

(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2002－538785

(P2002－538785A)

(43)公表日 平成14年11月19日(2002.11.19)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 1 2 Q 1/68	ZNA	C 1 2 Q 1/68	ZNA A 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
1/34		1/34	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53		37/00	102

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 86数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000－602818(P2000－602818)

(86)(22)出願日 平成12年2月29日(2000.2.29)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月3日(2001.9.3)

(86)国際出願番号 PCT/US00/05143

(87)国際公開番号 W000/52208

(87)国際公開日 平成12年9月8日(2000.9.8)

(31)優先権主張番号 09/261,115

(32)優先日 平成11年3月3日(1999.3.3)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザ・ユニバーシティ・オブ・シカゴ
THE UNIVERSITY OF
CHICAGO

アメリカ合衆国 60637 イリノイ シカゴ
、スイート 405, サウス・エリス・アベニ
ュー 5640

(72)発明者 ミラザベコフ, アンドレイ
アメリカ合衆国 イリノイ 60516, ダリ
アン, ビレッジ コート 1005

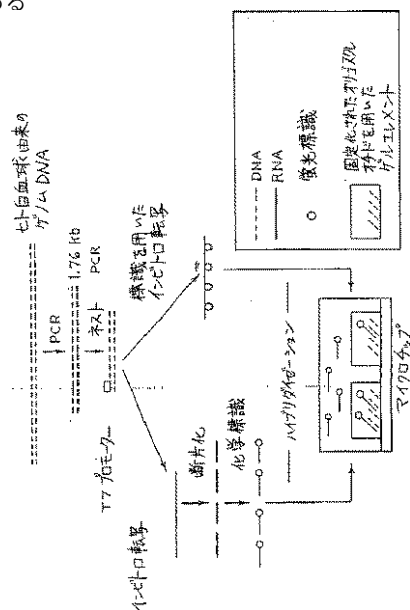
(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多重遺伝子情報をより単純なパターンに変換するカスタマイズされたオリゴヌクレオチドマイクロチップは、移動可能でありそして再利用可能である

(57)【要約】

本発明は、環境中、食品中ならびに生物学的サンプル中の、異なる遺伝子、器官および／または個体に対して特異的な核酸の、検出および同定をするためのカスタマイズされたオリゴヌクレオチドマイクロチップを、バイオセンサーとして使用することに関する。このマイクロチップは、遺伝子情報の多重ビットを、ユニットとして解釈される単純なシグナルパターンに変換するように設計される。サンプル由来のオリゴヌクレオチドがマイクロチップへハイブリダイズする方法が改善されたので、マイクロチップは、再利用可能かつ移動可能である。実地調査に対して、移動可能なレーザーまたはバーコードスキャナーが、適している。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプルの核酸中の少なくとも1つの窒素塩基配列を同定するための再利用可能なマイクロチップを使用するための方法であって、該方法は、以下：

(a) オリゴヌクレオチドのカスタマイズされたマトリックスをある配置でマイクロチップ上に提供する工程であって、ここで、該配置は、全体として検出可能なパターンを示すように設計された順序付けられたスキームであって、ここで、該検出可能なパターンは、該サンプル中の核酸の窒素塩基配列を同定する、工程；

(b) 該サンプル由来の核酸を該マイクロチップ上でハイブリダイズする工程；および

(c) 該サンプル中の少なくとも1つの窒素塩基配列を、該マイクロチップ上で全体として検出された該パターンによって同定する工程であって、ここで、該パターンは、オリゴヌクレオチドの位置から生じ、ここで、該オリゴヌクレオチドは、該サンプル核酸にハイブリダイズする、工程を包含する、方法。

【請求項2】 請求項1に記載の方法であって、ここで、前記窒素塩基配列が、DNA分子の中にある、方法。

【請求項3】 請求項1に記載の方法であって、ここで、前記窒素塩基配列が、16S RNA、mRNAまたは他のRNA分子の中にある、方法。

【請求項4】 請求項1に記載の方法であって、ここで、前記再利用可能なマイクロチップ上の前記オリゴヌクレオチドのカスタマイズされたマトリックスが、複数のゲル要素によって形成され、ここで、該要素の数が、該マトリックス中のオリゴヌクレオチドの数によって決定され、そしてここで、各ゲル要素が、所望の窒素塩基配列長および濃度の1つのオリゴヌクレオチドを含み、各ゲル要素は、互いから疎水性ガラス空間によって分離されており、そしてここで、該ゲル要素が、約30 μm以下の隙間の空間の平面上に垂直な高さを有し、該オリゴヌクレオチドは、特定の位置に配置されている、方法。

【請求項5】 請求項4に記載の方法であって、ここで、前記マトリックスが、以下：

【表1】

オリゴヌクレオチドの 名前および位置	配列 (5' to 3')
Nb1000	TGC GAC CGG TCA TGG (SEQ ID NO:6)
NIT3	CCT GTG CTC CAT GCT CCG (SEQ ID NO:7)
NEU23	CCC CTC TGC TGC ACT CTA (SEQ ID NO:8)
NSO190	CGA TCC CCT GCT TTT CTC (SEQ ID NO:9)
NSO1225	CGC GAT TGT ATT ACG TGT GA (SEQ ID NO:10)
NSMO156	TAT TAG CAC ATC TTT CGA T (SEQ ID NO:11)
NSV443	CCG TGA CCG TTT CGT TCC (SEQ ID NO:12)
BAC338	GCT GCC TCC CGT AGG GAT (SEQ ID NO:13)
NonBAC338	ACT CCT ACG GGA GGC AGC (SEQ ID NO:14)
UNI1390	GAC GGG CGG TGT GTA CAA (SEQ ID NO:15)

の前記塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含む、方法。

【請求項6】 請求項5に記載の方法であって、ここで、前記オリゴヌクレオチドが、以下：

【表2】

	I	II	III	IV
A	Nb1000	NIT3	NEU23	Nso190
B	Nso1225	Nsm156	Nsv443	
C	Bac338	NonBac338	Uni1390	

のマトリックス中に配置され、ここで、I、II、IIIおよびIVは、マイクロチップの列であり、そして「ABC」は、該マイクロチップの行である、方法。

【請求項7】 請求項1に記載の方法であって、以下：

(e) 前記サンプル中の前記窒素塩基配列を前記マイクロチップ上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせる前に、標識を該窒素塩基配列に添加する工程をさらに包含する、方法。

【請求項8】 請求項7に記載の方法であって、ここで前記標識が、蛍光色素である、方法。

【請求項9】 請求項7に記載の方法であって、ここで前記標識が、複数の異なる色素である、方法。

【請求項10】 硝化細菌の検出および分類をするためのマイクロチップマトリックスであって、ここで、該マトリックスが、以下：

【表3】

	I	II	III	IV
A	Nb1000	NIT3	NEU23	Nso190
B	Nso1225	Nsm156	Nsv443	
C	Bac338	NonBac338	Uni1390	

の設計を有し、ここで、I、II、IIIおよびIVは、マイクロチップの列であり、そしてA、B、Cは、該マイクロチップの行であり、ここで、塩基配列が、以下：

【表4】

オリゴヌクレオチドの 名前 および 位置	配列 (5' to 3')
Nb1000	5'-TGC GAC CGG TCA TGG-3'
NIT3	5'-CCT GTG CTC CAT GCT CCG-3'
NEU23	5'-CCC CTC TGC TGC ACT CTA-3'
NSO190	5'-CGA TCG CCT GCT TTT CTC- 3'
NSO1225	5'-CQC GAT TGT ATT ACG TGT GA-3'
NSMO156	5'-TAT TAG CAC ATC TTT CGA t-3'
NSV443	5'-CCG TGA CCG TTT CGT TCC-3'
BAC338	5'-GCT GCC TCC COT AGG GAT-3'
NonBAC338	5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC-3'
UNI1390	5'-GAC GGG CGG TGT GTA CAA-3'

である、

マトリックス。

【請求項11】 サンプル中の遺伝子の変異の存在についての診断アッセイであって、該アッセイが、以下：

(a) カスタマイズされた再利用可能なマイクロチップバイオセンサーを設計する工程であって、該バイオセンサーは、変異を有する遺伝子にハイブリダイズする少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含み、該設計する工程は、該変異の該ハイブリダイゼーションの存在下で検出可能な全体のパターンを生成する、工程；

(b) 該遺伝子配列のハイブリダイゼーションを可能にする条件下において、該サンプルを該カスタマイズされたマイクロチップバイオセンサーに接触させる工程であって、該遺伝子配列は、マイクロチップ上のオリゴヌクレオチドに対して変異である、工程；および

(c) 該マイクロチップのパターンを分析することによって、ハイブリダイゼーションが生じたか否かを決定する工程であって、該パターンから該遺伝子中の該変異の存在が決定される、工程を包含する、診断アッセイ。

【請求項12】 マイクロチップ上の窒素塩基配列と試験される窒素塩基配

列との間のミスマッチを検出するための非平衡融解曲線を用いる方法であって、該方法が、以下：

(a) 一連の温度においてマイクロチップ上の配列と、一致するかまたは一致しない該窒素塩基配列の間のハイブリダイゼーションを同時にモニタリングすることによって、該非平衡融解曲線を生成する工程；

(b) 該一致と該不一致との間に最大の識別が生じる温度を選択する工程；ならびに

(c) 該選択された温度において、試験される該窒素塩基配列の該不一致の程度を測定する工程：を包含する、方法。

【請求項13】 請求項12に記載の方法であって、ここで、前記選択された温度は、不一致した配列のシグナル強度が、一致した配列の該シグナル強度の少なくとも10分の1である温度である、方法。

【請求項14】 βグロブリン変異の検出のためのカスタマイズされたオリゴヌクレオチドマイクロチップであって、該マイクロチップが、以下：

【表5】

<u>識別名</u>	<u>配列</u>	<u>配列番号</u>
番号：		
IVS (N)	CCTGGGCAGGTTGGTATCA;	48
IVS I/2 T/A	CCTGGGCAGGaTGGTATCA;	49
IVS I/1 G/A	CCTGGGCAGaTTGGTATCA;	50
IVS I/6 T/C	CCTGGGCAGGTTGcTATCA;	51
IVS I/5 G/T	CCTGGGCAGGTTGtTATCA;	52
CD26 (N)	GTTGGTGGTGAGGCCCTGG;	53
CD26 G/A	GTTGGTGGTaAGGCCCTGG	54

の窒素塩基配列を有する7つのオリゴヌクレオチドを含む、マイクロチップ。

【請求項15】 遺伝子発現の定量化のための再利用可能なカスタマイズされたオリゴヌクレオチドマイクロチップであって、ここで、該マイクロチップの設計が、発現の程度に対応するパターンを示す、マイクロチップ。

【請求項16】 HLA多型の検出のためのカスタマイズされたオリゴヌクレオチドマイクロチップであって、ここで、該マイクロチップの設計は、HLAプローブが、ハイブリダイゼーションが生じた場合に、特定の質問に回答するように配置されるパターンを示す、マイクロチップ。

【請求項17】 請求項16に記載のカスタマイズされたオリゴヌクレオチドマイクロチップであって、以下のオリゴヌクレオチド：

【表6】

AGGCAACGTG (1) (配列番号 55);
 AGGCGACGTG (2) (配列番号 56);
 GGTGAACTGG (3) (配列番号 57);
 TAAATCTGCG (4) (配列番号 58);
 AGGCAACATG (5) (配列番号 59);
 CAAAACCTCC (6) (配列番号 60);
 GCAAACACCA (7) (配列番号 61);
 TACACCATAA (8) (配列番号 62);
 ACTGCTCATC (9) (配列番号 63);
 CAATGTCTTC (10) (配列番号 64);
 CTCCTCATCT (11) (配列番号 65);
 TGCCCGTCAA (12) (配列番号 66);
 TTAGGACAGC (13) (配列番号 67);
 ACACCA¹CAAG (14) (配列番号 68);
 CACAATGCCT (15) (配列番号 69);
 CAGCAGTAGA (16) (配列番号 70);
 TGC²GGTCAA (17) (配列番号 71);
 TTAGCACAGC (18) (配列番号 72)

を含む、マイクロチップ。

【請求項18】 試験サンプルに関する特定の質問に回答する再利用可能な遺伝子マイクロチップを設計するための方法であって、該回答は、全体として該マイクロチップ上の、該サンプル中に存在する、核酸分子の窒素塩基配列のハイブ

リダイゼーションパターンまたはリボ核酸分子の窒素塩基配列のハイブリダイゼーションパターンの検出によって提供され、該方法は、以下：

(a) 該特定の質問を決定する工程；および

(b) 該サンプル中に存在する核酸のハイブリダイゼーションが、全体として検出される場合に、該質問に対する回答を提供するパターンを提供するように、該マイクロチップを設計する工程；および

(c) 該パターンを検出する工程

を包含する、

方法。

【請求項19】 請求項18に記載の方法であって、ここで、前記サンプルは、水であり、そして前記質問は、何の病原体が存在するかである、方法。

【請求項20】 請求項18に記載の方法であって、ここで、前記サンプルは、血液であり、そして前記質問は、何の遺伝子変異が存在するかである、方法。

【請求項21】 請求項18に記載の方法であって、ここで、前記サンプルは、食品であり、そして前記特定の質問は、何の含有物が存在するかである、方法。

【請求項22】 請求項18に記載の方法であって、ここで、前記パターンは、バーコードパターンであり、そして該パターンの検出は、バーコードレーザースキャナーによって実施される、方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

米国政府は、米国エネルギー省と (Argonne National Laboratory) を代表する University of Chicago との間の契約 W 109-ENG に従って、本発明に対する権利を有する。

【0002】

新規のマイクロチップは、特定の質問に回答するようにカスタマイズされ、そしてそのマイクロチップ上に配置されたオリゴヌクレオチドを有し、その結果、複数ビットの情報が、より単純なパターンにより立証される。マイクロチップに対するハイブリダイゼーションの新規方法もまた提示される。

【0003】**(発明の背景)**

ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における相違は、環境、食品または生物学的なサンプルを分析するために利用され得る。微生物の検出および同定は、臨床目的、および汚染された食品、空気または土壌の検出のために重要である。環境微生物学における研究は、天然の集団の莫大な多様性をはっきり同定し、そして直接定量することができないためしばしば限定されている。この課題は、今や、異なる遺伝的特徴を直接測定するための分子生物学の使用が増大するにつれ、変化しつつある。(Mobarrryら, 1996; Stahl, 1995; Wagnerら, 1995)。例えば、DNAプローブは、今や、ハイブリダイゼーションによって、特定の異化機能に関与するタンパク質をコードする遺伝子を検出するため、および環境における異なる遺伝的集団を解明するために使用されている。特に、小サブユニット (SSU) の 16S rRNA に対して相補的な群特異的なDNAプローブの使用は、複合系における微生物集団構造の研究のための包括的な枠組みを提供した。このサブユニットの配列決定は、微生物分類に革命をもたらし、そして古細菌類 (Woese, 1987) の発見に至った。異なる細菌について大多数の配列が収集されている (Maidakら, 1996)。すべての微生物種は、そのリボゾームRNA遺伝子または他の遺伝子の可変な領域内の特定のDNA配列によって特徴付けられる。微生物分類およびその進化樹

の構築のための非常に効率よい手順は、これらの観察に基づく。リボゾームDNAにおける特定の配列の同定は、信頼性の高い微生物分析であり、これは、直接のDNA配列決定によって実施され得る。しかし、DNA配列決定は、環境または医療の適用のための商業スケールでの連続的微生物分析について使用するためには、かなり複雑であり、費用がかかり、そして時間のかかる手順である。結果として、商業的に実現可能に適合するような新たな方法が必要である。

【0004】

また、野外に持ち出すことができる方法も必要である。核酸ハイブリダイゼーションは、非常に特異的であり、そして感受性の高い手順であり、これは、高等生物または異なる生物の混合物のなかのゲノム中の他の何百万もの配列のなかで、特定の配列が検出および同定されることを可能にする。ハイブリダイゼーションの原理は、その直鎖状ヌクレオチド配列の類似性の関数としてある配列がハイブリダイズすることである。特定のオリゴヌクレオチドプローブに対する、非常に複雑な混合物からまでも抽出されたDNAまたはRNAのハイブリダイゼーションは、例えば、環境サンプル中の特定の微生物のはっきりした同定を生じた。そのような分析の過程で、RNAまたはDNAは、水溶液、空気または土壌から単離された微生物のサンプルから抽出され、フィルターに固定され、そして異なる微生物についてのいくつかのオリゴヌクレオチドプローブと連続的にハイブリダイズされる。しかし、そのサンプルは、種々の微生物に対応する数十万もの異なるオリゴヌクレオチドの存在についてチェックされる必要があり、これは、現在の方法を用いると極度に煩雑で、かつ高価であり、そして同定を解読するためにコンピューターによって解釈されねばならない結果を生成する。必要なものは、特定の課題に対する迅速な回答を提供する単純化されたパターンであり、例えば、これは、水サンプル中の任意の公知の病原体である。

【0005】

ヌクレオチドハイブリダイゼーションの適用範囲は、しばしば、アッセイの性質によって限定され、これは、概して、非依存性のハイブリダイゼーションおよび複数の環境サンプルの複数のDNAプローブに対する解釈を包含する。さらに、いくつかの検出アッセイは、例えば、PCRを介した標的核酸の増幅を必要と

する。これは、定量的な偏向に寄与し得る。従って、より高いサンプル処理能力およびより高い感度、迅速な結果の読み出しを提供するアッセイについての必要性が存在する。

【0006】

特定のDNAまたはRNA配列が目的である別の領域は、変異および多型の分析である。異なる遺伝子において発見された塩基変化（変異）の数は、急速に伸びている。これらの変化は、遺伝子疾患、疾患の素因および癌に関連し、微生物における薬物耐性の発生に関連し、そして遺伝子多型に関連する。多型は、サンプルの供給源を決定するために有用である（例えば、法医学分析）。HLA系におけるような多型は、組織移植の成功を予測するために必須である。単純で迅速かつ安価な方法で遺伝子における多くの変異を同時に分析する能力は、臨床医学において必須であり、そしてこの必要性は、変異をスクリーニングするための異なる方法の開発を刺激するのみならず、すべてが重篤な限界を有する。必要なことは、例えば、高度の技術の顕微鏡を要せずに臨床にびて使用するための運搬可能でかつ解釈可能であるキットである。

【0007】

フィルターに対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを固定したDNAのハイブリダイゼーションが、変異についてスクリーニングするための方法として示唆された（Connerら，1983）。しかし、一度にアッセイされ得る対立遺伝子の数が限定されている。そのフィルターは、数回しか使用可能ではなく、そして複雑な分析または結果を簡単に解釈する機会は殆どない。

【0008】

大スケールのハイブリダイゼーションに対する可能な解決策は、DNA配列ハイブリダイゼーションのためのマイクロチップの使用である（SHOM，マイクロチップにおけるオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーションによる配列決定）（例えば、Khrapko，1996；Yershov，1996）。数百または数千もの固定されたオリゴヌクレオチドのアレイの開発（いわゆる「オリゴヌクレオチドチップ」）は、多くの変異の同時の分析を可能にしている（概説について、Mirzabekov，1994を参照のこと）。そのようなア

レイは、オリゴヌクレオチドの並行合成によって (Southernら, 1992; Fodorら, 1991; Peaseら, 1994; Matsonら, 1995) か、または呼び合成したオリゴヌクレオチドの化学固定によって (Khrapkoら, 1991; Larnitureら, 1994; Ghuら, 1994) 製造され得る。ガラス表面 (Southernら, 1992; Fodorら, 1991; Ghuら, 1994)、ガラス孔 (Beattieら, 1995)、ポリプロピレンシート (Matsonら, 1995)、およびゲルパッド (Khrapkoら, 1991; Yershovら, 1996) は、オリゴヌクレオチド固定のための固体支持体として使用されている。しかし、「オリゴヌクレオチドアレイ技術は、それが有望であるところまでには至っていない」Southern, 1996 p. 115。

【0009】

当該分野における欠損のいくつかは、その結果の予測不可能性、最適な条件の知識の欠如、および正確かつ商業的実現可能性を実証することの欠如である。さらに、ハイブリダイゼーションの結果の分析は、多重ビットの情報を同化および解釈し得るコンピュータプログラム、ならびに抗技術顕微鏡を必要とする。マイクロチップは、運搬可能でもなく、再使用可能でもなく、容易に解釈し得るものでもない。

【0010】

(発明の要旨)

本発明は、オリゴヌクレオチドマイクロチップ技術の適用を具現化する。ここで、マイクロチップは、バイオセンサであり、そしてカスタマイズされたオリゴヌクレオチドマイクロチップは、核酸ハイブリダイゼーションの特定の適用のために設計される

ハイブリダイゼーションとは、規定された反応条件下で、部分的または完全に相補的な核酸が特定かつ安定な水素結合を形成する逆並行の様式で結合することを可能にするプロセスである。

【0011】

発明の局面としては、以下が挙げられる：

1. 複数ビットの遺伝的情報が、ユニットとして解釈されるパターンへと変換されるように設計されたマイクロチップ。ここで、そのパターンの出現は、特定の課題に対する回答を提供する；この構築物は、ハイブリダイゼーションパターンにより提供される容易に解釈可能な回答を提供することを容易にし、そしてハイブリダイゼーションの結果を解釈する高度の技術の装置の必要性をいくつか排除する；そして

2. カスタマイズされたマイクロチップ上のオリゴヌクレオチドへの、サンプル中のオリゴヌクレオチドのハイブリダイズする改善された方法は、洗浄工程を必要とするのではなく、むしろ非平衡の融点曲線（温度曲線）を測定する。これは、マイクロチップから固定されたオリゴヌクレオチドを除去する溶液を用いた戦場を必要としない；このことは、マイクロチップが再使用可能であることを意味する。なぜなら、オリゴヌクレオチドおよびゲルエレメント内に固定されたオリゴヌクレオチドが、洗浄除去されず、そして再使用のために利用可能であるからである（サンプルを有するマイクロチップは、一般的に、溶液中に保持されるが、マイクロチップは、乾燥され得、そして再使用されるまでに数ヶ月保存し得る）。

【0012】

マイクロチップへのハイブリダイゼーション後に示されるパターンは、ハイブリダイゼーションの性質に直接関係せず、そして「イエス」または「ノー」の信号、または「正」または「負」の信号を、バイナリー結果へと単純に変換せず、しかも、本発明のパターンは、量のグラデーションを別の形態のグラデーション（例えば、呈色グラデーション）へとも変換しない。オリゴヌクレオチドのマイクロチップ自体の上の意図的な構成は、情報を転移させず、試験核酸とのハイブリダイゼーションの後のみに、ハイブリダイゼーションシグナル自体がそのパターンを形成する。次いで、このパターンを、さらなる検出装置の助けを借りない視覚化解釈を含み得る検出手段によって検出される。

【0013】

マイクロチップ上のオリゴヌクレオチド位置付けの順序付けられたスキームを選択することによって、視覚化された信号が単純化され、そして増強され、例え

ば、文字「P」は、特定の病原体群が存在する場合に観察され：同じオリゴヌクレオチドプローブを含むチップ上のゲルエレメントのカラムは、適合するオリゴヌクレオチドが試験サンプル中に存在する場合に、正の線状カラムとして容易に検出可能である。可視的概観は、肉眼で観察するに十分な強度で有り得、UPC (Universal Product Code すなわち「バーコード」) レーザスキャナまたはレーザガンを用いて決定され得る。バーコードのための信号を受容する、スキャナおよびセンサの波長は、DNAとハイブリダイズするに使用される色素または標識に一致しなければならない。

【0014】

当然、局面1および2は、一緒に使用されなければならないわけではない。オリゴヌクレオチドの多数のハイブリダイゼーションによって得られた複数量の遺伝子情報を、より単純で容易に解釈し得るパターンへと変換することから生じる設計は、本発明のまえに使用される方法によって構築および分析されたマイクロチップ上で行われ得る。

【0015】

同様に、マイクロチップ上でハイブリダイゼーション結果を提供する改善された方法が、複数の片の遺伝子情報をより単純なパターンへと変換するように設計されていないマイクロチップ上で使用され得る。

【0016】

本発明の他の局面は、改善された予測可能性、増加した精度、およびヌクレオチド配列の検出および同定について標準化された因子を包含する。改善は、マイクロチップハイブリダイゼーションについて条件、方法および組成物を最適化することから得られる。意図的に順序付けられるスキームであって、特定の課題に回答するように設計され、そしてより単純なパターンへと複雑なデータを変換するものは、多数のハイブリダイゼーション情報が、マイクロチップの単なる走査から得られて、調査されるサンプル中の核酸による固定されたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを検出し得るようになされる。サンプルとしては、空気、水、土壌、血液、細胞、組織、組織培養物および食品が挙げられる。本発明の局面は、同じマイクロチップがハイブリダイゼーション信号の認知され得る悪

化を何ら伴わずに20～30を超える回数にわたりハイブリダイゼーションについて使用され得ることである。なぜなら、固定されたオリゴヌクレオチドは、洗浄されも剥がされもしないからである。マイクロチップのカスタマイズされたセットは、特定の適用のために得られる。また、あるサンプルにおける核酸の、マイクロチップ上の多数のオリゴヌクレオチドへの並行ハイブリダイゼーションが可能であり、これは、複製および標準化を可能にする。例えば、変動する数度の異なる微生物集団から回収されるSSUrRNAの配列多様性は、マイクロチップへの単純なハイブリダイゼーションによって分析される。大多数のHLA対立遺伝子は、マイクロチップへの単純なハイブリダイゼーションによってアッセイされる。

【0017】

本発明は、マイクロチップを用いてサンプル中のヌクレオチド配列を同定するための方法に関する。この方法は、以下の工程を包含する：

a) そのサンプル中の遺伝的配列を同定するように設計されたマイクロチップ上にオリゴヌクレオチドのカスタマイズされたマトリクスを提供する工程であって、順序付けされたスキームがオリゴヌクレオチドを位置付けしてハイブリダイゼーションの後の特定の課題を回答するようなパターンを提供する、工程；

b) そのサンプル自体またはそのマイクロチップ上で増幅された後のサンプルから抽出された核酸をハイブリダイゼーションさせる工程；ならびに

c) その配列に対してハイブリダイズするオリゴヌクレオチドのパターンを分析することによって、そのサンプル中に表されるヌクレオチド配列を同定する工程であって、そのパターンは、シグナルによって提供される、工程。

【0018】

本発明の実施のために適切な核酸は、DNA、mRNA、16S rRNAの配列および他のRNA種である。

【0019】

カスタマイズされたオリゴヌクレオチドマイクロチップは、本発明の局面である。そのマイクロチップとしては、支持体に固定されたゲルマトリクスであって、そのマトリクスはゲルパッドエレメントの複数の部位によって形成される。部

位の数、そのアレイ中のオリゴヌクレオチドの数によって決定される。ゲル各々のエレメントは、所望の配列、長さおよび濃度の化学的に固定された1つのヌクレオチドを含み；そのゲルエレメントは、互いに疎水性のガラス空間によって分離され、そしてゲル部分は、間隙空間の平面上の直角高さが一般に30 μm を超えない。いくつかの適用において、同じ型のオリゴヌクレオチドは、異なるゲルパッドに対して固定されてパターンを形成し得る。

【0020】

本発明は、遺伝子、RNA転写物または任意の他の独特のヌクレオチド配列（例えば、微生物の16SリボソームRNAをコードするもの）について核酸調製物をスクリーニングに関する。特定の型の生物についてのDNA/RNAまたは任意の独特のヌクレオチド配列の比が適切である。複数標識によって、異なる核酸配列であって、マイクロチップ上にハイブリダイズしたものの同時の検出および定量的比較が可能になる。

【0021】

本発明の方法としては、そのサンプル中のオリゴヌクレオチド配列を標識すること、その後、そのアレイとその配列を接触させることを包含する。適切な標識は、蛍光色素である。複数の異なる色素が同時に使用され得る。カスタマイズされたマイクロチップに固定されたオリゴヌクレオチドとしては以下が挙げられる： β グロビン遺伝子、Salmonellaに特異的な配列、多型HLA対立遺伝子配列。

【0022】

硝化細菌の検出および分類のためのオリゴヌクレオチドマイクロチップはカスタマイズされた設計を有する。ここで、そのマイクロチップの細胞における標識を同定することは、細菌のクラスから選択されたオリゴヌクレオチドを参照し、そしてその選択は、分類に関して特定の課題に回答するように設計される。

【0023】

本発明の適用の実施形態は以下である：汚染についてチェックするための環境から得られたサンプル（例えば、水、空気または土壌のサンプル）；医療診断のための、得られた生物学的サンプル；または汚染についてチェックするための食

品サンプル。他の適用としては、犯罪捜査のために得られたサンプル中のDNAを同定するための法医学試験、および染色体フラグメントの検出、または単一遺伝子変異（例えば、 β サラセミアまたは複数型の癌のような遺伝子疾患を診断するため）が挙げられる。移植またはヒトの多様性を研究するために多型HLA対立遺伝子について組織型決定することが容易になる。

【0024】

核酸調製物は、任意の型の環境において収集されるサンプルから作製される。ここで、おそらく、新たな（これまで未同定の）生物が回収され得る。

【0025】

サンプル中のDNAまたはRNA分子は、その単離の間に互いに分離され得、そして異なる蛍光色素で標識され得る。これらのRNAおよびDNAの分子は、試験されるべきサンプルに対して特異的なマイクロチップ上のオリゴヌクレオチドと同時にハイブリダイズされる。異なって標識されたDNAおよびRNAの同時ハイブリダイゼーションをいくつかの波長で多色を識別し得る顕微鏡で定量モニターすることにより、サンプル中のDNA/RNAの比の珪酸が可能になる。細菌サンプルについて、この比は、その細菌の生存性および生理学的活性の状態を決定する。1つの実施形態において、RNA/DNAの比を使用して、微生物増殖の活性状態から、死んだ細菌細胞および胞子を識別する。同様にして、ある色素で染色された細菌株のDNAまたはRNAの分子は、検査中の配列（単数または複数）に対して、内部標準として算出された量で添加され得る。ここで、その配列が異なる（第二の）色素で染色して検査される、その標準および検査される配列（プローブ）について異なる波長でのハイブリダイゼーション強度の蛍光測定によって、相対定量比の決定が可能になる。

【0026】

マイクロチップ上のハイブリダイゼーションは、サンプル中の異なる群の選択された細菌のはっきりした型決定を可能にする。マイクロチップハイブリダイゼーションは、細菌型決定のための、単純で、迅速で、安価で、信頼性の高い方法である。

【0027】

本発明の1つの局面は、チェックされ得る配列の数にも、検出され得る微生物の型の数にも制限がないことである。例えば、16S rRNA調製物の、異なるプローブとの複数の連続的なハイブリダイゼーションの代わりに、1回のみのハイブリダイゼーションが、異なる配列がサンプル中に存在するものを見出すために必要である。ハイブリダイゼーションの量は、劇的に減少し、そしてそのアッセイは、標準的な技術に比して、はるかに少ないRNAまたはDNAを必要とする。利点は、細菌培養および遺伝子増幅が回避され得ることである。

【0028】

本発明の方法は、サンプル調製時間を有意に減少し、野外状況から回収された生物の培養を回避し、そして特定のサンプル中に含まれる微生物の種の同定を可能にする。携帯型のマイクロチップが野外研究に利用可能である。

【0029】

例えば、選択された微生物群（硝化細菌を含む）の低分子rRNA配列に対して相補的なオリゴヌクレオチドは、その標的配列のDNAまたはRNAのいずれかの形態に由来する標識された標的核酸を選択的に保持するかまたはそれとハイブリダイズすることが示された。本発明の方法および組成物は、蛍光標識された核酸プローブであって、16S rRNA配列とハイブリダイズするものを用いて、以下の属のなかで識別する：Nitrosomonas、NitrobacterおよびNitrosovibrio sp.。各々の種は、そのrRNA遺伝子の可変領域の中に特異的なDNA配列を有する。そのrRNAは、天然に増幅され、しばしば1細胞あたり数千コピーで存在することから、それらは、高度の感度を提供し、多くの適用における増幅の必要性を排除する。

【0030】

本発明は、環境サンプルからの生物の同定を、現在利用可能であるものよりもより迅速かつより経済的なアプローチにおいて容易にする。さらに、公知のおよび新たに発見された微生物の分類学的状態に関して情報に富む新たな種が発見され得る。

【0031】

遺伝子における変異についての本発明の診断アッセイは、以下の工程を包含す

る。

【0032】

a. その変異を有する遺伝子にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含むカスタマイズされたオリゴヌクレオチドマイクロチップバイオセンサーを設計する工程であって、特定の課題に回答するためにどのオリゴヌクレオチドがそのサンプル中に存在するかに依存して、パターンが生じるように、このオリゴヌクレオチドがそのマイクロチップに位置付けされる、工程；

b. そのマイクロチップに対してその核酸のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、そのカスタマイズしたオリゴヌクレオチドマイクロチップバイオセンサに核酸サンプルを接触させる工程；ならびに

c. ハイブリダイゼーションのパターンを決定し、該パターンから、特定の核酸配列の存在が推測され、そしてその特定の課題に回答がされる、工程。

【0033】

遺伝子疾患についての診断アッセイのために、DNAの配列分析を、オリゴヌクレオチドアレイマイクロチップを用いて、PCR増幅されたDNAまたはそのRNA転写物のハイブリダイゼーションによって行う。対立遺伝子特異的に固定したオリゴヌクレオチドを含むポリアクリルアミドゲルパッドをマイクロチップのガラススライド上に固定する。PCR増幅されたゲノムDNAのRNA転写物を必要に応じて酵素または化学的方法によって蛍光標識し、そしてそのマイクロチップとハイブリダイズさせる。野外において、化学的方法が好ましい。なぜなら、結果がより迅速に入手されるからであり、そしてそのサンプルに必要ないくつかの化学物質は、同時にDNAをフラグメントするからである。

【0034】

融解曲線実験を行う場合、適合するオリゴおよびミスマッチのオリゴの両方を、ゲルパッドに固定し得、そして適合する核酸およびミスマッチの核酸の両方を、そのサンプル中に存在させ得る。このバイオチップは以下の2つの実施形態において再使用可能である：a) そのサンプルまたは試験核酸は、除去され得るかそのチップから剥がされ得、そして異なる試験サンプルが導入され得る、ならびに2) さらなる洗浄を行うことなく同じ融点曲線実験を行い得、そして再度実行

し得る。

【0035】

実験を異なる試験サンプルとともに行う場合、そのもとのサンプルをそのチップから、滅菌水を60℃での1時間（から一晩まで）のインキュベーション用いた洗浄または剥がし手順によって、除去する。その融点曲線実験が繰り返される場合（または再使用される場合）、その同じサンプルをそのチップと接触したままにし、そして種々の温度（通常、0℃～50℃）でハイブリダイゼーションシグナルの消失が観察される。

【0036】

そのチップがインキュベートされる場合、サンプルヌクレオチドを除去するために、実質的に固定されたオリゴのいずれもそのプロセスでは除去されない。なぜなら、これは、オリゴが、マイクロチップを構成するゲルパッドのゲルマトリクスに共有結合しているからである。

【0037】

異なるサンプルが10の連続する除去の後に適用されるチップの反復される再使用は、通常50回の使用に限定される。なぜなら、非特異的またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションシグナルが最終的に、ミスマッチハイブリダイゼーションシグナルの10分の1を超えるからである。チップが再使用される条件（50回まで）は、殆ど存在しない。そのような条件としては、そのチップを-20℃に冷却させること、またはそのチップが70℃を超える（これは、そのチップの分解を引き起こし、したがってチップが不安定になることが示されている）までに加熱される実験を行うことが挙げられる。

【0038】

オリゴヌクレオチドアレイ全体におけるハイブリダイゼーションおよび融解曲線のリアルタイムでの同時測定を、CCDカメラまたは特定のレーザスキャナを装着したレーザー光源を有する蛍光顕微鏡を用いて行う。ある人は、乾燥マイクロチップでしか研究していない。異なる安定性およびAT含量との二重鎖についてハイブリダイゼーション特異性をモニターすることは、融解曲線上での最適識別温度でその測定を行うことによって増強される。マイクロチップ診断は、適切

な対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを、重複オリゴマーのセットのなかから選択することによって最適化される。変異検出の精度は、正常および変異された対立遺伝子の少なくとも2つの異なる標識されたサンプルを有するマイクロチップの同時ハイブリダイゼーションによって、および複数波長蛍光顕微鏡を用いたそのハイブリダイゼーションを並行モニターすることによって増強され得る。配列分析の効率および信頼性は、 β サラセミア変異およびHLA多型の診断によって実証されている。遺伝子発現のレベルを決定することも、本発明の局面である。

【0039】

本発明の方法は、ハイブリダイゼーションの単純な手順しか必要とせず、かつ、1回のみのハイブリダイゼーションが必要であることから、これは迅速かつ安価である。本発明は、多数の情報を1回の実験から得ることを、数百ものデータ点の分析に比較して単純なパターンで可能にすることから、本発明は効率を増加させる。本発明は信頼性が高い。なぜなら、マイクロチップが再使用可能であるからである。固定されたオリゴヌクレオチドは、洗浄されない。ハイブリダイゼーションプローブのむだもない。したがって、そのマイクロチップハイブリダイゼーションは、安価でかつ比放射性同位体検出は、すべての手順を単純化する。

【0040】

かなり短めのマイクロチップ固定されたオリゴヌクレオチドとプローブとのハイブリダイゼーションによる効率的かつ正確な配列分析は、多くの因子に依存する。主要な因子は、ミスマッチを含む二重鎖からの完全な二重鎖の識別性の信頼性、ATリッチおよびGCリッチの二重鎖の安定性における相違、そのハイブリダイゼーションの効率、およびハイブリダイゼーションについて標識されたサンプルの調製における単純性である。

【0041】

塩基改変の同定は、オリゴヌクレオチドアレイ全体において形成される二重鎖の融解曲線の並行測定によって、ならびに2つの波長で2つの異なる標識されたサンプルの同時ハイブリダイゼーションおよび適切な対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドの選択によって顕著に改善される。

【0042】

本発明の動作のために考慮すべき他の因子としては、以下が挙げられる：（１）ハイブリダイゼーションの間に、マイクロチップ上に試験されるサンプルを含む流体の流れを性著すること；および（２）ゲル層および上部流体層に隣接させて冷却および加熱装置に置くことによって、異なる様式で、マイクロチップゲル層および流体層の温度を制御すること。このゲル層温度は、そのゲルのガラスプレート基板に装着した加熱／冷却デバイスによって均一または勾配の様式で制御される。野外研究のために、特定の課題について最適な温度は、研究室において予め決定される。

【0043】

「カスタマイズされたマイクロチップ」の定義は、支持体上のゲルエレメントのマイクロチップである。ここで、そのオリゴヌクレオチドは、順序付けされたスキームに従ってゲルエレメントに固定される。その結果、複数ビットの情報が、複数の課題に回答するようにより単純なパターンに従って順序付けされる。

【0044】

試験またはサンプルの核酸の、マイクロチップからの除去は、滅菌水を用いて少なくとも１時間（一晩まで）60℃で実施されるインキュベーション工程によって達成される。（この手順は、サザンブロットをプロービングする標準的な技術における再使用のためにフィルターを「剥がす（ストリップ）」工程に類似する）。ゲルマトリクスにおける固定されたオリゴヌクレオチドは、そのオリゴヌクレオチドが、ゲル支持体に共有結合しているときにはこのインキュベーションによっては除去されない。

【0045】

（好ましい実施形態の説明）

本発明は、カスタマイズされたオリゴヌクレオチドマイクロチップを、環境、食品および生物学的サンプル中での異なる遺伝子、生物および個体について特異的な核酸の検出および同定についてのバイオセンサとして用いることに関する。

「環境」とは、水、空気および土壌を包含する。核酸における配列の検出を使用して、サンプル中の微生物を同定し、遺伝的欠損または多型を診断し、遺伝子発

現を検出し、そして法医学研究を行う。

【0046】

本発明のマイクロチップ中の個々のゲルエレメントとのハイブリダイゼーションからの信号によって生成されるパターンを検出するための手段としては、以下が挙げられる：レーザスキャナ（例えば、レーザ「銃」（例えば、バーコードを走査するために用いられる））、蛍光顕微鏡に取り付けられたCCDカメラ。野外では、肉眼またはスキャナが使用される。

【0047】

本発明は、マイクロチップ上に固定されたオリゴヌクレオチドの意図的かつ情報性の配置に関する。その結果、試験サンプル中のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの際に、パターンが生成され、これは、適切な手段を用いて解釈され得る。ハイブリダイゼーションは、文字（図12）、デザインまたはバーコードのパターン（図13）によって検出され得る。ここで、カラム「1」および「3」は、黒い棒であり、これは、病原体の存在を示す。そして、「1」における特定の病原体は、異なる「3」におけるものからの異なる炭疽菌種である。カラムにおけるオリゴヌクレオチドの1つの型のすべてを固定することによって、例えば、そのパターンは、線形カラムとして容易に検出され、これは、単純な小さなゲルエレメント（単数または複数）におけるハイブリダイゼーションを検出すること（このことは、それを検出するために顕微鏡を必要とし、そして分析するためにコンピュータプログラムを必要とする）とは対照的である。

【0048】

核酸ハイブリダイゼーションは、非常に特異的であり、そして高感度の手順であり、そして特定の配列が、生物のゲノム中の数百万の他の配列から検出および同定されることを可能にする。しかし、核酸ハイブリダイゼーションは、有用であるが、非常に煩雑な手順である。この欠点は、異なる微生物についてオリゴヌクレオチドマイクロチップをバイオセンサとして用いることによって克服され得る。数 mm^2 または cm^2 のある小さな領域内に、リボゾームDNAまたは他の特異的な核酸に対して特異的である数百および数千～数十万の合成オリゴヌクレオチドプローブが固定される。引き続き、DNAまたはRNAの分子の、マイクロ

チップへのハイブリダイゼーションは、サンプル中で同定されるべきオリゴヌクレオチドの選択を可能にする。数百または数千の個々のハイブリダイゼーションを解釈することが必要である代わりに、ハイブリダイゼーションによって生成される比較的単純なパターンが分析される。

【0049】

細菌アッセイについて、純粋な培養微生物、精製された標的核酸または合成オリゴヌクレオチドでさえ、内部標準として有用であり、これは、核酸単離の効率または回収された標的核酸の絶対量を見積もる働きをする。

【0050】

カスタマイズされたオリゴヌクレオチドマイクロチップは、予備構成されたオリゴヌクレオチドの化学的固定、またはマイクロチップ上へのオリゴヌクレオチドの直接合成によって生成される。マイクロチップは、比較的長いオリゴヌクレオチドを含むが、前者の方法は、選択されるべき方法である。なぜなら、固定の前に、オリゴヌクレオチドが精製され、そして品質についてチェックされるからである。

【0051】

マイクロチップの製造、蛍光標識されたDNAまたはRNAとマイクロチップとのハイブリダイゼーション、およびCCDカメラ、コンピュータおよび適切なソフトウェアを備えた蛍光顕微鏡を用いたハイブリダイゼーションのモニタリングのための方法および技術が開発されている（米国特許第5,552,270号を参照のこと。これは、本明細書において参考として援用される）。

【0052】

オリゴヌクレオチドマイクロチップは、一般に $40 \times 40 \times 20 \mu\text{m}$ およびそれより大きいサイズの多くのポリアクリルアミドゲルパッドエレメントからなる。このエレメントは、ガラス表面に化学的に固定化される。各マイクロチップゲルエレメントは、共有結合を介して固定化される特定のプレ合成オリゴヌクレオチドを含有する。数百および数千もの異なる固定化オリゴヌクレオチドを含む数百ものマイクロチップは、特別に考案されたロボットによって製造され得る。ゲルアレイはまた、オリゴヌクレオチドアレイのインサイチュ合成を用いるフォー

マットを超えるいくつかの利点を提供する。合成オリゴヌクレオチドはマイクロチップ上の固定化の前にゲル電気泳動またはHPLCによって精製される。これは、オリゴヌクレオチドの純度の厳密な質的制御を提供し、そして高い特異性を確実にする。ポリアクリルアミドゲル支持体は、 $100 \times 100 \times 20 \mu\text{m}$ ゲルパッド当たり $0.03 \text{ pmol} \sim 10 \text{ pmol}$ までの固定化されたオリゴヌクレオチドの収容能を有する。これは、改善された定量化、および完全な二重鎖とミスマッチな二重鎖との間のより良好な識別を提供する。それはまた、ハイブリダイゼーションシグナル強度の差異を標準化する方法を提供する。

【0053】

ハイブリダイゼーションによる配列決定のためのオリゴヌクレオチドマイクロチップ技術は、任意のタイプのサンプル中の微生物の存在を同定するか、または新規な種を見出すために利用可能である。本明細書中の実施例において示されるように、特定のオリゴヌクレオチドプローブに対する、非常に複雑な混合物から抽出されたDNAまたはRNAのハイブリダイゼーションは、微生物の曖昧な同定を生じた。リボソーム16S rRNAの小サブユニットをコードする遺伝子についての微生物のヌクレオチド配列は、マイクロチップバイオセンサーのための基盤を形成する。遺伝子の直接配列決定の代わりに、微生物について特異的なオリゴヌクレオチドとのDNAサンプルまたはRNAサンプルのハイブリダイゼーション分析が実施される。この新規な技術は、効率的な微生物分析および環境モニタリングを提供する。微生物由来の蛍光標識したDNAおよびRNAのサンプルが、いくつかの微生物について特異的なオリゴヌクレオチドを含有するマイクロチップとハイブリダイズされる。これらの微生物は、マイクロチップハイブリダイゼーションパターンによって信頼性をもって同定される。微生物バイオセンサー技術が開発され、再利用可能にカスタマイズされた微生物オリゴヌクレオチドマイクロチップが本発明の方法によって生成され、そしてサンプル中の数百および数1000もの微生物の同時の量的および質的マイクロチップ分析のため、および新規な微生物の発見のための方法が、開発される。

【0054】

(実施例)

以下の実施例を、本発明の限定ではなくむしろ、本発明の局面の例示として示す。他の適用としては、遺伝的変異（例えば、ヘモグロビン障害に特徴的な変異）の検出；遺伝的多型（例えば、HLA）の検出；遺伝子発現の調査；疾患の原因因子の検出；法医学的研究；および微生物汚染物質の検出が挙げられる。

【0055】

（実施例1：オリゴヌクレオチドマイクロチップバイオセンサーの調製）

オリゴヌクレオチドを、394 DNA/RNA合成機（Applied Biosystems）を用いて合成する。固定化のためのオリゴヌクレオチドの合成は、3'末端位置で3-メチルウリジンを用いて開始した。

【0056】

1つの実施形態では、蛍光標識RNAを、T7 RNAポリメラーゼを用いて調製した。インビトロ転写のための鋳型DNA（133bp長および75bp長）をネストプライマーT7-V2L-45、5'-GGAATTCCTAATACGACTCACTATAGGG ACACCATGGTGCACCTGACTCC-3'（配列番号5）ならびに共通逆方向プライマーT7-V2L-103 5'-GGAATTCCTAATACGACTCACTATAGGGAGGTGAACGTGGATGAAGTTGG-3'（配列番号16）および5'-TCTCCTTAAACCTGTCTTGTAACC-3'（配列番号17）を用いるPCR増幅によって調製した。QIAquick PCR精製キット（QIAGEN）を製造者のプロトコルに従って用いて鋳型を精製した。RNAポリメラーゼ反応を、MEGAshortscript™ T7キット（Ambion）をフルオレセイン12-UTP（Molecular Probes）と共に用いて実施した。蛍光標識ssDNA（一本鎖DNA）フラグメントを、シングルプライマー再増幅によって調製した。

【0057】

ポリアクリルアミドゲル微小マトリックスを、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0中の4%アクリルアミド（アクリルアミド/ビスアクリルアミド19/1）、40%グリセロール、0.0002%メチレンブルー、および0.012%TEMEDの溶液の光重合によって調製した。この混合物を、UV光

で照射した組み立てられた重合チャンバーに適用した。

【0058】

2つのタイプのマイクロチップマトリクス（微小マトリックス（*micromatrix*））を、 $120\mu\text{m}$ および $220\mu\text{m}$ 間隔でそれぞれ置かれた、約 $60\times 60\times 20\mu\text{m}$ および約 $100\times 100\times 20\mu\text{m}$ のゲルパッドエレメントを用いて慣用的に調製した。約 1nl の活性化オリゴヌクレオチド溶液を、ロボットまたは簡単な手動デバイスのいずれかを用いてゲルエレメントに移した。

【0059】

このデバイスは、顕微操作ホルダー、電源、および冷却循環器と共に、両眼レンズ下に配置されたペルチェサーモスタットピンを備える。

【0060】

ゲル固定化オリゴヌクレオチドのマイクロチップの製造は、基本的に、以下の三工程からなる：ゲル微小マトリックス上に所望の位相幾何学のオリゴヌクレオチドを成形する工程；微小マトリックスにマイクロ容量（*microvolume*）のオリゴヌクレオチド溶液をロードする工程；およびゲル内に活性な3'末端または5'末端のアルデヒド基またはアミン基を含むオリゴヌクレオチドを固定化する工程。

【0061】

隣接するゲルパッド上に適用された異なるオリゴヌクレオチド溶液の交換を避けるために、パッドを、疎水性ガラス表面によって微小マトリックス上で分離させる。二次元スクライビングまたはレーザー蒸着（*laser evaporation*）を、微小マトリックス調製のために使用するが、これらの手順は、やや複雑な装置および熟練者を必要とする。光重合法は、これらの手順を著しく簡易化し、そして生化学研究室に対しても利用しやすいものとする。

【0062】

マスク指向性光重合による微小製作（例えば、マイクロエレクトロニクスにおけるフォトリソ法）は十分に開発された技術である。試験したいいくつかのアクリルアミド光重合技術から、修飾メチレンブルー誘導光重合が、微小マトリックス製造にとって最良の結果を生じた。ゲルマトリックスは、スライドガラス上に

光重合されたゲルパッドからなる。ゲルパッドは、不透明なグリッドによって被覆された場所には光重合が生じないため、マスク位相幾何学に従って形成される。

【0063】

マイクロチップは、活性化されたオリゴヌクレオチドの溶液を、活性なヒドロジド基またはアルデヒド基を含むゲルエレメントの微小マトリックス上に適用することにより製造される。微小マトリックス上に100までの異なるオリゴヌクレオチドを手動でロードするための簡易なデバイスが存在する。転移は、ピンの親水性上部表面によって実施される。この表面をまずオリゴヌクレオチド溶液中に浸漬して濡らし、次いで溶液から取り出してゲル表面と接触させる。これは、約1 n l のオリゴヌクレオチド溶液を±10%の再現性でもって転移させる。転移の過程でこのマイクロ容量溶液の蒸発を避けるために、ピンの温度を外気の露点近くに維持する。

【0064】

オリゴヌクレオチドを、ハイブリダイゼーションパターンデータが容易に判読可能なパターンになるデザインに従って配置する。

【0065】

(実施例2：ハイブリダイゼーション緩衝液を用いるDNAおよびRNAとのマイクロチップのハイブリダイゼーション)

蛍光標識DNAまたはRNA (5 μ l、0.1~1 pmol/ μ l) を、pH 7.0で1M NaCl、1mM EDTA、1% Tween-20、および10mMリン酸ナトリウムを含有するハイブリダイゼーション緩衝液中で+5℃で、約2~24時間の間、マイクロチップにハイブリダイズさせた。マイクロチップを、300 μ m上方にあるようにカバーガラスまたはテフロン（登録商標）シートで覆った。次いで、DNAまたはRNAフラグメントを含有するハイブリダイゼーション溶液を、10 μ l の冷却ハイブリダイゼーション緩衝液と置き換えた。カバーガラスを有するマイクロチップを熱に安定な台上に配置した。CCDカメラおよび適切なソフトウェアを備えた、4×4mmの観察視野を有する特別設計の多色エピ蛍光顕微鏡 (specially constructed m

ulticolor epifluorescent microscope)

を用いて、ハイブリダイゼーションを量的にモニタリングした。

【0066】

(実施例3：融解曲線の分析；ハイブリダイゼーション緩衝液を必要としない)

マイクロチップ上で使用されるポリアクリルアミドゲルは、二次元ガラス表面よりも、100倍以上高い、オリゴヌクレオチドの三次元固定化能を提供する。高濃度の固定化オリゴヌクレオチドは、ミスマッチの二重鎖の識別を容易にし、そしてマイクロチップにおける測定感度を増強する。このことは、レーザー走査システム(Lipshutzら、1995)よりも感度が低いけれども、CCDカメラ装備蛍光顕微鏡(Yershovら、1996)の使用を可能にする。しかし、これは、融解曲線の測定のためにリアルタイムで異なる温度でマイクロチップ上でのハイブリダイゼーションをモニタリングするという利点を提供する。融解曲線は、温度に対して二重鎖の量[蛍光強度]をプロットすることにより作成されるものとして、本明細書中では定義する。手順、ソフトウェア、およびハイブリダイゼーションマイクロチャンバー(Yershovら、1996)は全て、全てのマイクロチップオリゴヌクレオチドとのプローブのハイブリダイゼーションの際に形成される完全な二重鎖およびミスマッチの二重鎖について、同時に広範囲の温度で融解曲線を記録するために開発されている。

【0067】

著しい量の時間が、やや長いRNAまたはDNAプローブとハイブリダイズしたマイクロチップが平衡に達するために必要とされる。従って、非平衡解離融解曲線を測定した。しかし、加熱速度におけるいくつかの差異が結果に著しくは影響しなかった場合、これら曲線は平衡からあまり離れていない。例えば、合成19マーのマイクロチップオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションについての融解曲線は、非平衡RNAおよびDNA融解曲線を測定するために使用したのと同じ条件下で平衡に達した。融解曲線はまた、内部標準物を試験サンプルに添加する場合、平衡から離れた数分後に測定され得る。この標準物は、通常の対立遺伝子の異なって標識されたRNAであり得る。これは、核酸塩基変更の同定

を著しく促進する。

【0068】

(実施例4：非平衡ハイブリダイゼーションのための至適融解温度の選択)

本発明は、ゲル固定化ヌクレオチドのアレイ（マイクロチップ）と試験される未知のヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションが至適な識別融解温度で測定される SHOM 技術の改善を具現化する。この改善は、オリゴヌクレオチドアレイ全体におけるハイブリダイゼーションにより形成された二重鎖の融解曲線の並行測定、ならびに異なる蛍光色素で標識したヌクレオチドの2つのサンプルの同時ハイブリダイゼーションをモニタリングすること、および固定化プローブとしての適切な対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドの慎重な選択によって達成される。標識のために選択された蛍光色素は、十分に異なる波長の光を発光する。これら両方のタイプの標識は同じ反応混合物中で測定され得る。

【0069】

完全な二重鎖およびミスマッチの二重鎖との間の最大の識別は、完全な二重鎖からのハイブリダイゼーションシグナルの強度がその開始値の10分の1になった温度で達成され；そのような温度で、通常、ミスマッチの二重鎖からのハイブリダイゼーション強度は、バックグラウンドレベルに近づいた。ハイブリダイゼーションの開始シグナルが10分の1になる温度を、識別温度（ T_d ）と称する。

【0070】

本明細書の実施例6に記載のような β サラセミアの変異の検出の場合：（1）PCR増幅DNAのRNA転写物を固定化オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせた；（2）完全な40%GCリッチ二重鎖および70%GCリッチ二重鎖の T_d 値はそれぞれ52°および64°であった；（図1Aおよび図1Bにおける曲線1および3）；（3）固定化オリゴヌクレオチドを、1セットの重複配列の間から選択した；および（4）反応混合物中に含まれる2つのサンプルは、1つの蛍光色素で標識された変異対立遺伝子RNAと、異なる蛍光色素で標識された正常な対立遺伝子RNAのサンプルであった。

【0071】

T_d は、対立遺伝子DNAが利用可能である場合、RNAサンプルとのハイブリダイゼーションによって決定される。このようなDNAが利用可能でない場合、 T_d は、目的の変異対立遺伝子に対応する合成オリゴヌクレオチドを用いて実施された実験から生じるハイブリダイゼーションデータから測定され得る。

【0072】

完全な二重鎖およびミスマッチの二重鎖についての解離曲線は、半対数スケールでプロットされた場合、約 10° の範囲（曲線の中央部）で並行である。この 10°C 範囲では、完全な二重鎖とミスマッチの二重鎖とについてのシグナルの割合は、やや一定である。このことは、識別の手順を、 T_d を決定することにおけるいくらかの不正確さに対して頑強にする。この識別温度は、実験毎に変動し得る実験条件（加熱速度、イオン強度、プローブ濃度、断片化の程度など）に依存する。しかし、これらの変動は、マイクロチップエレメント全部について同様の程度で T_d およびハイブリダイゼーションシグナルの相対的強度に影響するわけではなく、従って、識別を著しくゆがめるものではない。従って、参照 T_d を提供するために、オリゴヌクレオチドCD26 (N) およびCD26 G/A（これらはそれぞれ、全ての試験したRNAと完全な二重鎖およびミスマッチの二重鎖を形成する）をマイクロチップに導入した。

【0073】

T_d が測定におけるいくらかの不正確さに対して頑強であるので、19マーのオリゴデオキシヌクレオチドを、これらの実験において、より高価な19マーオリゴリボヌクレオチドの代わりに使用した。DNA-RNAヘテロ二重鎖に対してDNA-DNAホモ二重鎖の安定性には差異がある（LesnikおよびFreier、1995）。患者由来のRNAとの、および19マーとのマイクロチップのハイブリダイゼーションのパターンは、10マーからののにやや類似していた。対応する合成オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションは、変異が、診断マイクロチップとのそのハイブリダイゼーションによってRNAサンプル中に同定される場合、コントロールとして好ましい。

【0074】

蛍光標識RNAサンプルの混合物を2人の患者から調製した；第1のサンプル

は、 β グロビン対立遺伝子の正常CD26領域にホモ接合性である患者由来のTMP標識RNAであった；第2のサンプルは、正常CD26領域および変異CD26G/A対立遺伝子にヘテロ接合性である患者由来のTMP標識RNAである。この混合物を、以下の固定化されたオリゴヌクレオチドを含む2つのマイクロチップエレメントからなるマイクロチップとハイブリダイズさせた。

【0075】

【表7】

	<u>配列</u>
Aサンプル(エレメント)-CD26(N-正常)	5'-GGCCT <u>C</u> ACCA-3MeU-3' (配列番号1)
Bサンプル(エレメント)-CD26(G/A-変異)	5'-GGCCT <u>I</u> ACCA-3MeU-3' (配列番号2)

【0076】

シグナルの位置決め (registration) の間に異なるフィルターを使用することにより、サンプル（これらは、マイクロチップの同じエレメントにおいて異なる色素 (TMP (赤) およびフルオレセイン (緑)) で標識した) の独立した同時の位置決めを可能にした。図2は、サンプル1とAマイクロチップエレメントとの相互作用を示す；グラフ2は、サンプル2とAマイクロチップエレメントとの相互作用を示す；グラフ3は、サンプル2とBマイクロチップエレメントとの相互作用を示す；そしてグラフ4は、サンプル1とBマイクロチップエレメントとの相互作用を示す。

【0077】

(実施例5：硝化微生物を同定するためにカスタマイズされたマイクロチップマトリクスバイオセンサーの使用)

本実施例における結果は、以前に利用可能な方法 (非平衡融解曲線ではない) を用いて得た。ニトロ芳香族化合物を分解する微生物としては、Pseudomonas (Pseudomonas)、Arthrobacter、Nocardia、Mycobacterium、および真菌類が挙げられる。

【0078】

以前には、これらの細菌を検出するための方法は、冗漫であり、かつ不正確であった。例えば、ニトロ芳香族化合物を分解し得る *Pseudomonas* を検出するために、2-ニトロトルエン (nitrotoluene) を、単独の炭素、エネルギーおよび窒素供給源として試験した。試験を実施するために土壌サンプルから細菌を単離することは難しかった。

【0079】

硝化細菌は、それらの長い生成時間および乏しい計数効率のために、最確数 (MPN) および選択的プレーティングのような培養技術を用いて研究するには、特に困難であることが分かった。従って、硝化菌 (nitrifier) の迅速な、そして培養に依存しない計数技術は、それらの生態系における調査を大いに促進し得た。

【0080】

ガラス表面上に固定化され、そして15~20塩基長の10のオリゴヌクレオチドのセットを含む、100×100×20 μmゲルパッド (あるいは100×100×20 μm) を有するマイクロチップを、細菌分類実験のために製造した。このセットは、16SリボソームRNAの異なる領域に相補的なオリゴヌクレオチドを含んだ。rRNAは、天然に増幅され、そしてしばしば1細胞当たり数千ものコピーで存在するので、それらは、高い感度を提供し、そして多くの適用における増幅についての必要性を除去する。1つのオリゴヌクレオチドは、ほとんどの生存生物において代表され、別のは細菌のほとんどのに代表的であり、そして残りは、ニトロソ (硝化) 細菌のみに属する。ニトロソ細菌オリゴヌクレオチドの群は、硝酸菌に代表的な2つのオリゴヌクレオチド、ニトロソモナス (*nitrosomonas*) に代表的な2つ、およびニトロソビブリオ菌 (*nitrosovibrio*) に代表的な1つからなる。1つのオリゴヌクレオチドは、ゲノムまたはcDNAからPCR増幅されたりリボソームdsDNAとのハイブリダイゼーションのためのrDNAのアンチセンス鎖に相補的であった。

【0081】

順序付けられたオリゴヌクレオチドローディング (チップ上に配置すること) のための以下のスキームは、細菌 (または生物、種) 分類のために有用である。

表1に示す微小マトリックス設計において、第1のオリゴヌクレオチドは、最も高い順序（order）を特徴付ける（すなわち、生存生物を識別するため）。

[Uni 1390-C I I I]。この順序を段階ごとに最も低いレベルにまで落とすこと（すなわち、科から、属へ、さらに種へ）は、調査されるサンプル中に存在するオリゴヌクレオチドのさらなる識別を提供する。例えば、硝化細菌を類別するために用いるオリゴヌクレオチドについては、細菌オリゴヌクレオチドが、次の位置にある。[Bac 338-C I および NonBac 338-C I I]。硝酸菌に特異的なオリゴヌクレオチド [Nb 1000-A I および N I T 3-A I I] およびアンモニア酸化体（oxidizer）に特異的なオリゴヌクレオチド [NEU 32または23?-A I I I、Nso 190-A I V および Nso 1225-B I] が、任意の順序で続く。最後に、ニトロソモナスに特異的なオリゴヌクレオチド [Nsa I 56-B I I] およびニトロソビブリオ菌に特異的なオリゴヌクレオチド [Nsv 443-B I I I] は、微小マトリックス設計を補完する。

【0082】

3つの異なる rRNA 調製物（細胞RNAのフェノール抽出物、精製リボソームから単離されたRNA、およびクローニングされたリボソームDNAのインビトロ転写物）、および共に断片化された二本鎖DNAおよび一本鎖DNAを用いてマイクロチップを評価した。マイクロチップ耐久能を増強し、そしてRNA分解を減少させるために、ハイブリダイゼーションを低温のホルムアミド緩衝液中で行った。全てのDNAおよびRNA調製物が使用され得るが、最良の識別は、本研究で評価したハイブリダイゼーション条件を用いて、インビトロ転写 rRNA について観察された。

【0083】

微生物マイクロチップのハイブリダイゼーションを、標的核酸の5つの異なる調製物を用いて実施した。リボソームRNAおよび総RNAを細胞から回収した。インビトロで転写したRNA、ならびに一本鎖および二本鎖のPCR増幅16S rDNAを、クローニングされた16S rRNA遺伝子を含むプラスミドから得た。これらのサンプルタイプの全てが、マイクロチップ固定化オリゴヌク

レオチドとのそれらのハイブリダイゼーションによる微生物の比較的信頼性のあ
る同定を提供し、そしてそれらは、異なる目的のために使用され得た。例えば、
rRNAは、天然に増幅された標的を提供する。また、細胞リボソーム含有量は
、増殖速度と共に変動することが周知であるので、一般に、rRNAの直接的な
定量がより活性な環境集団を同定するように働くと考えられる。対して、PCR
増幅rDNAの分析は、サンプル中に存在する全ての微生物のより一般的な測定
を提供する。あるいは、これらの測定は、組み合わせられ得た。例えば、環境サン
プルのRNAおよびDNA成分が単離され、そして異なる蛍光色素で標識され得
た。それらの組み合わせハイブリダイゼーション後、個々のゲルエレメントにハ
イブリダイズするRNAおよびDNAの得られた比は、対応する微生物集団の生
理学的状態を推測するために使用され得た。

【0084】

表2は、オリゴヌクレオチドの配列およびそれらの他の特徴を示す。

【0085】

【表8】

表 1
硝化微生物のための微小マトリックス設計

	I	II	III	IV
A	Nb1000	NIT3		Nso190
B	Nso1225	Nsm156	Nsv443	
C	Bac338	NonBac338	Uni1390	

【0086】

【表9】

表 2

オリゴヌクレオチド の名称が位置	配列 (5' to 3')	特異性	マイクロチップ 位置 表 1	T _d °C
Nb1000	5'-tgc gac cgg tca tgg-3' (SEQ ID NO: 6)	<i>Nitrobacter</i>	A-I	42°
NIT3	5'-cct ggc ctc cat gct cgg-3' (SEQ ID NO: 7)	<i>Nitrobacter</i>	A-II	66°
NEU23	5'-ccc ctc tgc tgc aca cta-3' (SEQ ID NO: 8)	アンモニア酸化体	A-III	66°
NSO190	5'-cga tcc cct gct ttt cta-3' (SEQ ID NO: 9)	アンモニア酸化体	A-IV	62°
NSO1225	5'-cgc gat tgt att acg tgg gga-3' (SEQ ID NO: 10)	アンモニア酸化体	B-I	51°
NSMO156	5'-tat tag cac att ttt cga t-3' (SEQ ID NO: 11)	<i>Nitrosomonas</i>	B-II	46°
NSV443	5'-cgg tga cgg ttt cgt tcc-3' (SEQ ID NO: 12)	<i>Nitrospirochaeta</i>	B-III	52°
BAC318	5'-gct gcc tcc cgt agc gat-3' (SEQ ID NO: 13)	細菌	C-I	54°
NonBAC338	5'-act cct acg gga ggc agc-3' (SEQ ID NO: 14)	Eub338 相補鎖	C-II	54°
URN1390	5'-gac ggg cgg tgt gta caa-3' (SEQ ID NO: 15)	全ての生物体(少しの例外を有する)	C-III	44°

実験的に決定した
in situ ハイブリダイゼーションから評価した。

【0087】

多数のハイブリダイゼーション条件を、ハイブリダイゼーションの効率および特異性について、試験した。低温でのホルムアミド含有緩衝液中のハイブリダイゼーションは、良好な結果を与えた。33%ホルムアミド中、5°Cで、ハイブリダイゼーションを行った。RNAサンプルおよび、オリゴヌクレオチドと支持体との共有結合（従って、マイクロチップの耐久能）は、低温でより安定である。さらに、これらの条件は、RNA安定性および約0～5°Cの低温での他のRNA分子に類似のマイクロチップ耐久能の観点から望ましかった。

【0088】

微生物マイクロチップにおけるハイブリダイゼーションを、異なるニトロソ細

菌の16S rDNAのインビトロのRNA転写物、総RNA抽出物、および*E. coli*および*Desulfovibrio vulgaris*から抽出されたりボソームRNA、ならびに16S rDNAのPCR増幅二本鎖または一本鎖DNAを用いて実施した。

【0089】

アンモニア酸化細菌についてのプローブは、異なる条件下で異なる識別特異性を示す。図3は、*Nitrosovibrio tenuis* (A)、*Nitrosomonas europaea* (B)、およびインビトロで転写された*E. coli* (C) または単離されたりボソームから回収された*E. coli* (D) の16S rRNAに対するハイブリダイゼーション後のマイクロチップ上の個々のゲルエレメントの蛍光を示す。同じマイクロチップを、蒸留水を用いる洗浄後の各ハイブリダイゼーションのために使用した。各マイクロチップを、20～30までのハイブリダイゼーション実験のために慣用的に使用した。示された全てのゲルエレメントについて、メンブレン支持ハイブリダイゼーションを用いて以前に決定された解離温度 (T_{ds}) における有意差に関わらず、ハイブリダイゼーションの適当なパターンを観察した(表1)。匹敵する安定性のハイブリッドについては、蛍光分析器がリアルタイムでハイブリダイゼーションシグナルをモニタリングし得るので、識別は、一般に、温度上昇(以下に記載)での洗浄により、またはそれらの融解特徴を同時に評価することによって達成される。

【0090】

図4Aおよび4Bは、標的RMA保持に対する洗浄温度上昇の効果を評価する実験の結果を示す。異なる蛍光色素(それぞれフルオレセインおよびテトラメチルローダミン)で標識した*Nitrosovibrio tenuis*および*E. coli* 16S rRNAの混合物を5℃でチップにハイブリダイズさせた。次いで、ハイブリダイゼーション溶液を洗浄緩衝液と置き換え、そして各RNA種の保持を、多色検出を用いて、各々10℃ずつ温度を上昇させた(60℃まで)後測定した。Ns01225(アンモニウム酸化体)、Nsm156(ニトロソモナス)、およびNonBac338(アンチセンス)に対する*E. coli* rRNAの非特異的ハイブリダイゼーションを、10℃洗浄の後に観察した

。しかし、この非特異的ハイブリダイゼーションは、40℃洗浄後に著しく減少した。同様に、*Nitrosovibrio tenuis*の16S rRNAは10℃で*Nitrosomonas* (Nsm156) にハイブリダイズしたが、40℃洗浄後に (NonBac338に比較して) バックグラウンド近くに減少した。本発明の方法を使用すると、ハイブリダイゼーション緩衝液は必要とされない。二重鎖の安定性における差異についてのより完全な矯正は、全てのマイクロチップエレメントについて平衡または非平衡融解曲線を測定することにより実施され得る。これは、個々の二重鎖安定性に影響する種々の因子 (例えば、それらの長さ、GC含量、ならびにRNAおよびDNAにおける二次構造および三次構造との競合を補う基盤を提供する。

【0091】

図4Bは、10℃および40℃の異なるマイクロチップオリゴヌクレオチドとのテトラメチルローダミン標識*E. coli*に対するフルオレセイン標識*Nitrosovibrio tenuis*のハイブリダイゼーション強度の比を示す (この比は、図4Aに示したデータから誘導される)。これらの比は、10℃とよりストリンジェントな条件についての40℃との間で、細菌に特異的なオリゴヌクレオチドおよび全ての生存生物に特異的なオリゴヌクレオチドについて著しく変化しなかった。しかし、この比は、アンモニア酸化体に特異的なオリゴヌクレオチドおよびニトロソビブリオに特異的なオリゴヌクレオチドについて、(10℃に比較して) 40℃で劇的に増加する。これは、*E. coli* RNAに比較して、相補的オリゴヌクレオチドとの*Nitrosovibrio tenuis* RNAのより大きな二重鎖安定性を反映する。ニトロソモナス比は増大するが、各標識RNAから発生するシグナルは、バックグラウンド近くである。この実験は、(細胞から単離されたか、または合成されたかのいずれかである) 第2の色素標識RNAの取り込みが、ハイブリダイゼーションパターンの定量的評価のための内部標準として使用され得たことを示す。

【0092】

異なるゲルエレメントに対する変動するハイブリダイゼーションは、各々が、異なる会合および解離速度論を有する、プローブのアレイを評価するために、1

つのハイブリダイゼーション条件を用いる予期された結果である。いくらかの程度まで、これらの差異は、個々のゲルエレメント中のオリゴヌクレオチドの濃度を変動させることにより標準化され得る。例えば、N s v 4 4 3 (b-I I I) に比較した、N s o 1 2 2 5 (b-I) およびU n i 1 3 9 0 (c-I I I) の比較的低いハイブリダイゼーションシグナルはそれぞれ、ゲルにおいて固定化される対応するオリゴヌクレオチドプローブの量を増加させることにより高められ得た。このアプローチを、いくつかの異なる濃度で（以前に記載の実験において使用した濃度の6倍高い濃度まで）固定化された選択されたプローブを用いてマイクロチップを合成することにより評価した。これは、各ゲルエレメントへの標準ローディング溶液（100 pmol / μ l プローブ）の多重適用によって達成した。N s o 1 2 2 5（アンモニア酸化体）およびN s v 4 4 3（ニトロソビブリオ菌様）の匹敵するハイブリダイゼーションが、N s o 1 2 2 5 プローブの3つの適用後に達成された（図5）。同様に、B a c 3 3 8（細菌）の2つの適用、およびU n i 1 3 9 0（全ての生存物）の5つが、N s v 4 4 3に匹敵するハイブリダイゼーションを生じた。

【0093】

用いた株。E s c h e r i c h i a c o l i、D e s u l f o v i b r i o v u l g a r i s P T 2 株、N i t r o s o v i b r i o t e n u i s N V 1 2 株、N i t r o s o m o n a s e u r o p a e a A T C C 1 9 7 1 9 株、およびN i t r o s o m o n a s C 5 6 株を、これらの実験のための核酸の供給源として使用した。

【0094】

RNA調製。総細胞RNAを、フェノール／クロロホルム抽出によって単離した。サンプルのいくつかについて、リボソーム富化を、RNA抽出の前に実施した。50 ml の対数期増殖E. c o l i またはD. v u l g a r i s P T 2 株を3, 500 g で10分間遠心分離し、そして4℃リボソーム緩衝液4 ml 中に再懸濁した。リボソーム富化緩衝液は、ジエチルピロカルボン酸処理二重蒸留水中20 mM M g C l 2、50 mM K C l、50 mM T r i s (pH 7. 5)、および5 mM β -メルカプトエタノールからなった。細胞懸濁液を、4つ

のネジ蓋微量遠心分離チューブの間で分け、そして0.5gの0.1mm ZrO₂ビーズを加えた。細胞懸濁物を2分間破壊し、氷上に5分間置き、そして2分間再度破壊した。細胞懸濁物を14000gで10分間遠心分離した。上清（リボソームを含む）を回収し、そして超遠心分離チューブに移した。リボソームを、70SのSvedberg沈降因子のために、Beckman Optima Series TLスウィングングバケットローター（Beckman、Fullerton、CA）において55,000rpm（201,000g平均）で50分間リボソーム緩衝液中で超遠心分離によってペレット化した。遠心分離後、上清を捨て、そしてRNAを、pH5.1フェノール／クロロホルムを用いる抽出によってペレット化リボソームから回収した。抽出されたRNAの質および量を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動および臭化エチジウム染色によって評価した。

【0095】

16S rDNAのクローニングおよびRNA転写物のインビトロ生産。DNAを、E. coli、Desulfovibrio vulgaris PT2、Nitrosovibrio tenuis NV12、Nitrosomonas europaea 19718、およびNitrosomonas strain C-56細胞ペーストから、グアニジン／珪藻法を用いて抽出した。完全に近い16S rDNA遺伝子（約1500塩基対）を、プライマーとしてS-D-Bact-0011-a-S-17（GTTTGATCCTGGCTCAG）（配列番号3）およびS-D-Bact-1492-a-A-21（ACGGYTACCTTGTTACGACTT）（配列番号4）、およびプレ混合PCR増幅緩衝液（Pharmacia Biotech Inc. Piscataway、NJ）（0.2mM Mg⁺⁺、2.5mM各dATP、dCTP、dGTP、dTTP、0.2mMの各増幅プライマー、および2.5単位のTaq DNAポリメラーゼ（Pharmacia）からなる）を用いるPCR増幅によって各々から回収した。温度サイクリングを、Idaho Technologyサーモサイクラー（Idaho Falls、ID）において、94℃で15秒、50℃で20秒、および72℃で30秒の30サイクルを用いて行っ

た。PCR産物をpCRプラスミド（Invitrogen、San Diego、CA）中に製造者の説明書に従ってクローニングした。プラスミドを、Wizardキット（Promega、Madison、WI）を用いて単離し、そしてクローニングしたSSU rRNA遺伝子のインビトロ転写のために使用した。

【0096】

DNAオリゴヌクレオチドプローブ。全てのプローブを、SSU rRNAに相補的であり、そしてメンブレンハイブリダイゼーションフォーマットを用いて以前に特徴付けた。5つのプローブは、Proteobacteriaのβ再分割内のアンモニア酸化細菌の異なる群にハイブリダイズする。S-G-Nso-190-b-A-19（Nso190）およびS-G-Nso-1225-a-A-20（Nso1225）は、Proteobacteriaのβサブクラス全ての配列決定されたアンモニア酸化体を包含し、プローブS-G-Nsm-156-a-A-19（Nsm156）は、Nitrosomonas属のメンバー（Nitrosococcus mobilisもまた含む）を同定し、プローブS-G-Nsv-443-a-A-20（Nsv443）はNitrosovibrio/Nitrosolobus/Nitrosospira群に特異的であり、そしてプローブS-G-Nsm-653-a-A-18（NEU23）はNitrosomonasのハロ耐性メンバーに特異的である。Nitrobacter属（亜硝酸酸化）のメンバーについてのプローブは、S-G-Nit-1000-b-A-15（Nb1000）およびS-G-Nit-1035-a-A-18（NIT3）であった。使用した他のプローブは、S-D-Bact-0338-a-A-18（細菌ドメインのメンバーにハイブリダイズする）；S-D-NBac-0338-a-S-18（NonBac338）（Bac338のアンチセンス鎖に相補的である）；およびS*-Univ-1390-a-A-18（Uni1390）（いくつかの原生動物を除いて、ほぼ全ての特徴付けられた生存生物のSSU rRNAに相補的である）であった。

【0097】

RNAおよびDNA標識および断片化。一本鎖DNAを、100倍過剰の順方

向プライマーを用いてAusubelら(1994)に従って非対称PCRによって調製した。簡潔に言えば、DNAを、80%蟻酸中で20℃で30分間、部分的に脱プリン化し、次いで0.5M塩酸エチレンジアミン(pH7.4)中に37℃で3時間、続いて0.1M NaBH₄の存在下で37℃で30分間、インキュベートした。フルオレセインイソチオシアネートを、無水DMSO中室温で1時間のインキュベーションによりフラグメント化したDNA中に取り込んだ。

【0098】

RNAを、塩基加水分解によりフラグメント化し、そしてウシホスファターゼで脱リン酸化した。フラグメント化RNAをNaIO₄により酸化し、そして6-カルボキシフルオロセイン(FAM)スクシンアミドのエチレンジアミン媒介カップリングによるか、またはテトラメチルローダミン(TMR)の直接取り込みによるかのいずれかにより標識した。

【0099】

(マイクロチップの製作) 各々60×60×20 μmまたは100×100×20 μmの寸法、そして20 μmまたは200 μmだけ離れて配置されたガラスに固定化されたゲルエレメントのマトリックスをそれぞれ調製した。このポリアクリルアミドゲルを、いくつかのアミド基を、ヒドラジン水和物の処理によりヒドラジド基での置換により活性化した。オリゴヌクレオチドは、NaIO₄を用いる3'末端3-メチルウリジンを酸化することにより活性化し、ゲルのヒドラジド基とのカップリングのためにジアルデヒド基を生成し、そして特別に考案したロボットを用いて0.5~1 n lの活性化オリゴヌクレオチド溶液(100 pmol/μl)を付与することにより各微小マトリックスエレメントにカップリングした。

【0100】

(ハイブリダイゼーションおよびイメージ分析) プローブ結合は、個々のゲルエレメントに対する蛍光標識されたDNAまたはRNA(テトラメチルローダミンまたはフルオレセイン)の結合により付与される蛍光を測定することにより定量した。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は、あつらえの落射蛍光顕微鏡のス

テージにマウントされたPeltierサーモテーブル（ -5.0°C ～ $+60.0^{\circ}\text{C}$ の作動範囲を備える）を用いて制御およびモニターした。マイクロチップを、 5°C で、一晚または6時間の間、 $2\sim 5\mu\text{l}$ のハイブリダイゼーション緩衝液〔33%ホルムアミド、 0.9M NaCl 、 1mM EDTA 、1%Tween 20、および 50mM リン酸ナトリウム（ $\text{pH}7.0$ ）〕中、 $0.2\sim 2\text{pmol}/\mu\text{l}$ の間のDNAおよびRNAの濃度でハイブリダイズさせた。このハイブリダイゼーション混合物を、顕微鏡観察の直前にホルムアミドを含まない $5\sim 10\mu\text{l}$ のハイブリダイゼーション緩衝液で置換した。シグナル強度に依存して曝露は $0.1\sim 10$ 秒の範囲であったが、代表的には約1秒であった。蛍光は、室温または $5\sim 60^{\circ}\text{C}$ の間の温度の範囲のいずれかを用いてモニターした。

【0101】

微小分子のアクリルアミドゲルへのカップリングの条件を考案し、固定化の間の液体蒸発の可能性を解除し、そしてオリゴヌクレオチドのゲルマトリックスとの共有結合が進行して終わることを確実にした。オリゴヌクレオチド溶液の微小容量がマトリックスのすべての細胞に付与された後、この微小マトリックスゲルエレメントを、周囲空気からの水を凝縮することにより膨潤させた。次いで、微小マトリックス表面を、不活性非発光オイルの薄層で覆い、そして活性化オリゴヌクレオチドの活性化ポリアクリルアミドへの化学的カップリングを実施して終了した。

【0102】

（実施例6：診断アッセイとしてのマイクロチップバイオセンサの使用）

このマイクロチップ技術を、ヒトゲノム疾患の信頼性のある診断のために、ゲノムDNAおよびRNA中の1塩基変化の同定のために首尾良く試験した。特製のマイクロチップは、 β サラセミア正常および異常 β グロビン遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドを含んでいた。被験体のゲノムDNA由来の、PCR増幅したDNAまたはRNAサンプルとのハイブリダイゼーションは、試験されるべきサンプル中変異の明白な同定を可能にした。この同定の信頼性は、異なる蛍光色素で染色した正常および変異RNAの2つのサンプルとの同時のハイブリダイゼーションを用いること、および異なる波長でのハイブリダイゼーションのモニタリ

ングにより；マイクロチップ上に形成された二重鎖に対する融解曲線を同時に測定することにより、およびDNAの変異した部位に相補的ないくつかのオリゴヌクレオチドの適正なセットを用いることにより増大された。

【0103】

βグロビンでの最も一般的に存在するβサラセミアの多くは、オリゴヌクレオチドマイクロチップバイオセンサを用いる診断アッセイで用いられた。これらの変異は、βグロビン遺伝子の第1イントロン（IVSI）中の第1、第2、第5、および第6ヌクレオチドについてのスプライス部位変異：IVSI/1 G/A（G/A=AをGで置換）、IVSI/2 T/C、IVSI/5 G/T、IVSI/5 G/C、IVSI/6 T/C、および第1エキソンの第26コドン（GAG）中のG/A置換（図6）、（異常ヘモグロビンEとしてもまた知られる）（用語については、Diaz-Chicoら、1988を参照のこと）。

【0104】

100H1100H20 μmゲルエレメント（Yershovら、1996）を用いたマイクロチップは、固定化デカオリゴヌクレオチド、すなわち、正常および変異体βサラセミア対立遺伝子に対応する10マーを含んでいた。これらの10マーは、ミスマッチを8マーより信頼性良くミスマッチを識別しなかったが、8マーより効率的にハイブリダイズした。従って、10マーは、このアッセイに好適であった。表3は、マイクロチップ上に固定化された対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドの配列を示す。二重鎖内のミスマッチは、末端位置におけるミスマッチよりかなり高い脱安定化影響を有し得る（Khrapkoら、1991）；従って、変異した塩基を固定化オリゴヌクレオチドの内側に配置した。

【0105】

異なる長さであって、かつランダムフラグメント化の後に回収された、一本鎖および二本鎖PCR増幅βグロビンDNAを、これらの変異のいくつかの同定のためのアッセイで試験した。しかし、RNAのハイブリダイゼーションが、DNAハイブリダイゼーションより好適であった。RNAフラグメントは、T7 RNAポリメラーゼを用いた転写によるPCR増幅されたゲノムDNA由来であった

(Lipshutzら、1995)。DNA分子あたり約100コピーの非標識または蛍光標識RNA転写物を合成し、ハイブリダイゼーションプローブの十分量を調製するための簡便な方法を提供した。RNAをフラグメント化し、そしてフラグメントあたり1つの蛍光色素分子を導入する。

【0106】

表3は、マイクロチップ対立遺伝子特異的10マーの配列を示す。マイクロチップIのオリゴヌクレオチドは、 β グロビン遺伝子の第1イントロン (IVS I / 1、2、5、6) の第1、第2、第5、または第6ヌクレオチド中、および第1エキソンのコドン番号26 (CD26) 中の β サラセミア単一塩基変異 (G/A-GをAで置換) をもつ患者のDNAの β グロビンのコード鎖に相補的である。マイクロチップIIのオリゴヌクレオチド1~16は、IVS I / 2 G/T対立遺伝子に対応する。変異した塩基および対応する正常塩基を、10マーの3'末端から2位~9位までに配置する。変異した塩基は、小太字で示し、そして正常対立遺伝子中の対応するオリゴヌクレオチド塩基を強調している。オリゴヌクレオチド合成およびマイクロチップ製作は、Yershovら (1996) に記載されていた。

【0107】

マイクロチップIは、RNAの75および133nt長と、フラグメント化なくして、またはフラグメント化の後 (133fr、表5、プローブ3aおよび4a)、ならびに β サラセミア変異に対応する、6つの合成19マーオリゴデオキシヌクレオチドと首尾良くハイブリダイズした。RNAおよび19マーは、フルオレセイン (F1) で標識したRNAプローブ2a、2b、および6bを除いて、TMRで標識した。融解曲線 (図1A-B、図2) を、各ハイブリダイゼーションにおいてすべてのマイクロチップオリゴヌクレオチドについて同時に測定した。これらの曲線は、識別温度 T_d におけるハイブリダイゼーション強度の値を提供した。Rは、 T_d において推定された完全二重鎖のシグナル (I_p) に対するミスマッチ二重鎖のハイブリダイゼーションシグナル (I_m) の比を、すべてのマイクロチップオリゴヌクレオチドについて同時に示す。 $R = I_m / I_p$ 。d₁₉合成19デオキシマーは、マイクロチップ上に固定化された対立遺伝子特異的

10マーに相補的であった。

【0108】

表4は、変異検出に関する10マー内の対立遺伝子塩基の位置の影響を示す。マイクロチップIIは、正常およびIVS 1/2 T/G対立遺伝子に対応する10マーの2つのセットを含む。このマイクロチップを、TMR標識正常対立遺伝子19マーと、およびRNA75nt長にハイブリダイズさせた。 $T_{0.1}$ は、マイクロチップ二重鎖についてのハイブリダイゼーションシグナルが、0℃におけるその初期値の1/10に低下する温度である。 $\Delta T_{0.1} = T_{0.1}$ (完全二重鎖) マイナス $T_{0.1}$ (対応するミスマッチ二重鎖) である。

【0109】

蛍光標識したRNAプローブを、第1エクソンからのβグロビン遺伝子のフラグメントから調製した(Lawnら、1980)。ヌクレオチド-47~+1714にマップされるヒトβグロビン遺伝子の1.76kbフラグメント(Lawnら、1980)のPCR増幅を、1μgのゲノムDNA(Ponezら、1982)および各50pmolの前方プライマー: 5'-GGAGCCAGGGCTGGGCATAAAAGT-3' (-47->-23) (配列番号18) および逆プライマー5'-ATTTTCCCAAGGTTTGAAGTAGCTC-3' (+1689->+1714) (配列番号19) (図7)を用いて実施した。この増幅は、100μlの、各200mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP、2.5mM MgCl₂、2単位のTaq DNAポリメラーゼ(BioMaster、Russia)、50mM KCl、10mM Tris-HCl、pH9.0、および0.1% Triton X-100を含む緩衝液中、DNAサーマルサイクラー(GeneAmp PCR System 2400、Perkin Elmer Corporation)中で実施した。反応条件は、95℃で45秒、66℃で90秒、および72℃で120秒の30サイクルであった。PCR産物は、2%低ゲル/溶解温度アガロースゲル(NuSieveアガロース、FMC)から精製した。159bpおよび102bpのDNAフラグメントを、3つのネスト(nested)プライマーをもつ10ngの1.75kbDNA、T7プロモーターを含む2つの配列、および共通逆プ

ライマーを用いて増幅した。ネストプライマーは、T7-V2L-45 (5' - GGAATTCCTAATACGACTCACTATAGGGACACCATG GTGCACCTGACTCC-3' -44->+66) (配列番号5) ; T7-V2L-103 (5' -GGAATTCCTAATACGACTCACTATAGGGAGGTGAACGTGGATGAAGTTGG-3' ; +102->-123) (配列番号16) ; および5' -TCTCCTTAAACCTGTC TTGTAACC-3' (共通逆 ; 153->+176) (配列番号17) であった。増幅は25サイクルで実施した (95℃で15秒、62℃で30秒、および72℃で30秒)。PCR産物は、QIAGEN QIA迅速PCR精製キットにより精製した。T7プロモーターを含むPCR増幅された159または102bp DNA (4-5 μg) を、T7RNAポリメラーゼ (Promega) の400単位を用いて転写し、133および175nt長のRNAを、300mM HEPES、pH7.6、30mM MgCl₂、16 μg BSA、40mM DTT、30単位のRnasin (Promega) および各4mMのATP、CTP、GTP、およびUTPを含む80 μlの緩衝液中に3時間38℃で生成した。反応混合物の除タンパク質は、20mM EGTA、pH8.0、2% SDA、およびプロテイナーゼK (10mg/ml) 中、15分、37℃で実施した。この混合物を、最初等容量のフェノール、次いで等容量のクロロホルムで抽出し、1容量のイソプロピルアルコールによって2回沈殿させ、0.5M LiClO₄から、そしてBio-Spin P6カラム (BioRad) 上で溶解した。

【0110】

10-100 μg RNAの、20マー~40マーの平均長さへのフラグメント化は、50 μlの0.1M KOH中、30分、40℃で実施した。次いで、5 μlの1M HEPES、pH7.6、および15 μlの1% HCO₄を4℃で添加した。過塩素酸カリウムのペレットを遠心分離により除去し、そしてRNAをアセトン中の2% LiClO₄の10容量により沈殿させた。このRNAをアセトンで2回洗浄し、そして20~30分間室温で乾燥させた。フラグメント化したRNAは、20mM Tris-HCl、pH8.0、1mM MgCl₂

、1mM ZnCl_2 、10単位のRnasin、5～7単位のウシ小腸ホスファターゼ(CIP)の50 μl 中、1時間、37℃で脱リン酸化した。RNAの除タンパク質および精製は、本明細書に記載のように実施した。

【0111】

RNAの化学的蛍光標識化のために、3'末端脱リン酸化ヌクレオシドを、20 μl の10mM 過ヨウ素酸ナトリウム中、20分、室温で酸化した。RNAをアセトンで沈殿させた。10%アセトニトリル中10モル過剰の10mM TMR-ヒドラジンを、20 μl の20mM酢酸ナトリウムpH4.0中の酸化したRNAフラグメントに添加した。

【0112】

この反応混合物を37℃で30～40分インキュベートし、そしてRNAと色素との間のヒドラジン結合を、新たに調製した1.5 μl の0.2M NaCNBH_3 を用いた還元により安定化し、そして室温で30分インキュベートした。次いで、この混合物を、水飽和n-ブタノールで4回抽出し、そしてアセトンで沈殿させた。あるいは、RNAを、マニュアルに従ってAmbion MEGA shortscriptキットを用い、転写の間にフルオレセイン-UTPの取り込みにより標識した。

【0113】

蛍光標識したRNA(1pmol/ μl)のマイクロチップとのハイブリダイゼーションは、0℃で18時間実施した。多くの場合、0℃におけるハイブリダイゼーションシグナルの強度は、完全二重鎖およびミスマッチ二重鎖で類似していた。完全二重鎖およびミスマッチ二重鎖ならびに種々のGCおよびAT含量を有する二重鎖は異なる安定性を示し、そしてそれ故、異なる温度で試験した。

【0114】

表4は、1)多くのホモ接合性およびヘテロ接合性の β サラセミア患者由来のRNAプローブと；および2)対応する19マーとの診断マイクロチップのハイブリダイゼーションの結果を要約する。この表は、各マイクロチップオリゴヌクレオチド上に形成された完全二重鎖に対するTdを示す。表3中の異なるマイクロチップオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションシグナルの相対強度Rは

、T dにおける完全二重鎖のシグナル（1. 0と推定した）に対して規格化された。大部分の場合、ミスマッチ二重鎖についての比は、0. 1より少なくかつ0に近い。これらの値は、（完全二重鎖のみからハイブリダイゼーションシグナルが観察されるとき）T dにおける患者中のホモ接合型変異およびヘテロ接合型変異の明白な同定を可能にするに十分低い。ホモ接合型RNAのマイクロチップとのハイブリダイゼーション（表5、プローブ1 a、2 a、2 b、および3 a）は、1つの固定化されたオリゴヌクレオチドとのみ完全二重鎖、およびほかのすべてとのミスマッチ二重鎖の特有の形成を示す。

【0115】

【表10】

表 3. マイクロチップ対立遺伝子特異的 102-
の配列

	#	対立遺伝子	変異した 塩基の位置	配列	位置
マイクロチップ	1	IVS (N)	-	5'-A TAC CAA CCT-gel (配列番号 20)	+141
	2	IVS 1/1 G/A	8	5'-A TAC CAA ICT-gel (配列番号 21)	+141
	3	IVS 1/1 G/T	8	5'-A TAC CAA aCT-gel (配列番号 22)	+141
	4	IVS 1/2 T/A	7	5'-A TAC Cal CCT-gel (配列番号 23)	+141
	5	IVS 1/2 T/C	7	5'-A TAC Cag CCT-gel (配列番号 24)	+141
	6	IVS 1/2 T/G	7	5'-A TAC Caa CCT-gel (配列番号 25)	+141
	7	IVS 1/3 G/A	4	5'-A TAl CAA CCT-gel (配列番号 26)	+141
	8	IVS 1/3 G/C	4	5'-A TAq CAA CCT-gel (配列番号 27)	+141
	9	IVS 1/3 G/T	4	5'-A TAu CAA CCT-gel (配列番号 28)	+141
	10	IVS 1/6 T/C	3	5'-A TgC CAA CCT-gel (配列番号 29)	+141
	11	CD 26 (N)	-	5'-G GCC TCA CCA-gel (配列番号 30)	+125
	12	CD 26 G/A	6	5'-G GCC TtA CCA-gel (配列番号 31)	+125
マイクロチップ	1	IVS (N)	9	5'-TGA TAC CAA C-gel (配列番号 32)	+143
	2	IVS 1/2 T/G	9	5'-TGA TAC CAa C-gel (配列番号 33)	+143
	3	IVS (N)	8	5'-GA TAC CAh CC-gel (配列番号 34)	+142
	4	IVS 1/2 T/G	8	5'-GA TAC CAo CC-gel (配列番号 35)	+142
	5	IVS (N)	7	5'-A TAC CAA CCT-gel (配列番号 36)	+141
	6	IVS 1/2 T/G	7	5'-A TAC CAe CCT-gel (配列番号 37)	+141
	7	IVS (N)	6	5'-TAC CAA CCT G-gel (配列番号 38)	+140
	8	IVS 1/2 T/G	6	5'-TAC CAe CCT G-gel (配列番号 39)	+140
	9	IVS (N)	5	5'-AC CAA CCT GC-gel (配列番号 40)	+139
	10	IVS 1/2 T/G	5	5'-AC CAe CCT GC-gel (配列番号 41)	+139
	11	IVS (N)	4	5'-C CAh CCT GCC-gel (配列番号 42)	+138
	12	IVS 1/2 T/G	4	5'-C CAe CCT GCC-gel (配列番号 43)	+138
11	13	IVS (N)	3	5'-CAh CCT GCC-gel (配列番号 44)	+137
	14	IVS 1/2 T/G	3	5'-CAe CCT GCC C-gel (配列番号 45)	+137
	15	IVS (N)	2	5'-Ah CCT GCC CA-gel (配列番号 46)	+136
	16	IVS 1/2 T/G	2	5'-Ae CCT GCC CA-gel (配列番号 47)	+136

【0116】

【表11】

表 4
変異検出における10マ-内の対立遺伝子塩基の
位置の影響

位置 対立遺伝子	19-マ-			RNA		
	完全なもの T_{11}	(G-A)の T_{11}	ΔT_{11}	完全なもの T_{11}	(G-A)の T_{11}	ΔT_{11}
9 -	40	32	8	35	37	-2
8	47	32	15	49	38	11
7	42	30	12	44	41	3
6	47	28	19	49	41	8
5	52	38	14	50	42	8
4	54	39	15	54	44	10
3	55	46	9	59	54	5
2	52	46	6	58	53	5

【0117】

【表12】

表5
マイクロチップを用いたハイブリダイゼーションによるβサラセミア変異の同定

ハイブリダイズしたプローブ			固定化された 10マーオリゴヌクレオチド																							
#	対立遺伝子	サイズ (nt)	R at Td=																							
			IVS (N)	I/1 G/A	I/1 G/T	I/2 T/A	I/2 T/C	I/2 T/G	I/5 G/A	I/5 G/G	I/5 G/T	I/6 T/C	CD26 (N)	CD26 G/A	42°C	39°C	38.5°C	42°C	48°C	45.5°C	37°C	44.5°C	40°C	50°C	54.5°C	49°C
1	a	IVS (N)	75	1	0.04	0	0.2	0.05	0.07	0	0	0.04	1	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	b	IVS (N)	19*	1	0.09	0.07	0.02	0.03	0.01	0.03	0.07	ND	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	a	IVS I/2 T/A	75	0.15	0	0	1	0.12	0.08	0	0	0	1	-	0.15	0	0	1	0.12	0.08	0	0	0	0	1	-
2	b	IVS I/2 T/A	133	0.03	0	0	1	0	0.3	0	0	0	1	-	0.03	0	0	1	0	0.3	0	0	0	0	1	0.19
	c	IVS I/2 T/A	19*	0.01	0	0	1	0.07	0.03	0	0	0	0.01	0	0.01	0	0	1	0.07	0.03	0	0	0	0.01	0	
	a	IVS I/1 G/A	133/	0.05	1	0	0.01	0	0.02	0	0	0	0	-	0.05	1	0	0.01	0	0.02	0	0	0	0	1	-
3	b	IVS I/1 G/A	19*	0.01	1	0.01	0.01	0	0	0.01	0	0	0	0	0.01	0.2	0.01	0.01	0	0	0.01	0	0	0	0	0
	a	IVS I/1 G/A & IVS I/6 T/C	133/	0.2	0.35	0	0.2	0	0.05	0	0	1	1	-	0.2	0.35	0	0.2	0	0.05	0	0	0	1	1	-
	b	IVS I/1 G/A	19*	0.01	1	0.01	0.01	0	0	0.01	0	0	0	0	0.01	0	0.01	0.01	0	0	0.01	0	0	0	0	0
4	c	IVS I/6 T/C	19*	0.1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	a	IVS I/5 G/T	19*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0.02	1	0	0	0	0
	b	CD26 (N)	19*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03
5	c	CD26 G/A	19*	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.04	1
	a	IVS (N)	75	1	0.04	0	0.2	0.05	0.07	0	0	0.04	1	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.04	1	-
	b	IVS I/2 T/A	133	0.03	0	0	1	0	0.3	0	0	0	1	-	0.03	0	0	1	0	0.3	0	0	0	0	1	-

【0118】

認知し得る例外は、それぞれ、非対応のサンプル IVS (N) および IVS 1/2 T/A RNAとのハイブリダイゼーションに際し、強いミスマッチシグナルを示す IVS 1/2 T/A および IVS 1/2 T/G 変異に対応するオリゴヌクレオチドである (表5、1 a、2 b、4 a、6 a および 6 b)。これらのミスマッチシグナルの相対的強度は、固定化に適切なオリゴヌクレオチ

ドを選択することにより有意に低減され得る。診断アッセイは、RNA 75ヌクレオチド (nt) 長 (表5、プローブ1 a、および6 a)、および133 nt 長 (プローブ2 aおよび6 b)、ならびに20-40 nt 長にフラグメント化された133 nt 長RNA (プローブ3 aおよび4 a) を用いて実施され得るようである。しかし、フラグメント化後のハイブリダイゼーションシグナルの強度は、約5倍増加し、そしてハイブリダイゼーションの時間は、数時間から数分に減少する。

【0119】

より長いRNAプローブはゲル中によりゆっくりと拡散し、そして安定な二次構造または凝集物を形成し得る。これらの因子は、ある程度短い固定化オリゴヌクレオチドとのそれらのハイブリダイゼーションを妨害する。従って、このフラグメント化は、サンプル調製において必須の工程であるようである。なぜなら、それはハイブリダイゼーションを増大し、そして迅速にするからである。

【0120】

融解曲線を測定することに加えて、変異および塩基変化の同定の信頼性は、多色蛍光顕微鏡の使用により増大され得る (Yershovら、1996)。この目的のために、試験されたRNAは、1つの蛍光標識によってマークされ、そして異なる色素で標識させた正常な対立遺伝子サンプルの存在下でマイクロチップとハイブリダイズされる。2つの色素を用いて測定されたハイブリダイゼーションのパターンと比は、異なる対立遺伝子塩基、すなわち変異に対応するマイクロチップオリゴヌクレオチドを除いてすべてのマイクロチップオリゴヌクレオチドについて同様である。表4は、このような実験の結果を示す。2つの波長で検出されたハイブリダイゼーションのパターンは、非常に類似している。

【0121】

表3に示されるように、変異IVSI-2 T/G、IVSI-2 T/C、およびIVSI-2 T/Aにマッチする固定化10マーは、その他の対立遺伝子に対応するいくつかのRNAプローブとかなり強くハイブリダイズする。RNA中の異なる構造因子がこのハイブリダイゼーションを引き起こし得る。これらの因子の影響は、10マーの異なる位置に変動可能なIVSI-2塩基を配置す

ることによって最小にし得る。これらの実験の結果を表4に示す。マイクロチップ I I は、フラグメント化75-nt-長RNAと、または合成DNA 19マーと（両方とも正常対立遺伝子に対応する）首尾良くハイブリダイズした。マイクロチップ I I は、正常対立遺伝子または I V S I - 2 T / G 対立遺伝子のいずれかに相補的である、8つの重複した2つの固定化10マーの2つの類似のセットを含んでいた。第1のセットのための対立遺伝子特異的塩基Aおよび第2のセットのための対立遺伝子特異的塩基Cは、これら10マーにおいて、第2～第9のすべての内部位置に位置する。これらの塩基は、完全A-TまたはミスマッチA-G塩基対をそれぞれ形成する。マイクロチップ上に形成された完全およびミスマッチ二重鎖の安定性は、この二重鎖の初期ハイブリダイゼーションシグナルが当初の強度の1/10まで減少する温度 $T_{0.1}$ として測定される。 $\Delta T_{0.1}$ は、完全二重鎖と類似のミスマッチ二重鎖との間の $T_{0.1}$ における最に対応する。完全二重鎖とミスマッチ二重鎖とのより良好な識別は、 $\Delta T_{0.1}$ のより高い値に反映される。識別効率（ ΔT ）は、ハイブリダイズしたRNAについて19マーより低かった。この識別は、対立遺伝子塩基を、固定化されたオリゴヌクレオチドの第9位または第7位にそれぞれ配置したとき、 $\Delta T = -2^{\circ}\text{C}$ および 3°C で驚くほど低かった。二次構造およびRNAの他の領域における類似の配列の存在がこの低下を引き起こすようである。これらの影響は、変異についてサーチされる領域の配列から部分的に予測され得る。しかし、対立遺伝子塩基が、他の場所、例えば、8、6、5、または4位に配置されるとき、高い識別（ $\Delta T = 8 - 11^{\circ}\text{C}$ ）に到達することは不可能である。

【0122】

PCR増幅されたDNAのRNA転写物のオリゴヌクレオチドマイクロチップとのハイブリダイゼーションは、患者のゲノムDNA中のホモ接合型およびヘテロ接合型 β サラセミア変異の信頼性ある塩基変化の同定および識別を可能にする。

【0123】

PCR増幅されたDNAから転写されたRNAは、PCR増幅により調製されたDNAの使用より、十分量の標識された一本鎖サンプルを調製するためのより

容易な方法を提供する。RNAはフラグメント化され得、そして1つの蛍光色素分子がフラグメントあたり導入され得る。

【0124】

(実施例7：遺伝子発現を検出するための特製マイクロチップバイオセンサの使用)

遺伝子発現は、現代分子生物学の中心的テーマの1つである。良く研究された遺伝子供給源からのDNAは、系統的にすでに配列決定されている。これらの配列について、ハイブリダイゼーション手順を首尾良く用いて、差次的遺伝子発現のレベルを推定する。この推定の結果は、発生生物学、発生児学、ならびに遺伝子疾患および感染疾患の処置の基礎的メカニズムを理解するために有用である。

【0125】

オリゴヌクレオチドマイクロチップが遺伝子発現を同定するために有用であるか否かを決定するために、マイクロチップバイオセンサハイブリダイゼーションを、6つの異なる遺伝子から単離された以下のssフラグメントを用いて実施した：

ーグリセロアルデヒド3ーリン酸デヒドロゲナーゼ (G3PDH) からの205bフラグメント；

ーヒトトランスフェリンレセプター (HTR) からの281bフラグメント；

ー β_2 ーミクログロブリン (B2M) からの224bフラグメント；

ーヒトインターロイキンー1 (IL1R) からの545bフラグメント；

ーヒトNF- κ B (p50) からの188bフラグメント；

ーインターフェロン γ レセプター (IGR) からの224bフラグメント。

【0126】

5つのハウスキーピング遺伝子 (G3PDH、HTR、B2M、IL1RおよびNF- κ b (p50)) (CLONTECHカタログ94/95「Tools for the Molecular Biologist」90-93ページ) に対応する、3'末端位置に3-メチルウリジン残基を有する、固定化された60bオリゴヌクレオチドを含む特製のマイクロチップを、相補的ssDNAフラグメントとのハイブリダイゼーション実験のために生成した。各オリゴヌク

レオチドを、マイクロチップ上の2つの位置に、1:10の量比（各々0.3 pmol:0.03 pmol）で付与した。固定化オリゴヌクレオチドに相補的な ssDNAフラグメントは、蛍光標識ヌクレオチド三リン酸（FUORscript T7、フルオロセイン標識インビトロ転写キット）を用いた非対称PCR増幅（1つのプライマーのみを用いる）によって合成された。さらに、PCRプライマーは、カラム上に保持されたアビジンを用いる合成された ssDNAフラグメントの次の単離のためのビオチンタグを保有していた（Sambrookら、「Molecular Cloning」第2版、12.14頁）。図8は、マイクロチップ上のハイブリダイゼーションを示す。各スポット中の蛍光の強度は、スポット中の、固定化されたオリゴヌクレオチドの量およびDNAフラグメントの長さに依存する。ハイブリダイゼーションには、0.5 pmol/μl（約0.05 μg/μl）の濃度で ssDNAを含む、緩衝液A（50%ホルムアミド、10%硫酸デキストラン、1% SDS、pH 7.4の50 mMリン酸ナトリウム、750 mM塩化ナトリウム、5 mM EDTA Na）を、室温で約6-12時間インキュベートし、H₂Oで簡単に洗浄し、そして蛍光顕微鏡で分析した。再ハイブリダイゼーションの前に、このマイクロチップは、緩衝液B（50%ホルムアミド、1% Tween 20）中で30分50℃で処理し、ハイブリダイズした ssDNAを完全に除去した。

【0127】

これらの結果は、蛍光で標識した ssDNAの濃度が、100倍まで増加され得ることを示す。個々の ssDNAフラグメントとのハイブリダイゼーションは、研究されたオリゴヌクレオチドの高い特異性を示す。異なる試験されたDNAと固定化されたオリゴヌクレオチドとの間で検出された交叉ハイブリダイゼーションはなかった。非特異的DNA（例えば、プローブ IGR）とハイブリダイズしたとき、いずれのオリゴヌクレオチドも、シグナルを示さなかった。これは、非発現遺伝子の「発現」を、ハウスキーピング遺伝子の発現から区別する。特定の細胞または組織中で発現されない遺伝子は、低い発現を有するとして、従来のスクリーニング手順で実際に釣り上げられ得、その一方すべての細胞内で発現されているその他の遺伝子（ハウスキーピング遺伝子）もまた、低～中程度の発現

を有するとして釣り上げられ得る。このハウスキーピング遺伝子は、実際に発現されている。この実施例では、シグナルにおける差異は、低レベル発現が、低レベルバックグラウンドから明白に区別され得るように検出可能である。

【0128】

この手順は、高および中程度発現レベルの遺伝子の発現を検出する。低レベル遺伝子発現を決定するためには、RT-PCR増幅がより好適である。

【0129】

(実施例8：HLA多形を検出するための本発明の特製マイクロチップバイオセンサの使用)

遺伝子型認識の困難な課題は、組織適合性遺伝子の領域にあるヒト白血球抗原(HLA)をコードする遺伝子の異なるハプロ型(対立遺伝子)を研究することで生じる。このHLA遺伝子座(クラスIおよびクラスII遺伝子)は、組織移植の組織適合性の原因である。対立遺伝子同定の必要性はまた、HLAクラスII遺伝子を含む種々の医療および生物学的課題において遭遇する。HLA遺伝子型といくつかの傷害との間の強い相関を示す多くの臨床データがあり、例えば、いくつかの対立遺伝子DQA1/DQB1は、IDDM(インスリン依存性糖尿病)、マラリア、自己免疫疾患(慢性関節リウマチおよび尋常性天疱瘡—重篤な水泡を引き起こす皮膚病)のような自己免疫疾患に明確に関連する。HLAの高レベルの多形は、いくつかの疾患に対するリスク群を決める個体の同定に有用であることが示されている。HLA型決定は、ドナーを移植体に一致させるために特に重要である。それはまた、不妊症検査として提案されている。

【0130】

この観点から、本発明は、固定化された8~12bp長のオリゴヌクレオチドのアレイをオリゴヌクレオチドマイクロチップに形成することを可能にし、それによってHLA DQA1対立遺伝子の同定を容易にする方法を提供する。

【0131】

アルゴリズムが設計され、そして種々のHLA下位対立遺伝子のすべての対立遺伝子のヌクレオチド配列の分析を可能にする特別のコンピュータプログラムが構築された。オリゴヌクレオチドの最適化されたセットを形成することは、高い

信頼性の、HLA対立遺伝子のホモ接合型およびヘテロ接合型の検出を提供する。

【0132】

18のPAAーゲル固定化（各々1 pmolの）短いオリゴヌクレオチドのアレイを含む特製のマイクロチップを、対立遺伝子同定のための、蛍光標識された相補的HLA DQA1 DNAまたはRNAプローブとのハイブリダイゼーションのために作成した。18デカマーを、以下の順で左から右にチップ上に付与した：

【0133】

【表13】

表 6					
第1(上段)の行	1	2	3	4	5'-コントロールオリゴ
第2:	5	6	7	8	3'-コントロールオリゴ
第3:	9	10	11	12	13
第4:	14	15	16	17	18

【0134】

オリゴヌクレオチドの配列を図9に示した。

【0135】

マイクロチップ上に固定化されたオリゴヌクレオチドは、DQA1 DNAの異なる対立遺伝子のセンス鎖、およびいくつかのコントロールオリゴヌクレオチドに相補的である。20オリゴヌクレオチドを備えたマイクロチップを、HLA DQA1領域中の15の異なる対立遺伝子の部分的同定のために製造した。PCRを用いて、ヒトゲノムDNAからのDQA1遺伝子の多形第2エクソンの（コドン12からコドン87に開始する）229bp DNAフラグメントを調製した。ネストプライマー2 DQAAMP-A：5'-atgggtgtaaaccttgtaaccagt（配列番号73）；および2 DQAAMP-B：5'-ttggtagcagcggtagagttg（配列番号74）を用いた。ネストPCRプライマーは、T7-2 DQAAMPおよびプライマーBであった。T7 R

NAポリメラーゼのプロモーターを含む第1のプライマーおよびPCR産物をインビトロ転写のために用いた。RNAプローブは、コードDNA鎖に同一であった。RNAをフラグメント化し、フルオレセインで標識し、そしてマイクロチップとのハイブリダイゼーションに用いた。ハイブリダイゼーション条件は以下の通りであった：1M NaCl、1mM EDTA、5mMリン酸Na、pH7.0、1% Tween 20中5℃で一晩のインキュベーション。次いで、温度を10℃の間隔で段階的に増加し、そして蛍光測定を各ステップで行った。緩衝液は変えなかった。

【0136】

図10はハイブリダイゼーション結果を示し、そして対立遺伝子同定のためにHLA DQA1チップを図示する。図10において、3つの対角線上に配置されたオリゴヌクレオチド（11-0101/0104対立遺伝子特異的；6-0101、01021、01022、0103、00104に特異的；17-0502を除いてすべての対立遺伝子に対応）は、ポジティブなハイブリダイゼーションシグナルを与え、そして3つの対角線上に配置された明るい蛍光スポットとして観察される。これらプローブは、0101また0104対立遺伝子として同定された（両方の対立遺伝子は、第2エクソンで同一である）。すべての他のオリゴヌクレオチドは、上記で記載したものと比較してかなり弱い蛍光シグナルを生じた。なぜなら、それらのいずれも対立遺伝子0101および0104に相補的な配列を含んでいないからである。その一方、0101または0104とは異なる任意の対立遺伝子は、別のセットのハイブリダイゼーションシグナルを示す。

【0137】

チップ上の最も明るい蛍光の矩形は：03011または0302特異的であるオリゴ番号4；オリゴ番号8はTaqポリメラーゼ特異的アーチファクト；オリゴ番号18-対立遺伝子0101-05011に属する；オリゴ11-0101、0104対立遺伝子特異的；17-0502を除くすべての対立遺伝子に対応；g4は蛍光コントロールオリゴ；番号13-番号18にミスマッチ。すべてのほかのチップエレメントは、有意により少ない強度の蛍光を示した。これらのプ

ローブにより同定された遺伝子型は、0101/0104-0302/0301
1ヘテロ接合型を有する。

【0138】

(実施例9：ライム病スピロヘータを検出するための特製のマイクロチップバイオセンサの使用)

種 *Barrettia burgdorferi*、およびダニ媒介のスピロヘータの関連種に属する細菌は、ヒトおよび獣医学疾患を引き起こし得る。核酸プローブは、ライム病を引き起こす細菌を検出するために利用可能である。これらの細菌は、免疫学的試験を利用可能であるが、標準的な微生物学的方法によっては同定され得ない。

【0139】

本発明の方法を用いて、オリゴヌクレオチドがWeisburg (1995)に従って調製され、そして臨床サンプル中のライム病を検出することにおける使用のために設計された微小マトリックスに添加される。

【0140】

(実施例10：食品サンプル中の *Salmonella* を検出するための特製のマイクロチップバイオセンサの使用)

Salmonella の存在は、標準的な微生物学的実験室手順に従って培養を調製すること、および形態学および生化学的特性について培養を試験することにより最も一般的に検出される。サンプルの収集の後約48時間後試験が始まり、そして終了するために数日を要する。

【0141】

しかし、*Salmonella* 試験のためのRNAおよびDNAプローブが利用可能である。本発明の方法を用い、オリゴヌクレオチドが本明細書に参考として援用されるLaneら (1996)に従って調製され、そして *Salmonella* のrRNAを非 *Salmonella* から区別することによって、食品サンプル中の *Salmonella* を検出することにおける使用のために設計されたマイクロチップに添加される。

【0142】

【表14】

引用文献

- AUSUBEL, F.M., R. BRENT, R.E. KINGSTON, D.D. MORE, J.G. SEIDMAN, J.A. SMITH, and K. STRUHL, Eds., ed. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Wiley Interscience: New York, NY.
- BEATTIE, K.L., BEATTIE, W.G., MENG, L., TURNER, S.L., CORAL-VAZQUEZ, R., SMITH, D.D., MCINTYRE, P.M. and DAO, D.D.: *Advances in Genosensor Research. Clin. Chem.* 41/5 (1995) 700-706.
- CONNER, B.J., REYERS, A.A., MORIN, C., ITAKURA, K., TEPLITZ, R.L. and WALLACE, R.B. (1983) Detection of sickle cell β -globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 278-282.
- DIAZ-CHICO, J.C., YANG, K.-G., YANG, K.-Y., EFREMOV, D.G., STOMING, T.A. and HUISMAN, T.H. (1988) *J. Biochim. Biophys. Acta* 949: 43-48.
- FODOR, S.P.A., READ, J.L., PIRRUNG, M.C., STRYER, L., LU, A.T. and SOLAS, D.: Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251 (1991) 767-773.
- GHU, Z., GUILFOYLE, R.A., THIEL, A.J., WANG, R., and SMITH, L.M.: Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass support. *Nucl. Acids Res.* 22 (1994) 5456-5465.
- KHRAPKO, K., LYSOV, YU. KHORLIN, A., IVANOV, I., YERSHOV, G., VASILENKO, S., FLORENTIEV, V., and MIRZABEKOV, A. (1991) A method for DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix. *J. DNA Sequencing* 1 375-388.
- KHRAPKO, K. R. *et al.* (1996) U.S. Pat. No. 5,552,270.
- LAMTURE, J.B., BEATTIE, K.L., BURKE, B.E., EGGERS, M.D., EHRLICH, D.J., FOWLE, R., HOLLIS, M.A., KOSICKI, B.B., REICH, R.K., SMITH, S.R., VARMA, R.S. and HOGAN, M.E.: Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge-coupled device. *Nucl. Acids Res.* 22 (1994) 2121-2125.

引用文献の読み方

- LANE, D.J. *et al.* (1996) Oligonucleotide Probes for Detection of Salmonella, U.S. Pat. No. 5,495,008.
- LAWN, R. EFSTRATIADIS, A., O'CONNEL, C., and MANIATIS, T. (1980) The nucleotide sequence of the human β -globin gene. *Cell* 21: 647-651.
- LESNIK, E.A., and FREIER, S. (1995) Relative thermodynamic stability of DNA, RNA, and DNA:RNA hybrid duplexes: relationship with base composition and structure. *Biochemistry* 34: 10807-10815.
- LIPSHUTZ, R.J., MORRIS, D., CHEM, M., HUBBELL, E., KOZAL, M.J., SHAH, N., SHEN, N., YANG, R. and FODOR, S.P.A. (1995) Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *BioTechniques* 19: 442-447.
- MAIDAK, B.C. *et al.* (1996) The ribosomal database project (RDP), *Nucleo Acids Res.* 24:82-85.
- MATSON, R.S., RAMPAL, J., PENTONEY, S.L., ANDERSON, P.D. and COASSIN, P.: Biopolymer synthesis on polypropylene support: oligonucleotide arrays. *Anal. Biochem.* 224 (1995) 110-116.
- MIRZABEKOV, A. (1994) DNA Sequencing by hybridization: a megasequencing method and a diagnostic tool? *Trends in Biotechnology* 12: 27-32.
- MOBARRY, B.K. *et al.* (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2156-2162.
- PEASE, A.C., SOLAR, D., SULLIVAN, E.J., CRONIN, M.T., HOLMES C.P. and FODOR, S.P.A.: Light-directed oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 5022-5026.
- PONCZ, M. SOŁOWIEJCZYK, D. and HARPEL, B. (1982) Construction of human gene libraries from small amount of peripheral bloods: analysis of β -like globin genes. *Hemoglobin* 6: 27-40.
- STAHL, D.A. (1995) Application of phylogenetically based hybridization probes to microbial ecology. *Mol. Ecol.* 4:535-542.
- SOUTHERN, E. M. (1996) DNA chips: analyzing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale, *TIG* 12:110-115.

引用文献の続き ②

SOUTHERN, E.M., MASKOS, U. and ELDER, J.K.: Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics* 13 (1992) 1008-1017.

WAGNER, M. *et al.* (1995) In situ identification of ammoniaoxidizing bacteria. *Sept. Appl. Microbiol* 18: 251-264.

WEISBURG, W.O. (1995) Nucleic Acid Probes for the Detection of Lyme Disease Spirochetes, U.S. Pat. No. 5,466,577.

WOESE, C.R. (1987) Bacterial evolution, *Microbiol. Rev.* 51:221-271.

YERSHOV, G., BARSKY, V., BELGOVSKIY, A., KIRILLOV, E., KREINDLIN, E., IVANOV, I., PARINOV, S., GUSHIN, D., DROBYSHEV, A., DUBILEY, S., and MIRZABEKOV, A. (1996) DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4913-4918.

U.S. Pat. No. 5,552,270

【0143】

(開示の要約)

本発明は、環境中、食品中ならびに生物学的サンプル中の、異なる遺伝子、器官および／または個体に対して特異的な核酸の、検出および同定をするためのカスタマイズされたオリゴヌクレオチドマイクロチップを、バイオセンサーとして使用することに関する。このマイクロチップは、遺伝子情報の多重ビットを、ユニットとして解釈される単純なシグナルパターンに変換するように設計される。サンプル由来のオリゴヌクレオチドがマイクロチップへハイブリダイズする方法が改善されたので、マイクロチップは、再利用可能かつ移動可能である。実地調査に対して、移動可能なレーザーまたはバーコードスキャナーが、適している。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、マイクロチップオリゴヌクレオチドを用いたRNAの二重鎖の非平衡融点曲線を示す。

【図2】

図2は、マイクロチップオリゴヌクレオチドを用いてハイブリダイズした75 nt長のRNAフラグメントについての4つの融点曲線の例を示す。このRNA

は、 $IVS\ 1/2\ T/A$ 変異を、 β グロビン遺伝子中に有する患者に由来した。この曲線を、初期のハイブリダイゼーションシグナルに対して正規化した。融点曲線1および3は、完全二重鎖に対応し；曲線2および4は、それぞれ内部にT-TまたはG-Tのミスマッチを含む二重鎖に対応する。完全およびミスマッチの二重鎖についての曲線は、約 $10^{\circ}C$ 互いにずれている。

【図3】

図3は、フルオレセイン標識された $16S\ rRNA$ のマイクロチップへのハイブリダイゼーションを示す。固定されたプローブを有するマイクロチップ（表1および表2を参照のこと）を、*Nitrosovibrio tenuis* (A)、*Nitrosomonas europaea* (B)、*E. coli* (C)のインビトロ転写された $16S\ rRNA$ 、および単離されたりボソームから回収された*E. coli* $rRNA$ (D)へ連続的にハイブリダイズさせた。右にあるパネルは、各プローブとそのRNAとの間のミスマッチの数を示す。

【図4】

図4Aおよび4Bは、異なって標識された*E. coli*および*Nitrosovibrio tenuis*の $rRNA$ の混合物の、 $10^{\circ}C$ および $40^{\circ}C$ でのマイクロチップへのハイブリダイゼーションを示す。A. そのマイクロチップは、フルオレセイン標識された*Nitrosovibrio tenuis*と、テトラメチルローダミン標識された*E. coli* $16S\ rRNA$ との混合物とハイブリダイズさせ、そして支持された温度で、任意ユニット (a. u.) の蛍光強度で連続的に洗浄した。 $10^{\circ}C$ および $40^{\circ}C$ で測定された*Nitrosovibrio tenuis* (I_{Nt}) 対*E. coli* ($I_{E.coli}$) $16S\ rRNA$ の比、 $R = (I_{Nt}/I_{E.coli})$ 。

【図5】

図5は、ハイブリダイゼーション強度に対する固定されたオリゴヌクレオチドの濃度効果を示す。異なる濃度の固定されたオリゴヌクレオチドを有するマイクロチップを、フルオレセインで標識した*N. tenuis* $16S\ rRNA$ とハイブリダイズし、そして $20^{\circ}C$ で洗浄した。曲線1は、Ns v 443に対応する（ニトロソビブリオ様）プローブ、曲線2-Bac 338 (*Bacteria*

)、曲線3-N s o 1 2 2 5 (アンモニア酸化体)、曲線4-Un i 1 3 9 0 (すべての生命)、ならびに曲線5-N s m-1 5 6 (ニトロソモナス (n i t r o s o m o n a s)) , a . u . -任意単位の蛍光強度。

【図6】

図6は、マイクロチップ上に固定されたオリゴヌクレオチドを特定するβグロビン対立遺伝子の配列を示す。

【図7】

図7は、オリゴヌクレオチドマイクロチップを用いてβグロビン変異を検出する実験設計を示す。

【図8】

図8は、遺伝子発現研究の結果を示す。

【図9】

図9は、18の短いHLAオリゴヌクレオチドを示す。

【図10】

図10は、そのマイクロチップに対してハイブリダイズされたHLAオリゴヌクレオチドを示す。

【図11】

図11は、ガラス支持体4上にゲルアレイ3を有するマイクロチップを含む密封マイクロチャンバ1を例示する。ポート2は、湿潤溶液を提供するためだけに用いられる。

【図12】

図12は、順序付けされたスキームを示す。ここで、文字「P」は、病原体からのオリゴヌクレオチドであるサンプルからのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションのグループが存在する場合に検出される。

【図13】

図13は、B. a n t h r a c i sが存在する場合のマイクロチップにおける順序付けされたスキームを示す。

【図1】

図 1A

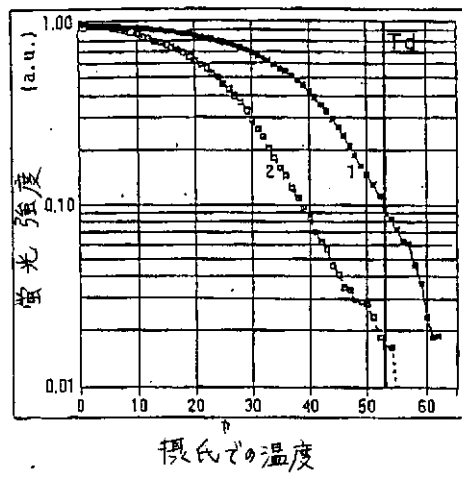
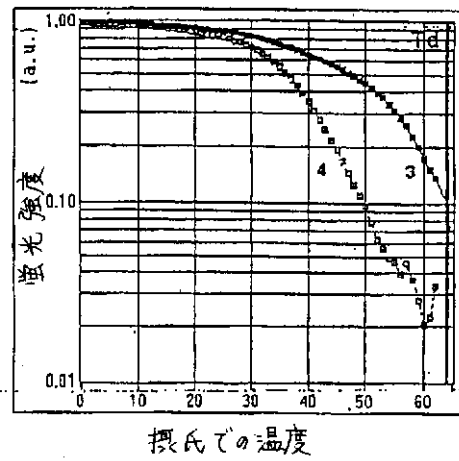
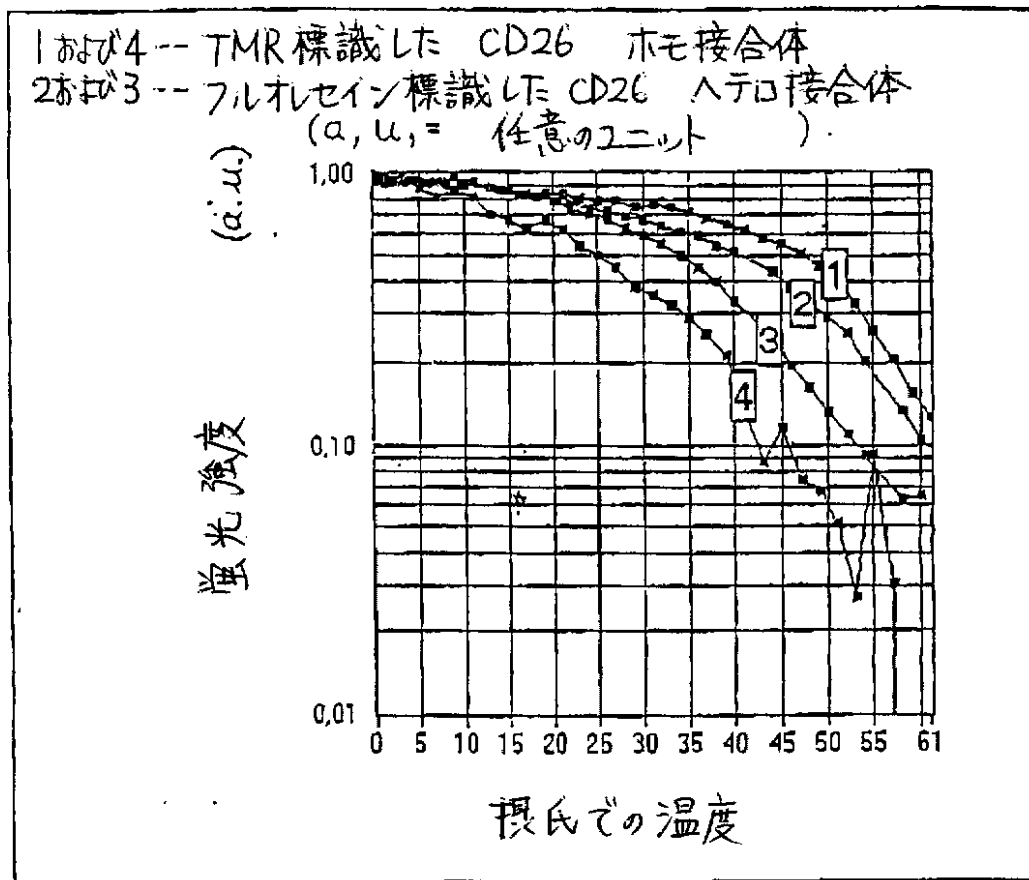


図 1B

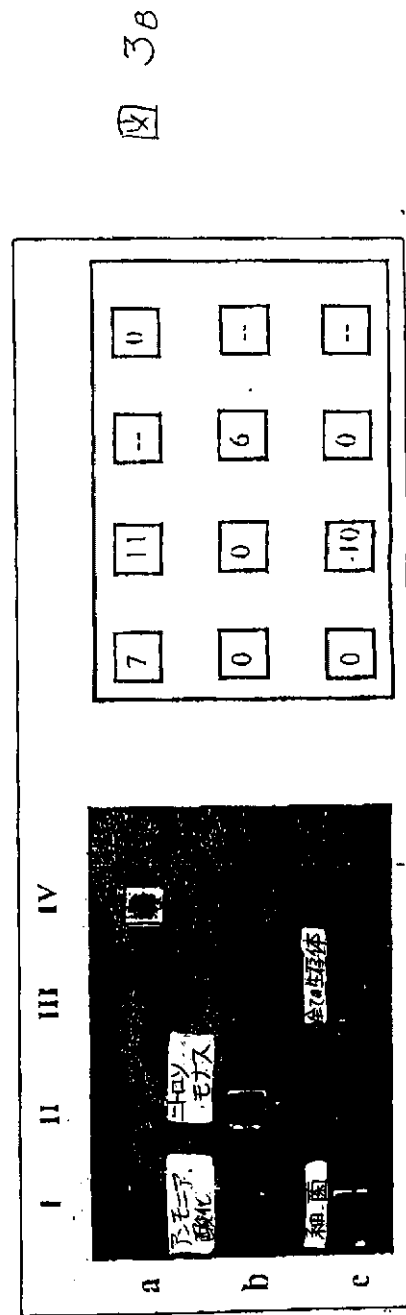
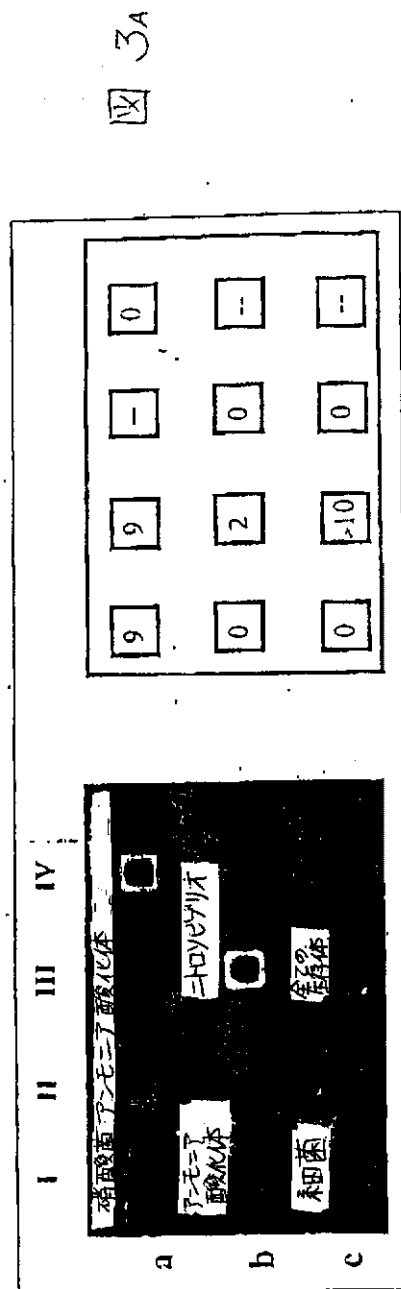


【図2】



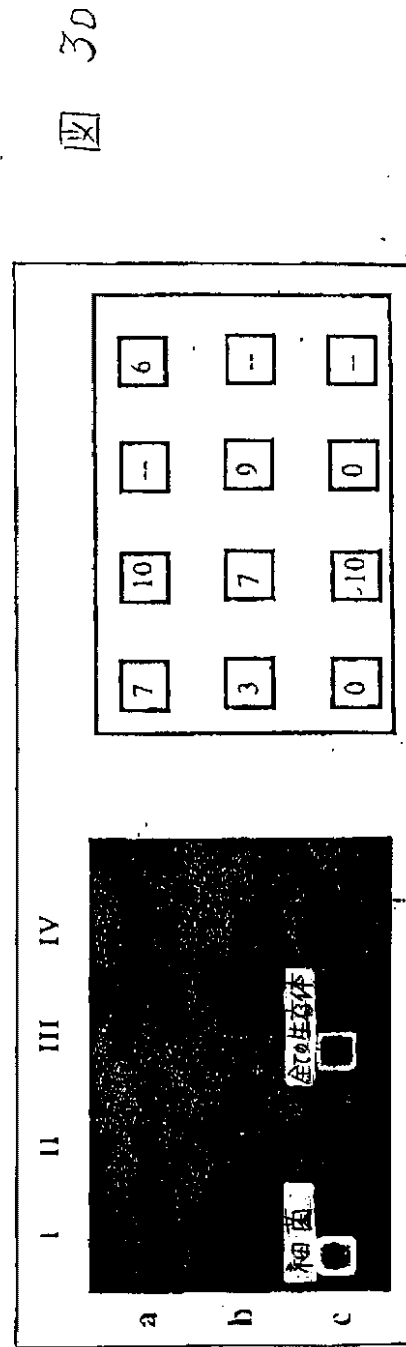
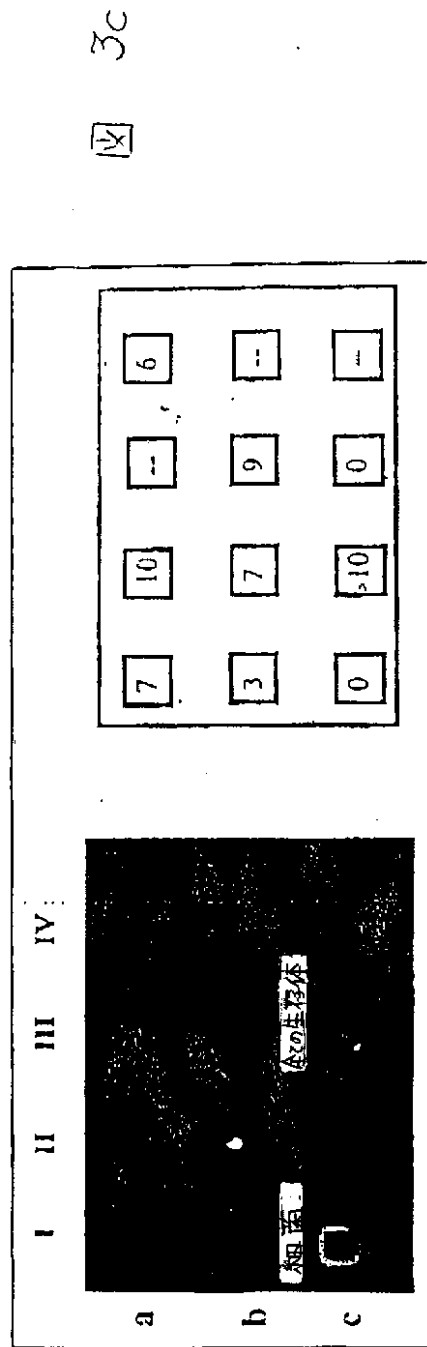
【図3A・B】

図3

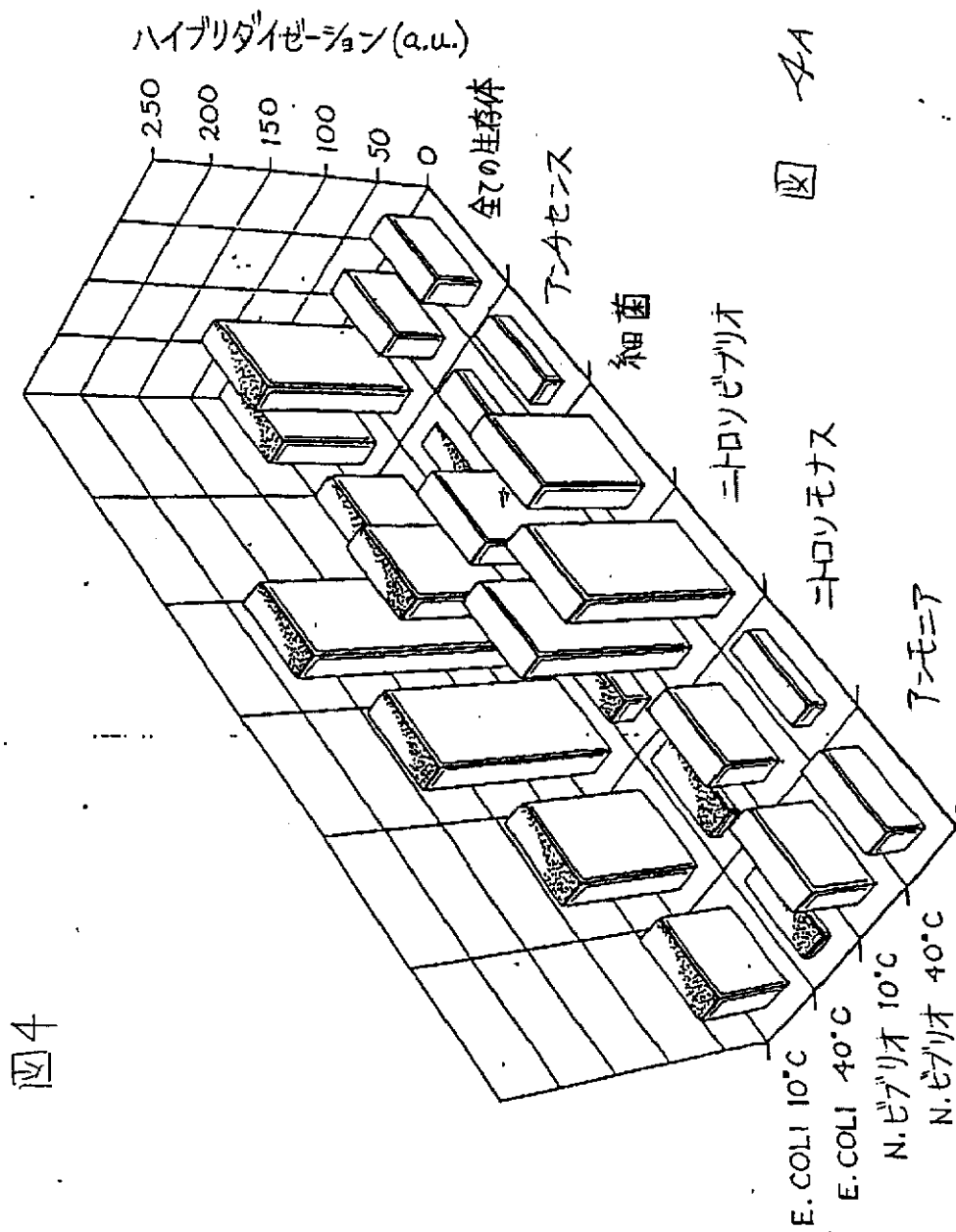


【図3C・D】

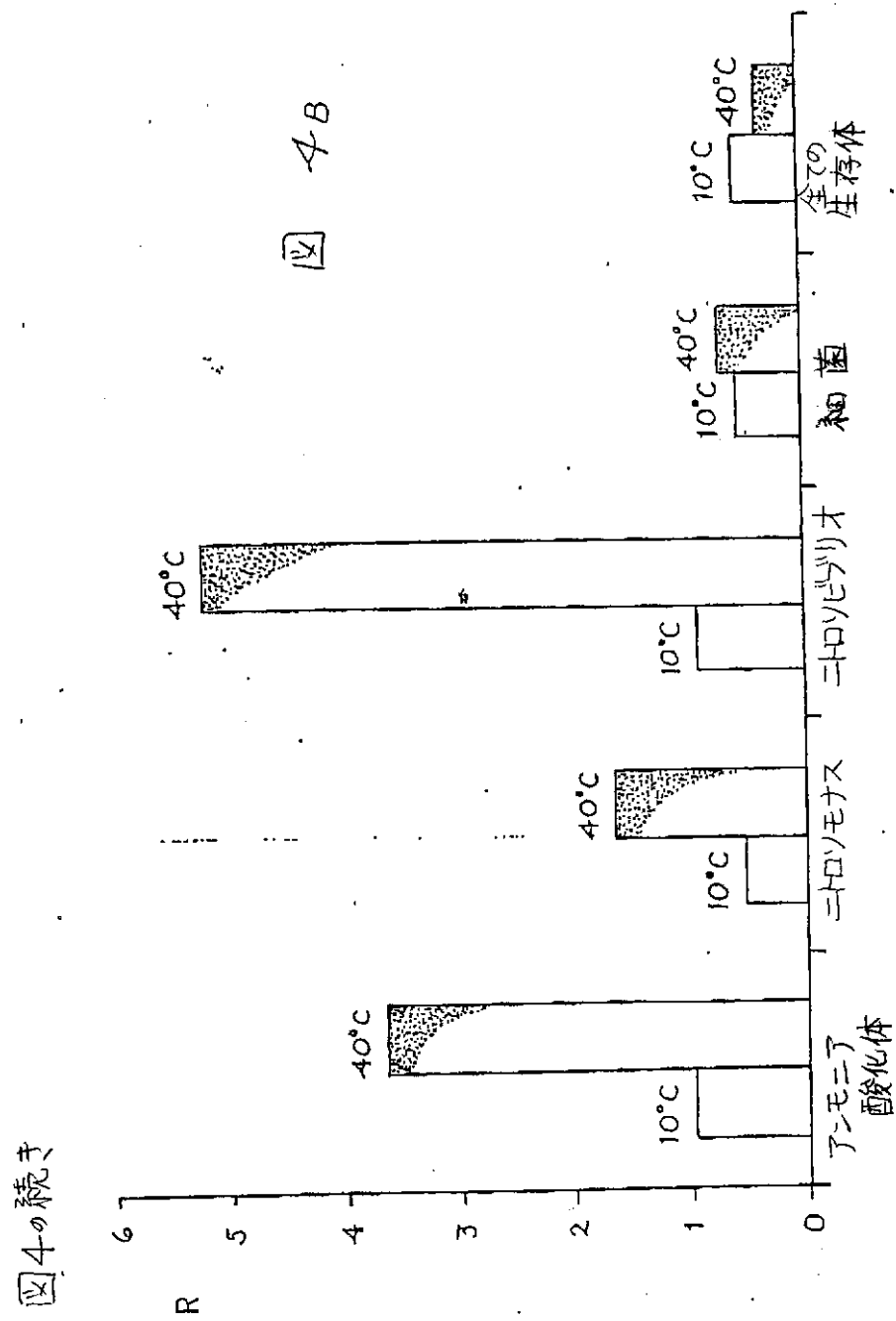
図3の続き



【図4A】



【図4B】



【図5】

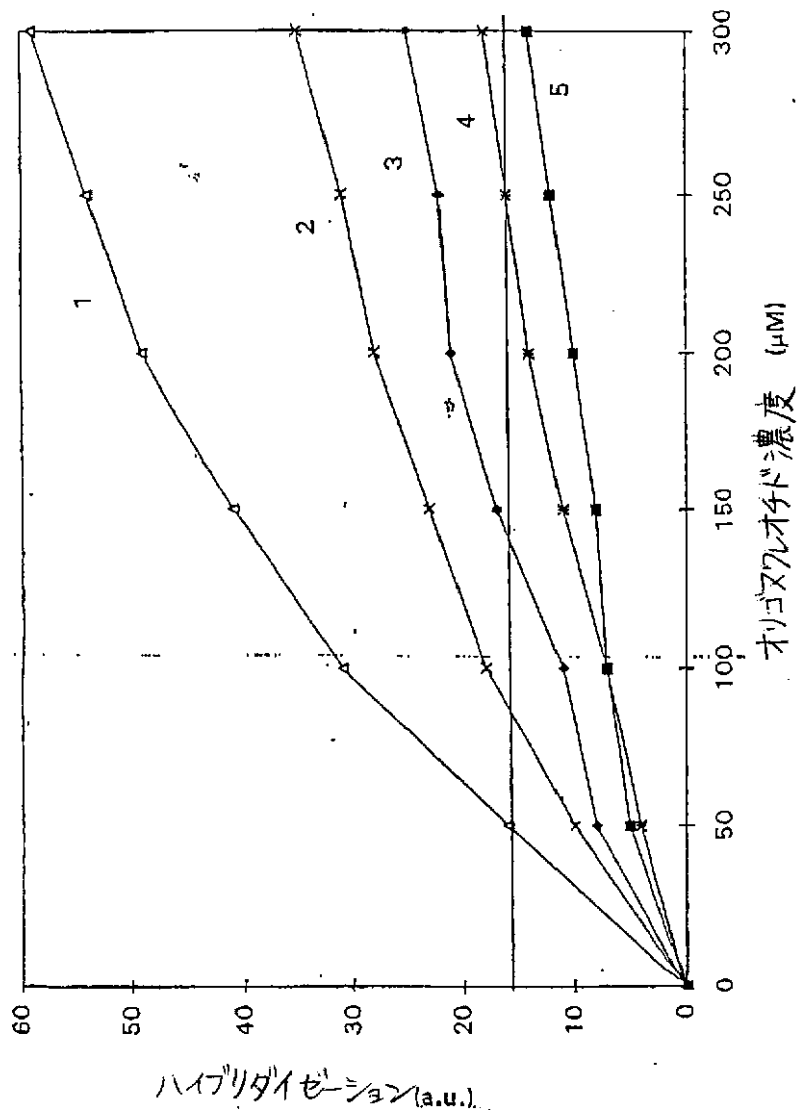
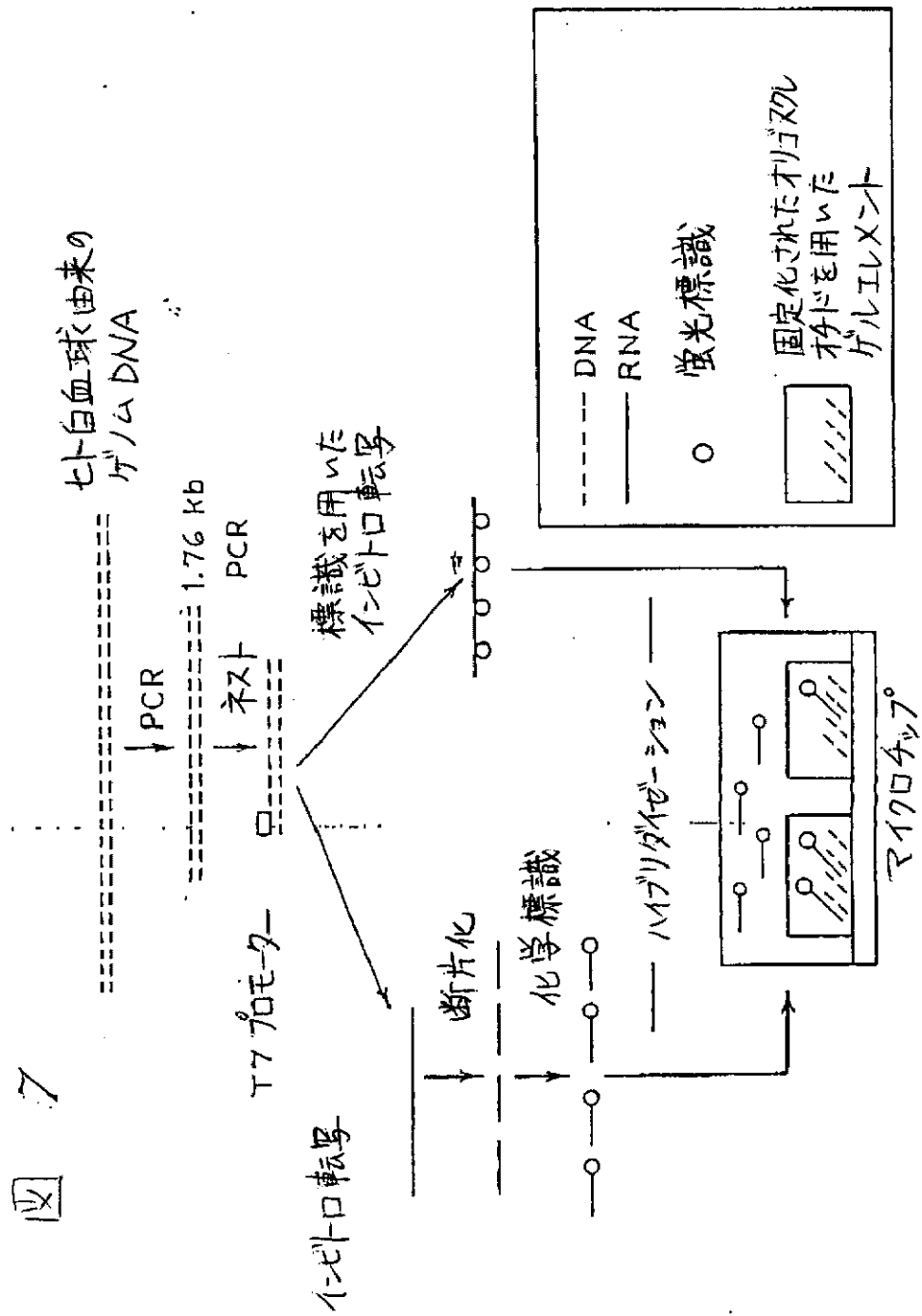


図 5

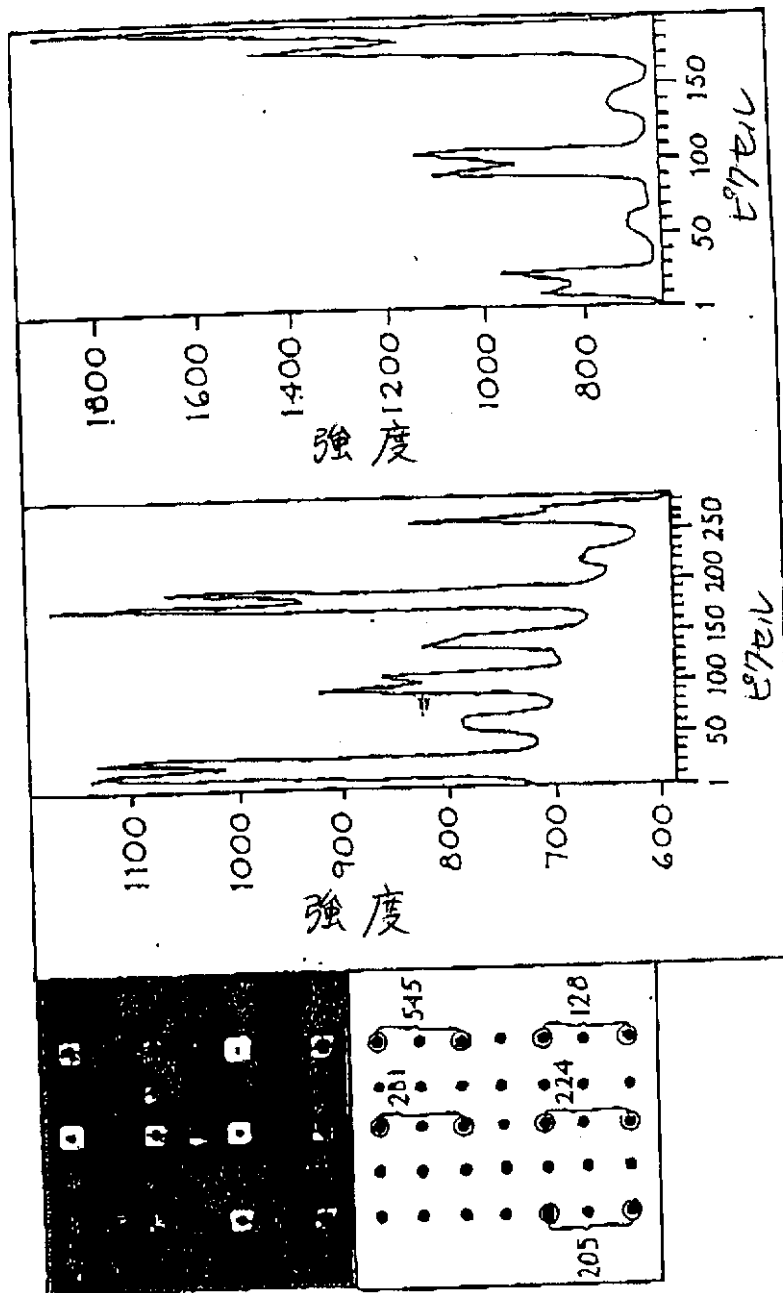
【図6】

a. IVS (N)	5'-TMR-CCTGGGCAGGTTGGTATCA-3' (配列番号 48);
b. IVS I/2 T/A	5'-TMR-CCTGGGCAGGatGGTATCA-3' (配列番号 49);
c. IVS I/1 G/A	5'-TMR-CCTGGGCAGaTTGGTATCA-3' (配列番号 50);
d. IVS I/6 T/C	5'-TMR-CCTGGGCAGGTTGtTATCA-3' (配列番号 51);
e. IVS I/5 G/T	5'-TMR-CCTGGGCAGGTTGtTATCA-3' (配列番号 52);
f. CD26 (N)	5'-TMR-GTTGGTGGTGAGGCCCTGG-3' (配列番号 53);
g. CD26 G/A	5'-TMR-GTTGGTGGTaAGGCCCTGG-3' (配列番号 54);

【図7】



【図8】



8

図

【图9】

5' -AGGCAACGTG	(1) (配列番号	55);
5' -AGGCGACGTG	(2) (配列番号	56);
5' -GGTGAACCTG	(3) (配列番号	57);
5' -TAAATCTGCG	(4) (配列番号	58);
5' -AGGCAACATG	(5) (配列番号	59);
5' -CAAAACCTCC	(6) (配列番号	60);
5' -GCAAACACCA	(7) (配列番号	61);
5' ...TACACCATAA	(8) (配列番号	62);
5' -ACTGCTCATC	(9) (配列番号	63);
5' -CAATGTCTTC	(10) (配列番号	64);
5' -CTCCTCATCT	(11) (配列番号	65);
5' -TGCCGGTCAA	(12) (配列番号	66);
5' -TTAGGACAGC	(13) (配列番号	67);
5' -ACACCACAAG	(14) (配列番号	68);
5' -CACAATGCCT	(15) (配列番号	69);
5' -CAGCAGTAGA	(16) (配列番号	70);
5' -TGCGGGTCAA	(17) (配列番号	71);
5' -TTAGCACAGC	(18) (配列番号	72);

【図10】

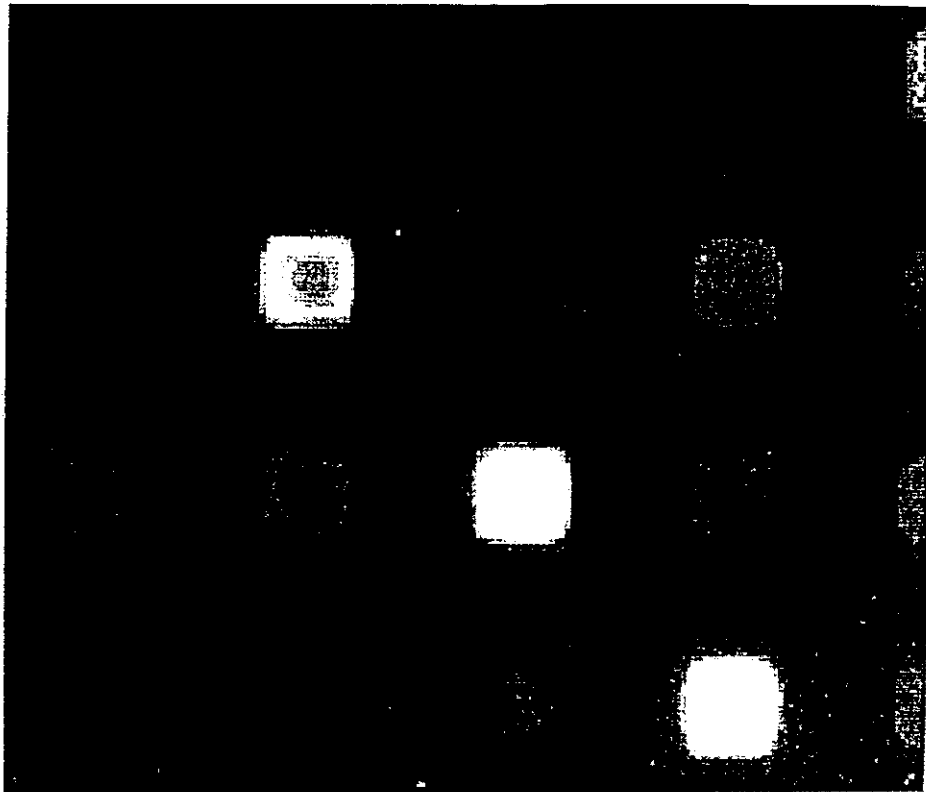
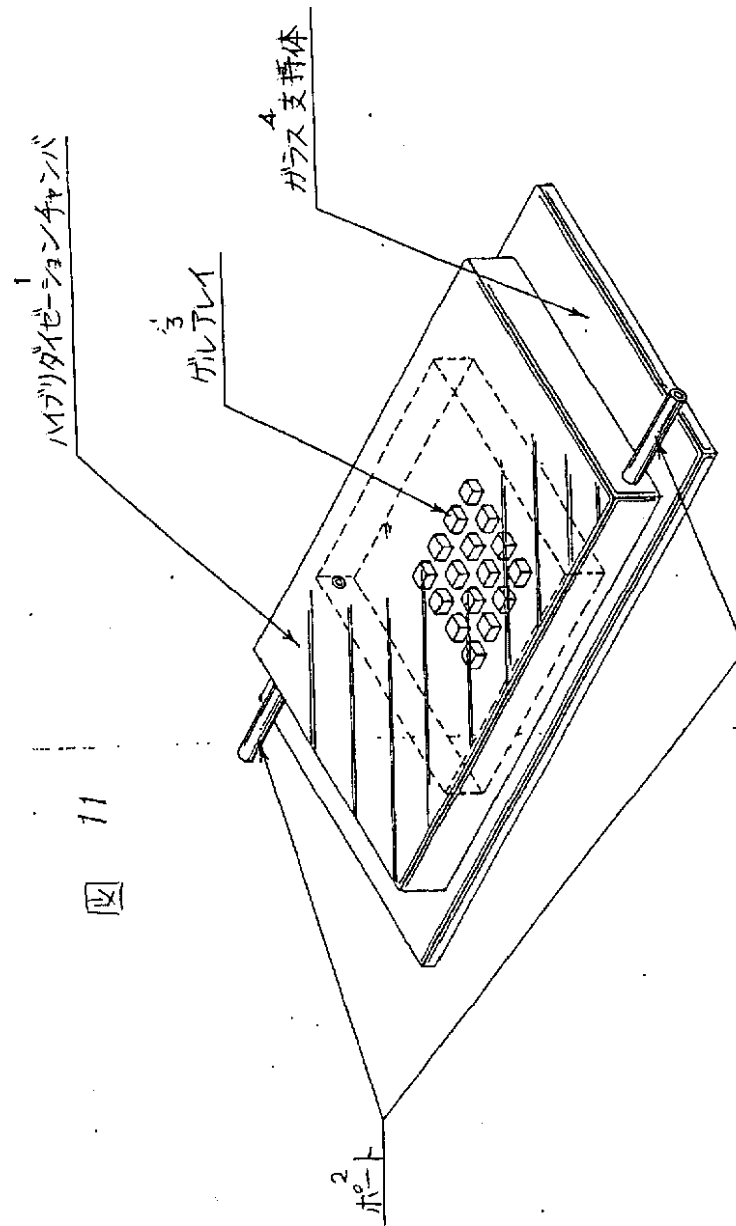


Fig. 10

【図11】



【図12】

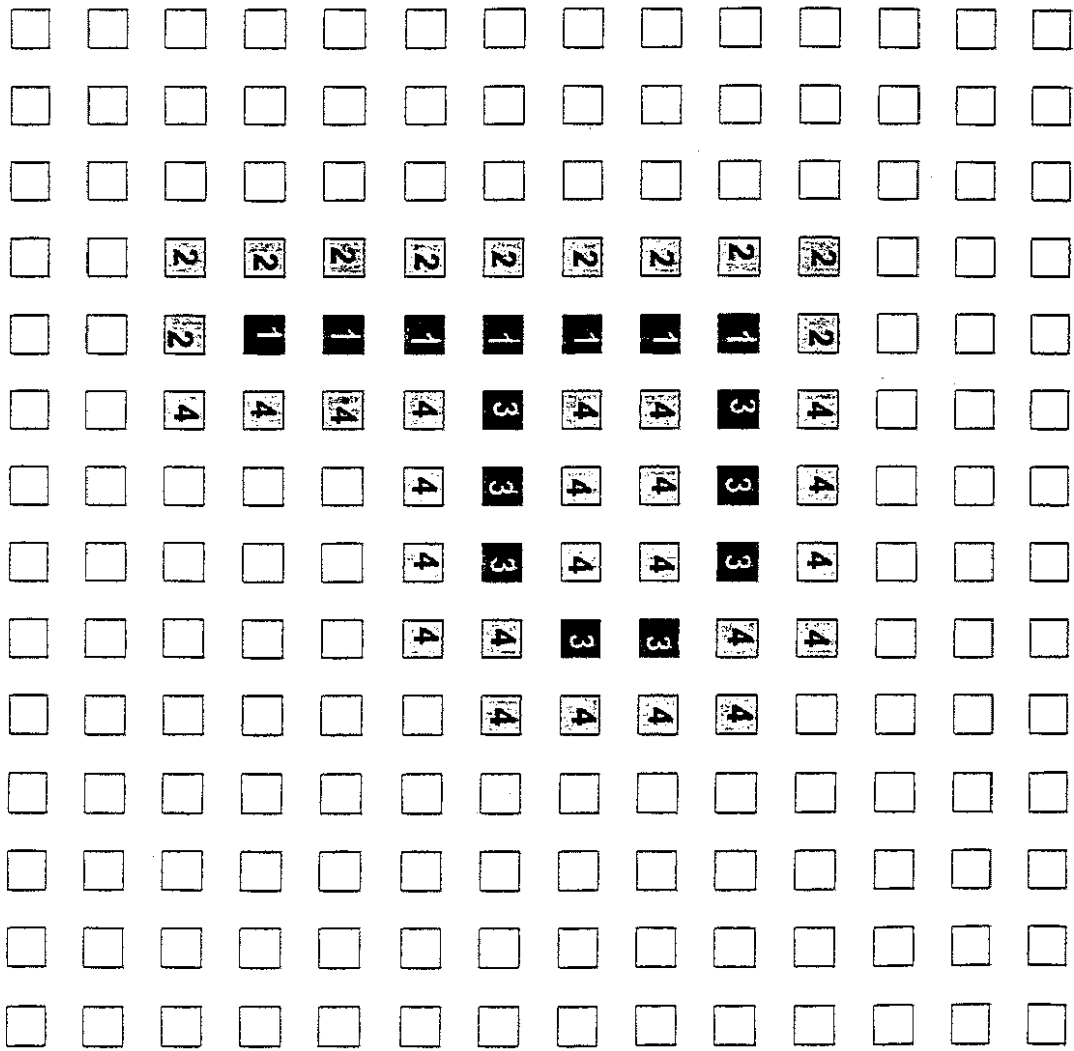
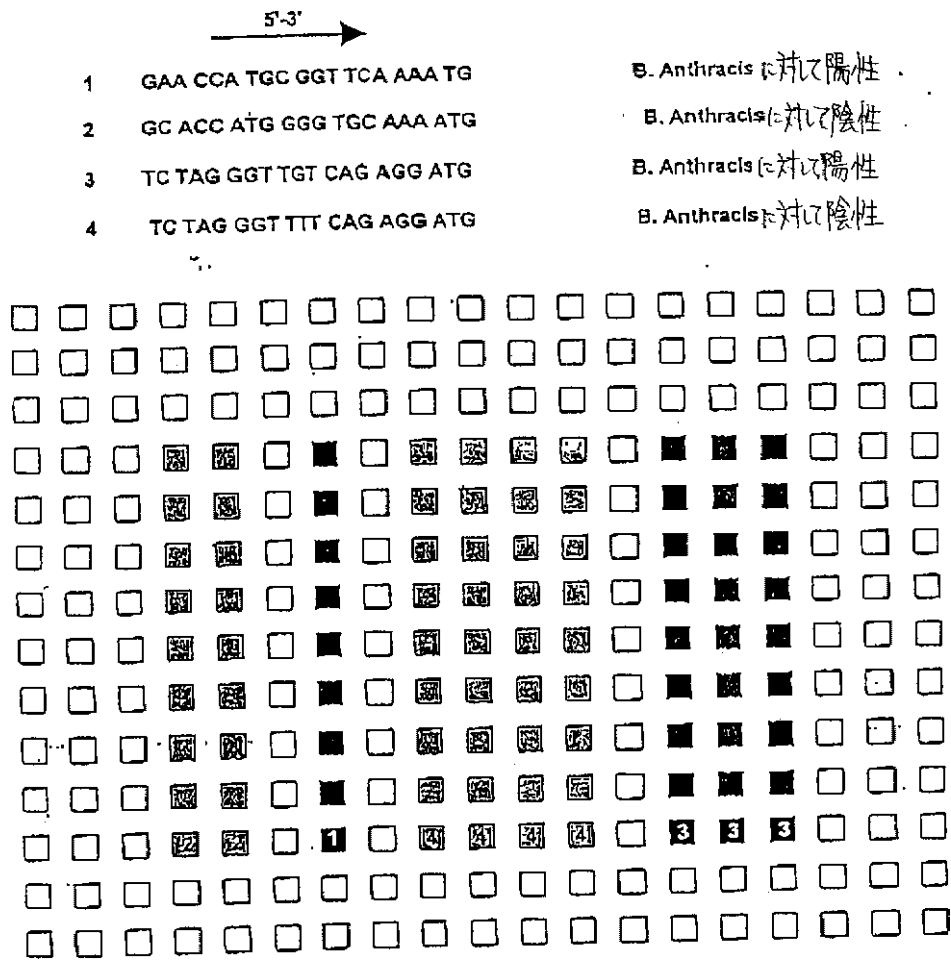


FIG. 12

【図13】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 00/05143
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPD-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBL, STRAND		
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 28444 A (UNIV CHICAGO) 2 July 1998 (1998-07-02) page 5, line 3 -page 13, line 28 page 11, line 10 - line 11; claims 1-22; figures 1-10; examples 1-10 ---	1-22
X	YERSHOV ET AL.: "DNA ANALYSIS AND DIAGNOSTICS ON OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIPS" PNAS, vol. 93, May 1996 (1996-05), pages 4913-4918, XP002064987 cited in the application the whole document --- -/-	1-4, 7-9, 11-15, 18-22
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ 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. *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 September 2001		Date of mailing of the international search report 17/09/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer van Klompenburg, W

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/05143

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 552 270 A (FLORENTIEV VLADIMIR L ET AL) 3 September 1996 (1996-09-03) cited in the application column 2, line 42 -column 3, line 7; claims 1-9; figures 1-8; examples 1-6 ---	1-4,7-9, 11-13, 15,18-22
X	CHEE M ET AL: "ACCESSING GENETIC INFORMATION WITH HIGH-DENSITY DNA ARRAYS" SCIENCE, vol. 274, 25 October 1996 (1996-10-25), pages 610-614, XP002022508 the whole document ---	1-3,7-9, 11-13, 15,18-22
X	SHALON D ET AL: "A DNA MICROARRAY SYSTEM FOR ANALYZING COMPLEX DNA SAMPLES USING TWO-COLOR FLUORESCENT PROBE HYBRIDIZATION" GENOME RESEARCH, vol. 6, no. 7, 1 July 1996 (1996-07-01), pages 639-645, XP000597095 the whole document ---	1-3,7-9, 11-13, 15,18-22
X	GUSCHIN ET AL.: "OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIPS AS GENOSENSORS FOR DETERMINATIVE AND ENVIRONMENTAL STUDIES IN MICROBIOLOGY" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 63, no. 6, June 1997 (1997-06), pages 2397-2402, XP002064989 the whole document ---	1-10,15, 18-20
X	DROBYSHEV ET AL.: "SEQUENCE ANALYSIS BY HYBRIDIZATION WITH OLIGONUCLEOTIDE MICROCHIP: IDENTIFICATION OF BETA-THALASSEMIA MUTATIONS" GENE, vol. 188, no. 1, March 1997 (1997-03), pages 45-52, XP002064990 the whole document ---	1-4,7-9, 11-15, 18-22
X	WO 95 00530 A (AFFYMAX TECH NV ;FODOR STEPHEN P A (US); LIPSHUTZ ROBERT J (US); H) 5 January 1995 (1995-01-05) page 28, line 20 - line 40 ---	16
X	ERLICH, HENRY A. ET AL: "HLA DNA typing", PCR PROTOC.: GUIDE METHODS APPL. (1990), 259-71. EDITOR(S): INNIS, MICHAEL A. PUBLISHER: ACADEMIC, SAN DIEGO, CALIF. CODEN: 56TMAY XP002079984 page 267 ---	16
X	WO 97 29212 A (GINGERAS THOMAS A ;CHEE MARK S (US); STRYER LUBERT (US); AFFYMETRI) 14 August 1997 (1997-08-14) figures 15,16 ---	18-22

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/05143

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 12354 A (WONG GORDON ; AFFYMETRIX INC (US); SAFER PENINA (US); LOCKHART DAVI) 26 March 1998 (1998-03-26) page 41, line 17 - line 28 page 28, line 14 - line 22 page 23, line 12 - line 20	18-22
A	BORMAN S: "DNA CHIPS COME OF AGE AFTER PERIOD OF GESTATION, TECHNOLOGY FOR GENETIC ANALYSIS IS BLOSSOMING" CHEMICAL AND ENGINEERING NEWS, vol. 74, no. 50, 9 December 1996 (1996-12-09), page 42/43 XP000633458 the whole document	1-22
A	MIRZABEKOV ET AL.: "DNA SEQUENCING BY HYBRIDIZATION- A MEGASEQUENCING METHOD AND A DIAGNOSTIC TOOL?" TIBTECH, vol. 1994, no. 12, 1994, pages 27-32, XP000670232 cited in the application page 28, left-hand column	1-22
A	WO 90 15157 A (GENE TRAK SYSTEMS) 13 December 1990 (1990-12-13) Probe 1660 to the 16s rRNA of Eubacteria. page 14-16	5,6,10
A	WO 96 36733 A (AKZO NOBEL NV ; EARLE STEVEN R (US); JACOBSON WALTER R (US)) 21 November 1996 (1996-11-21) Primer 299 for mycobacterial 16S rRNA amplification. page 13	5,6,10
A	WO 96 08582 A (BERGERON MICHEL G ; QUELLETTE MARC (CA); ROY PAUL H (CA)) 21 March 1996 (1996-03-21) Universal bacterial detection probe #3. page 43	5,6,10
A	US 5 462 855 A (SPRINGER WOLFGANG ET AL) 31 October 1995 (1995-10-31) the whole document	5,6,10
A	WO 89 11548 A (CETUS CORP) 30 November 1989 (1989-11-30) examples 4,5	14,16,17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/05143

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9828444 A	02-07-1998	AU 5716098 A EP 0951569 A	17-07-1998 27-10-1999
US 5552270 A	03-09-1996	WO 9216655 A SU 1794088 A DE 69221980 D DE 69221980 T EP 0535242 A JP 6507486 T AT 157706 T	01-10-1992 07-02-1993 09-10-1997 12-02-1998 07-04-1993 25-08-1994 15-09-1997
WO 9500530 A	05-01-1995	AU 7212494 A EP 0705271 A JP 9501561 T US 5837832 A US 6268152 B US 5861242 A	17-01-1995 10-04-1996 18-02-1997 17-11-1998 31-07-2001 19-01-1999
WO 9729212 A	14-08-1997	AU 2189397 A EP 0937159 A JP 2000504575 T US 6228575 B	28-08-1997 25-08-1999 18-04-2000 08-05-2001
WO 9812354 A	26-03-1998	AU 4495497 A EP 0943012 A JP 2001500741 T	14-04-1998 22-09-1999 23-01-2001
WO 9015157 A	13-12-1990	AT 127530 T AU 5950690 A CA 2031499 A DE 69022180 D DE 69022180 T EP 0431149 A JP 4500315 T US 5401631 A	15-09-1995 07-01-1991 01-12-1990 12-10-1995 01-02-1996 12-06-1991 23-01-1992 28-03-1995
WO 9636733 A	21-11-1996	US 5925518 A AU 5921596 A	20-07-1999 29-11-1996
WO 9608582 A	21-03-1996	AU 705198 B AU 3468195 A BR 9508918 A CA 2199144 A EP 0804616 A JP 10504973 T NO 971111 A NZ 292494 A US 6001564 A	20-05-1999 29-03-1996 21-10-1997 21-03-1996 05-11-1997 19-05-1998 09-05-1997 25-03-1998 14-12-1999
US 5462855 A	31-10-1995	DE 4014845 A AT 133209 T CA 2041889 A DE 59107264 D DK 456047 T EP 0456047 A ES 2082881 T JP 7087996 A	14-11-1991 15-02-1996 10-11-1991 29-02-1996 20-05-1996 13-11-1991 01-04-1996 04-04-1995

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/05143

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8911548 A	30-11-1989	AT 173508 T	15-12-1998
		AU 632494 B	07-01-1993
		AU 3754289 A	12-12-1989
		DE 68928853 D	24-12-1998
		DE 68928853 T	05-08-1999
		EP 0451141 A	16-10-1991
		IE 164389 L	20-11-1989
		IL 90358 A	18-08-1993
		JP 2897959 B	31-05-1999
		JP 3504328 T	26-09-1991

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
G 0 1 N 37/00	1 0 2	C 1 2 N 15/00	F
(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, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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			
(72)発明者 ガスチン, ドミトリー ワイ. アメリカ合衆国 メリーランド 20852, ロックビル, コングレッションナル レ ーン 259, アpartment ティー 3			
(72)発明者 チック, バレンタイン アメリカ合衆国 イリノイ 60517, ウ ッドリッジ, クリスタル コート 2540, アpartment 111			
(72)発明者 ドロビシェフ, アレクセイ ロシア 1444009, モスクワ リージョ ン, エレクトルソル, ナンバー9エイ ー3, スポルティブナヤ ストリート			
(72)発明者 フォティン, アレクサンダー アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, ナンバー2, ノルマンディー アベニュー 99			
(72)発明者 ヤーショフ, ゲナディー アメリカ合衆国 イリノイ 60521, ヒ ンズデール, エコー レーン ナンバー 5 105453			
(72)発明者 リソフ, ユーリ アメリカ合衆国 イリノイ 60521, ヒ ンズデール, モッキングバード レーン ナンバー 201 767 ウェスト 16			

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA14 CA01 CA09 CA11
HA13 HA14 HA19
4B029 AA07 AA23 BB02 BB11 BB13
BB20 CC03 FA15
4B063 QA12 QA17 QA18 QA19 QQ06
QQ08 QQ10 QQ12 QQ16 QQ18
QQ52 QR38 QR56 QR82 QS25
QS34 QS39 QX02

专利名称(译)	将多基因信息转换为更简单模式的定制寡核苷酸微尖端是移动的和可重复使用的		
公开(公告)号	JP2002538785A	公开(公告)日	2002-11-19
申请号	JP2000602818	申请日	2000-02-29
[标]申请(专利权)人(译)	芝加哥大学		
申请(专利权)人(译)	芝加哥大学		
[标]发明人	ミラザベコフアンドレイ ガスチンドミトリーワイ チックバレンタイン ドロビシェフアレクセイ フォティンアレクサンダー ヤーショフゲナディー リソフユーリ		
发明人	ミラザベコフ, アンドレイ ガスチン, ドミトリー ワイ. チック, バレンタイン ドロビシェフ, アレクセイ フォティン, アレクサンダー ヤーショフ, ゲナディー リソフ, ユーリ		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/00 C12M1/34 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6837 C12Q1/6881 C12Q1/6883 C12Q1/689 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6837 B01J2219/00644 C12Q1/6881 C12Q1/6883 C12Q1/689 C12Q2600/156 G16B25/00 C12Q2565/607 C12Q2565/513		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12M1/00.A C12M1/34.Z G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA14 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/ /HA19 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB02 4B029/BB11 4B029/BB13 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA12 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/ /QQ10 4B063/QQ12 4B063/QQ16 4B063/QQ18 4B063/QQ52 4B063/QR38 4B063/QR56 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02		
优先权	09/261115 1999-03-03 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了定制的寡核苷酸微芯片，用于检测和鉴定对环境，食物和生物样品中的不同基因，器官和/或个体具有特异性的核酸。用作生物传感器。该微芯片旨在将遗传信息的多个位转换为一个简单的信号模式，该信号模式被解释为一个单元。由于改进了方法，样品中的寡核苷酸可与微芯片杂交，因此微芯片可重复使用且可移动。对于现场调查，移动激光或条形码扫描仪是合适的。

ロチップは、移動可能でありそして再利用可能である

(57)【要約】

本発明は、環境中、食品中ならびに生物学的サンプル中の、異なる遺伝子、器官および/または個体に対して特異的な核酸の、検出および同定をするためのカスタマイズされたオリゴヌクレオチドマイクロチップを、バイオセンサーとして使用することに関する。このマイクロチップは、遺伝子情報の多重ビットを、ユニットとして解釈される単純なシグナルパターンに変換するように設計される。サンプル由来のオリゴヌクレオチドがマイクロチップへハイブリダイズする方法が改善されたので、マイクロチップは、再利用可能かつ移動可能である。実地調査に対して、移動可能なレーザーまたはバーコードスキャナーが、適している。

