

(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. Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 24 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2002-565143 (P2002-565143)	(73) 特許権者	302019245 タカラバイオ株式会社
(86) (22) 出願日	平成14年2月14日(2002.2.14)		滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号
(86) 国際出願番号	PCT/JP2002/001222	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開番号	W02002/064833		弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開日	平成14年8月22日(2002.8.22)	(74) 代理人	100106518
審査請求日	平成15年8月7日(2003.8.7)		弁理士 松谷 道子
(31) 優先権主張番号	特願2001-39268 (P2001-39268)	(74) 代理人	100116311
(32) 優先日	平成13年2月15日(2001.2.15)		弁理士 元山 忠行
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100122301
(31) 優先権主張番号	特願2001-40721 (P2001-40721)		弁理士 富田 憲史
(32) 優先日	平成13年2月16日(2001.2.16)	(72) 発明者	佐川 裕章
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		滋賀県草津市西渋川2丁目6-32
(31) 優先権主張番号	特願2001-101055 (P2001-101055)	(72) 発明者	小林 英二
(32) 優先日	平成13年3月30日(2001.3.30)		滋賀県大津市一里山6丁目18-19
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		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って、

(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】

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断箇所の 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断箇所の 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断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断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】

DNA ポリメラーゼの作用によって生成する伸長産物を鋳型とした核酸増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 17 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 19】

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 20】

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 19 記載のキット。

【請求項 21】

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 19 記載のキット。

【請求項 22】

核酸増幅法を実施するための試薬をさらに含有する 請求項 19 記載のキット。

20

【請求項 23】

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 24】

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 23 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 1000 塩基に 1 ヶ所程度の割合で存在するといわれ、ヒトのゲノム上には 300 万 ~ 1000 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) の違いを知るための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5660988号公報記載のサイクルプローブ反応(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ブ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、当該プローブは開裂し、塩基置換がある場合には、当該プローブは開裂しない。その後、開裂したプローブ由来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、該プローブ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5210015号、第5487972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プローブを使用する。該プローブは、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。該プローブ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、当該プローブが分解され、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'末端がブ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5137806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01/42498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。当該方法はプローブ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ブ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ブ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、プローブ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5846717号記載のインベダー(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ブを設計し、当該プローブ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は前もって標的核酸を増幅する必要がある。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ＳＮＰ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がなく、かつ、アニーリングした鋳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、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る。

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鋳型とした核酸増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。

10

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。

20

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することができる。

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。

30

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。

40

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

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、核酸に人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。

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SNP (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。

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。

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。

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。



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断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付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。

10

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断が左右される。ヌクレオチドが切断されて新たな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。

20

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ができる。

30

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断によって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断箇所より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断もしくは切断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鎖を選択的に切断する酵素である。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で切断されるヌクレオチドとすることができる。

40

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断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増幅反応と組み合わせて使用する

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可能である。

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<sub>a</sub> - N<sub>b</sub> - dN<sub>c</sub> - N' - 3'

(a: 1以上11以下の整数、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<sub>b</sub>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 ( $dNc - N'$ ) 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( $^{32}P$ 等)、色素、蛍光物質、発光物質、種々のリガンド(ピオチン、ジゴキシゲニン等)、酵素等が使用できる。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り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わせ、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包含される。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。

## (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

。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を鋳型として調製した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、精製が包含される。

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ペクトルによって測定する方法等を挙げることができる。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

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、鋳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（3SR；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。これらの方法において、鋳型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 electrophoresis）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、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

10

20

30

40

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。

10

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。

20

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こと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。

30

(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。

40

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RNAse H I I 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

50

社製) 0.5%、可溶性でんぷん(ナカライテスク社製) 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%、 $MgSO_4$  0.003%、 $NaCl$  0.001%、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.0001%、 $CoSO_4$  0.0001%、 $CaCl_2 \cdot 7H_2O$  0.0001%、 $ZnSO_4$  0.0001%、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.1ppm、 $KAl(SO_4)_2$  0.1ppm、 $H_3BO_4$  0.1ppm、 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.1ppm、 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$  0.25ppmの組成の培地2リットルを2リットル容のメジウムボトルにいれ、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*、ドイツ ザムルンク フォン ミクロオルガニズメンより購入: 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。

10

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(ナカライテスク社製)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 HII 遺伝子のクローニング

20

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 HII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。

30

参考例1-(1)で得たピロコッカス フリオサス ゲノムDNA 200ngを鋳型にして、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エクタック(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。増幅した約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 HII 遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

40

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 HII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 HII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日より日本国特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

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FERM BP-7654 [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RNase HII 標品の調製

参考例1-(2)で得られたpPFU220を大腸菌HMS174(DE3)(ノバジェン社製)に形質転換し、得られたpPFU220を含む大腸菌HMS174(DE3)を100 µg/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66.0 mlのソニケーションバッファー〔50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、2 mM フェニルメタンスルフォニルフルオリド〕に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を12000 rpm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12000 rpmで10分の遠心分離を行い、上清を集め、61.5 mlの熱処理上清液を得た。

この熱処理上清液をバッファーA〔50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM 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、RNase HIIはRESOURCE Qカラムを素通りした。

素通りしたRNase HII画分60.0 mlをバッファー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システムを用いて0~500 mM NaCl直線濃度勾配により溶出し、約150 mM NaClのところに溶出されたRNase HII画分を得た。

このRNase HII画分2.0 ml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、250 µlの濃縮液を100 mM NaCl、0.1 mM EDTAを含む50 mM Tris-HCl (pH 8.0)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、RNase HIIは、17キログ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Pfu RNase HII 標品とした。上記で得られたPfu RNase HII 標品を用いて下記の方法によりRNase H活性を測定した。

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM 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、20 µg/ml ポリ(dT)(アマシャムファルマシア バイオテク社製)、30 µg/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RNase H活性を測定するための基質液として使用した。

100 µlの基質液に1 µlの1 M MnCl<sub>2</sub>を加えて40℃で保温し、これに上記のPfu RNase HII 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、10 µlの0.5 M EDTAを加えて反応を停止し、260 nmにおける吸光度を測定した。

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

#### (5) 精製RNase H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40 mM Tris-HCl (pH 7.7、37℃)、4 mM 塩化マグネシウム、1 mM DTT、0.003% BSA、4%グリセロール、24 µM ポリ(dT)になるように滅菌水で調製した。

ポリ[8-<sup>3</sup>H]アデニル酸溶液：370 kBqのポリ[8-<sup>3</sup>H]アデニル酸溶液を20

10

20

30

40

50

0  $\mu$ l 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 25 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)、30 mM 塩化ナトリウム、50%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 985  $\mu$ l にポリ[8-<sup>3</sup>H]アデニル酸溶液 7  $\mu$ l 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 24  $\mu$ M になるように 8  $\mu$ l 加え、さらに 37 で 5 分間保持した。このようにしてポリ[8-<sup>3</sup>H]rA-ポリ dT 反応液 1000  $\mu$ l を調製した。次に、該反応液 200  $\mu$ l 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  $\mu$ l を加え、これらの反応液を経時的に 50  $\mu$ l 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  $\mu$ l およびブランク用反応液 50  $\mu$ l は、酵素液の代わりに酵素希釈液を 1  $\mu$ l 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  $\mu$ l、熱変性子牛胸腺 DNA 溶液 50  $\mu$ l および 10%トリクロロ酢酸 300  $\mu$ l (全 CPM 測定の場合は、超純水 300  $\mu$ l) 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  $\mu$ l 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-<sup>3</sup>H]rA-ポリ dT の 50  $\mu$ l 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 HII 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、ドイッチェ ザムルンクフォン ミクロオルガニズメン ウント ツェルクルツレン GmbH より購入：DSM 4139) 8 ml 相当分の菌体を集め、100  $\mu$ l の 25% ショ糖、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) に懸濁し、20  $\mu$ l の 0.5 M EDTA、10  $\mu$ l の 10 mg/ml 塩化リゾチーム (ナカライテスク社製) 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  $\mu$ l の 150 mM NaCl、1 mM EDTA、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10  $\mu$ l の 20 mg/ml プロテイナーゼ K (宝酒造社製) 及び 50  $\mu$ l 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  $\mu$ l の TE に溶解してゲノム DNA 溶液を得た。

#### (2) RNase HII 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 巻、第 364 - 370 頁 (1997)]、RNase HII 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/bt/m/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 A f u N d

10

20

30

40

50



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 30 ng を鋳型にして、20 pmol の A f u N d e 及び 20 pmol の A f u B a m をプライマーに用い、100 µl 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 で30秒、55 で30秒、72 で1分を1サイクルとし、40サイクル行った。増幅した約0.6 kbのDNA断片をN d e I 及び B a m H I (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p T V 1 1 9 N d (p T V 1 1 9 N の N c o I サイトをN d e I サイトに変換したもの)のN d e I 及び B a m H I 間に組込んだプラスミドp A F U 2 0 4 を作製した。

10

(3) R N a s e H I I 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p A F U 2 0 4 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、R N a s e 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R N a s e H I I 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p A F U 2 0 4 で形質転換された大腸菌J M 1 0 9 は、Escherichia coli JM109/pAFU204と命名、表示され、平成13年2月22日より日本国特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F E R M 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F E R M B P - 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R N a s e H I I 標品の調製

参考例2 - (2) で得られたp A F U 2 0 4 で大腸菌J M 1 0 9 を形質転換し、得られたp A F U 2 0 4 を含む大腸菌J M 1 0 9 を100 µg/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37.1 mlのソニケーションバッファー(50 mM T r i s - H C l (pH 8.0)、1 mM E D T A、2 mMフェニルメタンスルフォニルフルオリド)に懸濁し、超音波破碎機にかけた。この破碎液を12000 rpm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12000 rpmで10分間の遠心分離を行い、上清を集め、40.3 ml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(50 mM T r i s - H C l (pH 8.0)、1 mM E D T A)で平衡化したR E S O U R S E 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、F P L C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、R N a s e H I I はR E S O U R S E Qカラムを素通りした。

バッファーAで平衡化したR E S O U R S E 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、F P L C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、R N a s e H I I はR E S O U R S E Sカラムを素通りした。

40

素通りしたR N a s e H I I 画分 40.0 mlを50 mM N a C lを含むバッファーB(50 mM T r i s - H C l (pH 7.0)、1 mM E D T A)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40.2 mlを50 mM N a C lを含むバッファーBで平衡化したH i T r a p - h e p a r i nカラム(アマシャム ファルマシア バイオテク社製)に供し、F P L Cシステムを用いて50 ~ 550 mM N a C l直線濃度勾配により溶出した。その結果、約240 mM N a C lのところ溶出されたR N a s e H I I 画分を得た。

このR N a s e H I I 画分7.8 ml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600 µlの濃縮液を4回に分けて100 mM N a C l、0.

50

1 mM EDTAを含む50 mM Tris-HCl (pH 7.0) で平衡化した Superose 6 ゲルろ過カラム (アマシャム ファルマシア バイオテック社製) 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 Afu RNase HII 標品とした。

上記で得られた Afu RNase HII 標品を用いて、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、Afu RNase HII 標品に 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 (rA) 及びポリ (dT) (ともにアマシャム ファルマシア バイオテック製) 1 mg をそれぞれ 1 mM EDTA を含む 40 mM トリス-HCl (pH 7.7) 1 ml に溶解し、ポリ (rA) 溶液及びポリ (dT) 溶液を調製した。

次に、4 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、0.003 % BSA、4 % グリセロールを含む 40 mM トリス-HCl (pH 7.7) に、終濃度 20 µg/ml となるポリ (rA) 溶液、終濃度 30 µg/ml となるポリ (dT) 溶液を加え、37 °C で 10 分間反応後、4 °C に冷却し、ポリ (rA) - ポリ (dT) 溶液を調製した。このポリ (rA) - ポリ (dT) 溶液 100 µl に任意に希釈した酵素液 1 µl を加え、40 °C 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 °C 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 (rA) - ポリ (dT) 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 A<sub>260</sub> 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。

20

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 によって得られた増幅産物を pT7-Blue 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、得られた増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。

30

(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ル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、核酸増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。

40

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

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ヌ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 RNase H II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。

10

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ル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。

20

30

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。

40

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

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RNase H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RNase Hを使用して試みた。

すなわち、Pfu RNase H I I にかえて参考例2に記載のAfu RNase H I 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RNase HであるMja RNase H I I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Afu RNase H I I、Mja RNase H I Iを使用した反応の結果を示す。

図4に示されるように、Afu RNase H I I、Mja RNase H I I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にのみ増幅産物が観察されており、これらのRNase H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ル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 RNase H I I、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alleleの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、鋳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-Blu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ぞれを常法で精製し、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ル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

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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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 の加熱処理により鋳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、11 U の Afu RNase HII（宝酒造社製）及び、5.5 U 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  $\mu$ l を添加し、最終容量を 25  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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 をそれぞれ鋳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 allele 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 allele 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 を鋳型として用いた。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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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 の加熱処理により鋳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、11 U の Afu RNase HII、5.5 U の BcaBest DNA ポリメラーゼおよび滅菌水を含む全液量 20  $\mu$ l を添加し、最終容量を 25  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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

ラスミド 6 3 6 G の場合、レーン 2 はプラスミド 6 3 6 A の場合、レーン 3 はプラスミド 6 3 6 G / A を用いた場合を示す。

また、図 7 B は、ヌクレオチド 6 3 6 A 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 6 3 6 G の場合、レーン 2 はプラスミド 6 3 6 A の場合、レーン 3 はプラスミド 6 3 6 G / A を用いた場合を示す。図 7 A 及び 7 B 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 a l l e l e 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、P C R - R F L P 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 1 5 0 n g を鋳型として上記 ( 1 ) と同様の方法で S N P タイピングを行った。その結果を図 7 C に示す。すなわち、図 7 C は、ヒトゲノム DNA の S N P 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 6 3 6 G を用いた場合、レーン 2 はヌクレオチド 6 3 6 A を用いた場合である。

図 7 C に示したようにヌクレオチド 6 3 6 G 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 C Y P 2 C 1 9 6 3 6 塩基目の a l l e l e は、( 6 3 6 G / 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 P C R - R F L P 法によるタイピングを行った。まず、ゲノム DNA 1 5 0 n g を用いて、配列表の配列番号 2 6 および 2 7 のプライマーを用いて P C R 反応を行った。得られた P C R 増幅産物を B a m H I 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 7 D に示す。すなわち、図 7 D は、ヒトゲノム DNA を鋳型とし P C R - R F L P 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 P C R 増幅産物、レーン 2 は該 P C R 増幅産物を B a m H I で処理した場合である。

図 7 D に示したように、P C R 増幅産物が B a m H I により完全消化されたことから、P C R - R F L P 法においてもこのゲノム DNA の C Y P 2 C 1 9 6 3 6 塩基目の a l l e l e は ( 6 3 6 G / 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 P C R - R F L P 法による S N P 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 6 3 6 G 、 6 3 6 A 、 6 3 6 G / 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 6 3 6 G ならびにヌクレオチド 6 3 6 A の 5 ' 末端にお互いに識別可能な蛍光標識 R o x ( A B I 社製 ) 、 F a m ( A B I 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ずつ混合して用いた。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 F M - B I O I I M u l t i - V i e w ( 宝酒造社製 ) にて解析した。その結果、鋳型がプラスミド 6 3 6 G の場合は蛍光標識 R o x 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 6 3 6 A の場合は蛍光標識 F a m 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 6 3 6 G / A の場合は R o x 及び F a m 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康人全血 2 0 0  $\mu$  l ( サンプル番号 1 ~ 6 ) より G e n とるくん<sup>TM</sup> ( 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 1 6 0 n g を鋳型として、6 3 6 G 、 6 3 6 A の各 a l l e l e 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 2 8 、 2 9 記載のヌクレオチドを用い、実施例 7 - ( 1 ) と同様の方法で S N P タイピングを行った。その結果を図 8 A ~ 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 (636 G 検出用)、レーン 2 は配列番号 29 (636 A 検出用) をそれぞれヌ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 allele 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 7 G に示す。すなわち図 7 G 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 8 G 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 allele 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、本発明のヌクレオチド、ならびに該ヌ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わせることができ、高感度に塩基置換を検出することが可能である。さらに、適切な配列のヌクレオチドを組み合わせることで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することもできる。

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*

30

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

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

```

atgaagggtg ctggagttga tgaagcgggg agggggccgg taattggccc gttagtaatt 60
ggagtagccg ttatagatga gaaaaatatt gagaggttac gtgacattgg ggttaaagac 120
tccaaacaat taactcctgg gcaacgtgaa aaactattta gcaaattaat agatataccta 180
gacgattatt atgtttctct cgttaccccc aaggaaatag atgagaggca tcattctatg 240
aatgaactag aagctgagaa attcgttgta gccttgaatt cttaaggat caagccgcag 300
aagatatatg tggactctgc cgatgtagat cctaagaggt ttgctagtct aataaaggct 360
gggttgaaat atgaagccac ggttatcgcc gagcataaag ccgatgcaaa gtatgagata 420
gtatcggcag catcaataat tgcaaaggtc actagggata gagagataga gaagctaaag 480
caaaagtatg gggaatttgg ttctggctat ccgagtgatc cgagaactaa ggagtggctt 540
gaagaatatt acaacaata tggtagcttt cctccaatag ttaggagaac ttgggaaacc 600
gctaggaaga tagaggaaag 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

&lt;400&gt; 2

caggaggaga gacatatgaa aataggggga att 33

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

10

&lt;220&gt;

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

&lt;400&gt; 3

gaaggttgtg gatccacttt ctaaggtttc tta 33

20

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 672

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pyrococcus furiosus

&lt;400&gt; 4

atgaaaatag ggggaattga cgaagcagga agaggaccag cgatagggcc attagtagta 60  
gctactgtcg tcgttgatga gaaaaacatt gagaagctca gaaacattgg agtaaaagac 120  
tccaaacaac taacacccca tgaaaggaag aatttatttt ccagataac ctcaatagcg 180  
gatgattaca aaatagtgat agtatcccca gaagaaatcg acaatagatc aggaacaatg 240  
aacgagttag aggtagagaa gtttgcctc gccttaaatt cgcttcagat aaaaccagct 300  
cttatatacg ctgatgcagc ggatgtagat gccaatagat ttgcaagctt gatagagaga 360  
agactcaatt ataaggcgaa gattattgcc gaacacaagg ccgatgcaaa gtatccagta 420

30

gtttcagcag cttcaatact tgcaaagggtt gttagggatg aggaaatga aaaattaaaa 480  
 aagcaatatg gagacttttg ctctgggtat ccaagtgatc caaaaaccaa gaaatggctt 540  
 gaagagtact acaaaaaaca caactcttct cctccaatag tcagacgaac ctgggaaact 600  
 gtaagaaaaa tagaggaaag cattaaagcc aaaaaatccc agctaacgct tgataaatc 660  
 ttaagaaac 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

10

&lt;210&gt; 6

20

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<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

&lt;400&gt; 6

ctattgttgg atcatatucg

20

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 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

tggtagtgg 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

tggtagtgg agcuugt

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 gcacgatga ggctggaaag ggctgcgtca tggccact ggttggtgca 60
ggagtggctt gcacgatga ggataggctg agaaagcttg gtgtgaaaga ctccaaaag 120
ctaagtcagg ggaggagaga ggaactagcc gaggaataa ggaaaatctg cagaacggag 180
gttttgaaag tttctccga aaatctcgac gaaaggatgg ctgctaaaac cataaacgag 240
atttgaagg agtgetacgc tgaataatt ctcaggctga agcggaaat tgcttatgtt 300
gacagtctg atgtgattcc cgagagactt tcgagggagc ttgaggagat tacggggttg 360
agagtgttg ccgagcacia ggaggacgag aagtatcccc tggtagctgc ggcttcaatc 420
atcgcaaagg tggaaggga gcgggagatt gagaggctga aagaaaaatt cggggatttc 480
ggcagcggct atcgagcga tccgaggaca agagaagtgc tgaaggagt gatagcttca 540
ggcagaattc cgagctcgt gagaatgcgc tggagacgg tgcataatct gaggcagaag 600
acgttgacg atttctaac 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  
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

tggtataaac ggatccgttt agaaatcgtc 30

10

<210> 16

<211> 638

<212> DNA

<213> *Archaeoglobus fulgidus*

20

<400> 16

catatgaagg caggcatcga tgaggctgga aagggtcgc tcacggccc actggttgtt 60  
gcaggagtgg cttgcagcga tgaggatagg ctgagaaagc ttggtgtgaa agactccaaa 120  
aagctaagtc aggggaggag agaggaacta gccgaggaaa taaggaaaat ctgcagaacg 180  
gaggttttga aagttttctc cgaataatct gacgaaagga tggctgctaa aaccataaac 240  
gagattttga aggagtgtga cgtgaaata attctcaggc tgaagccgga aattgcttat 300  
gttgacagtc ctgatgtgat tcccgagaga ctttcgaggg agcttgagga gattacgggg 360  
ttgagagttg tgcccgagca caaggcggac gagaagtatc ccctggtagc tgcggcttca 420  
atcategcaa aggtggaaag ggagcgggag attgagaggc tgaaagaaaa attcggggat 480  
ttcggcagcg gctatgcgag cgatccgagg acaagagaag tgctgaagga gtggatagct 540  
tcaggcagaa ttccgagctg cgtgagaatg cgctggaaga cgggtgtcaa tctgaggcag 600  
aagacgcttg acgatttcta aacggatccc cgggtacc 638

30

<210> 17

40

&lt;211&gt; 205

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Archaeoglobus fulgidus

&lt;400&gt; 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

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

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

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

10

20

30

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

ttcctacgga agcaagtag

19

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

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

10

<400> 20

cacaaagaaa gccctcccca

20

<210> 21

<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> 21

tcgacacagc 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 ccctcccca

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

ttgtgtagt 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>

30

<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

gtaagcaccc 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

gtaagcaccc ccugaatc

18

<210> 30

20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

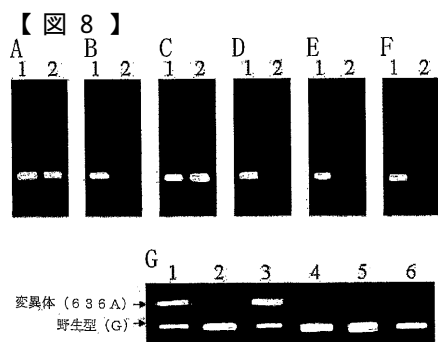
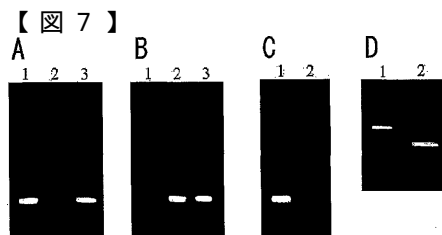
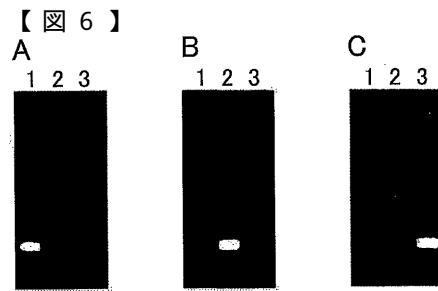
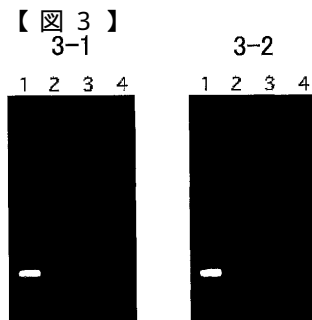
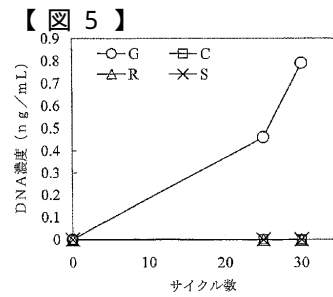
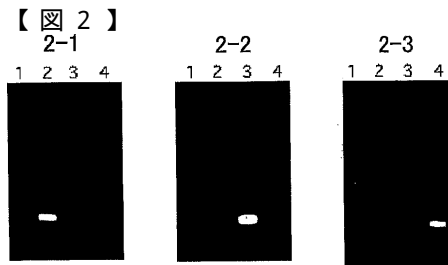
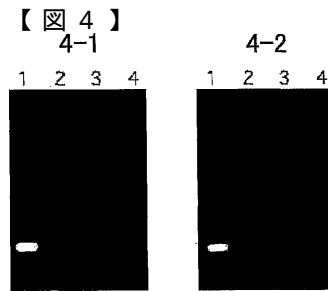
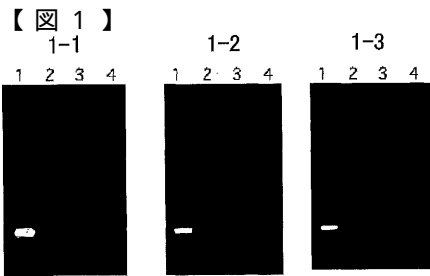
<223> Chimeric oligonucleotide primer to amplify a portion of human CYP2C19 gene. "nucleotides 19 to 21 are ribonucleotides-other nucleotides are deoxyribonucleotides"

30

<400> 30

ttggtcaata tagaatttug g

21



## 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.Oct.)p.73

- (58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>,DB名)  
BIOSIS/WPI(DIALOG)  
PubMed  
CA(STN)  
REGISTRY(STN)  
JICSTファイル(JOIS)