

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 528295

(P2003 - 528295A)

(43)公表日 平成15年9月24日(2003.9.24)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 G 0 4 2
31/22	121	31/22	P 4 B 0 2 4
33/577		33/577	A
37/00	102	37/00	102
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	F

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 87数)

(21)出願番号 特願2001 - 538558(P2001 - 538558)

(86)(22)出願日 平成12年11月14日(2000.11.14)

(85)翻訳文提出日 平成14年5月15日(2002.5.15)

(86)国際出願番号 PCT/US00/31277

(87)国際公開番号 W001/036681

(87)国際公開日 平成13年5月25日(2001.5.25)

(31)優先権主張番号 09/440,419

(32)優先日 平成11年11月15日(1999.11.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/707,178

(32)優先日 平成12年11月6日(2000.11.6)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ダイジーン・コーポレーション  
アメリカ合衆国メリーランド州20878,ゲイ  
ザーズバーグ,クローパー・ロード 1201

(72)発明者 ラザー, ジェイムズ・ジー  
アメリカ合衆国メリーランド州20817,ベセ  
スダ,ベルハイヴェン・ロード 9914

(72)発明者 ザケル, ジョアン・エム  
アメリカ合衆国メリーランド州21042,エリ  
コット・シティ,ハント・リッジ・ロード  
13317

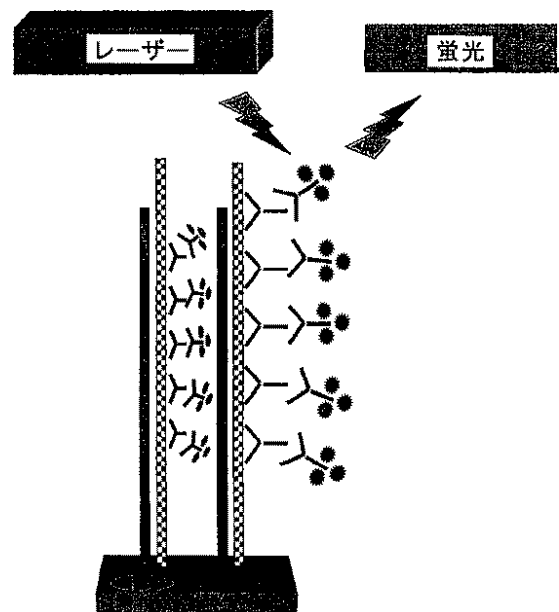
(74)代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マイクロアレイ上のRNA : DNAハイブリッドの免疫検出

(57)【要約】

本発明は、生物学上の分子の検出及び測定のためのハイブリダイゼーション方法及びキットを提供する。



**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** 工程：

a) サンプルの第1の生物分子を第2の固定化された生物分子にハイブリダイズさせることにより二本鎖ハイブリッドを形成し；そして

b) RNA：DNAハイブリッドの成分に特異的に結合する検出可能な存在物を使用してRNA：DNAハイブリッドを検出すること

からなる、RNA：DNAハイブリッドを検出するためのマイクロアレイ法。

**【請求項2】** 実在物がRNA：DNAハイブリッド特異的抗体である、請求項1記載の方法。

**【請求項3】** 実在物がRNA：DNAハイブリッド特異的抗体の断片である、請求項1記載の方法。

**【請求項4】** 抗体がモノクローナルである、請求項2及び3記載の方法。

**【請求項5】** 抗体がポリクローナルである、請求項2及び3記載の方法。

**【請求項6】** 第1の生物分子が固定化された第2の生物分子に結合する検出可能に標識された二本鎖ハイブリッドである、請求項1記載方法。

**【請求項7】** 固定化された第2の生物分子がタンパク質である、請求項6記載の方法。

**【請求項8】** 固定化された第2の生物分子が固相に結合した複数の生物分子を含む、請求項1記載の方法。

**【請求項9】** 工程：

a) サンプルの第1の生物分子を第2の固定化された生物分子にハイブリダイズさせることにより二本鎖ハイブリッドを形成し；そして

b) サンプルの生物分子の量を測定し；そして

c) RNA：DNAハイブリッドの成分に特異的に結合する検出可能な存在物を使用してRNA：DNAハイブリッドを検出すること

からなる、RNA：DNAハイブリッドを検出するためのマイクロアレイ法。

**【請求項10】** 実在物がRNA：DNAハイブリッド特異的抗体である、請求項9記載の方法。

**【請求項11】** 実在物がRNA：DNAハイブリッド特異的抗体の断片であ

る、請求項9記載の方法。

【請求項12】 抗体がモノクローナルである、請求項10及び11記載の方法。

【請求項13】 抗体がポリクローナルである、請求項10及び11記載の方法。

【請求項14】 第1の生物分子が固定化された第2の生物分子に結合する検出可能に標識された二本鎖ハイブリッドである、請求項9記載方法。

【請求項15】 固定化された第2の生物分子がタンパク質である、請求項14記載の方法。

【請求項16】 固定化された第2の生物分子が固相に結合した複数の生物分子を含む、請求項9記載の方法。

【請求項17】 工程：

a) サンプルの第1の生物分子を第2の固定化された生物分子にハイブリダイズさせることにより二本鎖ハイブリッドを形成し；そして

b) 逆転写を促進させる条件下で酵素を用いて生物分子の配列を伸長合成し；

c) RNA：DNAハイブリッドの成分に特異的に結合する検出可能な存在物を使用してRNA：DNAハイブリッドを検出すること

からなる、RNA：DNAハイブリッドを検出するためのマイクロアレイ法。

【請求項18】 実在物がRNA：DNAハイブリッド特異的抗体である、請求項17記載の方法。

【請求項19】 実在物がRNA：DNAハイブリッド特異的抗体の断片である、請求項17記載の方法。

【請求項20】 抗体がモノクローナルである、請求項18及び19記載の方法。

【請求項21】 抗体がポリクローナルである、請求項18及び19記載の方法。

【請求項22】 固定化された生物分子が公知の発現配列タグ（EST）である、請求項17記載方法。

【請求項23】 固定化された生物分子が少なくとも5 - 又は6 - 塩基の全て

の可能な核酸配列のユニバーサルアレイである、請求項17記載の方法。

【請求項24】 酵素がRNAse H機能を欠く好熱性逆転写酵素である、請求項17記載の方法。

【請求項25】 固定化された生物分子が固相に結合した複数の生物分子を含む、請求項17記載の方法。

【請求項26】 工程：

a) サンプルの第1の生物分子を、相補な第2の固定化された生物分子にハイブリダイズさせ；そして

b) 第2の生物分子を固定化された第3の生物分子にハイブリダイズさせるが、但し二本鎖ハイブリッドが工程a)及びb)の分子を含み；そして

c) RNA：DNAハイブリッドの成分に特異的に結合する検出可能な存在物を使用してRNA：DNAハイブリッドを検出することからなる、RNA：DNAハイブリッドを検出するためのマイクロアレイ法。

【請求項27】 実在物がRNA：DNAハイブリッド特異的抗体である、請求項26記載の方法。

【請求項28】 実在物がRNA：DNAハイブリッド特異的抗体の断片である、請求項26記載の方法。

【請求項29】 抗体がモノクローナルである、請求項27及び28記載の方法。

【請求項30】 抗体がポリクローナルである、請求項27及び28記載の方法。

【請求項31】 工程a)及びb)が同時に起こる、請求項26記載の方法。

【請求項32】 工程a)及びb)が逐次的に起こる、請求項26記載の方法。

。

【請求項33】 固定化された生物分子が固相に結合した複数の生物分子を含む、請求項26記載の方法。

【請求項34】 第2生物分子が：

a) 第1生物分子に相補な領域；及び

b) 固定化された第3の生物分子ユニバーサル捕捉用配列に相補な領域に相補

な捕捉用配列

を含む、請求項26記載の方法。

【請求項35】 固定化された第3の生物分子が：

a) 検出可能なように標識された第2の生物分子の共通領域に相補な領域；及び

b) 第1生物分子の可変領域に相補な可変領域

を含む、請求項26記載の方法。

【請求項36】 第2生物分子が第3相補生物分子の共通領域に結合する標識核酸n-マーである、請求項26記載の方法。

【請求項37】 標識が検出可能な発色蛍光標識であり、そして分析が2色検出法を利用する、請求項35及び36記載の方法。

【請求項38】 第1生物分子が核酸であり、第2生物分子が第1生物分子に相補な核酸であり、そして固定化された第3の生物分子がタンパク質である、請求項26記載の方法。

【請求項39】 第1生物分子が核酸に予め結合したペプチドであり、固定化第3生物分子であるタンパク質に結合し、但し第1生物分子に予め結合した上記核酸が第2生物分子の核酸に相補である、請求項26記載の方法。

【請求項40】 第1生物分子が核酸に予め結合したタンパク質であり、固定化第3生物分子であるタンパク質に結合し、但し第1生物分子に予め結合した上記核酸が第2生物分子の核酸に相補である、請求項26記載の方法。

【請求項41】 工程：

a) 第1の生物分子を、標識した第2の生物分子にハイブリダイズさせることにより二本鎖ハイブリッドを形成させ；そして

b) 上記標識二本鎖ハイブリッドを固定化された第3の生物分子に結合させ；そして

c) RNA：DNAハイブリッドの成分に特異的に結合する検出可能な存在物を使用してRNA：DNAハイブリッドを検出することからなる、RNA：DNAハイブリッドを検出するための方法。

【請求項42】

- a) 生物サンプルの安定化のためのサンプル輸送培地；
  - b) 固相に結合した生物分子；
  - c) 二本鎖ハイブリッド複合体の形成のための相補生物分子；
  - d) 核酸配列を伸長合成する酵素；
  - e) ハイブリダイゼーションを可能にするハイブリダイゼーションバッファー；
  - f) あらゆる非ハイブリダイズ核酸配列を除去する洗浄バッファー；及び
  - g) RNA：DNAハイブリッドの成分に特異的に結合する検出可能な存在物を使用してRNA：DNAハイブリッドを検出する手段
- の全て又は一部を含む、RNA：DNAハイブリッド検出キット。

【請求項43】 実在物がRNA：DNAハイブリッド特異的抗体である、請求項42記載のキット。

【請求項44】 実在物がRNA：DNAハイブリッド特異的抗体の断片である、請求項42記載のキット。

【請求項45】 抗体がモノクローナルである、請求項43及び44記載のキット。

【請求項46】 抗体がポリクローナルである、請求項43及び44記載のキット。

【請求項47】 固定化された生物分子が固相に結合した複数の生物分子を含む、請求項42記載のキット。

【請求項48】 酵素がRNase H機能を欠く好熱性逆転写酵素である、請求項42記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 技術分野

本発明はDNA、RNA、タンパク質などを含む生物学的分子検出の一般的分野、特に、ハイブリダイゼーションアッセイを使用する、固相上のRNA:DNAハイブリッド検出の分野である。

## 【0002】

## 背景技術

疾患状態に関係するものを含む多くの遺伝子、および微生物およびウイルスのRNAまたはDNAが単離され、および配列決定されている。そのような配列に基づいた核酸プローブが、多数の遺伝子および感染を同定するために現在利用可能である。核酸プローブとは、試験試料中の相補的RNAまたはDNAへハイブリダイズする検出可能な核酸配列である。プローブの検出は、試験試料中の特定の核酸配列（それに対してプローブが特異的である）の存在を示している。科学的研究を助けるのに加え、核酸プローブはウイルスおよび細菌、酵母および原虫のような微生物、ならびに患者試料中の特定の障害に関連する遺伝子突然変異を検出するために使用される。

## 【0003】

Grunstein, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3961 (1975) および Southern, J. Mol. Biol. 98:503 (1975) は放射性標識核酸プローブを使用するハイブリダイゼーション技術について記載している。核酸ハイブリダイゼーションプローブは他の検出法よりも高い感受性および特異性、および生きている生物体を必要としないことの利点を持っている。核酸ハイブリダイゼーションプローブはしばしば、容易に検出されるであろう放射性物質で標識される。

## 【0004】

プローブを標識するために放射性同位元素を利用する現在のハイブリダイゼーション技術は、放射性廃棄物の処理、および身体および作業場の汚染をモニタリングする必要があるため高い費用がかかる。加えて、<sup>32</sup>Pのような短い半減期の

放射性化合物では放射性プローブを頻繁に製造する必要がある。放射性核酸プローブハイブリダイゼーションはそれ故、臨床的診断のような商業的分野では思いとどまられている。

#### 【0005】

直接的放射性標識に付随する問題を避ける試みとして、プローブが間接的に標識された。間接的標識における一つの普通の方法は、化学的または酵素的技術を使用して核酸プローブへビオチン（小さなビタミン）を結合させることである。特異的核酸へのハイブリダイゼーションに続いて、ビオチンがストレプトアビジン（ビオチンを強固に結合し、酵素または蛍光色素で標識されている）との反応により検出される。結合されたビオチン - ストレプトアビジン複合体は発色基質との反応により検出され、および蛍光色素は適切な波長の入射光と反応させた場合に観察されるであろう。しかしながら、ビオチンまたはその他のハプテンによるハイブリダイゼーションプローブの間接標識は、しばしばプローブの“疎水性”を増加させる。プローブは相補的核酸標的以外の物質と非特異的に反応しやすくなり、高いバックグラウンドを導く。ビオチン標識は非特異的結合を増加させ、それは高いバックグラウンドを導き、それにより感度が減少し、偽陽性結果の可能性を増加させる。間接標識はまた標識密度が制限されるため、直接標識よりも感度が悪くなる；塩基の少しの分画のみが標識され、信号発生部位の数が限られる。プローブの標識密度を増加させると、非特異的結合を増加させ、バックグラウンドをより高くし、および最終的にはハプテンの塩基対形成の妨害によりプローブがその標的にハイブリダイズしなくなる。間接的に標識されたプローブはそれ故、その不正確さおよび偽陽性結果のため臨床的診断には適していない。

#### 【0006】

特異的核酸配列へのプローブのハイブリダイゼーションは、Albarell aらによる米国特許第4,563,417号に記載されているようにアクリジンオレンジまたはエチジウムブロミドのような挿入剤で検出されている。挿入剤はプローブおよび試料核酸のハイブリダイズした塩基対間に挿入されるようになり、ヘリックスの三次構造を解いてしまう。挿入剤およびほどかれたヘリックスにより作り出された、新規形成抗原決定基に対する特異的な抗体が通常的手段によ

り検出される。この方法は、挿入剤が特異的配列を認識できないために標的ハイブリッドに対する選択性を欠いている。さらに、抗体は挿入剤/核酸複合体のみを認識し、特異的配列を検出しない。従って、非特異的信号を防止するために追加の選択または精製工程が必要とされ、この時間を消費し、および労力がかかる方法を臨床診断には適さないものになっている。

#### 【0007】

特異的核酸配列へのプローブのハイブリダイゼーションはまた、Carriocoによる米国特許第4,743,535号に記載されているような標識されたプローブへ特異的である抗体の助けによっても検出できるであろう。プローブはフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)または蛍光剤のような検出可能な物質で標識される。特異的核酸配列へハイブリダイズした後、標識されたプローブに対して特異的な抗体が生化学的反応により検出される。この検出方法もまた非特異的結合および偽陽性結果の可能性を持ち、臨床スクリーニングにはあまり適していない。

#### 【0008】

標的増幅による核酸アッセイの感度を増加させる試みがなされてきた。核酸配列を増幅する方法は商業的に入手可能である。これらの方法にはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、連結増幅反応(LCR)および転写に基づいた増幅反応(TMA)が含まれる。PCR技術はMichael A. Innis, David H. Gelfand, John J. SninskyおよびThomas J. WhiteによるPCR Protocols A Guide to Methods and Application, pp. 39-45および337-385 (Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, 1990)に記載されている。PCR技術はまたMarx J. L.による、Science 140: 1408-1410 (1988)およびMullisによる米国特許第4,683,195および4,683,202、にも記載されている。連結増幅反応はWu, D. Y. and Wallace, R. B., Genomics 4: 560-569 (1989)およびBarringer, K. J., et al., G

ene 89:117-122 (1990)、に記載されている。転写に基づいた増幅反応はKwoh, D. Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177 (1989)、に記載されている。これらの方法は高感度の利点を持っているが、試料調製は長々しく、あきあきし、および費用がかかり、反応生成物夾雑物から生じる偽陽性を示しがちであり、および標的核酸の最初の量を正確に定量することができないという欠点を持っている。増幅反応生成物は最も多くの場合、ハイブリダイゼーションアッセイにより検出される。

#### 【0009】

試料中の核酸分子(RNAかまたはDNA)検出のためのアッセイで達成される感度の度合いは、DNAよりもRNAの方が一般的に低く、なぜなら、RNAは試料中の内因性RNAaseによる分解を受けやすく、検出に利用できるRNAがより少なくなるためである。加えて、試料中の夾雑物により生じるバックグラウンド妨害を、RNAのような標的核酸のさらなる分解を起こすことなく除くことは困難である。

#### 【0010】

核酸分子(即ち、RNA)検出のためのハイブリダイゼーションアッセイが開発されてきた。例えば、RNAのためのハイブリダイゼーション保護アッセイがGen-Probe Inc. (San Diego, CA)から市販品として入手可能である。ハイブリダイゼーション保護アッセイは、Engleberg, N. C., ASM News 57:183-186 (1991), Amold et al. Clin. Chem. 35:1588-1594 (1989) および米国特許第4,851,330、に記載されているように、アクリジニウム エステルへ連結された一本鎖核酸プローブを用いる。標的RNA分子へのプローブのハイブリダイゼーションは、熱加水分解からアクリジニウム エステル結合を保護し、そのため検出された化学発光信号は試料中の標的RNA量に比例する。この保護アッセイの感度はハイブリダイズされていないプローブにより起こされるバックグラウンド発光により制限される。

#### 【0011】

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体および他の類似の实在物が検出目的のため一般に使用される。特に、ポリクローナル抗体は多数のエピトープを認識し、一方、モノクローナル抗体は一つの特異的エピトープのみを認識する。RNA : DNAハイブリッドを検出するモノクローナル抗体は現在入手可能である。RNA : DNAハイブリッドを検出するポリクローナル抗体は製造されているが、しかしながら一般的に、それらは特異的エピトープに結合するように設計されているモノクローナル抗体ほど特異的ではない。

#### 【0012】

RNA : DNAハイブリッドに対するモノクローナル抗体は現在入手可能である。Stuartによる米国特許第4,732,847号およびStuartらによるProc. Natl. Acad. Sci. USA 78:375 1 (1981)の報文は、ポリ(A) - ポリ(dT)二重鎖に対して特異的なモノクローナル抗体を含んでいる固体表面上での特異的核酸配列のハイブリダイゼーション検出法を記載している。Stuartによれば、問題とする配列と相補的なDNAまたはRNAのアニーリングはRNA : DNAハイブリッドを形成する。Stuartは特に、ポリクローナル抗体では、一本または二本鎖核酸への有意な結合を排除することができないので、ポリクローナル抗体の使用に反対している。さらに、本明細書に記載した本発明とは異なり、Stuartはガラスまたはシリコンチップ上の非常に短いオリゴマーアレイのためのポリクローナル抗体の利点を企図していない。加えて、Stuartはガラススライドまたはシリコンチップ上のマイクロアレイ、特に高密度アレイを企図していない。Stuartは固相表面へ核酸プローブを結合させることを開示していない。その代わりに、Stuartは試料ポリヌクレオチドを表面に固定し、一方、プローブ(例えば、前もって決定されたヌクレオチド配列)は液相に存在している。前記のことを考えると、本発明は本分野に著しい利益および利点を提供する。

#### 【0013】

Boguslawski et al., J. Immunol. Methods 89:123-130 (1986)、は非特異的結合を減少させ、複雑な洗浄法を避ける試みにおいて、フィルター上の単離された抗 - ハイブリッド被覆ポ

リスチレンビーズを使用するハイブリダイゼーションアッセイを開発した。ハイブリドーマHB8730により分泌されるRNA：DNAハイブリッドに特異的なモノクローナル抗体がCarriicoらにより米国特許第4,833,084号に開示されている。Carriicoの特許において、プローブポリヌクレオチドおよび問題とする配列の特異的再アニーリングにより形成されたRNA：DNAハイブリッドは、モノクローナル抗体への結合により感度よくおよび特異的に検出できる。

#### 【0014】

マイクロアレイとは固相基板へ配列または固定化された、RNA、DNA、タンパク質などを含む別個の生物学的分子の規則的な配置を意味している。オリゴヌクレオチドおよびプローブのような結合剤のこれらのマイクロアレイは、バイオテクノロジー工業および関連分野において、ますます重要な道具となってきている。多数の結合剤から成っているマイクロアレイは、規則的な様式またはパターンで固体支持体の表面上へ固定化されており、薬剤スクリーニング、核酸スクリーニング、突然変異分析などを含む種々の応用での使用が見つけられている。マイクロアレイに関連してここで使用されるような要素には、基板の表面上に他とは別なおよび同定可能な様式で配置された、ハイブリダイズ可能な核酸配列、オリゴヌクレオチド、プライマー、プローブおよび/またはアミノ酸が当てはまる。マイクロアレイの使用を通じた生物学的分子の検出は、多数の試料および生物学的分子を分析し、分析に必要とされる試料量を減少させ、実験変化性を減少させ、試料調製時間を減少させ、結果を確認し、およびそのような分析の費用を減少させるために利益がある。

#### 【0015】

現在、マイクロアレイの主たる使用は生物学的試料中の遺伝子発現を測定することである。遺伝子発現測定はmRNAの存在または不在の検出、またはmRNA濃度の増加または減少の測定を含んでいる。しかしながら、通常の方法でハイブリダイゼーションを検出するため、および遺伝子発現を測定するためには、試料は最初に精製および標識されていなければならない。試料を精製および標識するための普通の技術は：1) RNA増幅、標識およびハイブリダイゼーション、

および2) cDNA標識およびハイブリダイゼーションである。第一の技術の増幅部分はVan Gelderらにより、1998および1999年に公開された、各々米国特許第5,716,785および5,891,636号に記載されている。高度に精製された全RNAまたはmRNAが使用され、それは費用のかかる、およびあきあきするほど時間を消費する方法である。オリゴ-dTプライマーはまた、ポリ-A尾部付きmRNAをアンチセンス一本鎖cDNAへ逆転写するためにも使用される。オリゴ-dTはさらに、dT配列の5'開始末端にT7 RNAポリメラーゼのための配列を含んでいる。逆転写後、RNAase H、DNAリガーゼおよびDNAポリメラーゼの組み合わせが、二本鎖cDNAを発生させるために使用される。本来のRTプライマーはT7 RNAポリメラーゼプロモーターを含んでいたため、二本鎖cDNAは完全T7 RNAプロモーターを含んでいる。二本鎖cDNAは次にT7 RNAポリメラーゼの鋳型として使用される。RNAの約100-1000の追加コピーがcDNAの各々のコピーから発生される。転写過程の間、標識ヌクレオチドが転写されたRNA内へ取り込まれる。標識RNAは次にDNAマイクロアレイへハイブリダイズされ、標識RNA:DNAハイブリッドを形成する。蛍光標識は直接的に検出され、一方、間接的標識は第二の結合剤との反応後に検出されるであろう。

#### 【0016】

第二の試料調製技術は標識cDNAを製造しおよび測定する。この技術において、全RNAおよびmRNAは生物学的試料から精製される。オリゴ-dTプライマーはポリ-A尾部付きmRNAをアンチセンス一本鎖cDNAへ逆転写するために使用される。逆転写過程の間、標識ヌクレオチドが発生しようとしているDNA鎖内へ取り込まれる。合成後、RNA鎖は破壊される。標識cDNA鎖は次にマイクロアレイへハイブリダイズされる。もし、ヌクレオチドが蛍光で標識されていたら、ハイブリッドは蛍光アレイスキャナーで直接可視化される。もしヌクレオチドがビオチンで標識されていたら、マイクロアレイは最初に標識ストレプトアビジンと反応させ、続いてスキャンされる。

#### 【0017】

これら両方の技術の欠点は数倍にもものぼる。第一に、両方とも大量の高度に精

製された核酸（即ち、RNAまたはDNA）を必要とする。精製は時間を消費し、および労力がかかる追加工程を必要とする。加えて、これらの技術は不正確である。逆転写は核酸配列に依存して異なった効率および動力学的速度で起こり、人為的に特定の核酸配列の濃度を变化させる。原核生物mRNAおよびいくつかの真核生物mRNAは3'開始末端にポリA配列または尾部を含んでいないか、またはポリA尾部が精製の間分解され、従って、逆転写工程を開始させるための配列が存在しないので、現在の技術では標識または検出できない。現在の技術はそれ故、検出に使用できる試料型に限定されている。また、これらの方法論は標識ヌクレオチドを含んでいる。非標識核酸内への標識核酸の取り込みは天然のヌクレオチドよりも低い効率および遅い速度で起こる。もう一度、標識は配列に依存して異なった効率で取り込まれるであろう。従って、標識密度は異なった配列間で相違し、これらの核酸の測定量を人為的に变化させる。それ故、定量は相対的であるのみである。標識核酸はまた、天然の核酸とは異なったハイブリダイゼーション動力学を示し、通常それらの特異性を低くする。加えて、本方法は同レベルの特異性を達成するために非修飾ヌクレオチドよりも高いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件を必要とするであろう。しかしながら、受容可能な特異性を達成するためのより高いストリンジェンシー条件の使用は、検出の感度を低下させるであろう。従って、正確で、時間および費用の両方が効率的であり、およびより高い感度および最少の非特異的結合で、一つまたはそれ以上の試料生物学的分子をスクリーニングできる、生物学的分子（DNA、RNA、タンパク質など）の検出および定量的分析のためのアッセイが必要とされている。

#### 【0018】

それ故、生物学的分子をスクリーニングするために使用が容易で、高度に特異的で、正確で、および感度が良好な、一つまたはそれ以上の生物学的分子（RNA、DNAまたはタンパク質が含まれるが、それらに限定されるわけではない）を検出および測定する方法を持つことは有用であろう。

#### 【0019】

従って、生物学的分子（RNA、DNAまたはタンパク質が含まれるが、それらに限定されるわけではない）の不在または存在を検出、および定量するアッセ

イを提供するのが本発明の目的である。

【0020】

試料中の第一の特異的標的生物学的分子および第二の生物学的プローブを含むRNA：DNAハイブリッドを検出するための方法を提供するのも本発明の目的である。

【0021】

最少偽陽性を持っている、感度が高いおよび定量的なアッセイを提供するのも本発明の目的である。

大量、平行スクリーニングのためのアッセイを提供するのも本発明のさらなる目的である。

【0022】

発明の要約

生体分子を相補的生体分子プローブとハイブリダイズさせることにより二本鎖ハイブリッドを形成し、続いて、検出可能であり、およびRNA：DNAハイブリッドを特異的に認識する抗体または他の実在物での、固相上に形成されたこれらの二本鎖ハイブリッドの免疫学的検出により、RNA、DNA、タンパク質などを含んでいる問題とする生物学的分子を検出および測定するためのアッセイが開示されている。この方法は、種々の試料中に存在する一つまたはそれ以上の特異的生物学的分子の存在を検出するために使用される。

【0023】

本発明は多数の生物学的分子の量を同時にモニタリングする（例えば、検出しおよび量を定量する）方法を提供する。

本発明はRNA：DNAハイブリッドを認識するために特異的である、検出可能に標識された実在物を使用する、RNA：DNAハイブリッドを検出するためのアッセイに関する。好適には、実在物は検出可能に標識されたRNA：DNAハイブリッド - 特異的抗体またはその断片である。RNA：DNAハイブリッドを検出するために使用される抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよいが、好適には、30塩基未満の長さを持っている、短い生物学的分子プローブ検出のためにポリクローナルである。

## 【0024】

本発明はまた、遺伝子発現、多型突然変異検出、またはSNP分析などによる生理学的応答を決定するために本発明のマイクロアレイを使用するアッセイにも関している。本方法は挿入または欠失突然変異を含んだ任意のおよびすべての遺伝子型変異を検出するために使用される。

## 【0025】

さらに、本発明は短い生物学的分子を伸張するために逆転写を利用し、それによりRNA：DNAハイブリッドの検出を促進するアッセイにも関している。好適には、逆転写酵素は熱安定性であり、およびRNAase H機能が欠けている。

## 【0026】

本発明はさらに、生物学的分子を検出および定量するためのキットに関しており、ここでそのキットは本発明によりここに記載されている多数の標的で、試料をスクリーニングするために使用される。

## 発明の詳細な説明

1以上の試料中の1以上の標的生物分子検出及び定量用のアッセイ及びキットが提供される。一般的に、限定はされないが、RNA、DNA、タンパク質などの生物分子からなる試験試料が集められ、固相に結合した、標的生物分子に特異的な核酸プローブに、直接的あるいは間接的にハイブリダイズする。ハイブリダイズしない核酸配列は、好ましくは洗浄により除かれる。次にハイブリダイゼーションは、検出可能な標識で直接的あるいは間接的に標識されたRNA：DNAハイブリッド抗体との反応により検出される、及び/又は結合核酸プローブ配列に相補的な標識された核酸配列により検出される。

## 【0027】

本発明の一つの態様において、好ましくは固相にスポットしたあるいは結合させたオリゴヌクレオチドあるいは他の核酸を用いて、試料の特異的な核酸を相補的な核酸プローブにハイブリダイズし、二本鎖RNA：DNAハイブリッドを形成する。RNA：DNAハイブリッドを特異的に認識するいかなる存在物、好ましくはRNA：DNAハイブリッドに特異的な抗体あるいはその断片も、検出及

び測定に使用されてよい。

【0028】

また、本発明は短い生物分子、好ましくは固相に固定されたプライマーあるいはプローブ、を利用する。好ましくはRNAseH機能を欠く逆転写酵素を用いてプライマーを伸長し、RNA：DNAハイブリッド特異的抗体、RNA：DNAハイブリッド抗体断片、あるいはRNA：DNAハイブリッドに特異的に結合する存在物がより効果的に結合し検出されるようにすることが望ましいだろう。

【0029】

本発明のさらなる態様は3つの生物分子を包含し、その全てが好ましくは核酸である。第一の試料生物分子が、好ましくはプローブである相補的な第二の生物分子にハイブリダイズし、同時にあるいは連続して、第二の核酸が第三の核酸にハイブリダイズし、ここで核酸のうちの一つは固相に固定され、形成されたRNA：DNAハイブリッドは、RNA：DNAハイブリッドに特異的な存在物により検出される。

【0030】

本発明のさらなる態様において、好ましくはタンパク質からなる固定された生物分子が、好ましくは核酸である試料生物分子に結合し、もしもその核酸がRNA：DNAハイブリッドである場合にはRNA：DNAハイブリッドに特異的な存在物により検出されるようにしてもよい。例えばDNAは固定化されたタンパク質のDNA結合部位に結合してもよく、ここでタンパク質-DNA複合体のDNA部分がRNAにハイブリダイズされてもよい。同様の様式で、固定化されたタンパク質はRNAに結合してもよく、ここでタンパク質-RNA複合体のRNA部分はDNAに結合してもよい。生じたRNA：DNAハイブリッドは、RNA：DNAハイブリッド特異的抗体あるいはその断片のようなRNA：DNAハイブリッドに特異的な存在物によって検出されてもよい。

【0031】

本発明はマイクロアレイの使用において当業に対する顕著な効果を提供する。クルード又は精製された試料のいずれもが使用されてよいために、本発明の試料調製法は単純化されており、生物分子のより正確な検出と測定を可能にする。ま

た、生物試料は検出と測定のために直接標識される必要がなく、標識に帰せられる干渉が避けられる。RNA : DNAハイブリッドに結合する存在物を利用することにより非常に高い標識密度が得られるであろうことから、本発明は生物分子を検出及び測定するための非常に感度の高い方法を提供する。このような鋭敏な感度により分析に要する試料の量が減少する。他の方法と異なり、本発明は原核生物mRNAといくつかの真核生物mRNAであってポリA尾部を欠くものあるいは精製後に分解されたものを測定するだろう。

#### 【0032】

本発明の他の効果は、逆転写酵素が必要でないことであるが、感度を上昇するために要望されるならば用いても良い。本発明の最も効果的な側面の一つは、生物分子の直接定量である。比較的のみにRNAを定量する他の慣用的な技法、例えば2色比較法、とは異なり、本発明は結果を解釈するための直接的アプローチと生物分子の単純化された分析を利用する。加えて、本発明はその単純化された試料化方法により複数の生物分子を同時に分析できる。したがって、本発明により、さらに直接的な解釈と結果の単純化が可能となる。

#### 【0033】

本発明では、本明細書中で使用される「プローブ」又は「核酸プローブ」は、第二の核酸へのハイブリダイゼーションが検出されるであろう1以上の核酸あるいは核酸様の断片の集合として定義される。このプローブは以下に記載のように未標識あるいは標識されており、第二の核酸への結合が検出されるだろう。プローブはゲノムの1以上の特定の部分からの核酸源から作製されてよく、これは周知でも未知でもよいが、例えば1以上のクローン、単離された全染色体又は染色体断片、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅産物の集合、あるいは合成核酸又はPNA分子である。またはプローブは無作為の、半無作為の、又は標的とされた配列からなるものであってよい。このプローブはある様式で、例えば繰り返し核酸のブロッキングあるいは除去により、又は特有の核酸の添加により加工されてもよい。したがって、「プローブ」という単語は本明細書中では、検出可能な核酸のみならず、検出可能な核酸であったたとえば核酸のブロッキングなどにより標的に適用される形態をとっているもの、をも指すものとして使用される。こ

のブロッキング核酸も別に言及されるだろう。「プローブ」が何を特定して指しているかは、この単語が用いられる文脈から明確となる。重合の開始点としての使用の文脈では、すなわち転写又は複製のためには、プローブはプライマーとしても機能するだろう。

#### 【0034】

プローブは固体表面上に固定された分離された核酸であってもよい。いくつかの実施例では、プローブは例えばWO96/17958に記載のような核酸のマイクロアレイのメンバーであってもよい。高密度のマイクロアレイを作製できる技術もこの目的のために使用される (Foder et al. Science 767-773 (1991)及び米国特許第5143854号、Pirrung, M.C.参照)。プローブは標的分子に質問するために反応基板上に素子として沈着されてもよく、直接的あるいは間接的に標識されていてよい。

#### 【0035】

開示された本発明のアッセイはあらゆる生物分子あるいは試料中の生物分子の組合せを検出及び定量するのに用いられてよく、ここで相互に交換可能に用いられる「生物学的分子 (biological molecule)」及び「生物分子 (biomolecule)」は、本明細書中で定義されるように、核酸、アミノ酸、類似体、ペプチド、抗体、等を指している。「核酸」はデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド及びそれらの重合体を指し、限定はされないが、合成あるいは細菌、酵母、ウイルス、及び植物や動物のような高等生物の細胞や組織から由来するものを含む、いかなる源からのものでもよく、別途限定しない限りは、天然に存在するヌクレオチドと同様の様式で機能するであろう天然のヌクレオチドの周知の類似体を含包してよい。ペプチド核酸 (PNAs) も核酸という用語の範囲内に含包される。

#### 【0036】

さらに本明細書中で「核酸」は2～約10000塩基長の範囲の一本又は二本鎖核酸として定義される。また本明細書中で用いられる場合、「核酸」はオリゴヌクレオチド、cDNA、mRNA、アンプリコン、プラスミド、等を指す。「オリゴヌクレオチド」は一つの所望の核酸プローブであって、少なくとも6～約

60塩基、好ましくは約15～30塩基、さらに好ましくは約20～25塩基からなり、PCR増幅やハイブリダイゼーションアッセイやマイクロアレイに用いられてよい。本明細書で使用される場合、当業で慣用的に定義されるように、オリゴヌクレオチドは「アンプリマー」及び「オリゴマー」の用語と実質的に同等であり、本明細書中で「プライマー」及び「プローブ」として使用されるだろう。

#### 【0037】

また、他に別途記載しない限り、この用語は天然ヌクレオチドの周知の類似体であって標準（reference）核酸と同様の結合特性を持ち天然に存在するヌクレオチドと同様の様式で代謝されるものを含む核酸を含包する。さらに、特定の核酸配列は保存的に修飾されたその変種（例えば縮重コドン置換）及び相補的な配列並びに明示的に示された配列をも暗黙的に含包する。

#### 【0038】

検出用の核酸配列、本明細書では対象の核酸分子（nucleic acid molecules of interest）あるいは標的核酸分子（target nucleic acid molecules）と称されているもの、は検出の必要性和目的に基づいて選択される。一般的に、対象の核酸分子は検出用核酸配列の選択のための周知の尺度に基づいて選ばれてよい。例えばある特定の核酸分子は病原体、病態あるいは疾病素質に関連しているかもしれず、そのような核酸分子の検出は診断的な価値を持つだろう。例えば、癌細胞又は正常細胞に特異的なmRNAが検出されるだろう。さらに、ここで開示の方法により、限定されないが、タンパク質、ペプチド、プライマー、及びDNA又はRNA分子からなる生物学的分子であって、他の生物学的あるいは化学的方法により生成した（CAR、NASBAなどにより生じた物のような）分子の検出をも可能にする。核酸の検出は突然変異、欠失、一ヌクレオチド多型の挿入、及び他の多型の検出も含む。

#### 【0039】

「試料（sample）」又は「標的試料（target sample）」は本明細書中で交換可能に用いられるが、最も広義に定義されて、核酸、アミノ酸、タンパク質、ペプチドなど（限定はされないが）の生物学的材料と生物学的分子の合成材料の両

方を含み、全ゲノムDNA、全RNA、例えば染色体からのゲノムDNA又はmRNA、あるいは特定のアンプリコン又は欠失内の選択された配列（例えば特定のプロモーター、遺伝子、増幅あるいは制限断片、cDNAなど）からなる試料を指す。本発明の一つの態様は標的核酸試料の存在又は不在のいずれかを検出し、定量されるべき試料の量を測定することである。「標的(target)核酸」なる用語は、プローブが向けられるより大きな核酸の特定の部分配列、あるいは全体の配列（例えば遺伝子又はmRNA）であって検出、定量及び存在又は不在を調べるためにそのレベルが必要とされるもの、を指してよい。その使用の違いは文脈から明らかになるだろう。

#### 【0040】

生物分子試料は特定の細胞又は組織から抽出されてよい。そこから生物分子が調製されるような組織試料は、典型的には、検出される増幅や欠失に関連した疾患に罹っていると疑われる患者から採取される。いくつかのケースでは、生物学的分子、例えば核酸、はPCRのような標準的手法を用いてハイブリダイゼーションの前に増幅されてもよい。「核酸試料」なる用語のこのような特別な使用法はこの用語が用いられる文脈から当業者にとって容易に明らかとなるだろう。例えば、核酸試料は当業者に周知の方法により調製された組織抽出物や細胞溶解物の試料であってよい。試料は、対象の生物学的分子が細胞から放出されてハイブリダイゼーションに利用可能になるように調製される。

#### 【0041】

また、本発明で開示される方法のための試料は、核酸を含む、あるいは含むであろうと思われるいかなる源からのものであってもよい。この核酸の源は精製された形態であっても未精製の形態であってもよい。開示の方法における使用に適した好ましいタイプの試料あるいは試料源は、核酸検出の他の方法における使用に適する試料として既知のあるいは同定されたような試料である。そのような試料は多く知られている。例えば、試料は農業あるいは食料製品からであってよく、又はヒトあるいは獣医の臨床の検体であってよい。試料は血漿、血清、血液、尿、痰、細胞溶解物などのような生物学的液体であってよい。試料は細菌、酵母、ウイルス及び植物や動物のような高等生物の細胞又は組織であって対象の生物

学的分子を持つと思われるものを含むだろう。核酸、例えばRNAの、抽出及び / 又は精製の方法は、Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982)により記載されている。

#### 【0042】

サンプルは粗精製または未精製状態であってもよいため、サンプルの調製または処理が簡略化される。より天然に近い状態にあるサンプルを用いることにより、正確な発現検出と定量が達成される。さらに、サンプルを標識および検出するため、逆転写酵素工程を開始させるためのポリA配列の存在を必要とする他の技術とは異なり、本発明を用いれば、原核生物mRNAおよびポリA尾部を3'末端に有さない真核生物mRNAを測定することができる。

#### 【0043】

開示の方法に使用する標的生物学的分子は、様々な起源のものであってよく、天然および合成のいずれであってもよい。例えば、各種のRNAとしては、メッセンジャーRNA、リボソームRNA、核小体RNA、転移RNA、ウイルスRNAおよびヘテロ核RNA、全ゲノムDNA、cDNA、タンパク質、ペプチド等が挙げられる。さらに、天然物質全体またはその断片を使用してもよい。

#### 【0044】

固相または固相支持体としては、プラスチック、樹脂、多糖類、シリカまたはシリカ系材料、官能化ガラス、変性シリコン、炭素、金属、無機ガラス、膜、ナイロン、絹、羊毛および木綿等の天然繊維、並びにポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。固相または固相支持体は、多孔質または無孔質のいずれであってもよい。一部の実施形態では、固相支持体を構成する材料は、カルボキシ、アミノ、ヒドロキシ等といった反応性基を有し、これらの反応性基をプローブの共有結合または非共有結合に使用する。適切なポリマーとしては、ポリスチレン、ポリエチレングリコールテレフタレート、ポリ酢酸ビニル、ポリ塩化ビニル、ポリビニルピロリドン、ポリアクリロニトリル、ポリメタクリル酸メチル、ポリテトラフルオロエチレン、ブチルゴム、スチレンブタジエンゴム、天然ゴム、ポリエチレン、ポリプロピレン、(ポリ)テトラフルオロエチレン、(ポリ)フッ化

ビニリデン、ポリカーボネートおよびポリメチルペンテンが挙げられるが、これらに限定されない。好適なポリマーとしては、米国特許第5,427,779号(Elsner, H. et al.; 引用により本明細書に含まれるものとする)に概説されているものが挙げられる。固相および固相支持体としては、プローブ、プライマー、オリゴヌクレオチド、タンパク質、ペプチド等を結合または付着させ得る任意の固体材料が挙げられるが、これらに限定されない。固相および固相支持体は任意の有用な形状をとることができ、例えば、薄膜または膜、ビーズ、ボトル、マイクロウェルプレート、シャーレ、スライドガラス、繊維、織布、成形ポリマー、粒子、チップおよびマイクロ粒子が挙げられる。固相にとって好適な基板形状はマイクロタイターシャーレ、シリコンチップ、スライドガラス、およびタグ付きビーズである。

#### 【0045】

分子を固相基板表面へ共有結合させる通常の適用に際しては、結合成分の性質および固相基板表面の性質に応じて、多様な反応用官能基を用いて表面を活性化してもよい。従って、必要であれば官能基を導入して固相基板表面を改質し、次いで該官能基を結合成分と反応させてもよい。

#### 【0046】

「マイクロアレイ」は、cDNA、アンプリコン、プラスミド、タンパク質、ペプチド等といった複数の異なる生物学的分子を含んでなるものであり、複数とは少なくとも2種類の異なる生物学的分子を意味し、生物学的分子はマトリックス状または構造状に並んで固相に固定化されている。理論上は、成分は1種類だけでよいものの、好適な実施形態では、少なくとも10、より一般的には少なくとも20、多くの場合少なくとも50、望ましくは100以上、さらには1,000以上であるが、一般には約 $10^4$ 以下、より一般的には約100,000以下の成分が存在し、約10~10,000成分が固相または固相支持体に固定化されているのが好ましい。指定の限られた部位に少量を特異的に有することができるため、理論上は異なる成分の数が $10^5$ を超えることができるものの、大体のところ100,000を超える必要はなく、このような多数の異なる成分はマイクロアレイの調製を複雑にするだけである。固相に固定化される成分の数は通常 $10^5$ を超えないため、結合成分の性質、シグナル

の発生源、検出されるシグナルの性質、シグナルの検出感度、マイクロアレイの性質(マイクロアレイのサイズ等)、マイクロアレイの製造方法などに応じて、アドレス可能な各部位の数が実質的に増える可能性がある。従って、マイクロアレイは「大規模平行スクリーニング」に用いるのが好ましく、本明細書中では、少なくとも10、好ましくは約1,000、より好ましくは約10,000の異なる生物学的分子のハイブリダイゼーションを同時にスクリーニングするものとして記載する。

#### 【0047】

マイクロアレイの好適な一形態には、本明細書に記載するように、1~10、10~100、最も好ましくは100を超える異なる核酸(好ましくはオリゴヌクレオチド、プライマー等)を、小さなドットもしくはエレメントのアレイとして堆積、スポットまたは合成したスポット状アレイが含まれる。固相上に堆積、スポットまたは合成されたこれらの核酸を、本発明では「エレメント」と呼ぶ。典型的には、エレメントは直径約1mm未満である。通常、エレメントのサイズは1 $\mu$ m~約5mm、好ましくは約1 $\mu$ m~約1mmである。開示の方法に使用する核酸プライマーは、既成のオリゴヌクレオチド合成法を用いて合成することができる。このような方法は、標準的な酵素消化とそれに続くヌクレオチド断片の単離(例えば、Sambrook et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 第2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)第5、6章)を参照されたい)から、MilligenまたはBeckman System 1 Plus DNA 合成機(例えば、Milligen-Bioscience, Burlington, MA製のモデル8700自動合成機またはABIモデル380B)を用いたシアノエチルホスホリアミダイト法による単純な合成法まで、様々である。オリゴヌクレオチドの作製に有用な合成法は、Ikuta et al.(Ann. Rev. Biochem. 53:323-356(1984); ホスホトリエステルの法およびホスフィトリエステルの法)並びにNarang et al.(Methods Enzymol., 65:610-620(1980); ホスホトリエステルの法)にも記載されている。

#### 【0048】

マイクロアレイの別の形状は3次元アレイであり、例えば、カラーコード化ビーズからなるアレイ(Luminex; Austin, TX)および高周波タグを有するビーズからなるアレイ(PharmaSeq; Monmouth Junction, NJ)が挙げられる。本発明で用い

る3次元マイクロアレイは3次元を有する任意の固相であり、各マイクロアレイは、複数の異なる生物学的分子(好ましくは核酸プライマー)が表面に結合している。従って、固相マイクロアレイ上の各プライマーの位置から、各核酸プライマー配列を同定することができる。開示のアッセイの操作を利用してもよい。例えば、複数の核酸プライマーを含む3次元マイクロアレイを目的の標的核酸と混合してもよい。プライマーが短い場合には、これらの分子をポリメラーゼ(例えば、逆転写酵素等)によって伸長させて、本明細書に記載するようなRNA:DNAハイブリッドに特異的な物質(例えば、抗体および抗体断片等)に結合できるようにするのが望ましい場合がある。抗体を固相上に捕捉することにより、RNA:DNAハイブリッドが形成された固相マイクロアレイのプライマーを、ハイブリッドが形成されなかったプライマーから分離することができる。次いで、RNA:DNAハイブリッドに特異的な物質を検出し、プライマーを同定すればよい。他の多くのアッセイスキームを開示の方法に使用することもできる。

#### 【0049】

マイクロアレイは、例えば、遺伝子発現、突然変異および多型分析、SNP、遺伝的変異の検出等への応用に際して、RNA、DNA、タンパク質等を検出および測定するアッセイの小型化に好適な形式として提案されたものである。マイクロアレイは、数十~数千の遺伝子または遺伝的変異(例えばSNP)のレベルを、単一装置上の単一サンプルから測定可能にするものである。従来のマイクロアレイ法の欠点は、測定対象の生物学的分子(好ましくは核酸(RNAまたはDNA))を最初に標識しなければならない点であり、この工程は、ある核酸を別の核酸(例えば、RNAを標識DNA)へ変換させることにより行われることが多く、これによって生物学的分子が検出および測定可能になる。

#### 【0050】

本発明では好ましくは、本明細書中で定義するような、DNA、RNA、アンプリコン、プラスミド等といった(但し、これらに限定されない)複数の核酸配列が固相支持体に固定化された「核酸マイクロアレイ」を用い、相補的な標的核酸をハイブリダイズさせる。マイクロアレイの核酸には、例えば、特異的な遺伝子もしくはクローン由来の配列、プローブ、プライマー、またはオリゴヌクレオチドを、多

孔質もしくは無孔質固相または固相支持体に結合させたものが含まれる。様々なサイズの核酸を本発明のマイクロアレイに使用することができる。

#### 【0051】

核酸は固相支持体または基板に結合させることができる。このようなマイクロアレイは、複数の異なる核酸がアレイ状、グリッド状、または他の組織化されたパターン状に結合または付着した固相支持体である。「核酸マイクロアレイ」は、好ましくは、シリコンチップ、スライドガラス、または他の固相支持体上に並んだ核酸配列鎖のアレイを含み、遺伝子発現、突然変異および多型分析等の検出および測定に対して幅広い用途を有する。核酸マイクロアレイを調製するにはいくつかの方法が利用可能である。核酸配列鎖は、受動的または化学的カップリング法によって固相基板に非共有結合または共有結合させることができる。他のアプローチでは、合成法を利用して核酸分子を直接基板表面上で構築する。より簡便ではあるが制限の多いアプローチは、標識核酸配列を調製し、次いで標識核酸配列を結合パートナーで予め被覆しておいた基板へ結合させるものである。

#### 【0052】

あるいは、タンパク質および/またはペプチドのエLEMENTを固相支持体または基板へ組織化されたパターン状に結合させることもできる。このような固定化タンパク質ELEMENTに、核酸、タンパク質、ペプチド、および/または核酸ハイブリッドを結合させればよい。検出は、RNA:DNAハイブリッドに特異的な物質(例えば、抗体または抗体断片)を用いて行う。固定化タンパク質またはペプチドがRNA:DNAハイブリッドに結合する場合には、タンパク質-ハイブリッド複合体のRNA:DNAハイブリッド部分を、RNA:DNAハイブリッドに特異的な物質を用いて検出することができる。固定化タンパク質がDNAに結合する場合には、タンパク質-DNA複合体のDNA部分をRNAにハイブリダイズさせ、RNA:DNAハイブリッドを形成させることができる。固定化タンパク質がRNAに結合する場合には、タンパク質-RNA複合体のRNA部分をDNAにハイブリダイズさせ、RNA:DNAハイブリッドを形成させればよい。RNA:DNAハイブリッドは、RNA:DNAハイブリッドに特異的な物質(例えば、RNA:DNAハイブリッド特異的抗体またはその断片)を用いて検出することができる。

## 【0053】

「ハイブリッド」とは、RNAまたはDNAからなる二本鎖核酸である。二重らせんはDNA:DNA、RNA:RNA、またはRNA:DNAのいずれかであり、人工ヌクレオチドを含んでいてもよい。RNAホモ二重らせんは、塩基対合した二本鎖RNAである。RNA:DNAヘテロ二重らせんは、RNA鎖とDNAヌクレオチド単量体を含む鎖とからなる。二重らせんは、全体が二本鎖になっていてもよいし、一部が二本鎖になっていてもよい。典型的には、二重らせんの少なくとも10塩基が二本鎖である。「特異的にハイブリダイズ(する)」または「特異的なハイブリダイゼーション」または「選択的にハイブリダイズ(する)」等の表現は、ストリンジェントな条件下で核酸分子が、複雑な混合物(例えば、全細胞)DNAまたはRNA中に存在する特定のヌクレオチド配列に優先的に結合、二重らせん化、またはハイブリダイズすることを云う。

## 【0054】

固相基板上に固定化された核酸プローブは、RNA:DNAハイブリッドの形成を基板上に局在化させることができる。このような局在化によって、後続の検出工程を妨害する可能性のある反応成分を洗い流す簡便な手段や、複数の異なる標的核酸配列を同時にアッセイする簡便な方法がもたらされる。RNA:DNAハイブリッドは、異なるプライマーが付着した各々の部位において別々に形成される得る。プローブを固定化して生物学的分子の固相マイクロアレイを形成するには、本明細書に記載の方法を使用すればよい。

## 【0055】

本明細書で定義するような「物質(entity)」とは、RNA:DNAハイブリッドを特異的に認識する任意の分子を云う。RNA:DNAハイブリッドを認識し得る物質の例としては、キメラ抗体、RNA:DNAハイブリッドに特異的に結合する天然もしくは遺伝子操作されたタンパク質または核酸が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0056】

物質の好適な一実施形態は「抗体」である。本発明では、抗体は最も広い意味で用いられるものとし、無傷の抗体全体、抗体断片、組換え抗体、キメラ抗体、多機能抗体凝集物、または、本明細書に記載の特徴を有する抗体結合部位を少なくとも1つ含む任意の抗体誘導物全般または他の物質を含むものとする。好ましく

は、本発明では、これらの物質はRNA:DNAハイブリッドを特異的に検出し、かつ特異的に結合するものである。免疫グロブリンの既知のクラスおよびサブクラスのいずれかの抗体(例えば、IgG、IgM等)、並びに、Fab、F(ab')およびF(ab')<sub>2</sub>として知られているIgG断片等の活性断片が意図されている。抗体には、特異的なエピトープに結合するモノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニスト、および中和抗体を含む)並びにポリエピトープ特異性を有するポリクローナル抗体、または他の物質が含まれていてもよい。

#### 【0057】

二本鎖RNA:DNAハイブリッドに特異的な任意の抗体または物質を使用して、本発明のハイブリッドを直接検出してもよい。本発明では、短鎖核酸配列、好ましくは30塩基長未満の核酸配列を検出するために抗体を用いる実施形態においては、ポリクローナル抗体が好適である。

#### 【0058】

RNA:DNAハイブリッドを検出するのに用いる抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれであってもよい。モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の混合物を用いるのが有利である場合もある。さらに、本発明は、特異的な結合特性を持つように特別に設計したポリクローナルまたはモノクローナル抗体の使用を包含する。例えば、極めて短鎖(20塩基対未満)のRNA:DNAハイブリッドに特異的に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を作製すれば、極めて短鎖のRNA:DNAハイブリッドを検出する際に使用できる。さらに、RNA:DNAハイブリッド内のミスマッチに対して感度の高いまたは低いモノクローナルまたはポリクローナル抗体を作製してもよい。RNA:DNAハイブリッド内のミスマッチに対して感度の高い抗体は、遺伝的変異の検出において特別の有用性が認められるのに対し、RNA:DNAハイブリッド内のミスマッチに対して感度の低い抗体は、特定のクラスの核酸の検出および定量に使用される。核酸三重らせん(DNA:RNA:DNAもしくはRNA:DNA:RNA)またはDNA:PNAもしくはRNA:PNAハイブリッド(ここでPNAは、本発明ではペプチド核酸と定義する)を特異的に検出する他の抗体も使用可能である。

#### 【0059】

RNA:DNAハイブリッドに対するポリクローナル抗体は、適切な実験動物に有効量のペプチドまたは抗原成分を注射し、血清を動物から回収し、公知の免疫吸着法のいずれかによって特定の血清を単離することにより調製する。ポリクローナルRNA:DNAハイブリッド抗体を作製するのに容易に使用し得る動物としては、ニワトリ、マウス、ウサギ、ラット、ヤギ、ウマなどが挙げられる。本発明のアクセシの好適な実施形態では、ポリクローナルRNA:DNAハイブリッド抗体を、RNA:DNAハイブリッドで免疫したヤギから誘導する。固相支持体上に固定化されたRNA:DNAハイブリッドに対するアフィニティー精製によって、ハイブリッド特異的抗体をヤギ血清から精製する。

#### 【0060】

常法によって調製したモノクローナル抗体をポリクローナル抗体の代わりに使用してもよい。様々な方法を使用して、RNA:DNAハイブリッドに特異的な適切な抗体を得ることができる(例えば、米国特許第4,833,084号(Carrico)、同第4,732,847号(Stuart et al.)およびStuart et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3751(1981))。ハイブリドーマHB8730によって分泌されるRNA:DNAハイブリッドに特異的なモノクローナル抗体が米国特許第4,833,084号(Carrico)に開示されている。好ましくは、本発明によれば、30塩基長を超える核酸の検出にはモノクローナル抗体を使用する。

#### 【0061】

抗RNA:DNAハイブリドーマの単離は、特定の欠損に関連する遺伝的突然変異のアクセシ開発と細菌およびウイルス感染の検出を向上させてきた。しかしながら、このようなRNA:DNAハイブリッド特異的モノクローナル抗体を用いるアクセシは、偽陽性結果を招く高レベルの非特異的結合を起こす場合が多い。Boguslawski et al., J. Immunol. Methods 89:123-130(1986)では、非特異的結合を減少させ、かつ煩雑な洗浄手法を回避する目的で、濾紙上に分離した抗ハイブリッド被覆ポリスチレンビーズを用いるハイブリダイゼーションアクセシが開発されている。

#### 【0062】

RNA:DNAハイブリッドに対する好ましい抗体は、Kitawaga, Y.およびStollar,

B.D. (Mol. Immunology 19:413-420 (1982)) の方法により、あるいは1988年3月22日にStuartらに対して発行されたU.S.特許No. 4,732,847中に記載された方法にしたがって調製され、両方共、参考文献として本明細書中に援用する。

#### 【0063】

ハイブリッドの存在の同定は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを使用することにより、またはRNA:DNAハイブリッド複合体に対して特異的なその他の単位を使用して、達成することができる。検出は、ハイブリッドRNA:DNA複合体に対して特異的な抗体のいずれかを標識することにより、あるいは抗複合体 (anticomplex) に結合する標識抗体を使用することにより、達成することができる。たとえば、抗体がマウスに由来する場合、マウス抗体に対する抗体、たとえばウサギ抗 (マウスIgG)、を標識して、それにより固体支持体に対して結合する複合体に結合したいずれかの抗複合体 (anticomplex) に対して結合させることができる。

#### 【0064】

幅広い種の標識を、ここで応用できる他の環境中で使用した。より一般的な標識の一つは、放射性核種であり、これをオートラジオグラフィーにより使用して、結合領域を可視化することができる。別の標識は、フルオロセイン、メルコシアニン、またはローダミンなどの蛍光剤であり、励起光に照射することにより、蛍光の存在をモニターすることができる。あるいは、酵素の領域において検出することができるそして局在化することができる産物を結果として生じる酵素を使用することができる。多数の色素または還元することができる金属を使用して、検出を行うことができる。一般的な酵素には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼなどが含まれる。特定の標識または検出可能なシグナルを観察する方法は、本発明にとって本質的ではない。抗複合体 (anticomplex) に対する抗体を使用することにより、複合体に対する抗複合体 (anticomplex) の特定の結合と関連する多数の標識を、大幅に増幅することができる。

#### 【0065】

ハイブリッドに対する抗体またはハイブリッドに対する二本鎖ハイブリッドに

特異的なその他の単位の、結果として得られる結合の検出を促進するため、通常は抗体を検出可能な化学物質基 (detectable chemical groups) により標識することができる。標識として機能することができる検出可能な化学物質基の例は、補酵素、酵素基質、酵素阻害剤および酵素それ自体などの酵素的に活性な基、蛍光剤、発色団、発光剤 (luminescers)、標識アビジンまたは標識ハプテンの結合により検出可能なビオチンまたはハプテンなどの特異的に結合可能なリガンド、そしてラジオアイソトープである。

#### 【0066】

完全なハイブリダイゼーションが生じるためには、二本鎖ハイブリッドを形成するために最適な条件が必要である。“ストリンジェントな条件”という用語は、プローブが相補的な配列に選択的にハイブリダイズしうるが、その他の配列に対してはそれよりも弱く、または全くハイブリダイズしない条件のことをいう。2本の一本鎖分子間での相補性は、“部分的”であってもよく、その場合、核酸のいくらかのみが結合し、または全体的な相補性が一本鎖分子間で存在する場合には、完全であってもよい。核酸鎖間での相補性の程度は、核酸鎖間でのハイブリダイゼーションの効率および強度に対して顕著な作用を有する。これは、核酸鎖間での結合に依存する増幅反応の際に、そしてPNA分子の設計および使用の際に、特に重要である。たとえば、サザンハイブリダイゼーションおよびノザンハイブリダイゼーションなどの核酸ハイブリダイゼーション実験の文脈において、“ストリンジェントなハイブリダイゼーション”および“ストリンジェントなハイブリダイゼーションの洗浄条件”は、配列依存的であり、異なる環境パラメータのもとでは異なる。核酸のハイブリダイゼーションに対するさらなるガイドは、Tijssen ((1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acids Probe part 1 chapter 2. “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acids probe assays”, Elsevier, N.Y.) 中に見いだされる。

#### 【0067】

“実質的に結合”とは、プローブ核酸と標的核酸との間での相補的なハイブリダイゼーションのことをいい、そして、ハイブリダイゼーション媒体のストリン

ジェンシーを減少させることにより適用させて、cDNA、アンプリコン、プラスミドなどを含む、結合オリゴヌクレオチド配列に対してハイブリダイズした標的ポリヌクレオチド配列の所望の検出を達成することができる、マイナーなミスマッチを包含する。

【0068】

プローブ核酸の目的の核酸分子に対するハイブリダイゼーションをいずれかの適した条件下で行うことができ、そして好ましくはハイブリダイゼーションに好ましく、二本鎖ハイブリッドを形成する条件下で行うことができる。たとえば、Sambrookら (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)) を参照。

【0069】

たとえば、本発明の一態様において、プライマーは逆転写を開始するために必要とされる。“プライマー”は、本明細書中では、DNAまたはRNA鋳型分子に対してアニールすることができ、核酸合成の開始点として機能する核酸分子として定義される。カスタムプライマーは、一般的には、合成オリゴヌクレオチドであり、それにはcDNA、アンプリコン、プラスミドなどが含まれるが、天然に存在するヌクレオチドは、*in vitro*および*in vivo*の両方においてプライマーとしても機能する。プライマーの*in vitro*使用には、たとえば、DNA合成、サンガーシークエンス、およびPCRが含まれる。

【0070】

この特定の態様は、いったん標的核酸サンプルを得た後は、目的とする標的核酸を同定するために、目的の核酸“鋳型”を必要とする。ここで、本明細書中で互換的に使用されるように、“核酸鋳型”または“鋳型”は、そこから別の高分子を直接合成するために情報を読みとるポリヌクレオチド配列として定義される。たとえば、これは、DNA合成またはRNAの転写の間にコピーされるDNA鎖、逆転写の間にコピーされるRNA鎖のことをいう場合がある。

【0071】

開示された方法のプライマーは、オリゴヌクレオチド、cDNA、アンプリコン、プラスミドなどであってもよく、目的の核酸分子上の領域に相補的な配列を有す

るRNAまたはDNAのいずれかであってもよい。本明細書中で使用される場合、プライマーの相補的な配列は、“相補的な部分”のことをいう。本明細書中で使用する場合、プライマーに相補的な目的の標的核酸分子上の領域は、“プライマー相補領域”という。目的の標的核酸分子のプライマー相補領域は、目的の標的分子のいずれかの領域であってもよい。逆転写酵素を使用する本発明のアッセイの態様のために、好ましい様式には、鋳型核酸分子の5'末端からいくらか離れた標的核酸分子のプライマー相補領域が含まれる。これにより、プライマーハイブリダイゼーション部位と鋳型核酸分子の末端との間の核酸鋳型の、より長い領域を得て、それにより検出すべきRNA:DNAハイブリッドの量を増幅する。

#### 【0072】

一般的には、目的の核酸分子のプライマー相補領域は、検出するための核酸配列を選択するための既知の分類に基づいて選択される。たとえば、他の核酸分子の中から特定の核酸分子を検出するため、プライマー相補領域は、目的の標的核酸分子に特徴的であるか、またはそれに独特のものであることが好ましい。RNA分子のいずれかのクラスが検出されることが望ましい場合、プライマー相補領域は、目的の標的核酸分子の全てと同一または実質的に同一である配列を有するように選択されることが好ましい。いったんプライマー相補領域を選択すると、目的の分子の選択したプライマー相補領域に相補的であるようにプライマーの配列を設計しまたは選択する。配列が既知の、あるいは配列を導き出すことができる、いずれかの核酸分子を、開示された方法を使用して検出することができる。

#### 【0073】

本発明の方法において、プライマーの相補的な部分は、プライマーとプライマー相補領域との間の特異的かつ安定なハイブリダイゼーションをサポートする長さを有する。一般的には、本発明のプライマーは、10~100ヌクレオチドを含むが、しかし、15~30ヌクレオチドであることが好ましい。

#### 【0074】

そのゲノムにより個体を特徴づける能力は、遺伝的情報の遺伝的な変異性による。必要なタンパク質をコードするDNA配列は種を超えてよく保存されているが、非コードのDNA領域または不可欠な機能を有さず、そしてしたがって核酸配列

の完全な保存は強力には選択されない、タンパク質の部分をコードするDNA領域が存在する。これらの可変領域は、遺伝的マーカーにより同定される。典型的には、遺伝的マーカーは、ゲノムの独自の可変領域に特異的に結合するオリゴヌクレオチドまたはアンプリコンなどのプローブにより結合される。いくつかの事例において、遺伝的マーカーに対する結合の存在または不存在は、個体の独自の核酸配列により個体を同定する。その他の事例において、マーカーは全ての個体の核酸配列に結合するが、しかし個体は、マーカープローブにより結合されるゲノム中の位置により同定される。遺伝的変異性の主要な原因は、付加、欠失、または点変異、組換え、および植物個体群における個体のゲノム中の転位可能な構成要素である。本発明は、遺伝子型変異の検出および測定のために使用することができる。たとえば、異なる配列により示されるSNPsなどの多型を検出することができる。

#### 【0075】

一般的に、本発明のアッセイには、以下の工程が関与する：

1. 生体分子プローブ、または標準な化学的技術を介して固相に対して生体分子プローブをスポットしまたは合成することにより、固体基材（たとえば、プレート、スライド、ウェル、ディッシュ、ビーズ、粒子、カップ、ストランド、チップ、およびストリップ、多孔性および非孔性の両方）に結合されるプローブのマイクロアレイを調製すること；
2. 目的とする第一の生物学的分子を含有する標的サンプルを固定化した第二の生体分子プローブに添加し、そしてRNA:DNAハイブリッドを形成させること；
3. RNA:DNAハイブリッド（RNA:DNAハイブリッド-特異的抗体またはその断片を含む）に特異的な検出可能な単位を添加すること；そして
4. 固定化したRNA:DNAハイブリッドに結合した単位を検出すること。

#### 【0076】

本発明の別の態様には、以下の工程が関与する：

1. 生体分子プローブ、または標準な化学的技術を介して固相に対して生体分子プローブをスポットしまたは合成することにより、固体基材（たとえば、プレート、スライド、ウェル、ディッシュ、ビーズ、粒子、カップ、ストランド、チッ

- ブ、およびストリップ、多孔性および非孔性の両方)に結合されるプローブのマイクロアレイを調製すること；
2. 目的とする第一の生物学的分子を含有する標的サンプルを固定化した第二の生体分子プローブに添加し、そしてRNA:DNAハイブリッドを形成させること；
  3. 好ましくはRNase H機能および熱安定性を欠損した、逆転写酵素を添加すること；
  4. 配列を伸長させる逆転写を促進する条件下でインキュベートし、したがって、非常に長いRNA:DNAハイブリッドを形成し、そして抗体検出を亢進すること；
  5. RNA:DNAハイブリッド(RNA:DNAハイブリッド-特異的抗体またはその断片を含む)に特異的な検出可能な単位を添加すること；そして
  6. 固定化したRNA:DNAハイブリッドに結合した単位を検出すること。

**【0077】**

本発明のさらなる態様には、以下の工程が含まれる：

1. 生体分子プローブ、または標準な化学的技術を介して固相に対して生体分子プローブをスポットしまたは合成することにより、固体基材(たとえば、プレート、スライド、ウェル、ディッシュ、ビーズ、粒子、カップ、ストランド、チップ、およびストリップ、多孔性および非孔性の両方)に結合されるプローブのマイクロアレイを調製すること；
2. 目的とする第一の生物学的分子を含有する標的サンプルをマイクロアレイに結合した第二の生体分子プローブおよび第三の非結合生体分子プローブに添加すること；
3. 第一の標的生物学的分子を、第三の生体分子プローブの相補的な領域とハイブリダイズさせること；
4. 固定化した第二の生体分子 プローブを、ハイブリダイズしなかった第三の生体分子プローブの相補的な領域とハイブリダイズさせること；
5. RNA:DNAハイブリッド(RNA:DNAハイブリッド-特異的抗体またはその断片を含む)に特異的な検出可能な単位を添加すること；そして
6. 固定化したRNA:DNAハイブリッドに結合した単位を検出すること。

**【0078】**

本発明の別の態様には、以下の工程が含まれる：

1. 生体分子プローブ、または標準な化学的技術を介して固相に対して生体分子プローブをスポットしまたは合成することにより、固体基材（たとえば、プレート、スライド、ウェル、ディッシュ、ビーズ、粒子、カップ、ストランド、チップ、およびストリップ、多孔性および非孔性の両方）に結合されるプローブのマイクロアレイを調製すること；
2. 目的の第一の生物学的分子を含有する標的サンプルを、マイクロアレイに結合した第二の生体分子プローブおよび第三の非結合の検出可能なように標識した生体分子プローブに対して添加すること；
3. 第一の標的生物学的分子を、第二の固相-結合生体分子プローブの相補的な領域とハイブリダイズさせ、そしてRNA:DNAハイブリッドを形成させること；
4. 固相-結合した第二の生体分子プローブを、第三の検出可能なように標識した生体分子プローブの相補的な領域とハイブリダイズさせること；
5. RNA:DNAハイブリッド（RNA:DNAハイブリッド-特異的抗体またはその断片を含む）に特異的な検出可能な単位を添加すること；そして
6. 固定化したRNA:DNAハイブリッドに結合したRNA:DNAハイブリッドに特異的な単位および検出可能なように標識した生体分子プローブの両方を別個に検出すること。

#### 【0079】

開示されたアッセイを使用して、サンプル中の目的とする複数の異なる生物学的分子を検出することができる。好ましくは、目的の標的生物学的分子のそれぞれにおいて存在する配列をスクリーニングするか、または目的の生物学的分子上の領域に対して全体的に相補的な複数のプローブを使用してスクリーニングするかのいずれかにより、これを達成する。後者のアプローチは、たとえば、特定の遺伝子に対する多数の異なる変異、または挿入変異または欠失変異を含むが、これらには限定されない、遺伝的変異と関連する、いくつかの疾患または疾患に対する素因を検出する際に使用するために好ましい。本発明は、遺伝子発現、マイクロアレイ上での生物学的分子（すなわち、RNA、DNA、タンパク質）の検出、変異および多型検出（すなわち、SNP）などを含むが、これらには限定されない、

様々な用途に応用することができるアッセイもまた、提供する。一特定態様において、変異のそれぞれの特性を有するこれらの遺伝子の変異核酸産物の領域に相補的な配列についてスクリーニングすることが好ましい。したがって、このアッセイの一つの主要な利点は、ハイスループットの用途であり、これにより多数のサンプルおよび疾患の可能性の大規模なスクリーニングが可能になる。

#### 【0080】

開示された方法を使用して、個々の生物または個々のサンプルに由来する異なる生物学的分子種の発現の比率を測定することもできる。この目的のため、この方法を使用して、複数の種を同時に検出する。本明細書中で開示する場合、マイクロアレイ検出は、この目的のために有用である。開示された方法を使用して、同一のまたは関連する生体分子配列を検出することもでき、ここで、関連する生物学的分子はそれらの間で共通する配列モチーフを有するが、それ以外は異なるものである。たとえば、細胞は、同一の制御配列、同一の構造モチーフ、またはその他の配列を共通に有する、複数の生物学的分子種を含有することができる。核酸分子のこのようなクラスを、プローブを共通の配列にハイブリダイズするように設計することにより、単一のプローブ種により検出することができる。

#### 【0081】

開示されたアッセイにおいて、RNA:DNAハイブリッド-特異的抗体およびその断片を含むRNA:DNAハイブリッドに特異的な単位を使用して、標的分子の標識をオプションではあるがもはや必要としないプローブマイクロアレイに対してハイブリダイズした生物学的分子を検出する。このアプローチにおいて、より長いRNA:DNAハイブリッドは、短いRNA:DNAハイブリッドよりもより多くの抗体に結合することができるので、RNA:DNAハイブリッドが長くなればなるほど、シグナルは大きくなる。したがって、マイクロアレイ上の核酸プローブ鎖が長くなればなるほど、標的核酸の検出はより感受性が高くなるか、またはハイブリダイズした標的核酸の所定量に対するシグナル強度はより強くなる。残念ながら、これらのマイクロアレイを調製する際に、プローブのより長い鎖を合成し、調製し、または使用することは、より困難になりそしてより費用がかかるようになる。

#### 【0082】

本発明のアッセイの一開示態様は、固体基材に結合した比較的短い核酸プローブ配列について記載し、それにより時間、労力、そしてマイクロアレイを作製するために必要な費用を最小にする。サンプル中の標的核酸配列をこれらの短いプローブにハイブリダイズさせて、長い核酸尾部 (tail) を有する短いRNA:DNAハイブリッドを作製する。この短いRNA:DNAハイブリッドは、おそらくは1または2のRNA:DNA抗体と結合するだけだろう。逆転写酵素を添加する場合、そして逆転写酵素が生じる様な条件である場合、RNA:DNAハイブリッドの核酸プローブ部分が、標的核酸鎖の長さまで伸長され、したがってRNA:DNAハイブリッドの長さが非常に増加する。標的核酸鎖が、長さ1500塩基である場合、得られたRNA:DNAハイブリッドは、1500塩基対に届くであろう。この長さのRNA:DNAハイブリッドは、非常に多数のRNA:DNA抗体と結合し、それにより、産生されるシグナルの強度を非常に増大させ、そして特異的な標的核酸配列の検出感受性を増大させる。

#### 【0083】

一開示態様は、結合した核酸プローブ配列の全部または部分を、RNA:DNAハイブリッド-依存性エキソヌクラーゼ機能 (一般にはRNase H機能または成分とも呼ばれる) を欠損する逆転写酵素を使用して逆転写することにより、標的核酸配列を検出する方法、および結果として得られるRNA:DNAハイブリッドをRNA:DNAハイブリッドに特異的な抗体を使用して検出する方法である。核酸プローブは、RNA:DNAハイブリッドを固体支持体と結合させるために、固体支持体上に固定化する。これにより、サンプル溶液からのハイブリッドの容易な分離および固体支持体上のハイブリッドの位置に基づく核酸分子の特異的な検出が可能になる。

#### 【0084】

本発明の一方法において、逆転写酵素を使用して、好ましくはRNase H機能を欠損する逆転写酵素を使用して、逆転写を行う。その後、目的の核酸分子、好ましくはこの態様においてはRNA、を含む反応混合物;ハイブリダイズし固定化された核酸プライマー;そして逆転写酵素を、目的のRNA分子の逆転写を可能にし、そしてDNA:RNAハイブリッドの形成を可能にする条件下でインキュベートする。開示された方法において使用することができる逆転写酵素または開示された方法において使用するために適合させることができる逆転写酵素の例は、表1に列

記する。本発明において使用するための好ましい逆転写酵素には、Life Technologyから入手する逆転写酵素18053-017、18064-014および18064-071；Promegaから入手する逆転写酵素M5301およびM5302；およびStratageneから入手する逆転写酵素600085；が含まれ、そのそれぞれは表1に開示する。

【0085】

【表1】

表 1

比活性	ユニットの定義	製造形態	混合活性	供給者 カタログ番号
	1 unit incorporates 1 nmol TTP into acid-insoluble form/10 min at 35°C using poly(A).oligo dT <sub>12-28</sub> as substrate	0.2 M KPO <sub>4</sub> , 2 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 50% glycerol, pH 7.2	No detectable RNase, exonuclease	Adv Biotech AB-0321 AB-0321b
26,700 U/mL	1 unit incorporates 1 nmol dTMP into acid-precipitable form/10 min at pH 8.3, 37°C	200 mM KPO <sub>4</sub> , 2 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 50% glycerol, pH 7.2	No detectable endonuclease, RNase	ACS Heideib F00750S F00750M
10-20 U/μl	1 unit incorporates 1.0 nmol [ <sup>3</sup> H]-UTP into acid-insoluble products/10 min at 37°C	0.2 M KPO <sub>4</sub> , 2.0 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 50% glycerol, pH 7.2	No detectable endonuclease, exonuclease, RNase	Amersham E 70041Y E 70041Z
>50,000 U/mg; >20,000 U/mL	1 unit incorporates 1 nmol [ <sup>3</sup> H]-dTMP into acid-precipitable products/10 min at 37°C using poly(A).d[pT] <sub>15</sub> as template primer	200 mM KPO <sub>4</sub> , 2 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 50% glycerol, pH 7.2	No detectable nonspecific RNases, nonspecific DNases (gel electrophoresis)	Boehringer 10911B 1495062
50,000 u/mL	1 unit incorporates 1 nmol [ <sup>3</sup> H]-TMP into nucleic acid product/10 min at 37°C	Solution containing 0.2 M KPO <sub>4</sub> , 2.0 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 50% glycerol, pH 7.2	No detectable nonspecific nuclease	ICN 855928 855929

【 0 0 8 6 】

【表 2】

比活性	ユニットの定義	製造形態	混合活性	供給者 カタログ番号
13 U/ $\mu$ L	1 unit incorporates 1 nmol dTTP into a TCA-insoluble product/10 min at pH 8.3, 37°C	0.2 M KPO <sub>4</sub> , 2 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 50% glycerol, pH 7.2	No detectable RNase, exogenous, nicking or degradation of RNA	NBL Gene 020704
30 U/ $\mu$ L	1 unit incorporates 1 nmol dTTP into a TCA-insoluble product/10 min at pH 8.3, 37°C	0.2 M KPO <sub>4</sub> , 2 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 50% glycerol, pH 7.2; for high efficiency synthesis of full length cDNA in the 6-10 kilobase range	No detectable RNase, exonuclease, endonuclease, nicking	NBL Gene 020703
>20,000 U/mg; 10,000-20,000 U/mL	1 unit incorporates 1 nmol dNTP into DE-81 adsorbable form/10 min at 37°C	200 mM KPO <sub>4</sub> , 2 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 50% glycerol, pH 7.2	No detectable RNase, DNase	Oncor 120111 120112
25,000-50,000 U/mg protein; 10,000-20,000 U/mL	1 unit incorporates 1 nmol dTMP into acid-insoluble product/10 min at pH 8.3, 37°C using poly(A)p[dT] <sub>12-18</sub> as template primer	Molecular biology grade; homogeneous purity; solution containing 0.2 M KPO <sub>4</sub> , 2.0 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 50% glycerol, pH 7.2	No detectable RNase, DNase, nickase	Pharmacia 27-0922-01 27-0922-02
10,000-70,000 U/mL	1 unit incorporates 1.0 nmol [ <sup>3</sup> H]-dTTP into acid-insoluble product/10 min at 37°C	Purified; 20 mM KPO <sub>4</sub> , 2 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 50% glycerol, pH 7.2	No detectable endonuclease, nonspecific RNase	Stratagene 600081 600082
>40,000 U/mg; >20,000 U/mL	1 unit incorporates 1 nmol TMP in acid-insoluble product/10 min at 37°C with poly(A..dT) <sub>n</sub> as substrate	Coolassie Blue shows a single band purity; 50 mM Tris.HCl, 10 mM DTT, 100 mM NaCl, 0.05% polydocanoi, 1 mM EDTA, 50% glycerol, pH 8.4	No detectable nonspecific RNases, nonspecific DNases (gel electrophoresis)	Boehringer 1062603

【 0 0 8 7 】

【表 3】

比活性	ユニットの定義	製造形態	混合活性	供給者 カタログ番号
50-250 U/ $\mu$ L	1 unit incorporates 1 nmol deoxyribonucleotides into acid-precipitable material/10 min at 37°C using poly(rA) <sub>12-18</sub> as template primer	>90% purity by SDS-PAGE; 20 mM Tris.HCl, 0.1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% NP40, 50% glycerol, pH 7.5	No detectable non-specific ss- and ds-endonuclease, exonuclease, RNase	Amersham E 70456Y E 70456Z
50,000 U/mL	1 unit incorporates 1 nmol TTP into acid-insoluble form/10 min at pH 8.0, 37°C using poly(rA) <sub>12-18</sub> as template primer	50 mM Tris.HCl, 0.1 mM DTT, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% NP40, 50% glycerol, pH 8.3	No detectable endonuclease, RNase	ACS Heidelb F00755S F00755M
200 U/ $\mu$ L	1 unit incorporates 1 nmol deoxyribonucleotide into acid-precipitable material/10 min at pH 8.3, 37°C using poly(A) <sub>12-18</sub> as template primer	Purity by SDS-PAGE, 250 mM Tris.HCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 375 mM KCl, pH 8.3 and 100 mM DTT	No detectable RNase H	Life Technol 18053-017
200 U/ $\mu$ L	1 unit incorporates 1 nmol deoxyribonucleotide into acid-precipitable material/10 min at pH 8.5, 37°C using poly(A) <sub>12-18</sub> as template primer	Purity by SDS-PAGE, 250 mM Tris.HCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 375 mM KCl, pH 8.3 and 100 mM DTT	No detectable RNase H	Life Technol 18064-014 18064-071

【 0 0 8 8 8 】

【表4】

比活性	ユニットの定義	製造形態	混合活性	供給者 カタログ番号
200 U/ $\mu$ L	1 unit incorporates 1 nmol deoxyribonucleotide into acid-precipitable material/10 min at pH 8.3, 37°C using poly(A)-oligo.[dT] <sub>12-18</sub> as template primer			Life Technol 28025-013 28025-021
25,000 U/mL	1 unit incorporates 10 nmol TTP into acid-insoluble material/10 min at 37°C using poly(rA).oligo(dT) as template primer	0.1 mM NaCl, 50 mM Tris.HCl, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% NP40, 50% glycerol, pH 7.6	No detectable endonuclease, RNase	NE Biolabs 253S 253L
>5000 U/mg protein	1 unit incorporates 1.0 nmol [ <sup>3</sup> H]-TMP into acid-insoluble products/10 min at 37°C using poly(A).d[pT] <sup>14</sup> as substrate	Recombinant; 99% by HPLC, SDS-PAGE; lyophilized containing 0.2% BSA as stabilizer	No detectable nuclease	Boehringer 1465333
20-40 U/ $\mu$ L	1 unit incorporates 1 nmol deoxyribonucleotide into DE-81 absorbable form/10 min at 37°C	Overproducer; 50 mM Tris.HCl, 0.1 M NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 50% glycerol, pH 8.3	No detectable endo and exodeoxyribonucleases, RNases	Fermentas EP0351 EP0352
100-200 U/ $\mu$ L	1 unit incorporates 1 nmol dTTP into acid-insoluble form/10 min at pH 8.3, 37°C	Recombinant; $\geq$ 90% purity by SDS gel; SX reaction buffer; 250 mM Tris.HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT, pH 8.3	No detectable RNase H <1% DNase <3% RNase $\geq$ 90% supercoiled plasmid	Promega M5301 M5302

【 0 0 8 9 】

【表5】

比活性	ユニットの定義	製造形態	混合活性	供給者 カタログ番号
	1 unit incorporates 1 nmol dTTP into acid-insoluble form/10 min at 37°C using poly(A) <sub>n</sub> oligo[dT] <sub>11-18</sub> as substrate	50 mM Tris.HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 50% glycerol, pH 8.3	No detectable RNase, exonuclease	Adv Biotech AB-0322 AB-0322b
	1 unit incorporates 1 nmol dTTP into acid-insoluble form/10 min at 37°C	50 mM Tris.HCl, 5.0 mM DTT, 1.0 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 0.1% NP40, 50% glycerol, pH 8.0	No detectable endonuclease, RNase	CHIMERX 1375-01 1375-02
55,000 U/mg	1 unit incorporates 10 nmol dTTP into acid-insoluble material/10 min at pH 8.6, 37°C using oligo.(dT) <sub>12-18</sub> primed poly(A) <sub>n</sub> as template	Solution containing 50% glycerol, 50 mM Tris.HCl, 0.1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Triton X-100, pH 7.5	No detectable RNase, endonuclease, exonucleolytic DNase, protease	Epicentre M4425H M4410H
	1 unit incorporates 1 nmol labeled dATP into acid-insoluble material/10 min at 37°C	Solution containing 0.1 mM NaCl, 50 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.1% NP40, 50% glycerol, pH 8.0		ICN 152020
	1 unit incorporates 1 nmol TMP into DE-81 adsorbable form/10 min at 37°C using polyA-oligodT <sub>12-18</sub> as substrate	50 mM Tris.HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50% glycerol, pH 8.3	No detectable RNase, DNase	Oncor 120301 120302

【0090】

【表6】

比活性	ユニットの定義	製造形態	混合活性	供給者 カタログ番号
50,000-95,000 U/mg protein; 10,000-20,000 U/mL	1 unit incorporates 1 nmol dTMP into acid-insoluble product/10 min at pH 8.3, 37°C using poly(rA):p[dT] <sub>12-18</sub> as template primer	Molecular biology grade; homogeneous purity; solution containing 50 mM Tris.HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 50% glycerol, pH 8.3	No detectable RNase, DNase, nickase	Pharmacia 27-0925-01 27-0925-02
50,000 U/mL	1 unit incorporates 1.0 nmol [ <sup>3</sup> H]TTP into acid-insoluble product/10 min at 37°C	50 mM Tris.HCl, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.1% NP40, 50% glycerol, pH 8.0	No detectable RNase H, DNase, nonspecific RNase	Stratagene 600085
10-30 U/μL	1 unit incorporates 1 nmol [ <sup>3</sup> H]dTMP/10 min at 37°C with poly(rA):oligo(dT) as template primer	200 mM KPO <sub>4</sub> , 2 mM DTT, 0.2% NP40, 50% glycerol, pH 7.2	No detectable non-specific nuclease	Amersham E 2610Y E 2610Z
400 U and 1600 U	1 unit incorporates 1 nmol [ <sup>3</sup> H]dTMP/10 min at pH 8.3, 37°C with poly(rA):oligo(dT) as template primer	Solution containing 200 mM KPO <sub>4</sub> , 2 mM DTT, 0.2% NP40, 50% glycerol, pH 7.2	No detectable nuclease	TaKaRa 2610

【 0 0 9 1 】

【表7】

比活性	ユニットの定義	製造形態	混合活性	供給者 カタログ番号
	Transcriptase: 1 unit incorporates 4 nmol dTTP into acid insoluble material/30 min at pH 8.3, 45°C using oligo(dT)18-primed poly(A) <sub>n</sub> as template; DNA Polymerase: 1 unit incorporates 10 nmol dNTP into acid insoluble material/50 min at pH 8.3, 74°C	Solution containing 50% glycerol, 50 mM Tris.HCl, 0.1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% NP40, pH 7.5; no detectable DNA exo- and endonuclease, protease, RNase		Epiceritre Retrothem™ RT R19250 R19500 R1910H
	1 unit incorporates 1 nmol dTTP into acid-insoluble form/10 min at 50°C	50 mM Tris.HCl, 5.0 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% glycerol, stabilizers, pH 7.5	No detectable endonuclease, 3'-exonuclease, 5'-exonuclease/5'-phosphatase, nonspecific RNase, ss- and ds-DNase	CHIMERx 1374-01 1374-02

## 【0092】

逆転写は一般に逆転写酵素の機能する温度範囲内の任意の温度において実施してよい。好ましくは、インキュベーション温度は逆転写酵素が機能して且つプライマーが標的核酸分子にハイブリダイズしたまま残るあらゆる温度である。非好

熱性逆転写酵素に関しては、好ましい温度は逆転写酵素のための最適な温度又はその付近の温度である。ほとんどの非好熱性逆転写酵素に関しては、この温度が約25 から45 の間になる。

【0093】

好ましい態様において、好熱性逆転写酵素は選択性を増大させるために使用される。好熱性逆転写酵素が機能するもっとも高い温度は本当に高くてよい。このため、好熱性逆転写酵素を用いる場合の逆転写酵素のための好ましい温度範囲は、対象のRNA分子とプライマーの間のハイブリッドの計算された溶融温度に關してもっとも便利に記載される。そのような溶融温度は、RNA / プライマー溶融温度 (R / P T<sub>m</sub>) と本明細書では呼ぶ。好ましい範囲は、対象のRNA分子とプライマーの間のハイブリッドの溶融温度より20 下であり、対象のRNA分子とプライマーの間のハイブリッドの5 上を含む。好熱性逆転写酵素を用いる場合の他の好ましい範囲は、表2に掲載されたものを含む。

【0094】

【表8】

表2

最大:	R/P T <sub>m</sub> まで	R/P T <sub>m</sub> の5°C 下まで	R/P T <sub>m</sub> の3°C 下まで
1	R/P T <sub>m</sub> の20°C 下	R/P T <sub>m</sub> の20°C 下	R/P T <sub>m</sub> の20°C 下
2	R/P T <sub>m</sub> の15°C 下	R/P T <sub>m</sub> の15°C 下	R/P T <sub>m</sub> の15°C 下
3	R/P T <sub>m</sub> の10°C 下	R/P T <sub>m</sub> の10°C 下	R/P T <sub>m</sub> の10°C 下
4	R/P T <sub>m</sub> の7°C 下	R/P T <sub>m</sub> の7°C 下	R/P T <sub>m</sub> の7°C 下
5	R/P T <sub>m</sub> の5°C 下	R/P T <sub>m</sub> の5°C 下	R/P T <sub>m</sub> の5°C 下
6	R/P T <sub>m</sub> の3°C 下	R/P T <sub>m</sub> の3°C 下	R/P T <sub>m</sub> の3°C 下

【0095】

特に注目すべきなのは、上記の列挙された範囲内の各々の特定のしかし不特定の範囲が別の好ましい範囲として意図されることである。逆転写酵素のための好ましい温度は、R / P T<sub>m</sub>より約20 下、R / P T<sub>m</sub>より約15 下、R

$R/P$   $T_m$ より約12 下、 $R/P$   $T_m$ より約10 下、 $R/P$   $T_m$ より約7 下、 $R/P$   $T_m$ より約5 下、 $R/P$   $T_m$ より約3 下、 $R/P$   $T_m$ より20 下、 $R/P$   $T_m$ より15 下、 $R/P$   $T_m$ より12 下、 $R/P$   $T_m$ より10 下、 $R/P$   $T_m$ より7 下、 $R/P$   $T_m$ より5 下、そして $R/P$   $T_m$ より3 下を含む。通常、温度が $R/P$   $T_m$ に近づけば近づくほど、RNAとプライマーの特異的ハイブリッドと非特異的ハイブリッドの間の識別の程度が高くなる。温度が $R/P$   $T_m$ に近いと、しかしながら、特異的ハイブリッドの安定性の低下がプライミングの効率の低さを引き起こすかもしれない。

#### 【0096】

$R/P$   $T_m$ は計算によるか又は経験的測定の何れかにより測定してよい。 $R/P$   $T_m$ を計算するためには核酸ハイブリッドの安定性を計算するためのあらゆる確立された計算式を使用してよい。 $R/P$   $T_m$ を計算するための好ましい計算式は、 $T_m = H/S + R \times \ln(C/4) + 16.6 \log [K^+] / 1 + 0.7 [K^+]^{2.37.15}$ であり、完璧にマッチするDNA:RNAの安定性に基いた研究に由来した。RNA:DNAハイブリッドに関しては、上記式へのホルムアミド濃度の取り込みは適用できないが、何故ならば、ホルムアミド濃度と $T_m$ の下降の関係が直線ではないからである。80%ホルムアミドにおいて、RNA:DNAハイブリッドはDNA:DNAハイブリッドよりも安定であり、配列に依存して約10から30  $T_m$ を大きくさせる (Hames & Higgins, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* (IRL Press Limited, Oxford, England, 1985))。80%ホルムアミドにおいて反応を実施すると、ホルムアミドを従って使用することにより、DNA:DNA二重鎖の形成を抑制し、RNA:DNAハイブリッドを優先的に選択し、そして $R/P$ に関する $T_m$ を見積もってもよい。RNA:ハイブリッドの $T_m$ の見積もりのために経験的に誘導された式は、短い核酸プライマーに関して正確ではないかもしれないため、ハイブリダイゼーション温度は40から60の温度範囲において0.1 - 0.4 Mの単価カチオン中でハイブリッド安定

性を評価することにより好適に決定される。R / P T<sub>m</sub>は経験的に決定してもよい(Lesnick and Freier, Biochemistry 34:10807-10815(1995), McGraw et al., Biotechniques 8:674-678(1990), 及びRychlik et al., Nucleic Acids Res. 18:6409-6412(1990))。

#### 【0097】

本明細書にて使用する好熱性逆転写酵素は、50より上の任意の温度においてその最大活性の少なくとも5%を保持するか、又は少なくとも50の最適温度を有するあらゆる逆転写酵素である。好ましい逆転写酵素は、少なくとも50の最適温度を有するものである。本明細書にて使用される逆転写酵素の最大活性は、以下に記載されるアッセイにおいて測定され、与えられた逆転写酵素がその最適温度において示す、活性として定義される。本明細書にて使用される逆転写酵素の最適温度は、逆転写酵素の活性が最大になる温度において定義され、以下に記載されるアッセイにおいて測定される。与えられた逆転写酵素の最適温度は、様々な温度にて以下のアッセイにおいてその活性を測定することにより決定してよい。通常、最適温度は、アッセイが5から10の間隔において実施することのみが要求される範囲内でのみ測定される必要がある。

#### 【0098】

固相基板への核酸配列の固定化の方法はよく確立されている。半分のプライマー及びローリングサークルの複製プライマーを含むオリゴヌクレオチドは確立されたカップリング法を使用してカップリングしてよい。例えば、付着法はPease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(11):5022-5026(1994)、及びKhrapko et al., Mol. Biol (Mosk) (USSR) 25:718-730(1991)により記載される。3'アミンオリゴヌクレオチドの固定化法は、Stimpson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6379-6383(1995)により記載される。オリゴヌクレオチドを固相支持体に付着させるための好ましい方法は、Guo et al., Nucl

enic Acids Res. 22: 5456 - 5465 (1994)に記載される。

【0099】

核酸又はプライマー分子の固相支持体への固定化及びアレイ化はあらゆる適切な技術を用いて達成してよい。例えば、固定化は、インサイチュ核酸合成 (Maskos and Southern, Nucleic Acids Research, 20: 1679 - 1684 (1992); Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 5022 - 5026 (1994)) 又は化学合成されたオリゴヌクレオチドの共有結合又は不動付着によるか (Guo et al., Nucleic Acids Research, 22: 5456 - 5465 (1994)) 又はロボットアレイ化技術と組み合わせた他の核酸、アンプリコン、cDNAs等の共有結合又は不動付着の何れかにより達成してよい。他の固定化技術はMcGallらへの米国特許5,412,087、Matsonらへの米国特許5,429,807、Fodorらへの米国特許5,510,087に記載される。幾千の異なるプライマーが固相支持体上にアレイ化されて、幾千の標的核酸配列を質問してよい。核酸又はプライマーの密度はアレイ化の方法及び検出手段により適合させるべきである。

【0100】

本発明の一つの態様は、特定の核酸プローブを含むユニバーサルアレイへの標的核酸配列のハイブリダイゼーションを含み、その際、「ユニバーサルアレイ」又は「ユニバーサルアレイ配列」は本明細書にて相互変換可能なようにあらゆる可能な塩基の組み合わせの短い核酸配列として定義される。上記ユニバーサルアレイ配列は6 - 10塩基、好ましくは5 - 6塩基の範囲を含み、可能な組み合わせの数(即ち、固相へ結合する別々のプローブ)はそれぞれ1024および4096であり、そして核酸発現分析を可能にし、その際、結果をフィンガープリントとして使用してよく、異なる組織又はサンプルが異なるフィンガープリントを与える。

【0101】

第3の核酸プローブを含む態様は、「捕捉用タグ」を使用することにより固相

アレイに固定化してよい。本明細書にて使用される捕捉用タグは他の化合物又はモエティに結合するかもしれないあらゆる化合物である。プライマーは即ち付着させた捕捉用タグのその結合パートナーへの結合を通して固定化される。そのような結合パートナーは本明細書にて「捕捉用ドック」と呼ぶ。捕捉用タグは化合物であり、例えば粒子又はハプテンであって、リガンド結合分子又は抗体のような他の分子に結合するか又は相互作用する化合物である。捕捉用タグと捕捉用ドックの間のそのような相互作用は特定の相互作用、例えばハプテンと抗体の間又はリガンドとリガンド結合分子の間の相互作用であることも好ましい。

#### 【0102】

このアッセイのさらなる態様は、2つの隣接領域：標的核酸特異的領域及び「捕捉用配列相補体」を有する捕捉用タグを含む。本明細書にて使用される「捕捉用配列相補体」は、固相マイクロアレイに固定化された「ユニバーサル捕捉用配列」に相補な核酸配列を含み、但し、「ユニバーサル捕捉用配列」は公知であり且つ固相マイクロアレイ上のその位置が予め決定されている短い核酸配列を意味する。「捕捉用配列相補体」を含む捕捉用タグ又はプローブは、その相補体をその相補な「ユニバーサル捕捉配列」へハイブリダイズさせることにより固相マイクロアレイに固定化してよい。

#### 【0103】

本発明の別の態様において、「捕捉用タグ」は固相マイクロアレイに結合したその「捕捉用ドック」にハイブリダイズする標識核酸プローブを意味し、但し、捕捉用ドックが標識核酸プローブに特異的な共通配列である。

#### 【0104】

別の捕捉用タグは、オリゴヌクレオチドにカップリングするかもしれないハイブリダイゼーション又はリガンド分子を含む。核酸プローブのコンテキストにおいて記載される捕捉用タグは Syvnen et al., *Nucleic Acids Res.*, 14:5037 (1986) に記載された。捕捉用タグはビオチンも含み、核酸に取り込まれてよい。

#### 【0105】

基板へのプライマーの接着又はカップリングは、ドックを基板に接着又はカッ

プリングすることにより達成してよい。上記捕捉用ドックは、プライマー上の捕捉用タグに結合するか、又は相互作用することにより、プライマーの接着を媒介する。基板上に固定化された捕捉用ドックは基板上のプライマーの捕捉を可能にする。別の捕捉用ドックを別のプライマーに付着させた基板の別の領域に付着させることにより、別のプライマーに付着した別の捕捉用タグが別に、よって基板上の診断上の位置において捕捉されるかもしれない。例えば、マイクロタイタープレートの複数アッセイにおいては、96までの異なる捕捉用タグに特異的な捕捉用ドックをマイクロタイタープレート上に、それぞれ異なる溝において固定化してよい。捕捉及び検出は、対応する核酸分子がサンプル中に存在する捕捉用タグに相当する溝においてのみ生じることになる。

#### 【0106】

一つの態様において、捕捉用ドックはオリゴヌクレオチドである。基板にオリゴヌクレオチドを固定化するか又はカップリングさせる方法はよく確立されている。例えば、付着法は Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(11):5022-5026(1994)、及び Khrapko et al., Mol Biol (Mosk (USSR) 25:718-730(1991) により記載される。3'アミンオリゴヌクレオチドのカゼインコートされたスライドへの固定化の方法は、Stimpson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6379-6383(1995) により記載される。オリゴヌクレオチドと固相基板に付着させるための別の方法は Guo et al., Nucleic Acids Res. 22:5456-5465(1994) に記載される。

#### 【0107】

タンパク質を基板に固定化するための方法はよく確立されている。固定化は、標準固定化化学を用いた、例えば、アミン化表面、カルボキシル化表面又はヒドロキシル化表面への付着により達成してよい。付着剤の例は、臭化シアン、スクシニミド、アルデヒド、塩化トシル、アビジン-ビオチン、光架橋剤、エポキシド、マレイミド及びグルタルアルデヒドである。これら及び他の付着剤並びにそれらの付着における使用方法は、Protein immobilization

n: Fundamentals and Applications, Richard F. Taylor, ed. (M. Dekker, New York, 1991), Johnstone and Torpe, Immunochimistry In Practice (Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 1987) ページ209-216及びページ241-242、及び Immobilized Affinity Ligands, Craig T. Hermanson et al., eds. (Academic Press, New York, 1992) に記載される。タンパク質は、抗体上の遊離基を基板内に存在する反応性側鎖グループへ化学的に架橋結合することにより、基板に付着させてよい。例えば、タンパク質は架橋剤としてグルタルアルデヒド又はカルボジイミドを使用して遊離のアミノ又はカルボキシル基を含む基板に化学的に架橋結合してよい。この方法においては、遊離タンパク質を含む水性溶液をグルタルアルデヒド又はカルボジイミド存在下で固相基板とインキュベートする。標準の固定化化学は当業者に知られている。

#### 【0108】

別の態様において、開示された方法の感度は、サンプル中に存在する遊離のハイブリダイズしない核酸を除去するために、ハイブリッドサンプルの繰り返しの洗浄により増加させられる。非特異的なハイブリダイズしない核酸を除去することは有用であるが、核酸中の二次構造が検出手段により認識されるかもしれず、アッセイバックグラウンドの上昇をもたらすかもしれないからである。

#### 【0109】

開示された方法を用いた使用のための好ましいハイブリダイゼーションサンプル核酸検出キットは、上記方法に要求される成分のいくつか又は全てを使用して作成されてよい。上記キットは、好ましくは、対象の核酸分子上の領域に相補な固定化プライマーを含み、そしてより好ましくは対象の核酸分子上の領域に各々相補な複数の固定化プライマーを含む。

#### 【0110】

好ましくは、キットが以下の成分の全て又はいくつかを含む：サンプルの安定

化のためのサンプル輸送培地；検出される第2生物分子に特異的な生物分子のマイクロアレイ；ハイブリダイゼーションバッファー；RNA：DNAハイブリッドに特異的な存在物（entity）；洗浄バッファー；増強バッファー；及びRNA：ハイブリッド特異的抗体を検出するのに必要な試薬。さらに、いくつかのキットはRNA：DNAハイブリッド依存性エキソヌクレアーゼ（RNase H）機能を欠く好熱性逆転写酵素を含んでよい。上記キットの別の組成物は、捕捉用配列相補領域を含む核酸プローブを含んでよい。さらに、上記キットは固相に結合した生物分子の共通配列にハイブリダイズする標識された生物分子プローブも含んでよい。キットは、限定ではないが、サンプル生物分子の検出のための生物分子のユニバーサルアレイをさらに含んでよい。キットはこれらの成分の全て又はそれらの一部を含んでよい。

#### 【0111】

増幅された抗体検出のためには、上記の直接検出のためのハイブリダイゼーションキットに含まれる試薬に加えて、全て又は一部を含む以下の試薬もキットに含んでよい：検出用に標識された抗マウスIgG；ビオチン化された抗マウスIgG；標識された抗マウスstreptavidin；ビオチン化抗streptavidin；又はアセチル化BSA溶液。

#### 【0112】

上記キットは陰性対照及び陽性対照を含むべきである。好ましくは、陰性対照及び陽性対照のためのプローブが、核酸配列を有する固相上に含まれる。

以下の非限定実施例は本アッセイ及びキットの使用を例示する。

#### 【0113】

##### 実施例

##### 実施例1

プローブマイクロアレイ上のRNA：DNAハイブリッドの検出

以下は、サンプル中の標的生物分子配列の検出のための開示された方法の一つの態様を実施するための好ましい方法の一例である。

#### 【0114】

通常、上記アッセイは0.05 µgの核酸のサンプルサイズを検出するために

使用されるのが好ましい。もっとも好ましくは、 $0.05 \mu\text{g} - 10 \mu\text{g}$ の全核酸を本発明のアッセイを用いて検出する。

#### 【0115】

標的核酸サンプルを、ヌクレアーゼを含まない水の中に懸濁し、そしてハイブリダイゼーションバッファーに加えた。ハイブリダイゼーション溶液を95 において2 - 5分間変性させた。標的核酸を含むハイブリダイゼーション溶液は、スポットされたオリゴヌクレオチドのマイクロアレイを有するガラススライドに加えた。65 において16 - 20時間ハイブリダイズさせる。直接検出するか又は増幅された検出の何れかへと続いた。

#### 【0116】

直接検出に関しては、表面に結合したプライマーのマイクロアレイを有するガラススライドを3回1 - 2分間1XPBS / 0.05% Tween 20™で洗浄し、そして回転振動機上で振動させた(1100rpm)。RNA : DNA抗体染色溶液を加えたところ、全濃度は $0.144 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ であった。ガラススライドマイクロアレイを溶液中で1時間室温において振動させながら(1100rpm)インキュベートした。ガラススライドを1XPBS / 0.05% Tween 20™で洗浄し、そして室温において15分間振動させた(1100rpm)。次に、マイクロアレイを、マウス抗体、特にCy3又はCy5に対する抗体染色溶液中で室温においてインキュベートし、そして1時間1100rpmにて振動させた。多数の蛍光染料を使用してよく、限定ではないが、例えばCy3又はCy5である。Cy - 染料の最終濃度は10%ヤギ血清及び1XPBS / 0.05 Tween 20™の溶液中で $0.04 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ であった。わずかに厳密な手段を使用して、スライドを4回約各々10秒間洗浄バッファー中で洗浄した。次に、スライドを増強バッファー中で53 において15分間インキュベートした。次に、スライドを洗浄バッファー中で4回各々約10秒間、ゆるい厳密性手段を用いて洗浄した。スライドガラスに結合したマイクロアレイを遠心分離により2000rpmにて7 - 10分間によるか又は乾燥するまで、乾燥させた。結果は、アレイスキャナー(Affymetrix 417 Array Scanner又は均等物)中で、それぞれCy3及びCy5で標識された抗体によ

り発色したスライドをスキャンするための532 nm及び635 nmにおける光励起によりスライドを読むことにより、分析した。

#### 【0117】

増幅された検出に関しては、スライドを3回1 - 2分間1 X P B S / 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 ™中で洗浄し、回転振動機上で1100 rpmにて振動させた。スライドをRNA : DNAハイブリッド特異的抗体染色溶液中で室温において1時間攪拌(1100 rpm)しながらインキュベートした。スポットしたスライドはヤギ染色溶液からのビオチン化マウスI g G抗体で被覆し、そして10分間室温においてインキュベートした。マイクロアレイを2回1 - 2分間それぞれ1 X P B S / 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 ™中で洗浄した。スポットしたスライドはヤギ抗マウスR - フィコエリトリンストレプトアビジン(0 . 0 1 μ g / μ l ; S A - P E ) 染色溶液で被覆し、10分間室温においてインキュベートした。洗浄は上記のとおり繰り返した。スポットしたスライドはストレプトアビジンに対して出現させたビオチン化ヤギ抗体(0 . 5 m g / m L ) 染色溶液で被覆し、そして10分間室温においてインキュベートした。スライドを再びヤギ抗マウスR - フィコエリトリンストレプトアビジン(0 . 0 1 μ g / μ l ; S A - P E ) 染色溶液と共に10分間室温においてインキュベートした。次に、スライドを3回1 - 2分間1 X P B S / 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 ™中で洗浄した。次に、マイクロアレイを2000 rpmにおける7 - 10分間の遠心分離によるか、又は乾燥するまで、乾燥させた。結果は、アレイスキャナー(A f f y m e t r i x 4 1 7 A r r a y S c a n n e r 又は均等物)中で、それぞれC y 3又はP E 及びC y 5で標識された抗体により発色したスライドをスキャンするための532 nm及び635 nmにおける光励起によりスライドを読むことにより、分析した。

#### 【0118】

### 実施例2

#### サンプルハイブリダイゼーション前の

#### 標識されたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション

C y 3 又はC y 5 で標識された n - マーのオリゴヌクレオチドを、S S C 及び

SDSを含むハイブリダイゼーションバッファーに加え、そして95℃にて2-5分間変性させた。多くの蛍光染料を使用してよく、限定ではないが、例えばCy3及びCy5である。多数の蛍光染料を使用してよく、限定ではないが、例えばCy3又はCy5である。スポットされたオリゴヌクレオチドを含むガラススライドをハイブリダイゼーション溶液で被覆し、そして室温において20秒間インキュベートした。カバースリップを2XSSC/0.2%SDSの厳しい浸潤により除去した。如何なる残余のSDSもスライドを0.05XSSCへ30分間浸潤することにより洗い流された。次に、スライドを2000rpmにて7-10分間の遠心分離によるか又は乾燥するまで、乾燥させた。結果は、アレイスキャナー(Affymetrix 417 Array Scanner又は同等物)中で、それぞれCy3及びCy5で標識された抗体により発色したスライドをスキャンするための532nm及び635nmにおける光励起によりスライドを読むことにより、分析した。

#### 【0119】

### 実施例3

RNAseH機能を欠く逆転写酵素により媒介されるRNAの検出

以下は、サンプル中の標的核酸配列の検出のための開示された方法のひとつの態様を実施する方法の一例である。

#### 【0120】

5プライムのビオチン化された20から30ヌクレオチドプライマーを、ストレプトアビジンコートされた固相と混合し、そして30から60分間20-27℃において一定振動(1100rpm)にてインキュベートした。標的核酸のサンプルを上記固相に加えた。ハイブリダイゼーション/伸長バッファー(100mM Tris-HCl, pH8.3, 150mM KCl, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM DTT, 及び1mMの各dNTP)を次に加えた。標的核酸及びプライマーは該混合物を最適なアニーリング温度まで、好ましくは60℃にて(最適アニーリング温度は利用したプライマー及び核酸により変化する)20-30分間加熱することにより、アニールさせた。上記混合物を、次に、20-27℃にて10分間冷却した。追加のハイブリダイゼーション/伸長バッファー及び逆

転写酵素、好ましくは高温安定性であってRNAse Hを欠く逆転写酵素を加えた。反応物を30 - 60分間42 °Cにおいてインキュベートした。EDTA (0.5 M)を加え、そして37 °Cにおいて30分間インキュベートした。RNA : DNAハイブリッド特異的アルカリホスファターゼ配合抗体混合物を加え、そして20 - 27 °Cにおいて30 - 60分間インキュベートした。あらゆる未結合の抗体を洗い去り、次に化学発色基板を添加した。溶液を15 - 30分間20 - 27 °Cにおいてインキュベートした。放射されたシグナルをルミノメーターで適切な波長にて読んだ。

【0121】

#### 実施例4

##### RNA : DNAハイブリッド特異的抗体の結合

ハイブリダイズしたRNA : DNAサンプルを抗体と共に上記ハイブリッドの配合を許容するのに十分な時間インキュベートした。該ハイブリッドは5分から24時間15 °Cから65 °Cにおいてプラットフォーム振動機上で0から1500 rpmのスピードにおけるインキュベーションにより抗体に結合させた。好ましくは、インキュベーション時間が30分から120分間であって、20から40 °Cにおいて300から1200 rpmのスピードであった。もっとも好ましくは、結合が約300から1000 rpmの間の回転振動スピードにて1時間の室温における激しい振動のインキュベーションにより起こった。当業者には、インキュベーション時間、温度及び振動を変更することにより所望な別の捕捉動力学を達成してよい。

【0122】

#### 実施例5

##### モノクローナル及びポリクローナル抗体により検出された

##### オリゴヌクレオチドの長さの比較

長さを変えた単一のオリゴヌクレオチドを10の複製物にて4つの異なる濃度においてスポットした。スポットされた72マーのオリゴヌクレオチドは、40Sリボソーマルタンパク質S11に相当するIMAGEクローン#259983の一部であった。より短いオリゴヌクレオチドは親の72マーの連続的な末端除

去物であった。これらのマイクロアレイを濃度を変えた相補RNAにハイブリダイズさせ、そしてモノクローナル一次RNA：DNAハイブリッド抗体を用いて可視化させた。800 pMの標的濃度において、実質的なシグナルが30塩基のオリゴヌクレオチドにおいて観察されたが、25塩基においてシグナルの急降下があった。図6Aは、RNA：DNAハイブリッド特異的モノクローナル抗体検出に際しての様々なスポットされたオリゴヌクレオチド濃度を用いた800 pMのRNA濃度におけるオリゴヌクレオチドの函数としてのノイズ比に対するシグナルの結果を示す。

#### 【0123】

ポリクローナル抗体検出プロトコルは、モノクローナル抗体に関しての上記プロトコルと同じであって、ウサギからのCy3-標識ヤギ二次抗体を、ヤギからのマウス抗体に変えたのが例外であった。ポリクローナルを用いた結果(図6B)は、30塩基未満のオリゴヌクレオチドに関するモノクローナル抗体に比較しての、顕著に改善された検出を示した。30塩基を越えるオリゴヌクレオチドに関してはシグナルにおける顕著な差異はなかった。

#### 【0124】

ポリクローナルRNA：DNA抗体は、モノクローナル抗体を用いた検出に比較して30塩基対未満のRNA：DNAハイブリッドを検出するのに顕著に感度の良い方法を提供した。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1A-Dは、マイクロアレイ上のRNA：DNAハイブリッドの免疫抗体検出の好ましい態様ノイズ模式的代表図である。図1Aは、図1Bに描かれたRNA：DNAハイブリッドを形成するマイクロアレイに付着させた相補DNA配列へのRNAサンプルのハイブリダイゼーションを示す。次に、抗体、モノクローナル又はポリクローナル、を図1Cに示すとおりRNA：DNAハイブリッドに結合させる。図1Dは蛍光レーザーキャナーを用いた蛍光標識の検出を例示する。

##### 【図2】

図2A-Dは、RNA:DNAハイブリッドの、ユニバーサル捕捉配列を含むマイクロアレイ上の免疫検出の第2の態様の模式的代表図である。図2Aは、ユニバーサルアレイの一本鎖DNAとサンプルRNAとのハイブリダイゼーションを示す。各ハイブリッドはDNA:DNA領域及びRNA:DNA領域を含むマイクロアレイ上に形成され、図2Bに描写したとおりである。抗体は図2CにおいてRNA:DNAハイブリッドを検出及び結合する。図2Dは蛍光レーザーキャナーを用いた蛍光抗体標識を含む検出の一つの手段を例示する。

### 【図3】

図3A-Eは、RNA:DNAハイブリッドの免疫検出の第3の態様の模式的代表図であって、但し、マイクロアレイは完全長配列が未知である場合のmRNAの定量のための発現された配列タグ(ESTs)を含む。図3Aは、マイクロアレイに結合した短いESTsへのサンプルRNAのハイブリダイゼーションを示す。RNAと短いDNAのハイブリッドの形成を図3Bに描写する。例えば逆転写酵素(RT)を使用して、図3Cに描写するように、DNAをRNAの完全長まで伸長合成する。図3D及び図3Eは、それぞれ、RNA:DNAハイブリッドの抗体認識及びレーザーキャナーによる蛍光抗体標識の検出を例示する。

### 【図4】

図4A-Dは、RNA:DNAハイブリッドの免疫検出の第4の態様の模式的代表図であって、但し、発明は2色検出法に向けられる。図4Aは、同一配列の領域及び可変配列の領域を含むマイクロアレイに結合した各DNAプローブを示す。標識されたDNAは共通配列とハイブリダイズし、そしてRNAサンプルは可変配列とハイブリダイズする。RNA:DNAハイブリッド及びDNA:標識されたDNAハイブリッドが形成され、図4Bに例示するとおりである。RNA:DNAハイブリッドに対して出現させた抗体は適切な領域に結合し；マイクロアレイは2つの異なる色の蛍光レーザーによりスキャンし；そしてシグナルは図4C-4Dに示すとおりに標準化される。

### 【図5】

図5A-Dは、RNA:DNAハイブリッドの免疫検出の第4の態様の模式的代表図であって、但し、発明は標識された縮重n-マーDNA及びサンプルRN

Aを含む。図5Aは、RNAサンプル及び/又は標識された縮重DNAに同時又は逐次的にハイブリダイズさせたマイクロアレイに結合させた各DNAプローブを示す。RNA：DNAハイブリッド及び/又はDNA：標識DNAハイブリッドが形成され、図5Bに示されるとおりである。RNA：DNAハイブリッドに対して出現させた抗体は適切な領域に結合し；マイクロアレイは2つの異なる色の蛍光レーザーによりスキャンし；そしてシグナルは図5C - 5Dに示すとおりに標準化される。

【図6】

図6A - Bは、マイクロアレイのノイズ比に対するシグナルの函数として、モノクローナル抗体（図6A）及びポリクローナル抗体（図6B）による検出を用いた固相结合オリゴヌクレオチド長さの比較を表すグラフである。

【図1A】

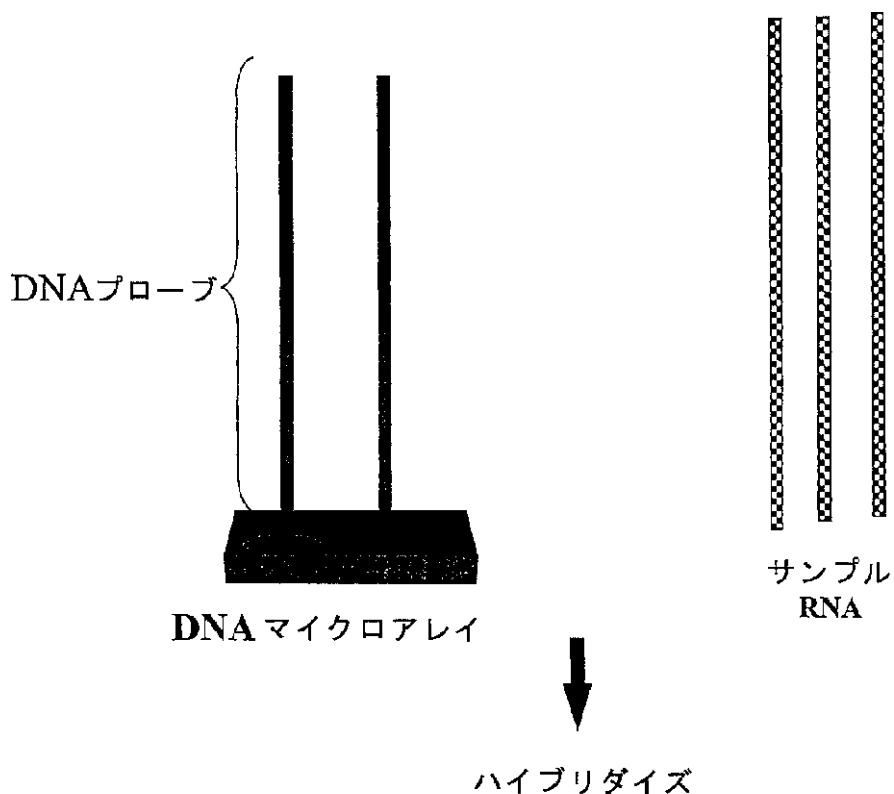


Figure 1A

【図1B】

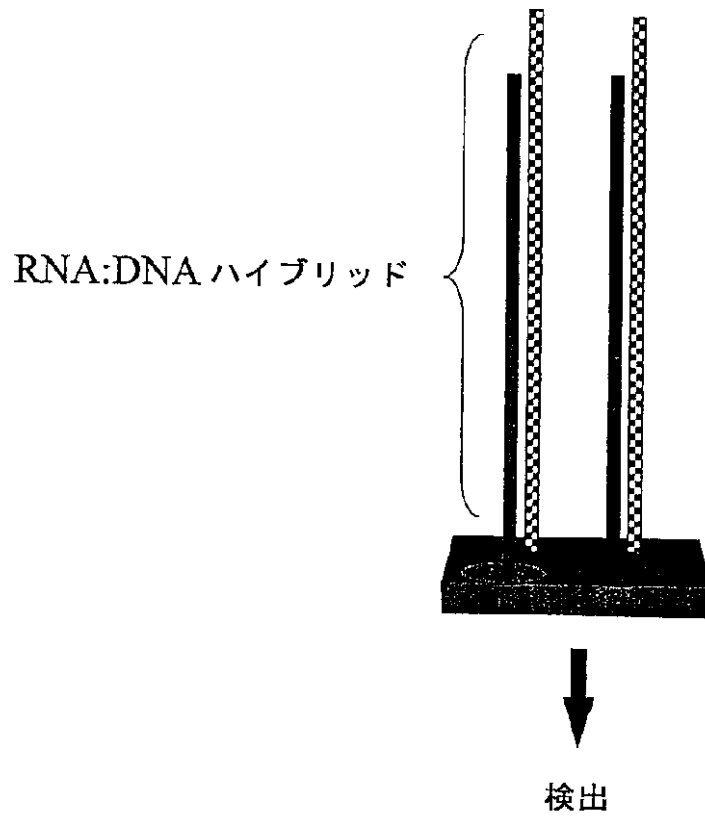
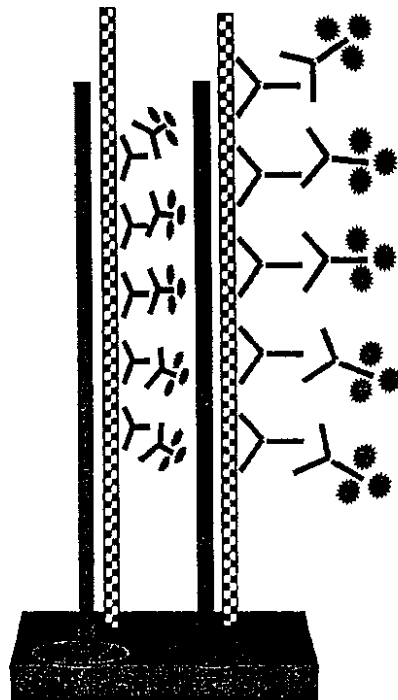


Figure 1B

【図1C】



スキャン

Figure 1C

【図1D】

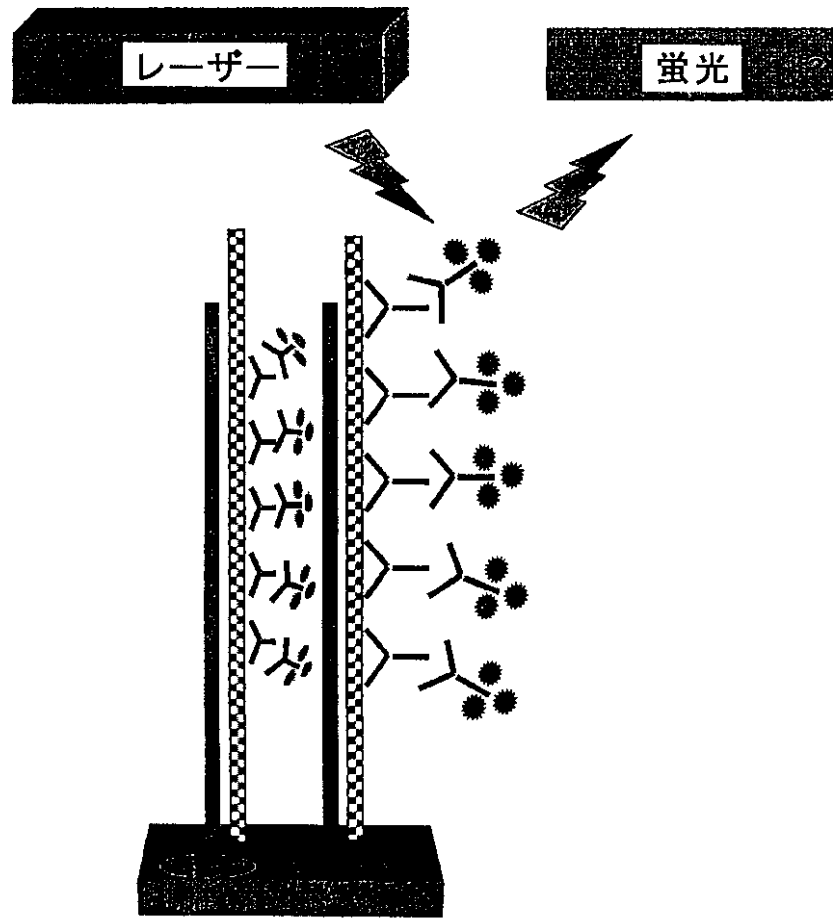


Figure 1D

【図2A】

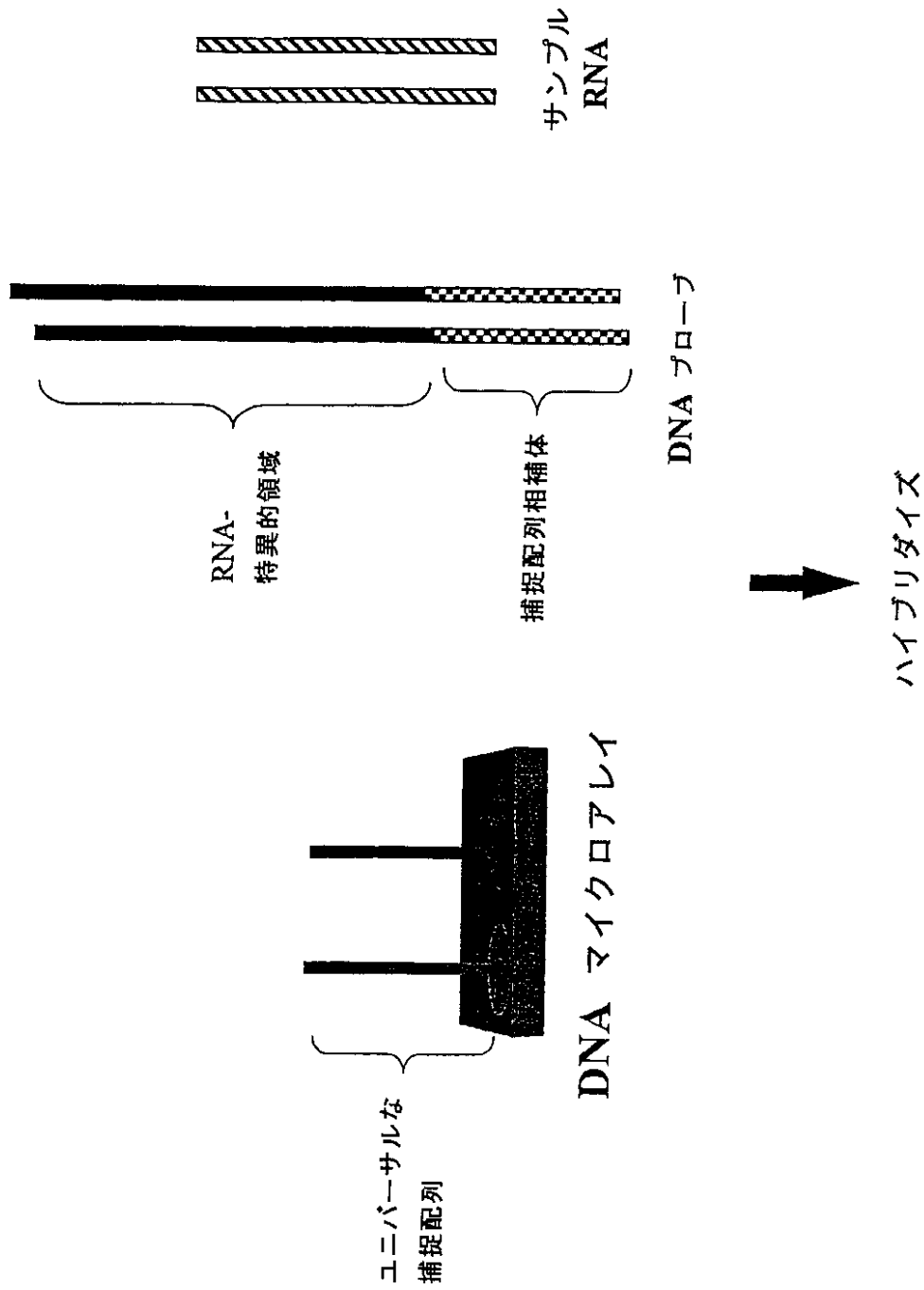


Figure 2A

【図2B】

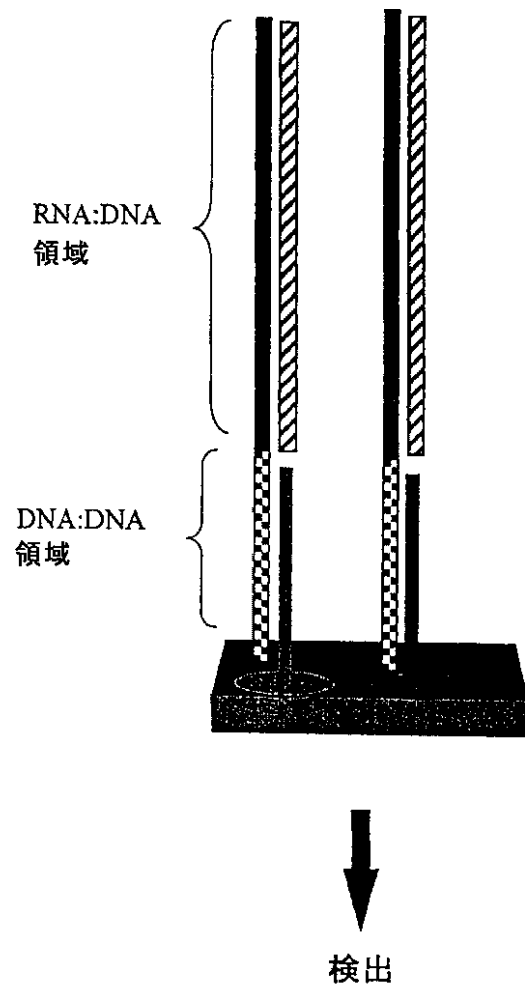
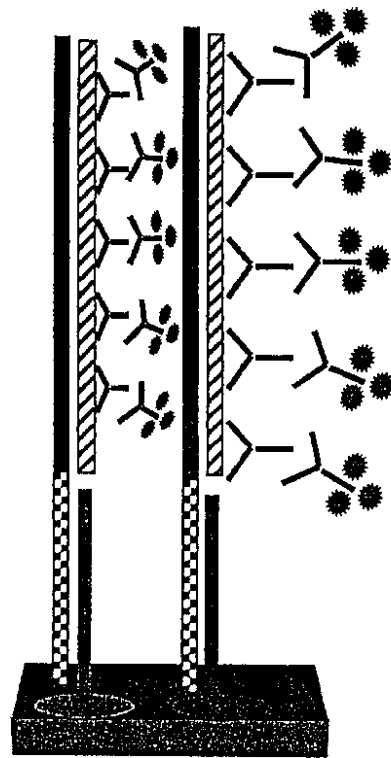


Figure 2B

【図2C】



スキャン

Figure 2C

【図2D】

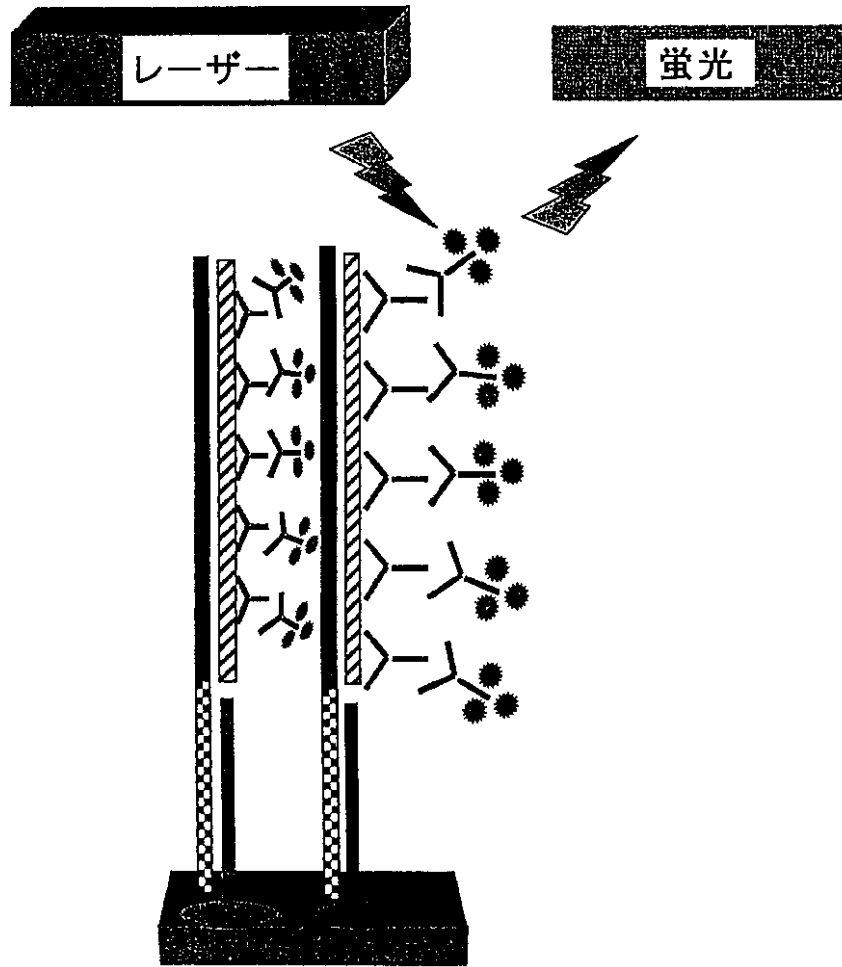


Figure 2D

【図3A】

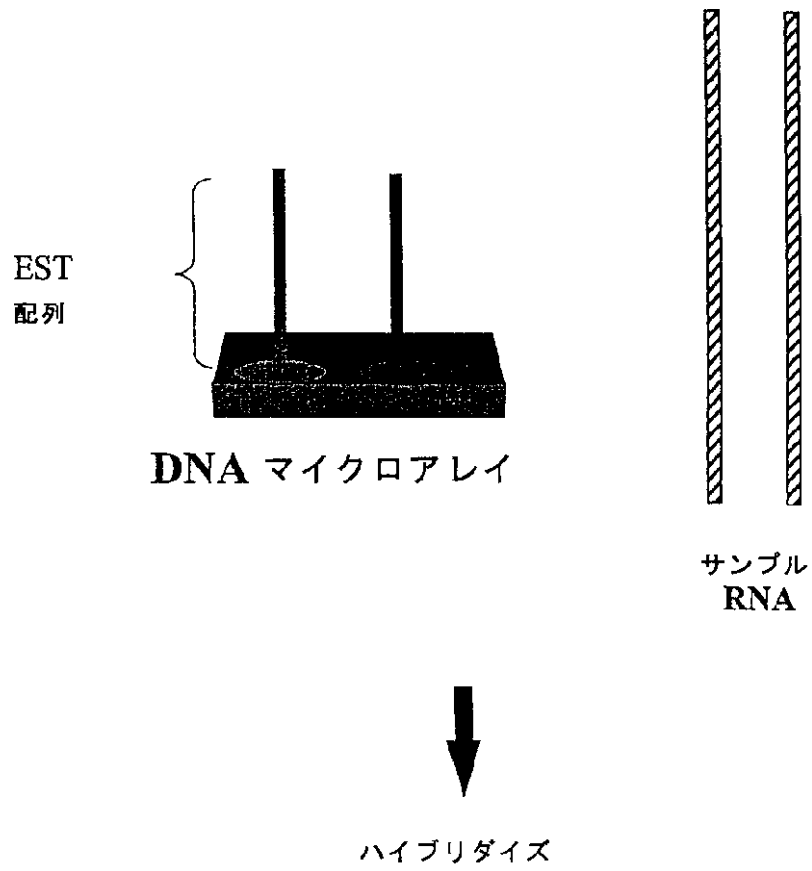


Figure 3A

【図3B】

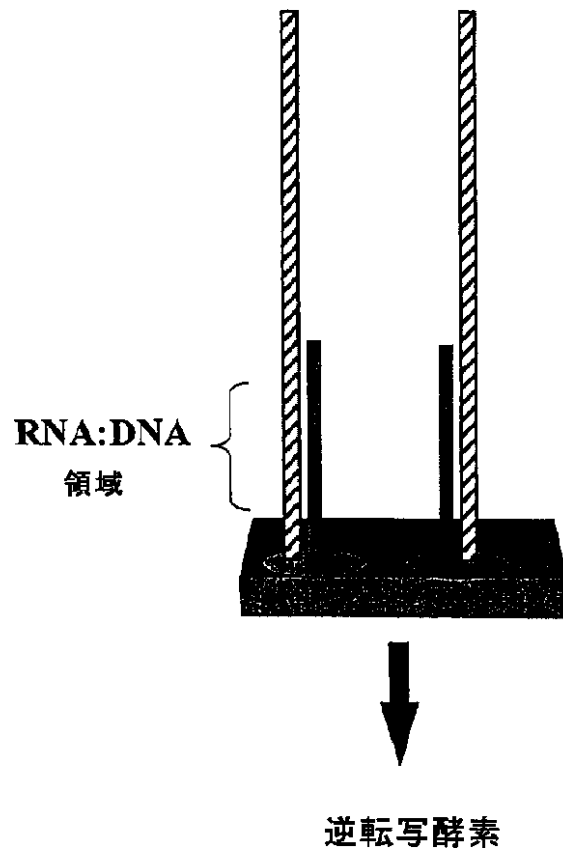


Figure 3B

【図3C】

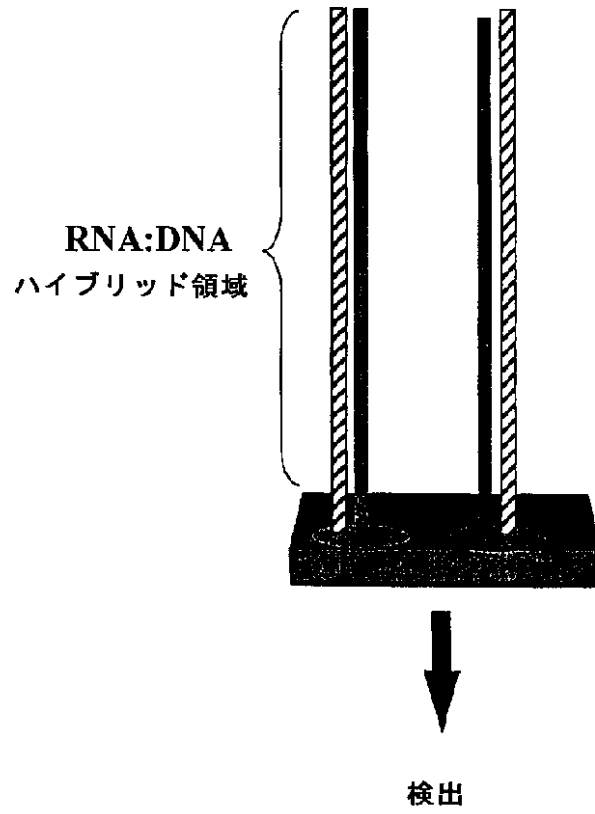


Figure 3C

【図3D】

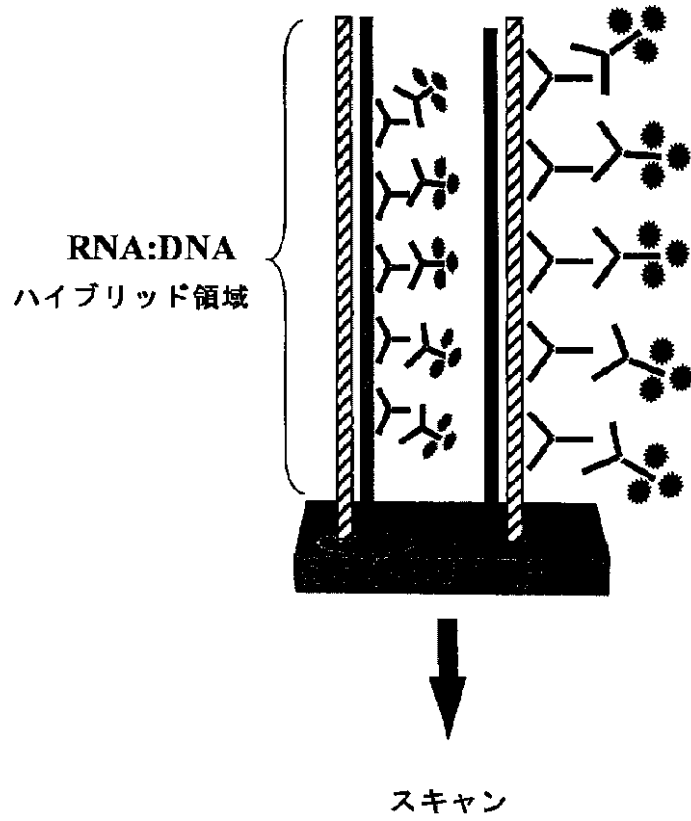


Figure 3D

【図3E】

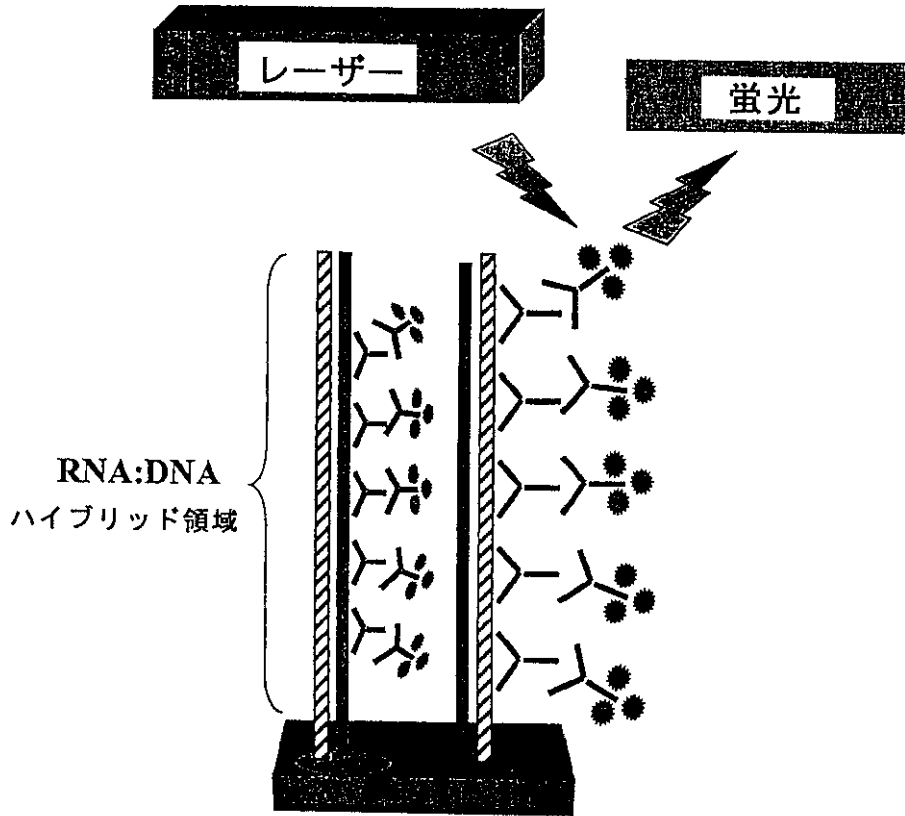
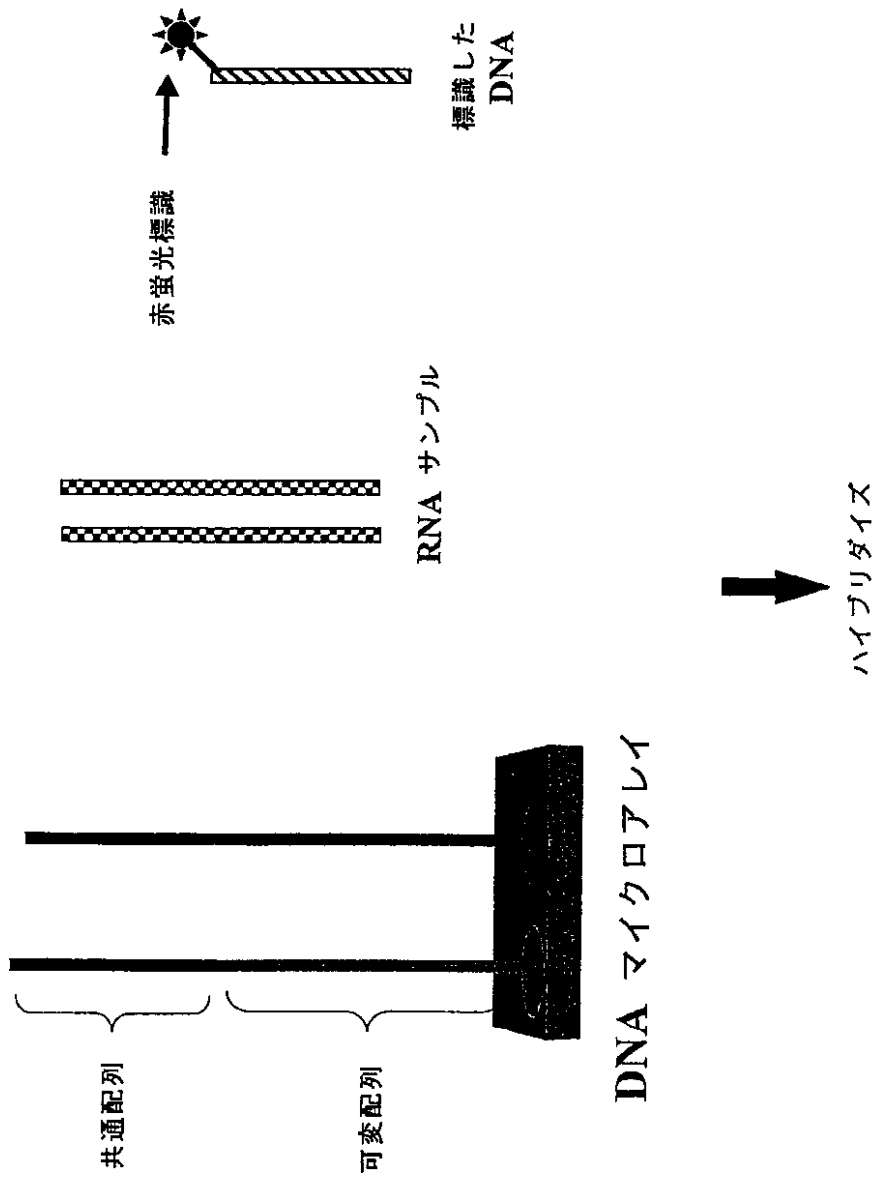


Figure 3E

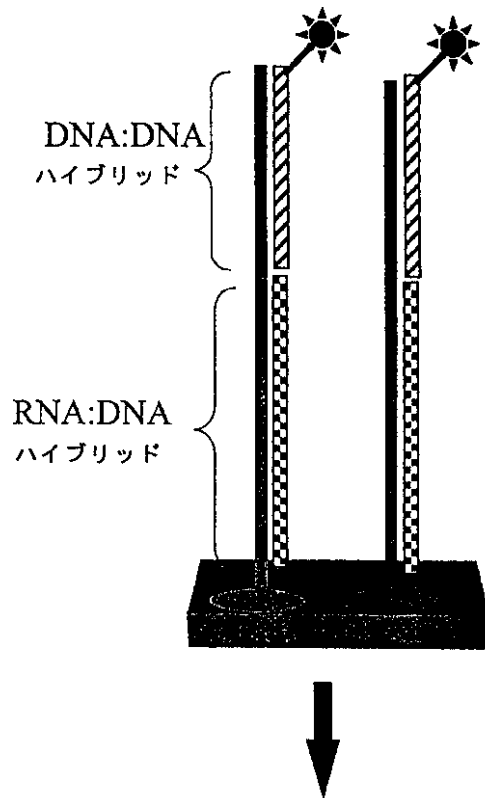
【図4A】



ハイブリダイズ  
(ハイブリダイゼーションはDNA配列の長さ依存して  
同時又は連続であってよい)

Figure 4A

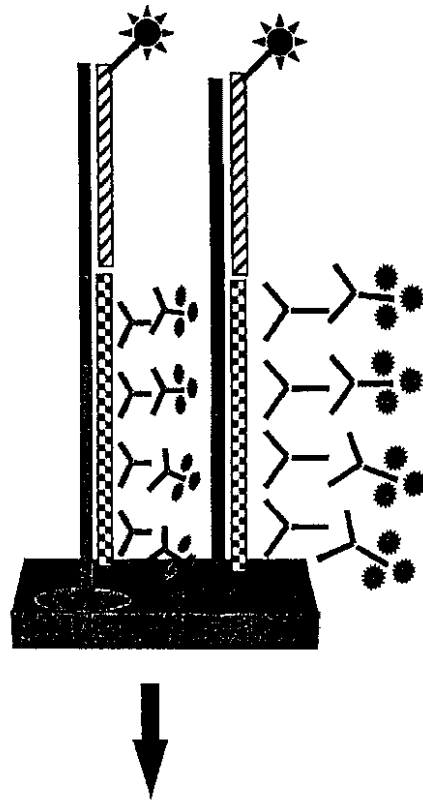
【図4B】



抗RNA:DNA抗体による検出

Figure 4B

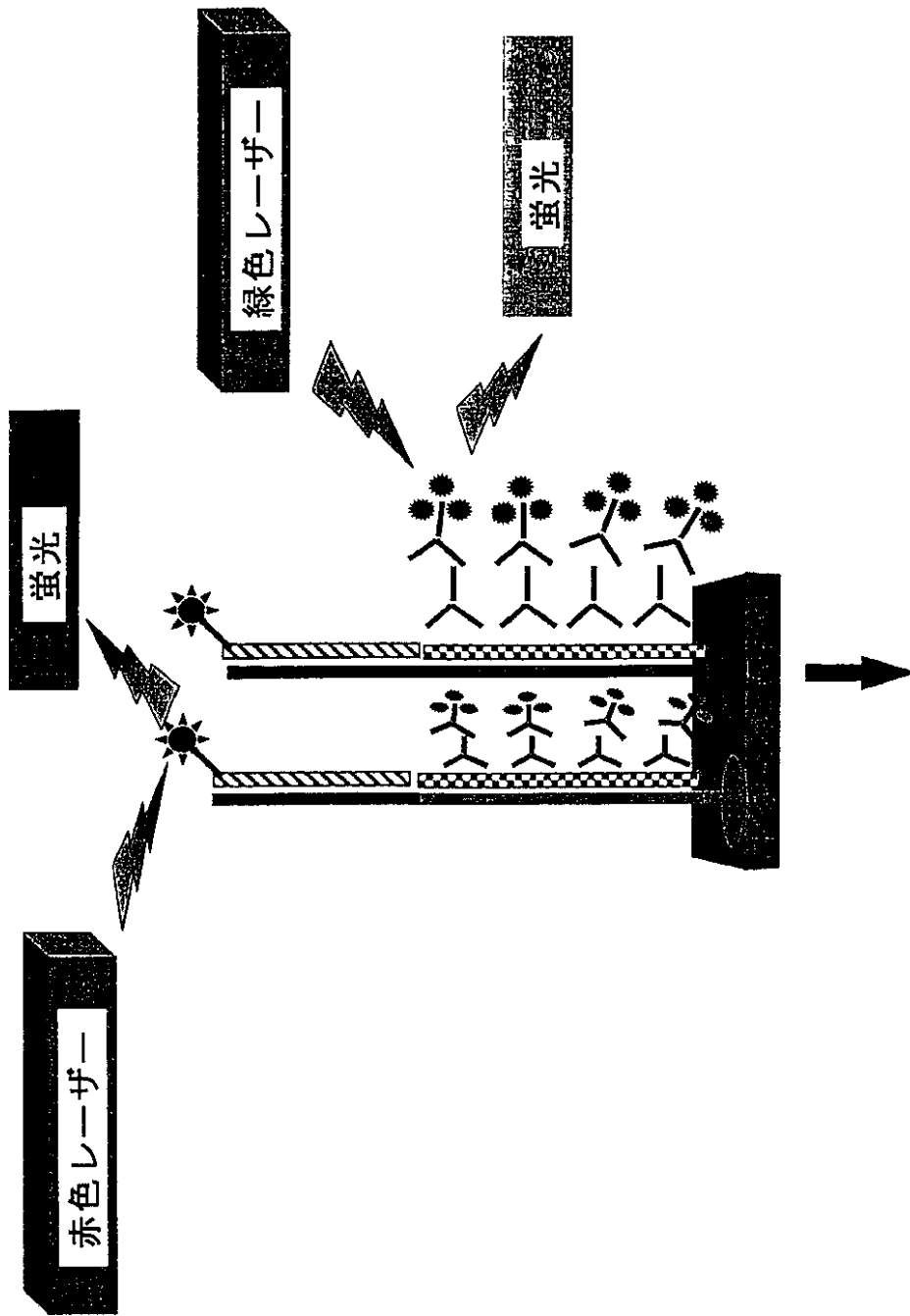
【図4C】



赤および緑のレーザーによるスキャン

Figure 4C

【図4D】



DNAからのシグナル(赤)によりRNAからのシグナル(緑)を標準化する

Figure 4D

【図5A】

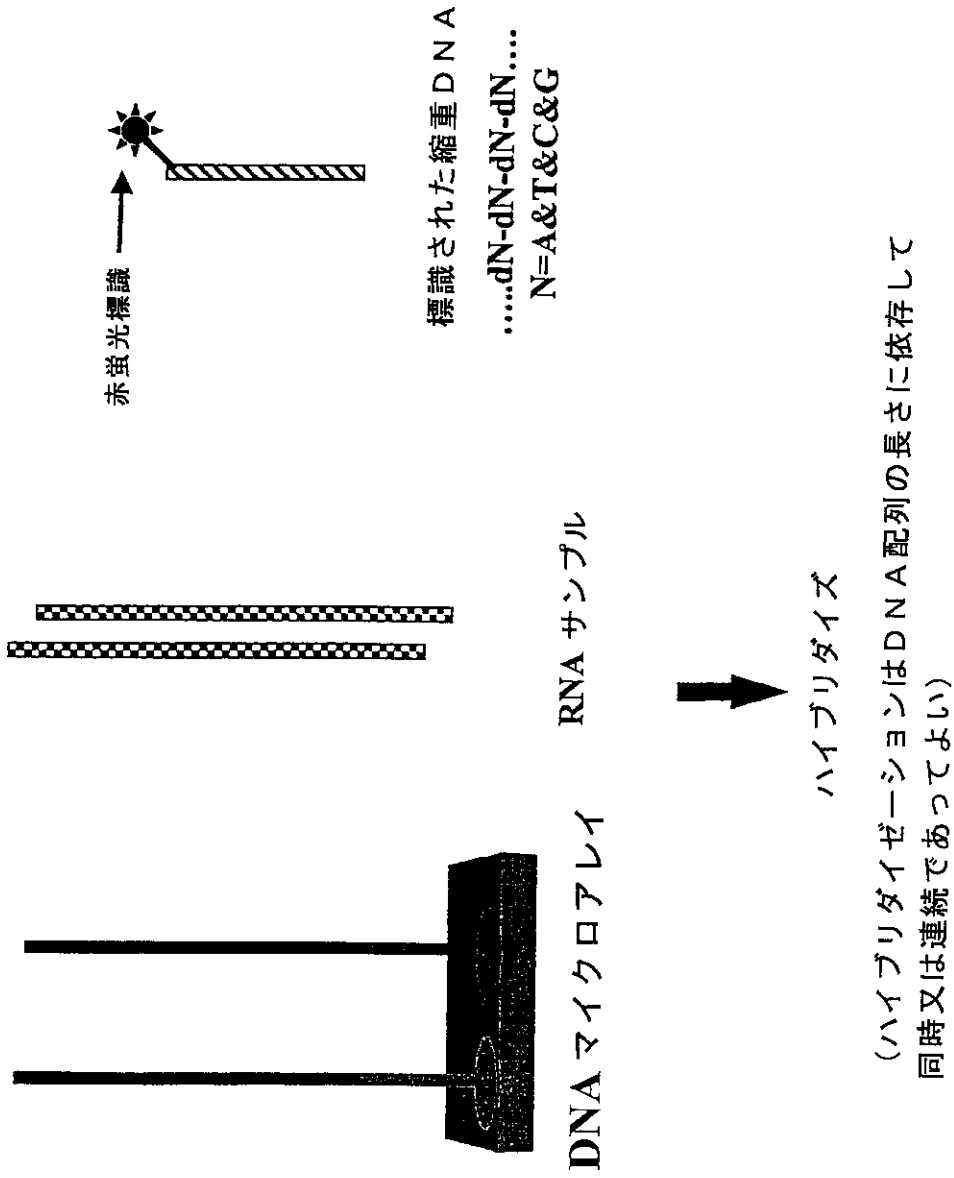
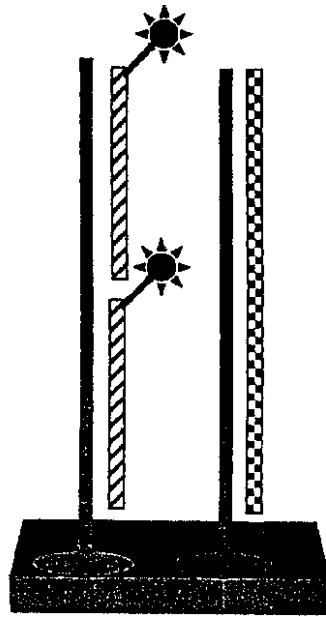


Figure 5A

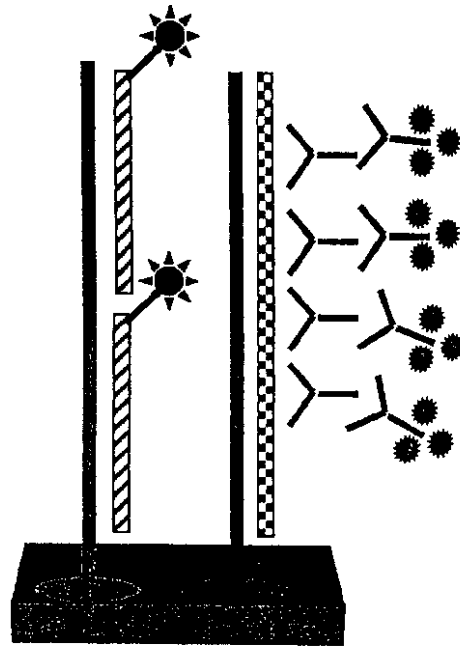
【図5B】



抗RNA : DNA抗体による検出

Figure 5B

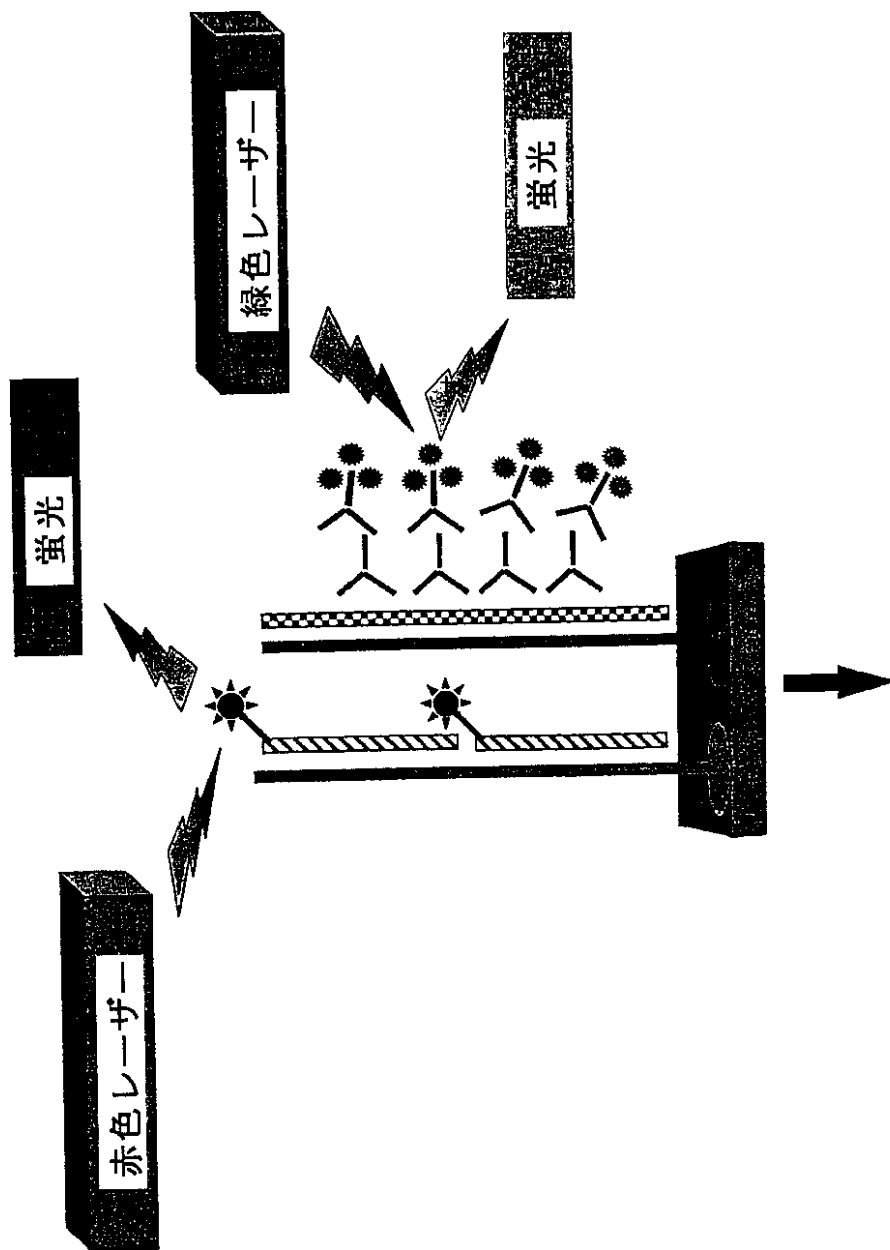
【図5C】



赤および緑のレーザーによるスキャン

Figure 5C

【図5D】



DNAからのシグナル(赤)によりRNAからのシグナル(緑)を標準化する

Figure 5D

【図6A】

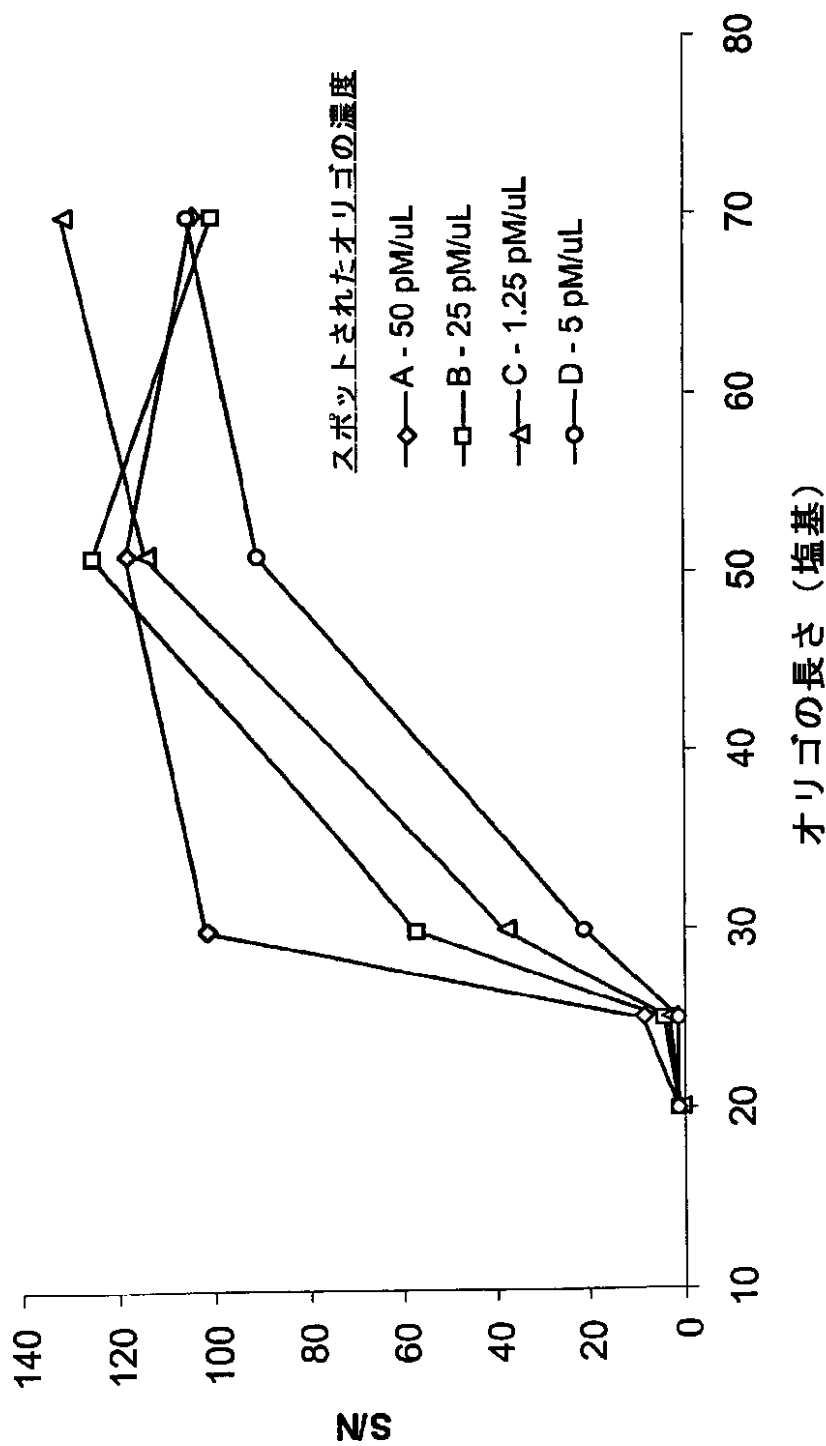


Figure 6A

【図6B】

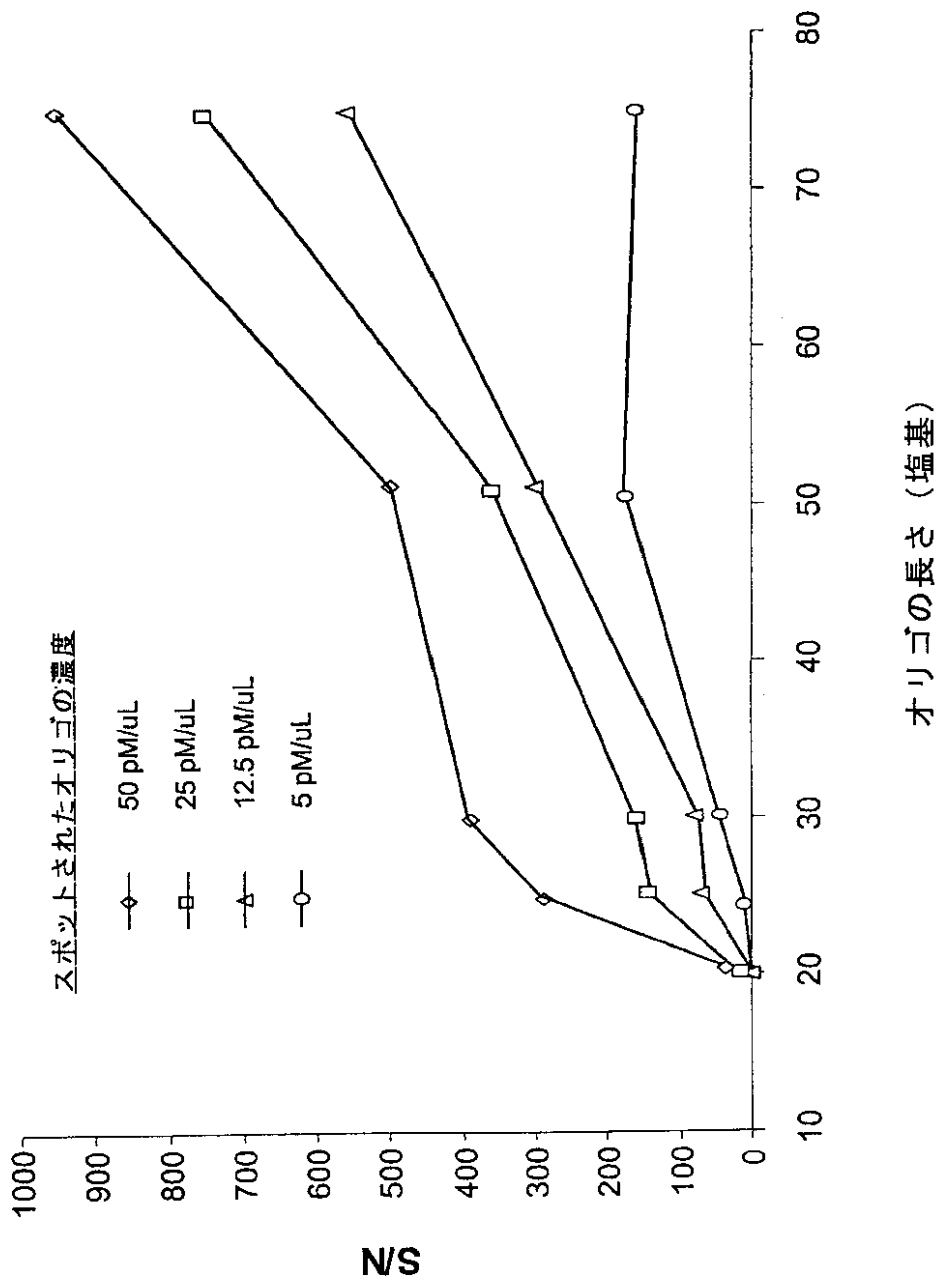


Figure 6B

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/31277
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N33/543		
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) IPC 7 C12Q		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 40224 A (DIGENE CORP) 12 August 1999 (1999-08-12) page 5-7 page 10 page 24-25 page 27, line 18 -page 30, line 5; claims	1-34, 38-48
X	WO 99 29909 A (DIGENE CORP) 17 June 1999 (1999-06-17)  page 5, line 16 -page 6 page 15-18; claims; example 1	1-16, 26-33, 38-47
X	WO 93 10263 A (DGI INC) 27 May 1993 (1993-05-27)  page 11-21 page 25; claims; figure 4; example 4	1-16, 26-33, 38-47
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *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		*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 *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 *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. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  15 August 2001		Date of mailing of the international search report  22/08/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo.nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Reuter, U

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/31277
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 288 737 A (MILES INC) 2 November 1988 (1988-11-02) page 9-11 page 22; claims ---	1-6, 8-14,16
X	US 4 732 847 A (STUART W DORSEY ET AL) 22 March 1988 (1988-03-22) cited in the application abstract column 3-4 ---	1-6, 8-14,16
A	WO 99 36571 A (BERNAUER HUBERT S ;BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH (DE); KLAPPROTH HOLGE) 22 July 1999 (1999-07-22) abstract; claim 12 page 10, paragraph 2 ---	1-48
A	WO 97 31256 A (BLOK HERMAN ;BARANY GEORGE (US); KEMPE MARIA (US); ZIRVI MONIB (US) 28 August 1997 (1997-08-28) page 6 page 10-11; claims; figure 13 ---	1-48
A	WO 99 32654 A (HITACHI CHEMICAL CO LTD ;MITSUHASHI MASATO (US); HITACHI CHEMICAL) 1 July 1999 (1999-07-01) the whole document ---	1-48
A	WO 99 39001 A (AMERSHAM PHARM BIOTECH AB ;ULFENDAHL PER JOHAN (SE)) 5 August 1999 (1999-08-05) the whole document ---	1-48
P,X	WO 00 60116 A (TROIPIX INC) 12 October 2000 (2000-10-12) the whole document -----	1-6, 8-14,16

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/31277

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9940224 A	12-08-1999	US 5994079 A	30-11-1999
		AU 2581199 A	23-08-1999
		EP 1053354 A	22-11-2000
WO 9929909 A	17-06-1999	US 6225053 B	01-05-2001
		AU 1819899 A	28-06-1999
		EP 1038036 A	27-09-2000
WO 9310263 A	27-05-1993	AT 189831 T	15-03-2000
		AU 673813 B	28-11-1996
		AU 3068992 A	15-06-1993
		DE 69230693 D	23-03-2000
		DE 69230693 T	15-06-2000
		DK 667918 T	05-06-2000
		EP 0667918 A	23-08-1995
		ES 2145750 T	16-07-2000
		FI 942239 A	06-07-1994
		GR 3033345 T	29-09-2000
		JP 7505759 T	29-06-1995
		JP 3091492 B	25-09-2000
		EP 0288737 A	02-11-1988
AU 1400588 A	06-10-1988		
DK 173888 A	02-10-1988		
FI 881497 A	02-10-1988		
JP 63270000 A	08-11-1988		
NO 881203 A	03-10-1988		
ZA 8801685 A	07-09-1988		
US 4732847 A	22-03-1988	US 4865980 A	12-09-1989
WO 9936571 A	22-07-1999	EP 1047794 A	02-11-2000
WO 9731256 A	28-08-1997	AU 735440 B	05-07-2001
		AU 2799797 A	10-09-1997
		CA 2244891 A	28-08-1997
		EP 0920440 A	09-06-1999
WO 9932654 A	01-07-1999	EP 1042497 A	11-10-2000
WO 9939001 A	05-08-1999	AU 3027699 A	16-08-1999
		EP 1051523 A	15-11-2000
WO 0060116 A	12-10-2000	AU 4051300 A	23-10-2000

## フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), AU, BR, CA, JP

(72)発明者 ストレインジ, クリスティーナ・エム  
アメリカ合衆国メリーランド州20874, ジ  
ャーマンタウン ピナクル ドクター  
303 12935

(72)発明者 ウィリアムズ, インナ・アール  
アメリカ合衆国メリーランド州20850, ロ  
ックヴィル, カー・アベニュー 504

(72)発明者 ロリンクツ, アッティラ・ティー  
アメリカ合衆国メリーランド州20878, ノ  
ース・ポトマック, チャイナ・ベリー・コ  
ート 6

Fターム(参考) 2G042 AA01 BD19 CA10 CB03 FB05  
HA02  
4B024 AA11 BA42 BA58 CA04 CA11  
HA08 HA15

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003528295A5</a>	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2001538558	申请日	2000-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	模因基因公司		
申请(专利权)人(译)	Digene公司		
当前申请(专利权)人(译)	Digene公司		
[标]发明人	ラザージェイムズジー ザケルジョアンエム ストレインジクリスティーナエム ウィリアムズインナール ロリンクツアッティラティー		
发明人	ラザー,ジェイムズ・ジー ザケル,ジョアン・エム ストレインジ,クリスティーナ・エム ウィリアムズ,インナ・アール ロリンクツ,アッティラ・ティー		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/577 G01N37/00 C12N15/09 G01N31/22 G01N33/543 C12Q1/68 C12N G01N33/53 G01N C12N15/11		
CPC分类号	C12Q1/6837 C12Q1/6804		
FI分类号	G01N33/53.M G01N31/22.121.P G01N33/577.A G01N37/00.102 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	2G042/AA01 2G042/BD19 2G042/CA10 2G042/CB03 2G042/FB05 2G042/HA02 4B024/AA11 4B024/BA42 4B024/BA58 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/HA08 4B024/HA15		
优先权	09/440419 1999-11-15 US 09/707178 2000-11-06 US		
其他公开文献	JP4873812B2 JP2003528295A		

#### 摘要(译)

本发明提供了用于检测和测量生物分子的杂交方法和试剂盒。