

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4336877号
(P4336877)

(45) 発行日 平成21年9月30日(2009.9.30)

(24) 登録日 平成21年7月10日(2009.7.10)

(51) Int.Cl.	F 1	
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 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-114381 (P2003-114381)	(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2004-313120 (P2004-313120A)		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	今村 玲英子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 β 3 アドレナリン受容体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 1 8 3 から始まる 1 5 ~ 3 0 塩基長の塩基配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識され、または、配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号 1 9 6 で終わる 2 0 ~ 3 0 塩基長の塩基配列を有し、3'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 8 ~ 1 2 に示す塩基配列のいずれかを有する請求項 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、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、β₃アドレナリン受容体をコードする核酸における、β₃アドレナリン受容体のアミノ酸配列の 6 4 位のトリプトファンがアルギニ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 183 から始まる 15 ~ 30 塩基長の塩基配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識され、または、配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号 196 で終わる 20 ~ 30 塩基長の塩基配列を有し、3'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。

10

【請求項 8】

核酸プローブが、配列番号 8 ~ 12 に示す塩基配列のいずれかを有する請求項 7 記載のキット。

【請求項 9】

β 3 アドレナリン受容体をコードする核酸における、 β 3 アドレナリン受容体のアミノ酸配列の 64 位のトリプトファンがアルギニ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】

20

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 β 3 アドレナリン受容体変異遺伝子の検出法およびそのためのキットに関する。

【0002】

【従来の技術】

β 3 アドレナリン受容体 (B3AR) は白色脂肪細胞における脂肪分解と褐色脂肪細胞における熱生産に大きな役割を果たしている。この B3AR のアミノ酸配列の 64 位のトリプトファンがアルギニンに置換している変異 (Trp64Arg) が存在すると安静時の代謝量が 200kcal 低下するといわれており、この変異と内蔵脂肪型肥満、インスリン抵抗性が関連しているといわれている。

30

【0003】

B3AR に Trp64Arg 変異をもたらす塩基の変異 (以下、「B3AR Trp64Arg 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。

【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かかってしまう。また、操作が複雑なため、自動化が困難である。

40

【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 1、特許文献 1)。

【0006】

【非特許文献 1】

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

50

- 6 3 5

【特許文献 1】

特開 2 0 0 2 - 1 1 9 2 9 1 号 公 報

【0 0 0 7】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、B3AR Trp64Arg変異を検出するのに有効な消光プローブを特定し、B3AR Trp64Arg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。

【0 0 0 8】

【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、B3AR Trp64Arg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。

【0 0 0 9】

本発明者らは、B3AR Trp64Arg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B3AR Trp64Arg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。

【0 0 1 0】

(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 1 8 3 から始まる 1 5 ~ 3 0 塩基長の塩基配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識され、または、配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号 1 9 6 で終わる 2 0 ~ 3 0 塩基長の塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブ。

【0 0 1 1】

(2) 核酸プローブが、配列番号 8 ~ 1 2 に示す塩基配列のいずれかを有する(1)の核酸プローブ。

【0 0 1 2】

(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、 β_3 アドレナリン受容体をコードする核酸における、 β_3 アドレナリン受容体のアミノ酸配列の64位のトリプトファンがアルギニ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。

【0 0 1 3】

(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。

【0 0 1 4】

(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。

【0 0 1 5】

(6) 増幅を核酸プローブの存在下で行う(5)の方法。

【0 0 1 6】

(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 1 8 3 から始まる 1 5 ~ 3 0 塩基長の塩基配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識され、または、配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号 1 9 6 で終わる 2 0 ~ 3 0 塩基長の塩基配列を有し、3'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。

10

20

30

40

50

【0017】

(8) 核酸プローブが、配列番号8～12に示す塩基配列のいずれかを有する(7)のキット。

【0018】

(9) β アドレナリン受容体をコードする核酸における、 β アドレナリン受容体のアミノ酸配列の64位のトリプトファンがアルギニ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(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183から始まる15～30塩基長の塩基配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識され、または、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号196で終わる20～30塩基長の塩基配列を有し、3'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(B3AR Trp64Arg変異における野生型の塩基を有する配列)において塩基番号183から始まる15～30塩基長の塩基配列または配列番号2に示す塩基配列(B3AR Trp64Arg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196で終わる20～30塩基長の塩基配列を有する他は、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8～12に示すものが挙げられる。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。

【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、B3AR Trp64Arg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。

【0022】

本発明検出方法は、B3ARをコードするDNAのB3AR Trp64Arg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、通常の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。

【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、通常の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

10

20

30

40

50

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、 T_m 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。

【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 T_m 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 T_m 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】

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
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B3AR Trp64Arg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183から始まる15 ~ 30塩基長の塩基配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識され、または

10

20

30

40

50

、配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号 196 で終わる 20 ~ 30 塩基長の塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている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。

10

【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B3AR遺伝子のTrp64Arg変異の部位を含む塩基配列(配列番号1)に基づき、Trp64Arg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】

20

【表2】

プライマー

名称	配列(5' 3')	mer	位置	配列番号
R	gccagcgaagtcacgaacac	20	239-220	3
F	ggcgctggcggtgc	14	132-145	4

【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、B3AR Trp64Arg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又はTAMRA(商標)による標識は、常法に従って行った。

30

【0040】

【表3】

プローブ

名称	配列(5' 3')	mer	位置	配列番号
5FL-mt-4-16	(BODIPY FL)-ccatcgccCggactcc-(P)	16	182-197	5
3T-mt-4-16	ccatcgccCggactcc-(TAMRA)	16	182-197	5
5FL-mt-4-19	(BODIPY FL)-ccatcgccCggactccgag-(P)	19	182-200	6
3T-mt-3-19	gtcatcgctggccatcgccC-(TAMRA)	19	172-190	7
3T-mt-2-20	cgtagccatcgccCggactc-(TAMRA)	20	177-196	8
5FL-wt-1-20	(BODIPY FL)-catcgccTggactccgagac-(P)	20	183-202	9
5FL-wt-1-18	(BODIPY FL)-catcgccTggactccgag-(P)	18	183-200	10
5FL-wt-1-16	(BODIPY FL)-catcgccTggactccg-(P)	16	183-198	11
5FL-wt-1-15	(BODIPY FL)-catcgccTggactcc-(P)	15	183-197	12

40

【0041】

ゲノムDNAをサンプルとして、Smart Cycler System (Cepheid)を用い、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 ~ 495 nm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

50

H ₂ O	13.2 μL	
10 × Gene Taqバッファー	2.5 μL	
80% グリセロール	6.25 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	
5 μM プローブ	1 μL	
100 μM プライマーF	0.125 μL	
100 μM プライマーR	0.25 μL	
5U/ μL Gene Taq	0.125 μL	
サンプル (0 ~ 2000コピー)	1 μL	10
合計	25 μL	

【 0 0 4 3 】

【表 5】

反応条件

50 ,2min

95 ,2min

95 ,1sec

66 ,18sec (50cycles)

20

T_m解析 (1 /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3T-mt-2-20、5FL-wt-1-20、5FL-wt-1-18、5FL-wt-1-16及び5FL-wt-1-15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B3AR Trp64Arg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配列及びmutant配列は、それぞれ配列番号 1 及び 2 の塩基配列の塩基番号171 ~ 205である。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

30

【 0 0 4 5 】

以下、プローブ5FL-wt-1-16を用いて、ゲノムDNAの絶対量に関する感度、及び、再現性を検討した。

【 0 0 4 6 】

ゲノムDNA (野生型) をそれぞれ、0、20、200及び2000コピー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、変異型の塩基配列 (配列番号 2 に示す塩基配列) を有するゲノムDNAを調製した。野生型ゲノムDNAとこの変異型ゲノムDNAとを混合したサンプル(wt/mt)を 10 個調製し、野生型ゲノムDNAのみのサンプル(wt/wt)及び変異型ゲノムDNA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。

40

【 0 0 4 8 】

さらに、プローブ5FL-wt-1-16の代わりにプローブ3T-mt-2-20を用いて同様にゲノムDNAの絶対量に関する感度、及び、再現性を検討した。結果を図 5 及び 6 に示す。図 5 及び 6 から明らかのように、高感度で再現性に優れることが示された。

【 0 0 4 9 】

なお、図 3 ~ 6 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

50

温度()である。

【0050】

【発明の効果】

本発明によれば、B3AR Trp64Arg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B3AR Trp64Arg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。Tm解析は数十秒で完了するため、検出に必要な時間が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Tm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、さらに、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。

【0051】

【配列表】

<110> アークレイ株式会社(Arkray, Inc.)

<120> β 3 アドレナリン受容体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-B0926

10

<160> 12

<210> 1

<211> 1227

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> allele

<222> 190

<400> 1

atggctccgt ggccacacga gaacagctct ctigcccat ggccggacct cccaccctg	60	
gcgcccaata ccgccaacac cagtgggctg ccaggggttc cgtgggaggc ggccctagcc	120	30
ggggcccctgc tggcgcctggc ggtgctggcc accgtgggag gcaacctgct ggtcatcgtg	180	
gccatgcctt ggactccgag actccagacc atgaccaacg ttttcgtgac ttgcctggcc	240	
gcagccgacc tggatgatggg actcctgggt gtgccgccgg cggccacctt ggcctgact	300	
ggccactggc cgtggggcgc cactggctgc gagctgtgga cctcggigga cgtgctgtgt	360	
gtgaccgcca gcatcgaaac cctgtgcgcc ctggccgtgg accgctacct ggcctgacc	420	
aaccgcctgc gttacggcgc actggcacc aagcgcctgc cccggacagc tgggtccctg	480	
gtgtgggtcg tgcggccgc ggtgtcgttt gcgcccatca tgagccagtg gtggcgcgta	540	40
ggggccgacg ccgaggcgca gcctgccac tccaaccgc gctgctgtgc ctccgctcc	600	

aacatgccct acgigcigct gtctctctcc gtctcttctt accttctctt tctcgtgatg 660
 ctcttcgtct acgcgcgggt ttctcgtggt gctacgcgcc agctgcgctt gctgcgcggg 720
 gagctgggcc gctttccgcc cgaggagtct ccgccggcgc cgtcgcgctc tctggccccg 780
 gccccggigg ggacgtgcgc tccgcccgaa ggggigcccc cctgcggccg gcggccccgcg 840
 cgctctcigc ctctccggga acaccgggcc ctgtgcacct tgggtctcat catgggcacc 900
 ttactctct gctggttgcc cttctttctg gccaacgtgc tgcgcgccct ggggggcccc 960
 tctctagtc cgggccccgc ttctcttggc ctgaactggc taggttatgc caattctgcc 1020
 ttcaaccgc tcatctactg ccgcagcccg gactttcgca gcgccttcg ccgtctctg 1080
 tgcgcctgcg gccgtgcct gctctcggag ccttgcgccg ccgcccgccc ggccctcttc 1140
 cctcggggcg ttctcgggc ccggagcagc ccagcgcagc ccaggcttgg ccaacggctc 1200
 gacggggctt ctggggagt ttcttag 1227

10

- <210> 2
- <211> 1227
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

20

- <220>
- <221> allele
- <222> 190

30

- <400> 2

atggctccgt ggcttcacga gaacagctct ctigccccat ggccggacct cccacccctg 60
 gcgcccata ccgccaacac cagtgggctg ccaggggttc cgtgggaggc ggccctagcc 120
 ggggcccigc tggcgciggc ggigcigggc accgiggag gcaaccigt ggtcatcgtg 180
 gccatgccc ggactccgag actccagacc atgaccaacg tgttcgtgac ttcgctggcc 240
 gcagccgacc tggigatggg actcciggtg gtcgcccgcc cggccacctt ggcctgact 300
 ggccactggc cgttgggcgc cactggctgc gactgtgga cctcgggtgga cgtgctgtgt 360
 gtgaccgcca gcatcgaaac cctgtgcgcc ctggccgigg accgtacctt ggcctgacc 420

40

aaccgcctgc gttacggcgc actggtcacc aagcctgcg cccggacagc tgtggctctg	480	
gtgtgggtcg tctcggccgc ggtgtcgttt gcgccatca tgagccagtg gtggcgcgta	540	
ggggccgacg ccgaggcgca gcctgccac tccaaccgcg gctgctgtgc cttegcctcc	600	
aacatgccct acgtgctgct gtctctctcc gtctctctct accttctctt tctctgtagt	660	
ctcttcgtct acgcgcgggt tttcgtggtg gctacgcgcc agctgcgctt gctgcgcggg	720	
gagctgggcc gctttccgcc cgaggagtct ccgccggcgc cgtcgcgctc tctggccccg	780	
gccccgggtg ggacgtgcgc tccgccgaa ggggtgcccc cctgcggccg gcggccccgcg	840	10
cgctctctgc ctctccggga acaccgggcc ctgtgcacct tgggtctcat catgggcacc	900	
ttcactctct gctggttgcc ctctttctg gccaacgtgc tgcgcgccct ggggggcccc	960	
tctctagctc cgggccccgc tttccttgcc ctgaactggc taggttatgc caattctgcc	1020	
ttcaaccgcg tcatctactg ccgcagcccg gactttcgca gcgccttccg ccgtctctg	1080	
tgccctgcg gccgtgcct gctccggag ccttgcgccg ccgccgccg ggccctcttc	1140	
ccctcgggcg ttcttgcggc ccggagcagc ccagcgcagc ccaggctttg ccaacggctc	1200	
gacggggctt ctggggagt ttcttag	1227	20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

gccagcgaag tcacgaacac	20	
-----------------------	----	--

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

30

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

ggcgctggcg gtgc

14

10

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

20

<400> 5

ccatgccccg gactcc

16

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

30

<400> 6

ccatgccccg gactccgag

19

40

<210> 7		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		10
<223> probe		
<400> 7		
gtcatcgtgg ccatcgccc	19	
<210> 8		
<211> 20		20
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> probe		
<400> 8		30
cgtggccatc gcccgactc	20	
<210> 9		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		40
<220>		

<223> probe

<400> 9

catcgccctgg actccgagac

20

<210> 10

<211> 18

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 10

20

catcgccctgg actccgag

18

<210> 11

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> probe

<400> 11

catcgccctgg actccg

16

<210> 12

40

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 12

catcgccctgg actcc

10

15

【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 (プローブ 5FL-wt-1-16 使用) 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 (プローブ 5FL-wt-1-16 使用) の再現性を示す。

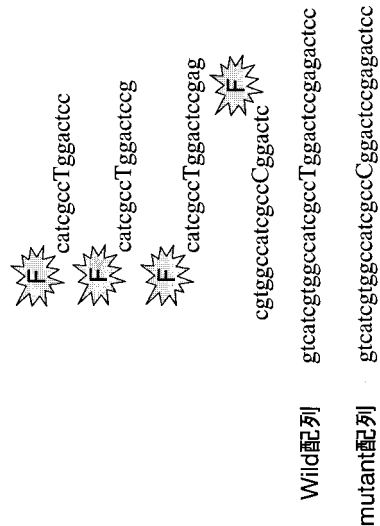
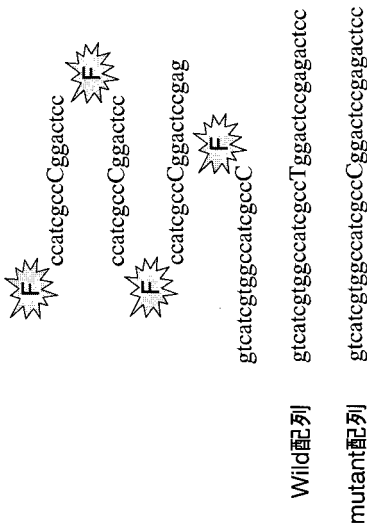
【図 5】 実施例 1 の方法 (プローブ 3T-mt-2-20 使用) のゲノム DNA の絶対量に関する感度を示す。

20

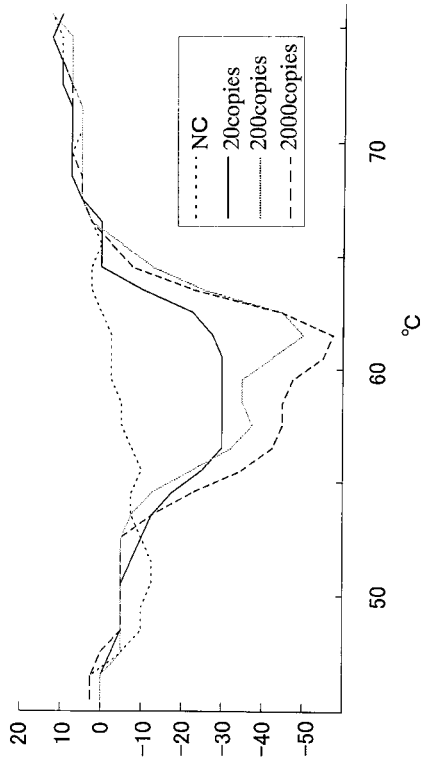
【図 6】 実施例 1 の方法 (プローブ 3T-mt-2-20 使用) の再現性を示す。

【 図 1 】

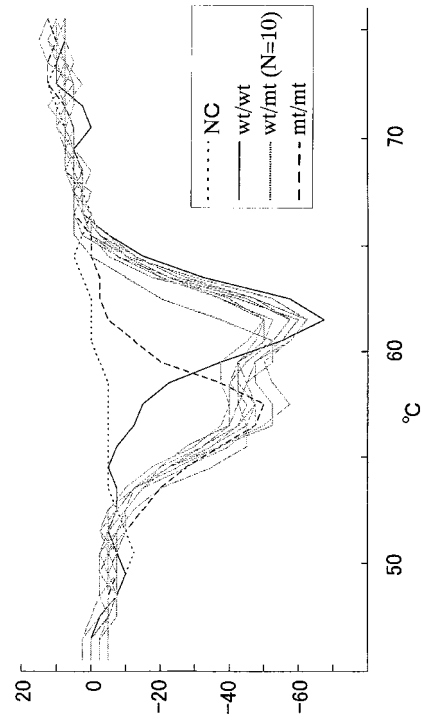
【 図 2 】



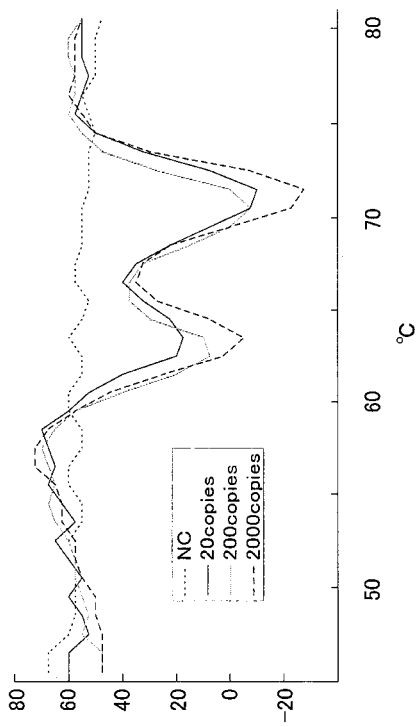
【 図 3 】



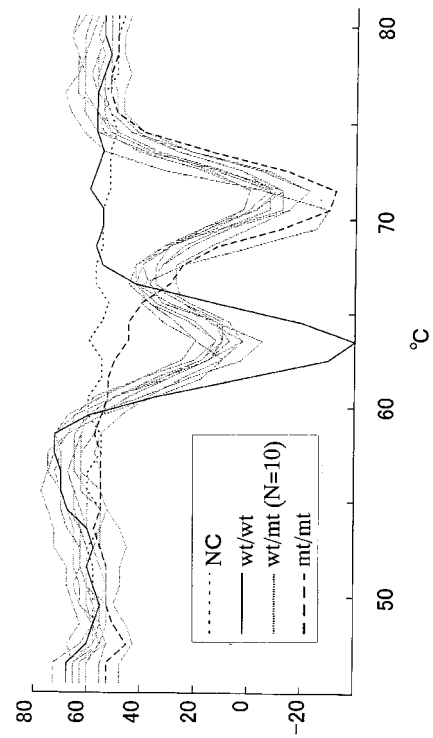
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/58 (2006.01)		G 0 1 N 33/566	
		G 0 1 N 33/58	A

(56)参考文献 特開2001-286300(JP,A)
 特開2002-119291(JP,A)
 国際公開第96/036641(WO,A1)
 特開2002-034598(JP,A)
 特表2001-513623(JP,A)
 国際公開第02/029379(WO,A1)
 特開2001-037489(JP,A)
 特開2000-509608(JP,A)
 Clinical Chemistry, 2000年, Vol.46, No.5, pp.631-635
 Clinical Biochemistry, 2002年, Vol.35, pp.35-40

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09
 C12Q 1/68
 G01N 21/64
 G01N 21/78
 G01N 33/53
 G01N 33/566
 G01N 33/58