하지 않고, 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 염기가 T인 경우는 수소 결합하게 된다. 이러한 상황 하에 있어서, 그 유전자 변이 검출용 프로브의 T_m값은, 목적 유전자 변이의 영향뿐만 아니라, 비목적 유전자 변이의 영향도 받게 되고, 그 유전자 변이 검출용 프로브를 사용했을 경우는, 적절하게 목적 유전자 변이의 상태를 검출할 수 없게 된다.
- [0058] 이와 같이, 대상 유전자를 코드하는 염기 서열에 포함되는 복수의 유전자 변이에 있어서, 상기 염기 서열에 상보적인 염기 서열에 대하여 상동성을 갖는 유전자 변이 검출용 프로브를 사용하여, 목적 유전자 변이를 검출하는 경우, 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치의 그 프로브 상의 염기를, 그 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 정상형 염기와 변이형 염기 중의 어느 것에도 결합하지 않는 염기(비상보적인 염기)로 함으로써, 본 발명에 의한 상기 (P1) 또는 (P1-1)올리고뉴클레오티드로 이루어지는 유전자 변이 검출용 프로브는, 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 염기형의 영향을 받지 않고, 목적 유전자 변이를 특이적으로 검출하는 것이 가능해진다.
- [0059] 마찬가지로, 대상 유전자를 코드하는 염기 서열에 포함되는 복수의 유전자 변이에 있어서, 상기 염기 서열과 동일한 염기 서열에 대하여 상동성을 갖는 유전자 변이 검출용 프로브를 사용하여, 목적 유전자 변이를 검출하는 경우, 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치의 그 프로브상의 염기를, 그 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 정상형 염기와 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기(다른 염기)로 함으로써, 본 발명에 의한 상기 (P1') 또는 (P1'-1)올리고뉴클레오티드로 이루어지는 유전자 변이 검출용 프로브는, 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 염기형의 영향을 받지 않고, 목적 유전자 변이를 특이적으로 검출하는 것이 가능해진다.
- [0060] 본 발명에 있어서의 유전자 변이 검출용 프로브는, 단일 염기 치환형, 결실형 및 삽입형으로 이루어지는 변이 중, 어느 쪽의 변이이어도 인식하는 것이 가능하다. 그 중에서도, 본 발명에 있어서의 유전자 변이 검출용 프로브는, 검출 감도의 관점에서, 단일 염기 치환형의 변이(단일 염기 변이)를 인식하는 유전자 변이 검출용 프로브로서 특히 유용하다.
- [0061] 본 발명에 의한 (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드는, 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치를 제외하고, 목적 유전자 변이가 포함되는 유전자를 코드하는 염기 서열에 상보적인 염기 서열에 대하여, 상동성을 갖는 것이다.
- [0062] 한편, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드는, 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치를 제외하고, 목적 유전자 변이가 포함되는 유전자를 코드하는 염기 서열과 동일한 염기 서열에 대하여, 상동성을 갖는 것이다.
- [0063] 본 발명에 있어서의 대상 유전자에는, 공지의 유전자 모두가 적용가능하다. 또한 본 발명에 있어서의 대상 유전자에는, 구조 유전자 및 전사 조절 영역 중의 어느 것이 포함된다.
- [0064] 본 명세서에 있어서 전사 조절 영역이란, 유전자 시그널 서열의 5' 상류 영역에 많이 존재하는(제1 인트론에 존재해도 되는) 서열이며, RNA 폴리머라제가 유전자로부터 RNA를 전사할 때에, 그 전사를 제어하는 서열이다.
- [0065] 또, 구조 유전자에 있어서는, 엑손의 부위 또는 인트론의 부위에 유전자 변이가 존재하고 있어도 되고, 더 구체적인 실시태양에서는 유전자 변이는 엑손의 부위에 존재하고 있어도 된다.
- [0066] 본 발명에 있어서 「상동성을 갖는」이란, 본 발명의 유전자 변이 검출용 프로브를 코드하는 염기 서열과, 「상기 대상 유전자를 코드하는 염기 서열의 일부 또는 전체에 상보적인 염기 서열」을 비교했을 때에, 80%~100%의 상동성을 갖는 올리고뉴클레오티드를 들 수 있다. 또한 검출 감도의 관점에서, 85% 이상의 동일성, 90% 이상의 동일성, 95% 이상의 동일성, 96% 이상의 동일성, 97% 이상의 동일성, 98% 이상의 동일성 또는 99% 이상의 동일성을 나타내도 된다.

- [0067] 상동성이 80% 이상이면, 검출 대상으로 되는 목적 유전자 변이가 포함되는 대상 유전자를 포함하는 시료 핵산에 대한 검출 감도가 양호하게 된다.
- [0068] 일 실시태양에서, 본 발명의 (P1) 또는 (P1-1) 올리고뉴클레오티드는 목적 유전자 변이 및 비목적 유전자 변이를 포함하는 대상 유전자를 코드하는 염기 서열의 일부에 대하여, 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치 및, 선택적으로, 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치를 제외하고, 상보적(완전히 상보적)이다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 (P1) 또는 (P1-1) 올리고뉴클레오티드는 목적 유전자 변이 및 비목적 유전자 변이를 포함하는 대상 유전자를 코드하는 염기 서열의 전체에 대하여, 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치 및, 선택적으로, 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치를 제외하고, 완전히 상보적이다.
- [0069] 다른 실시태양에서, 본 발명의 (P1') 또는 (P1'-1) 올리고뉴클레오티드는 목적 유전자 변이 및 비목적 유전자 변이를 포함하는 대상 유전자를 코드하는 염기 서열의 일부와, 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치 및, 선택적으로, 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치를 제외하고, 동일하다. 다른 실시태양에서, 본 발명의 (P1') 또는 (P1'-1) 올리고뉴클레오티드는 목적 유전자 변이 및 비목적 유전자 변이를 포함하는 대상 유전자를 코드하는 염기 서열의 전체와, 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치 및, 선택적으로, 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치를 제외하고, 동일하다.
- [0070] 본 발명에 있어서 「스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징한다」에 대해서, 이하에 설명한다.
- [0071] 하이브리다이제이션은, 공지 방법 혹은 그것에 준하는 방법, 예를 들면 Molecular Cloning 3rd(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001)에 기재된 방법 등에 따라서 행할 수 있다. 이 문헌은, 참조에 의해 본 명세서에 편입되는 것으로 한다.
- [0072] 스트린젠트한 조건이란, 특이적인 하이브리드가 형성되고, 비특이적인 하이브리드가 형성되지 않는 조건을 말한다. 전형적인 스트린젠트한 조건이란, 예를 들면 칼륨 농도는 약 25mM?약 50mM, 및 마그네슘 농도는 약 1.0mM?약 5.0mM 중에 있어서, 하이브리다이제이션을 행하는 조건을 들 수 있다. 본 발명의 조건의 일례로서 Tris-HCl(pH8.6), 25mM의 KCl, 및 1.5mM의 MgCl₂ 중에 있어서 하이브리다이제이션을 행하는 조건을 들 수 있지만, 이것에 한정되는 것이 아니다. 기타, 스트린젠트한 조건으로서, Molecular Cloning 3rd(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001)에 기재되어 있다. 이 문헌은, 참조에 의해 본 명세서에 편입되는 것으로 한다. 당업자는, 하이브리다이제이션 반응이나, 하이브리다이제이션 반응액의 염 농도 등을 변화시킴으로써 이러한 조건을 용이하게 선택할 수 있다.
- [0073] 이하, 본 발명에 의한 (P1), (P1-1), (P1') 및 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드에 관하여 설명한다. 필요에 따라서, 서열번호 1 또는 서열번호 2에 나타내는 염기 서열을 예로 들어 설명하지만, 본 발명에 의한 (P1), (P1-1), (P1') 및 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드는 이것에 한정되는 것이 아니다.
- [0074] 서열번호 1에 나타내는 염기 서열은, 약물 대사 효소인 CYP3A4 유전자 변이(CYP3A4*1B rs2740574)을 코드하는 염기 서열이다. CYP3A4를 코드하는 CYP3A4 유전자는, 인간의 제7 염색체에 위치한다. CYP3A4 유전자 변이는, 예를 들면 면역억제제 타크로리무스 등의 약물 대사와의 관련이 보고되어 있다(Clin. Pharmacol. Ther., 2006년, Vol. 80, p. 179-191). 따라서 CYP3A4 유전자에 있어서의 변이의 검출 결과는, 보다 효과적인 질환의 치료 방법의 선택시 등에, 극히 중요한 정보이다.
- [0075] 여기서, CYP3A4 유전자 변이인 rs2740574는, 서열번호 1의 501번째의 염기이다. 이 rs 번호는, National Center for Biotechnology Information의 dbSNP데이터베이스([//www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/))의 등록 번호를 나타낸다(이하 같다). CYP3A4 유전자의 야생형에서는, 서열번호 1에 나타내는 염기 서열의 501번째에 대응하는 염기는 A(아데닌)이지만, 변이형에 있어서는 G(구아닌)로 변이하어 있다.
- [0076] 서열번호 2에 나타내는 염기 서열은, 서열번호 1에 나타내는 염기 서열 중, 501번째의 목적 유전자 변이를 검출하기 위한 본 발명에 의한 유전자 변이 검출용 프로브의 1 예를 나타낸 것이다.
- [0077] 본 발명에 있어서의, 대상 유전자를 코드하는 염기 서열은, 복수의 유전자 변이를 포함한다. 구체적으로는, 상기 대상 유전자를 코드하는 염기 서열은, 2 이상의 유전자 변이를 포함하고 있으며, 예를 들면 3의 유전자 변이, 4의 유전자 변이를 포함하고 있어도 된다.
- [0078] 대상 유전자를 코드하는 염기 서열에 포함되는 복수의 유전자 변이 중, 목적 유전자 변이는, 대상 유전자를 코드하는 염기 서열로부터, 필요에 따라 적절히 선택할 수 있다. 예를 들면 서열번호 1의 CYP3A4 유전자를 코드하는 염기 서열에 있어서는, 501번째의 유전자 변이가, 검출 대상으로 되는 목적 유전자 변이로서 선택된다.

그 때문에 서열번호 1을 예로 들면, 본 발명에 의한 「목적 유전자 변이의 염기 위치의 변이형 염기」에는, A(아데닌) 또는 G(구아닌)이 해당하고, 본 발명에 의한 「목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기」에는 A(아데닌) 또는 G(구아닌) 중 상기와 다른 하나가 해당한다.

- [0079] (P1) 또는 (P1-1)올리고뉴클레오티드에 있어서, 서열번호 1에 나타내는 염기 서열을 예로 들면, 「목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 상보적인, 목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치의 염기」에는, T(티민) 또는 C(시토신)이 해당한다.
- [0080] (P1) 또는 (P1-1)올리고뉴클레오티드에 있어서, 서열번호 1에 나타내는 염기 서열을 예로 들면, 「비목적 유전자 변이의 염기 위치의 염기」에는, 서열번호 1에 나타내는 염기 서열의 507번째 위치의 R이 해당한다. 507번째 위치의 R은, 야생형에 있어서는 A(아데닌)이지만, 변이형에 있어서는 G(구아닌)로 변이하여 있다.
- [0081] (P1) 또는 (P1-1)올리고뉴클레오티드에 있어서, 서열번호 1에 나타내는 염기 서열을 예로 들면, 「비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인, 비목적 유전자 변이에 대응하는 염기 위치의 염기」에는, A(아데닌) 또는 G(구아닌)이 해당한다.
- [0082] (P1)올리고뉴클레오티드에 있어서, 서열번호 1에 나타내는 염기 서열을 예로 들면, 「상기 대상 유전자를 코드하는 염기 서열에 상보적인 염기 서열」에는, CYP3A4 유전자를 코드하는 염기 서열 중, 496번째?516번째의 염기로 형성되는 염기 서열에 상보적인 염기 서열이 해당한다.
- [0083] (P1-1)올리고뉴클레오티드에 있어서, 서열번호 1에 나타내는 염기 서열을 예로 들면, 「상기 대상 유전자를 코드하는 염기 서열과 동일한 염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드」에는, CYP3A4 유전자를 코드하는 염기 서열 중, 496번째?516번째의 염기로 형성되는 염기 서열과 동일한 염기를 갖는 올리고뉴클레오티드가 해당한다.
- [0084] (P1') 또는 (P1'-1)올리고뉴클레오티드에 있어서, 서열번호 1에 나타내는 염기 서열을 예로 들면, 「목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 동일한 염기」에는, A(아데닌) 또는 G(구아닌)이 해당한다.
- [0085] (P1') 또는 (P1'-1)올리고뉴클레오티드에 있어서, 서열번호 1에 나타내는 염기 서열을 예로 들면, 「비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기」에는, T(티민) 또는 C(시토신)이 해당한다.
- [0086] (P1') 또는 (P1'-1)올리고뉴클레오티드에 대해서는, (P1) 또는 (P1-1)올리고뉴클레오티드와 공통되는, 상기 이외의 점에 대해서는, 상기 (P1) 또는 (P1-1)올리고뉴클레오티드에 대해서 기재한 모든 사항이 적용된다.
- [0087] 또, 목적 유전자 변이의 염기 위치의 염기가, 1개의 야생형의 염기 및 1개의 변이형의 염기일 경우, 1개의 야생형의 염기 및 2개의 변이형의 염기일 경우, 및 1개의 야생형의 염기 및 3개의 변이형의 염기일 경우 중의 어느 경우도, 본 발명에 있어서의 「목적 유전자 변이」에 포함된다.
- [0088] 본 발명에 있어서의 (P1), (P1-1), (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드는, 하기 (a)~(f) 중의 어느 하나의 관계를 만족시키는 것을 들 수 있다.
- [0089] (a) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 A 또는 T의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 A 또는 T의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기 또는 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 C 또는 G이다.
- [0090] (b) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 C 및 G의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 C 및 G의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기 또는 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 A 또는 T이다.
- [0091] (c) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 A 및 C의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 A 및 C의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기는 A 또는 C이며, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 T 또는 G이다.
- [0092] (d) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 A 및 G의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 A 및 G의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어

는 것에도 비상보적인 염기는 A 또는 G이며, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 T 또는 C이다.

- [0093] (e) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 T 및 C의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 T 및 C의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기는 T 또는 C이며, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 A 또는 G이다.
- [0094] (f) 상기 비목적 유전자 변이의 염기 위치의 야생형 염기가 T 및 G의 어느 하나이고, 상기 비목적 유전자 변이의 변이형 염기가 T 및 G의 다른 하나인 경우, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기는 T 또는 G이며, 상기 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기는 A 또는 C이다.
- [0095] 또한 본 발명에 있어서의 상기 P1, P1-1, P1' 또는 P1'-1의 올리고뉴클레오티드에는, 상기 P1, P1-1, P1' 또는 P1'-1의 올리고뉴클레오티드에 염기가 삽입, 결실 또는 치환한 올리고뉴클레오티드도 본 발명에 있어서의 올리고뉴클레오티드에 포함된다.
- [0096] 당해 염기가 삽입, 결실 또는 치환한 올리고뉴클레오티드는, 상기 P1, P1-1, P1' 또는 P1'-1의 올리고뉴클레오티드와 동등 정도의 작용을 나타내면 된다. 염기가 삽입, 결실 또는 치환되어 있을 경우, 그 삽입, 결실 또는 치환의 위치는, 특히 한정되지 않는다. 삽입, 결실 또는 치환한 염기의 수로서는 1염기 또는 2염기 이상을 들 수 있고, 올리고뉴클레오티드 전체의 길이에 따라 다르지만, 예를 들면 1염기?10염기 또는 1염기?5염기를 들 수 있다.
- [0097] 본 발명의 상기 P1, P1-1, P1' 또는 P1'-1의 올리고뉴클레오티드의 길이로서는, 11mer?60mer일 경우를 들 수 있다. 당해 범위일 경우에는, 유전자 변이의 검출 감도가 양호하게 된다.
- [0098] 또한 본 발명의 상기 P1, P1-1, P1' 또는 P1'-1의 올리고뉴클레오티드의 길이로서는, 12mer?55mer, 15mer?45mer, 또는 18mer?40mer로 할 수 있다. 12mer?55mer라는 범위로 할 수 있다. 이에 따라 예를 들면 검출 감도가 높아지는 등의 경향이 있다.
- [0099] 또 상기 P1, P1-1, P1' 또는 P1'-1의 올리고뉴클레오티드의 염기 길이를 변화시킴으로써 예를 들면 상기 P1, P1-1, P1' 또는 P1'-1의 올리고뉴클레오티드가 그 상보 채(표적 서열)와 형성하는 하이브리드의 해리 온도인 Tm 값을, 원하는 값으로 조정할 수 있다.
- [0100] 이하, 본 발명의 유전자 변이 검출용 프로브를 설계하기 위한 방법에 대해서, 구체예를 들어서 설명한다. 그러나, 본 발명은 이것들에 한정되지 않는다.
- [0101] 서열번호 3에 나타내는 염기 서열은, rs20542을 포함하는 서열이다. 서열번호 3에 나타내는 염기 서열에는, 251번째 염기 위치에 있어서의 목적 유전자 변이와, 그 근방의 256번째 염기 위치에 있어서의 비목적 유전자 변이가 포함된다.
- [0102] 이 경우, 상기 (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드에 해당하는 유전자 변이 검출용 프로브는, 251번째의 염기에 대하여, (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 야생형 염기 또는 변이형 염기 중 어느 한쪽에 상보적인 염기를 선택하고, 256번째 염기에 대하여, (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기를 선택한다.
- [0103] 구체적으로는, 표 1 중, 서열번호 4 또는 서열번호 5에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브를 들 수 있다.
- [0104] 또한 상기 (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드에 해당하는 유전자 변이 검출용 프로브는, 251번째의 염기에 대하여, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 야생형 염기 또는 변이형 염기 중 어느 한쪽에 대하여 동일한 염기를 선택하고, 256번째 염기에 대하여, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 또는 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기를 선택한다.
- [0105] 구체적으로는, 표 1 중, 서열번호 6 또는 서열번호 7에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브를 들 수 있다.
- [0106] 얻어진 서열번호 4?서열번호 7에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브 중의 어느 프로브를 사용함으로써, 서열번호 3에 나타내는 염기 서열에 있어서의 251번째에 있어서의 목적 유전자 변이의 유무를 검출하는데 있어서,

그 251번째의 염기의 근방에 비목적 유전자 변이가 존재하는 경우에 있어서도, 그 251번째의 목적 유전자 변이의 유무를 특이적으로 검출하는 것이 가능해진다.

[0107] 표 1 중, 밑줄을 붙인 대문자는, 검출 대상으로 되는 목적 유전자 변이를 나타내고, 밑줄을 붙이지 않은 대문자는, 비목적 유전자 변이를 나타낸다. 이하 같다.

[0108] [표 1]

서열번호 4	(형광색소)-cTccagCagggcgagga
서열번호 5	(형광색소)-cAccagCagggcgagga
서열번호 6	(형광색소)-cctcgcctActggAgct
서열번호 7	(형광색소)-cctcgcctActggTgct

[0109]

[0110] 서열번호 8에 나타내는 염기 서열은, rs11881222을 포함하는 서열이다. 서열번호 8에 나타내는 염기 서열에는, 355번째에 있어서의 목적 유전자 변이와, 그 근방의 364번째에 비목적 유전자 변이가 포함되어 있다.

[0111] 이 경우, 상기 (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드에 해당하는 유전자 변이 검출용 프로브는, 355번째의 염기에 대하여, (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 상보적인 염기를 선택하고, 364번째의 염기에 대하여, (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기를 선택한다. 구체적으로는, 표 2 중, 서열번호 9 또는 서열번호 10에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브를 들 수 있다.

[0112] 또한 상기 (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드에 해당하는 유전자 변이 검출용 프로브는, 355번째의 염기에 대하여, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 한쪽에 대하여 동일한 염기를 선택하고, 364번째의 염기에 대하여, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중 어느 것에도 다른 염기를 선택한다. 구체적으로는, 표 2 중, 서열번호 11 또는 서열번호 12에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브를 들 수 있다.

[0113] 얻어진 서열번호 9?서열번호 12에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브 중의 어느 프로브를 사용함으로써, 서열번호 8에 나타내는 염기 서열에 있어서의, 355번째에 있어서의 목적 유전자 변이의 유무를 검출하는데 있어서, 그 355번째의 염기의 근방에 비목적 유전자 변이가 존재하는 경우에 있어서도, 그 355번째에 있어서의 목적 유전자 변이의 유무를 특이적으로 검출하는 것이 가능해진다.

[0114] [표 2]

서열번호 9	tccAtctctcctCtcccc-(형광 색소)
서열번호 10	tccGtctctcctCtcccc-(형광 색소)
서열번호 11	gggaGaggagagaTggac-(형광 색소)
서열번호 12	gggaGaggagagaCggac-(형광 색소)

[0115]

[0116] 서열번호 13에 나타내는 염기 서열은, rs80230660을 포함하는 서열이다. 서열번호 13에 나타내는 염기 서열에는, 201번째에 있어서의 목적 유전자 변이와, 그 근방의 187번째에 비목적 유전자 변이가 포함된다.

[0117] 이 경우, 상기 (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드에 해당하는 유전자 변이 검출용 프로브는, 201번째의 염기에 대하여, (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 야생형 염기 및 변이형 염기 중 어느 한쪽에 상보적인 염기를 선택하고, 187번째의 염기에 대하여, (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기를 선택한다. 구체적으로는, 표 3 중, 서열번호 14 또는 서열번호 15에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브를 들 수 있다.

[0118] 또한 상기 (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드에 해당하는 유전자 변이 검출용 프로브는, 201번째의 염기에 대하여, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 야생형 염기 및 변

이형 염기 중 어느 한쪽에 대하여 동일한 염기를 선택하고, 187번째의 염기에 대하여, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기를 선택한다. 구체적으로는, 표 3 중, 서열번호 16 또는 서열번호 17에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브를 들 수 있다.

[0119] 얻어진 서열번호 14?서열번호 17에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브 중의 어느 프로브를 사용함으로써, 서열번호 13에 나타내는 염기 서열에 있어서, 201번째에 있어서의 목적 유전자 변이의 유무를 검출하는데 있어서, 그 201번째의 염기의 근방에 비목적 유전자 변이가 존재하는 경우에 있어서도, 그 201번째에 있어서의 목적 유전자 변이의 유무를 특이적으로 검출하는 것이 가능해진다.

[0120] [표 3]

서열번호 14	<u>gctGccccaggaagacaCcaac</u> -(형광 색소)
서열번호 15	<u>gctGccccaggaagacaGcaac</u> -(형광 색소)
서열번호 16	<u>ttgGtgctctcctggggCagcccc</u> -(형광 색소)
서열번호 17	<u>ttgGtgctctcctggggCagcccc</u> -(형광 색소)

[0121]

[0122] 서열번호 13에 나타내는 염기 서열에는, 187번째에 있어서의 목적 유전자 변이와, 그 근방의 201번째의 비목적 유전자 변이가 포함된다.

[0123] 이 경우, 상기 (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드에 해당하는 유전자 변이 검출용 프로브는, 187번째의 염기에 대하여, (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 야생형 염기 및 변이형 염기 중 어느 한쪽에 상보적인 염기를 선택하고, 201번째의 염기에 대하여, (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 비상보적인 염기를 선택한다. 구체적으로는, 표 4 중, 서열번호 18에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브를 들 수 있다.

[0124] 또한 상기 (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드에 해당하는 유전자 변이 검출용 프로브는, 187번째의 염기에 대하여, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 야생형 염기 및 변이형 염기 중 어느 한쪽에 대하여 동일한 염기를 선택하고, 201번째의 염기에 대하여, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중의 어느 것에도 다른 염기를 선택한다. 구체적으로는, 표 4 중, 서열번호 19에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브를 들 수 있다.

[0125] 얻어진 서열번호 18 또는 서열번호 19에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브 중의 어느 프로브를 사용함으로써, 서열번호 13에 나타내는 염기 서열에 있어서의, 187번째에 있어서의 목적 유전자 변이의 유무를 검출하는데 있어서, 그 187번째의 염기의 근방에 비목적 유전자 변이가 존재하는 경우에 있어서도, 그 187번째에 있어서의 목적 유전자 변이의 유무를 특이적으로 검출하는 것이 가능해진다.

[0126] [표 4]

서열번호 18	<u>ctAccccaggaagacaTcaac</u> -(형광 색소)
서열번호 19	<u>tgAtgtctcctcctggggGagcc</u> -(형광 색소)

[0127]

[0128] 서열번호 20에 나타내는 염기 서열은, rs74182491을 포함하는 서열이다. 서열번호 20에 나타내는 염기 서열에는, 247번째에 있어서의 목적 유전자 변이와, 그 근방의 251번째의 비목적 유전자 변이가 포함된다.

[0129] 이 경우, 상기 (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드에 해당하는 유전자 변이 검출용 프로브는, 247번째의 염기에 대하여, (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 야생형 염기 및 변이형 염기 중 어느 한쪽에 상보적인 염기를 선택하고, 251번째의 염기에 대하여, (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오티드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중 어느 것에도 비상보적인 염기를 선택한다. 구체적으로는, 표 5 중, 서열번호 21 또는 서열번호 22에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브를 들 수 있다.

[0130] 또한 상기 (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오타드에 해당하는 유전자 변이 검출용 프로브는, 247번째의 염기에 대하여, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오타드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 야생형 염기 및 변이형 염기 중 어느 한쪽에 대하여 동일한 염기를 선택하고, 251번째의 염기에 대하여, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오타드 내의 대응하는 염기 위치의 염기로서, 비목적 유전자 변이의 야생형 염기 및 변이형 염기 중 어느 것에도 다른 염기를 선택한다. 구체적으로는, 표 5 중, 서열번호 23 또는 서열번호 24에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브를 들 수 있다.

[0131] 얻어진 서열번호 21?서열번호 24에 나타내는 유전자 변이 검출용 프로브 중의 어느 프로브를 사용함으로써, 서열번호 20에 나타내는 염기 서열 중에서, 247번째에 있어서의 목적 유전자 변이의 유무를 검출하는데 있어서, 그 247번째의 염기의 근방에 비목적 유전자 변이가 존재하는 경우에 있어서도, 그 247번째에 있어서의 목적 유전자 변이의 유무를 특이적으로 검출하는 것이 가능해진다.

[0132] [표 5]

서열번호 21	ggtTgccAtgtgactttc-(형광 색소)
서열번호 22	ggtGgccAtgtgactttc-(형광 색소)
서열번호 23	aagtcacaTggcAacc-(형광 색소)
서열번호 24	aagtcacaTggcCacc-(형광 색소)

[0133]

[0134] 또, 목적 유전자 변이의 근방에 존재하는 비목적 유전자 변이가, 상술한 바와 같은 단일 염기 치환 변이일 경우 뿐만 아니라, 결실형 변이나 삽입형 변이가 존재하는 경우에 있어서도, 본 발명을 따르면 검출 감도가 높은 유전자 변이 검출용 프로브를 제공할 수 있다.

[0135] 비목적 유전자 변이가 결실형 변이일 경우는, (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오타드 내의 대응하는 염기 위치의 염기(즉, 결실한 염기에 대응하는 염기 위치에 위치하는 (P1) 또는 (P1-1)의 염기)로서, 결실한 염기와 비상보적인 염기를 선택하고, 그 외는 상술한 방법을 따름으로써, 본 발명에 의한 (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오타드에 해당하는 유전자 변이 검출용 프로브를 얻을 수 있다. 구체적으로는, A가 결실한 변이일 경우는, (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오타드 내의 대응하는 염기 위치의 염기(즉, 결실한 염기 A에 대응하는 염기 위치에 위치하는 (P1) 또는 (P1-1)의 염기)를, A에 비상보적인 염기인 A, C 및 G에서 선택되는 적어도 하나의 염기로 하면 된다.

[0136] 마찬가지로, 비목적 유전자 변이가 결실형 변이일 경우는, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오타드 내의 대응하는 염기 위치의 염기(즉, 결실한 염기에 대응하는 염기 위치에 위치하는 (P1') 또는 (P1'-1)의 염기)로서, 결실한 염기와 다른 염기를 선택하고, 그 외는 상술한 방법을 따름으로써, 본 발명에 의한 (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오타드에 해당하는 유전자 변이 검출용 프로브를 얻을 수 있다. 구체적으로는, A가 결실한 변이일 경우는, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오타드 내의 대응하는 염기 위치의 염기(즉, 결실한 염기 A에 대응하는 염기 위치에 위치하는 (P1') 또는 (P1'-1)의 염기)를, A와는 다른 염기인 G, T 및 C에서 선택되는 적어도 하나의 염기로 하면 된다.

[0137] 비목적 유전자 변이가 삽입형 변이일 경우는, (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오타드 내의 대응하는 염기 위치의 염기(즉, 삽입한 염기에 대응하는 염기 위치에 위치하는 (P1) 또는 (P1-1)의 염기)로서 삽입한 염기에 비상보적인 염기를 선택하고, 그 외는 상술한 방법을 따름으로써, 본 발명에 의한 (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오타드에 해당하는 유전자 변이 검출용 프로브를 얻을 수 있다. 구체적으로는, G가 삽입된 변이일 경우는, (P1) 또는 (P1-1)의 올리고뉴클레오타드 내의 대응하는 염기 위치의 염기(즉, 삽입한 염기 G에 대응하는 염기 위치에 위치하는 (P1) 또는 (P1-1)의 염기)를, G에 비상보적인 염기인 A, T 및 C에서 선택되는 적어도 하나의 염기로 하면 된다.

[0138] 마찬가지로, 비목적 유전자 변이가 삽입형 변이일 경우는, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오타드 내의 대응하는 염기 위치의 염기(즉, 삽입한 염기에 대응하는 염기 위치에 위치하는 (P1') 또는 (P1'-1)의 염기)로서, 삽입한 염기와 다른 염기를 선택하고, 그 외는 상술한 방법을 따름으로써, 본 발명에 의한 (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오타드에 해당하는 유전자 변이 검출용 프로브를 얻을 수 있다. 구체적으로는, G가 삽입된 변이일 경우는, (P1') 또는 (P1'-1)의 올리고뉴클레오타드 내의 대응하는 염기 위치의 염기(즉, 삽입한 염기 G에 대응하는 염기 위치에 위치하는 (P1') 또는 (P1'-1)의 염기)를, G와는 다른 염기인 A, T 및 C에서 선택되는 적어도 하나의 염기로 하면 된다.

- [0139] 본 발명에 따른 상기 (P1), (P1-1), (P1') 또는 (P1'-1) 올리고뉴클레오티드는 형광 표지된 올리고뉴클레오티드 여도 된다. 상기 형광 표지 올리고뉴클레오티드는, 표적 서열에 하이브리다이징하고 있지 않을 때의 형광 강도에 비하여, 표적 서열에 하이브리다이징하고 있을 때의 형광 강도가 감소(소광)하거나 또는 증가하는 형광 표지 올리고뉴클레오티드이어도 된다. 그 중에서도 표적 서열에 하이브리다이징하고 있지 않을 때의 형광 강도에 비하여, 표적 서열에 하이브리다이징하고 있을 때의 형광 강도가 감소하는 형광 표지 올리고뉴클레오티드이어도 된다. 이러한 형광 소광 현상(Quenching phenomenon)을 이용한 프로브는, 일반적으로, 구아닌 소광 프로브라고 불리고 있어, 소위 QProbe(등록상표)로서 알려져 있다. 그 중에서도, 올리고뉴클레오티드를 3' 말단 혹은 5' 말단이 C가 되도록 설계하고, 그 말단의 C가, G에 근접하면 발광이 약해지도록 형광 색소로 표지화된 올리고뉴클레오티드이어도 된다.
- [0140] 또, QProbe를 사용한 검출 방법 이외에도, 공지의 검출 양식을 적용해도 된다. 이러한 검출 양식으로서는, Taq-man Probe법, Hybridization Probe법, Molecular Beacon법 또는 MGB Probe법 등을 들 수 있다.
- [0141] 상기 형광 색소로서는, 특히 제한되지 않지만, 예를 들면 플루오레세인, 인광체, 로다민, 폴리메틴 색소 유도체 등을 들 수 있다. 이들 형광 색소의 시판품으로서, 예를 들면 Pacific Blue, Bodipy FL, FluorePrime, Fluoredate, FAM, Cy3 및 Cy5, TAMRA 등을 들 수 있다.
- [0142] 형광 표지 올리고뉴클레오티드의 검출 조건은 특히 제한되지 않고, 사용하는 형광 색소에 따라 적절히 결정할 수 있다. 예를 들면 Pacific Blue는, 검출 파장 445nm~480nm, TAMRA는, 검출 파장 585nm~700nm, Bodipy FL은, 검출 파장 520nm~555nm에서 검출할 수 있다.
- [0143] 이러한 형광 색소를 갖는 프로브를 사용하면, 각각의 형광 시그널의 변동에 의해, 하이브리다이징과 해리를 용이하게 확인할 수 있다. 형광 색소의 올리고뉴클레오티드와의 결합은, 통상의 방법, 예를 들면 일본국 공개특허공보 특개 2002-119291호 공보 등에 기재된 방법을 따라서 행할 수 있다.
- [0144] 또 상기 형광 표지 올리고뉴클레오티드는, 예를 들면 3' 말단에 인산기가 부가되어도 된다. 형광 표지 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에 인산기를 부가시켜 줌으로써, 프로브 자체가 유전자 증폭 반응에 의해 신장하는 것을 충분히 억제할 수 있다. 후술하는 바와 같이, 변이의 유무를 검출하는 DNA(표적 DNA)는, PCR 등의 유전자 증폭법에 의해 조제할 수 있다. 그때, 3' 말단에 인산기가 부가된 형광 표지 올리고뉴클레오티드를 사용함으로써, 이것을 증폭 반응의 반응액 중에 공존시킬 수 있다.
- [0145] 또한 3' 말단에 상기한 바와 같은 표지화 물질(형광 색소)을 부가함으로써도, 마찬가지로의 효과를 얻을 수 있다.
- [0146] 상기 P1, P1-1, P1' 또는 P1'-1의 올리고뉴클레오티드는, 유전자를 코드하는 염기 서열이 복수의 유전자 변이를 포함하고 있었다고 해도, 검출 대상 외의 유전자 변이의 영향을 받지 않고, 검출 대상으로 되는 특정의 유전자 변이를 특이적으로 검출하기 위한 유전자 변이 검출용 프로브로서 사용할 수 있다.
- [0147] 또한 상기 유전자 변이 검출용 프로브는, 용해 곡선 분석용의 프로브로서 사용할 수 있다.
- [0148] <프라이머>
- [0149] 후술하는 본 발명에 있어서의 유전자 변이 검출 방법에서는, 검출 대상으로 되는 목적 유전자 변이를 포함하는 서열을 PCR법에 의해 증폭하는 경우는, 프라이머를 사용할 수 있다.
- [0150] 본 발명에 있어서 사용되는 프라이머는, 검출 대상으로 되는 목적유전자의 유전자 변이의 부위인, 예를 들면 서열번호 1에 나타내는 염기 서열 중 501번째의 염기 및 507번째의 염기에 대응하는 염기를 포함하는 핵산을 증폭 가능하면 특히 제한되지 않는다.
- [0151] PCR법에 적용하는 프라이머는, 본 발명의 유전자 변이 검출용 프로브가 하이브리다이제이션할 수 있는 영역을 증폭할 수 있는 것이면 특히 제한되지 않고, 예를 들면 서열번호 1에 나타내는 염기 서열로부터, 당업자라면 적절히 설계할 수 있다. 프라이머의 길이 및 Tm값은, 통상적으로는, 12mer~40mer 및 40℃~70℃, 또는 16mer~30mer 및 55℃~60℃로 할 수 있다.
- [0152] 또한 프라이머 세트의 각 프라이머의 길이는 동일하지 않아도 되지만, 양 프라이머의 Tm값은 거의 동일(또는, Tm값의 양 프라이머에서의 차이가 5℃ 이내)이어도 된다.
- [0153] 유전자 변이의 검출 방법은 상기 형광 표지 뉴클레오티드를 프로브로서 이용하는 방법이면, 특히 제한되지 않는다. 상기 P1, P1-1, P1' 또는 P1'-1의 올리고뉴클레오티드를 프로브로서 사용하는 유전자 변이 검출 방법의 일

레로서, Tm 해석을 이용한 유전자 변이 검출 방법에 대해서, 이하에 설명한다.

- [0154] <유전자 변이 검출 방법>
- [0155] 본 발명에 의한 유전자 변이 검출 방법은, 상기 형광 표지된 P1, P1-1, P1' 또는 P1'-1의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 유전자 변이 검출용 프로브(이하, 「형광 표지된 유전자 변이 검출용 프로브」라고도 한다)를 적어도 1종 사용하여 유전자 변이를 검출하는 것을 포함하는 유전자 변이 검출 방법이다.
- [0156] 본 발명에 의한 유전자 변이 검출 방법에 의하면, 상기 형광 표지된 유전자 변이 검출용 프로브를 적어도 1종 포함함으로써, 유전자 변이를 간편하게, 감도 좋게 검출 가능하게 한다.
- [0157] 또한 본 발명의 유전자 변이 검출 방법은, 다양한 인간 유전자에 있어서의 유전자 변이의 검출 방법이며, 하기 공정(I)~(IV)을 포함할 수 있고, 하기 공정(V)을 포함하고 있어도 된다. 또, 본 발명의 유전자 변이 검출 방법은, 상기 유전자 변이 검출용 프로브를 사용하는 것이 특징이며, 그 밖의 구성이나 조건 등은, 이하의 기재에 제한되지 않는다.
- [0158] (I) 상기 형광 표지된 유전자 변이 검출용 프로브 및 시료 중의 1분쇄 핵산을 접촉시켜서, 하이브리드를 얻는 것.
- [0159] (II) 상기 하이브리드를 포함하는 시료의 온도를 변화시킴으로써, 상기 하이브리드를 해리시켜, 상기 하이브리드의 해리에 의거하는 형광 시그널의 변동을 측정하는 것.
- [0160] (III) 상기 형광 시그널의 변동에 의거하여 하이브리드의 해리 온도인 Tm값을 검출하는 것.
- [0161] (IV) 상기 Tm값에 의거하여, 상기 시료 중의 1분쇄 핵산에 있어서의, 목적 유전자 변이의 존재를 검출하는 것.
- [0162] (V) 상기 유전자 변이의 존재에 의거하여, 상기 시료 중의 총 1분쇄 핵산에 있어서의, 유전자 변이를 갖는 1분쇄 핵산의 존재비를 결정하는 것.
- [0163] 또한 본 발명에 있어서는, 상기 공정(I)~(IV) 또는 상기 공정(I)~(V)에 더하여, 공정(I)의 하이브리드를 얻기 전 또는 공정(I)의 하이브리드를 얻는 것과 동시에, 핵산을 증폭하는 것을 더 포함하고 있어도 된다.
- [0164] 또, (III)에서 Tm값을 측정하는 것에는, 하이브리드의 해리 온도를 측정하는 것 뿐만 아니라, 하이브리드 형성체의 용해시에 온도에 따라 변동하는 형광 시그널의 미분값의 크기를 측정하는 것을 포함해도 된다.
- [0165] 본 발명에 있어서, 시료 중의 핵산은, 1분쇄 핵산이어도 되고 2분쇄 핵산이어도 된다. 상기 핵산이 2분쇄 핵산의 경우는, 예를 들면 상기 형광 표지된 유전자 변이 검출용 프로브와 하이브리다이징하는 것에 앞서, 가열에 의해 상기 시료 중의 2분쇄 핵산을 용해(해리)시켜서 1분쇄 핵산으로 하는 것을 포함해도 된다. 2분쇄 핵산을 1분쇄 핵산으로 해리함으로써, 상기 형광 표지된 유전자 변이 검출용 프로브와의 하이브리다이징이 가능해진다.
- [0166] 본 발명에 있어서, 검출 대상인 시료에 포함되는 핵산은, 예를 들면 생체 시료에 원래 포함되는 핵산이라도 되지만, 검출 정밀도를 향상할 수 있는 것으로부터, 생체 시료에 원래 포함되어 있는 핵산을 주형으로 하여 PCR 등에 의해 대상 유전자의 변이한 부위를 포함하는 영역을 증폭시킨 증폭 산물이어도 된다. 증폭 산물의 길이는, 특히 제한되지 않지만, 예를 들면 50mer~1000mer, 또는 80mer~200mer로 할 수 있다. 또한 시료 중의 핵산은, 예를 들면 생체 시료 유래의 RNA(토탈 RNA, mRNA 등)로부터 RT-PCR(Reverse Transcription PCR)에 의해 합성한 cDNA이어도 된다.
- [0167] 본 발명에 있어서, 상기 시료 중의 핵산에 대한, 본 발명의 유전자 변이 검출용 프로브의 첨가 비율(몰 비)은 특히 제한되지 않는다. 시료 중의 DNA를 대하여 예를 들면 1배 이하로 할 수 있다. 또한 충분한 검출 시그널 확보의 관점에서, 상기 시료 중의 핵산에 대한, 본 발명의 유전자 변이 검출용 프로브의 첨가 비율(몰 비)은, 0.1배 이하로 할 수 있다.
- [0168] 여기서, 시료 중의 핵산이란, 예를 들면 검출 목적의 유전자 변이가 발생하여 있는 검출 대상 핵산과 상기 유전자 변이가 발생하여 있지 않은 비검출 대상 핵산과의 합계이어도 되고, 검출 목적의 유전자 변이가 발생하여 있는 검출 대상 서열을 포함하는 증폭 산물과 상기 유전자 변이가 발생하여 있지 않은 비검출 대상 서열을 포함하는 증폭 산물과의 합계이어도 된다. 또, 시료 중의 핵산에 있어서의 상기 검출 대상 핵산의 비율은, 통상 미리 알 수 없지만, 결과적으로, 상기 유전자 변이 검출용 프로브의 첨가 비율(몰 비)은, 검출 대상 핵산(검출 대상

서열을 포함하는 증폭 산물)에 대하여 10배 이하로 할 수 있다. 또한 상기 다형 검출용 프로브의 첨가 비율(몰비)은, 검출 대상 핵산(검출 대상 서열을 포함하는 증폭 산물)에 대하여, 5배 이하, 또는 3배 이하로 할 수 있다. 또한 그 하한은 특히 제한되지 않지만, 예를 들면 0.001배 이상, 0.01배 이상, 또는 0.1배 이상으로 할 수 있다.

- [0169] 상기 DNA에 대한 본 발명에 있어서의 형광 표지된 유전자 변이 검출용 프로브의 첨가 비율은, 예를 들면 2분쇄 핵산에 대한 몰 비이어도 되고, 1분쇄 핵산에 대한 몰 비이어도 된다.
- [0170] 본 발명에 있어서, T_m 값을 결정하기 위한 온도 변화에 따르는 시그널 변동의 측정은, 상술한 바와 같은 원리로부터 260nm의 흡광도 측정에 의해 행할 수도 있지만, 상기 형광 표지된 유전자 변이 검출용 프로브에 부가한 표지의 시그널에 의거하는 시그널로서, 1분쇄 DNA와 상기 유전자 변이 검출용 프로브와의 하이브리드 형성의 상태에 따라 변동하는 시그널을 측정하는 것으로 한다. 이를 위해, 상기 형광 표지된 유전자 변이 검출용 프로브로서, 전술의 형광 표지 올리고뉴클레오티드를 사용할 수 있다. 형광 표지된 P1, P1-1, P1' 또는 P1'-1의 올리고뉴클레오티드(이하, 한꺼번에 「형광 표지 올리고뉴클레오티드」라고도 한다)로서는, 예를 들면 표적 서열에 하이브리다이즈하고 있지 않을 때의 형광 강도에 비하여, 표적 서열에 하이브리다이즈하고 있을 때의 형광 강도가 감소(소광)하는 형광 표지 올리고뉴클레오티드, 또는 표적 서열에 하이브리다이즈하고 있지 않을 때의 형광 강도에 비하여, 표적 서열에 하이브리다이즈하고 있을 때의 형광 강도가 증가하는 형광 표지 올리고뉴클레오티드를 들 수 있다.
- [0171] 전자와 같은 형광 표지 올리고뉴클레오티드이면, 검출 대상 서열과 하이브리드(2분쇄 DNA)를 형성하고 있는 때는 형광 시그널을 나타내지 않거나, 형광 시그널이 약하지만, 가열에 의해 형광 표지 올리고뉴클레오티드가 해리하면 형광 시그널을 나타내게 되거나, 형광 시그널이 증가한다.
- [0172] 또한 후자의 형광 표지 올리고뉴클레오티드이면, 검출 대상 서열과 하이브리드(2분쇄 DNA)을 형성함으로써 형광 시그널을 나타내고, 가열에 의해 형광 표지 올리고뉴클레오티드가 해리하면 형광 시그널이 감소(소실)한다. 따라서, 이 형광 표지에 의거하는 형광 시그널의 변화를 형광 표지 특유의 조건(형광 과장 등)으로 검출함으로써, 상기 260nm의 흡광도 측정과 마찬가지로, 용해의 진행 및 T_m 값의 결정을 행할 수 있다.
- [0173] 다음에 본 발명의 유전자 변이 검출 방법에 관하여, 형광 색소에 의거하는 시그널의 변화를 검출하는 방법에 관하여 구체적 예를 들어서 설명한다. 또, 본 발명의 유전자 변이 검출 방법은, 상기 형광 표지된 유전자 변이 검출용 프로브를 사용하는 것 자체가 특징이며, 그 밖의 공정이나 조건에 대해서는 하등 제한되지 않는다.
- [0174] 핵산 증폭을 행할 때의 주형으로 되는 핵산을 포함하는 시료로서는, 핵산, 특히 대상 유전자를 포함하고 있으면 되고, 특히 제한되지 않는다. 예를 들면 대장이나 폐 등의 조직, 백혈구 세포 등의 혈구, 전혈, 혈장, 객담, 구강 점막 현탁액, 손톱이나 모발 등의 체세포, 생식 세포, 젖, 복수액, 파라인 포매 조직, 위액, 위세정액, 오줌, 복막액, 양수, 세포 배양 등의 임의인 생물학적 기원에 유래하는 또는 유래할 수 있는 것을 들 수 있다. 또, 시료의 채취 방법, 핵산을 포함하는 시료의 조제 방법 등은, 제한되지 않고, 어느 것이든 종래 공지의 방법을 사용할 수 있다. 또한 주형으로 되는 핵산은, 상기 기원으로부터 얻어진 채로 직접적으로, 혹은 그 샘플의 특성을 개변하기 위해서 전처리한 후에 사용할 수 있다.
- [0175] 예를 들면 전혈을 시료로 하는 경우, 전혈로부터의 게놈 DNA의 단리는, 종래 공지의 방법에 의해 행할 수 있다. 예를 들면 시판의 게놈 DNA 단리 키트(상품명 GFX Genomic Blood DNA Purification kit; GE 헬스케어바이오사이언스사제) 등을 사용할 수 있다.
- [0176] 다음에 단리한 게놈 DNA를 포함하는 시료에, 상기 형광 표지 올리고뉴클레오티드를 포함하는 형광 표지된 유전자 변이 검출용 프로브를 첨가한다.
- [0177] 상기 형광 표지된 유전자 변이 검출용 프로브는, 단리한 게놈 DNA를 포함하는 액체 시료에 첨가해도 되고, 적당한 용매 중에서 게놈 DNA와 혼합해도 된다. 상기 용매로서는, 특히 제한되지 않고, 예를 들면 Tris-HCl 등의 완충액, KCl, MgCl₂, MgSO₄, 글리세롤 등을 포함하는 용매, PCR 반응액 등, 종래 공지의 것을 들 수 있다.
- [0178] 상기 형광 표지된 유전자 변이 검출용 프로브의 첨가의 타이밍은, 특히 제한되지 않고, 예를 들면 후술하는 PCR 등의 증폭 처리를 행하는 경우, 증폭 처리의 후에, PCR 증폭 산물에 대하여 첨가해도 되고, 증폭 처리 전에 첨가해도 된다.
- [0179] 이와 같이 PCR 등에 의한 증폭 처리 전에 상기 형광 표지된 유전자 변이 검출용 프로브를 첨가하는 경우는, 예를 들면 전술한 바와 같이, 그 3' 말단에, 형광 색소를 부가하거나, 인산기를 부가하거나 할 수 있다.

- [0180] 핵산 증폭의 방법으로서, 예를 들면 폴리머라제를 사용하는 방법 등을 들 수 있다. 그 예로서는, PCR법, ICAN법, LAMP법, NASBA법 등을 들 수 있다. 폴리머라제를 사용하는 방법에 의해 증폭하는 경우로서는, 본 발명에 있어서의 형광 표시된 유전자 변이 검출용 프로브의 존재 하에서 증폭을 행하는 것을 들 수 있다. 사용하는 형광 표시된 유전자 변이 검출용 프로브 및 폴리머라제에 따라, 증폭의 반응 조건 등을 조정하는 것은 당업자라면 용이하다. 이에 따라 핵산의 증폭 후에 형광 표시된 유전자 변이 검출용 프로브의 T_m 값을 해석하는 것만으로 유전자 변이를 검출할 수 있으므로, 반응 종료 후 증폭 산물을 분리할 필요가 없다. 따라서, 증폭 산물에 의한 오염의 걱정이 없다. 또한 증폭에 필요한 기기와 같은 기기로 검출하는 것이 가능하므로, 용기를 이동할 필요가 없고, 자동화도 용이하다.
- [0181] 또 PCR법에 사용하는 DNA 폴리머라제로서는, 통상 사용되는 DNA 폴리머라제를 특히 제한 없이 사용할 수 있다. 예를 들면 GeneTaq(닛폰진사제), Prime STAR Max DNA Polymerase (다카라바이오사제), Taq 폴리머라제 등을 들 수 있다.
- [0182] 폴리머라제의 사용량으로서, 통상 사용되는 농도이면 특히 제한은 없다. 예를 들면 Taq 폴리머라제를 사용할 경우, 예를 들면 반응 용액량 $50\mu\text{l}$ 에 대하여 $0.01\text{U}\sim 100\text{U}$ 의 농도로 할 수 있다. 이에 따라 목적 유전자 변이의 검출 감도가 높아지는 등의 경향이 있다.
- [0183] 또 PCR법은, 통상 사용되는 조건을 적절히 선택함으로써 행할 수 있다.
- [0184] 또, 증폭할 때, 리얼타임 PCR에 의해 증폭을 모니터링하여, 시료에 포함되는 DNA(검출 대상 서열)의 카피수를 조사할 수도 있다. 즉, PCR에 의한 DNA(검출 대상 서열)의 증폭에 따라서 하이브리드를 형성하는 프로브의 비율이 늘어나므로 형광 강도가 변동한다. 이것을 모니터링 함으로써, 시료에 포함되는 검출 대상 서열(정상 DNA 또는 변이 DNA)의 카피수나 존재비를 검출할 수 있다.
- [0185] 본 발명의 유전자 변이 검출 방법에 있어서는, 상기 형광 표시 올리고뉴클레오티드와, 시료 중의 1본쇄 핵산과를 접촉시켜서, 양자를 하이브리다이징시킨다. 시료 중의 1본쇄 핵산은, 예를 들면 상기한 바와 같이 해서 얻어진 PCR 증폭 산물을 해리함으로써 조제할 수 있다.
- [0186] 상기 PCR 증폭 산물의 해리(해리 공정)에 있어서의 가열 온도는, 상기 증폭 산물을 해리할 수 있는 온도이면 특히 제한되지 않는다. 예를 들면 $85^\circ\text{C}\sim 95^\circ\text{C}$ 이다. 가열 시간도 특히 제한되지 않는다. 가열 시간은, 예를 들면 1초 \sim 10분, 또는 1초 \sim 25분으로 할 수 있다.
- [0187] 또한 해리한 1본쇄 DNA와 상기 형광 표시 올리고뉴클레오티드와의 하이브리다이징은, 예를 들면 상기 해리 공정 후, 상기 해리 공정에 있어서의 가열 온도를 강하 시킴으로써 행할 수 있다. 온도 조건으로서, 예를 들면 $40^\circ\text{C}\sim 50^\circ\text{C}$ 이다.
- [0188] 하이브리다이징 공정의 반응액에 있어서의 각 조성의 체적이나 농도는, 특히 제한되지 않는다. 구체예로서는, 상기 반응액에 있어서의 DNA의 농도는, 예를 들면 $0.01\mu\text{M}\sim 1\mu\text{M}$, 또는 $0.1\mu\text{M}\sim 0.5\mu\text{M}$ 으로 할 수 있다. 상기 형광 표시 올리고뉴클레오티드의 농도는, 예를 들면 상기 DNA에 대한 첨가 비율을 만족시키는 범위이며, 예를 들면 $0.001\mu\text{M}\sim 10\mu\text{M}$, 또는 $0.001\mu\text{M}\sim 1\mu\text{M}$ 으로 할 수 있다.
- [0189] 그리고, 얻어진 상기 1본쇄 DNA와 상기 형광 표시 올리고뉴클레오티드와의 하이브리드를 서서히 가열하고, 온도 상승에 따르는 형광 시그널의 변동을 측정한다. 예를 들면 QProbe를 사용했을 경우, 1본쇄 DNA와 하이브리다이징한 상태에서는, 해리한 상태에 비하여 형광 강도가 감소(또는 소광)한다. 따라서, 예를 들면 형광이 감소(또는 소광)하고 있는 하이브리드를 서서히 가열하고, 온도 상승에 따르는 형광 강도의 증가를 측정하면 된다.
- [0190] 형광 강도의 변동을 측정할 때의 온도 범위는, 특히 제한되지 않지만, 예를 들면 개시 온도가 실온 $\sim 85^\circ\text{C}$, 또는 $25^\circ\text{C}\sim 70^\circ\text{C}$ 로 할 수 있다. 종료 온도는, 예를 들면 $40^\circ\text{C}\sim 105^\circ\text{C}$ 로 할 수 있다. 또한 온도의 상승 속도는, 특히 제한되지 않지만, 예를 들면 $0.1^\circ\text{C}/\text{초}\sim 20^\circ\text{C}/\text{초}$, 또는 $0.3^\circ\text{C}/\text{초}\sim 75^\circ\text{C}/\text{초}$ 로 할 수 있다.
- [0191] 다음에 상기 시그널의 변동을 해석해서 T_m 값으로서 결정한다. 구체적으로는, 얻어진 형광 강도로부터 각 온도에 있어서의 미분값($-d(\text{형광강도})/dT$)을 산출하고, 가장 낮은 값을 나타내는 온도를 T_m 값으로서 결정할 수 있다. 또한 단위시간 당의 형광강도증가량(형광강도증가량/ t)이 가장 높은 점을 T_m 값으로서 결정할 수도 있다. 또, 형광 표시된 유전자 변이 검출용 프로브로서, 소광 프로브가 아니라, 하이브리드 형성에 의해 시그널 강도가 증가하는 프로브를 사용했을 경우는, 반대로, 형광 강도의 감소량을 측정하면 된다.
- [0192] 또한 본 발명에 있어서는, 상기한 바와 같이, 하이브리드를 가열하고, 온도상승에 따르는 형광 시그널 변동(바

람직하게는 형광 강도의 증가)을 측정하지만, 이 방법 대신에, 예를 들면 하이브리드 형성시에 있어서의 시그널 변동의 측정을 행해도 된다. 즉, 상기 프로브를 첨가한 시료의 온도를 강하시켜서 하이브리드를 형성할 때의 상기 온도 강하에 따르는 형광 시그널 변동을 측정해도 된다.

- [0193] 구체예로서, QProbe를 사용했을 경우, 상기 프로브를 시료에 첨가한 때는, 상기 프로브는 해리 상태에 있기 때문에 형광 강도가 크지만, 온도의 강하에 의해 하이브리드를 형성하면, 상기 형광이 감소(또는 소광)한다. 따라서, 예를 들면 상기 가열한 시료의 온도를 서서히 강하하고, 온도 하강에 따르는 형광 강도의 감소를 측정하면 된다.
- [0194] 한편 하이브리드 형성에 의해 시그널이 증가하는 프로브를 사용했을 경우, 상기 프로브를 시료에 첨가한 때는, 상기 프로브는 해리상태에 있기 때문에 형광 강도가 작으나(또는 소광), 온도의 강하에 의해 하이브리드를 형성하면, 형광 강도가 증가하게 된다. 따라서, 예를 들면 상기 시료의 온도를 서서히 강하하고, 온도 하강에 따르는 형광 강도의 증가를 측정하면 된다.
- [0195] 복수의 유전자 변이를 동일한 계에서 검출하는 방법으로서, 특히 제한되는 것은 아니다. 예를 들면 각 유전자 변이를 검출할 수 있는 각 프로브를 미리 혼합하여, 시료에 첨가해도 되고, 1분쇄 핵산을 포함하는 시료에 각 유전자 변이를 검출할 수 있는 각 프로브를 연속적으로 첨가해도 된다.
- [0196] 여기서, 「계」란, 형광 표지 올리고뉴클레오티드 및 1분쇄 핵산이 하이브리다이즈한 하이브리드를 포함하는 시료로 형성되는 1개의 독립한 반응계를 의미한다.
- [0197] <유전자 변이 검출용 시약 키트>
- [0198] 본 발명의 유전자 변이 검출용 시약 키트는, 상술한 유전자 변이 검출용 프로브를 포함한다.
- [0199] 이 유전자 변이 검출용 시약 키트에는, 유전자를 코드하는 염기 서열이 복수의 유전자 변이를 포함하고 있다고 해도, 검출 대상 외의 유전자 변이의 영향을 받지 않고, 검출 대상으로 되는 특정의 유전자 변이를 특이적으로 검출하는 것이 가능한 기술의 유전자 변이 검출용 프로브의 적어도 1종을 포함함으로써, 유전자 변이의 검출을 보다 간편하게 행할 수 있는 등의 경향이 있다.
- [0200] 유전자 변이 검출용 프로브로서 2종 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 경우, 각각의 올리고뉴클레오티드는 혼합된 상태에서 포함되어 있어도, 별개로 포함되어 있어도 된다.
- [0201] 2종 이상의 상기 형광 표지 올리고뉴클레오티드는 발광 파장이 서로 다른 형광 색으로 표지화되어 있어도 된다.
- [0202] 이와 같이 형광 색소의 종류를 바꿈으로써, 같은 반응계이어도, 각각의 형광 표지 올리고뉴클레오티드에 관한 검출을 동시에 행하는 것도 가능하게 된다.
- [0203] 또한 본 발명에 있어서의 유전자 변이 검출용 시약 키트는, 상기 유전자 변이 검출용 프로브가 하이브리다이즈하는 영역을 갖는 염기 서열을 증폭하기 위한 프라이머를 더 포함하고 있어도 된다.
- [0204] 또, 유전자 변이 검출용 시약 키트에 포함될 수 있는 프로브 및 프라이머에 관해서는, 전술한 사항을 그대로 적용할 수 있다.
- [0205] 또한 본 발명에 있어서의 유전자 변이 검출용 시약 키트는, 상기 유전자 변이 검출용 프로브 및 상기 프라이머의 외에, 본 발명의 검출 방법에 있어서의 핵산 증폭을 행하는데 필요로 되는 시약류를 더 포함하고 있어도 된다. 또한 유전자 변이 검출용 프로브, 프라이머 및 기타의 시약류는, 별개로 수용되어 있어도 되고, 그것들의 일부가 혼합물로 되어 있어도 된다.
- [0206] 또, 「별개로 수용」이란, 각 시약이 비접촉 상태를 유지할 수 있게 구분된 것이면 되고, 반드시 독립해서 취급 가능한 개별의 용기에 수용될 필요는 없다.
- [0207] 유전자 변이를 나타내는 염기를 포함하는 염기 서열(유전자 변이 검출용 프로브가 하이브리다이즈하는 영역)을 증폭하기 위한 프라이머 세트를 포함함으로써, 예를 들면 보다 고감도로 유전자 변이를 검출할 수 있다.
- [0208] 또한 본 발명의 유전자 변이 검출용 시약 키트는, 상기 유전자 변이 검출용 프로브를 사용하여, 검출 대상인 핵산을 포함하는 시료에 관하여 미분 용해 곡선을 작성하여, 그 Tm값 해석을 행하고, 유전자를 코드하는 염기 서열에 있어서의 유전자 변이를 검출하는 것이 기재된 취급 설명서, 또는 유전자 변이 검출용 시약 키트에 포함되는 혹은 추가적으로 포함하는 것이 가능한 각종의 시약에 관하여 기재된 사용 설명서를 포함할 수 있다.

[0209] [실시예]

[0210] 이하, 본 발명을 실시예에서 상세하게 설명한다. 그러나, 본 발명은 그것들에 하등 한정되는 것이 아니다.

[0211] [실시예 1]

[0212] 전자동 SNPs 검사 장치(상품명 i-densy(상표), 아크레이사제)과, 하기 표 6에 기재한 처방의 검사용 시약을 사용하여, T_m 해석을 행했다.

표 6

[0213]	(반응액량: 50 μ l)	
	1×Gene Taq Universal buffer※	
	프로브: 3PB-CYP3A4*1B-R3	0.2 μ M
	주형(상보쇄)	0.2 μ M

[0214] ※넛폰진사제

[0215] 또, 상기 표 6에서 사용한 프로브(서열번호 2)의 상세를 이하의 표 7에 나타내며, 주형(상보 쇠)(ID-1?ID-16)의 상세를 이하의 표 8 및 표 9에 나타낸다. 또, 프로브 중의 3' 말단의 괄호 내는 형광 색소의 종류를 나타낸다.

[0216] T_m값은, Meltcalc 99 free(<http://www.meltdcalc.com/>)을 사용하여, 설정 조건: Oligoconc[μ M] 0.2, Na eq.[mM] 50의 조건으로 산출했다.

[0217] 표 7 중, T_m(WT)은, 주형이 검출 대상의 유전자 변이에 대하여 야생형일 때의 T_m값을 나타내고, T_m(mt)은, 주형이 검출 대상의 유전자 변이에 대하여 변이형일 때의 T_m값을 나타낸다. Δ 은, mt(변이형)과 WT(야생형)의 T_m값의 차이를 나타낸다.

[0218] [표 7]

명칭	서열	mer	T _m (WT)	T _m (mt)	Δ	GC(%)
3PB-CYP3A4*1B-R3	taaatcgccGctctcCtgccc-(Pacific Blue)	21	52.7	60.8	8.1	61.9

밑줄 대문자: *1B(목적SNP) 대문자: *1B 이외의 변이(목적 외 SNP)

[0219]

[0220] [표 8]

CYP3A4*1B-AA-40-F	AGCCATAGAGACAAGGGCAAGAGAGaGGCGATTTAATAGA	서열번호 25
CYP3A4*1B-GA-40-F	AGCCATAGAGACAAGGGCAGGAGAGaGGCGATTTAATAGA	서열번호 26
CYP3A4*1B-AG-40-F	AGCCATAGAGACAAGGGCAAGAGAGgGGCGATTTAATAGA	서열번호 27
CYP3A4*1B-GG-40-F	AGCCATAGAGACAAGGGCAGGAGAGgGGCGATTTAATAGA	서열번호 28

[0221]

[0222] [표 9]

		목적 SNP
ID-1	CYP3A4*1B-AA-40-F	A/A
ID-2	CYP3A4*1B-GA-40-F	G/G
ID-3	CYP3A4*1B-AG-40-F	A/A
ID-4	CYP3A4*1B-GG-40-F	G/G
ID-5	CYP3A4*1B-AA-40-F	G/G
	CYP3A4*1B-GA-40-F	
ID-6	CYP3A4*1B-AA-40-F	A/A
	CYP3A4*1B-AG-40-F	
ID-7	CYP3A4*1B-AA-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-GG-40-F	
ID-8	CYP3A4*1B-GA-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-AA-40-F	
ID-9	CYP3A4*1B-GA-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-AG-40-F	
ID-10	CYP3A4*1B-GA-40-F	G/G
	CYP3A4*1B-GG-40-F	
ID-11	CYP3A4*1B-AG-40-F	A/A
	CYP3A4*1B-AA-40-F	
ID-12	CYP3A4*1B-AG-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-GA-40-F	
ID-13	CYP3A4*1B-AG-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-GG-40-F	
ID-14	CYP3A4*1B-GG-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-AA-40-F	
ID-15	CYP3A4*1B-GG-40-F	G/G
	CYP3A4*1B-GA-40-F	
ID-16	CYP3A4*1B-GG-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-AG-40-F	

[0223]

[0224] T_m 해석은, 95℃에서 1초, 40℃에서 60초 처리하고, 계속해서 온도의 상승 속도 1℃/3초로, 40℃로부터 80℃까지 온도를 상승시키고, 그 사이의 경시적인 형광 강도의 변화를 측정했다.

[0225] 또, 형광 색소 Pacific Blue의 여기 파장은 365nm?415nm이며, 검출 파장은 445nm?480nm이며, 각 파장에 따라, 형광 표시 프로브에 유래하는 형광 강도의 변화를 각 시료마다 측정했다.

[0226] T_m 해석에 의해, 프로브의 형광값의 변화량을 나타낸 도 2(A)?(P)을 얻었다. 도면 중, 세로축은 단위시간 당의 형광 강도의 변화량(d형광강도증가량/t)을 나타내고, 가로축은 온도 (℃) 를 각각 나타낸다. 도 2 중, (A)은 주형으로서 ID-1, (B)은 주형으로서 ID-2, (C)은 주형으로서 ID-3, (D)은 주형으로서 ID-4, (E)은 주형으로서 ID-5, (F)은 주형으로서 ID-6, (G)은 주형으로서 ID-7, (H)은 주형으로서 ID-8, (I)은 주형으로서 ID-9, (J)은 주형으로서 ID-10, (K)은 주형으로서 ID-11, (L)은 주형으로서 ID-12, (M)은 주형으로서 ID-13, (N)은 주형으로서 ID-14, (O)은 주형으로서 ID-15, (P)은 주형으로서 ID-16을 각각 사용했을 경우의 형광값의 변화량을 나타낸 도면이다.

[0227] 도 2(A)?(P)의 결과로부터, 서열번호 2에 나타내는 프로브를 사용했을 경우는, 비목적 유전자 변이의 유무에 무관하게, 서열번호 1에 나타내는 염기 서열 중, 검출 대상으로 되는 501번째의 염기에 관하여, 유전자 변이의 유무를 검출할 수 있는 것이 밝혀졌다.

[0228] [실시에 2]

[0229] 전자동 SNPs 검사 장치 IS-5310(상품명 i-densy(상표), 아크레이사제)과 하기 표 10에 기재한 처방의 검사용 시약을 사용하여, T_m 해석을 행했다. 또한 처방을 실시예 1의 프로브를 실시예 2에 사용하고 있는 프로브로 변경하고, 마찬가지로의 실험을 행해도 동등한 결과가 얻어진다.

[0230] [표 10]

처방

(반응액량: 50 μl)	
1 × PCR 버퍼	
dNTP	0.2mM
MgCl ₂	1.5mM
Taq 폴리머라제(아크레이사제)	0.0376U
프로브 : 5FL-ABCG2 Q126X-T-R1	0.2 μM
주형	0.2 μM

[0231]

[0232] T_m 해석은, 95℃에서 1초, 40℃에서 60초 처리하고, 계속해서 온도의 상승 속도 1℃/3초로, 40℃부터 75℃까지 온도를 상승시키고, 이 사이의 경시적인 형광 강도의 변화를 측정했다. 여기 파장을 420nm~485nm에서 하고 측정 파장을 520nm~555nm에서 하여, 형광 표지 프로브에 유래하는 형광 강도의 변화를 각각 측정했다.

[0233] [표 11]

유형	주형 ①	주형 ②
야생형 1	ABCG2-Q126X-50-F-WT	/
야생형 2	ABCG2-Q126X-40-F-WTC	
변이형 1	ABCG2-Q126X-50-F-mt	
변이형 2	ABCG2-Q126X-40-F-mtC	
혼합형 1	ABCG2-Q126X-50-F-WT	ABCG2-Q126X-50-F-mt
혼합형 2	ABCG2-Q126X-40-F-WTC	ABCG2-Q126X-40-F-mtC
혼합형 3	ABCG2-Q126X-50-F-WT	ABCG2-Q126X-40-F-mtC
혼합형 4	ABCG2-Q126X-40-F-WTC	ABCG2-Q126X-50-F-mt

[0234]

[0235] 상기 기재의 프로브 및 1분쇄 핵산의 상세를 이하에 나타냈다.

[0236] [표 12]

프로브			
명칭	서열	(mer)	
5FL-ABCG2 Q126X-T-R1	(FL)-cccactTatacttacttAtaccac-(P)	24	서열번호 30
1분쇄 핵산			
명칭	서열	(mer)	
ABCG2-Q126X-50-F-WT	caaatgtaattcaggttacgtggtaCaagtaagatTagtgggtttgcat	50	서열번호 31
ABCG2-Q126X-50-F-mt	caaatgtaattcaggttacgtggtaTaagtaagatTagtgggtttgcat	50	서열번호 32
ABCG2-Q126X-40-F-WTC	ggttACgtggtaCaagtaagatCagtgggtttgcatttt	40	서열번호 33
ABCG2-Q126X-40-F-mtC	ggttACgtggtaTaagtaagatCagtgggtttgcatttt	40	서열번호 34

[0237]

[0238] 그 결과, 본 발명에 의한 유전자 변이 검출용 프로브를 사용함으로써, 야생형(서열번호 29의 234번째의 염기가 G) 1 및 2와, 변이형(서열번호 29의 234번째의 염기가 C) 1 및 2의 양쪽의 피크를 검출할 수 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 인간 게놈 타입의 야생형의 1분쇄 핵산과 변이형의 1분쇄 핵산을 1:1로 혼합한 혼합형 1~4을 사용하였을 경우에도, 본 발명에 의한 유전자 변이 검출용 프로브를 사용함으로써, 피크를 검출할 수 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0239] 야생형 1 및 야생형 2의 T_m값은 어느 것이나 50℃이며, 변이형 1 및 변이형 2의 T_m값은 어느 것이나 57℃이었다.

[0240] 또한 혼합형 1의 T_m값은 50℃와 56℃이며, 혼합형 2의 T_m값은 50℃와 56℃이며, 혼합형 3의 T_m값은 48℃와 56℃이며, 혼합형 4의 T_m값은 49℃와 57℃이었다.

[0241] 도 3에 T_m 해석에 의해 얻어진 야생형 1(A), 야생형 2(C), 변이형 1(B), 변이형 2(D), 혼합형 1(E), 혼합형 2(F), 혼합형 3(G) 및 혼합형 4(H)의 그래프를 각각 나타낸다. 또, 세로축은 형광 강도의 온도미분값을 나타내고, 가로축은 온도를 각각 나타낸다.

[0242] [비교예 1]

[0243] 전자동 SNPs 검사 장치(상품명 i-densy(상표), 아크레이사제)과, 하기 표 13에 기재한 처방의 검사용 시약을 사용하여, T_m 해석을 행했다.

표 13

[0244]	(반응액량: 50 μ l)
	1×Gene Taq Universal buffer※
	프로브: 3PB-CYP3A4*1B-R3TK
	주형(상보쇄)
	0.2 μ M
	0.2 μ M

[0245] ※넛폰진사제

[0246] 또, 상기 표 13에서 사용한 프로브(서열번호35)의 상세를 이하의 표 14에 나타내며, 주형(상보 쇠)(ID-17?ID-32)의 상세를 이하의 표 15에 나타낸다. 또, 프로브 중의 3' 말단의 괄호 내는 형광 색소의 종류를 나타낸다.

[0247] [표 14]

명칭	서열	mer	T _m (WT)	T _m (mt)	Δ	GC(%)
3PB-CYP3A4*1B-R3TK	taaatcgccTctctcQtgcc-(Pacific Blue)	21	48.9	57.6	8.7	57.1

밑줄 대문자: *1B(목적SNP) 대문자: *1B 이외의 변이(목적 외 SNP)

[0248]

[0249] [표 15]

		목적SNP
ID-17	CYP3A4*1B-AA-40-F	A/A
ID-18	CYP3A4*1B-GA-40-F	G/G
ID-19	CYP3A4*1B-AG-40-F	A/A
ID-20	CYP3A4*1B-GG-40-F	G/G
ID-21	CYP3A4*1B-AA-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-GA-40-F	
ID-22	CYP3A4*1B-AA-40-F	A/A
	CYP3A4*1B-AG-40-F	
ID-23	CYP3A4*1B-AA-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-GG-40-F	
ID-24	CYP3A4*1B-GA-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-AA-40-F	
ID-25	CYP3A4*1B-GA-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-AG-40-F	
ID-26	CYP3A4*1B-GA-40-F	G/G
	CYP3A4*1B-GG-40-F	
ID-27	CYP3A4*1B-AG-40-F	A/A
	CYP3A4*1B-AA-40-F	
ID-28	CYP3A4*1B-AG-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-GA-40-F	
ID-29	CYP3A4*1B-AG-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-GG-40-F	
ID-30	CYP3A4*1B-GG-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-AA-40-F	
ID-31	CYP3A4*1B-GG-40-F	G/G
	CYP3A4*1B-GA-40-F	
ID-32	CYP3A4*1B-GG-40-F	A/G
	CYP3A4*1B-AG-40-F	

[0250]

[0251] T_m 해석은, 95℃에서 1초, 40℃에서 60초 처리하고, 계속해서 온도의 상승 속도 1℃/3초로, 40℃로부터 80℃까지 온도를 상승시키고, 그 사이의 경시적인 형광 강도의 변화를 측정했다.

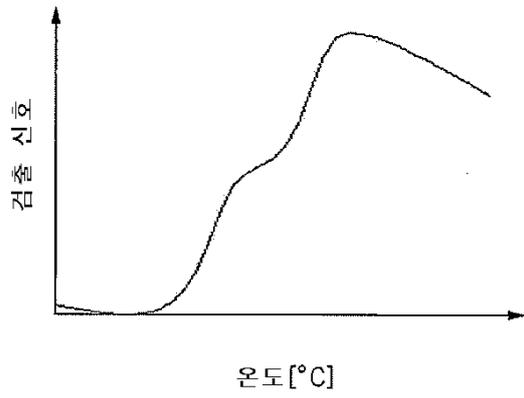
[0252] T_m 해석에 의해, 프로브의 형광값의 변화량을 나타낸 도 4를 얻었다. 도면 중, 세로축은 단위시간 당의 형광 강도의 변화량(d형광강도증가량/t)을 나타내고, 가로축은 온도(℃)를 각각 나타낸다. 도 4 중, (A)은 주형으로

서 ID-17, (B)은 주형으로서 ID-18, (C)은 주형으로서 ID-19, (D)은 주형으로서 ID-20, (E)은 주형으로서 ID-21, (F)은 주형으로서 ID-22, (G)은 주형으로서 ID-23, (H)은 주형으로서 ID-24, (I)은 주형으로서 ID-25, (J)은 주형으로서 ID-26, (K)은 주형으로서 ID-27, (L)은 주형으로서 ID-28, (M)은 주형으로서 ID-29, (N)은 주형으로서 ID-30, (O)은 주형으로서 ID-31, (P)은 주형으로서 ID-32을 각각 사용했을 경우의 형광값의 변화량을 나타낸 도면이다.

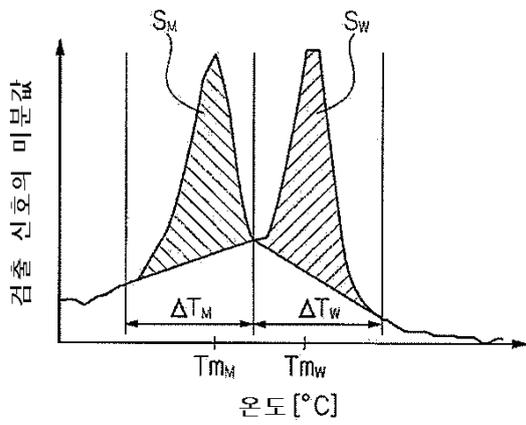
- [0253] 그 결과, 비교예 1에서 사용한 프로브를 사용했을 경우는, 비목적 유전자 변이의 유무의 영향을 받기 때문에, 서열번호 1에 나타낸 염기 서열 중, 검출 대상으로 되는 501번째의 염기에 관하여, 유전자 변이의 유무를 검출하는 것이 곤란한 것이 밝혀졌다.
- [0254] 이상과 같으므로, 본 발명에 의하면, 유전자를 코드하는 염기 서열에 포함되는 복수의 유전자 변이로부터, 비목적 유전자 변이의 염기형의 영향을 받지 않고, 검출 대상으로 되는 특정의 유전자 변이만을 특이적으로 검출할 수 있는 것이 밝혀졌다.
- [0255] 일본 특허출원2011-102987(출원일 2011년 5월 2일) 및 일본 특허출원2011-218114(출원일 2011년 9월 30일)의 개시는, 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 편입된다.
- [0256] 본 명세서에 기재된 모든 문헌, 특허출원 및 기술규격은, 개개의 문헌, 특허출원 및 기술규격이 참조에 의해 편입되는 구체적 또한 각각 기재되었을 경우와 같은 정도로, 본 명세서 중에 참조에 의해 편입된다.

도면

도면1

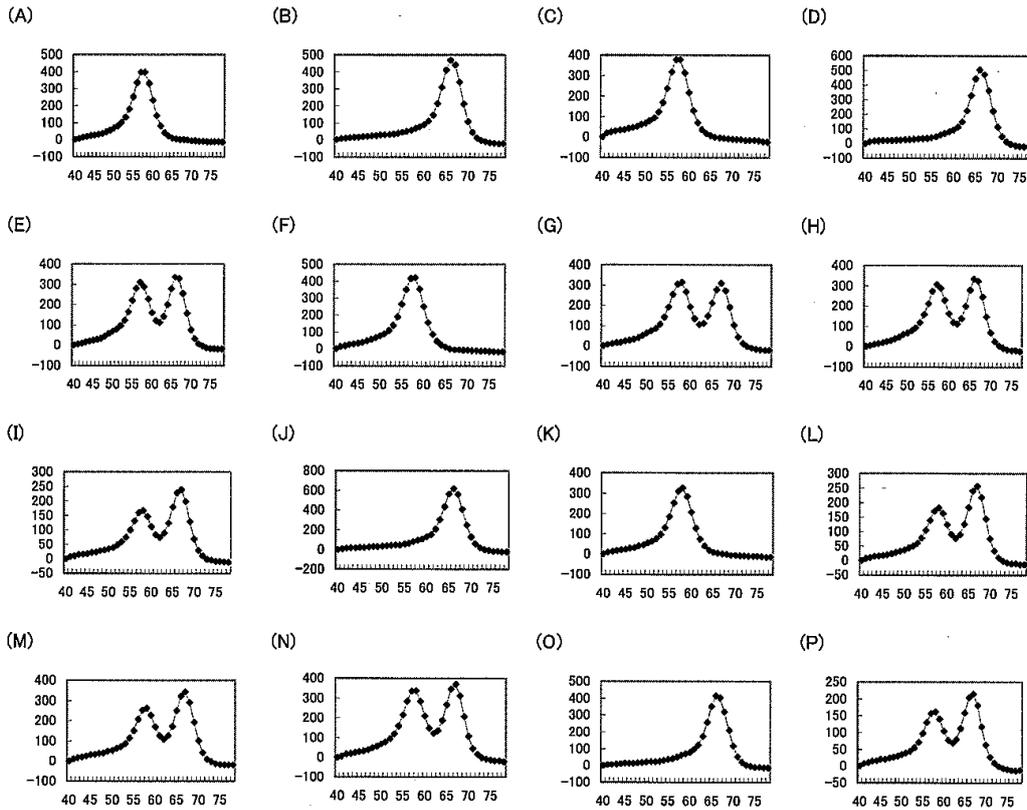


(A)

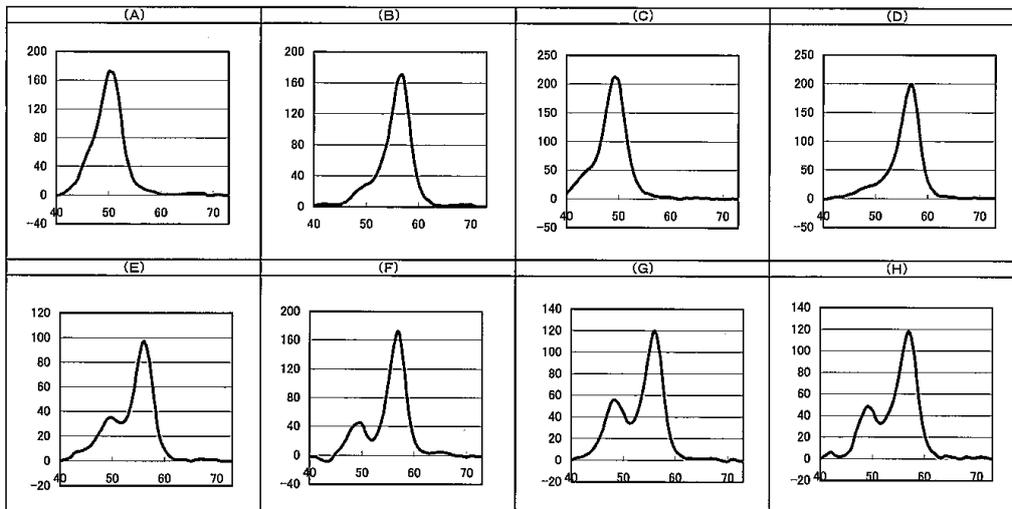


(B)

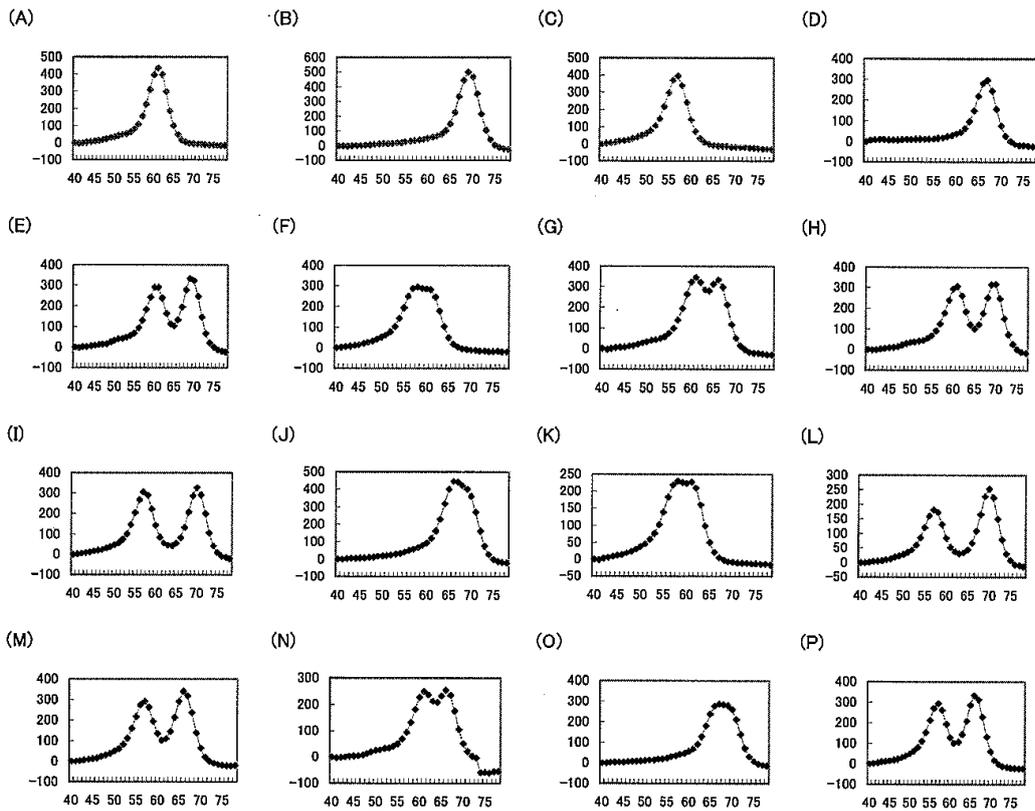
도면2



도면3



도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> ARKRAY, INC.
- <120> GENE MUTATION DETECTION PROBE, METHOD OF DETECTING GENE MUTATION AND GENE MUTATION DETECTION REAGENT KIT
- <130> P1433A
- <150> JP2011-218114
- <151> 2011-09-30
- <150> JP2011-102987
- <151> 2011-05-02
- <150> JP2012-082391
- <151> 2012-03-30
- <160> 35
- <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
- <211> 701
- <212> DNA

```

<213> Homo sapiens
<220><221> misc_feature
<222> (491)..(491)
<223> r is g or a.
<220><221>
> misc_feature
<222> (501)..(501)
<223> r is g or a.
<220><221> misc_feature
<222> (507)..(507)
<223> r is g or a.
<400> 1
cagctgaggc acagccaaga gctctggctg tattaatgac ctaagaagtc accagaaagt 60
cagaaggat gacatgcaga ggcccagcaa tctcagctaa gtcaactcca ccagcctttc 120
tagttgccca ctgtgtgtac agcaccttg tagggaccag agccatgaca ggaataaga 180
ctagactatg cccttgagga gctcacctct gttcagggaa acaggcgtgg aaacacaatg 240
gtggtaaaga ggaaagagga caataggatt gcatgaaggg gatggaaagt gccaggggga 300

ggaaatggtt acatctgtgt gaggagtttg gtgaggaaag actctaagag aaggctctgt 360
ctgtctgggt ttggaaggat gtgtaggagt cttctagggg gcacaggcac actccaggca 420
taggtaaaga tctgtagggt tggcttggtt ggatgaatit caagtattit ggaatgagga 480
cagccataga racaagggca rgagagrggc gatttaatag atttatgcc aatggctcca 540
cttgagtttc tgataagaac ccagaacctc tggactcccc agtaacattg attgagttgt 600
ttatgatacc teatagaata tgaactcaaa ggaggtcagt gagtggtgtg tgtgtgattc 660
tttgccaact tccaaggtgg agaagcctct tccaactgca g 701

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> 3PB-CYP3A4*1B-R3
<400> 2
taaatcgceg ctctctgcc c 21

<210> 3
<211> 501

```

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ3
 <220><221> misc_feature
 <222> (251)..(251)
 <223> r is g or a.
 <220><221> misc_feature
 <222> (256)..(256)
 <223> s is g or c.
 <220><221> misc_feature
 <222> (260)..(260)
 <223> y is t or c.
 <220><221> misc_feature
 <222> (273)..(273)
 <223
 > s is g or c.
 <400> 3
 gggctcgagg cgtcccccg ggagtcgct cttagcggtg cgtccgggct agcggcgagg 60
 ggccgccccca agtcttccca ccgccccac cttagcagcc cgacttgggg cctggaaagt 120
 ggagcacgcg gaggtgggag ggccctgcac gcggccccg gtggggaagg ggacgggcca 180
 gggattcaga ctcggtctt cccctcagga tgcagcaccg aggettcttc ctctcacc 240
 tctctgccct rctggsgcty acctcgcgg tcscaaaaa gaaaggtgat ggggatgat 300
 cgaaggaggg ctggggacgg gcagcagagg cccctccact tctgggctgg gccgcctggg 360
 ttcttagcct ggaacccag gaaggcggt cccgaggag tctcccctg cccagtcct 420

 gaactctgtt cctcgcgct ttagataag gtgaagaagg gcggccccg gagcgagtgc 480
 gctgagtggg cctgggggcc c 501
 <210> 4
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 4
 <400> 4
 ctccagcagg gcgagga 17
 <210> 5

<211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 5
 <400> 5
 caccagcagg gcgagga 17
 <210> 6
 <211> 18
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial
 <220><223> SEQ 6
 <400> 6
 cctcgccta ctggagct 18
 <210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 7
 <400> 7
 cctcgccta ctggtgct 18
 <210> 8
 <211> 588
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (322)..(322)
 <223> r is g or a.
 <220><221> misc_feature
 <222> (355)..(355)
 <223> r is g or a.
 <220><221> misc_feature
 <
 <222> (364)..(364)
 <223> r is g or a.

<220><221> misc_feature
 <222> (370)..(370)
 <223> r i s g o r a.
 <400> 8
 ctgctcagag ctcacagacc tgggtgcccg ggcctgacg actcacacag gcccgagct 60
 gggagaggat atggtgcagg gtgtgaagg gctggtccaa gacatcccc agggctgggt 120
 cagtgtcagc ggtggcctcc agaaccttca gcgtcagggc cagctcagcc tccaaagcca 180
 cggggcgctc ctcacctga ggagaggtga gaaagagcag gtgagggggg aggtgagggg 240
 aacaggttgg gggaggagga tagagaggaa caagtgaagg tgacaggcac aggggagagg 300
 gcacagccag tgtggtcagg trggagcaga gggaagggtg agcaggtgtg ggaraggag 360

 agarggacar tggagaagga gaaggtgaag gggccactac agagccaggt gagcagggct 420
 gggagggcag ggtgggct gactccccct ctcacctga gctgcctcag gtcccaggtc 480
 ctgggaaga ggcgggagcg gcacttcag tccttcagca gaagcgactc ttctagaca 540
 gcaaaggcac aggttagccc cagcaggagg ggtggaggtt agaccact 588
 <210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 9
 <400> 9
 tccatctctc ctctcccc 18
 <210> 10
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220><223> SEQ 10
 <400> 10
 tccgtctctc ctctcccc 18
 <210> 11
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 11

<400> 11
 gggagaggag agatggac 18

<210> 12
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 12
 <400> 12
 gggagaggag agacggac 18

<210> 13
 <211> 401
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature

<222> (187)..(187)
 <223> w i s a o r t.
 <220><221> misc_feature

<222> (201)..(201)
 <223> m i s a o r c.
 <400> 13
 aactatagtt gatacctata aaattgactt cacaatgcac tattgggtca aaatttccag 60
 ttgaaaaac agtgtgccta gacagtctgg tgaagttcag tttccaaact aatcatccgc 120
 aggtctccta gttcctcaaa tgcacatctt ctgactcctt taggggttcc ctatectcta 180
 gtgttgwtgt cttcctgggg magccctcta ttctgctctt gattgaattt cctctccgat 240
 atcacctgct tgectggcta tgatgatcat tgctgctgta gtgattcata aatgtatatt 300
 cctaactgtg gttgcgttcc tgaattctgt atgatgttcc cagcagcatt ccaaacagtt 360

tcatgtagcc ttctgttgta cccctcatct tgaactcagc a 401

<210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 14
 <400> 14

gctgccccag gaagacacca ac 22
 <210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 15
 <400> 15

gctgccccag gaagacagca ac 22
 <210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 16
 <400> 16

ttgctgtctt cctggggcag cccc 24
 <210> 17
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 17
 <400> 17

ttggtgtctt cctggggcag cccc 24
 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 18
 <400> 18

ctaccccagg aagacatcaa c 21
 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 19

<400> 19
 tgatgtcttc ctgggggagc c 21

<210> 20
 <211> 501

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (247)..(247)
 <223> y is c or t.
 <220><221> misc_feature
 <222> (251)..(251)
 <223> k is g or t.

<400> 20
 gttttttatg ccatgtatat ttctctatgt gtagcctttg cctaaaacaa cacatgatta 60
 atatttggtc attgttcctt ttgctatcac ccctgtctag gatctacaca ttaagaaaca 120
 aagacatgaa cgtctccatg gaaagactgg gaaaatggat tgcaggttct agcaggatgt 180
 cataataaat ggtgcatatc cagagtgcaa gatgattcag tctcaccaag aacctgaaa 240
 gtcacayggc kaccagcatt attgtgataa gaactactat tttgggagat agtttagcaa 300

agggtgccatg tagaaattga ttaagtcaga ggtatcttta acttgccacc acagagaaga 360
 gattaatttc atatacttcc attgagaaga gagataagaa tacaaaacca agctgatttg 420
 caggagtaaa cttgatattc aaatactatt tctgaatga cattttctga gacatgctaa 480
 ttgtaattac tttcagcttc a 501

<210> 21
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 21
 <400> 21
 ggttgccatg tgactttc 18
 <210> 22
 <211> 18
 <212> DNA

<213> Artificial

<220><223> SEQ 22

<400> 22

ggtggccatg tgactttc 18

<210> 23

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> SEQ 23

<400> 23

aagtcacatg gcaacc 16

<210> 24

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> SEQ 24

<400> 24

aagtcacatg gccacc 16

<210> 25

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> SEQ 25

<400> 25

agccatagag acaagggcaa gagagaggcg atttaataga 40

<210> 26

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> SEQ 26

<400> 26

agccatagag acaagggcag gagagaggcg atttaataga 40

<210> 27

<211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 27
 <400> 27
 agccatagag acaagggcaa gagagggcg atttaataga 40
 <210> 28
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> SEQ 28
 <400> 28
 agccatagag acaagggcag gagagggcg atttaataga 40

 <210> 29
 <211> 480
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (227)..(227)
 <223> y is t or c.
 <220><221> misc_feature
 <222> (234)..(234)
 <223> r is g or a.
 <220><221> misc_feature
 <222> (234)..(234)
 <223> s is g or c.
 <220><221> misc_feature
 <222> (245)..(245)
 <223> y is t or c.
 <400> 29
 agtagaattt ggattcaaag tagccatgag atatatagca tgtgttgag ggaaaaaac 60
 cccacaacat atatattctc ttataggta ttagaccac aacatatatg tcctcttata 120
 ggttattaga tgccttagct gcaaggaaag atccaagtgg attatctgga gatgttctga 180

taaatggagc accgcgacct gccaatcca aatgtaattc aggttaygtg gtasaagtaa 240
 gtatyagtgg gtttgcattt tctgtttcct ctgtttctat atgggtaagt gctttsctg 300
 atagttcaat gtgcttccag ttgattatgt gacatggtcc tagaactgac gttctttaca 360
 gcagcttttc ttaatttctc atagacactt atgtgaaaag gcaggagaaa tctggaatat 420
 ggcccttgta aggacagiga taccaattct agtttttgta tcatttctaa aatgatacat 480
 <210> 30
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> 5FL-ABCG2 Q126X-T-R1
 <400> 30
 cccacttata cttacttata ccac 24

 <210> 31
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> ABCG2-Q126X-50-F-WT
 <400> 31
 caaatgtaat tcaggttacg tgggtacaagt aagtattagt gggtttgcac 50
 <210> 32
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> ABCG2-Q126X-50-F-mt
 <400> 32
 caaatgtaat tcaggttacg tgggtataagt aagtattagt gggtttgcac 50
 <210> 33
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> ABCG2-Q126X-40-F-WTC
 <400> 33
 ggttacgtgg tacaagtaag tatcagtggg tttgcatttt 40

<210> 34

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> ABCG2-Q126X-40-F-mtC

<400> 34

ggttacgtgg tataagtaag tatcagtggg ttgcatttt 40

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> 3PB-CYP3A4 1B-R3TK

<400> 35

taaatgcct ctctctgcc c 21