

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-502468

(P2004-502468A)

(43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 M 1/00

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 M 1/00

Z N A A

A

テーマコード (参考)

4 B O 2 9

4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 57 頁)

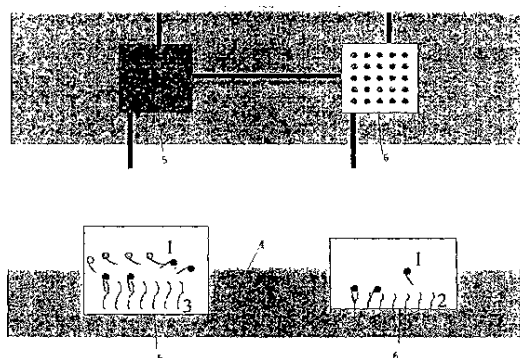
(21) 出願番号 特願2002-510705 (P2002-510705)  
 (86) (22) 出願日 平成13年6月14日 (2001.6.14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成14年12月12日 (2002.12.12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/BE2001/000101  
 (87) 国際公開番号 W02001/096592  
 (87) 国際公開日 平成13年12月20日 (2001.12.20)  
 (31) 優先権主張番号 00870127.8  
 (32) 優先日 平成12年6月14日 (2000.6.14)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 501427010  
 ファキュルテ ユニヴェルシテール ノー  
 トルーダム ド ラ ペ  
 ベルギー, ペー5000 ナムル, リ  
 ュ ド プリュッセル 61  
 (74) 代理人 100103816  
 弁理士 風早 信昭  
 (74) 代理人 100120927  
 弁理士 浅野 典子  
 (72) 発明者 レマクル, ジョゼ  
 ベルギー, ペー5020 マロン, シ  
 エマン デ ビエレ, 14  
 (72) 発明者 アル, ムリエル  
 ベルギー, ペー5000 ナムル, ア  
 ヴェニユ ゴドフロア, 42  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオチップ上のヌクレオチド標的配列の同定及び/又は定量のための反転検出

## (57) 【要約】

本発明は2組のヌクレオチド配列(1及び2)を用いて相互に対して相同性を示す一以上の標的ヌクレオチド配列であってサンプル中に存在する可能性がある一以上の標的ヌクレオチド配列(3)を同定及び/又は定量し、相同である可能性がある配列から区別する方法であって、所望によりラベルされたヌクレオチド配列の第一の組(1)が第一工程において前記標的ヌクレオチド配列(3)に特異的に結合し、ヌクレオチド配列の第一の組の所望によりラベルされているヌクレオチド配列(1)に対して相補的な配列の少なくとも一部を有する捕獲ヌクレオチド配列の第二の組(2)とのハイブリダイゼーションを通して検出され及び/又は定量され、ただし、前記捕獲ヌクレオチド配列(2)は1cm<sup>2</sup>当たり少なくとも4個の別個の領域のアレイに従って固体支持体の表面(4)上に固定されており、前記別個の領域のそれぞれは一種類の捕獲ヌクレオチド配列(2)と結合されており、所望によりラベルされたヌクレオチド配列(1)とそれらの対応する捕獲ヌクレオチド配列(2)との間の結合の同定及び定量はサンプル中に存在する標的ヌク



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

2組のヌクレオチド配列(1及び2)を用いて相互に対して相同性を示す一以上の標的ヌクレオチド配列であってサンプル中に存在する可能性がある一以上の標的ヌクレオチド配列(3)を同定及び/又は定量し、相同である可能性がある配列から区別する方法であって、所望によりラベルされたヌクレオチド配列の第一の組(1)が第一工程において前記標的ヌクレオチド配列(3)に特異的に結合し、ヌクレオチド配列の第一の組の所望によりラベルされているヌクレオチド配列(1)に対して相補的な配列の少なくとも一部を有する捕獲ヌクレオチド配列の第二の組(2)とのハイブリダイゼーションを通して検出され及び/又は定量され、ただし、前記捕獲ヌクレオチド配列(2)は1cm<sup>2</sup>当たり少なくとも4個の別個の領域のアレイに従って固体支持体の表面(4)上に固定されており、前記別個の領域のそれぞれは一種類の捕獲ヌクレオチド配列(2)と結合されており、所望によりラベルされたヌクレオチド配列(1)とそれらの対応する捕獲ヌクレオチド配列(2)との間の結合の同定及び定量はサンプル中に存在する標的ヌクレオチド配列(3)の同定及び定量と相互に関連することを特徴とする方法。

10

## 【請求項 2】

第一工程と第二工程の間に、ヌクレオチド配列の第一の組の所望によりラベルされた配列であって標的ヌクレオチド配列(3)に結合されていない配列が除去され、標的ヌクレオチド配列(3)に結合したヌクレオチド配列の第一の組の所望によりラベルされた配列(1)が第二工程におけるそれらの再使用の前に相互から脱ハイブリダイズされることを特徴とする請求項1記載の方法。

20

## 【請求項 3】

標的ヌクレオチド配列(3)がヌクレオチド配列の第一の組の一つ以上の所望によりラベルされた配列(1)とハイブリダイゼーション結合する前に、標的ヌクレオチド配列(3)が好ましくは共有結合によって固体支持体(4)上にまず結合されることを特徴とする請求項1又は2記載の方法。

## 【請求項 4】

標的ヌクレオチド配列(3)とヌクレオチド配列の第一の組の所望によりラベルされた配列(1)との間の結合が溶液中で生ずることを特徴とする請求項1又は2記載の方法。

## 【請求項 5】

ヌクレオチド配列の第一の組の所望によりラベルされた配列(1)がヌクレオチド配列の第二の組の捕獲ヌクレオチド配列(2)の長さとは本質的に同一又は類似(好ましくは80%より高く類似)である長さを有することを特徴とする請求項1~4のいずれか一項記載の方法。

30

## 【請求項 6】

同定及び/又は定量されるべき標的ヌクレオチド配列(3)がサンプル中に存在する相同配列と30%より高い、好ましくは60%より高い、より好ましくは80%より高い相同性を示すことを特徴とする請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 7】

同定及び/又は定量されるべき標的ヌクレオチド配列(3)が一塩基のみによって相同配列から異なることを特徴とする請求項1~6のいずれか一項記載の方法。

40

## 【請求項 8】

所望によりラベルされたヌクレオチド配列(1)が10~60塩基のそれらの配列の部分の一部を含み、その配列が標的ヌクレオチド配列(3)に特異的であることを特徴とする請求項1~7のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 9】

ヌクレオチド配列の第二の組の捕獲ヌクレオチド配列が所望によりラベルされたヌクレオチド配列(1)に相補的な配列を示すことを特徴とする請求項1~8のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 10】

50

ヌクレオチド配列の第二の組の捕獲ヌクレオチド配列(2)がそれらの完全配列に加えてヌクレオチド配列の第一の組の所望によりラベルされたヌクレオチド配列(1)に対して相補的な配列を有するか又は10~200塩基の長さを有するスペーサーを介して固体支持体に結合された配列を有することを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項11】

所望によりラベルされたヌクレオチド配列(1)が標的には特異的でないがそれらの捕獲プローブに特異的であるそれらの配列の一部を含むことを特徴とする請求項1~10のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

ラベルされたヌクレオチド配列(1)がSNPに隣接する標的配列に結合する様々なヌクレオチドによって停止された二種以上のラベルされた配列の混合物を含み、末端ヌクレオチドの一方はSNPに完全にマッチし、ラベルされたヌクレオチド配列(1)はSNP標的の他方の部位に結合する予定の他の付加されたプローブをも含み、完全にマッチするプローブは捕獲プローブアレイ上での検出前にリガーゼによってこのプローブに結合されることを特徴とする請求項1~11のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項13】

ラベルされたヌクレオチド配列(1)がプローブの混合物を含み、前記プローブのそれぞれはSNP部位に位置する少なくとも一塩基が異なり、捕獲プローブアレイ上で検出される前に特定ヌクレアーゼで処理されることを特徴とする請求項1~12のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項14】

検出及び/又は定量されるべき一種以上の標的ヌクレオチド配列(3)がrRNA、好ましくは16S, 23S, 18S及び25S rRNAからなる群から選択されたrRNAであることを特徴とする請求項1~13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

検出及び/又は定量されるべき一種以上の標的ヌクレオチド配列(3)がmRNA、好ましくはコンセンサス配列によってcDNAへと反転写されたmRNAであることを特徴とする請求項1~14のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

固体支持体がガラス、電子装置、シリコン支持体、プラスチック支持体、コンパクトディスク、フィルター、金属支持体、ポリリジンコートされた表面又はこれらの組合せからなる群から選択されることを特徴とする請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項17】

請求項1~16のいずれか一項記載の方法を行うための手段を含む、サンプル中に存在する可能性がある一以上の相同標的ヌクレオチド配列の診断及び/又は定量装置。

【請求項18】

装置が二つの別個の室(5及び6)を含み、それぞれが請求項1~16のいずれか一項記載の方法において行われる工程の一つに専ら用いられることを特徴とする請求項17記載の装置。

【請求項19】

室が固体支持体を含み、その上に捕獲ヌクレオチド配列(2)が1cm<sup>2</sup>当たり少なくとも4個の別個の領域のアレイに従ってその表面上に固定されており、前記別個の領域のそれぞれが一種類のヌクレオチド配列と結合されていることを特徴とする請求項17又は18記載の装置。

40

【請求項20】

請求項17~19のいずれか一項記載の装置上で請求項1~16のいずれか一項記載の方法の様々な工程を行うための機械又は自動機械。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

50

本発明はサンプル中に存在する一以上の標的ヌクレオチド配列を同定及び／又は定量し、相同配列とのそれらの区別を可能にする方法を提供する。特に、本発明は同じ科に属する微生物の特定の種を同定及び定量する方法、又は特定生物に属する一般的配列の様々なアイソタイプ（一ヌクレオチド多型（SNP）配列を含む）を検出及び／又は定量する方法を提供する。

#### 【0002】

##### 発明の背景及び技術の現状

多くの特異的捕獲ヌクレオチド配列で作られたバイオチップはサンプル中の検出されるべき対応する様々な相同ヌクレオチド配列の間の区別を行うための良好に適合されたツールである。

10

#### 【0003】

しかし、微生物間又は一つの微生物においてDNA又はRNA配列の一塩基のみで異なる相違が存在する。これらの配列は極めて類似しているので、一つの所定の標的ヌクレオチド配列と異なる捕獲ヌクレオチド配列（その上でそれがハイブリダイズすることができる）との間で交差反応が生ずるかもしれない。

#### 【0004】

一以上の標的ヌクレオチド配列のハイブリダイゼーション及び検出をミニチュア化によって可能とするバイオチップ技術は、バイオチップ上に多数の捕獲ヌクレオチド配列が結合されていると仮定して、一以上の標的ヌクレオチド配列の間の検出（区別）を行うための有用なツールである。それは組織の遺伝子発現パターンの決定も可能にし、それはmRNAをcDNAへとコピーしてこれらの配列に対して相補的な捕獲ヌクレオチド配列を含むバイオチップ上でそれらをハイブリダイゼーションさせることによって得られる。cDNA配列は相互に異なっているので交差反応のレベルは高く、捕獲ヌクレオチド配列（それらはかなり長い配列である）は組織からクローニングされたcDNAのバンクから構築され、ハイブリダイゼーションの速度及び収率は高い。

20

#### 【0005】

小さな捕獲ヌクレオチド配列が用いられた場合、標的配列が小片に切り分けられない限りハイブリダイゼーションのレベルはかなり低い。溶液中ではハイブリダイゼーション速度は鎖長の平方根に比例し、小さいものは制限的である（Wetmur, J. G., Biopolymers 10, 601 (1971); Anderson et Young in "Nucleic acid and hybridization", IRL Press, Hames, B. and Higgins, S. Editeurs, 73-111, Oxford-Washington DC (1985)）。反応が固体表面上で行われる場合、捕獲ヌクレオチド配列の長さの影響は溶液中よりもずっと大きい。従って小さな捕獲ヌクレオチド配列上での所定の標的DNA配列の固定速度と長い捕獲ヌクレオチド配列上での所定の標的DNA配列の固定速度との間の相違は極めて大きい。

30

#### 【0006】

DNA標的ヌクレオチド配列自体の検出はずっと問題がある。何故ならDNAはまず増幅されなければならないからである（通常PCRによって）。アンプリコン（amplicon）は2本鎖DNAであり、固体表面上に結合されている捕獲ヌクレオチド配列上にハイブリダイズするよりも溶液中で再会合しやすい（WO 98/11253）。この効果は捕獲ヌクレオチド配列の長さに直接依存しており、小さな捕獲ヌクレオチド配列は感受性の欠如に導く。DNAを非特異的な方法で片に切り分けることも可能である（多数の配列がチップ中で分析されると仮定して）。できるかぎり多数の捕獲ヌクレオチド配列を固体支持体の表面上に結合させて反応収率に影響を与えることも可能であるが、結合されることができる濃度に制限がある。配列の選択は最終的に重要である。何故なら、同一長であってもある配列は他の配列よりも高いハイブリダイゼーション収率を与えるからである（第一工程に好ましいか又は第一工程を加速することができ二本鎖形成を導く二次構造の形成）。

40

#### 【0007】

50

それ故、良好なハイブリダイゼーション収率を与えつつも標的相同配列の検出を可能にする中程度の長さの捕獲ヌクレオチド配列が妥協として提案されている。

#### 【0008】

しかし、小さな捕獲ヌクレオチド配列は一塩基の小ささで異なる配列間の区別を可能にする。小さな捕獲ヌクレオチド配列を担持するこれらのアレイの一つの適用は一ヌクレオチド多型 (SNPs) 配列の同定である (WO 98/56954)。

#### 【0009】

##### 発明の目的

本発明は異なる相同標的配列に特異的な捕獲ヌクレオチド配列を担持するアレイを用いて他の可能な相同標的配列の間から標的ヌクレオチド配列を同定及び/又は定量するための新規の改良された解決策であって従来技術の欠点を示さない解決策を提供することを目的とする。

#### 【0010】

##### 発明の概要

本発明はアレイ上にハイブリダイズされるべき配列のハイブリダイゼーションプロセスの反転を行うことによって、サンプル中に同時に存在することがあり得る相同標的配列間の区別を可能にする。

#### 【0011】

本発明による方法は、第一工程において標的に結合するヌクレオチド配列がアレイ上で検出されるべき標的として第二工程において用いられるという二工程の結合プロセスに基づいた標的ヌクレオチド配列の同定 (検出及び特性決定) 及び/又は定量を可能にする。

#### 【0012】

本発明による方法においては、標的DNA (又はRNA) 配列は所望によりラベルされた様々なヌクレオチド配列とまず反応させられ、次に、洗浄後、前記所望によりラベルされたヌクレオチド配列は標的ヌクレオチド配列から分離され、所望によりラベルされたヌクレオチド配列に対して相補的な捕獲ヌクレオチド配列を担持するアレイ上のハイブリダイゼーションによって最終的に同定される。本発明によれば、アレイ上にハイブリダイズするのは所望によりラベルされたヌクレオチド配列であり標的ヌクレオチド配列ではない。

#### 【0013】

本発明による方法においては、捕獲ヌクレオチド配列及び標的ヌクレオチド配列は同一であるそれらの配列の少なくとも一部又は部分を有し、一方、所望によりラベルされたヌクレオチド配列はそれらに相補的な配列である。特許請求の範囲に記載されるようなかかる反転方法は相同標的配列の間の有効な区別の問題を有利に解決する。

#### 【0014】

##### 定義

「相同ヌクレオチド配列」は対応する位置に同一ヌクレオチドを有するDNA又はRNA配列を意味する。相同 (又は配列同一性) の程度は、比較されるべき二つの配列のうちの一方におけるギャップの如き欠失又は挿入を考慮に入れて配列を最適に整列 (全配列) させた後の所定の位置における同一ヌクレオチドの割合として計算される。これは異なる生物種の如き遺伝的に異なる源中に存在する所定の遺伝子の配列の場合に、又は (同一ファミリーからの又は共通の構造ドメインを有する) 類似機能を有するタンパク質又は酵素の場合、事実である。相同性 (又は配列同一性) の程度は一以上の特定位置のみで又はそれらの配列の全てに沿って相同である配列を用いた場合は大きく変化し得る。両方の配列において同一である配列の一部 (又は部分) は「保存されている」と称される。それらの配列において高度の不変性を示す配列は「高度に保存されている」と称され、それらは高度の相同性を示す。一塩基のみで異なる配列は高度の相同配列とみなすことができる。これは一ヌクレオチド多型配列又はSNP配列の原因である配列の場合、事実である。

#### 【0015】

相同性 (又は配列同一性) は配列の整列後に計算され、コンピュータ化されている地域的な相同性アルゴリズム (例えば Clustal, Intelligent, 30

10

20

30

40

50

Mountain View, California, 又は Wisconsin Genetics Software Package, Genetics computer Group Madison, Wisconsin, USA における GAP, BESTFIT, FASTA 及び TFASTA 又は Boxshade を挙げることができるがこれらに限定されない)に基づいている。

#### 【0016】

##### 図面の簡単な説明

図1は本発明による反転バイオチップの模式図である。これは二つの室5及び6から作られており、これらは同一固体支持体4上に存在し、自動化の目的のために連結されている。

10

#### 【0017】

##### 本発明の詳細な記述

本発明は二つのバイオチップの使用を有利にも含む。そこではサンプルから同定され単離されるべき標的ヌクレオチド配列3を担持する第一の室5、及びバイオチップ7の固体支持体4に対する捕獲ヌクレオチド配列2のさまざまな結合を含む第二の室6が導入されている。前記捕獲ヌクレオチド配列は図1に示される通り、ラベルされたヌクレオチド配列1に特異的である。アッセイを行いやすくするため、標的ヌクレオチド配列3は固体支持体4上に固定されており、従って標的ヌクレオチド配列3は第一の室中の様々なラベルされたヌクレオチド配列1と反応することができる。しかし、この固定は本発明に必須ではない。何故なら第一ハイブリダイゼーションは溶液中で行うことができ、ラベルされたヌクレオチド配列1はその後、アレイ上で検出される(対応する捕獲ヌクレオチド配列2とのハイブリダイゼーション)前に標的ヌクレオチド配列3から分離されることができからである。

20

#### 【0018】

本発明による方法の第一の利点は特異性を検出速度と関連させることである。特異性は、相互に異なる標的ヌクレオチド配列の一部において選択されることができるといえるような小さなラベルされたヌクレオチド配列が用いられるという事実によって得られる。それが小さい配列を用いるという事実は一塩基のみ異なる配列(SNP配列)を区別することも可能にする。好ましい実施態様においては、ラベルされたヌクレオチド配列は対応する標的ヌクレオチド配列に特異的な8~60塩基、好ましくは15~30塩基の配列を有する。

30

#### 【0019】

本発明による方法の第二の利点は、固定された標的ヌクレオチド配列3上でのラベルされたヌクレオチド配列1のハイブリダイゼーションは捕獲ヌクレオチド配列2が小さく、溶液中の標的ヌクレオチド配列3が長いフラグメント(これは通常二本鎖になっている)である状況と比較するとかなり迅速なプロセスであるということである。更に、速度は固体支持体への標的ヌクレオチド配列3の結合部位から離れて位置するラベルされたヌクレオチド配列1のハイブリダイゼーションのための配列を選択し、そしてラベルされたヌクレオチド配列1を過剰に加えることによって加速されることができ。好ましい実施態様においては、ラベルされたヌクレオチド配列1は標的ヌクレオチド配列の量の100倍以上の大過剰で加えられる。これは標的ヌクレオチド配列3上へのこれらのラベルされたヌクレオチド配列1の固定速度及び収率を増大させるためである。

40

#### 【0020】

ラベルされたヌクレオチド配列1は全て標的ヌクレオチド配列3上でのそれらのハイブリダイゼーションのために一緒に存在し、これは反応がそれら自体の間で競争的になることを可能にする。配列は同一又は類似濃度で存在するので、結合収率は標的ヌクレオチド配列の親和性に依存するであろう。たとえ一塩基の小ささによって異なっている非相補的配列についての方よりも相補的配列についての方が好ましい結合が観察された。相同配列間の区別は極めて良好である。

#### 【0021】

第二の(アレイ)室6においてはハイブリダイゼーション収率は様々なラベルされたヌク

50

レオチド配列 1 について同様である。何故ならそれらは同一（又は類似）サイズを有し、それらは類似サイズの捕獲ヌクレオチド配列 2 上でハイブリダイズするからである。スポットの強度は（サンプル中に存在する）第一標的ヌクレオチド配列から離脱したラベルされたヌクレオチド配列 1 であって第二（アレイ）室 6 中でのハイブリダイゼーションに利用可能なラベルされたヌクレオチド配列 1 のレベルを反映する。

#### 【0022】

アレイ中の捕獲ヌクレオチド配列 2 上での配列の第二ハイブリダイゼーションは迅速なプロセスである。何故なら、小さな配列は迅速な反応を可能とするように設計された捕獲ヌクレオチド配列 2 上で反応するからである。捕獲ヌクレオチド配列 2 はかかる反応が速い速度で進行されるように最適化されることができ、固体支持体 4 への結合点から離れて特定配列を伸長させ、ハイブリダイゼーション速度を増大させる。相補的配列は他の非相補的配列と比較して常に過剰に存在するので、対応するスポットは反応の開始から高いシグナルを与え、標的ヌクレオチド配列の同定を可能にする。もし定性的測定のみが要求されるならば、反応は完了前に停止されることができる。何故なら、スポット上のシグナルレベルは反応の開始から溶液中のそれらの割合を反映するであろうからである。

10

#### 【0023】

本発明による方法の一つの好ましい実施態様は二本鎖標的 DNA の検出である。アレイ上での標的 DNA 配列の古典的な検出においては、標的 DNA 配列が溶液中で二本鎖を再形成できるという事実のためハイブリダイゼーション速度は低い。かかる状況に対抗する一つの方法は捕獲ヌクレオチド配列の長さを増大させることであるが、この場合、相同配列が同一捕獲ヌクレオチド配列上に交差ハイブリダイゼーションし、偽の検出を導くことがある。本発明においては標的はラベルされた捕獲ヌクレオチド配列と第二の標的鎖との間のハイブリダイゼーションに対する競争を減少又は除去するため固定前又は固定後に一本鎖にされる。ラベルされたヌクレオチド配列は溶液中でのそれらの再ハイブリダイゼーションを回避するために一本鎖ヌクレオチドであることが好ましい。

20

#### 【0024】

本発明は相同配列の同定及び / 又は定量（サンプル中の微生物の特定株の同定、又は研究において正常又は病気の状況で異なる役割を有するタンパク質をコードする関連遺伝子の集団の間で遺伝子が特異的に同定されなければならない場合）に特に好適である。これはレセプター、キナーゼ、ホスファターゼ、サイクリンの如き調節遺伝子、転写因子又はオンコジーンについて特に真実である。それらの配列の一部が同一であるので、標的相同ヌクレオチド配列はコンセンサスプライマーを用いて増幅又は複製されることができる。多くの適用においては、検出の役割は類似生物の標的ヌクレオチド配列（相同 DNA 又は RNA 配列）の間の区別を行うことである。その場合、保存されている配列の一部又は部分はこれらの相同ヌクレオチド配列（サンプル中に存在するなら）すべてを認識するプライマーの結合のために用いられる。生物の一つの科又は属について一つのプライマー対のみの使用はそれぞれの種又は亜種について特異的なプライマーを使用することと比較して有利である。何故なら生物の科の中には 30 以上の種を含むものもあるからである。1 回の多重 PCR でこれらの種すべてを増幅することを可能にする増幅条件を見出すことは（たとえ不可能ではないにしても）困難である。（五つの異なるヌクレオチド配列についての多重 PCR ですら再現性のある様式でサンプルを取扱うことがすでに困難である。）本発明によれば、各科について一つのプライマー対のみを用いて（細菌科の如き）生物の各科を増幅するためにアッセイを設計することができる。mRNA の反転写の場合のように複製のみが行われるならば、単一の pol-dT が複製を行って cDNA にする転写酵素として役立つことができる。

30

40

#### 【0025】

好ましくは、小さなラベルされたヌクレオチド配列 1 は第一及び第二ハイブリダイゼーション工程においてハイブリダイゼーションのために用いられる。小さなヌクレオチド配列 1 の使用は極めて相同な配列（30 ~ 98 % の相同性）の区別を可能とする。もしラベルされたヌクレオチド配列が好適に選択されるならば、それらは一塩基で異なる（SNP）

50

二つの配列の間で区別することができ、かくして多型の決定を可能にする。

【 0 0 2 6 】

好ましい実施態様においては、ラベルされたヌクレオチド配列 1 はそれらの標的ヌクレオチド 3 に特異的なそれらの配列の一部及び標的ヌクレオチド配列 3 に非特異的でありかつ所定のラベルされたヌクレオチド配列に特異的な追加テールを含む。このテールはアレイ室 6 上に存在する捕獲ヌクレオチド配列 2 と相補的である。テールはそれぞれのラベルされたヌクレオチド配列 1 について異なるので、それらはアレイ上での完全なマッチを安定化させ、その結果、標的ヌクレオチド配列に特異的な配列の一部において例えば一塩基異なる密接に関連したラベルされたヌクレオチド配列はアレイ上でより良好に区別されるであろう。

10

【 0 0 2 7 】

本発明による方法はヌクレオチド配列の改変を用いた S N P 配列の検出に適用されることができ、これらはまず標的 D N A 配列上にハイブリダイズされ、次に第二工程において様々な捕獲ヌクレオチド配列 2 を担持するアレイ室 6 上で検出される。

【 0 0 2 8 】

一実施態様においては、本発明は S N P 配列に隣接する標的ヌクレオチド配列に結合する、異なるヌクレオチドによって停止された二以上のラベルされたヌクレオチド配列の混合物を用いることによる S N P 配列の決定に適用され、ヌクレオチド配列の末端ヌクレオチドの一方は S N P 配列に完全にマッチされる。ラベルされたヌクレオチド配列以外に結合する他の追加ヌクレオチド配列の存在は、完全にマッチするヌクレオチド配列がリガーゼによりこのヌクレオチド配列に結合されることを可能とする。結合されたヌクレオチド配列は次に第二アレイ上で検出され、かくして S N P 配列が同定される。様々なラベルされたヌクレオチド配列は容易に同定されるように C y 3 , C y 5 又は C y 7 の如き異なるラベルを担持してもよい。もしラベルされていないのなら、第二の追加ヌクレオチド配列は生ずる結合生成物がラベルされるようにラベルされる必要がある。

20

【 0 0 2 9 】

本発明の他の実施態様においては、ラベルされたヌクレオチド配列の混合物が用いられ、それぞれの配列は同一 S N P 上の部位に位置する少なくとも一塩基において異なる。ハイブリダイゼーション後、ミスマッチヌクレオチド配列は一本鎖に特異的であるが二本鎖 D N A には影響を与えないヌクレアーゼによって切断され、プロセスが繰返される。未切断の及び切断されたヌクレオチド配列は次にアレイ室 6 上でのハイブリダイゼーションのために処理される。好適なハイブリダイゼーション条件において及びアレイ室上の良く選択された捕獲ヌクレオチド配列を用いると、それらは長い未切断の又は小さな切断されたヌクレオチド配列とハイブリダイズし、かくして S N P 配列の同定を可能にする。

30

【 0 0 3 0 】

本発明の他の実施態様においては、標的ヌクレオチド配列に沿って位置する S N P 配列の如き標的ヌクレオチド配列の異なる部分を認識した複数のヌクレオチド配列の混合物が用いられ、方法の第二工程においてアレイ上で検出される。多数の捕獲ヌクレオチド配列 2 がアレイ上に固定されることができ、多数のラベルされたヌクレオチド配列 1 の間で区別することができる。このようにして、所定の標的ヌクレオチド配列の中に存在する可能性のある突然変異の如き多数の変異について一つのアッセイで調査することが可能である。これはこれらの変異がすべて標的の中に潜在的に存在し、これらが病気の状況と関連している場合に特に有利である。これはオンコジーン ( P 5 3 の如き ) に生ずる突然変異について事実である ; それらの多くはがん進行に関連しており、H I V ウィルス酵素において医薬治療に対する抵抗性に導く。S N P は医薬治療に対する又は病気に対する反応に影響を与える個人的変異にもたぶん関連している。

40

【 0 0 3 1 】

好ましい実施態様においては、所定の問題に対して幅広い応答を得るためにいくつかの標的ヌクレオチド配列が第一ハイブリダイゼーション工程で用いられ、アレイ上で可能な多数の検出という利益が得られる。

50



## 【0032】

有利には標的ヌクレオチド配列は複製又は増幅工程によってラベルされることなしに検出されることができ、かくしてDNA又はRNA配列の直接検出を可能にする（多くの従来法においては、標的ヌクレオチド配列は増幅又は転写工程中にラベルされる）。これはバイオチップの最終用途における単純化を可能とする。何故なら、使用者は増幅をいかなる方法においても行うことができ、この工程中のラベルされた試薬の干渉に悩まされる必要がないからである。この特性はサンプルからの抽出後、直接配列を同定することを可能にし、複製又は増幅工程を除去し、それを行いやすくする。この直接検出は十分な材料が利用できる時のみ行うことができる。本発明による適用はリボゾーマルRNA：16s, 23s, 18s又は25sの如きRNAに適用するがmRNAにも適用する（しかしこれらに限定されない）。これらのRNAは一本鎖ヌクレオチドであるので、支持体上へのそれらの固定後、二本鎖アンプリコンの場合ほど劇的な変性を用いる必要はなく、従って非共有結合をこの工程で用いることができる。RNA（リボゾーマルRNA又はメッセンジャーRNA）の検出は、直接であれそれらの相補的DNA配列へのそれらの複製後であれ、本発明の好ましい実施態様である。何故なら、それらは通常多数のコピー数で細胞中に存在し、多くの適用においてはそれらの検出は増幅なしに行うことができるからである。この直接検出は定量をも容易にする。何故なら、増幅を回避することはこの工程による変異（これは克服することが困難である場合が極めて多い）を減少させるからである。直接検出は長いDNA配列に、それらを抽出及び変性した後、又はそれらを小さい片に切り分けた後に適合されることができる。

10

20

## 【0033】

本発明の好ましい実施態様においては、標的ヌクレオチド配列3はコンセンサスプライマーによって増幅（PCR）される（同一プライマーによって増幅される配列）。相同配列は例えば同一の科又は属の微生物中に存在する遺伝子の配列である。この増幅のためには、プライマーの一方はアミノ化され、従って増幅後アンプリコン鎖の一方はこのアミノ基を担持する。アンプリコンは次にアルデヒド基を担持する表面上でインキュベートされる。アミンとアルデヒドの間の反応は正常条件では自発的であり、他の試薬は不要である。反応後、還元剤（ $\text{NaBH}_4$ ）が添加されて反応性二重結合を削除する。次に第二鎖はヌクレオチド配列用の変性条件を用いて除去される。ヌクレオチド配列が標的鎖から分離するように温度をヌクレオチド配列の溶融温度より上に増大させてもよいが、アルカリ溶液の使用の如き他の条件も用いることができる。（二つの鎖を分離するためには0.1又は0.05NのNaOH溶液濃度で十分である。）

30

## 【0034】

活性化された表面へのアンプリコンの結合は、増幅後に溶液中になおも存在しているプライマーの存在によって制限され得る。これらのプライマーは活性化された表面と反応することもでき、それ故標的アンプリコンの固定を低下させる。必要ならばアンプリコンを表面上に固定する前にアンプリコンをプライマーから分離させる。（スピンカラム上での分離がかかる分離には好適だが、Nucleo trap PCR purification kit（Clontech）又はゲルフィルター上での濾過（Nucleo Spin Clontech）の如きシリカ由来の吸着もかかる分離に好適である。）

40

## 【0035】

サイズに応じたDNAフラグメントの分離は電気泳動法を用いても良好に得ることができる。かかる技術のミニチュア化は、かかるルーチン適用における必要の如き現在の適用に今や好適であることを可能とする。

## 【0036】

本発明によれば、アッセイは同一支持体4上で行われるタンデムチップである。第一室5上で標的ヌクレオチド配列は活性化された支持体4上に共有結合によって固定される。共有結合反応は化学において周知であり、それらの多くは例えばチップ表面上に存在するアルデヒド基とアミノ化された標的ヌクレオチド配列との反応によってチップ形成に既に用いられている。他の実施態様においては、標的配列は直接又は複製もしくは増幅工程中に

50

ビオチン化（好ましくは一方の鎖上で）されており、標的はストレプトアビジンでコートされた表面上に固定される。他の実施態様においては、ハプテン又はリガンドが標的配列上に固定され、従ってそれは表面上に固定された対応する抗体又は受容体によって固定される。

#### 【0037】

この工程を生じさせるために多くの支持体が適合されることができる。ガラスはアルデヒド基を担持するように活性化される。表面上にアルデヒドをグラフトするためには多くの異なる方法がある。ガラスはアミノシランと反応し、次にグルタルアルデヒドと反応する。カルボキシル基を固体支持体の表面上に結合させて次にそれらをアルデヒドへと還元してもよい。アルコール官能基はアルデヒドへと酸化されることもできる。しかし、SMC又はDSSの如き二官能性活性化剤の使用も有用である。何故なら、それらはアミノ基を活性化させそれらをそれぞれチオール又はアミノ基と結合させることができるからである。標的ヌクレオチド配列が二本鎖であり変性溶液中で処理されなければならない場合、かかる化学結合は支持体への標的ヌクレオチド配列の特に有用な共有結合固定を与える。しかし、ナイロン、セルロース誘導体の如き表面上への単純な吸着、又は正に帯電された表面（例えばポリリジン又はポリ（p h e - l y s）の如きコポリマーでカバーされた表面）上への単純な吸着も表面上にヌクレオチド配列を吸着させるための好適な方法である。この場合、条件は小さいプライマーよりもむしろ長い標的DNAフラグメントの吸着のために決定される。

10

#### 【0038】

もしガラスが不活性でありかつ低い自己蛍光性を有するというような多くの利点を有するならば、他の支持体、特にポリマーは有用であることができる。何故なら、それらはそれらの表面で様々な化学的に良く規定された基を用いて得ることができ、かくして標的DNAの固定を可能とするからである。ポリスチレンは表面上でカルボキシル又はアミノ基を得るために活性化され、アミノ-DNAの共有結合固定を可能とする（A n a l . B i o c h e m . 236, 85（1996））。大部分のポリマーはカルボキシル、アミノ又はアルデヒド基を得るために活性化することができる。ポリスチレンは平坦な支持体としてのみならずマイクロビーズとしても入手可能であり、これは固定された標的上でのラベルされたプローブの第一結合工程を行うために用いるのに有利である。

20

#### 【0039】

DNAを固定することができる全ての他の支持体（フィルター、シリコン支持体、金属支持体、コンパクトディスク、プラスチック又は電子装置の如き）も用いることができる。有利には前記固体支持体は単独のガラス又はプラスチックプレートであり、これは本発明による方法を改良するための追加の手段（バーコード、マーカー等）又は媒体（被覆等）を含んでいてもよい。プラスチック支持体中に挿入されたガラスの如き支持体の組合せは自動化のためにチップを取扱うのに有用である。

30

#### 【0040】

結合後及び／又は結合前に標的ヌクレオチド配列は変性され、一本鎖の固定された標的ヌクレオチド配列を生成する。様々なラベルされたヌクレオチド配列を含む溶液が次にこの第一モノチップに加えられ、それらはもしそれらの相補配列が標的ヌクレオチド配列上に存在するならば反応することができる。洗浄後、溶液は加熱され、結合されたヌクレオチド配列は標的ヌクレオチド配列から分離され溶液に見出される。この溶液は次に特定のチャンネル又は他の手段（マイクロポンプ又は弁を利用した洗浄工程）によってラベルされたヌクレオチド配列に特異的な捕獲ヌクレオチド配列を含む第二室6へと移される。第二ハイブリダイゼーションが次に行われ、ラベルされたヌクレオチド配列、従って標的ヌクレオチド配列の同定を可能にする。もし異なる工程が良好に行われるのなら、アッセイは定量的にすることができ、従って標的ヌクレオチド配列の同定のみならず定量をも可能にする。全ての工程は同一表面4上で行われるのでアッセイは使用者にとって行いやすく、自動化を可能とする。

40

#### 【0041】

50

本発明の好ましい実施態様においては、コンセンサスプライマーはサンプル中に存在する可能性がある相同配列のPCR増幅において用いられる。NH<sub>2</sub>の如き官能基又はビオチンは上述の通りそれらを個体表面上に付着させるために組込まれる。LCR, CPCR, NASBA, ICR, TMA又はなだれDNAの如き他の増幅方法も可能である。RNA増幅は反転写後、同様の方法で行うことができる。短い配列のDNAも制限酵素を用いた特定開裂によって得ることができ、小さな配列のRNAは熱による又は塩基の存在による非特定開裂によって得ることができる(WO 97/10365)。

#### 【0042】

ビオチン化されたラベルされたヌクレオチド配列(これはその後、蛍光分子又は酵素又はコロイド金粒子を有するストレプトアビジンコンジュゲートと結合する)を用いた間接ラベリングも用いることができる。これらの金粒子はそれ自体によって検出されるか又は銀の還元のための触媒として役立つことができる。沈殿は次に検出され、所望により定量される(EP-99870106.4)。

10

#### 【0043】

ラベリングはハプテンと抗体の反応を用いても得ることができる。抗体はラベルであるか又はシグナルを与えることができる分子と結合する。

#### 【0044】

DNAチップに適合された蛍光、比色、磁気、電気、電気発光、生物発光又は放射能に基づくDNA検出法は全てアレイの検出に用いることができる。

#### 【0045】

ラベルされたヌクレオチド配列及びそれらの相補的捕獲ヌクレオチド配列の検出の選択は、相同配列が相互から特異的に区別されなければならない場合、全プロセス中で非常に重要な工程である。配列間の相同性が高いほどこれらの配列の選択は一層重要である。相同配列が最も(又は多く)異なる小さな配列領域(又は部分)を選択してこの領域(又は部分)に対する相補物としてラベルされたヌクレオチド配列を設計することが好ましい。配列の長さは相同性によっても変化し、配列が異なれば長く、極めて相同であれば短い。配列は15~30塩基であることができるが、8塩基の小ささの配列又は60塩基の長さの配列も用いることができる。アレイ上にスポットされた捕獲ヌクレオチド配列はラベルされたヌクレオチド配列に対して相補的である。一つの好ましい実施態様においては、これらの配列2は表面4に結合された非特異的配列を有することによって又は固定用のリンカーを用いることによって表面4から特定の距離に位置する。

20

30

#### 【0046】

二つのハイブリダイゼーション工程を行うために単一の表面を使用することはプロセスが自動化及び微小流体光学技術に適合されることを可能とする。表面は二つの室に分けられ、第一の室では標的DNA又はRNAが結合されてラベルされた配列が標的配列上にハイブリダイズし、第二の室はアレイであり、様々な捕獲配列を含む。溶液はチャンネル及びポンプによって各室に注入され除去され、これによりインキュベーション及び洗浄を可能とする。室は要求された温度に加熱されることもできる。

#### 【0047】

二つの室は小さなパイプ又はチャンネルによって連結されることもでき、従ってラベルされたヌクレオチド配列の標的からの分離後、溶液は第二の室へと移されアレイ上でのハイブリダイゼーションプロセスが行われる。検出をも含む全プロセスが自動化されることができ、この反転チップ検出を容易なプロセスとする。本発明は固定された標的上でのラベルされたヌクレオチド配列の結合及び分離工程を繰返し、かくして特定のヌクレオチド配列が捕獲ヌクレオチド配列上でのそれらの区別のためにアレイに蓄積される。自動機械又は機械によるプロセスの自動化はプロセスを繰返すのに特に好適である。

40

#### 【0048】

この技術は現存の自動機械に容易に適合されることができる。それらの一つはELISAアッセイ用に開発されたVIDAS(Biomerieux, Lyon, France)である。それはチップ中での抗原/抗体反応を行うことに対する特異性を有しており、

50

チップは次に洗浄及びインキュベーションのために様々な溶液を徐々に通過させられる。このチップ中で得られる最終シグナルが次に記録される。アレイは分配チップの如き装置中に挿入されることができ、かくして溶液は内側にくみ上げられ、反応させられ、洗浄し、アレイ上でインキュベートする。チップ中で反応を行うことは抗体 - 抗原反応について開発されておりVIDAS機械 (Biomerieux, Lyon, France) によって行われるような自動化に良く適合されている。反応が完了した後、シグナルは後述のようにアレイ上で検出される。

#### 【0049】

二重アレイシステムは同様の方法で処理されることができ、各々はマイクロピペット装置中に挿入されてプロトコールによって要求される場合はヌクレオチド配列の溶液を通過させるために相互に連結されている。 10

#### 【0050】

微小流体工学技術は同一表面上で行われるべき過剰のプライマーからアンプリコンを増幅及び/又は分離する手順全てを可能とし、かくして「チップ上の研究室」をもたらす。最終表面は区画のいくつか又は全てを含むであろう：行われるべきPCR用の室、もし必要ならばアンプリコンを精製するための分離装置、アンプリコンの固定及び様々なラベルされたヌクレオチド配列との第一ハイブリダイゼーションのための室、及び最後にヌクレオチド配列の最終同定及び検出のためのアレイを有する室。全生成物は室間で行われるべき液体のための及び外部溶液を用いたインキュベーション及び洗浄のための必要な連結を担持するであろう。アッセイの十分に自動化された分析を得るために検出器を自動機械に加えることもできる。プライマーからのアンプリコンの分離は例えば ACLARA Biosciences, (Mountain View, Ca, USA) によって提案されているような濾過、吸着 - 脱吸着プロセス又は微小電気泳動を用いて行うことができる。 20

#### 【0051】

##### ハイブリダイゼーション結果の分析

アレイ上でのハイブリダイゼーション結果は、陽性ハイブリダイゼーションによって発されるシグナルに適合された検出システムを用いて機械によって検出及び/又は定量される必要がある。マイクロアレイにおいて用いられる最も一般的なDNAラベリングは蛍光ヌクレオチド配列の使用に基づいている。この場合、蛍光スキャナーが検出器として作用する (即ち共焦点蛍光スキャナー (Genetic Microsystem, Woburn, MA, USA))。 30

#### 【0052】

陽性スポット上での沈殿の形成、特にナノ金でラベルした後の銀沈殿は簡易な検出に特に好適である。何故なら比色スキャナー又は写真検出器という特に低コストの技術で反応レベルを検出及び/又は定量することができるからである (EP - 99870106.4)。

#### 【0053】

像認識用のソフトウェア分析はスポットに適合されてきており、その後、背景レベルが考慮に入れられて各スポット上に存在するシグナルが定量される。他のタイプの分析はスポットの相関分析に基づいており、それはスポットの各ピクセルの形状及びレベルを考慮に入れる。相関レベルに従ったスポットの分類は陽性又は陰性スポットへの分類を可能にし、原サンプル中に標的が存在するか否かについての容易な回答を使用者に与える。 40

#### 【0054】

ハイブリダイゼーションの定量は内部又は外部標準による従来のアプローチを用いて行われ、それは抽出に始まって、複製または増幅、第一ハイブリダイゼーション及びアレイ上での第二ハイブリダイゼーションへと続くプロセスの様々な工程において得られる異なる収率についての相関を可能にする。好ましい実施態様においては、既知の濃度の外部標準が全工程を適してサンプル及びプロセスに加えられ、全プロセスの効率を訂正する。本発明の方法は複製または増幅方法を通常含むので、競合的標準は本発明の好ましい実施態様である。それらのうちの一つは文献 WO 98/11253 において提案されている。 50

## 【0055】

好ましくは、この特定配列を通した標準のハイブリダイゼーション収率は標的配列のハイブリダイゼーション収率と同一であるかまたはこれから20%より多く異なることはなく、定量はWO 98/11253に記載されたように得られる。

## 【0056】

前記標準ヌクレオチド配列、外部及び/又は内部標準は本発明によるキット(装置)又は装置に含まれることが有利であり、所望により本発明による様々な工程を行うために必要な全ての媒体及び手段(ハイブリダイゼーション及び培養培地、ポリメラーゼ及び他の酵素、標準配列、ラベリング分子など)も含まれる。

## 【0057】

実施例特定 femA 遺伝子の検出による Staphylococcus (スタフィロコッカス) 種の同定

FemA 遺伝子は極めて高度に保存されている遺伝子であり、それらは異なるスタフィロコッカス種の間で50~90%の相同性を有する。サンプル中のスタフィロコッカス・エピデルミディス(Staphylococcus epidermidis)の同定は以下の五つの最も一般的なスタフィロコッカスを増幅することができるコンセンサスプライマーによる予備増幅を用いて行われた: エス・アウレス(S. aureus)、エス・エピデルミディス、エス・ヘモリティカス(S. haemolyticus)、エス・ホミニス(S. hominis)及びエス・サブロフィティカス(S. saprophiteticus)。プライマーの一方はアミノ化され、かくしてアンプリコンの一方の鎖はその5'端にアミノ基を担持していた。アンプリコンは次にアルデヒド基を担持するガラスに共有結合固定され、100℃に加熱することによって変性された。五つのスタフィロコッカス種に特異的なラベルされたヌクレオチド配列は次にこれらの一本鎖化されたアンプリコンと共にインキュベートされた。反応及び洗浄後、NaOH溶液中に回収された。この溶液は次に各ラベルされたヌクレオチド配列に特異的な捕獲ヌクレオチド配列のスポットにより形成されたアレイ上に添加された。反応及び洗浄後、ストレプトアビジン-Cy5コンジュゲートが添加され、続いて共焦点蛍光スキャナー(Genetic Microsystem)を用いて読み取られた。この方法の原理は図1及び図2に示されている。エス・エピデルミディスに特異的な捕獲ヌクレオチド配列を担持するスポットのみが陽性である。

## 【0058】

コンセンサスプライマーを用いた FemA 遺伝子の増幅

PCR増幅に用いられたプライマーの配列は以下の通りである:

FP 1 : 5' CCA CTA GCG TAC ATC AAT TTT GA 3'

FP 1HS : 5' CCC ACT CGC TTA TAT AGA ATT TGA 3'

FP 3 : 5' GGT TTA ATA AAG TCA CCA ACA TAT T 3'

FP 3は5'端にNH<sub>2</sub>基を有する。これらのプライマーは femA 遺伝子内の487bpの配列を増幅する。

## 【0059】

表面上でのアンプリコンDNAの固定

アンプリコンは High Pure PCR Product Purification kit (Boehringer, Mannheim, Germany) 上のクロマトグラフィーによって精製され、アミノ化プライマー及び遊離のヌクレオチドが除去された。表面上での固定のために、150nMの精製されたアンプリコンを含む溶液SSC3X pH5の100µlがハイブリダイゼーション室によって枠にはめられたシリル化顕微鏡スライド(Cell associates, Houston, USA)上で23

で30分インキュベートされた。インキュベーション後、スライドは0.1%SDSで1回、水で2回洗浄され、次にNaBH<sub>4</sub>(2.5mgが750µlのPBS及び250

10

20

30

40

50

μlの100%エタノール中に溶解された)と共に5分間インキュベートされ、次に3分間沸騰水中でインキュベートされ、スライドは使用するまで4で貯蔵された。

#### 【0060】

標的からの特定ヌクレオチド配列のハイブリダイゼーション及び除去

五つのスタフィロコッカス種検出のための特異的なビオチン化ヌクレオチド配列は以下の通りである：

*S. aureus*

ASaur01 : 5' CTA AAT GAA GAG CGT GAT ATT TTA  
AAT 3'

*S. epidermidis*

ASepi01 : 5' CTA AAT AAT GAA AGA AAT GTG CTT  
AAT 3'

*S. haemolyticus*

AShae01 : 5' TTA CAA AAT GAA CGT GAA ACT TTA  
AAT 3'

*S. hominis*

AShom01 : 5' CTT CAT GCA GAA CGT CAG ACA TTA  
AAT 3'

*S. saprophyticus*

ASsap01 : 5' TTA AAG GCT GAA CGC GAA GTA TTA  
AGT 3'

#### 【0061】

ビオチン化ヌクレオチド配列コントロールの配列は：

CMV23Biot 5' GGT TAT CAG AGG CCG CTT GGC CA 3'  
'である。

#### 【0062】

各プローブはその5端にビオチンを担持する。

#### 【0063】

ハイブリダイゼーションのため、100μlのハイブリダイゼーション溶液が標的DNAを担持するガラス上に添加される。この混合物は0.5Mのリン酸緩衝液pH7.4, 7% SDS, 100μg/mlサケ精子DNA, 30nMのエス・エピデルミデイスのビオチン化ヌクレオチド配列(1ヌクレオチド配列)又は30nMの各ヌクレオチド配列(5ヌクレオチド配列)を含有する。ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション室中で60で2時間行われる。サンプルはマレイン酸緩衝液10mM pH7.5, NaCl 15mM, Tween 0.03%を用いて4回洗浄される。

#### 【0064】

ハイブリダイズされたプローブは疎水性のペンで範囲を定められたハイブリダイズした領域中で70μlのNaOH 0.05Nを用いて25で5分間インキュベートすることによって解放される。50μlの溶液が次にマイクロチューブに移され、0.7Mリン酸緩衝液pH7.4, 10% SDS, 200μg/mlサケ精子DNA, 10nMのビオチン化されたCMVヌクレオチド配列(ハイブリダイゼーションコントロール)を含む溶液56μlを用いて中和される。

#### 【0065】

アレイ上のラベルされたヌクレオチド配列の検出

五つのスタフィロコッカスについての捕獲ヌクレオチド配列の配列は以下の通りである：

*S. aureus*

ATaur02 : 5' ATT TAA AAT ATC ACG CTC TTC ATT  
TAG 3'

*S. epidermidis*

ATepi02 : 5' ATT AAG CAC ATT TCT TTC ATT ATT

T A G 3 '  
 S . h a e m o l y t i c u s  
 A T h a e 0 2 : 5 ' A T T T A A A G T T T C A C G T T C A T T T T G  
 T A A 3 '  
 S . h o m i n i s  
 A T h o m 0 2 : 5 ' A T T T A A T G T C T G A C G T T C T G C A T G  
 A A G 3 '  
 S . s a p r o p h y t i c u s  
 A T s a p 0 2 : 5 ' A C T T A A T A C T T C G C G T T C A G C C T T  
 T A A 3 '

10

## 【0066】

捕獲ヌクレオチド配列コントロールの配列は：

C M V N H 2 : 5 ' T G G C C A A G C G G C C T C T G A T A A C C 3 '  
 である。

## 【0067】

各捕獲ヌクレオチド配列はその5 端にNH<sub>2</sub> 基を担持する。

## 【0068】

捕獲プローブの固定

アミノ化DNAのアルデヒドへのグラフトのための S c h e n a らによって記述される  
 プロトコール ( P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 3 , 1 0 6 1  
 4 , 1 9 9 6 ) は若干変化させて用いられた。

20

## 【0069】

アミノ化された捕獲ヌクレオチド配列は1 . 6 μ Mの濃度でスポットされた。捕獲ヌクレ  
 オチド配列はシリル化顕微鏡スライド上に自家製の配列器を用いてプリントされた。捕獲  
 ヌクレオチド配列はラベルされたヌクレオチド配列と相補的であり、それらの5 端でア  
 ミノ基によって停止されている。G e n e t i x ( U K ) からの2 5 0 μ mピン及び  
 C e l l A s s o c i a t e s ( H o u s t o n , U S A ) からのシリル化(アルデ  
 ヒド)顕微鏡スライドが用いられた。スポットは直径が4 0 0 μ mであり、分配された体  
 積は約1ナノリットルである。スライドは室温で乾燥され、使用されるまで4 で貯蔵さ  
 れた。

30

## 【0070】

ハイブリダイゼーション及び検出

1 0 6 μ lの変性生成物はハイブリダイゼーション室中で3 0分間5 0 でインキュベ  
 ートされる。スライドは次にマレイン酸緩衝液1 0 m M p H 7 . 5 , N a C l 1 5 m M  
 , T w e e n 0 . 0 3 % ( 洗 浄 緩 衝 液 ) で 4 回 洗 浄 され る 。 ガ ラ ス サ ン プ ル は マ レ イ ン  
 酸緩衝液1 0 0 m M p H 7 . 5 , N a C l 1 5 0 m M , G l o r i a ミルク粉末0  
 . 1 % 中 で 5 0 0 倍 に 希 釈 さ れ た 8 0 0 μ l の ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン ラ ベ ル さ れ た c y a  
 b i n 5 ( S i g m a S t L o u i s , M i ) と 共 に 室 温 で 4 5 分 間 イ ン キ ュ ベ ー  
 ト され る 。 ス ラ イ ド は 洗 浄 緩 衝 液 で 5 回 洗 浄 され 、 水 で 1 回 リ ン ス され て 乾 燥 され る 。 ス  
 ラ イ ド は G e n e t i c M i c r o s y s t e m ( W o b u r n , M A , U S A )  
 から の 共 焦 点 ス キ ャ ナ ー を 用 い て 読 み 取 ら れ る 。

40

## 【0071】

表1は(A)標的エス・エピデルミデイスのアンプリコンが固定され五つのスタフィロコ  
 ッカス種に特異的なラベルされたヌクレオチド配列1の混合物と共に第一室5中でインキ  
 ュベートされる場合の、又は(B)標的エス・アウレウスのアンプリコンが固定され特定  
 のラベルされたエス・エピデルミデイスのヌクレオチド配列と共にインキュベートされる  
 場合のスタフィロコッカス・エピデルミデイスの特定配列の検出について本発明による反  
 転バイオチップで得られた結果を示す。ハイブリダイゼーション後に標的ヌクレオチド配  
 列から分離したヌクレオチド配列1は次に五つのスタフィロコッカス種に特異的な五つの  
 可能なラベルされたプローブのための捕獲プローブ2を担持するアレイ(室6)上に移さ

50

れ、検出される。

【表 1】

表 1

以下の捕獲プローブを 担持するアレイ上での 検出 工 程 Ⅱ	A. 工 程 Ⅱ 五つのラベルされた プローブの存在下での <i>S. epidermidis</i> の固定された標的配列	B. 工 程 Ⅱ <i>S. epidermidis</i> のラベルされた プローブの存在 下での <i>S. aureus</i> の 固定された標的配列
<i>S. aureus</i>	2	0
<i>S. epidermidis</i>	19	0
<i>S. haemolyticus</i>	1	1
<i>S. hominis</i>	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	0	0
コントロール ハイブリダイゼーション +	51	25
コントロール ハイブリダイゼーション -	1	0

10

20

5

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明による反転バイオチップの模式図である。



【図 1】

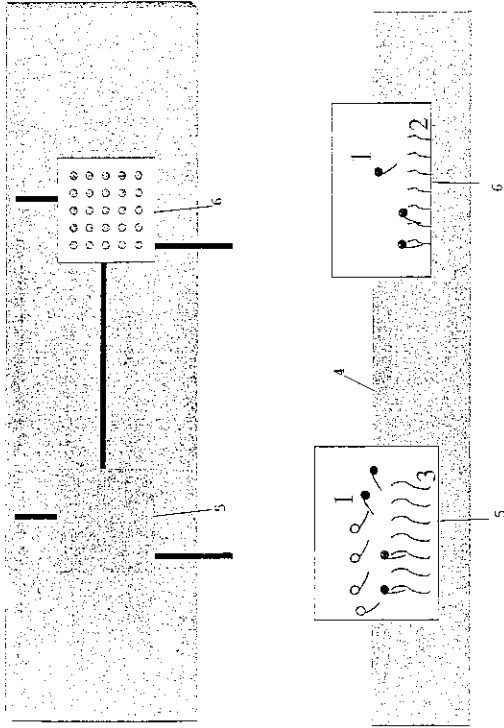


FIG. 1

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

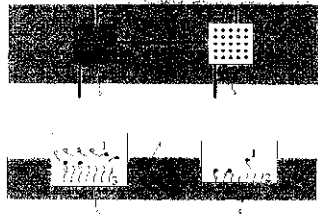
(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 01/96592 A2**

- (51) International Patent Classification: **C12Q** (74) Agents: VAN MALDEREN, Eric et al., Office Van Malderen, 6/1, place Reine Fabiola, B-1083 Brussels (BE).
- (21) International Application Number: PCT/BE00/00101
- (22) International Filing Date: 14 June 2001 (14.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00870127.8 14 June 2000 (14.06.2000) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX (HE/BE), 61, rue de Bruxelles, B-5000 Namur (BE).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): REMACLE, José (BE/BE), 14, chemin des Pierres, B-5020 Malonne (BE); ART, Muriel (BE/BE), 42, avenue Godfried, B-5000 Namur (BE); LOCKMAN, Laurence (BE/BE), 24, rue Henriette, B-6000 Bastogne (BE); ZAMMATTEO, Nathalie (BE/BE), 2023, avenue Jean Malenec, B-5100 Jambes (BE).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, DE, CH, CY, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, SF, TR); OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: REVERSE DETECTION FOR IDENTIFICATION AND/OR QUANTIFICATION OF NUCLEOTIDE TARGET SEQUENCES ON BIOCHIPS



(57) Abstract: The present invention relates to a method for the identification and/or the quantification of one or more target nucleotide sequences (3) present homologous to each other and being possibly present in a sample and discrimination from possibly homologous sequences, by using two sets of nucleotide sequences (1 and 2), wherein a first set of nucleotide sequences possibly labelled (1) bind specifically to said target nucleotide sequences (3) in a first step and are detected and/or quantified through hybridization with a second set of capture nucleotide sequences (2) having at least a part of sequence complementary to the possibly labelled nucleotide sequence (1) of the first set of nucleotide sequences, said capture nucleotide sequence (2) being immobilised upon the surface (4) of a solid support according to an array of at least 4 discrete regions/cm<sup>2</sup>, each of said discrete regions being bonded with one species of capture nucleotide sequences (2), and wherein the identification and quantification of the binding between the possibly labelled nucleotide sequence (1) and their corresponding capture nucleotide sequence (2) is correlated with the identification and the quantification of a target nucleotide sequence (3) present in the sample.

WO 01/96592 A2

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

1

5

REVERSE DETECTION FOR IDENTIFICATION AND/OR QUANTIFICATION  
OF NUCLEOTIDE TARGET SEQUENCES ON BIOCHIPS

10 Field of the invention

[0001] The present invention provides a method for the identification and/or the quantification of one or more target nucleotide sequences present in a sample and which allows their discrimination with homologous sequences, especially the identification and quantification of specific species of micro-organisms belonging to the same family or for the detection and/or the quantification of various isotypes of a general sequence belonging to a specific organism (including Single Nucleotide Polymorphism sequences).

Background of the invention and state of the art

[0002] Biochips made with many specific capture nucleotide sequences are well suited tools to perform a discrimination between corresponding various homologous nucleotide sequences to be detected in a sample.

[0003] However, it exists differences in one or between microorganisms which differ by only one base of the DNA or RNA sequences. As these sequences are very similar, a cross-reaction may occur between one given target nucleotide sequence and different capture nucleotide sequences on which it may hybridise.

[0004] The biochips technology which allows by miniaturisation, the hybridisation and detection of one or

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

2

more target nucleotide sequences are useful tools for the detection (discrimination) between one or more target nucleotide sequences, given to the high number of capture nucleotide sequences that are bound on the biochip. It allows also the determination of a gene expression pattern of a tissue, which is obtained by copying mRNA into cDNA and by their hybridisation upon biochips containing capture nucleotide sequences complementary to these sequences. As the cDNA sequences are different from each other, the level of cross-reaction is low, the capture nucleotide sequences being constructed from a bank of cDNAs cloned from the tissue (which are rather long sequences) and the rate and the yield of hybridisation is high.

[0005] When small capture nucleotide sequences are used the level of hybridisation is rather low, except if the target sequences are cut into smaller pieces. In solution, the rate of hybridisation is proportional to the square root of the strand length, the small one being the limiting one (Wetmur, J.G., Biopolymers 10, 601 (1971); Anderson et Young in "Nucleic acid and hybridisation", IRL Press, Kames, B. and Higgins, S. Editeurs, 73-111, Oxford-Washington DC (1985)). When the reaction is performed on a solid surface, the influence of the length of capture nucleotide sequences is even greater than in solution, so that the difference between the rate of fixation of a given target DNA sequence on small or long capture nucleotide sequences is very large.

[0006] The detection of DNA target nucleotide sequences itself is even more problematic since the DNA has first to be amplified (usually by PCR). Amplicons are double stranded DNA and tend to reassociate in solution rather than hybridise on capture nucleotide sequences, that are bound upon the solid surface (W098/11253). This effect is also directly dependent on the length of the capture

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

3

nucleotide sequences and small capture nucleotide sequences lead to a lack of sensitivity. It is possible to cut the DNA into pieces, in a non-specific way (given the large number of sequences to be analysed in chips). It is also possible to bind as much as possible capture nucleotide sequences upon a surface of the solid support in order to influence the yield of the reaction, but there are limitations to the concentration that can be bound. Finally the choice of the sequences is important, since even with the same length some sequences give higher hybridisation yield than other ones (formation of a secondary structure, which can favour or accelerate the first step leading to the double strand formation).

[0007] Therefore, capture nucleotide sequences of medium length have been proposed as a compromise which still gives a good yield of hybridisation while allowing the detection of target homologous sequences.

[0008] However, small capture nucleotide sequences allow discrimination between sequences which differ by as little as one base. One application of these array bearing small capture nucleotide sequences is the identification of Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) sequences (NC98/56954).

#### 25 Aims of the invention

[0009] The present invention aims to provide a new and improved solution for the identification and/or the quantification of a target nucleotide sequence among other possible homologous target sequences by using arrays bearing capture nucleotide sequences specific to the different homologous target sequences, and which does not present the drawbacks of the state of the art.

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

4

Summary of the invention

[0010] The present invention allows the discrimination between homologous target sequences that could be present simultaneously in a sample, by an inversion of the hybridisation process of the sequences to be hybridised on the array.

[0011] The method according to the invention allows a identification (detection and characterisation) and/or a quantification of target nucleotide sequences based on a two-step binding process in which the nucleotide sequences that bind to the target in the first step are used in the second step as targets to be detected on an array.

[0012] In the method according to the invention, the target DNA (or RNA) sequences react first with different possibly labelled nucleotide sequences, then after washing said possibly labelled nucleotide sequences are detached from the target nucleotide sequences and finally identified by hybridisation on an array bearing capture nucleotide sequences complementary to the possibly labelled nucleotide sequences. According to the invention, it is the possibly labelled nucleotide sequences that hybridise on the array and not the target nucleotide sequences.

[0013] In the method according to the invention, the capture nucleotide sequences and the target nucleotide sequences have at least a part or a portion of their sequences which is identical, while the possibly labelled nucleotide sequences are complementary sequences to them. Such inverted method, as described in the enclosed claims, advantageously solves the problem of an efficient discrimination between homologous target sequences.

Definitions

[0014] "Homologous nucleotide sequences" mean DNA or RNA sequences having the same nucleotide at corresponding

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

5

positions. The degree of homology (or sequence identity) is calculated as the percentage of identical nucleotides at given locations after the sequences have been optimally aligned (full sequence) taking into account insertions or deletions like gaps in one of the two sequences to be compared. This is the case for sequences of a given gene, present in genetically different sources like different organism species or for proteins or enzymes having similar functions (from the same family or sharing common structural domain). The degree of homology (or sequence identity) can vary a lot with sequences being homologous at only one or more specific locations or all along their sequences. The parts (or portions) of the sequences which are identical in both sequences are said "conserved". The sequences showing a high degree of invariance in their sequences are said to be highly conserved and they present a high degree of homology. Sequences differing by only one base can be considered as the highest degree of homologous sequences. This is the case of sequences responsible for the Single Nucleotide Polymorphism sequences or SNP sequences.

[0015] Homology (or sequence identity) is calculated after alignment of sequences and are based on local homology algorithms which have been computerised (as for example but not limited to Clustal, Intelligenetics, Mountain View, California, or GAP, BESTFIT, FASTA and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics computer Group Madison, Wisconsin, USA or Boxshade).

30 Short description of the drawings

[0016] Figure 1 is a schematic presentation of reversed biochips according to the invention made of two chambers 5 and 6 present upon the same solid support 4 and connected for the purpose of automation.

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

6

Detailed description of the present invention

[0017] The invention includes advantageously the use of double biochips wherein a first chamber 5 bearing a target nucleotide sequence 3 to be identified and isolated from a sample is introduced and a second chamber 6 comprising various bound capture nucleotide sequences 2 to the solid support 4 of the biochips 7, said capture nucleotide sequences being specific to the labelled nucleotide sequences 1, as represented in the Fig. 1. In order to make assays easy to perform, target nucleotide sequences 3 are immobilised on the solid support 4, so that they can react with various labelled nucleotide sequences 1 in the first chamber. However, this immobilisation is not essential to the invention since a first hybridisation can be performed in solution and the labelled nucleotide sequences 1 thereafter separated from the target nucleotide sequences 3 before being themselves detected on the array (hybridisation with corresponding capture nucleotide sequences 2).

[0018] The first advantage of the method is to ally a specificity with the rate of detection. The specificity is obtained by the fact that small labelled nucleotide sequences are used so that they can be chosen in the part of the target nucleotide sequences which differ from each other. The fact that it uses small sequences also allows to discriminate sequences differing by only one base (SNP sequences). In a preferred embodiment, the labelled nucleotide sequences have a sequence between 8 and 60 bases but preferably between 15 and 30 bases specific to the corresponding target nucleotide sequences.

[0019] The second advantage of the method according to the invention is that the hybridisation of the labelled nucleotide sequences 1 or the immobilised target nucleotide



WO 01/96592

PCT/BE01/00101

7

sequences 3 is a rather fast process compared to a situation where capture nucleotide sequences 2 are small and target nucleotide sequences 3 in solution are long fragments usually doubled stranded. Moreover, the rate can  
5 be accelerated by selecting a sequence for hybridisation of the labelled nucleotide sequences 1 located away from the binding site of the target nucleotide sequences 3 to the solid support and by adding the labelled nucleotide sequences 1 in excess. In a preferred embodiment, the  
10 labelled nucleotide sequences 1 are added in large excess, more than 100 times the target nucleotide sequences amount, in order to increase the rate and the yield of fixation of these labelled nucleotide sequences 1 on target nucleotide sequences 3.

15 [0020] All labelled nucleotide sequences 1 are present together for their hybridisation on target nucleotide sequences 3, which allows the reaction to be competitive between themselves. Since the sequences are present in the same or similar concentration, the yield of  
20 binding will depend on the affinity to the target nucleotide sequences. A favourable binding for the complementary sequence was observed compared to the non-complementary sequences even if they differ by as little as one base and discrimination between homologous sequences is  
25 very good.

[0021] In the second (array) chamber 6, the yield of hybridisation is similar for the various labelled nucleotide sequences 1 since they have the same (or similar) size and they hybridise on capture nucleotide  
30 sequences 2 of similar size. The intensity of the spots reflects the level of labelled nucleotide sequences 1 that have been detached from the first target nucleotide sequences (present in the sample) and are available for hybridisation in the second (array) chamber 6.

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

8

[0022] The second hybridisation of the sequences on the capture nucleotide sequences 2 in the array is a fast process since small sequences will react on capture nucleotide sequences 2 designed to allow fast reaction. The capture nucleotide sequences 2 can be optimised for such reaction to proceed at a fast rate, extending the specific sequence away from the binding point to the solid support 4 increases the rate of hybridisation. Since the complementary sequence is always in excess compared to the other non-complementary ones, the corresponding spot gives a higher signal from the beginning of the reaction, allowing to identify the target nucleotide sequence. If only qualitative determination is required, the reaction can be stopped before completion since the signal level on the spot will reflect their proportion in the solution from the start of the reaction.

[0023] One preferred embodiment of the method is the detection of double stranded target DNA. In the classical detection of target DNA sequences on array, the rate of hybridisation is low given the fact that the target DNA sequences can reform duplex in solution. One way to counteract such situation is to increase the length of the capture nucleotide sequences but in this case homologous sequences will cross-hybridised on the same capture nucleotide sequences, so leading to false detections. In this invention, the target is rendered single stranded either before or after being immobilised so as to reduce or remove the competition between the labelled capture nucleotide sequences and the second target strand for hybridisation. The labelled nucleotide sequences are preferably single stranded nucleotides in order to avoid their rehybridisation in solution.

[0024] The invention is particularly suitable for identification and/or quantification of homologous

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

9

sequences (identification of a particular strain of microorganism in a sample or in research when genes have to be identified specifically among a population of related genes coding for proteins having different roles in normal or pathological situation). This is especially true for regulatory genes like receptors, kinases, phosphatases, cyclins, transcriptional factors or oncogenes. Having part of their sequences identical, target homologous nucleotide sequences can be amplified or copied by using consensus primers. In many applications, the role of the detection is to discriminate between target nucleotide sequences of similar organisms (homologous DNA or RNA sequences). In that case, parts or portions of the sequences that are conserved, are used for the binding of primers that recognise all these homologous nucleotide sequences (if present in the sample). The use of only one primer pair for one family or genus of organisms is an advantage compared to the use of primers specific for each species or subspecies since some families of organisms comprise more than thirty species. It is also difficult (if not impossible) to find amplification conditions which would allow the amplification of all these species in one multiplex PCR (a multiplex PCR for 5 different nucleotide sequences is already difficult to handle in a reproductive way on samples). According to the invention, an assay can be designed in order to amplify each family of organisms (like the bacteria families) with only one primer pair for each family. If only a copy is performed as in the case of mRNA retrotranscription, a single pol- $\alpha$ T can serve for the transcriptase to perform the copy into cDNA.

[0025] Preferably, small labelled nucleotide sequences 1 are used for hybridisation in the first as well as in the second hybridisation steps. The use of small nucleotide sequences 1 allows the discrimination of very

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

10

homologous sequences (from 30 to 98% homology). If the labelled nucleotide sequences are appropriately chosen, they can discriminate between two sequences differing in one base (SNP) thus allowing the determination of

5 polymorphism.

[0026] In a preferred embodiment, the labelled nucleotide sequences 1 contain one part of their sequence specific of their target nucleotide sequences 3 and an additional tail which is non specific of the target

10 nucleotide sequences 3 and specific of a given labelled nucleotide sequence. This tail is complementary of the capture nucleotide sequences 2 present on the array chamber 6. Since the tail is different for each labelled nucleotide sequences 1, they stabilise perfect match on the array and

15 a consequence is that closely related labelled nucleotide sequences differing for example in one base in the part of the sequence specific of the target nucleotide sequences will be better discriminated on the array.

[0027] The method can be applied for detection of

20 SNP sequences by using modifications of the nucleotide sequences one hybridised on the target DNA sequence and then detected in a second step on the array chamber 6 bearing the various capture nucleotide sequences 2.

[0028] In one embodiment, the invention is applied

25 to determination of SNP sequences by using a mixture of two or more labelled nucleotide sequences terminated by a different nucleotide which bind to the target nucleotide sequence adjacent to the possible SNP sequence, one of end nucleotide of the nucleotide sequence being perfectly

30 matched to the SNP sequence. The presence of another annexed nucleotide sequence which will bind beside the labelled nucleotide sequence, allows the perfectly matched nucleotide sequence to be ligated to this nucleotide sequence by a ligase. The ligated nucleotide sequence is

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

11

then detected on the second array so that the SNP sequence is identified. The various labelled nucleotide sequences may bear different labels such as Cy3, Cy5 or Cy7 so as to be easily identified. If not labelled then the second annexed nucleotide sequence has to be labelled so that the resulting ligated product is labelled.

[0029] In another embodiment of the invention, a mixture of the labelled nucleotide sequence is used, each one differing in at least one base located at the site on the same SNP. After hybridisation, the mismatch nucleotide sequences are cut by a nuclease specific for single strand but without effect on the double stranded DNA and the process repeated. The uncut and cut nucleotide sequences are then processed for hybridisation on the array chamber 6. In appropriated hybridisation conditions and with well chosen capture nucleotide sequences on the array chamber, they can either hybridise the long uncut or the small cut nucleotide sequence thus allowing identification of the SNP sequence.

[0030] In another embodiment of the invention, a mixture of several nucleotide sequences is used which recognised different parts of the target nucleotide sequences, like SNP sequences located along the target nucleotide sequence, and detected in the second step of the method on the array. Numerous capture nucleotide sequences 2 can be fixed to the array and be able to discriminate between numerous labelled nucleotide sequences 1. In this way, it is possible to investigate in one assay for multiple variations like mutations possibly present in a given target nucleotide sequence. This is especially advantageous when all these variations are potentially present in the target and if they are correlated with a pathological situation. This is the case for mutations occurring in oncogenes (like P53); many of them being

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

12

associated with cancer progression, in HIV virus enzymes leading to resistance to drug treatment. SNP are also probably linked to individual variability influencing the response to drug treatment or to pathologies.

5 [0031] In a preferred embodiment, several target nucleotide sequences are used in the first hybridisation step in order to obtain a broader response to the given problem and taking profit of the numerous detections possible on the array.

10 [0032] Advantageously, target nucleotide sequences can be detected without being labelled by a copy or amplification step, thus making the direct detection of DNA or RNA sequences possible (in most previous methods, target nucleotide sequences are labelled during the amplification  
15 or transcription step). This allows a simplification in the final use of the biochips, since the user can perform the amplification in any way and does not have to bother with the possible interferences of labelled reagent during this step. This property also allows the identification of  
20 sequences directly after extraction from samples, removing the step of copying or amplification making it easier to perform. This direct detection can only be performed, when enough material is available. The applications according to the invention apply (but are not limited) to the RNAs like  
25 the ribosomal RNA: 16s, 23s, 18s or 25s but also the mRNA. Since these RNA are single strand nucleotides, it is not necessary to use denaturation as drastic as in the case of double stranded amplicons after their immobilisation on the support so that non covalent binding can be used in this  
30 step. Detection of RNA, ribosomal or messenger, either directly or after their copy into their complementary DNA sequence is a preferred embodiment of this invention since they are usually present in multiple copies in cells so that in many applications, their detection can be performed

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

13

without amplification. This direct detection also facilitates the quantification since avoiding the amplification reduced the variation due to this step which is very often difficult to master. Direct detection can also be adapted to long DNA sequences after their extraction and denaturation or after their cutting into smaller pieces.

[0033] In a preferred embodiment of the invention, the target nucleotide sequence 3 is amplified (PCR) by using consensus primers (sequences which will be amplified by the same primers). Homologous sequences are for example sequences of genes present in the same family or genus of microorganisms. For this amplification, one of the primer will be aminated so that after amplification, one of the amplicon strand will bear this amino group. The amplicons are then incubated on a surface bearing aldehyde groups. The reaction between the amine and the aldehyde is spontaneous in normal conditions, no other reagent are necessary. After the reaction a reducing agent is then added ( $\text{NaBH}_4$ ) in order to eliminate the reactive double bonds. The second strand is then removed by using denaturation conditions for the nucleotide sequences. It is possible to increase the temperature above the melting temperature of the nucleotide sequences, so that they separate from the target strand, but other conditions like the use of alkaline solution may be used (a concentration of 0.1 or even 0.05 N of a NaOH solution is sufficient to separate the two strands).

[0034] Binding of the amplicons to the activated surface can be limited by the presence of the primers which are still present in the solution after the amplification. These primers can also react on the activated surface thus lowering the fixation of the target amplicons. When

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

14

necessary, one separates the amplicons from the primers before performing their fixation on the surface (separation on spin column, but silica derived adsorption like the Nucleo trap PCR purification kit (Clontech) or the  
5 filtration on gel filter (Nucleo Spin Clontech) are also well suitable for such separation).

[0035] Separations of DNA fragments according to their size are also well obtained using electrophoretic methods and the miniaturisation of such techniques allows  
10 them to be now suitable for current applications like necessary in such routine applications.

[0036] According to the invention, the assay is a tandem chips performed on the same support 4. On the first chamber 5, the target nucleotide sequences are immobilised  
15 by covalent fixation on an activated support 4. Covalent reactions are well known in chemistry and many of them are already used for chips formation, for example by the reaction of an aminated target nucleotide sequence with an aldehyde group present on the chips surface. In another  
20 embodiment, the target sequences are biotinylated either directly or during the copy or amplification step preferably on one strand and the target immobilised on streptavidin coated surface. In another embodiment, any hapten or ligand is fixed on the target sequence so that it  
25 is immobilised by the corresponding antibody or receptor immobilised on a surface.

[0037] Many supports can be adapted for this step to occur. Glass is activated so as to bear aldehyde groups. There are many different ways to graft aldehyde groups on a  
30 surface. Glass reacts with aminosilane and then with glutaraldehyde. One may bind carboxyl groups upon the surface of the solid support and then reduce them into aldehyde. Alcohol functions can also be oxidised into aldehydes. However the use of bifunctional activators such



WO 01/46592

PCT/BE01/00101

15

as SMCC or DSS are also useful since they can activate amino groups and link them respectively on thiol or amine groups. Such chemical coupling gives a covalent fixation of the target nucleotide sequences to the support especially  
5 useful when the target nucleotide sequences are double stranded and have to be treated in a denaturation solution. However simple adsorption on surface, like nylon, cellulose derivative or positively charge surfaces for example covered with polylysine or on copolymer like the poly (phe-  
10 lys) is also a method suitable for the adsorption of nucleotide sequences on a surface. In this case, conditions are worked out for the adsorption of long target DNA fragments rather than small primers.

[0038] If glass has many advantages like being inert  
15 and having a low auto-fluorescence, other supports especially polymers can be useful since they can also be obtained with various chemically well defined groups at their surface, thus making the fixation of the target DNA possible. Polystyrene has been activated so as to obtain  
20 carboxyl or amino groups on the surface thus allowing covalent fixation of amino-DNA (Anal. Biochem. 236, 85 (1996)). Most of polymers can be activated in order to obtain carboxyl, amino or aldehyde groups. Polystyrene is available not only as flat support but also as microbeads  
25 which are advantageously used to perform the first binding step of the labelled probes on the immobilised targets.

[0039] All other supports which can fix DNA can be used, like filters, silicon supports, metallic supports, compact-discs, plastic or electronic devices.  
30 Advantageously, said solid support is a single glass or plastic plate which may comprise additional means (barcodes, markers, etc.) or media (coating, etc.) for improving the method according to the invention. A

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

16

combination of supports like glass inserted into plastic support is useful for handling the chips for automation.

- [0040] After and/or before binding, the target nucleotide sequences are denatured, leading to the formation of a single stranded immobilised target nucleotide sequences. The solution containing the various labelled nucleotide sequences are then added to this first monochips and they can react if their complementary sequence is present on the target nucleotide sequences.
- 10 After washing, the solution is heated and the bound nucleotide sequences detached from the target nucleotide sequences and are found in solution. This solution is then transferred to the second chamber 6 by specific channels or other means (washing step with the use of micropumps or
- 15 valves) that contains the capture nucleotide sequences specific for the labelled nucleotide sequences. The second hybridisation is then performed which will allows to identify the labelled nucleotide sequences and thus the target nucleotide sequence. If the different steps are well
- 20 performed the assay can be made quantitative thus allowing not only the identification but also the quantification of target nucleotide sequences. As all steps are performed on the same surface 4, the assay is easy to perform for the user and allows an automation.
- 25 [0041] In the preferred embodiment of this invention, consensus primers are used in PCR amplification of the homologous sequences possibly present in the sample. Functional groups such are  $\text{NH}_2$  or biotin are incorporated so as to attach them to a solid surface as described here
- 30 above. Other amplification methods like LCR, CPR, NASBA, ICR, TMA or avalanche DNA are also possible. RNA amplification can be performed in the same way after a retrotranscription. Short sequences of DNA can also be obtained by specific cleavage with restriction enzymes and

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

17

small sequences of RNA by non specific cleavage by heat or in the presence of base (WO97/10365).

[0042] Indirect labelling by using biotinylated labelled nucleotide sequences which will thereafter bind a streptavidin-conjugate either with fluorescent molecules or with enzyme or with colloidal gold particles, may be used. These gold particles can be detected by themselves or serve as catalysts for the reduction of silver. The precipitate is then detected and possibly quantified (EP-99870106.4).

10 [0043] Labelling could be also obtained with hapten and antibody reaction, the antibody being label or conjugate to molecule which can give a signal.

[0044] All methods of detection for DNA based on fluorescent, colorimetric, magnetic, electronic, electroluminescence, bioluminescence or radioactivity adapted for DNA chips can be used for the detection of the array.

[0045] The selection of the detection labelled nucleotide sequences and their complementary capture nucleotide sequences is a crucial step in the overall process when homologous sequences have to be specifically differentiated from each other. Higher are the homologies between the sequences, more important is the selection of these sequences. Preferably, one selects a small sequence region (or portion) where the homologous sequences differ most (or a lot) and to design the labelled nucleotide sequences as complementary to this region (or portion). The length of the sequences will also vary according to the homology, being longer when the sequences are rather different and smaller when they are very homologous. The sequences will be between 15 and 30 bases but as small as 8 bases and as long as 60 bases can be used. The capture nucleotide sequences that are spotted on the array are complementary to the labelled nucleotide sequences. In one

WO 01/96592

PCT/BE01/00101

18

preferred embodiment, these sequences 2 are located at a certain distance from the surface 4 either by having a non specific sequences which is bound to the surface 4 or by using a linker for the fixation.

5 [0046] The use of a single surface in order to perform the two hybridisation steps allows the process to be adapted for automation and for microfluidic technologies. The surface is divided in two chambers, the first one where the target DNA or RNA will be bound and  
10 where the labelled sequences will hybridise on the target sequences, and the second one which is the array and contains the various capture sequences. Solutions can be injected and removed from each chamber by channels and pumps so that incubations and washing are possible. The  
15 chambers can also be heated at the required temperatures.

[0047] The two chambers can also be connected by a small pipe or channel so that after detachment of the labelled nucleotide sequences from the target, the solution can be transferred into the second chamber and process for  
20 hybridisation on the array. The overall process including even the detection can be automated thus making this reversed chips detection an easy process. This invention repeats the steps of binding and detachment of labelled nucleotide sequences on the immobilised targets so that the  
25 specific nucleotide sequences accumulated in the array for their discrimination on capture nucleotide sequences. Automation of the process by automate or machine is particularly well suited for repeating the process.

[0048] This technology can be easily adapted to  
30 existing automates. One of them is the VIDAS (Biomerieux, Lyon, France), developed for ELISA assay. It has the particularity to perform the antigen/antibody reaction in the tube which is then passed step by step to the various solutions for washing and incubation. The final signal

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

19

obtain in this tip is then recorded. The array can be inserted into a device like a dispensary tip so that solutions is pump inside and is made to react, wash and incubate on the array. Performing the reaction in a tip has  
5 been developed for antibody-antigen reaction and is well adapted to automatisisation as performed by the VIDAS machine (Biomérieux, Lyon, France). After the reaction is complete the signal is detected on the array as described here under.

10 [0049] Double array system could be treated in the same way, each one being inserted into a micropipette device and being connected to each other for passing the solution of nucleotide sequences when required by the protocol.

15 [0050] Microfluidic techniques make also possible the overall procedure of amplification and/or the separation of amplicons from the excess primers to be performed on the same surface, thus leading to a "lab on a chips" product. The final surface will contain several or  
20 all of the compartments: a chamber for the PCR to be conducted, a separation device for the purification of the amplicons if necessary, a chamber for the immobilisation of the amplicons and the first hybridisation with the various labelled nucleotide sequences and finally a chamber with  
25 the array for the final identification of the detection nucleotide sequences. The overall product would bear the necessary connections for the liquid to be conducted between the chambers and for the incubations and washings with the external solutions. A detector, could also be  
30 added to the automate in order to obtain a fully automated analysis of the assay. Separation of the amplicons from the primers can be done using filtration, adsorption-desorption process or micro electrophoresis as proposed for example by ACLARA Biosciences, (Mountain View, Ca, USA).

Analysis of the result of the hybridisation

[0051] The result of the hybridisation on the array has to be detected and/or quantify by machine using  
5 detection system adapted to the signal which is to be emitted by positive hybridisation. The most common labelling of DNA used in micro-array is based on the use of fluorescent nucleotide sequences. In this case fluorescent scanners serve as detectors (i.e. confocal fluorescent  
10 scanner (Genetic Microsystem, Woburn, MA, USA)).

[0052] The formation of a precipitate on the positive spots, especially silver precipitate after labelling with nano-gold, is especially suitable for easy  
15 detection since colorimetric scanners or photographic detectors which are particularly low cost technology can detect and/or quantify the level of reaction (EP-99870106.4).

[0053] A software analysis for image recognition has been adapted to the spots, followed by a quantification of  
20 the signal present on each spot which take into account the level of the background. Another type of analysis is based on correlation analysis of the spots which takes into account the shape and the level of each pixel of the spot. A classification of the spots according to the level of  
25 correlation allows then a classification into positive or negative spots, giving the user an easy answer for the presence or not of the targets in the original sample.

[0054] Quantification of the hybridisation is performed using conventional approaches either by internal  
30 or external standard which allows corrections for the different yields obtained at the various steps of the process starting with the extraction, the copy or amplification, the first hybridisation and the second hybridisation on the array. In the preferred embodiment, an

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

21

external standard at known concentration is added in the sample and process through all steps in order to correct for the efficiency of the overall process. Since the method usually contains a copy or amplification method, a competitive standard is the preferred embodiment of the invention. One of them has been proposed in the document WO98/11253.

[0055] Preferably, the hybridisation yield of the standard through this specific sequence is identical or differ no more than 20% from the hybridisation yield of the target sequence and quantification is obtained as described in WO98/11253.

[0056] Said standard nucleotide sequence, external and/or internal standard, is also advantageously included in the kit (device) or apparatus according to the invention, possibly with all the media and means necessary for performing the different steps according to the invention (hybridisation and culture media, polymerase and other enzymes, standard sequence(s), labelling molecule(s), etc.).

#### Example

#### Identification of *Staphylococcus* species by detection of the specific *femA* genes

[0057] The *femA* genes are very conserved genes and they have an homology of 50 to 90 % between the different *Staphylococcus* species. The identification of *Staphylococcus epidermidis* in a sample was performed by using a preamplification by consensus primers which can amplify the 5 most common *Staphylococcus*: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, and *S. saprophiticus*. One of the primer was aminated, so that one stand of the amplicons bear an amino group at its 5' end. The amplicons were then covalently fixed to a glass

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

22

bearing aldehyde groups and then denatured by heating at 100 °C. The labelled nucleotide sequences specific of the 5 *Staphylococcus* species were then incubated with these single stranded amplicons. After reaction and washing, there were recovered in a solution of NaOH. This solution was then added on the array formed by spots of capture nucleotide sequences specific for each of the labelled nucleotide sequences. After reaction and washing, a streptavidin-Cy5 conjugate was added followed by the reading using a confocal fluorescent scanner (Genetic Microsystem). The principle of this method is shown in Fig. 1 and Fig. 2. Only the spots bearing the capture nucleotide sequences specific for *S. epidermidis* are positive.

15

#### Amplification of the femA gene using consensus primers

[0058] The sequences of the primers used for PCR amplification are the following:

FP 1 : 5' CCA CTA GCG TAC ATC AAT TTT GA 3'

20 FP 1HS : 5' CCC ACT CGC TTA TAT AGA ATT TGA 3'

FP 3 : 5' GGT TTA ATA AAG TCA CCA ACA TAT T 3' with a NH<sub>2</sub> group at 5' end? These primers amplify a sequence of 487 bp within the femA gene.

#### 25 Fixation of the amplicons DNA on a surface

[0059] Amplicons are purified by chromatography on High Pure PCR Product Purification kit (Boehringer, Mannheim, Germany) in order to eliminate aminated primers and free nucleotides. For the fixation on the surface,

30 100 µl of the solution SSC3X pH 5 containing 150 nM of purified amplicons were incubated for 30 min at 23°C on silylated microscopic slides (Cell associates, Houston, USA) framed by an hybridisation chamber. After incubation,



WO 01/46592

PCT/BE01/00101

23

the slides were washed once with 0.1% SDS, twice with water, and then incubated 5 min with  $\text{NaBH}_4$  (2.5 mg dissolved in 750  $\mu\text{l}$  of PBS and 250  $\mu\text{l}$  of 100% ethanol) and 3 min in boiling water slides were stored at 4°C until used.

Hybridisation and removal of the specific nucleotide sequences from the target

[0060] The specific biotinylated nucleotide sequences for the 5 staphylococci species detection are the following :

*S. aureus*

ASaur01 : 5' CTA AAT GAA GAG CGT GAT ATT TTA AAT 3'

*S. epidermidis*

ASepi01 : 5' CTA AAT AAT GAA AGA AAT GTG CTT AAT 3'

15 *S. haemolyticus*

AShae01 : 5' TTA CAA AAT GAA CGT GAA ACT TTA AAT 3'

*S. hominis*

AShom01 : 5' CTT CAT GCA GAA CGT CAG ACA TTA AAT 3'

*S. saprophyticus*

20 ASsap01 : 5' TTA AAG GCT GAA CGC GAA GTA TTA ACT 3'

[0061] The sequence of the biotinylated nucleotide sequence control is :

CMV23Biot 5' GGT TAT CAG AGG CCG CTT GGC CA 3'

[0062] Each probe bears a biotin at its 5' end.

25 [0063] For the hybridisation, 100  $\mu\text{l}$  of hybridisation solution are loaded on glass slide bearing the target DNA. This mixture contains 0.5 M phosphate buffer pH 7.4, 7% SDS, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  salmon sperm DNA, 30 nM of *S. epidermidis* biotinylated nucleotide sequences (1 nucleotide sequence) or 30 nM of each of the nucleotide sequences (5 nucleotide sequences). Hybridisation is carried out in an hybridisation chamber at 60°C for 2h. Samples are washed 4 times with Maleic buffer 10 mM pH 7.5, NaCl 15 mM, Tween 0.03%.

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

24

[0064] Probes hybridised are released with the incubation for 5 min at 25°C with 70 µl of NaOH 0.05 N within the hybridised area delimited by an hydrophobic pen. 50 µl of solution is then transferred into a microtube and  
 5 neutralised with 56 µl of solution containing 0.7 M phosphate buffer pH 7.4, 10% SDS, 200 µg/ml salmon sperm DNA, 10 mM biotinylated CMV nucleotide sequence (hybridisation control).

10 Detection of the labelled nucleotide sequences on the array  
 Sequences of the capture nucleotide sequences

[0065] The sequences of the capture nucleotide sequences for the 5 staphylococci are the following:

*S. aureus*

15 ATaur02 : 5' ATT TAA AAT ATC ACG CTC TTC ATT TAG 3'

*S. epidermidis*

ATepi02 : 5' ATT AAG CAC ATT TCT TTC ATT ATT TAG 3'

*S. haemolyticus*

AThae02 : 5' ATT TAA AGT TTC ACG TTC ATT TTG TAA 3'

20 *S. hominis*

AThom02 : 5' ATT TAA TGT CTG ACG TTC TGC ATG AAG 3'

*S. saprophyticus*

ATsap02 : 5' ACT TAA TAC TTC GCG TTC AGC CTT TAA 3'

[0066] The sequence of the capture nucleotide

25 sequence control is :

CMVNH2 : 5' TGG CCA AGC GGC CTC TGA TAA CC 3'

[0067] Each capture nucleotide sequence bears a NH<sub>2</sub> group at its 5' end.

30 Capture probe immobilisation

[0068] The protocol described by Schena et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10614, 1996) for the grafting of aminated DNA to aldehyde was followed with minor changes.

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

25

[0069] The aminated capture nucleotide sequences were spotted at a concentration of 1.6  $\mu$ M. The capture nucleotide sequences were printed onto the silylated microscopic slides with a home made arrayer. The capture  
 5 nucleotide sequences were complementary to the labelled nucleotide sequences and were terminated by an amino group at their 5' end. 250  $\mu$ m pins from Genetix (UK) and silylated (aldehyde) microscope slides from Cell Associates (Houston, USA) were used. The spots have 400  $\mu$ m in diameter  
 10 and the volume dispensed is about 1 nanoliter. The slides were dried at room temperature and stored at 4°C until used.

#### Hybridisation and detection

15 [0070] 106  $\mu$ l of denatured product are incubated in hybridisation chamber for 30 min at 50°C. Slides are then washed 4 times with Maleic buffer 10 mM pH 7.5, NaCl 15 mM, Tween 0.03% (washing buffer). Glass samples are incubated  
 20 45 min at room temperature with 800  $\mu$ l of streptavidin labelled cyabin5 (Sigma St Louis, Mi) 500x diluted in Maleic buffer 100 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Gloria milk powder 0.1%. Slides are washed 5 times with washing buffer, rinsed once with water and dried. Slides are read with a  
 25 confocal scanner from Genetic Microsystem (Rozburn, MA, USA).

[0071] Table 1 gives a result obtained with reversed biochips according to the invention for the detection of a specific sequence of *Staphylococcus epidermidis* (A) when  
 target *S. epidermidis* amplicons were immobilised and  
 30 incubated in a first chamber 5 with a mixture of the labelled nucleotide sequences 1 specific of the 5 *Staphylococcus* strains or (B) when target *S. aureus* amplicons were immobilised and incubated with specific

WO 01/96592

PCT/BE01/00101

26

labelled *S. epidermidis* nucleotide sequences. The nucleotide sequences 1 detached from the target nucleotide sequence after hybridisation were then transferred on an array (chamber 6) bearing capture probes 2, for the 5 possible labelled probes specific of the 5 *Staphylococcus* species sequences and detected.

WO 01/96592

PCT/BE01/00101

27

Table I

Detection on the array bearing the following capture probes Step II	A. Step I Immobilised target sequence of <i>S. epidermidis</i> in the presence of the 5 labelled probes	B. Step I Immobilised target sequence of <i>S. aureus</i> in the presence of the <i>S. epidermidis</i> labelled probe
<i>S. aureus</i>	2	0
<i>S. epidermidis</i>	19	0
<i>S. haemolyticus</i>	1	1
<i>S. hominis</i>	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	0	0
Control hybridization +	51	23
Control hybridization -	1	0

WO 01/96592

PCT/BE01/00101

28

CLAIMS

1. Method for the identification and/or the quantification of one or more target nucleotide sequences
- 5 (3) present homologous to each other and being possibly present in a sample and discrimination from possibly homologous sequences, by using two sets of nucleotide sequences (1 and 2), wherein a first set of nucleotide sequences possibly labelled (1) bind specifically to said
- 10 target nucleotide sequences (3) in a first step and are detected and/or quantified through hybridisation with a second set of capture nucleotide sequences (2) having at least a part of sequence complementary to the possibly labelled nucleotide sequence (1) of the first set
- 15 of nucleotide sequences, said capture nucleotide sequence (2) being immobilised upon the surface (4) of a solid support according to an array of at least 4 discrete regions/cm<sup>2</sup>, each of said discrete regions being bonded with one species of capture nucleotide sequences (2), and
- 20 wherein the identification and quantification of the binding between the possibly labelled nucleotide sequence (1) and their corresponding capture nucleotide sequence (2) is correlated with the identification and the quantification of a target nucleotide sequence (3) present
- 25 in the sample.
2. The method according to claim 1, wherein between the first step and the second step, the possibly labelled sequence of the first set of nucleotide sequences which are not bound to the target nucleotide sequence (3)
- 30 are removed and the possibly labelled sequences (1) of the first set of nucleotide sequences bound to the target nucleotide sequence (3) are deshybridised from each other before their reuse in the second step.

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

29

3. The method according to claim 1 or 2, wherein the target nucleotide sequences (3) are firstly bound upon the solid support (4), preferably by covalent binding before its hybridisation binding with one or more  
5 possibly labelled sequences (1) of the first set of nucleotide sequences.

4. The method according to claim 1 or 2, wherein the binding between the target nucleotide sequences (2) and the possibly labelled sequences (1) of the first  
10 set of nucleotide sequences occurs in solution.

5. The method according to any of the preceding claims 1 to 4, wherein the possibly labelled sequences (1) of the first set of nucleotide sequences have a length which is essentially identical or similar  
15 (preferably higher than 80% similar) to the length of the capture nucleotide sequences (2) of the second set of nucleotide sequences.

6. The method according to any of the preceding claims, wherein the target nucleotide sequences  
20 (3) to be identified and/or quantified present an homology with homologous sequences present in the sample higher than 30%, preferably higher than 60%, more preferably higher than 80%.

7. The method according to any of the preceding claims, wherein the target nucleotide sequences  
25 (3) to be identified and/or quantified differ from homologous sequences by only one base.

8. The method according to any of the preceding claims, wherein the possibly labelled nucleotide  
30 sequences (1) contain a part of a portion of their sequences comprised between 10 and 60 bases, a sequence which is specific to the target nucleotide sequence (3).

9. The method according to any of the preceding claims, wherein the capture nucleotide sequences

WO 01/46592

PCT/BE01/00101

30

of the second set of nucleotide sequences present a sequence which is complementary to the possibly labelled nucleotide sequences (1).

10. The method according to the claim 9,  
5 wherein the capture nucleotide sequences (2) of the second set of claims have a sequence which is complementary to the possibly labelled nucleotide sequences (1) of the first set of nucleotide sequences upon their complete sequence or have a sequence which is bound to the solid support through  
10 spacers having a length comprised between 10 and 200 bases.

11. The method according to any of the preceding claims, wherein the possibly labelled nucleotide sequences (1) contain part of their sequence being not  
15 specific of the target but specific of their capture probes.

12. The method according to any of the preceding claims, wherein the labelled nucleotide sequences (1) contain a mixture of two or more labelled sequences terminated by a different nucleotide which binds to the  
20 target sequence adjacent to the possible SNP, one of the end nucleotide being perfectly matched to the SNP, and another annexed probe which will bind to the other site of the SNP target, the perfectly matched probe being ligated to this probe by a ligase before detected on the capture  
25 probe array.

13. The method according to any of the preceding claims, wherein the labelled nucleotide sequences (1) contain a mixture of probes each one differing in at least one base located at the SNP site and treated with a  
30 specific nuclease before being detected on the capture probe array.

14. The method according to any of the preceding claims, wherein the one or more target nucleotide sequences (3) to be detected and/or quantified are rRNAs,



WO 01/46592

PCT/BE01/00101

31

preferably selected from the group consisting of 16S, 23S, 18S and 25S rRNAs.

15. The method according to any of the preceding claims 1 to 14, wherein the one or more target  
5 nucleotide sequences(3) to be detected and/or quantified are mRNAs, preferably a mRNA retrotranscribed into a cDNA by a consensus sequence.

16. The method according to any of the preceding claims, wherein the solid support is selected  
10 from the group consisting of glass, electronic device, silicon support, plastic support, compact disc, filter, metallic support, polylysine coated surfaces or a mixture thereof.

17. A diagnostic and/or quantification  
15 apparatus of one or more homologous target nucleotide sequences possibly present in a sample, which comprises means to perform the method according to any of the preceding claims.

18. Apparatus according to claim 17,  
20 characterised in that it comprises two separate chambers (5 and 6), each being dedicated to one of the step performed in the method according to any of the preceding claims 1 to 16.

19. The apparatus according to claim 17 or  
25 18, wherein the chamber comprises a solid support upon which capture nucleotide sequences (2) are immobilised upon its surface according to an array of at least 4 discrete regions/cm<sup>2</sup>, each of said discrete regions being bound with one species of nucleotide sequences.

30 20. A machine or automate for performing the various steps of the method according to any of the preceding claims 1 to 16 upon an apparatus according to claims 17 to 19.

WO 01/96592

PCT/BE01/00101

1/1

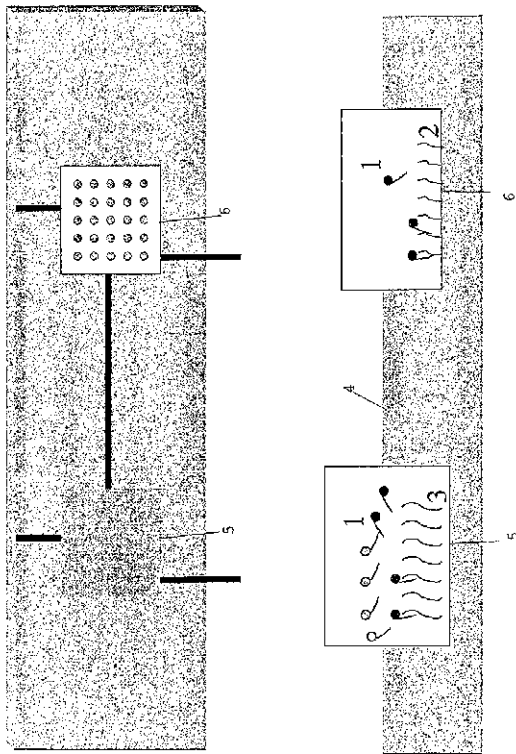


FIG. 1

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
20 December 2001 (20.12.2001)

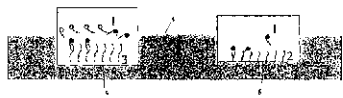
PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/96592 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68  
(21) International Application Number: PCT/BE01/00101  
(22) International Filing Date: 14 June 2001 (14.06.2001)  
(25) Filing Language: English  
(26) Publication Language: English  
(30) Priority Data: 00870127.8 14 June 2000 (14.06.2000) EP  
(71) Applicant (for all designated States except US): FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX (BE/BE); 01, rue de Bruxelles, B-5000 Namur (BE).  
(72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): REMACLE, José (BE/BE); 14, chemin des Pierres, B-5020 Malonne (BE). ART, Muriel (BE/BE); 42, avenue Godfried, B-5000 Namur (BE). LOCKMAN, Laurence (BE/BE); 34, rue Houmville, B-6600 Bastogne (BE). ZAMMATTEO, Nathalie (BE/BE); 202/3, avenue Jean Motene, B-5100 Jambes (BE).  
(74) Agents: VAN MALDEREN, Eric et al.; Office Van Malderen, 6/1, place Reine Fabiola, B-1083 Brussels (BE).  
(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HT, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.  
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  
Published: with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: REVERSE DETECTION FOR IDENTIFICATION AND/OR QUANTIFICATION OF NUCLEOTIDE TARGET SEQUENCES ON BIOCHIPS



WO 01/96592 A3

(57) Abstract: The present invention relates to a method for the identification and/or the quantification of one or more target nucleotide sequences (3) present homologous to each other and being possibly present in a sample and discrimination from possibly homologous sequences, by using two sets of nucleotide sequences (1 and 2), wherein a first set of nucleotide sequences possibly labelled (1) bind specifically to said target nucleotide sequences (3) in a first step and are detected and/or quantified through hybridisation with a second set of capture nucleotide sequences (2) having at least a part of sequence complementary to the possibly labelled nucleotide sequence (1) of the first set of nucleotide sequences, said capture nucleotide sequence (2) being immobilised upon the surface (4) of a solid support according to an array of at least 4 discrete regions/cm<sup>2</sup>, each of said discrete regions being bonded with one species of capture nucleotide sequences (2), and wherein the identification and quantification of the binding between the possibly labelled nucleotide sequence (1) and their corresponding capture nucleotide sequence (2) is correlated with the identification and the quantification of a target nucleotide sequence (3) present in the sample.

---

**WO 01/96592 A3**

(88) Date of publication of the international search report:  
11 April 2002

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/BE 01/00101
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C1201/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C1201		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 07917 A (NANOGEN) 14 March 1996 (1996-03-14) the whole document	17-20
Y	---	1-16
Y	ARMOUR ET AL: "MEASUREMENT OF LOCUS COPY NUMBER BY HYBRIDISATION WITH AMPLIFIABLE PROBES" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 28, no. 2, 2000, pages 605-609, XP002138423 ISSN: 0305-1048 the whole document	1-16
Y	WO 98 11253 A (ERNEST ISABELLE ; REMACLE JOSE (BE); ALEXANDRE ISABELLE (BE); ZAMMA) 19 March 1998 (1998-03-19) the whole document	1-16
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<b>* Special categories of cited documents</b> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "L" earlier document (not published on or after the international filing date) "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
12 December 2001		19/12/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5618, Postfach 2 Tel. +49 69 459 40-4040, Fax +49 69 459 40-4040 Fax +49 69 459 40-4040		Authorized officer  Hagenmaier, S

Form PCT/ISA210 (second sheet) July 1992

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/BE 01/00101

Continuation DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 93 25563 A (HOPE CITY ; WALLACE ROBERT BRUCE (US)) 23 December 1993 (1993-12-23) the whole document	1-16
Y	WO 97 27317 A (CHEE MARK ; LAI CHAOQIANG (US); LEE DANNY (US); AFFYMETRIX INC (US)) 31 July 1997 (1997-07-31) the whole document	1-16
Y	WO 97 31256 A (BLOK HERMAN ; BARANY GEORGE (US); KEMPE MARIA (US); ZIRVI MONIB (US)) 28 August 1997 (1997-08-28) the whole document	1-16
A	EP 0 420 260 A (HOFFMANN LA ROCHE) 3 April 1991 (1991-04-03) the whole document	
A	WO 93 03182 A (MESSULAM ALEC MOSES ; XENOPORE CORP (US)) 18 February 1993 (1993-02-18) the whole document	
A	WO 99 28497 A (BELMAAZA ABDELLAH ; BRUKNER IVAN (CA); POLYGENE INC (CA); ROUSSI N) 10 June 1999 (1999-06-10) the whole document	
P, X	WO 00 43538 A (UNIV MONTREAL ; BRUKNER IVAN (CA); PAQUIN BRUND (CA); TREMBLAY GUY) 27 July 2000 (2000-07-27) the whole document	1-16
P, X	WO 00 53317 A (BIOMERIEUX SA ; COLIN BRUND (FR)) 14 September 2000 (2000-09-14) the whole document	17,18
P, A	WO 00 72018 A (ADVANCED ARRAY TECHNOLOGIES S ; HAMELS SANDRINE (BE); HOUBION YVES) 30 November 2000 (2000-11-30) the whole document	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of Form PCT/ISA/210, July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/BE 01/00101	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 9607917	A	14-03-1996	US 5632957 A	27-05-1997	
			AU 702773 B2	04-03-1999	
			AU 3507095 A	27-03-1996	
			BR 9508908 A	28-10-1997	
			CN 1164894 A	12-11-1997	
			EP 0871888 A1	21-10-1998	
			FI 970957 A	07-05-1997	
			JP 10505497 T	02-06-1998	
			US 6099803 A	08-08-2000	
			WO 9607917 A1	14-03-1996	
			US 6245508 B1	12-06-2001	
			US 6309602 B1	30-10-2001	
			US 6319472 B1	20-11-2001	
			US 6068818 A	30-05-2000	
			US 6225059 B1	01-05-2001	
			US 6254827 B1	03-07-2001	
			US 6315953 B1	13-11-2001	
			US 2001014449 A1	16-08-2001	
			US 6187642 B1	13-02-2001	
			US 6306348 B1	23-10-2001	
			US 5849486 A	15-12-1998	
			US 6287517 B1	11-09-2001	
			US 6309601 B1	30-10-2001	
			US 2001026778 A1	04-10-2001	
			US 2001026935 A1	04-10-2001	
			US 6048690 A	11-04-2000	
			US 6051380 A	18-04-2000	
WO 9811253	A	19-03-1998	BE 1010608 A3	03-11-1998	
			BE 1011052 A3	06-04-1999	
			WO 9811253 A2	19-03-1998	
			EP 0929696 A2	21-07-1999	
			US 2001010906 A1	02-08-2001	
WO 9325563	A	23-12-1993	CA 2115342 A1	23-12-1993	
			WO 9325563 A1	23-12-1993	
			AU 674127 B2	12-12-1996	
			AU 2251192 A	04-01-1994	
			EP 0607151 A1	27-07-1994	
			JP 6509946 T	10-11-1994	
WO 9727317	A	31-07-1997	US 5981176 A	09-11-1999	
			AU 2253397 A	20-08-1997	
			EP 0880598 A1	02-12-1998	
WO 9731256	A	28-08-1997	WO 9727317 A1	31-07-1997	
			AU 735440 B2	05-07-2001	
			AU 2799797 A	10-09-1997	
			CA 2244891 A1	28-08-1997	
			EP 0920440 A2	09-06-1999	
			JP 2001519648 T	23-10-2001	
EP 0420260	A	03-04-1991	WO 9731256 A2	28-08-1997	
			US 5232829 A	03-08-1993	
			AT 187499 T	15-12-1999	
			AU 6189498 A	02-07-1998	
			AU 6329090 A	11-04-1991	
			AU 685144 B2	15-01-1998	

Form PCT/ISA(29C) (patent family members) July 1993

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			
Information on patent family members			International Application No.
			PCT/BE 01/00101
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0420260 A		AU 7280494 A	24-11-1994
		BR 9004881 A	10-09-1991
		CA 2026280 A1	30-03-1991
		DE 69033387 D1	13-01-2000
		DE 69033387 T2	30-03-2000
		DK 420260 T3	27-03-2000
		EP 0420260 A2	03-04-1991
		EP 0875583 A2	04-11-1998
		ES 2140372 T3	01-03-2000
		IL 95800 A	07-10-1994
		JP 2719225 B2	25-02-1998
		JP 3206898 A	10-09-1991
		NO 302204 B1	02-02-1998
		NZ 235463 A	25-03-1994
		NZ 247522 A	25-03-1994
		ZA 9007706 A	26-06-1991
WO 9303182 A	18-02-1993	US 5556748 A	17-09-1996
		AU 2243692 A	02-03-1993
		AU 2243792 A	02-03-1993
		CA 2114627 A1	18-02-1993
		CA 2114628 A1	18-02-1993
		EP 0605430 A1	13-07-1994
		EP 0596915 A1	18-05-1994
		WO 9303181 A1	18-02-1993
		WO 9303182 A1	18-02-1993
		IL 102305 A	15-04-1997
WO 9928497 A	10-06-1999	AU 1477299 A	16-06-1999
		WO 9928497 A1	10-06-1999
		EP 1036194 A1	20-09-2000
WO 0043538 A	27-07-2000	AU 2087900 A	07-08-2000
		WO 0043538 A1	27-07-2000
		EP 1144683 A1	17-10-2001
WO 0053317 A	14-09-2000	FR 2790682 A1	15-09-2000
		AU 3294900 A	28-09-2000
		EP 1159067 A1	05-12-2001
		WO 0053317 A1	14-09-2000
WO 0072018 A	30-11-2000	EP 1054259 A1	22-11-2000
		EP 1126272 A1	22-08-2001
		AU 4735500 A	12-12-2000
		WO 0072018 A1	30-11-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family member) (July 1992)



## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,S

(72)発明者 ロックマン, ローレンス

ベルギー, ベ - 6 6 0 0 ポストゲン, ルー エムランル, 2 4

(72)発明者 ザマテオ, ナタリー

ベルギー, ベ - 5 1 0 0 ジャンベ, アヴェニュー ジェアン マテルン, 2 0 2 / 3

Fターム(参考) 4B029 AA07 AA23 BB20 CC01 CC04 CC08 FA03 GB01 GB02

4B063 QA13 QA17 QA18 QQ42 QQ43 QQ52 QQ53 QQ54 QR14 QR32

QR84 QS25 QS34 QS36 QX02

## 【要約の続き】

レオチド配列(3)の同定及び定量と相互に関連することを特徴とする方法に関する。

【選択図】図1