(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-525786
(P2005-525786A)
(43)公表日　平成17年9月2日(2005.9.2)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	C12Q	1/68	A	2G045
C12M 1/00	C12M	1/00	A	2G054
C12N 15/09	G01N	21/78	C	4B024
G01N 21/78	G01N	33/53	M	4B029
G01N 33/53	G01N	33/58	A	4B063

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 40 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-531143(P2003-531143)
(86)(22)出願日　平成14年9月27日(2002.9.27)
(85)翻訳文提出日　平成16年5月31日(2004.5.31)
(86)国際出願番号　PCT/US2002/030951
(87)国際公開番号　WO2003/027638
(87)国際公開日　平成15年4月3日(2003.4.3)
(31)優先権主張番号　60/325,853
(32)優先日　平成13年9月27日(2001.9.27)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　503409827
スペクトラル　ジェノミクス、インク.
アメリカ合衆国、テキサス州　７７０５４、ヒューストン、スイート　２２００、エヌ．スタジアム　ドライブ　８０８０
(74)代理人　100071010
弁理士　山崎　行造
(74)代理人　100104086
弁理士　岩橋　赳夫
(74)代理人　100121762
弁理士　杉山　直人
(74)代理人　100126767
弁理士　白銀　博
(74)代理人　100122839
弁理士　星　貴子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アレイを用いた遺伝子モザイクの検出方法

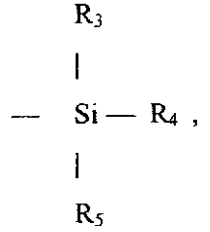
(57)【要約】
本発明は、生検または体液サンプルまたは癌細胞の培養物など細胞集団中の遺伝子モザイクを検出するアレイベースの方法を提供する。本発明はアレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）法の性能を最適化する方法も提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
アレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）を行うことにより細胞集団内の遺伝子モザイクを検出する方法であって、以下の工程を含む：
（ａ）複数個のクローンゲノム核酸断片を含んだアレイを提供する工程であって、各ゲノム核酸断片は基質表面上の公知の個別スポットに固定化され、実質的に完全な公知の核型第１のゲノムを含むアレイ及びクローンゲノム核酸断片を形成する；
（ｂ）第１のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第１の検出ラベルで標識された第１のゲノムの実質的に完全な相補体を含んだ複数のゲノム核酸断片を含む；
（ｃ）第２のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された複数のゲノム核酸を含み、該ゲノム核酸サンプルは細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含み、第２のサンプルの核型は公知であり工程（ｂ）の第１のサンプルの核型と異なる；
（ｄ）第３のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された未知の核型を有するゲノム核酸サンプルを含み、該ゲノム核酸は細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含む；
（ｅ）工程（ｃ）及び（ｄ）のサンプルの遷延照射（フラクション）（ｓｅｒｉａｌ ｄｉｌｕｔｉｏｎ ｆｒａｃｔｉｏｎｓ）を調製する工程；
（ｆ）工程（ｂ）のサンプルを別々に、工程（ｃ）の各サンプルの遷延フラクションと工程（ａ）のアレイと接触させる工程であって、サンプル中の核酸が該アレイに固定化された該ゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズする条件下で接触させる工程；
（ｇ）各遷延フラクションに関して、工程（ｆ）の接触後に各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各遷延フラクションの核型を決定する工程；
（ｈ）工程（ｂ）のサンプル及び工程（ｄ）のサンプルの遷延フラクションを工程（ａ）のアレイと接触させる工程であって、サンプル中の該核酸がアレイ上のゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズできる条件下で接触させる工程；
（ｉ）各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を工程（ｈ）の接触後に各遷延フラクション及に関して測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各遷延フラクションの核型を決定する工程；及び
（ｊ）工程（ｇ）の公知の核型に最も近い遷延フラクション核型決定を選択する工程及び工程（ｉ）と同じ遷延測定を選択し、工程（ｄ）のサンプルの核型を決定し、それにより細胞集団中の遺伝子モザイクの程度を決定する工程。
【請求項２】
細胞集団がヒト細胞を含む、請求項１の方法。
【請求項３】
細胞集団が染色体異常を有する疑いがある個体由来のものである、請求項１の方法。
【請求項４】
細胞集団が核型異常に関する病気または健康状態を有する疑いがある個体由来のものである、請求項１の方法。
【請求項５】
病気または健康状態が癌を含む、請求項１の方法。
【請求項６】
細胞集団が体液サンプルまたは組織サンプル由来である、請求項１の方法。
【請求項７】
体液または組織サンプルが癌細胞、腫瘍細胞サンプルを含む、請求項６の方法。
【請求項８】
細胞集団が生検サンプル由来である、請求項１の方法。
【請求項９】
細胞集団が血液サンプル由来である、請求項１の方法。

【請求項１０】
細胞集団が羊水サンプル由来である、請求項１の方法。
【請求項１１】
細胞集団が絨毛膜サンプル由来である、請求項１の方法。
【請求項１２】
細胞集団が胚細胞または胚組織サンプル由来である、請求項１の方法。
【請求項１３】
実質的に完全なゲノムが哺乳類ゲノムを含む、請求項１の方法。
【請求項１４】
哺乳類ゲノムがヒトゲノムを含む、請求項１の方法。
【請求項１５】
アレイ固定化ゲノム、第１のゲノム、第２のゲノム及び未知の核型ゲノムが同じ種由来のものである、請求項１の方法。
【請求項１６】
種が哺乳類である、請求項１の方法。
【請求項１７】
哺乳類がヒトである、請求項１６の方法。
【請求項１８】
クローン核酸断片が人工染色体を含む構築体内にクローンされる、請求項１の方法。
【請求項１９】
人工染色体が細菌性人工染色体（ＢＡＣ）を含む、請求項１８の方法。
【請求項２０】
人工染色体が、ヒト人工染色体（ＨＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）、形質転換（ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ－ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ）人工染色体（ＴＡＣ）及びバクテリオファージＰ１由来人工染色体（ＰＡＣ）からなる群より選択される、請求項１８の方法。
【請求項２１】
クローン核酸断片が、コスミドベクター、プラスミドベクター及びウイルスベクターからなる群より選択されるベクターを含む構築体内にクローンされる、請求項１８の方法。
【請求項２２】
クローン核酸断片が約５０キロ塩基（０．５メガ塩基）～約５００キロ塩基（５メガ塩基）長である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２３】
クローン核酸断片が約１００キロ塩基（１メガ塩基）～約４００キロ塩基（４メガ塩基）長である、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
クローン核酸断片が約３００キロ塩基（３メガ塩基）長である、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
第１のゲノムの核型が従来のＧバンド解析、ＦＩＳＨまたはＳＫＹにより決定される、請求項１に記載の方法。
【請求項２６】
第２のゲノムの核型が従来のＧバンド解析、ＦＩＳＨまたはＳＫＹにより決定される、請求項１に記載の方法。
【請求項２７】
アレイ固定化ゲノムの核型が公知である、請求項１に記載の方法。
【請求項２８】
検出ラベルが蛍光ラベルを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２９】
蛍光ラベルがＣｙ５（商標）またはその同等物を含む、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】

蛍光ラベルがＣｙ３（商標）またはその同等物を含む、請求項２８に記載の方法。
【請求項３１】
蛍光ラベルがローダミン、フルオレセインまたはアリール置換４，４－ジフルオロ－４－ボラ－３ａ，４ａ－ジアザ－ｓ－インドアセン染料または同等物を含む、請求項２８に記載の方法。
【請求項３２】
ゲノム核酸断片の標識がランダムプライム標識を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３３】
ゲノム核酸断片の標識がニックトランスレーション標識を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３４】
アレイ固定化ゲノムが野生型ゲノムを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３５】
第１のサンプルが野生型ゲノムを含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
第２のサンプルが癌細胞集団を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３７】
第２のサンプルがモザイク核型を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３８】
第２のサンプルが２以上の細胞集団を含むモザイク核型を含み、各小集団が異なる核型を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
第１のスポット内のアレイ固定化ゲノム核酸断片が第２のスポット内のアレイ固定化ゲノム核酸断片と比較して配列の重複がない、請求項１に記載の方法。
【請求項４０】
スポット内のアレイ固定化ゲノム核酸断片がアレイ上のその他全てのゲノム核酸含有スポットのアレイ固定化ゲノム核酸断片と比較して配列の重複がない、請求項３９に記載のアレイ。
【請求項４１】
各クローンゲノム核酸断片がアレイ上に重複してスポットされる、請求項１に記載のアレイ。
【請求項４２】
アレイ固定化ゲノム核酸の約９５％が検出ラベルを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４３】
アレイ固定化ゲノム核酸の約９８％が検出ラベルを含む、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
アレイ固定化ゲノム核酸の約１００％が検出ラベルを含む、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
アレイ固定化ゲノム核酸が第３の検出ラベルを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４６】
アレイ固定化ゲノム核酸が基質表面に共有結合する、請求項１に記載の方法。
【請求項４７】
請求項４６に記載のアレイであって、アレイ固定化ゲノム核酸が一般式：Ｒ１－Ｘ－Ｒ２を有する化合物に共有結合し、ここでＲ１は環状エーテル、アルデヒドまたはクロロメチルフェニル成分；ＸはＲ１部分とＲ２部分を結合するのに化学的に適した成分であり、Ｒ２部分は以下の一般式を有する

【化１】



ここで、Ｒ３、Ｒ４及びＲ５は同一または異なるアルコキシ基またはクロロ基を含む。

【請求項４８】

アレイ固定化ゲノム核酸が一般式：Ｒ１－Ｘ－Ｒ２を有する化合物に共有結合し、ここでＲ１はアミノ基、Ｒ２はアルコキシシラン基または塩化ハロゲン（ｃｈｌｏｒｏｈａｌｉｄｅ）基；及びＸはＲ１基とＲ２基を結合するのに化学的に適した成分である、請求項１に記載の方法。

【請求項４９】

アレイ固定化ゲノム核酸が一般式：R_1－Ｘ－Ｓｉ（OR_2）$_m$（Ｃｌ）$_n$（Ｒ）$_k$を有する化合物に共有結合し、ここで、ｍ＋ｋは整数の３であり、ｎはもしｍが０より大きい場合、０となることができ、またはｎ＋ｋは整数の３であり、ｍはもしｎが０より大きい場合、０となることがきる；Ｘは不活性リンカーであり；R_1は生体分子に反応性の基を含み；Ｒはアルキル基；及びR_2はアルキル基である、請求項１に記載の方法。

【請求項５０】

アレイがＳｐｅｃｔｒａｌＣｈｉｐ（商標）マウスＢＡＣアレイを含む、請求項１に記載の方法。

【請求項５１】

アレイがＳｐｅｃｔｒａｌＣｈｉｐ（商標）ヒトＢＡＣアレイを含む、請求項１に記載の方法。

【請求項５２】

連続希釈が２倍希釈である、請求項１に記載の方法。

【請求項５３】

連続希釈が１０倍希釈である、請求項５２に記載の方法。

【請求項５４】

基質表面上にスポットされた検出ラベルを測定できる装置の使用を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項５５】

該装置が電荷結合素子（ＣＣＤ）を含む、請求項５４に記載の方法。

【請求項５６】

該装置が多色蛍光イメージングができる、請求項５５に記載の方法。

【請求項５７】

多色蛍光イメージング・データを分析するためのコンピュータ・プロセッサの使用を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項５８】

さらにアレイからのイメージデータ及び核型分析のディスプレイ結果を解釈するためのコンピュータ及びコンピュータ・プログラムアルゴリズムの使用を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項５９】

アレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）を行うことにより癌細胞集団内の遺伝子モザイクの程度を検出する方法であって、以下の工程を含む：

（ａ）複数個のクローンゲノム核酸断片を含んだアレイを提供する工程であって、各ゲノム核酸断片は基質表面上の公知の個別スポットに固定化され、実質的に完全な公知の核型

第１のゲノムを含むアレイ及びクローンゲノム核酸断片を形成する；
（ｂ）第１のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第１の検出ラベルで標識された第１のゲノムの実質的に完全な相補体を含んだ複数のゲノム核酸断片を含む；
（ｃ）第２のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された複数のゲノム核酸を含み、該ゲノム核酸サンプルは細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含み、第２のサンプルの核型は公知であり工程（ｂ）の第１のサンプルの核型と異なる；
（ｄ）第３のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された未知の核型を有するゲノム核酸サンプルを含み、該ゲノム核酸は癌または腫瘍のゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含む；
（ｅ）工程（ｃ）及び（ｄ）のサンプルの遷延フラクション（ｓｅｒｉａｌ　ｄｉｌｕｔｉｏｎ　ｆｒａｃｔｉｏｎｓ）を調製する工程；
（ｆ）工程（ｂ）のサンプルを別々に、工程（ｃ）のサンプルの各遷延フラクションと工程（ａ）のアレイと接触させる工程であって、サンプル中の核酸が該アレイに固定化された該ゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズする条件下で接触させる工程；
（ｇ）各遷延フラクションに関して、工程（ｆ）の接触後に各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各遷延フラクションの核型を決定する工程；
（ｈ）工程（ｂ）のサンプル及び工程（ｄ）のサンプルの遷延フラクションを工程（ａ）のアレイと接触させる工程であって、サンプル中の該核酸がアレイ上のゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズできる条件下で接触させる工程；
（ｉ）各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を工程（ｈ）の接触後に各遷延フラクション及に関して測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各遷延フラクションの核型を決定する工程；及び
（ｊ）公知の核型に最も近い工程（ｇ）の希釈分留物核型決定を選択する工程及び工程（ｉ）と同じ遷延測定を選択し、工程（ｄ）のサンプルの核型を決定し、それにより癌細胞集団中の遺伝子モザイクの程度を決定する工程。
【請求項６０】
癌細胞集団が腫瘍由来サンプルを含む、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
アレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）を行うことにより細胞集団内の遺伝子モザイクを検出する方法であって、以下の工程を含む：
（ａ）複数個のクローンゲノム核酸断片を含んだアレイを提供する工程であって、各ゲノム核酸断片は基質表面上の公知の個別スポットに固定化され、実質的に完全な公知の核型第１のゲノムを含むアレイ及びクローンゲノム核酸断片を形成する；
（ｂ）第１のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第１の検出ラベルで標識された第１のゲノムの実質的に完全な相補体を含んだ複数のゲノム核酸断片を含む；
（ｃ）第２のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された複数のゲノム核酸を含み、該ゲノム核酸サンプルは細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含み、第２のサンプルの核型は公知であり工程（ｂ）の第１のサンプルの核型と異なる；
（ｄ）第３のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された未知の核型を有するゲノム核酸サンプルを含み、該ゲノム核酸は細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含む；
（ｅ）工程（ｃ）及び（ｄ）のサンプルの多分割照射（フラクション）（ｍｕｌｔｉｐｌｅ　ｆｒａｃｔｉｏｎｓ）を調製する工程；
（ｆ）様々な条件下で工程（ｂ）のサンプルを別々に、工程（ｃ）のサンプルのフラクションと工程（ａ）のアレイと接触させる工程；
（ｇ）各フラクションに関して、工程（ｆ）の接触後に各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション

により各フラクションの核型を決定する工程；
（ｈ）様々な条件下で工程（ｂ）のサンプル及び工程（ｄ）のサンプルの遷延フラクションを工程（ａ）のアレイと接触させる工程；
（ｉ）各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を工程（ｈ）の接触後に各フラクション及に関して測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各フラクションの核型を決定する工程；及び
（ｊ）工程（ｇ）の公知の核型に最も近いフラクション核型決定を選択する工程及び工程（ｉ）と同じ条件を選択し、工程（ｄ）のサンプルの核型を決定し、それにより細胞集団中の遺伝子モザイクの程度を決定する工程。
【請求項６２】
種々の条件が各フラクションのハイブリダイゼーション条件または洗浄条件において用いられる種々の温度を含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
種々の条件が各フラクションに用いるハイブリダイゼーション・バッファーまたは洗浄バッファーの種々の浸透圧を含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項６４】
種々の浸透圧が各フラクションに用いるハイブリダイゼーション・バッファーまたは洗浄バッファーの種々の塩濃度を含む、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
種々の条件がアレイに結合するサンプルの量を読み取る前または洗浄前に、各フラクションをアレイに接触させる種々の時間を含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項６６】
種々の条件が接触工程後かつアレイに結合したサンプル量の読み取り前に各フラクションの種々の洗浄時間を含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項６７】
種々の条件が各フラクションに用いられる核酸の種々の濃度を含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項６８】
種々の条件が各フラクションに用いられる種々の核酸サイズを含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項６９】
種々の浸透圧が各フラクションに用いるハイブリダイゼーション・バッファーまたは洗浄バッファーの種々の塩濃度を含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項７０】
種々の条件がハイブリダイゼーション条件または洗浄条件の種々の湿度を含む、請求項６１に記載の方法。
【請求項７１】
アレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）を行うことによりヒト細胞集団内の遺伝子モザイクを検出する方法であって、以下の工程を含む：
（ａ）複数個のクローンヒトゲノム核酸断片を含んだアレイを提供する工程であって、各ゲノム核酸断片は基質表面上の公知の個別スポットに固定化され、実質的に完全な公知の核型第１のヒトゲノムを含むアレイ及びクローンゲノム核酸断片を形成する；
（ｂ）第１のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第１の検出ラベルで標識された第１のヒトゲノムの実質的に完全な相補体を含んだ複数のゲノムヒト核酸断片を含む；
（ｃ）第２のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された複数のヒトゲノム核酸を含み、該ゲノム核酸サンプルは細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含み、第２のサンプルの核型は公知であり工程（ｂ）の第１のサンプルの核型と異なる；

（ｄ）第３のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された未知の核型を有する第２の検出ゲノムヒト核酸サンプルを含み、該ゲノム核酸は細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含む；（ｅ）工程（ｃ）及び（ｄ）のサンプルの遷延照射（フラクション）（ｓｅｒｉａｌ　ｄｉｌｕｔｉｏｎ　ｆｒａｃｔｉｏｎｓ）を調製する工程；
（ｆ）工程（ｂ）のサンプルを別々に、工程（ｃ）の各サンプルの遷延フラクションと工程（ａ）のアレイと接触させる工程であって、サンプル中の核酸が該アレイに固定化された該ゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズする条件下で接触させる工程；
（ｇ）各遷延フラクションに関して、工程（ｆ）の接触後に各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各遷延フラクションの核型を決定する工程；
（ｈ）工程（ｂ）のサンプル及び工程（ｄ）のサンプルの遷延フラクションを工程（ａ）のアレイと接触させる工程であって、サンプル中の該核酸がアレイ上のゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズできる条件下で接触させる工程；
（ｉ）各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を工程（ｈ）の接触後に各遷延フラクション及に関して測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各遷延フラクションの核型を決定する工程；及び
（ｊ）工程（ｇ）の公知の核型に最も近い遷延フラクション核型決定を選択する工程及び工程（ｉ）と同じ遷延測定を選択し、工程（ｄ）のサンプルの核型を決定し、それにより細胞集団中の遺伝子モザイクの程度を決定する工程。

【請求項７２】
アレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）の性能を最適化する方法であって、以下の工程を含む：
（ａ）複数個のクローンゲノム核酸断片を含んだアレイを提供する工程であって、各ゲノム核酸断片は基質表面上の公知の個別スポットに固定化され、実質的に完全な公知の核型第１のゲノムを含むアレイ及びクローンゲノム核酸断片を形成する；
（ｂ）第１のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第１の検出ラベルで標識された第１のゲノムの実質的に完全な相補体を含んだ複数のゲノム核酸断片を含む；
（ｃ）第２のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された複数のゲノム核酸を含み、該ゲノム核酸サンプルは細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含み、第２のサンプルの核型は公知であり工程（ｂ）の第１のサンプルの核型と異なる；
（ｄ）工程（ｃ）のサンプルの遷延照射（フラクション）（ｓｅｒｉａｌ　ｄｉｌｕｔｉｏｎ　ｆｒａｃｔｉｏｎｓ）を調製する工程；
（ｅ）工程（ｂ）のサンプルを別々に、工程（ｃ）の各サンプルの遷延フラクションと工程（ａ）のアレイと接触させる工程であって、サンプル中の核酸が該アレイに固定化された該ゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズする条件下で接触させる工程；
（ｆ）各遷延フラクションに関して、工程（ｅ）の接触後に各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各遷延フラクションの核型を決定する工程；
（ｈ）工程（ａ）及び工程（ｂ）のゲノムの公知の核型に最も近い工程（ｆ）の遷延フラクション核型決定を選択する工程、及び工程（ａ）で用いるアレイ上の類似種のゲノムＤＮＡを含む未知のサンプルの核型決定にそのフラクションを用いる工程。

【請求項７３】
種が哺乳類である、請求項７２に記載の方法。

【請求項７４】
哺乳類がヒトである、請求項７３に記載の方法。

【請求項７５】
アレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）の性能を最適化する方法であって、以下の工程を含む：（ａ）複数個のクローンゲノム核酸断

片を含んだアレイを提供する工程であって、各ゲノム核酸断片は基質表面上の公知の個別スポットに固定化され、実質的に完全な公知の核型第１のゲノムを含むアレイ及びクローンゲノム核酸断片を形成する；（ｂ）第１のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第１の検出ラベルで標識された第１のゲノムの実質的に完全な相補体を含んだ複数のゲノム核酸断片を含む；（ｃ）第２のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された複数のゲノム核酸を含み、該ゲノム核酸サンプルは細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含み、第２のサンプルの核型は公知であり工程（ｂ）の第１のサンプルの核型と異なる；（ｄ）工程（ｃ）のサンプルのフラクションを調製する工程；（ｅ）種々の条件下で工程（ｂ）のサンプルを別々に、工程（ｃ）の各サンプルのフラクションと工程（ａ）のアレイと接触させる工程；（ｆ）各希釈フラクション（ｄｉｌｕｔｉｏｎ　ｆｒａｃｔｉｏｎ）に関して、工程（ｅ）の接触後に各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各希釈フラクションの核型を決定する工程；（ｇ）工程（ａ）及び工程（ｂ）のゲノムの公知の核型に最も近い工程（ｆ）のフラクション核型決定を選択する工程、及び工程（ａ）で用いるアレイ上の類似種のゲノムＤＮＡを含む未知のサンプルの核型決定に条件を用いる工程。

【請求項７６】

フラクションが等しい量の核酸を含む、請求項７５に記載の方法。

【請求項７７】

種々の条件が各フラクションのハイブリダイゼーション条件または洗浄条件において用いる種々の温度を含む、請求項７５に記載の方法。

【請求項７８】

種々の条件が各フラクションに用いるハイブリダイゼーション・バッファーまたは洗浄バッファーの種々の浸透圧を含む、請求項７５に記載の方法。

【請求項７９】

種々の浸透圧が各フラクションに用いるハイブリダイゼーション・バッファーまたは洗浄バッファーの種々の塩濃度を含む、請求項７８に記載の方法。

【請求項８０】

種々の条件がアレイに結合するサンプルの量を読み取る前または洗浄前に、各フラクションをアレイに接触させる種々の時間を含む、請求項７５に記載の方法。

【請求項８１】

種々の条件が接触工程後かつアレイに結合したサンプル量の読み取り前に各フラクションを洗浄する種々の時間を含む、請求項７５に記載の方法。

【請求項８２】

種々の条件が各フラクションに用いる種々の核酸濃度を含む、請求項７５に記載の方法。

【請求項８３】

種々の条件が各フラクションに用いる種々の核酸サイズを含む、請求項７５に記載の方法。

【請求項８４】

種々の浸透圧が各フラクションに用いるハイブリダイゼーション・バッファーまたは洗浄バッファーの種々の塩濃度を含む、請求項７５に記載の方法。

【請求項８５】

種々の条件がハイブリダイゼーション条件または洗浄条件の種々の湿度を含む、請求項７５に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【０００１】

技術分野

本発明は分子生物学、遺伝診断学及びアレイまたは“バイオチップ”技術に関するものである。特に、本発明は生検サンプルや癌細胞培養物などの細胞集団における遺伝子モザ

イクの検出方法を提供する。また、本発明はアレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）法の性能を最適化する方法も提供する。

【０００２】

背景技術

ゲノムＤＮＡマイクロアレイに基づくコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）法は、個々の分裂中期染色体についての比較ハイブリダイゼーションにに依存する、従来のＣＧＨ法の多くの制限を解決する可能性を有する。分裂中期ＣＨＧにおいて、種々のサンプルのゲノムＤＮＡのメガ塩基対断片（例えば、公知の通常対比試験、例えば、可能性のある腫瘍）は固定染色体に標識及びハイブリダイズされる（例えば、Ｂｒｅｅｎ（１９９９）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（遺伝学）　３６：５１１－５１７；Ｒｉｃｅ（２０００）Ｐｅｄｉａｔｒｉｃ　Ｈｅｍａｔｏｌ（小児血液学）．Ｏｎｃｏｌ．１７：１４１－１４７を参照）。公知及び試験サンプル間のシグナルの違いを検出及び測定する。このように、“通常”と比較した試験サンプル内の欠落、増幅したまたは固有の配列が試験ゲノムＤＮＡに対する通常対照の蛍光比により検出できる。分裂中期ＣＨＧにおいて、（固定染色体上の）標的部位は溶性、標識ゲノムＤＮＡの過剰量により満たされる。

【０００３】

分裂中期ＣＨＧと対照的に、固定化ゲノムＤＮＡが分裂中期拡散している場合、アレイ－ベースのＣＧＨはバイオチップまたはマイクロアレイ・プラットフォーム上のアレイとして配置した固定化核酸を用いる。いわゆるアレイまたはチップＣＧＨ法は、単一で、タイムリーな、費用効率のよい、慎重な手順でゲノム全体にわたるＤＮＡ配列コピー数情報を提供することができ、その分解はアレイ内のＤＮＡ要素の数、大きさ及び地図位置に主に依存する。一般に、平均約１５０キロ塩基（ｋｂ）のクローンゲノムＤＮＡに各々適合できる、細菌性人工染色体またはＢＡＣはアレイの生成において使用される。

【０００４】

アレイＣＧＨ法の原理は簡単である。試験サンプル及び参考サンプル（例えば、染色体異常のないことが公知の細胞由来サンプル）の細胞由来の全ゲノムＤＮＡの衡平量を異なる条件で蛍光染料で標識し、該細胞ゲノムを集合的にカバーするクローンゲノムＤＮＡ断片を含むＢＡＣのアレイにコハイブリダイズする。最終的なコハイブリダイゼーションは蛍光的に標識されたアレイを生成し、その着色は試験及び参考ゲノムＤＮＡ内の配列の対比ハイブリダイゼーションをアレイＢＡＣ内の相同配列に反映する。理論上、ゲノムＤＮＡの試験及び参考サンプルの相同配列のコピー数比率は、アレイ内の個別ＢＡＣでのそれぞれの蛍光シグナル強度に正比例すべきである。該方法の多能性は、羊膜サンプル、絨毛膜サンプル（ＣＶＳ）、血液サンプル及び組織生検などの臨床細胞遺伝学サンプルにおけるＤＮＡコピー数の構成上の多様性並びに発癌性変質細胞において、例えば骨髄、血液または固形癌サンプルなど体細胞で獲得される変化の両方の検出を可能にする。

【０００５】

マイクロアレイゲノムプロファイリングは遺伝子テストにおいて革新的な発展を表す一方、特定の制限が残る。このことは遺伝子モザイクを検出するためのマイクロアレイゲノムプロファイリングの能力において特に当てはまるものである。遺伝子モザイクはサンプルまたは細胞の参照母集団内の染色体上明確な２以上の細胞株または細胞系統の存在として定義できる。例えば、固形癌（“サンプル”）の遺伝子構造は５０％　４７、ＸＸＸ及び５０％　４５、Ｘ、－Ｘ細胞となることができる。細胞集団中の遺伝子モザイクの存在または程度の正確な測定は病状（例えば癌）または健康状態（例えば遺伝染色体異常）の原因を測定するのに役立ち、または病状または健康状態のより正確な診断または予後診断を発展させるのに役立つ。

【０００６】

遺伝子モザイクは、個々の細胞の染色体を解析する、従来のＧバンド染色体解析によりごく普通に検出される。しかし核型分析の従来の遺伝学的手法と異なり、それはマイクロアレイゲノムプロファイリングで分析するサンプル由来の個々の細胞の染色体ではなく、

むしろ該サンプルの細胞から抽出される全ゲノムＤＮＡのＤＮＡ配列コピー数である。従ってＤＮＡコピー数の観点から、上記腫瘍のゲノムプロファイルは４６、ＸＸ細胞の参考集団から抽出した全ゲノムＤＮＡと違いはない。ゆえに、この腫瘍サンプルの遺伝子モザイクはマイクロアレイゲノムプロファイリングにより検出されない。

【０００７】

上述の例は、仮説ではあるが、マイクロアレイゲノムプロファイリングの遺伝子モザイク検出における潜在的な制限を説明するものである。それにもかかわらず、実際に、臨床サンプルで観測される遺伝子モザイクは、混合された遺伝子プロファイルがモザイク集団の存在を完全に隠す細胞集団をごくたまにしか必要としないようである。その代わり、マイクロアレイゲノムプロファイリングへの課題はより優勢な背景（ｂａｃｋｇｒｏｕｎｄ）細胞集団内でクローン性の明確な細胞集団を検出できる敏感性から来る。従来のマイクロアレイゲノムプロファイリングは構成上の遺伝子構造が複雑である、例えば４７、ＸＹ、＋２１［７］／４６、ＸＹ［１３］など患者由来の全ゲノムＤＮＡ内の遺伝子モザイクを検出しなかった。

【０００８】

潜在性モザイクの程度は臨床サンプル源に相関し得る。例えば、胎内及び非癌サンプルで観測されるモザイクの程度及び複雑性は通常、多くの腫瘍性変質細胞で観測されるほど目立ったものであることはまれである。非癌サンプルに適用するモザイクは通常、受精後、有糸分裂で染色体の不正確な分離を生じる。モザイクの程度は異常有糸分裂が起こる発達ステージに依存する。例えば、異常有糸分裂が受精卵の分割に関連した場合、モザイクのレベルまたは染色体上明確な構造を持つ細胞の割合は全組織でない場合５０％程度であることがほとんである。もしくは、３つの一次細胞型、外胚葉、中胚葉及び内胚葉の発達後、異常分離が起こった場合、異常細胞の存在は一次細胞型のいずれか由来の組織に対してのみ、またはさらに体の単一の臓器に対しても制限され得る。従って、ゲノムプロファイリングの観点から、非癌サンプルにおけるモザイクの検出は２つの主要因に依存し、すなわち、モザイク細胞を有する組織から抽出したゲノムＤＮＡ及び第二に組織サンプル内のモザイクレベルが何であるかに依存する。

【０００９】

非癌サンプル内で観測されるモザイクとは対照的に、多くの固形癌及びその他の腫瘍性変質細胞集団において観測されるモザイクは通常、細胞の進行性クローン性分化を生じる。最終的なモザイクは通常、非癌サンプルで見られるものよりはるかに複雑である。実際の実施例は該問題を明確にするのに役立つものである。細胞の新生集団を従来のＧバンド解析を行うことにより得られた以下の核型を考慮されたい。

【００１０】

４６，ＸＸ，ｄｅｌ（５）（ｑ１３）［７］／４７，ＸＸ，ｄｅｌ（５）（ｑ１３），＋８［９］／４８，ＸＸ，ｄｅｌ（５）（ｑ１３），＋８，＋９［９］。

【００１１】

以下はこの核型から推察したものである：染色体解析はこの新生細胞集団由来の２５細胞の全部について行った（［］かっこ内の数の総和、すなわち、７＋９＋９）。この解析から、染色体５のｑ１３バンドの欠失は初期の新生事象に関連したことを測定できる。しかしながら、この新生事象は継続するので、第２のクローンが染色体８（“＋８”で設計）の利得を得て発達し、次いでこの後のクローンからその他のものが染色体９の利得を得る（“＋８、＋９”で設計）ようである。従って、これらの細胞から抽出された１００％の全ゲノムＤＮＡは５ｑ１３の欠失を含む一方、染色体８の三染色体（トリソミー）は７２％（（９＋９）／２５）であり、染色体９８の三染色体は３６％（９／２５）だけである。ゆえに、この例において、品質管理の観点より、マイクロアレイゲノムプロファイリングの課題は、三染色体事象（ｔｒｉｓｏｍｉｃ　ｅｖｅｎｔ）をもし全ゲノムＤＮＡの３６％またはＤＮＡの７２％でのみ起こる場合、検出できるかどうかである。

【００１２】

概要

本発明は、アレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）を行うことにより細胞集団内の遺伝子モザイクを検出する方法を提供するものであり、以下の工程を含む：（ａ）複数個のクローンゲノム核酸断片を含んだアレイを提供する工程であって、各ゲノム核酸断片は基質表面上の公知の個別スポットに固定化され、実質的に完全な公知の核型第１のゲノムを含むアレイ及びクローンゲノム核酸断片を形成する；（ｂ）第１のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第１の検出ラベルで標識された第１のゲノムの実質的に完全な相補体を含んだ複数のゲノム核酸断片を含む；（ｃ）第２のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された複数のゲノム核酸を含み、該ゲノム核酸サンプルは細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含み、第２のサンプルの核型は公知であり工程（ｂ）の第１のサンプルの核型と異なる；（ｄ）第３のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された未知の核型を有するゲノム核酸サンプルを含み、該ゲノム核酸は細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含む；（ｅ）工程（ｃ）及び（ｄ）のサンプルの遷延照射（フラクション）（ｓｅｒｉａｌ　ｄｉｌｕｔｉｏｎ　ｆｒａｃｔｉｏｎｓ）を調製する工程；（ｆ）工程（ｂ）のサンプルを別々に、工程（ｃ）の各サンプルの遷延フラクションと工程（ａ）のアレイと接触させる工程であって、サンプル中の核酸が該アレイに固定化された該ゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズする条件下で接触させる工程；（ｇ）各遷延フラクションに関して、工程（ｆ）の接触後に各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各遷延フラクションの核型を決定する工程；（ｈ）工程（ｂ）のサンプル及び工程（ｄ）のサンプルの遷延フラクションを工程（ａ）のアレイと接触させる工程であって、サンプル中の該核酸がアレイ上のゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズできる条件下で接触させる工程；（ｉ）各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を工程（ｈ）の接触後に各遷延フラクション及に関して測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各遷延フラクションの核型を決定する工程；及び（ｊ）工程（ｇ）の公知の核型に最も近い遷延フラクション核型決定を選択する工程及び工程（ｉ）と同じ遷延測定を選択し、工程（ｄ）のサンプルの核型を決定し、それにより細胞集団中の遺伝子モザイクの程度を決定する工程。

【００１３】

細胞集団はいかなる細胞型も含むことができ、例えばヒト細胞などの哺乳類細胞である。１の側面において、細胞集団は染色体異常を有する染色体異常を有する疑いがある個体由来のものである。１の側面において、細胞集団は核型異常に関する病気または健康状態を有する疑いがある個体由来のものである。病気または健康状態はいかなる種類の癌も含み、良性または悪性腫瘍または過形成増殖（ｈｙｐｅｒｐｌａｓｔｉｃ　ｇｒｏｗｔｈ）などを含む。

【００１４】

１の側面において、細胞集団は体液サンプルまたは組織サンプル由来である。体液または組織サンプルは癌細胞、腫瘍細胞または増殖性組織細胞サンプルを含み得る。細胞集団は生検サンプル、血液サンプル、絨毛膜サンプル、胚細胞または胚組織サンプル、臍帯血サンプル等由来であってもよい。

【００１５】

１の側面において、実質的に完全なゲノムはヒトゲノムなどの哺乳類ゲノムを含む。１の側面において、アレイ固定化ゲノム、第１のゲノム、第２のゲノム及び未知の核型ゲノムは同じ種由来のものである。種はヒトなどの哺乳類である。

【００１６】

１の側面において、本方法で用いるクローン核酸断片は、細菌性人工染色体（ＢＡＣ）、ヒト人工染色体（ＨＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）、形質転換（ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ－ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ）人工染色体及びバクテリオファージＰ１由来人工染色体（ＰＡＣ）などの人工染色体を含む構築体内にクローンする。クローン核酸断片はコスミドベクター、プラスミドベクター及びウイルスベクターからなる群より選択されるベ

クターを含む構築体内にクローンできる。

【００１７】

１の側面において、クローン核酸断片は約５０キロ塩基（０．５メガ塩基）～約５００キロ塩基（５メガ塩基）長である。クローン核酸断片は約１００キロ塩基（１メガ塩基）～約４００キロ塩基（４メガ塩基）長であってもよい。クローン核酸断片は約３００キロ塩基（３メガ塩基）長であってもよい。

【００１８】

１の側面において、第１のゲノムの核型は従来のＧバンド解析、ＦＩＳＨまたはＳＫＹまたはこれらの組み合わせによって決定する。従って、１の側面において、アレイ固定化ゲノムの核型は公知である。

【００１９】

１の側面において、検出ラベルはＣｙ５（商標）または同等物、Ｃｙ３（商標）または同等物、ローダミン、フルオレセインまたはアリール置換４，４－ジフルオロ－４－ボラ－３ａ，４ａ－ジアザ－ｓ－インドアセン染料または同等物などの蛍光ラベルを含む。

【００２０】

別の側面において、ゲノム核酸断片の標識化はランダムプライム標識、ニックトランスレーション標識、増幅標識結合またはこれらの組み合わせを含む。

【００２１】

１の側面において、アレイ固定化ゲノムは野生型核型を含み、すなわち野生型ゲノム（“通常ゲノム”または“通常核型”ということもある）である。また、第１のサンプルは野生型核型（野生型または通常ゲノム）を含む。

【００２２】

１の側面において、第２のサンプルは癌細胞集団を含み、該細胞集団はモザイク核型を含む集団であってもよい。第２のサンプルは２以上の細胞小集団を含むモザイク核型を含んでもよく、各小集団は異なる核型を含む。

【００２３】

１の側面において、第１のスポット内のアレイ固定化ゲノム核酸断片は第２のスポット内のアレイ固定化ゲノム核酸断片と比較して配列の重複がない。１のスポット内のアレイ固定化ゲノム核酸断片はアレイ上のその他全てのゲノム核酸含有スポットのアレイ固定化ゲノム核酸断片と比較して配列の重複がない。１の側面において、各クローンゲノム核酸断片はアレイ上に重複してスポットされる。

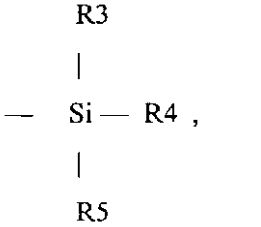
【００２４】

１の側面において、約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％または１００％のアレイ固定化ゲノム核酸は検出ラベルを含む。アレイ固定化ゲノム核酸は第３の検出ラベルを含んでもよい。

【００２５】

１の側面において、アレイ固定化ゲノム核酸は基質表面に共有結合する。アレイ固定化ゲノム核酸は以下の一般式を有する化合物に共有結合する：Ｒ１－Ｘ－Ｒ２、ここでＲ１は環状エーテル、アルデヒドまたはクロロメチルフェニル成分であり；ＸはＲ１部分とＲ２部分を結合するのに化学的に適した成分であり、Ｒ２部分は以下の一般式を有する。

【化１】



ここで、Ｒ３、Ｒ４及びＲ５は同一または異なるアルコキシ基またはクロロ基を含む。

【００２６】

１の側面において、アレイ固定化ゲノム核酸は以下の一般式を有する化合物に共有結合する：Ｒ１－Ｘ－Ｒ２、ここでＲ１はアミノ基、Ｒ２はアルコキシシラン基または塩化ハロゲン（ｃｈｌｏｒｏｈａｌｉｄｅ）基であり；及びＸはＲ１基とＲ２基を結合するのに化学的に適した成分である。アレイ固定化ゲノム核酸は以下の一般式を有する化合物に共有結合できる。

【００２７】

$R_1-X-Si(OR_2)m(Cl)_n(R)_k$

ここで、ｍ＋ｋは整数の３であり、ｎはもしｍが０より大きい場合、０であってもよく、またはｎ＋ｋは整数の３であり、ｍはもしｎが０より大きい場合、０であってもよい；Ｘは不活性リンカーであり；R_1は生体分子に反応性を有する基を含み；Ｒはアルキル基；及びR_2はアルキル基である。

【００２８】

１の側面において、アレイはＳｐｅｃｔｒａｌＣｈｉｐ（商標）マウスＢＡＣアレイまたはＳｐｅｃｔｒａｌＣｈｉｐ（商標）ヒトＢＡＣアレイを含む。

【００２９】

別の側面において、連続希釈は２倍希釈、３倍希釈、４倍希釈、５倍希釈、６倍希釈、７倍希釈、８倍希釈、９倍希釈または１０倍希釈である。

【００３０】

本方法はさらに基質表面上にスポットされた検出ラベルを測定できる装置の使用を含む。該装置は電荷結合素子（ＣＣＤ）を含む。該装置は多色蛍光イメージングができるものであってもよい。本方法はさらに多色蛍光イメージング・データを分析するためのコンピュータ・プロセッサ及び／またはコンピュータ実行分析法の使用を含む。本方法はさらにアレイからのイメージデータ及び核型分析のディスプレイ結果を解釈するためのコンピュータ及びコンピュータ・プログラムアルゴリズムの使用を含んでもよい。

【００３１】

本発明はアレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）を行うことにより癌細胞集団内の遺伝子モザイクの程度を検出する方法を含み、以下の工程を含む：（ａ）複数個のクローンゲノム核酸断片を含んだアレイを提供する工程であって、各ゲノム核酸断片は基質表面上の公知の個別スポットに固定化され、実質的に完全な公知の核型第１のゲノムを含むアレイ及びクローンゲノム核酸断片を形成する；（ｂ）第１のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第１の検出ラベルで標識された第１のゲノムの実質的に完全な相補体を含んだ複数のゲノム核酸断片を含む；（ｃ）第２のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された複数のゲノム核酸を含み、該ゲノム核酸サンプルは細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含み、第２のサンプルの核型は公知であり工程（ｂ）の第１のサンプルの核型と異なる；（ｄ）第３のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された未知の核型を有するゲノム核酸サンプルを含み、該ゲノム核酸は癌または腫瘍のゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含む；（ｅ）工程（ｃ）及び（ｄ）のサンプルの遷延フラクション（ｓｅｒｉａｌ ｄｉｌｕｔｉｏｎ ｆｒａｃｔｉｏｎｓ）を調製する工程；（ｆ）工程（ｂ）のサンプルを別々に、工程（ｃ）のサンプルの各遷延フラクションと工程（ａ）のアレイと接触させる工程であって、サンプル中の核酸が該アレイに固定化された該ゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズする条件下で接触させる工程；（ｇ）各遷延フラクションに関して、工程（ｆ）の接触後に各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各遷延フラクションの核型を決定する工程；（ｈ）工程（ｂ）のサンプル及び工程（ｄ）のサンプルの遷延フラクションを工程（ａ）のアレイと接触させる工程であって、サンプル中の該核酸がアレイ上のゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズできる条件下で接触させる工程；（ｉ）各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を工程（ｈ）の接触後に各遷延フラクション及に関して測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各遷延フラクションの核型を決定する工程

；及び（ｊ）公知の核型に最も近い工程（ｇ）の希釈分留物核型決定を選択する工程及び工程（ｉ）と同じ遷延測定を選択し、工程（ｄ）のサンプルの核型を決定し、それにより癌細胞集団中の遺伝子モザイクの程度を決定する工程。別の側面において、癌細胞集団は腫瘍由来サンプルを含み、良性または悪性腫瘍及び過形成細胞増殖などを含む。

【００３２】

本発明はアレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションを行うことにより細胞集団内の遺伝子モザイクを検出する方法を提供するものであり、以下の工程を含む：（ａ）複数個のクローンゲノム核酸断片を含んだアレイを提供する工程であって、各ゲノム核酸断片は基質表面上の公知の個別スポットに固定化され、実質的に完全な公知の核型第１のゲノムを含むアレイ及びクローンゲノム核酸断片を形成する；（ｂ）第１のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第１の検出ラベルで標識された第１のゲノムの実質的に完全な相補体を含んだ複数のゲノム核酸断片を含む；（ｃ）第２のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された複数のゲノム核酸を含み、該ゲノム核酸サンプルは細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含み、第２のサンプルの核型は公知であり工程（ｂ）の第１のサンプルの核型と異なる；（ｄ）第３のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された未知の核型を有するゲノム核酸サンプルを含み、該ゲノム核酸は細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含む；（ｅ）工程（ｃ）及び（ｄ）のサンプルの多分割照射（フラクション）（ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｆｒａｃｔｉｏｎｓ）を調製する工程；（ｆ）様々な条件下で工程（ｂ）のサンプルを別々に、工程（ｃ）のサンプルのフラクションと工程（ａ）のアレイと接触させる工程；（ｇ）各フラクションに関して、工程（ｆ）の接触後に各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各フラクションの核型を決定する工程；（ｈ）様々な条件下で工程（ｂ）のサンプル及び工程（ｄ）のサンプルの遷延フラクションを工程（ａ）のアレイと接触させる工程；（ｉ）各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を工程（ｈ）の接触後に各フラクション及に関して測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各フラクションの核型を決定する工程；及び（ｊ）工程（ｇ）の公知の核型に最も近いフラクション核型決定を選択する工程及び工程（ｉ）と同じ条件を選択し、工程（ｄ）のサンプルの核型を決定し、それにより細胞集団中の遺伝子モザイクの程度を決定する工程。

【００３３】

別の側面において、種々の条件として各フラクションのハイブリダイゼーション条件または洗浄条件において用いる種々の温度を含む。種々の条件は各フラクションに用いるハイブリダイゼーション・バッファーまたは洗浄バッファーの種々の浸透圧を含むことができる。種々の浸透圧は各フラクションに用いるハイブリダイゼーション・バッファーまたは洗浄バッファーの種々の塩濃度を含むことができる。種々の条件はアレイに結合するサンプルの量を読み取る前または洗浄前に、各フラクションをアレイに接触させる種々の時間を含むことができる。種々の条件は接触工程後かつアレイに結合したサンプル量の読み取り前に各フラクションの種々の洗浄時間を含むことができる。種々の条件は各フラクションに用いられる核酸の種々の濃度を含むことができる。種々の条件は各フラクションに用いられる種々の核酸サイズを含むことができる。種々の浸透圧は各フラクションに用いるハイブリダイゼーション・バッファーまたは洗浄バッファーの種々の塩濃度を含むことができる。種々の条件はハイブリダイゼーション条件または洗浄条件の種々の湿度を含むことができる。

【００３４】

本発明はアレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）を行うことによりヒト細胞集団内の遺伝子モザイクを検出する方法を提供し、以下の工程を含む：（ａ）複数個のクローンヒトゲノム核酸断片を含んだアレイを提供する工程であって、各ゲノム核酸断片は基質表面上の公知の個別スポットに固定化され、実質的に完全な公知の核型第１のヒトゲノムを含むアレイ及びクローンゲノム核酸断片を形成す

る；（ｂ）第１のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第１の検出ラベルで標識された第１のヒトゲノムの実質的に完全な相補体を含んだ複数のゲノムヒト核酸断片を含む；（ｃ）第２のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された複数のヒトゲノム核酸を含み、該ゲノム核酸サンプルは細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含み、第２のサンプルの核型は公知であり工程（ｂ）の第１のサンプルの核型と異なる；（ｄ）第３のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された未知の核型を有する第２の検出ゲノムヒト核酸サンプルを含み、該ゲノム核酸は細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含む；（ｅ）工程（ｃ）及び（ｄ）のサンプルの遷延照射（フラクション）（ｓｅｒｉａｌ　ｄｉｌｕｔｉｏｎ　ｆｒａｃｔｉｏｎｓ）を調製する工程；（ｆ）工程（ｂ）のサンプルを別々に、工程（ｃ）の各サンプルの遷延フラクションと工程（ａ）のアレイと接触させる工程であって、サンプル中の核酸が該アレイに固定化された該ゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズする条件下で接触させる工程；（ｇ）各遷延フラクションに関して、工程（ｆ）の接触後に各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各遷延フラクションの核型を決定する工程；（ｈ）工程（ｂ）のサンプル及び工程（ｄ）のサンプルの遷延フラクションを工程（ａ）のアレイと接触させる工程であって、サンプル中の該核酸がアレイ上のゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズできる条件下で接触させる工程；（ｉ）各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を工程（ｈ）の接触後に各遷延フラクション及に関して測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各遷延フラクションの核型を決定する工程；及び（ｊ）工程（ｇ）の公知の核型に最も近い遷延フラクション核型決定を選択する工程及び工程（ｉ）と同じ遷延測定を選択し、工程（ｄ）のサンプルの核型を決定し、それにより細胞集団中の遺伝子モザイクの程度を決定する工程。

【００３５】

本発明はアレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）の性能を最適化する方法を提供し、以下の工程を含む：（ａ）複数個のクローンゲノム核酸断片を含んだアレイを提供する工程であって、各ゲノム核酸断片は基質表面上の公知の個別スポットに固定化され、実質的に完全な公知の核型第１のゲノムを含むアレイ及びクローンゲノム核酸断片を形成する；（ｂ）第１のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第１の検出ラベルで標識された第１のゲノムの実質的に完全な相補体を含んだ複数のゲノム核酸断片を含む；（ｃ）第２のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された複数のゲノム核酸を含み、該ゲノム核酸サンプルは細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含み、第２のサンプルの核型は公知であり工程（ｂ）の第１のサンプルの核型と異なる；（ｄ）工程（ｃ）のサンプルの遷延照射（フラクション）（ｓｅｒｉａｌ　ｄｉｌｕｔｉｏｎ　ｆｒａｃｔｉｏｎｓ）を調製する工程；（ｅ）工程（ｂ）のサンプルを別々に、工程（ｃ）の各サンプルの遷延フラクションと工程（ａ）のアレイと接触させる工程であって、サンプル中の核酸が該アレイに固定化された該ゲノム核酸断片に特異的にハイブリダイズする条件下で接触させる工程；（ｆ）各遷延フラクションに関して、工程（ｅ）の接触後に各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各遷延フラクションの核型を決定する工程；（ｈ）工程（ａ）及び工程（ｂ）のゲノムの公知の核型に最も近い工程（ｆ）の遷延フラクション核型決定を選択する工程、及び工程（ａ）で用いるアレイ上の類似種のゲノムＤＮＡを含む未知のサンプルの核型決定にそのフラクションを用いる工程。１の側面において、該種はヒトなどの哺乳類である。

【００３６】

本発明はアレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）の性能を最適化する方法を提供し、以下の工程を含む：（ａ）複数個のクローンゲノム核酸断片を含んだアレイを提供する工程であって、各ゲノム核酸断片は基質表面上の

公知の個別スポットに固定化され、実質的に完全な公知の核型第１のゲノムを含むアレイ及びクローンゲノム核酸断片を形成する；（ｂ）第１のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第１の検出ラベルで標識された第１のゲノムの実質的に完全な相補体を含んだ複数のゲノム核酸断片を含む；（ｃ）第２のサンプルを提供する工程であって、該サンプルは第２の検出ラベルで標識された複数のゲノム核酸を含み、該ゲノム核酸サンプルは細胞または組織サンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含み、第２のサンプルの核型は公知であり工程（ｂ）の第１のサンプルの核型と異なる；（ｄ）工程（ｃ）のサンプルのフラクションを調製する工程；（ｅ）種々の条件下で工程（ｂ）のサンプルを別々に、工程（ｃ）の各サンプルのフラクションと工程（ａ）のアレイと接触させる工程；（ｆ）各希釈フラクション（ｄｉｌｕｔｉｏｎ　ｆｒａｃｔｉｏｎ）に関して、工程（ｅ）の接触後に各スポット上の第１及び第２の蛍光ラベルの量を測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各希釈フラクションの核型を決定する工程；（ｇ）工程（ａ）及び工程（ｂ）のゲノムの公知の核型に最も近い工程（ｆ）のフラクション核型決定を選択する工程、及び工程（ａ）で用いるアレイ上の類似種のゲノムＤＮＡを含む未知のサンプルの核型決定に条件を用いる工程。１の側面において、該フラクションは等しい量の核酸を含む。

【００３７】

別の側面において、種々の条件は各フラクションのハイブリダイゼーション条件または洗浄条件において用いる種々の温度を含む。種々の条件は各フラクションに用いるハイブリダイゼーション・バッファーまたは洗浄バッファーの種々の浸透圧を含むことができる。種々の浸透圧は各フラクションに用いるハイブリダイゼーション・バッファーまたは洗浄バッファーの種々の塩濃度を含むことができる。種々の条件はアレイに結合するサンプルの量を読み取る前または洗浄前に、各フラクションをアレイに接触させる種々の時間を含むことができる。種々の条件は接触工程後かつアレイに結合したサンプル量の読み取り前に各フラクションを洗浄する種々の時間を含むことができる。種々の条件は各フラクションに用いる種々の核酸濃度を含むことができる。種々の条件は各フラクションに用いる種々の核酸サイズを含むことができる。種々の浸透圧は各フラクションに用いるハイブリダイゼーション・バッファーまたは洗浄バッファーの種々の塩濃度を含むことができる。種々の条件はハイブリダイゼーション条件または洗浄条件の種々の湿度を含むことができる。

【００３８】

本発明の１以上の実施態様の詳細を付随図面及び以下の説明において示す。本発明のその他の特徴、目的及び利点は該説明及び図面及び請求の範囲から明らかである。

【００３９】

ここに記載する全ての文献、特許、特許出願、ＧｅｎＢａｎｋ配列及びＡＴＣＣ保管物はあらゆる目的においてここに明示的に引用するものとする。

【００４０】

詳細な説明

本発明は、細胞、組織または細胞培養集団などサンプル中のモザイクレベルを決定する新規なアレイ・ベースの方法を提供する。本発明の方法はマイクロアレイゲノムプロファイリングにクローン性の明確な細胞集団を検出できる敏感性を与える。本発明の方法はより優勢な背景（ｂａｃｋｇｒｏｕｎｄ）細胞集団内でクローン性の（核型基準により）明確な細胞集団を検出するのに十分な感度を有する。従って、本発明の方法は多くの固形癌及びその他の腫瘍性変質細胞及び複雑で異常な遺伝子構造を有する個体から得たサンプルにおいて観測されることが多い複雑な遺伝子モザイクレベルを正確に測定及び分析するのに特に適している。

【００４１】

１の側面において、本発明の方法は遺伝子モザイクを検出するマイクロアレイの感度を決定する。全ゲノムＤＮＡを例えば癌細胞集団などの所定のモザイクレベルを有する細胞集団から単離する。遺伝子モザイクレベルはいかなる手段で定めてもよく、例えば従来の

Ｇバンド染色体分析、“ＧＴＧバンド技術”ともいう（例えば、Ｓｃｈｅｒｅｓ（１９８２）Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．６１：８－１１；Ｗａｋｕｉ（１９９９）Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．４４：８５－９０を参照）；蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（“ＦＩＳＨ”）（例えばＺｈａｏ（２０００）Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｅｔ．Ｃｙｔｏｇｅｎｅｔ．１１８：１０８－１１１を参照）；またはスペクトル染色体分析（“ＳＫＹ”）（Ｖｅｌｄｍａｎ（１９９７）Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．１５：４０６－４１０を参照）またはそれらの組み合わせ（例えば、Ｚｈａｏ（２００１）Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｅｔ．Ｃｙｔｏｇｅｎｅｔ．１２７：１４３－１４７を参照）である。この細胞集団からの全ゲノムＤＮＡのマイクロアレイゲノムプロファイルを行い、明確な核型を有するクローン小集団の数及び全集団内のそれぞれの割合を測定する。それから、これらのアレイベース結果は従来の非アレイ手順（例えば、Ｇバンド染色体分析、ＦＩＳＨ、ＳＫＹなど）により分析した核型結果と比較する。従来法とアレイベース法との核型分析の整合性の度合いを比較し、目録にする。

【００４２】

他の側面において、（上述の従来法により所定の）公知染色体異常を含む細胞の相同体集団由来の前もって単離した全ゲノムＤＮＡは“通常核型”を含む“通常細胞”（例えば、染色体異常を含まない細胞）由来の単離ゲノムＤＮＡを含む連続希釈物のセット内で用いる。例えば、全ゲノムＤＮＡについてのマイクロアレイゲノムプロファイルはＸｑ欠失及び同時に１６ｑの三染色体を有する雌流産（ｆｅｍａｌｅ　ａｂｏｒｔｕｓ）に関して証明されている。この通常４６、ＸＸゲノムＤＮＡを有するテストゲノムＤＮＡの連続希釈（ｓｅｒｉａｌ　ｄｉｌｕｔｉｏｎｓ）を行う。各希釈ＤＮＡ混合物をマイクロアレイゲノムプロファイリングにより分析する。各希釈物の核型分析結果を従来手段により得た結果と比較する。最も正確な核型プロファイルを与える連続希釈法を決定し、未知の試験、例えば、生検または癌細胞の培養物など臨床サンプルを連続希釈するためのガイドラインを得る。従って、本発明の方法はアレイによるモザイク集団の検出の感度を増加させる。

【００４３】

サンプル内の異なるゲノムの複雑なサブセット、すなわち遺伝子モザイクを検出するアレイ能力を決定する手段を提供することにより、本発明の方法を用いて、細胞集団内の遺伝子異質性の存在及び程度を正確に測定できる。本発明の方法の使用は患者や複雑な構造遺伝子構成を有するサンプル、例えば上述の背景節で説明した４７、ＸＹ、＋２１［７］／４６、ＸＹ［１３］または４６、ＸＸ、ｄｅｌ（５）（ｑ１３）［７］／４７、ＸＸ、ｄｅｌ（５）（ｑ１３）、＋８［９］／４８、ＸＸ、ｄｅｌ（５）（ｑ１３）、＋８［９］由来の全ゲノムＤＮＡ内の遺伝子モザイクを検出する正確なマイクロアレイゲノムプロファイリングを可能にする。

【００４４】

他の例において、本発明の方法により、マイクロアレイを用いて４６、ＸＸ、ｄｅｌ（５）（ｑ１３）［７］／４７、ＸＸ、ｄｅｌ（５）（ｑ１３）、＋８［９］／４８、ＸＸ、ｄｅｌ（５）（ｑ１３）、＋８、＋９［９］と同等な複雑な核型を有する腫瘍細胞サンプル（“未知の核型”のサンプル）から抽出された全ゲノムＤＮＡが染色体８の三染色体である５ｑ１３、７２％（（９＋９）／２５）及び染色体９の三染色体３６％（９／２５）だけの欠失を含むことを確認することが可能である。ゆえに、品質管理の観点より、この例において、本発明の方法を用いてマイクロアレイゲノムプロファイリングは全ゲノムＤＮＡの３６％しか三染色体事象が起こっていなかった場合でも検出できる。本発明の方法を用いるマイクロアレイゲノムプロファイリングは全ゲノムＤＮＡの３６％以下の小集団を検出できる。

【００４５】

１の側面において、染色体の獲得及び損失の両方について人工モザイク集団の連続系を測定できる。さらに本方法の使用は、従来のＧバンド染色体分析で必要とされる、例えば所定の信頼水準内のモザイクの存在を除外するための計算信頼パラメーターを必要としな

い。Ｈｏｏｋ（１９８８）Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．４２：２１７－２２６；Ｃｌａｕｓｓｅｎ（１９８４）Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．６７：２３－２８；またはＣｈｅｕｎｇ（１９９０）Ｐｒｅｎａｔ．Ｄｉａｇｎ．１０：４１－５７に記載されている。

【００４６】

定義

別に定義しない限り、ここで用いる全ての技術及び科学用語は本発明の属する当業界において一般的に理解される意味を有する。ここで用いる以下の用語は特に示さない限りそこに記載された意味を有する。

【００４７】

ここで用いる“アレイ”または“マイクロアレイ”または“ＤＮＡアレイ”または“核酸アレイ”または“チップ”または“バイオチップ”の語は、複数の標的要素であり、各標的要素は基質表面に明確な位置で固定化された１以上の核酸などの生体分子を明確な量含む。さらに下記に詳細を記す。

【００４８】

ここで用いる“アリール置換４，４－ジフルオロ－４－ボラ－３ａ，４ａ－ジアザ－ｓ－インドアセン染料”の語は全ての“ボロンジピロメテンジフルオリドフルオロフォア”または“ＢＯＤＩＰＹ”染料及び“ジピロメテンボロンジフルオリド染料”（例えば、米国特許第４，７７４，３３９号を参照）またはその同等物を含み、ハイブリダイゼーション反応で使用する際にそれらの検出のため核酸の標識に一般的に使用される蛍光染料の種類である。例えば、Ｃｈｅｎ（２０００）Ｊ．Ｏｒｇ Ｃｈｅｎ．６５：２９００－２９０６：Ｃｈｅｎ（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ４２：１３７－１５１を参照されたい。また米国特許第６，０６０，３２４号；第５，９９４，０６３号；第５，６１４，３８６号；第５，２４８，７８２号；第５，２２７，４８７号；第５，１８７，２８８号も参照されたい。

【００４９】

“シアニン５”または“Ｃｙ５（商標）”及び“シアニン３”または“Ｃｙ３（商標）”の語は下記に詳細に説明するＡｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ（ピスカタウェイ、ニュージャージー州）（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，アーリントンハイツ、イリノイ州）により製造されている蛍光シアニン染料または同等物いう。例えば、米国特許第６，０２７，７０９号：第５，７１４，３８６号；第５，２６８，４８６号；第５，１５１，５０７号；第５，０４７，５１９号を参照されたい。これらの染料はＣｙ５（商標）またはＣｙ３（商標）に結合した５－アミノ－プロパギル－２’－デオキシシチジン５’－トリホスフェートの形で核酸内に組み込まれる。

【００５０】

ここで用いる“蛍光染料”及び“蛍光ラベル”の語は全ての公知の蛍光物を含み、ローダミン染料（例えば、テトラメチルローダミン、ジベンゾローダミン、米国特許第６，０５１，７１９号を参照）；フルオレセイン染料；“ＢＯＤＩＰＹ”染料及び同等物（例えば、ジピロメテンボロンジフルオリド染料、米国特許第５，２７４，１１３号を参照）；１－［イソインドリル］メチレン－イソインドール誘導体（米国特許第５，４３３，８９６号を参照）；及び全ての同等物などである。米国特許第６，０２８，１９０号、第５，１８８，９３４号も参照されたい。

【００５１】

ここで用いる“特異的にハイブリダイズする”及び“特異的ハイブリダイゼーション”及び“選択的にハイブリダイズする”の語はストリンジェントな条件下で特定のヌクレオチド配列に選択的に核酸分子を結合、複製またはハイブリダイズすることをいう。“ストリンジェント条件”の語はある核酸が第２の配列に選択的にハイブリダイズする条件（例えば、サンプルゲノム核酸のアレイ内の固定化核酸プローブへのハイブリダイズ）であって、その他の配列に全くではないにしてもより少ない程度にしかハイブリダイズしない条件をいう。核酸ハイブリダイゼーションとの関連で“ストリンジェントなハイブリダイゼーション”及び“ストリンジェントなハイブリダイゼーション洗浄条件”（例えば、アレ

イ、サザンまたはノーザンハイブリダイゼーションにおける場合）は配列に依存し、異なる環境パラメーター下では異なる。ここで用いるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は例えば、５０％ホルムアミド　５Ｘ　ＳＳＣ、及び１％　ＳＤＳを含むバッファー中４２℃でのハイブリダイゼーションまたは５Ｘ　ＳＳＣ、及び１％　ＳＤＳ含むバッファー中６５℃でのハイブリダイゼーション、その両方と０．２×ＳＳＣ及び０．１％　ＳＤＳの６５℃での洗浄などを含む。また、典型的なストリンジェントハイブリダイゼーション条件は４０％ホルムアミド、１Ｍ　ＮａＣｌ及び１％　ＳＤＳのバッファー中３７℃でのハイブリダイゼーション、及び１×ＳＳＣ、４５℃での洗浄も含む。類似のストリンジェンシー条件を得るために同程度だが異なるハイブリダイゼーション及び洗浄条件が利用できることは当業者にとって容易に理解されることである。

【００５２】

しかしながら、ハイブリダイゼーションの構成の選択は重要なことではなく、当業界で公知であるように、可溶性サンプル核酸が固定化核酸に特異的にハイブリダイズするかどうかを決定する条件を示す洗浄条件のストリンジェンシーが重要である。洗浄条件は例えば、塩濃度が約０．０２モル、ｐＨ７及び温度が少なくとも約５０℃または約５５℃～約６０℃；または塩濃度が約０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、７２℃、約１５分間；または塩濃度が約０．２Ｘ　ＳＳＸ、温度が少なくとも約５０℃または約５５℃～約６０℃、約１５～約２０分間；またはハイブリダイゼーション複合体を室温、１５分間、０．１％ＳＤＳを含む塩濃度約２Ｘ　ＳＳＣの溶液で２回洗浄し、それから０．１％ＳＤＳを含む０．１Ｘ　ＳＳＣで６８℃、１５分間で２回洗浄する；またはそれと同等の条件を含む。ストリンジェントな洗浄条件はまた、例えば、４２℃、０．２Ｘ　ＳＳＣ／０．１％　ＳＤＳであってもよい。同様のハイブリダイゼーション及び洗浄条件の詳細な説明及び試薬及びバッファー（例えば、ＳＳＣバッファー及び同等の試薬及び条件）に関しては、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、ＡｕｓｕｂｅｌまたはＴｉｊｓｓｅｎ（ここに引用する）を参照されたい。

【００５３】

“核型”の語は細胞または細胞集団の遺伝子構造または染色体構成を意味する。また、“核型”の語は細胞核の完全な染色体の組、及び染色体数及び異常を含む個体またはサンプルの染色体相補体を意味するためにも用いられる。本方法は細胞集団の核型を決定するために用い、サンプル内の核型小集団の数及び特定の核型を有する細胞集団の割合など細胞集団の遺伝子モザイクの決定を含む。

【００５４】

特定の病気及び健康状態は特徴的な核型を有するので、細胞または細胞集団の核型の決定はこれらの病気及び健康状態の診断、検出または予知に使用できる。同様に、癌または腫瘍集団の遺伝子モザイクレベルはその挙動及び生理機能（例えばその腫瘍形成性）を示すので、癌の遺伝子モザイクの決定は診断、予知及び治療計画に有用である。

【００５５】

ここで用いる“検出組成物を用いた標識”または“検出成分を用いた標識”の語句は検出組成物、すなわちラベルを含む核酸をいい、下に詳しく説明する。ラベルは核酸と別の生体分子であってもよく、例えば下記に説明する“分子ビーコン”のようなステムループ構造の形の核酸である。これは、例えばニックトランスレーション、ランダムプライマー伸長、変質プライマーを用いた増幅等による核酸内への標識塩基（または検出ラベルに結合できる塩基）の結合を含む。該ラベルは例えば、視覚、分光、光化学、生化学、免疫化学、物理学または化学的手段などの手段により検出できる。適当な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン・フルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリン；発光物質の例としてはルミノール；生物発光物質の例としてはルシフェラーゼ、ルシフェリン及びエクオリンなどがある。

【００５６】

ここで用いる“核酸”の語は、１本鎖または二本鎖のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドをいう。この語は公知の天然ヌクレオチド類似体を含む核酸を包含する

。この語は合成骨格を含む核酸様構造も包含する。本発明により提供されるＤＮＡ骨格類似体はホスホジエステル、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、ホスホルアミデート、アルキルホスホトリエステル、スルファミン酸、３’－チオアセタール、メチレン（メチルイミノ）、３’－Ｎ－カルバメート、モルホリノカルバメート及びペプチド核酸（ＰＮＡ）を含む。Ｆ．Ｅｃｋｓｔｅｉｎ、ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９１）編集のＯｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｎｄ Ａｎａｌｏｇｕｅｓ、ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（オリゴヌクレオチド及びアナログ、実践的手法）；Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ（アンチセンス戦略），Ａｎｎａｌｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，第６００巻、Ｂａｓｅｒｇａ ａｎｄ Ｄｅｎｈａｒｄｔ（ＮＹＡＳ１９９２）編集；Ｍｉｌｌｉｇａｎ（１９９３）Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３６：１９２３－１９３７；Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（アンチセンス研究及び応用）（１９９３、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ）を参照されたい。ＰＮＡは、Ｎ－（２－アミノエチル）グリシン単位など非イオン性骨格を有する。ホスホロチオエート結合は例えば、米国特許第６，０３１，０９２号；第６，００１，９８２号；第５，６８４，１４８号に記載されており、ＷＯ９７／０３２１１；ＷＯ９６／３９１５４；Ｍａｔａ（１９９７）Ｔｏｘｉｃｏｌ．Ａｐｐｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．１４４：１８９－１９７も参照されたい。その他の合成骨格はメチル－ホスホネート結合または別のメチルホスホネート及びホスホジエステル結合（例えば、米国特許第５，９６２，６７４号；Ｓｔｒａｕｓｓ－Ｓｏｕｋｕｐ（１９９７）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３６：８６９２－８６９８を参照）、及びベンジルホスホネート結合（例えば、米国特許第５，５３２，２２６号；Ｓａｍｓｔａｇ（１９９６）Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｖ ６：１５３－１５６を参照）の語を包含する。核酸の語は遺伝子、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、オリゴヌクレオチドプライマー、プローブ及び増幅生成物と交換可能に用いる。

【００５７】

“ゲノムＤＮＡ”または“ゲノム核酸”の語は１以上の細胞核から単離された核酸を含み、ゲノムＤＮＡ由来の（例えば、単離、増幅、クローン、合成された）核酸を含む。ゲノムＤＮＡは以下に詳細を説明するように、いかなる供給源から得てもよい。

【００５８】

ここで用いる“核酸を含むサンプル”または“核酸サンプル”の語は、別の核酸またはポリペプチドまたはそれらの組み合わせ（例えば、固定化プローブ）へのハイブリダイゼーションに適当な形態の（例えば、可溶性水溶液）ＤＮＡまたはＲＮＡ、または天然源から単離したＤＮＡまたはＲＮＡを表す核酸を含むサンプルをいう。核酸は単離、クローンまたは増幅され、例えば、実質的に全体ゲノム、実質的に特定の染色体の全部または一部または選択配列由来のゲノムＤＮＡ、ｍＲＮＡ、またはｃＤＮＡである（例えば、特定プロモーター、遺伝子、増幅または制限断片、ｃＤＮＡライブラリー等）。該核酸サンプルは特定の細胞、組織または体液から抽出し、または細胞株などの細胞培養物由来、または保存組織サンプル由来であり、以下に詳しく説明する。

【００５９】

ここで用いる“コンピューター”及び“プロセッサ”の語は最も広い一般的な意味で用い、そのような全ての装置を含む。本発明の方法は任意のコンピューター／プロセッサを用いて実施することができ、公知のソフトウェアまたは方法と併せて実施できる。例えば、コンピューター／プロセッサは従来の汎用デジタルコンピューターであり、例えば、超小型演算装置及びデータ転送バスなどの従来要素を含む、個人用“ワークステーション”コンピューターである。コンピューター／プロセッサはさらに、ダイナミック・ランダム・アクセス・メモリ、フラッシュメモリ等、または磁気ディスク・オプショナル記憶装置など大容量記憶装置などの記憶素子のいかなる形態を含んでもよい。

【００６０】

核酸の生成及び操作

本方法の実施は核酸の単離、合成、クローニング、増幅、標識及びハイブリダイゼーション（例えばＣＧＨ）を含む。ここに記載する、分析用核酸及びアレイ固定化核酸はゲノムＤＮＡを表し、染色体の明確な部分または全体またはゲノム全体を含む。コンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）反応について以下にさらに詳しく説明する（例えば、米国特許第５，８３０，６４５号；第５，９７６，７９０号を参照）。核酸サンプルは例えば蛍光染料などの検出成分で標識する。例えば、第１のサンプルはある蛍光物で標識し、第２のサンプルは第２の染料で標識する（例えば、Ｃｙ３（商標）及びＣｙ５（商標））。１の側面において、各サンプル核酸はその他の核酸サンプルの標識に使用した染料と異なる少なくとも１の検出成分、例えば異なる蛍光染料で標識する。

【００６１】

ある場合において、核酸はＰＣＲなど標準的な技術を用いて増幅する。増幅はハイブリダイゼーション前に核酸をサブクローンまたは標識するために用いることもできる。ここに記載するように、サンプル及び／または固定化核酸は標識できる。アレイ上のサンプルまたはプローブは例えばポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅生成物の収集物、実質的に染色体全体または染色体断片または実質的にゲノム全体、例えばクローンの集合体、例えばＢＡＣ、ＰＡＣ、ＹＡＣ等（下記参照）の１以上の特定（前もって選択した）部分由来の核酸源から生成でき、該核酸源を集合的に表す。アレイ固定化核酸またはゲノム核酸サンプルはいくつかの方法で処理でき、例えば反復核酸の遮断または除去、または選択核酸の濃縮である。

【００６２】

サンプルを固定化プローブ（例えばアレイ上）に塗布し、ハイブリダイゼーション及び洗浄後、各染料の位置（例えば、アレイ上のスポット）及び量を読み取る。固定化核酸は染色体またはゲノムの任意の部分または全体を表す。アレイ固定化核酸はクローンＤＮＡの形態であってもよく、例えばここに記載するＹＡＣ、ＢＡＣ、ＰＡＣ等である。アレイ技術分野において一般的なように、１の側面において、アレイ上の各“スポット”は公知の配列を有し、例えばゲノムまたはその他の配列の公知の断片である。本発明は当業界で公知の方法または手順または装置と併せて実施でき、これらは科学及び特許文献において十分に記載されている。

【００６３】

一般技術

ＲＮＡ、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、ベクター、ウイルスまたはこれらのハイブリッドのいずれも、本発明を実施するために用いる核酸は、遺伝子操作、増幅及び／、または発現／組換え生成された、種々の供給源から単離できる。任意の組換え発現系を用いることができ、細菌性細胞に加えて、例えば哺乳類、酵母、昆虫または植物細胞発現系を含む。

【００６４】

もしくは、例えばＣａｒｒｕｔｈｅｒｓ（１９８２）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．４７：４１１－４１８；Ａｄａｍｓ（１９８３）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１０５：６６１；Ｂｅｌｏｕｓｏｖ（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３４４０－３４４４；Ｆｒｅｎｋｅｌ（１９９５）Ｆｒｅｅ Ｒａｄｉｃ．Ｂｉｏｌ．Ｍｅｄ．１９：３７３－３８０；Ｂｌｏｍｍｅｒｓ（１９９４）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３３：７８８６－７８９６；Ｎａｒａｎｇ（１９７９）Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．６８：９０；Ｂｒｏｗｎ（１９７９）Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．６８：１０９；Ｂｅａｕｃａｇｅ（１９８１）Ｔｅｔｒａ．Ｌｅｔｔ．２２：１８５９；米国特許第４，４５８，０６６号に記載されているように、これらの核酸は公知の化学的合成技術によりｉｎ ｖｉｔｒｏで合成できる。それから、二本鎖ＤＮＡ断片は、相補鎖を合成して適当な条件下で該鎖を一緒にアニーリングすることにより、またはプライマー配列とＤＮＡポリメラーゼを用いて相補鎖を加えることにより得られる。

【００６５】

核酸操作技術、例えば、サブクローニング、プローブ標識（例えば、クレノウ・ポリメ

ラーゼを用いるランダムプライマー標識、ニックトランスレーション、増幅）、シーケンシング、ハイブリダイゼーション、Ｇバンド、ＳＫＹ、ＦＩＳＨ等は科学及び特許文献に十分に記載されており、例えばＳａｍｂｒｏｏｋ編集、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（第２版）、第１～３巻、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、（１９８９）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ａｕｓｕｂｅｌ編集、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９７）；Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ Ｗｉｔｈ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｐｒｏｂｅｓ、Ｐａｒｔ Ｉ．Ｔｈｅｏｒｙ ａｎｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ，Ｔｉｊｓｓｅｎ編集、Ｅｌｓｅｂｉｅｒ、Ｎ．Ｙ．（１９９３）を参照されたい。

【００６６】

ゲノム核酸のクローニング

本発明の方法で用いるゲノム核酸、例えばアレイ上に固定化したものまたはサンプルとして用いるものは、種々の輸送手段内にクローニングすることにより得られ、操作することができる。必要であれば、ゲノム核酸サンプルは任意のゲノムＤＮＡ源からスクリーニング及び再クローン化でき、または増幅できる。従って、様々な側面において、本発明の方法で用いるゲノム核酸の形態（アレイ及びサンプルなど）はゲノムＤＮＡ、例えば哺乳類及びヒト人工染色体、衛星人工染色体、酵母人工染色体、細菌性人工染色体、Ｐ１人工染色体等を含むゲノムライブラリーを含む。

【００６７】

哺乳類人工染色体（ＭＡＣ）及びヒト人工染色体（ＨＡＣ）は例えば、Ａｓｃｅｎｚｉｏｎｉ（１９９７）Ｃａｎｃｅｒ Ｌｅｔｔ．１１８：１３５－１４２；Ｋｕｒｏｉｗａ（２０００）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１８：１０８６－１０９０；米国特許第５，２８８，６２５号；第５，７２１，１１８号；第６，０２５，１５５号；第６，０７７，６９７号に記載されている。ＭＡＣは４００キロ塩基（Ｋｂ）以上の挿入を含むことができ、例えばＭｅｊｉａ（２００１）Ａｍ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．６９：３１５－３２６を参照されたい。Ａｕｒｉｃｈｅ（２００１）ＥＭＢＯ Ｒｅｐ．２：１０２－１０７は５．５キロ塩基サイズを有するヒト・ミニ染色体を形成する。

【００６８】

衛星人工染色体または衛星ＤＮＡベース人工染色体（ＳＡＴＡＣ）は例えば、Ｗａｒｂｕｒｔｏｎ（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ３８６：５５３－５５５；Ｒｏｕｓｈ（１９９７）Ｓｃｉｅｎｃｅ２７６：３８－３９；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ（１９９７）Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．１５：３３３－３３５に記載されている。ＳＡＴＡＣは、異なる哺乳類種の細胞の新しい（ｄｅ ｎｏｖｏ）染色体構造を誘発することにより作ることができる；例えば、Ｈａｄｌａｃｚｋｙ（２００１）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．３：１２５－１３２；Ｃｓｏｎｋａ（２０００）Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｓｃｉ．１１３（Ｐｔ １８）：３２０７－３２１６を参照されたい。

【００６９】

また、酵母人工染色体（ＹＡＣ）も使用でき、８０～７００ｋｂのサイズの挿入を通常含む。ＹＡＣは１００万塩基対サイズ以下のゲノム断片の安定増殖のために長年使用されてきた；例えば、米国特許第５，７７６，７４５号；第５，９８１，１７５号；Ｆｅｉｎｇｏｌｄ（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：８６３７－８６４１；Ｔｕｃｋｅｒ（１９９７）Ｇｅｎｅ １９９：２５－３０；Ａｄａｍ（１９９７）Ｐｌａｎｔ Ｊ．１１：１３４９－１３５８；Ｚｅｓｃｈｎｉｇｋ（１９９９）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２７：２１を参照されたい。

【００７０】

細菌性人工染色体（ＢＡＣ）は１２０ｋｂまたはそれ以上の挿入を含むことができるベクターであり、例えば米国特許第５，８７４，２５９号；第６，２７７，６２１号；第６

，１８３，９５７号を参照されたい。ＢＡＣは大腸菌Ｆ因子プラスミド系に基づくものであり、マイクログラム量における操作及び精製が容易である。ＢＡＣプラスミドは細胞につき１～２のコピーで保存されるので、本方法で使用できるＹＡＣで見られる再配列の問題がない；例えば、Ａｓａｋａｗａ（１９９７）Ｇｅｎｅ　６９－７９；Ｃａｏ（１９９９）Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．９：７６３－７７４を参照されたい。

【００７１】

Ｐ１人工染色体（ＰＡＣ）、バクテリオファージＰ１由来ベクターは例えば、Ｗｏｏｎ（１９９８）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　５０：３０６－３１６；Ｂｏｒｅｎ（１９９６）Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．６：１１２３－１１３０；Ｉｏａｎｎｏｕ（１９９４）Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔ．６：８４－８９；Ｒｅｉｄ（１９９７）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　４３：３６６－３７５；Ｎｏｔｈｗａｎｇ（１９９７）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　４１：３７０－３７８；Ｋｅｒｎ（１９９７）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　２３：１２０－１２４に記載されている。Ｐ１は７５～１００Ｋｂ　ＤＮＡ挿入を含むことができる大腸菌に感染するバクテリオファージである（例えば、Ｍｅｊｉａ（１９９７）Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ　７：１７９－１８６；Ｉｏａｎｎｏｕ（１９９４）Ｎａｔ　Ｇｅｎｅｔ　６：８４－８９を参照されたい）。ＰＡＣはラムダライブラリーとほぼ同じ方法でスクリーンする。Ａｓｈｗｏｒｔｈ（１９９５）Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．２２４：５６４－５７１；Ｇｉｎｇｒｉｃｈ（１９９６）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　３２：６５－７４も参照されたい。

【００７２】

その他のクローニング輸送手段も用いることができ、例えば、組換えウイルス；コスミド、プラスミドまたはｃＤＮＡであり；例えば、米国特許第５，５０１，９７９号；第５，２８８，６４１号；第５，２６６，４８９号を参照されたい。

【００７３】

これらのベクターは例えばルシフェラーゼ及び緑色蛍光タンパク遺伝子などのマーカー遺伝子を含むことができる（例えば、Ｂａｋｅｒ（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ　２５：１９５０－１９５６を参照）。配列、挿入部分、クローン、ベクター等は天然供給源から単離でき、ＡＴＣＣまたはＧｅｎＢａｎｋライブラリーまたは市販の供給源などから得られ、または合成または組換え方法により調製できる。

【００７４】

核酸増幅

オリゴヌクレオチドプライマーを用いた増幅は例えば、本発明の方法で用いるサブクローン、ゲノム核酸を生成または操作するために使用でき、固定化またはサンプル核酸内にラベルを組込み、アレイへハイブリダイズされた核酸レベルを検出または測定する等のために使用できる。また一般的に、変質プライマーを用いる増幅も、検出プローブ（例えば、Ｃｙ５（商標）－またはＣｙ３（商標）－シトシン結合）を試験または対照ゲノムＤＮＡを表す核酸内に組込むために有用であり、固定化ゲノムＤＮＡにハイブリダイズするために使用する。増幅はサンプル内の核酸の量を測るために使用でき、例えば米国特許第６，２９４，３３８号を参照されたい。当業者は適当なオリゴヌクレオチド増幅プライマーを選択及び設計できる。また、増幅方法は当業界に公知であり、例えばポリメラーゼ連鎖反応、ＰＣＲ（ＰＣＲ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ，Ａ　ＧＵＩＤＥ　ＴＯ　ＭＥＴＨＯＤＳ　ＡＮＤ　ＡＰＰＬＩＣＡＴＩＯＮＳ（ＰＣＲ手順、方法及び応用ガイド）、編集、Ｉｎｎｉｓ、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．（１９９０）及びＰＣＲ　ＳＴＲＡＴＥＧＩＥＳ（ＰＣＲ法）（１９９５）、編集、Ｉｎｎｉｓ、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．Ｎ．Ｙ．）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）（例えば、Ｗｕ（１９８９）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　４：５６０；Ｌａｎｄｅｇｒｅｎ（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４１：１０７７；Ｂａｒｒｉｎｇｅｒ（１９９０）Ｇｅｎｅ　８９：１１７を参照）；転写増幅（例えば、Ｋｗｏｈ（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：１１７３を参照）；及び自律配列複製（例えば、Ｇｕａｔｅｌｌｉ（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７：１８７４を参照）；Ｑ　ベータ・レプリカーゼ増幅（例えば、Ｓｍｉｔｈ（１９９７）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３５

：１４７７－１４９１を参照）、自動Ｑ　ベータ・レプリカーゼ増幅分析（例えば、Ｂｕｒｇ（１９９６）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｐｒｏｂｅｓ　１０：２５７－２７１）及びその他のＲＮＡポリメラーゼ媒介技術、例えば核酸配列ベース増幅または“ＮＡＳＢＡ”等があり、例えばＢｉｒｃｈ（２００１）Ｌｅｔｔ．Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３３：２９６－３０１；ｇｒｅｉｊｅｒ（２００１）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　９６：１３３－１４７を参照されたい。また、Ｂｅｒｇｅｒ（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５２：３０７－３１６；Ｓａｍｂｒｏｏｋ；Ａｕｓｕｂｅｌ；米国特許第４，６８３，１９５号及び第４，６８３，２０２号も参照されたい。

【００７５】

核酸のハイブリダイズ

本方法を実施する際、例えば単離、クローンまたは増幅ゲノム核酸などの核酸サンプルは固定化核酸にハイブリダイズする。他の側面において、ハイブリダイゼーション及び／または洗浄条件は中からストリンジェントな条件下で行う。核酸ハイブリダイゼーションの幅広い手引きが例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　Ａｕｓｕｂｅｌ、Ｔｉｊｓｓｅｎにある。一般に、高ストリンジェントなハイブリダイゼーション及び洗浄条件は特定のイオン強度及びｐＨでの特定配列の熱融解点（Ｔｍ）より約５℃低くなるように選択する。Ｔｍは標的配列の５０％を完全に適合するプローブにハイブリダイズする（特定のイオン強度及びｐＨにおける）温度である。非常にストリンジェントな条件は特定プローブのＴｍと等しくなるように選択する。アレイに１００以上の相補的残基を有する相補的核酸のハイブリダイゼーションのための典型的なストリンジェントハイブリダイゼーション条件は４２℃を含み、標準ハイブリダイゼーション溶液を用い（例えばＳａｍｂｒｏｏｋを参照）、該ハイブリダイゼーションは一晩中行う。また、典型的な高ストリンジェント洗浄条件は０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、７２℃、約１５分間を含む。典型的なストリンジェント洗浄条件は、６５℃、１５分間の０．２ｘ　ＳＳＣ洗浄も含む（例えばＳａｍｂｒｏｏｋを参照）。１の側面において、背景プローブシグナルを除去するために、中または低ストリンジェンシー洗浄を高ストリンジェンシー洗浄より先に用いる。例えば、１００ヌクレオチド以上の二本鎖のための典型的な中ストリンジェンシー洗浄は４５℃、１５分間、１ｘ　ＳＳＣを含む。例えば、１００ヌクレオチド以上の二本鎖のための典型的な低ストリンジェンシー洗浄は４０℃、１５分間、４ｘ～６ｘ　ＳＳＣを含む。

【００７６】

他の側面において、本発明のアレイベースのコンパラティブ・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）反応を実施する際、蛍光染料Ｃｙ３（商標）及びＣｙ５（商標）は、例えば試験細胞または組織に対する対照から得た核酸など、２つのサンプル由来の核酸断片を異なる標識をするために使用される。多くの市販機器はこれらの２つの染料検出のために適合させて設計される。Ｃｙ５（商標）または蛍光物またはその他の酸化性（ｏｘｉｄａｔｉｏｎ－ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ）化合物の安定性を増加させるために、酸化防止剤及びフリーラジカル・スカベンジャー（消去剤）をハイブリダイゼーション混合物、ハイブリダイゼーション及び／または洗浄溶液中で使用できる。従って、Ｃｙ５（商標）シグナルは格段に増加し、より長いハイブリダイゼーション時間が可能である。２００１年、４月１９日に提出された同時係属中の米国特許出願番号第（ＵＳＳＮ）０９／８３９，６５８を参照されたい。

【００７７】

ハイブリダイゼーション感度をさらに増加させるために、制御された不飽和湿度環境でハイブリダイゼーションを行うことができる；従って、ハイブリダイゼーション効率は湿度は飽和していない場合、著しく改善する。２００１年４月１９日に提出された同時係属中のＵＳＳＮ０９／８３９，６５８を参照されたい。ハイブリダイゼーション効率は湿度を動的制御する場合、すなわち、湿度がハイブリダイゼーション中変化する場合、向上する。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、洗浄及び／または検出段階時に操作者が湿度を制御できるハウジング及び制御機器を含むアレイ機器が使用できる。該機器はプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、洗浄及び検出工程を含

む全体的な手順サイクル中に、湿度（及び温度及びその他のパラメーター）のプレプログラミングを可能とする検出器、制御機器及び記憶部品を含むことができる。２００１年４月１９日に提出された同時係属中のＵＳＳＮ０９／８３９，６５８を参照されたい。

【００７８】

本発明の方法は温度変動を含むハイブリダイゼーション条件を含むことができる。ハイブリダイゼーションは、温度を前もって設定した場合または温度が比較的一定レベルの場合の条件（例えば、多くの市販オーブンのように、プラスまたはマイナス２、３度）と比較して、温度変化がある環境の方がより効率的である。反応チャンバー温度は変動的に例えば、オーブンまたは温度変化を作ることができるその他の装置により修正できる。２００１年４月１９日に提出された同時係属中のＵＳＳＮ０９／８３９，６５８を参照されたい。

【００７９】

本発明の方法は浸透圧変動を含むハイブリダイゼーション条件を含むことができる。ハイブリダイゼーション効率（すなわち時間平衡）は、例えば溶質勾配など過剰／低弾力性（ｔｏｎｉｃｉｔｙ）変化を含むハイブリダイゼーション環境によっても高めることができる。溶質勾配（ｓｏｌｕｔｅ　ｇｒａｄｉｅｎｔ）は機器内で生じる。例えば、低塩ハイブリダイゼーション溶液はアレイハイブリダイゼーション・チャンバーの片側に加え、高塩バッファーはチャンバー内で溶質勾配を生じるためにもう一方の側に加える。２００１年４月１９日に提出された同時係属中のＵＳＳＮ０９／８３９，６５８を参照されたい。

【００８０】

核酸の断片化及び分解

本発明の方法を実施する際、固定化及びサンプル核酸を様々な長さでクローン化、標識または固定化できる。例えば、１の側面において、ゲノム核酸は約２００塩基より短い。この小さいサイズに限定した標識ゲノムＤＮＡの使用は、例えばアレイベースＣＧＨにおいて、分子プロファイル分析の分解能を著しく向上させる。例えば、このような短い断片の使用により、固定化核酸上の反復配列及びその他の望ましくない“背景”クロスハイブリダイゼーションを著しく抑制できる。反復配列ハイブリダイゼーションの抑制は異なるコピー数（例えば増幅または欠失）の検出または固有配列の検出の信頼性を大きく増加させる。２００１年４月１９日に提出された同時係属中のＵＳＳＮ０９／８３９，６５８を参照されたい。

【００８１】

最終的な断片長さは例えばＤＮＡアーゼを用いた処理により修正できる。ニックトランスレーション反応においてＤＮＡポリメラーゼに対するＤＮＡアーゼの比を調節することにより分解生成物の長さが変化する。標準的なニックトランスレーションキットは通常３００～６００塩基対断片を生じる。必要であれば、標識核酸をさらに２００塩基以下、約２５から３０塩基程度までの断片に断片化でき、例えばＤＮＡエンドヌクレアーゼ、例えばＤＮＡアーゼ（例えば、Ｈｅｒｒｅｒａ（１９９４）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２３６：４０５－４１１；Ｓｕｃｋ（１９９４）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｒｅｃｏｇｎｉｔ．７：６５－７０を参照）または２塩基制限エンドヌクレアーゼＣｖｉＪＩ（例えば、Ｆｉｔｚｇｅｒａｌｄ（１９９２）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．２０：３７５３－３７６２）及び標準手順、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、Ａｕｓｕｂｅｌを参照、を用いて、その他の断片化方法も用いてまたは用いずに、ＤＮＡのランダム酵素消化を行う。

【００８２】

その他の手順もゲノムＤＮＡを断片化するために用いることができ、例えば、機械剪断、超音波処理（例えば、Ｄｅｉｎｉｎｇｅｒ（１９８３）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１２９：２１６－２２３を参照）、及び類似の手段（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、Ａｕｓｕｂｅｌ、Ｔｉｊｓｓｅｎ）を用いることができる。例えば、１の機械技術はシリンジ・ポンプによりＤＮＡサンプルに強引に小さな穴を通した場合に生じるポイントシンク（ｐｏｉｎｔ－ｓｉｎｋ）流体力学に基づき、例えば、Ｔｈｏｒｓｔｅｎｓｏｎ（１９９８）Ｇ

enome Res. 8：848－855を参照。また、Oefner（1996）Nucleic Acid Res. 24：3879－3886；Ordahl（1976）Nucleic Acid Res. 3：2985－2999を参照されたい。断片サイズは種々の技術によって評価でき、例えば、Siles（1997）J. Chromatogr. A. 771：319－329のような、キャピラリー電気泳動中で動的にサイズふるいしたポリマー溶液を用いてDNA断片化を分析する、サイジング電気泳動である。断片サイズは例えば、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化・飛行時間型質量分析によっても測定でき、例えば、Chiu（2000）Nucleic Acid Res. 28：E31を参照。

【0083】

コンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（CGH）

本発明の方法は、組織（例えば生検または血液サンプル）などの細胞集団中の遺伝子モザイクを検出するために、アレイベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（CGH）反応においても用いられる。CGHは、例えば配列またはコピー数の増減など、定量的変化を受けるゲノム内の領域を検出するために用いることができる分子細胞遺伝学手法である。腫瘍細胞のゲノム分析は変則的に増減を受けた領域を検出できる。

【0084】

CGH反応は試験遺伝子組成物と対照サンプルとを比較する；例えば、ゲノムDNAの試験サンプル（例えば、異なるまたは蓄積した遺伝子的欠陥を含む1以上の小集団を有すると疑われる細胞集団由来のもの）が例えば、“通常”または“野生型”遺伝子型の“陰性”対照、または例えば、公知の癌細胞または公知の欠陥、例えば転位または欠失または増幅等を含む細胞などの“陽性”対照と比較して、増幅、または欠失または変異断片を含むかどうかを比較する。

【0085】

本発明の方法はコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションを実施するためのあらゆる公知の方法及び手段及びそれらの変形を用いて実施でき、例えば、米国特許第6，197，501号；第6，159，685号；第5，976，790号；第5，965，362号；第5，856，097号；第5，830，645号；第5，721，098号；第5，665，549号；第5，635，351号；及びDiago（2001）American J. of Pathol. May；158（5）：1623－1631；Theillet（2001）Bull. Cancer 88：261－268；Werner（2001）Pharmacogenomics 2：25－36；Jain（2000）Pharmacogenomics 1：289－307. を参照されたい。

【0086】

アレイまたは“バイオチップ”

1の側面において、本発明の方法はアレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（CGH）を行うことにより細胞集団中の遺伝子モザイクを検出する。本発明は“マイクロアレイ”または“DNAアレイ”または“核酸アレイ”または“バイオチップ”とも呼ばれる公知の“アレイ”またはそれらの変形を用いて実施できる。アレイは多数の“標的要素”または“スポット”を総称したものであり、各要素は例えば、基質表面上の所定の位置に固定化されたポリペプチド、核酸分子またはプローブなどの1以上の生体分子を所定量含む。通常、固定化生体分子は特異結合のためにサンプルと接触させ、例えば、サンプル中の分子とアレイ間のハイブリダイゼーションである。固定化核酸は、ヒトゲノムなどの例えば、実質的に染色体全部または小部分または実質的にゲノム全部を含む、特異メッセージ（specific messages）（例えば、cDNAライブラリー）由来または遺伝子（例えば、ゲノムライブラリー）由来の配列を含むことができる。その他の標的要素は、陽性及び陰性対照等の参照配列を含むことができる。アレイの標的要素は種々のサイズ及び種々の密度で基質表面上に配置できる。様々なア

レイの標的要素は異なる量、密度、サイズ、標識または非標識で同じ分子種を含むことをできる。標的要素サイズ及び密度は、標識の性質（固定化分子も標識できる）、基質担体（固体、半固体、繊維質、キャピラリーまたは多孔性）等の多数の要因に依存する。各標的要素は実質的に同じ核酸配列、または異なる長さ及び／または異なる配列の核酸の混合物を含んでもよい。従って、ここに記載するように例えば、標的要素は１以上のＤＮＡクローン断片を含んでもよく、各コピーは異なる長さの断片にバラバラにされてもよい。アレイ表面上に固定された核酸の長さ及び複合性は本発明にとって重要ではない。アレイは任意の基質、例えば固体表面（例えば、ニトロセルロース、ガラス、石英、石英ガラス、プラスティック等）上に固定化された核酸を含むことができる。例えば、蛍光を測定する場合のシクロオレフィンポリマーを含むマルチウェル・プラットフォームについて記載する米国特許第６，０６３，３３８号を参照されたい。本発明の方法で使用されるアレイは、ハイブリダイゼーション及び洗浄反応時に湿度及び温度を制御するための部品を含むハウジングを含むことができる。

【００８７】

本発明の方法の実施において、公知のアレイ及びアレイを製造、使用する方法は、例えば、米国特許第６，２７７，６２８号；第６，２７７，４８９号；第６，２６１，７７６号；第６，２５８，６０６号；第６，０５４，２７０号；第６，０４８，６９５号；第６，０４５，９９６号；第６，０２２，９６３号；第６，０１３，４４０号；第５，９６５，４５２号；第５，９５９，０９８号；第５，８５６，１７４号；第５，８３０，６４５号；第５，７７０，４５６号；第５，６３２，９５７号；第５，５５６，７５２号；第５，１４３，８５４号；第５，８０７，５２２号；第５，８００，９９２号；第５，７４４，３０５号；第５，７００，６３７号；第５，５５６，７５２号；第５，４３４，０４９号；に記載されている全体または一部またはそれらの変形を含むことができ、また例えば、ＷＯ９９／５１７７３；ＷＯ９９／０９２１７；ＷＯ９７／４６３１３；ＷＯ９６／１７９５８；Ｊｏｈｎｓｔｏｎ（１９９８）Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．８：Ｒ１７１－Ｒ１７４；Ｓｃｈｕｍｍｅｒ（１９９７）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２３：１０８７－１０９２；Ｋｅｒｎ（１９９７）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２３：１２０－１２４；Ｓｏｌｉｎａｓ－Ｔｏｌｄｏ（１９９７）Ｇｅｎｅｓ，Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅｓ＆Ｃａｎｃｅｒ ２０：３９９－４０７；Ｂｏｗｔｅｌｌ（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｓｕｐｐ．２１：２５－３２も参照されたい。また、公開された米国特許出願番号第２００１００１８６４２号；第２００１００１８９２７号；第２００１００１６３２２号；第２００１００１４４４９号；第２００１００１４４４８号；第２００１００１２５３７号；第２００１０００８７６５号を参照されたい。本発明は任意の公知アレイを用いることができ、例えば、ＧｅｎｅＣｈｉｐｓ（商標）、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ、Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ、ＣＡ（アフィメトリックス、サンタクララ、カリフォルニア州）；ＳｐｅｃｔｒａｌＣｈｉｐ（商標）マウス ＢＡＣ アレイ、ＳｐｅｃｔｒａｌＣｈｉｐ（商標）ヒト ＢＡＣ アレイ及びＳｐｅｃｔｒａｌ ＧｅｎｏｍｉｃｓのＣｕｓｔｏｍ Ａｒｒａｙｓ、ヒューストン、テキサス及びそれら製造元の添付取扱説明書である。

【００８８】

基質表面

本発明を実施するために用いるアレイは剛体、半剛体または可撓性材料の基質表面を有することができる。基質表面はフラットまたは平面、ウェル形状、隆起状、エッチング溝、多孔質、ビーズ、糸状等の形であってもよい。基質は“捕獲プローブ”が直接または間接的に結合するいかなる材料であってもよい。例えば、適当な材料としては紙、ガラス（例えば、米国特許第５，８４３，７６７号を参照）、セラミックス、石英またはその他の結晶基質（例えば、ガリウムヒ素）、金属、半金属、ポリアクリロイルモルホリド（ｐｏｌａｃｒｙｌｏｙｌｍｏｒｐｈｏｌｉｄｅ）、種々のプラスティック及びプラスティックコポリマー、ナイロン（商標）、テフロン（登録商標）、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（４－メチルブテン）、ポリスチレン、ポリスチレン／ラテックス、ポリメタクリレート、ポリ（エチレンテレフタレート）、レーヨン、ナイロン、ポリ（ビニルブチレー

ト）、ポリビニリデンジフルオリド（ＰＶＤＦ）（例えば、米国特許第６，０２４，８７２号を参照）、シリコーン（例えば、米国特許第６，０９６，８１７号）、ポリホルムルデヒド（例えば、米国特許第４，３５５，１５３号；第４，６５２，６１３号を参照）、セルロース（例えば、米国特許第５，０６８，２６９号を参照）、酢酸セルロース（例えば、米国特許第６，０４８，４５７号を参照）、ニトロセルロース、種々の膜及びゲル（例えば、シリカ・エアロゲル、例えば、米国特許第５，７９５，５５７号を参照）、常磁性または超常磁性微粒子（例えば、米国特許第５，９３９，２６１号）等がある。反応性官能基は例えば、ヒドロキシル、カルボキシル、アミノ基等がある。シラン（例えば、モノ－及びジヒドロキシアルキルシラン、アミノアルキルトリアルコキシシラン、３－アミノプロピル－トリエトキシシラン、３－アミノプロピルトリメトキシシラン）はアミン官能基と反応するヒドロキシ官能基を提供することができる。

【００８９】

標識及び走査アレイを含む、核酸及び検出成分

本発明の方法は例えば、検出成分を含有または結合した、検出ラベルと接合した核酸を用いる。任意の検出成分を用いることができる。検出成分との接合は共有または非共有である。他の側面において、アレイ固定化核酸及びサンプル核酸は異なった形で検出され、例えば、これらは異なる標識を有し、異なるシグナルを放出する。

【００９０】

有用な標識は例えば、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ；蛍光染料（Ｃｙ５（商標）、Ｃｙ３（商標）、ＦＩＴＣ、ローダミン、ランタニド・リン光体、テキサスレッド）、電子密集試薬（例えば、金）、酵素、例えば、ＥＬＩＳＡで一般的に使われるもの（例えば、ホースラディシュ・ペルオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリ性ホスファターゼ）、比色分析ラベル（例えば、コロイド金）、磁気ラベル（例えば、Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（ダイナビーズ）（商標））、ビオチン、ジゴキシゲニンまたは抗血清またはモノクローナル抗体が利用できるハプテン及びタンパク質を含む。標識は検出する核酸に直接組込むことができ、または標的にハイブリダイズまたは結合するプローブまたは抗体に付着させることができる。ペプチドは第２のレポーター（ｒｅｐｏｒｔｅｒ）（例えば、ロイシンジッパー対配列、第２の抗体の結合部位、転写活性ポリペプチド、金属結合ドメイン、エピトープタグ）により認識される所定のポリペプチドエピトープを（例えば、ヌクレオシド塩基内に）組込むことにより検出可能になる。標識は、潜在的な立体障害を減少させるため、またはその他の有用または望ましい特徴に影響を与えるため、様々な長さのスペーサーアームにより付着できる。例えば、Ｍａｎｓｆｉｅｌｄ（１９９５）Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｐｒｏｂｅｓ　９：１４５－１５６を参照されたい。アレイベースＣＧＨにおいて、蛍光物は対にして一緒に用いることができる；例えば、１の蛍光物が対照を標識し（例えば、“公知の、または通常核型の核酸”）、及びもう一方の蛍光物が試験核酸を標識する（例えば、絨毛膜サンプルまたは癌細胞サンプル由来）。典型的な対としては：ローダミンとフルオレセイン（例えば、ＤｅＲｉｓｉ（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　１４：４５８－４６０）；リサミン（ｌｉｓｓａｍｉｎｅ）結合核酸類似体とフルオレセイン結合核酸類似体（例えば、Ｓｈａｌｏｎ（１９９６）上述）；Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｒｅｄ（商標）とＳｐｅｃｔｒｕｍ　Ｇｒｅｅｎ（商標）（Ｖｙｓｉｓ、Ｄｏｗｎｅｒｓ　Ｇｒｏｖｅ（ダウナーズグローブ）、イリノイ州）；Ｃｙ３（商標）とＣｙ５（商標）がある。Ｃｙ３（商標）及びＣｙ５（商標）は一緒に用いることができる；両方ともＡｍｅｒｓｈａｍ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ（アマシャム　ライフサイエンス）社（アーリントンハイツ、イリノイ州）により製造されている蛍光シアニン染料である。メロシアニン、スチリル及びオキソノール染料などのシアニン及び関連染料は特に光吸収性が強く、発光性が高い。例えば、米国特許第４，３３７，０６３号；第４，４０４，２８９号；第６，０４８，９８２号を参照されたい。

【００９１】

その他の蛍光ヌクレオチド類似体も用いることができ、例えば、Ｊａｍｅｓｏｎ（１９９７）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．２７８：３６３－３９０；Ｚｈｕ（１９９４）

Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．２２：３４１８－３４２２を参照。米国特許第５，６５２，０９９号及び第６，２６８，１３２号も例えば、蛍光オリゴヌクレオチドを生成するために酵素的または化学合成により、ＤＮＡ及び／またはＲＮＡまたはオリゴヌクレオチドなどの核酸に組込むためのヌクレオシド類似体について記載している。米国特許第５，１３５，７１７号は蛍光ラベルとして使用するためのフタロシアニン及びテトラベンズトリアザポルフィリン試薬について記載している。

【００９２】

検出成分は、共有または非共有手段により、例えば、クレノウポリメラーゼを用いるランダムプライマーラベリングなどの転写により、または“ニックトランスレーション”または増幅等によりゲノム核酸内に組込むことができ、所望により“標的”核酸に組込むことができる。例えば、１の側面において、ヌクレオチド塩基を例えば、Ｃｙ３（商標）またはＣｙ５（商標）のような蛍光染料などの検出成分に結合させ、それからサンプルゲノム核酸に組込む。ゲノムＤＮＡのサンプルは非標識ｄＣＴＰを用いてＣｙ３（商標）－またはＣｙ５（商標）－ｄＣＴＰ結合混合物と組み合わせることができる。Ｃｙ５（商標）は通常６３３ｎｍ線のＨｅＮｅレーザーにより励起され、発光は６８０ｎｍで集まる。例えば、Ｂａｒｔｏｓｉｅｗｉｃｚ（２０００）Ａｒｃｈｉｖｅｓ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃｓ ３７６：６６－７３；Ｓｃｈｅｎａ（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：１０６１４－１０６１９；Ｐｉｎｋｅｌ（１９９８）Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ２０：２０７－２１１；Ｐｏｌｌａｃｋ（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ２３：４１－４６も参照されたい。

【００９３】

他の側面において、核酸を標識するためにＰＣＲまたはニックトランスレーションを用いる場合、アリルアミン－ｄＵＴＰを蛍光染料またはハプテンのスクシンイミジル－エステル誘導体（ビオチンまたはジゴキシゲニン）にカップリングすることにより合成した修飾ヌクレオチドを用いる；この方法により最も一般的な蛍光ヌクレオチドのカスタム調製が可能となる。例えば、Ｈｅｎｅｇａｒｉｕ（２０００）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１８：３４５－３４８を参照されたい。

【００９４】

本発明の方法において、検出組成物を用いた標識（検出成分を用いたラベリング）は例えば、“分子ビーコン”または“アプタマービーコン”のようなステムループ構造形態の核酸などその他の核酸などの生体分子に付着した核酸を含んでもよい。検出成分としての分子ビーコンは当業界に公知である；例えば、Ｓｏｋｏｌ（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９５：１１５３８－１１５４３、５’及び３’末端上に適合蛍光ドナー及びアクセプター発色団を用いる合成“分子ビーコン”レポーター・オリゴデオキシヌクレオチド。相補的核酸鎖がない場合において、蛍光共鳴エネルギー移動がシグナル発信を妨げる場合分子ビーコンはステムループ構造内に残る。相補的配列を用いるハイブリダイゼーションにおいて、ステムループ構造はドナーとアクセプター部分間の物理的距離を広げ、その結果蛍光共鳴エネルギー移動を減少させ、ビーコンが適当な波長の光により活性化される場合検出シグナルを放出する。例えば、Ｇリッチな１８マー三重鎖形成オリゴデオキシリボヌクレオチドを含む分子ビーコンについて記載するＡｎｔｏｎｙ（２００１）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４０：９３８７－９３９５を参照されたい。また、米国特許第６，２７７，５８１号及び第６，２３５，５０４号も参照されたい。

【００９５】

アプタマービーコンは分子ビーコンによく似ている；例えば、Ｈａｍａｇｕｃｈｉ（２００１）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２９４：１２６－１３１；Ｐｏｄｄａｒ（２００１）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｐｒｏｂｅｓ １５：１６１－１６７；Ｋａｂｏｅｖ（２０００）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ． ２８：Ｅ９４を参照。アプタマービーコンは２以上の立体構造を選ぶことができ、その１つは配位子に結合できる。蛍光消光対は配位子結合により導入された構造変化を報告するために用いる。例えば、Ｙａｍａｍｏｔｏ（２０００）Ｇｅｎｅｓ Ｃｅｌｌｓ ５：３８９－３９６；Ｓｍｉｒｎｏｖ（２０００）Ｂ

ｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３９：１４６２－１４６８を参照されたい。

【００９６】

蛍光染料を用いて核酸を標識する方法に加えて、複数の蛍光を同時に検出する方法が当業者に公知である。例えば、米国特許第５，５３９，５１７号；第６，０４９，３８０号；第６，０５４，２７９号；第６，０５５，３２５号を参照されたい。例えば、分光器は光検出器の二次元アレイ上の発光スペクトルをイメージでき、従ってアレイのスペクトル的に十分解像された画像が得られる。例えば、量子収量及び光破壊（ｐｈｏｔｏｄｅｓｔｒｕｃｔｉｏｎ）収量などの蛍光物理学（Ｐｈｏｔｏｐｈｙｓｉｃｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｆｌｕｏｒｏｐｈｏｒｅ）及び検出器の感度はオリゴヌクレオチドアレイの読取り時間パラメーターである。十分なレーザー出力及び低光破壊収率の、Ｃｙ５（商標）及び／またはＣｙ３（商標）の使用により、アレイは５秒以下で読取ることができる。

【００９７】

Ｃｙ３（商標）及びＣｙ５（商標）などの２以上の蛍光物を（例えば、ＣＧＨ中で）一緒に用いる場合、すべての蛍光物の合成画像を作ることが必要である。２以上の画像を獲得するために、アレイは同時または順次スキャンできる。電荷結合素子またはＣＣＤは、本発明の方法の実施を含むマイクロアレイ走査システムで使用される。従って、本発明の方法で使用するＣＣＤは多色蛍光画像をスキャン及び分析できる。

【００９８】

任意の装置または方法またはそれらの変形が本発明の方法を実施するために使用または採用でき、例えば、多色蛍光画像をなどスキャニング及び分析する、アレイ読取り器または“スキャニング”装置などがある。例えば、米国特許第６，２９４，３３１号；第６，２６１，７７６号；第６，２５２，６６４号；第６，１９１，４２５号；第６，１４３，４９５号；第６，１４０，０４４号；第６，０６６，４５９号；第５，９４３，１２９号；第５，９２２，６１７号；第５，８８０，４７３号；第５，８４６，７０８号；第５，７９０，７２７号；及びアレイの説明でここに引用する特許を参照されたい。また、公開された米国特許出願番号第２００１００１８５１４号；第２００１０００７７４７号を参照されたい。

【００９９】

本発明の方法はさらにデータ分析を含み、例えば基質位置に応じた蛍光強度を測定する工程、“外れ値”（所定の統計的分布から逸脱したデータ）を除去する工程または残存データから得た標的の相対結合親和力を計算する工程を含むことができる。結果データは標的及びプローブ間の光放射または結合親和力に従って変化する各領域ごとの色付き画像として表示できる。例えば、米国特許第５，３２４，６３３号；第５，８６３，５０４号；第６，０４５，９９６号を参照されたい。本発明はまた、担体上に位置するサンプル上の標識マーカーを検出するための装置を含み、米国特許第５，５７８，８３２号を参照されたい。

【０１００】

ゲノム核酸源

本発明は、アレイベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）を行うことにより細胞集団または組織または液体サンプルなど、核酸を含む任意のサンプル中の遺伝子モザイクを検出する方法を提供する。核酸はゲノムＤＮＡ由来（例えば、単離、増幅、クローンした）のものであってよい。ゲノムＤＮＡは任意の供給源から得られる。

【０１０１】

１の側面において、核酸サンプルを調製する細胞、組織または体液サンプルは遺伝的欠陥に関する病気または健康状態を有する疑いがある患者から得たものである。病気または健康状態の原因、診断または予後診断は、例えばゲノム核酸塩基置換、増幅、欠失及び／または転位を有する細胞を含む癌または腫瘍など、遺伝的欠陥と関連し得る。細胞、組織または体液は例えば、羊膜サンプル、絨毛膜サンプル（ＣＶＳ）、血清、血液、脊髄血（ｃｈｏｒｄ　ｂｌｏｏｄ）または尿サンプル、ＣＳＦまたは骨髄穿刺、糞便サンプル、唾

液、涙、組織及び外科生検、針生検またはパンチ等から得られる。

【０１０２】

細胞、組織または体液サンプルを単離する方法は当業者に公知であり、限定されないが、吸引、組織切片、血液またはその他の体液の抽出、外科または針生検等を含む。患者から得た“臨床サンプル”は組織学的目的のために取得した凍結切片またはパラフィン切片を含む。サンプルは（細胞培養物の）上澄み、細胞溶解物、染色体異常及びコピー数などモザイクレベルを検出するために望ましい組織培養物から得た細胞由来のものであってもよい。

【０１０３】

遺伝子モザイクの検出による診断条件

本発明の方法は病気及び健康状態を診断し、適当な治療プランを計画、及び予後診断を評価するために用いることができる。本発明の方法は病気または健康状態の原因、診断または予後診断が１以上の遺伝的欠陥に関係する場合、例えばゲノム核酸塩基置換、増幅、欠失及び／または転位を有する細胞を含む癌または腫瘍、または遺伝性の遺伝子欠陥に関する場合に使用することができる。場合によっては、患者から得た腫瘍またはその他の癌細胞集団中に異なる遺伝構造（核型）を含んだ種々の小集団の量または度合いは、癌を分類し、または治療プランまたは予後診断を計画する際に有用である。高度な細胞集団中の遺伝子モザイクは癌の早い成長または転移の可能性の指標になることができる。例えば、神経膠腫由来細胞株における腫瘍抑圧遺伝子の正常に機能しないｍＲＮＡ発現の理由として、複合異常核型及び融合タンパク質による転写因子の生成の可能性が提案された。Ｋｒｅｘ（２００１）Ｊ．Ｎｅｕｒｏｏｎｃｏｌ．５２：１１９－１２８を参照されたい。

【０１０４】

染色体異常は先天性形成異常及び自然流産の代表的な原因となる。これらは構造異常、倍数性、三染色体性、及びモザイクを含む。常染色体の三染色体性の場合、生まれてからほとんど生き延びることができず、最も一般的な３つの三染色体は染色体１３、１８及び２１に関するものであり、それぞれパトー（Ｐａｔａｕ）、エドワード（Ｅｄｗａｒｄ’ｓ）及びダウン（Ｄｏｗｎ’ｓ）という症候群を生じる（例えば、Ｍｏｏｒｅ（２０００）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．８：２２３－２２８を参照）。従って、別の側面において、本発明の方法はパトー症候群、エドワード症候群及びダウン症候群の診断に用いられる。例えば、Ｄｊａｌａｌｉ（２０００）Ｐｒｅｎａｔ．Ｄｉａｇｎ．２０：９３４－９３５を参照されたい。他の側面において、本発明の方法は以下の症候群の診断に使用される（表１）：

【表１】

表 1: 隣接遺伝子症候群の染色体位置プロファイル

染色体番号	位置	症候群
1	1p36	1p 欠失症候群
3	3p25-pter	3p 欠失症候群
3	3p21-pter	3p 重複症候群
4	4p16.3	ウオルフ・ヒルシュホーン症候群
4	4p15.2-16.1	4p 重複症候群
5	5p15.2-pter	ネコなき（Cri du Chat）症候群
7	7p13.3	ミラー・ディッカー症候群
7	7p11.23	ウィリアムズ症候群
8	8q24.1	ランガーギデオン症候群（LGS）
8	8q24.1	毛髪鼻指節骨症候群（TRPS）
9	9p, 通常 9p22-pter	9p 欠失症候群
10	10p13p14	ディジョージ症候群Ⅱ
11	11p13	WAGR 症候群
11	11p15.5	ベックウィズ・ヴィードマン症候群
11	11p11.2	Potocki-Shaffer 症候群（多発性外骨腫性Ⅱ Locus）
15	15q12	アンジェルマン症候群
15	15q12	プラダー・ウィリー症候群
16	末端 16p13.3	ルビンスタイン・テイビ症候群
17	17p12	シャルコー・マリー・トゥース病 1A 型（CMT-1A）
17	17p12	圧迫性麻痺の遺伝性ニューロパチー
17	17p13.3	ミラー・ディッカー症候群/分離（Isolated）滑脳症
17	17p11.2	スミス・メイジェニス症候群
20	20p11.2p12	アラジル症候群
22	22q11.2(1-p13p14 も参照)	ディジョージ/Velocardiofacial 症候群
X	Xp21	先天性副腎過形成症（AHC）
X	Xp21	デュシェンヌ/ベッカー筋ジストロフィー
X	Xp21	グリセロールキナーゼ欠損症
X	Xp22	ペリツェウス・メルツバッハ病
X	Xp22.3	ステロイドスルファターゼ欠損症
Y	SRY 位置/Yp	SRY 位置異常

【０１０５】

本発明の方法は、新生児非培養血液サンプルから得たゲノムＤＮＡ由来染色体１３、１８、２１、Ｘ、及びＹの異数性を検出するために用いることもできる（例えば、Ｊａｌａｌ（１９９７）Ｍａｙｏ Ｃｌｉｎ．Ｐｒｏｃ．７２：７０５－７１０を参照されたい）。モザイクについて、妊娠９－１１週の絨毛膜サンプルにより調査して生育可能な妊娠が約１％～２％であることが報告されている。２倍体及び三染色体の胎児の両方が妊娠中に発見されており、子宮内胎児の生存に重大な影響を及ぼすようである。例えば、Ｈａｒｒｉｓｏｎ（１９９３）Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅｔ．９２：３５３－３５８を参照されたい。

【０１０６】

体外受精（ＩＶＦ）プログラムにおいて、卵細胞及び胚の着床前遺伝子診断（ＰＧＤ）は胚移植前の異常胚に備えた選択をする技術となっている。従って、別の側面において、本発明の方法は着床前遺伝子診断及び卵細胞及び胚中の構造異常の診断に用いられる。例えば、Ｆｕｎｇ（２００１）Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．４９：７９７－７９８を参照されたい。従って、別の側面において、本発明の方法は絨毛膜サンプリング（ＣＶＳ）及び胎児の染色体分析に用いられる。例えば、Ｓａｎｚ（２００１）Ｆｅｔａｌ Ｄｉａｇｎ．Ｔｈｅｒ．１６：９５－９７を参照されたい。

【０１０７】

遺伝子モザイクは受精卵前核マイクロインジェクションにより作ったトランスジェニッ

ク動物の間では多い。創始動物の交配前の生殖細胞モザイクのスクリーニングの成功した方法はトランスジェニック株の増殖に関する費用を大幅に減少させ、トランスジェニック家畜生産の効率を向上させるものである。従って、別の側面において、本発明の方法はトランスジェニック動物の生産、特に交配前の生殖細胞モザイクに関する創始動物のスクリーニングに用いられる。例えば、Ｉｂａｎｅｚ（２００１）Ｍｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．Ｄｅｖ．５８：１６６－１７２を参照されたい。

【０１０８】

実施例

以下の実施例は説明のためのものであり、請求項に記載した発明を限定するものではない。

【０１０９】

実施例１：核酸アレイの作成

以下の実施例は本発明のアレイを作成する典型的な手順を示すものである。

【０１１０】

ＢＡＣマイクロアレイの作成：

５０キロ塩基（ｋｂ）以上、約３００ｋｂ以下のＢＡＣクローンをＴｅｒｒｉｆｉｃ Ｂｒｏｔｈ培地内で成長させる。より大きな挿入、例えば３００ｋｂより小さいクローン及びより小さい、約１～２０ｋｂも用いられる。ＤＮＡは修正アルカリ溶菌法により調製する（例えば、ｓａｍｂｒｏｏｋを参照）。ＤＮＡは以下に説明するように標識する。

【０１１１】

それから、ＤＮＡを米国特許第６，０４８，６９５号に記載されているように化学修飾する。修飾ＤＮＡはそれから適当なバッファーに溶解し、米国特許第６，０４８，６９５号に記載されているように清潔なガラスに直接プリントする。通常、各クローンにつき複数のスポットがプリントされる。

【０１１２】

実施例２：　核酸標識及びＤＮＡアーゼ酵素断片化

標準ランダムプライミング法はゲノムＤＮＡをアレイに付着させる前に、該ゲノムＤＮＡを標識するために用い、例えば、ｓａｍｂｒｏｏｋを参照。サンプル核酸も同様に標識する。Ｃｙ３（商標）またはＣｙ５（商標）標識ヌクレオチドは０．０～約６の範囲のモル比（非標識ヌクレオチド対標識ヌクレオチド）で対応非標識ヌクレオチドを加えて補完される。標識は２～１０時間、３７℃で実施する。標識後、反応混合物を３～５分間、９５℃～１００℃に加熱して、ポリメラーゼを不活化し、テンプレートから新しく生成した標識“プローブ”核酸を変性させる。

【０１１３】

それから加熱サンプルを５分間、氷の上で冷却する。“較正”ＤＮＡアーゼ（ＤＮＡエンドヌクレアーゼ）酵素は（ランダムプライミングにより生成した）標識テンプレートを断片化するために加える。“トレース”量（微量）ＤＮＡアーゼを約３０～約１００塩基サイズの断片に標識核酸を消化／断片化するために加える（最終的な濃度は０．２～２ｎｇ／ｍｌであった；培養時間１５～３０分）。

【０１１４】

本発明の多数の実施態様を記載したが、本発明の概念及び範囲を逸脱することなく種々の修正が可能なことは当然のことである。従って、その他の実施態様も請求の範囲の範囲内である。

【手続補正書】

【提出日】平成16年7月22日(2004.7.22)

【手続補正１】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

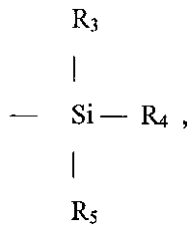
【補正の内容】

【特許請求の範囲】
【請求項１】
アレイ・ベースのコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーション（ＣＧＨ）を行うことにより細胞集団内の遺伝子モザイクの程度を検出する方法であって、ここで、複数個の複製において複数個のクローンゲノム核酸断片を含んだアレイを提供し、基質表面上の公知の個別スポットに固定化された各クローン断片はアレイを形成し、該クローンゲノム核酸断片は公知の第１の核型の実質的に完全な第一のゲノムを含み、当該方法は以下を含む：
（ａ）第１の核酸サンプル及び第２の核酸サンプル及び第２のサンプルの希釈フラクション（ｆｒａｃｔｉｏｎａｌ　ｄｉｌｕｔｉｏｎｓ）の混合物とアレイの複製を接触させる工程であって、第１のサンプルは第１の検出ラベルで標識された第１のゲノムの実質的に完全な相補体を含んだ複数のゲノム核酸断片を含み、第２のサンプルは第２の検出ラベルで標識された第２のゲノムの実質的に完全な相補体を含む複数のゲノム核酸を含み、及び第２のサンプルの核型は公知であり、かつ第１のサンプルの核型と異なる；
（ｂ）さらに第１の核酸サンプル及び第３の核酸サンプル及び第３の核酸サンプルの希釈フラクションの混合物とアレイの複製を接触させる工程であって、第３のサンプルは未知の核型を有するゲノム核酸サンプルを含み、第２の検出ラベルで標識され、第３のサンプルのゲノム核酸は試験細胞または組織サンプルから得た第３のサンプルのゲノム核酸の実質的に完全な相補体を含み、ここで、第１及び第２の各サンプルの混合物及び第１及び第３のサンプルの混合物中の核酸がアレイ上に固定化されたゲノム核酸断片へ特異的にハイブリダイズできる条件下で接触させる；
（ｃ）各接触アレイの各スポット上の第１のラベル及び第２のラベルの量を測定する工程及びコンパラティブ・ゲノミック・ハイブリダイゼーションにより各希釈フラクションの核型を決定する工程；及び
（ｄ）公知の核型に最も近い第２のサンプルの希釈フラクションの核型決定を選択する工程及び第３のサンプルの核型を決定するために第３のサンプルの同じ希釈フラクションデータを選択し、それにより細胞集団中の遺伝子モザイクの程度を決定する工程。
【請求項２】
細胞集団がヒト細胞を含む、請求項１の方法。
【請求項３】
細胞集団が染色体異常を有する疑いがある個体由来のものである、請求項１の方法。
【請求項４】
病気または健康状態が癌を含む、請求項１の方法。
【請求項５】
細胞集団が体液、組織、生検、血液サンプル、羊水、絨毛膜サンプル、胚細胞、及び胎児組織のサンプルからなる群より選択される、請求項１の方法。
【請求項６】
体液または組織サンプルが癌細胞、腫瘍細胞サンプルを含む、請求項５の方法。
【請求項７】
第１、第２及び第３のゲノムの少なくとも１つが哺乳類ゲノムを含む、請求項１の方法。
【請求項８】
第１、第２及び第３の哺乳類ゲノムがヒトゲノムを含む、請求項７の方法。
【請求項９】
クローン核酸断片が人工染色体を含む構築体内にクローンされる、請求項１の方法。
【請求項１０】
人工染色体が細菌性人工染色体（ＢＡＣ）を含む、請求項９の方法。
【請求項１１】
人工染色体が、ヒト人工染色体（ＨＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）、形質転換（ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ－ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ）人工染色体（ＴＡＣ）及びバクテリオファージＰ１由来人工染色体（ＰＡＣ）からなる群より選択される、請求項９の方法。

【請求項１２】
クローン核酸断片が、コスミドベクター、プラスミドベクター及びウイルスベクターからなる群より選択されるベクターを含む構築体内にクローンされる、請求項１の方法。
【請求項１３】
クローン核酸断片が約５０キロ塩基～約５００キロ塩基長である、請求項９に記載の方法。
【請求項１４】
クローン核酸断片が約１００キロ塩基～約４００キロ塩基長である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
クローン核酸断片が約３００キロ塩基長である、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
第１のゲノム及び第２のゲノムの少なくとも１つの核型が従来のＧバンド解析、ＦＩＳＨまたはＳＫＹにより決定される、請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
検出ラベルが蛍光ラベルを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
蛍光ラベルがＣｙ５（商標）またはその同等物を含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
蛍光ラベルがＣｙ３（商標）またはその同等物を含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項２０】
蛍光ラベルがローダミン、フルオレセインまたはアリール置換４，４－ジフルオロ－４－ボラ－３ａ，４ａ－ジアザ－ｓ－インドアセン染料または同等物を含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項２１】
アレイ固定化ゲノムが野生型ゲノムを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２２】
第１のサンプルが野生型ゲノムを含む、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
第２のサンプルが癌細胞集団を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２４】
第２のサンプルがモザイク核型を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２５】
第２のサンプルが２以上の細胞集団を含むモザイク核型を含み、各小集団が異なる核型を含む、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
第１のスポット内のアレイ固定化ゲノム核酸断片が第２のスポット内のアレイ固定化ゲノム核酸断片と比較して配列の重複がない、請求項１に記載の方法。
【請求項２７】
スポット内のアレイ固定化ゲノム核酸断片がアレイ上のその他全てのゲノム核酸含有スポットのアレイ固定化ゲノム核酸断片と比較して配列の重複がない、請求項２６に記載のアレイ。
【請求項２８】
各クローンゲノム核酸断片がアレイ上に重複してスポットされる、請求項１に記載のアレイ。
【請求項２９】
アレイ固定化ゲノム核酸が基質表面に共有結合する、請求項１に記載の方法。
【請求項３０】
請求項４６に記載のアレイであって、アレイ固定化ゲノム核酸が一般式：Ｒ１－Ｘ－Ｒ２を有する化合物に共有結合し、ここでＲ１は環状エーテル、アルデヒドまたはクロロメチ

ルフェニル成分；ＸはＲ１部分とＲ２部分を結合するのに化学的に適した成分であり、Ｒ２部分は以下の一般式を有する

【化１】



ここで、Ｒ３、Ｒ４及びＲ５は同一または異なるアルコキシ基またはクロロ基を含む。

【請求項３１】

アレイ固定化ゲノム核酸が一般式：Ｒ１－Ｘ－Ｒ２を有する化合物に共有結合し、ここでＲ１はアミノ基、Ｒ２はアルコキシシラン基または塩化ハロゲン（ｃｈｌｏｒｏｈａｌｉｄｅ）基；及びＸはＲ１基とＲ２基を結合するのに化学的に適した成分である、請求項１に記載の方法。

【請求項３２】

アレイ固定化ゲノム核酸が一般式：$R_1-X-Si(OR_2)_m(Cl)_n(R)_k$を有する化合物に共有結合し、ここで、ｍ＋ｋは整数の３であり、ｎはもしｍが０より大きい場合、０となることができ、またはｎ＋ｋは整数の３であり、ｍはもしｎが０より大きい場合、０となることがきる；Ｘは不活性リンカーであり；R_1は生体分子に反応性の基を含み；Ｒはアルキル基；及びR_2はアルキル基である、請求項１に記載の方法。

【請求項３３】

基質表面上にスポットされた検出ラベルを測定できる装置の使用を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項３４】

該装置が電荷結合素子（ＣＣＤ）を含む、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

該装置が多色蛍光イメージングができる、請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】

多色蛍光イメージング・データを分析するためのコンピュータ・プロセッサの使用を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項３７】

さらにアレイからのイメージデータ及び核型分析のディスプレイ結果を解釈するためのコンピュータ及びコンピュータ・プログラムアルゴリズムの使用を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項３８】

種々の条件下でサンプルのフラクションを接触させる工程をさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項３９】

種々の条件が、ハイブリダイゼーション条件において用いる温度；各フラクションの洗浄条件において用いられる温度；ハイブリダイゼーション・バッファーの浸透圧；洗浄バッファーの浸透圧；各フラクショを接触させる時間；各フラクションを洗浄する前の時間；各フラクションを洗浄する間の時間；ハイブリダイゼーション条件の湿度；読み取り前に各フラクションをアレイに接触させる時間；核酸の濃度；及び核酸サイズからなる群より選択される種々の条件を含む、請求項３８に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/30951

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) :C12Q 1/68
US CL :435/6

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/6

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WEST, STN, MEDLINE, BIOSIS, CAPLUS, EMBASE
search terms: comparative genomic hybridization, mosaic, array, label

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,251,601 B1 (BAO et al) 26 June 2001, see entire document.	1-85
Y	US 6,261,775 B1 (BASTIAN et al) 17 July 2001, see entire document.	1-85
Y	POLLACK. J.R. et al. Genome-wide Analysis of DNA Copy-number Changes Using cDNA Microaarays Nature Genetics. September 1999. Vol. 23. No. 1. pages 41-46, see entire document.	1-85
Y	PCT WO 97/18326 (BENSIMON et al) 22 May 1997, see entire document.	1-85

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 19 DECEMBER 2002	Date of mailing of the international search report 09 APR 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer ARUN CHAKRABARTI Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)★

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/30951

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ 33/58	Ｇ０１Ｎ 37/00 １０２	
Ｇ０１Ｎ 37/00	Ｃ１２Ｎ 15/00 Ａ	
	Ｃ１２Ｎ 15/00 Ｆ	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100118647
弁理士 赤松 利昭
(74)代理人 100129713
弁理士 重森 一輝
(72)発明者 モハメッド、マンスー
アメリカ合衆国 テキサス州 ７７０５４、ヒューストン、アルメダ・ロード ７２００、アパートメント ２１５

Ｆターム(参考) 2G045 CA25 CB01 CB02 DA13 FB02 FB12 GC15
2G054 AA07 AA08 CA22 CE02 EA03
4B024 AA11 AA20 CA01 CA11 DA02 DA03 EA02 EA04 HA14 HA20
4B029 AA07 AA23 BB11 CC11 FA10 FA15
4B063 QA17 QA20 QQ42 QQ52 QR32 QR56 QR63 QR66 QR82 QS05
QS10 QS24 QS34 QS39 QX02 QX04

专利名称(译)	使用阵列检测基因镶嵌的方法		
公开(公告)号	JP2005525786A	公开(公告)日	2005-09-02
申请号	JP2003531143	申请日	2002-09-27
[标]申请(专利权)人(译)	基因组学谱油墨		
申请(专利权)人(译)	光谱基因组学，油墨.		
[标]发明人	モハメッドマンスー		
发明人	モハメッド、マンスー		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6809 C12Q1/6886 G01N21/78 G01N33/58 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6809 C12Q1/6886 C12Q2565/501		
FI分类号	C12Q1/68.A C12M1/00.A G01N21/78.C G01N33/53.M G01N33/58.A G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA13 2G045/FB02 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/CA22 2G054/CE02 2G054/EA03 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/HA14 4B024/HA20 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB11 4B029/CC11 4B029/FA10 4B029/FA15 4B063/QA17 4B063/QA20 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR63 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS05 4B063/QS10 4B063/QS24 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02 4B063/QX04		
代理人(译)	山崎 行造 杉山直人 白银 博 赤松俊明		
优先权	60/325853 2001-09-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种基于阵列的方法，用于检测细胞群中的基因镶嵌，例如活组织检查或体液样品或癌细胞培养物。本发明还提供了用于优化基于阵列的比较基因组杂交（CGH）方法的性能的方法。

表 1: 隣接遺伝子症候群の染色体位置プロファイル

染色体番号	位置	症候群
1	1p36	1p 欠失症候群
3	3p25-pter	3p 欠失症候群
3	3p21-pter	3p 重複症候群
4	4p16.3	ウオルフ・ヒルシュホーン症候群
4	4p15.2-16.1	4p 重複症候群
5	5p15.2-pter	ネコなき（Cri du Chat）症候群
7	7p13.3	ミラー・ディッカー症候群
7	7p11.23	ウィリアムズ症候群
8	8q24.1	ランガーギデオン症候群（LGS）
8	8q24.1	毛髪鼻指節骨症候群（TRPS）
9	9p，通常 9p22-pter	9p 欠失症候群
10	10p13p14	ディジョージ症候群 II
11	11p13	WAGR 症候群
11	11p15.5	ベックウィズ・ヴィードマン症候群
11	11p11.2	Potocki-Shaffer 症候群（多発性外骨腫性 II Locus）
15	15q12	アンジェルマン症候群
15	15q12	プラダー・ウィリー症候群
16	末端 16p13.3	ルビンスタイン・テイビ症候群
17	17p12	シャルコー・マリー・トゥース病 1A 型（CMT-1A）
17	17p12	圧迫性麻痺の遺伝性ニューロパチー
17	17p13.3	ミラー・ディッカー症候群/分離（Isolated）滑脳症
17	17p11.2	スミス・メイジェニス症候群
20	20p11.2p12	アラジル症候群
22	22q11.2(1-p13p14 も参照)	ディジョージ/Velocardiofacial 症候群
X	Xp21	先天性副腎過形成症（AHC）
X	Xp21	デュシェンヌ/ベッカー筋ジストロフィー
X	Xp21	グリセロールキナーゼ欠損症
X	Xp22	ペリツェウス・メルツバッハ病
X	Xp22.3	ステロイドスルファターゼ欠損症
Y	SRY 位置/Yp	SRY 位置異常