

(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2015-529076

(P2015-529076A)

(43) 公表日 平成27年10月5日(2015.10.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 3
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 D	4 B O 6 3
G01N 33/542 (2006.01)	G01N 33/53 M	
G01N 21/64 (2006.01)	G01N 33/542 A	
C12Q 1/02 (2006.01)	G01N 21/64 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-530453 (P2015-530453)
 (86) (22) 出願日 平成25年9月11日 (2013. 9. 11)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年4月24日 (2015. 4. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/068824
 (87) 国際公開番号 WO2014/041024
 (87) 国際公開日 平成26年3月20日 (2014. 3. 20)
 (31) 優先権主張番号 PA201270555
 (32) 優先日 平成24年9月11日 (2012. 9. 11)
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(71) 出願人 515064836
 ユニセンス ダイアグノスティクス エー
 ビーエス
 デンマーク国 ディーコー ー 8 2 0 0 オ
 ーフス エン, トゥーウアガ 1
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74) 代理人 230113332
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 鎖置換交換反応を使用する非核酸分析物の検出

(57) 【要約】

本発明は、DNAおよびRNAとは異なる分析物を検出するための分析物検出システムに関する。前記システムは、互いに特異的にハイブリダイズし得る1セットのオリゴヌクレオチドを含み、その特異的ハイブリダイゼーションに基づいてシグナルを発生させることができる。前記システムは、シグナルの変化をもたらす、分析物(単数または複数)の存在下での前記オリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーション平衡の変化に依存する。一局面において、本発明は、DNAおよびRNAとは異なる分析物を検出するための分析物検出システムを提供し、ここで上記システムは、少なくとも第一のオリゴヌクレオチドA、第二のオリゴヌクレオチドBおよび第三のオリゴヌクレオチドSを含む。

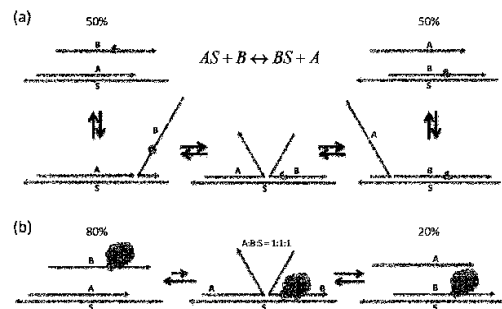


Fig. 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

DNA および RNA とは異なる分析物を検出するための分析物検出システムであって、前記システムは、少なくとも第一のオリゴヌクレオチド A、第二のオリゴヌクレオチド B および第三のオリゴヌクレオチド S を含み、

オリゴヌクレオチド A および B の各々が、オリゴヌクレオチド S 上の配列に相補的または部分的に相補的である配列を含み、かつオリゴヌクレオチド A および B が、動的平衡でオリゴヌクレオチド S へのハイブリダイゼーションについて競合し、かつ場合により、オリゴヌクレオチド A および B の少なくとも一方が、DNA および RNA とは異なる分析物と相互作用することができる共有結合で連結されている結合部分を含み；ならびに

10

オリゴヌクレオチド A および B の少なくとも一方、または前記オリゴヌクレオチドに結合された共有結合で連結されている結合部分が、DNA および RNA とは異なる分析物と相互作用することができ、前記分析物と前記オリゴヌクレオチドまたは結合部分との相互作用が、結果としてハイブリダイゼーション平衡をシフトさせることになり、平衡における前記シフトが検出可能なシグナルをもたらす、分析物検出システム。

【請求項 2】

前記オリゴヌクレオチドが、別々のヌクレオチド鎖上にある、請求項 1 に記載の分析物検出システム。

【請求項 3】

前記オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも 2 つが、共有結合によって部分的にまたは完全に接続されている、請求項 1 に記載の分析物検出システム。

20

【請求項 4】

オリゴヌクレオチド S が、1 つより多くのハイブリダイゼーションドメインを含み、場合により、2 つ以上のハイブリダイゼーションドメインが別々のヌクレオチド鎖上に位置する、請求項 1 に記載の分析物検出システム。

【請求項 5】

第一のオリゴヌクレオチド (1)、第二のオリゴヌクレオチド (3) および第三のオリゴヌクレオチド (5) を含む、請求項 1 に記載の分析物検出システムであって、ここで

前記第一のオリゴヌクレオチドまたは前記第二のオリゴヌクレオチドが、シグナル伝達システムの第一の部分を形成する第一の基 (2) を含み；

30

前記第三のヌクレオチドが、前記シグナル伝達システムの第二の部分を形成する第二の基 (6) を含み；

共有結合で連結されている少なくとも 1 つの結合部分 (4) が、前記第一のオリゴヌクレオチドまたは前記第二のオリゴヌクレオチド上に位置し；

前記第一のオリゴヌクレオチドまたは前記第二のオリゴヌクレオチドと前記第三のオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションが、前記第一のオリゴヌクレオチドまたは前記第二のオリゴヌクレオチドと前記第三のオリゴヌクレオチドとがハイブリダイズされないときとは異なるシグナルを発生させるか、またはシグナルの発生を触媒することができ；かつ

前記分析物の存在が、前記検出システムの前記ハイブリダイゼーション平衡を変化させ、その結果、シグナルが変化することになる、分析物検出システム。

40

【請求項 6】

前記第一のオリゴヌクレオチド (1) が、

○分岐点移動領域 (7) の 5' 側に位置する第一のトーホールド領域 (8) を含み；

前記第二のオリゴヌクレオチド (3) が、

○分岐点移動領域 (7) の 3' 側に位置する第二のトーホールド領域 (9) を含み；かつ

前記第三のオリゴヌクレオチド (5) が、

50

- 第一のトーホールド領域（ 8 ' ）と、
- 第二のトーホールド領域（ 9 ' ）と、
- 分岐点移動領域（ 7 ' ）と

を含み；ここで

前記第一のオリゴヌクレオチド（ 1 ）中の前記第一のトーホールド領域（ 8 ）と前記第三のオリゴヌクレオチド（ 5 ）中の前記第一のトーホールド領域（ 8 ' ）とが、相補的配列を含み；

前記第一のオリゴヌクレオチド（ 1 ）中の前記分岐点移動領域（ 7 ）と前記第三のオリゴヌクレオチド（ 5 ）中の前記分岐点移動領域（ 7 ' ）とが、相補的ヌクレオチドのストレッチを含み；

前記第二のオリゴヌクレオチド（ 3 ）中の前記第二のトーホールド領域（ 9 ）と前記第三のオリゴヌクレオチド（ 5 ）中の前記第二のトーホールド領域（ 9 ' ）とが、相補的ヌクレオチドのストレッチを含み；かつ

前記第二のオリゴヌクレオチド（ 3 ）中の前記分岐点移動領域（ 7 ）と前記第三のオリゴヌクレオチド（ 5 ）中の前記分岐点移動領域（ 7 ' ）とが、相補的ヌクレオチドのストレッチを含む、

請求項 5 に記載の分析物検出システム。

【請求項 7】

- 分岐点移動領域（ 7 ）の 5 ' 側に位置する第一のトーホールド領域（ 8 ）、
場合により、共有結合で連結されている少なくとも 1 つの結合部分（ 4 ）、
場合により、第一の基（ 2 ）であって、前記第一の基はシグナル伝達システムの第一の部分を形成する、第一の基
を含む、第一のオリゴヌクレオチド（ 1 ）と；

- 分岐点移動領域（ 7 ）の 3 ' 側に位置する第二のトーホールド領域（ 9 ）、
場合により、共有結合で連結されている少なくとも 1 つの結合部分（ 4 ）、
場合により、第一の基（ 2 ）であって、前記第一の基はシグナル伝達システムの第一の部分を形成する、第一の基
を含む、第二のオリゴヌクレオチド（ 3 ）と；

- 第一のトーホールド領域（ 8 ' ）、
第二のトーホールド領域（ 9 ' ）、
分岐点移動領域（ 7 ' ）、
場合により、共有結合で連結されている少なくとも 1 つの結合部分（ 4 ）、
第二の基（ 6 ）であって、前記第二の基はシグナル伝達システムの第二の部分を形成する、第二の基
を含む、第三のオリゴヌクレオチド（ 5 ）と

を含む、請求項 1 に記載の分析物検出システムであって、

但し、シグナル伝達システムの第一の部分を形成する前記第一の基（ 2 ）が、前記第一のオリゴヌクレオチド（ 1 ）および / または前記第二のオリゴヌクレオチド（ 3 ）のいずれかに含まれることを条件とし；

但し、共有結合で連結されている少なくとも 1 つの結合部分（ 4 ）が、前記第一のオリゴヌクレオチド（ 1 ）および / または前記第二のオリゴヌクレオチド（ 3 ）および / または前記第三のオリゴヌクレオチド（ 5 ）上に位置することを条件とし；ここで、

前記第一のオリゴヌクレオチド（ 1 ）中の前記第一のトーホールド領域（ 8 ）と前記第三のオリゴヌクレオチド（ 5 ）中の前記第一のトーホールド領域（ 8 ' ）とが、相補的配列を含み；

前記第一のオリゴヌクレオチド（ 1 ）中の前記分岐点移動領域（ 7 ）と前記第三のオリゴヌクレオチド（ 5 ）中の前記分岐点移動領域（ 7 ' ）とが、相補的ヌクレオチドのストレッチを含み；

前記第二のオリゴヌクレオチド（ 3 ）中の前記第二のトーホールド領域（ 9 ）と前記第三のオリゴヌクレオチド（ 5 ）中の前記第二のトーホールド領域（ 9 ' ）とが、相補的ヌ

10

20

30

40

50

クレオチドのストレッチを含み；

前記第二のオリゴヌクレオチド（３）中の前記分岐点移動領域（７）と前記第三のオリゴヌクレオチド（５）中の前記分岐点移動領域（７'）とが、相補的ヌクレオチドのストレッチを含み；

前記第一のオリゴヌクレオチド（１）と前記第三のオリゴヌクレオチド（５）間のハイブリダイゼーションが、前記第一のオリゴヌクレオチド（１）と前記第三のオリゴヌクレオチド（５）がハイブリダイズされないときとは異なるシグナルを発生させるか、もしくはシグナルの発生を触媒することができるが、但し、シグナル伝達システムの第一の部分を形成する前記第一の基（２）が前記第一のオリゴヌクレオチド（１）上に含まれることを条件とし；または

前記第二のオリゴヌクレオチド（３）と前記第三のオリゴヌクレオチド（５）間のハイブリダイゼーションが、前記第二のオリゴヌクレオチド（３）と前記第三のオリゴヌクレオチド（５）がハイブリダイズされないとき発生もしくは触媒されるシグナルとは異なるシグナルを発生させるか、もしくはシグナルの発生を触媒することができるが、但し、シグナル伝達システムの第一の部分を形成する前記第一の基（２）が前記第二のオリゴヌクレオチド（３）上に含まれることを条件とする、
分析物検出システム。

【請求項 8】

前記第一の基（２）および前記第二の基（６）によって形成される前記シグナル伝達システムが、クエンチャー - フルオロフォアシグナル伝達システム、フルオロフォア - クエンチャーシグナル伝達システム、FRETシグナル伝達システム、DNAペルオキシダーゼ触媒シグナル伝達システム、またはクエンチャーおよび一重項酸素増感剤であり；ならびに場合により、前記シグナル伝達システムが、蛍光ナノ粒子を利用する、前記請求項のいずれかに記載の分析物検出システム。

【請求項 9】

ヘミンおよび/または $ABTS^{2-}$ および/または H_2O_2 および/またはルミノールをさらに含む、前記請求項のいずれかに記載の分析物検出システム。

【請求項 10】

前記共有結合で連結されている少なくとも１つの結合部分（４）が、有機分子、抗体、抗原、アプタマー、ピオチンおよびハプテンから成る群より選択される、前記請求項のいずれかに記載の分析物検出システム。

【請求項 11】

前記共有結合で連結されている結合部分（４）が、 $150 \sim 1500 Da$ 、例えば $150 \sim 1200 Da$ 、例えば $150 \sim 1000 Da$ 、例えば $150 \sim 800 Da$ 、例えば $150 \sim 600 Da$ 、例えば $150 \sim 400 Da$ 、例えば $150 \sim 300 Da$ 、例えば $300 \sim 1500 Da$ 、例えば $400 \sim 1500 Da$ 、例えば $600 \sim 1500 Da$ 、例えば $800 \sim 1500 Da$ 、例えば $1000 \sim 1500 Da$ 、または例えば $1200 \sim 1500 Da$ の範囲内の分子量を有する有機分子である、前記請求項のいずれかに記載の分析物検出システム。

【請求項 12】

前記結合部分が、前記結合部分に結合されたその結合パートナーを有する、前記請求項のいずれかに記載の分析物検出システム。

【請求項 13】

前記分析物が、タンパク質、ペプチド、有機分子、抗体、抗原およびハプテンから成る群より選択される、前記請求項のいずれかに記載の分析物検出システム。

【請求項 14】

前記分析物が、 $150 \sim 1500 Da$ 、例えば $150 \sim 1200 Da$ 、例えば $150 \sim 1000 Da$ 、例えば $150 \sim 800 Da$ 、例えば $150 \sim 600 Da$ 、例えば $150 \sim 400 Da$ 、例えば $150 \sim 300 Da$ 、例えば $300 \sim 1500 Da$ 、例えば $400 \sim 1500 Da$ 、例えば $600 \sim 1500 Da$ 、例えば $800 \sim 1500 Da$ 、例えば 10

10

20

30

40

50

00 ~ 1500 Da、または例えば1200 ~ 1500 Daの範囲内の分子量を有する有機分子である、前記請求項のいずれかに記載の分析物検出システム。

【請求項15】

前記第一のオリゴヌクレオチド(1)が、前記第二のオリゴヌクレオチド(3)に共有結合で連結されており、かつ前記第二のオリゴヌクレオチド(3)が、前記第三のオリゴヌクレオチドに共有結合で連結されている、前記請求項のいずれかに記載の分析物検出システム。

【請求項16】

前記請求項のいずれかに記載の分析物検出システムを含む部品からなるキット。

【請求項17】

試料中のDNAおよびRNAとは異なる分析物の存在またはレベルを検出するための方法であって、前記方法は：

- a) 目的の分析物を含むまたは含むと推測される試料を提供するステップ；
- b) 請求項1 ~ 15のいずれかに記載の分析物検出システムを提供するステップ；
- c) 前記試料を前記分析物検出システムとともにインキュベートするステップ；
- d) 分析物の検出されたレベルを基準レベルと比較するステップ；および
- e) 前記試料中の分析物の存在またはレベルを決定するステップ

を含む、方法。

【請求項18】

前記第一のオリゴヌクレオチドと前記第三のオリゴヌクレオチド間、および前記第二のオリゴヌクレオチドと前記第三のオリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーション平衡が、前記結合部分への分析物の結合に基づいて、および/または前記結合部分に対する結合パートナーの解離に基づいてシフトされる、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記試料が、生物学的試料、例えば、血液試料、例えば血清もしくは血漿、尿試料、糞便試料、生検試料または唾液試料である、請求項17または18に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分析物検出システムに関する。詳細には、本発明は、分析物が核酸、すなわちDNAおよびRNA、ではない、分析物検出システムに関する。

【背景技術】

【0002】

様々な異なる方法、例えば、ELISA、SPR、QCM、電気化学的センサーなどを試料中のペプチド/タンパク質および他の分子の検出に利用することができる。これらの表面ベースの方法には高感度および多重感知能力が備わっているが、その固定手順は、タンパク質-リガンド結合に干渉することがあり、非特異的吸着に対抗するために慎重な洗浄およびブロッキングを必要とすることが多い。確立した均一アッセイはほんの少ししかなく、その中で、蛍光偏光は、小分子-タンパク質相互作用の研究に広く用いられている(Analysis of protein-ligand interactions by fluorescence polarization, Ana Rossi & Colin Taylor, Nature protocols, 2011)。

【0003】

電気化学的バイオセンサーは、通常、電子を生成または消費する反応の酵素的触媒に基づく。酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)は、ペプチド、タンパク質、抗体およびホルモンなどの物質の検出および定量のために設計されたプレートベースのアッセイである。表面プラズモン共鳴(SPR)は、固定されたリガンドの、そのリガンドがより大きいタンパク質に結合したときのサイズの増加を、金属薄膜の表面での屈折率の変化を記録することによって検出する。水晶振動子マイクロバランス(QCM)検出スキームは、結晶表面に堆積された薄層の質量変化および物理的特性の測定に基づく。蛍光偏光は、直線

10

20

30

40

50

偏光 (plan-polarized light) を用いて有効分子容の変化を検出することによって小さい蛍光リガンドのより大きいタンパク質への結合を検出する。

【0004】

試料中の核酸分子を検出することができる様々なアッセイ、例えば、PCR、サザンブロット法、ノーザンブロット法およびFISHも存在する。より最近のアプローチは、DNAトールド交換反応である。DNAトールド交換反応は、特異的トールド領域を各々が有する2本のDNA鎖が、支持体としての役割を果たす第三のDNA鎖とハイブリダイズするために互いに競合するシステムである。その大きなモジュラリティ、設計性および感度のため、それは、触媒性DNAネットワークの構築 (Zhangら、Engineering entropy-driven reactions and networks catalyzed by DNA、Science 2007、318、1121-1125)、DNA鎖置換反応速度の制御 (Zhangら、Control of DNA strand displacement kinetics using toehold exchange、J Am Chem Soc 2009、131、17303-17314)、および核酸ハイブリダイゼーションの特性の最適化 (Zhangら、Optimizing the specificity of nucleic acid hybridization、Nat Chem 2012、4、208-214) に用いられている。しかし、これらのシステムは、核酸分子の検出にしか適していない。

10

【0005】

それ故、DNAおよびRNAとは異なる分子を検出するための改善された検出システムは有利であろうし、特に、DNAおよびRNAとは異なる小分子を検出するためのより効率的なおよび/または信頼性のある検出システムは有利であろう。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Zhangら、Science (2007) 318、1121~1125

【非特許文献2】Zhangら、J Am Chem Soc (2009) 131、17303~17314

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、DNAおよびRNAとは異なる分析物を検出するための分析物検出システムを提供する。前記システムは、互いに特異的にハイブリダイズし得る1セットのオリゴヌクレオチドを含み、その特異的ハイブリダイゼーション事象に基づいてシグナルを発生させることができる。前記システムは、シグナルの変化をもたらす、分析物(単数または複数)の存在下での前記オリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーション平衡の変化に依存する。

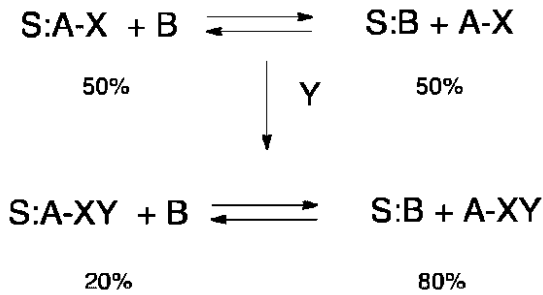
【0008】

本明細書において、本発明者らは、小分子(例えば、抗原またはハプテン)を3本のDNA鎖の1本以上に結合させることにより、非核酸標的検出にDNAトールド交換反応を活用する検出システムを提供する。小分子とその受容体タンパク質または抗体間の特異的結合は元の平衡をシフトさせるので、溶解状態の各成分の分布数変化を例えばFRET(フェルスター共鳴エネルギー移動)シグナルによってモニターすることができる。そのスキームを下に示す:

40

【0009】

【化 1】



ここで、A、BおよびSは3つのDNAオリゴヌクレオチドであり、それらの中でAおよびBは両方ともSに部分的に相補的である。Xは、Aを標識した小分子を表し、およびYは、その対応する結合タンパク質である。例えば、Yがなければ、AとBにはSとハイブリダイズする同等のまたはほぼ同等の能力があり、Yがあると、そのタンパク質の高さ、電荷または他の効果がハイブリダイゼーションエネルギーに影響を及ぼすことになり、それ故、それらの割合は、例えば50:50から20:80に変化することになる。基本的に、この概念は、各々のハイブリッド形成のためのエネルギーの小さな摂動がそれら2つのDNAハイブリッド間の平衡を比較的大きくシフトさせる結果になるという事実を利用する。

10

【0010】

典型的トーホールド交換反応システムにおいて、同じ分岐点移動領域を共有するがトーホールド領域が異なる2本のDNA鎖は、第三のDNAとハイブリダイズするために互いに動的に競合することになる。置換サイクル全体を図2に示す。例えば、鎖A(A)は、最初に鎖S(S)と対合してAS二重鎖を形成する。Sは、鎖B(B)のための別のトーホールド領域を有するので、B上のトーホールドにはS上のトーホールドとハイブリダイズする機会がある。AとBの両方がSと結合するとすぐに、配列対称性のため分岐点移動プロセスが起こることになる。この過程で、AおよびBには互いに置き換わる機会が同等にあり、そのため生成物の半分は、BがSの分岐点移動領域を完全に占有する一方でAがもっぱらトーホールドによってSと結合するものである。トーホールドは通常短いので、そのハイブリダイゼーションは不安定かつ一過性であり、結局、溶液中にBS+Aの成分が残る。前記ステップすべてが可逆的である。ここで、Bがその分岐点移動領域内に標識された結合部分を典型的に有することに留意されたい。

20

30

【0011】

分析物の存在下、Bに連結された小分子への分析物の結合は、トーホールド結合に対して大きい影響を及ぼさないこともあるが、分岐点移動プロセスを遂行するBに対するエネルギー障壁増加の原因になり、それ故、Sへの競合的結合に関してAと比較してBを不利(または場合によっては有利)にする。したがって、最終生成物において、熱力学的平衡は、より長いAS二重鎖(場合によってはより長いBS二重鎖)を形成する方向におよび標的分析物と結合した一本鎖Bを形成する方向にシフトされ、この分布数変化をFRETまたは他の光学的方法によって検出することができる。

40

【0012】

実施例の節で、様々なタイプの研究により、この概念がRNAおよびDNAとは異なる分析物検出に実際に機能し得ることを証明する。

【0013】

結論として、微調整したトーホールド交換反応に基づきタンパク質と小分子の両方を検出し得る新規検出システムを開発した。このアッセイは、酵素を含まず、ELISAなどの旧来のアッセイと比較して、タンパク質修飾、および二価抗原/抗体を探索する努力をしなくて済む。

【0014】

かかるアッセイは、健康、食品、獣医学および環境関連活動における様々な標的の検出のための高感度で特異的で頑強な高スループットプラットフォームとして使用され得る。

50

【 0 0 1 5 】

したがって、本発明の目的は、DNAおよびRNAとは異なる分子を検出し得る検出システムを提供することに関する。もう1つの目的は、DNAおよびRNAとは異なる小分子を検出し得る検出システムであって、分析物を検出するために分析物上の1つの結合部位しか必要としない検出システムを提供することである。これは、例えば、分析物上の2つの結合部位を必要とするELISAアッセイとは対照的である。小さな分析物のために2つの結合部位が存在しなくてもよい。

【 0 0 1 6 】

したがって、本発明の1つの態様は、DNAおよびRNAとは異なる分析物を検出するための分析物検出システムに関し、このシステムは、少なくとも第一のオリゴヌクレオチドA、第二のオリゴヌクレオチドBおよび第三のオリゴヌクレオチドSを含み、この場合

10

オリゴヌクレオチドAおよびBの各々は、オリゴヌクレオチドS上の配列に相補的または部分的に相補的である配列を含み、ならびにオリゴヌクレオチドAおよびBは、動的平衡でオリゴヌクレオチドSへのハイブリダイゼーションについて競合し、ならびに場合により、オリゴヌクレオチドAおよびBの少なくとも一方は、DNAおよびRNAとは異なる分析物と相互作用することができる共有結合で連結されている結合部分を含み；ならびに

オリゴヌクレオチドAおよびBの少なくとも一方、または前記オリゴヌクレオチドに結合された共有結合で連結されている結合部分は、DNAおよびRNAとは異なる分析物と相互作用することができるので、前記分析物とオリゴヌクレオチドまたは結合部分との相互作用が、結果としてハイブリダイゼーション平衡をシフトさせることになり、その平衡におけるシフトが検出可能なシグナルをもたらす。

20

【 0 0 1 7 】

前記分析物検出システムの説明に役立つ実例を図1および2に提供する。

【 0 0 1 8 】

背景技術の節で説明したように、本件に類似したアッセイがDNA検出のために記載されている。しかし、その構成は、DNAおよびRNAとは異なる分析物、例えばタンパク質および小有機分子、の検出には適していない。そのような目的には、異なるシステム、例えばELISAのほうが適している。

30

【 0 0 1 9 】

本発明のもう1つの態様は、本発明による分析物検出システムを含む部品からなるキット(kit of parts)に関する。

【 0 0 2 0 】

本発明のさらにもう1つの態様は、本発明による第一のオリゴヌクレオチド、第二のオリゴヌクレオチドおよび第三のオリゴヌクレオチドを含む部品からなるキットを提供することである。

【 0 0 2 1 】

本発明のさらにもう1つの態様は、試料中のDNAおよびRNAとは異なる分析物の存在またはレベル検出方法を提供することであり、この方法は、

40

- a) 目的の分析物を含むまたは含むと推測される試料を提供するステップ；
- b) 本発明による分析物検出システムを提供するステップ；
- c) 前記試料を前記分析物検出システムとともにインキュベートするステップ；
- d) 分析物の検出レベルを基準レベルと比較するステップ；および
- e) 前記試料中の分析物の存在またはレベルを決定するステップ

を含む。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 2 】

【 図 1 】 図 1 は、本発明による第一のオリゴヌクレオチド 1 (配列番号 1)、第二のオリゴヌクレオチド 3 (配列番号 2) および第三のオリゴヌクレオチド 5 (配列番号 3) の特

50

異的配列を用いる本発明の特定の実施形態を示す。8、8'および9、9'は、トーホールド領域を示し、7、7'は、分岐点移動領域を示す。矢印は、それらのオリゴヌクレオチドの5'から3'への方向を示す。

【図2】図2は、分析物が結合部分(4)に結合するときの平衡の変化の仕方の例を示す。図1に示したとおりの番号付け。a)標的分析物なければ、Sとハイブリダイズする同等のまたは同等に近い確率を有し、その結果ASおよびBSが50/50比になるように、AおよびBを設計することができる。b)分析物の存在下では、その分析物(この場合は標的)の立体または静電効果に起因して分岐点移動プロセス中にBに対するエネルギー障壁が実現され、その結果、ASおよびBSが80/20比になる。

【図3】図3は、ピオチンが結合部分であり、ストレプトアビジン(STV)が分析物であるときの検出システムを示す。本発明による第一のオリゴヌクレオチド1の修飾を含む特異的配列(配列番号4)、第二のオリゴヌクレオチド3の修飾を含む特異的配列(配列番号5)および第三のオリゴヌクレオチド5の修飾を含む特異的配列(配列番号6)を呈示する。図1に示したとおりの番号付け。加えて、2および6はシグナル伝達システムを示し、ならびに4は結合部分を示す。

【図4】図4は、ストレプトアビジン(STV)検出のためおよびピオチン検出のための三本鎖システムの結果を示す。(a)それぞれSTVを含有するおよび含有しない2つの試料についての正規化FRET効率。(b)それぞれSTVを含有するおよび含有しない2つの試料についての蛍光スペクトル。(c)STV検出の滴定曲線。(d)STV検出アッセイについての非変性ゲル分析。最初の2レーンは、1つのピオチンを有するシステムであり、その一方で最後の2レーンは、2つのピオチンを有するシステムである。挿入図は、2部位相互作用により鎖B上に結合されたSTVのスキームである。(e)阻害的戦略によるピオチンの定量的検出。分析物(ピオチン)を先ずSTVと混合し、その後、その混合物をアッセイに添加する。分析物がSTV上の結合部位を占有することになり、したがって、STVは不活性化される。

【図5】図5は、センサーアッセイのための3つの戦略を示す。戦略1では、分析物/標的(例えば、タンパク質または抗体)の直接検出をABSシステムにおける結合部分との相互作用によって達成する。阻害的戦略2では、未知の検体および対応するタンパク質を予混し、その後、正規のアッセイに添加する。検体が遊離リガンドを含むと、それらのリガンドがタンパク質の結合部位を塞ぐことになり、その結果、そのタンパク質はこのアッセイで機能できなくなる。競合的戦略3では、対応するタンパク質を先ず正規のDNAアッセイと混合物して新たなアッセイを形成し、その後、未知の検体を添加して、タンパク質と結合するために鎖B上のリガンドと競合させ、かくして平衡に対して逆効果を及ぼす。

【図6】図6は、対照実験を示す。A)図3に記載したABSシステムだが結合部分のないABSシステムに対する添加剤の影響。3フルオロフォア構成。B)図3に記載したABSだが、ピオチン結合部分を有するABSシステムに対する添加剤の影響。2フルオロフォア構成。ピオチン結合部分を含有するシステムにストレプトアビジンを添加したときを除き、いずれの分析物の添加後にも検出可能な変化は観察されなかった。

【図7】図7は、ストレプトアビジン結合アッセイの動態を示す。4nt(左)および6nt(右)のトーホールド長をそれぞれ有する2つのアッセイの比較。両方のアッセイにおいて、ピオチン修飾は、Bのトーホールド領域上に位置し、AおよびSは、1対のフルオロフォア(Alexa488およびAlexa555)を有する。結果は、(AおよびB両方の上の)トーホールドが長いほど、STV結合効果が小さくなることを犠牲にして、確実に速く平衡に達することを示し、これは、(b)におけるFRET結果によって確認される。最終設計は、好ましくは、動態とシグナル・ノイズ比の妥協案である。加えて、FRET測定は、STV添加後に4ntシステムが平衡に達するために3時間のインキュベーションで十分であることを示唆する(データは示されていない)。

【図8】図8は、ジゴキシゲニン(DIG)が結合部分であり、抗ジゴキシゲニン(aD)が分析物であるときの検出システムを示す。図A)は、本発明による第一のオリゴヌク

10

20

30

40

50

レオチド 1 の修飾を含む特異的配列（配列番号 7）、第二のオリゴヌクレオチド 3 の修飾を含む特異的配列（配列番号 8）および第三のオリゴヌクレオチド 5 の修飾を含む特異的配列（配列番号 6）を示す。図 1 に示したとおりの番号付け。加えて、2 および 6 はシグナル伝達システムを示し、ならびに 4 は結合部分を示す。棒グラフ B) は、a D の検出に基づく生 F R E T シグナル変化を示す。C) ジゴキシゲニンの化学構造。グラフ D) は、オリゴヌクレオチド 1、3 および 5 への a D の滴定に基づく、F R E T シグナル変化を示す。E) は、オリゴヌクレオチド A のみが見える、ネイティブポリアクリルアミドゲルの蛍光画像を示す。a D を添加すると A S 分布数の増加が見られる。

【図 9】図 9 は、ジゴキシゲニン（D I G）が結合部分であり、抗ジゴキシゲニン（a D）が分析物であるときのヒト血漿における検出システムを示す。図 A) 番号付けは、図 8 A と同じである。グラフ B) はヒト血漿を一切添加していないセンサーの構成（A B S）とヒト血漿を有する試料とを比較する三重対照実験の結果である。カラム 1 および 3 は、ヒト血漿なしでの a D の検出に基づく F R E T 変化を示し、カラム 2 および 5 は、ヒト血漿における F R E T 変化を示す。カラム 4 および 6 は、それぞれヒト血漿を有さないおよび有する遊離ジゴキシゲニンの検出のために競合アッセイを示す。

【図 10】図 10 は、ジゴキシゲニン（D I G）が結合部分であり、抗ジゴキシゲニン（a D）が分析物であるときのヒト唾液における検出システムを示す。図 A) 番号付けは、図 8 A と同じである。棒グラフ B) は、唾液試料中の a D の検出に基づく A S 分布数の変化を示す。

【図 11】図 11 は、いくつかのジゴキシゲニン（D I G）分子が結合部分としての役割を果たし、抗ジゴキシゲニン（a D）が分析物であるときの検出システムを示す。図 A) は、本発明による第一のオリゴヌクレオチド 1 の修飾を含む特異的配列（配列番号 7）、第二のオリゴヌクレオチド 3 の修飾を含む特異的配列（配列番号 9）および第三のオリゴヌクレオチド 5 の修飾を含む特異的配列（配列番号 6）を示す。この図は、a D の結合のためのいくつかの D I G 部分も示す。棒グラフ B) は、a D の検出に基づく A S 分布数の変化を示す。

【図 12】図 12 は、競合 / 阻害センサーとして動作するときの検出システムを示す。ここで、ジゴキシゲニン（D I G）は抗ジゴキシゲニン（a D）と一緒に結合部分としての役割を果たし、遊離 D I G は分析物としての役割を果たす。図 A) 番号付けは、図 8 A と同じである。棒グラフ B) は、緩衝液、ヒト血漿およびヒト唾液中の遊離 D I G を検出する阻害アッセイにおける A S 分布数変化を示す。

【図 13】図 13 は、阻害アッセイまたは競合アッセイによる D I G 滴定曲線を示す。

【図 14】図 14 は、ビタミン D（V D）が結合部分であり、ビタミン D 結合タンパク質（D B P）が分析物であるときの検出システムを示す。さらに、図 14 は、阻害および競合アッセイにおける標的としての遊離ビタミン D も示す。略図は、B 上の V D への D B P の結合によって促進される B の鎖置換を示す。バンドシフトアッセイは、オリゴヌクレオチド A のみが見える、ネイティブポリアクリルアミドゲルの蛍光画像を示す。D B P を添加すると A S 分布数の増加が見られる。第一のグラフは、センサーに対する D B P の滴定を示す。第二および第三のグラフは、それぞれ、V D の阻害的および競合的検出を示す。

【図 15】図 15 は、D N A 検出のための三本鎖アプタマーシステムの設計および結果を示す。本発明による第一のオリゴヌクレオチド 1 の修飾を含む特異的配列（配列番号 10）、第二のオリゴヌクレオチド 3 の修飾を含む特異的配列（配列番号 11）および第三のオリゴヌクレオチド 5 の修飾を含む特異的配列（配列番号 12）を提示する。図 1 および 3 に示したとおりの番号付け。（A）構造スイッチングアプタマーによる A T P 検出のスキーム。A T P の結合は、B 上の有効トールドを短縮することになり、その結果、B S の形成が妨げられる。（B）A T P 検出の滴定曲線。

【図 16】図 16 は、分割型 D N A ペルオキシダーゼシグナル伝達システムを使用するときのシステムを示す。本発明による第一のオリゴヌクレオチド 1 の修飾を含む特異的配列（配列番号 13）、第二のオリゴヌクレオチド 3 の修飾を含む特異的配列（1 つのピオチン：配列番号 5、および 2 つのピオチン配列番号 14）および第三のオリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

5の修飾を含む特異的配列(配列番号15)を提示する。図1および3に示したとおりの番号付け。2ピオチンシステムでも、目視検査は可能である。1つのピオチンおよび2つのピオチン両方での検出を示す。(A)分割型DNAペルオキシダーゼシグナル伝達システムを使用することによるSTV検出のスキームおよび結果。B上に2つのピオチンを組み込んだとき、STVの存在下で色差は明白であり、裸眼でも区別可能である。(B)1つのピオチンまたは2つのピオチンいずれかとともにSTVを含有するまたは含有しない試料の吸光度。

【図17】図17は、本発明による一本鎖システムの設計を示す。図1および3に示したとおりの番号付け。加えて、11は、リンカー領域を示す。

【図18】図18は、STV検出のための一本鎖システム、および実施例12に提示する配列を使用したときに得られた結果を提示する。(a)一本鎖システムを使用することによるSTV検出のスキーム。トーホールド交換反応が分子内で起こり、結果として生ずる配置を分割型DNAペルオキシダーゼからの変色によって同定することができる。(b)STVを含有するまたは含有しない一本鎖試料の吸光度。

【図19】図19は、特殊な小分子またはイオンの検出のための戦略を提供する。(a)水素結合による両面メラミン-チミン認識(bifacial meramine-thymine recognition)(挿入図)を使用することによる、メラミン検出のスキーム。メラミンがなければ、鎖Aは、鎖Bより長いトーホールドを有し、それ故、Sとの結合のより高い優先度を有する。T-Tミスマッチのための接続部として役立つことができるメラミンがあると、鎖Bは、Aより長いトーホールドを有し、したがってより長いBS二重鎖が予想される。(b)Hg²⁺は、Hg²⁺が両側のチミン残基のN1窒素間に線形に結合している高特異的「サンドイッチ」複合体を、DNAにおけるT-Tミスマッチ部位で形成することは周知であるので、(a)と同じ構成を用いて水銀二価カチオンを検出することができる(挿入図)。

【図20】図20は、鎖Sが内部に1つ(a)または2つ(b)のヘアピンを有する、より高度な戦略を示す。内部ヘアピンの機能は、標識されたりガンドおよびその結合タンパク質の位置の周囲にマルチアーム接合部を、その三次元配置によってより大きい立体障害を生じさせてSと結合タンパク質を有するBとの間のハイブリダイゼーションを妨げるために、構築することである。

【発明を実施するための形態】

【0023】

ここで、本発明を以下でより詳細に説明することにする。

【0024】

分析物検出システム

1つの態様において、本発明は、3つのオリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーション平衡に基づく分析物検出システムであって、試料中の非核酸分析物を検出することができる分析物検出システムに関する。

【0025】

本発明のこの態様のある実施形態は、第一のオリゴヌクレオチド(1)、第二のオリゴヌクレオチド(3)および第三のオリゴヌクレオチド(5)を含む分析物検出システムであって、

第一または第二のオリゴヌクレオチドが、シグナル伝達システムの第一の部分を形成する第一の基(2)を含み；

第三のヌクレオチドが、そのシグナル伝達システムの第二の部分を形成する第二の基(6)を含み；

共有結合で連結されている少なくとも1つの結合部分(4)が、第一または第二のオリゴヌクレオチド上に位置し；

第一または第二のオリゴヌクレオチドと第三のオリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーションが、前記第一または第二のオリゴヌクレオチドと第三のオリゴヌクレオチドとがハイブリダイズされないときとは異なるシグナルを発生させるか、またはシグナルの発生

10

20

30

40

50

を触媒することができ；ならびに

分析物の存在が、当該検出システムのハイブリダイゼーション平衡を変化させ、その結果、シグナルが変化することになる、分析物検出システムである。

【0026】

前記分析物検出システムは、例えば、

第一のオリゴヌクレオチド(1)が、

○分岐点移動領域(7)の5'側に位置する第一のトーホールド領域(8)

を含み；

第二のオリゴヌクレオチド(3)が、

○分岐点移動領域(7)の3'側に位置する第二のトーホールド領域(9)

を含み；および

第三のオリゴヌクレオチド(5)が、

○第一のトーホールド領域(8')と、

○第二のトーホールド領域(9')と、

○分岐点移動領域(7')と

を含み；

第一のオリゴヌクレオチド(1)中の第一のトーホールド領域(8)と第三のオリゴヌクレオチド(5)中の第一のトーホールド領域(8')とが、相補的配列を含み；

第一のオリゴヌクレオチド(1)中の分岐点移動領域(7)と第三のオリゴヌクレオチド(5)中の分岐点移動領域(7')とが、相補的ヌクレオチドのストレッチを含み；

第二のオリゴヌクレオチド(3)中の第二のトーホールド領域(9)と第三のオリゴヌクレオチド(5)中の第二のトーホールド領域(9')とが、相補的ヌクレオチドのストレッチを含み；および

第二のオリゴヌクレオチド(3)中の分岐点移動領域(7)と第三のオリゴヌクレオチド(5)中の分岐点移動領域(7')とが、相補的ヌクレオチドのストレッチを含むものであってもよい。

【0027】

特定の実施形態において、本発明は、DNAおよびRNAとは異なる分析物を検出するための分析物検出システムであって、

- 分岐点移動領域(7)の5'側に位置する第一のトーホールド領域(8)、

場合により、共有結合で連結されている少なくとも1つの結合部分(4)、

場合により、第一の基(2)(前記第一の基はシグナル伝達システムの第一の部分を形成する)

を含む、第一のオリゴヌクレオチド(1)と；

- 分岐点移動領域(7)の3'側に位置する第二のトーホールド領域(9)、

場合により、共有結合で連結されている少なくとも1つの結合部分(4)、

場合により、第一の基(2)(前記第一の基はシグナル伝達システムの第一の部分を形成する)

を含む、第二のオリゴヌクレオチド(3)と；

- 第一のトーホールド領域(8')、

第二のトーホールド領域(9')、

分岐点移動領域(7')、

場合により、共有結合で連結されている少なくとも1つの結合部分(4)、

第二の基(6)(前記第二の基はシグナル伝達システムの第二の部分を形成する)

を含む、第三のオリゴヌクレオチド(5)と

を含み；
但し、シグナル伝達システムの第一の部分を形成する第一の基(2)が、第一のオリゴヌクレオチド(1)および/または第二のオリゴヌクレオチド(3)のいずれかに含まれることを条件とし；

但し、共有結合で連結されている少なくとも1つの結合部分(4)が、第一のオリゴ

10

20

30

40

50

ヌクレオチド(1)および/または第二のオリゴヌクレオチド(3)および/または第三のオリゴヌクレオチド(5)上に位置することを条件とし;

第一のオリゴヌクレオチド(1)中の第一のトーホールド領域(8)と第三のオリゴヌクレオチド(5)中の第一のトーホールド領域(8')とが、相補的配列を含み;

第一のオリゴヌクレオチド(1)中の分岐点移動領域(7)と第三のオリゴヌクレオチド(5)中の分岐点移動領域(7')とが、相補的ヌクレオチドのストレッチを含み;

第二のオリゴヌクレオチド(3)中の分岐点移動領域(7)と第三のオリゴヌクレオチド(5)中の分岐点移動領域(7')とが、相補的ヌクレオチドのストレッチを含み;

第二のオリゴヌクレオチド(3)中の第二のトーホールド領域(9)と第三のオリゴヌクレオチド(5)中の第二のトーホールド領域(9')とが、相補的ヌクレオチドのストレッチを含み;

第一のオリゴヌクレオチド(1)と第三のオリゴヌクレオチド(5)間のハイブリダイゼーションが、前記第一のオリゴヌクレオチド(1)と第三のオリゴヌクレオチド(5)がハイブリダイズされないときとは異なるシグナルを発生させるか、もしくはシグナルの発生を触媒することができるが、但し、シグナル伝達システムの第一の部分を形成する第一の基(2)が第一のオリゴヌクレオチド(1)上に含まれることを条件とし;または

第二のオリゴヌクレオチド(3)と第三のオリゴヌクレオチド(5)間のハイブリダイゼーションが、前記第二のオリゴヌクレオチド(3)と第三のオリゴヌクレオチド(5)がハイブリダイズされないとき発生もしくは触媒されるシグナルとは異なるシグナルを発生させるか、もしくはシグナルの発生を触媒することができるが、但し、シグナル伝達システムの第一の部分を形成する第一の基(2)が第二のオリゴヌクレオチド(3)上に含まれることを条件とする、システムに関する。

【0028】

本明細書において用いる場合、用語「検出すること」は、分析物の存在または不在の定性的検出のみならず、本発明を用いる分析物の量の定量も包含することを意図したものである。

【0029】

本明細書において用いる場合の「分析物」への言及は、単一の分析物はもちろん、適用可能な場合には2つ以上の分析物の検出も含む。

【0030】

オリゴヌクレオチドA、BおよびSは、多くの場合、別々のヌクレオチド鎖上にあることになるが、共有結合によって部分的にまたは完全に接続されている2つ以上のオリゴヌクレオチドで本発明を行ってもよい。

【0031】

さらに、一般にA、BまたはSと呼ぶ3つのオリゴヌクレオチドを便宜上使用して本発明を本明細書において一般的に説明するが、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドAおよび/またはBと類似していてもよい追加のオリゴヌクレオチド、例えば、追加のオリゴヌクレオチドCまたは2つの追加のオリゴヌクレオチドCおよびDを使用して前記方法を行うことができることは明白であろう。あるいは、または加えて、本明細書に記載のオリゴヌクレオチドSに類似している1つ以上のさらなるオリゴヌクレオチドを用いて本発明を行ってもよい。例として、第一の分析物の検出のための1セットのオリゴヌクレオチド(A、B、S)とともに第二の分析物の検出のための第二のセットのオリゴヌクレオチド(C、D、S')を用いて本発明を行ってもよい。

【0032】

さらなる代替実施形態は、オリゴヌクレオチドSが1つより多くのハイブリダイゼーションドメインを含むものである。この代替実施形態の例を、1つ以上のヘアピンターンを有しており、それにより複数のハイブリダイゼーションドメインを形成するSを示す図20で説明する。複数のハイブリダイゼーションドメインを図20には単一のオリゴヌクレオチドSの一部であるように示すが、2つ以上のかかる結合ドメインが別々のヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド鎖上に位置する配置を使用することも可能であろう。

【0033】

前に述べたように、前記システムは、前記システム内のオリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーション平衡の変化に基づく。したがって、ある実施形態において、分析物の存在は、その検出システムのハイブリダイゼーション平衡を変化させ、その結果、例えばその分析物が不在であるときと比較して、シグナルが変化することになる。それ故、本発明は、オリゴヌクレオチド（例えば、DNA）間で起こるハイブリダイゼーション事象を利用して試料中の非DNA（または非RNA）の存在またはレベルを検出するユニークなシステムを提示する。このアッセイには、例えばELISA試験と比較していくつかの利点がある。

10

【0034】

- 「実地」作業を殆ど必要とせず、それがこのアッセイを迅速かつ安価にする。

【0035】

- 成分が長時間安定している。

【0036】

- 等温条件下でアッセイを行ってよく、それが必要装置を安価にする。

【0037】

- 分析物への1つの結合事象しか必要としないので、小さな分析物をより容易に検出し得る。これは、例えば、分析物上に2つの結合部位を通常必要とするELISAとは対照的である。

20

【0038】

- このアッセイは均一であり、したがって固定および洗浄プロセスをしなくて済み、ならびに非特異的吸着の問題も免れる。

【0039】

- このアッセイは、抗体標識またはタンパク質修飾しなくて済む。

【0040】

第一のオリゴヌクレオチド

第一のオリゴヌクレオチド(1)は、前記検出システムの一部を形成する。ある実施形態において、第一のオリゴヌクレオチド(1)の長さは、8~100ヌクレオチド、例えば10~100、例えば15~100、例えば20~100、例えば30~100、例えば40~100、例えば50~100、例えば60~100、例えば70~100、例えば80~100、例えば90~100、例えば8~90、例えば8~80、例えば8~70、例えば8~60、例えば8~50、例えば8~40、例えば8~30、例えば8~20、または例えば8~15ヌクレオチドの範囲内である。さらにもう1つの実施形態において、第一のオリゴヌクレオチド(1)は、配列番号1、4、7、10および13から成る群より選択される。特定の配列を提供するが、異なる配列の組み合わせを選択することができるので、本発明は、これらの配列に決して限定されない。分析物がそれらの配列とは無関係に検出されるということが、このことを明示している。試料中の1つより多くの分析物を検出するために多重アッセイを設計する場合、異なる配列が有用であることもある。実施例の節に、異なるオリゴヌクレオチドセットでの結果を提示する。

30

40

【0041】

本文脈において、用語「5'側」は、核酸分子内の特定のポイントまたは領域に対して5'である位置にある核酸配列を指す。同様に、用語「3'側」は、核酸分子内の特定のポイントまたは領域に対して3'である位置にある核酸配列を指す。

【0042】

第二のオリゴヌクレオチド

第二のオリゴヌクレオチド(3)は、前記検出システムの一部を形成する。ある実施形態において、第二のオリゴヌクレオチド(3)の長さは、8~100ヌクレオチド、例えば10~100、例えば15~100、例えば20~100、例えば30~100、例えば40~100、例えば50~100、例えば60~100、例えば70~100、例え

50

ば 80 ~ 100、例えば 90 ~ 100、例えば 8 ~ 90、例えば 8 ~ 80、例えば 8 ~ 70、例えば 8 ~ 60、例えば 8 ~ 50、例えば 8 ~ 40、例えば 8 ~ 30、例えば 8 ~ 20、または例えば 8 ~ 15ヌクレオチドの範囲内である。さらにもう1つの実施形態において、第二のオリゴヌクレオチド(3)は、配列番号2、5、8、9、11および14から成る群より選択される。上で述べたように、本発明は、これらの配列に決して限定されない。

【0043】

第三のオリゴヌクレオチド

第三のオリゴヌクレオチド(5)は、前記検出システムの一部を形成する。ある実施形態において、第三のオリゴヌクレオチド(5)の長さは、8 ~ 100ヌクレオチド、例えば10 ~ 100、例えば15 ~ 100、例えば20 ~ 100、例えば30 ~ 100、例えば40 ~ 100、例えば50 ~ 100、例えば60 ~ 100、例えば70 ~ 100、例えば80 ~ 100、例えば90 ~ 100、例えば8 ~ 90、例えば8 ~ 80、例えば8 ~ 70、例えば8 ~ 60、例えば8 ~ 50、例えば8 ~ 40、例えば8 ~ 30、例えば8 ~ 20、または例えば8 ~ 15ヌクレオチドの範囲内である。さらにもう1つの実施形態において、第三のオリゴヌクレオチド(5)は、特定の配列番号3、6、12および15から成る群より選択される。上で述べたように、本発明は、これらの配列に決して限定されない。

10

【0044】

オリゴヌクレオチド(1、3、5)の各々は、天然および/または非天然ヌクレオチド両方を含んでよい。したがって、ある実施形態において、オリゴヌクレオチド(1、3、5)は、天然および/または非天然ヌクレオチドを含む。さらにもう1つの実施形態において、非天然ヌクレオチドは、PNA、LNA、キシロ-LNA、ホスホロチオエート、2'-メトキシ、2'-メトキシエトキシ、モルホリノ、およびホスホロアミデート含有分子またはこれらの類するものから成る群より選択される。非天然ヌクレオチドの利点は、例えばヌクレアーゼによって分解されにくいので、より生体安定性であり得る点である。しかし、前記オリゴヌクレオチドは、DNAおよび/またはRNAから成ることもある。したがって、さらなる実施形態において、前記オリゴヌクレオチドは、天然核酸、例えばDNAまたはRNA、好ましくはDNAから成る。

20

【0045】

本明細書において用いる場合の用語「オリゴヌクレオチド」、「核酸」、「核酸分子」または「核酸配列」は、リボ核酸(RNA)もしくはデオキシリボ核酸(DNA)またはそれらのミミック/ミメティックのオリゴマーまたはポリマーを指す。この用語は、天然に存在する核酸塩基、糖および共有結合性ヌクレオシド間(主鎖)ホスホジエステル結合手から成る分子、ならびに同様に機能する天然に存在しない核酸塩基、糖および共有結合性ヌクレオシド間(主鎖)結合を有する分子、またはこれらの組み合わせを含む。かかる修飾または置換された核酸は、例えば細胞内取り込み増進、核酸標的に対する親和性強化ならびにヌクレアーゼおよび他の酵素の存在下での安定性増加などの望ましい特性のためネイティブ形態より好ましいことが多く、本文脈では用語「核酸類似体」または「核酸ミミック」によって記述される。核酸ミミック/ミメティックの好ましい例は、ペプチド核酸(PNA)、ロックド核酸(LNA)、キシロ-LNA、ホスホロチオエート、2'-メトキシ、2'-メトキシエトキシ、モルホリノ、およびホスホロアミデート含有分子またはこれらに類するものである。

30

40

【0046】

核酸、核酸分子または核酸配列は、例えば、もっぱらデオキシリボヌクレオチドから成ることもあり、もっぱらリボヌクレオチドから成ることもあり、もっぱら核酸ミミックもしくは類似体から成ることもあり、またはそれらのキメラ混合物から成ることもある。それらのモノマーは、典型的にはヌクレオチド間ホスホジエステル結合手によって連結されている。核酸のサイズは、典型的に、数モノマー単位、例えばそれらが一般にオリゴヌクレオチドと呼ばれるときには5 ~ 40から、数千のモノマー単位にわたる。核酸または核

50

酸配列が表示されているときには常に、別段の断り書きがない限り、ヌクレオチドが左から右へ5'から3'への順序であることならびに「A」がデオキシアデノシンを示し、「C」がデオキシシチジンを示し、「G」がデオキシグアノシンを示し、および「T」がチミジンを示すことは理解されるであろう。

【0047】

非天然ヌクレオチド

本明細書において用いる場合、「非天然ヌクレオチド」または「核酸類似体」または「人工ヌクレオチド」は、相補核酸配列(1)にハイブリダイズするように設計された、DNAまたはRNAの構造類似体を意味すると解される。ヌクレオチド間結合(単数または複数)、糖および/または核酸塩基の修飾により、核酸類似体は、次の望ましい特性のいずれかまたはすべてを獲得し得る：1)最適化されたハイブリダイゼーション特異性または親和性、2)ヌクレアーゼ耐性、3)化学的安定性、4)可溶性；5)膜透過性；ならびに6)合成および精製の容易さまたは低い合成および精製コスト。核酸類似体の例としては、ペプチド核酸(PNA)、ロックド核酸「LNA」、2'-O-メチル核酸、2'-フルオロ核酸、ホスホロチオエート、および金属ホスホン酸塩が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0048】

トーホールド領域

本文脈において、「トーホールド領域」は、ワトソン・クリック塩基対合を形成することができる2つの相補オリゴヌクレオチド領域を指し、またはトーホールド領域は、オリゴヌクレオチド中に位置する一本鎖配列を指すこともある。したがって、一本鎖オリゴヌクレオチドに関して用語「トーホールド領域」を用いるとき、それは一本鎖トーホールド領域を指し、これに対して二本鎖のもの(2つの一本鎖トーホールド領域が互いにハイブリダイズしているとき)に関して用語「トーホールド領域」を用いるとき、それは二本鎖領域を指すと解されたい。本文脈では、二本鎖トーホールド領域の各相補配列をXおよびX'として識別することがある。

20

【0049】

トーホールド領域は、異なる位置を有してよい。ある実施形態において、第三のオリゴヌクレオチド(5)中に第一の(一本鎖)トーホールド領域(8')および(一本鎖)第二のトーホールド領域(9')は、分岐点移動領域(7')の反対側に位置する。分岐点移動領域の反対側への一本鎖トーホールド領域8'および9'の配置は、アッセイを加速させ得る。

30

【0050】

異なるトーホールド領域間の交差ハイブリダイゼーションを最小限にするために、2つのトーホールド領域[8、8']および[9、9']は、異なる配列を有してもよい。したがって、ある実施形態において、第一のオリゴヌクレオチド(1)中の第一のトーホールド領域(7)および第二のオリゴヌクレオチド(1)中の第二のトーホールド領域(8)は似ていない。本文脈において、似ていないという表現は、異なる配列を有すると解してもよく、したがって100%同一ではない。

【0051】

2つの一本鎖トーホールド領域は、長さが互いに異なってもよい。このようにして、ハイブリダイゼーションのシフトをより容易に認識できることがある。したがって、もう一つの実施形態において、第一のトーホールド領域(8)の長さは、1~10ヌクレオチド、例えば1~8ヌクレオチド、例えば1~6ヌクレオチド、例えば1~4、ヌクレオチド、例えば2~10ヌクレオチド、例えば3~10ヌクレオチド、例えば4~10ヌクレオチド、例えば5~10ヌクレオチド、例えば7~10ヌクレオチドの範囲内、例えば3ヌクレオチド、例えば4ヌクレオチド、例えば5ヌクレオチド、または例えば6ヌクレオチドである。

40

【0052】

本明細書において用いる場合、用語「ハイブリダイゼーション」または「アニーリング

50

」は、二本鎖構造の1本の鎖の中のヌクレオチドが反対の鎖上のヌクレオチドとの特異的ワトソン・クリック塩基対合を被るような、二本鎖構造を形成するための一本鎖ヌクレオチドの会合を指す。この用語は、本発明によるオリゴヌクレオチドに組み込まれ得るヌクレオシド類似体、例えばデオキシイノシン、2つのアミノプリン塩基を有するヌクレオシド、およびこれらに類するもの、の対合も含む。

【0053】

さらなる実施形態において、第一のオリゴヌクレオチド(1)中の第一のトーホールド領域(8)および第三のオリゴヌクレオチド(5)中の第一のトーホールド領域(8')は、1~10、例えば2~10、例えば3~10、例えば4~10、例えば5~10、例えば2~8、例えば2~7、例えば2~6、例えば2~5、例えば2~4相補的ヌクレオチドのストレッチを含む。

10

【0054】

さらにもう1つの実施形態において、第一のオリゴヌクレオチド(1)中の第一のトーホールド領域(8)と第三のオリゴヌクレオチド(5)中の第一のトーホールド領域(8')とは、少なくとも70%相補的、例えば70~100%相補的、例えば75~100%相補的、例えば80~100%相補的、例えば85~100%相補的、例えば90~100%相補的、例えば95~100%相補的、例えば97~100%相補的、例えば99~100%相補的、または例えば100%相補的である。

【0055】

もう1つの実施形態において、第二のトーホールド領域(9、9')の長さは、1~10ヌクレオチド、例えば1~8ヌクレオチド、例えば1~6ヌクレオチド、例えば1~4ヌクレオチド、例えば2~10ヌクレオチド、例えば3~10ヌクレオチド、例えば4~10ヌクレオチド、例えば5~10ヌクレオチド、例えば7~10ヌクレオチドの範囲内、例えば3ヌクレオチド、例えば4ヌクレオチド、例えば5ヌクレオチド、または例えば6ヌクレオチドである。

20

【0056】

ある実施形態において、第二のオリゴヌクレオチド(3)中の第二のトーホールド領域(9)および第三のオリゴヌクレオチド(5)中の第二のトーホールド領域(9')は、1~10、例えば2~10、例えば3~10、例えば4~10、例えば5~10、例えば2~8、例えば2~7、例えば2~6、例えば2~5、例えば2~4相補的ヌクレオチドのストレッチを含む。

30

【0057】

分岐点移動領域

本文脈において、「分岐点移動」は、2つのトーホールド領域および分岐点移動領域内でのハイブリダイゼーションにより第一のオリゴヌクレオチドと第三のオリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーションの平衡が第二のオリゴヌクレオチドと第三のオリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーションの方におよびその逆にシフトする状況を指す。図2は、分岐点移動、および分析物の結合により平衡状態がどのように変化するかを示す。

【0058】

分岐点移動領域は、その相補的領域のため、第一のオリゴヌクレオチドと第三のオリゴヌクレオチド間および第二のオリゴヌクレオチドと第三のオリゴヌクレオチド間の分岐移動を助長する。したがって、ある実施形態において、分岐点移動領域(7、7')の長さは、3~30ヌクレオチド、例えば4~30、例えば5~30、例えば7~30、例えば9~30、例えば11~30、例えば15~30、例えば20~30、例えば25~30、例えば3~25、例えば3~20、例えば3~15、例えば3~11、例えば3~9、例えば3~7、例えば3~5、または例えば3~4ヌクレオチドの範囲内である。所望の長さを異なる温度および特定の配列に適応させてよい。さらにもう1つの実施形態において、第二のオリゴヌクレオチド(3)中の分岐点移動領域(7)および第三のオリゴヌクレオチド(5)中の分岐点移動領域(7')は、3~30相補的ヌクレオチド、例えば、4~30、例えば5~30、例えば7~30、例えば9~30、例えば11~30、例え

40

50

ば 15 ~ 30、例えば 20 ~ 30、例えば 25 ~ 30、例えば 3 ~ 25、例えば 3 ~ 20、
 例えば 3 ~ 15、例えば 3 ~ 11、例えば 3 ~ 9、例えば 3 ~ 7、例えば 3 ~ 5 または
 例えば 3 ~ 4 相補的ヌクレオチドのストレッチを含む。

【0059】

さらなる実施形態において、第二のオリゴヌクレオチド(3)中の分岐点移動領域(7)
)と第三のオリゴヌクレオチド(5)中の分岐点移動領域(7')とは、少なくとも70
 %相補的、例えば70~100%相補的、例えば75~100%相補的、例えば80~1
 00%相補的、例えば85~100%相補的、例えば90~100%相補的、例えば95
 ~100%相補的、例えば97~100%相補的、例えば99~100%相補的、または
 例えば100%相補的である。さらにさらなる実施形態において、第一のオリゴヌクレオ
 チド(1)中の分岐点移動領域(7)および第二のオリゴヌクレオチド(3)中の分岐点
 移動領域(7)は、3~30相補的ヌクレオチド、例えば4~30、例えば5~30、例
 えば7~30、例えば9~30、例えば11~30、例えば15~30、例えば20~3
 0、例えば25~30、例えば3~25、例えば3~20、例えば3~15、例えば3~
 11、例えば3~9、例えば3~7、例えば3~5、または例えば3~4相補的ヌクレオ
 チドのストレッチを含む。

10

【0060】

もう1つの実施形態において、第一のオリゴヌクレオチド(1)中の分岐点移動領域(7)
)と第二のオリゴヌクレオチド(3)中の分岐点移動領域(7)とは、少なくとも70
 %同一、例えば70~100%同一、例えば75~100%同一、例えば80~100%
 同一、例えば85~100%同一、例えば90~100%同一、例えば95~100%同
 一、例えば97~100%同一、例えば99~100%同一、または例えば100%同
 一である。したがって、第一および第二のオリゴヌクレオチド中の2つの分岐点移動領域7
 は、完全に同一である必要はない。

20

【0061】

追加の実施形態において、第一のオリゴヌクレオチド(1)中の分岐点移動領域(7)
)および第三のオリゴヌクレオチド(5)中の分岐点移動領域(7')は、3~30相補的
 ヌクレオチド、例えば4~30、例えば5~30、例えば7~30、例えば9~30、例
 えば11~30、例えば15~30、例えば20~30、例えば25~30、例えば3~
 25、例えば3~20、例えば3~15、例えば3~11、例えば3~9、例えば3~7
 、例えば3~5、または例えば3~4相補的ヌクレオチドのストレッチを含む。さらなる
 実施形態において、第一のオリゴヌクレオチド(1)と第三のオリゴヌクレオチド(5)
 中の分岐点移動領域(7')とは、少なくとも70%相補的、例えば70~100%相補
 的、例えば75~100%相補的、例えば80~100%相補的、例えば85~100%
 相補的、例えば90~100%相補的、例えば95~100%相補的、例えば97~10
 0%相補的、例えば99~100%相補的、または例えば100%相補的である。

30

【0062】

用語「配列同一性」は、等しい長さの2つのアミノ酸配列間または2つの核酸配列間の
 相同度の定量的尺度である。比較すべき2つの配列が等しい長さでない場合、ギャップの
 挿入または、代替的に、ポリペプチド配列もしくはヌクレオチド配列の末端での短縮を許
 すことにより、可能なベストフィットが得られるようにそれらをアラインしなければならない。
 配列同一性は、

40

【0063】

【化2】

$$\frac{(N_{ref} - N_{dif})100}{N_{ref}}$$

として算出することができ、

この式中、 N_{dif} は、アラインしたときの2つの配列中の非同一残基の総数であり、お
 よび N_{ref} は、それらの配列の一方における残基の数である。それ故、DNA配列AG
 TCAGTCは、配列AATCAATCと75%の配列同一性を有することになる(N_d

50

$i_f = 2$ および $N_{ref} = 8$)。ギャップは、特定の残基 (単数または複数) の非同一性としてカウントする、すなわち、DNA 配列 A G T G T C は、DNA 配列 A G T C A G T C と 75% の配列同一性を有することになる ($N_{dif} = 2$ および $N_{ref} = 8$)。

【0064】

本発明のポリペプチドまたはアミノ酸に基づく実施形態すべてにおいて、1つ以上の配列間の配列同一性の百分率は、clustalWソフトウェア (www.ebi.ac.uk/clustalW/index.html) によりそのプログラムのデフォルト設定を用いて実行したときのそれぞれの配列のアラインメントに基づく。本発明のヌクレオチドに基づく実施形態に関する1つ以上の配列間の配列同一性の百分率も、clustalWソフトウェアをデフォルト設定で使用するアラインメントに基づく。例えば、ヌクレオチド配列アラインメントのためのこれらの設定は、Alignment = 3Dfull、Gap Open 10.00、Gap Ext. 0.20、Gap separation Dist. 4、DNA weight matrix: identity (IUB) である。

10

【0065】

同様に、例えば前記オリゴヌクレオチドの1つについての相補配列を使用することによって、相補度を算出することができることは理解されるはずである。

【0066】

ある実施形態において、分岐点移動領域7と分岐点移動領域7'間のハイブリダイゼーションは、分岐点移動領域内に1つ以上のヘアピン、例えば、1~5ヘアピン、例えば1~3ヘアピン、例えば1~2ヘアピンまたは例えば1ヘアピンを含む。理論により拘束されないが、Sの中央に2つの隣接するヘアピンがあると、ASの複合体全体がホリディジャンクション構造を有することになり、このホリディジャンクションは、 Mg^{2+} の存在下で特定の3D構造を拡張し、それ故、SとハイブリダイズするためにAと競合するタンパク質結合B鎖に対してより大きな立体障害をおそらくもたらすことになるという仮説が立てられる (図20)。ある実施形態において、前記1つ以上のヘアピンは、1~20ヌクレオチド、例えば、3~20ヌクレオチド、例えば5~20ヌクレオチド、例えば10~20ヌクレオチド、例えば3~15ヌクレオチド、例えば3~10ヌクレオチド、または例えば5~15ヌクレオチドの長さを有する。

20

【0067】

結合部分

本発明による結合部分 (単数または複数) は、ワトソン・クリック塩基対合を形成しない分析物の前記アッセイによる検出を可能にする。同様に、DNA結合タンパク質などのDNAまたはRNAに結合しない分析物の検出を可能にする。

30

【0068】

前記1つ以上の結合部分は、原則的に、前記3つのオリゴヌクレオチドのいずれに位置してもよい。ある実施形態において、共有結合で連結されている少なくとも1つの結合部分(4)は、第一のオリゴヌクレオチド(1)上に位置する。もう1つの実施形態において、共有結合で連結されている少なくとも1つの結合部分(4)は、第二のオリゴヌクレオチド(3)上に位置する。第三の実施形態において、共有結合で連結されている少なくとも1つの結合部分(4)は、第三のオリゴヌクレオチド(5)上に位置する。ある実施形態において、前記結合検出システムは、1~5、例えば1~4、例えば1~3、例えば1~2、例えば1、例えば2~5、または例えば3~5の結合部分を含む。

40

【0069】

前記1つ以上の結合部分は、異なる位置にあってもよい。ある実施形態において、共有結合で連結されている少なくとも1つの結合部分(4)は、第一のオリゴヌクレオチド(1)、第二のオリゴヌクレオチド(3)または第三のオリゴヌクレオチド(5)中の分岐点移動領域(7)の一部に共有結合で連結されている。

【0070】

検出すべき具体的な分析物に依存して、異なるタイプの結合部分を利用してもよい。し

50

たがって、ある実施形態において、共有結合で連結されている少なくとも1つの結合部分(4)は、有機分子、抗体、抗原、アプタマー、ピオチンおよびハプテンから成る群より選択される。もう1つの実施形態において、前記抗原は、タンパク質抗原、ペプチド抗原または糖抗原である。一部の分析物は1つまたは少数のヌクレオチドと直接結合できることがあるので、場合によっては共有結合性接合を必要としない。これらの分析物としては、DNA結合タンパク質、一部のイオン(図19b)または挿入分子、および小分子、例えばメラミン(図19a)が挙げられる。ある実施形態において、前記結合部分は、共有結合で連結されている第一の部分が、その第一の部分に共有結合または非共有結合することができる第二の結合部分のためのハンドルとして機能するという意味で、サンドイッチ構造を有することもある。したがって、第二の結合部分は、二重機能I)第一の部分への結合およびII)分析物のための結合部位を有することがある。例えば、前記オリゴヌクレオチドの1つ以上についての部分を形成し、かつ分析物に結合することができるアプタマーの場合、共有結合で連結されている別の結合部分を必要としないこともある。

10

【0071】

小有機分子は、好ましい結合部分である。ある実施形態において、前記有機分子は、150~1500Da(ダルトン)、例えば150~1200Da、例えば150~1000Da、例えば150~800Da、例えば150~600Da、例えば150~400Da、例えば150~300Da、例えば300~1500Da、例えば400~1500Da、例えば600~1500Da、例えば800~1500Da、例えば1000~1500Da、または例えば1200~1500Daの範囲内の分子量を有する。小有機分子もまた本発明のための好ましい分析物である。より具体的な実施形態において、共有結合で連結されている少なくとも1つの結合部分(4)は、ビタミンD、葉酸塩、エンロフロキサシン、ジゴキシゲニンから成る群より選択される。本発明による小有機分子および/または共有結合で連結されている結合部分のさらなる例は、次のものである：

20

毒素：ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)、ブドウ球菌エンテロトキシンA(SEA)、ドゥモイ酸(DA)、アフラトキシン(afb1、afg1、afb2、afg2、afm1)、デオキシニパレノール、オクラトキシンA(OTA)。

【0072】

薬物：モルフィン-3-グルクロニド(M3G)、経口抗凝固薬ワルファリン、インスリン。

30

【0073】

農薬：アトラジン、シマジン、クロルピリホス、カルバリル、ジクロロジフェニルトリクロロエタン(DDT)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)。

【0074】

他の環境分析物：2-ヒドロキシビフェニル(HBP)、ベンゾ[a]ピレン(BaP)。フェノール(ビスフェノールA、アトラジン、ポリ塩素化ビフェニル、3,7,8-TCDD)、メラミンおよび関連化合物。

【0075】

獣医薬/抗生物質：ペニシリンおよびセファロスポリン、クロラムフェニコールおよびクロラムフェニコールグルクロニド、フェニコール抗生物質残留物、テトラサイクリン、タイロシン、エリスロマイシン、スルホンアミド抗生物質。

40

【0076】

化学的汚染物質：甲殻類における4-ノニルフェノール、乳牛におけるインスリン様成長因子-1(IGF-1)。

【0077】

ビタミン：ビタミンB2(リボフラビン)、ビタミンB5(パントテン酸)、ビタミンB8(ピオチン)、ビタミンB9(葉酸)、ビタミンB12(コバラミン)。

【0078】

ホルモン：プロゲステロン、ヒト絨毛性ゴナドトロピンホルモン(hCG)、17-エストラジオール、R-フェトプロテイン(AFP)、テストステロン、19-ノルテス

50

トステロン、メチルテストステロン、ボルデノンおよびメチルボルデノン。

【0079】

火薬：2, 4, 6 - トリニトロトルエン (TNT)、2, 4, 6 - トリニトロフェノール (TNP)、1, 3, 5 - トリニトロベンゼン (TNB)、トリアセトントリフェノキシド (TATP)、ヘキサメチレントリペルオキシジアミン (HMTD)、四硝酸ペンタエリトリール (PETN)、シクロトリメチレントリニトラミン (RDX)。

【0080】

上記化合物リストも本発明に従って検出される分析物であり得ると解されたい。

【0081】

抗体および他のタンパク質分析物：

診断用抗体：Mycoplasma hypopneumoniae 抗体、ブタコレラウイルス (CSFV) 抗体。

【0082】

ウイルス病原体に対する抗体：G型肝炎に対する抗体、ヒトB型肝炎ウイルス (hHBV) に対する抗体、単純ヘルペスウイルス1型および2型 (HSV-1、HSV-2) に対する抗体、エプスタイン・バーウイルスに対する抗体 (抗EBNA)、ヒト呼吸器多核体ウイルス (RSV) に対する抗体、抗アデノウイルス抗体。

【0083】

薬物誘発性抗体：インスリンまたは顆粒球 (insulin or granulocyte) マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) に対する抗体、他の組換えまたは非組換えタンパク質または抗体薬に対する抗体。

【0084】

タンパク質：カゼイン、免疫グロブリンG、葉酸結合タンパク質、ラクトフェリン、およびラクトペルオキシダーゼ。

【0085】

アレルゲンまたはアレルギーマーカー：ピーナッツアレルゲン、パスタ中のコンアルブミン/トロポミオシン、ゴマ種子タンパク質、トロポミオシン、免疫グロブリンE (IgE) 抗体、ヒスタミン (α-イミダゾールエチルアミン)。

【0086】

癌マーカー：前立腺特異的抗原 (PSA)、PSA-ACT複合体 (1-抗キモトリプシン)、炭水化物抗原 (CA 19-9)、タンパク質血管内皮成長因子 (VEGF)、インターロイキン-8 (IL-8)、癌胎児抗原 (CEA)、フィブロネクチン。

【0087】

他のマーカー：トロポニン (cTn I)、グルコース6-リン酸イソメラーゼ (GPI) に対する抗体、抗グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) 抗体、c-反応性タンパク質 (CRP)、シスタチンC、B型肝炎表面抗原 (HBsAg)。

【0088】

前記結合部分は、前記結合部分に結合したその結合パートナーを有することがある。本文脈において、用語「結合パートナー」は、結合部分に非共有結合する (bind non-covalently) ことがある分子を指すと解されたい。したがって、ある実施形態において、結合パートナーは、結合部分に非共有結合している。「結合部分」-「結合パートナー」カップルの非限定的な例は、抗体-抗原、ストレプトアビジン-ビオチン、葉酸受容体-葉酸である。したがって、ある実施形態において、前記結合部分は、前記結合部分に結合しているその結合パートナーを有する。

【0089】

検出される分析物のタイプに一部依存して3つの戦略を本検出システムに適用してよい。これらの戦略を下で概説し、例えばタンパク質もしくは抗体の検出 (戦略1) または小分子分析物の検出 (戦略2および3) に関して例示する。

【0090】

戦略1：直接アッセイ

10

20

30

40

50

1つの実施形態（戦略1）では、タンパク質または抗体が分析することとなる分析物である（図5、戦略1）。この戦略を用いて、結合部分へのタンパク質または抗体（分析物）の結合がハイブリダイゼーション平衡をシフトさせ、その後、それを検出することができる。この戦略を図3～5ならびに対応する実施例1および2においてさらに詳細に概説する。

【0091】

戦略2：阻害アッセイ

もう1つの実施形態（戦略2）では、小分子分析物（標的分子）を含む（または含むと推測される）試料を先ず、結合部分に対する結合パートナー（例えば、抗体などのタンパク質）と混合し、その後、その混合物をその検出システムの残りの部分に添加する（図5、戦略2）。試料中に含まれている標的小分子（分析物）がある場合、それらがタンパク質（結合パートナー）の結合部位を占有することになり、それ故、オリゴヌクレオチドB上に連結された共有結合で連結されている同じ小分子との相互作用によりハイブリダイゼーション平衡に干渉するためのそのタンパク質の結合能力は殆どまたは全くなくなる。したがって、試料中の分析物の存在は、結果として、その検出システムのオリゴヌクレオチド間のハイブリダイゼーション平衡を変化させることになる。これを阻害アッセイと呼ぶ。図4eは、ビオチン検出のためのかかるアッセイの結果を示す。

10

【0092】

戦略3：競合アッセイ

さらのもう1つの実施形態（戦略3）では、結合パートナー（タンパク質）を先ずアッセイに添加し、戦略1と同じ平衡シフトを生じさせ、その後、分析物（標的分子）を含むと推測される未知試料を添加する。遊離分析物分子が存在する場合、それらは、オリゴヌクレオチドB上の結合パートナー（タンパク質）に結合する、共有結合で連結されている結合部分と置き換わって、タンパク質と結合し、かくしてハイブリダイゼーション平衡を変化させ得る（図5、戦略3）。したがって、この戦略は競合アッセイである。阻害の戦略および競合的戦略両方において、元のアッセイと比較してシグナル変化が大きいほど、試料中に存在する標的分子は少ない。

20

【0093】

分析物

様々な種類の分析物が本発明によって検出され得る。前述のように、分析物は、DNAまたはRNAでない。同様に、分析物は、DNA相互作用性分析物、例えば、DNA結合タンパク質またはRNA結合タンパク質でなくてよい。ワトソン・クリック塩基対合を形成せず、DNAに結合する分析物の例は、DNA結合タンパク質、例えばヒストンである。ある実施形態において、分析物は、非DNAおよび非RNA結合分析物である。

30

【0094】

ある実施形態において、分析物は、タンパク質、ペプチド、有機分子、抗体、抗原、糖、脂質およびハプテンから成る群より選択される。もう1つの実施形態において、分析物は、タンパク質抗原、ペプチド抗原、または糖抗原である。さらにもう1つの実施形態において、分析物は、150～1500Da、例えば150～1200Da、例えば150～1000Da、例えば150～800Da、例えば150～600Da、例えば150～400Da、例えば150～300Da、例えば300～1500Da、例えば400～1500Da、例えば600～1500Da、例えば800～1500Da、例えば1000～1500Da、または例えば1200～1500Daの範囲内の分子量を有する有機分子である。特定の実施形態において、分析物は、ビタミン、毒素、アレルゲン、火薬、薬物、例えばコカイン、抗生物質、例えばエンロフロキサシン、農薬、ホルモン、化学的汚染物質、バイオマーカーから成る群より選択される。さらに、上で述べたものが本発明による分析物のより広範なリストである。

40

【0095】

シグナル伝達システム

本発明による検出システムは、分析物を検出するときにシグナルまたはシグナルの変化

50

をもたらすシグナル伝達システムを含む。シグナル伝達システムは、そのシグナル伝達システムの異なる部分を含むオリゴヌクレオチドがハイブリダイズされるとシグナルが発生または触媒されるという原理に基づく。例えば実施例1において例証するように、オリゴヌクレオチド1(A)とオリゴヌクレオチド5(S)のハイブリダイゼーションは、シグナル伝達システムの2つの部分が近接されると増加されたシグナルを発生させるが、オリゴヌクレオチド3とオリゴヌクレオチド5のハイブリダイゼーションは、シグナルを発生させる結果にならない。したがって、ある実施形態において、第二のオリゴヌクレオチド(3)は、第一の基(2)を含み、前記第一の基は、シグナル伝達システムの第一の部分形成し、および第三のオリゴヌクレオチド(5)は、第二の基(6)を含み、前記第二の基は、シグナル伝達システムの第二の部分形成する。

10

【0096】

同様に、シグナル伝達システムを第一のオリゴヌクレオチドと第三のオリゴヌクレオチドに分けてもよい。したがって、ある実施形態において、第一のオリゴヌクレオチド(1)は、第一の基(2)を含み、前記第一の基は、シグナル伝達システムの第一の部分形成し、および第三のオリゴヌクレオチド(5)は、第二の基(6)を含み、前記第二の基は、シグナル伝達システムの第二の部分形成する。

【0097】

シグナル伝達システムは、どのオリゴヌクレオチドが互いにハイブリダイズするかに依存して、異なるシグナルをもたらす第三の部分を含んでもよく、これは、各オリゴヌクレオチドが、その検出システムの一部を構成することを意味する。したがって、ある実施形態において、

20

- 第一のオリゴヌクレオチド(1)は、第一の基(2)を含み、前記第一の基は、シグナル伝達システムの第一の部分形成し；
- 第二のオリゴヌクレオチド(3)は、第三の基(10)を含み、前記第三の基(10)は、そのシグナル伝達システムの第三の部分形成し；および
- 第三のオリゴヌクレオチド(5)は、第二の基(6)を含み、前記第二の基は、シグナル伝達システムの第二の部分形成する。

【0098】

この構成を図4および対応する実施例において例証する。

【0099】

30

様々なタイプのシグナル伝達システムを利用してよい。したがって、ある実施形態において、第一の基(2)および第二の基(6)によって形成されるシグナル伝達システムは、クエンチャー-フルオロフォアシグナル伝達システム、フルオロフォア-クエンチャーシグナル伝達システム、FRETシグナル伝達システム、DNAペルオキシダーゼ触媒シグナル伝達システム、またはクエンチャーおよび一重項酸素増感剤である。シグナル伝達システムは、特にFRETまたはクエンチャーシステムの場合、蛍光ナノ粒子を利用することがある。実施例の節は、本発明に従って利用され得る構成の様々な例を提供する。さらにもう1つの実施形態において、

I. シグナル伝達システムの第一の部分形成する第一の基(2)は、クエンチャーであり、およびシグナル伝達システムの第二の部分形成する第二の基(6)は、フルオロフォアである、または

40

II. シグナル伝達システムの第一の部分形成する第一の基(2)は、フルオロフォアであり、およびシグナル伝達システムの第二の部分形成する第二の基(6)は、クエンチャーである、または

III. シグナル伝達システムの第一の部分形成する第一の基(2)は、FRETドナーであり、およびシグナル伝達システムの第二の部分形成する第二の基(6)は、FRETアクセプターである、または

IV. シグナル伝達システムの第一の部分形成する第一の基(2)は、FRETアクセプターであり、およびシグナル伝達システムの第二の部分形成する第二の基(6)は、FRETドナーである、または

50

V. シグナル伝達システムの第一の部分を形成する第一の基(2)は、DNAペルオキシダーゼシグナル伝達システムの前半部であり、およびシグナル伝達システムの第二の部分を形成する第二の基(6)は、DNAペルオキシダーゼシグナル伝達システムの後半部である。

【0100】

DNAペルオキシダーゼシグナル伝達システムを使用するとき、その検出システムは、さらなる成分を含むことがある。したがって、さらなる実施形態において、前記検出システムは、ヘミンおよび/またはABTS²⁻および/またはH₂O₂および/またはルミノールを含む。比色法、例えば金ナノ粒子(AuNP)または量子ドット(QD)、を本発明によるアッセイに組み込むことも可能である。

10

【0101】

シグナル伝達システムの異なる部分が前記オリゴヌクレオチドの異なる位置に共有結合で連結されていてよい。したがって、ある実施形態において、シグナル伝達システムの第一の部分および/またはシグナル伝達システムの第二の部分および/またはシグナル伝達システムの第三の部分は、それがカップリングされるオリゴヌクレオチド上の分岐点移動領域(7、7')の一部に共有結合で連結されている。

【0102】

もう1つの実施形態において、シグナル伝達システムの第一の部分および/またはシグナル伝達システムの第二の部分および/またはシグナル伝達システムの第三の部分は、それがカップリングされるオリゴヌクレオチド上のトーホールド領域(7、8)の一部に共有結合で連結されている。

20

【0103】

例えば、FRET対が近接するとシグナルが発生または増加されるようにFRET対を設計する方法は、当業者には公知である。同様に、フルオロフォア-クエンチャー対が近接するとシグナルが消失または弱化するようフルオロフォア-クエンチャー対を設計する方法は、当業者には公知である。実施例3およびその対応する図に、DNAペルオキシダーゼアッセイが、DNAペルオキシダーゼシグナル伝達システムの一部を含むオリゴヌクレオチドの各々が近接されたときにシグナルの発生を触媒するように設計され得る方法を示す。DNAペルオキシダーゼシグナル伝達システムの1つの利点は、それが、極少量の分析物の検出を可能にし得る増幅反応を構成する点である。もう1つの利点は、オリゴヌクレオチドが、より少ない修飾しか必要としないのでより容易に合成される点である。すべての上の例では、シグナル伝達システムの各部分を含む2つのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに起因して異なる対が近接される。上で説明したように、前記アッセイは、平衡反応に基づき、それ故シグナルは、例えば前記共有結合で連結されている結合部分に対する結合パートナーの結合または解離に起因する、ハイブリダイゼーション平衡の変化によって強化されることもあり、または弱化されることもある。

30

【0104】

特殊な実施形態では、分析物が核酸分子、例えばDNAまたはRNAであってもよいが、但し、シグナル伝達システムがDNAペルオキシダーゼシグナル伝達システムであることを条件とする。

40

【0105】

もう1つの特殊な実施形態において、分析物は、オリゴヌクレオチド(1)、(3)および/または(5)のいずれかの中の1、2または3個のチミン塩基と相互作用することができる、メラミンおよび構造的に関連がある化合物であってもよい。

【0106】

共有結合で連結されたオリゴヌクレオチド

場合によっては、検出システムがいくつかのオリゴヌクレオチドで構成されることは、ハイブリダイゼーション平衡に達するまでの時間を増加することがあるので、不利であることがある。本発明によるオリゴヌクレオチドは、互いに共有結合で連結されていてよく、これは、その検出システムが、3つの個別のオリゴヌクレオチドで作られているので

50

はなく、1つまたは2つの個別のオリゴヌクレオチドでもっばら構成されていることを意味する。この原理を実施例12ならびに対応する図17および18において例証する。したがって、ある実施形態において、第一のオリゴヌクレオチド、第二のオリゴヌクレオチドおよび第三のオリゴヌクレオチドは、共有結合で連結されている。

【0107】

したがって、ある実施形態において、前記第一のオリゴヌクレオチド(1)は、第二のオリゴヌクレオチド(3)に共有結合で連結されている。もう1つの実施形態において、第三のオリゴヌクレオチド(5)は、第一のオリゴヌクレオチド(1)に共有結合で連結されている。さらなる実施形態において、第二のオリゴヌクレオチド(3)は、第三のオリゴヌクレオチド(5)に共有結合で連結されている。さらなる実施形態において、前記第一のオリゴヌクレオチド(1)は、第二のオリゴヌクレオチド(3)に共有結合で連結されており、および第二のオリゴヌクレオチド(3)は、第三のオリゴヌクレオチドに共有結合で連結されている。さらにもう1つの実施形態において、第一のオリゴヌクレオチド(1)の3'末端は、第二のオリゴヌクレオチド(3)の5'末端に共有結合で連結されている。さらなる実施形態において、第二のオリゴヌクレオチド(3)の3'末端は、第三のオリゴヌクレオチド(5)の5'末端に共有結合で連結されている。

10

【0108】

前記オリゴヌクレオチドの2つ以上が互いに共有結合で連結されているとき、その検出システムが本発明による第一、第二および第三のオリゴヌクレオチドをなお含むことは理解されるはずである。

20

【0109】

特殊な実施形態において、分析物は、核酸分子、例えばDNAまたはRNAであってもよいが、但し、前記オリゴヌクレオチドの2つ以上が上で説明したように共有結合で連結されていることを条件とする。

【0110】

さらにもう1つの実施形態において、前記オリゴヌクレオチドは、リンカーによって共有結合で連結されている。追加の実施形態において、前記リンカーは、ホスホジエステル結合手、ヌクレオチド、例えば1~20、例えば1~10、1~5、3~10ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ペプチド、C-リンカー、例えばC1-C20リンカー、PEGリンカー、ジスルフィドリンカー、およびスルフィドリンカーから成る群より選択される。当業者が他の適するリンカーを見つけてもよい。

30

【0111】

部品からなるキット

前記検出システムを部品からなるキットの形態で提供してもよい。したがって、本発明のある態様は、本発明による分析物検出システムを含む部品からなるキットに関する。

【0112】

もう1つの態様において、本発明は、本発明による第一のオリゴヌクレオチド1、第二のオリゴヌクレオチド3および第三のオリゴヌクレオチド5を含む部品からなるキットに関する。

【0113】

前記キットは、さらなる成分を含んでもよい。したがって、ある実施形態において、前記キットは、ヘミンおよび/またはABTS²⁻および/またはH₂O₂をさらに含む。これらの成分は、DNAペルオキシダーゼアッセイを用いるときの前記キットのパーツであり得る。前に説明したように、前記結合部分に対する結合パートナーを前記キットに含めることが有利であることもある。したがって、さらなる実施形態において、前記キットは、前記結合部分に対する結合パートナーを含む。さらにもう1つの実施形態において、前記結合パートナーは、1つ以上の結合部分に非共有結合でカップリングされている。さらにもう1つの実施形態において、前記結合パートナーは、共有結合で連結されている結合部分を含むオリゴヌクレオチドとは別のそのキットの区画内にある。

40

【0114】

50

試料中の分析物の存在またはレベルの検出方法

本発明は、試料中の分析物の存在の検出方法も提供する。したがって、本発明のある態様は、試料中のDNAおよびRNAとは異なる分析物の存在またはレベル検出方法であって、

- a) 目的の分析物を含むまたは含むと推測される試料を提供するステップ；
- b) 本発明による分析物検出システムを提供するステップ；
- c) 前記試料を前記分析物検出システムとともにインキュベートするステップ；
- d) 分析物の検出レベルを基準レベルと比較するステップ；および
- e) 前記試料中の分析物の存在またはレベルを決定するステップ

を含む方法に関する。

10

【0115】

前記試料が、その試料を含むことが判っていることもあり、または分析物がその試料中に存在するかどうか判らないこともあることは理解されるはずである。第一の事例では定量が目的であることがあるのに対して、第二の事例については存在を検出するだけで十分であることがある。

【0116】

さらにもう1つの実施形態において、DNAおよびRNAとは異なる分析物は、核酸分子ではない。

【0117】

好ましくは、ハイブリダイゼーション平衡に達するまでインキュベーションステップを継続する。したがって、ある実施形態では、平衡に達するまでインキュベーションステップc)を継続する。しかし、そのアッセイを実時間でモニターしてもよい。ハイブリダイゼーション平衡は、結合部分への分析物の結合によって変化し得る。したがって、ある実施形態において、第一のオリゴヌクレオチド(1)と第三のオリゴヌクレオチド(5)間および第二のオリゴヌクレオチド(3)と第三のオリゴヌクレオチド(5)間のハイブリダイゼーション平衡は、結合部分への分析物の結合によってシフトされる。

20

【0118】

結合部分に対する結合パートナーがアッセイに含まれる場合、そのハイブリダイゼーション平衡は、異なる様式で変化される。したがって、もう1つの実施形態において、第一のオリゴヌクレオチド(1)と第三のオリゴヌクレオチド(5)間および第二のオリゴヌクレオチド(3)と第三のオリゴヌクレオチド(5)間のハイブリダイゼーション平衡は、結合部分(4)に対する結合パートナーの前記結合部分からの解離によってシフトされる。

30

【0119】

結合部分に対する結合パートナーを様々な時点でアッセイに含めてよい。さらにもう1つの実施形態では、試料をその検出システムのオリゴヌクレオチドとともにインキュベートする前に、結合部分に対する結合パートナーをその試料とともにインキュベートする。もう1つの実施形態では、試料をその検出システムのオリゴヌクレオチドとともにインキュベートした後、結合部分に対する結合パートナーをその試料とともにインキュベートする。さらにもう1つの実施形態では、結合部分に対する結合パートナーを、試料とのインキュベーション前に、その検出システムのオリゴヌクレオチドとともにインキュベートする。結合親和性に依存して、上記溶液の各々が最適なものであり得る。さらなる詳細については、図13も参照されたい。

40

【0120】

さらなる実施形態において、結合部分からの結合パートナーの解離は、その結合パートナーへの分析物の結合によって生ずる。

【0121】

インキュベーション時間は、用いられる試料のタイプ、分析物および正確なオリゴヌクレオチドに依存して、アッセイごとに異なってよい。したがって、ある実施形態において、インキュベーションステップc)は、1分~24時間、例えば1分~12時間、例えば

50

1分6時間、例えば1分～2時間、例えば1～60分、例えば1～30分、例えば1～15分、例えば1～5分、例えば5～60分、例えば10～60分、例えば15～60分、例えば30～60分、例えば1～6時間、例えば2～6時間または例えば4～6時間の期間、行われる。

【0122】

本アッセイの利点は、アッセイ中に温度を変える必要がないことがある点である。したがって、さらなる実施形態では、前記方法を等温条件下で行う。これは、加熱室または加熱板のみを使用してアッセイを行うことを意味する。同様に、室温の作業場でアッセイを行ってもよい。その場合、その後、必要な装置を使用してアッセイを分析することができる。DNAペルオキシダーゼシグナル伝達システムを使用する場合、目視検査によって結果を決定してもよい。さらにもう1つの実施形態では、前記方法を4～50、例えば10～50、例えば20～50、例えば25～50、例えば30～50、例えば35～50、例えば40～50、例えば4～40、例えば4～35、例えば4～30、例えば4～25、または例えば4～20の範囲内の温度で行う。さらにもう1つの実施形態では、等温条件下でアッセイを行う。

10

【0123】

試料

試料は、様々な起源からのものであってよい。ある実施形態において、試料は、環境から得られる試料、例えば水試料である。もう1つの実施形態において、試料は、生物学的試料である。さらなる実施形態において、試料は、食品試料、またはプラスチックである。プラスチックを、毒性であり得る軟化剤の存在について試験してもよい。

20

【0124】

さらにもう1つの実施形態では、生物学的試料を哺乳動物、例えばヒトから得た。さらなる実施形態において、生物学的試料は、血液試料、例えば血清もしくは血漿、尿試料、糞便試料、生検試料、または唾液試料である。アッセイに最適な条件をもたらすために、試料を本発明によるアッセイで用いる前に精製または実質的に精製してもよい。したがって、さらにもう1つの実施形態において、試料は、精製された試料である。試料を精製することの利点は、反応条件をより容易に制御できる点である。

【0125】

前記アッセイを様々な方法によって読み取ってよい。したがって、ある実施形態では、分析物の存在またはレベルを目視検査、光学密度、分光法、吸光分光法、蛍光分光法、電気化学、QCM、SPR、または顕微鏡法によって判定する。

30

【0126】

レベルまたは存在を決定することができるように、試料を基準レベルと比較することを必要とすることがある。したがって、さらにもう1つの実施形態において、基準レベルは、所定の値、標準曲線、または陰性対照である。基準レベルを様々な基準に基づいて、例えば、ROC曲線の使用によって設定してもよく、前記ROC曲線は、例えば診断試験において使用されることが多い。

【0127】

診断試験の精度を受信者動作特性曲線(「ROC曲線」)によって特性評価してもよい。ROCは、診断試験の様々な可能なカットオフポイントについての偽陽性率に対する真陽性率のプロットである。ROC曲線は、感度と特異度の間の関係を示す。すなわち、感度の増加は、特異性の減少を伴うことになる。曲線が左軸の近くそしてまたROC空間の上端の近くをたどるほど、試験の精度は高い。逆に、曲線がROCグラフの45度対角線に近くなるほど、試験の精度は低い。ROC下面積は、試験精度の尺度である。試験の精度は、その試験が、どれ程よく被験群を問題の疾患への罹患者と非罹患者に分けるかに依存する。1の曲線下面積(「AUC」と呼ばれる)は、完璧な試験を表し、その一方で0.5の面積は、あまり有用でない試験を表す。したがって、本発明のバイオマーカーおよび診断法は、0.50より大きいAUCを有し、より好ましい試験は、0.60より大きいAUCを有し、さらにいっそう好ましい試験は、0.70より大きいAUCを有する。

40

50

【 0 1 2 8 】

試験の有用性の他の有用な尺度は、陽性的中率および陰性的中率である。陽性的中率は、実際に陽性である試験陽性者の百分率である。陰性的中率は、実際に陰性である試験陰性者の百分率である。したがって、当業者は、特定の必要基準に基づいて基準レベルを決定することができることになる。

【 0 1 2 9 】

本発明の態様の1つについての文脈の中で説明した実施形態および特徴が、本発明の他の態様にもあてはまることに留意されたい。図面への参照により本発明を例示するために参照番号を本明細書およびクレームにおいて用いる場合、これらが単に説明のためのものであり、本発明を限定と解釈すべきでないことにも留意されたい。

10

【 0 1 3 0 】

本出願において引用するすべての特許および非特許文献は、それら全体が参照により本明細書に援用されている。

【 0 1 3 1 】

ここで、以下の非限定的実施例で本発明をさらに詳細に説明することにする。

【実施例】

【 0 1 3 2 】

(実施例1)

タンパク質：ストレプトアビジン (S T V) の検出

材料

20

A、BおよびSとそれぞれ名付けた3本のDNA鎖をこの実験では使用する。AおよびSは、内部アミン修飾を伴い、これをAlexaフルオロフォア標識のためのハンドルとして使用し、その一方でBは、内部ビオチン修飾を有する。それらの配列を下に与える(下線付けは、トーホールド領域を示す)：

【 0 1 3 3 】

【表1】

名称	配列	修飾
A - 配列番号 4	<u>TCATTCAA1ACCCTACG</u>	1:内部アミノ修飾因子 C6 dT
B - 配列番号 5	TTCAATACCC2ACG <u>TCTC</u>	2:内部ビオチン dT
S - 配列番号 6	<u>TGGAGACG1AGGGTATTGAATGAGGG</u>	1:内部アミノ修飾因子 C6 dT

30

【 0 1 3 4 】

すべてのオリゴヌクレオチドは、デンマークのDNA Technology A/Sから購入した。その会社が合成直後にRP-HPLC精製を行った。

【 0 1 3 5 】

Alexa Fluor (登録商標) 647スクシンイミジルエステルおよびAlexa Fluor (登録商標) 555スクシンイミジルエステルは、Invitrogenから購入した。

40

【 0 1 3 6 】

ストレプトアビジンを含めて、すべての他の試薬は、Sigma-Aldrichから購入した。

【 0 1 3 7 】

図3は、オリゴヌクレオチドが互いにどのようにハイブリダイズし得るのかを示す。

【 0 1 3 8 】

方法

フルオロフォア接合

標識手順は、Invitrogenによって与えられたプロトコルを参照するが、少し

50

変更を加える。より具体的には、アミン修飾DNA (16 μ L、100 μ M) をリン酸緩衝液 (10 μ L、0.4 M、pH 8.5) と混合し、その後、DMSOに溶解した活性化色素-エステル (100 μ g、約80 nmol) を添加した。この混合物において、DNAの最終濃度は約40 μ Mであり、エステルとアミンのモル比は50 : 1であった。28で一晩のインキュベーション後、その混合物をエタノール沈殿、続いてAgilent 1200シリーズでの逆相HPLC精製 (15分にわたって0.1 M TEAA中5~40% MeCN) によって処理した。260 nmでの吸収最大値がある対応するピーク内の試料を回収し、凍結乾燥させ、200 μ L H₂Oに再溶解した。使用前にNanoDrop 1000分光光度計によって到達濃度を決定した。

【0139】

STV検出のためのアッセイおよびその機能の構築

典型的なアッセイでは、1 : 1 : 1の正確な化学量論比を有する鎖A、BおよびSを、1 x [TAE - Mg²⁺] 緩衝液 (40 mM Tris - HAc (pH 8)、1 mM EDTA、12.5 mM Mg (Ac)₂) に混ぜ入れ、加えて標的タンパク質としてのSTVも混ぜ入れた。典型的な最終濃度は、各DNA成分について20 nM、およびSTVについて250 nMであった。実際のセンシングには必要でないが、一価結合を確実なものにするために過剰なSTVを使用した。反応速度データは、システムがほぼ平衡に達するために3時間で十分であることを示した (データを示さない) が、便宜上、その混合物を測定前に一晩、室温 (RT) でインキュベートした。

【0140】

分光蛍光計によるFRET測定

70 μ Lのアッセイ混合物を石英キュベットにピペットで移し、異なる試料間で2回、1 x [TAE - Mg²⁺] によって洗浄した。走査型分光蛍光計 (Fluoro - Max - 3、HORIBA Jobin Yvon Inc.) で蛍光測定を行った。Alexa 555については530 nmで励起が果たされた。FRET効率を $E = I_A / (I_A + I_D)$ として算出した。この式中、 I_A は、アクセプターピーク蛍光強度 (Alexa 647については667 nm) であり、および I_D は、ドナーピーク蛍光強度 (Alexa 555については566 nm) である。

【0141】

ゲル実験およびTyphoonスキャン

バルクFRET測定に使用した15 μ Lの各試料を、3 μ Lの6 x ゲル負荷色素 (NEB) と混合した後、6%非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) ゲル (アクリルアミド/ビスアクリルアミド; 19 : 1) のウェルに負荷し、冷蔵庫の中で溶離した (70 V、1.5時間)。ゲル自体および泳動用緩衝液の両方を作るために1 x TBE - Mg²⁺ ([Mg²⁺] = 12.5 mM) を使用した。

【0142】

電気泳動後、染色なしで、蛍光モードでTyphoon 9400 (Amersham Biosciences) を使用してゲルをスキャンした。赤色レーザー (633 nm) と670 nmバンドパスフィルター (655 nmと685 nmの間の光を透過させ、670 nmに中心を置く透過ピークを有する) を、それぞれ、Alexa 647色素の励起および発光のための組み合わせとして選んだ。8.3 x 7.3 cmミニゲルについての典型的スキャン時間は、200 μ mの画素サイズを使用したとき3分であった。その後、そのゲルをImageQuant TL 7.0 (GE Healthcare) によって分析した。レーン作成およびバンド検出は、手作業で行った。

【0143】

結果

STVがなければ、3本のDNA鎖間のハイブリダイゼーション事象は平衡に達することになり、その場合、BはSと結合するための4 nt トーホールドを有するが、Aは3 nt トーホールドしか有さないの、AS二重鎖より長いBS二重鎖が存在するはずである。ピオチン - STV相互作用によってBと結合することができるSTVがあると、STV

10

20

30

40

50

の嵩高さが高感度の分岐点移動プロセスを妨げるので元の平衡はシフトされることになり、前記分岐点移動プロセスによってしかBはAと置き換わってSとハイブリダイズすることができないため、その試料にはより短いBS二重鎖とより長いAS二重鎖が存在するはずである。

【0144】

FRET（フォルスター共鳴エネルギー移動）対を形成する2つのフルオロフォアを、溶液中のAS二重鎖の分布数を表すFRETシグナルを発するように、それぞれAおよびS上に付ける（図3も参照されたい）。正規化FRET効率のほぼ倍増がSTV添加後に明示された（図4a）。それらの多岐にわたる代表生蛍光データも示す（図4b）。加えて、滴定曲線を作成した。それを図4cに示す。この図は、定量検出の可能性およびサブナノモルの感度を示す。溶液中の各成分をそれぞれ観察することができる非変性PAGEゲルからさらなる証拠が得られる（図4d）。選択励起および発光波長が、ここではバンド強度のみがAの量を表わすことが保証することは、注目に値する。結果は、STVの存在下ではずっと短い一本鎖A（ssA）が残され、同時により長いAS二重鎖が形成されるという予想に完全に従う（図4d、1ピオチン）。

10

【0145】

この実施例では、2つのピオチンを1本のB鎖上にも付けた。これは、STVが四価結合能力を有し、そのためピオチン標識されたBが2部位相互作用によって巻き上がり、STVに巻き付くことになるという事実（図4d挿入図）を利用する。かくしてトーホールドは全く機能することができず、したがって、よりいっそう短いBSおよび長いASが予想される。実際、STV添加後の変化は、1ピオチンシステムより印象的である（図4c、2ピオチン）。

20

【0146】

補足説明

上の結果に加えて、以下の観測を行った（データは示さない）：

1．フルオロフォア-クエンチャー対をFRETの代わりに代替レポーターシステムとして試した。これも安定な結果をもたらした。

【0147】

2．2つの陰性対照を試験した：ピオチンを有さないシステムに添加したSTV、ピオチン標識されたシステムに添加した他のタンパク質（トロンピンまたは他の抗体）。いずれも有意なFRET変化を呈示しない。

30

【0148】

3．このセンシングアッセイの感度は、FRET値の測定に使用される計器の感度に依存する。これまでに行った研究では、標的タンパク質として1nMほどの低さのSTVを、最終濃度として1nM DNAを有するアッセイを使用することにより首尾よく検出した。

【0149】

結論

本発明者らは、ピオチン-STV相互作用をモデルシステムとしてうまく利用して、3本のDNA鎖の平衡に基づくアッセイには特異的標的タンパク質はもちろん小分子も検出する大きな可能性があることを証明した。バルクFRETデータとTyphoonスキャンゲル実験の両方で本発明者らの設計の有効性を確認し、STV添加後、シグナルを倍増（または設計しだいで半減）させることができる。

40

【0150】

（実施例2）

小分子：ピオチンの検出

実施例1において説明したシステムにおいて阻害戦略（図5；戦略2）を適用することにより、ピオチンを検出することができる。この実験では、検出される標的としてのピオチンを先ず所定量のSTVと混合し、その後、その混合物全体を標準アッセイに添加する。遊離ピオチンの存在下では、STV上のすべての活性結合部位が占有されることになり

50

、それ故、それは、DNA平衡に効果を及ぼすことができない。このシグナルオフ検出法を、14 nMのDNA、20 nMのSTV、および一連の濃度のビオチンを使用することによって試験した。滴定曲線を図4eに示す。ビオチンとSTV間のモル比は、STVの四価特性と一致する。

【0151】

方法

ストレプトアビジン添加前の実施例1におけるアッセイと同一のアッセイ構成を、14 nM DNAを使用して用いた。様々な濃度のビオチンを先ずストレプトアビジン(20 nM)と予混した。室温で3時間のインキュベーション後、その混合物を正規のアッセイに添加し、室温で一晩、暗所でインキュベートした。

10

【0152】

結果

標的分子としてのビオチンの不在下、STVは、平衡に対して前と同じ効果を示す。試料がビオチンを含有する場合、これらの遊離ビオチンがSTVの結合部位を塞ぐことになり、その結果、STVはこのアッセイで機能できなくなる。このシグナルオフ検出法は、ビオチンの検出のための滑らかな校正曲線をもたらした。結果は、四価のSTVを表す(図4e)。

【0153】

(実施例3)

ビオチン検出アッセイの特異性

対照システムは、2つのFRET対を有するが、標識された結合部分を一切有さない、3本のDNA鎖から成り得る。このシステムへの標的ストレプトアビジン、IgG、トロンピンまたはATPのいずれの添加も、検出可能なシグナル変化をもたらすことにならず(図6a)、これは、平衡をシフトさせる結合事象である設計の有効性を確認するばかりでなく、このシステムの良好な特異性の証拠としても役立つ。

20

【0154】

実施例1において説明したビオチンシステムに様々な標的を添加することにより特異性も試験し、それらのいずれも非特異的検出可能効果を示さなかった(図6b)。リガンドを有さない対照システムにSTVを添加することによってもこのアッセイの有効性を確認し、FRETシグナル変化は観察されなかった。

30

【0155】

(実施例4)

緩衝液中の抗ジゴキシゲニン(aD)検出

材料

A、BおよびSとそれぞれ名付けた3本のDNA鎖をこの実験では使用する。AおよびSは、内部アミン修飾を伴い、これをAlexaフルオロフォア標識のためのハンドルとして使用し、その一方でBは、内部ジゴキシゲニン修飾を有する。それらの配列を下に与える(下線付けは、トールド領域を示す)：

【0156】

【表2】

40

名称	配列	修飾
A - 配列番号7	<u>CTCATTCAA1ACCCTACG</u>	1:内部アミノ修飾因子 C6 dT
B - 配列番号8	TTCAATACCC2ACG <u>TCTC</u>	2: 5-アミノアリル- dU
S - 配列番号6	<u>TGGAGACG1AGGGTATTGAATGAGGG</u>	1:内部アミノ修飾因子 C6 dT

【0157】

A、BおよびSについてのオリゴヌクレオチドすべてを、Bioautomation

50

からのMerMade-12オリゴヌクレオチド合成装置を用いて社内で合成した。合成後、DNA鎖をTOPカートリッジ精製し、エタノール沈殿した。

【0158】

Alexa Fluor (登録商標) 647スクシンイミジルエステルおよびAlexa Fluor (登録商標) 555スクシンイミジルエステルは、Invitrogenから購入した。

【0159】

5-アミノアリル-dUホスホロアミダイトは、Berry & Associatesから購入した。

【0160】

抗ジゴキシゲニン₁は、Rocheから購入した。

【0161】

すべての他の試薬は、Sigma-Aldrichから購入した。

【0162】

図8Aは、オリゴヌクレオチドが互いにどのようにハイブリダイズし得るのかを示す。

【0163】

方法

フルオロフォア接合

実施例1と同じ。

【0164】

ジゴキシゲニン接合

アミン修飾DNA (100 μL、50 μM) をDMF (100 μL、150 nmol) 中の活性化ジゴキシゲニンエステル (DIG-NHS) に添加し、その後、トリエチルアミン (2 μL) をこれに添加した。この混合物において、DNAの最終濃度は25 μMであり、エステルとアミンのモル比は30 : 1である。25 °Cで1時間のインキュベーション後、その混合物をエタノール沈殿、続いてAgilent 1200シリーズでの逆相HPLC精製 (15分にわたって0.1 M TEAA中5~40% MeCN) によって処理した。260 nmでの吸収最大値がある対応するピークを有する試料を回収し、凍結乾燥させ、200 μL H₂Oに再溶解した。使用前にNanoDrop 1000分光光度計によって到達濃度を決定した。

【0165】

aD検出のためのアッセイおよびその機能の構築

実施例1と同じだが、標的タンパク質としてSTVの代わりにaDを用い、2倍過剰の抗ジゴキシゲニン (20 nMの各DNA成分、および40 nMのaD) を用いた。

【0166】

分光蛍光計によるFRET測定

試料調製およびFRET測定は、実施例1と同じである。

【0167】

ゲル実験およびTyphoonスキャン

実施例1と同じ。

【0168】

結果

得られた結果を図7に示す。aDの存在下でASの30%分布数増加を表すFRET値が観察される。様々なaD濃度での滴定を図8Dに示す。電気泳動によるaDの補足的検出法を図8Eに示す。

【0169】

(実施例5)

ヒト血漿中の抗ジゴキシゲニン (aD) の検出。

【0170】

材料

10

20

30

40

50

A、BおよびSとそれぞれ名付けた3本のDNA鎖をこの実験では使用する。AおよびSは、内部アミン修飾を伴い、これをAlexaフルオロフォア標識のためのハンドルとして使用し、その一方でBは、内部ジゴキシゲニン(DIG)修飾を有する。それらの配列を下に与える(下線付けは、トールド領域を示す)：

【0171】

【表3】

名称	配列	修飾
A - 配列番号 7	<u>CTCATTCAA1ACCCTACG</u>	1:内部アミノ修飾因子 C6 dT
B - 配列番号 8	TTCAATACCC2ACGTCTC	2: 5-アミノアリル- dU
S - 配列番号 6	<u>TGGAGACG1AGGGTATTGAATGAGGG</u>	1:内部アミノ修飾因子 C6 dT

10

【0172】

A、BおよびSについてのオリゴヌクレオチドすべてを、BioautomationからのMerMade-12オリゴヌクレオチド合成装置を用いて社内で合成した。合成後、DNA鎖をTOPカートリッジ精製し、エタノール沈殿した。

【0173】

Alexa Fluor (登録商標) 647スクシンイミジルエステルおよびAlexa Fluor (登録商標) 555スクシンイミジルエステルは、Invitrogenから購入した。

20

【0174】

5-アミノアリル-dUホスホロアミダイトは、Berry & Associatesから購入した。

【0175】

抗ジゴキシゲニンは、Rocheから購入した。

【0176】

ヒト全血は、デンマーク、スカイビュー(Skejby)にあるオーフス大学病院(Aarhus University Hospital)の血液バンクによって寄付された。

30

【0177】

すべての他の試薬は、Sigma-Aldrichから購入した。

【0178】

方法

フルオロフォア接合

実施例1と同じ。

【0179】

ジゴキシゲニン接合

実施例4と同じ。

40

【0180】

ヒト血漿調製

ヒト全血は、ドナーから採血され次第、前記病院によってEDTA緩衝剤で処理され、その採血から30分以内にその全血試料から血漿が分離された。これは、3000gで15分間の20での遠心分離によって行われた。血漿を構成する最上層がピペットで注意深く取り出され、直ちにより小さいアリコートで冷凍された。

【0181】

aD検出のためのアッセイおよびその機能の構築

実施例5と同じ。しかし、一晚のインキュベーションの前に、目的の抗体(aD)と予混された15% v/v 純粋血漿に試料を添加した。

50

【0182】

分光蛍光計によるFRET測定

試料調製およびFRET測定は、実施例4と同じである。しかし、ヒト血漿を含有するスペクトルを、TAE-Mg緩衝液中のヒト血漿のみを含有する試料(60μL 1×[TAE-Mg²⁺])中の10μL(血漿)をリファレンスとして使用するリファレンスサブトラクションに付した。

【0183】

結果

3回の独立した実験からの得た結果を図9に示す。観察することができるように、緩衝液へのaDの添加前のAS百分率と血漿へのaDの添加前のAS百分率は、同一である(B中の試料1および2)。2当量のaDを添加すると、FRET増加は、緩衝液中(試料3)と比較して血漿中(試料5)でのほうがほんの少しずつ低い。緩衝液中(試料4)および血漿中(試料6)での戦略3によるジゴキシゲニン(DIG)の検出についての結果も含める;これは、実施例8においてさらに詳細に説明することにする。

10

【0184】

(実施例6)

ヒト唾液中での抗ジゴキシゲニン(aD)の検出

材料

A、BおよびSとそれぞれ名付けた3本のDNA鎖をこの実験では使用する。AおよびSは、内部アミン修飾を伴い、これをAlexaフルオロフォア標識のためのハンドルとして使用し、その一方でBは、内部ジゴキシゲニン(DIG)修飾を有する。それらの配列を下に与える(下線付けは、トーホールド領域を示す):

20

【0185】

【表4】

名称	配列	修飾
A - 配列番号 7	<u>CTCATTCAA1ACCCTACG</u>	1:内部アミノ修飾因子 C6 dT
B - 配列番号 8	TTCAATACCC2ACGTCTC	2: 5-アミノアリル- dU
S - 配列番号 6	<u>TGGAGACG1AGGGTATTGAATGAGGG</u>	1:内部アミノ修飾因子 C6 dT

30

【0186】

A、BおよびSについてのオリゴヌクレオチドすべてを、BioautomationからのMerMade-12オリゴヌクレオチド合成装置を用いて社内で合成した。合成後、DNA鎖をTOPカートリッジ精製し、エタノール沈殿した。

【0187】

Alexa Fluor(登録商標)647スクシンイミジルエステルおよびAlexa Fluor(登録商標)555スクシンイミジルエステルは、Invitrogenから購入した。

40

【0188】

5-アミノアリル-dUホスホロアミダイトは、Berry & Associatesから購入した。

【0189】

抗ジゴキシゲニンは、Rocheから購入した。

【0190】

ヒト唾液は、1時間絶食していたヒトドナーから採集した。

【0191】

すべての他の試薬は、Sigma-Aldrichから購入した。

【0192】

50

図10は、オリゴヌクレオチドが互いにどのようにハイブリダイズし得るのかを示す。

【0193】

方法

フルオロフォア接合

実施例1と同じ。

【0194】

ジゴキシゲニン接合

実施例4と同じ。

【0195】

ヒト唾液調製

10

1時間絶食していた男性ヒトから1時間にわたってファルコンチューブに唾液を採集した。その唾液を1分間、徹底的にボルテックスし、その後、4、10、000gで10分間、遠心分離した。液体を固体から分離し、唾液を100k Amicon Ultra-0.5mL遠心濾過器によって濾過した。

【0196】

aD検出のためのアッセイおよびその機能の構築

実施例5と同じ。しかし、一晩のインキュベーションの前に、目的の抗体(aD)と予混された15% v/v 濾過唾液に試料を添加した。

【0197】

分光蛍光計によるFRET測定

20

試料調製およびFRET測定は、実施例7と同じである。しかし、ヒト血漿を含有するスペクトルを、TAE-Mg緩衝液中の濾過唾液のみを含有する試料(60μL 1×[TAE-Mg²⁺])中の10μL 血漿)をリファレンスとして使用するリファレンスサブトラクションに付した。

【0198】

結果

結果は、実施例7に匹敵し、FRET値は、ヒト唾液中、aDの存在下でASの28%分布数増加を表す。結果を図10にも示す。

【0199】

(実施例7)

30

DNAに対する複数のDIG修飾を用いるaDの検出

材料

A、BおよびSとそれぞれ名付けた3本のDNA鎖をこの実験では使用する。AおよびSは、内部アミン修飾を伴い、これをAlexaフルオロフォア標識のためのハンドルとして使用し、その一方でBは、4つの内部ジゴキシゲニン修飾(しかし4つの内部ジゴキシゲニン修飾に限定されない)を有する。それらの配列を下に与える(下線付けは、トールド領域を示す)：

【0200】

【表5】

40

名称	配列	修飾
A - 配列番号7	<u>CTCATTCAA1ACCCTACG</u>	1:内部アミノ修飾因子 C6 dT
B - 配列番号9	T2CAA2ACCC2ACG2 <u>CTCC</u>	2: 5-アミノアリル- dU
S - 配列番号6	<u>TGGAGACG1AGGGTATTGAATGAGGG</u>	1:内部アミノ修飾因子 C6 dT

【0201】

A、BおよびSについてのオリゴヌクレオチドすべてを、BioautomationからのMerMade-12オリゴヌクレオチド合成装置を用いて社内で合成した。合成

50

後、DNA鎖をTOPカートリッジ精製し、エタノール沈殿した。

【0202】

Alexa Fluor (登録商標) 647 スクシンイミジルエステルおよび Alexa Fluor (登録商標) 555 スクシンイミジルエステルは、Invitrogen から購入した。

【0203】

5 - アミノアリル - dU ホスホロアミダイトは、Berry & Associates から購入した。

【0204】

抗ジゴキシゲニンは、Roche から購入した。

10

【0205】

すべての他の試薬は、Sigma - Aldrich から購入した。

【0206】

図11は、オリゴヌクレオチドが互いにどのようにハイブリダイズし得るのかを示す。

【0207】

方法

フルオロフォア接合

実施例1と同じ。

【0208】

ジゴキシゲニン接合

実施例4と同じ。

20

【0209】

aD検出のためのアッセイおよびその機能の構築

実施例1と同じだが、標的タンパク質としてSTVの代わりにaDを用い、および8倍過剰の抗ジゴキシゲニン(20nMの各DNA成分、および160nMのaD)を用いる。

【0210】

分光蛍光計によるFRET測定

試料調製およびFRET測定は、実施例1と同じである。

【0211】

ゲル実験およびTyphoonスキャン

実施例1と同じ。

30

【0212】

結果

結果は、実施例4に匹敵し、FRET値は、aDの存在下でASの33%分布数増加を表す。

【0213】

(実施例8)

戦略2および3によるジゴキシゲニン(DIG)の検出。

【0214】

図12は、オリゴヌクレオチドが互いにどのようにハイブリダイズし得るのかを示す。

40

【0215】

材料

Sigma - Aldrichからのジゴキシゲニンを加えて、実施例4、5および6のとおり。

【0216】

方法

フルオロフォア接合

実施例1と同じ。

【0217】

50

ジゴキシゲニン接合

実施例 4 と同じ。

【 0 2 1 8 】

D I G 検出のためのアッセイおよびその機能の構築

実施例 4、5 および 6 と同じだが、競合アッセイのために遊離 D I G を様々な濃度で試料にさらに添加する。

【 0 2 1 9 】

分光蛍光計による F R E T 測定

試料調製および F R E T 測定は、実施例 7、9 および 10 と同じであるが、ヒト血漿および唾液を添加して、またはせずに、それぞれのシグナル調整を行う。

10

【 0 2 2 0 】

結果

結果は、実施例 4、5 および 6 に匹敵し、F R E T 値は、D I G が存在しない正規 30 % 増加と比較して、320 nM D I G の存在下で A S のほんの 0.5 % の分布数増加、および 40 nM D I G の存在下で 11 % A S 分布数増加を表す。40 nM D I G を含有するヒト血漿および唾液の場合、A S 分布数増加は、D I G なしでの 26 % および 28 % 増加と比較して、それぞれ 5 % および 2 % である。結果を図 12 にも示す。

【 0 2 2 1 】

(実施例 9)

ビタミン D 結合タンパク質 (D B P) およびビタミン D (V D) の検出

20

材料

A、B および S とそれぞれ名付けた 3 本の D N A 鎖をこの実験では使用する。A および S は、内部アミン修飾を伴い、これを A l e x a フルオロフォア標識のためのハンドルとして使用し、その一方で B は、内部ビタミン D 修飾を有する。それらの配列を下に与える (下線付けは、トーホールド領域を示す) :

【 0 2 2 2 】

【 表 6 】

名称	配列	修飾
A - 配列番号 7	<u>C</u> TCAATTCAA1ACCC <u>T</u> ACG	1: 内部アミノ修飾因子 C6 dT
B - 配列番号 16	TTCAATACCC2ACG <u>T</u> CTC	2: 5-アミノアリル- dU
S - 配列番号 6	<u>T</u> GGAGACG1AGGGTATTGAATGAGGG	1: 内部アミノ修飾因子 C6 dT

30

【 0 2 2 3 】

A、B および S についてのオリゴヌクレオチドすべてを、B i o a u t o m a t i o n からの M e r M a d e - 1 2 オリゴヌクレオチド合成装置を用いて社内合成した。合成後、D N A 鎖を T O P カートリッジ精製し、エタノール沈殿した。

【 0 2 2 4 】

A l e x a F l u o r (登録商標) 6 4 7 スクシンイミジルエステルおよび A l e x a F l u o r (登録商標) 5 5 5 スクシンイミジルエステルは、I n v i t r o g e n から購入した。

40

【 0 2 2 5 】

5 - アミノアリル - d U ホスホロアミダイトは、B e r r y & A s s o c i a t e s から購入した。

【 0 2 2 6 】

活性化ビタミン D エステルは、社内コレカルシフェロールから 2 段階で合成した。

【 0 2 2 7 】

すべての他の試薬は、S i g m a - A l d r i c h から購入した。

50

【0228】

図14は、オリゴヌクレオチドが互いにどのようにハイブリダイズし得るのかを示す。

【0229】

方法

フルオロフォア接合

実施例1と同じ。

【0230】

ビタミンD接合

実施例4におけるDIG-NHSと同じだが、DIG-NHSの代わりに活性化ビタミンDエステルを用いる。

10

【0231】

DBP検出のためのアッセイおよびその機能の構築

実施例4と同じだが、標的タンパク質としてaDの代わりにDBPを用いる。

【0232】

分光蛍光計によるFRET測定

試料調製およびFRET測定は、実施例1と同じである。

【0233】

ゲル実験およびTyphoonスキャン

実施例1と同じ。

【0234】

結果

結果は、実施例1に匹敵するが、FRET値は、DBPの存在下でASの20%分布数増加を表す。結果を図14にも示す。

20

【0235】

さらに、阻害的戦略および競合的戦略両方をビタミンDの検出に用いた。様々な濃度のビタミンDを、DBPタンパク質の添加前(阻害的戦略2)または後(競合的戦略3)に、アッセイ混合物に添加した。図14中の校正曲線から明白であるように、両方の方法がビタミンDの検出に成功した。

【0236】

(実施例10)

アプタマーシステムの例としてのATP検出

材料

A、BおよびSとそれぞれ名付けた3本のDNA鎖をこの実験では使用する。AおよびSは、内部アミン修飾を伴い、これをフルオロフォア標識のためのハンドルとして使用する。Bは、3'末端にATPアプタマーの配列を含むが、追加の修飾を一切有さない。それらの配列を下に与える(イタリック体は、トーホールド領域を示し;下線付けは、アプタマー領域を示す):

30

【0237】

【表7】

名称	配列	修飾
A - 配列番号 10	<i>CTCATTCAA1ACCCTACG</i>	1:内部アミノ修飾因子 C6 dT
B - 配列番号 11	<i>TTCAATACCCTACGACCTGGGGGAGTA</i> <i>TTGCGGAGGAAGGT</i>	
S - 配列番号 12	<i>CCCCAGGTCG1AGGGTATTGAATGAGG</i> <i>G</i>	1:内部アミノ修飾因子 C6 dT

40

【0238】

すべてのオリゴヌクレオチドをデンマークのDNA Technology A/Sから購入した。その会社が合成直後にRP-HPLC精製を行った。

50

【0239】

Alexa Fluor (登録商標) 647 スクシンイミジルエステルおよび Alexa Fluor (登録商標) 555 スクシンイミジルエステルは、Invitrogen から購入した。

【0240】

すべての他の試薬は、Sigma-Aldrich から購入した。

【0241】

方法

フルオロフォア接合

実施例 1 と同じ。

10

【0242】

aF 検出のためのアッセイおよびその機能の構築

実施例 1 と同じだが、STV の代わりに様々な濃度の ATP 分子を用いた。

【0243】

分光蛍光計による FRET 測定

実施例 1 と同じ。

【0244】

結果

この実施例の設計は、DNA 二重鎖とアプタマー-標的複合体との間の標的誘発性スイッチングを典型的に被る、いわゆる構造スイッチングアプタマーにヒントを得ている。ここでは、アプタマーの一部 (8 nt) が B 上のトーホールドとして役立ち、このトーホールドは、A のほうが短いトーホールド (4 nt) を有するので、S 上のトーホールドとハイブリダイズすることができ、その結果、溶液中で二重鎖が優位を占めることになる。標的 (ATP) が存在する場合、アプタマー-標的結合は、二重鎖中の水素結合との競争に勝つほど強く、したがって B 上に機能性トーホールドは残らない。それ故、AS 二重鎖が大部分を占めることになる。このスキームを図 15 a に示す。

20

【0245】

滴定曲線をマイクロモルスケールで作成した (図 15 b)。AS 二重鎖についての FRET の 60% までの増加を 1 mM ATP の存在下で観察することができる。ここで使用した各 DNA 成分の濃度は、20 nM であった。

30

【0246】

結論

この実施例において、本発明者らは、トーホールド交換反応システムと構造スイッチングアプタマー設計を併用して、アプタマー-標的結合により標的の検出を果たした。増幅せずとも、既に FRET シグナル変化は観察できるほど有意になっており、定量さえ可能である。このアプタマーシステムが、5' 末端または 3' 末端いずれかに位置するアプタマー領域を用いて機能し得ることに注目される。

【0247】

(実施例 11)

DNA ペルオキシダーゼシグナル伝達システムを使用するストレプトアビジン (STV) 検出

40

材料

A、B および S とそれぞれ名付けた 3 本の DNA 鎖をこの実施例において使用し、それらのうちの B のみが修飾を有する。それらの配列を下に与える (イタリック体は、トーホールド領域を示し; 下線付けは、DNA ペルオキシダーゼのグリッチ領域を示す):

【0248】

【表 8】

名称	配列	修飾
A - 配列番号 13	<u>TGGGTATTCAATACCCTACG</u>	
B - A - 配 列番号 14	TTCAATACCC2ACGTC2C	2: 内部ビオチン dT
S - A - 配 列番号 15	<u>TGGAGACGTAGGGTATTGAA</u> <u>TGGGCGGGT</u> <u>GGGT</u>	

【0249】

10

すべてのオリゴヌクレオチドは、デンマークの DNA Technology A/S から購入した。その会社が合成直後に RP-HPLC 精製を行った。

【0250】

すべての試薬は、Sigma-Aldrich から購入した。

【0251】

方法

STV 検出のためのアッセイおよびその機能の構築

典型的なアッセイでは、1:1:1 の正確な化学量論比を有する鎖 A、B および S を、 $1 \times [TAE - Mg^{2+}]$ 緩衝液 (40 mM Tris-HAc (pH 7)、1 mM EDTA、12.5 mM $Mg(Ac)_2$) に混ぜ入れ、加えて標的タンパク質としての STV も混ぜ入れた。その混合物を室温 (RT) で 3 時間インキュベートし、その後、それにヘミン (フェリプロトポルフィリン IX クロリド)、ABTS (2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)) および H_2O_2 (過酸化水素) を添加した。典型的最終濃度は、ビオチン標識 DNA について 200 nM、STV について 400 nM、ヘミンについては 2 μ M、ならびに ABTS および H_2O_2 については 2 mM であった。

20

【0252】

Nanodrop による吸光度測定

室温での半時間のインキュベーション後、1.5 μ L の各アッセイ混合物を Nanodrop 1000 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific Inc.) の受け台にピペットで移し、紫外・可視モードで測定した。420 nm での吸光度を記録した。

30

【0253】

結果

この実施例において、本発明者らは、A と S 間のハイブリダイゼーションによってそれらが一緒にされるとその触媒能力を回復することができる分割型 DNA ザイムの A と S 両方の末端への組み込みの例を与える。2 ビオチンシステムのスキームを図 16 に示す。

【0254】

STV がなければ、B のほうが長いトーホールドを有するので、S は B と結合する傾向がある。別々のグアニン四重鎖部分のため、低いペルオキシダーゼ活性を見いだすことができる。STV があると、鎖 B はそのトーホールドを失い、そのタンパク質の表面にはめ込まれるので、AS 二重鎖の形成は、十分に機能性のグアニン四重鎖をもたらす。必要反応物、例えば H_2O_2 、ABTS²⁻ およびヘミンの添加後、緑色が見えてくることとなり、420 nm での最大吸光度を記録することができる。

40

【0255】

有意な吸光度変化を図 16 において観察することができ、その差は、裸眼でも区別可能である。1 ビオチンシステムの変化も明白であるが、より強いバックグラウンドのため直接視覚化によりに識別することは難しいことに留意されたい。

【0256】

結論

50

本発明者らは、本発明者らのアッセイに光シグナルを備えさせるために新たなレポーターシステムを利用した。このシステムの利点は、共有結合標識の代わりに純粋なDNAの伸長しか必要としない点、ならびに触媒的および比色定量的特徴が結果を直接目視でも検出できるようにさせる点である。この方法を、実施例3で説明したような一本鎖システムにおいても利用してよい。

【0257】

(実施例12)

ストレプトアビジン(STV)検出のためのDNAグアニン四重鎖ペルオキシダーゼを併用した一本鎖システム

材料

Lと名付けた1本のDNA鎖のみをこの実験において使用する。特定の位置の内部アミン基を修飾し、それをさらなる標識のためのハンドルとして使用する。その配列を下に与える(イタリック体は、トーホールド領域を示し;下線付けは、DNAペルオキシダーゼのグリッチ領域を示す):

【0258】

【表9】

名称	配列	修飾
L - 配列番号 17	<i>TGGGTCAATACCCTACGATACCC1ACG</i> <i>TCTCTTTTTT</i> <u>GAGACGTAGGGTATTGT</u> <i>GGCGGGTGGGT</i>	1:内部修飾因子 C6 dT

10

20

【0259】

このオリゴヌクレオチドは、デンマークのDNA Technology A/Sから購入した。その会社が合成直後にRP-HPLC精製を行った。

【0260】

ストレプトアビジンを含めて、すべての他の試薬は、Sigma-Aldrichから購入した。

【0261】

図17は、分析物の存在に依存してオリゴヌクレオチドがどのように自己ハイブリダイズし得るのかを示す。

30

【0262】

位置(ヌクレオチド)1~5(2)は、G4-DNA(DNAペルオキシダーゼ)の4分の1である。位置6~7(8)は、第一のトーホールドである。位置8~17(7またはA)は、第一の分岐点移動領域である。位置18~27(7またはB)は、第二の分岐点移動領域であり、これは第一の分岐点移動領域と同じ配列を有するが、小分子修飾をもたらす。位置28~31(9)は、第二のトーホールドである。位置32~37(11)は、柔軟性をもたらすループ領域である。位置38~41(9')は、第三のトーホールド領域であり、これは第二のトーホールド領域と相補的である。位置42~51(7'またはS)は、第三の分岐点移動領域であり、これは第一または第二の分岐点移動領域と相補的である。位置52~53(8')は、第四のトーホールドであり、これは第一のトーホールドと相補的である。位置54~66(6)は、DNAペルオキシダーゼの残りの4分の3である。

40

【0263】

方法

ビオチン接合

この手順は、実施例1におけるフルオロフォア接合手順と同じであるが、色素-NHSエステルの代わりにビオチン-NHSエステルを用いる。

【0264】

STV検出のためのアッセイおよびその機能の構築

50

典型的なアッセイでは、鎖 L を $1 \times [TAE - Mg^{2+}]$ 緩衝液 (40 mM Tris - HAc (pH 7)、1 mM EDTA、12.5 mM $Mg(Ac)_2$) に混ぜ入れ、加えて標的タンパク質としての STV も混ぜ入れた。その混合物を室温 (RT) で 3 時間インキュベートし、その後、ヘミン (フェリプロトポルフィリン IX クロリド)、ABTS (2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)) および H_2O_2 (過酸化水素) を添加した。典型的最終濃度は、ピオチン標識 DNA について 200 nM、STV について 400 nM、ヘミンについては 2 μ M、ならびに ABTS および H_2O_2 については 2 mM であった。

【0265】

Nanodrop 分光光度計による吸光度測定

室温での 1 時間のインキュベーション後、1.5 μ L の各アッセイ混合物を Nanodrop 1000 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific Inc.) の受け台にピペットで移し、紫外・可視モードで測定した。420 nm での吸光度を記録した。

【0266】

結果

この設計の観念は、3 つのオリゴヌクレオチドすべてを 1 本の長い DNA 鎖に単純に組み込むことであり、これは、化学量論の問題を免れるばかりでなく、分子内反応のために鎖置換の反応速度を加速させる可能性も有する。1 本の DNA 鎖に対して 3 つの修飾を施す困難を回避するために、分割型 DNA ペルオキシダーゼと呼ばれる別のレポーターシステムを選んで、前の設計で使用した FRET システムの代わりに用いた。DNA ペルオキシダーゼの正確な配列およびその分割方法は、Shimron, S.; Wang, F.; Orbach, R.; Willner, I., *Amplified detection of DNA through the enzyme-free autonomous assembly of hemin/G-quadruplex DNAzyme nanowires*, *Anal Chem* 2012, 84, 1042-1048 に記載されている。満足なことに、このシグナル伝達システムは、オリゴヌクレオチドが共有結合で連結されている場合でさえ、ハイブリダイゼーション平衡に基づく本発明による検出システムのために機能し得る。

【0267】

この実施形態における長い DNA 鎖は、いくつかの領域から成る (図 18)。配列中の 5' から 3' は、次のとおりである: グアニン四重鎖の 4 分の 1、領域 a + 領域 b (これは元の鎖 A を表す)、領域 b + 領域 d (これは、元の鎖 B を表し、したがってその鎖上にピオチンを有する)、柔軟なヒンジとしてのループ e、領域 d* + 領域 b* + 領域 a* (これは S 鎖に由来する)、そして最後に、グアニン四重鎖の 4 分の 3。

【0268】

STV がなければ、トールド d のほうがトールド a より長いので、d* b* は、優先的に bd とハイブリダイズすることになる。この状態では、エネルギー的に好適でないバルジへの第一の領域 b の押し込みを行わない限り、2 つのグアニン四重鎖部分を合体させることはできない。第二の領域 b のピオチンの上に STV が結合すると、そのタンパク質塊が局所ハイブリダイゼーションまたは分岐点移動を妨げて、領域 b* にその好適なパートナーとして第一の領域 b を選ぶように強いることになる。その結果、前記グアニン四重鎖の 2 つの成分は、ヘミンの助けで、ABTS⁻ への ABTS²⁻ の H_2O_2 媒介酸化を触媒する能力があることが判っている完全な G テトラッドを形成するためのまさに正しい位置を占有する。生成物 ABTS⁻ は緑色を有するので、この反応の動態を目視でまたは分光光度計によって検出することができる。その配座変化過程を図 18 a に示す。

【0269】

ペルオキシダーゼ基質として ABTS を添加した 1 時間後の STV を有するまたは有さない試料の吸光度を図 18 b に与える。50% より大きい増加を STV 添加後に観察する

ことができる。これは、S T V 結合が G テトラッドの再構成およびより大きな構成体をもたらすという概念を証明する。同じ配列を有するが、その鎖上にピオチンがない D N A 鎖と S T V を混合することによる対照実験も行い、この場合、シグナル変化は見いだせなかった。

【 0 2 7 0 】

結論

この実施例では、標的タンパク質検出を果たすためにリガンドで標識した 1 本だけの D N A 鎖を使用することにより、前記検出システムをさらに単純化した。さらに、新たな触媒法をレポーターおよび増幅アプローチとして利用する。この実施例における S T V の結合は、鎖置換交換反応の分子内平衡を乱し、これは過酸化生成物の吸光度に反映された。本発明者らは、タンパク質または小分子（それぞれ、抗体および抗原）も標的にし、かつ指標として変色を用いるこのシステムは、E L I S A（酵素免疫測定法（E n z y m e - l i n k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y））の代替法になる可能性があると考えられる。

10

【 0 2 7 1 】

（実施例 1 3）

トーホールド長および結合部分の位置の効果

アッセイの性能を最適化するために、様々な試験を行った（データを示さない）。

【 0 2 7 2 】

A および B の融解温度が近いことは、平衡の感度にとって重要であると考えられる。A と B は同じ分岐点移動領域を共有するので、トーホールド領域がこのシステムにおける標的結合事象の効果の大きさの点での決定因子になる。本発明者らは、S T V の存在と不在のより良好な区別のために A 上のトーホールド長を調整した。結果は、A が 2 n t または 3 n t トーホールドを有するとき、S T V の効果、すなわち相対 F R E T 変化、が最大であることを示した。A についての 4 n t トーホールドが最適でない理由は、このシステムの B に対する 2 つの修飾が平衡を変化させるからであり得る。本発明者らは、標準構成（実施例 1）において A には 3 n t トーホールドを使用した。その構成では A も修飾を有するからである。

20

【 0 2 7 3 】

熱力学に加えて、本発明者らは、トーホールド長もこのシステムの動態に効果を及ぼすことを見いだす。より長いトーホールドは、反応速度を有意に増加させて、平衡への到達をはるかに速くさせる。これは、トーホールドが長いほど、結果として、全プロセス中の律速段階であるトーホールドハイブリダイゼーションが速くなるという事実と一致する。

30

【 0 2 7 4 】

ピオチンの位置の効果もこの実施例において調査した。B 上の 3 つの代表位置：トーホールド領域（T H）、分岐点移動領域（B M）および 3' 末端（T 3）、のうちの 1 つをピオチンで標識した。F R E T シグナル変化の点から見て、トーホールド上のピオチンが S T V 結合に対して最も高感度であり、続いて B M の上のピオチンが高感度であったことが判明した。B の 3' 末端におけるピオチンは、無視できる S T V 効果しか示さなかった。これは、尤もなことである。D N A 分岐点移動は、マグネシウムの存在下で異種構造に対して非常に敏感であり、そのため小さな局所環境変化がかなりの障害となり得ることは公知であったからである。しかし、単純なハイブリダイゼーションは、この特質を有さない。

40

【 図 3 】

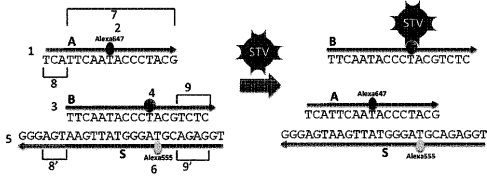
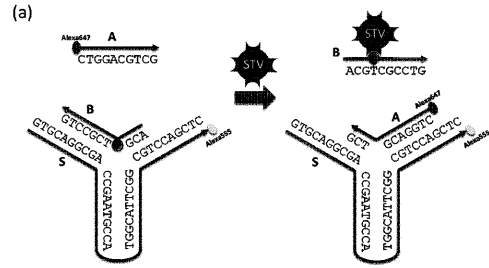
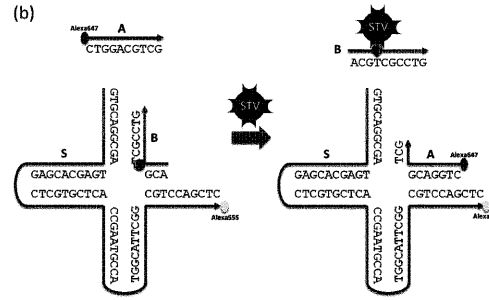


Fig. 3

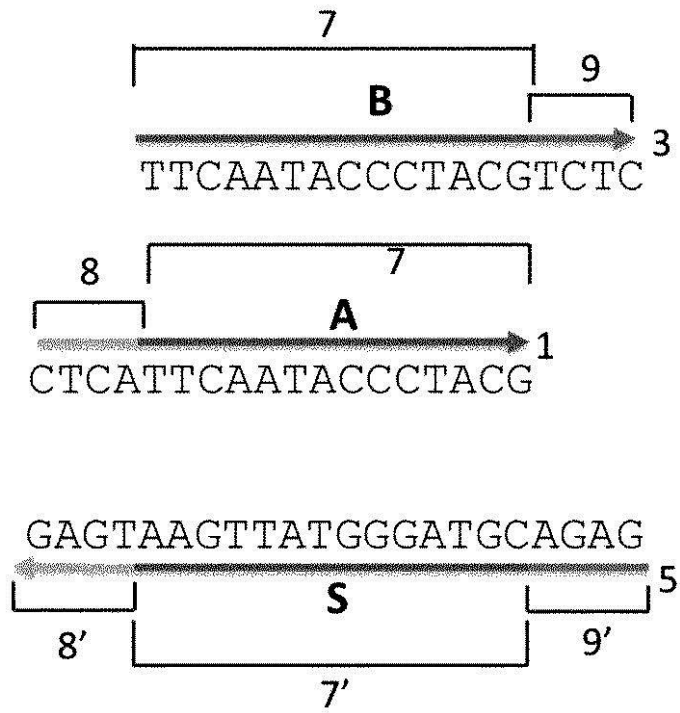
【 図 20 (a) 】



【 図 20 (b) 】



【 図 1 】



A:B:S=1:1:2 2つの二重鎖

A:B:S=1:1:1 動的平衡

Fig. 1

【 2 】

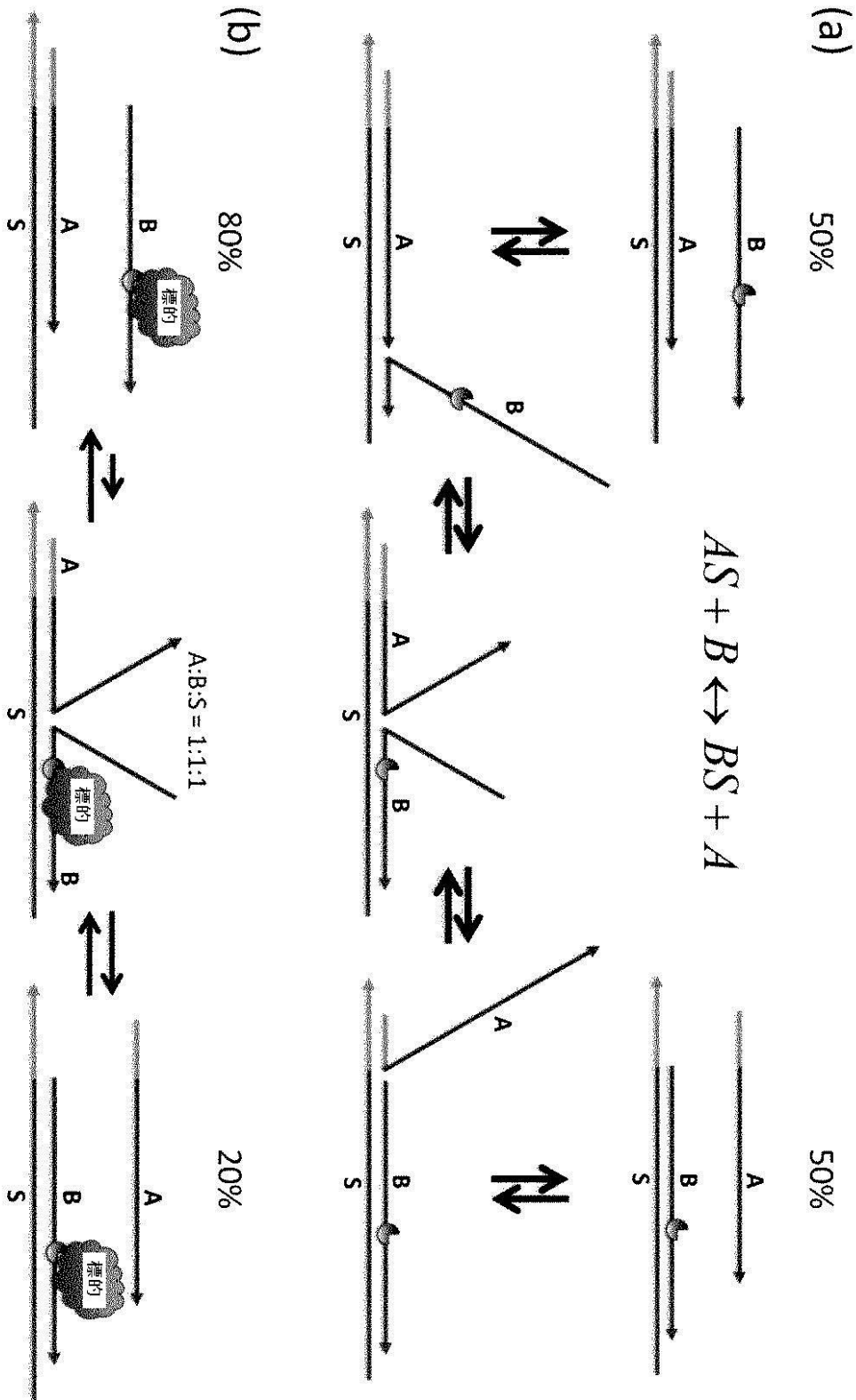


Fig. 2

【 図 4 】

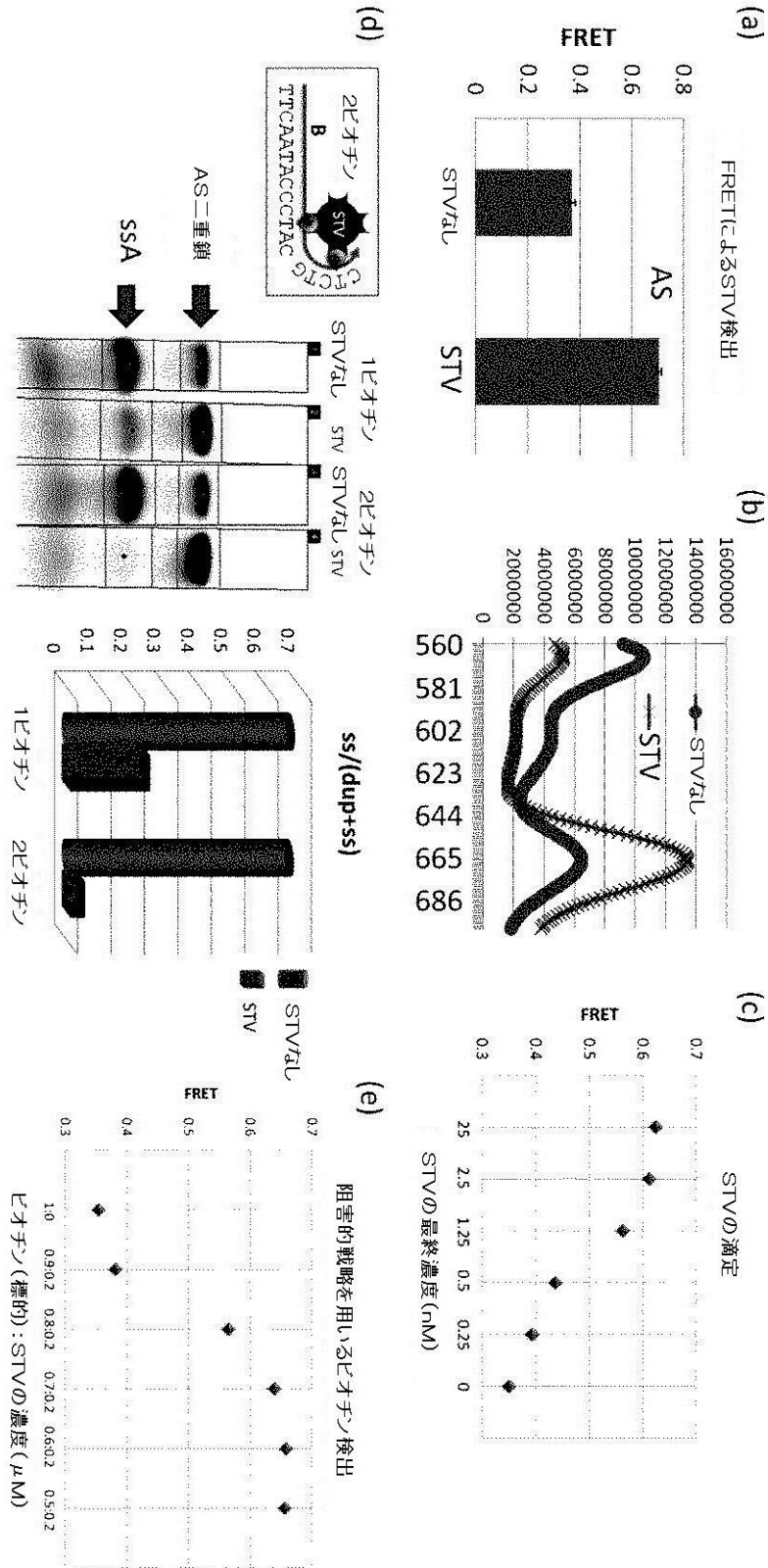


Fig. 4

【 図 5 】

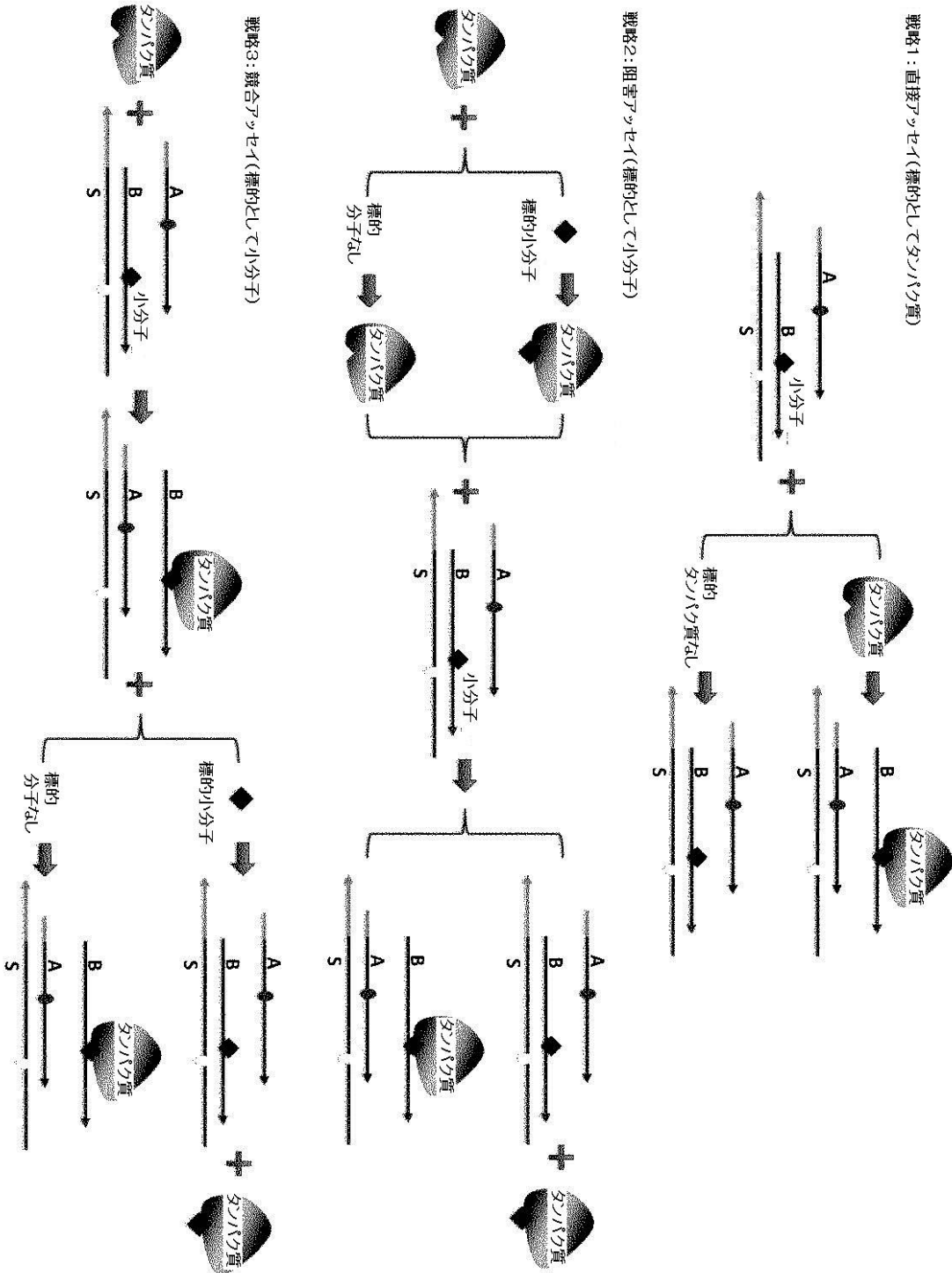
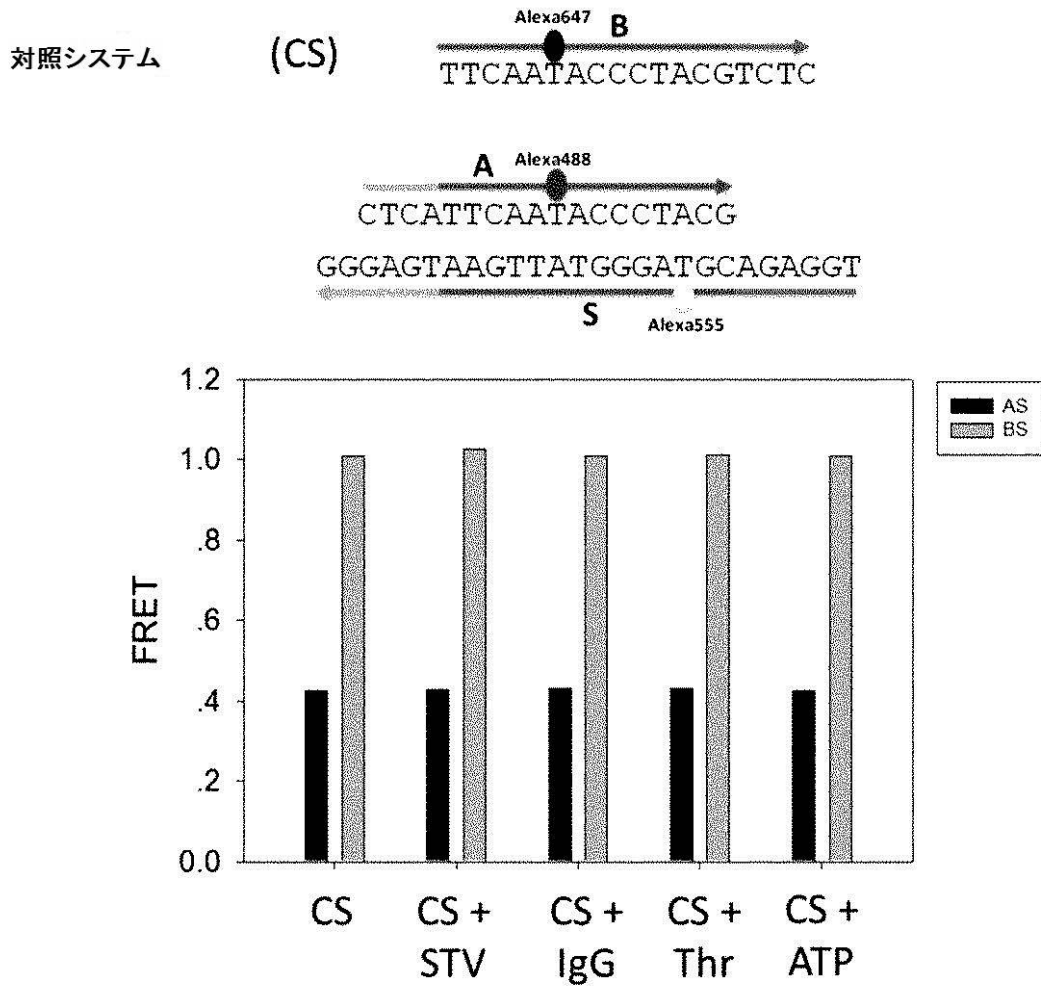


Fig. 5

【 図 6 】

A)



B)

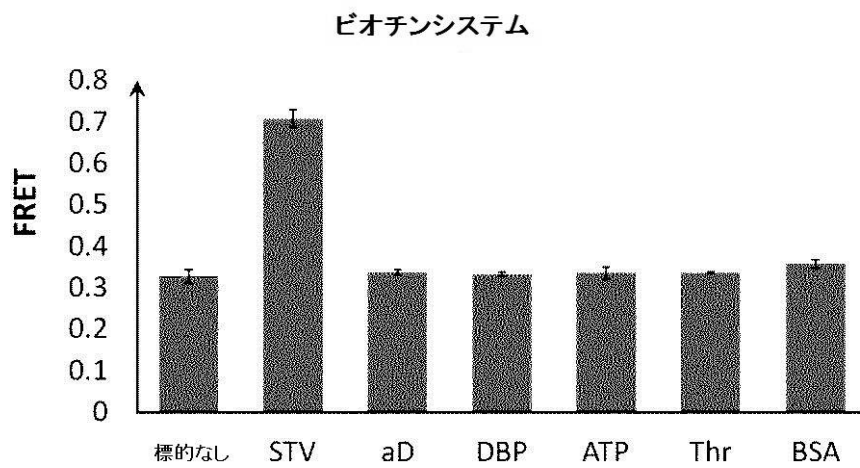


Fig. 6

【 図 7 】

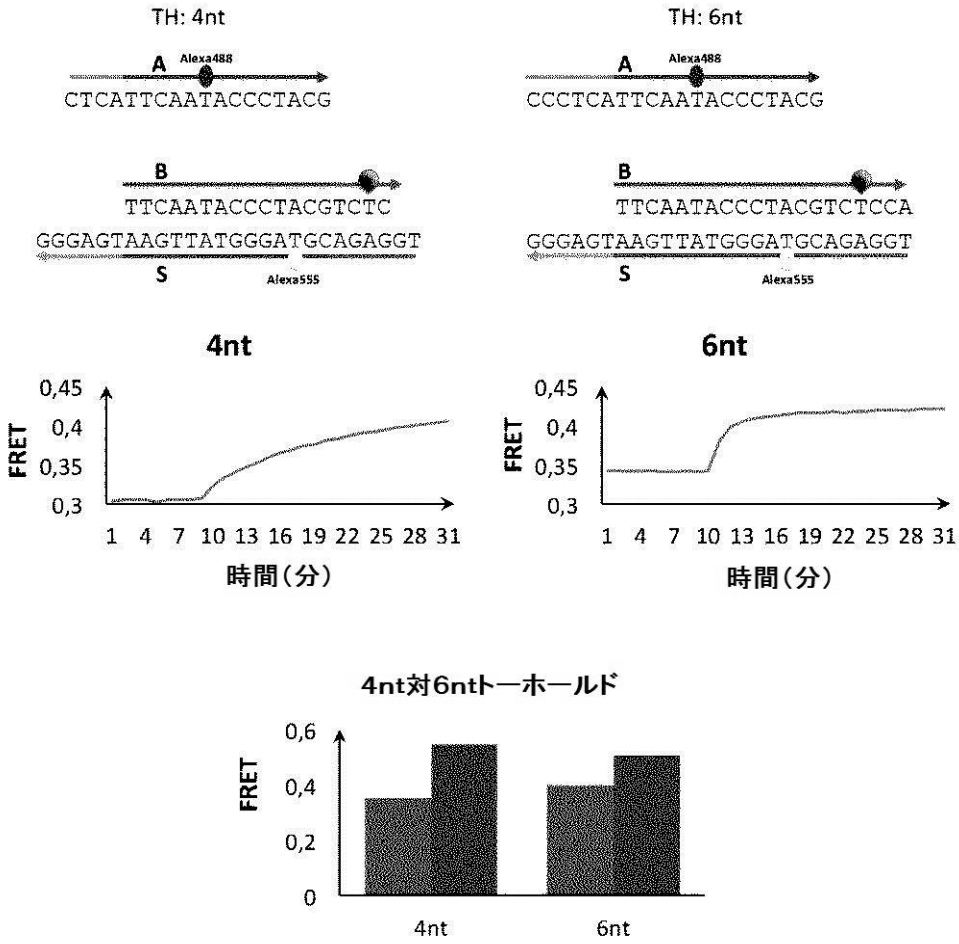


Fig. 7

【 図 8 】

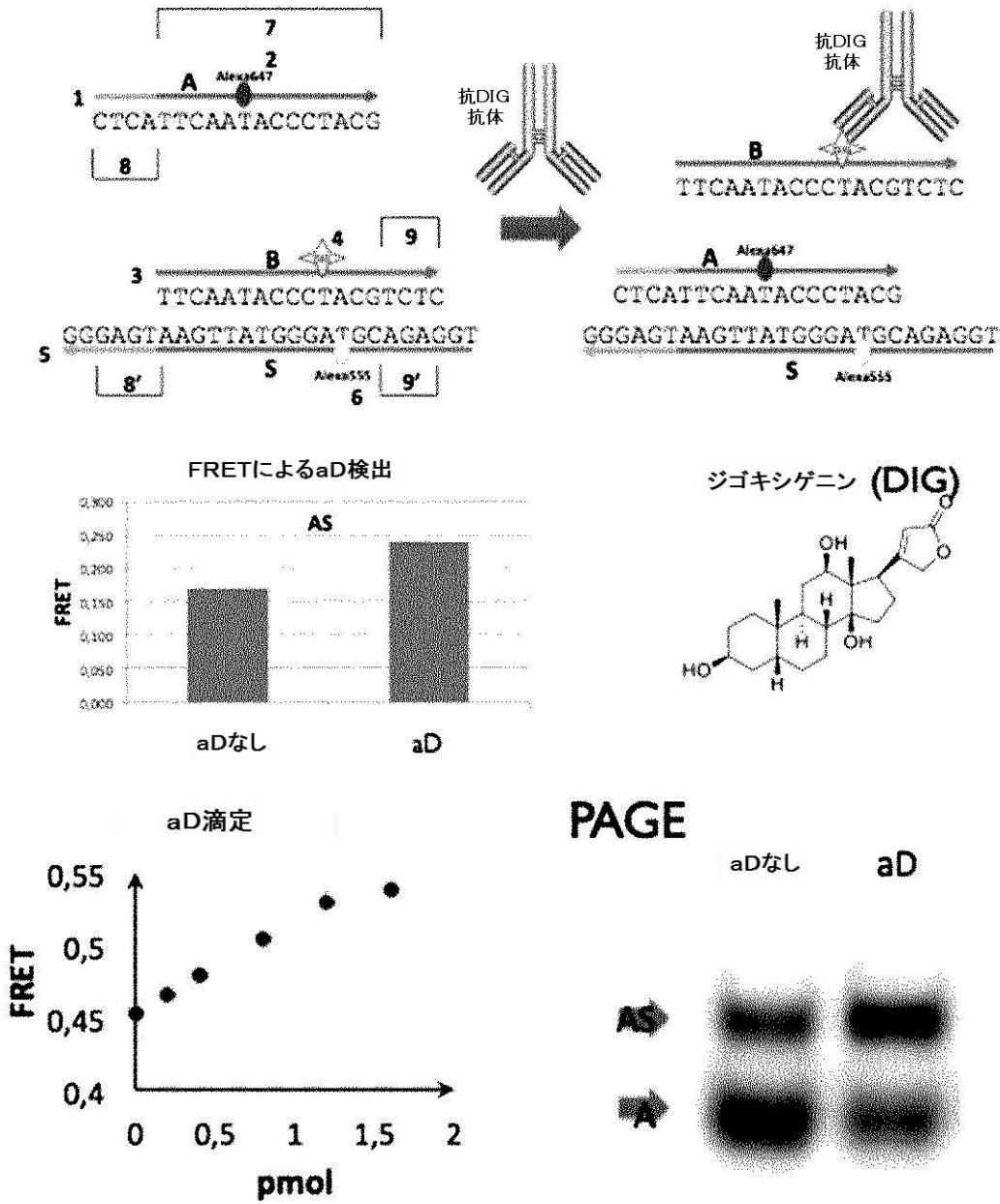
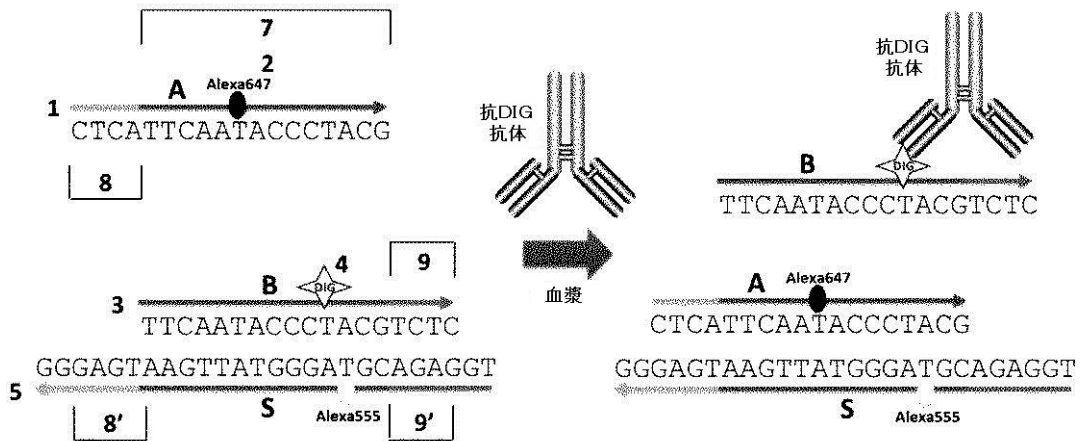


Fig. 8

【図 9】

A



B

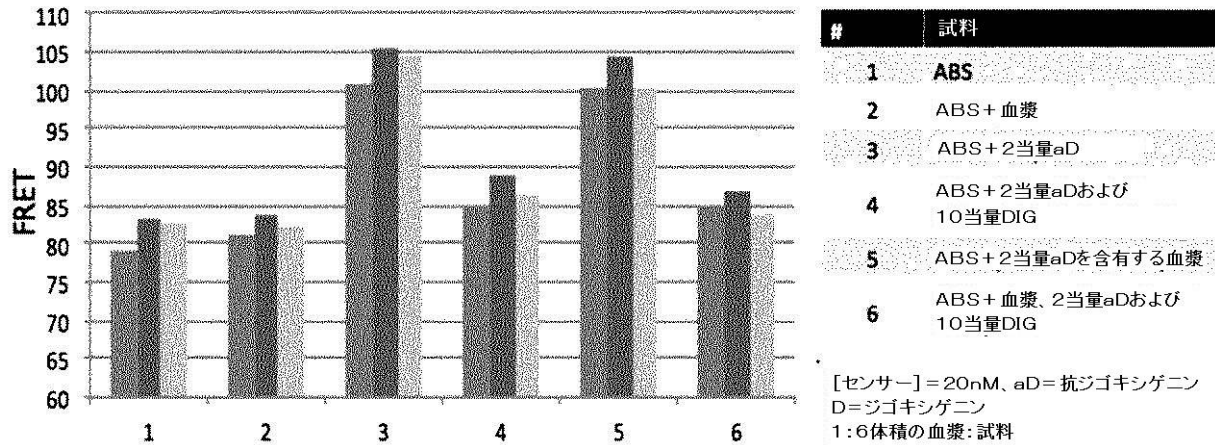


Fig. 9

【 図 1 0 】

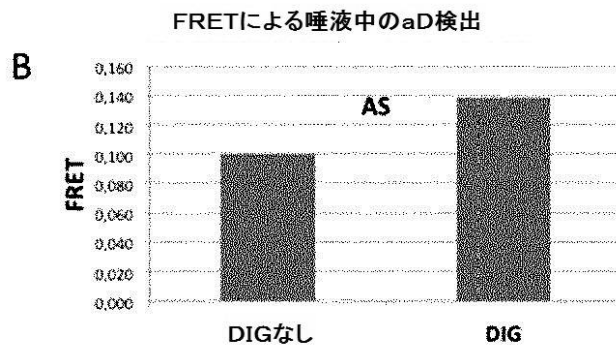
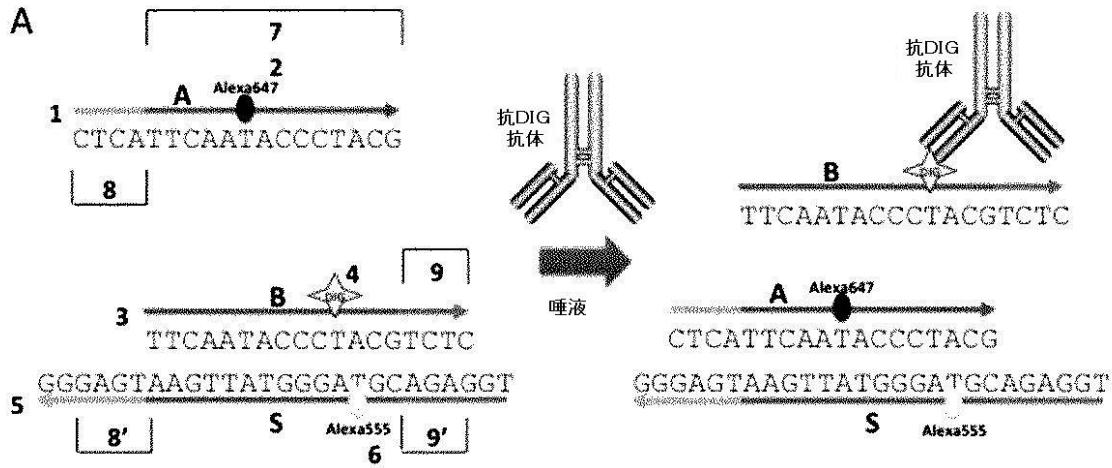
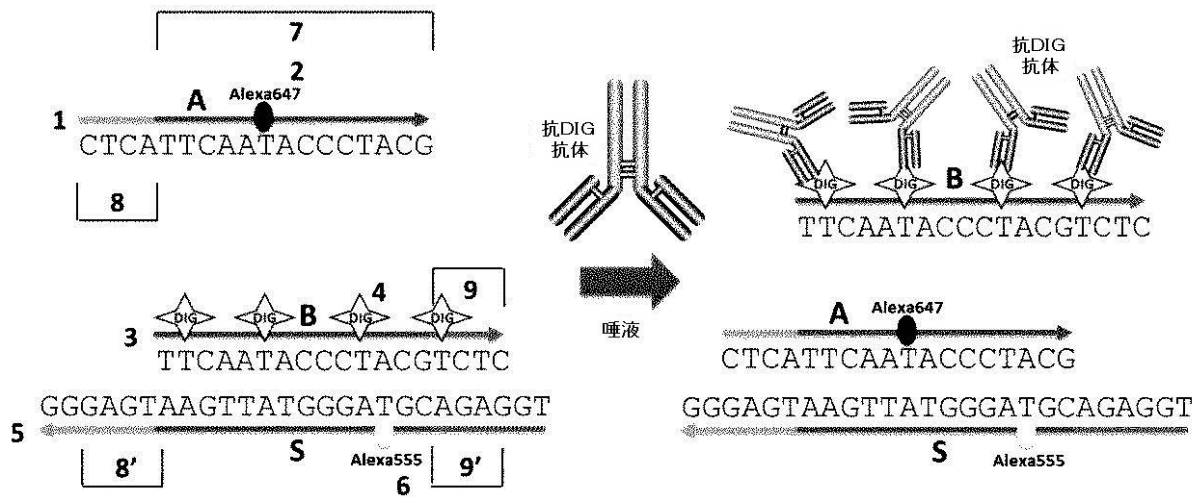


Fig. 10

【図 11】

A



B

複数の修飾を用いるFRETによるaD検出

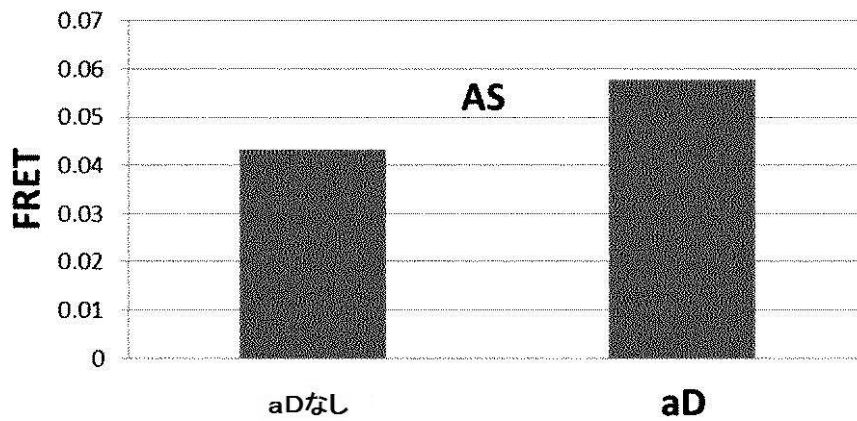
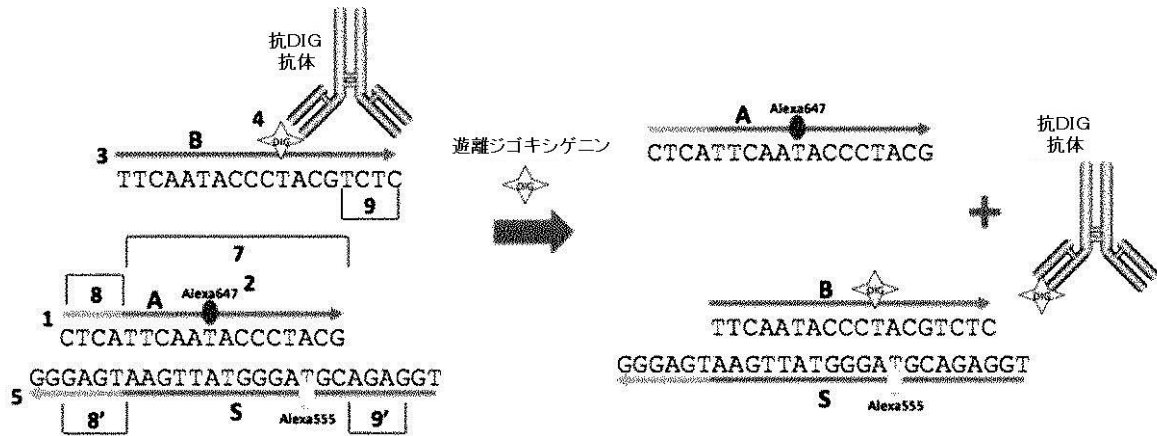


Fig. 11

【図 12】

A



B

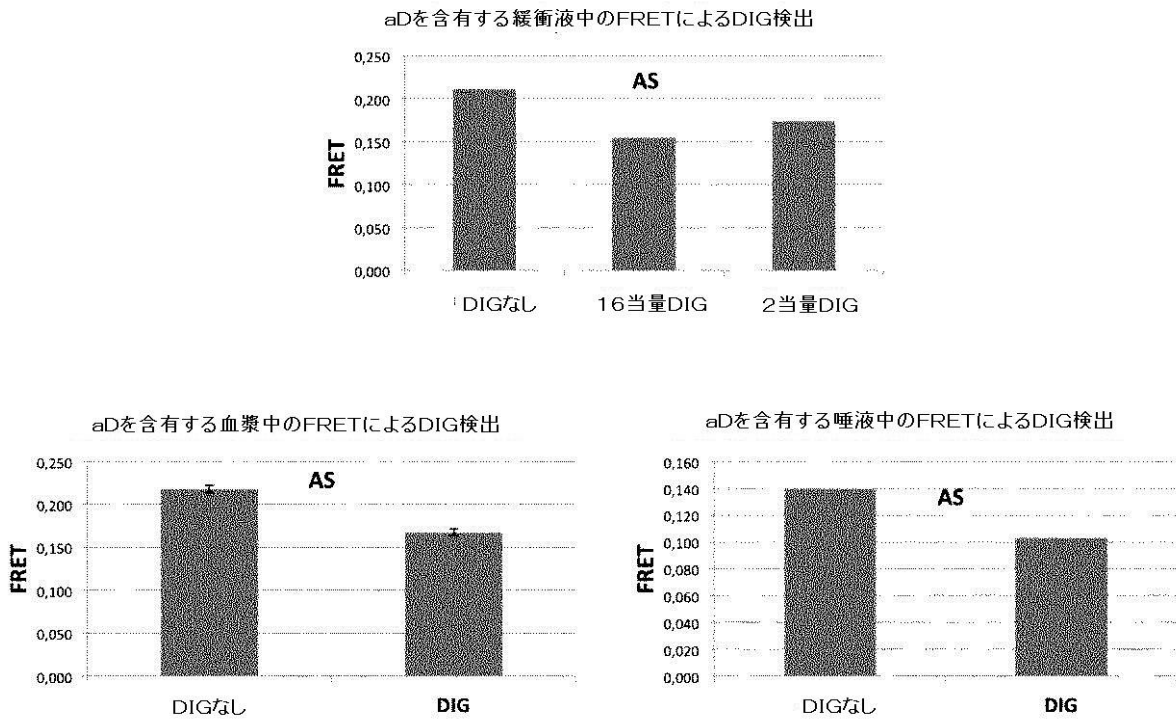
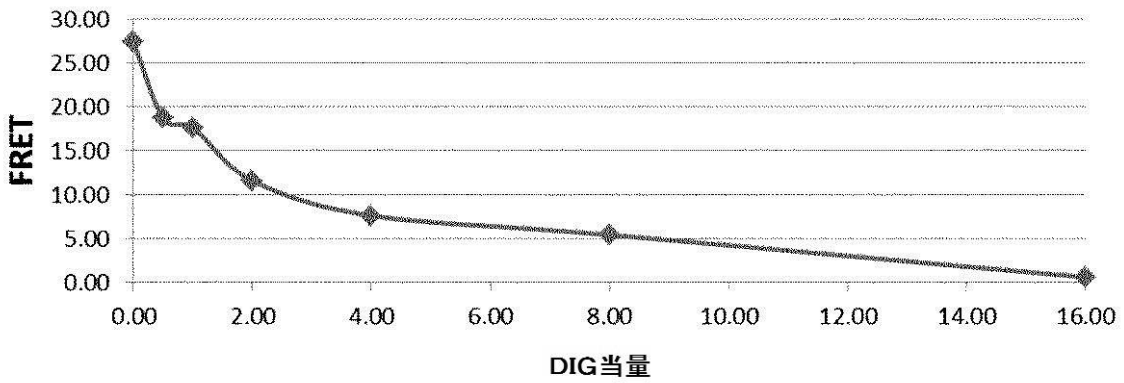


Fig. 12

【 図 1 3 】

添加したDIG当量でのFRET率についての阻害アッセイ



添加したDIG当量でのFRET率についての競合アッセイ

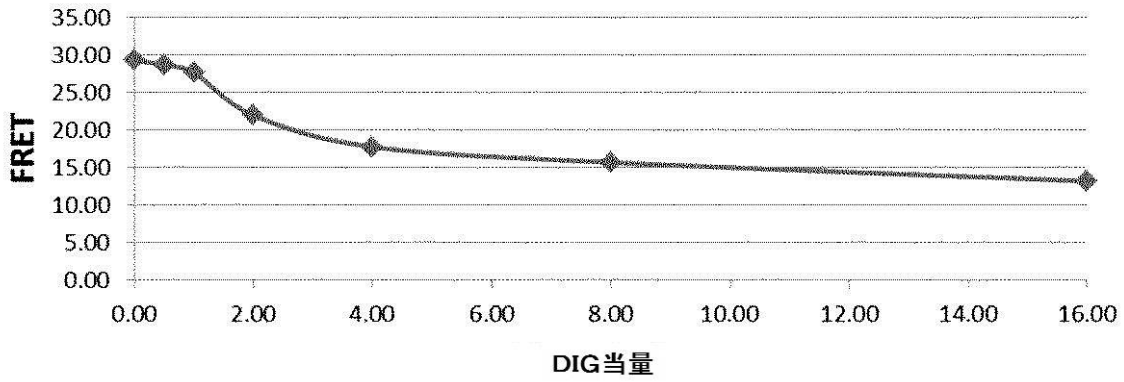
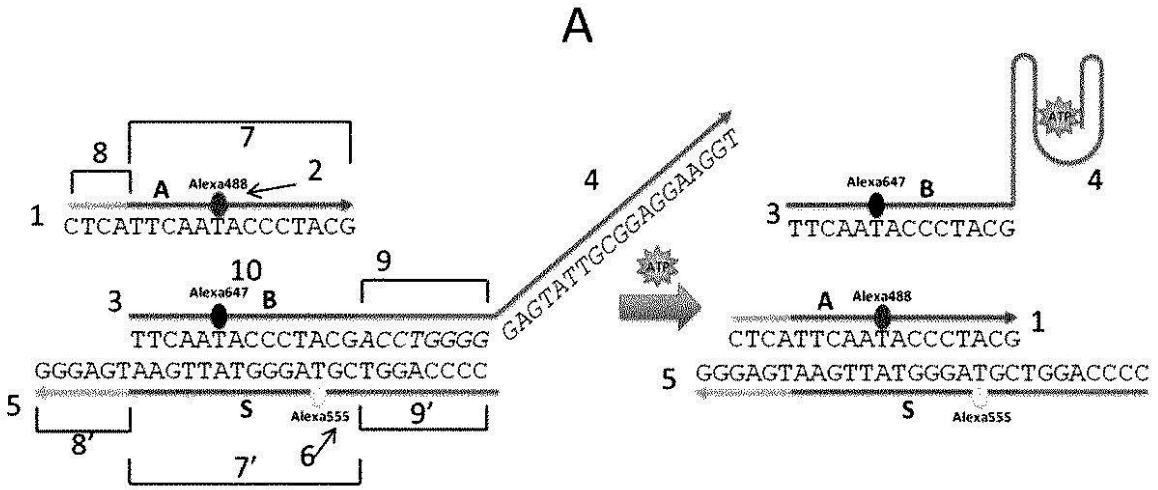


Fig. 13

【 図 15 】



B

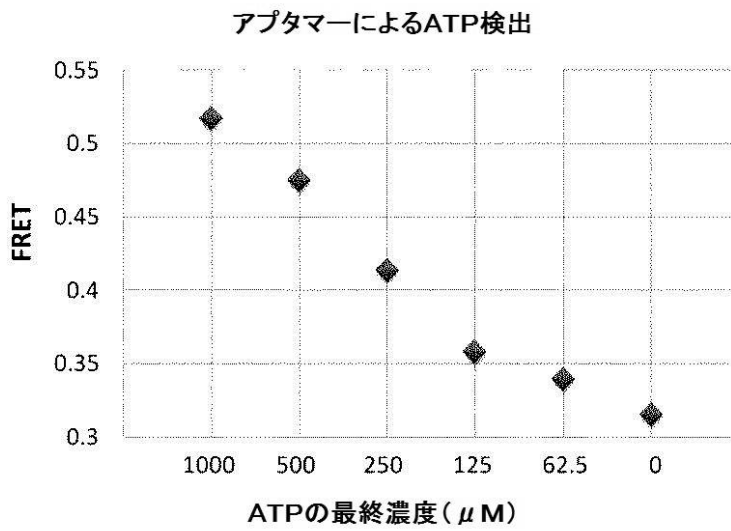
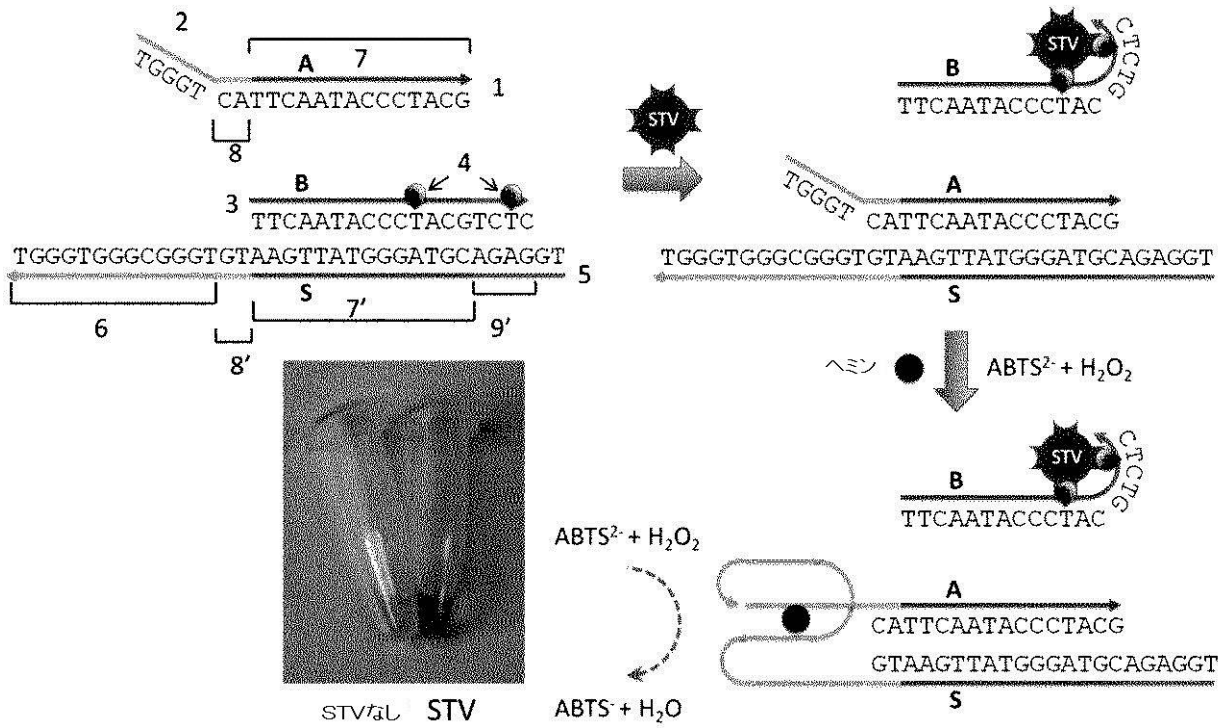


Fig. 15

【図16】

A



B

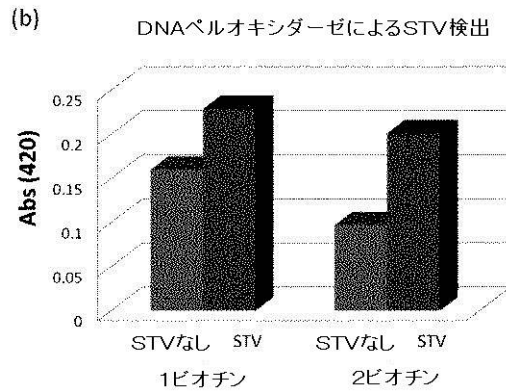


Fig. 16

【 図 17 】

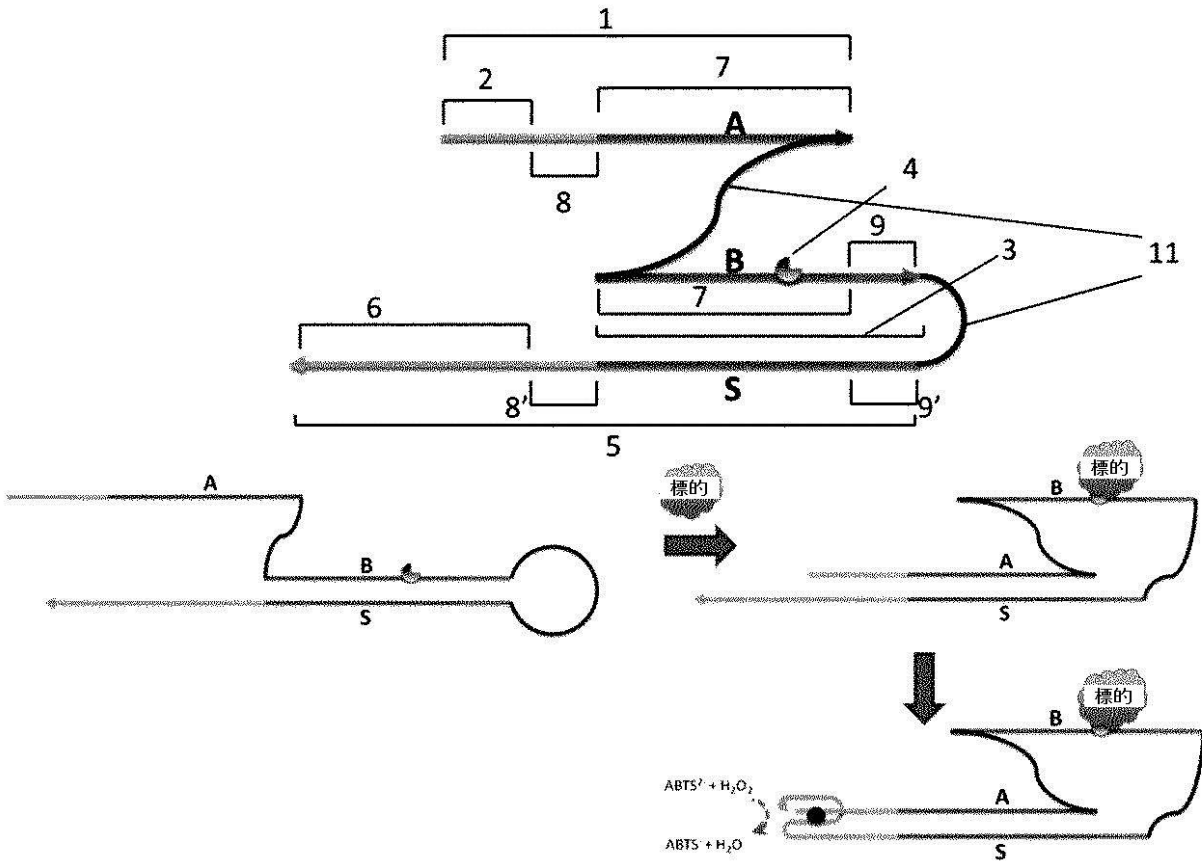
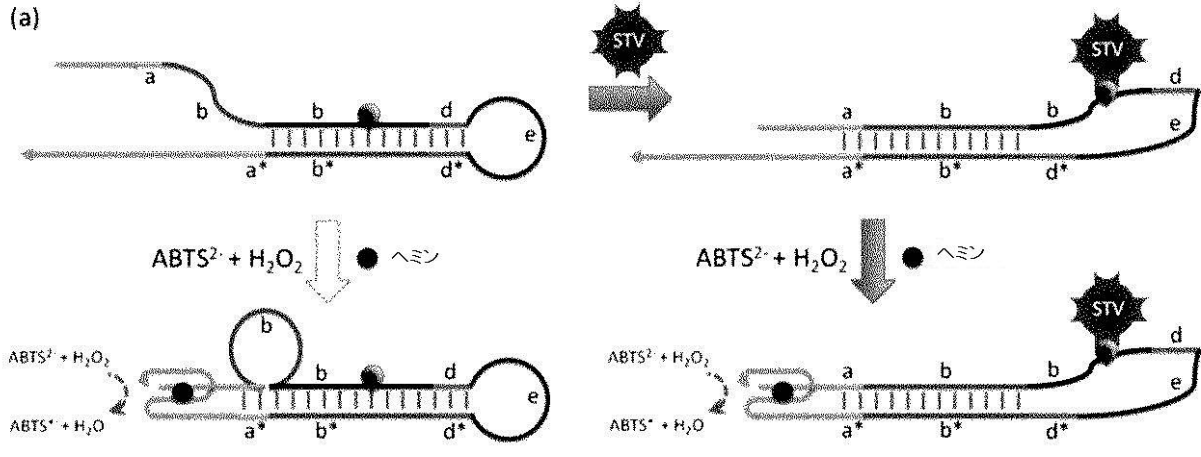


Fig. 17

【 図 18 】



(b)

STV検出のための一本鎖システム

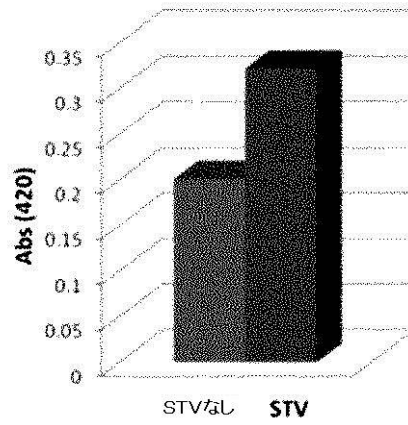


Fig. 18

【 図 19 】

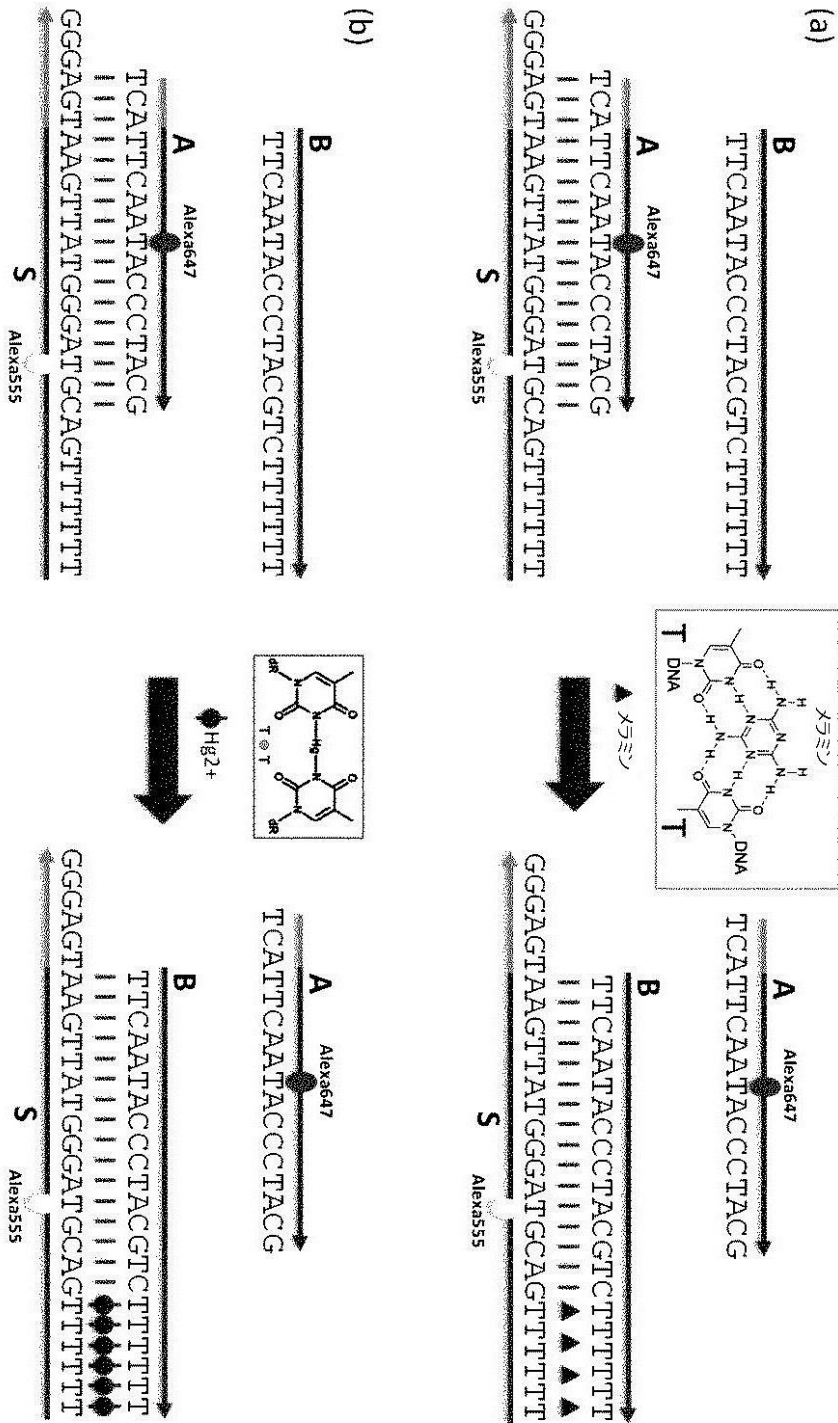


Fig. 19

【 配列表 】

2015529076000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成27年5月12日 (2015.5.12)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2015529076000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/068824

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 ADD.		
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) 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SONG T ET AL: "Synchronized assembly of gold nanoparticles driven by a dynamic DNA-fueled molecular machine", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 20120704 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY USA, vol. 134, no. 26, 4 July 2012 (2012-07-04) , pages 10803-10806, XP002715511, ISSN: 0002-7863 the whole document -----	1,3-6, 12,13, 16,17
X	DUOSE DZIFA Y ET AL: "Configuring robust DNA strand displacement reactions for in situ molecular analyses.", NUCLEIC ACIDS RESEARCH APR 2012, vol. 40, no. 7, April 2012 (2012-04), pages 3289-3298, XP002715512, ISSN: 1362-4962 the whole document -----	1,3-6, 12,13, 16,17
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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 "E" earlier application or patent 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		Date of mailing of the international search report
1 November 2013		12/11/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bots, Jürgen

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/068824

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHAO ZHANG ET AL: "A DNA-Origami Chip Platform for Label-Free SNP Genotyping Using Toehold-Mediated Strand Displacement", SMALL, vol. 6, no. 17, 6 September 2010 (2010-09-06), pages 1854-1858, XP055017003, ISSN: 1613-6810, DOI: 10.1002/smll.201000908 the whole document	1,3-6, 12,13, 16,17
A	WO 2012/058488 A1 (HARVARD COLLEGE [US]; ZHANG DAVID YU [US]; YIN PENG [US]) 3 May 2012 (2012-05-03)	1-19
A	ZHANG DAVID YU ET AL: "Engineering entropy-driven reactions and networks catalyzed by DNA", SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 318, no. 5853, November 2007 (2007-11), pages 1121-1125, XP002715513, ISSN: 0036-8075 the whole document	1-19
A	DAVID YU ZHANG ET AL: "Control of DNA Strand Displacement Kinetics Using Toehold Exchange", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 131, no. 47, 2 December 2009 (2009-12-02), pages 17303-17314, XP055016993, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja906987s the whole document	1-19
A	ZHANG DAVID YU ET AL: "Optimizing the specificity of nucleic acid hybridization.", NATURE CHEMISTRY MAR 2012, vol. 4, no. 3, March 2012 (2012-03), pages 208-214, XP008165567, ISSN: 1755-4349 the whole document	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/068824

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012058488	A1	03-05-2012	
		AU 2011319755 A1	30-05-2013
		CA 2817066 A1	03-05-2012
		CN 103328654 A	25-09-2013
		EP 2633071 A1	04-09-2013
		US 2013274135 A1	17-10-2013
		WO 2012058488 A1	03-05-2012

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 G 0 1 N 21/64 F
 C 1 2 Q 1/02

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

(72)発明者 ゴトヘルフ, クルト ヴェテラエ
 デンマーク国 ディーコー - 8 2 4 0 リスコフ, エスペダレン 8 9

(72)発明者 ザン, ザオ
 アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 7 7, ウエスト ヘブン, イェール ユニバーシティ
 ウエスト キャンパス 8 5 0

(72)発明者 シェルストラブ, ミシャエル ブレンドウム
 デンマーク国 ディーコー - 8 2 1 0 オーフス ヴィ, ブロンゼアルデルヴェイ 1 3 7

(72)発明者 ハイエセン, クレスチャン
 デンマーク国 ディーコー - 8 2 0 0 オーフス エン, 1ティホ., リイエガド 5

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA14 BA16 DA01 EA01 EA13 JA02 KA02 KA05 KA09
 4B063 QA01 QA18 QS34 QX02

专利名称(译)	使用链置换交换反应检测非核酸分析物		
公开(公告)号	JP2015529076A	公开(公告)日	2015-10-05
申请号	JP2015530453	申请日	2013-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	UNISENSE診断APS		
申请(专利权)人(译)	Unisensu診断由ES API		
[标]发明人	ゴトヘルフクルトヴェテラエ ザンザオ シエルストラップミシャエルブレンドウム ハイエセンクレスチャン		
发明人	ゴトヘルフ, クルト ヴエテラエ ザン, ザオ シエルストラップ, ミシャエル ブレンドウム ハイエセン, クレスチャン		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/542 G01N21/64 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/54386 C12Q1/6832		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/542.A G01N21/64.C G01N21/64.F C12Q1/02		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA14 2G043/BA16 2G043/DA01 2G043/EA01 2G043/EA13 2G043/JA02 2G043/KA02 2G043/KA05 2G043/KA09 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	夏木森下 飯田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
優先権	201270555 2012-09-11 DK		
外部链接	Espacenet		

摘要(译) 本发明涉及用于检测不同于DNA和RNA的分析物的分析物检测系统。该系统包含一组寡核苷酸，其可以以特定方式彼此杂交并且能够基于特定杂交事件产生信号。该系统依赖于在分析物或分析物存在下寡核苷酸之间的杂交平衡的变化，这导致信号的变化。	(21) 出願番号 特願2015-530453 (P2015-530453) (06) (22) 出願日 平成25年9月11日 (2013. 9. 11) (05) 翻訳文提出日 平成27年4月24日 (2015. 4. 24) (06) 国際出願番号 PCT/JP2013/068824 (07) 国際公開番号 WO2014/041024 (07) 国際公開日 平成26年3月20日 (2014. 3. 20) (31) 優先権主張番号 PA201270555 (32) 優先日 平成24年9月11日 (2012. 9. 11) (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)	(71) 出願人 515064836 ウニセンス ダイアグノスティクス エー ビーエス デンマーク国 デューコー-8200 オ ーフス エン, トゥーウアガ 1 (74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策 (74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹 (74) 代理人 100181674 弁理士 飯田 貴敏 (74) 代理人 100181641 弁理士 石川 大輔 (74) 代理人 230113332 弁理士 山本 健策
	最終頁に続く	