明 細 書

発明の名称

βグロビン遺伝子の変異を検出するためのマイクロアレイ及びその検出方法

技術分野

本発明は、βグロビン遺伝子の変異を検出するためのプローブ群、それを有するマイクロアレイ、及びそれを用いたβグロビン遺伝子の変異を検出する方法に関する。

背景技術

ヒトゲノムは、約３０億の遺伝子暗号（塩基）により構成されているが、個人間において多くの遺伝子暗号（塩基配列）の違いが存在することが明らかになってきている。現在、これら塩基配列の違いの中で、特に一塩基多型 （ＳＮＰ）が注目を集めている。

一塩基多型（ＳＮＰ）とは、ＤＮＡの塩基配列の中でたった１つの塩基の違うことであり、酒に強い弱いや、薬が効きやすいかどうかなど、人間の個性の最小単位にあたるものである。ヒトゲノム３０億塩基対の内、一塩基多型（ＳＮＰ）は約３００万個（５００～１０００塩基対に１個の割合）～１０００万個存在すると示唆され、特定のタンパク質が生成されなかったり、他人と違うものが生成されたりすることにより個人差（体質）、人種差などの違いをもたらしている。ヒトにおける遺伝子の個人差の研究では、一塩基多型を解析して、病気に対する感受性や薬物への応答を調べ、そのヒト個人にあった副作用の少ない薬を投薬するようなオーダーメイド医療が可能になると言われ、一塩基多型（ＳＮＰ）の解析の研究が進められている。

一塩基多型 （ＳＮＰ）が注目を集める理由は、核酸解析技術の向上により多数のＳＮＰの解析が可能となり、また疾患とＳＮＰとの関連が明らかになってきたからである。疾患関連遺伝子や、薬剤代謝の個人差の解析及び慢性疾患など広範囲な領域でＳＮＰとの関連が明らかになってきている。今後もＳＮＰとこれらの関連が

益々明らかになってくるものと期待されている。

核酸解析技術は、非常に多くの試料を取扱い、膨大な数の操作が含まれているが、複雑で時間がかかり、一般に高い精度が要求されるものである。核酸解析技術の内、多数の遺伝子変異を速やかに高い精度で検出する手段として、ＳＮＰ検出用ＤＮＡチップ（ＤＮＡチップは、ＤＮＡマイクロアレイとも言う。以下特に断らない限り同義とする。）が有効であることが知られている。

ＤＮＡチップとは、核酸プローブ（プローブ）が担体のそれぞれ決まった区画に固定化されたものであり、通常、核酸プローブには、被検核酸断片に対して相補的な塩基配列を有する１本鎖のＤＮＡあるいはオリゴヌクレオチド分子が用いられる。

ＳＮＰ検出用ＤＮＡチップには、核酸プローブとして、変異核酸の検査対象部位に相当する核酸断片の相補鎖が固定されている。変異の検査対象部位には、通常、１つの正常型と複数の変異型が存在し、それらのいずれかにマッチングする核酸プローブがプロット内に配列される。被検試料は、変異した検査対象部位に相当する核酸断片のみをＰＣＲ法に代表される核酸増幅法により増幅させた検体液を用いる。

この検体液を、ＳＮＰ検出用ＤＮＡチップの核酸プローブが固定された面に接触させ、検体核酸断片と対応する核酸プローブ間でハイブリダイゼーションを起こさせる。そして、このハイブリダイゼーションによる結合を光学的、あるいは、電気化学的なシグナルとして検出することにより、核酸プローブと結合した検体核酸断片を同定し、かつ、定量することができる。

ここで、核酸プローブと検体の組合せが、野生型プローブと野生型検体、あるいは、変異型プローブとそれに対応する変異型検体のようなパーフェクトマッチでは、ハイブリダイゼーションが完全であり強い結合となる。一方、核酸プローブと検体の組合せが、野生型プローブと変異型検体、あるいは、変異型プローブと野生型検体のようなミスマッチでは、水素結合の出来ない部位を必然的に伴うので、ハイブリダイゼーションが不完全であり、弱い結合となる。

通常、高い特異性を維持するために温度、塩、洗剤、溶媒、カオトロピック剤及び変性剤の種々の組合せにより達成される最も厳格な条件下でハイブリダイゼー

ションを行い、パーフェクトマッチとミスマッチとにおけるハイブリダイゼーションの結合力の差異に由来するシグナル強度の差異を検出することにより、検体中の遺伝子型を識別し、確定することが可能になる。

ところで、ヘモグロビンは、酸素を肺から細胞へそして二酸化炭素を細胞から肺へ運搬する鉄含有のアロステリック複合体タンパク質である。ヘモグロビンAは、主要な成熟ヘモグロビンタンパク質であり、4つのポリペプチド鎖（2つのα－グロビン鎖及び2つのβグロビン鎖）を含む。

多くのヒトの病気は、ヘモグロビンポリペプチド鎖をコードする1つ以上の遺伝子に影響を与える遺伝子変異に原因があるとされる。このような病気には鎌状赤血球貧血が含まれ、ヘモグロビンβ鎖中の点変異により生じる。また、βサラセミア症状は、1つの型のグロビン鎖の不十分な合成によって表現型で顕著になった遺伝子変異から生じる血液関連疾患であり、他の型のグロビン鎖の過剰合成を生じる（例えば、非特許文献1参照）。

一方、分子生物学的技法の最近の開発は、特定のヒトの病気の状態及び症状を引き起こす又は関連する遺伝子異常への研究を可能にしている。ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）及びその多くの改変した手法は、病気の状態及び症状にある遺伝子異常の研究のための特に有用な道具となる（例えば、非特許文献2及び3参照）。

ＰＣＲ法の使用は、特定の目的ＤＮＡ又はそのＤＮＡの部分を増幅し、増幅した部分のさらなる特徴付けを容易にする。このようなさらなる特徴付けには、サイズを決定するためのゲル電気泳動、ヌクレオチド配列決定、特定のプローブを使用するハイブリダイゼーション研究等が含まれる（例えば、非特許文献4参照）。

近年、ＳＮＰｓ（一塩基多型）等の遺伝子型（すなわち遺伝子多型）と疾病等との因果関係に関する研究が数多く行われ、遺伝子異常が特定の個体のゲノムに存在するか否かの決定が行われてきた。

ＳＮＰｓ等の一塩基変異又は2以上の塩基数の遺伝子変異を判定（検出）する方法としては、まずＰＣＲ－ＳＳＰ法がある。この手法は、変異した遺伝子の塩基配列に特異なプライマーを合成してＰＣＲを実施することから、数十個の遺伝子変異を判別するためには数十対のプライマーが必要となる。

この方法は分析時間が短く簡便な方法であるが、そうしたプライマーを合成する

際には細心な注意と知識及び時間が要求されるため、大量の検体分析には限界がある。加えて変異を検出したい箇所が多いほどＰＣＲ－ＳＳＰの数も多くなるため、多数の検体を一度に扱うのは難しいという欠点がある。

第２の方法としては、古くから行われている制限酵素断片長多型法（ＰＣＲ－ＲＦＬＰ法）が考えられる。共通配列部位にプライマーを設定し、その内側、すなわち、ＰＣＲ産物内に多型性をもたせて増幅する。増幅の後、増幅産物を様々な制限酵素によって切断し、そのＤＮＡ断片の大きさで遺伝子配列の変異を類別する。

この方法は結果の判定が易しく方法も簡単ではあるが、制限酵素が認識できる部位が限定された場合に判別が困難となり、また、検体の分離にはポリアクリルアミドゲルを使用しなければならないため、大量の検体や数十個の変異を同時に類別することは難しい。更に、一般に全血検体をそのままＰＣＲ増幅を行った後、制限酵素で断片化した場合、増幅検体中に全血由来のタンパクが残存し、制限酵素による切断が不完全になることが報告されている。つまり、ＤＮＡに結合したタンパク質がＤＮＡから離れていないため、制限酵素がＤＮＡに結合できずに切断反応が正常に進まず、ＤＮＡ抽出操作の必要性が生じる。

第３の方法として、ＰＣＲ－ＳＳＣＰ法がある。当該方法は、ＰＣＲ産物をホルムアミド等の変性剤を添加して一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）に変性させた後に、非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動する方法である。電気泳動においてｓｓＤＮＡは、その塩基配列に基づく特有の構造を有し、電気泳動中に固有の移動速度を示してそれぞれ異なるタイプのバンドを形成する。

この方法は、塩基配列に基づいて固有の移動速度を示すという性質を利用して塩基配列中の変異を類別する方法であるが、複雑かつ難易度の高い技術が必要であり、その結果の解析にも経験と知識が必要とされる。

第４の方法としては、ＰＣＲ－ＳＳＯ（ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ）法が考えられる。ＰＣＲ－ＳＳＯは正常部位と変異部位に対する合成プローブをフィルターにドットされた（マイクロプレートを用いることもある）ＰＣＲ産物とハイブリダイズさせて、変異の有無を検出する方法である。また、逆にプローブをドットし、ＰＣＲ産物をハイブリダイズするリバースドットブロット法もある。抗原抗体反応に例えると、ＤＮＡが抗原で変異部位

に対する特異的抗体と正常部位に特異的な抗体とを作用させて、何れの抗体と結合したかを観察する方法である。従来この方法の検出には、放射性同位元素が使用されていたが、使用施設の制約等から化学発光や発色等によって検出されるようになってきている。

本方法は簡便ではあるが、サンプル量を相当量確保するか、そうでない場合は逆に感度を向上させる手法を導入する必要がある（例えば、非特許文献５及び６、特許文献１参照）。

第５の方法としては、直接塩基配列決定法が知られている。直接塩基配列決定法は、ＰＣＲ増幅したＤＮＡ鎖を鋳型として、ベクターにサブクローニング等をしたりすることなく、直接塩基配列を決定する方法である。

この方法は、ＰＣＲ増幅したＤＮＡ鎖を非対称ＰＣＲと呼ばれる二次ＰＣＲを行ない一本鎖ＤＮＡ増幅して、一般的にはジデオキシ法を用いて塩基配列を決定する。この二次ＰＣＲは、一組のプライマーの一方を制限量にして（通常は１：１０～１：１００）ＰＣＲを行なうことによって一本鎖ＤＮＡを増幅する。最近ではサイクルシーケンス法が応用されるようになり、より簡単にシーケンス反応が行えるようになってきている。しかしながら、キットの価格が非常に高く、高価な装置も必要であり、実験過程も複雑であるため多量の検体を解析していくためにはコストがかかる。

特許文献 1: 特開平５－１８４３９８号公報
非特許文献 1: Weatherall ら, The Thalassaemia Syndromes, 第 3 版, Oxford, Blackwell Scientific, 1981
非特許文献 2: Erlich ら, Current Communications in Molecular Biology:Polymerase Chain Reaction, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press (1989)
非特許文献 3: Innis ら, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press (1990)
非特許文献 4: Sambrook ら, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press (1989)
非特許文献 5: Am. J. Hum. Genet. 43:095-100, 1988
非特許文献 6: Blood, Vol81, No 1 (January 1). 1993: pp 239-242

発明の開示

上述したように遺伝子の変異を分析・検出するために様々な検出方法が用いられているが、これらの方法の共通した欠点は、多数の変異を同時に検出するには極めて長い時間と多大な労力が要求され、特に大量の検体を分析するにはさらに困難になるという点である。

従って、本発明の主な目的は、簡便かつ短時間に多数の変異（検体）を検出することができる、βグロビン遺伝子の変異を検出するためのマイクロアレイを提供することにある。

本発明者らは、従来技術の問題点に鑑みて鋭意検討を重ねた結果、特定の配列を有するプローブを複数種類使用することにより上記目的を達成できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、配列番号３、４、７、８、１１、１２、１７、１８と配列番号２５～６６に示される遺伝子を含むβグロビン遺伝子の変異を検出するためのプローブ群、当該プローブ群が固定化されたマイクロアレイ、当該マイクロアレイを用いた変異の検出方法及びキットに関する。

本発明によれば、PCR産物を精製することなく、ハイブリダイゼーション溶液を混合して直接マイクロアレイに接触・反応させることができるため、多量の検体を用いた場合においても短時間で処理を進めることができる。さらには、βグロビン遺伝子の変異２５箇所を一度に検出することができるため、実用性、有用性に優れたものである。

図面の簡単な説明

図１：　図１は、本発明の補正方法を図示するものである。

図２：　図２は、本発明の補正方法を図示するものである。

図３：　図３は、本発明の補正方法を図示するものである。

図４：　図４は、本発明の補正方法を図示するものである。

図５：　第１・第２の多型検出用プローブのシグナル強度を表す蛍光座標系において、第１のコントロール核酸を複数回ハイブリダイズ結果をプロットし、さらにそれらの代表直線を示したもの

図６：　図５に加え、第２のコントロール核酸を複数回ハイブリダイズ結果をプ

ロットし、さらにそれらの代表直線を示したもの

図７：　補正値Ｃ、Ｃ２のグラフ

図８：　補正値Ｃ、Ｃ２、誤差角度を用いて補正した前後のプローブ性能データ

図９：　プラスミド由来の２５種類のサンプルから得られたデータの補正前、補正後

図10：　図９の補正後のグラフに表９のデータを重ね合わせた結果

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態のみに限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、様々な形態で実施をすることができる。

なお、本明細書において引用した全ての文献、および公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。また、本明細書は、本願優先権主張の基礎となる2012年03月29日に出願された日本国特許出願（特願2012-077394号）の明細書及び図面に記載の内容を包含する。

以下、本発明を詳細に説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態のみに限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、様々な形態で実施をすることができる。

また、特に記載のない場合、アミノ酸配列は左端をアミノ末端及び右端をカルボキシル末端とし、塩基配列は左端を5’末端及び右端を3’末端として表わすものとする。

1. 多型検出用プローブ

多型の検出では、一般にマイクロアレイが用いられるが、高感度な検出を行うためには、非特異的ハイブリダイゼーションを生じにくい、高性能なプローブが求められる。プローブの性能は一般的にプローブのＴm値に左右されるが（Ｔm値が高いと非特異的ハイブリダイゼーションが起こりやすい）、Ｔm値はプローブの配列によって決定される。従って、一般的には、検出対象となる多型の周辺領域の配列によりプローブの性能が制約されてしまう。

しかしながら、本発明者らは、プローブの配列に、プローブ本来の性能を損なわない程度の修飾を加えることにより、プローブのＴｍ値を調節し、プローブの性能を向上させることに成功した。

従って、本発明は、以下のプローブを提供する。

１以上の多型を有するポリヌクレオチド配列を検出するためのプローブであって、

当該配列とハイブリダイズし、且つ、少なくとも以下の要件のいずれか１つを満たすことを特徴とする、プローブ。

（１）当該配列の両端または片端に、それぞれ１つ以上の非相補的な塩基が含まれること。

（２）当該配列中に含まれる複数の多型のうち、検出目的ではない多型と対応する部分がユニバーサル塩基であること。

（３）検出目的の多型が、プローブのいずれかの末端から６塩基以下の位置にあること。

本発明において、「プローブ」とは、検体中に含まれる検出目的とする物質を捕捉することができるものをいい、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）等の核酸類を示す。これらのプローブは、試験管内で酵素等により合成されたＤＮＡ又は化学合成したオリゴヌクレオチド等、合成市販品又は生細胞等から得ることができる。また、制限酵素若しくは化学的に修飾した又は切断したＤＮＡ断片も用いることができる。

プローブの長さは、一般的に 10～100bp 程度であるが、10～80bp が好ましく、10～50bp がより好ましく、10～35bp がさらに好ましく、12～28bp が最も好ましい。

また、検出対象である「１以上の多型を有するポリヌクレオチド配列」とは、検体に含まれるポリヌクレオチドであって、その塩基配列のなかに１以上、2 以上、あるいは 3 以上の多型を有するものを意味する。

検出対象であるポリヌクレオチドは、おもにヒト検体に由来するものであるが、

増幅反応が可能であればどのような生物種を用いてもよい。

検体は、いかなる組織由来の細胞、血液、体液であってもよい。検体の具体例としては、ヒトの脳、心臓、肺、脾臓、腎臓、肝臓、膵臓、胆嚢、食道、胃、腸、膀胱及び骨格筋等の各種組織由来の細胞、血液並びに体液が挙げられる。より詳細には、血液、髄液、尿、喀痰、胸水、腹水、胃液及び水疱内体液等が挙げられる。

検出対象であるポリヌクレオチドは、マイクロアレイに供する前に精製しておくこともできる。ポリヌクレオチドの精製方法については、例えば、Maniatis らの記載（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, pp280, 281, 1982）に準ずる種々の技術が採用できる。

特徴（1）:検出対象である多型を含むポリヌクレオチド配列の両端または片端に、それぞれ１つ以上の非相補的な塩基が含まれること

一般に、グアニン（G）とシトシン（C）の含量が多い「GC リッチ」なポリヌクレオチドは、Tm 値が高く、非特異的ハイブリダイゼーションを起こしやすい。

そこで、本発明者らは、プローブとして使用するポリヌクレオチドが GC リッチ領域を含む場合、同領域の両端に GC リッチ配列と非相補的な塩基を含ませることにより、プローブと検出対象ポリヌクレオチドとの間にあえてミスマッチを生じさせ、それによってプローブの Tm 値を下げることができることを発見した。

「非相補的な塩基」とは、検出対象であるポリヌクレオチド配列上の対応する塩基とミスマッチを生じる塩基であれば何でもよい。例えば、検出対象であるポリヌクレオチド配列上の対応する塩基が「C」であれば、非相補的な塩基は「A」、「T」、「C」のいずれでもよい。検出対象であるポリヌクレオチド配列上の対応する塩基が「G」であれば、非相補的な塩基は「A」、「T」、「G」のいずれでもよい。また、検出対象であるポリヌクレオチド配列上の対応する塩基が「A」であれば、非相補的な塩基は「A」、「C」、「G」のいずれでもよい。さらに、検出対象であるポリヌクレオチド配列上の対応する塩基が「T」であれば、非相補的な塩基は「T」、「C」、「G」のいずれでもよい。

また、両端に含まれる非相補的な塩基の数は、5’末端と 3’末端とで異なって

いてもよい。

本発明において「非相補的な塩基」は、検出対象多型を含むポリヌクレオチド配列の両端部、あるいは多型を含むGCリッチ配列の両端部に含まれる。例えば、検出対象多型を含むポリヌクレオチド配列が「GGCGCGGCGCGG」である場合（中央下線部が検出対象多型）、特徴（1）を有するプローブは、「TGCGCGGCGCGA」であってもよく、「ATGCGCGGCGCGAA」であってもよく、「ATGGCGCGGCGCGGAA」であってもよい。

好ましくは、「非相補的な塩基」は、両端部のそれぞれに1塩基以上、2塩基以上、又は3塩基以上含まれる。

本発明において、GCリッチ領域とは、塩基配列全体に占めるG及びCの含量が50%以上、55%以上、60%以上、61%以上、62%以上、63%以上、64%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上又は95%以上である配列領域を意味する。

特徴（2）：検出対象である多型を含むポリヌクレオチド配列中に含まれる複数の多型のうち、検出目的ではない多型と対応する部分がユニバーサル塩基であること

この特徴を有するプローブは、検出対象であるポリヌクレオチド配列中に、検出対象である第1の多型に加え、非検出対象である第2の多型が含まれる場合に有用である。

この場合、プローブと検出対象ポリヌクレオチドとの結合力が、第1の多型の組み合わせ以外に、第2の多型の組み合わせにより変化するため、本来の検出対象である第1の多型について検出感度が低下する。

このポリヌクレオチド配列をそのままプローブの配列として用いた場合、第1の多型部分において検出対象ポリヌクレオチドがプローブとマッチするが、第2の多型部分ではマッチしない（ミスマッチする）場合と、第1の多型部分において検出対象ポリヌクレオチドがプローブとマッチしない（ミスマッチする）が、第2の多型部分ではマッチする場合が起こり得る。後者は第1の多型がマッチしないにもかかわらず、前者と同じレベルの結合力で、プローブと検出対

象ポリヌクレオチドがハイブリダイズするため、前者と同様の陽性シグナルを発することになる。

従って、上記のケースでは、前者（真の陽性）と、後者（偽陽性）とを区別することができない。

そこで、第2の多型の影響を無力化するため、本発明のプローブは、第2の多型に対応する部分にユニバーサル塩基を含むことを特徴とする。

本発明において、ユニバーサル塩基とは、天然の核酸塩基、すなわち、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシルのいずれとも塩基対を形成しない塩基を意味する。

このようなユニバーサル塩基の例としては、5-ニトロインドール、3-ニトロピロール、7-アザインドール、6-メチル-7-アザインドール、ピロールピリジン、イミダゾピリジン、イソカルボスチリル、プロピニル-7-アザインドール、プロピニルイソカルボスチリル、及びアレニル-7-アザインドールが挙げられるが、これに限定されるものではない。

あるいは、ユニバーサル塩基の例としては、そのプロピニル誘導体を含む以下の化合物のいずれか一つ以上が挙げられる。

8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシグアノシン、8-アザ-7-デアザ-2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシシチジン、2'-デオキシウリジン、2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシン、及びピロロ［2，3-d］ピリミジンヌクレオシド。

さらに、ユニバーサル塩基は、その誘導体を含む以下の化合物のいずれかからなるものであってもよい。

デオキシイノシン（例えば2'-デオキシイノシン）、7-デアザ-2'-デオキシイノシン、2'-アザ-2'-デオキシイノシン、3'-ニトロアゾール、4'-ニトロインドール、5'-ニトロインドール、6'-ニトロインドール、4-ニトロベンゾイミダゾール、ニトロインダゾール（例えば5'-ニトロインダゾール）、4-

アミノベンゾイミダゾール、イミダゾ-4，5-ジカルボキサミド、3’-ニトロイミダゾール、イミダゾール-4-カルボキサミド、3-(4-ニトロアゾール-1-イル)-1，2-プロパンジオール、及び8-アザ-7-デアザアデニン（ピラゾロ［3，4-d］ピリミジン-4-アミン)。

他の例において、ユニバーサル核酸塩基は、3-メチル-7-プロピニルイソカルボスチリル基、3-メチルイソカルボスチリル基、5-メチルイソカルボスチリル基、イソカルボスチリル基、フェニル基、又はピレニル基とリボース又はデオキシリボースとを組合せることにより、ユニバーサル核酸塩基を形成してもよい。

特徴（3）：検出目的の多型が、プローブのいずれかの末端から6塩基以下の位置にあること

また、本発明のプローブは、検出目的の多型が、プローブのいずれかの末端（5’末端又は3’末端）から6塩基以下の位置に存在するように設計することもできる。

このように設計されたプローブは、以下の点で有用である。

一般的に、一塩基多型検出用のプローブを設計する場合、検出目的の多型の位置を中心に 5’末端、3’末端側両方に同程度の塩基長をもったプローブ設計する。しかしながら検出目的の多型の部位の 5’末端または 3’末端側が極端にＧＣリッチ領域である、またはＡＴリッチ領域であると、検出目的の多型の位置でのプローブとのマッチ、またはミスマッチとは関係なく結合する、もしくは結合しない場合が起こりうる。

そこで検出目的の多型の位置を末端から6塩基以下の位置とし、ＧＣリッチ領域、またはＡＴリッチ領域を避けたプローブを用いることを特徴とする。本特徴のみではプローブの特異性を向上させることが出来ない場合においては、特徴（1）を組み合わせることもできる。

本発明のポリヌクレオチドの基となる遺伝子は、特に限定されるものではなく、例えば、G6PD 遺伝子、RAB27A 遺伝子、CHS1 遺伝子、MTHFR 遺伝子、HMGCL 遺伝子、SLC2A1 遺伝子、H6PD 遺伝子等が挙げられる。その他個別に情報を取得

するためには、疾患の情報とその原因やリスク因子である遺伝子が取得できるOMIM データベース（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim）にアクセスすればよい。

ある実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、ヒトβグロビン遺伝子から調製される。

本発明において、検出目的の多型を有するポリヌクレオチド配列は、グアニン及びシトシンの含有量の合計が６３％以上（GC リッチ）であり、ヒトβグロビン遺伝子の第９９番目～第１１７番目、第１２７番目～第１４２番目、第１４０２番目～第１４１６番目のヌクレオチド配列を有する。

あるいは、検出目的の多型を有するポリヌクレオチド配列は、グアニン及びシトシンの含有量の合計が４５％以下（GC プア）であり、ヒトβグロビン遺伝子の第１３７８番目～第１３９９番目のヌクレオチド配列を有する。

上記領域はGC リッチ領域またはAT リッチ領域であり、この箇所における多型を検出可能なプローブを提供する。

より具体的には、本発明のプローブは、GC リッチ領域に特化したものとして、配列番号３，４，７，８，１７又は１８に記載の配列を有する。

一方、本発明のプローブは、GC プア領域に特化したものとして、配列番号１１又は１２に記載の配列を有する。

また、本発明は、配列番号３，４，７，８，１１、１２、１７又は１８に記載の配列の少なくとも１つを有する、マイクロアレイを提供する。

２．プローブ群

本発明においては、配列番号３、４、７、８、１１、１２、１７、１８と配列番号２５～６６に示される配列をプローブとして使用し（本発明のプローブ群）、必要に応じて、本発明のプローブ群以外の遺伝子もプローブとして使用することができる。

3．マイクロアレイ

（1）支持体

上記プローブ群を実際に使用するためには、支持体に固定化する必要である。固定化する支持体の種類は限定されず、ハイブリダイゼーション反応時に反応液にプローブが溶出（放出）することがなく、反応後にどのプローブが反応したのか特定できるものであれば、いかなるものを用いてもよい。

例えば、フィルター、ビーズ、ゲル、チップ、スライドガラス、マルチウェルプレート、メンブレンおよび光ファイバー等を挙げることができる。より詳細には、Western Blotting フィルターペーパー、ナイロンメンブレン、ポリフッ化ビニリデン製メンブレン、
ニトロセルロースメンブレン（Pierce 社）、アフィニティビーズ（住友ベークライト株式会社）、MicroPlex（商標） Microspheres、xMAP Multi-Analyte LumAvidin Microspheres（Luminex 社）、ダイナビーズ（株式会社ベリタス）、DNA 固定化用 96 ウェルプレートキット（フナコシ社）、DNA 固定化用基板（住友ベークライト株式会社）、マイクロアレ
イ用コートスライドガラス（松波硝子工業株式会社）、ハイドロゲルスライド（パーキンエルマー社）、Sentrix（登録商標） Array Matrix（イルミナ社）等があげられる。

（2）固定化

プローブの固定化は、フィルター、メンブレン等を用いる場合は無修飾のプローブをそのままスポットし、UV ランプ等の照射により固定化することができる。また、表面が化学的に活性化されているビーズ、チップ、スライドガラス、マルチウェルプレート、メンブレンおよび光ファイバー等を用いる場合は、末端が化学的に共有結合できるものを用いることが好ましい。より具体的には、5’末端又は3’末端にアミノ基等を導入したものを用いる。さらにゲル等に固定化する場合には、共重合反応可能な不飽和官能基が導入されているものを用いる。この導入基を持つことで置換（メタ）アクリルアミド誘導体やアガロース誘導体、及び架橋剤との共重合反応により、ゲルの網目構造に固定される。核酸の鎖の末端に不飽和官能基を

導入する方法に関しては、例えば、国際公開第０２／０６２８１７号に記載されるような公知の方法ですることができる。

本発明では、ゲル又はゲル中にプローブを固定化するのが好ましい。ゲル中に固定化することによりプローブの濃度を高くすることができるので、マイクロアレイの検出感度を高めることができるからである。また、本発明では、当該ゲルを貫通孔中に保持し、当該貫通孔を複数有する貫通孔型マイクロアレイを使用するのが好ましい。

貫通孔型マイクロアレイは、薄片プレートに貫通孔を形成して得ることもできるが、プローブを固定化したゲル担体をその種類毎に別々の中空繊維等管状体の中空部内に保持させ、そのすべての中空繊維等管状体を集束させ固定した後、繊維の長手方向で切断を繰り返すことにより得られるマイクロアレイが好ましい。安定した品質のマイクロアレイを大量生産することができるからである。このようにして、それぞれのプローブが独立した状態（１種類のプローブが１つの貫通孔内に固定化された状態）で、各貫通孔内に固定化されたマイクロアレイを得ることができる。

以下、貫通孔型マイクロアレイの製造方法の一態様について説明する。当該マイクロアレイは、下記（ｉ）～（ｉｖ）の工程を経て製造することができる。

工程（ｉ）：複数本の中空繊維を、中空繊維の各繊維軸が同一方向となるように３次元に配列し、その配列を樹脂で固定することにより、中空繊維束を製造する工程

貫通孔を形成する方法に特に限定はなく、例えば、特開２００１－１３３４５３号公報に記載されたような中空繊維を同軸方向に配列させた配列体を作製後、樹脂で固める方法を利用することができる。中空繊維は、種々の材料を用いることができるが、有機材料が好ましい。

有機材料からなる中空繊維としては、例えば、ナイロン６、ナイロン６６、芳香

族ポリアミド等のポリアミド系中空繊維、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカーボネート等のポリエステル系中空繊維、ポリアクリロニトリル等のアクリル系中空繊維、ポリエチレンやポリプロピレン等のポリオレフィン系中空繊維、ポリメタクリル酸メチル等のポリメタクリレート系中空繊維、ポリビニルアルコール系中空繊維、ポリ塩化ビニリデン系中空繊維、ポリ塩化ビニル系中空繊維、ポリウレタン系中空繊維、フェノール系中空繊維、ポリフッ化ビニリデンやポリテトラフルオロエチレン等からなるフッ素系中空繊維、ポリアルキレンパラオキシベンゾエート系中空繊維等が挙げられる。中空繊維は多孔質であってもよく、溶融紡糸法又は溶液紡糸法に延伸法、ミクロ相分離法、抽出法等の公知の多孔化技術を組み合わせることにより得ることができる。多孔度は特に限定されるものではないが、繊維材料単位長さ辺りに固定化されるプローブの密度を高めるという観点から、比表面積が大きくなるように高い多孔度であることが望ましい。中空繊維の内径は任意に設定できる。好ましくは１０～２０００μm、より好ましくは１５０～１０００μmとすることができる。

当該中空繊維の製造方法は限定されず、特開平１１－１０８９２８号公報に記載されたような公知の方法で製造することができる。例えば、溶融紡糸法が好ましく、ノズルとしては馬蹄型やＣ型ノズル、２重管ノズル等を使用することができる。本発明においては、連続した均一な中空部を形成させることができる点で２重管ノズルを用いるのが好ましい。

また、必要に応じて、中空繊維にはカーボンブラック等の黒色顔料を適量含有させたものを用いることもできる。黒色顔料を含有することにより、検出する際にゴミ等の夾雑物由来の光学的ノイズを軽減することができたり、樹脂の強度を上げたりすることができる。顔料の含有量は限定されず、中空繊維のサイズやマイクロアレイの使用目的等に応じて適宜選択することができる。例えば、０．１～１０質量%、好ましくは０．５～５質量%、より好ましくは１～３質量%とすることができる。

ブロック体の製造は配列体の配列が乱れないように接着剤等の樹脂で固定する

方法が利用できる。例えば、粘着シート等のシート状物に複数本の中空繊維を所定の間隔をもって平行に配置し、シート状とした後、このシートを螺旋状に巻き取る方法（特開平１１－１０８９２８号公報参照）が挙げられる。

また、複数の孔が所定の間隔をもって設けられた多孔板２枚を孔部が一致するように重ねあわせ、それらの孔部に、中空繊維を通過させ、２枚の多孔板の間隔を開き、２枚の多孔板間の、中空繊維の周辺に硬化性樹脂原料を充満させ硬化させる方法（特開２００１－１３３４５３号公報）が挙げられる。

硬化性樹脂原料としては、ポリウレタン樹脂、エポキシ樹脂等の有機材料からなるものが好ましい。具体的には、有機高分子等から構成される１種類以上の材料から形成されているものが好ましい。有機高分子としては、ポリウレタン、シリコン樹脂、エポキシ樹脂等のゴム材料や、ナイロン６、ナイロン６６、芳香族ポリアミド等のポリアミド系樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカーボネート等のポリエステル系樹脂、ポリアクリロニトリル等のアクリル系樹脂、ポリエチレンやポリプロピレン等のポリオレフィン系樹脂、ポリメタクリル酸メチル等のポリメタクリレート系樹脂、ポリビニルアルコール系樹脂、ポリ塩化ビニリデン系樹脂、ポリ塩化ビニル系樹脂、フェノール系樹脂、ポリフッ化ビニリデンやポリテトラフルオロエチレン等からなるフッ素系樹脂、ポリアルキレンパラオキシベンゾエート系樹脂等が挙げられる。有機高分子にはカーボンブラック等の黒色顔料を適量含有させることもできる。黒色顔料を添加することにより、検出する際にゴミ等の夾雑物由来の光学的ノイズを軽減することができたり、また、樹脂の強度を上げたりすることができる。顔料の含有量は限定されず、中空繊維のサイズやマイクロアレイの使用目的等に応じて適宜選択することができる。例えば、０．１～１０質量％、好ましくは０．５～５質量％、より好ましくは１～３質量％とすることができる。

本発明で配列する中空繊維の数、すなわちスポットの数は限定されず、目的とする実験等に応じて適宜選択することができる。従って、中空繊維同士の距離も、マ

イクロアレイの面積と配列する中空繊維の数等に応じて適宜選択することができる。

工程（ｉｉ）：プローブ群を含むゲル前駆体溶液を中空繊維束の各中空繊維の中空部に導入する工程

中空糸内へ充填するゲル材の種類は、特に限定されず、天然物から得られるゲル材であれば、アガロース、アルギン酸ナトリウム等の多糖類の他、ゼラチン、ポリリジン等のタンパク質等が利用できる。合成高分子としては、例えば、ポリアクリロイルスクシンイミド等反応性官能基を有するポリマーと、反応性を示す架橋剤を反応させて得られるゲルが利用できる。他には、アクリルアミド、Ｎ、Ｎ－ジメチルアクリルアミド、Ｎ－イソプロピルアクリルアミド、Ｎ－アクリロイルアミノエトキシエタノール、Ｎ－アクリロイルアミノプロパノール、Ｎ－メチロールアクリルアミド、Ｎ－ビニルピロリドン、ヒドロキシエチルメタクリレート、（メタ）アクリル酸及びアリルデキストリン等の重合性モノマーを単量体として、多官能性単量体、例えば、メチレンビス（メタ）アクリルアミド、ポリエチレングリコールジ（メタ）アクリレート等との共重合により得られる合成高分子ゲルが好ましい。

本発明のマイクロアレイに用いるゲルの濃度は特には限定されず、使用するプローブの長さや量に応じて適宜選択することができる。例えば、単量体成分の濃度に換算して、２～１０質量％が好ましく、より好ましくは３～７質量％、更により好ましくは３．５～５質量％である。２質量％以上とするのは、プローブが確実に固定化することができ、標的物質の検出を効率良く行うことができるからである。また、１０質量％以下とするのは、それ以上濃度を高くしても飛躍的な効果が得られにくいからである。

合成高分子ゲルを前記の貫通孔基板のマイクロアレイに保持させる場合は、前記ブロックに合成高分子のゲル前駆体溶液を充填させた後、ブロック内でゲル化させて保持させることができる。ゲル前駆体溶液をブロックの貫通孔内に充填する方法は、例えば、微細な針を有するシリンジに前記溶液を吸引し、各中空繊維の中空部

に針を差し込むことにより導入することができる。また、中空繊維束の固定されている端部の中空部を封止し、もう一方の固定されていない端部の中空部を開放しておく。次にメタクリル基等の重合反応点を末端に持つ核酸プローブを含むゲル前駆体溶液を調製し、該ゲル前駆体溶液及び前記中空繊維束をデシケーター内に設置し、次いで中空繊維束の中空繊維が固定されていない端部を、この溶液中に浸し、デシケーター内を減圧状態にした後、常圧に戻すことにより、中空繊維の溶液に浸した端部より、この溶液を中空繊維中空部へ導入することができる。

工程（ｉｉｉ）：中空繊維束の中空部に導入したゲル前駆体溶液を反応させ、プローブを含むゲル状物を中空繊維の中空部に保持する工程

中空繊維の中空部に導入されたゲル前駆体溶液を重合させることにより、プローブを含むゲル状物を中空繊維の中空部に保持させる。重合条件は特には限定されず、使用したゲル前駆体の種類等により適宜選択することができる。例えば、アクリルアミド系の単量体であれば、ラジカル開始剤を使用して重合することができ、好ましくは、アゾ系開始剤を利用した熱重合反応により重合させることができる。

プローブの種類やサイズは限定されず、検出対象となる物質又は化合物の種類に応じて適宜選択することができる。

工程（ｉｖ）：中空繊維束を繊維の長手方向に交叉する方向で切断して薄片化する工程

切断方法は、薄片化することができれば限定されない。例えば、ミクロトーム、レーザー等により行うことができる。得られる薄片の厚みは限定されず、実験の目的等に応じて適宜選択することができる。例えば、５mm以下、好ましくは０．１～１mmとすることができる。

（３）βグロビン遺伝子の変異の検出

本発明において、βグロビン遺伝子の変異を検出するとは、βグロビン遺伝子配列中の変異部分を有する塩基部位、配列を特定することを意味し、また、複数の特

定された対立遺伝子からどの対立遺伝子の組（二倍体の生物）であるかを判定することを意味する。

（ａ）まず、ヒトゲノムＤＮＡを含む検体と、核酸増幅用プライマーセット、ヌクレオチド単体及びＤＮＡ伸長酵素を含む反応溶液とを接触させればよい。

＜検体（核酸増幅の鋳型となる核酸）＞

検体（核酸増幅の鋳型となる核酸）とは、本発明において検出する目的となる遺伝子配列すなわちβグロビン遺伝子配列を含む核酸をいい、βグロビン遺伝子配列の断片が含まれ、以下に述べる増幅反応が進行するものであればどのような形態の核酸でもよい。

検体の由来は、ヒト由来であり増幅反応が可能であればどのようなものを用いてもよい。　検体はまた、いかなる組織由来の細胞、血液、体液を使用してもよい。例えば、脳、心臓、肺、脾臓、腎臓、肝臓、膵臓、胆嚢、食道、胃、腸、膀胱、骨格筋等の各種組織由来の細胞、血液、体液が挙げられる。より詳細には、例えば、血液、髄液、尿、喀痰、胸水、腹水、胃液、水疱内体液等が挙げられる。

また、検体は、後述する核酸増幅を行う前に、当該増幅に用い得るDNA含有試料として
調製及び精製しておくことが好ましい。当該調製及び精製は、公知の核酸抽出法に従って行うことができ、例えば、Maniatis らの記載（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, pp280, 281, 1982）に準ずる種々の技術を用いることができ
る。

＜核酸増幅用プライマーセット、プローブ位置＞

本発明はβグロビン遺伝子の変異を検出するためのプローブセットに関し、NCBI Reference Sequence: NC_000011.9（配列長135006516塩基）の相補鎖配列上にコ

ードされているβグロビン遺伝子配列の変異を検出する。

通常、検出しようとする核酸の変異箇所はあらかじめ決めておくことが検出の点から好ましい。プライマー対は、検出しようとする変異箇所を含んだ増幅産物が生成されるのであれば、どこに設計してもよい。例えばエキソン１、２に含まれる変異箇所をまとめて複数検出する場合には、エキソン１より上流のフォワードプライマーとエキソン２下流のリバースプライマーで核酸増幅を行い、その増幅産物を検出すればよい。また複数の領域を一度に検出する場合には複数のプライマー対を用いることができる。この場合、増幅する段階で非特異的な核酸断片が生成していないかどうか条件設定をする段階で確認しておくことが好ましい。一度条件を決めてしまえば、その条件で再現性よく検出することができる。

プローブとなるオリゴヌクレオチドの塩基配列は、増幅産物配列（プライマーセットで挟まれる領域）の内部に含まれるようにプローブ配列を決定する。プローブは通常、１５～３５ヌクレオチド程度の長さで設定し、検出する変異領域１つに対して通常１組（野生型検出用プローブと変異型検出用プローブの２種）又はそれ以上（１組以上）のプローブを必要とする。

後の検出が容易になるように、使用するプライマーセットはあらかじめその末端を蛍光物質（Ｃｙ３、Ｃｙ５等）やビオチン等であらかじめ標識しておくとよい。標識方法は特に限定されず、増幅反応において著しく反応が阻害される等の現象がみられなければどのような方法でもよい。反応後、酵素との複合体、例えばストレプトアビジンアルカリフォスファターゼコンジュゲートをさらに反応させ、基質を加えることにより発色させることも可能である。

＜増幅反応＞

上記核酸増幅の鋳型となる核酸（検体）を鋳型にして、核酸増幅反応により、βグロビン遺伝子の変異箇所で検出しようとする領域の核酸断片を増幅させる。核酸の増幅方法としてはＰＣＲ法、ＬＡＭＰ法、ＩＣＡＮ法、ＴＲＣ法、ＮＡＳＢＡ法、

ＰＡＬＳＡＲ法等様々な方法を使用することができる。核酸の検出上特に問題が生じなければいずれの方法も核酸増幅反応に用いることができるが、これらの中でも簡便さの観点からＰＣＲ法が好ましい。

核酸増幅反応に用いる温度制御装置は、市販のサーマルサイクラーを用いることができる。例えば、GeneAmp 9600 や GeneAmp 9700（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）、T Professional シリーズ（バイオメトラ社）等を用いることができるが、熱伝導性、蓋の形状について問題が生じなければどのような型式のものであってもよい。

＜増幅反応で用いるヌクレオチド単体＞

ヌクレオチド単体は、通常の増幅反応で用いるデオキシリボヌクレオチド三リン酸等が挙げられる。これもプライマーセットと同様、後の検出が容易になるような誘導体を用いることも可能であるが、増幅反応を阻害しないものを使用することが好ましい。

＜増幅反応で用いるＤＮＡ伸長酵素、その他＞

ＤＮＡ伸長酵素は、通常のＰＣＲ法に用いられるものと同様に、耐熱性細菌に由来するＤＮＡポリメラーゼであるＴａｑＤＮＡポリメラーゼ、ＴｔｈＤＮＡポリメラーゼ、ＰｆｕＤＮＡポリメラーゼ等を使用することができる。

使用可能な酵素やキットとしては、Hot StarTaq DNA Polymerase（QIAGEN 社製）、PrimeStarMax DNA ポリメラーゼ（タカラバイオ社）、SpeedSTAR HS DNA ポリメラーゼ（タカラバイオ社）、KOD-Plus-Neo（東洋紡社）、KAPA2G FastHotStartPCR キット（日本ジェネティックス（株）社）、AmpDirect キット（島津製作所）等が挙げられ、その他には直接血
液（体液等）から核酸増幅反応ができるものであれば操作が簡便になるのでより好ましい。

上記の構成要素を混合する方法としては、酵素が失活しない、液が泡立ってチューブから漏えいしないように混合すればどのような混合の仕方でもよい。通常は上記すべての構成成分を０．２ｍＬ程度の大きさのＰＣＲ用チューブに分注しボルテックスミキサーで混合した後、蓋についた溶液を落とすために軽く遠心（スピンダウン）すればよい。またホットスタートＰＣＲを行う場合においては、混合時に酵素が活性化されない条件で混合を行う。

次に、（ｂ）上記（ａ）で得られた反応液を核酸増幅反応に供すればよい。

核酸増幅反応は例えばＰＣＲ反応で増幅する場合においては、９０℃～９８℃で５分間程度テンプレートとなる核酸を解離させる酵素を活性化させた後、９４℃３０秒（核酸の解離）、６０℃３０秒（プライマーのアニーリング）、７２℃３０秒（プライマーからの伸長反応）程度のサイクルを２５～５０サイクル繰り返すことにより指数関数的に核酸を増幅させることができる。またＰＣＲ反応でない等温条件での核酸増幅反応を行う場合においては、４０℃～６５℃程度の一定温度でインキュベートすることにより増幅した核酸を得ることができる。

（ｃ）続いて、（ｂ）で得られた核酸断片を、本発明のマイクロアレイに接触させることにより、検体中の目的とする核酸を検出することができる。

工程（ｃ）においては、核酸増幅反応液を精製することなく、直接ハイブリダイゼーション溶液を加えて、マイクロアレイに接触させることができる。ハイブリダイゼーション溶液とは増幅核酸が、マイクロアレイに固定化されたプローブとハイブリダイゼーション反応を可能にさせる溶液である。

より詳細には、Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ　ｂｕｆｆｅｒ等のバッファー溶液にＮａＣｌ溶液、$MgCl_2$溶液等の塩を混合した溶液やＳＳＣ溶液、ＳＤＳやＴｗｅｅｎ２０等の界面活性剤を混合したものである。本発明で使用するプローブとの反応を行う場合においては、ＳＤＳ等、冷却時に界面活性剤の結晶が析出しないＴＮＴ　ｂ

ｕｆｆｅｒ（Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ　ｂｕｆｆｅｒ溶液、ＮａＣｌ溶液、Ｔｗｅｅｎ溶液の混合溶液）を用いることが好ましい。

Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ又はＮａＣｌの濃度は、終濃度としてそれぞれ０．０６Ｍ～０．４８Ｍが好ましく、０．１２Ｍ～０．２４Ｍがより好ましい。Ｔｗｅｅｎは終濃度として、０．０１～０．２質量％、好ましくは０．０２～０．１５質量％、より好ましくは０．０３～０．１２質量％とすることができる。

また、接触時の温度は４５～６５℃が好ましく、５０～５５℃がより好ましく、さらに４５～７０℃が好ましく、またさらに５０～６５℃が好ましい。接触させる時間はハイブリダイゼーション反応が起こり、変異が検出できれば限定さないが、非特異的な反応を抑えるためには短いほど良い。例えば、接触時間は１５分～４時間、好ましくは２０分～３時間、より好ましくは３０分～２時間とすることができる。

＜核酸（増幅産物）の検出＞

上記工程（ｃ）によりマイクロアレイ中のプローブで捕捉された核酸を検出する。

検出方法としては捕捉された核酸が検出されれば限定されず、公知の方法を使用することができる。例えば、蛍光物質や発光物質を標識基質として使用し、発色測定や蛍光強度測定を行う方法、目視による方法等を用いることができる。

より詳細には、フルオロイメージングアナライザーやＣＣＤカメラ等を用いて捕捉された核酸の有無及び定量を行うことができる。近年多用されつつあるＰＣＲ反応随時定量装置等を用いて蛍光量を経時的にモニタリングすることにより、より信頼性の高い核酸の定量ができる。

さらに、酵素反応を利用する又は利用しない発色試薬等を用いて発色を行うこともできる。このような方法では、目視で直接観察したり光学スキャナーでスキャン

したりすることが可能である。

本発明の核酸の検出方法は、配列表で開示したβグロビン遺伝子の変異３０箇所の解析への適用が挙げられるが、さらには適切なプローブを設計・使用することによって本発明で開示した変異箇所以外の箇所についての検出キットを作製することも可能である。

（４）キット

本発明において、プライマーセット及び本発明のプローブ群を有するマイクロアレイを、βグロビン遺伝子の変異を検出するためのキットとして使用することも可能である。プライマーセットとしては、配列番号２１で示されるオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号２２で示されるオリゴヌクレオチドプライマーのセット、又は配列番号２３で示されるオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号２４で示されるオリゴヌクレオチドプライマーのセットをより好適に使用することができる。

４．マイクロアレイ・プローブの評価方法

既に述べたように、マイクロアレイで多型の検出を行う場合、使用するプローブが非特異的ハイブリダイゼーションを起こさないことが好ましい。つまり、非特異的ハイブリダイゼーションを起さないプローブは、性能が高いものと評価される。

そこで、本発明は、プローブの性能を定量的に評価する方法として、以下の方法を提供する。

以下の工程を含む、マイクロアレイ・プローブの評価方法。

(1)　第１の多型検出用プローブがハイブリダイズして得られるシグナル強度を表すＹ軸と、第２の多型検出用プローブがハイブリダイズして得られるシグナル強度を表すＸ軸とを含む蛍光座標系において、第１の多型用コントロール核酸を、第１及び第２の多型検出用プローブからなる多型検出用プローブペアとハイブリダイズして得られた蛍光座標をプロットする工程、

(2)　前記Ｙ軸とＸ軸との交点０と、前記工程（1）でプロットされた蛍光座標と

を通る直線の傾きに反比例する値を補正値Cと定める工程、

(3) 工程(1)及び(2)を複数の多型検出用プローブペアについて行い、各プローブ間で補正値Cを比較し、補正値Cが最小となるプローブペアを第1の多型検出に適したプローブとして決定する工程。

本発明において、第1の多型と第2の多型は、同一の多型における異なる対立遺伝子である。すなわち、第1の多型は、第1の対立遺伝子であり、第2の多型は、前記第1の対立遺伝子に対応する第2の対立遺伝子である。

以下、各工程の概要を説明する。

工程(1):プロット工程

まず、工程(1)において、第1の多型用コントロール核酸が、第1及び第2の多型検出用プローブからなる多型検出用プローブペアとハイブリダイズして得られるシグナル強度を蛍光座標系にプロットする。本発明の蛍光座標系において、Y軸は第1の多型検出用プローブがハイブリダイズして得られるシグナル強度を表し、X軸は第2の多型検出用プローブがハイブリダイズして得られるシグナル強度を表す。ここでY軸とX軸の交点を0とする。また、Y軸とX軸とは直交していていもよく、直交していなくてもよい。

前記プロットにより第1の多型検出用プローブの蛍光特性を表す蛍光座標$P(x_1, y_1)$が得られる。

非特異的なハイブリダイゼーションを起こさない理想的なプローブの蛍光座標Pは$x_1=0$、$y_1>0$となる(図1:パネルA)。

しかしながら、実際には多くのプローブが、ある程度の非特異的ハイブリダイゼーションを生じる。従って、多くのプローブでは、蛍光座標Pは$x_1>0$かつ$y_1>0$となる(図1:パネルB)。

ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション溶液中で行われる。ハイブリダイゼーション溶液とはコントロール核酸とプローブとのハイブリダイゼーショ

ン反応を可能にさせる溶液であるが、より具体的には、Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ　ｂｕｆｆｅｒ等のバッファー溶液にＮａＣｌ溶液、$MgCl_2$溶液等の塩を混合した溶液やＳＳＣ溶液、ＳＤＳやＴｗｅｅｎ２０等の界面活性剤を混合したものがある。一般的に反応を行う場合においては、ＳＤＳ等、冷却時に界面活性剤の結晶が析出しないＴＮＴ　ｂｕｆｆｅｒ(Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ　ｂｕｆｆｅｒ溶液、ＮａＣｌ溶液、Ｔｗｅｅｎ溶液の混合溶液）を用いることが好ましい。またその終濃度は０．０６Ｍ～０．４８Ｍが好ましく、より好ましくは終濃度が０．１２Ｍ～０．２４Ｍである。また接触時の温度は、４５℃～７０℃が好ましく、より好ましくは５０℃～６５℃である。接触時間はハイブリダイゼーション反応が起こり検出できる範囲であれば短いほど好ましい。通常１５分～４時間、好ましくは２０分～３時間、より好ましくは３０分～２時間である。

シグナルとは、前述のハイブリダイゼーションの結果、プローブで捕捉されたコントロール核酸の量を数値化したものである。一般的には、プローブとハイブリダイズさせる核酸試料に蛍光物質や発光物質を結合させ、プローブ領域から発せられる蛍光や発色の強度を測定することによりシグナルを得ることができる。具体的には、シグナルは、フルオロイメージングアナライザーやＣＣＤカメラ等を用いて得ることができる。

プローブに「対応した」シグナルとはシグナル内にバックグラウンド由来のシグナルを含みうるが、プローブに「由来した」シグナルとはプローブ本来の特異性に由来するシグナルを意味する

工程（2）：補正値の決定

次に、プロットされた蛍光座標Ｐと交点０とを通る直線Ｌを求め、この直線Ｌの傾きに反比例する値を補正値Ｃ（Ｃ>0）としてもよい。

具体例として、補正値Ｃは、直線ＬとＸ軸とがなすラジアン角度α（$0 \leqq \alpha \leqq \pi/2$）に反比例するものであってもよい（図１：パネルＣ）。つまり、蛍光座標Ｐを Ｙ軸上に存在するように補正する場合、角度αを（$\pi/2$）÷α倍増幅させる必要があるが（図１：パネルＤ）、この増幅度に基づき、補正値Ｃ＝（$\pi/2$）÷α（$C \geqq 1$）

と定めることもできる。

工程（3）：プローブペアの比較

通常、1つの多型を検出するためには、複数の候補のプローブが用意される。従って、複数の候補プローブについて上記工程（1）及び（2）を行い、各プローブの補正値Cを定める必要がある。

このようにして得られた補正値Cを比較することにより、候補プローブの性能を比較評価することができる（図1：パネルE）。

すでに述べた通り、理想的なプローブでは、蛍光座標PはY軸上に存在するため、$\alpha=\pi/2$ となる。従って、理想的なプローブでは補正値C＝（$\pi/2$）÷（$\pi/2$）=1となる。

一方、ある程度の非特異的ハイブリダイゼーションを生じるプローブの場合、$\alpha<\pi/2$ となるので、補正値 C>1 となる。例えば、$\alpha=\pi/4$ の場合、補正値 C＝2となり、$\alpha=\pi/6$ の場合、補正値C =3となる。

従って、本発明の方法では、補正値Cの値が小さいほど、そのプローブは高性能である判断される。すなわち、補正値Cが最小となるプローブ（つまり角度αが最大）が第1の多型検出に適したプローブとして決定される。例えば、図1パネルEの例ではプローブペアNo.3が第1の多型検出に適したプローブとして決定される。

以上に述べた工程には種々の改変を加えてもよい。

例えば、工程（1）において、コントロール核酸とプローブとのハイブリダイズを2回以上繰り返し、2点以上の蛍光座標を獲得してもよい（図2：パネルA：この場合は3点の蛍光座標）。この場合、獲得した2点以上の蛍光座標の代表値Mを求め、工程（2）における直線Lは、交点0と代表値Mとを通る中央直線であってもよい（図2：パネルB）。ここで代表値とは複数の値を代表する値である。例えば、平均値、中央値又は重み付けした平均値などが挙げられるが、外れ値に対する頑強性の点で中央値が好ましい。

さらに、工程（1）において、交点0と蛍光座標とを通る各直線のうち（蛍光座

標が2点以上存在するので、直線も2本以上存在する)、前記中央直線との傾きの差がある直線を選択し、これを誤差直線(傾きの差が最大の直線を選択する場合は第1の誤差直線とする)と定めてもよい(図2:パネルB)。

第1の誤差直線を定める場合、工程(2)は、

(a) 前記中央直線とX軸との間の角度α(ラジアン)を求め、

補正値$C=\pi/2\div\alpha$を求める処理(図2:パネルC)、

(b) 前記中央直線と誤差直線(傾きの差が最大の直線を選択する場合は第1の誤差直線とする)とがなす角度を誤差角θ(ラジアン)と定め、

さらに、補正誤差角θ'(ラジアン)$=\theta$(ラジアン)$\times$補正値Cと定める処理を含むものとする。

誤差角は必要に応じて上記の定数倍をしてもよい。また、差がある直線として、差が最も大きな直線を第1の誤差直線と定めてもよく、複数の差がある直線との角度差から信頼区間を加味した誤差角の範囲を定めてもよい。

他方、第2の多型用コントロール核酸を用いて、第2の多型検出用プローブに対し、上記工程(1)~(3)に相当する工程(4)~(6)を行ってもよい。

具体的には、工程(4)~(6)は以下のとおりである。

(4) 第2の多型用コントロール核酸を、第1及び第2の多型検出用プローブからなる多型検出用プローブペアとハイブリダイズして得られた蛍光座標をプロットする工程、

(5) 交点0と、工程(4)でプロットされた蛍光座標とを通る直線の傾きに比例する値を補正値C_2と定める工程、

(6) 工程(4)及び(5)を複数の多型検出用プローブペアについて行い、各プローブ間で補正値C_2を比較し、補正値C_2が最小となるプローブペアを第2の多型検出に適したプローブとして決定する工程。

工程(4):プロット工程

工程(4)において、第2の多型用コントロール核酸が、第1及び第2の多型検

出用プローブからなる多型検出用プローブペアとハイブリダイズして得られるシグナル強度を蛍光座標系にプロットする。

前記プロットにより第2の多型検出用プローブの蛍光特性を表す蛍光座標$P_2(x_2, y_2)$が得られる（図３：パネルA）。

工程（5）：補正値の決定

次に、プロットされた蛍光座標P_2と交点0とを通る直線L_2を求め、この直線L_2の傾きに比例する値を補正値C_2（$C_2>0$）としてもよい。

具体例として、補正値C_2は、直線L_2とY軸とがなすラジアン角度β（$0 \leqq \beta \leqq \pi/2$）に反比例するもの（つまり、$L_2$の傾き（$\pi/2-\beta$）に比例する）であってもよい（図３：パネルB）。蛍光座標P_2をX軸上に存在するように補正する場合、角度βを（$\pi/2$）÷β倍増幅させる必要があるが（図３：パネルC）、この増幅度に基づき、補正値C_2＝（$\pi/2$）÷β（$C_2 \geqq 1$）と定めることもできる。

工程（6）：プローブペアの比較

上記工程（3）と同様に、複数の候補プローブペアについて上記工程（4）及び（5）を行い、各プローブの補正値C_2を定める必要がある。

このようにして得られた補正値C_2を比較することにより、候補プローブの性能を比較評価することができる（図３：パネルD）。

すでに述べた通り、理想的なプローブペアでは、蛍光座標P_2はX軸上に存在するため、$\beta=\pi/2$となる。従って、理想的なプローブでは補正値C_2＝（$\pi/2$）÷（$\pi/2$）=1となる。

一方、ある程度の非特異的ハイブリダイゼーションを生じるプローブの場合、$\beta<\pi/2$となるので、補正値$C_2>1$となる。例えば、$\beta=\pi/4$の場合、補正値$C_2=2$となり、$\beta=\pi/6$の場合、補正値$C_2=3$となる。

従って、補正値C_2の値が小さいほど、そのプローブは高性能である判断される。すなわち、補正値C_2が最小となるプローブが第2の多型検出に適したプローブとして決定される。例えば、図３パネルDの例ではプローブペアNo.4'が第2の多型検出に適したプローブとして決定される。

以上に述べた工程には種々の改変をくわえてもよい。

例えば、工程（4）において、コントロール核酸とプローブとのハイブリダイズを2回以上繰り返し、2点以上の蛍光座標を獲得してもよい（図４：パネルＡ：この場合3点の蛍光座標）。この場合、獲得した2点以上の蛍光座標の代表値M_2を求め、工程（2）における直線L_2は、交点0と代表値M_2とを通る第2の中央直線であってもよい（図４：パネルＢ）。

ここで代表値とは複数の値を代表する値である。例えば、平均値、中央値又は重み付けした平均値などが挙げられるが、外れ値に対する頑強性の点で中央値が好ましい。

さらに、工程（4）において、交点0と蛍光座標とを通る各直線のうち（蛍光座標が2点以上存在するので、直線も2本以上存在する）、前記第2の中央直線との傾きの差がある直線を選択し、これを誤差直線（傾きの差が最大の直線を選択する場合は第２の誤差直線とする）と定めてもよい（図４：パネルＢ）。

第2の誤差直線を定める場合、工程（2）は、

(a) 前記第2の中央直線とY軸との間の角度β（ラジアン）を求め、

補正値$C_2=\pi/2\div\beta$を求める処理、

(b) 前記第2の中央直線と誤差直線（傾きの差が最大の直線を選択する場合は第２の誤差直線とする）とがなす角度を誤差角θ_2（ラジアン）と定め、

さらに、補正誤差角θ_2'（ラジアン）＝θ_2（ラジアン）×補正値C_2と定める処理

を含むものとする。

誤差角は必要に応じて上記の定数倍をしてもよい。差がある直線として、差が最も大きな直線を第２の誤差直線と定めてもよく、また複数の差がある直線との角度差から信頼区間を加味した誤差角の範囲を定めてもよい。

また、本発明は、上記方法により評価されたプローブの補正値C（又はC_2）を表

示する方法を提供しプローブの性能が評価される。さらには、補正値C（又はC_2）を使用して補正された座標と補正された誤差範囲を表示する方法も提供する。
本発明の評価方法では、各プローブ間の性能を容易に比較することができ、また誤差範囲を考慮して遺伝子型を判定することも可能である。

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、これらの実施例は、本発明の例示を目的とするものであり、本発明を限定するものではない。

実施例

［実施例１］

ＤＮＡマイクロアレイを用いてβグロビン遺伝子の２５箇所の変異を一括して検出することを検討した。検出対象する変異の箇所を以下の表１に示した。

表１　βグロビンの変異箇所

変異箇所No.	HGVS nomenclature
1	c.-137C>A
2	c.-81A>G
3	c.-80T>C
4	c.-78A>G
5	c.2T>G
6	c.5T>C
7	c.19G>A
8	c.27_28insG
9	c.46delT
10	c.52A>T
11	c.59A>G
12	c.79G>A
13	c.84_85insC

変異箇所No.	HGVS nomenclature
14	c.92+1G>T
15	c.92+5G>C
16	c.108C>A
17	c.170G>A
18	c.216_217insA
19	c.251G>A
20	c.316-197C>T
21	c.364G>C
22	c.370_377delACCCCACC
23	c.380T>G
24	c.410G>A
25	c.441_442insAC

このうち、変異ｃ．５２Ａ＞Ｔ　、ｃ．８４＿８５ｉｎｓＣ　、ｃ．３６４Ｇ＞Ｃ、ｃ．３８０Ｔ＞Ｇを検出するプローブは、周囲の塩基配列の特徴上、プローブ設計の難易度が高いため先に検討を実施した。

１．貫通穴型ＤＮＡマイクロアレイの作製

ＤＮＡマイクロアレイを以下のようにして製造した。

＜１－１．プローブの調製＞

プローブとなる配列番号１～１８記載のオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドの５’末端にアミノヘキシル基が導入されたオリゴヌクレオチドとして合成した。合成後、そのオリゴヌクレオチドに、無水メタクリル酸を反応させ、さらにＨＰＬＣで精製、分取することにより、表２の配列番号１～１８で示される塩基配列を有する５’末端ビニル化オリゴヌクレオチドを取得した。配列の特徴として、配列番号１，２は変異ｃ．５２Ａ＞Ｔに近接した変異ｃ．５９Ａ＞Ｔの変異の影響をうけるプローブであるが、配列番号３，４は変異ｃ．５２Ａ＞Ｔに近接した変異ｃ．５９Ａ＞Ｔの変異にハイブリダイズするユニバーサル塩基としてイノシンを導入している。

同様に配列番号５，６は変異ｃ．８４＿８５ｉｎｓＣに近接した変異ｃ．７９Ｇ＞Ａの変異の影響を受けるプローブであるが、配列番号７，８は変異ｃ．８４＿８５ｉｎｓＣに近接した変異ｃ．７９Ｇ＞Ａの変異にハイブリダイズするユニバーサル塩基としてイノシンを導入している。

また、配列番号１１，１２は変異を検出するための異なる塩基の箇所がプローブの３末端から６塩基の位置にあり、配列番号１７、１８は両末端に「ＡＡ」を導入している。

表２　プローブ配列候補

変異 c.52A>T 検出用プローブペア候補 1		
12_1_c.52A>T	CTGTGGGGCAAGGTGAACG	配列番号 1
12_2_c.52A>T	CTGTGGGGCTAGGTGAACG	配列番号 2
変異 c.52A>T 検出用プローブペア候補 2		
12_c.52A>T①kai1	GGCAAGGTGAICGTGGATG	配列番号 3
12_c.52A>T②kai1	GGCTAGGTGAICGTGGATG	配列番号 4
変異 c.84_85insC 検出用プローブペア候補 1		
15_1_c.84_85insC	TGGTGAGGCCCTGGGCAGG	配列番号 5
15_2_c.84_85insC	TGGTGAGGCCCCTGGGCAG	配列番号 6

変異 c. 84_85insC 検出用プローブペア候補 2

15_c. 84_85insC①kai1	GTIAGGCCCTGGGCAG	配列番号 7
15_c. 84_85insC②kai1	TIAGGCCCCTGGGCAG	配列番号 8

変異 c. 364G>C 検出用プローブペア候補 1

26_1_c. 364G>C	TTTGGCAAAGAATTCACCC	配列番号 9
26_2_c. 364G>C	TTTGGCAAACAATTCACCC	配列番号 10

変異 c. 364G>C 検出用プローブペア候補 2

26_c. 364G>C①kai1	CCATCACTTTGGCAAAGAATTC	配列番号 11
26_c. 364G>C②kai1	CCATCACTTTGGCAAACAATTC	配列番号 12

変異 c. 380T>G 検出用ﾌﾟﾛｰﾌﾞﾍﾟｱ候補 1

28_1_c. 380T>G	ACCCCACCAGTGCAGGCTG	配列番号 13
28_2_c. 380T>G	ACCCCACCAGGGCAGGCTG	配列番号 14

変異 c. 380T>G 検出用プローブペア候補 2

28_1_c. 380T>G_20111104	CAGTGCAGGCTGCCTATCAGA	配列番号 15
28_2_c. 380T>G_20111104	CAGGGCAGGCTGCCTATCAGA	配列番号 16

変異 c. 380T>G 検出用プローブペア候補 3

27_28 ﾌﾟﾛｰﾌﾞ ①(Wt-T)	AACCCACCAGTGCAGGCAA	配列番号 17
27_28 ﾌﾟﾛｰﾌﾞ ②(Wt-G)	AACCCACCAGGGCAGGCAA	配列番号 18

配列番号１～１８記載のオリゴヌクレオチドは、ヒトβグロビン遺伝子配列の一部分とハイブリダイズすることができる。

＜１－２．ＤＮＡマイクロアレイ＞

本実施例では、表１に記載のプローブ（配列番号１～１８）及びプローブを搭載しない箇所については核酸プローブの代わりに水を使用した核酸マイクロアレイ（(ジェノパール：登録商標)、三菱レイヨン株式会社）を用いた。

2．βグロビン遺伝子の変異検出用プローブの評価

＜2－1．プラスミドテンプレートDNAの作製＞

NCBI Reference Sequence: NC_000011.9（配列長135006516塩基）の5246730塩基目から5248465塩基目の相補鎖配列上にβグロビン遺伝子配列がコードされている。その配列を配列番号19に示した。また、配列番号20で示すNM_000518.4| Homo sapiens hemoglobin, beta (HBB), mRNAの配列と比較することで、ゲノムDNA配列中のエキソン領域を特定した。（タンパク質コード領域51塩基目～494塩基目、exon1：1塩基目～142塩基目、エキソン2：143塩基目～365塩基目、エキソン3：366塩基目～626塩基目）

配列番号19中、斜体で示した配列箇所は配列番号21～24のプライマー配列の位置、下線で示した配列はエキソン領域、四角で囲んだ領域はUTR領域である。

βグロビン遺伝子の野生型テンプレートとして、配列番号19に示した配列を含むプラスミドを合成して用意し（株式会社BEX社の人工遺伝子合成サービスを用いてpUC57ベクターに挿入したものである）、10ng／μlに濃度を調製した。

またこれと同様に先の表1に示したHGVS nomenclatureに従った変異表記の位置に変異が入ったプラスミドDNA（25種類）を個々に用意し、それらも10ng／μlに濃度を調製した。

プライマー対＜配列番号21、22、23、24＞

配列番号21	Amplicon1F	ACTCCTAAGCCAGTGCCAGA
配列番号22	Amplicon1R	cy5-CACTCAGTGTGGCAAAGGTG
配列番号23	MRC-Amplicon2F	GTATCATGCCTCTTTGCACCATTC
配列番号24	MRC-Amplicon2R	cy5-CAGATGCTCAAGGCCCTTCATA

＜配列番号19＞

>gi|224589802:c5248465-5246730 Homo sapiens chromosome 11, GRCh37.p5 Primary Assembly

A*ACTCCTAAGCCAGTGCCAGA*AGAGCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCACCCTGTGG
AGCCACACCCTAGGGTTGGCCAATCTACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAGCCAGGGCTGGGCATAAA
AGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGCAACCTCAAA
CAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAAC
GTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACC
AATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCT
ATTGGTCTATTTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTT
TGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCT
CGGTGCCTTTAGTGATGGCCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGG*CACCTTTGCCACACTGAGTGA*GCT
GCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGGACGCTTGATGTTTTCT
TTCCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGATAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAAT
GGGAAACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTCTTTTATTTGCTGTT
CATAACAATTGTTTTCTTTTGTTTAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTTACTATTA
TACTTAATGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAAAA
AAACTTTACACAGTCTGCCTAGTACATTACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGCATATTCATAAT
CTCCCTACTTTATTTTCTTTTATTTTTAATTGATACATAATCATTATACATATTTATGGGTTAAAGTGT
AATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGC
TTTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGG
CAATAATGATACAAT*GTATCATGCCTCTTTGCACCATTC*TAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTA
AGGCAATAGCAATATCTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAACTGATGTAAGAGGTTTCAT
ATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTA
TTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCCTCCCACAGCTCCTGG
GCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTCACCCCACCAGTGCAGGCTGCCT
ATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGCCCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCTTGCT
GTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCTTTGTTCCCTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGGATAT*TATGAAGG*
*GCCTTGAGCATCTG*G

＜配列番号２０＞

>gi|28302128|ref|NM_000518.4| Homo sapiens hemoglobin, beta (HBB), mRNA

ACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTG

AGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGG

GCAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTG

ATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCC

TGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACG

TGGATCCTGAGAACTTCAGGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAG

AATTCACCCCACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGCCCACA

AGTATCACTAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCTTTGTTCCCTAAGTCCAACT

ACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTC

ATTGC

＜ＰＣＲ反応＞

野生型のプラスミドＤＮＡと表１記載の番号１０、１３、２１、２３（変異ｃ．５２Ａ＞Ｔ 、ｃ．８４＿８５ｉｎｓＣ 、ｃ．３６４Ｇ＞Ｃ、ｃ．３８０Ｔ＞Ｇを含む）の変異型プラスミドＤＮＡ４種類、計５種類を鋳型とし、

配列番号２１～２４の２組のプライマー対を用いてＰＣＲ反応を行った。ＰＣＲ反応にはＫＯＤ ＦＸ Ｎｅｏキット（東洋紡社）を用いた。

＜ＰＣＲ反応液組成＞

プラスミドＤＮＡ溶液（10ng/μL）	1μL（野生型、又は変異型）
Amplicon1F ﾌﾟﾗｲﾏｰ（20μM）	1μL
Amplicon1R ﾌﾟﾗｲﾏｰ（20μM）	1μL
MRC-Amplicon2F ﾌﾟﾗｲﾏｰ（20μM）	0.5μL
MRC-Amplicon2R ﾌﾟﾗｲﾏｰ（20μM）	0.5μL
2×buffer	50μl
2mM dNTPs	20μl
ミリＱ水	24μl
KOD FX Neo	2μl
反応容量	100μl

ＰＣＲ反応にはＧｅｎｅＡｍｐ９７００サーマルサイクラーを用い、Ｍａｘモードで反応した。温度条件を以下に示した。

＜ＰＣＲ反応温度条件＞

９５℃　１０分間

（９４℃３０秒、６８℃３０秒、７２℃３０秒）×３５サイクル

４℃　反応終了

反応後の反応液100μlに以下のバッファー溶液を加え200μlとした。

反応液	100μl
1M Tris/HCl（pH7.5）バッファー	48μl
5M NaCl溶液	9.6μl
0.5% Tween20水溶液	20μl
ミリＱ水	22.4μl
合計	200μl

その後、この溶液２００μｌを専用チャンバーに入れ（http://www.mrc.co.jp/genome/about/usage.htmlに記載）、引き続いてＤＮＡマ

イクロアレイを入れてふたを閉め、５５℃で２時間インキュベートした。インキュベート後、チップをそれぞれ０．２４Ｍ　ＴＮＴ　ｂｕｆｆｅｒ　１０ｍｌに５５℃、２０分間浸漬した。その後、引き続いて、０．２４Ｍ　ＴＮ　ｂｕｆｆｅｒ　１０ｍｌに５５℃、１０分間浸漬して洗浄を実施した。洗浄後、検出を実施した。

検出は、冷却ＣＣＤカメラ方式のＤＮＡマイクロアレイ自動検出装置を用いた。ＤＮＡマイクロアレイをウェル上部から露光時間４秒間で撮像し、各スポットにおけるｃｙ５の蛍光シグナルを検出した。マイクロアレイ上のプローブが搭載されていないスポットをブランクスポットとし、その蛍光強度の中央値をバックグラウンド値とした。すべてのスポットの蛍光強度からバックグランド値を減算した値を各プローブのシグナルとした。

野生型の配列を第１の多型、変異型の配列を第２の多型、第１の多型用コントロール核酸を野生型プラスミドとして、複数回実験を行った結果を表３に示した。また、表３の結果を、第１の多型検出用プローブがハイブリダイズして得られるシグナル強度を表すＹ軸と、第２の多型検出用プローブがハイブリダイズして得られるシグナル強度を表すＸ軸とを含み、Ｘ－Ｙ軸が直交している蛍光座標系にプロットした結果を図５に示した（図５：第１・第２の多型検出用プローブのシグナル強度を表す蛍光座標系において、第１のコントロール核酸を複数回ハイブリダイズ結果をプロットし、さらにそれらの代表直線を示した図）。

図５の点線は、各々のプローブペア候補の複数（２回または３回）の実験結果の平均シグナル強度と、原点とを結ぶ直線（代表直線とする）であり、グラフ中の数式はこれらの直線の式を示している。

プローブの選択については、代表直線の傾きに反比例する値を補正値Ｃと定め、複数の多型検出用プローブペアについて行い比較し、補正値Ｃが最小となるものを選択する。本検討では、補正値Ｃはπ／２÷代表直線とＸ軸とのなす角度（ラジアン）で算出した。各プローブペアのうち、性能のよいプローブペアとして、ｃ．５２Ａ＞Ｔの変異を検出するプローブとして、配列番号１，２のペアと配列番

号３，４のペアでは、配列番号３、４のペア、

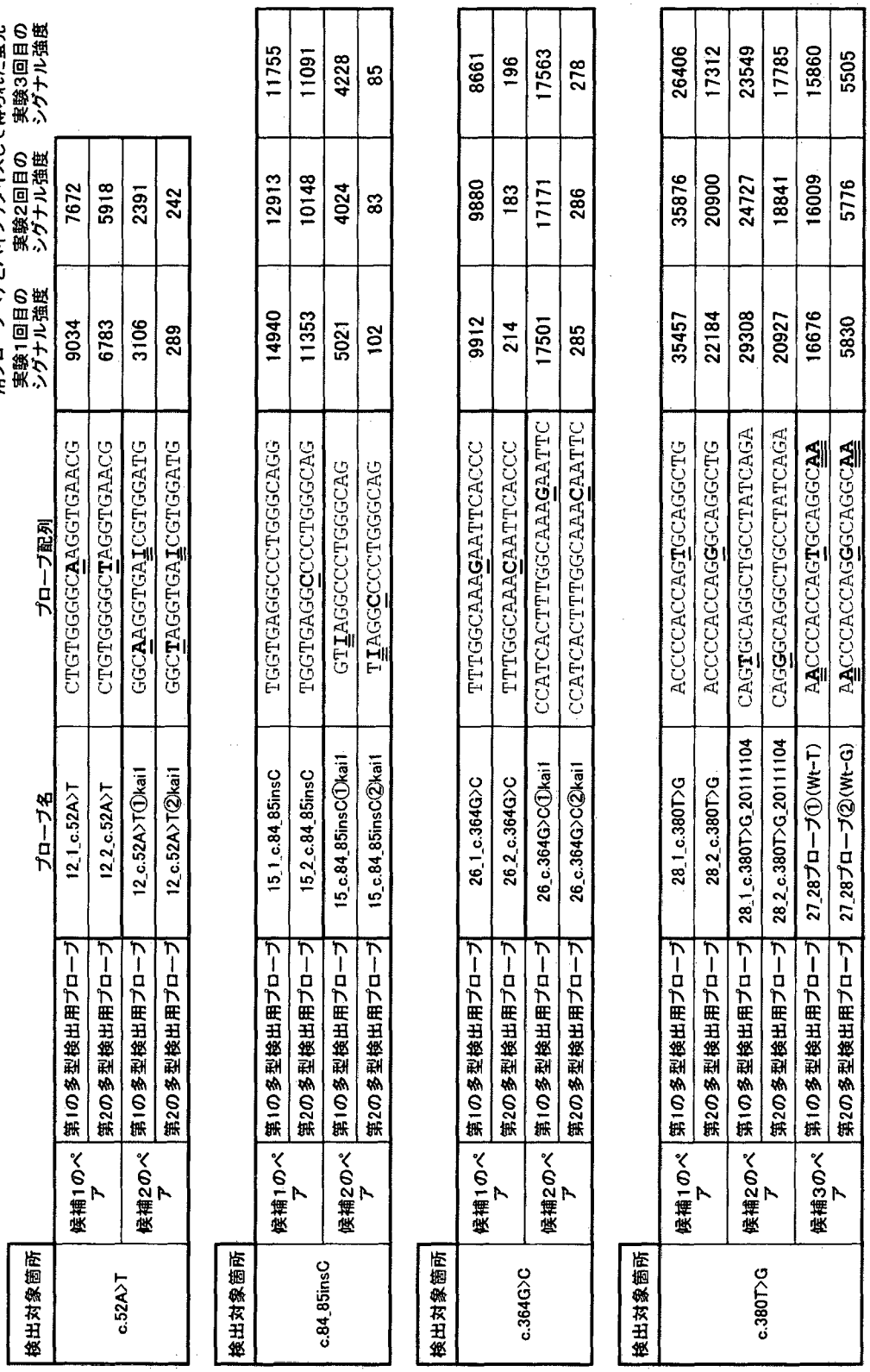
ｃ．８４＿８５ｉｎｓＣの変異を検出するプローブとして、配列番号５，６のペアと配列番号７，８のペアでは、配列番号７、８のペア、

ｃ．３６４Ｇ＞Ｃの変異を検出するプローブとして、配列番号９，１０のペアと配列番号１１，１２のペアでは、配列番号１１、１２のペア、

ｃ．３８０Ｔ＞Ｇの変異を検出するプローブとして、配列番号１３，１４のペア、配列番号１５，１６のペア、配列番号１７，１８のペアでは、配列番号１７、１８のペア、

をプローブ候補の中から選択することができた。

表3　野生型プラスミド（第１の多型用コントロール核酸）を用いて複数回実験を行った結果

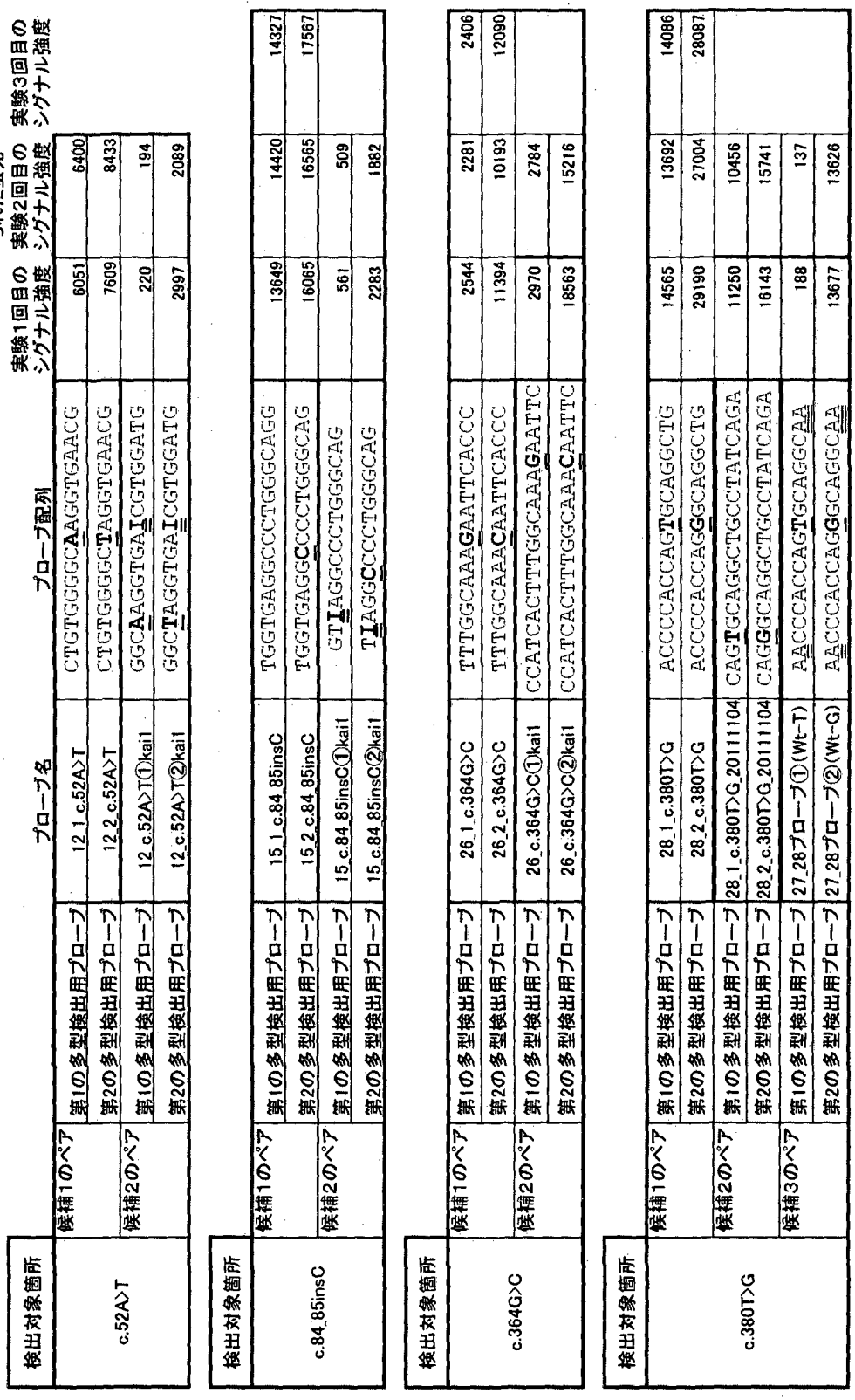


検出対象箇所		プローブ名	プローブ配列	第1の多型用コントロール核酸(野生型)を多型検出用プローブペアとハイブリダイズして得られた蛍光シグナル強度 実験1回目の	実験2回目の	実験3回目の
c.52A>T	候補1のペア	第1の多型検出用プローブ	12_1_c.52A>T	CTGTGGGGCAAGGTGAACG	9034	7672
		第2の多型検出用プローブ	12_2_c.52A>T	CTGTGGGGCTAGGTGAACG	6783	5918
	候補2のペア	第1の多型検出用プローブ	12_c.52A>T①kai1	GGCAAGGTGAICGTGGATG	3106	2391
		第2の多型検出用プローブ	12_c.52A>T②kai1	GGCTAGGTGAICGTGGATG	289	242
検出対象箇所						
c.84_85insC	候補1のペア	第1の多型検出用プローブ	15_1_c.84_85insC	TGGTGAGGCCCTGGGCAGG	14940	12913	11755
		第2の多型検出用プローブ	15_2_c.84_85insC	TGGTGAGGCCCCTGGGCAG	11353	10148	11091
	候補2のペア	第1の多型検出用プローブ	15_c.84_85insC①kai1	GTIAGGCCCTGGGCAG	5021	4024	4228
		第2の多型検出用プローブ	15_c.84_85insC②kai1	TIAGGCCCCTGGGCAG	102	83	85
検出対象箇所						
c.364G>C	候補1のペア	第1の多型検出用プローブ	26_1_c.364G>C	TTTGGCAAAGAATTCACCC	9912	9880	8661
		第2の多型検出用プローブ	26_2_c.364G>C	TTTGGCAAACAATTCACCC	214	183	196
	候補2のペア	第1の多型検出用プローブ	26_c.364G>C①kai1	CCATCACTTTGGCAAAGAATTC	17501	17171	17563
		第2の多型検出用プローブ	26_c.364G>C②kai1	CCATCACTTTGGCAAACAATTC	285	286	278
検出対象箇所						
c.380T>G	候補1のペア	第1の多型検出用プローブ	28_1_c.380T>G	ACCCCACCAGTGCAGGCTG	35457	35876	26406
		第2の多型検出用プローブ	28_2_c.380T>G	ACCCCACCAGGGCAGGCTG	22184	20900	17312
	候補2のペア	第1の多型検出用プローブ	28_1_c.380T>G_20111104	CAGTGCAGGCTGCCTATCAGA	29308	24727	23549
		第2の多型検出用プローブ	28_2_c.380T>G_20111104	CAGGGCAGGCTGCCTATCAGA	20927	18841	17785
	候補3のペア	第1の多型検出用プローブ	27_28プローブ①(Wt-T)	AACCCACCAGTGCAGGCAA	16676	16009	15860
		第2の多型検出用プローブ	27_28プローブ②(Wt-G)	AACCCACCAGGGCAGGCAA	5830	5776	5505

表３に示すプローブ配列において、一重下線の塩基は検出対象の多型であり、二重下線の塩基は本発明の修飾（イノシン置換又はアデニン挿入）を行った塩基である。

同様に、野生型の配列を第１の多型、変異型の配列を第２の多型、第２の多型用コントロール核酸を変異型プラスミドとして、複数回実験を行った結果を表４に示した。また、表３と表４の結果を、第１の多型検出用プローブがハイブリダイズして得られるシグナル強度を表すＹ軸と、第２の多型検出用プローブがハイブリダイズして得られるシグナル強度を表すＸ軸とを含み、Ｘ－Ｙ軸が直交している蛍光座標系にプロットした結果を図６に示した（図６　図５に加え、第２のコントロール核酸を複数回ハイブリダイズ結果をプロットし、さらにそれらの代表直線を示した図）。

表4　変異型プラスミド（第２の多型用コントロール核酸）を用いて複数回実験を行った結果



検出対象箇所		第2の多型用コントロール核酸(変異型)を多型検出用プローブペアとハイブリダイズして得られた蛍光		実験1回目のシグナル強度	実験2回目のシグナル強度	実験3回目のシグナル強度
		プローブ名	プローブ配列			
c.52A>T	候補1のペア	第1の多型検出用プローブ	12_1_c.52A>T	CTGTGGGGCAAGGTGAACG	6051	6400
		第2の多型検出用プローブ	12_2_c.52A>T	CTGTGGGGCTAGGTGAACG	7609	8433
	候補2のペア	第1の多型検出用プローブ	12_c.52A>T①kai1	GGCAAGGTGAICGTGGATG	220	194
		第2の多型検出用プローブ	12_c.52A>T②kai1	GGCTAGGTGAICGTGGATG	2997	2089
c.84_85insC	候補1のペア	第1の多型検出用プローブ	15_1_c.84_85insC	TGGTGAGGCCCTGGGCAGG	13649	14420	14327
		第2の多型検出用プローブ	15_2_c.84_85insC	TGGTGAGGCCCCTGGGCAG	16065	16565	17567
	候補2のペア	第1の多型検出用プローブ	15_c.84_85insC①kai1	GTIAGGCCCCTGGGCAG	561	509	
		第2の多型検出用プローブ	15_c.84_85insC②kai1	TIAGGCCCCTGGGCAG	2283	1882	
c.364G>C	候補1のペア	第1の多型検出用プローブ	26_1_c.364G>C	TTTGGCAAAGAATTCACCC	2544	2281	2406
		第2の多型検出用プローブ	26_2_c.364G>C	TTTGGCAAACAATTCACCC	11394	10193	12090
	候補2のペア	第1の多型検出用プローブ	26_c.364G>C①kai1	CCATCACTTTGGCAAAGAATTC	2970	2784	
		第2の多型検出用プローブ	26_c.364G>C②kai1	CCATCACTTTGGCAAACAATTC	18563	15216	
c.380T>G	候補1のペア	第1の多型検出用プローブ	28_1_c.380T>G	ACCCCACCAGTGCAGGCTG	14565	13692	14086
		第2の多型検出用プローブ	28_2_c.380T>G	ACCCCACCAGGGCAGGCTG	29190	27004	28087
	候補2のペア	第1の多型検出用プローブ	28_1_c.380T>G_20111104	CAGTGCAGGCTGCCTATCAGA	11250	10456	
		第2の多型検出用プローブ	28_2_c.380T>G_20111104	CAGGGCAGGCTGCCTATCAGA	16143	15741	
	候補3のペア	第1の多型検出用プローブ	27_28プローブ①(Wt-T)	AACCCACCAGTGCAGGCAA	188	137	
		第2の多型検出用プローブ	27_28プローブ②(Wt-G)	AACCCACCAGGGCAGGCAA	13677	13626	

表４に示すプローブ配列において、一重下線の塩基は検出対象の多型であり、二重下線の塩基は本発明の修飾（イノシン置換又はアデニン挿入）を行った塩基である。

図６グラフ中の「第２の多型用コントロール核酸をハイブリダイズ」を含む系列は、変異型のプラスミドをハイブリダイズした結果である。点線または実線は、各々のプローブペア候補の複数（２回または３回）の実験結果の平均シグナル強度と、原点とを結ぶ代表直線である。

これらのプローブの選択については、代表直線の傾きに比例する値を補正値Ｃ２と定め、複数の多型検出用プローブペアについて行い比較し、補正値Ｃ２が最小となる第２（変異型）の多型検出に適したプローブペアを選択する。

本検討では、補正値Ｃ２はπ／２÷（π／２－代表直線とＸ軸とのなす角度（ラジアン））として算出した。各プローブペアのうち、性能のよいプローブペアとして、

ｃ．５２Ａ＞Ｔの変異を検出するプローブとして、配列番号１，２のペアと配列番号３，４のペアでは、配列番号３、４のペア、

ｃ．８４＿８５ｉｎｓＣの変異を検出するプローブとして、配列番号５，６のペアと配列番号７，８のペアでは、配列番号７、８のペア、

ｃ．３６４Ｇ＞Ｃの変異を検出するプローブとして、配列番号９，１０のペアと配列番号１１，１２のペアでは、配列番号１１、１２のペア、

ｃ．３８０Ｔ＞Ｇの変異を検出するプローブとして、配列番号１３，１４のペア、配列番号１５，１６のペア、配列番号１７，１８のペアでは、配列番号１７、１８のペア、

をプローブ候補の中から選択することができた。

以上、これまで示した補正値Ｃ、Ｃ２のグラフを図７に示した。

プローブの評価に引き続き、遺伝子型判定の際に有用となる誤差範囲について以下の表５のように設定した。第１のコントロール核酸または第２のコントロール核酸を２回以上の繰り返して得られたシグナル強度から平均値を算出し、そのプロー

ブペアが与える代表座標とした。また代表座標と原点を通る直線を代表直線としＸ軸と代表直線との角度を代表座標角度として個々のデータと原点と結ぶ直線と代表直線との角度を算出し（ラジアン単位)、最大の角度を誤差角度とした。また、補正値Ｃ、Ｃ２、誤差角度を用いて補正した前後のプローブ性能データについて図８に示した。

表5　本発明の補正方法の具体的例示

第1の多型用コントロール核酸を多型検出用プローブペアとハイブリダイズして得られた蛍光

検出対象箇所		プローブ名	実験1回目のシグナル強度	実験2回目のシグナル強度	実験3回目のシグナル強度	実験1角度	実験2角度	実験3角度	代表座標	代表座標角度	代表直線との角度の差		最大の差の角度	補正値C	補正後誤差角
c.52A>T	候補1のペア	12_1_c.52A>T	9034	7672		0.9268	0.9138		8353	0.921	0.0060	0.0070	0.0070	1.7060	0.0119
		12_2_c.52A>T	6783	5918					6351						
	候補2のペア	12_c.52A>T①kai1	3106	2391		1.4781	1.4701		2748	1.475	0.0035	0.0045	0.0045	1.0652	0.0048
		12_c.52A>T②kai1	289	242					265						
c.84_85insC	候補1のペア	15_1_c.84_85insC	14940	12913	11755	0.9210	0.9047	0.8145	13203	0.882	0.0387	0.0225	0.0678	1.7804	0.1207
		15_2_c.84_85insC	11353	10148	11091				10864						
	候補2のペア	15_c.84_85insC①kai1	5021	4024	4228	1.5505	1.5503	1.5506	4425	1.550	0.0001	0.0002	0.0001	0.0002	1.0131	0.0002
		15_c.84_85insC②kai1	102	83	85				90						
c.364G>C	候補1のペア	26_1_c.364G>C	9912	9880	8661	1.5492	1.5523	1.5482	9484	1.550	0.0007	0.0023	0.0018	0.0023	1.0134	0.0023
		26_2_c.364G>C	214	183	196				198						
	候補2のペア	26_c.364G>C①kai1	17501	17171	17563	1.5545	1.5542	1.5550	17412	1.555	0.0000	0.0004	0.0004	0.0004	1.0105	0.0004
		26_c.364G>C②kai1	285	286	278				283						
c.380T>G	候補1のペア	28_1_c.380T>G	35457	35876	26406	1.0117	1.0433	0.9905	32580	1.017	0.0056	0.0260	0.0268	0.0268	1.5441	0.0414
		28_2_c.380T>G	22184	20900	17312				20132						
	候補2のペア	28_1_c.380T>G_20111104	29308	24727	23549	0.9507	0.9197	0.9240	25861	0.933	0.0182	0.0129	0.0086	0.0182	1.6844	0.0306
		28_2_c.380T>G_20111104	20927	18841	17785				19184						
	候補3のペア	27_28プローブ①(Wt-T)	16676	16009	15860	1.2345	1.2245	1.2367	16182	1.232	0.0026	0.0074	0.0048	0.0074	1.2751	0.0094
		27_28プローブ②(Wt-G)	5830	5776	5505				5704						

第2の多型用コントロール核酸を多型検出用プローブペアとハイブリダイズして得られた蛍光

検出対象箇所		プローブ名	実験1回目のシグナル強度	実験2回目のシグナル強度	実験3回目のシグナル強度	実験1角度	実験2角度	実験3角度	代表座標	代表座標角度	代表直線との角度の差		最大の差の角度	補正値C2	補正後誤差角
c.52A>T	候補1のペア	12_1_c.52A>T	6051	6400		0.6718	0.6492		6226	0.660	0.0118	0.0108	0.0118	1.7247	0.0204
		12_2_c.52A>T	7609	8433					8021						
	候補2のペア	12_c.52A>T①kai1	220	194		0.0732	0.0924		207	0.081	0.0079	0.0113	0.0113	1.0544	0.0120
		12_c.52A>T②kai1	2997	2089					2543						
c.84_85insC	候補1のペア	15_1_c.84_85insC	13649	14420	14327	0.7043	0.7163	0.6842	14132	0.701	0.0029	0.0149	0.0172	0.0172	1.8067	0.0311
		15_2_c.84_85insC	16065	16565	17567				16732						
	候補2のペア	15_c.84_85insC①kai1	561	509		0.2410	0.2642		535	0.251	0.0105	0.0127	0.0127	1.1906	0.0151
		15_c.84_85insC②kai1	2283	1882					2083						
c.364G>C	候補1のペア	26_1_c.364G>C	2544	2281	2406	0.2197	0.2202	0.1964	2410	0.212	0.0082	0.0086	0.0151	0.0151	1.1556	0.0174
		26_2_c.364G>C	11394	10193	12090				11226						
	候補2のペア	26_c.364G>C①kai1	2970	2784		0.1587	0.1810		2877	0.169	0.0101	0.0122	0.0122	1.1203	0.0137
		26_c.364G>C②kai1	18563	15216					16889						
c.380T>G	候補1のペア	28_1_c.380T>G	14565	13692	14086	0.4628	0.4693	0.4649	14114	0.466	0.0027	0.0037	0.0037	1.4212	0.0052
		28_2_c.380T>G	29190	27004	28087				28094						
	候補2のペア	28_1_c.380T>G_20111104	11250	10456		0.6087	0.5863		10853	0.598	0.0109	0.0114	0.0114	1.6143	0.0184
		28_2_c.380T>G_20111104	16143	15741					15942						
	候補3のペア	27_28プローブ①(Wt-T)	188	137		0.0137	0.0100		162	0.012	0.0019	0.0019	0.0019	1.0076	0.0019
		27_28プローブ②(Wt-G)	13677	13626					13651						

［実施例２］

ＤＮＡマイクロアレイを用いてβグロビン遺伝子の２５箇所の変異を一括して検出ため、配列番号３、４、７、８、１１、１２、１７、１８と配列番号２５～６６に示されるプローブを搭載したアレイを作製した。

検出対象とする変異の箇所は実施例１の表１と同様であり、ＤＮＡマイクロアレイも実施例１と同様に作製した。

＜ＰＣＲ反応＞

表１記載の番号１～２５の変異型プラスミドＤＮＡを鋳型とし、配列番号２１～２４の２組のプライマー対を用いてＰＣＲ反応を行った。ＰＣＲ反応にはアンプダイレクトプラスキット（島津製作所）を用いた。

＜ＰＣＲ反応液組成＞

プラスミドDNA溶液（10ng/μL）	1μL(野生型又は変異型)
Amplicon1Fプライマー（20μM）	1μL
Amplicon1Rプライマー（20μM）	1μL
MRC-Amplicon2Fプライマー（20μM）	0.5μL
MRC-Amplicon2Rプライマー（20μM）	0.5μL
2×アンプダイレクトバッファー	50μl
BioTaq（アンプダイレクトプラスキット付属）	1μl
ミリQ水	45μl
合計	100μl

ＰＣＲ反応にはＧｅｎｅＡｍｐ９７００サーマルサイクラーを用い、Ｍａｘモードで反応した。温度条件を以下に示した。

＜ＰＣＲ反応温度条件＞

９５℃　１０分間

（９４℃３０秒、６８℃３０秒、７２℃３０秒）×３５サイクル

４℃　反応終了

反応後の反応液100μlに以下のバッファー溶液を加え200μlとした。

反応液	100μl

1M Tris/HCl (pH7.5) バッファー	48μl
5M NaCl 溶液	9.6μl
0.5% Tween20 水溶液	20μl
ミリQ水	22.4μl
合計	200μl

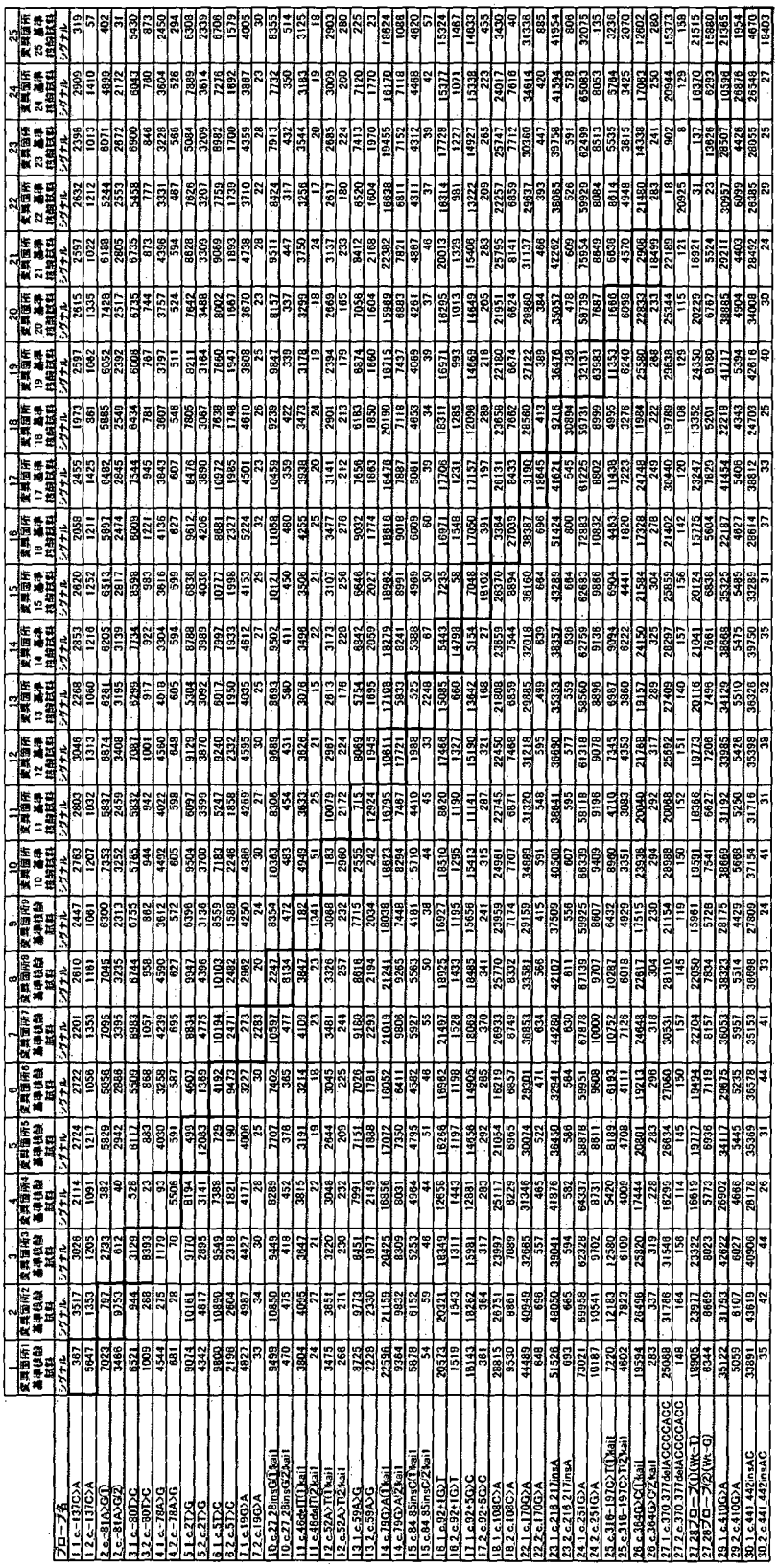
その後、この溶液２００μｌを専用チャンバーに入れ(http://www.mrc.co.jp/genome/about/usage.html に記載)、引き続いてＤＮＡマイクロアレイを入れてふたを閉め、５５℃で２時間インキュベートした。

インキュベート後、チップをそれぞれ０．２４Ｍ　ＴＮＴ　ｂｕｆｆｅｒ　１０ｍｌに５５℃、２０分間浸漬した。その後、引き続いて、０．２４Ｍ　ＴＮ　ｂｕｆｅｒ　１０ｍｌに５５℃、１０分間浸漬して洗浄を実施した。洗浄後、検出を実施した。

検出は、冷却ＣＣＤカメラ方式のＤＮＡマイクロアレイ自動検出装置を用いた。ＤＮＡマイクロアレイをウェル上部から露光時間４秒間で撮像し、各スポットにおけるｃｙ５の蛍光シグナルを検出した。マイクロアレイ上のプローブが搭載されていないスポットをブランクスポットとし、その蛍光強度の中央値をバックグラウンド値とした。すべてのスポットの蛍光強度からバックグランド値を減算した値を各プローブのシグナルとした。

結果を表６にしめした。

表6　変異プラスミド２５種類を用いた検出結果：シグナル値

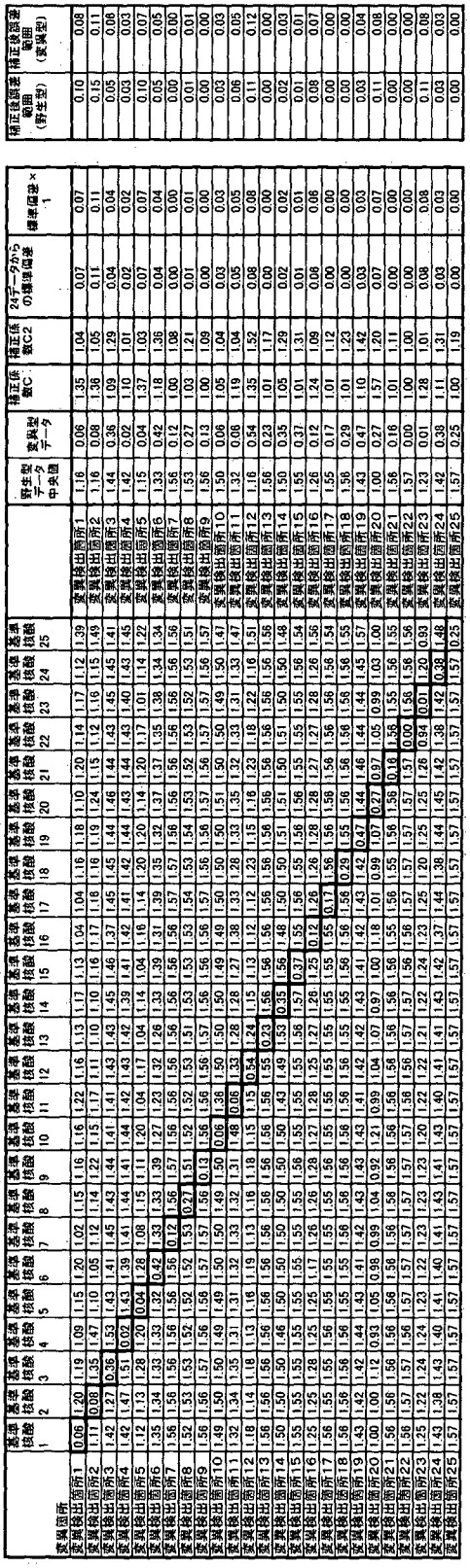


引き続き、プローブペアごとに野生型プローブに由来するシグナル／変異型プローブに由来するシグナルを算出した後、ラジアン単位に換算した（表７左側）。その後、２５回ハイブリダイズしたデータのうち、野生型２４データの中央値（ラジアン）と標準偏差（ラジアン）を算出した。π/2÷野生型の中央値を計算することにより、補正値Ｃを、π/2÷（π/2-変異型）を計算することにより、補正値Ｃ２を算出した（表７右）。

その後、誤差範囲として、野生型２４データの標準偏差に補正値Ｃ、または補正値Ｃ２を乗算することにより、補正後の誤差範囲を算出した（表７右端）。

誤差範囲の上端または下端を遺伝子型の判定の範囲として補正前後でのデータについて図９（図９プラスミド由来の２５種類のサンプルから得られたデータの補正前、補正後）に示した。

表7　プラスミド由来の２５種類のサンプルから得られたデータと補正値、標準偏差



変異箇所	基準核酸 1	基準核酸 2	基準核酸 3	基準核酸 4	基準核酸 5	基準核酸 6	基準核酸 7	基準核酸 8	基準核酸 9	基準核酸 10	基準核酸 11	基準核酸 12	基準核酸 13	基準核酸 14	基準核酸 15	基準核酸 16	基準核酸 17	基準核酸 18	基準核酸 19	基準核酸 20	基準核酸 21	基準核酸 22	基準核酸 23	基準核酸 24	基準核酸 25		野生型データ中央値	変異型データ	補正係数C	補正係数C2	24データからの標準偏差	標準偏差×1	補正後閾値範囲（野生型）	補正後閾値範囲（変異型）
変異検出箇所1	0.06	1.20	1.19	1.09	1.15	1.20	1.02	1.15	1.16	1.16	1.22	1.16	1.13	1.17	1.13	1.04	1.04	1.16	1.18	1.10	1.20	1.14	1.17	1.12	1.39	変異検出箇所1	1.16	0.06	1.35	1.04	0.07	0.07	0.10	0.08
変異検出箇所2	1.17	0.08	1.35	1.47	1.10	1.05	1.12	1.14	1.22	1.15	1.17	1.11	1.10	1.10	1.16	1.17	1.18	1.16	1.19	1.24	1.15	1.15	1.16	1.15	1.49	変異検出箇所2	1.16	0.08	1.36	1.05	0.11	0.11	0.15	0.11
変異検出箇所3	1.42	1.27	0.36	1.53	1.43	1.41	1.45	1.43	1.44	1.44	1.41	1.43	1.43	1.45	1.46	1.37	1.45	1.45	1.44	1.46	1.44	1.43	1.45	1.45	1.41	変異検出箇所3	1.44	0.36	1.09	1.29	0.04	0.04	0.05	0.06
変異検出箇所4	1.42	1.47	1.51	0.02	1.43	1.39	1.41	1.44	1.41	1.41	1.44	1.42	1.43	1.42	1.39	1.41	1.42	1.41	1.42	1.43	1.43	1.43	1.40	1.43	1.45	変異検出箇所4	1.42	0.02	1.10	1.01	0.02	0.02	0.03	0.03
変異検出箇所5	1.12	1.13	1.28	1.20	0.04	1.28	1.08	1.15	1.11	1.20	1.04	1.17	1.04	1.14	1.04	1.16	1.14	1.20	1.14	1.20	1.14	1.17	1.01	1.14	1.22	変異検出箇所5	1.15	0.04	1.37	1.03	0.07	0.07	0.10	0.07
変異検出箇所6	1.35	1.34	1.33	1.33	1.32	0.42	1.33	1.33	1.39	1.27	1.23	1.32	1.26	1.33	1.39	1.31	1.39	1.35	1.32	1.37	1.37	1.35	1.38	1.34	1.34	変異検出箇所6	1.33	0.42	1.18	1.36	0.04	0.04	0.05	0.05
変異検出箇所7	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	0.12	1.56	1.57	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.53	1.56	1.57	1.57	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	変異検出箇所7	1.56	0.12	1.00	1.08	0.00	0.00	0.00	0.00
変異検出箇所8	1.52	1.53	1.53	1.52	1.52	1.52	1.53	0.27	1.51	1.52	1.52	1.53	1.51	1.53	1.53	1.53	1.54	1.53	1.54	1.53	1.52	1.53	1.52	1.53	1.51	変異検出箇所8	1.53	0.27	1.03	1.21	0.01	0.01	0.01	0.01
変異検出箇所9	1.56	1.56	1.57	1.56	1.56	1.57	1.57	1.56	0.13	1.56	1.56	1.56	1.57	1.56	1.56	1.57	1.56	1.56	1.56	1.57	1.56	1.56	1.57	1.57	1.57	変異検出箇所9	1.56	0.13	1.00	1.09	0.00	0.00	0.00	0.00
変異検出箇所10	1.49	1.50	1.50	1.49	1.49	1.50	1.50	1.49	1.50	0.06	1.38	1.50	1.50	1.50	1.50	1.49	1.50	1.50	1.50	1.51	1.50	1.50	1.49	1.50	1.47	変異検出箇所10	1.50	0.06	1.05	1.04	0.03	0.03	0.03	0.03
変異検出箇所11	1.32	1.34	1.35	1.31	1.31	1.32	1.33	1.32	1.31	1.48	0.06	1.33	1.28	1.28	1.27	1.38	1.33	1.28	1.33	1.35	1.32	1.33	1.31	1.33	1.47	変異検出箇所11	1.32	0.06	1.19	1.04	0.05	0.05	0.06	0.06
変異検出箇所12	1.18	1.14	1.18	1.13	1.16	1.19	1.13	1.16	1.18	1.15	0.54	1.24	1.15	1.15	1.28	1.15	1.12	1.23	1.15	1.16	1.23	1.18	1.22	1.16	1.51	変異検出箇所12	1.16	0.54	1.35	1.52	0.08	0.08	0.11	0.12
変異検出箇所13	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.55	0.23	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.58	変異検出箇所13	1.56	0.23	1.01	1.17	0.00	0.00	0.00	0.00
変異検出箇所14	1.50	1.50	1.50	1.46	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.43	1.49	1.53	0.35	1.56	1.48	1.50	1.50	1.51	1.51	1.50	1.51	1.50	1.50	1.48	変異検出箇所14	1.50	0.35	1.05	1.29	0.02	0.02	0.02	0.03
変異検出箇所15	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.55	1.56	1.55	1.55	1.55	1.56	1.57	0.37	1.55	1.56	1.55	1.56	1.56	1.55	1.55	1.55	1.56	1.54	変異検出箇所15	1.55	0.37	1.01	1.31	0.01	0.01	0.01	0.01
変異検出箇所16	1.25	1.25	1.28	1.25	1.25	1.17	1.26	1.26	1.28	1.27	1.28	1.25	1.27	1.28	1.25	0.12	1.26	1.26	1.28	1.28	1.27	1.25	1.27	1.28	1.56	変異検出箇所16	1.26	0.12	1.24	1.09	0.06	0.06	0.08	0.07
変異検出箇所17	1.56	1.55	1.55	1.56	1.56	1.55	1.55	1.55	1.56	1.56	1.56	1.55	1.55	1.55	1.55	0.17	1.56	1.56	1.56	1.58	1.56	1.56	1.56	1.56	1.54	変異検出箇所17	1.55	0.17	1.01	1.12	0.00	0.00	0.00	0.00
変異検出箇所18	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.55	1.56	1.56	1.56	1.58	1.58	1.56	1.55	1.55	1.55	1.55	0.29	1.55	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.55	変異検出箇所18	1.56	0.29	1.01	1.23	0.00	0.00	0.00	0.00
変異検出箇所19	1.43	1.42	1.42	1.44	1.43	1.41	1.42	1.43	1.43	1.43	1.41	1.42	1.43	1.41	1.42	1.43	1.42	0.47	1.44	1.46	1.44	1.44	1.44	1.45	1.57	変異検出箇所19	1.43	0.47	1.10	1.42	0.03	0.03	0.03	0.04
変異検出箇所20	1.00	1.00	1.12	0.93	1.05	0.98	0.99	1.04	0.92	1.21	0.99	1.04	1.07	0.97	1.00	1.18	1.01	0.99	1.07	0.27	0.97	1.05	0.99	1.03	1.00	変異検出箇所20	1.00	0.27	1.57	1.20	0.07	0.07	0.11	0.08
変異検出箇所21	1.56	1.58	1.56	1.56	1.56	1.56	1.58	1.56	1.58	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.55	1.56	1.55	1.56	1.56	0.16	1.56	1.55	1.56	1.55	変異検出箇所21	1.56	0.16	1.01	1.11	0.00	0.00	0.00	0.00
変異検出箇所22	1.56	1.57	1.57	1.56	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.56	1.56	1.57	1.57	1.56	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	0.00	1.56	1.56	1.56	変異検出箇所22	1.57	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
変異検出箇所23	1.25	1.22	1.24	1.24	1.23	1.22	1.23	1.23	1.23	1.20	1.22	1.22	1.21	1.22	1.24	1.23	1.25	1.20	1.25	1.25	1.26	0.94	0.01	1.20	0.93	変異検出箇所23	1.23	0.01	1.28	1.01	0.08	0.08	0.11	0.08
変異検出箇所24	1.43	1.38	1.43	1.40	1.41	1.40	1.41	1.43	1.41	1.43	1.40	1.41	1.41	1.43	1.42	1.37	1.44	1.38	1.44	1.45	1.42	1.38	1.42	0.28	1.48	変異検出箇所24	1.42	0.28	1.11	1.31	0.03	0.03	0.03	0.03
変異検出箇所25	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	0.25	変異検出箇所25	1.57	0.25	1.00	1.19	0.00	0.00	0.00	0.00

本検討とは別に ECACC Ethnic Diversity DNA Panels(EDP-1)（シグマ社 Catalogue No: 07020701）を購入し、１つのサンプルをシークエンサーで塩基配列を解析したところ、変異箇所１２がヘテロでサンプルであることが分かった。そこで引き続き、本サンプルを用いて実施例２に示した方法と同様の方法で、ＤＮＡチップのデータを取得したところ、表８のシグナル強度が得られた。

引き続き、表８のシグナル強度をプローブペアごとに（野生型プローブに由来するシグナル）／（変異型プローブに由来するシグナル）を算出した後、ラジアン単位に換算し、さらに表７中の補正値Ｃを乗算した。結果を表９に示した。また図９の補正後のグラフに表９のデータを重ね合わせたところ（図１０：図９の補正後のグラフに表９のデータを重ね合わせた結果）、変異箇所１２番のところのみ、野生型のエラーバーと変異型のエラーバーで示される間にプロットされ、ヘテロ接合であることが判定できた。

表８　変異箇所１２がヘテロであるサンプル由来のＤＮＡチップシグナル値

プローブ	シグナル強度
1_1_c.-137C>A	1909
1_2_c.-137C>A	807
2_c.-81A>G①	8805
2_c.-81A>G②	3997
3_1_c.-80T>C	7676
3_2_c.-80T>C	1228
4_1_c.-78A>G	5293
4_2_c.-78A>G	799
5_1_c.2T>G	9591
5_2_c.2T>G	5016
6_1_c.5T>C	14262
6_2_c.5T>C	2827
7_1_c.19G>A	6619
7_2_c.19G>A	38
10_c.27_28insG①kai1	13476
10_c.27_28insG②kai1	715
11_c.46delT①kai1	5258
11_c.46delT②kai1	28
12_c.52A>T①kai1	4699
12_c.52A>T②kai1	347
13_1_c.59A>G	12209
13_2_c.59A>G	2773
14_c.79G>A①kai1	22830
14_c.79G>A②kai1	14559
15_c.84_85insC①kai1	5048
15_c.84_85insC②kai1	51
16_1_c.92+1G>T	27551
16_2_c.92+1G>T	2101
17_1_c.92+5G>C	23286
17_2_c.92+5G>C	457
18_1_c.108C>A	35463
18_2_c.108C>A	11120
22_1_c.170G>A	48518
22_2_c.170G>A	703
23_1_c.216_217insA	57316
23_2_c.216_217insA	504
24_1_c.251G>A	62857
24_2_c.251G>A	12711
25_c.316-197C>T①kai1	4843
25_c.316-197C>T②kai1	3308
26_c.364G>C①kai1	22720
26_c.364G>C②kai1	304
27_1_c.370_377delACCCCACC	30203
27_2_c.370_377delACCCCACC	131
27_28プローブ①(Wt-T)	22188
27_28プローブ②(Wt-G)	7791
29_1_c.410G>A	41279
29_2_c.410G>A	5540
30_1_c.441_442insAC	41848
30_2_c.441_442insAC	41

表9　表8のデータを補正したデータ

	ラジアン（補正前）	補正係数C	ラジアン（補正後）
変異検出箇所1	1.17	1.35	1.59
変異検出箇所2	1.14	1.36	1.56
変異検出箇所3	1.41	1.09	1.54
変異検出箇所4	1.42	1.10	1.57
変異検出箇所5	1.09	1.37	1.49
変異検出箇所6	1.38	1.18	1.62
変異検出箇所7	1.56	1.00	1.57
変異検出箇所8	1.52	1.03	1.56
変異検出箇所9	1.57	1.00	1.57
変異検出箇所10	1.50	1.05	1.57
変異検出箇所11	1.35	1.19	1.60
変異検出箇所12	1.00	1.35	1.36
変異検出箇所13	1.56	1.01	1.57
変異検出箇所14	1.49	1.05	1.56
変異検出箇所15	1.55	1.01	1.57
変異検出箇所16	1.27	1.24	1.58
変異検出箇所17	1.56	1.01	1.57
変異検出箇所18	1.56	1.01	1.58
変異検出箇所19	1.42	1.10	1.56
変異検出箇所20	0.97	1.57	1.52
変異検出箇所21	1.56	1.01	1.57
変異検出箇所22	1.57	1.00	1.57
変異検出箇所23	1.23	1.28	1.58
変異検出箇所24	1.44	1.11	1.59
変異検出箇所25	1.57	1.00	1.57

産業上の利用可能性

本発明により、高品質なプローブ、同プローブを備えたマイクロアレイ及びプローブの評価方法が提供される。

配列表フリーテキスト

配列番号 1～18：プローブ

配列番号 21～24：プライマー

配列番号 25～66：プローブ

配列表

5

請 求 の 範 囲

1． １以上の多型を有するポリヌクレオチド配列を検出するためのプローブであって、

当該配列とハイブリダイズし、且つ、少なくとも以下の要件のいずれか１つを満たすことを特徴とする、プローブ。

（１）当該配列の両端に、それぞれ１つ以上の非相補的な塩基が含まれること

（２）当該配列中に含まれる複数の多型のうち、検出目的ではない多型と対応する部分がユニバーサル塩基であること

（３）検出目的の多型が、プローブのいずれかの末端から６塩基以下の位置にあること

2． １以上の多型を有するポリヌクレオチド配列が、当該配列中グアニン及びシトシンの含有量の合計が６３％以上の配列であって、

当該配列とハイブリダイズし、且つ、以下の（１）及び／又は（２）の要件を満たすことを特徴とする、プローブ。

（１）当該配列の両端に、それぞれ１つ以上の非相補的な塩基が含まれること

（２）当該配列中に含まれる複数の多型のうち、検出目的ではない多型と対応する部分がユニバーサル塩基であること

3． １以上の多型を有するポリヌクレオチド配列が、当該配列中グアニン及びシトシンの含有量の合計が４５％以下の配列であって、

当該配列とハイブリダイズし、且つ、

検出目的の多型が、プローブのいずれかの末端から６塩基以下の位置にあること、

を特徴とする、プローブ。

4． １以上の多型を有するポリヌクレオチド配列がヒトβグロビン遺伝子配列である、請求項１～３のいずれかに記載のプローブ。

5． グアニン及びシトシンの含有量の合計が６３％以上である、１以上の多型

を有するポリヌクレオチド配列が、配列番号３、４、７、８、１７又は１８に記載の配列を有する、請求項２記載のプローブ。

６．　グアニン及びシトシンの含有量の合計が４５％以下である、１以上の多型を有するポリヌクレオチド配列が、配列番号１１又は１２に記載の配列を有する、請求項３記載のプローブ。

７．　配列番号３、４、７、８、１１、１２、１７又は１８に記載の配列の少なくとも１つを有する、マイクロアレイ。

８．　配列番号３、４、７、８、１１、１２、１７、１８、２５～６６に示される遺伝子を含む、βグロビン遺伝子の変異を検出するためのプローブ群。

９．　配列番号３、４、７、８、１１、１２、１７、１８、２５～６６に記載の配列の少なくとも１つを有する、マイクロアレイ。

１０．　少なくとも請求項１～9 のいずれか一項に記載のプローブを含む、βサラセミア検出キット。

１１．　請求項７、９に記載のマイクロアレイを含む、βサラセミア検出キット。

１２．　（イ）（ｉ）配列番号２１で示されるオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号２２で示されるオリゴヌクレオチドプライマー、及び/又は（ｉｉ）配列番号２３で示されるオリゴヌクレオチドプライマーと配列番号２４で示されるオリゴヌクレオチドプライマーと、

（ロ）請求項７又は９に記載のマイクロアレイと

を含む、βグロビン遺伝子変異検出用キット。

１３．　以下の工程を含む、多型検出用マイクロアレイプローブペアの評価方法。

(1)　第１の多型検出用プローブがハイブリダイズして得られるシグナル強度を表すＹ軸と、第２の多型検出用プローブがハイブリダイズして得られるシグナル強度を表すＸ軸とを含む蛍光座標系において、第１の多型用コントロール核酸を多型検出用プローブペアとハイブリダイズして得られた蛍光座標をプロットする工程、

(2)　前記Ｙ軸とＸ軸との交点０と、前記工程（1）でプロットされた蛍光座標とを通る直線の傾きに反比例する値を補正値Ｃと定める工程、

(3) 工程 (1) 及び (2) を複数の多型検出用プローブペアについて行い、各プローブ間で補正値 C を比較し、補正値 C が最小となるプローブペアを第一の多型検出に適したプローブとして決定する工程

１４．前記蛍光座標系は前記 Y 軸と X 軸とが直交しているものである、請求項１３に記載の方法。

１５．前記工程 (1) は、前記コントロール核酸と、前記プローブとのハイブリダイズを 2 回以上行って 2 点以上の蛍光座標を獲得し、各座標の代表値 M を定めるものであり、かつ、

前記工程 (2) において、前記直線は前記交点 O と前記代表値 M とを通る中央直線である、請求項１３又は１４に記載の方法

１６．前記工程 (1) はさらに、交点 O と前記 2 点以上の蛍光座標とを通る複数の直線のうち、前記中央直線との傾きの差がある直線を選択し、これを誤差直線と定める処理を含み、

前記工程 (2) は、

(a) 前記中央直線と X 軸との間の角度 α (ラジアン) から、

補正値 $C=\pi/2\div\alpha$ を求める処理、

(b) 前記中央直線と誤差直線とがなす角度を誤差角 θ (ラジアン) から、

補正誤差角 θ' (ラジアン) ＝ θ (ラジアン) ×補正値 C

を求める処理、

を含むものである、

請求項１４又は１５に記載の方法。

１７．以下の工程をさらに含む、請求項１３～１６に記載の方法。

(4) 第 2 の多型用コントロール核酸を第 2 の多型検出用プローブペアとハイブリダイズして得られた蛍光座標をプロットする工程、

(5) 交点 O と、前記工程 (4) でプロットされた蛍光座標とを通る直線の傾きに比例する値を補正値 C_2 と定める工程、

(6) 工程 (4) 及び (5) を複数の第 2 の多型検出用プローブペアについて行い、各プローブ間で補正値 C_2 を比較し、補正値 C_2 が最小となるプローブペアを第 2 の多型検出に適したプローブとして決定する工程

１８．　前記工程（4）は、前記第２の多型用コントロール核酸と、前記第２の多型検出用プローブとのハイブリダイズを２回以上行って２点以上の蛍光座標を獲得し、各座標の代表値M_2を定めるものであり、かつ、

前記工程（5）において、前記直線が前記交点０と前記代表値M_2とを通る第２の中央直線である、請求項17に記載の方法。

１９．　前記工程（4）はさらに、交点０と前記２点以上の蛍光座標とを通る複数の直線のうち、前記第２の中央直線との傾きの差がある直線を選択し、これを誤差直線と定める処理を含み、

前記工程（5）は、

（c）前記第２の中央直線とＹ軸との間の角度β（ラジアン）から、

補正値$C_2=\pi/2\div\beta$を求める処理、及び

（d）前記第２の中央直線と誤差直線とがなす角度を第２の誤差角θ_2（ラジアン）から、

第２の補正誤差角θ_2'（ラジアン）＝θ_2（ラジアン）×補正値C_2

を求める処理、

を含むものである、

請求項18に記載の方法。

２０．　請求項13～19のいずれか一項に記載の方法を利用した遺伝子型判別表示プログラム。