

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5096007号
(P5096007)

(45) 発行日 平成24年12月12日 (2012.12.12)

(24) 登録日 平成24年9月28日 (2012.9.28)

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

請求項の数 5 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2007-20722 (P2007-20722)	(73) 特許権者	000156581
(22) 出願日	平成19年1月31日 (2007.1.31)		日鉄環境エンジニアリング株式会社
(65) 公開番号	特開2008-182974 (P2008-182974A)		東京都千代田区東神田一丁目9番8号
(43) 公開日	平成20年8月14日 (2008.8.14)	(74) 代理人	100098707
審査請求日	平成22年1月14日 (2010.1.14)		弁理士 近藤 利英子
		(74) 代理人	100135987
			弁理士 菅野 重慶
		(74) 代理人	100161377
			弁理士 岡田 薫
		(74) 代理人	100169812
			弁理士 阿部 寛志
		(74) 代理人	100146042
			弁理士 梶原 克哲

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸プローブセットを用いるリアルタイムPCR方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

グアニンと相互作用したときに蛍光強度が減衰する蛍光消光物質(d)で標識されたヌクレオチド(a)を含むオリゴヌクレオチドからなる1個または2個の蛍光プローブ(A)と、該蛍光プローブ(A)がハイブリダイズする1個または2個の蛍光プローブ結合領域(b1)と、標的核酸(C)とハイブリダイズする標的核酸結合領域(b2)とを有するオリゴヌクレオチドからなるバインディングプローブ(B)とからなり、上記蛍光プローブ(A)が、上記蛍光プローブ結合領域(b1)にハイブリダイズし、かつ上記標的核酸(C)が上記標的核酸結合領域(b2)にハイブリダイズしたときに、上記標的核酸(C)を含む核酸中のグアニンと、上記ヌクレオチド(a)に標識された蛍光消光物質(d)とが相互作用して該蛍光消光物質(d)の蛍光強度が減衰するように、上記蛍光プローブ(A)と上記バインディングプローブ(B)が設計されている核酸プローブセットを用いることを特徴とするリアルタイムPCR方法。

【請求項2】

前記蛍光消光物質(d)が、テトラブプロモスルホンフルオレセイン(TBSF)、2-オキソ-6,8-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-3-カルボン酸(Pacific Blue(商標))、ローダミン6G、カルボキシローダミン6G、カルボキシテトラメチルローダミンおよび4,4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸(BODIPY(商標))-FLからなる群から選択されるいずれかである請求項1に記載のリアルタイムPCR方法。

【請求項 3】

前記 1 個または 2 個の蛍光プローブ (A) が、5' 末端ヌクレオチドまたは 3' 末端ヌクレオチドを蛍光消光物質 (d) で標識したオリゴヌクレオチドである請求項 1 に記載のリアルタイム PCR 方法。

【請求項 4】

前記 1 個または 2 個の蛍光プローブ (A) が、5 ~ 50 塩基長である請求項 3 に記載のリアルタイム PCR 方法。

【請求項 5】

前記標的核酸結合領域 (b2) が 5 ~ 60 塩基長である請求項 1 に記載のリアルタイム PCR 方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子工学の分野に関し、より詳しくは核酸の分析のために用いる核酸プローブセットおよびその使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

標的核酸の検出方法においては、標的核酸と特異的にハイブリダイズする一本鎖核酸プローブが広く用いられている。一本鎖核酸プローブを用いる標的核酸の検出方法の一つに、当該核酸プローブを蛍光物質で標識し、この核酸プローブが標的核酸に結合したときに、標的核酸中のグアニンの作用で蛍光が消光し、標的核酸から解離するといった消光した蛍光が発光する現象を利用する Q-プローブ法 (Quenching Probe) がある。Q-プローブ法は、プローブの構造がシンプルであること、プローブ設計にトライ・アンド・エラーが不要であることおよび精度の高い結果が得られるという優れた利点がある (例えば、特許文献 1 および特許文献 2 を参照のこと)。

20

【0003】

【特許文献 1】特許第 3437816 号公報

【特許文献 2】特開 2002-119291 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0004】

しかし、このような従来的一本鎖核酸プローブは、対象とする標的核酸ごとに、異なる塩基配列をもつ蛍光標識核酸プローブを用意しなければならない。このような蛍光標識した核酸プローブは、比較的高価であり、また、その合成に長時間を要するという問題点があるため、それをを用いた実験もコストがかかり、準備に時間を要するという問題点がある。

【0005】

従って、本発明の目的は、上述した従来技術の問題点を解決し、短時間で、安価に調製できる核酸プローブおよびその使用方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

40

【0006】

上記目的は、以下の本発明によって達成される。すなわち、本発明は、グアニンと相互作用したときに蛍光強度が減衰する蛍光消光物質 (d) で標識されたヌクレオチド (a) を含むオリゴヌクレオチドからなる 1 個または 2 個の蛍光プローブ (A) と、該蛍光プローブ (A) がハイブリダイズする 1 個または 2 個の蛍光プローブ結合領域 (b1) と、標的核酸 (C) とハイブリダイズする標的核酸結合領域 (b2) とを有するオリゴヌクレオチドからなるバインディングプローブ (B) とからなり、上記蛍光プローブ (A) が、上記蛍光プローブ結合領域 (b1) にハイブリダイズし、かつ上記標的核酸 (C) が上記標的核酸結合領域 (b2) にハイブリダイズしたときに、上記標的核酸 (C) を含む核酸中のグアニンと、上記ヌクレオチド (a) に標識された蛍光消光物質 (d) とが相互作用し

50

て該蛍光消光物質 (d) の蛍光強度が減衰するように、上記蛍光プローブ (A) と上記バインディングプローブ (B) が設計されている核酸プローブセットを用いることを特徴とするリアルタイムPCR方法である。

【 0 0 0 7 】

上記本発明の核酸プローブセットにおいては、前記蛍光消光物質 (d) が、テトラプロモスルホンフルオレセイン (TBSF)、2-オキソ-6,8-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-3-カルボン酸 (Pacific Blue (商標))、ローダミン 6 G、カルボキシローダミン 6 G、カルボキシテトラメチルローダミンおよび4,4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸 (BODIPY (商標) -FL) からなる群から選10
択されるいずれかであること；前記 1 個または 2 個の蛍光プローブ (A) が、5' 末端ヌクレオチドまたは 3' 末端ヌクレオチドを蛍光消光物質 (d) で標識したオリゴヌクレオチドであること；前記 1 個または 2 個の蛍光プローブ (A) が、5 ~ 50 塩基長であること；前記標的核酸結合領域 (b 2) が 5 ~ 60 塩基長であることが好ましい。

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

従来、核酸の種々の分析方法に使用される核酸プローブは、高価な蛍光物質で標識したものを分析対象の標的核酸ごとに調製する必要があったが、本発明によれば、高価な蛍光物質で標識した核酸プローブを標的核酸ごとに調製せず10にすむため、従来の核酸プローブに比べ、安価にかつ短時間で核酸プローブを提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 3 】

次に、本発明を実施するための最良の形態を、図面を参照しながら説明する。なお、本発明において、上記蛍光プローブ (A) と上記バインディングプローブ (B) とがハイブリダイズした複合体を「核酸プローブセット複合体」と呼ぶことがある。20

【 0 0 1 4 】

また、本発明において「ヌクレオチド」というときは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのモノマーを意味し、「オリゴヌクレオチド」というときは、ヌクレオチドから構成されるオリゴマーのことをいい、このオリゴマーは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのみから構成されていてもよいし、両者を含むものであ30
ってもよい。

【 0 0 1 5 】

本発明でいう「標的核酸」とは、本発明の核酸プローブセットを構成するバインディングプローブ (B) の標的核酸結合領域 (b 2) と特異的にハイブリダイズする塩基配列の領域を意味し、種々の核酸または遺伝子の一部である場合も含むものとする。また、標的核酸は、その種類はいかなるものでもよく、DNA、RNA、LNA、PNAおよび人工的に修飾された核酸などを挙げることができる。

【 0 0 1 6 】

本発明の核酸プローブセットの一例を図 1、図 2 および図 8 に示す。これらの図中、(A) は蛍光プローブ、(B) はバインディングプローブであり、本発明の核酸プローブセットは、上記蛍光プローブ (A) とバインディングプローブ (B) とからなる。(C) は標的核酸の一例である。40

【 0 0 1 7 】

図 1 は、蛍光プローブ (A) と蛍光プローブ結合領域 (b 1) と標的核酸結合領域 (b 2) とがそれぞれ 1 個であり、かつ標的核酸 (C) とハイブリダイズする前の本発明の核酸プローブセット複合体を示す模式図である。図 2 は、図 1 に示す標的核酸 (C) と本発明の核酸プローブセット複合体とがハイブリダイズした状態を示す模式図である。図 8 は、蛍光プローブ (A) と蛍光プローブ結合領域 (b 1) がそれぞれ 2 個であり、かつ標的核酸 (C) とハイブリダイズする前の本発明の核酸プローブセット複合体を示す模式図である。

【 0 0 1 8 】

本発明の核酸プローブセットを構成する1個または2個の蛍光プローブ(A)(以下単に「蛍光プローブ(A)」と云う場合がある)は、蛍光物質(d)で標識されたヌクレオチド(a)を含むオリゴヌクレオチドである。当該蛍光プローブ(A)の塩基配列は、バインディングプローブ(B)の蛍光プローブ結合領域(b1)とハイブリダイズするものであれば特に制限されず、検出または分析対象の標的核酸の種類にかかわらず常に同じものを用いることもできる。このように、本発明の核酸プローブセットを構成する蛍光プローブ(A)は、特定の標的核酸に対応する塩基配列を持つ必要がないため、本発明の核酸プローブセットを用いて、標的核酸の分析を行う場合、高価な蛍光物質を有する蛍光プローブを検出または分析対象の標的核酸ごとに調製せずすむという利点がある。

【0019】

10

一方、本発明の核酸プローブセットを構成するバインディングプローブ(B)は、上記蛍光プローブ(A)とハイブリダイズする1個または2個の蛍光プローブ結合領域(b1)(以下単に「蛍光プローブ結合領域(b1)」と云う場合がある)および標的核酸(C)とハイブリダイズする標的核酸結合領域(b2)とを有するオリゴヌクレオチドである。

【0020】

図1に示す本発明の核酸プローブセットは、図2に示すように、本発明の核酸プローブセット複合体と標的核酸(C)とがハイブリダイズしたときに、蛍光プローブ(A)中の蛍光物質(d)と標的核酸(C)を含む核酸中のグアニンとが相互作用して該蛍光物質(d)の蛍光キャラクターが変化するように設計されている。

20

【0021】

上記グアニンは、標的核酸を含む核酸中にあれば、標的核酸の塩基配列領域中であっても、標的核酸の塩基配列領域の外側であってもよい。上記グアニンが、標的核酸の塩基配列中にあり、ハイブリダイズしたバインディングプローブ(B)のシトシンと塩基対を形成している場合、蛍光物質(d)とグアニンとの相互作用が幾分低下するが特に問題はなく、さらには上記グアニンが、標的核酸の塩基配列領域の外側にあるなどの理由で塩基対を形成していない場合、蛍光物質(d)とグアニンとの相互作用が容易となるのでより好ましい。

【0022】

次に、図3を用いて、本発明の核酸プローブセット複合体と標的核酸(C)とがハイブリダイズしている場合に、蛍光物質(d)と標的核酸(C)を含む核酸中のグアニン塩基を持つ任意のヌクレオチド(以下、「ヌクレオチド」と略す。)とが相互作用できる条件について説明する。以下の説明中、標的核酸(C)の3'末端のグアニン塩基を持つヌクレオチドをヌクレオチドとする。図3は、図2の蛍光物質(d)の周辺部分を拡大して表示したものである。蛍光物質(d)とヌクレオチドとが相互作用できる条件は、後述する蛍光物質(d)と蛍光物質(d)で標識されたヌクレオチド(a)とを結ぶスペーサーの長さにも依存し、一定しないが、一般化すると以下のように表現できる。

30

【0023】

蛍光プローブ(A)とバインディングプローブ(B)とがハイブリダイズしている場合において、蛍光プローブ(A)と塩基対を形成している蛍光プローブ結合領域(b1)中のヌクレオチドであって、標的核酸結合領域(b2)に最も近いヌクレオチド(以下、「ヌクレオチド」と略す。)と塩基対を形成している蛍光プローブ(A)中のヌクレオチドとする。このヌクレオチドと蛍光物質で標識されたヌクレオチド(a)との距離(-a)を塩基数で表した数をXとする。図3において、ヌクレオチドは、蛍光プローブ結合領域(b1)中3'末端にあるチミン塩基を持つヌクレオチドであり、ヌクレオチドは、蛍光プローブ(A)中蛍光物質(d)で標識されたヌクレオチド(a)に隣接するアデニン塩基を持つヌクレオチドであり、この場合のXは1である。なお、隣接しているヌクレオチドを「X=1」とカウントし、1個おいて隣接しているヌクレオチドを「X=2」とカウントする。

40

【0024】

50

次に、標的核酸 (C) と塩基対を形成している標的核酸結合領域 (b2) 中のヌクレオチドであって、ヌクレオチド に最も近いヌクレオチド (以下「ヌクレオチド」と略す。) とヌクレオチド との距離 () を塩基数で表した数を Y とする。図 3 において、ヌクレオチド は、標的核酸結合領域 (b2) 中、5' 末端にあるシトシン塩基を持つヌクレオチドであり、この場合の Y は 1 である。なお、Y のカウントは X の場合と同じである。

【0025】

また、バインディングプローブ (B) と標的核酸 (C) とがハイブリダイズしている場合において、ヌクレオチド と塩基対を形成している標的核酸 (C) 中のヌクレオチドをとす。このヌクレオチド と上記ヌクレオチド との距離 () を塩基数で表した数を Z とする。図 3 において、ヌクレオチド は標的核酸 (C) 中 3' 末端のグアニン塩基を持つヌクレオチドであり、このヌクレオチドはヌクレオチド であるので、Z は 0 である。なお、Z のカウントは X の場合と同じである。

【0026】

本発明の核酸プローブセット複合体と標的核酸 (C) とがハイブリダイズしている場合に、蛍光物質 (d) とヌクレオチド のグアニンとが相互作用できる条件は、X、Y および Z の和が 6 以下となる場合が好ましい。蛍光物質 (d) と蛍光物質 (d) で標識されたヌクレオチド (a) とを結ぶスペーサーの長さにも依存するが、X、Y および Z の和は 4 以下がより好ましく、最も好ましくは 2 である。

【0027】

本発明においては、蛍光プローブ (A) に標識する蛍光物質 (d) は、グアニンと相互作用したときに、蛍光物質 (d) の蛍光キャラクターが変化するものを使用する。なお、本発明において、「蛍光キャラクター」とは、蛍光強度のことを意味し、「グアニンと蛍光物質とが相互作用して蛍光物質の蛍光キャラクターが変化する」とは、グアニンと蛍光物質とが相互作用していない状態での蛍光物質の蛍光強度と、相互作用している状態での蛍光強度とが異なることを意味し、その程度は限定しないものとする。また、蛍光の「消光」とは、蛍光物質がグアニンと相互作用しない場合と比べて、グアニンと相互作用したときに蛍光強度が減衰することを意味し、その程度は限定しないものとする。

【0028】

本発明の核酸プローブセットに好適に使用できる蛍光物質の例としては、フルオレセインおよびその誘導体 (例えば、フルオレセイン-4-イソチシアネート (FITC)、テトラクロロフルオレセイン、ヘキサクロロフルオレセイン、テトラプロモスルホンフルオレセイン (TBSF) およびそれらの誘導体)、EDANS (5-(2-アミノエチル)アミノ-1-ナフタレンスルホン酸)、6-JOE (6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン)、3,6-ジアミノ-9-[2,4-ビス(リチオオキシカルボニル)フェニル]-4-(リチオオキシスルホニル)-5-スルホナトキサンチリウム/3,6-ジアミノ-9-[2,5-ビス(リチオオキシカルボニル)フェニル]-4-(リチオオキシスルホニル)-5-スルホナトキサンチリウム (Alexa Fluor (登録商標) 488 (モレキュラー・プローブ社))、2,3,3,7,7,8-ヘキサメチル-5-[4-[5-(2,5-ジオキソ-3-ピロリン-1-イル)ペンチルカルバモイル]フェニル]-2,3,7,8-テトラヒドロ-9-アゾニア-1H-ピラノ [3,2-f:5,6-f'] ジインドール-10,12-ジスルホン酸 12-ナトリウム (Alexa Fluor (登録商標) 532 (モレキュラー・プローブ社))、1-[6-[(2,5-ジオキソ-1-ピロリジニル)オキシ]-6-オキソヘキシル]-2-[3-[1-[6-[(2,5-ジオキソ-1-ピロリジニル)オキシ]-6-オキソヘキシル]-1,3-ジヒドロ-3,3-ジメチル-5-スルホ-2H-インドール-2-イリデン]-1-プロペニル]-3,3-ジメチル-5-スルホ-3H-インドリウム (Cy3 (商標; アマシャム・バイオサイエンス社))、6-[[2-[5-[1-[6-(スクシンイミジルオキシ)-6-オキソヘキシル]-3,3-ジメチル-5-スルホナト-1H-インドール-2(3H)-イリデン]-1,3-ペンタジエニル]-3,3-ジメチル-5-スルホナト-3H-インドール-1-イウム]-1-イル]ヘキサ酸スクシンイミジル・カリウム (Cy5 (商標; アマシャム・バイオサイエンス社))、2-オキソ-6,8-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-3-カルボン酸 (Pacific Blue (商標; モレキュラー・プローブ社))、ローダミン 6 G (R6G) およびその誘導

10

20

30

40

50

体（例えば、カルボキシローダミン 6 G (CR6G)、テトラメチルローダミン (TMR)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート (TMRITC)、x-ローダミン、カルボキシテトラメチルローダミン (TAMRA)）、9-[2-(クロロスルホニル)-4-スルホナトフェニル]-2,3,6,7,12,13,16,17-オクタヒドロ-1H,5H,11H,15H-キサンテノ[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']ジキノリジン-18-イウム/9-[4-(クロロスルホニル)-2-スルホナトフェニル]-2,3,6,7,12,13,16,17-オクタヒドロ-1H,5H,11H,15H-キサンテノ[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']ジキノリジン-18-イウム (テキサスレッド (モレキュラー・プローブ社))、4,4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸 (BODIPY (商標)-FL (モレキュラー・プローブ社))、4,4-ジフルオロ-5-フェニル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸 (BODIPY (商標)-R6G (モレキュラー・プローブ社))、4,4-ジフルオロ-5-スチリル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸 (BODIPY (商標) 564 (モレキュラー・プローブ社))並びに4,4-ジフルオロ-5-(4-フェニル-1,3-ブタジエニル)-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸 (BODIPY (商標) 581 (モレキュラー・プローブ社))を挙げることができる。

【0029】

これらの中でもテトラプロモスルホンフルオレセイン、2-オキソ-6,8-ジフルオロ-7-ヒドロキシ-2H-1-ベンゾピラン-3-カルボン酸 (Pacific Blue (商標))、ローダミン 6 G、カルボキシローダミン 6 G、カルボキシテトラメチルローダミンおよび4,4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸 (BODIPY (商標)-FL)を使用することがより好ましく、4,4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸 (BODIPY (商標)-FL)を使用することがもっとも好ましい。

【0030】

本発明の核酸プローブセットに使用する蛍光プローブ (A) は、オリゴヌクレオチドの製造受託会社 (例えば、つくばオリゴサービス株式会社、茨城県) などに製造を委託して使用することができる。オリゴヌクレオチドに蛍光物質を標識する方法は、特に限定されず、従来公知の標識方法を利用することができる。(Nature Biotechnology、14巻、303~308頁、1996年; Applied and Environmental Microbiology、63巻、1143~1147頁、1997年; Nucleic acids Research、24巻、4532~4535頁、1996年)。

【0031】

例えば、5'末端ヌクレオチドに蛍光物質を結合させる場合は、まず、常法に従って5'末端のリン酸基にスペーサーとして、例えば、 $-(CH_2)_n-SH$ を導入する。このようなスペーサーは市販のものを使用することができる (例えば、Midland Certified Reagent Company社、米国)。この場合、nは3~8、好ましくは6である。このスペーサーにSH基反応性を有する蛍光物質またはその誘導体を結合させることにより蛍光標識されたオリゴヌクレオチドを得ることができる。当該蛍光標識されたオリゴヌクレオチドは、逆相クロマトグラフィーなどで精製して、本発明の蛍光プローブ (A) とすることができる。

【0032】

また、オリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドに蛍光物質を結合させることもできる。この場合は、リボースまたはデオキシリボースの3'位CのOH基にスペーサーとして、例えば、 $-(CH_2)_n-NH_2$ を導入する。このようなスペーサーも市販のものを使用することができる (例えば、Midland Certified Reagent Company社、米国)。別の方法として、リボースまたはデオキシリボースの3'位CのOH基にリン酸基を導入して、リン酸基のOH基にスペーサーとして、例えば、 $-(CH_2)_n-SH$ を導入する。この場合、nは3~8、好ましくは4~7である。

【0033】

上記のスペーサーにアミノ基またはSH基に反応性を有する蛍光物質またはその誘導体を結合させることにより蛍光物質で標識されたオリゴヌクレオチドを合成することができ

10

20

30

40

50

る。当該オリゴヌクレオチドを逆相クロマトグラフィーなどで精製して、本発明の蛍光プローブ(A)とすることができる。スペーサーとして $-(CH_2)_n-NH_2$ を導入する場合、キット試薬(例えば、Uni-link aminomodifier、クロンテック社)を用いるのが便利である。そして、常法に従って当該オリゴヌクレオチドに蛍光物質を結合させることができる。

【0034】

蛍光プローブ(A)中の蛍光物質で標識されたヌクレオチド(a)は、オリゴヌクレオチドの両末端ヌクレオチドに限定されるものではなく、両末端ヌクレオチド以外のヌクレオチドを蛍光物質で標識することもできる(ANALYTICAL BIOCHEMISTRY、225、32-38頁、1998年)。

10

【0035】

以上のようにして本発明の核酸プローブセットを構成する蛍光プローブ(A)を調製できるが、好ましい蛍光プローブ(A)の形態は、5'末端または3'末端ヌクレオチドを蛍光物質(d)で標識したものであり、より好ましくは、5'末端ヌクレオチドをBODIPY(商標)-FLで標識したものである。また、蛍光物質(d)で標識されたヌクレオチドの塩基としては、グアニンまたはシトシンであることが好ましい。

【0036】

本発明の核酸プローブセットを構成する蛍光プローブ(A)は、バインディングプローブ(B)の蛍光プローブ結合領域(b1)とハイブリダイズする塩基配列であればよく、塩基長に特に制限はないが、4塩基以下であるとハイブリダイズ効率が低いという点で好ましくなく、51塩基以上であると非特異的なハイブリッドが生じやすいという点で好ましくないことがある。従って、蛍光プローブ(A)は、5~50塩基であることが好ましく、より好ましくは10~35塩基、特に好ましくは12~30塩基である。

20

【0037】

蛍光プローブ(A)の塩基配列は、バインディングプローブ(B)の蛍光プローブ結合領域(b1)とハイブリダイズする限り、当該蛍光プローブ結合領域(b1)と相補的でないヌクレオチドを有してもよい。例えば、図1の蛍光プローブ(A)のように、5'末端にバインディングプローブ(B)とは相補的でないヌクレオチドを有するものでもよい。一方、上記バインディングプローブ(B)中の上記蛍光プローブ結合領域(b1)の塩基配列は、蛍光プローブ(A)とハイブリダイズするものであればよく、その塩基長は蛍光プローブ(A)の塩基長に依存する。

30

【0038】

バインディングプローブ(B)中の標的核酸結合領域(b2)は、標的核酸(C)とハイブリダイズする塩基配列であればよく、その塩基長は、標的核酸の塩基長に依存するが、4塩基以下であると標的核酸(C)とのハイブリダイズ効率が低いという点で好ましくなく、61塩基以上であると非特異的なハイブリッドが生じやすいという点で好ましくないことがある。従って、標的核酸結合領域(b2)は、5~60塩基であることが好ましく、より好ましくは15~30塩基である。標的核酸結合領域(b2)の塩基配列は、標的核酸(C)とハイブリダイズする限り標的核酸(C)と塩基対を形成しない塩基配列を有してもよい。

40

【0039】

本発明の核酸プローブセットは、核酸の種々の分析方法に用いることができる。本発明の核酸プローブセットを用いて、溶液中に標的核酸が存在するか否かを判定する標的核酸の検出方法の例を以下に示す。

【0040】

まず、標的核酸の検出をする溶液(以下、「検出サンプル」と略す。)を段階希釈して、数種の溶液を調製する。これらの段階希釈した検出サンプルに本発明の核酸プローブセット、すなわち蛍光プローブ(A)とバインディングプローブ(B)をそれぞれ一定量加え、次いで、添加した本発明の核酸プローブセット複合体と標的核酸とがハイブリダイズするように溶液の温度を調整した後、蛍光強度を測定する。上記本発明のプローブセット

50

複合体と標的核酸とをハイブリダイズさせる温度は、本発明の核酸プローブセット複合体と標的核酸との融解温度（以下「 $T_m 1$ 」と呼ぶ）やその他の溶液条件により変動するが、当該核酸プローブセット複合体と標的核酸との配列特異的なハイブリダイゼーションが起こり、かつ非特異的なハイブリダイゼーションが生じない温度範囲であることが好ましく、好ましくは $T_m 1 \sim (T_m 1 - 40)$ 、より好ましくは $T_m 1 \sim (T_m 1 - 20)$ 、さらに好ましくは $T_m 1 \sim (T_m 1 - 10)$ である。このような好ましい温度の一例として、約60が挙げられる。

【0041】

また、本発明の核酸プローブセットを構成する蛍光プローブとバインディングプローブとの融解温度（以下「 $T_m 2$ 」と呼ぶ）は、蛍光強度を確実に測定するために、 $T_m 1$ より高いことが好ましく、 $T_m 2 - T_m 1$ が5以上であることがより好ましい。

10

【0042】

上記検出サンプル中に標的核酸が存在しない場合、段階希釈した検出サンプルのいずれにおいても同程度の蛍光強度が観察される。一方、上記検出サンプル中に標的核酸が存在する場合、本発明の核酸プローブセットの蛍光物質による蛍光は標的核酸を含む核酸中のグアニンにより消光される。この消光の程度は、上記溶液中の核酸プローブセットと標的核酸との比率を変えることによって変化する。このため、上述したように段階希釈した検出サンプル中に本発明の核酸プローブセットを添加して、それらの蛍光強度を測定することにより、蛍光消光の発生の有無から標的核酸の存在を判定することができ、蛍光消光の大きさから標的核酸の存在量を定量することができる。

20

【0043】

また、本発明の核酸プローブセットは、リアルタイムPCR方法に用いることもできる。リアルタイムPCR方法において、本発明の核酸プローブセットを用いて増幅産物を定量する場合、PCRで増幅する塩基配列またはその一部を標的核酸として、当該標的核酸とハイブリダイズするようにバインディングプローブ（B）中の標的核酸結合領域（b2）の塩基配列を決定する。

【0044】

このようにして作製した本発明の核酸プローブセットをPCR反応溶液に添加して、PCR反応を行い、PCRの各サイクルにおいて蛍光強度を測定する。PCR反応によって、反応溶液中の標的核酸が増幅すると、当該標的核酸を含む核酸中のグアニンにより本発明の核酸プローブセットの蛍光物質による蛍光が消光されるため、蛍光強度および蛍光消光の大きさからPCRによる増幅産物を定量することができる。

30

【0045】

さらに、本発明の核酸プローブセットは、核酸の塩基配列多型の分析に用いることもできる。分析できる塩基配列多型の例としては、基準となる塩基配列からの1塩基多型、塩基置換、塩基欠失および塩基挿入などを挙げることができる。このような分析方法の一例を以下に示す。

【0046】

本分析方法では、基準となる塩基配列を標的核酸（C）として、標的核酸（C）を含む溶液と、分析対象の核酸を含む溶液とを調製する。それぞれの溶液に本発明の核酸プローブセット、すなわち上記標的核酸（C）とハイブリダイズするように設計した標的核酸結合領域（b2）を有するバインディングプローブ（B）と蛍光プローブ（A）とを加えた後、各溶液において、添加した本発明の核酸プローブセット複合体と標的核酸（C）または分析対象の核酸とをハイブリダイズさせ、次いで蛍光強度の温度依存性を測定する。具体的には、溶液の温度を低温から高温に変化させながら、各温度について蛍光強度を測定する。

40

【0047】

この測定結果を温度に対してプロットしたものを、「融解曲線」と呼ぶ。標的核酸を含む溶液について融解曲線を温度で微分することにより、本発明の核酸プローブセット複合体と標的核酸（C）との $T_m 1$ を、極値を示す温度として容易に求めることができる。こ

50

のような融解曲線分析は、当業者に周知の市販のプログラムを用いることによって行うことができる。

【0048】

上記標的核酸(C)を含む溶液の蛍光強度は、低温では標的核酸(C)を含む核酸中のグアニンによる蛍光消光現象により抑制される。しかし、溶液温度を T_m1 付近まで上げると本発明の核酸プローブセット複合体から標的核酸が解離し、蛍光消光の程度が弱くなるため、蛍光強度は急激に増加する。分析対象の核酸の塩基配列中に塩基配列多型、例えば、標的核酸の塩基配列からの1塩基多型、塩基置換、塩基欠失および塩基挿入などがあると、当該分析対象の核酸と本発明の核酸プローブセット複合体との T_m1 は、標的核酸(C)と本発明の核酸プローブセット複合体との T_m1 より低い値を示す。このため、標的核酸と本発明の核酸プローブセット複合体の蛍光強度の温度依存性と、分析対象の核酸と本発明の核酸プローブセット複合体の蛍光強度の温度依存性とを比較することにより、標的核酸の塩基配列に対する分析対象の核酸の塩基配列多型を分析することができる。このような分析手順としては、融解曲線どうしを比較することもできるが、それぞれの融解曲線を温度で微分し、極値を与える温度として T_m1 を求め、それを比較することによって、容易に変異の有無を判断することができる。

10

【0049】

また、分析対象の核酸の塩基配列のうち、蛍光プローブの蛍光物質に対して消光作用をするグアニン塩基を持つヌクレオチドが変異している場合、いずれの温度においても蛍光消光現象による蛍光強度の低下が生じないため、その融解曲線から変異を特定することができる。

20

【0050】

従来、融解曲線分析においては、標的核酸ごとに高価な蛍光標識をした塩基配列の異なる核酸プローブを用意する必要があり、その合成に長時間を要していたが、本発明の核酸プローブセットを融解曲線分析に使用することにより、標的核酸ごとに高価な蛍光標識をした核酸プローブを用意する必要がないため、融解曲線分析の準備時間を短縮でき、かつ融解曲線分析をより安価に実施することができる。

【0051】

前記で説明した本発明の核酸プローブセットは、1個の蛍光プローブ結合領域(b1)を持つバイディングプローブ(B)と1個の蛍光プローブ(A)とから構成されているが、本発明の核酸プローブセットは、図8に示すように、蛍光プローブ結合領域(b1)を2個有するものであってもよい。この蛍光プローブ結合領域(b1)は同じ塩基配列でも異なる塩基配列でもよいが、異なる塩基配列であることが好ましい。この場合には蛍光プローブは1個でもよいが、塩基配列の異なる2個の蛍光プローブ(A)を有することが好ましい。図8に示す本発明の核酸プローブセットにおける蛍光プローブ結合領域(b1)と蛍光プローブ(A)との構成は前記と同様である。

30

【0052】

上記バイディングプローブ(B)が蛍光プローブ結合領域を2個有し、それらの塩基配列が異なる本発明の核酸プローブセットは、ABC-PCR(Alternately Binding probe Competitive PCR;Taniら、Analytical Chemistry、印刷準備中を参照のこと)方法において従来使用されているABプローブの代わりとして好適に使用することができる。

40

【0053】

Taniらが開示するABC-PCR方法は、競合的PCR方法の一種であり、PCR反応溶液中に増幅対象の塩基配列(以下、「増幅配列」と略す。)を含む核酸の他に、増幅配列の一部をグアニンに置換した核酸(以下、「内部標準核酸」と略す。)並びに上記増幅配列の一部と相補的な塩基配列を持ち、その両端をそれぞれの励起波長および蛍光波長が異なる別の蛍光物質で標識した核酸プローブ(以下、「ABプローブ」と略す。)を加えてPCR反応を行う方法である。上記ABプローブは、増幅配列を含む核酸とハイブリダイズしたときに、片方の蛍光物質のみが当該核酸中のグアニンにより消光され、かつ、内部標準核酸とハイブリダイズしたときには、両方の蛍光物質が当該内部標準核酸中の

50

グアニンにより消光されるように設計されているため、2種の蛍光物質の蛍光強度から、PCR反応による増幅産物を定量することができる。

【0054】

上記従来のABC-PCR方法において使用する蛍光標識されたABプローブは、増幅対象の塩基配列ごとに異なるプローブを使用しなければならないが、本発明の核酸プローブセットを上記ABプローブの代わりに用いることにより、高価な蛍光標識をした蛍光プローブを、増幅対象の塩基配列ごとに用意する必要がないので、より安価にABC-PCR方法を実施することができる。

【0055】

このようなABC-PCR方法での使用に適する本発明の核酸プローブセットの一例を図8に示す。この場合、PCRで増幅する塩基配列の一部を標的核酸(C)として、当該標的核酸とハイブリダイズするようにバインディングプローブ(B)中の標的核酸結合領域(b2)の塩基配列を決定する。ABC-PCR方法においてABプローブの代わりとして本発明の核酸プローブセットを使用する場合、当該核酸プローブセットを構成する2本の蛍光プローブに標識するそれぞれの励起波長および蛍光波長が異なる蛍光物質の好ましい組み合わせの例としては、BODIPY(商標)-FLとTAMRAの組み合わせを挙げることができる。

10

【実施例】

【0056】

次に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらの実施例は本発明の単なる例示であって、本発明の限定を意図するものではない。

20

【0057】

[実施例1] <標的核酸検出試験>

図1に示すように、ヒトUCP1遺伝子の一部と同じ塩基配列を持つオリゴヌクレオチドを標的核酸(配列番号:1)とし、5'末端側に蛍光プローブと相補的な塩基配列の蛍光プローブ結合領域(b1)を、3'末端側に標的核酸と相補的な塩基配列の標的核酸結合領域(b2)を持つバインディングプローブ(配列番号:2)および配列番号3の塩基配列を持ち、5'末端ヌクレオチドをBODIPY(商標)-FL(モレキュラー・プローブ社)で標識した蛍光プローブからなる核酸プローブセットを用いて、標的核酸検出試験を行った。

30

配列番号1: tgaccacagtttgatcgagtg

配列番号2: tctcggagtcgggcgatcactcgatcaactgtggtca - リン酸

配列番号3: BODIPY(商標)-FL-catcgcccggactccgaga - リン酸

【0058】

なお、上記バインディングプローブと上記蛍光プローブは、3'末端にリン酸基を持つ。上記標的核酸、バインディングプローブおよび蛍光プローブの合成は、つくばオリゴサービス株式会社(つくば市)に委託した。

【0059】

PCR緩衝液(50mM KCl、10mM トリス塩酸、1.5mM MgCl₂を含む。濃度はいずれも最終濃度。pH8.7)中に標的核酸の最終濃度が0、0.1、0.2、0.3、0.4および0.5μMとなるように段階希釈した6種の標的核酸溶液を調製し、それぞれに蛍光プローブ(最終濃度0.05μM)およびバインディングプローブ(最終濃度0.2μM)を加え、各溶液について60にて蛍光強度の測定を行った。蛍光強度の測定には、LightCycler(登録商標)480(Roche社)を用いた。測定結果を図4に示す。

40

【0060】

図4より、溶液中に標的核酸が存在しない場合と比べ、溶液中に標的核酸が存在する場合には、蛍光強度が減少することおよび溶液中の標的核酸濃度が高いほど蛍光強度の減少が大きいことを確認した。これらの結果は、標的核酸溶液に本発明の核酸プローブセットを添加してその蛍光強度を測定することにより、特定の塩基配列を持つ標的核酸の存在を

50

判定できることを示しており、かつこの測定が溶液中の標的核酸の定量に応用できることを示唆するものである。

【0061】

[実施例2] <定量リアルタイムPCR実験>

PCRの鋳型DNAとしてヒトゲノムDNA試料(プロメガ株式会社)を500ng、50ng、5ng、0.5ngまたは0.05ng含む5種のリアルタイムPCR用の反応溶液を調製した。各反応溶液は、いずれも、DNA合成酵素としてTITANIUM Taq DNAポリメラーゼ(クロンテック社)、4種のdNTP(それぞれ最終濃度0.2mM)、フォワードプライマー(配列番号:4、最終濃度0.5μM)、リバースプライマー(配列番号:5、最終濃度0.15μM)、所定量のTITANIUM Taq PCR緩衝液(クロンテック社)および本発明の核酸プローブセットを含む。

10

【0062】

当該本発明の核酸プローブセットは、ヒトゲノム中のUCP1遺伝子の一部(配列番号:1)を標的核酸とし、5'末端側に蛍光プローブと相補的な塩基配列の蛍光プローブ結合領域(b1)を、3'末端側に標的核酸と相補的な塩基配列の標的核酸結合領域(b2)を持つバインディングプローブ(配列番号:2、最終濃度0.2μM)と、配列番号3の塩基配列を持ち、5'末端ヌクレオチドをBODIPY(商標)-FL(モレキュラー・プローブ社)で標識した蛍光プローブ(最終濃度0.05μM)とから構成される。各PCR反応溶液は、滅菌水で20μlにメスアップして調製した。本PCR反応により上記標的核酸を含む核酸が増幅される。

20

配列番号4: agtggtggctaagagagaa

配列番号5: aaggagtggcagcaagt

【0063】

なお、バインディングプローブと蛍光プローブは、3'末端にリン酸基を持つ。上記標的核酸および核酸プローブは、つくばオリゴサービス株式会社(つくば市)に、フォワードプライマーおよびリバースプライマーは、株式会社日本遺伝子研究所(仙台市)に合成を委託した。

【0064】

上記反応溶液をリアルタイムPCR装置(LightCycler(登録商標)480(Roche社))を用いて以下のPCR反応に供した。

30

(1) 熱変性工程: 95 で120秒間

(2) 熱変性工程: 95 、10秒間

(3) アニール工程: 60 、20秒間

(4) 伸長工程: 72 、10秒間

(1)の熱反応工程の後、工程(2)~(4)を繰り返した。(3)の各アニール工程において蛍光強度を測定し、蛍光強度が、5サイクル目の蛍光強度の95%以下の値となった最初のサイクル数(以下、Ct(サイクルスレッシュホールド)値と略す)を求めた。なお、Ct値は、各PCRサイクルでの蛍光強度を直線で結び、この直線から求めた値である。

【0065】

40

各初期添加鋳型DNA量に対するCt値(2回の測定の平均値)をプロットした図を図5に示す。図5から、初期添加鋳型DNA量と本発明の核酸プローブセットを用いて測定したCt値との間には良好な相関関係があることが明らかとなった。すなわち、本実験結果は、リアルタイムPCR方法において本発明の核酸プローブセットが、PCR反応前の反応溶液に含まれる標的核酸を含む鋳型DNAの定量およびPCR反応後の反応溶液に含まれる標的核酸を含む増幅産物の定量のためのプローブとして非常に有用であることを示している。

【0066】

[実施例3] <本発明の核酸プローブセットと標的核酸との複合体の融解曲線分析>

ヒトUCP1遺伝子の一部である21塩基長の核酸(配列番号:1)を標的核酸とし、

50

5'末端側に蛍光プローブと相補的な塩基配列領域を持ち、3'末端側に配列番号1の標的核酸と相補的な塩基配列領域を持つバインディングプローブ(配列番号:2)と配列番号3の塩基配列を持ち、5'末端のヌクレオチドをBODIPY(商標)-FL(モレキュラー・プローブ社)で標識した蛍光プローブとからなる本発明の核酸プローブセットを用いて、本発明の核酸プローブセットと標的核酸との複合体の融解曲線分析を行った。また、上記標的核酸の5'末端側から17番目の塩基をアデニンに置換した核酸(配列番号:6)を上記標的核酸の代わりに用いて、同様に融解曲線分析を行った。なお、以下の実施例3において標的核酸および配列番号6の核酸を総称して「標的核酸類」と略す。

配列番号6: tgaccacagtttgatcaagtg

【0067】

なお、上記バインディングプローブと上記蛍光プローブは、3'末端にリン酸基を持つ。上記標的核酸類および核酸プローブの合成は、つくばオリゴサービス株式会社(つくば市)に委託した。

【0068】

本発明の核酸プローブセット(蛍光プローブ(最終濃度0.05 μ M)およびバインディングプローブ(最終濃度0.2 μ M))を含むPCR緩衝液(50mM KCl、10mM トリス塩酸、1.5mM MgCl₂を含む。濃度はいずれも最終濃度。pH8.7)に、標的核酸または配列番号6の核酸(いずれも最終濃度0.1 μ M)を加えた溶液および標的核酸類を加えない溶液の3種類の溶液を用意し、それぞれの溶液を40℃にて60秒間保ち、本発明の核酸プローブセットと上記標的核酸類とをハイブリダイズさせた後、溶液温度を40℃から80℃まで上昇させながら蛍光強度を測定し(測定は1につき5回)、図6に示す融解曲線を得た。図中、配列番号1の標的核酸を含む溶液の融解曲線をD、配列番号6の核酸を含む溶液の融解曲線をE、標的核酸類を含まない溶液の融解曲線をFで示す。また、これらの融解曲線の負の一次微分曲線を図7に示す。なお、蛍光強度の測定にはLightCycler(登録商標)480(Roche社)を用いた。

【0069】

実験の結果、本発明の核酸プローブセットを用いて融解曲線分析を行うことにより、図7のDおよびEで示される融解曲線の負の一次微分曲線から、上記本発明の核酸プローブセットと標的核酸類との複合体のT_{m1}を極小を示す温度として明確に求めることができた。上記標的核酸結合領域と完全に相補的な配列番号1の標的核酸と上記核酸プローブセットとの複合体のT_{m1}は約64℃であったが、上記標的核酸結合領域とミスマッチ塩基対を持つ配列番号6の核酸と上記核酸プローブセットとの複合体のT_{m1}は、より低い約56℃であった。これらの結果は、本発明の核酸プローブセットが、融解曲線分析において従来使用されている核酸プローブの代わりとして、好適に使用できることを示すものである。

【0070】

[実施例4] <ABC-PCR実験>

アンモニア酸化細菌(Nitrosomonas europaea(NBRC 14298))のアンモニア酸化酵素をコードするamoA遺伝子の一部(配列番号:7)を標的核酸とする本発明の核酸プローブセットを用いて、ABC-PCR実験を行い、本発明の核酸プローブセットの有効性を評価した。

配列番号7: gtcaccagccagttgcgtgtcagat

【0071】

本ABC-PCR実験に用いる核酸プローブセットは、図8に示すように1本のバインディングプローブと、2本の蛍光プローブとから構成される。上記バインディングプローブ(配列番号:8)は、5'末端側と3'末端側に塩基配列の異なる2つの蛍光プローブ結合領域を持ち、中央部に標的核酸結合領域を持つ55塩基長のオリゴヌクレオチドである。上記バインディングプローブの5'末端側とハイブリダイズする蛍光プローブ(A1-amoA)は、配列番号9の塩基配列を持ち、5'末端ヌクレオチドをBODIPY(商標)-FL(モレキュラー・プローブ社)で標識し、3'末端にリン酸基を持つ15塩基長のオ

10

20

30

40

50

リゴヌクレオチドである。

【 0 0 7 2 】

一方、上記バインディングプローブの3'末端側とハイブリダイズする蛍光プローブ(A2-amoA)は、配列番号10の塩基配列を持ち、3'末端ヌクレオチドをカルボキシテトラメチルローダミン(TAMRA)で標識した15塩基長のオリゴヌクレオチドである。

配列番号8 : attcgggcgggcttaatctgacacgcaactggctggtgactttgggggggggttt

配列番号9 : BODIPY(商標)-FL-taagccccccgaat - リン酸

配列番号10 : aaaccccccccaaa-TAMRA

【 0 0 7 3 】

また本実施例では、内部標準核酸として、上記標的核酸を有するアンモニア酸化細菌のamoA遺伝子中、標的核酸の3'末端に隣接する3'末端側(外側)の2塩基を公知の方法(例えば、Higuchiら、Nucleic Acids Res.、1988年、第16巻、7351~7367頁を参照のこと)によりグアニンに置換したamoA遺伝子を使用した。前記蛍光プローブ(A1-amoA)は、核酸プローブセット複合体として標的核酸とハイブリダイズした場合には消光されないが、内部標準核酸とハイブリダイズした場合、amoA遺伝子中の上記置換されたグアニンにより消光される。

【 0 0 7 4 】

ABC-PCR実験に用いたPCR反応溶液は、DNA合成酵素として所定量のTITANIUM Taq DNAポリメラーゼ(クロンテック社)、所定量のTITANIUM Taq PCR緩衝液(クロンテック社)、最終濃度200μMのdATP、dCTPおよびdGTP、最終濃度600μMのdUTP(ロシュ・ダイアグノスティクス社)、フォワードプライマー(配列番号:11、最終濃度0.1μM)、リバースプライマー(配列番号:12、最終濃度1μM)、上記バインディングプローブ(最終濃度0.1μM)および上記2種の蛍光プローブ(いずれも最終濃度0.15μM)、増幅産物によるコンタミネーションを防ぐためのウラシルDNAグリコシダーゼ(0.25U、ロシュ・ダイアグノスティクス社)並びに内部標準核酸を10³コピー含む。上記標的核酸を含まないPCR反応溶液および上記標的核酸を10、100、300、1,000、3,000、10,000または100,000コピー含むPCR反応溶液を調製し、それぞれ滅菌水で25μlにメスアップした。

配列番号11 : gghgactgggayttctgg

配列番号12 : cctckgsaaagccttcttc

【 0 0 7 5 】

上記配列中、HはA、CまたはTを意味し、YはCまたはTを意味し、KはGまたはTを意味し、SはGまたはCを意味する。

なお、上記標的核酸は、NBRC液体培地中で培養したアンモニア酸化細菌(Nitrosomonas europaea(NBRC 14298)、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 生物遺伝資源部門より購入)0.5g(湿重量)からBio101 FastDNAスピンキット(Qbiogene社)を用いてDNAを抽出し、これをMicrocon(登録商標)YM-50(ミリポア社)を用いて精製したゲノムDNAとして使用した。

【 0 0 7 6 】

コンタミネーションを防ぐために、上記PCR反応溶液を調製する間、該溶液を室温に保ちウラシルDNAグリコシダーゼによるグリコシダーゼ反応をさせ、溶液調製後、以下のPCR反応に供した。

- (1) 熱変性工程 : 95 で120秒間
- (2) 熱変性工程 : 95 、45秒間
- (3) アニール工程 : 55 、60秒間
- (4) 伸長工程 : 72 、45秒間
- (5) 伸長工程 : 72 、45秒間

(1)の熱反応工程の後、工程(2)~(4)を60サイクル行ったのち、(5)の

10

20

30

40

50

伸長工程を行った。PCR反応のサーマルサイクラーは、iCycler（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社）を使用した。

【0077】

PCR反応終了後、SmartCycler（登録商標、セフェイド社）を用いて95 および55にて反応溶液の蛍光強度を測定した。蛍光プローブA1 - amoAの蛍光強度（以下、蛍光強度A1と略す。）は、励起波長450～495nm、検出波長505～537nmで測定し、蛍光プローブA2 - amoAの蛍光強度（以下、蛍光強度A2と略す。）は、励起波長527～555nm、検出波長565～605nmで測定した。

【0078】

得られた蛍光強度を以下の式1に代入し、標的核酸を含む7種の反応溶液について補正蛍光強度値を求めた。 10

[式1]

$$\text{蛍光強度補正值} = [(G_{U,55}/G_{U,95}) - (G_{55}/G_{95})] / [(R_{U,55}/R_{U,95}) - (R_{55}/R_{95})]$$

ここで、

$G_{U,55}$: 標的核酸を含まない反応溶液の55における蛍光強度A1

$G_{U,95}$: 標的核酸を含まない反応溶液の95における蛍光強度A1

G_{55} : 標的核酸を含む反応溶液の55における蛍光強度A1

G_{95} : 標的核酸を含む反応溶液の95における蛍光強度A1

$R_{U,55}$: 標的核酸を含む反応溶液の55における蛍光強度A2

$R_{U,95}$: 標的核酸を含む反応溶液の95における蛍光強度A2 20

R_{55} : 標的核酸を含まない反応溶液の55における蛍光強度A2

R_{95} : 標的核酸を含まない反応溶液の95における蛍光強度A2

である。

【0079】

得られた補正蛍光強度値を、PCR反応前の標的核酸数を横軸にとった片対数グラフにプロットした図を図9に示す。この図から、本発明の核酸プローブセットを用いてABC-PCR実験を行っても、従来使用されるABプローブを用いる場合と同様に直角双曲線に回帰するグラフ（関係式）が得られた。

【0080】

次に、この関係式を検量線として用い、ABC-PCR反応後の反応溶液の蛍光強度から、PCR反応前の反応溶液中に含まれる標的核酸数を算出する実験を行った。 30

標的核酸のコピー数以外は前記ABC-PCR反応溶液と同様の3種類のPCR反応溶液を調製した。該反応溶液として、標的核酸を0、2、000または6、000コピー含む溶液をそれぞれ5サンプルずつ調製した。上記3種類のPCR反応溶液を、上記ABC-PCR実験と同様に60サイクルのPCR反応に供し、反応後の蛍光強度を上記式1に代入して補正蛍光強度値を求め、この値を上記の検量線にあてはめることにより、PCR反応前の標的核酸数を算出した。結果を表1に示す。

【0081】

[表1]

PCR反応前の標的核酸数	2000	6000
1回目の算出値	2400	5900
2回目の算出値	1900	5800
3回目の算出値	2200	6500
4回目の算出値	2300	6200
5回目の算出値	1800	5900
算出値の平均値	2120	6060
算出値の標準偏差 (%)	12.210	4.754

10

【0082】

表1から明らかなように、PCR反応後の反応溶液の蛍光強度から算出したPCR反応前の標的核酸数の算出値は、実際に使用した標的核酸のコピー数とよく一致していた。この結果は、本発明の核酸プローブセットが、従来使用されてきたABC-PCR実験に利用でき、高い信頼性を持つことを示すものである。

【産業上の利用可能性】

【0083】

本発明により、標的核酸を特異的に分析できる核酸プローブセットが提供される。本発明の核酸プローブセットは、高価な蛍光標識した核酸プローブを分析対象の標的核酸ごとに調製する必要がないため、従来の核酸プローブに比べ安価にかつ短時間で標的核酸に対する核酸プローブを調製することができるという利点を有する。本発明の核酸プローブセットは、医学、分子生物学および農学などの分野において、核酸の検出、定量、多型分析、突然変異の検出などに応用することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1】標的核酸(C)とハイブリダイズする前の本発明の核酸プローブセット複合体を示す模式図である。

【図2】標的核酸(C)とハイブリダイズした本発明の核酸プローブセット複合体を示す模式図である。

30

【図3】図2の蛍光物質(d)の周辺部分を拡大して示す模式図である。

【図4】標的核酸濃度の異なる溶液に一定量の本発明の核酸プローブセットを添加後、蛍光強度を測定し、その値をプロットした図である。

【図5】初期添加鋳型DNA量の異なるPCR反応溶液をリアルタイムPCR測定に供し、各溶液についてCt値をプロットした図である。

【図6】本発明の核酸プローブセット複合体と標的核酸類との融解曲線を示す図である。

【図7】図6の融解曲線の負の一次微分曲線を示す図である。

【図8】実施例4で使用した本発明の核酸プローブセットを示す模式図である。

【図9】本発明の核酸プローブセットを用いたABC-PCR実験で得られた補正蛍光強度値と、反応前の標的核酸数との相関を示す図である。

40

【符号の説明】

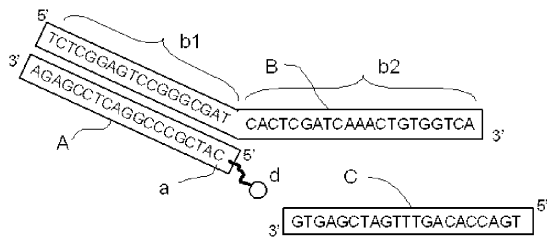
【0085】

- A 蛍光プローブ
- B バインディングプローブ
- C 標的核酸
- a 蛍光物質で標識されたヌクレオチド
- b1 蛍光プローブ結合領域
- b2 標的核酸結合領域
- d 蛍光物質

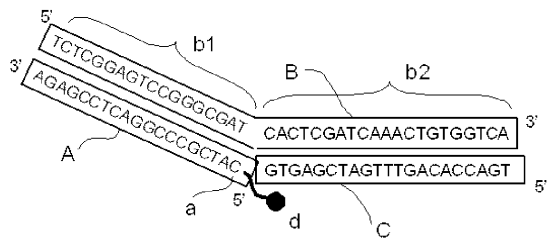
50

ヌクレオチド
ヌクレオチド
ヌクレオチド
ヌクレオチド
ヌクレオチド

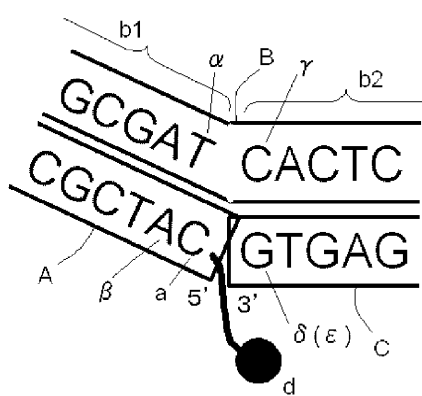
【図1】



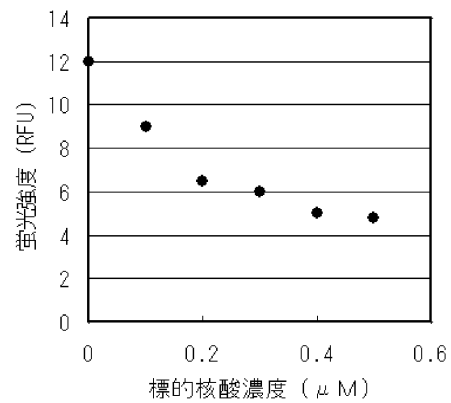
【図2】



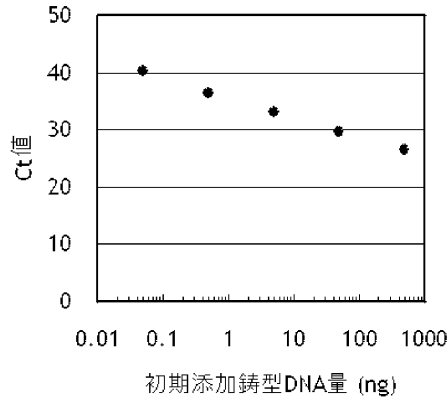
【図3】



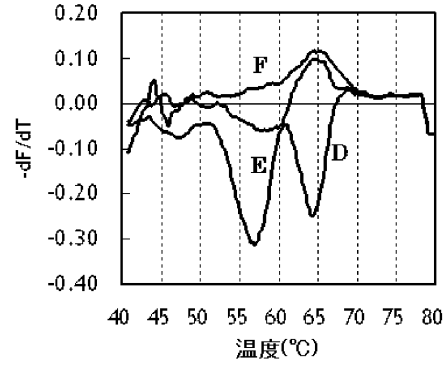
【図4】



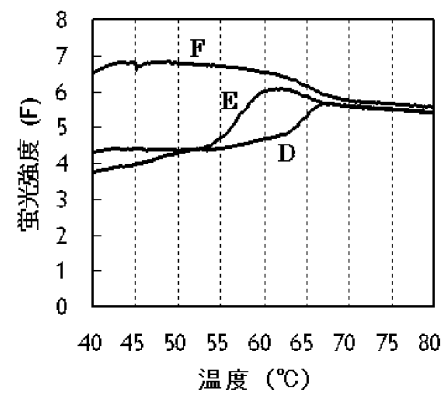
【 图 5 】



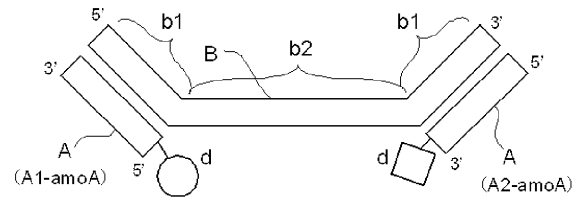
【 图 7 】



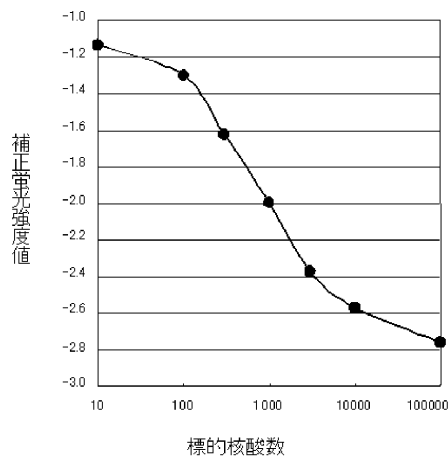
【 图 6 】



【 图 8 】



【 图 9 】



【配列表】

005096007000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 市川 康平
東京都千代田区東神田1-9-8 株式会社J-Bio21内
- (72)発明者 中村 和憲
東京都千代田区東神田1-9-8 株式会社J-Bio21内
- (72)発明者 蔵田 信也
東京都千代田区東神田1-9-8 株式会社J-Bio21内

審査官 佐久 敬

- (56)参考文献 特開2002-335999(JP,A)
特開2003-334078(JP,A)
特開2004-049231(JP,A)
特開2004-000203(JP,A)
特開2002-355084(JP,A)
特開2002-191372(JP,A)
特開2002-119291(JP,A)
特開2002-000275(JP,A)
特開2001-286300(JP,A)
高津京子 他, 新規一塩基多型解析技術の開発 - SNaPpy法及びQP法 - , Bio Industry, 2005年, Vol.22, No.9, p.63-69
蔵田信也 他, 東日本支部(産学連携による実用化研究を考える)(第2回)蛍光消光現象を利用した新しい遺伝子解析技術の実用化, 生物工学会誌, 2005年, Vol.83, No.1, p.38-39
TORIMURA M. et al., Fluorescence-Quenching Phenomenon by Photoinduced Electron Transfer between a Fluorescent Dye and a Nucleotide Base., Analytical Sciences, 2001年, Vol.17, No.1, P.155-160

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00
C12N 15/00-15/90
CAplus/Biosis/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamII)