

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

NPM1遺伝子のexon12の変異を検出するためのプローブであって、下記P5、P5'、P6、P6'、P7、P7'、P1、P1'、P2およびP2'から選択される少なくとも1種の蛍光標識オリゴヌクレオチドからなることを特徴とする多型検出用プローブ。

(P5) 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列を有し、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P5') 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P6) 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列を有し、塩基番号153番目に対応する塩基がグアニンであり、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P6') 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号153番目に対応する塩基がグアニンであり、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P7) 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列を有し、塩基番号153番目に対応する塩基がグアニンであり、塩基番号154番目に対応する塩基がチミンであり、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P7') 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号153番目に対応する塩基がグアニンであり、塩基番号154番目に対応する塩基がチミンであり、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P1) 配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号135～150を含む16～50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列であり、塩基番号135に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P1') 配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号135～150を含む16～50塩基長の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号135に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P2) 配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号164～182を含む19～50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列であり、塩基番号182に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、および

(P2') 配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号164～182を含む19～50塩基長の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号182に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド。

【請求項 2】

P5、P5'、P6、P6'、P7およびP7'のオリゴヌクレオチドは、蛍光色素で標識された塩基番号145に対応する塩基を3'末端から数えて1～3番目の位置に有し、

P1およびP1'のオリゴヌクレオチドは、蛍光色素で標識された塩基番号135に対応する塩基を3'末端から数えて1～3番目の位置に有し、

P2およびP2'のオリゴヌクレオチドは、蛍光色素で標識された塩基番号182に対応する塩基を5'末端から数えて1～3番目の位置に有する、請求項1記載のプローブ。

【請求項 3】

P5、P5'、P6、P6'、P7およびP7'のオリゴヌクレオチドは、蛍光色素で標識された塩基番号145に対応する塩基を3'末端に有し、

P1およびP1'のオリゴヌクレオチドは、蛍光色素で標識された塩基番号135に対応する塩基を3'末端に有し、

P2およびP2'のオリゴヌクレオチドは、蛍光色素で標識された塩基番号182に対応する塩基を5'末端に有する、請求項1記載のプロープ。

【請求項4】

P1およびP1'のオリゴヌクレオチドは、塩基番号153-156のいずれかの塩基に対応する塩基を5'末端とし、蛍光色素で標識された塩基番号135に対応する塩基を3'末端に有し、

P2およびP2'のオリゴヌクレオチドは、塩基番号153-156のいずれかの塩基に対応する塩基を3'末端とし、蛍光色素で標識された塩基番号182に対応する塩基を5'末端に有する、請求項1記載のプロープ。

10

【請求項5】

P5、P5'、P6、P6'、P7およびP7'のオリゴヌクレオチドは、塩基番号162を5'末端とし、蛍光色素で標識された塩基番号145に対応する塩基を3'末端に有し、

P1およびP1'のオリゴヌクレオチドは、塩基番号155を5'末端とし、蛍光色素で標識された塩基番号135に対応する塩基を3'末端に有し、

P2およびP2'のオリゴヌクレオチドは、塩基番号156を3'末端とし、蛍光色素で標識された塩基番号182に対応する塩基を5'末端に有する、請求項1記載のプロープ。

【請求項6】

前記オリゴヌクレオチドは、標的配列にハイブリダイズしないときに蛍光を発し、且つ標的配列にハイブリダイズしたときに蛍光強度が減少するかまたは増加する、請求項1～5のいずれか1項記載のプロープ。

20

【請求項7】

前記オリゴヌクレオチドが、標的配列にハイブリダイズしないときに蛍光を発し、標的配列にハイブリダイズしたときに蛍光強度が減少する、請求項6記載のプロープ。

【請求項8】

前記プロープが、融解曲線分析用のプロープである、請求項1～7のいずれか1項に記載のプロープ。

【請求項9】

P5、P5'、P6、P6'、P7およびP7'のオリゴヌクレオチドの塩基長が12～35で、P1およびP1'のオリゴヌクレオチドの塩基長が16～35で、P2およびP2'のオリゴヌクレオチドが19～35である、請求項1～8のいずれか1項記載の多型検出用プロープ。

30

【請求項10】

NPM1遺伝子のexon12における多型の検出方法であって、請求項1～9のいずれか1項に記載のプロープを少なくとも1種用いることを特徴とする方法。

【請求項11】

NPM1遺伝子のexon12における多型の検出方法であって、下記工程(I)～(IV)を含むことを特徴とする方法。

(I) 核酸を含有する試料に、請求項1～9のいずれか1項に記載のプロープを添加して前記核酸に前記プロープをハイブリダイズさせる工程、

(II) 温度を変化させて前記核酸と前記プロープとのハイブリッド形成体を解離させ、ハイブリッド形成体の解離に基づくシグナルの変動を測定する工程、

40

(III) 前記シグナルの変動を解析して前記試料中の一本鎖核酸におけるT_m値を検出する工程、および

(IV) 前記T_m値から前記試料中の一本鎖核酸における、目的の多型の有無または多型を有する一本鎖核酸の存在比を決定する工程。

【請求項12】

さらに、(I)の工程の前または(I)の工程と同時にDNAを増幅することを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

請求項10～12のいずれか1項に記載の方法により、NPM1遺伝子のexon12における多型を検

50

出する工程、および多型の有無を決定する工程を含む、急性骨髄性白血病のかかりやすさ、病態および/または予後を分析する方法。

【請求項 1 4】

請求項1～9のいずれか 1 項に記載のプロープを含む、NPM1遺伝子における多型を検出するための試薬キット。

【請求項 1 5】

さらに、NPM1遺伝子の配列番号1に示す塩基配列におけるP5、P5'、P6、P6'、P7、P7'P1、P1'、P2、P2'のオリゴヌクレオチドがハイブリダイズする配列を含む領域を増幅するためのプライマーを含む、請求項14に記載の試薬キット。

【請求項 1 6】

前記プライマーが、下記P3およびP4またはP3'およびP4'から選択される多型検出用プライマーである、請求項 1 4 または 1 5 に記載の試薬キット。

(P3)106番目の塩基Tを3'末端とし配列番号1に相同的な10～50塩基のオリゴヌクレオチド、および

(P4)205番目の塩基Tを3'末端とし配列番号1の相補鎖に相同性を有する10～50塩基のオリゴヌクレオチド、ならびに

(P3')106番目の塩基Tを3'末端とし配列番号1の相補鎖に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する10～50塩基のオリゴヌクレオチド、および

(P4')205番目の塩基Tを3'末端とし配列番号1の塩基配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する10～50塩基のオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、NPM1遺伝子のexon12変異を検出する方法、ならびにそのための核酸プロープおよびキットに関する。

【0002】

急性骨髄性白血病（AML）の病因に関連する DNA 変異は多数発見されている。NPM1遺伝子変異は成人の急性骨髄性白血病患者に見つかり、FLT3-ITD遺伝子変異の結果と組み合わせることで予後予測に関連することが報告されている（非特許文献1）。NPM1遺伝子の変異タイプとしては、例えば、非特許文献2～7に記載されており、報告症例数の多さや変異が起こる塩基配列箇所から代表的な変異としては、タイプA、タイプB、タイプD、タイプ7、タイプQ、タイプ10、タイプE、タイプ6などが挙げられる。

【0003】

塩基の多型を検出する方法としては、以下の方法が知られている。

非特許文献7には、PCRで増幅した後に電気泳動で分離し、そこから切出したゲルから増幅産物を精製し、ダイレクトシーケンスする方法が記載されている。非特許文献8には、DHPLC法とシーケンス法により検出する方法が記載されている。

しかしながら、これらの方法は、(1)増幅産物を取り出すので、コンタミネーションの危険性があり、(2)操作が自動化されておらず、また各項目それぞれについて操作が必要であることから、手間とコストを必要とし、(3)結果解析に専門知識や専門スキルを必要とし、そして、(4)シーケンス解析の検出特異性は20%程度と低いため、正常細胞の割合が多い癌細胞では、検出が難しいという問題があった。

【0004】

一方、変異を含む領域をPCRで増幅した後、蛍光色素で標識された核酸プロープを用いて融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を解析する方法が知られている（特許文献1，2）。これらの文献においては、プロープの設計に関し、末端部が蛍光色素により標識された消光プロープが標的核酸にハイブリダイゼーションしたとき、末端部分においてプロープ-核酸ハイブリッドの複数塩基対が少なくとも一つのGとCのペアを形成するように設計するという教示はある。しかしながら、これらの方法は実施する上で全ての任意配列で実施可能ではないという問題があった。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2001-286300号公報

【特許文献2】特開2002-119291号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Blood. 2007;109 : 874-885

【非特許文献2】New Eng J Med 352 : 254-266, 2005

【非特許文献3】Blood. 2005;106 : 1419-1422

【非特許文献4】Blood. 2005;106 : 3740-3746

【非特許文献5】Blood. 2005;106 : 3733-3739

【非特許文献6】Blood. 2006;108 : 1999-2005

【非特許文献7】Blood. 2005;106 : 2854-2861

【非特許文献8】Haematologica 2007; 92 : 1268-1269

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、NPM1遺伝子のexon12変異を検出するのに有効なプローブを特定し、NPM1遺伝子のexon12変異を検出する方法、およびそのためのキットを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、NPM1遺伝子のexon12変異を含む特定の領域に基づいてプローブを設計し、該プローブを用いる融解曲線分析を行うことにより当該変異を検出できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0009】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) NPM1遺伝子のexon12の変異を検出するためのプローブであって、下記P5、P5'、P6、P6'、P7、P7'、P1、P1'、P2およびP2'から選択される少なくとも1種の蛍光標識オリゴヌクレオチドからなることを特徴とする多型検出用プローブ。

(P5) 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列を有し、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P5') 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P6) 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列を有し、塩基番号153番目に対応する塩基がグアニンであり、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P6') 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号153番目に対応する塩基がグアニンであり、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P7) 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列を有し、塩基番号153番目に対応する塩基がグアニンであり、塩基番号154番目に対応する塩基がチミンであり、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P7') 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号15

10

20

30

40

50

3番目に対応する塩基がグアニンであり、塩基番号154番目に対応する塩基がチミンであり、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P1) 配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号135～150を含む16～50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列であり、塩基番号135に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P1') 配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号135～150を含む16～50塩基長の塩基配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号135に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P2) 配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号164～182を含む19～50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列であり、塩基番号182に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、および

(P2') 配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号164～182を含む19～50塩基長の塩基配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号182に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド。

(2) P5、P5'、P6、P6'、P7およびP7'のオリゴヌクレオチドは、蛍光色素で標識された塩基番号145に対応する塩基を3'末端から数えて1～3番目の位置に有し、

P1およびP1'のオリゴヌクレオチドは、蛍光色素で標識された塩基番号135に対応する塩基を3'末端から数えて1～3番目の位置に有し、

P2およびP2'のオリゴヌクレオチドは、蛍光色素で標識された塩基番号182に対応する塩基を5'末端から数えて1～3番目の位置に有する、(1)記載のプロープ。

(3) P5、P5'、P6、P6'、P7およびP7'のオリゴヌクレオチドは、蛍光色素で標識された塩基番号145に対応する塩基を3'末端に有し、

P1およびP1'のオリゴヌクレオチドは、蛍光色素で標識された塩基番号135に対応する塩基を3'末端に有し、

P2およびP2'のオリゴヌクレオチドは、蛍光色素で標識された塩基番号182に対応する塩基を5'末端に有する、(1)記載のプロープ。

(4) P1およびP1'のオリゴヌクレオチドは、塩基番号153-156のいずれかの塩基に対応する塩基を5'末端とし、蛍光色素で標識された塩基番号135に対応する塩基を3'末端に有し、

P2およびP2'のオリゴヌクレオチドは、塩基番号153-156のいずれかの塩基に対応する塩基を3'末端とし、蛍光色素で標識された塩基番号182に対応する塩基を5'末端に有する、(1)記載のプロープ。

(5) P5、P5'、P6、P6'、P7およびP7'のオリゴヌクレオチドは、塩基番号162を5'末端とし、蛍光色素で標識された塩基番号145に対応する塩基を3'末端に有し、

P1およびP1'のオリゴヌクレオチドは、塩基番号155を5'末端とし、蛍光色素で標識された塩基番号135に対応する塩基を3'末端に有し、

P2およびP2'のオリゴヌクレオチドは、塩基番号156を3'末端とし、蛍光色素で標識された塩基番号182に対応する塩基を5'末端に有する、(1)記載のプロープ。

(6) 前記オリゴヌクレオチドは、標的配列にハイブリダイズしないときに蛍光を発し、且つ標的配列にハイブリダイズしたときに蛍光強度が減少するかまたは増加する、(1)～(5)のいずれか1項記載のプロープ。

(7) 前記オリゴヌクレオチドが、標的配列にハイブリダイズしないときに蛍光を発し、標的配列にハイブリダイズしたときに蛍光強度が減少する、(6)記載のプロープ。

(8) 前記プロープが、融解曲線分析用のプロープである、(1)～(7)のいずれか1項に記載のプロープ。

(9) P5、P5'、P6、P6'、P7およびP7'のオリゴヌクレオチドの塩基長が12～35で、P1およびP1'のオリゴヌクレオチドの塩基長が16～35で、P2およびP2'のオリゴヌクレオチドが19～35である、(1)～(8)のいずれか1項記載の多型検出用プロープ。

(10) NPM1遺伝子のexon12における多型の検出方法であって、(1)～(9)のいずれ

10

20

30

40

50

か 1 項に記載のプローブを少なくとも 1 種用いることを特徴とする方法。

(1 1) NPM1遺伝子のexon12における多型の検出方法であって、下記工程 (I) ~ (I V) を含むことを特徴とする方法。

(I) 核酸を含有する試料に、(1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載のプローブを添加して前記核酸に前記プローブをハイブリダイズさせる工程、

(I I) 温度を変化させて前記核酸と前記プローブとのハイブリッド形成体を解離させ、ハイブリッド形成体の解離に基づくシグナルの変動を測定する工程、

(I I I) 前記シグナルの変動を解析して前記試料中の一本鎖核酸における T m 値を検出する工程、および

(I V) 前記 T m 値から前記試料中の一本鎖核酸における、目的の多型の有無または多型を有する一本鎖核酸の存在比を検出する工程。

(1 2) さらに、(I) の工程の前または (I) の工程と同時に DNA を増幅することを含む、(1 1) に記載の方法。

(1 3) (1 0) ~ (1 2) のいずれか 1 項に記載の方法により、NPM1遺伝子のexon12における多型を検出する工程、および多型の有無を決定する工程を含む、急性骨髄性白血病のかかりやすさ、病態および/または予後を分析する方法。

(1 4) (1) ~ (9) のいずれか 1 項に記載のプローブを含む、NPM1遺伝子における多型を検出するための試薬キット。

(1 5) さらに、NPM1遺伝子の配列番号1に示す塩基配列における P5、P5'、P6、P6'、P7、P7'、P1、P1'、P2、P2' のオリゴヌクレオチドがハイブリダイズする配列を含む領域を増幅するためのプライマーを含む、(1 4) に記載の試薬キット。

(1 6) 前記プライマーが、下記 P3 および P4 並びに P3' および P4' から選択される多型検出用プライマーである、(1 4) または (1 5) に記載の試薬キット。

(P3) 106 番目の塩基 T を 3' 末端とし配列番号 1 に相同的な 10 ~ 50 塩基のオリゴヌクレオチド、および

(P4) 205 番目の塩基 T を 3' 末端とし配列番号 1 の相補鎖に相同性を有する 10 ~ 50 塩基のオリゴヌクレオチド並びに

(P3') 106 番目の塩基 T を 3' 末端とし配列番号 1 の相補鎖に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する 10 ~ 50 塩基のオリゴヌクレオチド、および

(P4') 205 番目の塩基 T を 3' 末端とし配列番号 1 の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する 10 ~ 50 塩基のオリゴヌクレオチド。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明のプローブを添加して融解曲線分析 (T m 解析) を行うだけで NPM1 遺伝子の exon12 の変異の検出が可能となる。本発明のプローブは、特異性が高く、検出感度が高い。本発明の方法を用いることにより、PCR を行う場合であっても、増幅産物を取り出す必要がないため、コンタミネーションの危険性がほぼ無い。また、本発明の方法は、操作が簡単なので自動化が容易である。本発明のプローブを使用すれば、現在報告されている変異の中の代表的な 8 つの変異タイプの内、7 つの変異が識別可能である。また代表的な 2 つの変異タイプ (タイプ A, E) については、野生型に含まれる変異が 10% であっても検出可能である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】(A) 核酸混合物の融解曲線、及び (B) 微分融解曲線の一例を示す図である。

【図 2】検量線の一例を示す図である。

【図 3】本発明のプローブの設計概略図を示す。実施例において使用される本発明のプローブの位置を示す。また、比較例において使用されるプローブの位置を示す。

【図 4】実施例 1 の W T (相補鎖オリゴヌクレオチド) についての T m 解析における単位時間当たりの T A M R A (3 T - N P M 1 - e 1 2 - R 1) の蛍光強度の変化量 (d 蛍光強度増加量 / t) を縦軸とし、温度を横軸とし、これらの関係を示す。以下の図においても、

縦軸と横軸の関係は同様である。

【図5】実施例1のmt type A(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(3T-NPM1-e12-R1)を用いた。

【図6】実施例1のmt type B(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(3T-NPM1-e12-R1)を用いた。

【図7】実施例1のmt type D(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(3T-NPM1-e12-R1)を用いた。

【図8】実施例1のmt type 7(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(3T-NPM1-e12-R1)を用いた。

【図9】実施例1のWT(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(5T-NPM1-e12-R2)を用いた。 10

【図10】実施例1のmt type Q(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(5T-NPM1-e12-R2)を用いた。

【図11】実施例1のmt type 10(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(5T-NPM1-e12-R2)を用いた。

【図12】実施例1のmt type E(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(5T-NPM1-e12-R2)を用いた。

【図13】実施例1のmt type 6(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(5T-NPM1-e12-R2)を用いた。

【図14】比較例1のWT(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(3T-NPM1-e12-R3)を用いた。 20

【図15】比較例1のmt type A(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(3T-NPM1-e12-R3)を用いた。

【図16】比較例1のmt type B(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(3T-NPM1-e12-R3)を用いた。

【図17】比較例1のmt type D(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(3T-NPM1-e12-R3)を用いた。

【図18】比較例1のmt type 7(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(3T-NPM1-e12-R3)を用いた。

【図19】比較例1のmt type Q(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(3T-NPM1-e12-R3)を用いた。 30

【図20】比較例1のmt type 10(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(3T-NPM1-e12-R3)を用いた。

【図21】比較例1のmt type E(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(3T-NPM1-e12-R3)を用いた。

【図22】比較例1のmt type 6(相補鎖オリゴヌクレオチド)についてのTm解析において、プローブにTAMRA(3T-NPM1-e12-R3)を用いた。

【図23】実施例2の血液検体についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにBODIPY FL(3FL-NPM1-e12-R1)(左図)とTAMRA(5T-NPM1-e12-R2)(右図)を用いた。 40

【図24】実施例2のWT 100%(プラスミド)についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにBODIPY FL(3FL-NPM1-e12-R1)(左図)とTAMRA(5T-NPM1-e12-R2)(右図)を用いた。

【図25】実施例2のmt type A 100%(プラスミド)についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにBODIPY FL(3FL-NPM1-e12-R1)(左図)とTAMRA(5T-NPM1-e12-R2)(右図)を用いた。

【図26】実施例2のmt type A 30%、Wt 70%(プラスミド)についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにBODIPY FL(3FL-NPM1-e12-R1)(左図)とTAMRA(5T-NPM1-e12-R2)(右図)を用いた。

【図27】実施例2のmt type A 20%、Wt 80%(プラスミド)についてのPCR反応 50

後のTm解析において、プローブにBODIPY FL (3 FL - NPM1 - e12 - R1) (左図)とTAMRA (5 T - NPM1 - e12 - R2) (右図)を用いた。

【図28】実施例2のmt type A 10%、Wt 90% (プラスミド) についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにBODIPY FL (3 FL - NPM1 - e12 - R1) (左図)とTAMRA (5 T - NPM1 - e12 - R2) (右図)を用いた。

【図29】実施例2のmt type E 100% (プラスミド) についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにBODIPY FL (3 FL - NPM1 - e12 - R1) (左図)とTAMRA (5 T - NPM1 - e12 - R2) (右図)を用いた。

【図30】実施例2のmt type E 30%、Wt 70% (プラスミド) についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにBODIPY FL (3 FL - NPM1 - e12 - R1) (左図)とTAMRA (5 T - NPM1 - e12 - R2) (右図)を用いた。

【図31】実施例2のmt type E 20%、Wt 80% (プラスミド) についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにBODIPY FL (3 FL - NPM1 - e12 - R1) (左図)とTAMRA (5 T - NPM1 - e12 - R2) (右図)を用いた。

【図32】実施例2のmt type E 10%、Wt 90% (プラスミド) についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにBODIPY FL (3 FL - NPM1 - e12 - R1) (左図)とTAMRA (5 T - NPM1 - e12 - R2) (右図)を用いた。

【図33】比較例2の血液検体についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにTAMRA (3 T - NPM1 - e12 - R3)を用いた。

【図34】比較例2のWt 100% (プラスミド) についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにTAMRA (3 T - NPM1 - e12 - R3)を用いた。

【図35】比較例2のmt type A 100% (プラスミド) についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにTAMRA (3 T - NPM1 - e12 - R3)を用いた。

【図36】比較例2のmt type A 20%、Wt 80% (プラスミド) についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにTAMRA (3 T - NPM1 - e12 - R3)を用いた。

【図37】比較例2のmt type E 100% (プラスミド) についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにTAMRA (3 T - NPM1 - e12 - R3)を用いた。

【図38】比較例2のmt type E 20%、Wt 80% (プラスミド) についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにTAMRA (3 T - NPM1 - e12 - R3)を用いた。

【図39】実施例4のmt type A (プラスミド) についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにPacific Blue (mtA-R4)を用いた。

【図40】実施例4のmt type A (プラスミド) についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにTAMRA (mtB-R5)を用いた。

【図41】実施例4のmt type A (プラスミド) についてのPCR反応後のTm解析において、プローブにBODIPY FL (mtD-R6)を用いた。

【発明を実施するための形態】

【0012】

< 1 > 本発明プローブおよび本発明検出方法

本発明プローブは、NPM1遺伝子のexon12の変異を検出するためのプローブであって、下記(P5)、(P5')、(P6)、(P6')、(P7)、(P7')、(P1)、(P1')、(P2)、および(P2')から選択される少なくとも1種の蛍光標識オリゴヌクレオチドからなることを特徴とする多型検出用プローブである。

(P5)配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145~156を含む12~50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列を有し、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P5')配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145~156を含む12~50塩基長の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

10

20

30

40

50

(P6) 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列を有し、塩基番号153番目に対応する塩基がグアニンであり、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P6') 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号153番目に対応する塩基がグアニンであり、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P7) 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列を有し、塩基番号153番目に対応する塩基がグアニンであり、塩基番号154番目に対応する塩基がチミンであり、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P7') 配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号145～156を含む12～50塩基長の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号153番目に対応する塩基がグアニンであり、塩基番号154番目に対応する塩基がチミンであり、塩基番号145に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P1) 配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号135～150を含む16～50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列であり、塩基番号135に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P1') 配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号135～150を含む16～50塩基長の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号135に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、

(P2) 配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号164～182を含む19～50塩基長の塩基配列に相補的な配列またはそれに相同な配列であり、塩基番号182に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド、および

(P2') 配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号164～182を含む19～50塩基長の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、塩基番号182に対応する塩基がシトシンであり蛍光色素で標識されているオリゴヌクレオチド。

【0013】

本発明プローブは、配列番号2に示す塩基配列（NPM1遺伝子のexon12の変異タイプAの塩基を有する配列）において上記(P5)、(P5')、(P6)、(P6')、(P7)、(P7')に特定された配列を有し、(P6)、(P6')については、塩基番号153番目に対応する塩基がグアニンであり、(P7)、(P7')については、さらに塩基番号154番目に対応する塩基がチミンである他は、特許文献1，2に記載された消光プローブと同様にして作製できる。また、本発明プローブは、配列番号1に示す塩基配列（NPM1遺伝子のexon12の野生型の塩基を有する配列）において上記(P1)、(P1')、(P2)および(P2')に特定された配列を有する他は、特許文献1，2に記載された消光プローブと同様にして作製できる。なお、本発明の配列番号1に示す配列は、GenBankのアクセッションナンバーNG_016018の27689番目から28278番目である。また、配列番号2に示す配列は、塩基番号153～157番目の4塩基が付加されている点でのみ配列番号1に示す配列と異なる。

【0014】

本発明のプローブの長さとしては、P5、P5'、P6、P6'、P7、P7'については、例えば、12～50塩基長、12～35塩基長、または12～30塩基長である。P1、P1'については、例えば、16～50塩基長、16～35塩基長、または16～30塩基長である。P2、P2'については、例えば、19～50塩基長、19～35塩基長、または19～30塩基長である。

本発明プローブは、例えば、配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号153-156（下記表1のgcag）のいずれかの塩基に対応する塩基を末端とするプローブであり、P1、P1'については、塩基番号153-156のいずれかの塩基を5'末端とし、P2、P2'については、塩基

10

20

30

40

50

番号153-156のいずれかの塩基を3'末端とする。本発明のプロープは、例えば、配列番号1に示す塩基配列において、P1, P1'については、塩基番号155の塩基を5'末端とし、P2, P2'については、塩基番号156の塩基を3'末端とする。

【0015】

本願における「相同性」とは、特定の塩基配列において、塩基配列の相補鎖に例えば、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上の同一性を有する配列を有している塩基配列をさす。本願においては、100%の同一性を有していてもよい。

本願におけるハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning 3rd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001)

に記載の方法等に従って行うことができる。この文献は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

ストリンジェントな条件とは、特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。典型的なストリンジェントな条件とは、例えば、カリウム濃度は約25mM～約50mM、及びマグネシウム濃度は約1.0mM～約5.0mM中において、ハイブリダイゼーションを行う条件があげられる。本発明の条件の1例としてTris-HCl (pH 8.6)、25mMのKCl、及び1.5mMのMgCl₂中においてハイブリダイゼーションを行う条件が、挙げられるが、これに限定されるものではない。その他、ストリンジェントな条件としては、Molecular Cloning 3rd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001)に記載されている。この文献は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。当業者は、ハイブリダイゼーション反応や、ハイブリダイゼーション反応液の塩濃度等を変化させることによって、このような条件を容易に選択することができる。

【0016】

さらに、本発明における前記P5、P5'、P6、P6'、P7、P7'、P1、P1'、P2、P2'の蛍光標識オリゴヌクレオチドには、それぞれ前記P5、P5'、P6、P6'、P7、P7'、P1、P1'、P2、P2'の蛍光標識オリゴヌクレオチドに塩基が挿入、欠失又は置換した蛍光標識オリゴヌクレオチドも包含される。

当該塩基が挿入、欠失又は置換した蛍光標識オリゴヌクレオチドは、前記P5、P5'、P6、P6'、P7、P7'、P1、P1'、P2、P2'の蛍光標識オリゴヌクレオチドと同等程度の作用を示せばよく、塩基が挿入、欠失又は置換されている場合、その挿入、欠失又は置換の位置は、特に限定されない。挿入、欠失又は置換した塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられ、蛍光標識オリゴヌクレオチド全体の長さによって異なるが、例えば1塩基～10塩基又は1塩基～5塩基が挙げられる。

【0017】

挿入、欠失又は置換の中でも、本発明における前記P5、P5'、P6、P6'、P7、P7'、P1、P1'、P2、P2'の蛍光標識オリゴヌクレオチドとしては、それぞれ前記P5、P5'、P6、P6'、P7、P7'、P1、P1'、P2、P2'の蛍光標識オリゴヌクレオチドの塩基が置換した蛍光標識オリゴヌクレオチドが挙げられる。置換の位置は、特に限定されない。例えば、検出感度の観点より、配列番号2で示される配列のうち152番目～166番目の塩基以外の位置、または配列番号1で示される配列のうち152番目～162番目の塩基以外の位置の塩基が置換されることが挙げられる。置換される塩基の数としては1塩基又は2塩基以上が挙げられる。置換される塩基の数は、蛍光標識オリゴヌクレオチド全体の長さによって異なるが、例えば1塩基～5塩基、又は1塩基～3塩基が挙げられる。

【0018】

前記蛍光標識オリゴヌクレオチドにおける、オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチドの他、修飾されたオリゴヌクレオチドも含まれる。

前記オリゴヌクレオチドの構成単位としては、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレ

オチド、人工核酸等が挙げられる。前記人工核酸としては、DNA、RNA、RNAアナログであるLNA (Locked Nucleic Acid) ; ペプチド核酸であるPNA (Peptide Nucleic Acid) ; 架橋化核酸であるBNA (Bridged Nucleic Acid) 等が挙げられる。

前記オリゴヌクレオチドは、前記構成単位のうち、一種類から構成されてもよいし、複数種類から構成されてもよい。

【0019】

本発明において使用されるNPM1遺伝子のexon12の変異を検出するためのプローブの塩基配列の例としては、P5としては、5'-cactgcCAGAcagagatc-3' (配列番号56) が挙げられ、P6としては、5'-cactgcCATGcagagatc-3' (配列番号57) が挙げられ、P7としては、5'-cactgcCAGGcagagatc-3' (配列番号58) が挙げられ、P1としては、5'-tgccagagatcttgaatagcc-3' (配列番号4) が挙げられ、P2としては、5'-ctattttcttaaagagacttcctccac-3' (配列番号5) が挙げられる。

10

蛍光色素としては、特許文献1, 2に記載されたものが使用できるが、具体例としては、Pacific Blue(商標)、FAM(商標)、TAMRA(商標)、BODIPY FL(商標)等が挙げられる。蛍光色素のオリゴヌクレオチドへの結合方法は、通常の方法、例えば特許文献1, 2に記載の方法に従って行うことができる。

【0020】

本発明の(P5), (P5'), (P6), (P6'), (P7), (P7'), (P1), (P1'), (P2)または(P2')のいずれか1つのオリゴヌクレオチドを用いることにより、例えば、(P5), (P6), (P7)または(P5'), (P6'), (P7')の3つのオリゴヌクレオチドを用いることにより、例えば、(P1)および(P2)または(P1')および(P2')の2つのオリゴヌクレオチドを用いることにより、本実施例3, 4に示される配列番号56 - 58に示すプローブを用いることにより、または、本実施例1, 2に示される配列番号4, 5に示すプローブを用いることにより、NPM1遺伝子のexon12の変異を検出することができる(図3)。

20

【0021】

本発明プローブは、標的配列にハイブリダイゼーションしないときに蛍光色素の蛍光が発光し、標的配列にハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少または増加することが好ましい。本発明プローブは、例えば、ハイブリダイゼーションしないときに蛍光色素の蛍光が発光し、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が消光する、消光プローブである。

30

また、本発明プローブは、5'または3'末端から数えて1~3番目の塩基が蛍光色素により標識化されていることが好ましく、3'末端が蛍光色素により標識されていることがより好ましい。なお、本明細書において、「5'末端から数えて1~3番目」という場合は、5'末端を1番目として数え、「3'末端から数えて1~3番目」という場合は、3'末端を1番目として数える。

なお、本発明プローブにおいて蛍光色素により標識されている塩基は、P5, P5', P6, P6', P7, P7'については、配列番号2における145番目の塩基であり、P1, P1'については、配列番号1における135番目の塩基であり、P2, P2'については、配列番号1における182番目の塩基である。

40

【0022】

本発明のオリゴヌクレオチドにより検出することのできるNPM1遺伝子のexon12の変異は、例えば、以下の表1に記載されており、タイプA、タイプB、タイプD、タイプC、タイプE、タイプGm、タイプKm、タイプNm、タイプOm、タイプQm、タイプ3、タイプ4、タイプ6、タイプ7、タイプ13、タイプ10、タイプG+、タイプH+、タイプI+、タイプJ+、およびタイプIからなる群より選択される少なくとも1つ以上の変異を検出できる。

【0023】

【表 1】

表 1

■NPM1遺伝子のexon12の変異

変異の症例数

		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	配列番号
494 ☆	Wild-Type	gaccaagaggctattcaagatctct		g		gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	18
49 ☆	A	gaccaagaggctattcaagatctct		g	tctg	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	19
1 ☆	B	gaccaagaggctattcaagatctct		g	catg	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	20
1 ☆	C	gaccaagaggctattcaagatctct		g	cttg	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	21
49 ☆	D	gaccaagaggctattcaagatctct		g	cctg	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	22
1 ☆	E	gaccaagaggctattcaagatctct		g		gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	23
1	F	gaccaagaggctattcaagatctct		g		gcag		t		ctcttgccc		aagtcctttaagaaaatag	24
1	E*	gaccaagaggctattcaagatctct		g		gcag		t		ccctggaga		aagtcctttaagaaaatag	25
1	G*	gaccaagaggctattcaagatctct		g		gcag		t		ccctggccc		aagtcctttaagaaaatag	26
1	H*	gaccaagaggctattcaagatctct		g		gcag		t		gcttgccc		aagtcctttaagaaaatag	27
	J	gaccaagaggctattcaagatctct		g		gcag		t		gttttcaa		aagtcctttaagaaaatag	28
	L	gaccaagaggctattcaagatctct	cccg	g		gcag		t	ctctttcta			aagtcctttaagaaaatag	29
	K	gaccaagaggctattcaagatctct		g		gcag		t	ccctttcca			aagtcctttaagaaaatag	30
	M	gaccaagaggctattcaagatctct		g	tagc	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	31
	N	gaccaagaggctattcaagatctct		g	ccac	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	32
	O	gaccaagaggctattcaagatctct		g		gcag	cgtttcc				ggagg	aagtcctttaagaaaatag	33
	P	gaccaagaggctattcaagatctct		g	tacottcc			t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	34
1 ☆	Q	gaccaagaggctattcaagatctct		g		gcag	agga	t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	35
1 ☆	Gm	gaccaagaggctattcaagatctct		g	caag	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	36
3 ☆	Km	gaccaagaggctattcaagatctct		g	ccgg	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	37
1	Lm	gaccaagaggctattcaagatctct		g	ccgcgg	ag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	38
2 ☆	Nm	gaccaagaggctattcaagatctct		g	ccag	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	39
1 ☆	Om	gaccaagaggctattcaagatctct		g	tttg	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	40
1 ☆	Qm	gaccaagaggctattcaagatctct		g	tcgg	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	41
1	1	gaccaagaggctattcaagatctct		g		gcag	tcca	t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	42
1 ☆	3	gaccaagaggctattcaagatctct		g	tcat	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	43
1 ☆	4	gaccaagaggctattcaagatctct		g	cttg	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	44
1 ☆	6	gaccaagaggctattcaagatctct		g		gca	agattttaaato				ggagg	gtctctttaagaaaatag	45
1 ☆	7	gaccaagaggctattcaagatctct	atgc	ctg		gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	46
1	12	gaccaagaggctattcaagatctct		g	gccc	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	47
1 ☆	13	gaccaagaggctattcaagatctct		g	taag	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	48
1 ☆	10	gaccaagaggctattcaagatctct		g		gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	49
1	14	gaccaagaggctattcaagatctct		g		gcag		t		ctgctccc		aagtcctttaagaaaatag	50
1 ☆	G+	gaccaagaggctattcaagatctct		g	tttg	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	51
1 ☆	H+	gaccaagaggctattcaagatctct		g	cttg	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	52
1 ☆	I+	gaccaagaggctattcaagatctct		g	taag	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	53
1 ☆	J+	gaccaagaggctattcaagatctct		g	tatg	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	54
1 ☆	I	gaccaagaggctattcaagatctct		g	caga	gcag		t			ggagg	aagtcctttaagaaaatag	55

表 1 は、NPM1 遺伝子の野生型と各変異型についての exon12 の領域の配列の比較を示す。

NPM1 遺伝子の exon12 においては様々な変異配列が報告されている。いくつかの文献に記載の変異報告数をまとめて、表の左側に「変異の症例数」と記載した。A の変異配列の報告はかなり多く、次に B や D の変異配列の報告が多い。

表 1 の塩基配列において、例えば、変異タイプ A は「tctg」が④の部分に挿入されている。また、変異タイプ E は⑨の部分に「ctcttgccc」が挿入され、⑩の「ggagg」が欠失している。

実施例で検出を検討した変異タイプの横に☆マークを記載する。

【0024】

(P5), (P5'), (P6), (P6'), (P7), (P7') のオリゴヌクレオチドを用いる場合には、タイプ A、タイプ B、タイプ D、タイプ C、タイプ Gm、タイプ Km、タイプ Nm、タイプ Om、タイプ Qm、タイプ 3、タイプ 4、タイプ 13、タイプ G+、タイプ H+、タイプ I+、タイプ J+、およびタイプ I などを検出することができる。

配列番号 1 に示す塩基配列において塩基番号 153-156 の領域より 5' 側の配列のプロープ、例えば、(P1), (P1') のオリゴヌクレオチドを用いる場合には、タイプ A、タイプ B、タイプ D、およびタイプ 7 などを検出することができる。

配列番号 1 に示す塩基配列において塩基番号 153-156 の領域より 3' 側の配列のプロープ、例えば、(P2), (P2') のオリゴヌクレオチドを用いる場合には、タイプ 10、タイプ E、およびタイプ 6 などを検出することができる。

また、本発明の (P5), (P5'), (P6), (P6'), (P7), (P7') のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド、または (P1) もしくは (P1') および (P2) もしくは (P2') のオリゴヌクレオチドを用いることにより、NPM1 遺伝子の exon12 の変異の有無を検出することができ、急性骨髄性白血病のかかりやすさ、病態および/または予後の診断が可能となる。

【0025】

本実施例に示される配列番号56, 57, 58, 4, 5のプロープを用いることにより、NPM1遺伝子のexon12の変異を検出することができる。配列番号56 - 58, 4に示すプロープについては、3'末端が蛍光色素で標識され、配列番号5に示すプロープについては、5'末端が蛍光色素で標識されている。

【0026】

本発明の検出方法は、上記のような本発明のプロープを用いることを特徴とする。すなわち、本発明の検出方法は、配列番号2に示す塩基配列において、塩基番号157-160の領域（配列番号1の塩基番号153-156に対応）を含む1つ以上のプロープを用いることもできるし、上記P5, P5', P6, P6', P7, P7'の1つ以上のプロープを用いることもできる。また、本発明の検出方法は、配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号153-156の領域を末端とする1つ以上のプロープを用いることもできるし、上記P1, P1', P2およびP2'の1つ以上のプロープを用いることもできる。

【0027】

本発明の検出方法は、例えば、本発明のプロープを使用し、以下の工程を含むことを特徴とする。

(I) 核酸を含有する試料に、本発明のプロープを添加して前記核酸に前記プロープをハイブリダイズさせる工程、

(II) 温度を変化させて前記核酸と前記プロープとのハイブリッド形成体を解離させ、ハイブリッド形成体の解離に基づくシグナルの変動を測定する工程、

(III) 前記シグナルの変動を解析して前記試料中の一本鎖核酸におけるT_m値を検出する工程、および

(IV) 前記T_m値から前記試料中の一本鎖核酸における、目的の多型の有無または多型を有する一本鎖核酸の存在比を検出する工程。

【0028】

本発明検出方法は、本発明プロープを用いることの他は、通常の核酸増幅および融解曲線分析（T_m解析）の方法に従って行うことができる。また、本発明の検出方法は、前記工程（I）の前または工程（I）と同時に核酸を増幅することを含んでいてもよい。

【0029】

核酸増幅の方法としては、ポリメラーゼを用いる方法が好ましく、その例としては、PCR、ICAN、LAMP等が挙げられる。ポリメラーゼを用いる方法により増幅する場合は、本発明プロープの存在下で増幅を行うことが好ましい。用いるプロープに応じて、増幅の反応条件等を調整することは当業者であれば容易である。これにより、核酸の増幅後にプロープのT_m値を解析するだけなので、反応終了後増幅産物を取り扱う必要がない。よって、増幅産物による汚染の心配がない。また、増幅に必要な機器と同じ機器で検出することが可能なので、容器を移動する必要すらない。よって、自動化も容易である。

【0030】

なお、工程（III）でT_m値を決定することには、T_mの温度を決定することだけでなく、T_mのピークの高さを決定することを含む。ピークの高さにより、多型を有する塩基配列の存在比を決定することができる。なお、多型を有する塩基配列の存在比をより定量的に決定するには、下記に示すような検量線を作成し、それに基づいて存在比を決定することが好ましい。

【0031】

多型を有する塩基配列の存在比を定量的に決定する方法について、野生型と特定の変異型の存在比の決定を例に挙げて以下に示す。ただし、この方法は一例にすぎず、多型を有する塩基配列の存在比の決定の仕方はこれに限定されない。

【0032】

まず、野生型の核酸W_tと変異型の核酸M_tとの2種類の核酸の存在比を各々異ならせた複数の核酸混合物を作製し、複数の核酸混合物の各々について、融解曲線解析装置等を用いて融解曲線を得る。

10

20

30

40

50

図 1 (A) に、ある 1 つの核酸混合物の温度と蛍光強度との関係で表された融解曲線、及び図 1 (B) に温度と蛍光強度の微分値との関係で表された融解曲線 (微分融解曲線ともいう) を示す。この微分融解曲線からピークを検出することにより、核酸 W t の融解温度 T_{m_W} 及び核酸 M t の融解温度 T_{m_M} を検出して、 T_{m_W} 及び T_{m_M} を含む温度範囲の各々を設定する。 T_{m_W} を含む温度範囲 ΔT_W としては、例えば、 T_{m_W} と T_{m_M} との間で蛍光強度の微分値が最小となる温度を下限、蛍光強度のピークの裾野に対応する温度を上限とする温度範囲を設定することができる。また、 T_{m_M} を含む温度範囲 ΔT_M としては、例えば、 T_{m_W} と T_{m_M} との間で蛍光強度の微分値が最小となる温度を上限、蛍光強度のピークの裾野に対応する温度を下限とする温度範囲を設定することができる。なお、温度範囲 ΔT_W 及び温度範囲 ΔT_M は、同一の幅 (例えば、10) または異なる幅 (例えば、温度範囲 ΔT_W が 10 、温度範囲 ΔT_M が 7) となるように設定することができる。また、温度範囲 ΔT_W 及び温度範囲 ΔT_M は、それぞれの融解温度 T_m からプラス X 、マイナス X の幅 (X は例えば 15 以内、望ましくは 10 以内) というように設定することができる。

【 0 0 3 3 】

次に、温度範囲 ΔT_W 及び温度範囲 ΔT_M の各々について、微分融解曲線の温度範囲の下限に対応する点と上限に対応する点とを通る直線と微分融解曲線とで囲まれた面積 (図 1 (B) の斜線部分) を求める。面積の求め方の一例として、具体的に以下のように求めることができる。温度 T における蛍光強度の微分値を $f (T)$ とし、温度 T におけるベース値を $B (T)$ とし、下記 (1) 式により求める。

$$\text{面積 } S = \{ f (T_{s+1}) - B (T_{s+1}) \} + \{ f (T_{s+2}) - B (T_{s+2}) \} + \cdots + \{ f (T_{e-1}) - B (T_{e-1}) \} \quad \cdots (1)$$

ただし、 T_s は各温度範囲における下限値、 T_e は上限値である。また、各温度 T におけるベース値 $B (T)$ は、下記 (2) 式により求まる値であり、蛍光強度の検出信号に含まれるバックグラウンドレベルを表すものである。このベース値を蛍光強度の微分値から減算することにより、蛍光強度の検出信号に含まれるバックグラウンドの影響を除去する。

$$B (T) = a \times (T - T_s) + f (T_s) \quad \cdots (2)$$

ただし、 $a = \{ f (T_e) - f (T_s) \} / (T_e - T_s)$ である。

【 0 0 3 4 】

上記 (1) 式及び (2) 式に従って、各核酸混合物について、温度範囲 ΔT_W における面積 S_W 及び温度範囲 ΔT_M における面積 S_M を求め、面積比と各核酸混合物の存在比との関係を表す検量線を作成する。図 2 に、横軸に存在比 (核酸混合物の総量に対する核酸 M t の割合) をとり、縦軸に面積比 (S_M / S_W) をとった検量線の一例を示す。なお、面積比は S_W / S_M で定めてもよい。

実際の試料を用いて得られた融解曲線と微分融解曲線から面積比を算出し、上記のようにしてあらかじめ作成した検量線に基づいて、実際の試料中に含まれる多型を有する塩基配列の存在比を決定することができる。

【 0 0 3 5 】

本発明において、試料中の DNA は、一本鎖 DNA でもよいし二本鎖 DNA であってもよい。前記 DNA が二本鎖 DNA の場合は、例えば、前記ハイブリダイズ工程に先立って、加熱により前記試料中の二本鎖 DNA を解離させる工程を含むことが好ましい。二本鎖 DNA を一本鎖 DNA に解離することによって、次のハイブリダイズ工程において、検出用プローブとのハイブリダイズが可能となる。

【 0 0 3 6 】

本発明において、前記試料中の DNA に対する、本発明のプローブの添加割合 (モル比) は、制限されないが、検出シグナルを十分に確保できることから、試料中の DNA に対して 1 倍以下が好ましく、0.1 倍以下がより好ましい。この際、試料中の DNA とは、例えば、検出目的の多型が発生している検出対象 DNA と前記多型が発生していない非検出対象 DNA との合計でもよいし、検出目的の多型が発生している検出対象配列を含む増幅産物と前記多型が発生していない非検出対象配列を含む増幅産物との合計でもよい。な

お、試料中のDNAにおける前記検出対象DNAの割合は、通常、不明であるが、結果的に、前記プローブの添加割合（モル比）は、検出対象DNA（検出対象配列を含む増幅産物）に対して例えば、10倍以下、5倍以下、または3倍以下である。また、その下限は特に制限されないが、例えば、0.001倍以上、0.01倍以上であり、または0.1倍以上である。

【0037】

前記DNAに対する本発明のプローブの添加割合は、例えば、二本鎖DNAに対するモル比でもよいし、一本鎖DNAに対するモル比でもよい。

【0038】

T_m値について説明する。二本鎖DNAを含む溶液を加熱していくと、260nmにおける吸光度が上昇する。これは、二本鎖DNAにおける両鎖間の水素結合が加熱によってほどけ、一本鎖DNAに解離（DNAの融解）することが原因である。この現象に基づき、融解温度T_mとは、一般に、吸光度が、吸光度全上昇分の50%に達した時の温度と定義される。

【0039】

本発明において、前記P5、P5'、P6、P6'、P7、P7'、P1、P1'、P2、P2'の蛍光標識オリゴヌクレオチドが相補的な塩基配列を有するDNAとハイブリダイズした場合のT_m値と、非相補的なDNAとハイブリダイズした場合のT_m値との差は、例えば5以上が挙げられる。前記T_m値の差が5以上であることで、上述の変異をより高感度に検出することができる。

また、前記T_m値の差としては、5以上、又は7以上等が挙げられる。

前記T_m値の差を大きくする方法としては、プローブ配列においてそのハイブリダイズする塩基配列に対してミスマッチとなる塩基を含める方法や、例えばNature Biotechnology (1997) vol 15 p. 331 - 335に記載の方法などが挙げられる。

【0040】

本発明において、T_m値を決定するための温度変化に伴うシグナル変動の測定は、前述のような原理から260nmの吸光度測定により行うこともできるが、本発明のプローブに付加した標識のシグナルに基づくシグナルであってDNAとプローブとのハイブリッド形成の状態に応じて変動するシグナルを測定することが好ましい。このため、本発明のプローブとして、前述の標識化プローブを使用することが好ましい。前記標識化プローブとしては、例えば、標的配列にハイブリダイズしないときに蛍光を発し、且つ標的配列にハイブリダイズしたときに蛍光強度が減少（消光）する蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブ、または標的配列にハイブリダイズしないときに蛍光を発し、且つ標的配列にハイブリダイズしたときに蛍光強度が増加する蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブが挙げられる。前者のようなプローブであれば、検出対象配列とハイブリッド（二本鎖DNA）を形成している際にはシグナルを示さないか、シグナルが弱いですが、加熱によりプローブが遊離するとシグナルを示すようになるか、シグナルが増加する。また、後者のプローブであれば、検出対象配列とハイブリッド（二本鎖DNA）を形成することによってシグナルを示し、加熱によりプローブが遊離するとシグナルが減少（消失）する。したがって、この標識に基づくシグナルの変化をシグナル特有の条件（吸光度等）で検出することによって、前記260nmの吸光度測定と同様に、融解の進行ならびにT_m値の決定を行うことができる。標識化プローブにおける標識化物質は、例えば、前述のとおりであるが蛍光色素標識化プローブが好ましい。

【0041】

核酸増幅を行う際の鋳型となる核酸としては、核酸を含んでいればよく、特に制限されないが、例えば、血液、口腔粘膜懸濁液、爪や毛髪等の体細胞、生殖細胞、乳、腹水液、パラフィン包埋組織、胃液、胃洗浄液、腹膜液、羊水、細胞培養などの任意の生物学的起源に由来する又は由来しうるものである。鋳型となる核酸は、該起源から得られたままで直接的に、または該サンプルの特性を改変するために前処理した後で使用することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 2 】

以下、PCRを用いる場合を例として、さらに説明する。PCRに用いるプライマー対は、本発明プローブがハイブリダイゼーションできる領域が増幅されるようにする他は、通常のPCRにおけるプライマー対の設定方法と同様にして設定することができる。プライマーの長さおよびTm値は、通常には、12mer～40merで40～70、または16mer～30merで55～60である。プライマー対の各プライマーの長さは同一でなくてもよいが、両プライマーのTmはほぼ同一（通常には、相違が2以内）であることが好ましい。なお、Tm値は最近接塩基対(Nearest Neighbor)法により算出した値である。プライマー対の例としては、配列番号16, 17に示す塩基配列を有するプライマーからなるものが挙げられる。

【 0 0 4 3 】

PCRは、本発明で使用される本発明プローブの存在下で行うことが好ましい。これにより、増幅反応終了後に増幅産物を精製などすることなくTm解析を行うことができる。用いるプローブに応じて、プライマーのTm値やPCRの反応条件を調整することは当業者であれば容易である。

【 0 0 4 4 】

Tm解析の結果に基づくNPM1遺伝子のexon12の変異の検出は通常の方法に従って行うことができる。本発明における検出とは、変異の有無の検出および多型を有する核酸の存在比の決定を包含する。

【 0 0 4 5 】

なお、本発明のプローブおよび多型検出方法により、NPM1遺伝子のexon12の変異を検出することができ、検出された変異の有無に基づいて、急性骨髄性白血病のなりやすさ、病態および/または予後を診断することができる。

【 0 0 4 6 】

< 2 > 本発明キット

本発明キットは、本発明の検出方法に用いるためのキットである。このキットは、本発明の多型検出用プローブを含むことを特徴とする。なお、本発明のキットは、急性骨髄性白血病のかかりやすさ、病態および/予後を判断するのに使用できる。

プローブについては、本発明プローブに関し、上記に説明した通りである。

【 0 0 4 7 】

本発明検出キットは、プローブの他に、本発明の検出方法における核酸増幅を行うのに必要とされる試薬類、特にDNAポリメラーゼを用いる増幅のための上述のプライマーをさらに含んでいてもよい。

本発明検出キットにおいてプローブ、プライマーおよびその他の試薬類は、別個に収容されていてもよいし、それらの一部が混合物とされていてもよい。

【 0 0 4 8 】

本発明において、検出対象となる試料中の試料核酸、多型検出用プローブ又はプライマーの個々の配列に関して、これら互いの相補的な関係に基づいて記述された事項は、特に断らない限り、それぞれの配列と、各配列に対して相補的な配列とについても適用される。各配列に対して相補的な当該配列について本発明の事項を適用する際には、当該相補的な配列が認識する配列は、当業者にとっての技術常識の範囲内で、対応する本明細書に記載された配列に相補的な配列に、明細書全体を読み替えるものとする。

【 0 0 4 9 】

以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。ただし、これらの実施例は例示であり、これらに限定されない。

【 実施例 】

【 0 0 5 0 】

実施例 1（相補鎖オリゴヌクレオチドを検出対象とし、P1,P2プローブを用いる場合）

NPM1遺伝子のexon12の塩基配列（配列番号1（野生型））に基づき、表2に示す、末端部にCを有するプローブを設計した。表2中、プローブの位置は、配列番号1に示す塩基配列における塩基番号を示す。3'末端のPは、リン酸化されていることを示す。TAMRAに

10

20

30

40

50

よる標識は、常法に従って行った。

また、検出対象として使用した相補鎖オリゴヌクレオチドの配列を表2に示す。表2中、オリゴヌクレオチドの位置は、配列番号1に示す塩基配列における塩基番号を示す。

【0051】

【表2】

表2

配列番号	プローブ名	配列(5'→3')	位置	Mer
配列番号4	3T-NPM1-e12-R1	tgccagagatcttgaatagcc-(TAMRA)	155-135	21
配列番号5	5T-NPM1-e12-R2	(TAMRA)-ctattttcttaaagagacttctccac-P	182-156	27

10

配列番号	相補鎖 オリゴ名	配列(5'→3')	位置	mer
配列番号6	WT	ccaggctattcaagatctctggcagtgagggaagtctctttaagaaaatagttt	132-185	54
配列番号7	mt type A	ccaggctattcaagatctctgTCTGgcagtgagggaagtctctttaagaaaatagttt		58
配列番号8	mt type B	ccaggctattcaagatctctgCATGgcagtgagggaagtctctttaagaaaatagttt		58
配列番号9	mt type D	ccaggctattcaagatctctgCCTGgcagtgagggaagtctctttaagaaaatagttt		58
配列番号10	mt type 7	ccaggctattcaagatctATGCctggcagtgagggaagtctctttaagaaaatagttt		58
配列番号11	mt type Q	ccaggctattcaagatctctggcagAGGAtggagggaagtctctttaagaaaatagttt		58
配列番号12	mt type 10	ccaggctattcaagatctctggcagtCTGCTCCCaagtctctttaagaaaatagttt		58
配列番号13	mt type E	ccaggctattcaagatctctggcagtCTCTTGCCCaagtctctttaagaaaatagttt		58
配列番号14	mt type 6	ccaggctattcaagatctctggcaAGATTTCTTAATCgtctctttaagaaaatagttt		59

20

*大文字の塩基は各変異に特徴的な変異箇所を示す。

【0052】

NPM1遺伝子のExon12領域の変異を2つのプローブで検出するために設計したプローブの性能を確認するため、NPM1 exon12領域の野生型配列と各種変異配列の相補鎖を準備し、プローブと相補鎖オリゴヌクレオチドを含む以下の試薬溶液を調製した。

プローブ3T-NPM1-e12-R1に対して相補鎖オリゴヌクレオチドは WT、mt type A、B、D、または7を、プローブ5T-NPM1-e12-R2に対して相補鎖オリゴヌクレオチドは WT、mt type Q、10、E、または6を添加した。

30

【0053】

【表3】

表3

処方) 全量 25 μ l

1×GeneTaq Buffer	
プローブ ※	0.2 μ M
鋳型オリゴヌクレオチド(WT,mt)	0.5 μ M

40

【0054】

Tm解析の条件は下記の通りである。Tm解析における励起波長および検出波長は、それぞれ520～555 nmおよび585～700 nm (TAMRA) であった。

調製した試薬溶液をi-densy 反応チューブに添加し、試薬が蒸発しないようにミネラルオイル30 μ Lを重層し、以下の反応条件でTm解析を実施してTAMRAの蛍光値の変化量を解析した。

【0055】

【表 4】

表 4

T_m 解析条件

95°C, 1sec

↓

40°C, 60sec

↓

40°C→80°C、1°C/3sec

【 0 0 5 6 】

10

表 2 のプローブを用いて T_m 解析を行った結果、3T-NPM1-e12-R1 (配列番号 4) については、T A M R A のピークが、6 5 (WT)、5 9 (タイプ A)、6 0 (タイプ B)、6 0 (タイプ D)、5 5 (タイプ 7) 付近で見られた (図 4 ~ 8)。

このように、WT、各変異で検出ピークが確認できた。また、WT と各変異の T_m 値の差 (ΔT_m) は 5 ~ 10 であり、変異を検出するために十分な T_m 値の差があることが分かり、変異を検出することに適したプローブであることが分かった。

結果を表 5 に示す。

【 0 0 5 7 】

【表 5】

20

表 5

	T _m (°C)	ΔT _m (°C)
WT	65	—
A	59	6
B	60	5
D	60	5
7	55	10

30

【 0 0 5 8 】

また、5T-NPM1-e12-R2 (配列番号 5) については、T A M R A のピークが、6 4 (WT)、6 2 (タイプ Q)、5 2 (タイプ 10)、5 2 (タイプ E)、4 9 (タイプ 6) 付近で見られた (図 9 ~ 13)。

このように、WT、各変異で検出ピークが確認できた。また、WT と変異タイプ Q の T_m 値の差 (ΔT_m) は 2 であったが、他の変異タイプでは十分な T_m 値の差があることが分かり、変異を検出することに適したプローブであることが分かった。

結果を表 6 に示す。

【 0 0 5 9 】

【表 6】

表 6

	T _m (°C)	ΔT _m (°C)
WT	64	—
Q	62	2
10	52	12
E	52	12
6	49	15

10

【0060】

実施例 1 の結果より、P 1 (配列番号 4) および P 2 (配列番号 5) のプローブを用いたとき、NPM1 遺伝子の exon12 変異の多型 (タイプ A、タイプ B、タイプ D、タイプ 7、タイプ 10、タイプ E、タイプ 6) について、T_m 解析で分析可能な蛍光強度の変化が認められた。すなわち、変異型は、野生型のピークに加えて、他のピークを有するものであり、固有の蛍光強度の変化量のパターンの変化が存在する。従って、P 1 (配列番号 4) および P 2 (配列番号 5) のプローブを用いることにより、NPM1 遺伝子の exon12 変異の多型を検出することができる。

20

【0061】

比較例 1 (相補鎖オリゴヌクレオチドを検出対象とする場合)

NPM1 遺伝子の Exon12 領域の変異を 1 つのプローブで検出するために設計したプローブの性能を確認するため、NPM1 exon12 領域の野生型配列と各種変異配列の相補鎖を準備し、プローブと相補鎖を含む以下の試薬溶液を調製した。

試薬溶液は実施例 1 と同様とし、プローブのみ以下のプローブを用いた。また T_m 解析も実施例 1 と同様に実施した。

また、変異の検出のために使用したプローブの配列を表 7 に示す。表 7 中、プローブの位置は、配列番号 1 に示す塩基配列における塩基番号を示す。

【0062】

30

【表 7】

表 7

配列番号	プローブ名	配列 (5'→3')	位置	mer
配列番号 15	3T-NPM1-e12-R3	gagacttcctccactgccagagatc-(TAMRA)	169-145	25

【0063】

WT やいくつかの変異タイプでは問題なく検出できたが、変異タイプ A、D、7 では検出ピークが確認できず、様々な変異の検出に適していないプローブであることが分かった (図 14 - 22)。

40

結果を表 8 に示す。

【0064】

【表 8】

表 8

	T _m (°C)	ΔT _m (°C)
WT	70	-
A	検出不可	
B	63	7
D	検出不可	
7	検出不可	
Q	63	7
10	55	15
E	50	20
6	44	26

10

【 0 0 6 5 】

実施例 2（血液検体または人工核酸プラスミドを検出対象として用いる場合）

核酸増幅した後、T_m解析による検出が可能であるかを検討するため、血液検体を用いて反応を行った。また、NPM1遺伝子のexon12変異がどの程度混ざった検体まで検出が可能であるか、野生型配列と変異配列（AタイプとEタイプ）の人工核酸プラスミドの混合比率を振り、その検出波形を確認した。人工核酸はpUCプラスミドベクターにNPM1遺伝子のexon12周辺配列の野生型配列（590bp、配列番号1）、変異タイプA（594bp、配列番号2）、変異タイプE（594bp、配列番号3）を挿入したプラスミドを用いた。

20

全自動SNP s 検査装置（商品名i-densy IS-5310、アークレイ社製）を用いてPCR及びT_m解析を行った。PCRおよびT_m解析の条件は下記の表 1 1 の通りである。

また、変異の検出に使用したプローブおよびプライマーの配列を表 1 2 に示す。表 1 2 中、プローブおよびプライマーの位置は、配列番号 1 に示す塩基配列における塩基番号を示す。

30

T_m解析における励起波長および検出波長は、それぞれ420～485 nmおよび520～555 nm（BODIPY FL）、または、それぞれ520～555 nmおよび585～700 nm（TAMRA）とした。

試薬溶液は以下の通りであった。

【 0 0 6 6 】

【表 9】

表 9

(反応液量: 50 μ l)	
1 $\times$ PCR buffer	
dNTP	0.2mM
MgCl ₂	1.5mM
Taq ポリメラーゼ(アークレイ社製)	1.88U/test
NPM1-F2	1 μ M
NPM1-R4	0.5 μ M
3FL-NPM1-e12-R1	0.8 μ M
5T-NPM1-e12-R2	0.8 μ M
template	4 μ l

10

【 0 0 6 7 】

< 全血の調製 >

全血10 μ lを希釈液(1) 70 μ lに加え、よく混合した後、この混合液10 μ lを希釈液(2) 70 μ lに加えた。この混合液17 μ lを95 °で10分加熱して4 μ lの前処理済全血を得た。これを1 testあたりのtemplateとして使用した。

20

【 0 0 6 8 】

【表 1 0】

表 1 0

希釈液(1)	
Tris-HCl (pH8.0)	10mM
EDTA (pH8.0)	0.1mM
SDS	0.30%

30

希釈液(2)	
Tris-HCl (pH8.0)	10mM
500mM EDTA (pH8.0)	0.1mM

【 0 0 6 9 】

< 人工核酸プラスミド >

任意の割合で野生型と変異型を混合した500コピー / μ lの人工核酸プラスミドを4 μ l使用した。

40

【 0 0 7 0 】

【表 1 1】

表 1 1

PCR および T_m 解析条件

95°C, 60sec

↓

(95°C, 1sec, 58°C, 15sec) × 50

↓

95°C, 1sec

↓

40°C, 60sec

↓

40°C → 75°C, 1°C/3sec

10

【0 0 7 1】

【表 1 2】

表 1 2

配列番号	名称	sequence (5'→3')	位置	mer
配列番号4	3FL-NPM1-e12-R1	tgccagagatcttgaatagcc-(BODIPY FL)	155-135	21
配列番号5	5T-NPM1-e12-R2	(TAMRA)-ctattttcttaaagagacttctccac-P	182-156	27
配列番号16	NPM1-F2	gatgtctatgaagtgttggttcct	81-116	26
配列番号17	NPM1-R4	caactgttacagaaatgaaataagacggaaa	235-205	31

20

【0 0 7 2】

血液検体を用いて i-densy で測定した結果、問題なく検出ピークが確認できた (図 2 3)。

30

人工核酸プラスミドを用いた検出波形を確認したところ、BODIPY FL は 63 、TAMRA も 63 に野生型の検出ピークが確認できた (図 2 4)。

変異タイプ A の場合、BODIPY FL の 56-57 に検出ピークが確認され (図 2 5 の左図)、変異タイプ E の場合、TAMRA の 50-51 に検出ピークが確認できた (図 2 9 の右図)。任意に割合で混合させたプラスミドの場合、変異タイプ A と E の両方で 10% の変異配列が混合された状態でも変異の検出ピークが確認できた (図 2 8 の左図、図 3 2 の右図)。

【0 0 7 3】

実施例 2 の結果より、P 1 (配列番号 4) および P 2 (配列番号 5) のプローブを用いたとき、血液検体を用いた場合、そして、10% の変異配列が混合される場合でも、NPM1 遺伝子の exon12 変異の多型 (タイプ A、タイプ E) について、T_m 解析で解析の可能な蛍光強度の変化が認められた。従って、P 1 (配列番号 4) および P 2 (配列番号 5) のプローブを用いることにより、NPM1 遺伝子の exon12 変異の多型を検出することができる。

40

【0 0 7 4】

比較例 2

比較例として、3T-NPM1-e12-R3 プローブを用いた。以下の溶液を用いて核酸増幅した後、T_m 解析による検出が可能であることを検討した。プライマー配列や反応条件は実施例 2 と同様とした。プラスミド溶液 (500 コピー/μL) を 4 μL 反応チューブに添加して、以下の反応条件で i-densy で反応した。T_m 解析では TAMRA の蛍光値の変化量を解析した。

【0 0 7 5】

50

【表 1 3】

表 1 3

(反応液量: 50 μ l)	
1 $\times$ PCR buffer	
dNTP	0.2mM
MgCl ₂	1.5mM
Taq ポリメラーゼ(アークレイ社製)	1.88U/test
NPM1-F2	1 μ M
NPM1-R4	0.5 μ M
5T-NPM1-e12-R3	0.8 μ M
template	4 μ l

10

配列番号	プローブ名	配列 (5'→3')	mer
配列番号 15	3T-NPM1-e12-R3	gagacttcctccactgccagagatc-(TAMRA)	25

20

【 0 0 7 6 】

【表 1 4】

表 1 4

PCR および T_m 解析条件

95°C, 60sec

↓

(95°C, 1sec, 58°C, 15sec) $\times$ 50

↓

95°C, 1sec

↓

40°C, 60sec

↓

40°C→75°C, 1°C/3sec

30

【 0 0 7 7 】

血液を用いた場合と人工核酸プラスミドの野生型と変異タイプEを検体として用いた場合は、問題なく検出ピークが得られた(図 3 3, 3 4, 3 7)。しかしながら、変異タイプA100%を検体とした場合は検出ピークが確認できなかった(図 3 5)。さらに、変異タイプAまたはEを20%混合させた人工核酸を反応させた場合、変異タイプの検出ピークが確認できず、野生型の検出ピークしか確認できなかった(図 3 6, 3 8)。これらの結果から、実施例2の結果と比較して、3T-NPM1-e12-R3のプローブはNPM1のexon12の変異の検出に適していないと判断される。

40

【 0 0 7 8 】

実施例 3 (相補鎖オリゴヌクレオチドを検出対象とし、P5, P6, P7 プローブを用いる場合)
NPM1遺伝子のexon12変異は多種の配列が報告されているが、そのほとんどはタイプA、B、Dである(表1参照)。そのためタイプA、B、Dが明確に検出することが、NPM1遺伝子のe

50

xon12変異検出用プローブとして有用である。

NPM1遺伝子のexon12の塩基配列（配列番号2（変異タイプA））に基づき、表15に示す、末端部にCを有するプローブを設計した。表15中、プローブの位置は、配列番号2に示す塩基配列における塩基番号を示す。Pacific Blue, TAMRAおよびBODIPY FLによる標識は、常法に従って行った。

試薬溶液は実施例1と同様とし、プローブのみ以下のプローブを用いた。またTm解析も実施例1と同様に実施した。

また、検出対象として使用した相補鎖オリゴヌクレオチドの配列を表1に記載されており、表1に記載の4の部分に挿入変異を持つ配列である。

【0079】

【表15】

表15

配列番号	プローブ名	配列(5' →3')	位置	Mer
配列番号56	3PB-NPM1-mtA-R4	cactgcCAGAcagagatc-(Pacific Blue)	162-145	18
配列番号57	3T-NPM1-mtB-R5	cactgcCATGcagagatc-(TAMRA)	162-145	18
配列番号58	3FL-NPM1-mtD-R6	cactgcCAGGcagagatc-(BODIPY FL)	162-145	18

10

20

【0080】

Tm解析における励起波長および検出波長は、それぞれ365～415 nmおよび445～480 nm（Pacific Blue）、520～555 nmおよび585～700 nm（TAMRA）、420～485 nmおよび520～555 nm（BODIPY FL）であった。

【0081】

上記に示したプローブを用いて、実施例1と同様にTm解析による検出ピーク（Tm値）の確認を行った。また、野生型の相補鎖に対するTm値と各変異配列に対するTm値の差を確認した。

3PB-NPM1-mtA-R4（配列番号56）については、WTと変異タイプM、N、Gm、12、IとのTm値の差（ ΔT_m ）は4以下であったが、他の変異タイプでは十分なTm値の差があることが分かり、変異を検出することに適したプローブであることが分かった。

30

3T-NPM1-mtB-R5（配列番号57）については、WTと変異タイプM、N、12とのTm値の差（ ΔT_m ）は4以下であったが、他の変異タイプでは十分なTm値の差があることが分かり、変異を検出することに適したプローブであることが分かった。

3FL-NPM1-mtD-R6（配列番号58）については、WTと変異タイプM、N、3、12、IとのTm値の差（ ΔT_m ）は4以下であったが、他の変異タイプでは十分なTm値の差があることが分かり、変異を検出することに適したプローブであることが分かった。

結果を表16に示す。

【0082】

【表 16】

表 16

mtA-R4 プローブと各 Tm 値			mtB-R5 プローブと各 Tm 値			mtD-R6 プローブと各 Tm 値		
タイプ	Tm(°C)	ΔT_m (°C)	タイプ	Tm(°C)	ΔT_m (°C)	タイプ	Tm(°C)	ΔT_m (°C)
WT	45	-	WT	42	-	WT	44	-
A	64	19	A	55	13	A	61	17
B	53	8	B	66	24	B	62	18
D	57	12	D	56	14	D	67	23
C	51	6	C	62	20	C	60	16
M	46	1	M	44	2	M	43	-1
N	41	-4	N	42	0	N	48	4
Gm	47	2	Gm	62	20	Gm	55	11
Km	52	7	Km	54	12	Km	63	19
Nm	50	5	Nm	55	13	Nm	60	16
Om	58	13	Om	57	15	Om	54	10
Qm	60	15	Qm	52	10	Qm	57	13
3	51	6	3	51	9	3	46	2
4	50	5	4	60	18	4	59	15
12	48	3	12	41	-1	12	48	4
13	53	8	13	52	10	13	50	6
G+	58	13	G+	54	12	G+	54	10
H+	50	5	H+	59	17	H+	59	15
I+	53	8	I+	52	10	I+	50	6
J+	59	14	J+	60	18	J+	55	11
I	42	-3	I	53	11	I	47	3

【0083】

mtA-R4プローブは、WT配列（14mer）に加えてタイプAに特有の「t c t g」配列を4mer挿入した塩基配列に相補的なプローブである。mtA-R4プローブは、タイプA配列と18mer一致、タイプB配列と16mer一致、タイプDと配列17mer一致するため、WT相補鎖の（14mer一致）よりも高いTm値（高い親和性）が得られ、これら変異配列を検出することができる。

同様に、タイプB配列に相補的なmtB-R5プローブは、タイプA配列と16mer一致、タイプB配列と18mer一致、タイプD配列と17mer一致し、WT相補鎖よりも高いTm値が得られる。

同様に、タイプD配列に相補的なmtD-R6プローブは、タイプA配列と17mer一致、タイプB配列と17mer一致、タイプD配列と18mer一致し、WT相補鎖よりも高いTm値が得られる。

【0084】

実施例4（相補鎖オリゴヌクレオチドを検出対象として検出感度を確認する場合）

NPM1遺伝子のexon12変異のタイプAがどの程度混ざった検体まで検出が可能であるか、野生型配列と変異配列の人工核酸プラスミドの混合比率を振り、その検出波形を確認した。人工核酸はpUCプラスミドベクターにNPM1遺伝子のexon12周辺配列の野生型配列（590bp、配列番号1）、変異タイプA（594bp、配列番号2）を挿入したプラスミドを用いた。

【0085】

【表 1 7】

表 1 7

(反応液量:50 μ l)

1×PCR buffer	
dNTP	0.2mM
MgCl ₂	1.5mM
Taq ポリメラーゼ(アークレイ社製)	1.88U/test
NPM1-F2	1 μ M
NPM1-R4	0.5 μ M
プローブ	0.8 μ M
鋳型プラスミド*	4 μ l

10

* 鋳型プラスミドは、10%、3%、0%(WT100%)の割合で

野生型と変異型(タイプ A)を混合した 500 コピー/ μ lの人工核酸プラスミドを 4 μ l 使用した。

【0 0 8 6】

20

PCRおよびTm解析の条件は実施例 2 の表 1 1 と同様とした。Tm解析における励起波長および検出波長は、それぞれ365～415 nmおよび445～480 nm (Pacific Blue)、520～555 nmおよび585～700 nm (TAMRA)、420～485 nmおよび520～555 nm (BODIPY FL)であった。

【0 0 8 7】

表 1 5 のプローブを用いてTm解析を行った結果、mtA-R4プローブは、mtA 10%や3%の時に61-62 に (図 3 9)、mtB-R5プローブは、mtA 10%の時に53 に (図 4 0)、mtD-R6プローブは、mtA 10%や3%の時に59-60 に (図 4 1)、変異タイプAと考えられる検出ピークが確認できた。

【0 0 8 8】

実施例 4 の結果より、mtA-R4 (配列番号 5 6)、mtB-R5 (配列番号 5 7)、mtD-R6 (配列番号 5 8) のプローブを用いたとき、NPM1遺伝子のexon12変異の多型 (タイプA) について、Tm解析で分析可能な蛍光強度の変化が認められた。すなわち、変異型は、野生型のピークに加えて、他のピークを有するものであり、固有の蛍光強度の変化量のパターンの変化が存在する。従って、mtA-R4 (配列番号 5 6)、mtB-R5 (配列番号 5 7)、mtD-R6 (配列番号 5 8) のプローブを用いることにより、NPM1遺伝子のexon12変異の多型 (タイプA) が少量混在する検体から当該変異を高い感度で検出可能であることが理解される。

30

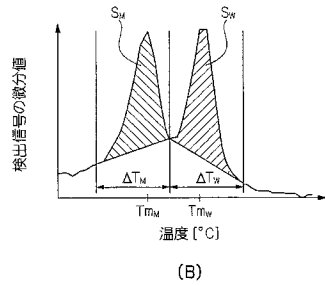
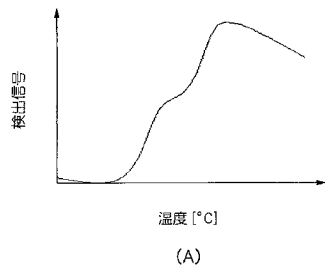
【産業上の利用可能性】

【0 0 8 9】

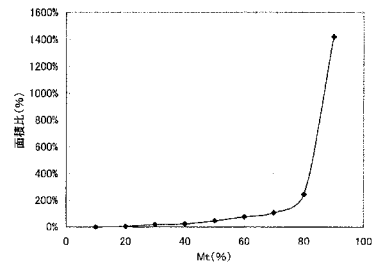
本発明のプローブを用いることより、急性骨髄性白血病のかかりやすさ、病態および/または予後を診断することができる。

40

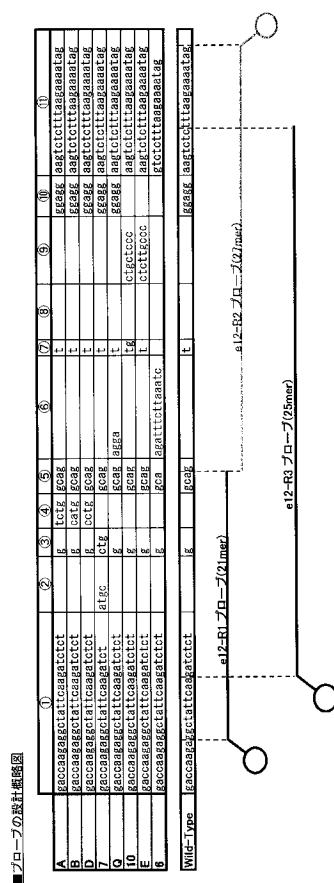
【図 1】



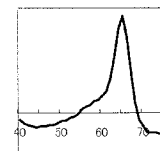
【図 2】



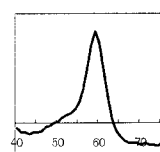
【図 3】



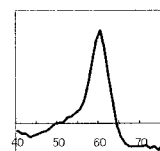
【図 4】



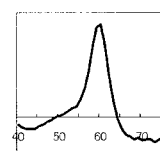
【図 5】



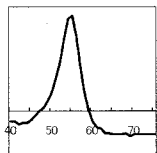
【図 6】



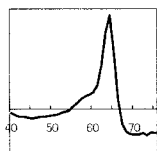
【図 7】



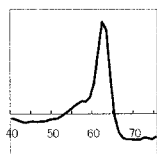
【図 8】



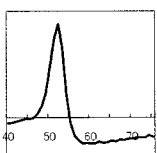
【図 9】



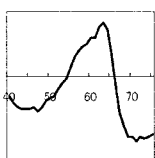
【図 10】



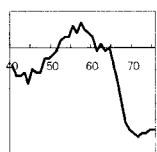
【図 11】



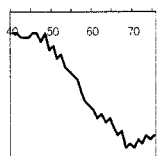
【図 16】



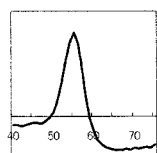
【図 17】



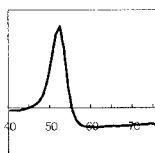
【図 18】



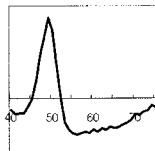
【図 19】



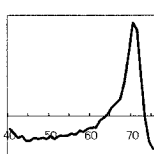
【図 12】



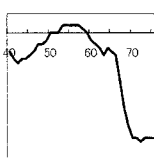
【図 13】



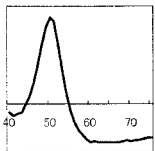
【図 14】



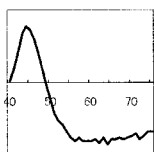
【図 15】



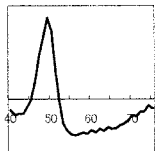
【図 20】



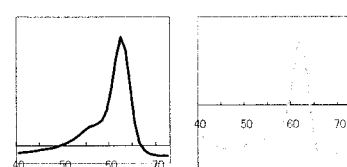
【図 21】



【図 22】



【図 23】



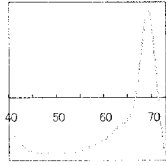
The figure consists of two side-by-side plots. Both plots have a horizontal axis representing temperature in degrees Celsius, with major tick marks at 40, 50, 60, and 70. The left plot shows a smooth, solid black curve that starts at a low value at 40°C, rises to a peak at 60°C, and then falls back to a low value at 70°C. The right plot shows a noisy, dashed black curve that follows a similar trend, starting low at 40°C, rising to a peak at 60°C, and falling back to a low value at 70°C. The noise in the right plot is more pronounced than in the left plot.

The figure consists of two side-by-side plots. The left plot shows a bell-shaped curve representing the rate of polymerization as a function of temperature. The x-axis is labeled with temperatures 40, 50, 60, and 70. The curve starts at 40°C, rises to a peak at approximately 55°C, and then falls back to the baseline by 70°C. The right plot shows a much flatter curve, also representing the rate of polymerization as a function of temperature. The x-axis is labeled with temperatures 40, 50, 60, and 70. The curve is relatively flat, with a very slight increase around 55°C.

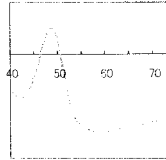
pH	0.1 g (mg/g)	0.2 g (mg/g)	0.5 g (mg/g)
4.0	~10	~10	~10
5.0	~20	~20	~20
6.0	~80	~80	~80
7.0	~85	~85	~85

Temperature (°C)	Rate of Reaction
40	0.25
50	0.35
60	0.95
70	0.15

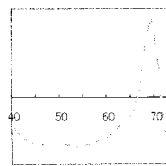
【図 3 6】



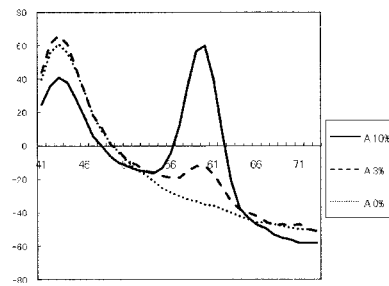
【図 3 7】



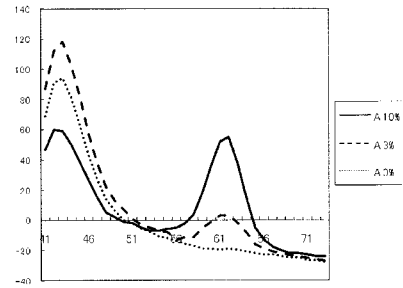
【図 3 8】



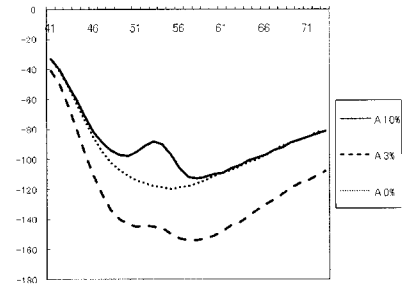
【図 4 1】



【図 3 9】



【図 4 0】



【配列表】

2012235777000001.app

专利名称(译)	检测npm1基因第12外显子突变的探针及其应用		
公开(公告)号	JP2012235777A	公开(公告)日	2012-12-06
申请号	JP2012102626	申请日	2012-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	爱科来株式会社		
申请(专利权)人(译)	ARKRAY公司		
[标]发明人	細見敏也		
发明人	細見 敏也		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/156		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M C12N15/00.A C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA12 4B063/QA19 4B063/QQ43 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	川口义行 高田大辅		
优先权	2011102327 2011-04-28 JP		
其他公开文献	JP5940874B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种鉴定NPM1基因的外显子12突变，检测NPM1基因的外显子12突变的方法及其试剂盒。用于检测NPM1基因的外显子12中的突变的探针，该探针是与在特定碱基序列中的特定位点或与之同源的序列中具有12至50个碱基的长度的序列互补的序列，和 具有在严格条件下与之杂交的碱基序列，与该特定位点的第一个碱基相对应的碱基是选自用荧光染料标记的寡核苷酸的胞嘧啶，至少一种 一种用于检测多态性的探针，其包含荧光标记的寡核苷酸。[选择图]图3

