

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6325667号
(P6325667)

(45) 発行日 平成30年5月16日 (2018. 5. 16)

(24) 登録日 平成30年4月20日 (2018. 4. 20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2018. 01)
 C 1 2 M 1/34 (2006. 01)
 C 1 2 M 1/00 (2006. 01)
 G O 1 N 33/50 (2006. 01)
 G O 1 N 33/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A A
 C 1 2 Q 1/68 Z
 C 1 2 M 1/34 Z
 C 1 2 M 1/00 A
 G O 1 N 33/50 P

請求項の数 15 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-526155 (P2016-526155)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月21日 (2014. 10. 21)
 (65) 公表番号 特表2016-535596 (P2016-535596A)
 (43) 公表日 平成28年11月17日 (2016. 11. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2014/009870
 (87) 国際公開番号 W02015/060609
 (87) 国際公開日 平成27年4月30日 (2015. 4. 30)
 審査請求日 平成28年9月9日 (2016. 9. 9)
 (31) 優先権主張番号 10-2013-0125087
 (32) 優先日 平成25年10月21日 (2013. 10. 21)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2013-0143495
 (32) 優先日 平成25年11月25日 (2013. 11. 25)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 516120445
 キム・ソンチョン
 大韓民国 03733 ソウル ソデムン
 ーグ トンニンムンゴンウォンーギル 1
 7 110ードン 202ーホ
 (74) 代理人 100107515
 弁理士 廣田 浩一
 (74) 代理人 100107733
 弁理士 流 良広
 (74) 代理人 100115347
 弁理士 松田 奈緒子
 (74) 代理人 100163038
 弁理士 山下 武志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) (i) 分析対象生体試料から標的タンパク質の含まれたタンパク質試料を取得し、取得されたタンパク質試料を、該タンパク質試料中の標的タンパク質に特異的に結合するリガンドにオリゴヌクレオチドが連結された分析リガンドと反応させて、標的タンパク質ー分析リガンド複合体のみを分離して得、(i i) 前記生体試料と同じ生体試料から標的核酸の含まれた核酸試料を取得し、取得された核酸試料を、該核酸試料中の標的核酸に特異的に結合する上流オリゴヌクレオチド及び下流オリゴヌクレオチドと反応させてハイブリダイゼーションさせた後、上流オリゴヌクレオチドと下流オリゴヌクレオチドとの間の分離された領域を連結させて完全な二重鎖核酸を得る段階と、

(b) 前記複合体と前記二重鎖核酸とを混合する段階と、

(c) 前記混合物から前記複合体のオリゴヌクレオチドと前記二重鎖核酸を同時に検出する段階とを含んでなることを特徴とする、生体試料中の標的タンパク質と標的核酸の同時分析方法。

【請求項 2】

前記標的核酸は、RNAを逆転写して得たcDNA、ゲノムDNA、及び重硫酸ナトリウム (sodium bisulfate) 処理されたゲノムDNAよりなる群から選ばれた1つ以上であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記標的核酸が非変異 (野生型 (wild type)) 標的核酸、変異 (mutan

t) 標的核酸またはメチル化標的核酸であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記リガンドが抗体、ペプチドまたはアプタマーであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記(c)段階は、

(c-1) 前記混合物で前記複合体のオリゴヌクレオチドと前記二重鎖核酸を同時に増幅する段階、及び

(c-2) 前記複合体のオリゴヌクレオチドの増幅物と前記二重鎖核酸の増幅物を同時に検出する段階によって行われることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

10

【請求項6】

(c-1) 段階は、前記複合体のオリゴヌクレオチドと前記二重鎖核酸が、同じ配列の順方向プライマーが結合する領域及び同じ配列の逆方向プライマーが結合する領域を有することにより、1組の順方向プライマーと逆方向プライマーで行われることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記複合体のオリゴヌクレオチドには、前記リガンドが特異的に結合する標的タンパク質を指示してその標的タンパク質を識別することを可能にする領域が存在し、

前記二重鎖核酸には、前記上流・下流オリゴヌクレオチドが特異的に結合する標的核酸を指示してその標的核酸を識別することを可能にする領域が存在し、

20

前記(c-2)段階は、前記増幅物から前記標的タンパク質の識別領域と前記標的核酸の識別領域を同時に検出することにより行われることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項8】

前記順方向プライマー及び前記逆方向プライマーのいずれか1つは検出シグナルを発生させるプライマーであり、

前記(c-2)段階は前記増幅物から前記検出シグナルを検出して行われることを特徴とする、請求項6に記載の方法。

【請求項9】

検出シグナルを発生させるプライマーは順方向プライマーであることを特徴とする、請求項8に記載の方法。

30

【請求項10】

前記複合体を構成する前記分析リガンドのオリゴヌクレオチドは、順方向プライマーが結合する領域、逆方向プライマーが結合する領域、及びこれらの領域の間にリガンドが特異的に結合する標的タンパク質を指示してそのタンパク質を識別することを可能にする領域を含み、

前記二重鎖核酸を構成する前記上流オリゴヌクレオチドは、順方向プライマーが結合する領域と、該領域の下流で標的核酸に特異的にハイブリダイゼーションする領域を含み、

前記二重鎖核酸を構成する前記下流オリゴヌクレオチドは、前記上流オリゴヌクレオチドの特異的ハイブリダイゼーション領域が認知する標的核酸領域の下流を認知してハイブリダイゼーションする領域と、該ハイブリダイゼーション領域の下流で逆方向プライマーが結合する領域とを含み、

40

前記上流・下流オリゴヌクレオチドが特異的に結合する標的核酸を指示してその標的核酸を識別することを可能にする領域が、前記上流オリゴヌクレオチドの順方向プライマー結合領域とハイブリダイゼーション領域との間、または前記下流オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション領域と逆方向プライマー結合領域との間に存在し、

前記複合体のオリゴヌクレオチドと前記二重鎖核酸の上流・下流オリゴヌクレオチドは、同じ配列の順方向プライマーが結合する領域と、同じ配列の逆方向プライマーが結合する領域とを有し、

これにより、

50

前記(c)段階は、

(c-i) 前記混合物で前記複合体のオリゴヌクレオチドと前記二重鎖核酸を1組の順方向プライマー及び逆方向プライマーで同時に増幅する段階と、

(c-ii) 前記複合体のオリゴヌクレオチドの増幅物と前記二重鎖核酸の増幅物から前記標的タンパク質識別領域と標的核酸識別領域を同時に検出する段階とを含んでなることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記順方向プライマーは、検出シグナルを発生させるプライマーであり、

前記(c-ii)段階における前記標的タンパク質識別領域と標的核酸識別領域の同時検出は、前記検出シグナルを検出することにより行われることを特徴とする、請求項10

10

【請求項12】

前記(c-ii)検出段階は、

前記標的タンパク質の識別領域に相補的な捕捉プローブ、及び前記標的核酸の識別領域に相補的な配列を有する捕捉プローブが固着されたマイクロアレイに、前記増幅物を処理することにより、捕捉プローブと増幅物とのハイブリダイゼーションを誘導する段階と、

ハイブリダイゼーションされていない増幅物を除去する段階と、

捕捉プローブとハイブリダイゼーションされた増幅物から前記検出シグナルを検出する段階とを含んでなることを特徴とする、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

20

前記(a)段階の標的核酸は、変異配列が存在するものと推定される標的核酸であり、

前記(a)段階は、前記変異配列に相補的な配列を有する追加の上流オリゴヌクレオチドを前記上流・下流オリゴヌクレオチドと共に前記標的核酸と反応させることにより行われ、

前記(c-i)段階は、前記追加の上流オリゴヌクレオチドに対する追加の順方向プライマーを前記順方向プライマー及び逆方向プライマーと共に添加することにより行われ、

前記追加の上流オリゴヌクレオチドは、順方向プライマーが結合する領域、該領域の下流で標的核酸に特異的にハイブリダイゼーションする領域、及び該ハイブリダイゼーション領域の下流で前記変異配列に相補的な配列を含み、

前記追加の順方向プライマーは、前記順方向プライマーとは異なる配列を有することを特徴とする、請求項10に記載の方法。

30

【請求項14】

前記変異配列は1～3のヌクレオチドからなることを特徴とする、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記(a)段階の標的核酸は、メチル化された配列が存在するものと推定されるゲノム核酸に二硫化物を処理して得た変形配列を有する標的核酸であり、

前記(a)段階は、前記変形配列に特異的に結合するハイブリダイゼーション領域を有する追加の上流オリゴヌクレオチドを前記上流・下流オリゴヌクレオチドと共に前記標的核酸と反応させることにより行われ、

40

前記(c)段階は、前記追加の上流オリゴヌクレオチドに対する追加の順方向プライマーを前記順方向プライマー及び逆方向プライマーと共に添加することにより行われ、

前記追加の上流オリゴヌクレオチドは、順方向プライマーが結合する領域、該領域の下流で標的核酸に特異的にハイブリダイゼーションする領域、及び該ハイブリダイゼーション領域の下流で前記変形配列に相補的な配列を含み、

前記追加の順方向プライマーは、前記順方向プライマーとは異なる配列を有することを特徴とする、請求項10に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、一般に、生体分子分析方法に関し、さらに具体的には、生体分子の生物学的意義を分析するために、様々な標的分子に結合する分析リガンド、及び標的核酸の特定の領域と完全に相補的に結合するオリゴヌクレオチドを用いて一度の検査で生体試料における生体分子を分析する方法及び装置に関する。

【背景技術】

【0002】

生体分子は、生体試料を構成する数多くのタンパク質、核酸、脂質、及び炭水化物などの物質である。このような生体分子を分析する技術、及び生体試料における生体分子の量的な状態を総合化した情報、すなわち生体分子のプロファイル (profile) を生産する技術は、物理学、生化学及び生物情報学の発達に伴って広く開発されたが、従来の方法や機器の使用及び維持費、容易性、精度、敏感度、検査時間及び過程の自動化などの問題により、効率のよい新規方法及び装置に対する必要性が非常に高い。

10

【0003】

生体分子分析及びプロファイル生産技術は、それ自体が究極的な目標ではなく、目標を達成するための一つの手段であるが、微生物、細胞、組織などに有用に使用することができるため、医学、獣医学、環境工学、食品工学、農業などへと広範囲に応用されている。

【0004】

生体試料である組織、細胞塊、細胞及び微生物などを構成する核酸、タンパク質及び有機物質などを含む生体分子のプロファイルは、物理・化学的な性質を利用して様々な方法で作られている。

20

【0005】

生体試料にある生体分子のプロファイルを用いて生物学的意義を分析するための臨床意思決定支援システム (Clinical Decision Support System) は、医師が患者診療の際に診断及び治療に関する意思決定 (Decision Making) を行う過程を支援するシステムである。臨床意思決定支援システムは、事例ベースの機械学習推論システム (Case Based Machine Learning Inference System) とエキスパートシステム (Expert System) に大別される。事例ベースの機械学習推論システムは、疾患が判定された患者の臨床情報 (Clinical Information) 及び生物学的情報、すなわち生体分子プロファイルデータを収集した後、機械学習を利用して、与えられた臨床情報と生物学的情報などから疾患を推論または判別することができるようにするシステムである。エキスパートシステムは、医学専門家によって予め定められているルール (Rule) を使って疾病を診断するシステムである。

30

【0006】

最も代表的な生体分子である遺伝物質たる核酸及びタンパク質について考察すると、遺伝情報は、染色体を構成するデオキシリボ核酸 (DNA) の非常に長い分子形態で保存され、前記染色体は、ヒトゲノムを形成するおよそ30億個のヌクレオチドを含む。染色体におけるヌクレオチドの配列は、各個体の特性を決定する上で重要な役割を果たす。多数の一般的な疾病は、個体間のヒトゲノムのヌクレオチド配列における変形に基づく。同種に属する生物体個体のゲノムに含まれている遺伝子コードは、互いに一致せず、多型性 (polymorphism) と呼ばれる塩基配列上の違いが存在する。多型性には、1つ以上の塩基が欠失 (deletion) または挿入 (insertion) されたものや、特定の塩基配列が重複 (repeat) したものなどが知られている。一つの塩基が別の塩基で置換されたものは、一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism、以下「SNP」と略す) と命名される。

40

【0007】

多くのSNPの遺伝子型分析化学 (genotyping chemistries) としては、PCR-制限断片長多型分析 (PCR-restriction fragment length polymorphism analysis)、一本鎖高次構

50

造多型検出 (single-strand conformation polymorphism detection)、ジデオキシミニ配列分析 (dideoxy minisequencing)、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ (oligonucleotide ligation assays)、アレル特異的PCR (allele-specific polymerase chain reaction、以下「AS PCR」と略記する。)、リガーゼ連鎖反応 (ligase chain reaction)、プライマー要求ヌクレオチド結合分析 (primer-required nucleotide incorporation assays)、及び蛍光エネルギー移動に基づく分析 (fluorescence energy transfer-based assays) などが提示された (非特許文献1~3)。上記のリストに加えて、最近追加されたものは、短い単一DNA断片の質量を正確に直接決定することが可能な質量分光法 (mass spectrometry) (非特許文献4) とオリゴヌクレオチドマイクロアレイに基づく分析 (Oligonucleotide microarray-based analysis) (非特許文献5) がある。

10

【0008】

対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション (allelic specific hybridization) は、Affymetrix whole genome SNP array (非特許文献6)、Idaho Hi-Res Melting curve analysis system (非特許文献7)、dynamic allele-specific hybridization (DASH) (非特許文献8)、及びIllumina Golden Gate SNP Genotyping Arrays (非特許文献9) などがあり、蛍光エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer (FRET)) は、TaqMan (非特許文献10) などがあり、分子ビーコン分析 (Molecular beacons assays) は、非特許文献11に開示されており、AS PCRを活用した伸長 (extension) 技術は、Illumina Infinium bead array (非特許文献12)、Beckman GenomeLab SNPstream system (非特許文献13)、及びSequenom MassARRAY SNP system (非特許文献14) などがある。

20

【0009】

これらのSNP同定を行うための方法は、特定の目的に応じて相対的な長所と短所を持っているので、どの方法が他の方法よりさらに優れるかについては断定的に言うことはできない。一方、DNAベースのマイクロアレイ技術は、特定の遺伝子または遺伝子群の存在、量または発現パターンを分析することができる簡単な方法として大きな脚光を浴びている (非特許文献15~16)。

30

【0010】

それぞれの細胞には5万~10万個程度の遺伝子があるが、細胞は選択的に遺伝子を使用する。その中の多くは細胞自身の生命維持活動や日常的な活動のための遺伝子である。このような遺伝子をハウスキーピング遺伝子 (housekeeping gene、以下「HKG」という) と呼ぶ。また、内因性の標準発現遺伝子は、特定の遺伝子の機能を解明したり、特定機能の遺伝子を探索したり、特定条件の生物体の発現様相を作成したりする目的で対照群として用いられる。これらの様々な分子生物学的目的によって、特定或いは多数の遺伝子発現量の比較のために開発されたメッセンジャーRNA (messenger RNA、以下「mRNA」という) の定量分析を利用する様々な遺伝子発現測定法は、伝統的な逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (reverse transcriptase polymerase chain reaction: 以下「RT-PCR」という) から最近開発された定量的リアルタイム重合酵素連鎖反応法 (quantitative real time PCR: 以下「qRT-PCR」という)、遺伝子発現系列分析 (serial analysis of gene expression: 以下「SAGE」という)、及びマイクロアレイ (Microarray) などがある。

40

50

【0011】

しかし、従来のDNAマイクロアレイは、単にハイブリダイゼーション方式によって標的配列を検出するから、交差反応(cross reaction)による偽陽性(false positives)問題が発生するので、ハイブリダイゼーションシグナルの信頼度を改善しなければならないという問題点がある。また、従来のマイクロアレイの場合、ハイブリダイゼーション方式によって検出を行うため、ハイブリダイゼーションの後に厳しい洗浄工程が要求されるという問題点があり、ハイブリダイゼーションの前に標的配列を一本鎖にする過程が不可欠である。一方、最近発表されたオンチップ(on-chip)PCRは、ハイブリダイゼーションまたはプローブエクステンション(probe extension)方式により検出するため、既存のマイクロアレイと同様にheterogeneous assay systemであり、リアルタイム検出が不可能で正確な定量が難しいという問題点がある。

10

【0012】

また、最近では、プロテオームに対するハイスループットスクリーニング(High Throughput Screening)技法でタンパク質チップ(Protein chip)またはアプタマーチップ(Aptamer chip)(非特許文献17～18)が開発されて使われている。このようなハイスループットスクリーニングに使用される支持体としては、スライドガラス、バイオセンサーの感知表面、ビーズ、ナノ粒子などがある。

20

【0013】

また、プロファイル进行分析して有用な生体分子を決定し、これを分離した後、MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight)などでこれらの構成成分を確認する方法などが行われている。最近では、SELDI-TOFMS(Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry)によってタンパク質プロファイルに関する多くの研究が行われている(非特許文献19～21)。別の接近方法として、DNAと核酸ポリメラーゼ(polymerase)を用いてシグナルを増幅する技術であるimmuno-PCR(IPCR)の方法が開発された(非特許文献22)。

30

【0014】

前述のように、免疫分析法は、検出感度の向上及び多重分析能の向上において発展を重ねたが、依然として、分析費用の節減、分析時間の短縮、敏感度の向上、及び再現性の増大という技術的課題に直面している。

【0015】

本発明者は、プロテオームに対するプロファイルを生産するreverse-SELEx(特許文献1参照)、アプタマーベースの核酸チップ(特許文献2参照)、アプタマーベースの核酸チップを用いた生物学的意義分析技術(特許文献3参照)、及び遺伝子変異分析方法(特許文献4)などを提案したが、生体試料におけるタンパク質と核酸を一度の検査で分析することができないという問題点があった。本発明はかかる問題点を解決するために提案された。

40

【0016】

生体試料の生体分子を総体的に分析する研究は、医学的に病気に関連した生体分子のプロファイル进行分析することにより、疾病を診断することが可能な生体分子、治療成績进行分析することが可能な生体分子、疾病の発症及び進行に重要な役割を果たす生体分子、疾病に対する感受性に関連した生体分子、及び新薬開発の標的分子を解明することに使用することができるだろう。

【0017】

上述した従来の生体分子をそれぞれ独立に分析する技術の問題点を克服して、生体分子をより改善された効率性及び敏感度でリアルタイムにて分析することができる技術を開発するために研究した結果、本発明のように様々な種類の生体分子を1回の検査で分析する

50

ことが可能な方法を開発することにより、本発明の目的を達成した。

【0018】

究極的に、生体試料の生体分子を総体的に分析する研究は、医学的に疾病に関連した生体分子のプロファイルを分析することにより、疾病を診断することが可能な生体分子、治療成績を分析することが可能な生体分子、疾病の発症及び進行に重要な役割を果たす生体分子、疾病に対する感受性に関連した生体分子、及び新薬開発の標的分子を解明することを使用することができるだろう。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0019】

【特許文献1】韓国特許登録第10-0670799号

【特許文献2】韓国特許登録第10-0464225号

【特許文献3】韓国特許登録第10-0923048号

【特許文献4】韓国特許出願第10-2013-0118222号

【非特許文献】

【0020】

【非特許文献1】Landegren, U., et al., 1998, Genome Res., 8:769-776

【非特許文献2】Gut, I. G., 2001, Hum Mutat, 17:475-492

【非特許文献3】Shi, M. M., 2001, Clin Chem, 47:164-172

【特許文献4】Ross P et al., 2000, BioTechniques, 29:620-629

【非特許文献5】Wang, D. G. et al., 1998, Science, 280:1077-1082

【非特許文献6】Komura D., et al., 2006, Genome Res. 2006; 16: 1575-84. 6

【非特許文献7】Graham R., et al., 2005, Clin Chem. 51: 1295-8

【非特許文献8】Prince J. A., et al., 2001, Genome Res. 11: 152-62

【非特許文献9】Gunderson K. L., et al., 2005, Nat Genet. 37: 549-54

【非特許文献10】Holloway J. W., et al., 1999, Hum Mutat. 14: 340-7

【非特許文献11】Barreiro L. B., et al., 2009, Methods Mol Biol. 578: 255-76

【非特許文献12】Oliphant A., et al., 2002, Biotechniques. Suppl: 56-8, 60-1

【非特許文献13】Bell P. A., et al., 2002, Biotechniques. 2002; Suppl: 70-2, 74, 76-7

【非特許文献14】Hayes B. J., et al. 2007, Bioinformatics. 2007; 23: 1692-3

【非特許文献15】Schena et al., 1995, Science, 270:467-470

【非特許文献16】DeRisi et al., 1996, Nature Genetics 14:457-460

【非特許文献17】Smith et al., Mol Cell Proteomics, 11-18. 2003

10

20

30

40

50

【非特許文献18】McCaulley et al., Anal Biochem, 319 (2), 244-250. 2003

【非特許文献19】Adam et al., Cancer Research, 62, 3609-3614. 2002

【非特許文献20】Li et al., Clinical Chemistry, 48, 1296-1304. 2002

【非特許文献21】Petricoin et al., The Lancet, 359, 572-577. 2002

【非特許文献22】Sano et al., Science 258, 120-122. 1992

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

上記目的を達成するために、本発明は、分析しようとする試料にあるタンパク質を含む2つまたはそれ以上の生体分子を核酸分析方法で分析することの特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

【0022】

また、本発明は、前記試料を構成する前記生体分子からレセプター及び核酸を準備する段階と、前記レセプターと分析リガンドとを反応させてレセプター-分析リガンド複合体を形成する段階と、前記分析しようとする核酸である標的核酸、及び前記レセプター-分析リガンド複合体のオリゴヌクレオチドである標的核酸から標的DNAを製造する段階と、前記標的DNAを分析する段階とを含む方法によって、生体試料に含まれている生体分子の生物学的意義を分析することの特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

20

【0023】

また、本発明は、生体試料に含まれているレセプター及び核酸の生物学的意義を分析するための、生体試料にある生体分子を1回の検査で分析する核酸チップを提供する。

【0024】

また、本発明は、生体試料が、細菌、真菌類、ウイルス、細胞株及び組織よりなる群から選ばれた少なくとも一つであることを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

30

【0025】

本発明の目的は、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供し、これらを利用して効率よく生成した結合情報から、生体分子に関連した疾病情報を含む各種生物学的意義を分析することができるようにすることにある。

【課題を解決するための手段】

【0026】

本発明において、用語「生体分子」は、生体を構成するとともに機能を担当する特殊な分子である。その最も主なものとしては、例えばタンパク質、核酸、多糖類及び脂質などの大きな巨大分子、例えばアミノ酸、ヌクレオチド、単糖類及びビタミンなどの低分子物質、例えば鉄、銅などの金属、無機イオンなどが例示される。

40

【0027】

リガンドは、レセプターに結合する物質であって、代表的には、抗体、ペプチド、核酸及びアプタマーなどがある。レセプターは、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質 (lipid)、多糖類、糖タンパク質、ホルモン、受容体、抗原、抗体、ウイルス、病原体、毒性物質、基質、代謝産物、遷移状態類似体 (transition state analog)、補助因子 (cofactor)、阻害剤、薬、染料、栄養分、成長因子、細胞、組織などであってもよく、制限なくほぼ全ての化学的または生物学的エフェクター (effector) となり、いずれのサイズの分子でも検出できる標的分子を意味する。

50

【0028】

レセプターは、リガンド（ら）とレセプターを結合し、相互作用、またはそうでなければレセプターと連合してレセプターの機能に作用し、変化させる或いは無効化する一つまたはそれ以上のリガンドに特異的な分子または分子のクラスターを含む構造を言及する。

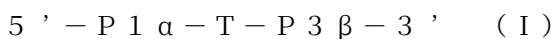
【0029】

抗体は、抗原との特異的結合をして抗原-抗体反応を起こす物質である。アプタマー（aptamer）は、低分子化合物からタンパク質まで様々な種類のレセプターに高い親和性及び特異性で結合することができる特性を有する小さな（20～60ヌクレオチド）一本鎖核酸（DNAまたはRNA）断片を意味する。

【0030】

分析リガンドは、特定のリガンドにデザインされたオリゴヌクレオチドが連結された構造体である。前記オリゴヌクレオチドは、リガンドに結合するレセプターである生体分子を核酸分析方法で分析する用途に使用することができる。分析リガンドのオリゴヌクレオチドの構成は、次の一般式（I）で表されることを特徴とする方法：

【0031】



【0032】

前記一般式（I）において、P1は、シグナルプライマー対における順方向プライマーと完全に相補的に結合する領域であり、Tは、捕捉プローブと完全に相補的に結合する領域であって、標的一本鎖核酸を識別するための、ハイブリダイゼーション反応で使用するプローブとして機能するように設計することができる。P3は、シグナルプライマー対における順方向プライマーと完全に相補的に結合する領域である。 α 及び β はヌクレオチドの個数を示し、 α 及び β は8～30の整数である。

【0033】

標的核酸は、前記分析しようとする試料から分離される核酸、または前記分析しようとする試料から分離されるレセプターに結合するアプタマーを意味し、上流オリゴヌクレオチドの少なくとも一部と相補的に結合する領域、及び下流オリゴヌクレオチドの少なくとも一部と相補的に結合する塩基配列を含むポリヌクレオチドを言及する。いくつかの態様において、当該標的核酸は、二つのオリゴヌクレオチドと完全に相補的に結合する領域の間に伸長領域或いは切れ目（nick）を有してもよい。標的核酸は、一本鎖または二重鎖DNAまたはRNAを含むことができる。また、標的DNAは、上流オリゴヌクレオチドと下流オリゴヌクレオチドとが直接結合する鋳型DNAを指し示す。

【0034】

上記の目的を達成するために、本発明は、分析しようとする試料にあるタンパク質を含む2つまたはそれ以上の生体分子を核酸分析方法で分析することを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

【0035】

試料には、リガンドに結合するタンパク質を含む数多くの生体分子が存在している。このような点で、生体分子は、生体分子-リガンド複合体を形成することにより、リガンドシグナルで検出できる。これに基づいて生体分子分析技術が開発された。

【0036】

本発明は、前記試料を構成する前記生体分子からレセプター及び核酸を準備する段階と、前記レセプターと分析リガンドとを反応させてレセプター-分析リガンド複合体を形成する段階と、前記分析しようとする核酸である標的核酸、及び前記レセプター-分析リガンド複合体のオリゴヌクレオチドである標的核酸から標的DNAを製造する段階と、前記標的DNAを分析する段階とを含む方法によって、生体試料に含まれているアプタマーのレセプター及び核酸の生物学的意義を分析することを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

【0037】

図1は、生体試料から核酸及びタンパク質を分離し、タンパク質を分析リガンドと反応

10

20

30

40

50

させてタンパク質－分析リガンド複合体を製造し、核酸をRNA及びDNAに分離した後、分析しようとする標的核酸が含まれている標的DNAを製造し、これらの標的核酸の特定の領域と完全に相補的に結合するオリゴヌクレオチドで生体分子を分析し、生体試料における生体分子の生物学的意義を決定する全体的なフローチャートを示す。

【0038】

図2は、生体試料から分離されたレセプターと分析リガンドの複合体であり、分析リガンドはリガンドと、リガンドを指示する塩基配列及びユニバーサルPCRプライマーからなるオリゴヌクレオチドとで構成されていることを示す。

【0039】

本発明の好適な実施形態によれば、好ましくは、細胞で構成された生体試料における細胞を可溶化させてレセプターとしての生体分子を製造し、追加的な段階を行うことにより、DNA及びRNAなどの核酸を公知の方法で分離することができる。準備された前記生体分子とアプタマーとを反応させて生体分子－分析リガンド複合体を製造し、様々な方法によって、製造された複合体を分離することができる。好ましくは、製造された生体分子－分析リガンド複合体の分離方法は、まず、生体分子を支持体に結合させた後、分析リガンドを反応させて生体分子－分析リガンド複合体を形成し、洗浄段階を行って未結合分析リガンドを除去することにより、精製された複合体を準備することができる。前記分離されたRNA、DNA、及び前記生体分子－分析リガンド複合体などの核酸を、分析しようとする標的核酸にして、一般的な核酸分析方法で標的核酸の定量分析及び変異分析を行うことができる。そして、分析された結果から、生体分子の含まれている生体試料における生体分子の生物学的意義を決定することもできる。

【0040】

本発明は、前記特定の核酸の定量分析、変異分析、及びメチル化有無分析を行うことを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

【0041】

前記特定核酸変異は、遺伝子変異であって、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) と構造変異 (Structural Variation) などがある。遺伝子変異が表現型 (phenotype) の変化、疾病に対する感受性、及び治療薬剤に対する反応の違いなど個人間の差を決定すると知られている。特に、疾患の発生及び進行過程に関与する変異を疾患関連遺伝子変異 (Disease-associated Genetic Variants) と呼ぶ。SNPは、DNA塩基配列における1つの塩基配列 (A、T、G、C) の差を示す遺伝的変化または変異を意味する。構造変異は欠失、逆位、添加、複製などのDNA構造変異を意味する。

【0042】

また、本発明において、細胞内核酸のメチル化有無分析は、核酸にバイサルファイト (bisulfite) を処理して発生する核酸のヌクレオチド変形を含むこともできる。前記核酸にバイサルファイト (bisulfite) を処理することにより、メチル化されていないシトシン (cytosine) 残基はウラシル (uracil) 残基に変形し、メチル化シトシン残基は変形のない状態で存在する。このようなバイサルファイト (bisulfite) の処理前後のヌクレオチド変化を分析することができた。その結果として、核酸のメチル化有無を確認することができる。

【0043】

本発明において、アプタマーレセプター定量分析の内部精度管理は、分析しようとする生体試料に含まれていない物質を用いることを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

【0044】

好ましくは、一般に、定性定量分析の場合、各種試験・検査時の比較のために分析しようとする生体試料に含まれている生体分子で内部精度管理を行う。前記精度管理用物質は、分析しようとする試料に常に一定量で存在する物質が理想的であるが、そうでない場合

、試料に含まれていない物質である外来物質を使用することができ、好ましくは、分析しようとする試料が生体試料である場合、前記生体試料に含まれていない外来生体分子で構成できる。精度管理は、管理用試料のような外的基準を使用せず、毎回の測定で得られる一群の検査結果を分析して測定値の精度を管理する内部精度管理を意味する。

【0045】

好ましくは、本発明において、内部精度管理用物質は、ヒト由来の生体試料を分析する場合、ヒト由来の生体試料に含まれていない生体分子であって、植物特異生体分子を使用することができる。現在、ヒトゲノムプロジェクト、及び植物の一種であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ゲノムプロジェクトが完了して植物特異タンパク質が報告されている。本発明では、ヒト由来の生体試料を分析するために、標準物質として植物特異タンパク質を使用することができる。

10

【0046】

本発明において、標的核酸を定量分析し、或いは標的核酸の塩基配列を分析することを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

【0047】

前記標的核酸を分析する方法は、PCR (polymerase chain reaction)、LCR (ligase chain reaction)、SDA (strand displacement amplification)、TMA (transcription-mediated amplification)、bDNA (branched DNA)、Invader方法、及びRCA (rolling circle amplification) などとすることができる。好ましくは、前記標的核酸からLCRで形成された二重鎖核酸を鋳型としてPCRを行い、生成された増幅産物を分析することができる。

20

【0048】

本発明において、前記標的核酸と同じ方向に完全に相補的に結合する上流オリゴヌクレオチド及び下流オリゴヌクレオチドを製造する段階と、前記標的核酸と前記上流オリゴヌクレオチド及び下流オリゴヌクレオチドとを反応させて完全な二重鎖核酸を製造する段階と、前記完全な二重鎖核酸を鋳型として、シグナルプライマーを用いて標識及び増幅してターゲットプローブを製造する段階と、前記ターゲットプローブと捕捉プローブとをハイブリダイゼーション反応させ、形成された産物から発生するシグナルを分析する段階とを含んでなることを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

30

【0049】

本発明に使用されているように、標的核酸を言及するときの「相補的結合塩基配列」は、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを許容するのに十分な長さのヌクレオチドを意味し、相補的な塩基配列は、長さが約6〜1,000ヌクレオチド長であり、好ましくは約8〜30ヌクレオチド長、最も好ましくは10〜25ヌクレオチド長である。

【0050】

本発明では、前記標的核酸と同じ方向に完全に相補的に結合するオリゴヌクレオチドの中でも、上流に位置するオリゴヌクレオチドを上流オリゴヌクレオチドと称し、下流に位置するオリゴヌクレオチドを下流オリゴヌクレオチドと称する。

40

【0051】

本発明に係る「上流オリゴヌクレオチド」は、好ましくは長さが6〜100、より好ましくは8〜30、最も好ましくは20ヌクレオチド長である。

【0052】

本発明に係る「下流オリゴヌクレオチド」の3'領域は、標的核酸に少なくとも部分的に相補的であり、好ましくは長さが8〜80、最も好ましくは10〜20ヌクレオチド長である。

【0053】

「捕捉プローブ」は、反応におけるポリヌクレオチドの確認及び／またはポリヌクレオ

50

チドの源泉追跡のために用いられるユニークなヌクレオチド配列を意味する。捕捉プローブ配列は、シグナルプライマーの5末端または3末端にありうる。捕捉プローブ塩基配列は、大きさ及び組成において広範囲に多変することができる。次の参考資料は、特定の具体例に適した一連の捕捉プローブ塩基配列を選択するためのガイドラインを提示する（米国特許第5,635,400号；Brenner et al, 2000, PNAS, 97: 1665-1670；Shoemaker et al, 1996, Nature Genetics, 14: 450-456；欧州特許公開0799897A1；米国特許第5,981,179号、及びこれに類似するもの）。特定の具体例において、捕捉プローブの塩基配列は、4～36ヌクレオチド、または6～30ヌクレオチド、または8～20ヌクレオチド長を保有することができる。

10

【0054】

また、本発明において、捕捉プローブの塩基配列は標的核酸の特異塩基配列であってもよい。

【0055】

本発明において、前記標的核酸の定量分析のために、前記上流オリゴヌクレオチドは、順方向シグナルプライマーと完全に相補的に結合する塩基配列である領域、及び前記標的核酸と完全に相補的に結合する塩基配列である領域などから構成され、下流オリゴヌクレオチドは、前記標的核酸と完全に相補的に結合する塩基配列である領域、前記捕捉プローブと完全に相補的に結合する塩基配列である領域、及び逆方向シグナルプライマーと完全に相補的に結合する塩基配列である領域などで構成されたことを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

20

【0056】

図3は生体試料から分離されたRNAを逆転写して形成された核酸に上流オリゴヌクレオチドグレードと下流オリゴヌクレオチドで二重鎖核酸を形成した後、定量分析する方法を示す図である。

【0057】

また、本発明は、前記標的核酸の定量分析のために前記上流オリゴヌクレオチド及び下流オリゴヌクレオチドを製作する段階において、前記上流オリゴヌクレオチドの構成は、
（i）シグナルプライマー対における順方向プライマーが完全に相補的に結合する領域、及び
（ii）ハイブリダイゼーションされる標的核酸と実質的に相補的なハイブリダイゼーション配列領域などで構成されたオリゴヌクレオチドである。

30

【0058】

上記において、前記上流オリゴヌクレオチドは次の一般式（I I）で表される：

【0059】**【0060】**

前記一般式（I I）において、P1は、シグナルプライマー対における順方向プライマーと完全に相補的に結合する領域であり、Hは、ハイブリダイゼーションされる標的核酸と実質的に相補的なハイブリダイゼーション配列領域である。 α 及び β はヌクレオチドの個数を示し、 α 及び β は8～30の整数である。

40

【0061】

前記上流オリゴヌクレオチドとして、前記特定の標的核酸に完全に（perfectly）相補的な配列が利用できるが、特異的ハイブリダイゼーションを妨げない範囲内で実質的に（substantially）相補的な配列が利用されることも可能である。好ましくは、前記上流オリゴヌクレオチドは、本発明の特定標的核酸の10～30個の連続ヌクレオチド残基を含む配列にハイブリダイゼーションできる配列を含む。

【0062】

下流オリゴヌクレオチドの構成は、（i）前記標的核酸に前記上流オリゴヌクレオチドと同じ方向に完全に相補的に結合する領域、（ii）前記捕捉プローブに完全に相補的に結合する領域と、（iii）シグナルプライマー対における逆方向プライマーに完全に相

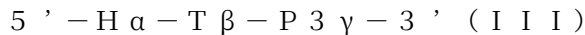
50

補的に結合する領域などである。

【0063】

上記において、前記下流オリゴヌクレオチドは次の一般式（ⅠⅠⅠ）で表される：

【0064】



【0065】

前記一般式（ⅠⅠⅠ）において、Hは、前記標的核酸に前記上流オリゴヌクレオチドの3'末端が結合する位置の次の塩基配列から完全に相補的に結合する領域であり、Tは、捕捉プローブと完全に相補的に結合する領域であって、標的一本鎖核酸を識別するための、ハイブリダイゼーション反応で使用するプローブとして機能するように設計することができる。P3は、シグナルプライマー対における逆方向プライマーと完全に相補的に結合する領域である。 α 、 β 及び γ は、ヌクレオチドの個数であって、8～30の整数である。

10

【0066】

本発明において、前記標的核酸変異を分析するために、前記上流オリゴヌクレオチドは、順方向シグナルプライマーと完全に相補的に結合する塩基配列である領域、前記標的核酸と完全に相補的に結合する塩基配列、及び前記標的核酸の変異されたヌクレオチドを区分することが可能な塩基配列である3'末端領域などで構成され、前記下流オリゴヌクレオチドは、前記標的核酸と完全に相補的に結合する塩基配列である領域、前記捕捉プローブと完全に相補的に結合する塩基配列である領域、逆方向シグナルプライマーと完全に相補的に結合する塩基配列である領域などで構成されることを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

20

【0067】

図4は、生体試料から核酸及びレセプターを分離して核酸及びレセプター分析リガンド複合体などから標的核酸を製造し、これらの標的核酸の特定領域に完全に相補的に結合するオリゴヌクレオチドで標的核酸変異分析を行う全体的なフローチャートを示す。

【0068】

図5は、生体試料から分離した核酸にバイサルファイト（bisulfite）を処理して標的DNAを製造した後、これらの標的核酸の特定領域に完全に相補的に結合するオリゴヌクレオチドで核酸のメチル化有無分析を行う全体的なフローチャートを示す。

30

【0069】

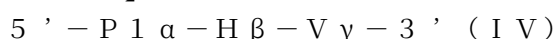
また、本発明は、標的核酸変異分析のために前記上流オリゴヌクレオチド及び下流オリゴヌクレオチドを製作する段階において、前記上流オリゴヌクレオチドは、（i）シグナルプライマー対における順方向プライマーと完全に相補的に結合する領域（P1）、（ii）標的核酸と完全に相補的なハイブリダイゼーション配列を有する変異隣接領域（H）、及び（iii）ヌクレオチド変異に該当する変異領域（V）で構成され、ヌクレオチド変異情報を有する上流オリゴヌクレオチドは、2種またはそれ以上のオリゴヌクレオチドなどからなる。

【0070】

上記において、前記上流オリゴヌクレオチドは次の一般式（ⅠⅤ）で表される：

40

【0071】



【0072】

前記一般式（ⅠⅤ）において、P1は、シグナルプライマー対における順方向プライマーと完全に相補的に結合する領域であり、Hは、ハイブリダイゼーションされる標的核酸と完全に相補的なハイブリダイゼーション配列を有する変異隣接特異領域であり、Vは、ヌクレオチド変異に該当する変異特異領域である。 α 、 β 及び γ はヌクレオチドの個数を示し、 α 及び β は8～30の整数であり、 γ は1～3の整数である。

【0073】

前記上流オリゴヌクレオチドとして、前記SNPを含む配列に完全に（perfect

50

ly) 相補的な配列が利用できるが、特異的ハイブリダイゼーションを妨げない範囲内で実質的に (substantially) 相補的な配列が利用されることも可能である。好ましくは、前記上流オリゴヌクレオチドは、本発明の SNP を含む 10～30 個の連続ヌクレオチド残基を含む配列にハイブリダイゼーションできる配列を含む。より好ましくは、前記上流オリゴヌクレオチドの 3'-末端は、前記 SNP 塩基に相補的な塩基を有する。一般に、ハイブリダイゼーションにより形成される二本鎖 (duplex) の安定性は、末端の配列の一致によって決定される傾向があるため、3'-末端に SNP 塩基と相補的な塩基を有する上流オリゴヌクレオチドにおける末端領域がハイブリダイゼーションされなければ、このような二本鎖は厳しい条件の下で解体されることがある。

【0074】

10

下流オリゴヌクレオチドは、(i) 前記標的核酸に上流オリゴヌクレオチドと同じ方向に完全に相補的に結合する領域 (H)、(ii) 前記捕捉プローブと完全に相補的に結合する領域 (T) と、(iii) シグナルプライマー対における逆方向プライマーと完全に相補的に結合する領域 (P3) などで構成される。

【0075】

上記において、前記下流オリゴヌクレオチドは次の一般式 (V) で表される：

【0076】

$5' - H\alpha - T\beta - P3\gamma - 3' \quad (V)$

【0077】

前記一般式 (V) において、Hは、前記標的核酸と完全に相補的に結合する変異隣接特異領域であり、Tは、捕捉プローブと完全に相補的に結合する領域であって、変異に関連するヌクレオチドのある一本鎖核酸を識別するための、ハイブリダイゼーション反応で使用するプローブとして機能するように設計することができる。P3は、シグナルプライマー対における逆方向プライマーと完全に相補的に結合する領域である。 α 、 β 及び γ は、ヌクレオチドの個数を示し、8～30の整数である。

20

【0078】

前記上流オリゴヌクレオチド及び下流オリゴヌクレオチドは、当該技術分野における公知の任意の適切な方法 (化学的合成など) により合成及び製造される。また、前記上流オリゴヌクレオチド及び下流オリゴヌクレオチドは、商業的供給源を介して簡単に利用可能である。

30

【0079】

本発明に用いられる上流オリゴヌクレオチド及び下流オリゴヌクレオチドは、鋳型の一部にハイブリダイゼーションまたはアニーリングされることにより二重鎖構造を形成する。このような二重鎖構造の形成に適した核酸ハイブリダイゼーションの条件は、文献 [Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)] 及び文献 [Haymes, B. D., et al., Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D. C. (1985)] に開示されている。

40

【0080】

本発明において、アニーリングは、標的ヌクレオチド配列とシグナルプライマーとの間に特異的結合を可能にする厳しい条件下で行われる。アニーリングのための厳しい条件は、配列依存的であり、周囲の環境的変数に応じて様々である。このように増幅された標的核酸は、一つの分子上に多重標的位置を含む標的核酸分子であり、これを用いて同時に多重標的位置を分析することができる。

【0081】

本発明において、前記標的核酸と前記上流オリゴヌクレオチド及び下流オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション反応によって形成された部分二重鎖核酸における二つの

50

オリゴヌクレオチドの間に伸長領域がある場合、伸長反応し、連結反応して完全な二重鎖核酸を形成することを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

【0082】

本発明に使用されているように、「伸長領域」は、核酸重合化活性を介してオリゴヌクレオチドの伸長を許容するのに十分な長さのヌクレオチドを指す。「伸長領域」は、標的及び鋳型核酸のいくつかの態様に存在する。存在する場合、「伸長領域」は、標的または鋳型核酸の上流オリゴヌクレオチドと下流オリゴヌクレオチドとの間にある。「伸長領域」は、長さが約1～1000ヌクレオチド長であり、好ましくは約1～100ヌクレオチド長、より好ましくは3～50ヌクレオチド長、最も好ましくは3～10ヌクレオチド長

10

【0083】

伸長反応 (extension) は、ポリメラーゼを用いて前記伸長領域にヌクレオチドを追加することにより、プライマーを伸長させることをいう。核酸と完全に相補的に結合したオリゴヌクレオチドを伸長させると、この核酸は伸長反応のための鋳型として作用する。本発明において、前記DNAポリメラーゼは、Taq DNAポリメラーゼ及びPfu DNAポリメラーゼよりなる群から選択でき、これに限定されない。熱安定性 (thermostable) DNAポリメラーゼであればいずれのものでも使用できる。

【0084】

連結反応 (ligation) は、上流オリゴヌクレオチドの3末端または伸張した上流オリゴヌクレオチドの3末端と下流オリゴヌクレオチドに酵素触媒的に連結させることをいう。本発明において、リガーゼはE. coli DNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼ、T4 DNAリガーゼ及びAmp ligaseリガーゼよりなる群から選択できる。

20

【0085】

本発明において、前記標的核酸と前記上流オリゴヌクレオチド及び下流オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション反応によって形成された部分二重鎖核酸が、二つのオリゴヌクレオチドの間に切れ目 (nick) がある場合、連結反応して完全な二重鎖核酸を形成することを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

30

【0086】

前記連結反応は、リガーゼ (ligase) によるヌクレオチド配列の連結を触媒することが可能な反応をいう。特定長さの2種のオリゴヌクレオチドを、標的核酸と並んで完全に相補的に結合するようにした後、このときに形成される二重螺旋の切れ目 (nick) 部位をDNAリガーゼによって通常の核酸の連結原理に立脚した通常の連結反応を介して、2種のオリゴヌクレオチドを一本鎖状態に連結する反応である。よって、核酸の連結を誘導するリガーゼとして、当業界で通常使用される酵素を制限なく使用することができる。

【0087】

前記連結反応に使用する酵素は、E. coli DNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼ、T4 DNAリガーゼ及びAmp ligaseリガーゼなどよりなる群から選択でき、これに限定されない。DNA結合活性を有するリガーゼであればいずれのものでも使用できる。

40

【0088】

また、前記リガーゼ反応は、単一の標的遺伝子または変異の検出が可能であるうえ、複数の標的を認知する複数のオリゴヌクレオチドを用いて一度の反応で行うことができる。この場合には、それぞれのリガーゼオリゴヌクレオチド塩基配列のうち、標的核酸とハイブリダイゼーションされる部分のTm (melting temperature) 値の誤差が5以内となるように、それぞれの変異位置に合うリガーゼとオリゴヌクレオチドを選定することを特徴とすることができる。

50

【0089】

本発明において、前記標的核酸と前記上流オリゴヌクレオチド及び下流オリゴヌクレオチドとをハイブリダイゼーション反応し、形成された前記部分二重鎖核酸を連結反応して前記完全な二重鎖核酸を形成する反応を二回またはそれ以上繰り返し行うことを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法を提供する。

【0090】

本発明において、前記シグナルプライマーは標識物質のあるユニバーサル順方向PCRプライマーとユニバーサル逆方向PCRプライマーからなることを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

【0091】

上記において、前記シグナルプライマー (signal primers) は次の一般式 (VI) 及び (VII) で表される：

【0092】

順方向プライマー：5' - X - P - 3' (VI)

逆プライマー：5' - P - 3' (VII)

【0093】

一般式 (VI) 及び (VII) において、Xは、検出可能な標識物質であって、生体分子の定量分析のために対照区試料から製造されるターゲットプローブ、及び実験区試料から製造されるターゲットプローブに使用される標識物質は互いに異なってもよく、好ましくは、前者はCy3、後者はCy5である。

【0094】

また、核酸の変異解析のために標識物質が使用される。例えば、前記プライマーの5'末端に蛍光レポーター分子、或いは物理的な特徴のあるレポーター分子などが結合して変異関連ヌクレオチドの種類、すなわち変異類型を識別する。好ましくは、蛍光分析は、ヌクレオチド変異によって、野生型 (wild type) はCy3、突然変異型 (mutation type) はCy5で標識することができる。Pは、上流オリゴヌクレオチド及び下流オリゴヌクレオチドシグナルプライマーが完全に相補的に結合する領域である。

【0095】

前記シグナルプライマー対における順方向プライマー (P1またはP2) は、前記上流オリゴヌクレオチドの構成におけるシグナルプライマーの結合する領域の塩基配列に完全に相補的に結合する塩基配列から構成され、好ましくは、ユニバーサルPCRプライマー (universal PCR primer) であり、標的核酸のヌクレオチド変異に応じて、前記シグナルプライマーの5'末端に蛍光レポーター分子、或いは物理的な特徴のあるレポーター分子などである標識物質 (X) が選定される。ハイブリダイゼーション反応を終結し、ヌクレオチド変異を決定するとき、標識物質から発生するシグナルを使用する。

【0096】

また、前記シグナルプライマー対における逆方向プライマー (P3) は、前記下流オリゴヌクレオチドの構成におけるシグナルプライマーの結合する領域の塩基配列に完全に相補的に結合する塩基配列から構成され、好ましくは、ユニバーサルPCRプライマー (universal PCR primer) である。ユニバーサルPCRプライマーは、一般に塩基配列の決定やPCRなどに多く使用される塩基配列であるオリゴヌクレオチドであって、商業的なクローニングベクターに多く存在する。

【0097】

本発明において、前記捕捉プローブは、前記ターゲットプローブの標識物質がある一本鎖核酸と完全に相補的に結合する塩基配列を有することを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

【0098】

本発明において、前記捕捉プローブは、ターゲットプローブの標識物質がある一本鎖核

10

20

30

40

50

酸に存在する逆方向の下流オリゴヌクレオチドの特異塩基配列に完全に相補的に結合する塩基配列を有することを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法を提供する。

【0099】

前記捕捉プローブ (capture probes) は、前記増幅産物に結合してこれらを識別する役割を果たす。前記標的核酸を鋳型としてシグナルプライマーで増幅反応を行って作られた増幅産物は、プライマー結合領域 (T) に基づいて、標識物質のある一本鎖核酸と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸、オリゴヌクレオチド、及び PNA (peptide nucleic acid) などを製造するのに使用できる。

【0100】

本発明において、前記ターゲットプローブは、対照区試料から製造する対照ターゲットプローブ、及び実験区試料から製造する分析ターゲットプローブで構成されることを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法を提供する。

【0101】

本発明に係る、対照区試料と実験区試料から生体分子を分離して定量分析をしようとする場合、対照区試料から分離された生体分子から標的 DNA を製造した後、これを鋳型としてシグナルプライマーで PCR を行って対照ターゲットプローブを製造し、実験区試料から製造された標的 DNA を鋳型として PCR を行って分析ターゲットプローブを製造する。これらの製造された対照ターゲットプローブと分析ターゲットプローブとを混合してターゲットプローブを準備する。対照ターゲットプローブの製造に使用するシグナルプライマーの標識物質と、対照ターゲットプローブの製造に使用するシグナルプライマーの標識物質とを互いに異なるようにすることができる。好ましくは、前者は Cy 3、後者は Cy 5 蛍光物質を使用することができる。

【0102】

本発明において、前記捕捉プローブは支持体に結合することを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法を提供する。

【0103】

本発明において、前記支持体はスライドガラス、バイオセンサーの感知表面、ビーズ、ナノ粒子などを含むことを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法を提供する。

【0104】

図 6 は、スライドガラス基板に固定された前記捕捉プローブと標識物質のあるターゲットプローブとをハイブリダイゼーションさせて洗浄した後、発生するシグナルを分析して生体分子を分析することを示す図である。

【0105】

好ましくは、捕捉プローブは、スライドガラスまたはバイオセンサーの感知表面などに結合できるが、結合可能に変形してもよい。このような変形は、オリゴヌクレオチドの 5' 末端に C1 ~ C20 のアルキル基が結合でき、スライドガラス或いは感知表面との結合を容易にするために、チオールなどの物質が付加できる。ところが、このような変形は目的に応じて適宜変化が可能である。

【0106】

このように捕捉プローブが固定された支持台は、マイクロアレイの一種であり、バイオセンサーの感知表面を意味することができ、目標物質が結合して発生する変化を測定して目標物質を感知することができるものであればいずれでも使用できる。特に、蛍光変化は、捕捉プローブに結合した標識物質の蛍光物質を分析して測定できる。ここで利用可能なものは、従来の固体支持台たるスライドガラスである。

【0107】

前記ハイブリダイゼーション反応におけるハイブリダイゼーション (アニーリング) 温度は、40℃ ~ 70℃ であり、好ましくは 45℃ ~ 68℃ であり、より好ましくは 50℃ ~ 65℃ であり、最も好ましくは 60℃ ~ 65℃ である。ハイブリダイゼーションの条件

10

20

30

40

50

は、文献 [Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)] 及び文献 [Haymes, B. D., et al., Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D. C. (1985)] に開示された事項を参照して決定できる。ハイブリダイゼーションに適用される厳しい条件 (stringent condition) は、温度、イオン強度 (緩衝液の濃度)、及び有機溶媒などの化合物の存在などを調節して決定できる。このような厳しい条件は、ハイブリダイゼーションされる配列によって異なるように決定できる。例えば、前記厳しい条件の中でも、高厳格条件は、0.5M NaHPO₄、7% SDS (sodium dodecyl sulfate)、1mM EDTAで65℃の条件でハイブリダイゼーションし、0.1×SSC (standard saline citrate) / 0.1% SDSで68℃の条件で洗浄することを意味する。または、高厳格条件は、6×SSC / 0.05%ピロリン酸ナトリウムで48℃の条件で洗浄することを意味する。低厳格条件は、例えば、0.2×SSC / 0.1% SDSで42℃の条件で洗浄することを意味する。

10

【0108】

前記マイクロアレイにおいて、前記捕捉プローブは、ハイブリダイゼーションアレイ要素 (hybridizable array element) として用いられ、基体 (substrate) 上に固定化される。好ましい基体は、適した堅固性または半堅固性支持体であって、例えば、膜、フィルター、チップ、スライド、ウエハー、ファイバー、磁性ビーズまたは非磁性ビーズ、ゲル、管類、プレート、高分子、微小粒子及び毛细管を含む。前述した捕捉プローブは前記基体上に配列され、固定化される。このような固定化は、化学的結合方法またはUVなどの共有結合的方法によって行われる。例えば、前記捕捉プローブは、エポキシ化合物またはアルデヒド基を含むように変形したガラス表面に結合できるとともに、ポリリシンコーティング表面にUVによって結合できる。また、前記ハイブリダイゼーションアレイ要素はリンカー (例えば、エチレングリコールオリゴマー及びジアミン) によって基体に結合できる。

20

【0109】

前記捕捉プローブに結合した増幅産物の標識物質及び変異関連ヌクレオチドのある一本鎖核酸から発生するシグナルを計測する機器は、シグナルの種類に応じて決定される。ハイブリダイゼーション反応の後、発生したハイブリダイゼーションシグナルを検出する。ハイブリダイゼーションシグナルは、例えば、捕捉プローブに結合した標識の種類に応じて様々な方法で検出することができる。

30

【0110】

一方、本発明のマイクロアレイに適用される試料DNAは、標識 (labeling) でき、マイクロアレイ上の捕捉プローブとハイブリダイゼーションされる。ハイブリダイゼーション条件は多様にすることができる。ハイブリダイゼーション程度の検出及び分析は標識物質に応じて様々に行われ得る。

40

【0111】

前記捕捉プローブに結合した標識物質は、ハイブリダイゼーション有無を検出させるシグナルを提供することができる。これはオリゴヌクレオチドに連結できる。適した標識は、蛍光団 (例えば、フルオレセイン (fluorescein)、フィコエリトリン (phycoerythrin)、ローダミン、リサミン (lissamine)、Cy3及びCy5 (Pharmacia))、発色団、化学発光団、磁性粒子、放射性同位元素 (P32及びS35)、マス標識、電子密集粒子、酵素 (アルカリ性ホスファターゼまたはホスラディッシュペルオキシダーゼ)、補助因子、酵素に対する基質、重金属 (例えば、金) 及び抗体、ストレプトアビジン、ビオチン、ジゴキシゲニン及びキレート基などの特定の結合パートナーを有するヘプテンを含むが、これに限定されるものではない。標識

50

は、当業界で通常行われる様々な方法、例えば、ニックトランスレーション (nick translation) 方法、ランダムプライミング方法 (Multiprime DNA labelling systems booklet, “Amersham” (1989))、及びカインেশション方法 (Maxam & Gilbert, 1989, Methods in Enzymology, 65:499) によって実施できる。標識は、蛍光、放射能、発色測定、重量測定、X線回折または吸収、磁気、酵素的活性、マス分析、結合親和性、ハイブリダイゼーション高周波、またはナノ結晶によって検出することが可能なシグナルを提供する。

【0112】

前記マイクロアレイの製作方法は、当該技術分野における公知の任意の適切な方法により合成及び製造される。また、マイクロアレイ製作機器は、商業的供給源を用いて便利に利用可能である。従来公知の様々な方法 (M. Schena, 1999, DNA microarray; a practical approach, Oxford) で、捕捉プローブが規則的に配列された核酸チップを製作することができる。

【0113】

本発明において、前記標識物質は、ビオチン (Biotin)、Cy2、GFP、YO-PRO-1、YOYO-1、カルセイン (Calcein)、FITC、FlourX、ALEXA 488、Rhodamine 110、ABI 5-FAM、Oregon Green 500、Oregon green 488、RiboGreen、Rhodamine Green、Rhodamine 123、Magnesium Green、Calcium Green、TO-PRO-1、TOTO-1、ABI JOE、BODIPY 530/550、Dil、BODIPY TMR、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、Alexa 546、TRITC、Magnesium Orange、Phycocerythrin R&B、Rhodamine Phalloidin、Calcium Orange、Pyronin Y、Rhodamine B、ABI TAMRA、Rhodamine Red、Cy3.5、ABI ROX、Calcium Crimson、Alexa 594、Texas Red、Nile Red、YO-PRO-3、YOYO-3、R-phycocyanin、C-phycocyanin、TOPRO-3、TOTO-3、DiD DilC (5)、Thiadicarbocyanine、Cy5.5、Cy5及びCy3から選択される蛍光色素を使用することを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

【0114】

本発明において、前記捕捉プローブがスポッティング (spotting) されたチップ (chip) を製作する段階と、前記ターゲットプローブとチップの表面に固定化されたプローブとのハイブリダイゼーション (hybridization) 反応を行い、洗浄 (washing) する段階と、蛍光色素に特異的な波長のレーザー (laser) でチップをスキャン (scanning) し、ハイブリダイゼーション反応結果に基づく蛍光強度を測定することにより、標的核酸の量及び変異を同時に分析する段階とを含んでなることを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

【0115】

本発明は、生体試料に含まれているレセプター及び核酸の生物学的意義を分析するための、オリゴヌクレオチドを用いて生体試料にあるレセプター及び核酸を分析するキットを提供する。

【0116】

本発明において、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法によって実施することを中心とし、前記生体分子を含む試料からレセプターと核酸を準備する試料処理装置と、前記標的核酸を製造しこれを増幅するモジュール及び前記増幅された産物を分析するモジュールからなる増幅装置とを含む生体分子分析システムを有することを特徴とする、オリ

10

20

30

40

50

ゴヌクレオチドを用いた生体分子分析装置を提供する。

【0117】

本発明の生体分子分析方法をより効率よく測定するために、生体分子を含む試料からアプタマーレセプターと核酸を分離する試料処理装置と、前記標的核酸を製造して増幅するモジュール及び前記増幅された産物を分析するモジュールからなる増幅装置とを含む、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析装置において、本発明のシステムは、混合チャンバー、溶解チャンバー及び反応チャンバーからなる試料処理装置及び増幅装置で構成され、これらが統合されて運営されることも可能である。

【0118】

関心対象の生体分子を含有しているものとされるサンプルの分析は、一連のサンプル準備段階を伴い、混合チャンバーと溶解チャンバーからなる試料処理装置で行われる。これらの段階は、ろ過、細胞溶解、RNA、DNA及びレセプターの精製、レセプター分析リガンド複合体の製造、及び試薬との混合を含むことができる。生体分子分析結果に対する確信を持つためには、サンプル準備過程の汚染に対する制御が有用であろう。核酸増幅反応のためにサンプルを調製し、サンプル調製の有効性を検証する方法を提供する。

10

【0119】

サンプルは、細胞、孢子、微生物、及びウイルスよりなる群から選択される標的エンティティーを含有するものとされる。この標的エンティティーは少なくとも一つの標的生体分子を含む。前記方法は、サンプルとサンプル調製対照群とを混合する混合チャンバーを有する装置内にサンプルを導入する段階を含む。サンプル調製対照群は、細胞、孢子、微生物及びウイルスよりなる群から選択される。該サンプル調製対照群は精度管理物質を含む。また、前記装置は溶解チャンバーと反応チャンバーを備える。サンプルは混合チャンバー内でサンプル調製対照群と混合される。

20

【0120】

また、前記方法は、サンプル調製対照群及びサンプル内に存在する場合の標的エンティティーを溶解チャンバーで溶解処理して生体分子を精製する段階と、レセプター分析リガンド複合体を形成する段階と、溶解チャンバー内で遊離したRNA、DNA及びレセプター分析リガンド複合体を反応チャンバー内で核酸増幅条件に晒す段階と、少なくとも一つの精度管理物質の存在有無を検出する段階とを含む。精度管理物質の肯定的検出の場合はサンプル調製過程が満足であったことを示すのに対し、精度管理物質を検出することができない場合はサンプルが不適切に調製されたことを示す。

30

【0121】

本発明は、核酸増幅反応のためのサンプルを調製し、そのサンプル調製の有効性を検証する増幅装置を提供する。サンプルは、細胞、孢子、微生物、及びウイルスよりなる群から選択される標的エンティティーを含有するものとされる。この標的エンティティーは、少なくとも一つの標的生体分子を含む。前記装置は、サンプルに混合されるサンプル調製対照群を収容する第1チャンバーのある本体を含む。サンプル調製対照群は細胞、孢子、微生物、及びウイルスよりなる群から選択され、このサンプル調製対照群は精度管理物質を含む。

【0122】

40

また、前記本体は、サンプル内に存在する場合の標的エンティティー及びサンプル調製対照群を溶解処理し、これらから生体分子を遊離させ、RNA、DNA及びレセプターを分離する溶解チャンバーを含む。さらに、前記本体は、遊離したアプタマーレセプターとアプタマーとを反応させてレセプターアプタマー複合体を形成する分析リガンド反応チャンバーを含む。さらに、前記本体は、増幅及び検出のための核酸を維持する反応チャンバーを含む。前記装置は、サンプル調製対照群と混合されたサンプルを、第1チャンバーから溶解チャンバー内へ流れるように案内し、溶解チャンバーで遊離した生体分子を反応チャンバー内へ流れるように案内する少なくとも一つの流れ制御器をさらに含む。

【0123】

いくつかの実施形態において、溶解チャンバーは、サンプルが溶解チャンバーを介して

50

流れる際に、サンプル内に存在する場合の標的エンティティ及びサンプル調製対照群を捕獲する酵素、少なくとも1つのフィルター及び固相物質を収容し、前記装置は、溶解チャンバーを介して流れた使用済みのサンプル流体を収容する少なくとも一つの廃棄チャンバーをさらに含む。また、前記少なくとも一つの流れ制御器は、溶解チャンバーを介して流れた使用済みのサンプル流体を廃棄チャンバーへ流れるように案内することができる。

【0124】

いくつかの実施形態において、前記装置は、溶解チャンバーへ超音波を提供するために溶解チャンバーの壁に結合された超音波トランスデューサをさらに含む。いくつかの実施形態において、前記装置は、サンプル調製対照群及び標的エンティティを破裂させるために溶解チャンバー内にビーズをさらに含む。

10

【0125】

本発明の別の様態によれば、溶解過程の有効性を決定する方法を提供する。この方法は、細胞、孢子、微生物及びウイルスよりなる群から選択された標的エンティティを含むものとされるサンプルをサンプル調製対照群と混合する段階を含む。標的エンティティは、少なくとも一つの精度管理物質を含む。サンプル調製対照群は細胞、孢子、微生物及びウイルスよりなる群から選択され、このサンプル調製対照群は精度管理物質を含む。サンプル調製対照群とサンプル内に存在する場合の標的エンティティの混合物は溶解処理される。また、前記方法は、溶解処理中にサンプル調製対照群から生体分子が遊離したか否かを決定するように精度管理物質の存在有無を検出する段階をさらに含む。精度管理物質の肯定的検出の場合は、サンプル調製過程が満足であったことを示すのに対し、精度管理物質を検出することができない場合は、サンプルが不適切に調製されたことを示す。

20

【0126】

いくつかの実施形態において、前記方法は、溶解処理の前に、サンプル調製対照群及びサンプル内に存在する場合の標的エンティティを固相物質によって捕獲するために、サンプル調製対照群と混合されたサンプルが、固相物質を収容するチャンバーを介して流れるようにする段階を含む。

【0127】

いくつかの実施形態において、サンプルは、サンプルとサンプル調製対照群とを混合する前に予備濾過できる。いくつかの実施形態において、溶解処理は、サンプル調製対照群及び標的エンティティを超音波エネルギーに露出させることを含む。また、いくつかの実施形態において、溶解処理は、サンプル調製対照群及び標的エンティティを破裂させるためにビーズを攪拌させることを含む。いくつかの実施形態において、サンプル調製対照群は孢子である。いくつかの実施形態において、混合段階は、サンプル調製対照群を含む乾燥ビーズを分解することを含む。

30

【0128】

いくつかの実施形態において、溶解処理は化学的溶解剤と接触させることを含む。いくつかの実施形態において、マーカー核酸配列は、マーカー核酸を（例えば、PCBによって）増幅し、増幅されたマーカー核酸配列を検出することにより検出される。いくつかの実施形態において、マーカー核酸配列は、マーカー核酸配列に結合できるプローブからのシグナルが限界値を超えるか否かを決定することにより検出される。

40

【0129】

増幅装置の反応容器の反応チャンバー内の反応混合物は核酸増幅条件に晒される。反応を利用したRNAまたはDNA鋳型の増幅は公知になっている[米国特許第4,683,195号;米国特許第4,683,202号;PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., , 1990)]。DNAの核酸増幅は、DNAを熱変性させること、増幅されるDNA分節に側接する配列に2つのオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングすること、及びアニーリングされたプライマーをDNAポリメラーゼによって伸長させることを1サイクルとし、該サイクルの繰り返しを伴う。プライマーは、標的配列の対向す

50

る鎖 (strand) にハイブリダイズする一方で、ポリメラーゼによるDNA合成がプライマー間の領域にわたって進行するように配向され、DNA分節の量を効果的に2倍にする。また、拡張生成物は補完的であり、プライマーを結合することができるため、個々の連続的なサイクルは、前のサイクルで合成されたDNAの量を実質的に2倍にする。これは、サイクル当たり 2^n (ここで、 n はサイクル数)の比率で特定標的分節の指数的蓄積をもたらす。増幅反応及びリガーゼ連鎖反応 (ligase chain reaction; LCR) などの方法が、mRNA、cDNA、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーから標的DNA配列の核酸配列を直接増幅させるのに使用できる。また、等温増幅反応が公知になっており、本発明の方法に応じて使用できる。

【0130】

10

核酸増幅反応は、好ましくは、反応容器内の反応混合物を増幅反応に必要な温度に加熱及び／または冷却させる熱処理装置を用いて行う。また、このような熱処理装置は、サンプル調製対照群のマーカー核酸配列、及びサンプルでテストするための一つ以上の標的核酸配列を検出する一つ以上の検出機構を含むことができる。反応容器内の核酸配列を増幅及び検出するための光学検出器が組み込まれた好ましい熱処理装置 (米国特許第6, 369, 893号; 米国特許第6, 391, 541号)を使用することができる。また、反応混合物の温度を制御し、この反応混合物における核酸配列を検出するための本発明に適した多くのその他の公知の方法がある。

【0131】

20

また、サンプル調製対照群の精度管理物質、及びサンプルでテストするための一つ以上の精度管理物質の検出は、プローブを用いて行うことが好ましい。反応容器は、光学的に検出できるプローブからのシグナルが通過する一つ以上の透明または光透過性の壁を有することが好ましい。好ましくは、捕捉プローブが核酸配列を検出及び定量化することを使用できる。核酸捕捉プローブを採用する様々な数多くの分析法がある。これらの捕捉プローブの一部は、他の分子またはモイエティ (moiety) との相互作用で変化により蛍光源の蛍光発光における変化を有するシグナルを生成する。

【0132】

増幅生成物の検出のための他の好ましい方法として、蛍光プローブは、蛍光レポーター染料 (fluorescent reporter dye) 全てによって標識化されたオリゴヌクレオチドからなる。捕捉プローブの分裂はレポーター染料の蛍光強度の増加を発生させる。

30

【0133】

サンプル内における標的生体分子の検出またはその欠如を確信するために、サンプル調製の汚染を制御しなければならない。これは、サンプル調製対照群がサンプル内の標的エンティティー (例えば、生体分子を含有している標的細胞、孢子、ウイルスまたは微生物) と同じ処理を受けなければならない理由である。サンプル調製対照群の精度管理物質が検出されれば、サンプル調製は満足すべきであるとみなされる。精度管理物質の存在が検出できなければ、サンプル調製は不適切であるとみなされ、標的核酸配列に対するテストの結果は「未定」であるとみなされる。好ましくは、精度管理物質の存在有無は、ターゲットプローブに結合することが可能な捕捉プローブからのシグナルが限界値、例えば分析法に対して有効であるとみなされるように満足または超過しなければならない所定の蛍光発光の限界値を超過するかどうかを決定することにより検出される。

40

【0134】

流体制御装置は所望のプロトコルに基づいてコンピュータで制御できる。単一バルブを使用すると、只一つの失敗要素により高い製造歩留まりを生成することができる。流体制御及び処理構成部材の統合は、コンパクトな装置 (例えば、小型カートリッジの形態) を得ることができ、成形及び組立の自動化を容易にする。前述したように、そのようなシステムは、好ましくは希釈及び混合能力、中間洗浄能力及び確実な加圧能力を含むことができる。システム内の流体経路は、システム内の流体の汚染を最小限に抑え、かつ、そのような流体の収容及び制御を容易にするように通常閉鎖される。反応容器は、便利に取り外

50

し及び交換が可能であり、いくつかの実施形態では廃棄可能である。

【0135】

本発明は、生体試料に含まれているアプタマーのレセプター及び核酸の生物学的意義を分析するための、オリゴヌクレオチドを用いて、生体試料にあるアプタマーのレセプター及び核酸を分析する核酸チップを提供する。

【0136】

本発明では、前記生体分子情報データを利用した生物学的意義分析のための構成は、患者群の前記生体分子情報と対照群の前記生体分子情報に関するデータの入力を受けてデータベースを構築するモジュールと、前記入力された情報データを用いて分析システムで前処理を行うモジュールと、前記前処理された結果に基づいて患者のモデルを生成するモジュールと、前記生成されたモデルをロードし、来院患者に適用してブラインドテスト（Blind test）たる診断を行うモジュールと、交差検定を用いてシステムの性能を評価するモジュールとを含むことを特徴とする、生体分子分析方法及び装置を提供する。

10

【0137】

本発明において、前記生体分子情報データを利用した生物学的意義予測システムは、例示的に診断であるが、これに限定されない。

【0138】

本発明で生成される多くの生体分子情報データは、高次元の特性を有する膨大な量の情報であって、細胞、組織または疾病に関連した様々な情報を生成することができる。前記入力されたデータを用いて分析システムで前処理を行うモジュールは、患者の状態に影響を及ぼす特徴を見付け、分類性能を向上させるための多変量分析方法は、正確な治療及び診断のために重要変数を見つけて次元を縮小したり、特性の変形によって主要特質を見つけたりする特徴抽出（Feature Selection）手続きである。

20

【0139】

特徴抽出は、細部的に、クラス情報を学習に使用するかどうかによって教師無し学習（Unsupervised Learning）方式または教師付き学習方式（Supervised Learning）がある。教師無し学習方式に主に活用されているPCA（Principal Component Analysis）またはICA（Independent Component Analysis）は、変数の特性を考慮して特質を抽出することができる。教師付き学習方式は、クラス情報と変数間の統計的な有意性または変数間の相関関係を活用して変数を選択する方式である。この方式は、与えられた特質集合に対して前方向（Forward）または後方向（Backward）に特質を順次追加または除去しながら分類器に適用させた性能を介して主要特質を算出することができる。

30

【0140】

前記前処理された結果を用いて学習を行って患者のモデルを生成するモジュールは、選択された特質を適切な分類器（Classifier）を用いてクラスによって分類するための手続きを行う。

【0141】

本発明において人工ニューラルネットワーク（Artificial Neural Network）を使用したのが、入力と出力に応じて行動を決定する特性のため、パターン認識、関数近似、分類技法などの様々な分野で応用されている。人工ニューラルネットワークは、その構造が複数の層（layers）、ノード（nodes）、ニューラルネットワーク接続重みで構成される。本発明に使用されるニューラルネットワーク層間接続方式はフィードフォワード（Feed-forward）方式である。入力パターンに応じて各ノードに対するニューラルネットワーク接続重みと活性化関数を用いて出力値を算出した。生成された結合情報を用いて特定の作業を処理したときに推定した値と実際の結果値とが異なる場合、算出された値を実際の結果値と比較しながら誤差を減らす過程を繰り返し行う方式が、フィードフォワード方式である。

40

【0142】

50

前記患者のモデルを生成する方法は、線形モデル (linear models)、サポートベクターマシン (support vector machines)、ニューラルネットワーク (neural networks)、分類及び回帰ツリー (classification and regression trees)、アンサンブル学習法 (ensemble learning methods)、判別式分析 (discriminant analysis)、最近隣方法 (nearest neighbor method)、ベイジアンネットワーク (Bayesian networks)、及び独立成分分析 (independent components analysis) よりなる群から選択されることを特徴とする、生体分子分析方法及び装置を提供する。

【0143】

正確かつ総合的なメカニズム (Mechanism) が解明されていない大多数の疾患については、事例をベースとする診断の重要性が非常に大きいといえる。ところが、特定の機械学習技法に限定して考案された、従来の事例ベースの機械学習推論システムは、精度が低い。よって、改善されたシステムの開発が持続的に求められている。また、従来のシステムは、学習された臨床検査項目全体を利用した疾患判別機専用で考案されており、各疾患別臨床検査項目の重要度や優先順位を活用することが可能な方法を提供していない。

【0144】

本発明は、医師の正確な疾患診断を支援するための事例ベースの機械学習推論を用いた疾患診断及び検査項目選定システムに関するもので、患者の事例データベース (Data base) を介して訓練された人工ニューラルネットワーク (Neural Network) を利用した機械学習器である疾患判別器によって新しい患者の検査情報を分析して疾患を判別し、予備診断による各疾患の最終判別のための最小の重要検査項目を選定して提供するシステムに関するものである。機械学習推論を利用した疾患診断法は、機械学習技法を個別に適用して構成している。前記患者のモデルを生成する方法は、線形モデル (linear models)、サポートベクターマシン (support vector machines)、ニューラルネットワーク (neural networks)、分類及び回帰ツリー (classification and regression trees)、アンサンブル学習法 (ensemble learning methods)、判別式分析 (discriminant analysis)、最近隣方法 (nearest neighbor method)、ベイジアンネットワーク (Bayesian networks)、独立成分分析 (independent components analysis) などがある。

【0145】

本システムは、構成及び実務への応用の観点から、2つに分けて構成することができるが、診断のみのための独立 (stand alone) 型の診断システムと既存の病院情報システム、すなわち、OCS、PACS、LISなどと連携した統合システムで構成することができる。統合システムとの連動のためにはHL7及びDICOM規約に基づいてシステムを構成しなければならない。本システムは、初期モデルとしてのPMS (Patient Monitoring System) と連動して診断の精度を高めた。また、PMSだけでなく、OCS、EMR、PACSなどの様々な医療情報システムと連動したシステムとして開発し、様々な疾患因子を含んでいるより正確な診断システムとして開発することができる。

【0146】

本発明によれば、前記生体試料は細菌、真菌類、ウイルス、細胞株及び組織よりなる群から選択された少なくとも一つであることを特徴とする、オリゴヌクレオチドを用いた生体分子分析方法及び装置を提供する。

【発明の効果】

【0147】

本発明は、オリゴヌクレオチドを用いて生体分子を分析することにより、生体試料から

10

20

30

40

50

生体分子の生物学的意義を確認することができ、蛍光学的に高い感度で検出することができる。さらに、一度の検査で様々な生体分子を分析することにより、生体試料における表現型の変化、疾病に対する敏感性、及び治療薬剤に対する反応の違いなど、個人間の差を効率よく決定する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0148】

【図1】生体試料から核酸及びタンパク質を分離した後、タンパク質と分析リガンドとを反応させて製造されたタンパク質-分析リガンド複合体、及び核酸から分離されたRNA及びDNAなどの標的核酸を含む核酸から、分析しようとする標的DNAを製造し、標的核酸の特定領域に完全に相補的に結合するオリゴヌクレオチドを用いて生体分子を分析し、生物学的意義を分析する全体的なフローチャートである。

10

【図2】生体試料から分離されたレセプターと分析リガンドとの複合体である。

【図3】生体試料から分離されたRNAを逆転写した後、cDNAを対象としてRNAの定量分析を行うことを示す図である。

【図4】生体試料から分離された標的核酸の特定領域に完全に相補的に結合するオリゴヌクレオチドを用いて標的核酸変異分析を行う全体的なフローチャートである。

【図5】生体試料から分離された標的核酸のメチル化有無分析を行う全体的なフローチャートである。

【図6】標識物質のあるターゲットプローブをアレイ上の捕捉プローブとハイブリダイゼーションして発生するシグナルを分析することにより生体分子を分析することを示す図である。

20

【図7】アレイ上にIL17及びIL17RAに相応するアプタマー、mRNA、DNA変異及びメチル化有無に相応する捕捉プローブの配置図である。

【図8】IL17及びIL17RAに相応するタンパク質、mRNA及びDNA変異、並びにメチル化有無を分析するために、オリゴヌクレオチドを用いて部分的二本鎖核酸及び完全な二本鎖核酸を製作した後、これを鋳型としてシグナルプライマーの存在下でPCRを介して標識及び増幅して得たターゲットプローブを、アレイに固着された前記捕捉プローブにハイブリダイゼーションすることにより形成されたイメージである。

【発明を実施するための形態】

【0149】

30

以下、添付図面と実施例を参照して、本発明に係る標準物質及び核酸チップの製造方法、並びにこれらを用いた2つまたはそれ以上の生体分子からなる生体試料にある生体分子の分析方法を詳細に説明する。以下の実施例は、本発明を例示的に説明するものに過ぎず、本発明の範囲を制限するものと意図されていない。

【0150】

本発明に使用される特定の生体分子は、IL17及びIL17RAであり、アレイを用いた一度の検査でこれらのタンパク質、mRNA及びDNA変異を分析しようとする。

【0151】

IL-17は、CD4+T細胞であるTh17細胞が生産するサイトカインであって、例えばAccession code AAH67505やNP002181で示すアミノ酸配列を有するタンパク質である。IL-17はIL-17AまたはCTLA-8と呼ばれることもある。IL-17受容体はIL-17が結合する細胞表面タンパク質を意味する。IL-17受容体ファミリーとしてIL-17RA、IL-17RB、IL-17RC、IL-17RD、IL-17REが知られている。

40

【0152】

本発明において、「IL-17媒介炎症性疾患」は、Th17細胞だけでなく、ガンマ/デルタT細胞、NK細胞、大食細胞、好中球などの免疫または炎症細胞から分泌されるIL-17により発生または悪化する呼吸器疾患、消化器疾患、皮膚疾患、血管または代謝性疾患、骨関節疾患及び脳神経疾患などを含む。

【0153】

50

具体的に、前記呼吸器疾患は鼻炎、鼻ポリープ、副鼻腔炎、喘息、気管支炎、慢性閉塞性肺疾患、気管支拡張症、細気管支炎、肺炎、肺線維症、肺癌などを含み、前記消化器疾患は口腔炎、食道炎、胃炎、胃潰瘍、炎症性腸炎、過敏性腸症候群、胆導管炎、膵炎、口腔癌、食道癌、胃癌、大腸癌、胆道癌、胆嚢癌、膵臓癌などを含み。

【0154】

また、前記血管または代謝性疾患は動脈硬化症、糖尿病、痛風などを含み、前記骨関節疾患は関節リウマチ、骨関節炎、骨粗しょう症などを含み。前記脳神経疾患は血管性認知症、アルツハイマー病、退行性脳疾患などを含み。

【0155】

定量分析するタンパク質及びRNA定量分析の対象は、IL17及びIL17RAであり、GenBankデータシステム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) から得られるIL17及びIL17RA遺伝子の塩基配列情報 (IL17のAccession number: NM_002190、及びIL17RAのAccession number: NM_014339) である。

10

【0156】

DNA変異の分析はIL17及びIL17RAのSNPを対象とし、これに関する情報は<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>から収集した。

【0157】

核酸のメチル化有無分析は、IL17プロモーター-144位置 (Thomas, R. M., et al., 2012, J Biol Chem. 287(30): 25049-59.) に対して行った。

20

【0158】

【表 1 - 1】

標的核酸の特定領域（H）の塩基配列

種類	上流オリゴヌクレオチド (5' → 3')	下流オリゴヌクレオチド (5' → 3')	一連 番号
β -actin mRNA	gggcgacgagggcccagagcaagaga	ggcatcctcacctgaagtaccca	1
	cagatcatgtttgagaccttcaaca	ccccagccatgtacgttgctatcca	2
IL17 mRNA	ccctcaggaacccctcatccttcaaa	gacagcctcatttcggactaaactc	3
	taaccggaataccaataccaatccc	aaaaggtcctcagattactacaacc	4
IL17RA mRNA	ggagcagaagcctcccagccactag	ccttttgggtcagtcctctccaata	5
	gagtacaggataccacaatgcactc	ttcctgcgtagagcacatgttccca	6
IL17 SNP			
rs10484879	AAACTCATCGTGAAGTCAAACATTCAA	ATTGGAAGAAAGAGCTATAGAAAAT	7
	AAACTCATCGTGAAGTCAAACATTAC		
rs8193038	GGAATACTGTATATGTAGGATAGGAAA	TGAAAGCTTTGGTAGGTATTTAAGT	8
	GGAATACTGTATATGTAGGATAGGAAG		
rs8193037	TGTCACCCCTGAACCCACTGCGACACA	CCACGTAAGTGACCACAGAAGGAGA	9
	TGTCACCCCTGAACCCACTGCGACACG		
rs8193036	CCCCCTGCCCCCTTTTCTCCATCTC	CATCACCTTTGTCCAGTCTCTATCC	10
	CCCCCTGCCCCCTTTTCTCCATCTT		
rs4711998	TGTATTCTGAGAAGGAATATTCTCA	AGGACCTGAGTCCAAGTTCATCTTA	11
	TGTATTCTGAGAAGGAATATTCTCG		
rs3819025	TCATTGGTGGTGAGTCCTGCACTAACA	TGCGATGCTCTTGCTGATTTGGACC	12
	TCATTGGTGGTGAGTCCTGCACTAACG		
rs3819024	AACACCTGGCCAAGGAATCTGTGAGGA	AAAGAAAGATCAAATGGAAAATCAA	13
	AACACCTGGCCAAGGAATCTGTGAGGG		
rs3804513	CAAATGTATTTTGATCATTGACTTCA	TACAAATAAGTCTCTGTCTGTGGA	14
	CAAATGTATTTTGATCATTGACTTCT		
rs3748067	TGGGCTGAACCTTTCTCATACTTAAAA	TTCGTTCTGCCCCATCAGCTCCTTT	15
	TGGGCTGAACCTTTCTCATACTTAAAG		

【 0 1 5 9 】

10

20

30

【表 1 - 2】

rs2275913	CTGCCCTTCCCATTTTCCTTCAGAAGA	AGAGATTCTTCTATGACCTCATTGG	16
	CTGCCCTTCCCATTTTCCTTCAGAAGG		
rs1974226	CTGAACTTTTCTCATACTTAAAGTTCA	TTCTGCCCCATCAGCTCCTTTCTGG	17
	CTGAACTTTTCTCATACTTAAAGTTTCG		
IL17RA SNP			
rs151315255	GATGGCCTGCCTGCGGCTGACCTGATC	CCCCCACCCTGAAGCCCAGGAAGG	18
	GATGGCCTGCCTGCGGCTGACCTGATT		
rs139412425	TGGATCATCTACTCAGCCGACCACCCC	CTCTACGTGGACGTGGTCTGAAAT	19
	TGGATCATCTACTCAGCCGACCACCK		
rs6518661	CTGTCACTAAGGAGTTAACCCCGCAA	AGCAGTTTTTTCATCACATCTCTGA	20
	CTGTCACTAAGGAGTTAACCCCGCAG		
rs6518660	CATAGTAGATAGCAATCTATTCAACCA	TTTCTAGTTTGATGGACATTTAGAT	21
	CATAGTAGATAGCAATCTATTCAACCG		
rs5748864	gcaagttaggattagagggtgggacA	tttagccccacccctttacccatca	22
	gcaagttaggattagagggtgggacG		
rs4819554	TGGGAAGTAACGACTCTCTTAGGTGCA	GCTGGGACACAGTCTCACAGACCAG	23
	TGGGAAGTAACGACTCTCTTAGGTGCG		
rs2241049	GCATGGGAGGACCTATGGGAGGTTCCA	ATAACATTTCAGTAGCATCTCGGCCA	24
	GCATGGGAGGACCTATGGGAGGTTCCG		
rs2241046	ATGCTATTTTCCCTTTTTCCTCTGTTT	TCATTGCAGAACCAATTCGGGTAA	25
	ATGCTATTTTCCCTTTTTCCTCTGTTT		
rs2229151	CACCCCTCTACGTGGACGTGGTCTTA	AAATTCGCCCAGTTCCTGCTCACCG	26
	CACCCCTCTACGTGGACGTGGTCTTG		
rs882643	ACGCTTTCCCAACCACAATCCTTCAC	CTCAGGCATCTCCTCGGGGATCCCC	27
	ACGCTTTCCCAACCACAATCCTTCAG		
rs879577	TCAGCGGTGGGGGATCAGGTCAGCCA	CAGGCAGGCCATCTAAGGAAACAAG]	28
	TCAGCGGTGGGGGATCAGGTCAGCCG		
rs879576	TGGTCGGCTGAGTAGATGATCCAGACC	TTCCTGGGCTTCAGCGGTGGGGGGA	29
	TGGTCGGCTGAGTAGATGATCCAGACT		

【0 1 6 0】

【表 1 - 3】

rs879576	TGGTCGGCTGAGTAGATGATCCAGACC	TTCCTGGGCTTCAGCGGTGGGGGGA	30
	TGGTCGGCTGAGTAGATGATCCAGACT		
rs721930	GTTCTGAGGGGTGATTAGGGAGGAGAC	TTTAGTTTAACTTGGAGTCCTTCAG	31
	GTTCTGAGGGGTGATTAGGGAGGAGAG		
IL17 Aptamer	ggucuageccggaggaguc	aguaaucgguagacc	32
IL17RA Aptamer	ACGCGCTAGGATCAA	AGCTGCACTGAAGTG	33
IL17 メチル化 (プロモーター - 1 4 4 位置)	tcaaatcaattttaacatta tctacaacaag	gtcatacttgtgggtgga gaccaaagcc	34

10

20

30

40

50

【0161】

【表2-1】

捕捉プローブ及びその相補的塩基配列（リガンドを指示するzip-code塩基配列）

種類	捕捉プローブ（5' → 3'）（53）	捕捉プローブの相補的塩基配列 （5' → 3'）
1	GATTTGTATTGATTGAGATTAAAG	CTTTAATCTCAATCAATACAAATC
2	TGATTGTAGTATGTATTGATAAAG	CTTTATCAATACATACTACAATCA
3	GATTGTAAGATTTGATAAAGTGTA	TACACTTTATCAAATCTTACAATC
4	GATTTGAAGATTATTGGTAATGTA	TACATTACCAATAATCTTCAAATC
5	GATTGATTATTGTGATTTGAATTG	CAATTCAAATCACAATAATCAATC
6	GATTTGATTGTAAAAGATTGTTGA	TCAACAATCTTTTACAATCAAATC
7	ATTGGTAAATTGGTAAATGAATTG	CAATTCATTTACCAATTTACCAAT
8	GTAAGTAATGAATGTAAAAGGATT	AATCCTTTTACATTGATTACTTAC
9	GTAAGATGTTGATATAGAAGATTA	TAATCTTCTATATCAACATCTTAC
10	TGTAGATTTGTATGTATGTATGAT	ATCATACATACATACAAATCTACA
11	GATTAAGTGATTGATGATTTGTA	TACAAATCATCATCACTTTTAAATC
12	AAAGAAAGAAAGAAAGAAAGTGTA	TACACTTTCTTTCTTTCTTTCTTT
13	TTAGTGAAGAAGTATAGTTTATTG	CAATAAACTATACTTCTTCACTAA
14	AAAGTAAGTTAAGATGTATAGTAG	CTACTATACATCTTACTATACTTT
15	TGAATTGATGAATGAATGAAGTAT	ATACTTCATTGATTCATCAATTCA
16	TGATGATTTGAATGAAGATTGATT	AATCAATCTTCATTCAAATCATCA
17	TGATAAAGTGATAAAGGATTAAAG	CTTTAATCCTTTATCACTTTATCA

【0162】

10

20

30

【表 2 - 2】

18	TGATTTGAGTATTTGAGATTTGA	TCAAAATCTCAAATACTCAAATCA
19	GTATTTGAGTAAGTAATTGATTGA	TCAATCAATTACTTACTCAAATAG
20	GATTGTATTGAAGTATTGAAAAG	CTTTTACAATACTTCAATACAATC
21	TGATTTGAGATTAAAGAAAGGATT	AATCCTTTCTTTAATCTCAAATCA
22	TGATTGAATTGAGTAAAAAGGATT	AATCCTTTTACTCAATTCAATCA
23	AAAGTTGAGATTTGAATGATTGAA	TTCAATCATTCAAATCTCAACTTT
24	GTATTGTATTGAAAAGGTAATTGA	TCAATTACCTTTTCAATACAATAC
25	TGAAGATTTGAAGTAATTGAAAAG	CTTTTCAATTACTTCAAATCTTCA
26	TGAAAAAGTGTAGATTTTGAGTAA	TTACTCAAAATCTACACTTTTTCA
27	AAAGTTGAGTATTGATTTGAAAAG	CTTTTCAAATCAATACTCAACTTT
28	TTGATAATGTTTGTGTTGTTGTAG	CTACAAACAAACAAACATTATCAA
29	AAAGAAAGGATTTGTAGTAAGATT	AATCTTACTACAAATCCTTTCTTT
30	GTAAAAAGAAAGGTATAAAGGTAA	TTACCTTTATACCTTTTCTTTTAC
31	GATTAAAGTTGATTGAAAAGTGAA	TTCACTTTTCAATCAACTTTAATC
32	GTAGATTAGTTTGAAGTGAATAAT	ATTATTCACTTCAAACATACTAC
33	AAAGGATTAAGTGAAGTAATTGA	TCAATTACTTCACTTTAATCCTTT
34	TGAAATGAATGAATGATGAAATTG	CAATTCATCATTCAATTCATTCA

10

20

【0163】

【表 3】

ユニバーサルPCRプライマーの塩基配列

順方向プライマー (5' → 3')	逆方向プライマー (5' → 3')
P1: 5- ACTTCGTCAGTAACGGAC -3	P3: 5- GTCTGCCTATAGTGAGTC -3
P2: 5- GAGTCGAGGTCATATCGT -3	

30

【実施例】

【0164】

実施例 1：生体分子の準備

【0165】

細胞或いは細胞からなる組織試料から All Prep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen 社、米国) で生体分子を分離した。本発明では、ヒトの軟骨組織 (Promocell 社、ドイツ) を生体試料として使用した。軟骨組織を製造社から提供されたバッファで溶解させ、溶解した試料をカラムに処理した後、遠心分離して DNA をカラム膜に結合させ、濾過された溶液を収獲した。カラム膜にある DNA の分離は、DNA の在るカラムを洗浄し、膜から DNA を抽出した後、遠心分離して DNA を収獲した。前記収獲された濾過溶液を製造社から提供されるカラムに処理し、濾過された溶液中のタンパク質を沈殿及び遠心分離して収獲した。また、カラムにある RNA を洗浄し、膜にある RNA を抽出した後、遠心分離して収獲した。

40

【0166】

実施例 2：分析リガンドの製造

【0167】

2-1. 抗体及びアプタイマー分析リガンド

【0168】

50

前記軟骨組織で特定タンパク質の定量分析を行うために用いられる前記タンパク質－抗体分析リガンド複合体の製造のために、IL17（カタログ番号BAF317）及びIL17RA（カタログ番号BAF177）ビオチン－抗体を購入した（R&D Systems社、米国）。

【0169】

前記軟骨組織で特定のタンパク質の定量分析を行うために用いられる前記タンパク質－アプタマー複合体の製造のために使用されるアプタマーは、IL17（韓国特許第10-1276519-0000号）及びIL17RA（Chen, L., et al., 2011, Osteoarthritis and Cartilage 19; 711-718）に特異的に結合する一本鎖核酸であって、表4に提示された塩基配列を有する。IL17及びIL17RAビオチン－アプタマーを有機合成して準備した（Bioneer社製、韓国）。

10

【0170】

【表4】

IL17及びIL17RAアプタマーの塩基配列

種類	塩基配列（5' → 3'）	備考
IL17	GGUCUAGCCGGAGGAGUCAGUAAUCGGUAGACC	
IL17RA	ACGCGCTAGGATCAAAGCTGCACTGAAGTG	

【0171】

タンパク質定量分析のための抗体分析リガンドのビオチン－オリゴヌクレオチドの構成は、次の一般式（I）で表される。

20

【0172】

5'－ビオチン－P1－T－P3－3' （I）

【0173】

前記一般式（I）において、P1は、検出シグナルを有する順方向プライマーに相補的に結合する領域であり、Tは、捕捉プローブと完全に相補的に結合する領域であって、リガンドが結合する標的タンパク質またはそれに対する一本鎖核酸を識別するための、ハイブリダイゼーション反応で使用するプローブとして機能するように設計することができる。P3は、シグナルのプライマー対における逆方向プライマーと相補的に結合する領域である。

30

【0174】

前記準備されたビオチン－抗体及びビオチン－アプタマーをアビジンを介してビオチン－オリゴヌクレオチドと連結して構造体を製造した。前者を抗体分析リガンドと称し、後者をアプタマー分析リガンドと称した。

【0175】

2-2. 上流及び下流オリゴヌクレオチド

【0176】

2-2-1. 核酸定量分析

【0177】

核酸定量分析を行うための前記上流オリゴヌクレオチドの構成は、次の一般式（II）で表される。

40

【0178】

5'－P1－H－3' （II）

【0179】

前記一般式（II）において、P1は、検出シグナルを有する順方向プライマーに相補的に結合する領域であり、Hは、ハイブリダイゼーションされる標的核酸と相補的にハイブリダイゼーションする配列領域である。

【0180】

前記下流オリゴヌクレオチドの構成は、次の一般式（III）で表される。

50

【0181】

$$5' - HT - P3 - 3' \quad (III)$$

【0182】

前記一般式 (III) において、Hは、前記標的核酸に前記上流オリゴヌクレオチドの3'末端が結合する位置の下流の配列と相補的に結合する領域であり、Tは、捕捉プローブと完全に相補的に結合する領域であって、標的核酸またはそれに対する一本鎖核酸を識別するための、ハイブリダイゼーション反応で使用するプローブとして機能するように設計することができる。P3は、逆方向プライマーと相補的に結合する領域である。

【0183】

前記一般式 (III) と一般式 (III) におけるHは、 β -actin、IL17、IL17R mRNAなどに対して特異的な塩基配列を有し、前記表1-1～表1-3に提示されており、Tは表2-1～表2-2に提示されており、P1及びP3は表3に提示されており、これらの配列を参照して核酸変異分析のための上流及び下流オリゴヌクレオチドを有機合成した (Bioneer社、韓国)。

10

【0184】

2-2-2. 核酸変異分析

【0185】

標的核酸変異分析のための前記上流オリゴヌクレオチドの構成は、次の一般式 (IV) で表される。

【0186】

$$5' - P2 - H - V - 3' \quad (IV)$$

20

【0187】

前記一般式 (IV) において、P2は、検出シグナルを有する順方向プライマーが相補的に結合する領域であり、Hは、標的核酸と相補的にハイブリダイゼーションする配列を有する領域であり、Vは、標的核酸の変異配列と相補的にハイブリダイゼーションする変異配列に特異的な領域である。上流オリゴヌクレオチドは2つまたはそれ以上から構成できる。

【0188】

前記下流オリゴヌクレオチドの構成は、次の一般式 (V) で表される。

30

【0189】

$$5' - H - T - P3 - 3' \quad (V)$$

【0190】

前記一般式 (V) において、Hは、前記標的核酸の変異特異領域の下流で標的核酸と相補的にハイブリダイゼーションする配列領域であり、Tは、捕捉プローブと相補的に結合する領域であって、変異を有する標的核酸またはそれに対する一本鎖核酸を識別するための、ハイブリダイゼーション反応で使用するプローブとして機能するように設計することができる。P3は、逆方向プライマーと相補的に結合する領域である。

40

【0191】

前記一般式 (IV) と一般式 (V) におけるHは、IL17のSNP、IL17RのSNP、メチル化IL17などに対して特異的な塩基配列を有し、表1-1～表1-3に提示されており、Tは表2-1～表2-2に提示されており、P2とP3は表3に提示されており、これらの配列を参照して核酸変異分析のための上流及び下流オリゴヌクレオチドを有機合成した (Bioneer社、韓国)。

【0192】

実施例3：精度管理一本鎖核酸の製造

【0193】

50

標準物質は、http://genomics.msu.edu/plant_specific/から確保したA、B、C、D及びEの5種類の植物特異タンパク質で構成されている（表5参照）。

【0194】

【表5】

植物特異タンパク質

種類	遺伝子座 (Locus)	内容	Accession number
A	At1g65390.1	防御／免疫タンパク質 (defense/immunity protein)	GO:0003793
B	At5g39310.1	細胞伸長 (cell elongation)	GO:0009826
C	At4g15910.1	乾燥で誘導されるタンパク質 (D i 2 1) (Drought-Induced Protein) (Di21)	GO:0009414
D	At1g12860.1	B h l hタンパク質 (Bhlh Protein)	GO:0003677
E	At4g02530.1	葉緑体チラコイドルーメンタンパク質 (Chloroplast Thylakoid Lumen Protein)	GO:0009543

【0195】

選定された5種の植物特異タンパク質は、大腸菌発現システムを用いて、相応するタンパク質を発現させた後、発現されたタンパク質を分離し、標準SELEX方法（Ellington, A. D. and J. W. Szostak. 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature 346: 818-822; Gold, L., P. Allen, J. Binkley, D. Brown, D. Schneider, S. R. Eddy, C. Tuerk, L. Green, S. Macdougall, and D. Tasset 1993. RNA: the shape of things to come, pp. 497-510. In: R. F. Gesteland and J. F. Atkins (eds.). The RNA World, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y.)によって、標準物質に結合する一本鎖核酸を確保した。

【0196】

これを精度管理一本鎖核酸と命名し、これらの塩基配列を用いて、ビオチンが結合されたビオチン-精度管理一本鎖核酸を製造し、実施例2の一般式(I)で表されるビオチン-オリゴヌクレオチドを製造した。ビオチン-精度管理一本鎖核酸をアビジンを介してビオチン-オリゴヌクレオチドと連結して標準物質分析のための構造体を製作し、これを便宜のために「精度管理リガンド」と称した。

【0197】

実施例4：標的核酸の準備

【0198】

4-1. タンパク質

【0199】

4-1-1. 抗体分析リガンド

【0200】

前記準備された軟骨組織から分離したタンパク質溶液100μLを入れたマイクロタイターウェル(microtiter well)を、4℃で一晩中或いは37℃で2時間0.05M炭酸塩緩衝液(pH9.6)でコートした。

【0201】

ビオチン-抗体(10μg/ml)100μLにアビジン(7.2μg/ml)を添加したままで30分間室温におき、前記ビオチン-オリゴヌクレオチドを添加して抗体-ア

10

20

30

40

50

ビジン-オリゴヌクレオチド構造体を製造した。これを抗体分析リガンドと称した。

【0202】

ウェルを、3%脱脂粉乳、0.1mMエチレンジアミン四酢酸、0.02%アジ化ナトリウムを含有するリン酸塩緩衝生理食塩水でブロック(180 μ L/well)し、リン酸塩緩衝生理食塩水-ツイン20で2回洗浄した後、抗体分析リガンド(10 μ g/ml)100 μ Lを添加して2時間37 $^{\circ}$ Cで培養した。このウェルを5分間5回ツイン-リン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後、非特異的に結合されたビオチン-オリゴヌクレオチドを除去するために蒸留水で5分間4回洗浄した。各ウェルにある内容物を500 μ Lのエッペンドルフ(Eppendorf)チューブに移して保管し、これを核酸試料として用いた。

10

【0203】

4-1-2. アプタマー分析リガンド

【0204】

前記準備されたビオチン-IL17アプタマー(10/100)及びビオチン-IL17RAアプタマー(10/100)にそれぞれアビジン(7.2/)を添加したままで30分間室温におき、前記準備されたビオチン-オリゴヌクレオチド(10/)を添加してアプタマー-アビジン-オリゴヌクレオチド構造体を製造し、これをアプタマー分析リガンドと称した。

【0205】

前記準備された軟骨組織から分離したタンパク質溶液をニトロセルロース(nitrocellulose)ディスクに処理して固定させた後、SELEXバッファで、前記タンパク質が付着したディスクとIL17及びIL17RAアプタマー分析リガンドを30分間処理し、タンパク質-アプタマー分析リガンド複合体を形成させた後、洗浄を行い、非特異的に結合したアプタマーを除去することにより精製されたタンパク質-アプタマー分析リガンド複合体を準備した。これをタンパク質の定量分析のために核酸試料として用いた。

20

【0206】

4-2. RNA

【0207】

特定RNAの定量分析及び変異を分析するために、軟骨組織から精製した全RNA10ng、dT₂₀プライマー((株)Bioneer、100pmoles/20 μ L反応液)、MMLV逆転写酵素((株)Bioneer、200U/20 μ L反応液)、10 $\times$ 反応緩衝溶液2 μ L、RNasin(Promega; 15U/20 μ L反応液)及びベタイン(Sigma社; 500mM/20 μ L反応液)を混合して逆転写反応液を製造した。製造された逆転写反応液を用いて、既存の単一温度条件である42 $^{\circ}$ Cまたは52 $^{\circ}$ C10分、20分、40分または60分反応の後、37 $^{\circ}$ C2分、50 $^{\circ}$ C3分を1サイクルとして2サイクル、4サイクル、8サイクルまたは12サイクル、或いは、37 $^{\circ}$ C1分、47 $^{\circ}$ C3分、55 $^{\circ}$ C1分を1サイクルとして2サイクル、4サイクル、8サイクルまたは12サイクル繰り返して逆転写反応を行った。生成されたcDNAを核酸試料として用いた。

30

40

【0208】

4-3. DNA変異

【0209】

特定DNAの変異有無を分析するためにキットを用いて、軟骨組織からゲノムDNAを抽出し、NanoDropを用いてその濃度を測定し、DNA変異分析のための標的核酸として用いた。

【0210】

4-4. メチル化

【0211】

特定DNAのメチル化有無を分析するためにキットを用いて、軟骨組織からゲノムDN

50

Aを抽出し、Nano Dropを用いてその濃度を測定した。その後、抽出したDNA約1~2 µg程度を0.5 N濃度の水酸化ナトリウムと混ぜて16 mMにして37℃で15分間反応させることにより、DNAが一本鎖となるように変形させた。その後、3.5 M濃度の重硫酸ナトリウム (Sodium bisulfate) と0.01 M濃度のヒドロキノン (Hydroquinone) 試薬を添加し、56℃で16時間化学反応させた。その後、エタノールを用いた沈殿反応を行い、変換されたDNAのみを濃縮させて純粋分離し、50℃の3次蒸留水に溶かした後、0.1 M濃度となるように水酸化ナトリウムを添加し、常温で15分間反応させることにより、シトシンの脱硫酸化反応を行い、もう一度エタノール沈殿反応で濃縮させ、最終的に30℃の3次蒸留水に溶かして20℃に保管した。これを、メチル化有無を分析するための標的核酸として用いた。

10

【0212】

実施例5：増幅用核酸試料の製造

【0213】

前記軟骨組織から準備され且つ標的核酸が含まれた、RNA試料、ゲノムDNA試料、タンパク質-分析リガンド複合体の核酸試料などから、各増幅用核酸試料を次のとおり準備し、混合することにより、増幅反応に使用される反応溶液とした。

【0214】

実施例4でタンパク質定量分析のために収穫したオリゴヌクレオチドを有するタンパク質-分析リガンド複合体をそのまま増幅用核酸試料として用いた。

【0215】

20

増幅用核酸試料は、実施例4でRNA定量分析のために分離されたRNAが逆転写反応によってcDNAに転換された核酸試料、DNA変異分析のために分離されたゲノムDNAの核酸試料、及びメチル化有無の分析のためにゲノムDNAのメチル化情報を反映した塩基配列の変化が生じた、メチル化有無の分析のための核酸試料から次のとおり製造した。

【0216】

前記核酸試料の混合物と前記上・下流オリゴヌクレオチドとをハイブリダイゼーション反応させて部分的二重鎖核酸を製造し、この部分的二重鎖核酸を完全な二重鎖核酸に転換させる連結反応を行うことにより、前記増幅用核酸試料を製造した。

【0217】

30

次の反応溶液でPCR機器を用いて、95℃5分間変性の後、95℃1分、70℃1分、68℃1分、66℃1分及び64℃3分を1サイクルとして10サイクル繰り返し行った。

【0218】

10 mlの反応溶液は、20 mMのTrisHCl (pHは7.6)、25 mMの酢酸ナトリウム、10 mMの酢酸マグネシウム、1 mMのジチオスレイトール、1 mMのNAD⁺、0.1% Triton X-100、実施例2で準備された上流オリゴヌクレオチドと下流オリゴヌクレオチド (各500 pM)、1 unit Taq DNAリガーゼ (New England Biolabs、MA、米国)、及び上記で準備された100 µgの核酸試料の混合物から構成された。

40

【0219】

実施例6：増幅反応

【0220】

前記増幅反応は、次の反応溶液でPCR機器を用いて、95℃3分間変性の後、95℃10秒、56℃10秒及び72℃20秒を1サイクルとして42サイクル繰り返し行った。前記25 mlの反応溶液は、10 mMのTrisHCl (pH8.6)、50 mMのKCl、2.5 mMのMgCl₂、5% (V/V) グリセリン、1 U Taq DNAポリメラーゼ、1 pmolの順方向シグナルプライマー (野生型標的核酸分析のためにはP1のみを使用し、変異標的核酸分析のためにはP1とP2を使用する。)、20 pmolの逆方向シグナルプライマー (P3)、及び2 mlの実施例3の反応溶液などから構成され

50

た。

【0221】

野生型標的核酸分析のためのプライマーは、分析リガンドまたは上流オリゴヌクレオチドのP1領域に相補的に結合し且つ検出シグナルを発生させる、Cy3で標識している順方向プライマー、及びP3領域に相補的に結合する逆方向プライマーから構成する。

【0222】

変異標的核酸を分析するために、順方向プライマーは、非変異標的核酸を増幅させ且つP1領域に相補的に結合する、Cy3で標識している順方向プライマーと、P2領域に相補的に結合する、Cy5で標識している順方向プライマーの少なくとも2つから構成し、前記逆方向プライマーは、P3領域に対するユニバーサルなプライマーから構成する。これらのPCRプライマーの塩基配列は表2-1～表2-2に提示されている。

10

【0223】

実施例7：アレイの製造

【0224】

前記捕捉プローブは、標的核酸を識別するために、標的核酸に相応する塩基配列を有するオリゴマー（表3）を提示し、有機合成して（Bioneer社）、製造された捕捉プローブを図4に準じてアレイに固定した。

【0225】

前記下流オリゴヌクレオチドを設計する際に、表3の捕捉プローブは、表4の下流オリゴヌクレオチドと完全に相補的に結合する標的核酸の特定領域を指示するようにした。

20

【0226】

これを具体的に考察すると、表1-1～表1-3の番号1の捕捉プローブは、表2-1～表2-2の番号1の β -actin mRNAの下流オリゴヌクレオチドと完全に相補的に結合する領域、表1-1～表1-3の番号3の捕捉プローブは、表2-1～表2-2の番号3のIL17 mRNAの下流オリゴヌクレオチドと完全に相補的に結合する領域をそれぞれ指示するようにした。

【0227】

GAPS（Gamma Amino Propyl Silane）がコートされたスライドガラスであるUltraGAPSTM Coated Slide（Corning社）を用いて、捕捉一本鎖核酸が一定の規則で固着された核酸チップを製作した。核酸チップの製作にはピン（pin）方式のマイクロアレイヤーシステム（Microarrayer system、GenPak社）を使用し、スポット間隔（spot spacing）はスポットの中心間（center-to-center）距離が150 μ mとなるようにした。それぞれの捕捉一本鎖核酸を標準溶液に溶かして濃度を調節した。このとき、アレイヤー内の湿度を70％に維持してスポットティング（spotting）を行った。スポットティングされたスライドは、加湿チャンバー（humidified chamber）で24～48時間放置した後、UV crosslinkerでベークする過程を行った。公知の方法で捕捉一本鎖核酸をスライドガラスに固定させ、スライドを直ちに遠心分離して乾燥させた後、遮光状態で保管した。前記アレイの製作方法における基板は、ガラスで製作されたスライドガラスである。このとき、基板は、アミン基またはアルデヒド基などでコートされたものを使用することができる。例えば、GAPS（Gamma Amino Propyl Silane）がコートされたスライドガラスであるUltraGAPSTM Coated Slide（Corning社）を用いて、前記捕捉プローブを一定の規則で配列固着させてアレイを製作する。

30

【0228】

このようなアレイの製作では、アレイヤーシステム（Microarrayer system）を使用することができ、それぞれの捕捉プローブを緩衝液に溶かして濃度を調節する。このとき、アレイヤー内の湿度は70％～80％に維持してスポットティング（spotting）を行う。

40

【0229】

50

スポットティングされたスライドは、加湿チャンバー (humidified chamber) で放置した後、UV cross linker でベーク (baking) する過程を行う。

【0230】

このような本発明に係るアレイは、関連技術分野で広く知られている方法によって捕捉一本鎖核酸をスライドガラスに固定させ、スライドを直ちに遠心分離して乾燥させた後、使用するまで遮光状態で保管する。

【0231】

実施例8：アレイハイブリダイゼーション及び分析

【0232】

前記表1-1～表1-3にある標的核酸の特定領域の塩基配列と、捕捉プローブと完全に相補的に結合する領域とを含むターゲットプローブを本発明のアレイの捕捉プローブに処理して60℃で4～12時間ハイブリダイゼーションし、42℃で0.1×SSC溶液で洗浄した。

【0233】

このとき、ハイブリダイゼーション溶液は、1Mの塩化ナトリウム、0.3Mのクエン酸ナトリウム、0.5% SDS、または100 µg/ml のサケ精子DNA、0.2% ウシ血清アルブミンまたは一本鎖核酸を含む。ハイブリダイゼーション (Hybridization) を行った後、アレイを洗浄溶液で洗浄した。

【0234】

このとき、洗浄溶液は、例えば、1×SSC+0.2% SDS、1×SSC+0.2% SDS、0.5×SSC+0.2% SDS、0.01×SSC+0.2% SDSの組成を含み、この順でそれぞれの段階ごとに42℃で30分間行った。

【0235】

実施例9：核酸チップのスポット探索及び分析

【0236】

実施例6の洗浄が終了した後、スライドガラスを遠心分離で乾燥させ、使用済みの蛍光染料を励起 (excitation) するための適切な波長のレーザー (Cy5、635 nm) を有するレーザースキャナー (laser scanner、GenePix 4000、Axon社) を用いて探索した。蛍光イメージは、TIFF (multi image tagged image file) フォーマットで保存した後、適切な画像分析 (image analysis) ソフトウェア (GenePix Pro 3.0、Axon社) で分析した。

【0237】

スポット (spot) 当たりのシグナル強度 (signal intensity、単位：quanta) は、周囲の背景の基本的なシグナルを差し引いたものを使用する。ここで、背景シグナルは、特定のスポットの周囲にある4つのスポットの周辺シグナルからなるローカルバックグラウンド (local background) を意味する。スポットが持っている画素 (pixel) の90%以上が背景シグナル+2標準偏差 (S.D.; standard deviation) を超えるシグナル強度を示すときに、データの分析に含ませ、上記の条件を満たさなければ、データに含ませないスポット (bad spot) に分類し、分析に含ませないのが一般的である。

【0238】

標識効率 (Labeling efficiency) による偏差 (variation) は、内部標準 (internal standard、IS) のシグナルを用いて正規化 (例えば、Normalized Intensity = Probe Intensity / IS intensity) し、単一標識 (monolabeling) をした場合にはCy5チャンネルのシグナル強度 (signal intensity) でその結果を記録し、スポットティング (spotting) が2倍以上になった場合には平均値を使用する。ターゲット一本鎖核酸のシグナル強度 (signal intensity)

、S)は、スポットのピクセル(pixel)に対してそれぞれのシグナル強度を求めた後、これらの中央値(median)を使用する(median value of pixel-by-pixel)。シグナル強度(S)は、内部標準(IS)を用いて標識効率による偏差を正規化する。

【0239】

$$S'(\text{normalized value}) = S(\text{Cy5-reference}) \times (\text{Cy5} - \text{IS})$$

【0240】

上記の方法でピクセル密度の分析結果と実際の試料量との関係を説明し、その相関関係を確認することができる。

10

【0241】

前記実験で得ることが可能な一例である図6を参照すると、アレイ上のスポット蛍光程度で生体試料におけるタンパク質定量分析、mRNA定量分析、DNA変異分析及びDNAメチル化有無分析などを行うことができる。

【0242】

図7は、IL17及びIL17RAに相応するタンパク質、mRNA及びDNA変異を分析するために、オリゴヌクレオチドを用いて部分的二本鎖核酸及び完全な二本鎖核酸を製作した後、これを鋳型としてシグナルプライマーの存在下でPCRを介して標識及び増幅して得たターゲットプローブを、アレイに固着された前記捕捉プローブにハイブリダイゼーションすることにより形成されたイメージである。

20

【0243】

図8において、スポットの蛍光程度は、捕捉プローブと標識物質のあるターゲットプローブとが形成する二本鎖の性質に応じて多様であり、単一の捕捉プローブからなるスポットで標識物質のあるターゲットプローブのシグナルによって決定される。

【0244】

生体分子の標的核酸でPCRして得た増幅産物に由来する標識物質のあるターゲットプローブとアレイ捕捉プローブの塩基配列は一本鎖核酸ー捕捉プローブの二本鎖の安定性に影響を与え、アレイのスポットにある標識物質のあるターゲットプローブの量は蛍光程度に影響を与える。

【0245】

30

したがって、図8の蛍光程度は標識物質のあるターゲットプローブの量を表現し、前記標識物質のあるターゲットプローブの量は生体試料にある標的核酸に相応する生体分子の量を示す。

【0246】

対照区試料と実験区試料から分離される標的核酸から、互いに異なる標識物質、好ましくは、前者はCy3、後者はCy5標識シグナルプライマーを用いてターゲットプローブを準備した場合、すなわち、形成されるスポットが青ー黄ー赤のカラースペクトルを示すことは、捕捉プローブに結合したCy-3標識ターゲットプローブとCy-5標識ターゲットプローブの割合が多様であって現れる現象であり、特定のスポットのカラースペクトルの程度は、対照区試料と実験区試料で特定の生体分子が存在する様相に該当する。

40

【0247】

核酸変異分析のために、スポットのカラースペクトルから、スポットに相応する標的核酸を含む生体試料における標的核酸に相応する特定の遺伝子変異を確認することができる。標的核酸の特定領域の変異ヌクレオチドと完全に相補的に結合する場合にのみ増幅産物が生成され、これを鋳型としたターゲットプローブが作られるため、最終的に形成されたスポットのカラースペクトラムを分析してアレイの全スポットの程度を確認することにより、生体試料における特定遺伝子の変異を確認することができる。つまり、図7において、赤いスポットは、Cy5標識物質によって発生したものであり、変異に関連したシグナルプライマーP2に相応して生体試料におけるアレイ上の捕捉プローブに相応するSNPが存在することを示す。

50

【0248】

メチル化有無を確認するために、メチル化特異上流オリゴヌクレオチドに相応するシグナルプライマーP1はCy3で標識しており、非メチル化上流オリゴヌクレオチドに相応するシグナルプライマーP2はCy5で標識している。図7においてIL17メチル化スポットが青色であるから、本実験に使用された試料のIL17プロモーター144位置のシトシンはメチル化されることが分かる。

【0249】

実施例10：大腸菌の細胞外分子を含む生体分子の分析

【0250】

11-1. Amp^R遺伝子を分析するためのオリゴヌクレオチドの製造

10

【0251】

プラスミドpUC19のAmp^R遺伝子を分析するためのオリゴヌクレオチドの構成は、前記一般式(IV)と一般式(V)に従って前記上流オリゴヌクレオチド及び下流オリゴヌクレオチドを表6のとおりデザインして有機合成した(Bioneer社、韓国)。

【0252】

【表6】

Amp^R遺伝子を分析するためのオリゴヌクレオチド

項目	塩基配列(5'→3')
上流オリゴヌクレオチド(野生型)	5-GCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATG-3
上流オリゴヌクレオチド(変異型)	5-GCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATA-3
下流オリゴヌクレオチド	5-CCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGT-3

20

【0253】

10-2. 細胞表面分子の分析リガンドの製作

【0254】

本発明者によって提案された大腸菌結合一本鎖核酸(韓国特許第10-0730359号参照)の塩基配列は、表7のとおりである。この塩基配列に基づいて、ビオチン一本鎖核酸リガンドとビオチンオリゴヌクレオチドは、一般式(I)に従って、表2-1～表2-2及び表3を参照してデザインして有機合成した(Bioneer社、韓国)。

【0255】

30

【表 7】

大腸菌表面分子に結合するアプタマーの塩基配列

一連番号	塩基配列 (5' → 3')
1	cgcaguuugc gcgcgguucca aguucucuca ucacggaaua
2	acacugcgug cuuacgacuu cuggucccau cauucggcua
3	aguucgauga gggugacacc gccaggagug uuugcuagac
4	acccgucgau aaugacugaa cuuccucua cuuaaagggg
5	ggguaagggg auguuucugg gauucaagcg ccugauucug
6	ucuguauuuug uacgcaccga agauaagaga gggaguggau
7	cauggggcggg ccgcgguuca uucgggauua uugcggaucc
8	ucagggugug aaguucucc gcgcuagugg cuuguauguu
8	gucggggguug caaggcgucg uagcguguau uuugauggu
10	gcguaugggc gggucauuag gacaauuuua ccacucgcga
11	auugucugug ugacuagucg gucuagugug ggggagaaga
12	uuaccacuga guuaauuugu acggucugcg guguaauua
13	gcuaucuaa uuauagaggc ggucggggua gugucaucgu
14	uaggagagcg ggagcugaga acuuagaggc gccgauacac
15	gacguauuac aguaaaguug gcgccauucg auuucugauc
16	auaccagcuu auucaauuau accagcuuau ucaauuuuugu
17	ccguaagucc ggucuuccuu gcugagucgc ccuuucaggu
18	uuggugggga gggccaguua ggucuaauuu ccgacgcgca

10

20

【0256】

前記準備されたビオチン-大腸菌アプタマー (10 μg / μL) 100 μL それぞれに アビジン (7.2 μg / μL) を添加したままで30分間室温におき、前記準備されたビオチン-オリゴヌクレオチド (10 μg / μL) を添加してアプタマー-アビジン-オリゴヌクレオチド構造体を製造した。これをアプタマー分析リガンドと称した。

30

【0257】

10-3. 大腸菌-分析リガンド複合体からの生体分子の分離及び分析

【0258】

大腸菌とアプタマー分析リガンドプールとを反応させた後、大腸菌-アプタマー分析リガンド複合体を洗浄及び分離した。上記で収穫した大腸菌-分析リガンド複合体から、pUC19プラスミド及び大腸菌の表面に結合した一本鎖核酸などを含む総核酸を分離した。分離された総核酸を標的核酸として実施例5と同様の方法で標的DNAを製造した。実施例6と同様の方法で標識及び増幅し、実施例7で製作されたアレイを分析した。大腸菌の表面生体分子のプロファイル及びAmp^R遺伝子を確認した。

40

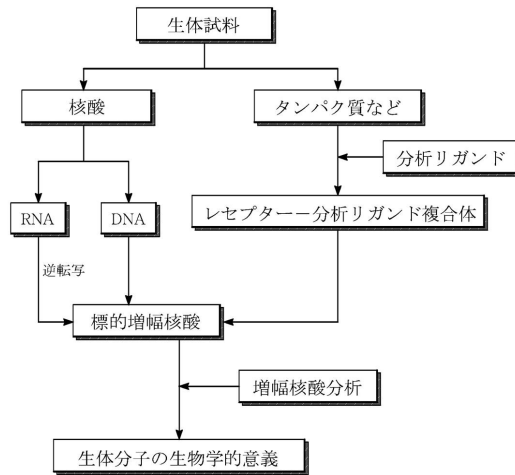
【産業上の利用可能性】

【0259】

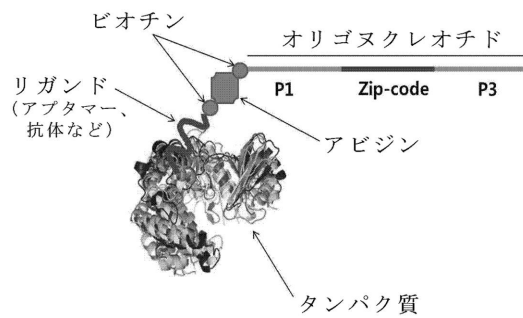
本発明のオリゴヌクレオチドを用いて、生体試料にある生体分子を一度の検査で分析することにより、生体試料の生体分子の生物学的意義を確認することができ、蛍光学的に高感度で検出することができる。したがって、本発明は、一度の検査で様々な生体分子を分析することにより、生体試料における表現型の変化、疾病に対する敏感性、及び治療薬剤に対する反応の違いなど、個人間の差を効率よく決定する方法を提供することが可能なので、人間の疾病の克服に大きく寄与し、経済的に医療産業上非常に有用な効果がある。

50

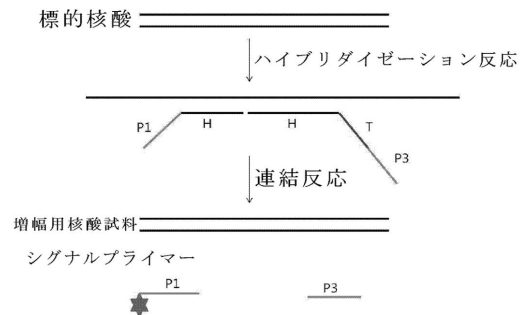
【図 1】



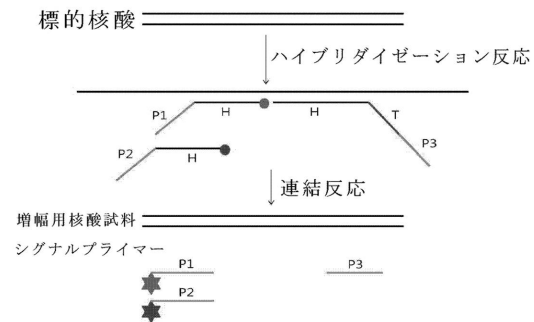
【図 2】



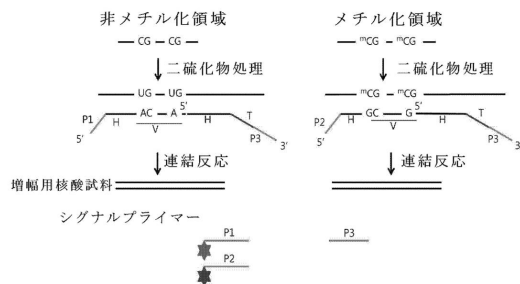
【図 3】



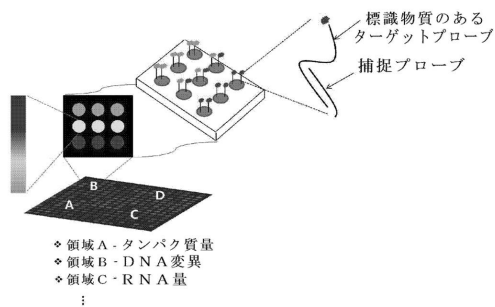
【図 4】



【図 5】



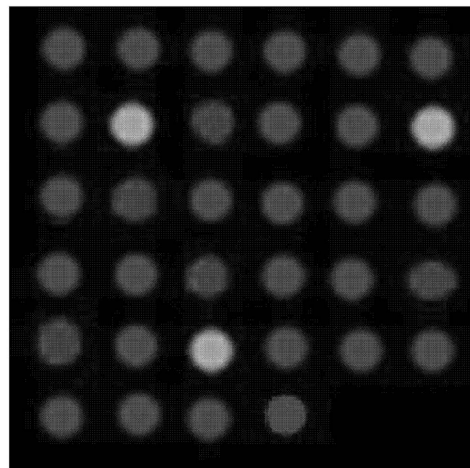
【図 6】



【図 7】

β-actin mRNA_1	β-actin mRNA_2	IL17 mRNA_1	IL17 mRNA_2	IL17RA mRNA_1	IL17RA mRNA_2
IL17 SNP_1	IL17 SNP_2	IL17 SNP_3	IL17 SNP_4	IL17 SNP_5	IL17 SNP_6
IL17 SNP_7	IL17 SNP_8	IL17 SNP_9	IL17 SNP_10	IL17 SNP_11	IL17RA SNP_1
IL17RA SNP_2	IL17RA SNP_3	IL17RA SNP_4	IL17RA SNP_5	IL17RA SNP_6	IL17RA SNP_7
IL17RA SNP_8	IL17RA SNP_9	IL17RA SNP_10	IL17RA SNP_11	IL17RA SNP_12	IL17RA SNP_13
IL17RA SNP_14	IL17 アプタマー	IL17RA アプタマー	IL17 メチル化	-	-

【図 8】



【配列表】

0006325667000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/115 (2010.01) G 0 1 N 33/68
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 H
C 1 2 N 15/00 F

(72)発明者 キム・ソンチョン
大韓民国 03733 ソウル ソデムン－グ トンニンムンゴンウォン－ギル 17 110－
ドン 202－ホ

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 国際公開第2011/162894 (WO, A1)
特表2009-528054 (JP, A)
特表2006-500033 (JP, A)
特表2012-506712 (JP, A)
特表2009-521946 (JP, A)
国際公開第2012/106525 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 33/48-33/98
C 1 2 M 1/00- 3/10
C 1 2 Q 1/00- 3/00
C 1 2 N 15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)