

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4672365号
(P4672365)

(45) 発行日 平成23年4月20日(2011.4.20)

(24) 登録日 平成23年1月28日(2011.1.28)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 33 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願2004-518823 (P2004-518823)
 (86) (22) 出願日 平成15年7月4日(2003.7.4)
 (65) 公表番号 特表2005-532058 (P2005-532058A)
 (43) 公表日 平成17年10月27日(2005.10.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/FI2003/000544
 (87) 国際公開番号 W02004/005545
 (87) 国際公開日 平成16年1月15日(2004.1.15)
 審査請求日 平成18年6月30日(2006.6.30)
 (31) 優先権主張番号 20021325
 (32) 優先日 平成14年7月5日(2002.7.5)
 (33) 優先権主張国 フィンランド(FI)

(73) 特許権者 500020771
 ヴァルティオン・テクニッリネン・トウト
 キムスケスクス
 フィンランド、エフイーエンーO2150
 エスポー、ヴオリミエヘンティエ5番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100116311
 弁理士 元山 忠行
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74) 代理人 100127638
 弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 混合物中のポリヌクレオチドの定量のための方法および試験キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

分解を達成するためのサイズまたは質量に基づく分画と組み合わせて溶液ハイブリダイゼーションを用いてポリヌクレオチド混合物中の複数の個別のリボポリヌクレオチドの量または相対的比率を定量する方法であって、以下の連続工程を含むことを特徴とする方法：

(a) あらかじめ決定された数の可溶性ポリヌクレオチドプローブを含む、1または複数の組織化されたプールを用意する工程、ここで、該ポリヌクレオチドプローブの数は2～500であり、各プローブはサンプルにおける個別の標的リボポリヌクレオチドに相補的であり、分析物リボポリヌクレオチドと比較してモル量において過剰に存在し、そして各プローブのハイブリダイズするヌクレオチドは同数であり、かつプローブは該ポリヌクレオチドプローブにサイズまたは質量を変化させる1または複数の分解可能化タグを付与することにより区別可能となるものであり、それによって、ハイブリダイゼーションまたは捕捉反応に影響を与えることなく、分画、分離または記録システムにおいてポリヌクレオチドプローブが異なる易動度を有することになり、該プールはその独自の容器に組織化された状態で配置されているものであり、それら容器は分離しているか結合している；

(b) 標的リボポリヌクレオチドの混合物を含むサンプルから単離した分析物リボポリヌクレオチドに少なくとも1つのアフィニティータグを付与する工程；そしてその後、

(c) 工程(i)および(ii)を同時に、または(i)から(ii)の順で連続して行う工程；ここで工程(i)および(ii)は以下である：

10

20

(i) 工程(a)からのモル量において過剰の可溶性ポリヌクレオチドプローブおよび工程(b)からの分析物リボポリヌクレオチドの間でハイブリダイゼーション反応を起こさせ、可溶性ハイブリッドの定量的形成を導く工程；
(ii) 分析物リボポリヌクレオチドのアフィニティータグのアフィニティーペアを備えた分離補助手段にハイブリッドを定量的に捕捉することにより、工程(i)で定量的に形成したハイブリッドを回収する工程；
(d) 分離補助手段上に捕捉されたアフィニティータグ付加されたサンプルリボポリヌクレオチドおよびアフィニティータグ付加されたハイブリッドを洗浄する工程、
(e) 分離補助手段に捕捉されたハイブリッドから非修飾形態におけるポリヌクレオチドプローブを定量的に遊離させる工程；および、
(f) その量がサンプルにおける分析物リボポリヌクレオチド混合物中の相補的標的リボポリヌクレオチドの量に対応する、区別可能なプローブを分離し、その量または相対的比率を記録する工程。

10

【請求項 2】

個体におけるポリヌクレオチド転写産物の量または相対的比率の動的変化を測定するための請求項 1 の方法であって、可溶性ポリヌクレオチドプローブが、生物において発現する転写産物の亜群、種、亜種に特異的なゲノム内配列からの選択されたある程度保存された領域または超可変領域とハイブリダイズする種または群-特異的リボポリヌクレオチドから設計される方法。

【請求項 3】

20

混合標的集団を含むサンプルから単離された分析物リボポリヌクレオチドがメッセンジャーRNA (mRNA)であることを特徴とする請求項 2 の方法。

【請求項 4】

標的集団におけるリボポリヌクレオチドの量または相対的比率の動的変化を測定するための請求項 1 の方法であって、可溶性デオキシリボポリヌクレオチドプローブが異なる系統発生レベルに特異的および/または異なる系統発生レベルを表すゲノム内配列からの選択されたある程度保存された領域または超可変領域とハイブリダイズする種または群-特異的リボポリヌクレオチドから設計され、混合標的集団における亜群、種、亜種の同定を可能にする方法。

【請求項 5】

30

混合標的集団を含むサンプルから単離されたりボポリヌクレオチド分析物がリボゾームRNAを含むことを特徴とする請求項 4 の方法。

【請求項 6】

分解可能化タグが、同時にトレーサー、アフィニティーおよび/またはプライマータグとしても作用しうることを特徴とする請求項 1 の方法。

【請求項 7】

分解可能化タグが篩媒体において分離可能であることを特徴とする請求項 1 の方法。

【請求項 8】

アフィニティーおよび/またはプライマータグとしても作用しうる分解可能化タグがオリゴヌクレオチド残基であることを特徴とする請求項 7 の方法。

40

【請求項 9】

アフィニティーおよび/またはトレーサータグとしても作用しうる分解可能化タグがアミノ酸またはペプチドであることを特徴とする請求項 7 の方法。

【請求項 10】

トレーサータグとしても作用しうる分解可能化タグが蛍光、発光、赤外吸収、電磁気特性、放射能および酵素活性によって記録可能な標識からなる群から選択されることを特徴とする請求項 7 の方法。

【請求項 11】

個別の、定量的に捕捉され、遊離したポリヌクレオチドプローブの量が、適用した分解可能化タグに応じて選択される完全にまたは部分的に自動化された記録システムによって

50

記録されることを特徴とする請求項 1 の方法。

【請求項 1 2】

記録システムが分解可能化タグに応じて質量分析、電気泳動またはクロマトグラフィー技術から選択されることを特徴とする請求項 1 1 の方法。

【請求項 1 3】

定量的に回収されたプライマータグ付加されたプローブの量が、プローブが遊離され、その後増幅され、所望によりPCR-反応前、反応中あるいは反応後にトレーサータグ付加された後に、分解可能化タグに応じて選択された記録システムによって記録されることを特徴とする請求項 1 から 1 2 のいずれかの方法。

【請求項 1 4】

プライマーが普遍的プライマーであることを特徴とする請求項 1 3 の方法。

【請求項 1 5】

ポリヌクレオチドプローブが、安定なDNA断片、合成または組換えポリヌクレオチドあるいは修飾ポリヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 の方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 の方法であって、リボポリヌクレオチドの集団または混合物における個別のリボポリヌクレオチドの量の変動の比較、定量評価が複数の試験キットのセットを提供することにより実施され、比較される各サンプルについて少なくとも1つの試験キットが提供され、該試験キットはそれぞれあらかじめ決定された数の可溶性ポリヌクレオチドプローブを含む1または複数の同一の組織化されたプールを含み、ここで、該ポリヌクレオチドプローブの数は2～500であり、各プローブがサンプルにおける個別の標的リボポリヌクレオチドに相補的なDNAであり、サンプルにおける標的リボポリヌクレオチドと比べてモル量において過剰に存在し、そして各プローブは、同数のハイブリダイズするヌクレオチドを有し、かつ各プローブは該ポリヌクレオチドプローブにサイズまたは質量を変化させる1または複数の分解可能化タグを付与することより区別可能になるものであり、それによって、ハイブリダイゼーションまたは捕捉反応に影響を与えることなくポリヌクレオチドプローブが分画、分離または記録システムにおいて異なる易動度を有するものとなり、ポリヌクレオチドプローブの各プールが分離していても互いに結合していてもよい独自の容器に組織化されて配置されていることを特徴とする請求項 1 の方法。

【請求項 1 7】

個別の試験キットにおける分解可能化タグがトレーサータグではなく、複数の試験キットのセットが発光シグナルによって互いに区別可能なトレーサータグを備えていることを特徴とする、請求項 1 6 の方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 - 1 7 のいずれかの方法を行うための試験キットであり、試験キットがあらかじめ決定された数の可溶性ポリヌクレオチドプローブを含む1または複数の組織化されたプールを含み、ここで、該ポリヌクレオチドプローブの数は2～500であり、各プローブがサンプルにおける個別の標的リボポリヌクレオチドに相補的であり、サンプルにおける分析物リボポリヌクレオチドと比べてモル量において過剰に存在し、それぞれのハイブリダイズするヌクレオチドは同数であり、かつ、各プローブにサイズまたは質量を変化させる1または複数の分解可能化タグを付与することよりポリヌクレオチドプローブが区別可能になるものであり、それによって、ハイブリダイゼーションまたは捕捉反応に影響を与えることなくポリヌクレオチドプローブが分画、分離または記録システムにおいて異なる易動度を有するものとなり、ポリヌクレオチドプローブの各プールが分離していても互いに結合していてもよい独自の容器に組織化されて配置されている試験キット。

【請求項 1 9】

個体におけるポリヌクレオチド転写産物の量または相対的比率の動的变化を測定するための請求項 1 8 の試験キットであって、可溶性ポリヌクレオチドプローブが生物において発現する転写産物の亜群、種、亜種に特異的なゲノム内配列からの選択されたある程度保存された領域または超可変領域とハイブリダイズする種または群-特異的リボポリヌクレ

10

20

30

40

50

オチドから設計されることを特徴とする、請求項 18 の試験キット。

【請求項 20】

混合標的集団を含むサンプルから単離されたりボポリヌクレオチド分析物がメッセンジャーRNA(mRNA)を含むことを特徴とする請求項 18 の試験キット。

【請求項 21】

標的集団におけるリボポリヌクレオチドの量または相対的比率の動的变化を測定するための請求項 18 の試験キットであって、可溶性ポリヌクレオチドプローブが異なる系統発生レベルに特異的および/または異なる系統発生レベルを表すゲノム内配列からの選択されたある程度保存された領域または超可変領域とハイブリダイズする種または群-特異的リボポリヌクレオチドから設計され、混合標的集団における亜群、種、亜種の同定を可能にする試験キット。

10

【請求項 22】

混合標的集団を含むサンプルから単離されたりボポリヌクレオチド分析物がリボゾームRNAを含むことを特徴とする請求項 21 の試験キット。

【請求項 23】

分解可能化タグが、同時にトレーサー、アフィニティーまたはプライマータグとしても作用しうることを特徴とする請求項 18 の試験キット。

【請求項 24】

分解可能化タグが篩媒体において分離可能であることを特徴とする請求項 23 の試験キット。

20

【請求項 25】

アフィニティータグおよび/またはプライマータグとしても作用しうる分解可能化タグがオリゴヌクレオチド残基であることを特徴とする請求項 24 の試験キット。

【請求項 26】

アフィニティーおよび/またはトレーサータグとしても作用しうる分解可能化タグがアミノ酸またはペプチドであることを特徴とする請求項 24 の試験キット。

【請求項 27】

さらにトレーサータグとしても作用しうる分解可能化タグが蛍光、発光、赤外吸収、電磁気特性、放射能および酵素活性によって記録可能な標識からなる群から選択されることを特徴とする請求項 24 の試験キット。

30

【請求項 28】

ポリヌクレオチドプローブの可溶性プールがマイクロタイタープレート上のウェルに配置されることを特徴とする請求項 18 の試験キット。

【請求項 29】

ポリヌクレオチドプローブが、安定なDNA断片、合成または組換えポリヌクレオチドあるいは修飾ポリヌクレオチドであることを特徴とする請求項 18 の試験キット。

【請求項 30】

リボポリヌクレオチドの集団または混合物における個別のリボポリヌクレオチドの量の変動の比較、定量評価のための、2以上の請求項 18 の試験キットのセットであって、該セットが、比較される各サンプルのため、同一のポリヌクレオチドプローブのプールを含む少なくとも2つの同一の試験キットを含むことを特徴とするセット。

40

【請求項 31】

該セットにおける各個別の試験キットが、発光シグナルによって互いに区別可能なトレーサータグを備えていることを特徴とする請求項 30 のセット。

【請求項 32】

衛生学的状況、疫学的状況、微生物集団に対する外部刺激または処置手段の効果の評価のための請求項 30 のセット。

【請求項 33】

外部刺激または処置が抗生物質処置または衛生学的手段からなる群から選択される、請求項 32 のセット。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、およそ同数のヌクレオチドを有するポリヌクレオチドプローブ混合物を用いてポリヌクレオチド配列の混合物から、存在する複数の個々の標的ポリヌクレオチド配列の量または相対的比率の定量を同時に行うための方法および試験キットに関する。該方法および試験キットにより、生物の混合物を含むサンプル、即ち標的集団に存在する多数の個体および関連亜集団の動的変化の定量が可能となる。本発明は、定量的アフィニティ補助溶液ハイブリダイゼーションおよび分解提供分画(resolution providing fractionation)の組み合わせに基づく。本発明は国際特許出願W002/055734号に開示の発明と密接に関連しており、該出願においては、プローブ混合物の個々のポリヌクレオチド配列が異なる区別可能なサイズを有する。これに対して、本発明の認識用プローブはおよそ同数のヌクレオチドを有する。本発明の方法および試験キットは、保健医療、環境調査、医薬産業および食品産業に有用であり、多くのその他の、診断、生物学および科学目的に適用することが出来る。

10

【背景技術】

【0002】

急速に蓄積しつつある遺伝情報と膨大な量の情報の操作を可能にするコンビナトリアル・ケミストリーおよびバイオインフォマティクスの組み合わせにより、自然環境における動的状況および変動の同時および／または逐次研究を可能にする、新規なより正確な方法が要求されるようになった。したがって、分子生物学、保健医療、疫学、製薬および食品産業における研究を行うための全く新しいアプローチが要求されている。

20

【0003】

保健医療ならびに製薬および食品産業において、特に、開業医、環境専門家、産業衛生士、安全管理者、衛生指導員、環境専門家、獣医および／またはその他の健康または疫学リスクの可能性の評価に関し責任のある人々により、生物の全集団に対する治療上、衛生上またはその他の効果を評価する新規な有効な手段が求められている。例えば、衛生上および治療上の手段を含む新規および従来の治療様式の効果を評価するための方法および手段に対する要求が高まっている。

【0004】

30

遺伝的キー要素の入手可能性およびその生物学的役割と機能についての知識を含む、蓄積しつつある情報に基づいて、新たな方法が次々と開発されている。強力な新規な手段は、オリゴマー-チップ技術である。マイクロアレイ技術に共通の特徴であって、本発明とは異なる特徴は、試薬として用いられるプローブまたはポリヌクレオチド配列が固体支持体に固定化または結合されていることである。プローブの固定化は立体障害として作用し、ハイブリダイゼーションが化学量論的に起こるのを妨げ、その結果低収率となってしまう。オリゴマー-チップ技術は膨大な量のサンプルの同時操作を可能とするが、結果は定量的ではなく、広いダイナミック・レンジでの定量的比較を行うことができない。

【0005】

アフィニティ補助溶液ハイブリダイゼーションの原理は周知であり、例えば、米国特許第6136531号および米国特許第4968602号に開示されている。質量分析法を用いるDNAの診断および検出が、例えば、米国特許第6043031号および国際特許出願W099/37663号に記載されている。

40

【0006】

米国特許第5807682号は、同じ遺伝子における1または複数の突然変異部位を検出するためのアフィニティ補助溶液ハイブリダイゼーションおよび分画を適用する方法を開示している。プローブは短いオリゴヌクレオチド配列であり、ハイブリダイゼーション温度が非常に重要であるため、多数のプローブを同時に用いるのが困難である。というのはかかる多数のプローブは異なる融点を有する傾向にあるからである。特異的突然変異部位を同定するこれらの1または複数のプローブを、選択的に化学合成した非荷電ポリマーでブ

50

ローブを修飾することによって分離同定する。かかるポリマーは、電荷/分画障害を変化させ、非ふるい媒体(non-sieving medium)中でプローブを異なる速度で移動させる。

【0007】

上記方法はいずれも、複数の異なるポリヌクレオチドを同時に定量する方法を提供するという課題に挑むものではない。

【0008】

国際特許出願W002/055734号において、定量的結果を得るという課題を解決する方法および試験キットが記載されている。該特許出願は、細胞または組織サンプルにおけるポリヌクレオチドの定量またはその量の変動を測定するための試薬を含む方法および試験キットを開示する。該方法および試験キットは、16から数千塩基対の範囲の異なる、互いに区別できるサイズを有する可溶性ポリヌクレオチドプローブの組織化されたプールを適用するものである。該定量的方法は、例えば、転写プロファイルまたは発現パターンにおける変動の比較評価を可能にする。該方法は、可溶性ポリヌクレオチドプローブの異なる区別可能なサイズに基づくものである。個々の核酸配列の評価を可能にするのはプローブのサイズにおける差異である。

10

【0009】

ある程度保存された領域または超可変領域からのプローブは様々な生物の、群、属、種または亜種を含む系統発生レベルでの分類および組織化を可能にすることが知られている。該プローブを用いる混合物中の個体、その亜集団の量の定量的評価は標的集団における動的变化研究を可能にするであろう。残念なことに、国際特許出願W002/055734号に開示されている方法はおよそ同数のヌクレオチドを有するポリヌクレオチド配列であるプローブには適用できない。というのは結果の読みの十分な分解能が達成できないからである。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、本発明の目的は、健康上のリスクの調査や評価にたずさわりの回復その他の治療手段を必要とする専門家がリスクや治療法の評価についての定量的データを得ることが出来るような新規かつ有効な手段を提供することである。

【0011】

本発明の目的は、個体または集団における一定の亜群の量および相対的比率の定量のためだけでなく、細胞内で起こる内因性または固有の制御機構あるいは生物または生物集団あるいはそのポリヌクレオチドに外部から与えられる選択された手段または処置による集団における逐次変化の比較評価を可能とする方法および試験キットを提供することである。様々な場所から得られたサンプルにおける集団の比較評価も本方法によって行うことが出来る。同時に本発明の目的は、その他の手段では検出限界を下回るであろう非常に少量の分析物ポリヌクレオチドの定量を可能とする、非常に感度の高い試験を提供することである。これはサンプル中のプローブの配列に相補的な配列を有する分析物ポリヌクレオチドの量に対応する、プローブのPCR-増幅によって達成される。分析物ポリヌクレオチドに対してプローブが過剰量存在することから、プローブはPCR-増幅の前に定量的に回収および遊離される。

30

40

【0012】

本発明および国際特許出願W002/055734号に記載の方法および試験キットの利点には、分析すべきポリヌクレオチド調製物、特にRNAの質が重要ではないという事実が含まれる。例えば、RNAはその不安定性のために特別の処理が必要であることが知られているが、定量的評価のための分解可能化タグを付加することなく用いることが出来る。固定化工程および特定の市販の試薬を含める必要が無い試験キットの製造により、所与の生物または関連生物における遺伝子の特定のサブセットに着目する、容易に適用できるテイラーメード試験の調製が可能となる。

【0013】

該方法は完全に自動化または半自動化された構成として用いることが出来る。工程をい

50

くつかの段階で止めることが出来る。サンプルおよび反応産物は十分なデータが収集されるまで、あるいは結果の加工及び記録を続けるのにより好適となるまで保存することが出来る。

【課題を解決するための手段】

【0014】

(発明の概要)

要約すると、本発明は、混合物における複数の別のポリヌクレオチド配列の量および/または相対的比率の変化および変動の同時かつ定量的な記録を可能にするものである。該方法および試験キットにより、異なる場所または異なる時点、即ち特定の内部または外部処理または処置の前後に採取したサンプルまたは混合集団プールからの個体またはその亜群の量および/または相対的比率の測定が可能となる。これは特に、抗菌処理、衛生学的手段その他の処置を含む、標的集団に与えられた様々な物理的および化学的刺激の効果および影響を研究するのに有用である。本発明はまた、集団の内部変化の評価も可能とする。本発明は複数の生物学的現象の同時比較評価を可能とする。

10

【0015】

本発明の方法および試験キットは定量的であるだけでなく、非常に感度の高いものであり、少量のポリヌクレオチド配列の定量的検出を可能とする。本発明の方法および試験キットの特徴および用途は請求の範囲に規定される。

【0016】

(発明の詳細な記載)

20

本発明に用いられる用語は、組換えDNA技術および核酸ハイブリダイゼーション技術の分野で通常有する意味を有する。しかし本発明においていくつかの用語は、より広いまたはいくらか異なる意味で用いられる。それゆえ用語のいくつかを以下により詳細に定義する。

【0017】

(定義)

「標的集団」との語は、様々のいくらか関連のある個体を含むサンプルに存在する、いくつかの異なる個体の混合物を意味し、これは例えばそれらの系統発生関係にしたがって群または亜集団において編成されているものでもよい。かかる混合標的集団の例は、生きているか死んでいる生物を含むか含んでいたすべての粗サンプルにみられ、生物としては、細菌、真菌酵母、植物および動物等が含まれる。環境研究は例えば、汚染土壌サンプルから行ってもよい。腸に生息する細菌集団は衛生士にとって興味のあるものである。サンプル中のサルモネラ菌 (*Salmonella*)、赤痢菌 (*Shigella*) および大腸菌 (*E.coli*) の量または相対的比率は、食品産業、レストラン及び台所における衛生学的標準および健康リスクを示す。酵母集団を酵母菌属 (*Saccharomyces*)、トルロプシス属 (*Torulopsis*)、カンジダ (*Candida*) などの存在についてチェックすることが出来る。かかる情報は、例えば、汚染物の存在を排除するために重要である。アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、アオカビ属 (*Penicillium*)、トリコデルマ属 (*Trichoderma*) およびその他の真菌の量または相対的比率は建物における真菌による汚染の指標として利用できる。最終的に迅速な救命結果を提供する該方法の別の用途は、抗生物質耐性細菌によっておこる疾患を患う患者からのサンプルに対する特定の抗生物質の効果の評価である。本発明の方法により分類および試験され得る植物およびヒトを含む動物でさえ集団を形成する。

30

40

【0018】

生物には、生物の同定およびその群または亜集団における組織化を可能にする、好ましくは高度に保存された領域、部分的に保存された領域、または超可変領域を含む、特徴付けされているか、部分的に特徴付けされているか、特徴付けされていないゲノムを有するあらゆる単細胞または多細胞生物が含まれる。標的集団は生きている生物を含むか含んでいたいずれの標本由来であってもよく、生物としては、微生物、植物、動物およびヒトが含まれる。大腸菌、出芽酵母およびヒトのゲノムは現在ある程度完全に特徴付けされているゲノムを有する生物の代表である。多型の存在は本発明の特に興味深い目的である。

50

【 0 0 1 9 】

本発明において、集団は該集団を含むサンプルから単離されたポリヌクレオチド混合物の形態にて評価される。サンプルポリヌクレオチド混合物は、個別のポリヌクレオチド配列およびその群を含み、それらは共通の、ある程度保存されたプローブによって同定される。集団は様々な系統発生レベルを表す亜集団、例えば、群、属、種または亜種に分けることが出来る。該個別のポリヌクレオチド配列およびその亜群の量または相対的比率を評価することにより、逐次的サンプルの採取または異なる場所からのサンプルの比較による、ポリヌクレオチド配列の混合物または標的集団において起こる生物または個別のポリヌクレオチド配列の量および/または相対的比率の動的变化を評価することが出来る。

【 0 0 2 0 】

サンプルにおけるポリヌクレオチド配列、即ち分析物はいずれのサイズであってもよいことに注目されたい。一般に、それらはある程度断片化したポリヌクレオチド配列である。本発明において同定に用いられる試薬またはプローブは、およそ同数のヌクレオチドを有するポリヌクレオチド配列である。ポリヌクレオチドプローブに分解可能化タグを付与することによって区別可能なサイズにより識別できるものとなる。分解可能化タグは、例えば、アフィニティータグ、プライマータグとして作用するものであってもよいし、単に分解可能化トレーサータグとして作用するものであってもよい、ポリヌクレオチド配列である。本発明において、オリゴヌクレオチドは2-12塩基対からなり、プローブは15塩基対より大きい、例えば18-35 塩基対であるのが好ましい。特に、PCR-増幅が用いられるより感受性の高い本発明の方法の態様では、プローブはより多い塩基対、好ましくは少なくとも30塩基対であるのがよい。それゆえ、本発明のプローブはポリヌクレオチド配列として定義される。原則として、上限はないが、短いプローブがより経済的で調製および操作が容易であることは自明である。長いプローブはまた、短い分解可能化タグの付加によって区別可能にすることがより困難である。したがって、本発明の特徴によって解決される特定の課題はポリヌクレオチドプローブの長さではなく、およそ同数のヌクレオチドを有するポリヌクレオチド配列を、結果の正確な読みを可能にするためにいかに有効に区別可能とするかということである。

【 0 0 2 1 】

「プール」との語は、可溶性または可溶化可能なポリヌクレオチドプローブ、即ち、比較的短いおよそ同数のヌクレオチドを有する、即ち同じサイズのポリヌクレオチドであって、サンプルの混合物中の、所望の標的ポリヌクレオチド配列に相補的であってそれゆえ所望の標的ポリヌクレオチド配列を同定することが出来る、ポリヌクレオチドプローブのサブセットまたはライブラリーを意味する。各プールは任意に決定された数のポリヌクレオチドプローブを含む。便宜的には任意の数は、例えば、およそ10プローブである。しかし、本方法には2または3のプローブを用いてもよいが、プローブのより便宜な数は各プールごとに5以上のプローブである。数百の可溶性プローブを含むプールを備えた試験キットを調製して本発明の定量的および/または比較的方法に用いてもよい。数千のプローブを含むプールを調製することも可能であるが、結果を読む際に十分な解像度を得るために好ましい上限はおよそ300-500種のプローブである。言い換えると、プローブは互いに質量分析、クロマトグラフィーまたは電気泳動技術によって区別できるものでなければならない。プールは「組織化されている」といわれるが、これは各プールの中身が既知であり、組織化され、規定され、認識可能な様式で、同定を可能とするために印をつけたり、名前をつけたりされていてもよい独自の容器に配置されているからである。例えば一連のプール同一のマイクロウェルプレートに調製されている場合、各ウェルはその中身だけでなく、その位置によっても特徴付けされている。したがって、同定を正確に行うことが可能である。

【 0 0 2 2 】

本発明において、「ポリヌクレオチドプローブのプール」とは、選択されたポリヌクレオチドプローブから出来た可溶性ポリヌクレオチド配列、即ちDNA断片のセットまたは混合物であって、例えば保存モチーフなどの共通のポリヌクレオチド配列を有する生物の所

10

20

30

40

50

望の群を同定することができるものである。かかる共通のポリヌクレオチド配列は周知であり、ある程度保存された領域を含み、特にリボゾームRNA(rRNA)などにおいてみられるが、ポリヌクレオチド配列を含むその他の組織およびオルガネラにも存在する。

【0023】

リボゾームはすべての生細胞に存在し、タンパク質とリボゾームRNA(rRNA)からなることが知られている。該rRNAは交互の保存領域と可変領域からなり、9つの可変領域がみられ、例えば、細菌16SrRNAにおけるものが挙げられる(図5)。rRNA遺伝子(rDNA)はrrn オペロン中に組織化されており、ここでrDNA遺伝子は超可変スペーサー領域によって分離されている。ほとんどの生物はいくつかのrrn オペロンをゲノム中に有しており、多くの場合、構造rRNAのゲノム内(intragenomic)配列は高度に類似している。rDNA配列データ、特に小サブユニットrDNAの分析により異なる系統発生レベル;群、属、種または亜種に特異的な情報を含む遺伝子配列における可変領域が明らかとなった(図6)。したがって、特定の生物に特有の配列を見いだすことが出来る。これを利用して細菌およびその他の微生物の検出および同定のための種および群特異的核酸プローブの設計が行われてきた。多数の生物にある程度共有されている、ある程度保存された領域またはモチーフにより、標的集団中の個体を特定の群または亜集団に組織化させることが出来る。それゆえ、標的集団中の個体および亜群の変動の同定および比較評価も可能となる。その他の起源からのDNAおよびRNAもいくつかの可変領域および保存領域を含み、これを標的集団における個体または特定の亜群の特異的同定に利用できる。その他の遺伝子に対するポリヌクレオチドプローブおよび対応するメッセンジャーRNA(mRNA)も、機能的特性、例えば細菌における抗生物質耐性および遺伝子アレル多型のモニターに使用することができる。

【0024】

「過剰」との語は、定量に必須である正確な読みを達成するために、サンプル中の分析物ポリヌクレオチドと比較してポリヌクレオチドプローブがモル過剰に存在することを意味する。正確な読みのためには、可溶性ポリヌクレオチドプローブはモル過剰、即ち過剰に存在する必要がある、そして例えば質量によって区別可能でなければならない。

【0025】

本発明において、「区別可能性」はいわゆる「分解可能化タグ」を備えたプローブを提供することによって達成される。生物の関連群の同定を可能にし、本発明の用途に特に有用な本発明のポリヌクレオチドプローブは一般に、およそ同数のヌクレオチドを有する。使用前に、該ポリヌクレオチド配列に、サイズに基づく分離、分画または記録システムにおいてそれらを区別可能とする特徴を修飾または付与するとよい。これはポリヌクレオチド配列の末端に「分解可能化タグ」を付加することによって達成され、かかるタグによりプローブの質量が変化し、それによって用いられる分画、分離、または記録システムにおいて異なる易動度を備えさせることが出来る。好ましくは、分解可能化タグは同時にアフィニティー、トレーサーまたはプライマータグとしても作用するものである。好ましくは、該タグは所望の複数の機能を有するのがよい。

【0026】

例えば、定量される標的ポリヌクレオチドに対して過剰に存在するポリヌクレオチドプローブに以下のようなポリヌクレオチド配列を備えさせてもよい：ポリA、ポリT、ポリU、ポリC、ポリG、混合ポリヌクレオチド、例えば、ポリAT、ポリGCまたはその他のヌクレオチドの組み合わせあるいはその他のこれらの混合物を含むその他のオリゴヌクレオチド配列。分解可能化タグであるだけでなく、これらのオリゴヌクレオチド配列は、アフィニティータグおよびプライマータグとしても作用することが出来る。トレーサータグまたは標識、例えば異なるサイズのフルオロフォアは検出を可能にするだけでなく、サイズまたは質量において十分な差を有する場合、分解可能化タグとしても有用である。ハイブリダイゼーション反応を阻害しないアミノ酸またはペプチドも分解可能化タグとして利用できるが、これらもアフィニティータグおよびトレーサータグとして作用しうる。ペプチド・オリゴヌクレオチド接合体の合成にはいくつかの戦略が報告されており、いずれも本発明に適用することが出来る。ハイブリダイゼーションを阻害しないように、分解可能化タグ

はプローブの一方の末端にのみ付着させるのが推奨される。しかし、プライマーをタグとして用いる場合、それらは当然プローブの両端に位置づけられる。

【 0 0 2 7 】

「トレーサータグ」は、プローブの検出および/または記録を可能にする標識またはマーカを意味する。本発明の基本的な態様において、トレーサータグは検出可能または記録可能なマーカまたは標識、例えばフルオロフォアである。トレーサータグは好ましくはプローブの一方に末端に付着させるのがよいことに注目されたい。プローブはトレーサーがプローブと分析物との間のハイブリダイゼーション反応を阻害することがないように末端タグ付加される。本発明において、トレーサータグは異なる質量を有するプローブを備えさせることによって分解可能化タグとしても機能することが出来、それにより異なる易動度を有するようになる。

10

【 0 0 2 8 】

「トレーサータグ」との語は、可視の、またはそれ以外の手段によって検出可能な、即ち直接記録可能な、あるいは他の試薬と接触させて検出可能または記録可能となる標識またはマーカを意味する。電気化学特性または磁性、例えば質量分析特性、蛍光、発光、赤外吸収、放射能または酵素反応によって記録可能なトレーサータグが特に好適である。しかし、ここでは言及しないあらゆるトレーサータグであって、自動的手段または装置によって容易に記録可能なタグを利用できることは明らかである。質量分析またはクロマトグラフィー技術を記録に用いる場合はトレーサータグは必要ないが、同数のヌクレオチドを有するポリヌクレオチドプローブはサイズまたは質量によって分解を可能にするその他の基を備えていなければならないことに注目されたい。

20

【 0 0 2 9 】

蛍光色素、例えば、2-((ヨードアセチル)アミノ)エチル)アミノナフチレン-1-スルホン酸)(1,5-IEDANS)、フルオレセイン、ボディピイ (Bodipy)、FTC、テキサスレッド (Texas Red)、フィコエリトリン、ローダミン、カルボキシテトラメチルローダミン、DAPI、インドピラス色素 (indopyras dye)、カスケードブルー (Cascade Blue)、オレゴングリーン (Oregon Green)、エオシン、エリトロシン、ピリジルオキサゾール、ベンズオキサジアゾール、アミノナフチレン、ピレン、マレイミド、クマリン、ルシファーイエロー (Lucifer Yellow)、ヨウ化プロピジウム、ポルフィリン (porphyrin)、CY3、CY5、CY9、ランタニド、クリプタート、ランタニドキレートまたは該トレーサー分子の誘導体またはアナログが好適なトレーサータグの例である。蛍光ポリヌクレオチドプローブは、連続フローシステム及び装置と組み合わせた自動または半自動の結果の読みに特に有用である。ポリヌクレオチドプローブを区別可能とする程度に異なるサイズおよび質量を有するフルオロフォアは上記から見いだすことが出来る。特にホスホラミダイト、例えば、6-FAMTM、VICTM、NEDTM、ROXTMおよびPETTM (すべてApplied Bioシステムによる登録商標)をポリヌクレオチドプローブの末端標識に用いることが出来る。

30

【 0 0 3 0 】

本発明の特定の態様においては、非常に少量の分析物ヌクレオチドを同定しなければならず、より感度の高い試験が要求される。かかる場合には、プローブに末端プライマー配列の対、即ち「プライマータグ」を備えさせて、定量的に回収されたプローブの増幅を可能にする。プローブにさらに任意のトレーサータグ、例えば異なるサイズのフルオロフォアを、特にPCR-増幅工程中に備えてもよい。かかるプローブの3'-および5'-末端に配置するプライマータグは、アフィニティータグ付加された分析物にハイブリダイズしたプローブの定量的回収後のプローブの増幅を可能にする。プライマー配列の一方は非常に短いものでもあってもよく、他方はより長く、同時にアフィニティータグおよび分解可能化タグとして作用するものであってもよい。この態様において、プローブに任意のトレーサータグを増幅中または増幅後に備えさせてもよい。質量分析を記録に用いる場合、トレーサーは不要である。分解を可能にするタグ、例えばプライマーまたはアフィニティータグとして作用するオリゴヌクレオチドを個別のプローブが備えていれば十分である。

40

【 0 0 3 1 】

50

ハイブリダイゼーション反応を阻害しないアミノ酸およびペプチドを付着させてもよく、好ましくはポリヌクレオチドプローブの末端に付加してもよい。ペプチド・オリゴヌクレオチド接合体の合成についてはいくつかの戦略が報告されており、そのいずれも本出願に適用することが出来る(例えば、Lonnberg, H. Annu. Rep. Prog. Chem., Sect B 1999, 95, 207-234および2001, 97, 177-208を参照)。異なるサイズのプローブの類似の化学的調製方法を用いてペプチド以外の有機化学残基をポリヌクレオチドに結合させてもよい。該アミノ酸またはペプチド配列は同時に「アフィニティータグ」および/または「トレーサータグ」として作用しうる。アミノ酸ヒスチジンは有用な例である。リガンドを含むペプチドを「アフィニティータグ」として用いてもよい。酵素活性を有するペプチドは「トレーサータグ」として作用しうる。抗体-抗原対として機能するペプチドは、アフィニティーおよびトレーサーならびに分解可能化タグとして作用しうる。

10

【0032】

「分析物」との語は、標的集団を含むサンプルから得られるポリヌクレオチド配列を意味する。標的集団からのポリヌクレオチド配列混合物はいずれのヌクレオチド配列(DNAまたはRNA)であってもよく、例えばメッセンジャーRNA (mRNA)、トランスファーRNA(tRNA)が挙げられるが、リボゾームRNA (rRNA)またはそれをコードする遺伝子が特に有用である。標的集団は異なる場所から、異なる時点で採取すればよく、例えば標的集団に影響を有する処置の前後に採取すればよい。標的集団のサンプルにおけるポリヌクレオチド配列はそれ自体方法、例えば(Sambrook, J. and Russel, D., Molecular cloning - A Laboratory Manual, Third Edition (2001))によって単離される。分析物ポリヌクレオチド配列を含むサンプル調製物は好適なアフィニティータグを有するように修飾すればよい。

20

【0033】

分析物ポリヌクレオチドには化学反応によってアフィニティータグ付加すればよく、ここで例えば、ビオチン残基を被験ポリヌクレオチドまたは核酸分子に共有結合させると、修飾ポリヌクレオチド分析物、即ち、ビオチン化ポリヌクレオチド分析物が生じる。立体障害によってトレーサータグ付加されたプローブとポリヌクレオチド分析物の間のハイブリダイゼーション反応が阻害されるのを防ぐために、ポリヌクレオチド分析物はアフィニティーペアの小さい方の対応物によってタグ付加し、より大きい方の対応物は固体支持体即ち分離補助手段に付着させる。ポリヌクレオチド配列によって表される集団の組成の分析のためには、アフィニティータグ付加された分析物ポリヌクレオチド配列はいずれの種類のポリヌクレオチド配列であってもよく、例えば全RNAまたはrRNAまたは遺伝子調製物であってもよい。アフィニティータグおよびその対応物即ちペアはいわゆるアフィニティーペアを提供し、これによってアフィニティータグ付加された物質の固体支持体への捕捉が可能となり、この場合固体支持体は分離補助手段とよばれる。

30

【0034】

「アフィニティー補助溶液ハイブリダイゼーション」は周知の方法であり、プローブと分析物ヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーション反応が溶液中で立体障害なしに起こることが可能である。アフィニティータグによってハイブリッドが固相に捕捉され、それによって回収された核酸の分離および洗浄が可能となりそしてその後捕捉されたハイブリッドまたはプローブが遊離して測定される。

40

【0035】

分解可能化タグとしても適用される「アフィニティータグ」は例えば、オリゴヌクレオチド残基、アミノ酸残基等から見いだされ、例えば、ヒスチジン、ペプチドまたは糖残基が挙げられ、ハプテン、例えばビオチンも含まれる。かかるタグの中にはトレーサータグとしても機能するものがある。例えば、標識または非標識オリゴヌクレオチド残基は、アフィニティータグ、プライマータグおよび分解可能化タグとして用いることが出来る。

【0036】

「アフィニティータグ」との語は、分析物ポリヌクレオチドに別の物質に対して高アフィニティーを有する標識またはマーカが備えられていることを意味する。言い換えると、アフィニティータグはその対応物即ちアフィニティーペアと強い結合を形成する傾向に

50

ある。アフィニティーペアの間に形成される強い結合により、アフィニティーペアが所望の物質の捕捉の手段として作用することが出来る。有用なアフィニティーペアは、例えば、ビオチン-アビジンまたはビオチン-ストレプトアビジンであるが、その他の合成または非合成の「アフィニティーペア」即ち結合性物質を適用することが出来る。好適な「アフィニティーペア」は例えば、受容体とリガンド、抗原と抗体、およびそれらの断片である。本発明の好ましい「アフィニティータグ」には小分子、例えば、ビオチン、ヒスチジンオリゴヌクレオチド、ハプテン、グリカンなども含まれるが、好ましい「アフィニティータグ」の対応物はより大きい分子、例えば、アビジン、ストレプトアビジン、金属キレート、抗体、レクチンなどであり、「分離補助手段」の被覆に用いられる。本発明において特に好ましいアフィニティータグは、ポリヌクレオチド、例えば、ポリ(dA)、ポリ(dT)、ポリ(dG)、ポリ(dC)およびそれらの混合物である。アフィニティータグだけでなく、それらによって異なるサイズの分解可能化タグも提供される。

10

【0037】

「分離補助手段」との語は、好ましくは固体支持体、例えば、マイクロビーズ、ラテックス粒子、磁気粒子、糸、釘、棒、マイクロウェル、アフィニティークラムであって、「アフィニティータグ」の対応物即ちアフィニティーペアを備えているかそれによって被覆されているものである。所望により、分離補助手段は例えば相分離または電気泳動手段を含んでいてもよく、それはアフィニティータグの対応物の存在に依存する。

【0038】

「可溶性ポリヌクレオチドプローブ」のプールは好ましくはある程度特徴付けされているポリヌクレオチド配列のライブラリーから様々な方法、例えば天然源からの単離、合成方法、PCR-技術または組換えDNA技術あるいはそれらの組み合わせを用いて調製する(Sambrook, J. and Russell, D., Molecular cloning - A Laboratory Manual, Third Edition (2001))。特定の亜群または個体を表すことが出来る異なるポリヌクレオチドプローブがプール内に配置または配列されて、特定の亜集団を表すすべてのポリヌクレオチドプローブ分子が特定のまたは特徴的なサイズまたは質量を有するようになることによって、クロマトグラフィー、ゲル電気泳動または質量分析を用いた同定が可能となる。

20

【0039】

特徴付けされているプローブの使用が好ましいが、あまり特徴付けされていないゲノムから国際特許出願W002/055734号に記載のようにしプローブのプールを調製することも可能であり、その後、かかるポリヌクレオチドプローブに上記の分解可能化タグを備えて、その分離および記録を可能とすることが出来る。

30

【0040】

「修飾ポリヌクレオチド配列」との語は、合成によって調製されたポリヌクレオチドプローブのセットが便宜に修飾されていてもよいことを意味し、例えば、ヌクレオチド配列の糖リン酸骨格はペプチド結合によって置換されてもよく、いわゆるロックされた(lock ed)ヌクレオシドアナログからなるものとしてもよい。修飾ポリヌクレオチドは、例えば国際特許出願W096/20212号に記載のペプチド核酸(PNA)または国際特許出願W099/14226号に記載のロックされた核酸(LNA)等である。該修飾ポリヌクレオチドプローブは本発明の方法および試験キットに便宜に適用することが出来る。それらはゲノムDNAまたはcDNAをモデルとして用いて複製してもよい。しばしばそれらは安定性の向上など、非修飾DNAプローブと比べて向上した特性を有することがあり、トレーサータグを付加しやすいなどの利点を有することもある。

40

【0041】

「可溶性または可溶化可能なポリヌクレオチドプローブ」を含む「可溶性の組織化されたプール」は、どのような容器に含まれていてもよく、該容器は、完全に分離していてもよいし、固定されていないか強固に固定された様式で互いに結合していてもよい。もっとも簡便な形態において、組織化されたプールは1または複数の容器、例えば試験管またはピンを含み、かかる容器は固定されていない様式、例えば試験管立てにおいて互いに結合していてもよい。強固に固定された様式で結合している容器に配置された組織化されたプ

50

ールの実践的な例は、マイクロタイタープレートの区画またはウェルによって提供される。上述のように、可溶性プールは好ましくは、例えばマイクロタイタープレートのウェルのように、組織化された様式で配置される。可溶性プールは、プールおよびプールにおけるポリヌクレオチドプローブがはっきりと区別できるように組織化される。ウェルを備えたマイクロタイタープレートは、多くの組織化されたプールの組織化および同時取り扱いを可能にする、典型的な市販の態様である。当然、その他のテーラーメイドのより便宜な複数の区画を有する組織化されたプールを開発および構築することも出来、適当な指示書や取扱説明書を含めてもよい。

【 0 0 4 2 】

結果は所望により自動的または半自動的である手段または装置、例えば、クロマトグラフィ技術および質量分析によって記録される。全体の系は完全にまたは部分的に自動化されたものとする事が出来る。プローブを区別する技術には、電気泳動をともなっているともなっていないなくてもよい、篩または非篩媒体における分離または分画が含まれる。篩媒体には、マトリックス、例えばゲルなどにおけるクロマトグラフィ分離が含まれ、これによってプローブはそのサイズまたは質量に基づいて分離する。電荷はプローブの移動速度を上昇させることもあるが、分離に必須ではない。分画すべき材料を篩にかけるマトリックスが存在しない非篩媒体においては、質量と電荷の比が一定であるプローブはサイズにかかわらず同じ速度で移動する。ポリヌクレオチド配列においては、オリゴヌクレオチドの添加は、質量と電荷の比を変化させるものではない。したがって、非篩媒体での異なる易動度を達成するためには、プローブに非荷電物質を付加して異なる速度で移動するようにさせるとよい。この易動度の差は異なるサイズのヌクレオチド配列からなるプライマータグまたはアフィニティータグの添加、あるいはヌクレオチド配列における通常の比と比べて質量と電荷の比を変化させない物質を添加することによっては達成されない。

【 0 0 4 3 】

それゆえ、本発明における定量的に回収されたプローブの分画および分離方法は上述の因子に適合するようにすべきである。本発明のプローブを区別する好ましい方法はそれゆえ質量分析または篩媒体におけるクロマトグラフィ分離である。分離をキャピラリー電気泳動によって行う場合、好ましい態様は篩媒体を用いるものであり、これは分子量の大きいプローブの移動を遅らせるものである。例えばポリアクリルアミドでの常套のゲル電気泳動も好ましい方法である。プローブの組織化されたプールの必須の特徴は、1つのプールにおけるすべてのプローブが選択された分画方法によって分離および定量できることであり、分画が行われる原理は重要ではない。

【 0 0 4 4 】

(発明の一般的説明)

本発明は、およそ同一のサイズを有するポリヌクレオチドプローブを用いてポリヌクレオチド配列の混合物における、複数の個別のポリヌクレオチドまたはその亜群の量または相対的比率の同時定量を可能にする方法に関する。本発明の1つの態様において、ポリヌクレオチド配列はある程度関連した生物の標的集団を表すサンプルに存在する、選択された個体、亜群、属、種または株を表す。固有の原因、例えば、時間経過または外的刺激、例えば、抗菌処理、衛生学的手段による集団における亜群または個体の量の変動を評価することが出来る。本発明の別の態様において、1つの生物におけるポリヌクレオチド配列の転写産物の量または相対的比率の変動を測定することが出来る。これによって、例えば、染色体における非相同的対立遺伝子の発現の差異の証明が可能となり、特定の疾患の異なる徴候の理由を説明することが可能となる。それによってまた、1つの生物における多型の研究も可能となる。該方法および試験キットは環境および集団研究にも適用できる。本発明の方法の基本原理は、ハイブリダイゼーション反応からなり、これは、溶液中で起こり、形成されたハイブリッドはアフィニティータグの対応物、即ちアフィニティーペアを備えているかそれによって被覆されている固体支持体上に回収即ち捕捉される。被覆は化学的手段、例えば、接合によって行われる。固体分離補助手段の表面とアフィニティータグの対応物の間のアフィニティーは安定な結合形成に充分であることもある。あらかじ

10

20

30

40

50

め特徴付けされている、部分的に特徴付けされている、または特徴付けされていないプール(ライブラリー)からのトレーサータグ付加、好ましくは末端タグ付加されたポリヌクレオチドプローブに、分析すべきサンプルから得たアフィニティータグ付加された分析物ポリヌクレオチド配列を接触させる。

【0045】

1 または複数の可溶性プールは、あらかじめ決定された、しかし任意の数の、好ましくは2-500、より好ましくは5-400、もっとも好ましくは10-300の可溶性ポリヌクレオチド配列を含む。本方法の前提条件は、およそ同一のサイズのポリヌクレオチドプローブが、ポリヌクレオチドプローブに「分解可能化タグ」を結合または末端付加することによって区別可能になることであり、分解可能化タグは、分離および分画を可能にし、例えば、電気泳動技術、質量分析またはクロマトグラフィーにより正確な同定および結果の計算が可能になるように個別のポリヌクレオチドプローブの分解を可能にするものである。

【0046】

可溶性ポリヌクレオチドプローブは例えば質量分析を用いてトレーサータグを用いずに同定することも出来る。そうではなく、可溶性ポリヌクレオチドプローブに本発明の基本的態様において直接検出可能または記録可能であって分解可能化タグとしても機能する標識およびマーカートレーサータグを備えさせてもよい。本発明のより進展した超高感度の検出または比較評価を可能にする態様においては、ポリヌクレオチドプローブと短かすぎないオリゴヌクレオチドの使用が好ましく、ポリヌクレオチドプローブに一对の末端プライマータグを備えることにより、プローブの定量的回収の後にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を可能にするとよい。増幅の際、プローブに例えばトレーサータグ付加されたプライマーまたは標識ヌクレオチドを用いてトレーサータグを付加してもよい。この場合、分解可能化タグはトレーサータグであってはならない。可溶性プールは、分離しているか、緩く結合しているか、あるいは取り外し可能の独自の容器に組織化して配置される。組織化されたプールはよりコンパクトな構造の中または上に配置してもよく、ここで容器はある程度強固に互いに結合したものであり、例えばマイクロタイタープレート上のウェルである。

【0047】

本発明の基本的な態様において、ポリヌクレオチドプローブのサイズまたは質量対電荷比に差を与える分解可能化タグは、トレーサーまたはプライマータグの存在下または不在下で標的集団を含むサンプルからの単離によって得られた分析物ポリヌクレオチド調製物とハイブリダイズする。サンプリングされた標的集団に存在する分析物ポリヌクレオチド配列は、公知の方法によって単離される。一般に標的集団からの測定すべき分析物ポリヌクレオチドは、リボゾームRNA(rRNA)、メッセンジャーRNA(mRNA)あるいはそれらに対応する遺伝子(DNA)である。該分析物に少なくとも1つのアフィニティータグ、例えば、ビオチン、ヒスチジン、オリゴヌクレオチド配列、例えば、オリゴ(dT)、-(dA)、-(dC)、-(dG)またはそれらの混合物やハプテンまたはグリカンを備えさせる。分析物ポリヌクレオチドは好ましくはビオチンで標識する。

【0048】

これら試薬調製工程の後、プローブと分析物とのハイブリダイゼーション反応を起こさせる。ハイブリッドは分子的に正確に定量的に可溶性ポリヌクレオチドプローブとアフィニティータグ付加された分析物との間で形成される。プールに存在する異なるポリヌクレオチドプローブは知られており、分析物と比べて各プローブは過剰に存在するために、分析物とプローブとのハイブリダイゼーション反応の結果、ハイブリッドが化学量論的に生じ、回収されるプローブの量がサンプル中に存在する分析物ポリヌクレオチドの量に対応することは明らかである。当然、分析物配列はrRNA配列である必要はない。本方法によって、あらゆる一本鎖配列および二本鎖分析物を一本鎖にする変性工程の後にあらゆる二本鎖配列を定量することが可能である。

【0049】

上述のように溶液中でのハイブリダイゼーションによって、DNA:RNA(DNA:DNA)ハイブリ

10

20

30

40

50

ッドが形成する。一般に、溶液ハイブリダイゼーションはハイブリッド、例えば、DNA:DNA、DNA:RNA、RNA:RNA、PNA:DNA、PNA:RNA、LNA:DNA、LNA:RNAなどの形成を導くハイブリダイゼーションが起こる条件下でおこなう。最適条件はポリヌクレオチドプローブ、分析物などに依存して変動する。その後、アフィニティータグを有する分析物ポリヌクレオチド配列のその対応物に対するアフィニティーによる助けにより、ハイブリッドはアフィニティータグの対応物で被覆された分離補助手段に回収または捕捉される。分析物配列にハイブリダイズすることができたポリヌクレオチドプローブのみが、分離補助手段に収集され、定量的に回収され、所望により増幅された後記録される。捕捉および収集されたハイブリッドはハイブリダイゼーション溶液から除去または分離され、その他の試薬や未反応のプローブを含まないようにするために洗浄される。アフィニティータグ付加されたポリヌクレオチド分析物とハイブリッドを形成しなかったポリヌクレオチドプローブはハイブリダイゼーションまたは洗浄溶液に残り、したがって除かれる。捕捉および収集されたハイブリッドは過剰のプローブを含まないように洗浄される。過剰のプローブとは例えば、アフィニティータグ付加された分析物配列にハイブリダイズすることができなかったプローブである。ハイブリダイズすることができない場合とは、標的集団において特定の個体または亜群を表す、該ポリヌクレオチドプローブに対応する分析物配列がサンプルに存在しなかった場合である。分析物から分離または遊離した収集されたポリヌクレオチドプローブには任意にトレーサータグを付加してもよい。この場合、分解可能化タグはトレーサータグであってはならない。プールに存在する、対応するプローブが無いためにハイブリダイズすることができなかった、余ったアフィニティータグおよびアフィニティータグ付加された分析物配列は当然固体分離補助手段に捕捉されるが、ハイブリッドから溶出およびその後の分離工程にて分離される。プローブ内に相補鎖が無いアフィニティータグ付加された分析物も、分離補助手段に捕捉されるが、それらはハイブリダイゼーション工程が化学量論的に起こることを妨げるものではなく、その結果の分析工程を妨げるものではない。それらは、例えば、プローブがハイブリッドおよび/または分離補助手段から単離または遊離される際に破壊または除去すればよい。

【 0 0 5 0 】

本発明の方法において、任意にトレーサータグ付加されたプローブとアフィニティータグ付加された分析物との間に形成されるハイブリッドを回収するために分離補助手段(SAT)が必要である。固体支持体である分離補助手段、例えば、微小粒子、マイクロビーズ、ラテックス粒子、磁気粒子、糸、釘、棒、マイクロウェルおよびアフィニティークラムは、アフィニティータグの対応物またはアフィニティーペアを備えられるかそれによって被覆される。分離補助手段はアフィニティータグの対応物の捕捉のために相分離または電気泳動手段を含むものでもよい。

【 0 0 5 1 】

分離補助手段に回収されたハイブリッドは、分離補助手段からまず溶出によって、ついでハイブリッドの水素結合の破壊によって遊離し、ハイブリッドから遊離した任意にタグ付加された個別のプローブはそのサイズによって単離、分離され、その定量を可能とする手段によって記録される。各プローブはサンプルにおける分析物ポリヌクレオチド配列を表すため、個体を表す個別のポリヌクレオチド配列の量または比を分子に基づいて定量することが出来る。あるいは、ハイブリッドの結合をまず破壊した後に、固体支持体とプローブを含む溶液を用いた分離補助手段に応じた適当な方法によって互いに分離してもよい。その後、例えば遠心分離によって、プローブをそのサイズに基づいて分離し、その定量を可能とする手段によって記録する。分離補助手段上の精製および単離されたプローブは、ポリヌクレオチド鎖の結合を壊すことが出来る溶液、例えば、NaOH、NH₄OHまたはホルムアミドによって溶出する。

【 0 0 5 2 】

したがって、標的集団における生物の特定の個体または亜群を表す分析物ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドプローブ、即ち、サンプルに存在する分析物ポリヌクレオチド配列と相補鎖を有するポリヌクレオチドプローブのみが分

離補助手段によって捕捉され、記録用に回収される。

【0053】

これはその個別のサイズによって同定可能な、あるいは区別可能とされる、自動的または半自動的に検出可能あるいは記録可能な任意にトレーサータグ付加されたプローブは、捕捉または回収され、その後記録のために遊離または単離されることを意味する。当業者には、特定の場合に工程を行う順序を変更してもよいことが明らかであろう。

【0054】

トレーサータグが無い場合、プローブは質量分析によって直接記録する。タグがトレーサー、例えば蛍光物質の場合も、プローブを分析物ポリヌクレオチドから分離した際トレーサータグを有していなければ、直接記録することができる。任意にトレーサータグ付加された試薬プローブは、単離され遊離した形態で存在し、その量はそれらにハイブリダイズした分析物核酸の量に正確に対応する。

【0055】

タグが任意にトレーサータグを備えた末端プライマーの対である場合、プローブを分析物ポリヌクレオチド配列からの分離後に増幅させてもよく、増幅中または増幅後にトレーサータグを付加してもよい。例えば、任意の増幅サイクル数の後、ポリヌクレオチドプローブにトレーサータグを付加して記録してもよい。あるいは、相補的プライマーにトレーサータグを付加し、それによって増幅中にプローブにトレーサータグを備えさせてもよい。増幅により、別の方法によると検出限界を下回るような少量しか存在しない亜集団またはポリヌクレオチド配列の記録が可能となる。分析物ポリヌクレオチドのより感受性の高い評価を可能とする、本発明の進展した態様において、プローブ上のタグは末端プライマー配列である。末端プライマータグ付加されたプローブを本発明の基本的な態様と同様にしてアフィニティータグ付加された分析物ポリヌクレオチドとハイブリダイズさせる。化学量論的ハイブリダイゼーション反応の後、ハイブリッドは分離補助手段に捕捉され、プライマータグ付加されたプローブは公知の方法によって回収される。その量が、サンプル中に存在する分析物ポリヌクレオチドの量に対応する回収されたプローブは、任意の回数公知のPCR-技術によって増幅してもよい。PCR-増幅後またはPCR-増幅中に、プローブにトレーサーを所望により付加し、プローブを記録する。プライマータグ付加されたプローブの回収は定量的であり、分析物分子数に対応し、既知量の分子が含まれていることから、プローブの増幅回数、即ち、倍加または複製回数により、元のサンプル中の分析物の量の算出は容易である。これによって増幅しなければ検出限界を下回り、記録不可能な分析物ポリヌクレオチドであっても定量的評価をすることができる。したがって、本発明の方法の感度は高度に上昇させうる。これは、非常に感度の高い試験が要求される場合、例えばサンプリングした集団、例えば組織診サンプルがわずかな生物あるいは細胞しか含まない場合に非常に有用である。

【0056】

したがって、アフィニティー選択したプローブプロフィールを、そのサイズに基づいてプローブを分離した後、高感度の自動または部分的に自動の定量的記録システムによって評価できる。分離は例えばクロマトグラフィー、電気泳動技術、例えばキャピラリーまたはゲル電気泳動および質量分析によって行う。区別可能なサイズまたは質量とすることにより記録可能になるポリヌクレオチドプローブであって、特定のプールに存在するプローブは、常に既知のプローブによって同定できる相補的分析物分子に対応する。したがってポリヌクレオチド混合物または混合標的集団における個別のポリヌクレオチドを非常に正確に推測できる。

【0057】

固有の制御機構による固有の変化の応答として、あるいは外部刺激、例えば薬剤、病理的状态の応答として細胞または組織サンプルに存在する様々なポリヌクレオチドの量の変動の比較定量的評価は、少なくとも2つの組織化された可溶性プールを必要とするが、好ましくは試験するサンプルごとに少なくとも1つの組織化されたプールがあるのがよい。各プールは同一のポリヌクレオチドプローブを含むが、組織化されたプール、例えば、そ

10

20

30

40

50

れぞれマイクロタイタプレート上の個別のウェルに存在するプールには、所望により記録可能なトレーサータグを備えさせるとよい。トレーサータグを使用する場合、区別可能なトレーサー、例えば発光波長の異なるフルオロフォアを使用するのが好ましい。好適な態様において、可溶性プールはマイクロタイタプレートに用意する。各マイクロタイタプレートは独自の特異的な記録可能なトレーサーを有する点以外は同一であり、トレーサーがフルオロフォアである場合、好ましくは異なる区別可能な発光波長のものであると、変動の同時記録が可能となる。トレーサータグを用いずに質量分析を用いて量を比較することも可能であり、コンピュータに基づく自動的システムを用いて記録された結果を計算及び比較させることが出来る。

【 0 0 5 8 】

以下の方法フローチャートにより本発明の実施方法を説明する：

調製工程

工程1-およそ同一のサイズを有する可溶性ポリヌクレオチドプローブの組織化されたプールの調製

ケース1-リボゾームRNAからの領域の選択

rDNA断片を細菌または微生物の特定の種または群を表すある程度保存された領域または可変領域を表すように選択する。DNA断片に分解可能化タグまたはテイルまたは標識を備えて、サイズ分画-段階において良好に分解されるようにする。

(a)ポリヌクレオチドテイル付加(工程2参照)

(b)トレーサー標識(工程2参照)

(c)タンパク質-テイル付加(工程2参照)

【 0 0 5 9 】

ケース2-その他の起源からの領域の選択

ポリヌクレオチドを、その他の遺伝子、例えば、抗生物質耐性遺伝子あるいはその対応するmRNAの領域を表すよう選択する。同じ遺伝子の異なる対立遺伝子を区別することが出来るポリヌクレオチド配列を選択してもよい。

【 0 0 6 0 】

工程2- DNAプローブへのトレーサー、フルオロフォアまたはサイズ付与テイルによる末端標識

好ましくは、2 (または3以上)セットの区別可能な色素を有するDNAを調製する。これによって集団の変化または内部機構、例えば病理状態あるいは外部刺激、例えば薬剤によるポリヌクレオチド量、特にrRNA量の変動の同時比較研究が可能になる。工程1および2は調製工程であり、商業的に有用な試験キットの基礎をなす。DNAプールは多数の実験用に大量に製造してもよい。したがって、この比較的単調な工程を何度も繰り返す必要はない。

【 0 0 6 1 】

分析工程

工程1-一本鎖ポリヌクレオチド分析物の調製

核酸を公知の方法によって混合集団プールから単離する。細胞からのRNAの単離は適当な実験条件で公知方法(例えばSambrook, J. and Russel, D., Molecular cloning - A Laboratory Manual, Third Edition (2001))によって行う。ポリヌクレオチド分析物が二本鎖の場合、分析物を変性して本発明の方法に要求される一本鎖配列にしなければならない。

【 0 0 6 2 】

工程2-アフィニティータグ付加された分析物の調製

単離したDNAまたはRNAに化学的、非酵素的方法によってアフィニティータグ付加、例えばピオチン化する。光活性化試薬であるフォトピオチンがこの目的に便利であり市販されている。RNAはcDNAに転写されるものではなく、標識のために酵素標識するためのものであるため、RNAは強力な界面活性剤、例えばSDS中で調製および保存すればよい。RNaseはSDSによって阻害されるため、インタクトなRNAの単離は容易である。特にひどくなければ

10

20

30

40

50

、断片化は問題ではない。RNA断片のサイズは捕捉能力に影響を与えるものではない。

【0063】

工程3-溶液ハイブリダイゼーション

各可溶性のトレーサータグ付加されたプローブ(DNA)プールをアフィニータグ付加された分析物(RNA)調製物のアリコットに接触させる。それぞれのプール区画に提供された小容積の中でハイブリダイゼーションを遊離溶液中で起こさせる。これによって迅速かつ定量的な反応が起こる。

【0064】

工程4-分離工程

アフィニティーペア、例えばアビジンを備えたマイクロビーズまたはその他の分離補助手段を添加してRNA分子を捕捉する。遊離のDNAを除くために洗浄する。

10

【0065】

工程5-回収工程

ホルムアミドまたはNaOHなどのDNA:RNAハイブリッドを開裂する溶液で溶出する。必要であれば、プローブを溶出液の蒸発によって、あるいは沈降によって濃縮し、一本鎖DNAを洗浄する。一本鎖DNAを電気泳動サンプルまたはバッファー溶液に取り出す。溶出物の電気泳動が直接行われ、異なるプローブが同時に記録されるような条件を用いるのが好ましい。

【0066】

工程6-結果の記録

20

クロマトグラフィーまたはゲル電気泳動によってDNA:DNAまたはDNA:RNAハイブリッドから溶出したDNAのサイズおよび量を測定する。質量分析を用いてもよい。2つのDNA/RNA調製物の差が、異なる色素で標識したDNA断片にハイブリダイズさせ、電気泳動の前にDNAを混合することにより、容易に観察される。

【0067】

工程7-結果の解釈

ケース1の場合、集団の組成がそのプローブがプールに含まれている亜集団について直接測定される。同様にケース2の場合、個体または集団における特定の機能的特性の存在(遺伝子の存在または発現)が直接測定される。

30

【0068】

工程8-任意の増幅

非常に感度の高いアッセイが要求される場合、分離補助手段から溶出した試薬ポリヌクレオチド配列、即ちトレーサータグ付加されたプローブを定量的選択工程の後にPCRで増幅するとよい。このアプローチを用いる場合、試薬ポリヌクレオチド配列、即ちプローブは、トレーサータグを備えた同じPCRプライマー対によって、同じプールにおけるすべてのプローブの増幅を可能にする共通末端配列を含むよう改変しなければならない。

【0069】

プローブが、ゲル電気泳動またはクロマトグラフィーによるサイズまたは易動度による分離を可能にするためのタグまたはテイルを備えている場合も、質量分析を用いて質量に基づき記録することも出来る。この場合、トレーサータグは不要であり、方法のさらなる改良が可能である。トレーサータグの使用を不要にすることにより、方法を簡便にすることが出来、高価な記録可能な標識の使用が回避できる。あるいは、方法は以下の連続工程を含む上記の方法に完全に対応する：

40

(a) 同定または記録を可能にする異なるサイズを有するあらかじめ決定された任意の数の可溶性プローブポリヌクレオチド配列を含む、1または複数の組織化されたプールを用意する工程、ここで該プールは分離しているか互いに結合している独自の容器に組織化された様式で配置される；

(b) 標的生物の細胞または組織サンプルに存在する分析物ポリヌクレオチド配列を単離し、該分析物に少なくとも1つのアフィニータグを付加する工程；

(c) 工程(a)からの可溶性プローブと工程(b)からの分析物との間にハイブリダイゼーション

50

ン反応を起こさせ、可溶性プローブ:アフィニティータグ付加された分析物-ハイブリッドの形成を導く工程;

(d)工程(c)で形成されたプローブ:分析物-ハイブリッドを、分析物のアフィニティータグのアフィニティーペアを備えた分離補助手段に該ハイブリッドを捕捉することによって分離する工程;

(e)分離補助手段からプローブを回収する工程;および、

(f)電気泳動技術または質量分析を用いてプローブのサイズおよび量を記録する工程。

【0070】

試験キット

本発明はまた、定量を行うための試験キットに関する。試験キットはあらかじめ決定された任意の数の可溶性のポリヌクレオチドプローブを含む1または複数の可溶性の組織化されたプールを含み、該ポリヌクレオチドプローブは全集団に共通な、あるいは特定の生物の亜群に特異的な相補的分析物ヌクレオチド配列、例えば、ある程度保存された領域または可変領域にハイブリダイズするものである。あるいは、試験キットは特定の機能、例えば抗生物質耐性、をコードする遺伝子およびそれに対応する mRNAにハイブリダイズするプローブを含む。ポリヌクレオチドプローブは任意にタグを備えており、それはトレーサータグまたは末端プライマータグ配列の対である。好ましくは、トレーサータグは末端標識された検出可能なトレーサータグ、例えば、フルオロフォアであり、ポリヌクレオチドプローブに異なるサイズを付与するものである。

【0071】

試験キットは可溶性の組織化されたプールを含み、各プールは複数の、好ましくは10を超える、もっとも好ましくは約100以上のプローブを有する。プールは好ましくはその独自の容器、例えば試験管、ピンまたはマイクロタイタープレートのウェルまたは区画に組織された様式で配置される。試験キットが定量を行うための、好ましくはマイクロタイタープレートまたは対応するテラーメード構造であるとしても、試験キットはある程度固定された編成、例えば、試験管立ておよび/またはその他の堅固な構造において組織化された、任意の数の試験管、ピンなどであってよい。試験キットは特注またはテラーメードであってもよく、適当な指示書および使用説明書を含むものであってよい。

【0072】

試験キットに用いられる可溶性ポリヌクレオチドプローブのプールは、DNA断片から調製すればよい。それらは合成ポリヌクレオチドや修飾DNAであってもよい。試験キットを特徴付けされているゲノム用に調製する場合、試験キットのプールは好ましくは、ゲノム中の研究すべき各遺伝子から少なくとも1つのポリヌクレオチド断片(プローブ)を含む。特徴付けされていないゲノムを研究する場合、プールは大量に調製するのがよく、より一般的あるいはより特異的研究のために、商業的生産されたものでもよい。

【0073】

試薬ポリヌクレオチドプローブが特徴付けされているゲノム由来である場合、各プローブ分子は所与の遺伝子に対応することが知られており、各プローブは特異的にそのサイズおよびプールによって同定される。特定の混合集団における生物またはその亜群の量または相対的比率の変動はしたがって直接的に比較でき、自動記録された結果から自動的に計算できる。試薬ポリヌクレオチドプローブがあまり特徴付けされていない場合、例えばそれがゲノムが配列決定されていない生物由来の場合であっても、有用な結果を得ることが出来る。

【0074】

好適な態様において、試験キットはマイクロタイタープレート上に調製される。かかる実践的な本発明の態様において、酵母、クロストリジウム、食品汚染をもたらす細菌などの既知または未知配列からのDNA断片を含むプールを試験キットの調製に用いることが出来る。各プールが例えばおよそ10-100のプローブまたは断片を含む場合、十分に良好な解像度が達成される。プールにおける各プローブが所与の細菌種を表す場合、数千種についてのプローブを1つのマイクロタイタープレートに配置することが出来、さらにコントロ

ールを含めることも出来る。捕捉されたDNAプローブは部分的にそれが属するプール即ちマイクロタイターウェルによって、部分的にはそのサイズによって同定される。

【0075】

任意の記録可能なトレーサータグは、蛍光、赤外吸収、電磁気特性、放射能および酵素活性によって検出可能なトレーサーの群から選択されるのが好ましい。好ましい蛍光によって記録可能なトレーサータグは、蛍光色素またはフルオロフォアである。質量分析は別の好適な態様であり、トレーサータグを用いない記録および定量を可能にする。トレーサータグが好ましい態様であるとしても、それは本発明の方法に必須ではなく、本発明の試験キットに要求されるのは、可溶性の組織化されたプールにおけるプローブが異なるサイズを有しているかあるいは区別可能にできるものであることである。プローブには任意にトレーサータグまたは末端プライマータグを付加してもよい。したがって、実用的な試験キットは、トレーサーを備えていないとしても、末端プライマータグ付加されたプローブの組織化されたプールを備えたものである。

10

【0076】

もっとも簡便な形態における本発明の試験キットは、異なるサイズを有する可溶性のタグ付加されたプローブの組織化されたプールである。該試験キットはそれ自体完全であるが、任意にトレーサー、アフィニティーペアおよび/または分離補助手段を含めてもよいことに注目すべきである。しかし、かかる補助的試薬は必須ではない。本発明の方法の実施のための補助的試薬および手段は市販されているか、あるいはその他の起源のものである。したがって、本発明の方法および試験キットは、使用者の特定の要求に応じたテーラ

20

【0077】

かかる試験キットの製造様式は、固定化工程を含まなくてもよいものであり、所与の集団における生物の特定のサブセットまたは亜集団に注目するテーラード試験に容易に適用できる。試験キットは細胞または組織サンプルにおけるポリヌクレオチドの標識用に任意にアフィニティータグを含んでいてもよく、また、任意に分析物標識用のアフィニティータグの対応物を備えているかそれによって被覆されている分離補助手段を含んでいてもよい。分析物にアフィニティータグを、分離補助手段に対応物を提供する、任意のアフィニティーペアにはこれらに限定されないが、例えば、ビオチンとアビジンまたはストレプトアビジン、ヒスチジンと金属キレート、ハプテンと抗体またはグリカンとレクチンが含まれる。

30

【0078】

試験キットに含まれていてもよいし、あるいは別々に提供されてもよい任意の分離補助手段は、微小粒子、マイクロビーズ、ラテックス粒子、磁気粒子、糸、釘、棒、マイクロウェルまたはアフィニティークラムからなる固体支持体の群から選択される。分離補助手段はアフィニティータグの対応物の捕捉のために相分離 または電気泳動手段を含んでいてもよい。

【0079】

ポリヌクレオチド配列の混合物における個別のポリヌクレオチド配列またはその亜群の量または相対的比率の変動の比較評価のためには、同一のセットのプローブを備えた組織化されたプールを提供すればよい。この場合、各組織化されたプール即ち試験キットに任意に異なってもよい区別可能なトレーサータグを所望により含めてもよい。かかるタグはそのサイズまたは易動度に基づいて区別可能なものであり、好ましくは異なる発光波長で発光するものである。

40

【0080】

タグが同時に分解可能化タグとしても作用する末端プライマータグである場合、試験キットは同一であるが、増幅の後、回収および/または増幅されたプローブは任意に区別可能なトレーサータグを備えられてもよい。あるいは、相補的プライマーペアにトレーサータグを備えてもよく、増幅中のトレーサータギングが可能となる。これらの補助的試薬は

50

任意に試験キットに含めてもよいし、その他の市販あるいはその他の起源から提供してもよい。サンプル中のポリヌクレオチド量における変動の簡便な比較評価を可能にするためには、異なる発光波長で発光する異なる区別可能なトレーサータグを備えた試験キットを調製するのが便利であり、かかる発光は自動または半自動装置で記録できる。

【0081】

固有の変化または外部刺激、例えば、抗生物質、病理的状态、疫学的状態に应答しての、ポリヌクレオチド混合物または標的集団における様々な個別のポリヌクレオチドまたは生物、その亜群の量における変動の比較定量的評価のための試験キットは便宜には、少なくとも2つの固体支持体またはマイクロタイタープレートを含む。各固体支持体またはマイクロタイタープレートには同一のポリヌクレオチドプローブのプールが含まれており、プローブには任意にトレーサータグが備えられている。各固体支持体またはマイクロタイタープレートは任意にその独自の区別可能なトレーサータグを含んでいてもよく、それによって異なる時点、例えば、薬剤処置の前後、に得られた細胞または組織サンプルの同時記録が可能となる。集団プロファイリング、即ち、2以上の分析物ポリヌクレオチド調製物の差の分析は、分析物サンプルと、区別可能かつ自動的に記録可能な異なる末端標識されたトレーサータグを付加した試薬ポリヌクレオチドプローブとをハイブリダイズさせることによって容易に記録可能である。ハイブリダイゼーション工程の後、異なるサンプルを所望により混合し、それらの差異を各ピークにおけるトレーサータグの比を互いに測定することによって直接測定することが出来る。試験キットには最終工程において得られるトレーサータグ付加されたプローブの増幅用の少なくとも1対のプライマーを含めて試験の感受性を高めてもよい。

【0082】

本発明の方法は、選択された混合集団のサンプルにおける一定の生物およびその亜群の量における変動の定量および比較評価に有用である。

【0083】

ヒト消化管はおそらく報告されている中でもっとも複雑な微生物生態系であり、ヒト大腸には少なくとも400の細菌種が生育していると見積もられる。この非常に複雑な生態系を研究するために、簡便なハイスループット分析手段、例えば、本発明に記載のものが必要とされている。本発明は多数の細菌群および種の存在およびその消化管サンプルにおける相対量についての同時スクリーニングを可能にする。例えば、機能性食品の研究において特に興味深いのは、腸内微生物集団の変動を追跡することである。ビフィズス菌および乳酸菌はヒト腸の常在微生物集団に属し、よくバランスのとれた腸内微生物叢のマーカー生物であると考えられている。ビフィズス菌 (*Bifibacteria*) および乳酸菌 (*lactobacteri a*) は栄養療法においてよくモニターされる。属-または群-特異的プローブならびに多数の種-特異的プローブがビフィズス菌および乳酸菌について入手可能となっており、したがって、本発明は容易にかかる細菌の検出に適用できる。腸内細菌のもう1つの重要な群はクロストリジウムであり、クロストリジウムのなかには潜在的に病原性のものもある。選択培地が不十分なために、クロストリジウムを羅列するのはやっかいであるが、本発明はクロストリジウムおよびその他の微生物群の培地に依存しない定性的および定量的モニタリングアプローチを提供する。

【0084】

本発明は臨床微生物学、例えば、細菌集団への抗菌処理の効果の評価においても利用できる。抗生物質耐性細菌による感染などの緊急事態において正確な抗菌処理を行うには、迅速なスクリーニング方法が特に有用である。

【0085】

飲料水の供給および食品ならびに飼料生産においては衛生学的手段と良好な管理が要求される。本発明に基づいて、飲料水や食品の微生物学的質を管理するための胃試験キットを設計できる。食品産業においては、病原微生物、例えば、サルモネラ菌、リステリア菌、バシラス属および大腸菌についての信頼できる試験が優先されるが非病原性腐敗細菌、例えば、乳酸菌や酵母についての試験もしばしば要求される。

【0086】

本発明のさらなる適用分野は、建造物中に増殖し、したがって室内に空気に毒素や胞子を放出することによってヒトの健康をむしばむ真菌を検出するための試験キットである。かかる微生物はまた、建物や歴史的に重要な芸術品、例えば、古代の壁画、彫刻などにも損傷を与えうる。適当な試験キットを原因となる微生物の同定のために設計し、管理手段の有効性をモニターすることが出来る。

【0087】

微生物生態学においては培地非依存的モニタリング方法が必須である。というのは、実験室の培養条件では微生物の天然環境を模倣することが出来ず、したがって、環境サンプルにおけるわずかな画分の微生物のみしか研究室用の培地に回収されないからである。様々な試験を様々な土壌および水系サンプルにおける非培養微生物集団のモニタリングに設計することが出来、それによって、公害、農業その他の天然生態系へのヒトの影響、および原油の流出などの環境汚染の是正装置の効力を評価することが出来る。基本的な環境調査においては、微生物生態系における自然の季節変動のモニターおよび地理的に異なる位置における類似の生態系の比較が興味深い。

10

【0088】

試験キットはポリヌクレオチドプローブからなるものとすればよく、プローブは一定の遺伝子の対立遺伝子を区別できるものである。かかるキットを例えば遺伝子の特定の対立遺伝子の分布を研究するために集団研究に用いることが出来る。同様に、様々な遺伝子における点突然変異を認識するポリヌクレオチドもキットにおいて利用できる。

20

【0089】

上記の用途の他に、本方法および試験キットを進化の研究や関係の評価に用いることも出来る。考古学においては、古代の壁画や塑像その他の芸術品の微生物による分解の原因の研究および妨害手段の効果のモニタリングに用いることが出来る。

【0090】

本方法および試験キットはヒトおよび動物の健康に潜在的に有害な影響を与える点突然変異の検出や、集団における遺伝子の特定の対立遺伝子の分布などの集団研究にも利用できる。

【0091】

本発明の試験キットはそのもっとも簡便かつ安価な形態において、上記試験キットと以下の点以外では同じである。即ち、該試験キットはあらかじめ決定された任意の数の可溶性ポリヌクレオチド配列プローブを含む1または複数の組織化されたプールであり、該プローブは質量分析による同定と記録を可能にするため異なるサイズを有する。プローブは、質量分光学的即ち-分光分析手段による定量的測定の前に増幅を可能にするために末端プライマータグを備えていてもよい。非標識プローブのプールは、分離していても互いに結合していてもよい独自の容器に組織化されて配置される。

30

【0092】

本発明の試薬を含む試験キットは好ましくは自動的または半自動的プロセスでの実行に適用できるものであり、その例を図11においてフローシートに示す。自動的装置が適合性でなければプロセスは阻害され、試薬は別の固体支持体へと移ってしまう。第一工程は好ましくは自動ピペティング装置にて行い、ここで、ビオチン化サンプルRNAがピペットによりプールにおける異なるサイズのプローブを含む各プールに入れられる。その後、試験キットは凍結乾燥器を用いて乾燥するとよい。乾燥により体積の差による影響が除外される。任意の凍結乾燥により作業を続けるのに好適となるまで作業を停止させることが出来る。

40

【0093】

作業は適当なハイブリダイゼーションバッファーを自動ピペティング装置中のプールに添加することによって再開する。プレートは適当な手段、例えばフィルムまたはホイルでシールして次の工程における蒸発を避ける。試験キットが好適な熱シーラーを備えている場合、それを自動サーマルブロック内に配置し、そこでは温度が所望により上下してプ

50

ローブの変性とハイブリダイゼーションが可能となる。ハイブリダイゼーション後、プローブ:分析物-ハイブリッドを含む溶液は磁気粒子プロセッサに入れられ、アフィニティー捕捉、洗浄および溶出工程がストレプトアビジン/アビジン被覆磁性ビーズを工程から工程、例えば、KingFisher プレートにプログラムされたプロトコールにしたがって移すことにより行われる。溶出液は自動装置が異なるタイプのマイクロタイタープレートを用いるものである場合、所望により新たなプレートに移される。ウェルは定量的トランスファー用の溶出バッファーですすがれ、混合溶液が凍結乾燥器で蒸発され、サンプルの保存が可能となり、記録をより都合のよい時間に行うことが出来るようになる。言い換えると、該方法は簡単に測定を行うための異なるタイムスケジュールおよびプロトコールに適用させることが出来る。プローブ断片、サイズ標準および濃度標準は直接、あるいは便宜な工程の後に、自動的に自動分析装置に注入すればよい。プローブ断片に結合した標識の強度はピークの高さまたは面積として測定される。既知量の濃度標準の面積を用いて、各プローブ断片の絶対量を決定することが出来る。

10

【0094】

本発明の実験的設計および一般原理を本発明者らの研究室にて入手できる細菌株および合成ポリヌクレオチドを用いてさらに詳細に説明する。ここで用いる株およびポリヌクレオチドは単に例示的なものである。本発明は該株およびポリヌクレオチドまたは反応溶液に限定されるものではない。

【0095】

本発明の原理は実施例に用いたコンストラクトをその他の株または多量入手できるポリヌクレオチド配列およびプローブで置換することにより確認できる。当業者であれば容易に本発明の原理を異なる用途に適用することができよう。

20

【実施例1】

【0096】

電場におけるプローブの易動度およびプローブの改変

全RNAを*Clostridium symbiosum* 株 VTT E-981051T (以下、E1051と称する)から抽出し、2つの16S rRNA 標的化プローブであるBact (Amann R. I., et al., Appl. Environ. Microbiol. 56:1919-1925, 1990)および Erec (Franks, A. H., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:3336-3345, 1998)とハイブリダイズさせた。プローブ Bactは細菌 (真性細菌とも称された) に特異的であり (Amann et al., 1990)、プローブ Erecは*Clostridium* *coccoides* - *Eubacterium rectale*群に属する細菌に特異的である (Franks, A. H., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:3336-3345, 1998)。種 *Clostridium symbiosum* は、*Clostridium coccoides* - *Eubacterium rectale*-群に属し、したがってそのrRNA/rDNAはBactとErecとの両方のプローブに認識された。さらに、Erec-5A - プローブ Erecの改変版であって5A-テイルが付加されている (5つのさらなるアデノシン) - をモデル実験に用いた。実験は以下の工程にしたがって行った:

30

【0097】

調製工程:

RNase無含有使い捨て微小遠心管、ピペットチップ、試薬などを調製および分析工程において必要であるたびに用いた。

40

【0098】

工程1-プローブ

16SrRNA 標的化オリゴヌクレオチドプローブ

5'GCTGCCTCCCGTAGGAGT3' (配列番号:1)、

5'GCTTCTTAGTCARGTACCG3' (配列番号:2)および、

5'GCTTCTTAGTCARGTACCGAAAAA3' (配列番号:3)、

ここでR=A/Gは表1に挙げ、5'-末端を6-FAMTM フルオロフォアで標識し、これはApplied Biosystemから購入した:

【0099】

表1. プローブ

50

| プローブ 名前 | 配列 | 長さ (ヌクレオチド) | 参考文献 |
|------------|--------|----------------|---------------------|
| Bact | 配列番号:1 | 18 | Amann et al., 1990 |
| Erec | 配列番号:2 | 19 | Franks et al., 1998 |
| Erec-5A | 配列番号:3 | 24 | buu |

【 0 1 0 0 】

工程2 - 分析物の調製

Clostridium symbiosum E1051を純粋培養として強化クロストリジウム (Clostridium) 培養液(Difco)中で嫌気条件下、37 で培養した。E1051からの全RNAをZoetendal, E. G 10
., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:3854-3859 (1998)にしたがって抽出した。

【 0 1 0 1 】

分析工程:

工程1 - 分析物配列へのアフィニティータグ付加

RNAにPHOROPROBER ピオチン SP-1000によって製造業者(VECTOR Laboratories)の指示に従ってアフィニティータグ付加した。次いで、ピオチン化RNAを遊離のピオチンからRNeasy ミニキットによってRNAクリーンアップのプロトコルを適用して製造業者(Qiagen)の指示に従って精製した。

【 0 1 0 2 】

工程2 - 溶液ハイブリダイゼーション

RNAサンプル(102 ng)のアリコットを終濃度、5xSSC (0.75M NaCl - 75mM クエン酸ナトリウム、pH7.0)、0.1%(w/v) SDS および 1xデンハルト (0.02%(w/v) フィコール、0.02%(w/v) ポリビニルピロリドン、0.02%(w/v) ウシ血清アルブミン)のハイブリダイゼーション溶液中でポリヌクレオチドプローブ(1 pmol)と混合した。ハイブリダイゼーション混合物の体積は20 µlであった。反応混合物を70 で2分ついで40 で30分インキュベートした。

【 0 1 0 3 】

工程3 - アフィニティー捕捉、洗浄および溶出

ハイブリダイゼーションの後、KingFisher 磁気粒子プロセッサ ThermoLabsystems)を用いてストレプトアビジンで被覆された磁気ビーズを順にプログラムされたプロトコルにしたがってKingFisher マイクロタイタープレート上を移動させることにより、アフィニティー捕捉、洗浄および溶出工程を行った。各工程の溶液はあらかじめマイクロタイタープレートの特定のウェルにピペットで入れ、手順は室温でおこなった。

【 0 1 0 4 】

ハイブリダイゼーション反応をKingFisher プレートの特定のウェルに移した。NaCl濃度をアフィニティー捕捉の好適なように調整するため(1M)、そしてハイブリダイゼーション混合物を定量的にKingFisherウェルに移すため、ハイブリダイゼーションチューブ/ウェル40 µlのリンス溶液ですすぎ、次いでリンス溶液をハイブリダイゼーション混合物を含む同じKingFisher ウェルに添加した。リンス溶液は1部の2M NaCl-10mM Tris-HCl (pH 7.5)-1mM EDTAおよび2.33部のハイブリダイゼーション溶液からなる(工程2参照)。

【 0 1 0 5 】

ピオチン化RNAおよびRNA-オリゴヌクレオチド-ハイブリッドをストレプトアビジンで被覆した磁気粒子Dynabeads R M-280 (50 µg, Dynal A.S., Norway)に30分間収集した。捕捉の後、粒子を150 µl 1xSSC (0.15M NaCl-15mMクエン酸ナトリウム、pH7.0) - 0.1%SDSで3回、150 µlの水(脱イオン、限外ろ過水、RNaseフリー)で2回洗浄し、プローブを30 µlのホルムアミドで溶出した。次いで、ホルムアミドを凍結乾燥器で蒸発させ、プローブを10 µlの水に再懸濁した。

【 0 1 0 6 】

工程 4 - 溶出したプローブの同定

溶出したプローブをABI310 キャピラリー電気泳動装置(Applied Biosystems)を用いて 50

分析した。溶出したプローブを泳動挙動に基づいて同定した。あらかじめ、遊離プローブを同じ泳動条件で同じ装置で泳動し、その泳動挙動を測定した。個別のラン(即ちサンプル)の比較を容易にするためにサイズ標準をサンプルに添加した。結果は電気泳動図およびデータファイルから読み、これを図7に示す。

【 0 1 0 7 】

図7から理解されるように、1ヌクレオチドのみサイズが相違するオリゴヌクレオチドプローブはキャピラリー電気泳動において個別のピークとして分離され、Erec プローブへの5A-テイル付加は有意にその泳動挙動を変化させた。5A-テイルの付加によるプローブErecの修飾にも拘わらず、それは株 E1051からの標的RNAを認識した。

【 実施例 2 】

【 0 1 0 8 】

本発明のプロトコールにおけるプローブの特異性

2つのプローブChis と Erec (Franks, A. H., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:3336-3345, 1998)の特定の反応条件における特異性を、プローブを多数の細菌株とハイブリダイズさせることによって確認した。プローブ Bactを細菌rRNAの統合性を確認するため、ハイブリダイゼーションにおいて内部コントロールとして用いた。Chis は、Clostridium histolyticum 群に属する細菌に特異的である(Franks, A. H., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:3336-3345, 1998)。プローブBact およびErecは実施例1に記載した。以下の工程にしたがって実験を行った。

【 0 1 0 9 】

調製工程:

工程1- プローブ

5'-末端を6-FAMTMで標識した、Chis 5'TTATGCGGTATTAATCTRCCTTT3' (配列番号:4)、(ここでR=C/T; Franks, A. H., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:3336-3345, 1998)をApplied Biosystemsから購入した。プローブBact および Erecは実施例1の調製工程1に記載の通りにして得た。

【 0 1 1 0 】

工程2 - 分析物の調製

VTT Culture Collectionからの様々な微生物(表2)の純粋培養を適切な栄養培地で培養し、細菌からの全RNAをZoetendal, E. G., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:3854-3859 (1998)に記載のように、あるいは全RNA単離のためのプロトコールを適用してRNeasy ミニキットを用いて製造業者(Qiagen)の指示にしたがって抽出した。Trichoderma reeseiからの全RNAをTRIzol^{IR} 試薬法(Life Technologies; Gibco BRL)を用いて抽出した。

【 0 1 1 1 】

10

20

30

【表 1】

表 2. 試験生物

| 種 | 株別コード | | プローブに対する標的 | | | |
|-----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|------------|------|------|----|
| | VTT | International Culture Collection | Bact | Erec | Chis | |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> | E-00022 ^T | ATCC 824 | + | - | + | 10 |
| <i>Clostridium tyrobutyricum</i> | E-99908 | DSM663 | + | - | + | |
| <i>Clostridium symbiosum</i> | E-981051 ^T | ATCC 14940 | + | + | - | |
| <i>Eubacterium rectale</i> | E-022088 | ATCC 33656 | + | + | - | |
| <i>Clostridium leptum</i> | E-021850 ^T | DSM 753 ^T | + | - | - | 20 |
| <i>Clostridium lituseburense</i> | E-021853 ^T | DSM 797 ^T | + | - | - | |
| <i>Trichoderma reesei</i> | D-74075 | ATCC 26921 | - | - | - | |
| | | | | | | |

【 0 1 1 2 】

分析工程:

工程1 - 分析物配列へのアフィニティータグ付加

RNAに実施例1の分析工程1に記載のようにビオチンによってアフィニティータグ付加した。ビオチン化の後、ビオチン化RNAを遊離ビオチンからVECTOR Laboratoriesによるプロトコールにしたがって、あるいはRNeasy ミニキットを用い、製造業者の指示に従って (Qiagen) RNA クリーンアップ用のプロトコールを適用して精製した。

【 0 1 1 3 】

工程2 - 溶液ハイブリダイゼーション

RNAサンプル(50 ~ 80 ng)のアリコットをオリゴヌクレオチドプローブBactおよびChisまたはBactおよびErec(各1 pmol)を含むハイブリダイゼーション溶液と混合した(実施例1の分析工程2参照)。ハイブリダイゼーション混合物の終容量は20 µlであった。反応混合物を70 °Cで2分、50 °Cで30分インキュベートした。

【 0 1 1 4 】

工程3 - アフィニティー捕捉、洗浄および溶出

アフィニティー捕捉、洗浄および溶出を実施例1の分析工程1に記載のようにKingFisher 磁気粒子プロセッサ (ThermoLabsystems)を用いて行った。

【 0 1 1 5 】

工程 4 - 溶出したプローブの同定

溶出したプローブを実施例1の分析工程4に記載のようにABI310 キャピラリー電気泳動装置 (Applied Biosystems)を用いて分析した。

【 0 1 1 6 】

図8に示すように、オリゴヌクレオチドプローブChisおよびErecは、特定のハイブリダイゼーション条件下で予測された特異性を示し(表2)、その標的群に属する株についてのみシグナルを生じた。プローブは図8には示さないが、株E-00022^T および E-022088にも予測された特異性を示した。さらに、プローブ Bactは所望の特異性を示しTrichoderma reesei RNAについてのシグナルは生じなかった。株 E-021850からのRNAは部分的に分解していたが、プローブ Bactによるシグナルを生じ、これは例えば調製工程の間に共有され

10

20

30

40

50

たRNA の分析にも本方法が利用できることを示す。特定のハイブリダイゼーション条件は3つのすべてのプローブについて同じであり、したがってこれらプローブはプローブのプールとして利用できる。

【実施例 3】

【0117】

定量評価

全RNAを*Clostridium tyrobutyricum* VTT E-99908 (以下E908と称する)から抽出し、様々な量のRNA (0.01-10ng)をプローブBactおよびChisとハイブリダイズさせた。実験は以下の工程にしたがって行った:

【0118】

調製工程:

工程1- プローブ

実施例1の調製工程1および実施例2の調製工程1に記載のプローブBactおよびChisを本実験に用いた。

【0119】

工程2 - 分析物の調製

E908を純粋培養として強化クロストリジウム(*clostridial*)培養液 (Difco)で嫌気条件にて37℃で培養し、全RNAをRNeasy ミニキットを用いて製造業者(Qiagen)の指示に従って細菌からの全RNA 単離用プロトコールによって抽出した。

【0120】

分析工程:

工程 1 - 分析物配列へのアフィニティータグ付加

RNAに実施例1の分析工程1に記載のようにビオチンによってアフィニティータグ付加した。ビオチン化の後、ビオチン化RNAを遊離のビオチンからVECTOR Laboratoriesによるプロトコールにしたがって精製した。

【0121】

工程2 - 溶液ハイブリダイゼーション

E908からの全RNA抽出物を十分に希釈し、RNAサンプルのアリコット(0.01; 0.05; 0.1; 0.5; 1.0および10.0 ng)をオリゴヌクレオチドプローブBactおよびChis (各1 pmol)を含むハイブリダイゼーション溶液と混合した(実施例1の分析工程2参照)。ハイブリダイゼーション混合物の終容量は20 µlであった。反応混合物を70℃で2分、ついで50℃で30分インキュベートした。

【0122】

工程3 - アフィニティー捕捉、洗浄および溶出

アフィニティー捕捉、洗浄および溶出を実施例1の分析工程1に記載のようにKingFisher 磁気粒子プロセッサ (ThermoLabsystems)を用いて行った。

【0123】

工程 4 - 溶出したプローブの同定

溶出したプローブを実施例1の分析工程4に記載のようにABI310 キャピラリー電気泳動装置(Applied Biosystems)を用いて分析した。

【0124】

図9に示すように、プローブのシグナル強度(ピークの高さ及び面積)はハイブリダイゼーションに用いたRNA量とよく相関していた。両方のプローブは16S rRNA 分子内に標的部位を有するが、分子の異なる領域におけるものである。プローブBactおよびChisのフルオロフォア標識は等レベルであり、したがってプローブからのシグナル強度を比較できる。

【実施例 4】

【0125】

微生物集団の分析

全RNAを株 E1051、E908および*Clostridium lituseburense* VTT E-021853 (以下E1853と称する)から抽出した。これら株からの様々な量のRNAを混合し、プローブBact、Erecお

10

20

30

40

50

よびChisからなるプローブのプールとハイブリダイズさせた。実験は以下の工程にしたがって行った：

【 0 1 2 6 】

調製工程：

工程1- プローブ

実施例1の調製工程1および実施例2の調製工程1に記載のプローブ Bact、ErecおよびChis を本実験に用いた。

【 0 1 2 7 】

工程2 - 分析物の調製

E1051、E908およびE1853の純粋培養からの全RNAを実施例2の調製工程2に記載のように調整した。

【 0 1 2 8 】

分析工程：

工程1 - 分析物配列へのアフィニティータグ付加

RNAに実施例1の分析工程1に記載のようにビオチンによってアフィニティータグ付加した。ビオチン化の後、ビオチン化RNAを実施例2の分析工程1に記載のように遊離のビオチンから精製した。

【 0 1 2 9 】

工程2 - 溶液ハイブリダイゼーション

様々な細菌（表3）からの特定量のRNAを混合し、オリゴヌクレオチドプローブ Bact、ChisおよびErec（各1 pmol each）を含むハイブリダイゼーション溶液（実施例1の分析工程2参照）を添加した。ハイブリダイゼーション混合物の終容量は20 μ lであった。反応混合物を70 $^{\circ}$ Cで2分、次いで50 $^{\circ}$ Cで30分インキュベートした。

【 0 1 3 0 】

【表 2】

| 実施例 4 においておこなったハイブリダイゼーション実験 | | | | |
|------------------------------|----------------|-----------|------|-------|
| ハイブリダイゼーション 反応 | プローブ プール | 全RNAの%RNA | | |
| | | E1051 | E908 | E1853 |
| I | Bact、Erec、Chis | 100 | — | — |
| II | Bact、Erec、Chis | — | 100 | — |
| III | Bact、Erec、Chis | 20 | 20 | 60 |
| IV | | 50 | 50 | — |
| V | Bact、Chis | 80 | 20 | — |
| | Bact、Chis | | | |

【 0 1 3 1 】

工程3 - アフィニティー捕捉、洗浄および溶出

アフィニティー捕捉、洗浄および溶出を実施例1の分析工程1に記載のようにKingFisher 磁気粒子プロセッサ（ThermoLabsystemes）を用いて行った。

【 0 1 3 2 】

工程 4 - 溶出したプローブの同定

溶出したプローブを実施例1の分析工程 4に記載のようにABI310 キャピラリー電気泳動装置（Applied Biosystems）を用いて分析した。

【 0 1 3 3 】

図10Aに示すように、C. symbiosum E1051からのRNA を分析した場合、プローブ Erecからのシグナルはプローブ Bactからのシグナルより低かった。これはプローブ Erecのフルオロフォア標識レベルがプローブ Bactと比べて低かったことによる。プローブBactおよびChisのフルオロフォア標識レベルは同等であるので、C. tyrobutyricum E908からのRNA を分析した場合のプローブBactおよびChisからのシグナル強度は同等であった。したがって、プローブ標識レベルを、検出限界を適切なレベルに調整することが出来た。C. t

tyrobutyricum E908、C. symbiosum E1051およびC. lituseburense E1853からのRNAを含む微生物集団の定性的分析において、すべてのプローブ、Bact、ChisおよびErecは予測通りのシグナルを生じた。Bact プローブはすべての株を同定し、Chisは株 E908のみ、Erecは株 E1051のみを同定した。

【 0 1 3 4 】

図10Bに示すように、フルオロフォア標識レベルが同等であるプローブBactおよびChisを用いて、混合細菌集団 (C. tyrobutyricum E908および C. symbiosum E1051)において、C. histolyticum 群 (C. tyrobutyricum E908)に属する細菌の相対的比率を定量することが出来た。Bact プローブは両方の株を同定するが、Chisは株 E908しか同定しない。

【実施例 5】

10

【 0 1 3 5 】

質量分析による16S rRNA 標的化プローブの検出および定量

サンプル中の16S rRNA 標的化プローブ Bact (Amann R. I., et al., Appl. Environ. Microbiol. 56:1919-1925,1990) および Chis (Franks, A. H., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:3336-3345,1998)の相対的比率を質量分析を用いて定量した。実験設定は、C. histolyticum -群に属する細菌が全細菌集団の一部を形成するプローブ検出状況を模倣したものとした。プローブ Bactはすべての細菌(以前は真性細菌と称された)(Amann R. I., et al., Appl. Environ. Microbiol. 56:1919-1925,1990)を認識し、プローブ ChisはClostridium histolyticum群に属する細菌のみを認識する(Franks, A. H., et al., Appl. Environ. Microbiol. 64:3336-3345, 1998)。実験は以下の工程にしたがった：

20

【 0 1 3 6 】

調製工程：

工程1 - プローブ

実施例1の調製工程1および実施例2の調製工程1に記載の16S rRNA 標的化オリゴヌクレオチドプローブ BactおよびChisを本実験に用いた。

【 0 1 3 7 】

工程2 - 分析物の調製

1 μ Mのプローブ Bactおよび0.1 μ Mのプローブ Chisを含むサンプルを調製した。

【 0 1 3 8 】

分析工程：

30

工程1 - 質量分析によるプローブの検出および定量

BactおよびChis プローブを含むサンプルをマトリックス支援脱離/イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS)を用いて製造業者(Sequenom)の指示にしたがって分析した。プローブをその質量に基づいて同定し、そのサンプル中の相対量をシグナル強度(ピークの高さ)によって定量した。

【 0 1 3 9 】

図12に示すように、プローブBactおよびChis は質量分析において個別のピークとして同定できた。プローブ Chisは2つのピークを示した。というのは該プローブは2種類の配列を有し(3'末端から6番目の塩基がC または T)、その結果異なる質量を有するからである。Bact プローブのシグナルは、プローブ Chisからの2つのピークの併合シグナルよりもおよそ10倍高かった。プローブのシグナル強度はサンプルにおけるその相対的比率とよく相関していた。

40

【実施例 6】

【 0 1 4 0 】

ビオチン化オリゴ (dT)を用いた細胞または組織サンプルにおけるポリヌクレオチド量の変動の定量的および/または比較評価

調製工程：

ゲノムDNAおよびオリゴヌクレオチドを用いて異なるサイズの特異的プローブを作成した。

【 0 1 4 1 】

50

工程1. -ゲノムDNAの調製

Saccharomyce cerevisiae VTT-H1346 (wt) 細胞を培養し、収集し、ゲノムDNAを細胞から、Supplement 39, Current Protocols in Molecular Biology (1997) 13.11.1-13.11.4, John Wiley & Sons, Inc.に記載のようにして単離した。

【 0 1 4 2 】

工程2. -プライマーの設計および調製

一連の遺伝子に特異的なプローブ配列をKivioja et al, Bioinformatics, 2002 July; 18 Suppl 1:S199-206に記載の方法およびコンピュータプログラムを用いて得(*S.cerevisiae* 遺伝子についてのプローブ: YAL054c-ACS1、YCR005c-CIT2、YMR083w-ADH3およびYBL015w-ACH1)、あるいはプログラム: EBI Genomes Server (2001) at <http://www.ebi.ac.uk/genome/>. を、*S.cerevisiae*のゲノムを形成するコード配列 (CDS)のダウンロードに、Steve Rozen, Ien J.Skaletsky (1998) Primer3 Code available at http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html.をCDSにおける唯一のプライマーの発見に、そして、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> をプライマーおよびインシリコで調製したゲノム/CDS の産物(*S.cerevisiae* 遺伝子YFL039c-ACT1についてのプローブ)の独自性の確認に用いた。

【 0 1 4 3 】

得られたフォワードおよびリバース プライマー配列はそれぞれ以下の通り(5'-3'方向)
YAL054c-ACS1:

ACAATGCCAGGGTTTGACAATG (配列番号:5)および、
AAAGACATCGGGCCATTTGC (配列番号:6)、

YCR005c-CIT2:

TTAGCACGCCCATGAAGTGG (配列番号:7) および、
AGGATGAAGATTTCTGGACTTGA (配列番号:8)、

YMR083w-ADH3:

AAGCTACCAAAGGTGGCCCTC (配列番号:9) および、
AGGCTTCTCTCGTATCAGCTCTGT (配列番号:10)、

YBL015w-ACH1:

GCCCTCTGACGACATGTCCAG (配列番号:11) および、
ATTGGCGTGC GCGTAAATGT (配列番号:12) および、

YFL039c-ACT1:

GCCCCAGAAGAACACCCTGT (配列番号:13) および、
ACCGGCCAAATCGATTCTCA (配列番号:14)。

【 0 1 4 4 】

特定の遺伝子について得られた各プライマーペアに、いわゆる普遍的プライマー配列をフォワードおよびリバースプライマーに結合させた: 5'-tgctaggcgccgctc-3' (配列番号:15) 配列をプライマーペアのフォワードプライマーに、5'-ggatgcccgcgtctc-3' (配列番号:16) 配列をリバースプライマーに結合させた。したがって例えば 遺伝子YBL015w-ACH1について全長フォワード プライマーは、

5'-tgctaggcgccgctcGCCCTCTGACGACATGTCCAG-3' (配列番号:17)

そして全長リバースプライマーは、

5'-ggatgcccgcgtctcATTGGCGTGC GCGTAAATGT-3' (配列番号:18)である。

【 0 1 4 5 】

特異的および普遍的配列の両方を含むプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)を用いて産生したプローブの最終サイズは以下の通りであった:

YAL054c-ACS1: 193 塩基;

YCR005c-CIT2: 207 塩基;
YMR083w-ADH3: 248 塩基;
YFL039c-ACT1: 290 塩基; および、
YBL015w-ACH1: 453 塩基

【 0 1 4 6 】

普遍のおよび特異的部分からなるプライマーはSigma-Genosys Ltd.から購入した。普遍的プライマー、5'-tgctaggcgcgccgtc-3' (配列番号:15)および5'-末端に6FAMTM フルオロフォアがついた5'-ggatgcggccgctctc-3' (配列番号:16)はThermoElectron Corporationから購入した。

【 0 1 4 7 】

工程 3. - プローブの調製

PCR 反応を行って(工程1からの)ゲノムDNAからの特異的プローブ配列を増幅した。バッファー条件は使用する耐熱性校正(3'-5' エキソヌクレアーゼ活性)DNA ポリメラーゼに応じて調整した。PCR プログラムは: 98 10秒、70 20秒(-0,5 /サイクル)、72 25秒; 20 サイクルの98 10秒、65 20秒、72 25秒; 72 10分、を用いた。

【 0 1 4 8 】

次いで、PCR 反応を QIAquick PCR 精製キットプロトコール (QIAquickR Spin Handbook, March 2001; QIAGEN)を用いて精製した。プローブ断片を2,5-4% アガロースゲルにて(臭化エチジウムで染色)水平ゲル電気泳動で75V、1-2時間泳動し、単離後、さらにQIAquick ゲル抽出キットプロトコール (QIAquickR Spin Handbook, March 2001; QIAGEN)を用いて精製した。

【 0 1 4 9 】

蛍光標識を2回目のPCR 反応の際にプローブに導入した。5'-結合フルオロフォア、6FAMTMを備えた普遍的プライマーを用いて上記と本質的に同様の条件下で精製プローブを増幅した。次いでPCR 反応を QIAquick PCR精製キットプロトコール(QIAquickR Spin Handbook, March 2001; QIAGEN)を用いて精製した。プローブをキャピラリー電気泳動 DNAシーケンサーABI PRISM 310, Genetic Analyser (Applied Biosystems)により GeneScanR 分析ソフトウェア(Applied Biosystems)を用いて分析した。プローブサンプルを適当な濃度に希釈し、既知量のGeneScan-500 サイズ標準 (Applied Biosystems)と混合し、ホルムアミドを添加して好適な注入容量とした。

【 0 1 5 0 】

Agilent 2100 BioanalyzerR および DNA 500 LabChip キット(# 5064-8284、Agilent)を用いて各PCRの後の精製産物の質と量をモニターした。PCRによるプローブの調製を図13に示す。

【 0 1 5 1 】

工程 4. - RNA 分析物の調製

S.cerevisiae VTT-H2217 細胞を必須アミノ酸含有酵母窒素基本(Difco、#291940)培地(Sherman et al. の修飾、Methods in yeast genetics、Cold Spring Harbor Laboratory, 1983)、および3%グルコースで、O.D. 3,5-4,0となるまで培養し、メッセンジャーRNAをP-omega Notes Magazine Number 41、p.14、(1993)に記載の少量用プロトコールにしたがって単離した。mRNAの収率と完全性をAgilent 2100 BioanalyzerR および RNA 6000 Nano LabChip キット(#5064-4476、Agilent)を用いて確認した。

【 0 1 5 2 】

実験は以下の工程にしたがった:

分析工程:

工程1- ハイブリダイゼーションアッセイの集合.

ハイブリダイゼーションアッセイをPCR プレート(#AB-0600、Abgene)に集め、以下を混合した: 2x ハイブリダイゼーション溶液: 1.2M NaCl、0,12 M クエン酸ナトリウム (pH7)、0.2%(w/v)SDS、40% ホルムアミドおよび0.04%(w/v)フィコール、0.04%(w/v) ポリビニ

10

20

30

40

50

ルピロリドン、0.04%(w/v) ウシ血清アルブミン (2xデンハルト 溶液); プローブ混合物 (100 fmolの各6FAMTM 標識化プローブ含有); 200、400 または600 ngのmRNA (各量はAおよびBにおいて二連); 3,5 fmol / (ng mRNA)のビオチン化オリゴ(dT) プローブ (Z5261、Promega)。Rnase無含水を用いてハイブリダイゼーション溶液を希釈して終容量において1xとした。アッセイの典型的な終容量は30-60 μ Lである。

【 0 1 5 3 】

工程2-溶液中でのプローブおよびオリゴ(dT)からmRNAへの変性およびハイブリダイゼーション

PCR プレートを開脱可能な熱シーリングホイル(EASY Peel、AB-0745 Abgene and Thermosealer (AB-0384/240 Abgene)でシーリングした。集めたアッセイ混合物をサーマルブロック(DNA EngineTM PTC200、MJ Research)中で75 で5分、58 で 8時間、および45 で8時間インキュベートした。最後に、ハイブリダイゼーション反応を室温で10分間インキュベートした(ビオチン化オリゴ(dT) プローブをmRNAにハイブリダイズさせるため)。

【 0 1 5 4 】

工程3-アフィニティー捕捉、洗浄および溶出

ハイブリダイゼーションの後、KingFisher 磁気粒子プロセッサ(ThermoLabsystems)を用いてストレプトアビジンで被覆した磁気粒子を順にKingFisher マイクロタイタープレート上をプログラムされたプロトコールにしたがって移動させることによりアフィニティー捕捉、洗浄および溶出工程を行った。各工程の溶液はマイクロタイタープレートの特定のウェルにあらかじめピペットでいれておき、手順は室温で行った。

【 0 1 5 5 】

インキュベーションウェルからのハイブリダイゼーション反応をKingFisher プレートの特定のウェルに移した。ハイブリダイゼーション混合物を定量的にKingFisher ウェルに移すために、工程2におけるインキュベーションウェルを1.5x ハイブリダイゼーション容量の0,5xSSC (0.075M NaCl - 7.5mM クエン酸ナトリウム、pH6.5) - ですすぎ、0,1%SDS 溶液およびリンス溶液をハイブリダイゼーション混合物を含む同じKingFisher ウェルに添加した。

【 0 1 5 6 】

ビオチン化オリゴ(dT):mRNA:プローブ -ハイブリッドをストレプトアビジンで被覆した磁気粒子(ストレプトアビジン MagneSphereR Paramagnetic particles、Z5241、Promega)に30分間収集した。捕捉の後、粒子を0,2xSSC-0,1%SDSで 3 回、0,1xSSC-0,1%SDSで 2 回洗浄し、プローブを30 μ Lのホルムアミドで溶出した。次いで、ホルムアミドを凍結乾燥器で蒸発させ、プローブを5 μ Lの水に再懸濁した。

【 0 1 5 7 】

工程4-溶出したプローブの同定および分析

溶出したプローブをキャピラリー電気泳動 DNAシーケンサーABI PRISMR 310、Genetic Analyser (Applied Biosystems)およびGeneScanR 分析ソフトウェア (Applied Biosystems)を用いて分析した。再懸濁したサンプルを既知量のGeneScan-500サイズ標準 (Applied Biosystems)と混合し、ホルムアミドを添加して注入容量に適するようにした。

【 0 1 5 8 】

溶出したプローブをサイズ標準と比較してのそのキャピラリー電気泳動における泳動挙動に基づいて同定し、泳動は調製工程3における単一のプローブについて同じ泳動条件で行った。溶出したプローブの量はそのピーク面積にしたがって測定した(蛍光面積単位、AU)。結果は電気泳動図およびデータファイルから読んだ。すべてのアッセイ (mRNA量 200、400 および 600 ng)におけるプローブs YBL015w-ACH1 (サイズ 453 塩基) およびYCR005c-CIT2 (サイズ 207 塩基)からの蛍光 (AU)比を計算し(二連、AおよびB)、これを表4に示す。また 6 回のアッセイにおける平均および標準偏差も示す。

【 0 1 5 9 】

【表 3】

| アッセイ A および BにおけるプローブYBL015w-ACH1 (サイズ 453 塩基)および YCR005c-CIT2 (サイズ 207 塩基)からのシグナル比 | | | | |
|--|--------|--------|-----|------|
| アッセイにおける mRNA量 | アッセイ A | アッセイ B | 平均 | 標準偏差 |
| 200 | 4.7 | 4.5 | 5.2 | 0.7 |
| 400 | 5.5 | 4.6 | | |
| 600 | 6.0 | 6.1 | | |

【実施例 7】

10

【0160】

少量の分析物の定量的評価

調製工程:

調製工程は実施例6に記載のように行った。

【0161】

分析工程:

プローブの分析工程は実施例6と異なり、以下に記載するように非常に少量のRNAを検出できるように実験を設定した。

【0162】

工程1-ハイブリダイゼーションアッセイの集合

20

ハイブリダイゼーションアッセイを実施例6の分析工程1に記載のよう集合させた(各 mRNA量 200、400および 600ng CおよびDにおいて二連)。

【0163】

工程2-溶液中でのプローブおよびオリゴ(dT)の変性およびmRNAへのハイブリダイゼーション

変性およびハイブリダイゼーションは実施例6の分析工程2に記載のように行った。

【0164】

工程3-アフィニティー捕捉、洗浄および溶出

アフィニティー捕捉、洗浄および溶出は実施例6の分析工程3に記載のように行った。

【0165】

30

工程4- 溶出したプローブの増幅

溶出したプローブ(5 µlの水に再懸濁)をフルオロフォア標識化プライマー(実施例6の調製工程2に記載)を用いてPCR反応により増幅した。バッファー条件は使用する耐熱性校正(3'-5' エキソヌクレアーゼ活性)DNAポリメラーゼに適するように調整した。例えば、98 30秒; 15 サイクルの98 10秒、72 30秒からなるPCRプログラムを用いた。ネガティブコントロール(テンプレート無し)を同じPCRプログラムを用いて行った。

【0166】

工程5-増幅されたプローブの精製

次いでPCR反応をQIAquick PCR精製キットプロトコール (QIAquickR Spin Handbook, March 2001; QIAGEN)を用いて精製した。

40

【0167】

工程6-精製したプローブの希釈

精製したプローブを水で1:100に希釈した。ネガティブコントロールは希釈しなかった。

。

【0168】

工程7-希釈したプローブおよびネガティブコントロールの同定および分析

希釈したプローブを、実施例6の分析工程4にて溶出したプローブと同じ条件下でキャピラリー電気泳動 DNA シークエンサーABI PRISM 310、Genetic Analyser (Applied Biosystems) およびGeneScanR 分析 ソフトウェア (Applied Biosystems)を用いて同定および分析した。0,5 µlの希釈サンプルまたは1 µlの非希釈ネガティブコントロールを既知量の

50

GeneScan-500 サイズ標準 (Applied Biosystems)と混合し、ホルムアミドを添加して注入容量に適するようにした。

【 0 1 6 9 】

増幅および希釈したプローブをサイズ標準と比較してのキャピラリー電気泳動における泳動挙動に基づいて同定し、泳動は調製工程3における単一プローブについて同じ泳動条件で行った。増幅および希釈したプローブの量はピーク面積(AU)にしたがって測定した。結果は電気泳動図およびデータファイルから読んだ。

【 0 1 7 0 】

増幅しない(実施例6)および増幅した600 ng のmRNA (分析工程1)を集めたアッセイおよびネガティブコントロール増幅の電気泳動図を図14に示す。非増幅サンプルにおいては、プローブ YCR005c-CIT2 (207 塩基)からのピークのみが明らかに観察される。増幅(および希釈した)アッセイでは、YCR005c-CIT2が強いピークとしてみられ、プローブYAL054c-ACS1 (193 塩基)およびYFL039c-ACT1 (サイズ 290 塩基)からのピークも明らかにみられ、プローブ遺伝子YMR083w-ADH3 (248 塩基)からのピークもわずかにみられる。ネガティブコントロールPCRでは問題のプローブの増幅は示されなかった。

【 0 1 7 1 】

すべての増幅したアッセイ(mRNA 量 200、400および600ng)におけるプローブYBL015w-ACH1 (サイズ 453 塩基) および YCR005c-CIT2 (サイズ 207 塩基)からのプローブ蛍光(AU)比を計算し(二連、CおよびD)、表5に示す。6回のアッセイにおける比の平均および標準偏差も示す。増幅したアッセイ(表5)および非増幅アッセイ(表4)から計算した 2つのプローブの平均比は精製、希釈、および少容量のピペッティングにより定量が乱れることを考慮してもよく一致していた。

【 0 1 7 2 】

【表 4】

| 15 サイクルの PCR後のアッセイ C およびDにおけるプローブYBL015w-ACH1 (サイズ 453 塩基) およびYCR005c-CIT2 (サイズ 207 塩基)からのシグナル比 | | | | |
|---|--------|--------|-----|------|
| アッセイにおける mRNA量 (ng) | アッセイ C | アッセイ D | 平均 | 標準偏差 |
| 200 | 3.5 | 3.8 | 4.1 | 0.5 |
| 400 | 4.6 | 4.4 | | |
| 600 | 3.8 | 4.5 | | |

【図面の簡単な説明】

【 0 1 7 3 】

【図 1】図1は、キャピラリー電気泳動による異なるフルオロフォアを有する一本鎖DNA断片およびポリヌクレオチドの分離を示す。

【図 2 A】図2Aは、トレーサー(星印)タグ付加されたプローブ(P)とアフィニティー即ちビオチン(B)タグ付加された一本鎖RNA分析物配列とのハイブリダイゼーション工程および分析物(A)とプローブ(P)とのハイブリッド(H)の形成を示す。

【図 2 B】図2Bは、分解可能化タグとしても同時に作用するトレーサータグ(星印)を備えたプローブ(P)とアフィニティー即ちビオチン(B)タグ付加された二本鎖ポリヌクレオチド即ちRNA分析物配列とのハイブリダイゼーション工程、および、分析物(A)とプローブ(P)とのハイブリッド(H)形成を示す。分析物配列と一致しないプローブまたはモル過剰に存在するプローブは溶液中に遊離のまま残る。

【図 3 A】図3Aは、アフィニティータグ(B)の対応物により被覆された固体分離補助手段(SAT)へのアフィニティー(B)タグ付加されたハイブリッド(H)の捕捉を示す。

【図 3 B】図3Bは、アフィニティー(B)タグ付加されたハイブリッド(H)の、アフィニティータグ(B)の対応物により被覆された固体分離補助手段(SAT)への捕捉を示す。アフィニティータグ付加された分析物配列にハイブリダイズしなかったトレーサータグ付加されたプローブ配列は捕捉されない。当然、分離補助手段(SAT)は遊離のアフィニティータグおよ

びプローブ配列にハイブリダイズしていないアフィニティータグ付加された分析物にも結合する。

【図4】図4は、トレーサータグ付加されたプローブ(P)の固体分離補助手段(SAT)からの溶出を用いた遊離/分離補助手段(SAT)を備えたアフィニティータグ付加された分析物配列(A)およびトレーサータグ付加されたプローブ(P)の溶液中への放出を示す。

【図5】図5A-Bは、微生物生態学における16S rRNAアプローチを示す。図5AはリボソームRNA遺伝子オペロンを示し、これには、16S、23Sおよび5S rRNAが含まれ、16S rRNAのそして可変領域1-9が強調されている。図5Bは種の同定を可能にする可変領域およびある程度保存された微生物群の同定を可能にする領域を含む16S rRNAの構造を示す。

【図6】図6はクロストリジウムおよび関連する細菌の系統発生樹を示す。

【図7】図7は、実施例1による本発明の比較方法を実施した際に、電気泳動図およびデータファイルから記録された結果を示す。すべてのプローブは、*C. symbiosum* E981051 RNAとのハイブリダイゼーションにおいて機能的である。BactおよびErecプローブは異なるサイズ(それぞれ18および19塩基)および異なる易動度を有する。Erec-5A プローブの電気泳動易動度は、A-テイルの付加により、Erec プローブの易動度と異なる。

【図8】図8A-Bは、実施例2による本発明の比較方法を実施した際に、電気泳動図およびデータファイルから記録された結果を示す。図8Aは、プローブBactおよびChisによる結果を示す。Chisプローブは株 *C. tyrobutyricum* E99908のみを認識するのに対し、Bactプローブはすべての細菌株を認識する。いずれのプローブも真菌 *Trichoderma reesei* は認識しない。図8Bは、プローブBactおよびErecによる結果を示す。Erecプローブは、株 *C. symbiosum* E981051のみを認識するのに対し、Bactプローブはすべての細菌株を認識する。いずれのプローブも真菌 *Trichoderma reesei* は認識しない。

【図9】図9は実施例3による本発明の定量的方法を実施した際に、電気泳動図およびデータファイルから記録された結果を示す。BactおよびChis プローブのシグナル強度はハイブリダイゼーションに用いた *C. tyrobutyricum* E908 RNAの量に対応する。

【図10】図10A-Bは実施例4による本発明の定性的かつ定量的方法を実施した際に、電気泳動図およびデータファイルから記録された結果を示す。図10Aは、プローブBactおよびErecを用いて *C. symbiosum* E1051からのRNAを、プローブBactおよびChisを用いて *C. tyrobutyricum* E908からのRNAを、そしてプローブBact、ChisおよびErecを用いて *C. butyricum* E908、*C. symbiosum* E1051および *C. lituseburensis* E1853からのRNAを含む微生物集団を分析した際に得られた結果を示す。Bact プローブはすべての株を認識するのに対し、Chis プローブは株 E908のみを、Erec プローブは株 E1051のみを認識する。プローブBactおよびChisを標識するフルオロフォアのレベルは同じである一方、プローブ Erecのレベルはより低い。各株からのRNAの比率をハイブリダイゼーションに用いた全RNAのパーセンテージとして示す。図10Bは、プローブBactおよびChisを用いて *C. tyrobutyricum* E908および *C. symbiosum* E1051を含む微生物集団を分析した結果を示す。Bact プローブは両方の株を認識する一方、Chis プローブは株E908のみを認識する。各株からのRNAの比率をハイブリダイゼーションに用いた全RNAのパーセンテージとして示す。

【図11】図11は、方法の半自動化実行をフローシートとして示す。

【図12】図12は、本発明の実施例5による定性的かつ定量的方法を行った場合の質量スペクトルおよびデータファイルから記録された結果を示す。BactおよびChis プローブのシグナル強度はサンプル中のそれらの濃度に対応する。

【図13】図13は、PCRによるプローブの調製の模式図である。

【図14】図14は、PCR-増幅(=15サイクルのPCR)を行った、行っていない(=未増幅)ならびにネガティブコントロールの等量のmRNAについてのアッセイからのプローブ面積(蛍光単位)を示す電気泳動図である。サンプルはBI 310 遺伝子分析器で泳動した。

【図 1】

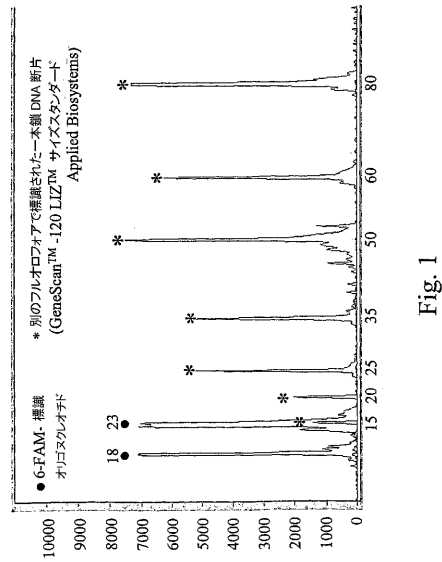


Fig. 1

【図 2 A】

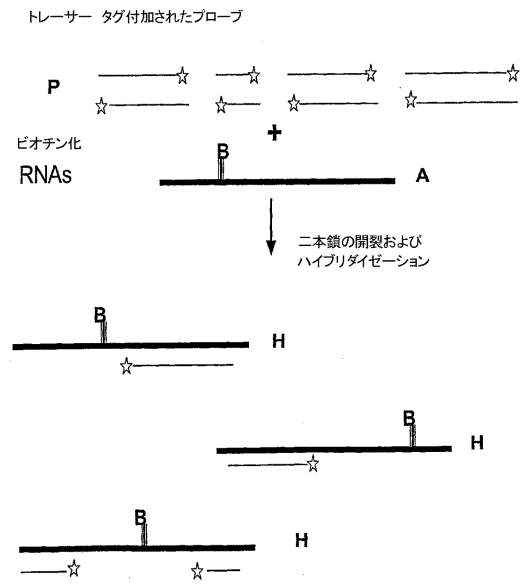


Fig. 2A

【図 2 B】

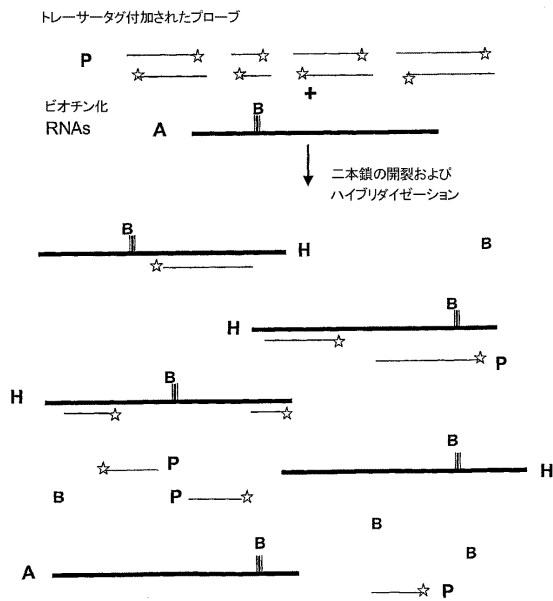


Fig. 2B

【図 3 A】

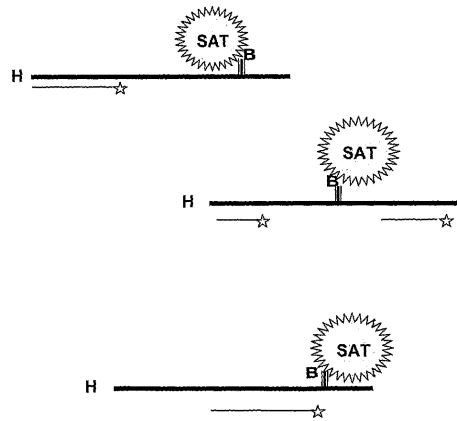


Fig. 3A

【図 3 B】

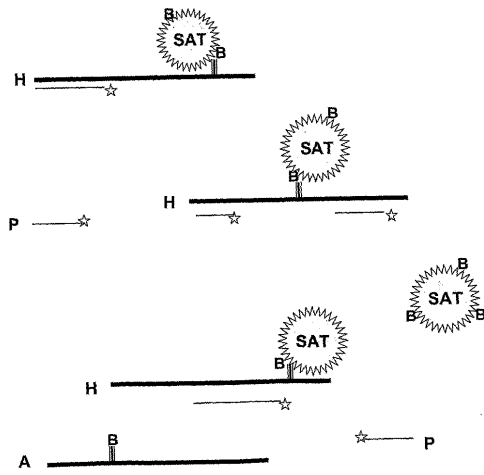


Fig. 3B

【図 4】

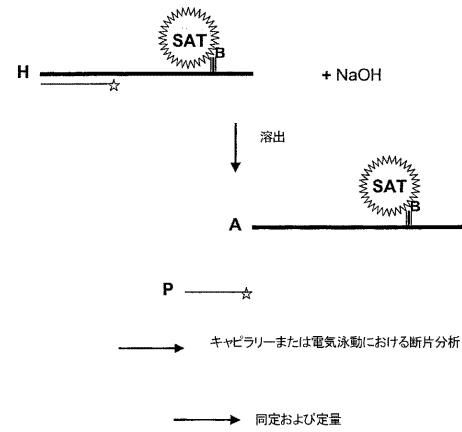


Fig. 4

【図 5 A】

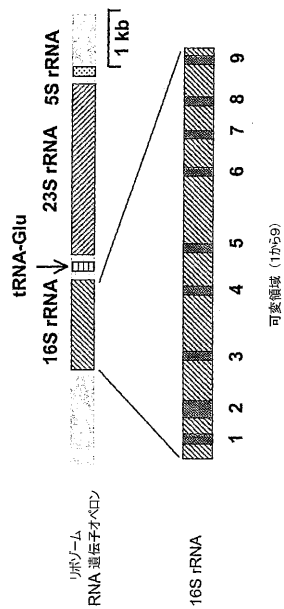


Fig. 5A

【図 5 B】

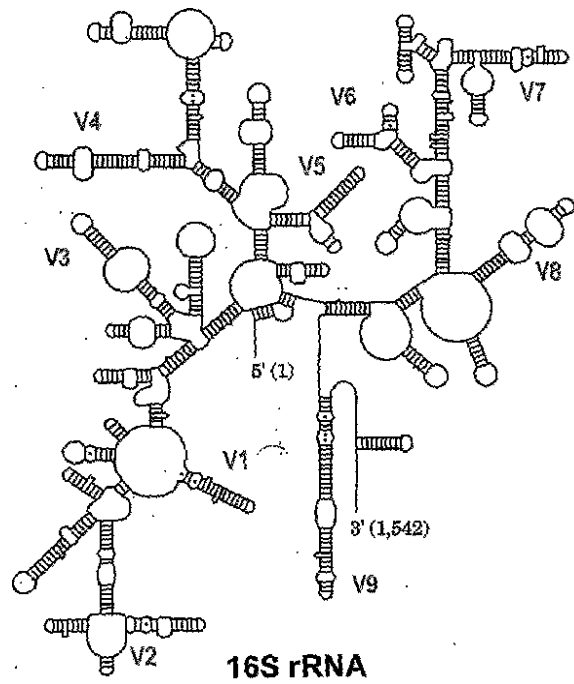
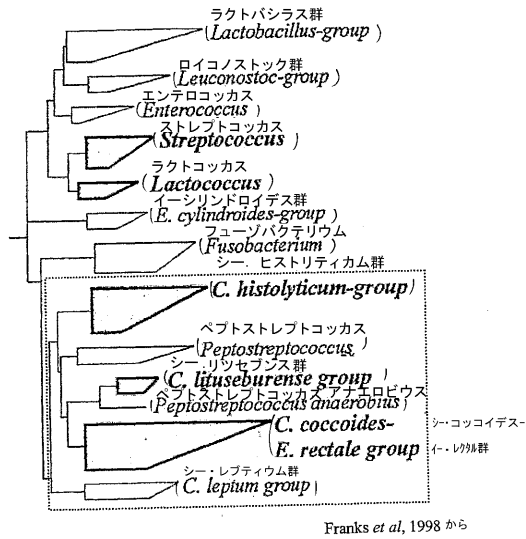


Fig. 5B

【図 6】



【図 7】

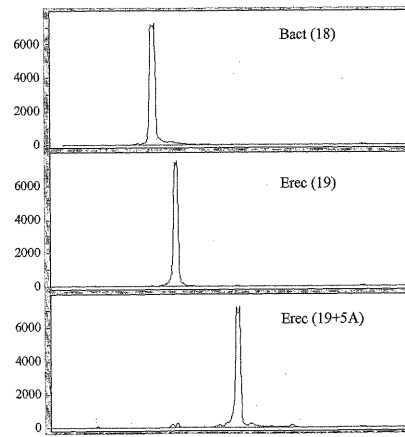


Fig. 7

【図 8】

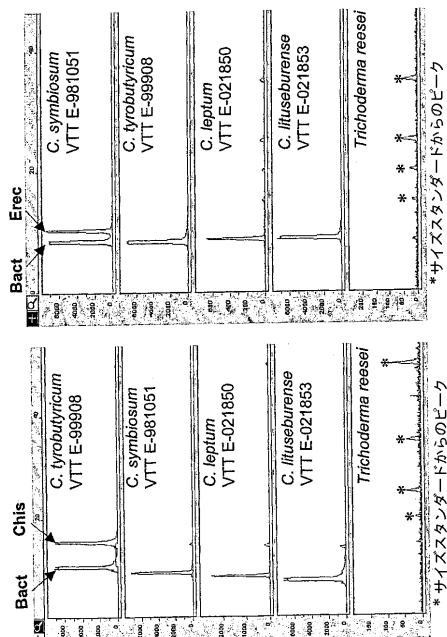


Fig. 8B

Fig. 8A

【図 9】

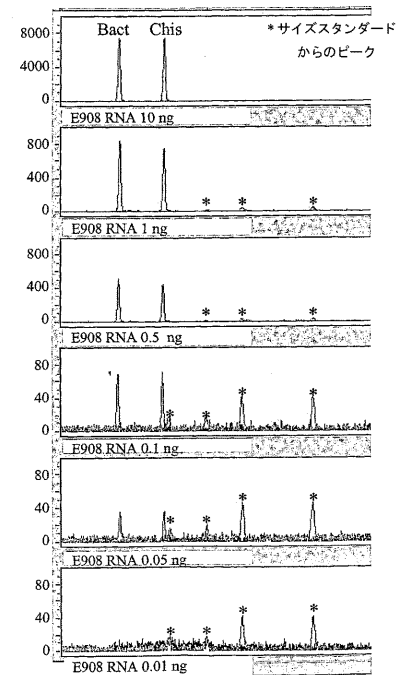


Fig. 9

【図 10 a】

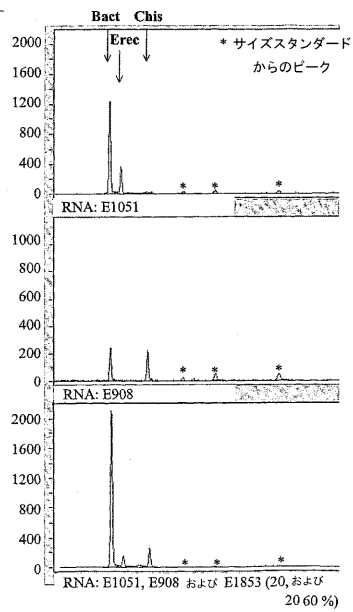


Fig. 10a

【図 10 b】

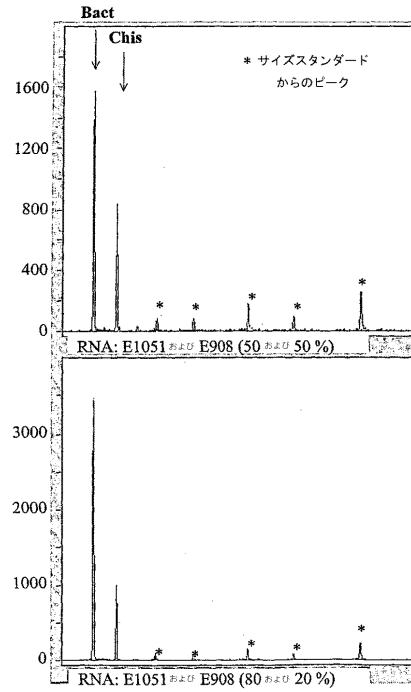


Fig. 10b

【図 1 1】

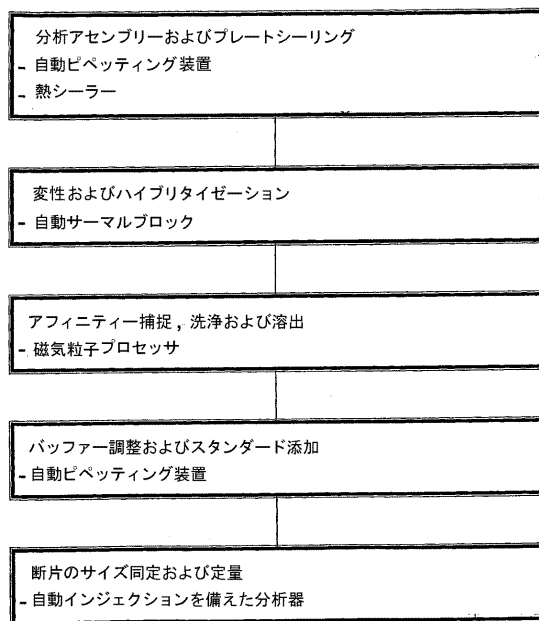


Fig. 11

【図 1 2】

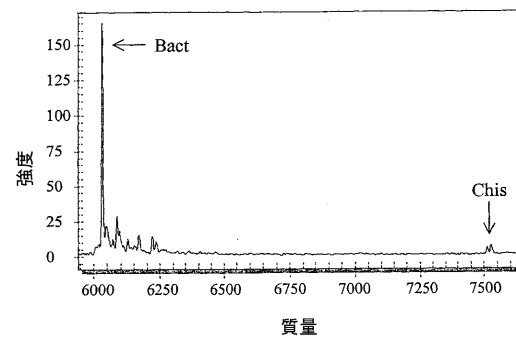


Fig. 12

【図 13】

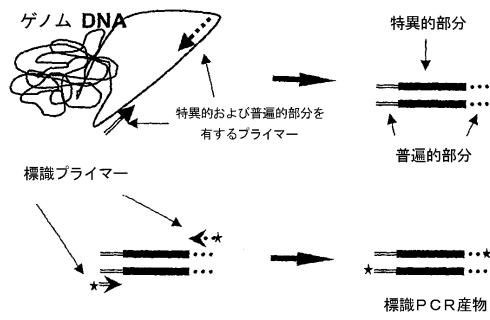


Fig. 13

【図 14】

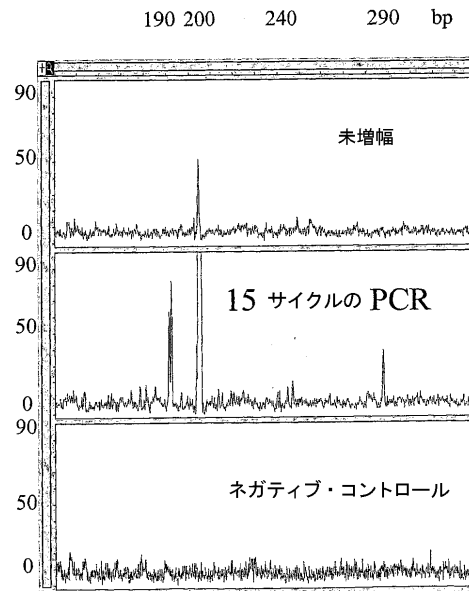


Fig. 14.

【配列表】

0004672365000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ハンス・セーデルlund
フィンランド、エフィーエン - 0 2 9 4 0 エスポー、サロンキティエ 1 9 番
- (72)発明者 レータ・サトカリ
フィンランド、エフィーエン - 0 0 3 9 0 ヘルシンキ、コルサリンティエ 8 番、セー 5 5
- (72)発明者 カリ・カタヤ
フィンランド、エフィーエン - 0 2 7 6 0 エスポー、スナンニータンクヤ 4 番、デー 1 3
- (72)発明者 クリスティーナ・タッキネン
フィンランド、エフィーエン - 0 2 2 0 0 エスポー、ハルティランティエ 1 2 番、アー 1

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 国際公開第 0 0 / 0 0 9 4 8 7 (W O , A 1)
特表 2 0 0 0 - 5 0 3 8 4 5 (J P , A)
特開平 0 9 - 0 9 8 7 9 9 (J P , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C12N 15/09
C12Q 1/68
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)