

(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 - 503011

(P2003 - 503011A)

(43)公表日 平成15年1月28日(2003.1.28)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09 1/00	ZNA	C 1 2 N 1/00 C 1 2 Q 1/02 1/68	U 2 G 0 4 3 2 G 0 4 5 A 2 G 0 5 9
C 1 2 Q 1/02 1/68		G 0 1 N 21/21 21/27	Z 2 G 0 6 0 C 4 B 0 2 4
G 0 1 N 21/21			

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 68数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 609609(P2000 - 609609)

(86)(22)出願日 平成12年3月31日(2000.3.31)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月2日(2001.10.2)

(86)国際出願番号 PCT/US00/08773

(87)国際公開番号 W000/060120

(87)国際公開日 平成12年10月12日(2000.10.12)

(31)優先権主張番号 09/286,091

(32)優先日 平成11年4月2日(1999.4.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 エムティー テクノロジー, インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0245
1 ワルタム,ベア ヒル ロード 303

(72)発明者 ボールズ, ティー., クリスチャン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0242
0 レキシントン,パートウェル ロード
76

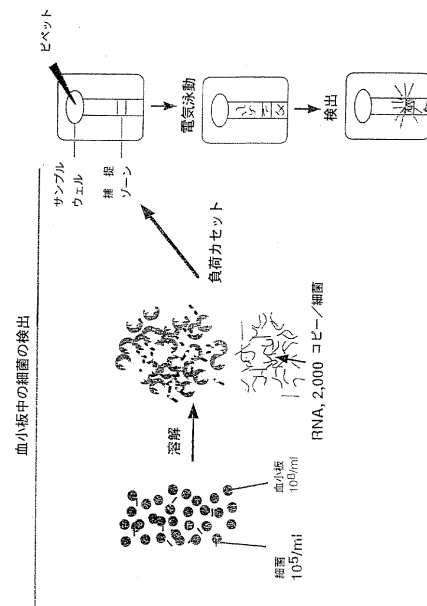
(74)代理人 弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 固定プローブを使用する微生物の検出方法

(57)【要約】

本発明は、固定化された捕捉プローブを含む電気泳動を用いる、テストサンプル中の微生物学的標的分子の有無を検出する工程を含む、微生物の有無の検出方法を開示する。また、本発明は、推定変異標的分子内の変異部位の検出方法を開示する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の工程：

(a) 少なくとも1つの領域内に固定化された1種以上の捕捉プローブを含有する電気泳動媒体内に、微生物学的標的分子を導入する工程；

(b) 前記電気泳動媒体を電界に供し、固定化された捕捉プローブを含む前記電気泳動媒体の少なくとも1つの領域に微生物学的標的分子の電気泳動移動をもたらす工程；ならびに

(c) 前記媒体内に固定化された、微生物学的標的分子または微生物学的標的分子/捕捉プローブ複合体の存在を検出する工程を含み、それにより、固定化された捕捉プローブを含有する電気泳動媒体の少なくとも1つの領域内における、微生物学的標的分子または微生物学的標的分子/捕捉プローブ複合体の検出が、前記テストサンプル中における微生物の存在を示す、テストサンプル中の1種以上の微生物学的標的分子の有無を検出する工程を含む、テストサンプル中の微生物の有無の検出方法。

【請求項2】 工程(a)の前に、テストサンプルを処理して微生物および/または宿主から標的分子の1種以上を放出させる、請求項1記載の方法。

【請求項3】 微生物が、細菌、ウイルス、真菌および寄生虫からなる群より選ばれる請求項1記載の方法。

【請求項4】 細菌が、セラチア・マルセッセンス、スタヒロコッカス・エピデルミディス、スタヒロコッカス・アウレウス、シュードモナス・エルジノーサ、大腸菌、バシラス・セレウス、エンテロバクター・クロアケ、ストレプトコッカス・ピオゲネス、スタヒロコッカス・ワーネリ、ストレプトコッカス・(-ヘモリティク)(-hemolytic)、ストレプトコッカス・ニューモニエ、ストレプトコッカス・ミティス、サルモネラ、セラチア・リクファシエンス(liquefaciens)、クレブシエラ、プロピオニバクテリウム・アクネス、エルシニア・エンテロコリチカ、シュードモナス・フルオレッセンス、シュードモナス・プチダおよびその組み合わせからなる群より選ばれる請求項3記載の方法。

【請求項5】 微生物学的標的分子が、核酸、タンパク質、ペプチドおよびその組み合わせからなる群より選ばれる請求項1記載の方法。

【請求項6】 核酸が、DNAおよびRNAからなる群より選ばれる請求項5記載の方法。

【請求項7】 テストサンプルが、血液、血漿、血小板、赤血球、尿、糞便、汗、気管滲出物、房水、硝子液、皮膚、毛髪、細胞、組織および器官の培養系からなる群より選ばれる請求項1記載の方法。

【請求項8】 捕捉プローブが、核酸、修飾核酸、核酸類似体およびその組み合わせからなる群より選ばれる請求項1記載の方法。

【請求項9】 電気泳動媒体が、少なくとも1種のポリマーを含む溶液である請求項1記載の方法。

【請求項10】 ポリマーが、ポリアクリルアミド、ポリ(N,N-ジメチルアクリルアミド)ポリマー、ポリ(ヒドロキシエチルセルロース)ポリマー、ポリ(エチレンオキシド)ポリマー、ポリ(ビニルアルコール)ポリマーおよびその組み合わせからなる群より選ばれる請求項9記載の方法。

【請求項11】 前記媒体が、少なくとも1種のポリマーから形成されているゲルである請求項1記載の方法。

【請求項12】 電気泳動媒体が、ポリアクリルアミドポリマー、アガロースポリマー、澱粉ポリマーおよびその組み合わせからなる群より選ばれる少なくとも1種のポリマーを用いて形成されている請求項11記載の方法。

【請求項13】 以下の工程：

(a) テストサンプル由来の1種以上の微生物学的標的分子を、ハイブリダイゼーションに適した条件下で、少なくとも1種のアダプターポリヌクレオチドと接触させ、それによりアダプター/標的ハイブリダイゼーション複合体を形成する、アダプター/標的ハイブリダイゼーション複合体を形成する工程；

(b) (a)のハイブリダイゼーション複合体を、少なくとも1つのその領域内に固定化された1種以上の捕捉プローブポリヌクレオチドを含有する電気泳動媒体に導入する工程；

(c) 前記電気泳動媒体を電界に供し、固定化された捕捉プローブポリヌクレオチドを含む前記電気泳動媒体の少なくとも1つの領域に前記アダプター/標的複合体の電気泳動移動をもたらす工程；ならびに

(d) 前記媒体内に固定化された、アダプター / 標的 / 捕捉プローブ複合体の存在を検出する工程、
を含む、アダプター分子を用いる、テストサンプル中の1種以上の微生物学的標的分子の有無を検出する工程を含む、テストサンプル中の微生物の有無の検出方法。

【請求項14】 微生物が、細菌、ウイルス、真菌および寄生虫からなる群より選ばれる請求項13記載の方法。

【請求項15】 微生物学的標的分子が、核酸、タンパク質およびペプチドからなる群より選ばれる請求項13記載の方法。

【請求項16】 核酸が、DNAおよびRNAからなる群より選ばれる請求項15記載の方法。

【請求項17】 テストサンプルが、血液、血漿、血小板、赤血球、尿、糞便、汗、気管滲出物、房水、硝子液、皮膚、毛髪、細胞、組織および器官の培養系からなる群より選ばれる請求項13記載の方法。

【請求項18】 アダプターポリヌクレオチドが、配列番号：1である請求項13記載の方法。

【請求項19】 工程(a)において、アダプター / 標的ハイブリダイゼーション複合体を、前記アダプターポリヌクレオチドと標的分子との間の結合配列領域と重複しない前記標的分子に相補的なヌクレオチド配列を含有するサンドイッチプローブと、ハイブリダイゼーションに適した条件下で混合する、請求項13記載の方法。

【請求項20】 サンドイッチプローブポリヌクレオチドがアルカリホスファターゼに結合している請求項19記載の方法。

【請求項21】 サンドイッチプローブポリヌクレオチドが配列番号：2である請求項20記載の方法。

【請求項22】 微生物学的標的ポリヌクレオチドが配列番号：3である請求項13記載の方法。

【請求項23】 固定化された捕捉プローブポリヌクレオチドが配列番号：4である請求項13記載の方法。

【請求項24】 (a) 微生物学的標的分子のある領域に相補的なヌクレオチド配列領域を含有する少なくとも1種の捕捉プローブポリヌクレオチドを、捕捉プローブポリヌクレオチドとハイブリダイズさせるのに使用する微生物学的標的ヌクレオチド配列領域に部分的に相同なヌクレオチド配列を含有する少なくとも1種のシグナルポリヌクレオチドと、前記捕捉プローブポリヌクレオチドとシグナルポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに適した条件下で接触させ、それにより捕捉プローブ/シグナルポリヌクレオチド複合体を形成する、少なくとも1種の捕捉プローブ/シグナルポリヌクレオチド複合体を形成する工程；

(b) 微生物学的標的分子を、少なくとも1つの領域内に固定化された1種以上の捕捉プローブを含む電気泳動媒体内に導入する工程；

(c) 前記電気泳動媒体を電界に供し、固定化された捕捉プローブポリヌクレオチドを含む前記電気泳動媒体の少なくとも1つの領域内に前記微生物学的標的分子の電気泳動移動をもたらす工程；ならびに

(d) 前記媒体内のシグナル層における少なくとも1種の遊離シグナルポリヌクレオチドの存在を検出し、それによりテストサンプル中の1種以上の微生物学的標的分子の存在を示す工程

を含む、シグナルポリヌクレオチド置換反応を用いる、テストサンプル中の1種以上の微生物学的標的分子の有無を検出する工程を含む、微生物の有無の検出方法。

【請求項25】 捕捉プローブポリヌクレオチドが配列番号：5である請求項24記載の方法。

【請求項26】 シグナルポリヌクレオチドが配列番号：6である請求項24記載の方法。

【請求項27】 微生物学的標的分子が配列番号：7である請求項24記載の方法。

【請求項28】 以下の工程：

- (a) 少なくとも1つの領域内に固定化された1種以上の捕捉プローブを含有する電気泳動媒体内に、1種以上の推定変異標的分子を導入する工程；
- (b) 前記電気泳動媒体を電界に供し、固定化された捕捉プローブを含む前記電

電気泳動媒体の少なくとも1つの領域に1種以上の推定変異標的分子の電気泳動移動をもたらす工程；ならびに

(c) 前記媒体内に固定化された、推定変異標的分子/捕捉プローブ複合体の存在を検出する工程、

を含むテストサンプル中に存在する推定変異標的分子または分子群の1種以上における少なくとも1個のヌクレオチド配列変異部位の同定方法。

【請求項29】 捕捉プローブが、電気泳動媒体の1つ以上の不連続な領域内に固定化されている請求項28記載の方法。

【請求項30】 捕捉プローブが、核酸、修飾核酸、核酸類似体およびその組み合わせからなる群より選ばれる請求項28記載の方法。

【請求項31】 捕捉プローブが、配列番号：8、配列番号：15および配列番号：16～20からなる群より選ばれる請求項28記載の方法。

【請求項32】 推定変異標的分子が、細菌分子、ウイルス分子、真菌分子および寄生虫分子からなる群に由来する請求項28記載の方法。

【請求項33】 推定変異標的分子が核酸である請求項32記載の方法。

【請求項34】 推定変異標的分子が、DNAおよびRNAからなる群より選ばれる請求項33記載の方法。

【請求項35】 推定変異標的分子が、配列番号：9～14および配列番号：21～24からなる群より選ばれる請求項35記載の方法。

【請求項36】 推定変異標的分子が、配列番号：25～28からなる群より選ばれるプライマーを用いて合成される請求項35記載の方法。

【請求項37】 テストサンプルが、血液、尿、糞便、汗、気管滲出物、房水、硝子液、皮膚、毛髪、細胞、組織および器官の培養系からなる群より選ばれる請求項28記載の方法。

【請求項38】 (a) 微生物標的分子を、内部に固定化された捕捉プローブ複合体を含有する電気泳動媒体に導入する工程、ここで、前記捕捉プローブ複合体は、つなぎ鎖(tether)核酸分子とハイブリダイズした標識シグナル核酸分子を含有する；

(b) 前記電気泳動媒体を電界に供し、固定化された捕捉プローブを含む前記電

電気泳動媒体の少なくとも1つの領域に前記微生物標的分子の電気泳動移動をもたらす工程；

(c) ハイブリダイゼーションに適した条件下で、前記標的分子を工程(a)の捕捉プローブ複合体と接触させることにより新しいハイブリッド複合体を形成する工程、ここで、前記シグナル核酸分子は、前記標的分子と置換され、それにより、前記つなぎ鎖核酸分子とハイブリダイズした標的分子を含有する新しいハイブリッド複合体を形成する；ならびに

(d) シグナル核酸を検出し、それによりテストサンプルにおける標的分子の存在を示す工程

を含む、置換アッセイを用いる、テストサンプルにおける微生物標的分子の有無の検出方法。

【請求項39】 捕捉プローブ複合体が、電気泳動媒体の不連続な層内に固定化されている請求項38記載の方法。

【請求項40】 前記標識が、放射活性、蛍光、化学発光、リン光、発光、親和性標識、酵素抱合体およびその組み合わせからなる群より選ばれる請求項38記載の方法。

【請求項41】 検出の手段が、質量測定、密度測定、質量分光分析、プラズモン共鳴、放出、分極、屈折率、電気伝導度、粘度、濁度および旋光度からなる群より選ばれる請求項38記載の方法。

【請求項42】 (a) 微生物標的分子を、内部に固定化された捕捉プローブ複合体を含有する電気泳動媒体に導入する工程、ここで、前記捕捉プローブ複合体は、つなぎ鎖核酸分子とハイブリダイズした標識シグナル核酸分子を含有する；

(b) 前記電気泳動媒体を電界に供し、固定化された捕捉プローブを含む前記電気泳動媒体の少なくとも1つの領域に前記微生物標的分子の電気泳動移動をもたらす工程；

(c) ハイブリダイゼーションに適した条件下で、前記標的分子を工程(a)の捕捉プローブ複合体に接触させることにより標的-シグナルハイブリッド複合体を形成する工程、ここで、前記シグナル核酸分子は、前記標的分子と置換され、

かつハイブリダイズし、それにより、標的 - シグナルハイブリッド複合体を形成する；ならびに

(d) 標的 - シグナルハイブリッド複合体を検出し、それによりテストサンプルにおける標的分子の存在を示す工程

を含む、逆置換アッセイを用いる、テストサンプルにおける微生物標的分子の有無の検出方法。

【請求項43】 捕捉プローブ複合体が、電気泳動媒体の不連続な層内に固定化されている請求項42記載の方法。

【請求項44】 前記標識が、放射活性、蛍光、化学発光、リン光、発光、親和性標識、酵素抱合体およびその組み合わせからなる群より選ばれる請求項42記載の方法。

【請求項45】 検出の手段が、質量測定、密度測定、質量分光分析、プラズモン共鳴、放出、分極、屈折率、電気伝導度、粘度、濁度および旋光度からなる群より選ばれる請求項42記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

関連出願

本出願は、1997年5月16日出願の米国仮特許出願第60/046,708号の恩恵を主張する、1997年8月8日出願の米国特許出願第08/971,845号の一部継続出願である、1999年4月2日(02.04.999)出願の米国特許出願第09/286,091号の継続出願であり、またそれに対する優先権を主張する。これらは本明細書に参考文献としてそれらの教示の全体が組み込まれている。

【0002】

発明の背景

全血および赤血球、血小板、血漿といった血液産物はこの過去の世紀を通じて、レシピエントの患者に輸血されてきた。これらの潜在的な輸血成分の微生物汚染については頻度は少なかったものの、それでも輸血関連死亡の症例が報告されてきており、またこうした輸血を受けなければならない患者にとってだけでなく、医療関係者の社会においても双方で心配の種となっている。Clinical Microbiology Reviewsで指摘されているように、全血あるいはその産物は採取時に少量の細菌を当初含む可能性があり、また、だからといって敗血症の脅威が存在しているわけではない。しかし、これらの血液産物を保存するに当たっては、レシピエントの患者に敗血症を引き起こす可能性のあるレベルまで細菌が増殖する可能性がある。(Wagner, S. J.ら、Clinical Microbiology Reviews, 7:290(1994))。

【0003】

患者に血液あるいは血液産物を輸血するのに先立って汚染微生物を検出する必要がはっきりとそこには存在する。現在では、汚染微生物、特に細菌微生物をスクリーニングするのに用いられる方法がいくつかある。視覚的検査は、血液バッグの内容物の色が変化したかどうかを判定するのに用いられている。その色が適当な赤から暗赤色に変わった場合は、それは細菌汚染を示している可能性がある

。しかし、この方法はやり損ねるおそれのないものではない。この方法は不正確になる可能性がある定性的な評価に頼っており、汚染された血液バッグを見逃す可能性がある。

【0004】

染色は、微生物汚染の検出にもまた使用することができる。Wrightの染色だけではなく、グラム染色あるいはアクリジンオレンジは多くの場合、細菌汚染を検出するのに用いられる。しかし、こうした染色は、血液バッグ内に含まれている細菌汚染種に対する陽性シグナルを示すのに十分なほど感受性があるわけではないであろう。

【0005】

血液サンプル、あるいはその産物のうちの1つは、汚染があるかどうかを判定するために培養することができる。培養システムを使用する第1の欠点は、1つの結果を得るのに24～48時間が一般的にかかることである。結果として、その血液を時間的に有効なやり方でテストすることができない。この技術に対するもう1つの欠点は、陰性所見を検出することができるエンドポイントがないことである。

【0006】

その他にも有用なアッセイ方法があるが、それらは顕著な欠点も有している (Rorer, M. L., *Advance / Laboratory*, 6月号: 41-46 (1997))。例えば、いくつかの方法では、テストサンプル中の汚染微生物に核酸が存在することを検出するのにハイブリダイゼーションアッセイに頼っている。これらの方法では、第1に、溶液相検出プロトコルによりその微生物の核酸を検出する。例えば、標識化されている核酸プローブが溶液中で微生物のヌクレオチド配列にハイブリダイズされる。そのテストサンプルから得られるハイブリダイズされていない核酸は、例えば、加水分解により処理されなければならない、あるいはそのハイブリダイズされた複合体は、溶液中の核酸のハイブリダイズされていない種から取り出なければならない。(これについては、以下を参照のこと: Brecher, M. E.ら、*Transfusion*, 34: 750-755 (1994); Brecher, M. E.ら、*Transfus*

ion, 33:450-457(1993); Hoganらに付与された米国特許第5,541,308号、Kohneに付与された米国特許第5,288,611号;およびKohneに付与された米国特許第4,851,330号)。これらの溶液相プロトコルは、時間を浪費するものであり、また信頼できないものである可能性がある。

【0007】

微生物汚染の自信に満ちたモニタリングを確実に行うのに十分な感受性があり、迅速で正確である、血液および血液産物の微生物汚染を検出する方法に対する必要性がいまだに存在する。その方法は、感受性がある、迅速で、また病院、医師の診療所など、あるいは複雑な検査室装置が多くの場合欠けている分野などのさまざまな環境に調整可能なものである必要がある。

【0008】

発明の要約

本発明は、核酸、修飾核酸および核酸類似体を電気泳動媒体に共有結合で付着させる(固定)ことができ、また、電気泳動法が、固定された核酸、修飾核酸あるいは核酸類似体に、特異的に結合(例えば、会合)するあるいはそれらにより結合される標的分子を分離し、精製し、あるいは分析するのに使用することができるという発見に関する。固定された核酸、修飾核酸あるいは核酸類似体は、本明細書では捕捉プローブと呼ぶ。これらの固定捕捉プローブはさまざまな分子、例えば、微生物学的標的分子の分析に使用することができる。本発明により包含されている1つの特異的結合反応はハイブリダイゼーションである。ハイブリダイゼーションにより、捕捉プローブは典型的には、標的核酸、例えば、微生物学的核酸分子のヌクレオチド配列に実質的に相補的であるヌクレオチド配列から成る核酸であり、そのため、特異的なハイブリダイゼーションを結果的に生じる。さらに、ペプチド核酸(PNA)などの核酸類似体は、捕捉プローブとして使用するために電気泳動媒体に共有結合で付着させることができる。電気泳動分離のために使用される媒体内に固定されているその捕捉プローブは、捕捉プローブと特異的にハイブリダイズし、これまたその基質に固定される標的核酸を結果的に生じる。本明細書で使用するとき、「基質」という用語は、媒体の分子篩特性を

もたらし、また、その捕捉プローブの固定のための手段をもたらず、その電気泳動媒体の固定高分子成分を言う。適当な基質材料の実施例には、架橋ポリアクリルアミド、アガロースおよび澱粉などのゲル形成ポリマーが含まれる。キャピラリー電気泳動適用で通常使用されるものとしては、線形ポリアクリルアミド、ポリ(N,N-ジメチルアクリルアミド)、ポリ(ヒドロキシエチルセルロース)、ポリ(エチレンオキシド)およびポリ(ビニルアルコール)などの非ゲル形成ポリマーもまた適当な基質として役に立つ。

【0009】

本発明は特に、電気泳動法が適当な電気泳動基質上に固定されている捕捉プローブと接触している溶液相標的分子を移動させるのに使用されている、微生物学的標的分子の有無を検出することにより、テストサンプル中の微生物の有無を検出する方法に関する。

【0010】

本発明の方法は、電気泳動法にかけることができる、および核酸に結合するあるいは核酸により結合される、微生物に起源を有する何らかの化学的実体(例えば、電気泳動野に置かれたときに検出可能な移動性を有する荷電分子)の分析に適用することができる。こうした実体には、例えば、DNAあるいはRNA分子、核酸結合タンパク質、およびアプタマー結合パートナー(アプタマーは、ペプチド、タンパク質および多糖類などの特異的結合パートナーに結合するように選択される核酸である; Jenisonら、Science, 263:1425-1429(1994))。例えば、本明細書に記載されている方法は、特異的結合が標的核酸と捕捉プローブとの間の相互作用を包含する、固定捕捉プローブを使用して微生物生物体から得られる標的核酸の分析のために使用することができる。

【0011】

テストサンプルはいかなる供給源からのものでもあり得るし、また捕捉プローブと結合複合体を形成できるいずれかの分子を含むことができる。本発明により特異的に包含されるのは、体組織(例えば、皮膚、毛髪、内臓)、体液、例えば、全血、血小板、赤血球、血漿、尿、精液、汗あるいは細胞、組織および臓器の

培養系から、公知の技術を使用して得られる、微生物を含む生物学的供給源から得られるサンプルである。

【0012】

テストサンプルは、結合に有用なテストサンプルに含まれている標的分子になるように、当業者には公知のものである、そうしたやり方で処理される。例えば、テストサンプル中のその標的分子が細菌特異的ヌクレオチド配列である場合、細菌細胞溶解産物を調製し、またその細胞溶解産物（例えば、タンパク質および脂質などのその他の細胞成分だけではなく、標的核酸をも含有している）を分析することができる。代替的には、その標的核酸は分析に先立って単離する（標的核酸をその他の細胞成分から実質的に遊離させる）ことができる。単離は公知のラボ技術を使用して達成することかできる。標的核酸はまた、分析に先立って増幅する（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応あるいはリガーゼ連鎖反応技術により）こともできる。

【0013】

推定微生物標的分子を含有するテストサンプルはその後、適当な電気泳動媒体の中に導入される。捕捉プローブが、直接その媒体に付着されることにより、あるいはその基質内に懸濁されまた捕集される粒子に付着されることにより電気泳動基質内に固定される。いずれの場合でも、その捕捉プローブは固定され、つまり、その印加電界の影響下では移動することはない。

【0014】

微生物標的分子を含有するテストサンプルは、電気泳動工程の前、その間、あるいはその後に検出可能に標識化することができる。基質に固定された微生物標的分子/捕捉プローブ複合体の存在を検出することは、標的分子が生じてくるテストサンプル中の微生物の存在を示すものである。

【0015】

一旦テストサンプルが電気泳動媒体の中に導入されると、そのテストサンプルの標的分子が電界に供され、もし存在する場合は、1つあるいはそれ以上の捕捉プローブに結合するのに十分な条件と時間の下で、基質中をテストサンプルが電気泳動移動して、これを基質中に固定されている標的分子/捕捉プローブ複合体

を生じる。核酸電気泳動法で使用される典型的な電圧勾配は、およそ 1 V/cm ~ 100 V/cm の範囲にある。その他の電界強度はある種の高度に特殊化された適用には有効であり得る。

【0016】

本明細書に記載されている方法に有用な電気泳動基質は数々の異なる形式で設けることができる。例えば、基質はその物理的長さがその横幅あるいは深さを著しく超えている、例えば、チューブ内に含まれているかあるいは狭いストリップとしてフォーマット化されている形式で設けることができる。代替的には、基質はその長さや横幅が著しくその深さを超えていて、例えば、表面上に比較的薄い層としてあるいはスラブとしてフォーマット化されている形式で設けることができる。代替的には、基質は、正確な、あるいはおおよそ直線状、多角形、球形、楕円形の固体、あるいは同様の物理的形狀として、その長さ、横幅および深さが同じオーダーの場合は、1つの固形体として基本的には設けることができる。特に、基質は、使い捨ての容器（例えば、カセット）の中に設けることができる。

【0017】

本明細書に記載されている方法に有用な固定捕捉プローブの位置配置もまた数々の異なる形式で設けることができる。例えば、基質には、均一に基質全体に、あるいは、代替的には、基質の1つまたはそれ以上の別々の領域に分布された1つまたはそれ以上の捕捉プローブを含めることができる。また、サンプルがその基質を移動するとき、捕捉プローブ領域の配列の中を、サンプルが移動するように、同様の（または異なる）固定捕捉プローブの2つまたはそれ以上の領域あるいはプローブの組み合わせたものの位置決めを行うことができる。

【0018】

代替的には、固定捕捉プローブ領域の1つまたは配列の中をそれぞれが通過する、2つまたはそれ以上の移動路を形成するように固定捕捉プローブの複数領域の位置決めを行うことができる。

【0019】

微生物変異の検出もまた本発明に開示されている。テストサンプル内に含まれる1つあるいはそれ以上の推定変異標的分子に相補的である核酸捕捉プローブが

、捕捉層を形成する電気泳動媒体内に固定される。テストサンプルは、捕捉層を含む電気泳動媒体に適用され、また電気泳動にかけられる。相補的一本鎖核酸（すなわち、推定変異標的分子）が捕捉層に入ると、それらは、プローブによりハイブリダイズされ、固定される。非相補的な核酸は、妨害されずにその捕捉層中を通過する。標的分子内の配列変異を検出するように捕捉プローブを特異的に設計することができる。1つの実施態様では、捕捉層に入ると、推定変異標的分子は、変異標的分子に相補的であるように設計される固定プローブにハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションの結果、変異標的はゲルに固定される。野生型標的分子あるいは検出されることを所望されていない、特異的変異を処理していない標的分子は捕捉層中を通過する。1つ以上の変異部位を検出することが可能であると考えることができる。この実施態様では、特定の変異部位に特異的な固定プローブを含有する複数の捕捉層を電気泳動媒体内に形成することができる。

【0020】

本発明のもう1つの実施態様では、アダプター分子を使用して1つあるいはそれ以上の微生物学的標的分子の有無を検出することにより、テストサンプル中の微生物の有無を検出する方法が開示される。微生物標的分子は標的分子に特異的な少なくとも1つのヌクレオチド配列領域を有するアダプター分子と混合される。アダプター/標的複合体はその後電気泳動に供される。複合体は、アダプター分子に特異的である固定捕捉プローブと接触するようになるまで電気泳動媒体中で移動を継続する。アダプター分子は捕捉プローブの特定クラスに特異的である第2ヌクレオチド配列領域を有する。より高度な複合体がアダプター/標的複合体と適当な固定捕捉プローブとの間で形成される。この3部分からなる複合体の検出はテストサンプル中の微生物標的分子の存在を示し、またしたがって、テストサンプル中の微生物の存在を示す。

【0021】

もう1つの実施態様では、本発明はシグナルポリヌクレオチド置換反応を使用して1つあるいはそれ以上の微生物学的標的分子の有無を検出することにより、テストサンプル中の微生物の有無を検出する方法を開示する。複合体は、捕捉プ

ローブとシグナルポリヌクレオチドの間で形成される。捕捉プローブは電気泳動媒体中に固定、またはその媒体の1つあるいはそれ以上の別々の領域に固定することができる。標的分子は電気泳動媒体に導入され、また電気泳動を行う。標的分子の存在下では、シグナルポリヌクレオチドは、標的分子の濃度により、置換されるか、シグナルポリヌクレオチドよりも標的に高い親和性を有する捕捉プローブにより置換することができるかのいずれかである。遊離されたシグナルポリヌクレオチドの存在を検出することにより、テストサンプル中の微生物標的分子の存在が示され、またしたがって、テストサンプル中の微生物の存在が示される。

【0022】

本発明のもう1つの実施態様では、置換アッセイを使用してテストサンプル中の標的分子の有無を検出するための方法が開示される。1つあるいはそれ以上の標的分子を含有するテストサンプルが固定捕捉プローブを含有する媒体中における電気泳動にかけられる。これらの捕捉プローブは2つの成分から成る。第1の成分は、検出可能に標識化された一本鎖核酸分子である。このシグナル分子は典型的には第2の成分よりも短い。第2の成分はつなぎ鎖(tether)核酸分子である。このつなぎ鎖分子には、標的分子内に含まれるヌクレオチド配列領域に相補的であるヌクレオチド配列領域が含まれる。このシグナル分子はつなぎ鎖分子のこの相補的領域の一部にハイブリダイズする。このシグナルとつなぎ鎖型は共に1つのプローブ複合体を形成する。つなぎ鎖分子は電気泳動媒体内に固定される。標的分子は電気泳動下で移動する場合、そのプローブ複合体と接触することができる。標的分子はそのつなぎ鎖から得られるシグナルを置換し、またそのつなぎ鎖分子にハイブリダイズする。シグナル分子は電界が終止されるまで、移動を継続する。一本鎖シグナル分子の検出により、テストサンプル中の1つあるいはそれ以上の標的分子の存在が示される。

【0023】

もう1つの実施態様では、逆置換アッセイを使用してテストサンプル内の標的分子の有無を検出するための方法が開示される。1つあるいはそれ以上の標的分子を含有するテストサンプルが電気泳動にかけられる。電気泳動媒体には、固定

捕捉プローブが含まれる。これらの捕捉プローブは2つの成分からなる。第1の成分は、検出可能に標識化されるシグナル核酸分子である。第2の成分はつなぎ鎖核酸分子である。シグナル分子は標的分子内に含まれるヌクレオチド配列に相補的である。つなぎ鎖分子とシグナル分子はハイブリッドを形成し、このハイブリッドはプローブ複合体と呼称される。標的分子はそのプローブ複合体と接触し、そのシグナル分子はその複合体から置換され、また標的分子にハイブリダイズする。この新しいハイブリッドは、電界が終止されるまで、移動を継続する。このハイブリッドの検出は、テストサンプル中の1つあるいはそれ以上の標的分子を示す。

【0024】

固相方法論を用いることにより、ハイブリダイズされていない核酸を加水分解するための付加的な酵素処理の使用、あるいはハイブリダイズされていない核酸種からハイブリダイズされた複合体を分離するためのクロマトグラフィ法、例えば、サイズ排除クロマトグラフィを用いる必要、などの溶液相検出に伴う数々の困難を回避することができる。これらの方法には、アッセイ時間の延長などの望ましくない効果を生じる結果となり得る付加的な工程を必要とする。

【0025】

さらに、汚染微生物を検出するのに使用されるいずれかの方法の感受性は、臨床的に該当すると考えられる微生物のレベルを検出するのに十分である必要がある。テストは感受性があるがまた正確である必要があるが、しかし、例えば、臨床的な有意性が不可解のままの細菌の実際の濃度は 10^5 CFU/mLあるいはそれ以上といった程度にすぎない。(Krishnan, L. Aら、Transfusion Medicine II, 9(1):176(1995))。

【0026】

このように、本明細書に説明されている研究の結果、現在の方法は、微生物の存在を示す微生物標的分子に特異的に結合する固定捕捉プローブを使用するテストサンプル中の潜在的汚染微生物の迅速で、感受性があり、効率的かつ正確な電気泳動法による分析に利用可能である。ここで前記方法により説明される検出の感受性により、蛍光などの非放射性手段を使用して微生物を検出することが可能

になっている。これにより、汚染微生物を検出するより安全でさらに便利な方法が用意される。

【0027】

発明の詳細な説明

本発明は、捕捉プローブが電気泳動基質中で固定される（例えば、共有結合で付着される）特異的結合反応を分析するための電気泳動法に関する。特に、本発明は、細菌、ウイルス、真菌、および寄生虫の標的分子を含めた1つあるいはそれ以上の微生物標的分子の有無を検出することによりテストサンプル中の微生物の有無を検出するための方法に関する。その捕捉プローブは、テストサンプル中に存在する標的分子に特異的に結合する、あるいはハイブリダイズする、酸、修飾核酸、あるいは核酸類似体（PNAなど）である。テストサンプルは電気泳動基質の中に導入され、また捕捉プローブへのその標的分子の特異的な結合に適切な条件下で電界に供される。固定されたプローブは、電気泳動基質中の内部に付着され、またその基質内で結合が起こる。捕捉プローブは基質中の全般にわたって固定することができ、またあるいはそれらは、基質の1つあるいはそれ以上の個別領域内に固定することができる。図1は、テストサンプル中の1つあるいはそれ以上の微生物標的分子の有無を検出することにより微生物の有無を検出することに関わる段階のいくつかを図示している概略説明図である。

【0028】

サンプル調製

適当なサンプル調製には、微生物あるいは複数の微生物を溶解するのに要する工程が含まれ、それによって、タンパク質、ペプチドおよび核酸を含むそれらの生化学的内容物が放出される。宿主細胞に侵入する微生物の場合、その宿主細胞は、微生物標的分子を遊離するために、例えば、呼吸器系の上皮細胞に感染するライノウイルスあるいはアデノウイルスにより示される哺乳類宿主細胞のウイルス侵入の場合、細胞溶解にかけることができる。微生物標的分子は特定の微生物、例えば、大腸菌（*E. coli*）に特異的であり得るし、あるいは微生物の1つのクラス、例えば、細菌（細菌汚染を検出するためにたいいていの細菌に共通している16S rRNAを使用する）を示し得る。1つあるいはそれ以上の微生物

物標的分子の存在が、テストサンプル中の微生物汚染の存在を示す。デオキシリボ核酸 (DNA) とリボ核酸 (RNA) の両方が本発明の範囲内にあるように企図されている。細菌標的に関しては、好適には、RNAは細胞壁と細胞膜の制約から解放されている。しかし、細菌DNA、例えば、プラスミドDNAもまた、本発明の範囲内にあるように企図されている。標的分子がウイルスから生成される場合は、DNAおよびRNA分子の両方とも、ウイルスのクラスにもよるが、宿主細胞、あるいはウイルス感染の段階によるが、ウイルス被膜からまず遊離させることにより分析にかけ得る。任意には、付加的な工程は、細胞溶解、続いてその溶解産物の半精製などの汚染微生物から所望される標的分子をさらに精製するために採用することができる。例えば、所望される微生物標的分子が二本鎖DNAである場合、その場合には、その調製を、例えば、S1ヌクレアーゼを用いて、分析されるテストサンプルから一本鎖核酸種を除去するように処理することができる。図2は血小板含有供給源から得られる微生物標的分子特異的細菌標的分子の調製を図示する概略説明図である。

【0029】

電気泳動基質

電気泳動法に適さないいずれかの基質も本発明の方法に使用することができる。適当な基質には、アクリルアミドおよびアガロースが含まれており、両方とも核酸電気泳動法用に一般に使用されている。しかし、他の材料もまた使用することができる。実施例には、化学的に修飾されたアクリルアミド、澱粉、デキストラン、およびセルロース系のポリマーが含まれる。付加的な実施例には、修飾アクリルアミドおよびアクリル酸エステル (例えば、Polysciences社、ポリマーと単量体のカタログ、1996-1997、ペンシルバニア州ワリントン市、を参照のこと)、澱粉 (Smithies, Biochem. J., 71: 585 (1959); 製品番号S5651、Sigma Chemical Co., ミズーリ州セントルイス市)、デキストラン (例えば、Polysciences社、ポリマーと単量体のカタログ、1996-1997、ペンシルバニア州ワリントン市、を参照のこと)、そして、セルロース系ポリマー (例えば、Quesada, Current Opin. in Biotechno

logy, 8: 82-93 (1997) を参照のこと) などが含まれる。上に挙げられたこれらのポリマーのいずれも、本発明で使用される捕捉プローブの特異的な付着を可能にするように化学的に修飾することができる。

【0030】

本発明により特に包含されているのは、捕捉プローブとしての核酸、修飾核酸、あるいは核酸類似体の使用方法である。核酸含有ゲルを作製するための核酸を結合する方法は、当業者には公知のものである。核酸、修飾核酸および核酸類似体は、臭化シアンあるいはシアヌル酸クロリド活性化を使用してアガロース、デキストラン、セルロース、およびスターチポリマーに結合することができる。カルボキシル基を含有するポリマーはカルボジイミド結合を使用して第1級アミン基を有する合成捕捉プローブに結合され得る。第1アミンを担体するポリマーは、グルタルアルデヒドあるいはシアヌル酸クロリドによりアミン含有プローブに結合され得る。多くのポリマーはチオール含有合成プローブに結合され得るチオール反応基により修飾することができる。多くの他の適当な諸方法を文献に見つけることができる。(総説に関しては、Wong, 『タンパク質共役と架橋の化学("Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking")』CRC Press刊, 1993年、フロリダ州Boca Raton、を参照のこと)。

【0031】

本明細書に記載されている捕捉プローブを重合可能な化学基に共有結合的に付着させる方法もまた開発されている。重合可能な単量体化合物の適当な混合物により共重合化されるとき、高濃度の固定された核酸を含有する基質は産生することができる。重合可能な化学基に核酸を共有結合的に付着させる方法の例は「核酸を含有する重合可能な複合体("Nucleic Acid-Containing Polymerizable Complex")」と題される米国特許出願第08/812,105号およびRehmanら、Nucleic Acid Res., 27: 649-655 (1999)に見られ、両方の文献は参考文献として本明細書に全体として組み込まれている。

【0032】

いくつかの方法に関しては、2つあるいはそれ以上の基質形成材料の混合物を含有している複合基質を使用するのに有用であり得、1つの例は複合体アクリルアミド - アガロースゲルを含む。これらのゲルは典型的には、2 ~ 5%アクリルアミドおよび0.5% ~ 1%アガロースを含む。こうしたゲルにおいては、アクリルアミドゲルは、主要な篩機能をもたらすが、しかし、アガロースが入っていない場合は、こうした低濃度のアクリルアミドゲルでは簡便な操作を行うには機械的な強度に欠ける。アガロースは、アクリルアミドの篩機能を有意に改変することなく、機械的な支持を与える。こうした場合、その成分が溶液相核酸標的ともっとも緊密な接触を行うため、核酸はゲルの篩機能を与えるその成分に付着させることができる。

【0033】

多くの適用で、アガロースおよび架橋ポリアクリルアミドなどのゲル形成基質が好ましいものとなる。しかし、キャピラリー電気泳動法(CE)適用に関しては、電気泳動基質として可溶性ポリマーを使用することが簡便であり、また再現性もある。CE分析に有用であると証明された可溶性ポリマーの例は、Quesada (Current Opinion in Biotechnology, 8: 82 - 93 (1997))に記載されているように、ポリアクリルアミド、ポリ(N,N-ジメチルアクリルアミド)、ポリ(ヒドロキシエチルセルロース)、ポリ(エチレンオキシド)およびポリ(ビニルアルコール)といった線状ポリマーである。こうした可溶性基質はまた、本発明の方法を実施するのに使用することができる。固定捕捉プローブを含有する可溶性ポリマー基質の調製のための「核酸を含有する重合可能な複合体("Nucleic Acid-Containing Polymerizable Complex")」と題される米国特許出願第08/812,105号にみられる方法を使用するのに特に都合が良く、この文献は参考文献として本出願に全体として組み込まれている。Timofeevら、Nucleic Acids Res., 24: 3142 - 3148 (1996)にみられる事前に形成されたポリアクリルアミドゲルにオリゴヌクレオチドプローブを付着させるためのもう1つのアプローチもまた、事前に重合された可溶性線状ポリアクリルアミドに捕捉プローブを付着させるのに

使用することができ、その教示は参考文献として本出願に全体として組み込まれている。

【0034】

核酸はそれ自体を電気泳動基質の中に組み込むことができる粒子に付着させることができる。粒子は肉眼的に、顕微鏡下でみることができ、あるいは天然のコロイド状であり得る。(Polyciences社、1995-1996粒子カタログ、ペンシルバニア州ワリントン市、を参照のこと)。Cantorら、米国特許第5,482,863号には、懸濁液あるいは粒子を含有する電気泳動ゲルを型にとるための方法が記載されている。その粒子はゲル形成化合物と混合される上述のものに類似した方法を使用して核酸に連結され、また所望される基質形態の中に懸濁液として型にとられる。

【0035】

基質形式および基質を製造する方法

基質はさまざまな形式で構成することができる。例えば、ゲルが支持体内の重合により形成される場合、線状ゲルは、穴あるいは管などの線状支持体内での形成を含む技術により形成され、代替的には間仕切りあるいは溝を形成することにより数多くのストリップの中に2次元ゲルをさらに分けることにより形成される。穴、ストリップあるいは溝形式で、1つあるいはそれ以上という数の共重合可能な捕捉プローブが、重合ゲル内に1つあるいはそれ以上の捕捉プローブを供給するために、ゲル重合の前あるいはその間かのいずれかで、空間位置決めドロップ技術などの任意に空間的に規定された位置において、ゲル材料に加えられる。管形式では、ゲル単量体の配列、ゲル単量体の混合物および重合可能な捕捉プローブがその成分の空間的關係を保護するために*in situ*でその後重合される、空間的に識別される成分のセットと濃度を提供するように連続して管の中に導入することができる。重合誘導収縮の間にゲルの一体性を保護するために、管壁は、ゲルの収縮時に側方に縮む弾性材料で作ることができる。代替的には、漸進性重合がその管の一方の端から誘導され、一方、収縮を補償するためにもう一方の端にさらに液体材料を加えることができる。こうした漸進性重合は、重合触媒剤の拡散を含む手段により、あるいは、照射供給源の移動あるいはその照

射供給源への漸進性曝露などによってその管の一方の端からもう一方への電磁気あるいはその他の照射を誘導する重合の漸進性適用により、誘導することができる。代替的には、線状フォーマットゲルは、以下に説明されるように產生される2次元ゲルから得られる線状スライスあるいは3次元ゲルから得られる線状コアを取り出すことにより製造することができる。

【0036】

2次元ゲルは、支持体の表面上の形成、または2つの支持体表面間の形成を含めた技術により形成することができる。ゲル単量体の層が適用され、多量の共重合可能な捕捉プローブが、ゲル中での任意に空間的位置を保護するために *i n s i t u* で重合される、重合前あるいは重合時に任意に空間的に有意なやり方でその層に適用することができる。多量重合可能な捕捉プローブの適用は、位置決めプログラム可能ドロッパー技術を含む公知の手段により実施することができる。重合時のゲル収縮は、支持体表面間の間隙の縮小を可能にするを含む手段により、また補償するために側方からさらに加えられた材料により側方収縮を可能にすることにより、調整することができる。2次元ゲルは、ゲル形成前、ゲル形成時、あるいはゲル形成後に間仕切りの使用により、あるいは溝に形成することにより、あるいは形成後により幅の狭いセクションにスライスすることにより、数多くのストリップにさらに分けることができる。

【0037】

3次元ゲルは数多くの技術により形成することができる。複数線状ストリップあるいは2次元層は、上述のように繰り返し構築することができ、それぞれは任意に局在化した捕捉プローブを含み、各ストリップあるいは層は3次元容量を生じるように下に横たわる層上で重合される。代替的には、任意に適所に局在する捕捉プローブを任意に備えた多くの2次元ゲルを上述のように、形成することができ、また3次元構造を設けるために一緒に組み立てることができる。

【0038】

ハイブリダイゼーション結合反応の分析用固定プローブ

本発明の方法においては、さまざまな捕捉プローブを使用することができる。典型的には、本発明の捕捉プローブは、標的分子がその捕捉プローブにハイブリ

ダイズする微生物標的分子に実質的に相補的なポリヌクレオチド配列を有する核酸から成る。核酸捕捉プローブの相補性は、テストサンプル中で標的分子を特異的に結合し、また、テストサンプル中でその微生物標的分子の有無、したがって、テストサンプル中の微生物の有無を示すのに十分であるだけのものを必要とする。本発明における使用に適当なプローブは、RNA、DNA、核酸類似体、修飾核酸、および、例えば、ペプチド核酸などの他の有機成分を有する核酸から成る混合クラスのキメラプローブを含む。捕捉プローブは一本鎖あるいは二本鎖核酸であり得る。典型的には、捕捉プローブの長さは少なくとも5ヌクレオチドの長さであり、さらに典型的には、5～50ヌクレオチドの間の長さであり、またそれは数千塩基の長さでもあり得る。

【0039】

本明細書で定義されるとき、「核酸」という用語には、DNA（デオキシリボ核酸）あるいはRNA（リボ核酸）が含まれる。本明細書では「単離された」ものとして表されている核酸は、起源となっているその供給源の成分（例えば、細胞の中に存在しているとき、あるいはライブラリーなどの核酸の混合物）から分離されている核酸であり、また、さらなる処理を行うことができるものである。単離された核酸には、当業者には公知の方法により得られる核酸が含まれる。こうした単離された核酸には、実質的に純粋な核酸（すなわち、タンパク質、炭水化物、あるいは脂質会合から遊離した核酸）、化学的合成により、生物学および化学的方法の組み合わせにより、製造される核酸、および単離された組換え核酸が含まれる。

【0040】

本明細書で使用される場合、「修飾核酸」には、修飾糖基、リン酸基、あるいは修飾塩基を含有する核酸が含まれる。修飾塩基を有する核酸の例には、例えば、アセチル化、カルボキシル化、あるいはメチル化塩基（例えば、4-アセチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、1-メチルイノシン、ノルバリン、あるいはアロ-イソロイシン）が含まれる。修飾ポリヌクレオチドを含有するプローブもまた有用であり得る。例えば、デアザグアニン塩基とウラシル塩基を含有するポリヌクレオチドは、ハイブリダイズされたプローブの熱安

定性を減少させるために、グアニンおよびチミン含有ポリヌクレオチドの代わりに使用することができる (Wetmur, *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26: 227-259 (1991))。同様に、5-メチルシトシンは、熱安定性が增大したハイブリッドが所望される場合は、シトシンの代わりに置換することができる (Wetmur, *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26: 227-259 (1991))。2'-O-メチル基の付加などのリボース糖基への修飾は、固定RNAプローブのヌクレアーゼ感受性を低減することができる (Wagner, *Nature*, 372: 333-335 (1994))。ホスホジエステル主鎖から負の電荷を取り除く修飾はハイブリッドの熱安定性を増大させることができる (Moodyら、*Nucleic Acids Res.*, 17: 4769-4782 (1989); Iyerら、*J. Biol. Chem.*, 270: 14712-14717 (1995))。

【0041】

本明細書で使用されるとき、「核酸類似体」には、糖リン酸主鎖は欠くが、しかし、塩基対を介して複合体を形成する能力を保持している分子が含まれる。こうした核酸類似体は当業者には公知のものである。有用な核酸類似体の1つの例は、標準的なDNA塩基が反復N-(2-アミノエチル)-グリシン単位から成る修飾ペプチド主鎖に付着されるペプチド核酸(PNA)である (Nielsenら、*Science*, 254: 1497-1500, (1991))。ペプチド主鎖は、標準的なDNAおよびRNA一本鎖により塩基対に対して適当な距離をとって塩基を保持することが可能である。PNA鎖には負に荷電したホスホジエステル結合がないという事実におそらくは起因するのであるが、PNA-DNAハイブリッド二本鎖は、等価のDNA-DNA二本鎖よりもずっと強い。さらに、それらの通常見られない構造のため、PNAはヌクレアーゼ分解には非常な耐性がある。これらの理由で、PNA核酸類似体は固定プローブアッセイに有用である。同様の設計上の戦略は、固定プローブアッセイに関する有用な特性を有することになるその他の核酸を構築することに使用することができる

ことは当業者にとって明らかである。

【0042】

本明細書で定義されるとき、「実質的に相補的」とは、捕捉プローブのポリヌクレオチド配列が微生物標的分子の正確なポリヌクレオチド配列を反映する必要はないが、しかし、特定条件下で標的分子にハイブリダイズするように十分相補的でなければならないということの意味する。例えば、非相補的塩基あるいは付加的ポリヌクレオチドは、それとハイブリダイズするのに十分な相補的塩基を有している配列中に散在することができる。一般的には、要求される相補性の度合いは約90%～約100%である。

【0043】

ハイブリダイゼーションの特異的条件は、当業者であれば、経験的に決定することができる。例えば、非特異的ハイブリダイゼーション反応を有意に減少する緊縮条件を選択するべきである。核酸ハイブリダイゼーションの緊縮条件は例えば、Ausubel, F.M.ら編『分子生物学における現行プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)』、第1巻、補遺26、1991年刊で説明されており、その教示は参考文献として本出願に全体として組み込まれている。プローブ長さ、塩基組成、ハイブリダイズする配列間のミスマッチの割合、温度およびイオン強度などの要因が核酸ハイブリッドの安定性に影響を与える。例えば、適度なあるいは高度にストリジエントな緊縮条件は、プローブおよび微生物標的分子の化学的特性の一部に依存して経験的に決定することができる。

【0044】

微生物汚染のテストサンプルをスクリーニングするには、用いられている捕捉プローブが微生物特異的分子に方向付けられる必要がある。例えば、テストサンプルが、レトロウイルスに感染していると疑われる場合、その場合は、そのプローブをgag、pol、またはenvのウイルスヌクレオチド配列のいずれかあるいはそれらの断片に対して方向付けることができる。ちょうど提示されている実施例では、各クラスが、挙げられているそのウイルスヌクレオチド配列あるいはそれらの断片のうちの1つに対して方向付けられる、3つのクラスのプローブ

が用いられる場合、複数プローブを使用することができる。テストサンプル、例えば、血小板が細菌汚染の存在について分析される場合、その場合は、プローブは特定の細菌DNA配列、あるいは細菌RNA配列（例えば、rRNA配列）に対するものであり得る。後者の場合は、プローブは好適には、ヒトRNAとは反応しないだろうが、その血小板を汚染した細菌種から得られるRNAとは反応するだろう。（これについては、以下を参照のこと：Brecher, M. E. ら、Transfusion, 34:750-755 (1994); Brecher, M. E. ら、Transfusion, 33:450-457 (1993); Hoganらに付与された米国特許第5,541,308号; Kohneに付与された米国特許第5,288,611号; Kohneに付与された米国特許第4,851,330号、これらの教示全体が参考文献として本明細書に全体として組み込まれている。）血小板を汚染することが知られているいくつかの細菌種が表1に挙げられている。その表に挙げられている種は本発明を使用するスクリーニングに適当な標的微生物の例である。

【0045】

【表1】

血小板から一般に単離される細菌	
1)セラチア・マルセッセンス*	11)ストレプトコッカス・ニューモニエ
2)スタヒロコッカス・エピデルミディス*	12)ストレプトコッカス・ミティス
3)スタヒロコッカス・アウレウス*	13)サルモネラ種
4)シュードモナス・エルジノーサ*	14)サラチア・リクファシエンシス
5)大腸菌*	15)クレブシエラ種
6)バシラス・セレウス*	16)プロピオニバクテリウム・アクネス
7)エンテロバクター・クロアケ*	17)エルシニア・エンテロコリチカ
8)ストレプトコッカス・ピオゲネス*	18)シュードモナス・フルオレッセンシス
9)スタヒロコッカス・ワーネリ	19)シュードモナス・プチダ
10)ストレプトコッカス(α -ヘモリティク)	

*細菌種に最も一般に関連している

【0046】

一本鎖および二本鎖標的分子

本発明の1つの実施態様では、一本鎖微生物標的分子と一本鎖固定捕捉プローブが使用される。この実施態様は、微生物RNA標的分子の分析には特に有用である。それはまた、標的の復元が急速ではない、複合体サンプルから得られる特定の標的の捕捉には有用である。PCR産物などの高度に濃縮された微生物標的は、急速な回復のため、電気泳動法の直前に変性を要求することが可能である。例えば、100~250塩基対の長さであるPCR産物の分析に関しては、75%ホルムアミド(容量/容量)にそのサンプルを引き上げ、また電気泳動法の直前に5分間70℃よりも高く加熱するのに都合が良い。

【0047】

本発明のもう1つの実施態様では、二本鎖微生物標的が一本鎖固定捕捉プローブにより捕捉される。例えば、捕捉プローブは三本鎖構造を形成するために二本鎖核酸と会合するように設計される。第3の鎖は二本鎖分子の主な溝に局在しており、二本鎖分子の塩基によりHogsteen塩基対相互作用を形成する(HoganとKessler, 米国特許第5,176,966号と、Cantorら、米国特許第5,482,836号)。プローブの設計はしたがって、こうした化学的相互作用を支配する制約を受けやすい。しかし、天然に存在する核酸中に三重構造を形成することができる配列の頻度は、多くの微生物標的核酸がこのプローブ設計ストラテジーを使用して特に捕捉することができるほど高い。

【0048】

代替的には、捕捉プローブは、置換ループ構造の形成により二本鎖核酸と会合するように設計することができる。こうしたプローブは、二本鎖分子核酸の一本鎖にのみ結合し、またその二本鎖分子のプローブ相同二本鎖を局所的に置換する。この置換は、そのプローブ-標的鎖相互作用が標的鎖間の相互作用よりもずっと好ましい場合にのみ達成することができる。こうしたプローブは修飾塩基とWetmur, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26:227-259 (1991)、主鎖修飾(Moodyら、*Nucleic Acids Res.*, 17:4769-4782 (1989))および核酸類似体(Nielsonら、*Science*, 254:1497-1500 (1991))を使用

して作製することができる。塩基対が天然に存在する核酸と非常に緊密に且つ特異的に結合しているペプチド核酸(PNA)プローブの使用は本実施態様では特に有用である。

【0049】

標的分子の分析のための均一に修飾された電気泳動媒体

本発明の本実施態様では、実質的にすべての媒体が、捕捉プローブあるいは複数のプローブにより修飾される。捕捉プローブおよび電気泳動条件の選択は、捕捉プローブと標的分子との間の結合が、電気泳動分析の時間スケールについて、一過性のもので、急速で可逆的なものであるように行われる。こうした条件下で、標的分子は、電気泳動運転時に捕捉プローブに結合、放出および再結合するという多くのサイクルを経験する。この可逆的結合は捕捉プローブが存在しない場合にその移動度に比べて、測定された標的の電気泳動移動度を減らす効果を有している。捕捉プローブへの結合が強い場合、標的の移動度は実質的に低減する。捕捉プローブへの結合が弱い場合、標的の移動度はほんの少ししか低減しない。このように、捕捉プローブあるいは複数のプローブが存在しない場合に同様の電気泳動移動度を有する構造的に関連性のある標的は、特異的捕捉プローブに対するそれらの親和性に基づいて識別することができる。本方法は、以下に説明するように、微生物標的核酸配列変化の分析に特に有用である。この分析方法は、サンプルを汚染していると疑われている複数の病原体を同定する必要があるテストサンプル、例えば、血小板中の複数の汚染に対するスクリーニングに利用することができる。

【0050】

標的分子分析用1次元アレイ

本発明の本実施態様では、標的分子を含有するサンプルが、それぞれが少なくとも1つのクラスの捕捉プローブを含有している、一連の個別の基質層中を電気泳動にかけられる。例えば、ハイブリダイゼーション結合反応においては、捕捉プローブに相補的である微生物標的核酸がゲル層内に含有されている捕捉プローブにハイブリダイズし、また、したがってそのゲル層、すなわち、捕捉層に保持される。非相補的サンプル核酸は捕捉層を通過する。捕捉プローブと相補的サン

プル核酸との間のハイブリッドの存在が、本明細書に記載されている適当な標識化ストラテジーにより捕捉層内で検出される。

【0051】

この1次元形式にはいくつか重要な利点がある。まず、サンプルのすべてが捕捉層を通過し、またしたがって、ハイブリダイゼーションには有用となる。これは、たいていの他の固相ハイブリダイゼーション法を超える主な利点となっている。高濃度の固定プローブを使用することで、小さなゲルバンド中のすべてのハイブリダイズ可能なサンプル核酸鎖を捕捉することができる。

【0052】

第2に、個別の電気泳動移動度を有する完全な核酸種は本方法による分析には必要とされない。ハイブリダイゼーションと検出は、単に短い配列の相同性を必要とするだけであるし、部分的に減成された微生物核酸はまだシグナルを付与するからである。微生物標的核酸はすべて、それらが減成されるかどうか、その基質において特定の点に濃縮されるため、この属性はまた検出感受性を増加させる。伝統的なゾーン電気泳動法では、サンプル核酸はすべて、検出用の個別のバンドとして、移動しなければならない。

【0053】

第3に、サンプル量は重要ではない。本発明では、サンプル核酸はすべてたとえ大量のサンプル量が使用されても、捕捉層を通過する。これは、最大限の検出感受性と解像度のためにサンプル量が可能なかぎり少量である必要がある伝統的なゾーン電気泳動法を超える有意な利点である。

【0054】

本実施態様では、捕捉層は単一あるいは複数のクラスの捕捉プローブを含有していてもよい。単層における複数の捕捉プローブの使用は、数多くの異なる微生物のうちのいずれか1つが検出される必要があるアッセイに有用である。例えば、培地中における、あるいは輸血に使用される血液サンプル（例えば、血小板）中におけるいかなる細菌の存在および/または同定に本実施態様を用いることができる。したがって、細菌に対する一般的なテストは、捕捉プローブとして、すべては必要ではなくとも、たいていの細菌に共通する保存された細菌遺伝子配列

のコレクションを使用してもよい。特定細菌の同定は必ずしも重要ではないため、プローブのコレクションは、いずれかの、またすべての細菌が同じ捕捉層で検出されることを確実なものとする、さまざまな細菌に特異的な複数のプローブの広範なスペクトルから構成することができるだろう。

【0055】

複数の捕捉層もまた、本実施態様に使用することができる。これは多重ハイブリダイゼーションアッセイを作り出すために同じゲル装置で複数の捕捉層を連続的に型どりをする簡単なものである。アッセイ時に、テストサンプルをそのすべての層にわたって電気泳動にかけ、そして相補的なサンプル標的核酸を各層に捕捉させる。各層のハイブリッドの量は、使用される捕捉プローブに関してサンプル組成を直接反映する。例えば、固定捕捉プローブの異なる個別の層があり、各層が特定の細菌種に特異的である場合、テストサンプルを電気泳動にかけるとき、細菌の相補的な種が存在する場合は、細菌のその特定種に特異的な特定クラスの固定捕捉プローブによって検出されるだろう。

【0056】

例えば、本明細書に記載されている方法が、3つの細菌種、大腸菌 (*E. coli*)、*S. アウレウス* (*S. aureus*) および *S. ピオゲネス* (*S. pyogenes*) に関するテストサンプルをスクリーニングするのに使用されれば、電気泳動媒体は、固定捕捉プローブを含む3つの個別の層が存在するように構築される。各層は3つの細菌のうちの1つに特異的であり、例えば、層1は大腸菌に対して特異的な捕捉プローブを含んでおり、層2は、*S. アウレウス* に特異的な捕捉プローブを含んでおり、また層3は *S. ピオゲネス* に特異的な捕捉プローブを含んでいる。テストサンプルはその後に電気泳動にかけられる。テストサンプルが大腸菌と *S. ピオゲネス* とだけに汚染されている場合、その場合には、捕捉層1と3には、そのテストサンプルが大腸菌と *S. ピオゲネス* により汚染されており、*S. アウレウス* ではないことを示す捕捉プローブと標的分子の間に形成されるハイブリダイゼーション複合体を含有する。

【0057】

適当にハイブリダイズされる核酸のみが各層に保持されることを確実なものとする。

する条件を同定することができる。20塩基の長さの捕捉プローブによる電気泳動ハイブリダイゼーションは、室温にて伝統的な非変性ゲルと緩衝液システムを使用して実施することができる。このサイズの完全に相補的なハイブリッドは、長時間の間安定であると思われる。しかし、さらなる緊縮性が、そのゲルに尿素あるいはホルムアミドなどの変性剤を加えることにより、あるいは温度を上げながらそのゲルを泳動することにより、達成することができる。

【0058】

2次元プローブアレイ

1次元プローブアレイは、限られた数の捕捉プローブを用いる分析に使用することができる。大きな数の配列の分析には、固定プローブの2次元アレイを使用することができる。そのアレイは多くのやり方で形成することができる。簡易2次元アレイは、例えば、複数垂直整列スペーサーを使用して通常のスラブゲル装置で鋳造することができ、結果において、1次元アレイの1つのアレイを作り出すことができる。

【0059】

さらに複雑な2次元アレイは2つのステップ、まず、1つのプレート上の基質（例えば、ポリアクリルアミドゲル）点の集合の1つのアレイとして捕捉プローブ領域を重合するというステップ、それから、そのアレイの上に上方ゲルプレートを戴置することによりその点の集合を「サンドイッチし」、またそのプローブ点の集合の間の空隙スペース中に非修飾ゲルにより充填するというステップで作成することができる。

【0060】

いずれの場合でも、テストサンプルは基質の全長にわたるバンドとして、例えば、基質の一番上の端部に装填される。本実施態様では、テストサンプル全体は捕捉プローブのすべてとは接触しない。しかし、2次元分析が望ましい場合のたいていの適用では、そのサンプル核酸は高いコピー数で存在し、そのため、この問題は影響の大きい障害物をもたらすことはない。

【0061】

3次元プローブアレイ

本出願に記載されているハイブリダイゼーションの諸方法にはまた、例えば、高産出量および/あるいは価格効果を実現する多重並行アッセイに特に有用であり得る、そういった3次元アレイも包含することができる。こうしたアッセイは、複数サンプルが表面あるいは面に適用することができる場合に3次元固体の形式で供給することができ、そして、捕捉プローブの1つあるいはそれ以上の領域が遭遇するよう、その固体の容量全体を移動するように作られる。そのアレイ中を移動時に捕捉プローブの同じ配列に各サンプルが遭遇するようにアレイは產生することができ、代替的には、異なるサンプル混合物を分析するように、あるいは1つあるいはそれ以上のサンプル混合物内成分の異なるセットを分析するように、捕捉プローブの異なる配列を、この目的のために位置決めすることができる。

【0062】

変異の検出

本実施態様では、本発明は、標的分子のヌクレオチド配列内の変異を検出する方法に関する。例えば、細菌、ウイルス、寄生生物、その他が変異したかどうかを判定することが所望される場合がある。微生物のゲノム内の変異を検出することは、その微生物に関する有意な情報につながる可能性がある。例えば、細菌は、抵抗性を伝達する遺伝子材料を受け取ることにより、抗生物質に対して抵抗性になることができる。レトロウイルスなどのある種のウイルスは、迅速な変異速度を有していることで悪名が高い。一般的な風邪の原因となっているウイルス（例えば、アデノウイルス）は、宿主間できわめて容易に変異することができる。特定の微生物汚染に対してどんな治療的な養生法が採用されるべきかを予測するために、例えば、抗体の攻撃に対して感受性がある以前の抗原を取り除くような、そうしたやり方でウイルスが変異するかどうか、その遺伝子ステータスを確かめることは非常に重要なことであると言えることができる。本実施態様では、テストサンプルには、1つあるいはそれ以上の推定変異標的分子、すなわち、そのヌクレオチド配列内に含まれている少なくとも1つの変異部位を有する標的核酸を含んでいる。その変異部位には、ヌクレオチド配列内に1つあるいはそれ以上の塩基変異が含まれている可能性がある。本実施態様では、電気泳動媒体内に固

定された捕捉プローブは、変異標的分子内に含まれる特定の変異部位に対して相補的であるヌクレオチド配列領域を含んでいる。この相補的領域は、その変異が本当に任意のテストサンプル内に存在する場合は、その特定の変異標的分子にハイブリダイズするのに使用される。1つの実施態様では、捕捉プローブは均一な濃度で基質中で見つけることができる。1つの好適な実施態様では、捕捉プローブは電気泳動媒体の1つあるいはそれ以上の個別の領域に固定される。異なる変異部位を含有する複数の変異標的分子は、さまざまな変異標的分子内に含まれる、異なる変異部位に対応する、あるいは、その異なる変異部位に相補的なヌクレオチド配列領域を含有する固定化捕捉プローブを使用して検出することができる。(Kenney, M.ら、BioTechniques, 25(3):516-521(1998)、その教示は本出願に全体として組み込まれている)。1つの変異標的分子が1つ以上の変異部位を含んでいる可能性があることも考えられる。これらの変異部位は、その変異標的分子内に含まれている1つの特定の変異部位に相補的であるように設計されている複数の捕捉プローブにより検出することができる。複数の捕捉プローブは、電気泳動用媒体内の、1つの特定変異部位の検出のための特異的な種々の捕捉層に固定化されうる。テストサンプル核酸の電気泳動の移動度は、固定化プローブとの相補性の程度により影響を受ける。プローブに対して完全な相補性を有する標的分子は、捕捉プローブを介して電気泳動用媒体に固定化され、低い相補性を有する標的分子は、捕捉層を通過する(Kenney, M.ら、BioTechniques, 25(3):516-521(1998))。

【0063】

サンプルは、固体相ハイブリダイゼーション分析に先立って標識化されたヌクレオチド三リン酸塩を用いて、PCR増幅法により都合よく調製し、標識化することができる。

【0064】

単一置換による標的分子の検出

本発明のもう1つの実施態様では、鎖置換反応(米国特許第4,766,062号;米国特許第4,766,064号;Vary, Nucleic Acid

s Res. , 15 : 6883 - 6897 (1987) ; Varyā, Clinical Chemistry 32 : 1696 - 1701 (1986) を参照のこと、それらの教示全体は参考文献として組み込まれている)、あるいは逆鎖置換(米国特許第60/103,075号を参照のこと、その教示全体が参考文献として本出願に組み入れられている))を使用してテストサンプルから得られる微生物の検出のための諸方法が開示される。

【0065】

置換アッセイでは、部分的二本鎖プローブが用いられている。本出願では「つなぎ鎖」核酸と呼称されているそのプローブの長い一本鎖核酸部分は、標的内に含まれるヌクレオチド配列領域に相補的である。このつなぎ鎖は約5~約100ヌクレオチドの長さである。このプローブのその他の成分は、本出願では以降、「シグナル」核酸と呼称される、非標識化つなぎ鎖成分の特定の部分配列(標的分子内に含まれるヌクレオチド配列領域に相補的である同じサブ配列)に相補的である、短い一本鎖の、検出可能に標識化された核酸である。このシグナルは約5~約50ヌクレオチドの長さである。これはそのつなぎ鎖に相補的であるため、そのシグナル核酸の配列は標的の一部に関する配列において同一(あるいは非常に類似している)である。その2つのプローブの一本鎖成分がハイブリダイズされるときには、そのシグナルおよびつなぎ鎖一本鎖は、シグナル核酸がそのつなぎ鎖と完全に塩基対であるハイブリッドを形成し、またそのつなぎ鎖には、標的とのハイブリダイゼーションに有用である一本鎖領域が含まれる。

【0066】

従来からの置換アッセイでは、プローブは1つあるいはそれ以上の標的分子を含むテストサンプルと一緒にインキュベートされ、またその標的はつなぎ鎖成分の一本鎖部分にハイブリダイズする。標的はそのつなぎ鎖の全長に相同であるため、その標的はシグナル核酸との相同鎖交換反応を開始し、またそのつなぎ鎖からそれを置換する。標的が長く、またそのつなぎ鎖によりより安定した二本鎖分子を形成するので、その鎖交換反応は、シグナル核酸置換の方向に急速に進む。(これについてはGreen, C.とTibbetts, C., Nucleic Acids Res. , 9 : 1905 - 1918 (1981) を参照のこと、

その教示全体は本出願に参考文献として組み込まれている)。当業者であれば、置換された標識化シグナル核酸がサンプル中の標的の量を正確に反映する実験上の条件を見つけ出すことができる。(これについては、米国特許第4,766,062号;米国特許第4,766,064号;Vary, *Nucleic Acids Res.*, 15:6883-6897(1987);Varyら、*Clinical Chemistry* 32:1696-1701(1986)を参照のこと、それらの教示全体は参考文献として組み込まれている)。

【0067】

本発明の本実施態様では、置換法を使用して微生物学的アッセイを実施するための簡便化されたプロセスが開示される。特に、置換プローブ複合対のつなぎ鎖成分は、電気泳動基質内に固定される。このように、標的分子は、ハイブリダイゼーションに適している条件下で、捕捉プローブを含有する基質中を通してそれらを電気泳動にかけることにより、プローブ複合体(ハイブリッドシグナルとつなぎ鎖核酸とから成る)と接触する。標的分子が固定化捕捉プローブ複合体と接触するとき、その標的分子はプローブ複合体のシグナル成分を置換し、その複合体の固定されてつながれた成分にハイブリダイズする。その置換の後、置換されたシグナルプローブ成分が検出され、またその元のテストサンプル中の標的分子の存在と数を測定するために定量化される。

【0068】

もう1つの実施態様では、逆置換がテストサンプル中の1つあるいはそれ以上の標的分子の検出に関して説明される。その置換プローブ複合体は2つの核酸から成る。すなわち、「シグナル」核酸と「つなぎ鎖」核酸である。この複合体においては、そのシグナルは標的核酸に対して相補的である。そのつなぎ鎖核酸はしたがって、その標的の特定部分配列に対して配列においては同一、あるいは実質的にほぼ同じである。本発明の1つの好適な実施態様では、そのシグナル核酸は検出可能に標識化される。標的核酸が固定化置換プローブ複合体を含む電気泳動媒体を通して電気泳動にかけられ、またハイブリダイゼーションに適する条件下で、そのプローブ複合体と接触するようになると、その場合には、そのシグナル核酸はその標識とハイブリダイズし、またそのシグナル核酸は相同鎖交換によ

りそのつなぎ鎖核酸から取り除かれる。逆置換反応の産物はそのシグナル核酸とその標的とのハイブリッドである。このハイブリッドは捕捉プローブ層から移動し、また検出することができ、また固定置換プローブ層からそれが移動して離れると、定量化が可能になる。

【0069】

これらの置換方法の1つの主な利点は、その標的分子が検出可能に標識化される必要がないことである。標的分子置換反応は、電気泳動基質における検出可能に標識化されたプローブ分子の移動を生じる。プローブを標識化する数多くの異なる方法が説明されてきたが、放射能、蛍光成分、化学発光部分、直接酵素抱合体などの直接標識と、2次あるいは3次標識化分子と一緒に使用するための親和性標識などの間接標識の両方がある。逆置換アッセイは標識特異的ではなく、またいずれの実用的な標識も使用することができる。

【0070】

本発明のもう1つの実施態様では、標的依存性プローブ置換は、つなぎ鎖核酸の特性における変化により、あるいはその置換反応により改変されるシグナルつなぎ鎖複合体の特性における変化により、検出することができる。

【0071】

その後ひき続いて、検出の異なる形態が標識化プローブ核酸を使用することが多く、その他のものは標識化つなぎ鎖核酸を、さらに他のものは標識化つなぎ鎖および標識化プローブを使用し、またその他のものは非標識化プローブおよび非標識化つなぎ鎖を使用しうる。

【0072】

プローブ置換の検出は、物質のいずれかの化学的あるいは物理的特性に関する値、あるいは値の変化を検出することを含むその他の手段により達成することができるが、それらに限定されるわけではない。こうした値あるいは値における変化には、それらに限定されるわけではないが、以下のものが含まれる。すなわち、物理的測定法（質量あるいは密度測定法、質量分析法、プラズモン（染色体外遺伝決定因子）共鳴法）、光学的検出（発光、吸光、蛍光、リン光、ルミネセンス、化学ルミネセンス、偏光、屈折率変化、その他）、電氣的伝導度、その他の

電磁気エネルギーの吸収あるいは放出、放射能および溶液特性における誘発変化（粘度、濁度、旋光度）など、である。

【0073】

検出スキーム

特異的結合反応の検出、例えば、捕捉プローブに結合される固定微生物標的分子の検出は、数々の異なるやり方で達成することができる。

【0074】

テスト分子は結合反応に先立って検出可能に標識化することができる。直接標的標識化のための適当な標識は、集中的吸光（例えば、輝度の高い色調に）、放射能、蛍光、リン光、化学ルミネセンス、あるいは触媒によるものであり得る。修飾ポリヌクレオチドを使用した核酸サンプルの直接標的標識は、当業者であれば、周知の数々の酵素による諸方法により達成することができる（Sambrookら、「分子クローニング：ラボマニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、第2版、Cold Spring Harbor Press社刊、1989年、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー市、に総説）。

【0075】

代替的には、標的分子は、それ自身標識化されているか、あるいは検出可能なシグナルを産生できるかのいずれかである第2の特異的結合実体により認識することができるリガンドを使用して間接的に標識化することができる。

【0076】

こうした間接的システムの1つの例は、ビオチン化されたポリヌクレオチドを使用した標識化である。このシステムでは、サンプルは標準的な核酸標識化技術と、ビオチン化ポリヌクレオチドを使用して酵素的に標識化される。その結果として生じたビオチン修飾核酸は、ストレプトアビジンあるいはアビジンタンパク質分子のビオチン特異的結合により検出することができる。ストレプトアビジンあるいはアビジン分子は、適当な物質により化学ルミネセンスあるいは比色シグナルを産生するのに使用することができる、アルカリホスファターゼあるいは西洋ワサビペルオキシダーゼなどの、フルオレセインあるいはリポーター酵素などの

蛍光標識に結合することができる(総説に関しては、KellerとManak, 「DNAプローブ(DNA Probes)」, 第2版、マクミラン出版刊、1993年、ロンドン; Pershingら編「診断学的分子生物学 - 原則と適用(Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications)」, American Society for Microbiology刊、1993年、ワシントン, D.C.を参照のこと)。

【0077】

もう1つの有用な検出システムは、核酸中に組み込まれているジゴキシゲニン-dUTPを認識する、アルカリホスファターゼに結合した、抗ジゴキシゲニン抗体を使用するジゴキシゲニンシステムである。(Ausubel, F.M. 編「分子生物学における現行プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」, 第1巻、§§3.18.1~3.19.6(1995); これらの教示全体は参考文献として本出願に全体として組み込まれている)

【0078】

検出可能に標識化されたハイブリダイゼーションプローブもまた、間接的標的標識として使用することができる。例えば、標的核酸は以降は「サンドイッチ」プローブと呼ばれる、検出可能に標識化されたプローブによるハイブリダイゼーションにより、電気泳動法に先立って間接的に標識化することができる。このサンドイッチプローブは捕捉プローブにより認識される領域とは重複しない微生物標的の領域とハイブリダイズするように設計される。このサンドイッチプローブは電気泳動法時に残って標的と会合するように設計され、捕捉プローブには直接結合し得ない。

【0079】

サンドイッチプローブはまた、電気泳動による捕捉の後に標的分子を標識化するのに使用することができる。この標識化の方法においては、非標識化標的が電気泳動法にかけられ、またまず捕捉プローブにハイブリダイズする。その後、サンドイッチプローブが捕捉層を通過して電気泳動にかけられる。要するに、その

捕捉された標的はその時点で、サンドイッチプローブに対する新しい「捕捉」プローブとして作用する。この捕捉標的サンドイッチプローブ複合体はその時点で、サンドイッチプローブ標識により検出することができる。

【0080】

プロット法もまた、標的結合捕捉プローブの検出に適応することができる。例えば、検出表面は結合サンプル成分を有する分離媒体に並列され、またそのサンプル成分はその後に、検出表面に移動し、任意に、例えば、溶媒あるいは試薬変更などの化学的手段により補助が行われる。ここで、移されたサンプル成分が、インターカレート染色の光学的検出などの公知の手段により、あるいはハイブリダイズ放射線種から得られる放射能の検出により検出される。

【0081】

さまざまな光学的技術が、捕捉プローブに結合されるサンプル成分の存在を検出するのに使用することができる。例えば、その捕捉プローブが線状アレイ中に配置されている場合は、各シグナルのその位置および強度が、機械的に、あるいは光学的に、検出可能なシグナルのアレイに沿って単一検出器をスキャンすることにより測定することができる。代替的には、検出可能なシグナルの線状アレイは検出可能なシグナルのアレイにアレイ検出器を並列させること、あるいはアレイ検出器上のシグナルアレイのすべてあるいは一部を光学的に画像化することなどにより、線状アレイ検出器により検出することができる。

【0082】

検出可能なシグナルを伴う捕捉プローブが2次元アレイとして配置されるとき、数々の検出方式を用いることができる。単一検出器は、機械的あるいは光学的スキャンングにより、あるいはいずれかの組み合わせより、各時点でそのシグナルを測定するのに使用することができる。代替的には、線状光学的検出アレイは、並列あるいは光学的画像化によりシグナルのセットを検出するのに使用することができ、またこうしたシグナルの複数セットは、機械的あるいは光学的にシグナルアレイあるいは検出器をスキャンングすることにより、検出することができる。代替的には、捕捉プローブの2次元アレイは、固定化捕捉プローブから得られる光学的シグナルアレイに並列することにより、あるいはその光学的シグナ

ルアレイの光学的画像により2次元光学領域検出器により全部あるいは一部で光学的に検出することが可能である。

【0083】

3次元アレイとして捕捉プローブが配置されるとき、個々のシグナルの検出は、1つあるいはそれ以上のアレイのサブセクションをまず物理的にとることにより、上記の技術により配置することができる。代替的には、共焦点顕微鏡技術などの光学方式を用いることができ、それによって1つあるいは数々の検出可能なシグナルが画像化され、またその他からの干渉は最少限度で検出され、またその他のシグナルが光学的調整後に引き続き検出される。

【0084】

本発明の特徴およびその他の詳細は、次に実施例においてさらに詳細に説明され、また指摘されることになる。本発明の特定の実施態様は、図示説明により示されるが、本発明に関する制限としてではない。本発明の主な特徴は、本発明の範囲から離れることなく、さまざまな実施態様において用いることができる。

【0085】

実施例

実施例1：血小板濃縮物における細菌汚染用ゲルに基づくサンドイッチアッセイ

微生物汚染が疑われる血小板濃縮物250 μ Lは、エシェリキア・コリ（大腸菌；E. coli）細胞を含む緩衝液250mL（pH7.0の200mMリン酸ナトリウム緩衝液、2mM EDTA、2%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、0.1%ヘパリン）を混合することにより作成された。その大腸菌細胞は、LB寒天プレート培養培地から得た細菌のコロニーにより、液体LBブイヨン2mLを摂取することにより作成され、また振とうを加えて37 $^{\circ}$ Cにて一夜増殖させた（Maniatisら、「分子クローニング：ラボマニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、第2版、Cold Spring Harbor Press社刊、1989年、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー市）。翌朝、一夜培養培地が新鮮なLB媒体により100倍に希釈され、また600nmで2.4の光学的吸光度になるまで増殖させた。その培養培地は30秒間マイクロ遠心分離機（10,000

x g) でペレット化され、また氷冷TE緩衝液(10 mM トリス-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) に、 4×10^9 細胞/mL の密度まで再懸濁された。

【0086】

血小板濃縮物のアリコートが、洗浄された大腸菌細胞により以下のように、注入された。すなわち、

- 1) 血小板濃縮液 1.75 mL
- 2) pH 6.8 の 1 M リン酸ナトリウム緩衝液 0.35 mL
- 3) 10 mM アウリントリカルボン酸 0.36 mL (Rnase 阻害剤、Sigma Chemical 社、ミズーリ州セントルイス市)
- 4) 10% wt/v SDS 0.35 mL
- 5) 0.5 M Na_2EDTA 0.035 mL
- 6) 10% 低分子量ヘパリン (Sigma Chemical 社) 0.035 mL

【0087】

緩衝液/血小板混合物のアリコート(450 μL) がネジ蓋マイクロ遠心分離機試験管の中に施与され、また洗浄された大腸菌細胞の連続希釈液の50 μL アリコートが加えられた。この試験管は短時間混ぜ合わされ、また、アルミニウム加熱ブロックで130~140 にて10分間加熱された。その結果生じた溶解産物はマイクロ遠心分離機(10,000 x g) で室温にて10分間遠心分離に掛けられた。

【0088】

溶解産物のアリコートがハイブリダイゼーション反応で以下のように使用される。すなわち、

- 1) 溶解され、注入された血小板濃縮液 24 μL
- 2) 10x 共役ハイブリダイゼーション緩衝液 4 μL (1 M NaCl, pH 8.3 の 337 mM トリス-ホウ酸塩、10 mM MgCl_2 , 1 mM ZnCl_2 , pH 6.8 の 30 mM リン酸ナトリウム緩衝液)
- 3) 10 μM アダプターポリヌクレオチド配列 (5' - GCT GCT T

CC TTC CGG ACC TGA GTG AAT ACG TTC C
CG GGC CT - 3' [配列番号: 1])、2 μ l

4) 300 nMアルカリホスファターゼ (AP) 共役サンドイッチプローブ6 μ l (5' - AP - NH₂ - G GCA CAC GCG TCA TCT GCC TTC - 3' [配列番号: 2])、6 μ l

5) 10 mMアウリントリカルボン酸1 μ l

6) 水1 μ l

ハイブリダイゼーションは53にて10分間実施した。ちなみに、本出願で使用されるとき、ポリヌクレオチドという用語は、「ポリヌクレオチド配列」という語句と相互に交換可能である。

【0089】

アダプタープローブは、5'最末端側の21ヌクレオチドが、大腸菌の4.5S RNAの塩基65から41までに相補的であり、また3'最末端側の20ヌクレオチドがゲル固定化捕捉プローブポリヌクレオチドに相補的である41-mer DNAポリヌクレオチドである。本実施例で使用されている細菌標的ポリヌクレオチドは大腸菌の4.5S RNAから得たヌクレオチド配列であり、またそれは以下のとおりである。

すなわち、

GGGGGCTCTG TTGGTTCTCC CGCAACGCTA CT
CTGTTTAC CAGGTCAGGT CCGGAAGGAA GCAGC
CAAGG CAGATGACGC GTGTGCCGGG ATGTGAGC
TGG CAGGGCCCCC ACCC (Genbank受託番号 # A
E000151 U00096; 塩基10899-11013; 配列番号: 3)

。

【0090】

ハイブリダイズサンプルは、EDTAは含めることなくpH8.3の90 mM トリスホウ酸緩衝液を含む垂直5%ポリアクリルアミドゲル(29:1、単量体:ビスwt/wt)上に装填された。そのゲルは3つのセクションに注ぎ込まれた。ゲルの中央層には固定化捕捉プローブポリヌクレオチドが含まれる(あるい

は単に捕捉プローブ、5' - アクリルアミド - AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC - 3' [配列番号 : 4])。アクリルアミド修飾プローブは、ポリアクリルアミド基質との重合時にアクリルアミドゲル混合物の中に含まれていた。そのアクリルアミド基は、市販されていて入手可能なアクリルアミドホスホルアミダイト (Acrydite (商標) , Mosaic Technologies , マサチューセッツ州ボストン市) を使用して捕捉プローブに加えられた。捕捉層の捕捉プローブの濃度は $4 \mu\text{M}$ であった。ゲルの上方および下方セクションには捕捉プローブは含まれていなかった。ゲルは、およそ 0.75 mm の厚さ $\times 10 \text{ cm}$ の長さ $\times 10 \text{ cm}$ 幅であった。電気泳動は 200 V で 90 分間、 34 というゲル温度にて実施された (Penguin 装置 , Owl Scientific 社 , マサチューセッツ州ウォボーン市)。

【0091】

電気泳動の後、ゲルがガラス電気泳動プレートから取り外され、また AP 緩衝液 (pH 11 の 2.4 M ジエチルアミン - HCl 緩衝液、 1 mM MgCl_2 , 0.1 mM ZnCl_2) の中で 10 分間洗浄された。ゲルはその後、Attophos 化学蛍光 AP 基板 (Attophos , Lumigen , Boehringer Mannheim Biochemicals 社 , インディアナ州インディアナポリス市) 15 mL に 10 分間浸漬された。蛍光 AP 産物が、2次元蛍光スキャナーを使用して画像化された (Fluorimager 595 , Molecular Dynamics 社 , カリフォルニア州 Sunnyvale)。

【0092】

そのゲルの蛍光画像は図 5 に図示されている。そのゲルを水平に横切るように伸びている捕捉層の位置は、かぎ括弧付きの 7 により示されている。

サンプルは以下のやり方で装填された。すなわち、

- レーン 1 : 10^7 大腸菌細胞を含む事前にハイブリダイズされた溶解産物、
- レーン 2 : 装填されたサンプルなし、
- レーン 3 : 10^6 大腸菌細胞を含む事前にハイブリダイズされた溶解産物、
- レーン 4 : 10^5 大腸菌細胞を含む事前にハイブリダイズされた溶解産物、

レーン5： 10^4 大腸菌細胞を含む事前にハイブリダイズされた溶解産物、

レーン6：大腸菌細胞を加えずに事前にハイブリダイズされた溶解産物。

【0093】

結果はレーン1、3および4の捕捉層におけるAP活性を示す。微量AP活性がレーン5の高度対照画像では観察される。レーン6ではバックグラウンドの上のAP活性の払底がみられる。結論としては、本出願で説明されているサンドイッチアッセイには、 $10^4 \sim 10^5$ 細菌細胞を検出するには十分な感受性がある。

【0094】

実施例2：ゲルハイブリダイゼーションによる細菌RNAの鎖置換検出

エンテロバクター・クロアケ (*Enterobacter cloacae*)、シュドモナス・エルジノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*)、バシラス・セレウス (*Bacillus cereus*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、スタヒロコッカス・エピデルミディス (*Staphylococcus epidermidis*)、スタヒロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) から得られたすべての細菌RNAは、加熱フェノールを使用して培養された細胞からの抽出により精製された。5 mL 栄養ブイヨン (Difco、Fisher Scientific 社により配送、ペンシルバニア州ピッツバーグ市) 培養培地は、栄養寒天プレートから得られた単一分離コロニーで開始して、 37°C にて一夜増殖された。次いでこの一夜培養後に、100 mL 栄養ブイヨンが一夜培養培地に接種された。この新しい培養培地は4時間増殖することができ、その後細菌は遠心分離機 ($6000 \times g$) を使用することにより集菌された。細菌細胞は、酢酸ナトリウム緩衝液 5 mL 中に再懸濁された ($\text{pH } 5.2$, 20 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA)。懸濁された細胞に対して、事前に加熱されていた (70°C 、1:1、容量:容量、水で事前に平衡化) 10% SDS 500 μL およびフェノールクロロホルム 5 mL が加えられ、またその後、力強い振とうにかけられた。その混合液はその後 70°C にて10分間、間欠的振とうを加えながらインキュベ

ートされた。細菌細胞を含有する混合液はその後に、親水性相と疎水性相を分離するために8000×gで10分間遠心分離にかけられた。水性相は新しい試験管に移され、また上述のように、フェノール/クロロホルムを使用して再抽出された。RNAはその後に、3M酢酸ナトリウム(pH5.2, 3M酢酸ナトリウム)とエタノール2.5容量の10%容量溶液を使用して、2回連続エタノール析出により水性相から回収された。回収されたRNAはその後、およそ1~2mL TE緩衝液(pH8.0の10mMトリス-HCl, 1mM EDTA)の中で溶解され、また-20℃にて保存された。RNAの濃度は、1 OD₂₆₀単位あたり33µg/mLであると想定して、260nmにおける吸光度により測定された。RNA濃度は最終溶液の中で、1~3µg/µLの範囲であった。

【0095】

電気泳動ゲルは3つのセクションに注ぎ込まれた。そのゲルの中央層には、固定可能なつなぎ鎖捕捉プローブポリヌクレオチド(5'-アクリルアミド-GGT AAG GTT CTT CGC GTT GCA TCG AAT TA A ACC ACA TGC TCC ACC GCT TGT G-3' [配列番号:5])を蛍光シグナルポリヌクレオチド(5'-Cy3-CAC AAG CGG TGG AGC ATG TGG TTT-3' [配列番号:6])、ここで、Cy3が蛍光ホスホルアミダイトの位置を示す)によりハイブリダイズすることにより形成される、固定されていて部分的に二本鎖置換プローブ複合体が含まれる。アクリルアミド修飾置換複合体は、重合時にアクリルアミドゲル混合物の中に入れられ、ポリアクリルアミド基質による共重合により層の中に固定化された。アクリルアミド基は、市販されていて入手可能なアクリルアミドホスホルアミダイト(Acrydite (商標), Mosaic Technologies社、マサチューセッツ州ボストン市)を使用してつなぎ鎖ポリヌクレオチドに加えられる。捕捉層中の置換プローブ複合体の濃度は、2µMであった。そのゲルの上方および下方セクションには捕捉プローブは含まれていなかった。そのゲルはおよそ0.75mmの厚さ×10cm長さ×10cm幅であった。

【0096】

細菌RNAあるいは細菌標的ポリヌクレオチドのサンプルは、そのRNAを小

さな片に切断するために、50 にて30分間100mM NaOHでの処理により、加水分解され、またそれによって、16S rRNAの分子内2次構造を減らした。本実施例の中で使用された大腸菌16S rRNAヌクレオチド配列は次のとおりである。すなわち、5' - C A C A A G C G G T G G A G C A T G T G G T T T A A T T C G A T G C A A C G C G A A G A A C C T T A C C - 3' (Genbank受託番号：#M24386；rRNAヌクレオチド配列位置933-984，[配列番号：7])である。大腸菌から得たこの16S rRNAの5' - 末端は、上記の蛍光シグナルポリヌクレオチドと部分的配列相同を分かち合って共有していた。大腸菌16S rRNAヌクレオチド配列では、捕捉プローブポリヌクレオチドによりその増加した塩基対のため、蛍光シグナルよりも、固定化捕捉プローブとの相補性の度合いが高かった。標的ポリヌクレオチドが捕捉プローブ/シグナルポリヌクレオチド複合体と接触するとき、基本的には親和性の差異であるこの差異に基づいて、標的ポリヌクレオチドは、シグナルポリヌクレオチドを置換し、また新しい複合体が標的ポリヌクレオチドと捕捉プローブポリヌクレオチドの間に形成されることになる。

【0097】

中和後、サンプルを中性1x TBE (pH8.3の89mMトリス - ホウ酸塩、2mM EDTA) 6%ポリアクリルアミドゲル(29:1単量体:ビスアクリルアミド、wt:wt)上で走行させた。すべてのRNAのおよそ30~40µgをそのゲルの各レーンで走行させた。ヒト18S rRNA配列と大腸菌16S rRNA配列から成る陰性および陽性の対照サンプルはそれぞれ、T7 RNAポリメラーゼを使用して適当なベクターのインビトロ転写により産生された。これらインビトロ転写物もまたNaOHにより加水分解され、中和され、また細菌RNA標準サンプルと並行して電気泳動にかけられた。電気泳動は35のゲル温度を使用して100Vで実施された(Penguin装置、Owl Scientific社、マサチューセッツ州ウォーバーン市)。電気泳動後、そのゲルはガラスプレートから取り外され、Cy3染色蛍光(Amersham Pharmacia Biotech社、ニュージャージー州ピスカタウェイ

市)がゲルスキャナー(Fluorimager 595, Molecular Dynamics社、カルフォルニア州サニーバレー市)を使用して測定された。

【0098】

図6はゲルの蛍光画像を図示している。インビトロ転写対照を含むレーンは除いて、RNAのおよそ30~40 µgが各レーンに加えられた。ヒトインビトロ転写物のおよそ8ピコモル;それに、大腸菌インビトロ転写物4ピコモルが、対照として使用された(右レーン)。観察できるように、大腸菌インビトロ転写物およびその他のすべてのRNAは、その置換複合体から、シグナル層に図示されている蛍光シグナルポリヌクレオチドを置換することができた。対照的に、ヒト18S rRNAインビトロ転写物はその置換複合体に相補的なヌクレオチド配列の欠損のため、シグナルを置換することができなかった。したがって、図示されているその置換アッセイは、ヒトrRNAから干渉されることなく、広範な系統多様性を有する細菌RNAを検出することができる。

【0099】

実施例3: 固体相分析を使用した変異検出

5'-末端アクリダイト基を含有するポリヌクレオチドが、本実施例で使用された(Research Genetics社、アラバマ州Huntsville; Eurogentec社、ベルギー、Seraing; Operon Technologies社、カリフォルニア州Alameda市)。非修飾および5'-フルオレイン標識化ポリヌクレオチドが、Ransom Hill Biosciences社(カリフォルニア州Ramona市)から入手された。凍結乾燥されたポリヌクレオチドがTE緩衝液(pH8.3の10mMトリス-HCl、1mM EDTA)の中で溶解され、-20℃にて冷凍保存された。濃度はA₂₆₀ nm読み取り値(1光学濃度(OD)単位当たり33 µg/mLオリゴヌクレオチドと想定)から測定された。すべての濃度はオリゴヌクレオチド鎖に関連しているものである。

【0100】

本実施例で使用されるポリヌクレオチドの配列は以下に説明される。「F1」

および「Ac」はフルオレセインとアクリライト修飾をそれぞれ表わす。フルオレセイン標識化標的分子を使用して、ハイブリダイゼーション(viz, 捕捉)の効率を示すために設計された第1実験で使用された捕捉プローブは、5'-Ac-GTA CCA TAA CAG CAA GCC TCA-3' [配列番号: 8]、それに、使用された標的ポリヌクレオチドは以下のとおりであった。すなわち、(i)左相補的レーン、5'-Fl-TGA GGC TTG CTG TTA TGG TAC-3' [配列番号: 9]; (ii)右相補的レーン、5'-Fl-TGA GGC TTG CTT TTA TGG TAC-3' [配列番号: 10]; (iii)非相補的、5'-Fl-ATT ACG TTG ATA TTG CTG ATT A-3' [配列番号: 11]、である(図7参照)。その2つの相補的ポリヌクレオチドは、5'末端から12塩基の単一位置で異なる(下線部)。使用された非緊縮ゲル条件下(すなわち、23ゲル温度)で、その2つの相補的なポリヌクレオチドの間のヌクレオチド配列差異は識別されない(図7参照)。

【0101】

次の実験では、異なる複数および単数の塩基ミスマッチを含有する一連の標的分子は、以前の実験で使用されたように、同じ捕捉プローブを使用して走行させ、またその標的分子は、フルオレセイン標識化補体(compl.): 5'-Fl-TGA GGC TTG CTG TTA TGG TAC-3' [配列番号: 12]に基づいたものであった(図8参照)。さまざまな変異標的分子は、捕捉プローブとのミス対合のタイプと、標的分子の5'末端からの距離により上の図8に標識化されている。そのミス対合はコロンにより分離されている標的分子中の塩基がその後続く捕捉プローブの中の塩基により同定される。例えば、c:t, 5レーンで使用される標的分子は、5'-Fl-TGA GTC TTG CTG TTA TGG TAC-3' [配列番号: 13]であり、またc:t, 5; a:a, 7; a:c, 14レーンで使用されている標的は、5'-Fl-TGA GTC ATG CTG TCA TGG TAC-3' [配列番号: 14]である。下線部の位置は、完全相補的標的分子とは異なるものである。この実験の非相補的標的分子は以前の実験で使用されたものと同じものである。

【0102】

次の実験では、固体相ハイブリダイゼーションがPCR産物における変異を検出するのに使用され、特に、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)逆転写酵素コドン41変異：5'-Ac-GT ACA GAG CTG GAA AAG G-3' [配列番号：15] (その変異位置は下線部) を同定するのに使用される捕捉プローブを使用してHIV逆転写酵素における変異を検出するのに使用された。そのコドン215~219変異を同定するのに使用された捕捉プローブは、5'-Ac-GG CTC TAC ACA CCA GAC CAA-3' [配列番号：16] であった(その変異位置は下線部) (図9参照)。

【0103】

次に多形態を検出する能力が調べられた。その捕捉プローブは、以下のとおりである。すなわち、(i) A', 5'-Ac-GTT TTC AGC TCC ACC TAC CAC AAG T-3' [配列番号：17]、(ii) B', 5'-Ac-GTT TTA GCT CCA ACT ACC ACA AGT T-3' [配列番号：18]、(iii) C', 5'-Ac-GTT TTG CAC CTC AAA GCT GTT CCG T-3' [配列番号：19]、および(iv) D', 5'-Ac-GTT TTG TTC ATG CCG CCC ATG CAG G-3' [配列番号：20]、そして、その標的分子は以下のとおりであった。すなわち、(i) A, 5'-Fl-AC TTG TGG TAG TTG GAG CTG-3' [配列番号：21]、(ii) B, 5'-Fl-AA CTT GTG GTA GTT GGA GCT-3' [配列番号：22]、(iii) C, 5'-Fl-AC GGA ACA GCT TTG AGG TGC-3' [配列番号：23]、(iv) D, 5'-Fl-CC TGC ATG GGC GGC ATG AAC-3' [配列番号：24] であった。標的分子AおよびBは、19塩基の共通ヌクレオチド配列を分かち合っていて共有している(図10参照)。

【0104】

アクリルアミドゲル(5%~20%総アクリルアミド、29:1単量体:ビス-アクリルアミド)が、0.5x TBE緩衝液(pH8.3, の45mMトリ

ス - ホウ酸塩、1 mM EDTA) の中に10%水性過硫酸アンモニウム7 μ L およびゲル溶液のmL当たり2 μ LのN, N, N', N' - テトラメチレンジアミン (TEMED) を加えることにより、調製され、また、重合された。標準的なミニゲルシステム (Mini-PROTEAN (登録商標) II, 8 x 10 cm プレート (Bio-Rad) およびPenguin (商標), 10 x 10 cm プレート (Owl Scientific社、マサチューセッツ州ウォーバーン市)) が、0.8 ~ 1.5 mmの間の厚さの範囲にあるスペーサーと一緒に使用された。

【0105】

典型的には、そのゲルは3つのセクションで鑄造された。まず、低い方の非修飾ゲルが注ぎ込まれ、また重合が可能となった。次に、アクリライト修飾捕捉プローブを含有する捕捉層が非修飾ゲル上で重合された。その層の均一な重合を確実なものとするため、捕捉層の容量はおよそ0.5 cmであった。アクリライト捕捉プローブ (10 μ M最終的な濃度) は、触媒添加の前に非重合ゲル溶液と混ぜ合わせる。その捕捉層の重合後、ゲル表面が0.5 x TBEにより完全に洗浄され、またそのゲルカセットの残りが非修飾ゲルで充填された。

【0106】

非変性アクリルアミドゲルは100 ~ 150 Vの印加電圧で0.5 x TBE緩衝液で泳動させた (ゲル長さは8 ~ 10 cm)。ゲルは、サンプル装填前に15 ~ 20分間事前に泳動させた。フルオレセイン標識化標的分子は、ショ糖含有緩衝液と混合され、また事前に加熱することなく装填された。標識化PCR産物は、通常は50 μ L反応液から5 μ Lであるが、75%ホルムアミド (容量/容量) まで引き上げて、また装填前に90 にて2分間加熱された。

【0107】

変異を含有するプラスミド (pKRT67/70/215/219, pKRT41/215/219) および、HIV逆転写酵素遺伝子 (HIV-RT) の野生型 (pKRTwt) サブクローンが使用された。プラスミドサンプルはHindIIIにより制限され、また制限材料の10⁶ コピーが、初期PCR標的として使用された。増幅が94 にて10秒間、50 にて10秒間、および72

にて1分間から成る30サイクルの間、実施された。反応混合液には10mM トリス-HCl (pH8.3)、50mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 0.5% Tween (登録商標) 20, 50μM dCTP、dTTPおよびdATP、32μM dGTP, 16μMフルオレセイン-dGTP (NEN Life Science Products, マサチューセッツ州ボストン市)、0.005U/μL AmpliTaq (登録商標) DNAポリメラーゼ (Perkins Elmer社、コネチカット州ノーウォーク市)および1μM増幅プライマーが含まれる。HIV-RTのコドン215~219領域を含有する321-塩基対(bp)標的分子が、プライマー5'-ATG AGA CAC CAG GGA TTA GA-3' [配列番号: 25]、および5'-TAG GCT GTA CTG TCC ATT TAT-3' [配列番号: 26]を使用して増幅された。HIV-RTのコドン41領域を含む249-bp標的分子は、プライマー5'-GGA TGG CCC AAA AGT TA-3' [配列番号: 27]、および5'-CCT GCG GGA TGT GGT ATT C-3' [配列番号: 28]を使用して増幅された。

【0108】

図7はフルオレセイン標識化標的分子を使用してハイブリダイゼーションの効率を図示説明している。その結果により、相補的サンプル(Cレーン)が捕捉プローブを含む捕捉層上に完全に固定されたが、一方、非相補的標的分子(Nレーン)は保持されていなかったことが示されている。

【0109】

図8は、さまざまな温度におけるアクリライトゲル中の捕捉プローブの泳動を用いて、異なる複数および単一塩基ミスマッチを含む一連の標的分子を図示している。アクリライトゲル測定により達成された高度緊縮性は、末端に近い変異標的が、完全に相補的な標的が緊密なバンドを形成する条件下でその結合が弱められているため、捕捉層へスメア(smear)し(そして、その中を歩いていく)という事実により示される。図8Aは、40にて典型的なゲル泳動を示し、一方、図8Bは、データセット全体のグラフ図を提供している。図8Bにみられるように、ミスマッチはいくつかのクラスに分類された。たいていは、40 というゲ

ル温度が捕捉を妨げるように十分に不安定化された。いくつかはまだ部分的に40では保持されていたが、しかし、45にて捕捉層から効率的に取り除かれた。たった1つのミスマッチは45では捕捉層から完全に取り除かれることはなかった。しかし、その変異体は末端近くの位置に局在していて(21塩基標的分子のうち20)、また、通常、こうした末端近くのミスマッチは反応速度論的溶解分析を行わないで識別することは難しい。

【0110】

図9はPCR産物の変異をタイプ分けする際のアクリライトゲルの使用法を図示説明している。特にHIV逆転写酵素における変異の2つのセットが検出された。コドン41変異が単一ヌクレオチド変化であり、一方、コドン215~219では、変異は、4つのヌクレオチドの置換を含む。フルオレセイン標識化PCR産物が、HIV-RT断片を有するプラスミド標的分子から調製され、ホルムアミドにより変性され、またその後、HIV-RT変異に特異的な捕捉プローブを含むゲル上に装填される。両方の場合で、その変異プローブ-相補的鎖は効率的に捕捉され、一方、野生型産物ではそうではない。このように、両方の場合で、変異遺伝子は野生型遺伝子からはっきりと識別することができる。

【0111】

図10は、複数の捕捉層を使用して、多形態の検出を図示説明している。標的分子「A」および「B」は、共通19-塩基配列を共有しており、また両方とも効率的に第1「A」捕捉層により捕捉される。「A」および「B」標的が同時に装填された場合にレーンでもっとも良くみられるように(図10、一番左と右のレーン)、「B」捕捉層による標的「A」および「B」の相補性は、「A」捕捉層の僅かな過剰装填が原因となって引き起こされる標的の溢れ出しから観察することができる。標的「C」および「D」は、層「C」および「D」に対する完全な特異性をそれぞれ示している。

【0112】

本発明はその一定の実施態様を参照しつつ詳細に示され、説明されてきたが、当業者であれば、形態における、また詳細におけるさまざまな変更が、添付の請求項により定義されているような本発明の主旨と範囲から離れることなく、その

中で行われる場合があることは理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、細菌標的分子を検出することに関わる、種々の段階を示す概略説明図である。

【図2】

図2は、血小板含有供給源から得られる、潜在的な細菌標的分子の調製を図示している概略説明図である。

【図3】

図3は、サンドイッチアッセイを図示している概略説明図である。

【図4】

図4は、鎖置換アッセイを図示している概略説明図である。

【図5】

図5は、標的分子に対するサンドイッチアッセイの結果を示すゲルの写真である。

【図6】

図6は、標的分子に対する単一置換アッセイの結果を示すゲルの写真である。

【図7】

図7は、媒体内の個別層の中で固定された捕捉プローブと、その捕捉プローブに相補的な2つの分子と、1つの非相補的標的分子とを使用する置換アッセイの結果を示すゲルの写真である。

【図8】

図8 AとBは、固相技術を使用して変異体の分析を図示している。図8 Aは標的分子内の変異を検出するというゲル分析から得られたゲルである。図8 Bはこの実験で使用される11個の異なる標的分子に関するプロフィールである。

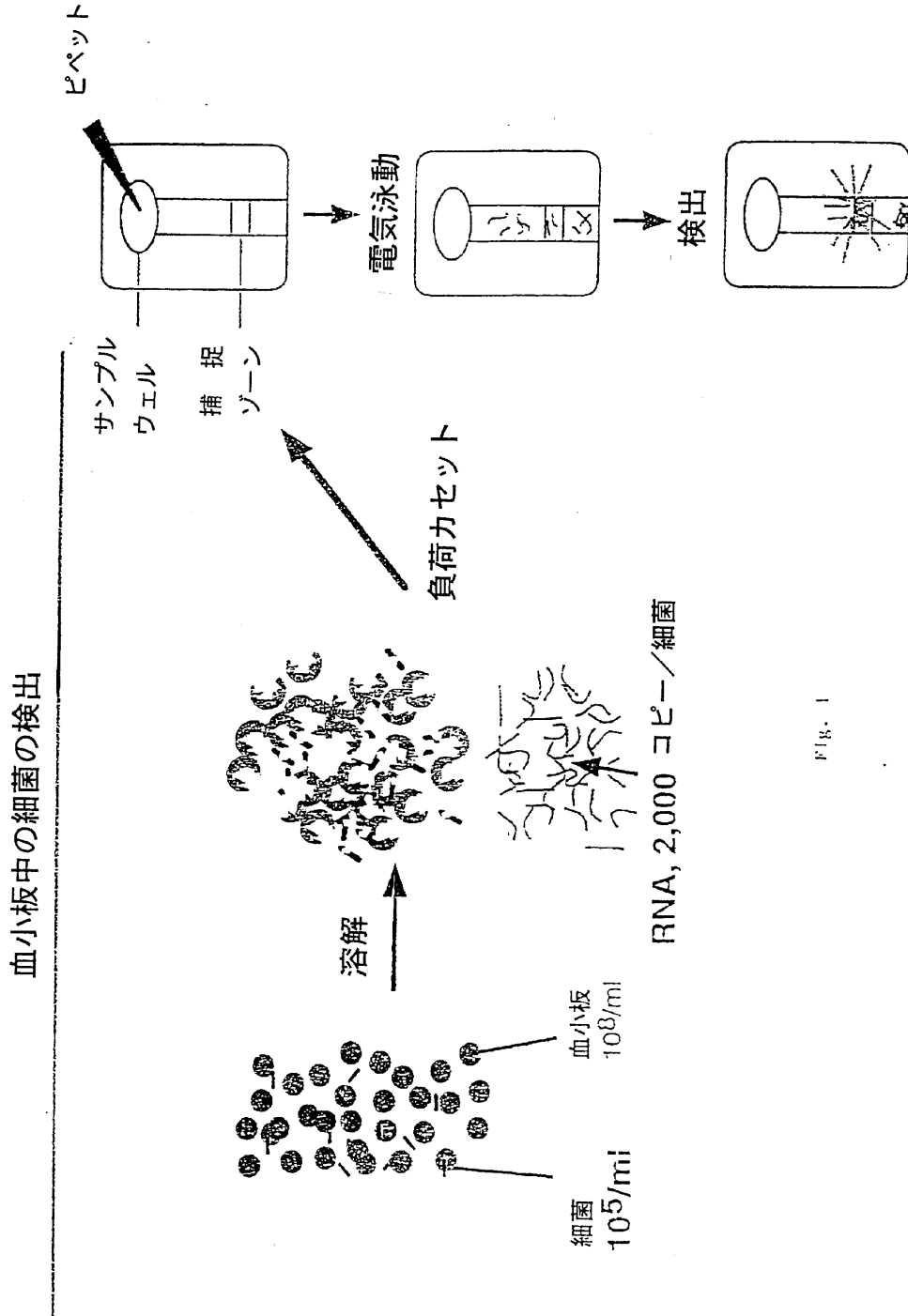
【図9】

図9は、特にHIV逆転写酵素遺伝子におけるPCR産物中の変異体を検出するための実験の結果を示すゲルの写真である。

【図10】

図10は複数の捕捉層ゲルを使用した1つの実験の結果を示すゲルの写真である。

【図1】



【図2】

血小板中の細菌の検出のための標的

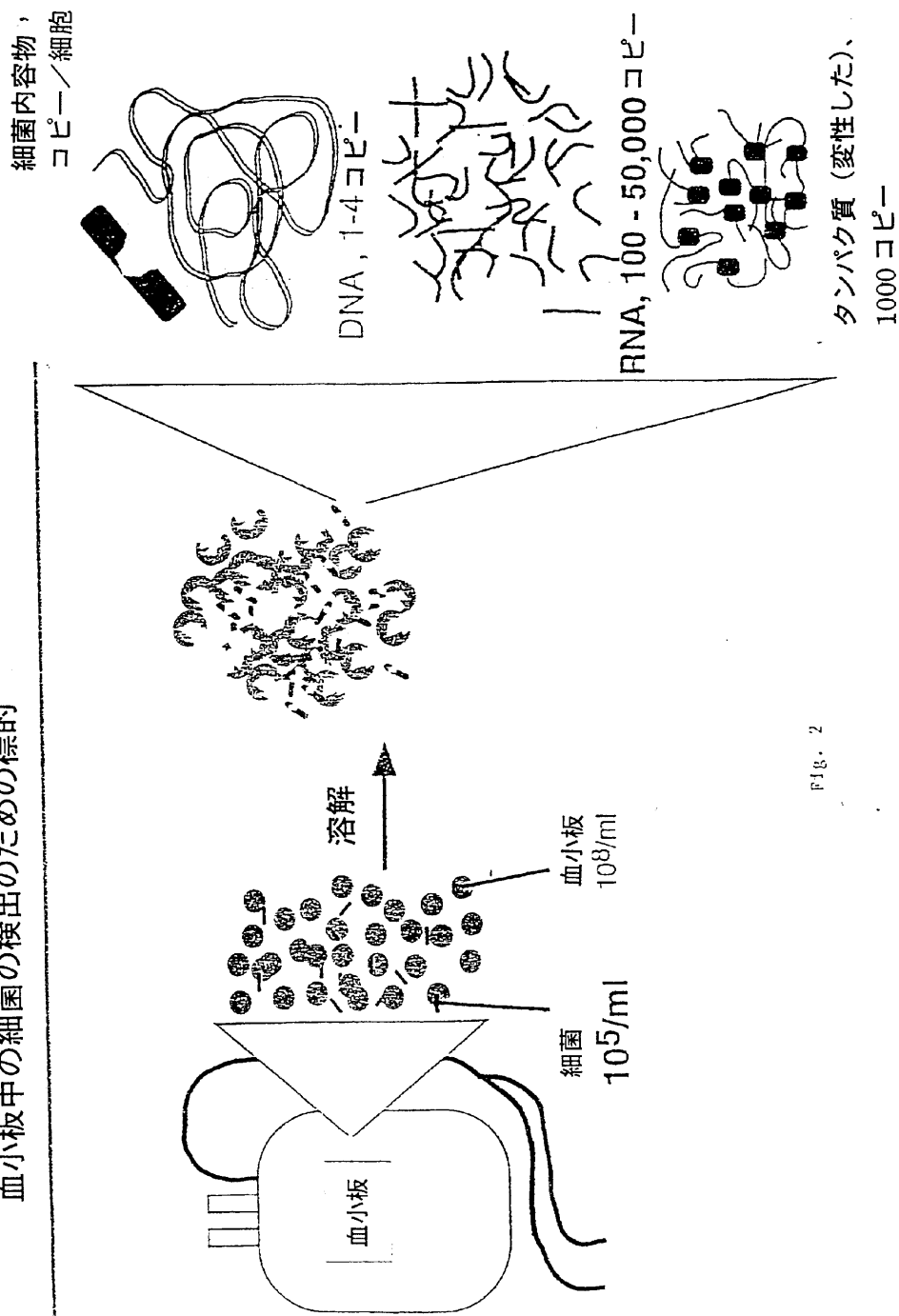


Fig. 2

【図3】

サンドイッチアッセイ

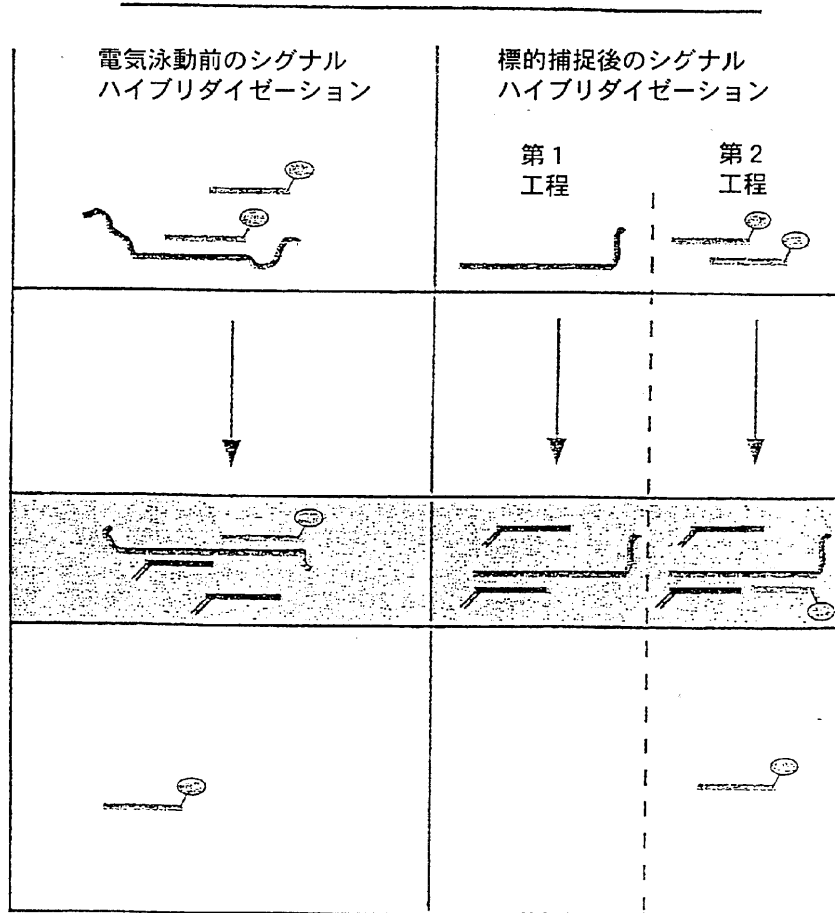


Fig. 3

【図4】

鎖置換アッセイ

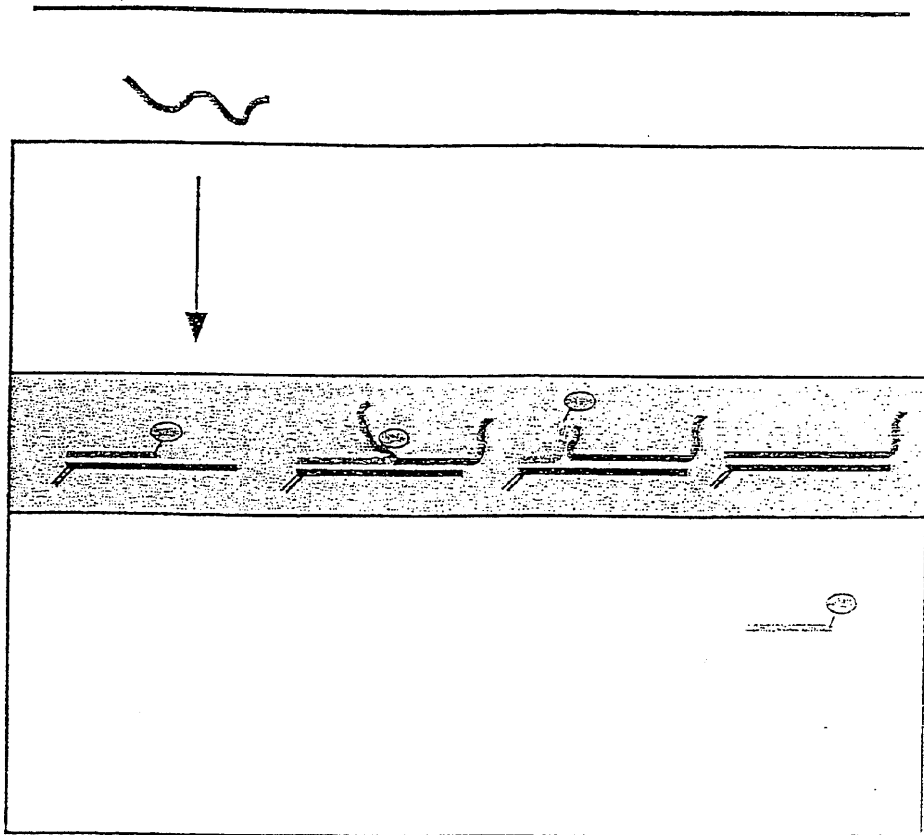


Fig. 4

【図5】

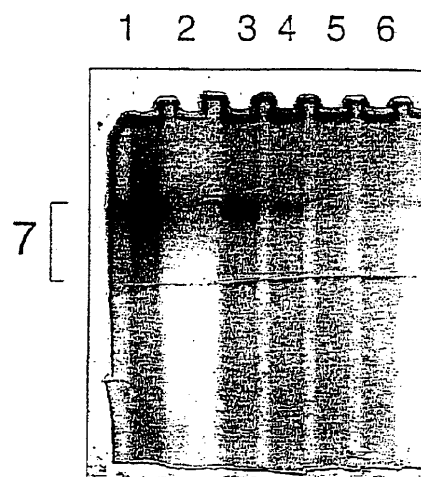


Fig. 5

【図6】

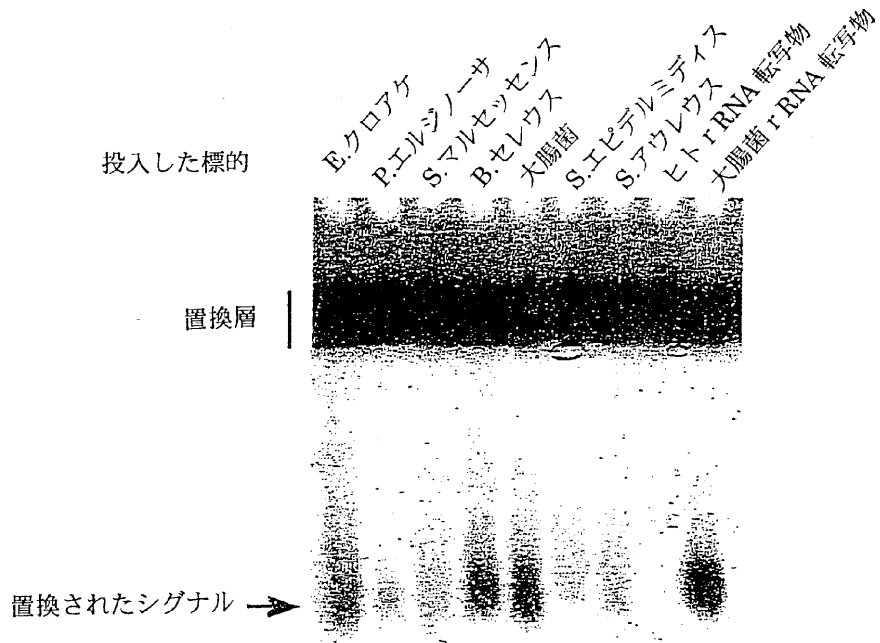


Fig. 6

【図7】

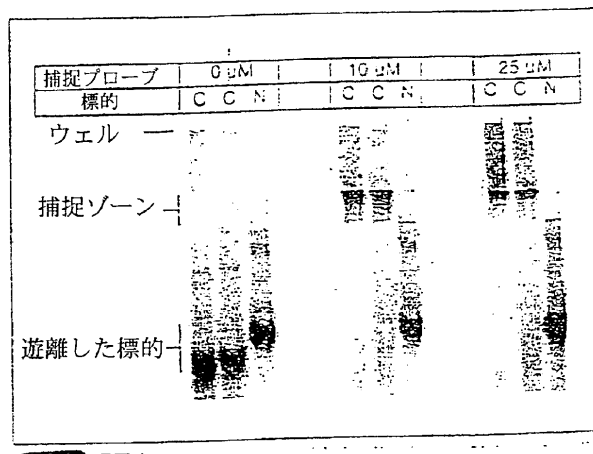
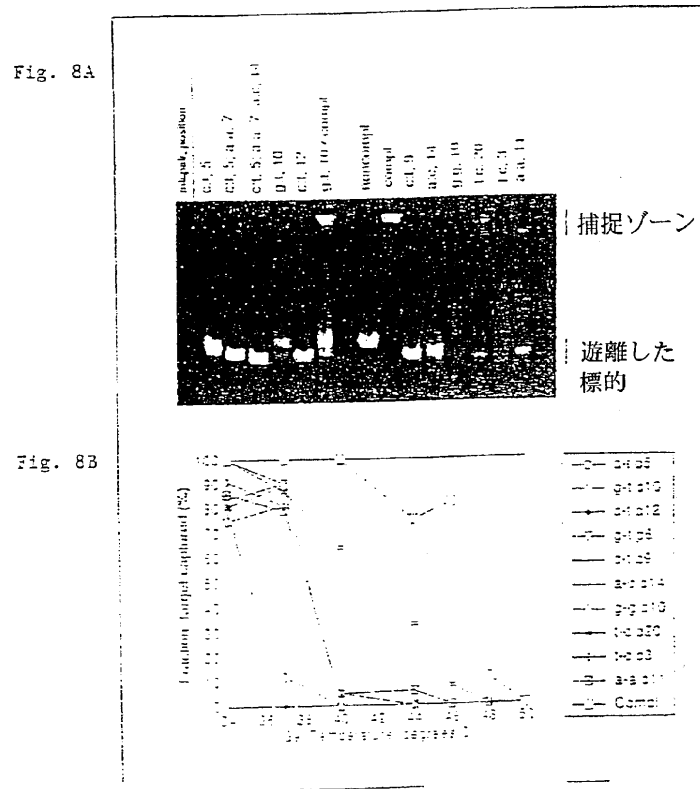


Fig. 7

【図8】



【図9】

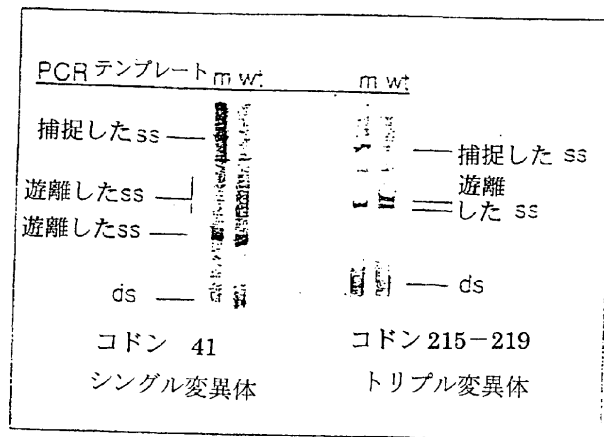
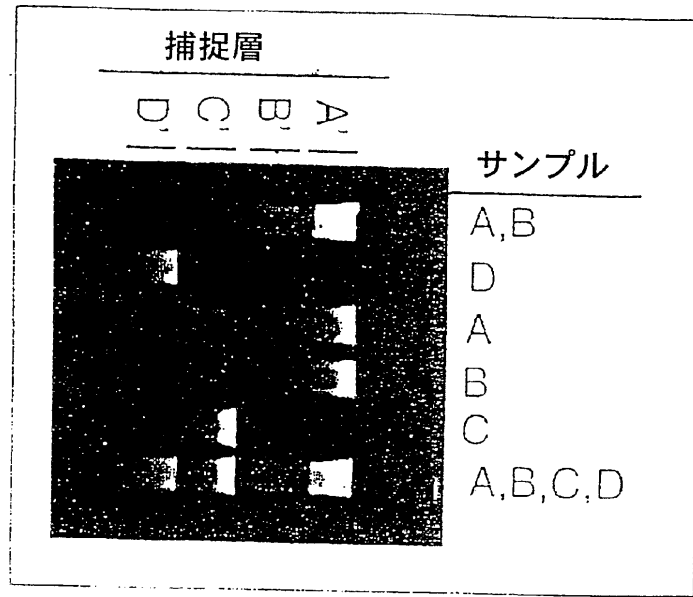


Fig. 9

【図10】



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/08773
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N33/50		
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 G01N		
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) EPQ-Internal, 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 98 51823 A (MOSAIC TECHNOLOGIES ; ABRAMS EZRA S (US); MUIR ANDREW R (US); BOLES) 19 November 1998 (1998-11-19) claims 1-17 page 23, paragraph 2 page 11 -page 19, paragraph 2 page 3, paragraph 2 -page 6, paragraph 3 ---	1-12
X	REHMAN F ET AL: "Immobilization of acrylamide-modified oligonucleotides by co-polymerization" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 27, no. 2, 15 February 1999 (1999-02-15), pages 649-55, XP002155808 page 654, paragraph 2 ---	1-12
	-/--	
<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 18 December 2000		Date of mailing of the international search report 03.04.01
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. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer OSBORNE, H

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/08773

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199115 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1991-105680 XP002075496 & JP 03 047097 A (HITACHI LTD), 28 February 1991 (1991-02-28) abstract ---	1-12
A	US 5 632 957 A (TU EUGENE ET AL) 27 May 1997 (1997-05-27) column 8 -column 9, line 9 ---	1-12
P,X	WO 99 30145 A (ADAMS CHRISTOPHER P ;BOLES T CHRISTIAN (US); MOSAIC TECHNOLOGIES ()) 17 June 1999 (1999-06-17) page 2, line 16 -page 7, line 7; cIaims 1,9-18 -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.
PCT/US 00/08773

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

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

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

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

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

Claims 1-12.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-12

Method for determining the presence or absence of a microorganism using electrophoresis technology to monitor hybridization-based sequence detection.

2. Claims: 13-23

Method for detecting the presence or absence of a microorganism using an adapter molecule.

3. Claims: 24-27,38-41,42-45

Methods for detecting the presence or absence of a microorganism involving displacement reactions.

4. Claims: 28-37

Method for identifying at least one mutation site in one or more putative mutant molecules.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 00/08773

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9851823 A	19-11-1998	AU 7489498 A EP 0981647 A	08-12-1998 01-03-2000
JP 3047097 A	28-02-1991	NONE	
US 5632957 A	27-05-1997	US 6017696 A US 5605662 A AU 702773 B AU 3507095 A BR 9508908 A CN 1164894 A EP 0871888 A FI 970957 A JP 10505497 T US 6099803 A WO 9607917 A US 6068818 A US 5849486 A US 6048690 A US 6051380 A AU 708677 B AU 2966195 A BR 9506035 A CA 2169852 A CN 1135220 A EP 0717749 A FI 961034 A JP 9503307 T NZ 289731 A WO 9601836 A AU 692800 B AU 8125794 A AU 8522798 A AU 8522898 A BR 9407952 A CA 2175483 A CN 1141078 A EP 0727045 A FI 961843 A JP 9504910 T NZ 275962 A WO 9512808 A US 5929208 A	25-01-2000 25-02-1997 04-03-1999 27-03-1996 28-10-1997 12-11-1997 21-10-1998 07-05-1997 02-06-1998 08-08-2000 14-03-1996 30-05-2000 15-12-1998 11-04-2000 18-04-2000 12-08-1999 09-02-1996 14-10-1997 25-01-1996 06-11-1996 26-06-1996 02-05-1996 31-03-1997 24-09-1998 25-01-1996 18-06-1998 23-05-1995 10-12-1998 10-12-1998 26-11-1996 11-05-1995 22-01-1997 21-08-1996 20-06-1996 13-05-1997 28-07-1998 11-05-1995 27-07-1999
WO 9930145 A	17-06-1999	AU 1804099 A	28-06-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
G 0 1 N	21/27	G 0 1 N	Z 4 B 0 6 3
	21/41		Z 4 B 0 6 5
	21/59		F
	21/64		G
		27/06	Z
	27/06	33/483	F
	27/447	33/53	M
	33/483	33/566	
	33/53	33/58	A
	33/566	C 1 2 N	Z N A A
	33/58	G 0 1 N	3 2 5 B
			3 1 5 F
			3 1 5 G
			3 2 5 E
			3 1 5 K

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

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA03 DA02 EA01
EA02 GA07 GB21
2G045 BB01 BB20 CA02 CA24 CA25
CA26 CB01 CB03 CB04 CB09
CB12 CB21 CB26 DA12 DA13
DA14 DA36 FB02 FB04 FB05
FB07 GC04 GC06 GC07 GC09
GC11 GC16 GC30 JA04
2G059 AA05 BB12 CC16 DD03 DD04
EE01 EE02 EE04 FF12 HH02
KK04
2G060 AA07 AD06 AE40 AF08 HC06
KA09
4B024 AA11 CA02 CA04 CA09 GA11
HA14
4B063 QA01 QA18 QQ05 QQ06 QQ07
QQ10 QR32 QR35 QR55 QR56
QS35 QX02 QX07
4B065 AA01X AA15X AA29X AA41X
AA46X AA48X AA49X AA53X
BD02 BD50 CA46

专利名称(译)	使用固定探针检测微生物的方法		
公开(公告)号	JP2003503011A	公开(公告)日	2003-01-28
申请号	JP2000609609	申请日	2000-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	EM茶科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	Emuti科技公司		
[标]发明人	ポールズティークリスチャン		
发明人	ポールズ, ティー., クリスチャン		
IPC分类号	G01N21/64 C12N1/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6837 C12Q1/689 G01N21/21 G01N21/27 G01N21/41 G01N21/59 G01N27/06 G01N27/447 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	C12Q1/689 C12Q1/6837 C12Q2600/156		
FI分类号	C12N1/00.U C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N21/21.Z G01N21/27.C G01N21/41.Z G01N21/59.Z G01N21/64.F G01N21/64.G G01N27/06.Z G01N33/483.F G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/58.A C12N15/00.ZNA.A G01N27/26.325.B G01N27/26.315.F G01N27/26.315.G G01N27/26.325.E G01N27/26.315.K		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/CA03 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/EA02 2G043/GA07 2G043/GB21 2G045/BB01 2G045/BB20 2G045/CA02 2G045/CA24 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB09 2G045/CB12 2G045/CB21 2G045/CB26 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB04 2G045/FB05 2G045/FB07 2G045/GC04 2G045/GC06 2G045/GC07 2G045/GC09 2G045/GC11 2G045/GC16 2G045/GC30 2G045/JA04 2G059/AA05 2G059/BB12 2G059/CC16 2G059/DD03 2G059/DD04 2G059/EE01 2G059/EE02 2G059/EE04 2G059/FF12 2G059/HH02 2G059/KK04 2G060/AA07 2G060/AD06 2G060/AE40 2G060/AF08 2G060/H06 2G060/KA09 4B024/AA11 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/GA11 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ06 4B063/QQ07 4B063/QQ10 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QS35 4B063/QX02 4B063/QX07 4B065/AA01X 4B065/AA15X 4B065/AA29X 4B065/AA41X 4B065/AA46X 4B065/AA48X 4B065/AA49X 4B065/AA53X 4B065/BD02 4B065/BD50 4B065/CA46		
优先权	09/286091 1999-04-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了一种检测微生物的存在或不存在的方法，该方法包括以下步骤：使用固定化的捕获探针的电泳来检测待测样品中微生物目标分子的存在或不存在。本发明还公开了一种用于检测推定的突变靶分子中的突变位点的方法。

