

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 535569

(P2003 - 535569A)

(43)公表日 平成15年12月2日(2003.12.2)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53			M
		33/543	541 B
33/543	541		541 Z

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 82数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 606785(P2000 - 606785)

(86)(22)出願日 平成12年3月16日(2000.3.16)

(85)翻訳文提出日 平成13年9月19日(2001.9.19)

(86)国際出願番号 PCT/US00/06950

(87)国際公開番号 W000/056926

(87)国際公開日 平成12年9月28日(2000.9.28)

(31)優先権主張番号 09/272,970

(32)優先日 平成11年3月19日(1999.3.19)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ヴァリジェン (ユーエス) , インコーポレーテッド
アメリカ合衆国 18940 ペンシルベニア州
、ニュータウン、フィーザント ラン
300

(72)発明者 トリーシュ、イザベル
フランス国 エフ - 75020 パリ、ル デイ
オルテュクス、84

(72)発明者 イリス、フランコイス、ジェイ . エム .
フランス国 エフ - 92370 チャヴィル、ル
ド ボークエット、3

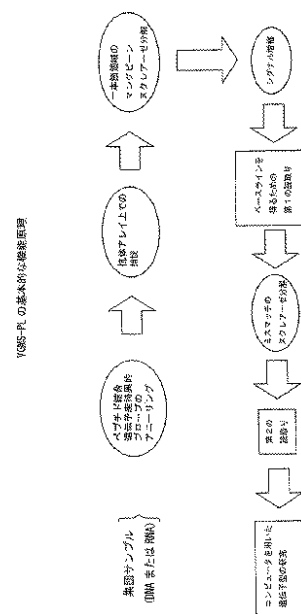
(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外 2 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ペプチド標識オリゴヌクレオチドと抗体アレイを用いた核酸多型の検出方法

(57)【要約】

本発明は、核酸集団を核酸多型についてスクリーニング
する際に使用する方法および組成物に関する。本発明の
方法は、一般にはValiGeneSM Mutatio
n Screening, Peptide-Link
d(VGMS-PL)法と呼ばれるものであるが、具体
的には、PCR増幅工程を必要とせず動物および植物
の核酸の遺伝子マッピング並びに遺伝子発現を分析する
ハイスループット分析用に設計されたものである。特に
、本発明の方法では、識別可能かつ同定可能なペプチド
タグで標識したオリゴヌクレオチドプローブを使用し、
これをアドレス可能な抗体アレイ上に捕捉する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 被験体に由来する核酸サンプルの塩基多型を分析するハイスループット分析法であって、

(a)複数のペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブと溶液状態の核酸サンプルとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させ、

(b)サンプル中の核酸へハイブリダイズする複数のプローブのうち1つ以上を、ペプチド標識の1つ以上に免疫特異的な抗体を含んでなる抗体アレイを用いて検出する、

ことを含んでなる前記方法。

【請求項2】 1つ以上のプローブの検出をPCRまたはMutSを利用せずに行う、請求項1記載の方法。

【請求項3】 1以上の被験体に由来する核酸サンプルを多型の有無についてスクリーニングする方法であって、下記の工程：

(a)溶液状態の核酸サンプルと1以上の塩基多型特異的ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上のオリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ、ここで、各プローブは、第1検出標識に共有結合させた第1マーカールと、第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識に共有結合させた第2マーカールを含んでなり、

(b)1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、

(c)固相表面とマングベーンヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる条件下にて接触させ、

(d)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(e)固相表面から、第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、

(f)固相表面上のハイブリッド分子をミスマッチ塩基対で切断し、

(g)固相表面から、第1検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対す

る第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率を比較する、
を記載の順に含んでなり、第1比率と第2比率との間に差がある場合に多型が同定されたとする、前記方法。

【請求項4】 1以上の被験体に由来する核酸サンプルを多型の有無についてスクリーニングする方法であって、下記の工程：

(a)溶液状態の核酸サンプルと1以上の塩基多型特異的ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上の塩基多型特異的オリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ、ここで、各プローブは、第1マーカースと第2マーカースを含んでなり、

(b)1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、

(c)固相表面とマングベーンヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる条件下にて接触させ、

(d)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(e)固相表面を、(i)第1マーカースに対する特異的結合能を有する第1パートナー分子、および(ii)第2マーカースに対する特異的結合能を有する第2パートナー分子と接触させ、ここで第1パートナー分子は第1検出標識を含んでなり、第2パートナー分子は第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識を含んでなり、

(f)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(g)固相表面から、第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、

(h)固相表面上のハイブリッド分子をミスマッチ塩基対で切断し、

(i)固相表面から、検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対する第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率を比較する、

を記載の順に含んでなり、第1比率と第2比率との間に差がある場合に多型が同

定されたとする、前記方法。

【請求項5】 1以上の被験体に由来する核酸サンプルを多型の有無についてスクリーニングする方法であって、下記の工程：

(a)溶液状態の核酸サンプルと1以上の塩基多型特異的ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上の塩基多型特異的オリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ、ここで、各プローブは、第1マーカースと第2マーカースを含んでなり、

(b)1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、

(c)固相表面とマングベーンヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる条件下にて接触させ、

(d)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(e)固相表面を、第1マーカースに対する結合能を有する第1の一次パートナー分子および第2マーカースに対する結合能を有する第2の一次パートナー分子と接触させ、

(f)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(g)固相表面を、(i)第1の一次パートナー分子に対する結合能を有する第1の二次パートナー分子、および(ii)第2の一次パートナー分子に対する結合能を有する第2の二次パートナー分子と接触させ、ここで第1の二次パートナー分子は第1検出標識を含んでなり、第2の二次パートナー分子は第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識を含んでなり、

(h)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(i)固相表面から、第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、

(j)固相表面上のハイブリッド分子をミスマッチ塩基対で切断し、

(k)固相表面から、第1検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対する第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率を比較する、

を記載の順に含んでなり、第1比率と第2比率との間に差がある場合に多型が同定されたとする、前記方法。

【請求項6】 抗体アレイの1以上の抗体に結合される塩基多型特異的ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブを1以上含んでなる組成物。

【請求項7】 1以上の塩基多型特異的ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブのうち少なくとも1つが、

(a)該オリゴヌクレオチドの5'末端に共有結合したペプチド、

(b)該オリゴヌクレオチドの5'側の2番目に位置する第1マーカ、および

(c)該オリゴヌクレオチドの3'末端に位置する第2マーカ

を含んでなるものである、請求項3、4または5記載の方法。

【請求項8】 固相表面が複数の遺伝子座を含んでなり、各遺伝子座は、1以上のオリゴヌクレオチドプローブのうちの1つへ、ペプチド標識オリゴヌクレオチドのペプチドを介して特異的に結合することができ、該ペプチドは該オリゴヌクレオチドの5'末端に共有結合している、請求項3、4または5記載の方法。

【請求項9】 第1または第2マーカがビオチン部分に共有結合しており、第1または第2パートナー分子がアビジンまたはストレプトアビジンである、請求項4記載の方法。

【請求項10】 第1または第2マーカがビオチン部分に共有結合しており、第1または第2の一次パートナー分子がアビジンまたはストレプトアビジンである、請求項5記載の方法。

【請求項11】 第1または第2マーカが炭水化物部分に共有結合しており、第1または第2パートナー分子がレクチンである、請求項4記載の方法。

【請求項12】 第1または第2マーカが炭水化物部分に共有結合しており、第1または第2の一次パートナー分子がレクチンである、請求項5記載の方法。

【請求項13】 第1パートナー分子が第1マーカに特異的に結合する抗体であり、第2パートナー分子が第2マーカに特異的に結合する抗体である、請求項4記載の方法。

【請求項14】 第1および第2の一次パートナー分子が別個の一次抗体であり、第1および第2の二次パートナー分子が別個の二次抗体である、請求項5記載の方法。

【請求項15】 第1検出標識または第2検出標識のいずれか一方または両方が、酵素、蛍光団、化学発光標識、または放射性同位元素である、請求項3、4または5記載の方法。

【請求項16】 第1検出マーカーまたは第2検出マーカーのいずれか一方または両方が蛍光団である、請求項3、4または5記載の方法。

【請求項17】 1以上の被験体に由来する核酸サンプルにおける多型を同定する方法であって、下記の工程：

(a)溶液状態の核酸サンプルと1以上の塩基多型特異的ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上のオリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ、ここで、各プローブは、第1検出標識に共有結合させた第1マーカーと、第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識に共有結合させた第2マーカーを含んでなり、

(b)1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、

(c)固相表面とマングベーンヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる条件下にて接触させ、

(d)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(e)固相表面から、第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、

(f)固相表面上のハイブリッド分子をミスマッチ塩基対で切断し、

(g)固相表面から、第1検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対する第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率を比較する、

を記載の順に含んでなり、第1比率が第2比率を少なくとも35%上回った場合に多型が同定されたとする、前記方法。

【請求項18】 1以上の被験体に由来する核酸サンプルにおける多型を同定する方法であって、下記の工程：

(a)溶液状態の核酸サンプルと1以上の塩基多型特異的ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上の塩基多型特異的オリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ、ここで、各プローブは、第1マーカースと第2マーカースを含んでなり、

(b)1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、

(c)固相表面とマングベーンヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる条件下にて接触させ、

(d)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(e)固相表面を、(i)第1マーカースに対する特異的結合能を有する第1パートナー分子、および(ii)第2マーカースに対する特異的結合能を有する第2パートナー分子と接触させ、ここで第1パートナー分子は第1検出標識を含んでなり、第2パートナー分子は第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識を含んでなり、

(f)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(g)固相表面から、第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、

(h)固相表面上のハイブリッド分子をミスマッチ塩基対で切断し、

(i)固相表面から、第1検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対する第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率を比較する、

を記載の順に含んでなり、第1比率が第2比率を少なくとも35%上回った場合に多型が同定されたとする、前記方法。

【請求項19】 1以上の被験体に由来する核酸サンプルにおける多型を同定する方法であって、下記の工程：

(a)溶液状態の核酸サンプルと1以上の塩基多型特異的ペプチド標識オリゴヌ

クレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上の塩基多型特異的オリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ、ここで、各プローブは、第1マーカ―と第2マーカ―を含んでなり、

(b) 1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、

(c) 固相表面とマングベীনヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる条件下にて接触させ、

(d) 固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(e) 固相表面を、第1マーカ―に対する結合能を有する第1の一次パートナー分子および第2マーカ―に対する結合能を有する第2の一次パートナー分子と接触させ、

(f) 固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(g) 固相表面を、(i)第1の一次パートナー分子に対する結合能を有する第1の二次パートナー分子、および(ii)第2の一次パートナー分子に対する結合能を有する第2の二次パートナー分子と接触させ、ここで第1の二次パートナー分子は第1検出標識を含んでなり、第2の二次パートナー分子は第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識を含んでなり、

(h) 固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(i) 固相表面から、第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、

(j) 固相表面上のハイブリッド分子をミスマッチ塩基対で切断し、

(k) 固相表面から、第1検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対する第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率を比較する、

を記載の順に含んでなり、第1比率が第2比率を少なくとも35%上回った場合に多型が同定されたとする、前記方法。

【請求項20】 固相表面が複数の遺伝子座を含んでなり、各遺伝子座は、ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブの1以上のペプチドに特異的な抗体を

含んでなる、請求項3、4、5、17、18または19記載の方法。

【請求項21】 固相表面がプラスチックチップである、請求項3、4、5、17、18または19記載の方法。

【請求項22】 固相表面がマイクロタイタープレートのウェルである、請求項3、4、5、17、18または19記載の方法。

【請求項23】 サンプルに含まれる核酸が2 µg未満である、請求項1、3、4、5、17、18または19記載の方法。

【請求項24】 サンプルに含まれる核酸が、ゲノムDNAおよびcDNAからなる群より選択される、請求項1、3、4、5、17、18または19記載の方法。

【請求項25】 サンプルに含まれる核酸がゲノムDNAである、請求項1、3、4、5、17、18または19記載の方法。

【請求項26】 サンプルに含まれる核酸がcDNAである、請求項1、3、4、5、17、18または19記載の方法。

【請求項27】 サンプルに含まれる核酸が二本鎖DNAである、請求項1、3、4、5、17、18または19記載の方法。

【請求項28】 サンプルに含まれる核酸が一本鎖DNAである、請求項1、3、4、5、17、18または19記載の方法。

【請求項29】 ハイブリッド分子のミスマッチ塩基対での切断を、前記ハイブリッド分子と1以上の特定のヌクレアーゼとをハイブリッド分子のミスマッチ塩基対の切断が可能となる条件下にて接触させることにより行う、請求項3、4、5、17、18または19記載の方法。

【請求項30】 ハイブリッド分子のミスマッチ塩基対での切断を、前記ハイブリッド分子と大腸菌エンドヌクレアーゼⅤおよびS1ヌクレアーゼとをハイブリッド分子のミスマッチ塩基対での切断が可能となる条件下にて接触させることにより行う、請求項3、4、5、17、18または19記載の方法。

【請求項31】 第1および第2検出標識が、同一波長で励起されるが異なる周波数で発光する蛍光団である、請求項3、4、5、17、18または19記載の方法。

【請求項32】 被験体に由来するサンプルにおいて、選択的スプライシングを受けたRNA転写産物の有無を検出または測定する方法であって、下記の工程：

(a)溶液状態の核酸サンプルと、既知のスプライス部位配列を含む1以上のペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上のオリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ、ここで、各プローブは、第1検出標識に共有結合させた第1マーカート、第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識に共有結合させた第2マーカールを含んでなり、

(b)1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、

(c)固相表面とマングベーンヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる条件下にて接触させ、

(d)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(e)固相表面から、第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、

(f)固相表面上のハイブリッド分子をミスマッチ塩基対で切断し、

(g)固相表面から、第1検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対する第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率を比較する、

を記載の順に含んでなり、第1比率と第2比率との間に差がある場合に、選択的スプライシングを受けたRNA転写産物がサンプル中に含まれるとする、前記方法。

【請求項33】 被験体に由来するサンプルにおいて、選択的スプライシングを受けたRNA転写産物の有無を検出または測定する方法であって、下記の工程：

(a)溶液状態の核酸サンプルと、既知のスプライス部位配列を含む1以上のペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の核酸へ

のハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上のオリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ、ここで、各プローブは、第1マーカ―と第2マーカ―を含んでなり、

(b) 1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、

(c) 固相表面とマングベーンヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる条件下にて接触させ、

(d) 固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(e) 固相表面を、(i) 第1マーカ―に対する特異的結合能を有する第1パートナー分子、および(ii) 第2マーカ―に対する特異的結合能を有する第2パートナー分子と接触させ、ここで第1パートナー分子は第1検出標識を含んでなり、第2パートナー分子は第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識を含んでなり、

(f) 固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(g) 固相表面から、第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、

(h) 固相表面上のハイブリッド分子をミスマッチ塩基対で切断し、

(i) 固相表面から、第1検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対する第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率を比較する、

を記載の順に含んでなり、第1比率と第2比率との間に差がある場合に、選択的スプライシングを受けたRNA転写産物がサンプル中に含まれるとする、前記方法。

【請求項34】 被験体に由来するサンプルにおいて、選択的スプライシングを受けたRNA転写産物の有無を検出または測定する方法であって、

(a) 溶液状態の核酸サンプルと、既知のスプライス部位配列の配列を含む1以上のペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上のオリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ

- 、ここで、各プローブは、第1マーカ―と第2マーカ―を含んでなり、
- (b) 1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、
- (c) 固相表面とマングビーンヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる条件下にて接触させ、
- (d) 固相表面に結合しなかった物質を除去し、
- (e) 固相表面を、第1マーカ―に対する結合能を有する第1の一次パートナー分子および第2マーカ―に対する結合能を有する第2の一次パートナー分子と接触させ、
- (f) 固相表面に結合しなかった物質を除去し、
- (g) 固相表面を、第1の一次パートナー分子に対する結合能を有する第1の二次パートナー分子、および第2の一次パートナー分子に対する結合能を有する第2の二次パートナー分子と接触させ、ここで第1の二次パートナー分子は第1検出標識を含んでなり、第2の二次パートナー分子は第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識を含んでなり、
- (h) 固相表面に結合しなかった物質を除去し、
- (i) 第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、
- (j) ハイブリッド分子をミスマッチ塩基対で切断し、
- (k) 第1検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対する第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率を比較する、
- ことを含んでなり、第1比率と第2比率との間に差がある場合に、選択的スプライシングを受けたRNA転写産物がサンプル中に含まれるとする、前記方法。

【請求項35】 被験体に由来するサンプルにおいて、選択的スプライシングを受けたRNA転写産物の有無を検出または測定する方法であって、下記の工程：

- (a) 溶液状態の核酸サンプルと、既知のスプライス部位配列の配列を含む1以上のペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の

核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上のオリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ、ここで、各プローブは、第1検出標識に共有結合させた第1マーカースと、第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識に共有結合させた第2マーカースを含んでなり、

(b) 1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、

(c) 固相表面とマングビーンヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる条件下にて接触させ、

(d) 固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(e) 第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、

(f) ハイブリッド分子をミスマッチ塩基対で切断し、

(g) 第1検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対する第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率を比較する、

を記載の順に含んでなり、第1比率が第2比率を少なくとも35%上回った場合に、選択的スプライシングを受けたRNA転写産物がサンプル中に含まれるとする、前記方法。

【請求項36】 被験体に由来するサンプルにおいて、選択的スプライシングを受けたRNA転写産物の有無を検出または測定する方法であって、下記の工程：

(a) 溶液状態の核酸サンプルと、既知のスプライス部位配列の配列を含む1以上のペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上のオリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ、ここで、各プローブは、第1マーカースと第2マーカースを含んでなり、

(b) 1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、

(c) 固相表面とマングビーンヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる

条件下にて接触させ、

(d)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(e)第1マーカ―を第1パートナー分子と接触させ、第2マーカ―を第2パートナー分子と接触させ、ここで第1パートナー分子は第1検出標識を含んでなり、第2パートナー分子は第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識を含んでなり、

(f)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(g)第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、

(h)ハイブリッド分子をミスマッチ塩基対で切断し、

(i)第1検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対する第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率を比較する、

を記載の順に含んでなり、第1比率が第2比率を少なくとも35%上回った場合に、選択的スプライシングを受けたRNAがサンプル中に含まれるとする、前記方法

。

【請求項37】 被験体に由来するサンプルにおいて、選択的スプライシングを受けたRNA転写産物の有無を検出または測定する方法であって、

(a)溶液状態の核酸サンプルと、既知のスプライス部位配列の配列を含む1以上のペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上のオリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ、ここで、各プローブは、第1マーカ―と第2マーカ―を含んでなり、

(b)1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、

(c)固相表面とマングベーンヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる条件下にて接触させ、

(d)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(e)固相表面を、第1マーカ―に対する結合能を有する第1の一次パートナー

分子および第2マーカーに対する結合能を有する第2の一次パートナー分子と接触させ、

(f)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(g)固相表面を、(i)第1の一次パートナー分子に対する結合能を有する第1の二次パートナー分子、および(ii)第2の一次パートナー分子に対する結合能を有する第2の二次パートナー分子と接触させ、ここで第1の二次パートナー分子は第1検出標識を含んでなり、第2の二次パートナー分子は第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識を含んでなり、

(h)固相表面に結合しなかった物質を除去し、

(i)第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、

(j)固相表面上のハイブリッド分子をミスマッチ塩基対で切断し、

(k)固相表面から、第1検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対する第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率を比較する、

ことを含んでなり、第1比率が第2比率を少なくとも35%上回った場合に、選択的スプライシングを受けたRNA転写産物がサンプル中に含まれるとする、前記方法。

【請求項38】 被験体が植物である、請求項1、3または4記載の方法。

【請求項39】 被験体がウイルス、細菌、酵母、または真菌である、請求項1、3または4記載の方法。

【請求項40】 被験体が哺乳動物である、請求項1、3または4記載の方法。

【請求項41】 被験体が、ウマ、ブタ、ヒツジ、ウシ、イヌ、ネコ、またはヒトである、請求項1、3または4記載の方法。

【請求項42】 被験体がヒトである、請求項1、3または4記載の方法。

【請求項43】 被験体が目的の表現型を示す複数のヒト被験者である、請求項1、3または4記載の方法。

【請求項44】 ペプチド標識に共有結合させた、第1ヌクレオチド配列を含む第1分子と、第1配列に相補的であって、かつ目的の塩基多型の野生型または変異型およびそのフランキング領域に相補的な追加のヌクレオチドと隣接している第2ヌクレオチド配列を含む第2分子とを含んでなる、2分子ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項45】 ペプチド標識に共有結合させた、15～25ヌクレオチド長の第1配列からなるヌクレオチド配列を有する第1分子と、第1配列に相補的であって、かつ目的の塩基多型の野生型または変異型およびそのフランキング領域に相補的な30～40個のヌクレオチドと隣接している15～25ヌクレオチド長の第2配列からなるヌクレオチド配列を有する第2分子とを含んでなる、2分子ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項46】 第2分子が少なくとも1つの検出マーカールを含んでなる、請求項44または45記載のプローブ。

【請求項47】 少なくとも1つの検出マーカールが蛍光団である、請求項46記載のプローブ。

【請求項48】 第1分子が第2分子へハイブリダイズすると、少なくとも1つのヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド塩基誘導体が、二本鎖構造から一本鎖構造への移行点からヌクレオチド3個以内の位置に生じる、請求項44または45記載のプローブ。

【請求項49】 第1分子が第2分子へハイブリダイズすると、6個のヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド塩基誘導体が、二本鎖構造から一本鎖構造への移行点からヌクレオチド3個以内の位置に生じる、請求項44または45記載のプローブ。

【請求項50】 ペプチド標識に共有結合させた、第1ヌクレオチド配列を含む精製された第1分子と、第1ヌクレオチド配列に相補的であって、かつ目的の塩基多型の野生型または変異型およびそのフランキング領域に相補的な追加のヌクレオチドと隣接している第2ヌクレオチド配列を含む精製された第2分子とを、1以上の容器内に含んでなるキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

1. 発明の分野

本発明は、核酸集団のヌクレオチド多型についてのスクリーニングに使用するための組成物および方法に関する。その方法は、一般にValiGeneSM Mutation Screening, Peptide-Linked(VGMS-PL)法と呼ばれ、特にPCR増幅工程の必要のないハイスループット遺伝子型マッピングおよび核酸の遺伝子発現解析のために設計される。特に本発明の方法は、解析のためにアドレス可能な抗体アレイにおいて捕捉される、識別可能かつ同定可能な標識（例えば、ペプチドタグ）で標識したオリゴヌクレオチドプローブを使用する。

【0002】

2. 発明の背景

ゲノム規模配列決定の成果があらわれ、近いうちにあらゆる遺伝病が分子ベースで理解されることになる。一塩基多型(SNP)検出解析は、数多くのヒト疾患の根底にある遺伝子ベースのマッピングにおいてますます有力な役割を果たしている。

【0003】

ヒトゲノムのいずれの2つのコピー間でも1000ヌクレオチド毎に約1つは異なっている(Cooper, 1996, Hum. Genet. 69: 201-205)。これらの遺伝子変異、すなわちSNPのいくつかにより、かかる遺伝子によりコードされるタンパク質の変化がもたらされる。ゲノムの非タンパク質コード領域にある残りのものは「サイレント」である。かかるSNPは現在、例えば遺伝的障害を診断し、遺伝病の素因を調べ、遺伝的サンプルの家系を同定もしくは調査し、または遺伝子配列と複合疾患もしくは薬剤応答および毒性のような表現型の状態とを相関させるために利用されている(Risch and Merikangas, 1996, Science 273: 1516-1517)。遺伝学および分子生物学的研究のこの有力な組み合わせにより薬剤開発の様子が変わってきている。SNPと、ハンチントン舞踏病、アルツハイマー病および様々な形の乳癌との相関関係が明らかにされてきた。薬理ゲノム科学の開発分野では特定のSNPを用いて患者の病気に対する羅病性、ならびに薬剤毒性および応答を調べ、予

測する。また薬理ゲノム科学により薬剤を設計するための新規標的を同定し、かつ既存の薬剤の使用を最適化する手段も提供され得る。これを理解することで結果として遺伝病の早期診断、予防および治療へとつながることが望まれる。

【0004】

一塩基多型は、DNA配列決定、制限酵素解析または部位特異的ハイブリダイゼーションをはじめとする数多くの方法によって同定することができる。しかしながら、SNPおよび他の変異についてのハイスループットゲノム規模スクリーニングには高精度かつ高感度で多数の遺伝子座を同時に解析する能力が必要である。感度を高めるため、単一ヌクレオチド検出の現行のハイスループット法は標的核酸サンプルの、通常はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅を含む工程に依存している(例えば、Nikiforovら, 1997年10月21日付与の米国特許第5,679,524号; McIntoshら, 1998年12月30日発行のPCT公報W098/59066; Goelletら, 1995年5月11日発行のPCT公報W095/12607; Wangら, 1998, Science 280: 1077-1082; Tyagiら, 1998, Nature Biotechnol. 16: 49-53; Chenら, 1998, Genome Res. 8: 549-556; Pastinenら, 1996, Clin. Chem. 42: 1391-1397; Chenら, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 10756-10761; Shuberら, 1997, Hum. Mol. Gen. 6: 337-347; Liuら, 1997, Genome Res. 7: 389-398; Livakら, Nature Genet. 9: 341-342; DayおよびHumphries, 1994, Anal. Biochem. 222: 389-395参照)。しかしながら、PCR法の忠実度は限られたものである。PCRプライマー対の組み合わせには擬似反応生成物を生み出す傾向がある。さらに最終反応生成物中のエラー数は、エラーがDNAサンプルに導入された後、PCR増幅のラウンド毎に指数関数的に増加する。よって、核酸集団において稀にしかない変異を探す場合、PCRエラーは実質的に不都合であるに違いない。

【0005】

上記の全ての理由から、極めて感度が高く、極めて特異的な、PCRを行わない核酸変異のハイスループット検出方法が差し迫って必要である。本発明は以下で詳細に説明する、かかる方法を提供する。

【0006】

本明細書における参考文献の引用または考察は、かかる参考文献が本発明の先

行技術であることを認めるものではない。

【0007】

3. 発明の概要

本発明は、核酸集団における一塩基多型(SNP)と他の変異の検出方法を提供する。PCRを伴わないハイスループット・スクリーニングのための本発明の方法は、細胞由来の全RNAから直接、定性的および定量的に、変化や多型を検出したり、遺伝子発現を分析するのに使用される。本発明の方法は、例えば、障害の診断、遺伝病の素因の判定、身元もしくは祖先の判定、または遺伝子配列と表現型症状との関連付けに利用することができる。

【0008】

具体的な実施形態では、本発明は、識別可能かつ同定可能なペプチドタグを有するSNP特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いて、アドレス可能なアレイ(addressable-array)を利用した高効率かつ高感度なハイスループット・スクリーニングを行い、核酸標的分子における多型を検出する方法に関する。まず、識別可能なマーカを含んでなるSNP特異的ペプチド結合オリゴヌクレオチドプローブを、標的核酸サンプルへハイブリダイズさせる。次に、形成された任意のハイブリッド分子を、高密度のアドレス可能な抗体アレイ上に捕捉し、捕捉したハイブリッド分子のミスマッチ塩基対を認識および切断する酵素で処理する。最後に、切断されたハイブリッド分子上に存在するマーカを検出および分析し、目的とする特定の標的核酸分子内にある任意の多型部位を同定する。

【0009】

本発明の方法は、遺伝子型の検出に現在利用し得る技術よりも、いくつかの点で優れている。第一に、本明細書に記載の方法によって、PCR増幅工程の必要なく、最少量の遺伝物質を用いて遺伝的変異を検出することが可能となるため、検査対象のサンプルへ新たな突然変異が導入されるのを回避することができる。他の遺伝子型判定法では、典型的にはPCR増幅工程を利用して核酸サンプル内の所定の標的配列のシグナルを増幅し、検出を行っている。本発明では、複数の限られた量の標的から複数のシグナルを増幅する。これにより、各種の生物源(例えば、遺伝障害を患う可能性のある患者から採取した組織の生検材料)に由来する

遺伝物質の量がごくわずかであっても、信頼性の高いSNP検出が可能となる。第二に、他の遺伝子型マッピング法と違って、溶液状態で核酸ハイブリダイゼーションが生じるため、ハイブリダイゼーション・パートナーを固定化する必要がない。溶液ハイブリダイゼーションは、一方のパートナーを固定化したハイブリダイゼーションよりも効率がよく、ミスマッチ検出の効率が向上する。第三に、アドレス可能なチップアレイによって、遺伝子型のハイスループット分析用の順応性のある検出系が可能となる。患者または遺伝学的サンプルから複数のSNP部位を同時にスクリーニングしたり、あるいは、多数の異なるDNAサンプルにおいて単一のSNP部位を同時に検査することができる。例えば、一実施形態では、標的核酸サンプルにおける複数の多型の検出が一回の実施で可能である。それぞれがユニークなペプチド標識と検出対象の多型部位に対応する配列とを有する複数のプローブを別個に調製することができる。このような複数のプローブは、「バッチ」ごとに標的核酸サンプルとハイブリダイズさせればよい。別の実施形態では、単一のSNP遺伝子座の有無について、複数の標的核酸サンプルを同時にスクリーニングすることができる。

【0010】

本出願中では、ペプチド標識と該標識に結合させる抗体について言及する。ペプチドと抗体との組合わせの他にも、当業者であれば、任意の標識が適切な結合パートナーと組合わせることが可能なことは明らかであろう。このような標識および結合パートナーの例としては、限定するわけではないが、ジゴキシゲニン-抗ジゴキシゲニン、ビオチン-ストレプトアビジン、リガンド(例えば、ホルモン)-受容体、および炭水化物-レクチンの組合わせが挙げられる。本発明は、相補配列のハイブリダイゼーションによって互いに認識し合う核酸標識と核酸結合パートナーとを用いても実施可能である。核酸の誘導体も標識および結合パートナーとして使用できる(例えば、ペプチド核酸)。

【0011】

本明細書中、用語「多型」とは、種々のゲノムまたは個体間に2つ以上の相対するゲノムヌクレオチド配列または対立遺伝子が存在することをいう。「多型」とは、特定のゲノム配列の2つ以上の変異体を集団内に見出し得る状態を指す。「多

型部位」とは、変異が生じている遺伝子座のことである。一塩基多型(即ち、SNP)は、単一塩基対変異体のことであり、典型的には、多型部位において1個のヌクレオチドが別のヌクレオチドによって置換されている。単一ヌクレオチドの欠失または挿入によってもSNPが生じる。

【0012】

本開示においては、記載を明瞭かつ簡潔にするために用語「SNP」および「SNP検出」を使用するが、これらの用語の意味には、二塩基多型および多塩基多型、並びに一塩基多型の検出方法が含まれるものと理解されたい。さらに、用語「SNP」および「SNP検出」は、核酸配列における欠失および挿入の検出方法を含むことを意味する。従って、本発明の方法を用いることにより、各種サイズの置換、欠失または挿入を検出することが可能である。

【0013】

本明細書に記載のSNP検出法では、塩基多型特異的プローブを使用する。塩基多型特異的プローブは、1以上の識別可能な「マーカ」を含んでなる。マーカは、好ましくはオリゴヌクレオチドの合成時にプローブへ導入されるヌクレオチド残基であり、1)検出標識(例えば、蛍光団)に共有結合されるか、または2)標識された同種結合パートナーと接触させることにより、核酸の合成後に標識される親和性基(例えば、ビオチン)に共有結合される。検出標識としては、限定するわけではないが、発光化合物、発色団、蛍光化合物、放射性同位元素もしくは放射性同位元素を含む基、または非同位標識(例えば、酵素もしくは染料)が挙げられる。従って、検出標識は、ヌクレオチドへ直接結合させてもよいし、または、例えばヌクレオチドへ直接結合させた親和性基に結合するパートナー分子上に存在させることで、間接的に結合させてもよい。

【0014】

本発明は、被験体に由来する核酸サンプルの塩基多型を分析するハイスループット分析法を提供する。この方法には、複数のペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブと溶液状態の核酸サンプルとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させ、サンプル中の核酸へハイブリダイズする複数のプローブのうち1つ以上を、ペプチド標識の1つ以上に免

疫特異的な抗体を含んでなる抗体アレイを用いて検出することが含まれる。本方法の一実施形態では、1つ以上のプローブの検出をPCRまたはMutS(ミスマッチ塩基対を含む核酸を認識して結合する大腸菌ミスマッチ結合タンパク質)を利用せずに行う。

【0015】

本発明はさらに、1以上の被験体に由来する核酸サンプルを多型の有無についてスクリーニングする方法を提供する。この方法には、下記の工程が記載順に含まれる：a)溶液状態の核酸サンプルと1以上の塩基多型特異的ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上のオリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ、ここで、各プローブは、第1検出標識に共有結合させた第1マーカールと、第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識に共有結合させた第2マーカールを含んでなり、b)1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、c)固相表面とマングビーンヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる条件下にて接触させ、d)固相表面に結合しなかった物質を除去し、e)固相表面から、第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、f)固相表面上のハイブリッド分子をミスマッチ塩基対で切断し、そしてg)固相表面から、第1検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対する第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率を比較して、第1比率と第2比率との間に差がある場合に、多型が同定されたとする。

【0016】

別の実施形態では、本発明は、1以上の被験体に由来する核酸サンプルを多型の有無についてスクリーニングする方法を提供する。この方法には、下記の工程が記載順に含まれる：a)溶液状態の核酸サンプルと1以上の塩基多型特異的ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上の塩基

多型特異的オリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ、ここで、各プローブは、第1マーカ―と第2マーカ―とを含んでなり、b)1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、c)固相表面とマングビーンヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる条件下にて接触させ、d)固相表面に結合しなかった物質を除去し、e)固相表面を、(i)第1マーカ―に対する特異的結合能を有する第1パートナー分子、および(ii)第2マーカ―に対する特異的結合能を有する第2パートナー分子とを接触させ、ここで第1パートナー分子は第1検出標識を含んでなり、第2パートナー分子は第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識を含んでなり、f)固相表面に結合しなかった物質を除去し、g)固相表面から、第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、h)固相表面上のハイブリッド分子をミスマッチ塩基対で切断し、そしてi)固相表面から、第1検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対する第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率とを比較して、第1比率と第2比率との間に差がある場合に、多型が同定されたとする。これらの方法の一実施形態では、第1または第2マーカ―がビオチン部分に共有結合しており、第1または第2パートナー分子がアビジンまたはストレプトアビジンである。別の実施形態では、第1または第2マーカ―が炭水化物部分に共有結合しており、第1または第2パートナー分子がレクチンである。別の実施形態では、第1パートナー分子が第1マーカ―に特異的に結合する抗体であり、第2パートナー分子が第2マーカ―に特異的に結合する抗体である。

【0017】

別の実施形態では、1以上の被験体に由来する核酸サンプルを多型の有無についてスクリーニングする方法が提供される。この方法には、下記の工程が記載順に含まれる：a)溶液状態の核酸サンプルと1以上の塩基多型特異的ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを、該プローブのサンプル中の核酸へのハイブリダイゼーションを促進する条件下にて接触させて、核酸と1以上の塩基多型特異的オリゴヌクレオチドプローブとの間に1以上のハイブリッド分子を形成させ、

ここで、各プローブは、第1マーカ―と第2マーカ―とを含んでなり、b)1以上のハイブリッド分子のうち少なくとも1つを固相表面へ捕捉し、c)固相表面とマングビーンヌクレアーゼとを、該ヌクレアーゼが活性となる条件下にて接触させ、d)固相表面に結合しなかった物質を除去し、e)固相表面を、第1マーカ―に対する結合能を有する第1の一次パートナー分子および第2マーカ―に対する結合能を有する第2の一次パートナー分子と接触させ、f)固相表面に結合しなかった物質を除去し、g)固相表面を、(i)第1の一次パートナー分子に対する結合能を有する第1の二次パートナー分子、および(ii)第2の一次パートナー分子に対する結合能を有する第2の二次パートナー分子と接触させ、ここで第1の二次パートナー分子は第1検出標識を含んでなり、第2の二次パートナー分子は第1検出標識と識別可能なシグナルを発生する第2検出標識を含んでなり、h)固相表面に結合しなかった物質を除去し、i)固相表面から、第1検出標識に由来する第1シグナルと第2検出標識に由来する第2シグナルを検出または測定し、j)固相表面上のハイブリッド分子のミスマッチ塩基対を切断し、そしてk)固相表面から、第1検出標識に由来する第3シグナルと第2検出標識に由来する第4シグナルを検出または測定して、第2シグナルの第1シグナルに対する第1比率および第4シグナルの第3シグナルに対する第2比率を決定し、第1比率と第2比率とを比較して、第1比率と第2比率との間に差がある場合に、多型が同定されたとする。一実施形態では、第1または第2マーカ―がビオチン部分に共有結合しており、第1または第2の一次パートナー分子がアビジンまたはストレプトアビジンである。別の実施形態では、第1または第2マーカ―が炭水化物部分に共有結合しており、第1または第2の一次パートナー分子がレクチンである。さらに別の実施形態では、第1および第2の一次パートナー分子が別個の一次抗体であり、第1および第2の二次パートナー分子が別個の二次抗体である。

【0018】

本発明はさらに、抗体アレイの1以上の抗体に結合される塩基多型特異的ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブを1以上含んでなる組成物を提供する。

【0019】

これらの方法の一実施形態では、1以上の塩基多型特異的ペプチド標識オリゴ

ヌクレオチドプローブのうち少なくとも1つが、a)該オリゴヌクレオチドの5'末端に共有結合したペプチド、b)該オリゴヌクレオチドの5'側の2番目に位置する第1マーカ―、およびc)該オリゴヌクレオチドの3'末端に位置する第2マーカ―を含んでなるものである。

【0020】

これらの方法の別の実施形態では、固相表面が複数の遺伝子座を含んでなるものであり、各遺伝子座は、1以上のオリゴヌクレオチドプローブのうちの1つへ、ペプチド標識オリゴヌクレオチドのペプチドを介して特異的に結合することができ、該ペプチドは該オリゴヌクレオチドの5'末端に共有結合している。第1または第2マーカ―が炭水化物部分に共有結合しており、第1または第2パートナー分子がレクチンである。

【0021】

別の実施形態では、第1検出標識または第2検出標識のいずれか一方または両方が、酵素、蛍光団、化学発光標識、または放射性同位元素である。別の実施形態では、第1検出マーカ―または第2検出マーカ―のいずれか一方または両方が蛍光団である。

【0022】

本発明の各種実施形態では、第1比率と第2比率とを比較することでシグナルを測定し、第1比率が第2比率を少なくとも35%上回った場合に、多型が同定されたとする。

【0023】

一実施形態では、固相表面が複数の遺伝子座を含んでなるものであり、各遺伝子座は、ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブのペプチドの1つ以上に特異的な抗体を含んでなる。別の実施形態では、固相表面がプラスチックチップである。別の実施形態では、固相表面がマイクロタイタープレートのウェルである。別の実施形態では、サンプルに含まれる核酸が2 µg未満である。別の実施形態では、サンプルに含まれる核酸が、ゲノムDNAおよびcDNAからなる群より選択されるものである。別の実施形態では、サンプルに含まれる核酸がゲノムDNAである。別の実施形態では、サンプルに含まれる核酸がcDNAである。別の実施形態で

は、サンプルに含まれる核酸が二本鎖DNAである。別の実施形態では、サンプルに含まれる核酸が一本鎖DNAである。別の実施形態では、ハイブリッド分子のミスマッチ塩基対での切断を、前記ハイブリッド分子と1以上の特定のヌクレアーゼとをハイブリッド分子のミスマッチ塩基対での切断が可能となる条件下にて接触させることにより行う。別の実施形態では、ハイブリッド分子のミスマッチ塩基対での切断を、前記ハイブリッド分子と大腸菌エンドヌクレアーゼⅤおよびS1ヌクレアーゼとをハイブリッド分子のミスマッチ塩基対での切断が可能となる条件下にて接触させることにより行う。別の実施形態では、第1および第2検出標識が、同一波長で励起されるが異なる周波数で発光する蛍光団である。

【0024】

各種の実施形態では、本発明は、サンプル中に含まれる選択的スプライシングを受けたRNA転写産物の有無を検出または測定する方法を包含する。

【0025】

一実施形態では、被験体が植物である。別の実施形態では被験体がウイルス、細菌、酵母または真菌である。別の実施形態では、被験体が哺乳動物である。別の実施形態では、被験体がウマ、ブタ、ヒツジ、ウシ、イヌ、ネコまたはヒトである。別の実施形態では、被験体がヒトである。別の実施形態では、被験体が目的の表現型を示す複数のヒト被験者である。

【0026】

本出願中では、SNP特異的プローブが2つのマーカーを有するものとして言及するが、3、4またはそれ以上の識別可能なように標識したマーカーを含むSNPプローブも本発明の範囲内に含まれるものと理解されたい。例えば、このようなマーカーを、オリゴヌクレオチドの配列内の位置に配置することで、別のミスマッチ塩基対またはスプライス部位配列の検出が可能になる。

【0027】

本発明の方法は、PCRを伴わない遺伝子型の直接マッピングに使用することができ、また、対立遺伝子の増幅とヘテロ接合現象の喪失の定量的なゲノム分析に使用することができる。本発明はさらに、上記の方法を含んでなる、被験体由来のサンプルに含まれるRNAを検出および測定する方法を提供する。この方法では

、SNP特異的オリゴヌクレオチドプローブは、既知のRNA転写産物または既知のストライプ部位配列の配列を含んでなるものである。このような方法を使用することで、ごく少量のRNAサンプルにおける遺伝子発現を定性的にも定量的にもモニターできる。一実施形態では、サンプルは、組織サンプルまたは生検材料から抽出された細胞由来の全RNAである。別の実施形態では、このような方法をin situで使用して、診断および予後判定を目的とした組織学的標本内での遺伝子発現をモニターする。

【0028】

4. 図面の簡単な説明

(図面の説明については下記参照)

5. 発明の詳細な説明

本発明は、核酸集団に存在する多型を同定するための、一般にValiGeneSM Mutation Screening, Peptide-Linked法(VGMS-PL法)と呼ばれる方法を提供する。この方法は、例えば薬剤応答および毒性を調べ、遺伝障害を診断し、遺伝病の素因および危険因子を調査し、個々の同定または家系を調査して遺伝子配列と身体的障害もしくは症候群との相関関係を算定するために用いられている。

【0029】

現在利用可能な遺伝子型決定法では、典型的にはPCR工程を利用し、全サンプルの増幅によりゲノムサンプル内の所定の標的量を増やしてその検出を増強するものである。本発明では、数多くの限られた量の標的に由来するシグナルの増幅により検出を増強し、PCR増幅工程の必要がないようにしている。シグナル増幅は、親和性基のペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブへの導入と、後の工程での上記親和性基と検出可能な標識を有するパートナー分子との接触により達成される。

【0030】

本発明は溶液ハイブリダイゼーションおよびミスマッチを認識して検出するエンドヌクレアーゼによる切断を利用する。それにより本発明は、従来のミスマッチ検出法に使用されてきた、ミスマッチ塩基対を含有する核酸を認識して結合する、MutSのような大腸菌(E.coli)ミスマッチ結合タンパク質を使用しなくてもよ

いこととなる(Wagnerら, 1995, Nucl. Acids Res. 23: 3944-3948 ; Wagnerら, EPO 596 028 B1およびPCT94/08022)。

【0031】

具体的に説明すると、本明細書において以下に開示した方法では、標的核酸分子のハイブリダイゼーションプローブとして識別マーカを有するペプチド結合オリゴヌクレオチドを含んでなる、塩基多型特異的プローブを使用する。PCRを行わない直接SNP検出方法の基本操作の原理を図1に示す。各被験体または各被験体集団から採取した核酸サンプルを目的の遺伝子座に特異的なペプチド結合オリゴヌクレオチドプローブとアニーリングする。例えば、核酸サンプルがゲノムDNAである場合、かかる遺伝子座はSNPであってよい。別の実施形態において、アッセイする核酸サンプルがRNAである場合には、その遺伝子座はスプライス部位であってよい。次いでアニーリングしたプローブ：標的核酸ハイブリッドを固相表面で捕捉し、酵素処理して固定されないプローブを除去する。好ましくは、所望によりプローブ5'-および3'末端識別マーカに由来するシグナルを記録する前にシグナル増幅工程を行ってもよい。次いで固相表面を、ミスマッチ塩基対の位置でハイブリッドを特異的に消化する一連の酵素で処理し、第2シグナルを記録する。ミスマッチ塩基対でのそれらの消化前後にハイブリッドから読みとった情報の解析により、目的の遺伝子座におけるSNPまたはスプライス部位の存在を判定し、様々な実施形態においては正確に定量する。一実施形態においては、ハイブリッド分子を高密度アドレス可能なアレイに捕捉し、捕捉されたハイブリッド分子のミスマッチ塩基対を認識して切断する酵素により解析する。次いで切断したハイブリッド分子に存在する検出標識を検出し、解析して目的の特定の標的核酸分子内の多型部位を同定する。

【0032】

本発明の様々な実施形態において、標識オリゴヌクレオチドを多型特異的ハイブリダイゼーションプローブとして用いる。アドレス可能な抗体アレイにおけるプローブの捕捉に使用するペプチド標識とともに、かかるプローブを本方法の様々な工程において標識核酸とのハイブリダイゼーションを検出するマーカでも標識する。上記のように、VGMS-PL法の基本操作の原理を図1に示す。PCRを行わ

ない遺伝子型マッピング解析の概略図を図2に示す。典型的な陽性および陰性プローブを図2のパネル上部に示す。以下、この方法を本明細書において詳しく説明する。

【0033】

5.1 オリゴヌクレオチドプローブ

本発明の様々な実施形態では、ペプチド標識SNP特異的または遺伝子座特異的オリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーションプローブとして用い、多型配列を標的化して検出する。好ましい実施形態では、SNP特異的プローブは3つの特性を有する合成オリゴヌクレオチドを含有している（陽性および陰性プローブは図2のパネル上部に示す）。第1に、ペプチド標識とオリゴヌクレオチドの5'末端とを結合する（図2では白枠で示す）。第2に、検出標識であるか、あるいは抗体のようなパートナー分子と結合し得る親和性標識もしくはかかる第1マーカと結合する親和性のパートナーであってもよい第1マーカ(F₁)をオリゴヌクレオチドの5'末端の2番目に位置するデオキシリボース塩基上に配置する（図2ではF₁で示す）。第3に、第1マーカと識別可能な第2マーカ(F₂)をオリゴヌクレオチドの3'末端のデオキシリボース塩基上に配置する（図2ではF₂で示す）。

【0034】

多型特異的オリゴヌクレオチドプローブは、任意の核酸配列に相当するように、好ましくは公知のまたは多型を含むと考えられる領域に相当するように設計する。臨床的に重要な数多くの多型が知られている。例えば、アポリポタンパク質E変異体のようなアポリポタンパク質遺伝子のSNPIはアテローム性動脈硬化症(Breslow, 1996, Science 272: 685-688参照)およびアルツハイマー病(Selkoe, 1997, Science 275: 630-631; Weisgraber, 1996, FASEB J. 10: 1485-1494)のような疾患に関係している。アポリポタンパク質および低密度リポタンパク質(LDL)受容体遺伝子における突然変異は家族性高コレステロール血症(Hobbsら, 1990, Ann. Rev. Genet. 24: 133-170; Brownら, 1984, Sci. Amer. 251: 58-66)の患者に共通している。β-グロビン遺伝子座における多型もまた周知である；例えばβ-グロビン遺伝子の単一塩基対の突然変異によりアミノ酸であるグルタミン酸がバリンに置き換わり、その結果として鎌状赤血球貧血を起こすことになる(I

ngam, 1957, Nature 180: 326-328)。

【0035】

公知のまたは多型部位を含むと考えられる任意の遺伝子を本発明の方法において標的核酸として用いることができる。公知のまたは推測されるSNP部位のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は一般に、GenBankのような配列データベースまたはヒト疾患の一般的な変異体の供給源として突然変異データベースを確立しているHUGOデータベースイニシアティブ(initiative)において入手可能である(Cottonら, 1998, Science 279:10-11)。Entrezのようなコンピュータプログラムを使用し、データベースを閲覧して、目的の任意のヌクレオチドまたはアミノ酸配列データを検索することができる<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>参照)。またこれらのデータベースを、アライメントスコアおよび統計学により類似配列を評価するFASTAおよびBLASTのようなプログラムを使用して検索し、クエリー配列と様々な程度の類似性を有する配列を同定することも可能である。

【0036】

SNP特異的プローブは1以上の識別「マーカー」を含有している。マーカーは、好ましくはオリゴヌクレオチドの合成中(第5.4.3節参照)にプローブに導入されるヌクレオチド塩基であり、1)検出標識(例えば蛍光団)と共有結合されるか、または、2)標識された同種結合パートナーと接触させることにより核酸合成後に標識される親和性基(例えばビオチン)と共有結合される。検出標識としては、限定されるものではないが、発光化合物、発色団、蛍光化合物、放射性同位元素もしくはそれを含有する基、または酵素もしくは色素のような非同位標識が挙げられる。このように、検出標識を直接ヌクレオチドと結合するか、または間接的に、例えばヌクレオチドに直接結合させた親和性基と結合するパートナー分子に存在させることによって間接的に結合させてもよい。例えば、使用してもよい親和性基またはパートナー分子としては、限定されるものではないが、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、ハプテン、ならびにモノクローナルおよびポリクローナル一次または二次抗体が挙げられる。

【0037】

単一のSNP特異的プローブ上に2種以上のマーカーが存在する場合には、2種の

マーカーが識別できることが重要である。かかる検出マーカーのアッセイは当技術分野では周知である(例えば、HarlowおよびLane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 第14章参照)。好ましい実施形態では、これはプローブのマーカー残基と結合する異なる親和性基と結合する識別可能なパートナー分子の使用により達成される。例えば、SNP特異的プローブの3' マーカーとビオチン分子とを結合させる。ビオチンの結合パートナー分子であるストレプトアビジンとセイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)のような酵素標識とを結合させてもよく、それを親和性結合パートナーとして用いてビオチンが結合したマーカーと特異的に結合させてもよい。マーカーを示差的に標識するため、SNP特異的プローブの5' マーカーと2価または3価カチオンのキレート(Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Eu^{3+} など, Dahlenら, 1994, *Bioconjug. Chem.* 5: 268-72; LiおよびSelvin, 1997, *Bioconjug. Chem.* 8: 127-132)およびオボアルブミン、チログロブリンなどのようなPDLS結合球状タンパク質とを結合させてもよく、それを用いてキレートマーカーと特異的に結合させてもよい。リジン、ジピコリネートおよびスクシネートの重合体であるPDLSは、2価および3価カチオンと高い親和性で結合し、紫外光により励起させた場合にそれらが発光する可視発光を著しく増強する(LamtireおよびWensel, 1995, *Bioconjug. Chem.* 6: 88-92)。

【0038】

もう1つの実施形態では、特定プローブの識別マーカーは異なる周波数で発光する異なる蛍光団を含有している。標識、シグナル増幅およびシグナル検出に使用する方法の詳細については第5.4節で記載する。

【0039】

最も好ましい実施形態では、SNP特異的プローブは2種の識別可能かつ検出可能な親和性標識を含有している。もう1つの実施形態では、SNP特異的プローブは、3~4種以上の示差的標識マーカーを含有している。かかるマーカーをオリゴヌクレオチド配列内の位置に配置することで別のミスマッチ塩基対またはスプライス結合配列の検出が可能になる。

【0040】

本発明の様々な実施形態では、1以上のプローブを、同じ分子において1以上の多型を標的化した1つの反応において用いてもよい。単一の反応においてプローブ混合物を用いる場合、事前解析によりプローブ間および標的断片間の相互作用を最小限にし、プローブ間の類似 ΔG 特性を保証することが推奨される。オリゴヌクレオチドプローブのかかる事前解析は当業者には周知である。

【0041】

5.2 PCRを行わない遺伝子型マッピング法

この実施形態では、本発明の方法を用いてDNAサンプルの多型部位、例えば、SNPを検出する。この方法を用いてSNP特異的オリゴヌクレオチドプローブと標的分子間の単一ミスマッチを検出するか、または単一のミスマッチ、二重ミスマッチもしくはマルチプレックスミスマッチを識別してもよい。

【0042】

一般にDNAサンプルのPCRを行わない遺伝子型マッピング法には以下の工程：1) 標的DNAと第1および第2マーカ含有するSNP特異的ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブとを接触させ；2) アニールしたハイブリッドを固相表面で捕捉し；3) その固相表面をマングベーンヌクレアーゼで処理し；4) 固相表面に結合しなかった物質を除去し；5) 第1および第2マーカに由来するシグナルを検出し；6) 存在するいずれかのミスマッチ塩基対でプローブDNAを切断し；そして7) 第1および第2マーカに由来する別のシグナルを検出することが含まれる。

【0043】

第1の工程では、標的DNAをサンプルから調製する。標的DNAは限定されるものではないが、全血、血漿、血清、皮膚、唾液、尿、リンパ液、生検吸引液から得られた細胞、組織培養細胞、培養基などの生物学的サンプル；または食物、水もしくは他の物質などの非生物学的サンプルから得ることができる。上記供給源からのDNAの調製方法は当業者には周知である(例えば、Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, 1987-1994 Current Protocols, 1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.参照)。

【0044】

一実施形態では、標的DNAはゲノムDNAの断片である。もう1つの実施形態では

、試験DNAはcDNAである。また別の実施形態では、標的DNAは目的の複数の被験体、例えば特定の疾患に苦しむ被験体由来のゲノムDNAの混合集団である。

【0045】

標的DNAは、DNAを平均長が300塩基対となるように断片化してハイブリダイゼーション用に調製する。好ましい実施形態において、これは1以上の制限エンドヌクレアーゼにより処理した後にプローブとともにアニーリングすることにより達成され、これにより適当な長さの断片が得られる。使用されるいずれのSNP特異的プローブ内にも現れない認識部位を認識して切断するよう制限酵素が選択される。好ましくは、かかる処理により約100～1000塩基対のサイズ範囲にある、さらに好ましくは、200～500塩基対の範囲にある、最も好ましくは、約300塩基対のDNA断片を得る。数多くの制限酵素、好ましくは4塩基認識部位を有する制限酵素は、当技術分野で公知であり、かつ商業的に入手可能であり、この目的に使用することが可能である。もう1つの実施形態では、DNAを音波処理により断片化し、DNA分子を平均サイズ300塩基対となるように剪断する。

【0046】

次いでDNA断片とペプチド標識SNP特異的オリゴヌクレオチドプローブとをハイブリダイゼーションを引き起こし得る条件下で混合する。典型的なハイブリダイゼーション条件は以下の通りである。好ましくはゲノムDNA 300ng（目的のSNPを含有する約 9×10^4 コピーの標的遺伝子）とプローブ 100fg（約 3.5×10^6 コピーのプローブ）とを、10mM Tris-HCl(pH 7.5)；1mM EDTA、50mM NaCl；および1mM 臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)を含有するバッファー中、全容量5 μ lで混合する。この混合物を98℃で5分間加熱することにより変性させ、68℃で20分間混合物をインキュベートすることにより再生させる。結果を最適化するために、ストリンジェンシーを調整することが可能である。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーの調整方法は慣例であり、当技術分野で周知である（例えば、Sambrookら、1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Ausubelら編, in the Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals(著作権), 1987-1994 Current Protocols(著作権), 1994-1997 J

ohn Wiley and Sons, Inc.; Dyson, N. J., 1991, Immobilization of nucleic acid and hybridization analysis, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Vol.2, T. A. Brown編, pp.111-156, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, U. K.参照)。塩濃度、融解温度、変性剤の有無、ならびにハイブリダイズする核酸の種類および長さ(例えば、DNA、RNA、PNA)が当技術分野で公知の方法による特定の溶液ハイブリダイゼーション反応のストリンジエンシーを調整する際に考慮される変数の数例である(Ausubelら, 1987-1994, p. 2.10.7-2.10.16; BrittenおよびDavidson, 1985, Hybridization Strategy. In B. D. HanesおよびS. J. Higgins編, Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, p. 3-46 IRL Press, Oxford University Press, Oxford; Mullisら, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-73)。

【0047】

第2の工程ではアニーリングしたハイブリッドを固相面で捕捉する。ある実施形態において単一プローブを用いる場合、固相面はマイクロタイターディッシュのウェルであってよい。典型的な例としては、限定されるものではないが、マイクロタイタープレート(例えば、Maxisorb)のウェルを、0.1M Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH 9.1)中4mg/mlの濃度まで希釈した抗ペプチド抗体100 μl で37℃で1.5時間被覆する。次いでプレートを4℃で一晩保存してもよい。各ウェルをリン酸緩衝溶液(PBS) 200 μl ; 0.1% Tween 20(Sigma); 10mM EDTAで4回洗浄する。ウェルを100 μl PBS; 3%ウシ血清アルブミン(BSA, Sigma)中、室温で2時間インキュベートして非特異的結合部位をブロックして、再度上記のように洗浄する。

【0048】

再びアニーリングした混合物をPBSで最終容量120 μl にし、抗体で被覆したウェルに移し、37℃で45分間インキュベートする。次いでこのウェルをPBS 200 μl ; 0.1% Tween 20; 10mM EDTA中で十分に洗浄し(3~4回)、ペプチド標識を有するプローブとハイブリダイズしなかった全ての標的分子のような結合していない核酸を除去する。

【0049】

もう1つの実施形態において多数のプローブを捕捉し、バッチでまたは「マル

チップ」で同時に解析する場合、固相面は複数の遺伝子座を含有しており、それぞれの遺伝子座はSNP特異的プローブと結合したペプチドに特有の親和性を有する抗体を含有している（すなわち抗体アレイチップ）。かかるアレイおよびその構築方法についての詳しい説明は第5.5節で記載する。上記マイクロタイタープレートについて記載したように、チップを1以上のSNP特異的プローブと接触させることができる。

【0050】

第3の工程では固相面をマングベーンヌクレアーゼのような一本鎖ヌクレアーゼで処理して、ハイブリッド分子の一本鎖領域を切断し、かつハイブリダイズしていない全てのプローブを破壊する。マングベーンヌクレアーゼはDNAおよびRNA二本鎖分子の末端から一本鎖伸長部分をはずして平滑末端とし、かつ内部ミスマッチを二本鎖DNA：DNAまたは完全DNA：RNAハイブリッドの連続する3塩基より短くする、一本鎖特異的DNAおよびRNAエンドヌクレアーゼである。例えば、マイクロタイタープレートのウェルに0.05単位のマングベーンヌクレアーゼを含有するバッファー150 μ lを充填し、37℃で15分間インキュベートする；次いでウェルをリン酸緩衝溶液(PBS；150mM NaCl-10mM NaPO₄，pH 7.4)200 μ lで4回洗浄する。この処理の後、全ての標的：プローブハイブリッドはSNPミスマッチの有無に関わりなく、5'および3' マーカーをともに含有することになる。連続する3塩基より大きなミスマッチを含有するハイブリッドにおいてだけは、5'および3' マーカーが互いに分かれて存在することになる。

【0051】

チップを工程2のように十分にすすぎ、工程5においてSNPオリゴヌクレオチドプローブのマーカーからシグナルを検出する。マーカーを直接標識しなかった場合、この時点で当技術分野で公知のいずれの親和性標識法によってそれらを標識してもよい。

【0052】

好ましい実施形態では、検出標識を含有するパートナー分子を加えて親和性官能基と特異的に結合させる。例えば、SNP特異的プローブの3' マーカーとビオチン分子とを結合させてもよい。ビオチンの結合パートナー分子であるストレプト

アビジンとセイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)のような酵素標識とを結合させてもよく、それを親和性結合パートナーとして用いてビオチン結合マーカースと特異的に結合させてもよい。特別な実施形態では、 1×10^{-5} 希釈のAmdex試薬120 μl は、ストレプトアビジンが結合し、アガロースが結合した、セイヨウワサビペルオキシダーゼ約100分子の集合である。25 で30分間のインキュベーション後、ウェルをPBS 200 μl で4回洗浄して過剰なストレプトアビジンHRPを除去し、TMB (テトラメチルデカン酸、セイヨウワサビペルオキシダーゼの基質) 溶液160 μl を加える。結果として起こる発色反応を5分間進行させ、液体60 μl を(新たなマイクロタイタープレートの)被覆していないウェルに移し、それに1M硫酸25 μl を加えて発色を固定する。この第1の反応物の強度をプレートリーダー分光光度計で450nmにおいて読み取る。第2のマーカース、5' 標識と、例えば2価または3価陽イオン(Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Eu^{3+} 、他、Dahlenら, 1994, Bioconjug. Chem. 5: 268-72; LiおよびSelvin, 1997, Bioconjug. Chem. 8: 127-32)のキレート化合物とを結合させてもよい。オボアルブミン、チログロブリン、他のようなPDLS結合球状タンパク質を用いてキレートマーカースと特異的に結合させてもよい(LamtureおよびWensel, 1995, Bioconjug. Chem. 6: 88-92)。リジン、ジピコリネート、およびスクシネートの重合体である、PDLSは2価および3価陽イオンと高い親和性で結合し、紫外光により励起させた場合にそれらが放射する可視発光を強く増強する(LamtureおよびWensel, 1995, Bioconjug. Chem. 6: 88-92)。

【0053】

もう1つの実施形態では、検出標識を含有する一次抗体を加え、第1および第2マーカースの一方または双方と特異的に結合させる。さらにもう1つの実施形態では、一次抗体を加え、洗浄し、続いて検出標識で標識した二次抗体を加える。かかる標識および検出法については当技術分野で十分に公知であり、さらに第5.4.1および5.4.2節で記載する。

【0054】

プローブの3' および5' マーカースを評価するために第1回目の「ベースライン」となる記録を取る。得られた記録と「対照」サンプルから得られた記録とを比べてシグナルを標準化する。かかる対照サンプルにおいて非多型部位の配列を有

するオリゴヌクレオチドを非多型配列を有するサンプルとハイブリダイズさせる。この記録がミスマッチ検出解析前に存在した開始材料量の基準となる。ここで、両シグナルを発するプローブをDNA標的相同体とハイブリダイズさせ、5'シグナルのみを発するプローブをプローブ配列に関して少なくとも連続する3塩基に及ぶ欠失または挿入を含有する標的とハイブリダイズさせる。この記録もまた様々なSNP特異的プローブ間の抗体結合親和力における差についてサンプルを標準化するベースラインとなる記録となる。

【0055】

第6の工程ではハイブリッドを1種以上の酵素で消化し、ミスマッチ塩基対の位置において切断する。好ましい実施形態では、デオキシイノシン3'エンドヌクレアーゼ大腸菌エンドヌクレアーゼV(endoV)およびS1ヌクレアーゼ(S1)を用いる。大腸菌nfi遺伝子の産物であるEndoV (dl Endo、GenBank登録番号U00006としても知られている)は、デオキシイノシン残基、単一塩基ミスマッチ、挿入/欠失ミスマッチ、アプリン酸(apurinic)部位、フラップ、および偽Y構造(pseudo-Y structure)を有するDNAを認識してニックを入れるデオキシイノシン3'エンドヌクレアーゼである(DempleおよびLinn, 1982, J. Biol. Chem. 257: 2848-55; YaoおよびKow, 1996, J. Biol. Chem. 271: 30672-6; YaoおよびKow, 1997, J. Biol. Chem. 272: 30774-79)。この実施形態では、endoVはミスマッチ塩基対の配列内容により、除去する1ヌクレオチドの近傍またはそのヌクレオチドのいずれかの、標的鎖(非プローブ)3'とミスマッチとのホスホジエステル結合においてミスマッチしたハイブリッドを切断する。S1ヌクレアーゼはendoVにより導入された一本鎖ニックの向かいを切断し、二本鎖に亀裂が生ずる。よって、SNPが存在する場合、EndoVおよびS1ヌクレアーゼによる切断により5'マーカーから3'マーカーが切り離される。SNPが存在しない場合、3'および5'マーカーは同一分子と結合したままである。

【0056】

ある実施形態では、マイクロタイターディッシュのウェルに0.001単位のS1ヌクレアーゼおよび0.05単位のエンドヌクレアーゼVを含有する反応バッファー120 μ lを充填する。この反応を37℃で15分間進行させ、次いでウェルを上記のよう

に洗浄する。もう1つの実施形態では、この方法をマルチプレックスで行う場合、捕捉したハイブリッドを含有する抗体チップをS1ヌクレアーゼ0.01単位/mlおよびendoV 0.5単位/mlを含有する37℃反応槽に入れ、12～15分間インキュベートする。PBSの溶液バットに浸漬することにより洗浄を達成する。

【0057】

第7の工程では再びシグナルを生じさせて、第2回目の記録を取る。ある実施形態では、例えばTMB溶液160μlを加え、結果として起こる発色反応を5分間進行させる。1M 硫酸40μlを加えてこの第2の反応物における発色強度を上記のように記録する。もう1つの実施形態では、抗体アレイを再び顕出し、シグナルを記録する。3'シグナル強度が変化しない場合、アレイ座標にはプローブと同一のハイブリダイズしたゲノム配列を含有しており、3'シグナルは消滅したが5'シグナル強度は変化しない場合、座標にはプローブとは同一でないハイブリダイズしたゲノム配列を含有しており、3'シグナル強度が（例えば、35%を超えて）低下した場合、座標にはプローブのヘテロ接合体であるハイブリダイズしたゲノム断片を含有している。もう1つの実施形態では、3'シグナル強度が25%を超えて低下した場合、座標にはプローブのヘテロ接合体であるハイブリダイズしたゲノム断片を含有している。もう1つの実施形態では、3'シグナル強度が20%を超えて低下した場合、座標にはプローブのヘテロ接合体であるハイブリダイズしたゲノム断片を含有している。第6節の実施例はいかにシグナルを解析して多形部位の存在を検出するかというものである。

【0058】

様々な実施形態においてこの方法をマルチプレックスSNPスクリーニングに使用する。本明細書において使用される「マルチプレックス」とは、単一核酸標的における1を超えるSNP部位または1を超える核酸標的における単一SNP部位の存在について同時にスクリーニングすることを意味する。ある実施形態では、例えばSNP検出方法を使用して単一被験体由来の核酸サンプルをSNP部位のスペクトルの変化についてスクリーニングする。

【0059】

本方法のこの実施形態は、病気の診断、被験体の遺伝障害についての疾病素質

の調査、患者の薬剤治療に対する耐性および毒性の調査をはじめとする多様な用途に、および被験体の家系の同定または調査に有効であると考えられる。この実施形態では、SNP特異的ペプチド標識オリゴヌクレオチドのライブラリーを使用して単一DNAサンプルをSNPの存在について調べる。公知のSNP配列の「陽性」プローブと「陰性」プローブとの対を含むSNP特異的ペプチド標識オリゴヌクレオチドのライブラリーを使用して単一の患者の核酸をスクリーニングする。ハイブリダイゼーションをバッチで行い、数多くのプローブを単一の混合物の標的核酸とアニーリングする。この生成物をアドレス可能な抗体アレイにおいて解析する。各プローブはそのアレイ「アドレス」、x-y座標により同定可能である。

【0060】

もう1つの実施形態では、SNP検出方法を表現型 / 遺伝子型関連解析におけるマルチプレックススクリーニングに使用してもよい。この実施形態では、標的DNAサンプルは注目する疾患（例えば、関節炎、喘息または癌）に苦しむ個体群由来の複数のDNA分子を含有している。対照DNAサンプルは疾患のない群由来のDNA分子を含有している。2群を数多くのSNPプローブに関してマルチプレックススクリーニングし、その結果を2群間で比較する。

【0061】

さらにもう1つの実施形態では、SNP検出方法を数多くの個体の1以上のSNP部位についてのマルチプレックススクリーニングに使用してもよい。この方法は例えば、大勢の患者の遺伝障害、薬剤感受性、血液型、他についての診断的スクリーニングに有効である。この実施形態では、特定のSNPに対応するSNP特異的プローブといずれの数の異なるペプチド標識とを結合させてもよい。各SNPプローブを標的核酸の異なるサンプルと別々にアニーリングし、その結果として各サンプルが区別して標識される。次いでサンプルを「バッチで」同時に進行させ、アドレス可能な抗体アレイを用いて検出して解析する。

【0062】

アドレス可能なアレイチップは再生利用して繰り返し使用できる。例えば、捕捉ペプチドが抗体から外れるpH勾配を用いることによりアドレス可能なアレイチップ上の抗体からペプチドを外すことができる。次いでこのチップを保存または

即時再生するためにPBSで十分にすすぐ。

【0063】

5.3. アドレス可能な抗体アレイを用いた遺伝子の分析方法

本発明の別の態様では、ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブおよびアドレス可能な抗体アレイを用いて、定性および定量の両面で、遺伝子発現事象をモニターする方法を提供する。本明細書に記載する方法を用いて、例えば、組織サンプル中に、選択的にスプライシングまたはミススプライシングされたRNAを含む野生型または多型RNAのレベルまたは存在量を検出もしくは測定する、あるいは、組織生検または組織学的標本における定性および定量的遺伝子発現レベルを直接モニターすることができる。このような生検および組織学的標本は、遺伝障害が疑われる患者から採取して、例えば、そこで、1以上の突然変異が存在しないか存在するかを確認することができる。さらに別のマーカー（例えば、蛍光標識）で標識したペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブを用いて、特に、RNAスプライス部位で、このような潜在的遺伝変異の既知部位をモニターすることが可能である。

【0064】

特に、関心の高い標的は、イントロン - エキソン境界で起こる既知の突然変異であり、これは、異常にスプライシングされたmRNAをもたらし、その結果、広い範囲の遺伝障害を引き起こす。突然変異は、一般に、このようなスプライス部位結合配列で起こり、前駆体mRNA分子からの非コードRNAの干渉配列を排除するスプライシング事象により、2つのエキソンの境界にまたがるmRNAの領域が形成される。実際に、ヒトの遺伝病を引き起こす全ての点突然変異の15%が、RNAスプライシング欠陥を形成している（Krawczakら、1992、Hum. Genet. 90:41-54）。このようなスプライシング突然変異は、イントロン / エキソン境界付近でエキソン配列に影響を及ぼすことが多い；これらのスプライス部位突然変異の多くは、「サイレント」突然変異であり、コードされたタンパク質の一次アミノ酸配列の改変を一切起こさない。いくつかの非限定的例として、血小板減少症を引き起こすインテグリンGPIIIa遺伝子におけるG→A突然変異（Jinら、1996、J. Clin. Invest. 98:1745-54）；遺伝性チロシン血症を引き起こすフマリルアセトアセテ

ート加水分解酵素に対する遺伝子中のC→T突然変異(van Amstelら、1996、Hum. Genet. 97:51-59)；脳脊髄症を引き起こすピルビン酸デヒドロゲナーゼE1aにおけるA→G突然変異(de Meirleirら、1994、Pediatr. Res. 36:707-712)；ならびに、その他多数(概要は、CooperおよびMattox、1997、Am. J. Hum. Genet. 61:259-266を参照)を含む。

【0065】

スプライス部位プローブは、ゲノムのスプライス部位突然変異または選択的スプライシング事象のいずれかが起こることがわかっている、もしくは疑われる所与のRNAのスプライス部位配列にまたがるように設計される。このような突然変異、ならびに、エキソン1とエキソン2の間のスプライス部位にまたがるスプライス部位オリゴヌクレオチドプローブの概略図を図3に示す。

【0066】

全リボ核酸(RNA)は、利用可能な細胞の供給源および量に応じて、当業者には公知の様々な方法により、組織サンプルから単離することができる。精製RNAは、生検や、組織培養細胞等から回収した組織サンプルから調製することができる。次に、標準的論文に記載されている方法(例えば、Methods in Enzymology、1987、第154巻、Academic Press；Sambrookら、1989、前掲；ならびに、Ausubelら、前掲)を実施することにより、全核および全細胞質RNAの精製に際し、通常の分子生物学反応を実施することができる。以下に詳しく述べる方法は、説明のためであり、何ら制限するものではない。また、市販の各種のRNA調製装置を、製造者の教示にしたがって使用し、本発明の方法で用いるRNAを単離および精製してもよい。実のところ稀にしか発現されない遺伝子産物を含むRNAを回収するためには、高分子量で高品質のRNAを取得するのが好ましい。高品質のRNAを調製するためには、細胞の完全な溶解物およびヌクレアーゼの迅速な不活性化を提供する方法が好ましい。多くのこのような方法が、当業者には公知である。例えば、単一工程RNA調製方法では、穏やかなデタージェントおよびβメルカプトエタノールまたはジチオトレイトールと共に、強力なカオトロピック剤、すなわち、イソチオシアン酸グアニジニウムを用いることにより、タンパク質を変性すると同時に、ヌクレアーゼを不活性化した後、超遠心分離によりRNAの精製を行う

(ChomczynskiおよびSacchi、1987、Anal. Biochem. 162:156-159 ; Chomczynski、1989、米国特許第4,843,155号)。また、この方法は、特に、少量の細胞材料からRNAを分離する場合に、使用することができる。

【0067】

次に、精製したRNAをハイブリダイゼーション・バッファー（例えば、150 mM KCl、10 mM TrisCl pH 8.3、1 mM EDTA中に10~50 µgのRNA）中で、65 °Cに加熱することにより、2次構造物をすべて破壊し、プローブの全回収物のアリコートはこの混合物に添加する。次に、RNAをプローブと混合し、室温までゆっくりと冷却することにより、ハイブリダイゼーションを生じさせる。好ましい実施形態では、RNA転写物を識別および測定するため、続いて、第5.2節に記載したSNP検出方法を実施するが、その際、SNP特異的プローブを、スプライス部位プローブで置換し、また、DNA標的核酸に代わり、RNA標的核酸を用いる。ハイブリダイゼーション反応の後、オリゴヌクレオチドのペプチド標識に対する結合相手を含む固相表面に、該サンプルを接触させる。様々な実施形態において、例えば、固相表面は、マイクロタイタープレート、あるいは、マルチプレックス遺伝子発現分析を目的とする場合には、アドレス可能な抗体アレイ（例えば、プラスチックチップ上）でよい。

【0068】

次に、上記固相をマングベーンヌクレアーゼで処理する。このヌクレアーゼは、一本鎖領域（およびあらゆる過剰プローブ）を切断するが、ミスマッチ塩基対は認識しないか、もしくは、切断しない。最初の記録を取る（図3の R_1 ）。プローブに存在する2つのマーカが、蛍光団（例えば、図3の F_1 および F_2 ）である場合には、それらの発光波長をモニターすることにより、一方もしくは両方の波長で発光するプローブを保持する任意のアドレス可能な遺伝子座を識別する。初期記録はまた、プローブにより捕捉されたRNA分子の数を表す内部ベースラインを提供する。従って、RNAに対して過剰量のプローブを用いることにより、初期記録からの読出しを定量することにより、被検サンプルにおける特定の転写産物の量を正確に定量することができる。

【0069】

所与のプロープに対応するスプライス部位結合の形成を生じるスプライシング事象が、所与のサンプルに起こらなかった場合には、マングベーンヌクレアーゼ処理により、該プロープの部分的消化が生じ、 F_2 蛍光団を含む3' プロープ断片の解放が起こる。従って、サンプル中のRNAが、スプライス部位プロープの配列に対応するスプライス部位で、不適切にスプライシングされたり、あるいは、選択的にスプライスされた場合には、マングベーンヌクレアーゼ処理後の固相支持体に結合したままのプロープは、 F_1 蛍光団を保持するが、マングベーンヌクレアーゼ消化により、 F_2 蛍光団は喪失する（図3の実施例を参照）。これにより、選択的にスプライシングされた転写産物が識別される。このようなRNAを発現するサンプルは、ゲノムDNAレベルで、スプライス部位突然変異を有する候補である。次に、このサンプルを大腸菌エンドヌクレアーゼV（endo V）とS1ヌクレアーゼ（S1）で処理し、2番目の記録を取る（図3の R_2 ）。この読出しの分析を、第5.2節に記載したように、実施する。

【0070】

別の実施形態では、アニーリング工程の後、ハイブリダイゼーション混合物中の過剰蛍光標識「エンプティー」（すなわち、非アニール）プロープを排除することにより、最終生成物におけるシグナルへの寄与を低減することができる。これは、例えば、RNAの混合物およびプロープをヒドロキシアパタイトカラムに通過させることにより達成される。一本鎖プロープがカラムに捕捉されるが、RNAに結合したアニール済プロープは、カラムフロースルー中に現れる。別の実施形態では、電気泳動により、ハイブリダイズされたプロープから、エンプティー・プロープを分離することができる。このような電気泳動は、例えば、上記ハイブリダイゼーション容器とチップをつなげるチャンバ内で実施される側方電気泳動工程により達成される。さらに別の実施形態では、「抗プロープ」を用いて、過剰非アニールプロープから蛍光シグナルを排除することができる。抗プロープは、目的とするプロープに存在する蛍光団に適合させた2つの蛍光消光剤を有するペプチド標識プロープと相補性のオリゴヌクレオチドを含む。適切な工程で、抗プロープを反応物に添加およびアニーリングすることによって、蛍光を「一掃」することができる。そうしないと、過剰非アニールプロープの存在により、この

蛍光が発生することになる。従って、以上例示したように、本発明を実施するのに、様々な代替的实施形態が利用可能であり、これらは、様々な要求に合うように、当業者が選択することができる。

【0071】

5.4 オリゴヌクレオチドプローブの標識および検出方法

本発明の非PCR高処理量方法の感受性を高めるには、多様な標識、シグナル増幅、ならびに、検出方法が重要である。シグナル増幅および増強された検出方法は、低い存在量で存在するおよび/または少量の組織サンプルから、核酸配列の、これまでより優れた検出を可能にする。このような方法はまた、1回のランで、より大きなサンプルサイズのマルチプレックススクリーニングを容易にする。検出標識でプローブを標識し、シグナルを増幅および検出し、オリゴヌクレオチドを調製した後、オリゴヌクレオチドをペプチドに結合させる方法について、本明細書中の以下に説明する。

【0072】

5.4.1 標識方法

「標識」または「検出標識」は、発光、蛍光、もしくは放射性同位体または、これを含む群、ならびに、酵素または色素等の非同位体標識を指す。1つのプローブに、2つ以上のマーカが存在する本明細書に記載の実施形態については、2つの検出標識が、識別可能であることが重要である。これは、例えば、異なる周波数で発光する様々な蛍光団の使用、もしくは、第5.4.2節で述べたように、様々な蛍光団を含む親和性・パートナー分子の使用、あるいは、様々なタイプの発光剤、酵素または色素の使用により、達成することができる。

【0073】

オリゴヌクレオチドプローブは、検出標識で直接または間接的に標識することができる。好ましい実施形態では、SNP特異的オリゴヌクレオチドプローブの合成中、該オリゴヌクレオチドプローブに、親和性官能基を組み込むことにより、該プローブを間接的に標識する（オリゴヌクレオチドの合成方法については、以下の第5.4.3節を参照のこと）。パートナー分子は、該親和性官能基を特異的に認識し、これに結合する。このパートナー分子は、親和性結合パートナーに結合

した蛍光団等の検出標識を含有することができる。あるいは、第1パートナー分子に対して親和性を有する第2パートナー分子(2次抗体等)を用いてもよい。この場合、第1ではなく、第2親和性結合パートナーが、検出標識を含むことになる。間接的親和性標識方法は、当業者には公知である(概要は、Current Protocols in Immunology、Coliganら編、1997、John Wiley & Sons、Inc. 米国、pp. 8.10.12-8.10.21)。

【0074】

好ましい実施形態では、ペプチド標識オリゴヌクレオチドは、ビオチニル化オリゴヌクレオチドで標識し、ストレプトアビジン結合の検出可能化合物を用いて、検出する。ビオチニル化オリゴヌクレオチドは、当業者には公知である。例えば、ビオチン-NHSエステル法を用いて、オリゴヌクレオチドをビオチニル化することができる。あるいは、オリゴヌクレオチド合成中に、ビオチンホスホロアミダイトを用いて、ビオチンを結合してもよい(Cocuzza、1989、Tetrahed. Lett. 30、6287-6290)。Glen Researchから入手可能なこのようなビオチンホスホロアミダイトの1つは、1-ジメトキシトリチロキシ-2-(N-ビオチニル-4-アミノブチル)-プロピル-3-O-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホロアミダイトである。この化合物は、分岐点を有するため、さらに添加が可能である。このビオチンホスホロアミダイトで使用される枝分れスペーサーについては、Nelsonらにより記載されている(1992、Nucl. Acids Res. 20、6253-6259)。別の5'-ビオチンホスホロアミダイト、すなわち、[1-N-(4,4'-ジメトキシトリチル)-ビオチニル-6-アミノヘキシル]-2-シアノエチル-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホロアミダイトを用いて、オリゴヌクレオチドをビオチニル化してもよい。この化合物は、Zeneca PLCからのライセンスを得て、Glen Researchにより市販されている。

【0075】

別の実施形態では、例えば、親和性官能基は、2価または3価陽イオン(Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Eu^{3+} 等)のキレートであり、また、オボアルブミンやチログロブリン等のPDLS結合の球状タンパク質が、親和性結合パートナーとして用いられる(Dahlenら、1994、Bioconjug. Chem. 5:268-72; LiおよびSelvin、1997、Bioconjug. Chem. 8:127-32; LamtureおよびWensel、1995、Bioconjug. Chem. 6:88-92)。

【0076】

別の実施形態では、ジゴキシゲニン標識ヌクレオチド等のハプテン標識ヌクレオチドの組込みにより、オリゴヌクレオチド・プローブを標識し (Holtskeおよび Kessler 1990)、該ハプテンに特異的に結合する抗体、例えば、抗DIGアルカリ性ホスファターゼまたはPODコンジュゲート (Fabフラグメント) を用いて、ハプテン標識塩基を検出する。このような化合物は、化学発光、比色分析、もしくは蛍光基質を用いて、検出することができる。親和性標識や、それらの検出および単離のための試薬のいくつかは、市販されている。

【0077】

別の実施形態では、SNP特異的プローブは、直接標識する。検出標識は、図2に描くように、デオキシリボース塩基に結合した識別可能な蛍光団 (F_1 および F_2) でよい。検出標識を核酸に結合する直接的方法是、当業者には公知である。例えば、BurdickおよびOakesによる "Diagnostic Kit and Method Using a Solid Phase Capture Means For Detecting Nucleic Acid" という表題の欧州特許公開番号EP 0370 694 A2、1990年5月30日公開には、オリゴヌクレオチドへのこのような標識の結合方法が開示されている。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーの合成前に、蛍光団をデオキシリボヌクレオチド塩基に結合することができる。合成中、オリゴヌクレオチドに蛍光色素標識ホスホロアミダイトを組み込むことにより、直接標識を達成することも可能である。蛍光標識ヌクレオシド類似体は、市販されており、あるいは、当業者には公知の方法で、合成により生成することもできる (Brumbaughら、1998、Proc. Natl. Acad. Sci. (米国)、85:5610-5614)。このような類似体は、有機金属中間体を介して、2'-デオキシヌクレオシドを誘導体化することにより、5-ジメトキシトリチル・アダクトを得ることにより、合成することができる。メチルエステルを加水分解、活性化した後、適切にモノアクリル化したアルキルジアミンと反応させる。このようなリンカー・アーム・ヌクレオシドを精製した後、化学オリゴヌクレオチド合成に適したヌクレオシド類似体に変換することができる。このような2つのフルオレセイン標識は、5'-ヘキサクロロ・クロロ・クロロ-フルオレセイン・ホスホロアミダイト (HEX) および5'-テトラクロロ-フルオレセイン・ホスホロアミダイト (TET) で

あり、両者共、Glen Researchから入手可能である。オリゴヌクレオチドは、当業者には公知の任意の方法を用いて合成してもよい（第5.4.3節を参照）。例えば、標準的ホスホロアミダイト化学を用いることができ、多くの民間供給者のいずれからでも試薬を入手することができる（例えば、Applied Biosystems 392/394 DNA合成装置）。

【0078】

5.4.2 シグナルおよび検出方法

本明細書に提示する実施形態では、1つのプローブに、2つ以上のマーカが存在することから、2つの検出標識は識別可能であることが重要である。これは、例えば、以下に述べるように、異なる周波数で発光する様々な蛍光団の使用、各種ハプテンまたは親和剤の使用、あるいは、異なるタイプの発光剤の使用により達成することができる。

【0079】

好ましい実施形態では、検出標識は発光剤である。発光剤は、励起エネルギー源に応じて、放射発光、化学発光、生物発光、ならびに、光発光（蛍光およびりん光を含む）として分類することができる。当業者には公知の様々な蛍光色素を用いてもよい。一般に用いられる色素の2つのグループは、フルオレセインを基材とする色素と、ローダミンを基材とする色素である。使用することができる非限定的な蛍光団の具体例を表1に記載する。

【0080】

【表1】

表1

一般に用いられる蛍光団の発光および吸光スペクトル

色素	吸光 (nm)	発光 (nm)
フルオレセイン	494	525
6-Pam	494	525
Joe	520	548
Tet	521	536

Hex	535	536
Cy3	552	570
Tamara	565	580
Rox	568	595
Texas red	587	602
Cy5	643	667

一般に、フルオレセインを基材とする蛍光団は、短い波長（500 nm未満）を吸収し、吸収された光子より約30 nm長い波長を有する光子を放射する傾向がある。これに対し、ローダミン基材の蛍光団は、緑／黄色域で吸収し、吸収された光子に近いエネルギーで（その差は25 nmより小さい）、放射する。1つ以上の蛍光団を用いる場合には、1つの蛍光団の発光波長の結果は、別の蛍光団の吸光スペクトルの範囲内であるため、両立できる蛍光団を選択するのに注意を払い、交差消光（cross-quenching）を回避するようにしなければならない。その場合、第2蛍光団の発光だけを検出する。従って、最も好ましい実施形態において、標識は、同じ波長を吸収するが、異なる周波数で発光する2つの蛍光団である。

【0081】

当業者には公知のあらゆる方法を用いて、検出標識からのシグナルを視覚化または検出することができる。1実施形態では、検出標識は、分光装置により測定することができる。例えば、蛍光は、蛍光光度計、もしくは、フローサイトメーター等の装置により測定が可能である。蛍光物質に関するアッセイを実施する方法は、当業者には公知であり、例えば、Lackowicz, J.R., 1983, Principles of Fluorescence Spectroscopy、ニューヨーク：Plenum Pressに記載されている。別の実施形態では、検出標識は、共焦点顕微鏡検査法により検出することができる。

【0082】

5.4.3 オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド類似体

本発明の方法に関連して用いられるオリゴヌクレオチドは、多くの場合、長さが約10～約100ヌクレオチドの範囲にあるオリゴヌクレオチドを含む。具体的態様では、オリゴヌクレオチドの長さは、10ヌクレオチド、15ヌクレオチド、25ヌ

クレオチド、50ヌクレオチド、100ヌクレオチド、もしくは、200ヌクレオチド、あるいは、10～500ヌクレオチドまでのいずれのヌクレオチド数でよい。好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドプローブは、長さが、35～65ヌクレオチド、あるいは、約50ヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、DNAまたはRNA、もしくはキメラ混合物または誘導体、もしくはそれらの改変された形態、あるいは、一本鎖または二本鎖、もしくは一部が二本鎖のいずれでもよい。オリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、もしくはリン酸エステル骨格鎖、あるいは、それらの組合わせのいずれにおいて改変してもよい。オリゴヌクレオチドは、ビオチン、蛍光団、もしくはペプチド等の他の付属基を含んでもよい。改変オリゴヌクレオチドを用いる場合には、そのような改変が、酵素活性（例えば、S1ヌクレアーゼ、endo V等）に及ぼす恐れのある影響に考慮しなければならない。

【0083】

本発明の方法に関連して用いられるオリゴヌクレオチドまたはその誘導体は、当業者には公知の任意の方法、例えば、自動化DNA合成装置（Biosearch、Applied Biosystems等から市販されているもの等）の使用により、合成することができる。例として、ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチドは、Steinらの方法（1988、Nucl. Acids Res. 16、3209）により合成され、メチルホスホネート・オリゴヌクレオチドは、制御された多孔質ガラス（pore glass）ポリマー支持体（Sarinら、1988、Proc. Nat'l Acad. Sci. 米国、85、7448-7451）等を使用することにより調製することができる。αアノマー・オリゴヌクレオチドは、相補的RNAとの特異的二本鎖ハイブリッドを形成するが、これは、通常のβ単位とは反対に、鎖は互いに平行に延びる（Gautierら、1987、Nucl. Acids Res. 15、6625-6641）。

【0084】

オリゴヌクレオチドは、当業者には公知の任意の方法（例えば、Applied Biosystems 392/394DNA合成装置を用いた標準的ホスホロアミダイト化学）を用いて、合成することができる。さらに、合成のための試薬は、多数の民間供給者のいずれからでも入手可能である。オリゴヌクレオチドの合成中、スペーサー・ホスホロアミダイト分子を用いて、例えば、塩基対合が望ましくないオリゴヌクレオ

チドの切片を架橋するか、あるいは、塩基対合の過程にあるオリゴヌクレオチド部分から離して、標識またはタグを配置することが可能である。スペーサーの長さは、スペーサー・ホスホロアミダイトの逐次付加により変えることができる。スペーサー・ホスホロアミダイト分子は、5'-または3'-オリゴヌクレオチド改変因子として用いてもよい。このようなスペーサーは、スペーサー・ホスホロアミダイト9（すなわち、9-0-ジメトキシトリチル-トリエチレングリコール、1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホロアミダイト、ならびに、スペーサーホスホロアミダイト18（すなわち、18-0-ジメトキシトリチル-ヘキサエチレングリコール、1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホロアミダイト）を含み、両者共、Glen Research（バージニア州スターリング）から入手可能である。

【0085】

標準的オリゴヌクレオチド合成に使用するその他のスペーサーも入手可能である。例えば、スペーサー・ホスホロアミダイトC3およびdスペーサー・ホスホロアミダイトを用いて、オリゴヌクレオチド・プローブ内の望ましくない自己ハイブリダイゼーション事象を不安定化したり、不適切な組合わせの鑄型/プローブ複合体間の偽ハイブリダイゼーション事象を不安定化することができる。このスペーサーは、Glen Researchから入手可能であり（例えば、3-0-ジメトキシトリチル-プロピル-1-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホロアミダイト）、そして、付加することによって、オリゴヌクレオチド配列内の未知の塩基と置換することができる。

【0086】

オリゴヌクレオチドへの標識の組込みを増加する方法として、分岐スペーサーを用いることができる。また、このような分岐スペーサーを用いて、多様に枝分かれしたプローブを介したハイブリダイゼーションによる検出可能なシグナルを増加することも可能である。分岐スペーサーもまた、例えば、Glen Researchから市販されている。

【0087】

ビオチニル化したオリゴヌクレオチドは、当業者には公知である。オリゴヌク

レオチドは、ビオチン-NHSエステル方法を用いて、ビオチニル化することができる。あるいは、ビオチン・ホスホロアミダイトを用いて、オリゴヌクレオチド合成中にビオチンを結合させてもよい (Cocuzza, 1989, Tetrahed. Lett. 30, 6287-6290)。Glen Researchから入手可能なこのようなビオチンホスホロアミダイトの1つは、1-ジメトキシトリチロキシ-2-(N-ビオチニル-4-アミノブチル)-ブロピル-3-0-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホロアミダイトである。この化合物はまた、分岐点を有するため、さらに付加が可能である。このビオチン・ホスホロアミダイトで用いられる枝分かれスペーサーは、Nelsonらにより記載されている (1992, Nucl. Acids Res. 20, 6253-6259)。

【0088】

別の5'-ビオチン・ホスホロアミダイト、すなわち、[1-N-(4,4'-ジメトキシトリチル)-ビオチニル-6-アミノヘキシル]-2-シアノエチル-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホロアミダイトを用いて、オリゴヌクレオチドをビオチニル化してもよい。この化合物は、Zeneca PLCからライセンスを得て、Glen Researchにより市販されている。

【0089】

オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの改変塩基部分を含み、該部分は、限定するものではないが、下記を含む群から選択される：5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルケオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルケオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メチトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、プソイドウラシル、ケオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-

チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、ならびに、2,6-ジアミノプリン。

【0090】

オリゴヌクレオチドは、限定するものではないが、下記を含む群から選択される少なくとも1つの改変リン酸エステル骨格鎖を含む：ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミドチオエート、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、ならびに、ホルムアセタール、もしくは、これらの類似体。

【0091】

5.4.4 オリゴヌクレオチドとペプチドとの結合

標識オリゴヌクレオチドは、長い間、特定の配列の検出に用いられてきた。例えば、BurdickおよびOakes (Diagnostic kit and method using a solid phase capture means for detecting nucleic acids、欧州特許公開番号EP 0370 694 A 2、1990年5月30日公開)は、目的とする予め決定された配列に相補的な特定の核酸配列と共に、標識オリゴヌクレオチドの使用を開示している。ペプチド標識オリゴヌクレオチドを用いた抗体固相支持体上で、核酸を操作する方法は、以前に記載されている(1998年9月16日提出されたIrisおよびPournyによる米国係属出願である出願第09/174,328号を参照。尚、該出願は、参照としてその全文を本明細書に組み入れるものとする)。

【0092】

好ましい実施形態では、ペプチド標識をオリゴヌクレオチドプローブに結合させる。ペプチド標識は、チップを基材とする抗体アレイに結合するための親和性標識として使用される。ペプチドをオリゴヌクレオチドに結合する方法は、当業者には公知であり、例えば、Soukchareun S.ら、1995、Bioconjug, Chem. 6:43-53; Tung CHら、1991、Bioconjug. Chem. 2:464-465; Bruick RKら、1996、Chem. Biol. 3:49-56; Tung CHら、1995、Bioconjug. Chem. 6:292-295; Robles J.ら、Bioconjug, Chem., 1997、8:785-788; ならびに、Rajur S.B.ら、1997、Bioconjug, Chem. 8:935-940を参照されたい。

【0093】

本発明の方法で使用する各種ペプチドに結合されるオリゴヌクレオチドは、例えば、Cybergene S.A. (11 rue Claude Bernard, z1 nord, 35400, Saint Mallo、フランス) およびGlen Research (22825 Davis Drive, Sterling, Virginia 20164) から入手することができる。Glen Researchからのさらに詳しい情報は、そのウェブサイト()を通じて取得することができる。

【0094】

Glen Researchにより推奨されるオリゴヌクレオチドへのペプチドの具体的結合方法の1つは、次の通りである(また、も参照のこと)。ヘテロ二官能架橋試薬を用いて、N-末端リジン残基を有する合成ペプチドを5'-チオール-改変オリゴヌクレオチドに結合する。このような架橋試薬は、N-マレイミド-6-アミノカプロイル-(2'-ニトロ, 4'-スルホン酸)フェニルエステル(mal-sac-HNSA)である。mal-sac-HNSAのナトリウム塩は、Bachem Bioscienceから入手可能である。好都合なことには、mal-sac-HNSA架橋剤とアミノ基との反応により、ジアニオンフェノラート(すなわち、1-ヒドロキシ-2-ニトロ-4-ベンゼンスルホン酸)を放出する。また、このジアニオンフェノラートは、黄色の発色団である。この発色団の特性により、(i)結合反応の完了度を定量化する手段(結合反応の完了度が高まるにつれ、黄色の度合が強まる)と、(ii)ゲルろ過中の遊離架橋試薬からの活性化ペプチド(すなわち、mal-sac-HNSAに架橋され、5'-チオール-改変オリゴヌクレオチドと接触可能な状態にあるペプチド)の分離度をモニターする上での補助が提供される。

【0095】

mal-sac-HNSA架橋剤を用いる場合に、使用する具体的工程は、次の通りでよい。最初に、N-末端リジンを有するペプチドを合成する。あるいは、リジンεアミノ基は、実際には、リジンαアミノ基より反応性が高いことから、内部リジンを有するペプチドを用いてもよい。第2に、当業者には公知の方法を用いて、5'-チオール基を有するオリゴヌクレオチドを合成する。第3に、リン酸ナトリウムバッファ(pH 7.1)中で過剰のmal-sac-HNSAと反応させる。第4に、ペプチドmal-sac-HNSAコンジュゲートを遊離架橋剤から分離し、ゲルろ過カラム(例えば

、NAP-5、Pharmacia、Uppsala、スウェーデン）を用いて、バッファーをリン酸ナトリウムバッファー（pH 6）に交換する。第5に、チオール改変オリゴヌクレオチドを活性化させ、脱塩した後、ゲルろ過カラムで、リン酸ナトリウム（pH 6）にバッファー交換する。第6に、活性化したペプチドをチオール改変オリゴヌクレオチドと反応させる。最後に、ペプチド - オリゴヌクレオチドコンジュゲートをイオン交換クロマトグラフィー（例えば、Nucleogen DEAE-500-10または同等物）により精製する。イオン交換カラムからの溶離順序は、次の通りである：第1に遊離ペプチド、次にペプチド標識オリゴヌクレオチド、そして最後に、遊離オリゴヌクレオチド。

【0096】

好ましい実施形態では、本発明の方法で使用するための、2部構成（すなわち、2つの異なる分子から成る）ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブを構築することができる（図4参照）。2分子プローブは、ペプチド標識（すなわち、前述のように製造または取得したペプチド - オリゴヌクレオチド・コンジュゲート）に結合したあらゆる長さのヌクレオチドを含む第1分子と、所与の多型性の検出に特異的な追加ヌクレオチド（すなわち、野生型または変異型いずれかの標的的多型性とその隣接領域とに相補的なもの）に隣接する、第1分子に相補的なヌクレオチドを含む第2分子から構築することができる。好ましい実施形態では、2分子プローブは、ペプチド標識に結合した少なくとも15ヌクレオチドを含む第1分子と、所与のSNP検出に特異的な30～40ヌクレオチドに隣接する第1分子に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含む第2分子から構築することができる。別の好ましい実施形態では、該2分子プローブは、第1分子、すなわち、ペプチド標識に結合した15～25ヌクレオチドから成るヌクレオチド配列と；第2分子、すなわち、第1分子に相補的であり、かつ所与のSNP検出に特異的な30～40ヌクレオチドに隣接する15～25ヌクレオチドから成るヌクレオチド配列とから構築することができる。その場合には、該第2分子の少なくとも1ヌクレオチドは、検出可能な標識で標識されている。次に、上記2分子または2部をハイブリダイゼーションにより集合（assemble）させた後、所与のSNP検出に用いる（図4）。2部構成プローブを用いる利点とは、製造コストが比較的安価なプローブの第2部

を簡便に合成して目的とする各種SNPの検出に特異的として、製造コストが比較的高価な標準化されたペプチド・オリゴヌクレオチド・コンジュゲートのセットの取得に伴う費用を大幅に節約することである。

【0097】

2部構成プローブを用いる場合には、集合したプローブ内の、二本鎖から一本鎖構造へのトランジション付近の位置に、標準的なヌクレアーゼ耐性ヌクレオチドベースの誘導体（例えば、チオール化塩基）を含ませるのが望ましいであろう（図4の陰を付けた長方形を参照のこと）。従って、好ましい実施形態では、3つのチオール化塩基をペプチド・オリゴヌクレオチド・コンジュゲートの3'末端に配置し、その際、該ペプチド標識を5'末端に結合させると共に、二本鎖部分にすぐ隣接する集合プローブの一本鎖部分における最初の3塩基となるように、さらに3つのチオール化塩基を配置する（図4の影を付けた長方形を参照のこと）。限定するものではないが、さらに好ましい態様では、上記プローブの第2部におけるチオール化塩基にすぐ隣接する第1または第2塩基は、第1標識（例えば、図4のF₁）で標識し、遊離（free）一本鎖末端の最後の塩基は、第2標識（例えば、図4のF₂）で標識することができる。

【0098】

さらに、本発明は、1つ以上の容器に、ヌクレオチドの第1配列を含み、かつペプチド標識に共有結合した精製第1分子と、該第1配列と相補的であると同時に、野生型または変異型である目的のヌクレオチド多型性およびその隣接領域に相補的な追加ヌクレオチドと隣接する第2配列を含む精製第2分子とを含んで成るキットを提供する。

【0099】

5.5 アドレス可能な抗体アレイ

本発明で用いるアドレス可能なアレイは、プラスチックチップ等の固相表面上の正確な位置に結合した複数の異なるポリペプチドを含む。表面上の各ポリペプチドの位置は既知であり、従って、「アドレス可能」である。好ましい実施形態では、これらのポリペプチドは、ペプチド結合オリゴヌクレオチドプローブに対して特異的な親和性を有する個別の抗体である。

【0100】

固相表面は、限定するものではないが、プラスチック、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ガラス、ニトロセルロール、デキストラン、ナイロン、金属、ならびに、写真平版材料を含む、いずれの材料から成るものでもよい。固相表面は、好ましくはチップであるが、ビーズ、膜、微粒子等の形状や、マイクロタイタープレート、試験管またはその他の反応器等の反応器内側面を含む別の形状でもよい。

【0101】

好ましい実施形態では、上記抗体は、それらのFcドメインを介して、プラスチックチップに共有結合させる。別の実施形態では、抗体をチップ上に吸着させる。抗体アレイを含むタンパク質アレイを構築する方法は、当業者には公知である（例えば、Fodorら、1996、"Photobabile Nucleoside and peptide protecting groups"、米国特許第5,489,678号；Barretら、1993、"Spatially-addressable immobilization of anti-ligands on surfaces"、米国特許第5,252,743号；BlawasおよびReichert、1998、"Protein patterning"、Biomaterials 19:595-609；Blawasら、1996、"Patterning antibodies for multiple analyte sensor via photodeprotection chemistry"、San Jose:SPIE；Delamarcheら、1996、"Immobilization of antibodies on a photoactive self-assembled monolayer on gold"、Langmuir 12、1997-2006；Firestoneら、1996、"Film architecture in biomolecular assemblies、Effect of linker on the orientation of genetically engineered surface-bound proteins"、J. Amer. Chem. Soc. 118、9033-9041；Mooneyら、1996、Patterning of functional antibodies and other proteins by photolithography of silane monolayers、Proc. Natl. Acad. Sci. 93、12287-12291；Pirrungら、1996、"A general method for the spatially defined immobilization of biomolecules on glass surfaces using 'caged' biotin"、Bioconjugate Chem. 7、317-321；Gaoら、1995、"Immunosensing with photoimmobilized immunoreagents on planar optical wave guides"、Biosensors Bioelectron 10、317-328；Schnaら、1995、"Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray"、

Science 270、467-470 ; Lomら、1993、" A versatile technique for patterning biomolecules onto glass coverslips "、J. Neurosci. Methods、385-397 ; Popeら、1993、" New applications of silane coupling agents for covalently binding antibodies to glass and cellulose solid phase surfaces "、Bioc conjugate Chem. 4、116-171 ; Schrammら、1992、" Antibody-antigen complex formation with immobilized immunoglobulins "、Anal. Biochem. 205、47-56 ; Gombotzら、1991、Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces、J. Biomed. Mater. Res. 25、1547-1562 ; Alarieら、1990、" Evaluation of antibody immobilization techniques for fiber optic-based fluoroimmunosensing "、Analy. Chim. Acta 229、169-176 ; Owakuら、1993、Optical immunosensing for IgG、Sensors Actuators B、13-14、723-724 ; Bhatiaら、1989、" Use of thiol-terminal silanes and heterobifunctional cross linkers for immobilization of antibodies on silica surfaces "、Analy. Biochem. 178、408-413 ; Linら、1988、" Characterization of immobilized antibodies on silica surfaces "、IEEE Trans. Biomed. Engng.、35(6)、466-371)。

【0102】

好ましい実施形態では、伝導性ポリマーの電子的に活性化させたコポリマーと抗体とを含んで成る「プラスチックチップ」上に、抗体を配列する。このようなアレイは、当業者には公知であり、ポリヌクレオチドに基づくアレイ用の固相支持体にポリヌクレオチドを結合するのに使用されている（1998年11月17日発行の米国特許第5,837,859号；1994年10月13日付のPCT公報W094/22889号）。配列したパターンは、コンピューターにより生成および保存することができる。このチップは、事前に作製しておき、4 でPBS中に保存することができる。上記抗体アレイは、再生して、繰返し使用することが可能である。例えば、該チップにpH勾配をかけて捕獲したペプチドを抗体から放出させることにより、ペプチドを放出することができる。次に、該チップをリン酸緩衝化生理食塩水で入念にすすぎ洗いをし、保存、もしくはすぐ再使用する。

【0103】

5.5.1 抗体およびペプチド

本発明の方法で使用する抗体は、当業者には公知のあらゆる抗体を含む。このような抗体は、一般に、例えば、目的とする核酸を操作するのに用いられる。これに関し、核酸は、該核酸自体の一部、あるいは、該核酸に結合した（共有または非共有のいずれか）別の抗原（例えば、タンパク質、ペプチドまたはハプテン）に結合した抗体により操作することができる。好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドプローブに共有結合したペプチド抗原を用いて、核酸を操作する。このような抗体は、限定するものではないが、以下に記載するように、ポリクローナル、モノクローナル、キメラおよびヒト化抗体を含む。さらに、一本鎖抗体、FabフラグメントおよびFab(ab')₂フラグメント、Fab発現ライブラリーにより生成されたフラグメント、抗イディオタイプ（抗Id）抗体、ならびに、これらのうちいずれかのエピトープ結合フラグメントを用いてもよい。

【0104】

本発明で用いることのできるポリクローナル抗体は、免疫動物の血清に由来する抗体分子の異種集団である。当業者には公知の様々な方法を用いて、目的とする抗原に対するポリクローナル抗体を生成することができる。例えば、ポリクローナル抗体の生成のために、限定するものではないが、ウサギ、マウス、ラット等の様々な宿主動物に、目的抗原またはその誘導体を注射することにより、これらの動物を免疫することができる。宿主の種に応じて、各種アジュバントを添加し、免疫学的応答を高めることが可能である。このようなアジュバントは、限定するものではないが、下記を含む：フロイント・アジュバント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムのような鉱物性ゲル、リソレシチン(lysolecithin)のような界面活性剤、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびに、BCG (bacille Calmette-Guerin) やcorynebacterium parvumのような潜在的に有用なヒトアジュバントを含む。このようなアジュバントは、当業者には公知である。

【0105】

本発明で用いることのできるモノクローナル抗体は、特定の抗原に対する抗体の同種集団である。培養中の連続的細胞系による抗体分子の生成を達成する、当業者には公知の様々な方法を用いて、目的の抗原に対するモノクローナル抗体（

mAb)を作製することができる。これらは、限定するものではないが、最初KohlerおよびMilsteinにより記載された(1975、Nature 256:495-497)ハイブリドーマ法、さらに近年のヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozborら、1983、Immunology Today 4:72)、ならびに、EBV-ハイブリドーマ法(Coleら、1985、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、Inc.、pp. 77-96)を含む。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDを含むイムノグロブリンクラスおよびそのサブクラスのいずれのものでもよい。本発明で用いられるmAbを産生するハイブリドーマは、in vitroまたはin vivoのいずれで培養してもよい。

【0106】

本発明の方法で用いることのできるモノクローナル抗体は、限定するものではないが、ヒトモノクローナル抗体を含む。ヒトモノクローナル抗体は、当業者には公知である多数の方法のいずれかによって作製することができる(例えば、Tengら、1983、Proc. Natl. Acad. Sci. 米国、80、7308-7312; Kozborら、1983、Immunology Today 4、72-79; Olssonら、1982、Meth. Enzymol. 92、3-16)。

【0107】

本発明の方法で、キメラ抗体を用いることもできる。キメラ抗体は、マウスmAbに由来する可変領域等の様々な動物種に由来する様々な部分とヒト免疫グロブリン定常領域を有するものを含んで成る分子である。多様な方法を用いて、適当な生物活性のヒト抗体分子に由来する遺伝子と一緒に、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子をスプライシングすることにより、このようなキメラ抗体を生成することができる(例えば、Morrisonら、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. 米国、81:6851-6855; Neubergerら、1984、Nature、312:604-608; Takedaら、1985、Nature 314:452-454を参照)。

【0108】

本発明の方法で、ヒト化したモノクローナル抗体を用いることもできる。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1つ以上の相補性決定領域(CDR)と、ヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域とを有する非ヒト種由来の抗体分子である。簡潔に言えば、免疫グロブリン軽または重鎖可変領域は、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる3つの超可変領域により中断される「フレームワーク」領域から

構成される。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、厳密に規定されている（Karatら、1983、Sequences of proteins of immunological interest、米国厚生省を参照）。ヒト化抗体の生成のために、多様な方法が開発されている（例えば、Queen、米国特許第5,585,089号；Winter、米国特許第5,225,539号を参照のこと。尚、両特許は、参照によりその全文を本明細書に組み込むものとする）。

【0109】

あるいは、一本鎖抗体を生成するために記載された方法（米国特許第4,946,778号；Bird、1988、Science 242:423-426；Hustonら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. 米国、85:5879-5883；ならびに、Wardら、1989、Nature 334:544-546）を調整して、本明細書の装置に有用な一本鎖抗体を生成することができる。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋を介して、Fv領域の重および軽鎖フラグメントと一緒に連結することにより形成される。

【0110】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の方法により生成することができる。例えば、このようなフラグメントは、限定するものではないが、下記を含む：抗体分子のペプシン消化により生成することができる $F(ab')_2$ フラグメント、ならびに、 $F(ab')_2$ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することにより生成することができるFabフラグメント。あるいは、Fab発現ライブラリーを構築する（Huseら、1989、Science 246:1275-1281）ことにより、所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの高速かつ容易な識別が可能となる。

【0111】

本発明の方法に有用と考えられる抗体もしくはそのフラグメントの選択は、抗体またはフラグメントファージディスプレイライブラリーの使用により容易になるであろう。このような手法は、コンプレキシティーが高い（例えば、 10^9 ）ライブラリーを効率よくスクリーニングし、これにより、本発明の方法で使用するのが好ましい抗体またはフラグメントを同定する機会を劇的に高くするという利点を提供する。免疫グロブリン・レパートリーをクローン化する方法（「レパートリー・クローニング」）は、当業者には公知であり、完全にin vitroで実施する

ことができ、従って、抗体産生動物を必要とせずに、ほぼ全種類の抗体の生成が可能になる。このような方法は、以下に、例として、手短に説明する。

【0112】

メッセンジャーRNA (mRNA) は、末梢血液から得られたヒトBリンパ球から抽出する。mRNAは、逆転写酵素および標準的プロトコルを用いたcDNA合成用の鋳型として役立つ。次に、この非常に複雑なcDNA混合物から、PCRにより、免疫グロブリンcDNAを特異的に増幅する。天然の抗体の結合特性を有する免疫グロブリン・フラグメントを構築するために、抗体軽(L)および重(H)鎖をコード化する遺伝子からPCR産物を取得する。次に、該産物をファージミド・ベクターに導入する。繊維状ファージ(ファージミド)を用いて、F+大腸菌を感染させる。このファージミド・ベクターの発現は、VCS M13やM13 K07などの適当な細菌宿主内のヘルパーファージの干渉により、バクテリオファージ表面上のscFv免疫グロブリン分子の発現を引き起こす。バクテリオファージ集団は、レパートリーに含まれるすべての特異性を有する免疫グロブリンの混合物をディスプレイする。抗原免疫吸着の反復工程、次いで、ファージ増殖により、抗原特異性免疫グロブリンをこの集団から選択する。複数ラウンドの選択の後、目的とする抗原にのみ特異的なバクテリオファージが残った場合には、これを新しい宿主へと導入し、宿主に可溶性形態のファージ・コード化タンパク質を多量に発現させる。こうして得られたタンパク質は、自然の抗体に非常に類似した構造を有するヒト抗体フラグメントである。

【0113】

組換えヒト抗体およびそのフラグメントを生成するためのファージディスプレイ方法の使用により、タンパク質、ペプチド、核酸、糖等の非常に広範な各種抗原に結合する能力のあるタンパク質を生成することに成功している。この効果的な手法の詳細については、次の参考文献を参照されたい(Marks, J.D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J. Griffiths, A.D.およびWinter, G., 1991, "By-passing immunization: human antibodies from V-gene libraries displayed on phage", J. Mol. Biol. 222, 581; Nissim, A., Hoogenboom, H. R., Tomlinson, I. M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D. およびWinter,

r, G., 1994, "Antibody fragments from a "single pot" phage display library as immunochemical reagents", EMBO J. 13, 692; Hoet, R.M.A., F.H.J. van den Hoogen, J.M.H. Raats, P.E.M.H. Litjens, R.M.T. de WildtおよびW.J. van Venrooij, 1996, "Isolation and characterization of antibody fragments directed to disease markers isolated from patient derived combinatorial libraries", In Keystone Symposium entitled "Exploring and Exploiting Antibody and Ig Superfamily Combining Sites", Taos, New Mexico, 米国, Abstract; Van Kuppervelt, T.H., Dennissen, M.A.B.A., Veerkamp, J.H., Van Venrooij, W.J.およびHoet, R.M.A., 1996, "Anti-heparan sulfate antibody fragments derived from a phage display library", XVth FECTS Meeting, ドイツ国ミュンヘン; De Wildt, R.M.T., Finner, R. Ouwehand, W.H. Griffiths, A.D., Van Venrooy, W.J.およびHoet, R.M.A., 1996, "Characterization of human variable domain antibody fragments against the U1 RNA-associated A protein, selected from a synthetic and patient derived combinatorial V gene library", Eur. J. Immunol. 26, 629-639; De Wildt, R.M.T., Steenbakkers, P.G., Pennings, A.H.M., van den Hoogen F.H.J., Van Venrooij, W.J.およびR.M.A. Hoet, 1997, "A new method for analysis and production of monoclonal antibody fragments originating from single human B-cells", J. Immunol. Methods. 207, 61-67; Willems, P.M., Hoet, R.M., Huys, E.L., Raats, J.M., Mensink, E.J.およびR.A. Raymakers, 1998, "Specific detection of myeloma plasma cells using anti-idiotypic single chain antibody fragments selected from a phage display library", Leukemia 12, 1295-1302; van Kuppevelt, T.H., Dennissen, M.A.B.A., van Venrooij, W.J., Hoet, R.M.A.およびJ.H. Veerkamp, 1998, "Generation and application of type-specific anti-heparan sulfate antibodies using phage display technology, Further evidence for heparan sulfate heterogeneity in the kidney", J. Biol. Chem. 273, 12960-12966; Hoet, R.M.A., Raats, J.M.H., de Wildt, R., Dumortier, H., Muller, S., van den Hoogen, F.およびW.J. van Venrooij, 1998, "Human monoclonal autoantibody fragments from combinatorial antibody

y libraries directed to the U1snRNP associated U1C protein, epitope mapping, immunolocalization and V-gene usage”、Mol. Immunol. 35、1045-1055)。

【0114】

さらに抗体生成の一般的方法および使用が、本発明の方法に關しての使用に適している。例えば、HarlowおよびLane、1988、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、ニューヨーク州(本明細書に参照により全文を組み込む)を参照されたい。

【0115】

1文字のアミノ酸コードは、次のように、以下に挙げる配列リストの3文字のアミノ酸コードに対応する：AはAla；RはArg；NはAsn；DはAsp；BはAsx；CはCys；QはGln；EはGlu；ZはGlx；GはGly；HはHis；IはIle；LはLeu；KはLys；MはMet；FはPhe；PはPro；SはSer；TはThr；WはTrp；YはTyr；VはVal。

【0116】

本発明の使用に適した抗体は、下記を含み、Affinity Bioreagents, Inc. (79, rue des Morillons, 75015, Paris、フランス)から入手可能である。

【0117】

1) カタログ番号PA1-047 (アフィニティー精製ウサギIgG)。このAbにより認識される対応ペプチドは、KFSREKKA AKT (配列番号1)。

【0118】

2) カタログ番号PA1-039 (アフィニティー精製ウサギ・イムノゴビン (immunoglobulin))。このAbにより認識される対応ペプチドは、DQKRYHEDIFG (配列番号2)。

【0119】

3) カタログ番号PA1-036 (精製ウサギIgG)。このAbにより認識される対応ペプチドは、DLKEEKDINNNVKKT (配列番号3)。

【0120】

4) カタログ番号PA1-014 (精製ウサギ抗体)。このAbにより認識される対応ペプチドは、CTGEEDTSE (配列番号4)。

【0121】

5) カタログ番号PA3-013 (アフィニティー精製IgG)。このAbにより認識される対応ペプチドは、PEETQTQDQPM (配列番号5)。

【0122】

6) カタログ番号PA1-815 (ウサギ抗血清)。このAbにより認識される対応ペプチドは、QKSDQGVGPGAT (配列番号6)。

【0123】

7) カタログ番号PA3-034 (ウサギポリクローナル血清IgG)。このAbにより認識される対応ペプチドは、DIGQSIKKFSKV (配列番号7)。このポリクローナル抗体はまた、QRADSLSSHL (配列番号8) も認識する。

【0124】

さらに、本発明の方法で使用する抗体は、Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (440 Arsenal Street, Watertown, Massachusetts 02171、米国) から入手することができる。これらは、下記を含む：

1) コード番号561 (抗血清からのウサギIgG)。認識される対応ペプチドは、Y PYDVDPYA (配列番号9)。

【0125】

2) コード番号562 (抗血清からのウサギIgG)。認識される対応ペプチドは、E QKLISEEDL (配列番号10)。

【0126】

3) コード番号563 (抗血清からのウサギIgG)。認識される対応ペプチドは、Y TDIEMNKLKG (配列番号11)。

【0127】

5.6 標的となる遺伝的障害

一実施形態では、本発明のハイスループットSNPスクリーニング方法は、患者のサンプルにおける遺伝的障害の診断に用いられる。この方法を用いて試験することのできる遺伝的障害の非制限的例には、嚢胞性線維症、テイ・サックス病、鎌状赤血球貧血、血友病、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、ならびに、肥満症などの遺伝病が含まれる。このような遺伝病は、アルツハイマー病、パーキンソ

ン病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、ウイルソン病、脊髄小脳性運動失調、フリードライヒ運動失調症およびその他の運動失調等の変性および非変性神経疾患、ならびに、クロイツフェルト・ヤコブ病、歯状核赤核淡蒼球ルイジアン萎縮病(dentatorubral pallidoluysian atrophy)、海綿様変性脳症、筋緊張性異栄養症、うつ病、精神分裂病およびてんかんのようなプリオン病を含む。遺伝病はまた、例えば、低血糖やフェニルケトン尿症等の代謝障害も含み得る。心臓血管障害および症状も含まれ、非制限的例として、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞、ならびに、高血圧が含まれる。本発明は、さらに、ライム病、結核、および性感染症の検出および診断にも用いることができる。

【0128】

別の実施形態では、本発明のSNP検出方法は、疾病および障害の遺伝的根拠を決定するのに用いることができる。例えば、SNP検出方法を用いて、遺伝的根拠が未知である障害に罹患した患者に存在する多型性を検出および比較することができる。このマルチプレックス非PCR SNP検出方法の適用は、1つ以上の遺伝子座が表現型に関与する可能性がある複雑な障害に特に有用である。関与遺伝子座が決定されると、SNP検出方法は、このような疾病の早期検出および治療にさらに有用となり得る。臨床的に関心を集める標的障害の非制限的例は下記を含む：喘息、関節炎、乾癬、エキシマ(excema)、アレルギー、薬剤耐性、薬剤毒性、ならびに、限定するものではないが、ヒト肉腫および癌、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、骨膜腫、中皮腫、ユーイング腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、大腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、グリオーマ、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上皮細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴音神経腫、希突起グリオーマ、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽腫等の癌；白血病、例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病（骨髄芽球性、前骨髄性、骨髄単球性、単球性および赤白血病）；慢性白血病（慢性骨髄性（顆粒球性）白血

病および慢性リンパ性白血病) ; ならびに、真性赤血球増加、リンパ腫(ホジキン病および非ホジキン病)、多発性骨髄腫、ワルデシュトレーム・マクログロブリン血症、およびH鎖病。

【0129】

さらに、SNP検出方法は、自己免疫疾患を有する患者の遺伝的相違および診断を決定するのに有用であり、このような自己免疫病には、限定するものではないが、下記が含まれる：インスリン依存性糖尿病、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、シューグレン病、強皮病、多発性筋炎、慢性活動性肝炎、混合性結合組織病、原発性胆汁性肝硬変、悪性貧血、自己免疫甲状腺炎、特発性アジソン病、白斑、グルテン過敏性腸疾患、グレーブス病、重症筋無力病、自己免疫性好中球減少症、特発性血小板減少性紫斑、リウマチ様関節炎、肝硬変、尋常性天疱瘡、自己免疫性不妊症、グッドパスチャー病、水疱性類天疱瘡、円板状狼瘡、潰瘍性大腸炎およびデンスデポジット病。

【0130】

遺伝子型スクリーニング方法は、疾病に関連しない特定のSNPのスクリーニングに用いることもできる。非制限的例として、非コードゲノム配列に存在するSNP、もしくは様々なヒト血液型に関連するSNPが挙げられる。

【0131】

本発明の好ましい態様では、本発明の方法は、ヒトSNPの識別に特に有用である。しかし、本明細書に記載した方法は、他の哺乳動物、例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギおよびブタ等の飼育動物、ネコおよびイヌのようなペット、さらには、農業で重要な植物および園芸植物の病気を診断するのに有用であることは理解されよう。

【0132】

6. 実施例：非PCR遺伝子型マッピング

DNAサンプルにおける多型の存在について本発明の方法がどのように分析されるかを示すために、次の実施例を記載する。ここに記載する工程は、図2に概略を示した。プローブの作製および標識方法、ならびに、酵素反応を実施する方法については、前記第5節に詳しく記載している。この実施例では、目的とする1

塩基多型性 (SNP) は、正常の野生型 (WT) 塩基対がA/TであるG/C塩基対多型性である。

【0133】

図2に示すように、SNP部位にGを有するペプチド標識オリゴヌクレオチド「陽性プローブ」を合成する。該プローブは、図2に示すように、5'末端からの第2ヌクレオチドと、3'末端に、それぞれ位置する2つの蛍光団、F₁およびF₂を有する。これと同じ配列だが、SNP部位にTを有する第2のペプチド標識オリゴヌクレオチドを作製する。このプローブは「陰性プローブ」である。この陰性プローブを、陽性プローブと同じ蛍光団で、厳密に同じ位置に標識する。

【0134】

分析しようとする第1核酸サンプルでは、SNPは、遺伝子の両コピーで発生する。標的DNAサンプルのアリコートに、上記プローブを個別の反応でアニーリングする。抗体チップ、もしくは、アドレス可能な遺伝子座を有する単抗体チップに結合した後、サンプルをマングベーンヌクレアーゼで消化することにより、突出末端を除去する。第1読取り値を記録し、上記2つの蛍光団からのシグナルを検出する。読み出したデータは、サンプルからのシグナルの比率として表し、既知のSNP対照サンプルに正規化する。陽性および陰性プローブのいずれも、両蛍光団を保持しているため、両サンプルの第1読取り値 (R₁) は1.0であることが予想される (以下の表2を参照)。

【0135】

【表2】

表2

陽性SNPプローブ (G)

	R ₁	R ₂
F1	1.0	1.0
F2	1.0	1.0

陰性WTプローブ (T)

	R ₁	R ₂
F1	1.0	1.0
F2	1.0	0

次に、S1ヌクレアーゼ (S1) およびエンドヌクレアーゼV (Endo V) を含有する溶液に、上記チップを浸してミスマッチ塩基対で鎖切断を起こす。標的DNAは

、プローブと同じ配列を有することになるため、酵素は、陽性SNPプローブのSNP部位を切断しない。しかし、プローブの野生型塩基Tが、標的DNAのGと対合しないため、陰性プローブは、SNP部位で切断される。従って、陽性プローブは、両蛍光団を保持するのに対し、陰性プローブは、F1蛍光団しか保持しない。第2読取りを実施する(R_2)。再び、第1読取り値と同様、ヌクレアーゼで処理していない対照サンプルが、ベースライン読取り値を提供する。読出しは、抗体チップを酵素で処理していない対照サンプルからのベースライン読取り値に対するシグナルとして表す。予想される結果を以下の表2に示す。

【0136】

SNPが存在するかどうかを決定するために、表3の2つの表の上段に示すように、F1に対するF2の比率を各プローブおよび各読取り値について計算する。SNPプローブについては、予想されるF2/F1比率は、 R_1 が1.0、 R_2 が1.0である。2つの比率を比較する。第1比率が、第2比率より少なくとも20%大きい場合には、ミスマッチが確認される。さらに好ましくは、第1比率が、第2比率より少なくとも25%、極めて好ましくは、35%大きければ、ミスマッチが確認される。ここでは、ミスマッチは確認されなかった。従って、DNAはプローブと同じである、すなわち、多型SNP部位を含んでいる。この結果を確認するために、陰性WTプローブについて、同じ計算を実施した。WTプローブについては、予想されるF2/F1比率は、 R_1 が1、 R_2 が2である。2つの比率を比較する。 R_1 比率が、 R_2 比率より少なくとも20%大きい場合には、ミスマッチが確認される。さらに好ましくは、 R_1 比率が、 R_2 比率より少なくとも25%、極めて好ましくは、35%大きければ、ミスマッチが確認される。1は0より大きいため、ミスマッチが確認され、標的DNAは野生型ではなく、これにより、陽性プローブについての結果が確認される。

【0137】

SNP部位に野生型塩基を有する標的DNAサンプルを用いると、両プローブについて、反対の結果が予想される。典型的な予想結果を表3の下方の表に示す。

【0138】

【表3】

表 3

陽性SNPプローブ (G)

標的 DNA	R ₁	R ₂
T/A (SNP)	1.0	1.0
G/C (野生型)	1.0	0

陰性SNPプローブ (G)

標的DNA	R ₁	R ₂
T/A (SNP)	1.0	0
G/C (野生型)	1.0	1.0

さらに複雑な標的DNAサンプルを用いた実験でも、分析は同じである。この方法を用いて、例えば、ヘテロ接合型遺伝子型、すなわち、標的DNAサンプルが、SNPを有する1つの対立遺伝子と、WT塩基を有する他の対立遺伝子とを含む遺伝子型を有するDNAサンプルのマッピングを実施することができる。この場合、ハイブリッドの半分が、陽性SNPプローブまたは陰性WTプローブのいずれかを用いた実験で、SNP部位にミスマッチ塩基対を有するため、あらゆるサンプルにおいて、プローブの半分だけがS1およびEndo Vで切断されることになる。再び、以下の表4にある2つの表の中段に示すように、F1に対するF2の比率を各プローブおよび各読取り値について計算する。SNPプローブについては、予想されるF2/F1比率は、R₁が1.0、R₂が0.5である。2つの比率を比較する。第1比率が、第2比率より少なくとも20%大きい場合には、ミスマッチが確認される。さらに好ましくは、第1比率が、第2比率より少なくとも25%、極めて好ましくは、35%大きければ、ミスマッチが確認される。ここでは、ミスマッチが確認された。陰性WTプローブについても、同じ計算を実施する。WTプローブについて、予想されるF2/F1比率は、R₁が1、R₂が0.5である。前記と同様に、R₁比率が、R₂比率より少なくとも20%、好ましくは、25%、さらに好ましくは、35%大きければ、ミスマッチが確認される。従って、標的DNAは、完全に野生型でもなければ、遺伝子型がSNP

であるわけでもない。両プローブについてのF2/F1比率もやはり、R₁が1.0、R₂が0.5であることから、ヘテロ接合性が確認される。ホモ接合WTおよびSNP対立遺伝子を有する対照標的DNAサンプルを用いて、結果を確認することができる。考えられる3つの遺伝子型すべてについて予想される結果を以下の表4に示す。

【0139】

【表4】

表4

陽性SNPプローブ (G)

対立遺伝子 ₁	対立遺伝子 ₂	R ₁	R ₂
G/C (野生型)	G/C (野生型)	1.0	1.0
G/C (野生型)	T/A (SNP)	1.0	0.5
T/A (SNP)	T/A (SNP)	1.0	0

陰性WTプローブ (A)

対立遺伝子 ₁	対立遺伝子 ₂	R ₁	R ₂
G/C (野生型)	G/C (野生型)	1.0	0
G/C (野生型)	T/A (SNP)	1.0	0.5
T/A (SNP)	T/A (SNP)	1.0	1.0

同様の分析を用いて、標的DNAサンプルのさらに複雑な集団を比較した。例えば、本発明の一実施形態では、非PCRマルチプレックスSNP検出器方法を用いて、特定の障害を遺伝子型と関連させることができる。この場合、2つの標的DNAサンプル：目的とする障害に罹患した集団由来の多数のDNAサンプルと、非罹患集団由来の対照サンプルを比較する。前述したように、この分析を用いて、両集団間の多数のSNP部位における相違を検出する。対照集団には存在しないが、罹患集団におけるSNP部位の存在により、該SNP部位と障害との相関が可能になる。

【0140】

本明細書に記載および請求する本発明は、本明細書に開示した具体的実施形態にその範囲が制限されることはない。これらの実施形態は、本発明のいくつかの態様を説明することを目的とするからである。同等の実施形態は、いずれも、本発明の範囲に含まれるものとする。実際に、本明細書に図示および記載したもの

以外の様々な本発明の変更事項は、以上の記載から当業者には明らかであろう。このような変更事項もまた、添付の請求の範囲内にあるものとする。本明細書全体を通じて、様々な参考文献を引用したが、それぞれの内容は、参照により本明細書にその全文を組み込むものとする。

【図面の簡単な説明】

【図1】 VGMS-PL方法の概略図説明。

【図2】 遺伝子型マッピング方法。本方法は陽性および陰性オリゴヌクレオチドプローブを用いてもよく、各々はペプチド（白抜き）および2つの異なる蛍光団（ F_1 および F_2 ）で標識されている。

【図3】 遺伝子発現解析方法の概略図説明。

【図4】 2部構成ペプチド標識オリゴヌクレオチドプローブ。図示されているプローブは検出すべき多型（N）の両側がペプチド（白抜き）および2つの異なる蛍光団（ F_1 および F_2 ）で標識されている。ヌクレアーゼ消化に耐性のヌクレオチド塩基の誘導体（例えば、チオール化塩基）の位置は影付き長方形で示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> VALIGENE CORPORATION

<120> METHODS FOR DETECTION OF NUCLEIC ACID POLYMORPHISMS USING
PEPTIDE-LABELED OLIGONUCLEOTIDES AND ANTIBODY ARRAYS

<130> 9408-042-228

<140> PCT/US00/

<141> 2000-03-17

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 1

Lys Phe Ser Arg Glu Lys Lys Ala Ala Lys Thr
1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 2

Asp Gln Lys Arg Tyr His Glu Asp Ile Phe Gly
1 5 10

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 3

Asp Leu Lys Glu Glu Lys Asp Ile Asn Asn Asn Val Lys Lys Thr
1 5 10 15

<210> 4

<211> 9

```

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oryctolagus cuniculus

<400> 4
Cys Thr Gly Glu Glu Asp Thr Ser Glu
  1                      5

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oryctolagus cuniculus

<400> 5
Pro Glu Glu Thr Gln Thr Gln Asp Gln Pro Met
  1                      5                      10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oryctolagus cuniculus

<400> 6
Gln Lys Ser Asp Gln Gly Val Glu Gly Pro Gly Ala Thr
  1                      5                      10

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oryctolagus cuniculus

<400> 7
Asp Ile Gly Gln Ser Ile Lys Lys Phe Ser Lys Val
  1                      5                      10

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oryctolagus cuniculus

```

<400> 8
Gln Arg Ala Asp Ser Leu Ser Ser His Leu
1 5 10

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 9
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 10
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

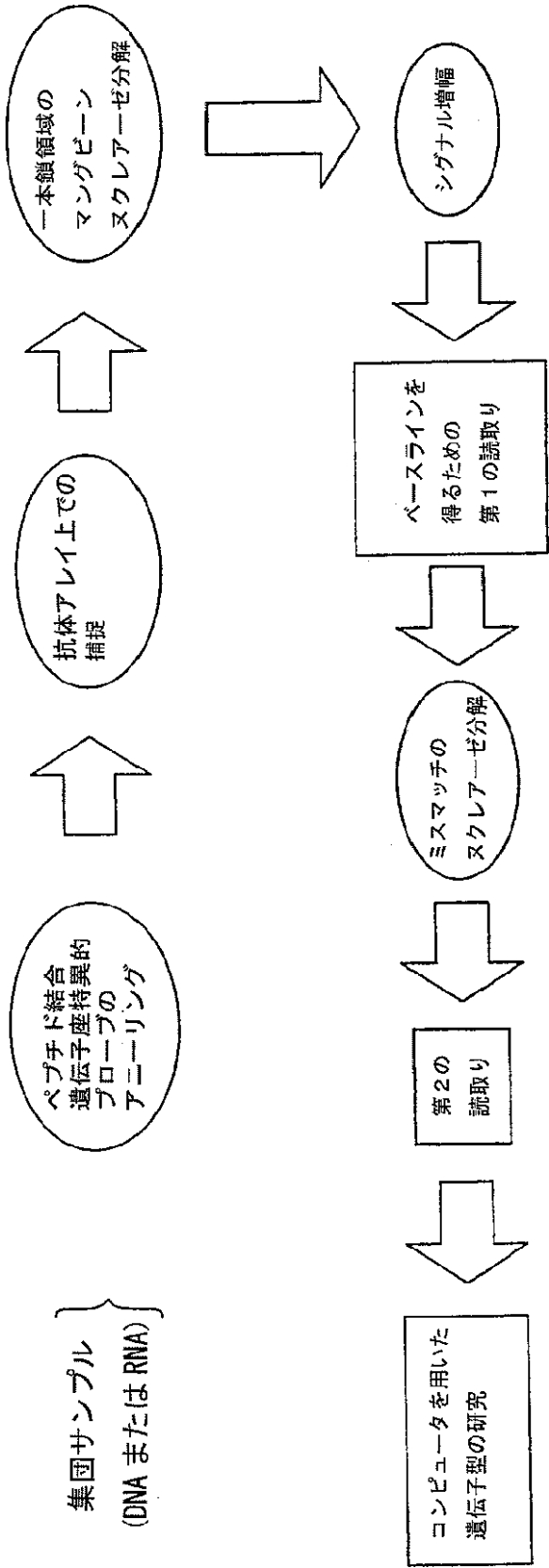
<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 11
Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Lys Leu Gly Lys
1 5 10

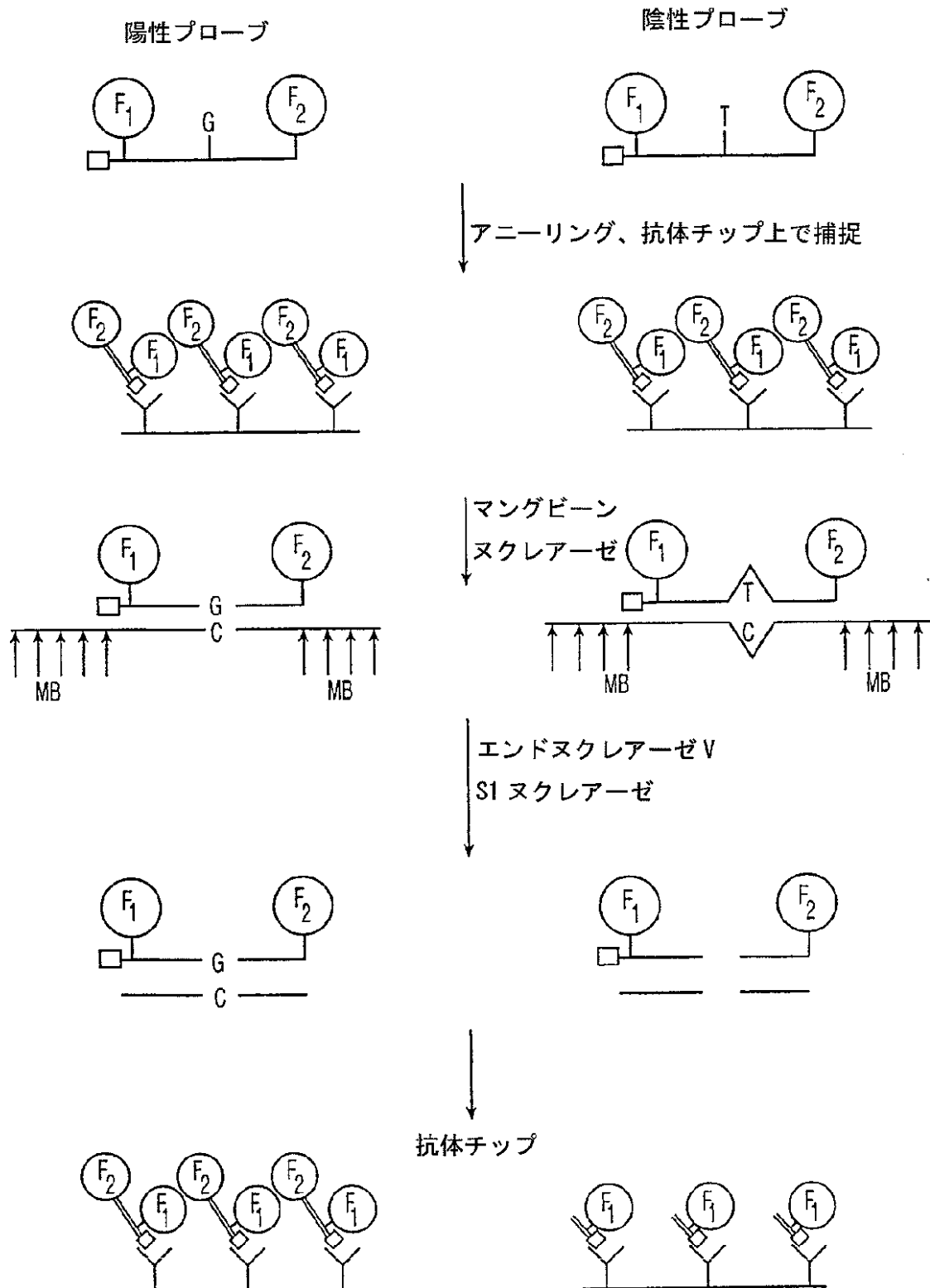
【図1】

VGMS-PL の基本的な機能原理



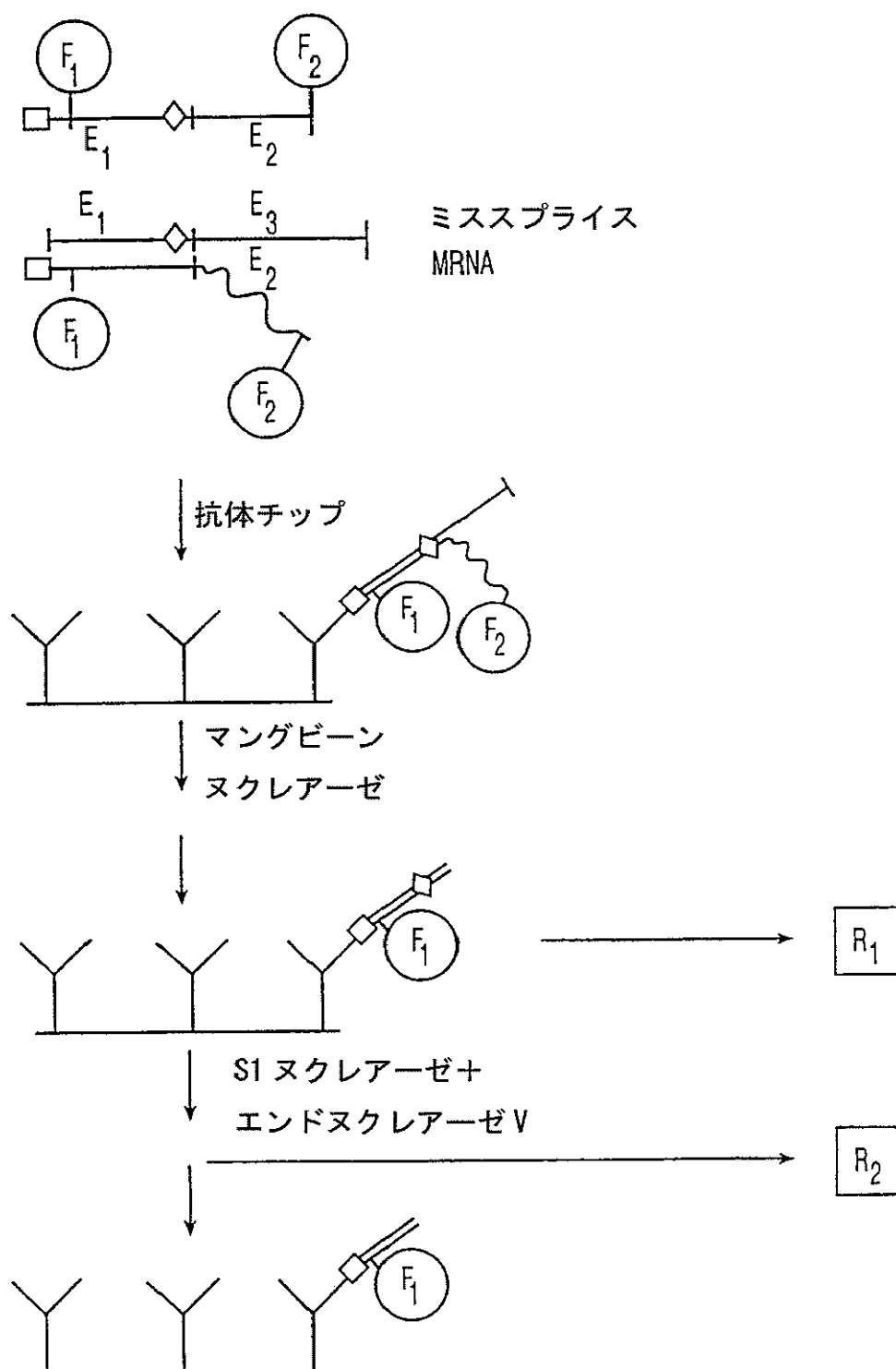
【図2】

遺伝子型マッピング分析

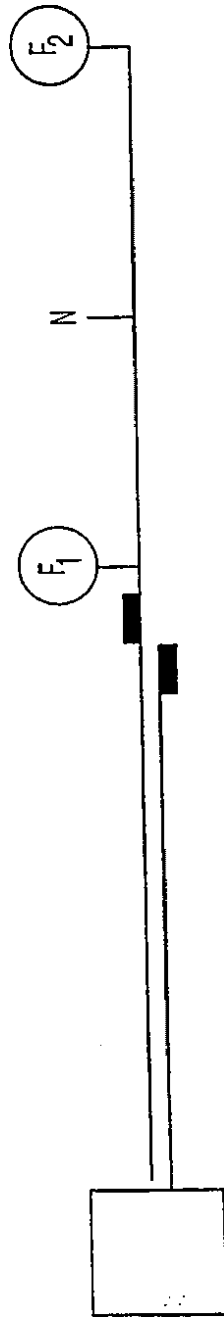


【図3】

遺伝子発現分析



【図4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/58 G01N33/68		International Application No. PCT/US 00/06950
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q G01N C07K C12N		
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, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 04042 A (BURDEN DAVID W) 28 January 1999 (1999-01-28) page 2, line 14 -page 3, line 27 page 22, line 14 -page 27, line 37	1,2
A	claims 1-23; example 1	3-43
X	WO 98 26095 A (GENETRACE SYSTEMS INC ;SHALER THOMAS A (US); BECKER CHRISTOPHER H) 18 June 1998 (1998-06-18) page 54 -page 57, line 28	44-46, 48,50
A	claims 45-49,63,69,75; figures 7,23; examples 1,2,5	1-43,47, 49
--- -/--		
☒ 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 11 October 2001		Date of mailing of the international search report 18/10/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer van Klompenburg, W

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 00/06950

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 40902 A (TREVIGEN INC) 19 December 1996 (1996-12-19) page 2, line 17 - line 26 page 5 -page 6, line 23 page 23, line 11 -page 24, line 26 claims 1-16; figures 1,2; example 11	3-43
P,X	WO 99 36575 A (VALIGENE CORP) 22 July 1999 (1999-07-22) page 58, line 3 - line 10 page 70, line 19 -page 71, line 18 page 73, line 20 - line 29 page 77, line 12 -page 80, line 4 claims 1-49	1,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/06950

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9904042 A	28-01-1999	AU 8409298 A WO 9904042 A1	10-02-1999 28-01-1999
WO 9826095 A	18-06-1998	AU 5794498 A EP 0963443 A1 WO 9826095 A1	03-07-1998 15-12-1999 18-06-1998
WO 9640902 A	19-12-1996	US 5656430 A AU 6252796 A EP 0832210 A1 JP 11506932 T WO 9640902 A1 US 5763178 A	12-08-1997 30-12-1996 01-04-1998 22-06-1999 19-12-1996 09-06-1998
WO 9936575 A	22-07-1999	US 6221585 B1 AU 2234699 A EP 1045927 A1 WO 9936575 A1	24-04-2001 02-08-1999 25-10-2000 22-07-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
G 0 1 N 33/543		G 0 1 N 33/566	
33/566		37/00	1 0 2
37/00	1 0 2	C 1 2 N 15/00	F

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J
, C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,
M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K
E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W
) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U ,
T J , T M) , A E , A L , A M , A T , A U , A Z ,
B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C
R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E , E S , F I
, G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D ,
I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K
Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A
, M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z ,
P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S
K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G
, U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W

(72)発明者 ポールニー、ジャン - ルイ
フランス国 エフ - 92200 ニュイリー、
ル ペロネ、150

F タ-ム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA03 CA04 CA09
HA12 HA14
4B063 QA12 QA19 QQ01 QQ42 QR14
QR56 QS03 QS33 QS34

专利名称(译)	使用肽标记的寡核苷酸和抗体阵列检测核酸多态性的方法		
公开(公告)号	JP2003535569A	公开(公告)日	2003-12-02
申请号	JP2000606785	申请日	2000-03-16
[标]申请(专利权)人(译)	变化仁Yuesu公司		
申请(专利权)人(译)	Varijen (Yuesu) 有限公司		
[标]发明人	トリーシュイザベル イリスフランコイスジェイエム ポールニージャンルイ		
发明人	トリーシュ、イザベル イリス、フランコイス、ジェイ.エム. ポールニー、ジャン-ルイ		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6804 C12Q1/6823 C12Q1/6827 C12Q1/683 C12Q1/6837 G01N33/543 G01N33/566 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/683 C12Q1/6804 C12Q1/6823 C12Q1/6827 C12Q1/6837 C12Q2565/531 C12Q2565/1025 C12Q2525/107 C12Q2521/30		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/543.541.B G01N33/543.541.Z G01N33/566 G01N37/00.102 C12N15/00.F		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA12 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ42 4B063/QR14 4B063/QR56 4B063/QS03 4B063/QS33 4B063/QS34		
优先权	09/272970 1999-03-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于筛选核酸群体中核酸多态性的方法和组合物。本发明的方法通常被称为V阿里 g ^ 烯 SM 中号重复 小号压纹， P肽- 大号 着墨 (VGMS-PL) 方法，特别是，它被设计用于动植物核酸的基因定位和基因表达的高通量分析，而无需PCR扩增步骤。特别地，本发明的方法使用用可区分和可识别的肽标签标记的寡核苷酸探针，其被捕获在可寻址抗体阵列上。

