

(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 - 540802

(P2002 - 540802A)

(43)公表日 平成14年12月3日(2002.12.3)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53		33/566	
33/566		C 1 2 N 15/00	ZNA A

審査請求 未請求 予備審査請求 (全263数)

(21)出願番号	特願2000 - 609613(P2000 - 609613)	(71)出願人	イェール ユニバーシティ Y A L E U N I V E R S I T Y アメリカ合衆国 コネチカット 06511, ニ ュー ヘイブン, ウィットニー アベニュー - 2
(86)(22)出願日	平成12年4月6日(2000.4.6)	(72)発明者	リザルディ, ポール エム. アメリカ合衆国, コネチカット 06492, ウォ ーリングフォード, ストニー ブルック ロ ード 7
(85)翻訳文提出日	平成13年10月9日(2001.10.9)	(72)発明者	ロス, マシュー イー. アメリカ合衆国, コネチカット 06405, ブラ ンフォード, メドレー レーン 20
(86)国際出願番号	PCT/US00/09284	(74)代理人	弁理士 石田 敬 (外 4 名) 最終頁に続く
(87)国際公開番号	W000/60124		
(87)国際公開日	平成12年10月12日(2000.10.12)		
(31)優先権主張番号	60/127,932		
(32)優先日	平成11年4月6日(1999.4.6)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】 配列標識の固定されたアドレス分析

(57)【要約】

核酸サンプルの包括的分析のための方法、及び前記方法への使用のためのディテクター組成物が開示される。配列標識の固定されたアドレス分析 (F A A S T) と称する方法は、種々の付着端配列を有する 1 組の核酸フラグメントの生成；付着端の配列に基づいての前記フラグメントのインデキシング；前記フラグメントによるディテクター配列の会合；ディテクターアレイ上のインデキシングされたフラグメントの配列に基づく捕獲；及びフラグメントラベルの検出を包含する。複数の付着端配列の生成は、1 又は複数の核酸切断と共に核酸サンプルをインキュベートすることによって達成される。インデキシングされたフラグメントは、プローブへのハイブリダイゼーション及びカップリング、好ましくは連結により捕獲される。前記方法は、再現性で且つ配列特異的な態様での核酸の複合体サンプルのすばやく且つ容易な分類を可能にする。前記方法の 1 つの形は、既知の又は可能性ある配列の異なった組み合わせの、核酸分子における会合の決定を可能にする。前記方法のもう 1 つの形は、修飾の存在又は不在に分子の切断を基づかせることによって、核酸分子における配列の修飾を評価する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸サンプル中の核酸フラグメントを同定するための方法であって、

(a) 複数の異なる配列を有する付着端を集合的に生成する1又は複数の核酸開裂試薬と共に核酸サンプルをインキュベートして、付着端を有する核酸フラグメントを生成し、

(b) 複数のアダプター - インデクサーを前記核酸サンプルとを混合し、そして核酸フラグメントに前記アダプター - インデクサーを共有結合させ、ここで個々のアダプター - インデクサーは異なる付着端を有し、前記アダプター - インデクサーの個々の付着端は前記核酸開裂試薬により生成される付着端と適合でき、

(c) 前記核酸サンプルに複数のライゲーター - ディテクターをハイブリダイズさせ、ここで個々のライゲーター - ディテクターは、少なくとも1のアダプター - インデクサーの付着端を包含し、そしてそれに隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又は相補的な配列を含み、

(d) 前記核酸サンプルに複数のディテクタープローブをハイブリダイズさせ、そして前記ライゲーター - ディテクターを前記ディテクタープローブに共有結合させ、ここで個々のディテクタープローブは異なる配列を有し、そして

(e) 前記ディテクタープローブへのライゲーター - ディテクターの結合を、直接的に又は間接的に検出することを含む方法。

【請求項2】 個々のアダプター - インデクサーが付着端部分及び検出部分を含んで成り、ここで個々のアダプター - インデクサーのディテクターの部分が別々に検出でき、そして前記アダプター - インデクサーのディテクター部分を、直接的に又は間接的に検出することをさら含んで成る請求項1記載の方法。

【請求項3】 各々のライゲーター - ディテクターがディテクター部分を含んで成り、ここで個々のライゲーター - ディテクターのディテクター部分はアダプター - インデクサーの1つのディテクター部分に対応し、ライゲーター - ディテクターの検出部分の検出がその対応するアダプター - インデクサーのディテクター部分の間接的な検出である請求項2記載の方法。

【請求項4】 アダプター - インデクサーの検出部分の検出が、その対応するライゲーター - ディテクターのディテクター部分の間接的な検出である請求項2記載の方法。

【請求項5】 少なくとも1つのアダプター - インデクサーの検出部分がラベルである請求項2記載の方法。

【請求項6】 前記アダプター - インデクサーが連結により核酸フラグメントに共有結合され、そして前記ライゲーター - ディテクターが連結によりディテクタープローブに共有結合される請求項1記載の方法。

【請求項7】 段階(b)の前、サンプルを複数のインデックスサンプルに分けることをさらに含んで成り、ここで異なったライゲーター - ディテクターが個々のインデックスサンプルによりハイブリダイズされ、個々のインデックスサンプルにおけるライゲーター - ディテクターが、インデックスサンプル中のアダプター - インデクサーの付着端を包含し、そしてそれに隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又は相補的な配列を含んで成る請求項1記載の方法。

【請求項8】 前記ライゲーター - ディテクターが、アダプター - インデクサーの付着端のすべて又は一部に、及びインデックスサンプルに使用されるアダプター - インデクサーの隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又は相補的な配列を含んで成る請求項6記載の方法。

【請求項9】 段階(b)に続いて、前記核酸フラグメントの鎖を分離し、そして前記鎖の1本のみを用いて、段階(c)を進行せしめることをさらに含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項10】 前記鎖が、前記鎖の1つに会合される捕捉タグを用いて分離される請求項9記載の方法。

【請求項11】 前記捕捉タグがアダプター - インデクサーに会合される請求項10記載の方法。

【請求項12】 前記インデックスサンプルにおける種々の核酸フラグメントの濃度が標準化される請求項9記載の方法。

【請求項13】 前記核酸フラグメントへの鎖が分離され、そして前記核酸フラグメントの濃度が、前記核酸フラグメントへの1つの鎖を固定し、前記核酸

フラグメントを変性し、豊富な核酸フラグメントについての $C_0t_{1/2}$ よりも長く、且つ希核酸フラグメントについての $C_0t_{1/2}$ よりも短い時間、前記核酸フラグメントを再生し、そして前記再生されなかった核酸フラグメントを集めることによって標準化される請求項12記載の方法。

【請求項14】 前記ライゲーター - ディテクターの連結が、ライゲーター - ディテクターにより開始される、増幅標的サークルのローリングサークル複製によって検出される請求項8記載の方法。

【請求項15】 前記核酸開裂試薬がN個の異なった配列を有する付着端を生成し、そして前記サンプルがN個のインデックスサンプルに分けられる請求項8記載の方法。

【請求項16】 前記ディテクタープローブが、すべて同じ長さのものである請求項8記載の方法。

【請求項17】 前記ディテクタープローブが、6, 7又は8個の長さのヌクレオチドである請求項16記載の方法。

【請求項18】 前記ディテクタープローブが、すべて類似するハイブリッド安定性を有する請求項8記載の方法。

【請求項19】 前記核酸開裂試薬が制限酵素である請求項8記載の方法。

【請求項20】 前記核酸サンプルが1つの制限酵素により消化され、ここで前記制限酵素が複数の異なった配列を有する付着端を生成する請求項19記載の方法。

【請求項21】 前記制限酵素が、その認識配列とは異なる部位で開裂するタイプII-S制限酵素である請求項20記載の方法。

【請求項22】 個々のライゲーター - ディテクターが、前記アダプター - インデクサーの付着端を包含し、そして隣接する配列のすべて又は一部に適合する配列を含んで成る請求項6記載の方法。

【請求項23】 個々のライゲーター - ディテクターが、前記アダプター - インデクサーの付着端を包含し、そして隣接する配列のすべて又は一部に相補的な配列を含んで成る請求項6記載の方法。

【請求項24】 少なくとも1つのライゲーター - ディテクターが、前記ア

アダプター - インデクサーの付着端を包含し、そして隣接する配列のすべて又は一部に適合する配列を含んで成り、そして少なくとも1つのライゲーター - ディテクターが、前記アダプター - インデクサーの付着端を包含し、そして隣接する配列のすべて又は一部に相補的な配列を含んで成る請求項6記載の方法。

【請求項25】 前記核酸サンプルにおける種々の核酸フラグメントの濃度が標準化される請求項6記載の方法。

【請求項26】 前記核酸フラグメントの濃度が、前記核酸フラグメントの1つの鎖を固定し、前記核酸フラグメントを変性し、豊富な核酸フラグメントについての $C_0t_{1/2}$ よりも長く、且つ希核酸フラグメントについての $C_0t_{1/2}$ よりも短い時間、前記核酸フラグメントを再生し、そして前記再生されなかった核酸フラグメントを集めることによって標準化される請求項25記載の方法。

【請求項27】 個々のアダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、支持体上に固定される請求項8記載の方法。

【請求項28】 前記ディテクタープローブが、支持体上に固定される請求項27記載の方法。

【請求項29】 アダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブのすべてが、同じ支持体上に固定される請求項27記載の方法。

【請求項30】 アダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブのすべてが、異なった支持体上に固定される請求項27記載の方法。

【請求項31】 前記支持体がビーズである請求項30記載の方法。

【請求項32】 前記アダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、少なくとも1つのアダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが支持体上に固定され、そして少なくとも1つの他のアダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブがそれぞれ、異なった支持体上に固定されるように、複数の異なった支持体上に固定される請求項27記載の方法。

【請求項33】 前記アダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、アレイにおいて存在する請求項27記載の方法。

【請求項34】 前記ディテクタープローブが、アレイにおいて存在する請求項33記載の方法。

【請求項35】 個々のアダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、捕捉タグ、ソーティングタグ又は両者に会合される請求項8記載の方法。

【請求項36】 前記ライゲーター - ディテクターが、捕捉タグ又はソーティングタグに会合される請求項35記載の方法。

【請求項37】 前記アダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、前記捕捉タグを通して捕獲される請求項35記載の方法。

【請求項38】 前記アダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、前記ソーティングタグを通して分類される請求項35記載の方法。

【請求項39】 前記ライゲーター - ディテクターがソーティングタグに会合され、そして前記アダプター - インデクサーが捕捉タグに会合される請求項35記載の方法。

【請求項40】 前記ライゲーター - ディテクターが捕捉タグに会合され、そして前記アダプター - インデクサーがソーティングタグに会合される請求項35記載の方法。

【請求項41】 前記ディテクタープローブソーティングタグに会合され、そして前記アダプター - インデクサーが捕捉タグに会合される請求項35記載の方法。

【請求項42】 前記アダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、複数の異なった捕捉タグ又は複数の異なったソーティングタグに会合される請求項35記載の方法。

【請求項43】 前記核酸サンプルにおける少なくとも1つの核酸フラグメ

ントの一部の配列を決定することをさらに含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項44】 前記核酸開裂試薬が制限酵素であり、

前記核酸サンプルが1つの制限酵素により消化され、前記制限酵素が複数の異なった配列を有する付着端を生成し、

前記制限酵素がその認識配列とは異なる部位で開裂するタイプII-S制限酵素であり、そして

前記核酸フラグメントの一部が、前記付着端配列、ディテクタープローブがハイブリダイズする付着端配列に隣接する配列、及び前記制限酵素の認識配列に対応する請求項43記載の方法。

【請求項45】 前記一部が、前記付着端に隣接する配列と前記制限酵素の認識配列との間の、既知の長さであるが、しかし未知の配列のギャップを包含する請求項44記載の方法。

【請求項46】 前記一部が、下記構造式：

A - B - C - D

[式中、Aは制限酵素の認識配列であり、Bは未知の配列のギャップであり、Cは、ディテクタープローブがハイブリダイズした配列であり、そしてDは付着端配列である] を有する請求項45記載の方法。

【請求項47】 前記核酸フラグメントの一部の決定された配列に基づくプローブ又はプライマーを用いて、核酸サンプルにおける核酸フラグメントに対する核酸を検出し、又は増幅することをさらに含んで成る請求項44記載の方法。

【請求項48】 前記ディテクタープローブがアレイに存在し、個々のディテクタープローブがアレイにおける異なった位置で固定され、そしてディテクタープローブへのライゲーター - ディテクターの連結の検出がアレイにおける異なった位置でのライゲーター - ディテクターの存在を検出することによって達成される請求項8記載の方法。

【請求項49】 前記アレイにおけるライゲーター - ディテクターの位置、量、又は位置及び量が、前記アレイにおけるライゲーター - ディテクターのパターンを構成し、

前記アレイにおけるライゲーター - ディテクターのパターンと、第2核酸サン

ブルを用いて別の方法により決定された、アレイにおけるライゲーター - ディテクターのパターンとを比較することをさらに含んで成る請求項48記載の方法。

【請求項50】 前記アレイにおけるライゲーター - ディテクターのパターンと、複数の異なった核酸サンプルを用いて、複数の別の方法により決定された、アレイにおけるライゲーター - ディテクターのパターンとを比較することをさらに含んで成る請求項49記載の方法。

【請求項51】 段階(c)に続いて、
前記インデックスサンプルを、1又は複数の第2核酸開裂試薬と共にインキュベートし、そして

第2アダプターを、個々のインデックスサンプルと共に混合し、そして前記第2アダプターを前記核酸フラグメントに連結することをさらに含んで成り、ここで個々の前記アダプターの前記第2核酸開裂試薬の1つにより生成される末端と適合できる末端を有する請求項8記載の方法。

【請求項52】 段階(c)の前、
個々のインデックスサンプルを、1又は複数の制限されたインデックスサンプル及び制限されていないインデックスサンプルに分け、

個々の制限されたインデックスサンプルを、異なった第3核酸開裂試薬と共にインキュベートすることをさらに含んで成り、

ここで段階(c)、(d)及び(e)が、制限された及び制限されていない両インデックスサンプルにより行われる請求項51記載の方法。

【請求項53】 前記第2核酸開裂試薬と共にインキュベーションする前、
個々のインデックスサンプルを、複数組の二次インデックスサンプルに分け、
ここで個々の組のインデックスサンプルにおける個々の第2インデックスサンプルが1又は複数の異なった組の第2核酸開裂試薬と共にインキュベートされる請求項51記載の方法。

【請求項54】 段階(c)、(d)及び(e)が個々の第2インデックスサンプルにより行われる請求項53記載の方法。

【請求項55】 段階(c)の前、
個々の第2インデックスサンプルを、1又は複数の制限されたインデックスサ

ンプル及び制限されていないインデックスサンプルに分け、

個々の制限されたインデックスサンプルを、異なった第3核酸開裂試薬と共にインキュベートすることをさらに含んで成り、

ここで段階(c)、(d)及び(e)が制限された及び制限されていない両インデックスサンプルにより行われる請求項53記載の方法。

【請求項56】 前記第1、第2、及び第3核酸開裂試薬が制限酵素である請求項55記載の方法。

【請求項57】 前記第2核酸開裂試薬と共にインキュベーションした後、個々のインデックスサンプルを、複数組の第2インデックスサンプルに分けることをさらに含んで成る請求項51記載の方法。

【請求項58】 段階(c)、(d)及び(e)が個々の第2インデックスサンプルにより行われる請求項57記載の方法。

【請求項59】 前記第1及び第2核酸開裂試薬が制限酵素である請求項51記載の方法。

【請求項60】 前記核酸フラグメントへの第2アダプターの連結に続いて

、

アダプター-インデクサー及び第2アダプターが連結されているインデックスサンプルにおける核酸フラグメントを増幅することをさらに含んで成る請求項51記載の方法。

【請求項61】 前記核酸フラグメントが、PCRにより増幅される請求項60記載の方法。

【請求項62】 PCRのために使用されるプライマーが、前記アダプター-インデクサー及び第2アダプターにおける配列に相補的である請求項61記載の方法。

【請求項63】 段階(b)の前、核酸サンプルを複数のインデックスサンプルに分けることをさらに含んでなり、

ここで1よりも多くの核酸開裂試薬が段階(a)において使用され、個々のインデックスサンプルが異なった1つの核酸開裂試薬と共にインキュベートされ、

ここで異なったライゲーター-ディテクターが個々のインデックスサンプルに

よりハイブリダイズされ、個々のインデックスサンプルにおけるライゲーター - ディテクターが、インデックスサンプルにおけるアダプター - インデクサーの付着端を包含し、そしてそれに隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又は相補的な配列を含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項64】 段階(b)続いて、

アダプター - インデクサーが連結されているインデックスサンプルにおける核酸フラグメントを増幅することをさらに含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項65】 増幅に続いて、

前記増幅された核酸フラグメントの鎖を分離し、そして前記鎖の1本のみを用いて、段階(c)を進行せしめることをさらに含んで成る請求項64記載の方法。

【請求項66】 前記鎖が、前記鎖の1つに組み込まれる捕捉タグを用いて分離される請求項65記載の方法。

【請求項67】 前記捕捉タグが、核酸フラグメントの増幅のために使用されるプライマーにより会合される請求項66記載の方法。

【請求項68】 前記核酸フラグメントが、PCRにより増幅される請求項64記載の方法。

【請求項69】 段階(b)及び(d)における連結に続いて、塩基ミスマッチを破壊するか又は変更する試薬と共に前記インデックスサンプルをインキュベートすることをさらに含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項70】 前記塩基ミスマッチ試薬が、(1)T4エンドヌクレアーゼVII、(2)MutH, MutL及びMutS、(3)T7エンドヌクレアーゼI、(4)MutY、(5)グリコシラーゼ又は(6)トポイソメラーゼIである請求項69記載の方法。

【請求項71】 段階(b)及び(d)における連結の前、

前記インデックスサンプルを、塩基ミスマッチに結合する試薬とともに混合することをさらに含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項72】 前記塩基ミスマッチ試薬が、(1)Mecl、(2)MutS、(3)MSH2 - MSH6、(4)MLH1 - PMS1、又は(5)MS

H 2 - M S H 3 である請求項 7 1 記載の方法。

【請求項 7 3】 個々のアダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブがラベルを含み、そしてディテクタープローブへのライゲーター - ディテクターの連結がラベルにより検出される請求項 8 記載の方法。

【請求項 7 4】 個々のライゲーター - ディテクターがラベルを含み、ここで前記ディテクタープローブへのライゲーター - ディテクターの連結の検出が、連結されなかったライゲーター - ディテクターから連結されたライゲーター - ディテクターを分離し、そして前記ライゲーター - ディテクターのラベルを検出することによって達成される請求項 7 3 記載の方法。

【請求項 7 5】 個々の異なったライゲーター - ディテクターが異なったラベルを含み、個々のディテクタープローブが捕捉タグ又はソーティングタグにより会合され、結合されなかったライゲーター - ディテクターからの連結されたライゲーター - ディテクターの分離が、捕捉タグ又は分類することによって達成され、ここで前記連結されたライゲーター - ディテクターがディテクタープローブと分離する請求項 7 4 記載の方法。

【請求項 7 6】 前記ソーティングタグが蛍光ラベルであり、そして連結されなかったライゲーター - ディテクターからのディテクタープローブの分離が蛍光ラベルソーターを用いて達成される請求項 7 5 記載の方法。

【請求項 7 7】 前記ラベルが蛍光、リン光又は化学ルミネセンスラベルである請求項 7 3 記載の方法。

【請求項 7 8】 前記ラベルの少なくとも 2 種が、異なった蛍光、リン光又は化学ルミネセンス発光寿命を通して一時的に区別される請求項 7 7 記載の方法。

【請求項 7 9】 前記ラベルが、核磁気共鳴、電子常磁性共鳴、表面増強されたラマン散乱、表面プラスモン共鳴、蛍光、リン光、化学ルミネセンス、共鳴ラマン、マイクロ波、又はそれらの組み合わせにより検出される請求項 7 3 記載の方法。

【請求項 8 0】 前記ラベルが、核磁気共鳴、電子常磁性共鳴、表面増強さ

れたラマン散乱、表面プラスモン共鳴、蛍光、リン光、化学ルミネセンス、共鳴ラマン、マイクロ波、又はそれらの組み合わせを用いて検出される請求項79記載の方法。

【請求項81】 前記ラベルが、ラベルを含んで成るビーズである請求項73記載の方法。

【請求項82】 前記ラベルが、分子バーコードである請求項81記載の方法。

【請求項83】 前記ラベルが、質量ラベルである請求項73記載の方法。

【請求項84】 対照の核酸サンプルに対して段階(a)~(e)を行い、異なったディテクタープローブに連結されるライゲーター-ディテクターのパターンの、核酸サンプルと対照の核酸サンプルとの間の差異を同定することをさらに含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項85】 前記対照の核酸サンプルと共に使用されるライゲーター-ディテクターが、核酸サンプルと共に使用されるライゲーター-ディテクターのラベルとは異なったラベルを含み、

ここで前記対照のインデックスサンプルが、段階(d)の前、対応するインデックスサンプルと共に混合される請求項84記載の方法。

【請求項86】 複数の核酸サンプルに対して段階(a)~(e)を行うことをさらに含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項87】 対照の核酸サンプルに対して段階(a)~(e)を行い、異なったディテクタープローブに連結されるライゲーター-ディテクターのパターンの、核酸サンプルと対照の核酸サンプルとの間の差異を同定することをさらに含んで成る請求項86記載の方法。

【請求項88】 異なったディテクタープローブに連結されるライゲーター-ディテクターのパターンの核酸サンプル間での差異を同定することをさらに含んで成る請求項86記載の方法。

【請求項89】 異なったディテクタープローブに連結されるライゲーター-ディテクターの存在、量、存在及び量、又は不在のパターンが、核酸サンプルにおける核酸フラグメントのカatalogを構成する請求項8記載の方法。

【請求項90】 第2核酸サンプルにおける核酸フラグメントの第2カタログを調製し、そして前記第1カタログ及び第2カタログを比較することをさらに含んで成る請求項89記載の方法。

【請求項91】 前記第1核酸サンプルに限界量で存在するが、しかし前記第2核酸サンプルには限界量で存在しない核酸フラグメントに対応する核酸フラグメントを同定し又は調製することをさらに含んで成る請求項91記載の方法。

【請求項92】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルと同じタイプの生物からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項93】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルと同じタイプの組織からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項94】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルと同じ生物からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項95】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルよりも異なった時間で得られる請求項94記載の方法。

【請求項96】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルよりも異なった生物からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項97】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルよりも異なったタイプの生物からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項98】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルよりも異なった種の生物からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項99】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルよりも異なった株の生物からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項100】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルよりも異なった細胞区画からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項101】 前記第1核酸サンプルに存在するが、しかし前記第2核酸サンプルには存在しない核酸フラグメントに対応する核酸フラグメントを同定し又は調製することをさらに含んで成る請求項90記載の方法。

【請求項102】 前記核酸フラグメントをプローブとして使用することをさらに含んで成る請求項101記載の方法。

【請求項103】 プローブとしての核酸フラグメントの使用が、異なった核酸サンプルにより段階(a)～(e)を反復することによって達成され、ここで前記核酸フラグメントが段階(d)及び(e)においてディテクタープローブとして使用される請求項102記載の方法。

【請求項104】 異なったディテクタープローブに連結されるライゲーター-ディテクターの量のパターンが、核酸サンプルにおける核酸フラグメントのカタログを構成し、

ここで前記パターンが、ディテクタープローブにハイブリダイズされる配列の塩基ミスマッチの確立に基づいて、予測されるパターンに比較される請求項8記載の方法。

【請求項105】 個々のアダプター-インデクサーが、一本鎖部分及び二本鎖部分を含んで成る核酸を含んで成り、ここで前記一本鎖部分が付着端であり、そして前記二本鎖部分が個々のアダプター-インデクサーにおける同じ配列を有する請求項8記載の方法。

【請求項106】 前記ディテクタープローブへのライゲーター-ディテクターの連結の検出が、アダプター-インデクサー、連結されたライゲーター-ディテクター、アダプター-インデクサーにより会合される質量ラベル、連結されたライゲーター-ディテクターにより会合される質量ラベル、又はそれらの組み合わせを、質量分光計により検出することによって達成される請求項8記載の方法。

【請求項107】 前記アダプター-インデクサー、連結されたライゲーター-ディテクター、アダプター-インデクサーにより会合される質量ラベル及び連結されたライゲーター-ディテクターにより会合される質量ラベルが、マトリックス-助力のレーザー脱着/イオン化時間経過質量分光計により検出される請求項106記載の方法。

【請求項108】 前記アダプター-インデクサー、連結されたライゲーター-ディテクター、アダプター-インデクサーにより会合される質量ラベル及び連結されたライゲーター-ディテクターにより会合される質量ラベルの組成が、フラグメント化パターンを分析することによって決定される請求項106記載の

方法。

【請求項109】 結合されなかったライゲーター - ディテクターが、連結されたアダプター - インデクサーの検出前、ディテクタープローブから洗浄される請求項106記載の方法。

【請求項110】 段階(b)に続いて、インデックスサンプルを、1又は複数の第2核酸開裂試薬と共にインキュベートすることをさらに含んで成る請求項106記載の方法。

【請求項111】 前記アダプター - インデクサー、ディテクタープローブ又は両者が、光分解性ヌクレオチドを含み、ここでディテクタープローブへのライゲーター - ディテクターの連結に続いて、

前記光分解性ヌクレオチドの光分解、及び

質量分光計による、連結されたライゲーター - ディテクターの1又は両鎖の検出をさらに含んで成る請求項106記載の方法。

【請求項112】 前記ディテクタープローブへのライゲーター - ディテクターの連結に続いて、

1又は複数の核酸開裂試薬と共に、前記連結されたライゲーター - ディテクター及びディテクタープローブのインキュベーション、及び

質量分光計による前記連結されたライゲーター - ディテクターの1又は両鎖の検出をさらに含んで成る請求項106記載の方法。

【請求項113】 段階(b)に続いて、

前記インデックスサンプルを、1又は複数の第2核酸開裂試薬と共にインキュベートし、そして

第2アダプターを、個々のインデックスサンプルと共に混合し、そして前記第2アダプターを前記核酸フラグメントに連結することをさらに含んで成り、ここで個々の前記アダプターの前記第2核酸開裂試薬の1つにより生成される末端と適合できる末端を有し、

ここで前記第2核酸開裂試薬の少なくとも1つが、その認識部位の修飾に対して敏感である請求項8記載の方法。

【請求項114】 前記第1及び第2核酸開裂試薬が制限酵素である請求項

1 1 3 記載の方法。

【請求項 1 1 5】 前記認識部位の修飾が、メチル化、アルキル化、二量体化、誘導体化、脱プリン化又はA D P - リボシル化である請求項 1 1 4 記載の方法。

【請求項 1 1 6】 前記修飾が、単離される場合、核酸フラグメントに存在し、又は単離の後、核酸フラグメントに導入される請求項 1 1 4 記載の方法。

【請求項 1 1 7】 段階 (c) の前、

個々のインデックスサンプルを、1 又は複数の制限されたインデックスサンプル及び制限されなかったインデックスサンプルに分け、

異なった第3制限酵素により個々の制限されたインデックスサンプルを消化することをさらに含んで成り、

ここで段階 (c)、(d) 及び (e) が制限された及び制限されていない両インデックスサンプルにより行われる請求項 1 1 4 記載の方法。

【請求項 1 1 8】 前記核酸フラグメントへの第2アダプターの連結に続いて、

アダプター - インデクサー及び第2アダプターが連結されているインデックスサンプルにおける核酸フラグメントを増幅することをさらに含んで成る請求項 1 1 4 記載の方法。

【請求項 1 1 9】 前記核酸サンプルにおける核酸フラグメントの少なくとも1つの一部の配列を決定することをさらに含んで成る請求項 1 1 8 記載の方法。

【請求項 1 2 0】 前記核酸フラグメントへの第2アダプターの連結に続いて、

第2アダプターに連結されない核酸フラグメントから、第2アダプターに連結される核酸フラグメントを分離することをさらに含んで成り、ここで第アダプターに連結される核酸フラグメントのみが段階 (c) に使用される請求項 1 1 4 記載の方法。

【請求項 1 2 1】 前記第2制限酵素の少なくとも1つが、(1) その認識部位の修飾に対して敏感であり、そして (2) その認識部位の修飾に対して敏感

である第2制限酵素と同じ認識部位を有し、

前記第2制限酵素による消化の前、

個々のインデックスサンプルを、複数組の第2インデックスサンプルに分け、
ここで、個々の組の第2インデックスサンプルにおける個々の第2牽引サンプル
が、異なった第2制限酵素により消化され、

ここで段階(c)～(e)が前記個々の第2インデックスサンプルに行われる
請求項114記載の方法。

【請求項122】 その認識部位の修飾に対して敏感である第2制限酵素を
包含する異なったディテクタープローブに連結されるライゲーター - ディテクタ
ーの存在又は不在のパターンと、その認識部位の修飾に対して鈍感であり、そし
てその認識部位の修飾に対して敏感である第2制限酵素と同じ認識部位を有する
第2制限酵素を包含する異なったディテクタープローブに連結されるライゲータ
ー - ディテクターの存在又は不在のパターンとを比較することをさらに含んで成
り、

ここで前記パターンの差異が核酸サンプルにおける核酸の修飾を示す請求項1
21記載の方法。

【請求項123】 異なったディテクタープローブに連結されるライゲータ
ー - ディテクターの存在、量、存在及び量、又は不在のパターンが、核酸サンプ
ルにおける核酸フラグメントのカatalogを構成する請求項114記載の方法。

【請求項124】 第2核酸サンプルにおける核酸フラグメントの第2カタ
ログを調製し、そして前記第1カタログ及び第2カタログを比較することをさら
に含んで成り、ここで前記第1及び第2カタログにおける差異が、前記第1及び
第2核酸サンプルの修飾の差異を示す請求項123記載の方法。

【請求項125】 前記第2核酸サンプルが第1核酸サンプルと同じ細胞型
からのサンプルであり、但し、第1核酸サンプルが由来する細胞は、第2核酸サ
ンプルが由来する細胞に比較して、修飾欠失性である請求項123記載の方法。

【請求項126】 前記第2核酸サンプルが第1核酸サンプルとは異なる細
胞型からのサンプルであり、そして第1核酸サンプルが由来する細胞が、第2核
酸サンプルが由来する細胞に比較して、修飾欠失性である請求項123記載の方

法。

【請求項127】 前記核酸開裂試薬が制限酵素であり、ここで前記制限酵素はそれらの認識配列とは異なる部位で開裂するタイプII-S制限酵素であり、

段階(a)の前、

核酸サンプルにおける1又は複数の核酸分子に興味ある領域に隣接する制限酵素のための認識部位を導入し、

ここで前記ライゲーター-ディテクターが制限酵素のための認識部位の配列及びそれに隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又は相補的である配列を含んで成る請求項6記載の方法。

【請求項128】 前記認識部位が、前記認識配列を含むプライマーを用いて核酸分子を増幅することによって導入される請求項128記載の方法。

【請求項129】 前記核酸分子がPCRを用いて増幅される請求項128記載の方法。

【請求項130】 前記ディテクタープローブが、興味ある領域における既知の又は可能性ある配列に適合するか又は相補的な配列を包含する請求項127記載の方法。

【請求項131】 前記興味ある領域に複数の既知の又は可能性ある配列が存在し、ここで前記ディテクタープローブ組が、それぞれ既知の又は可能性ある配列に適合し、又は相補的な配列を包含する請求項130記載の方法。

【請求項132】 前記核酸サンプルにおける核酸分子が免疫グロブリン又はT細胞受容体核酸分子であり、ここで前記核酸分子は可変領域、N領域及び連結領域を有し、

ここで前記制限酵素のための認識部位が、前記核酸分子のN領域に隣接する核酸分子の可変領域中に導入され、

ここで前記ライゲーター-ディテクターは、制限酵素のための認識部位の配列のすべて又は一部、又はN領域までではあるが、しかしその領域を包含しない、制限酵素のための認識部位に隣接する可変領域配列の配列のすべて又は一部に適合するか又はそれに対して相補的な配列を含んでなり、

ここで複数の既知の又は可能性ある配列は、核酸分子のN領域に隣接する核酸分子の連結領域の配列のすべて又は一部に適合するか又はそれに対して相補的な配列である請求項131記載の方法。

【請求項133】 1組のアダプター - インデクサー、ここで個々のアダプター - インデクサーは異なった付着端を有し、前記アダプター - インデクサーの個々の付着端は、複数の異なった配列を有する付着端を集合的に生成する1又は複数の核酸開裂試薬により生成される付着端と適合でき；

1組のライゲーター - ディテクター、ここで個々のライゲーター - ディテクターは、異なったアダプター - インデクサーの付着端のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサーの隣接する配列のすべて又は一部と適合するか又はそれに対して相補的である配列を含んで成り；及び

複数のディテクタープローブ、ここで個々のディテクタープローブは異なった配列を有する；を含んで成るキット。

【請求項134】 前記アダプター - インデクサーの個々の付着端が、制限酵素により生成される付着端と適合できる請求項133記載のキット。

【請求項135】 前記キットが、個々のアダプター - インデクサーに対応する少なくとも1つのライゲーター - ディテクターを包含する請求項133記載のキット。

【請求項136】 少なくとも1つのアダプター - インデクサー、少なくとも1つのライゲーター - ディテクター、少なくとも1つのディテクタープローブ、又はそれらの組み合わせが、ラベルを含む請求項135記載のキット。

【請求項137】 前記ラベルが蛍光、リン光又は化学ルミネセンスラベルである請求項136記載のキット。

【請求項138】 前記ラベルの少なくとも2種が、異なった蛍光、リン光又は化学ルミネセンス発光寿命を通して一時的に区別される請求項137記載のキット。

【請求項139】 前記ラベルが、核磁気共鳴、電子常磁性共鳴、表面増強されたラマン散乱、表面プラスモン共鳴、蛍光、リン光、化学ルミネセンス、共鳴ラマン、マイクロ波、又はそれらの組み合わせにより検出される請求項136

記載のキット。

【請求項140】 前記ラベルが、ラベルを含んで成るビーズである請求項136記載のキット。

【請求項141】 前記ラベルが、分子バーコードである請求項140記載のキット。

【請求項142】 前記ラベルが、質量ラベルである請求項136記載のキット。

【請求項143】 前記核酸開裂試薬がN個の異なった配列を有する付着端を生成し、そして前記キットがN個の異なったアダプター - インデクサーを含む請求項133記載のキット。

【請求項144】 前記ディテクタープローブが、6, 7又は8個の長さのヌクレオチドである請求項133記載のキット。

【請求項145】 個々のライゲーター - ディテクターが、ラベルを含む請求項133記載のキット。

【請求項146】 前記ラベルが、蛍光ラベルである請求項145記載のキット。

【請求項147】 前記キットが個々のアダプター - インデクサーに対応する少なくとも2種のライゲーター - ディテクターを含み、ここで所定のアダプター - インデクサーに対応する個々のライゲーター - ディテクターが異なったレベルを含む請求項145記載のキット。

【請求項148】 前記ディテクタープローブが、すべて同じ長さのものである請求項133記載のキット。

【請求項149】 前記ディテクタープローブが、すべて類似するハイブリッド安定性を有する請求項133記載のキット。

【請求項150】 個々のアダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、支持体上に固定される請求項133記載のキット。

【請求項151】 前記ディテクタープローブが、支持体上に固定される請求項150記載のキット。

【請求項152】 個々のアダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、捕捉タグ、ソーティングタグ又は両者に会合される請求項133記載のキット。

【請求項153】 前記ライゲーター - ディテクターが、捕捉タグ又はソーティングタグに会合される請求項152記載のキット。

【請求項154】 前記ディテクタープローブが、

(a) 付着端を有する核酸フラグメントを生成するために、複数の異なった配列を有する付着端を集合的に生成する、1又は複数の核酸開裂試薬と共に核酸サンプルをインキュベートし、

(b) 複数のアダプター - インデクサーと、前記核酸サンプルとを混合し、そして核酸フラグメントに前記アダプター - インデクサーを共有結合し、ここで個々のアダプター - インデクサーは異なった付着端を有し、前記アダプター - インデクサーの個々の付着端は前記核酸開裂試薬により生成される付着端と適合でき、

(c) 前記核酸サンプルにより複数のライゲーター - ディテクターをハイブリダイズし、ここで個々のライゲーター - ディテクターは、アダプター - インデクサーの少なくとも1つの付着端を包含し、そしてそれに隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又は相補的な配列を含んで成り、

(d) 前記核酸サンプルにより複数のディテクタープローブをハイブリダイズし、そして前記ライゲーター - ディテクターを前記ディテクタープローブに共有結合し、ここで個々のディテクタープローブは異なった配列を有し、

(e) 前記ディテクタープローブへのライゲーター - ディテクターの結合を、直接的に又は間接的に検出し、ここで異なったディテクタープローブに結合されるライゲーター - ディテクターのパターンが核酸サンプルにおける核酸フラグメントのカタログを構成し、

(f) 第2核酸サンプルにおける核酸フラグメントの第2カタログを調製し、そして前記第1カタログ及び第2カタログを比較し、そして

(g) 第1核酸サンプルに存在するが、しかし第2核酸サンプルには存在しない核酸フラグメントに対応する核酸フラグメントを調製することによって調製さ

れる核酸フラグメントである請求項133記載のキット。

【発明の詳細な説明】

開示される本発明は一般的に、核酸特徴化及び分析の分野、及び特に、遺伝子発現パターン及びゲノムの分析及び比較の分野に関する。

遺伝子 - 発現パターンにおける差異の研究は、分化及び発生の機構を理解するための最も有望なアプローチの1つである。さらに、疾病関連の標的分子の同定は、合理的な医薬発明のための新規接近手段を開く。現在、分子発現パターンの分析のための次の2種のアプローチが存在する：(1) mRNA - 発現地図の生成、及び(2) タンパク質の発現プロファイルが技法、例えば二次元ゲル電気泳動、質量分光計 [マトリックス - 助力 - 脱着 - イオン化 - 時間経過 (MALDI - TOF) 又はエレクトロスプレー] 及びピコモル以下の量のタンパク質を配列決定する能力により分析される、“プロトコム (protcom)” の試験。転写体のイメージングのための従来のアプローチ、例えばノザンプロット又はブランクハイブリダイゼーションは、mRNA - 発現パターンを分析するために時間がかかり、且つ材料集約的な手段である。それらの理由のために、産業的及び臨床学的研究における高い処理能力のスクリーニングのための他の方法が開発されて来た。

遺伝子発現の分析における進歩は、1977年におけるノザンプロット技法の開発であった (Alwineなど, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5350 - 5345 (1977))。この技法により、ラベルされたcDNA又はRNAプローブは、mRNA転写体の発現パターンを研究するためにRNAプロットにハイブリダイズされる。他方では、RNAアーゼ - 保護アッセイは、特定のRNAの発現を検出できる。それらのアッセイは、同様の態様でのmRNAサブセットの発現の決定を可能にする。RNAアーゼ - 保護アッセイに関しては、分析されたmRNAの配列は、選択されたmRNAとのハイブリッドを形成するラベルされたcDNAを合成するために、知られるべきであり；そのようなハイブリッドは、一本鎖 - 特異的ヌクレアーゼによるRNA分解を阻止する。第3のアプローチとして、示差ブランク - フィルターハイブリダイゼーションは、クローン化されたcDNAの発現における特定の差異の同定を可能にする (Maniatisなど, Cell 15: 687 - 701 (1978))

。それらのすべての技法は遺伝子発現における差異の研究のための卓越した手段であるが、それらの種類の方法の制限要因は、発現パターンが既知遺伝子のためのみ分析され得ることである。

遺伝子発現パターンの分析は、異なった起源のmRNAプールに1つの起源のmRNAプールをハイブリダイズすることによって生成されるDNAライブラリーの開発を有意に前進せしめた。次にハイブリダイゼーション段階において相補的鎖を見出さない転写体が、cDNAライブラリーの構成のために使用される(Hedrickなど., Nature 308:149-153(1984))。この方法に対する種々の改良が、特定のmRNAを同定するために開発されて来た(Swaroopなど., Nucleic Acids Res. 25:1954(1991); Diatchenkoなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:6025-6030(1996))。それらの1つは、ビオチン-及び制限-介在性富化を通しての特異的に発現されたmRNAの選択的増幅であり(SABRE; Laveryなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6831-6836(1997))、すなわちテスター集団に由来するcDNAがドライバー(対照)集団のcDNAに対してハイブリダイズされる。テスター-cDNA含有ハイブリッドに対して特異的な精製段階の後、テスター-テスターホモハイブリッドが、付加されたリンカーを用いて特異的に増幅され、従って、これまで知られていない遺伝子の単離を可能にする。

真核生物mRNAの示差的表示の技法は、二方向態様で組織的に、転写された遺伝子进行分析し、そして比較するための最初の1-管方法であり;減法的及び示差的ハイブリダイゼーション技法が特異的に発現された遺伝子の一方方向性同定のために適合されて来た(Liang and Pardee, Science 258:967-971(1992))。精製が、示差的表示の再現性、効率及び性能を強化するために提案されて来た(Bauerなど., Nucleic Acids Res. 11:4272-4280(1993); Liang and Pardee, Curr. Opin. Immunol. 7:274-280(1995); Ito and Sakalci, Methods Mol. B

iol. 85:37-44 (1997); Praschar and Weissman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:659-663 (1996)。それらのアプローチは、従来のPCRに基づく示差的表示よりも再現性であり且つ正確であるが、それらはまだ、ゲル電気泳動の使用を必要とし、そしてしばしば、分析からの一定のDNAフラグメントの排除を包含する。

2種の複合体ゲノム間の差異を同定するために元来、開発されたが、代表的な差異分析(RDA)は減法的ハイブリダイゼーション及びPCRの両者を利用することによって示差的遺伝子発現を分析するために適合された(Lisitsynなど., Science 259:946-951 (1993); Hubank and Schatz, Nucleic Acids Res. 22:5640-5648 (1994)。第1の段階においては、2種の異なった集団、すなわちテスター及びドライバー(対照)に由来するmRNAが逆転写され; 前記テスターcDNAは、示差遺伝子発現の発生が予測されるcDNA集団を表す。時折開裂する制限エンドヌクレアーゼによる消化に続いて、リンカーがcDNAの両端に連結される。次に、PCR段階が異なった遺伝子プールの初期表示を生成する。テスター及びドライバーcDNAのリンカーが消化され、そして新規リンカーがラスターcDNAの末端に連結される。次に、テスター及びドライバーcDNAが、テスター及びドライバーcDNAプールにおいて共通の一本鎖cDNA間でのハイブリダイゼーションを促進するために、過剰のドライバーcDNAと共に1:100の比で混合される。cDNAのハイブリダイゼーションに続いて、PCRは、二本鎖cDNAの両端上のプライミング部位を通して、テスターcDNAにより生成されるそれらのホモ重複体のみを、指数的に増幅する(O'Neill and Sinclair, nucleic Acids Res. 25:2681-2682 (1997); Wadaなど., Kidney Int. 51:1629-1638 (1997); Edmanなど., J. 323:113-118 (1997))。

細胞又は生物の遺伝子-発現パターンは、その基本的な生物学的特徴を決定する。mRNAコードの配列の発現及び特徴化を促進するために、種々の組織から

直接的に、cDNAのフラグメントを配列決定する考えが明らかになった(Adamsなど., Science 252:1651-1656(1992); Adamsなど., Nature 377:3-16(1995))。それらの発現された配列標識(EST)は、ゲノム由来の配列におけるコード領域の同定を可能にする。公的に入手できるESTデータベースは、コンピューターによる遺伝子発現の比較分析を可能にする。示差的に発現された遺伝子は、所定の器官又は細胞型の発現された配列のデータベースと、異なった起源からの配列情報を比較することによって同定され得る(Leeなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8303-8307(1995); Vasmatazisなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:300-304(1998))。ESTの配列決定に対する欠点は、大規模な配列決定施設の必要性である。

遺伝子発現の連続分析(SAGE)は、比較分析を通して示差的に発現された遺伝子の同定への配列に基づくアプローチである(Velculescuなど., Science 270:484-487(1995))。それは、異なった細胞集団又は組織に由来する配列の同時分析を可能にする。次の3段階がSAGEについての分子基礎を形成する：

(1) 発現された転写体を同定するための配列標識(10-14bp)の生成；
(2) クローン化され、そして配列決定され得るコンカテマーを得るための配列標識の連結；及び(3) 標識により同定された遺伝子の発現における差異を決定するための配列データの比較。この方法は、分析されるべきあらゆるmRNA集団のために行われる。SAGEの主要欠点は、対応する遺伝子が遺伝子バンクに寄与されるそれらの標識についてのみ同定され得、従ってSAGEの効率を入手できるデータベースの程度に依存性にする事実である。他方では、単純に、配列決定作業のほとんどが細胞mRNAにおいて高い頻度で存在するそれらの標識に対する反復した読み取りを付与するので、いずれかの所定のmRNA集団の95%の有効範囲を提供することができるSAGEデータ組を完全にするための主要配列決定の努力が必要とされる。換言すれば、SAGE配列決定実験は、独得の標識が、多くの週の配列決定の努力の後でのみ、データベースに蓄積し始めるで

あろう、まれなmRNAについての収獲遞減を付与する。

遺伝子発現プロファイル及びゲノム組成の研究に対する異なったアプローチは、DNAマイクロアレイの使用である。現在のDNAマイクロアレイは、高い密度で組織的にグリッド化される。そのようなマイクロアレイは、ナイロンフィルター、ガラススライド又はシリコンチップの表面に連結される、cDNA（例えば、EST）、PCR生成物又はクローン化されたDNAを用いることによって生成される（Schenaなど、Science 270, 467-470（1995））。DNAアレイはまた、合成されたオリゴヌクレオチドを直接的に適用することによって、合成されたオリゴヌクレオチドをマトリックスに直接的に適用することによって、又はフォトリトグラフィー及び固相化学合成を組み合わせ、より洗練された方法により、合成オリゴヌクレオチドからアセンブリーされ得る（Fodorなど、Nature 364:555-556（1993））。遺伝子発現における差異を決定するためには、ラベルされたcDNA又はオリゴヌクレオチドが、DNA-又はオリゴマー-担持アレイにハイブリダイズされる。DNA又はオリゴヌクレオチドをラベリングするために異なった蛍光団を用いる場合、2種のプローブがアレイに同時に適用され、そして異なった波長で比較される。10,000及びそれ以上の遺伝子の発現が単一のチップ上で分析され得る（Cheeなど、Science 274:614（1996））。しかしながら、cDNA及びオリゴヌクレオチドアレイの感度に依存して、ハイブリダイゼーションシグナルの強度は、弱く又は多量に発現された遺伝子が分析される場合、直線範囲から逸れる。従って、特別に発現された遺伝子の正確な検出を確保する個々の最適化段階が必要とされる。そのようなマイクロアレイ方法は、多くの興味ある生物学的問題と取り組むために使用され得るが、それらは新規遺伝子の発現のためには適切でない。

示差的表示又はSAGEに固有の遺伝子発現のための能力を有するアレイハイブリダイゼーション技法の力及び便利を兼ね備えた方法についての必要性がある。そのような方法は、それがゲル電気泳動の使用を伴なわないで、及び冗長性DNA配列決定努力の必要性を伴なわないで、包括的な遺伝子発現分析を可能にできる場合、最も魅力あるものである。

従って、核酸配列標識の包括的分析のための方法を提供することが、本発明の目的である。

核酸配列標識のインデキシングを可能にするディテクター組成物を提供することが、本発明のもう1つの目的である。

発明の簡単な要約：

核酸サンプルの包括的分析のための方法、及び前記方法への使用のためのディテクター組成物が開示される。配列標識の固定されたアドレス分析 (F A A S T) と称する方法は、種々の付着端配列を有する1組の核酸フラグメントの生成；付着端の配列に基づいての前記フラグメントのインデキシング；前記フラグメントによるディテクター配列の会合；ディテクターアレイ上のインデキシングされたフラグメントの配列に基づく捕獲；及びフラグメントラベルの検出を包含する。複数の付着端配列の生成は、1又は複数の核酸開裂試薬と共に核酸サンプルをインキュベートすることによって達成される。好ましくは、これは、認識配列とは異なる部位で分解する制限エンドヌクレアーゼ、又は複数の制限エンドヌクレアーゼによる消化に核酸サンプルをゆだねることによって達成される。インデキシングされたフラグメントは、プローブへのハイブリダイゼーション及びカップリング、好ましくは連結により捕獲される。前記プローブは好ましくは、アレイに、又は分類できるビーズ上に固定される。

前記方法は、インデキシングされたフラグメントの検出を可能にし、ここで検出は、個々のフラグメントの元の付着端の配列、制限エンドヌクレアーゼの認識配列 (付着端配列とは異なる場合)、及びプローブに対応する配列を包含する、フラグメントのためのいくつかの配列情報を提供する。前記方法は、再現できる及び配列 - 特異的態様での核酸複合体サンプルのすばやく且つ容易な分類を可能にする。

配列標識の可変性アドレス分析 (V A A S T) として言及される1つの形のF A A S T方法は、既知の又は可能性ある配列の種々の組み合わせの、核酸分子における会合の決定を可能にする。例えば、免疫グロブリン又はT細胞受容体における連結及び可変領域の特定の組み合わせが決定され得る。配列標識の修飾助力分析 (M A A S T) として言及されるもう1つの形のF A A S T方法は、修飾の

存在又は不在に分子の分解を基づかせることによって、核酸分子における配列の修飾を評価する。例えば、核酸分子においてメチル化される部位は、その部位でメチル化に対して敏感である制限酵素により開裂されないであろう。メチル化に対して鈍感である制限酵素はその部位で分解し、従って配列標識の異なったパターンを生成する。

発明の特定の記載：

配列標識の固定されたアドレス分析 (F A A S T) として言及される、開示される方法は、再現でき且つ配列特異的な態様で、核酸の複合体サンプルのすばやく且つ容易な分類を可能にする。そのようなカタログは、サンプル間の差異の便利な検出を可能にするために、他の核酸サンプルの他の同様にして調製されたカタログと比較され得る。核酸サンプルについての有意な量の情報を組み込むカタログは、関連する核酸サンプルの検出及び核酸サンプルの比較のために使用され得る核酸サンプルのフィンガープリントとして作用することができる。例えば、特定の生物の存在又は正体は、試験生物の核酸のカタログを生成し、そしてその得られるカタログと、既知生物から調製された対照カタログとを比較することによって検出され得る。遺伝子発現パターンにおける変化及び差異はまた、異なった細胞サンプルからの m R N A のカタログを調製し、そしてそのカタログを比較することによっても検出され得る。配列のカタログはまた、核酸サンプルの源に対して特異的である 1 組のプローブ又はプライマーを生成するためにも使用され得る。

開示される方法と、生成される核酸カタログとの比較は、前記方法において生成され、そして分類される配列情報の高い規則の性質により促進される。前記方法への固定化、分類及び / 又はアレイ検出の使用は、その方法の自動化、情報の分類及び他のカタログとの比較を可能にする。前記方法は、充填された及び空のビン、及び / 又はビンにおけるシグナルの量のパターンを伴って、充填され得、空であり、又は異なったレベルに充填され得る多数の配列特異的ビンの同等物をもたらし、分類されている核酸サンプルについての情報を提供する。

F A A S T 方法は次の基本的な段階を包含する。核酸サンプルは、1 又は複数の核酸開裂試薬、好ましくは種々の配列を有する付着端を有する 1 組の D N A フ

ラグメントをもたらす制限エンドヌクレアーゼと共にインキュベートされる。好ましい形の方法においては、サンプルがアリコート（インデックスサンプルとして言及される）に分けられ；好ましくは多くのアリコートに劣らず、付着端配列が存在する。複数の制限エンドヌクレアーゼが使用される場合、核酸サンプルは好ましくは、開裂に続いて、インデックスサンプルに分けられる。次に、個々のサンプル（核酸サンプルが分けられる場合、個々のインデックスサンプル）が、インデックスサンプルにおけるDNAフラグメント上の可能な付着端の1つと適合できる付着端をそれぞれ有する、1又は複数のアダプター - インデクサーと共に混合される。好ましくは、異なったアダプター - インデクサーは、個々のインデックスサンプルと共に混合される。次に、アダプター - インデクサーが、好ましくは連結により、適合できるDNAフラグメントに共有結合される。

次に、個々のサンプル（又は個々のインデックスサンプル）におけるDNAフラグメントが、ライゲーター - ディテクターにハイブリダイズされる。個々のライゲーターの1つの端は、第1核酸開裂試薬により生成される可能な付着端配列の1つのすべて又は一部、又は開裂が認識配列から逸れない場合、第1核酸開裂試薬の認識配列のすべて又は一部に適合するか、又はそれに対して相補的な配列を有する。ライゲーター - ディテクターは、アダプター - インデクサーに結合されるフラグメントにおける付着端配列に隣接する配列に適合するか又はそれに対して相補的な配列を有することができ、そして好ましくは有する。個々のインデックスサンプルに使用されるライゲーター - ディテクターは好ましくは、インデックスサンプルに使用されるアダプター - インデクサー配列における、付着端配列を包含する配列に適合するか、又はその配列に対して相補的である。

最終的に、個々のサンプル（又はインデックスサンプル）は、好ましくは連結により、1又は複数のディテクタープローブと反応せしめられ、そしてそのプローブに結合される。好ましくは、使用される組のディテクタープローブは、所定の長さのあらゆる可能な配列（例えば、あらゆる可能な6塩基配列）を包含する。プローブ及びライゲーター - ディテクターオリゴヌクレオチドの末端は、プローブがライゲーター - アダプターの末端に隣接してハイブリダイズする場合でのみ結合される。プローブは好ましくは、固定されたオリゴヌクレオチドである。

サンプルからの個々のプロセッシングされたDNAフラグメントは、プローブへのライゲーター - ディテクター の結合に基づいてシグナルをもたらすであろう。複合体核酸サンプルは、シグナルの独得のパターンを生成するであろう。それは、核酸サンプルの独得な分類、及び異なった核酸サンプルから生成されるシグナルのパターンの敏感且つ強力な比較を可能にするこのパターンである。

プローブへのライゲーター - ディテクター の結合は、直接的に又は間接的に検出され得る。例えば、プローブ、ライゲーター - ディテクター 又は会合されたアダプター - インデクサー のいずれかが検出され得る。所定のプローブによるライゲーター - ディテクター 又はアダプター - インデクサー への会合は、プローブ及びライゲーター - ディテクター の結合の表示である。そのような会合の検出は、プローブ、ディテクター - ライゲーター 又はアダプター - インデクサー の固定化を通して、及びプローブ、ディテクター - ライゲーター 及び / 又はアダプター - インデクサー と共に捕捉タグ、ソーティングタグ及び検出できるラベルを通して促進され得る。固定化、及び捕捉タグ、ソーティングタグ及びラベルとの会合のいずれかの組み合わせが使用され得る。好ましくは、プローブはアレイに固定され、そしてライゲーター - 検出が検出できるラベルにより会合される。従って、固定されたプローブの特定のアレイにおける特定の位置でのシグナルの検出は、核酸サンプルからインデキシングされる核酸フラグメントについての情報を提供することができる。

プローブがアレイにおいて固定される場合、DNAフラグメントがシグナルを生成する前記アレイ及びそのアレイにおける位置は、DNAフラグメントの付着端の配列、及び前記付着端に隣接する配列（又は第1制限酵素の認識配列及び認識配列及び付着端配列がオーバーラップする場合、隣接する配列）を同定する。これは、4個の塩基の付着端及び6個の塩基の同定されたオリゴヌクレオチドが使用される場合、10個の塩基の配列である。使用される場合、タイプII-S制限酵素の認識配列と開裂部位との間の固定された関係、及び認識配列の正体は、DNAフラグメントについての追加の配列情報を提供する。同じ効果が、特定のプローブを捕獲し、分離し、又は検出することによって（捕捉タグ、ソーティングタグ及びラベルを通して）、達成され得る。すなわち、プローブ及びそれに

結合されるライゲーター - ディテクターが同定され得る限り、パターンが決定され得る。

任意には、ライゲーター - ディテクターとのハイブリダイゼーションの前、個々のサンプル（又はインデックスサンプル）は、1又は複数の他の核酸開裂試薬（第2核酸開裂試薬として言及される）、好ましくは4個の塩基の認識配列を有する制限酵素と共にインキュベートされ得る。次に、第2アダプターが、サンプルにおけるDNAフラグメントに、好ましくは連結により結合され得る。次に、そのDNAフラグメントは、いずれかの適切な方法、例えばPCRを用いて増幅され得る。

配列標識の修飾助力された分析（MAAST）として言及される1つの形のFAAST方法は、分子の開裂を、修飾の存在又は不在に基づかせることによって、核酸分子における配列の修飾を評価する。例えば、核酸分子においてメチル化される部位は、その部位でメチル化に対して敏感である制限酵素により切断されないであろう。メチル化に対して鈍感である制限酵素はその部位で分解し、従って配列標識の異なったパターンを生成する。

配列標識の可変性アドレス分析（VAAST）として言及される1つの形のFAAST方法は、既知の又は可能性ある配列の種々の組み合わせの、核酸分子における会合の決定を可能にする。例えば、免疫グロブリン又はT細胞受容体における連結及び可変領域の特定の組み合わせが決定され得る。VAASTは、FAASTと同じ基本的な段階を使用し、そして核酸サンプルの開裂の前、1つの段階を付加する。VAASTにおいては、切断のための認識部位、好ましくは制限酵素認識部位が、核酸サンプルにおける核酸フラグメント中に導入される。次に、この認識部位が、第1の基本的なFAAST方法において切断の標的物として使用され得る。アダプター - インデクサーは、認識部位が導入された配列に隣接すると思われる既知の又は可能性ある配列と適合するよう選択されるべきである。その結果物は、核酸フラグメントに由来する中央配列を囲む定義された末端配列を有するフラグメントである。これは、既知の又は可能性ある配列の会合の評価を可能にする。特に、認識部位が特定のアダプター - インデクサー（既知の又は可能性ある隣接配列と適合する配列を有する）と共に導入された配列の会合が

検出され得る。

材料：

核酸サンプル：

いずれの核酸サンプルでも、開示される方法に使用され得る。適切な核酸サンプルの例は、ゲノムサンプル、mRNAサンプル、核酸ライブラリー（cDNA及びゲノムライブラリーを包含する）、全細胞サンプル、環境サンプル、培養物サンプル、組織サンプル、体液及び生検サンプルを包含する。多くの核酸サンプル源が知られており、又は開発され得、そしていずれでも開示される方法に使用され得る。開示される方法と共に使用するための好ましい核酸サンプルは、有意な複合核酸サンプル、例えばゲノムサンプル及びmRNAサンプルである。

核酸フラグメントは、大きな核酸分子のセグメントである。開示される方法に使用されるような核酸フラグメントは一般的に、切断された核酸分子を言及する。核酸開裂試薬と共にインキュベートされた核酸サンプルは、消化されたサンプルとして言及される。制限酵素を用いて消化された核酸サンプルは、消化されたサンプルとして言及される。

インデックスサンプルは、さらなるプロセッシングのために異なったアリコートに分けられた核酸サンプルである。開示される方法においては、インデックスサンプルは好ましくは、異なったアダプター - インデクサーが、消化されたサンプルに存在する核酸フラグメントに、好ましくは連結により結合するために添加される、消化された核酸サンプルのアリコートである。開示される方法においては、異なった核酸フラグメントが、そのフラグメントの付着端配列に基づいて、異なったインデックスサンプルにおいてプロセッシングされる。従って、好ましくは、消化された核酸サンプルは、サンプルを消化するために使用される核酸開裂試薬により可能性ある付着端配列の数が生成されるようできるだけ多くのインデックスサンプルに分けられる。複数の異なった核酸開裂試薬が核酸サンプルを切断するために使用される場合、好ましくは、核酸サンプルは、使用される核酸開裂試薬と同じほど多くのアリコートに分けられ、そして核酸サンプルは、切断の前に分けられる。

対照の核酸サンプルは、もう1つの核酸サンプル（テスター核酸サンプルとし

て言及され得る)が比較される核酸サンプルである。対照のインデックスサンプルは、もう1つのインデックスサンプル(テスターインデックスサンプルとして言及され得る)が比較されるインデックスサンプルである。

第2インデックスサンプルは、インデックスサンプルのアリコートである。従って、インデックスサンプルは、多くの第2インデックスサンプルに分けられ得る。第2インデキシングインデックスサンプルは、核酸開裂試薬、好ましくは制限酵素により切断される。制限されたインデックスサンプル及び制限されていないインデックスサンプルは、インデックスサンプルのアリコートである。制限されたインデックスサンプルは核酸を開裂試薬により切断されるが、制限されていないインデックスサンプルは、それにより切断されない。制限された第2インデックスサンプル及び制限されていない第2インデックスサンプルは、第2インデックスサンプルのアリコートである。制限された第2インデックスサンプルは核酸開裂試薬により切断されるが、制限されていない第2インデックスサンプルはそれにより切断されない。第2インデックスサンプル、制限されたインデックスサンプル、制限されていないインデックスサンプル、制限された第2インデックスサンプル、及び制限されていない第2インデックスサンプルは、集合的には、誘導体インデックスサンプルとして言及される。個々のインデックスサンプルに由来し、そしていくつかの場合、もう1つの誘導体インデックスサンプルに由来する。

核酸開裂試薬：

開示される方法は、核酸開裂試薬を使用する。核酸開裂試薬は、核酸分子に対する切断を引き起こし、仲介し、又は触媒する、化合物、複合体及び酵素である。好ましい核酸開裂試薬は、配列-特異的態様で核酸分子を切断するそれらのものである。制限酵素(制限エンドヌクレアーゼとしても言及される)は、核酸開裂試薬の好ましい形である。他の核酸開裂試薬は、Szybal skiの普遍的な制限エンドヌクレアーゼを包含し(Szybal ski, Gene 40(2-3):169-73(1985); Podhaj ska and Szybal ski, Gene 40(2-3):175-82(1995)[公開された正誤表はGene 43(3):325(1985)に見られる]、そして進歩し

たDNA切断システムはBreakerなどにより開発された(Carmiなど, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(5):2233-2237(1998))。

多くの核酸開裂試薬は知られており、そして開示される方法に使用される。開示される方法に関しては、核酸開裂試薬は一般的に、認識配列及び切断部位を有する。多くの核酸開裂試薬、特に制限酵素はまた、切断部位で付着端を生成する。認識配列は、核酸分子に存在する場合、同起源の核酸開裂試薬により核酸分子の切断を方向づけるであろうヌクレオチド配列である。核酸開裂試薬の切断部位は、通常、認識配列に関して、核酸開裂試薬が核酸分子を切断する部位である。付着端(付着端、突出端及び5'又は3'オーバーハングとしても言及される)は、二本鎖核酸セグメントの末端での一本鎖核酸セグメントである。

本発明の方法の特定の態様に関しては、使用される核酸開裂試薬は、この方法において使用される他の制限酵素に対して一定の性質及び/又は一定の関係を有するであろう。例えば、開示される方法のいくつかの好ましい態様においては、多くの異なった配列を有する付着端を生成する核酸開裂試薬が好ましく、そして認識配列からの切断部位オフセットを有する核酸開裂試薬が最も好ましい。開示される方法の他の態様は、異なった認識配列を有し、そして/又は本発明の方法における他の段階で同じインデックスサンプルに対して使用される他の核酸開裂試薬とは異なった付着端を生成する異なった核酸開裂試薬の使用を必要とする。例えば、3種の消化物(すなわち、切断反応)がこの方法において使用される場合、好ましくは、個々の消化物に使用される核酸開裂試薬は、他の消化物に使用される核酸開裂試薬の認識配列とは異なった認識配列を有する。そのような場合、核酸開裂試薬の既知性質が、適切な核酸開裂試薬を選択し、または企画するために使用され得る。

核酸開裂試薬が認識配列とは異なった又ははなれた部位でDNAを切断する場合、異なった配列を有する種々の付着端が生成され得る。これは、核酸における認識配列がいずれかの配列の次に存在し、そして、切断部位がいずれかの配列を有することができるからである。例えば、FokIは、GGATGの認識部位から9個(上方の鎖)及び13個(下方の鎖)下流のヌクレオチドを切断する。4

個の塩基の付着は、どんな配列でも、認識部位から10～13個のヌクレオチド離れて存在すべきであろう。十分な切断部位を与える場合、合計256個の異なった付着端配列（あらゆる可能な4個の塩基配列である）が、F o k I 消化に起因する。結果として、制限酵素、例えばタイプII-S制限酵素は、多くの異なった配列を有する付着端を生成するといわれる。

本明細書において使用される場合、特にことわらない限り、用語、消化物、消化、消化された及び消化するとは、一般的に、切断反応又は切断の作用を言及し、そしてタンパク質酵素、又はいずれかの特定の機構による切断に限定されるものではない。同様に、用語、制限されたとは、いずれかの核酸切断を言及するものであって、制限酵素による切断を言及するものではない。核酸開裂試薬においては、配列-特異性は、単なるいくつかの配列特異性を必要とし、絶対的な配列特異性を必要としない。すなわち、完全に又は一部定義された認識配列を有する核酸開裂試薬が好ましい。従って、それらの認識配列にいくつかの縮重を有する核酸開裂試薬は、まだ、配列-特異的であると思われる。

第2核酸開裂試薬は、第2インデックスサンプルを消化するために使用される核酸開裂試薬である。第3核酸開裂試薬は、制限されたインデックスサンプル又は制限された第2インデックスサンプルを消化するために使用される核酸開裂試薬である。第2及び第3核酸開裂試薬は好ましくは、認識配列において切断するタイプII制限エンドヌクレアーゼである。第2制限酵素は、第2インデックスサンプルを消化するために使用される制限酵素である。第2制限酵素は、制限されたインデックスサンプル又は制限された第2インデックスサンプルを消化するために使用される酵素である。第2及び第3制限酵素は、好ましくは、認識配列において切断するタイプII制限エンドヌクレアーゼである。

標準の態様での制限酵素の使用の他に、S z y b a l s i k (S z y b a l s i k , G e n e 4 0 (2 - 3) : 1 6 9 - 7 3 (1 9 8 5) ; P o d h a j s k a a n d S z y b a l s k i , G e n e 4 0 (2 - 3) : 1 7 5 - 8 2 (1 9 9 5) [公開された正誤表はG e n e 4 3 (3) : 3 2 5 (1 9 8 5) に見られる] により記載されるように、普遍的制限エンドヌクレアーゼとしてタイプII-S酵素を使用することができる。そのS z y b a l s k i の技法においては

、一本鎖又は二本鎖DNAが、タイプII-S酵素と組合して、記載される構造体を用いて、いずれかの任意の（但し、特異的な）部位で切断され得る。より進歩したDNA切断システムは、Breakerなどにより開発された（Carmi など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(5):2233-2237(1998)）。それらのシステムにおいては、Breakerは、DNAが標的DNAにおける特定の配列を認識し、そして標的DNA、一本鎖又は二本鎖標的物を切断できることを示す。特定の作用のためのDNAの開発のためのBreakerのシステムによれば、適切な時間及び努力が与えられる場合、認識及び特定の切断のための適切なDNAは実用的であることが明白である。

アダプター - インデクサー：

アダプター - インデクサーは、1本鎖部分及び二本鎖部分を含む二本鎖核酸である。前記一本鎖部分は、アダプター - インデクサーの一端で存在し、付着端を構成する。付着端は、アダプター - インデクサーの付着端部分として言及される。好ましくは、突出する一本鎖（付着端）は、2, 3, 4又は5個のヌクレオチドを有する。アダプター - インデクサーの二本鎖部分は、いずれかの便利な配列又は長さを有することができる。一般的に、二本鎖部分の配列及び長さは、方法における続く段階に適合されるよう選択される。例えば、アダプター - インデクサーにおける配列は、プライマー又はプローブハイブリダイゼーションのために使用され得る。アダプター - インデクサーの主な目的は、連結態によるハイブリダイゼーションのための配列を提供することである。アダプターが結合されているサンプルにおけるフラグメントが増幅される場合、アダプター - インデクサーはまた、プライマーハイブリダイゼーションのための配列（ライゲーター - ディテクターハイブリダイゼーションのための配列とオーバーラップするか又は隣接できる）を提供することができる。従って、アダプター - インデクサーの二本鎖部分についての好ましい配列組成及び長さは一般的に、プローブ及びプライマーハイブリダイゼーションのために有用であるそれらのものである。アダプター - インデクサーはまた、アダプター - インデクサーの検出を促進するよう企画されるディテクター部分を包含することができる。例えば、検出部分は、ハイブリ

ダイゼーション標的物である配列であり得るか、又はそれはラベル又は標識であり得る。

一般的に、アダプター - インデクサーの二本鎖部分の配列は、前記方法における続く段階に使用されるべきいずれかの制限酵素の認識配列を含むべきではない。好ましくは、アダプター - インデクサーは、自己相補的であるいずれかの配列も有さない。この条件は、ミスマッチ又はギャップを伴わないで6個よりも長いヌクレオチドの相補的領域が存在しない場合に適合されると思われる。

開示される方法に使用するための1組のアダプター - インデクサーは、異なったアダプター - インデクサーを含むべきではなく、ここで一本鎖部分は、ヌクレオチドA, C, G及びTの組み合わせ及び置換から選択された異なったヌクレオチド配列をそれぞれ有する。複数の核酸開裂試薬が第1消化物に使用される場合、個々のアダプター - インデクサーの一本鎖部分は、核酸開裂試薬の1つにより生成される付着端配列と適合できる異なったヌクレオチド配列を有することができる。1つの組におけるアダプター - インデクサーの付着端は異なった配列を有するが、好ましくは、それは1つの核酸開裂試薬による切断により生成されるインデキシングフラグメントへの前記組の使用を促進するために同じ長さのものであり得る。好ましくは、1組のアダプター - インデクサーのメンバーは、その組の個々のメンバーのために同一である二本鎖部分を含む。

好ましい組のインデキシングリンカー鎖は次のものを含んで成る：(a) 共通する同一の配列、及び3'末端及び5'末端から選択された1つの末端で、A, G, C及びTヌクレオチドの置換及び組み合わせから選択された、2, 3, 4及び5個のヌクレオチドから選択された長さのユニーク配列をそれぞれ有する少なくとも2つの一本鎖第1オリゴヌクレオチド；及び(b) 第1オリゴヌクレオチドのいずれか1つによりハイブリダイズされる場合、ユニーク配列を有する付着端を有する末端を含む二本鎖アダプター - インデクサーが生じるよう、その配列が第1オリゴヌクレオチドの共通する配列に対して相補的である一本鎖第2オリゴヌクレオチド。

アダプター - インデクサーはまた、アダプター - インデクサーが結合されているフラグメントの固定又は捕獲を促進するために捕捉タグを含むことができるか

又はそれにより会合され得る。一般的に、捕捉タグは、結合対の1つのメンバー、例えばビオチン及びストレプトタビジンであり得る。捕捉タグは本明細書の他の部分においてより詳細に論じられる。アダプター - インデクサーはまた、アダプター - インデクサーが結合されているフラグメントの分類又は分離を促進するためにソーティングタグを含むことができるか又はそれにより会合され得る。一般的に、ソーティングタグは、検出できるラベル、例えば蛍光成分又は操作できる成分、例えば磁気ビーズであり得る。ソーティングタグは本明細書の部分でより詳細に論じられる。アダプター - インデクサーはまた、アダプター - インデクサーが結合されているフラグメントの検出を促進するためにラベルを含むことができるか又はそれにより会合され得る。アダプター - インデクサーはまた、支持体上に固定され得る。

アダプター - インデクサーはまた、付着端の反対側の末端で突出する端を含むことができる。そのような末端は、例えば、アダプター - インデクサーにより会合されるべきラベルのためのハイブリダイゼーション標的物として使用され得（そして、従って、アダプター - インデクサーの検出部分として見なされ得る）。アダプター - インデクサーはまた、検出のためのアダプター - インデクサー配列の開放を促進するために1又は複数の光分解性ヌクレオチドを含むことができる。光分解性ヌクレオチド及びそれらの使用は、W000/04036号に記載されている。

アダプター - インデクサーは、天然に存在するヌクレオチドから構成される必要はない。修飾されたヌクレオチド、異常塩基のヌクレオチド、及びオリゴヌクレオチド類似体を使用され得る。必要とされるすべては、アダプター - インデクサーが本明細書に記載される一般構造を有し、そして開示される方法において必要とされる相互作用及び反応を行うことができることである。

ライゲーター - ディテクター：

ライゲーター - ディテクターは、核酸サンプルから開示される方法により生成される核酸フラグメントの一部に対しては相補的である一本鎖領域を含む核酸分子である。ライゲーター - ディテクターは一般的に、アダプター - インデクサーに対する特定の配列関係を有する。ライゲーター - ディテクターは、アダプター

- インデクサーの少なくとも1つの付着体を包含し、そしてそれに隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又はそれに対して相補的である。ライゲーター - ディテクターのディテクター部分として言及される配列を包含する。従って、ライゲーター - ディテクターは、付着端配列（いずれかの側又は両側）に隣接する核酸フラグメントにおける配列に適合するか又は相補的な配列、付着端に適合するか又は相補的な配列、又は付着端配列及び付着端に隣接する核酸フラグメントにおける両配列に適合するか又は相補的な配列を有する。

好ましくはライゲーター - ディテクターの配列は、付着端配列のすべて又は一部、及び付着端配列と共に使用するために企画されたアダプター - インデクサーの隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又はそれに対して相補的である。この形で、ライゲーター - ディテクターの配列は、切断が認識配列から逸れない場合、第1制限酵素の認識配列のすべて又は一部と適合するか、又はそれに対して相補的である。V A A S Tに関しては、好ましくは、ライゲーター - ディテクターは、付着端配列に隣接する核酸フラグメントにおける配列に適合するか又は相補的な配列を含む。ライゲーター - ディテクターにおける配列が適合するか又は相補的であるかにかかわらず、アダプター - インデクサーの鎖及び/又はフラグメントは、ライゲーター - ディテクターにハイブリダイズするであろう。好ましくは、適合性であるか又は相補的であるライゲーター - ディテクターの1つのタイプのみが、所定のF A A S T反応に使用される。

アダプター - インデクサーとライゲーター - ディテクターとの間の配列関係のいくつかの例が、図1に示されている。図1におけるライゲーター - ディテクター1 - 12は、アダプター - インデクサーIの付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサーIの隣接する配列のすべて又は一部に適合するよう企画される。ライゲーター - ディテクター13 - 19は、アダプター - インデクサーIの付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサーI隣接配列のすべて又は一部に対して相補的であるよう企画される。ライゲーター - ディテクター21 - 32は、アダプター - インデクサーIIの付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサーIIの隣接する配列のすべて又は一部に適合するよう企画される。ライゲーター - ディテクター33 - 40は、アダプタ

ー - インデクサー I I の付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサー I I の隣接配列のすべて又は一部に対して相補的であるよう企画される。ライゲーター - ディテクターに包含されるアダプター - インデクサーの隣接配列の一部が、ライゲーター - ディテクターに包含される付着端配列の一部と隣接することを注目すること。これは、隣接により意味されることである。

図 1 におけるライゲーター - ディテクター 1 - 4 は、アダプター - インデクサー I の付着端配列のすべて、及びアダプター - インデクサー I の隣接する配列のすべて又は一部に適合するよう企画される。ライゲーター - ディテクター 5 - 12 は、アダプター - インデクサー I の付着端配列の一部、及びアダプター - インデクサー I の隣接配列のすべて又は一部に対して適合するよう企画される。ライゲーター - ディテクター 2 - 4 及び 8 - 12 は、アダプター - インデクサー I の付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサー I の隣接する配列の一部に適合するよう企画される。ライゲーター - ディテクター 13 - 16 は、アダプター - インデクサー I の付着端配列のすべて、及びアダプター - インデクサー I の隣接する配列のすべて又は一部に対して相補的であるよう企画される。ライゲーター - ディテクター 17 - 19 は、アダプター - インデクサー I の付着端配列の一部、及びアダプター - インデクサー I の隣接配列のすべて又は一部に対して相補的であるよう企画される。ライゲーター - ディテクター 14 - 16 は、アダプター - インデクサー I の付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサー I の隣接する配列の一部に対して相補的であるよう企画される。ライゲーター - ディテクター 20 は、制限酵素の認識配列（アダプター - インデクサー I の付着端と適合できる付着端を生成する）のすべて、及びアダプター - インデクサー I の隣接する配列のすべてに適合するよう企画される。アダプター - インデクサー付着端配列を越えて延長する特別なヌクレオチドを注目すること。これは、認識配列におけるフランキングヌクレオチドである。

ライゲーター - ディテクター 21 - 24 は、アダプター - インデクサー I I の付着端配列のすべて、及びアダプター - インデクサー I I の隣接する配列のすべて又は一部に適合するよう企画される。ライゲーター - ディテクター 25 - 32 は、アダプター - インデクサー I I の付着端配列の一部、及びアダプター - イン

デクサー I I の隣接配列のすべて又は一部に適合するよう企画される。ライゲーター - デテクター 2 2 - 2 4 及び 2 8 - 3 1 は、アダプター - インデクサー I I の付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサー I I の隣接する配列の一部に適合するよう企画される。ライゲーター - デテクター 3 3 - 3 6 は、アダプター - インデクサー I I の付着端配列のすべて、及びアダプター - インデクサー I I の隣接配列のすべて又は一部に対して相補的であるよう企画される。ライゲーター - デテクター 3 7 - 4 0 は、アダプター - インデクサー I I の付着端配列の一部、及びアダプター - インデクサー I I の隣接する配列のすべて又は一部に対して相補的であるよう企画される。ライゲーター - デテクター 3 4 - 3 6 及び 4 0 は、アダプター - インデクサー I I の付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサー I I の隣接配列の一部に対して相補的であるよう企画される。

第 1 消化物に使用される核酸開裂試薬が、認識配列が付着端配列を超えて延長するよう、核酸開裂試薬のための認識配列内を切断する場合、ライゲーター - デテクターはまた、その認識配列のすべて又は一部に適合するか又はそれに対して相補的であり得る。認識配列が付着端配列（例えば、6 個の塩基の認識配列及び 4 個の塩基の付着端）を超えて延長する場合、ライゲーター - デテクター配列は、その同種起源のアダプター - インデクサーの付着端配列を超えて延長することができる。そのようなライゲーター - デテクターの例は、図 1（ライゲーター - デテクター番号 2 0）に示される。

ライゲーター - デテクターは配列に基づく検出システムを用いて検出され得るが、ライゲーター - デテクターはまた、ライゲーター - デテクターの検出を促進するためにラベルを含むことができる。多くのラベルは知られており、そしてこの目的のために使用され得る。ライゲーター - デテクターはまた、ライゲーター - デテクターの固定化又は捕獲を促進するために捕捉タグを含むか、又はそれにより会合され得る。ライゲーター - デテクターはまた、ライゲーター - デテクターの分類又は促進するためにソーティングタグを含むか、又はそれにより会合され得る。ライゲーター - デテクターはまた、支持体上にも固定され得る。

ライゲーター - ディテクターはまた、検出のためのライゲーター - ディテクターの開放を促進するために1又は複数の光分解性ヌクレオチドを含むことができる。光分解性ヌクレオチド及びそれらの使用は、WO 00/04036号に記載されている。

ライゲーター - ディテクターは、天然に存在するヌクレオチドから構成される必要はない。修飾されたヌクレオチド、異常塩基のヌクレオチド、及びオリゴヌクレオチド類似体を使用され得る。必要とされるすべては、ライゲーター - ディテクターが本明細書に記載される一般構造を有し、そして開示される方法において必要とされる相互作用及び反応を行うことができることである。

ディテクタープローブ：

ディテクタープローブは、配列特異的態様で核酸にハイブリダイズできる分子、好ましくはオリゴヌクレオチドである。開示される方法においては、ディテクタープローブは、ライゲーター - ディテクターがハイブリダイズされるサンプル核酸フラグメントに存在する相補的配列に基づいてライゲーター - ディテクターを捕獲するために使用される。ディテクタープローブは好ましくは、種々のプローブ、好ましくはプローブの長さでヌクレオチド配列とのあらゆる可能な組み合わせを有する（又はあらゆる組み合わせにハイブリダイズできる）1組のプローブを有するセットに使用される。ディテクタープローブは好ましくは、個々のプローブが同じ長さを有するセットに使用される。ディテクタープローブのプローブ部分のための好ましい長さは、5、6、7及び8個の長さのヌクレオチドである。ディテクタープローブは好ましくは、プローブ部分（サンプルフラグメントへのハイブリダイゼーションのための）、及びプローブ部分が支持体、捕捉タグ、ソーティングタグ又はラベルに結合されるリンカー部分を包含する。それらのリンカー部分は、いずれかの適切な構造を有することができ、そして一般的に、ディテクタープローブの固定化又は合成方法に基づいて選択されるであろう。リンカー部分は、いずれかの適切な長さを有し、そして好ましくは、プローブ部分の効果的なハイブリダイゼーションを可能にするために十分な長さのものである。便利さのために及び特にことわらない限り、ディテクタープローブの長さは、プローブのプローブ部分の長さを言及する。固定化されたディテクタープローブ

は、支持体上に固定されるディテクタープローブである。

ディテクタープローブは、支持体上に固定され得、そして好ましくは固定される。ディテクタープローブはまた、ディテクタープローブはまた、それらが結合されているプローブ及びライゲーター - ディテクターの固定化又は捕獲を促進するために捕捉タグを含み、又はそれにより会合され得る。

ディテクタープローブはまた、プローブに結合されるプローブ配列及びライゲーター - ディテクターの開放を促進するために1又は複数の光分解性ヌクレオチドを含むことができる。光分解性ヌクレオチド及びそれらの使用は、WO 0 / 0 4 0 3 6 号に記載されている。

ディテクタープローブは、天然に存在するヌクレオチドから構成される必要はない。修飾されたヌクレオチド、異常塩基のヌクレオチド、及びオリゴヌクレオチド類似体を使用され得る。必要とされるすべては、プローブが本明細書に記載される一般構造を有し、そして開示される方法において必要とされる相互作用及び反応を行うことができることである。

プローブアレイ：

異なったディテクタープローブは、セットとして一緒に使用され得る。このセットは、プローブのすべて又はサブセットの混合物として使用され、プローブは別々の反応において別々に使用され、又はアレイにおいて固定される。別々に又は混合物として使用されるプローブは、例えば捕捉タグ、ソーティングタグ又はビーズ上への固定化の使用を通して物理的に分離できる。プローブアレイ（本明細書においては、アレイとしても言及される）は、アレイ上の同定された又は予測される位置で固定される多くのプローブを包含する。この場合、多くのプローブは、異なった配列をそれぞれ有する複数のプローブを言及する。アレイ上の予測される位置は、1つのタイプのプローブ（すなわち、その位置でのすべてのプローブは同じ配列を有する）を有する。個々の位置は、プローブの複数のコピーを有するである。アレイにおける異なった配列のプローブの空間的分離は、核酸サンプルにおける核酸フラグメントへのプローブのハイブリダイゼーションを通してプローブに結合されるようになるライゲーター - ディテクターの別々の検出及び同定を可能にする。ライゲーター - ディテクターがプローブアレイにおけ

る所定の位置で検出される場合、それは、ライゲーター - ディテクターがハイブリダイズした核酸フラグメントにおける部位に隣接する配列がアレイにおけるその位置で固定されるプローブに相補的であることを示す。

アダプター - インデクサー及びライゲーター - ディテクターは又は、アレイにおいて固定され得る。開示される方法の異なった態様が、固定され、ラベルされ、又は標識される異なった成分により行われ得る。アダプター - インデクサー及びライゲーター - ディテクターのアレイは、下記のようにして及びディテクタープローブについて本明細書において記載されるようにして、製造され、そして使用され得る。

プローブアレイに使用するための固定状態支持体は、オリゴヌクレオチドが直接的に又は間接的に結合され得るいずれかの固体材料を包含する。これは、材料、例えばアクリルアミド、セルロース、ニトロセルロース、ガラス、ポリスチレン、ポリエチレンビニルアセテート、ポリプロピレン、ポリメタクリレート、ポリエチレン、ポリ酸化エチレン、ポリシリケート、ポリカーボネート、テフロン（登録商標）、フルオロカーボン、ナイロン、シリコーンゴム、ポリ無水物、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリオルトエステル、ポリプロピルフマレート、コラーゲン、グリコサミノグリカン及びポリアミノ酸を包含する。固体状態支持体は、いずれか有用な形、例えば薄フィルム又は膜、ビーズ、ボトル、皿、繊維、繊維織物、形状化されたポリマー、粒子及び微小粒子の形を有することができる。固体状態支持体のための好ましい形は、マイクロタイター - 皿である。マイクロタイター皿の最も好ましい形は、標準の96 - ウェル型である。

固体状態へのオリゴヌクレオチドの固定化方法は、十分に確立されている。ディテクタープローブは、確立されている結合方法を用いて、支持体に結合され得る。例えば、適切な結合方法は、Peaseなど、, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (11) :

5022 - 5026 (1994)、及びKhrapkoなど、, Mol. Biol. (Mosk) (USSR) 25 : 718 - 730 (1991) により記載される。カゼイン被覆されたスライド上への3' - アミノオリゴヌクレオチドの固定化方法は、Stimpsonなど、, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9

2 : 6 3 7 9 - 6 3 8 3) により記載される。固体状態支持体へのオリゴヌクレオチドの結合の好ましい方法は、Guoなど., *Nucleic Acids Res.* 22 : 5 4 5 6 - 5 4 6 5 (1 9 9 4) により記載される。

固体状態支持体上にオリゴヌクレオチドのアレイを生成するための方法もまた知られている。そのような技法の例は、アメリカ特許第5, 871, 928号 (Fodorなど.,), アメリカ特許第5, 54, 413号、第5, 429, 807号及び第5, 599, 695号 (Peaseなど.,) に記載される。

好ましいけれども、所定のプローブアレイが単一のユニット又は構造体である必要はない。プローブのセットは、固体支持体のいずれかのメンバー上に分布され得る。例えば、極端には、個々のプローブは、別々の反応管又は容器に固定され得る。

アレイにおけるプローブはまた、類似するハイブリッド安定性を有するよう企画され得る。これは、ディテクタープローブへのフラグメントのハイブリダイゼーションをより効果的にし、そしてミスマッチハイブリダイゼーションの発生率を低める。プローブのハイブリッド安定性は、既知の式及び熱力学の原理を用いて計算され得る (例えば、Santa Luciaなど., *Biochemistry* 3555 - 3562 (1996); Freierなど., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 9373 - 9377 (1986); Breslauerなど., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 3746 - 3750 (1986) を参照のこと)。プローブのハイブリッド安定性は、例えば、プローブを化学的に修飾することによって、より類似するようされ得る (ハイブリッド安定性の平滑性として言及され得る工程) (Nguyenなど., *Nucleic Acids Res.* 25 (15) : 3059 - 3065 (1997); Hohsisel, *Nucleic Acids Res.* 24 (3) : 430 - 432 (1996))。ハイブリッド安定性はまた、特殊化された条件下でハイブリダイゼーションを行うことによって平滑化され得 (Nguyenなど., *Nucleic Acids Res.* 27 (6) : 1492 - 1498 (1999); Woodなど., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (6) : 1585 - 1588 (1985))。

プローブのハイブリッド安定性を平滑化するためにもう1つの手段は、プローブの長さを変えることである。これは、プローブのすべてが類似するハイブリッド安定性（可能な程度まで）を有するよう、個々のプローブのハイブリッド安定性の調節を可能にする。プローブから単一のヌクレオチドの付加又は欠失は一定のインクレメントでプローブのハイブリッド安定性を変えるので、プローブアレイにおけるプローブのハイブリッド安定性は等しくないであろう。この理由のために、ハイブリッド安定性の類似性とは、本明細書において使用される場合、プローブのハイブリッド安定性の類似性のいずれかの上昇性を言及する（又は、プローブのハイブリッド安定性における差異の低下を言及する）。これはハイブリッド安定性におけるそのような高められた類似性がハイブリダイゼーションの効率及び適合度、及びディテクタープローブの連結を改良することができるので、有用である。

サンプルフラグメントへのディテクタープローブのハイブリダイゼーション及び連結の効率はまた、異なったハイブリダイゼーション条件にゆだねられ得るプローブアレイの部分又はセグメントにおける類似するハイブリッド安定性のディテクタープローブをグループ分けすることによっても改良され得る。この場合、ハイブリダイゼーション条件は、特定種類のプローブのために最適化され得る。ラベル：

ディテクタープローブに結合されるライゲーター - ディテクターの検出及び定量化を助けるために、ラベルが、ライゲーター - ディテクター、ディテクタープローブ及び/又はアダプター - インデクサー中に組み込まれ、結合され、又は会合され得る。好ましくは、ライゲーター - ディテクターはラベルされる。ラベルは、ライゲーター - ディテクターにより、直接的に又は間接的に会合され得、そして測定でき、検出できるシグナルを、直接的に又は間接的にもたらすいずれかの分子である。ラベルは、それが成分に共有的に又は非共有的にカップリングされるか又は結合される場合、その成分に会合される。ラベルは、それが成分に共有結合される場合、その成分に結合される。核酸中への組み込み、カップリング又は会合のための多くの適切なラベルは知られている。開示される方法への使用のために適切なラベルの例は、放射性同位体、蛍光分子、リン光分子、生物ルミ

ネセント分子、酵素、抗体及びリガンドである。

適切な蛍光ラベルの例は、次のものを包含する：フルオレセイン (F I T C)、5, 6 - カルボキシメチルフルオレセイン、テキサスレッド、ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1, 3 - ジアゾール - 4 - イル (N B D)、クマリン、塩化ダンシル、ローダミン、4' - 6 - ジアミジンノ - 2 - フェニルイノドール (D A P I)、及びシアニン色素 Cy 3, Cy 3. 5, Cy 5, Cy 5. 5 及び Cy 7。好ましい蛍光ラベルは、フルオレセイン (5 - カルボキシフルオレセイン - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル) 及びローダミン (5, 6 - テトラメチルローダミン) である。同時検出のための好ましい蛍光ラベルは、F I T C、及びシアニン色素 Cy 3, Cy 3. 5, Cy 5, Cy 5. 5 及び Cy 7 である。それらのほたる石についてのそれぞれの吸収度及び発光最大値は次の通りである：F I T C (490 nm; 420 nm)、Cy 2 (554 nm; 568 nm)、Cy 3. 5 (581 nm; 588 nm)、Cy 5 (652 nm; 672 nm); Cy 5. 5 (682 nm; 703 nm) 及び Cy 7 (755 nm; 778 nm); 従ってそれらの同時検出を可能にする。蛍光ラベルは、種々の市販源、例えば M o l e c u l a r P r o b e s, Eugene, OR 及び R e s e a r c h O r g a n i c s, C l e v e l a n d, O h i o から得られる。

ラベルされたヌクレオチドは、それらが、合成の間、ライゲーター - ディテクター中に直接的に組み込まれ得るので、ラベルの形を含む。DNA 又は RNA 中に組み込まれ得るラベルの例は、ヌクレオチド類似体、例えば BrdUrd (H o y a n d S c h i m k e, M u t a t i o n R e s e a r c h 290: 217 - 230 (1993)), BrUTP (W a n s i c k など., J . C e l l B i o l o g y 122: 283 - 293 (1993)), 及びビオチンにより (L a n g e r など., P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 78: 6633 (1981)), 又は適切なハプテン、例えばジゴキシゲニンにより (K e r k h o f, A n a l . B i o c h e m. 205: 359 - 364 (1992)), 修飾されたヌクレオチドを包含する。適切な蛍光ラベルされたヌクレオチドは、フルオレセイン - イソチオシアネート - dUTP、シアニン - 3 - dUTP 及びシアニン - 5 - dUTP である (Y u など., N u c l e i c

A c i d s R e s . , 2 2 : 3 2 2 6 - 3 2 3 2 (1 9 9 4)) 。 DNAのための好ましいヌクレオチド類似体検出ラベルはB r d U r d (B U D Rミリン酸、S i g m a) であり、そしてRNAのための好ましいヌクレオチド類似体検出ラベルは、ビオチン - 1 6 - ウリジン - 5 ' - 三リン酸 (ビオチン - 1 6 - d U T P , B o e h r i n g e r M a n n h e i m) である。フルオレセイン、C y 3 及びC y 5 は、直接的なラベリングのためにd U T P に連結され得る。C y 3 . 5 及びC y 7 は、ビオチン - 又はジゴキシゲニン - ラベルされたプローブの第2の検出のためにアビジン又は抗 - ジゴキシゲニン接合体として入手できる。

核酸中に組み込まれるラベル、例えばビオチンは、当業界において良く知られている感受性方法を用いて、連続的に検出され得る。例えば、ビオチンは、ビオチンに結合され、そして続いて、適切な基質の化学ルミネセンス (例えば、化学ルミネセンス基質C S P D : ニナトリウム、3 - (4 - メトキシスピロ - [1 , 2 - ジオキセタン - 3 - 2 ' - (5 ' - クロロ) トリシルロ [3 , 3 , 1 , 1 ³ - 7] デカン] - 4 - イル) フェニルホスフェート ; T r o p i x , I n c .) により検出される、ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ接合体 (T r o p i x , I n c .) を用いて検出され得る。

他のラベルは、分子又は金属バーコード、質量ラベル、及び核磁気共鳴、電子常磁性共鳴、表面増強されたラマン散乱、表面プラスモン共鳴、蛍光、リン光、化学ルミネセンス、共鳴ラマン、マイクロ波、又はそれらの組み合わせにより検出できるラベルを包含する。質量ラベルは、ラベルされた成分、すなわち質量分光計における特有の質量特性を有するか又はそれを付与する、化合物又は成分である。質量ラベルは、質量分光計が検出のために使用される場合に有用である。好ましい質量ラベルは、ペプチド核酸及び炭水化物である。ラベルの組み合わせもまた、有用である。例えば、2 6 5 のラベルのユニーク組み合わせを有する、色素コードされた微小ビーズは、多くの成分を特徴づけるために有用である。例えば、2 5 6 の異なったライゲーター - ディテクターは、独得にラベルされ、そして検出され得、開示される方法の多重化及び自動化を可能にする。

有用なラベルは、次の文献に記載されている : d e H a a s , R . R , など

. , "Platinum porphyrins as phosphorescent label for time-resolved microscopy," *J. Histochem. Cytochem.* 45(9):1279-92(1997); Karger and Gesteland, "Digital chemiluminescence imaging of DNA sequencing blots using a charge-coupled device camera," *Nucleic Acids Res.* 20(24):6657-65(1992); Keyes, R. S., など. , "Overall and internal dynamics of DNA as monitored by five-atom-tethered spin labels," *Biophys. J.* 72(1):282-90(1997); Kirschstein, S., など. , "Detection of the DeltaF508 mutation in the CFTR gene by means of time-resolved fluorescence methods," *Bioelectrochem. Bioenerg.* 48(2):415-21(1999); Kricka, L. J., "Selected strategies for improving sensitivity and reliability of immunoassays," *Clin. Chem.* 40(3):347-57(1994); Kricka, L. J., "Chemiluminescent and bioluminescent techniques," *Clin. Chem.* 37(9):1472-81(1991); Kumke, M. U., など. , "Temperature and quenching studies of fluorescence polarization detection of DNA hybridization," *Anal. Chem.* 69(3):500-6(1997); McCreery, T., "Digoxigenin labeling," *Mol. Biotechnol.* 7(2):121-4(1997); Mansfield, E. S., など. , "Nucleic acid detection using non-radi

oactive labeling methods," *Mol. Cell Probes* 9(3):145-56(1995); Nurmi, J., など., "A new label technology for the detection of specific polymerase chain reaction products in a closed tube," *Nucleic Acids Res.* 28(8):28(2000); Oetting, W.S., など., "Multiplexed short tandem repeat polymorphisms of the Weber 8A set of markers using tailed primers and infrared fluorescence detection," *Electrophoresis* 19(18):3079-83(1998); Roda, A., など., "Chemiluminescent imaging of enzyme-labeled probes using an optical microscope-videocamera luminograph," *Anal. Biochem.* 257(1):53-62(1998); Siddiqi, A., など., "Evaluation of electrochemiluminescence- and bioluminescence-based assays for quantitating specific DNA," *Lab. Anal.* 10(6):423-31(1996); Stevenson, C.L., など., "Synchronous luminescence: a new detection technique for multiple fluorescent probes used for DNA sequencing," *Bio techniques* 16(6):1104-11(1994); Vo-Dinh, T., など., "Surface-enhanced Raman gene probes," *Anal. Chem.* 66(20):3379-83(1994); Volkers, H.H., など., "Microwave label detection technique for DNA *in situ* hybridization," *Eur. J. Morphol.* 29(

1) : 59 - 62 (1991)。

金属バーコード、すなわち分子バーコードの形は、30 - 300 nmの直径 × 400 - 4000 nmの多層多金属ロッドである。それらのロッドは、アルミナ金型中への電着により構成され、次にアルミナが除去され、小さな多層目的物が残る。システムは、7種までの異なった金属により、12までの区画をコードされ、ここで前記金属は異なった反射能を有し、そして従って、金属に依存して、光学顕微鏡において、より明るく又は暗く出現し；これが実際的に制限されていない識別コードを導く。金属バーがガラス又は他の材料により被服され得、そしてプローブが当業界において通常知られている方法を用いてガラスに結合され；アッセイ読み出し情報は標的物からの蛍光によってであり、そしてプローブの正体はバーコードの明暗パターンからである。

ラベルにより生成されるシグナルを検出し、そして測定するための方法は知られている。例えば、放射性同位体は、シンチレーション計数又は直接的な可視化により検出され得；蛍光分子が蛍光分光計により検出され得；リン光分子が分光計により検出され、又はカメラにより直接的に可視化され得；酵素が、その酵素により触媒される反応の生成物の検出又は可視化により検出され得；抗体がその抗体に結合される第2検出ラベルを検出することによって検出され得る。そのような方法は、増幅及び検出の開示される方法に直接的に使用され得る。本明細書において使用される場合、検出分子は、増殖された核酸と相互作用し、そして1又は複数の検出ラベルが結合される分子である。もう1つの形の検出においては、ラベルは、異なった蛍光、リン光又は化学ルミネセント発光寿命を通して一時的に区別され得る。多重化された時間 - 依存性検出は、Squireなど., J . M i c r o s c o p y 197 (2) : 136 - 149 (2000) 及びWO 00 / 08443号に記載されている。

ラベルの量又は強度の定量的測定が使用され得る。例えば、定量化は、所定のラベル及び従って、ラベル化された成分が限界レベル又は量で存在するかどうかを決定するために使用され得る。限界レベル又は量は、シグナルのいずれかの所望するレベル又は量であり、そして実施される方法の特定の形の必要性に適合するよう選択され得る。

第2アダプター：

第2アダプターは、1本鎖部分及び二本鎖部分を含む二本鎖核酸である。前記一本鎖部分は、第2アダプター的一端で存在し、そして付着端を構成する。好ましくは、突出する一本鎖（付着端）は、2, 3, 4又は5個のヌクレオチドを有する。第2アダプターの二本鎖部分は、いずれかの便利な配列又は長さを有することができる。一般的に、二本鎖部分の配列及び長さは、方法における続く段階に適合されるよう選択される。例えば、第2アダプターにおける配列は、プライマー又はプローブハイブリダイゼーションのために使用され得る。アダプターが連結されているサンプルにおけるフラグメントが増幅され得る場合、第2アダプターは、プライマーハイブリダイゼーションのためのプローブを提供することができる。従って、第2アダプターの二本鎖部分のための好ましい配列組成及び長さは一般的に、プライマーハイブリダイゼーションのために有用であるそれらのものである。

一般的に、第2アダプターの二本鎖部分の配列は、方法における続く段階に使用されるいずれかの核酸開裂試薬の認識配列を含むべきではない。好ましくは、第2アダプターは、自己-相補的であるいずれかの配列を有さない。この条件は、ミスマッチ又はギャップを有さない、6個よりも多くのヌクレオチドの相補的領域が存在しない場合に適合されると思われる。

開示される方法への使用のための1組みの第2アダプターは、異なった第2アダプターを含むことができ、ここで1本鎖部分はそれぞれ、第2制限酵素の1つにより生成される付着端配列と適合できる異なったヌクレオチド配列を有する。好ましくは、1組の第2アダプターのメンバーは、前記組の個々のメンバーに対して同一である二本鎖部分を含む。

第2アダプターはまた、第2アダプターが結合されているフラグメントの固定又は捕獲を促進するために捕捉タグを含み、又はそれにより会合され得る。第2アダプターはまた、第2アダプターが結合されているフラグメントの分類又は分離を促進するためにソーティングタグを含み、又はそれにより会合され得る。第2アダプターはまた、第2アダプターが結合されているフラグメントの検出を促進するために、ラベルを含み、又はそれにより会合され得る。第2アダプターは

また、支持体上に固定され得る。

捕捉タグ

捕捉タグは、捕捉タグを有する化合物または複合体を、それを有さないものから分離するために用いられ得る任意の化合物である。好ましくは、捕捉タグは、リガンド結合分子または抗体のような別の化合物と結合するかまたは相互作用するリガンドまたはハプテンのような化合物である。捕捉タグおよび捕捉構成成分間のこのような相互作用が、ハプテンおよび抗体またはリガンドおよびリガンド結合分子間のような特異的相互作用であるのも好ましい。

核酸プローブの関係で記載される好ましい捕捉タグは、Syvnen et al., Nucleic Acids Res., 14:5037 (1986) により記載されている。好ましい捕捉タグとしては、核酸中に組み入れられ得るビオチンが挙げられる。開示された方法では、アダプター - インデクサーまたは二次アダプター中に組み入れられる捕捉タグは、支持体に接着されるかまたは結合されることによりサンプル断片（アダプターがそれに結合されている）を捕捉させ得る。このような捕捉は、断片の洗浄および取扱いの単純化を可能にし、そしてすべてのまたは一部の方法の自動化を可能にする。

支持体上のサンプル断片の捕捉は、いくつかの方法で成し遂げられ得る。一実施態様では、捕捉ドックが支持体に接着されるかまたは結合される。捕捉ドックは、断片上に捕捉タグを結合するかまたはそれと相互作用することによりサンプル断片の接着を媒介する化合物または部分である。支持体上に固定された捕捉ドックは、支持体上の断片の捕捉を可能にする。このような捕捉は、その後の過程を妨げ得る反応構成成分を洗い落とす便利な手段を提供する。

開示された方法に用いるための支持体は、検定の構成成分が接着または結合され得る任意の固体物質を含み得る。支持体の例としては、アクリルアミド、セルロース、ニトロセルロース、ガラス、ポリスチレン、ポリエチレンビニルアセテート、ポリプロピレン、ポリメタクリレート、ポリエチレン、ポリエチレンオキシド、ポリシリケート、ポリカルボネート、テフロン、フルオロカーボン、ナイロン、シリコンゴム、ポリアンヒドライド、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリオルトエステル、ポリプロピルフメレート、コラーゲン、グリコサミノグリカン

およびポリアミノ酸のような物質が挙げられるが、これらに限定されない。支持体は、薄皮膜または膜、ビーズ、ボトル、皿、繊維、織繊維、造形ポリマー、粒子および微粒子を含めた任意の有用な形態を有し得る。支持体の好ましい形態は、プレートおよびビーズである。ビーズの最も好ましい形態は、磁気ビーズである。

一実施態様では、捕捉ドックは、オリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドを支持体に固定し、結合するための方法は、十分確立されている。例えば、適切な付着方法は、Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(11):5022-5026(1994)およびKhrapko et al., Mol. Biol. (Mosk) (USSR) 25:718-730(1991)により記載されている。カゼイン被覆スライド上の3'-アミノオリゴヌクレオチドの固定化のための方法は、Stimpson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6379-6383(1995)により記載されている。固体状態支持体へのオリゴヌクレオチドの好ましい付着方法は、Guo et al., Nucleic Acids Res. 22:5456-5465(1994)により記載されている。

別の実施態様では、捕捉ドックは、抗ハイブリッド抗体である。支持体に抗体を固定するための方法は、十分確立されている。固定化は、標準固定化化学を用いて、例えばアミノ化表面、カルボキシル化表面またはヒドロキシル化表面に取り付けることにより成し遂げられ得る。付着剤の例は、臭化シアン、スクシンイミド、アルデヒド、トシルクロリド、アビジン-ビオチン、光架橋可能剤、エポキシドおよびマレイミドである。好ましい付着剤は、グルタルアルデヒドである。これらのおよびその他の付着剤、ならびに付着にそれらを用いるための方法は、Protein immobilization: fundamentals and applications, Richard F. Taylor, ed. (M. Dekker, New York, 1991), Johnstone and Thorpe, Immunochimistry In Practice (Blackwell Scientific Publication

s, Oxford, England, 1987) pages 209 - 216 and 241 - 242およびImmobilized Affinity Ligands, Craig T. Hermanson et al., eds. (Academic Press, New York, 1992)に記載されている。抗体は、支持体内に存在する反応性側基に抗体上の遊離アミノ基を化学的に架橋することにより、支持体に取り付けられ得る。例えば、抗体は、架橋剤としてグルタルアルデヒドまたはカルボジイミドを用いて、遊離アミノまたはカルボキシル基を含有する支持体に化学的に架橋され得る。この方法では、遊離抗体を含有する水性溶液は、グルタルアルデヒドまたはカルボジイミドの存在下で固体状態支持体とともにインキュベートされる。グルタルアルデヒドによる架橋のために、反応体は、pH 7.4で0.1Mカコジル酸ナトリウムのような緩衝化溶液中の2容量%グルタルアルデヒドとともにインキュベートされ得る。他の標準固定化化学は、当業者には既知である。

ソーティングタグ

ソーティングタグは、ソーティングタグを有する化合物または複合体を、それを有さないものから分類または分離するために用いられ得る任意の化合物である。概して、すべての捕捉タグはソーティングタグであり得る。ソーティングタグは、検出され得る、そしてタグ化構成成分のソーティングを媒介し得る化合物および部分も含み得る。このような形態のソーティングタグは、一般に捕捉タグではない。例えば、蛍光部分は、その部分でタグ化された構成成分の、そうでないもの（または異なるタグを有するもの）からのソーティングを可能にし得る。しかしながら、このような蛍光部分は、それが相互作用し、捕捉され得る適切な捕捉ドックを必ずしも有さない。好ましくは、ソーティングタグは、ソーティングを媒介し得る標識、例えば蛍光標識である。

増幅標的環（サークル）

増幅標的環（ATC）は、一般に40～1000ヌクレオチド、好ましくは約50～150ヌクレオチド、最も好ましくは約50～100ヌクレオチドを含有する環状一本鎖DNA分子である。ATCの部分は、回転環状増幅（RCA）に有用なATCを作製する特殊な機能を有する。これらの部分は、プライマー補足

部分およびレポータータグ部分と呼ばれる。プライマー補足部分およびレポータータグ部分は、増幅標的環の必要素子である。ATCの特定部分に対応しないATCのセグメントは、恣意的選定配列であり得る。ATCは自己相補的であるいかなる配列も有さないのが好ましい。ミスマッチまたはギャップを伴わない6ヌクレオチド長より長い相補的領域が存在しない場合、この条件は満たされ则认为られる。

増幅標的環は、複製されると、増幅標的環と相補的な配列の多重反復を含有する長いDNA分子を生じる。この長いDNA分子は、本明細書中では、タンデム配列DNA (TS-DNA) と呼ばれる。TS-DNAは、プライマー相補的部分およびレポータータグ部分と相補的な配列を含有する。TS-DNA中のこれらの配列は、プライマー配列 (回転環複製プライマーの配列と適合する) およびレポータータグと呼ばれる。増幅標的環およびそれらの使用はさらに、米国特許第5,854,033号に記載されている。

方法

FAAST法は、以下の基本的過程を包含する。二本鎖DNAに具現される核酸サンプルを、種々の配列を伴う付着末端を有する一組のDNA断片が生成されるように、1つ又はそれ以上の核酸開裂試薬、好ましくは制限エンドヌクレアーゼとともにインキュベートする。この目的のために好ましいのは、オフセット開裂部位を有する単一II-S型制限エンドヌクレアーゼの使用である。このようなII-S類制限エンドヌクレアーゼは認識配列と異なる部位で切断するため、仔レア種々の配列を伴う付着末端を有する一組のDNA断片を生じる。制限エンドヌクレアーゼまたはそれらの認識部位で切断するその他の核酸開裂試薬の混合物で核酸サンプルを消化することにより、同様の作用が得られる。

4塩基付着末端に関しては、256の考え得る配列がある。一般紙期は、 $N = 4^X$ (式中、Xは付着末端の長さであり、Nは考え得る配列の数である)。十分に複雑な核酸サンプルでは、これらの配列はすべて、DNA断片組の末端に示される。核酸サンプルは、アリコート (インデックスサンプルと呼ばれる) に、好ましくは付着末端配列が存在するのと同様に多数のアリコート (即ち $N = 4^X$ アリコート) に分けられる。多重制限エンドヌクレアーゼを用いる場合、好ましく

は消化前に、核酸サンプルをインデックスサンプルに分ける。単一制限エンドヌクレアーゼを用いる場合には、好ましくは消化後に、核酸サンプルをインデックスサンプルに分ける。次に、各インデックスサンプルを異なるアダプター - インデクサーと混合するが、その各々はそのインデックスサンプル中のDNA断片上の考え得る付着末端の1つと適合性である付着末端を有する。次に、アダプター - インデクサーを適合性DNA断片上に結合する。次に基本的方法は、ライゲーター - ディテクターとの核酸サンプルのハイブリダイゼーションに進行する。

任意に、ライゲーター - ディテクターとのハイブリダイゼーション前に、各インデックスサンプルを次に1つ又はそれ以上のその他の核酸開裂試薬（第二核酸開裂試薬と呼ばれる）、好ましくは制限酵素とともにインキュベートし得る。第二核酸開裂試薬は、好ましくは4塩基認識配列を有する制限酵素である。インデックスサンプルはすべて、好ましくは同一核酸開裂試薬（単数または複数）で消化される。あるいは、指標試薬はさらに、その各々が異なる第二核酸開裂試薬または核酸開裂試薬組で消化される第二指標試薬に分けられる。次に、第二アダプターは、インデックスサンプル（または第二インデックスサンプル）中のDNA断片に結合され得る。好ましくは、同一第二アダプターを各サンプルサンプルに用いる。異なる第二アダプターは、好ましくは、同一インデックスサンプルから得られる第二インデックスサンプルとともに用いられる。この場合、同一組の第二アダプターが各組の第二インデックスサンプルとともに用いられるのが好ましい。各インデックスサンプル（または第二インデックスサンプル）中のDNA断片は、ここでは各末端に結紮されたアダプターを有する。次に、PCRのような任意の適切な方法を用いて、DNA断片を増幅し得る。アダプター中の配列は、この増幅のためのプライマー結合部位として用いられ得る。

任意に、ライゲーター - ディテクターとのハイブリダイゼーション前に、インデックスサンプル（または第二インデックスサンプル）は、さらなるアリコートに分けられ得る。これらは、制限化インデックスサンプルおよび非制限化インデックスサンプル（または第二インデックスサンプルが存在する場合には、制限化第二インデックスサンプルおよび非制限化第二インデックスサンプル）と呼ばれる。一般に、インデックスサンプル（または第二インデックスサンプル）は、1

つ又はそれ以上の制限化インデックスサンプルおよび1つの非制限化インデックスサンプルに分けられ得る。制限化インデックスサンプル（または制限化第二インデックスサンプル）は次に、各々異なる核酸開裂試薬（第三核酸開裂試薬と呼ばれる）、好ましくは制限酵素とともにインキュベートされるが、しかし非制限化インデックスサンプル（または制限化第二インデックスサンプル）はそうでない。第三核酸開裂試薬は、好ましくはそれによりサンプルが消化された核酸開裂試薬または第二核酸開裂試薬のいずれとも異なる。

いくつかの場合には、第三核酸開裂試薬は、制限化インデックスサンプル（または制限化第二インデックスサンプル）中のいくつかのDNA断片を切断し、したがって増幅（ライゲーター - ディテクターとの核酸サンプルのハイブリダイゼーション前のもう一つの任意の過程）に役立たない断片を作製する。この方法では、制限化インデックスサンプルおよび非制限化インデックスサンプル（または制限化および非制限化第二インデックスサンプル）により生成されるシグナル箱となり得るし、第三制限酵素の1つの認識配列を含有する断片が同定され得る。

第二インデックスサンプル、制限化インデックスサンプル、非制限化インデックスサンプル、制限化第二インデックスサンプルおよび非制限化第二インデックスサンプルは、本明細書中では集合的に誘導性インデックスサンプルと呼ばれる。各々は、インデックスサンプルから、そしていくつかの場合には別の誘導性インデックスサンプルから得られる。概して、最後に生成された誘導性インデックスサンプルだけが、本方法では前方に運ばれる。例えば、第二インデックスサンプルが作製された場合、それらが得られたオリジナルインデックスサンプルは、本方法ではもはや前方に運ばれない（第二インデックスサンプルが運ばれる）。同様に、制限化および非制限化第二インデックスサンプルが作製された場合には、オリジナルインデックスサンプルも、制限化および非制限化第二インデックスサンプルが得られる第二インデックスサンプルも本方法では前方に運ばれない。しかしながら、インデックスサンプルおよび誘導性インデックスサンプルのすべてまたはいくつかを前方に運ぶことにより、付加的情報が獲得され得る。

基本的過程（およびあらゆる所望の任意の過程）後、各インデックスサンプル（または、用いられる場合には、核誘導性インデックスサンプル）中のDNA断

片を、ライゲーター - ディテクターとハイブリダイズする。各ライゲーター - ディテクターの一部分は、少なくとも1つのアダプター - インデクサーの付着末端を含めた、そしてそれに隣接する配列のすべてまたは一部と適合するかあるいは相補的である。好ましくは、ライゲーター - ディテクターは、制限酵素での消化により生成される考え得る付着末端配列の1つと適合するかまたは相補的である配列を有する。ライゲーター - ディテクターは、それらの認識配列で切断する制限酵素が用いられる場合には、制限酵素の認識配列中のヌクレオチドとも相補的であり得る。ライゲーター - ディテクターは、アダプター - インデクサー中の共通配列と適合するかまたは相補的である配列も有し得る。この場合、適切なライゲーター - ディテクターはインデックスサンプルの各々（または用いられる場合には、各誘導性インデックスサンプル）とともに用いられる。即ち、各インデックスサンプル（または各誘導性インデックスサンプル）に用いられるライゲーター - ディテクターオリゴヌクレオチドは、そのインデックスサンプルに用いられる（または誘導性インデックスサンプルが得られたインデックスサンプルに用いられる）アダプター - インデクサー配列中の、付着末端配列（ならびに付着末端配列と重複する場合には、認識配列）を含めた配列と適合するかまたは相補的である。あるいは、ライゲーター - ディテクターは、付着末端配列に隣接する、そしてアダプター - インデクサーからの断片の反対側の核酸断片の配列（アダプター - インデクサーがそれに結合された）と適合するかまたは相補的である配列を有し得る。このようなライゲーター - ディテクターは、V A A S Tに用いるために好ましい。

最後に、各インデックスサンプル（または各誘導性インデックスサンプル）をディテクタープローブと混合し、プローブをライゲーター - ディテクターと結合する。好ましくは、用いられるプローブ組は、所定腸のすべての考え得る配列（例えば、すべての考え得る6塩基配列）を含む。ディテクタープローブをアレイ中に固定し得る。

プローブがライゲーター - ディテクターの末端に隣接してハイブリダイズする場合のみ、ディテクタープローブおよびライゲーター - アダプターの末端を一緒に結合する。したがって、ライゲーター - ディテクターの末端がハイブリダイズ

するオリジナルサンプルからのDNA断片中の領域のすぐ隣りにプローブと相補的な配列（好ましくは付着末端配列）が存在する場合のみ、ライゲーター - ディテクターをディテクタープローブと結合する。開示された方法の種々の構成成分の関係および相互作用の例を、図2、3、4および5に示す。

サンプルからの各プロセッシング化DNA断片（即ち、アダプター - インデクサーが結紮された各DNA断片）は、ディテクタープローブとのライゲーター - ディテクター（およびアダプター - インデクサー）の会合を生じる。この会合は、会合化構成成分の1つから生成されたシグナルにより検出される。開示された方法の好ましい形態では、ディテクタープローブ組（多重組が用いられる場合）が用いられ、この場合、所定断片に関するシグナルはオリジナル付着末端配列（または認識配列）により確定される。各々の異なる付着末端または認識配列は、別個のインデックスサンプル中でプロセッシングされる。別組のディテクタープローブが、各インデックスサンプルまたは誘導性インデックスサンプルのために用いられる。所定断片に関するシグナルが会合され、検出されるプローブ組中のプローブは、DNA断片とハイブリダイズしたライゲーター - ディテクターに結合されるためには、ディテクタープローブがこの配列とハイブリダイズしなければならないために、付着末端配列（または認識配列）に隣接するDNA断片中の配列により確定される。複合核酸サンプルは、プローブ組中に独特のパターンのシグナルを生成する。核酸サンプルの独特のカatalog作製、ならびに異なる核酸サンプルから生成されるシグナルのパターンの高感度且つ強力な比較を可能にするのは、このパターンである。

シグナルが会合するディテクタープローブ組および組中の特定のプローブは、シグナルを生じるDNA断片の配列ならびに付着末端に隣接する配列（あるいは制限酵素の認識配列ならびに認識配列に隣接する配列）を同定する。これは、4塩基付着末端および6塩基プローブが用いられる場合には、10塩基配列である。ディテクタープローブの各組は異なる付着末端配列を有する異なるアダプター - インデクサーを用いたため、ディテクタープローブ組は付着末端配列（4塩基）を同定する。各プローブは異なる配列を伴う異なるプローブを有するため、特定のプローブは付着末端に隣接する配列（6塩基）を同定する。隣接配列と相補

的な配列を有するプローブのみがハイブリダイズし、したがってシグナルと会合するようになる。認識配列とⅡⅡ-S型制限酵素の開裂部位との固定関係は、そして用いられる場合には認識配列の同一性は、DNA断片についての付加的配列情報を提供する。

生成された情報は、プローブアレイが用いられる場合、同様である。所定断片に関するシグナルが検出されるアレイ（多重アレイが用いられる場合）は、オリジナル付着末端配列（または認識配列）の配列により確定される。各々の異なる付着末端または認識配列は、別個のインデックスサンプル中でプロセッシングされる。別個のアレイが、各インデックスサンプルまたは誘導性インデックスサンプルのために用いられる。DNA断片とハイブリダイズしたライゲーター-ディテクターに結合されるためには、プローブがこの配列とハイブリダイズしなければならないために、付着末端配列（または認識配列）に隣接するDNA断片中の配列により、所定断片に関するシグナルが検出されるアレイ中の位置が確定される。複合核酸サンプルは、アレイ上に独特のパターンのシグナルを生成する。

DNA断片がシグナルを生成するアレイおよびアレイの位置は、DNA断片の付着末端の配列ならびに付着末端に隣接する配列（あるいは制限酵素の認識配列ならびに認識配列に隣接する配列）を同定する。これは、4塩基付着末端および6塩基プローブが用いられる場合には、10塩基配列である。各アレイが異なる付着末端配列を有する異なるアダプター-インデクサーを用いたため、アレイは付着末端配列（4塩基）を同定する。各位置は異なる配列を伴う異なるプローブを有するため、アレイ中の位置は、付着末端に隣接する配列（6塩基）を同定する。隣接配列と相補的な配列を有するプローブのみがハイブリダイズし、したがってシグナルと会合するようになる。認識配列とⅡⅡ-S型制限酵素の開裂部位との間の固定関係は、そして用いられる場合には認識配列の同一性は、DNA断片についての付加的配列情報を提供する。

集合的に複数の異なる付着末端配列を生じる1つ又はそれ以上の核酸開裂試薬を用いて、開示された方法を実施する。好ましくは、核酸開裂試薬により生成される付着末端配列は、核酸開裂試薬の認識配列により限定されない。生成される付着末端は、好ましくは2、3、4または5ヌクレオチド長である。開示された

方法に用いるための好ましい核酸開裂試薬は、I I - S型制限エンドヌクレアーゼであって、これは認識部位の外側（またはそこから分枝した）位置でDNAを切断する酵素であって、付着末端を生成する。I I - S型制限エンドヌクレアーゼの例は、F o k I、B b v I、H g a I、B s p M IおよびS f a N Iである。

開示された方法に用いるための核酸開裂試薬は、4ヌクレオチドA、C、GおよびTの順列および組合せを包含する付着末端を生じる。突出する塩基の数が多いほど、末端ヌクレオチド配列の考え得る順列および組合せの数は多く、そして特異的であると思われるインデキシングは多い。例えば、4塩基、5' - 突出付着末端を有する断片を放出する制限エンドヌクレアーゼ、例えばF o k Iは、44または256の考え得る突出テトラヌクレオチド末端を生成する。平均12,000の異なるcDNAを有するcDNAサンプルの制限エンドヌクレアーゼF o k Iによる切断は、4塩基、5' 突出末端を有する断片の混合物を生じる。塩基の無作為分布を含有するサンプルに関しては、平均で、F o k Iは45塩基対毎に2回切断して、512塩基対の平均断片サイズを生じる。cDNAの平均長が1,700塩基対である場合、各cDNAはおおよそ4つの断片を生じる。全サンプルが、約 $4 \times 12,000 = 48,000$ 断片を含有する。44 = 256の考え得るテトラヌクレオチド配列が、したがって各付着末端に関して256の考え得る同一性が存在する。平均で、 $48,000 / 256 = 188$ の所定付着末端を有する断片が存在する。これらの断片は各々、各断片中の付着末端配列に隣接する配列に基づいて異なるプローブとのハイブリダイゼーションにより分類される。六量体プローブアレイは、4,096の異なる6ヌクレオチドプローブを有する。したがって、プローブアレイ中の4,096の六量体のうちの188のみが、平均で、ライゲーター - ディテクターと結紮する。各々4,096の異なる六量体ディテクタープローブを有する256プローブアレイを用いると、 $256 \times 4,096 = 1,048,576$ “貯蔵棚”で、この場合、48,000断片を分布する。これは、異なるcDNAサンプルを用いた場合、異なるパターンを同定するための十分な機会を残す。

制限エンドヌクレアーゼB s p 2 4 IによるヒトゲノムDNA (3 X 10

9塩基対の一倍体数を有する)の切断は、5塩基、3'-突出末端を有する断片の大きく且つ複雑な混合物を放出する。平均で、Bsp24Iは、46塩基対毎に2回切断して、2048塩基対の平均断片サイズを生じ、 $3 \times 109 / 2048 = \text{約} 1.5 \times 106$ 断片をもたらす。45 = 1024の考え得るペンタヌクレオチド配列で、したがって、各付着末端に関して1024の考え得る同一性が存在する。平均で、 $1.5 \times 106 / 1024 = 1$ 、465の所定付着末端配列を有する断片である。これらの断片は各々、各断片中の付着末端配列に隣接する配列に基づいて異なるプローブとのハイブリダイゼーションにより分類される。七量体プローブアレイは、16, 384の異なる7ヌクレオチドプローブを有する。したがって、アレイ中の16, 384の七量体のうちの1, 465のみが、平均で、ライゲーター-ディテクターと結紮する。各々16, 384の異なる七量体ディテクタープローブを有する1024ディテクターアレイを用いると、 $1024 \times 16, 384 = 1, 6 \times 107$ “貯蔵棚”で、この場合、 1.5×106 断片を分布する。

6塩基認識配列を有する20の異なる制限エンドヌクレアーゼによるcDNAサンプルの切断は、付着末端を有する断片の混合物を生じる。平均で、6塩基認識配列を有する制限エンドヌクレアーゼは、46 = 4096塩基対毎に1回切断する。サンプルが、1, 500塩基対のcDNA平均長を有する約12, 000cDNA分子を含有する場合には、制限酵素の1つによる切断は、約3200切断片(したがって、付着末端を有する6400DNA断片)を生じる。4塩基認識配列を有する2つの異なる制限エンドヌクレアーゼによるサンプルのさらなる切断(二次消化)は、44 = 256塩基対毎に1回、付加的切断を生じる。二次消化は、多くの場合、各断片上に切断を生じるため、これは($20 \times 2 = 40$ 第二インデックスサンプルの各々に関して)、各々約256塩基対長の約6, 400断片を生じる。

4塩基認識配列を有する5つの異なる制限エンドヌクレアーゼが三次消化に用いられる場合には、各制限化第二インデックスサンプル中の断片の約半数が切断される(これらの制限酵素が256塩基対毎に約1回切断するためである)。したがって、 $20 \times 2 \times 5 = 200$ の各制限化第二インデックスサンプル中に約3

、200断片（無傷、アダプター - インデクサーおよび二次アダプターを有する）が存在する（非制限化第二インデックスサンプル中には約6,400断片が存在する）。これらの断片は各々、各断片中の付着末端配列に隣接する配列に基づいて異なるプローブとのハイブリダイゼーションにより分類される。六量体プローブアレイは、4,096の異なる6ヌクレオチドプローブを有する。したがって、アレイ中の4,096の六量体のうちの3,200のみが、平均で、ライゲーター - ディテクターと結紮する。各々4,096の異なる六量体プローブを有する200プローブアレイを用いると、 $200 \times 4,096 = 819,200$ “貯蔵棚” で、この場合、 $3,200 \times 200 = 640,000$ の総断片を分布する（六量体アレイは、 $200 \times 16,384 = 3,276,800$ “貯蔵棚” を提供する）。

これらの実施例が説明するように、認識配列の長さ、生成される付着末端の長さ、および一緒に用いられるプローブの長さは、核酸断片が分類されるデータ貯蔵棚の数を決定する。十分長の付着末端およびディテクタープローブを用いることにより、断片のソーティングを分析されるサンプルの複雑性に適合させ得る。

アダプター - インデクサーの包括的パネルの使用は、核酸断片の複合混合物の選定亜組への特定の機能的修飾の付着、およびそのように修飾された分子の同定のための手段を提供する。このような限定亜組の分子は、付加的切断およびインデキシングにより、あるいは確立された技法、例えばクローニング、PCR増幅またはゲル電気泳動のいずれかによりさらに分解し得る。そのクラスのこのの成員は、長さ、配列または制限エンドヌクレアーゼ地図のような特徴を同定することにより区別し得る。アダプター - インデクサーの付着末端の配列は、多数の核酸断片をインデキシングする手段を提供する。

異なる配列のディテクタープローブは、プローブアレイ上の異なる位置で固定し得る。この点では、プローブアレイ上のプローブの配列およびインデックスサンプル中の核酸断片の配列は、アレイ上のどこで、ライゲーター - ディテクターが結合されるようになるかを確定する。プローブアレイ中の異なる位置でのライゲーター - ディテクターの存在、量、存在および量、あるいは非存在は、したがって、サンプル中の特定の核酸配列の存在または非存在に基づいた核酸サンプル

の特色および指紋を提供するシグナルのパターンを形成する。この理由のために、シグナルのこのパターン（即ち、ライゲーター - ディテクターが存在、量、存在および量、あるいは非存在のパターン）のカタログ作製は、特に興味深い開示された方法の一実施態様である。本明細書中で別記したように、プローブミスマッチの確率を用いて、異なるディテクタープローブとの特定の断片の示差的ハイブリダイゼーションを基礎にしたより複雑なカタログを作製し得る。

カタログは、例えばプローブアレイ上のライゲーター - ディテクターのパターン、プローブアレイ上のライゲーター - ディテクターが存在のパターン、サンプル中の核酸断片のカタログ、あるいはサンプル中の核酸配列のカタログとして作製し、言及し得る。カタログ中の情報は、好ましくは位置情報の形態（即ち、ディテクターアレイ中の位置）、さらに好ましくは配列の形態である。カタログに関する好ましい配列情報は、ライゲーター - ディテクターが結合されたディテクタープローブの配列、ならびにサンプル中に存在する核酸断片の配列（ライゲーター - ディテクターが結合されたディテクターアレイ中の位置から得られる）を含む。

核酸サンプルのこのようなカタログを、任意の他のサンプルから得られる同様のカタログと比較して、サンプル中の類似性および差（サンプル中の核酸の類似性および差を示す）を検出し得る。例えば、第一核酸サンプルのカタログを、第一核酸サンプルと同一型の生物からのサンプル、第一核酸サンプルと同一型の組織からのサンプル、第一核酸サンプルと同一生物体からのサンプル、第一核酸サンプルと同一供給源から、しかし異なる時期に得られたサンプル、第一核酸サンプルと異なる生物体からのサンプル、第一核酸サンプルと異なる型の組織からのサンプル、第一核酸サンプルと異なる系統の生物体からのサンプル、第一核酸サンプルと異なる種の生物体からのサンプル、あるいは第一核酸サンプルと異なる型の生物体からのサンプルのカタログと比較し得る。

同一型の組織は、肝臓組織、筋組織または皮膚の組織である（これらは同一のまたは異なる生物体または生物体類からであり得る）。同一生物体とは、同一固体、動物または細胞を指す。例えば、患者から採取される2つのサンプルは、同一生物体からである。同一供給源とは、類似の、しかしより広範な、例えば同一

生物体、同一生物体からの同一組織、または同一cDNAライブラリーからのサンプルを指す。比較される同一供給源からのサンプルは、好ましくは異なる時点で収集される（したがって、検出される時間を経て考え得る変化を可能にする）。これは、治療の効果または症状の変化が査定される場合に、特に有用である。異なる生物体とは、異なる個々の生物体、例えば異なる患者、異なる個々の動物を指す。異なる生物体は、同一種類の異なる生物体または異なる種類の生物体を含む。異なる種類の生物体とは、イヌとネコ、ヒトとネズミまたは大腸菌とサルモネラ菌のような異なる種類の生物体を指す。異なる種類の組織とは、肝臓と腎臓、または皮膚と脳といった異なる種類の組織を指す。異なる系統または種の生物体とは、それらの用語が当業界で理解されているように、それらの種または系統名が異なる生物体を指す。

ディテクタープローブと結合したライゲーター - ディテクターの存在、量、存在および量、または非存在は、ライゲーター - ディテクターに組み入れられた、結合されたまたはそれと会合した標識の検出により達せられ得る。あるいは、ライゲーター - ディテクターは、それらの配列の検出に基づいて検出し得る。これらの検出は一般に、ライゲーター - ディテクターのカップリングの直接検出と呼ばれる。多数の配列特異的検出技法のいずれか、例えば標識化プローブのハイブリダイゼーションを、この目的のために用い得る。ライゲーター - ディテクターの存在、量、存在および量、または非存在は、ライゲーター - ディテクターにより媒介されるシグナルを発生することによっても検出し得る。以下に記載する回転複製のためのプライマーとしてのライゲーター - ディテクターの使用は、この好ましい例である。ライゲーター - ディテクターの存在、量、存在および量、または非存在は、ライゲーター - ディテクターが結合されるディテクタープローブ、結合ライゲーター - ディテクターと会合するアダプター - インデクサー、またはその両方を検出することによっても検出し得る。これらの検出は一般に、ライゲーター - ディテクターのカップリングの間接検出と呼ばれる。

本方法中の核酸増幅により、核酸断片に関して検出されるシグナルを増大し得る。アダプター - インデクサーが結合された核酸断片（アダプター / 断片と呼ばれる）が増幅されるか、あるいはディテクタープローブと結合されたライゲータ

ー - ディテクターが増幅されるかまたは別の核酸の増幅を媒介するのが好ましい。最初の場合には、任意の適切な方法を用いて、アダプター / 断片を増幅し得る。これらの例としては、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、リガーゼ連鎖反応 (LCR)、自立性配列複製 (3SR)、核酸配列ベースの増幅 (NASBA)、鎖置換増幅 (SDA)、Q β レプリカーゼによる増幅、および回転環増幅 (RCA) が挙げられる (Birkenmeyer and Mushahwar, J. Virological Methods, 35:117-126 (1991); Landegren, Trends Genetics, 9:199-202 (1993); Lizardi et al., Nature Genetics 19(3):225-232 (1998))。ライゲーター - ディテクター増幅の場合、増幅の好ましい形態は、ライゲーター - ディテクターによりプライムされる一本鎖環状DNA分子の回転環増幅である。この方法では、ライゲーター - ディテクターを介してディテクターアレイに固定された増幅化鎖を用いてDNA環の長いタンデム反復を生成する。増幅のこの技法は、PCT出願WO 97 / 19193に記載されている。ライゲーター - ディテクターが回転環複製プライマーとして用いられる場合は、増幅DNAが検出され得る (直接的にまたは組み入れ標識を介して) ため、ライゲーター - ディテクター中に標識を組み入れる必要はない。

アダプター / 断片の増幅は、断片末端のアダプター - インデクサー配列の存在により (そして第二アダプターが用いられる場合には、他方の末端の第二アダプター配列の存在により) 促される。例えば、アダプター配列は、増幅プライマー配列のためにも用いられ得る。アダプター配列を用いて、回転環複製によるその後の増幅のためにアダプター / 断片を環化し得る。回転環増幅は、米国特許第5,854,033号およびPCT出願WO 97 / 19193に記載されている。

別の実施態様では、アダプター - インデクサーが結合された核酸断片の鎖 (アダプター / 断片) を、ライゲーター - ディテクターとのハイブリダイゼーションの前に分離し得る。このような鎖分離は、ライゲーター - ディテクターハイブリダイゼーションの効率を改良し得る。任意の適切な技法を用いて、この分離を成

し遂げ得る。鎖分離は、好ましくはアダプター - インデクサーの鎖の一方の上に捕捉タグを含めるかまたはタグをソーティングすることにより成し遂げ得る。津ににこのような捕捉タグを用いて、アダプター / 断片の一方の鎖を固定し、他方の鎖を洗い落とす。固定化または洗浄化鎖は、本方法では前方に運ばれ得る。ソーティングタグは、ソーティング技法により鎖の分離を可能にし得る。

別の実施態様では、インデックスサンプル中の種々の核酸断片の濃度は、標準化される。標準化は、用いられ得るあらゆる増幅過程の前または後に実施し得る。断片標準化のための好ましい技法は、核酸断片の一方の鎖の固定化、核酸断片の変性、多量の核酸断片のための $c O t 1 / 2$ より大きい時間のならびにまばらな核酸断片に関する $c O t 1 / 2$ 未満の時間の核酸断片の再生、ならびに非再生核酸断片の収集を包含する。

ハイブリダイゼーションエラーを矯正するために、単一、二元的または逐次方式で2つの一般的アプローチの一方を用い得る。説明のために、ガラスマイクロアレイ検出系で実行されるハイブリダイゼーションおよび結紮実験を考察する。第一のアプローチでは、結紮過程前に、正しくないプローブ配列とのインデクサーディテクターの結紮を遮断する方法によりハイブリダイズ化アレイを処理する。このアプローチの鍵は、共有結合メカニズムが結合をなしえないよう、結紮されるニックを遮断する（滅菌的に妨害する）ことである。実際には、ハイブリダイズ化アレイをとって、それを遮断実体および適切な緩衝液と接触し、マスキング実体がミスマッチ上に正しく置かれるようになり、次に結紮により練続するのに適した温度で適切な時間、系を保持する。特定のミスマッチと結合するために選択される多数の一本鎖抗体は、多数の酵母菌ミスマッチ修復および細胞周期チェックポイントタンパク質、例えばMSH2 ~ MSH6と同様に、この方法のための使用を有する (Habracken et al., ATP-dependent assembly of a ternary complex consisting of a DNA mismatch and the yeast MSH2 - MSH6 and MLH1 - PMS1 protein complexes. J Biol Chem 273(16):9837-41(1998); MSH2 - MSH3 (Habracken et al., Bi

nding of insertion/deletion DNA mismatches by the heterodimer of yeast mismatch repair protein MSH2 and MSH3. *Curr Biol* 6(9):1185-7(1996)); および Mec1 (Paciotti et al., Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p. *Embo J* 17(14):4199-209(1998))。

第二のアプローチは、ミスマッチを含有する鎖を認識し、特異的に切断する系で共有結合化プローブ-標的サンプルを処理することである。この第二のアプローチは、プローブアレイの最終緊縮洗浄において、破壊されたミスマッチ化サンプルがシグナル検出操作前にチップから洗い落とされるように、ミスマッチの認識およびミスマッチ化領域の破壊的ターゲティングまたは「エラーチェック」を利用する。實際上、ハイブリダイズ化および結紮化プローブアレイをとって、それを適切な緩衝液中のエラーチェック試薬と接触し、エラーチェック試薬がミスマッチを突き止め、最終緊縮洗浄前にミスマッチを含有する鎖を破壊するのに適切な温度で適切な時間、系を保持する。1つ又はそれ以上の以下の「エラーチェック」系を用い得る：T4エンドヌクレアーゼVII；タンパク質MutH、MutLおよびMutSと一緒に；MutY (Lu and Hsu, Detection of single DNA base mutations with mismatch repair enzymes. *Genomics* 14(2):249-55(1992))；グルコシラーゼ (Neddermann and Jericny, Efficient removal of uracil from G.U mispairs by the mismatch-specific thymine DNA glycosylase from HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(5):1642-6(1994))；mammalian topoisomerase I (Yeh et al., Mammalian t

opoisomerase I has base mismatch nicking activity. J Biol Chem 269(22):15498-504(1994)) およびT7エンドヌクレアーゼI。

特に、開示された方法におけるハイブリダイゼーション/カップリング過程 - アダプター - インデクサーが断片に結合され、そしてライゲーター - ディテクターがディテクタープローブに結合される過程の忠実度は、ミスマッチヌクレアーゼ、例えばT4エンドヌクレアーゼVIIでサンプルを消化することにより増大し得る。T4エンドヌクレアーゼVIIは、ミスマッチが存在する二本鎖DNAを切断する。非正統的ハイブリダイゼーション/結紮を「非結紮化する」ことにより、核酸断片のカタログ作製ミスは、おそらく少なくされる。適切緊縮ハイブリダイゼーション条件を用いることにより、ハイブリダイゼーション/結紮過程の忠実度を最大にし得る。

以下に、FAASTの例、ならびに得られ得る配列および配列関係を提示する。単一II-S型制限酵素を一次消化に用いる場合、得られ得る配列情報は以下の構造を用いて説明し得る：

DNA断片：

..NNNNXXXX..NNNNRRRRRROOOOOOOOSSSSNNNN..

配列情報： RRRRRROOOIIIIIISSSS

これらの構造においては、各文字はヌクレオチドを表す。Nは、任意のヌクレオチド（本方法との特別な同一性および関係を有さない）を表す。Rは、II-S型制限酵素の認識配列中のヌクレオチドを表す。Oは、II-S型制限酵素の認識部位および切断部位間のオフセット中のヌクレオチドを表す。Sは、II-S型制限酵素による切断に起因する付着末端中のヌクレオチドを表す。Xは、二次制限酵素の認識/切断部位中のヌクレオチドを表す。Iは、固定化オリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを表す。

DNA断片..NNNNXXXX..NNNNRRRRRROOOOOOOOSSSSNNNN..から、配列情報RRRRRROOOIIIIIISSSSが得られる。この実施例では、II-S型制限酵素は、5塩基認識配列、切断部位に対する9塩基オフセットを有し（即ち、認識配列と切断部位の間に9つの塩基

が存在する)、そして4塩基付着末端を作製する。プローブは、六量体配列を有する。したがって、シグナルが生成される各アレイ位置は、本実施例では、特定の配列: n n n n n - - - n n n n n n n n n n (ここでnは同定化ヌクレオチドを表し、各-は、非同定化ヌクレオチドを表す)を表す。これは、確定配列と呼ばれる。配列が決定された核酸断片の部分は、付着末端、ディテクタープローブがハイブリダイズする付着末端配列に隣接する配列、および制限酵素の認識配列に対応する(それぞれS、IおよびR)。

この配列情報は、以下の構造によっても表され得る:

A - B - C - D

(この場合、Aは制限酵素の認識配列であり、Bは未知の配列のギャップであり、Cは固定化オリゴヌクレオチドがハイブリダイズした配列であり、そしてDは付着末端配列である)。ギャップは、認識配列とプローブがハイブリダイズした配列との間のヌクレオチドを表す。Cは常に、付着末端配列Dに隣接する。前記の実施例では、AはR R R R Rであり、BはO O Oであり、CはI I I I I Iであり、そしてDはS S S Sである。開裂なしでは増幅は認められず(したがって、その核酸分子のさらなるプロセッシングもない)、シグナルは存在しないという結果になるため、二次制限酵素による開裂も有用な情報を付加する。

開示された方法を用いて得られる配列情報は、核酸断片の特定の実施例を用いて説明し得る。以下の配列を有する核酸断片を含有する核酸サンプルを仮定する:

.. CGGTGGATGACTTGAAGCTATGCTTAGG..

.. GCCACCTACTGAACTTCGATACGAATCC..

G G A T Gの認識配列ならびに9および13ヌクレオチドによる切断部位オフセットを有するII-S型制限酵素であるF o k Iでサンプルが消化される場合、断片は開裂されて以下の断片を生成する(F o k I認識配列を太字で示す):

.. CGGTGGATGACTTGAAGC TATGCTTAGG..

.. GCCACCTACTGAACTTCGATAC GAATCC..

対応するアダプター-インデクサーが断片と結紮され、結紮化断片が対応するライゲーター-ディテクターとハイブリダイズされる場合、以下の核酸が得られる

(アダプター - インデクサーからの配列に下線を付す) :

TATGCGGTATTACAGCCTATTGGG—標識

..GCCACCTACTGAACTTCGATACGCCATAATGTCGGATAACCC.

核酸が適切なプローブ(本実施例では固定化六量体)とハイブリダイズされ、プローブおよびライゲーター - ディテクターが結紮される場合、以下の構造が得られる :

支持体 — TGAAGCTATGCGGTATTACAGCCTATTGGG—標識

..GCCACCTACTGAACTTCGATACGCCATAATGTCGGATAACCC.

ライゲーター - ディテクターの標識が検出されるプローブアレイ中の位置により、固定化プローブの配列を同定する。隣接付着末端の配列は、ライゲーター - ディテクターの標識が検出されるディテクターアレイにより同定する(異なるディテクターアレイが各付着末端配列に用いられるため)。最後に、認識配列に対する切断部位の関係により、認識配列の配列を同定する。したがって、この実施例では、ATAC付着末端ディテクターアレイのTGAAGC六量体位置中の標識の検出は、以下の配列を有する核酸サンプル中の核酸断片の存在を示す :

CCTACNNNACTTCGATAC.

この配列を一般構造A - B - C - Dと関連させると、AはCCTACであり、BはNNNであり、CはACTTCGであり、そしてDはATACである。

一次消化のために多制限酵素を用いる場合、得られる配列情報は、以下の構造を用いて説明し得る :

DNA断片 :

..NNXXXXNN..NNRRRRNN..NNIIIIIISSSSSSNN..

配列 : XXXX.....RRRR.....IIIIIISSSSSS

これらの構造においては、各文字はヌクレオチドを表す。Nは、任意のヌクレオチド(本方法との特別な同一性および関係を有さない)を表す。Sは、一次制限酵素の認識配列(付着末端を含む)中のヌクレオチドを表す。Xは、二次制限酵素の認識/切断部位中のヌクレオチドを表す。Rは、三次制限酵素の認識配列中のヌクレオチドを表す。Iは、ディテクタープローブと相補的なヌクレオチド

を表す。二次および三次制限酵素の認識部位間の、ならびに二次制限酵素の認識部位とプローブ補足体間の配列および距離は、基本的方法では確定されない。

DNA断片 . . NNXXXXNN . . NNRRRRNN . . NNIIIIII
SSSSSSNN . . から、配列情報XXXX RRRR
. . IIIIIISSSSSSが得られる。この実施例では、固定化プローブは、
六量体配列を含有する。したがって、シグナルが生成される各アレイ位置は、本
実施例では、特定の配列：nnnn . . . nnnnn . . . nnnnnnnnnnnnn
nn（ここでnは固定化ヌクレオチドを表し、各 . . . は、非固定化ギャップ配
列を表す）を表す。これは、確定配列と呼ばれる。配列が決定された核酸断片の
部分は、一次制限酵素の認識配列、ディテクタープローブがハイブリダイズする
認識配列に隣接する配列、二次制限酵素の認識配列、および三次制限酵素の認識
配列に対応する（それぞれS、I、XおよびR）。

この配列情報は、以下の構造によっても表され得る：

E - B - F - B - C - D

（この場合、Bは未知の配列のギャップであり、Cはプローブがハイブリダイズ
した配列であり、Dは一次制限酵素の認識配列であり、Eは二次制限酵素の認識
配列であり、そしてFは三次制限酵素の認識配列である）。ギャップは、二次お
よび三次制限酵素の認識配列間、ならびに三次制限酵素の認識配列とプローブが
ハイブリダイズした配列との間のヌクレオチドを表す。Cは常に、認識配列Dに
隣接する。前記の実施例では、CはIIIIIIであり、DはSSSSSSであ
り、EはXXXXであり、そしてFはRRRRである。

開示された方法を用いて得られる配列情報は、核酸断片の特定の実施例を用い
てさらに説明し得る。以下の配列を有する核酸断片を含有する核酸サンプルを仮
定する：

.. CGCATGGG . . ATAGCTTG . . CAAGCTATGGATCCGA . .
.. GCGTACCC . . TATCGAAC . . GTTCGATACCTAGGCT . .

4塩基付着末端を生じるGGATCCの認識配列を有する制限酵素であるBam
HIでサンプルが一次消化される場合、断片は開裂されて以下の断片を生成する
：

..CGCATGGG..ATAGCTTG..CAAGCTATG GATCCGA..
 ..GCGTACCC..TATCGAAC..GTTTCGATACCTAG GCT..

対応するアダプター - インデクサーが断片と結紮され、断片がNlaI（制限配列CATG）で消化される場合、結果は以下の通りである：

..CGCATG GG..ATAGCTTG..CAAGCTATGGATCTGGTATTACAGCCTATTG
 ..GC GTACCC..TATCGAAC..GTTTCGATACCTAGACCATAATGTCGGATAAC

第二アダプターの付加および対応するライゲーター - ディテクターとのハイブリダイゼーション後、以下の核酸を得る（アダプター - インデクサーからの配列に下線を付す）。アダプター - インデクサーが付着末端配列および残りの認識配列の両方とハイブリダイゼーションすることに留意（即ち、付着末端中にCはない）。

GGATCTGGTATTACAGCCTATT-*

CGGTACCTAGAGAGTGTACCC. TATCGAAC..GTTTCGATACCTAGACCATAATGTCGGATAA

この核酸が適切なプローブ（この実施例では固定化六量体）とハイブリダイズされ、そして固定化プローブおよびライゲーター - ディテクターが結紮される場合、以下の構造が得られる：

支持体 - AGCTATGGATCCGGTATTACAGCCTATT-*

CGGTACCTAGAGAGTGTACCC. TATCGAAC..GTTTCGATACCTAGGCCATAATGTCGGATAA

ライゲーター - ディテクターの標識が検出されるアレイ中の位置により、固定化プローブの配列を同定する。隣接認識配列（付着末端を含む）の配列は、ライゲーター - ディテクターの標識が検出されるアレイにより同定する（異なる組のアレイが各インデックスサンプルに用いられるため）。二次制限酵素の認識配列の配列は、ライゲーター - ディテクターの標識が検出されるアレイにより同定する（異なる組のアレイが各二次インデックスサンプルのために用いられるため）。最後に、三次制限酵素で消化された制限化第二インデックスサンプルのためのアレイからはシグナルは存在しないか否かを見ることにより、内部配列（三次制限酵素の認識配列）の存在を確定する（異なるアレイは各制限化および非制限化第二インデックスサンプルのために用いられる）。シグナルが存在しない場合、それは、認識部位が断片中に存在することを示す。三次制限酵素による消化後に

増幅過程が存在しない場合には、この消化は、NlaI消化の前またはNlaI消化の後に実施される。

したがって、この実施例では、CCTAGG付着末端組のアレイ中のGTAC二次認識部位組のアレイ中のTCGA三次認識部位アレイのAGCTAT六量体位置中の標識の検出は、以下の配列を有する核酸サンプル中の核酸断片の存在を示す：

GTAC...TCGA...TCGATACCTAGG.

この配列を一般構造E - B - F - B - C - Dと関連させると、CはTCGATAであり、DはCCTAGGであり、EはGTACであり、そしてFはTCGAである。

FAASTにおける標識の使用およびソーティングは、新規の方法でマイクロビーズを使用する以下の実施例を用いて説明し得る。この実施例では、256のライゲーター - ディテクターを256の色コード化マイクロビーズの表面に結合させる。単一色により、各ライゲーター - ディテクターを同定する。標的配列とのこれらの新規の「マイクロビーズライゲーター - ディテクター」のアニールングおよび結紮後、256組の「マイクロビーズライゲーター - ディテクター」を、1プローブ/ウエルで、4096の六量体プローブを含有する4096ウエル微量滴定プレート中に同時に投入する。ハイブリダイゼーション中の完全適正配列のみが、特異的マイクロビーズ標識化複合体にフルオロクロム標識化六量体を結紮する。Luminexフロー分析機は、色コード化マイクロビーズを識別し、それらの蛍光を同時に測定するため、微量滴定プレート上のウエルの特定アドレス（およびそのアドレスに含入される六量体）を知ることにより、ライゲーター - ディテクターに隣接する6塩基を同定し得る。計画を以下に説明する。

一本鎖アンプリコンを生成するまでの過程は、II-S酵素切断片、アダプター - インデクサー結紮、二次4bp酵素切断片、第二アダプター結紮、PCR増幅、ならびに一本鎖断片を生成するための断片の捕捉および変性を含めて、一本FAASTの場合と同様である。

256一本鎖DNAアンプリコンを256ライゲーター - ディテクターとアニールングする。ライゲーター - ディテクターオリゴヌクレオチドの256の異なる

る配列が存在するが、これは、生成される4塩基付着末端の各々と相補的である256の異なるライゲーター-ディテクターを含む。ライゲーター-ディテクターを、シグナリング部分、例えば蛍光染料または蛍光ビーズで標識する。256アニール化一本鎖調製物の各々を4096のアリコートに分け、4096六量体プローブの1つとハイブリダイズさせる。例えば、4096六量体は4096微量滴定プレート中に含入去れ、各々のウェルは単一六量体プローブを含有する。4096六量体プローブは各々、5'末端で蛍光標識され、遊離3'ヒドロキシル末端を含有する。

アニール化一本鎖アンプリコンとの六量体プローブのハイブリダイゼーションおよび結紮後、256調製物をストレプトタビジンを含有する別のウェルに移して、非結合物質を洗い落とす(六量体プローブはビオチン基も含有する)。次に2つのシグナルを測定する。

1つのシグナルはサンプルに対応する(例えば、テスターまたは対照)。蛍光的コード化ビーズ(Luminex)により、テスターおよび対照サンプルを識別する。一実施態様では、512色、即ちテスター用に256色および対照用に256色を用いる。しかしながら、256色コード化ビーズも用い得るが、この場合、テスターおよび対照間でビーズは「オフセット」される。例えば、色1はテスターに関しては六量体2に対応するが、しかし対照に関しては六量体3に対応するといった具合である。二次シグナルは標識化六量体プローブから出て、ライゲーター-ディテクターとアニール化された一本鎖DNAのレベルを側定する。ここで測定される2つのシグナルは、Luminex100のような計器で同時に読み取られる。

多数の種々のプローブ組およびアレイが当業界で既知であり、FAASTとともに用い得る。Terstappen等(Tibbe, A.G., et al., Optical tracking and detection of immunomagnetically selected and aligned cells. Nat. Biotechnol. 1999. 17(12): p. 1210-3; Dolan, G.J. and L.W.M.M. Terstappen, Magnetic separation apparatus

and methods employing an internal magnetic capture gradient and an external transport force, .1999: 米国特許第5,985,153号; Terstappen, L.W.M.M. and P.A. Liberti, Quantitative cell analysis methods employing magnetic separation, .1999: 米国特許第5,993,665号; Terstappen, L.W.M.M. and P.A. Liberti, Methods for biological substance analysis employing internal magnetic gradients separation and an externally-applied transport force, .2000: 米国特許第6,013,188号)は、当該細胞の検出のための免疫磁氣的選定および蛍光的標識化プローブを立証した。それらの技法では、免疫特異的結合プローブを用いて細胞を標識し、その結果生じる標識化細胞を、外的適用磁場により検出器範囲に動かす。サンプル容器の一側壁のリトグラフ処理により、十分確定された空間パターンに沿ったタグ化細胞の位置特定が改良される。

Thorp等(Napier, M.E., et al., Probing biomolecule recognition with electron transfer: electrochemical sensors for DNA hybridization. Bioconjug Chem, 1997. 8(6): p. 906-13; Thorp, H.H., C.R. Loomis, and M.E. Napier, Polymer-electrodes for detecting nucleic acid hybridization and method of use thereof, .1999: 米国特許第5,968,745号; Thorp, H.H., et al., Electrochemical detection of nucleic acid hybridization, .1999: 米国特許第5,871,918号; Welch, T.W., Electrochemical pro

bes for detection of molecular interactions and drug discovery, .1999:WO9964847) は、電気化学的検出方法を開発した。彼等の方法は、サンプル増幅または蛍光標識の使用を伴わずに標的核酸を直接検出する。検出は、 $Ru(bpy)_3^{2+}$ の酸化還元周期後、電気化学的測定により成し遂げる。測定素子は、電極に結合されたオリゴヌクレオチドプローブを合成的に調製し、電極は、バイオチップ、微量滴定プレートおよび把持具を含めた種々のフォーマットに二次加工されていた。

DNAサンプルの分析のために、フローサイトメトリーのような計数技術と結びつけたスペクトル標識化が開発されている(Fulton, R. J., Method and compositions for flow cytometric determination of DNA sequences, 1998: 米国特許第5,736,330号; Phipps, S., et al., Precision fluorescently dyed particles and methods of making and using same, .1999:WO9919515; Chandler, D. and M. B. Chandler, Microparticles with multiple fluorescent signals, .1999:WO9937814)。このような分析においては、それらの表面に結合されたプローブにより μ 規模のビーズを色コード化し、標的を分析的蛍光タグで標識し、そしてビーズ色および分析的色を含有する同時発生事象を計数する。このようにして、多数の色のプローブアレイを非常に迅速且つ容易に読み取ることができる。

マイクロスフェアを用いる別の方法で、Walt et al. (Walt, D. R., Techview: 分子生物学。ビーズによる光ファイバー・アレー. Science, 2000, 287(5452): p. 451-2; Ferguson, J. F., B. G. Healey, and D. R. Walt, 混合液体サンプルの中のオリゴヌクレオチド分子種を選択的に検出する光ファイバー・バイオセンサー. 1988:WO9850782; Walt, D. R. and K. L. Michael, コードされたマイクロスフェアを用いる光ファイバー・

センサー・2000：米国特許第6,023,540号；Michael, K. L. et al., ランダムな順序のアドレス可能な高密度光センサー・アレー．*Anal Chem*, 1998, 70(7) : p. 1242-8)は、プローブをマイクロスフェアに付着させ、その後マイクロスフェアが光ファイバー・アレーの末端にランダムな空間的パターンで凝集するシステムを開発した。各マイクロスフェアの“光バーコード”シグネチャーによって、付着したプローブが識別され、標識されたターゲットの信号がそのターゲットの濃度を示す。

修飾による配列タグの分析 (MAAST)

修飾による配列タグの分析 (MAAST) はFAASTの一形態であって、核酸分子中の修飾の有無による開裂の差を検出することによって核酸分子の配列の修飾を評価するものである。例えば、核酸分子のメチル化された部位は、その部位のメチル化に敏感な制限酵素によって切断されない。メチル化に敏感でない制限酵素は、その部位で開裂するので配列タグのパターンに差が生ずる。異なる核酸サンプルによる結果の比較によって、異なるサンプルでの修飾レベル又はパターンの差を明らかにすることができる。ここで用いられる場合、認識部位の修飾に敏感な核酸開裂試薬又は制限酵素とは、その部位が修飾されない場合に限り開裂する、又はその部位が修飾された場合に限り開裂する（すなわち、その核酸開裂試薬又は制限酵素は開裂のためにある特定の修飾状態を必要とする）核酸開裂試薬又は制限酵素である。その認識部位の修飾に敏感でない核酸開裂試薬又は制限酵素とは、その部位が修飾されているかどうかに関わりなく開裂する核酸開裂試薬又は制限酵素である。

MAASTは、核酸分子の修飾の状態、レベル、及び条件を評価するのに有用である。多くの核酸修飾が知られており、大部分が生物学的な影響及び意義を有する。例えば、メチル化は、動物及び植物における遺伝子形質発現を調節するための普遍的なメカニズムである (Bird and Wolffe, メチル化に誘発される抑制ベルト、プレス、及びクロマチン、*Cell* 99: 451-454 (1999) ; Finnegan et al., 植物におけるDNAメチル化、*Annual Rev Physiol* 49: 223-247 (1998) ; Bird, あらためてDNAメチル化、*Science* 286: 228

7-2288(1999))。メチル化の生理学的な影響についての理解はいくつかの分野で有益である。プロモーター領域のメチル化が*in vitro*及び*in vivo*で転写を抑制することは良く調べられている(Baylinc et al., DNAメチル化の変化: 新生物のある基本的側面、*Adv Cancer Res* 72:141-96(1998))。例えば、新生物及び腫瘍抑制に関わるいくつかの遺伝子のプロモーターは、過剰メチル化される(Melki et al., 急性骨髄性白血病における複数遺伝子の同時DNA過剰メチル化、*Cancer Res* 59(15):3730-40(1999))。メチル化は、また、植物の発生と開花に重要な機能を果たしている。

差動的なメチル化を用いて遺伝子の機能を研究するために、従来はメチル化されるDNA配列についての事前の知識が必要であり、それは問題の領域をクローニングし、配列を決定し、メチル化感受性を検証するために多大な努力を払った後に初めて得られるものであった。MAASTは、その好ましい形態では、高スループットのマイクロアレイ技術のパワーと*in silico*分析を、差動ディスプレイの感度と定量性に組み合わせることによって差動的にメチル化される配列の同定を迅速化する。

MAASTは、ゲノム・スケールでプロモーターを同定するために現在用いられている他の方法に比べていくつかの利点を有する。プロモーターやその他の調節エレメントを高スループットな仕方で同定するための現在のアプローチには次のようなものがある: 転写因子結合部位、 β -ラクタマーゼ挿入、のヌクレオチド配列の*in silico*分析(Whitney et al., 生きている哺乳類細胞における信号伝達のゲノム全体にわたる機能分析、*Nat Biotechnol* 16(13):1329-33(1998))、COBRA(Xiong and Laird, COBRA: 高感度及び定量的なDNAメチル化分析、*Nuc Acid Res* 25(12):2532-2534(1997))、及び制限ランドマーク・ゲノム走査(Costell et al., 異常CpG-アイランドメチル化は非ランダム及び腫瘍タイプ特異的パターンを有する、*Nature Genetics* 25:132-138(2000))。

他の形態の修飾は、特定の因子によって生ずるいくつかのタイプのDNA損傷を示す。それは、アルキル化、ダイマー化、誘導体化、脱プリン、あるいはADP-リボシル化、などである。修飾とその源の例は、Lodovici et al., ヒト白血球におけるDNA損傷のマーカーとしての8-ヒドロキシデオキシグアノシンのレベル、Free Radic Biol Med 28(1):13-7(2000); Maehira et al., 受動的喫煙に曝されたラット肺のタンパク質キナーゼC、8-ヒドロキシデオキシグアノシン、及びK-ras癌遺伝子、の変化、Clin Chim Acta 289(1-2):133-44(1999); Gamboa Da Costa et al., in Vitro及びin Vivoでアルファーヒドロキシ-N-デスメチルタモキシフェンによって形成される主要DNAアダクトの特性、Chem Res Toxicol 13(3):200-207(2000); Phillips et al., DNAアダクト決定方法及び化合物の遺伝毒性試験への応用、Environ Mol Mutagen 35(3):222-233(2000); Airolidi et al., 危険評価における手段としての発癌物質-DNAアダクト、Adv Exp Med Biol 472:231-40(1999); Purewal et al., 近交系Fischer 344及びWistar Kyotoラットの結腸と前立腺におけるアセチル化遺伝子型と2-アミノ-1-メチル-6-フェニリミダゾ[4,5-b]ピリジン(PhIP)DNAアダクト形成の関連、Cancer Lett 149(1-2):53-60(2000)、に記述されている。

MAASTはFAASTと同じ基本的ステップを用い、第二の核酸開裂試薬による開裂と、核酸断片への第二のアダプターの結合とを含む。相違は、MAASTがその認識部位の修飾に敏感な核酸開裂試薬を用いるということである。すなわち、核酸開裂試薬は修飾された部位で開裂しないか、又は修飾された部位でのみ開裂する。認識部位で修飾されている核酸断片では、断片は第二の核酸開裂試薬で開裂せず、第二のアダプターが末端に付け加えられることはない。

開裂されない核酸断片は、いろいろな仕方でこの手順から淘汰される。例えば、第二のアダプターを付加した後に核酸断片を増幅する場合、増幅は末端におけ

る第二のアダプターの存在に依存するようにすることができる。これは、例えば、第二のアダプターにおける配列と相補的なPCRプライマーを用いることによって遂行できる。開裂されない核酸断片は、例えば、第二のアダプターに捕獲タグ、選別タグ、又はラベルを含めることによって淘汰することができる。捕獲又は選別タグの有無に基づいて断片を捕獲又は選別することによって、この手順において第二のアダプターを含む断片だけが先へ進行するようにできる。

あるラベルを第二のアダプターと結びつけて、全ての断片がこの手順で先へ進んでも、第二のアダプターを（したがって、ラベルを）含むものだけが検出可能な信号を生ずるようにすることができる（このシナリオでは、第二のアダプター上のラベルをディテクタープローブ及び/又はライゲーター-ディテクターと関連させて検出しなければならない）。第二のアダプターにおけるラベルをこのように用いることによって、開裂した断片と開裂しない断片（すなわち、第二の核酸開裂試薬で開裂した又は開裂しない断片）の識別も可能になる。これは、ディテクタープローブ、ライゲーター-ディテクター、又はアダプター-インデクサー上のラベル、捕獲タグ、又は選別タグによってライゲーター-ディテクターのディテクタープローブへの結合を検出し、断片上の第二のアダプターの存在、量、存在と量、又は不在、をそのラベルで検出することによって行われる。

MAASTは、また、あるタイプの細胞又は生物が、別のタイプの細胞又は生物における遺伝子の発現やその他の生物学的経路に影響を及ぼす仕方を明らかにすることにも利用できる。例えば、あるマウスを遺伝子ターゲッティングによって遺伝的に変えてある特定のメチルトランスフェラーゼ遺伝子を不活性化するとしよう（マウスについてはいくつか知られているが、説明の都合上ただ1つしかないとして）。関心ある細胞（例えば、B細胞）がそのマウスから取られ、正常なマウスから取られた他の関心ある細胞（例えば、T細胞）と混合される。B細胞とT細胞が混ぜ合わされる。すると、T細胞メチル化のパターンを、B細胞を混合したものとB細胞を混合しないものとで比較することができる。B細胞のメチルトランスフェラーゼは不活性化されているので、観測されるメチル化の変化はT細胞の中で起こっていると結論するのが安全であろう。

標準的な差動的遺伝子発現方法を用いた場合、多くの遺伝子で、どの転写物が

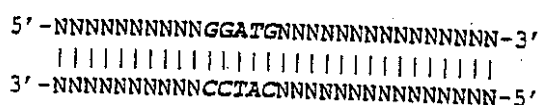
B細胞からのものであり、どの転写物がT細胞からのものであるかを区別することは非常に難しく、遺伝子によっては不可能であろう（どの二つの細胞タイプもいくつかの遺伝子の形質発現を共有しているから）。しかしMAASTでは、事前の遺伝的変更により、すなわち、メチルトランスフェラーゼ遺伝子が削除されていることにより、混合細胞集団での遺伝子発現を調べることが可能になる。

MAASTは以下の説明によってさらに良く理解できる。

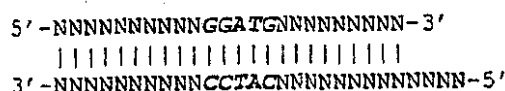
1. 対照及び試験サンプルからゲノムDNA (gDNA) を単離する。

2. 二つの制限酵素の組を選ぶ。各組は、タイプII-S制限酵素と、メチル化されたときにDNAを切断しないタイプII制限酵素を含む。この説明では、FokI (II-S) とHincPII (II、メチル化敏感) が例として用いられる。使用できそうなタイプII-S制限酵素及びタイプII制限酵素はいくつかある。

3. まず、gDNAをタイプII-S制限エンドヌクレアーゼによって消化する。5'末端4塩基オーバーハングが好ましい：

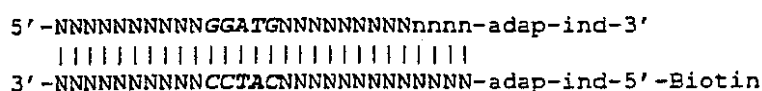


FokIで切断すると次のようになる：



4. 各々が256のユニークなアダプター-インデクサーの1つを含む256のウエルに配分する。

5. 4つの塩基オーバーハングと相補的なアダプター-ライゲーター（256の1つ）を結紮する。アダプター-インデクサーは、結紮されない鎖から分けるその後の精製を容易にするビオチン部分を含む。



6. 結紮生成物を洗浄して結紮されないものを除く。結紮された生成物だけを残す。

```

5'-NNNNNNNNNNGGATGNNNNNNNNNNnnnn-adap-ind-3'
      |||||
3'-NNNNNNNNNNCCTACNNNNNNNNNNNN-adap-ind-5'-Biotin

```

7. メチル化敏感な制限エンドヌクレアーゼ（又は、同じ部位を認識する制限酵素の対 / 組合わせで一方の酵素はメチル化された部位を切断せず他方の酵素は切断するもの）による第二の消化。

例：H i n P I I による対照サンプルの消化：

```

5'-NNNGCGCNNNNNNNNNN//NNNNNNNNNNGGATGnnnn..adap-ind-3'
      |||||
3'-NNNGCGCNNNNNNNNNN//NNNNNNNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'-Biotin

```

H i n P I I で切断すると次のようになる：

```

5'-NNNG   CGCNNNNNNNNNN//NNNNNNNNNNGGATGnnnn..adap-ind-3'
      |||||
3'-NNNGCGC   GNNNNNNNNNN//NNNNNNNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'-Biotin

```

例：H i n P I I による試験サンプル（これはH i n P I I 部位でメチル化されている）の消化：

```

      CH3
      |
5'-NNNGCGCNNNNNNNNNN//NNNNNNNNNNGGATGnnnn..adap-ind-3'
      |||||
3'-NNNGCGCNNNNNNNNNN//NNNNNNNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'-Biotin

```

（メチル化敏感な）H i n P I I で切断すると次のようになる：

```

      CH3  (No cut)
      |
5'-NNNGCGCNNNNNNNNNN//NNNNNNNNNNGGATGnnnn..adap-ind-3'
      |||||
3'-NNNGCGCNNNNNNNNNN//NNNNNNNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'-Biotin

```

8. 洗浄してメチル・アダプターに結紮する。第二のアダプターはメチル化敏感な制限エンドヌクレアーゼによって認識される部位に生成される付着する端に特異的である。第二のアダプターの結紮は、DNAがメチル化敏感な制限酵素で切断されたときに（この例でメチル化が存在しないとき）最も効率的である。DNAが切断されていないとき、結紮のために利用できる付着する端がない。したがって、開裂を阻害する仕方でメチル化されたゲノムDNAの領域は以後のステップの基質にならない。

例：メチル化敏感な制限酵素で切断されたDNAへの第二のアダプターの結紮

```

5'-sec-adap..NNNG CGCNNNNNNN//NNNNNGGATGnnnn..adap-ind-3'
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
3'-sec-adap..NNNCGC GNNNNNNN//NNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'-Biotin

5'-sec-adap..NNNCGC GNNNNNNN//NNNNNGGATGnnnn..adap-ind-3'
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
3'-sec-adap..NNNCGC GNNNNNNN//NNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'-Biotin

```

9. 固定されたgDNA断片ライブラリーのPCR又は他の適当な増幅方法による増幅。増幅プライマーはアダプターの各々の適当な鎖に対して相補的であるように設計される。

例：PCRによって生成されるアンプリコン

```

5'-sec-adap..NNNCGC GNNNNNNN//NNNNNGGATGnnnn..adap-ind-3'
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
3'-sec-adap..NNNCGC GNNNNNNN//NNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'

```

10. T7遺伝子6エキソヌクレアーゼによる消化ステップを用いて一本鎖アンプリコンを生成することができる。このステップは、増幅に用いられるプライマーの1つがプライマーの5'末端でホスホジエステル・リンケージの代わりに5ホスホロチオエート・リンケージを有する形で合成されていることを必要とする。ホスホロチオエート・リンケージを含む鎖は消化から防護される。

例：エキソヌクレアーゼによる消化の後の一本鎖アンプリコン。

```

3'-sec-adap..NNNCGC GNNNNNNN//NNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'

```

11. ライゲーター - ディテクタープローブにハイブリダイズする。

例：5'リン酸基をもつライゲーター - ディテクターにハイブリダイズされたgDNAアンプリコン。ライゲーター - ディテクターはラベルを、例えば3'末端にくっついた蛍光分子をもつ。

```

5'- nnnn-lig-detect-Signal.A
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
3'-sec-adap..NNCGCGNN//NNCCTACNNNNNNNNNNnnnn..adap-ind-5'

```

12. ユニバーサルディテクターアレーにハイブリダイズする。ハイブリダイズされたライゲーター - ディテクタープローブを含む256のゲノムDNAプレパートの各々に、4,096の可能な全てのヘキサマーから成る包括的なディテクターアレーを接触させる。このアレーのヘキサマー・プローブはある特定の

順序で配分されている。プローブはアレーの表面から、好ましくは非ポリヌクレオチド・リンカー・スペーサーによって、隔離されていることが好ましい。

例：固定化ヘキサマーに結合されたディテクター - ライゲーター。

```

Surface---linker spacer-----NNNNNN-3'

                                     5'-nnnn-lig-detect-Signal.A
                                     |||
3'-sec-adap..NNCGCGNN//NNCCTACNNNNNNNNNNnnnn..adap-ind-5'

```

256の一般ディテクターアレーの各々における蛍光信号は適当な蛍光走査計器又は蛍光ビーズを用いて測定される。

例：各アレー・アドレスのタグ配列（5既知 + 3未知 + 10既知塩基）。ある未知の距離にあるメチル化部位の配列も同定される。

```

<< methyl site      5      (3)  6 + 4
3'-sec-adap..NNCGCGNN//NCCTACNNNNNNNNNNnnnn..adap-ind-5'

```

13. 導出された配列情報の特定

ゲノム配列情報が得られた場合、もしもその配列がある特定された遺伝子の5'末端にあるならば、導出された配列を用いたBLASTサーチによってプロモーターの存在が示される。予測されるメチル化部位の*in silico*分析がこの想定を容易にするだろう。ゲノム配列が得られない場合、配列タグは、まだはっきりしていない問題のゲノムDNA領域を調べる出発点として役立てられる。

配列タグの可変アドレス分析 (VAAST)

配列タグの可変アドレス分析 (VAAST) は、FAAST法の一形態であって、核酸分子における既知の又は可能な配列のいろいろな組み合わせの関連を決定することを可能にする。例えば、免疫グロブリン又はT細胞レセプタにおける結合及び可変領域の特定組み合わせを決定することができる。VAASTはFAASTと同じ基本ステップを用い、核酸サンプルの開裂の前に1つステップを付け加える。VAASTでは、開裂のための認識部位、好ましくは制限酵素認識部位、が核酸サンプル中の核酸断片に導入される。そして、この認識部位が基本FAAST法における開裂部位として用いられる。アダプター - インデクサーは、この認識部位が導入された配列に隣接して現れる既知の又は可能な配列にマッチ

するように選ばなければならない。結果として、ある核酸断片から導出される中央配列のまわりに一定の末端配列がある断片が得られる。これによって既知の又は可能な配列の関連を評価することができる。特に、認識部位が導入された配列とある特定アダプター - インデクサー（これは既知の又は可能な隣接配列とマッチする配列をもつ）との関連を検出できる。

V A A S Tは次の説明によってさらに良く理解される。

1. 問題のサンプルからRNAを単離し、cDNA (DNA) を作る。
2. 二つのPCRプライマーの組、1つはV領域に特異的なもの、1つはJ領域（又は、望むなら、D又はC領域）に特異的なもの、を選ぶ。第一の好ましい方法（いくつかあるが）では、VプライマーはタイプII - S制限部位、例えばF o k I、を含む。さらに、V特異的プライマーは、O'末端にいくつかのホスホロチオエート・リンケージを含む。アンプリコンの長さはプライマーの布置によってコントロールされる。

例：cDNA標的：

```

          V      | (N) |      J      /      /      C
5' -GATCTAGATCAGTNNNNNNNTGACCATGT...CGTGAATCATG-3'
      |||
3' -CTAGATCTAGTCANNNNNNACTGGTACA...GCACTTAGTAC-5'

```

導入されたF o k I部位を含むcDNAアンプリコンの例：

```

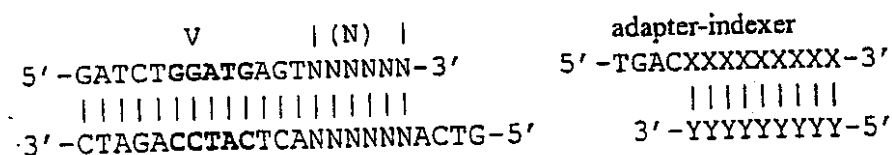
          V      | (N) |      J
5' -GATCTGGATGAGTNNNNNNNTGACCATGT...-3'
      |||
3' -CTAGACCTACTCANNNNNNACTGGTACA...-5'

```

3. PCRの後、アンプリコンはF o k Iで消化され、アダプター - インデクサーが結紮される。これでアンプリコンは、T7エキソヌクレアーゼ遺伝子6によって消化される準備が整う。アダプター - インデクサーの5'末端はT7エキソヌクレアーゼ遺伝子6による消化から防護されていない。したがって、T7エキソヌクレアーゼ遺伝子6による消化ステップで一本鎖のアンプリコンが生成される。

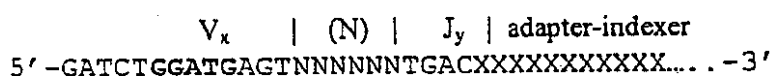
ステップ2からのcDNA

F o k I 消化

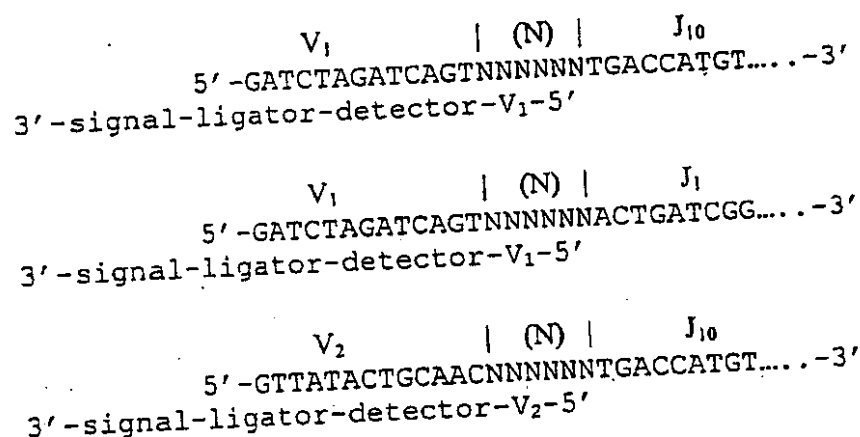


4. PCRの後、アンプリコンはT7エキソヌクレアーゼ遺伝子6によって消化される。

T7エキソヌクレアーゼ遺伝子6で処理されたアンプリコンの例：



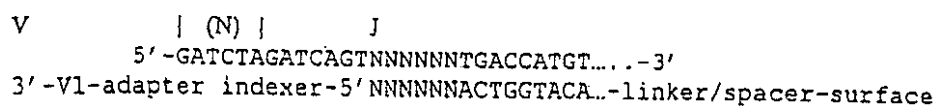
5. 一本鎖アンプリコンが100のVライゲーター-ディテクターのプール(各々がラベルを有し、各々1つのV領域遺伝子セグメントに特異的である)にハイブリダイズされる。全てのVライゲーター-ディテクター(長さは約25塩基)は、1つのV領域遺伝子セグメントにハイブリダイズするように先験的に(a priori)設計される。V及びJ添字ナンバーはここでは説明のために任意に選ばれている。



この例では、V1ライゲーター-ディテクターもV2ライゲーター-ディテクターもJ10プローブにハイブリダイズし結紮して信号を生成すること注意到しよう。さらに、V1ライゲーター-ディテクターはJ1アドレスから信号を生成する；ここから、配列タグの可変アドレス分析というネーミングが出てくる。ハイブリダイズされた複合体のアドレスは、どのJ領域遺伝子セグメントに

V遺伝子セグメントが結合したかに依る。この同じ原理が100のV遺伝子セグメント全てにあてはまる。

6. アンプリコン/アダプター・インデクサー複合体に、全ての既知のJ遺伝子セグメント及びVとJの間に6つのヌクレオチド塩基を付加して生成される配列に対して特異的なオリゴヌクレオチド・プローブを含む包括的なアドレス・アレーを接触させる。Jセグメントの数(50)は少ないので、プローブのサイズを6塩基に制限する必要はない。ハイブリダイゼーション適合度を高めるためにもっとストリンジエントな条件が望まれる場合、好ましい長さは8乃至15塩基以上になる。



N領域で生成される全ての可能な配列をカバーするために必要なプローブの複雑度を示す：

N領域塩基 の数	可能なN領域 配列の数	J s の数	配列の数
0	0	50	50
1	4	50	200
2	16	50	800
3	64	50	3200
4	256	50	12800
5	1024	50	51200
6	<u>4096</u>	50	<u>204800</u>
	5461		273050

したがって、N領域で全ての可能な配列が生成され、全てのJ遺伝子セグメントが利用されると仮定すると、273,050の配列が可能である。さらに、100のV遺伝子セグメントが全て用いられると仮定すると、可能な配列の総数は：

$100 \times 273,050 = 27,305,000$ - すなわち、2700万強の

配列となる。

以下の所見は、尋ねられる可能性がある配列の複雑度を10 - 100倍拡大する：

所見1：ここでは考慮されていないが、N領域の付加は、ゼロから6までが最も普通であるが、6塩基を超えることもあることは十分確立されている。

所見2：複雑度の増加は、DNAエディティングと呼ばれている現象からも生ずる。これは、V領域の3'末端及びJ領域の5'末端の塩基が“噛み取られ”てさらに多様性を生ずるものである。簡単のために、DNAエディティングはこの説明では考慮されていない。

所見3：最後に、ここで記述されるIg及びTCRレセプター・ファミリーは細胞表面のヘテロ・ダイマーとして表される。例えば、TCR - アルファ鎖はTCR - ベータ鎖と関連している。したがって、cDNAのアルファ及びベータ遺伝子に関する配列の変化を同時に調べるチップを生成することは簡単な仕事である。

所見4：TCR及びIg配列の完全な多様性はV、D、J、及びC領域の任意の組み合わせを想定している。可能な組み合わせは、VDJC、VNDJC、VJJC、VNJC、VDDJC、VNDDNJJC、VDNDNJJC、VNDNDNJJC、及びこれらの任意の組み合わせを含む。

質量分析検出

質量分析測定手法をFAASTにおける検出に利用できる。この方法は、マトリックスによるレーザー脱着/電離飛行時間(MALDI - TOF)質量分析法を含む。この方法は自動化が可能であり、多数のサンプル及び分析を迅速に処理することができる。

質量分析検出法は、小さな分子の方がうまくゆくので、質量分析検出の前に、又はその一部として、いくつかのFAAST成分を切断することが有益である。質量分析による検出の前に検出しようとするオリゴヌクレオチド分子を短く切断するのにいくつかの方法が考えられる。FAASTプロトコルは通常に進められ、好ましい実施の形態では、ヘキサマー・プローブが付着された表面が、マトリックスによるレーザー脱着/電離、飛行時間、質量分析器(MALDI - TOF

- M S) のソース領域と共用される。F o k I インデックス切断によるF A A S T プロセスで得られる断片は下のようなものであろう

```

Surface---3' HHHHHHNNIIIIIXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-1-3'
              XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-5
              /
3' ...YYYYYYYY

```

ここで：

Hは、ヘキサマー・プローブ、断片に結紮されている；

Iは、インデクシング・ステップからのクアドラマー；

Nは、F A A S T で読み取られない未知の塩基；

Xは、相補的な塩基、適切でないもの；

Yは、F A A S T 断片の残りのヌクレオチド；

- は、リンカー、ユニバーサル塩基、擬態又はその他の相似物；

Lはラベルである。

太字は可能なサブ断片を表す。

約50塩基を超える断片では、質量分析法の性能はDNAサンプルに関しては低くなる。化学的、生物的、物理的（熱的）、その他の開裂手段を用いてもっと小さい、もっと適当なサブ断片を生成して質量分析器で分析することができる。

Q - T O F システム (M i c r o m a s s , U S 本社は S u i t e 4 0 7 N , 1 0 0 C u m m i n g s C e n t e r , B e v e r l y , M A 0 1 9 1 5 - 6 1 0 1 , U S A) のような装置では、断片化の程度を多少調節することができ、親イオンを見てから断片化を高め、分解断片そして配列を調べる；この方法はフルサイズのサブ断片を決定し、サブ断片の配列（それは基本F A A S T 法の場合よりも長い配列情報である）をこれらの公知の手段で推測しようとするものである。検出できる断片は、スキームによりトップ・ストランド、ボトム・ストランド、又はその両方である。ラベルは開裂可能な質量タグであっても、又ストランドにラベルを付けなくても良い。

このために使用できる開裂手段はいくつかある。例えば、1つの方法は（本明細書の別のところで記述されている）S z y b a l s k i の方法であり、F o k I を用いてある任意の、特異的な認識部位からある一定の距離のところ切断する。この方法は、タイプ I I - S 又はタイプ I I I の他の制限酵素にも拡張でき

る。この方法を2回用いることもできる、すなわち、1回は表面に近い方の端を切り取るために、1回は表面から遠い方の端を切り取るために用いる；好ましくは、タイプIIの酵素を用いて表面から最も遠い端を切断する。

McrBC (NEB、#272)を用いて、G/Aに隣接するメチルシトシン部位を切断することができる。切断サイトは明確ではないが(約30塩基)、それを有利に利用して親ならびに断片セットを生成することができる。オリゴヌクレオチドに付着された金属を含むポルフィリンは、光にさらされるとそのポルフィリンのすぐ近くでDNAを切断することが示されている(テキサフィリン、US5607924)。ハイブリダイゼーション・テキサフィリンを変性し、光と合わせて用いて残りの鎖を開裂することができるだろう。別の開裂方法は、Dervanの方法である(Cartwright, I.L., et al., メチジウムプロピルEDTA、鉄(II)、によるクロマチンの開裂、Proc Natl Acad Sci USA, 1983.80(11): p.3213-7; Schultz, P.G. and P.B. Dervan, ペンタ-N-メチルピロルカルボキシアミドEDTA X Fe(II)によるDNAの配列特異的な二本鎖開裂、Proc Natl Acad Sci USA, 1983.80(22): p.6834-7)。光開裂リンケージを用いる方法はOlejnik et al.によって記述されている(Olejnik, J. et al., 光開裂可能なペプチド-DNA複合体: 合成及びMALDI-MSを用いるDNA分析への応用、Nucleic acid Res, 1999.27(23): p.4623-31; Olejnik, J., E. Krzymska-Olejnik, and K.J. Rothchild, 生体分子の単離と検出のための光開裂可能な親和性タグ、Methods Enzymol, 1998.291: p.135-54; Olejnik, J., E. Krzymska-Olejnik, and K.J. Rothchild, 5'末端DNA/RNA標識のための光開裂可能なアミノタグ ホスホルアミジト、Nucleic acid Res, 1998.26(15): p.3572-6; Olejnik, J., E. Krzymska-Olejnik, and K.J. Rothchild, 5'末端DNA/RNA標識のための光開裂可能な

アミノタグ ホスホルアミジト、Nucleic acid Res , 1998 . 26 (15) : p . 3572 - 6 ; Olejnik , J . , et al . , 光開裂可能なビオチン誘導体：生体分子の単離のための可変的アプローチ、Proc Natl Acad Sci USA , 1995 . 92 (16) : p . 7590 - 4)。

これらのリンケージは光を用いて開裂して表面から断片を放出させることができ、それによって穏やかな脱着を可能にする。WO 0004036は光開裂可能なヌクレオチドとそれを利用する方法を記載している。

ある実施の形態では、異なる配列及び分子量のペプチド核酸 (PNA) 分子などの質量ラベル (Hanvey et al . , Science 258 : 1481 - 1485 (1992)) を、ライゲーター - ディテクターやアダプター - インデクサーにおける配列に特異的に結合するラベルとして用いることができる。サンプルのレーザー脱着を用いて分析器に放出されて質量によって分解されるPNAラベルのMALDI - TOF質量スペクトルが生成される。各PNAラベルの強度はいろいろな成分 (例えば、ライゲーター - ディテクターやアダプター - インデクサー) の相対的な量を表す。言い換えると、PNAスペクトルはアレーの特定の場所における標識された成分の相対的な存在量の間接的指標であるスカラー値を生成する。

確率検出

ハイブリダイゼーションによる配列決定はミスマッチ・エラーを生ずることが知られている (Lipschutz , R . J . , ハイブリダイゼーションによる確率的なDNA配列決定、J Biomol Struct Dyn , 1993 , 11 (3) : 637 - 53)。配列情報のデータベース探索は現在正規表現に基づいており、データベース記載とサーチ配列の間でマッチする“文字”を必要とする。FAASTは、正規表現マッチング (塩基毎の合致 v s 非合致) を、配列タグ (すなわち、FAASTで生成される断片) の同一性付与の信頼性を決定する確率機能で置き換えることを可能にする。

FAAST法は、結紮を用いてライゲーター位の近くのハイブリダイゼーションの特異性を改善する。この改善にも関わらず、特にライゲーター位から離れた

ヌクレオチドに関しては、ミスマッチの有限の確率が残る。エラー率は、最も小さい二つのミスマッチ性質に依存する：塩基のペアリング、すなわち、AとG；ライゲーター位からの距離。

信頼度の値を決定するプロセスの一例として、ライゲーター位から最も遠いヘキサマー・プローブにおける二つの塩基を、塩基に下で示すようにナンバーを付けて、考えよう。

```

                <hexamer>
surface-linker-spacer-NNNNNNnnnn-ligator-detect-signal-3' <probe>
                |||
3'-adapter..NNNNNNNNnnnn-adapter-indexer-5' <target>
                123456 <position>

```

ここで、この特定のケースでは、表面 - - - リンカー - スペース - - - A T X X X、となっており、以下の説明ではA T（位置1及び2）塩基に焦点を合わせる。

表現される可能な配列の組を評価するために、Dayhoff（Dayhoff, M.O., R.M. Schwartz, and B.C. Orcutt, タンパク質の配列と構造におけるタンパク質の進化的変化のモデル、M.O. Dayhoff, Editor. 1978, National Biomedical Research Foundation: Washington DC）及びVenezia（Venezia, D. and P.J. O'Hara, マッチ重みセットによる迅速モチーフ・コンプライアンス・スコアリング. Comput Appl Biosci, 1993. 9(1): 65-9）のタンパク質手法にしたがって、重みマトリックスが用いられる。これらのマトリックスの係数はFASTシステムに関して実験的に決定される。下に、位置1と2を表すマトリックス（説明用の係数をもつ）の1例を示す。ここで、列は上の鎖のヌクレオチドを表し、行は下の鎖のヌクレオチドを表す。実際の係数は実験的に決定できる。

位置 1				位置 2			
A	T	C	G	A	T	C	G
A	[.02, .90, .03, .05]			A	[.01, .97, .01, .01]		
T	[.90, .02, .03, .05]			T	[.97, .01, .01, .01]		
C	[.02, .03, .05, .90]			C	[.01, .01, .01, .97]		
G	[.03, .02, .90, .05]			G	[.01, .01, .97, .01]		

ヘキサマー A T X X X X での完全マッチ検出の場合、スコアは、下で太字で示されているマトリックス係数の積として決定される； $0.90 \times 0.97 = 0.87$ 。

位置 1				位置 2			
A	T	C	G	A	T	C	G
A	[.02, .90, .03, .05]			A	[.01, .97, .01, .01]		
T	[.90, .02, .03, .05]			T	[.97, .01, .01, .01]		
C	[.02, .03, .05, .90]			C	[.01, .01, .01, .97]		
G	[.03, .02, .90, .05]			G	[.01, .01, .97, .01]		

一方の鎖で1つの塩基のミスマッチが起こる場合、例えばヘキサマー側で位置1においてA→Gとなる場合、スコアは同様に、 $0.05 \times 0.97 = 0.05$ と決定される。

位置 1				位置 2			
A	T	C	G	A	T	C	G
A	[.02, .90, .03, .05]			A	[.01, .97, .01, .01]		
T	[.90, .02, .03, .05]			T	[.97, .01, .01, .01]		
C	[.02, .03, .05, .90]			C	[.01, .01, .01, .97]		
G	[.03, .02, .90, .05]			G	[.01, .01, .97, .01]		

この手順は、同様に任意の数の塩基に拡張できる。ある与えられた数のヌクレオチドについて、全ての可能なミスマッチに対してスコアを計算して順位を付けて並べて最も確からしい同定物 (i d e n t i t y) を見つけることができる。カットオフ・スコアを用いてマトリックス推定からの可能な同定物 (i d e n t i t i e s) の数を減らすことができる。例えば、上で例示したマトリックスを

用いると、0.50を超えるスコア閾値による配列は唯1つの配列しか与えず、それがプローブにマッチする配列になる。

前記プローブに対するミスマッチ事象の全体から配列及びそれぞれの確率スコアを推定する方法は1からnに拡張することができる。ここでnはハイブリダイゼーションに利用できる自由塩基の数である。

完全には特定されていない生物（すなわち、少なくとも配列決定が行われ、合致（consensus）配列が構成されている）で、塩基のランダムな分布を仮定するならば、ユニークネスに関する信頼度の値を計算することができる。例えば、推定108塩基のゲノムをもつ生物において、長さが15塩基の候補があるとすると、 $108 / 4^{15} = 0.1$ は1よりもずっと小さいので、この15塩基の断片はユニークであると予期される。この特定の15塩基断片が2回起こると予期できるためには、ゲノムは10倍大きくなければならない。

既知のゲノムにおける分布は、完全にはランダムでないことが知られており、情報が集まるにつれて、ランダムな分布という最初の仮定を改良することができる。この新しい情報を用いて信頼度の値を割り当てて利用することができる。

一例として、メンバーがA B C D 1、A B C D 2、A B C D 3である仮想的な遺伝子ファミリーA B C Dを考えよう。3つのメンバーは熱ショックなど何らかの事象の後で見つかったものであり、したがって、推測で熱ショック遺伝子ファミリーに属するとされ、その遺伝子ファミリーの間では相当な長さの保存（conserved）配列があるようになっている。また、その生物は植物であり、A B C D 1はその植物の根から単離され、A B C D 2はその植物の葉から単離され、A B C D 3はその植物の花から単離されたとしよう。推定マトリックスは下のように見えるだろう

	1	2	3
A B C D 1	[. 6 0 , . 1 5 , . 0 5]		
A B C D 2	[. 2 5 , . 6 0 , . 1 5]		
A B C D 3	[. 0 5 , . 1 5 , . 6 0]		

ここで、列1は根を表し、列2は葉を表し、列3は花を表す。

配列の信頼度が高いが、配列はファミリーの3つの既知のメンバーのどれかに

属する1つの実験で、サンプルの源(すなわち、根、葉、又は花)は遺伝子の同一性推定を可能にする。数学的に完全に閉じた取り扱いをするためには、マトリックスはファミリーの全てのエレメントを含んでいなければならない、ここではこのファミリーのまだ見つかっていない遺伝子を考慮するために、行と列は加え合わせても1にならない; 他のすべてのメンバーには0.05という総和が割り当てられ、その生物について知られる情報が増すのに伴って値は更新される。

この推定を拡張して生物相同性を含めることができる。すなわち、植物1の遺伝子A B C D 1からF A A S Tタグを全ての生物のデータベースで探す場合、植物2, 植物3、哺乳類1, 等とのマッチがある。推定マトリックスは、データベースの既知の生物データから構築される。

上述の計算と分析は、次のカタログ構築の例によって説明することができる。2プローブ検出器アレー、対照サンプル、及び試験サンプルを考えよう。2プローブは既知の配列: A、基質 - - リンカー - - A G G G A G - 3' 及びB、基質 - - リンカー - - A T G G A G、を有するとしよう。これらのプローブはその同族配列; A A、... T C C C T C ...、及び... T A C C T C ... を対照及び試験サンプルから捕獲し、さらに、ここで述べたように低い確率でミスマッチの分子種を捕獲する。上で述べたような推定マトリックス法を用いて正しいマッチングの確率が計算される。

F A A S T手順が対照及び試験サンプルで実行され、生ずる信号がプローブディテクターアレーから集められ、4つの信号を含むカタログが作成される:

対照		試験	
A A	B B	A A	B B
A . 3 0	. 0 3	A . 8 0	. 1 0
B . 0 3	. 5 0	B . 0 3	. 5 0

カタログはまた、上述のように、各プローブ/標的の組み合わせに対する確率、及び/又は確率から導出されるエントリー、を含む。説明のために、プローブ配列Aが標的配列A Aとペアになる確率が0.80であり、プローブ配列Aが標的配列B Bとペアになる確率が0.10であり、プローブ配列Bが標的配列A Aとペアになる確率が0.05であり、プローブ配列Bが標的配列B Bとペアにな

る確率が0.75であると仮定しよう、すなわち、

	推定	
	A A	B B
A	.80	.10
B	.05	.75

各標的に対応する信号を決定することは線形代数の単純な応用問題である。ここでは、例えば、対応するエントリーをかけ合わせて対照及び試験を問題の標的の確率論的パターンに対応するパターンに変換する。例えば、対照サンプルで、標的A Aに帰せられる全信号は 0.30×0.80 (Aプローブ部位で、完全マッチ) + 0.03×0.05 (Bプローブ部位で、不完全マッチ) = 約0.24である。試験サンプルでは、A A標的信号は $0.80 \times 0.80 + 0.03 \times 0.05$ = 約0.64である。対照及び試験のパターンをA Aに対応する配列に関して比較するとA Aの相対量で対照から試験へ、それぞれ0.24から0.64への増加が認められる。パターンにおける他の全てのエントリーが同じようにして計算される。

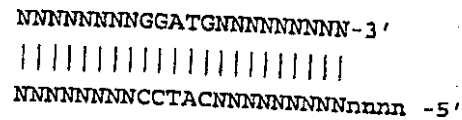
実施例 (I l l u s t r a t i o n s)

開示された方法は以下の実施例を参照してさらに良く理解される。

実施例 1 - F A A S T

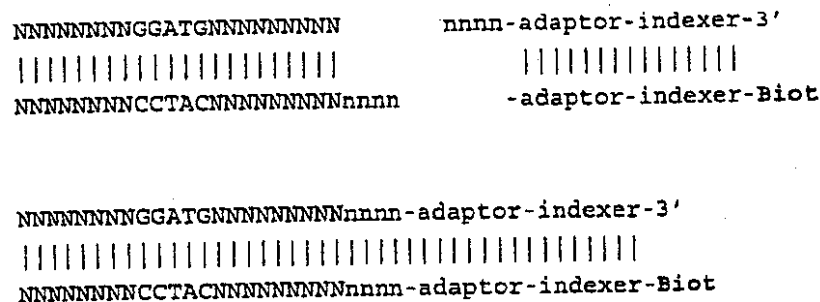
1. 二本鎖cDNAが標準の手順を用いて逆転写酵素で調製される。
2. その二本鎖cDNAがクラスII-S制限エンドヌクレアーゼで開裂される。このステップでは利用できるいくつかのクラスII-S酵素のどれを用いても良い。好ましいクラスII-S酵素はcDNAのユニークな5-塩基配列を認識し、認識配列より8又は9塩基下流にある部位で開裂する。可能な開裂部位の数は全部で256の異なる配列を含み、256の異なる4-塩基付着末端のどれかを生成する。このステップで適当な酵素としては、例えば、B b v I (認識、G C A G C - > N 8開裂)、及びF o k I (認識、G G A T G - > N 9)がある。

例：F o k Iによる開裂



3 a . 3 8 4 ウエルのマイクロタイタ皿を用いて、cDNA消化物を256の等量アリクオットに分け、各アリクオットをT4DNAリガーゼの存在下で第一のアダプター - インデクサーと共にインキュベートする。クラスII - S酵素によって生成される付着末端にアダプターを結合するプロセスは“インデクシング”と命名された (Unrau and Deugau, Gene 145:163-169 (1994))。cDNA消化によって生成される256の可能な4 - 塩基付着末端に対応して、256の異なる第一のアダプター - インデクサーがある。アダプターは非結紮末端にビオチン部分を含み、その後のステップにおけるアダプターの固定を可能にしている。

例：第一のアダプター - インデクサー (256のうちの1つ) の結紮



3 b . 結紮されたものが、ファージT4エンドヌクレアーゼVIIの存在下で、ミスマッチ開裂条件の下でインキュベートされる (Youil et al., Genomics 32:431-435 (1996))。このステップで、結紮されたDNAが不完全にペアになった付着末端にアダプターが結合したところで開裂される。すなわち、このステップは前の結紮ステップのエラー・チェックを行う。このステップはオプションである。

4 a . 256のcDNAアリクオットの各々がユニークな4 - 塩基配列を認識する1つの特異的な制限エンドヌクレアーゼによって消化される。フリケント・カッターであるどんな4カッター酵素もこのステップに適している。この消化で、結紮された第一のアダプター - インデクサーを既に含むcDNAの多くが開裂される。この消化の後、用いられるクラスII - S及び4カッター制限酵素の特異的な組に依るが、cDNA断片は平均サイズが100乃至200塩基の不均質

な集団を含む。cDNA断片は、結紮されたアダプターと付着末端を含むならば、将来の分析に役立つタグを含む。このステップはオプションである。

4 b . 2 5 6 の反応の各々からの産物が、表面にビオチン化されたアダプターを結合するために固定されたアビジンを含む別々のマイクロタイタ・ウエルに入れられる。このステップの結果、ステップ3でアダプターに良く結紮された全ての断片が固定される。結合されていない断片は洗浄によって除去される。得られる256の固定化断片セットの全体は固定化cDNA断片ライブラリーと呼ばれる。このステップはオプションである。

例：4 カッター付着末端をもつ表面固定化タグ

```

5' nnnnNNN...NNNGGATGNNNNNNNNnnnn-adaptor-indexer-3'
|||||
3' NNN...NNNCCTACNNNNNNNNnnnn-adaptor-indexer-Biot-SURF

```

5 . 固定化cDNA断片ライブラリーの各メンバーは、固定化cDNA断片をユニバーサル・プライミング配列と結合させるために、DNAリガーゼの存在下で第二のアダプターと共にインキュベートされる。結合されないアダプターは洗浄によって除去される。このステップはオプションである。

例：二つのアダプターをもつ固定化cDNAタグ

```

second.adap-nnnnNNN...
|||||
second.adap-nnnnNNN...

...NNNGGATGNNNNNNNNnnnn-adaptor-indexer-3'
|||||
...NNNCCTACNNNNNNNNnnnn-adaptor-indexer-Biot-SURF

```

6 a . 固定化cDNA断片ライブラリーの全てのメンバーが、PCRなどの適当な増幅方法によって増幅される。全部で256の別々の増幅反応が行われる。二つの増幅プライマーが用いられる、一つは第二のアダプターの鎖と相補的になるように設計され、もう一つは第一のアダプター - インデクサーと相補的になるように設計される。第一のアダプター - インデクサーと相補的なプライマーは、256の可能なプライマー配列の一つであり、ステップ2で生成される4 - 塩基の付着末端の一つだけと4つの塩基で重なる。増幅は、PCRを用いて、全部で

12乃至18サイクルにわたって行われる。このステップはオプションである。

例：PCRで生成されたアンプリコン

```
second.adap-nnnnnNNN...NNGGATGNNNNNNNNNNnnnn-adaptor-indexer-3'
|||||
second.adap-nnnnnNNN...NNCCTACNNNNNNNNNNnnnn-adaptor-indexer-5'
```

6b. T7エキソヌクレアーゼ遺伝子6による消化ステップ(Nikiforov et al., PCR Method and Application 3:285-291(1994))を用いて一本鎖アンプリコンを生成することもできる。この消化ステップは、6aで用いられるプライマーの1つが、そのプライマーの5'末端でホスホジエステル・リンケージの代わりに5ホスホチオエート・リンケージを用いて合成されていると想定している(Nikiforov et al.(1994))。このリンケージは一つの鎖を消化から防護する。このステップはオプションである。

例：エキソヌクレアーゼ消化の後の一本鎖アンプリコン

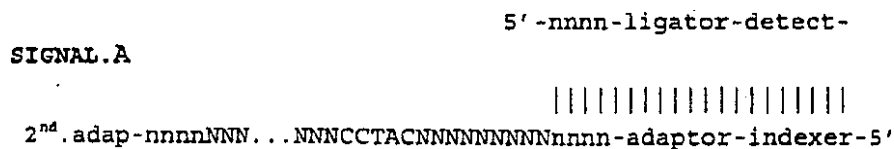
```
second.adaptor-nnnnnNNN...NNCCTACNNNNNNNNNNnnnn-adaptor-indexer-5'
```

6c. ステップ6で増幅されたタグを生成するのに別の方法がある。一例は、Walker et al., Nucleic Acid Research 20:1691-1696(1992)のStrand Displacement増幅法である。cDNAタグを増幅するさらに別の方法は、回転サークル増幅(Lizardi et al., Nature Genetics 19:225-232(1998); Lizardiへの米国特許第5,854,033号)である。回転サークル増幅を用いるには、結紮によって円形にしたcDNAを生成する必要がある。円形にした二本鎖DNAを生成する結紮方法は当業者には周知である。このステップはオプションである。

7a. 増幅されたcDNAタグの256の標本の各々が別の384ウエルのマイクロタイタ皿に移され、蛍光標識されたディテクター・ライゲーターオリゴヌクレオチドとハイブリダイズされる。256の異なる配列のディテクター・ライゲーターオリゴヌクレオチドがあり、それはステップ2で生成された4-塩基付

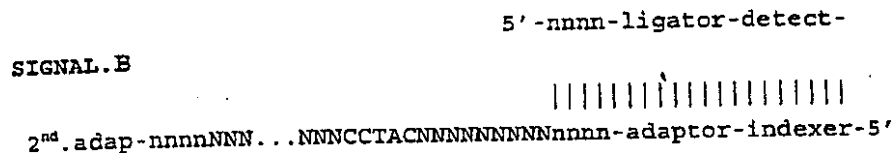
着末端の各々と相補的な256の異なるライゲーター - ディテクターを含む。256の増幅されたcDNAタグの各々に対し特異的な同族の配列だけが用いられる。ライゲーター - ディテクターは5'リン酸基を含む。

例：リン酸化されたライゲーター - ディテクターとハイブリダイズされたcDNAアンプリコン



7b. 対照vs. 試験mRNA集団の発現プロフィールをもっと正確に比較するために、このステップでは異なる色の蛍光染料で標識されたディテクター - ライゲーターオリゴヌクレオチドの第二の組が組み込まれる。すなわち、対照タグは色“A”のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズされ、試験タグは色“B”のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズされる。ハイブリダイゼーションが完了した後、cDNAタグのペアになっている組が混合され、次のステップ8へ進む。

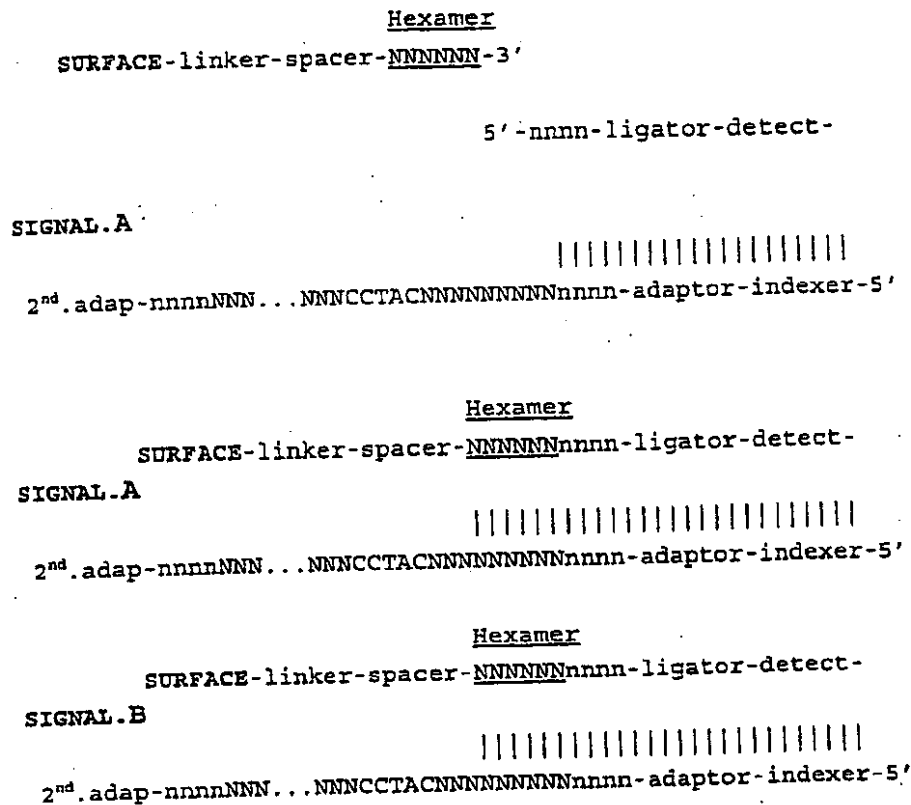
例：リン酸化されたライゲーター - ディテクターとハイブリダイズされたcDNAアンプリコン



8. ハイブリダイズされたライゲーター - ディテクターを含むcDNAの256の標本の各々に包括的なプローブ・アレーを接触させる。この包括的なプローブ・アレーは固い表面に並べられ、表面から非ポリヌクレオチドのリンカー - スペースで隔離された4,096のヘキサマー（あるいは、16,384のヘプタマー）の完全な組から成る。ヘキサマー（又はヘプタマー）は、自由な3'-ヒドロキシル末端を含む。アレーにおける256の検出反応の各々は、T4 DNAリガーゼ又は他の適当なリガーゼを用いて、特異的な同族のヘキサマー配列をディテクター - ライゲータープローブの5'末端に隣接する対応する配列に結紮するように、同一のハイブリダイゼーション / 結紮条件の下で行われる。ハイブリダイゼーションの後、結合されていない物質は非常に厳重な洗浄によって除

去される。

例：固定化ヘキサマー（HEXAMER）に結合されたディテクター - ライゲーター



9. ハイブリダイゼーション・エラーを小さくするために、エラー・チェック・ステップが結紮の後に行われる。このエラー・チェック・ステップは、ライゲーター - ディテクタープローブにおける誤ってペアになった塩基（誤ってペアになったC又はTを含むもの）を開裂する。このステップは、(Ellis et al., Human Mutation 11:345-353 (1998)) に記述されているようなミスマッチした塩基の化学的開裂を用いて行われる。この方法は誤って結紮されたライゲーター - ディテクタープローブを全て破壊する訳ではないが、アレー・アドレスの約50%でノイズを減少させる。他のエラー・チェック方法を用いてミスマッチしたGやAを除去することができる。このステップはオプションである。

10. 256の一般プローブ・アレーの各々の蛍光信号は、適当な蛍光走査計器を用いて測定される。256のアレー全部を合わせた信号から発現プロフィー

ル・データセットが生成される。各信号のアドレスは、太字で示された既知の配列に翻訳される。

例：各アレー・アドレスで決定される配列（5既知+3未知+10既知塩基）

。

5 (3) 6 + 4

second.adap-nnnnnNNN...NNNCCTACNNNNNNNNnnnn-adaptor-indexer-5'

11、発現プロフィールのデータセットは、入手可能な配列データから予測することができる満ちあふれている遺伝子産物の予想されるアドレスパターンを考慮に入れてさらに分析された。2つの組織の間の発現の違いは、対照およびテストに対応する2つの異なる色シグナルの比により測定される。間違ったアドレスで豊富な配列の交差雑種形成により発生した不一致を解消するには同様の実験が異なるペアの制限酵素で行なわれなければならない。

オーバーサンプリングの計算：

平均的なmRNA = 17000塩基、平均的な標識 = 120塩基。

平均的なmRNAに対する標識数 = 4。

すなわち平均的なmRNAは、何回もサンプリングして正確な検出の確度を増す

。

篩のコンプレキシティーに関する考察：

mRNAのコンプレキシティー = 転写物12,000個 × 1700塩基 = $>> 1 \times 10^7$ 。

五量体 = $1 / 1024 \times$ 四量体 = $1 / 256 \times$ 六量体 = $1 / 4096 = >>> 1 / 1 \times 10^9$ 。

平均標識サイズ120塩基と仮定して：

標識の数 = $12000 \times (4) = 48,000$ 標識。

各256マイクロタイターウェル中の標識の数 = 188。

異なるアレイアドレスの数 = $256 \times 4,096 = 1,048,576$ (六量体)。

異なるアレイアドレスの数 = $256 \times 16,384 = 4,194,304$ (七量体)。

1、二重鎖 cDNA を、標準の手順を用いて逆転写酵素により調製する。

このステップ用の好適な酵素の例には下記のものがある：

E c o R I G A A T T C

```
..NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNR-3'
...|||||
...NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRRSSSS -5'
```

```

              primer complement
sticky end SSSSnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
           |||||
           nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn

```

適切なDNA合成酵素を加え、こうして開裂したcDNA中に存在する全ての

適合性のある末端と結合させる。

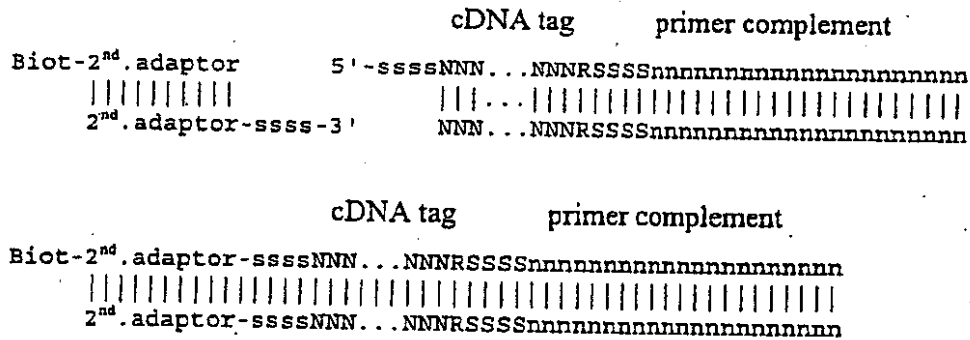
4、二回目の消化：結合した二重鎖 c D N A を含有する C 個のインデックスサンプルの各々を、R 個（一般には 1 から 5 ）の等分割量（二次インデックスサンプル）に分け、これら二次インデックスサンプルの各々を N 個（一般には 1 または 2 ）の異なる 4 塩基認識エンドヌクレアーゼの異なる混合物で開裂する。この混合物が一回目の消化に用いたものと同一の酵素を含有しないという条件で、多くの入手可能な制限エンドヌクレアーゼの任意の混合物をこのステップにおいて用いることができる。したがって、 $C \times R$ 個の断片が第二回目の消化を行なう過程で生ずる可能性がある。第二回目の消化ステップで用いた N 個の酵素の混合物には下記のような酵素が含まれる。

A c i I	スティッキー = 2	C C G C
H h a I	スティッキー = 2	G C G C
T a q I	スティッキー = 2	T C G A
C s p 6 I	スティッキー = 2	G T A C
S a u 3 A I	スティッキー = 4	G A T C
T s p 5 0 9 I	スティッキー = 4	A A T T
T a i I	スティッキー = 4	A C G T

N 個の酵素の混合物によるこの二回目の消化は、結合したアダプター - インデクサーをすでに含有しているこれら c D N A の多くを開裂することになる。この消化後、c D N A 断片は平均サイズが 6 0 から 3 0 0 塩基の不均一な集団を含むことになり、これは用いられた N 個の 4 塩基の認識制限エンドヌクレアーゼの特定の混合物に左右される。

5、各分割量を T 4 D N A 合成酵素の存在下で二番目のアダプターとともにインキュベートする。N 個の酵素の混合物により生成し得る 2 塩基または 4 塩基のスティッキーエンドに対応する N 個の異なる二番目のアダプターが存在する。第二アダプターは、次のステップにおいて第二アダプターの固定化を可能にするために、非結合末端にビオチン部分を含有することができる。

例：二番目のアダプター（N 個のうちの 1 つ）の連結反応



更なる分析用の生産的 cDNA 断片は、両末端で結合しているアダプターを含有することになる。

5 b、（オプション）：結合した二次インデックスサンプルを、誤対合を開裂する条件下でファージT4エンドヌクレアーゼVIIの存在下でインキュベートする（Youil等、1996）。このステップは、アダプターが不完全なペアであるスティッキーエンドと接合している場合、任意の結合しているDNAを開裂することになる。したがって、このステップはそれ以前の連結反応ステップのエラーチェックを行なう。

6、各二次インデックスサンプルをD個の分割量に分け、これら分割量（制限二次インデックスサンプル）のうちのD - 1を第一消化において用いられた4塩基の認識制限エンドヌクレアーゼの組には含まれていない4塩基の認識制限エンドヌクレアーゼと、第二消化において用いられたN個の4塩基の認識制限エンドヌクレアーゼの混合物とにより消化する。残りの消化されていない分割量は非制限二次インデックスサンプルである。この消化ステップは断片のサブセットを開裂し、ステップ7において増幅できなくすることになる。

6 b、（オプション）：表面にビオチン化されたアダプター（または任意のリガンド - アダプター）を結合させるために、 $C \times R \times D$ 個の二次インデックスサンプルの各々から採った材料を、固定化されたアビジン（または任意の適切な結合性部分）を含有する別々のマイクロタイターウェル上に置く。このステップは、ステップ5において二番目のアダプターとうまく結合し、ステップ6において開裂しなかった全ての断片の固定化をもたらすことになる。若干の結合していない断片を洗浄により除去した。 $C \times R \times D$ 個の固定化された断片の組から得られた捕集物は、固定化二次インデックスサンプルと呼ばれる。

7、全ての固定化二次インデックスサンプルを、PCRなどの適切な増幅法を用いて増幅する。合計 $C \times R \times D$ 個の別々の増幅反応が行なわれる。2つの増幅プライマーが用いられ、一方は第二アダプターの鎖と相補的であるように設計され、他方はアダプター - インデクサーと相補的であるように設計される。アダプター - インデクサーと相補的なプライマーは C 個の可能なプライマー配列の1つであり、一回目の消化の酵素認識部位と4塩基だけ重複している。異なる R 個の各反応において第二アダプターと相補的なプライマーは N 個の可能なプライマー配列の1つであり、第二消化において用いられた N 個の酵素の混合物の各酵素認識部位と4塩基だけ重複している。増幅は、PCRを用いて合計12から25サイクル行なう。

例：PCRにより生じたアンプリコン

```
second.adaptor-ssssNNN...NNNRSSSS-adaptor-indexer-3'
|||||
second.adaptor-ssssNNN...NNNRSSSS-adaptor-indexer-5'
```

7b、ステップ7において増幅された標識を生成するには別法がある。一例は、Walker等(1992)の鎖置換増幅(Strand Displacement Amplification)法である。さらに別のcDNA標識の増幅方法は、ローリングサークル増幅(Lizardi等、1998)である。ローリングサークル増幅を用いるには、連結反応により環状化されたcDNA標識を生成させることが必要である。環状化された二重鎖DNAを生成する連結反応の方法はよく知られている。

8、一重鎖アンプリコンを生成させるには、T7エキソヌクレアーゼ遺伝子6(Nikiforov等、1993)による消化ステップを使用することができる。この消化ステップは、ステップ7において用いたプライマーの1つが、プライマーの5'末端でリン酸ジエステル結合を5個のチオリン酸エステル結合で置き換えることにより合成されると仮定している(Nikiforov等、1993)。これらの結合は消化から一本の鎖を保護する。

例：エキソヌクレアーゼ消化後の一重鎖アンプリコン

```
second.adaptor-ssssNNN...NNNRSSSS-adaptor-indexer-5'
```

9、増幅した二次インデックスサンプルの各々を別のマイクロタイター皿に移し、蛍光標識したライゲーター - ディテクターオリゴヌクレオチドと雑種形成する。各々がアダプター - インデクサーの1つと相補的なC個の異なるライゲーター - ディテクターが存在する。特定の同族配列のみが増幅した二次インデックスサンプルの各々において用いられる。これらのライゲーター - ディテクターは、5' - リン酸基を含有する。

例：リン酸化されたライゲーター - ディテクターと雑種形成したcDNAアンプリコン

```

                    5'-RSSSS-ligatör-detector-SIGNAL.A
                      |||
second.adaptor-ssssNNN...NNNRSSSS-adaptor-indexer-5'

```

9b、対照対テスターのmRNA集団のより正確な発現プロフィールを描くために、このステップは異なる色の蛍光染料で標識したライゲーター - ディテクターの二つ目の組を取り入れることができる。したがって、対照用標識を「A型シグナル」のC個のライゲーター - ディテクターと雑種形成し、一方テスター用標識は「B型シグナル」のC個のライゲーター - ディテクターと雑種形成する。雑種形成の完了後、Aをコード化した二次インデックスサンプルおよびBをコード化した二次インデックスサンプルのペアになった組を混合し、下記のステップ10に進む。

例：リン酸化されたライゲーター - ディテクターと雑種形成したcDNAアンプリコン

```

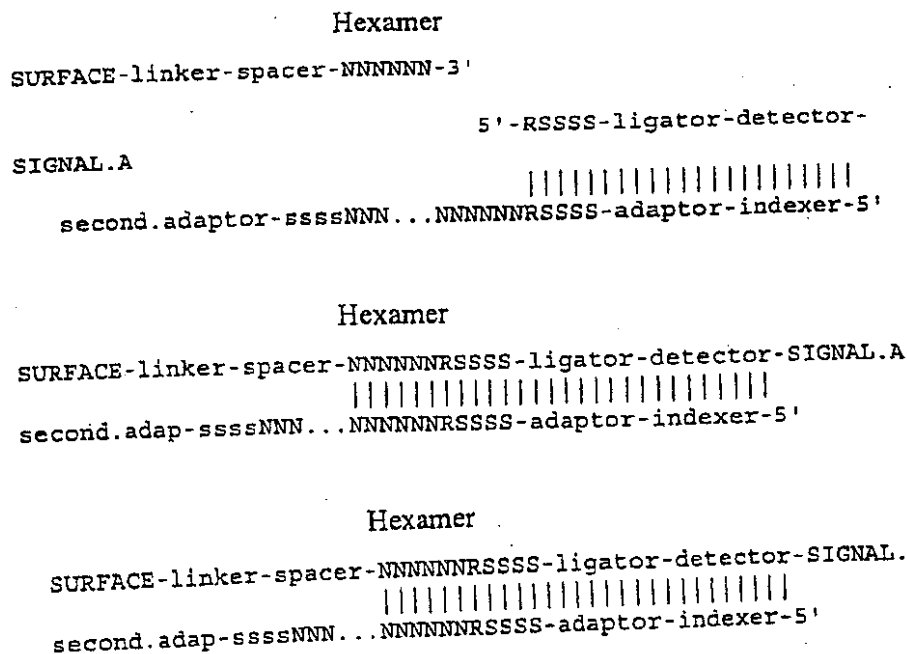
                    5'-RSSSS-ligatör-detector-SIGNAL.B
                      |||
second.adaptor-ssssNNN...NNNRSSSS-adaptor-indexer-5'

```

10、雑種形成されたライゲーター - ディテクターを含有することになったC × R × D個の二次インデックスサンプルの各々を統合型アドレスアレイ（プローブアレイ）と接触させる。統合型アドレスアレイは、固体表面上に並んだ完全な一組の六量体4,096個（または別法では七量体16,384個）からなり、非ポリヌクレオチドのリンカー - スペースーにより表面から分離されている。六量体（七量体）はフリーの3' - 水酸基末端を含有する。アレイ上におけるC ×

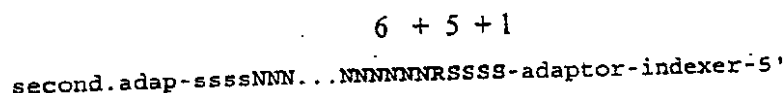
R × D個の各検出反応は、特定の同族六量体配列とライゲーター - ディテクタープローブの5'末端に隣接する対応配列との連結反応を達成するために、T4 DNA合成酵素または任意の他の適切な合成酵素を用いて同一の雑種形成 / 連結反応条件下で行なわれる。雑種形成後、若干の結合していない材料を非常に厳しい洗浄により除去する。

例：固定化された六量体に接合したライゲーター - ディテクター

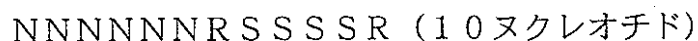


11、C × R × D個の統合型アドレスアレイ各々のシグナルは、適切な読出し機器を用いて測定される。発現プロフィールのデータセットは、C × R × D個のアレイの各アドレスにおけるシグナル比から得られる。各シグナルのアドレスを太字で示した配列に翻訳する。六量体プローブ由来の6つのヌクレオチド、認識 / スティックエンド配列由来の5つのヌクレオチド、および認識配列中の最後の塩基由来の1つのヌクレオチドである。

例：各アレイアドレスに対して決定された配列



決定された配列：



所与の二次インデックスサンプルから得られる各々1つのD - 1制限二次イン

デックスサンプルにおいて見えなくなる特定のシグナルは、cDNA断片内の特定の開裂部位〔下記のREST〕の存在を示している。

4 4 6 + 5 + 1
second.adap-ssssNNN...NNN[REST]NNN...NNNNNNR\$SSS-adaptor-indexer

NNNNNNNR\$SSSSーアダプターーインデクサー

決定された配列：

ssss...〔REST〕...NNNNNNNR\$SSSSR (4...4...
10=18ヌクレオチド)

発現データセットは、入手可能な配列データから予測できる豊富な遺伝子産物の予想されるアドレスパターンを考慮に入れて分析される。2つの組織の間の発現の違いは、対照およびテスターに対応する2つの異なる色シグナルの比により測定される。N = 1の場合、第二アダプターに隣接する配列、すなわちssssスティッキーエンド配列もまた既知である。

実施例

実施例1、FAASTインデキシング付きDNAアンプリコンの創出

配列標識またはFAASTの固定アドレス分析によって複雑なDNAを、制限酵素による消化、続いて二重らせんアダプターとの連結反応の2つの一連のラウンドを含むプロセスにより部分的に知られている配列の小さな断片の集団に並び替える。第一ラウンドではDNAを、酵素の認識部位とは異なる部位で切断し未決定の配列の5'または3'張り出し部分を生じさせるII-S型制限酵素により消化する。相補的な張り出し部分を含有する二重らせんアダプターのみが被制限DNA末端と結合する能力があることになる。第二ラウンドではDNA断片を、認識部位の内部で切断し、既知の配列の5'または3'張り出し部分を生じさせる制限酵素により消化する。続いて、対応する配列の二重らせんアダプターをこれら末端に結合させる。この実施例においては第一ラウンドの消化に対しては、認識部位から9塩基を切断し4塩基の5'張り出し部分を生じさせるFokIをII-S型制限酵素として用いる。第二ラウンドの消化に対しては、対応する認識部位内で切断し、それぞれ3'および5'に4塩基の張り出し部分を生じさ

せるNlaIIIかDpnIIのいずれかを用いることができる。既知の配列の2つのyORFに消化/連結反応の2つのラウンドを受けさせ、各yORFから得られたただ一つのPCRアンプリコンが予想されたFAASTインデキシング付き断片に対応することを実証する。

一手順において、各々ユニークな酵母の読み取り枠(yORF)を含有する2つのPCR産物を、FAAST手順の第一段階を通して別個に処理した。この段階は、制限酵素による消化、続いて酵素による開裂により生成した4塩基の張り出し部分と、適合性のあるアダプターオリゴヌクレオチド複合体の連結反応との2つの一連のラウンドを含む。溶液中で行なわれる第一ラウンドにおいては、yORFをFokIにより消化し、制限末端を適合性のあるアダプター-インデクサー複合体と結合させた。固体表面で行なわれる第二ラウンドにおいては、断片をさらにNlaIIIかDpnIIのいずれかにより消化し、適合性のある第二アダプター複合体と結合させた。各yORF由来の2つの最終産物をPCRにより増幅した。これらFAASTインデキシング付きDNA断片のアイデンティティを制限地図分析により、また配列決定により決定した。

下記の結果を得た。消化/連結反応の第一ラウンドにおいては、yORFのYCR100CおよびYKL051W(これらはResearch Genetics, Inc. から入手)に対応するサイズがそれぞれ1.0kbpおよび1.1kbpのPCR産物を、FokIにより別々の反応で消化した。両PCR産物は、それぞれの配列のin silico制限分析から予想されるように4つの異なる制限断片を生成した。アダプター/インデクサー複合体を、その一つが5'末端にビオチン部分を含有するオリゴヌクレオチドの適切なペアをアニーリングすることにより作製した。これらアダプターは、各yORFの唯一の断片の5'の4塩基張り出し部分を補完するように設計された。T4DNA合成酵素を使用して、約20倍過剰のアダプター複合体を用いる標準条件下でアダプター/インデクサーをFokIで処理したDNAと結合させた。室温(約22℃)で30分間インキュベートした後、反応物はAffiniTipストレプトアビジンマイクロカラムを通過させた。アダプター/インデクサー複合体と結合したyORFのDNA断片のみが、ビオチンのストレプトアビジンとの結合によりマイクロカラ

ム中に留められた。

第二ラウンドの消化/連結反応においては、反応緩衝液100 μ lを用いてストレプトアビジン結合DNAを含有するAffiniTipマイクロカラムの母材を濡らすことにより下記のステップを行なった。YCR100CおよびYKL051W由来のDNAをそれぞれNlaIIIおよびDpnIIにより37℃で1時間消化した。次いでマイクロカラムを洗浄して酵素と、アダプター/インデクサーを含有しない全てのDNA断片を完全に除去した。T4DNA合成酵素を用いて、必要に応じてNlaIIIかDpnIIのいずれかの4塩基張り出し部分に適合する過剰のアダプターを使用して第二アダプター複合体をストレプトアビジン結合DNAと結合させた。室温(約22℃)で1時間連結反応を行ない、続いて母材を完全に洗浄して合成酵素および未反応のアダプターを除去した。

一重鎖アンプリコンを回収するために下記のステップを採用した。AffiniTipマイクロカラムの母材を0.1M NaOHに浸漬してストレプトアビジン結合DNAを変性した。このステップでは、アビジン部分を含有するDNA鎖は母材と結合したまま残り、一方相補鎖は溶液中に放出される。溶離分(40 μ l)を3M酢酸ナトリウム4 μ lで中和した。一重鎖DNA(ssDNA)を、キャリアーとしてグリコーゲン5 μ gを用いてエタノールに沈殿させ、TE緩衝液10 μ l中に再溶解した。溶出したssDNAは、標準の電気泳動分析におけるDNA結合染料を用いて検出することができなかった。各溶離剤1 μ lを、インデクサーおよび第二アダプター配列に相補的なプライマーのペアを含むPCR反応物50 μ l中に鋳型として加えた。YCR100CおよびYKL051Wから予想されたFAASTインデキシング付きアンプリコンは、それぞれ166bpおよび191bpである。予想されたサイズのDNAは、対応するPCR反応の産物中で識別できた。レーンより上に表示されたようにssDNAの希釈物で出発したPCR反応物から得られたサンプルを、1XTBEに溶かした4~20%ポリアクリルアミドゲル上に流した。基準を用いて表示されたPCR産物のサイズを決定した。プライマーのバンドおよび推定されるPCRの人為産物もまた同定された。予測されたFAASTアンプリコン内のユニーク配列を認識する制限酵素による消化は、これら産物を予想されるサイズの断片に開裂した。ssDN

Aの1:10の希釈物で出発したPCR反応物から得られたDNAを、表示された制限酵素で消化した。手のついていない制限断片に対応するバンドを同定した。YCR100C由来の166bpのアンプリコンを、HpaIIにより97および69bpの断片に開裂した。YKL051W由来の191bpのアンプリコンを、HinfIにより111および80bpの断片に開裂した。手のついていない産物をゲルから抽出し、更なるPCR増幅に使用した。この材料の配列決定により、それが予想されるFAASTアンプリコンの配列から構成されていることを確認した。PCRプライマーのアニーリング領域および4塩基制限部位を同定した。FokIの開裂および認識部位とその順序もまた同定された。PCR増幅に用いられたプライマーと同じペアを用いてDNA断片の両方の鎖の配列決定を行なった。

以上のことをまとめると、FAASTアダプターは、予想されたPCRアンプリコンの産生により実証されるように、2つのyORFから得られる特定の制限断片とうまく結合した。これらの結果は、次の雑種形成分析において用いられるゲノムDNAのFAASTインデキシング付けを例示している。

実施例2、FAASTのエラー修正

バクテリオファージのタンパク質T7エンドヌクレアーゼIは、とりわけヘテロ二本鎖DNAと結合し、鎖の1つから誤対合による1から2塩基の5'を切り取る。この特性は、T7エンドヌクレアーゼIをDNAの構造および突然変異分析の研究における重要なツールにした。この実施例において、この酵素が表面に結合したDNAの誤対合の除去に役立つことを示す。表面に結合した核酸のエラー修正については今まで実証されたことがなかった。誤対合の除去手順は、標的DNA鎖を集めて六量体のミクロアレイにする雑種形成の間にエラー修正することが望ましい。

プローブオリゴヌクレオチドのミクロアレイは、ポリエチレングリコールのスペーサー部分(PEG)を介してガラス製スライド(SurModics, Inc.)の表面に二重結合している。プローブオリゴヌクレオチドは、六量体のプローブ配列(B、A、D、またはE)、アダプター-インデクサー配列の23塩基(23化合物)、および発蛍光団(Cy5)から構成された。次いで47塩基

の標的オリゴヌクレオチドを標準条件下でアニーリングしてプローブ分子にした。標的配列は、アダプター - インデクサー配列に補的な23塩基(23化合物)、プローブオリゴヌクレオチドに非相補的な18塩基(N_{18})、および別の発蛍光団(Cy5)から構成される。プローブと標的オリゴヌクレオチドの間の雑種形成は、T7エンドヌクレアーゼIで処理する前にCy3の蛍光を測定することにより決定された。

雑種形成時にプローブと標的の分子は、標的オリゴヌクレオチドと相補的でない六量体プローブ領域の幾つかの位置を除いては連続二重鎖らせんを形成する。マイクロアレイをT7エンドヌクレアーゼIにより100mM NaClを補給した緩衝液No. 4(NEB)中で20分間、22℃で処理した。Cy5の蛍光を、T7エンドヌクレアーゼIで処理する前(Pre-T7)と後(Post-T7)でGeneral Scanning 3000(GSILumonics)を用いて測定した。Cy5シグナルの損失は、エンドヌクレアーゼで処理する前に検出したシグナル量の百分率として表わされる。複製マイクロアレイの点から得られる測定値は、塩基の誤対合を含有する複合体由来のCy5シグナルの著しく大きな損失を例示した。

まとめると、これらの結果はT7エンドヌクレアーゼIがDNAマイクロアレイから少なくとも2つの誤対合をもつ雑種を除去することができることを示している。

【図面の簡単な説明】

【図1】2種の例のアダプター - インデクサー(上部)の1つと共に使用するために企画されたライゲーター - ディテクター(番号付けされた四角)の例の列挙である。付着端配列(又は、それらの補体)は、太字で示される。

【図2】単一の例の核酸分子に焦点を向けられた開示される方法の例の間に使用され、そして形成される核酸分子の列挙である(パネルA)。制限酵素認識配列は下線が引かれ、そして付着端配列は太字で示される。パネルBは、FokIによる切断の後の核酸分子を示す。パネルCは、核酸フラグメント(左)、及び適合できるアダプター - インデクサーの例(左;これは図1からのアダプター - インデクサーIである)を示す。パネルDは、核酸フラグメント連結されるアダプ

ター - インデクサーを示す。パネルEは、アダプター / フラグメント (上部) の 1 つの鎖 (上方の鎖)、及び適合できるライゲーター - ディテクターの例 (底部 ; これは図 1 からのライゲーター - ディテクター 13 である) を示す。パネルFは、アダプター / フラグメント鎖にハイブリダイズされたライゲーター - ディテクターを示す。パネルGは、アダプター / フラグメント / ライゲーター (上部)、及びディテクターアレイ上に固体された適合できるヘキサマーディテクターアレイプローブ (底部) を示す。パネルHは、ライゲーター - ディテクター (両者ともアダプター / フラグメントにハイブリダイズされる) に連結されるディテクターアレイプローブを示す。パネルIは、ディテクターアレイ上に固定される、連結されたプローブ / ライゲーター - ディテクターを示す。

【図 3】単一の例の核酸分子に焦点を向けられた開示される方法の例の間に使用され、そして形成される核酸分子の列挙である (パネルA)。この例においては、核酸分子の低部鎖が使用される。制限酵素認識配列は下線が引かれ、そして付着端配列は太字で示される。パネルBは、F o k I による切断の後の核酸分子を示す。パネルCは、核酸フラグメント (左)、及び適合できるアダプター - インデクサーの例 (左 ; これは図 1 からのアダプター - インデクサー I である) を示す。パネルDは、核酸フラグメント連結されるアダプター - インデクサーを示す。パネルEは、アダプター / フラグメント (上部) の低部鎖 (上方の鎖)、及び適合できるライゲーター - ディテクターの例 (底部 ; これは図 1 からのライゲーター - ディテクター I である) を示す。パネルFは、アダプター / フラグメント鎖にハイブリダイズされたライゲーター - ディテクターを示す。パネルGは、アダプター / フラグメント / ライゲーター (上部)、及びディテクターアレイ上に固体された適合できるヘキサマーディテクターアレイプローブ (底部) を示す。パネルHは、ライゲーター - ディテクター (両者ともアダプター / フラグメントにハイブリダイズされる) に連結されるディテクターアレイプローブを示す。パネルIは、ディテクターアレイ上に固定される、連結されたプローブ / ライゲーター - ディテクターを示す。

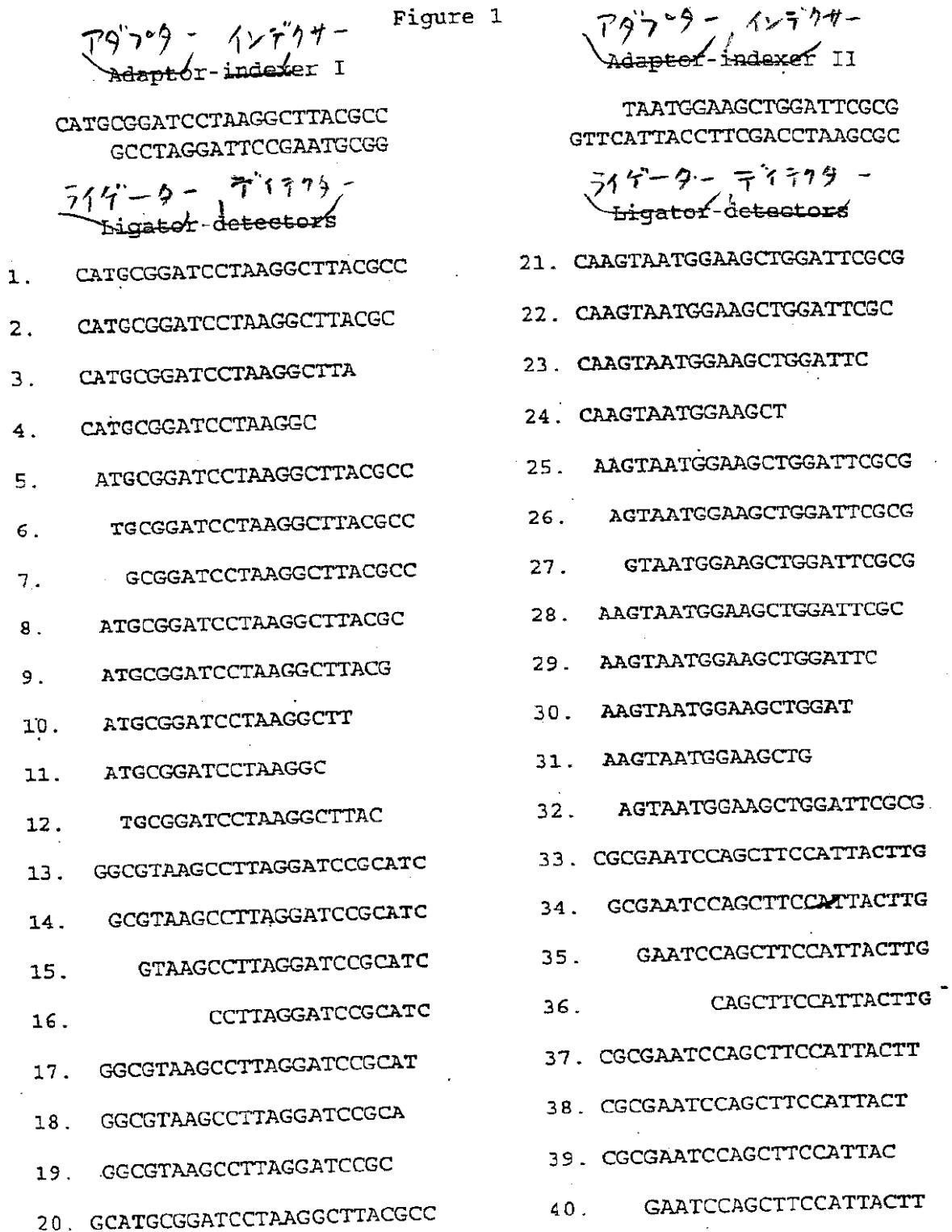
【図 4】単一の例の核酸分子に焦点を向けられた開示される方法の例の間に使用され、そして形成される核酸分子の列挙である (パネルA)。これは、図 2 にお

ける例と同じであるが、但し第2アダプターの付加が例示される。制限酵素認識配列は下線が引かれ、そして付着端配列は太字で示される。パネルDは、核酸フラグメント連結されるアダプター - インデクサーを示す。パネルD1は、*Sau*3AIによる切断の後の核酸分子を示す。パネルD2は、核酸フラグメント（右）及び適合できる第2アダプターの例（左）を示す。パネルD3は、核酸フラグメントに連結される第2アダプター（アダプター - インデクサーはフラグメントの他端に連結される）を示す。パネルFは、アダプター / フラグメント鎖にハイブリダイズされたライゲーター - ディテクターを示す。パネルHは、ライゲーター - ディテクター（両者ともアダプター / フラグメントにハイブリダイズされる）に連結されるディテクターアレイプローブを示す。パネルIは、ディテクターアレイ上に固定される、連結されたプローブ / ライゲーター - ディテクターを示す。

【図5】単一の例の核酸分子に焦点を向けられた開示される方法の例の間に使用され、そして形成される核酸分子の列挙である（パネルA）。これは、図2における例と同じであるが、但し捕捉タグの付加が例示される。制限酵素認識配列は下線が引かれ、そして付着端配列は太字で示される。パネルBは、*Fok*Iによる切断の後の核酸分子を示す。パネルCは、核酸フラグメント（左）、及び適合できるアダプター - インデクサーの例（左；これは図1からのアダプター - インデクサーIである）を示す。前記アダプター - インデクサーは、捕捉タグ（標識）を包含する。パネルDは、核酸フラグメント連結されるアダプター - インデクサーを示す。パネルEは、アダプター / フラグメント（上部）の1つの鎖（上方の鎖）、及び適合できるライゲーター - ディテクターの例（底部；これは図1からのライゲーター - ディテクター13である）を示す。鎖の分離は、捕捉タグにより促進され得る。パネルFは、アダプター / フラグメント鎖にハイブリダイズされたライゲーター - ディテクターを示す。パネルGは、アダプター / フラグメント / ライゲーター（上部）、及びディテクターアレイ上に固定された適合できるヘキサマーディテクターアレイプローブ（底部）を示す。パネルHは、ライゲーター - ディテクター（両者ともアダプター / フラグメントにハイブリダイズされる）に連結されるディテクターアレイプローブを示す。パネルIは、ディテク

ターアレイ上に固定される、連結されたプローブ/ライゲーター - ディテクターを示す。

【図1】



【図2】

Figure 2

- A ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGACAACCAGCCATTCACGGGC...
...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCTGTTGGTCGGTAAGTGCCCG...
- B ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGT ATGGACAACCAGCCATTCACGGGC...
...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACC TGTGGTCGGTAAGTGCCCG...
- C ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGT ATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACC GCCTAGGATTCCGAATGCGG
- D ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCTAGGATTCCGAATGCGG
- E ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
TACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG-label
- F ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
TACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG-label
- G ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
TACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG-label
- support
支持体
TTAGCA
- H ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
TTAGCATACCGCTAGGATTCCGAATGCGG-label
- support
支持体
- I TTAGCATACCGCTAGGATTCCGAATGCGG-label
support

【図3】

Figure 3

A ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGACAACCAGCCATTACGGGC...
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCTGTGGTCGGTAAGTGCCCG...

B ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGT ATGGACAACCAGCCATTACGGGC...
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACC TGTGGTCGGTAAGTGCCCG...

C ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGT ATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACC GCCTAGGATTCCGAATGCGG

D ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG

E ATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-label
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG

F ATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-label
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG

G support
 支持件 AATCGT
 ATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-label
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG

H support
 支持件 AATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-label
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG

I support
 支持件 AATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-label

Figure 4

【図4】

A ...TCCCTGATCAGAATC...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGACAACACGAGCCATTACGGG...
 ...AGGACTAGTCTTAG...TATACGAAATCCGCCTACGATTAGCATACCTGTTGGTCGTAAGTGCCC...

D ...TCCCTGATCAGAATC...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 ...AGGACTAGTCTTAG...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCGGAATGCGG

D1 ...TCCCT GATCAGAATC...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 ...AGGACTAG TCTTAG...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCGGAATGCGG

D2 GCAACTTCAAAGCCTTTAGC GATCAGAATC...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 CGTTGAAGTTTCGGAAATCGCTAG TCTTAG...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCGGAATGCGG

D3 GCAACTTCAAAGCCTTTAGCGGATCAGAATC...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 CGTTGAAGTTTCGGAAATCGCTAGTCTTAG...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCGGAATGCGG

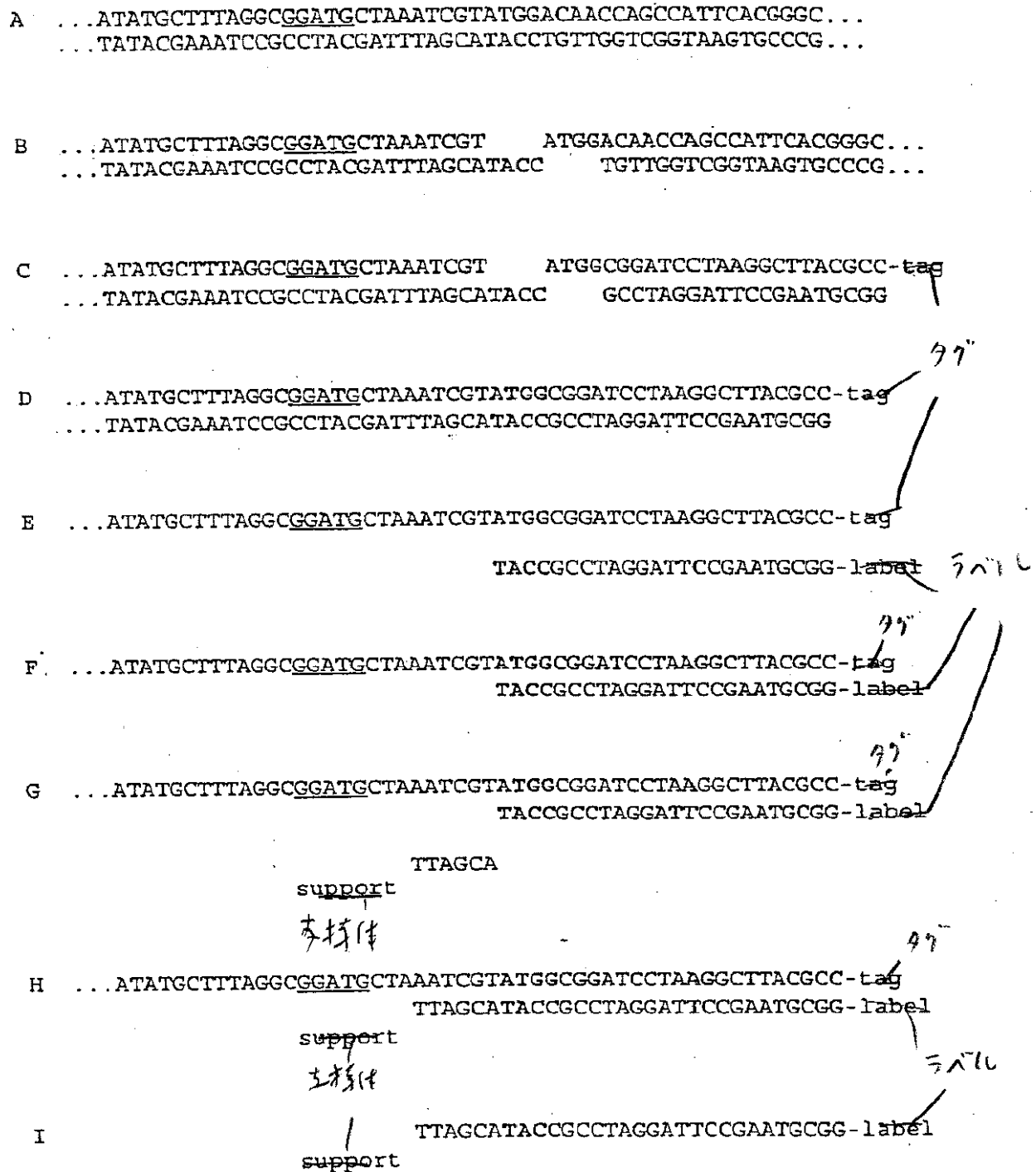
F GCAACTTCAAAGCCTTTAGCGGATCAGAATC...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 TACCGCCTAGGATTCGGAATGCGG-label 7211

H GCAACTTCAAAGCCTTTAGCGGATCAGAATC...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 TTAGCATACCGCCTAGGATTCGGAATGCGG-label
 support 7211
 支持体
 support
 TTAGCATACCGCCTAGGATTCGGAATGCGG-label

I

【図5】

Figure 5



【手続補正書】

【提出日】平成13年10月18日(2001.10.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の名称】 配列標識の固定されたアドレス分析

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸サンプル中の核酸フラグメントを同定するための方法であって、

(a) 複数の異なる配列を有する付着端を集合的に生成する1又は複数の核酸開裂試薬と共に核酸サンプルをインキュベートして、付着端を有する核酸フラグメントを生成し、

(b) 複数のアダプター - インデクサーを前記核酸サンプルとを混合し、そして核酸フラグメントに前記アダプター - インデクサーを共有結合させ、ここで個々のアダプター - インデクサーは異なる付着端を有し、前記アダプター - インデクサーの個々の付着端は前記核酸開裂試薬により生成される付着端と適合でき、

(c) 前記核酸サンプルに複数のライゲーター - ディテクターをハイブリダイズさせ、ここで個々のライゲーター - ディテクターは、少なくとも1のアダプター - インデクサーの付着端を包含し、そしてそれに隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又は相補的な配列を含み、

(d) 前記核酸サンプルに複数のディテクタープローブをハイブリダイズさせ、そして前記ライゲーター - ディテクターを前記ディテクタープローブに共有結合させ、ここで個々のディテクタープローブは異なる配列を有し、そして

(e) 前記ディテクタープローブへのライゲーター - ディテクターの結合を、直接的に又は間接的に検出することを含む方法。

【請求項2】 個々のアダプター - インデクサーが付着端部分及び検出部分

分を含んで成り、ここで個々のアダプター - インデクサーのディテクターの部分が別々に検出でき、そして前記アダプター - インデクサーのディテクター部分を、直接的に又は間接的に検出することをさらに含んで成る請求項1記載の方法。

【請求項3】 各々のライゲーター - ディテクターがディテクター部分を含んで成り、ここで個々のライゲーター - ディテクターのディテクター部分はアダプター - インデクサーの1つのディテクター部分に対応し、ライゲーター - ディテクターの検出部分の検出がその対応するアダプター - インデクサーのディテクター部分の間接的な検出である請求項2記載の方法。

【請求項4】 アダプター - インデクサーの検出部分の検出が、その対応するライゲーター - ディテクターのディテクター部分の間接的な検出である請求項2記載の方法。

【請求項5】 少なくとも1つのアダプター - インデクサーの検出部分がラベルである請求項2記載の方法。

【請求項6】 前記アダプター - インデクサーが連結により核酸フラグメントに共有結合され、そして前記ライゲーター - ディテクターが連結によりディテクタープローブに共有結合される請求項1記載の方法。

【請求項7】 段階(b)の前、サンプルを複数のインデックスサンプルに分けることをさらに含んで成り、ここで異なったライゲーター - ディテクターが個々のインデックスサンプルによりハイブリダイズされ、個々のインデックスサンプルにおけるライゲーター - ディテクターが、インデックスサンプル中のアダプター - インデクサーの付着端を包含し、そしてそれに隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又は相補的な配列を含んで成る請求項1記載の方法。

【請求項8】 前記ライゲーター - ディテクターが、アダプター - インデクサーの付着端のすべて又は一部に、及びインデックスサンプルに使用されるアダプター - インデクサーの隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又は相補的な配列を含んで成る請求項6記載の方法。

【請求項9】 段階(b)に続いて、前記核酸フラグメントの鎖を分離し、そして前記鎖の1本のみを用いて、段階(c)を進行せしめることをさらに含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項10】 前記鎖が、前記鎖の1つに会合される捕捉タグを用いて分離される請求項9記載の方法。

【請求項11】 前記捕捉タグがアダプター - インデクサーに会合される請求項10記載の方法。

【請求項12】 前記インデックスサンプルにおける種々の核酸フラグメントの濃度が標準化される請求項9記載の方法。

【請求項13】 前記核酸フラグメントの鎖が分離され、そして前記核酸フラグメントの濃度が、前記核酸フラグメントの1つの鎖を固定し、前記核酸フラグメントを変性し、豊富な核酸フラグメントについての $C_0t_{1/2}$ よりも長く、且つ希核酸フラグメントについての $C_0t_{1/2}$ よりも短い時間、前記核酸フラグメントを再生し、そして前記再生されなかった核酸フラグメントを集めることによって標準化される請求項12記載の方法。

【請求項14】 前記ライゲーター - ディテクターの連結が、ライゲーター - ディテクターにより開始される、増幅標的サークルのローリングサークル複製によって検出される請求項8記載の方法。

【請求項15】 前記核酸開裂試薬がN個の異なった配列を有する付着端を生成し、そして前記サンプルがN個のインデックスサンプルに分けられる請求項8記載の方法。

【請求項16】 前記ディテクタープローブが、すべて同じ長さのものである請求項8記載の方法。

【請求項17】 前記ディテクタープローブが、6, 7又は8個の長さのヌクレオチドである請求項16記載の方法。

【請求項18】 前記ディテクタープローブが、すべて類似するハイブリッド安定性を有する請求項8記載の方法。

【請求項19】 前記核酸開裂試薬が制限酵素である請求項8記載の方法。

【請求項20】 前記核酸サンプルが1つの制限酵素により消化され、ここで前記制限酵素が複数の異なった配列を有する付着端を生成する請求項19記載の方法。

【請求項21】 前記制限酵素が、その認識配列とは異なる部位で開裂する

タイプII - S制限酵素である請求項20記載の方法。

【請求項22】 個々のライゲーター - ディテクターが、前記アダプター - インデクサーの付着端を包含し、そして隣接する配列のすべて又は一部に適合する配列を含んで成る請求項6記載の方法。

【請求項23】 個々のライゲーター - ディテクターが、前記アダプター - インデクサーの付着端を包含し、そして隣接する配列のすべて又は一部に相補的な配列を含んで成る請求項6記載の方法。

【請求項24】 少なくとも1つのライゲーター - ディテクターが、前記アダプター - インデクサーの付着端を包含し、そして隣接する配列のすべて又は一部に適合する配列を含んで成り、そして少なくとも1つのライゲーター - ディテクターが、前記アダプター - インデクサーの付着端を包含し、そして隣接する配列のすべて又は一部に相補的な配列を含んで成る請求項6記載の方法。

【請求項25】 前記核酸サンプルにおける種々の核酸フラグメントの濃度が標準化される請求項6記載の方法。

【請求項26】 前記核酸フラグメントの濃度が、前記核酸フラグメントの1つの鎖を固定し、前記核酸フラグメントを変性し、豊富な核酸フラグメントについての $C_0t_{1/2}$ よりも長く、且つ希核酸フラグメントについての $C_0t_{1/2}$ よりも短い時間、前記核酸フラグメントを再生し、そして前記再生されなかった核酸フラグメントを集めることによって標準化される請求項25記載の方法。

【請求項27】 個々のアダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、支持体上に固定される請求項8記載の方法。

【請求項28】 前記ディテクタープローブが、支持体上に固定される請求項27記載の方法。

【請求項29】 アダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブのすべてが、同じ支持体上に固定される請求項27記載の方法。

【請求項30】 アダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブのすべてが、異なった支持体上に固定される請求項27

記載の方法。

【請求項31】 前記支持体がビーズである請求項30記載の方法。

【請求項32】 前記アダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、少なくとも1つのアダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが支持体上に固定され、そして少なくとも1つの他のアダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブがそれぞれ、異なった支持体上に固定されるように、複数の異なった支持体上に固定される請求項27記載の方法。

【請求項33】 前記アダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、アレイにおいて存在する請求項27記載の方法。

【請求項34】 前記ディテクタープローブが、アレイにおいて存在する請求項33記載の方法。

【請求項35】 個々のアダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、捕捉タグ、ソーティングタグ又は両者に会合される請求項8記載の方法。

【請求項36】 前記ライゲーター - ディテクターが、捕捉タグ又はソーティングタグに会合される請求項35記載の方法。

【請求項37】 前記アダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、前記捕捉タグを通して捕獲される請求項35記載の方法。

【請求項38】 前記アダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、前記ソーティングタグを通して分類される請求項35記載の方法。

【請求項39】 前記ライゲーター - ディテクターがソーティングタグに会合され、そして前記アダプター - インデクサーが捕捉タグに会合される請求項35記載の方法。

【請求項40】 前記ライゲーター - ディテクターが捕捉タグに会合され、そして前記アダプター - インデクサーがソーティングタグに会合される請求項35

記載の方法。

【請求項41】 前記ディテクタープローブソーティングタグに会合され、そして前記アダプター - インデクサーが捕捉タグに会合される請求項35記載の方法。

【請求項42】 前記アダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、複数の異なった捕捉タグ又は複数の異なったソーティングタグに会合される請求項35記載の方法。

【請求項43】 前記核酸サンプルにおける少なくとも1つの核酸フラグメントの一部の配列を決定することをさらに含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項44】 前記核酸開裂試薬が制限酵素であり、
前記核酸サンプルが1つの制限酵素により消化され、前記制限酵素が複数の異なった配列を有する付着端を生成し、

前記制限酵素がその認識配列とは異なる部位で開裂するタイプII - S制限酵素であり、そして

前記核酸フラグメントの一部が、前記付着端配列、ディテクタープローブがハイブリダイズする付着端配列に隣接する配列、及び前記制限酵素の認識配列に対応する請求項43記載の方法。

【請求項45】 前記一部が、前記付着端に隣接する配列と前記制限酵素の認識配列との間の、既知の長さであるが、しかし未知の配列のギャップを包含する請求項44記載の方法。

【請求項46】 前記一部が、下記構造式：

A - B - C - D

[式中、Aは制限酵素の認識配列であり、Bは未知の配列のギャップであり、Cは、ディテクタープローブがハイブリダイズした配列であり、そしてDは付着端配列である] を有する請求項45記載の方法。

【請求項47】 前記核酸フラグメントの一部の決定された配列に基づくプローブ又はプライマーを用いて、核酸サンプルにおける核酸フラグメントに対する核酸を検出し、又は増幅することをさらに含んで成る請求項44記載の方法。

【請求項48】 前記ディテクタープローブがアレイに存在し、個々のディ

テクタープローブがアレイにおける異なった位置で固定され、そしてディテクタープローブへのライゲーター - ディテクターの連結の検出がアレイにおける異なった位置でのライゲーター - ディテクターの存在を検出することによって達成される請求項8記載の方法。

【請求項49】 前記アレイにおけるライゲーター - ディテクターの位置、量、又は位置及び量が、前記アレイにおけるライゲーター - ディテクターのパターンを構成し、

前記アレイにおけるライゲーター - ディテクターのパターンと、第2核酸サンプルを用いて別の方法により決定された、アレイにおけるライゲーター - ディテクターのパターンとを比較することをさらに含んで成る請求項48記載の方法。

【請求項50】 前記アレイにおけるライゲーター - ディテクターのパターンと、複数の異なった核酸サンプルを用いて、複数の別の方法により決定された、アレイにおけるライゲーター - ディテクターのパターンとを比較することをさらに含んで成る請求項49記載の方法。

【請求項51】 段階(b)に続いて、

前記インデックスサンプルを、1又は複数の第2核酸開裂試薬と共にインキュベートし、そして

第2アダプターを、個々のインデックスサンプルと共に混合し、そして前記第2アダプターを前記核酸フラグメントに連結することをさらに含んで成り、ここで個々の前記アダプターの前記第2核酸開裂試薬の1つにより生成される末端と適合できる末端を有する請求項8記載の方法。

【請求項52】 段階(c)の前、

個々のインデックスサンプルを、1又は複数の制限されたインデックスサンプル及び制限されていないインデックスサンプルに分け、

個々の制限されたインデックスサンプルを、異なった第3核酸開裂試薬と共にインキュベートすることをさらに含んで成り、

ここで段階(c)、(d)及び(e)が、制限された及び制限されていない両インデックスサンプルにより行われる請求項51記載の方法。

【請求項53】 前記第2核酸開裂試薬と共にインキュベーションする前、

個々のインデックスサンプルを、複数組の二次インデックスサンプルに分け、
ここで個々の組のインデックスサンプルにおける個々の第2インデックスサンプルが1又は複数の異なった組の第2核酸開裂試薬と共にインキュベートされる請求項51記載の方法。

【請求項54】 段階(c)、(d)及び(e)が個々の第2インデックスサンプルにより行われる請求項53記載の方法。

【請求項55】 段階(c)の前、
個々の第2インデックスサンプルを、1又は複数の制限されたインデックスサンプル及び制限されていないインデックスサンプルに分け、
個々の制限されたインデックスサンプルを、異なった第3核酸開裂試薬と共にインキュベートすることをさらに含んで成り、
ここで段階(c)、(d)及び(e)が制限された及び制限されていない両インデックスサンプルにより行われる請求項53記載の方法。

【請求項56】 前記第1、第2、及び第3核酸開裂試薬が制限酵素である請求項55記載の方法。

【請求項57】 前記第2核酸開裂試薬と共にインキュベーションした後、
個々のインデックスサンプルを、複数組の第2インデックスサンプルに分けることをさらに含んで成る請求項51記載の方法。

【請求項58】 段階(c)、(d)及び(e)が個々の第2インデックスサンプルにより行われる請求項57記載の方法。

【請求項59】 前記第1及び第2核酸開裂試薬が制限酵素である請求項51記載の方法。

【請求項60】 前記核酸フラグメントへの第2アダプターの連結に続いて、
アダプター-インデクサー及び第2アダプターが連結されているインデックスサンプルにおける核酸フラグメントを増幅することをさらに含んで成る請求項51記載の方法。

【請求項61】 前記核酸フラグメントが、PCRにより増幅される請求項60記載の方法。

【請求項62】 PCRのために使用されるプライマーが、前記アダプター - インデクサー及び第2アダプターにおける配列に相補的である請求項61記載の方法。

【請求項63】 段階(b)の前、核酸サンプルを複数のインデックスサンプルに分けることをさらに含んでなり、

ここで1よりも多くの核酸開裂試薬が段階(a)において使用され、個々のインデックスサンプルが異なった1つの核酸開裂試薬と共にインキュベートされ、

ここで異なったライゲーター - ディテクターが個々のインデックスサンプルによりハイブリダイズされ、個々のインデックスサンプルにおけるライゲーター - ディテクターが、インデックスサンプルにおけるアダプター - インデクサーの付着端を包含し、そしてそれに隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又は相補的な配列を含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項64】 段階(b)続いて、

アダプター - インデクサーが連結されているインデックスサンプルにおける核酸フラグメントを増幅することをさらに含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項65】 増幅に続いて、

前記増幅された核酸フラグメントの鎖を分離し、そして前記鎖の1本のみを用いて、段階(c)を進行せしめることをさらに含んで成る請求項64記載の方法。

【請求項66】 前記鎖が、前記鎖の1つに組み込まれる捕捉タグを用いて分離される請求項65記載の方法。

【請求項67】 前記捕捉タグが、核酸フラグメントの増幅のために使用されるプライマーにより会合される請求項66記載の方法。

【請求項68】 前記核酸フラグメントが、PCRにより増幅される請求項64記載の方法。

【請求項69】 段階(b)及び(d)における連結に続いて、塩基ミスマッチを破壊するか又は変更する試薬と共に前記インデックスサンプルをインキュベートすることをさらに含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項70】 前記塩基ミスマッチ試薬が、(1)T4エンドヌクレアーゼVII、(2)MutH, MutL及びMutS、(3)T7エンドヌクレアーゼI、(4)MutY、

(5) グリコシラーゼ又は(6) トポイソメラーゼIである請求項69記載の方法

。

【請求項71】 段階(b)及び(d)における連結の前、
前記インデックスサンプルを、塩基ミスマッチに結合する試薬とともに混合することをさらに含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項72】 前記塩基ミスマッチ試薬が、(1) Mec1、(2) MutS、(3) MSH2 - MSH6、(4) MLH1 - PMS1、又は(5) MSH2 - MSH3である請求項71記載の方法。

【請求項73】 個々のアダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブがラベルを含み、そしてディテクタープローブへのライゲーター - ディテクターの連結がラベルにより検出される請求項8記載の方法。

【請求項74】 個々のライゲーター - ディテクターがラベルを含み、
ここで前記ディテクタープローブへのライゲーター - ディテクターの連結の検出が、連結されなかったライゲーター - ディテクターから連結されたライゲーター - ディテクターを分離し、そして前記ライゲーター - ディテクターのラベルを検出することによって達成される請求項73記載の方法。

【請求項75】 個々の異なったライゲーター - ディテクターが異なったラベルを含み、個々のディテクタープローブが捕捉タグ又はソーティングタグにより会合され、結合されなかったライゲーター - ディテクターからの連結されたライゲーター - ディテクターの分離が、捕捉タグ又は分類することによって達成され、ここで前記連結されたライゲーター - ディテクターがディテクタープローブと分離する請求項74記載の方法。

【請求項76】 前記ソーティングタグが蛍光ラベルであり、そして連結されなかったライゲーター - ディテクターからのディテクタープローブの分離が蛍光ラベルソーターを用いて達成される請求項75記載の方法。

【請求項77】 前記ラベルが蛍光、リン光又は化学ルミネセンスラベルである請求項73記載の方法。

【請求項78】 前記ラベルの少なくとも2種が、異なった蛍光、リン光又

は化学ルミネセンス発光寿命を通して一時的に区別される請求項77記載の方法。

【請求項79】 前記ラベルが、核磁気共鳴、電子常磁性共鳴、表面増強されたラマン散乱、表面プラスモン共鳴、蛍光、リン光、化学ルミネセンス、共鳴ラマン、マイクロ波、又はそれらの組み合わせにより検出される請求項73記載の方法。

【請求項80】 前記ラベルが、核磁気共鳴、電子常磁性共鳴、表面増強されたラマン散乱、表面プラスモン共鳴、蛍光、リン光、化学ルミネセンス、共鳴ラマン、マイクロ波、又はそれらの組み合わせを用いて検出される請求項79記載の方法。

【請求項81】 前記ラベルが、ラベルを含んで成るビーズである請求項73記載の方法。

【請求項82】 前記ラベルが、分子バーコードである請求項81記載の方法。

【請求項83】 前記ラベルが、質量ラベルである請求項73記載の方法。

【請求項84】 対照の核酸サンプルに対して段階(a)～(e)を行い、異なったディテクタープローブに連結されるライゲーター-ディテクターのパターンの、核酸サンプルと対照の核酸サンプルとの間の差異を同定することをさらに含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項85】 前記対照の核酸サンプルと共に使用されるライゲーター-ディテクターが、核酸サンプルと共に使用されるライゲーター-ディテクターのラベルとは異なったラベルを含み、

ここで前記対照のインデックスサンプルが、段階(d)の前、対応するインデックスサンプルと共に混合される請求項84記載の方法。

【請求項86】 複数の核酸サンプルに対して段階(a)～(e)を行うことをさらに含んで成る請求項8記載の方法。

【請求項87】 対照の核酸サンプルに対して段階(a)～(e)を行い、異なったディテクタープローブに連結されるライゲーター-ディテクターのパターンの、核酸サンプルと対照の核酸サンプルとの間の差異を同定することをさらに含んで成る請求項86記載の方法。

【請求項88】 異なったディテクタープローブに連結されるライゲーター - ディテクターのパターンの核酸サンプル間での差異を同定することをさらに含んで成る請求項86記載の方法。

【請求項89】 異なったディテクタープローブに連結されるライゲーター - ディテクターの存在、量、存在及び量、又は不在のパターンが、核酸サンプルにおける核酸フラグメントのカatalogを構成する請求項8記載の方法。

【請求項90】 第2核酸サンプルにおける核酸フラグメントの第2カatalogを調製し、そして前記第1カatalog及び第2カatalogを比較することをさらに含んで成る請求項89記載の方法。

【請求項91】 前記第1核酸サンプルに限界量で存在するが、しかし前記第2核酸サンプルには限界量で存在しない核酸フラグメントに対応する核酸フラグメントを同定し又は調製することをさらに含んで成る請求項91記載の方法。

【請求項92】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルと同じタイプの生物からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項93】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルと同じタイプの組織からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項94】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルと同じ生物からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項95】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルよりも異なった時間で得られる請求項94記載の方法。

【請求項96】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルよりも異なった生物からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項97】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルよりも異なったタイプの生物からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項98】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルよりも異なった種の生物からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項99】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルよりも異なった株の生物からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項100】 前記第2核酸サンプルが、前記第1核酸サンプルよりも

異なった細胞区画からのサンプルである請求項90記載の方法。

【請求項101】 前記第1核酸サンプルに存在するが、しかし前記第2核酸サンプルには存在しない核酸フラグメントに対応する核酸フラグメントを同定し又は調製することをさらに含んで成る請求項90記載の方法。

【請求項102】 前記核酸フラグメントをプローブとして使用することをさらに含んで成る請求項101記載の方法。

【請求項103】 プローブとしての核酸フラグメントの使用が、異なった核酸サンプルにより段階(a)~(e)を反復することによって達成され、ここで前記核酸フラグメントが段階(d)及び(e)においてディテクタープローブとして使用される請求項102記載の方法。

【請求項104】 異なったディテクタープローブに連結されるライゲーター-ディテクターの量のパターンが、核酸サンプルにおける核酸フラグメントのカタログを構成し、

ここで前記パターンが、ディテクタープローブにハイブリダイズされる配列の塩基ミスマッチの確立に基づいて、予測されるパターンに比較される請求項8記載の方法。

【請求項105】 個々のアダプター-インデクサーが、一本鎖部分及び二本鎖部分を含んで成る核酸を含んで成り、ここで前記一本鎖部分が付着端であり、そして前記二本鎖部分が個々のアダプター-インデクサーにおける同じ配列を有する請求項8記載の方法。

【請求項106】 前記ディテクタープローブへのライゲーター-ディテクターの連結の検出が、アダプター-インデクサー、連結されたライゲーター-ディテクター、アダプター-インデクサーにより会合される質量ラベル、連結されたライゲーター-ディテクターにより会合される質量ラベル、又はそれらの組み合わせを、質量分光計により検出することによって達成される請求項8記載の方法。

【請求項107】 前記アダプター-インデクサー、連結されたライゲーター-ディテクター、アダプター-インデクサーにより会合される質量ラベル及び連結されたライゲーター-ディテクターにより会合される質量ラベルが、マトリ

ックス - 助力のレーザー脱着/イオン化時間経過質量分光計により検出される請求項106記載の方法。

【請求項108】 前記アダプター - インデクサー、連結されたライゲーター - ディテクター、アダプター - インデクサーにより会合される質量ラベル及び連結されたライゲーター - ディテクターにより会合される質量ラベルの組成が、フラグメント化パターンを分析することによって決定される請求項106記載の方法。

【請求項109】 結合されなかったライゲーター - ディテクターが、連結されたアダプター - インデクサーの検出前、ディテクタープローブから洗浄される請求項106記載の方法。

【請求項110】 段階(b)に続いて、インデックスサンプルを、1又は複数の第2核酸開裂試薬と共にインキュベートすることをさらに含んで成る請求項106記載の方法。

【請求項111】 前記アダプター - インデクサー、ディテクタープローブ又は両者が、光分解性ヌクレオチドを含み、ここでディテクタープローブへのライゲーター - ディテクターの連結に続いて、

前記光分解性ヌクレオチドの光分解、及び

質量分光計による、連結されたライゲーター - ディテクターの1又は両鎖の検出をさらに含んで成る請求項106記載の方法。

【請求項112】 前記ディテクタープローブへのライゲーター - ディテクターの連結に続いて、

1又は複数の核酸開裂試薬と共に、前記連結されたライゲーター - ディテクター及びディテクタープローブのインキュベーション、及び

質量分光計による前記連結されたライゲーター - ディテクターの1又は両鎖の検出をさらに含んで成る請求項106記載の方法。

【請求項113】 段階(b)に続いて、

前記インデックスサンプルを、1又は複数の第2核酸開裂試薬と共にインキュベートし、そして

第2アダプターを、個々のインデックスサンプルと共に混合し、そして前記第

2 アダプターを前記核酸フラグメントに連結することをさらに含んで成り、ここで個々の前記アダプターの前記第2核酸開裂試薬の1つにより生成される末端と適合できる末端を有し、

ここで前記第2核酸開裂試薬の少なくとも1つが、その認識部位の修飾に対して敏感である請求項8記載の方法。

【請求項114】 前記第1及び第2核酸開裂試薬が制限酵素である請求項113記載の方法。

【請求項115】 前記認識部位の修飾が、メチル化、アルキル化、二量体化、誘導体化、脱プリン化又はADP - リボシル化である請求項114記載の方法。

【請求項116】 前記修飾が、単離される場合、核酸フラグメントに存在し、又は単離の後、核酸フラグメントに導入される請求項114記載の方法。

【請求項117】 段階(c)の前、
個々のインデックスサンプルを、1又は複数の制限されたインデックスサンプル及び制限されなかったインデックスサンプルに分け、

異なった第3制限酵素により個々の制限されたインデックスサンプルを消化することをさらに含んで成り、

ここで段階(c)、(d)及び(e)が制限された及び制限されていない両インデックスサンプルにより行われる請求項114記載の方法。

【請求項118】 前記核酸フラグメントへの第2アダプターの連結に続いて、

アダプター - インデクサー及び第2アダプターが連結されているインデックスサンプルにおける核酸フラグメントを増幅することをさらに含んで成る請求項114記載の方法。

【請求項119】 前記核酸サンプルにおける核酸フラグメントの少なくとも1つの一部の配列を決定することをさらに含んで成る請求項118記載の方法。

【請求項120】 前記核酸フラグメントへの第2アダプターの連続に続いて、

第2アダプターに連結されない核酸フラグメントから、第2アダプターに連結される核酸フラグメントを分離することをさらに含んで成り、ここで第アダプタ

ーに連結される核酸フラグメントのみが段階（c）に使用される請求項114記載の方法。

【請求項121】 前記第2制限酵素の少なくとも1つが、（1）その認識部位の修飾に対して敏感であり、そして（2）その認識部位の修飾に対して敏感である第2制限酵素と同じ認識部位を有し、

前記第2制限酵素による消化の前、

個々のインデックスサンプルを、複数組の第2インデックスサンプルに分け、ここで、個々の組の第2インデックスサンプルにおける個々の第2牽引サンプルが、異なった第2制限酵素により消化され、

ここで段階（c）～（e）が前記個々の第2インデックスサンプルに行われる請求項114記載の方法。

【請求項122】 その認識部位の修飾に対して敏感である第2制限酵素を包含する異なったディテクタープローブに連結されるライゲーター - ディテクターの存在又は不在のパターンと、その認識部位の修飾に対して鈍感であり、そしてその認識部位の修飾に対して敏感である第2制限酵素と同じ認識部位を有する第2制限酵素を包含する異なったディテクタープローブに連結されるライゲーター - ディテクターの存在又は不在のパターンとを比較することをさらに含んで成り、

ここで前記パターンの差異が核酸サンプルにおける核酸の修飾を示す請求項121記載の方法。

【請求項123】 異なったディテクタープローブに連結されるライゲーター - ディテクターの存在、量、存在及び量、又は不在のパターンが、核酸サンプルにおける核酸フラグメントのカタログを構成する請求項114記載の方法。

【請求項124】 第2核酸サンプルにおける核酸フラグメントの第2カタログを調製し、そして前記第1カタログ及び第2カタログを比較することをさらに含んで成り、ここで前記第1及び第2カタログにおける差異が、前記第1及び第2核酸サンプルの修飾の差異を示す請求項123記載の方法。

【請求項125】 前記第2核酸サンプルが第1核酸サンプルと同じ細胞型からのサンプルであり、但し、第1核酸サンプルが由来する細胞は、第2核酸サ

ンプルが由来する細胞に比較して、修飾欠失性である請求項123記載の方法。

【請求項126】 前記第2核酸サンプルが第1核酸サンプルとは異なる細胞型からのサンプルであり、そして第1核酸サンプルが由来する細胞が、第2核酸サンプルが由来する細胞に比較して、修飾欠失性である請求項123記載の方法。

【請求項127】 前記核酸開裂試薬が制限酵素であり、ここで前記制限酵素はそれらの認識配列とは異なる部位で開裂するタイプII-S制限酵素であり、
段階(a)の前、

核酸サンプルにおける1又は複数の核酸分子に興味ある領域に隣接する制限酵素のための認識部位を導入し、

ここで前記ライゲーター-ディテクターが制限酵素のための認識部位の配列及びそれに隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又は相補的である配列を含んで成る請求項6記載の方法。

【請求項128】 前記認識部位が、前記認識配列を含むプライマーを用いて核酸分子を増幅することによって導入される請求項128記載の方法。

【請求項129】 前記核酸分子がPCRを用いて増幅される請求項128記載の方法。

【請求項130】 前記ディテクタープローブが、興味ある領域における既知の又は可能性ある配列に適合するか又は相補的な配列を包含する請求項127記載の方法。

【請求項131】 前記興味ある領域に複数の既知の又は可能性ある配列が存在し、ここで前記ディテクタープローブ組が、それぞれ既知の又は可能性ある配列に適合し、又は相補的な配列を包含する請求項130記載の方法。

【請求項132】 前記核酸サンプルにおける核酸分子が免疫グロブリン又はT細胞受容体核酸分子であり、ここで前記核酸分子は可変領域、N領域及び連結領域を有し、

ここで前記制限酵素のための認識部位が、前記核酸分子のN領域に隣接する核酸分子の可変領域中に導入され、

ここで前記ライゲーター-ディテクターは、制限酵素のための認識部位の配列

のすべて又は一部、又はN領域までではあるが、しかしその領域を包含しない、制限酵素のための認識部位に隣接する可変領域配列の配列のすべて又は一部に適合するか又はそれに対して相補的な配列を含んでなり、

ここで複数の既知の又は可能性ある配列は、核酸分子のN領域に隣接する核酸分子の連結領域の配列のすべて又は一部に適合するか又はそれに対して相補的な配列である請求項131記載の方法。

【請求項133】 1組のアダプター - インデクサー、ここで個々のアダプター - インデクサーは異なった付着端を有し、前記アダプター - インデクサーの個々の付着端は、複数の異なった配列を有する付着端を集合的に生成する1又は複数の核酸開裂試薬により生成される付着端と適合でき；

1組のライゲーター - ディテクター、ここで個々のライゲーター - ディテクターは、異なったアダプター - インデクサーの付着端のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサーの隣接する配列のすべて又は一部と適合するか又はそれに対して相補的である配列を含んで成り；及び

複数のディテクタープローブ、ここで個々のディテクタープローブは異なった配列を有する；を含んで成るキット。

【請求項134】 前記アダプター - インデクサーの個々の付着端が、制限酵素により生成される付着端と適合できる請求項133記載のキット。

【請求項135】 前記キットが、個々のアダプター - インデクサーに対応する少なくとも1つのライゲーター - ディテクターを包含する請求項133記載のキット。

【請求項136】 少なくとも1つのアダプター - インデクサー、少なくとも1つのライゲーター - ディテクター、少なくとも1つのディテクタープローブ、又はそれらの組み合わせが、ラベルを含む請求項135記載のキット。

【請求項137】 前記ラベルが蛍光、リン光又は化学ルミネセンスラベルである請求項136記載のキット。

【請求項138】 前記ラベルの少なくとも2種が、異なった蛍光、リン光又は化学ルミネセンス発光寿命を通して一時的に区別される請求項137記載のキット。

【請求項139】 前記ラベルが、核磁気共鳴、電子常磁性共鳴、表面増強されたラマン散乱、表面プラスモン共鳴、蛍光、リン光、化学ルミネセンス、共鳴ラマン、マイクロ波、又はそれらの組み合わせにより検出される請求項136記載のキット。

【請求項140】 前記ラベルが、ラベルを含んで成るビーズである請求項136記載のキット。

【請求項141】 前記ラベルが、分子バーコードである請求項140記載のキット。

【請求項142】 前記ラベルが、質量ラベルである請求項136記載のキット。

【請求項143】 前記核酸開裂試薬がN個の異なった配列を有する付着端を生成し、そして前記キットがN個の異なったアダプター - インデクサーを含む請求項133記載のキット。

【請求項144】 前記ディテクタープローブが、6、7又は8個の長さのヌクレオチドである請求項133記載のキット。

【請求項145】 個々のライゲーター - ディテクターが、ラベルを含む請求項133記載のキット。

【請求項146】 前記ラベルが、蛍光ラベルである請求項145記載のキット。

【請求項147】 前記キットが個々のアダプター - インデクサーに対応する少なくとも2種のライゲーター - ディテクターを含み、ここで所定のアダプター - インデクサーに対応する個々のライゲーター - ディテクターが異なったレベルを含む請求項145記載のキット。

【請求項148】 前記ディテクタープローブが、すべて同じ長さのものである請求項133記載のキット。

【請求項149】 前記ディテクタープローブが、すべて類似するハイブリッド安定性を有する請求項133記載のキット。

【請求項150】 個々のアダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、支持体上に固定される請求項133記載の

キット。

【請求項151】 前記ディテクタープローブが、支持体上に固定される請求項150記載のキット。

【請求項152】 個々のアダプター - インデクサー、ライゲーター - ディテクター又はディテクタープローブが、捕捉タグ、ソーティングタグ又は両者に会合される請求項133記載のキット。

【請求項153】 前記ライゲーター - ディテクターが、捕捉タグ又はソーティングタグに会合される請求項152記載のキット。

【請求項154】 前記ディテクタープローブが、

(a) 付着端を有する核酸フラグメントを生成するために、複数の異なった配列を有する付着端を集合的に生成する、1又は複数の核酸開裂試薬と共に核酸サンプルをインキュベートし、

(b) 複数のアダプター - インデクサーと、前記核酸サンプルとを混合し、そして核酸フラグメントに前記アダプター - インデクサーを共有結合し、ここで個々のアダプター - インデクサーは異なった付着端を有し、前記アダプター - インデクサーの個々の付着端は前記核酸開裂試薬により生成される付着端と適合でき、

(c) 前記核酸サンプルにより複数のライゲーター - ディテクターをハイブリダイズし、ここで個々のライゲーター - ディテクターは、アダプター - インデクサーの少なくとも1つの付着端を包含し、そしてそれに隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又は相補的な配列を含んで成り、

(d) 前記核酸サンプルにより複数のディテクタープローブをハイブリダイズし、そして前記ライゲーター - ディテクターを前記ディテクタープローブに共有結合し、ここで個々のディテクタープローブは異なった配列を有し、

(e) 前記ディテクタープローブへのライゲーター - ディテクターの結合を、直接的に又は間接的に検出し、ここで異なったディテクタープローブに結合されるライゲーター - ディテクターのパターンが核酸サンプルにおける核酸フラグメントのカatalogを構成し、

(f) 第2核酸サンプルにおける核酸フラグメントの第2カatalogを調製し、

そして前記第1カタログ及び第2カタログを比較し、そして

(g) 第1核酸サンプルに存在するが、しかし第2核酸サンプルには存在しない核酸フラグメントに対応する核酸フラグメントを調製することによって調製される核酸フラグメントである請求項133記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

開示される本発明は一般的に、核酸特徴化及び分析の分野、及び特に、遺伝子発現パターン及びゲノムの分析及び比較の分野に関する。

【0002】

遺伝子 - 発現パターンにおける差異の研究は、分化及び発生の機構を理解するための最も有望なアプローチの1つである。さらに、疾病関連の標的分子の同定は、合理的な医薬発明のための新規接近手段を開く。現在、分子発現パターンの分析のための次の2種のアプローチが存在する：(1) mRNA - 発現地図の生成、及び(2) タンパク質の発現プロファイルが技法、例えば二次元ゲル電気泳動、質量分光計 [マトリックス - 助力 - 脱着 - イオン化 - 時間経過 (MALDI - TOF) 又はエレクトロスプレー] 及びピコモル以下の量のタンパク質を配列決定する能力により分析される、“プロトコム (protcom)” の試験。転写体のイメージングのための従来のアプローチ、例えばノザンプロット又はブランクハイブリダイゼーションは、mRNA - 発現パターンを分析するために時間がかかり、且つ材料集約的な手段である。それらの理由のために、産業的及び臨床学的研究における高い処理能力のスクリーニングのための他の方法が開発されて来た。

【0003】

遺伝子発現の分析における進歩は、1977年におけるノザンプロット技法の開発であった (Alwineなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5350-5345 (1977))。この技法により、ラベルされたcDNA又はRNAプローブは、mRNA転写体の発現パターンを研究するためにRNAプロットにハイブリダイズされる。他方では、RNアーゼ - 保護アッセイは、特定のRNAの発現を検出できる。それらのアッセイは、同様の態様でのmRNAサブセットの発現の決定を可能にする。RNアーゼ - 保護アッセイに関しては、分析されたmRNAの配列は、選択されたmRNAとのハイブリッドを

形成するラベルされたcDNAを合成するために、知られるべきであり；そのようなハイブリッドは、一本鎖 - 特異的ヌクレアーゼによるRNA分解を阻止する。第3のアプローチとして、示差ブランク - フィルターハイブリダイゼーションは、クローン化されたcDNAの発現における特定の差異の同定を可能にする (Maniatisなど., Cell 15: 687-701 (1978))。それらのすべての技法は遺伝子発現における差異の研究のための卓越した手段であるが、それらの種類の方法の制限要因は、発現パターンが既知遺伝子のためのみ分析され得ることである。

【0004】

遺伝子発現パターンの分析は、異なった起源のmRNAプールに1つの起源のmRNAプールをハイブリダイズすることによって生成されるDNAライブラリーの開発を有意に前進せしめた。次にハイブリダイゼーション段階において相補的鎖を見出さない転写体が、cDNAライブラリーの構成のために使用される (Hedrickなど., Nature 308: 149-153 (1984))。この方法に対する種々の改良が、特定のmRNAを同定するために開発されて来た (Swaroopなど., Nucleic Acids Res. 25: 1954 (1991); Diatchenko など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6025-6030 (1996))。それらの1つは、ビオチン - 及び制限 - 介在性富化を通しての特異的に発現されたmRNAの選択的増幅であり (SABRE; Laveryなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6831-6836 (1997))、すなわちテスター集団に由来するcDNAがドライバー (対照) 集団のcDNAに対してハイブリダイズされる。テスター - cDNA含有ハイブリッドに対して特異的な精製段階の後、テスター - テスターホモハイブリッドが、付加されたリンカーを用いて特異的に増幅され、従って、これまで知られていない遺伝子の単離を可能にする。

【0005】

真核生物mRNAの示差的表示の技法は、二方向態様で組織的に、転写された遺伝子を分析し、そして比較するための最初の1 - 管方法であり；減法的及び示差的ハイブリダイゼーション技法が特異的に発現された遺伝子の一方向性同定のために適合されて来た (Liang and Pardee, Science 258: 967-971 (1992))。精製が、示差的表示の再現性、効率及び性能を強化するために提案されて来た (Bauerなど., Nucleic Acids Res. 11: 4272-4280 (1993); Liang and Pardee, Curr.

Opin. Immunol. 7: 274-280 (1995); Ito and Sakalci, Methods Mol. Biol. 85: 37-44 (1997); Praschar and Weissman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 659-663 (1996)). それらのアプローチは、従来のPCRに基づく示差的表示よりも再現性であり且つ正確であるが、それらはまだ、ゲル電気泳動の使用を必要とし、そしてしばしば、分析からの一定のDNAフラグメントの排除を包含する。

【0006】

2種の複合体ゲノム間の差異を同定するために元来、開発されたが、代表的な差異分析(RDA)は減法的ハイブリダイゼーション及びPCRの両者を利用することによって示差的遺伝子発現を分析するために適合された(Lisitsyn など., Science 259: 946-951 (1993); Hubank and Schatz, Nucleic Acids Res. 22: 5640-5648 (1994)). 第1の段階においては、2種の異なった集団、すなわちテスター及びドライバー(対照)に由来するmRNAが逆転写され; 前記テスターcDNAは、示差遺伝子発現の発生が予測されるcDNA集団を表す。時折開裂する制限エンドヌクレアーゼによる消化に続いて、リンカーがcDNAの両端に連結される。次に、PCR段階が異なった遺伝子プールの初期表示を生成する。テスター及びドライバーcDNAのリンカーが消化され、そして新規リンカーがテスターcDNAの末端に連結される。次に、テスター及びドライバーcDNAが、テスター及びドライバーcDNAプールにおいて共通の一本鎖cDNA間でのハイブリダイゼーションを促進するために、過剰のドライバーcDNAと共に1:100の比で混合される。cDNAのハイブリダイゼーションに続いて、PCRは、二本鎖cDNAの両端上のプライミング部位を通して、テスターcDNAにより生成されるそれらのホモ重複体のみを、指数的に増幅する(O'Neill and Sinclair, nucleic Acids Res. 25: 2681-2682 (1997); Wada など., Kidney Int. 51: 1629-1638 (1997); Edman など., J. 323: 113-118 (1997))。

【0007】

細胞又は生物の遺伝子-発現パターンは、その基本的な生物学的特徴を決定する。mRNAコードの配列の発現及び特徴化を促進するために、種々の組織から直接的に、cDNAのフラグメントを配列決定する考えが明らかになった(Adams など., Science 252: 1651-1656 (1992); Adams など., Nature 377: 3-16 (1995))。そ

これらの発現された配列標識 (EST) は、ゲノム由来の配列におけるコード領域の同定を可能にする。公的に入手できるESTデータベースは、コンピュータによる遺伝子発現の比較分析を可能にする。示差的に発現された遺伝子は、所定の器官又は細胞型の発現された配列のデータベースと、異なった起源からの配列情報を比較することによって同定され得る (Leeなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8303-8307 (1995); Vasmatazisなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 300-304 (1998))。ESTの配列決定に対する欠点は、大規模な配列決定施設の必要性である。

【0008】

遺伝子発現の連続分析 (SAGE) は、比較分析を通して示差的に発現された遺伝子の同定への配列に基づくアプローチである (Velculescuなど., Science 270: 484-487 (1995))。それは、異なった細胞集団又は組織に由来する配列の同時分析を可能にする。次の3段階がSAGEについての分子基礎を形成する：

(1) 発現された転写体を同定するための配列標識 (10 - 14bp) の生成；(2) クローン化され、そして配列決定され得るコンカテマーを得るための配列標識の連結；及び(3) 標識により同定された遺伝子の発現における差異を決定するための配列データの比較。この方法は、分析されるべきあらゆるmRNA集団のために行われる。SAGEの主要欠点は、対応する遺伝子が遺伝子バンクに寄与されるそれらの標識についてのみ同定され得、従ってSAGEの効率を入手できるデータベースの程度に依存性にする事実である。他方では、単純に、配列決定作業のほとんどが細胞mRNAにおいて高い頻度で存在するそれらの標識に対する反復した読み取りを付与するので、いずれかの所定のmRNA集団の95%の有効範囲を提供することができるSAGEデータ組を完全にするための主要配列決定の努力が必要とされる。換言すれば、SAGE配列決定実験は、独得の標識が、多くの週の配列決定の努力の後でのみ、データベースに蓄積し始めるであろう、まれなmRNAについての収穫逡減を付与する。

【0009】

遺伝子発現プロフィール及びゲノム組成の研究に対する異なったアプローチは、DNAマイクロアレイの使用である。現在のDNAマイクロアレイは、高い密度で組

織的にグリッド化される。そのようなマイクロアレイは、ナイロンフィルター、ガラススライド又はシリコンチップの表面に連結される、cDNA（例えば、EST）、PCR生成物又はクローン化されたDNAを用いることによって生成される（Sche naなど., Science 270, 467-470 (1995)）。DNAアレイはまた、合成されたオリゴヌクレオチドを直接的に適用することによって、合成されたオリゴヌクレオチドをマトリックスに直接的に適用することによって、又はフォトリトグラフィー及び固相化学合成を組合わす、より洗練された方法により、合成オリゴヌクレオチドからアセンブリーされ得る（Fodor など., Nature 364: 555-556 (1993)）。遺伝子発現における差異を決定するためには、ラベルされたcDNA又はオリゴヌクレオチドが、DNA - 又はオリゴマー - 担持アレイにハイブリダイズされる。DNA又はオリゴヌクレオチドをラベリングするために異なった蛍光団を用いる場合、2種のプローブがアレイに同時に適用され、そして異なった波長で比較される。10,000及びそれ以上の遺伝子の発現が単一のチップ上で分析され得る（Cheeなど., Science 274: 614 (1996)）。しかしながら、cDNA及びオリゴヌクレオチドアレイの感度に依存して、ハイブリダイゼーションシグナルの強度は、弱く又は多量に発現された遺伝子が分析される場合、直線範囲から逸れる。従って、特別に発現された遺伝子の正確な検出を確保する個々の最適化段階が必要とされる。そのようなマイクロアレイ方法は、多くの興味ある生物学的問題と取り組むために使用され得るが、それらは新規遺伝子の発現のためには適切でない。

【0010】

示差的表示又はSAGEに固有の遺伝子発現のための能力を有するアレイハイブリダイゼーション技法の力及び便利を兼ね備えた方法についての必要性がある。そのような方法は、それがゲル電気泳動の使用を伴なわないで、及び冗長性DNA配列決定努力の必要性を伴なわないで、包括的な遺伝子発現分析を可能にできる場合、最も魅力あるものである。

【0011】

従って、核酸配列標識の包括的分析のための方法を提供することが、本発明の目的である。

【0012】

核酸配列標識のインデキシングを可能にするディテクター組成物を提供することが、本発明のもう1つの目的である。

【0013】

発明の簡単な要約：

核酸サンプルの包括的分析のための方法、及び前記方法への使用のためのディテクター組成物が開示される。配列標識の固定されたアドレス分析（FAAST）と称する方法は、種々の付着端配列を有する1組の核酸フラグメントの生成；付着端の配列に基づいての前記フラグメントのインデキシング；前記フラグメントによるディテクター配列の会合；ディテクターアレイ上のインデキシングされたフラグメントの配列に基づく捕獲；及びフラグメントラベルの検出を包含する。複数の付着端配列の生成は、1又は複数の核酸開裂試薬と共に核酸サンプルをインキュベートすることによって達成される。好ましくは、これは、認識配列とは異なる部位で分解する制限エンドヌクレアーゼ、又は複数の制限エンドヌクレアーゼによる消化に核酸サンプルをゆだねることによって達成される。インデキシングされたフラグメントは、プローブへのハイブリダイゼーション及びカップリング、好ましくは連結により捕獲される。前記プローブは好ましくは、アレイに、又は分類できるビーズ上に固定される。

【0014】

前記方法は、インデキシングされたフラグメントの検出を可能にし、ここで検出は、個々のフラグメントの元の付着端の配列、制限エンドヌクレアーゼの認識配列（付着端配列とは異なる場合）、及びプローブに対応する配列を包含する、フラグメントのためのいくつかの配列情報を提供する。前記方法は、再現できる及び配列 - 特異的態様での核酸複合体サンプルのすばやく且つ容易な分類を可能にする。

【0015】

配列標識の可変性アドレス分析（VAAST）として言及される1つの形のFAAST方法は、既知の又は可能性ある配列の種々の組み合わせの、核酸分子における会合の決定を可能にする。例えば、免疫グロブリン又はT細胞受容体における連結及び可変領域の特定の組み合わせが決定され得る。配列標識の修飾助力分析（MAAS

T) として言及されるもう1つの形のFAAST方法は、修飾の存在又は不在に分子の分解を基づかせることによって、核酸分子における配列の修飾を評価する。例えば、核酸分子においてメチル化される部位は、その部位でメチル化に対して敏感である制限酵素により開裂されないであろう。メチル化に対して鈍感である制限酵素はその部位で分解し、従って配列標識の異なったパターンを生成する。

【0016】

発明の特定の記載：

配列標識の固定されたアドレス分析 (FAAST) として言及される、開示される方法は、再現でき且つ配列特異的な態様で、核酸の複合体サンプルのすばやく且つ容易な分類を可能にする。そのようなカタログは、サンプル間の差異の便利な検出を可能にするために、他の核酸サンプルの他の同様にして調製されたカタログと比較され得る。核酸サンプルについての有意な量の情報を組み込むカタログは、関連する核酸サンプルの検出及び核酸サンプルの比較のために使用され得る核酸サンプルのフィンガープリントとして作用することができる。例えば、特定の生物の存在又は正体は、試験生物の核酸のカタログを生成し、そしてその得られるカタログと、既知生物から調製された対照カタログとを比較することによって検出され得る。遺伝子発現パターンにおける変化及び差異はまた、異なった細胞サンプルからのmRNAのカタログを調製し、そしてそのカタログを比較することによっても検出され得る。配列のカタログはまた、核酸サンプルの源に対して特異的である1組のプローブ又はプライマーを生成するためにも使用され得る。

【0017】

開示される方法と、生成される核酸カタログとの比較は、前記方法において生成され、そして分類される配列情報の高い規則の性質により促進される。前記方法への固定化、分類及び/又はアレイ検出の使用は、その方法の自動化、情報の分類及び他のカタログとの比較を可能にする。前記方法は、充填された及び空のビン、及び/又はビンにおけるシグナルの量のパターンを伴って、充填され得、空であり、又は異なったレベルに充填され得る多数の配列特異的ビンの同等物をもたらし、分類されている核酸サンプルについての情報を提供する。

【0018】

FAAST方法は次の基本的な段階を包含する。核酸サンプルは、1又は複数の核酸開裂試薬、好ましくは種々の配列を有する付着端を有する1組のDNAフラグメントをもたらす制限エンドヌクレアーゼと共にインキュベートされる。好ましい形の方法においては、サンプルがアリコート（インデックスサンプルとして言及される）に分けられ；好ましくは多くのアリコートに劣らず、付着端配列が存在する。複数の制限エンドヌクレアーゼが使用される場合、核酸サンプルは好ましくは、開裂に続いて、インデックスサンプルに分けられる。次に、個々のサンプル（核酸サンプルが分けられる場合、個々のインデックスサンプル）が、インデックスサンプルにおけるDNAフラグメント上の可能な付着端の1つと適合できる付着端をそれぞれ有する、1又は複数のアダプター - インデクサーと共に混合される。好ましくは、異なったアダプター - インデクサーは、個々のインデックスサンプルと共に混合される。次に、アダプター - インデクサーが、好ましくは連結により、適合できるDNAフラグメントに共有結合される。

【0019】

次に、個々のサンプル（又は個々のインデックスサンプル）におけるDNAフラグメントが、ライゲーター - ディテクターにハイブリダイズされる。個々のライゲーターの1つの端は、第1核酸開裂試薬により生成される可能な付着端配列の1つのすべて又は一部、又は開裂が認識配列から逸れない場合、第1核酸開裂試薬の認識配列のすべて又は一部に適合するか、又はそれに対して相補的な配列を有する。ライゲーター - ディテクターは、アダプター - インデクサーに結合されるフラグメントにおける付着端配列に隣接する配列に適合するか又はそれに対して相補的な配列を有することができ、そして好ましくは有する。個々のインデックスサンプルに使用されるライゲーター - ディテクターは好ましくは、インデックスサンプルに使用されるアダプター - インデクサー配列における、付着端配列を包含する配列に適合するか、又はその配列に対して相補的である。

【0020】

最終的に、個々のサンプル（又はインデックスサンプル）は、好ましくは連結により、1又は複数のディテクタープローブと反応せしめられ、そしてそのプローブに結合される。好ましくは、使用される組のディテクタープローブは、所定

の長さのあらゆる可能な配列（例えば、あらゆる可能な6塩基配列）を包含する。プローブ及びライゲーター - ディテクターオリゴヌクレオチドの末端は、プローブがライゲーター - アダプターの末端に隣接してハイブリダイズする場合でのみ結合される。プローブは好ましくは、固定されたオリゴヌクレオチドである。

【0021】

サンプルからの個々のプロセッシングされたDNAフラグメントは、プローブへのライゲーター - ディテクターの結合に基づいてシグナルをもたらすであろう。複合体核酸サンプルは、シグナルの独得のパターンを生成するであろう。それは、核酸サンプルの独得な分類、及び異なった核酸サンプルから生成されるシグナルのパターンの敏感且つ強力な比較を可能にするこのパターンである。

【0022】

プローブへのライゲーター - ディテクターの結合は、直接的に又は間接的に検出され得る。例えば、プローブ、ライゲーター - ディテクター又は会合されたアダプター - インデクサーのいずれかが検出され得る。所定のプローブによるライゲーター - ディテクター又はアダプター - インデクサーへの会合は、プローブ及びライゲーター - ディテクターの結合の表示である。そのような会合の検出は、プローブ、ディテクター - ライゲーター又はアダプター - インデクサーの固定化を通して、及びプローブ、ディテクター - ライゲーター及び/又はアダプター - インデクサーと共に捕捉タグ、ソーティングタグ及び検出できるラベルを通して促進され得る。固定化、及び捕捉タグ、ソーティングタグ及びラベルとの会合のいずれかの組み合わせが使用され得る。好ましくは、プローブはアレイに固定され、そしてライゲーター - 検出が検出できるラベルにより会合される。従って、固定されたプローブの特定のアレイにおける特定の位置でのシグナルの検出は、核酸サンプルからインデキシングされる核酸フラグメントについての情報を提供することができる。

【0023】

プローブがアレイにおいて固定される場合、DNAフラグメントがシグナルを生成する前記アレイ及びそのアレイにおける位置は、DNAフラグメントの付着端の配列、及び前記付着端に隣接する配列（又は第1制限酵素の認識配列及び認識配

列及び付着端配列がオーバーラップする場合、隣接する配列)を同定する。これは、4個の塩基の付着端及び6個の塩基の同定されたオリゴヌクレオチドが使用される場合、10個の塩基の配列である。使用される場合、タイプII-S制限酵素の認識配列と開裂部位との間の固定された関係、及び認識配列の正体は、DNAフラグメントについての追加の配列情報を提供する。同じ効果が、特定のプローブを捕獲し、分離し、又は検出することによって(捕捉タグ、ソーティングタグ及びラベルを通して)、達成され得る。すなわち、プローブ及びそれに結合されるライゲーター-ディテクターが同定され得る限り、パターンが決定され得る。

【0024】

任意には、ライゲーター-ディテクターとのハイブリダイゼーションの前、個々のサンプル(又はインデックスサンプル)は、1又は複数の他の核酸開裂試薬(第2核酸開裂試薬として言及される)、好ましくは4個の塩基の認識配列を有する制限酵素と共にインキュベートされ得る。次に、第2アダプターが、サンプルにおけるDNAフラグメントに、好ましくは連結により結合され得る。次に、そのDNAフラグメントは、いずれかの適切な方法、例えばPCRを用いて増幅され得る。

【0025】

配列標識の修飾助力された分析(MAAS)として言及される1つの形のFAAS方法は、分子の開裂を、修飾の存在又は不在に基づかせることによって、核酸分子における配列の修飾を評価する。例えば、核酸分子においてメチル化される部位は、その部位でメチル化に対して敏感である制限酵素により切断されないであろう。メチル化に対して鈍感である制限酵素はその部位で分解し、従って配列標識の異なったパターンを生成する。

【0026】

配列標識の可変性アドレス分析(VAAS)として言及される1つの形のFAAS方法は、既知の又は可能性ある配列の種々の組み合わせの、核酸分子における会合の決定を可能にする。例えば、免疫グロブリン又はT細胞受容体における連結及び可変領域の特定の組み合わせが決定され得る。VAASは、FAASと同じ基本的な段階を使用し、そして核酸サンプルの開裂の前、1つの段階を付加する。VAAS

においては、切断のための認識部位、好ましくは制限酵素認識部位が、核酸サンプルにおける核酸フラグメント中に導入される。次に、この認識部位が、第1の基本的なFAAST方法において切断の標的物として使用され得る。アダプター - インデクサーは、認識部位が導入された配列に隣接すると思われる既知の又は可能性ある配列と適合するよう選択されるべきである。その結果物は、核酸フラグメントに由来する中央配列を囲む定義された末端配列を有するフラグメントである。これは、既知の又は可能性ある配列の会合の評価を可能にする。特に、認識部位が特定のアダプター - インデクサー（既知の又は可能性ある隣接配列と適合する配列を有する）と共に導入された配列の会合が検出され得る。

【0027】

材料：

核酸サンプル：

いずれの核酸サンプルでも、開示される方法に使用され得る。適切な核酸サンプルの例は、ゲノムサンプル、mRNAサンプル、核酸ライブラリー（cDNA及びゲノムライブラリーを包含する）、全細胞サンプル、環境サンプル、培養物サンプル、組織サンプル、体液及び生検サンプルを包含する。多くの核酸サンプル源が知られており、又は開発され得、そしていずれでも開示される方法に使用され得る。開示される方法と共に使用するための好ましい核酸サンプルは、有意な複合核酸サンプル、例えばゲノムサンプル及びmRNAサンプルである。

【0028】

核酸フラグメントは、大きな核酸分子のセグメントである。開示される方法に使用されるような核酸フラグメントは一般的に、切断された核酸分子を言及する。核酸開裂試薬と共にインキュベートされた核酸サンプルは、消化されたサンプルとして言及される。制限酵素を用いて消化された核酸サンプルは、消化されたサンプルとして言及される。

【0029】

インデックスサンプルは、さらなるプロセッシングのために異なったアリコートに分けられた核酸サンプルである。開示される方法においては、インデックスサンプルは好ましくは、異なったアダプター - インデクサーが、消化されたサン

ブルに存在する核酸フラグメントに、好ましくは連結により結合するために添加される、消化された核酸サンプルのアリコートである。開示される方法においては、異なった核酸フラグメントが、そのフラグメントの付着端配列に基づいて、異なったインデックスサンプルにおいてプロセッシングされる。従って、好ましくは、消化された核酸サンプルは、サンプルを消化するために使用される核酸開裂試薬により可能性ある付着端配列の数が生成されるようできるだけ多くのインデックスサンプルに分けられる。複数の異なった核酸開裂試薬が核酸サンプルを切断するために使用される場合、好ましくは、核酸サンプルは、使用される核酸開裂試薬と同じほど多くのアリコートに分けられ、そして核酸サンプルは、切断の前に分けられる。

【0030】

対照の核酸サンプルは、もう1つの核酸サンプル（テスター核酸サンプルとして言及され得る）が比較される核酸サンプルである。対照のインデックスサンプルは、もう1つのインデックスサンプル（テスターインデックスサンプルとして言及され得る）が比較されるインデックスサンプルである。

【0031】

第2インデックスサンプルは、インデックスサンプルのアリコートである。従って、インデックスサンプルは、多くの第2インデックスサンプルに分けられ得る。第2インデキシングインデックスサンプルは、核酸開裂試薬、好ましくは制限酵素により切断される。制限されたインデックスサンプル及び制限されていないインデックスサンプルは、インデックスサンプルのアリコートである。制限されたインデックスサンプルは核酸を開裂試薬により切断されるが、制限されていないインデックスサンプルは、それにより切断されない。制限された第2インデックスサンプル及び制限されていない第2インデックスサンプルは、第2インデックスサンプルのアリコートである。制限された第2インデックスサンプルは核酸開裂試薬により切断されるが、制限されていない第2インデックスサンプルはそれにより切断されない。第2インデックスサンプル、制限されたインデックスサンプル、制限されていないインデックスサンプル、制限された第2インデックスサンプル、及び制限されていない第2インデックスサンプルは、集合的には、

誘導体インデックスサンプルとして言及される。個々のインデックスサンプルに由来し、そしていくつかの場合、もう1つの誘導体インデックスサンプルに由来する。

核酸開裂試薬：

開示される方法は、核酸開裂試薬を使用する。核酸開裂試薬は、核酸分子に対する切断を引き起こし、仲介し、又は触媒する、化合物、複合体及び酵素である。好ましい核酸開裂試薬は、配列 - 特異的態様で核酸分子を切断するそれらのものである。制限酵素（制限エンドヌクレアーゼとしても言及される）は、核酸開裂試薬の好ましい形である。他の核酸開裂試薬は、Szybalskiの普遍的な制限エンドヌクレアーゼを包含し（Szybalski, Gene 40 (2-3): 169-73 (1985); Podhajska and Szybalski, Gene 40 (2-3): 175-82 (1995) [公開された正誤表はGene 43 (3): 325 (1985)に見られる]、そして進歩したDNA切断システムはBreakerなどにより開発された（Carmiなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (5): 2233-2237 (1998)）。

【0032】

多くの核酸開裂試薬は知られており、そして開示される方法に使用される。開示される方法に関しては、核酸開裂試薬は一般的に、認識配列及び切断部位を有する。多くの核酸開裂試薬、特に制限酵素はまた、切断部位で付着端を生成する。認識配列は、核酸分子に存在する場合、同起源の核酸開裂試薬により核酸分子の切断を方向づけるであろうヌクレオチド配列である。核酸開裂試薬の切断部位は、通常、認識配列に関して、核酸開裂試薬が核酸分子を切断する部位である。付着端（付着端、突出端及び5'又は3'オーバーハングとしても言及される）は、二本鎖核酸セグメントの末端での一本鎖核酸セグメントである。

【0033】

本発明の方法の特定の態様に関しては、使用される核酸開裂試薬は、この方法において使用される他の制限酵素に対して一定の性質及び/又は一定の関係を有するであろう。例えば、開示される方法のいくつかの好ましい態様においては、多くの異なった配列を有する付着端を生成する核酸開裂試薬が好ましく、そして認識配列からの切断部位オフセットを有する核酸開裂試薬が最も好ましい。開示

される方法の他の態様は、異なった認識配列を有し、そして/又は本発明の方法における他の段階で同じインデックスサンプルに対して使用される他の核酸開裂試薬とは異なった付着端を生成する異なった核酸開裂試薬の使用を必要とする。例えば、3種の消化物（すなわち、切断反応）がこの方法において使用される場合、好ましくは、個々の消化物に使用される核酸開裂試薬は、他の消化物に使用される核酸開裂試薬の認識配列とは異なった認識配列を有する。そのような場合、核酸開裂試薬の既知性質が、適切な核酸開裂試薬を選択し、または企画するために使用され得る。

【0034】

核酸開裂試薬が認識配列とは異なった又ははなれた部位でDNAを切断する場合、異なった配列を有する種々の付着端が生成され得る。これは、核酸における認識配列がいずれかの配列の次に存在し、そして、切断部位がいずれかの配列を有することができるからである。例えば、FokIは、GGATGの認識部位から9個（上方の鎖）及び13個（下方の鎖）下流のヌクレオチドを切断する。4個の塩基の付着は、どんな配列でも、認識部位から10～13個のヌクレオチド離れて存在すべきであろう。十分な切断部位を与える場合、合計256個の異なった付着端配列（あらゆる可能な4個の塩基配列である）が、FokI消化に起因する。結果として、制限酵素、例えばタイプII-S制限酵素は、多くの異なった配列を有する付着端を生成するといわれる。

【0035】

本明細書において使用される場合、特にことわらない限り、用語、消化物、消化、消化された及び消化するとは、一般的に、切断反応又は切断の作用を言及し、そしてタンパク質酵素、又はいずれかの特定の機構による切断に限定されるものではない。同様に、用語、制限されたとは、いずれかの核酸切断を言及するものであって、制限酵素による切断を言及するものではない。核酸開裂試薬においては、配列-特異性は、単なるいくらかの配列特異性を必要とし、絶対的な配列特異性を必要としない。すなわち、完全に又は一部定義された認識配列を有する核酸開裂試薬が好ましい。従って、それらの認識配列にいくらかの縮重を有する核酸開裂試薬は、まだ、配列-特異的であると思われる。

【0036】

第2核酸開裂試薬は、第2インデックスサンプルを消化するために使用される核酸開裂試薬である。第3核酸開裂試薬は、制限されたインデックスサンプル又は制限された第2インデックスサンプルを消化するために使用される核酸開裂試薬である。第2及び第3核酸開裂試薬は好ましくは、認識配列において切断するタイプII制限エンドヌクレアーゼである。第2制限酵素は、第2インデックスサンプルを消化するために使用される制限酵素である。第2制限酵素は、制限されたインデックスサンプル又は制限された第2インデックスサンプルを消化するために使用される酵素である。第2及び第3制限酵素は、好ましくは、認識配列において切断するタイプII制限エンドヌクレアーゼである。

【0037】

標準の態様での制限酵素の使用の他に、Szybalski (Szybalski, Gene 40 (2-3): 169-73 (1985); Podhajska and Szybalski, Gene 40 (2-3): 175-82 (1995) [公開された正誤表はGene43(3): 325(1985)に見られる]により記載されるように、普遍的制限エンドヌクレアーゼとしてタイプII-S酵素を使用することができる。そのSzybalskiの技法においては、一本鎖又は二本鎖DNAが、タイプII-S酵素と組合して、記載される構造体を用いて、いずれかの任意の(但し、特異的な)部位で切断され得る。より進歩したDNA切断システムは、Breakerなどにより開発された(Carmiなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(5): 2233-2237 (1998))。それらのシステムにおいては、Breakerは、DNAが標的DNAにおける特定の配列を認識し、そして標的DNA、一本鎖又は二本鎖標的物を切断できることを示す。特定の作用のためのDNAの開発のためのBreakerのシステムによれば、適切な時間及び努力が与えられる場合、認識及び特定の切断のための適切なDNAは実用的であることが明白である。

アダプター - インデクサー :

アダプター - インデクサーは、1本鎖部分及び二本鎖部分を含む二本鎖核酸である。前記一本鎖部分は、アダプター - インデクサーの一端で存在し、付着端を構成する。付着端は、アダプター - インデクサーの付着端部分として言及される。好ましくは、突出する一本鎖(付着端)は、2, 3, 4又は5個のヌクレオチ

ドを有する。アダプター - インデクサーの二本鎖部分は、いずれかの便利な配列又は長さを有することができる。一般的に、二本鎖部分の配列及び長さは、方法における続く段階に適合されるよう選択される。例えば、アダプター - インデクサーにおける配列は、プライマー又はプローブハイブリダイゼーションのために使用され得る。アダプター - インデクサーの主な目的は、連結態によるハイブリダイゼーションのための配列を提供することである。アダプターが結合されているサンプルにおけるフラグメントが増幅される場合、アダプター - インデクサーはまた、プライマーハイブリダイゼーションのための配列（ライゲーター - ディテクターハイブリダイゼーションのための配列とオーバーラップするか又は隣接できる）を提供することができる。従って、アダプター - インデクサーの二本鎖部分についての好ましい配列組成及び長さは一般的に、プローブ及びプライマーハイブリダイゼーションのために有用であるそれらのものである。アダプター - インデクサーはまた、アダプター - インデクサーの検出を促進するよう企画されるディテクター部分を包含することができる。例えば、検出部分は、ハイブリダイゼーション標的物である配列であり得るか、又はそれはラベル又は標識であり得る。

【0038】

一般的に、アダプター - インデクサーの二本鎖部分の配列は、前記方法における続く段階に使用されるべきいずれかの制限酵素の認識配列を含むべきではない。好ましくは、アダプター - インデクサーは、自己相補的であるいずれかの配列も有さない。この条件は、ミスマッチ又はギャップを伴わないで6個よりも長いヌクレオチドの相補的領域が存在しない場合に適合されると思われる。

【0039】

開示される方法に使用するための1組のアダプター - インデクサーは、異なったアダプター - インデクサーを含むべきではなく、ここで一本鎖部分は、ヌクレオチドA, C, G及びTの組み合わせ及び置換から選択された異なったヌクレオチド配列をそれぞれ有する。複数の核酸開裂試薬が第1消化物に使用される場合、個々のアダプター - インデクサーの一本鎖部分は、核酸開裂試薬の1つにより生成される付着端配列と適合できる異なったヌクレオチド配列を有することができる。

。1つの組におけるアダプター - インデクサーの付着端は異なった配列を有するが、好ましくは、それは1つの核酸開裂試薬による切断により生成されるインデキシングフラグメントへの前記組の使用を促進するために同じ長さのものであり得る。好ましくは、1組のアダプター - インデクサーのメンバーは、その組の個々のメンバーのために同一である二本鎖部分を含む。

【0040】

好ましい組のインデキシングリンカー鎖は次のものを含んで成る：(a) 共通する同一の配列、及び3'末端及び5'末端から選択された1つの末端で、A, G, C及びTヌクレオチドの置換及び組み合わせから選択された、2, 3, 4及び5個のヌクレオチドから選択された長さのユニーク配列をそれぞれ有する少なくとも2つの一本鎖第1オリゴヌクレオチド；及び(b) 第1オリゴヌクレオチドのいずれか1つによりハイブリダイズされる場合、ユニーク配列を有する付着端を有する末端を含む二本鎖アダプター - インデクサーが生じるよう、その配列が第1オリゴヌクレオチドの共通する配列に対して相補的である一本鎖第2オリゴヌクレオチド。

【0041】

アダプター - インデクサーはまた、アダプター - インデクサーが結合されているフラグメントの固定又は捕獲を促進するために捕捉タグを含むことができるか又はそれにより会合され得る。一般的に、捕捉タグは、結合対の1つのメンバー、例えばビオチン及びストレプトタビジンであり得る。捕捉タグは本明細書の他の部分においてより詳細に論じられる。アダプター - インデクサーはまた、アダプター - インデクサーが結合されているフラグメントの分類又は分離を促進するためにソーティングタグを含むことができるか又はそれにより会合され得る。一般的に、ソーティングタグは、検出できるラベル、例えば蛍光成分又は操作できる成分、例えば磁気ビーズであり得る。ソーティングタグは本明細書の部分でより詳細に論じられる。アダプター - インデクサーはまた、アダプター - インデクサーが結合されているフラグメントの検出を促進するためにラベルを含むことができるか又はそれにより会合され得る。アダプター - インデクサーはまた、支持体上に固定され得る。

【0042】

アダプター - インデクサーはまた、付着端の反対側の末端で突出する端を含むことができる。そのような末端は、例えば、アダプター - インデクサーにより会合されるべきラベルのためのハイブリダイゼーション標的物として使用され得（そして、従って、アダプター - インデクサーの検出部分として見なされ得る）。アダプター - インデクサーはまた、検出のためのアダプター - インデクサー配列の開放を促進するために1又は複数の光分解性ヌクレオチドを含むことができる。光分解性ヌクレオチド及びそれらの使用は、W000/04036号に記載されている。

【0043】

アダプター - インデクサーは、天然に存在するヌクレオチドから構成される必要はない。修飾されたヌクレオチド、異常塩基のヌクレオチド、及びオリゴヌクレオチド類似体を使用され得る。必要とされるすべては、アダプター - インデクサーが本明細書に記載される一般構造を有し、そして開示される方法において必要とされる相互作用及び反応を行うことができることである。

ライゲーター - ディテクター：

ライゲーター - ディテクターは、核酸サンプルから開示される方法により生成される核酸フラグメントの一部に対しては相補的である一本鎖領域を含む核酸分子である。ライゲーター - ディテクターは一般的に、アダプター - インデクサーに対する特定の配列関係を有する。ライゲーター - ディテクターは、アダプター - インデクサーの少なくとも1つの付着体を包含し、そしてそれに隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又はそれに対して相補的である。ライゲーター - ディテクターのディテクター部分として言及される配列を包含する。従って、ライゲーター - ディテクターは、付着端配列（いずれかの側又は両側）に隣接する核酸フラグメントにおける配列に適合するか又は相補的な配列、付着端に適合するか又は相補的な配列、又は付着端配列及び付着端に隣接する核酸フラグメントにおける両配列に適合するか又は相補的な配列を有する。

【0044】

好ましくはライゲーター - ディテクターの配列は、付着端配列のすべて又は一部、及び付着端配列と共に使用するために企画されたアダプター - インデクサー

の隣接する配列のすべて又は一部に適合するか又はそれに対して相補的である。この形で、ライゲーター - ディテクターの配列は、切断が認識配列から逸れない場合、第1制限酵素の認識配列のすべて又は一部と適合するか、又はそれに対して相補的である。VAASTに関しては、好ましくは、ライゲーター - ディテクターは、付着端配列に隣接する核酸フラグメントにおける配列に適合するか又は相補的な配列を含む。ライゲーター - ディテクターにおける配列が適合するか又は相補的であるかにかかわらず、アダプター - インデクサーの鎖及び/又はフラグメントは、ライゲーター - ディテクターにハイブリダイズするであろう。好ましくは、適合性であるか又は相補的であるライゲーター - ディテクターの1つのタイプのみが、所定のFAAST反応に使用される。

【0045】

アダプター - インデクサーとライゲーター - ディテクターとの間の配列関係のいくつかの例が、図1に示されている。図1におけるライゲーター - ディテクター1 - 12は、アダプター - インデクサーIの付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサーIの隣接する配列のすべて又は一部に適合するよう企画される。ライゲーター - ディテクター13 - 19は、アダプター - インデクサーIの付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサーIの隣接配列のすべて又は一部に対して相補的であるよう企画される。ライゲーター - ディテクター21 - 32は、アダプター - インデクサーIIの付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサーIIの隣接する配列のすべて又は一部に適合するよう企画される。ライゲーター - ディテクター33 - 40は、アダプター - インデクサーIIの付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサーIIの隣接配列のすべて又は一部に対して相補的であるよう企画される。ライゲーター - ディテクターに包含されるアダプター - インデクサーの隣接配列の一部が、ライゲーター - ディテクターに包含される付着端配列の一部と隣接することを注目すること。これは、隣接により意味されることである。

【0046】

図1におけるライゲーター - ディテクター1 - 4は、アダプター - インデクサーIの付着端配列のすべて、及びアダプター - インデクサーIの隣接する配列のす

べて又は一部に適合するよう企画される。ライゲーター - ディテクター 5 - 12は、アダプター - インデクサーIの付着端配列の一部、及びアダプター - インデクサーIの隣接配列のすべて又は一部に対して適合するよう企画される。ライゲーター - ディテクター 2 - 4 及び 8 - 12は、アダプター - インデクサーIの付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサーIの隣接する配列の一部に適合するよう企画される。ライゲーター - ディテクター 13 - 16は、アダプター - インデクサーIの付着端配列のすべて、及びアダプター - インデクサーIの隣接する配列のすべて又は一部に対して相補的であるよう企画される。ライゲーター - ディテクター 17 - 19は、アダプター - インデクサーIの付着端配列の一部、及びアダプター - インデクサーIの隣接配列のすべて又は一部に対して相補的であるよう企画される。ライゲーター - ディテクター 14 - 16は、アダプター - インデクサーIの付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサーIの隣接する配列の一部に対して相補的であるよう企画される。ライゲーター - ディテクター 20は、制限酵素の認識配列（アダプター - インデクサーIの付着端と適合できる付着端を生成する）のすべて、及びアダプター - インデクサーIの隣接する配列のすべてに適合するよう企画される。アダプター - インデクサー付着端配列を越えて延長する特別なヌクレオチドを注目すること。これは、認識配列におけるフランキングヌクレオチドである。

【 0 0 4 7 】

ライゲーター - ディテクター 21 - 24は、アダプター - インデクサーIIの付着端配列のすべて、及びアダプター - インデクサーIIの隣接する配列のすべて又は一部に適合するよう企画される。ライゲーター - ディテクター 25 - 32は、アダプター - インデクサーIIの付着端配列の一部、及びアダプター - インデクサーIIの隣接配列のすべて又は一部に適合するよう企画される。ライゲーター - ディテクター 22 - 24及び28 - 31は、アダプター - インデクサーIIの付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサーIIの隣接する配列の一部に適合するよう企画される。ライゲーター - ディテクター 33 - 36は、アダプター - インデクサーIIの付着端配列のすべて、及びアダプター - インデクサーIIの隣接配列のすべて又は一部に対して相補的であるよう企画される。ライゲーター - ディテクター 37 -

40は、アダプター - インデクサーIIの付着端配列の一部、及びアダプター - インデクサーIIの隣接する配列のすべて又は一部に対して相補的であるよう企画される。ライゲーター - ディテクター34 - 36及び40は、アダプター - インデクサーIIの付着端配列のすべて又は一部、及びアダプター - インデクサーIIの隣接配列の一部に対して相補的であるよう企画される。

【0048】

第1消化物に使用される核酸開裂試薬が、認識配列が付着端配列を超えて延長するよう、核酸開裂試薬のための認識配列内を切断する場合、ライゲーター - ディテクターはまた、その認識配列のすべて又は一部に適合するか又はそれに対して相補的であり得る。認識配列が付着端配列（例えば、6個の塩基の認識配列及び4個の塩基の付着端）を超えて延長する場合、ライゲーター - ディテクター配列は、その同種起源のアダプター - インデクサーの付着端配列を超えて延長することができる。そのようなライゲーター - ディテクターの例は、図1（ライゲーター - ディテクター番号20）に示される。

【0049】

ライゲーター - ディテクターは配列に基づく検出システムを用いて検出され得るが、ライゲーター - ディテクターはまた、ライゲーター - ディテクターの検出を促進するためにラベルを含むことができる。多くのラベルは知られており、そしてこの目的のために使用され得る。ライゲーター - ディテクターはまた、ライゲーター - ディテクターの固定化又は捕獲を促進するために捕捉タグを含むか、又はそれにより会合され得る。ライゲーター - ディテクターはまた、ライゲーター - ディテクターの分類又は促進するためにソーティングタグを含むか、又はそれにより会合され得る。ライゲーター - ディテクターはまた、支持体上にも固定され得る。

【0050】

ライゲーター - ディテクターはまた、検出のためのライゲーター - ディテクターの開放を促進するために1又は複数の光分解性ヌクレオチドを含むことができる。光分解性ヌクレオチド及びそれらの使用は、WO 00/04036号に記載されている。

【0051】

ライゲーター - ディテクターは、天然に存在するヌクレオチドから構成される必要はない。修飾されたヌクレオチド、異常塩基のヌクレオチド、及びオリゴヌクレオチド類似体を使用され得る。必要とされるすべては、ライゲーター - ディテクターが本明細書に記載される一般構造を有し、そして開示される方法において必要とされる相互作用及び反応を行うことができることである。

ディテクタープローブ：

ディテクタープローブは、配列特異的態様で核酸にハイブリダイズできる分子、好ましくはオリゴヌクレオチドである。開示される方法においては、ディテクタープローブは、ライゲーター - ディテクターがハイブリダイズされるサンプル核酸フラグメントに存在する相補的配列に基づいてライゲーター - ディテクターを捕獲するために使用される。ディテクタープローブは好ましくは、種々のプローブ、好ましくはプローブの長さでヌクレオチド配列とのあらゆる可能な組み合わせを有する（又はあらゆる組み合わせにハイブリダイズできる）1組のプローブを有するセットに使用される。ディテクタープローブは好ましくは、個々のプローブが同じ長さを有するセットに使用される。ディテクタープローブのプローブ部分のための好ましい長さは、5、6、7及び8個の長さのヌクレオチドである。ディテクタープローブは好ましくは、プローブ部分（サンプルフラグメントへのハイブリダイゼーションのための）、及びプローブ部分が支持体、捕捉タグ、ソーティングタグ又はラベルに結合されるリンカー部分を包含する。それらのリンカー部分は、いずれかの適切な構造を有することができ、そして一般的に、ディテクタープローブの固定化又は合成方法に基づいて選択されるであろう。リンカー部分は、いずれかの適切な長さを有し、そして好ましくは、プローブ部分の効果的なハイブリダイゼーションを可能にするために十分な長さのものである。便利さのために及び特にことわらない限り、ディテクタープローブの長さは、プローブのプローブ部分の長さを言及する。固定化されたディテクタープローブは、支持体上に固定されるディテクタープローブである。

【0052】

ディテクタープローブは、支持体上に固定され得、そして好ましくは固定され

る。ディテクタープローブはまた、ディテクタープローブはまた、それらが結合されているプローブ及びライゲーター - ディテクターの固定化又は捕獲を促進するために捕捉タグを含み、又はそれにより会合され得る。

【0053】

ディテクタープローブはまた、プローブに結合されるプローブ配列及びライゲーター - ディテクターの開放を促進するために1又は複数の光分解性ヌクレオチドを含むことができる。光分解性ヌクレオチド及びそれらの使用は、WO 00/04036号に記載されている。

【0054】

ディテクタープローブは、天然に存在するヌクレオチドから構成される必要はない。修飾されたヌクレオチド、異常塩基のヌクレオチド、及びオリゴヌクレオチド類似体を使用され得る。必要とされるすべては、プローブが本明細書に記載される一般構造を有し、そして開示される方法において必要とされる相互作用及び反応を行うことができることである。

プローブアレイ：

異なったディテクタープローブは、セットとして一緒に使用され得る。このセットは、プローブのすべて又はサブセットの混合物として使用され、プローブは別々の反応において別々に使用され、又はアレイにおいて固定される。別々に又は混合物として使用されるプローブは、例えば捕捉タグ、ソーティングタグ又はビーズ上への固定化の使用を通して物理的に分離できる。プローブアレイ（本明細書においては、アレイとしても言及される）は、アレイ上の同定された又は予測される位置で固定される多くのプローブを包含する。この場合、多くのプローブは、異なった配列をそれぞれ有する複数のプローブを言及する。アレイ上の予測される位置は、1つのタイプのプローブ（すなわち、その位置でのすべてのプローブは同じ配列を有する）を有する。個々の位置は、プローブの複数のコピーを有するである。アレイにおける異なった配列のプローブの空間的分離は、核酸サンプルにおける核酸フラグメントへのプローブのハイブリダイゼーションを通してプローブに結合されるようになるライゲーター - ディテクターの別々の検出及び同定を可能にする。ライゲーター - ディテクターがプローブアレイにおけ

る所定の位置で検出される場合、それは、ライゲーター - ディテクターがハイブリダイズした核酸フラグメントにおける部位に隣接する配列がアレイにおけるその位置で固定されるプローブに相補的であることを示す。

【0055】

アダプター - インデクサー及びライゲーター - ディテクターは又は、アレイにおいて固定され得る。開示される方法の異なった態様が、固定され、ラベルされ、又は標識される異なった成分により行われ得る。アダプター - インデクサー及びライゲーター - ディテクターのアレイは、下記のようにして及びディテクタープローブについて本明細書において記載されるようにして、製造され、そして使用され得る。

【0056】

プローブアレイに使用するための固定状態支持体は、オリゴヌクレオチドが直接的に又は間接的に結合され得るいずれかの固体材料を包含する。これは、材料、例えばアクリルアミド、セルロース、ニトロセルロース、ガラス、ポリスチレン、ポリエチレンビニルアセテート、ポリプロピレン、ポリメタクリレート、ポリエチレン、ポリ酸化エチレン、ポリシリケート、ポリカーボネート、テフロン、フルオロカーボン、ナイロン、シリコーンゴム、ポリ無水物、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリオルトエステル、ポリプロピルマレート、コラーゲン、グリコサミノグリカン及びポリアミノ酸を包含する。固体状態支持体は、いずれか有用な形、例えば薄フィルム又は膜、ビーズ、ボトル、皿、繊維、繊維織物、形状化されたポリマー、粒子及び微小粒子の形を有することができる。固体状態支持体のための好ましい形は、マイクロタイター - 皿である。マイクロタイター皿の最も好ましい形は、標準の96 - ウェル型である。

【0057】

固体状態へのオリゴヌクレオチドの固定化方法は、十分に確立されている。ディテクタープローブは、確立されている結合方法を用いて、支持体に結合され得る。例えば、適切な結合方法は、Peaseなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA91 (11):

5022-5026 (1994)、及びKhrapkoなど., Mol. Biol. (Mosk)(USSR)25:718-730 (

1991)により記載される。カゼイン被覆されたスライド上への3' - アミンオリゴヌクレオチドの固定化方法は、Stimpsonなど., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6379-6383)により記載される。固体状態支持体へのオリゴヌクレオチドの結合の好ましい方法は、Guoなど., *Nucleic Acids Res.* 22: 5456-5465 (1994) により記載される。

【0058】

固体状態支持体上にオリゴヌクレオチドのアレイを生成するための方法もまた知られている。そのような技法の例は、アメリカ特許第5,871,928号 (Fodorなど.,)、アメリカ特許第5,54,413号、第5,429,807号及び第5,599,695号 (Peaseなど.,) に記載される。

【0059】

好ましいけれども、所定のプローブアレイが単一のユニット又は構造体である必要はない。プローブのセットは、固体支持体のいずれかのメンバー上に分布され得る。例えば、極端には、個々のプローブは、別々の反応管又は容器に固定され得る。

【0060】

アレイにおけるプローブはまた、類似するハイブリッド安定性を有するよう企画され得る。これは、ディテクタープローブへのフラグメントのハイブリダイゼーションをより効果的にし、そしてミスマッチハイブリダイゼーションの発生率を低める。プローブのハイブリッド安定性は、既知の式及び熱力学の原理を用いて計算され得る (例えば、Santa Lucia など., *Biochemistry* 3555 - 3562 (1996); Freier など., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9373-9377 (1986); Breslauer など., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3746-3750 (1986) を参照のこと)。プローブのハイブリッド安定性は、例えば、プローブを化学的に修飾することによって、より類似するようされ得る (ハイブリッド安定性の平滑性として言及され得る工程) (Nguyenなど., *Nucleic Acids Res.* 25 (15): 3059-3065 (1997); Hohsisei, *Nucleic Acids Res.* 24 (3): 430-432 (1996))。ハイブリッド安定性はまた、特殊化された条件下でハイブリダイゼーションを行うことによって平滑化され得 (Nguyenなど., *Nucleic Acids Res.* 27 (6): 1492-1498 (1999);

Wood など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA82 (6): 1585-1588 (1985))。

【0061】

プローブのハイブリッド安定性を平滑化するためにもう1つの手段は、プローブの長さを変えることである。これは、プローブのすべてが類似するハイブリッド安定性(可能な程度まで)を有するよう、個々のプローブのハイブリッド安定性の調節を可能にする。プローブから単一のヌクレオチドの付加又は欠失は一定のインクレメントでプローブのハイブリッド安定性を変えるので、プローブアレイにおけるプローブのハイブリッド安定性は等しくないであろう。この理由のために、ハイブリッド安定性の類似性とは、本明細書において使用される場合、プローブのハイブリッド安定性の類似性のいずれかの上昇性を言及する(又は、プローブのハイブリッド安定性における差異の低下を言及する)。これはハイブリッド安定性におけるそのような高められた類似性がハイブリダイゼーションの効率及び適合度、及びディテクタープローブの連結を改良することができるので、有用である。

【0062】

サンプルフラグメントへのディテクタープローブのハイブリダイゼーション及び連結の効率はまた、異なったハイブリダイゼーション条件にゆだねられ得るプローブアレイの部分又はセグメントにおける類似するハイブリッド安定性のディテクタープローブをグループ分けすることによっても改良され得る。この場合、ハイブリダイゼーション条件は、特定種類のプローブのために最適化され得る。ラベル:

ディテクタープローブに結合されるライゲーター - ディテクターの検出及び定量化を助けるために、ラベルが、ライゲーター - ディテクター、ディテクタープローブ及び/又はアダプター - インデクサー中に組み込まれ、結合され、又は会合され得る。好ましくは、ライゲーター - ディテクターはラベルされる。ラベルは、ライゲーター - ディテクターにより、直接的に又は間接的に会合され得、そして測定でき、検出できるシグナルを、直接的に又は間接的にもたらすいずれかの分子である。ラベルは、それが成分に共有的に又は非共有的にカップリングされるか又は結合される場合、その成分に会合される。ラベルは、それが成分に共

有結合される場合、その成分に結合される。核酸中への組み込み、カップリング又は会合のための多くの適切なラベルは知られている。開示される方法への使用のために適切なラベルの例は、放射性同位体、蛍光分子、リン光分子、生物ルミネセント分子、酵素、抗体及びリガンドである。

【0063】

適切な蛍光ラベルの例は、次のものを包含する：フルオレセイン (FITC)、5, 6 - カルボキシメチルフルオレセイン、テキサスレッド、ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1, 3 - ジアゾール - 4 - イル (NBD)、クマリン、塩化ダンシル、ローダミン、4' - 6 - ジアミジンノ - 2 - フェニルイノドール (DAPI)、及びシアニン色素Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5及びCy7。好ましい蛍光ラベルは、フルオレセイン (5 - カルボキシフルオレセイン - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル) 及びローダミン (5, 6 - テトラメチルローダミン) である。同時検出のための好ましい蛍光ラベルは、FITC、及びシアニン色素Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5及びCy7である。それらのほたる石についてのそれぞれの吸収度及び発光最大値は次の通りである：FITC (490nm; 420nm)、Cy2 (554nm; 568nm)、Cy3.5 (581nm; 588nm)、Cy5 (652nm; 672nm); Cy5.5 (682nm; 703nm) 及びCy7 (755nm; 778nm); 従ってそれらの同時検出を可能にする。蛍光ラベルは、種々の市販源、例えばMolecular Probes, Eugene, OR及びResearch Organics, Cleveland, Ohio から得られる。

【0064】

ラベルされたヌクレオチドは、それらが、合成の間、ライゲーター - ディテクター中に直接的に組み込まれ得るので、ラベルの形を含む。DNA又はRNA中に組み込まれ得るラベルの例は、ヌクレオチド類似体、例えばBrdUrd (Hoy and Schimke, Mutation Research 290: 217-230 (1993)), BrUTP (Wansickなど., J. Cell Biology 122: 283-293 (1993)), 及びビオチンにより (Langerなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6633 (1981))、又は適切なハプテン、例えばジゴキシゲニンにより (Kerkhof, Anal. Biochem. 205: 359-364 (1992))、修飾されたヌクレオチドを包含する。適切な蛍光ラベルされたヌクレオチドは、フルオレセイン - イソチオシアネート - dUTP、シアニン - 3 - dUTP及びシアニン - 5 - dUTP

である (Yuなど., Nucleic Acids Res., 22: 3226-3232 (1994))。DNAのための好ましいヌクレオチド類似体検出ラベルはBrdUrd (BUDRミリン酸、Sigma)であり、そしてRNAのための好ましいヌクレオチド類似体検出ラベルは、ビオチン - 16 - ウリジン - 5' - 三リン酸 (ビオチン - 16 - dUTP, Boehringer Mannheim) である。フルオレセイン、Cy3及びCy5は、直接的なラベリングのためにdUTPに連結され得る。Cy3.5及びCy7は、ビオチン - 又はジゴキシゲニン - ラベルされたプローブの第2の検出のためにアビジン又は抗 - ジゴキシゲニン接合体として入手できる。

【0065】

核酸中に組み込まれるラベル、例えばビオチンは、当業界において良く知られている感受性方法を用いて、連続的に検出され得る。例えば、ビオチンは、ビオチンに結合され、そして続いて、適切な基質の化学ルミネセンス (例えば、化学ルミネセンス基質CSPD: ニナトリウム、3 - (4 - メトキシスピロ - [1, 2 - ジオキセタン - 3 - 2' - (5' - クロロ) トリシルロ [3, 3, 1, 1^{3,7}] デカン] - 4 - イル) フェニルホスフェート; Tropix, Inc.) により検出される、ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ接合体 (Tropix, Inc.) を用いて検出され得る。

【0066】

他のラベルは、分子又は金属バーコード、質量ラベル、及び核磁気共鳴、電子常磁性共鳴、表面増強されたラマン散乱、表面プラスモン共鳴、蛍光、リン光、化学ルミネセンス、共鳴ラマン、マイクロ波、又はそれらの組み合わせにより検出できるラベルを包含する。質量ラベルは、ラベルされた成分、すなわち質量分光計における特有の質量特性を有するか又はそれを付与する、化合物又は成分である。質量ラベルは、質量分光計が検出のために使用される場合に有用である。好ましい質量ラベルは、ペプチド核酸及び炭水化物である。ラベルの組み合わせもまた、有用である。例えば、265のラベルのユニーク組み合わせを有する、色素コードされた微小ビーズは、多くの成分を特徴づけるために有用である。例えば、256の異なったライゲーター - ディテクターは、独得にラベルされ、そして検出され得、開示される方法の多重化及び自動化を可能にする。

【0067】

有用なラベルは、次の文献に記載されている：de Haas, R. R., など., “Platinum porphyrins as phosphorescent label for time-resolved microscopy,” J. Histochem. Cytochem. 45(9): 1279-92 (1997); Karger and Gesteland, “Digital chemiluminescence imaging of DNA sequencing blots using a charge-coupled device camera,” Nucleic Acids Res. 20(24): 6657-65 (1992); Keyes, R. S., など., “Overall and internal dynamics of DNA as monitored by five-atom-tethered spin labels,” Biophys. J. 72(1): 282-90 (1997); Kirschstein, S., など., “Detection of the DeltaF508 mutation in the CFTR gene by means of time-resolved fluorescence methods,” Bioelectrochem. Bioenerg. 48(2): 415-21 (1999); Kricka, L. J., “Selected strategies for improving sensitivity and reliability of immunoassays,” Clin. Chem. 40(3): 347-57 (1994); Kricka, L. J., “Chemiluminescent and bioluminescent techniques,” Clin. Chem. 37(9): 1472-81 (1991); Kumke, M. U., など., “Temperature and quenching studies of fluorescence polarization detection of DNA hybridization,” Anal. Chem. 69(3): 500-6 (1997); McCreery, T., “Digoxigenin labeling,” Mol. Biotechnol. 7(2): 121-4 (1997); Mansfield, E. S., など., “Nucleic acid detection using non-radioactive labeling methods,” Mol. Cell Probes 9(3): 145-56 (1995); Nurmi, J., など., “A new label technology for the detection of specific polymerase chain reaction products in a closed tube,” Nucleic Acids Res. 28(8): 28 (2000); Oetting, W.S., など., “Multiplexed short tandem repeat polymorphisms of the Weber 8A set of markers using tailed primers and infrared fluorescence detection,” Electrophoresis 19(18): 3079-83 (1998); Roda, A., など., “Chemiluminescent imaging of enzyme-labeled probes using an optical microscope-videocamera luminograph,” Anal. Biochem. 257(1): 53-62 (1998); Siddiqi, A., など., “Evaluation of electrochemiluminescence-and bioluminescence-based assays for quantitating specific DNA,” Lab. Anal. 10(6): 423-31 (1996); Stevenson, C. L., など., “Synchronous luminescence: a new d

etection technique for multiple fluorescent probes used for DNA sequencing,” *Biotechniques* 16(6): 1104-11 (1994); Vo-Dinh, T., など., “Surface-enhanced Raman gene probes,” *Anal. Chem.* 66(20): 3379-83 (1994); Volk, H. H., など., “Microwave label detection technique for DNA in situ hybridization,” *Eur. J. Morphol.* 29(1): 59-62 (1991)。

【0068】

金属バーコード、すなわち分子バーコードの形は、30 - 300nmの直径×400 - 4000nmの多層多金属ロッドである。それらのロッドは、アルミナ金型中への電着により構成され、次にアルミナが除去され、小さな多層目的物が残る。システムは、7種までの異なった金属により、12までの区画をコードされ、ここで前記金属は異なった反射能を有し、そして従って、金属に依存して、光学顕微鏡において、より明るく又は暗く出現し；これが実際的に制限されていない識別コードを導く。金属バーがガラス又は他の材料により被服され得、そしてプローブが当業界において通常知られている方法を用いてガラスに結合され；アッセイ読み出し情報は標的物からの蛍光によってであり、そしてプローブの正体はバーコードの明暗パターンからである。

【0069】

ラベルにより生成されるシグナルを検出し、そして測定するための方法は知られている。例えば、放射性同位体は、シンチレーション計数又は直接的な可視化により検出され得；蛍光分子が蛍光分光計により検出され得；リン光分子が分光計により検出され、又はカメラにより直接的に可視化され得；酵素が、その酵素により触媒される反応の生成物の検出又は可視化により検出され得；抗体がその抗体に結合される第2検出ラベルを検出することによって検出され得る。そのような方法は、増幅及び検出の開示される方法に直接的に使用され得る。本明細書において使用される場合、検出分子は、増殖された核酸と相互作用し、そして1又は複数の検出ラベルが結合される分子である。もう1つの形の検出においては、ラベルは、異なった蛍光、リン光又は化学ルミネセント発光寿命を通して一時的に区別され得る。多重化された時間 - 依存性検出は、Squireなど., *J. Microscopy* 197(2): 136-149 (2000) 及びWO 00/08443号に記載されている。

【0070】

ラベルの量又は強度の定量的測定が使用され得る。例えば、定量化は、所定のラベル及び従って、ラベル化された成分が限界レベル又は量で存在するかどうかを決定するために使用され得る。限界レベル又は量は、シグナルのいずれかの所望するレベル又は量であり、そして実施される方法の特定の形の必要性に適合するよう選択され得る。

第2アダプター：

第2アダプターは、1本鎖部分及び二本鎖部分を含む二本鎖核酸である。前記一本鎖部分は、第2アダプター的一端で存在し、そして付着端を構成する。好ましくは、突出する一本鎖（付着端）は、2, 3, 4又は5個のヌクレオチドを有する。第2アダプターの二本鎖部分は、いずれかの便利な配列又は長さを有することができる。一般的に、二本鎖部分の配列及び長さは、方法における続く段階に適合されるよう選択される。例えば、第2アダプターにおける配列は、プライマー又はプローブハイブリダイゼーションのために使用され得る。アダプターが連結されているサンプルにおけるフラグメントが増幅され得る場合、第2アダプターは、プライマーハイブリダイゼーションのためのプローブを提供することができる。従って、第2アダプターの二本鎖部分のための好ましい配列組成及び長さは一般的に、プライマーハイブリダイゼーションのために有用であるそれらのものである。

【0071】

一般的に、第2アダプターの二本鎖部分の配列は、方法における続く段階に使用されるいずれかの核酸開裂試薬の認識配列を含むべきではない。好ましくは、第2アダプターは、自己-相補的であるいずれかの配列を有さない。この条件は、ミスマッチ又はギャップを有さない、6個よりも多くのヌクレオチドの相補的領域が存在しない場合に適合されると思われる。

【0072】

開示される方法への使用のための1組みの第2アダプターは、異なった第2アダプターを含むことができ、ここで1本鎖部分はそれぞれ、第2制限酵素の1つにより生成される付着端配列と適合できる異なったヌクレオチド配列を有する。

好ましくは、1組の第2アダプターのメンバーは、前記組の個々のメンバーに対して同一である二本鎖部分を含む。

【0073】

第2アダプターはまた、第2アダプターが結合されているフラグメントの固定又は捕獲を促進するために捕捉タグを含み、又はそれにより会合され得る。第2アダプターはまた、第2アダプターが結合されているフラグメントの分類又は分離を促進するためにソーティングタグを含み、又はそれにより会合され得る。第2アダプターはまた、第2アダプターが結合されているフラグメントの検出を促進するために、ラベルを含み、又はそれにより会合され得る。第2アダプターはまた、支持体上に固定され得る。

【0074】

捕捉タグ

捕捉タグは、捕捉タグを有する化合物または複合体を、それを有さないものから分離するために用いられ得る任意の化合物である。好ましくは、捕捉タグは、リガンド結合分子または抗体のような別の化合物と結合するかまたは相互作用するリガンドまたはハプテンのような化合物である。捕捉タグおよび捕捉構成成分間のこのような相互作用が、ハプテンおよび抗体またはリガンドおよびリガンド結合分子間のような特異的相互作用であるのも好ましい。

【0075】

核酸プローブの関係で記載される好ましい捕捉タグは、Syvnen et al., Nucleic Acids Res., 14:5037 (1986) により記載されている。好ましい捕捉タグとしては、核酸中に組み入れられ得るビオチンが挙げられる。開示された方法では、アダプター - インデクサーまたは二次アダプター中に組み入れられる捕捉タグは、支持体に接着されるかまたは結合されることによりサンプル断片（アダプターがそれに結合されている）を捕捉させ得る。このような捕捉は、断片の洗浄および取扱いの単純化を可能にし、そしてすべてのまたは一部の方法の自動化を可能にする。

【0076】

支持体上のサンプル断片の捕捉は、いくつかの方法で成し遂げられ得る。一実

施態様では、捕捉ドックが支持体に接着されるかまたは結合される。捕捉ドックは、断片上に捕捉タグを結合するかまたはそれと相互作用することによりサンプル断片の接着を媒介する化合物または部分である。支持体上に固定された捕捉ドックは、支持体上の断片の捕捉を可能にする。このような捕捉は、その後の過程を妨げ得る反応構成成分を洗い落とす便利な手段を提供する。

【0077】

開示された方法に用いるための支持体は、検定の構成成分が接着または結合され得る任意の固体物質を含み得る。支持体の例としては、アクリルアミド、セルロース、ニトロセルロース、ガラス、ポリスチレン、ポリエチレンビニルアセテート、ポリプロピレン、ポリメタクリレート、ポリエチレン、ポリエチレンオキシド、ポリシリケート、ポリカルボネート、テフロン、フルオロカーボン、ナイロン、シリコンゴム、ポリアンヒドライド、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリオルトエステル、ポリプロピルフメレート、コラーゲン、グリコサミノグリカンおよびポリアミノ酸のような物質が挙げられるが、これらに限定されない。支持体は、薄皮膜または膜、ビーズ、ボトル、皿、繊維、織繊維、造形ポリマー、粒子および微粒子を含めた任意の有用な形態を有し得る。支持体の好ましい形態は、プレートおよびビーズである。ビーズの最も好ましい形態は、磁気ビーズである。

【0078】

一実施態様では、捕捉ドックは、オリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドを支持体に固定し、結合するための方法は、十分確立されている。例えば、適切な付着方法は、Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(11):5022-5026 (1994) およびKhrapko et al., Mol. Biol. (Mosk) (USSR) 25:718-730 (1991) により記載されている。カゼイン被覆スライド上の3'-アミノオリゴヌクレオチドの固定化のための方法は、Stimpson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6379-6383 (1995) により記載されている。固体状態支持体へのオリゴヌクレオチドの好ましい付着方法は、Guo et al., Nucleic Acids Res. 22:5456-5465 (1994) により記載されている。

【0079】

別の実施態様では、捕捉ドックは、抗ハイブリッド抗体である。支持体に抗体を固定するための方法は、十分確立されている。固定化は、標準固定化化学を用いて、例えばアミノ化表面、カルボキシル化表面またはヒドロキシル化表面に取り付けることにより成し遂げられ得る。付着剤の例は、臭化シアン、スクシンイミド、アルデヒド、トシルクロリド、アビジン - ビオチン、光架橋可能剤、エポキシドおよびマレイミドである。好ましい付着剤は、グルタルアルデヒドである。これらのおよびその他の付着剤、ならびに付着にそれらを用いるための方法は、Protein immobilization:fundamentals and applications,Richard F. Taylor, ed. (M. Dekker, New York, 1991), Johnstone and Thorpe, Immunochimistry In Practice (Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 1987) pages209-216 and 241-242およびImmobilized Affinity Ligands, Craig T. Hermanson et al., eds. (Academic Press, New York, 1992)に記載されている。抗体は、支持体内に存在する反応性側基に抗体上の遊離アミノ基を化学的に架橋することにより、支持体に取り付けられ得る。例えば、抗体は、架橋剤としてグルタルアルデヒドまたはカルボジイミドを用いて、遊離アミノまたはカルボキシル基を含有する支持体に化学的に架橋され得る。この方法では、遊離抗体を含有する水性溶液は、グルタルアルデヒドまたはカルボジイミドの存在下で固体状態支持体とともにインキュベートされる。グルタルアルデヒドによる架橋のために、反応体は、pH7.4で0.1 Mカコジル酸ナトリウムのような緩衝化溶液中の2容量%グルタルアルデヒドとともにインキュベートされ得る。他の標準固定化化学は、当業者には既知である。

【0080】

ソーティングタグ

ソーティングタグは、ソーティングタグを有する化合物または複合体を、それを有さないものから分類または分離するために用いられ得る任意の化合物である。概して、すべての捕捉タグはソーティングタグであり得る。ソーティングタグは、検出され得る、そしてタグ化構成成分のソーティングを媒介し得る化合物および部分も含み得る。このような形態のソーティングタグは、一般に捕捉タグではない。例えば、蛍光部分は、その部分でタグ化された構成成分の、そうでない

もの（または異なるタグを有するもの）からのソーティングを可能にし得る。しかしながら、このような蛍光部分は、それが相互作用し、捕捉され得る適切な捕捉ドックを必ずしも有さない。好ましくは、ソーティングタグは、ソーティングを媒介し得る標識、例えば蛍光標識である。

【0081】

増幅標的環（サークル）

増幅標的環（ATC）は、一般に40～1000ヌクレオチド、好ましくは約50～150ヌクレオチド、最も好ましくは約50～100ヌクレオチドを含有する環状一本鎖DNA分子である。ATCの部分は、回転環状増幅（RCA）に有用なATCを作製する特殊な機能を有する。これらの部分は、プライマー補足部分およびレポータータグ部分と呼ばれる。プライマー補足部分およびレポータータグ部分は、増幅標的環の必要素子である。ATCの特定部分に対応しないATCのセグメントは、恣意的選定配列であり得る。ATCは自己相補的であるいかなる配列も有さないのが好ましい。ミスマッチまたはギャップを伴わない6ヌクレオチド長より長い相補的領域が存在しない場合、この条件は満たされ则认为られる。

【0082】

増幅標的環は、複製されると、増幅標的環と相補的な配列の多重反復を含有する長いDNA分子を生じる。この長いDNA分子は、本明細書中では、タンデム配列DNA（TS-DNA）と呼ばれる。TS-DNAは、プライマー相補的部分およびレポータータグ部分と相補的な配列を含有する。TS-DNA中のこれらの配列は、プライマー配列（回転環複製プライマーの配列と適合する）およびレポータータグと呼ばれる。増幅標的環およびそれらの使用はさらに、米国特許第5,854,033号に記載されている。

【0083】

方法

FAAST法は、以下の基本的過程を包含する。二本鎖DNAに具現される核酸サンプルを、種々の配列を伴う付着末端を有する一組のDNA断片が生成されるように、1つ又はそれ以上の核酸開裂試薬、好ましくは制限エンドヌクレアーゼとともにインキュベートする。この目的のために好ましいのは、オフセット開

裂部位を有する単一ⅡⅡ-S型制限エンドヌクレアーゼの使用である。このようなⅡⅡ-S類制限エンドヌクレアーゼは認識配列と異なる部位で切断するため、仔レア種々の配列を伴う付着末端を有する一組のDNA断片を生じる。制限エンドヌクレアーゼまたはそれらの認識部位で切断するその他の核酸開裂試薬の混合物で核酸サンプルを消化することにより、同様の作用が得られる。

【0084】

4塩基付着末端に関しては、256の考え得る配列がある。一般紙期は、 $N = 4^X$ （式中、Xは付着末端の長さであり、Nは考え得る配列の数である）。十分に複雑な核酸サンプルでは、これらの配列はすべて、DNA断片組の末端に示される。核酸サンプルは、アリコート（インデックスサンプルと呼ばれる）に、好ましくは付着末端配列が存在するのと同様に多数のアリコート（即ち $N = 4^X$ アリコート）に分けられる。多重制限エンドヌクレアーゼを用いる場合、好ましくは消化前に、核酸サンプルをインデックスサンプルに分ける。単一制限エンドヌクレアーゼを用いる場合には、好ましくは消化後に、核酸サンプルをインデックスサンプルに分ける。次に、各インデックスサンプルを異なるアダプター-インデクサーと混合するが、その各々はそのインデックスサンプル中のDNA断片上の考え得る付着末端の1つと適合性である付着末端を有する。次に、アダプター-インデクサーを適合性DNA断片上に結合する。次に基本的方法は、ライゲーター-ディテクターとの核酸サンプルのハイブリダイゼーションに進行する。

【0085】

任意に、ライゲーター-ディテクターとのハイブリダイゼーション前に、各インデックスサンプルを次に1つ又はそれ以上のその他の核酸開裂試薬（第二核酸開裂試薬と呼ばれる）、好ましくは制限酵素とともにインキュベートし得る。第二核酸開裂試薬は、好ましくは4塩基認識配列を有する制限酵素である。インデックスサンプルはすべて、好ましくは同一核酸開裂試薬（単数または複数）で消化される。あるいは、指標試薬はさらに、その各々が異なる第二核酸開裂試薬または核酸開裂試薬組で消化される第二指標試薬に分けられる。次に、第二アダプターは、インデックスサンプル（または第二インデックスサンプル）中のDNA断片に結合され得る。好ましくは、同一第二アダプターを各サンプルサンプルに

用いる。異なる第二アダプターは、好ましくは、同一インデックスサンプルから得られる第二インデックスサンプルとともに用いられる。この場合、同一組の第二アダプターが各組の第二インデックスサンプルとともに用いられるのが好ましい。各インデックスサンプル（または第二インデックスサンプル）中のDNA断片は、ここでは各末端に結紮されたアダプターを有する。次に、PCRのような任意の適切な方法を用いて、DNA断片を増幅し得る。アダプター中の配列は、この増幅のためのプライマー結合部位として用いられ得る。

【0086】

任意に、ライゲーター - ディテクターとのハイブリダイゼーション前に、インデックスサンプル（または第二インデックスサンプル）は、さらなるアリコートに分けられ得る。これらは、制限化インデックスサンプルおよび非制限化インデックスサンプル（または第二インデックスサンプルが存在する場合には、制限化第二インデックスサンプルおよび非制限化第二インデックスサンプル）と呼ばれる。一般に、インデックスサンプル（または第二インデックスサンプル）は、1つ又はそれ以上の制限化インデックスサンプルおよび1つの非制限化インデックスサンプルに分けられ得る。制限化インデックスサンプル（または制限化第二インデックスサンプル）は次に、各々異なる核酸開裂試薬（第三核酸開裂試薬と呼ばれる）、好ましくは制限酵素とともにインキュベートされるが、しかし非制限化インデックスサンプル（または制限化第二インデックスサンプル）はそうでない。第三核酸開裂試薬は、好ましくはそれによりサンプルが消化された核酸開裂試薬または第二核酸開裂試薬のいずれとも異なる。

【0087】

いくつかの場合には、第三核酸開裂試薬は、制限化インデックスサンプル（または制限化第二インデックスサンプル）中のいくつかのDNA断片を切断し、したがって増幅（ライゲーター - ディテクターとの核酸サンプルのハイブリダイゼーション前のもう一つの任意の過程）に役立たない断片を作製する。この方法では、制限化インデックスサンプルおよび非制限化インデックスサンプル（または制限化および非制限化第二インデックスサンプル）により生成されるシグナル箱となり得るし、第三制限酵素の1つの認識配列を含有する断片が同定され得る。

【0088】

第二インデックスサンプル、制限化インデックスサンプル、非制限化インデックスサンプル、制限化第二インデックスサンプルおよび非制限化第二インデックスサンプルは、本明細書中では集合的に誘導性インデックスサンプルと呼ばれる。各々は、インデックスサンプルから、そしていくつかの場合には別の誘導性インデックスサンプルから得られる。概して、最後に生成された誘導性インデックスサンプルだけが、本方法では前方に運ばれる。例えば、第二インデックスサンプルが作製された場合、それらが得られたオリジナルインデックスサンプルは、本方法ではもはや前方に運ばれない（第二インデックスサンプルが運ばれる）。同様に、制限化および非制限化第二インデックスサンプルが作製された場合には、オリジナルインデックスサンプルも、制限化および非制限化第二インデックスサンプルが得られる第二インデックスサンプルも本方法では前方に運ばれない。しかしながら、インデックスサンプルおよび誘導性インデックスサンプルのすべてまたはいくつかを前方に運ぶことにより、付加的情報が獲得され得る。

【0089】

基本的過程（およびあらゆる所望の任意の過程）後、各インデックスサンプル（または、用いられる場合には、核誘導性インデックスサンプル）中のDNA断片を、ライゲーター - ディテクターとハイブリダイズする。各ライゲーター - ディテクターの一部は、少なくとも1つのアダプター - インデクサーの付着末端を含めた、そしてそれに隣接する配列のすべてまたは一部と適合するかあるいは相補的である。好ましくは、ライゲーター - ディテクターは、制限酵素での消化により生成される考え得る付着末端配列の1つと適合するかまたは相補的である配列を有する。ライゲーター - ディテクターは、それらの認識配列で切断する制限酵素が用いられる場合には、制限酵素の認識配列中のヌクレオチドとも相補的であり得る。ライゲーター - ディテクターは、アダプター - インデクサー中の共通配列と適合するかまたは相補的である配列も有し得る。この場合、適切なライゲーター - ディテクターはインデックスサンプルの各々（または用いられる場合には、各誘導性インデックスサンプル）とともに用いられる。即ち、各インデックスサンプル（または各誘導性インデックスサンプル）に用いられるライゲータ

ー - ディテクターオリゴヌクレオチドは、そのインデックスサンプルに用いられる（または誘導性インデックスサンプルが得られたインデックスサンプルに用いられる）アダプター - インデクサー配列中の、付着末端配列（ならびに付着末端配列と重複する場合には、認識配列）を含めた配列と適合するかまたは相補的である。あるいは、ライゲーター - ディテクターは、付着末端配列に隣接する、そしてアダプター - インデクサーからの断片の反対側の核酸断片の配列（アダプター - インデクサーがそれに結合された）と適合するかまたは相補的である配列を有し得る。このようなライゲーター - ディテクターは、V A A S Tに用いるために好ましい。

【0090】

最後に、各インデックスサンプル（または各誘導性インデックスサンプル）をディテクタープローブと混合し、プローブをライゲーター - ディテクターと結合する。好ましくは、用いられるプローブ組は、所定腸のすべての考え得る配列（例えば、すべての考え得る6塩基配列）を含む。ディテクタープローブをアレイ中に固定し得る。

【0091】

プローブがライゲーター - ディテクターの末端に隣接してハイブリダイズする場合のみ、ディテクタープローブおよびライゲーター - アダプターの末端と一緒に結合する。したがって、ライゲーター - ディテクターの末端がハイブリダイズするオリジナルサンプルからのDNA断片中の領域のすぐ隣りにプローブと相補的な配列（好ましくは付着末端配列）が存在する場合のみ、ライゲーター - ディテクターをディテクタープローブと結合する。開示された方法の種々の構成成分の関係および相互作用の例を、図2、3、4および5に示す。

【0092】

サンプルからの各プロセッシング化DNA断片（即ち、アダプター - インデクサーが結紮された各DNA断片）は、ディテクタープローブとのライゲーター - ディテクター（およびアダプター - インデクサー）の会合を生じる。この会合は、会合化構成成分の1つから生成されたシグナルにより検出される。開示された方法の好ましい形態では、ディテクタープローブ組（多重組が用いられる場合）

が用いられ、この場合、所定断片に関するシグナルはオリジナル付着末端配列（または認識配列）により確定される。各々の異なる付着末端または認識配列は、別個のインデックスサンプル中でプロセッシングされる。別組のディテクタープローブが、各インデックスサンプルまたは誘導性インデックスサンプルのために用いられる。所定断片に関するシグナルが会合され、検出されるプローブ組中のプローブは、DNA断片とハイブリダイズしたライゲーター - ディテクターに結合されるためには、ディテクタープローブがこの配列とハイブリダイズしなければならないために、付着末端配列（または認識配列）に隣接するDNA断片中の配列により確定される。複合核酸サンプルは、プローブ組中に独特のパターンのシグナルを生成する。核酸サンプルの独特のカatalog作製、ならびに異なる核酸サンプルから生成されるシグナルのパターンの高感度且つ強力な比較を可能にするのは、このパターンである。

【0093】

シグナルが会合するディテクタープローブ組および組中の特定のプローブは、シグナルを生じるDNA断片の配列ならびに付着末端に隣接する配列（あるいは制限酵素の認識配列ならびに認識配列に隣接する配列）を同定する。これは、4塩基付着末端および6塩基プローブが用いられる場合には、10塩基配列である。ディテクタープローブの各組は異なる付着末端配列を有する異なるアダプター - インデクサーを用いたため、ディテクタープローブ組は付着末端配列（4塩基）を同定する。各プローブは異なる配列を伴う異なるプローブを有するため、特定のプローブは付着末端に隣接する配列（6塩基）を同定する。隣接配列と相補的な配列を有するプローブのみがハイブリダイズし、したがってシグナルと会合するようになる。認識配列とII-S型制限酵素の開裂部位との固定関係は、そして用いられる場合には認識配列の同一性は、DNA断片についての付加的配列情報を提供する。

【0094】

生成された情報は、プローブアレイが用いられる場合、同様である。所定断片に関するシグナルが検出されるアレイ（多重アレイが用いられる場合）は、オリジナル付着末端配列（または認識配列）の配列により確定される。各々の異なる

付着末端または認識配列は、別個のインデックスサンプル中でプロセッシングされる。別個のアレイが、各インデックスサンプルまたは誘導性インデックスサンプルのために用いられる。DNA断片とハイブリダイズしたライゲーター - ディテクターに結合されるためには、プローブがこの配列とハイブリダイズしなければならないために、付着末端配列（または認識配列）に隣接するDNA断片中の配列により、所定断片に関するシグナルが検出されるアレイ中の位置が確定される。複合核酸サンプルは、アレイ上に独特のパターンのシグナルを生成する。

【0095】

DNA断片がシグナルを生成するアレイおよびアレイの位置は、DNA断片の付着末端の配列ならびに付着末端に隣接する配列（あるいは制限酵素の認識配列ならびに認識配列に隣接する配列）を同定する。これは、4塩基付着末端および6塩基プローブが用いられる場合には、10塩基配列である。各アレイが異なる付着末端配列を有する異なるアダプター - インデクサーを用いたため、アレイは付着末端配列（4塩基）を同定する。各位置は異なる配列を伴う異なるプローブを有するため、アレイ中の位置は、付着末端に隣接する配列（6塩基）を同定する。隣接配列と相補的な配列を有するプローブのみがハイブリダイズし、したがってシグナルと会合するようになる。認識配列とII-S型制限酵素の開裂部位との間の固定関係は、そして用いられる場合には認識配列の同一性は、DNA断片についての付加的配列情報を提供する。

【0096】

集散的に複数の異なる付着末端配列を生じる1つ又はそれ以上の核酸開裂試薬を用いて、開示された方法を実施する。好ましくは、核酸開裂試薬により生成される付着末端配列は、核酸開裂試薬の認識配列により限定されない。生成される付着末端は、好ましくは2、3、4または5ヌクレオチド長である。開示された方法に用いるための好ましい核酸開裂試薬は、II-S型制限エンドヌクレアーゼであって、これは認識部位の外側（またはそこから分枝した）位置でDNAを切断する酵素であって、付着末端を生成する。II-S型制限エンドヌクレアーゼの例は、FokI、BbvI、HgaI、BspMIおよびSfaNIである。

【0097】

開示された方法に用いるための核酸開裂試薬は、4ヌクレオチドA、C、GおよびTの順列および組合せを包含する付着末端を生じる。突出する塩基の数が多いほど、末端ヌクレオチド配列の考え得る順列および組合せの数は多く、そして特異的であると思われるインデキシングは多い。例えば、4塩基、5' - 突出付着末端を有する断片を放出する制限エンドヌクレアーゼ、例えばFokIは、 4^4 または256の考え得る突出テトラヌクレオチド末端を生成する。平均12,000の異なるcDNAを有するcDNAサンプルの制限エンドヌクレアーゼFokIによる切断は、4塩基、5' 突出末端を有する断片の混合物を生じる。塩基の無作為分布を含有するサンプルに関しては、平均で、FokIは45塩基対毎に2回切断して、512塩基対の平均断片サイズを生じる。cDNAの平均長が1,700塩基対である場合、各cDNAはおおよそ4つの断片を生じる。全サンプルが、 $4 \times 12,000 = 48,000$ 断片を含有する。 $4^4 = 256$ の考え得るテトラヌクレオチド配列が、したがって各付着末端に関して256の考え得る同一性が存在する。平均で、 $48,000 / 256 = 188$ の所定付着末端を有する断片が存在する。これらの断片は各々、各断片中の付着末端配列に隣接する配列に基づいて異なるプローブとのハイブリダイゼーションにより分類される。六量体プローブアレイは、4,096の異なる6ヌクレオチドプローブを有する。したがって、プローブアレイ中の4,096の六量体のうちの188のみが、平均で、ライゲーター - ディテクターと結紮する。各々4,096の異なる六量体ディテクタープローブを有する256プローブアレイを用いると、 $256 \times 4,096 = 1,048,576$ “貯蔵棚” で、この場合、48,000断片を分布する。これは、異なるcDNAサンプルを用いた場合、異なるパターンを同定するための十分な機会を残す。

【0098】

制限エンドヌクレアーゼBsp24IによるヒトゲノムDNA (3 X 10⁹塩基対の一倍体数を有する) の切断は、5塩基、3' - 突出末端を有する断片の大きく且つ複雑な混合物を放出する。平均で、Bsp24Iは、46塩基対毎に2回切断して、2048塩基対の平均断片サイズを生じ、 $3 \times 10^9 / 2048 = \text{約} 1.5 \times 10^6$ 断片をもたらす。 $4^5 = 1024$ の考え得るペンタヌクレオチド配列で、したがって、各付

着末端に関して1024の考え得る同一性が存在する。平均で、 $1.5 \times 106/1024 = 1,465$ の所定付着末端配列を有する断片である。これらの断片は各々、各断片中の付着末端配列に隣接する配列に基づいて異なるプローブとのハイブリダイゼーションにより分類される。七量体プローブアレイは、16,384の異なる7ヌクレオチドプローブを有する。したがって、アレイ中の16,384の七量体のうちの1,465のみが、平均で、ライゲーター - ディテクターと結紮する。各々16,384の異なる七量体ディテクタープローブを有する1024ディテクターアレイを用いると、 $1024 \times 16,384 = 1,6 \times 10^7$ “貯蔵棚” で、この場合、 1.5×106 断片を分布する。

【0099】

6塩基認識配列を有する20の異なる制限エンドヌクレアーゼによるcDNAサンプルの切断は、付着末端を有する断片の混合物を生じる。平均で、6塩基認識配列を有する制限エンドヌクレアーゼは、 $4 \times 6 = 4096$ 塩基対毎に1回切断する。サンプルが、1,500塩基対のcDNA平均長を有する約12,000cDNA分子を含有する場合には、制限酵素の1つによる切断は、約3200切断片（したがって、付着末端を有する6400DNA断片）を生じる。4塩基認識配列を有する2つの異なる制限エンドヌクレアーゼによるサンプルのさらなる切断（二次消化）は、 $4 \times 4 = 256$ 塩基対毎に1回、付加的切断を生じる。二次消化は、多くの場合、各断片上に切断を生じるため、これは（ $20 \times 2 = 40$ 第二インデックスサンプルの各々に関して）、各々約256塩基対長の約6,400断片を生じる。

【0100】

4塩基認識配列を有する5つの異なる制限エンドヌクレアーゼが三次消化に用いられる場合には、各制限化第二インデックスサンプル中の断片の約半数が切断される（これらの制限酵素が256塩基対毎に約1回切断するためである）。したがって、 $20 \times 2 \times 5 = 200$ の各制限化第二インデックスサンプル中に約3,200断片（無傷、アダプター - インデクサーおよび二次アダプターを有する）が存在する（非制限化第二インデックスサンプル中には約6,400断片が存在する）。これらの断片は各々、各断片中の付着末端配列に隣接する配列に基づいて異なるプローブとのハイブリダイゼーションにより分類される。六量体プローブアレイは、4,096の異なる6ヌクレオチドプローブを有する。したがって、アレイ中の4,096の六

量体のうちの3,200のみが、平均で、ライゲーター - ディテクターと結紮する。各々4,096の異なる六量体プローブを有する200プローブアレイを用いると、 $200 * 4,096 = 819,200$ “貯蔵棚” で、この場合、 $3,200 * 200 = 640,000$ の総断片を分布する（六量体アレイは、 $200 * 16,384 = 3,276,800$ “貯蔵棚” を提供する）。

【0101】

これらの実施例が説明するように、認識配列の長さ、生成される付着末端の長さ、および一緒に用いられるプローブの長さは、核酸断片が分類されるデータ貯蔵棚の数を決定する。十分長の付着末端およびディテクタープローブを用いることにより、断片のソーティングを分析されるサンプルの複雑性に適合させ得る。

【0102】

アダプター - インデクサーの包括的パネルの使用は、核酸断片の複合混合物の選定亜組への特定の機能的修飾の付着、およびそのように修飾された分子の同定のための手段を提供する。このような限定亜組の分子は、付加的切断およびインデキシングにより、あるいは確立された技法、例えばクローニング、PCR増幅またはゲル電気泳動のいずれかによりさらに分解し得る。そのクラスのこのの成員は、長さ、配列または制限エンドヌクレアーゼ地図のような特徴を同定することにより区別し得る。アダプター - インデクサーの付着末端の配列は、多数の核酸断片をインデキシングする手段を提供する。

【0103】

異なる配列のディテクタープローブは、プローブアレイ上の異なる位置で固定し得る。この点では、プローブアレイ上のプローブの配列およびインデックスサンプル中の核酸断片の配列は、アレイ上のどこで、ライゲーター - ディテクターが結合されるようになるかを確定する。プローブアレイ中の異なる位置でのライゲーター - ディテクターの存在、量、存在および量、あるいは非存在は、したがって、サンプル中の特定の核酸配列の存在または非存在に基づいた核酸サンプルの特色および指紋を提供するシグナルのパターンを形成する。この理由のために、シグナルのこのパターン（即ち、ライゲーター - ディテクターの存在、量、存在および量、あるいは非存在のパターン）のカatalog作製は、特に興味深い開示された方法の一実施態様である。本明細書中で別記したように、プローブミスマ

ッチの確率を用いて、異なるディテクタープローブとの特定の断片の示差的ハイブリダイゼーションを基礎にしたより複雑なカタログを作製し得る。

【0104】

カタログは、例えばプローブアレイ上のライゲーター - ディテクターのパターン、プローブアレイ上のライゲーター - ディテクターの存在のパターン、サンプル中の核酸断片のカタログ、あるいはサンプル中の核酸配列のカタログとして作製し、言及し得る。カタログ中の情報は、好ましくは位置情報の形態（即ち、ディテクターアレイ中の位置）、さらに好ましくは配列の形態である。カタログに関する好ましい配列情報は、ライゲーター - ディテクターが結合されたディテクタープローブの配列、ならびにサンプル中に存在する核酸断片の配列（ライゲーター - ディテクターが結合されたディテクターアレイ中の位置から得られる）を含む。

【0105】

核酸サンプルのこのようなカタログを、任意の他のサンプルから得られる同様のカタログと比較して、サンプル中の類似性および差（サンプル中の核酸の類似性および差を示す）を検出し得る。例えば、第一核酸サンプルのカタログを、第一核酸サンプルと同一型の生物からのサンプル、第一核酸サンプルと同一型の組織からのサンプル、第一核酸サンプルと同一生物体からのサンプル、第一核酸サンプルと同一供給源から、しかし異なる時期に得られたサンプル、第一核酸サンプルと異なる生物体からのサンプル、第一核酸サンプルと異なる型の組織からのサンプル、第一核酸サンプルと異なる系統の生物体からのサンプル、第一核酸サンプルと異なる種の生物体からのサンプル、あるいは第一核酸サンプルと異なる型の生物体からのサンプルのカタログと比較し得る。

【0106】

同一型の組織は、肝臓組織、筋組織または皮膚の組織である（これらは同一のまたは異なる生物体または生物体類からであり得る）。同一生物体とは、同一固体、動物または細胞を指す。例えば、患者から採取される2つのサンプルは、同一生物体からである。同一供給源とは、類似の、しかしより広範な、例えば同一生物体、同一生物体からの同一組織、または同一cDNAライブラリーからのサ

ンプルを指す。比較される同一供給源からのサンプルは、好ましくは異なる時点で収集される（したがって、検出される時間を経て考え得る変化を可能にする）。これは、治療の効果または症状の変化が査定される場合に、特に有用である。異なる生物体とは、異なる個々の生物体、例えば異なる患者、異なる個々の動物を指す。異なる生物体は、同一種類の異なる生物体または異なる種類の生物体を含む。異なる種類の生物体とは、イヌとネコ、ヒトとネズミまたは大腸菌とサルモネラ菌のような異なる種類の生物体を指す。異なる種類の組織とは、肝臓と腎臓、または皮膚と脳といった異なる種類の組織を指す。異なる系統または種の生物体とは、それらの用語が当業界で理解されているように、それらの種または系統名が異なる生物体を指す。

【0107】

ディテクタープローブと結合したライゲーター - ディテクターの存在、量、存在および量、または非存在は、ライゲーター - ディテクターに組み入れられた、結合されたまたはそれと会合した標識の検出により達せられ得る。あるいは、ライゲーター - ディテクターは、それらの配列の検出に基づいて検出し得る。これらの検出は一般に、ライゲーター - ディテクターのカップリングの直接検出と呼ばれる。多数の配列特異的検出技法のいずれか、例えば標識化プローブのハイブリダイゼーションを、この目的のために用い得る。ライゲーター - ディテクターの存在、量、存在および量、または非存在は、ライゲーター - ディテクターにより媒介されるシグナルを発生することによっても検出し得る。以下に記載する回転複製のためのプライマーとしてのライゲーター - ディテクターの使用は、この好ましい例である。ライゲーター - ディテクターの存在、量、存在および量、または非存在は、ライゲーター - ディテクターが結合されるディテクタープローブ、結合ライゲーター - ディテクターと会合するアダプター - インデクサー、またはその両方を検出することによっても検出し得る。これらの検出は一般に、ライゲーター - ディテクターのカップリングの間接検出と呼ばれる。

【0108】

本方法中の核酸増幅により、核酸断片に関して検出されるシグナルを増大し得る。アダプター - インデクサーが結合された核酸断片（アダプター / 断片と呼ば

れる)が増幅されるか、あるいはディテクタープローブと結合されたライゲーター - ディテクターが増幅されるかまたは別の核酸の増幅を媒介するのが好ましい。最初の場合には、任意の適切な方法を用いて、アダプター / 断片を増幅し得る。これらの例としては、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、リガーゼ連鎖反応 (LCR)、自立性配列複製 (3SR)、核酸配列ベースの増幅 (NASBA)、鎖置換増幅 (SDA)、Q β レプリカーゼによる増幅、および回転環増幅 (RCA) が挙げられる (Birkenmeyer and Mushahwar, J. Virological Methods, 35: 117-126 (1991); Landegren, Trends Genetics, 9:199-202 (1993); Lizardi et al., Nature Genetics 19 (3):225-232 (1998))。ライゲーター - ディテクター増幅の場合、増幅の好ましい形態は、ライゲーター - ディテクターによりプライムされる一本鎖環状DNA分子の回転環増幅である。この方法では、ライゲーター - ディテクターを介してディテクターアレイに固定された増幅化鎖を用いてDNA環の長いタンデム反復を生成する。増幅のこの技法は、PCT出願WO 97/19193に記載されている。ライゲーター - ディテクターが回転環複製プライマーとして用いられる場合は、増幅DNAが検出され得る (直接的にまたは組み入れ標識を介して) ため、ライゲーター - ディテクター中に標識を組み入れる必要はない。

【0109】

アダプター / 断片の増幅は、断片末端のアダプター - インデクサー配列の存在により (そして第二アダプターが用いられる場合には、他方の末端の第二アダプター配列の存在により) 促される。例えば、アダプター配列は、増幅プライマー配列のためにも用いられ得る。アダプター配列を用いて、回転環複製によるその後の増幅のためにアダプター / 断片を環化し得る。回転環増幅は、米国特許第5,854,033号およびPCT出願WO 97/19193に記載されている。

【0110】

別の実施態様では、アダプター - インデクサーが結合された核酸断片の鎖 (アダプター / 断片) を、ライゲーター - ディテクターとのハイブリダイゼーションの前に分離し得る。このような鎖分離は、ライゲーター - ディテクターハイブリダイゼーションの効率を改良し得る。任意の適切な技法を用いて、この分離を成

し遂げ得る。鎖分離は、好ましくはアダプター - インデクサーの鎖の一方の上に捕捉タグを含めるかまたはタグをソーティングすることにより成し遂げ得る。津ににこのような捕捉タグを用いて、アダプター / 断片の一方の鎖を固定し、他方の鎖を洗い落とす。固定化または洗浄化鎖は、本方法では前方に運ばれ得る。ソーティングタグは、ソーティング技法により鎖の分離を可能にし得る。

【0111】

別の実施態様では、インデックスサンプル中の種々の核酸断片の濃度は、標準化される。標準化は、用いられ得るあらゆる増幅過程の前または後に実施し得る。断片標準化のための好ましい技法は、核酸断片の一方の鎖の固定化、核酸断片の変性、多量の核酸断片のための $c_0 t_1 / 2$ より大きい時間のならびにまばらな核酸断片に関する $c_0 t_1 / 2$ 未満の時間の核酸断片の再生、ならびに非再生核酸断片の収集を包含する。

【0112】

ハイブリダイゼーションエラーを矯正するために、単一、二元的または逐次方式で2つの一般的アプローチの一方を用い得る。説明のために、ガラスマイクロアレイ検出系で実行されるハイブリダイゼーションおよび結紮実験を考察する。第一のアプローチでは、結紮過程前に、正しくないプローブ配列とのインデクサー - ディテクターの結紮を遮断する方法によりハイブリダイズ化アレイを処理する。このアプローチの鍵は、共有結合メカニズムが結合をなしえないよう、結紮されるニックを遮断する（滅菌的に妨害する）ことである。実際には、ハイブリダイズ化アレイをとって、それを遮断実体および適切な緩衝液と接触し、マス킹実体がミスマッチ上に正しく置かれるようになり、次に結紮により連続するのに適した温度で適切な時間、系を保持する。特定のミスマッチと結合するために選択される多数の一本鎖抗体は、多数の酵母菌ミスマッチ修復および細胞周期チェックポイントタンパク質、例えばMSH2 ~ MSH6と同様に、この方法のための使用を有する（Habraken et al., ATP-dependent assembly of a ternary complex consisting of a DNA mismatch and the yeast MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 protein complexes. J Biol Chem 273 (16) :9837-41 (1998) ; MSH2-MSH3 (Habraken et al., Binding of insertion/deletion DNA mismatches by the hete

rodimer of yeast mismatch repair protein MSH2 and MSH3. *Curr Biol* 6 (9) :1185-7 (1996) ;およびMec1 (Paciotti et al., Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p. *Embo J* 17 (14) :4199-209 (1998)))。

【0113】

第二のアプローチは、ミスマッチを含有する鎖を認識し、特異的に切断する系で共有結合化プローブ - 標的サンプルを処理することである。この第二のアプローチは、プローブアレイの最終緊縮洗浄において、破壊されたミスマッチ化サンプルがシグナル検出操作前にチップから洗い落とされるように、ミスマッチの認識およびミスマッチ化領域の破壊的ターゲティングまたは「エラーチェック」を利用する。實際上、ハイブリダイズ化および結紮化プローブアレイをとって、それを適切な緩衝液中のエラーチェック試薬と接触し、エラーチェック試薬がミスマッチを突き止め、最終緊縮洗浄前にミスマッチを含有する鎖を破壊するのに適切な温度で適切な時間、系を保持する。1つ又はそれ以上の以下の「エラーチェック」系を用い得る：T4エンドヌクレアーゼVII；タンパク質MutH、MutLおよびMutSと一緒に；MutY (Lu and Hsu, Detection of single DNA base mutations with mismatch repair enzymes. *Genomics* 14 (2) :249-55 (1992))；グルコシラーゼ (Neddermann and Jericny, Efficient removal of uracil from G.U mispairs by the mismatch-specific thymine DNA glycosylase from HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (5) :1642-6 (1994)；mammalian topoisomerase I (Yeh et al., Mammalian topoisomerase I has base mismatch nicking activity. *J Biol Chem* 269 (22) :15498-504 (1994))およびT7エンドヌクレアーゼI。

【0114】

特に、開示された方法におけるハイブリダイゼーション/カップリング過程 - アダプター - インデクサーが断片に結合され、そしてライゲーター - ディテクターがディテクタープローブに結合される過程の忠実度は、ミスマッチヌクレアーゼ、例えばT4エンドヌクレアーゼVIIでサンプルを消化することにより増大し得る。T4エンドヌクレアーゼVIIは、ミスマッチが存在する二本鎖DNA

を切断する。非正統的ハイブリダイゼーション／結紮を「非結紮化する」ことにより、核酸断片のカタログ作製ミスは、おそらく少なくされる。適切緊縮ハイブリダイゼーション条件を用いることにより、ハイブリダイゼーション／結紮過程の忠実度を最大にし得る。

【0115】

以下に、F A A S Tの例、ならびに得られ得る配列および配列関係を提示する。単一I I - S型制限酵素を一次消化に用いる場合、得られ得る配列情報は以下の構造を用いて説明し得る：

D N A断片：

..NNNNXXXX..NNNNRRRRR000000000SSSSNNNN..

配列情報： RRRRR000IIIIIISSSS

これらの構造においては、各文字はヌクレオチドを表す。Nは、任意のヌクレオチド（本方法との特別な同一性および関係を有さない）を表す。Rは、I I - S型制限酵素の認識配列中のヌクレオチドを表す。Oは、I I - S型制限酵素の認識部位および切断部位間のオフセット中のヌクレオチドを表す。Sは、I I - S型制限酵素による切断に起因する付着末端中のヌクレオチドを表す。Xは、二次制限酵素の認識／切断部位中のヌクレオチドを表す。Iは、固定化オリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチドを表す。

【0116】

D N A断片..NNNNXXXX..NNNNRRRRR000000000SSSSNNNN..から、配列情報RRRRR000IIIIIISSSSが得られる。この実施例では、I I - S型制限酵素は、5塩基認識配列、切断部位に対する9塩基オフセットを有し（即ち、認識配列と切断部位の間に9つの塩基が存在する）、そして4塩基付着末端を作製する。プローブは、六量体配列を有する。したがって、シグナルが生成される各アレイ位置は、本実施例では、特定の配列：nnnnn---nnnnnnnnnn（ここでnは固定化ヌクレオチドを表し、各-は、非固定化ヌクレオチドを表す）を表す。これは、確定配列と呼ばれる。配列が決定された核酸断片の部分は、付着末端、ディテクタープローブがハイブリダイズする付着末端配列に隣接する配列、および制限酵素の認識配列に対応する（それぞれS、IおよびR）。

【0117】

この配列情報は、以下の構造によっても表され得る：

A - B - C - D

(この場合、Aは制限酵素の認識配列であり、Bは未知の配列のギャップであり、Cは固定化オリゴヌクレオチドがハイブリダイズした配列であり、そしてDは付着末端配列である)。ギャップは、認識配列とプローブがハイブリダイズした配列との間のヌクレオチドを表す。Cは常に、付着末端配列Dに隣接する。前記の実施例では、AはRRRRRであり、Bは000であり、CはIIIIIIであり、そしてDはSSSSである。開裂なしでは増幅は認められず(したがって、その核酸分子のさらなるプロセッシングもない)、シグナルは存在しないという結果になるため、二次制限酵素による開裂も有用な情報を付加する。

【0118】

開示された方法を用いて得られる配列情報は、核酸断片の特定の実施例を用いて説明し得る。以下の配列を有する核酸断片を含有する核酸サンプルを仮定する：

..CGGTGGATGACTTGAAGCTATGCTTAGG..

..GCCACCTACTGAACTTCGATACGAATCC..

GGATGの認識配列ならびに9および13ヌクレオチドによる切断部位オフセットを有するII-S型制限酵素であるFokIでサンプルが消化される場合、断片は開裂されて以下の断片を生成する(FokI認識配列を太字で示す)：

..CGGTGGATGACTTGAAGC TATGCTTAGG..

..GCCACCTACTGAACTTCGATAC GAATCC..

対応するアダプター - インデクサーが断片と結紮され、結紮化断片が対応するライゲーター - ディテクターとハイブリダイズされる場合、以下の核酸が得られる(アダプター - インデクサーからの配列に下線を付す)：

TATGCGGTATTACAGCCTATTGGG - 標識

..GCCACCTACTGAACTTCGATACGCCATAATGTCGGATAACCC.

核酸が適切なプローブ(本実施例では固定化六量体)とハイブリダイズされ、プローブおよびライゲーター - ディテクターが結紮される場合、以下の構造が得ら

れる：

支持体 - TGAAGCTATGCGGTATTACAGCCTATTGGG - 標識

..GCCACCTACTGAACTTCGATACGCCATAATGTCGGATAACCC.

ライゲーター - ディテクターの標識が検出されるプローブアレイ中の位置により、固定化プローブの配列を同定する。隣接付着末端の配列は、ライゲーター - ディテクターの標識が検出されるディテクターアレイにより同定する（異なるディテクターアレイが各付着末端配列に用いられるため）。最後に、認識配列に対する切断部位の関係により、認識配列の配列を同定する。したがって、この実施例では、ATAC付着末端ディテクターアレイのTGAAGC六量体位置中の標識の検出は、以下の配列を有する核酸サンプル中の核酸断片の存在を示す：

CCTACNNNACTTCGATAC.

この配列を一般構造 A - B - C - D と関連させると、A は CCTAC であり、B は NNN であり、C は ACTTCG であり、そして D は ATAC である。

【0119】

一次消化のために多制限酵素を用いる場合、得られる配列情報は、以下の構造を用いて説明し得る：

DNA断片：

..NNXXXXNN..NNRRRRNN..NNIIIIIISSSSSSNN..

配列： XXXX.....RRRR.....IIIIIISSSSSS

これらの構造においては、各文字はヌクレオチドを表す。Nは、任意のヌクレオチド（本方法との特別な同一性および関係を有さない）を表す。Sは、一次制限酵素の認識配列（付着末端を含む）中のヌクレオチドを表す。Xは、二次制限酵素の認識／切断部位中のヌクレオチドを表す。Rは、三次制限酵素の認識配列中のヌクレオチドを表す。Iは、ディテクタープローブと相補的なヌクレオチドを表す。二次および三次制限酵素の認識部位間の、ならびに二次制限酵素の認識部位とプローブ補足体間の配列および距離は、基本的方法では確定されない。

【0120】

DNA断片..NNXXXXNN..NNRRRRNN..NNIIIIIISSSSSSNN..から、配列情報XXXX..
....RRRR.....IIIIIISSSSSSが得られる。この実施例では、固定化プローブは、

六量体配列を含有する。したがって、シグナルが生成される各アレイ位置は、本実施例では、特定の配列：nnnn...nnnn...nnnnnnnnnnnnnn（ここでnは同定化ヌクレオチドを表し、各...は、非同定化ギャップ配列を表す）を表す。これは、確定配列と呼ばれる。配列が決定された核酸断片の部分は、一次制限酵素の認識配列、ディテクタープローブがハイブリダイズする認識配列に隣接する配列、二次制限酵素の認識配列、および三次制限酵素の認識配列に対応する（それぞれS、I、XおよびR）。

【0121】

この配列情報は、以下の構造によっても表され得る：

E - B - F - B - C - D

（この場合、Bは未知の配列のギャップであり、Cはプローブがハイブリダイズした配列であり、Dは一次制限酵素の認識配列であり、Eは二次制限酵素の認識配列であり、そしてFは三次制限酵素の認識配列である）。ギャップは、二次および三次制限酵素の認識配列間、ならびに三次制限酵素の認識配列とプローブがハイブリダイズした配列との間のヌクレオチドを表す。Cは常に、認識配列Dに隣接する。前記の実施例では、CはIIIIIIであり、DはSSSSSSであり、EはXXXXであり、そしてFはRRRRである。

【0122】

開示された方法を用いて得られる配列情報は、核酸断片の特定の実施例を用いてさらに説明し得る。以下の配列を有する核酸断片を含有する核酸サンプルを仮定する：

..CGCATGGG..ATAGCTTG..CAAGCTATGGATCCGA..

..GCGTACCC..TATCGAAC..GTTCGATACCTAGGCT..

4塩基付着末端を生じるGGATCCの認識配列を有する制限酵素であるBamHIでサンプルが一次消化される場合、断片は開裂されて以下の断片を生成する：

..CGCATGGG..ATAGCTTG..CAAGCTATG GATCCGA..

..GCGTACCC..TATCGAAC..GTTCGATACCTAG GCT..

対応するアダプター - インデクサーが断片と結紮され、断片がNlaI（制限配列CATG）で消化される場合、結果は以下の通りである：

..CGCATG GG..ATAGCTTG..CAAGCTATGGATCTGGTATTACAGCCTATTG
 ..GC GTACCC..TATCGAAC..GTTTCGATACCTAGACCATAATGTCGGATAAC

第二アダプターの付加および対応するライゲーター - ディテクターとのハイブリダイゼーション後、以下の核酸を得る（アダプター - インデクサーからの配列に下線を付す）。アダプター - インデクサーが付着末端配列および残りの認識配列の両方とハイブリダイゼーションすることに留意（即ち、付着末端中にCはない）。

【0123】

GGATCTGGTATTACAGCCTATT - *

CGGTACCTAGAGAGTGTACCC.TATCGAAC..GTTTCGATACCTAGACCATAATGTCGGATAA

この核酸が適切なプローブ（この実施例では固定化六量体）とハイブリダイズ去れ、そして固定化プローブおよびライゲーター - ディテクターが結紮される場合、以下の構造が得られる：

支持体 - AGCTATGGATCCGGTATTACAGCCTATT - *

CGGTACCTAGAGAGTGTACCC.TATCGAAC..GTTTCGATACCTAGGCCATAATGTCGGATAA

ライゲーター - ディテクターの標識が検出されるアレイ中の位置により、固定化プローブの配列を同定する。隣接認識配列（付着末端を含む）の配列は、ライゲーター - ディテクターの標識が検出されるアレイにより同定する（異なる組のアレイが各インデックスサンプルに用いられるため）。二次制限酵素の認識配列の配列は、ライゲーター - ディテクターの標識が検出されるアレイにより同定する（異なる組のアレイが各二次インデックスサンプルのために用いられるため）。最後に、三次制限酵素で消化された制限化第二インデックスサンプルのためのアレイからはシグナルは存在しないか否かを見ることにより、内部配列（三次制限酵素の認識配列）の存在を確定する（異なるアレイは各制限化および非制限化第二インデックスサンプルのために用いられる）。シグナルが存在しない場合、それは、認識部位が断片中に存在することを示す。三次制限酵素による消化後に増幅過程が存在しない場合には、この消化は、NlaI消化の前またはNlaI消化の後に実施される。

【0124】

したがって、この実施例では、CCTAGG付着末端組のアレイ中のGTAC二次認識部位組のアレイ中のTCGA三次認識部位アレイのAGCTAT六量体位置中の標識の検出は、以下の配列を有する核酸サンプル中の核酸断片の存在を示す：

GTAC...TCGA...TCGATACCTAGG.

この配列を一般構造 E - B - F - B - C - D と関連させると、C は TCGATA であり、D は CCTAGG であり、E は GTAC であり、そして F は TCGA である。

【0125】

F A A S T における標識の使用およびソーティングは、新規の方法でマイクロビーズを使用する以下の実施例を用いて説明し得る。この実施例では、256のライゲーター - ディテクターを256の色コード化マイクロビーズの表面に結合させる。単一色により、各ライゲーター - ディテクターを同定する。標的配列とのこれらの新規の「マイクロビーズライゲーター - ディテクター」のアニーリングおよび結紮後、256組の「マイクロビーズライゲーター - ディテクター」を、1 プローブ / ウエルで、4096の六量体プローブを含有する4096ウエル微量滴定プレート中に同時に投入する。ハイブリダイゼーション中の完全適正配列のみが、特異的マイクロビーズ標識化複合体にフルオロクロム標識化六量体を結紮する。Luminexフロー分析機は、色コード化マイクロビーズを識別し、それらの蛍光を同時に測定するため、微量滴定プレート上のウエルの特定アドレス（およびそのアドレスに含入される六量体）を知ることにより、ライゲーター - ディテクターに隣接する6塩基を同定し得る。計画を以下に説明する。

【0126】

一本鎖アンプリコンを生成するまでの過程は、I I - S 酵素切断片、アダプター - インデクサー結紮、二次4 bp 酵素切断片、第二アダプター結紮、P C R 増幅、ならびに一本鎖断片を生成するための断片の捕捉および変性を含めて、一基本 F A A S T の場合と同様である。

【0127】

256一本鎖DNAアンプリコンを256ライゲーター - ディテクターとアニーリングする。ライゲーター - ディテクターオリゴヌクレオチドの256の異なる配列が存在するが、これは、生成される4塩基付着末端の各々と相補的である256の異

なるライゲーター - ディテクターを含む。ライゲーター - ディテクターを、シグナリング部分、例えば蛍光染料または蛍光ビーズで標識する。256アニールン化一本鎖調製物の各々を4096のアリコートに分け、4096六量体プローブの1つとハイブリダイズさせる。例えば、4096六量体は4096微量滴定プレート中に含入去れ、各々のウェルは単一六量体プローブを含有する。4096六量体プローブは各々、5'末端で蛍光標識され、遊離3'ヒドロキシル末端を含有する。

【0128】

アニール化一本鎖アンプリコンとの六量体プローブのハイブリダイゼーションおよび結紮後、256調製物をストレプトタビジンを含む別のウェルに移して、非結合物質を洗い落とす（六量体プローブはビオチン基も含有する）。次に2つのシグナルを測定する。

【0129】

1つのシグナルはサンプルに対応する（例えば、テスターまたは対照）。蛍光的コード化ビーズ（Luminex）により、テスターおよび対照サンプルを識別する。一実施態様では、512色、即ちテスター用に256色および対照用に256色を用いる。しかしながら、256色コード化ビーズも用い得るが、この場合、テスターおよび対照間でビーズは「オフセット」される。例えば、色1はテスターに関しては六量体2に対応するが、しかし対照に関しては六量体3に対応するといった具合である。二次シグナルは標識化六量体プローブから出て、ライゲーター - ディテクターとアニール化された一本鎖DNAのレベルを測定する。ここで測定される2つのシグナルは、Luminex100のような計器で同時に読み取られる。

【0130】

多数の種々のプローブ組およびアレイが当業界で既知であり、FASTとともに用い得る。Terstappen等（Tibbe, A.G., et al., Optical tracking and detection of immunomagnetically selected and aligned cells. Nat. Biotechnol. 1999. 17 (12) :p.1210-3; Dolan, G.J. and L.W.M.M. Terstappen, Magnetic separation apparatus and methods employing an internal magnetic capture gradient and an external transport force, . 1999:米国特許第5,985,153号; Terstappen, L.W.M.M. and P.A. Liberti, Quantitative cell analysis met

hods employing magnetic separation,. 1999:米国特許第5,993,665号 ; Terstappen, L.W.M.M. and P.A. Liberti, Methods for biological substance analysis employing internal magnetic gradients separation and an externally-applied transport force,. 2000:米国特許第6,013,188号) は、当該細胞の検出のための免疫磁氣的選定および蛍光的標識化プローブを立証した。それらの技法では、免疫特異的結合プローブを用いて細胞を標識し、その結果生じる標識化細胞を、外的適用磁場により検出器範囲に動かす。サンプル容器の一側壁のリトグラフ処理により、十分確定された空間パターンに沿ったタグ化細胞の位置特定が改良される。

【0131】

Thorp等 (Napier, M.E., et al., Probing biomolecule recognition with electron transfer:electrochemical sensors for DNA hybridization. Bioconjug Chem, 1997.8 (6) :p.906-13; Thorp, H.H., C.R. Loomis, and M.E. Napier, Polymer-electrodes for detecting nucleic acid hybridization and method of use thereof,. 1999:米国特許第5,968,745号 ; Thorp, H.H., et al., Electrochemical detection of nucleic acid hybridization,. 1999:米国特許第5,871,918号 ; Welch, T.W., Electrochemical probes for detection of molecular interactions and drug discovery,. 1999: W09964847) は、電気化学的検出方法を開発した。彼等の方法は、サンプル増幅または蛍光標識の使用を伴わずに標的核酸を直接検出する。検出は、 $Ru(bpy)_3^{2+}$ の酸化還元周期後、電気化学的測定により成し遂げる。測定素子は、電極に結合されたオリゴヌクレオチドプローブを合成的に調製し、電極は、バイオチップ、微量滴定プレートおよび把持具を含めた種々のフォーマットに二次加工されていた。

【0132】

DNAサンプルの分析のために、フローサイトメトリーのような計数技術と結びつけたスペクトル標識化が開発されている (Fulton, R.J., Method and compositions for flow cytometric determination of DNA sequences, 1998:米国特許第5,736,330号 ; Phipps, S., et al., Precision fluorescently dyed particles and methods of making and using same,. 1999: W09919515; Chandler, D.

and M.B. Chandler, Microparticles with multiple fluorescent signals,. 1999; W09937814)。このような分析においては、それらの表面に結合されたプローブにより μ 規模のビーズを色コード化し、標的を分析的蛍光タグで標識し、そしてビーズ色および分析的色を含有する同時発生事象を計数する。このようにして、多数の色のプローブアレイを非常に迅速且つ容易に読み取ることができる。

【0133】

ミクロスフェアを用いる別の方法で、Walt et al. (Walt, D. R., Techview: 分子生物学。ビーズによる光ファイバー・アレー. Science, 2000, 287 (5452): p.451-2; Ferguson, J. F., B. G. Healey, and D. R. Walt, 混合液体サンプルの中のオリゴヌクレオチド分子種を選択的に検出する光ファイバー・バイオセンサー. 1988: W09850782; Walt, D. R. and K. L. Michael, コードされたミクロスフェアを用いる光ファイバー・センサー. 2000: 米国特許第6,023,540号; Michael, K. L. et al., ランダムな順序のアドレス可能な高密度光センサー・アレー. Anal Chem, 1998. 70(7): p. 1242-8) は、プローブをミクロスフェアに付着させ、その後ミクロスフェアが光ファイバー・アレーの末端にランダムな空間的パターンで凝集するシステムを開発した。各ミクロスフェアの“光バーコード”シグネチャーによって、付着したプローブが識別され、標識されたターゲットの信号がそのターゲットの濃度を示す。

修飾による配列タグの分析 (MAAST)

修飾による配列タグの分析 (MAAST) はFAASTの一形態であって、核酸分子中の修飾の有無による開裂の差を検出することによって核酸分子の配列の修飾を評価するものである。例えば、核酸分子のメチル化された部位は、その部位のメチル化に敏感な制限酵素によって切断されない。メチル化に敏感でない制限酵素は、その部位で開裂するので配列タグのパターンに差が生ずる。異なる核酸サンプルによる結果の比較によって、異なるサンプルでの修飾レベル又はパターンの差を明らかにすることができる。ここで用いられる場合、認識部位の修飾に敏感な核酸開裂試薬又は制限酵素とは、その部位が修飾されない場合に限り開裂する、又はその部位が修飾された場合に限り開裂する(すなわち、その核酸開裂試薬又は制限酵素は開裂のためにある特定の修飾状態を必要とする)核酸開裂試薬

又は制限酵素である。その認識部位の修飾に敏感でない核酸開裂試薬又は制限酵素とは、その部位が修飾されているかどうかに関わりなく開裂する核酸開裂試薬又は制限酵素である。

【0134】

M A A S Tは、核酸分子の修飾の状態、レベル、及び条件を評価するのに有用である。多くの核酸修飾が知られており、大部分が生物学的な影響及び意義を有する。例えば、メチル化は、動物及び植物における遺伝子形質発現を調節するための普遍的なメカニズムである (Bird and Wolffe, メチル化に誘発される抑制ベルト、プレス、及びクロマチン、Cell 99: 451-454 (1999); Finnegan et al., 植物におけるDNAメチル化、Annual Rev Physiol 49: 223-247 (1998); Bird, あらためてDNAメチル化、Science 286: 2287-2288 (1999))。メチル化の生理学的な影響についての理解はいくつかの分野で有益である。プロモーター領域のメチル化がin vitro 及びin vivoで転写を抑制することは良く調べられている (Baylin et al., DNAメチル化の変化：新生物のある基本的側面、Adv Cancer Res 72: 141-96 (1998))。例えば、新生物及び腫瘍抑制に関わるいくつかの遺伝子のプロモーターは、過剰メチル化される (Melki et al., 急性骨髄性白血病における複数遺伝子の同時DNA過剰メチル化、Cancer Res 59(15): 3730-40 (1999))。メチル化は、また、植物の発生と開花に重要な機能を果たしている。

【0135】

差動的なメチル化を用いて遺伝子の機能を研究するために、従来はメチル化されるDNA配列についての事前の知識が必要であり、それは問題の領域をクローニングし、配列を決定し、メチル化感受性を検証するために多大な努力を払った後に初めて得られるものであった。M A A S Tは、その好ましい形態では、高スループットのマイクロアレー技術のパワーとin silico分析を、差動ディスプレイの感度と定量性に組み合わせることによって差動的にメチル化される配列の同定を迅速化する。

【0136】

M A A S Tは、ゲノム・スケールでプロモーターを同定するために現在用いら

れている他の方法に比べていくつかの利点を有する。プロモーターやその他の調節エレメントを高スループットな仕方で同定するための現在のアプローチには次のようなものがある：転写因子結合部位、 β -ラクタマーゼ挿入、のヌクレオチド配列のin silico分析 (Whitney et al., 生きている哺乳類細胞における信号伝達のゲノム全体にわたる機能分析、Nat Biotechnol 16(13): 1329-33 (1998))、COBRA (Xiong and Laird, COBRA: 高感度及び定量的なDNAメチル化分析、Nuc Acid Res 25(12): 2532-2534(1997))、及び制限ランドマーク・ゲノム走査 (Costell et al., 異常 CpG - アイランドメチル化は非ランダム及び腫瘍タイプ特異的パターンを有する、Nature Genetics 25: 132-138 (2000))。

【0137】

他の形態の修飾は、特定の因子によって生ずるいくつかのタイプのDNA損傷を示す。それは、アルキル化、ダイマー化、誘導体化、脱プリン、あるいはADP-リボシル化、などである。修飾とその源の例は、Lodovici et al., ヒト白血球におけるDNA損傷のマーカーとしての8-ヒドロキシデオキシグアノシンのレベル、Free Radic Biol Med 28(1): 13-7 (2000); Maehira et al., 受動的喫煙に曝されたラット肺のタンパク質キナーゼC、8-ヒドロキシデオキシグアノシン、及びK-ras癌遺伝子、の変化、Clin Chim Acta 289(1-2): 133-44 (1999); Gamboa Da Costa et al., in Vitro 及びin Vivo でアルファ-ヒドロキシ-N-デスメチルタモキシフェンによって形成される主要DNAアダクトの特性、Chem Res Toxicol 13(3): 200-207 (2000); Phillips et al., DNAアダクト決定方法及び化合物の遺伝毒性試験への応用、Environ Mol Mutagen 35(3): 222-233 (2000); Airoidi et al., 危険評価における手段としての発癌物質-DNAアダクト、Adv Exp Med Biol 472: 231-40 (1999); Purewal et al., 近交系Fischer 344及びWistar Kyotoラットの結腸と前立腺におけるアセチル化遺伝子型と2-アミノ-1-メチル-6-フェニリミダゾ[4,5-b]ピリジン(PhIP)DNAアダクト形成の関連、Cancer Lett 149(1-2): 53-60 (2000)、に記述されている。

【0138】

M A A S TはF A A S Tと同じ基本的ステップを用い、第二の核酸開裂試薬による開裂と、核酸断片への第二のアダプターの結合とを含む。相違は、M A A S Tがその認識部位の修飾に敏感な核酸開裂試薬を用いるということである。すなわち、核酸開裂試薬は修飾された部位で開裂しないか、又は修飾された部位でのみ開裂する。認識部位で修飾されている核酸断片では、断片は第二の核酸開裂試薬で開裂せず、第二のアダプターが末端に付け加えられることはない。

【0139】

開裂されない核酸断片は、いろいろな仕方でこの手順から淘汰される。例えば、第二のアダプターを付加した後に核酸断片を増幅する場合、増幅は末端における第二のアダプターの存在に依存するようにすることができる。これは、例えば、第二のアダプターにおける配列と相補的なP C Rプライマーを用いることによって遂行できる。開裂されない核酸断片は、例えば、第二のアダプターに捕獲タグ、選別タグ、又はラベルを含めることによって淘汰することができる。捕獲又は選別タグの有無に基づいて断片を捕獲又は選別することによって、この手順において第二のアダプターを含む断片だけが先へ進行するようにできる。

【0140】

あるラベルを第二のアダプターと結びつけて、全ての断片がこの手順で先へ進んでも、第二のアダプターを（したがって、ラベルを）含むものだけが検出可能な信号を生ずるようにすることができる（このシナリオでは、第二のアダプター上のラベルをディテクタープローブ及び/又はライゲーター - ディテクターと関連させて検出しなければならない）。第二のアダプターにおけるラベルをこのように用いることによって、開裂した断片と開裂しない断片（すなわち、第二の核酸開裂試薬で開裂した又は開裂しない断片）の識別も可能になる。これは、ディテクタープローブ、ライゲーター - ディテクター、又はアダプター - インデクサー上のラベル、捕獲タグ、又は選別タグによってライゲーター - ディテクターのディテクタープローブへの結合を検出し、断片上の第二のアダプターの存在、量、存在と量、又は不在、をそのラベルで検出することによって行われる。

【0141】

M A A S Tは、また、あるタイプの細胞又は生物が、別のタイプの細胞又は生

物における遺伝子の発現やその他の生物学的経路に影響を及ぼす仕方を明らかにすることにも利用できる。例えば、あるマウスを遺伝子ターゲティングによって遺伝的に変えてある特定のメチルトランスフェラーゼ遺伝子を不活性化するとしよう（マウスについてはいくつか知られているが、説明の都合上ただ1つしかないとして）。関心ある細胞（例えば、B細胞）がそのマウスから取られ、正常なマウスから取られた他の関心ある細胞（例えば、T細胞）と混合される。B細胞とT細胞が混ぜ合わされる。すると、T細胞メチル化のパターンを、B細胞を混合したものとB細胞を混合しないものとで比較することができる。B細胞のメチルトランスフェラーゼは不活性化されているので、観測されるメチル化の変化はT細胞の中で起こっていると結論するのが安全であろう。

【0142】

標準的な差動的遺伝子発現方法を用いた場合、多くの遺伝子で、どの転写物がB細胞からのものであり、どの転写物がT細胞からのものであるかを区別することは非常に難しく、遺伝子によっては不可能であろう（どの二つの細胞タイプもいくつかの遺伝子の形質発現を共有しているから）。しかしMAASTでは、事前の遺伝的変更により、すなわち、メチルトランスフェラーゼ遺伝子が削除されていることにより、混合細胞集団での遺伝子発現を調べることが可能になる。

【0143】

MAASTは以下の説明によってさらに良く理解できる。

【0144】

1. 対照及び試験サンプルからゲノムDNA（gDNA）を単離する。

【0145】

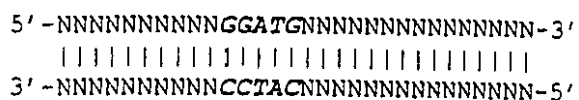
2. 二つの制限酵素の組を選ぶ。各組は、タイプII-S制限酵素と、メチル化されたときにDNAを切断しないタイプII制限酵素を含む。この説明では、FokI（II-S）とHinpII（II、メチル化敏感）が例として用いられる。使用できそうなタイプII-S制限酵素及びタイプII制限酵素はいくつかある。

【0146】

3. まず、gDNAをタイプII-S制限エンドヌクレアーゼによって消化する。
- 5'末端4塩基オーバーハングが好ましい：

【0147】

【化1】

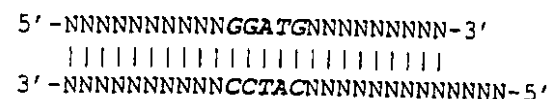


【0148】

FokIで切断すると次のようになる：

【0149】

【化2】



【0150】

4．各々が256のユニークなアダプター - インデクサーの1つを含む256のウェルに配分する。

【0151】

5．4つの塩基オーバーハングと相補的なアダプター - ライゲーター（256の1つ）を結紮する。アダプター - インデクサーは、結紮されない鎖から分けるその後の精製を容易にするビオチン部分を含む。

【0152】

【化3】

5'-NNNNNNNNNN**GGATG**NNNNNNNNNNnnnn-adap-ind-3'
 {|||||}|||||}|||||}|||||}
 3'-NNNNNNNNNN**CCTAC**NNNNNNNNNNNN-adap-ind-5'-Biotin

【0153】

6. 結紮生成物を洗浄して結紮されないものを除く。結紮された生成物だけを残す。

【0154】

【化4】

5'-NNNNNNNNNN**GGATG**NNNNNNNNNNnnnn-adap-ind-3'
 |||||}|||||}|||||}|||||}
 3'-NNNNNNNNNN**CCTAC**NNNNNNNNNNNN-adap-ind-5'-Biotin

【0155】

7. メチル化敏感な制限エンドヌクレアーゼ(又は、同じ部位を認識する制限酵素の対/組合わせで一方の酵素はメチル化された部位を切断せず他方の酵素は切断するもの)による第二の消化。

【0156】

例: H i n P IIによる対照サンプルの消化:

【0157】

【化5】

5'-NNNGCGCNNNNNNNN//NNNNNNNN**GGATG**nnnn..adap-ind-3'
 |||||}|||||}|||||}|||||}
 3'-NNNGCGCNNNNNNNN//NNNNNNNN**CCTAC**NNNN..adap-ind-5'-Biotin

【0158】

H i n P I Iで切断すると次のようになる：

【0159】

【化6】

```

5'-NNNG   CGCNNNNNNNNN//NNNNNNNNNGGATGnnnn..adap-ind-3'
   ||||   ||| ||| ||| ||| ||| |||
3'-NNNCGC  GNNNNNNNNN//NNNNNNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'-Biotin
  
```

【0160】

例：H i n P I Iによる試験サンプル（これはH i n P I I部位でメチル化されている）の消化：

【0161】

【化7】

```

          CH3
           |
5'-NNNGCGCNNNNNNNNN//NNNNNNNNNGGATGnnnn..adap-ind-3'
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
3'-NNNCGCGNNNNNNNNN//NNNNNNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'-Biotin
  
```

【0162】

（メチル化敏感な）H i n P I Iで切断すると次のようになる：

【0163】

【化8】

```

          CH3  (No cut)
           |
5'-NNNGCGCNNNNNNNNN//NNNNNNNNNGGATGnnnn..adap-ind-3'
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
3'-NNNCGCGNNNNNNNNN//NNNNNNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'-Biotin
  
```

【0164】

8. 洗浄してメチル・アダプターに結紮する。第二のアダプターはメチル化敏感な制限エンドヌクレアーゼによって認識される部位に生成される付着する端に特異的である。第二のアダプターの結紮は、DNAがメチル化敏感な制限酵素で切断されたときに（この例でメチル化が存在しないとき）最も効率的である。DNAが切断されていないとき、結紮のために利用できる付着する端がない。したがって、開裂を阻害する仕方でメチル化されたゲノムDNAの領域は以後のステップの基質にならない。

【0165】

例：メチル化敏感な制限酵素で切断されたDNAへの第二のアダプターの結紮。

【0166】

【化9】

```

5'-sec-adap..NNNG CGCNNNNNNN//NNNNNGGATGnnnn..adap-ind-3'
      |||  |||||  |||||
3'-sec-adap..NNNCGC GNNNNNNN//NNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'-Biotin

5'-sec-adap..NNNGCGCNNNNNNN//NNNNNGGATGnnnn..adap-ind-3'
      |||||  |||||  |||||
3'-sec-adap..NNNCGCGNNNNNNN//NNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'-Biotin

```

【0167】

9. 固定されたgDNA断片ライブラリーのPCR又は他の適当な増幅方法による増幅。増幅プライマーはアダプターの各々の適当な鎖に対して相補的であるように設計される。

【0168】

例：PCRによって生成されるアンプリコン

【0169】

【化10】

```

5'-sec-adap..NNNGCGCNNNNNNNN//NNNNNGGATGnnnn..adap-ind-3'
      |||||}|||||} |||||}|||||}
3'-sec-adap..NNNCGCGNNNNNNNN//NNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'

```

【0170】

10. T7遺伝子6エキソヌクレアーゼによる消化ステップを用いて一本鎖アンプリコンを生成することができる。このステップは、増幅に用いられるプライマーの1つがプライマーの5'末端でホスホジエステル・リンケージの代わりに5ホスホロチオエート・リンケージを有する形で合成されていることを必要とする。ホスホロチオエート・リンケージを含む鎖は消化から防護される。

【0171】

例：エキソヌクレアーゼによる消化の後の一本鎖アンプリコン。

【0172】

【化11】

```

3'-sec-adap..NNNCGCGNNNNNNNN//NNNNNCCTACNNNN..adap-ind-5'

```

【0173】

11. ライゲーター - ディテクタープローブにハイブリダイズする。

【0174】

例：5'リン酸基をもつライゲーター - ディテクターにハイブリダイズされたgDNAアンプリコン。ライゲーター - ディテクターはラベルを、例えば3'末端にくっついた蛍光分子をもつ。

【0175】

【化12】

```

                    5'-nnnn-lig-detect-Signal.A
                      |||
3'-sec-adap..NNCGCGNN//NNCCTACNNNNNNNNNNnnnn..adap-ind-5'

```

【0176】

12. ユニバーサルディテクターアレーにハイブリダイズする。ハイブリダイズされたライゲーター - ディテクタープローブを含む256のゲノムDNAプレパラートの各々に、4,096の可能な全てのヘキサマーから成る包括的なディテクターアレーを接触させる。このアレーのヘキサマー・プローブはある特定の順序で配分されている。プローブはアレーの表面から、好ましくは非ポリヌクレオチド・リンカー・スペーサーによって、隔離されていることが好ましい。

【0177】

例：固定化ヘキサマーに結合されたディテクター - ライゲーター。

【0178】

【化13】

```

Surface---linker spacer---NNNNNN-3'

                    5'-nnnn-lig-detect-Signal.A
                      |||
3'-sec-adap..NNCGCGNN//NNCCTACNNNNNNNNNNnnnn..adap-ind-5'

```

【0179】

256の一般ディテクターアレーの各々における蛍光信号は適当な蛍光走査計器又は蛍光ビーズを用いて測定される。

【0180】

例：各アレー・アドレスのタグ配列（5既知 + 3未知 + 10既知塩基）。ある未知の距離にあるメチル化部位の配列も同定される。

【0181】

【化14】

```

      << methyl site      5      (3)      6 + 4
3' ~sec-adap..NNCGCGNN//NCCTACNNNNNNNNNNnnnn..adap-ind-5'

```

【0182】

13. 導出された配列情報の特定

ゲノム配列情報が得られた場合、もしもその配列がある特定された遺伝子の5'末端にあるならば、導出された配列を用いたBLASTサーチによってプロモーターの存在が示される。予測されるメチル化部位のin silico分析がこの想定を容易にするだろう。ゲノム配列が得られない場合、配列タグは、まだはっきりしていない問題のゲノムDNA領域を調べる出発点として役立てられる。

配列タグの可変アドレス分析 (VAAST)

配列タグの可変アドレス分析 (VAAST) は、FAAST法の一形態であって、核酸分子における既知の又は可能な配列のいろいろな組み合わせの関連を決定することを可能にする。例えば、免疫グロブリン又はT細胞レセプタにおける結合及び可変領域の特定組み合わせを決定することができる。VAASTはFAASTと同じ基本ステップを用い、核酸サンプルの開裂の前に1つステップを付け加える。VAASTでは、開裂のための認識部位、好ましくは制限酵素認識部位、が核酸サンプル中の核酸断片に導入される。そして、この認識部位が基本FAAST法における開裂部位として用いられる。アダプター - インデクサーは、この認識部位が導入された配列に隣接して現れる既知の又は可能な配列にマッチするように選ばなければならない。結果として、ある核酸断片から導出される中央配列のまわりに一定の末端配列がある断片が得られる。これによって既知の又は可能な配列の関連を評価することができる。特に、認識部位が導入された配列とある特定アダプター - インデクサー (これは既知の又は可能な隣接配列とマッチする配列をもつ) との関連を検出できる。

【0183】

V A A S Tは次の説明によってさらに良く理解される。

【0184】

1. 問題のサンプルからRNAを単離し、cDNA(DNA)を作る。

【0185】

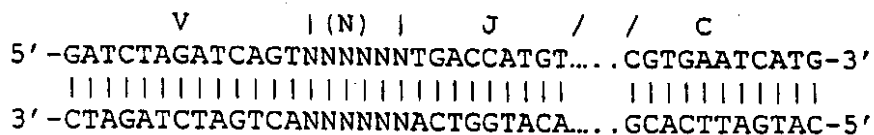
2. 二つのPCRプライマーの組、1つはV領域に特異的なもの、1つはJ領域(又は、望むなら、D又はC領域)に特異的なもの、を選ぶ。第一の好ましい方法(いくつかあるが)では、VプライマーはタイプII-S制限部位、例えばFokI、を含む。さらに、V特異的プライマーは、5'末端にいくつかのホスホロチオエート・リンケージを含む。アンプリコンの長さはプライマーの布置によってコントロールされる。

【0186】

例：cDNA標的：

【0187】

【化15】

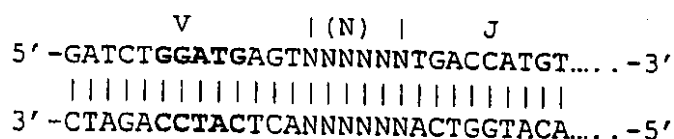


【0188】

導入されたFokI部位を含むcDNAアンプリコンの例：

【0189】

【化16】



【0190】

3. PCRの後、アンプリコンはF o k Iで消化され、アダプター - インデクサーが結紮される。これでアンプリコンは、T7エキソヌクレアーゼ遺伝子6によって消化される準備が整う。アダプター - インデクサーの5'末端はT7エキソヌクレアーゼ遺伝子6による消化から防護されていない。したがって、T7エキソヌクレアーゼ遺伝子6による消化ステップで一本鎖のアンプリコンが生成される。

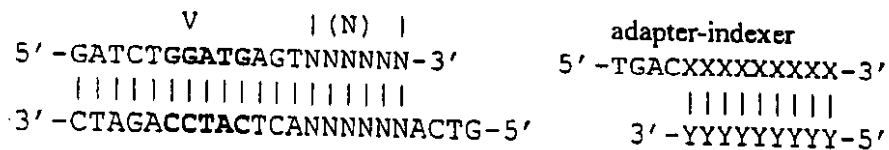
【0191】

ステップ2からのcDNA

F o k I消化

【0192】

【化17】



【0193】

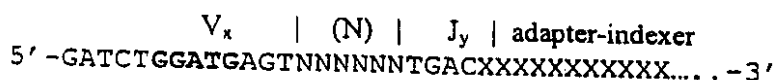
4. PCRの後、アンプリコンはT7エキソヌクレアーゼ遺伝子6によって消化される。

【0194】

T7エキソヌクレアーゼ遺伝子6で処理されたアンプリコンの例：

【0195】

【化18】

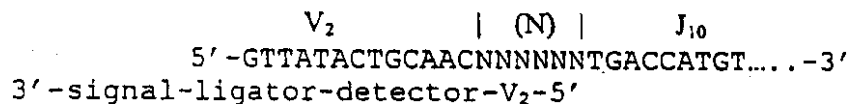
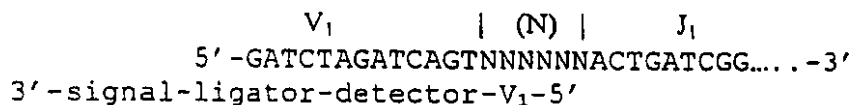
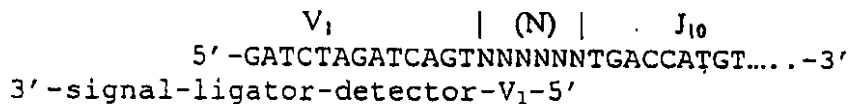


【0196】

5. 一本鎖アンプリコンが100のVライゲーター - ディテクターのパール(各々がラベルを有し、各々1つのV領域遺伝子セグメントに特異的である)にハイブリダイズされる。全てのVライゲーター - ディテクター(長さは約25塩基)は、1つのV領域遺伝子セグメントにハイブリダイズするように先験的に(a priori)設計される。V及びJ添字ナンバーはここでは説明のために任意に選ばれている。

【0197】

【化19】



【0198】

この例では、V1ライゲーター - ディテクターもV2ライゲーター - ディテクターもJ10プロープにハイブリダイズし結紮して信号を生成するということに注意しよう。さらに、V1ライゲーター - ディテクターはJ1アドレスから信号を生成する;ここから、配列タグの可変アドレス分析というネーミングが出てくる。ハイブリダイズされた複合体のアドレスは、どのJ領域遺伝子セグメントにV遺伝子セグメントが結合したかに依る。この同じ原理が100のV遺伝子セグメント全てにあてはまる。

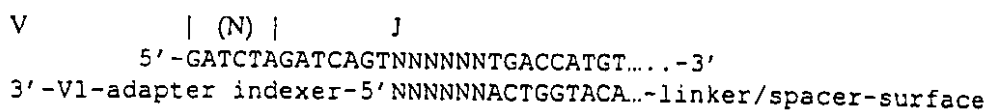
【0199】

6. アンプリコン/アダプター・インデクサー複合体に、全ての既知のJ遺伝子セグメント及びVとJの間に6つのヌクレオチド塩基を付加して生成される配

列に対して特異的なオリゴヌクレオチド・プローブを含む包括的なアドレス・アレーを接触させる。Jセグメントの数(50)は少ないので、プローブのサイズを6塩基に制限する必要はない。ハイブリダイゼーション適合度を高めるためにもっとストリンジェントな条件が望まれる場合、好ましい長さは8乃至15塩基以上になる。

【0200】

【化20】



【0201】

N領域で生成される全ての可能な配列をカバーするために必要なプローブの複雑度を示

す：

N領域塩基 の数	可能なN領域 配列の数	J s の数	配列の数
0	0	50	50
1	4	50	200
2	16	50	800
3	64	50	3200
4	256	50	12800
5	1024	50	51200
6	4096	50	204800
	5461		273050

したがって、N領域で全ての可能な配列が生成され、全てのJ遺伝子セグメントが利用されると仮定すると、273,050の配列が可能である。さらに、100のV遺伝子セグメントが全て用いられると仮定すると、可能な配列の総数は

:

$100 \times 273, 050 = 27, 305, 000$ - すなわち、2700万強の配列となる。

【0202】

以下の所見は、尋ねられる可能性がある配列の複雑度を10 - 100倍拡大する：

所見1：ここでは考慮されていないが、N領域の付加は、ゼロから6までが最も普通であるが、6塩基を超えることもあることは十分確立されている。

【0203】

所見2：複雑度の増加は、DNAエディティングと呼ばれている現象からも生ずる。これは、V領域の3'末端及びJ領域の5'末端の塩基が“噛み取られ”てさらに多様性を生ずるものである。簡単のために、DNAエディティングはこの説明では考慮されていない。

【0204】

所見3：最後に、ここで記述されるIg及びTCRレセプター・ファミリーは細胞表面のヘテロ・ダイマーとして表される。例えば、TCR - アルファ鎖はTCR - ベータ鎖と関連している。したがって、cDNAのアルファ及びベータ遺伝子に関する配列の変化を同時に調べるチップを生成することは簡単な仕事である。

【0205】

所見4：TCR及びIg配列の完全な多様性はV、D、J、及びC領域の任意の組み合わせを想定している。可能な組み合わせは、VDJC、VNDJC、VJC、VNJC、VDDJC、VNDDNJ C、VDNDNJ C、VNDNDNJ C、及びこれらの任意の組み合わせを含む。

質量分析検出

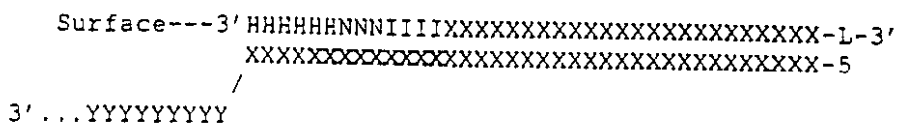
質量分析測定手法をFAASTにおける検出に利用できる。この方法は、マトリックスによるレーザー脱着 / 電離飛行時間 (MALDI - TOF) 質量分析法を含む。この方法は自動化が可能であり、多数のサンプル及び分析を迅速に処理することができる。

【0206】

質量分析検出法は、小さな分子の方がうまくゆくので、質量分析検出の前に、又はその一部として、いくつかのF A A S T成分を切断することが有益である。質量分析による検出の前に検出しようとするオリゴヌクレオチド分子を短く切断するのにいくつかの方法が考えられる。F A A S Tプロトコルは通常に進められ、好ましい実施の形態では、ヘキサマー・プローブが付着された表面が、マトリックスによるレーザー脱着/電離、飛行時間、質量分析器(MALDI-TOF-MS)のソース領域と共用される。F o k Iインデックス切断によるF A A S Tプロセスで得られる断片は下のようなものであろう

【0207】

【化21】



【0208】

ここで：

- Hは、ヘキサマー・プローブ、断片に結紮されている；
- Iは、インデクシング・ステップからのクアドラマー；
- Nは、F A A S Tで読み取られない未知の塩基；
- Xは、相補的な塩基、適切でないもの；
- Yは、F A A S T断片の残りのヌクレオチド；
- は、リンカー、ユニバーサル塩基、擬態又はその他の相似物；
- Lはラベルである。

太字は可能なサブ断片を表す。

【0209】

約50塩基を超える断片では、質量分析法の性能はDNAサンプルに関しては低くなる。化学的、生物的、物理的(熱的)、その他の開裂手段を用いてもっと

小さい、もっと適当なサブ断片を生成して質量分析器で分析することができる。
 Q - T O F システム (Micromass, US本社はSuite 407N, 100 Cummings Center, Beverly, MA 01915-6101, USA) のような装置では、断片化の程度を多少調節することができ、親イオンを見てから断片化を高め、分解断片そして配列を調べる；この方法はフルサイズのサブ断片を決定し、サブ断片の配列（それは基本 F A A S T 法の場合よりも長い配列情報である）をこれらの公知の手段で推測しようとするものである。検出できる断片は、スキームによりトップ・ストランド、ボトム・ストランド、又はその両方である。ラベルは開裂可能な質量タグであっても、又ストランドにラベルを付けなくても良い。

【0210】

このために使用できる開裂手段はいくつかある。例えば、1つの方法は（本明細書の別のところで記述されている）Szybalskiの方法であり、F o k I を用いる任意の、特異的な認識部位からある一定の距離のところで切断する。この方法は、タイプII - S 又はタイプIII の他の制限酵素にも拡張できる。この方法を2回用いることもできる、すなわち、1回は表面に近い方の端を切り取るために、1回は表面から遠い方の端を切り取るために用いる；好ましくは、タイプII の酵素を用いて表面から最も遠い端を切断する。

【0211】

M c r B C (NEB、#272) を用いて、G / A に隣接するメチルシトシン部位を切断することができる。切断サイトは明確ではないが（約30塩基）、それを有利に利用して親ならびに断片セットを生成することができる。オリゴヌクレオチドに付着された金属を含むポルフィリンは、光にさらされるとそのポルフィリンのすぐ近くでDNAを切断することが示されている（テキサフィリン、US5607924）。ハイブリダイゼーション・テキサフィリンを変性し、光と合わせて用いて残りの鎖を開裂することができるだろう。別の開裂方法は、Dervanの方法である（Cartwright, I. L., et al., メチジウムプロピル E D T A、鉄(II)、によるクロマチンの開裂、Proc Natl Acad Sci USA, 1983. 80(11): p. 3213-7; Schultz, P. G. and P. B. Dervan, ペンタ - N - メチルピロルカルボキシアミド E D T A X F e (II) によるDNAの配列特異的な二本鎖開裂、

Proc Natl Acad Sci USA, 1983. 80(22): p.6834-7)。光開裂リンケージを用いる方法はOlejnik et al. によって記述されている(Olejnik, J. et al., 光開裂可能なペプチド-DNA複合体: 合成及びMALDI-MSを用いるDNA分析への応用、Nucleic acid Res, 1999. 27(23): p.4623-31; Olejnik, J., E. Krzymanska-Olejnik, and K. J. Rothchild, 生体分子の単離と検出のための光開裂可能な親和性タグ、Methods Enzymol, 1998. 291: p.135-54; Olejnik, J., E. Krzymanska-Olejnik, and K. J. Rothchild, 5'末端DNA/RNA標識のための光開裂可能なアミノタグ ホスホルアミジト、Nucleic acid Res, 1998. 26(15): p.3572-6; Olejnik, J., E. Krzymanska-Olejnik, and K. J. Rothchild, 5'末端DNA/RNA標識のための光開裂可能なアミノタグ ホスホルアミジト、Nucleic acid Res, 1998. 26(15): p.3572-6; Olejnik, J., et al., 光開裂可能なビオチン誘導体: 生体分子の単離のための可変的アプローチ、Proc Natl Acad Sci USA, 1995. 92(16): p.7590-4)。

これらのリンケージは光を用いて開裂して表面から断片を放出させることができ、それによって穏やかな脱着を可能にする。WO 0004036 は光開裂可能なヌクレオチドとそれを利用する方法を記載している。

【0212】

ある実施の形態では、異なる配列及び分子量のペプチド核酸(PNA)分子などの質量ラベル(Harvey et al., Science 258: 1481-1485 (1992))を、ライゲーター-ディテクターやアダプター-インデクサーにおける配列に特異的に結合するラベルとして用いることができる。サンプルのレーザー脱着を用いて分析器に放出されて質量によって分解されるPNAラベルのMALDI-TOF質量スペクトルが生成される。各PNAラベルの強度はいろいろな成分(例えば、ライゲーター-ディテクターやアダプター-インデクサー)の相対的な量を表す。言い換えると、PNAスペクトルはアレーの特定の場所における標識された成分の相対的な存在量の間接的指標であるスカラー値を生成する。

確率検出

ハイブリダイゼーションによる配列決定はミスマッチ・エラーを生ずることが知られている(Lipshutz, R. J., ハイブリダイゼーションによる確率的なDN

【 0 2 1 3 】

ライゲーター位からの距離。

信頼度の値を決定するプロセスの一例として、ライゲーター位から最も遠いヘキサマー・プローブにおける二つの塩基を、塩基に下で示すようにナンバーを付けて、考えよう。

【化 2 2】

【 0 2 1 6 】

【 0 2 1 7 】

表現される可能な配列の組を評価するために、Dayhoff (Dayhoff, M. O., R.

M. Schwartz, and B. C. Orcutt, タンパク質の配列と構造におけるタンパク質の進化的変化のモデル、M. O. Dayhoff, Editor. 1978, National Biomedical Research Foundation: Washington DC) 及び Venezia (Venezia, D. and P. J. O'Hara, マッチ重みセットによる迅速モチーフ・コンプライアンス・スコアリング. Comput Appl Biosci, 1993. 9(1): 65-9) のタンパク質手法にしたがって、重みマトリックスが用いられる。これらのマトリックスの係数は F A A S T システムに関して実験的に決定される。下に、位置 1 と 2 を表すマトリックス (説明用の係数をもつ) の 1 例を示す。ここで、列は上の鎖のヌクレオチドを表し、行は下の鎖のヌクレオチドを表す。実際の係数は実験的に決定できる。

【 0 2 1 8 】

位置 1				位置 2			
A	T	C	G	A	T	C	G
A [.02, .90, .03, .05]				A [.01, .97, .01, .01]			
T [.90, .02, .03, .05]				T [.97, .01, .01, .01]			
C [.02, .03, .05, .90]				C [.01, .01, .01, .97]			
G [.03, .02, .90, .05]				G [.01, .01, .97, .01]			

ヘキサマー A T X X X X での完全マッチ検出の場合、スコアは、下で太字で示されているマトリックス係数の積として決定される ; $0.90 \times 0.97 = 0.87$.

位置 1				位置 2			
A	T	C	G	A	T	C	G
A [.02, .90, .03, .05]				A [.01, .97, .01, .01]			
T [.90, .02, .03, .05]				T [.97, .01, .01, .01]			
C [.02, .03, .05, .90]				C [.01, .01, .01, .97]			
G [.03, .02, .90, .05]				G [.01, .01, .97, .01]			

一方の鎖で 1 つの塩基のミスマッチが起こる場合、例えばヘキサマー側で位置 1 において A → G となる場合、スコアは同様に、 $0.05 \times 0.97 = 0.05$ と決定される。

【 0 2 1 9 】

位置 1				位置 2			
------	--	--	--	------	--	--	--

A	T	C	G	A	T	C	G
A [.02, .90, .03, .05]				A [.01, .97, .01, .01]			
T [.90, .02, .03, .05]				T [.97, .01, .01, .01]			
C [.02, .03, .05, .90]				C [.01, .01, .01, .97]			
G [.03, .02, .90, .05]				G [.01, .01, .97, .01]			

この手順は、同様に任意の数の塩基に拡張できる。ある与えられた数のヌクレオチドについて、全ての可能なミスマッチに対してスコアを計算して順位を付けて並べて最も確からしい同定物 (identity) を見つけることができる。カットオフ・スコアを用いてマトリックス推定からの可能な同定物 (identities) の数を減らすことができる。例えば、上で例示したマトリックスを用いると、0.50を超えるスコア閾値による配列は唯1つの配列しか与えず、それがプローブにマッチする配列になる。

【0220】

前記プローブに対するミスマッチ事象の全体から配列及びそれぞれの確率スコアを推定する方法は1からnに拡張することができる。ここでnはハイブリダイゼーションに利用できる自由塩基の数である。

【0221】

完全には特定されていない生物 (すなわち、少なくとも配列決定が行われ、合致 (consensus) 配列が構成されている) で、塩基のランダムな分布を仮定するならば、ユニークネスに関する信頼度の値を計算することができる。例えば、推定108塩基のゲノムをもつ生物において、長さが15塩基の候補があるとする、 $108 / 4^{15} = 0.1$ は1よりもずっと小さいので、この15塩基の断片はユニークであると予期される。この特定の15塩基断片が2回起こると予期できるためには、ゲノムは10倍大きくなければならない。

【0222】

既知のゲノムにおける分布は、完全にはランダムでないことが知られており、情報が集まるにつれて、ランダムな分布という最初の仮定を改良することができる。この新しい情報を用いて信頼度の値を割り当てて利用することができる。

【0223】

一例として、メンバーがA B C D 1、A B C D 2、A B C D 3である仮想的な遺伝子ファミリーA B C Dを考えよう。3つのメンバーは熱ショックなど何らかの事象の後で見つかったものであり、したがって、推測で熱ショック遺伝子ファミリーに属するとされ、その遺伝子ファミリーの間では相当な長さの保存 (conserved) 配列があるようになっている。また、その生物は植物であり、A B C D 1はその植物の根から単離され、A B C D 2はその植物の葉から単離され、A B C D 3はその植物の花から単離されたとしよう。推定マトリックスは下のように見えるだろう

	1	2	3
A B C D 1	[.60,	.15,	.05]
A B C D 2	[.25,	.60,	.15]
A B C D 3	[.05,	.15,	.60]

ここで、列1は根を表し、列2は葉を表し、列3は花を表す。

【0224】

配列の信頼度が高いが、配列はファミリーの3つの既知のメンバーのどれかに属する1つの実験で、サンプルの源 (すなわち、根、葉、又は花) は遺伝子の同一性推定を可能にする。数学的に完全に閉じた取り扱いをするためには、マトリックスはファミリーの全てのエレメントを含んでいなければならない、ここではこのファミリーのまだ見つかっていない遺伝子を考慮するために、行と列は加え合わせても1にならない；他のすべてのメンバーには0.05という総和が割り当てられ、その生物について知られる情報が増すのに伴って値は更新される。

【0225】

この推定を拡張して生物相同性を含めることができる。すなわち、植物1の遺伝子A B C D 1からF A A S Tタグを全ての生物のデータベースで探す場合、植物2、植物3、哺乳類1、等とのマッチがある。推定マトリックスは、データベースの既知の生物データから構築される。

【0226】

上述の計算と分析は、次のカタログ構築の例によって説明することができる。
2プローブ検出器アレー、対照サンプル、及び試験サンプルを考えよう。2プロ

ープは既知の配列：A、 基質 - - リンカー - - A G G G A G - 3' 及びB、
 基質 - - リンカー - - A T G G A G 、を有するとしよう。これらのプローブ
 はその同族配列；A A、 . . . T C C C T C . . . 、及び . . . T A C C
 T C . . . を対照及び試験サンプルから捕獲し、さらに、ここで述べたように
 低い確率でミスマッチの分子種を捕獲する。上で述べたような推定マトリックス
 法を用いて正しいマッチングの確率が計算される。

【0227】

F A A S T手順が対照及び試験サンプルで実行され、生ずる信号がプローブデ
 ィテクターアレーから集められ、4つの信号を含むカタログが作成される：

対照		試験	
A A	B B	A A	B B
A .30	.03	A .80	.10
B .03	.50	B .03	.50

カタログはまた、上述のように、各プローブ/標的の組み合わせに対する確率
 、及び/又は確率から導出されるエントリー、を含む。説明のために、プローブ
 配列Aが標的配列A Aとペアになる確率が0.80であり、プローブ配列Aが標的配
 列B Bとペアになる確率が0.10であり、プローブ配列Bが標的配列A Aとペアに
 なる確率が0.05であり、プローブ配列Bが標的配列B Bとペアになる確率が0.75
 であると仮定しよう、すなわち、

推定	
A A	B B
A .80	.10
B .05	.75

各標的に対応する信号を決定することは線形代数の単純な応用問題である。こ
 こでは、例えば、対応するエントリーをかけ合わせて対照及び試験を問題の標的
 の確率論的パターンに対応するパターンに変換する。例えば、対照サンプルで、標的
 A Aに帰せられる全信号は 0.30×0.80 (A プローブ部位で、完全マッチ) + $0.03 \times$
 0.05 (B プローブ部位で、不完全マッチ) = 約0.24である。試験サンプルでは、A
 A 標的信号は $0.80 \times 0.80 + 0.03 \times 0.05$ = 約0.64である。対照及び試験のパタン

をA Aに対応する配列に関して比較するとA Aの相対量で対照から試験へ、それぞれ0.24から0.64への増加が認められる。パターンにおける他の全てのエントリーが同じようにして計算される。

実施例 (Illustrations)

開示された方法は以下の実施例を参照してさらに良く理解される。

【0228】

実施例 1 - F A A S T

1. 二本鎖cDNAが標準の手順を用いて逆転写酵素で調製される。

【0229】

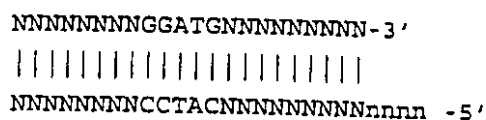
2. その二本鎖cDNAがクラスII-S制限エンドヌクレアーゼで開裂される。このステップでは利用できるいくつかのクラスII-S酵素のどれを用いても良い。好ましいクラスII-S酵素はcDNAのユニークな5-塩基配列を認識し、認識配列より8又は9塩基下流にある部位で開裂する。可能な開裂部位の数は全部で256の異なる配列を含み、256の異なる4-塩基付着末端のどれかを生成する。このステップで適当な酵素としては、例えば、BbvI (認識、G C A G C -> N 8 開裂)、及びFokI (認識、G G A T G -> N 9) がある。

【0230】

例：FokIによる開裂

【0231】

【化23】



【0232】

3a. 384ウエルのマイクロタイタ皿を用いて、cDNA消化物を256の等量アリクオットに分け、各アリクオットをT4DNAリガーゼの存在下で第一のアダプター-インデクサーと共にインキュベートする。クラスII-S酵素によ

って生成される付着末端にアダプターを結合するプロセスは“インデクシング”と命名された (Unrau and Deugau, Gene 145: 163-169 (1994))。cDNA消化によって生成される256の可能な4-塩基付着末端に対応して、256の異なる第一のアダプター - インデクサーがある。アダプターは非結紮末端にビオチン部分を含み、その後のステップにおけるアダプターの固定を可能にしている。

【0233】

例：第一のアダプター - インデクサー (256のうちの1つ) の結紮

【0234】

【化24】

```

NNNNNNNNGGATGNNNNNNNNNN          nnnn-adaptor-indexer-3'
|||||
NNNNNNNNCCTACNNNNNNNNNNnnnnn      -adaptor-indexer-Biot

```

```

NNNNNNNNGGATGNNNNNNNNNNnnnnn-adaptor-indexer-3'
|||||
NNNNNNNNCCTACNNNNNNNNNNnnnnn-adaptor-indexer-Biot

```

【0235】

3b. 結紮されたものが、ファージT4エンドヌクレアーゼVIIの存在下で、ミスマッチ開裂条件の下でインキュベートされる (Youil et al., Genomics 32: 431-435 (1996))。このステップで、結紮されたDNAが不完全にペアになった付着末端にアダプターが結合したところで開裂される。すなわち、このステップは前の結紮ステップのエラー・チェックを行う。このステップはオプションである。

【0236】

4a. 256のcDNAアリクオットの各々がユニークな4-塩基配列を認識する1つの特異的な制限エンドヌクレアーゼによって消化される。フリケント・カッターであるどんな4カッター酵素もこのステップに適している。この消化で、結紮された第一のアダプター - インデクサーを既に含むcDNAの多くが開裂

【 0 2 3 7 】

【 0 2 3 8 】

【 0 2 3 9 】

5' nnnnnNNN...NNNGGATGNNNNNNNNNNnnnnn-adaptor-indexer-3'
 |||
 3' NNN...NNNCCTACNNNNNNNNNNnnnnn-adaptor-indexer-Biot-SURF

【 0 2 4 0 】

【 0 2 4 1 】

【 0 2 4 2 】

【化 2 6】

```
second.adap-nnnnNNN...
|||||
second.adap-nnnnNNN...
```

```
...NNNGGATGNNNNNNNNnnnn-adaptor-indexer-3'
|||||
...NNNCCTACNNNNNNNNnnnn-adaptor-indexer-Biot-SURF
```

【0243】

6 a . 固定化 c D N A 断片ライブラリーの全てのメンバーが、P C R などの適当な増幅方法によって増幅される。全部で 2 5 6 の別々の増幅反応が行われる。二つの増幅プライマーが用いられる、一つは第二のアダプターの鎖と相補的になるように設計され、もう一つは第一のアダプター - インデクサーと相補的になるように設計される。第一のアダプター - インデクサーと相補的なプライマーは、2 5 6 の可能なプライマー配列の一つであり、ステップ 2 で生成される 4 - 塩基の付着末端の一つだけと 4 つの塩基で重なる。増幅は、P C R を用いて、全部で 1 2 乃至 1 8 サイクルにわたって行われる。このステップはオプションである。

【0244】

例：P C R で生成されたアンプリコン

【0245】

【化 2 7】

```
second.adap-nnnnNNN...NNNGGATGNNNNNNNNnnnn-adaptor-indexer-3'
|||||
second.adap-nnnnNNN...NNNCCTACNNNNNNNNnnnn-adaptor-indexer-5'
```

【0246】

6 b . T 7 エキソヌクレアーゼ遺伝子 6 による消化ステップ (Niki forov et al., PCR Method and Application 3: 285-291 (1994)) を用いて一本鎖アンブ

リコンを生成することもできる。この消化ステップは、6aで用いられるプライマーの1つが、そのプライマーの5'末端でホスホジエステル・リンケージの代わりに5ホスホチオエート・リンケージを用いて合成されていると想定している(Nikiforov et al. (1994))。このリンケージは一つの鎖を消化から防護する。このステップはオプションである。

【0247】

例：エキソヌクレアーゼ消化の後の一本鎖アンプリコン

【0248】

【化28】

second.adaptor-nnnnnNNN..NNNCCTACNNNNNNNNnnnnn-adaptor-indexer-5'

【0249】

6c. ステップ6で増幅されたタグを生成するのに別の方法がある。一例は、Walker et al., Nucleic Acid Research 20: 1691-1696 (1992)のStrand Displacement増幅法である。cDNAタグを増幅するさらに別の方法は、回転サークル増幅(Lizardi et al., Nature Genetics 19: 225-232 (1998); Lizardi への米国特許第5,854,033号)である。回転サークル増幅を用いるには、結紮によって円形にしたcDNAを生成する必要がある。円形にした二本鎖DNAを生成する結紮方法は当業者には周知である。このステップはオプションである。

【0250】

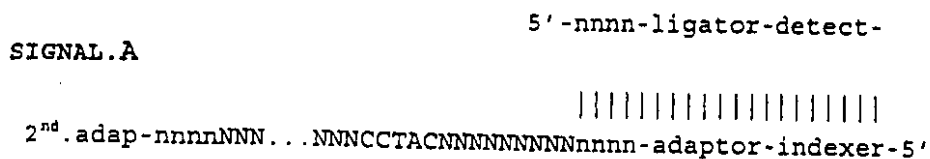
7a. 増幅されたcDNAタグの256の標本の各々が別の384ウエルのマイクロタイタ皿に移され、蛍光標識されたディテクター・ライゲーターオリゴヌクレオチドとハイブリダイズされる。256の異なる配列のディテクター・ライゲーターオリゴヌクレオチドがあり、それはステップ2で生成された4-塩基付着末端の各々と相補的な256の異なるライゲーター・ディテクターを含む。256の増幅されたcDNAタグの各々に対し特異的な同族の配列だけが用いられる。ライゲーター・ディテクターは5'リン酸基を含む。

【0251】

例：リン酸化されたライゲーター - ディテクターとハイブリダイズされた c D
N A アンプリコン

【0252】

【化29】



【0253】

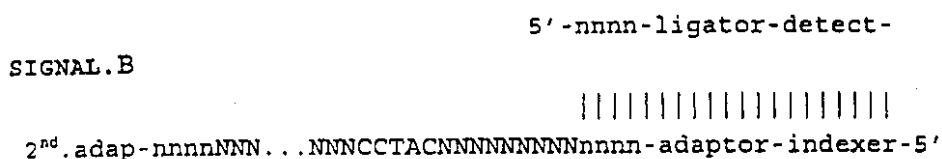
7 b. 対照 vs. 試験 m R N A 集団の発現プロフィールをもっと正確に比較するために、このステップでは異なる色の蛍光染料で標識されたディテクター - ライゲーターオリゴヌクレオチドの第二の組が組み込まれる。すなわち、対照タグは色 “ A ” のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズされ、試験タグは色 “ B ” のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズされる。ハイブリダイゼーションが完了した後、c D N A タグのペアになっている組が混合され、次のステップ 8 へ進む。

【0254】

例：リン酸化されたライゲーター - ディテクターとハイブリダイズされた c D
N A アンプリコン

【0255】

【化30】



【0256】

8. ハイブリダイズされたライゲーター - ディテクターを含むcDNAの256の標本の各々に包括的なプローブ・アレーを接触させる。この包括的なプローブ・アレーは固い表面に並べられ、表面から非ポリヌクレオチドのリンカー - スペースで隔離された4,096のヘキサマー（あるいは、16,384のヘプタマー）の完全な組から成る。ヘキサマー（又はヘプタマー）は、自由な3' - ヒドロキシル末端を含む。アレーにおける256の検出反応の各々は、T4 DNAリガーゼ又は他の適当なリガーゼを用いて、特異的な同族のヘキサマー配列をディテクター - ライゲータープローブの5'末端に隣接する対応する配列に結紮するように、同一のハイブリダイゼーション / 結紮条件の下で行われる。ハイブリダイゼーションの後、結合されていない物質は非常に厳重な洗浄によって除去される。

【0257】

例：固定化ヘキサマー（HEXAMER）に結合されたディテクター - ライゲーター

【0258】

【化31】



【0259】

9. ハイブリダイゼーション・エラーを小さくするために、エラー・チェック・ステップが結紮の後に行われる。このエラー・チェック・ステップは、ライゲーター - ディテクタープローブにおける誤ってペアになった塩基（誤ってペアになったC又はTを含むもの）を開裂する。このステップは、(Ellis et al., Human Mutation 11: 345-353 (1998)) に記述されているようなミスマッチした塩基の化学的開裂を用いて行われる。この方法は誤って結紮されたライゲーター - ディテクタープローブを全て破壊する訳ではないが、アレー・アドレスの約50%でノイズを減少させる。他のエラー・チェック方法を用いてミスマッチしたGやAを除去することができる。このステップはオプションである。

【0260】

10. 256の一般プローブ・アレーの各々の蛍光信号は、適当な蛍光走査計器を用いて測定される。256のアレー全部を合わせた信号から発現プロフィー

ル・データセットが生成される。各信号のアドレスは、太字で示された既知の配列に翻訳される。

【0261】

例：各アレー・アドレスで決定される配列（5既知+3未知+10既知塩基）

。

【0262】

【化32】

5 (3) 6 + 4

second.adap-nnnnnNNN...NNNCCTACNNNNNNNNNNnnnn-adaptor-indexer-5'

【0263】

11、発現プロファイルのデータセットは、入手可能な配列データから予測することができる満ちあふれている遺伝子産物の予想されるアドレスパターンを考慮に入れてさらに分析された。2つの組織の間の発現の違いは、対照およびテストに対応する2つの異なる色シグナルの比により測定される。間違っアドレスで豊富な配列の交差雑種形成により発生した不一致を解消するには同様の実験が異なるペアの制限酵素で行なわれなければならない。

【0264】

オーバーサンプリングの計算：

平均的なmRNA = 17000塩基、平均的な標識 = 120塩基。

平均的なmRNAに対する標識数 = 4。

すなわち平均的なmRNAは、何回もサンプリングして正確な検出の確度を増す

。

【0265】

篩のコンプレキシティーに関する考察：

mRNAのコンプレキシティー = 転写物12,000個 × 1700塩基 = >>1 × 10⁷。

五量体 = $1 / 1024 \times$ 四量体 = $1 / 256 \times$ 六量体 = $1 / 4096 = > > > 1 / 1 \times 10^9$ 。

【0266】

平均標識サイズ120塩基と仮定して：

標識の数 = $12000 \times (4) = 48,000$ 標識。

各256マイクロタイターウェル中の標識の数 = 188。

異なるアレイアドレスの数 = $256 \times 4,096 = 1,048,576$ (六量体)。

異なるアレイアドレスの数 = $256 \times 16,384 = 4,194,304$ (七量体)。

【0267】

実例2 - F A A S T

1、二重鎖cDNAを、標準の手順を用いて逆転写酵素により調製する。

【0268】

2、一回目の消化：二重鎖cDNAをC個の等分割量（インデックスサンプル）に分け、2または4塩基のスティッキーエンドを生成する異なる6種類の塩基認識制限エンドヌクレアーゼで各インデックスサンプルを開裂する。多くの入手可能な制限エンドヌクレアーゼのいずれか1つをこのステップに用いることができる。

【0269】

このステップ用の好適な酵素の例には下記のものがある：

B a m H I G G A T C C

B c l I T G A T C A

B g l H A G A T C T

B s i W I C G T A C G

B s p H I T C A T G A

E c o R I G A A T T C

例：C個の一番目の制限酵素（Rは認識配列中の塩基であり、Sはスティッキーエンド中の塩基であり（勿論これもまた認識配列中にある）、Nは任意の塩基

【化 3 3】

...NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNR-3'
...|||||
...NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRRSSSS -5'

【化 3 4】

```

                    primer complement
sticky end   SSSSnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
              |||||
              nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
```

4、二回目の消化：結合した二重鎖cDNAを含有するC個のインデックスサンプルの各々を、R個（一般には1から5）の等分割量（二次インデックスサンプル）に分け、これら二次インデックスサンプルの各々をN個（一般には1また

は2)の異なる4塩基認識エンドヌクレアーゼの異なる混合物で開裂する。この混合物が一回目の消化に用いたものと同一の酵素を含有しないという条件で、多くの入手可能な制限エンドヌクレアーゼの任意の混合物をこのステップにおいて用いることができる。したがって、 $C \times R$ 個の断片が第二回目の消化を行なう過程で生ずる可能性がある。第二回目の消化ステップで用いたN個の酵素の混合物には下記のような酵素が含まれる。

【0275】

A c i I	スティッキー = 2	C C G C
H h a I	スティッキー = 2	G C G C
T a q I	スティッキー = 2	T C G A
C s p 6 I	スティッキー = 2	G T A C
S a u 3 A I	スティッキー = 4	G A T C
T s p 5 0 9 I	スティッキー = 4	A A T T
T a i I	スティッキー = 4	A C G T

N個の酵素の混合物によるこの二回目の消化は、結合したアダプター - インデクサーをすでに含有しているこれらcDNAの多くを開裂することになる。この消化後、cDNA断片は平均サイズが60から300塩基の不均一な集団を含むことになり、これは用いられたN個の4塩基の認識制限エンドヌクレアーゼの特定の混合物に左右される。

【0276】

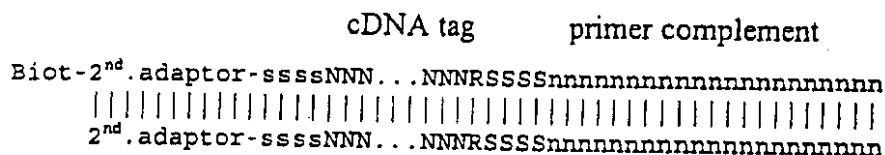
5、各分割量をT4DNA合成酵素の存在下で二番目のアダプターとともにインキュベートする。N個の酵素の混合物により生成し得る2塩基または4塩基のスティッキーエンドに対応するN個の異なる二番目のアダプターが存在する。第二アダプターは、次のステップにおいて第二アダプターの固定化を可能にするために、非結合末端にビオチン部分を含有することができる。

【0277】

例：二番目のアダプター（N個のうちの1つ）の連結反応

【0278】

【化35】



6 b、（オプション）：表面にビオチン化されたアダプター（または任意のリ

ガンド - アダプター) を結合させるために、 $C \times R \times D$ 個の二次インデックスサンプルの各々から採った材料を、固定化されたアビジン (または任意の適切な結合性部分) を含有する別々のマイクロタイターウェル上に置く。このステップは、ステップ5において二番目のアダプターとうまく結合し、ステップ6において開裂しなかった全ての断片の固定化をもたらすことになる。若干の結合していない断片を洗浄により除去した。 $C \times R \times D$ 個の固定化された断片の組から得られた捕集物は、固定化二次インデックスサンプルと呼ばれる。

【0283】

7、全ての固定化二次インデックスサンプルを、PCRなどの適切な増幅法を用いて増幅する。合計 $C \times R \times D$ 個の別々の増幅反応が行なわれる。2つの増幅プライマーが用いられ、一方は第二アダプターの鎖と相補的であるように設計され、他方はアダプター - インデクサーと相補的であるように設計される。アダプター - インデクサーと相補的なプライマーはC個の可能なプライマー配列の1つであり、一回目の消化の酵素認識部位と4塩基だけ重複している。異なるR個の各反応において第二アダプターと相補的なプライマーはN個の可能なプライマー配列の1つであり、第二消化において用いられたN個の酵素の混合物の各酵素認識部位と4塩基だけ重複している。増幅は、PCRを用いて合計12から25サイクル行なう。

【0284】

例：PCRにより生じたアンプリコン

【0285】

【化36】

```
second.adaptor-ssssNNN...NNNRSSSS-adaptor-indexer-3'
|||||
second.adaptor-ssssNNN...NNNRSSSS-adaptor-indexer-5'
```

【0286】

7b、ステップ7において増幅された標識を生成するには別法がある。一例は

、Walker等(1992)の鎖置換増幅(Strand Displacement Amplification)法である。さらに別のcDNA標識の増幅方法は、ローリングサークル増幅(Lizardi等、1998)である。ローリングサークル増幅を用いるには、連結反応により環状化されたcDNA標識を生成させることが必要である。環状化された二重鎖DNAを生成する連結反応の方法はよく知られている。

【0287】

8、一重鎖アンプリコンを生成させるには、T7エキソヌクレアーゼ遺伝子6(Nikiforov等、1993)による消化ステップを使用することができる。この消化ステップは、ステップ7において用いたプライマーの1つが、プライマーの5'末端でリン酸ジエステル結合を5個のチオリン酸エステル結合で置き換えることにより合成されると仮定している(Nikiforov等、1993)。これらの結合は消化から一本の鎖を保護する。

【0288】

例：エキソヌクレアーゼ消化後の一重鎖アンプリコン

【0289】

【化37】

second.adaptor-ssssNNN...NNNRSSSS-adaptor-indexer-5'

【0290】

9、増幅した二次インデックスサンプルの各々を別のマイクロタイター皿に移し、蛍光標識したライゲーター-ディテクターオリゴヌクレオチドと雑種形成する。各々がアダプター-インデクサーの1つと相補的なC個の異なるライゲーター-ディテクターが存在する。特定の同族配列のみが増幅した二次インデックスサンプルの各々において用いられる。これらのライゲーター-ディテクターは、5'-リン酸基を含有する。

【0291】

例：リン酸化されたライゲーター - ディテクターと雑種形成した c D N A アン
ブリコン

【0292】

【化38】

```

                    5'-RSSSS-ligator-detector-SIGNAL.A
                    |||||
second.adaptor-ssssNNN...NNNRSSSS-adaptor-indexer-5'

```

【0293】

9 b、対照対テスターの m R N A 集団のより正確な発現プロフィールを描くために、このステップは異なる色の蛍光染料で標識したライゲーター - ディテクターの二つ目の組を取り入れることができる。したがって、対照用標識を「A型シグナル」のC個のライゲーター - ディテクターと雑種形成し、一方テスター用標識は「B型シグナル」のC個のライゲーター - ディテクターと雑種形成する。雑種形成の完了後、Aをコード化した二次インデックスサンプルおよびBをコード化した二次インデックスサンプルのペアになった組を混合し、下記のステップ10に進む。

【0294】

例：リン酸化されたライゲーター - ディテクターと雑種形成した c D N A アン
ブリコン

【0295】

【化39】

```

                    5'-RSSSS-ligator-detector-SIGNAL.B
                    |||||
second.adaptor-ssssNNN...NNNRSSSS-adaptor-indexer-5'

```

【0296】

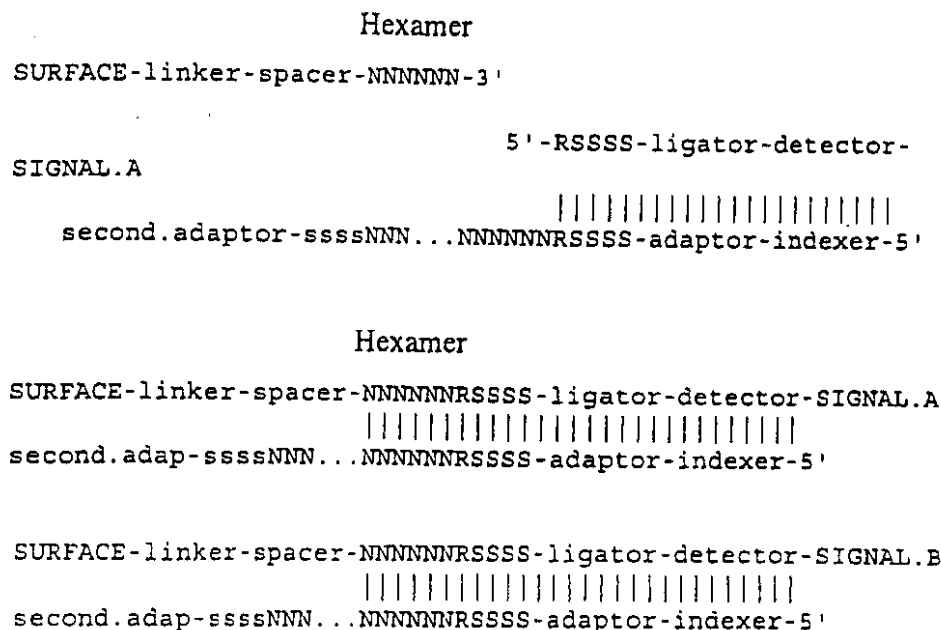
10、雑種形成されたライゲーター - ディテクターを含有することになった $C \times R \times D$ 個の二次インデックスサンプルの各々を統合型アドレスアレイ（プローブアレイ）と接触させる。統合型アドレスアレイは、固体表面上に並んだ完全な一組の六量体4,096個（または別法では七量体16,384個）からなり、非ポリヌクレオチドのリンカー - スペースーにより表面から分離されている。六量体（七量体）はフリーの3' - 水酸基末端を含有する。アレイ上における $C \times R \times D$ 個の各検出反応は、特定の同族六量体配列とライゲーター - ディテクタープローブの5'末端に隣接する対応配列との連結反応を達成するために、T4 DNA合成酵素または任意の他の適切な合成酵素を用いて同一の雑種形成 / 連結反応条件下で行なわれる。雑種形成後、若干の結合していない材料を非常に厳しい洗浄により除去する。

【0297】

例：固定化された六量体に接合したライゲーター - ディテクター

【0298】

【化40】



【0299】

11、 $C \times R \times D$ 個の統合型アドレスアレイ各々のシグナルは、適切な読出し機器を用いて測定される。発現プロファイルのデータセットは、 $C \times R \times D$ 個のアレイの各アドレスにおけるシグナル比から得られる。各シグナルのアドレスを太字で示した配列に翻訳する。六量体プローブ由来の6つのヌクレオチド、認識/スティッキーエンド配列由来の5つのヌクレオチド、および認識配列中の最後の塩基由来の1つのヌクレオチドである。

【0300】

例：各アレイアドレスに対して決定された配列

【0301】

【化41】

6 + 5 + 1

second.adap-ssssNNN...NNNNNNNRSSSS-adaptor-indexer-5'

【0302】

決定された配列：

NNNNNNNRSSSSR (10ヌクレオチド)

所与の二次インデックスサンプルから得られる各々1つの $D - 1$ 制限二次インデックスサンプルにおいて見えなくなる特定のシグナルは、cDNA断片内の特定の開裂部位〔下記のREST〕の存在を示している。

【0303】

【化42】

4

4

6 + 5 + 1

second.adap-ssssNNN...NNN[REST]NNN...NNNNNNNRSSSS-adaptor-indexer

【0304】

決定された配列：

s s s s . . . [R E S T] . . . N N N N N R S S S S R (4 . . . 4 . .
 . 1 0 = 1 8 ヌクレオチド)

発現データセットは、入手可能な配列データから予測できる豊富な遺伝子産物の予想されるアドレスパターンを考慮に入れて分析される。2つの組織の間の発現の違いは、対照およびテスターに対応する2つの異なる色シグナルの比により測定される。N = 1の場合、第二アダプターに隣接する配列、すなわち s s s s スティッキーエンド配列もまた既知である。

【0305】

実施例

実施例1、F A A S T インデキシング付きDNAアンプリコンの創出

配列標識またはF A A S Tの固定アドレス分析によって複雑なDNAを、制限酵素による消化、続いて二重らせんアダプターとの連結反応の2つの一連のラウンドを含むプロセスにより部分的に知られている配列の小さな断片の集団に並び替える。第一ラウンドではDNAを、酵素の認識部位とは異なる部位で切断し未決定の配列の5'または3'張り出し部分を生じさせるI I - S型制限酵素により消化する。相補的な張り出し部分を含有する二重らせんアダプターのみが被制限DNA末端と結合する能力があることになる。第二ラウンドではDNA断片を、認識部位の内部で切断し、既知の配列の5'または3'張り出し部分を生じさせる制限酵素により消化する。続いて、対応する配列の二重らせんアダプターをこれら末端に結合させる。この実施例においては第一ラウンドの消化に対しては、認識部位から9塩基を切断し4塩基の5'張り出し部分を生じさせるF o k IをI I - S型制限酵素として用いる。第二ラウンドの消化に対しては、対応する認識部位内で切断し、それぞれ3'および5'に4塩基の張り出し部分を生じさせるN l a I I I IかD p n I I I Iのいずれかを用いることができる。既知の配列の2つのy O R Fに消化/連結反応の2つのラウンドを受けさせ、各y O R Fから得られたただ一つのP C Rアンプリコンが予想されたF A A S T インデキシング付き断片に対応することを実証する。

【0306】

一手順において、各々ユニークな酵母の読み取り枠 (y O R F) を含有する 2 つの P C R 産物を、F A A S T 手順の第一段階を通して別個に処理した。この段階は、制限酵素による消化、続いて酵素による開裂により生成した 4 塩基の張り出し部分と、適合性のあるアダプターオリゴヌクレオチド複合体の連結反応との 2 つの一連のラウンドを含む。溶液中で行なわれる第一ラウンドにおいては、y O R F を F o k I により消化し、制限末端を適合性のあるアダプター - インデクサー複合体と結合させた。固体表面で行なわれる第二ラウンドにおいては、断片をさらに N l a I I I I か D p n I I のいずれかにより消化し、適合性のある第二アダプター複合体と結合させた。各 y O R F 由来の 2 つの最終産物を P C R により増幅した。これら F A A S T インデキシング付き DNA 断片のアイデンティティを制限地図分析により、また配列決定により決定した。

【0307】

下記の結果を得た。消化 / 連結反応の第一ラウンドにおいては、y O R F の Y C R 1 0 0 C および Y K L 0 5 1 W (これらは R e s e a r c h G e n e t i c s , I n c . から入手) に対応するサイズがそれぞれ 1 . 0 k b p および 1 . 1 k b p の P C R 産物を、F o k I により別々の反応で消化した。両 P C R 産物は、それぞれの配列の i n s i l i c o 制限分析から予想されるように 4 つの異なる制限断片を生成した。アダプター / インデクサー複合体を、その一つが 5 ' 末端にビオチン部分を含有するオリゴヌクレオチドの適切なペアをアニーリングすることにより作製した。これらアダプターは、各 y O R F の唯一の断片の 5 ' の 4 塩基張り出し部分を補完するように設計された。T 4 D N A 合成酵素を使用して、約 2 0 倍過剰のアダプター複合体を用いる標準条件下でアダプター / インデクサーを F o k I で処理した DNA と結合させた。室温 (約 2 2) で 3 0 分間インキュベートした後、反応物は A f f i n i T i p ストレプトアビジンマイクロカラムを通過させた。アダプター / インデクサー複合体と結合した y O R F の DNA 断片のみが、ビオチンのストレプトアビジンとの結合によりマイクロカラム中に留められた。

【0308】

第二ラウンドの消化 / 連結反応においては、反応緩衝液 1 0 0 μ l を用いてス

トレプトアビジン結合DNAを含有するAffiniTipマイクロカラムの母材を濡らすことにより下記のステップを行なった。YCR100CおよびYKL051W由来のDNAをそれぞれNlaIIIおよびDpnIIにより37℃で1時間消化した。次いでマイクロカラムを洗浄して酵素と、アダプター/インデクサーを含有しない全てのDNA断片を完全に除去した。T4DNA合成酵素を用いて、必要に応じてNlaIIIかDpnIIのいずれかの4塩基張り出し部分に適合する過剰のアダプターを使用して第二アダプター複合体をストレプトアビジン結合DNAと結合させた。室温(約22℃)で1時間連結反応を行ない、続いて母材を完全に洗浄して合成酵素および未反応のアダプターを除去した。

【0309】

一重鎖アンプリコンを回収するために下記のステップを採用した。AffiniTipマイクロカラムの母材を0.1M NaOHに浸漬してストレプトアビジン結合DNAを変性した。このステップでは、アビジン部分を含有するDNA鎖は母材と結合したまま残り、一方相補鎖は溶液中に放出される。溶離分(40μl)を3M酢酸ナトリウム4μlで中和した。一重鎖DNA(ssDNA)を、キャリアーとしてグリコーゲン5μgを用いてエタノールに沈殿させ、TE緩衝液10μl中に再溶解した。溶出したssDNAは、標準の電気泳動分析におけるDNA結合染料を用いて検出することができなかった。各溶離剤1μlを、インデクサーおよび第二アダプター配列に相補的なプライマーのペアを含むPCR反応物50μl中に鋳型として加えた。YCR100CおよびYKL051Wから予想されたFAASTインデキシング付きアンプリコンは、それぞれ166bpおよび191bpである。予想されたサイズのDNAは、対応するPCR反応の産物中で識別できた。レーンより上に表示されたようにssDNAの希釈物で出発したPCR反応物から得られたサンプルを、1XTBEに溶かした4~20%ポリアクリルアミドゲル上に流した。基準を用いて表示されたPCR産物のサイズを決定した。プライマーのバンドおよび推定されるPCRの人為産物もまた同定された。予測されたFAASTアンプリコン内のユニーク配列を認識する制限酵素による消化は、これら産物を予想されるサイズの断片に開裂した。ssDNAの1:10の希釈物で出発したPCR反応物から得られたDNAを、表示され

た制限酵素で消化した。手のついていない制限断片に対応するバンドを同定した。Y C R 1 0 0 C由来の166bpのアンプリコンを、H p a I Iにより97および69bpの断片に開裂した。Y K L 0 5 1 W由来の191bpのアンプリコンを、H i n f Iにより111および80bpの断片に開裂した。手のついていない産物をゲルから抽出し、更なるP C R増幅に使用した。この材料の配列決定により、それが予想されるF A A S Tアンプリコンの配列から構成されていることを確認した。P C Rプライマーのアンニ - リング領域および4塩基制限部位を同定した。F o k Iの開裂および認識部位とその順序もまた同定された。P C R増幅に用いられたプライマーと同じペアを用いてD N A断片の両方の鎖の配列決定を行なった。

【0310】

以上のことをまとめると、F A A S Tアダプターは、予想されたP C Rアンプリコンの産生により実証されるように、2つのy O R Fから得られる特定の制限断片とうまく結合した。これらの結果は、次の雑種形成分析において用いられるゲノムD N AのF A A S Tインデキシング付けを例示している。

【0311】

実施例2、F A A S Tのエラー修正

バクテリオファージのタンパク質T7エンドヌクレアーゼIは、とりわけヘテロ二本鎖D N Aと結合し、鎖の1つから誤対合による1から2塩基の5'を切り取る。この特性は、T7エンドヌクレアーゼIをD N Aの構造および突然変異分析の研究における重要なツールにした。この実施例において、この酵素が表面に結合したD N Aの誤対合の除去に役立つことを示す。表面に結合した核酸のエラー修正については今まで実証されることがなかった。誤対合の除去手順は、標的D N A鎖を集めて六量体のマイクロアレイにする雑種形成の間にエラー修正することが望ましい。

【0312】

プローブオリゴヌクレオチドのマイクロアレイは、ポリエチレングリコールのスペーサー部分(P E G)を介してガラス製スライド(S u r M o d i c s , I n c .)の表面に二重結合している。プローブオリゴヌクレオチドは、六量体のプ

ローブ配列 (B、A、D、または E)、アダプター - インデクサー配列の 23 塩基 (23 化合物)、および発蛍光団 (Cy 5) から構成された。次いで 47 塩基の標的オリゴヌクレオチドを標準条件下でアニーリングしてプローブ分子にした。標的配列は、アダプター - インデクサー配列に補的な 23 塩基 (23 化合物)、プローブオリゴヌクレオチドに非相補的な 18 塩基 (N₁₈)、および別の発蛍光団 (Cy 5) から構成される。プローブと標的オリゴヌクレオチドの間の雑種形成は、T7 エンドヌクレアーゼ I で処理する前に Cy 3 の蛍光を測定することにより決定された。

【0313】

雑種形成時にプローブと標的の分子は、標的オリゴヌクレオチドと相補的でない六量体プローブ領域の幾つかの位置を除いては連続二重鎖らせんを形成する。マイクロアレイを T7 エンドヌクレアーゼ I により 100 mM NaCl を補給した緩衝液 No. 4 (NEB) 中で 20 分間、22 °C で処理した。Cy 5 の蛍光を、T7 エンドヌクレアーゼ I で処理する前 (Pre - T7) と後 (Post - T7) で General Scanning 3000 (GSI Lumonics) を用いて測定した。Cy 5 シグナルの損失は、エンドヌクレアーゼで処理する前に検出したシグナル量の百分率として表わされる。複製マイクロアレイの点から得られる測定値は、塩基の誤対合を含有する複合体由来の Cy 5 シグナルの著しく大きな損失を例示した。

【0314】

まとめると、これらの結果は T7 エンドヌクレアーゼ I が DNA ミクロアレイから少なくとも 2 つの誤対合をもつ雑種を除去することができることを示している。

【図面の簡単な説明】

【図1】

2 種の例のアダプター - インデクサー (上部) の 1 つと共に使用するために企画されたライゲーター - ディテクター (番号付けされた四角) の例の列挙である。付着端配列 (又は、それらの補体) は、太字で示される。

【図2】

単一の例の核酸分子に焦点を向けられた開示される方法の例の間に使用され、そして形成される核酸分子の列挙である（パネルA）。制限酵素認識配列は下線が引かれ、そして付着端配列は太字で示される。パネルBは、FokIによる切断の後の核酸分子を示す。パネルCは、核酸フラグメント（左）、及び適合できるアダプター - インデクサーの例（左；これは図1からのアダプター - インデクサーIである）を示す。パネルDは、核酸フラグメント連結されるアダプター - インデクサーを示す。パネルEは、アダプター/フラグメント（上部）の1つの鎖（上方の鎖）、及び適合できるライゲーター - ディテクターの例（底部；これは図1からのライゲーター - ディテクター13である）を示す。パネルFは、アダプター/フラグメント鎖にハイブリダイズされたライゲーター - ディテクターを示す。パネルGは、アダプター/フラグメント/ライゲーター（上部）、及びディテクターアレイ上に固体された適合できるヘキサマーディテクターアレイプローブ（底部）を示す。パネルHは、ライゲーター - ディテクター（両者ともアダプター/フラグメントにハイブリダイズされる）に連結されるディテクターアレイプローブを示す。パネルIは、ディテクターアレイ上に固定される、連結されたプローブ/ライゲーター - ディテクターを示す。

【図3】

単一の例の核酸分子に焦点を向けられた開示される方法の例の間に使用され、そして形成される核酸分子の列挙である（パネルA）。この例においては、核酸分子の低部鎖が使用される。制限酵素認識配列は下線が引かれ、そして付着端配列は太字で示される。パネルBは、FokIによる切断の後の核酸分子を示す。パネルCは、核酸フラグメント（左）、及び適合できるアダプター - インデクサーの例（左；これは図1からのアダプター - インデクサーIである）を示す。パネルDは、核酸フラグメント連結されるアダプター - インデクサーを示す。パネルEは、アダプター/フラグメント（上部）の低部鎖（上方の鎖）、及び適合できるライゲーター - ディテクターの例（底部；これは図1からのライゲーター - ディテクターIである）を示す。パネルFは、アダプター/フラグメント鎖にハイブリダイズされたライゲーター - ディテクターを示す。パネルGは、アダプター/フラグメント/ライゲーター（上部）、及びディテクターアレイ上に固体された適合で

きるヘキサマーディテクターアレイプローブ（底部）を示す。パネルHは、ライゲーター - ディテクター（両者ともアダプター/フラグメントにハイブリダイズされる）に連結されるディテクターアレイプローブを示す。パネルIは、ディテクターアレイ上に固定される、連結されたプローブ/ライゲーター - ディテクターを示す。

【図4】

単一の例の核酸分子に焦点を向けられた開示される方法の例の間に使用され、そして形成される核酸分子の列挙である（パネルA）。これは、図2における例と同じであるが、但し第2アダプターの付加が例示される。制限酵素認識配列は下線が引かれ、そして付着端配列は太字で示される。パネルDは、核酸フラグメント連結されるアダプター - インデクサーを示す。パネルD1は、Sau3AIによる切断の後の核酸分子を示す。パネルD2は、核酸フラグメント（右）及び適合できる第2アダプターの例（左）を示す。パネルD3は、核酸フラグメントに連結される第2アダプター（アダプター - インデクサーはフラグメントの他端に連結される）を示す。パネルFは、アダプター/フラグメント鎖にハイブリダイズされたライゲーター - ディテクターを示す。パネルHは、ライゲーター - ディテクター（両者ともアダプター/フラグメントにハイブリダイズされる）に連結されるディテクターアレイプローブを示す。パネルIは、ディテクターアレイ上に固定される、連結されたプローブ/ライゲーター - ディテクターを示す。

【図5】

単一の例の核酸分子に焦点を向けられた開示される方法の例の間に使用され、そして形成される核酸分子の列挙である（パネルA）。これは、図2における例と同じであるが、但し捕捉タグの付加が例示される。制限酵素認識配列は下線が引かれ、そして付着端配列は太字で示される。パネルBは、FokIによる切断の後の核酸分子を示す。パネルCは、核酸フラグメント（左）、及び適合できるアダプター - インデクサーの例（左；これは図1からのアダプター - インデクサーIである）を示す。前記アダプター - インデクサーは、捕捉タグ（標識）を包含する。パネルDは、核酸フラグメント連結されるアダプター - インデクサーを示す。パネルEは、アダプター/フラグメント（上部）の1つの鎖（上方の鎖）、及び

適合できるライゲーター - ディテクターの例（底部；これは図1からのライゲーター - ディテクター13である）を示す。鎖の分離は、捕捉タグにより促進され得る。パネルFは、アダプター/フラグメント鎖にハイブリダイズされたライゲーター - ディテクターを示す。パネルGは、アダプター/フラグメント/ライゲーター（上部）、及びディテクターアレイ上に固体された適合できるヘキサマーディテクターアレイプローブ（底部）を示す。パネルHは、ライゲーター - ディテクター（両者ともアダプター/フラグメントにハイブリダイズされる）に連結されるディテクターアレイプローブを示す。パネルIは、ディテクターアレイ上に固定される、連結されたプローブ/ライゲーター - ディテクターを示す。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図1】

Figure 1

アダプターーインテグラー I		アダプターーインテグラー II	
CATGCGGATCCTAAGGCTTACGCC GCCTAGGATTCCGAATGCGG		TAATGGAAGCTGGATTTCGCG GTTTCATTACCTTCGACCTAAGCGC	
ライゲーターーティテクター		ライゲーターーティテクター	
1.	CATGCGGATCCTAAGGCTTACGCC	21.	CAAGTAATGGAAGCTGGATTTCGCG
2.	CATGCGGATCCTAAGGCTTACGC	22.	CAAGTAATGGAAGCTGGATTTCGC
3.	CATGCGGATCCTAAGGCTTA	23.	CAAGTAATGGAAGCTGGATTTC
4.	CATGCGGATCCTAAGGC	24.	CAAGTAATGGAAGCT
5.	ATGCGGATCCTAAGGCTTACGCC	25.	AAGTAATGGAAGCTGGATTTCGCG
6.	TGCGGATCCTAAGGCTTACGCC	26.	AGTAATGGAAGCTGGATTTCGCG
7.	GCGGATCCTAAGGCTTACGCC	27.	GTAATGGAAGCTGGATTTCGCG
8.	ATGCGGATCCTAAGGCTTACGC	28.	AAGTAATGGAAGCTGGATTTCGC
9.	ATGCGGATCCTAAGGCTTACG	29.	AAGTAATGGAAGCTGGATTTC
10.	ATGCGGATCCTAAGGCTT	30.	AAGTAATGGAAGCTGGAT
11.	ATGCGGATCCTAAGGC	31.	AAGTAATGGAAGCTG
12.	TGCGGATCCTAAGGCTTAC	32.	AGTAATGGAAGCTGGATTTCGCG
13.	GGCGTAAGCCTTAGGATCCGCATC	33.	CGCGAATCCAGCTTCCATTACTTG
14.	GCGTAAGCCTTAGGATCCGCATC	34.	GCGAATCCAGCTTCCATTACTTG
15.	GTAAGCCTTAGGATCCGCATC	35.	GAATCCAGCTTCCATTACTTG
16.	CCTTAGGATCCGCATC	36.	CAGCTTCCATTACTTG
17.	GGCGTAAGCCTTAGGATCCGCAT	37.	CGCGAATCCAGCTTCCATTACTT
18.	GGCGTAAGCCTTAGGATCCGCA	38.	CGCGAATCCAGCTTCCATTACT
19.	GGCGTAAGCCTTAGGATCCGC	39.	CGCGAATCCAGCTTCCATTAC
20.	GCATGCGGATCCTAAGGCTTACGCC	40.	GAATCCAGCTTCCATTACTT

【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2】

Figure 2

A ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGACAACCAGCCATTACGGGC...
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTAGCATACCTGTTGGTCGGTAAGTGCCCG...

B ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGT ATGGACAACCAGCCATTACGGGC...
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTAGCATACC TGTGGTCGGTAAGTGCCCG...

C ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGT ATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTAGCATACC GCCTAGGATTCCGAATGCGG

D ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG

E ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 TACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG-ラベル

F ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 TACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG-ラベル

G ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 TACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG-ラベル

TTAGCA
 支持体

H ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 TTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG-ラベル
 支持体

I TTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG-ラベル
 支持体

【手続補正4】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図3】

Figure 3

A ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGACAACCAGCCATTCACGGGC...
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCTGTTGGTCGGTAAGTGCCCG...

B ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGT ATGGACAACCAGCCATTCACGGGC...
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACC TGTGGTCGGTAAGTGCCCG...

C ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGT ATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACC GCCTAGGATTCCGAATGCGG

D ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG

E ATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-ラベル
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG

F ATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-ラベル
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG

G 支持体
 AATCGT
 ATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-ラベル
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG

H 支持体
 AATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-ラベル
 ...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG

I 支持体
 AATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-ラベル

【手続補正 5】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

Figure 4

A ...TCCCTGATCAGAATC...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGACAACCGCCATTACGGG...
 ...AGGGACTAGTCTTAG...TATACGAAATCCGCCCTACGATTAGCATACCTGTGGTAAAGTGCCC...

D ...TCCCTGATCAGAATC...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 ...AGGGACTAGTCTTAG...TATACGAAATCCGCCCTACGATTAGCATACCGCCTAGGATTCGGAATGCGG

D1 ...TCCCT GATCAGAATC...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 ...AGGGACTAG TCTTAG...TATACGAAATCCGCCCTACGATTAGCATACCGCCTAGGATTCGGAATGCGG

D2 GCAACTTCAAAGCCCTTTAGC GATCAGAATC...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 CGTTGAAGTTTCGGAAATCGCTAG TCTTAG...TATACGAAATCCGCCCTACGATTAGCATACCGCCTAGGATTCGGAATGCGG

D3 GCAACTTCAAAGCCCTTTAGCGATCAGAATC...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 CGTTGAAGTTTCGGAAATCGCTAGTCTTAG...TATACGAAATCCGCCCTACGATTAGCATACCGCCTAGGATTCGGAATGCGG

F GCAACTTCAAAGCCCTTTAGCGATCAGAATC...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 TACCGCCTAGGATTCGGAATGCGG-ラベル

H GCAACTTCAAAGCCCTTTAGCGATCAGAATC...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC
 TTAGCATACCGCCTAGGATTCGGAATGCGG-ラベル
 支持体

I TTAGCATACCGCCTAGGATTCGGAATGCGG-ラベル
 支持体

【補正対象項目名】図5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図5】

Figure 5

A ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGACAACCAGCCATTACGGGC...
...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCTGTTGGTCGGTAAGTGCCCG...

B ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGT ATGGACAACCAGCCATTACGGGC...
...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACC TGTTGGTCGGTAAGTGCCCG...

C ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGT ATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-タグ
...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACC GCCTAGGATTCCGAATGCGG

D ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-タグ
...TATACGAAATCCGCCTACGATTTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG

E ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-タグ
TACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG-ラベル

F ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-タグ
TACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG-ラベル

G ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-タグ
TACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG-ラベル

TTAGCA
支持体

H ...ATATGCTTTAGGCGGATGCTAAATCGTATGGCGGATCCTAAGGCTTACGCC-タグ
TTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG-ラベル
支持体

I TTAGCATACCGCCTAGGATTCCGAATGCGG-ラベル
支持体

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/09284

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) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WD 98 40518 A (GUILFOYLE RICHARD A ; GUO ZHEN (US); WISCONSIN ALUMNI RES FOUND (US) 17 September 1998 (1998-09-17) claim 1 ---	1-154
Y	EP 0 735 144 A (JAPAN RES DEV CORP) 2 October 1996 (1996-10-02) claims 1-5 ---	1-154
Y	EP 0 130 515 A (MOLECULAR DIAGNOSTICS INC) 9 January 1985 (1985-01-09) claims 1,2 ---	1-154
Y	US 5 858 656 A (DEUGAU KENNETH VICTOR ET AL) 12 January 1999 (1999-01-12) column 4, line 21 - line 45; claim 1 --- -/--	1-154
☒ 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 October 2001		Date of mailing of the international search report 05/11/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5616 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gabriëls, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.
PCT/US 00/09284

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 46704 A (LYNX THERAPEUTICS INC) 11 December 1997 (1997-12-11) claims 1-27 ---	1-154
Y	WO 97 13877 A (LYNX THERAPEUTICS INC ;MARTIN DAVID W (US)) 17 April 1997 (1997-04-17) page 23, line 10 -page 33, line 10 ---	1-154
Y	WO 98 30721 A (PIONEER HI BRED INT ;BIRD RONALD L (US); FEAZEL RHONDA (US); HELEN) 16 July 1998 (1998-07-16) claims 1,36; examples 1-3 ---	1-154
Y	WO 93 17126 A (NEW YORK HEALTH RES INST) 2 September 1993 (1993-09-02) claims 1,36; examples 1-3 ---	1-154
Y	WO 98 31831 A (BRAX GENOMICS LTD ;THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUNTER (GB)) 23 July 1998 (1998-07-23) page 8 -page 16; claim 1 ---	1-154
Y	WO 97 31256 A (BLOK HERMAN ;BARANY GEORGE (US); KEMPE MARIA (US); ZIRVI MONIB (US) 28 August 1997 (1997-08-28) claims 1,2 ---	1-154
A	WO 98 48047 A (BRAX GENOMICS LTD ;THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUENTER (GB) 29 October 1998 (1998-10-29) the whole document ---	1-154
P,X	WO 00 09756 A (PERKIN ELMER CORP) 24 February 2000 (2000-02-24) claim 1 ---	1-154
E	WO 01 12855 A (UNIV YALE) 22 February 2001 (2001-02-22) the whole document -----	1-154

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

 International Application No.
 PCT/US 00/09284

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9840518	A	17-09-1998	US 5994068 A AU 7465198 A EP 0970250 A1 WO 9840518 A2 US 6228999 B1 US 6280948 B1	30-11-1999 29-09-1998 12-01-2000 17-09-1998 08-05-2001 28-08-2001
EP 0735144	A	02-10-1996	JP 2763277 B2 JP 9028399 A JP 2763278 B2 JP 8322598 A AU 692685 B2 AU 5031196 A EP 0735144 A1 US 5707807 A	11-06-1998 04-02-1997 11-06-1998 10-12-1996 11-06-1998 10-10-1996 02-10-1996 13-01-1998
EP 0130515	A	09-01-1985	CA 1222680 A1 EP 0130515 A2 JP 60036497 A	09-06-1987 09-01-1985 25-02-1985
US 5858656	A	12-01-1999	US 5508169 A CA 2036946 A1	16-04-1996 07-10-1991
WO 9746704	A	11-12-1997	US 5846719 A AU 733782 B2 AU 3374097 A CN 1230226 A CZ 9803979 A3 EP 0923650 A1 HU 0003944 A2 JP 2000515006 T NO 985698 A PL 331513 A1 US 6138077 A US 6172218 B1 WO 9746704 A1 US 6235475 B1 US 6172214 B1 US 6150516 A US 6013445 A	08-12-1998 24-05-2001 05-01-1998 29-09-1999 14-07-1999 23-06-1999 28-03-2001 14-11-2000 08-02-1999 19-07-1999 24-10-2000 09-01-2001 11-12-1997 22-05-2001 09-01-2001 21-11-2000 11-01-2000
WO 9713877	A	17-04-1997	AU 712929 B2 AU 4277896 A AU 6102096 A AU 7717596 A CN 1193357 A CZ 9700866 A3 CZ 9703926 A3 EP 0793718 A1 EP 0832287 A1 EP 0931165 A1 FI 971473 A HU 9900910 A2 JP 11507528 T JP 10507357 T NO 971644 A NO 975744 A PL 324000 A1	18-11-1999 06-05-1996 30-12-1996 30-04-1997 16-09-1998 17-09-1997 17-06-1998 10-09-1997 01-04-1998 28-07-1999 04-06-1997 28-07-1999 06-07-1999 21-07-1998 02-06-1997 05-02-1998 27-04-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/09284

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9713877	A		US 6280935 B1	28-08-2001
			WO 9641011 A1	19-12-1996
			WO 9713877 A1	17-04-1997
			US 6235475 B1	22-05-2001
			AU 718357 B2	13-04-2000
WO 9830721	A	16-07-1998	AU 6024598 A	03-08-1998
			US 6100030 A	08-08-2000
			WO 9830721 A1	16-07-1998
WO 9317126	A	02-09-1993	AU 3728093 A	13-09-1993
			CA 2130562 A1	02-09-1993
			EP 0675966 A1	11-10-1995
			WO 9317126 A1	02-09-1993
			US 6103463 A	15-08-2000
WO 9831831	A	23-07-1998	AU 728805 B2	18-01-2001
			AU 5570298 A	07-08-1998
			EP 0960215 A1	01-12-1999
			WO 9831831 A1	23-07-1998
			JP 2001508308 T	26-06-2001
WO 9731256	A	28-08-1997	AU 735440 B2	05-07-2001
			AU 2799797 A	10-09-1997
			CA 2244891 A1	28-08-1997
			EP 0920440 A2	09-06-1999
			WO 9731256 A2	28-08-1997
WO 9848047	A	29-10-1998	AU 733924 B2	31-05-2001
			AU 7063898 A	13-11-1998
			CN 1252103 T	03-05-2000
			EP 0981645 A1	01-03-2000
			WO 9848047 A2	29-10-1998
WO 0009756	A	24-02-2000	US 6232067 B1	15-05-2001
			AU 5560199 A	06-03-2000
			WO 0009756 A1	24-02-2000
			US 6258539 B1	10-07-2001
WO 0112855	A	22-02-2001	US 6261782 B1	17-07-2001
			AU 6638000 A	13-03-2001
			AU 6770800 A	13-03-2001
			AU 6900100 A	13-03-2001
			WO 0112671 A1	22-02-2001
			WO 0112855 A2	22-02-2001
			WO 0112856 A2	22-02-2001

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), 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, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 フェン, リ

アメリカ合衆国, ニューヨーク 10461,
ブロンクス, アパートメント 2 ティー,
ラインランダー アベニュー 1579

(72)発明者 ゲラ, シザー イー.

アメリカ合衆国, コネチカット 06437,
ギルフォード, ノートンタウン ロード
441

(72)発明者 ウェーバー, シェーン シー.

アメリカ合衆国, コネチカット 06525,
ウッドブリッジ, エバーグリーン ドライ
ブ 1

(72)発明者 コフマン, ジョセフ シー.

アメリカ合衆国, コネチカット 06518,
ハムデン, ファーミントン ロード 24

(72)発明者 ラティマー, ダリン アール.

アメリカ合衆国, コネチカット 06405,
ブランフォード, アパートメント 2 ビ
ー, フローレンス ロード 123

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA19 AA20 CA01 CA09

CA11 CA20 HA09 HA11 HA13

HA14 HA19

4B063 QA13 QQ42 QQ52 QR01 QR08

QR14 QR20 QR32 QR35 QR38

QR42 QR56 QR62 QR84 QS12

QS25 QS28 QS34 QX02

专利名称(译)	固定序列标签的地址分析		
公开(公告)号	JP2002540802A	公开(公告)日	2002-12-03
申请号	JP2000609613	申请日	2000-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
[标]发明人	リザルディ ポール エム ロスマシューイー フェンリ ゲラシザーイー ウェーバーシェーンシー コフマンジョセフシー ラティマーダリンアール		
发明人	リザルディ, ポール エム. ロス, マシュー イー. フェン, リ ゲラ, シザー イー. ウェーバー, シェーン シー. コフマン, ジョセフ シー. ラティマー, ダリン アール.		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6809 C12Q1/6837 C12Q1/6855 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6855 C12Q1/6809 C12Q1/6837 Y10S977/924 C12Q2525/191 C12Q2525/179 C12Q2521/313 C12Q2565/513		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA09 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA19 4B063/QA13 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR01 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR20 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR38 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR84 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QX02		
优先权	60/127932 1999-04-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于核酸样品的全面分析的方法，以及用于该方法的检测器组合物。一种称为序列标签固定地址分析 (FFAST) 的方法可产生一组具有不同粘性末端序列的核酸片段；根据粘性末端的序列对片段进行索引；通过片段检测检测器序列。关联；在检测器阵列上基于序列的索引片段捕获；以及片段标记的检测。通过将核酸样品与一个或多个核酸切割孵育来完成多个粘性末端序列的产生。通过与探针杂交并偶联，优选连接来捕获索引片段。该方法允许以可再现的和序列特异性的方式对核酸的复杂样品进行快速和容易的分类。该方法的一种形式允许确定已知或可能序列的不同组合在核酸分子中的缔合。该方法的另一种形式通过基于存在或不存在修饰的核酸分子的切割来评估核酸分子中序列的修饰。

