

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5341291号
(P5341291)

(45) 発行日 平成25年11月13日(2013.11.13)

(24) 登録日 平成25年8月16日(2013.8.16)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 M	1/00	(2006.01)	C 12 M	1/00	A
C 12 M	1/34	(2006.01)	C 12 M	1/34	B
C 12 Q	1/68	(2006.01)	C 12 Q	1/68	A
GO 1 N	33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 2 1

請求項の数 24 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-509524 (P2002-509524)
 (86) (22) 出願日 平成13年7月6日 (2001.7.6)
 (65) 公表番号 特表2004-512499 (P2004-512499A)
 (43) 公表日 平成16年4月22日 (2004.4.22)
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2001/003039
 (87) 國際公開番号 WO2002/004671
 (87) 國際公開日 平成14年1月17日 (2002.1.17)
 審査請求日 平成20年7月7日 (2008.7.7)
 (31) 優先権主張番号 0016836.9
 (32) 優先日 平成12年7月7日 (2000.7.7)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

前置審査

(73) 特許権者 505010744
 ダイアグノスティックス フォー ザ リ
 アル ワールド、リミティド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア 940
 85, サニーベール, デルレイ アベニ
 ュ 840
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敏
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ディップスティック検定における改良型結合相互作用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するためのディップスティックであって、以下の：

試料溶液を接触させるための接触端を有するクロマトグラフィーストリップ、
 接触端から離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし得るか、あるいは標的核酸に結合されたフック（鈎針）捕捉プローブとハイブリダイズし得る捕捉プローブであり、捕捉プローブが捕捉プローブスペーサーに連結され、捕捉プローブスペーサーが捕捉帯に連結され、それにより捕捉帯に捕捉プローブを固定し、そして捕捉帯と捕捉プローブとの間に間隔を置く捕捉プローブを含み、

i) 前記捕捉プローブスペーサーが捕捉プローブの一端に連結され、かつ前記捕捉プローブスペーサーに連結されない捕捉プローブの末端が、捕捉プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合に標的核酸とハイブリダイズせず、あるいは捕捉プローブがフック捕捉プローブとハイブリダイズしていた場合にフック捕捉プローブとハイブリダイズしない1つまたはそれ以上のヌクレオチドと結合され；

ii) 前記捕捉プローブスペーサーが捕捉プローブの末端間で捕捉プローブの一部に連結され、かつ前記捕捉プローブの一端または両端が、捕捉プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合に標的核酸とハイブリダイズせず、あるいは捕捉プローブがフック捕捉プローブとハイブリダイズしていた場合にフック捕捉プローブとハイブリダイズしない1

10

20

つまたはそれ以上のヌクレオチドと結合され；

iii) 前記捕捉プローブスペーサーが、標的核酸またはフック捕捉プローブとハイブリダイズしていた場合、生成された塩基対との積重ね相互作用を生じ得るヌクレオ塩基を含むヌクレオチド、3-ヒドロキシプロピルホスフェート又はヘキサエチレングリコールホスフェートを含む；又は

iv) 前記捕捉プローブスペーサーが捕捉帯に直接吸着され、リンカーにより当該捕捉プローブに共有結合したB S Aを含んでなる、

ことを特徴とするディップスティック。

【請求項 2】

前記捕捉プローブスペーサーがB S Aをさらに含んで成り、ここで当該捕捉プローブは前記ヌクレオチドに結合され、当該ヌクレオチドは前記B S Aに結合され、それにより捕捉プローブとB S Aとの間に間隔を置く、請求項1記載のディップスティック。 10

【請求項 3】

ヌクレオチドがリンカーによりB S Aに結合される請求項2記載のディップスティック。 20

【請求項 4】

接触端およびクロマトグラフィーストリップの捕捉帯間に置かれたプローブ帯に放出可能に固定された検出プローブであって、標的核酸とハイブリダイズして、標的核酸の検出を可能にし得る検出プローブをさらに含む請求項1～3のいずれかに記載のディップスティック。 20

【請求項 5】

検出プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合に標的核酸の直接検出を可能にする標識と検出プローブが結合される請求項4記載のディップスティック。

【請求項 6】

検出プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合に標的核酸の直接検出を可能にするために検出リガンド結合部分により結合され得る検出リガンドと検出プローブが結合される請求項4記載のディップスティック。

【請求項 7】

標識または検出リガンドが検出プローブスペーサーに連結され、そして検出プローブスペーサーが検出プローブに連結されて、それにより標識または検出リガンドを検出プローブに結合させて、検出プローブと標識または検出リガンドとの間に間隔を置く請求項5または6記載のディップスティック。 30

【請求項 8】

試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するためのディップスティックであって、以下の：

試料溶液を接触させるための接触端を有するクロマトグラフィーストリップ、

接触端から遠く離れた捕捉帯に固定された捕捉部分であって、標的核酸と直接または間接的に結合し得る捕捉部分、ならびに

接触端および捕捉帯間に置かれたプローブ帯に放出可能に固定された検出プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし得る、そして標識と結合されて、検出プローブを利用した標的核酸の直接的検出を可能にし、あるいは検出リガンドに結合されて検出プローブを利用した標的核酸の間接的検出を可能にする検出プローブ 40

を含み、標識または検出リガンドが検出プローブスペーサーに連結され、そして検出プローブスペーサーが検出プローブに連結されて、それにより標識または検出リガンドを検出プローブに結合し、そして標識または検出リガンドと検出プローブとの間に間隔を置き、

i) 前記検出プローブスペーサーが検出プローブの一端に連結され、かつ前記検出プローブスペーサーに連結されない検出プローブの末端が、検出プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合に標的核酸とハイブリダイズしない1つまたはそれ以上のヌクレオチドと結合され； 50

ii) 前記検出プローブスペーサーが検出プローブの末端間で検出プローブの一部に連結され、かつ前記検出プローブの一端または両端が、検出プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合に標的核酸とハイブリダイズしない1つまたはそれ以上のヌクレオチドと結合され；

iii) 前記検出プローブスペーサーが、標的核酸とハイブリダイズしていた場合、生成された塩基対との積重ね相互作用を生じ得るヌクレオ塩基を含むヌクレオチド、3-ヒドロキシプロピルホスフェート又はヘキサエチレングリコールホスフェートを含む；又は

iv) 前記検出プローブスペーサーがB S Aを含んでなる、
ことを特徴とするディップスティック。

【請求項 9】

10

標識または検出リガンドがビーズまたはビーズの一部に付着され、そしてB S Aがビーズに直接吸着される請求項8記載のディップスティック。

【請求項 10】

B S Aがリンカーにより検出プローブに連結される請求項8または9記載のディップスティック。

【請求項 11】

検出プローブスペーサーがヌクレオチドを含む請求項8～10のいずれかに記載のディップスティック。

【請求項 12】

検出プローブがヌクレオチドに結合され、そしてヌクレオチドがB S Aに結合されて、それにより検出プローブとB S Aとの間に間隔を置く請求項11記載のディップスティック。

20

【請求項 13】

ヌクレオチドがリンカーによりB S Aに結合される請求項12記載のディップスティック。

【請求項 14】

捕捉部分が、標的核酸と、あるいは標的核酸に結合されたフック捕捉プローブとハイブリダイズし得る捕捉プローブを含む請求項8～13のいずれかに記載のディップスティック。

【請求項 15】

30

捕捉部分が、標的核酸に結合された捕捉プローブに結合された捕捉リガンドと結合し得る請求項8～13のいずれかに記載のディップスティック。

【請求項 16】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

請求項1～3のいずれかに記載のディップスティック、ならびに

標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブを利用した標的核酸の検出を可能にし得る検出プローブ

を含むキット。

【請求項 17】

検出プローブが、標的核酸とハイブリダイズされた標的検出プローブの直接的検出を可能にする標識と、あるいは検出リガンド結合部分により標的核酸とハイブリダイズされた検出プローブの間接的検出を可能にする検出リガンドと結合される請求項16記載のキットであって、標識または検出リガンドが検出プローブスペーサーに連結され、そして検出プローブスペーサーが検出プローブに連結されて、それにより標識または検出リガンドを検出プローブに結合し、そして標識または検出リガンドと検出プローブとの間に間隔を置くキット。

40

【請求項 18】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

請求項15記載のディップスティック、ならびに

標的核酸と、または標的核酸に結合されたフック捕捉プローブとハイブリダイズし得る

50

捕捉プローブであって、捕捉部分により結合され得る捕捉リガンドに結合される捕捉プローブ

を含むキット。

【請求項 19】

捕捉リガンドが捕捉プローブに連結され、そして捕捉プローブスペーサーが捕捉プローブに連結されて、それにより捕捉リガンドを捕捉プローブと結合し、そして捕捉リガンドと捕捉プローブの間に間隔を置く請求項18記載のキット。

【請求項 20】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

試料溶液を接触させるための接触端を有するクロマトグラフィーストリップ、および標的核酸と、または標的核酸に結合されたフック捕捉プローブとハイブリダイズし得る捕捉プローブであって、接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定されている捕捉プローブを含むディップスティック、ならびに

標的核酸とハイブリダイズし得る、標識に結合されて検出プローブを利用した標的核酸の直接検出を可能にし、あるいはリガンドに結合されて検出プローブを利用した標的核酸の間接的検出を可能にする検出プローブ

を含み、標識または検出リガンドが検出プローブスペーサーに連結され、そして検出プローブスペーサーが検出プローブに連結されて、それにより標識または検出リガンドを検出プローブに結合して、標識または検出リガンドと検出プローブとの間に間隔を置き、

i) 前記検出プローブスペーサーが検出プローブの一端に連結され、かつ前記検出プローブスペーサーに連結されない検出プローブの末端が、検出プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合に標的核酸とハイブリダイズしない1つまたはそれ以上のヌクレオチドと結合され；

ii) 前記検出プローブスペーサーが検出プローブの末端間で検出プローブの一部に連結され、かつ前記検出プローブの一端または両端が、検出プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合に標的核酸とハイブリダイズしない1つまたはそれ以上のヌクレオチドと結合され；

iii) 前記検出プローブスペーサーが、標的核酸とハイブリダイズしていた場合、生成された塩基対との積重ね相互作用を生じ得るヌクレオ塩基を含むヌクレオチド、3-ヒドロキシプロビルホスフェート又はヘキサエチレングリコールホスフェートを含む；又は

iv) 前記検出プローブスペーサーがB S Aを含んでなる、

ことを特徴とするキット。

【請求項 21】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

試料溶液を接触させるための接触端を有するクロマトグラフィーストリップ、および接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分であって、標的核酸と直接または間接的に結合し得る捕捉部分を含むディップスティック、

標的核酸と、または標的核酸に結合されたフック捕捉プローブとハイブリダイズし得る捕捉プローブであって、捕捉部分により結合され得る捕捉リガンドと結合される捕捉プローブ、ならびに

標的核酸とハイブリダイズし得る、標識に結合されて検出プローブを利用した標的核酸の直接検出を可能にし、あるいは検出リガンドに結合されて検出プローブを利用した標的核酸の間接的検出を可能にする検出プローブ

を含み、標識または検出リガンドが検出プローブスペーサーに連結され、そして検出プローブスペーサーが検出プローブに連結されて、それにより標識または検出リガンドを検出プローブに結合し、そして標識または検出リガンドと検出プローブとの間に間隔を置き、または捕捉プローブが捕捉プローブスペーサーに連結され、そして捕捉プローブスペーサーが捕捉リガンドに連結されて、それにより捕捉リガンドを捕捉プローブに結合し、捕捉リガンドと捕捉プローブとの間に間隔を置き、そして

i) 前記スペーサーがプローブの一端に連結され、かつ前記スペーサーに連結されない

10

20

30

40

50

プローブの末端が、プローブが標的核酸又はフック捕捉プローブとハイブリダイズしていた場合に標的核酸とハイブリダイズしない1つまたはそれ以上のヌクレオチドと結合され；

ii) 前記スペーサーがプローブの末端間でプローブの一部に連結され、かつ前記プローブの一端または両端が、プローブが標的核酸又はフック捕捉プローブとハイブリダイズしていた場合に標的核酸とハイブリダイズしない1つまたはそれ以上のヌクレオチドと結合され；

iii) 前記スペーサーが、標的核酸はフック捕捉プローブとハイブリダイズしていた場合、生成された塩基対との積重ね相互作用を生じ得るヌクレオ塩基を含むヌクレオチド、3-ヒドロキシプロピルホスフェート又はヘキサエチレングリコールホスフェートを含む；又は

iv) 前記スペーサーがB S Aを含んでなる、
ことを特徴とするキット。

【請求項22】

ディップスティックアッセイにおいて標的核酸を検出するためのディップスティックアッセイプローブであって、当該プローブは標的核酸にハイブリダイズすることができる核酸又は核酸類似体と、当該プローブを使用して標的核酸の直接的な検出を可能にするラベル又は当該プローブを使用して標的核酸の間接的な検出を可能にするリガンドを含み、ここで当該ラベル又はリガンドはスペーサーに結合され、そしてこのスペーサーは核酸又は核酸類似体に結合され、これにより当該ラベル又はリガンドは当該核酸又は核酸類似体とは間隔を置き、そして

i) 前記スペーサーがプローブの一端に連結され、かつ前記スペーサーに連結されないプローブの末端が、プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合に標的核酸とハイブリダイズしない1つまたはそれ以上のヌクレオチドと結合され；

ii) 前記スペーサーが、3-ヒドロキシプロピルホスフェート又はヘキサエチレングリコールホスフェートを含む；又は

iii) 前記スペーサーがB S Aを含んでなる、
ことを特徴とする、ディップスティックアッセイプローブ。

【請求項23】

ディップスティックアッセイにおいて標的核酸を捕捉するためのディップスティックアッセイプローブであって、当該プローブは標的核酸にハイブリダイズすることができる核酸又は核酸類似体と、当該プローブを使用して標的核酸の捕捉を可能にするリガンドを含み、ここで当該リガンドはスペーサーに結合され、そしてこのスペーサーは核酸又は核酸類似体に結合され、これにより当該リガンドは当該核酸又は核酸類似体とは間隔を置き、そして

i) 前記スペーサーがプローブの一端に連結され、かつ前記スペーサーに連結されないプローブの末端が、プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合に標的核酸又はフック捕捉プローブとハイブリダイズしない1つまたはそれ以上のヌクレオチドと結合され；

ii) 前記スペーサーがプローブの末端間でプローブの一部に連結され、かつ前記プローブの一端または両端が、プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合に標的核酸又はフック捕捉プローブとハイブリダイズしない1つまたはそれ以上のヌクレオチドと結合され；

iii) 前記スペーサーが、当該スペーサーが標的核酸にハイブリダイズしていた場合に生成される塩基対との積重ね相互作用を生じ得るヌクレオ塩基を含むヌクレオチド；3-ヒドロキシプロピルホスフェート；又はヘキサエチレングリコールホスフェートを含む；又は

iv) 前記スペーサーがB S Aを含んでなる、
ことを特徴とする、ディップスティックアッセイプローブ。

【請求項24】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載のディップスティック、又は請求項 16 ~ 21 のいずれかに記載のキット又は請求項 22 又は 23 記載のプローブを使用することを含んで成る、試料液中の標的核酸の存在を試験するための方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、ディップスティックによる核酸検出強化に関する。本発明のディップスティックは、例えばクラミジア属細菌のトラコーマクラミジア *Chlamydia trachomatis* のような病原性微生物に患者が感染しているか否かを同定するために、試料溶液中の標的核酸の存在を検出するために用いられる。

【0002】

10

試料溶液中の標的核酸の存在を検出するためのいくつかの慣用的試験は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いた標的核酸の増幅によっている。この反応は少量の標的核酸の検出を可能にする一方、それは結果が得られる前に数時間要する。これは、例えば患者の待ち時間を最小限にするために、しばしばできるだけ速く結果を得ることが望ましいため、有意の欠点を有し得る。このような方法のさらなる欠点は、反応を実施するための高価な専門家装備および相対的に高価な試薬に対する要件である。

【0003】

これに対照するものとして、ディップスティックは、任意の専門家装備を必要とせずに非増幅化標的核酸を検出し得るし、結果は、PCR ベースの方法よりはるかに迅速に得られる。その場合、患者は同一来院で治療され得る。これは、患者が後日戻ってくる見込みはありそうもなく、またはそれはできない場合に特に有益である。

20

【0004】

米国特許第5,310,650号に記載された典型的慣用的ディップスティックでは、一本鎖 DNA 捕捉プローブは、フィルターの一端(接触端)から離れた捕捉帯でニトロセルロースフィルター上に固定される。捕捉プローブの配列の一部は、検出される標的核酸の一次領域の配列と相補的である。標的化一本鎖 DNA 検出プローブは、フィルターの捕捉帯および接触端間に位置するプローブ帯でニトロセルロースフィルター上に固定される。検出プローブは、標的核酸の二次領域(一次領域とは異なる)の配列と相補的な配列を有する。

【0005】

30

標的 DNA を含有すると思われる試料溶液中の一本鎖標的 DNA を検出するために、ニトロセルロースフィルターの接触端は試料溶液と接触される。試料溶液は毛管作用によりフィルターに吸い上げられ、プローブ帯および捕捉帯を通過する。試料溶液がプローブ帯を通過すると、それは検出プローブを流動させて、それを捕捉帯に向かって試料溶液とともに上昇させる。流動化検出プローブは次に、試料溶液中に存在する任意の標的 DNA の二次領域とハイブリダイズし得る。

【0006】

ハイブリダイズ化検出プローブおよび標的 DNA が捕捉帯に達すると、標的 DNA の一次領域は固定化捕捉プローブとハイブリダイズし得る。それにより三成分複合体が、標的核酸、捕捉プローブおよび標識化検出プローブ間に形成される。したがって捕捉帯での標識の存在は、標的 DNA が試料溶液中に存在することを示す。

40

【0007】

第二の型の慣用的ディップスティックに関しては、標識化 DNA 検出プローブはニトロセルロースフィルター上に固定されない。その代わり、検出プローブは、検出プローブと試料溶液中の任意の標的核酸とのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で試料溶液に付加される。次にニトロセルロースフィルターの接触端が試料溶液と接触され、試料溶液がディップスティックに吸い上げられると、検出プローブとハイブリダイズされる任意の標的核酸が、捕捉プローブにより捕捉帯で捕捉され得る。

【0008】

しかしながら慣用的ディップスティックによる核酸検出の感度は低い可能性がある。標的核酸が二本鎖である場合には、ディップスティック検出の感度は低いことがある。した

50

がって試料溶液中の標的核酸の存在は、時としては検出され得ない。したがってディップスティックによる標的核酸検出の感度を改良するのが望ましい。

【0009】

本発明の第一の局面によれば、試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するためのディップスティックであって、以下の：

試料溶液を接触させるための接触端を有するクロマトグラフィーストリップ、ならびに接触端から離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし得るか、あるいは標的核酸に結合されたフック捕捉プローブとハイブリダイズし得る捕捉プローブであり、捕捉プローブが捕捉プローブスペーサーに連結され、捕捉プローブスペーサーが捕捉帯に連結され、それにより捕捉帯に捕捉プローブを固定し、そして捕捉帯と捕捉プローブとの間に間隔を置く捕捉プローブを含むディップスティックが提供される。

【0010】

「クロマトグラフィーストリップ」という用語は、毛管作用により溶液を輸送し得る物質の任意の多孔性ストリップを意味するために本明細書中で用いられる。

捕捉プローブスペーサーは、捕捉プローブが標的核酸またはフックプローブとハイブリダイズし得るのを防止することなく、捕捉プローブと捕捉帯との間に間隔を置く任意の構成成分を含み得る。好ましくは捕捉プローブスペーサーは、生体高分子を含む。

【0011】

捕捉プローブスペーサーは、タンパク質を含み得る。「タンパク質」という用語は、1つまたはそれ以上のアミノ酸残基を含む任意の化合物を意味するために本明細書中で用いられる。好ましいタンパク質の例は、天然タンパク質、好ましくはウシ血清アルブミン(B S A)、チログロブリンまたはその誘導体である。誘導体としては、アミノ酸置換、付加または欠失により、あるいは翻訳後修飾によりB S Aまたはチログロブリンとは異なるタンパク質が挙げられる。

【0012】

捕捉プローブをタンパク質スペーサーに連結するためには、捕捉プローブを機能的にすることが一般的に必要である。これは、捕捉プローブと反応し得る一次反応基およびタンパク質と反応し得る二次反応基を含む変性剤の使用によりなされ得る。適切な変性剤は、ホスホルアミダイト基および第一アミノ基(または使用前に脱保護化される保護化第一アミノ基)を含む。ホスホルアミダイト基は、ヒドロキシリル基(捕捉プローブが核酸である場合、通常は捕捉プローブの5' - OHまたは3' - OH)と反応し得るし、第一アミノ基はタンパク質のカルボキシリル基と反応し得る。適切な変性剤の例は、6-(トリフルオロアセチルアミノ)ヘキシリル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホルアミダイト(C 6-T F A)である。その他の適切な変性剤は、当業者に既知である。

【0013】

一旦変性剤が捕捉プローブおよびタンパク質と反応して、捕捉プローブをタンパク質に連結すれば、反応化変性剤は、本明細書中では「リンカー」と呼ばれる。

好ましくはタンパク質は、捕捉プローブに直接吸着される。

慣用的ディップスティックでは、検出プローブまたは捕捉プローブは、共有結合、吸着、熱の使用により、またはU V 架橋によりディップスティックに固定される。しかしながら、タンパク質は、捕捉プローブより容易に且つ効率的にディップスティックに固定され得る、ということが判明した。その結果として、捕捉帯へのタンパク質の直接吸着は、慣用的固定よりも、ディップスティックに捕捉プローブを固定するより便利で且つより効率的な手段である。

【0014】

捕捉プローブスペーサーは、非タンパク質を含み得る。好ましい配置では、捕捉プローブスペーサーは、タンパク質および非タンパク質を含み、捕捉プローブは非タンパク質に結合され、そして非タンパク質はタンパク質に結合されて、それにより捕捉プローブとタンパク質との間に間隔を置く。

10

20

30

40

50

タンパク質に非タンパク質を連結するためには、非タンパク質と反応し得る一次反応基およびタンパク質と反応し得る二次反応基を含む変性剤を用いることが一般的に必要である。

【0015】

ヘキシル基を含む非タンパク質とともに用いるための適切な変性剤は、6-(トリフルオロアセチルアミノ)ヘキシル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホルアミダイト(C6-TFA)である。その他の適切な変性剤は、当業者に既知である。

一旦変性剤が非タンパク質およびタンパク質と反応して、非タンパク質をタンパク質に連結すれば、反応化変性剤は、本明細書中では「リンカー」と呼ばれる。

【0016】

適切な非タンパク質スペーサー構成成分の例としては、1',2'-ジデオキシリボースホスフェート(dS)、3-ヒドロキシプロピルホスフェート(SC₃)およびヘキサエチレングリコールホスフェート(S)が挙げられる。これらの化合物の化学構造は、図1に示されている。

しかしながら好ましくは、非タンパク質は、捕捉プローブが標的核酸またはフック捕捉プローブとハイブリダイズしていた場合、形成された塩基対と積重ね相互作用を生じ得るヌクレオ塩基を含む。さらに好ましくは、非タンパク質はヌクレオチドを含む。もっとも好ましくは、非タンパク質は1つまたはそれ以上のヌクレオチドのみからなる。

【0017】

好ましくは非タンパク質は、少なくとも3ヌクレオチドモノマー長である。1つのヌクレオチドモノマー(N)の長さは、1個の1',2'-ジデオキシリボースホスフェート(dS)または1個の3-ヒドロキシプロピルホスフェート(SC₃)の長さとほぼ等しい。3個のヌクレオチドモノマーは、1個のヘキサエチレングリコールホスフェート(S)の長さとほぼ等しい。

【0018】

捕捉プローブスペーサーは、捕捉プローブが標的核酸またはフック捕捉プローブとハイブリダイズするのを妨げない捕捉プローブの任意の部分に連結され得る。捕捉プローブスペーサーが捕捉プローブの末端間の捕捉プローブの一部分に連結される場合、捕捉プローブの一端または両端は、捕捉プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合には標的核酸とハイブリダイズせず、あるいは捕捉プローブがフック捕捉プローブとハイブリダイズしていた場合にはフック捕捉プローブとハイブリダイズしない1つまたはそれ以上のヌクレオチド、好ましくは少なくとも3つのヌクレオチドと結合され得る。

【0019】

好ましくは捕捉プローブスペーサーは、捕捉プローブの一端に連結される。捕捉プローブスペーサーが捕捉プローブの一端に連結される場合、捕捉プローブスペーサーに連結されない捕捉プローブの末端は、捕捉プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合には標的核酸とハイブリダイズせず、あるいは捕捉プローブがフック捕捉プローブとハイブリダイズしていた場合にはフック捕捉プローブとハイブリダイズしない1つまたはそれ以上のヌクレオチド、好ましくは少なくとも3つのヌクレオチドと結合され得る。

【0020】

フック捕捉プローブは、標的核酸とハイブリダイズし得る一次領域および捕捉プローブとハイブリダイズし得る二次領域を含み、それにより標的核酸との捕捉プローブの間接的結合を可能にする。フック捕捉プローブは、少なくとも1つの核酸または核酸類似体を含み得る。

本発明の第一の局面のディップスティックは、試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、標的核酸とハイブリダイズし得る検出プローブが、標的核酸との検出プローブのハイブリダイゼーションのための条件下で試料溶液とともにインキュベートされる方法に用いられ得る。ディップスティックの接触端は試料溶液と接触され、もう監査用により試料溶液がディップスティックを上昇するのを可能にする。試料溶液中の検出プローブとハイブリダイズされた標的核酸は次に、捕捉帯で捕捉プローブにより捕捉され得る

10

20

30

40

50

。次に試料溶液中の標的核酸の存在が、捕捉帯での検出プローブの存在により示される。

【0021】

したがって本発明は、試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

本発明の第一の局面のディップスティック、および

標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブを利用した標的核酸の検出を可能にし得る検出プローブ

を含むキットも提供する。

【0022】

試料溶液とともに検出プローブをインキュベートする代わりに、検出プローブは、例えば接触端とクロマトグラフィーストリップの捕捉帯との間のプローブ帯でディップスティックに放出可能に固定され得る。試料溶液中の標的核酸の存在について試験するためには、試料溶液が毛管作用によりディップスティックに吸い上げられるよう、ディップスティックの接触端が試料溶液と接触され得る。試料溶液がディップスティックのプローブ帯を通過すると、検出プローブが試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズし、そして標的核酸とともに捕捉帯に移動し得るよう、それが検出プローブを流動化する。検出プローブとハイブリダイズされた標的核酸は、試料溶液が捕捉帯を通過すると、捕捉プローブにより捕捉される。次に試料溶液中の標的核酸の存在が、捕捉帯での検出プローブの存在により示される。

【0023】

検出プローブは標的に結合され、それにより捕捉帯での標的核酸の直接検出を可能にする。あるいは検出プローブは、検出リガンドに結合されて、検出リガンド結合部分を用いた標的核酸の間接的検出を可能にする。標識または検出リガンドは、検出プローブに連結される検出プローブスペーサーに連結され、それにより標識または検出リガンドを検出プローブに結合して、標識または検出リガンドと検出プローブとの間に間隔を置く。

【0024】

本発明の第二の局面によれば、試料溶液中の標的核酸の存在について試験するためのディップスティックであって、以下の：

試料溶液を接触させるための接触端を有するクロマトグラフィーストリップ、

接触端から遠く離れた捕捉帯に固定された捕捉部分であって、標的核酸と直接または間接的に結合し得る捕捉部分、ならびに

接触端および捕捉帯間に置かれたプローブ帯に放出可能に固定された検出プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし得る、そして標的と結合されて、検出プローブの直接的検出を可能にし、あるいは検出リガンドに結合されて検出プローブの間接的検出を可能にする検出プローブ

を含むディップスティックであって、標識または検出リガンドが検出プローブスペーサーに連結され、そして検出プローブスペーサーが検出プローブに連結されて、それにより標識または検出リガンドを検出プローブに結合し、そして標識または検出リガンドと検出プローブとの間に間隔を置くディップスティックが提供される。

【0025】

検出プローブスペーサーは、検出プローブが標的核酸とハイブリダイズし得るのを妨げることなく、検出プローブと標識またはリガンドとの間に間隔を置く任意の構成成分を含み得る。好ましくは検出プローブスペーサーは生体高分子を含む。

検出プローブスペーサーは、タンパク質を含み得る。「タンパク質」という用語は、1つまたはそれ以上のアミノ酸残基を含む任意の化合物を意味するために本明細書中で用いられる。好ましいタンパク質の例は、天然タンパク質、例えばウシ血清アルブミン(BSA)、チログロブリンまたはその誘導体である。誘導体としては、アミノ酸置換、付加または欠失により、あるいは翻訳後修飾により BSA またはチログロブリンとは異なるタンパク質が挙げられる。

【0026】

10

20

30

40

50

検出プローブをタンパク質スペーサーに連結するためには、検出プローブを機能的にすることが一般的に必要である。これは、検出プローブと反応し得る一次反応基およびタンパク質と反応し得る二次反応基を含む変性剤の使用によりなされ得る。

適切な変性剤の例は、6-(トリフルオロアセチルアミノ)ヘキシル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホルアミダイト(C6-TFA)である。その他の適切な変性剤は、当業者に既知である。

【0027】

一旦変性剤が検出プローブおよびタンパク質と反応して、検出プローブをタンパク質に連結すれば、反応化変性剤は、本明細書中では「リンカー」と呼ばれる。

標識または検出リガンドは、ビーズのような粒子の一部であり得るか、またはそれに付着される。好ましくはタンパク質は、標識または検出リガンドに直接吸着される。

【0028】

検出プローブスペーサーは、非タンパク質を含み得る。好ましい配置では、検出プローブスペーサーは、タンパク質および非タンパク質を含み、検出プローブは非タンパク質に結合され、そして非タンパク質はタンパク質に結合されて、それにより検出プローブとタンパク質との間に間隔を置く。

タンパク質に非タンパク質を連結するためには、非タンパク質と反応し得る一次反応基およびタンパク質と反応し得る二次反応基を含む変性剤を用いることが一般的に必要である。ヘキシル基を含む非タンパク質とともに用いるための適切な変性剤は、6-(トリフルオロアセチルアミノ)ヘキシル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホルアミダイト(C6-TFA)である。その他の適切な変性剤は、当業者に既知である。

【0029】

一旦変性剤が非タンパク質およびタンパク質と反応して、非タンパク質をタンパク質に連結すれば、反応化変性剤は、本明細書中では「リンカー」と呼ばれる。

その他の配置では、検出プローブスペーサーは非タンパク質のみを含む。このような配置に関しては、標識または検出リガンドに非タンパク質を連結するためには、非タンパク質を機能的にすることが一般的に必要である。これは、非タンパク質と反応し得る一次反応基および標識または検出リガンドと反応し得る二次反応基を含む変性剤を用いることによりなされ得る。

【0030】

非タンパク質がヒドロキシル基を含み、そして標識または検出リガンドがカルボキシル基を含む場合、適切な変性剤は、ホスホルアミダイト基および第一アミノ基(または使用前に脱保護される保護化第一アミノ基)を含む。6-(トリフルオロアセチルアミノ)ヘキシル-(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)-ホスホルアミダイト(C6-TFA)は適例である。その他の適切な変性剤は、当業者に既知である。

【0031】

適切な非タンパク質検出プローブスペーサー構成成分の例としては、1',2'-ジデオキシリボースホスフェート(dS)、3-ヒドロキシプロピルホスフェート(S_{C3})およびヘキサエチレングリコールホスフェート(S)が挙げられる。

しかしながら好ましくは、非タンパク質は、検出プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合、形成された塩基対と積重ね相互作用を生じ得る塩基を含む。さらに好ましくは、非タンパク質はヌクレオチドを含む。もっとも好ましくは、非タンパク質は1つまたはそれ以上のヌクレオチドのみからなる。

【0032】

好ましくは非タンパク質は、少なくとも3ヌクレオチド長である。

検出プローブスペーサーは、検出プローブが標的核酸とハイブリダイズするのを妨げない検出プローブの任意の部分に連結され得る。検出プローブスペーサーが検出プローブの末端間の検出プローブの一部分に連結される場合、検出プローブの一端または両端は、検出プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合には標的核酸とハイブリダイズしな

10

20

30

40

50

い1つまたはそれ以上のヌクレオチド、好ましくは少なくとも3つのヌクレオチドと結合され得る。

【0033】

好ましくは検出プローブスペーサーは、検出プローブの一端に連結される。検出プローブスペーサーが検出プローブの一端に連結される場合、検出プローブスペーサーに連結されない検出プローブの末端は、検出プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合には標的核酸とハイブリダイズしない1つまたはそれ以上のヌクレオチド、好ましくは少なくとも3つのヌクレオチドと結合され得る。

【0034】

捕捉部分は、塩基対合により、または非塩基対合相互作用により、標的核酸と直接または間接的に結合し得る。10

例えば捕捉部分は、標的核酸と直接的にハイブリダイズし得る捕捉プローブを含み得る。あるいは捕捉部分は、標的核酸に結合されたフック捕捉プローブとハイブリダイズし得る捕捉プローブを含み得る。

【0035】

捕捉部分は、標的核酸に結合された捕捉プローブに結合される捕捉リガンドと結合して、それにより捕捉部分と標的核酸との間接的結合を可能にし得る。例えば捕捉部分は、抗体または抗体断片であり得る。捕捉プローブが捕捉リガンドに連結され得る場合、捕捉プローブは、捕捉リガンドと捕捉プローブとの間に間隔を置くために、捕捉リガンドに連結される捕捉プローブスペーサーに連結され得る。20

【0036】

フック捕捉プローブは、それが試料溶液中の標的核酸と結合し、試料溶液が毛管作用によりディップスティックに吸い上げられると、捕捉プローブにより捕捉され得るよう、試料溶液に付加され得る。

捕捉プローブ、フック捕捉プローブおよび検出プローブは各々、少なくとも1つの核酸または核酸類似体を含み得る。プローブが1つより多い核酸または核酸類似体を含む場合、それらは好ましくは一緒にハイブリダイズされる。

【0037】

本発明は、試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するためめキットであって、以下の：30

捕捉部分が、標的核酸に結合された捕捉プローブに結合された捕捉リガンドと結合し得る本発明の第二の局面によるディップスティック、ならびに

標的核酸と、または標的核酸に結合されたフック捕捉プローブとハイブリダイズし得る捕捉プローブであって、捕捉部分により結合され得る捕捉リガンドに結合される捕捉プローブ

を含むキットも提供する。

【0038】

適切な標識の例としては、テキスタイル染料、金属ゾル、例えばコロイド金および着色粒子、例えば着色ラテックス粒子が挙げられる。このような標識は、検出プローブに直接結合され得るか、あるいは検出プローブが検出リガンドに結合される場合には、検出リガンド結合部分に結合され得る。40

適切な捕捉または検出リガンドの例としては、ビオチン（例えば抗ビオチン抗体、アビジン、ストレプタビジンまたはその誘導体により捕捉または検出される）、フルオロセイン（例えば抗フルオレスイン抗体により捕捉または検出される）、および2,4-ジニトロフェノール(DNP)（例えば抗DNP抗体により捕捉または検出される）が挙げられる。

【0039】

検出プローブは、標的核酸に結合されたフック検出プローブとハイブリダイズし得る普遍検出プローブを含み得る。普遍検出プローブは標識または検出リガンドに連結され、それにより検出プローブの検出を可能にし得る。50

本発明のキットおよびディップスティックは、試料溶液中の標的核酸を検出するために用いられるキットに必要な任意の試薬をさらに含み得る、と理解される。例えば、検出リガンドに結合された検出プローブを含む本発明のキットは、検出リガンド結合部分をさらに含み得る。これは、ディップスティックに分離されるか、あるいは接触端および捕捉帯間のディップスティックに放出可能的に固定され得る。

【0040】

検出リガンド結合部分は、抗体または抗体断片、あるいは非抗体を含み得る。例えば検出リガンドがビオチンを含む場合、検出リガンド結合部分は、ビオチン結合活性を保持する抗ビオチン抗体、ストレプタビジン、アビジンまたはその誘導体を含み得る。好ましくは検出リガンド結合部分は標識され、それにより検出プローブおよび検出リガンド結合部分を用いた標的核酸の間接的検出を可能にする。10

【0041】

本発明は、スペーサーに連結された検出プローブおよび/または捕捉プローブの使用に関すると、そして検出プローブまたは捕捉プローブは標的核酸の検出方法によってディップスティックに固定されるかまたは試料溶液とともにインキュベートされ得る、と理解される。

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

i) 試料溶液を接触させるための接触端を有するクロマトグラフィーストリップ、および標的核酸と、または標的核酸に結合されたフック捕捉プローブとハイブリダイズし得る捕捉プローブであって、接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定されている捕捉プローブを含むディップスティック、ならびに20

i i) 標的核酸とハイブリダイズし得る、標識に結合されて検出プローブを利用した標的核酸の直接的検出を可能にする、あるいはリガンドに結合されて検出プローブを利用した標的核酸の標的核酸の間接的検出を可能にする検出プローブ

を含むキットであって、標識または検出リガンドが検出プローブスペーサーに連結され、そして検出プローブスペーサーが検出プローブに連結されて、それにより標識または検出リガンドを検出プローブに結合し、標識または検出リガンドと検出プローブとの間に間隔を置くキットも本発明により提供される。

【0042】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

i) 試料溶液を接触させるための接触端を有するクロマトグラフィーストリップ、および接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分であって、標的核酸と直接または間接的に結合し得る捕捉部分を含むディップスティック、30

i i) 標的核酸と、または標的核酸に結合されたフック捕捉プローブとハイブリダイズし得る捕捉プローブであって、捕捉部分により結合され得る捕捉リガンドに結合される捕捉プローブ、ならびに

i i i) 標的核酸とハイブリダイズし得る、標識に結合されて検出プローブを利用した標的核酸の直接検出を可能にし、あるいは検出リガンドに結合されて検出プローブを利用した標的核酸の間接的検出を可能にする検出プローブ

を含むキットであって、標識または検出リガンドが検出プローブスペーサーに連結され、そして検出プローブスペーサーが検出プローブに連結されて、それにより標識または検出リガンドを検出プローブに結合し、そして標識または検出リガンドと検出プローブとの間に間隔を置くキットも本発明により提供される。40

【0043】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

i) 試料溶液を接触させるための接触端を有するクロマトグラフィーストリップ、および接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分を含むディップスティック、

i i) 標的核酸と、または標的核酸に結合されたフック捕捉プローブとハイブリダイズし得る捕捉プローブであって、捕捉プローブが捕捉プローブスペーサーに連結され、そし50

て捕捉プローブスペーサーが捕捉リガンドに連結されて、それにより捕捉リガンドを捕捉プローブに結合し、捕捉リガンドと捕捉プローブとの間に間隔を置く捕捉プローブ、ならびに

i i i) 標的核酸とハイブリダイズし得る、標識に結合されて検出プローブを利用した標的核酸の直接検出を可能にし、あるいは検出リガンドに結合されて検出プローブを利用した標的核酸の間接的検出を可能にする検出プローブ

を含むキットも本発明により提供される。

【 0 0 4 4 】

本発明のさらなる局面によれば、固相にプローブを固定するための方法であって、タンパク質に結合されたプローブを提供し、そしてタンパク質を固相に吸着することを包含する方法が提供される。10

固相にプローブを固定するための本発明の方法は、プローブをタンパク質に結合することをさらに包含し得る。

【 0 0 4 5 】

プローブは好ましくはリンカーに結合され、そしてリンカーはタンパク質に結合される。プローブは、好ましくはリンカーがタンパク質に結合される前にリンカーに結合される。。

プローブは、核酸または核酸類似体を包含し得る。

リンカーは、好ましくはプローブの非ヌクレオ塩基部分に結合される。プローブが核酸を含む場合、リンカーは好ましくはプローブの糖またはホスフェート基に結合される。プローブが核酸類似体 P N A (タンパク質核酸)を含む場合、リンカーは好ましくはプローブのアミノ基に結合される。これは、リンカーがヌクレオ塩基の塩基対合を妨害しないようにということである。あるいはリンカーは、プローブおよびその結合相手の塩基対合相互作用をリンカーが妨害しないよう、プローブの結合相手(例えば標的核酸)とハイブリダイズし得るプローブの部分の 5' または 3' に結合され得る。20

【 0 0 4 6 】

プローブは、好ましくは、リンカーに結合されたホスホルアミダイト基とプローブのヒドロキシル基との反応により、またはリンカーのヒドロキシル基とプローブに結合されたホスホルアミダイト基との反応により、リンカーに結合される。

リンカーは好ましくは、リンカーに結合された第一アミノ基とタンパク質のカルボキシル基との反応により、タンパク質に結合される。30

【 0 0 4 7 】

固相は、膜を、好ましくはニトロセルロース膜を含み得る。あるいは固相は、ビーズのような粒子を含み得る。

プローブに結合されたタンパク質の固相への吸着により固相に固定されたプローブも、本発明により提供される。

試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するためのディップスティック検定における本発明のディップスティック、キットまたはプローブの使用も、本発明により提供される。。

【 0 0 4 8 】

捕捉プローブスペーサーに連結された捕捉プローブが標的核酸とのハイブリダイゼーションのために利用可能であるため、捕捉プローブスペーサーを有する本発明のディップスティックの感度は改良される、と考えられる。捕捉プローブはそれにより、標的核酸とのハイブリダイゼーションのために利用可能であり、そして捕捉リガンドが捕捉部分による結合のために利用可能であるため、捕捉プローブが捕捉プローブスペーサーにより捕捉リガンドに結合される本発明のディップスティックまたはキットの感度は改良され得る。40

【 0 0 4 9 】

同様に、検出プローブスペーサーが標的核酸とのハイブリダイゼーションのために検出プローブをより利用可能にするために、検出プローブを標識に結合する検出プローブスペ50

ーサーを有する本発明のディップスティックまたはキットの感度は改良される、と考えられる。検出プローブが検出プローブスペーサーにより検出リガンドに結合される場合、検出プローブは標的核酸とのハイブリダイゼーションのためにより利用可能であり、そして検出プローブリガンドも検出リガンド結合部分に対してより利用可能であり得る、と考えられる。

【0050】

ヌクレオチドまたはヌクレオ塩基が、捕捉プローブまたは検出プローブと標的核酸との間に形成される塩基対との積重ね相互作用を生じ得るために、本発明によるヌクレオ塩基を含むスペーサーの使用は特に有効であると考えられる。積重ね相互作用の生成は、捕捉プローブまたは検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し、それによりディップスティックの捕捉帯での標的核酸の捕捉または検出の効率を改良すると考えられる。10

【0051】

適切な場合、本発明のディップスティックおよびキットは、試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するための以下の種類のディップスティック検定において用いられ得る：

1) 接触端を有するクロマトグラフィーストリップおよび接触端から遠く離れた捕捉帯で固定された捕捉プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし得る捕捉プローブを含むディップスティックが提供される。検出プローブは、検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下で試料溶液と接触される。試料溶液は、ディップスティックの接触端と接触されて、毛管作用により試料溶液を捕捉帯に移動させ、それにより標的核酸および検出プローブを試料溶液とともに捕捉帯に移動させ、そして標的核酸を捕捉帯で捕捉させる。検出プローブは次に、捕捉帯で検出され得る。捕捉帯での検出プローブの存在は、標的核酸が試料溶液中に存在したことを示す。20

【0052】

この検定の変法では、検出プローブは、ディップスティックから分離される代わりに、接触端および捕捉帯間のディップスティックに放出可能的に固定され得る。ディップスティックの接触端が試料溶液と接触された場合、試料溶液が捕捉帯に移動すると、放出検出プローブが試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズし得るよう、毛管作用により試料溶液が捕捉帯に移動されて、検出プローブが試料溶液中に放出される。

【0053】

この検定のさらなる変法では、検出プローブは試料溶液から分離され、そしてディップスティックの捕捉帯と接触される。これは通常は、ディップスティックの接触端が試料溶液と接触された後に実行される。検出プローブは捕捉帯と直接接触され得るし、あるいは検出プローブは、ディップスティックの接触端と接触されて、毛管作用によりプローブ溶液を捕捉帯に移動させる別個のプローブ溶液中に存在し得る。30

【0054】

2) 接触端を有するクロマトグラフィーストリップおよび接触端から遠く離れた捕捉帯で固定された捕捉部分であって、標的核酸にハイブリダイズされた捕捉プローブを結合し得る捕捉部分を含むディップスティックが提供される。捕捉プローブは、捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下で試料溶液と接触される。試料溶液は、ディップスティックの接触端と接触されて、毛管作用により試料溶液を捕捉帯に移動させ、それにより標的核酸および捕捉プローブを試料溶液とともに捕捉帯に移動させ、そして捕捉部分を捕捉プローブに結合することにより標的核酸を捕捉帯で捕捉させる。標的核酸は次に、捕捉帯で検出され得る。標的核酸は、検定(1)に関して記載したような検出プローブを用いて検出され得る。検出プローブは、捕捉プローブと一緒に、または捕捉プローブとは別々に(任意の順序で)、試料溶液に付加され得る。あるいは、検出プローブは、接触端および捕捉帯間のディップスティックに放出可能的に固定され得るし、あるいは別個に、検定(1)に関して記載されたような捕捉帯と接触され得る。40

【0055】

この検定(2)の変法では、捕捉プローブは、試料溶液と混合される代わりに、接触端

および捕捉帯間のディップスティックに放出可能的に固定され得る。ディップスティックの接触端が試料溶液と接触されて、毛管作用により試料溶液が捕捉帯に移動されると、放出捕捉プローブが試料溶液中に放出されるよう、捕捉プローブが試料溶液中に放出され、したがって放出された捕捉プローブは、試料溶液が捕捉帯に移動すると試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズし得る。標的核酸は、試料溶液と接触され、接触端および捕捉帯間のディップスティックに放出可能的に固定され、または別個に捕捉帯と接触され得る検出プローブを用いて検出され得る。

【0056】

検定(2)のさらなる変法では、捕捉プローブは、毛管作用により試料溶液が捕捉帯に達する前に(または例外的に同時に)、捕捉帯と接触され得る。これは、標的核酸が捕捉され得るよう、捕捉帯で捕捉部分により捕捉プローブを結合させる。捕捉プローブは、それを捕捉帯に直接適用することにより、またはディップスティックの接触端と捕捉プローブを接触させて、毛管作用によりプローブ捕捉プローブを捕捉帯に移動させることにより、別個に捕捉プローブと接触される別個の捕捉プローブ溶液中に存在し得る。ディップスティックの接触端の試料溶液とのその後の接触は、毛管作用により標的核酸を捕捉帯に到達させて、そこで捕捉される。さらに標的核酸は、試料溶液と接触され、接触端および捕捉帯間のディップスティックに放出可能的に固定され、あるいは別個に捕捉帯と接触され得る検出プローブを用いて検出され得る。検定(2)における検出プローブの使用に代わるものとして、標的核酸は、例えば標識と標的核酸との共有結合により、試料溶液中で直接標識され得る。これは、前駆体標識を試料溶液と接触させ、標識と標的核酸の共有結合のための条件下で試料溶液および前駆体標識をインキュベートすることにより、達成され得る。

10

【0057】

検定(2)の捕捉部分は、捕捉プローブとハイブリダイズし得る普遍捕捉プローブであり得るし、あるいは捕捉部分は、捕捉プローブとの非塩基対合相互作用により結合し得る。例えば捕捉プローブが1つまたはそれ以上の捕捉リガンドを含む場合、捕捉部分は捕捉リガンド結合部分である。

20

【0058】

ディップスティック検定が標的核酸とハイブリダイズし得る1つより多いプローブを用いる場合、すべてのプローブが試料溶液に付加されるのが、そしてハイブリダイゼーションが単一段階で実行されるのが好ましい。これは検定を簡素化し、それをより容易に且つより迅速に実施させる。一段階ハイブリダイゼーション検定を用いる標的核酸の検出感度は、ハイブリダイゼーションが多段階で実行される場合の検出感度とほぼ等しい、ということが判明した。多段階ハイブリダイゼーションは、異なるプローブと試料溶液中の標的核酸との連続ハイブリダイゼーションにより、あるいはディップスティックを、各々異なるプローブを含有する異なる溶液と接触することにより実行され得る。通常は、多段階ハイブリダイゼーションの後者の方法は、異なるプローブ溶液との各接触間にディップスティックを洗浄することを包含する。多段階ハイブリダイゼーションが好ましい環境が存在し得るが、しかしより簡単且つ迅速なフォーマットの一段階ハイブリダイゼーションが通常は好ましい、と理解される。

30

【0059】

試料溶液はハイブリダイゼーション反応を单一ハイブリダイゼーション段階で起こさせ、そして非塩基対合相互作用を起こさせて(例えば検出リガンドと検出リガンド結合部分との間、ならびに捕捉リガンドと捕捉リガンド結合部分との間)、そして標的核酸および1つまたはそれ以上のハイブリダイズ化プローブおよび(任意に)リガンド結合部分を含む複合体を毛管作用によりディップスティックまで押し上げるための適切な組成物を有する、というのが最も好ましい。このような試料溶液を用いて、ハイブリダイゼーション反応は次に単一段階で実行され、そして試料溶液がディップスティックの接触端と直接接触される前に(試料溶液を先ず希釈し、または変える必要性を伴わずに)、任意のリガンド-リガンド結合部分相互作用が起こり得る、と理解される。リガンド-リガンド結合部分相互作用

40

50

作用は、試料溶液が捕捉帯に移動すると、所望によりディップスティック上で付加的にまたは代替的に起こり得る。標的核酸の簡単且つ迅速なディップスティック検出は、それにより促される。

【0060】

このような結果は、塩、洗剤およびブロッキングタンパク質、例えばBSAまたは粉乳とともに標準ハイブリダイゼーション緩衝液（例えばSSPE緩衝液またはトリス緩衝液）を含む試料溶液を用いて達成される、ということをわれわれは見出した。このような検定を用いた標的核酸の検出感度は、他のディップスティック検定とほぼ等しいかまたはそれより良好であることが判明した。

【0061】

10

添付の図面を参照しながら、本発明の実施態様を実例としてここで説明する。

実施例は、クラミジア属細菌のトラコマクラミジア*Chlamydia trachomatis*(CT)の隠れたプラスミドのDNA断片の検出に関する。CTは、性感染病の最も一般的な原因の一つである。CT感染は、不妊症を引き起こし得るし、そして妊娠中には、自然流産を、さらに出産時または出産後子宮内膜炎を生じ得る。新生児において、CT感染は失明および慢性呼吸疾患を引き起こし得る。感染男性の約10%、および感染女性の約70%がCT感染の症状を示さない。したがって、病気の早期治療が開始され得るよう、CT感染の的確な診断が重要である。

【0062】

20

実施例においては、ディップスティック10を用いて、試料溶液14中の一本鎖または二本鎖CT標的核酸12を検出しようと試みた(図2参照)。ディップスティック10は、試料溶液14を接触するための接触端18を有するニトロセルロースのストリップ16、ならびに接触端18から遠く離れたニトロセルロースストリップ16の捕捉帯22に固定された捕捉プローブ20を包含する。抗ビオチン抗体染料接合体24は、接触端18と捕捉帯22との間に位置するニトロセルロースストリップの接合体帯26で放出可能的に固定される。捕捉プローブ20は、標的核酸12の一方の鎖(一次鎖)の一次領域とハイブリダイズし得る。

【0063】

30

試料溶液14は、トラコマクラミジア*Chlamydia trachomatis*で1ml尿をスパイクし、次に15K rpmで30分間、尿を遠心分離することにより調製される。ペレットが100μl標準ハイブリダイゼーション緩衝液(遮断剤、例えばカゼインまたはBSAを含む)中に再懸濁される。標的核酸とハイブリダイズし得る検出プローブ28が次に付加される(使用される場合、検出プローブおよび/または捕捉プローブにより認識される領域に隣接する標的核酸とハイブリダイズし得るヘルパー プローブとともに)。検出プローブ28は、ビオチンに(または実施例5においてはフルオレセインに)結合される(当業者に周知の方法を用いて)。試料溶液14は次に、100℃に7分間加熱され、そして冷却される。

【0064】

40

ディップスティック10の接触端18は次に、試料溶液14と接触される。試料溶液14、ならびに検出プローブ28とハイブリダイズされた任意の標的核酸12は、毛管作用によりディップスティック10を上昇する。試料溶液14が接合体帯26を通過すると、それは抗ビオチン抗体-染料接合体24を流動化する。放出された抗ビオチン抗体-染料接合体24は次に、標的核酸12とハイブリダイズされた検出プローブ28に結合されたビオチンと結合し得る。

【0065】

抗ビオチン抗体-染料接合体24、検出プローブ28および標的核酸12間に形成される複合体は次に、ディップスティック10に吸い上げられて捕捉帯22まで移動し、そこで複合体の標的核酸が固定化捕捉プローブ20とハイブリダイズし得る。捕捉プローブ20は、それが捕捉帯22を通って移動すると、試料溶液14により流動化され得ないような方法で捕捉帯22に固定される。その結果として、捕捉プローブに結合された複合体は捕捉帯中に残存し、捕捉帯での抗ビオチン抗体-染料接合体の染料の存在により検出され

50

得る。

【 0 0 6 6 】

試料溶液中に C T 標的核酸が存在しない場合、検出プローブ 2 8 は捕捉帯 2 2 で捕捉され得ず、したがって染料は捕捉帯で可視的でない。試料溶液中に C T 標的核酸が存在するが、しかし不十分量の標的核酸が捕捉帯で捕捉され得る場合には、試料溶液中の標的核酸の存在は検出されない。

標的核酸の検出感度は、捕捉プローブがハイブリダイズする標的核酸の領域と検出プローブがハイブリダイズする領域との間の距離が26ヌクレオチド未満である場合、低減され得る、ということが判明した。したがって、これらの領域間の距離は少なくとも26ヌクレオチド、好ましくは少なくとも200ヌクレオチドである、というのが好ましい。

【 0 0 6 7 】

前記の標的核酸の捕捉は、以下の実施例中では直接プローブ捕捉として言及される。実施例における標的核酸の検出の強度は、0~5のスケールで記録され、5は最強検出を表し、そして0は検出なしを表す。

以下の実施例に用いられるプローブの配列を以下に示す：

配列番号 1 : 5' TGC AAC TCT TGG TGG TAG ACT TTG C

配列番号 2 : 5' GCG CAC AGA CGA TCT ATT TTT TGC A

配列番号 3 : 5' CGG GCG ATT TGC CTT AAC CCC ACC A

配列番号 4 : 5' CCA AGC TTA AGA CTT CAG AGG AGC G

配列番号 5 : 5' CAT GCG TTT CCA ATA GGA TTC TTG G

配列番号 6 : 5' CAC AGT CAG AAA TTG GAG TGC TGG C

配列番号 7 : 5' CTT GCT GCT CGA ACT TGT TTA GTA C

配列番号 8 : 5' AGA AGT CTT GGC AGA GGA AAC TTT T

配列番号 9 : 5' CTA GAA TTA GAT TAT GAT TTA AAA GGG

配列番号 1 0 : 5' TTC ATA TCC AAG GAC AAT AGA CCA A

配列番号 1 1 : 5' TGA TCT ACA AGT ATG TTT GTT GAG T

配列番号 1 2 : 5' TGC ATA ATA ACT TCG AAT AAG GAG AAG

配列番号 1 3 : 5' TCC CTC GTG ATA TAA CCT ATC CG

配列番号 1 4 : 5' CAG GTT GTT AAC AGG ATA GCA CGC

配列番号 1 5 : 5' CTC GTT CCG AAA TAG AAA ATC GCA

配列番号 1 6 : 5' GGT AAA GCT CTG ATA TTT GAA GAC

配列番号 1 7 : 5' CTG AGG CAG CTT GCT AAT TAT GAG T

下記の実施例における検出プローブの構造は、図 1 2 に模式的に示されている。

【 0 0 6 8 】

実施例 1

実験設定：

捕捉フォーマット：直接プローブ捕捉(c p) (ディップスティック上に固定された配列番号 1 4) ；

検出プローブ(d p)：5' 末端に直接結合されたビオチンを伴う、あるいは 3 ヌクレオチド(N₃)、6 ヌクレオチド(N₆)、S または S S スペーサーによる配列番号 1 3 または配列番号 1 5 、もしくは 3' 末端に直接結合されたビオチンを伴う配列番号 1 3 。各々の 1 0¹² コピー。

【 0 0 6 9 】

検出フォーマット：抗ビオチン抗体染料接合体；

標的 D N A : 73 または 76 ヌクレオチド一本鎖 D N A 断片 (5 × 10¹¹ ~ 10¹⁰ コピー) 。

【 0 0 7 0 】

結果

10

20

30

40

【表1】

dp 配列番号13

標的のコピー :	5×10^{11}	10^{11}	5×10^{10}	10^{10}
----------	--------------------	-----------	--------------------	-----------

検出プローブ シグナル強度

dp-B ^{5'}	3.5	3.0	2.0	1.0
dp-N ₃ -B ^{5'}	4.5	3.5	3.0	1.5
dp-N ₆ -B ^{5'}	5.0	4.0	3.0	2.0
dp-S-B ^{5'}	4.0	3.0	2.0	1.0
dp-SS-B ^{5'}	4.5	3.5	2.5	1.0
3' B-dp	5.0	3.5	3.0	2.0

dp 配列番号15

標的のコピー :	5×10^{11}	10^{11}	5×10^{10}
----------	--------------------	-----------	--------------------

検出プローブ シグナル強度

dp-B ^{5'}	3.5	2.0	1.0
dp-N ₃ -B ^{5'}	4.0	3.0	2.0
dp-N ₆ -B ^{5'}	4.5	3.0	2.0
dp-S-B ^{5'}	4.0	2.5	1.5
dp-SS-B ^{5'}	4.0	2.5	1.5

【0071】

これらの結果は、以下のことを示す：

N₆、N₃、S S または S スペーサーにより 5' 末端に結合されたビオチンを伴う検出プローブを用いた標的核酸検出の感度は、5' 末端に直接結合されたビオチンを伴う検出プローブを用いた感度より高かった。

【0072】

N₃ および N₆ スペーサーは、S および S S スペーサーより良好であった。

ビオチン(またはその他の検出リガンド)は検出プローブの一端に結合される、というのが好ましい。捕捉プローブおよび検出プローブが捕捉帯で標的核酸とハイブリダイズされる場合に形成された複合体においては、ビオチン(またはその他の検出リガンド)は、捕捉プローブとハイブリダイズする標的核酸の領域に近位の検出プローブの末端に(内部的に配向される)、あるいは好ましくは捕捉プローブとハイブリダイズする標的核酸の領域に遠位の検出プローブの末端に(外部的に配向される)存在し得る。検出プローブに検出リガンドを結合するためにスペーサーが用いられない場合には、標的核酸の検出感度は一般に、検出リガンドが外部的に配向される場合は、より高い。したがって検出プローブは通常は、検出リガンドが外部的に配向されるよう、選択される。

【0073】

しかしながら本実施例では、検出プローブの 3' 末端に直接結合された外部的配向ビオチンを伴う検出プローブを用いた検出感度は、6 ヌクレオチドスペーサーにより検出プローブの 5' 末端に結合された内部的配向ビオチンを伴う検出プローブを用いた感度と同様に良好であった。したがって本発明にしたがってスペーサーが用いられる場合には、検出プローブは、検出リガンドが捕捉帯で捕捉される複合対中で外部的には移行されるよう選択さ

30

40

50

10

れねばならないというわけではない。

【0074】

実施例2：

実験設定

捕捉フォーマット：ディップスティック膜上に固定された直接プロープ捕捉(c p)配列番号14；

検出プロープ：3ヌクレオチド(N₃)、6ヌクレオチド(N₆)、SまたはSSスペーサーにより5'末端に直接結合されたビオチンを伴うプロープ(d p)配列番号13、配列番号15および配列番号16。各々の10¹²コピー。

検出フォーマット：抗ビオチン抗体染料接合体；

標的DNA：214 bp二本鎖DNA断片(10¹¹~10¹⁰コピー)。

【0075】

結果

【表2】

標的のコピー：	10 ¹¹	5×10 ¹⁰	10 ¹⁰
検出プロープ	シグナル強度		
dp13-B+dp15-B+dp16-B	1.5	1.0	0.0
dp13-N ₃ -B+dp15-N ₃ -B+dp16-N ₃ -B	3.0	2.0	0.5
dp13-N ₆ -B+dp15-N ₆ -B+dp16-N ₆ -B	4.5	3.0	1.0
dp13-S-B+dp15-S-B+dp16-S-B	3.0	2.0	<0.5
dp13-SS-B+dp15-SS-B+dp16-SS-B	3.5	3.0	0.5
dp13-非1ab+dp15-N ₆ -B+dp16-N ₆ -B	2.5	1.5	0.5

【0076】

これらの結果は以下のことを示す：

二本鎖標的核酸の検出感度は、N₃、N₆、SSまたはSスペーサーを用いて5倍以上改良された。

検出感度は、N₃およびSスペーサーを用いた場合よりN₆およびSSスペーサーを用いた方が高かったが、これは、スペーサーの長さが検出感度改良のために重要であることを示す。

検出感度は、以下のスペーサーが等価長を有するという事実にもかかわらず、SSスペーサーよりN₆スペーサーを用いたほうがより高かったが、これは、スペーサーの物理化学的特性が検出感度改良のために重要であることを示す。

【0077】

N₆スペーサーにより5'末端でビオチンに各々結合された2つの検出プロープ(dp13非1ab+dp15-N₆-B+dp16-N₆-B)(この場合、ビオチンは捕捉プロープにより捕捉された複合体中で内部的に配向される)のみを用いる検出の感度は、5'末端でビオチンに各々直接結合された3つの検出プロープ(dp13-B+dp15-B+dp16-B)(この場合、一検出プロープ(dp13-B)のビオチンは捕捉プロープにより捕捉された複合体中で外部的に配向される)を用いた検出感度より大きかった。

【0078】

実施例1および2からの結論

標的核酸検出の感度は、検出プロープに検出リガンドを結合するためにスペーサーを用いることにより増大される。

10

20

30

40

50

長いスペーサーのほうが短いスペーサーより良好である。

等価長であるがしかし異なる物理化学的特性を有するスペーサーは、検出感度に異なる作用を及ぼした。特に、非タンパク質構成成分がヌクレオチドのみからなるスペーサーは、非ヌクレオチド構成成分を含むスペーサーより良好である。これに関して考え得る説明をいかに示す：

1. ヌクレオチドスペーサーは、検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化することにより、検出感度を改良し得る。これらのスペーサーのヌクレオチドは、検出プローブが標的核酸とハイブリダイズする場合、標的核酸のヌクレオチドと塩基対合すると予測されない。これらのヌクレオチドのヌクレオチド塩基は、検出プローブが標的核酸とハイブリダイズする場合に形成される塩基対との積重ね相互作用を生じ得る。これらの積重ね相互作用は、標的核酸と検出プローブとの間に生成されるハイブリッドの安定性を強化し、それにより標的核酸の検出感度を強化し得る。10

【0079】

2. ヌクレオチドスペーサーは、SおよびSSスペーサーより剛性であり得る。ヌクレオチドスペーサーのリボース環は、SおよびSSスペーサーのポリエチレングリコール基よりはるかに大きい剛性を提供すると予測される。このより大きい剛性は、検出リガンド結合部分との相互作用のためにヌクレオチドスペーサーに結合される検出リガンドの利用可能性を増大し得る。

【0080】

3. ヌクレオチドおよび非ヌクレオチドスペーサー間の極性の差は、検出感度における差異を生じ得る。20

【0081】

実施例3

実験設定

捕捉フォーマット：直接プローブ捕捉(c p)配列番号10(ディップスティック上に固定)；

検出プローブ：直接的に、あるいはN₆、SS、(dS)₆、(SC₃)₆またはSN₃SN₃Sスペーサーによりビオチンに結合された検出プローブ(d p)配列番号13。各々の10¹²コピー；

検出フォーマット：抗ビオチン抗体染料接合体；30

ヘルパープローブ：配列番号10に隣接する配列番号5および配列番号6；配列番号13に隣接する配列番号1および配列番号2(10¹²コピー)。

標的DNA：872 bp二本鎖DNA断片(2x10¹¹~10¹⁰コピー)。

【0082】

結果

【表3】

標的のコピー： 2×10^{11} 5×10^{10}

<u>検出プローブ</u>	<u>シグナル強度</u>	
dp-B	<1.0	0.0
dp-N ₆ -B	2.0	0.5
dp-SS-B	1.0	0.0
dp-(dS) ₆ -B	1.0	0.0
dp-(SC ₃) ₆ -B	1.0	0.0
dp-SN ₃ SN ₃ S-B	1.5	0.0

10

20

30

40

50

【0083】

これらの結果は、以下のことを示す：

S S、(d S)₆および(S C₃)₆スペーサーは、それらの構造的差異および特性にもかかわらず、等価長を有し、そして標的核酸の検出感度の強化に同様の作用を及ぼした。

【0084】

N₆スペーサーは、S S、(d S)₆および(S C₃)₆スペーサーと等価長を有する。しかしながらN₆スペーサーは、標的核酸の検出感度の改良により大きい作用を及ぼした。

標的核酸検出の感度は、S N₃ S N₃ S スペーサー(試験した最長スペーサー)よりN₆スペーサーを用いたほうがより高かった。これに関して考え得る説明は、スペーサーのN₃構成成分のヌクレオ塩基と検出プローブおよび標的核酸間に形成される塩基対との間の積重ね相互作用をSモノマーが低減または排除する、というものであり得る。このデータは、スペーサーの非対合ヌクレオ塩基と標的核酸および検出プローブ間に形成される二重鎖との間の積重ね相互作用が標的核酸の検出感度の強化に重要である、という結論を支持する。

10

【0085】

実施例4

ディップスティック試験により、ならびにドットプロット分析により、異なる物理化学的特性および長さを有するスペーサーを評価した。ドットプロット分析は、検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションの非存在下で分析される検出プローブに結合されたビオチンとの抗ビオチン抗体の相互作用の効率性を可能にする。異なるスペーサーによりビオチンに結合された検出プローブの5x10⁸~5x10¹¹コピーを、正荷電ナイロン膜上の異なる場所にスポットティングし、そして膜とUV架橋させた。次に膜を、アルカリ性ホスファターゼ(ニトロブルーテトラゾリウム/5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート(NBT/BCIP)色原性基質を転換し得る)に結合された抗ビオチン抗体とともにインキュベートし、洗浄し、NBT/BCIP色原性基質とともにインキュベートし、そして膜を観察して、捕捉帯でいかなる色が生成されたかを見た。

20

【0086】

ディップスティック試験のための実験設定

捕捉フォーマット：直接プローブ捕捉(c p)配列番号14(ディップスティック上に固定)；

30

検出プローブ：直接的に、あるいはヌクレオチドまたは非ヌクレオチドスペーサーにより5'末端でビオチンに結合された検出プローブ(d p)配列番号13。各々の10¹²コピー；

検出フォーマット：抗ビオチン抗体染料接合体；

ヘルパープローブ：配列番号14に隣接する配列番号2および配列番号3(10¹²コピー)。

標的DNA：416 bp二本鎖DNA断片(5x10¹⁰~10⁹コピー)。

【0087】

結果

【表4】

標的のコピー :	5×10^{10}	5×10^9	
<u>検出プローブ</u>	<u>シグナル強度</u>		
dp-B ⁵	3.5	0.5	
dp-N ₃ -B ⁵	4.5	1.5	
dp-N ₄ -B ⁵	4.5	1.0	
dp-N ₅ -B ⁵	4.5	1.0	10
dp-N ₆ -B ⁵	5.0	1.5	
dp-(dS) ₆ -B ⁵	4.0	0.5	
dp-S-B ⁵	3.5	0.0	
dp-SS-B ⁵	4.0	0.0	
dp-SSS-B ⁵	4.5	0.0	
dp-SSSS-B ⁵	4.0	0.0	
dp-SN ₃ SN ₃ S-B ⁵	4.5	0.5	

20

【0088】

ドットプロット分析のための実験設定

検出プローブ：直接的に、あるいはヌクレオチドまたは非ヌクレオチドスペーサーにより5'末端でビオチンに結合された検出プローブ配列番号13；

検出フォーマット：アルカリ性ホスファターゼに結合された抗ビオチン抗体。NBT/BST色原性基質による検出；

【0089】

結果

【表5】

30

スペーサー	検出限界
なし	$5.0 \times E11$
N ₃	$5.0 \times E10$
N ₄	$5.0 \times E10$
N ₅	$5.0 \times E10$
N ₆	$2.5 \times E10$
(dS) ₆	$2.5 \times E10$
SN ₃ SN ₃ S	$2.5 \times E9$
SSSS	$2.5 \times E9$
SSS	$5.0 \times E9$
SS	$2.5 \times E10$
S	$5.0 \times E11$

40

【0090】

ディップスティック試験の結果を以下に示す：

50

3、4または5ヌクレオチドスペーサーとともに検出プローブを用いた標的核酸検出の感度に、有意差は認められない。

【0091】

6ヌクレオチドスペーサーを用いた検出感度は、3~5ヌクレオチドスペーサーより極わずかに良好である。

ヌクレオチドのみからなるスペーサーを用いた検出感度は、非ヌクレオチドを含むスペーサーを用いた場合より良好であった。例えばN₃スペーサーは、15ヌクレオチド長と等価である最長スペーサーS N₃ S N₃ Sより良好であった。

【0092】

(dS)₆スペーサーは、SSスペーサーよりわずかに良好である。 10

ドットプロット試験の結果を以下に示す：

検出感度は、最長スペーサー(SSSおよびS N₃ S N₃ S)を用いた場合に最高であった。

異なる物理化学的特性を有する等価長スペーサー(N₆、(dS)₆およびSS)を用いた検出感度は、同様であった。

【0093】

実施例3および4からの結論

dS構成成分は、ヌクレオチドと同様の構造を有する。ともに、剛性を提供すると予測されるリボース残基を有する。しかしながらヌクレオチドは、dS構成成分中には存在しないヌクレオチド塩基を有する。N₆スペーサーと比較した場合の標的核酸検出の感度に及ぼす(dS)₆スペーサーの異なる作用は、ヌクレオチドスペーサーを用いた検出の感度の改良に及ぼすより大きい作用が、標的核酸と塩基対合しないヌクレオチドの存在により主に説明される、ということを示唆する。 20

【0094】

スペーサーの組成は、その長さより重要であると思われる(実施例4のディップスティック試験におけるdp-N₃-B^{5'}およびdp-S N₃ S N₃ S-B^{5'}に関する結果と比較)。

(dS)₆スペーサーを用いた検出感度は、SSスペーサーを用いた場合より高い。これらのスペーサーは、等価長を有する。これは、スペーサーの物理化学的特性、例えば剛性または極性もスペーサーによる検出感度の改良に影響を及ぼし得る、ということを示唆する。 30

【0095】

実施例4のドットプロット分析は、抗ビオチン抗体に対するビオチンの利用可能性に関してはスペーサー長が重要である、ということを示す。抗ビオチン抗体によるビオチン認識の感度は、ビオチンがN₆スペーサーにより固定プローブに結合されようが、(dS)₆またはSSスペーサーにより結合されようが、同様である。しかしながら実施例4のディップスティック試験における検出感度に及ぼすこれらのスペーサーの作用は異なった。これは、スペーサーの組成が、抗ビオチン抗体によるビオチンの認識におけるよりも、標的核酸との検出プローブのハイブリダイゼーションにおいてより重要である、ということを示唆する。スペーサーの長さは、抗ビオチン抗体(またはその他の検出リガンド結合部分)によるビオチン(またはその他の検出リガンド)の認識のためのスペーサーの組成よりも、より重要であると思われる。 40

【0096】

実施例5

実験設定

捕捉フォーマット：ディップスティックに固定されたBSAに結合された直接プローブ捕捉(c p)配列番号14。捕捉プローブは、直接的にまたは6ヌクレオチドスペーサーにより、BSAに結合される；

検出プローブ：フルオレセインに結合された検出プローブ(dp)配列番号13；

検出フォーマット：抗フルオレセイン抗体-染料接合体； 50

標的 D N A : 73 nt または 76 nt 一本鎖 D N A 断片 (10^{11} コピー)。

【0097】

結果

【表 6】

標的のコピー :	10^{11}	
<u>捕捉プローブ</u>	<u>シグナル強度</u>	
cp-BSA-ディップスティック	4.0	
cp-N ₆ -BSA-ディップスティック	5.0	10

【0098】

実施例 6

実験設定

捕捉フォーマット：ディップスティックに固定された B S A に 5' 末端で結合された直接プローブ捕捉 (c p) 配列番号 1 4。捕捉プローブは、N₆ または S N₃ S N₃ S スペーサーにより、B S A に結合される；

検出プローブ：ビオチンに結合された検出プローブ (d p) 配列番号 7、8、9、10、11、12、13、15、16 および 17；

検出フォーマット：抗ビオチン抗体 - 染料接合体；

標的 D N A : 872 bp 二本鎖 D N A 断片 ($10^{11} \sim 2.5 \times 10^9$ コピー)。

【0099】

結果

【表 7】

標的のコピー :	10^{11}	2.5×10^{10}	10^{10}	5×10^9	2.5×10^9	
<u>捕捉プローブ</u>	<u>シグナル強度</u>	,				30
cp-SN ₃ SN ₃ S-BSA-ディップスティック	4.0	3.5	2.5	1.0	0.0	
cp-N ₆ -BSA-ディップスティック	4.5	4.0	3.0	1.5	0.0	

【0100】

実施例 7

実験設定

捕捉フォーマット：ディップスティックに固定された B S A に結合された直接プローブ捕捉 (c p) 配列番号 1 5。捕捉プローブは、N₆ スペーサーにより、B S A に結合される；

ヘルパープローブ：配列番号 1 5 に隣接する配列番号 3 および配列番号 4；

検出プローブ：本実施例では、検出プローブはフックプローブおよび普遍プローブを含む。フックプローブは、配列番号 1 7（標的核酸とハイブリダイズし得る）に対応する配列および普遍プローブの配列と相補的な配列を有する。普遍プローブは、N₆ または S N₃ S N₃ S スペーサーによりテキスタイル染料に結合される。フックプローブの 10^{12} コピーが存在する；

標的：872 bp 二本鎖 D N A 断片 (10^{11} および 10^{10} コピー)。

【0101】

結果

50

【表8】

標的のコピー :	10^{11}	10^{10}
<u>捕捉プローブ</u>	<u>シグナル強度</u>	
万能プローブ-SN ₃ SN ₆ -染料	2.0	0.0
万能プローブ-N ₆ -染料	2.0	0.5

【0102】

10

実施例5、6および7からの結論

固定タンパク質に捕捉プローブを結合するためのディップスティックに固定されたタンパク質、および非タンパク質を含むスペーサーの使用（実施例5および6）、あるいは検出プローブに標識を結合するための非タンパク質スペーサーの使用（実施例7）は、標的核酸の検出感度を改良する。

【0103】

核酸検出の感度は、スペーサーの非タンパク質構成成分が完全にヌクレオチドで構成された場合に、最高であった。

【0104】

20

実施例8

タンパク質担体によりまたは受動的吸着によりディップスティック膜に固定された捕捉プローブを用いた標的核酸検出の感度を、本実施例で比較する。

【0105】

第一アミノ基を用いて5' - または3' 末端で機能化された捕捉プローブ10 nmolを、10% BSA 1 μlおよび50 mM EDS緩衝液（pH 6.1）25 μlと混合して、500 μlマイクロ遠心管中で水を用いて49 μlとした。次にカップリング試薬（水中に新たに調製された300 mMの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDAC）1 μlを付加し、ウエル中で混合した。混合物を室温で一夜放置して、BSAを捕捉プローブに結合し、次に2~8℃で保存した。次にBSA-捕捉プローブをディップスティックの捕捉帯に適用し、ディップスティックを80℃で1時間加熱した。

30

【0106】

捕捉プローブ対BSAのモル比およびEDACカップリング試薬の濃度を最適化した。2.7:1、3.2:1、4.1:1、5.2:1、6.6:1、10.9:1の捕捉プローブ：BSAを試験した。1、1.5、2、4、5および20 mMの濃度のEDACを試験した。5 mMより高い濃度は、BSA-捕捉プローブを溶液から析出させた。

【0107】

40

実験設定

捕捉フォーマット：ディップスティックに直接固定された配列番号14による、またはBSAタンパク質スペーサーによる直接プローブ捕捉。捕捉プローブおよび捕捉プローブ-BSAをディップスティックに適用し、80℃で1時間ディップスティックを処理することにより固定した；

検出プローブ：ビオチン標識化検出プローブ（dp）配列番号13 (10^{12} コピー)；

検出フォーマット：抗ビオチン抗体-染料接合体；

標的DNA：73ヌクレオチド一本鎖DNA断片 (1×10^{11} コピー)。

【0108】

結果

捕捉プローブ：	シグナル
捕捉プローブ-BSA	4.0
捕捉プローブ	0.0

【0109】

50

結論

ディップスティックに直接固定された捕捉プローブを用いて、標的核酸を検出できなかった。しかしながら、捕捉プローブを B S A に結合し、そして B S A をディップスティックに固定した場合には、強い検出シグナルを得た。

【0110】

以下の実施例は、タンパク質スペーサーにより着色粒子に結合されたプローブを用いた標的核酸の検出に関する。B S A に結合されたプローブで着色染料粒子を被覆した。タンパク質を染料粒子に吸着させ、それにより染料粒子にプローブを結合させる。用いた手法は以下のとおりであった：

10 mM NaCl、1 mM EDTA、pH 7.5を含有する10 mMリン酸塩緩衝液434 μl 中で洗浄染料 ($A_{575} = 900$) を希釈する。プローブ - B S A (2 mg/ml) 5 μl を付加し、十分に混合して、室温で1時間回転させる；

20 %アルカリ処理カゼイン50 μl を付加する。十分に混合し、室温で1時間回転させる；

室温で1時間、ミクロ遠心機で4000 rpmで遠心分離する；

上清を除去し、5%スクロース、2%アルカリ処理カゼイン、0.02% Na アジドを含有する接合緩衝液500 μl 中にペレットを再懸濁する。

【0111】

実施例 9

実験設定

捕捉フォーマット：捕捉プローブ配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16 および配列番号 17 に結合された抗ビオチン抗体 / ビオチン (10^{12} コピー / 試験)；

代替的に、直接プローブ捕捉フォーマット (配列番号 14 または配列番号 15) を比較のために用いた；

B S A により染料粒子に結合された直接検出プローブ配列番号 10；

ヘルパープローブ：配列番号 10 に隣接する配列番号 5 および配列番号 6； 標的 : 87 2 bp 二本鎖 DNA 断片 ($10^{11} \sim 10^8$ コピー)。

【0112】

結果

多プローブを用いたシグナル増幅

【表 9】

捕捉プローブ	Seq ID	All				
シグナル強度	No 13	No 14	No 15	No 16	No 17	5
	1	0	1	1	1	5

10^{11} コピー標的

【0113】

感度分析

10

20

30

40

【表10】

標的コピー	1×10^{11}	1×10^{10}	5×10^9	1×10^9	5×10^8	1×10^8	
抗体捕捉	5	4.5	4	2.5	2	0.5	
(5-プローブ)							
直接プローブ	4.5	3	2.5	1.5	0	0	
捕捉							
(配列番号15)							10
直接プローブ	3	2	0.5	0	0	0	
捕捉							
(配列番号14)							

【0114】

これらの結果は、直接検出プローブ - 染料接合体が抗体捕捉フォーマットおよび直接プローブ捕捉フォーマットとともに作用することを示す。

【0115】

実施例10

20

実験設定

捕捉フォーマット：ディップスティックに固定されたBSAに結合された直接プローブ捕捉(c p)配列番号15；

ヘルパー プローブ：配列番号15に隣接する配列番号3および配列番号4；

検出プローブ領域配列番号17。この領域に置ける標的DNAと、ならびに普遍プローブ配列と相補的な配列を有する「フックプローブ」を、 10^{12} コピー／試験で用いた；

検出フォーマット：BSAにより普遍プローブに結合されたテキスタイル染料；

標的：872 bp dsDNA断片(10^{11} および 10^{10} コピー)。

【0116】

結果：

30

標的のコピー 10^{11} 10^{10}

シグナル 2.0 0.0

【0117】

直接検出プローブ染料接合体フォーマットと比較した場合のこのフォーマットの利点は、普遍ヌクレオチド配列のプローブが着色粒子に接合される場合、それが核酸の視覚的検出のための普遍試薬の適用を可能にする点である。

【0118】

実施例11

40

実験設定

捕捉フォーマット：ディップスティックに固定されたBSAに結合された直接プローブ捕捉配列番号15；

ヘルパー プローブ：配列番号15に隣接する配列番号3および配列番号4；

検出プローブ領域配列番号17。この領域に置ける標的DNAと、ならびに普遍プローブ配列2と相補的な配列を有する「フック」検出プローブ1を、 10^{12} コピー／試験で用いた；

検出フォーマット：フック検出プローブは、標的核酸の配列と、ならびに一次普遍検出プローブの配列と相補的な配列を含む。一次普遍検出プローブはBSAに結合され、BSAは一次着色粒子に吸着されて、それにより一次普遍検出プローブを一次着色粒子に結合する。いくつかの二次普遍検出プローブも、一次着色粒子に吸着されたBSAに各々結合される。二次普遍検出プローブは、三次普遍検出プローブの配列と相補的な配列を含む。

50

三次普遍検出プローブは、二次着色粒子に吸着された B S A に結合される。標的核酸がフック検出プローブ、一次、二次および三次普遍検出プローブならびに一次および二次着色粒子を用いて検出される場合、図 11 におけるように、单一一次着色粒子は標的核酸上に一次層を形成し、そしていくつかの二次着色粒子は標的核酸上に二次層を形成する。いくつかの着色粒子はこの方法で各標的核酸に付着され得るため、標的核酸の検出感度は、フック検出プローブおよび着色粒子に結合された单一普遍検出プローブの使用と比較して改良される、と考えられる。

【 0 1 1 9 】

標的 : 872 bp d s D N A 断片 (10¹¹ および 10¹⁰ コピー)。

結果 :

標的のコピー	10 ¹¹	10 ¹⁰
シグナル	2.0	0.5

1598 bp d s D N A 標的を用いて、同様の結果を得た。

【 0 1 2 0 】

実施例 12 : トラコーカクラミジア *Chlamydia trachomatis* の一段階核酸ディップスティック検定検出

実験設定 :

試薬 :

捕捉フォーマット : B S A 担体によりディップスティック膜上に固定されたオリゴヌクレオチドプローブ捕捉 ;

検出フォーマット : 多ビオチン標識化検出体プローブ ; 抗ビオチン抗体 - コロイド金接合体 ;

試料調製 : P B S 緩衝液中の 10⁶ コピー / μl ~ 10³ コピー / μl の濃度で、トラコーカクラミジア *Chlamydia trachomatus* (C t) 基本小体 (E B) 細胞を調製し、100 ℃ で 20 分間加熱した。

【 0 1 2 1 】

ハイブリダイゼーション / ディップスティック実行緩衝液 : 塩、洗剤およびプロッキングタンパク質、例えば B S A または粉乳を含有する標準ハイブリダイゼーション緩衝液。

【 0 1 2 2 】

方法 :

検出プローブ、ヘルパー プローブおよび 5 × 10⁶ ~ 5 × 10³ コピーの E B をハイブリダイゼーション緩衝液中に希釈して 80 μl とし、100 ℃ で 7 分間加熱した。次に混合物を手短に遠心分離して、すべての液体を収集し、20 μl の抗ビオチン A b コロイド金と混合した。全 100 μl の混合物をディップスティック上に吸い上げてさせて、シグナルを発現させた。

【 0 1 2 3 】

結果および考察

表および図 13 に提示した結果は、試料調製段階を含めて 1 時間未満で、一段階核酸ディップスティック検定を用いて C t E B の約 10⁴ コピーが検出され得たことを示した。

そのように提示されたディップスティック検出検定は他のサンドイッチハイブリダイゼーション検定とほぼ等しい検出感度を有するが、しかしそれは、速度および簡便性という大きい利点を有する。

【 0 1 2 4 】

例えば PCT WO 93/1322 に開示された C t の検出のためのサンドイッチハイブリダイゼーション検定は、複雑な多構成成分微小滴定プレートフォーマット検定であり、これは 5 時間未満では成し遂げられなかった。この検定は、限定順序でのその構成成分の漸次付加を要する多段階検定であって、インキュベーションおよび洗浄段階はすべての新規の構成成分の付加後である。

【 0 1 2 5 】

本発明の目的の核酸ディップスティック検定は、構成成分の付加および洗浄のための異なる段階を必要とせずに、一段階で実行し得る。このサンドイッチハイブリダイゼショ

10

20

30

40

50

ン検定は、ハイブリダイゼーションおよびその他の親和性対形成のためにそれらを有益にさせるために、1つより多い溶液条件を必要としない。同一溶液条件は、同様にディップスティック膜を通過する構成成分の自由移動に役立ち得る。

【0126】

ディップスティックによる一本鎖および二本鎖標的核酸の検出感度は、本発明のスペーサーの使用により有意に改良され得ることが判明した。二本鎖環状標的核酸の検出感度も、本発明のスペーサーの使用により増大され得る。

一本鎖標的核酸は、分子内塩基対合相互作用により二次構造を形成することが既知である。このような二次構造は、標的核酸との捕捉プローブおよび検出プローブの結合を阻害し得る。したがって、検出プローブおよび捕捉プローブが結合する標的核酸の領域は、しばしば二次構造を実質的に有さないと予測される領域として選択される。
10

【0127】

本発明のスペーサーの使用により達成される二本鎖標的核酸の検出感度改良は、二次構造に関する標的核酸の領域を認識する捕捉プローブおよび／または検出プローブを用いた一本鎖標的核酸の検出感度も改良されることを意味する。この利点は、捕捉プローブおよび／または検出プローブが、標的核酸により形成される二次構造の予測に基づいて選択されねばならないわけではなく、したがって捕捉および検出プローブの選択を簡素化し得るという点である。

【0128】

ディップスティック検出の慣用的方法は、環状二本鎖標的核酸の検出時に非常に不十分であると考えられる。その結果として、このような標的核酸は、通常は、標的が検出される前に二本鎖化標的を線状化する酵素で処理される。本発明のスペーサーを用いた環状二本鎖標的核酸の検出改良は、標的核酸の線状かが必要とされず、したがって検出方法を簡素化することを意味する。
20

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の捕捉プローブスペーサーまたは検出プローブスペーサーの構成成分として適切な非タンパク質構成成分の化学構造を示す。

【図2】 本発明の一実施態様を用いたトラコーマクラミジア*Chlamydia trachomatis*標的核酸の検出を示す。

【図3】 実施例1に関する実験設定を示す。
30

【図4】 実施例2に関する実験設定を示す。

【図5】 実施例3に関する実験設定を示す。

【図6】 実施例4に関する実験設定を示す。

【図7】 実施例6に関する実験設定を示す。

【図8】 実施例7に関する実験設定を示す。

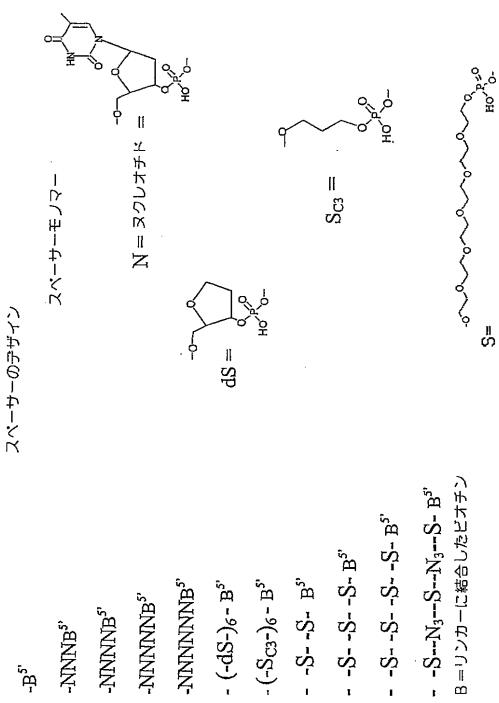
【図9】 実施例9に関する実験設定を示す。

【図10】 実施例10に関する実験設定を示す。

【図11】 実施例11に関する実験設定を示す。そして

【図12】 実施例で用いられるビオチン検出リガンドに結合された異なる検出プローブの構造を模式的に示す。
40

【図1】



【図2】

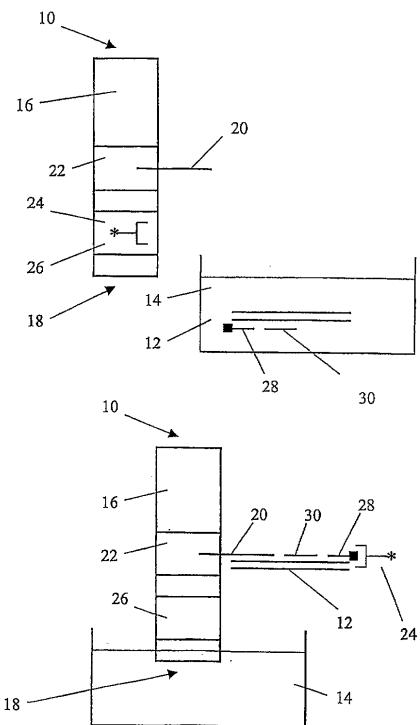
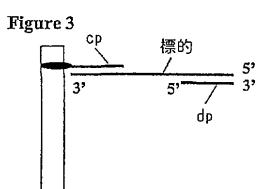
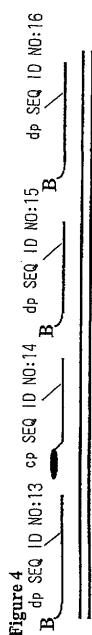


Figure 2

【図3】

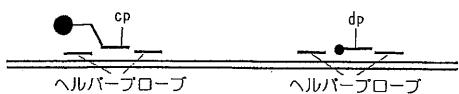


【図4】



【図5】

Figure 5



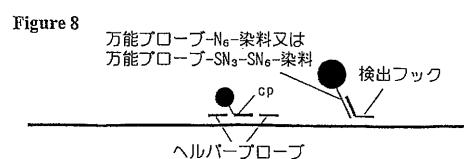
【図6】



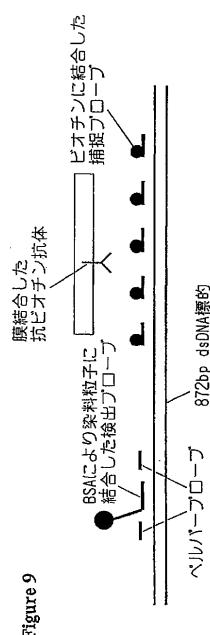
【図7】



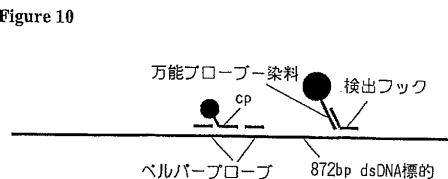
【図8】



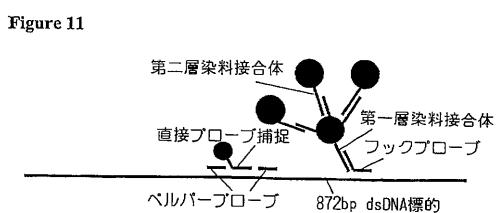
【図9】



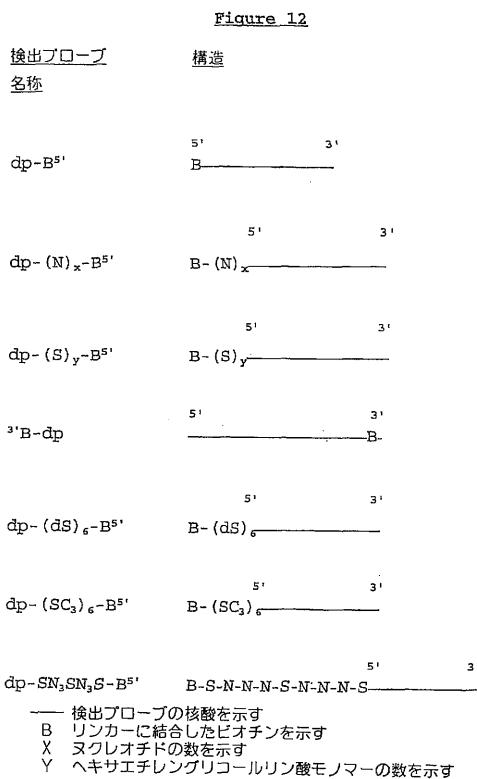
【図10】



【図11】



【図12】



【図13】

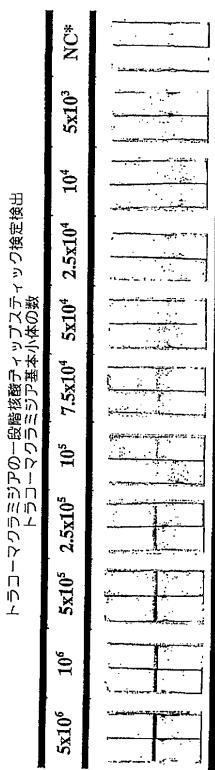


Figure 13

*NC :陰性コントロール

【図14】

Figure 14

トラコマクラミジアの核酸ディップスティック検定検出

No dB*	5x10 ⁶	10 ⁶	5x10 ⁵	2.5x10 ⁵	10 ⁵	7.5x10 ⁴	5x10 ⁴	2.5x10 ⁴	10 ⁴	5x10 ³	NC**
初回 シグナル	2.20*	2.50*	3.30*	4.30*	5.35*	8.10*	8.45*	14.05*	24*	-	-
10'での シグナル	4	3	2.5	2	1.5	1	1	0.5	0	0	0
20'での シグナル	5	4	3.5	3	2.5	2	1.5	1	0.25	0	0
30'での シグナル	5	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0	0
1hでの シグナル	5	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.0	0.5	0	0

*トラコマクラミジアの基本小体 (EB) 数
**NC :陰性対照

*トラコマクラミジアの基本小体 (EB) 数
**NC :陰性対照

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 M
G 0 1 N 33/566 (2006.01) G 0 1 N 33/566

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
(74)代理人 100172557
弁理士 鈴木 啓靖
(72)発明者 リー, エレン
イギリス国, ケンブリッジ シービー2 2ビーティー, ロング ロード, イースト アングリア
ブラッド センター サイト, デパートメント オブ ヒーマトロジー - ダイアグノスティック
ディベロップメント, ユニバーシティ オブ ケンブリッジ
(72)発明者 ディネバ, マグダ アナスタソバ
イギリス国, ケンブリッジ シービー1 8ディーエス, グレイストーク ロード 62
(72)発明者 フ, シアン ユン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94587, ユニオン シティ, トレイルサイド ウェイ 2
509

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 米国特許第05310650(US, A)
国際公開第95/027081(WO, A1)
欧州特許出願公開第00163220(EP, A1)
特表平05-500749(JP, A)
国際公開第90/001564(WO, A1)
国際公開第00/034457(WO, A1)
特表平05-501957(JP, A)
特表平06-501622(JP, A)
特開昭61-274699(JP, A)
米国特許第05747248(US, A)
米国特許第04751177(US, A)
特表平09-507024(JP, A)
特開2000-102384(JP, A)
特表平11-513257(JP, A)
特表平09-505556(JP, A)
JU J, NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 英国, OXFORD UNIVERSITY PRESS, 1996年 3月, V24 N6
, P1144-1148

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15/00 - 15/90
C 12 M 1/00 - 3/10
C 12 Q 1/00 - 3/00
MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMII)