

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4454249号
(P4454249)

(45) 発行日 平成22年4月21日(2010.4.21)

(24) 登録日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G O 1 N 21/64 (2006.01)	G O 1 N 21/64	C
G O 1 N 21/78 (2006.01)	G O 1 N 21/64	F
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 21/78	C

請求項の数 9 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-114380 (P2003-114380)	(73) 特許権者	000141897
(22) 出願日	平成15年4月18日(2003.4.18)		アークレイ株式会社
(65) 公開番号	特開2004-313119 (P2004-313119A)		京都府京都市南区東九条西明田町57番地
(43) 公開日	平成16年11月11日(2004.11.11)	(74) 代理人	100100549
審査請求日	平成18年3月9日(2006.3.9)		弁理士 川口 嘉之
		(74) 代理人	100090516
			弁理士 松倉 秀実
		(74) 代理人	100089244
			弁理士 遠山 勉
		(72) 発明者	平井 光春
			京都府京都市南区東九条西明田町57 アークレイ株式会社内
		審査官	吉田 知美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 隣ラ氏島アミロイドタンパク質変異遺伝子の検出法ならびにそのための核酸プローブおよびキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号247で終わる13~30塩基長の配列に相補的な配列からなり、5'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブ。

【請求項2】

核酸プローブが、配列番号12または13からなる請求項1記載の核酸プローブ。

【請求項3】

一塩基多型の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて、
10
蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、隣ラ氏島アミロイドタンパク質をコードする核酸における、隣ラ氏島アミロイドタンパク質のアミノ酸配列の20位のセリンがグリシンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異であり、核酸プローブは、請求項1または2に記載の核酸プローブである前記方法。

【請求項4】

試料に含まれる核酸における一塩基多型の部位を含む領域を増幅して一塩基多型を有する核酸を得ることを含む請求項3記載の方法。

【請求項5】

増幅をDNAポリメラーゼを用いる方法により行う請求項4記載の方法。

【請求項6】

増幅を核酸プローブの存在下で行う請求項5記載の方法。

【請求項7】

末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号247で終わる13～30塩基長の配列に相補的な配列からなり、5'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブを含む、請求項3記載の方法のためのキット。

【請求項8】

核酸プローブが、配列番号12または13からなる請求項7記載のキット。

【請求項9】

膵ラ氏島アミロイドタンパク質をコードする核酸における、膵ラ氏島アミロイドタンパク質のアミノ酸配列の20位のセリンがグリシンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異を含む領域を、DNAポリメラーゼを用いる方法で増幅するためのプライマーをさらに含む請求項7または8記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、膵ラ氏島アミロイドタンパク質変異遺伝子の検出法ならびにそのための核酸プローブおよびキットに関する。

【0002】

【従来の技術】

膵ラ氏島アミロイドタンパク質(Islet Amyloid Polypeptide(IAPP))は2型糖尿病患者の膵ラ氏島に高頻度に沈着しているアミロイドの主要構成成分で、膵細胞からインスリンと共に血中に分泌されている。IAPPのアミノ酸配列の20位のセリンがグリシンに置換するミスセンス変異(S20G変異)は日本人2型糖尿病患者の約2.6%、その中でも若年発症者の約10%に存在しており、この変異が存在することで糖尿病の発症リスクが高まるといわれている。

【0003】

IAPPにS20G変異をもたらす塩基の変異(以下、「IAPP S20G変異」ともいう)が存在するとその部分に制限酵素の認識部位が出現するため、PCRで変異部分を含むように増幅を行い、制限酵素で切断し、その後電気泳動で切断されたかどうかを検出するという方法(PCR-RFLP)で検出を行うことが知られている(非特許文献1)。

【0004】

PCRは数分子の鋳型から数10億倍もの分子を増幅するため、増幅産物がほんの少し混入した場合でも偽陽性、偽陰性の原因になり得る。PCR-RFLPはPCR反応後に増幅産物を取り出して制限酵素処理を行うという必要があるため、増幅産物が次の反応系に混入する恐れがある。よって、偽陽性、偽陰性の結果が得られてしまうことがある。さらに、PCR終了後、制限酵素で処理を行い、その後電気泳動を行うため、検出に必要な時間も非常に長くなってしまふ。また、操作が複雑なため、自動化が困難である。

【0005】

一方、一般に、変異を含む領域をPCRで増幅した後、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を解析する方法が知られている(非特許文献2、特許文献1)。

【0006】

【非特許文献1】

日本糖尿病学会編、「糖尿病遺伝子診断ガイド」、文光堂、p.56-59

【非特許文献2】

クリニカルケミストリー(Clinical Chemistry)、2000年、第46巻、第5号、p.631-635

【特許文献1】

10

20

30

40

50

特開 2002 - 119291 号公報

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、IAPP S20G変異を検出するのに有効な消光プローブを特定し、IAPP S20G変異を検出する方法及びそのためのキットを提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

上述のプローブを用いる方法に関する文献においては、プローブの設計に関し、末端部が蛍光色素により標識された消光プローブが標的核酸にハイブリダイゼーションしたとき、末端部分においてプローブ - 核酸ハイブリッドの複数塩基対が少なくとも一つのGとCのペアを形成するように設計するという教示があるのみである。本発明者らは、IAPP S20G変異に関し、上記条件を満たす消光プローブを設計し、検出を試みたが、容易に検出を可能とする消光プローブは得られなかった。

10

【0009】

本発明者らは、IAPP S20G変異を含む特定の領域に基づいて消光プローブを設計することにより、消光プローブを用いる融解曲線分析によりIAPP S20G変異を検出できることを見出し、本発明を完成した。

本発明は、以下のものを提供する。

【0010】

(1) 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号247で終わる13~30塩基長の配列に相補的な配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブ。

20

【0011】

(2) 核酸プローブが、配列番号12または13を有する(1)の核酸プローブ。

【0012】

(3) 一塩基多型の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、腓ラ氏島アミロイドタンパク質をコードする核酸における、腓ラ氏島アミロイドタンパク質のアミノ酸配列の20位のセリンがグリシンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異であり、核酸プローブは、(1)または(2)の核酸プローブである前記方法。

30

【0013】

(4) 試料に含まれる核酸における一塩基多型の部位を含む領域を増幅して一塩基多型を有する核酸を得ることを含む(3)の方法。

【0014】

(5) 増幅をDNAポリメラーゼを用いる方法により行う(4)の方法。

【0015】

(6) 増幅を核酸プローブの存在下で行う(5)の方法。

【0016】

(7) 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号247で終わる13~30塩基長の配列に相補的な配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブを含む、(3)の方法のためのキット。

40

【0017】

(8) 核酸プローブが、配列番号12または13を有する(6)のキット。

【0018】

(9) 腓ラ氏島アミロイドタンパク質をコードする核酸における、腓ラ氏島アミロイドタンパク質のアミノ酸配列の20位のセリンがグリシンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異を含む領域を、DNAポリメラーゼを用いる方法で増幅するためのプライマーをさらに

50

含む(7)または(8)のキット。

【0019】

【発明の実施の形態】

<1>本発明プローブ及び本発明検出方法

本発明プローブは、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号247で終わる13~30塩基長の配列に相補的な配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識されていることを特徴とする。

【0020】

本発明プローブは、配列番号1に示す塩基配列(IAPP S20G変異における変異型の塩基を有する配列)において塩基番号247で終わる13~30塩基長の配列に相補的な配列を有する他は、特許文献1に記載された消光プローブと同様でよい。本発明に使用される消光プローブの塩基配列の例としては、配列番号12及び13が挙げられる。蛍光色素としては、特許文献1に記載されたものが使用できるが、具体例としては、FAM(商標)、TAMRA(商標)、BODIPY(商標) FL等が挙げられる。蛍光色素のオリゴヌクレオチドへの結合方法は、通常の方法、例えば特許文献1に記載の方法に従って行うことができる。

10

【0021】

本発明検出方法は、一塩基多型の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、膝ラ氏島アミロイドタンパク質をコードする核酸における、膝ラ氏島アミロイドタンパク質のアミノ酸配列の20位のセリンがグリシンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異であり、核酸プローブは本発明プローブであることを特徴とする。

20

【0022】

本発明検出方法は、IAPPをコードするDNAのIAPP S20G変異を含む領域を増幅すること、及び、本発明プローブを用いることの他は、通常核酸増幅及び融解曲線分析(Tm解析)の方法に従って行うことができる。

【0023】

核酸増幅の方法としては、ポリメラーゼを用いる方法が好ましく、その例としては、PCR、ICAN、LAMP等が挙げられる。ポリメラーゼを用いる方法により増幅する場合は、本発明プローブの存在下で増幅を行うことが好ましい。用いるプローブに応じて、増幅の反応条件等を調整することは当業者であれば容易である。これにより、核酸の増幅後にプローブのTmを解析するだけなので、反応終了後増幅産物を取り扱う必要がない。よって、増幅産物による汚染の心配がない。また、増幅に必要な機器と同じ機器で検出することが可能なので、容器を移動する必要すらない。よって、自動化も容易である。

30

【0024】

以下、PCRを用いる場合を例として、さらに説明する。PCRに用いるプライマー対は、本発明プローブがハイブリダイゼーションできる領域が増幅されるようにする他は、通常PCRにおけるプライマー対の設定方法と同様にして設定することができる。プライマーの長さ及びTmは、通常には、10mer~40merで40~70、好ましくは15mer~25merで55~60である。プライマー対の各プライマーの長さは同一でなくてもよいが、両プライマーのTmはほぼ同一(通常には、相違が2以内)であることが好ましい。なお、Tm値は最近接塩基対(Nearest Neighbor)法により算出した値である。プライマー対の例としては、配列番号2及び3に示す塩基配列を有するプライマーからなるものが挙げられる。

40

【0025】

PCRは、本発明で使用される本発明プローブの存在下で行うことが好ましい。これにより、増幅反応終了後に増幅産物を取り扱う操作を行うことなくTm解析を行うことができる。用いるプローブに応じて、プライマーのTmやPCRの反応条件を調整することは当業者であれば容易である。

【0026】

50

代表的なPCR反応液の組成を挙げれば、以下の通りである。

【0027】

【表1】

DNA断片	$10^1 \sim 10^8$ 分子 / 反応	
プライマー	200 ~ 1000 M	
プローブ	100 ~ 1000 n M	
ヌクレオチド	各20 ~ 200 μ M	
DNAポリメラーゼ	0.01 ~ 0.03単位 / μ l	
Tris-HCl (pH 8.4 ~ 9.0)	5 ~ 20 m M	
MgCl ₂	1.5 ~ 3 m M	10
KCl	10 ~ 100 m M	
グリセロール	0 ~ 20 %	

(最終液量 : 10 ~ 100 μ l)

【0028】

また、代表的な温度サイクルを挙げれば、以下の通りであり、この温度サイクルを通常25 ~ 40回繰り返す。

- (1) 変性、90 ~ 98 °C、1 ~ 60秒
- (2) アニール、60 ~ 70 °C、10 ~ 60秒
- (3) 伸長、60 ~ 75 °C、10 ~ 180秒

【0029】

アニール及び伸長を一ステップで行う場合には、60 ~ 70 °C、10 ~ 180秒の条件が挙げられる。

【0030】

T_m解析は、本発明プローブの蛍光色素の蛍光を測定する他は通常の方法に従って行うことができる。蛍光の測定は、蛍光色素に応じた波長の励起光を用い発光波長の光を測定することに行うことができる。T_m解析における昇温速度は、通常には、0.1 ~ 1 °C / 秒である。T_m解析を行うときの反応液の組成は、プローブとその塩基配列に相補的な配列を有する核酸とのハイブリダイゼーションが可能であれば特に制限されないが、通常には、一価の陽イオン濃度が1.5 ~ 5 mM、pHが7 ~ 9である。PCR等のDNAポリメラーゼを用いる増幅方法の反応液は、通常、この条件を満たすので、増幅後の反応液をそのままT_m解析に用いることができる。

【0031】

T_m解析の結果に基づくIAPP S20G変異の検出は通常の方法に従って行うことができる。本発明における検出とは、変異の有無の検出の他、変異型DNAの定量、野生型DNAと変異型DNAの割合の測定も包含する。

【0032】

< 2 > 本発明キット

本発明キットは、本発明の検出方法に用いるためのキットである。このキットは、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブ（消光プローブ）であって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号247で終わる13 ~ 30塩基長の配列に相補的な配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブを含むことを特徴とする。

【0033】

消光プローブについては、本発明プローブに関し、上記に説明した通りである。

【0034】

本発明検出キットは、消光プローブの他に、本発明の検出方法における核酸増幅を行うのに必要とされる試薬類、特にDNAポリメラーゼを用いる増幅のためのプライマーをさらに含んでいてもよい。

【0035】

本発明検出キットにおいて消光プローブ、プライマー及びその他の試薬類は、別個に収容

10

20

30

40

50

されていてもよいし、それらの一部が混合物とされていてもよい。

【0036】

【実施例】

以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

【0037】

【実施例1】

ヒト IAPP 遺伝子の S20G 変異を含む塩基配列 (配列番号 1) に基づき、S20G 変異を含む部分を増幅できるように表 2 に示すプライマーを設計した。表 2 中、位置は、配列番号 1 に示す塩基配列における塩基番号を示す。

【0038】

【表 2】

プライマー

名称	配列 (5' 3')	mer	位置	配列番号
F	cacatgtgcaacgcagcg	18	192-209	2
R	ctcttgccatatgtattggatccc	24	296-273	3

【0039】

次に、表 3 に示す、末端部に C を有するプローブを設計した。表 3 中、位置は、配列番号 1 に示す塩基配列における塩基番号を示す。また、塩基配列中の大文字は、IAPP S20G 変異の部位を示し、3' 末端の (P) は、リン酸化されていることを示す。BODIPY (商標) FL 及び TAMRA (商標) による標識は、常法に従って行った。

【0040】

【表 3】

プローブ

名称	配列 (5' 3')	mer	位置	配列番号
5FL-mt-5-14 (BODIPY FL)	-cattccGgcaacaa-(P)	14	229-242	4
5FL-mt-5-15 (BODIPY FL)	-cattccGgcaacaac-(P)	15	229-243	5
5FL-wt-5-22 (BODIPY FL)	-cattccAgcaacaactttggtg-(P)	22	229-250	6
5FL-mt-5-22 (BODIPY FL)	-cattccGgcaacaactttggtg-(P)	22	229-250	7
3FL-wt-4-25	caccaaagtgtgtgcTggaatgaac-(BODIPY FL)	25	250-226	8
3FL-mt-3-22	gaatggcaccaaagtgtgtgcC-(BODIPY FL)	22	256-235	9
5FL-wt-2-24 (BODIPY FL)	-cTggaatgaactaaaaatttgcc-(P)	24	236-213	10
5FL-mt-2-24 (BODIPY FL)	-cCggaatgaactaaaaatttgcc-(P)	24	236-213	11
5FL-mt-1-21 (BODIPY FL)	-caaagtgtgtgcCggaatgaa-(P)	21	247-227	12
5T-mt-1-21 (6-TAMRA)	-caaagtgtgtgcCggaatgaa-(P)	21	247-227	12
5FL-mt-1-18 (BODIPY FL)	-caaagtgtgtgcCggaat-(P)	18	247-230	13
5T-mt-1-18 (6-TAMRA)	-caaagtgtgtgcCggaat-(P)	18	247-230	13
5FL-wt-1-18 (BODIPY FL)	-caaagtgtgtgcTggaat-(P)	18	247-230	14

【0041】

IAPP S20G 周辺領域約 600bp (配列番号 1) を組み込んだプラスミドをサンプルとして、Smart Cycler System (Cepheid) を使い、以下の条件で PCR 及び Tm 解析を行った。Tm 解析における励起波長及び検出波長は、それぞれ 450 ~ 495nm 及び 505 ~ 537 nm (BODIPY FL)、527 ~ 555 nm 及び 565 ~ 605 nm (TAMRA) であった。

【0042】

【表 4】

反応液組成

H ₂ O	15.95 µL
10 × Gene Taq バッファー	2.5 µL
40% グリセロール	3.125 µL
各 10mM dATP, dUTP, dGTP, dCTP	0.5 µL
2U/ µL ウラシル-N-グリコシラーゼ	0.05 µL

10

20

30

40

50

5 μ M プローブ	1 μ L
100mM MgCl ₂	0.375 μ L
100 μ M プライマーF	0.25 μ L
100 μ M プライマーR	0.125 μ L
5U/ μ L Gene Taq	0.125 μ L
サンプル (0~2000コピー)	1 μ L
合計	25 μ L

【 0 0 4 3 】

【 表 5 】

反応条件

50°C, 2min

↓

95°C, 2min

↓

95°C, 1sec

66°C, 18sec (50cycles)

↓

T_m解析 (1°C/sec)

【 0 0 4 4 】

各プローブを用いてPCR及びT_m解析を行った結果、プローブ5FL-mt-1-18、5T-mt-1-18、5FL-mt-1-21および5T-mt-1-21を用いたときのみ、T_m解析で解析の可能な蛍光強度の変化が認められた。なお、各プローブのIAPP S20G変異を含む塩基配列に対する配置を図1及び2に示す。図中、Wild配列(配列番号15)及びmutant配列(配列番号16)は、配列番号1の塩基配列の塩基番号213~262に相当する。また、図中、Fは蛍光色素を示す。図1及び2に示す配置からみて、プローブがT_m解析で使用できるかどうかは、蛍光色素を結合させたCの位置に依存すると考えられ、プローブの長さは、多型部位を含む限り、あまり重要でないと考えられる。

【 0 0 4 5 】

以下、プローブ5FL-mt-1-21を用いて、ゲノムDNAの絶対量に関する感度、再現性、及び、変異型の割合に関する検出感度を検討した。

【 0 0 4 6 】

上記プラスミドの代わりに、ゲノムDNA(野生型)をそれぞれ、0、20、200及び2000コピーを含むサンプルを用いて、上記の方法を繰り返した。結果を図3に示す。図3から明らかのように、20コピーであっても検出可能であることが示された。

【 0 0 4 7 】

次に、野生型の塩基配列(配列番号1の塩基配列において塩基番号285がAである他は上記プラスミドと同じ)を有するプラスミドを調製した。野生型プラスミドとこの変異型プラスミドとを混合したサンプル(wt/mt)を10個調製し、野生型プラスミドのみのサンプル(wt/wt)及び変異型プラスミドのみのサンプル(mt/mt)とともに、上記の方法を繰り返した。結果を図4に示す。図4から明らかのように、本方法は再現性に優れることが示された。

【 0 0 4 8 】

さらに、野生型プラスミドと変異型プラスミドとの比率を変えて、上記の方法を繰り返した。結果を図5に示す。比率に応じて、両ピークの高さが変化し、両ピークの高さの比に基づいて、比率を求めることが可能なことが示された。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 9 】

なお、図3～5において縦軸は、蛍光強度の一次導関数の逆符号の値 ($-dF/dt$)、横軸は温度 () である。

【 0 0 5 0 】

【発明の効果】

本発明によれば、IAPP S20G変異を検出するのに有効な消光プローブが提供され、さらに、それを用いるIAPP S20G変異を検出する方法及びそのためのキットが提供される。T_m解析は数十秒で完了するため、検出に必要な時間も大幅に短略化出来る。プローブの存在下での核酸の増幅とT_m解析を組み合わせる本発明の好ましい態様によれば、核酸の増幅後にプローブのT_mを解析するだけなので、反応終了後増幅産物を取り扱う必要がない。よって、増幅産物による汚染の心配がない。また、増幅に必要な機器と同じ機器で検出することが可能なので、容器を移動する必要すらない。よって、自動化も容易である。

10

【 0 0 5 1 】

【配列表】

〈110〉 アークレイ株式会社(Arkray, Inc.)

〈120〉 豚ラ氏島アミロイドタンパク質変異遺伝子の検出法ならびにそのための
核酸プローブおよびキット

〈130〉 P-B0925

10

〈160〉 16

〈210〉 1

〈211〉 600

〈212〉 DNA

〈213〉 Homo sapiens

20

〈220〉

〈221〉 allele

〈222〉 235

〈400〉 1

aatctcagcc atctagggtg ttgcaaacca aaacactgag ttacttatgt gaaaattggt	60	
tctttggitt tcatcaatac aagatatttg atgtcacatg gctggatcca gctaaaatic	120	30
taaggcteta acttttcaca ttgttccat gttaccagtc atcaggtgga aaagcggaaa	180	
tgcaacactg ccacatgtgc aacgcagcgc ctggcaaatt ttttagtica ttccggcaac	240	
aactttggig ccattctctc atctaccaac gtgggatcca atacgtatgg caagaggaat	300	
gcagtagagg ttttaaagag agagccactg aattacttgc cccittagag gacaatgtaa	360	
ctctatagtt attgttttat gttctagtga ttccctgtat aatttaacag tgcccttttc	420	
atctccagtg tgaatataat gtcigigigi ctgatgttg ttgctaggac atataccctc	480	
tcaaaagatt gttttatatg tagtactaac taaggtecca taataaaaag atagtatctt	540	40
ttaaaatgaa atgtttttgc tatagatttg tattttaaaa cataagaacg tcattttggg	600	

⟨210⟩ 2		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		10
⟨223⟩ primer		
⟨400⟩ 2		
cacatgtgca acgcagcg	18	
⟨210⟩ 3		
⟨211⟩ 24		20
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ primer		
⟨400⟩ 3		30
ctcttgccat atgtattgga tccc	24	
⟨210⟩ 4		
⟨211⟩ 14		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		40
⟨220⟩		

<223> probe

<400> 4

cattccggca acaa

14

<210> 5

<211> 15

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 5

20

cattccggca acaac

15

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> probe

<400> 6

cattccagca acaactttgg tg

22

<210> 7

40

<211> 22

⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ probe		
⟨400⟩ 7		10
cattccggca acaactttgg tg	22	
⟨210⟩ 8		
⟨211⟩ 25		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		20
⟨220⟩		
⟨223⟩ probe		
⟨400⟩ 8		
caccaaagtt gtgctggaa tgaac	25	
⟨210⟩ 9		30
⟨211⟩ 22		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ probe		40
⟨400⟩ 9		

gaatggcacc aaagtgttg cc	22	
⟨210⟩ 10		
⟨211⟩ 24		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		10
⟨220⟩		
⟨223⟩ probe		
⟨400⟩ 10		
ctggaatgaa ctaaaaaatt tgcc	24	
⟨210⟩ 11		20
⟨211⟩ 24		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ probe		30
⟨400⟩ 11		
ccggaatgaa ctaaaaaatt tgcc	24	
⟨210⟩ 12		
⟨211⟩ 18		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		40

<220>

<223> probe

<400> 12

caaagttggt gccggaat

18

<210> 13

10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

20

<400> 13

caaagttggt gccggaatga a

21

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> probe

<400> 14

caaagttggt gctggaat

18

40

<210> 15

<211> 50
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 ggcaaatttt ttagttcatt ccagcaacaa ctttgggtgcc attctctcat 50

10

<210> 16
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

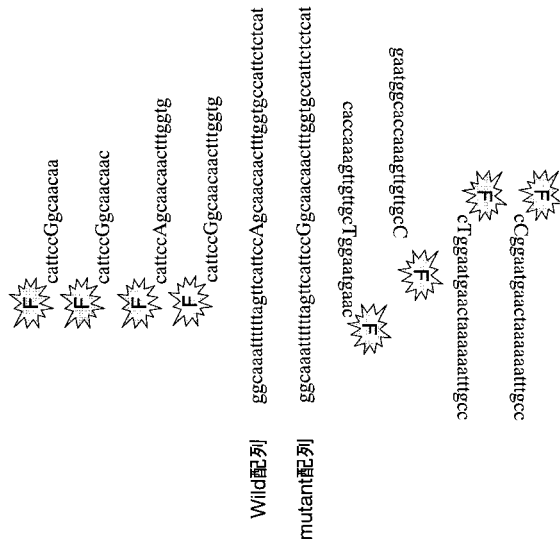
<400> 16
 ggcaaatttt ttagttcatt ccggcaacaa ctttgggtgcc attctctcat 50

20

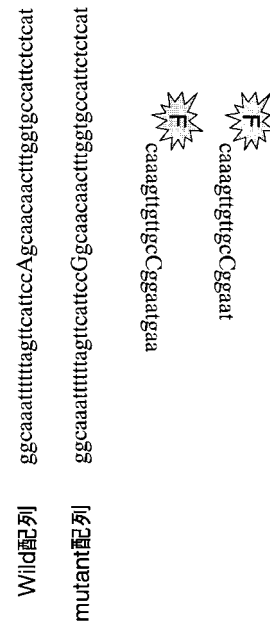
【図面の簡単な説明】

- 【図 1】 変異の識別不可能な消光プローブの位置を示す。
- 【図 2】 変異の識別可能な消光プローブの位置を示す。
- 【図 3】 実施例 1 の方法のゲノムDNAの絶対量に関する感度を示す。
- 【図 4】 実施例 1 の方法の再現性を示す。
- 【図 5】 実施例 1 の方法の変異型の割合に関する検出感度、定量性を示す。

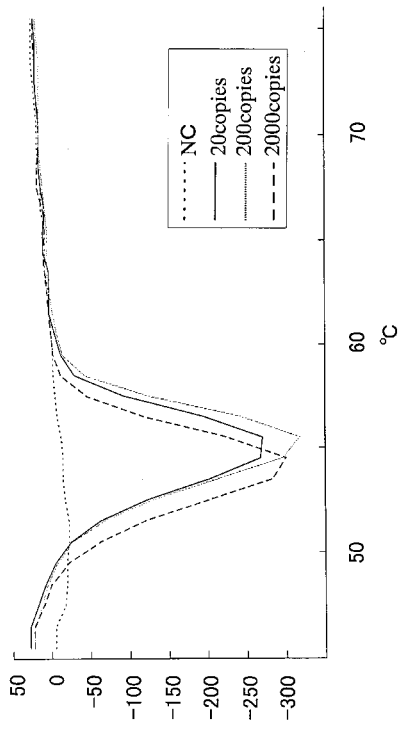
【 図 1 】



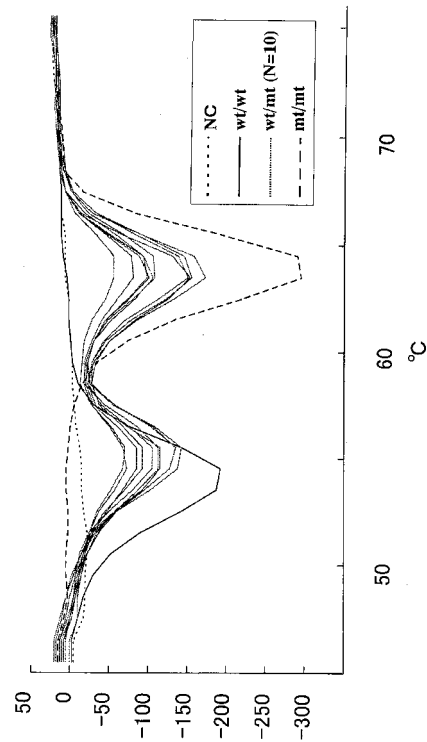
【 図 2 】



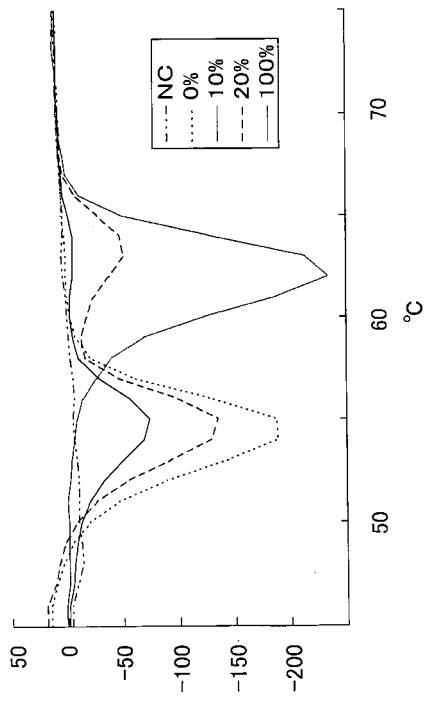
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/53 M

(56)参考文献 国際公開第02/072875(WO,A1)
特開2001-286300(JP,A)
特開2002-119291(JP,A)
国際公開第02/014555(WO,A1)
特表2000-509608(JP,A)
Clin. Chem., 2000年, Vol.46, No.5, p.631-635
Amyloid, 2001年, Vol.8, No.4, p.242-249
Nucleic Acids Res., 2002年, Vol.30, No.9, p.2089-2095
Nat. Biotechnol., 1999年, Vol.17, p.87-88

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68
C12N 15/11
G01N 21/64
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)