

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4393378号
(P4393378)

(45) 発行日 平成22年1月6日(2010.1.6)

(24) 登録日 平成21年10月23日(2009.10.23)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68 Z N A A
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
G O 1 N	33/53 (2006.01)	G O 1 N	33/53 M
G O 1 N	33/543 (2006.01)	G O 1 N	33/543 5 1 1 B
G O 1 N	33/566 (2006.01)	G O 1 N	33/543 5 1 1 M

請求項の数 23 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-511549 (P2004-511549)	(73) 特許権者	504238301 ビオメリュー
(86) (22) 出願日	平成15年6月3日(2003.6.3)		フランス国 エフ-69280 マルシー レトワール, シュマン ド ロルム
(65) 公表番号	特表2005-535305 (P2005-535305A)	(74) 代理人	100086586 弁理士 安富 康男
(43) 公表日	平成17年11月24日(2005.11.24)	(74) 代理人	110000914 特許業務法人 安富国際特許事務所
(86) 国際出願番号	PCT/FR2003/001659	(72) 発明者	マンラン, ベルナル フランス国 エフ-69100 ヴィウ ルバンヌ, リュ ド ラ ドゥア, 2 1
(87) 国際公開番号	W02003/104490	(72) 発明者	ペラン, アニェス フランス国 エフ-69007 リヨン, リュ ド サン-クルー, 17 最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成15年12月18日(2003.12.18)		
審査請求日	平成18年4月17日(2006.4.17)		
(31) 優先権主張番号	02/06883		
(32) 優先日	平成14年6月5日(2002.6.5)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

(54) 【発明の名称】 ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を同時に検出する方法、並びに、診断におけるその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも1種の核酸、及び、性質の異なる少なくとも1種の他のリガンドからなる対象検体を含む可能性のある試料中でハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を同時に検出する方法であって、

以下の段階：

(i) 反応バッファー中に希釈した既知容量の試料を、前記対象検体を捕獲するためのパートナーであらかじめ被覆した捕獲表面上に配置する段階であって、

前記捕獲するためのパートナーは、少なくとも1種の核酸プローブ及び少なくとも1種の抗リガンド(antiligand)からなる段階、

(ii) 15 ~ 60 の温度で反応させる段階、並びに、

(iii) 起こったハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を視覚化する段階：

を含む

ことを特徴とする方法。

【請求項2】

段階(i)と段階(ii)の間に以下の段階(i')：

(i') 前記対象検体に特異的な結合パートナーを添加する段階であって、前記パートナーはあらかじめ標識と結合させたものである段階：

を更に含む

ことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

段階 (i i) と段階 (i i i) の間に以下の 2 つの段階 (i i ') 及び段階 (i i ' ')
:

(i i ') 前記対象検体に特異的な結合パートナーを添加する段階であって、前記パートナーはあらかじめ標識と結合させたものである段階、及び、

(i i ' ') 15 ~ 60 の温度で反応させる段階:

を更に含む

ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

生物試料中に含まれる標的核酸があらかじめ標識されていて、段階 (i ') 又は段階 (i i ') で添加する結合パートナーは、リガンドに特異的なパートナーをあらかじめ標識したもののみである

ことを特徴とする請求項 2 又は 3 に記載の方法。

10

【請求項 5】

段階 (i ') 及び段階 (i i ') において、リガンドに特異的な結合パートナーの代わりに、生物試料中に含まれている可能性のあるリガンドをあらかじめ標識したものを添加する

ことを特徴とする請求項 2 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

標識に特異的な基質を段階 (i i i) の前に添加して、ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を視覚化する

ことを特徴とする請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7】

捕獲表面を段階 (i i) 及び / 又は段階 (i i ' ') の後に洗浄する

ことを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

反応温度が 35 ~ 45 である

ことを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

反応温度が 37 ~ 41 である

ことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

反応温度が 37 又は 41 である

ことを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

反応バッファーは、イオン強度 0.4 ~ 1 M であり、pH 7 ~ 8 であり、界面活性剤を含む

ことを特徴とする請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

核酸特異的結合パートナー、リガンド特異的結合パートナー、請求項 4 に記載の標的核酸、及び、請求項 5 に記載のリガンドを、同じ標識で標識する

ことを特徴とする請求項 2 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 13】

捕獲パートナーは同一の疾患に対するマーカーである

ことを特徴とする請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

捕獲パートナーは異なる疾患に対するマーカーである

ことを特徴とする請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

伝染性疾患又は代謝由来疾患を検出するための請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方

50

法。

【請求項 16】

ウイルス性疾患を検出するための請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

細菌の存在の工業的な診断における請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

生物分子を同定及び / 又は定量するための請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

細胞又は組織のトランスクリプトーム及びプロテオームを同時に検出するための請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 20】

捕獲表面；少なくとも 1 種の核酸プローブ、及び、性質の異なる少なくとも 1 種の他の抗リガンドからなる対象検体を捕獲するためのパートナー；並びに、イオン強度が 0.4 ~ 1 M であり、pH が 7 ~ 8 であり、界面活性剤を含む反応バッファーを含む診断用キット。

【請求項 21】

標的リガンドに特異的な結合パートナーをあらかじめ標識したものを更に含むことを特徴とする請求項 20 に記載の診断用キット。

【請求項 22】

試験する試料中に含まれている可能性のあるリガンドをあらかじめ標識したものの、及び、反応バッファーを更に含むことを特徴とする請求項 20 に記載の診断用キット。

20

【請求項 23】

標的核酸に特異的な結合パートナーを更に含むことを特徴とする請求項 21 又は 22 に記載の診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を同時に検出する新規の方法、並びに、治療的及び工業的診断における、並びに、生物分子の同定及び / 又は定量におけるその使用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

病状の診断又は監視には、非常に一般的には、ハイブリダイゼーション検出及び / 又は免疫検出が必要である。従って、AIDS を診断する際には、p24 タンパク質、抗ウイルスエンベロープタンパク質抗体及びウイルスの RNA の存在、又は、抗 p24 タンパク質抗体及びウイルスの RNA の存在の両方を調べる必要がある可能性がある。

【0003】

同一の操作条件下において、かつ、同一反応媒体中において、ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を同時に検出することにより、この 2 種の反応の検出を要する病状を容易に診断できるようになるであろう。

40

【0004】

共通のパラメーターを使用して免疫反応及びハイブリダイゼーション反応を検出するという研究は、従来技術において既になされている。

【0005】

例えば、特許文献 1 に、各検体に特異的なマーカーを使用して多数の検体を同時に検出することを目的とした方法が記載されている。しかしながら、この方法は、ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応の両方を同時に検出することについては記載しておらず、また、視覚化するために、各検体に特異的な各マーカーによって異なる操作条件を使用している。

50

【 0 0 0 6 】

また、特許文献 2 には、検出マーカーとして半導体ナノ結晶を使用して、検体を同時に検出する方法も記載されている。ハイブリダイゼーション反応又は免疫反応は、読み取る波長の変化から分かる。しかしながら、この方法は、検体をそれぞれ異なる条件下で調べるために、分析試料を数個に分けなければならないという点が不利である。

【 0 0 0 7 】

従って、従来技術における方法には、同一操作条件下かつ同一反応媒体中におけるハイブリダイゼーション反応及び免疫反応の同時検出が、複雑で高価であるという理由から不可能である、という欠点がある。

【特許文献 1】PCT 特許 WO 01 / 8 6 2 9 6

10

【特許文献 2】PCT 特許 WO 01 / 6 1 0 4 0

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

そこで、本出願人は、ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を同時に検出する新規の方法を開発し、上記欠点を克服した。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

従って、本発明の目的は、

少なくとも 1 種の核酸、及び、性質の異なる少なくとも 1 種の他のリガンドからなる対象検体を含む可能性のある試料中でハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を同時に検出する方法であって、

20

以下の段階：

(i) 反応バッファー中に希釈した既知容量の試料を、上記対象検体を捕獲するためのパートナーであらかじめ被覆した捕獲表面上に配置する段階であって、

上記捕獲するためのパートナーは、少なくとも 1 種の核酸プローブ及び少なくとも 1 種の抗リガンド (a n t i l i g a n d) からなる段階、

(i i) 1 5 ~ 6 0 の温度で反応させる段階、並びに、

(i i i) 起こったハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を視覚化する段階：

を含む

30

ことを特徴とする方法、並びに、

(例えばウイルス性等の) 伝染性疾患及び代謝由来疾患を検出するための、並びに、細菌の存在を工業的に診断するための、並びに、生物分子を同定及び / 又は定量するための、この方法の使用

である。

【 0 0 1 0 】

本発明の別の主題は、

本発明の方法の実施に有用な、生物学的な、又は、診断用の試験キット

である。

【 0 0 1 1 】

40

本発明の方法は、容易に実施できる方法であり、あらゆる期待に反して、試料中において、同一操作条件 (すなわち反応媒体及び温度) 下で、少なくとも 1 種の核酸及び性質の異なる少なくとも 1 種の他のリガンドからなる対象検体の存在を検出できるようにする方法である。上記対象検体の存在は、ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を視覚化することによって実証される。

【 0 0 1 2 】

「ハイブリダイゼーション反応」という用語は、捕獲核酸と標的核酸との間の任意の反応を意味することを意図し、「免疫反応」という用語は、捕獲抗リガンドと、核酸以外の標的リガンドとの間の任意の反応を意味することを意図する。

【 0 0 1 3 】

50

「核酸」という用語は、オリゴヌクレオチド、デオキシリボ核酸及びリボ核酸、並びに、それらの誘導体を意味することを意図する。

【0014】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、適切なハイブリダイゼーション条件下で少なくとも部分的に相補的なオリゴヌクレオチドとハイブリダイズできる、天然の又は改変された少なくとも2つのヌクレオチド（デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド又はその両方）の鎖を意味する。「改変されたヌクレオチド」という用語は、例えば、改変された塩基を含むヌクレオチド、並びに/又は、ヌクレオチド間の結合における改変及び/若しくはバックボーンにおける改変を含むヌクレオチドを意味することを意図する。改変された塩基の例としては、イノシン、メチル-5-デオキシシチジン、ジメチルアミノ-5-デオキシウリジン、ジアミノ-2,6-プリン及びプロモ-5-デオキシウリジンを挙げることができる。

10

【0015】

改変されたヌクレオチド間の結合の例としては、チオリン酸、N-アルキルリン酸アミド (alkylphosphoramidate)、アルキルホスホン酸エステル (alkylphosphonate) 及びアルキルホスホジエステル結合を挙げることができる。フランス特許FR-A-2607507に記載されるもの等の -オリゴヌクレオチド、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 第8巻, Issue 16, 1998年8月18日, 2219~2222頁に記載されるチオリン酸-LNA及び2'-チオ-LNA等のLNA、M. Egholmらの文献 (J. Am. Chem. Soc. (1992), 114, 1895-1897) の主題であるPNAは、バックボーンが改変されたヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドの例である。

20

【0016】

「核酸以外の性質の異なるリガンド」という用語は、特異的な結合パートナーと結合できる、核酸とは異なる任意の分子を意味することを意図する。この結合パートナーは、捕獲パートナーからなる場合に、抗リガンドと称される。便宜上、「リガンド」及び「抗リガンド」という用語を、以下において、ハイブリダイゼーション反応ではなく、免疫反応でできる任意の化合物を示すために使用することとする。

【0017】

リガンドとしては、例えば、抗原、抗体、ポリペプチド、タンパク質、ハプテン、糖、酵素及びその基質を挙げることができる。

30

【0018】

抗リガンドとしては、リガンドの例と同様のもの、及び、レクチン、細胞受容体及びアダプターを挙げることができる。

【0019】

「抗原」という用語は、免疫応答で合成が引き起こされるような抗体によって認識できる化合物を意味する。

【0020】

「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、遺伝子組換えで得られる抗体、及び、抗体断片を含む。

40

【0021】

ポリクローナル抗体の取得は、対象である標的抗原の少なくとも1種で動物を免疫し、続いて、上記動物の血清を採取して、(特に、上記抗体によって特異的に認識される抗原(特に、対象である標的抗原)を付着させたカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって)他の血清成分から上記抗体を分離し、所望の抗体を精製した状態で回収することによって実施できる。

【0022】

モノクローナル抗体の取得はハイブリドーマ技術によって実施でき、その一般的な原理を以下に記載する。

50

【0023】

まず動物を、一般的にはマウス（又は、*in vitro*における免疫の場合は培養細胞）を、対象である標的抗原で免疫する。これにより、Bリンパ球が上記抗原に対する抗体を産生できる。次に、このような抗体産生リンパ球を「不死」骨髄腫細胞（例示におけるマウス細胞）と融合させ、ハイブリドーマを作成する。こうして得られた異種細胞混合物から、特定の抗体を産生でき、かつ、無限に増殖できる細胞を選択する。ハイブリドーマをそれぞれクローンの形態で複製し、それぞれにモノクローナル抗体を作成させ、所望の腫瘍抗原に対する認識特性を（例えば、ELISAによって、一次元若しくは二次元免疫阻害によって、免疫蛍光法によって、又は、バイオセンサーの使用によって）試験してもよい。こうして選択したモノクローナル抗体をその後、（特に、上述のアフィニティークロマトグラフィー法によって）精製する。

10

【0024】

抗体断片は、その結合パートナー又は捕獲パートナーと結合する機能を維持しているような断片である。

【0025】

「ポリペプチド」という用語は、少なくとも2つのアミノ酸からなる鎖を意味することを意図する。「アミノ酸」という用語は、タンパク質をコードする主要なアミノ酸、酵素作用の後に得られる（*trans*-4-ヒドロキシプロリン等の）アミノ酸、天然アミノ酸であるがタンパク質中には存在しない（ノルバリン（*norvaline*）、*N*-メチル-L-ロイシン、スタリン（*staline*）等の）アミノ酸（*Hunt S. Chemistry and Biochemistry of the amino acids*, Barrett GC, ed., Chapman and Hall, ロンドン, 1985年）、固体の支持体の合成又は液相中で使用できる、化学基で保護されたアミノ酸、及び、非天然アミノ酸を意味することを意図する。

20

【0026】

「タンパク質」という用語は、核タンパク質、リボタンパク質、リンタンパク質、金属タンパク質及び糖タンパク質等の、繊維状及び球状のホロタンパク質及びヘテロタンパク質を含む。

【0027】

「ハプテン」という用語は、免疫原でない化合物、すなわち、自力では抗体産生による免疫反応を促進できないが、既知条件下で動物を免疫して（特にハプテン-タンパク質コンジュゲートで免疫して）得られる抗体によって認識できる化合物を示す。これらの化合物は一般的に分子量が3000 Da未満であり、より一般的には2000 Da未満であり、例えば、グリコシル化ペプチド、代謝産物、ビタミン、ホルモン、プロスタグランジン、毒素又は様々な医薬品、ヌクレオシド及びヌクレオチドであってよい。

30

【0028】

酵素及びその基質は当業者に公知である。捕獲抗リガンドとして酵素を使用すると、その酵素の基質類似体を試験試料中において探索できる。

【0029】

レクチンは、*Biochemistry*（第4版，G. L. Zubay, 1998年，The McGraw-Hill Companies, 米国，ボストン）に記載されるように、当業者に公知の機構によって糖を認識できる。

40

【0030】

抗リガンドとして使用される受容体は、標的リガンドであるエンベロープタンパク質と結合できる表面タンパク質である。このような受容体の例としては、HIV gp120 エンベロープタンパク質に対するCXCR4ケモカイン受容体が含まれる（*Coranaiti, M. T., 2001年, Neuroscience Letters, 312(2), 67-70*）。

【0031】

アプタマーは捕獲パートナーであり、事実上、抗体として働くと共にタンパク質リガンド

50

と結合する機能を有するタンパク質及び核酸である (Toulme, J. J. 及び Giege, R., 1998年, *Medicine Science*, 14(2), 155-166)。

【0032】

本発明の方法において試験した試料は、生物学的なものであっても、工業的なものであってもよい。

【0033】

生物試料としては、血液、リンパ液、脳脊髄液、咽頭から採取した標本、膣スミア及び尿等の、対象検体を含有できる任意の生物学的流体を挙げることができる。

【0034】

工業試料としては、生物学的分析が必要な、工業から出る任意の試料を挙げることができる。食品産業から出る試料(調理済み料理、処理水)は、工業試料の例の一部である。

【0035】

試料を希釈する反応バッファは、ハイブリダイゼーションバッファと免疫反応で使用するバッファとの中間の反応バッファである。このバッファは、当業者には明瞭である。

【0036】

ある特定の実施形態によれば、反応バッファは、イオン強度0.4~1Mであり、pH7~8であり、界面活性剤を含む。

【0037】

反応バッファとしては、リン酸塩、ナトリウム塩、リチウム塩及びHEPESに基づくバッファを挙げることができ、界面活性剤としては、Tween20、Tween80及びTritonを挙げることができる。

【0038】

従って、本発明の独創的な点は、この反応バッファ中において、ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応の両方を検出できるという点である。

【0039】

本発明の方法の反応温度は15~60である。15未満の温度では、ハイブリダイゼーション反応が相対的に特異的でなくなる危険性があり、特にオリゴヌクレオチドが8bpを超える長さである場合には、温度が60を超えるトリガンド及び抗リガンドの観点から問題が出てくる可能性がある。実際、このような温度では、変性するタンパク質があり、かつ、ハイブリダイゼーション反応は30bpより長い大きなオリゴヌクレオチドの場合にのみ可能となる。

【0040】

ある実施形態によれば、反応温度は35~45、好ましくは37~41であり、37~41の温度がより好ましい。

【0041】

試験する試料を配置する捕獲表面は、核酸プローブ及び抗リガンドを付着させることができる任意の表面であってよい。捕獲表面としては、マイクロウェル、マイクロプレート、ポリマー表面、メンブレン、顕微鏡用スライドガラス、(シリカ、ガラス、マイカ又は石英等の)機能化又は非機能化無機担体、(金及び銀等の)金属表面、並びに、粒子及び微粒子(特に磁気粒子及び微粒子)を挙げることができる。

【0042】

本発明の方法において、捕獲表面を、上記対象検体を捕獲するためのパートナー、すなわち核酸プローブ及び抗リガンドであらかじめ被覆する。

【0043】

捕獲パートナーは、本出願人によるフランス特許出願FR00/14691(フランス特許FR2816711)に記載される方法によって配置できる。この方法は、96ウェルマイクロプレート形式に特に適切な、接触させずに配置する方法である。この方法は、機械的衝撃を与えて、校正した微小滴をノズルを通してマイクロプレートのウェルの底に放

10

20

30

40

50

出す方法である。こうして、衝撃を与える毎に、ノズルの直径によって直径の異なる（約50～500 μmの）滴が得られる。

【0044】

上記のパートナーの配置は、内径約100ミクロン程度のガラス製毛細管を使用して手作業で実施することもできる。この場合、配置を実施するために毛細管を配置表面と接触させなければならず、このために、配置表面とわずかに衝撃が発生する。

【0045】

ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応の視覚化は、直接又は間接的な方法等の任意の検出方法によって実施できる。

【0046】

直接検出する場合、すなわち標識を使用しない場合、ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を、例えば、プラズモン共鳴、又は、導電性高分子を備えた電極におけるサイクリックボルタンメトリーによって観察する。

【0047】

間接的に、すなわち標識で検出する場合、標識は、対象検体に対して直接、又は、上記対象検体に特異的な結合パートナーをあらかじめ標識したものを介して、実施できる。

【0048】

「対象検体に特異的な結合パートナー」という表現は、対象検体と結合できる任意のパートナーを意味することを意図しており、例として、核酸、抗原、抗体、抗体断片、タンパク質、ハプテン、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、及び、酵素の基質が挙げられる。

【0049】

上記対象検体に特異的な結合パートナーをあらかじめ標識したものを使用してハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を視覚化する実施形態によれば、本発明の方法は、段階(i)と段階(ii)の間に以下の段階(i')：

(i') 上記対象検体に特異的な結合パートナーを添加する段階であって、上記パートナーはあらかじめ標識と結合させたものである段階：

を更に含む。

【0050】

上記対象検体に特異的な結合パートナーをあらかじめ標識したものを使用してハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を視覚化する別の実施形態によれば、本発明の方法は、段階(ii)と段階(iii)の間に以下の2つの段階(ii')及び段階(ii'')：

(ii') 上記対象検体に特異的な結合パートナーを添加する段階であって、上記パートナーはあらかじめ標識と結合させたものである段階、及び、

(ii'') 15～60の温度で反応させる段階：

を更に含む。

【0051】

従って、この場合、本発明の方法は、2つの反応段階、すなわち、対象検体を捕獲するためのパートナーと対象検体とを結合させる段階(段階(ii))、及び、捕獲パートナー/対象検体コンジュゲートと対象検体に特異的な結合パートナーとを結合させる段階(段階(ii''))を含む。

【0052】

更に別の実施形態によれば、ハイブリダイゼーション反応の視覚化は、核酸型の対象検体をあらかじめ標識することによって行い、また、免疫反応の視覚化は、上記対象検体に特異的なリガンド型の結合パートナーを標識することによって行う。その結果、この実施形態においては、標的核酸があらかじめ標識されているため、段階(i')又は段階(ii')で添加する結合パートナーは、リガンドに特異的なパートナーをあらかじめ標識したもののみである。

【0053】

また、免疫反応は「競合」法によっても検出できる。リガンドに特異的なパートナーの代

10

20

30

40

50

わりに、生物試料中に含まれている可能性のあるリガンドをあらかじめ標識したものを、次に反応媒体に添加する（段階（*i'*）及び段階（*ii'*））。これは、本発明の別の実施形態の一部である。この場合、検出シグナルは、検出対象リガンドが存在しない場合に最も大きく、非標識の検出対象リガンドの濃度が競合反応によって増加するにつれて徐々に減少する。

【0054】

捕獲表面を、本発明の各実施形態における反応段階（段階（*ii*）及び/又は段階（*iii'*））の後で洗浄して、特異的な相互作用をしていない、未反応の分子及び吸着の弱い分子を捕獲表面から除去してもよい。このようにして、ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応の視覚化を改善する。これは、本発明の別の実施形態の一部である。

10

【0055】

洗浄媒体としては、例えば、A. Perrinらによる文献（*J. Immunological Methods*, 1999年, 224, 77-87）に記載されるPBS-tweenを使用できる。

【0056】

「標識」という用語は、検出可能なシグナルを直接又は間接的に発することができる標識の付着を意味することを意図する。このような標識の例としては、

- 例えば比色定量、蛍光又は発光によって検出可能なシグナルを発する、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ又はグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ等の酵素、

20

- 発光又は染料の化合物等の発色団、

- ^{32}P 、 ^{35}S 又は ^{125}I 等の放射性物質、

- フルオレセイン、ローダミン、アレクサ（Alexa）又はフィコシアニン等の蛍光性物質、及び、

- 金粒子若しくは磁気ラテックス粒子等の粒子、又は、リポソーム

が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0057】

また、例えば別のリガンド/抗リガンドの対を使用する機構等の間接的な機構も使用できる。リガンド/抗リガンドの対は当業者に公知であり、例えば、ビオチン/ストレプトアビジン、ハプテン/抗体、抗原/抗体、ペプチド/抗体、糖/レクチン、及び、ポリヌクレオチド/このポリヌクレオチドに相補的な配列等の対が挙げられる。この場合、結合媒介物質を有するのはリガンドである。抗リガンドは、上述の標識によって直接検出できる可能性もあるし、又は、リガンド/抗リガンドによって検出できる可能性もある。

30

【0058】

これらの間接的な検出機構においては、特定の条件下でシグナルを増幅することになる。このシグナルの増幅方法は当業者に公知であり、本出願人による先のフランス特許出願FR 98/10084又はWO-A-95/08000、又は、文献*J. Histochem. Cytochem.* (45: 481-491, 1997年)を参照することができる。

【0059】

ポリメラーゼを使用して標識を直接又は間接的に組み込むことによって、核酸型の対象検体をあらかじめ標識できる。

40

【0060】

対象検体に特異的な結合パートナーの標識は、当業者に広く公知であり、例えばGregg T. Hermansonによる文献（*Bioconjugate Techniques*, 1996年, Academic Press Inc, 525 B Street, サンディエゴ, カリフォルニア州92101, 米国）に記載されている。

【0061】

例えば酵素を使用する等といった、使用するコンジュゲートの標識の型によって、当業者は標識を視覚化するために試薬を加えることができる。

50

【0062】

従って、本発明の方法のある実施形態によれば、標識に特異的な基質を段階(iii)の前に添加して、ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を視覚化する。

【0063】

上記試薬は、当業者に広く公知であり、特にPrinciples and Practice of Immunoassay(第2版, C. Price編, D. J. Newman Stockton Press, 1997年, 345 Park Avenue South, ニューヨーク)に記載されている。

【0064】

本発明の方法のために標識する成分、すなわち核酸特異的結合パートナー、リガンド特異的結合パートナー、生物試料中に含まれる標的核酸、及び、生物試料中に含まれていてよいリガンドを、異なる標識で又は同じ標識で標識できる。後者の溶液が好ましい。

10

【0065】

本発明の方法によって検出したハイブリダイゼーション反応及び免疫反応は、ある1種の疾患の存在を表している可能性がある。この場合、捕獲表面に投与する捕獲パートナーは、その疾患のマーカーであり、本発明の実施形態の一部である。

【0066】

このように、例えば、AIDSの初期診断において、抗p24タンパク質抗体及びウイルスのRNAの両方の存在を探索できる。従って、捕獲表面に存在する捕獲パートナーは、p24タンパク質であってもよく、ウイルスのRNAとハイブリダイゼーション反応できる核酸プローブであってもよい。

20

【0067】

本発明の方法で検出したハイブリダイゼーション反応及び免疫反応によって、様々な疾患を表すことができる。この場合、結合パートナーは異なる疾患に対するマーカーであり、本発明の別の実施形態の一部である。従って、本発明の方法は、生物試料を1種だけ使用して同一操作条件下で同時に、核酸の検出又は性質の異なるリガンドの検出によっていくつかの異なる疾患を実証してスクリーニングするために使用できる。この方法は、例えば、(病原体が存在しないことの確認が望まれる)献血由来の血液を輸血前に分析する際に有用である可能性がある。

【0068】

本発明の方法で検出できる疾患は、相互作用できる対象検体と捕獲パートナーとの対が少なくとも1対知られている全ての疾患である。

30

【0069】

上記疾患は、AIDS若しくは肝炎等の伝染性(すなわちウイルス又は細菌による)疾患等であってよく、又は、甲状腺亢進症若しくは糖尿病等の代謝性疾患であってよい。

【0070】

従って、本発明の別の主題は、伝染性又は代謝由来の疾患を検出するための、本発明の方法の使用からなる。

【0071】

本発明の更に別の主題は、細菌の存在の工業的診断における本発明の方法の使用からなる。実際には、工業における細菌の存在、特に食品産業におけるリステリア又はサルモネラ菌の存在は、ハイブリダイゼーション反応の検出(細菌のDNA又はRNAの検出)及び免疫反応の検出(細菌タンパク質の検出)によって確認できる。

40

【0072】

また、本発明の別の主題は、生物分子を同定及び/又は定量するための、本発明の方法の使用からなる。実際には、多数の異なる捕獲パートナーを使用して多数の異なる生物分子を確認する場合、本発明の方法によって、どの分子が試料中に存在するかを確認できる。同様に、性質の異なるものを少し含む多数の捕獲パートナーを使用する場合、本発明の方法によって、試料中に存在する生物分子を定量することにより、病状又は環境条件の一般的な状態を明らかにできる。

50

【 0 0 7 3 】

本発明の別の主題は、細胞又は組織のトランスクリプトーム及びプロテオームを同時に検出するための、本発明の方法の使用からなる。このように、細胞又は組織の全てのRNA（トランスクリプトーム）及び全てのタンパク質（プロテオーム）を同時に検出することにより、RNAと比較してタンパク質の過剰発現の潜在的な障害があるか、又は、その逆であるかを実証できる。

【 0 0 7 4 】

本発明の方法を実施するために、少なくとも1種の以下の構成成分：

- 捕獲表面、
 - 少なくとも1種の核酸プローブ、及び、性質の異なる少なくとも1種の他の抗リガンドからなる対象検体を捕獲するためのパートナー、
 - 反応バッファー、
 - 任意に、標的リガンドに特異的なパートナーをあらかじめ標識したもの、又は、試験する試料中に含まれている可能性のあるリガンドをあらかじめ標識したもの、並びに、
 - 任意に、標的核酸に特異的なパートナー：
- からなるキットを使用できる。

10

【 0 0 7 5 】

上記キットは、試験する試料が工業的な物質である場合には生物学的試験キットと記載でき、試験する試料が生物学的な物質である場合には診断用試験キットと記載でき、本発明の別の実施形態の一部である。

20

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 7 6 】

本発明は、以下の実施例及び付随の図1及び図2からより完全に理解できるであろう。上記実施例は説明のために記載するだけであって、限定するものではない。

【 0 0 7 7 】

- 図1は2つのグラフを示す。
- 1つめは、ヒト血清中の、p24タンパク質/VEMAポリマー捕獲パートナーと抗p24タンパク質抗体との間の免疫反応を示す蛍光の放出を、血清の希釈度に対して示すグラフである（図1A）。
- 2つめは、適切であれば、核酸プローブ捕獲パートナーC+（HIVウィルスDNAターゲットと反応できる）及びC-（HIVウィルスDNAターゲットと反応できない）及びHIVウィルスDNAターゲットの間のハイブリダイゼーション反応を示す、又は、この反応が存在しないことを示す蛍光の放出を、PCR産物の希釈度に対して示すグラフである（図1B）。

30

【 0 0 7 8 】

- 図2は、ウェル数17の多重投与用検出チップを使用する際の配置図を示す。各捕獲パートナーは、ウェル2つずつの中に配置する：
- ・ウェル1、9及び17中；HIVウィルスに対する核酸捕獲パートナー（C_{HIV}）、
- ・ウェル3及び11中；B型肝炎ウィルスHBVに対する核酸捕獲パートナー（C_{HBV}）、
- ・ウェル7及び15中；C型肝炎ウィルスHCVに対する核酸捕獲パートナー（C_{HCV}）、
- ・ウェル5及び13中；HIVウィルスに対するタンパク質捕獲パートナー（gp160エンベロープタンパク質）、
- ・ウェル4及び12中；HCVウィルスに対するタンパク質捕獲パートナー（コアタンパク質）、
- ・ウェル8及び16中；HBVウィルスに対するタンパク質捕獲パートナー（1ウェル当たり異なる2種のHBsAg表面抗原）、及び、
- ・ウェル2、6、10及び14中；この研究に対して特異的でないタンパク質捕獲パートナー、すなわち抗TSH抗体（NSP1、ウェル2及び10）、及び、抗HCG抗体（N

40

50

S P 2、ウェル 6 及び 1 4)。

【実施例 1】

【0079】

<患者において、ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を検出してH I Vウィルスの存在を示すための捕獲表面の調製>

1. 1. 抗 p 2 4 タンパク質抗体を認識できる捕獲パートナーの調製

D M S O (ジメチルスルホキシド) / 水の 9 0 / 1 0 (V / V) 混合物中に 1 g / L で溶解した無水マレイン酸ビニルエーテルポリマー M A V E - 6 7 (6 7 0 0 0 g / m o l) の溶液を、フラスコ中で調製した。この混合物を 3 7 °C で 4 8 時間インキュベートした。その後、組み換え p 2 4 タンパク質 3 6 μ g (p m R K 2 4 H、バイオメリュー社、M a r r c y l ' E t o i l e、フランス) を、ポリマー溶液 1 0 0 μ L と混合した。この混合物を 3 7 °C で 3 時間インキュベートした。

10

【0080】

1. 2. H I VウィルスのRNAから増幅したDNAターゲットを認識できる捕獲パートナーの調製

次のオリゴヌクレオチド 2 種 (DNA ターゲットとハイブリダイズできる C +、及び、ハイブリダイズできない C -、) をそれぞれ、濃度 1 0 μ M になるように 3 × P B S バッファー (0 . 4 5 M 塩化ナトリウム、0 . 1 5 M リン酸ナトリウム、p H 6 . 8) - E D T A 1 0 m M 中に希釈した。

C + : N H ₂ - C G C T T C G A C A G C G A C G T G G G G

C - : N H ₂ - T A T G A A A C T T A T G G G G A T A C

20

【0081】

1. 3. 捕獲表面の調製

上記フランス特許出願 F R 0 0 / 1 4 6 9 1 中に記載される方法に従って、微量滴定用プレート (N u n c 社、M a x i s o r b) の各ウェル中にスポット 4 つを接触させずに配置した。スポット 2 つは p 2 4 タンパク質 - M A V E ポリマーコンジュゲートからなり、スポットの一方は C + プローブ、他方は C - プローブからなる。スポットを配置した後、プレートをすぐに 4 °C のチャンパー中に移して 2 時間静置し、その後、6 0 °C で 3 0 分間インキュベートした。

30

【実施例 2】

【0082】

<対象検体の調製、及び、その特異的な捕獲>

2. 1. 対象検体の調製

D N A ターゲット (2 0 0 b p) を、細胞培養物から抽出したウイルス遺伝子の一部から R T - P C R によって作成した。これらを、5 ' 位をビオチンで標識した下記プライマー A 及び B を使用してビオチン化した：

プライマー A : C A T g T g C T A C T T C A C C A A C g g

プライマー B : C T g g T A g T T g T g T C T g C A C A A

【0083】

これらのターゲットを導入直前に、等量の 0 . 2 N 水酸化ナトリウムと共に大気温において 5 分間インキュベートし、変性させた。様々なヒト血清について、抗 p 2 4 タンパク質抗体が存在するか存在しないかを従来の方法であらかじめ試験し、0 . 1 M リン酸ナトリウム、0 . 5 M 塩化ナトリウム、0 . 6 5 % t w e e n 2 0、0 . 0 1 4 % サケ DNA 及び 2 % P E G 4 0 0 0 からなる p H 7 の反応バッファー A 中に 5 0 0 倍希釈した。

40

【0084】

2. 2. 対象検体の特異的な捕獲

希釈した患者の血清 3 0 μ L、反応バッファー A 3 0 μ L、及び、変性させた DNA ターゲット 3 μ L を混合し、この混合物を各ウェル中に注入した。これを 3 7 °C で 1 時間反応させた。その後、0 . 1 5 M 塩化ナトリウム及び 0 . 0 5 % t w e e n 2 0 を含む 5 0 m M リン酸ナトリウムバッファー (P B S - t w e e n) でウェルを洗浄した。

50

【実施例 3】

【0085】

<ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応の検出>

混合物（反応バッファー A 30 μ L、ペルオキシダーゼ結合抗ヒト抗体（ヤギ）10 ng（Jackson ImmunoResearch社）、ターゲットDNAと相補的なオリゴヌクレオチド 0.07 pmol）を各ウェル中に注入することにより、プレート底に固定した捕獲プローブと検出プローブとの間に上記ターゲットを挟むことができた。このオリゴヌクレオチドの5'位をペルオキシダーゼであらかじめ標識した。37℃で1時間反応させた後、ウェルをPBS-tweenで洗浄した。

【0086】

次に、ペルオキシダーゼに対する比色定量沈殿用基質（TMB、bioFX社）30 μ Lを各ウェル中に添加した。20分間かけて視覚化した後、基質をピペットで除去し、画像処理ソフト（Image Pro+、Soft Imaging社）を備えた顕微鏡（Zeiss社、AxioPlan2）にCCDカメラ（Spot社）を接続し、これを用いて各スポットの吸光度を測定した。このソフトを使用すると、各スポットのシグナル強度を、0（黒、シグナルなし）～255（白、シグナルが飽和）のデジタル値に変換できる。

【0087】

比較として、ハイブリダイゼーションの特異性を試験するためにDNAターゲットを省略するか、又は、ウィルス（HIV-）を含まない血清を使用する以外は、上記操作を繰り返して行った。得られた結果を下記表1中に示す。

【0088】

【表1】

血清	DNAターゲット の存在	C+スポット の強度	C-スポット の強度	P24-MAVEスポット の強度
HIV+	有	103	48	115
HIV-	有	108	45	45
HIV+	無	47	45	109
HIV-	無	46	51	48

【0089】

上記の結果から、反応の特異性は十分であることが分かる。DNAターゲットが存在しても、P24抗原と抗P24抗体との間の免疫反応の認識は損なわれない。一方、核酸プローブスポット上へのDNAターゲットのハイブリダイゼーションは、媒体中に抗体が存在する場合に可能である。検体がどちらか一方存在しても、望ましくないバックグラウンドノイズは発生しない。HIV-血清に対する場合と同様に、C-スポットは全く検出されない。

【実施例 4】

【0090】

<本発明の方法による検出の定量及び定性>

DNAターゲットの濃度及びHIV+血清の希釈度を変える以外は実施例1及び2に記載の操作を繰り返して行った。その後、ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応を以下のように検出した。

【0091】

混合物（反応バッファー A 30 μ L、アルカリフォスファターゼ結合抗ヒト抗体（ヤギ）10 ng（Jackson ImmunoResearch社）、アルカリフォスファタ

10

20

30

40

50

ーゼ標識ストレプトアビジン（シグマ社）25 ng）を各ウェル中に注入した。この混合物を37℃で1時間反応させた後、ウェルをPBS-tweenで洗浄した。

【0092】

その後、アルカリフォスファターゼの蛍光性基質（ECF、アマシャム社、調製済）30 μLを各ウェル中に添加した。視覚化を5分間かけて行った後、ピペットで基質を除去し、上記実施例3中に示すように各スポットの蛍光強度を測定した。

【0093】

血清又はPCR産物の希釈度に対して蛍光量を表す結果を、図1A及び図1B中に示す。分かりやすくするため、p24タンパク質-MAVEポリマーコンジュゲートスポットについて測定したシグナルを図1A中に、C+スポット（菱形）及びC-スポット（四角形）について同一ウェル中で測定したシグナルを図1B中に示す。

10

【0094】

図1Aにおいて、ウェル中の血清濃度が増加するにつれて蛍光シグナルが直線的に増加し、プラトーに達することが、希釈度1/1000未満の場合に観察された。従って、本発明を使用すれば定量が可能である。検出限界は、統計学的手法に従って、0.00001と推定される。この値は、血清の希釈度1/100000と一致する。このように高感度であるため、HIV感染後の血清の変化を早期に検出できる。

【0095】

図1Bにおいて、血清を順次希釈して観察された状態と同様の状態が見られる。蛍光シグナルは、特異的なスポットC+上のDNAターゲットの濃度に対して増加する（菱形）。一方、ターゲットとハイブリダイズできないC-スポット上のシグナルは安定していて、ターゲットがない状態における測定値と類似している（四角形）。検出限界は0.00007、すなわちPCR産物の希釈度1/14000と推定される。

20

【実施例5】

【0096】

<反応温度及びバッファーを変えることによる影響>

160 mMのHEPES、0.5 M塩化リチウム及び0.05% tween 20からなるpH 7.5の反応バッファーBを更に使用し、かつ、温度を41℃とする以外は実施例4の操作を繰り返して行った。この実験において、血清はウイルス（HIV+）を含み、ウイルスのDNAを認識しないターゲット（C-）は含まない。結果を下記表2中に示す。

30

【0097】

【表2】

温度	反応バッファー	C+スポット のシグナル	P24-MAVEスポット のシグナル
37℃	A	2.1	3.8
37℃	B	1.8	2.7
41℃	A	1.6	3.6
41℃	B	1.3	1.8

40

【実施例6】

【0098】

<HIV、HBV及びHCVウイルスによって引き起こされたウイルス感染の検出チップ中における同時検出>

6.1. 結合した核酸及びタンパク質パラメーターを調べるための生物学的ツール

6.1.1. ハイブリダイゼーション反応

Ambion社（オースティン、テキサス、アメリカ）から入手したHIV RNAター

50

ゲットを使用した。ピオチン化プライマー (SK431 TGCTATGTCAGTTCCCTTGGTTCTCT、及び、SK462 AGTTGGAGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT)、及び、PCR産物を捕獲するためのアミノ化した捕獲プローブ (C_{HIV}: GAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAAATGGGAT) をEurogentec社 (スラン、ベルギー) において合成した。

【0099】

HCVウィルスのRNAを、Nucleospin RNAウィルスキット (Macherey-Nagel社、Hoerdtt、フランス) を使用して慢性患者の血清から抽出し、ピオチン化プライマー (RC21: CTCCTGGGGCACTCGCAAGC、及び、RC1: GTGTAGCCATGGCGTTAGTA) (Roque Afonso A.M., 2000年, Journal of Virological Methods, 86, 55-60) を使用してRT-PCRで増幅した。アミノ化したHCV捕獲プローブの配列は、C_{HCV} (CATAGTTGGTCTGCGGAACCGGTGAGT) である。HIV及びHCVのRNAを、プロメガ社 (マディソン、ウィスコンシン州、アメリカ) のAccessキットを使用して、下記条件下においてRT-PCRで増幅した: 1xAMV/Tf1反応バッファー、1.8mMのMgSO₄、0.2mMのdNTP、1µMのプライマー、1USIのAMV逆転写酵素、及び、5USIのTf1 DNAポリメラーゼ; RTサイクル (48、45分間); 35PCRサイクル (94、30秒間; 60、1分間; 68、2分間); 最終伸張 (68、7分間)。

【0100】

アガロース+臭化エチジウムのゲル上でアンプリコンを調べた。増幅産物の濃度を、mass ladder (Eurogentec社) (HIVアンプリコンについて46nM、HCVアンプリコンについて23nM) を使用して調べた。

【0101】

HBV遺伝子由来の一本鎖合成ターゲット (74bp) (CCCAGTAAAGTTCCCCACCTTATGAGTCCAAGGAATTACTAACATTTGAGATTCCCGAGATTGAGATCTTCTGCGA)、アミノ化した捕獲プローブ (C_{HBV}: ATCTCGGGAAATCTCAATGTTAG) 及びピオチン化検出プローブ (D_{HBV}: TATTCCGACTCATAAGGTG) (両プローブともHBVターゲットに相補的である) を、Eurogentec社において合成した。

【0102】

6.1.2. 免疫反応

HCVコアタンパク質 (HCVコア) 及びHIVエンベロープタンパク質 (gp160) は、本出願人が作成した。2種の異なるHBV表面抗原 (HBsAg)、すなわち、サブタイプAy抗原 (Hytest社、トゥルク、フィンランド) 及びCliniqa社製血漿サブタイプAd抗原 (Fallbrook、カリフォルニア州、アメリカ) を使用した。

【0103】

この研究において非特異的なマウス抗体2種、すなわち抗TSH抗体 (NSP₁) 及び抗HCG抗体 (NSP₂) を使用して、アッセイの特異性を確認した。HIV、HBV及びHCVヒト血清は、リヨンの病院から入手した。

【0104】

アルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgGコンジュゲート (ヤギ) は、Jackson ImmunoResearch社 (West Grove、ペンシルベニア州、アメリカ) から入手し、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンはシグマ社 (St Quentin、フランス) から入手した。

【0105】

6.2. 検出チップの調製、及び、生物学的アッセイプロトコール

6.2.1. 捕獲パートナーの配置

オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチド吸着用反応バッファー (150mMリン酸塩

10

20

30

40

50

、450 mMのNaCl、1 mMのEDTA；pH 7.4）中に10 μMに希釈した。非特異的なIgGを、pH 9.3の50 mM炭酸塩バッファー中に50 μg/mLに希釈した。gp160、HBsAg及びHCVコアタンパク質を、PBS中に10 μg/mLに希釈した。

【0106】

バイオチップ配列装置（パーキンエルマー社、ボストン、アメリカ）を使用して配置した。スポット16 + 1個を、スポットとして、円形に、白色微量滴定用プレート（グライナー社、ロングウッド、アメリカ）中に、同じものを2つずつ配置した（図2）。配置して、温度（10℃）及び湿度（50%）を制御した条件下でインキュベートした後、プレートを洗浄し（PBS-tween 0.05%）、乾燥させて4℃で保存した。

10

【0107】

6.2.2. 核酸ターゲット及び抗体の捕獲

検体を、下記のように様々に組み合わせて使用した。

I：HBVターゲット

II：HIVターゲット

III：HBV血清

IV：HIV血清

V：HBV + HIVターゲット

VI：HBV + HIV + HCVターゲット

VII：HBV + HIV + HCVターゲット + HBV血清

VIII：HBV + HIV + HCVターゲット + HBV血清 + HIV血清

20

【0108】

これを実施するために、下記のを各ウェル中に注入した：0.2 N水酸化ナトリウム 1.5 μLであらかじめ変性したHIV又はHCV増幅産物 1.5 μL；10 nMの合成HBV DNAを3 μL；10倍希釈したヒト血清 1 μL。反応バッファー（0.1 MのNa₂HPO₄/NaH₂PO₄；0.5 MのNaCl；0.65%のtween 20；2%のPEG 4000；pH 7）で容量30 μLまで希釈し、この溶液を37℃で1時間インキュベートした後、PBS-tween 0.05%混合物で洗浄した

【0109】

6.2.3. 検出

プレートを0.2 μMのD_{HBV}溶液と共に37℃で30分間インキュベートした後（HBV検出）、洗浄した。その後、これを、ストレプトアビジン-アルカリフォスファターゼ（0.5 μg/mL）及びアルカリフォスファターゼ標識抗ヒト抗体（ヤギ）（μg/mL）の溶液の存在下でインキュベートした。続いてプレートをPBS-tween 0.05%で洗浄し、アルカリフォスファターゼに対する沈殿性基質を各ウェル中に添加した（BM purple、ロシェ社、バーゼル、スイス）。画像処理ソフトに連結したCCDカメラを使用してプレートを撮影することによって、各スポットに結合している灰色部分の平均値を測定できた。結果を下記表3中に示す。

30

【0110】

【表 3】

検体の組み合わせ	予想される スポットの位置	実際の スポットの位置	検体に結合している 灰色部分の値 (a.u.)
I	3, 11	3, 11	34 935
II	1, 9, 17	1, 9, 17	38 144
III	8, 16	8, 16	33 664
IV	5, 13	5, 13	12 480
V	3, 11	3, 11	43 605
	1, 9, 17	1, 9, 17	49 470
VI	3, 11	3, 11	43 350
	1, 9, 17	1, 9, 17	48 832
	7, 15	7, 15	14 917
VII	3, 11	3, 11	36 465
	1, 9, 17	1, 9, 17	42 712
	7, 15	7, 15	11 857
	8, 16	8, 16	45 772
VIII	3, 11	3, 11	34 807
	1, 9, 17	1, 9, 17	40 290
	7, 15	7, 15	11 730
	8, 16	8, 16	42 840
	5, 13	5, 13	12 240

10

20

30

【 0 1 1 1 】

インキュベートした検体の性質に関連してスポットが発生した。このことから、捕獲パートナーが異なる疾患に対するマーカーである場合においてさえ、ハイブリダイゼーション反応及び免疫反応は同一の操作条件下で、特に同一バッファー中で同一温度において起こることがわかった。

40

【図面の簡単な説明】

【 0 1 1 2 】

【図 1】図 1 A は、ヒト血清中の、p 2 4 タンパク質 / V E M A ポリマー捕獲パートナーと抗 p 2 4 タンパク質抗体との間の免疫反応を示す蛍光の放出を、血清の希釈度に対して示すグラフである。図 1 B は、適切であれば、核酸プローブ捕獲パートナー C + (H I V ウィルス D N A ターゲットと反応できる) 及び C - (H I V ウィルス D N A ターゲットと反応できない) 及び H I V ウィルス D N A ターゲットの間のハイブリダイゼーション反応を示す、又は、この反応が存在しないことを示す蛍光の放出を、P C R 産物の希釈度に対して示すグラフである

【図 2】多重投与用検出チップを使用する際の配置図を示す。

50

【 図 1 】

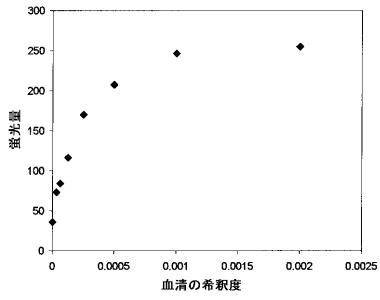


図 1A

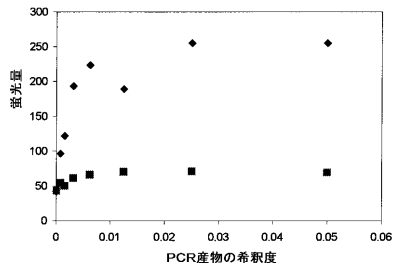
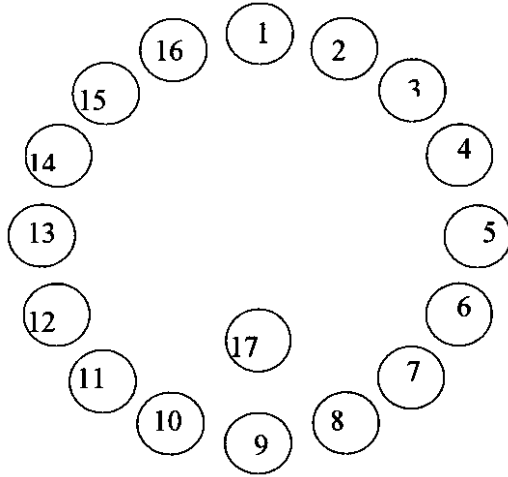


図 1B

【 図 2 】



【 配列表 】

[0004393378000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/569 (2006.01) G 0 1 N 33/566
G 0 1 N 33/569 B

(72)発明者 テレッツ, アラン
フランス国 エフ - 6 9 1 3 0 エキュリー, リュ デュ ドメーヌ, 2 0

審査官 三原 健治

(56)参考文献 国際公開第97/029206(WO,A1)
特表平10-504903(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/EMBASE(STN)

专利名称(译)	同时检测杂交反应和免疫反应的方法及其在诊断中的应用		
公开(公告)号	JP4393378B2	公开(公告)日	2010-01-06
申请号	JP2004511549	申请日	2003-06-03
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	生物梅里埃		
当前申请(专利权)人(译)	生物梅里埃		
[标]发明人	マンランベルナール ペランアニエス テレツアラン		
发明人	マンラン, ベルナール ペラン, アニエス テレツ, アラン		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	C12Q1/6883 G01N33/543		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.M G01N33/543.511.B G01N33/543.511.M G01N33/566 G01N33/569.B		
审查员(译)	三原贤治		
优先权	2002006883 2002-06-05 FR		
其他公开文献	JP2005535305A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在本发明中，一种同时检测样品中杂交反应和免疫反应的方法，所述样品可含有包含至少一种核酸和至少一种不同性质的其他配体的主题分析物，以下步骤：(i) 将已知体积的稀释样品置于预先涂有配偶体以捕获目标分析物的捕获表面上的反应缓冲液中，捕获伙伴包括至少一种核酸探针和至少一种抗配体，(ii) 在15°C至60°C的温度下反应，(iii) 可视化已发生的杂交反应和免疫反应：包括一种方法，特征在于：使用该方法检测传染病或代谢或病毒性疾病，并用于细菌存在的工业诊断以及用于鉴定和/或定量生物分子上。另外，这种方法在诊断中的应用，可用于实施本发明方法的生物或诊断测试试剂盒 同样。

血清	DNAターゲット の存在	C+スポット の強度	C-スポット の強度	P24-MAVEスポット の強度
HIV+	有	103	48	115
HIV-	有	108	45	45
HIV+	無	47	45	109
HIV-	無	46	51	48