

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第 1 部門第 1 区分  
 【発行日】平成21年4月9日 (2009.4.9)

【公開番号】特開2007-275006(P2007-275006A)  
 【公開日】平成19年10月25日 (2007.10.25)  
 【年通号数】公開・登録公報2007-041  
 【出願番号】特願2006-107876(P2006-107876)  
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成21年2月24日 (2009.2.24)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

分析対象核酸に特異的な塩基配列を有する対象核酸認識用プローブユニットと、各々異なる塩基配列を有し、かつ蛍光物質で標識された複数の標識プローブユニットについて、一の前記プローブユニットの5'末端近傍の一部と他の一の前記プローブユニットの3'末端近傍の一部とに相補的な配列を各々有する複数の相補オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせて、前記対象核酸認識用プローブユニットと前記複数の標識プローブユニットと前記複数の相補オリゴヌクレオチドからなるプローブユニット結合体を得る第 1 のステップと、

前記プローブユニット結合体中の隣接するプローブユニットをライゲーションにより接合して、複数の蛍光物質で標識された分析プローブを得る第 2 のステップとを有することを特徴とする、分析プローブ製造方法。

【請求項 2】

分析対象核酸に特異的な塩基配列を有する対象核酸認識用プローブユニットと、各々異なる塩基配列を有する複数の標識用プローブユニットについて、一の前記プローブユニットの5'末端近傍の一部と他の一の前記プローブユニットの3'末端近傍の一部とに相補的な配列を各々有する複数の相補オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせて、前記対象核酸認識用プローブユニットと前記複数の標識用プローブユニットと前記複数の相補オリゴヌクレオチドからなるプローブユニット結合体を得る第 1 のステップと、

前記プローブユニット結合体中の隣接するプローブユニットをライゲーションによって接合する第 2 のステップと、

前記複数の標識用プローブユニットの各々に蛍光物質を導入して、複数の蛍光物質で標識された分析プローブを得る第 3 のステップとを有することを特徴とする、分析プローブ製造方法。

【請求項 3】

前記ライゲーションを行う前に、前記プローブユニット結合体にDNAポリメラーゼと基質dNTPを作用させて、前記プローブユニット間のギャップを埋めるステップを有すること

を特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の分析プローブ製造方法。

【請求項 4】

前記蛍光物質は、前記標識プローブユニット又は標識用プローブユニットの5'末端及び3'末端から5塩基以上内側に位置する塩基に結合していることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の分析プローブ製造方法。

【請求項 5】

前記蛍光物質は、前記標識プローブユニット又は標識用プローブユニットの実質的に中央に位置する塩基に結合していることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の分析プローブ製造方法。

【請求項 6】

前記標識プローブユニット又は標識用プローブユニットは、9塩基以上30塩基以下の長さを有することを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の分析プローブ製造方法。

【請求項 7】

前記複数の標識プローブユニットは各々同一の前記蛍光物質で標識されているか、又は前記複数の標識用プローブユニットは各々同一の前記蛍光物質を導入されることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の分析プローブ製造方法。

【請求項 8】

前記複数の標識プローブユニットは各々異なる蛍光物質で標識されているか、又は前記複数の標識用プローブユニットは各々異なる蛍光物質を導入されることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の分析プローブ製造方法。

【請求項 9】

前記対象核酸認識用プローブユニットが、枝分れを有する分岐プローブであることを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の分析プローブ製造方法。

【請求項 10】

各々異なる塩基配列を有する複数のプローブユニットと、一の前記プローブユニットの5'末端近傍の一部と他の一の前記プローブユニットの3'末端近傍の一部とに相補的な配列を各々有する複数の相補オリゴヌクレオチドを含む、分析プローブ製造用キット。

【請求項 11】

前記複数のプローブユニットの1つが、分析対象核酸に特異的な塩基配列を有する対象核酸認識用プローブユニットであることを特徴とする、請求項 10 に記載の分析プローブ製造用キット。

【請求項 12】

前記対象核酸認識用プローブユニット以外の前記複数のプローブユニットの各々が蛍光物質で標識された標識プローブユニットであることを特徴とする、請求項 11 に記載の分析プローブ製造用キット。

【請求項 13】

前記標識プローブユニットは9塩基以上30塩基以下の長さを有し、前記蛍光物質は前記標識プローブユニットの5'末端及び3'末端から5塩基以上内側に位置する塩基に結合していることを特徴とする、請求項 12 に記載の分析プローブ製造用キット。

【請求項 14】

分析対象核酸に特異的な塩基配列を有する対象核酸認識用プローブユニットと、各々異なる塩基配列を有し、かつ蛍光物質で標識されたインターナルな塩基を含み、タンデムに連結された複数の標識プローブユニットを含む分析プローブであって、前記蛍光物質で標識されたインターナルな塩基同士が8塩基以上離れていることを特徴とする分析プローブ。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0020】

本発明の分析プローブ製造方法において、対象核酸認識用プローブユニットは、枝分れを有する分岐プローブ（米国特許第5124246号）であってもよい。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0039】

上記の通り、対象分子の配列を認識する配列を持つオリゴヌクレオチド（対象核酸認識用プローブユニット）と、蛍光標識を施したオリゴヌクレオチド（標識プローブユニット）をライゲーションによりつなぎ合わせることで、蛍光体の数を制御しつつ、複数の蛍光体で標識されたプローブを作製することが可能となる。別の対象分子を検出する場合には、対象分子を認識する配列だけを変更すれば良く、蛍光標識部分は、対象分子によらずユニバーサルに使用できる。すなわち、本発明はこれらユニバーサルに利用できる蛍光標識プローブを作製するためのキットも提供する。本発明のキットはある特定の対象分子解析用のものであっても良いし、対象分子を認識する配列を持つオリゴヌクレオチドをユーザが用意し、様々な対象分子に対して容易に蛍光標識プローブを作製できる形態であっても良い。キットの必須構成要素である、蛍光体標識オリゴヌクレオチド（標識プローブユニット）や、蛍光体、オリゴヌクレオチドに蛍光体を導入するためのリンカーは上記の通りである。本発明により、直鎖状オリゴヌクレオチドもしくは分岐状オリゴヌクレオチド鎖に複数の蛍光体が導入されたプローブが得られるが、各蛍光体は8塩基以上離れた塩基に標識される。

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0050

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0050】

各オリゴヌクレオチドを50 pmolずつ混ぜ合わせ、dNTPとDNAポリメラーゼを含む緩衝溶液中で37℃、10分間反応させて、オリゴヌクレオチドを伸長させて2塩基のギャップを埋める反応を行った。この伸長反応の後にライゲーションを行い、ビオチン標識オリゴヌクレオチドと対象分子を認識するオリゴヌクレオチドがつなぎ合わされたプローブ106を得た。この際、プローブの相補鎖もライゲーションでつなぎ合わされて、相補鎖107を生じる。プローブ106とストレプトアビジン標識した量子ドット108を混ぜ合わせて、複数の量子ドットで標識されたプローブ109を得た。得られたプローブを蛍光顕微鏡にて測定した結果を図11に示す。プローブ109を測定した画像110では蛍光を発するプローブが観測されているのに対し、1つの量子ドットを導入したプローブを測定した画像111では、明確な蛍光像が観測されておらず、本発明によりプローブの蛍光強度を容易に増加できることが確認された。

## 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0053】

【図1】図1は、ライゲーションにより複数の蛍光物質で標識されたプローブを作製し、標的分子に対してハイブリダイズさせ、検出する手順を示した図である。

【図2】図2は、オリゴヌクレオチド（プローブユニット）同士をハイブリダイズさせ、

その後ライゲーションにより複数のプローブを作製する手順を示した図である。

【図3】図3は、蛍光体を標識していないオリゴヌクレオチド（標識用プローブユニット）同士をハイブリダイズさせ、ライゲーションによりオリゴヌクレオチドをつなぎ合わせた後に蛍光体を標識することで複数の蛍光体で標識されたプローブを作製する手順を示した図である。

【図4】図4は、蛍光体が標識されたオリゴヌクレオチド（標識プローブユニット）と相補オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせ、DNAポリメラーゼによりギャップを埋めた後にライゲーションを行い、複数の蛍光体が標識されたプローブを作製する手順を示した図である。

【図5】図5は、様々な蛍光体で標識されているオリゴヌクレオチド（標識プローブユニット）をつなぎ合わせて複数種類の蛍光体が複数個導入されたプローブを作製する手順を示した図である。

【図6】図6は、分岐プローブの枝部分にオリゴヌクレオチド（標識プローブユニット）をライゲーションさせ、複数の蛍光標識が施された分岐プローブを作製する手順を示した図である。

【図7】図7は、蛍光標識されたオリゴヌクレオチド（標識プローブユニット）同士をハイブリダイズさせ、その後ライゲーションにより複数の蛍光体が標識されたプローブを作製する手順を示した図である。

【図8】図8は、単一の蛍光体が標識されたプローブと、複数の蛍光体で標識されたプローブの蛍光強度を比較したグラフである。

【図9】図9は、インターナルな塩基に蛍光体が標識されたオリゴヌクレオチド（標識プローブユニット）をライゲーションする際に、蛍光体が標識された塩基の位置とライゲーション効率の関係を示したグラフである。

【図10】図10は、ビオチンが標識されたオリゴヌクレオチド（標識プローブユニット）同士をハイブリダイズさせ、DNAポリメラーゼによりギャップを埋めた後にライゲーションを行い、その後蛍光体を標識して、複数の蛍光体が標識されたプローブを作製する手順を示した図である。

【図11】図11は、1つの量子ドットが標識されたプローブと、複数の量子ドットが標識されたプローブを蛍光顕微鏡にて計測した画像である。