

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-511986  
(P2013-511986A)

(43) 公表日 平成25年4月11日(2013.4.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 M	
	G O 1 N 33/53 U	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2012-541193 (P2012-541193)  
 (86) (22) 出願日 平成22年11月24日 (2010.11.24)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年5月21日 (2012.5.21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/058006  
 (87) 国際公開番号 W02011/066388  
 (87) 国際公開日 平成23年6月3日 (2011.6.3)  
 (31) 優先権主張番号 12/625,657  
 (32) 優先日 平成21年11月25日 (2009.11.25)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510099866  
 ジェニスフィア・エルエルシー  
 アメリカ合衆国ペンシルバニア州 1944  
 O, ハットフィールド, スターリング・ド  
 ライブ 2801  
 (74) 代理人 100114775  
 弁理士 高岡 亮一  
 (74) 代理人 100121511  
 弁理士 小田 直  
 (72) 発明者 ゲッツ, ロバート, シー.  
 アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 19  
 426, カレッジビル, 218 ウィンタ  
 ーベリー レーン

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸分子検出のための方法、試薬およびキット

(57) 【要約】

標識分子が核酸分子の3'末端に直接結合した標識核酸分子の作製および検出アッセイでの使用のための方法、試薬およびキットが提供される。

【選択図】 図1

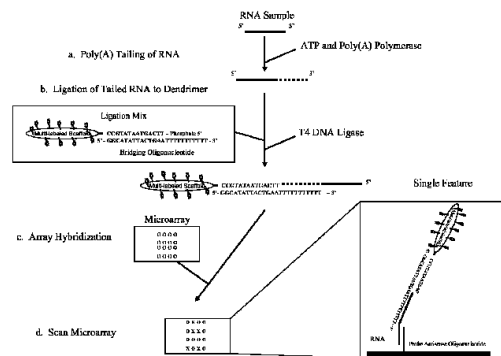


FIGURE 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識分子が結合した核酸標識分子であって、核酸配列とハイブリダイゼーション可能な5'リン酸基を含むオリゴヌクレオチド伸長配列を含む核酸標識分子。

## 【請求項 2】

分子量が約5 kDa ~ 約250 kDaである、請求項1に記載の核酸標識分子。

## 【請求項 3】

1 ~ 約15個の標識分子を含む、請求項1に記載の核酸標識分子。

## 【請求項 4】

前記標識分子がビオチンまたはフルオロフォアからなる、請求項1に記載の核酸標識分子。

10

## 【請求項 5】

分子量が約5 kDa以下で3'末端に単一のビオチン分子を有する一本鎖DNAオリゴヌクレオチドの形態である、請求項1に記載の核酸標識分子。

## 【請求項 6】

標識標的RNA分子を作製するための方法であって、

a) 5'末端と3'末端とを有する一本鎖RNA分子を提供することと、

b) 前記一本鎖RNA分子の3'末端にオリゴヌクレオチドテールを結合させることと

20

c) センス鎖とアンチセンス鎖とを有する部分的二本鎖核酸配列であって、前記センス鎖が、検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識分子を3'末端に含む核酸標識分子を含み、アンチセンス鎖が、オリゴヌクレオチドテールに相補的な配列を含む一本鎖3'オーバーハングを含む部分的二本鎖核酸配列を提供することと、

d) 前記3'オーバーハング配列との相補的塩基対形成により前記部分的二本鎖核酸配列と前記オリゴヌクレオチドテールをアニールさせることと、

e) 前記部分的二本鎖核酸配列のセンス鎖の5'末端を前記オリゴヌクレオチドテールの3'末端とライゲートして、検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識分子を含む前記核酸標識分子を、前記RNA分子の3'末端と結合させることにより、標識標的RNA分子を作製することと

30

を含む方法。

## 【請求項 7】

前記一本鎖RNA分子がmiRNA分子である、請求項6に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記核酸標識分子が、検出可能なシグナルを放出または発生することができる複数の標識分子が結合した多標識ポリマー足場であり、前記多標識ポリマー足場が、5'リン酸基を含み前記部分的二本鎖核酸配列のアンチセンス鎖とハイブリダイゼーション結合することができるオリゴヌクレオチド伸長配列を含み、前記多標識ポリマー足場が、1つ以上の標識オリゴヌクレオチドがハイブリダイズする複数の一本鎖部位を有する樹枝状ポリヌクレオチド組成物であり、前記樹枝状ポリヌクレオチド組成物が、5'-3'方向のハイブリダイゼーションにより結合した2つ以上のポリヌクレオチドモノマーから基本的に構成され、前記多標識ポリマー足場の総分子量が約50 ~ 約350 kDaである、請求項7に記載の方法。

40

## 【請求項 9】

前記多標識ポリマー足場が、1つ以上の標識オリゴヌクレオチドがハイブリダイズすることができる複数の一本鎖部位を有する三量体直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物であり、

前記直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物が、5'-3'方向のハイブリダイゼーションにより結合した第一、第二および第三のポリヌクレオチドモノマーから基本的に構成され

50

各ポリヌクレオチドモノマーが、互いにハイブリダイゼーション結合する前に、第一、第二および第三の一本鎖ハイブリダイゼーション部位を有し、

前記直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物において、前記第一のポリヌクレオチドモノマーの第三の一本鎖ハイブリダイゼーション部位が第二のポリヌクレオチドモノマーの第一の一本鎖ハイブリダイゼーション部位とハイブリダイゼーション結合し、かつ前記第二のポリヌクレオチドモノマーの第三の一本鎖ハイブリダイゼーション部位が前記第三のポリヌクレオチドモノマーの第一の一本鎖ハイブリダイゼーション部位とハイブリダイゼーション結合し、前記第一のポリヌクレオチドモノマーの第一の一本鎖部位が、前記部分的二本鎖核酸配列のアンチセンス鎖とハイブリダイゼーション結合が可能であり、かつ前記直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物内の第二の一本鎖ハイブリダイゼーション部位が、1つ以上の標識分子を含む1つ以上の標識オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーション結合する、

10

請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記部分的二本鎖核酸配列のアンチセンス鎖が、前記多標識ポリマー足場のオリゴヌクレオチド伸長配列および前記一本鎖RNA分子の3'末端のオリゴヌクレオチドテールの両方とハイブリダイゼーション結合が可能な架橋オリゴヌクレオチドを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記核酸標識分子が、検出可能なシグナルを放出または発生することができる、それと結合した1つ以上の標識分子を有し、かつ前記部分的二本鎖核酸配列のアンチセンス鎖とハイブリダイゼーション結合が可能な5'リン酸基を含むオリゴヌクレオチド伸長配列を含む、請求項6に記載の方法。

20

【請求項12】

前記核酸標識分子が約5kDa～約250kDaの分子量である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記核酸標識分子が1～約15個の標識分子を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項14】

前記標識分子がビオチンまたはフルオロフォアからなる、請求項11に記載の方法。

30

【請求項15】

前記核酸標識分子が、約5kDaの分子量で3'末端に単一のビオチン分子を有する一本鎖DNAオリゴヌクレオチドの形態である、請求項11に記載の方法。

【請求項16】

段階a)～e)が単一の反応混合物中で行われる、請求項6に記載の方法。

【請求項17】

固体支持体上のRNAアンチセンスプローブを検出するための方法であって、

a) RNA分子の相補的ヌクレオチド配列を含むアンチセンスプローブを有する固体支持体を、請求項6に記載の方法により作製した標識標的RNA分子と接触させることと、

b) 前記固体支持体と前記標識標的RNA分子を、前記標識標的RNA分子が前記RNAアンチセンスプローブとハイブリダイズすることができる十分な時間および温度でインキュベートすることと、

40

c) 前記固体支持体を洗浄して、ハイブリダイズしていない標識標的mRNAを除去することと、

d) ハイブリダイズした前記標識標的RNA分子のシグナルを検出して、固体支持体上のRNAアンチセンスプローブを検出することと

を含む方法。

【請求項18】

前記標識標的RNA分子がmiRNA分子である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

50

標識標的DNA分子を作製するための方法であって、

- a) 5'末端と3'末端とを有する一本鎖DNA分子を提供することと、
- b) 前記一本鎖DNA分子の3'末端にオリゴヌクレオチドテールを結合させることと

c) センス鎖とアンチセンス鎖とを有する部分的二本鎖核酸配列であって、前記センス鎖が、検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識分子を3'末端に含む核酸標識分子を含み、アンチセンス鎖が、オリゴヌクレオチドテールに相補的な配列を含む一本鎖3'オーバーハングを含む部分的二本鎖核酸配列を提供することと、

d) 前記3'オーバーハング配列との相補的塩基対形成により前記部分的二本鎖核酸配列と前記オリゴヌクレオチドテールをアニールさせることと、

e) 前記部分的二本鎖核酸配列のセンス鎖の5'末端を前記オリゴヌクレオチドテールの3'末端とライゲートして、検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識分子を含む前記核酸標識分子を、前記DNA分子の3'末端と結合させることにより、標識標的DNA分子を作製することと

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

コンピュータに読み可能な形式の配列表が、参照によりその内容全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

近年、動植物の遺伝子発現の転写後調節において機能する、マイクロRNA (miRNA) と呼ばれる低分子非コードRNAのクラスが同定されている (Carrington および Ambrose, *Science* 301: 336 (2003))。miRNAはセンチュウ (*C. elegans*) において最初に同定され、その標的mRNAの3'非翻訳領域 (UTR) またはコード配列の相補的な部位と塩基対形成して、その翻訳を抑制することにより作用する (Wangら, *Nucleic Acids Res.* 32: 1688 (2004))。

【0003】

成熟miRNAは、約22ヌクレオチド (nt) の長さしかないが、ダイサー複合体の作用により約70merの前駆体 (プレ-miRNA) 配列のヘアピン領域から生じる (Leeら, *EMBO J.* 21: 4663 (2002))。次いで、成熟miRNAは、遺伝子調節に対するmiRNAの作用を仲介するリボ核タンパク質複合体であるmiRNPの中に組み込まれる (Mourelatosら, *Genes Dev.* 16: 720 (2002))。

【0004】

蠕虫およびハエのゲノムでは約100のmiRNAがコードされ、脊椎動物ゲノムでは約250のmiRNAがコードされていることが、バイオインフォマティクスの研究により予測されている (Laiら, *Genome Biol.* 4: R42 (2003); Limら, *Genes Dev.* 17: 991 (2003); Limら, *Science* 299: 1540 (2003))。これは各ゲノムで予測されるタンパク質コード遺伝子の数の約0.5~1%を占め、調節遺伝子産物のクラスとしてのmiRNAの重要性を裏付けている (BrenneckeおよびCohen, *Genome Biol.* 4: 228 (2003))。

【0005】

miRNAは、植物の花および葉の発生、蠕虫の幼生の発生、ハエのアポトーシスおよび脂肪代謝ならびに哺乳動物の造血分化および神経発生を含めた様々な生物学的プロセスに参与すると考えられている (Bartel, *Cell* 116: 281 (2004))

10

20

30

40

50

。さらに、数多くのmiRNA遺伝子が癌に関連したヒト染色体領域(たとえば、脆弱部位、限界点、ヘテロ接合性喪失部位、増幅部位)に位置している(Calínら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:2999(2004))。また様々なmiRNAが、脆弱X精神遅滞タンパク質(FMRP)と*in vivo*で相互作用することも示されており(Jinら, Nat. Neurosci. 7:113(2004))、このことは、ヒトの健康および疾患におけるこれら小型のRNAの役割を示唆している。

#### 【0006】

異なる細胞型および疾患状態が特定のmiRNAの発現と関連しているため、miRNAの時間的および空間的両方の発現プロファイルを入手することが重要である。miRNAの発現レベルを判定するために、ノーザンハイブリダイゼーションが用いられてきたが(例えば、Sempereraら, Genome Biol. 5:R13(2004); Aravinら, Dev. Cell 5:337(2003); Gradら, Mol. Cell 11:1253(2003); Limら, Genes & Dev. 17:991(2003)を参照されたい)、この方法は、ハイスループット解析に必要な労力が大き過ぎる。miRNAの発現をモニターするために、PCRによる方法が使用されてきたが、こうした方法は、高価な遺伝子特異的プライマー(例えば、Schmittgenら, Nucleic Acids Res. 32:e43(2004)を参照されたい)またはプライマー結合リンカーをmiRNA分子と結合させるための非効率的な平滑末端ライゲーションの使用を必要とする(例えば、Miskaら, Genome Biol. 5:R68(2004); Gradら, Mol. Cell 11:1253(2003); Limら, Genes & Dev. 17:991(2003)を参照されたい)。さらにPCRでは、増幅される標的miRNA分子の集団に大きなバイアスが生じ得る。

#### 【0007】

近年、各種組織および細胞型におけるmiRNAの発現パターンを同定するためのハイスループットなマイクロアレイが開発されている(例えば、Babakら, RNA 10:1813(2004); Calínら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:11755(2004); Liuら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:9740(2004); Miskaら, Genome Biol. 5:R68(2004); SioudおよびRosok, BioTechniques 37:574(2004); Krichevskyら, RNA 9:1274(2003)を参照されたい)。miRNA発現検出でのマイクロアレイの使用にはいくつかの利点があり、一時点における同じ試料内での複数の遺伝子発現を判定する能力、少量のRNAしか必要としないこと、ならびに前駆体および成熟miRNA分子両方の発現を同時に同定する可能性が挙げられる。

#### 【0008】

しかし、成熟miRNAは長さがわずかに約22ntであり、しかも所与の組織中にごく限られた量で存在するため、低分子RNAはマイクロアレイの標識および検出が困難である(SioudおよびRosok, BioTechniques 37:574(2004))。例えば、マイクロアレイ解析で使用するmiRNA分子を、フルオロフォアの共有結合を用いて直接標識することができるが(例えば、Babakら, RNA 10:1813(2004); MICROMAX(商標)ASAP miRNA Chemical Labeling Kit, Perkin Elmer, Waltham, MA; Label IT(商標) $\mu$ Array Labeling Kit, Mirus Bio Corp., Madison, WIを参照されたい)、この方法はわずかな標的miRNA分子を検出するだけの感度がない。また直接標識では、ランダムに組み込まれたフルオロフォアの分子間消光が生じることにより、感度がさらにすることもある。マイクロアレイ解析で使用するcDNAを作製するために、ランダムプライマーによるmiRNA分子の逆転写が用いられてきたが(例えば、SioudおよびRosok, BioTechniques 37:574(2004); Liuら, Proc. Natl. Acad.

10

20

30

40

50

Sci. USA 101:9740(2004)を参照されたい)、この方法では、元の完全長miRNA集団が正確に示されない。

【0009】

miRNA解析の精度と感度が共に大幅に向上した新たな標識方法が開発されている(例えば、米国特許公開第2006/0094025号として公開されている同時係属の米国特許出願第10/979,052号)。しかし、上記方法は、間接的な標識結合を利用したものであり、アッセイでシグナルを発生させるために複数のハイブリダイゼーション段階を必要とする。さらに上記方法は、結合キネティクスを向上させるために独立したハイブリダイゼーション段階を必要とする、巨大な捕捉試薬分子が負担となる。上記方法では、良好な結果が得られる一方で、ハイスループット解析に容易に適用することができず、所望の結果を得るために、はるかに多くの時間を必要とする。結果的には、マイクロアレイおよびハイスループット解析で使用するためのmiRNA分子を迅速に、高感度でかつ効率的に標識および検出するための方法が早急に必要とされている。

10

【発明の概要】

【0010】

出願者らは、核酸標識分子をmiRNA分子の3'末端に直接結合させる、標的miRNA分子を標識するための方法を発明した。出願者らは、最適化核酸標識分子の使用により、PCRを必要とすることなく消光を低減しシグナル強度を増強して、miRNA解析、特にハイスループット解析のための改善された方法および試薬が得られることを見出した。最適化核酸標識分子は、好ましくは、検出可能なシグナルを放出または発生することができる複数の標識分子が結合した多標識ポリマー足場である。多標識ポリマー足場は、標識分子が結合することができる任意のポリマー、例えば、タンパク質、ペプチド、炭水化物、多糖、脂質、脂肪酸、核酸などであり得る。好適な実施形態では、多標識ポリマー足場は、20~1000塩基、より好ましくは300~750塩基の核酸を含み、かつライゲーション可能な一端および検出可能なシグナルを放出または発生することができる10~15個の標識分子を含む、低分子DNAデンドリマーを含む。ライゲーション可能な末端は、miRNA分子の3'末端とライゲートし得る5'リン酸を有する。核酸標識分子は、マイクロアレイおよびビーズアッセイのような各種検出プラットフォーム上でのmiRNA分子との迅速で効率的なハイブリダイゼーションが可能な十分に小さい大きさである。

20

30

【0011】

したがって、本発明の一態様は、検出可能なシグナルを放出または発生することができる複数の標識分子が結合した多標識ポリマー足場に関し、この多標識ポリマー足場は、核酸配列とのハイブリダイゼーション結合が可能な5'リン酸基を含むオリゴヌクレオチドテールを含む。好適な実施形態では、多標識ポリマー足場は、総分子量が約50~約350kDaである。いくつかの実施形態では、標識分子は1つ以上のフルオロフォア部分を含む。他の実施形態では、標識分子は1つ以上のビオチン部分を含む。

【0012】

好適な実施形態では、伸長配列が結合可能な核酸配列は、同様に核酸分子とハイブリダイズ可能なポリマー足場から独立した別の架橋オリゴヌクレオチドである。ポリマー足場と架橋オリゴヌクレオチドは、核酸分子を標識する系を共に構成する。好ましくは、ポリマー足場から独立した別の核酸分子は、RNA分子、より好ましくは非コードRNAまたはmiRNA分子である。5'リン酸基が存在することにより、ポリマー足場とRNA分子3'末端との連結が可能となる。この方法でDNA分子も標識し得る。

40

【0013】

好適な実施形態では、多標識ポリマー足場は、1つ以上の標識オリゴヌクレオチドがハイブリダイズ可能な複数の一本鎖部位を有する直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物であり；前記直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物は、5'-3'方向のハイブリダイゼーションにより結合した第一、第二および第三のポリヌクレオチドモノマーからなり；各ポリヌクレオチドモノマーは、互いにハイブリダイゼーション結合する前に、第一、第二および第

50

三の一本鎖ハイブリダイゼーション部位を有し；かつ前述直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物において、第一のポリヌクレオチドモノマーの第三の一本鎖ハイブリダイゼーション部位は、第二のポリヌクレオチドモノマーの第一の一本鎖ハイブリダイゼーション部位とハイブリダイゼーション結合し、かつ第二のポリヌクレオチドモノマーの第三の一本鎖ハイブリダイゼーション部位は、第三のポリヌクレオチドモノマーの第一の一本鎖ハイブリダイゼーション部位とハイブリダイゼーション結合し、第一のポリヌクレオチドモノマーの第一の一本鎖部位が、核酸配列とハイブリダイゼーション結合することができ、かつ前記直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物内の第二の一本鎖ハイブリダイゼーション部位が、1つ以上の標識分子を含む1つ以上の標識オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーション結合する。

10

## 【0014】

本発明の別の態様は、標識標的miRNA分子の作製方法に関するものであり、この方法は、

- a) 5' および 3' 末端を有する一本鎖miRNA分子を提供すること；
- b) 一本鎖miRNA分子の3' 末端にオリゴヌクレオチドテールを結合させること；
- c) センス鎖とアンチセンス鎖とを有する部分的二本鎖核酸配列であって、センス鎖が検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識分子を含む核酸標識分子を3' 末端に含み、かつアンチセンス鎖がオリゴヌクレオチドテールに相補的な配列を含む一本鎖3' オーバーハングを含む核酸配列を提供すること；
- d) 3' オーバーハング配列による相補的な塩基対形成により、部分的二本鎖核酸配列をオリゴヌクレオチドテールとアニールさせること；および
- e) 部分的二本鎖核酸配列のセンス鎖の5' 末端とオリゴヌクレオチドテールの3' 末端をライゲートすることにより、検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識分子を含む核酸標識分子をmiRNA分子の3' 末端と結合させて、標識標的miRNA分子を作製することを含む。

20

## 【0015】

いくつかの実施形態では、miRNA分子を全RNA源の形で提供し、他の実施形態では、miRNA分子を低分子量RNA分子が濃縮されているRNA源の形で提供する。オリゴヌクレオチドテールは、好ましくはポリ(A)ポリメラーゼを用いて結合させたポリAテールである。好ましくは、T4 DNAリガーゼを用いてライゲーションを行う。好適な実施形態では、部分的二本鎖核酸配列は、記載の多標識ポリマー足場および架橋オリゴヌクレオチド、より好ましくは上記直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物からなる。

30

## 【0016】

本発明の別の態様は、固体支持体上のmiRNAアンチセンスプローブの検出方法に関するものであり、この方法は、

- a) miRNA分子の相補的ヌクレオチド配列を含むアンチセンスプローブを有する固体支持体を、
  - i) 5' および 3' 末端を有する一本鎖miRNA分子を提供すること；
  - ii) 一本鎖miRNA分子の3' 末端にオリゴヌクレオチドテールを結合させること；
  - iii) センス鎖とアンチセンス鎖とを有する部分的二本鎖核酸配列であって、センス鎖が検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識分子を含む核酸標識分子を3' 末端に含み、かつアンチセンス鎖がオリゴヌクレオチドテールに相補的な配列を含む一本鎖3' オーバーハングを含む核酸配列を提供すること；
  - iv) 3' オーバーハング配列による相補的な塩基対形成により、部分的二本鎖核酸配列をオリゴヌクレオチドテールとアニールさせること；および
  - v) 部分的二本鎖核酸配列のセンス鎖の5' 末端とオリゴヌクレオチドテールの3' 末端をライゲートすることにより、検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識分子を含む核酸標識分子をmiRNA分子の3' 末端と結合させて、標識

40

50

標的 m i R N A 分子を作製することを含む方法により作製された標識標的 m i R N A 分子と接触させること；

b) 固体支持体と標識標的 m i R N A 分子を、標識標的 m i R N A 分子が m i R N A アンチセンスプローブとハイブリダイズすることができる十分な時間および温度でインキュベートすること；

c) 固体支持体を洗浄して、ハイブリダイズしていない標識標的 m R N A を除去すること；および

d) ハイブリダイズした標識標的 m i R N A 分子のシグナルを検出することにより、固体支持体上の m i R N A アンチセンスプローブを検出すること

を含む。

10

#### 【0017】

いくつかの実施形態では、固体支持体はマイクロアレイまたはマイクロタイタープレートのような平面固体支持体であり、他の実施形態では、固体支持体はビーズである。m i R N A プローブは、成熟 m i R N A もしくはプレ m i R N A 配列の両方に対して、またはプレ m i R N A 配列のみに対して特異的であり得る。

#### 【0018】

本発明の別の態様は、m i R N A 解析で使用するための標識標的 m i R N A 分子作製のためのキットに関するものであり、このキットは、センス鎖とアンチセンス鎖とを有する部分的二本鎖核酸配列であって、センス鎖が、検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識を含む核酸標識分子を含み、かつアンチセンス鎖が、オリゴヌクレオチドテールに相補的な配列を含む一本鎖3'オーバーハングを含む部分的二本鎖核酸配列；および部分的二本鎖核酸配列を用いて標識標的 m i R N A 分子を作製するための指示書を含む。

20

#### 【0019】

いくつかの実施形態では、またキットは、部分的二本鎖核酸配列の一本鎖3'オーバーハング配列に相補的であるオリゴヌクレオチドテールを標的 m i R N A 分子の3'末端に結合させるための少なくとも1つの酵素；および部分的二本鎖核酸配列のセンス鎖の5'末端を標的 m i R N A 分子の3'末端と結合させるための少なくとも1つの酵素も含む。他の実施形態では、2色以上のアッセイを行うことができるように、異なる検出可能なシグナルを放出または発生することができる複数の核酸標識分子を提供する。好適な実施形態では、部分的二本鎖核酸配列は、上記多標識ポリマー足場および架橋オリゴヌクレオチドからなる。より好適な実施形態では、多標識ポリマー足場は上記直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物である。

30

#### 【0020】

本発明の別の態様は、検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識分子が結合した核酸標識分子に関するものであり、この核酸標識分子は、核酸配列とハイブリダイゼーション可能な5'リン酸基を含むオリゴヌクレオチド伸長配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸標識分子は、DNAを含みかつ総分子量が約5~約250kDaである。好適な実施形態では、核酸標識分子は、総分子量が約2~約2.3kDaの一本鎖DNAオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、標識分子は1つ以上のフルオロフォア部分を含む。他の実施形態では、標識分子は1つ以上のビオチン部分を含む。標識分子は、好ましくは1~約15個の標識分子を含む。核酸標識分子を上記方法およびキットに使用し得る。

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0021】

【図1】 a ~ d は、本発明の方法による標的 m i R N A 分子の標識および m i R N A プローブの検出を表す図である。

【図2】 本発明の好適な核酸標識分子を表す図である。

【図3】 核酸標識分子の長さとの関係を示すグラフである。

50

【図4】miRNAハイブリダイゼーションアッセイに使用する1段階標識工程と2段階標識工程を対照比較した図である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明は、RNAマイクロアレイ解析で使用するための核酸分子、方法およびキットに関する。「RNA分子」、「miRNA分子」、「mRNA分子」、「DNA分子」、「cDNA分子」および「核酸分子」という用語は、それぞれ単一種の単一の分子、複数の分子および異なる種の複数の分子を包含することが意図される。また「miRNA分子」という用語は、成熟miRNAおよびプレmiRNA分子の両方を包含することも意図される。マイクロアレイの用語と一致する「標的miRNA」は、標識されるmiRNAまたは相補的cDNA配列を指し、「miRNAプローブ」は、固体支持体と直接結合した未標識のセンスまたはアンチセンスmiRNA配列を指す。「核酸標識分子」という用語は、miRNA分子の3'末端とライゲートすることが可能であり、かつ検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識分子を含む、DNAデンドリマーのような任意の非天然ヌクレオチド配列を指す。

10

【0023】

本発明の方法は、検出可能なシグナルを放出または発生することができる標識を含む核酸標識分子を、少なくとも1つのmiRNA分子の3'末端に結合させることを含む。次いで、得られた標識miRNA分子(1つまたは複数)を用いて、固体支持体と結合したmiRNAプローブを検出し、miRNA発現プロファイルを得ることができる。適切に標識された標的分子および適切に設計されたプローブを用いて、成熟miRNAおよびプレmiRNAの発現プロファイルの両方を決定することができる。

20

【0024】

現在利用できる技術は、フルオロフォアの共有結合により標的miRNA分子を直接標識するか、または標的miRNA分子をランダムにプライミングし逆転写して標識cDNA分子を作製するものであり、いずれもmiRNAプローブとのハイブリダイゼーション後にわずかな標的miRNA分子を検出するのに必要な感度をもたないが、本発明の方法は、こうした技術とは異なる。また本発明の方法は、標識標的分子の集団に増幅バイアスが生じ得るPCRによる標識技術とも異なる。

【0025】

本発明の方法は、分子生物学分野のルーチン技術を用いる。一般的な分子生物学的方法を開示している基本的なテキストとしては、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual(第3版, 2001)およびAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology(1994)が挙げられる。

30

【0026】

本発明の方法はRNA分子源を用いる。好ましくは、源はmiRNA分子が濃縮されている。全体にわたって「miRNA」および「濃縮」に言及されるが、本明細書に開示される方法は、濃縮されているか否かに関係なく、植物および細菌中に見られるような修飾された3'末端を有するRNA分子を含めた、3'末端を有する任意の核酸分子を標識するために使用し得ることを理解するべきである。任意のRNA分子を標識し得る。また本発明の方法を、デオキシリボヌクレオチドの存在下で3'末端にポリマーテールを合成する酵素と組み合わせて利用できる3'末端を有するDNA分子の標識にも拡張し得る。デオキシリボヌクレオチドの存在下でポリマーテールを合成することができる酵素の1つの例が、末端デオキシヌクレオチド転移酵素(TdT)である。

40

【0027】

全RNAからmiRNA分子を濃縮するために数多くの方法および市販キットが利用できる。例としては、miRvana(商標)miRNA単離キット(Ambion、Austin、TX)、PureLink(商標)miRNA単離キット(Invitrogen、Carlsbad、CA)、mirPremier(商標)マイクロRNA単離キ

50

ット (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) および miRNAeasy Miniキット (Qiagen, Valencia, CA)、変性PAGEゲルでの精製 (例えば、Miskaら, Genome Biol. 5:R68 (2004) を参照されたい)、適当な大きさの分子量カットオフフィルターを用いた遠心分離 (例えば、Microcon (登録商標) YMフィルター装置、Millipore, Billerica, MA) ならびに酢酸ナトリウム/エタノール沈殿 (例えば、Wangら, Nucleic Acids Res. 32:1688 (2004) を参照されたい) が挙げられる。

#### 【0028】

miRNAは、任意の生物試料または環境試料中に存在するウイルス粒子、植物および動物源を含めた、miRNAを含有する任意の組織または細胞源から入手し得る。好ましくは、源は動物組織、より好ましくは哺乳動物組織、最も好ましくはヒト組織である。またRNAは、RNA抽出キット、例えばRecoverAll (商標) 全核酸単離キット (Ambion, Austin Tx) などを用いて、臨床FFPE試料からも精製し得る。

10

#### 【0029】

RNAを増幅工程に供し得る。RNA増幅キットの例としては、SenseAMP RNA増幅キット (Genisphere, Hatfield, PA)、MessageAmp (商標) RNA増幅キット (Ambion, Austin, TX)、Ovation (商標) RNA増幅システム (NuGen Technologies, San Carlos, CA) などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

#### 【0030】

図1に関して、一本鎖オリゴヌクレオチドテールを一本鎖miRNA分子の3'末端に結合させる (図1aを参照されたい)。オリゴヌクレオチドテールは、ヌクレオチドを一本鎖RNAと結合させる任意の手段により組み込み得る。好ましくは、適当な緩衝液中、適当なヌクレオチドの存在下で、ポリ(A)ポリメラーゼ (PAP) またその他の適当な酵素を用いてオリゴヌクレオチドテールを一本鎖cDNAに結合させる。好ましくは、オリゴヌクレオチドテールはホモポリマーヌクレオチドテール (すなわち、ポリA, ポリG、ポリCまたはポリT) である。好ましくは、オリゴヌクレオチドテールは、一般に約3ヌクレオチド~500ヌクレオチド超の長さ、好ましくは約20~約100ヌクレオチドの長さの範囲のポリAテールである。PAPを用いる場合、好適な緩衝液は、マグネシウムイオンおよびマンガンイオンの両方を含有するトリス-HCl、pH8.0 (またはその他の適当な緩衝液) である。例えば、緩衝液は、1~100mMのトリス-HCl、pH8.0、1~20mMのMgCl<sub>2</sub> および1~20mMのMnCl<sub>2</sub>、ならびに0.01~20mMのATPを含み得る。テーリング反応は通常、37°Cで5~60分間行う。

30

#### 【0031】

標識標的miRNA分子を作製するために、検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識を含む核酸標識分子を3'末端に含むセンス鎖を含む部分的二本鎖デオキシ核酸配列を、ライゲーションにより3'オリゴヌクレオチドテールと結合させる (図1bを参照されたい)。この工程は、3'オリゴヌクレオチドテールと、オリゴヌクレオチドテールに相補的なデオキシヌクレオチド配列を含む、部分的二本鎖デオキシ核酸配列のアンチセンス鎖3'末端のオーバーハング配列との間の相補的塩基対形成により促進される。例えば、オリゴヌクレオチドテールがポリAテールである場合、部分的二本鎖デオキシ核酸配列の3'オーバーハングは、一般に約3ヌクレオチド~50ヌクレオチド超の長さ、好ましくは約10~約30ヌクレオチドの長さの範囲のデオキシチミジン配列を3'末端に含む。配列同士が相補的であると見なされるためには、3'オーバーハング配列の特定のヌクレオチド配列が3'オリゴヌクレオチドテールの特定のヌクレオチド配列に完全に (すなわち、100%) 相補的である必要はなく、また3'オーバーハング配列の長さが3'オリゴヌクレオチドテールの長さと同じである必要もない。3'オーバーハングが3'オリゴヌクレオチドテールとアニールし捕捉配列が適切にm

40

50

iRNA分子の3'末端の位置に来るのに十分な相補性が2つの配列間にあるだけでよいということ当業者は認識するであろう。

#### 【0032】

適切な位置に来れば、ライゲーションにより核酸標識分子を3'オリゴヌクレオチドテールと結合させる。このようなオーバーハングまたは「付着末端」ライゲーション反応は平滑末端ライゲーション反応に比べて、効率的であり、また高い温度で行うことができる。さらに、オリゴデオキシヌクレオチドテールの使用により、デオキシ核酸標識分子DNAとDNAテールのライゲーションが可能となり、この方がDNAとmiRNAを直接ライゲートするよりも効率的である。任意のDNAリガーゼをライゲーションに使用し得る。好ましくは、DNAリガーゼはT4 DNAリガーゼである。T4 DNAリガーゼを用いる場合、好適な緩衝液は、Roche Applied Science (Indianapolis, IN)により供給される10×ライゲーション緩衝液(660mMトリス-HCl、pH7.5、50mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、10mM ATP)の1/10希釈物である。反応はEDTAの添加により停止させることが好ましい。

10

#### 【0033】

miRNA分子のテール付加および標識分子へのテールのライゲーションは、記載の通りに別々の反応で行うか、または単一の反応混合物中に行い得る。このような「1段階」工程の方が高いスループットが得られ、またアッセイ間の再現性が向上する。単一の反応混合物は通常、18~37℃で30~45分間インキュベートする。

20

#### 【0034】

ライゲーション反応で使用する核酸標識分子は、好ましくは、検出可能なシグナルを放出または発生することができる複数の標識分子が結合した多標識ポリマー足場である。また足場は、3'テール付加したmiRNA分子とのライゲーションのための5'リン酸基を含むオリゴヌクレオチド伸長配列も含む(図1bを参照されたい)。多標識ポリマー足場は、標識分子が結合することができる任意のポリマー、例えば、タンパク質、ペプチド、炭水化物、多糖、脂質、脂肪酸、核酸などであり得る。多標識ポリマー足場の総分子量は、好ましくは約50~約350kDaである。ポリマー足場は、好ましくは、消光が低減もしくは除去されるように、および/または巨大な検出分子(例えば、ストレプトアビジン)への接近が可能であるように相隔たった約2~10個の標識分子を含む。当業者は、入手可能な文献に基づいて、適当な標識分子の間隔を決定することができる。例えば、米国特許第6,762,292号、同第6,072,043号および同第6,046,038号には、蛍光標識分子と核酸足場との結合に最適な間隔を決定する工程が記載されている。一般に核酸足場での標識分子の間隔は、少なくとも10ntあれば十分である。他のタイプの足場での間隔は、適宜決定し得る。

30

#### 【0035】

図2は、本発明の好適な多標識ポリマー足場を図示している。多標識ポリマー足場は、核酸配列とのハイブリダイゼーション結合が可能な5'リン酸基を有するオリゴヌクレオチド伸長配列を含む。この実施形態では、核酸配列は図2に示される架橋オリゴヌクレオチドであり、その5'部分はポリマー足場のオリゴヌクレオチドテールに相補的であり、3'部分はmiRNA分子の3'オリゴヌクレオチドテールに相補的である。ポリマー足場と架橋オリゴヌクレオチドは、miRNA分子を標識するための系を共に構成する。オリゴヌクレオチドテールの5'リン酸基により、ポリマー足場をmiRNA分子とライゲートすることができる。架橋オリゴヌクレオチドは通常、ライゲーション反応中、ポリマー足場のオリゴヌクレオチドテールよりもモル過剰、好ましくは約1.8~2.6倍のモル過剰である。ハイブリダイズした架橋オリゴヌクレオチド/ポリマー足場オリゴヌクレオチドテールは、上記部分的二本鎖デオキシ核酸配列を共に形成して、miRNA分子を標識するための系を構成する。この場合も同様に、図2に示される配列は例示的なものに過ぎず、ハイブリダイゼーション可能な任意の配列を使用し得ることを理解するべきである。

40

#### 【0036】

50

好適な実施形態では、多標識ポリマー足場は、20～1000塩基、より好ましくは300～750塩基の核酸を含み、1つのライゲート可能な末端および検出可能なシグナルを放出または発生することができる10～15個の標識分子を含む、低分子の直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物である。上で述べたように、ライゲート可能な末端は、テール付加したmiRNA分子とライゲートすることができる5'リン酸を有する。いくつかの実施形態では、直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物は、低分子の3DNA(商標)デンドリマー捕捉試薬(Genisphere Inc., Hatfield, Pa.)である。デンドリマーは、標識分子と捕捉配列との結合のために、2種類の一本鎖ハイブリダイゼーション「アーム」を表面に含む高度に分岐した核酸分子である。1つのデンドリマーが各種類のアームを複数有し得るため、ハイブリダイゼーションで得られるシグナルが大幅に増強される。樹枝状試薬を用いたシグナル増強は、Nilsenら, J. Theor. Biol. 187:273(1997); Stearsら, Physiol. Genomics 3:93(2000); 米国特許第5,175,270号、同第5,484,904号、同第5,487,973号、同第6,072,043号、同第6,110,687号および同第6,117,631号; ならびに米国特許公開第2002/0051981号に記載されている。最適に設計されたデンドリマーの使用により、消光が低減または除去されるように標識分子を配置することができる。さらに、バイアスのかかった標的核酸分子自体の増幅を発生させることなく標識分子中のシグナルを増幅または増強することができる。

10

20

#### 【0037】

直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物は、5'-3'方向のハイブリダイゼーションにより互いに結合した第一、第二および第三のポリヌクレオチドモノマーを含んでもよく、各ポリヌクレオチドモノマーは、互いにハイブリダイゼーション結合する前に、第一、第二および第三の一本鎖ハイブリダイゼーション部位を有する。第一のポリヌクレオチドモノマーの第三の一本鎖ハイブリダイゼーション部位は、第二のポリヌクレオチドモノマーの第一の一本鎖ハイブリダイゼーション部位とハイブリダイゼーション結合し、第二のポリヌクレオチドモノマーの第三の一本鎖ハイブリダイゼーション部位は、第三のポリヌクレオチドモノマーの第一の一本鎖ハイブリダイゼーション部位とハイブリダイゼーション結合している。直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物の第一のポリヌクレオチドモノマーの第一の一本鎖部位は、核酸配列とハイブリダイゼーション結合するように設計されている。本明細書に記載の標識方法において使用する場合、核酸配列は、多標識ポリマー足場を3'オリゴヌクレオチドテール付加されたmiRNA分子と結合するために使用する図2に示される架橋オリゴヌクレオチド配列である。

30

40

#### 【0038】

直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物を組み立てるために使用する各ポリヌクレオチドモノマー内の各第二の一本鎖ハイブリダイゼーション部位は、1つ以上の標識オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーション結合するように設計されている。標識オリゴヌクレオチドは1つ以上の標識分子を含む。好ましくは、第三のポリヌクレオチドモノマーの第三の一本鎖ハイブリダイゼーション部位も1つ以上の標識オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーション結合している。標識直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物は、組立て後に、例えばソラレンの化学作用を用いて架橋することが好ましい。

#### 【0039】

他の実施形態では、核酸標識分子(核酸標識試薬とも呼ぶ)は、検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識分子が結合したポリヌクレオチドであり、この核酸標識分子は、核酸配列とのハイブリダイゼーションが可能な5'リン酸基を含むオリゴヌクレオチド伸長配列を含む。好適な実施形態では、核酸標識分子は、DNAを含み、かつ総分子量が約5～約250kDaである。標識分子は、好ましくは約1～約15個の標識分子を含む。特に好適な実施形態では、核酸標識分子は、標識分子を除いた総分子量が約5kDa以下であり、かつ3'末端に1個の標識分子を含む一本鎖DNAオリゴヌクレオチドを含む。他の実施形態では、一本鎖DNAオリゴヌクレオチドの分子量は

50

、任意の標識分子を除いて約2～約2.3kDaである。

【0040】

核酸標識分子上の標識分子(1つまたは複数)は、検出可能なシグナルを放出または発生することができる任意の分子であり得る。このような分子としては、検出可能なシグナルを直接放出または発生する分子、例えば放射性分子、蛍光分子および化学発光分子、ならびに比色アッセイで使用する西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼのような酵素などが挙げられる。また上記分子として、検出可能なシグナルを直接は発生しないが、直接発生する系において結合する、ビオチン/ストレプトアビジン、抗原/抗体およびその他のハプテンの組合せのような分子も挙げられる。好ましくは、シグナル発生分子は、検出可能なシグナルを直接放出または発生する分子、より好ましくはフルオロフォア、最も好ましくはCy3もしくはCy5色素(GE Healthcare, Piscataway, NJ)、Oyster(登録商標)-550もしくはOyster(登録商標)-650色素(Denovo Biolabels, Minister, Germany)、またはAlexa Fluor(商標)555もしくは647色素(Molecular Probes, Eugene, OR)のような他の適当な色素である。標識オリゴヌクレオチドを調製するための標識分子の使用は、当該技術分野で公知である。

10

【0041】

次いで、標識miRNA分子を、miRNAプローブを含む固体支持体と接触させる(図1cを参照されたい)。本明細書で使用される「固体支持体」は、核酸プローブを含む、スライド、チップ、膜、ビーズおよびマイクロタイプレートを含めた任意の固体支持体を包含することが意図される。miRNAプローブを固体支持体に結合させるための方法は当業者に公知である(例えば、Babakら, RNA 10:1813(2004); Calinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:11755(2004); Liuら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:9740(2004); Miskaら, Genome Biol. 5:R68(2004); Sioud and Rosok, BioTechniques 37:574(2004); Krichevskyら, RNA 9:1274(2003)を参照されたい)。あるいは、平面およびビーズ型両方のmiRNAマイクロアレイを、例えば、Invitrogen, Carlsbad, CA(NCode(商標)miRNAマイクロアレイ)、Exiqon, Woburn, MA(miRCURY(商標)miRNAアレイ)、CombiMatrix, Mukilteo, WA(miRNA Custom Array(商標))およびLuminex, Austin, TX(FlexmiR(商標)miRNAパネル)から購入することができる。また標識miRNA分子は、酵素結合オリゴ吸着アッセイ(ELOSA)でも使用し得る。

20

30

【0042】

標識標的miRNA分子の場合、固体支持体はアンチセンスmiRNA分子プローブを含む。プローブは成熟miRNA配列とプレmiRNA配列の両方を検出するように設計されていてもよく、またはプローブはプレmiRNA配列に特異的であってもよい。比較によりプレ配列と成熟配列の両方のプロファイルを得ることができる。miRNAプローブは、例えば、miRBase Sequence Database(<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>), The Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, UK(Griffiths-Jonesら, Nucleic Acids Res. 34:D140(2006))から公的に入手可能な既知のmiRNAおよびプレmiRNA配列を用いて設計し得る。新規なmiRNA配列を用いてmiRNAプローブを設計してもよく、また新規なmiRNA配列を、当業者に公知のコンピュータによる方法(例えば、Ambrosら, Curr. Biol. 13:807(2003); Gradら, Mol. Cell 11:1253(2003); Laiら, Genome Biol. 4:R42(2003); Limら,

40

50

Genes & Dev. 17:991 (2003); Limら, Science 299:1540 (2003)を参照されたい)またはmiRNAクローニングストラテジー(例えば、Wangら, Nucleic Acids Res. 32:1688 (2004); Lagos-Quintanaら, Science 294:853 (2001); Lauら, Science 294:858 (2001); Leeら, Science 294:862 (2001)を参照されたい)を用いて同定することができる。

【0043】

固体支持体と標識miRNA分子を、標識miRNA分子がmiRNAプローブとハイブリダイズすることができる十分な時間と温度で、ハイブリダイゼーション緩衝液中でインキュベートする。適切なアレイハイブリダイゼーション緩衝液としては、無ヌクレアーゼ水で75%まで希釈した2×SSC、4×Denhardt液、1%SDS、0.5Mリン酸ナトリウム、2mMEDTA、pH8.0)および2×増強ハイブリダイゼーション緩衝液(ExpressHyb(商標)、BD Biosciences Clontech、Palo Alto、CA)が挙げられる。適切なビーズアッセイ緩衝液は、4~4.5MのTMAC、5~15%の脱イオン化ホルムアミド、0.1~2%のBSA、0.25~1mg/mlのサケ精子DNAを含有する。

10

【0044】

好ましくは、固体支持体および捕捉配列-標識核酸分子を約0.5~72時間、好ましくは18~24時間、約25~65℃、好ましくは45~65℃でインキュベートする。ハイブリダイズしていない余分な標識miRNA分子は、予熱した2×SSC、0.2%SDS洗浄緩衝液中、25~60℃、好ましくは50~55℃で15分間、2×SSC中、室温で10~15分間、0.2×SSC中、室温で10~15分間洗浄することにより除去し得る。次いで固体支持体を、通常はスキャニングにより解析する(図1d)。マイクロアレイアッセイは、適当な機器、例えばGenePix(登録商標)Pro3.0ソフトウェアを備えたGenePix(登録商標)4000Bマイクロアレイスキャナ(Molecular Devices、Sunnyvale、CA)またはScanArray(商標)5000(PerkinElmer、Waltham、MA)などを用いて解析する。ビーズアッセイは、Luminex Corporation(Austin、TX)により供給される計測器およびソフトウェアならびに当業者に公知の同様の装置を用いて解析し得る。

20

30

【0045】

本発明の方法および試薬は、好都合にはキットの形態でパッケージ化し得る。このようなキットは、各種研究および診断用途に使用し得る。例えば、本発明の方法およびキットを用いて、異なる細胞もしくは組織、同じ細胞もしくは組織の異なる亜群、同じ細胞もしくは組織の異なる生理状態、同じ細胞もしくは組織の異なる発生段階、または同じ組織の異なる細胞集団における1つ以上のmiRNAの発現の比較解析を容易に行うことができる。このような解析により、miRNAのレベルの統計的な有意差を明らかにし、解析する細胞または組織によっては、次にこれを用いて、各種疾患状態の診断、疾患進行の予後および疾患治療のための標的の特定を容易に行うことができる。

【0046】

本発明に従って多種多様なキットを調製し得る。例えば、標識標的miRNA分子の作製のためのキットは、センス鎖とアンチセンス鎖とを有する部分的二本鎖核酸配列であって、センス鎖が、検出可能なシグナルを放出または発生することができる1つ以上の標識を含む核酸標識分子を含み、アンチセンス鎖が、オリゴヌクレオチドテールに相補的な配列を含む一本鎖3'オーバーハングを含む部分的二本鎖核酸配列;および部分的二本鎖核酸配列を用いた標識標的miRNA分子を作製するための指示書を含み得る。好適な実施形態では、部分的二本鎖核酸配列は、上記多標識ポリマー足場および架橋オリゴヌクレオチドからなる。他の好適な実施形態では、多標識ポリマー足場は上記直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物である。

40

【0047】

50

指示書は通常、書面または印刷物を含むが、これらに限定されない。このような指示を記憶し、最終使用者に伝達することができる任意の媒体が、本発明により考慮される。このような媒体としては、電子記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学式媒体（例えば、CD ROM）などが挙げられるが、これらに限定されない。このような媒体は、上記指示書を提供するインターネットサイトのアドレスを含み得る。

#### 【0048】

またキットは、本発明の標識miRNA分子作製のための1つ以上の以下の成分または試薬も含み得る：RNアーゼ阻害剤；オリゴヌクレオチドテールを一本鎖RNA分子に結合させるための酵素（例えば、ポリ(A)ポリメラーゼ）；オリゴヌクレオチドテールを一本鎖DNA分子に結合させるための酵素（例えば、TdT）；逆転写酵素；および部分的二本鎖核酸配列をオリゴヌクレオチドテールと結合させるための酵素（例えば、T4 DNAリガーゼ）。キットは、ハイブリダイゼーション液および洗浄液、インキュベーション容器、カバーガラス、ならびに各種のシグナル検出、シグナル発生、シグナル増強およびシグナル保護試薬を含めた、成分および試薬、ならびにmiRNAアッセイで標識miRNAを使用するための指示書をさらに含み得る。さらにキットは、本発明の標識miRNA分子の作製および使用に適合する緩衝液、ヌクレオチド、塩、無RNアーゼ水、容器、バイアル、反応チューブなどを含み得る。成分および試薬は、適当な記憶媒体で番号を付した容器で提供し得る。

10

#### 【0049】

本発明の方法による特定の実施形態を以下の実施例で説明する。実施例は単に例示的なものであり、開示の残りの部分を決して限定するものではないことが意図される。

20

#### 【実施例】

#### 【0050】

##### 実施例 1

全RNA中のmiRNA分子の標識およびアンチセンスmiRNAプローブとのハイブリダイゼーション

直鎖樹枝状ポリヌクレオチド核酸標識分子の調製

三量体の直鎖樹枝状ポリヌクレオチド核酸標識分子を上記のように調製した。標識分子は分子量が165kDaで、15個のフルオロフォア部分を10~15ntの間隔で含み、組立て後にUV-Aの存在下でトリオキシサレンを用いて架橋された。標識分子は、図2で示される5'-リン酸化オリゴヌクレオチド伸長配列(5'-TTCAGTAAATATGCC-3';配列番号1)を含んでいた。UV照射した調製物を、Microcon(登録商標)YM-30マイクロ濃縮器を供給業者(Millipore、Billerica、MA)の指示通りに用いて精製した。

30

#### 【0051】

直鎖樹枝状ポリヌクレオチド核酸標識分子を含有するライゲーション混合物の調製

42μlの精製標識分子(2,380ng/μl)を、図2に示される架橋オリゴヌクレオチド(5'-GGCATA TTA CTG AAT TTT TTT TTT T-3';配列番号2)(904ng/μl)12.3μlおよび10×ライゲーション緩衝液(660mMトリス-HCl、pH7.5、50mM MgCl、10mM DTT、10mM ATP;Roche Applied Science、Indianapolis、IN)35μlと混合して最終体積210μlにした。架橋オリゴヌクレオチドを、図2に示される5'-リン酸化オリゴヌクレオチド伸長配列と下記の3'ポリ(A)テール付加したmiRNA分子の両方とハイブリダイゼーション結合するように設計し、標識分子とテール付加miRNA分子がライゲートできるようにした。混合物を、1リットルビーカーに準備した0.30Lの水浴中、60°Cで10分間加熱した。次いで、ライゲーション混合物の入ったビーカーを室温まで冷却させた。10×ライゲーション緩衝液140μlを加え、チューブをボルテックスしてかき混ぜた。次いで混合物を、使用するまで-20°Cで保管した。

40

50

## 【0052】

miRNA分子のテール付加

1.5  $\mu$ gのラット脳全RNAおよび1.5  $\mu$ gのラット肝臓全RNA (Ambion、Austin、TX)を、別々に無ヌクレアーゼ水で10  $\mu$ lにした。1.5  $\mu$ lの10 $\times$ 反応緩衝液(50 mM トリス-HCl、pH 8.0、10 mM MgCl<sub>2</sub>)、1.5  $\mu$ lの25 mM MnCl<sub>2</sub>、1  $\mu$ lの0.02 mM ATPおよび1  $\mu$ lのポリ(A)ポリメラーゼ(5 U/ $\mu$ L)を加え、37 で15分間加熱して、全RNAにポリ(A)テールを付加した。

## 【0053】

miRNAのライゲーション

ライゲーション混合物4  $\mu$ lおよびT4 DNAリガーゼ(2 U/ $\mu$ L)2  $\mu$ lを加え、室温で30分間インキュベートして、ポリ(A)テール付加したRNA分子をライゲートした。停止液(0.25 M EDTA)2.5  $\mu$ lを加えて反応を停止させた。ラット脳RNAを、Oyster(登録商標)-550標識分子を含むデンドリマー分子とライゲートし、ラット肺RNAを、Oyster(登録商標)650標識分子を含むデンドリマー分子とライゲートした。

10

## 【0054】

標識miRNAのマイクロアレイハイブリダイゼーション

マイクロアレイハイブリダイゼーション混合物を調製する前に、2 $\times$ 増強ハイブリダイゼーション緩衝液(無ヌクレアーゼ水で75%まで希釈したExpressHyb(商標)緩衝液(BD Biosciences Clontech、Palo Alto、CA)を解凍し、再懸濁させた。標識RNA分子を5  $\mu$ lの10%BSAおよび2 $\times$ 増強ハイブリダイゼーション緩衝液と混合して、1 $\times$ の最終濃度にした。ハイブリダイゼーション混合物をNCODE(商標)マイクロアレイ(Invitrogen、Carlsbad、CA)に添加し、ガラスカバースリップを被せ、52 で一晩インキュベートした。単色アッセイ用に、一方の標識miRNA集団のみを選択されたハイブリダイゼーション混合物中、残りの体積を無ヌクレアーゼ水で満たしインキュベートした。

20

## 【0055】

52 に予熱した2 $\times$ SSC、0.2%SDS洗浄緩衝液中でマイクロアレイを洗浄してカバースリップを取り除いた。マイクロアレイを、予熱した2 $\times$ SSC、0.2%SDS洗浄緩衝液中、52 で15分間、2 $\times$ SSC中、室温で10~15分間、0.2 $\times$ SSC中、室温で10~15分間、順に洗浄した。マイクロアレイを乾いた50 mL遠心チューブに移し、粘着バーコードまたはラベルがすべてチューブの下側に向くようにスライドを配置した。マイクロアレイが入ったチューブを、マイクロアレイを乾燥させるためにチューブキャップをせずに直ちに800~1000 RPMで遠心分離した。マイクロアレイの表面に触れないように注意しながら、マイクロアレイをチューブから取り出した。GenePix(登録商標)Pro3.0ソフトウェアを備えたGenePix(登録商標)4000Bマイクロアレイスキャナ(Molecular Devices、Sunnyvale、CA)を用いてアレイをスキャンして、元のサンプル中のmiRNA配列の発現プロファイルを作製した。脳と肝臓のプロファイルを比較して、各種miRNAの差異プロファイルを確立した。肝臓には主としてmiR122が存在し、脳には主としてmiR124aおよびmiR9が存在することが観察された。miR16およびmiRlet7a-f、ならびにその他のmiRNAが脳および肝臓の両方で発現されたが、これらは組織特異的プロファイルを示していた。

30

40

## 【0056】

実施例2

濃縮RNA中のmiRNA分子の標識およびアンチセンスmiRNAプローブとのハイブリダイゼーション

マイクロアレイハイブリダイゼーションの前に、ラット脳およびラット肝臓全RNAの低分子量RNAを濃縮したこと以外は、実施例1の手順に従った。1.5  $\mu$ gのラット脳

50

およびラット肝臓全RNAを10mMトリス、pH8.0で100 $\mu$ lに別々に希釈し、80 $^{\circ}$ Cまで3分間加熱し、氷上で冷却した。50 $\mu$ lの10mMトリス、pH8.0を加え、13,000RPMで3分間遠心分離することにより、Microcon(登録商標)YM-100マイクロ濃縮器(Millipore、Billerica、MA)を各RNA試料用に予湿した。カラムを新たな収集チューブに入れ、各100 $\mu$ lの試料を加え、13,000RPMで7分間遠心分離した。低分子量RNA分子を含有する各通過画分(約95 $\mu$ l)を、Microcon(登録商標)YM-3マイクロ濃縮器(Millipore、Billerica、MA)を用いて13,000RPMで30分間遠心分離することにより濃縮した。次いで5 $\mu$ lの10mMトリス-HCl、pH8.0を各試料リザーバに加え、カラム側面を軽くたたいて静かにかき混ぜた。次いで各試料リザーバを新たな収集チューブに逆さにして入れ、13,000RPMで3分間遠心分離して、濃縮された濃縮RNAを収集した(-5-10 $\mu$ lが回収された)。次いで、各濃縮RNA試料を無ヌクレアーゼ水で10 $\mu$ lにした。

10

#### 【0057】

濃縮RNA分子に、上記の通りにポリ(A)を付加し、ライゲーションを行い、NCod(商標)マイクロアレイとハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後に、アレイを上記の通りに洗浄およびスキャンして、元のサンプル中のmiRNA配列の発現プロファイルを作製した。実施例1(全RNA log<sub>2</sub>(肝臓/脳))と実施例2(濃縮RNA log<sub>2</sub>(肝臓/脳))のデータを比較すると、0.933のPearson相関が認められた。

20

#### 【0058】

##### 実施例3

##### ELOSA

##### プレートのコーティング

CoStar(Corning、Lowell、MA)マイクロタイタープレートの各ウェルに1xPBS中1 $\mu$ g/mLのヒトmiR122アンチセンスDNAオリゴヌクレオチド(5'-CAAACA CCA TTG TCA CAC TCC A-3'; 配列番号3)を100 $\mu$ l加えてコーティングした。プレートをマイクロプレート圧着シラー(PerkinElmer、Waltham、MA)で覆い、室温で一晩インキュベートした。次いで、プレートを1xPBS、0.05%Tween-20で2回洗浄し、吸い取り紙で乾燥させた。

30

#### 【0059】

##### プレートのブロッキングおよびmiRNAの標識

各ウェルに1xPBS中4%のBSAを200 $\mu$ l加えた。プレートにカバーをして、室温で1~2時間インキュベートした。プレートのブロッキングインキュベーション時に、全RNAおよび濃縮RNA中のmiRNA分子を標識した。1 $\mu$ g、0.75 $\mu$ g、0.5 $\mu$ gおよび0.25 $\mu$ gのラット肝臓全RNA(Ambion、Austin、TX)から、上の実施例に記載されている通りに、Microcon(登録商標)YM-100マイクロ濃縮器(Millipore、Billerica、MA)を用いて低分子量RNAを濃縮し、次いでMicrocon(登録商標)YM-3マイクロ濃縮器(Millipore、Billerica、MA)を用いて濃縮した。上の実施例1に記載されている通りに、濃縮RNA試料ならびに1 $\mu$ g、0.75 $\mu$ g、0.5 $\mu$ gおよび0.25 $\mu$ gのラット肝臓全RNAにポリ(A)テールを付加した。ライゲーション混合物4 $\mu$ lおよびT4 DNAリガーゼ(2U/ $\mu$ L)2 $\mu$ lを加え、室温で30分間インキュベートして、テール付加RNA分子をライゲートした。ライゲーション混合物は、直鎖樹枝状ポリヌクレオチド核酸標識分子がフルオロフォア部分ではなくビオチン部分を含む以外は、実施例1のライゲーション混合物と同じであった。停止液(0.25M EDTA)2.5 $\mu$ lを加えて反応を停止させ、23.5 $\mu$ lのビオチン化RNAを得た。ブロッキングが完了した後、プレートを1xPBS、0.05%Tween-20で2回洗浄し、吸い取り紙で乾燥させた。

40

50

## 【0060】

## 試料のハイブリダイゼーション

19  $\mu$ l の T M A C 溶液 ( 4 . 5 M T M A C , S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s , M O ) 、 7 5 m M T r i s 、 p H 8 . 0 . 1 5 % サ ル コ シ ル ( S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s , M O ) 、 6 m M E D T A ( A m b i o n , A u s t i n , T X ) 、 2 6  $\mu$ l の 脱 イ オ ン 化 ホ ル ム ア ミ ド ( E M D , G i b b s t o w n , N J ) 、 5  $\mu$ l の 1 0 % B S A お よ び 無 ヌ ク レ ア ー ゼ 水 1 . 5  $\mu$ l を 2 3 . 5  $\mu$ l の 各 ビ オ チ ン 化 試 料 に 加 え て 、 最 終 体 積 7 5  $\mu$ l に し た 。 各 試 料 を 静 か に か き 混 ぜ 、 遠 心 分 離 し 、 コ ー テ ィ ン グ さ れ た プ ロ ッ ク 済 み ウ ェ ル に 添 加 し た 。 試 料 を プ レ ー ト で 3 ~ 4 時 間 、 室 温 で ハ イ ブ リ ダ イ ズ さ せ た 。 ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン 後 、 最 初 に 5 2 まで 予 熱 し た 2 x S S C 、 0 . 2 % S D S 洗 浄 緩 衝 液 で 2 回 洗 浄 し 、 次 い で 室 温 で 2 x S S C で 2 回 洗 浄 し 、 次 い で 室 温 で 0 . 2 x S S C で 2 回 洗 浄 し た 。

10

## 【0061】

## ストレプトアビジン - HRPハイブリダイゼーション

ストレプトアビジン - HRP ( S A - H R P , R & D S y s t e m s , M i n n e a p o l i s , M N ) を 、 製 造 者 の 推 奨 に 従 っ て 1 x P B S 中 4 % の B S A ( E q u i t e c h - B i o , K e r r v i l l e , T X ) で 希 釈 し た 。 希 釈 し た S A - H R P を 各 ウ ェ ル に 5 0  $\mu$ l 加 え 、 プ レ ー ト を 穏 や か に 振 盪 し な が ら 室 温 で 1 時 間 、 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 次 い で 、 プ レ ー ト を 1 x P B S 、 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 で 2 ~ 4 回 洗 浄 し 、 吸 い 取 り 紙 で 乾 燥 さ せ た 。

20

## 【0062】

## シグナル発現

T M B 基 質 ( P i e r c e , R o c k f o r d , I L ) 1 0 0  $\mu$ l を 各 ウ ェ ル に 加 え 、 プ レ ー ト を 室 温 で 1 ~ 1 5 分 間 イ ン キュ ベ ー ト し た 。 B i o S o u r c e ( 商 標 ) 停 止 緩 衝 液 ( I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A ) 1 0 0  $\mu$ l を 各 ウ ェ ル に 加 え た 。 V i c t o r <sup>3</sup> マ ル チ ラ ベ ル プ レ ー ト リ ー ダ ー ( P e r k i n E l m e r , W a l t h a m , M A ) で 4 5 0 n m で の 吸 光 度 を 読 み 取 っ た 。 濃 縮 R N A お よ び 全 R N A の 両 方 に お い て 、 入 力 し た R N A と 観 察 さ れ た シ グ ナ ル と の 間 に 、 相 関 係 数 が そ れ ぞ れ 0 . 9 8 5 お よ び 0 . 9 7 3 の 直 線 関 係 が 見 ら れ た 。 m i R 1 2 2 の 検 出 限 界 は 、 濃 縮 m i R N A ま た は 全 R N A の い ず れ で も 全 R N A の 0 . 2 5  $\mu$ g 未 満 で あ る と 判 定 さ れ た 。

30

## 【0063】

## 実施例 4

## miRNA分子のLuminexビーズ検出

実施例 3 で 上 に 述 べ た 通 り に 、 ラ ッ ト 脳 お よ び 肝 臓 由 来 の 全 R N A ( A m b i o n , A u s t i n , T X ) に ポ リ ( A ) テ ー ル を 付 加 し 、 ビ オ チ ン 化 樹 枝 状 ポ リ ヌ ク レ オ チ ド 核 酸 標 識 分 子 と ラ イ ゲ ー ト し た 。 2 種 類 の 蛍 光 色 素 を 様 々 な 量 で 含 有 し 、 2 種 類 の 蛍 光 色 素 の 比 か ら 一 方 の タ イ プ の ビ ー ズ を 別 の タ イ プ の も の と 区 別 す る こ と が で き る 各 種 L u m i n e x 銘 柄 の カ ル ボ キ シ ル 化 マ イ ク ロ ビ ー ズ 調 製 物 ( L u m i n e x , A u s t i n , T X ) を 、 L u m i n e x の 手 順 を 用 い て 、 選 択 さ れ た ラ ッ ト 成 熟 m i R N A 配 列 ( m i R B a s e S e q u e n c e D a t a b a s e ; <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences> ) を 表 す 各 種 ア ミ ノ 化 2 2 m e r ア ン チ セ ン ス m i R N A プ ロ ー プ ( I D T t e c h n o l o g i e s ) と 共 有 結 合 さ せ た 。 複 数 の m i R N A 特 異 性 を 同 時 に 検 出 す る た め に 設 計 さ れ た 多 重 検 出 ア ッ セ イ で は 、 ラ イ ゲ ー ト し た R N A 試 料 1 7  $\mu$ l を 、 1 0 % ホ ル ム ア ミ ド 、 4 . 5 M T M A C 、 0 . 1 % B S A お よ び 2 5 n g /  $\mu$ l の サ ケ 精 子 D N A を 含 む 緩 衝 液 3 3  $\mu$ l 中 の 複 数 の 各 種 タ イ プ の L u m i n e x ビ ー ズ に 加 え た 。 ビ ー ズ - R N A 混 合 物 を 、 5 0 0  $\mu$ l ポ リ プ ロ ピ レ ン チ ュ ー ブ 中 、 4 7 まで 一 晩 、 3 0 0 R P M で 水 平 方 向 に 攪 拌 し な が ら イ ン キュ ベ ー ト し た 。 ビ ー ズ を フ ィ ル タ ー マ イ ク ロ プ レ ー ト に 移 し 、 5 6 まで 予 熱 し た 2 x S S C 、 2 0 % ホ ル ム ア ミ ド で 吸 引 過 により 洗 浄 し た 後 、 室 温 に お い て 2 x S S C 、 0 . 2 x S S C お よ び 1 x P B S で 洗 浄 し た 。 1 x P B S 中 の ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン - フ ィ コ エ リ ト リ ン コ ン ジ

40

50

ユゲート (Invitrogen, Carlsbad, CA) (2 ng/μl) 100 μl を各ビーズ混合物に加え、37 °C で30分間、300 RPMで攪拌しながらインキュベートした。ビーズを1×PBSで3回洗浄し、125 μlの1×PBS中に再懸濁させ、製造者の推奨に従ってLuminex 100 ISシステムで解析した。バックグラウンド値の2倍を上回る特異的miRNAプローブの平均蛍光強度(MFI)値が、ライゲートRNA調製物中のmiRNA分子の特異的検出を表した。脳および肝臓miRNAのプロファイルを、実施例1および2のmiRNAアレイで観察されたプロファイルと比較した。Luminexプラットフォームで試験したすべてのmiRNAのプラットフォーム間で同様の肝臓/脳プロファイルが観察された。

#### 【0064】

##### 実施例5

アンチセンスmiRNAプローブとのハイブリダイゼーションのための標的miRNA分子を直接標識するキット

標識標的miRNA分子の作製およびマイクロアレイハイブリダイゼーションのためのキットを以下の成分で構築した：

Oyster (登録商標) - 550および650ライゲーション混合物 (直鎖樹枝状ポリヌクレオチド組成物250 ng/μlおよび架橋オリゴヌクレオチド31.7 ng/μl) (Genisphere, Hatfield, PA)；

10×反応緩衝液 (50 mM トリス-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>)；

MnCl<sub>2</sub> (25 mM)；

ATP混合物 (10 mM)；

ポリ(A)ポリメラーゼ (5 U/μL)；

2×SDSベースのハイブリダイゼーション緩衝液 (2×SSC, 4×Denhardt液, 1% SDS, 0.5 M リン酸ナトリウム, 2 mM EDTA, pH 8.0)；

2×増強ハイブリダイゼーション緩衝液 (予め無ヌクレアーゼ水で75%に希釈したExpressHyb (商標) 緩衝液 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA))；

T4 DNAリガーゼ (2 U/μL)；ならびに

無ヌクレアーゼ水。

#### 【0065】

番号を付したバイアルに成分を入れ、キット成分を用いた標識標的miRNA分子の作製およびマイクロアレイハイブリダイゼーションのための印刷された取扱説明書を添付した容器に入れた。

#### 【0066】

##### 実施例6

全RNA中のmiRNA分子の標識およびアンチセンスmiRNAプローブとのハイブリダイゼーション

直鎖樹枝状ポリヌクレオチド核酸標識分子の調製

上記の通りに1つ以上のビオチン化オリゴヌクレオチドを緩衝剤 (10 mM トリス-HCl, pH 8.0) および塩 (100 mM NaCl) を含有する溶液中で混合することにより、ポリヌクレオチド核酸標識分子を調製した。標識ポリヌクレオチド分子は分子量が5~250 kDa (いずれの標識分子も除く) であり、1~15個の標識分子 (ビオチンまたは蛍光色素) を含んでいた。フルオロフォア部分に10~15 ntの間隔を置いた。標識ポリヌクレオチドは、組立て後にUV-Aの存在下でトリオキシサレンを用いて架橋した。標識分子は、図2に示される5'-リン酸化オリゴヌクレオチド伸長配列 (5'-TTC AGT AAT ATG CC-3'；配列番号1) を含んでいた。UV照射した調製物を、Microcon (登録商標) YM-30マイクロ濃縮器を供給業者 (Millipore, Billerica, MA) の指示通りに用いて精製した。

#### 【0067】

直鎖樹枝状ポリヌクレオチド核酸標識分子を含有するライゲーション混合物の調製

10

20

30

40

50

精製標識分子を、図2に示される架橋オリゴヌクレオチド(5'-GGC ATA TTA CTG AAT TTT TTT TTT T-3';配列番号2)および35 μlの10×ライゲーション緩衝液(660 mM トリス-HCl、pH 7.5、50 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM DTT、10 mM ATP; Roche Applied Science、Indianapolis、IN)と混合し210 μlの最終体積にした。架橋オリゴヌクレオチドを、図2に示される5'-リン酸化オリゴヌクレオチド伸長配列および下記の3'ポリ(A)テール付加したmiRNA分子の両方とハイブリダイゼーション結合するように設計し、標識分子とテール付加miRNA分子がライゲートできるようにした。混合物を、1リットルビーカーに準備した0.30 Lの水浴中、60°Cで10分間加熱した。次いで、ライゲーション混合物の入ったビーカーを室温まで冷却させた。10×ライゲーション緩衝液140 μlを加え、チューブをボルテックスしてかき混ぜた。次いで混合物を、使用するまで-20°Cで保管した。

10

## 【0068】

miRNA分子のテール付加およびライゲーション

2段階工程:

1 μgのラット脳全RNAおよび1 μgのラット肝臓全RNA(Ambion、Austin、TX)を、別々に無ヌクレアーゼ水で10 μlにした。1.5 μlの10×反応緩衝液(50 mM トリス-HCl、pH 8.0、10 mM MgCl<sub>2</sub>)、1.5 μlの25 mM MnCl<sub>2</sub>、1 μlの0.02 mM ATPおよび1 μlのポリ(A)ポリメラーゼ(5U/μL)を加え、37°Cで15分間加熱して、全RNAにポリ(A)テールを付加した。

20

## 【0069】

ライゲーション混合物4 μlおよびT4 DNAリガーゼ(2U/μL)2 μlを加え、室温で30分間インキュベートして、ポリ(A)テール付加したRNA分子をライゲートした。停止液(0.25 M EDTA)2.5 μlを加えて反応を停止させた。ラット脳RNAを、Oyster(登録商標)-550標識分子を含むデンドリマー分子とライゲートし、ラット肺RNAを、Oyster(登録商標)-650標識分子を含むデンドリマー分子とライゲートした。

## 【0070】

1段階工程:

1 μgのラット脳全RNAおよび1 μgのラット肝臓全RNA(Ambion、Austin、TX)を、別々に無ヌクレアーゼ水で10 μlにした。1.5 μlの25 mM MnCl<sub>2</sub>、4 μlのライゲーション混合物、2 μlのT4 DNAリガーゼ(2U/μL)および1 μlのポリ(A)ポリメラーゼ(5U/μL)を加え、25~37°Cで45分間インキュベートして、全RNAを標識した。停止液(0.25 M EDTA)2.5 μlを加えて反応を停止させた。2段階工程と同様に、ラット脳RNAを、Oyster(登録商標)-550標識分子を含むデンドリマー分子とライゲートし、ラット肺RNAを、Oyster(登録商標)-650標識分子を含むデンドリマー分子とライゲートした。

30

## 【0071】

蛍光標識miRNAのマイクロアレイハイブリダイゼーション

マイクロアレイハイブリダイゼーション混合物を調製する前に、2×増強ハイブリダイゼーション緩衝液(無ヌクレアーゼ水で75%まで希釈したExpressHyb(商標)緩衝液(BD Biosciences Clontech、Palo Alto、CA))を解凍し、再懸濁させた。標識RNA分子を5 μlの10%BSAおよび2×増強ハイブリダイゼーション緩衝液と混合して、1×の最終濃度にした。ハイブリダイゼーション混合物をNCODE(商標)マイクロアレイ(Invitrogen、Carlsbad、CA)に添加し、ガラスカバースリップを被せ、52°Cで一晩インキュベートした。単色アッセイ用に、一方の標識miRNA集団のみを選択されたハイブリダイゼーション混合物中、残りの体積を無ヌクレアーゼ水で満たしインキュベートした。

40

50

## 【0072】

52 に予熱した2×SSC、0.2%SDS洗浄緩衝液中でマイクロアレイを洗浄してカバースリップを取り除いた。マイクロアレイを、予熱した2×SSC、0.2%SDS洗浄緩衝液中、52 で15分間、2×SSC中、室温で10~15分間、0.2×SSC中、室温で10~15分間、順に洗浄した。マイクロアレイを乾いた50mL遠心チューブに移し、粘着バーコードまたはラベルがすべてチューブの下側に向くようにスライドを配置した。マイクロアレイが入ったチューブを、マイクロアレイを乾燥させるためにチューブキャップをせずに直ちに800~1000RPMで遠心分離した。マイクロアレイの表面に触れないように注意しながら、マイクロアレイをチューブから取り出した。GenePix (登録商標) Pro 3.0ソフトウェアを備えたGenePix (登録商標) 4000Bマイクロアレイスキャナ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いてアレイをスキャンして、元のサンプル中のmiRNA配列の発現プロファイルを作製した。脳と肝臓のプロファイルと比較して、各種miRNAの差異プロファイルを確立した。肝臓には主としてmiR122が存在し、脳には主としてmiR124aおよびmiR9が存在することが観察された。miR16およびmiRlet7a-f、ならびにその他のmiRNAは脳および肝臓の両方で発現されたが、これらは組織特異的プロファイルを示していた。

10

## 【0073】

ビオチン標識miRNAのマイクロアレイハイブリダイゼーション

標識RNA分子を、2×GeneChipハイブリダイゼーション緩衝液 (GeneChip Hyb Was Stain Kit, Affymetrix, Santa Clara, CA) 50μl、100%ホルムアミド (VWR) 5μl、DMSO (GeneChip Hyb Was Stain Kit, Affymetrix, Santa Clara, CA) 10μl、20×真核Hyb対照 (Affymetrix, Santa Clara, CA) 5μl、対照B2 (Affymetrix, Santa Clara, CA) 1.7μlおよび無ヌクレアーゼ水 (Ambion, Austin, TX) 10μlと混合した。ハイブリダイゼーション混合物をGeneChip (商標) マイクロRNAマイクロアレイ (Affymetrix, Santa Clara, CA) に添加し、製造者の推奨に従って47 で一晚 (16時間) インキュベートした。アレイを洗浄し、Fluidics Script, FS450\_\_003を用いてAffymetrix Fluidics Station 450で染色した。

20

30

## 【0074】

結果

所与の実験で使用したビオチン標識したポリヌクレオチド標識試薬に応じて、標識タグの推定の大きさは約100~700塩基長の間であった (この長さには、オリゴヌクレオチドテールの長さや標識試薬の長さが含まれる)。各種の大きさのポリヌクレオチド標識試薬を比較したAffymetrix GeneChip (商標) マイクロRNAアレイで観察された結果を図3にまとめる。1試薬当たりのビオチン分子数に関係なく、低分子の標識試薬の方が大きな分子のものよりも有意に良好に機能した。

40

## 【0075】

蛍光標識したポリヌクレオチド標識試薬を用いた2段階標識工程と1段階標識工程の対照比較では、1段階法の方が、はるかにワークフローが容易であり、多数の試料の並行処理に適していることが示された。アレイの結果 (図4) では、2段階法と1段階法の平均にほとんどまたは全く差が示されず、このことは、反応を別々に行うか、1つの反応混合物中にまとめるかに関係なく、2つの酵素的段階 (ポリAテール付加およびライゲーション) が同様の効率で行われることを示唆している。また再現性は、2段階工程よりも1段階工程の方が高かった。

## 【0076】

本明細書に引用されるすべての刊行物は、特許刊行物および非特許刊行物ともに、本発明が属する分野の当業者の技術レベルを示すものである。これらの刊行物はすべて、個々

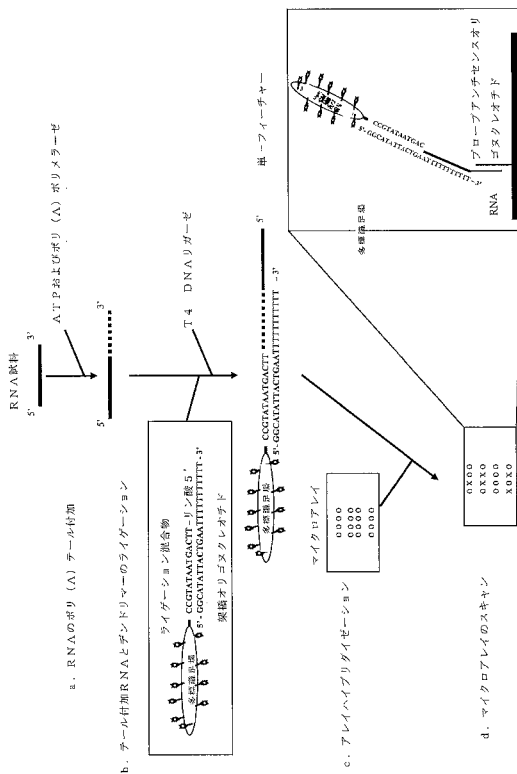
50

の刊行物が、参照により組み込まれるものとしてそれぞれ具体的かつ個別に明記された場合と同様に、参照により本明細書に完全に組み込まれる。

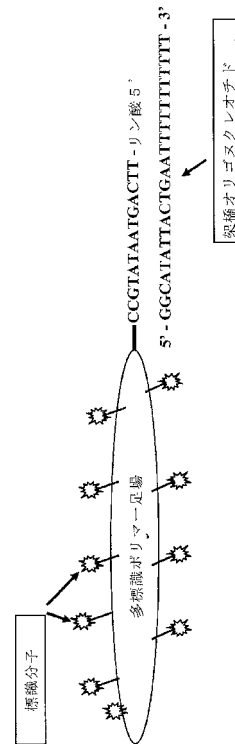
【0077】

本発明は、本明細書では特定の実施形態に関して記載されているが、これらの実施形態は、単に本発明の原理および応用の例示に過ぎないことを理解するべきである。したがって、以下の特許請求の範囲により定められる本発明の精神および範囲を逸脱することなく、数多くの修正が例示の実施形態に施され得ること、また他の構成が考案され得ることを理解するべきである。

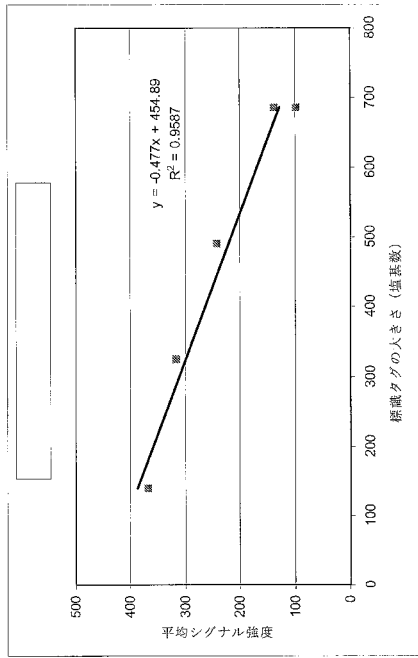
【図1】



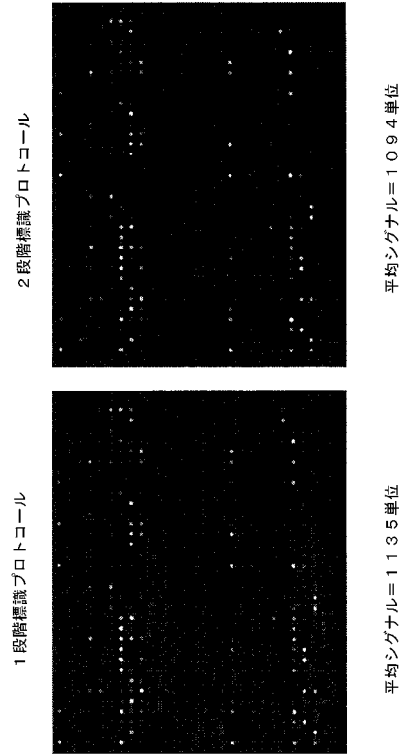
【図2】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

2013511986000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 10/58006
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C07H 21/00 (2011.01) USPC - 536/24.3; 536/25.32 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C07H 21/00 (2011.01) USPC: 536/24.3; 536/25.32 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/6; 435/91.52; 435/91.5; 435/287.2; 535/24.3; 535/24.31; 535/24.32; 535/25.32 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB): polymer, scaffold, extension sequence, gets, trimeric, dendritic, sense, antisense, biotin, fluorophore, molecular weight --- Please see continuation on second extra sheet ---		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	WO 2009/102866 A2 (GETTS et al.) 20 August 2009 (20.08.2009), para [0010], [0011], [0012], [0013], [0014], [0015], [0016], [0026], [0028], [0030], [0033], [0037], [0047], [0048].	1-15, 17-19 16
Y	US 2009/0081644 A1 (NELSON et al.) 26 March 2009 (26.03.2009), abstract; para [0007], [0008].	16
A	US 6,569,627 B2 (WITTEWER et al.) 27 May 2003 (27.05.2003), col 45, in 29-31 -claim 1	1
A	US 2006/0160098 A1 (ZAK et al.) 20 July 2006 (20.07.2006), abstract; para [0041], [0048], [0060]	1, 4, 10
A	US 2008/0300142 A1 (GETTS et al.) 4 December 2008 (04.12.2008), abstract; para [0010], [0011], [0013]	1-4, 8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 March 2010 (13.03.2011)		Date of mailing of the international search report <b>29 MAR 2011</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 10/58006

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-5, drawn to a nucleic acid labeling molecule

Group II: Claims 6-19, drawn to a method for producing a labeled target RNA molecule and a method for the detection of a RNA antisense probe on a solid support.

--- Please see continuation on first extra sheet ---

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/58008

## Continuation of Box (III): Lack of Unity

The groups listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons.

Groups I and II share the technical feature of a nucleic acid labeling molecule comprising one or more label molecules capable of emitting or producing a detectable signal at its 3' end. However, this does not represent an improvement over the prior art as US 6,569,627 to Wittwer et al teaches such a nucleic acid labeling molecule (probe labeled 3' with fluorescein; col 45, ln 29-31).

Accordingly, unity of invention is lacking.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US 10/58006

Continuation of (B): Fields Searched - Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Google Scholar: trimeric dendritic polynucleotide label biotin fluorophore kDA

esp@conot: Genisphere, Robert Getts

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 カズシン, ジェームス  
アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 19525, ギルバーツビル, 2358 ターンベリー  
ロード

(72)発明者 バウワース, ジェシカ  
アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 19438, ハーレーズビル, 284 キャスリーン  
サークル

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA11 HA11  
4B063 QA01 QA18 QQ52 QR56 QR66 QR82 QS03 QS36 QX02