

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3681729号
(P3681729)

(45) 発行日 平成17年8月10日(2005.8.10)

(24) 登録日 平成17年5月27日(2005.5.27)

(51) Int.C1.⁷

F 1

C12N 15/09
C12Q 1/68C12N 15/00
C12Q 1/68Z N A A
A

請求項の数 24 (全 45 頁)

(21) 出願番号 特願2002-565143 (P2002-565143)
 (86) (22) 出願日 平成14年2月14日 (2002.2.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2002/001222
 (87) 国際公開番号 WO2002/064833
 (87) 国際公開日 平成14年8月22日 (2002.8.22)
 審査請求日 平成15年8月7日 (2003.8.7)
 (31) 優先権主張番号 特願2001-39268 (P2001-39268)
 (32) 優先日 平成13年2月15日 (2001.2.15)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2001-40721 (P2001-40721)
 (32) 優先日 平成13年2月16日 (2001.2.16)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2001-101055 (P2001-101055)
 (32) 優先日 平成13年3月30日 (2001.3.30)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 302019245
 タカラバイオ株式会社
 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100116311
 弁理士 元山 忠行
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 繁史
 (72) 発明者 佐川 裕章
 滋賀県草津市西渋川2丁目6-32
 (72) 発明者 小林 英二
 滋賀県大津市一里山6丁目18-19
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 塩基置換の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的核酸上の特定の塩基における塩基置換の有無を検出する方法であつて、

(1) 標的核酸を含有する試料とヌクレオチドとを混合する工程：ここで当該ヌクレオチドは、

A) その3'末端が当該末端からのDNAポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されており、

B) 標的核酸上の前記特定の塩基を含有する領域にアニーリングしうる塩基配列を有しており、

C) 当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在する場合にはヌクレオチドはヌクレアーゼによる切断を受けず、かつ、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合にはヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて新たな3'末端を生じるような配列を含有しており、

(2) 前記混合物をヌクレアーゼ、およびDNAポリメラーゼで処理する工程：および

(3) ヌクレアーゼによるヌクレオチドの切断の有無を検出する工程、
を包含することを特徴とする塩基置換の検出方法。

【請求項2】

ヌクレアーゼとしてリボヌクレアーゼH、ヌクレオチドとして特定の塩基に対応する塩基を含有する領域にリボヌクレオチドを含有するヌクレオチドを使用する請求項1記載の塩

10

20

基置換の検出方法。

【請求項 3】

ヌクレアーゼとして制限酵素、ヌクレオチドとして特定の塩基に対応する塩基を含有する領域に制限酵素の認識配列を含有するヌクレオチドを使用する請求項 1 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 4】

標的核酸に塩基置換が存在しない場合に、標的核酸と形成される複合体にミスマッチを生じないような配列を有するヌクレオチドが使用される請求項 1 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 5】

標的核酸に塩基置換が存在する場合に、標的核酸と形成される複合体にミスマッチを生じないような配列を有するヌクレオチドが使用される請求項 1 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 6】

D N A ポリメラーゼの作用によって生成する伸長産物の有無によってヌクレオチドの切断が検出される請求項 1 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 7】

ヌクレアーゼの作用によって生成する遊離したヌクレオチドの 3' 側断片の有無によってヌクレオチドの切断が検出される請求項 1 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 8】

ヌクレオチドに標識化合物が付加されており、該標識を用いてヌクレオチドの切断が検出される請求項 1 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 9】

標識化合物が、ヌクレオチドのヌクレアーゼによる切斷箇所の 3' 側部分に付加されていることを特徴とする請求項 8 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 10】

標識化合物が、ヌクレオチドのヌクレアーゼによる切斷箇所の 5' 側部分に付加されていることを特徴とする請求項 8 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 11】

ヌクレオチドに標識化合物として蛍光物質が付加されている請求項 8 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 12】

さらに、蛍光を消光しうる物質がヌクレオチドに付加されており、ヌクレアーゼによる切斷に伴って蛍光が発生する請求項 11 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 13】

蛍光偏光法によってヌクレオチドの切斷を検出することを特徴とする請求項 11 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 14】

ヌクレオチドの 3' 末端の修飾が、リボースの 3 位の水酸基の修飾である請求項 1 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 15】

ヌクレオチドが、ヌクレオチドアナログ及び / 又は修飾ヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項 1 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 16】

ヌクレオチドアナログが、デオキシリボイノシンヌクレオチドあるいはデオキシリボウラシルヌクレオチドであり、修飾リボヌクレオチドが (- S) リボヌクレオチドである請求項 15 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 17】

D N A ポリメラーゼの作用によって生成する伸長産物を鑄型とした核酸增幅の工程をさらに包含する請求項 1 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

請求項 1 7 記載の塩基置換の検出方法を用いた対立遺伝子の遺伝子型を解析する方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 記載の塩基置換の検出方法に使用されるキットであって、下記 A) ~ C) 記載のヌクレオチドを含有することを特徴とするキット：

A) その 3' 末端が当該末端からの DNA ポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されており、

B) 標的核酸上の前記特定の塩基を含有する領域にアニーリングしうる塩基配列を有しており、

C) 当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在する場合にはヌクレオチドはヌクレアーゼによる切断を受けず、かつ、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合にはヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて新たな 3' 末端を生じるような配列を含有する。10

【請求項 2 0】

ヌクレアーゼおよび / または DNA ポリメラーゼを含有することを特徴とする 請求項 1 9 記載のキット。

【請求項 2 1】

DNA 伸長の有無を検出するための試薬をさらに含有する 請求項 1 9 記載のキット。

【請求項 2 2】

核酸增幅法を実施するための試薬をさらに含有する 請求項 1 9 記載のキット。20

【請求項 2 3】

請求項 1 記載の塩基置換の検出方法に使用される反応液であって、下記 A) ~ C) 記載のヌクレオチドを含有することを特徴とする反応液：

A) その 3' 末端が当該末端からの DNA ポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されており、

B) 標的核酸上の前記特定の塩基を含有する領域にアニーリングしうる塩基配列を有しており、

C) 当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在する場合にはヌクレオチドはヌクレアーゼによる切断を受けず、かつ、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合にはヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて新たな 3' 末端を生じるような配列を含有する。30

【請求項 2 4】

ヌクレアーゼおよび / または DNA ポリメラーゼを含有することを特徴とする 請求項 2 3 記載の反応液。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は遺伝子上の塩基置換の検出に有用なヌクレオチド、該ヌクレオチドを使用する遺伝子上の塩基置換の検出方法、ならびにそのためのキットに関する。

背景技術40

同一種に属する生物個体のゲノム上に含有される遺伝暗号は同一ではなく、多型 (polymorphism) と呼ばれる塩基配列上の差違が存在することが知られている。多型には 1 ~ 数十塩基の欠失や挿入、特定の塩基配列が重複するものなどが知られているが、1 個の塩基が他の塩基に置換されているものは一塩基置換多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) と呼ばれている。

一塩基置換多型は数百塩基から 1 0 0 0 塩基に 1 ケ所程度の割合で存在するといわれ、ヒトのゲノム上には 3 0 0 万 ~ 1 0 0 0 万の SNP があると推定されている。SNP は疾病に関連する遺伝子の探索、疾病へのかかりやすさ、薬に対する感受性 (作用、副作用) の違いを知るために指標として注目されており、その検出方法についても研究が進められている。50

従来の SNP の検出手段は、ハイブリダイゼーションに基づくもの、プライマー伸長に基づくものあるいは酵素の基質特異性を利用するものに大別される。

ハイブリダイゼーション法は、塩基置換の有無を核酸試料とプローブとのハイブリダイゼーションによって検出するものである。該方法は一塩基の違いによってハイブリダイゼーションが左右されるようなプローブ、ならびにハイブリダイゼーション条件を見出す必要があり、高い再現性を有する検出系の構築が困難である。

例えば、米国特許第 5 6 6 0 9 8 8 号公報記載のサイクルプロープ反応 (cycle probe reaction) を用いた変異検出方法が挙げられる。該方法においては、開裂し易い結合を有する核酸プロープを目的とする核酸分子にハイブリダイズさせる。目的とする核酸分子中に塩基置換がない場合には、当該プロープは開裂し、塩基置換がある場合には、当該プロープは開裂しない。その後、開裂したプロープ由來の遊離断片の発生度合いを検出、定量することにより塩基置換を検出することを特徴とする。しかしながら、該方法では標的核酸が微量の場合、該プロープの開裂化物の量が少ないため開裂化物量が検出できるレベルに到達するまでに相当のタイムラグがある。10

別法として、米国特許第 5 2 1 0 0 1 5 号、第 5 4 8 7 9 7 2 号公報記載の TaqMan 法を用いた変異検出方法が挙げられる。該方法では、蛍光色素及びクエンチャーが付加した TaqMan プロープを使用する。該プロープは、塩基置換を含むものと、塩基置換を含まないものの 2 種類を使用する。該プロープを目的とする核酸分子にハイブリダイズさせ、その上流からプライマーが伸長してくると、DNA ポリメラーゼの 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性により、目的とする核酸分子が塩基置換を含まない場合のみ、当該プロープが分解され、発生する蛍光を検出することにより塩基置換を検出することを特徴とする。しかしながら、該方法において、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ、ならびに 3' 末端がプロックされた標識ヌクレオチドを用いて PCR を行う必要があり、厳密な温度調整が必要であり、検出するまでに要する時間も長いという問題がある。20

酵素を利用する方法としては、まず DNA ポリメラーゼを使用する方法があり、該方法にはさらに (1) 米国特許第 5 1 3 7 8 0 6 号公報記載の塩基置換を検出しようとする塩基部分に 3' 末端がアニーリングするプライマーを使用し、プライマー伸長反応の有無から塩基置換を検出する方法、(2) 国際公開パンフレット第 0 1 / 4 2 4 9 8 号記載の 3' 末端から 2 番目のヌクレオチドに検出しようとする塩基置換部位が位置するプライマーを使用し、プライマー伸長反応の有無から塩基置換を検出する方法、(3) 塩基置換を検出しようとする塩基の 3' 側に隣接する塩基に 3' 末端がアニーリングするプライマーを使用し、当該プライマーに取り込まれる塩基を判別して目的部分の変異の有無とその塩基を決定する方法、の 3 つがある。30

次に、DNA リガーゼを使用する方法がある。当該方法はプロープの末端部分を塩基置換を検出しようとする塩基部分に対応させることにより、ここに隣接したプロープとのライゲーションの有無から塩基置換を検出する。

DNA ポリメラーゼ、DNA リガーゼを使用する方法は、塩基置換に基づくプライマーもしくはプロープと標的核酸の間のミスマッチを正確に検出できない可能性がある。すなわち、これらの酵素はミスマッチを有するプライマー、プロープの場合でも酵素反応を開始し、誤った結果を与えることがある。40

すなわち、標的核酸と当該プライマーとのアニーリングエラー及び使用するリガーゼあるいはポリメラーゼのエラーに起因する擬陽性の場合があり、反応条件特に反応温度等を非常に厳密にコントロールする必要があり、再現性に問題がある。

最後に、米国特許第 5 8 4 6 7 1 7 号記載のインベーダー (Invader) 法のように、二本鎖核酸の特殊な構造を認識して切断する活性を有する酵素を利用する方法が挙げられる。このような酵素としては cleavase が知られており、塩基置換が存在する (あるいは存在しない) 場合に当該酵素に認識されるような構造を形成するプロープを設計し、当該プロープの切断を調べることによって塩基置換を検出することが可能である。しかしながら、二本鎖核酸の特殊な構造を認識して切断する活性を有する酵素を使用する方法はその50

感度に問題を有する。すなわち、当該方法は異分子の標的核酸から1つのシグナルが生成する方法であり、微量の核酸試料からでは塩基置換の検出に十分なシグナルを得られない。もちろんプローブ切断反応を反復してシグナルを増強することも可能であるが、強いシグナルを得るためにには前もって標的核酸を增幅する必要がある。すなわち、該方法では標的核酸が微量の場合、該プローブの切断物の量が少ないため該切断物量が検出できるレベルに到達するまでに相当のタイムラグがある。

以上のように、上記の方法はいくつかの問題点を有しており、塩基置換を正確に検出できる方法が求められていた。

発明の目的

従って本発明の目的は、上記方法の問題を解決し、微量の核酸試料を使用して正確、かつ
再現性に優れた塩基置換、例えばS N Pを検出する手段を提供することにある。
10

発明の概要

上記課題を解決するためには、塩基置換を正確に検出し、かつその結果を強いシグナルとして得ることが可能な方法が望まれている。

本発明者らは、塩基置換を検出しようとする標的核酸にアニーリング可能であり、インタクトな状態ではその3'末端からはDNAポリメラーゼによるDNA伸長反応が開始されることはなく、かつ、アニーリングした鑄型鎖の塩基配列に応じてヌクレアーゼによる切断が左右されるようなヌクレオチドを作成した。さらに、当該ヌクレオチドを使用した、標的核酸上の塩基置換を正確、かつ高感度に検出可能な方法を構築し、本発明を完成させた。
20

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は標的核酸上の特定の塩基における塩基置換の有無を検出する方法に関し、

(1) 標的核酸を含有する試料とヌクレオチドとを混合する工程：ここで当該ヌクレオチドは、

A) その3'末端が当該末端からのDNAポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されており、

B) 標的核酸上の前記特定の塩基を含有する領域にアニーリングしうる塩基配列を有しており、

C) 当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合にはヌクレオチドはヌクレアーゼによる切断を受けず、かつ、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在する場合にはヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて新たな3'末端を生じるような配列を含有しており、
30

(2) 前記混合物をヌクレアーゼ、およびDNAポリメラーゼで処理する工程：および

(3) ヌクレアーゼによるヌクレオチドの切断の有無を検出する工程、

を包含することを特徴とする。

第1の発明の塩基置換の検出方法としては、ヌクレアーゼとしてリボヌクレアーゼH、又
クレオチドとして特定の塩基に対応する塩基を含有する領域にリボヌクレオチドを含有する
ヌクレオチドを使用する方法、ヌクレアーゼとして制限酵素、ヌクレオチドとして特定の
塩基に対応する塩基を含有する領域に制限酵素の認識配列を含有するヌクレオチドを使用する方法が例示される。
40

本発明の第2の発明は標的核酸の塩基置換の検出方法に関し、

(1) 標的核酸を含有する試料とヌクレオチドとを混合する工程：ここで当該ヌクレオチドは、

A) その3'末端が当該末端からのDNAポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されており、

B) 標的核酸上の前記特定の塩基を含有する領域にアニーリングしうる塩基配列を有しており、

C) 当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在する場合にはヌクレオチ
50

ドはヌクレアーゼによる切断を受けず、かつ、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合にはヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて新たな3'末端を生じるような配列を含有しており、

- (2) 前記混合物をヌクレアーゼ、およびDNAポリメラーゼで処理する工程：および
- (3) ヌクレアーゼによるヌクレオチドの切断の有無を検出する工程、
を包含することを特徴とする。

第2の発明の検出方法としては、ヌクレアーゼとしてミスマッチ特異的ヌクレアーゼを使用する方法が例示される。

第1、第2の発明の検出方法に使用されるヌクレオチドは、標的核酸に塩基置換が存在しない場合に標的核酸と形成される複合体にミスマッチを生じないような配列を有するヌクレオチド、標的核酸に塩基置換が存在する場合に標的核酸と形成される複合体にミスマッチを生じないような配列を有するヌクレオチドのいずれであってもよい。
10

第1、第2の発明の態様としては、DNAポリメラーゼの作用によって生成する伸長産物の有無によって塩基置換の有無を判定する方法、ヌクレアーゼの作用によって生成する遊離したヌクレオチドの3'側断片の有無によって塩基置換の有無を判定する方法が例示される。また、標識されたヌクレオチドを使用し、当該標識を利用して前記伸長産物、もしくは前記のヌクレオチドの3'側断片を検出することが可能である。前記標識には蛍光物質を使用することができる。さらに、蛍光物質、蛍光を消光しうる物質が付加されており、ヌクレアーゼによる切断、もしくはそれに続くDNAの伸長によって蛍光を発するヌクレオチドを使用することも可能である。前記蛍光標識されたヌクレオチドを使用する態様においては、検出に蛍光偏光法を利用することができます。
20

第1、第2の発明の塩基置換の検出方法に使用されるヌクレオチドにおいて、3'末端の修飾としてはリボースの3位の水酸基の修飾が例示される。また、本発明の塩基置換の検出方法に使用されるヌクレオチドは、ヌクレオチドアナログ及び/又は修飾ヌクレオチドを含有していてもよい。該ヌクレオチドアナログとしては特に限定はされないが例えば、デオキシリボイノシンヌクレオチドあるいはデオキシリボウラシルヌクレオチド等が、修飾リボヌクレオチドとしては(-S)リボヌクレオチドが好適に使用できる。さらに、
第1、第2の発明の方法には、DNAポリメラーゼの作用によって生成する伸長産物を鑄型とした核酸增幅の工程をさらに包含することができる。

本発明の第3の発明は、本発明の第1、第2の発明の塩基置換の検出方法を用いた対立遺伝子の遺伝子型を解析する方法に関する。
30

本発明の第4の発明は標的核酸上の特定の塩基における塩基置換の検出に使用されるヌクレオチドに関し、

A) その3'末端が当該末端からのDNAポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されており、

B) 標的核酸上の前記特定の塩基を含有する領域にアニーリングしうる塩基配列を有しており、

C) 当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在する場合にはヌクレオチドはヌクレアーゼによる切断を受けず、かつ、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合にはヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて新たな3'末端を生じるような配列を含有する、
40

ことを特徴とするヌクレオチドに関する。

第4の発明のヌクレオチドとしては、標的核酸上の特定の塩基に対応する塩基を含有する領域にリボヌクレオチドを含有し、当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合にはリボヌクレアーゼHによって切断されるもの、標的核酸上の特定の塩基にに対応する塩基を含有する領域に制限酵素の認識配列を含有し、当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合には制限酵素によって切断されるも
50

のが例示される。

本発明の第5の発明は標的核酸上の特定の塩基における塩基置換の検出に使用されるヌクレオチドであって、

A) その3'末端が当該末端からのDNAポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されており、

B) 標的核酸上の前記特定の塩基を含有する領域にアニーリングしうる塩基配列を有しており、

C) 当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合にはヌクレオチドはヌクレアーゼによる切断を受けず、かつ、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在する場合にはヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて新たな3'末端を生じるような配列を含有する、

ことを特徴とするヌクレオチド。

第5の発明のヌクレオチドとしては、標的核酸と形成される複合体において標的核酸との間にミスマッチが存在する場合にミスマッチ特異的ヌクレアーゼにより切断されるヌクレオチドが例示される。

第4、第5の発明のヌクレオチドは、標的核酸に塩基置換が存在しない場合に、標的核酸と形成される複合体にミスマッチを生じないような配列を有するもの、標的核酸に塩基置換が存在する場合に、標的核酸と形成される複合体にミスマッチを生じないような配列を有するもののいずれであってもよい。

また、第4、第5の発明のヌクレオチドは標識化合物が付加されたものでもよく、その位置はヌクレアーゼによる切断箇所の3'側部分あるいは5'側部分のいずれであってもよい。前記標識化合物としては、例えば蛍光物質を使用することができ、さらに、蛍光を消光しうる物質が付加することにより、ヌクレアーゼによる切断、もしくはそれに続くDNAの伸長によって蛍光を発するヌクレオチドとができる。

第4、第5の発明のヌクレオチドにおいて、3'末端の修飾としてはリボースの3位の水酸基の修飾が例示される。また、本発明のヌクレオチドは、ヌクレオチドアナログ及び/又は修飾ヌクレオチドを含有していてもよい。該ヌクレオチドアナログとしては特に限定はされないが例えば、デオキシリボイノシンヌクレオチドあるいはデオキシリボウラシルヌクレオチド等が、修飾ヌクレオチドとしては(-S)リボヌクレオチドが好適に使用できる。

本発明の第6の発明は標的核酸上の塩基置換の検出に使用されるキットに関し、第4、第5の発明のヌクレオチドを含有することを特徴とする。

第6の発明のキットとしては、ヌクレアーゼおよび/またはDNAポリメラーゼを含有するもの、DNA伸長の有無を検出するための試薬をさらに含有するもの、核酸増幅法を実施するための試薬をさらに含有するものが挙げられる。

【図面の簡単な説明】

図1：本発明の塩基置換の検出方法による、ヒト遺伝子上の塩基置換の検出の結果を示す図である。

図2：本発明の塩基置換の検出方法による、ヒト遺伝子上の塩基置換の検出の結果を示す図である。

図3：本発明の塩基置換の検出方法による、ヒト遺伝子上の塩基置換の検出の結果を示す図である。

図4：本発明の塩基置換の検出方法による、ヒト遺伝子上の塩基置換の検出の結果を示す図である。

図5：本発明の塩基置換の検出方法による、ヒト遺伝子上の塩基置換の検出の結果を示すグラフである。

図6：本発明の塩基置換の検出方法による、ヒト遺伝子上の塩基置換の検出の結果を示す図である。

図7：本発明の塩基置換の検出方法による、ヒト遺伝子上の塩基置換の検出の結果を示す

10

20

30

40

50

図である。

図8：本発明の塩基置換の検出方法による、ヒト遺伝子上の塩基置換の検出の結果を示す図である。

発明の詳細な説明

本明細書に記載の「塩基置換」とは、核酸上の特定の部位において、その一部の塩基が他の塩基に置換されていることを指す。「塩基置換」により生物個体間の遺伝情報の違いが生じ、この遺伝情報の違いは多型（polymorphism）、もしくはバリエーション（variation）と呼ばれている。本明細書において「塩基置換」とは、上記の多型、バリエーションにおける塩基置換を包含する。また、核酸に入為的に導入された塩基置換も本明細書における「塩基置換」に含まれる。

10

本明細書に記載の「塩基置換」において、置換されている塩基の数には特に限定はなく、1塩基もしくはそれ以上の置換が存在してもよい。

本発明は、ゲノム多型やバリエーションの検出、特に、遺伝子上のS N P（一塩基置換多型）の検出に特に好適である。

以下に本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明のヌクレオチド

本発明のヌクレオチドは標的核酸上の塩基置換を検出しようとする箇所を含む領域にアニーリングしうる塩基配列を有している。インタクトな状態ではDNAポリメラーゼによるDNA伸長のプライマーとして機能することはないが、ヌクレアーゼによって切断を受けた後に初めてプライマーとして機能することができる。上記のような性質を有するものであればその鎖長には特に限定はなく、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドのいずれもが本発明に使用できる。通常、8～50塩基、好ましくは10～40塩基、特に好ましくは12～30塩基のオリゴヌクレオチドが本発明のヌクレオチドとして使用される。

20

本発明のヌクレオチドは、通常、デオキシリボヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチドである。必要に応じ、リボヌクレオチド、ヌクレオチドのアナログや誘導体（修飾物）を含有することができる。ヌクレオチドのアナログとしては、例えば塩基部分にイノシン、7-デアザグアニン等の塩基を有するヌクレオチドアナログあるいはリボースの誘導体を有するヌクレオチドアナログを使用することができる。また、修飾ヌクレオチドとしてはリン酸基に結合する酸素原子が硫黄原子に置換された（-S）ヌクレオチドや標識化合物が付加されたヌクレオチド等が例示される。さらに、本発明のヌクレオチドはペプチド核酸[PNA、Peptide Nucleic Acid、ネイチャー（Nature）、第365巻、第566～568頁（1993）]を含有するものであってもよい。本発明を特に限定するものではないが、好ましくは、上記のヌクレオチドのアナログや誘導体等は使用されるヌクレアーゼの作用に影響を与えない部位に導入される。本発明のヌクレオチドへのヌクレオチドアナログの導入は、ヌクレオチド自身の高次構造形成の抑制、標的核酸とヌクレオチドとのアニーリングの安定化の観点から有効である。すなわち、本発明の塩基置換の検出方法に用いることのできるヌクレオチドとしての機能を保持する範囲で、ヌクレオチドアナログ及び／又は修飾ヌクレオチドを含んでいてもよい。

30

本発明において使用されるヌクレオチドは、標的核酸上の特定の塩基における塩基置換を検出するために、下記に示すような性質を有している。

40

A) その3'末端が当該末端からのDNAポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されている。

B) 標的核酸上の前記特定の塩基を含有する領域にアニーリングしうる塩基配列を有している。

C) 当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応する、すなわち該塩基と水素結合を形成するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在する（または存在しない）場合にはヌクレオチドはヌクレアーゼによる切断を受けず、かつ、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない（または存在する）場合にはヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて新たな3'末端を生じるような配列を含有している。

50

ここで、ヌクレアーゼにより切断されたヌクレオチドの 5' 側断片は標的核酸とアニーリングした状態を保持することができる。また、このヌクレオチドの 5' 側断片の 3' 末端ではリボースまたはデオキシリボースの 3 位に水酸基が存在しており、該末端からの DNA ポリメラーゼによる DNA 伸長が可能である。すなわち、上記ヌクレオチドはヌクレアーゼによって切斷される塩基配列を有する場合にはプライマーの前駆体として機能する。上記のように、本発明のヌクレオチドはその 3' 末端が DNA ポリメラーゼによる DNA 伸長反応に使用できない形に修飾されている。上記目的を達成可能であればその修飾手段には特に限定はないが、例えば、3' 末端にジデオキシヌクレオチド、リボースの 3 位の水酸基が修飾されたヌクレオチド、DNA ポリメラーゼによる伸長が立体障害により妨害されるような修飾を付されたヌクレオチド等を附加することがあげられる。上記のヌクレオチドのリボースの 3 位の水酸基の修飾方法としては、アルキル化やその他の公知の修飾方法を利用することができ、例えばアミノアルキル化することにより、DNA 伸長反応を防ぐことができる。

また、本発明のヌクレオチドは、使用される条件において標的核酸の塩基置換を検出しようとする領域にアニーリングしうる塩基配列を有している。すなわち、標的核酸と実質的に相補的な配列を有していればよく、目的とする塩基における置換の検出に支障をきたさない範囲であれば標的核酸に完全に相補的な塩基配列を有している必要はない。

上記の本発明のヌクレオチドを標的核酸とアニーリングさせ、適切なヌクレアーゼと DNA ポリメラーゼの存在下にインキュベートを行った場合、標的核酸に塩基置換が存在するか否か、すなわち当該ヌクレオチドと標的核酸とがアニーリングして形成された二本鎖核酸にミスマッチ部位が存在するか否かでヌクレオチドの切斷が左右される。ヌクレオチドが切斷されて新たな 3' 末端が生じた場合にのみ標的核酸を鋳型とした DNA 伸長が起こることから、DNA 伸長の有無によってミスマッチの有無、すなわち塩基置換の有無を知ることができる。

本発明においては、検出しようとする塩基置換が存在する場合にミスマッチが生じるように前記ヌクレオチドを作成すること、逆に塩基置換が存在した場合にはミスマッチが生じないように作成することのどちらも可能である。さらに、目的の塩基に対応する位置に 4 種の塩基のいずれかを配置した 4 種のヌクレオチドを作成して使用し、どの塩基を有するプライマーで伸長が起こるかを調べることにより、塩基置換の存在と置換している塩基の種類とを同時に知ることもできる。

本発明のヌクレオチドは、上記のようにヌクレアーゼによる切斷によって DNA 伸長が可能なプライマーに変換される。ここで、ヌクレオチドのヌクレアーゼによる切斷箇所より 5' 側の部分が DNA 伸長におけるプライマーとして機能する。当該ヌクレアーゼとしては、ヌクレオチドと標的核酸とがアニーリングして形成された二本鎖核酸中のミスマッチの存在に対応して前記ヌクレオチドを切斷もしくは切斷しないものであれば特に限定はないが、例えば、リボヌクレアーゼ H、制限酵素、ミスマッチ特異的ヌクレアーゼ等があげられる。

リボヌクレアーゼ H (RNase H) は DNA と RNA から形成された二本鎖核酸を認識し、RNA 鎖を選択的に切斷する酵素である。本発明のヌクレオチドの置換を検出しようとする塩基に対応する部分にリボヌクレオチドを配置しておくことにより、ミスマッチが存在しない場合にのみリボヌクレアーゼ H で切斷されるヌクレオチドとができる。

本発明に使用されるリボヌクレアーゼとしては、上記のリボヌクレオチドを含有する本発明のヌクレオチドと、これと相補的な DNA から形成された二本鎖核酸を認識し、当該リボヌクレオチド部分を選択的に切斷する活性を有していれば特に限定はない。このような酵素としては、例えば、大腸菌由来のリボヌクレアーゼ H の他、好熱性バチルス属細菌、サーマス属細菌、ピロコッカス属細菌、サーモトガ属細菌あるいはアルカエオグロバス属細菌等由来のリボヌクレアーゼ H 等も好適に使用できる。リボヌクレアーゼ H は、同時に使用される DNA ポリメラーゼと同じ反応条件で高い活性を示すものが好ましいが、特に限定されるものではない。本発明のヌクレオチドを核酸增幅反応と組み合わせて使用する

10

20

30

40

50

場合には、当該反応の実施される条件において活性を示すリボヌクレアーゼHを使用することが好ましく、例えば、PCR法のような高温での反応、処理を含む核酸増幅反応を利用する場合には耐熱性リボヌクレアーゼHを使用することが有利である。耐熱性リボヌクレアーゼHとしては、例えばバチルス・カルドテナクス (*Bacillus caldotenax*)、ピロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*)、ピロコッカス・ホリコシイ (*Pyrococcus horikoshii*)、サーモコッカス・リトラリス (*Thermococcus litoralis*)、サーモトガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*)、アルカエオグロバス・フルギダス (*Archaeoglobus fulgidus*)、メタノコッカス・ヤナシ (*Methanococcus jannashi*) 由来のリボヌクレアーゼH等を使用することができる。

制限酵素はDNAの特定の塩基配列(4~8塩基)を認識し、当該配列内部、もしくはその周辺部を切断する酵素である。置換を検出しようとする塩基部分が制限酵素の認識配列と重複する場合には、当該配列を含むヌクレオチドを作成し、塩基置換の検出に使用することができる。ヌクレオチドと標的核酸との間にミスマッチが生じる場合には制限酵素による切断が起こらず、これによって塩基置換の有無を知ることができる。このようなヌクレオチドを使用するにあたっては標的核酸側が制限酵素によって切断を受けないようにする必要があるが、使用する制限酵素に対応する修飾メチラーゼを使用して特定の塩基をメチル化するなどの方法により、標的核酸特異的に制限酵素への耐性を付与することができる。

上記の2種のヌクレアーゼとは逆に、標的核酸とヌクレオチドとの間のミスマッチを認識して切断するような酵素を使用してもよい。このような酵素としてはMutH等を使用することができる。

本発明のヌクレオチドが上記のヌクレアーゼによる切断を受け、新たな3'末端が生じると、当該末端よりDNAの伸長が開始される。この工程に使用されるDNAポリメラーゼとしては、鋳型DNAの配列に依存してプライマーの3'末端よりDNA伸長が可能なものであれば特に限定はない。例えば、大腸菌DNAポリメラーゼI、クレノウ・フラグメント、T7 DNAポリメラーゼ、好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼ(Bst DNAポリメラーゼ、Bca DNAポリメラーゼ)、サーマス属細菌由来DNAポリメラーゼ(Taq DNAポリメラーゼ等)、好熱性古細菌由来型DNAポリメラーゼ(Pfu DNAポリメラーゼ等)が挙げられる。

本発明のヌクレオチドを遺伝子増幅反応と組み合わせて使用する場合には、それぞれの遺伝子増幅反応に適したDNAポリメラーゼを選択して使用すればよい。

本発明のヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて生じる3'側部分の断片は、その鎖長が短い場合には標的核酸から遊離するが、十分な鎖長を有している場合には標的核酸とのアニーリングを維持することが可能である。DNAポリメラーゼとして鎖置換活性を有するものを使用した場合には、当該断片はDNAポリメラーゼによるDNAの伸長とともに標的核酸から解離させられる。また、5'~3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを使用した場合には、当該断片はDNAポリメラーゼによって分解される。

上記の、ヌクレアーゼとしてリボヌクレアーゼHを使用する本発明のヌクレオチドとしては、特に限定するものではないが、例えば、下記一般式で表す構造をもつオリゴヌクレオチドを本発明に使用することができる。

一般式：5' - dN_a - N_b - dN_c - N' - 3'

(a : 1以上11以上の整数、b : 1以上の整数、c : 0または1以上の整数、dN : デオキシリボヌクレオチド、N : リボヌクレオチド、N' : DNAポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されたヌクレオチド。)

上記一般式において、N_bで表される部位は置換の検出の対象となる塩基に対応する塩基を含んでいる。また、上記の各ヌクレオチドはその機能を損なわない範囲でヌクレオチドのアナログや誘導体(修飾ヌクレオチド)を含有していてもよい。

例えば、上記一般式において、N'が修飾デオキシリボヌクレオチドであり、aが1以上11以上の任意の整数、b = 1~3、c = 0~2のキメラオリゴヌクレオチドであるヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドが例示される。塩基置換の検出の対象となる塩基に対応する塩基は、N_bで表される部分に位置していれば特に限定はない。本発明の実施態様の一つとしては、例えば(d N c - N')で表される部分の長さが3塩基であり、塩基置換を検出しようとする塩基に対応する塩基をN_bで表される部分の最も3'側に測定したヌクレオチドが好適に使用でき、該ヌクレオチドは塩基置換の検出に関する良好な特異性を示す。

本発明のヌクレオチドに適切な標識を施すことにより、ヌクレアーゼによる切断、あるいはそれに続くDNA伸長反応により生じる産物(伸長産物)によってヌクレオチドから分離した3'側断片の検出を容易にし、塩基置換の存在を簡便に確認することができる。

ヌクレオチドの標識方法には限定はなく、例えば放射性同位体(³²P等)、色素、蛍光物質、発光物質、種々のリガンド(ビオチン、ジゴキシゲニン等)、酵素等が使用できる。
10 標識されたヌクレオチド由来の産物は当該標識に応じた検出方法でその存在を確認することができる。直接検出できないリガンドの場合には、検出可能な標識を付されたリガンド結合性の物質と組み合わせればよい。例えば、リガンド標識したヌクレオチド由来の産物と酵素標識した抗リガンド抗体とを組み合せ、シグナルを増幅することによって標的核酸を高感度に検出することが可能である。

ヌクレオチドを蛍光標識する態様としては、例えば当該ヌクレオチドを蛍光物質と該蛍光物質の発する蛍光を消光する作用を有する物質の両者で、適当な間隔をとって標識したものが含まれる。このようなプライマーはインタクトな状態では蛍光を発することはないが、ヌクレアーゼにより切断されて蛍光物質と消光物質との距離が離れた場合には蛍光を発するようになる。このようなヌクレオチドはDNA伸長反応の開始と同時に蛍光が発せられるため、反応中の反応液を直接観察することによって塩基置換の有無を知ることができる。
20

(2) 本発明の塩基置換の検出方法

本発明の塩基置換の検出方法は、上記(1)に記載された本発明のヌクレオチドを使用し、下記の工程；

- 1) 標的核酸を含有する試料と前記ヌクレオチドとを混合する工程；
- 2) 前記混合物をヌクレアーゼ、およびDNAポリメラーゼで処理する工程；および
- 3) ヌクレアーゼによるヌクレオチドの切断の有無を検出する工程、

により実施されることを特徴とする。上記(1)に記載された本発明のヌクレオチドの特徴に従い、ヌクレアーゼによるその切断の有無から塩基置換が存在するか否かを判定する。
30

本発明の塩基置換の検出方法に使用される標的核酸としては一本鎖、二本鎖の核酸、すなわちDNA、RNAを使用することができる。使用するヌクレアーゼによってはRNAを標的核酸とすることが困難な場合もあるが、その場合には当該RNAを鉄型として調製したcDNAを標的核酸として使用することにより、RNA上の塩基置換を検出することが可能である。

本発明においては、標的核酸を含有する試料を検出反応に使用することができる。

上記試料には特に限定はなく、核酸、もしくは生物を含む可能性のあるあらゆる試料、例えば、細胞、組織(生検試料等)、全血、血清、脳脊髄液、精液、唾液、喀痰、尿、糞便、毛髪、細胞培養物等を使用することができる。上記の検体は、特に限定するものではないが、好ましくは適切な処理によって、例えばDNAポリメラーゼの反応を実施が可能な形態としたうえ、本発明の方法に供することができる。このような処理には細胞の溶解や試料からの核酸の抽出、精製が含まれる。
40

本発明の塩基置換の検出方法においては、使用されるヌクレオチドの切断の有無、ならびにそれに続いて起こるDNA伸長反応の有無から塩基置換の存在が判定される。その方法には特に限定はなく、公知の核酸分析手法を使用することができる。例えば、DNA伸長反応の有無を調べる方法としては、生成した伸長産物をゲル電気泳動法(アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル等)あるいはキャピラリー電気泳動法によって分離して確認する方法、伸長産物の鎖長の増加をマススペクトルによって測定する方法等を挙げができる。また、別の態様としては、例えば、伸長産物へのヌクレオチドの取り込みを調べ
50

る方法がある。当該方法では、適切な標識を付加したヌクレオチド 3 リン酸が高分子の伸長産物に取り込まれる量として伸長産物の合成量を知ることができる。伸長産物は、例えば酸による沈殿処理やゲル電気泳動によって未反応のヌクレオチドと分離し、その生成量を測定することができる。さらに、DNA 伸長反応によって生成するピロリン酸を酵素的に検出する方法を使用してもよい。

本発明の検出方法において、さらに公知の核酸増幅反応を用いて当該伸長産物を増幅してもよい。このような態様は、高感度に塩基置換を検出する観点から有用である。

上記の核酸増幅反応には特に限定はなく、鑄型核酸に相補的な配列を有するプライマーが使用される種々の核酸増幅方法が使用できる。例えばポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR ; polymerase chain reaction、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号および第4,800,159号)、鎖置換型増幅法 (SDA ; strand displacement amplification、特公平7-114718号)、自立複製法 (SSR ; self-sustained sequence replication)、NASBA法 (nucleic acid sequence based amplification、特許第2650159号)、TMA法 (transcription-mediated amplification)、ICAN法 (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids、国際公開第00/56877号パンフレット) 等の公知の増幅方法を使用することができる。これらの方 20 法において、鑄型DNA鎖に相補的なDNAを合成する際のプライマーとして本発明のヌクレオチドを使用することにより、標的核酸上の塩基置換を検出することができる。

上記のような核酸増幅法を利用して本発明の塩基置換の検出方法を実施する場合には、各方法に使用されるプライマーの少なくとも一つとして本発明のヌクレオチドを使用し、さらに反応系中に当該ヌクレオチドに適したヌクレアーゼを共存させればよい。

上記のような、核酸増幅反応を利用した塩基置換の検出においては、当該反応による特異的な増幅産物の生成から塩基置換の存在を判定することができる。増幅産物の生成は、特に限定するものではないが、例えばゲル電気泳動、増幅産物に相補的な配列を有するプローブを使用したハイブリダイゼーション法、蛍光標識ヌクレオチドを利用した蛍光偏光法、タックマン法等が使用でき、さらに各遺伝子増幅方法に特有の検出反応も利用することができる。

本発明の検出方法を用いてゲノムレベルでの塩基置換を解析する場合には、大量の塩基配列を解析するために反応系を微量量化し、さらに集積度を高める手段を組み合わせてもよい。その手段の一つとして、最先端の超微細加工技術を駆使して、本発明の検出方法あるいは解析方法の基本プロセス、例えば、DNAの細胞からの抽出、核酸増幅反応、目的DNAの検出等のプロセスを数cm角～指先大のマイクロチップ上に集積化したものを組み合わせてもよい。さらに、必要に応じてゲル或いはキャピラリー電気泳動、検出用プローブとのハイブリダイゼーションのプロセスを組み合わせてもよい。該システムは、マイクロチップ、マイクロCE (capillary electophoresis) チップあるいはナノチップとも呼ばれている。

このようなシステムにおける核酸増幅反応としては目的のDNA断片が増幅されるものであればいずれの核酸増幅反応も利用することができる。特に限定はされないが例えば、ICAN法のような等温条件下で核酸を増幅できる方法が好適に使用できる。該方法を組み合わせることにより、当該システムの単純化が可能となり、上記のような集積化されたシステムでの利用に非常に好適である。さらに、本発明の技術を利用してさらに高い集積度のシステムの構築が可能となる。

本発明の方法において、本発明のヌクレオチドに修飾ヌクレオチドを含ませること及び/又は反応温度を適宜調整することにより塩基置換の検出の特異性を向上させることができる。

上記(1)に記載された、標識が付加された本発明のヌクレオチドは、DNA伸長反応の有無の確認を容易にすることができる、本発明の塩基置換の検出方法に有用である。この場合、当該ヌクレオチド由来の標識物質を上記のような各標識に適した方法で検出し、伸長反応の有無を確認すればよい。

例えば、蛍光物質が付加された本発明のヌクレオチドを使用する場合、標識がプライマー 50

として利用される部分に付加されていれば、伸長産物をその蛍光を利用して検出することができる。また、ヌクレオチドのヌクレアーゼによる切断箇所よりも3'側に付加されていれば、3'側断片の標的核酸からの解離やDNAポリメラーゼの有する5'-3'エキソヌクレアーゼによる該断片の低分子化等に基づいて伸長反応の有無を検出することができる。このような、蛍光標識されたヌクレオチドの分子量の変化を伴う態様においては蛍光偏光法の利用が好適である。

また、蛍光物質と該蛍光物質の発する蛍光を消光する作用を有する物質とを付加して蛍光を発することのないように標識した本発明のヌクレオチドを使用する場合、伸長反応が起こると同時に蛍光が発せられるようになるため、極めて容易に塩基置換を検出することができる。

上記の各態様において、塩基置換を検出しようとする位置に対応してアデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、チミン(T)あるいはウラシル(U)のそれぞれを有し、かつそれぞれが互いに区別可能な異なる標識を付されたヌクレオチドを利用することにより、塩基置換の存在とともに、塩基置換がある場合には置換している塩基の種類を同時に知ることができる。

本発明のヌクレオチドを使用し、PCR法によって塩基置換を使用することもできる。この場合、PCR法の一方のプライマーのかわりに本発明のヌクレオチドを使用し、通常のPCR用反応液にさらに前記ヌクレオチドに応じたヌクレアーゼを添加すればよい。この場合、ヌクレアーゼとしてPCRの条件において失活しないものを選択することにより、高感度に塩基置換を検出することができる。

ヒトを含む高等動物の細胞は、通常1対の染色体を有する二倍体である。そのため、染色体上の特定の塩基について塩基置換が存在する可能性がある場合、当該細胞は両染色体ともに塩基置換を有しないホモ接合体(ホモ型)、両染色体ともに塩基置換が存在するホモ接合体(ホモ型)、あるいは一方の染色体のみに塩基置換を有するヘテロ接合体(ヘテロ型)の3通りの可能性がある。

二倍体の細胞より調製した核酸試料について本発明の塩基置換の検出方法を適用することにより、遺伝子上の任意の塩基について当該細胞、すなわち当該細胞を有する個体の遺伝子型がホモ型あるいはヘテロ型のいずれかであるかを調べることができる。特に限定はないが例えば、4通りの塩基のそれぞれに対応し、ミスマッチが存在しない場合に切断を受けるタイプのヌクレオチドを使用して本発明の方法を実施した場合、遺伝子型がヘテロ型である細胞由来の核酸試料では2種のヌクレオチドについてヌクレオチドの切断にともなうシグナルが検出される。一方、遺伝子型がホモ型である細胞由来の核酸試料では1種のヌクレオチドのみでシグナルが検出され、さらにこのホモ型が塩基置換を有する、あるいは有しないことも同時に判定することができる。このように、本発明の方法は、上記のような対立遺伝子上の塩基置換の検出にも有用である。

(3) 本発明の塩基置換の検出に使用されるキット

本発明は、上記の本発明の塩基置換の検出に使用されるキットを提供する。1つの実施態様において、該キットは本発明のヌクレオチドを含有することを特徴とする。塩基置換の有無と同時に置換した塩基を特定できるような、4種の塩基それぞれを含有するヌクレオチドのセットを含有するものでもよい。さらに、当該ヌクレオチドに適したヌクレアーゼ、DNAポリメラーゼやその基質(dNTP)、反応に適した緩衝液等を含有するものやプライマー・伸長産物の検出のための試薬を含有するものであってもよい。核酸増幅法と組み合わせて塩基置換を検出するためのキットとしては、当該増幅法に使用される反応液を調製するための試薬を含有するものが好適である。

実施例

以下に実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は実施例の範囲に限定されるものではない。

参考例1 ピロコッカス フリオサスのRNaseHII遺伝子のクローニング

(1) ピロコッカス フリオサス ゲノムDNAの調製

トリプトン(ディフコラボラトリーズ社製)1%、酵母エキス(ディフコラボラトリーズ

10

20

30

40

50

社製) 0.5%、可溶性でんぶん(ナカライトスク社製) 1%、ジャマリンS・ソリッド(ジャマリンラボラトリー社製) 3.5%、ジャマリンS・リキッド(ジャマリンラボラトリー社製) 0.5%、MgSO₄ 0.003%、NaCl 0.001%、FeSO₄ · 7H₂O 0.0001%、CoSO₄ 0.0001%、CaCl₂ · 7H₂O 0.0001%、ZnSO₄ 0.0001%、CuSO₄ · 5H₂O 0.1 ppm、KAl(SO₄)₂ 0.1 ppm、H₃BO₄ 0.1 ppm、Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.1 ppm、NiCl₂ · 6H₂O 0.25 ppmの組成の培地2リットルを2リットル容のメジュウムボトルにいれ、120、20分間殺菌した後、窒素ガスを吹き込み、溶存酸素を除去し、これにピロコッカス フリオサス(*Pyrococcus furiosus*、ドイッヂェ ザムルンク フォン ミクロオルガニスメンより購入: DSM 3638)を接種して、95、16時間静置培養した後、遠心分離によって菌体を得た。

次に、得られた菌体を4mlの25%ショ糖、50mM Tris-HCl(pH 8.0)に懸濁し、0.4mlの10mg/ml塩化リゾチーム(ナカライトスク社製)水溶液を加えて、20で1時間反応させた。反応終了後、この反応液に24mlの150mM NaCl、1mM EDTA、20mM Tris-HCl(pH 8.0)、0.2mlの20mg/mlプロテイナーゼK(宝酒造社製)及び2mlの10%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液を加え、37で1時間保温した。

反応終了後、フェノール-クロロホルム抽出、続いてエタノール沈殿を行い、約1mgのゲノムDNAを調製した。

(2) RNase H I I 遺伝子のクローニング

ピロコッカス ホリコシ(*Pyrococcus horikoshii*)の全ゲノム配列が公開されており(DNAリサーチ(DNA Research)、第5巻、第55-76頁(1998))、RNase H I Iのホモログをコードする遺伝子(PH1650)が1つ存在することが明らかになっている(配列番号1、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 ホームページ:<http://www.nite.go.jp/>)。

そこで、このPH1650遺伝子(配列番号1)と一部公開されているピロコッカス フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)のゲノム配列(University of Utah, Utah Genome Center ホームページ:<http://www.genome.utah.edu/sequence.html>)でホモロジー検索をおこなった。その結果、非常にホモロジーの高い配列が見つかった。

得られた配列をもとにプライマー1650Nde(配列番号2)及び1650Bam(配列番号3)を合成した。

参考例1-(1)で得たピロコッカス フリオサス ゲノムDNA 200ngを鑄型にして、20pmolの1650Nde及び20pmolの1650Bamをプライマーに用い、100μlの容量でPCRを行った。PCRでのDNAポリメラーゼはタカラExタック(宝酒造社製)を添付のプロトコールに従って用い、PCRは94で30秒、55で30秒、72で1分を1サイクルとし、30サイクル行った。增幅した約0.7kbのDNA断片をNdeI及びBamHI(ともに宝酒造社製)で消化し、得られたDNA断片をプラスミドベクターpET3a(ノバジェン社製)のNdeI及びBamHI間に組込んだプラスミドpPFU220を作製した。

(3) RNase H I I 遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

参考例1-(2)で得られたpPFU220の挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法によって決定した。

得られた塩基配列の結果を解析したところ、RNase H I Iをコードすると考えられるオープンリーディングフレーム(open reading frame; ORF)が見出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号4に示す。また、該塩基配列から推定されるRNase H I Iのアミノ酸配列を配列表の配列番号5に示す。

なお、プラスミドpPFU220で形質転換された大腸菌JM109は、Escherichia coli JM109/pPFU220と命名、表示され、平成12年9月5日より日本国〒305-8566茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM P-18020として寄託され、また前記独立行政法人

10

20

30

40

50

産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 F E R M B P - 7 6 5 4 [国際寄託への移管請求日：平成13年7月9日]として寄託されている。

(4) 精製RNaseHII標品の調製

参考例1-(2)で得られたpPFU220を大腸菌HMS174(DE3)(ノバジエン社製)に形質転換し、得られたpPFU220を含む大腸菌HMS174(DE3)を100μg/mlのアンピシリンを含む2リットルのLB培地に植菌し、37で16時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を66.0mlのソニケーションバッファー[50mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA、2mMフェニルメタンスルフォニルフルオライド]に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を12000rpmで10分間の遠心分離を行い、得られた上清を60、15分間の熱処理にかけた。その後、再度12000rpmで10分の遠心分離を行い、上清を集め、61.5mlの熱処理上清液を得た。10

この熱処理上清液をバッファーA[50mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA]で平衡化したRESOURSE Qカラム(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)に供し、FPLCシステム(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、RNaseHIIはRESOURSE Qカラムを素通りした。

素通りしたRNaseHII画分60.0mlをバッファーAで平衡化したRESOURSE Sカラム(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)に供し、FPLCシステムを用いて0~500mM NaCl直線濃度勾配により溶出し、約150mM NaClのところに溶出されたRNaseHII画分を得た。20

このRNaseHII画分2.0mlをセントリコン-10(アミコン社製)を用いた限外ろ過により濃縮し、250μlの濃縮液を100mM NaCl、0.1mM EDTAを含む50mM Tris-HCl(pH8.0)で平衡化したSuperdex 200ゲルろ過カラム(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)に供し、同じバッファーで溶出を行った結果、RNaseHIIは、17キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、RNaseHIIが1量体として存在する場合に相当する。

こうして溶出されたRNaseHIIをPfu RNaseHII標品とした。上記で得られたPfu RNaseHII標品を用いて下記の方法によりRNaseH活性を測定した。30

10mM Tris-HCl(pH8.0)、1mMジチオスレイトール(ナカライテスク社製)、0.003%ウシ血清アルブミン(フラクションV、シグマ社製)、4%グリセロール、20μg/mlポリ(dT)(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)、30μg/mlポリ(rA)(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)を混合し、37で10分間保温した。これをRNaseH活性を測定するための基質液として使用した。

100μlの基質液に1μlの1M MnCl₂を加えて40で保温し、これに上記のPfu RNaseHII標品を適当に希釈したものを加えて反応を開始した。40で30分間反応を行った後、10μlの0.5M EDTAを加えて反応を停止し、260nmにおける吸光度を測定した。40

その結果、上記のPfu RNaseHII標品を添加した反応液では、先に10μlの0.5M EDTAを加えた後にこれを添加したものに比べて260nmにおける吸光度の値が高かった。よって、当該標品がRNaseH活性を有することが明らかになった。

(5) 精製RNaseH活性の測定

a) 使用する試薬液の調製

力価測定用反応液：最終濃度がそれぞれ40mM Tris-HCl(pH7.7、37)、4mM 塩化マグネシウム、1mM DTT、0.003% BSA、4%グリセロール、24μM ポリ(dT)になるように滅菌水で調製した。

ポリ[8-³H]アデニル酸溶液：370kBqのポリ[8-³H]アデニル酸溶液を2050

0 μl の滅菌水に溶解した。

ポリアデニル酸溶液：ポリアデニル酸を 3 mM になるように滅菌超純水で希釈した。

酵素希釈液：最終濃度がそれぞれ 2.5 mM Tris-HCl (pH 7.5、37℃)、5 mM 2-メルカプトエタノール、0.5 mM EDTA (pH 7.5、37℃)、3.0 mM 塩化ナトリウム、5.0% グリセロールになるように滅菌水で調製した。

熱変性子牛胸腺DNAの調製：子牛胸腺DNA 200 mg を TE バッファー 100 ml に懸濁し、膨潤させた。該溶液の UV 260 nm の吸光度を測定し、1 mg / ml の濃度に滅菌超純水で希釈した。次に、該溶液を 100℃ で 10 分間加熱後、氷浴中で急冷した。

b) 活性測定方法

上記 a) で調製した力価測定用反応液 98.5 μl にポリ [8 -³H] アデニル酸溶液 7 μl を加え 37℃ で 10 分間保持した。次にポリアデニル酸を最終濃度が 2.4 μM になるように 8 μl 加え、さらに 37℃ で 5 分間保持した。このようにしてポリ [8 -³H] r A - ポリdT 反応液 1000 μl を調製した。次に、該反応液 200 μl を分取し、30℃ で 5 分間保持した後、任意の希釈系列で希釈した酵素液 1 μl を加え、これらの反応液を経時的に 50 μl ずつサンプリングして、後の測定に用いた。酵素添加からサンプリングまでの間の時間を Y 分とした。また、全 CPM 用反応液 50 μl およびブランク用反応液 50 μl は、酵素液の代わりに酵素希釈液を 1 μl 加えて調製した。該サンプリング溶液に 100 mM ピロリン酸ナトリウム 100 μl、熱変性子牛胸腺DNA溶液 50 μl および 10% トリクロロ酢酸 300 μl (全 CPM 測定の場合は、超純水 300 μl) を加え、0℃ で 5 分間保持後、10000 rpm で 10 分間遠心した。遠心後、得られた上清 250 μl をバイアルに入れ、アクアゾル - 2 (NEN ライフサイエンスプロダクツ社製) 10 ml を加え、液体シンチレーションカウンターで CPM を測定した。

c) ユニット計算

各酵素のユニット (Unit) 数は、以下の計算式で算出した。

$$\text{Unit/ml} = \{ (\text{測定した CPM} - \text{ブランク CPM}) \times 1.2^* \times 20 \times 1000 \times \text{希釈率} \} \times 200 (\mu\text{l}) / (\text{全 CPM} \times Y \text{ 分} \times 50 (\mu\text{l}) \times 9^{**})$$

1.2^{*} : 全 CPM 中に含まれるポリ [8 -³H] r A - ポリdT の 50 μl 当たりの nmol 数

9^{**} : 補正係数

参考例 2 アルカエオグロバス フルギダスの RNase H I 遺伝子のクローニング

(1) アルカエオグロバス フルギダス ゲノムDNAの調製

アルカエオグロバス フルギダス (Archaeoglobus fulgidus、ドイツチエザムルンクフォンミクロオルガニスメン ウント ツエルクルツレン GmbH より購入: DSM 4139) 8 ml 相当分の菌体を集め、100 μl の 2.5% ショ糖、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) に懸濁し、20 μl の 0.5 M EDTA、10 μl の 10 mg / ml 塩化リゾチーム (ナカライトスク社製) 水溶液を加えて、20℃ で 1 時間反応させた。反応終了後、この反応液に 800 μl の 150 mM NaCl、1 mM EDTA、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 μl の 20 mg / ml プロテイナーゼ K (宝酒造社製) 及び 50 μl の 10% ラウリル硫酸ナトリウム水溶液を加え、37℃ で 1 時間保温した。反応終了後、フェノール - クロロホルム抽出、エタノール沈殿、風乾した後に 50 μl の TE に溶解してゲノムDNA溶液を得た。

(2) RNase H I 遺伝子のクローニング

アルカエオグロバス フルギダス (Archaeoglobus fulgidus) は全ゲノム配列が公開されており [Klenk, HP ら、ネイチャー (Nature)、第 390 卷、第 364 - 370 頁 (1997)]、RNase H I のホモログをコードする遺伝子 (AF0621) が 1 つ存在することが明らかになっている (配列番号 13、<http://www.tigr.org/tdb/CMR/btm/htmls/SplashPage.html>)。

そこで、この AF0621 遺伝子 (配列番号 13) の配列をもとにプライマー AfuNd

e (配列番号14) 及びA f u B a m (配列番号15) を合成した。

参考例2-(1)で得たアルカエオグロバス フルギダス ゲノムDNA 30ngを鑄型にして、20pmolのA f u N d e 及び20pmolのA f u B a mをプライマーに用い、100μlの容量でPCRを行なった。PCRでのDNAポリメラーゼはパイロベストDNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を添付のプロトコールに従って用い、PCRは94度30秒、55度30秒、72度1分を1サイクルとし、40サイクル行った。増幅した約0.6kbのDNA断片をNde I及びBamHI(ともに宝酒造社製)で消化し、得られたDNA断片をプラスミドベクターpTV119Nd(pTV119NのNco IサイトをNde Iサイトに変換したもの)のNde I及びBamHI間に組込んだプラスミドpAFU204を作製した。10

(3) RNaseHII遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

参考例2-(2)で得られたpAFU204の挿入DNA断片の塩基配列をジデオキシ法によって決定した。

得られた塩基配列の結果を解析したところ、RNaseHIIをコードすると考えられるオープンリーディングフレームが見出された。このオープンリーディングフレームの塩基配列を配列表の配列番号16に示す。また、該塩基配列から推定されるRNaseHIIのアミノ酸配列を配列表の配列番号17に示す。

なお、プラスミドpAFU204で形質転換された大腸菌JM109は、Escherichia coli JM109/pAFU204と命名、表示され、平成13年2月22日より日本国〒305-8566茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM P-18221として寄託され、また前記独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7691[国際寄託への移管請求日：平成13年8月2日]として寄託されている。20

(4) 精製RNaseHII標品の調製

参考例2-(2)で得られたpAFU204で大腸菌JM109を形質転換し、得られたpAFU204を含む大腸菌JM109を100μg/mlのアンピシリンを含む2リットルのLB培地に植菌し、37度16時間振盪培養した。培養終了後、遠心分離によって集めた菌体を37.1mlのソニケーションバッファー〔50mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA、2mMフェニルメタンスルフォニルフルオライド〕に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を12000rpmで10分間の遠心分離を行い、得られた上清を70、15分間の熱処理にかけた。その後、再度12000rpmで10分の遠心分離を行い、上清を集め、40.3mlの熱処理上清液を得た。30

この熱処理上清液をバッファーA〔50mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA〕で平衡化したRESOURCE Qカラム(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)に供し、FPLCシステム(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、RNaseHIIはRESOURCE Qカラムを素通りした。

バッファーAで平衡化したRESOURCE Sカラム(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)に供し、FPLCシステム(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)を用いてクロマトグラフィーを行なった。その結果、RNaseHIIはRESOURCE Sカラムを素通りした。40

素通りしたRNaseHII画分40.0mlを50mM NaClを含むバッファーB〔50mM Tris-HCl(pH7.0)、1mM EDTA〕2リットルを外液として、2時間の透析を3回行なった。透析後の酵素液40.2mlを50mM NaClを含むバッファーBで平衡化したHiTrap-heparinカラム(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)に供し、FPLCシステムを用いて50~550mM NaCl直線濃度勾配により溶出した。その結果、約240mM NaClのところに溶出されたRNaseHII画分を得た。

このRNaseHII画分7.8mlをセントリコン-10(アミコン社製)を用いた限外ろ過により濃縮し、約600μlの濃縮液を4回に分けて100mM NaCl、0.50

1 mM EDTAを含む50 mM Tris-HCl (pH 7.0)で平衡化したSuperoose 6ゲルろ過カラム（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）に供し、同じバッファーで溶出を行った結果、RNase HIIは、30.0キロダルトンの分子量に相当する位置に溶出された。この分子量は、RNase HIIが1量体として存在する場合に相当する。

こうして溶出されたRNase HIIをAf u RNase HII標準とした。

上記で得られたAf u RNase HII標準を用いて、参考例1-(5)に記載の方法により酵素活性を測定した結果、Af u RNase HII標準にRNase H活性が認められた。

以下の実施例における耐熱性RNase Hのunit数は、以下の方法により算出した。
10
ポリ(r A)及びポリ(d T)（ともにアマシャム ファルマシア バイオテク社製）1mgをそれぞれ1 mM EDTAを含む40 mM Tris-HCl (pH 7.7) 1 mlに溶解し、ポリ(r A)溶液及びポリ(d T)溶液を調製した。

次に、4 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.003% BSA、4%グリセロールを含む40 mM Tris-HCl (pH 7.7)に、終濃度20 μg/mlとなるポリ(r A)溶液、終濃度30 μg/mlとなるポリ(d T)溶液を加え、37で10分間反応後、4に冷却し、ポリ(r A)-ポリ(d T)溶液を調製した。このポリ(r A)-ポリ(d T)溶液100 μlに任意に希釈した酵素液1 μlを加え、40で10分間反応させ、0.5 M EDTA 10 μlを加えて反応を停止させた後、260 nmの吸光度を測定した。対照として、上記反応液に0.5 M EDTA 10 μlを加えた後、40
20

で10分間反応させ、吸光度を測定した。その後、EDTA非存在下で反応させ求めた吸光度から対象の吸光度を引いた値（吸光度差）を求めた。すなわち、酵素反応によってポリ(r A)-ポリ(d T)ハイブリッドから遊離したヌクレオチドの濃度を吸光度差から求めた。RNase Hの1単位は、1 nmolのリボヌクレオチドが遊離したのに相当するA₂₆₀を10分間に増加させる酵素量とし、下記の式に従って算出した。

単位(unit) = [吸光度差 × 反応液量(ml)] / 0.0152 × (110 / 100) × 希釈率

実施例1 ヒトc-Ki-ras遺伝子上の塩基置換の検出

(1) テンプレートの作成

ヒトc-Ki-rasエクソン1のコドン12にそれぞれGGT(Gly)、CGT(Arg)、TGT(Cys)、AGT(Ser)の配列を有したDNA断片を調製した。すなわち、ラス・ミュータント・セット(ras Mutant Set c-Ki-ras codon 12、宝酒造社製)中の上記のコドンに対応するテンプレートDNAとラス・ジーン・プライマーセット(ras Gene Primer Set c-Ki-ras/12、宝酒造社製)を用いたPCRによって得られた增幅産物をpT7-B1ueベクター(ノバジェン社製)にクローニングした。こうして得られた組換えプラスミドを鋳型とし、M13プライマーM4、RV(いずれも宝酒造社製)を用いたPCRを実施し、得られた增幅断片を回収してそれぞれテンプレート12G、12R、12C、12Sとした。

(2) 塩基置換の検出

ヒトc-Ki-rasエクソン1の塩基配列に従って、上記テンプレート12Gを特異的に検出するためのフォワード側ヌクレオチドとして、それぞれ配列番号7~9記載の塩基配列を有する3種のキメラオリゴヌクレオチドを合成した。これらは3'末端のヌクレオチドのリボース部分の3位の水酸基がアミノヘキシリ化されたキメラオリゴヌクレオチドである。また、該ヌクレオチドは、コドン12がGlyをコードしているヒトc-Ki-rasエクソン1の塩基配列に相補的な配列を有している。また、核酸增幅のためのアンチセンスプライマーとして配列番号6の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成した。

それぞれ50 pmolのフォワード側ヌクレオチドとアンチセンスプライマー、1 μlの0.25%プロピレンジアミン水溶液、鋳型としてテンプレート12G、12C、12R、12Sのいずれか1 pgを含む全量5 μlの反応液を調製し、サーマルサイクラーパー
40
50

ソナル（宝酒造社製）で98℃、2分間加熱処理の後、53℃の加熱処理を行って鋳型にプライマー側又クレオチドならびにアンチセンスプライマーをアニーリングさせた。上記加熱処理を行った各溶液に0.625mM dNTP混合液、40mM HEPES-KOH緩衝溶液(pH7.8)、125mM 酢酸カリウム、5mM 酢酸マグネシウム、0.0125%ウシ血清アルブミン、1.25%ジメチルスルホキシド、16Uの参考例1に記載のPfu RNaseHII及び、5.5UのBest DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）及び滅菌水を含む全液量20μlを添加し、最終容量を25μlとした。該反応液は53℃、1時間保持した。反応終了後、該反応液5μlを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。この結果を図1に示す。図1-1~3に示されたアガロースゲルにおいて、レーン1~4はそれぞれテンプレート12G、12C、12R、12Sを用いた場合の反応液がアプライされている。また、図1-1、2、3は、それぞれ配列番号7、8、9のヌクレオチドを使用した反応の結果を示す。

図1に示されるように、配列番号7~9記載のヌクレオチドを用いた場合には、いずれもテンプレート12Gを使用した場合のみ、すなわち標的核酸がコドン12にGlyをコードしている場合のみに増幅産物が観察された。このことから、本発明のヌクレオチドを使用することにより、標的核酸上の塩基置換の判別が可能であることが示された。さらに、イノシンを含有したヌクレオチドを用いることにより、特異的増幅を向上させることができることを確認した。

実施例2 c-Ki-rasコドン12の他のアレルの検出

実施例1の結果を基に、実施例1-(1)で調製した、12R、12C、12S上のコドン12の塩基を特異的に判別可能なヌクレオチドとして、それぞれ配列番号10~12に示す塩基配列をするキメラオリゴヌクレオチドを合成した。配列番号10、11、12はそれぞれコドン12がCys、Arg、Serであるアレルに対応する塩基配列を有している。また、これらはいずれも3'末端のヌクレオチドのリボース部分の3位の水酸基がアミノヘキシリ化されたヌクレオチドである。これらのヌクレオチドと配列番号6記載のアンチセンスプライマーとを使用し、実施例1-(2)と同一反応条件下、反応を行なった。反応終了後、該反応液5μlを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。この結果を図2に示す。図2-1~3に示されたアガロースゲルにおいて、レーン1~4はそれぞれテンプレート12G、12C、12R、12Sを用いた場合の反応液がアプライされている。また、図2-1、2、3は、それぞれ配列番号10、11、12のヌクレオチドを使用した反応の結果を示す。

図2に示されるように、配列番号10、11、12のヌクレオチドを用いた場合には、それぞれテンプレート12C、12R、12Sと組み合わせた場合のみに特異的な増幅産物が認められた。すなわち、本発明のヌクレオチドは目的とする塩基を正確に判別する能力を有していた。さらに、イノシンを含有したオリゴヌクレオチドを用いる事により、特異的増幅を向上させることができることを確認した。

実施例3 ゲノムDNA上のアレル特異的なDNA増幅

c-Ki-rasエクソン1のコドン12がGly(GGT)である事を確認されている、ヒトゲノムDNA(クロンテック社製)150ng、または30ngを用い、実施例1、2においてコドン12の4種のアレルを特異的に検出する事が示された配列番号7、10、11、12記載のヌクレオチド(それぞれコドン12がGly、Cys、Arg、Serの場合に対応)、ならびに配列番号6記載のアンチセンスプライマーを使用し(2)と同一条件下、反応を行った。反応終了後、該反応液5μlを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図3に示す。

図3-1、2に示されたアガロースゲルにおいて、レーン1~4はそれぞれ配列番号7、10、11、12記載のヌクレオチドを用いた場合の反応液がアプライされている。また、図3-1、2は、それぞれ150ng、30ngのヒトゲノムDNAを使用した反応の結果を示す。

図3に示されるように、上記のヒトゲノムDNAの使用量にかかわらず、配列番号7のヌクレオチドのみにおいてDNA断片の増幅が認められ、他のヌクレオチドでのDNA断片

10

20

30

40

50

の増幅は見られなかった。このことから、本発明の塩基置換の検出方法により、ゲノムDNA上の特定のアレルを検出可能であることが確認された。

実施例4 種々のRNaseHを用いた検出

実施例1に示された塩基置換の検出を、種々のRNaseHを使用して試みた。

すなわち、Pfu RNaseHIIにかえて参考例2に記載のAfu RNaseHI I、ストラクチャー(Structure)、第8巻、第897~904頁に記載の方法で調製したメタノコッカス・ヤナシ(Methanococcus jannashi)由来のRNaseHであるMja

RNaseHIIをそれぞれ使用した。フォワード側ヌクレオチドとして配列番号7のヌクレオチド、アンチセンスプライマーとして配列番号6のオリゴヌクレオチドを使用し、実施例1と同じ条件で反応を行なった。反応終了後、該反応液5μlを3.0%アガロースゲル電気泳動に供した。この結果を図4に示す。図4-1~2に示されたアガロースゲルにおいて、レーン1~4はそれぞれテンプレート12G、12C、12R、12Sを用いた場合の反応液がアプライされている。また、図4-1、2は、それぞれAuf RNaseHII、Mja RNaseHIIを使用した反応の結果を示す。

図4に示されるように、Auf RNaseHII、Mja RNaseHIIを用いた場合には、いずれもテンプレート12Gを使用した場合のみ、すなわち標的核酸がコドン12にG1yをコードしている場合のみに増幅産物が観察されており、これらのRNaseHによって標的核酸上の塩基置換の判別が可能であることが示された。

実施例5 変性操作の必要なDNA増幅反応系(PCR)を用いたSNPの検出

変性操作の必要なDNA増幅反応系における本発明の方法について検討した。まず、ヒト

c-Ki-rasエクソン1の塩基配列に従って、上記テンプレート12Gを特異的に検出するためのセンス側ヌクレオチドとして配列表の配列番号25記載のキメラオリゴヌクレオチドを合成した。該ヌクレオチドは、3'末端のヌクレオチドのリボース部分の3位の水酸基がアミノヘキシリ化されたヌクレオチドである。また、同様にアンチセンスプライマーとして配列番号18の塩基配列を有するプライマーを合成した。上記各50pmolの上記合成ヌクレオチド及びプライマー(センス方向ヌクレオチドとアンチセンス方向プライマー)と2.5μlのEx Taqバッファー(宝酒造社製)、2μlの2.5mM dNTP混合液、50UのAfu RNaseHII、0.625UのEx Taq

DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を含む全量24μlの反応液を調製した。この反応液に、実施例1で調製したテンプレート12G、12C、12R、12Sの10ng/μl溶液をそれぞれ1μl添加し、サーマルサイクラー(宝酒造社製)を用い、94℃5秒、59℃2分、72℃5秒のPCR反応を25、30サイクル行った。反応終了後、得られた各反応液1μlをアジレント2100バイオアナライザ(ヒューレットパッカード社製)で分析した。その結果を図5に示す。図5は、各テンプレートにおける目的の増幅産物量を示すグラフであり、縦軸は目的の増幅産物量、横軸はPCRのサイクル数を示す。図5に示した用に、検出に用いたプライマーとa11e1eの一一致するテンプレート12Gを用いた場合にのみ特異的に目的のDNAの増幅が確認された。すなわち、本発明の方法が、鑄型となる核酸の変性操作が必要なDNA増幅反応系においても有効であることが確認できた。

実施例6 K-rasコドン61のアレル特異的な検出

別の塩基置換の検出の場合について検討した。すなわち、ヒトc-Ki-ras エクソン2のコドン61にそれぞれCAA(Glu)、AAA(Lys)、GAA(Gln)の配列を有したDNA断片を、配列表の配列番号19、20に記載のDNAプライマーを用いてPCRで増幅し、pT7-Blueベクターにクローニングした。これらのDNA断片がクローニングされたベクターのそれを常法で精製し、それぞれ61Q、61K、61Eとした。次に実施例1-(2)の結果を基に、ヒトc-Ki-ras エクソン2の塩基配列に基いて61Q、61K、61Eの各ベクターを特異的に検出するヌクレオチドとして、それぞれ配列表の配列番号21、22、23記載のキメラオリゴヌクレオチドを合成した。これらはいずれも3'末端のヌクレオチドのリボース部分の3位の水酸基がアミノヘキシリ化されたヌクレオチドである。これらのヌクレオチドをセンスプライマー

10

20

30

40

50

として、配列表の配列番号 24 記載のプライマーをアンチセンスプライマーとして用いて以下の反応を行った。上記各 50 pmol の合成オリゴヌクレオチドプライマー（センス方向とアンチセンス方向プライマー）と 1 μl の 0.05% プロピレンジアミン水溶液、61Q、61K、61E の各テンプレート DNA 10 pg を含む全量 5 μl の反応液をサーマルイクラーパーソナル（宝酒造社製）で 98° で 2 分間の後、53° の加熱処理により鑄型にプライマーをアニーリングさせた。上記熱処理をした各溶液に 0.625 mM dNTP 混合液、40 mM HEPES-KOH 緩衝溶液（pH 7.8）、125 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、0.0125% ウシ血清アルブミン、1.25% ジメチルスルホキシド、11U の Afu RNase HII（宝酒造社製）及び、5.5U の BcABest DNA ポリメラーゼ（宝酒造社製）及び滅菌水を含む全液量 20 μl を添加し、最終容量を 25 μl とした。該反応液は 58° 、1 時間保持した。反応終了後、該反応液 5 μl を 3.0% アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図 6 に示す。すなわち、図 6A は、配列番号 21 記載の 61Q 検出用プライマーを用いた場合の検出結果を示す電気泳動パターンであり、レーン 1 はテンプレート 61Q、レーン 2 はテンプレート 61K、レーン 3 はテンプレート 61E をそれぞれ鑄型に用いた場合を示す。また、図 6B は、配列番号 22 記載の 61K 検出用プライマーを用いた場合の検出結果を示す電気泳動パターンであり、レーン 1 はテンプレート 61Q、レーン 2 はテンプレート 61K、レーン 3 はテンプレート 61E をそれぞれ用いた場合を示す。さらに、図 6C は、配列番号 23 記載の 61E 検出用プライマーを用いた場合の検出結果を示す電気泳動パターンであり、レーン 1 はテンプレート 61Q、レーン 2 はテンプレート 61K、レーン 3 はテンプレート 61E をそれぞれ用いた場合を示す。

図 6A、B、C に示したように配列表の配列番号 21, 22, 23 を用いた場合に各 a11e1e 特異的に ICAN 反応によって目的の DNA 増幅産物が得られる事を確認した。すなわち、塩基置換の対象が変わっても本発明の方法が有効であることを確認した。

実施例 7 CYP2C19 (636) のアレル特異的な検出

(1) 遺伝子的にホモ型あるいはヘテロ型であるかの検出方法について検討した。対象として、ヒト CYP2C19 の 636 番目の塩基の a11e1e を選択した。まず、ヒト CYP2C19 の 636 番目の塩基が G あるいは A である DNA 断片を、配列表の配列番号 26、27 に記載の DNA プライマーを用いた PCR 反応で増幅し、pT7-Blue ベクターにクローニングした。これら DNA 断片がクローニングされたプラスミドをそれぞれ常法で精製し、それぞれプラスミド 636G、636A とした。

上記プラスミド 636G、636A ならびにプラスミド 636G と 636A を 1:1 に混合したプラスミド 636G/A を鑄型として用いた。すなわち、プラスミド 636G ならびにプラスミド 636A は遺伝子的にホモ型、プラスミド 636G/A が遺伝子的にヘテロ型のモデルである。次に、上記 636G ならびに 636A を特異的に検出するヌクレオチドとして、それぞれ配列表の配列番号 28、29 記載のヌクレオチドを合成した。これらのヌクレオチドをセンスプライマー、配列表の配列番号 30 記載のプライマーをアンチセンスプライマーとして用い、以下の反応を行った。上記各 50 pmol の合成オリゴヌクレオチドプライマー（センス方向とアンチセンス方向プライマー）と 1 μl の 0.05% プロピレンジアミン水溶液、プラスミド 636G、636A ならびに 636G/A の各テンプレート DNA 1 pg 含む全量 5 μl の反応液をサーマルサイクラーパーソナル（宝酒造社製）で 98° で 2 分間の後、53° の加熱処理により鑄型にプライマーをアニーリングさせた。上記熱処理をした各溶液に 0.625 mM dNTP 混合液、40 mM HEPES-KOH 緩衝溶液（pH 7.8）、125 mM 酢酸カリウム、5 mM 酢酸マグネシウム、0.0125% ウシ血清アルブミン、1.25% ジメチルスルホキシド、11U の Afu RNase HII、5.5U の BcABest DNA ポリメラーゼおよび滅菌水を含む全液量 20 μl を添加し、最終容量を 25 μl とした。該反応液は、53° 、1 時間保持した。反応終了後、該反応液 5 μl を 3.0% アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図 7A 及び 7B に示す。すなわち、図 7A は、ヌクレオチド 636G を用いた場合の検出結果を示す電気泳動パターンであり、レーン 1 はテンプレートがプ

ラスミド 636G の場合、レーン 2 はプラスミド 636A の場合、レーン 3 はプラスミド 636G/A を用いた場合を示す。

また、図 7B は、ヌクレオチド 636A を用いた場合の検出結果を示す電気泳動パターンであり、レーン 1 はテンプレートがプラスミド 636G の場合、レーン 2 はプラスミド 636A の場合、レーン 3 はプラスミド 636G/A を用いた場合を示す。図 7A 及び 7B に示したように、いずれのヌクレオチドを用いた場合でも a11e1e 特異的な検出が行えることが確認できた。

(2) ヒトゲノム DNA をテンプレートに用いた場合について、PCR - RFLP 法と解析の比較を行った。まず、ヒトゲノム DNA (クローンテック社製) を 150ng を鋳型として上記(1)と同様の方法で SNP タイピングを行った。その結果を図 7C に示す。すなわち、図 7C は、ヒトゲノム DNA の SNP タイピングした結果を示す電気泳動パターンであり、レーン 1 はヌクレオチド 636G を用いた場合、レーン 2 はヌクレオチド 636A を用いた場合である。

図 7C に示したようにヌクレオチド 636G を用いた場合にのみ目的の増幅 DNA が検出され、このゲノム DNA の CYP2C19 636 塩基目の a11e1e は、(636G/G) のホモ型であると判断された。

一方、上記ヒトゲノム DNA を用いて PCR - RFLP 法によるタイピングを行った。まず、ゲノム DNA 150ng を用いて、配列表の配列番号 26 および 27 のプライマーを用いて PCR 反応を行った。得られた PCR 増幅産物を BamHI で処理した後、該反応液を 3.0% アガロースゲル電気泳動に供した。その結果を図 7D に示す。すなわち、図 7D は、ヒトゲノム DNA を鋳型とし PCR - RFLP 法によりタイピングを行った結果を示す電気泳動パターンであり、レーン 1 は PCR 増幅産物、レーン 2 は該 PCR 増幅産物を BamHI で処理した場合である。

図 7D に示したように、PCR 増幅産物が BamHI により完全消化されたことから、PCR - RFLP 法においてもこのゲノム DNA の CYP2C19 636 塩基目の a11e1e は (636G/G) のホモ型であると判断された。

また、本発明の塩基置換の検出方法と従来の PCR - RFLP 法による SNP タイピングの結果が一致することが確認できた。

(3) 上記(1)で調製したプラスミド 636G、636A、636G/A を用いて相同染色体上のジェノタイプを想定した検出方法を検討した。反応は、以下のようにして行った。まず、ヌクレオチド 636G ならびにヌクレオチド 636A の 5' 末端にお互いに識別可能な蛍光標識 Rox (ABI 社製)、Fam (ABI 社製) をそれぞれ結合させたものを合成した。当該蛍光標識ヌクレオチドは等量づつ混合して用いた。検出方法は、上記(1)と同様の方法で行った。反応終了後、該反応液の一部を 3.0% アガロースゲル電気泳動に供し、増幅産物と未反応の蛍光標識ヌクレオチドが十分に分離するまで泳動を行った。電気泳動後のアガロースゲルを FM - BIO II Multi - View (宝酒造社製) にて解析した。その結果、鋳型がプラスミド 636G の場合は蛍光標識 Rox の蛍光シグナルのみが確認できた。また、鋳型がプラスミド 636A の場合は蛍光標識 Fam の蛍光シグナルのみが確認できた。さらに、鋳型がプラスミド 636G/A の場合は Rox 及び Fam の両方の蛍光シグナルが確認できた。以上のことから、本発明の方法が相同染色体上のジェノタイプ (ホモ型あるいはヘテロ型) を解析できる方法として有用であることを確認した。

実施例 8 全血から抽出したゲノム DNA を用いたタイピング

インフォームドコンセントの得られた健常人全血 200 μl (サンプル番号 1 ~ 6) より Gen とるくんTM (宝酒造社製) を用いて、ゲノム DNA を調製した。調製したゲノム DNA 160ng を鋳型として、636G、636A の各 a11e1e を特異的に検出するプライマーとして、それぞれ配列番号 28、29 記載のヌクレオチドを用い、実施例 7 - (1) と同様の方法で SNP タイピングを行った。その結果を図 8A ~ F に示す。すなわち図 8 の A ~ F は、それぞれ血液サンプル 1 ~ 6 から抽出したゲノム DNA を鋳型とし実施例 7 - (1) の方法でタイピングした結果を示す電気泳動パターンであり、各図のレー

10

20

30

40

50

ン1は配列番号28(636G検出用)、レーン2は配列番号29(636A検出用)をそれぞれスクレオチドとして用いた場合である。図8のA~Fに示した増幅産物のパターンから、各血液サンプルのCYP2C19 636塩基目のa11e1eは(サンプル1:G/A、2:G/G、3:G/A、4:G/G、5:G/G、6:G/G)とタイピングされた。一方、同じゲノムDNAを鋳型に、実施例7-(2)と同様の方法でPCR-RFLP法によりタイピングを行った。その結果を図7Gに示す。すなわち図7Gは血液サンプル1~6から調製したゲノムDNAを鋳型とし、PCR-RFLP法によりタイピングを行った結果を示す電気泳動パターンであり、レーン1~6はそれぞれ血液サンプル1~6から抽出したゲノムDNAを鋳型とした場合である。図8Gに示す電気泳動結果から、これら各血液サンプルから調製したDNAを鋳型としたPCR増幅産物の切断パターンよりCYP2C19 636塩基目のa11e1eは(サンプル1:G/A、2:G/G、3:G/A、4:G/G、5:G/G、6:G/G)とタイピングされ、前記の結果と一致した。
10

以上のことから、本発明の方法が実際の臨床検体を用いた場合においても有効であることを確認した。

産業上の利用の可能性

上記の、本発明のスクレオチド、ならびに該スクレオチドを使用する塩基置換の検出方法は、天然に存在する、あるいは人為的に導入された塩基置換の検出に有用である。

本発明によれば、標的核酸上の塩基置換の有無を簡便、かつ再現性よく検出することができる。本発明の方法は公知の核酸増幅方法と容易に組み合せることができ、高感度に塩基置換を検出することが可能である。さらに、適切な配列のスクレオチドを組み合わせて使用することにより、塩基置換の有無と同時にどのような塩基への置換が起こっているかを知ることもできる。
20

本発明は、多型やバリエーションのような生物のゲノムDNA上に生じた塩基置換、例えばSNPの検出、同定に使用することができ、ヒトにおける疾患遺伝子の検索、薬剤感受性の解析など、ゲノム創薬、ゲノム医療の分野においても有用である。

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO:1: a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity

from Pyrococcus horikoshii

SEQ ID NO:2: PCR primer 1650Nde for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Pyrococcus furiosus

SEQ ID NO:3: PCR primer 1650Bam for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Pyrococcus furiosus

SEQ ID NO:6: Chimeric oligonucleotide primer to amplify the DNA of a

10

20

30

portion of human c-Ki-ras gene. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:7: Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

SEQ ID NO:8: Chimeric oligonucleotide primer precursor to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 12 to 15 are ribonucleotides, nucleotide 17 is inosine-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group" 10

SEQ ID NO:9: Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 14 and 15 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group" 20

SEQ ID NO:10: Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

SEQ ID NO:11: Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group" 30

SEQ ID NO:12: Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides, nucleotide 17 is inosine-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

SEQ ID NO:13: Nucleotide sequence of AF0621 gene from Archaeoglobus

fulgidus.

SEQ ID NO:14: PCR primer AfuNde for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Archaeoglobus fulgidus.

SEQ ID NO:15: PCR primer AfuBam for cloning a gene encoding a polypeptide having a RNaseHII activity from Archaeoglobus fulgidus.

SEQ ID NO:16: Nucleotide sequence of ORF in RnaseHII from Archaeoglobus fulgidus.

SEQ ID NO:17: Amino acid sequence of RNaseHII from Archaeoglobus fulgidus. 10

SEQ ID NO:18: Designed PCR primer to amplify a portion of c-ki-ras oncogene exon 1

SEQ ID NO:19 Designed PCR primer to amplify a portion of human c-ki-ras oncogene exon 2

SEQ ID NO:20: Designed PCR primer to amplify a portion of human c-ki-ras oncogene exon 2 20

SEQ ID NO:21: Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

SEQ ID NO:22: Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group" 30

SEQ ID NO:23: Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

SEQ ID NO:24: Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 17 to 19 are

ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides”

SEQ ID NO:25: Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. “nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3’-OH group of the nucleotide at 3’ end is protected with amino hexyl group”

SEQ ID NO:26: Designed PCR primer to amplify a portion of human CYP2C19 gene

SEQ ID NO:27: Designed PCR primer to amplify a portion of human CYP2C19 gene

10

SEQ ID NO:28: Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human CYP2C19 gene. “nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3’-OH group of the nucleotide at 3’ end is protected with amino hexyl group”

SEQ ID NO:29: Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human CYP2C19 gene. “nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3’-OH group of the nucleotide at 3’ end is protected with amino hexyl group”

20

SEQ ID NO:30: Chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human CYP2C19 gene. “nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides”

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> Method for detection of nucleotide substitution

<130> 663051

10

<150> JP 2001-39268

<151> 2001-02-15

<150> JP 2001-40721

<151> 2001-02-16

<150> JP 2001-101055

20

<151> 2001-03-30

<150> JP 2001-177381

<151> 2001-06-12

<150> JP 2001-290384

<151> 2001-09-25

30

<150> JP 2001-338440

<151> 2001-11-02

<150> JP 2001-368929

<151> 2001-12-03

<160> 30

<210> 1

<211> 663

<212> DNA

<213> Pyrococcus horikoshii

<400> 1

10

atgaaggttg ctggagttga tgaagcgggg agggggccgg taattggccc gtttagtaatt 60
ggagtagccg ttatagatga gaaaaatatt gagaggttac gtgacattgg ggttaaagac 120
tccaaacaat taactcctgg gcaacgtcaa aaactattta gcaaattaat agatatccta 180
gacgattatt atgttcttct cgttaccccc aaggaaatag atgagaggca tcattctatg 240
aatgaacttag aagctgagaa attegttgta gcettgaatt cttaaggat caagccgcag 300
aagatataatg tggactctgc ccatgttagat cctaagaggt ttgctagtct aataaaggct 360
gggttgaat atgaagccac gggttatcgcc gagcataaag ccgtatgcaaa gtatgagata 420
gtatccgcag catcaataat tgcaaaaggtc actaggata gagagataga gaagctaaag 480
caaaaagtatg gggatattgg ttctggctat ccgagtgate cgagaactaa ggagtggctt 540
gaagaatatt acaaacaata tggtgacttt cctccaatag ttaggagaac ttgggaaacc 600
gcitaggaaga tagaggaag gtttagaaaa aatcagctaa cgcttgataa attccttaag 660
tga 663

20

<210> 2

30

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer 1650Nde for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from Pyrococcus furiosus

40

<400> 2

caggaggaga gacatatgaa aataggggga att 33

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> PCR primer 1650Bam for cloning a gene encoding a polypeptide
having a RNaseHII activity from Pyrococcus furiosus

<400> 3

gaaggttgtg gatccacttt ctaaggtttc tta 33

20

<210> 4

<211> 672

<212> DNA

<213> Pyrococcus furiosus

<400> 4

ataaaaatag gggaaattga cgaagcagga agaggaccag cgatagggcc attagtagta 60

30

gctactgtcg tcgttgaatga gaaaaacatt gagaagctca gaaacattgg agtaaaagac 120

tccaaacaac taacacccccca tgaaaggaag aatttatttt cccagataac ctcaatagcg 180

gatgattaca aaatagtgtat agtatccccca gaagaaatcg acaatagatc aggaacaatg 240

aacgagttag aggttagagaa gtttgctctc gccttaaatt cgcttcagat aaaaccagct 300

cttatatacg ctgatgcagc ggatgttagat gccaatagat ttgcaagctt gatagagaga 360

agactcaatt ataaggcgaa gattattgcc gaacacaagg ccgatgcaaa gtatccagta 420

gttcagcag ctcaatact tgcaaagggtt gtttagggatg agggaaattga aaaattaaaa 480
 aagcaatatg gagactttgg ctctgggtat ccaagtgate caaaaaccaa gaaatggctt 540
 gaagagtact acaaaaaaca caactcttc cctccaatag tcagacgaac ctggaaact 600
 gtaagaaaaaa tagagggaaag cattaaagcc aaaaaatccc agctaacgct tgataaaattc 660
 tttaagaaac ct 672

<210> 5

<211> 224

10

<212> PRT

<213> Pyrococcus furiosus

<400> 5

Met Lys Ile Gly Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Ala Ile

1 5 10 15

Gly Pro Leu Val Val Ala Thr Val Val Val Asp Glu Lys Asn Ile

20

20 25 30

Glu Lys Leu Arg Asn Ile Gly Val Lys Asp Ser Lys Gln Leu Thr

35 40 45

Pro His Glu Arg Lys Asn Leu Phe Ser Gln Ile Thr Ser Ile Ala

50 55 60

Asp Asp Tyr Lys Ile Val Ile Val Ser Pro Glu Glu Ile Asp Asn

65 70 75

30

Arg Ser Gly Thr Met Asn Glu Leu Glu Val Glu Lys Phe Ala Leu

80 85 90

Ala Leu Asn Ser Leu Gln Ile Lys Pro Ala Leu Ile Tyr Ala Asp

95 100 105

Ala Ala Asp Val Asp Ala Asn Arg Phe Ala Ser Leu Ile Glu Arg

110 115 120

Arg Leu Asn Tyr Lys Ala Lys Ile Ile Ala Glu His Lys Ala Asp

40

125	130	135
Ala Lys Tyr Pro Val Val Ser Ala Ala Ser Ile Leu Ala Lys Val		
140	145	150
Val Arg Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Lys Lys Gln Tyr Gly Asp		
155	160	165
Phe Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Lys Thr Lys Lys Trp Leu		
170	175	180
Glu Glu Tyr Tyr Lys Lys His Asn Ser Phe Pro Pro Ile Val Arg		
185	190	195
Arg Thr Trp Glu Thr Val Arg Lys Ile Glu Glu Ser Ile Lys Ala		
200	205	210
Lys Lys Ser Gln Leu Thr Leu Asp Lys Phe Phe Lys Lys Pro		
215	220	

<210> 6 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Chimeric oligonucleotide primer to amplify the DNA of a portion of
human c-Ki-ras gene. "nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides-other
nucleotides are deoxyribonucleotides" 30

<400> 6
ctattgttgg atcatatucg 20

<210> 7
<211> 18 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on
human c-Ki-ras gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other
nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the
nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

10

<400> 7

tggtagttgg agcuggtg 18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on
human c-Ki-ras gene. "nucleotides 12 to 15 are ribonucleotides,
nucleotide 17 is inosine-other nucleotides are deoxyribonucleotides and
the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl
group"

30

<400> 8

tggtagttgg agcuggng 18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on
human c-Ki-ras gene. "nucleotides 14 and 15 are ribonucleotides--other
nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the
nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

10

<400> 9

tggtagttgg agcuggtg 18

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on
human c-Ki-ras gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides--other
nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the
nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

30

<400> 10

tggtagttgg agcuugtg 18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

10

<400> 11

tggtagttgg agcucgtg 18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides, nucleotide 17 is inosine-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

30

<400> 12

tggtagttgg agcuagng 18

<210> 13

<211> 626

<212> DNA

<213> Archaeoglobus fulgidus

<400> 13

atgaaggcag gcatcgatga ggctggaaag ggctgcgtca tcggccact ggttgttgc 60
ggagtggctt gcagcgatga ggataggctg agaaagctt gtgtgaaaga ctccaaaaag 120
ctaagtcaagg ggaggagaga ggaactagcc gagaaataa gaaaaatctg cagaacggag 180
gttttcaaag tttctcccga aaatctcgac gaaaggatgg ctgctaaaac cataaacgag 240
atttttaagg agtgetacgc taaaataatt ctcaggctga agccggaaat tgcttatgtt 300
gacagtcctg atgtgattcc cgagagactt tcgagggagc ttgaggagat tacggggtt 360
agagttgtgg ccgagcacaa ggcggacgag aagtatcccc tggtagctgc ggcttcaatc 420
atcgcaaagg tggaaaggga gcgggagatt gagaggctga aagaaaaatt cggggatttc 480
ggcagcggct atgcgagcga tccgaggaca agagaagtgc tgaaggagtg gatagctca 540
ggcagaattc cgagctgcgt gagaatgcgc tggaaagacgg tgtcaaattct gaggcagaag 600
acgtttgacg atttctaaac gaaacc 626

10

20

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer AfuNde for cloning a gene encoding a polypeptide having
30 a RNaseHII activity from Archaeoglobus fulgidus

30

<400> 14

aagctgggtt tcatatgaag gcaggcatcg 30

<210> 15

<211> 30

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer AfuBam for cloning a gene encoding a polypeptide having
a RNaseHII activity from Archaeoglobus fulgidus

<400> 15

10

tggtaataac ggatccgtt agaaatcg 30

<210> 16

<211> 638

<212> DNA

<213> Archaeoglobus fulgidus

20

<400> 16

catatgaagg caggcatcga tgaggctgga aagggtcg cg tcatggccc actggtttt 60

gcaggagtg gg cttgcagcga tgaggatagg ctgagaaaagc ttggtgtgaa agactccaaa 120

aagctaagtc aggggaggag agaggaacta gcccggaaa taaggaaaat ctgcagaacg 180

gaggtttga aagtttctcc cgaaaatctc gacgaaagga tggctgctaa aaccataaac 240

gagatttga aggagtgcta cgctgaaata atttcaggc tgaagccgga aattgcttat 300

gttgacagtc ctgatgtgat tcccgagaga ctttcgggg agcttgagga gattacgggg 360

30

ttgagagtgg tggccgagca caaggccggac gagaagtatc ccctggtagc tgccgcttca 420

atcategcaa aggtggaaag ggagcggggat attgagaggc tgaaagaaaa attcggggat 480

ttcggcagcg gctatgcgag cgatccgagg acaagagaag tgctgaagga gtggatacg 540

tcaggcagaa ttccgagatc cgtgagaatc cgctgaaaga cggtgtcaaa tctgaggcag 600

aagacgcctt acgatttcta aacggatccc cgggtacc 638

<210> 17

40

<211> 205

<212> PRT

<213> Archaeoglobus fulgidus

<400> 17

Met Lys Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Lys Gly Cys Val Ile Gly				
1	5	10	15	
Pro Leu Val Val Ala Gly Val Ala Cys Ser Asp Glu Asp Arg Leu				10
20	25	30		
Arg Lys Leu Gly Val Lys Asp Ser Lys Lys Leu Ser Gln Gly Arg				
35	40	45		
Arg Glu Glu Leu Ala Glu Glu Ile Arg Lys Ile Cys Arg Thr Glu				
50	55	60		
Val Leu Lys Val Ser Pro Glu Asn Leu Asp Glu Arg Met Ala Ala				
65	70	75		20
Lys Thr Ile Asn Glu Ile Leu Lys Glu Cys Tyr Ala Glu Ile Ile				
80	85	90		
Leu Arg Leu Lys Pro Glu Ile Ala Tyr Val Asp Ser Pro Asp Val				
95	100	105		
Ile Pro Glu Arg Leu Ser Arg Glu Leu Glu Glu Ile Thr Gly Leu				
110	115	120		
Arg Val Val Ala Glu HisLys Ala Asp Glu Lys Tyr Pro Leu Val				30
125	130	135		
Ala Ala Ala Ser Ile Ile Ala Lys Val Glu Arg Glu Arg Glu Ile				
140	145	150		
Glu Arg Leu Lys Glu Lys Phe Gly Asp Phe Gly Ser Gly Tyr Ala				
155	160	165		
Ser Asp Pro Arg Thr Arg Glu Val Leu Lys Glu Trp Ile Ala Ser				
170	175	180		40

Gly Arg Ile Pro Ser Cys Val Arg Met Arg Trp Lys Thr Val Ser

185

190

195

Asn Leu Arg Gln Lys Thr Leu Asp Asp Phe

200

205

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed PCR primer to amplify a portion of c-ki-ras oncogene exon

1

<400> 18

20

ctattgttgg atcatattcg

20

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Designed PCR primer to amplify a portion of human c-ki-ras
oncogene exon 2

<400> 19

ttcc tacgga agcaaggtag

19

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed PCR primer to amplify a portion of human c-ki-ras
oncogene exon 2

10

<400> 20

cacaaagaaa gcccctccca 20

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on
human c-Ki-ras gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other
nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the
nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

30

<400> 21

tgcacacagc aggucaag 18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

10

<400> 22

tcgacacagc agguaaag 18

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

30

<400> 23

tcgacacagc aggugaag 18

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 17 to 19 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

<400> 24

acaaagaaag ccctccccca 19

10

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on human c-Ki-ras gene. "nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

20

<400> 25

ttgtaggtat tggagcuggt g 21

30

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed PCR primer to amplify a portion of human CYP2C19 gene

<400> 26

tattatctgt taactaatat ga 22

<210> 27

<211> 20

<212> DNA 10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed PCR primer to amplify a portion of human CYP2C19 gene

<400> 27

acttcagggc ttggtaata 20 20

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on
human CYP2C19 gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other
nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the
nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group"

<400> 28

gtaaggcaccc ccuggatc 18

40

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect the nucleotide substitution on
human CYP2C19 gene. "nucleotides 13 to 15 are ribonucleotides-other
nucleotides are deoxyribonucleotides and the 3'-OH group of the
nucleotide at 3' end is protected with amino hexyl group" 10

<400> 29

gtaaggcaccc ccugaatc

18

<210> 30

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

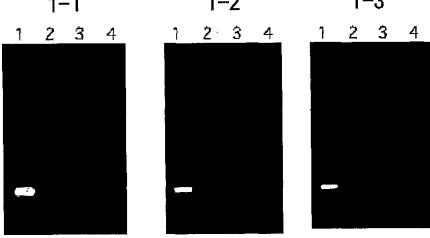
<223> Chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human
CYP2C19 gene. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other
nucleotides are deoxyribonucleotides" 30

<400> 30

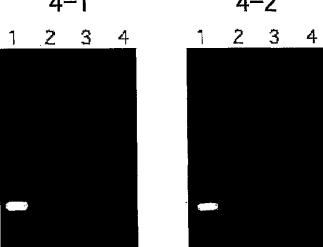
ttggtaata tagaatitug g

21

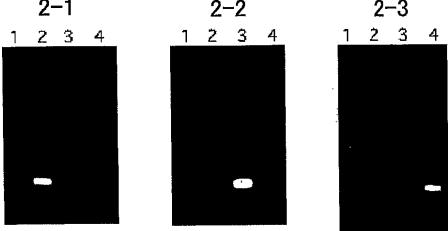
【図1】



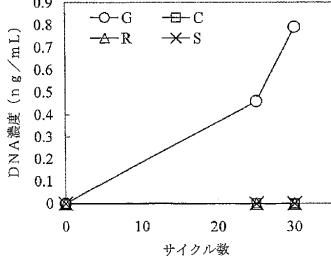
【図4】



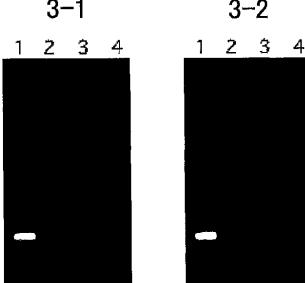
【図2】



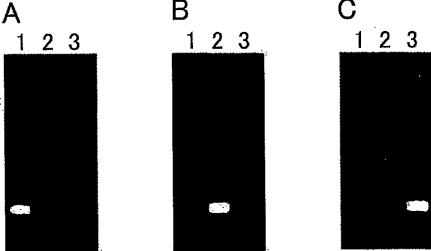
【図5】



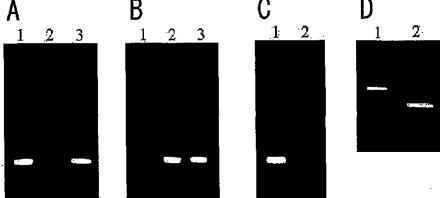
【図3】



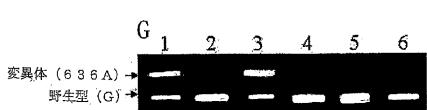
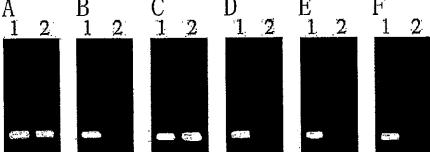
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 特願2001-177381(P2001-177381)

(32) 優先日 平成13年6月12日(2001.6.12)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

(31) 優先権主張番号 特願2001-290384(P2001-290384)

(32) 優先日 平成13年9月25日(2001.9.25)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

(31) 優先権主張番号 特願2001-338440(P2001-338440)

(32) 優先日 平成13年11月2日(2001.11.2)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

(31) 優先権主張番号 特願2001-368929(P2001-368929)

(32) 優先日 平成13年12月3日(2001.12.3)

(33) 優先権主張国 日本国(JP)

早期審査対象出願

(72) 発明者 加藤 郁之進

京都府宇治市南陵町1-1-150

審査官 高堀 栄二

(56) 参考文献 特開昭62-190086(JP,A)

特表平02-504110(JP,A)

特表平06-500021(JP,A)

米国特許第5660988(US,A)

特開平8-56700(JP,A)

米国特許第5137806(US,A)

国際公開第01/42498(WO,A1)

国際公開第97/27214(WO,A1)

国際公開第00/56877(WO,A1)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,Vol.88,No.16(1991)p.7276-7280

日本鑑識科学技術学会誌,Vol.6,別冊(2001.0ct.)p.73

(58) 調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed

CA(STN)

REGISTRY(STN)

JICSTファイル(JOIS)