(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4494695号
(P4494695)
(45)発行日　平成22年6月30日(2010.6.30)　(24)登録日　平成22年4月16日(2010.4.16)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 25/16	(2006.01)	G01N	25/16	C
C12M 1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A
G01N 21/01	(2006.01)	G01N	21/01	B

請求項の数 14　(全 24 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001-527204(P2001-527204)
(86)(22)出願日　平成12年9月29日(2000.9.29)
(65)公表番号　特表2003-510600(P2003-510600A)
(43)公表日　平成15年3月18日(2003.3.18)
(86)国際出願番号　PCT/FR2000/002703
(87)国際公開番号　WO2001/023867
(87)国際公開日　平成13年4月5日(2001.4.5)
審査請求日　平成19年8月16日(2007.8.16)
(31)優先権主張番号　99/12229
(32)優先日　平成11年9月30日(1999.9.30)
(33)優先権主張国　フランス(FR)

(73)特許権者　502124444
コミッサリア　ア　レネルジー　アトミーク　エ　オ　ゼネルジ　ザルタナテイヴ
フランス国　エフー７５０１５　パリ，バテイマン　「　ル　ポナン　デー　」，リュ　ルブラン　２５
(73)特許権者　500077845
ビオメリュー・ソシエテ・アノニム
フランス・６９２８０・マルシ・レトワール・シュマン・ドゥ・ロルム（番地なし）
(74)代理人　100064908
弁理士　志賀　正武
(74)代理人　100108578
弁理士　高橋　詔男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】分子認識反応を検出するための方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
支持体に固定化された第一の分子と、試験溶液中に存在する第二の分子との間の分子認識反応の、第一の分子及び第二の分子をラベリングすることのない検出方法であって、前記検出が光熱的方法によって実施される方法。
【請求項２】
第一と第二の核酸分子の間の核酸のハイブリダイゼーション反応の、ラベリングすることのない検出方法であって、以下の工程：
－　固相支持体に第一の核酸分子を固定化する工程；
－　固相支持体に固定化された第一の核酸分子を、前記第一の分子にハイブリダイズ可能な第二の核酸分子を含むと考えられる試験溶液と、前記ハイブリダイゼーションに好ましい条件下で接触させることを実施する工程；
－　前記固相支持体を洗浄し、支持体に固定化された前記第一の分子と、前記第一の分子にハイブリダイズした前記第二の分子とからなる検出サンプルを単離する工程；並びに
－　光熱的方法により前記サンプルの吸収を測定する工程；
からなる方法。
【請求項３】
前記光熱的方法がサーマルレンズ法である、請求項１または２記載の方法。
【請求項４】
前記光熱的方法が、サンプルが励起ビームによって照射され、サンプルによる励起ビー

ムの吸収が、プローブビームの屈折または反射によって検出される光熱的偏向の方法である、請求項１または２記載の方法。
【請求項５】
プローブビームと励起ビームが互いに交差する、請求項４記載の方法。
【請求項６】
プローブビームと励起ビームが、交軸方向の配置、またはほぼ同一線上の配置で存在する、請求項４記載の方法。
【請求項７】
励起ビームが、パルス化レーザー、連続的強度調節レーザー、または多色光から選択される、請求項４から６のいずれか一項記載の方法。
【請求項８】
プローブビームの屈折または反射が、多元素フォトダイオードによって、またはプローブビームの一部のみを受け取る単純なフォトダイオードによって検出される、請求項４から７のいずれか一項記載の方法。
【請求項９】
励起ビームが、275nmでの連続的アルゴンレーザー、266nmの波長を有する４象限YAGレーザー、または多色光から選択されるレーザーから得られるビームである、請求項４から８のいずれか一項記載の方法。
【請求項１０】
プローブビームが、基体または存在する分子によって吸収されない波長を有する、請求項４から９のいずれか一項記載の方法。
【請求項１１】
275nmでの連続的アルゴンレーザー、266nmの波長を有する４象限YAGレーザー、または多色光から選択されるレーザーから得られるビームである入射ビームが使用される、請求項３記載の方法。
【請求項１２】
さらにサンプルの吸収の測定値を、コントロールサンプルの測定値と比較する工程を含む、請求項１から１１のいずれか一項記載の方法。
【請求項１３】
試験、診断、または核酸のハイブリダイゼーションの検出のための、請求項１から１２のいずれか一項記載の方法の使用。
【請求項１４】
分子認識反応が、核酸のハイブリダイゼーション、抗原／抗体タイプの認識反応、タンパク質／タンパク質タイプの相互作用、または酵素／基質タイプの相互作用である、請求項１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、いずれのラベリングも含まない、分子認識反応を検出するための方法、及びこの方法を実施するための装置に関する。
【０００２】
本発明は、例えば分子生物学において第一と第二の分子の間の分子認識の検出及び分析の一般的分野に関する。
【０００３】
本発明に従って、分子認識は、結合分子として検出可能なように両分子の十分に安定な結合を導く、幾分複雑な分子の間の特異的な相互作用として定義されても良い。例えばこれは、核酸（DNA及び／またはRNA）のハイブリダイゼーション、抗原／抗体タイプの認識反応、タンパク質／タンパク質タイプの相互作用、酵素／基質タイプの相互作用等であっても良い。それ故本発明に関連する分子は、前記記載の相互作用に関与するものである。
【０００４】

本発明の方法では、二つの分子の一方が固相支持体に固定化されているこのタイプの分子認識が、光熱的方法によって吸収の変化を検出することにより検出されても良い。

【０００５】

この方法は、バイオチップでのスクリーニングまたはハイブリダイゼーションの検出の構成中で、水性媒体または空気中の固相支持体上の核酸のハイブリダイゼーションにおいて特に応用が見出される。

【０００６】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

例えば、核酸ハイブリダイゼーションの検出は一般的に、蛍光分子でのラベリングによって実施されている。しかしながら、このタイプの検出は、いくつかの化学的試薬の使用を必要とし、高いコストと長期的な加工期間を導く。さらに、蛍光を利用する方法は、常に非常に正確であるというわけではない。最後に、少なくとも一つの分子が、ラベリングによって修飾され、これは分子認識反応に影響するかもしれない。

【０００７】

また、例えば偏光解析法、光学角度測定法、または共鳴法による、サンプル中の厚さまたは指数の変化を検出することを含む光学的方法のような他の方法も提案されている。

【０００８】

しかしながら、固相支持体でのオリゴヌクレオチドの場合、例えば形成された層が、数オングストロームから数ナノメーターの厚さの超微細であるため、厚さまたは指数の変化の検出は、非常に高感度で高価な研究室の機械を必要とする。

【０００９】

【課題を解決するための手段】

特に本発明の目的は、固相支持体に固定化された捕獲分子と称される第一の分子と、試験溶液中に存在する標的分子と称される第二の分子の間の分子認識反応に対する、いずれのラベリングをも含まない新規な検出方法を提供することである。

【００１０】

本発明の方法は、検出が光熱的方法によって実施されるという特徴を有する。

【００１１】

【発明の実施の形態】

本発明に従って、認識反応並びに第一及び第二の分子は、前記記載のものであって良い。

【００１２】

第一及び第二の分子が核酸分子である場合、本発明の方法は、例えば以下の工程を含む：

－　固相支持体に第一の核酸分子を固定化する工程；

－　固相支持体に固定化された第一の核酸分子を、前記第一の分子にハイブリダイズ可能な第二の核酸分子を含むと考えられる試験溶液と、前記ハイブリダイゼーションに好ましい条件下で接触させることを実施する工程；

－　前記固相支持体を洗浄し、支持体に固定化された前記第一の分子と、前記第一の分子にハイブリダイズした前記第二の分子とからなる検出サンプルを単離する工程；並びに

－　光熱的方法により前記サンプルの吸収を測定する工程。

【００１３】

さらに、本発明の方法は、前記記載の測定サンプルの吸収の測定値と、吸収が周知の測定値である較正サンプルとも称されるコントロールサンプルの測定値と比較する工程を含んでも良い。

【００１４】

固相支持体に固定化された第一の分子は、捕獲分子と称されても良く、試験溶液中に存在する第二の分子は、標的分子と称されても良い。これが支持体に固定化されたDNA分子である場合、それは「プローブ」と称されても良い。

【００１５】

ハイブリダイズされるまたはされない薄い核酸層は、通常非吸収性であると考慮されることに周知することは重要である。これは主に、"Ellipsometric and interferometric cha

racterization of DNA probes immobilized on a combinational assay", Gray等, Langmuir 1997, 13, 2833-2842に記載されている。

【００１６】

これに対して、本発明者は、分子認識反応の検出及び分析に適用される光熱的方法に興味を有した。全てのこれらの方法は、一般的にサンプルの励起を有し、その吸収は、一般的にレーザーである励起ビームと称される光供給源によって測定されるべきである。入射光エネルギーの一部が、サンプルによって吸収される。吸収されたエネルギーの割合は、サンプルの吸収スペクトルと、励起供給源の放射スペクトルによって示される。吸収されたエネルギーの一部は、熱に変換される。残りのものが放射され、例えば蛍光または化学反応を生じても良い。前記熱は、吸収媒体及び隣接する媒体の温度を変化を導き、その温度の変化は、密度、及びそれ故指標の変化、または圧力の変化、または音波の発生によって表されても良い。吸収による温度の上昇は一般的に不均一であり、それ故分析媒体及び隣接する媒体の指標勾配を生産し、それによって媒体の密度を温度の上昇により不均質にする。

【００１７】

光熱的方法は、吸収によって導かれる影響を測定することにある。

【００１８】

本発明者は、前記光熱的方法の中で、例えば光熱的偏向法及びサーマルレンズ法が、本発明に従って使用されても良いことを示した。

【００１９】

光熱的偏向法は、指標勾配が見出される領域を通過する、プローブビームと称される光ビームの偏向を測定することよりなる方法である。言い換えると、それは励起ビームを介する吸収サンプルの加熱によるプローブビームの偏向を測定することよりなる。この光熱的偏向法は、吸収マッピング、熱的パラメーターイメージングのような表面分析に適用されているが、前記記載のような分子認識の検出のためには未だ適用されていない。

【００２０】

サーマルレンズ法は本質的に、指標勾配が見出される領域を通過する光ビーズの焦点あわせの変化を測定することよりなる。

【００２１】

光熱的方法の十分な説明は、例えば標準テキスト"Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis, S.E. Bialkowski, vol. 134 in Chemical Analysis: a Series of Monographs on Analtycal Chemistry and its Applications, Wiley"に見出されるであろう。

【００２２】

本発明の方法に従って、固相支持体は、第一の分子が直接的または間接的に、化学的に固定化できる支持体として定義されても良い。好ましくはこの支持体は、光熱的検出を妨げないように、その表面に配置されるサンプルの吸収と比較して低い吸収を有する。さらに、支持体の伝導性があまりに高いと、熱の広範囲の分布を誘導し、それによって温度勾配を低下し、検出シグナルを低下するため、前記支持体は好ましくは低い熱伝導性を有する。

【００２３】

本発明に従って、この支持体は、例えばシリカ、ガラスまたはプラスチックの支持体といった、DNAチップの製造において使用されている支持体であっても良い。それはまた、シグナルを雑音比に改良するために、誘電体層でその表面を被覆することによって半導体を処理可能であっても良い。

【００２４】

本発明に従って、第一の捕獲分子と称される分子は、前記支持体に固定化される。この支持体への第一の分子の固定化は、当業者に周知の従来の化学反応によって達成されて良く、目的とされる応用に所望される支持体、固定化される分子、及び結合強度の特性に従って選択されても良い。

【００２５】
この固定化は、直接的または間接的であっても良い。
【００２６】
以下に記載される文献１から１０は、この明細書の最後に参考文献として挙げられている。
【００２７】
例えば本発明に従って、支持体がシリカ支持体である場合、シリカ支持体の官能化処理は、第一の分子の固定化を可能にする反応性化学基を固定化するために、支持体の表面を修飾するように、第一の分子を固定化する前に実施されても良い。そのような処理は、以下の実施例１に記載されているが、非常に多数の他の例が、Pease等（文献６）、Guo等（文献４）、Maskos等（文献６）等のような特別な文献に見出されるであろう。前記記載のように、シリカは唯一の可能な支持体であるわけではなく、各支持体がそれに対して適切な表面処理を受けるであろう。ポリプロピレンフィルム上でのこれを説明するために、例えばMatson等（文献７）の参考文献が挙げられる。
【００２８】
反応性化学基は一般的に、Guo等（文献４）に挙げられたようなアミン基、またはKohsaka等（文献５）に挙げられたようなカルボン酸基、またはMaskos等（文献６）に挙げられたようなエポキシ基であり、これらのために効果的で使用が容易な商業的カップリング剤が存在する（例えばPierceのカタログ参照）。
【００２９】
共有結合カップリングは、支持体に第一の分子を固定化するための唯一の方法ではない。ポリスチレン反応性ウェルまたはElaissari等（文献３）に記載されたようなミクロビーズに抗体を固定化するために広く使用されている受動的吸着は、Balladur等（文献１）にも見られるようにしばしば非常に有効である。Noy等（文献８）；及びCornell等（文献２）に見られるような第一の分子が化学的にカップリングされている脂質鎖を含むLangmuir-Blodgettフィルムの形成のようなより最近の固定化法、またはさらにPorath等，1975（文献１０）に見られるような金属－キレート法もまた考慮されても良い。
【００３０】
本発明に従って、第一の分子が支持体に固定化される場合、以下の工程が前記記載の接触工程及び洗浄工程となっても良い。
【００３１】
本発明に従って、接触工程はもちろん、上記ハイブリダイゼーションに好ましい条件、即ち核酸のハイブリダイゼーションを可能にすることが当業者に明らかである適切なpH、適切な温度、及び適切な溶液の下で実施される。この溶液は、試験溶液である。
【００３２】
本発明に従って、支持体を洗浄する工程は、主に支持体上の認識分子と反応していない溶液中の分子、即ち前述の例において、支持体に固定化された核酸分子にハイブリダイズしない溶液の核酸分子を除去する目的を有する。かくして、ハイブリダイズせず支持体に結合しない前記分子によって生産されるであろう強力なバックグランドノイズが、測定の間で避けられるであろう。
【００３３】
もちろん、前記分子を固定化する支持体の洗浄は、ハイブリダイゼーションに関与する核酸を変性せず、前記の形成されたハイブリダイゼーションを破壊せず、支持体に固定化された前記第一の分子を放出しない穏やかな洗浄であるべきである。洗浄の例は、以下の実施例に示されている。この洗浄工程内で、選択された光熱的方法によって吸収を測定するために使用される測定サンプルを得ることが可能である。
【００３４】
本発明の方法に従って、選択された光熱的方法が光熱的偏向法である場合、例えば核酸を含むサンプルは、励起ビームと称される光ビームで照射され、サンプルによる励起ビームの吸収が、プローブビームの屈折または反射によって検出される。

【００３５】
例えば励起ビームは、パルス化レーザーまたは強度調節性の連続的レーザーであっても良い。好ましくはそれは、例えば目的が核酸のハイブリダイゼーションを検出することである場合の核酸の吸収範囲といった、サンプルの吸収範囲における放射波長を有する。
【００３６】
本発明に従って、プローブビームは好ましくは、本発明の基体または本発明の分子によって吸収されない波長を有する。
【００３７】
本発明に従って、励起ビームは、275nmの連続的アルゴンレーザー、または266nmの波長を有する４象限YAGレーザーから選択されるレーザーから得られるビームであって良い。もし供給源の放射スペクトル及びその強度が、検出のための十分なシグナルを提供するのであれば、励起ビームは例えば水銀ランプといった多色供給源によって提供されても良い。
【００３８】
プローブビームは、励起ビームによって照射されるサンプル部分の近傍に向けられる。さらにプローブビームは、励起ビームと同一でも異なっても良い。プローブビームは好ましくは、例えば633nmのヘリウムレーザーから得られるものであるレーザービームである。
【００３９】
プローブ及び励起ビームの相対的位置は、使用される配置を規定する。例えば、プローブビームは、以下の媒体の一つ以上を交差しても良い：サンプル、例えばオリゴヌクレオチド、固相支持体または周囲の媒体、例えば液体または気体。
【００４０】
励起ビームに対するプローブビームの向きは、機械的密集に依存して、及び／または入射角に従って最大の吸収を探求することによる感度を最適化するために、最良なように選択されて良い。
【００４１】
本発明に従って、プローブ及び励起ビームは、互いに交差する。
【００４２】
本発明に従って、プローブ及び励起ビームは、交軸方向の配置で、または実質的に同一線上の配置で配置されて良い。交軸方向の配置では、プローブと励起ビームは互いに交差し、互いに直交している。この配置は、添付の図１ａに模式的に示されている。同一線上の配置では、励起及びプローブビームは互いに交差するが、ほぼ同一線上である。添付の図１ｂは、同一線上の配置の模式図である。
【００４３】
これらの図面において、符号１は励起ビームを示し、交軸方向の配置で符号３が、実質的に同一線上の配置で符号５がプローブビームを示し、符号７は固相支持体に配置された測定サンプルを示す。
【００４４】
プローブビームの屈折または反射は、多成分フォトダイオードによって、例えば二つまたは四つの象限を有する検出器によって、アレイまたはマトリックスによって、あるいはカバーまたはナイフによって部分的に被覆された、またはプローブビームの一部のみを受け取る単一のフォトダイオードによって検出されても良い。
【００４５】
単一のフォトダイオードの場合、励起ビームの可能な電力変化から、サンプルの吸収の変化を解離するために、もう一つの検出器が必要であっても良い。
【００４６】
図２は、プローブビームの偏向を検出するための各種の配置の模式図である。この図では、-A-は、２象限検出器９と、検出器上でプローブビームによって形成されるスポット１１を模式的に説明し、-B-は、４象限検出器を説明し、-C-は、マトリックス検出器を説明し、-D-は、カバー１３で部分的に被覆された単一のフォトダイオードを説明し、並びに-E-は、オフ軸光検出器を説明する。

【００４７】
十分な感度を得るために、サンプル、例えばオリゴヌクレオチドによる励起ビームの一部の吸収によって引き起こされるプローブビームの偏向は、研究室の温度変化のような環境に伴う変化から好ましくは区別される。このため、励起ビームは、連続的なビームであれば調節によって、またはパルス化操作によってのいずれかで、時間でマークされても良い。調節周波数と、レファレンスシグナルを得る可能性を制御することによって、励起ビームの部分的な吸収によって生成する加熱による偏向は、選択的に検出されても良い。
【００４８】
使用されるビームの配置をどのようなものであれ、得られた情報は場所的であり、例えば核酸を含むサンプルの励起ビームの衝撃点の周辺の領域に関する。
【００４９】
この領域のサイズは、サンプルの衝撃点での励起ビームのサイズのような実験的パラメーター、またはその調節周波数によって、並びにサンプル及び環境媒体の支持体の熱的挙動によって示されても良い。これは特に、これらの各種の媒体における熱拡散によるものである。
【００５０】
情報が場所的であるため、検出ユニットは、励起ビームに対して固相支持体を置換するためのシステムと結びつけられても良い。次いで全体が、プローブビームの偏向値をサンプルの一つの地点から別の地点へ比較させるようにし、特にシグナルがマッピングとして照射されても良い。
【００５１】
例えばサンプルの一つの地点は、分子認識領域、即ち与えられたタイプの標的分子についての認識特性を有する分子を表面で有する支持体の一部として解されても良い。それ故固相支持体は、サンプルと会合し、それ自体いくつかの認識地点または領域からなる。かくして支持体は、官能化された支持体である。
【００５２】
核酸の場合、これらの認識領域のそれぞれは、同じサンプルを形成する別の認識領域とは好ましくは異なるがこれに制限されない、一つのタイプの捕獲分子のみと関連する。かくして、各認識領域のサイズを増大すること、または同じ種類の捕獲分子と関連するいくつかの認識領域を有することのいずれかが可能であり、これは検出されるシグナルを増大する目的を有する。
【００５３】
シグナルがマッピングとして照射される場合、捕獲分子とハイブリダイズするまたはしないいくつかの標的分子に対応するいくつかの認識領域の測定値を有することができる。
【００５４】
さらに、これらの認識領域の一つまたはいくつかは、前記記載の一つまたはいくつかの較正サンプルに指定されても良い。
【００５５】
これが必要とされる場合、偏向シグナルは、例えばレファレンスサンプルまたは較正サンプルを介して、吸収値に変換されても良い。周知で安定な吸収を有するこのレファレンスサンプルは、サンプルに対するものと同様な実験条件の下で、光熱的偏向測定の対象となっても良い。得られた値に関して、測定された電気的シグナルを吸収レベルに変換するための係数を計算することが可能である。
【００５６】
最後に、光熱的方法がサーマルレンズ法である場合、275nmの連続的アルゴンレーザー、または266nmの波長を有する４象限YAGレーザーから選択されるレーザービームであっても良い入射ビームが使用される。
【００５７】
サーマルレンズ法は、アセンブリーがより簡単であるため興味深い。
【００５８】

実際この場合、プローブレーザー及び励起レーザーとして機能する一つのみのレーザーが存在する。サンプルとの相互作用の後、焦点が変化する。測定は単に、最初の時点での光束の変化を測定することのみにある。励起ビームは、透過、即ちサンプルを通じた透過、または反射のいずれかで使用されても良い。

【００５９】

それ故本発明の独自性は、光熱的方法が、例えば固相支持体上のオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションの、分子認識を検出するために今まで使用されていないという事実に主に基づく。より一般的に、吸収の変化の測定に基づく方法は、このタイプの支持体での検出のために全く使用されていない。

【００６０】

本発明の方法は特に、いずれのラベリング工程またはラベルをも必要としないという利点を有する。例えばそれは、核酸のハイブリダイゼーションを検出することによる診断試験について有利に使用されても良い。これは以下の応用的実施例で説明されるであろう。

【００６１】

さらに、百万分の数十部といった非常に小さな吸収及び吸収の変化が検出されても良い。

【００６２】

本発明はまた、以下の構成要素を含む、本発明の方法を実施するための装置に関する：

－　固相支持体を配置する手段；

－　前記支持体を照射する手段；

－　前記照射手段によって照射された際に、支持体によって担持されるサンプルによる光の吸収を検出する手段；並びに

－　前記照射手段と前記検出手段を配置する手段。

【００６３】

本発明に従って、支持体を配置する手段は、例えばMicrocontrole（登録商標）のマイクロメーターサイズの変換及び回転ステージといった、前記支持体を正確に置換することが知られているいずれかの手段であっても良い。これらの手段は、特にマッピングのための自動化を備えるように電動化されても良い。

【００６４】

本発明に従って、サンプルを照射する手段、及びサンプルによる光吸収を検出するための手段は、特に使用される光熱的方法、支持体、及び検出される分子認識に従って選択されても良い。サンプルを照射する手段は、例えば前記記載のような励起ビームであっても良い。

【００６５】

光熱的偏向法が関与する場合、吸収を検出する手段は、プローブビームと、プローブビームの屈折または反射を検出するための手段とを含んでも良い。これらの手段は、以下に記載され、以下の実施例にも記載される。サーマルレンズ法が関与する場合、検出手段は、プローブビームと、焦点で配置された絞りとを含んでも良い。

【００６６】

本発明に従って、前記記載の照射手段と検出手段とを配置するための手段は、支持体を配置するための前記記載のもののような手段であっても良い。

【００６７】

本発明の他の構成及び利点は、もちろん説明的で非制限的なものである添付の図面を参考にして以下に記載される説明及び実施例を読むことで、さらに明らかとなるであろう。

【００６８】

実施例４を説明する配列のリストは、配列表に記載されている。

【００６９】

【実施例】

実施例１：測定方法

本発明に従って使用されるシステムは、交軸方向の配置における光熱的偏向に基づく。

【００７０】

添付の図３は、本発明に従った光熱的偏向法によるサンプルの吸収の測定の原理の模式図である。

【００７１】

この図において、励起ビーム１５は、275nmの連続的アルゴンレーザー(COHERENTのINOVA(登録商標)40タイプ)から制動され、それは球状のミラー（示さず）によってサンプル７に焦点形成され、スポットの直径（示さず）はサンプル５の表面で７０ミクロンである。励起ビームの波長は、核酸のハイブリダイゼーションの検出を提供するように選択される。励起ビームの電力は、レーザー出力で300mWである。

【００７２】

プローブビーム１７は、633nmのヘリウム－ネオンレーザーから得られるビームである。このプローブビームの波長は重要ではない。本発明に従って、雑音比に対するより優れたシグナルは、励起ビームのものから遠い波長で得られても良い。

【００７３】

偏向の検出は、４象限検出器-B-（図２参照）によって実施され、引き続き増幅とサブトラクションエレクトロニクスが実施される（示さず）。符号１７ａは、光熱的偏向によって偏向されたプローブビームを示す。角度θは、サンプルに対して通常２０に対する励起ビームの入射角を示す（混合線で示される）。

【００７４】

励起ビームの波長を選択する妨害フィルター（示さず）が、調節された励起ビームからの共存する光の影響を避けるために、４象限検出器の前に配置されても良い。

【００７５】

本発明の装置では、プローブレーザー、４象限検出器、及び関連エレクトロニクスが、ALIS社製のもののような商業的測定セルの必須部分を形成しても良い。このセルから得られるシグナルが、同期的検出ステージに送られる。

【００７６】

励起ビームは、周波数が調節可能な、以下で機械的チョッパーと称される機械的スロットディスクによって調節されても良い。チョッパーのコントロールシグナルは、同期的検出のレファレンスとして使用される。周波数は157Hzである。測定されるシグナルは、同期的検出ステージの出力で得られる（励起ビームの調節周波数での偏向シグナルの振幅）。

【００７７】

サンプルと互いに対するそれぞれの両ビームの配置は、変換及び回転ステージ(Micro-Controle(登録商標))によって準備され、そのいくつかは、例えばバイトチップのマッピングのため、特定の調節フェーズで自動化を提供するために電動化される。前記調節は、プローブビームを含むサンプルに対して直交する平面で偏向シグナルを最大化するように自動的に実施される。マッピングの間、必要であれば、調整的な置換が、マッピングの間で正しい相対的な配置が維持されることを保証するように、マッピングのためのスキャン軸に直交的な方向で実施される。この矯正的な置換は、予備的測定工程において自動的に決定される。サンプルに対して正常であるものに対する励起ビームの入射角、及びサンプルに対するセルの向きは調節可能であっても良い。プローブ及び励起ビームの相対的位置と向きはまた、独立に調節可能であっても良い。

【００７８】

本発明に従った装置の線図は、添付の図４に説明される。この図において、線図には示されていないシャッターが、置換フェーズの間で励起ビームをカットオフすることを可能にし、置換の後にアセンブリーを安定化させるための選択された待機期間の後、十分に決定された時間間隔の間で励起ビームを回復させることを可能にする。符号１９は、275nmアルゴンレーザーを示し、符号２１は、レーザービームを配置するためのミラーを示し、符号２３は、機械的チョッパーを示し、符号２５は、チョッパーを通過した後のレーザービームを示し、符号２７は、焦点形成ミラーを示し、符号３１は、測定サンプルを示す。

【００７９】

符号３４は、プローブレーザー３２と４象限ダイオード３３が挿入されている測定セルを

形成する。
【００８０】
サンプルの配置の繰り返し性能は、線図には示されていない例えば自動視準望遠鏡によって提供されても良い。測定装置全体は、置換をコントロールし、二つの直交した方向で偏向シグナルを獲得するワークステーションによって操作されても良い。
【００８１】
この実施態様において、偏向は、サンプルの平面に平行な方向に沿って、且つ後者に直交する方向に沿って測定される。後者の測定は、有用なシグナルを形成するものである。同時的検出ステージによって提供されるエレクトリックシグナルは、サンプルの一つの地点から別の地点を比較するように使用されても良い。
【００８２】
経時的に安定であると想定されるサンプルに対してレーザー流の下でレファレンス測定を実施することによって、シグナルは吸収値に変換されても良く、その吸収は、分光高度計で測定可能であり、光熱的偏向測定ベンチの直線範囲に位置される。
【００８３】
実施例２：官能化支持体の調製
この実施例で選択される分子は、核酸、特にオリゴヌクレオチドである。
【００８４】
本発明の方法に従った測定サンプルを形成するための薄い生物学的層の製造は、例えば以下の二つの工程を含むことができる：
１）基体の官能化、並びに
２）オリゴヌクレオチドの接合。
【００８５】
基体の官能化
選択された支持体はシリカである。オリゴヌクレオチドは、このタイプの材料と共有結合を達成できないため、後者を官能化する。支持体の官能化は、オリゴヌクレオチドを接合可能な反応基を基体に導入するために、基体の表面を修飾する目的を有する。
【００８６】
この工程は例えば、スルホクロム混合物による支持体の第一の処理、次いでシラン化を必要とする。スルホクロム混合物での処理は、95%硫酸中の酸化クロムの飽和溶液によって実施されても良い。その目的は、支持体上に存在する有機混在物を除去し、シラノール基を作製することである。次いで、例えばトルエン溶液、1%アミノプロピルジメチルエトキシシラン(AMPMES)中での支持体のインキュベーションといった、標準的なシラン化法によって実施される。この工程の間、シランは、スルホクロム混合物での処理の間で作製されたシラノール基と反応する。アミン基を有するシランの層の形成がこれにより生じ、これによりオリゴヌクレオチドを接合することが可能である。
【００８７】
オリゴヌクレオチドの接合
捕獲分子を形成するオリゴヌクレオチドは、直接的に、またはアビジン分子を通じてのいずれかで、支持体に接合される。
【００８８】
この後者の場合、アビジンの分子を、カップリング剤、フェニレンジイソチオシアナート(PDC)を通じてシランに事前に接合する。アビジンは、小さな分子：ビオチンに対して強力なアフィニティーを提供する。それ故それは、ビオチンのオリゴヌクレオチドキャリアーを認識し、非常に強力に固定化できる。それ故支持体を、10%ジメチルホルムアミド／ピリジン0.2%PDCの溶液中でインキュベートする。支持体の洗浄と乾燥後、支持体に数ミリメーターの直径の小滴の形態で、アビジンを沈着させる。ビオチンのキャリアーオリゴヌクレオチドを、同じ場所に沈着させる。
【００８９】
実施例３：官能化支持体の使用

この工程は、試験溶液中に存在する標的分子を形成する、核酸またはその断片のハイブリダイゼーションを実施することよりなる。それは本質的に二つの工程よりなる：
1) 核酸のハイブリダイゼーション（記載される実験では、相補的オリゴヌクレオチド）；並びに
2) 非ハイブリダイズ化核酸の洗浄。
もちろん、これらの工程の前に、核酸の特別な場合では、試験溶液を得る他の準備工程を実施することが必要であっても良い。これらの工程は、抽出工程、増幅工程、及び切断工程であっても良い。

【００９０】

抽出

この抽出は、完全に標準的な態様で実施される。実際、増幅法によって後に増幅可能な材料を得ることを可能にする、いずれのDNA抽出法が使用されても良い。抽出と共に、これらの細胞溶解法、次いで核酸の精製は、遺伝学的分析のため通常推奨されるもの、またはQIAGEN S.A.社製のQIAmp Blood Kit(登録商標)のような商業的製品を使用する迅速な方法である。

【００９１】

増幅

かくして、シグナルを増幅することによって標的分子の数を増大することは賢明であろう。非常に数多くの増幅法が存在する。従来技術は、増幅される配列の特異的なプライマーを使用して核酸配列の増幅を可能にする方法を記載する。かくして、興味ある核酸の断片が、核酸の準備の間で増幅されても良い。数多くの方法が、ポリメラーゼによる伸長のためのプライマーとして機能する標的配列に相補的なオリゴヌクレオチドを使用する。

【００９２】

DNAの増幅のため、特許US-A-4,683,195、US-A-4,683,202及びUS-A-4,800,159に記載されたようなPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）、例えば特許出願EP-A-0.201.184に説明されるLCR（リガーゼ連鎖反応）、または特許出願WO-A-90/01069に記載されたRCR（修復連鎖反応）が存在する。

【００９３】

RNAの増幅のため、いくつかの方法が各種の文献に記載されている。これらの方法は、以下のものである：
－特許出願WO-A-90/06995の35S（自己維持配列複製）；
－特許出願WO-A-91/02818のNASBA（核酸配列ベース増幅）；
－特許US-A-5,194,370のSPSR（単一プライマー配列複製）；並びに
－特許US-A-5,399,491のTMA（転写介在増幅）。

【００９４】

切断

増幅産物が、大きさとして大きい核酸を形成するであろうため、切断をするのが賢明であろう。かくして、そのような標的核酸が捕獲分子にハイブリダイズする場合、標的核酸とのハイブリダイゼーションの後に形成される二本鎖はあまり安定ではない。これは、ポリヌクレオチドが検出プローブとして使用される場合もあてはまる。その理由は、立体阻害、または必ずしも同じサイズではない捕獲分子との間の特性の欠如のためであろう。それ故、シグナルの質的及び量的な損失が存在するであろう。

【００９５】

立体阻害は、核酸の長さのためだけではなく、二次構造の存在または維持のためでもあろう。切断はこれらの構造を破壊することができ、かくしてハイブリダイゼーションを最適化する。この立体阻害は、例えばAffymetrix社によって開発されたDNAチップのような、高密度で捕獲プローブを含む表面でのハイブリダイゼーションの場合に、特に重要な役割を果たす("Accessing Genetic Information with High-Density DNA arrays", M, Shee等, Science, 274, 610-614. "Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis", A. Caviani Pease等, Proc. Natl. Sci. USA, 1994, 91, 5022-5026

)。この方法では、捕獲プローブは一般的に、約２０ヌクレオチドの短いサイズを有する。

【００９６】

核酸の切断に関しては、数多くの方法が当該技術分野で記載されている。第一に切断は酵素的であっても良く、つまり核酸の断片化がヌクレアーゼ（DNアーゼまたはRNアーゼ）によって実施されても良い。次いで3'-OH、5'-OH、3'-リン酸、5'-リン酸末端を有するサイズにおいて小さい断片が作製される。

【００９７】

第二に、切断は化学的であっても良い。例えばDNAの場合、DNAの脱プリン化または脱ピリミジン化が実施され、次いでそれが「β-除去」と称される機構によって塩基の存在下で切断される。DNAの切断は、他のものとして酸化、アルキル化、遊離基の付加の機能によって実施されても良い。RNAを切断するために、しばしば例えばイミダゾールといった化学的触媒として使用される有機分子と組み合わせて、金属カチオンが使用される。この切断は、アルカリ媒体で好ましくは実施され、3'-リン酸末端を有する断片を作製する。

【００９８】

ハイブリダイゼーション

次いで、オリゴヌクレオチドを接合する支持体は、例えば６×SSPE＋0.05% Triton X-100＋20nM標的の溶液といった、相補的オリゴヌクレオチドを含む溶液中で、３５℃で３０分インキュベートされる。

【００９９】

非ハイブリダイズ化核酸の洗浄

ハイブリダイゼーションの後、ハイブリダイズしない核酸を、同じ溶液、６×SSPE＋0.05% Triton-X中で洗浄することによって除去する。

【０１００】

本発明の方法に従った検出の直前に、サンプルを洗浄溶液からとりだし、水に迅速に通過させてバッファーを除去し、核酸を「脱ハイブリダイズ」しないよう注意しながら風乾する。

【０１０１】

結果

二列のオリゴヌクレオチドピンを含むサンプルで、マッピングを実施する。各ピンは、約３ミリメーターの直径を有する。下部の列のピンは、相補性によってハイブリダイズする３２マーのオリゴヌクレオチドを含み、一方で上部の列のピンは、相補的ではない別の３２マーのオリゴヌクレオチドを含む。マッピング工程は２５０ミクロンである。

【０１０２】

測定時間を、栓子を開く前の１秒を含む、地点当たり５秒とする。それ故測定地点を、４秒間照射する。測定をこの時間の間でできるだけ迅速に実施する。各測定の間で照射される時間の遅れは、１秒の１０分の１である。それ故各測定地点で、シグナルは時間に依存して提供される。時間に従ったシグナルの変化の速度は、添付した図５中の曲線によって表される。

【０１０３】

この図において、縦軸Ｓは、吸光ユニット中のシグナルを表し、横軸ｔは秒単位の時間を表す。

【０１０４】

シグナルは、栓子を開く前にバックグランドノイズの期間を含み、栓子を開いた後急速に増大する。最大値の到達してから、測定シグナルは再び低下し、これは測定地点でのサンプルの変化を表す。マッピングの各地点で得られたシグナルを比較するために、マッピング形態にディスプレーされた値を各シグナルから差し引くことが好ましい。例えばこの値は、測定された最大値、または所定の測定時間での値であっても良い。各一時的シグナルについての十分に選択された関数を調整することが可能であり、且つ関数の調節のパラメーターの一つまたは後者の最大値を代表値として選択することも可能である。この知りフ

ェーズの後、結果をマッピング形態にディスプレーする。

【０１０５】

我々が実験的に得たマッピングは、添付の図６に示されている。それは、マッピングの各地点で測定されたシグナルの最大値に関し、最大値は１．５秒の近傍のｔについて生じた。このマッピングでは、ハイブリダイズしてもしなくても良いオリゴヌクレオチドピンが、吸収が非常に低いバックグランドから好ましくは区別される。マッピングにおいて鮮やかな青色の色彩を有する右欄のピンは、マッピングにおいて緑色から黄色の色彩を有する左側の欄のものより、低い吸収を有する；右側の欄のピンをより十分に見るためにマッピングの獲得の間で支持体の手動のシフトが存在したため、黒色の長方形は非マップ化領域に対応する。それ故マッピングの観察は、オリゴヌクレオチドがハイブリダイズするかしないかを測定するのに十分である。

【０１０６】

添付の図７Ａ及び７Ｂの棒グラフは、縦軸の二つの異なるスケールでの、与えられたシグナル強度（横軸）についてのマッピング（縦軸）の画素の数を表す。バックグランド、非ハイブリダイズ化オリゴヌクレオチド、及びハイブリダイズ化オリゴヌクレオチドに対応する３種の態様が出現するのが明らかに見られる。ハイブリダイズしてもしなくても良いピンの自動認識を可能にするイメージ処理法の使用が可能なこれらの態様は、十分に分離している。例えば単純限界により、ハイブリダイズしたピンのみ維持させることが可能であり、いくつかの吸収地点は、測定ピンから容易に区別される。

【０１０７】

実施例４：診断試験

慢性関節リウマチに感受性の遺伝学的構成成分の重要な部分は、免疫応答の調節の機構のコアで中枢の機能を有する、Tリンパ球に対するペプチドの提示に関与するHLA-DR分子のｂ鎖をコードする、HLA-DRB遺伝子と関連可能である。より正確には、HLA-DRb1分子の第三の超可変領域の70から74位に対応する５アミノ酸の特異的配列の存在が、慢性関節リウマチと関連するとして報告されている各種の対立遺伝子について見出されたことが示されている。QKRAAまたはQRRAAまたはRRRAA（アミノ酸の文字でコード）の配列に対応するこの「共有エピトープ」を含むことは、十分に文献に記載されている。

【０１０８】

しかしながら、もしこの群のDRB1★04対立遺伝子が、慢性関節リウマチと関連するであれば、現在知られている全ての対立遺伝子（DRB1★0401またはDRB1★0427）は、この疾患と必ずしも関連しない。この結果は、もし存在する対立遺伝子に従ってDRB1★04対立遺伝子の群のタイピングに制限されるのであれば、真のポジティブまたは真のネガティブに加えて、臨床医及び患者を動揺させる必要のないであろう偽のポジティブを得ることができるということを導く。

【０１０９】

分子生物学的手法の場合（DRB1対立遺伝子の分析：DRB1★01からDRB1★10の命名に従ってなされた結果）、臨床医は、DRB1★04対立遺伝子の存在に本質的に興味を有する。

【０１１０】

疾患の素因を示唆する結果の場合、DRB1★04対立遺伝子を明らかにする(1998年に公式命名に従ってDRB1★0401から0427)ために、DR4のサブタイピングとして周知である、高い解像度として知られる分子生物学的方法を使用する第二の試験が一般的に実施され、ここでDRB1★0401、0404、0405及び0408のみが、疾患と関連することが報告されている。

【０１１１】

抽出

QIAGEN S.A.社製のQIAmp Blood Kitのような前記記載の商業的製品によって、抽出を実施する。

【０１１２】

増幅

この増幅は、HLA-DRB遺伝子の公式命名に従って、コドン5から94に対応するエキソン2の

領域を含むHLA-DRローカスに関する。以下の表１は、この前記記載のローカスのPCRによる増幅の間で使用されるプライマーを記載する。それはこの増幅を実施することができる物理化学的位置の全ても与える。

【０１１３】

【表１】

表１：興味あるHLA-DR領域の同時的増幅

プライマー	－P1(5'-DRプライマー)：CCG GAT CCT TCG TGT CCC CAC AGC ACG (5'>3') －P2(3'-DRプライマー)：TCG CCG CTG CAC TGT GAA G (5'>3')
増幅混合物	－バッファー10×TEMAG(*)：10μL －dNTP(20mM)：1μL(0.2mM最終) －P1(30μM)：0.8μL(0.25μM最終) －P2(30μM)：0.8μL(0.25μM最終) －AmpliTaq(5U/μL)：0.5μL(2.5U) －DNA：100-500ng －H2O：QSP100μL
増幅プログラム	(96℃で5分)＋10×(98℃で10秒＋65℃で30秒＋72℃で30秒)＋30×(96℃で20秒＋65℃で30秒＋72℃で30秒)

(*)：バッファー10×TEMAG：500mM Tris-HCl pH8.8、150mM硫酸アンモニウム、15mM MgCl2、500μM EDTA、0.1%ゼラチン

【０１１４】

この実施例では、二つのソースP1とP2を分離する距離を、切断が実施されないように十分に短く選択する。もちろん、生産されたアンプリコンがそれを必要とするのであれば、この核酸の断片化は、前記説明された手段と条件に従って実施されても良い。

【０１１５】

官能化支持体の調製

慢性関節リウマチに対する遺伝学的素因の研究を実施することが可能なように、HLA-DRB1及びHLA-B★27対立遺伝子または対立遺伝子の群の正確な分析を可能にするオリゴヌクレオチドプローブのセットを使用して、ハイブリダイゼーション反応の群を使用することには理由がある。表２は、これらの二つの疾患の検出のために使用されるプローブの群を記載する。左から右に与えられる説明は、以下の通りである：

－　HLA命名において指定されたプローブの符号；

－　この文献での配列番号；

－　関連するHLA遺伝子；

－　このプローブを形成する配列；並びに

－　HLA遺伝子上のコドン（３ヌクレオチド）の位置。

【０１１６】

【表２】

表２：オリゴヌクレオチドプローブ

プローブ	配列番号	HLA 遺伝子	配列(5'>3')	位置 (コドン)
C+	1	DR	TTC GAC AGC GAC GTG GGG	40-45
C-	2	-	TAT GAA ACT TAT GGG GAT AC	-
4	3	DR	GAT ACT TCT ATC ACC A	29-34
QK71	4	DR	GAG CAG AAI CGG ICC *GAG CAG AAG CGG GCC*	69-73
IDE71	5	DR	CTG GAA GAC GAI CGG *CTG GAA GAC GAG CGG*	68-72
E74	6	DR	AGC AIA IGC IGG ICI AII *AGC AGA GGC GGG CCG AGG*	69-75
QR71	7	DR	CAG AGG CGI GII ICI GTG *CAG AGG CGG GCC GCG GTG*	70-75
S57	8	DR	GCC TAG CGC CGA GTA	55-60
1	11	DR	TGG CAG CTT AAG TTT GAA	9-14
52	12	DR	TAC TCT ACG TCT GAG T	10-15
2	13	DR	CAG CCT AAG AGG GAG TG	10-15
7+9	14	DR	IAG GTI GAC AIC GTG TGC *CAG GTG GAC ACC GTG TGC*	74-79
10	15	DR	GGA GGA GGT TAA GTT	8-13
8+12	16	DR	CTC TAC GGG IGA GT *CTC TAC GGG TGA GT*	10-15
3	19	DR	CCG GGT GGA CAA CIA C *CCG GGT GGA CAA CTA C*	73-78

【０１１７】

特定のプローブについての、イタリックの第二の配列は、天然の配列、つまり４種のヌクレオチド、アデノシン(A)、チミン(T)、グアニン(G)及びシトシン(C)からのみ形成される配列を特定する。他の配列は、異なるヌクレオチドによる特定のものの置換を除いて、同じヌクレオチドを有する。この場合、それはイノシンである。イノシンの使用は、ハイブリダイズする予定の配列に対して、プローブの特異性を再び改良することを可能にする。捕獲プローブの特異性は、以下の表３に明白に特定される。

【０１１８】

【表３】

表３：分子または捕獲プローブの主な特異性

プローブ	配列番号	特異性
C+	1	全てのDRB1＊
C-	2	なし
4	3	DRB1＊04
QK71	4	共有エピトープに対応するQKRAA単位を有するDRB1＊04対立遺伝子
IDE71	5	DRB1＊0402
E74	6	DRB1＊0403、0406及び0407
QR71	7	共有エピトープに対応するQRRAA単位を有するDRB1＊0100404、0405、0408及び1402対立遺伝子
S57	8	DRB1＊0405
1	9	DRB1＊01
52	１０	DRB1＊03、11、13及び14
2	１１	DRB1＊02
7+9	１２	DRB1＊07及び09
10	１３	DRB1＊10
3	１４	DRB1＊03
8+12	１５	DRB1＊08及び12

【０１１９】
これらのプローブは、前記記載のように固相支持体に次にセットアップされる。もちろん、後の分析を容易にするために、ある地点または認識部位に各タイプのプローブを配置することが適切である。
【０１２０】
この場合、ポジティブであれネガティブであれコントロールを含むことによって、１５の異なる認識領域が必要である。認識領域の数を増大するのに十分であることから、同じ固相支持体上で他の試験を実施することも可能である。
【０１２１】
【表４】

表４：固相支持体上の異なる認識領域の組織化

認識領域		認識領域	
C+	配列番号１	1	配列番号９
C-	配列番号２	52	配列番号１０
4	配列番号３	2	配列番号１１
QK71	配列番号４	7	配列番号１２
IDE71	配列番号５	10	配列番号１３
E74	配列番号６	8+12	配列番号１４
QR71	配列番号７	3	配列番号１５
S57	配列番号８		

【０１２２】
DRB1＊遺伝子の全ての対立遺伝子の検出を可能にするポジティブコントロール（配列番号１）が存在し、これはｍ、増幅が表１に記載されたプライマーP1とP2の間の興味ある領域

に明白に関連することをチェックすることが可能である。ネガティブコントロール（配列番号２）は、診断目的を有さない。それは特定のスタンダードを実現するためだけに存在する。この配列は、HLAに必ずしも特異的ではなく、HLA遺伝子で見出されないランダムな配列に対応する。

【０１２３】

配列番号３は、DRB1★04群を形成する全ての対立遺伝子のタイピングを可能にする。それは、血清学によるHLAタイピング法をDR4by群として定義する群に属する、全てのDRB1★04対立遺伝子の同定を可能にする。それは低い解像度を有するプローブに関し、つまり数多くの対立遺伝子が、後者によって認識されるであろう。

【０１２４】

配列番号４から８について、それらは、特定の配列を共有する対立遺伝子を特異化することによって、DRB1★04群を形成する対立遺伝子のいくつかのタイピングを可能にする。それは高い解像度を有するプローブに関し、つまりいくつかの対立遺伝子、あるいは唯一のもののみを、これらのプローブによって認識できるであろう。

【０１２５】

全てのこれらのプローブは、慢性関節リウマチに対する遺伝学的素因と関連する共有エピトープを有する対立遺伝子を検出するために使用される。とりわけ、配列番号４及び７のプローブは、慢性関節リウマチに対する感受性と関連する対立遺伝子の検出が可能であり、配列番号５及び６のプローブは、慢性関節リウマチに対する抵抗性と関連する対立遺伝子の検出が可能である。配列番号８のプローブは、DRB1★0405対立遺伝子の確定を可能にする。

【０１２６】

結果

以下に説明される結果では、本発明に従った分析方法で得られた結果が、実際に明白に確認されるかどうかをチェックできるように、我々は特徴が知られている試験溶液で操作した。

【０１２７】

第一の試験溶液

以下の表５は、配列番号２のプローブ（ネガティブコントロール）のシグナルの値を差し引いた、第一の試験溶液で得られたシグナル値を示す。０の値から多かれ少なかれ離れたこれらの値は、ハイブリダイゼーションが生じたか否かを推定することが可能である。０の値は、配列番号２について得られた値から有意に区別されない全ての値について付されている配列番号２のプローブについて計算された平均での標準誤差の２倍未満の偏差）。

【０１２８】

【表５】

表５：第一の試験溶液で得られるハイブリダイゼーションの結果

認識領域と関連するプローブ	シグナル（任意単位）	+/−	認識領域と関連するプローブ	シグナル（任意単位）	+/−
SEQ ID NO 1	3000	+	SEQ ID NO 9	0	−
SEQ ID NO 2	0	−	SEQ ID NO 10	0	−
SEQ ID NO 3	920	+	SEQ ID NO 11	2100	+
SEQ ID NO 4	260	+	SEQ ID NO 12	0	−
SEQ ID NO 5	0	−	SEQ ID NO 13	0	−
SEQ ID NO 6	0	−	SEQ ID NO 14	0	−
SEQ ID NO 7	0	−	SEQ ID NO 15	0	−
SEQ ID NO 8	0	−			

【０１２９】
HLA-DRの分析は、以下のことを示す：
－　配列番号１のプローブはポジティブである：HLA-DR増幅試験とハイブリダイゼーション試験は十分に機能した；
－　配列番号３及び配列番号４のプローブはポジティブである；DRB1★0401対立遺伝子が存在する；並びに
－　配列番号１１のプローブはポジティブである：DRB1★02の対立遺伝子が存在する。
【０１３０】
結論として、慢性関節リウマチに対して感受性の対立遺伝子（DRB1★0401）が存在し、第二の対立遺伝子は、慢性関節リウマチに対して中性の証拠であるDRB1★02である。
【０１３１】
第一のサンプルのHLAタイピングは、HLA-DRB1★0401/1602であった。
【０１３２】
第二の試験溶液
以下の表６は、第二の試験サンプルで得られたODの値を示す。
【０１３３】
【表６】

表６：第二の試験溶液で得られるハイブリダイゼーションの結果

認識領域と関連するプローブ	シグナル（任意単位）	+/-	認識領域と関連するプローブ	シグナル（任意単位）	+/-
SEQ ID NO 1	3000	+	SEQ ID NO 9	0	-
SEQ ID NO 2	0	-	SEQ ID NO 10	0	-
SEQ ID NO 3	310	+	SEQ ID NO 11	2700	+
SEQ ID NO 4	0	-	SEQ ID NO 12	0	-
SEQ ID NO 5	370	+	SEQ ID NO 13	0	-
SEQ ID NO 6	0	-	SEQ ID NO 14	0	-
SEQ ID NO 7	0	-	SEQ ID NO 15	0	-
SEQ ID NO 8	0	-			

【０１３４】
以下のような４種のポジティブプローブが存在する：
－　配列番号１のプローブ：HLA-DR増幅試験とハイブリダイゼーション試験は十分に機能した；
－　配列番号３のプローブ；少なくともDRB1★0401対立遺伝子が存在する；
－　配列番号５のプローブ；少なくともDRB1★0402対立遺伝子が存在する；並びに
－　配列番号１１のプローブ：少なくともDRB1★02の対立遺伝子が存在する。
【０１３５】
それ故、それは慢性関節リウマチに対する遺伝学的感受性に関与しない二つのDR4対立遺伝子、DRB1★0402及びDRB1★02に関する。
【０１３６】
この第三のサンプルのHLAタイピングは、HLA-DRB1★0402/02であった。
【０１３７】
【参考文献】

Doc. 1:

Balladur, V., Theretz, A., and Mandrand, B. Determination of the Main Forces Driving DNA Oligonucleotide Adsorption onto Aminated Silica Wafers. *J. Colloid Interface Sci* 194 (2): 408-418, 1997.

Doc. 2:

Cornell, B.A., Braach-Maksvytis, V.L.B., King, L.G., Osman, P.D.J., Raguse, B., Wieczorek, L., and Pace, R.J. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature* 387: 580-583, 1997.

Doc. 3:

Elaissari, A., Cros, P., Pichot, C., Laurent V., and Mandrand, B. Adsorption of oligonucleotides onto negatively and positively charged latex particles. *Colloids and Surfaces* 83: 25-31, 1994.

Doc. 4:

Guo, Z., Guilfoyle, A., Thiel, A.J., Wang, R., and Smith, L.M. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucl. Acids Res.* 22 (24): 5456-5465, 1994.

Doc. 5:

Kohsaka, H., Taniguchi, A., Richman, D.D., and Carson, D.A. Microtiter format gene quantification by covalent capture of competitive PCR products: application to HIV-1 detection. *Nucl. Acids Res.* 21(15):3469-3472, 1993.

Doc. 6:
Maskos, U. and Southern, E.M. Oligonucleotide hybridisations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesized in situ. *Nucl. Acids Res.* 20(7):1679-1684, 1992.

Doc. 7:
Matson, R.S., Rampal, J.B., and Coassin, P.J. Biopolymer synthesis on polypropylene supports - I. Oligonucleotides. *Analytical Biochemistry* 217:306-310, 1994.

Doc. 8:
Noy, A., Vezenov, D.V., Kayyem, J.F., Meade, T.J., and Lieber, C.M. Stretching and breaking duplex DNA by chemical force microscopy. *Chem. Biol.* 4(7):519-527, 1997.

Doc. 9:
Pease, A.C., Solas, D., Sullivan, E.J., Cronin, M.T., Holmes, C.P., and Fodor, S.P. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:5022-5026, 1994.

Doc. 10: Porath, J., Carlsson, J., Olsson, T., and Belfrage, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258(5536):598-599, 1975.

【図面の簡単な説明】
【図１】　図１は、本発明の方法に従った光熱的偏向の検出における、励起ビームとプローブビームの交軸方向の配置（図１ａ）と同一線上の配置（図１ｂ）の模式図である。
【図２】　図２は、プローブビームの偏向を検出するための各種の配置の模式図である。
【図３】　図３は、本発明に従った熱的偏向法によるサンプルの吸収の測定の模式図である。
【図４】　図４は、本発明の方法を実施するための装置を説明する線図である。
【図５】　図５は、本発明の方法に従った、核酸よりなるサンプルの吸収の測定について

の結果を示すグラフである。
【図６】　図６は、二つの列のオリゴヌクレオチドパッドを含むサンプルで実施された、本発明の方法に従った検出のマッピングである。
【図７】　図７Ａ及び７Ｂは、図６のマッピングの画素の数を表す棒グラフである。
【符号の説明】
１　：励起ビーム
３　：プローブビーム
５　：プローブビーム
７　：測定サンプル
９　：２象限検出器
１１：スポット
１３：カバー
１５：励起ビーム
１７：プローブビーム
１９：275nmアルゴンレーザー
２１：ミラー
２３：機械的チョッパー
２５：レーザービーム
２７：点形成ミラー
３１：測定サンプル
３２：プローブレーザー
３３：４象限ダイオード
３４：測定セル

【図１】

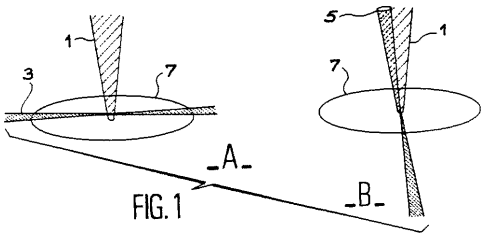


FIG. 1

【図２】

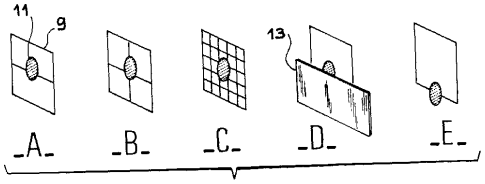


FIG. 2

【図３】

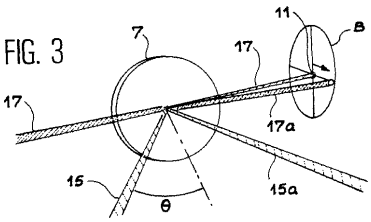


FIG. 3

【図４】

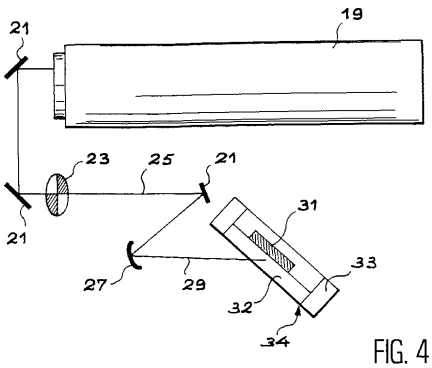


FIG. 4

【図５】

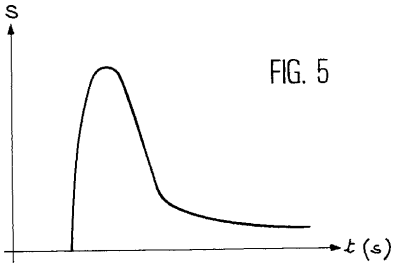


FIG. 5

【図６】

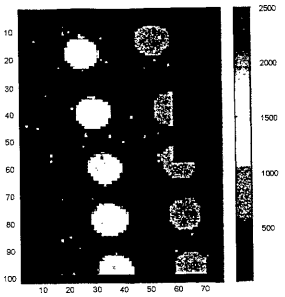


FIG. 6

【図７Ａ】

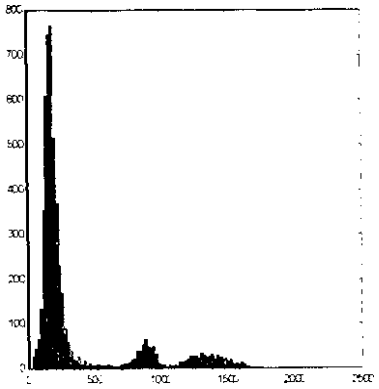


FIG. 7A

【図７Ｂ】

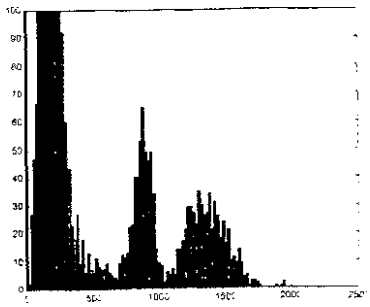


FIG. 7B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
G01N 21/41	***(2006.01)***	G01N	21/41	Z
G01N 33/483	***(2006.01)***	G01N	33/483	D
G01N 33/53	***(2006.01)***	G01N	33/53	M
G01N 33/566	***(2006.01)***	G01N	33/566	
G01N 37/00	*(2006.01)*	G01N	37/00	102

(74)代理人 100089037
弁理士 渡邊 隆
(74)代理人 100101465
弁理士 青山 正和
(74)代理人 100094400
弁理士 鈴木 三義
(74)代理人 100107836
弁理士 西 和哉
(74)代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦
(74)代理人 100110364
弁理士 実広 信哉
(72)発明者 パトリック・シャトン
フランス・Ｆ－３８５７０・テイ・”ルートル”（番地なし）
(72)発明者 ルドヴィック・プピネ
フランス・Ｆ－３８１７０・セイシネ・アヴニュ・ヴィクトル・ユーゴ・１６２
(72)発明者 フレデリック・ギノ
フランス・Ｆ－３８３４０・ヴォルップ・リュ・デュ・ジェネラル・ルクラーク・５５
(72)発明者 アルメル・ノヴェリ・ルソー
フランス・Ｆ－３８１８０・セイサン・リュ・デュ・パルク・２９

審査官 高橋 亨

(56)参考文献 実開平０６－０７２０４９（ＪＰ，Ｕ）
米国特許第０５８７４２１３（ＵＳ，Ａ）
米国特許第０５８４３６５５（ＵＳ，Ａ）
K.Adehelm, K.Haupt, H.P.Saultz, H.G.Walther, Development of a sensitive detection system based on the photothermal effect biomolecular interaction studies, Proceedings of Biomedical Optoelectronics in Clinical Chemistry and Biotechnology, 米国, The Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, １９９５年 ９月１４日, Vol.2629, pp.325-333
北森武彦，熱レンズ顕微鏡と非発光性分子の単一分子定量，蛋白質 核酸 酵素，日本，共立出版株式会社，１９９９年 ８月 １日，Vol.44 No.10，pp.1527-1531

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
G01N 25/16
JSTPlus(JDreamII)