

(43) 国際公開日
2006年2月23日 (23.02.2006)

PCT

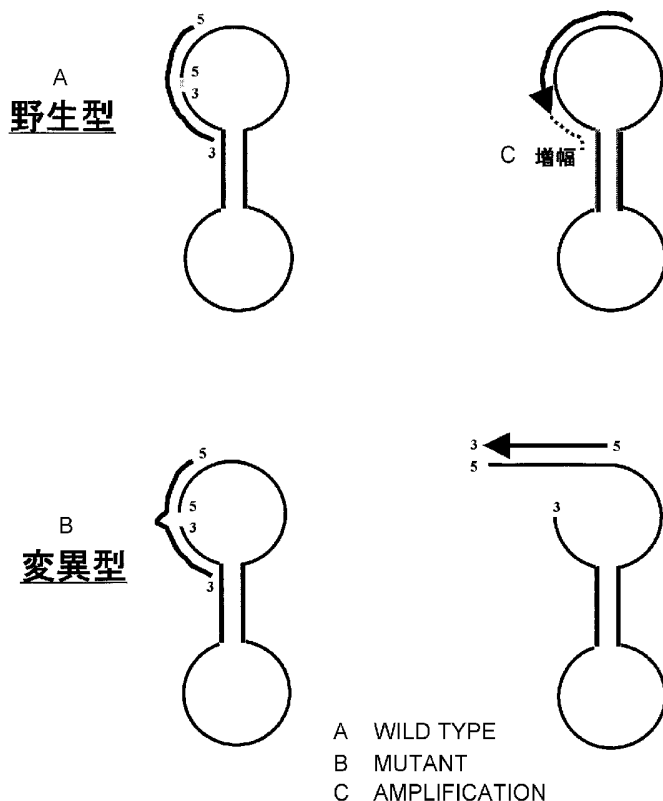
(10) 国際公開番号
WO 2006/019155 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/015131
- (22) 国際出願日: 2005年8月19日 (19.08.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-240793 2004年8月20日 (20.08.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ダナフォーム (KABUSHIKI KAISHA DNAFORM) [JP/JP]; 〒1080073 東京都港区三田一丁目3-35 Tokyo (JP). 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 林崎 良英 (HAYASHIZAKI, Yoshihide) [JP/JP]; 〒3050061 茨城県つくば市稲荷前22-8 Ibaraki (JP). 林 利藏 (HAYASHI, Toshizo) [JP/JP]; 〒1080073 東京都港区三田一丁目3-35 株式会社ダナフォーム内 Tokyo (JP). 三谷 康正 (MITANI, Yasumasa) [JP/JP]; 〒7210941 広島県福山市引野町北五丁目20-5 Hiroshima (JP).
- (74) 代理人: 奥山 尚一, 外(OKUYAMA, Shoichi et al.); 〒1070052 東京都港区赤坂3丁目2番12号赤坂ノアビル8階 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: TYPING METHOD FOR GENE POLYMORPHISM

(54) 発明の名称: 遺伝子多型のタイピング方法



(57) Abstract: A method of typing a gene polymorphism which involves: the step of preparing ring-opened single-stranded nucleic acid(s) comprising one or more single-stranded nucleic acids; the step of incubating a sample together with the ring-opened single-stranded nucleic acid(s) as described above in the state where the ring-opened single-stranded nucleic acid(s) have the stem-loop structure; and the step of further incubating one or more primers complementary to part(s) of one or more loops in the stem-loop structure together with the incubated sample as described above. Thus, a typing method for a gene polymorphism whereby typing can be easily, quickly and accurately carried out can be provided.

(57) 要約: 一又は複数の一本鎖核酸からなる開環一本鎖核酸を準備するステップと、前記開環一本鎖核酸がステムループ構造を有する状態において、サンプルと前記開環一本鎖核酸をインキュベートする

るステップと、前記ステムループ構造の一つ又は二つ以上のループ部分の一部に相補的な1種類又は2種類以上のプライマーを、前記インキュベート後

[続葉有]

WO 2006/019155 A1



- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,

CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

遺伝子多型のタイピング方法

技術分野

- [0001] 本発明は、SNP(一塩基多型)のような遺伝子多型のタイピング方法に関する。より詳しくは、本発明は、従来の方法と比較して、精度が高く迅速かつ特異性の高い、遺伝子多型をタイピングすることができる方法を提供する。

背景技術

- [0002] 遺伝情報を担う塩基配列は、個体間で多くの部位が異なっていることが知られている。同一集団内において、ある遺伝子座におけるアレルが2種以上存在する状態を多型または変異と呼び、一般的には、ある塩基の変化が1%以上の頻度で存在する場合を多型、1%未満の場合を変異と呼んでいる。

このような多型又は変異には、1個の塩基の違いによるSNP(一塩基多型;Single Nucleotide Polymorphism)、1～数十塩基が欠失や挿入されたもの、2塩基から数十塩基を1単位とする反復配列の反復数の相違(VNTR又はマイクロサテライト多型)などが知られている。

特にSNPは、多型マーカーとして、疾患に関係する遺伝子を探索するための有用なツールとして役立つのみならず、特定の疾患に対する罹患可能性、薬剤に対する応答性、薬剤に対する副作用の可能性について、非常に有用な情報を提供することができる。SNP部位の塩基を判別、すなわち、SNPのタイピングをより正確、容易、迅速に行なうことが求められている。

- [0003] SNPのタイピング法としては、TaqManPCR法、インベーター法、MALDI-TOF/MS法、RCA法、DNAチップ法等を挙げることができる。これらの方法によっても、1)検出に時間が掛かる、2)検出の工程が煩雑である、3)精度が低いなどの問題があり、大規模なサンプルのSNPタイピングや、農作物の現場での検査など迅速性、簡便性が求められるケースには実用化が難しかった。

非特許文献1:Tsugunori Notomi et. al. (2000):Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research、Vol.28、No.12: e63

非特許文献2:Kentaro Ngamine and Tesu Hase、Tsugunori Notomi:Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Molecular and Cellular Probes Vol.16、No.3、223-229、2002.

発明の開示

- [0004] 今回の発明の目的は、比較的少量のゲノムDNAを用いて遺伝子多型、特にSNP部位について、容易、迅速かつ正確なタイピングを行うことのできるタイピング方法を提供することを目的とする。
- [0005] 本発明者らは、上記目的達成のため、遺伝子多型の新規タイピング方法を開発した。すなわち、本発明は、遺伝子多型のタイピング方法であって、(1)一又は複数の一本鎖核酸からなる開環一本鎖核酸を準備するステップと、ここで、前記開環一本鎖核酸は、互いに相補的な配列を持つためステムループ構造をとることができ、ステムループ構造を有する状態において、前記開環一本鎖核酸は一つ又は二つ以上のループ部分を有し、前記ステムループ構造のステム部分以外の部位に前記一本鎖核酸の開環部が位置し、アレルの前記多型部位に相補的な配列を5'又は3'末端にもち、前記開環部を含めた領域において前記多型部位を含む配列に相補的であり、(2)前記開環一本鎖核酸がステムループ構造を有する状態において、サンプルと前記開環一本鎖核酸をインキュベートするステップと、(3)前記ステムループ構造の一つ又は二つ以上のループ部分の一部に相補的な1種類又は2種類以上のプライマーを、前記インキュベート後のサンプルとさらにインキュベートするステップとを含む遺伝子多型のタイピング方法である。
- [0006] 前記(3)のインキュベートステップにおいて、ループ部分の一部に相補的な前記プライマーに加えて、さらにステムループ構造のループ部分の一部と同じ配列をもつ1種類又は2種類以上のプライマーとインキュベートすることができる。これにより、一本鎖核酸を鋳型として増幅された核酸を、さらに鋳型として増幅がおこるため、多型のタイピングの検出感度が上がる。

本発明の遺伝子多型のタイピング方法では、さまざまな種類の多型をタイピングでき、SNP(一塩基多型)のタイピングも可能である。

本発明の遺伝子多型のタイピング方法では、アレルの前記多型部位における相補

的な配列が、開環一本鎖核酸の5'側又は3'側のいずれに位置してもよいが、3'末端に位置するのが望ましい。

[0007] さらに本発明は、遺伝子多型をタイピングするための開環一本鎖核酸であって、互いに相補的な配列を持つためステムループ構造をとることができ、ステムループ構造を有する状態において、前記開環一本鎖核酸は一つ又は二つ以上のループ部分を有し、前記ステムループ構造のステム部分以外の部位に前記一本鎖核酸の開環部が位置し、アレルの前記多型部位に相補的な配列を5'又は3'末端にもち、前記開環部を含めた領域において前記多型部位を含む配列に相補的であることを特徴とする開環一本鎖核酸を提供する。

[0008] 本発明の開環一本鎖核酸は、さまざまな種類の多型のタイピングに使用することができ、SNP(一塩基多型)のタイピングも可能である。

本発明の開環一本鎖核酸は、アレルの前記多型部位における相補的な配列が、開環一本鎖核酸の5'側又は3'側のいずれに位置してもよいが、3'末端に位置するのが望ましい。

[0009] さらに、本発明は、上記開環一本鎖核酸と、前記ステムループ構造の一つ又は二つ以上のループ部分の一部に相補的な1種類又は2種類以上のプライマーと、DNAポリメラーゼとを含む、遺伝子多型をタイピングするためのキットに関する。このキットには、ステムループ構造のループ部分の一部と同じ配列をもつ1種類又は2種類以上のプライマーをさらに含ませることが可能である。このキットにより、より容易、迅速、正確な遺伝子多型のタイピングを行なうことができる。

[0010] 本発明では、特定のアレルを含む場合にのみ、開環一本鎖核酸が閉環して、環状構造をとることができる。環状構造をとった一本鎖核酸のステムループ構造のループ部分の一部に相補的な1種類又は2種類以上のプライマーにより、閉環した一本鎖環状核酸を鋳型にローリングサークル型の増幅が行なわれ、一本鎖DNAが合成される。これにより、遺伝子多型のタイピングを行なうことができるが、一塩基について相違するSNPについてもタイピングが可能である。

特に、一本鎖核酸のループの一部と同じ配列を持つ1種類又は2種類以上の第二のプライマーをさらに用いると、増幅されて生じた一本鎖核酸を鋳型として、目的とす

る配列を含む一本鎖核酸が合成されるため、増幅効率が高まり、検出感度が上がる。

図面の簡単な説明

[0011] 図1は、本発明の一実施態様を示す模式図である。

図2は、従来のタイピング法と本願のタイピング法との比較を示す模式図である。

図3は、実施例のTem-Wの増幅結果を示すグラフである。

図4は、実施例のTem-Mの増幅結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0012] 本発明では、特定のアレルが開環一本鎖核酸の開環部分にミスマッチすることなくアニーリングした場合のみ、開環一本鎖核酸が閉環して、ローリングサークル型の核酸増幅が行なわれる。本発明で用いる開環一本鎖核酸には、次の条件を満たしたものをを用いる。(1)互いに相補的な配列を持つためステムループ構造をとることができる、(2)ステムループ構造を有する状態において、前記開環一本鎖核酸は一つ又は二つ以上のループ部分を有する、(3)前記ステムループ構造のステム部分以外の部位に前記一本鎖核酸の開環部が位置する、(4)アレルの前記多型部位に相補的な配列を5'又は3'末端にもつ、(5)開環部を含めた領域において前記多型部位を含む配列に相補的である。

一分子の開環一本鎖核酸は、一分子又は複数分子の一本鎖核酸から構成される。例えば、一分子の一本鎖核酸から構成される開環一本鎖核酸は、鎖内で逆向き反復配列を持ち、1つの開環部をもつ。二分子の一本鎖核酸から構成される開環一本鎖核酸は、2つの開環部をもつ。例えば、サンプルが2以上のアレルを含むかどうか(例えば、野生型アレルと変異型アレルをヘテロで持つか否か)について判別するために、二分子の一本鎖核酸から構成され、二つの開環部分を持つ開環一本鎖核酸であって、野生型アレルに相補的な配列を2つの開環部分のうち一つの5'又は3'末端にもち、変異型アレルに相補的な配列を残りの開環部分の5'又は3'末端にもつ開環一本鎖核酸を用いることができる。

[0013] 開環一本鎖核酸は、特定のアレルの多型部位に相補的な配列を5'又は3'末端に

もつ。そのため、サンプルに特定のアレルが含まれる場合に、開環一本鎖核酸のループ部分に当該アレルがミスマッチを生じることなくアニーリングする。ミスマッチを生じることなくアニーリングした場合に限り、開環部の5'末端と3'末端の塩基がライゲーションして閉環一本鎖環状構造が形成される。

開環構造の一本鎖核酸には、核酸の増幅が起こらないが、ライゲーションにより環状構造が形成されたときには、その後の核酸増幅ステップにおいて、ループ部分にアニーリングしたプライマーを起点に伸長が起こり、一本鎖環状核酸を鋳型としてローリングサークル型の核酸増幅が起こる。核酸の増幅の有無を調べることによって、遺伝子多型がタイピングされる。ステムループ構造を持つライゲーションされた一本鎖環状核酸を増幅させる方法を、SURCAS法(Super Rolling Circle Amplification System)と呼ぶ。

- [0014] 本発明の遺伝子多型のタイピング方法を、SNPを検出する場合を例にして、図1を元に説明する。図1の開環一本鎖核酸は、二本鎖部分の両端にそれぞれ1つずつループをもつダンベル構造と呼ばれる構造をとることができる。この開環一本鎖核酸は、開環部を二つのループ部分のうちの一つにもち、3'末端にSNP部位に相補的な塩基を有する。この3'末端の塩基は、野生型アレルに相補的な塩基であり、ループ部分においてタイピング対象の核酸がミスマッチを生じることなくアニーリングすることができる。これにより、一本鎖核酸の5'末端塩基と3'末端塩基との間でライゲーションを起こし、閉環して、一本鎖環状核酸が形成される。

一方、変異型アレルがループ部分にアニーリングした場合には、開環一本鎖核酸の3'末端の塩基と、SNP部位との間でミスマッチが生じる。そのため、一本鎖核酸の5'末端塩基と3'末端塩基との間でライゲーションは起きず、開環構造のままである。

- [0015] その後、一本鎖核酸のループ部分の一部に相補的な配列を有する1種又は2種以上のプライマーと共にインキュベートする。このとき、ライゲーションにより、閉環構造となった一本鎖環状核酸には、ループ部分にアニーリングしたプライマーからローリングサークル型の増幅が起こるが、開環一本鎖核酸の場合には、ローリングサークル型の核酸増幅が起こらない。核酸増幅の有無を調べることにより、野生型アレルと変異型アレルとを判別できる。

[0016] 遺伝子多型のタイピングを行なうサンプルは、任意の核酸を対象とすることができる。例えば、血液、組織、器官、培養細胞、バイオブシー試料等の生物学的試料由来のものから核酸を抽出してタイピングを行なうことができる。また、核酸としては、例えばゲノムDNA、cDNA、ミトコンドリアDNAを例示できる。好ましくは、ヒトの場合、白血球から抽出されたゲノムDNAを用いることができる。目的とする多型部位を含む配列を、本発明のタイピング方法を行なう前に予めPCR等で増幅しておくこともできる。一方、血液、組織、器官、培養細胞、バイオブシー試料等の生物学的試料から、核酸を抽出することなく遺伝子多型のタイピングを行なうことも可能である。

[0017] 本発明の遺伝子多型のタイピング方法において、一本鎖核酸のループ部分の一部に相補的な配列を有するプライマーのほかに、一本鎖核酸のステムループ構造のループ部分の一部と同じ配列をもつプライマーと共に、サンプルをインキュベートすることができる。これにより、特定のアレルがサンプル中に含まれていた場合に、核酸の増幅が起こるが、この増幅された核酸を鋳型にした増幅が起こるため、多型のタイピングの検出感度が上がる。プライマーは、一本鎖核酸の任意の個所と同じ配列を持つものを使用できるが、増幅効率の点からステムループ構造のループ部分と同じ配列を持つものが好ましい。プライマーの塩基数は、鋳型となる一本鎖核酸にアニーリングする限り、特に限定されない。一本鎖核酸にアニーリングするプライマーは、1種類以上用いることができ、一本鎖核酸の複数の部位にそれぞれアニーリングする複数種のプライマーを用いることができる。

なお、開環一本鎖核酸は、図1に示すようなダンベル構造に限らず、ステムループ構造を1つだけ有するものや、3つ以上のステムループ構造を有するものであってもよい。開環部は、ステム部分以外であれば、ステムループ構造のループ部分であっても、ステムループ構造以外にあってもよい。複数のステムループ構造を有する場合には、複数のループのそれぞれ、又は、複数のループのうちの1以上のループについて、ループ部分の一部と同じ配列をもつ複数のプライマーを用いることができる。

[0018] 本発明による遺伝子多型のタイピング法において使用するDNAポリメラーゼは、鎖置換(strand displacement)活性(鎖置換能)を有するものであればよく、常温性、中温性、もしくは耐熱性のいずれのものも好適に使用できる。また、このDNAポリメラ

ーゼは、天然体もしくは人工的に変異を加えた変異体のいずれであってもよい。さらに、このDNAポリメラーゼは、実質的に5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有しないものであることが好ましい。このようなDNAポリメラーゼとしては、Φ29ファージDNAポリメラーゼを例示できる。また、他の例として、バチルス・ステアロサーモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*、以下「B. st」という)、バチルス・カルドテナックス(*Bacillus caldotenax*、以下「B. ca」という)等の好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体、大腸菌(*E. coli*)由来DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント等が挙げられる。さらには、Vent DNAポリメラーゼ、Vent(Exo⁻)DNAポリメラーゼ、DeepVent DNAポリメラーゼ、DeepVent(Exo⁻)DNAポリメラーゼ、MS-2ファージDNAポリメラーゼ、Z-Taq DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、Pfu turbo DNAポリメラーゼ、KOD DNAポリメラーゼ、9oNm DNAポリメラーゼ、Therminator DNAポリメラーゼなどが挙げられる。より耐熱性にさせるためにトレハロースなどを添加したり、より酵素を安定化させるためにGlycerolなどを添加したりする事も可能である。さらに、目的核酸がRNAの場合、逆転写酵素活性が強いBca(exo⁻)DNAポリメラーゼを用いる事が好ましい。逆転写酵素活性が弱い場合は、これらの酵素と逆転写酵素活性のあるM-MuLV Reverse Transcriptase等を組み合わせて使用することが望ましい。

本発明において使用するDNAリガーゼは、任意のリガーゼを用いることができ、例えば、Ampligase Thermostable DNA ligaseやT4 DNA ligaseなどを用いることができる。

- [0019] サンプルと開環一本鎖核酸とを反応させて、目的とする遺伝子多型がサンプルに含まれる場合に開環一本鎖核酸をライゲーションさせる反応、及びローリングサークル型の核酸増幅反応の温度、時間、緩衝液組成等の条件は、選択したリガーゼ、ポリメラーゼ、タイピング対象の核酸配列の長さ等に応じて異なるが、当業者が適宜選択することができる。例えば、ライゲーション反応には、94℃30秒、37℃5分を15サイクルさせ、核酸増幅には25～35℃で1.5～4時間程度行なうことができる。特定のアレルが含まれていたかどうかは、一本鎖環状核酸を鋳型とした核酸増幅が行なわれたかどうかで判断できる。核酸増幅の有無は、当業者に公知の方法、例えば、電

気泳動、蛍光による検出により行なうことができる。

[0020] 上記で本発明を一般的に説明したが、さらに下記では、本発明を実施例により具体的に説明する。しかし、この実施例は説明することを目的とするものであり、本発明の範囲をこれら実施例に限定することを意図するものではない。

実施例 1

[0021] 1) 原理

サンプル中に含まれるSNPのタイピング実験を行った。図1に示すように、相補的な配列間でハイブリダイズしてダンベル構造を形成したときに生じるループ部分に、検出したい異なる一塩基(SNP部位)が位置するように、開環一本鎖構造をもつ検出プローブをデザインした。この実施例では、検出プローブである開環一本鎖核酸の3'末端にSNP部位に相補的な塩基が位置している。

サンプルが野生型の塩基をもつ場合には、検出プローブのループ部分にサンプルDNAがミスマッチを生じることなくアニーリングするために、検出プローブの5'末端と3'末端とがライゲーションして閉環一本鎖環状構造をとることができる。サンプルが変異型の塩基を持つ場合には、検出プローブのループ部分にサンプルDNAがアニーリングするときに、検出プローブの3'末端塩基の位置でミスマッチを生じるため、ライゲーションして環状構造をとることができない。したがって、サンプルが野生型の塩基をもつ場合のみ、検出プローブが環状構造となるため、検出プローブを鋳型として増幅が起こる。

[0022] 2) 検出対象となる核酸の調整

下記の配列Tem-WおよびTem-Mを持つ2種類の検出対象となるオリゴヌクレオチドを、ABI社(Applied Biosystem Inc.)のDNAシンセサイザー394型により合成した。このオリゴヌクレオチドは、3'末端に伸長反応が起こらないようにアミノ酸修飾したオリゴヌクレオチドである。2つのオリゴヌクレオチドは、一塩基異なる配列になっている(太字で示す)。それぞれのオリゴヌクレオチドの0.3 μ M溶液を調整し、サンプル溶液とした。

[0023] [化1]

Tem-W : 3-GTCATGAATCCTGCAATTTTC-5

Tem-M : 3-GTCATGAATTCTGCAATTTTC-5

[0024] Loop1-W、Loop1-Mは、本発明の検出プローブとなる開環一本鎖核酸である。太字の配列は、互いに相補的であり、鎖内でステムループを形成する配列である。また、本発明によるLoop1-WおよびLoop1-Mの増幅効率と比較検討するために、Loop2-W、Loop2-Mを形成した。Loop2-W、Loop2-Mは、鎖内に互いに相補的な塩基配列を持たず、すなわち、ステムループ部を形成しない従来型のプローブである(比較例)。Loop1タイプ、Loop2タイプにおいて、網掛けされた領域が標的配列とハイブリダイゼーションする領域である。下線部分の配列は、下記に記載した増幅反応用プライマーのプライミング領域を示す。また、図2に、本発明のプローブによる検出と従来用いられていたプローブを用いた場合の検出について比較した模式図を示す。

[0025] [化2]

<本発明の検出シグナル増幅ループ配列>

Loop1-W: 5-GACGTTAAAGTATAGAGGTATCCGCATCGACGGCATATGCCATAGCATT
TTTATCCACGATCACCCGTCGATGCCAGTACTTAG-3

Loop1-M: 5-GACGTTAAAGTATAGAGGTATCCGCATCGACGGCATATGCCATAGCATT
TTTATCCACGATCACCCGTCGATGCCAGTACTTAA-3

[0026] [化3]

<従来の検出シグナル増幅ループ配列>

Loop2-W: 5-GACGTTAAAGTATAGAGGTATCCGCATCGACGGCATATGCCATAGCATT
TTTATCCACGATCACGAGCCTAGCGCAGTACTTAG-3

Loop2-M: 5-GACGTTAAAGTATAGAGGTATCCGCATCGACGGCATATGCCATAGCATT
TTTATCCACGATCACGAGCCTAGCGCAGTACTTAA-3

[0027] 3) プローブのライゲーション

プローブとサンプルDNAのアニーリングおよびライゲーションは、Xiaoquen Qi et. al (Nucleic Acid Research Vol. 29, e116)の方法により行った。

[0028] [表1]

<ligation mixture>

15 mM MgCl ₂
1.5 mM nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)
2U of Ampligase Thermostable DNA ligase (Epicentre Technologies)
0.6 μM 各プローブ

[0029] 5 μlのligation mixtureを2)で調整した各サンプル溶液10 μlに加え、94℃30秒、37℃5分のサイクルを15回繰り返した。

[0030] 4)プライマーの調整

増幅反応用プライマーとして下記配列のオリゴヌクレオチドを2)と同様の方法により合成した。

[0031] [化4]

PGAL1: 5-TACCTCTATACTTTAACGTC-3

pBADf: 5-ATGCCATAGCATTTTTATCC-3

[0032] 5)ローリングサークル増幅反応

下記の組成で増幅反応液を調整し、3)のライゲーション反応後の溶液を0.1 μlに加え、30℃で3時間増幅反応を行った。増幅反応はSTRATAGENE社、Mx3000Pにより検出した。

[0033] [表2]

<増幅試薬組成>

10xbuffer	2.5 μ l
100xBSA	0.25 μ l
DMSO	1.25 μ l
dNTPs (Final 1.4 uM)	1.4 μ l
T4Gene32 (アマシャム社)	0.5 μ l
Phi29Pol (NEB 社)	2.0 μ l
各 Primer (Final 0.4 uM)	2 μ l
H ₂ O	up to 25 μ L

[0034] Tem-Wの増幅結果を図3に、Tem-Mの結果を図4に示す。Loop1タイプ、Loop2タイプのどちらも、サンプル中の異なる一塩基を検出することができるが、Loop2と比較して、明らかにLoop1の方が増幅の効率がよく、検出時間を1時間短縮することができた。Loop1-W、Loop1-Mを用いた場合には、増幅産物が図11に示すようなステムループを形成するため、プライマーがアニーリングしやすいため、従来のプライマーと比較して増幅効率がよいものと考えられる。この結果から、本発明の方法は、一塩基が異なる配列を特異的に増幅することができるため、一塩基多型(SNP)の検出を行なう場合に効果的であることが示された。

請求の範囲

- [1] 遺伝子多型のタイピング方法であって、
- (1)一又は複数の一本鎖核酸からなる開環一本鎖核酸を準備するステップと、ここで、前記開環一本鎖核酸は、
- 互いに相補的な配列を持つためステムループ構造をとることができ、
- ステムループ構造を有する状態において、前記開環一本鎖核酸は一つ又は二つ以上のループ部分を有し、
- 前記ステムループ構造のステム部分以外の部位に前記一本鎖核酸の開環部が位置し、
- アレルの前記多型部位に相補的な配列を5'又は3'末端にもち、
- 前記開環部を含めた領域において前記多型部位を含む配列に相補的であり、
- (2)前記開環一本鎖核酸がステムループ構造を有する状態において、サンプルと前記開環一本鎖核酸をインキュベートするステップと、
- (3)前記ステムループ構造の一つ又は二つ以上のループ部分の一部に相補的な1種類又は2種類以上のプライマーを、前記インキュベート後のサンプルとさらにインキュベートするステップと
- を含む遺伝子多型のタイピング方法。
- [2] 前記(3)のインキュベートステップにおいて、ループ部分の一部に相補的な前記プライマーに加えて、さらにステムループ構造のループ部分の一部と同じ配列をもつ1種類又は2種類以上のプライマーとインキュベートすることを特徴とする請求項1に記載の方法。
- [3] 遺伝子多型が、SNP(一塩基多型)である請求項1に記載の方法。
- [4] アレルの前記多型部位における相補的な配列が3'末端に位置する請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- [5] 遺伝子多型をタイピングするための開環一本鎖核酸であって、
- 互いに相補的な配列を持つためステムループ構造をとることができ、
- ステムループ構造を有する状態において、前記開環一本鎖核酸は一つ又は二つ以上のループ部分を有し、

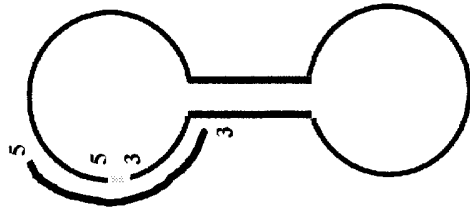
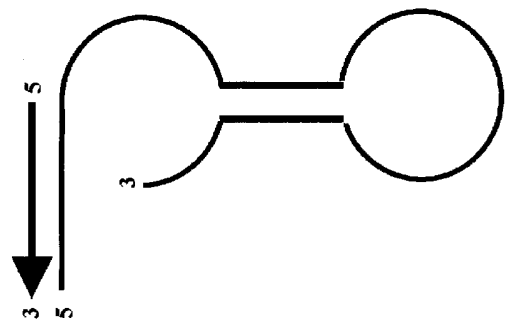
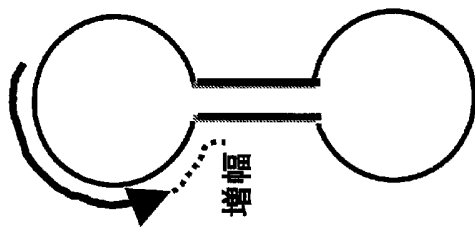
前記ステムループ構造のステム部分以外の部位に前記一本鎖核酸の開環部が位置し

アレルの前記多型部位に相補的な配列を5'又は3'末端にもち、

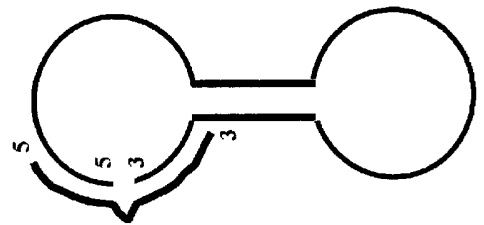
前記開環部を含めた領域において前記多型部位を含む配列に相補的であることを特徴とする開環一本鎖核酸。

- [6] SNP(一塩基多型)をタイピングするための請求項5に記載の開環一本鎖核酸。
- [7] アレルの前記多型部位における相補的な配列が、3'末端に位置する請求項5又は6に記載の開環一本鎖核酸。
- [8] 請求項5～7のいずれか1項に記載の開環一本鎖核酸と、前記ステムループ構造の一つ又は二つ以上のループ部分の一部に相補的な1種類又は2種類以上のプライマーと、DNAポリメラーゼとを含む、遺伝子多型をタイピングするためのキット。
- [9] ステムループ構造のループ部分の一部と同じ配列をもつ1種類又は2種類以上のプライマーをさらに含む請求項8に記載のキット。

[図1]

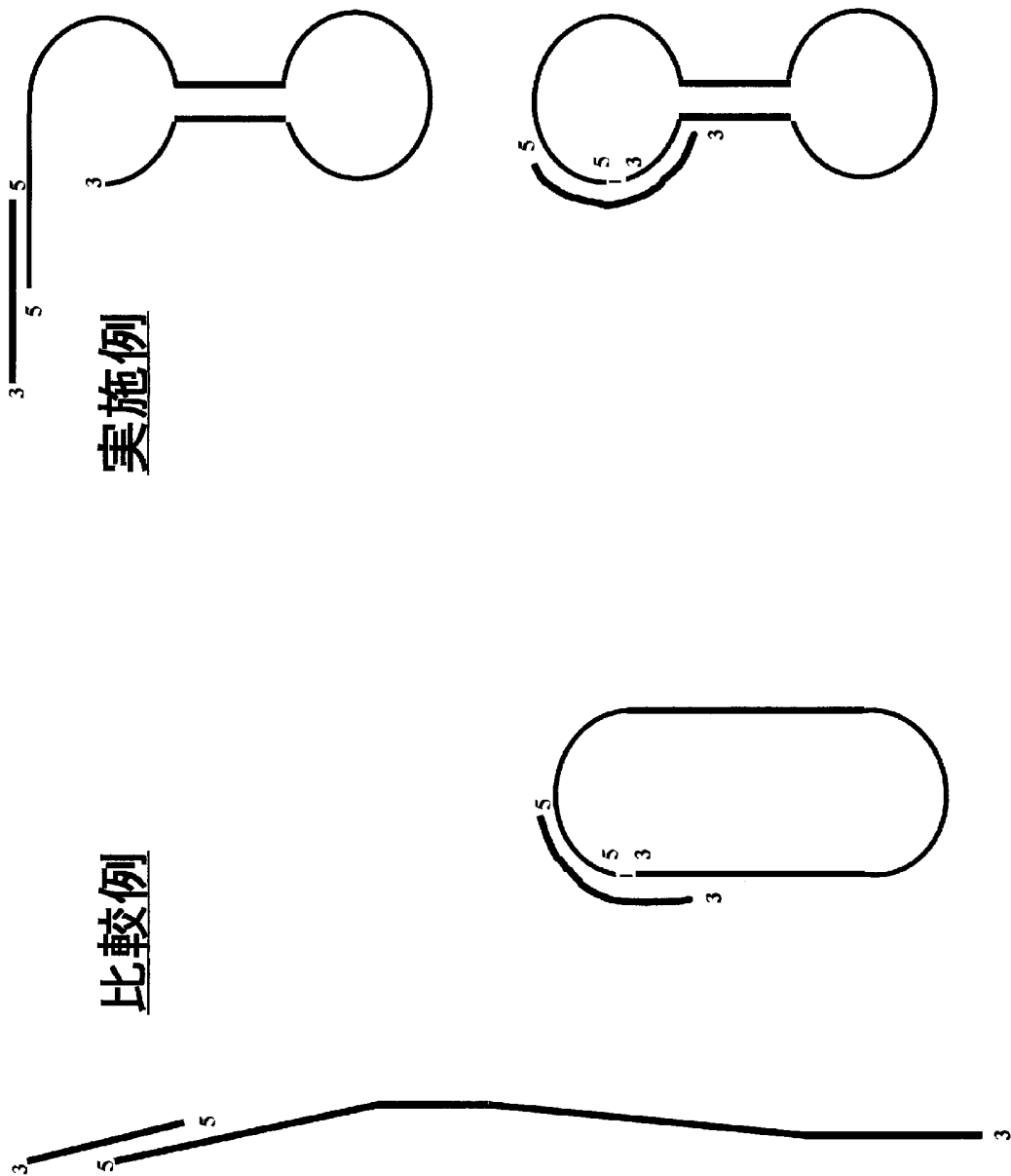


野生型

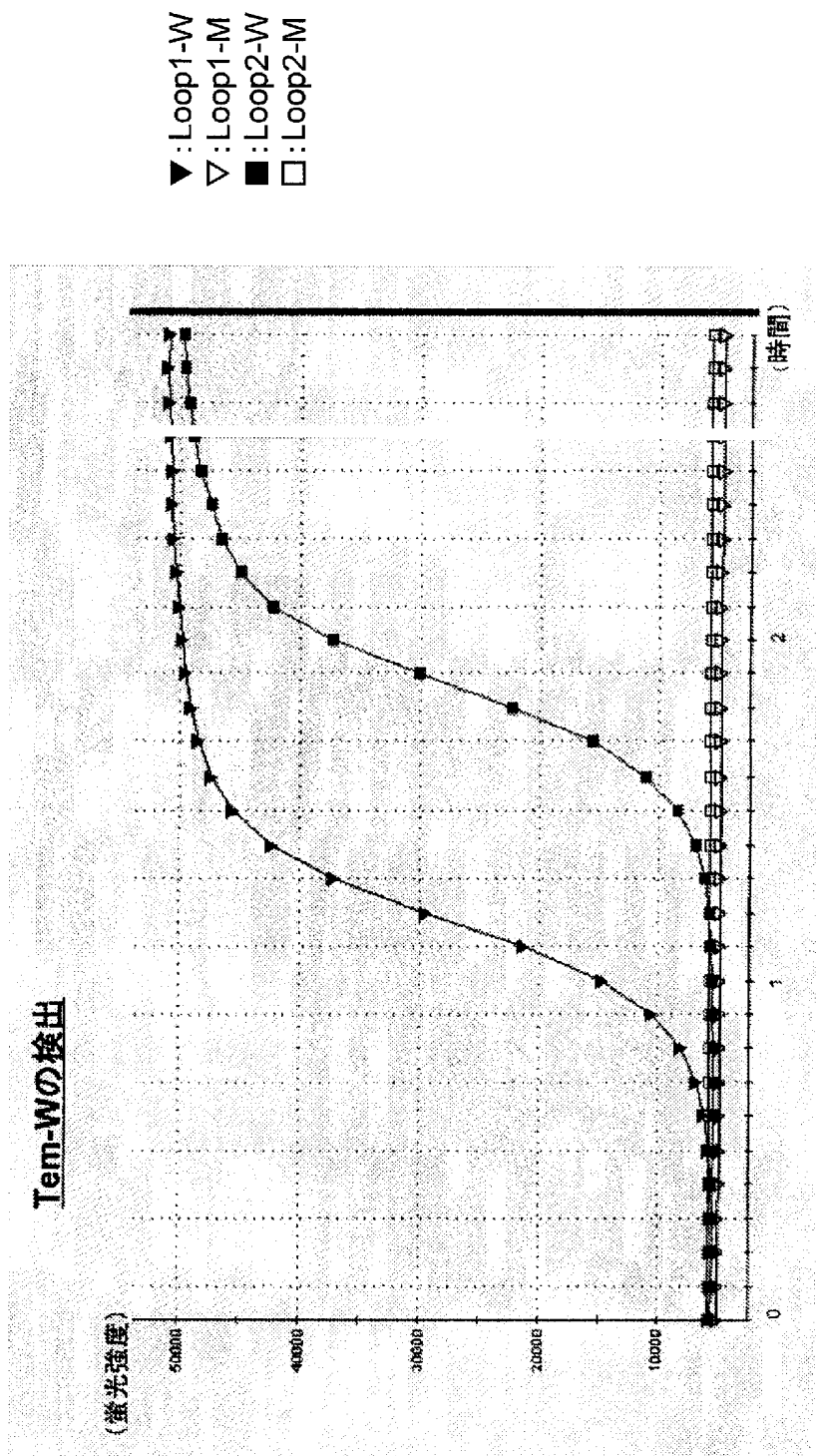


変異型

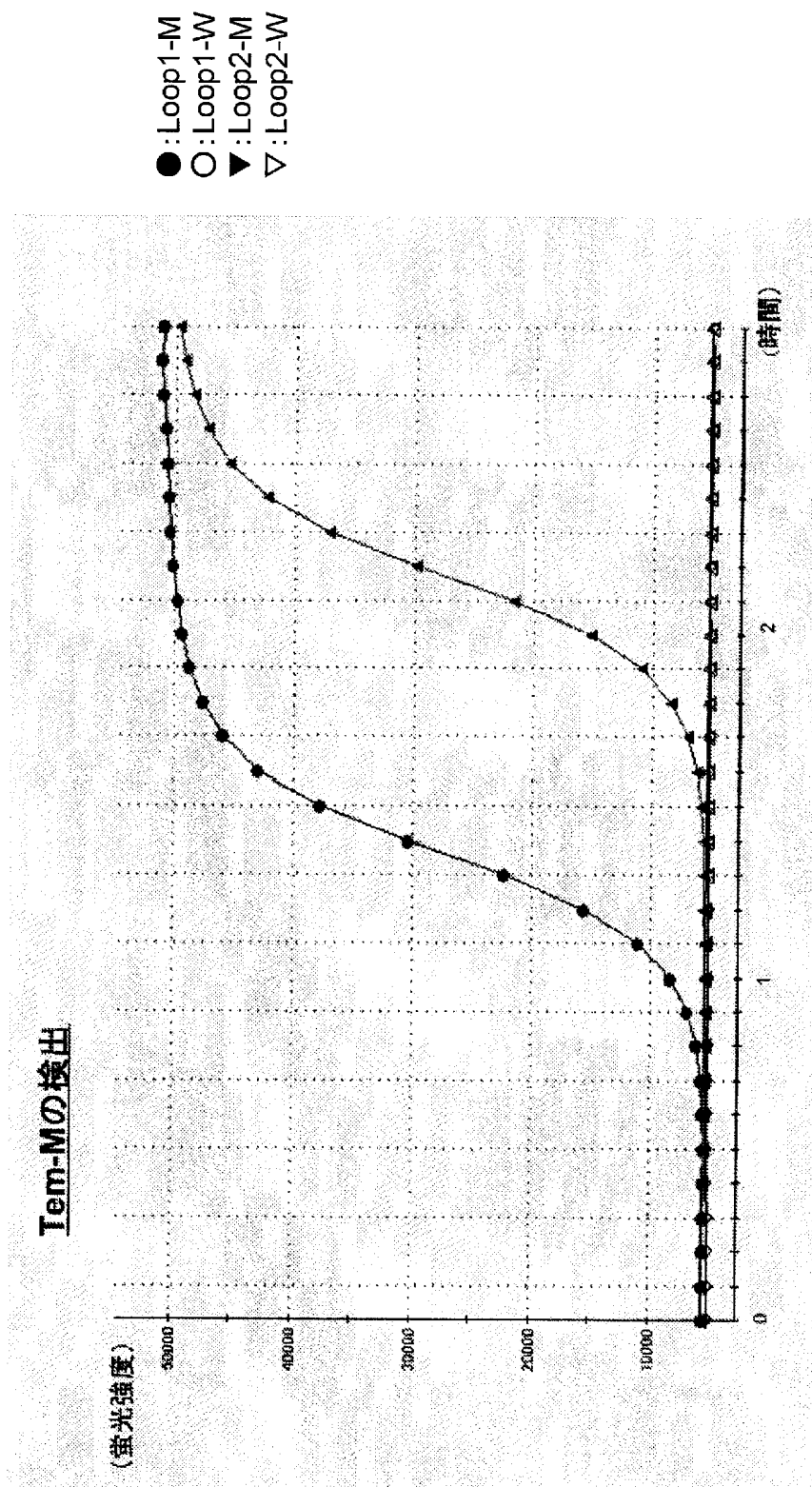
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/015131

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09 (2006.01), **C12Q1/68** (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09 (2006.01), **C12Q1/68** (2006.01)

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

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2001/71043 A1 (QUANTUM DOT CORP., US), 27 September, 2001 (27.09.01), & AU 200150937 A & US 2002/039732 A1 & US 2002/034747 A1 & US 6500622 B2 & US 2004/171039 A1	1-9
A	BROUDE, N.E., et al., DNA microarrays with stem-loop DNA probes: preparation and applications, Nucleic Acids Res, 2001, Vol.29, No.19, E92	1-9
A	BORDONI, R., et al., Investigation of the multiple anchors approach in oligonucleotide microarray preparation using linear and stem- loop structured probes, Nucleic Acids Res, 2002, Vol.30, No.8, E34	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 November, 2005 (14.11.05)

Date of mailing of the international search report

22 November, 2005 (22.11.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/015131

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANTHONY, R.M. et al., Effect of secondary structure on single nucleotide polymorphism detection with a porous microarray matrix; implications for probe selection, Biotechniques, 2003, Vol.34, No.5, pages 1082 to 1084, 1086, 1088 to 1089	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09 (2006.01), C12Q1/68 (2006.01)			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09 (2006.01), C12Q1/68 (2006.01)			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2001/71043 A1 (QUANTUM DOT CORP, US) 2001.09.27, & AU 200150937 A & US 2002/039732 A1 & US 2002/034747 A1 & US 6500622 B2 & US 2004/171039 A1		1-9
A	BROUDE, N.E., et al., DNA microarrays with stem-loop DNA probes: preparation and applications, Nucleic Acids Res, 2001, Vol.29, No.19, E92		1-9
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 14.11.2005		国際調査報告の発送日 22.11.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 飯室 里美 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 2936

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	BORDONI, R., et al., Investigation of the multiple anchors approach in oligonucleotide microarray preparation using linear and stem-loop structured probes, Nucleic Acids Res, 2002, Vol.30, No.8, E34	1-9
A	ANTHONY, R.M., et al., Effect of secondary structure on single nucleotide polymorphism detection with a porous microarray matrix; implications for probe selection, Biotechniques, 2003, Vol.34, No.5, p.1082-1084, 1086, 1088-1089	1-9