

(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2005-524849

(P2005-524849A)

(43) 公表日 平成17年8月18日(2005.8.18)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	2 GO 4 3
C 1 2 M 1/00	GO 1 N 33/543 5 9 5	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 2 9
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 54 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2004-503919 (P2004-503919)	(71) 出願人 596057893	
(86) (22) 出願日 平成15年5月7日 (2003.5.7)	ノースウエスタン ユニバーシティ	
(85) 翻訳文提出日 平成16年11月22日 (2004.11.22)	アメリカ合衆国, イリノイ 60208-	
(86) 国際出願番号 PCT/US2003/014100	1111, エバンストン, クラーク スト	
(87) 国際公開番号 W02003/095973	リート 633	
(87) 国際公開日 平成15年11月20日 (2003.11.20)	(74) 代理人 100068755	
(31) 優先権主張番号 60/378,538	弁理士 恩田 博宣	
(32) 優先日 平成14年5月7日 (2002.5.7)	(74) 代理人 100105957	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	弁理士 恩田 誠	
(31) 優先権主張番号 60/383,630	(72) 発明者 マーキン、チャド	
(32) 優先日 平成14年5月28日 (2002.5.28)	アメリカ合衆国 60091 イリノイ州	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	ウィルメット シックスティーンズ ス	
(31) 優先権主張番号 10/172,428	トリート 111	
(32) 優先日 平成14年6月14日 (2002.6.14)		
(33) 優先権主張国 米国 (US)		
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 ラマン分光分析のフィンガープリントを備えた分析物質検出用のナノ粒子プローブ

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも1種のラマン色素および特異的結合要素が結合した粒子を含んでなる試薬、ならびに当該試薬の使用法を含む。本発明は、特異的結合要素および2種以上の異なるラマン色素の試薬、ならびに当該試薬の使用法も含む。特異的結合要素が結合した、新しい種類の粒子プローブについて記載する。これらの試薬は新規な検出戦略において使用されるが、この戦略では、マイクロアレイ方式において標的およびその下にあるチップによって捕捉された色素標識粒子の、表面増強ラマン散乱 (SERS) プロモーターとして作用しうる銀コーティングを作製するために、Auナノ粒子の触媒的性質を利用する。この戦略によって、スキャナによるグレー・スケールの検出の感度が上昇し、選択性が向上するだけでなく、検出における分光分析のフィンガープリントとしてラマン標識を使用するという概念に基づき非常に多数のプローブを設計することが可能であるため、多重化能力および限定能力を得る手段がもたらされる。これらのスペクトルをフィンガープリントとして使用して、1つの溶液中のオリゴヌクレオチドまたは他の標的を区別する。この方法を使用して、6種のラマン標識ナノ粒子プローブを用いて6種の非類似DNA標的を識別可能であり、一塩基多型 (SNP) を有する2つのRNA標的も識別可能であった。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つのラマン標識および特異的結合要素が結合した粒子からなり、該ラマン標識を活性化して S E R S 効果を生じさせることが可能である試薬。

【請求項 2】

前記粒子が 2 つ以上の異なるラマン標識を有する、請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 3】

前記特異的結合要素が D N A、R N A、ポリペプチド、抗体、抗原、炭水化物、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、炭水化物、ホルモン、ステロイド、ビタミン、薬剤、ウイルス、多糖、脂質、リボ多糖、糖タンパク質、リポタンパク質、核タンパク質、オリゴヌクレオチド、抗体、免疫グロブリン、アルブミン、ヘモグロビン、凝固因子、ペプチドホルモンおよびタンパク質ホルモン、非ペプチドホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、腫瘍特異的エピトープからなるペプチド、細胞、細胞表面分子、微生物、微生物の断片、一部分、成分または生成物、小有機分子、核酸およびオリゴヌクレオチド、任意の前記物質の代謝産物または任意の前記物質に対する抗体である、請求項 1 に記載の試薬。

10

【請求項 4】

核酸およびオリゴヌクレオチドが、遺伝子、ウイルス R N A およびウイルス D N A、細菌 D N A、真菌 D N A、哺乳動物 D N A、c D N A、m R N A、R N A 断片および D N A 断片、オリゴヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、一本鎖および二本鎖核酸、天然および合成核酸からなる、請求項 3 に記載の試薬。

20

【請求項 5】

前記粒子が金、A g、C u、P t、A g / A u、P t / A u、C u / A u コア・シェル粒子および合金粒子である、請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 6】

前記粒子がナノ粒子である、請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 7】

前記粒子が金属ナノ粒子である、請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 8】

前記粒子が金ナノ粒子である、請求項 1 に記載の試薬。

30

【請求項 9】

前記ラマン標識が前記粒子に直接結合している、請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 10】

前記ラマン標識が前記粒子に間接的に結合している、請求項 9 に記載の試薬。

【請求項 11】

少なくともいくつかの前記ラマン標識が、前記特異的結合対要素に結合している、請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 12】

前記結合体が前記粒子に共有結合している、請求項 11 に記載の試薬。

【請求項 13】

前記特異的結合対要素が、官能基によって前記粒子に共有結合している、請求項 1 に記載の試薬。

40

【請求項 14】

前記ラマン標識が染色物質によって活性化される、請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 15】

前記染色物質が銀、金または銅染色物質からなる、請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 16】

2 つ以上の異なるラマン標識が結合した特異的結合要素からなる試薬。

【請求項 17】

前記特異的結合要素が、抗原と抗体の特異的結合対、ビオチンとアビジンの結合対、炭

50

水化物とレクチンの結合対、相補的ヌクレオチド配列、相補的ペプチド配列、エフェクター分子と受容体分子、酵素補因子と酵素、および酵素阻害剤と酵素からなる群から選択される特異的結合対の要素からなる、請求項 16 に記載の試薬。

【請求項 18】

前記特異的結合要素が DNA、RNA、ポリペプチド、抗体、抗原、炭水化物、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、炭水化物、ホルモン、ステロイド、ビタミン、薬剤、ウイルス、多糖、脂質、リボ多糖、糖タンパク質、リポタンパク質、核タンパク質、オリゴヌクレオチド、抗体、免疫グロブリン、アルブミン、ヘモグロビン、凝固因子、ペプチドホルモンおよびタンパク質ホルモン、非ペプチドホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、腫瘍特異的エピトープからなるペプチド、細胞、細胞表面分子、微生物、微生物の断片、一部分、成分または生成物、小有機分子、核酸およびオリゴヌクレオチド、任意の前記物質の代謝産物または任意の前記物質に対する抗体である、請求項 16 に記載の試薬。 10

【請求項 19】

核酸およびオリゴヌクレオチドが、遺伝子、ウイルス RNA およびウイルス DNA、細菌 DNA、真菌 DNA、哺乳動物 DNA、cDNA、mRNA、RNA 断片および DNA 断片、オリゴヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、一本鎖および二本鎖核酸、天然および合成核酸からなる、請求項 18 に記載の試薬。

【請求項 20】

前記特異的結合要素が、DNA、RNA、抗体、抗原、ポリペプチド、または炭水化物である、請求項 16 に記載の試薬。 20

【請求項 21】

(a) 請求項 1 に記載の試薬と分析物質との複合体を形成する工程と、
(b) 該複合体を支持体に結合させる工程と、
(c) 該支持体上の該複合体を染色して、前記ラマン標識の SERS 効果を活性化する工程と、
(d) 該 SERS 効果を測定する工程と
からなる分析物質を検出するための方法。

【請求項 22】

前記複合体が、1 つまたは複数の特異的結合物質によって前記支持体に結合される、請求項 21 に記載の方法。 30

【請求項 23】

(a) 分析物質を支持体に結合させる工程と、
(b) 請求項 1 に記載の試薬と該支持体上の分析物質とを複合体形成させる工程と、
(c) 該支持体上の該複合体を染色して、ラマン標識の SERS 効果を活性化する工程と、
(d) 該 SERS 効果を測定する工程と
からなる分析物質を検出するための方法。

【請求項 24】

前記試薬を、1 つまたは複数の特異的結合物質によって、前記支持体上の前記分析物質に間接的に結合させる、請求項 23 に記載の方法。 40

【請求項 25】

前記標的分析物質が、抗体、抗原、ハプテン、受容体、リガンド、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、核酸、膜または膜分画、脂質、膜-タンパク質複合体、炭水化物、ウイルス、細胞またはマクロ分子もしくは分子複合体からなる、請求項 21 または 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記特異的結合要素が、抗体、抗原、受容体、リガンド、タンパク質、ポリペプチド、小分子または核酸からなる、請求項 21 または 23 に記載の方法。

【請求項 27】

前記特異的結合要素が、抗原と抗体の特異的結合対、ビオチンとアビジンの結合対、炭水化物とレクチンの結合対、相補的ヌクレオチド配列、相補的ペプチド配列、エフェクター分子と受容体分子、酵素補因子と酵素、および酵素阻害剤と酵素からなる群から選択される特異的結合対の要素からなる、請求項 21 または 23 に記載の方法。

【請求項 28】

前記特異的結合要素が DNA、RNA、ポリペプチド、抗体、抗原、炭水化物、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、炭水化物、ホルモン、ステロイド、ビタミン、薬剤、ウイルス、多糖、脂質、リポ多糖、糖タンパク質、リポタンパク質、核タンパク質、オリゴヌクレオチド、抗体、免疫グロブリン、アルブミン、ヘモグロビン、凝固因子、ペプチドホルモンおよびタンパク質ホルモン、非ペプチドホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、腫瘍特異的エピトープからなるペプチド、細胞、細胞表面分子、微生物、微生物の断片、一部分、成分または生成物、小有機分子、核酸およびオリゴヌクレオチド、任意の前記物質の代謝産物または任意の前記物質に対する抗体である、請求項 27 に記載の方法。

10

【請求項 29】

核酸およびオリゴヌクレオチドが、遺伝子、ウイルス RNA およびウイルス DNA、細菌 DNA、真菌 DNA、哺乳動物 DNA、cDNA、mRNA、RNA 断片および DNA 断片、オリゴヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、一本鎖および二本鎖核酸、天然および合成核酸からなる、請求項 28 に記載の方法。

20

【請求項 30】

多数の種類の標的分析物質の検出を可能とするために、前記支持体に複数の異なる第 1 の特異的結合要素がアレイ状に結合している、請求項 21 または 23 に記載の方法。

【請求項 31】

前記支持体が、スライドガラス、マイクロプレート・ウエル、ビーズ、ポリマー製の膜、または光ファイバーからなる、請求項 21 または 23 に記載の方法。

【請求項 32】

サンプル中の、少なくとも 2 つの結合部位を有する 1 つまたは複数の標的分析物質の有無を検出するための方法であって、

該標的分析物質を支持体上に固定するための、1 種類または複数種類の第 1 の特異的結合要素が結合した支持体を提供する工程と、

30

1 種類または複数種類の粒子を提供する工程であって、それぞれの種類の粒子に (a) 1 つまたは複数のラマン標識、および (b) 特異的標的分析物質に結合するための第 2 の特異的結合要素が結合しており、(i) それぞれの種類の粒子に結合した該ラマン活性標識が異なっていて特異的標的分析物質の識別子としての役割を果たし、かつ (ii) それぞれの種類の粒子に結合した第 2 の特異的結合要素が異なっていて特異的標的分析物質を標的としていることを特徴とする工程と、

サンプル中に 1 つまたは複数の標的分析物質の存在する場合に粒子と複合体形成した試験支持体が形成されるように、粒子、サンプル、および支持体を、標的分析物質と第 1 および第 2 の特異的結合要素との間の特異的結合相互作用に有効な条件下で接触させる工程と、

40

該試験支持体と染色物質を接触させて、表面増強ラマン散乱 (SERS) を発生可能な表面を有する検出用支持体を生成させる工程と、

SERS スペクトルを得て分析することによって、サンプル中の 1 つまたは複数の標的分析物質の存在の指標として、前記検出用支持体上の前記粒子複合体の存在を判定する工程と

からなる方法。

【請求項 33】

多数の種類の標的分析物質の検出を可能とするために、前記支持体に複数の異なる第 1 の特異的結合要素がアレイ状に結合している、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

50

前記支持体が、スライドガラス、マイクロプレート・ウエル、ビーズ、ポリマー製の膜、または光ファイバーからなる、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記ラマン標識の少なくとも一部分が、前記特異的結合要素に結合している、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記ラマン標識がオリゴヌクレオチドに結合している、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記オリゴヌクレオチドが、ポリアデノシンまたはポリチミジンである、請求項 3 3 に記載の方法。

10

【請求項 3 8】

前記オリゴヌクレオチドが、いかなる標的核酸とも相補的ではない、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記粒子がナノ粒子である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記粒子が金属ナノ粒子である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記ラマン標識が前記特異的結合対要素に結合している、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記結合体が前記粒子と共有結合している、請求項 4 1 に記載の方法。

20

【請求項 4 3】

前記特異的結合要素が DNA、RNA、ポリペプチド、抗体、抗原、炭水化物、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、炭水化物、ホルモン、ステロイド、ビタミン、薬剤、ウイルス、多糖、脂質、リポ多糖、糖タンパク質、リポタンパク質、核タンパク質、オリゴヌクレオチド、抗体、免疫グロブリン、アルブミン、ヘモグロビン、凝固因子、ペプチドホルモンおよびタンパク質ホルモン、非ペプチドホルモン、インターロイキン、インターフェロン、サイトカイン、腫瘍特異的エピトープからなるペプチド、細胞、細胞表面分子、微生物、微生物の断片、一部分、成分または生成物、小有機分子、核酸およびオリゴヌクレオチド、任意の前記物質の代謝産物または任意の前記物質に対する抗体である、請求項 3 2 に記載の方法。

30

【請求項 4 4】

核酸およびオリゴヌクレオチドが、遺伝子、ウイルス RNA およびウイルス DNA、細菌 DNA、真菌 DNA、哺乳動物 DNA（例えばヒト DNA）、cDNA、mRNA、RNA 断片および DNA 断片、オリゴヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、一本鎖および二本鎖核酸、天然および合成核酸からなる、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記特異的結合要素が、抗原と抗体の特異的結合対、ビオチンとアビジンの結合対、炭水化物とレクチンの結合対、相補的ヌクレオチド配列、相補的ペプチド配列、エフェクター分子と受容体分子、酵素補因子と酵素、および酵素阻害剤と酵素からなる群から選択される特異的結合対の要素からなる、請求項 3 2 に記載の試薬。

40

【請求項 4 6】

サンプル中の、配列が少なくとも 2 つの部分をもつ 1 つまたは複数の標的核酸の有無を検出するための方法であって、

特異的核酸標的の第 1 の部分と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが結合した支持体を提供する工程と、

1 種類または複数種類の粒子を提供する工程であって、それぞれの種類の粒子にはオリゴヌクレオチドおよび少なくとも 1 以上のラマン活性標識が結合しており、(i) それぞれの種類の粒子に結合したオリゴヌクレオチドのうち少なくともいくつかは、特異的標的

50

核酸の配列の第 2 の部分と相補的な配列を有し、かつ (i i) それぞれの種類の粒子に結合したラマン標識が異なっていて特異的標的核酸の識別子としての役割を果たし、前記ラマン標識が少なくとも 1 つのラマン標識からなることを特徴とする工程と、

1 つまたは複数の標的核酸が前記サンプル中に存在する場合に 1 つまたは複数の粒子複合体が結合した試験支持体が形成されるように、粒子、支持体、およびサンプルを、支持体に結合したオリゴヌクレオチドと核酸の第 1 の部分のハイブリダイゼーション、および粒子に結合したオリゴヌクレオチドと核酸の第 2 の部分のハイブリダイゼーションに有効な条件下で接触させる工程と、

該試験支持体と染色物質を接触させて、表面増強ラマン散乱 (S E R S) を発生可能な表面を有する検出用支持体を生成させる工程と、

S E R S スペクトルを得て分析することによって、サンプル中の 1 つまたは複数の標的核酸の存在の指標として前記検出用支持体上の前記粒子複合体の存在を判定する工程とからなる方法。

10

【請求項 47】

前記ラマン標識が、前記オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に結合している、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

多数の種類の標的分析物質の検出を可能にするために、前記支持体に複数の異なる第 1 の特異的結合要素がアレイ状に結合している、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 49】

前記支持体が、スライドガラス、マイクロプレート・ウェル、ビーズ、ポリマー製の膜、または光ファイバーからなる、請求項 46 に記載の方法。

20

【請求項 50】

前記ラマン標識の少なくとも一部分が、前記特異的結合対要素に結合している、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 51】

前記ラマン標識がオリゴヌクレオチドに結合している、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 52】

前記オリゴヌクレオチドが、ポリアデノシンまたはポリチミジンである、請求項 51 に記載の方法。

30

【請求項 53】

前記オリゴヌクレオチドが、いかなる標的核酸とも相補的ではない、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 54】

前記粒子がナノ粒子である、請求項 46 に記載の試薬。

【請求項 55】

前記粒子が金属ナノ粒子である、請求項 46 に記載の試薬。

【請求項 56】

前記ラマン標識が前記特異的結合対要素に結合している、請求項 46 に記載の試薬。

【請求項 57】

前記複合体が前記粒子と共有結合している、請求項 X に記載の試薬。

40

【請求項 58】

サンプル中の、配列が少なくとも 2 つの部分を持つ 1 つまたは複数の標的核酸の有無を検出するための方法であって、

該核酸の第 1 の部分と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが結合した支持体を提供する工程と、

それぞれオリゴヌクレオチドが結合しており、かつ該オリゴヌクレオチドの一部分と結合したラマン活性標識をそれぞれ含んでなる 1 種類または複数種類の粒子を提供する工程であって、(i) 該粒子に結合したオリゴヌクレオチドのうち少なくともいくつかは該核酸の第 2 の部分と相補的な配列を有し、かつ (i i) それぞれの種類の粒子と結合したラ

50

マン標識が特異的標的核酸の識別子としての役割を果たし、前記ラマン標識が、ラマン散乱を誘導可能な放射線により照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも1つのラマン標識からなることを特徴とする工程と、

前記標的核酸が前記サンプル中に存在する場合に粒子複合体が結合した試験支持体が形成されるように、粒子、支持体、およびサンプルを、支持体に結合したオリゴヌクレオチドと核酸の第1の部分のハイブリダイゼーション、および粒子に結合したオリゴヌクレオチドと核酸の第2の部分のハイブリダイゼーションに有効な条件下で接触させる工程と、

該試験支持体と染色物質を接触させて、表面増強ラマン散乱 (SERS) を発生可能な表面を有する検出用支持体を生成させる工程と、

SERSスペクトルを得て分析することによって、該サンプル中の該標的核酸の存在の指標として、前記検出用支持体上の前記粒子複合体の存在を判定する工程とからなる方法。 10

【請求項59】

前記ラマン標識が、前記オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分と結合している、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

多数の種類の標的核酸または標的核酸の一部分の検出を可能にするために、該支持体に複数の異なるオリゴヌクレオチドがアレイ状に結合している、請求項58に記載の方法。

【請求項61】

前記支持体が、スライドガラス、マイクロプレート・ウェル、ビーズ、ポリマー製の膜、または光ファイバーからなる、請求項58に記載の方法。 20

【請求項62】

前記粒子がナノ粒子である、請求項58に記載の方法。

【請求項63】

前記粒子が金属ナノ粒子である、請求項58に記載の方法。

【請求項64】

前記粒子が金ナノ粒子である、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

1つまたは複数の分子をスクリーニングして、該分子が1つまたは複数の特定の受容体のリガンドであるかどうか、該分子がサンプル中に存在するかどうかを判定するための方法であって、 30

1つまたは複数の特定の受容体が結合した支持体を提供する工程と、

1種類または複数種類の結合体を提供する工程であって、該結合体が、粒子、該粒子に結合したオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドの一部分に結合したラマン活性標識、および特定の種類の結合体のオリゴヌクレオチドの一部分と結合した前記サンプル由来の分子からなり、前記ラマン活性標識が、ラマン散乱を誘導可能な放射線により照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも1つのラマン活性分子からなることを特徴とする工程と、

該分子が特定の受容体のリガンドである場合に粒子と複合体形成した試験支持体が形成されるように、粒子、サンプル、および支持体を、粒子に結合した分子と支持体に結合した特定の受容体との間の特異的結合相互作用に有効な条件下で接触させる工程と、 40

該試験支持体と染色物質を接触させて、表面増強ラマン散乱 (SERS) を発生可能な表面を有する検出用支持体を生成させる工程と、

SERSスペクトルを得て分析することによって、特定の受容体に対するリガンドの確証として、前記検出用支持体上の前記粒子複合体の存在を判定する工程とからなる方法。

【請求項66】

多数の種類の分子の検出を可能にするために、該支持体に複数の異なる受容体がアレイ状に結合している、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

前記支持体が、スライドガラス、マイクロプレート・ウェル、ビーズ、ポリマー製の膜、または光ファイバーからなる、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 68】

前記粒子がナノ粒子である、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 69】

前記粒子が金属ナノ粒子である、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 70】

前記粒子が金ナノ粒子である、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

1 つまたは複数の分子をスクリーニングして、該分子が 1 つまたは複数の特定の受容体のリガンドであるかどうか、該分子がサンプル中に存在するかどうかを判定するための方法であって、

1 つまたは複数の特定の受容体が結合した支持体を提供する工程と、

特異的結合対の第 1 の要素で修飾した分子を提供する工程と、

1 種類または複数種類の結合体を提供する工程であって、該結合体が、粒子、該粒子に結合した 1 つまたは複数のラマン活性標識、および該粒子に結合した特異的結合対の第 2 の要素からなり、前記ラマン活性標識が、ラマン散乱を誘導可能な放射線により照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも 1 つのラマン活性分子からなることを特徴とする工程と、

該分子が特定の受容体のリガンドである場合に粒子と複合体形成した試験支持体が形成されるように、粒子、サンプル、および支持体を、分子と支持体に結合した特定の受容体との間、特異的結合対の第 1 の要素と第 2 の要素との間の特異的結合相互作用に有効な条件下で接触させる工程と、

該試験支持体と染色物質を接触させて、表面増強ラマン散乱 (SERS) を発生可能な表面を有する検出用支持体を生成させる工程と、

SERS スペクトルを得て分析することによって、特定の受容体のリガンドの確証として、前記検出用支持体上の前記粒子複合体の存在を判定する工程とからなる方法。

【請求項 72】

多数の種類の分子の検出を可能にするために、該支持体に複数の異なる受容体がアレイ状に結合している、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 73】

前記支持体が、スライドガラス、マイクロプレート・ウェル、ビーズ、ポリマー製の膜、または光ファイバーからなる、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 74】

前記粒子が金、Ag、Cu、Pt、Ag/Au、Pt/Au、Cu/Au コア・シェル粒子および合金粒子である、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 75】

前記粒子がナノ粒子である、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 76】

前記粒子が金属ナノ粒子である、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 77】

前記粒子が金ナノ粒子である、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 78】

前記ラマン標識が前記粒子に直接結合している、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 79】

前記ラマン標識が前記粒子に間接的に結合している、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 80】

前記ラマン標識が染色物質によって活性化される、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 81】

10

20

30

40

50

前記染色物質が銀、金または銅染色物質を含んでなる、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

1 つの容器に入った請求項 1 に記載の試薬、および別の容器に入ったラマン増強用染色物質からなる、試験用キット。

【請求項 83】

1 つの容器に入った請求項 1 に記載の試薬、および別の容器に入った銀、金または銅染色ラマン増強剤からなる、試験用キット。

【請求項 84】

1 つの容器に入った請求項 16 に記載の試薬、および別の容器に入ったラマン増強用染色物質からなる、試験用キット。

10

【請求項 85】

1 つの容器に入った請求項 16 に記載の試薬、および別の容器に入った銀、金または銅染色ラマン増強剤からなる、試験用キット。

【請求項 86】

光ファイバー束を備えてなる光ファイバー製検出装置であって、該光ファイバー束の終端は光ファイバーの端部となっており、複数の光ファイバーの端部に請求項 1 に記載の試薬が配置されていることを特徴とする検出装置。

【請求項 87】

光ファイバーの端部の 2 つ以上の請求項 1 に記載の試薬が、異なる特異的結合要素および異なるラマン標識を有する、請求項 86 に記載の光ファイバー製検出装置。

20

【請求項 88】

光ファイバー束を備えてなる光ファイバー製検出装置であって、該光ファイバー束の終端は光ファイバーの端部となっており、複数の光ファイバーの端部に請求項 16 に記載の試薬が配置されていることを特徴とする検出装置。

【請求項 89】

光ファイバーの端部の 2 つ以上の請求項 16 に記載の試薬が、異なる特異的結合要素および異なるラマン標識を有する、請求項 86 に記載の光ファイバー製検出装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、SERS 系検出法、光学装置、ならびに特異的結合要素およびラマン標識で官能化された粒子または担体またはラマン色素担体を含んでなる検出用プローブに関する。

【背景技術】

【0002】

(相互参照文献)

本出願は、2002 年 5 月 7 日に提出された米国仮出願第 60/378,538 号(ケース番号 02-338)、および 2002 年 5 月 28 日に提出された同第 60/383,630 号(ケース番号 02-338-A)に基づく優先権の特典を主張する、2002 年 6 月 14 日に提出された米国特許出願第 10/172,428 号の一部継続出願であり、これらはいずれもその全容を本願明細書に援用する。本出願中に記載の研究は、米空軍科学調査部(Air Force Office of Scientific Research)、DARPA、および NSF の助成金により一部支援されている。したがって米国政府は、本発明に対して一部権利を有するものとする。

40

【0003】

(発明の背景)

化学分子および生物分子に関する、高感度、高選択性の検出形式の開発は、過去 10 年間でなされたゲノミクスおよびプロテオミクスの進展のあらゆる可能性を実現させるために、最も重要である(非特許文献 1~4 を参照のこと)。高密度遺伝子チップによって、数千の遺伝子の発現レベルを同時に調べるのが可能となっている。低密度チップによ

50

て、1 サンプル中の多くの考えられる生物学的有害物質（バイオハザード）を実験室および臨床現場のいずれにおいても同定できる見込みが示されてきている。容認され使用されている主要な標識技術は、現在は分子蛍光マーカーに基づくものであるが、近年のナノ粒子技術の進展によって、従来の蛍光に基づく手法よりも感度および選択性が著しく高く、おそらくは一層簡単かつ多用途の読み取り用ハードウェアを備えたシステムが示されてきている（非特許文献 5 ～ 17 を参照のこと）。生物学的診断に関する研究のための次世代標識技術としてのナノ粒子に関する、精力的な議論がなされている。

【 0 0 0 4 】

最も感度および選択性の高い DNA 検出形式の 1 つは、プローブとしてのオリゴヌクレオチド官能化ナノ粒子、シグナル増大のための粒子誘発型銀現像技法、および光学式読み取り用のプラットフォームを用いるものである（非特許文献 8 を参照のこと）。この「スキャナによる DNA 検出」方式について現在示されている検出限界は 1 0 0 a M であり、このシステムの有用性は、比較的短い合成鎖、PCR 産物、およびゲノム DNA 標的を用いて実証されている（非特許文献 17 および 18 を参照のこと）。この手法の制約は、同手法が本質的にグレー・スケールに基づく 1 色のシステムであることである。すべての DNA 検出システムの柔軟性および適用性は、位置指定可能（addressable）で個々に識別可能な標識情報を備えた複数の種類の標識を利用することから利点を得ている。蛍光の場合、他の研究者らにより、量子ドットを含めた多数の蛍光物質（フルオロフォア）を使用して、使用する蛍光物質の種類およびプローブ中のそれらのシグナル比によって変わる光学的特徴を備えたコード化構造物を作製可能であることが実証されている（非特許文献 11 および 19 を参照のこと）。これらの手法は、典型的には μm の大きさのプローブを使用し、したがって、適切なシグナル強度および均一性を有するコード化構造物を得ることが可能である。さらに分子状の蛍光物質の場合、スペクトル特性の重複および蛍光物質の光退色速度の不均一性（非特許文献 1 および 11 を参照のこと）が原因で、この手法にはいくつかの潜在的な複雑さがある。

【 0 0 0 5 】

当分野では、さまざまな分析物質を検出するために表面増強ラマン分光法（SERS）を使用することが報告されている。例えば、特許文献 1 は、SERS を使用する DNA 塩基配列決定の方法および装置について述べている。特許文献 2 は、SERS を使用して分析物質全般を検出することについて述べている。特許文献 3 は、特異的結合分子に結合させたラマン標識の使用について述べている。特許文献 4 は、イムノアッセイにおける SERS の使用について述べている。特許文献 5 は、SERS の使用、核酸および核酸サブユニットの検出について述べている。特許文献 6 および特許文献 7 は、銀を使用して SERS 活性を有する支持体を形成し、吸着分子のラマン散乱を増大させることについて述べている。

【特許文献 1】米国特許第 5, 306, 403 号

【特許文献 2】米国特許第 5, 266, 498 号

【特許文献 3】米国特許第 5, 445, 972 号

【特許文献 4】米国特許第 5, 376, 556 号

【特許文献 5】米国特許第 6, 127, 120 号

【特許文献 6】米国特許第 6, 242, 264 号

【特許文献 7】米国特許第 6, 025, 202 号

【非特許文献 1】ジー・ギブソン（G. Gibson）、エス・ブイ・ミューズ（S.V. Muse）、「ゲノム科学のプライマー（A Primer of Genome Science）」、米国マサチューセッツ州サンダーランド所在のシナウア・アソシエーツ・インコーポレイテッド（Sinauer Associates, Inc.）2002 年

【非特許文献 2】エム・シェーナ（M. Schena）、ディ・シャロン（D. Shalon）、アール・ダブリュ・デービス（R.W. Davis）、ピー・オー・ブラウン（P.O. Brown）、サイエンス誌（Science）、1995 年、第 270 巻、p. 467

【非特許文献 3】エム・チー（M. Chee）、アール・ヤン（R. Yang）、イー・ハッベル

- (E. Hubbell)、エイ・ベルノ(A. Berno)、エックス・シー・ヒュアン(X.C. Huang)、ディ・スターン(D. Stern)、ジェイ・ウィンクラー(J. Winkler)、ディ・ジェイ・ロックハート(D.J. Lockhart)、エム・エス・モリス(M.S. Morris)、エス・ピー・エイ・フォード(S.P.A. Fodor)、サイエンス誌、1996年、第274巻、p. 610
- 【非特許文献4】エム・スナイダー(M. Snyder)ら、サイエンス誌、2001年、第293巻、p. 2101
- 【非特許文献5】アール・エルガニアン(R. Elghanian)、ジェイ・ジェイ・ストルホッフ(J.J. Storhoff)、アール・シー・マキック(R.C. Mucic)、アール・エル・レステインガー(R.L. Letsinger)、シー・エイ・ミルキン(C.A. Mirkin)、サイエンス誌、1997年、第277巻、p. 1078
- 【非特許文献6】エム・ブルチェス ジュニア(M. Bruchez Jr.)、エム・モロンネ(M. Moronne)、ピー・ジン(P. Gin)、エス・ワイス(S. Weiss)、エイ・ピー・アリビスアトス(A.P. Alivisatos)、サイエンス誌、1998年、第281巻、p. 2013
- 【非特許文献7】ダブリュ・シー・ダブリュ・チャン(W.C.W. Chan)、エス・ニー(S. Nie)、サイエンス誌、1998年、第281巻、p. 2016
- 【非特許文献8】ティ・エイ・タトン(T.A. Taton)、シー・エイ・ミルキン(C.A. Mirkin)、アール・エル・レステインガー(R.L. Letsinger)、サイエンス誌、2000年、第289巻、p. 1757
- 【非特許文献9】エス・ジェイ・パーク(S.J. Park)、ティ・エイ・タトン(T.A. Taton)、シー・エイ・ミルキン(C.A. Mirkin)、サイエンス誌、2002年、第295巻、p. 1503
- 【非特許文献10】エル・ヒー(L. He)、エム・ディ・ミュージック(M.D. Musick)、エス・アール・ナイスウォーナー(S.R. Nicewarner)、エフ・ジー・サリナス(F.G. Salinas)、エス・ジェイ・ベンコヴィック(S.J. Benkovic)、エム・ジェイ・ナタン(M.J. Natan)、シー・ディ・キーティング(C.D. Keating)、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ誌(J. Am. Chem. Soc.)、2000年、第122巻、p. 9071
- 【非特許文献11】エム・ハン(M. Han)、エックス・ガオ(X. Gao)、ジェイ・ズイー・シュ(J.Z. Su)、エス・ニー(S. Nie)、ネイチャーバイオテクノロジー誌(Nature Biotechnology)、2001年、第19巻、p. 631
- 【非特許文献12】アイ・ウィルナー(I. Willner)、エフ・パトルスキー(F. Patolsky)、ジェイ・ワッサーマン(J. Wasserman)、アンゲヴァンテ・ヒェミー・インターナショナル・エディション誌(Angew. Chem. Int. Ed.)、2001年、第40巻、p. 2261
- 【非特許文献13】エイチ・マットウシ(H. Mattoussi)、ジェイ・エム・マウロ(J.M. Mauro)、イー・アール・ゴールドマン(E.R. Goldman)、ジー・ピー・アンダーソン(G.P. Anderson)、ブイ・シー・サンダー(V.C. Sunder)、エフ・ブイ・ミクレック(F.V. Mikulec)、エム・ジー・パウエンディ(M.G. Bawendi)、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ誌、2000年、第122巻、p. 12142
- 【非特許文献14】エス・パサック(S. Pathak)、エス・ケイ・チョイ(S.K. Choi)、エヌ・アーンハイム(N. Arnheim)、エム・イー・トンブソン(M.E. Thompson)、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ誌、2001年、第123巻、p. 4103
- 【非特許文献15】エス・シュルツ(S. Schultz)、ディ・アール・スミス(D.R. Smith)、ジェイ・ジェイ・モック(J.J. Mock)、ディ・エイ・シュルツ(D.A. Schultz)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エイ誌(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、2000年、第97巻、p. 996
- 【非特許文献16】シー・エム・ニーマイア(C.M. Niemeyer)、アンゲヴァンテ・ヒェミー・インターナショナル・エディション誌、2001年、第40巻、p. 4128
- 【非特許文献17】ウェブサイト(www.nanosphere-inc.com.)を参照のこと

【非特許文献 18】シー・エイ・ミルキン (C.A. Mirkin)、米国カリフォルニア州サンディエゴにて開催の AACC 会議、2001 年

【非特許文献 19】ディ・アール・ウォルト (D.R. Walt)、サイエンス誌、2000 年、第 287 巻、p. 451

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

前述の SERS 系検出法のいずれも、単一または多重サンドイッチ・ハイブリダイゼーションのアッセイ方式の使用については実証されていない。これは、部分的には、SERS 活性を有する安定な支持体を再現性よく作製し官能化するのが困難であること^{2 3}、および多重検出を可能にするための適切なプローブ設計戦略が欠如していることによる可能性がある。したがって、SERS 系検出アッセイ、特に単一または多重サンドイッチ・ハイブリダイゼーションのアッセイ形式で使用するためのプローブおよび方法が必要とされている。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明では、分析物質の SERS 系アッセイで使用するための、ラマン標識を含む粒子と該粒子に結合した特異的結合要素とからなる新規な検出用試薬を提供する。標的分析物質、該分析物質用の捕捉プローブを含む支持体、および検出用試薬の存在下では、この試薬は有利なことに、結合パートナーである分析物質と複合または結合して、支持体と直接的または間接的に結合する複合体を形成する。したがって、支持体上の標識された複合体中のラマン標識を、染色、例えば銀、金または銅による増強処理により SERS 活性とし、レーザーで照射すると SERS 効果が得られるようにすることが可能である。一般にこの複合体は、固体支持体上に捕捉され、銀処理により SERS 効果を生じる。あるいはこの複合体を、固体支持体である基材と直接的または間接的に結合済みの分析物質と、直接的または間接的に複合体形成させることが可能である。本発明では、SERS 効果は、その測定時間付近で生じる。この試薬は好都合なことに、多用途のための莫大な数の試薬に索引を付ける方法として、特定の特異的結合要素を備えた特定の粒子担体を識別する方法として粒子担体に結合した多数の異なるラマン色素を含むことが可能である。

20

【0008】

本発明は、DNA、RNA、ポリペプチド、抗体、抗原、小分子などの特異的結合物質と結合したいくつかの異なるラマン色素の複合体を含む、検出用試薬も提供する。これは、試薬の索引ツールとしても働く。

30

【0009】

本発明は、SERS 技術をナノ粒子アッセイ技法と共に使用して分析物質検出の並外れた感度および特異性をもたらし、とりわけ分析物質の多重判定を実施可能であるという点において、特に従来技術の方法と区別される。

【0010】

本発明は、SERS 系検出法、光学装置、ならびに特異的結合要素およびラマン標識で官能化された粒子または担体またはラマン色素担体を含んでなる検出用プローブに関する。検出用プローブを表面増強ラマン散乱 (SERS) 分光法と組み合わせて使用して、分析物質の多重検出を行うことが可能である。このことは図 1 に、DNA および RNA 標的に関して例示されている。オリゴヌクレオチドは、凝集した粒子上で SERS により直接検出することが可能であるが^{2 6}、配列の異なるオリゴヌクレオチドでも構造が類似しているため、識別困難なスペクトルが生じる。したがって、オリゴヌクレオチド配列を識別するために、異なるオリゴヌクレオチドを標識するのに異なるラマン色素を使用しなければならない^{2 0, 2 1}。かつて、単一または多重サンドイッチ・ハイブリダイゼーションのアッセイ形式を可能にする SERS 系検出法は実証されていない。部分的には、この顕著な技術上の欠如は、安定した SERS 活性支持体を再現性良く作製し官能化する際の困難^{2 3}、および多重検出を可能にする適切なプローブの設計戦略の欠如に起因する。多重

40

50

標識能力と結び付いた、高感度および高選択性の検出の利点を得るために、例えばDNA（またはRNA）の検出（図1）に使用可能であるが、タンパク質、ペプチド、薬剤、小分子などの他の特異的結合物質にも同様に適用可能な、新しい種類の粒子プローブが設計されている。検出用プローブは、ラマン色素で標識したオリゴヌクレオチドで官能化した金粒子を含んでなることが好ましい。しかしながら、任意の適切で様々な大きさ、形状および材料の粒子を使用することが可能である。ラマン標識を選択することによって指定可能な、ラマン分光のフィンガープリントは、ラマン分光をスキャン（走査）することによって、銀による増強処理の後に読み取ることが可能である（図1）。金または銅染色材料などの、他の増強物質を使用することも可能である。この戦略におけるSERS活性の支持体は検出事象の前に作製されるので、多大で再現性の良いラマン散乱の応答を得ることが可能である。 10

【0011】

したがって、本発明の1実施形態では、検出用試薬またはプローブを提供する。この実施形態の1態様では、検出用試薬は、特異的結合要素とラマン標識とが結合した粒子を含んでなる。ラマン標識は、チオールなどの官能基、および官能基を有する連結基の使用を含めた任意の適切な方法で、直接的または間接的に粒子と結合することが可能である。あるいはラマン標識を特異的結合要素と結合させて、生成物全体を粒子と結合させることも可能である。SERS検出サンドイッチ系アッセイで使用する場合、銀、金または銅などの増強染色物質で検出用試薬を処理して、照射時にSERS効果を与えることが可能である。 20

【0012】

検出法において使用するとき、この試薬を、特異的結合要素と結合する分析物質と複合体形成させることが可能であり、生成した複合体を直接的または間接的に支持体上で捕捉することが可能である。支持体上の複合体中のラマン標識を、銀、金または銅などの染色物質で処理して、レーザーによる照射時にSERS効果を活性化させる。代替例として、分析物質を固体支持体基材上に直接的または間接的に捕捉し、検出用試薬と直接的または間接的に反応させてから染色およびSERS測定を実施することも可能である。2種以上の異なるラマン標識を、多用途のために粒子上で使用することも可能である。

【0013】

本発明のこの実施形態の他の態様では、2種以上の異なるラマン標識が結合した特異的結合物質を含んでなる検出用試薬を提供する。試薬粒子または特異的結合物質上で2種以上の異なるラマン標識を使用することによって、多用途のための莫大な数の異なる粒子および試薬に索引を付す方法が提供される。 30

【0014】

本発明の他の実施形態では、これらの試薬を使用して分析物質を検出するための方法を提供する。

したがって、本発明のこの実施形態の1態様では、サンプル中の1つまたは複数の、少なくとも2つの結合部位を有する標的分析物質の有無を検出するための方法を提供する。この方法は：

支持体であって、標的分析物質を直接的または間接的に同支持体上に固定するための1種類または複数種類の第1の特異的結合相補物または捕捉プローブが結合した支持体を提供する工程と、 40

1種類または複数種類の検出用プローブを提供する工程であって、それぞれの種類の検出用プローブが（a）1つまたは複数のラマン活性標識、および（b）特異的標的分析物質と直接的または間接的に結合するための第2の特異的結合相補物、が結合した粒子を含んでなり、（i）それぞれの種類の粒子に結合したラマン活性標識が異なっていて特異的標的分析物質の識別子の役割を果たし、（ii）それぞれの種類の粒子と結合した第2の特異的結合相補物が異なっていて特異的標的分析物質を標的としており、かつ（iii）ラマン活性標識が、ラマン散乱を誘導可能な放射線を照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも1つのラマン活性分子を含んでなる、ことを 50

特徴とする工程と、

サンプル中に1つまたは複数の標的分析物質が存在する場合に粒子と複合体形成した試験支持体が形成されるように、粒子、サンプル、および支持体を、標的分析物質と第1および第2の特異的結合相補物の間の特異的結合相互作用に有効な条件下で接触させる工程と、

該試験支持体と染色物質を接触させて、表面増強ラマン散乱（SERS）を発生可能な表面を有する検出用支持体を生成させる工程と、

SERSスペクトルを得て分析することによって、サンプル中の1つまたは複数の標的分析物質の存在の指標として、前記検出用支持体上の前記粒子複合体の存在を判定する工程と

からなる。支持体と結合した第1の特異的結合相補物は、直接的または間接的に標的分析物質を支持体に固定する捕捉プローブである。この捕捉プローブを支持体上の個別領域に配置して、サンプル中の1以上の標的分析物質、または標的分析物質の複数の部分を検出可能とすることができる。さらに、検出用プローブを、標的分析物質と検出用プローブの間の特異的結合相互作用を可能にするのに有効な条件下で標的分析物質と最初に接触させてから、支持体上の捕捉プローブと接触させることが可能である。代替例として、標的分析物質を、捕捉プローブと分析物質の間の特異的結合相互作用を可能にするのに有効な条件下で支持体上の捕捉プローブと最初に接触させてから、検出用プローブと接触させることが可能である。あるいは検出用プローブ、標的分析物質および捕捉プローブを同時に接触させることも可能である。

10

20

【0015】

この実施形態の他の態様では、サンプル中の、少なくとも2つの部分を有する配列の1つまたは複数の標的核酸の有無を検出するための方法を提供する。この方法は：

核酸の第1の部分と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが結合した支持体を提供する工程と、

オリゴヌクレオチドが結合しており、かつ該オリゴヌクレオチドの一部と結合したラマン活性標識を含んでなる1種類または複数種類の粒子を提供する工程であって、(i)それぞれの種類の粒子と結合したオリゴヌクレオチドのうち少なくともいくつかは、特異的標的核酸の配列の第2の部分と相補的な配列を有し、かつ(ii)それぞれの種類の粒子と結合したラマン標識が異なっていて特異的標的核酸の識別子の役割を果たし、前記ラマン活性標識が、ラマン散乱を誘導可能な放射線を照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも1つのラマン活性分子を含んでなる、ことを特徴とする工程と、

30

1つまたは複数の標的核酸が前記サンプル中に存在する場合に1つまたは複数の粒子複合体が結合した試験支持体が形成されるように、粒子、支持体、およびサンプルを、支持体に結合したオリゴヌクレオチドと核酸の第1の部分とのハイブリダイゼーション、および粒子に結合したオリゴヌクレオチドと核酸の第2の部分とのハイブリダイゼーションに有効な条件下で接触させる工程と、

該試験支持体と染色物質を接触させて、表面増強ラマン散乱（SERS）を発生可能な表面を有する検出用支持体を生成させる工程と、

40

SERSスペクトルを得て分析することによって、サンプル中の1つまたは複数の標的核酸の存在の指標として、前記検出用支持体上の前記粒子複合体の存在を判定する工程とからなる。

【0016】

本発明のさらに別の実施形態では、サンプル中の、少なくとも2つの部分を有する配列の標的核酸の有無を検出するための方法を提供する。この方法は：

核酸の第1の部分と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが結合した支持体を提供する工程と、

オリゴヌクレオチドが結合しており、かつ該オリゴヌクレオチドの一部と結合したラマン活性標識を含んでなる粒子を提供する工程であって、(i)該粒子に結合したオリゴ

50

ヌクレオチドの少なくともいくつか、核酸の第2の部分と相補的な配列を有し、かつ(i i)粒子と結合したラマン活性標識が標的核酸の識別子として働き、前記ラマン活性標識が、ラマン散乱を誘導可能な放射線を照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも1つのラマン活性分子を含んでなる、ことを特徴とする工程と、

前記標的核酸が前記サンプル中に存在する場合に粒子複合体が結合した試験支持体が形成されるように、粒子、支持体、およびサンプルを、支持体に結合したオリゴヌクレオチドと核酸の第1の部分とのハイブリダイゼーション、および粒子に結合したオリゴヌクレオチドと核酸の第2の部分とのハイブリダイゼーションに有効な条件下で接触させる工程と、

該試験支持体と染色物質を接触させて、表面増強ラマン散乱(SERS)を発生可能な表面を有する検出用支持体を生成させる工程と、

SERSスペクトルを得て分析することによって、サンプル中の標的核酸の存在の指標として、前記検出用支持体上の前記粒子複合体の存在を判定する工程とからなる。

10

【0017】

本発明のさらに別の実施形態では、サンプル中の、少なくとも2つの部分を有する配列の核酸の一塩基多型の有無を検出する方法を提供する。この方法は：

核酸の第1の部分と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが結合した支持体を提供する工程と、

20

オリゴヌクレオチドが結合しており、該オリゴヌクレオチドの一部と結合したラマン活性標識を含んでなる1種類または複数種類の粒子を提供する工程であって、(i)それぞれの種類の粒子に結合したオリゴヌクレオチドのうち少なくともいくつか、核酸の配列の第2の部分と相補的であると考えられる配列を有し、前記核酸の配列の第2の部分は、同核酸の野生型配列と比較すると1ヌクレオチドの置換を有する疑いがあることと、(i i)それぞれの種類の粒子に結合したラマン活性標識が異なっていて、1ヌクレオチドの置換を有する特異的配列の識別子としての役割を果たし、前記ラマン活性標識が、ラマン散乱を誘導可能な放射線を照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも1つのラマン活性分子を含んでなることと、を特徴とする工程と、

粒子、支持体、およびサンプルを、支持体に結合したオリゴヌクレオチドと核酸の第1の部分とのハイブリダイゼーション、および粒子に結合したオリゴヌクレオチドと核酸の第2の部分とのハイブリダイゼーションに有効な条件下で接触させて、1つまたは複数の粒子複合体が結合した試験支持体を形成する工程と、

30

厳密な(ストリンジェントな)洗浄を支持体に施して、非特異的に結合した全ての粒子、および核酸配列の第2の部分と相補的ではないオリゴヌクレオチドを有する全ての粒子複合体を十分に除去する工程と、

該試験支持体と染色物質を接触させて、表面増強ラマン散乱(SERS)を発生可能な表面を有する検出用支持体を生成させる工程と、

SERSスペクトルを得て分析することによって、サンプル中の前記核酸の一塩基多型の存在の指標として前記検出用支持体上の粒子複合体の存在を判定する工程とからなる。

40

【0018】

標的として核酸を検出するための前述の方法では、核酸を最初に支持体と接触させることにより、核酸配列の第1の部分を支持体に結合した相補的オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせ、次いで支持体に結合した核酸を、ラマン標識を有しオリゴヌクレオチドが結合した粒子と接触させることにより、該粒子に結合したオリゴヌクレオチドのうち少なくともいくつかを支持体に結合した核酸の配列の第2の部分とハイブリダイズさせる。

【0019】

あるいは、核酸を最初に、ラマン標識を有しオリゴヌクレオチドが結合した粒子と接触させることにより、粒子に結合したオリゴヌクレオチドのうち少なくともいくつかを核酸

50

の配列の第2の部分とハイブリダイズさせ；次いで粒子に結合した核酸を支持体と接触させることにより、粒子に結合した核酸の配列の第1の部分、支持体に結合した相補的オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる。他の実施形態では、支持体は、1種類の核酸の複数部分の検出、複数の種類の核酸の検出、あるいはこの両方を可能にするために、複数の種類のオリゴヌクレオチドがアレイ状に（整列された状態で）結合している。別例として、核酸、検出用プローブ、および支持体に結合した捕捉オリゴヌクレオチドを同時に接触させることが可能である。

【0020】

本発明の他の態様では、少なくとも2つ以上の異なるラマン活性標識を検出用プローブに使用する。2つ以上の種類のラマン標識の比は、同じであっても異なってもよい。

10

本発明のさらに別の実施形態では、検出用プローブまたは試薬を提供する。該試薬は、特定の標的分析物質に結合するための特異的結合相補物、およびそれと結合した少なくとも1種類のラマン活性標識を含んでなり、(i)ラマン活性標識が、特異的標的分析物質の識別子としての役割を果たすことと、(ii)ラマン活性標識が、ラマン散乱を誘導可能な放射線を照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも1つのラマン活性分子を含んでなることを特徴とする。本発明の他の実施形態では、検出用プローブは、粒子、特定の標的分析物質に結合するための特異的結合相補物、および少なくとも1種類のラマン活性標識を含んでなり、(i)ラマン活性標識が、特異的標的分析物質の識別子としての役割を果たすことと、(ii)ラマン活性標識が、ラマン散乱を誘導可能な放射線を照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも1つのラマン活性分子を含んでなることを特徴とする。ラマン標識は、粒子に直接結合させても間接的に結合させてもよい。別例として、ラマン標識を特定の標的分析物質と結合させることも可能であり、次いでその結合体を粒子に結合させる。

20

【0021】

本発明のさらに別の実施形態では、検出用プローブは、(a)粒子、(b)粒子に結合した、特定の標的分析物質に結合するための特異的結合相補物、(c)少なくとも1種類のラマン活性標識であって、(i)特異的標的分析物質の識別子としての役割を果たし、(ii)ラマン散乱を誘導可能な放射線を照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも1つのラマン活性分子を含んでなるラマン活性標識、および(d)粒子に結合したオリゴヌクレオチドであって、ラマン標識の少なくともいくつかは、そのオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分と結合していることを特徴とするオリゴヌクレオチド、を含んでなる。

30

【0022】

本発明のこの実施形態の他の態様では、検出用試薬は、粒子、該粒子に結合したオリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドの一部分に結合した少なくとも1種類のラマン標識を含んでなり、粒子に結合したオリゴヌクレオチドの少なくともいくつかは標的核酸の少なくとも一部分と相補的な配列を有する。

【0023】

本発明の他の態様では、検出用試薬は、粒子と、該粒子に結合したオリゴヌクレオチドと、第1および第2の部分、オリゴヌクレオチド連結基と、少なくとも1種類のラマン標識が結合したオリゴヌクレオチドとを含んでなり、粒子に結合したオリゴヌクレオチドのうち少なくともいくつかはオリゴヌクレオチド連結基の第1の部分と相補的な配列を有し、ラマン活性標識が結合したオリゴヌクレオチドがオリゴヌクレオチド連結基の第2の部分と相補的な配列を有し、粒子に結合したオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分が標的核酸と相補的な配列を有することを特徴とする。

40

【0024】

本発明のさらに別の実施形態では、試薬は、粒子、該粒子に結合したオリゴヌクレオチド、第1および第2の部分、オリゴヌクレオチド連結基、少なくとも1種類のラマン標識が結合したオリゴヌクレオチド、および標的分析物質に特異的な結合相補物を有するオリゴヌクレオチドを含んでなり、粒子に結合したオリゴヌクレオチドのうち少なくともい

50

くつつかがオリゴヌクレオチド連結基の第 1 の部分と相補的な配列を有し、ラマン活性標識が結合したオリゴヌクレオチドがオリゴヌクレオチド連結基の第 2 の部分と相補的な配列を有し、特異的結合相補物が結合したオリゴヌクレオチドがオリゴヌクレオチド連結基の第 2 の部分と相補的な配列を有することを特徴とする。

【 0 0 2 5 】

本発明の他の実施形態では、サンプル中の 1 つまたは複数の標的分析物質を検出するためのキットを提供する。該キットは、例えば特異的結合要素を有し、少なくとも 1 つのラマン標識が結合した粒子を含んでなる試薬などの上記の検出用試薬と；染色用試薬と；捕捉用試薬を有する支持体とを 1 つの容器中に備える。代表的なキットは：

粒子と、該粒子に結合したオリゴヌクレオチドと、該オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に結合したラマン標識とを含んでなる 1 つまたは複数の種類の結合体であって、(i) それぞれの種類の粒子に結合したオリゴヌクレオチドのうち少なくともいくつつかが、特異的標的核酸の配列の第 2 の部分と相補的な配列を有し、かつ (i i) それぞれの種類の粒子に結合したラマン活性標識が異なっていて特異的標的核酸の識別子としての役割を果たし、前記ラマン活性標識が、ラマン散乱を誘導可能な放射線を照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも 1 つのラマン活性分子を含むことを特徴とする結合体と、

標的核酸の配列の第 1 の部分と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが結合した任意選択の支持体と、

表面増強ラマン散乱 (S E R S) を発生可能な支持体表面を作製するための、任意選択の染色用試薬と
からなる。

【 0 0 2 6 】

本発明の他の実施形態では、核酸の配列が少なくとも 2 つの部分有する、サンプル中の 1 つまたは複数の標的分析物質を検出するための、キットを提供する。このキットは：

オリゴヌクレオチドが結合しており、該オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に結合したラマン標識を含んでなる粒子であって、(i) 該粒子に結合したオリゴヌクレオチドのうち少なくともいくつつかが、標的核酸の配列の第 2 の部分と相補的な配列を有し、かつ (i i) 該粒子に結合したラマン活性標識が標的核酸の識別子としての役割を果たし、前記ラマン活性標識が、ラマン散乱を誘導可能な放射線を照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも 1 つのラマン活性分子を含んでなることを特徴とする粒子、および

標的核酸の配列の第 1 の部分と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが結合した任意選択の支持体
からなる。

【 0 0 2 7 】

本発明の他の実施形態では、サンプル中の、少なくとも 2 つの部分有する配列の 1 つまたは複数の標的核酸を検出するためのキットを提供する。このキットは：

ラマン活性標識が結合したオリゴヌクレオチドの入った第 1 の容器と、該オリゴヌクレオチドのラマン活性標識が、ラマン散乱を誘導可能な放射線を照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも 1 つのラマン活性分子を含んでなることと、

粒子および該粒子に結合したオリゴヌクレオチドを含んでなる結合体の入った第 2 の容器と、それぞれの種類の粒子に結合したオリゴヌクレオチドのうち少なくともいくつつかが、ラマン活性標識を有するオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分と相補的な配列を有することと、

標的核酸の配列の第 1 の部分と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが結合した任意選択の支持体と、

表面増強ラマン散乱 (S E R S) を発生可能な支持体表面を作製するための、任意選択の染色用試薬と

10

20

30

40

50

からなる。

【0028】

本発明の他の実施形態では、サンプル中の、少なくとも2つの部分を有する配列の1つまたは複数の標的核酸を検出するためのキットを提供する。このキットは：

1つまたは複数の種類のラマン活性標識が結合したオリゴヌクレオチドの入った1つまたは複数の容器と、ラマン活性標識が、ラマン散乱を誘導可能な放射線を照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも1つのラマン活性分子を含んでなることと、

粒子および該粒子に結合したオリゴヌクレオチドを含んでなる結合体の入った第2の容器と、それぞれの種類の粒子に結合したオリゴヌクレオチドのうち少なくともいくつかは、ラマン活性標識を有するオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分と相補的な配列を有することと、

標的核酸の配列の第1の部分と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが結合した任意選択の支持体および任意選択の染色物質である試薬とからなる。

【0029】

本発明の他の実施形態では、1つまたは複数の分子をスクリーニングして、その分子が1つまたは複数の特定の受容体のリガンドであるかどうか、その分子がサンプル中に存在するかどうかを判定するための方法を提供する。この方法は：

1つまたは複数の特定の受容体が結合した支持体を提供する工程と、

粒子、該粒子に結合した特異的結合物質、特異的結合物質の一部分に結合したラマン活性標識、および特異的結合物質の一部分と結合した前記サンプル由来の分子を含む試薬を提供する工程であって、前記ラマン活性標識が、ラマン散乱を誘導可能な放射線を照射されると検出可能または測定可能なラマン散乱シグナルを生じる少なくとも1つのラマン活性化分子を含んでなることを特徴とする工程と、

分子が特定の受容体のリガンドである場合に粒子と複合体形成した試験支持体が形成されるように、粒子、サンプル、および支持体を、粒子に結合した分子と支持体に結合した特定の受容体との間の特異的結合相互作用に有効な条件下で接触させる工程と、

該試験支持体と染色物質を接触させて、表面増強ラマン散乱（SERS）を発生可能な表面を有する検出用支持体を生成させる工程と、

SERSスペクトルを得て分析することによって、特定の受容体に対するリガンドの確証として、前記検出用支持体上の前記粒子複合体の存在を判定する工程とからなる。

【0030】

本発明は、他の態様において、特異的結合物質とラマン標識とを有する粒子試薬が光ケーブル中の光ファイバーの端部に会合された、光ファイバー分析物質検出用装置も含む。

本発明のこれらの実施形態、および他の実施形態は、以下の詳細な説明に照らせば明らかであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

（A）定義

本明細書で使用する「分析物質」、または「標的分析物質」は、本発明を使用して、試験サンプル中で定量化または検出される物質である。分析物質は任意の物質であってよく、該物質としては天然に存在する特異的結合要素（例えば抗体、ポリペプチド、DNA、RNA、細胞、ウイルスなど）があり、あるいは該物質として特異的結合要素を作製することも可能であり、また分析物質はアッセイにおいて1つまたは複数の特異的結合要素に結合可能である。「分析物質」には、任意の抗原物質、ハプテン、抗体、およびこれらの組合せも含まれる。分析物質には、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、炭水化物、ホルモン、ステロイド、ビタミン、治療目的で投与された薬剤および不法な目的で投与された薬剤などの薬剤、細菌、ウイルス、ならびに任意の前記物質の代謝産物または任意の前記物

10

20

30

40

50

質に対する抗体が含まれうる。本発明に従い検出または定量化することが可能な分析物質の他の例には、多糖、脂質、リボ多糖、糖タンパク質、リポタンパク質、核タンパク質、オリゴヌクレオチド、および核酸がある。特異的分析物質には、抗体、免疫グロブリン、アルブミン、ヘモグロビン、凝固因子、ペプチドおよびタンパク質ホルモン（例えばインシュリン、ゴナドトロピン、ソマトロピン）、非ペプチドホルモン、インターロイキン、インターフェロン、その他のサイトカイン、腫瘍特異的エピトープ（例えば腫瘍特異的タンパク質上でのみ見られるエピトープ）を含むペプチド、細胞（例えば赤血球細胞）、細胞表面分子（例えばCD抗原、インテグリン、細胞受容体）、微生物（ウイルス、細菌、寄生虫、カビおよび真菌）、微生物の断片、一部分、成分または生産物、小有機分子（例えばジゴキシン、ヘロイン、コカイン、モルフィン、メサリン、リセルグ酸、テトラヒドロカンナビノール、カンナビノール、ステロイド、ペンタミンジン（pentamidine）、およびビオチン）などがある。検出または定量化可能な核酸およびオリゴヌクレオチドには、遺伝子（例えば、特定の疾患と関連がある遺伝子）、ウイルスRNAおよびDNA、細菌DNA、真菌DNA、哺乳動物DNA（例えばヒトDNA）、cDNA、mRNA、RNA断片およびDNA断片、オリゴヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、一本鎖および二本鎖核酸、天然および合成核酸などがある。本質的にあらゆる分析物質を、その分析物質に特異的な抗体を使用して検出または定量化することが可能である。さらに、分析物質と特異的に結合する任意の分子を使用することが可能であり、多くのこのような分子が当分野で知られている。例えば、核酸を、分析物質である該核酸の少なくとも一部分と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを使用して、検出または定量化することが可能である。さらに、レクチンを使用して、多糖およびグリコシル化タンパク質を検出または定量化することが可能である。他の例として、受容体を使用してそのリガンドを検出することが可能であり、その逆も然りである。

【0032】

本明細書で使用する「分析物質類似体」とは、分析物質特異的結合要素と交差反応する物質を指し、該物質の交差反応の程度は分析物質自体より高いことも低いこともありうる。分析物質類似体には、修飾された分析物質、および断片化または合成された分析物質分子の一部分が含まれうるが、ただし分析物質類似体は、当該分析物質と共通のエピトープ部位を少なくとも1つ有するものとする。

【0033】

本明細書で使用する「分析物質エピトープ」は、特異的結合事象の際に特異的リガンド結合対の1要素と接触する、分析物質のその部分を示す。特異的結合事象の際に分析物質のエピトープと接触する、特異的結合対の要素のその部分は、「パラトープ」と呼ばれる。

【0034】

本明細書で使用する「分析物質仲介リガンド結合事象」とは、特異的リガンド結合対の2要素間の特異的結合事象であって、その結合の程度が分析物質の存在、および存在量によって影響される事象を意味する。このような影響は通常、分析物質が、特異的リガンド結合対の1要素に含まれる構造またはエピトープと類似または同一の構造またはエピトープを含み、これを該特異的リガンド結合対のもう1つの要素が認識することによって特異的結合事象が生じるためにもたらされる。結果として分析物質は特異的リガンド結合対の1要素と特異的に結合し、このことによって該要素が特異的リガンド結合対のもう1つの要素と結合するのを妨げる。

【0035】

本明細書で使用する「補助的な特異的結合要素」とは、捕捉試薬および指標試薬の特異的結合要素に加えて使用される特異的結合要素であり、最終的な結合複合体の一部になる。1つまたは複数の補助的な特異的結合要素を、本発明のアッセイで使用する事が可能である。例えば、指標試薬が補助的な特異的結合要素と結合することが可能で、次に該要素が分析物質と結合可能なアッセイにおいて、補助的な特異的結合要素を使用することが可能である。

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用する「会合」は、2つ以上の分子および/または粒子状物質が、互いに非常に接近して保持されている状態である。

本明細書で使用する「捕捉試薬」または「捕捉プローブ」は、分析物質または指標試薬との結合能を有し、実質的に固体の材料に直接的または間接的に結合させることが可能な特異的結合要素である。固相の捕捉試薬複合体を使用して、アッセイの結合成分と非結合成分を分離することが可能である。

【 0 0 3 7 】

本明細書で使用する「結合体」は、1成分と他の成分との化学結合により形成される物質である。このような種類の物質の1例には、ウシ血清アルブミンと化学的に活性化した

10

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用する「増強物質」、または「増強剤」は、粒子上のラマン標識の活性化をもたらしてSERS効果を生み出す、銀または金染色物質などの染色物質である。

本明細書で使用する「指標試薬」は、特異的結合要素または金属表面に直接的または間接的に結合した検出可能な標識を含んでなる。

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用する「介在分子」は、特異的結合対の要素およびラマン活性標識の両方が結合される任意の物質である。

20

本明細書で使用する「粒子」は、液体中に分散させることが可能であり、表面増強ラマン光散乱(SERS)または表面増強共鳴ラマン光散乱(SERRS)の現象を支持する任意の物質である。粒子の例には、金または銀、Pt、Cu、Ag/Au、Pt/Au、Cu/Auのコロイド、コア・シェル粒子または合金粒子、すなわち金、銀、銅、または伝導帯電子を示す他の物質の粒子、中空粒子、または薄片があるが、これらに限定はされない。粒子表面がSERSおよびSERRS効果に関与するので、伝導帯電子を示す物質で予めコーティングされた、伝導帯電子を示さない物質の薄片または粒子も、適切な粒子状物質になる。粒子には、金属ナノ粒子などのナノ粒子がある。

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用する「放射線」は、試験混合物に加えると該混合物中のラマン活性標識によってラマン・スペクトルが生じるのを誘発する、電磁放射線の形態のエネルギーである。

30

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用する「ラマン標識」は、適切な波長の放射線で照射すると、存在する他の成分のラマン・スペクトルと識別可能で検出可能なラマン・スペクトルを生成する、任意の物質である。ラマン活性標識に関する他の用語には、色素およびレポーター分子がある。このような標識については、以下でさらに論じる。

【 0 0 4 2 】

「SERRS(表面増強共鳴ラマン散乱)」は、SERS活性表面の吸着物質がレーザ励起波長と共鳴する結果生じる。その結果生じる増強は、共鳴および表面増強の産物である。

40

【 0 0 4 3 】

「SERS(表面増強ラマン散乱)」は、ある金属表面の近傍である分子によって示されるラマン散乱の増大を意味する。

本明細書で使用する「特異的結合要素」とは、特異的結合対、すなわち分子の一方が化学的または物理的手段によって第2の分子と特異的に結合するような2つの異なる分子、うちの1要素である。抗原と抗体の特異的結合対以外に、他の特異的結合対には、ピオチンとアビジン、炭水化物とレクチン、相補的ヌクレオチド配列(標的核酸配列を検出するためにDNAハイブリダイゼーション・アッセイで使用するプローブおよび捕捉核酸配列など)、相補的ペプチド配列、エフェクター分子と受容体分子、酵素補因子と酵素、

50

酵素阻害剤と酵素、細胞、ウイルスなどがある。さらに、特異的結合対には、本来の特異的結合要素の類似体である要素が含まれうる。例えば、分析物質の誘導体または断片、すなわち分析物質類似体は、それが分析物質と共通の少なくとも1つのエピトープを有する限り、使用することが可能である。免疫反応性の特異的結合要素には、抗原、ハプテン、抗体、およびこれらの複合体があり、組換えDNA法またはペプチド合成により作製されたものも含まれる。

【0044】

本明細書で使用する「試験混合物」は、試験サンプルと、試験サンプル中の分析物質を検出するために本発明を適用するべく用いられる他の物質との混合物を意味する。これらの物質の例には、特異的結合要素、補助結合要素、分析物質類似体、ラマン活性標識、緩衝剤、希釈剤、および表面増強ラマン分光を引き起こすことが可能な表面を有する粒子状物質、および他の物質がある。

10

【0045】

本明細書で使用する「試験サンプル」は、本発明を使用して検出およびアッセイすべき分析物質を含むサンプルを意味する。試験サンプルは、分析物質以外の他の成分を含むことが可能であり、物理的性質は液体でも固体でもよく、例えば流動性の液体などを含めた任意の大きさまたは体積であってよい。試験サンプルは、分析物質以外の任意の物質を、その物質が特異的結合要素の特異的結合または分析物質もしくは分析物質類似体を妨害しない限りにおいて、含むことが可能である。試験サンプルの例には、血清、血漿、唾液、精液、尿、他の体液、ならびに地下水または排水、土壌抽出物、空気および残留農薬などの環境サンプルがあるが、これらに限定はされない。

20

【0046】

(B) 試薬

本発明は、検出アッセイで使用するのに好適なラマン標識および特異的結合物質が結合した任意の適切な粒子の使用を企図している。しかしながら、本発明を実施する際には、ナノ粒子が好ましい。粒子の大きさ、形状および化学的組成は、DNAバーコードなどの得られるプローブの性質に貢献する。これらの性質には、光学的性質、光電子工学的性質、電気化学的性質、電子工学的性質、さまざまな溶液中での安定性、孔およびチャンネルの大きさの違い、フィルタとして作用しながら生物活性のある分子を分離する能力などがある。異なる大きさ、形状および/または化学的組成を有する粒子の混合物の使用も、均一な大きさ、形状および化学的組成を有するナノ粒子の使用も企図される。適切な粒子の例には、非制限的に、ナノおよびミクロンの大きさのコア粒子、凝集粒子、等方性粒子(球状粒子など)および反等方性粒子(棒状、四面体状、角柱状など非球状の粒子)、ならびに、その全容を本願明細書に援用する2002年12月28日に出願された米国特許出願第10/034,451号および2002年12月28日に出願された国際特許出願第PCT/US01/50825号に記載されたコア・シェル粒子などの粒子がある。

30

【0047】

本発明を実施する際に有用なナノ粒子には、金属(例えば、金、銀、銅および白金)、半導体(例えば、CdSe、CdS、およびZnSでコーティングされたCdSまたはCdSe)、および磁性(例えば強磁性)コロイド材料がある。本発明を実施する際に有用な他のナノ粒子には、ZnS、ZnO、TiO₂、AgI、AgBr、HgI₂、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In₂S₃、In₂Se₃、Cd₃P₂、Cd₃As₂、InAs、およびGaAsがある。ナノ粒子の大きさは、約1.4nm~約150nm(平均径)であることが好ましく、約5~約50nmであることがさらに好ましく、約10~約30nmであることが最も好ましい。ナノ粒子は、棒状、角柱状、立方体状、四面体状、またはコア・シェルの粒子であってもよい。

40

【0048】

金属ナノ粒子、半導体ナノ粒子および磁性ナノ粒子を作製する方法は、当分野でよく知られている。例えば、シュミット、ゲー、(Schmid, G.) 編「クラスターとコロイド(Clusters and Colloids)」、ヴァインハイム(Weinheim) 所在のVCH、1994年; ハ

50

ヤト、エム・エイ・(Hayat, M.A.) 編「金コロイド：原理、方法および応用 (Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications)」米国サンディエゴ所在のアカデミック・プレス (Academic Press) 1991年；マサート、アール・(Massart, R.)、IEEE トランザクションズ・オン・マグネティクス誌 (IEEE Transactions On Magnetism) 第17巻、p. 1247、1981年；アーマディ、ティ・エス・(Ahmadi, T.S.) ら、サイエンス誌、第272巻、p. 1924、1996年；ヘングレイン、エイ・(Henglein, A.) ら、ザ・ジャーナル・オブ・フィジカル・ケミストリー誌 (J. Phys. Chem.) 第99巻、p. 14129、1995年；カルティス、エー・シー・(Curtis, A.C.) ら、アンゲヴァンテ・ヒェミー・インターナショナル・エディション・イン・イングリッシュ誌 (Angew. Chem. Int. Ed. Engl.)、第27巻、p. 1530、1988年；を参照のこと。 10

【0049】

ZnS、ZnO、TiO₂、AgI、AgBr、HgI₂、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In₂S₃、In₂Se₃、Cd₃P₂、Cd₃As₂、InAs、およびGaAs ナノ粒子を作製する方法も、当分野ではよく知られている。例えば、ウェラー (Weller)、アンゲヴァンテ・ヒェミー・インターナショナル・エディション・イン・イングリッシュ誌 (Angew. Chem. Int. Ed. Engl.)、第32巻、p. 41、1993年；ヘングレイン (Henglein)、トピックス・イン・カレント・ケミストリー誌 (Top. Curr. Chem.) 第143巻、p. 113、1988年；ヘングレイン (Henglein)、ケミカル・レビュー誌 (Chem. Rev.) 第89巻、p. 1861、1989年；ブラス (Brus)、アプライド・フィジックス・エイ誌 (Appl. Phys. A.) 第53巻、p. 465、1991年；バーンクマン (Bahncmann)「太陽エネルギーの光化学変換と貯蔵 (Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy)」、ペリツェッティ (Pelizzetti) およびスキアヴェロ (Schiavello) 編、1991年、p. 251；ワン (Wang) およびヘロン (Herron)、ザ・ジャーナル・オブ・フィジカル・ケミストリー誌 (J. Phys. Chem.) 第95巻、p. 525、1991年；オルシャフスキー (Olshavsky) ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ誌 (J. Am. Chem. Soc.) 第112巻、p. 9438、1990年；ウシダ (Ushida) ら、ザ・ジャーナル・オブ・フィジカル・ケミストリー誌 (J. Phys. Chem.) 第95巻、p. 5382、1992年を参照のこと。 20

【0050】

適切なナノ粒子は、例えばテッドベラ・インコーポレイティッド (Ted Pella, Inc.) (金)、アマシャム・コーポレーション (Amersham Corporation) (金) およびナノプローブス・インコーポレイティッド (Nanoprobes, Inc.) (金) から市販されている。 30

【0051】

現在、分析物質を検出する際に最も良く使用されるのは金ナノ粒子である。コロイド状の金ナノ粒子は、その美しい色を生み出す波長帯域 (バンド) に高い吸光係数を有する。これらの強烈な色は、粒子の大きさ、濃度、粒子間距離、および凝集体の凝集の程度および形状 (幾何学的形状) と共に変化するので、これらの材料は比色アッセイに非常に魅力的なものとなっている。例えば、金ナノ粒子に結合したオリゴヌクレオチドと、オリゴヌクレオチドおよび核酸とのハイブリダイゼーションによって、肉眼で見ることが可能な迅速な色の変化がもたらされる。コア・シェル・ナノ粒子を含めた適切なナノ粒子、およびこのようなナノ粒子を作製するための方法は、例えば譲受人ナノスフェア・インコーポレイティッド (Nanosphere, Inc.) の2001年1月12日出願された国際特許出願第PCT/US01/01190号；2001年3月28日出願された同第PCT/US01/10071号；2001年12月7日出願された同第PCT/US01/46418号；2001年12月12日出願された同第PCT/US01/050825号；および2002年5月22日出願された同第PCT/US02/16382号に記載されており、これらの開示内容はその全容を本願明細書に援用する。 40

【0052】

(C) 特異的結合要素の結合

粒子、特異的結合要素、またはこの両方を官能化して、特異的結合要素を粒子に結合させて検出用プローブを作製することが可能である。このような方法は、当分野ではよく知られている。例えば、アルカンチオールでその3'末端または5'末端を官能化したオリゴヌクレオチドは、金ナノ粒子に容易に結合する。ホワイトサイズ(Whitesides)、米国テキサス州ヒューストンにおけるロバート・エイ・ウェルチ基金(Robert A. Welch Foundation)第39回ケミカル・リサーチ・ナノフェイズ・ケミストリー会議(Conference on Chemical Research Nanophase Chemistry)会報、p. 109~121、1995年を参照のこと。マキック(Mucic)ら、ケミカル・コミュニケーションズ誌(Chem. Commun.) p. 555~557、1996年も参照されたい(この文献には3'チオールDNAを平らな金表面に結合させる方法が記載されている;この方法を使用して、オリゴヌクレオチドをナノ粒子に結合させることが可能である)。アルカンチオール法を使用して、オリゴヌクレオチドを他の金属、半導体および磁性コロイド、ならびに前に列挙した他のナノ粒子に結合させることも可能である。オリゴヌクレオチドを固体表面に結合させるための他の官能基には、ホスホロチオエート基(例えば、オリゴヌクレオチド-ホスホロチオエートの金表面への結合については米国特許第5,472,881号を参照のこと)、置換アルキルシロキサン(例えば、オリゴヌクレオチドのシリカおよびガラス表面への結合についてはバーウェル(Burwell)、ケミカル・テクノロジー誌(Chemical Technology)第4巻、p. 370~377、1974年およびマッツイッチ(Matteucci)およびカルサース(Caruthers)、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ誌(J. Am. Chem. Soc.)第103巻、p. 3185~3191、1981年、ならびにアミノアルキルシロキサンの結合およびメルカプトアルキルシロキサンの同様の結合についてはグラバー(Grabar)ら、アナリティカル・ケミストリー誌(Anal. Chem.)、第67巻、p. 735~743を参照のこと)がある。末端が5'チオヌクレオチドまたは3'チオヌクレオチドで終わるオリゴヌクレオチドも、オリゴヌクレオチドを固体表面に結合させるために使用することが可能である。以下の参考文献は、オリゴヌクレオチドをナノ粒子に結合させるのに使用可能な他の方法を記載するものである:ヌッツォ(Nuzzo)ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ誌(J. Am. Chem. Soc.)第109巻、p. 2358、1987年(金上のジスルフィド);アララ(Allara)およびヌッツォ(Nuzzo)、ラングミュア誌(Langmuir)第1巻、p. 45、1985年(アルミニウム上のカルボン酸);アララ(Allara)およびトンプキンス(Tompkins)、ジャーナル・オブ・コロイド・アンド・インターフェイス・ソサイエティ誌(J. Colloid Interface Sci.)第49巻、p. 410~421、1974年(銅上のカルボン酸);アイラー(Iler)「シリカの化学(The Chemistry Of Silica)」、第6章、ワイリー(Wiley)社、1979年(シリカ上のカルボン酸);ティモンズ(Timmons)およびジスマン(Zisman)、ザ・ジャーナル・オブ・フィジカル・ケミストリー誌(J. Phys. Chem.)第69巻、p. 984~990、1965年(白金上のカルボン酸);ソリアガ(Soriaga)およびハッバード(Hubbard)、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ誌(J. Am. Chem. Soc.)第104巻、p. 3937、1982年(白金上の芳香環化合物);ハッバード(Hubbard)、アカウンツ・オブ・ケミカル・リサーチ誌(Acc. Chem. Res.)第13巻、p. 177、1980年(白金上のスルフォラン、スルホキシド、および他の官能性溶媒);ヒックマン(Hickman)ら、ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ誌(J. Am. Chem. Soc.)第111巻、p. 7271、1989年(白金上のイソニトリル);マオズ(Maoz)およびサギブ(Sagiv)、ラングミュア誌(Langmuir)第3巻、p. 1045、1987年(シリカ上のシラン);マオズ(Maoz)およびサギブ(Sagiv)、ラングミュア誌、第3巻、p. 1034、1987年(シリカ上のシラン);ヴァッサーマン(Wasserman)ら、ラングミュア誌、第5巻、p. 1074、1989年(シリカ上のシラン);エルテコーヴァ(Eltekova)およびエルテコフ(Eltekov)、ラングミュア誌、第3巻、p. 951、1987年(二酸化チタンおよびシリカ上の、芳香族カルボン酸、アルデヒド、アルコールおよびメトキシ基);レック(Lec)ら、ザ・ジャーナル・オブ・フィジカル・ケミストリー誌(J.

10

20

30

40

50

Phys. Chem.) 第 9 2 巻、p . 2 5 9 7、1 9 8 8 年 (金属上の剛性 (rigid) リン酸)
。

【 0 0 5 3 】

米国特許出願第 0 9 / 7 6 0 , 5 0 0 号および同第 0 9 / 8 2 0 , 2 7 9 号、ならびに
国際出願第 P C T / U S 0 1 / 0 1 1 9 0 号および同第 P C T / U S 0 1 / 1 0 0 7 1 号
には、本発明を実施する際に有用な、環状ジスルフィドで官能化したオリゴヌクレオチド
について記載されている。環状ジスルフィドは、その環中に 2 つのイオウ原子を含めた、
5 個または 6 個の原子を有することが好ましい。適切な環状ジスルフィドは市販されてお
り、あるいは周知の手法により合成してもよい。還元型の環状ジスルフィドを使用するこ
とも可能である。

10

【 0 0 5 4 】

当業者は、核酸、抗原、抗体、タンパク質、ペプチド、小分子、炭水化物、または任意
の特異的結合要素を直接的または間接的に粒子に結合させることが可能な非常にさまざま
な方法を理解している。例えば、連結基を使用して、特異的結合要素をナノ粒子に結合さ
せることが可能である。

【 0 0 5 5 】

(D) 支持体

検出可能な変化の観察が可能な任意の支持体を使用することが可能である。適切な支持
体には、透明な固体表面 (例えばガラス、石英、プラスチックおよび他のポリマー)、不
透明な固体表面 (例えば、T L C シリカ・プレート、濾紙、ガラス・ファイバー製フィル
タ、硝酸セルロース膜、ナイロン膜、P D V F 膜などの白い固体表面)、および伝導性固
体表面 (例えば、インジウム - スズ酸化物 (I T O)) がある。支持体は任意の形状また
は厚さであってよいが、一般には平らで薄い。好ましいのは、ガラス (例えばスライドグ
ラスまたはガラス・ビーズ) またはプラスチック (例えば、マイクロタイター・プレートの
ウエル) などの、透明な支持体である。

20

【 0 0 5 6 】

光ファイバーケーブル中の光ファイバーの端部は、本発明の 1 実施形態における支持体
の役割も果たす。表面マイクロアレイ形式の D N A 検出のための代替法として、光ファイ
バー束の端部を所望の試薬と接触させることも可能である。表面アレイ法に関しては、試
薬は少なくとも 1 つのラマン標識が結合した粒子を含み、同試薬は同時に特異的結合要素
も含む。

30

【 0 0 5 7 】

光ファイバー束中の 1 つまたは複数の光ファイバーは、束の端部 (ここに試薬が存在す
る) に向かって、ラマン散乱を刺激するべく選択された周波数のレーザー光を伝送するこ
とが可能である。レーザー光を伝送するファイバーを、励起ファイバーと呼んでもよい。
このように試薬が刺激されると、ラマン標識が活性化され、S E R S 効果がもたらされる
。

【 0 0 5 8 】

S E R S 効果によって生じた光の一部は後方散乱し、光ファイバー束中の残りのファイ
バー、回収ファイバー内へと伝わる。この後方散乱光を、光ファイバー束の他端で検出す
ることが可能である。多数のサンプルを 1 つの励起レーザー源および 1 つの検出装置だけ
で処理することが可能であるが、様々な試薬について励起および検出を最適化するために
必要であれば、複数のレーザーおよび検出装置を使用することも可能である。

40

【 0 0 5 9 】

(E) 捕捉プローブの支持体への結合

捕捉プローブを支持体に結合させるために、任意の適切な方法を使用することが可能で
ある。例えば、核酸標的と相補的なオリゴヌクレオチドを含む捕捉プローブを、例えばク
リセイ (Chrisey) ら、ヌクレイック・アシッド・リサーチ誌 (Nucleic Acids Res.)、
第 2 4 巻、p . 3 0 3 1 ~ 3 0 3 9、1 9 9 6 年 ; クリセイ (Chrisey) ら、ヌクレイッ
ク・アシッド・リサーチ誌、第 2 4 巻、p . 3 0 4 0 ~ 3 0 4 7、1 9 9 6 年 ; マキック

50

(Mucic)ら、ケミカル・コミュニケーションズ誌 (Chem. Commun.) p. 555、1996年；ツィーママンおよびコックス (Zimmermann and Cox)、ヌクレイック・アシッド・リサーチ誌、第22巻、p. 492、1994年；ボトムレイ (Bottomley)ら、ザ・ジャーナル・オブ・バキューム・サイエンス・テクノロジー・エイ誌 (J. Vac. Sci. Technol. A)、第10巻、p. 591、1992年；およびヘグナー (Hegner)ら、エフイービーエス・レターズ誌 (FEBS Lett.)、第336巻、p. 452、1993年に記載されているようにして支持体に結合させることが可能である。

【0060】

支持体を使用するとき、多数の異なる標的分析物質を検出するために、複数の捕捉プローブを支持体にアレイ状に結合させることが可能である。例えば、それぞれのスポットが1つの試薬分析物質複合体と結合するように設計された異なる種類の捕捉プローブを含むようなスポットの列を備えた支持体を提供してもよい。1つまたは複数の分析物質を含むサンプルをそれぞれのスポットに施し、アッセイの残りの部分は、本発明の適切な試薬を使用して前述のうちの1方法で実施する。

10

【0061】

(F) ラマン標識

ラマン標識は、示差的なラマン散乱スペクトルを有する多くの分子のうちの任意のものであってよい。酵素イムノアッセイで使用する酵素とは異なり、これらの標識種は、安定、単純、安価な、必要に応じて化学的に修飾することが可能な分子でありうる。以下の属性が、この用途における標識の有効性を高める：(a) レーザー励起波長付近に強い吸収バンドがあること (吸光係数 10^4 付近)；(b) 官能基が特異的結合要素と共有結合することが可能と思われること；(c) 光安定性であること；(d) 十分な表面および共鳴増強によりナノグラム未満の範囲の分析物質の検出が可能であること；(e) 標識された特異的結合要素と標識されていない特異的結合要素との間の結合相互作用における干渉が最小限であること；(f) 使用する励起波長における強烈な蛍光発光が最小限であること；(g) 数箇所の強いピークを有する、比較的単純な散乱パターンであること；および/または(h) 標識が互いに干渉しない散乱パターンを有するため、いくつかの指標分子を同時に分析可能であること。

20

【0062】

以下は、これらのラマン活性標識となりうる候補の一部 (すべてではない) のリストである：4 - (4 - アミノフェニルアゾ) ベンゼンアルソン酸ナトリウム塩、アルセナゾ I、塩基性フクシン、シカゴ・スカイブルー (Chicago sky blue)、ダイレクト・レッド 81 (direct red 81)、ディスパース・オレンジ 3 (disperse orange 3)、HABA (2 - (4 - ヒドロキシフェニルアゾ) - 安息香酸)、エリスロシン B、トリパン・ブルー、ボンソー S、ボンソー SS、1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン、クレシル紫、および p - ジメチルアミノアゾベンゼン。選択した標識を、目的の特異的結合要素と共有結合させてもよいし、または結合もしくは会合させることが可能である。

30

【0063】

本発明の重要な態様は、複数のラマン標識を粒子に結合させて、様々な粒子に索引を付すための多重コード化ラマン標識を提供しうることである。したがって本発明は、複数のラマン色素および1つの特異的結合物質 (例えば DNA、RNA、抗体、抗原、小分子など) が結合した試薬を含む。粒子系検出用プローブに関しては、ラマン標識または色素を直接的または間接的に粒子と結合させればよい。ラマン標識を、金属ナノ粒子などの粒子の表面と結合可能な官能基、例えばチオール、アミン、またはホスフィンで修飾することが可能である。所望であれば、ラマン色素を、ナノ粒子の安定性を高めるためにオリゴヌクレオチド (例えば、ポリアデノシン、ポリチミジン) などの分子で、あるいは特異的結合対の要素 (核酸標的の少なくとも一部分と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、または特定のリガンドの受容体など) で、さらに官能化することが可能である。あるいは、ラマン標識を、粒子に結合するための官能基を有する分子または任意の連結基、例えばポリ A またはポリ T オリゴヌクレオチドと結合させることが可能である。

40

50

【 0 0 6 4 】

複数のラマン標識を粒子と結合させる必要があるわけでもないが、特異的結合反応によって粒子と複合体形成させることが可能である。したがって本発明は、特異的結合リガンド、例えばDNA、RNA、抗体、抗原、小分子、細胞またはウイルスなどと結合した多数のSERSS試薬を包含する。この実施形態は、以下、すなわち

ラマン₁ - ラマン₂ - ラマン₃ - (特異的結合リガンド)

のように想定することが可能である。

【 0 0 6 5 】

(G) 励起源

好ましい実施形態では、レーザーが励起源の役割を果たす。レーザーは、ヘリウム - ネオンまたはダイオード・レーザーなどの、安価な種類のものであってよい。このようなレーザーの操作寿命は、50,000時間を超える可能性がある。

【 0 0 6 6 】

1実施形態では、ダイオード・レーザーを使用してIRスペクトルまたはその付近を励起し、蛍光干渉を最小限にする。使用する励起源は必ずしも単色である必要はなく、必ずしも強力な励起源である必要もない。ランプを使用することも可能である。

【 0 0 6 7 】

SERSS効果は、表面を直接照射することによって、あるいはプラズモン - 活性表面下の導波路からのエバネッセント波によって、励起することが可能である。

(H) ラマン標識プローブ

異なる特異性を有する特異的結合要素から、示差的な散乱パターンを有する異なるラマン活性標識をそれぞれ備えたいくつかの異なる種類の複合体を作製することが可能である。アッセイにおいてこれらの複合体を混合することによって、同じサンプル中のいくつかの異なる分析物質を同時に分析することが可能になるとと思われる。本発明の他の態様では、複合体に2つ以上の異なるラマン標識を含めることが可能である。

【 0 0 6 8 】

留意すべき重要なことは、従来の蛍光系チップ検出とは対照的に、1回のレーザー励起を使用して、単一のラマン・スペクトルからラマン強度の比を抽出可能であることである。さらに、利用可能なラマン色素の数は、利用可能かつ識別可能な蛍光色素の数よりはるかに多い^{20, 21, 26}。ラマン色素は、蛍光性であっても非蛍光性であってもよい。色素分子にわずかな化学修飾を施して新しい色素を得ることが可能であるが、この2つの色素はほとんど識別不可能な蛍光スペクトルを示すにもかかわらず異なるラマン・スペクトルを有する²⁶。したがって、このラマン・フィンガープリント法によって、従来の蛍光系検出手法よりも融通の利く可能性が高く、利用可能かつ重複のないプローブ群が大きく、多重化能力が高くなる。この手法はランダム・アレイに拡張されており、高い多重化能力が必須なビーズ系方式が開発中である。(I) SERSSの増強(増強剤)

最初は、ラマン標識プローブは検出可能なSERSS活性をほとんど、あるいは全く有していない。銀染色物質などの染色物質によって強力なSERSSの増強がもたらされる。支持体を使用すると検出可能な変化を生み出すことが可能であり、銀染色によってさらに増強することも可能である。銀の還元を触媒する任意の種類のナノ粒子を用いて、銀染色を実施することが可能である。貴金属(例えば金および銀)で作製されたナノ粒子が好ましい。バセル(Bassell)ら、ザ・ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー誌(J. Cell Biol.)、第126巻、p. 863~876、1994年; ブラウン - ホーランド(Braun-Howland)ら、バイオテクニクス誌(Biotechniques)、第13巻、p. 928~931、1992年を参照のこと。核酸の検出用に使用するナノ粒子が銀の還元を触媒しない場合は、銀イオンを核酸と複合体形成させて還元を触媒することが可能である。ブラウン(Braun)ら、ネイチャー誌(Nature)、第391巻、p. 775、1998年を参照のこと。さらに、核酸上のリン酸基と反応することが可能な銀染色物質が知られている。

【 0 0 6 9 】

銀、金または銅染色物質を使用して、前に記載したものを含めた、支持体上で行われる

10

20

30

40

50

任意のアッセイの検出可能な変化を、生成または増大させることが可能である。特に銀染色は、1種類のナノ粒子を使用するアッセイの感度を著しく増大させるので、ナノ粒子の層の使用を削除可能なことが多いことがわかってきている。

【0070】

(J) ラマン散乱の検出

いくつかの方法が、ラマン散乱を検出するために利用可能である。これらは一般に、様々な種類の分光計と共に使用することが可能である。SERSにおいては、その主な測定は、特定の波長での光の散乱強度の測定である。SERSでは、励起ビーム由来の強烈なバックグラウンドの存在下で、波長シフトした散乱強度を測定する必要がある。大きなストークスシフトを有するラマン活性物質を使用することによって、この測定が簡単になる

10

【0071】

読み取り手段をさらに単純化するための、いくつかの概念が提案されている。これらの概念には、散乱光を回収するための波長選択的なミラー、フィルタ、またはホログラフィー光学要素の使用が含まれる。

【0072】

入射光ビームと表面の角度も、検出装置の位置も、SERSの使用には重要ではない。平らな表面に関しては、レーザー・ビームの表面を、垂線に対して60度に配置することが一般的に行われ、ビームと90度または180度での検出が標準的である。SERS励起は、固有のサンプル由来の蛍光が抑制されると思われる近赤外線範囲で行うことが可能

20

【0073】

シグナルを現像する時間は必要ではない。なぜなら、照射するとすぐに読み取りが始まり、励起光が極端に強烈で化学変化が起きるのではない限りシグナルを消失させずに望むだけ長くデータを回収することが可能だからである。光吸収に依存するシステムのように、シグナルが過剰に現像されることはありえない。蛍光読み取りシステムとは異なり、SERSレポーター基は自己消光することはないので、プローブ分子上のラマン・レポーター基の数を増やすことによって、シグナルを増強することが可能である。SERS活性表面付近の蛍光分子も、表面で消光するであろう。

30

【0074】

(K) 装置

本発明は、自動分析装置としての使用に適合可能である。装置は個々のストークスシフトしたスペクトル線をモニタすることになると思われるので、複雑な単色光分光器システムに関する必要性はない。ホログラフィー光学要素などの、当分野の現況の光学技術における近年の進展によって、価格および複雑性が研究室レベルの装置より低い適切な分光計の設計が可能である。

【0075】

SERSの結果として得られる光学的読み取りエネルギーは、超高感度光子計数装置を必要とする場合よりも高い。実際、現在使用されているいくつかのSERS分光計には、シリコン・フォトダイオード検出装置が組み込まれている。研究室レベルの分光計で使用される典型的な単色光分光器の光学的効率は10%未満である。前述のような光学材料および光学要素の進展によって、数種の特定のスペクトル線だけに専用の簡単な分光計について光学的効率を2~3倍の増大させることが可能となるはずである。このことは、以前の主要な関心の1つ、レイリー散乱線の阻止にも向けられる。コストの著しい削減を伴って、一般的な単色光分光器システムの1つまたは複数段階のフィルタを、最新フィルタの 10^{-9} レベルの阻止能力に置き換えることが可能なはずである。

40

【実施例1】

【0076】

(マイクロアレイの作製)

50

市販のアレイ作製装置 (G M S 4 1 7 a r r a y e r 、ゲノティックマイクロシステムズ・インコーポレイテッド (Genotic MicroSystems, Inc.)) を使用して 5' - ヘキシルチオール・キャップ構造のオリゴヌクレオチド (0 . 1 5 M N a C l 、 p H 6 . 5 リン酸バッファ (P B S 、 1 0 m M リン酸) 中に 1 m M) をスポットすることにより、オリゴヌクレオチド捕捉鎖を S M P B - (スクシンイミジル 4 - (マレミドフェニル) - ブチレート) 官能化スライドガラスに固定化した。チップに捕捉オリゴヌクレオチドをスポットした後 (約 2 0 0 μ m スポット) 、 S M P B とヘキシルチオール・キャップ構造オリゴヌクレオチドとのカップリング反応をすすめるためにチップを恒湿器内に 1 2 時間置いた。次いで該チップをナノピュア (Nanopure : 登録商標) 水で十分に洗浄した。チップをヘキシルチオール・キャップ構造ポリアデニン (A₁₅) 溶液 (0 . 1 m M) に 4 時間浸した後、3 - メルカプト - プロパンスルホン酸ナトリウム塩溶液 (0 . 2 M) に 3 0 分浸して残りの S M P B 部位を処理することにより、オリゴヌクレオチドスポットの周囲のチップ領域を不動態化した。最後に、チップをナノピュア純水で洗浄し、マイクロアレイ遠心機で乾燥させた (2 0 0 0 g) 。

10

【実施例 2】

【0077】

(C y 3 (登録商標) 標識 (プロピルチオール) キャップ構造オリゴヌクレオチドの合成および精製)

この実施例では、ラマン標識が結合したオリゴヌクレオチド、すなわち : (3' H S - C y 3 - A₁₀ - A A T C T C A A C G T A C C T (図 1 9 a の配列番号 1) 、 3' H S - C y 3 - A₁₀ - C T C - C C T - A A T - A A C - A A T) (図 1 の配列番号 2 5) の合成について説明する。

20

【0078】

市販の DNA 合成機 (E x p e d i t e : 商標) を使用し、T h i o l - M o d i f i e r C 3 S - S C P G (controlled-pore glass) (商品名) の固相支持体上での標準的なホスホロアミダイト化学法⁵によって、C y 3 標識 (プロピルチオール) キャップ構造オリゴヌクレオチドを 1 μ m o l スケールで合成した。オリゴヌクレオチドへの C y 3 ユニットの導入には、C y 3 - C E ホスホロアミダイト (インドジカルボシアニン (indodicarbocyanine) 3 , 1' - O - (4 - モノメソキシトリチル) - 1 - O - (2 - シアノエチル) - (N , N - ジイソプロピル) - ホスホロアミダイト) (グレンリサーチ (Glen Research)) を使用した。精製を容易にするため、末端のジメトキシトリチル (D M T) 保護基は除去しなかった。合成後、固相支持体からオリゴヌクレオチドを切り離し、塩基から保護基を除去するために、C P G に固定化されたオリゴヌクレオチドを 1 m l の濃水酸化アンモニウム中で 5 5 ° で 8 時間インキュベートした。いずれの場合も、スクシニルエステル結合している固相支持体からの切断によって、(メルカプトプロピル) オリゴヌクレオチドおよびメルカプトエタノール・リンカーからなる混合ジスルフィドが生じた。アンモニアを蒸発させた後、H P O D S H y p e r s i l (登録商標) カラム (3 0 0 Δ 、 2 5 0 × 1 0 m m 、 保持時間 = 3 2 分) を使用した分離用逆相 H P L C によって、未精製オリゴヌクレオチドを精製した (0 . 0 3 M トリエチル酢酸アンモニウム (T E A A) 、 p H 7 、 および 1 % / 分グラジエントの 9 5 % C H₃ C N / 5 % 0 . 0 3 M T E A A 、 流速 3 m L / 分とし、DNA の U V 吸収 (2 5 4 n m および 5 5 0 n m) をモニタリングした) 。 8 0 % 酢酸溶液中に精製オリゴヌクレオチドを 3 0 分間溶解させて D M T を切断した後、蒸発させた ; 該オリゴヌクレオチドを 5 0 0 μ L の水に再分散させ、該溶液を酢酸エチルで抽出した (3 × 3 0 0 μ L) 。 溶媒を蒸発させた後、オリゴヌクレオチドを 4 0 0 μ L の 0 . 1 M ジチオトレイトール (D T T) 、 0 . 1 7 M リン酸バッファ (p H 8) 溶液に再分散させて (室温、2 時間) 、 3' ジスルフィドを切断した。この溶液の分割物 (< 1 0 O D) を N A P - 5 (商標) 脱塩カラム (アマシャムファルマシアバイオテク A B (Amersham Pharmacia Biotech A B)) で精製した。

30

40

【実施例 3】

【0079】

50

(T M R、C y 3 . 5 (登 録 商 標) お よ び C y 5 (登 録 商 標) 標 識 (プ ロ ピ ル チ オ ー ル) キ ャ ッ プ 構 造 オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド の 合 成 と 精 製)

この実施例では、ラマン標識が結合した3種類のオリゴヌクレオチド、すなわち：3' H S - - T M R - A₁₀ - A A C C G A A A G T C A A T A [図 1 9 a の 配 列 番 号 2] ; 3' H S - - C y 3 . 5 - A₁₀ - C C T C A T T T A C A A C C T [図 1 9 a の 配 列 番 号 3] ; お よ び 3' H S - - C y 5 - A₁₀ - C T C C C T A A T A A C A A T [図 1 9 b の 配 列 番 号 4] の 合 成 に つ い て 説 明 す る。色素は標準的な切断試薬(アンモニア)に対して感受性なので、非常に穏やかな条件下で脱保護反応を実施できるように、ここでは非常に弱い塩基モノマー(グレンリサーチ(Glen Research)由来)、すなわちフェノキシアセチル(Pac)保護dA、4-イソプロピル-フェノキシアセチル(iPr-Pac)保護dG、およびアセチル(Ac)保護dCを使用した。T A M R A - d T (T M R - d T、5' - ジメトキシトリチルオキシ - 5 - [N - ((テ ト ラ メチルローダミニル) - アミノヘキシル) - 3 - アクリルイミド] - 2' - デオキシウリジン - 3' - [2 - シアノエチル] - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホロアミダイト)、C y 3 . 5 - C E ホスホロアミダイト(インドジカルボシアニン 3 . 5 , 1' - O - (4 - モノメトキシトリチル) - 1 - O - (2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル) - ホスホロアミダイト)およびC y 5 - C E ホスホロアミダイト(インドジカルボシアニン 5 , 1' - O - (4 - モノメトキシトリチル) - 1 - O - (2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル) - ホスホロアミダイト)を、それぞれオリゴヌクレオチドを標識するために使用した。オリゴヌクレオチドの合成後、合成用カラムの内容物を2 mLの反応バイアルに移し、無水メタノールに溶解した1 mLの0.05 M 炭酸カリウム液で処理した(4時間、室温)。その後、支持体から上清をピペティングで回収し、1.5 mLの2 M トリエチル酢酸アンモニウムで中和した。C y s 3 標識オリゴヌクレオチドの合成について前述したように、さらなる精製を行った。H P L C の 保 持 時 間 は それぞれ、28分(TMR標識プロピルチオール・キャップ構造オリゴヌクレオチド)、32分(Cy3標識プロピルチオール・キャップ構造オリゴヌクレオチド)、30分(Cy5標識プロピルチオール・キャップ構造オリゴヌクレオチド)である。

【実施例4】

【0080】

(ロ ー ダ ミ ン 6 G お よ び テ キ サ ス ・ レ ッ ド 標 識 (プ ロ ピ ル チ オ ー ル) キ ャ ッ プ 構 造 オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド の 合 成 と 精 製)

この実施例では、ラマン標識が結合した2種類のオリゴヌクレオチド、すなわち：3' H S - - R d - A₁₀ - T C A A C A T T G C C T T C T T [図 1 9 b の 配 列 番 号 5] お よ び 3' H S - - T R - A₁₀ - T C T T C T T A T A A A C C T T A T T [図 1 9 a の 配 列 番 号 6] の 合 成 に つ い て 説 明 す る。図24を参照されたい。これらのオリゴヌクレオチドはいずれも2工程合成で作製した。第1工程ではアミノ修飾オリゴヌクレオチド(3' - S - S - - (N H₂) - A₁₀ - T C A A C A T T G C C A T C T T お よ び 3' - S - S - - (N H₂) - A₁₀ - T C T T C T T A T A A A C C T T A T T)を文献の手順⁵にしたがって合成した。a m i n o - m o d i f i e r C 6 d T (5' - ジメトキシトリチル - 5 - [N - (トリフルオロアセチルアミノヘキシル) - 3 - アクリルイミド] - 2' - デオキシウリジン, 3' - [(2 - シアノエチル) - (N, N - ジイソプロピル)] - ホスホロアミダイト)をDNA合成機(Expedite)のポジション5にセットし、従来の自動合成によってアミノ修飾オリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドの切断、脱保護および精製は、Cy3修飾オリゴヌクレオチドの合成について説明した手順(上記)にしたがって行った(保持時間=26分)。第2工程ではスクシンイミドエステル修飾Rhod6G(5-カルボキシル-ローダミン6G、スクシンイミジルエステル)およびテキサス・レッド(Texas Red-X-スクシンイミジルエステル)をそれぞれ、アミノ修飾オリゴヌクレオチドに結合させた。標準的な実験では、アミノ修飾されたアルキルチオール・キャップ構造オリゴヌクレオチド(0.15 μmol)をホウ酸ナトリウムバッファ(0.1 M、pH=8.5、

0.5 ml) に溶かし、2.5 mg のスクシンイミドエステル修飾 Rhod6G (もしくはテキサス・レッド) を含む DMSO 溶液 (150 μ l) をオリゴヌクレオチドのバッファ溶液に添加した (図 24)。溶液を室温で 12 時間かき混ぜた後、Rhod6G (もしくはテキサス・レッド) 標識オリゴヌクレオチドをエタノール沈殿 (3 回) および前述の条件の HPLC をさらに行うことにより精製した。

【実施例 5】

【0081】

(DNA 検出アッセイ)

標準的な DNA 検出の実験では、3 成分サンドイッチ・アッセイをマイクロアレイ方式で使用する (図 1)。特定の標的 DNA 鎖の存在をモニタするために、Cy3 修飾アルキルチオール・キャップ構造オリゴヌクレオチド鎖で修飾した金ナノ粒子 (直径 13 ± 2 nm) をプローブとして使用した。これらのナノ粒子結合体は、本願明細書に全体を援用する 2003 年 1 月 14 日発行の米国特許第 6,506,564 号 (ナノスフェア インコーポレイテッド (Nanosphere, Inc.)、譲受人) に記載のエイジング法 (aging process) に従って調製した。平均して 110 個のオリゴヌクレオチド鎖が 13 nm の各金ナノ粒子上に結合している。ラマン散乱断面積が大きいことから Cy3 基をラマン標識として選択した^{2,3}。適切な 15 mer の捕捉鎖をスポットしたチップを、室温の恒湿器中で、30 mer の標的配列 (100 pM) を含む 0.6 M NaCl - PBS バッファ溶液 (10 mM リン酸、pH 7) でコーティングした。4 時間後、チップを 0.6 M NaCl - PBS バッファ溶液で 4 回洗浄して非特異的に結合した標的を除去した。次に、標的配列の突出している領域とハイブリダイズさせるために、ナノ粒子プローブの 0.6 M NaCl - PBS バッファ溶液 (2 nM) でチップを 1.5 時間処理した (図 1)。次いで 0.6 M 硝酸 - PBS バッファ溶液でチップを洗浄して、塩素イオンおよび非特異的に結合したナノ粒子プローブを除去した。チップを直ちに銀増強溶液 (テッドペラ・インコーポレイテッド (Ted Pella, Inc) 社) で 8 分間処理し、続いてナノピュア水でリンスし、マイクロアレイ遠心機で乾燥させた (2000 g)。チップには肉眼でも観察可能なグレー・スポットが現れるが、文献の手順⁸によりプラットフォーム (Expression 1600、エプソン) を用いて画像化が可能である (図 2A および B)。グレー・スポットを 0.3 M NaCl - PBS バッファ溶液中でラマン分光法により画像化することも可能である (Solution Raman 633 分光計、ディテクション・リミット・インコーポレイテッド (Detection Limit Inc.) 社、30 mW He-Ne レーザー) (図 2C)。チップを 0.65 N. A. アダプタ (25 μ m レーザー・スポット) を備えた光ファイバプローブでスキャンしたところ、各スポットは 1192 cm^{-1} で一貫した強いラマン応答を示している (図 2D)。

【0082】

銀増強処理を行う前には、肉眼ではナノ粒子プローブを観察不可能であり、ラマン散乱シグナルは検出不可能であった (図 2A)。これは、この状態にある未現像のナノ粒子 (直径 13 nm) については電磁場の増強がないからである^{2,4-2,6}。当該サイズの密集した金ナノ粒子は表面増強ラマン散乱を増強し得るとの報告もある^{2,7-3,0}。しかしながら、技術的に意味のある標的濃度 (< 1 nM) での DNA 検出の場合、そのような効果を生むにはナノ粒子の間隔が大きすぎる。銀による増強処理後には Cy3 標識ナノ粒子プローブの周囲で銀粒子が大きくなり、大きなラマン散乱増強をもたらすことが可能になる。一般に、得られるスペクトルは、銀粒子上のローダミン 6G 分子の研究でブラス (Brus) らが報告したような、シャープなラマン線 (約 $15 \text{ cm}^{-1} \sim 30 \text{ cm}^{-1}$) と付随するブロードな基調連続線の両方を含んでいる^{3,0-3,1}。重要なのは、ラマン散乱シグナルが、ほとんど粒子上に固定化された Cy3 色素分子からのみ生じていることである。ガラス表面上の、オリゴヌクレオチド、溶媒分子およびスクシンイミジル 4 - (マレイミドフェニル) - ブチレート (SMPB) 等の他の分子種からはシグナルは全く観察されなかった。さらに、各々のラマン線のラマン散乱周波数はどの実験においても一定値を示し、偏差は 2 cm^{-1} 以下である。Cy3 標識ナノ粒子プローブから一定した SERS シグナ

ルが測定されたことから、Cy3のラマン・スペクトルを、分光学的フィンガープリントとして特定の標的オリゴヌクレオチド鎖の存在をモニタするのに使用可能である。

【実施例6】

【0083】

(低濃度(例: 20 fM)の標的DNAの検出)

一般的な実験においては、適切な捕捉鎖をスポットしたチップ(図3A)を、鎖長30 merの標的配列(20 fM)を含む0.75 M NaCl-PBSバッファ溶液(10 mM リン酸、pH 7)で、恒湿器中で室温にてコーティングした。8時間後、チップを0.75 M NaCl-PBSバッファ溶液で洗浄して非特異的に結合した標的を除去した。次に、標的配列の突出している領域にハイブリダイズさせるために、ナノ粒子プローブの0.75 M NaCl-PBSバッファ溶液(500 pM)でチップを3時間処理した(図3A)。塩素イオンおよび非特異的に結合したナノ粒子プローブを除去するために、0.75 M 硝酸-PBSバッファ溶液でチップを洗浄した。該チップを直ちに銀増強溶液(テッドペラ・インコーポレイテッド社)で15分間処理し、続いてナノピュア水でリンスしてからマイクロアレイ遠心機で乾燥させた(2000 g)。チップ上のスポットは、乾燥状態でプラットフォームで画像化してもよいし(図3B)、湿潤状態(0.3 M NaCl、pH 7、PBSバッファ溶液)でラマン分光法によって画像化することも可能である(図3Cおよび3D)。この技法を用いた現時点での最適化されていない検出限界は10 fMである。

10

【実施例7】

20

【0084】

(多数のオリゴヌクレオチド標的の検出)

この実施例では、複数のラマン標識プローブを使用した多数のオリゴヌクレオチドの検出について説明する。個別かつ測定可能なSERSSシグナルを備えた多数のプローブを作製するために、実施例5で記述した方法とCy3以外の色素で官能化したナノ粒子プローブとを使用することができる。この方法によって、多数のオリゴヌクレオチド標的を同時に多重検出することが可能になる。この点を実証するために、標準的なDNA自動合成でオリゴヌクレオチドに導入可能な、ラマン・スペクトルの異なる6種類の市販の色素を選択した。ラマン標識オリゴヌクレオチド修飾した6種類の金ナノ粒子プローブを作製したが、それらは、以下の統計的に固有な30~36 merの配列、すなわち: A) A型肝炎ウイルスVal117ポリプロテイン遺伝子(HVA)、(B) B型肝炎ウイルス表面抗原遺伝子(HVB)、(C) HIV、(D) エボラ・ウイルス(EV)、(E) 痘瘡ウイルス(天然痘、VV)および(F) 炭疽菌(BA)防御抗原遺伝子、に相補的な配列を備えるものとした(図4)^{3 2}。これらのプローブを使って、6種類の標的分析物質に対する新しいラマン走査技術の多重検出能力を示すことが可能である。

30

【0085】

このシステムの選択性を評価し、かつ異なる標的の混合物を含む溶液中でのDNA鎖の数と種類の決定能力を評価するために、8つの個別のテストを行った(図4および5)。すべての実験において標的DNA鎖の濃度を一定に保ち(各々100 pM)、ハイブリダイゼーション条件は前述のとおりとした。最初のテストでは(図5、列1)、すべてのスポットが銀沈着による同じ強度のグレー色を示している。しかしながら、ラマン走査法を用いることによりこれらのスポットを容易に識別することが可能であり、銀を含んでいるスポットの分光学的フィンガープリントによって正確なラマン標識がひとたび決定されれば、これによって標的配列を同定することが可能である。分析を単純化するために、各々のラマン標識プローブに対応した色(四角形ボックス)(図4および図5B)を割り当てた。最初のテスト(図5A)では6種類の標的をすべて存在させたが、いずれもプラットフォームによる測定では強いグレー・スケール値を示し、予想通りのラマン・フィンガープリントを示している。次の7つの実験では、多重検出に対するこの方法の適合性を評価するために、1つまたは複数の標的を意図的に除去した。単色グレー・スケール法では、交差ハイブリダイゼーションが起きているかどうかを判定することはできないということに留

40

50

意されたい。しかしながら、この「多色」走査型ラマン測定法で各スポットの S E R S スペクトルを注意深く調べることににより、どの標識がどのスポットを形成しているのかを決定することができる。配列が全く異なっている図 5 の実験では、各標的から予想される分光プローブの痕跡以外には、検出可能なラマン線は實際上全くないことが判明した。このことは種類の異なる標的とプローブの間で交差ハイブリダイゼーションが起きていないことを意味する。

【0086】

注意すべきことは、得られた S E R S シグナルが、ラマン色素で標識された金粒子が銀形成を始めた支持体領域だけから生じているということである。それゆえに、この「多色」走査型ラマン検出法は、金粒子が存在しない場での銀沈着によるバックグラウンド・シグナルを記録しない。このことは、前述のグレー・スケールの走査法の場合、特に著しく低濃度 ($< 50 \text{ fM}$) の標的の場合にはあてはまらない。

10

【実施例 8】

【0087】

(オリゴ・リボ核酸 (RNA) 標的における一塩基多型 (SNP) の識別と限定)

この実施例では、一塩基多型 (SNP) を識別するための検出システムにおける、ラマン標識を有するオリゴヌクレオチドの利用について記述するが、遺伝子発現の研究の場合、単一スポットのシグナルに限定可能な RNA 検出方法が望まれる。よく知られていることだが、オリゴヌクレオチドで十分に官能化されたナノ粒子プローブは非常に鋭い熱誘発性変性遷移を示し、その結果 DNA 検出における従来のフルオロフォア分子プローブよりも実質的に高い選択性がもたらされる^{5、8、9}。しかしながら RNA 検出との関連においてはこれらのプローブの挙動については何もわかっていない。ラマン分光に基づくこのシステムの選択性および SNP 標的の同定能力をさらに評価するために、同じ捕捉 DNA 鎖に結合し得るが、プローブ結合領域に 1 塩基変異を有する 2 種類の RNA 標的 (標的 1 : T_1 、正常; 標的 2 : T_2 、1 塩基の差異あり、図 6) を選択した。従って、これらの 2 種類の RNA 標的鎖を識別するために、配列とラマン標識が異なる 2 種類の DNA 官能化プローブ (プローブ 1 : P_1 、プローブ 2 : P_2) が必要である (図 6)。2 種類の標的 (T_1 、 T_2) をいかに識別し得るかということだけでなく、2 種類の標的の混合物をいかに半定量的な方法で分析し得るのかを実証するために 7 種の個別テストを行った。

20

【0088】

標準的な実験では、適切な捕捉鎖 (図 6) を S M P B 官能化スライドガラスに 4 連にスポットした。これらのスライドガラスを、混合物でない RNA 標的 1 もしくは標的 2、または標的 1 と 2 の混合物 (オリゴヌクレオチド総濃度 1 nM) を含む $0.3 \text{ M NaCl} - \text{PBS}$ バッファ溶液 (10 mM リン酸、 $\text{pH } 7$) で恒湿器中にて室温でコーティングした。2 時間後、チップを $0.3 \text{ M NaCl} - \text{PBS}$ バッファ溶液で 4 回洗浄し、非特異的に結合した標的を除去した。次に、ナノ粒子プローブ (2 nM 、プローブ 1 : プローブ 2 = 1 : 1) を含む $0.3 \text{ M NaCl} - \text{PBS}$ バッファ溶液でチップを 1.5 時間処理して、標的配列の突出している領域とハイブリダイズさせた (図 7)。チップを 0.3 M 硝酸ナトリウム - PBS バッファ溶液で洗浄して塩素イオンと非特異的に結合したナノ粒子プローブを除去した。チップを銀増強により現像すると、標的の比が異なるグレー・スポットについてのラマン測定では、類似のスペクトルを生じ (図 8)、それらはプローブ 1 およびプローブ 2 を等量ずつ含む試料のスペクトルとほとんど同一である。この結果は、チップ上にプローブ 1 とプローブ 2 が等量ずつ存在することを示す。これは、完全に塩基配列が適合 (マッチ) したオリゴヌクレオチド 2 本鎖と 1 塩基が不適合 (ミスマッチ) のオリゴヌクレオチド 2 本鎖では、安定性が同程度であるからであり、従ってナノ粒子プローブ (1 および 2) は、どの標的比においてもほとんど等しい量でチップ上のスポットに結合した。この条件化では 2 種類の標的を識別することは不可能である。

30

40

【0089】

これらの各テストでは、恒湿器中で、 T_1 と T_2 を異なる比率 (総濃度 = 1 nM) で含む $0.3 \text{ M NaCl} - \text{PBS}$ バッファ溶液でスライドガラスを処理した。2 時間後、非

50

特異的に結合した標的を除去するために、チップを $0.3 \text{ M NaCl} - \text{PBS}$ バッファ溶液で洗浄した。次に、ナノ粒子プローブ (P_1 および P_2 の比率は $1:1$ 、総濃度 2 nM) でチップを 1.5 時間処理して、標的配列の突出している領域とハイブリダイズさせた (図 6)。チップを 0.3 M 硝酸ナトリウム - PBS バッファで洗浄して塩素イオンおよび非特異的に結合したナノ粒子プローブを除去した。4 通りのハイブリダイゼーションの組合せ、すなわち $T_1 : P_1$ 、 $T_2 : P_2$ 、 $T_1 : P_2$ 、 $T_2 : P_1$ が可能であることに注意されたい (図 6)。チップを予め厳密 (ストリンジェント) に洗浄せずに銀増強で現像すると、異なる溶液標的比に対応するグレー・スポット上のラマン測定結果は 7 種類の実験のすべてにおいてほぼ同一のスペクトルを生じるが、これらのスペクトルは、プローブ 1 およびプローブ 2 を $1:1$ の比率で含む試料のスペクトルともほぼ同一である (補足情報参照)。これらのデータは、スポット上の標的分子の組成にかかわらず、プローブ 1 と 2 がチップ上のスポットに等しい量で結合していることを示す。

【0090】

従って、スポット上の標的の組成を同定するために、塩もしくは温度による厳密な洗浄が行わなければならない。よって、不完全な 2 本鎖 ($T_1 : P_2$ および / もしくは $T_2 : P_1$ 、図 6 C および 6 D) を選択的に変性させるが完全に相補的なオリゴヌクレオチドから形成された 2 本鎖 ($T_1 : P_1$ および / もしくは $T_2 : P_2$ 、図 6 A および 6 B) は変性させない、塩 ($8 \text{ mM NaCl} - \text{PBS}$ バッファ) による厳密な洗浄を行った⁹。このような厳密な洗浄とそれに続く銀染色を行った後に、グレー・スポット上のラマン測定を利用して、得られたスペクトルからスポット上の標的の組成を容易に同定することが可能である。混合物でない RNA 標的 1 もしくは RNA 標的 2 のみが存在するテストでは、プローブ 1 もしくはプローブ 2 に応じたシグナルのみがそれぞれ観察された (図 9 の B「a」および「g」を比較されたい)。混合物を用いた実験では、両プローブに対するシグナル ($I_1 : 1650 \text{ cm}^{-1}$ (プローブ 1)、 $I_2 : 1588 \text{ cm}^{-1}$ (プローブ 2)) が検出されたが、シグナル強度の比率は個々の実験における 2 種類の標的の比率に比例する (図 9 B の挿入図)。

【実施例 9】

【0091】

(タンパク質のスクリーニング：小分子相互作用)

このラマン検出方式は、タンパク質 - 小分子間およびタンパク質 - タンパク質間の相互作用に関するタンパク質マイクロアレイへの応用においても使用可能である。タンパク質 - 小分子間の相互作用を検出するために、無関係の 3 種類の小分子であって、その特異的な受容体タンパク質が入手可能な小分子、すなわち：ピオチンおよび抗ピオチンマウスモノクローナル抗体；DIG (ステロイド・ジゴキシゲニン) および抗 DIG マウスモノクローナル抗体；DNP (ジニトロフェニル) および抗 DNP マウスモノクローナル抗体を選択した。この 3 種類の小分子を、ラマン色素で官能化した金粒子で標識した (金ナノ粒子 (直径 13 nm) は、小分子キャップ構造の、ラマン色素およびアルキルチオールで官能化したポリアデニン (A_{20}) で修飾した (図 11 A))。標準的な検出実験では、3 組すべてのタンパク質を、市販のアレイ作製装置を使用してタンパク質溶液 ($200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、5% グリセロール) をスポットすることにより、アルデヒドで官能化したスライドガラス上に 3 連で固定化した (図 11 A)³³、³⁴。恒湿器中で 4 時間インキュベートした後に、該タンパク質チップを、0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS バッファ (0.173 M NaCl 、 0.027 M KCl 、 $4.3 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $1.4 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{pH} = 7.4$) で洗浄し、タンパク質チップ上の無反応アルデヒドを不動態化するために同溶液中に 4 時間浸漬した。 PBS 溶液 (0.173 M NaCl 、 0.027 M KCl 、 $4.3 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $1.4 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{pH} = 7.4$) で洗浄後、ラマン標識した小分子プローブで該タンパク質チップを処理した (4、2 時間)。バッファ溶液 (0.2 M NaNO_3 、 5 mM リン酸、 $\text{pH} 7.4$) で洗浄後、金粒子で官能化されたタンパク質チップを銀増強溶液で 8 分間処理し、ナノピュア水で洗浄した。ラマン測定の前に、銀染色されたチップを $2 \times \text{PBS}$ 溶

液に10分間浸漬した。

【0092】

最初のテストでは、ラマン標識した小分子プローブ3種類をすべて含む溶液でタンパク質チップを処理した。銀増強処理後、3連ドットのアレイが肉眼でもはっきりと観察される(図11B-1)。ドットのラマン・スペクトルを測定したところ、正しいプローブ・スペクトルが得られ、交差反応を示す徴候はみられなかった(すなわち1%未満であり、ビオチンにはCy3、DIGにはCy3.5、DNPにはCy5)。次に、同種のチップについて、DIGプローブとDNPプローブの存在下で実験し、予想通りの結果を得た(図11B-2およびC)。2種類のプローブの他の組み合わせ全てについて実験し、この場合も予想通りの結果を得たが、このことは、当該システムの選択性が高いことを示している(図11B-3、C-3、11B-4およびC-4)。2種類のプローブの実験では、このアレイ用のプローブが1種類存在せず、このことは他の相互作用対をスクリーニングする際のコントロールの役割を果たしている。

10

【実施例10】

【0093】

(タンパク質-タンパク質間相互作用のスクリーニング)

タンパク質-タンパク質の相互作用のスクリーニング研究用に3対のタンパク質、すなわちマウス免疫グロブリンG(IgG)とその抗体、ユビキチンとその抗体、ヒト・プロテインCとその抗体を選択した。マウスIgG、ユビキチン、およびヒト・プロテインCを、それぞれアルデヒド・スライド上に4連でスポットティングした。金ナノ粒子をはじめに抗体で、次にラマン色素標識オリゴヌクレオチドで官能化させた。図12に標識手順を示す。抗体(10μg、pH=9.2)を金粒子溶液(13nm、10nM、1mL、pH9.2)に添加し、20分間後にラマン色素キャップ構造のアルキルチオール官能化ポリアデニン(A₁₀、0.2=OD₂₆₀)を該溶液に添加した。12時間後に、金粒子の表面をさらに不動態化するために同溶液に10%BSA溶液(0.3mL)を添加し、10分間静置した。ラマン色素キャップ構造の金粒子-抗体コンジュゲートを、遠心分離(14000rpm)により粒子を沈殿させて精製した。過剰のオリゴヌクレオチド、BSAおよび抗体を含む上清を静かに移して粒子から取り除くことが可能である。その後粒子プローブをPBSバッファに再分散させる。次いでプローブ(金ナノ粒子濃度は2nM、抗体濃度は約2μg/mL)をタンパク質チップの現像に使用した。タンパク質-タンパク質間相互作用のスクリーニング・プロトコールは、(前述の)タンパク質-小分子間相互作用の場合と同様である。

20

30

【0094】

図13のA4のチップは、3種類のラマン標識抗体プローブ全てを用いて同時に処理されたものである。銀増強処理の後、3種類の2×2ドットのアレイ全てが銀現像により明らかに目にみえる。ラマン分析の結果は交差反応がないことを示し、色素はすべて正しいスポットに存在している(図13)。

【0095】

フルオロフォアを用いる方法と同様、この新しい走査型検出方式もゲノミクスおよびプロテオミクス上の一般的な検出方法を提供するものであるが、さらに感度が高く、より多くの標識が可能である。利用可能なラマン色素の数は、利用可能かつ識別可能な蛍光色素の数よりはるかに多い²⁰、²¹。ラマン色素は蛍光色素でも非蛍光色素でもよい。色素をわずかに修飾することによって異なるラマン・スペクトルを有する新しい色素を生み出すことが可能であり、識別不可能な蛍光スペクトルを示す色素であってもラマン・スペクトルによって識別可能である¹⁶。従来の多色蛍光色素で標識する方式では、データの読み出しにマルチ・レーザーと複数回のスキャンとを必要とする¹。これに対し、このラマン走査検出方式で必要なのは単色レーザーと1回のスキャンだけであり、このことは、ハイ・スループットの読み出し処理が可能であることを示唆している。量子ドット標識の蛍光検出で必要なのは単色レーザーだけであるが、異なるサイズおよび形状の量子ドット・ナノ粒子からは、通常、多色が生じる⁶、⁷。形やサイズの違う、生物標識に会合したナノ粒

40

50

子は、異なる熱力学的・反応速度論的特性をもつことになると考えられるが、このことは、マイクロアレイを用いる同時進行の生物学的検出にとっては問題である。それとは対照的に、ラマン走査検出方式で必要とされるのは、単一サイズの金ナノ粒子（ここでは13 nm）の担体と、様々なラマン色素由来の標識情報のみである。それゆえに、本明細書中で記述される標識のほとんどは同様の熱力学的・反応速度論的な標的結合特性を有し、この特性が、より速くより正確なハイ・スループットのマイクロアレイを用いた生体分子マッピングおよび生体分子スクリーニングにとって必要不可欠である¹。

【実施例11】

【0096】

（複数のラマン色素で標識したナノ粒子プローブ）

上述のラマン標識は全て1色素系、すなわち単一の担体とラマン色素である。2つ以上のラマン色素をナノ・サイズのナノ粒子担体に搭載することが可能である。標識成分間の比率調整によって、大規模にコード化されたラマン標識を作製することが可能である（図14および15）。2色素系では、同一の塩基配列を有するがラマン標識の異なる（Cy3およびTMR）2種類のアルキルチオール・キャップ構造オリゴヌクレオチド鎖を用いて直径13 nmの金ナノ粒子を同時に修飾し、複合ラマン標識を作成した。この2色素標識ナノ粒子プローブは1色素標識ナノ粒子プローブと類似の熱力学的・反応速度論的性質を有する（すなわち同一の鎖についての同一のハイブリダイゼーション速度論と融解温度）。標準的なDNA検出実験（標的濃度は100 pM、図1）では、銀染色スポット由来のラマン・スペクトルは、Cy3およびTMRの両方から発生するラマン線の特徴をはっきりと示している（図16、左）。Cy3とTMRの比率を変えることによって、異なる複合ラマン・スペクトルが得られた（図16、右）。これらのラマン・スペクトルは、測定される領域内の主たる帯域の相対強度の差によって識別可能である。参照手段を複数とすることにより異なるラマン標識の同定の精度が高まり、この2色素ラマン標識方法が実用可能となる。2色素系以外に、Cy3、TMR、およびCy3・5の間の量的比率を変えた3色素標識の2例を図17に示す。

【0097】

1色素、2色素および3色素のみならず、より多くの色素を組み合わせた標識系も利用可能である。大きな疑問は、このラマン標識系で標識をいくつまで利用し得るのかということである。2色素系では5段階の強度レベル（0、1、2、3、4）を想定し、13種類の標識を生成することが可能である。10色素系および14色素系を用いて、それぞれ500万の標識および30億の標識を生成することが可能である（図15）。

【実施例12】

【0098】

（マイクロビーズを用いる生物学的検出）

数多くの並行標識技術が、マイクロビーズを用いる生物学的検出法において特に重要である。マイクロビーズ技術は、遺伝子発現のモニタリング、SNP遺伝子型決定、プロテオミクス・スクリーニング、創薬のための重要な生物学的分析方式として浮上しつつある¹、¹³。マイクロアレイ技法と比較して、マイクロビーズ検出は、ハイブリダイゼーションを用いる手法における適応性が高く、分析物質の拡散が速く、また、作製が簡単で安価である。しかしながら、マイクロアレイのような位置的コード化を伴わないマイクロビーズ検出は、粒子プローブについてある種のバーコード化を施す方法に頼らざるを得ない。現在の蛍光色素を用いるコード化手法における主要な問題は、発光スペクトルが広いことと有機色素間でエネルギーが伝達されることが原因で識別可能な標識の数が限定されるということである¹¹。これに対し、ラマン標識はこれらの問題を克服可能である。

【0099】

標準的なDNA標的検出系では、3成分サンドイッチ・アッセイ方式を利用可能である。我々の実験では、ガラス・マイクロビーズ（直径210～250 nm）をオリゴヌクレオチド捕捉鎖によって官能化した（図18）。単一種類の、もしくは混合したラマン色素で標識されたアルキルチオール・キャップ構造のオリゴヌクレオチド・プローブで修飾し

た金ナノ粒子（直径13 nm）を合成した。次に、ラマン色素および金粒子の会合プローブ（金粒子に対して2 nM）を、4 × PBSバッファ溶液（0.6 M NaCl、10 mMリン酸バッファ（pH 7））中で、捕捉鎖オリゴヌクレオチドで官能化されたガラス・マイクロビーズ表面上の標的鎖とともに2時間、同時にハイブリダイズさせ、塩素イオンおよび非特異的に結合したナノ粒子標識を除去するために、第2のバッファ溶液（0.6 M硝酸ナトリウム、10 mMリン酸）で洗浄した後、即座に銀増強溶液（ビービーインターナショナル（BBInternational）製）で8分間処理した。ラマン測定前に、マイクロビーズを2 × PBSバッファに10分間浸してラマン散乱シグナルをさらに増強させた。

【0100】

マイクロビーズ検出方式における新しい走査型ラマン技術の多重化能力を実証するために、8標的分析物質検出実験を選択した。標的、捕捉、およびプローブのオリゴヌクレオチド鎖の配列を図19aおよびbに示す。対応するラマン・スペクトル（色付きの円形および四角形のボックスで示されている）を図20に示す。標準的な実験では、8種類の捕捉鎖をそれぞれマイクロビーズに結合させた。すべてのマイクロビーズを一緒に混合して、適応性の広い「ランダム・マイクロアレイ」を構築した。次いで8種類の標的（100 nM）およびラマン標識ナノ粒子プローブ（2 nM）を、前述したハイブリダイゼーション条件下でランダム・マイクロアレイ溶液に添加した。洗浄および銀染色後、マイクロビーズはダーク・グレーの球体として現れ、予想通りのラマン痕跡（シグネチャ）を示している（図21）。読み出し処理を簡便にするためにマイクロビーズを機械的に整列させ（図22、上図）、走査型ラマン分光法によって連続方式で読み出しを行った（図22、下図）。さらに、マイクロビーズのラマン・フィンガープリントを、光ファイバーによって読み出すことも可能である（図23）。

【0101】

この新しいラマン標識技術の他に、最近の2種類の方法により、大規模な同時並列標識能を実用化する可能性が示されている。すなわち、量子ドット標識マイクロビーズおよび1ミクロン未満の金属バーコードである¹¹、³⁵。しかしながら、これらの方法はどちらもミクロン・サイズの構造体を用いた多重標識を実現するものである。それとは対照的に、本発明のラマン標識はナノ・サイズの標識方法であり、このようなミクロン・サイズの標識方法よりもはるかに適応性が広い。特に、プローブのフットプリントはより小さく、該プローブを用いるこのシステムの特異性および感度は、大きな構造体を用いるシステムよりも格段に改良しやすい。ナノ粒子を用いるこの新しい方法は、様々な理由で重要である。まず第1に、従来の蛍光を用いるチップ検出と比較すると、1回のレーザー励起によって発生する1つのラマン・スペクトルから、ラマン強度の比率を割り出すことが可能である。第二に、利用可能なラマン色素の数が、利用可能かつ識別可能な蛍光色素の数よりはるかに多い²⁰、²¹、²⁶。実際にラマン色素は蛍光性のものでも非蛍光性のものでもよいが、色素分子をわずかに化学標識することによって新しい色素を作り出すことが可能であり、たとえこの2種類の色素が実際に識別不能な蛍光スペクトルを有するとしても、新しい色素は異なるラマン・スペクトルを有する²⁶。それゆえに、このフィンガープリント法は、従来の蛍光を用いる検出方法よりも、潜在的に適応性がより広く、利用可能かつ重複のないプローブの種類がより多く、多重化能力がより高い。最後にこの方法は、類似する分子蛍光を利用する方法よりも感度が数オーダー高いことや選択性がけた違いに高いことなど、前述の金ナノ粒子を用いる検出法のあらゆる利点を備えている⁸、⁹。

【実施例13】

【0102】

（プロット検出用のラマン標識）

これまでに述べたラマン検出の実験はすべて、ガラスチップもしくはガラス・ビーズの表面上で行われた。しかしながら、支持体の選択も非常に適応性が広い。ポリマー（例えばニトロセルロース、PVDF）の支持体もラマン検出実験によく適しており、一般にサザン・ブロットティング、ノーザンブロットティングおよびウェスタン・ブロットティング実験で使用されるポリマー支持体については、同支持体由来の大きなバックグラウンドはみら

10

20

30

40

50

れない(図25)。従って、本実施例で述べるラマン標識技法はサザン、ノーザン、およびウェスタン・ブロットティング実験においても適用可能である。

【0103】

ウェスタン・ブロットティングに先立ち、染色済み分子量ラベル(アプロチニン、リゾチーム、ソイビーン・トリプシン・インヒビターおよび炭酸脱水酵素)を、プレ・キャストのトリス塩酸ポリアクリルアミドゲルの1レーンにのせ、同じゲルの別のレーンにユビキチンをのせた(試料はローディング・バッファ溶液に溶解($130\mu\text{g}/250\mu\text{L}$): 60mM トリス・塩酸、 2% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、 5mM β -メルカプトメタノール、 0.005% プロモフェノール・ブルー、 20% グリセロール)。電場をかけ(200V 、定電圧)(Power Pac Basic (商標)パワーサプライ、米国カリフォルニア州(CA94547)ハーキュリーズ(Hercules)所在のバイオラッドラボラトリーズ(Bio-Rad Laboratories)社製)、これらのタンパク質試料をポリアクリルアミドゲル(SDS バッファ溶液: 25mM トリス、 192mM グリシン、 0.1% (W/v) SDS、 $\text{pH}=8.3$)で分離した。その後、電場2時間をかけてタンパク質試料をニトロセルロース膜に転写した(400mA 、定電流; 転写バッファ: 25mM トリス、 192mM グリシン、および 20% (v/v) メタノール、 $\text{pH}=8.3$)。染色済みタンパク質ラベルは、膜上に青色でくっきりと見えたが、ユビキチンは見えなかった。次に、ニトロセルロース膜をバッファ溶液(20mM トリス・バッファ、 $\text{pH}7.6$ 、 150mM NaCl)で3回洗浄し、次いでタンパク質のない領域を不動態化するために、ミルク溶液(20mM トリス・バッファ、 $\text{pH}7.6$ 、 150mM NaCl、 5% ドライ・ミルク)中に12時間置いた(図26)。不動態化の後、膜をCy3.5で標識した金ナノ粒子抗ユビキチンプローブで処理した(図27A、金ナノ粒子 2nM 、抗体濃度は約 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 、実施例10を参照)。金ナノ粒子で官能化された膜を銀増強溶液(レディング(Redding)所在のテッドペラ・インコーポレイテッド(Ted Pella, Inc.)製)で8分間処理すると、金ナノ粒子プローブを含む領域は銀染色によってダーク・グレー色を示した(図27B)。ラマン測定の前に、銀染色された膜を $2\times\text{PBS}$ 溶液に10分間浸漬した。膜上のダーク・グレー領域から発生する標準的なラマン・スペクトルは、ラマン線がほとんどCy3.5からのものであり、ニトロセルロース膜、タンパク質分子および実験に用いた他の化学物質から発生しているものではないことを示す(図27C)。これらの結果は、本明細書に記述されたラマン標識が、ブロットティング実験に応用可能なことを実証している。

【0104】

【表 1】

参照文献

1. G. Gibson, S. V. Muse, *A Primer of Genome Science* (Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, 2002).
2. M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P.O. Brown, *Science* **1995**, *270*, 467.
3. M. Chee, R. Yang, E. Hubbell, A. Berno, X. C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D. J. Lockhart, M. S. Morris, S. P. A. Fodor, *Science* **1996**, *274*, 610. 10
4. M. Snyder, et al., *Science* **2001**, *293*, 2101.
5. R. Elghanian, J. J. Storhoff, R. C. Mucic, R. L. Letsinger, C. A. Mirkin, *Science* **1997**, *277*, 1078.
6. M. Bruchez Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013.
7. W. C. W. Chan, S. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016.
8. T. A. Taton, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Science* **2000**, *289*, 1757.
9. S. J. Park, T. A. Taton, C. A. Mirkin, *Science*, **2002**, *295*, 1503.
10. L. He, M. D. Musick, S. R. Nicewarner, F. G. Salinas, S. J. Benkovic, M. J. Natan, C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9071. 20
11. M. Han, X. Gao, J. Z. Su, S. Nie, *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 631.
12. I. Willner, F. Patolsky, J. Wasserman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2261.
13. H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12142.
14. S. Pathak, S. K. Choi, N. Arnheim, M. E. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4103.
15. S. Schultz, D. R. Smith, J. J. Mock, D. A. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 996. 30
16. C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128.
17. See website: www.nanosphere-inc.com.
18. C. A. Mirkin, AACC Meeting, San Diego, CA, **2001**.
19. D. R. Walt, *Science* **2000**, *287*, 451.
20. D. Graham, B. J. Mallinder, W. E. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1061.
21. D. Graham, W. E. Smith, A. M. T. Linacre, C. H. Munro, N. D. Watson, P. C. White, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4703.
22. L. M. Demers, C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds III, R. L. Letsinger, R. Elghanian, 40

- G. Viswanadham, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5535.
23. R. L. McCreery, *Raman spectroscopy for chemical analysis* (John Wiley & Sons, New York, **2000**).
24. G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, J. M. Chalmers and P. R. Griffiths, Ed., Wiley, New York, **2002**, page:759-774.
25. A. Campion, P. Kambhampati. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 241.
26. K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2957.
27. S. R. Emory, S. Nie, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 493. 10
28. R. C. Freeman, K. G. Grabar, K. A. Allison, R. M. Bright, J. A. Davis, A. P. Guthrie, M. B. Hommer, M. A. Jackson, P. C. Smith, D. G. Walter, M. J. Natan, *Science* **1995**, *267*, 1629.
29. M. D. Musick, C. D. Keating, M. H. Keefe, M. J. Natan, *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 1499.
30. A. M. Michaels, M. Nirmal, L. E. Brus, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9932.
31. A. M. Michaels, J. Jiang, L. Brus, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 11965.
32. From the web site of National Center for Biotechnology Information (NCBI):
<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>. 20
33. G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science* **2001**, *289*, 1760.
34. B. B. Haab, M. J. Dunham, and P. O. Brown, *Genome Biology* **2001**, *2*(2):
 research0004.1-0004.13.
35. S. R. Nicewarner-Peña, R. G. Freeman, B. D. Reiss, L. He, D. J. Peña, I. D. Walton, R. Cromer, C. D. Keating, M. J. Natan. *Science* **2001**, *294*, 137.

【図面の簡単な説明】

【 0 1 0 5 】

【図 1】オリゴヌクレオチドおよびラマン標識で官能化したナノ粒子を使用する、チップを用いた DNA 検出法を示す図。 30

【図 2】Cy3 標識で官能化したナノ粒子とハイブリダイズさせた後の、銀染色の前 (A) および後 (B) にマイクロアレイをプラットフォームでスキャンした画像を示す図。(C) 銀染色スポットの 1 つから得た、典型的なラマン・スペクトル。(D) チップ上の位置の関数として表された、 1192 cm^{-1} におけるラマン強度のプロファイル; ラマン装置からのレーザー・ビームは、「B」図中の線によって示されるように左から右にチップ上を移動する。

【図 3 A】ラマン走査法を使用する際の、最適化されていない DNA 検出限界を示す図。(A) マイクロアレイを用いるサンドイッチ検出形式。 40

【図 3 B】ラマン走査法を使用する際の、最適化されていない DNA 検出限界を示す図。(B) Cy3・5 標識で官能化したナノ粒子とハイブリダイズさせた後の、標的濃度 20 fM についてのマイクロアレイのプラットフォームによる画像。ラマン装置からのレーザー・ビームは、図中の線によって定義されるように左から右にチップ上を移動する。

【図 3 C】ラマン走査法を使用する際の、最適化されていない DNA 検出限界を示す図。(C) 銀染色スポットの 1 つから得た、典型的なラマン・スペクトル。

【図 3 D】ラマン走査法を使用する際の、最適化されていない DNA 検出限界を示す図。(D) チップ上の位置の関数としての、 1199 cm^{-1} におけるラマン強度プロファイル。

【図 4】左側は 6 つの色素のラマン・スペクトルを示す図。それぞれの色素は、我々の標 50

識スキームにおける様々な色（四角形のボックスを参照）と相関する。右側は6種のDNA標的の分析システムを示す図。標的鎖の配列情報は、米国ナショナル・センター・オブ・バイオロジカル・インフォメーション（National Center for Biological Information）のウェブサイト（<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>）から得た。

【図5】（A）銀染色したマイクロアレイのプラットフォーム画像、および（B）対応するラマン・スペクトルを示す図。色付きボックスは、図4の色でコード化したラマン・スペクトルと相関する。

【図6】2つのRNA標的（標的1：完全なもの、標的2：1塩基異なるもの）の違いを示す図。

【図7】RNA標的1もしくは2のみ、または標的1と2の混合物の、マイクロアレイへのハイブリダイゼーションを（A）厳密な洗浄前、（B）厳密な洗浄後について示す図。 10

【図8】（A）ナノ粒子とハイブリダイズさせたマイクロアレイの典型的なプラットフォーム画像を（1）厳密な洗浄前、（2）厳密な洗浄後、ただし銀増強処理の前、および（3）銀増強処理の後について示す図。（4）厳密な洗浄前、ただし銀増強処理の後の、ナノ粒子とハイブリダイズさせたマイクロアレイのプラットフォーム画像。（B）（4）の銀増強処理スポットの典型的なラマン・スペクトル（紫色の線）を、混合プローブ（1：1、プローブ1：プローブ2、銀増強処理後）のスペクトル（黒色の線）と比較して示す図。（C）混合プローブ（プローブ1：プローブ2、1：1、銀増強処理後）のラマン・スペクトルを、プローブ1のスペクトル（TMRのみ、青色の線）またはプローブ2（Cy3のみ、赤色の線）と比較して示す図。 20

【図9】（A）ナノ粒子官能化マイクロアレイの典型的なプラットフォーム画像を（1）厳密な洗浄前、（2）厳密な洗浄後、ただし銀染色の前、および（3）銀染色の後について示す図。（B）異なる比（a）1：0；（b）5：1；（c）3：1；（d）1：1；（e）1：2；（f）1：3；（g）1：5；（h）0：1の標的1と標的2における、染色スポットのラマン・スペクトル（ $1550 \sim 1750 \text{ cm}^{-1}$ ）。 $400 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ の全体のラマン・スペクトルは、サポート情報に示す。挿入図はラマン強度の比（ I_2 / I_1 ）の標的の比（ T_2 / T_1 ）に対するプロファイルであり、 I_1 は 1650 cm^{-1} におけるラマン強度（プローブ1すなわちTMR標識した金オリゴヌクレオチド結合体に由来）であり、 I_2 は 1588 cm^{-1} におけるラマン強度（プローブ2すなわちCy3標識した金オリゴヌクレオチド結合体に由来）である。 30

【図10】異なる比（a）1：0；（b）5：1；（c）3：1；（d）1：1；（e）1：3；（f）1：5；および（g）0：1の標的1と標的2における、銀増強処理スポットからのラマン・スペクトル（ $400 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ ）を示す図。

【図11】（A）タンパク質-小分子相互作用のスクリーニングに関するスキームを示す図。（B）銀染色したマイクロアレイのプラットフォーム画像を示す図、および（C）図4の色でコード化したスキームに従う、対応するラマン・スペクトルを示す図。ビオチンはCy3で標識し、DIGはCy3・5で標識し、DNPはCy5で標識した。プローブ調製の詳細についてはサポート情報を参照のこと。

【図12】ラマン分光を用いるタンパク質検出方式を示す図。

【図13】タンパク質-タンパク質スクリーニング実験に関する、銀染色したマイクロアレイのプラットフォーム画像を示す図（A1～4）。（B）銀染色スポット中のプローブをラマン法で識別するための色コードを示す図（交差反応性は観察されない）。抗マウスIgGをCy3修飾-アルキルチオール-キャップ構造ポリアデニン（ A_{10} ）で標識し、抗ユビキチン抗体はCy3・5修飾-アルキルチオール-キャップ構造ポリアデニン（ A_{10} ）で標識し、抗ヒト・プロテインC抗体はCy5修飾-アルキルチオール-キャップ構造ポリアデニン（ A_{10} ）によって標識した。 A_{10} オリゴヌクレオチド・スパーサーを使用して、粒子プローブの安定性を高めた³³。 40

【図14】多重化能力を有するラマン標識ナノ粒子プローブの作製例を示す図。R1、R2、およびR3は異なるラマン色素である。

【図15】多数のラマン標識を有する大量のナノ粒子プローブの作製を示す図。 50

【図 16】左側：2つのラマン標識（C y 3：T M R = 1：1、黒色の線）を有するプローブについてマイクロアレイの形態で銀染色した後のラマン・スペクトルを、T M R（青色の線）またはC y 3（赤色の線）のみを有するプローブのスペクトルと比較して示す図。右側：2種の色素で官能化したナノ粒子プローブのラマン・スペクトルをC y 3とT M Rの比の関数として示す図。

【図 17】左側および右側：3色素複合標識（黒色の線）の2つのラマン・スペクトルを、T M R（青色の線）、C y 3（赤色の線）およびC y 3・5（緑色の線）のスペクトルと比較して示す図。

【図 18】分光ラマン法を使用する、マイクロビーズを用いた検出方式を示す図。

【図 19 A】8種のDNA標的解析システムを示す図（A）。それぞれのプローブ鎖は、1種類の色素または2種類の色素標識によって標識した（ラマン・スペクトルに対応する四角形のボックスおよび円を参照。色付きボックスおよび円は、図 20の色でコード化されたラマン・スペクトルと相関する）。

10

【図 19 B】8種のDNA標的解析システムを示す図（B）。それぞれのプローブ鎖は、1種類の色素または2種類の色素標識によって標識した（ラマン・スペクトルに対応する四角形のボックスおよび円を参照。色付きボックスおよび円は、図 20の色でコード化されたラマン・スペクトルと相関する）。

【図 20】1種類の色素6種および混合色素2種のラマン・スペクトルを示す図。それぞれのスペクトルは、我々の標識スキーム中の様々な色と相関する（四角形のボックスおよび円を参照）。

20

【図 21】銀染色した微小球体の顕微鏡画像を示す図。色付きの円は、図 20中の色でコード化されたラマン・スペクトルと相関する。

【図 22】銀染色した微小球体を一直線に並べた光学顕微鏡画像を示す図。色付きボックスは、図 20中の色でコード化されたラマン・スペクトルと相関する。

【図 23】マイクロビーズを使用する、光ファイバーを用いた検出方式を示す図。

【図 24】ラマン標識オリゴヌクレオチドの合成を示す図。

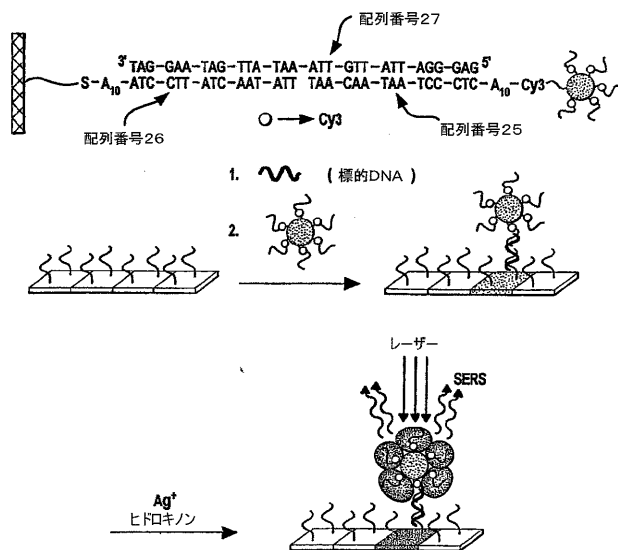
【図 25】ポリマー支持体上でのラマン検出実験を示す図。A：ニトロセルロース上の、銀染色したC y 3修飾B N T・A₂₀金ナノ粒子プローブ；B：P V D F上の、銀染色したC y 3・5修飾D I G・A₂₀金ナノ粒子プローブ。

【図 26】ウェスタン・ブロッティング実験におけるラマン標識技法の使用を示す模式図。

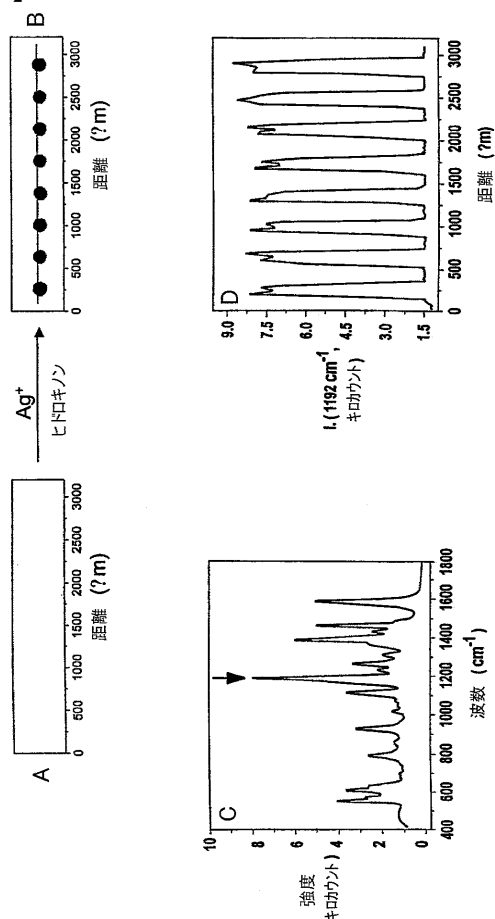
30

【図 27】（a）ユビキチンプローブとして使用するための、抗ユビキチン抗体で修飾したC y 3・5標識金ナノ粒子を示す図。（b）金粒子・プローブで現像したニトロセルロース膜（銀染色の後）を示す図。（c）銀染色した金ナノ粒子を有するダーク・グレー領域の典型的なラマン・スペクトルを示す図。

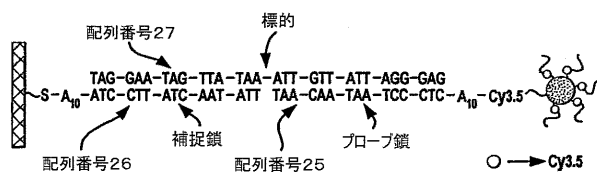
【図 1】



【図 2】



【図 3 A】



【図 3】

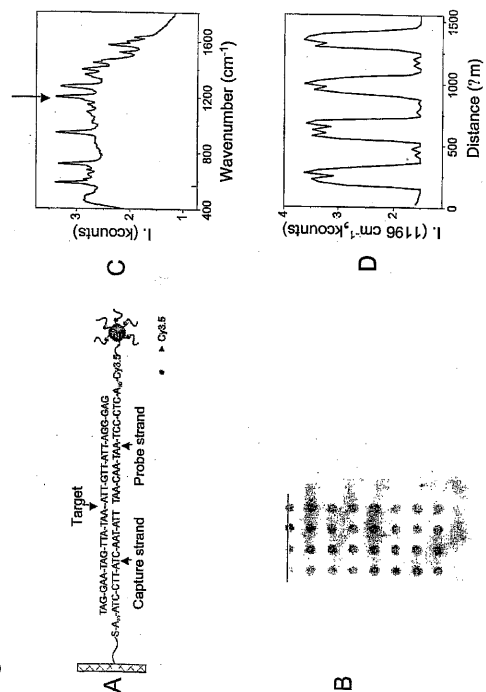
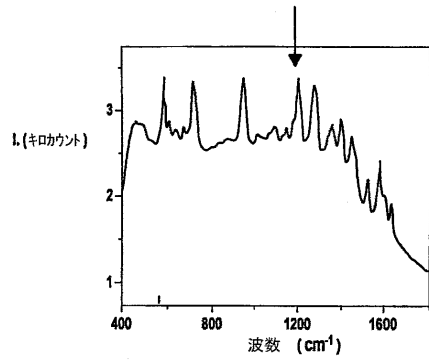
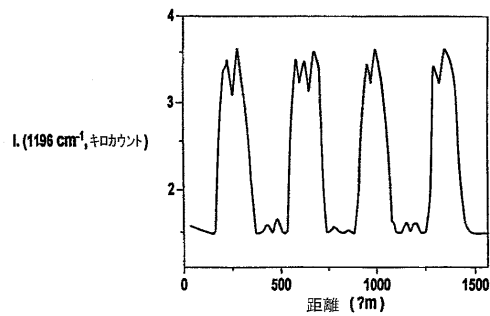


Figure 3

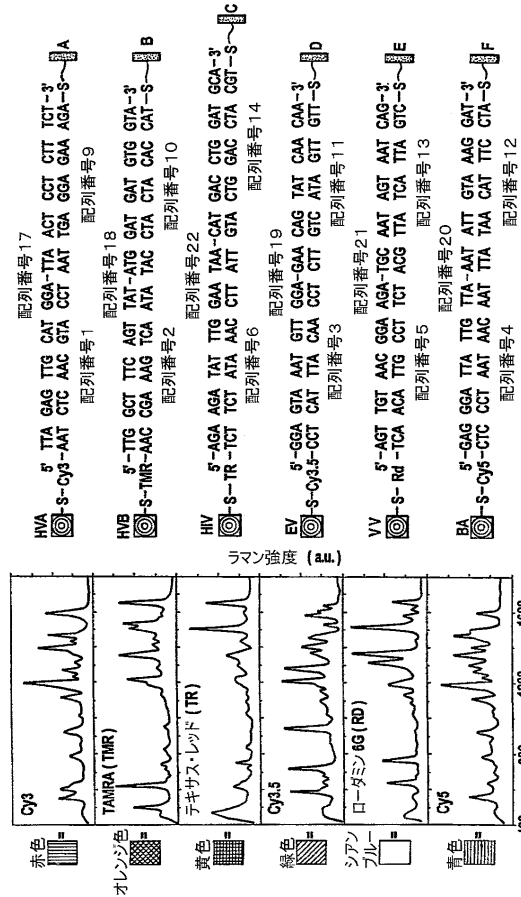
【図3C】



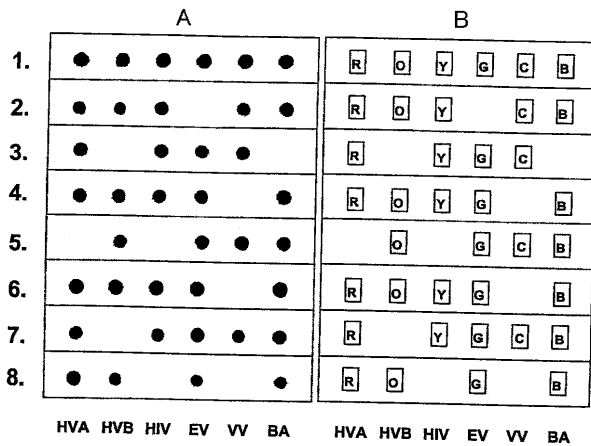
【図3D】



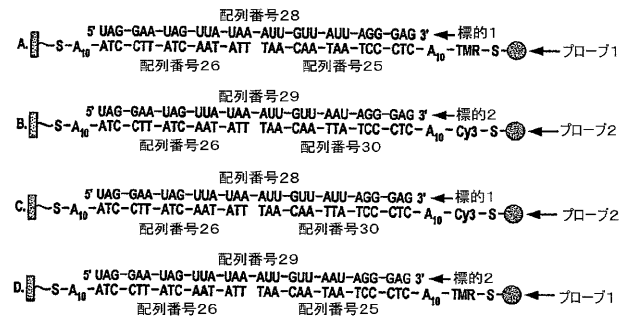
【図4】



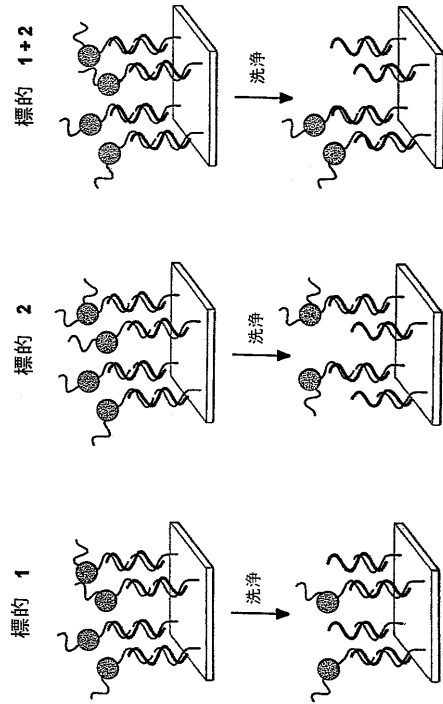
【図5】



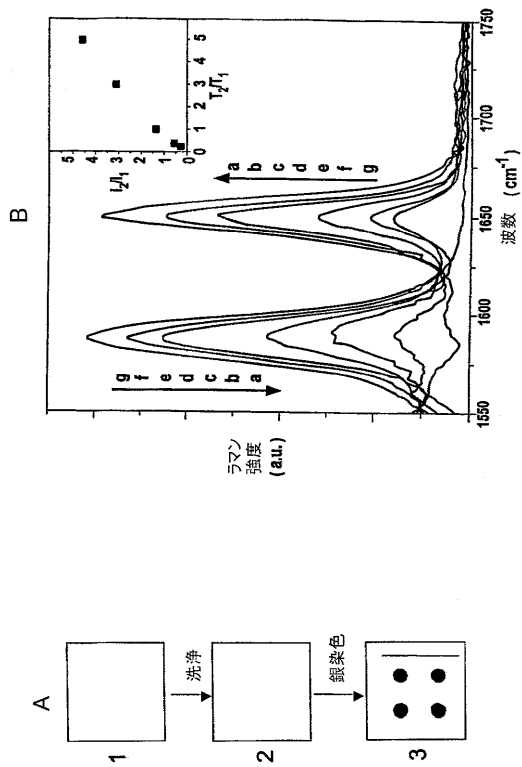
【図6】



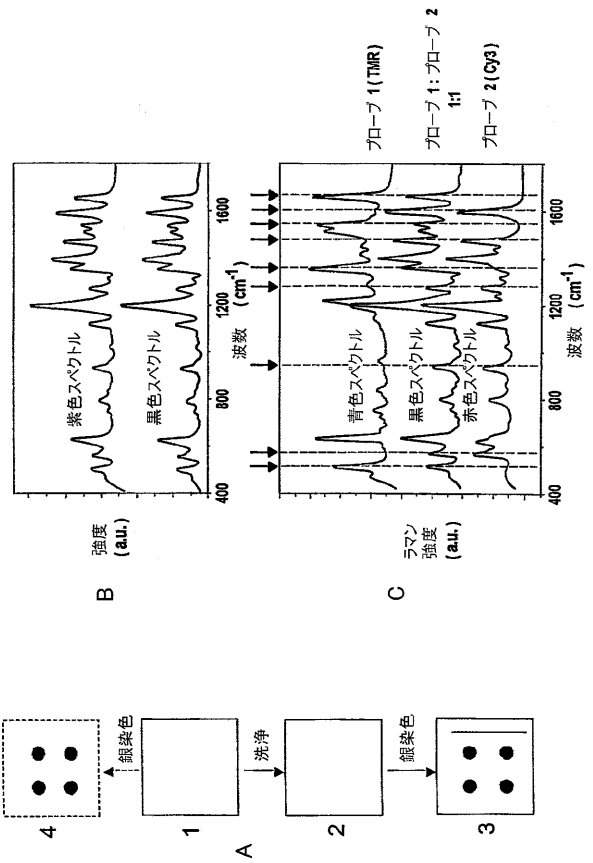
【図 7】



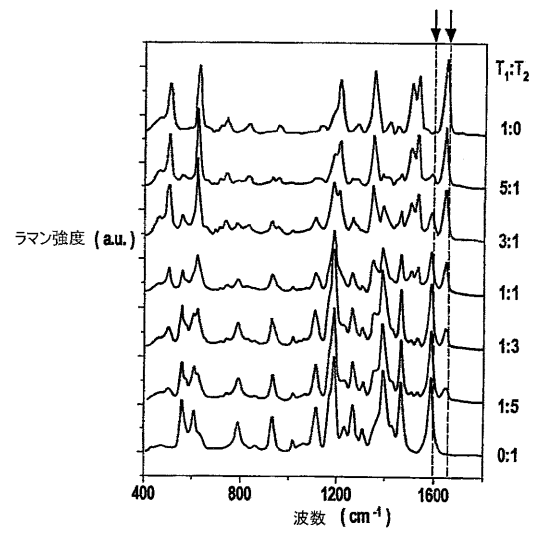
【図 9】



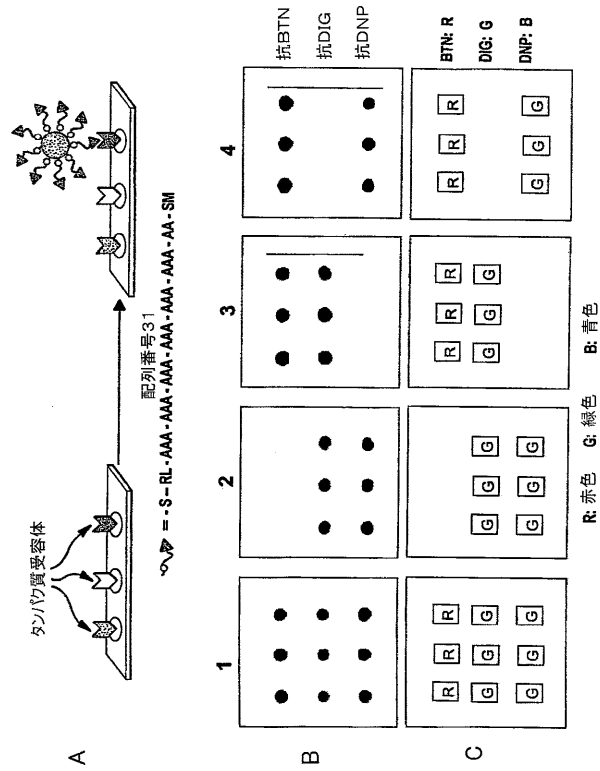
【図 8】



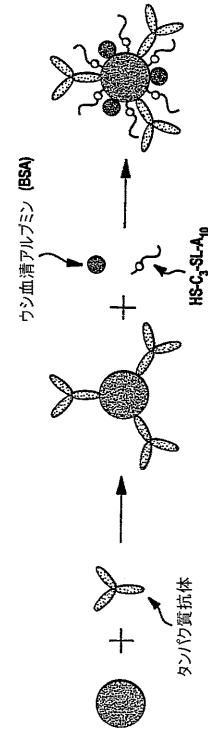
【図 10】



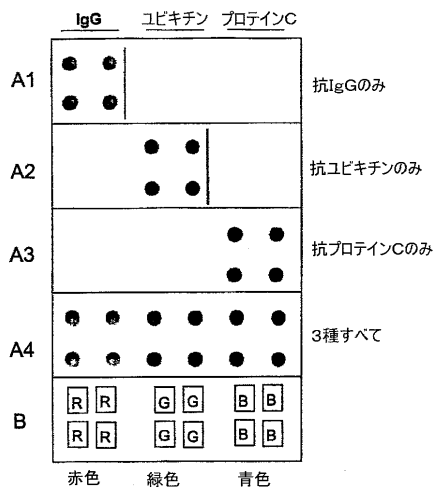
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】

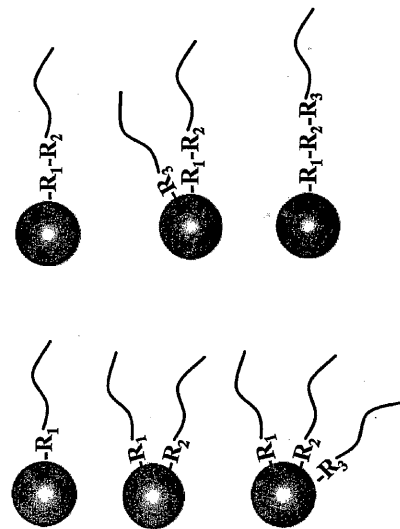
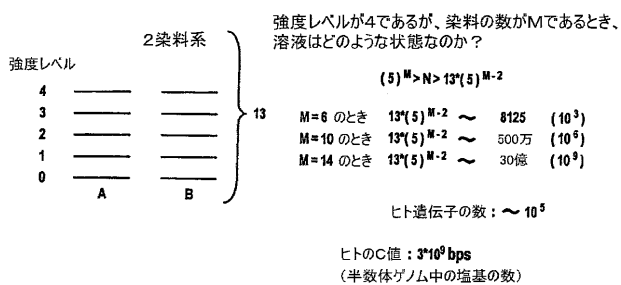
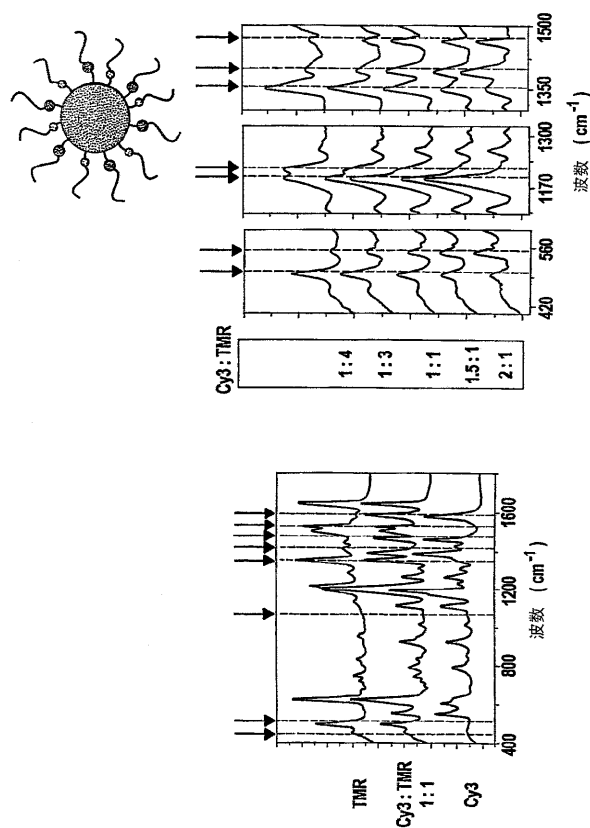


Figure 14

【図 15】



【図 16】



【図 17】

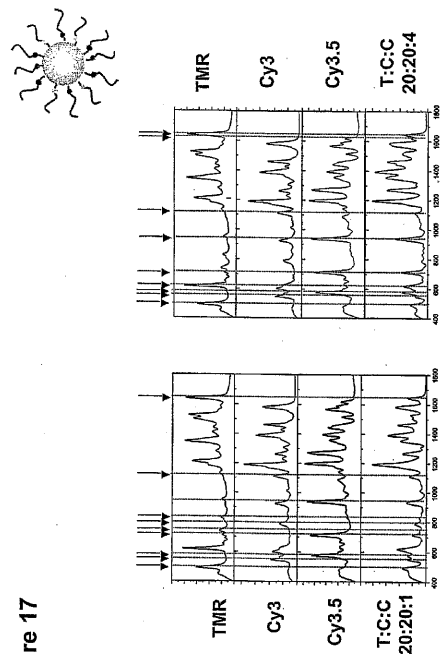
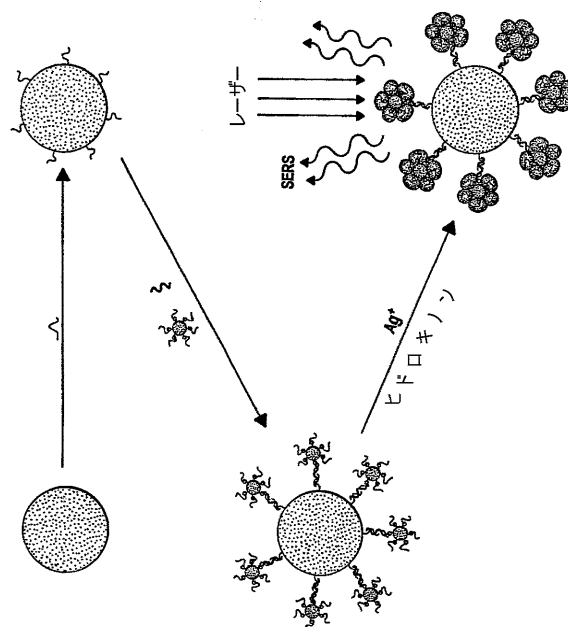
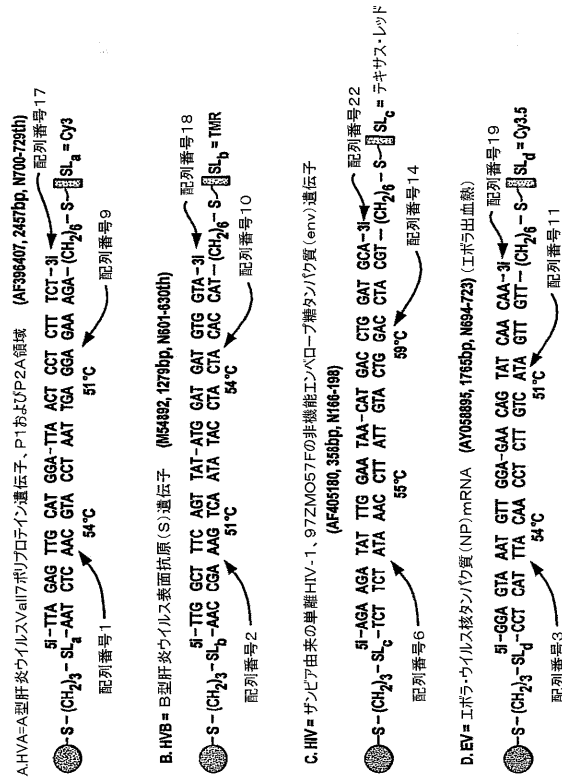


Figure 17

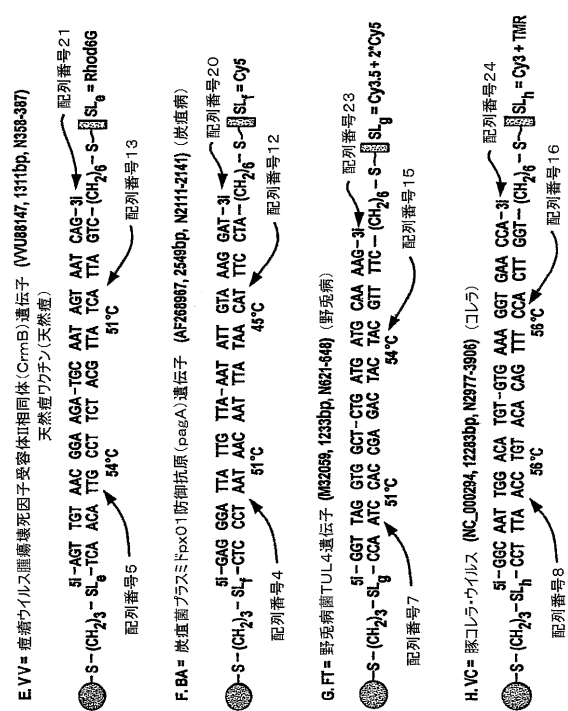
【図 18】



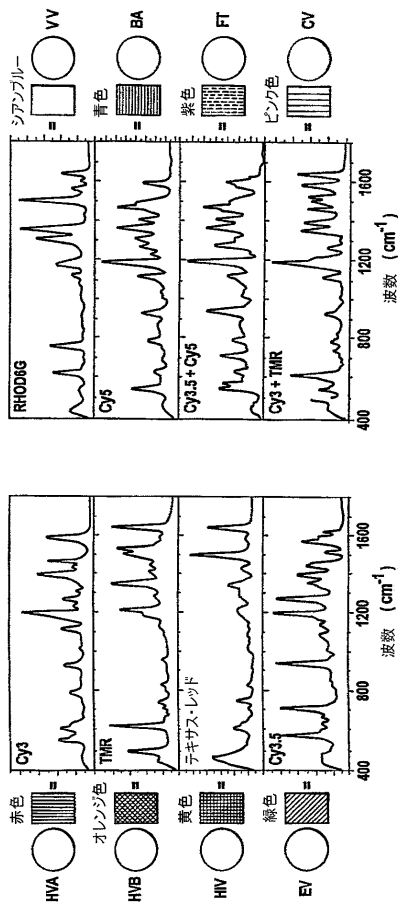
【 図 19 A 】



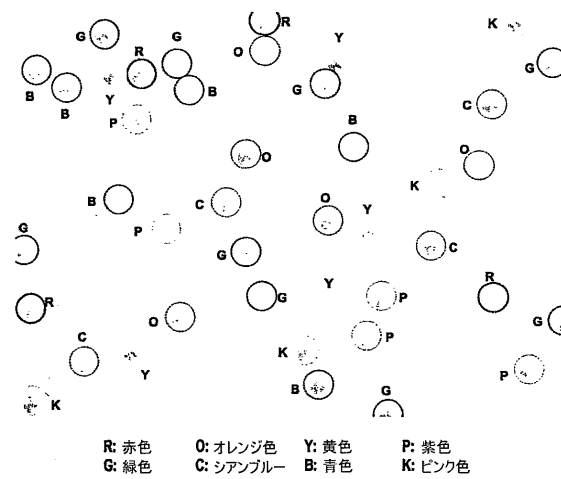
【 図 19 B 】



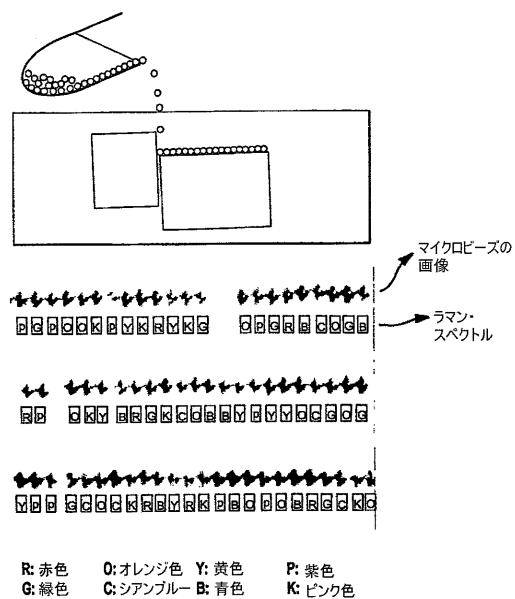
【 図 20 】



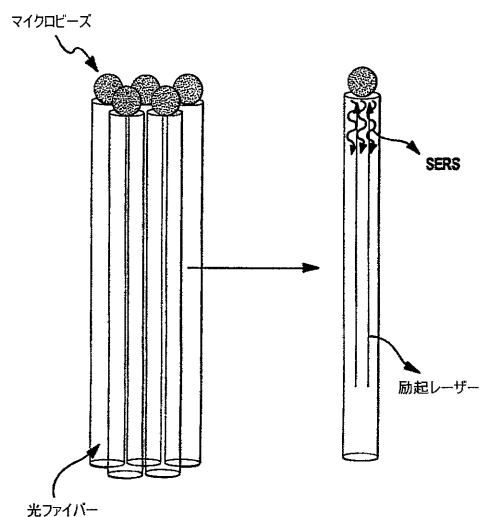
【 図 21 】



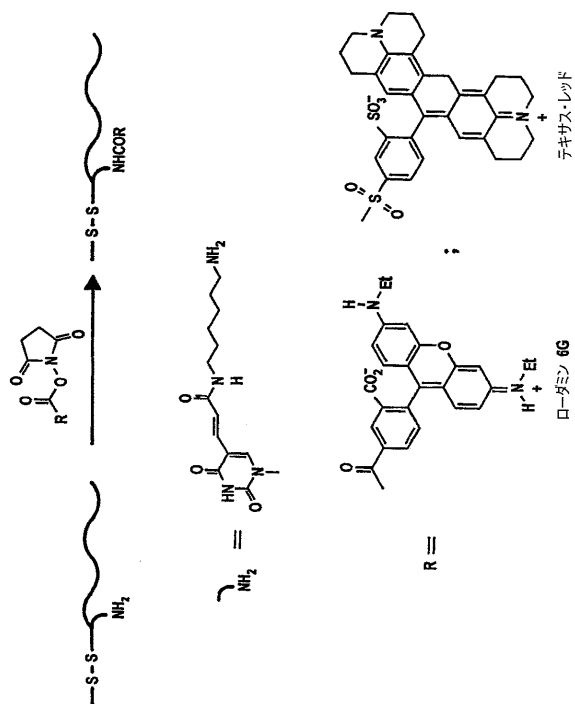
【図 2 2】



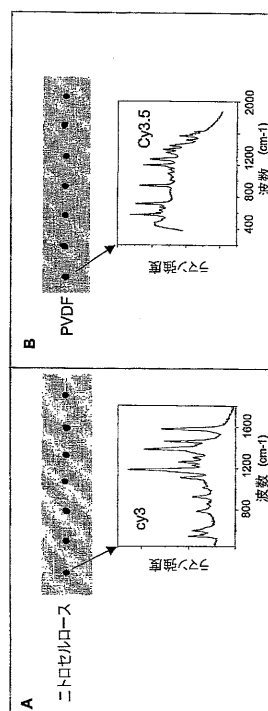
【図 2 3】



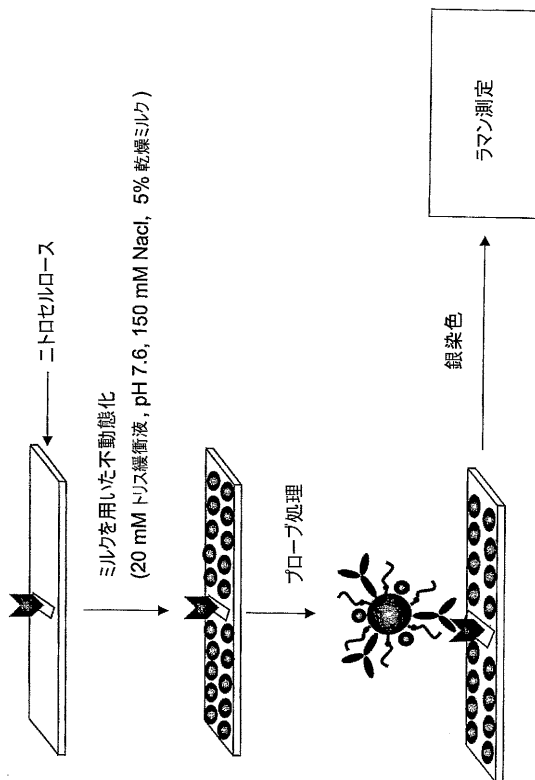
【図 2 4】



【図 2 5】



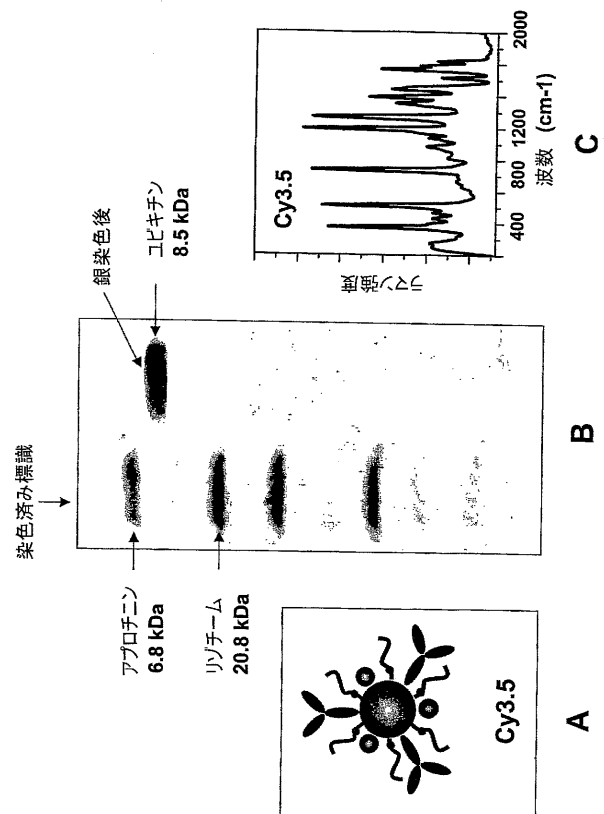
【図 26】



【配列表】

2005524849000001.app

【図 27】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/14100
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/53, 33/553; C12Q 1/68 US CL : 436/6, 7.1, 164, 525; 435/538 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. : 436/6, 7.1, 164, 525; 435/538 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) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KNEIPP et al. Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy. Chem. Rev. 1999, Vol. 99, pages 2957-2975, entire document.	1-56 and 58-88
X,P	CAO et al. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. Science. 30 August 2002, Vol. 297, pages 1536-1540, see entire document.	1-56 and 58-88
Y	GEARHEART et al. Oligonucleotide adsorption to gold nanoparticles: A surface-enhanced Raman spectroscopy study of intrinsically bent DNA. J. Phys. Chem. B. 2001, Vol. 105, pages 12609-12615, see entire document.	1-56 and 58-88
Y	GRAHAM et al. Surface-enhanced resonance Raman scattering as a novel method of DNA discrimination. Agnew. Chem. Int. Ed. 2000, Vol. 39, No. 6, pages 1061-1063, see entire document.	1-56 and 58-88
Y	MIHAELS et al. Surface enhanced Raman spectroscopy of individual rhodamine 6G molecules on large Ag nanocrystals. J. Am. Chem. Soc. 1999, Vol. 121, pages 9932-9939, see entire document.	1-56 and 58-88
Y	HAN et al. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. Nature Biotech. July 2001, Vol. 19, pages 631-635, see entire document.	1-56 and 58-88
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"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 28 April 2004 (28.04.2004)		Date of mailing of the international search report 28 MAY 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Monika Steinberg Telephone No. 703-308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/14100

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JIN et al. Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. Science. 30 November 2001, Vol. 294, pages 1901-1903, see entire document.	1-56 and 58-88
Y	LI et al. Multiple-thiol-anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates. Nucleic. Acids Res. 30 April 2002, Vol. 30, No. 7, pages 1553-1562, see entire document.	1-56 and 58-88
Y	PARK et al. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. Science. 22 February 2002, Vol. 295, pages 1503-1506, see entire document.	1-56 and 58-88
Y	TATON et al. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. Science. 08 September 2000, Vol. 289, pages 1757-1760, see entire document.	1-56 and 58-88
Y	US 5,266,498 A (TARCHA et al.) 30 November 1993 (30.11.1993), see entire document.	1-56 and 58-88
Y	US 5,376,556 A (TARCHA et al.) 27 December 1994 (27.12.1994), see entire document.	1-56 and 58-88

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/14100

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. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claim Nos.: 57
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:
Due to a typographical error Claim 57 is dependent upon an unknown claim "x".
3. ☐ Claim 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/14100

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

DIALOG (Biotech), Electronic Journals, WEST

search terms: raman, sers, particle, nanoparticle(sphere), microparticle(sphere), quantum-dots, detection, nucleic, dna, analyte, screen, ligand, biomolecules, macromolecules, probes, hybridize, array, authors

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/65	G 0 1 N 21/65	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	U
G 0 1 N 33/553	G 0 1 N 33/553	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 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,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,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,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 カオ、ユン - ウェイ
アメリカ合衆国 6 0 2 0 2 イリノイ州 エバンストン オーク アベニュー 1 2 2 8 アパ
ートメント 5

(72)発明者 ジン、ロンチャオ
アメリカ合衆国 6 0 2 0 1 イリノイ州 エバンストン メープル アベニュー 2 2 0 3 ア
パートメント エフ 3

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 DA01 EA03 GA07 GB21
4B024 AA11 AA19 AA20 CA01 CA11 HA12
4B029 AA07 AA21 AA23 BB01 BB15 BB20 CC03 CC08 CC13 FA09
FA15
4B063 QA01 QA18 QQ05 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR56 QR74
QR83 QR84 QS03 QS32 QS36 QS39 QX01

专利名称(译)	纳米粒子探针用于拉曼光谱分析指纹图谱的分析物检测		
公开(公告)号	JP2005524849A	公开(公告)日	2005-08-18
申请号	JP2004503919	申请日	2003-05-07
申请(专利权)人(译)	西北大学		
[标]发明人	マーキンチャド カオユンウェイ ジンロンチャオ		
发明人	マーキン、チャド カオ、ユン-ウェイ ジン、ロンチャオ		
IPC分类号	G01N21/65 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/587 C12Q1/6816 G01N33/54373 G01N33/583 Y02A50/54		
FI分类号	G01N33/543.541.Z G01N33/543.595 C12M1/00.A C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N21/65 G01N33/53.U G01N33/553 G01N33/566 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/DA01 2G043/EA03 2G043/GA07 2G043/GB21 4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB01 4B029/BB15 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/CC13 4B029/FA09 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR56 4B063/QR74 4B063/QR83 4B063/QR84 4B063/QS03 4B063/QS32 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	昂达诚		
优先权	60/378538 2002-05-07 US 60/383630 2002-05-28 US 10/172428 2002-06-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明包括含有颗粒的拉曼染料，其中至少一个和所述特异性结合成员结合，以及使用该试剂的试剂。本发明还包括特异性结合成员和两个或更多个不同的拉曼染料的试剂，以及使用该试剂。特异性结合成员结合，描述了一种新类型的颗粒探针。这些试剂在小说检测策略中使用的，这种策略，目标和染料标记通过它下面的芯片中的微阵列系统捕获可以用作表面增强拉曼散射作用的颗粒（SERS）启动子银为了产生涂层，基于金纳米颗粒的催化性质。灰度检测的这种策略，扫描仪的灵敏度增加不仅提高了选择性，设计基于在检测使用拉曼标签作为指纹谱分析的概念的大量探针的由于能够在装置，用于获取一个复用能力和有限的能力的结果。使用这些光谱指纹在一个解决方案中区分寡核苷酸或其他目标。使用这种方法，有可能识别使用六个拉曼标记纳米粒子探针6个异种DNA靶，也与单核苷酸多态性可区分的两个RNA靶（SNP）。

【 图 1 】

