



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0087488
(43) 공개일자 2009년08월17일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2009-7013664</p> <p>(22) 출원일자 2007년11월30일
심사청구일자 2009년06월30일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2009년06월30일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2007/073621</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2008/069288
국제공개일자 2008년06월12일</p> <p>(30) 우선권주장
JP-P-2006-325951 2006년12월01일 일본(JP)</p> | <p>(71) 출원인
캐논 가부시끼가이샤
일본 도쿄도 오오따꾸 시모마루쵸 3쵸메 30방 2고</p> <p>(72) 발명자
타카하마 신이치로
일본국 도쿄도 오오따꾸 시모마루쵸 3쵸메 30방 2고 캐논 가부시끼가이샤나이</p> <p>미즈타니 유리
일본국 도쿄도 오오따꾸 시모마루쵸 3쵸메 30방 2고 캐논 가부시끼가이샤나이</p> <p>(74) 대리인
임옥순</p> |
|--|--|

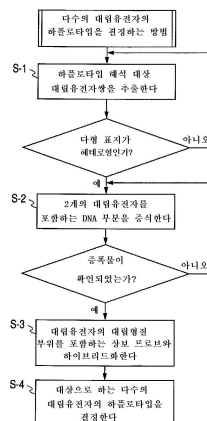
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 다수의 대립 유전자의 하플로타입의 결정방법

(57) 요약

2개의 대립 유전자를 포함하는 부위를 증폭하는 데 있어서, 상기 대립 유전자 중 1개의 대립 유전자의 다형을 하나의 증폭 프라이머의 3' 말단에 혹은 그 근방에 위치결정하므로, 변이형 뉴클레오타이드(들)와 정합하는 프라이머와 야생형 뉴클레오타이드(들)와 정합하는 프라이머의 2개의 프라이머 중 하나의 프라이머로부터만 사슬이 신장하게 된다. 다른 쪽의 프라이머는 대립 유전자에 의해 영향받지 않지만, 다른 쪽의 대립 유전자를 증폭산물에 포함시키도록 위치결정되어 있다. 제1대립 유전자의 하나의 특정 대립형질을 지닌 대상 게놈 DNA만을 PCR 증폭한다. 이 기술은, 그 증폭산물 내의 제2대립 유전자의 대립형질이 식별될 수 있다면, 제1 및 제2대립 유전자의 하플로타입이 결정될 수 있다는 사실을 이용한다. 제2대립 유전자의 2개의 대립형질(메이저/마이너)을 식별하는 상보 서열을 지닌 프로브를 설계하고, 상기 프로브 세트를 고상 지지체 상에 고정하고, 이들을 증폭산물로 하이브리드화하여 하이브리드체를 형성하는 프로브를 식별하는 것을 본 발명의 특징으로 한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

3'측에 헤테로형의 제1다형 부위를 지니고, 5'측에 헤테로형의 제2다형 부위를 가지는 표적 핵산의 하플로타입을 결정하는 방법에 있어서,

(i) (a-1) 이하의 순방향 프라이머 중 하나:

(a-1-1) 상기 제1다형 부위에 상보적인 염기 서열을 포함하고, 상기 제1다형이 변이형인 경우 표적 핵산을 신장 가능하고, 또한 상기 제1다형이 야생형인 경우 표적 핵산을 신장시키지 않는 순방향 프라이머, 및

(a-1-2) 상기 제1다형 부위에 상보적인 염기 서열을 포함하고, 상기 제1다형이 야생형인 경우 표적 핵산을 신장 가능하고, 또한 상기 제1다형이 변이형인 경우 표적 핵산을 신장시키지 않는 순방향 프라이머; 및

(b-1) 상기 표적 핵산의 상보체의, 상기 제2다형의 3'측에 위치하며, 해당 제2다형을 포함하지 않는 소정의 염기 서열에 대해서 상보적인 염기 서열을 포함하는 역방향 프라이머를 이용해서 해당 표적 핵산의 PCR(Polymerization Chain Reaction)을 수행하는 공정;

(ii) 상기 공정(i)의 결과로서 얻어진 산물을, 상기 제2다형의 야생형 뉴클레오타이드(들)를 포함하는 해당 표적 핵산의 염기 서열의 소정 부분과 동일한 염기 서열을 가지는 제1프로브 및 상기 제2다형의 변이형 뉴클레오타이드(들)를 포함하는 해당 표적 핵산의 염기 서열의 소정 부분과 동일한 염기 서열을 가지는 제2프로브와 하이브리드화(hybridizing)하여, 상기 제1프로브 및 제2프로브와의 하이브리드체 형성을 나타내는 시그널을 검출하는 하이브리드화 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 하플로타입의 결정 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 하이브리드화 공정(ii)은, 상기 제1프로브 및 제2프로브가 고정된 프로브 담체를 상기 공정(i)의 결과로서 얻어진 산물과 하이브리드화하는 공정을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 하플로타입의 결정 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 순방향 프라이머(a-1-1)는, 그의 3'말단 또는 그 근방에, 변이형 뉴클레오타이드(들)를 지닌 상기 제1다형에 상보적인 뉴클레오타이드(들)를 지니며;

상기 순방향 프라이머(a-1-2)는, 그의 3'말단 또는 그 근방에, 야생형 뉴클레오타이드(들)를 지닌 상기 제1다형에 상보적인 뉴클레오타이드(들)를 지니는 것을 특징으로 하는 하플로타입의 결정 방법.

청구항 4

3'측에 제1다형 부위를 가지고, 5'측에 제2다형 부위를 가지는 표적 핵산의 하플로타입을 결정하기 위한 프라이머 세트로서,

이하의 2개의 순방향 프라이머 중 하나의 순방향 프라이머:

상기 제1다형 부위에 상보적인 염기 서열을 포함하고, 상기 표적 핵산의 제1다형이 변이형인 경우 해당 표적 핵산을 신장 가능하고, 또한 상기 표적 핵산의 제1다형이 야생형인 경우 해당 표적 핵산을 신장시키지 않는 순방향 프라이머 및

상기 제1다형 부위에 상보적인 염기 서열을 포함하고, 상기 표적 핵산의 제1다형이 야생형인 경우 해당 표적 핵산을 신장 가능하고, 또한 상기 표적 핵산의 제1다형이 변이형인 경우 해당 표적 핵산을 신장시키지 않는 순방향 프라이머; 및

상기 표적 핵산의 상보체의, 상기 제2다형의 3'측에 위치하며, 상기 제2다형을 포함하지 않는 소정의 염기 서열에 대해서 상보적인 염기 서열을 가지는 역방향 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 하는 프라이머 세트.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 적어도 2개의 헤테로형 다형(heterozygous polymorphism)을 가지는 표적 핵산의 하플로타입(haplotype)을 결정하는 방법 및 그러한 결정을 위해 이용되는 프라이머 세트에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 하플로타입은 단일의 염색체에 위치하는 2개 또는 그 이상의 다형의 시스 배치이다. 하플로타입 정보는 특정 질환이나 이상, 또한 특정 약제 감수성과 관련이 있으므로 매우 유용한 것으로 생각되고 있다. 종래, 하플로타입의 해석은 가계의 다세대에 걸친 다형에 대한 유전 정보의 추적 조사나, 계산기에 기초한 추정 알고리즘을 필요로 하였다. 한편, PCR(Polymerization Chain Reaction) 기술의 진보에 의해 분자 레벨로 DNA를 직접 분석할 수 있게 되어, 그러한 분석결과를 하플로타입의 결정에 이용하는 방법이 제안되어 있다. 그러나, PCR을 이용해서 하플로타입을 결정하기 위해서는, 대립 유전자에 특이적인 프라이머의 조합을 다수개 이용해서 여러 번 PCR을 수행할 필요가 있다. 또, 단지 2개의 대립 유전자만을 고려할 경우, 2개의 프라이머 쌍을 다형 부위에 배치하여, 그 증폭의 유무를 조사해서 하플로타입을 결정하려고 하는 시도도 있었다. 이 방법은, 단일 시험관 에세이(assay)를 이용한 하플로타입 결정 방법(일본국 공개 특허 제2002-272482호 공보)으로 제안되어 있다. 보다 구체적으로는, 제1다형을 포함하는 순방향 프라이머는, 5' 말단에 대립형질 종별(allele type)에 따라서 다른 시그널을 얻는 표지가 수식되어 있다. 또, 제2다형을 포함하는 역방향 프라이머에 대해서는, 표적 서열에는 존재하지 않는 플랩(flap) 서열을 5' 말단에 부착하여, 해당 프라이머가 대립형질에 따른 길이를 지니는 증폭산물(amplicon)을 얻도록 설계되어 있다. 이들 프라이머를 이용해서, 양방향에서부터 대립형질-특이적 PCR 에세이를 수행한다. PCR 증폭산물 중의 형광 표지와 증폭산물의 길이를 검출함으로써, 어느 프라이머 쌍이 증폭을 일으켰는지 알 수 있어, 하플로타입을 결정할 수 있다.

<3> 그러나, 상기 설명된 공지의 방법에 있어서는, 프라이머에 다형 서열을 지닌 부위가 포함되는 것이 필수적이다. 그 때문에, 프라이머의 염기 서열을 선택하는 자유도가 제한된다. 여기서, 대립형질-특이적 PCR을 행하기 위해서는, PCR에 이용하는 프라이머들의 T_m 이 유사할 필요가 있다. 그러나, 전술한 프라이머의 염기 서열의 선택에 제약이 있으면, 프라이머들의 T_m 을 유사하게 하는 것이 곤란해질 경우가 있을 수 있다. 즉, 상기 일본국 공개 특허 제2002-272482호 공보의 방법에 따라, 정밀도 높게 하플로타입을 검출하는 것은 T_m 이 유사한 프라이머가 이용될 수 있는 위치에 다형이 있는 경우로 제한되어 버릴 가능성이 있다. 이 외에, 상기 검출 방법에서는, 순방향 프라이머와 역방향 프라이머의 양쪽 모두의 서열 위치를 변위시키는 것이 곤란하다. 따라서, 순방향 프라이머와 역방향 프라이머가 프라이머 다이머를 형성한 경우에는, 하플로타입을 검출할 수 없게 된다.

발명의 상세한 설명

<4> 본 발명은, 다형의 위치에 관계없이, 하플로타입을 보다 정확하게 결정하는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 적어도 2개의 헤테로형 다형을 가지는 표적 핵산의 하플로타입을 결정하는 방법 및 이 목적을 위해 이용되는 프라이머 세트를 제공한다.

<5> 본 발명의 방법은, 3'측에 헤테로형의 제1다형 부위를 지니고, 5'측에 헤테로형의 제2다형 부위를 가지는 표적 핵산의 하플로타입을 결정하는 것으로서, 이 방법은,

<6> (i) (a-1) 이하의 순방향 프라이머 중 하나:

<7> (a-1-1) 상기 제1다형 부위에 상보적인 염기 서열을 포함하고, 상기 제1다형이 변이형인 경우 표적 핵산을 신장 가능하고, 또한 상기 제1다형이 야생형인 경우 표적 핵산을 신장시키지 않는 순방향 프라이머, 및

<8> (a-1-2) 상기 제1다형 부위에 상보적인 염기 서열을 포함하고, 상기 제1다형이 야생형인 경우 표적 핵산을 신장 가능하고, 또한 상기 제1다형이 변이형인 경우 표적 핵산을 신장시키지 않는 순방향 프라이머; 및

<9> (b-1) 상기 표적 핵산의 상보체의, 상기 제2다형의 3'측에 위치하며, 해당 제2다형을 포함하지 않는 소정의 염기 서열에 대해서 상보적인 염기 서열을 포함하는 역방향 프라이머를 이용해서 해당 표적 핵산의 PCR을 수행하는 공정;

<10> (ii) 상기 공정(i)의 결과로서 얻어진 산물을, 상기 제2다형의 야생형 뉴클레오타이드를 포함하는 해당 표적 핵산의 염기 서열의 소정 부분과 동일한 염기 서열을 가지는 제1프로브 및 상기 제2다형의 변이형 뉴클레오타이드를 포함하는 해당 표적 핵산의 염기 서열의 소정 부분과 동일한 염기 서열을 가지는 제2프로브와 하이브리드화(hybridizing)하여, 상기 제1프로브 및 제2프로브와의 하이브리드체 형성을 나타내는 시그널을 검출하는 공정을

포함하는 것을 특징으로 한다.

- <11> 또, 본 발명에 의한 하플로타입을 결정하는 데 이용되는 프라이머 세트는, 3'측에 제1다형 부위를 가지고, 5'측에 제2다형 부위를 가지는 표적 핵산의 하플로타입을 결정하기 위한 프라이머 세트로서, 해당 프라이머 세트는,
- <12> 이하의 2개의 순방향 프라이머 중 하나:
- <13> 상기 제1다형 부위에 상보적인 염기 서열을 포함하고, 상기 표적 핵산의 제1다형이 변이형인 경우 해당 표적 핵산을 신장 가능하고, 또한 상기 표적 핵산의 제1다형이 야생형인 경우 해당 표적 핵산을 신장시키지 않는 순방향 프라이머 및
- <14> 상기 제1다형 부위에 상보적인 염기 서열을 포함하고, 상기 표적 핵산의 제1다형이 야생형인 경우 해당 표적 핵산을 신장 가능하고, 또한 상기 제1다형이 변이형인 경우 해당 표적 핵산을 신장시키지 않는 순방향 프라이머; 및
- <15> 상기 표적 핵산의 상보쇄의, 상기 제2다형의 3'측에 위치하며, 상기 제2다형을 포함하지 않는 소정의 염기 서열에 대해서 상보적인 염기 서열을 가지는 역방향 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <16> 이상 설명한 것처럼, 본 발명에 의하면, 다수의 헤테로형 다형이 존재할 때에 그 하플로타입을 동시에 그리고 철저히 결정할 수 있다.

실시예

<22> 발명을 수행하기 위한 최상의 모드

- <23> 본 발명에서는, 마이크로어레이로 하플로타입을 결정하는 데 있어서, 표적으로 되는 게놈 DNA의 대상으로 되는 다형에 대해서 대립 유전자 특이적 PCR 증폭 프로토콜을 이용한다. 먼저, 제1대립 유전자의 유전형질들 중 하나에 대해서 특이적이고 또한 제2대립 유전자를 포함하는 증폭산물이 생산된다. 이 증폭산물은 이어서 각각 상기 제2대립 유전자의 대립형질의 각각에 대해서 특이적인 올리고뉴클레오타이드 프로브와 하이브리드화하여, 제2대립 유전자의 대립형질을 식별한다. 이 기술은, 제1대립 유전자와 제2대립 유전자가 하플로타입을 형성한 경우에 그 분자 레벨에서의 가장 강력한 검출 방법일 수 있다. 제2대립 유전자가 메이저 대립형질인 경우에 DNA 하이브리드체를 구성하는 상보쇄 프로브와, 제2대립 유전자가 마이너 대립형질인 경우에 DNA 하이브리드체를 구성하는 다른 상보쇄 프로브를 준비하고, 예를 들어 마이크로어레이 등의 고체 지지체 상에 고정시킨다. 어느 쪽의 프로브에 하이브리다이제이션(hybridization)이 일어났는지를 표지로 확인함으로써 그 하플로타입을 결정할 수 있다. 대립 유전자의 후보가 다수쌍 있는 경우, 고체 지지체 상에 탑재된 N×2개의 프로브와 하이브리드화함으로써 그 N개의 하플로타입을 철저히 해석할 수 있다. 제1대립 유전자는 미리 선별된 헤테로형이면, 하플로타입을 식별하는 전용의 고체 지지체를 구성할 수 있다. 증폭 프라이머들 중 하나는, 하나의 대립 유전자의 대립형질들 중 하나에 특이적으로 되도록 설계될 수 있고, 다른 증폭 프라이머는 증폭산물에 다른 대립 유전자를 포함하도록 설계될 필요가 있다. 표지는, 예를 들어, 프라이머 상에 담지된 동시에, 대립형질 특이적인 증폭이 성공적으로 일어날 경우에만 다른 대립 유전자와 하이브리드화한 프로브에 그 형광이 검출될 수 있는 구성된 형광단(fluorophore)일 수 있다.
- <24> 본 발명에 있어서는, 제1대립 유전자의 대립형질들 중 하나에 특이적인 영역을 지닌 증폭산물을 얻기 위해서, 이하의 순방향 프라이머들 중 하나가 이용된다:
- <25> (a-1-1) 상기 제1다형 부위에 상보적인 염기 서열을 포함하고, 표적 핵산의 제1다형이 변이형인 경우 해당 표적 핵산을 신장 가능하고, 또한 상기 제1다형이 야생형인 경우 표적 핵산을 신장시키지 않는 순방향 프라이머; 및
- <26> (a-1-2) 상기 제1다형 부위에 상보적인 염기 서열을 포함하고, 상기 표적 핵산의 제1다형이 야생형인 경우 해당 표적 핵산을 신장 가능하고, 또한 상기 제1다형이 변이형인 경우 표적 핵산을 신장시키지 않는 순방향 프라이머.
- <27> 이들 순방향 프라이머에 있어서, 표적 핵산의 타이핑에 의거하는, 기존의 제1다형을 포함하는 부분의 서열을 기초로 해서 이 부분이 PCR 증폭산물 중에 얻어지도록 상기 프라이머의 염기 서열(및/또는 상기 서열의 길이)은 표준 방식에 의해 설정 가능하다.
- <28> 또한, 변이형 또는 야생형의 다형이 선택될 수 있다.
- <29> 제2다형을 포함하는 부분을 증폭산물 중에 얻기 위한 역방향 프라이머는, 표적 핵산의 상보쇄 상의, 제2다형의

3'측으로부터, 해당 제2다형을 포함하지 않는 소정의 염기 서열에 대해서 상보적인 염기 서열을 가지도록 설계된다. 표적 핵산의 타이핑에 의거하는 기존의 제2다형을 포함하는 부분의 서열을 기초로 해서 이 부분이 PCR 증폭산물 중에 얻어지도록, 역방향 프라이머의 염기 서열(서열 길이)은 표준 방식에 의해 설정 가능하다.

<30> 제2다형을 포함하는 부분의 검출에 이용하는 프로브도, 제2다형을 포함하는 부분이 표적 핵산의 타이핑으로부터 이미 공지되어 있으므로, 이 부분에 특이적인 서열을 선택해서 이 선택된 서열을 검출 가능한 프로브의 염기 서열(및/또는 서열 길이)을 표준 방식에 의해 설정 가능하다.

<31> 이하, 본 발명의 실시형태에 대해서 설명한다.

<32> **제1실시형태**

<33> 이하, 본 발명의 제1실시형태에 대해 도 1을 참조해서 설명한다. 본 실시형태는 게놈 DNA 상에 있는 다수의 대립 유전자의 대립형질 종별을 결정하는 수법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 2개 또는 2개 이상의 대립 유전자의 하플로타입을 결정하는 절차를 이하에 순서에 따라 설명한다.

<34> 본 실시형태에서는, 게놈 DNA 상의 2개의 헤테로형 대립 유전자의 하플로타입을 결정한다. 2개의 대립 유전자 간 거리는 약 수개의 염기쌍 내지 수십개의 염기쌍에서부터 수백 내지 수천개의 염기쌍의 범위일 수 있다. 따라서, 양 대립 유전자를 지니는 증폭산물을 제조할 필요가 있다. 2개의 대립 유전자를 여기서는 5'측으로부터 세어서 제1대립 유전자 및 제2대립 유전자라고 정의한다. 제1대립 유전자의 메이저 대립형질은 G, 마이너 대립형질은 C, 제2대립 유전자의 메이저 대립형질은 G, 마이너 대립형질은 T이다.

<35> 본 실시형태에 있어서 그 하플로타입을 결정하기 위해서, 제1대립 유전자의 메이저 대립형질 또는 마이너 대립형질을 선택적으로 증폭하도록 프라이머의 3'말단을 대립형질의 위치에 정합시킨다. 예를 들어, 3'말단에 제1대립 유전자의 마이너 대립형질과 상보로 되도록 제1프라이머(순방향 프라이머)를 설계하여, 제1대립 유전자가 마이너 대립형질이면 신장이 일어나지만, 메이저 대립형질이면 신장이 진행되지 않는다. 한편, 반대쇄의 제2프라이머(역방향 프라이머)는, 제1프라이머의 결합 위치를 기준으로 이용해서 제2대립 유전자를 개입시키도록 설계되어 있다. 제2프라이머는 대립형질 종별에는 의존하지 않는다. 이 구성에서는, 제1대립 유전자가 마이너 대립형질인 경우에 대량의 증폭산물을 생성하므로, 제1대립 유전자가 마이너 대립형질이며 제2대립 유전자를 포함하는 증폭산물이 우선적으로 생산되는 것으로 확인되었다. 그 때문에, 증폭산물에 있어서 제2대립 유전자의 대립형질 종별을 결정함으로써, 제1 및 제2대립 유전자의 하플로타입을 결정할 수 있다.

<36> 본 발명에 의한 하플로타입을 결정하는 방법은, 이하에 기재된 1) 및 2) 스텝을 포함한다:

<37> 1) 제1대립 유전자의 대립형질들 중 하나를 선택해서, 제2대립 유전자를 포함하는 증폭산물만을 생성하는 스텝;

<38> 2) 상기 증폭산물을 제2대립 유전자용의 대립형질에 특이적인 상보적 프로브와 하이브리드화시켜, 제2대립 유전자의 대립형질을 식별하는 스텝.

<39> 도 1은 상기 스텝들을 나타낸 순서도이다. (S-1)은 제1대립 유전자와 제2대립 유전자가 모두 헤테로형인 것을 확인하는 스텝이다. 각각의 대립 유전자에 대해 이용되는 타이핑하는 방법에 대해서는 제한이 없다. 제1대립 유전자와 제2대립 유전자 중 적어도 하나가 호모형(homozygous)이면, 두 대립 유전자의 하플로타입 조합은 공지인 것으로 되어, 본 발명을 적용할 필요성은 없다.

<40> 본 실시형태에서는, 각각의 유전자형을 표적화한 후 헤테로형을 확인한 조합만을 대상으로 한다. (S-2)는 제1대립 유전자의 마이너 대립형질에 특이적인 제1프라이머와 제2대립 유전자를 포함하는 반대쇄의 제2프라이머와의 조합 사용을 통해 증폭산물을 대상 게놈으로부터 얻는 스텝이다. 제1대립 유전자의 마이너 대립형질에 특이적인 제1프라이머는, 상보적으로 되도록 변이 부위가 3' 말단에 위치한 프라이머이며, 이 프라이머는 대상 게놈 서열이 메이저 대립형질인 경우에는 신장되지 않는다. 여기서, 제1대립 유전자는 헤테로형이므로, 마이너 대립형질의 게놈과 제1프라이머가 어닐링된 경우에만 신장 반응이 진행된다. 즉, 형성된 증폭산물은 제1대립 유전자가 마이너 대립형질을 지닌 것으로 한정된다. 제2프라이머는 대상 게놈에 의해 영향받지 않고, 그 대상 게놈에서의 그의 형태를 정합시킨 제2대립 유전자를 포함하는 증폭산물을 생성한다. 이 경우, 제1대립 유전자가 마이너 대립형질인 경우, 제2대립 유전자의 상기 정합 대립형질을 포함하는 증폭산물이 형성된다. 제2대립 유전자가 메이저 대립형질인지 마이너 대립형질인지는 어떠한 영향도 미치지 않지만, 제1대립 유전자와의 하플로타입은 제2대립 유전자의 대립형질에 특이적인 프로브와 상기 증폭산물을 하이브리드화함으로써 결정될 수 있다. 제1프라이머가, 상기 경우와는 달리, 메이저 대립형질에 특이적으로 되도록 설계된 경우에도 본 발명의 본질은 동일하게 유지된다.

- <41> 또, 제2대립 유전자를 결정하는 데 있어서, 표지를 사용할 필요가 있다. 제1프라이머 또는 제2프라이머의 어느 쪽도 표지화될 수 있다. 대안적으로는, 신장 반응 과정에서, 표지화된 뉴클레오타이드가 증폭산물 중에 도입된다. 표지는 형광 물질, 화학 발광 물질 또는 방사선 동위체일 수 있다. 본 실시형태에서는 Cy3 형광 색소 표지를 이용한다. (S-3)은 제2대립 유전자에 특이적인 프로브를 고정한 고체 지지체와 증폭산물을 하이브리드화시키는 스텝이다. 프로브는, 각각, 마이너 대립형질 또는 메이저 대립형질에 특이적인 것을 준비한다. 이들 프로브는, 고체 지지체 상에 고정되고 있어도 되고, 또는 액상반응에서 FRET를 일으키는 구성으로 이용해도 된다. 본 실시형태에서는, 고체 지지체를 사용해서 제2대립 유전자를 결정한다. 즉, 제2대립 유전자의 마이너 대립형질에 특이적인 프로브가 배치되어 있는 고체 지지체 상의 특정 위치에서만 형광을 보이면, 이것은 제1대립 유전자와 제2대립 유전자가 마이너/마이너 하플로타입을 형성하고 있는 것을 의미한다. 동시에, 이것은 또한 메이저/메이저 하플로타입의 존재를 확정한다. 한편, 제2대립 유전자의 메이저 대립형질에 특이적인 프로브가 배치되어 있는 고체 지지체 상의 특정 위치에서만 형광을 보이면, 이것은 제1대립 유전자와 제2대립 유전자가 마이너/메이저 하플로타입을 형성하고 있는 것을 의미하며, 이와 동시에, 메이저/마이너 하플로타입의 존재도 확정한다. 또한, 제2대립 유전자의 메이저 대립형질에 특이적인 프로브와 마이너 대립형질에 특이적인 프로브의 양쪽 모두가 배치되어 있는 고체 지지체 상의 양쪽 부위에서 형광을 보이면, 이것은 제1대립 유전자와 제2대립 유전자가 약한 하플로타입 관계를 지닌다고 해석될 수 있다. 이와 같이 해서, (S-4)는 이 제2대립 유전자의 대립형질 및 제1대립 유전자와 제2대립 유전자의 하플로타입을 결정하는 스텝이다.
- <42> 도 2는 앞서 설명된 제1대립 유전자(201) 및 제2대립 유전자(202)의 대상 게놈 상의 위치 관계를 나타낸 배치도이다. 제1프라이머(203) 및 제2프라이머(204)와 그들의 증폭산물(205)도 이 도면에 도시되어 있다. 앞에서 설명한 바와 같이, 제1프라이머(203)의 3' 말단부는 제1대립 유전자(201)의 변이 부위에 해당하고, 제2프라이머(204)는 제2대립 유전자(202)를 포함하는 영역의 하류에 위치한다. 제1프라이머(203)에 의해서, 제1대립 유전자(201)의 대립형질들 중 하나를 포함하는 신장 산물의 생산이(도 2의 상부) 다른 대립형질을 포함하는 신장 산물의 생산보다 많다(도 2의 하부). 즉, PCR에 의해, 제1대립 유전자(201)의 2개의 대립형질 중 하나를 포함하는 대상 게놈 쪽만이 증폭된다. 따라서, 제2대립 유전자(202)는 또한 그 대상 게놈 쪽만 정합하는 대립형질을 가질 것이다. 그 외에, 도면에 도시된 제2대립 유전자(202)의 대립형질을 포함하는 프로브를 설계한다.
- <43> 표 1은, 본 실시형태에 관련된, 1쌍의 증폭 프라이머와 그들의 증폭산물 및 제2대립 유전자의 프로브의 염기 서열을 나타낸다. 굵은 글씨는, 5' 측으로부터 시작해서 이 순서로 제1대립 유전자의 대립형질 위치(변이형 뉴클레오타이드 C) 및 제2대립 유전자의 대립형질 위치(변이형 뉴클레오타이드 T)에 대응한다. 순방향 프라이머(FP)에는 변이형 뉴클레오타이드 C를 선택한다.

표 1

<44> 순방향 프라이머(FP)	5'-AGGGCGGCAGAGGTC-3'
역방향 프라이머(RP)	5'-CTACTCTCCTTGGCCTTT-3'
증폭산물	5'-AGGGCGGCAGAGGTCCTGAGGCTCCCCTACCAGAAGCAAA CATGGATGGT GGGTGAAACACAGGCTGGACCAGAAGCCAGGCTGAGAA GGGGAAGCAG GTTTGGGGACTTCTCTGGAGAAGGGCATTTATACATGGCAT GAAGGACTG GATTTTCCAAAGGCCAAGGAAGAGTAG-3'
제2대립 유전자의 메이저 대립형질 G에 대한 프로브	5'-TCTCCAGGACGTCCCCCAAACC-3'
제2대립 유전자의 마이너 대립형질 T에 대한 프로브	5'-TCTCCAGGAAGTCCCCCAAACC-3'

<45> **제2실시형태**

- <46> 본 발명의 제2실시형태를, 도 5를 이용해서 이하에 설명한다. 각 대립 유전자의 다형의 위치는 "×"로 표시된다. 제N번째, 제N+1번째, 제N+2번째 위치의 다형만 여기에 표시하고, 나머지는 생략하고 있지만, 이것은 다형의 수를 한정하는 것을 의미하는 것은 아니다. 이 경우, 순방향 프라이머에 Cy3-표지를 하고 있지만, 말할 필요도 없이 그것이 역방향 프라이머이거나 혹은 신장하는 뉴클레오타이드쇄 자체에 표지되어 있어도 본 발명의 본질적인 특징이 바뀌는 것은 아니다.
- <47> 본 실시형태에서는, 다수의 복대립 유전자의 하플로타입을 결정하는 일반화된 수법을 기술한다. 여기에서는 N

개의 헤테로형의 다형을 테스트한다. 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, FP(N)(N번째의 다형에 대해서 순방향의 프라이머)과 RP(N)(반대 방향의 역방향 프라이머)을 정의한다. N+1번째 이후도, 순방향 프라이머 FP(N+1), FP(N+2), ..., 그리고 역방향 프라이머 RP(N+1), RP(N+2), ... 도 마찬가지로 정의할 수 있다. N번째의 다형과 N+1번째의 다형을 포함하는 PCR 증폭산물을 생산하기 위해서, 순방향 프라이머 FP(N)과 역방향 프라이머 RP(N+1)을 설계한다. FP(N)은 선택된 2개의 대립형질 중 하나를 지니는, 제N번째의 다형을 3' 말단에 지니도록 설계된다. RP(N+1)은 PCR 증폭산물이 제N+1번째의 다형을 포함하도록 제N번째 다형의 반대쪽에 설계된다. FP(N)과 RP(N+1)의 프라이머쌍은, 제N번째의 다형이 2개의 대립형질 중 하나에만 정합하는 경우 제N번째 다형과 제N+1번째 다형을 포함하는 PCR 증폭산물을 얻는 쌍이다. 이어서, N=1, 2, 3, ..., m에 대해서 m개의 PCR 증폭으로부터 반응 산물을 얻어, FP(N)에 의해 선택된 제N번째 대립 유전자에 대한 제N+1번째 대립 유전자를 결정할 수 있는 프로브와 하이브리드화한다. 여기에 설명된 경우에서, 2×m개의 대립형질과 정합하도록 설계된 프로브를 마이크로어레이 상의 원하는 위치에 고정한다.

<48> m개의 PCR 증폭에서 얻어진 증폭산물을 혼합해서, 이하의 실시예 1에 기재된 프로토콜에 따라서 마이크로어레이 상의 프로브와 하이브리드화한다. 이것을 행함으로써, 다수의 대립 유전자의 하플로타입의 조합을 단일 표지만으로 망라적으로 결정할 수 있다. 또, 본 발명의 수법, 즉, 하나의 대립 유전자의 2개의 대립형질에 대응하는 서열을 가지는 2개의 프로브의 어느 쪽이 하이브리다이제이션되었는지를 판정해서 그 대립형질을 식별하는 수법은, 하플로타입의 분석 정밀도를 향상시킨다.

<49> 여기에서는, 헤테로형의 대립 유전자에 대한 논의로 한정했지만, 제1대립 유전자의 2개의 대립형질에 관해서 개별적으로 특이적인 프라이머를 2세트 준비해서, 별개로 하이브리다이제이션해서 결정해도 무방하다.

<50> **실시예 1**

<51> 상기 제 1 실시형태에 의한 실시예를 이하에 기재한다.

<52> **I. 검체의 조제와 특정 유전자 영역의 추출**

<53> 사용한 템플레이트 DNA는, 일본인으로부터 유래된 B 세포주로부터 추출된 게놈 DNA의 대사효소 유전자 CYP2D6의 5 kbp 영역만을 증폭해서, 얻어진 증폭산물을 초순수로 8 ng/μl로 희석시킴으로써 조제하였다. 이 처리는 의사 유전자인 CYP2D7, CYP2D8 등의 중복 서열 영역을 제외하고, 순수한 CYP2D6 영역을 얻도록 행해지고 있었다. 상세하게는, 표 2에 열거된 일반적으로 널리 이용되는 프라이머를 이용하였다.

표 2

<54>	2D6-DPKup	GTTATCCCAGAAGGCTTTGCAGGCTTC
	2D6-DPKlow	GCCGACTGAGCCCTGGGAGGTAGGTA

<55> 또, PCR 용액은 표 3에 표시된 바와 같이 조제되어, PCR 사이클은 도 3에 나타낸 바와 같이 수행되고, 그 결과, CYP2D6 유전자 영역의 증폭산물(5079 bp)을 얻었다.

<56> 반응 프로세스에서는, 변성, 어닐링 및 신장의 3-스텝 사이클을 35회 반복하였고, 냉각 후, 정제 프로세스에 의해 증폭산물을 정제시켰다.

<57> PCR 증폭산물은 정제용 컬럼(Qiagen QIAquick PCR Purification Kit)을 이용해서 정제하였고, PCR 증폭산물 용액의 액량은 50μl로 조정하였다. 이와 같이 해서 얻어진 정제된 PCR 증폭산물 용액의 일부를 샘플링하여, 표준 방식에 의해 전기 영동을 실시하여, 생성물의 크기로부터 목적의 PCR 산물이 합성되어 있는 것을 확인하였다. 또한, 생성물은 순수에 의해 8 ng/μl로 더욱 희석되었다.

표 3

<58>	Expand Long Enzyme Mix(Roche)	0.375 μl
	2D6-DPKup(1 mM)	4 μl
	2D6-DPKlow(1 mM)	4 μl
	버퍼 1	2.5 μl
	dNTP(각각 10 mM)	0.875 μl
	H ₂ O	12.25 μl

게놈 DNA	1 μ l
합계	25 μ l

<59> II. PCR 증폭

<60> 프라이머의 설계 및 PCR 증폭산물의 정제

<61> 표 4는 증폭 반응에 사용되는 시약과 그들의 혼합 비율을 나타낸다. PCR용 버퍼, DNA 폴리메라제, 뉴클레오타이드, 프라이머 및 템플레이트 DNA의 농도와 그 사용량도 여기에 기재한다. 여기에서는 Cy3-표지화된 프라이머를 사용하였다.

표 4

<62>

항목	농도	양[μ l]
H ₂ O	--	17.3
순방향 프라이머(FP)	10 μ M	1.0
역방향 프라이머(RP)	10 μ M	1.0
10×버퍼	4 μ M	2.5
dNTP	2 mM	2.5
(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	각각	0.2
Ampli Taq Gold(TAKARA)	8 ng/ μ l	
템플레이트 DNA		
합계	--	25.0

<63> 도 4는 증폭 반응에 적용된 프로토콜을 나타낸다. 반응 프로세스에서는, 변성, 어닐링 및 신장의 3-스텝 사이클을 35회 반복하고, 냉각 후, 정제 프로세스에 의해 증폭산물을 정제시켰다.

<64> PCR 증폭산물은 정제용 컬럼(Qiagen QIAquick PCR Purification Kit) 상에서 정제시켰다. 정제 후, PCR 증폭산물 용액의 액량은 50 μ l로 조정하였다. 이와 같이 해서 얻어진 정제된 PCR 증폭산물 용액의 일부를 샘플링하여, 표준 방식에 의해 전기 영동을 실시하여, 생성물의 크기로부터 목적의 PCR 산물이 합성되어 있는 것을 확인하였다. 또한, 사용된 프라이머 및 증폭산물의 서열은 앞서의 표 1에 나타낸 바와 같았다.

<65> III. 마이크로어레이의 제작

<66> (1) 프로브의 설계

<67> 상기 PCR 산물에 대해서 2종의 프로브를 설계하였다. 프라이머의 설계에 있어서와 같이, 각 프로브가 제2대립 유전자의 대립형질의 염기 서열을 특이적으로 인식할 수 있도록 충분히 고려하여 프로브를 설계하였다. 이 프로브 설계에 있어서, 순방향 프라이머(FP)로부터 신장한 DNA쇄는 프로브와 하이브리드체를 형성하는 것이다. 각 프로브의 염기 서열은 형성된 하이브리드체의 안정성을 고려해서, 염기쌍 길이를 조정하는 등에 의해 주의해서 설계되었다. 설계된 2개의 프로브의 서열은 표 1에 표시되어 있다.

<68> (2) 프로브의 합성 및 마이크로어레이의 제작

<69> 프로브의 합성 및 마이크로어레이의 제작은, 캐논사로부터 개시되어 있는 DNA 마이크로어레이의 제작법(일본국 공개 특허 평11-187900호 공보)을 이용해서 수행되었다. 즉, 기관 프로세스에 대해서는, 석영 유리에 실란커플링제로 처리하고, 이것에 EMCS(N-(6-maleimidocaproyloxy)succinimide)를 결합해서, 표면에 말레이미드기를 도입하였다. 또 프로브 합성에 관해서는, 5' 말단에 티올기가 도입된 프로브를 합성해서 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)에 의해 정제하였다. DNA 마이크로어레이를 제작하기 위하여, 잉크젯 프린터(상품명: BJT-850, 캐논사 제품)의 개조형을 사용해서, 유리 기관 상에 각 프로브를 스폿(spot)하였다. 또한, 유리 기관의 크기는 25 mm×75 mm×1 mm(W×L×T)였다.

<70> IV. 하이브리다이제이션

<71> 상기 III에서 제작한 DNA 마이크로어레이와, 핵산 검체 샘플로서 상기 II에서 제작한 PCR 증폭산물을 이용해서, 마이크로어레이 상에서의 하이브리다이제이션을 행하였다.

<72> (1) DNA 마이크로어레이의 블로킹

<73> BSA(소혈청 알부민 분획 V: 시그마사 제품)를 농도 1 중량%로 되도록 100mM NaCl/10mM 인산 버퍼에 용해시켰다. 이 용액에 상기 II에서 제작한 DNA 마이크로어레이를 실온에서 2시간 침지하고, 유리 기판면의 블로킹을 실시하였다. 블로킹 종료 후, 0.1 중량% SDS(도데실황산 나트륨)를 함유하는 2×SSC 용액(NaCl 300 mM, 시트르산 나트륨(trisodium citrate dihydrate, 즉, C₆H₅Na₃·2H₂O) 30mM, pH 7.0)으로 세정을 실시하였다. 이어서, 순수 로 린스를 실시하였다. 그 후, 스핀-드라이어에서 DNA 마이크로어레이를 건조시켰다.

<74> (2) 하이브리다이제이션 용액의 조제

<75> PCR 증폭산물 용액 2 μl를 이용해서 이하에 부여된 최종 농도로 되도록, 하이브리다이제이션 용액을 조제하였다. 하이브리다이제이션 용액의 조성은 이하의 조성을 지녔다.

<76> 6×SSPE/10% 포름아마이드/PCR 증폭산물 용액

<77> (6×SSPE : NaCl 900 mM, NaH₂PO₄·H₂O 60 mM, EDTA 6 mM, pH 7.4)

<78> (3) 하이브리다이제이션

<79> 건조한 DNA 마이크로어레이를 하이브리다이제이션 장치(Genomic Solutions Inc. 제품, Hybridization Station)에 세트하고, 상기 조성을 지닌 하이브리다이제이션 용액을 이용해서, 이하의 절차 및 조건에 따라서 하이브리다이제이션 반응을 수행하였다.

<80> 이용된 하이브리다이제이션 조건 및 절차는 다음과 같았다:

<81> 상기 하이브리다이제이션 용액을 65℃로 가온해서 3분간 그 온도에서 유지한 뒤, 92℃에서 2분간, 이어서 50℃에서 4시간 유지하였다. 그 후, 0.1% SDS를 함유하는 2×SSC를 이용해서 40℃에서 세정을 행하였다. 또한, 2×SSC를 이용해서 25℃에서 세정을 실시하고, 필요에 따라서 통상의 메뉴얼에 따라 순수로 린스하고, 마지막으로 스핀-드라이어로 탈수를 실시하였다.

<82> (4) 형광 측정

<83> 하이브리다이제이션 반응 종료 후, 스핀-건조한 DNA 마이크로어레이에 대해서, DNA 마이크로어레이용 형광 스캐너(Axon사 제품, Genepix 4000 B)를 이용해서, 하이브리드체에 유래하는 형광 측정을 실시하였다. 각 프로브에 대해 얻어진 측정 결과는 하기 표 5에 표시되어 있다.

표 5

프로브 중	형광 휘도값(535nm에서의 상대치)
메이저 대립형질	530
마이너 대립형질	1800

<85> 휘도의 산출에 있어서는, DNA 마이크로어레이의, 프로브 DNA의 스폿이 없는 부분 상에서의 형광 강도를 배경값으로서 취하고, 각 스폿의 겉보기 형광 강도에서 배경값을 뺀 값을 측정된 형광 강도로 취하였다. 또, 측정은 2회 실시하고, 그 평균치를 여기에 나타내었다.

<86> 이 결과로부터, 제1대립 유전자와 제2대립 유전자의 하플로타입은 C/T(마이너/마이너)로 되도록 결정되었다. 또, 두 대립 유전자가 헤테로형이었으므로, 그 디플로타입은 G/G(메이저/메이저)인 것으로 결정되었다. 여기에서는, 헤테로형의 대립 유전자로 한정했지만, 제1대립 유전자의 두 대립형질에 대해서 개별적으로 특이적인 프라이머를 2세트 준비해서 별도로 하이브리다이제이션을 행해도 된다.

<87> 본 발명은 상기 실시형태로 한정되지 않고, 본 발명의 정신과 범위 내에서 각종 변형 및 변경이 행해질 수 있다. 따라서, 본 발명의 정신을 일반에 알리기 위하여, 이하의 청구의 범위를 작성하였다.

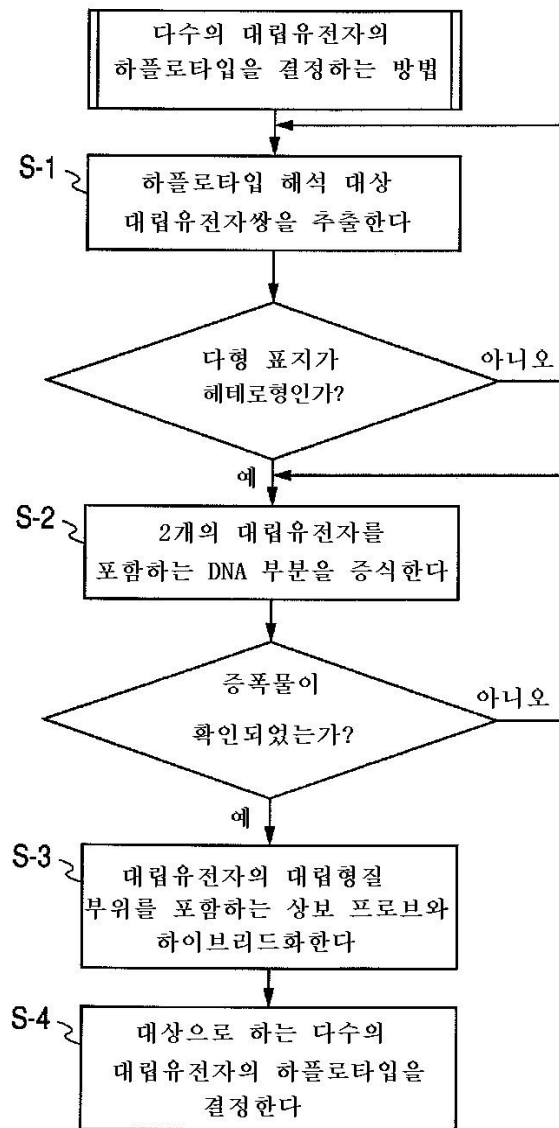
<88> 본 출원은 일본국 특허 출원 제2006-325951호(출원일: 2006년 12월 1일)의 우선권을 주장하며, 이 기초 출원은 참조로 그의 전문이 여기에 원용되어 있다.

도면의 간단한 설명

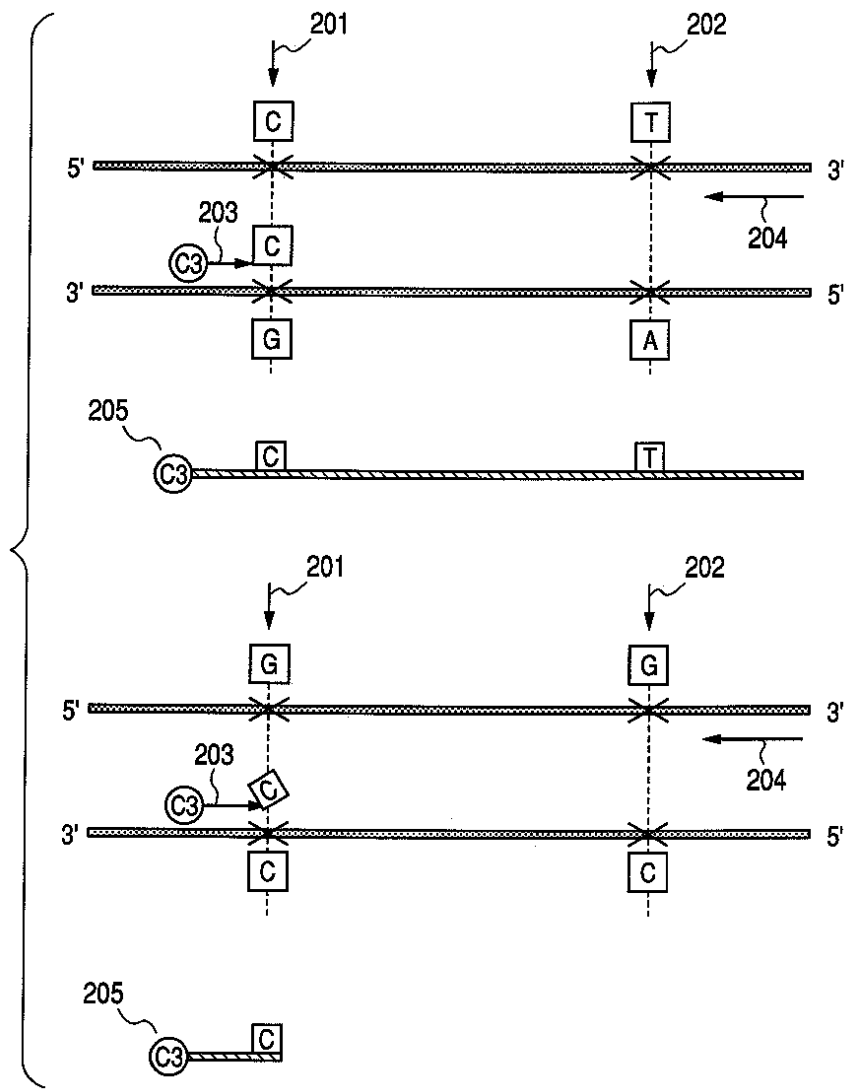
- <17> 도 1은 본 발명의 제1실시형태에 있어서의 2개의 대립 유전자의 하플로타입을 결정하는 순서도;
- <18> 도 2는 본 발명의 제1실시형태에 있어서의 2개의 대립 유전자의 배치를 나타낸 도면;
- <19> 도 3은 본 발명의 제1실시형태에 있어서의 특정 유전자 부위 추출을 위한 PCR 증폭에 이용되는 프로토콜을 나타낸 도면;
- <20> 도 4는 본 발명의 제1실시형태에 있어서의 PCR 증폭에 이용되는 프로토콜을 나타낸 도면;
- <21> 도 5는 본 발명의 제2실시형태에 있어서의 2개 이상의 다수의 대립 유전자의 배치를 나타낸 도면.

도면

도면1



도면2



도면3

94℃	1분
94℃	60초
66.5℃	30초
68℃	5분
68℃	7분
15℃	∞

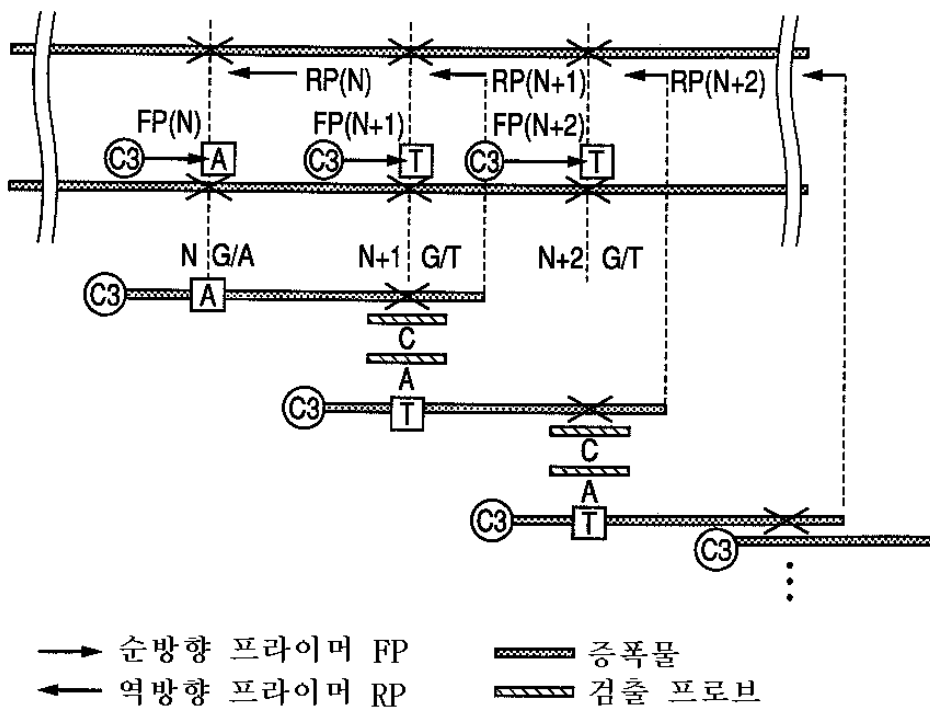
35 사이클

도면4

95℃	5분
95℃	30초
60℃	30초
72℃	30초
10℃	∞

35 사이클

도면5



서열 목록

- <110> CANON KABUSHIKI KAISHA
- <120> METHOD OF DETERMINING THE HAPLOTYPE OF MULTIPLE ALLELIC GENES

- <150> JP2006-325951
- <151> 2006-12-01

- <160> 7

- <170> Kopatent In 1.71

- <210> 1
- <211> 15

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 1
 agggcggcag aggtc 15

<210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 2
 ctactcttcc ttggccttt 19

<210> 3
 <211> 176
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 agggcggcag aggtcctgag gctcccctac cagaagcaaa catggatggt ggtgaaacc 60

acaggctgga ccagaagcca ggctgagaag gggaagcagg tttgggggac ttcttgaga 120

agggcattta tacatggcat gaaggactgg attttcaaaa ggccaaggaa gagtag 176

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Probe

<400> 4
tctccaggac gtccccaaa cc 22

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Probe

<400> 5
tctccaggaa gtccccaaa cc 22

<210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 6
gttatccag aaggctttgc aggcttc 27

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 7
gccgactgag ccctgggagg taggta 26