

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4236281号
(P4236281)

(45) 発行日 平成21年3月11日 (2009. 3. 11)

(24) 登録日 平成20年12月26日 (2008. 12. 26)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)
 G O 1 N 21/78 (2006. 01)
 G O 1 N 33/53 (2006. 01)
 G O 1 N 33/531 (2006. 01)
 G O 1 N 33/532 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A A
 G O 1 N 21/78 C
 G O 1 N 33/53 M
 G O 1 N 33/531 B
 G O 1 N 33/532 B

請求項の数 12 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-500570
 (86) (22) 出願日 平成8年5月14日 (1996. 5. 14)
 (65) 公表番号 特表平11-506924
 (43) 公表日 平成11年6月22日 (1999. 6. 22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1996/006919
 (87) 国際公開番号 W01996/041178
 (87) 国際公開日 平成8年12月19日 (1996. 12. 19)
 審査請求日 平成15年5月14日 (2003. 5. 14)
 (31) 優先権主張番号 08/475, 334
 (32) 優先日 平成7年6月7日 (1995. 6. 7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 08/484, 320
 (32) 優先日 平成7年6月7日 (1995. 6. 7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者

ジェン・プローブ・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9212
 1, サン・ディエゴ, ジェネティック・セ
 ンター・ドライブ 10210

(74) 代理人

弁理士 社本 一夫

(74) 代理人

弁理士 今井 庄亮

(74) 代理人

弁理士 増井 忠武

(74) 代理人

弁理士 栗田 忠彦

(74) 代理人

弁理士 小林 泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミセル保護アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の核酸分析物の検出方法であって、

a) 発光標識がある核酸プローブの複数コピーを前記試料に提供し、前記コピーの少なくとも一部が前記分析物に結合してプローブ：分析物複合体を形成し、

b) 前記試料中で、プローブ：分析物複合体を形成しないプローブに結合する標識をクエンチングするが、プローブ：分析物複合体に結合する標識はクエンチングしない、ミセル、リボソーム、脂質二重層またはそれらの組み合わせを形成し、そして

c) 前記試料中の前記分析物の存在または量の指標として、前記プローブ：分析物複合体と結合する標識による発光を検出すること
 を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記標識が、触媒、反応物及びコファクターのうち少なくとも1つにより活性化されなければ検出されない、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記標識が蛍光化合物である、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記標識が化学発光化合物である、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 5】

工程 b) で、少なくとも二種類の異なる両親媒性物質が前記試料に添加されてミセル、リ

ポソーム、脂質二重層またはそれらの組み合わせを形成する、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

前記少なくとも 2 種類の両親媒性物質の疎水性が異なる、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

第一の両親媒性物質が、TRITON^R X-100、TRITON^R X-305、Tween^R 20、Brij^R 35 及び Nonidet P-40 からなる群より選択される、請求項 5 または 6 記載の方法。

【請求項 8】

第一の両親媒性物質が、セチルトリメチルアンモニウム塩、セチルピリジニウム塩、セチルジメチルエチルアンモニウム塩、3-(シクロヘキシルアミノ)-2-ヒドロキシル-1-プロパンスルホン酸塩、ベンゾニウム (benzthonium) 塩、ベンジルジメチル塩、ベンジルジメチルステアリルアンモニウム塩、ベンジルトリメチルアンモニウム塩、ベンジルセチルジメチルアンモニウム塩、ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウム塩、ベンザルコニウム塩、及びドデシル硫酸塩からなる群より選択される、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 9】

第一の両親媒性物質が TRITON^R X-100 であり、第二の両親媒性物質が、セチルトリメチルアンモニウム塩、セチルピリジニウム塩、セチルジメチルエチルアンモニウム塩、3-(シクロヘキシルアミノ)-2-ヒドロキシル-1-プロパンスルホン酸塩、ベンゾニウム塩、ベンジルジメチル塩、ベンジルジメチルステアリルアンモニウム塩、ベンジルトリメチルアンモニウム塩、ベンジルセチルジメチルアンモニウム塩、ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウム塩及びベンザルコニウム塩からなる群より選択される、請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

前記第一の両親媒性物質が TRITON^R X-100 であり、前記第二の両親媒性物質がセチルトリメチルアンモニウム塩及びセチルピリジニウム塩からなる群より選択される、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

前記標識が、4-(2-スクシンイミジルオキシカルボニルエチル)-フェニル-10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレートフルオロスルホネート、O-ジメチルアクリジニウムエステル、1-メチルアクリジニウムエステル、2,7-ジメチルアクリジニウムエステル、ナフチルアクリジニウムエステル、及び O-ジブromoアクリジニウムエステルからなる群より選択される、請求項 4 記載の方法。

【請求項 12】

工程 b) で、ミセルが、界面活性剤の臨界ミセル濃度と少なくとも等しい量で前記試料にもたらされる前記界面活性剤で形成される、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、生物学的分析物を検出し定量するための組成物及び方法に関する。より詳しくは、本発明は分子生物学及び／または免疫学の応用分野を利用する方法を用いた、生物学的分析物の検出に関する。そのような検出方法及び組成物の用途には、ヒトまたは動物の疾病及び感染の診断、ヒトの消費のための食物及び他の製品の試験、並びに法廷及び環境の試験が含まれる。

発明の背景

微生物、ウイルス並びに核酸及びタンパク質のような生物学的分子の検出及び定量は、多くの分野、例えばヒトの疾病及び感染の診断並びに食物及び環境試験において重要な影響を及ぼす。さらに、組織、痰、尿、血液、精液、唾液及び他の生物学的材料からの特定の生体分子の検出及び定量は、種々の分野において、例えば限定するものではないが、犯罪における容疑者の特定及び親子鑑定において重要性が増してきている。

現在、そのような試験方法及び分析においては、与えられたサンプルにおける特定の生物

10

20

30

40

50

体、組織、または分子の存在を同定するために、一般的に分子プローブとしての核酸またはタンパク質が使用されている。例えば、核酸プローブ及び抗体のようなタンパク質は、“標識”され得る。即ち、放射性核種、独立して追跡可能な予め決められた化学反応に関与することができる酵素（または酵素基質）、または蛍光、発光もしくは化学発光化合物のような検出可能部分に結合され得る。標識プローブ分子を、特定の分析物に、該プローブと分析物が結合し得る条件下で曝した場合、結合した標識の量は、サンプル中に元々存在する分析物の量と相関関係を有する。

核酸及び抗体のいずれも分子プローブとして使用し得るが、一定の用途においては、これらのタイプのプローブの一方が他方より適している。例えば、一本鎖核酸は、サンプル中の該プローブに相補的なヌクレオチド配列を有する標的の核酸の検出のための方法において、最も頻繁に使用される。

ヌクレオチド配列は、一本鎖の核酸を含む一連のヌクレオチド（例えば、アデノシン（A）、チミジン（T）、シトシン（C）、グアナジン（G）、イノシン（I）、ウラシル（U）のリン酸エステル）の順序を意味し、慣用的には、当該核酸の鎖の5'末端から3'末端に記載される。適当な反応条件下では、一本鎖核酸は、別の一本鎖核酸とハイブリダイズして、対向する鎖の相補的な塩基対の間が水素結合で支持されている二重らせん構造を形成し得る。一般的に、そのような構造においては、AがTまたはUと水素結合し、GまたはIがCと水素結合し（時折ミスマッチを起こし得るが鎖の分離を起こすことはない）、そのような場合、各核酸の鎖は、他の核酸の鎖に相補的であると言える。従って、核酸プローブは、標的領域として相補的なヌクレオチドを有する他の核酸の検出に、最も一般的に使用されている。

核酸ハイブリダイゼーションの配列特異性のため、及びヌクレオチド配列レベルの種の分岐進化のため、核酸プローブは、抗体プローブよりも、生物体の特定の種の検出に適することが多い。核酸プローブは非常に感受性であり得る。例えば、少量の標的核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応（例えば、EP0 0 200 362）及び転写ベース増幅システム（例えばWO 91/01384, WO 93/22461及びWO 94/03472）のような方法を用いて増幅することができ、特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いて検出することができる。核酸プローブは、同じ遺伝子またはヌクレオチド配列の変形（version）の間の僅かな違い（一つのみスマッチの場合もある）を有効に区別することができ、これにより、遺伝子の欠陥または突然変異の診断スクリーニングが可能になる。核酸プローブは種の範囲内での特定の個体の同定にも使用し得る。例えば、犯罪者をその核酸の断片をスクリーニングすることによりディスカウント（discount）すること、または特定することさえ可能である。

抗体も、特定の細胞、ウイルス及びタンパク質の同定または検出に有効な手段であり得る。従って、免疫診断方法は、特定の疾病または感染状態、遺伝子の欠陥、または特定の抗原もしくは検出が求められている物質に関連する生理的状态の存在の試験に使用され得る。

核酸及び／または抗体を使用する分析方法の多くは、プローブ：分析物複合体を非結合プローブから分離するために物理的結合工程を利用する。これらの分析方法は、ヘテロジナスアッセイ（heterogeneous assay）と呼ばれている。“プローブ：分析物複合体”または“プローブ：分析物結合体（conjugate）”は、少なくとも一つの分析物分子と安定に結合した少なくとも一つの抗体または核酸プローブ分子（好ましくは検出可能な部分または原子で標識された）を含む特異的結合分子化学種を意味する。分析物分子は、核酸または抗原のような検出、定量及び／または同定が求められている分子化学種である。

“ハイブリッド”、“プローブ：分析物ハイブリッド”は、プローブと分析物の両方が核酸であるプローブ：分析物複合体である。

物理的分離工程を利用する分析方法においては、分離工程において、ガラス、鉱物またはポリマー材料のような固相マトリックスを使用しても良い。分離は、非結合プローブ分子を液相に残して、プローブ：分析物複合体を固相マトリックスに優先的に結合することを含む。そのような場合は、洗浄工程の後に固相支持体に結合しているプローブの量がサンプル内の分析物の量に比例する。また、分析は、プローブ：分析物複合体を液相に残して

10

20

30

40

50

、非結合プローブを固相マトリックスに優先的に結合することを含むものであっても良い。このような場合は、洗浄工程の後に液相に存在するプローブの量が元のサンプル内の分析物の量に比例する。プローブが核酸またはオリゴヌクレオチドである場合は、固相支持体には、ヒドロキシルアパタイト、ポリカチオン成分、疎水性または“逆相”材料などの吸着材料、DEAEのようなイオン交換マトリックス、ゲル濾過マトリックスまたはこれらの固相材料の1種類またはそれ以上の組み合わせが含まれるが、これは限定的なものではない。ゲル濾過のような媒体の場合は、分離はオリゴヌクレオチドの結合によるのではなく、大きさ及び形の異なる分子の分子篩により起こる。

ヘテロジナスアッセイ方法は、目的的分析物が含まれると考えられるサンプルを添加する前に、固相マトリックスにプローブを結合することをも含む。サンプル混合物中に存在する場合には目的的分析物を標識しうるであろう条件で、サンプルを標識に接触させることができる。固相マトリックスは、プローブとマトリックスとの間に共有結合が形成されるように誘導または活性化してもよい。さもなければ、プローブは、強力な非共有相互作用、例えば、限定的なものではないが、イオン、疎水性、逆相、免疫結合、キレート、及び／または酵素－基質相互作用によりマトリックスに結合されても良い。マトリックスに結合されたプローブを、プローブ：分析物複合体の形成を可能にする条件下で、標識された分析物に曝した後、固相マトリックスを、非結合の標識分析物がなくなるように洗浄することにより、分離工程を行う。逆に、分析物は、固相マトリックスに結合して、標識プローブに接触し、検出前に過剰の遊離のプローブをマトリックスから洗い流すこともできる。

さらに別のタイプのアッセイシステムは、“ホモジナスアッセイ (homogenous assay)” と呼ばれるものであり、これは通常固相分離工程なしに溶液中で行うことができ、一般的には遊離のプローブと分析物：プローブ複合体との化学的差異を利用するものである。ホモジナスフォーマットに使用しうるアッセイシステムの例としては、米国特許5,283,174号に開示されているハイブリダイゼーション保護アッセイ (HPA) があり、これによると、プローブを化学発光部分に結合し、分析物に接触させ、その後、分析物：プローブ複合体に結合した化学発光試薬は変化させないが、非ハイブリダイズプローブに結合した化学発光試薬を変化させる条件下で、選択的化学的分解または検出可能な安定性の変化を起こす。この特許は本出願と所有者が共通するものであり、本明細書中に参照として取り込まれる。

標識されたプローブまたは分析物が、非標識の類似物と結合について競合する競合アッセイは、一般的にはヘテロジナスフォーマットで使用される。システムがどのように設計されるかによって、結合標識プローブの量または非結合標識プローブの量のいずれかが、サンプル中の分析物の量と相互関係を有する。しかしながら、そのようなアッセイは物理的分離工程なしにホモジナスフォーマットに、またはホモジナス及びヘテロジナスアッセイの両方の要素を取り入れたフォーマットで使用することもできる。

本発明は、ホモジナスフォーマットにおいても、ヘテロジナスフォーマットにおいても、または上記で概説した混合フォーマットにおいても使用されうる。これは、分析物との複合体または結合体を形成する物質に結合した時、結合しない時とは反対の、標識の検出可能性についての可逆的差異を起こすアッセイに関する。好ましい観点においては、本発明は、“遊離型”または非結合型とは反対の、複合または結合型で、標識物質が異なって検出される環境を確立する手段に関する。

本発明の特別な目的は、分析物を検出、同定または測定する方法であって、検出方法が、標識とそのマイクロ環境との関係をベースとし、これにより標識が、それが結合する物質に関しての結合状態と非結合状態とを識別することを可能にするものを提供することにある。本発明の別の目的は、そのような標識の識別能力を利用するために、標識された物質のマイクロ環境を変える方法を提供することにある。

本発明の別の目的は、単純であり、結果を得るのに必要なオペレーターの工程の数が最小限であるアッセイ方法を提供することにある。従って、本発明は、結合対の検出が物理的分離工程なしに成し遂げられる、ホモジナスフォーマットに特に有用であるが、上記のよ

10

20

30

40

50

うに、ここに記載された本発明の方法及び組成物は、望まれる場合にはそのような工程を含むように容易に変更できる。

本発明のさらに別の目的は、診断アッセイにおけるバックグラウンドシグナルの量を減少させ、これにより該アッセイについてのシグナル対ノイズ比を増加させ、元々のサンプル中の分析物がより少量である場合でも検出可能とする方法に関する。診断アッセイの感度におけるそのような改良により、例えば、患者の試料中の微量の病原性細菌、真菌、またはビリオンの迅速且つ正確な同定を可能にし、これにより迅速且つ正確な診断及び治療が可能になるという明らかな利点を得られる。

下記の例は、発光物質、特に化学発光及び発光化合物を標識として用いた本発明の方法及び組成物を説明するものである。しかしながら、本開示を考慮すれば、化合物がプローブ：分析物複合体と洗剤ミセルの間に隔離されやすく、且つそのマイクロ環境の一つが標識の検出可能性をクエンチングまたは抑制する限り、他のタイプの検出可能化合物、例えば蛍光剤を標識剤として用いたアッセイフォーマットにも同様に本発明を適用できることは当業者に明らかであろう。本発明において、そのような隔離は、標識化合物が結合するプローブが、アッセイ媒体中で、目的の分析物と結合しているか、非結合、即ち遊離の状態

10

で存在しているかに依存して起こる。
“クエンチング(quench)”の語は、標識物質が検出され、または検出可能となるのを防ぐことを意味し、これは直接作用しても間接的に作用してもよい。好ましい実施態様においては、クエンチングは、トリガー剤(triggering agent)と標識(例えば化学発光標識)との反応を妨げる物質の使用により行われ、その結果クエンチングされた標識は、例えば発光により検出可能となることができなくなる。さもないければ、クエンチング剤は、標識と相互作用し、これにより標識により発せられるエネルギーを吸収する。例えば、蛍光標識である1,5-IEDANS (Molecular Probes, Eugene, OR) がクエンチング部分DABCYL (Molecular Probes, Eugene, OR) と相互作用し、蛍光の発光を妨げる場合である。

20

HPA (ハイブリダイゼーション保護アッセイ) として知られるアッセイフォーマットは、アッセイ選択性が標識試薬の分子のマイクロ環境をベースとするものであり、上記のように、米国特許5,283,174号に記載されている。HPAフォーマットにおいては、分析物結合プローブが標識物質と結合されており、この標識物質は、標識されたプローブが目的の分析物と安定な複合体を形成しない限り特異的な分解を起こす。過酸化水素のような酸化剤を添加すると、完全な分析物に関連する標識からの化学発光のみが検出可能になる。

30

標識の活性が、それが結合した物質が分析物に結合しているか否かにより異なるアッセイフォーマットの別のタイプのものとして、典型的には標識として酵素を使用するものがある。プローブ結合酵素は、基質を利用して、比色、蛍光または化学発光シグナルを引き出し、これらが後に検出される。そのようなフォーマットは、米国特許第3,654,090号、第3,817,837号及び第4,190,496号に記載されている。

米国特許第5,093,270号には、リポソーム小胞を用いてマーカー分子、例えば蛍光及び化学発光分子をカプセル封入し、続いてこれを水混合性アルコールを用いてリポソームから放出させる方法が記載されている。米国特許第4,640,898号及び4,816,419号には、荷電 SDS ミセルを用い、ゲンタマイシンが特異的抗体に結合しているときには結合しない条件下で、遊離の蛍光標識ゲンタマイシンの反対に帯電したゲンタマイシン部分に結合させるゲンタマイシンの競合アッセイが記載されている。その後、蛍光標識強度及び発光の分極性の変化が検出された。

40

界面活性剤ミセルによる蛍光量の増加及び発光の分極の変化が、Gratzel and Thomas, The Application of Fluorescent Techniques to the Study of Micellar Systems in 2 Modern Fluorescent Spectroscopy 169 (ed. E.L. Wehry 1976) に開示されている。

発明の要約

本発明は、標識プローブの検出可能性が、プローブが目的の分析物に結合しているか“遊離”即ち結合していないかに依存する定性及び定量分析方法及び組成物に関する。この方法は、両親媒性分子、例えば洗剤(界面活性剤)または脂質を使用してミセルまたはリポソームを形成することを含む。標識分子は、プローブが結合していないときミセルまたは

50

リポソームの中に隔離され、これにより、標識の検出可能性を消失または減少するように作用すると考えられる。しかしながら、同じ条件下で、プローブ：分析物複合体に関する標識は隔離されず、従って検出することができる。

本発明は、プローブが標的の分析物に安定に結合しているか否かに依存して、分子プローブに結合した標識化合物を区別して検出できるようにする単純で、感受性が高く、且つ高価でない方法を提供する。“プローブ”の語は、目的の分析物に優先的に結合するかまたは安定に結合するようになる全ての分子片を意味する。従って、限定的な例ではないが、プローブには、核酸、タンパク質、酵素、抗体、抗原、ハプテン、炭水化物、脂質、リポたんぱく質、リポ多糖類、核タンパク質、細胞レセプター、細胞結合タンパク質、染料、または挿入剤が含まれる。同様に、限定的な例ではないが、分析物には、原子、分子片、複合体または凝集物、ビリオン、細胞、核酸、タンパク質、酵素、抗体、抗原、ハプテン、炭水化物、脂質、リポタンパク質、リポ多糖類、核タンパク質、細胞レセプター、細胞結合タンパク質が含まれる。

一つの実施態様において、本発明は、a) 前記分析物に特異的に結合しうるプローブ、b) 前記プローブに結合する検出可能な標識であって、前記標識の検出可能性が、前記プローブが、プローブ：分析物複合体の一部を構成しているかまたは非結合のままであるかに依存するもの、及びc) 目的分析物を含有すると考えられるサンプルを提供することを含む分析物の有無または量の測定方法に関する。これらの要素を、プローブと分析物がプローブ：分析物複合体を形成する条件下で合わせ、ミセル（または脂質二重層）の形成を起こすのに十分な量の両親媒性物質、例えば界面活性剤または脂質を、この結合対及び非結合標識プローブと接触させる。その後、標識を分析物の存在または量の指標として検出する。

好ましい実施態様において、標識は疎水性化合物、例えば疎水性染料または蛍光もしくは化学発光化合物であり、これは二本鎖核酸に結合または挿入することもできる。特に好ましい実施態様において、検出される化合物は、前駆体標識化合物、例えばアクリジニウムエステル誘導体の、過酸化水素、過酸化物形成化合物またはスーパーオキシドラジカルのような酸化剤による酸化により形成されるN-置換-9-アクリドンである。励起されたアクリドンは、光の形態の電磁波を発生し、これは光度計を用いて検出または定量することが可能である。

他の実施態様において、標識は、プローブが分析物に結合しているときには検出可能であるが、標識プローブが未結合のままの場合はミセルとの相互作用により標識の化学発光ポテンシャルのクエンチングを起こす化学発光ローダミン誘導体である。

他の好ましい実施態様においては、プローブ及び分析物が、互いにハイブリダイズして二本鎖核酸ハイブリッド複合体を形成する一本鎖核酸である。

実施態様において、脂質二重層は、二重層の内側が疎水性であり、外側が親水性である少なくとも1種類の正に帯電した脂質から形成される。別の実施態様においては、二重層の内側の疎水性は、少なくとも1種類の中性または帯電した脂質または洗剤の添加により変化する。

他の好ましい実施態様において、界面活性剤ミセルは、少なくとも1種類の帯電した界面活性剤化学種、好ましくは疎水性“尾部”及びアッセー条件下で正に帯電した“頭部”を有するカチオン性洗剤を含む。これらの用語は、洗剤及び脂質の化学に精通した者に周知である。

他の好ましい実施態様において、界面活性剤ミセルは、疎水性の異なる“尾部”領域を有する少なくとも2種類の洗剤分子を含む。この実施態様において、異なる比率で表面活性分子を混合すると、それらを含む界面活性剤の最も疎水性の高い“尾部”領域と、最も疎水性の低い“尾部”領域の間の疎水性を有する疎水性領域を有する一定範囲のミセルを形成することができる。

本発明の特に好ましい実施態様において、ミセルは、少なくとも1種類のカチオン性界面活性剤化学種、特に、セチルトリメチルアンモニウム塩、セチルピリジニウム塩、セチルジメチルエチルアンモニウム塩、3-（シクロヘキシルアミノ）-2-ヒドロキシ-1-プロパン

10

20

30

40

50

スルホン酸塩、ベンゾニウム塩 (benzthonium)、ベンジルジメチル塩、ベンジルジメチルステアリルアンモニウム塩、ベンジルトリメチルアンモニウム塩、ベンジルセチルジメチルアンモニウム塩、ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウム塩及びベンザルコニウム塩からなる群より選択されるものの混合物を含み、そして少なくとも1種類の他の界面活性剤化学種を含んでいてもよく、これは特に、TRITON系、Tween系、Brij系及びNP系の界面活性剤、最も好ましくは、TRITON^R X-100、TRITON^R X-305、Tween20、Brij35及びNP-40からなる群より選択されるものである。

標識は、任意の安定な手段、例えば、ハプテン結合により、キレート基を介して、抗原抗体反応により、または共有結合によりプローブに結合される。リンカー部分、例えば、N-ヒドロキシスクシネート基を、標識をプローブに結合するのに使用しても良い。しかしながら、標識とプローブを結合することのできる他の基を有する結合も、当該分野で知られている。出願人は現在のところ、プローブと分析物の両方が核酸である場合は、標識をプローブに結合するには非ヌクレオチド結合試薬を使用するのが好ましいとする。これは、本願と所有者を共通にし、本明細書に参考として取り入れられる、Arnold等のEPO 0 313 219に開示されている。

従って、本発明の目的は、分析物：プローブ結合対を未結合の標識プローブから分離するための物理的分離工程を必要とすることなく、溶液中で分析物を特異的に検出するのに有用な方法及び組成物を提供することにある。しかしながら、本発明の方法は、所望により、例えば未結合標識プローブの残留バックグラウンドを減少し、これによりアッセイシステムにおけるシグナル対ノイズ比を増加させるために、物理的分離工程と組み合わせてもよい。

さらに、本発明の他の目的は、HPAのような他の分析方法と組み合わせることにより、アッセイのシグナル対ノイズ比及び再現性を高める方法を提供することにある。さらに、この方法が、比較的安価な試薬及び組成物を利用するものであること、並びにここに記載された組成物及び方法を利用する分析キットは、組み合わせ、梱包及び輸送が、特別な装置を必要とする他の方法よりも容易であることも理解されるであろう。さらに、本発明は、一つの試験容器で、最小限の工程で迅速に実施できる分析方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

図1は、種々のアクリジニウムエステル誘導体の構造を示す。

図2は、種々の両親媒性物質の構造を示す。

図3は、CTAB濃度の関数としての標準AEの化学発光のプロットである。

図4は、CTAB濃度の関数としてのプローブ結合及びハイブリッド結合標準AEの化学発光のプロットである。

図5は、TRITON X-100濃度の関数としての、CTABの存在下の、遊離標準AE、プローブ結合標準AE及びハイブリッド結合標準AEの化学発光のプロットである。

図6は、CPC濃度の関数としてのプローブ結合及びハイブリッド結合標準AEの化学発光のプロットである。

図7は、TRITON X-100濃度の関数としての、CPC及びCPBの存在下の、プローブ結合又はハイブリッド結合標準AEの化学発光のプロットである。

図8は、プローブ結合及びハイブリッド結合標準AEの化学発光に対する異なるカチオン性洗剤の効果を示すグラフである。

図9は、プローブ結合及びハイブリッド結合標準AEの化学発光に対するTRITON X-100を増加した効果を示すグラフである。

図10は、プローブ結合及びハイブリッド結合標準AEの化学発光に対する、CPC及び異なる中性洗剤を含有する混合ミセルの効果を示すグラフである。

図11は、プローブ結合及びハイブリッド結合標準AEの化学発光に対する、カチオン性、アニオン性及び両イオン性洗剤からなる均質ミセルの効果を示すグラフである。

図12は、プローブ結合及びハイブリッド結合標準AEの化学発光に対する、CPCまたはCTABの濃度を一定としてTRITON X-100の濃度を増加した混合ミセルの効果を示すグラフである。

10

20

30

40

50

図13は、プローブ結合及びハイブリッド結合標準AEの化学発光に対する、TRITON X-100の濃度を一定として、CPCの濃度を増加した混合ミセルの効果を示すグラフである。

図14は、CPC濃度の関数としてのプローブ結合またはハイブリッド結合標準AEの化学発光のプロットである。分析物はリボソームRNAである。

図15は、CPC濃度を一定としたTRITON X-100の濃度の関数としてのプローブ結合またはハイブリッド結合標準AEの化学発光のプロットである。分析物はリボソームRNAである。

図16は、CPCの濃度を一定としたTRITON X-100の濃度の関数としてのハイブリッド結合AE誘導体の化学発光のプロットである。

図17は、CPCの濃度を一定としたTRITON X-100の濃度の関数としてのプローブ結合AE誘導体の化学発光のプロットである。

10

図18は、プローブ結合及びハイブリッド結合2,7-diMe AEの化学発光におけるBTC量の増加の効果を示すグラフである。

図19Aは、TRITON X-100の増加する濃度の関数としての、一定濃度のCTABの存在下におけるプローブ結合及びハイブリッド結合ローダミンの化学発光のプロットである。

図19Bは、TRITON X-100の増加する濃度の関数としての、一定濃度のCPCの存在下におけるプローブ結合及びハイブリッド結合ローダミンの化学発光のプロットである。

図20は、TRITON X-100の濃度の関数としての、一定濃度のCPCの存在下における、プローブ結合(WP)及びハイブリッド結合(WT+WP)及び mismatches のハイブリッド結合標準AE(MT+WP)の化学発光のプロットである。

図21は、混合脂質濃度の関数としてのプローブ結合及びハイブリッド結合標準AEの化学発光のプロットである。

20

発明の詳細な説明

本発明は、標識プローブの検出可能性が、プローブが目的の分析物に結合しているか、“遊離”、即ち結合していないかに依存する定性及び定量分析方法及び組成物に関する。本方法は、ミセル、リポソーム、または脂質二重層を形成する洗剤（界面活性剤）または脂質のような両親媒性物質分子の使用を含む。これらの条件下では、標識分子は、下記で説明するように、プローブが結合していない場合はミセルまたは二重層の疎水性の内層の中に隔離され、プローブ結合標識の検出可能性を消し去るかまたは減少すると考えられる。

“界面活性剤”及び“洗剤”の語は、本明細書で交互に使用され、分離した疎水性及び親水性の領域を有し、溶液中で均質及び／または不均質のミセルを形成することのできる全てのクラスの両親媒性物質分子を意味する。“脂質”の語は、分離した疎水性及び親水性の領域を有し、溶液中で均質及び／または不均質リポソームまたは二重層を形成することのできる両親媒性物質分子を意味するものとして使用される。これらの脂質は、洗剤ほど水溶液に溶解しない傾向にあり、ミセルよりむしろリポソームまたは脂質二重層を形成する。しかし、脂質二重層は、疎水性の内層及び親水性の外層表面からなり、従って、これらの構造が、本発明においてミセルと類似した方法で機能すると考えられる。通常、ミセルは疎水性の内側と親水性の外側を有する単層構造である。“両親媒性物質”の語は、界面活性剤及び脂質のような、分離した親水性及び疎水性領域を有し、ミセル、リポソーム、二重層及びこれらの構造の組み合わせを形成することができる化合物を意味する。

30

理論に拘束されることを望むものではないが、出願人は、ミセルまたは二重層の内部が疎水性の環境を提供し、これに疎水性部分を有する標識が引きつけられ、保持されるものと信じる。標識されたプローブが非結合状態にあるとき、該標識の疎水性部分はミセルまたは脂質二重層の疎水性の内側により隔離され、これにより、標識の検出可能シグナルがクエンチングされる。さもなければ、化学発光標識のような、検出可能になる前に活性化または反応（トリガー）を必要とする標識の場合、ミセル（または二重層）が、標識が検出可能となるのに必要な触媒、反応物またはコファクターに標識が接触するのを防ぐ遮蔽物を供すると考えられる。本明細書においては、そのような試薬をトリガー剤と呼び、それらと標識が検出可能なシグナルを形成するのに関与する反応をトリガー反応と呼ぶ。

40

対照的に、出願人は目的の分析物と安定に結合したプローブ分子に結合した標識は、おそらく標識とプローブ：分析物複合体とのより強い競合作用により、ミセルまたはリポソーム

50

ムの内部に結合せず、従って、クエンチングされることがないものと信じる。そのようなプローブ：分析物複合体の関連する相互作用は、事実上かなり疎水性であると考えられる。

本発明の特に好ましい実施態様において、プローブと分析物は両方とも一本鎖の核酸であり、標識はN-アクリジニウムフェニルエステル誘導体であり；エステル結合の酸化により発光励起N-アクリドンが製造される限りアクリジニウム環は1またはそれ以上の位置で置換されていてよく、フェニル環も1またはそれ以上の位置で置換されていてよい。アクリジニウムエステル（AE）誘導体の非限定的リストを図1に示す。そのようなアクリジニウムエステルの最も単純な例は、4-（2-スクシンイミジルオキシカルボニルエチル）-フェニル-10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレートフルオロスルホネート（以下、標準AEと記す）であり、これは好ましくは非ヌクレオチドリンカーを介してオリゴヌクレオチドプローブの塩基にまたは塩基の間に結合される。既に本明細書中に参照により取り込まれているEP0 313 219（上掲）参照。プローブと分析物の核酸が安定な二本鎖ハイブリッドを形成すると、二重らせんのトポロジーの部分としてのメジャーグループ（major groove）とマイナーグループ（minor groove）を生じる。

しかしながら、フェニル基以外の基を有するか、またはさらに置換基を有する化学発光アクリジニウム誘導体が当該分野で知られている。例えば、Corning; McCapra; Hoescht参照。そのような誘導体は、それらと本明細書に記載されたアクリジニウムフェニルエステルとの化学的類似性のため、本アッセイにおいて機能することが当業者に予測されるであろう。

本発明の実施態様において、一定量の界面活性剤、例えばカチオン性洗剤であるセチルトリメチルアンモニウムブロマイド（CTAB）を、ミセルを形成するのに十分な濃度で、アッセイ溶液に添加する。これらの条件下では、標識がプローブに結合した場合でさえ、アクリジニウムエステル標識の化学発光ポテンシャルは、強力にクエンチングされる。

“化学発光ポテンシャル”の語は、反応体または触媒のようなトリガー剤の反応混合物に添加することにより光を発する化合物の能力を意味する。アクリジニウムエステル誘導体の場合、トリガー剤は、光により励起するN-アクリドンを生成することのできる任意の酸化剤（例えば、限定的なものではないが、過酸化水素、過酸化水素生成化合物、またはスーパーオキシド生成化合物）である。

これに対して、標識され、ハイブリダイズされたプローブを含有する溶液に界面活性剤を添加する場合、最初は低濃度の界面活性剤で化学発光シグナルがクエンチングされ、洗剤または脂質濃度の増加に伴いハイブリッド結合標識の化学発光ポテンシャルが徐々に復活することになる。

本発明の実施態様の一つにおいては、ミセルの形成の前に、一定量のTRITON^R X-100（ポリオキシエチレンアルコール）を、CPC（セチルピリジニウムクロライド）のようなカチオン性界面活性剤に添加する。この系において、ハイブリダイズしたプローブに結合したアクリジニウムエステル標識による化学発光は、最初はクエンチングされるが、その後、さらに高濃度のTRITON^R X-100の添加により容易に検出可能なレベルまで増加する。しかしながら、ハイブリダイズしていないプローブに結合した標識は、酸化剤を添加した後、非イオン性洗剤の量を増加してもクエンチングされたままである。

理論に拘束されることを望むものではないが、出願人は、核酸プローブと分析物の場合、ハイブリダイズしたプローブに結合したアクリジニウムエステル誘導体が、二重らせん的一方または両方のグループに生じた疎水性“ポケット”の中にあるものと信じる。そこに存在する標識は、過酸化水素またはスーパーオキシドラジカルにより酸化されやすいためであり（結果として検出可能な発光を生じる）、洗剤ミセルまたは脂質二重層がエネルギーがより高く且つハイブリッド結合標識にとってより望ましくない環境を与えるのに十分な程度強く二重のグループに結合している。二本鎖環境のない場合、ハイブリダイズしていないプローブに結合した標識は、この好ましいマイクロ環境を欠いており、優先的にミセルまたは二重層の疎水性内部に結合するようになる。

この、または他の実施態様において、別の可能なメカニズムは、検出可能な標識が、洗剤

ミセルまたは脂質二重層に結合するようになるよりも容易に二重らせんの塩基の間に優先的に挿入されるものである。さらに、標識が挿入するらせん構造を有しない場合、ミセルまたは二重層の疎水性内部によりさらにクエンチングされやすくなる。

隔離現象は、ミセル（または二重層）内部の疎水性を、特定のプローブ：分析物結合体について変化させることにより操作され得る。標識の性質に依存して、例えば異なるタイプの疎水性“尾部”を有する両親媒性物質の混合物により、ミセルまたは二重層内部の疎水性を“チューニング（tune）”し得る。従って、長い未置換脂肪鎖を有する両親媒性物質（例えば $(\text{CH}_2)_{15}\text{-CH}_3$ “尾部”を有するCPC）は、酸素またはイオウのような不変のヘテロ原子を有する両親媒性物質（例えば $-(\text{O-CH}_2\text{-CH}_2)_{18}\text{-OH}$ 尾部”を有するTRITON[®] X-100）に比べて、より疎水性の高い“尾部”を有すると考えられる。そのような疎水性の尾部は全て非極性であり、後者のタイプは前者のタイプのアルカン尾部に比べてより大きな双極モーメントを有する尾部を有し、従って、疎水性がより低い。従って、例えば、例えばこれらの二つのタイプの界面活性剤の混合物を含有するミセルの内部は、それらを含む二つのタイプの界面活性剤に比べて中程度の疎水性である。洗剤の比率を調節することにより、当業者はこの開示の指示に従って、ミセル内部の疎水性を正確に調節することができる。これにより、プローブ：分析物結合体よりも疎水性が低い、遊離のプローブに関する標識を隔離するには十分な疎水性を有する内部を有するミセル及び二重層を設計することができる。このことは、アッセイの最適化を導きうる。

本発明は、ミセルが、プローブまたは分析物分子の一方または両方のものと反対の電荷を有する両親媒性物質を用いて製造されうることをも補償する。例えば、プローブと標的が、両方とも負に帯電した核酸である場合、ミセルまたは二重層は、ミセル表面に核酸を集めることのできるカチオン性両親媒性物質またはカチオン性もしくは中性両親媒性物質の混合物を用いて製造することができる。そのような場合、標識のクエンチングは、中性の両親媒性物質のみを用いた系よりも効率がよいことが予想される。

有効量とは、本アッセイにおいて、標識されたプローブ：分析物複合体と遊離のプローブの間のノイズに対するシグナルの比率を増加させうる両親媒性物質の量を意味する。好ましい実施態様においては、プローブ：分析物複合体からのシグナル対遊離のプローブ結合標識（ノイズ）の比は、2倍またはそれ以上、4倍またはそれ以上、10倍またはそれ以上、20倍またはそれ以上、50倍またはそれ以上、100倍またはそれ以上、200倍またはそれ以上である。

アッセイシステムが、標識を検出するのに使用する器具のタイプ、標識の性質及び検出すべきサンプルの量を含むファクターに依存して、それらの再現性及び正確性において大きく変化し得ることが理解されるであろう。同一のサンプルの間で検出に関する標準偏差（変動係数CV）が小さいシステムにおいては、正の結果（シグナル）と負の結果（ノイズ）とを高い信頼度で識別するには、非常に小さいシグナル対ノイズ比で十分である。逆に、検出システムが高いCVを有する場合は、同じ程度の結果の信頼性を得るためには、より大きなシグナル対ノイズ比が必要である。

本明細書においては標識プローブについて言及しているが、本発明の方法及び組成物は、標識分析物と非標識プローブを用いた競合アッセイフォーマットにおいても実施され得ることが理解されるであろう。重要なことは、プローブ：分析物複合体が、標識にとってミセルまたは二重層の疎水性内部よりも好ましいマイクロ環境を提供し、さらに標識にとってアッセイ水溶液よりも好ましい環境を提供することである。

さらに、タンパク質は疎水性且つ極性の領域を含み、らせんを形成し得ることも理解されるであろう。タンパク質とプローブとの結合は、これらの領域の1またはそれ以上のマスクングまたは中和、及びポケットまたはグループのような三次元構造の形成により、マイクロ環境を変化させる結果となりうる。従って、本発明の開示に照らせば、当業者は本発明の方法及び組成物を、分析物及びプローブの両方がタンパク質であるアッセイにも有効に使用しうることを当然に予想するであろう。

さらに、プローブと標的の両方が核酸である場合、標的の核酸は、一本鎖核酸である必要はない。例えば、出願人は、一本鎖核酸プローブが二本鎖核酸分析物に導かれ、結果とし

10

20

30

40

50

て三本鎖のプロープ：分析物複合体を生じる本発明の実施態様を予想する。

さらに、本発明の実施態様を下記の実施例において説明する。これらの実施例は、この明細書の最後にある請求の範囲により定められた本発明の範囲を限定するものではない。

実施例

実施例では、他に断りがない限り方法及び試薬は以下の通りとした。略号を付した化学化合物は本書中以下においてその完全名称またはその略号のいずれかによって言及される。以下の洗剤および脂質の構造は図2に示す。

A. 両親媒性物質

1 塩化ベンジルアルコニウム (B A C) を Serva Fine Chemicals 社、Westbury, New York から得た。

2 塩化ベンジルジメチルテトラデシルアンモニウム (B D T A C) を Aldrich Chemical 社、Milwaukee, WI から得た。

3 塩化ベンジルセチルジメチルアンモニウム (B C D A C) を Aldrich Chemical 社、Milwaukee, WI から得た。

4 塩化ベンジルトリメチルアンモニウム (B T A C) を Serva Fine Chemicals 社、Westbury, New York から得た。

5 塩化ベンジルジメチルステアシルアンモニウム (B D S A C) を Aldrich Chemical 社、Milwaukee, WI から得た。

6 塩化ベンゾニウム (B T C) を Serva Fine Chemicals 社、Westbury, New York から得た。

7 3 - (シクロヘキシルアミノ) - 2 - ヒドロキシル - 1 - プロパンスルホン酸を Sigma Chemical 社、St. Louis, MO から得た。

8 臭化セチルトリメチルアンモニウム (C T A B) を Serva Fine Chemicals 社、Westbury, New York から得た。

9 臭化セチルピリジニウム (C P B) を Sigma Chemical 社、St. Louis, MO から得た。

10 塩化セチルピリジニウム (C P C) を Sigma Chemical 社、St. Louis, MO から得た。

11 臭化セチルジメチルエチルアンモニウム (C D E A B) を Sigma Chemical 社、St. Louis, MO から得た。

12 Brij 35 を Sigma Chemical 社、St. Louis, MO から得た。

13 Tween 20 を Sigma Chemical 社、St. Louis, MO から得た。

14 TRITON^R X-100 (TRITON^R は Union Carbide Chemicals 及び Plastics 社の登録商標である) は Kodak Company, Rochester, NY から得た。

15 TRITON^R X-305 (TRITON^R は Union Carbide Chemicals 及び Plastics 社の登録商標である) は Sigma Chemical 社、St. Louis, MO から得た。

16 TRITON^R Q-S44 (TRITON^R は Union Carbide Chemicals 及び Plastics 社の登録商標である) は Sigma Chemical 社、St. Louis, MO から得た。

17 ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) は Biorad Laboratories, San Leandro, CA から得た。

18 Nonidet P-40 (NP-40) は、Sigma Chemical 社、St. Louis, MO から得た。

19 ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (D O P E) はどこか? から得た。

20 臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム (D D A B) はどこか? から得た。

全ての試薬は実施例に開示した使用のために 0.6 M ホウ酸 (pH 8.8) に溶解した。

B. 標識プロープ

標識を、EPO 0 313 219 (上記) に記載した通り非ヌクレオチドリinkerを使用して実施例に記載したオリゴヌクレオチドプロープに結合した。便宜上、単一のリンカー型を、アクリジニウムエステル誘導体を以下の実施例でプロープに結合するために使用した：このリンカーはフェニル環のパラ位に付着し、式：フェニル - (CH₂)₂ - CO - NH - (CH₂)₅ - CO - NH - CH₂ - CH - (ホスホジエステル - ヌクレオチド) - CH₂ - ホスホジエステルヌクレオチド (式中、-CH- は 2 方向分岐点を意味し、二価の一方は括弧

10

20

30

40

50

で示される)を有していた。他に断らない限り、実施例の各々で使用するアクリジニウムエステル誘導体は標準A Eである。標準A EまたはA E誘導体で標識した全てのプローブは 8×10^{19} R L U /モルの比活性を有していた。

標識としてローダミンを使用する実施例では、ローダミンは以下のようにしてオリゴヌクレオチドプローブに結合させた：

付着したN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を有するローダミン結合体をApplied Biosystems社 (Foster City, CA) から購入した (カタログ番号400980)。5'ジメトキシトリチル-5-[N-トリフルオロアセチルアミノヘキシル]-3-アクリルイミド]-2'-デオキシウリジン、3'-[(2-シアノエチル)-(N,N-ジイソプロピル)]-ホスホルアミダイト修飾ヌクレオチドをGlen Research, Sterling, VAから購入した。修飾ヌクレオチドを合成オリゴヌクレオチドに取り込んだ：オリゴヌクレオチド合成は標準ホスホルアミダイト化学を使用して行った。例えば、Carruthers, 他、Methods in Enzymology, Volume 143, pg.287 (1987), Bhatt, 米国特許第5,252,723号 (本出願と同じ所有者) およびKlem他、PCT出願WO 92/07864号 (これらは全て引用により本明細書中に取り込まれる) を参照。修飾ヌクレオチドをトリフルオロ成分は30%水酸化アンモニウムで切断し、次いでローダミン結合体のNHS基と反応してローダミン染料をヌクレオチドに結合させる。

C. ミセル形成

上記したように洗剤を実施例で示した濃度で0.6Mホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH8.8) に溶解した。100 μ l の得られた溶液を各試験時点について12mm $\times$ 75mmのSarstedtポリエステルチューブに置いた。ハイブリダイズした標識プローブと標的核酸または標識プローブ単独のいずれかの10 μ l のアリコート (50,000-1,000,000相対光単位 (R L U) の標識；プローブは 8×10^{19} R L U /モルの比活性を有していた) を各チューブに添加し、チューブを10秒間激しくボルテックスし、室温で10分間放置した後に、検出工程に進んだ。

D. 化学発光の検出

各試料をLeader^R I 発光測定器 (Gen-Probe社、San Diego, CA) に置いた。化学発光を、各チューブへの200 μ l の0.001NのHNO₃中0.1% (v/v) H₂O₂の自動注入と0.5~2秒後の200 μ l の1NのNaOHの注入によって開始させた。生じた化学発光を試料当たり全部で5秒間検出した。

以下の実施例は本発明の各種態様を例示するものであり、本方法および組成物の一般的適用性および有用性並びに出願人が現在知る最適な実施形態を十分に開示することを意図する。本開示を指針として使用することによって、他の電荷を有するか中性の界面活性剤または脂質、両親媒性物質の組み合わせ、並びに本発明の方法および組成物を使用することができる条件を見いだすことは当業者にとって通常のスクリーニング事項であろう。

実施例 1

この実施例では、遊離標準A E (4-(2-スクシンイミジルオキシカルボニルエチル)-フェニル-10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレートフルオロスルホネート) を、プローブに結合することなく、以下の条件下で化学発光について分析した。100 μ l の容量で0.6Mのホウ酸ナトリウム (pH8.7) 中に0%、0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、0.5%、1%および2% (w/v) C T A Bを含有する溶液が、標準A E (約250,000-600,000 R L U；実施例で使用した標準A Eの比活性は 2×10^{20} R L U /モルであった) の溶液10 μ l から与えた。ミセルを上記したように形成した。次いで、各試料を上記したようにルミノメーターで化学発光について分析した。結果を表3に示す。

チューブ番号	RLU(パーセント)*	濃度CTAB % (W/V)
1	100.000	0.000
2	9.350	0.010
3	9.800	0.020
4	12.400	0.050
5	9.800	0.100
6	10.200	0.500
7	12.300	1.000
8	13.700	2.000

*100%RLUはCTABの不在下で標識から得た化学発光である (258,574RLU)。

データは、CTABの低濃度 (0.01% (w/v)) の添加が、洗浄剤の不在下での化学発光収量の約10%まで遊離標準AEの化学発光を減少させることを示す。この洗浄剤濃度は、水溶液中でのCTABについての臨界ミセル濃度0.026%w/vにほぼ等しい。CTABのより高い濃度では、停止の程度は高いままである。

実施例2

標準AEを上記した配列番号7のプロープに結合した。片方のセットの試料において、4 μ lの標識プロープ (160 pmoles) を8mlの11mMのコハク酸リチウム (pH 5.1) に添加した。1ミリリットルのこの溶液を次いで、2 μ l (80 pmoles) の配列番号8の未標識DNA標識分析物に添加し、室温で40分間ハイブリダイズさせた。他方のセットの試料を標的分析物を付与しなかった以外は全く同一に処理した。実施例1と同様に、1セット内の各チューブを次いで、異なる濃度のCTABで与え、ミセルを形成し、化学発光を上記したように検出した。結果を以下および図4に記載する。

チューブ番号	RLU標識 ハイブリッド (パーセント)*	RLU標識 プロープ (パーセント)*	濃度CTAB % (W/V)
1	100.000	100.000	0.000
2	1.900	6.800	0.010
3	2.000	5.800	0.030
4	1.300	5.000	0.100
5	4.000	4.100	0.380
6	12.250	2.400	1.000
7	21.200	2.600	2.000

* 標識プロープおよび標識ハイブリッドのパーセントRLUは、ミセルの不在下で各々から得た化学発光を100%に等しくすることによって別個に計算した；即ち、プロープについての100%RLU=238,639およびプロープについての100%RLU=317,842

データは、C T A Bの濃度が増加するにつれて、化学発光が、洗浄剤を有さない対照チューブと比較して、標識プローブについては約3%、標識ハイブリッドについては約3%最初に減少することを示す。

しかし意外なことに、C T A Bの濃度が増加するにつれて、標識ハイブリッドからの化学発光は（洗浄剤の不在下で）最初の値の約20%まで増加する一方、標識プローブのみを含有するチューブからの化学発光収量は同一条件下で減少する。即ち、これらの結果はD N A標的分析物の存在が、分析系がハイブリッドが結合した検出可能な標識とプローブが結合した停止した標識とを約0.38% (w/v) C T A B以上の濃度で区別することができる能力のために、C A T Bのみを使用する相同分析形式で検出できることを実証する。

10

実施例 3

この実施例では、全チューブが0.6Mのホウ酸ナトリウム中の0.4% (w/v) のC T A Bを含有した。先の実施例に示したように、これは、標識プローブと標識プローブ/分析物ハイブリッドの間の区別がほとんどまたは全く存在しない（図4を参照）C T A Bの濃度である。

3セットのチューブを実施例2と同様に作製した。1番目のセットは遊離A E標識のみを含有し、もう一つのセットのチューブは標識プローブのみを含有し、そして3番目のセットのチューブは標識プローブ：D N A分析物ハイブリッドを含有した。ハイブリダイゼーションを実施例2に記載したように実施した。プローブおよび標的オリゴヌクレオチドは実施例2で使用したものであった。各セット内のチューブにまた、TRITON^R X-100（ポリエチレングリコール p-イソオクチルフェニルエーテル；0.6Mのホウ酸ナトリウム中）を最終濃度0%、0.5%、1%、2%および4% (v/v) になるように添加した。ミセルの形成および化学発光の検出を実施例1（遊離標識）および実施例2（標識プローブおよび標識プローブ：分析物ハイブリッド）に記載したように実施した。

20

以下および図5に示すように、TRITON^R X-100を添加して異なる疎水性「テイル」を有する洗浄剤の混合ミセルを形成することは、遊離A E標識およびA E標識プローブの化学発光収量にほとんど影響を与えず、前者は「非界面活性剤」対照の約10%の化学発光収量を維持し、後者は試験したTRITON^R X-100の範囲に渡ってさらに低い収量を有した。

しかし意外なことに、標識プローブ：分析物ハイブリッドから得た化学発光シグナルは、添加したTRITON^R X-100の0%から2% (v/v) の範囲内の濃度で劇的に増加した；洗浄剤の不在下で得られたR L U sの約2%から約100%。即ち、標識ハイブリッドと標識プローブとの間を判別する分析の能力は、混合ミセルを使用する場合に実質的に増加する。出願人は、混合ミセルの存在下でこの判別が増強される正確な機構に関して不確実なままであるが、これらのデータおよび以下に示す追加のデータは、異なる「テイル」を有する両親媒物質を混合することによってミセル内部の疎水性が変化することが、プローブ：分析物複合体に付随したものの向こうに遊離プローブに結合した標識を隔離するミセルの能力を増加できることを強く示唆する。

30

チューブ 番号	濃度TRITON ^R X-100% (V/V)	RLU標識 プローブ (パーセント)*	RLU標識 ハイブリッド (パーセント)*	RLU標識 AE (パーセント)*
1	0.000	0.610	2.500	10.600
2	0.500	1.330	15.200	10.550
3	1.000	1.030	34.800	10.220
4	2.000	1.500	100.000	9.740
5	4.000	4.000	101.300	11.900

10

* 100%RLUは、ミセルの不在下での標準AE、標識プローブ、および標識ハイブリッド条件の各々から得た化学発光に割り当てる。100%（未結合標準AE）=258,574、100%（標識プローブ）=606,625、および100%（標識ハイブリッド）=613,519

実施例 4

20

別の正に帯電した表面活性剤、セチルピリジニウムクロライド（CPC）から作製したミセルを、AE標識プローブおよびAE標識ハイブリッドの判別を生じる能力について試験した。CPCはCTABと同一の疎水性側鎖を有するが異なる極性「ヘッド」基を有する。2セットの試料を使用し、片方は標識プローブ：DNA標的分析物ハイブリッド（実施例2のようにハイブリダイズしたもの）を使用し、他方は標識プローブのみを使用する。プローブおよび標的オリゴヌクレオチドは、上記実施例2で使用したものである。各セットのチューブについて、0.01%、0.1%、0.3%、0.5%、および1%（w/v）CPCの溶液を作製した。ミセルの形成および検出工程は上記した通りとした。

以下および図6に示すように、標識プローブおよび標識ハイブリッドの両方の化学発光は0.01%のCPCでさえ強く停止し、停止効果は、1%（w/v）CPCの濃度でいずれかの試料からほとんど全く光が放出されなくなるまで、両方のケースで増大した。

30

チューブ番号	RLU標識 プローブ (パーセント)*	RLU標識 ハイブリッド (パーセント)*	濃度CPC % (W/V)
1	100.000	100.000	0.000
2	1.440	3.360	0.030
3	0.960	2.400	0.100
4	0.450	2.050	0.300
5	0.380	1.340	0.500
6	0.490	0.600	1.000

40

* 100%RLUは、CPCの不在下での標識プローブおよび標識ハイブリッド条件の各々から得た化学発光に割り当てる。100%（標識プローブ）=206,968および100%（標識ハイブリッド）=316,803RLU

50

実施例 5

この実施例では、判別の程度に対する帯電した表面活性剤の対イオンの影響を、0.4%のCPCまたはCPBを含有し、TRITON^R X-100の濃度を变化させたミセルを形成することによって試験した。これらの化合物の唯一の相違は、前者の対イオンが塩化物であるのに対して、後者の対イオンが臭化物であることである。プローブと標的オリゴヌクレオチドは実施例2で使用したものである。

4セットのチューブを構築した。2つは、0.4% (w/v) CPCまたはCPBのいずれか中に標準AEに結合した遊離プローブを含有し、2つは、2種のカチオン性表面活性剤のいずれか中に標識プローブ：DNA標的ハイブリッドを含有していた。各々のセットのチューブに、0%、0.5%、1%、2%および4% (v/v) のTRITON^R X-100を与えた。ハイブリダイゼーション、ミセルの形成、および検出は上記実施例2に記載したように行った。

以下および図7に示すように、標識プローブのみの化学発光は、対イオンの性質に関係なく同様に強く停止した。しかし対照的に、CPC中の標識ハイブリッドの化学発光は、CPB中の標識ハイブリッドよりもTRITON^R X-100の濃度が増加しても少ししか停止されず、0.4% (w/v) CPC/4% (v/v) TRITON^R X-100を混合したミセルはAE標識ハイブリッドの検出可能度を洗浄剤の不在下でのその値の約81%まで戻し、0.4% (w/v) CPB/4% (v/v) TRITON^R X-100を混合したミセルは同じ値の約36%までしか戻さなかった。

チューブ 番号	RLU (CPC中の標識 ハイブリッド) (パーセント)*	RLU (CPC中の標識 プローブ) (パーセント)*	RLU (CPB中の標識 ハイブリッド) (パーセント)*	RLU (CPB中の標識 プローブ) (パーセント)*	濃度TRITON ^R X-100 %(V/V)
1	0.270	0.080	0.330	0.080	0.000
2	2.700	0.100	0.990	0.090	0.500
3	10.400	0.120	2.260	0.120	1.000
4	53.000	0.210	6.960	0.170	2.000
5	81.000	0.390	31.600	0.400	4.000

* 100%RLUは、ミセルの不在下での標識プローブおよび標識ハイブリッド条件の各々から得た化学発光に割り当てる。100% (標識プローブ) =602,982RLUおよび100% (標識ハイブリッド)=579,711RLU

データは、混合ミセルを含む洗浄剤の疎水性「テイル」の性質が、標識プローブおよび分析物結合対および標識遊離プローブの間の判別に影響を与える唯一の因子ではないことを示すが；この実施例で試験した2セットの混合ミセルの疎水性は多分同一であり、判別は帯電した洗浄剤に付随した対イオンにより影響を受けた。データはまた、使用した帯電した洗浄剤に関係なくTRITON^R X-100の添加により遊離プローブおよびハイブリッドの間の判別が可能になることを示す。最後に、これらの結果は、判別が、TRITON^R X-100の添加によりミセル内部の疎水性を減少することによってこれらの条件下で増強されることを示唆する。

実施例 6

1パネルのカチオン性洗浄剤を本発明の方法と一緒に使用して評価した；試験した洗浄剤はCDEAB、BDSAC、BTC、BAC、BDTAC、BTAC、CPBおよびBCDACであった。各洗浄剤を0.6Mのホウ酸ナトリウム (pH8.7) に溶解した。各

洗浄剤について、遊離 A E 標識プローブおよび標識 DNA ハイブリッドの検出可能性を 3 つの条件下で測定した： a) 0.05% (w/v) カチオン性表面活性剤の存在下、 b) 0.5% (w/v) カチオン性表面活性剤の存在下、 および c) 0.5% (w/v) カチオン性表面活性剤プラス 2% (v/v) TRITON^R X-100 の存在下。ハイブリダイゼーションは実施例 2 と同様に行った。ミセルの形成および検出工程は上記のように行った。プローブおよび標的オリゴヌクレオチドは実施例 2 で使用したものであった。結果は以下および図 8 に示す。

結果は、本書に開示下方法の一般的適用可能性を実証する。明らかに分かるように、幾つかの洗浄剤は、添加した TRITON^R X-100 の不在下でプローブに結合した標準 A E およびハイブリッドに結合した標準 A E の間を識別することができた一方（即ち、BTAC）、他の洗浄剤は TRITON^R X-100 を有する混合ミセルに存在する場合に、より良好に判別することができる（即ち、CDEAB、BDSAC、BTC、BAC、BDTAC および BCDAC）。全ての場合で、洗浄剤ミセルは、ハイブリッドおよびプローブ間の判別を生じる標識ハイブリッドの検出可能性を阻害するよりも大きい程度で、ハイブリダイズしない標識プローブの化学発光検出可能性を阻害する。実際、少なくとも BTAC の場合、標識されたハイブリッドの化学発光収量は、これらの条件下で分析した場合に混合ミセルの存在下で増強されるようである。

	0.05%(W/V)カチオン性洗浄剤		0.05%(W/V)カチオン性洗浄剤		0.05%(W/V)カチオン性洗浄剤 2%TRITON ^R X-100	
カチオン性 洗浄剤	RLU (標識ハイブリッド) (パーセント)*	RLU (標識プローブ) (パーセント)*	RLU (標識ハイブリッド) (パーセント)*	RLU (標識プローブ) (パーセント)*	RLU (標識ハイブリッド) (パーセント)*	RLU (標識プローブ) (パーセント)*
CDEAB	2.900	1.460	8.500	0.890	74.000	0.420
BDSAC	1.850	1.580	2.300	1.000	18.400	1.300
BTC	2.200	1.060	1.030	0.580	89.050	0.410
BAC	1.060	1.350	1.170	1.510	68.300	0.650
BDTAC	1.160	1.710	1.810	1.330	68.100	0.390
BTAC	78.200	18.800	60.100	1.620	118.000	13.300
CPB	0.500	0.960	0.125	0.180	3.230	0.160
BCDAC	1.060	0.930	4.330	0.590	67.000	0.520

* 100%RLUは、ミセルの不在下での標識プローブおよび標識ハイブリッド条件の各々から得た化学発光に割り当てる。100%（標識ハイブリッド）=395,580RLU および 100%（標識プローブ）=389,611RLU

実施例 7

標識プローブおよび標識プローブ：分析物ハイブリッドを判別するという TRITON^R X-100 のみを含有する均質な帯電していないミセルの能力を以下の方法で試験した。A E 標識プローブまたは A E 標識プローブ：分析物ハイブリッドのいずれかに TRITON^R X-100 を最終濃度 0%、0.03%、0.1%、0.5%、2% または 4% (v/v) まで付与した。ハイブリダイゼーション、ミセルの形成および検出は実施例 2 のように行った。プローブおよび標的オリゴヌクレオチドは実施例 2 で使用したものである。

以下および図 9 に示すように、たとえ少量の (0.03%) TRITON^R X-100 を溶液に添加した場合でも、プローブとハイブリッドとの判別は明白に実証された。TRITON^R X-100 の濃度を増加させると、ハイブリッドに付随した標識の化学発光は増加し続けた一方、標識プローブに対するミセルの停止効果は、約 0.5% から 2% の TRITON^R X-100 の濃度で最

小化されるようであった。即ち、この実験により、均質な非イオン性洗浄剤ミセルを使用する本発明による分析がプローブとハイブリッドとを判別できることが実証される。

濃度(V/V) TRITON ^R X-100	RLU (標識ハイブリッド TRITON ^R X-100中) (パーセント) *	RLU (標識プローブ TRITON ^R X-100中) (パーセント) *
0	100	100
0.03	111	68
0.1	117	66
0.5	122	63
2	125	66
4	137	72

* 100%RLUは、ミセルの不在下での標識プローブおよび標識ハイブリッド条件の各々から得た化学発光に割り当てる。100% (標識ハイブリッド) =318, 550RLUおよび100% (標識プローブ)=273, 953RLU

実施例 8

1 パネルの中性洗浄剤を、CPCを有する混合ミセル中で本発明の方法と一緒に使用して評価した；試験した中性洗浄剤はTRITON^R X-100、TRITON^R X-305、Brij 35、Tween 20、およびNP-40であった。各中性洗浄剤について、遊離AE標識プローブおよび標識DNAハイブリッドの検出可能性を0.4% (w/v) CPCおよび2% (v/v) の中性洗浄剤の存在下で測定した。ハイブリダイゼーション、ミセルの形成および検出工程は実施例2の記載と同様に行った。プローブおよび標的オリゴヌクレオチドは実施例2で使用したものであった。結果は以下および図10に示す。

イオン性洗浄剤	RLU(標識プローブ) (パーセント) *	RLU(標識ハイブリッド) (パーセント) *
TRITON ^R X-100	0.450	58.800
TRITON ^R X-305	0.210	5.000
Brij 35	0.350	13.200
Tween 20	0.280	4.700
NP-40	0.320	5.200

* 100%RLUは、ミセルの不在下での標識プローブおよび標識ハイブリッド条件の各々から得た化学発光に割り当てる。100% (標識ハイブリッド) =578, 863RLUおよび100% (標識プローブ)=556, 523RLU

これらの均一な分析条件下で、CPCおよび各々の評価した中性洗浄剤から形成した混合ミセルはAE標識プローブおよびAE標識DNAハイブリッドを判別することができた。

実施例 9

1 パネルの異なる表面活性剤を本発明の方法での使用について評価した。この実験では、各々の評価した界面活性剤のみから形成された均質なミセルを使用した。これらの界面活性剤は、中性 (TRITON^R X-305、Brij 35、Tween 20およびNP-40)、両性イオン (CAPSO) およびアニオン性 (TRITON^R QS-44およびドデシル硫酸ナトリウム (SDS)) の性質であった。0.5% (v/v) の各洗浄剤を使用した。Brij 35、CAPSOおよびSDSの場合は、0.5% (w/v) を使用した。ミセルの形成および標準AE標識の検出は他に断らない限り実施例1に記載したように行った。プローブおよび標的オリゴヌクレオチドは実施例2で使用したものである。結果は以下および図11に示す。

洗浄剤	RLU(標識プローブ) (パーセント) *	RLU(標識ハイブリッド) (パーセント) *
TRITON ^R X-305	54.000	114.000
Tween 20	47.000	111.000
NP-40	45.000	115.000
Brij 35	53.000	119.00
CAPSO	14.000	117.00
TRITON ^R QS-44	68.000	129.000
SDS	42.000	138.000

* 100%RLUは、ミセルの不在下での標識プローブおよび標識ハイブリッド条件の各々から得た化学発光に割り当てる。100% (標識ハイブリッド) =318,550RLUおよび100% (標識プローブ)=273,950RLU

データが示すように、アニオン性、中性および両性イオンのミセルは、カチオン性ミセルについて観察されたものと同様の様式で、ハイブリッドに結合した標識のものよりもハイブリダイズしないプローブに結合した標識の化学発光を優先的に停止することができる。しかし、観測された判別の規模は、カチオン性ミセルに関して見られたものより小さく、これは多分、負に帯電した核酸と洗浄剤との間のイオン性相互作用の欠如によるものである。

実施例 10

標識判別に対する高濃度のTRITON^R X-100の影響を一定濃度のカチオン性洗浄剤の条件下で測定した。2種のカチオン性表面活性剤、CPCおよびCTABをこれらの実験で使用した：両方とも0.4% (w/v) の濃度で存在した。TRITON^R X-100を0.5%、4%、10%、および25% (v/v) の濃度で各セット (CPCまたはCTABのいずれかを含む) のチューブに添加した。ハイブリダイゼーションを実施例2と同様に行った；ミセルの形成および検出工程は実施例1と同様とした。プローブおよび標的オリゴヌクレオチドは実施例2で使用したものである。結果は以下および図12に示す。

	C P C			C T A B		
濃度TRITON [®] X-100% (W/V)	RLU (標識ハイブリッド) パーセント*	RLU (標識プローブ) パーセント*	%ハイブリッド %プローブ	RLU (標識ハイブリッド) パーセント*	RLU (標識プローブ) パーセント*	%ハイブリッド %プローブ
0.5%	1.200	0.500	2.4	16.500	0.750	22
4%	70.000	1.000	70	101.000	3.200	3.44
10%	75.000	1.000	75	98.000	3.000	32.67
25%	134.000	25.000	5.36	181.000	32.000	5.66

10

* 100%RLUは、ミセルの不在下での標識プローブおよび標識ハイブリッド条件の各々から得た化学発光に割り当てる。100% (標識ハイブリッド) = 575,566RL

Uおよび100% (標識プローブ) = 558,255RLU

データは、TRITON[®] X-100の濃度を0.5%から4% (v/v)へ増大させると (即ち、混合ミセルを含むイオン性表面活性剤に対するTRITON[®] X-100の比率を増大させると)、標準AE標識ハイブリッドの化学発光収量が増大する一方、標識されたハイブリダイズしないプローブの停止を著しくは減少させないことを示す。イオン性洗浄剤がCPCでもCTAB (これらはいずれもTRITON[®] X-100の疎水性「テイル」とは相違する同一の疎水性「テイル」を有する)でも、これは当てはまるが、CTAB含有ミセルを有する溶液中での標準AE標識ハイブリッドの化学発光収量はこれらの条件下でCPC系においてよりも終始一貫して大きかった。結果は、TRITON[®] X-100の濃度が10% (v/v)まで上昇した場合ほぼ同一である。25% (v/v)のTRITON[®]濃度で、標識ハイブリッドの化学発光収量は、表面活性剤ミセルを含有しない系でのハイブリッドの検出に関して見られたものより上まで増大する；しかし、標識プローブの停止は著しく減少し、より大きなバックグラウンド並びに分析用のシグナルーノイズ比 (%ハイブリッド/%プローブ)の減少が生じる。

20

実施例 11

標識判別に対するイオン性界面活性の濃度の増加の影響をTRITON[®] X-100の一定濃度の条件下で測定した。各チューブ中のTRITON[®] X-100の濃度は4% (v/v)であった。増大する濃度のCPC (0%、0.4%、0.7%、1%、2%、3%、および4% (w/v))を含有する2セットのチューブを作製した；片方はAE標識プローブのみを含み、他方はAE標識ハイブリッドを含んだ。プローブおよび標的オリゴヌクレオチドは実施例2で使用したものとした。ハイブリダイゼーションを実施例2と同様に行った；ミセルの形成および検出工程は実施例1と同様とした。結果は以下および図13に示す。

30

チューブ 番号	濃度CPC % (W/V)	RLU (標識ハイブリッド) (パーセント*)	RLU (標識プローブ) (パーセント*)	%ハイブリッド %プローブ
1	0.000	100.000	51.000	1.96
2	0.400	64.000	0.700	91.4
3	0.700	38.000	0.230	165.2
4	1.000	27.400	0.070	391.4
5	2.000	8.000	0.090	88.9
6	3.000	4.000	0.000	---
7	4.000	2.600	0.055	47.3

* 100%RLUは、ミセルの不在下での標識プローブおよび標識ハイブリッド条件の各々から得た化学発光に割り当てる。100% (標識ハイブリッド) = 605,316RLU
Uおよび100% (標識プローブ) = 307,205RLU

結果が示すように、CPCを系に添加しない場合には、標識された遊離プローブのために検出された化学発光の量は、標識されたハイブリッドについて検出されたものの約50%である(約2:1のシグナル/ノイズ比を産生)。しかし、0.4%(w/v)の濃度でCPCを添加すると、シグナル/ノイズ比は約91:1まで増大する。0.7%のCPC濃度で、シグナル/ノイズ比は165:1まで増大する。1%(w/v)より高いCPC濃度で、シグナル/ノイズ比の有意な改善はない。従って、これらの条件下では、比較的低濃度のイオン性界面活性剤で十分に、標識されたハイブリッドと遊離プローブとの良好な判別を有意な分析感度を犠牲にすることなく行うことができる。これらのデータは、遊離プローブおよびプローブ:分析物結合体の間の判別を最大化するためには本発明の混合ミセル中に異なる洗浄剤の適切な混合物を得ることの重要性を実証している;このようなスクリーニング実験および実施例に提供される他の実験は、当業者が通常行うものであり、標識および両親媒性物質の任意の組み合わせに適用可能である。

実施例 12

本発明を他の方法と一緒に使用してその性能を増大できることを実証する。この実施例では、標準AE-標識プローブおよびハイブリッドを、本明細書に記載した表面活性剤ミセルの不在下または存在下のいずれかで、ハイブリダイゼーション保護分析(HPA)を使用して評価した。Arnold et al. 米国特許第5,283,174号(引用により本明細書中に取り込む)に記載されたHPAは、示差加水分解法を利用して、標識分析物:プローブ複合体および標識されたプローブとを判別する。しかし、少量のプローブ付随標識は加水分解に耐性であり、バックグラウンド化学発光に寄与する可能性がある。

2つの異なるDNAプローブ/分析物の対をこの実施例で評価した。第1のプローブおよび標的オリゴヌクレオチドは各々配列番号5および6であった。第2プローブおよび標的は各々配列番号3および4であった。各プローブを上記した方法により標準AEに結合させた。

ハイブリダイゼーション反応は以下の通り行った。1 μ l (1 pmole) のプローブを30 μ lの0.5MのLiCl、0.1Mのコハク酸リチウム(pH 5.1)に添加した。プローブ:分析物ハイブリッドを代表するチューブに、4 μ lの標的分析物(4 pmole)も添加した。チューブを60 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。

3種の条件を、標識DNAプローブまたは標識DNAハイブリッドのいずれかを含有するチューブの対のために確立した。オリゴヌクレオチド(標識プローブ単独または標識ハイ

ブリッドのいずれか)を100 μ lの0.6 μ Mのホウ酸ナトリウム(pH 8.7)に添加し、1% (v/v)のTRITON^R X-100および遊離プローブ付随標識を60℃で10分間インキュベーションすることによって加水分解させた。加水分解の前および後の混合物のアリコートを検出のために回収した。ミセルを添加すべき試料のために、次いで、チューブに100 μ lの0.8% (w/v) CPC、6% (v/v)のTRITON^R X-100、および0.6 Mのホウ酸ナトリウム(pH 8.7) (配列番号5および6)または0.8% (w/v) CPC、4% (v/v)のTRITON^R X-100、および0.6 Mのホウ酸ナトリウム(pH 8.7) (配列番号3および4)を添加した。TRITON^R X-100を含まない同一の溶液を既に回収したアリコートに添加した。

ミセルの形成および検出は実施例1と同様とした。結果を以下に示す。

プローブ& 標識オリゴ ヌクレオチド	RLU (標識プローブ)	RLU (標識ハイブリッド)	ブランク	%プローブ	%ハイブリッド	%ハイブリッド %プローブ
配列番号 5と6 (ミセルなし)	659690	937988	360	100	100	1
配列番号 5と6 (HPA)	1249	332084	360	0.0135	35.4	2622
配列番号 5と6 (HPAとミセル)	790	212796	552	0.0036	22.6	6278
配列番号 3と4 (ミセルなし)	7335130	914096	336	100	100	1
配列番号 3と4 (HPA)	1369	596856	336	0.0141	65.3	4631
配列番号 3と4 (HPAとミセル)	698	324046	572	0.0017	35.4	20824

* 100%RLUは、ミセルの不在下での標識プローブおよび標識ハイブリッド条件の各々から得た化学発光に割り当てる。

各プローブ：標識の組み合わせを使用して得たデータから明らかにわかるように、標識されたハイブリッドから検出された化学発光を遊離の標識されたプローブから検出された化学発光と比較することによって測定された、分析のシグナル/ノイズ比は本発明の方法を使用することによって改善される。ある場合では、ミセル含有分析のシグナル/ノイズ比の増加は、ミセルを含まない同一の分析について観察されたシグナル/ノイズ比の2.4倍であった；他方のプローブおよび分析物の対を使用する分析の場合、シグナル/ノイズ比は、非ミセル含有分析で観測されたものより約4.5倍大きかった。即ち、この結果は、本発明は、他の分析系と一緒に使用した場合のそのシグナル/ノイズ比を増加するのに一般的に有用であることを示している。また、このような実験は、AE標識されたプローブの示差的加水分解を使用する分析において2重の試料の間での変動が本明細書に記載したような両親媒性物質を使用することによって減少し、分析の正確性および定量結果の信頼度を改善することを示した。

実施例 13

この実験では、本発明が標識プローブと標識DNA：RNAハイブリッドを判別できることを評価した。標的核酸は、*Chlamydia trachomatis*の純粋培養物から精製した全リボソームRNA（rRNA）であった。プローブは配列番号9のヌクレオチド配列を有しており、rRNAの1個のサブユニットに相補的になるように設計された。未標識のヘルパーオリゴヌクレオチドを使用して、rRNA標的へのプローブの結合を促進した；ヘルパープローブはHogan et al. 米国特許第5,030,557号（引用により本明細書中に取り込む）に記載されている。ヘルパープローブは一定の場合に（例えば、標的分析物がかなりの二次的構造を有している場合）核酸ハイブリダイゼーションを助けることができるが、それ自体は本出願の一部ではない。この実施例で使用するプローブは上記したような標準AEで標識された。

ハイブリダイゼーションは以下の通り行った：3 μ l（0.05 pmol es）のプローブを6 μ lの水に添加した。これを4 μ l（0.25 pmol es）の標的rRNA、2 μ l（10 pmol es）の未標識ヘルパープローブおよび15 μ lの200mMのコハク酸リチウム（pH 5.1）と混合し、60℃で40分間インキュベートした。ミセルの形成および検出は実施例2に記載した通り行った。

2セットの条件をこの実施例のために使用した。第1のセットでは、AE標識プローブおよびAE標識ハイブリッドを、増加する濃度のCPC（0%、0.03%、0.1%、0.3%、0.5%、および1%（w/v））の存在下で試験した。結果を以下および図14に示す。分かるように、結果は、DNA：DNAハイブリダイゼーションについて観察されたものと同様である（図6と比較）；分析混合物にCPCミセルを添加すると、プローブとハイブリッドの両方のAE標識の停止が生じる。

チューブ番号	濃度CPC % (W/V)	RLU (標識 ハイブリッド) (パーセント)*	RLU (標識 プローブ) (パーセント)*
1	0.000	100.000	100.000
2	0.030	3.100	2.000
3	0.100	0.560	0.560
4	0.300	0.400	0.120
5	0.500	0.450	0.100
6	1.000	0.330	0.000

* 100%RLUは、CPCの不在下での標識プローブおよび標識ハイブリッド条件の各々から得た化学発光に割り当てる。100%（標識ハイブリッド）=56,716RLU
および100%（標識プローブ）=35,384RLU

図15は、0.4%（w/v）CPC中の標識したプローブまたはハイブリッドに増加する量のTRITON^R X-100を添加することの結果を示す。明らかに分かるように、ミセルの形成および検出の前に反応混合物に異なる疎水性「テイル」を有する第2の洗浄剤を添加すると、系が遊離プローブと標識DNA：RNAハイブリッドを区別できる能力の大幅な増大が生じる。作用の機構は確かなものではないが、出願人はこの増加がミセル内部の疎水性の「ターニング」の結果であると考え。標識プローブ単独の化学発光は、4%（v/v）までのTRITON^R X-100の濃度でさえ強く停止されたままである一方、標識されたハイブリッドの検出可能性は、TRITON^R X-100の濃度が少なくとも4%（v/v）である混合CPC：TRITON^R X-100ミセルの存在下で著しく増大する。これらの結果はDNA：DNAハイブリッドを使用した場合に観察されたおのと非常に似ている（図7と比較）

チューブ番号	濃度TRITON X-100 % (V/V)	RLU (標識 ハイブリッド) (パーセント)*	RLU (標識 プローブ) (パーセント)*
1	0.000	1.000	0.030
2	0.500	1.600	0.080
3	1.000	7.000	0.080
4	2.000	22.000	0.110
5	3.000	40.000	0.160
6	4.000	45.000	0.390

10

* 100%RLU は、ミセルの不在下での標識プローブおよび標識ハイブリッド条件の各々から得られた化学発光に割り当てられる。100% (標識ハイブリッド) =56,716 RLU および100% (標識プローブ) =35,384 RLU.

20

即ち、これらのデータは、本方法および組成物をDNAおよびRNA分析物を等しく効率的に検出および測定するために一般的に適用できることを裏付ける。さらに、本実施例で使用したRNA分析物分子は、先の実施例のDNA分析物よりもかなり大きかったので、核酸標的の大きさは本発明の操作に影響を与える重要な因子ではないように思われる。

実施例 1 4

この実施例では、異なるアクリジニウムエステル誘導体を同一のプローブに結合し、一定濃度のCPCおよび増加する濃度のTRITON^R X-100 (0%、0.5%、1%、2%および4% (v/v)) の存在下で同一の標的にハイブリダイズさせた。これらの誘導体の幾つかは複素環式アクリジニウム環中に置換基を有する一方 (1-メチル-AE、2,7-ジメチルAE)、他のものはフェニル環上に置換基を有するか (o-ジメチル-AE、o-ジブromo-AE)、またはフェニル環を別のアリール基に置換している (ナフチル-AE) ;あるいは、それらは標準AEと同一である。同様の性能を発揮することが予測されたこれら及び他のAE誘導体の構造は図1に示される;これらの誘導体の上記の命名法は本出願を通じて使用される一方、図1の試験において各々の誘導体の正確な構造が何であるのかは当業者には明白であろう。上記のように、これらのAE誘導体が、本発明の方法および組成物で作用することが予測される標識の完全なリストを表示するものではないことは当業者に明らかであろう。各AE誘導体を上記と同様にしてプローブに結合した。この実施例では、プローブおよびDNA標的分析物は各々配列番号1および2のヌクレオチド配列のものであった。

30

ハイブリダイゼーションは以下の通り実施した。最終容量30μlの0.1Mのコハク酸リチウム (pH5.1) および0.5MのLiClに、1.7μlのプローブ (0.1pmole) を添加した。標識ハイブリッドを含有するチューブの場合、4μl (1pmole) の標的オリゴヌクレオチドも添加した。チューブを60℃で60分間インキュベートした。

40

インキュベーション後、10μlの各チューブの含有物 (各チューブは20,000~200,000RLUの標識を含有する) を以下に示す濃度の200μlの洗浄剤溶液に添加した。チューブを10秒間ボルテックスし、室温で10分間放置した。検出は実施例1に記載したようにした。

以下および図16に要約するように、標準AEを含むいずれかのAE誘導体を含有する標識ハイブリッドの化学発光は、非イオン性界面活性剤の濃度の増加とともに同様に増加し

50

た。

チューブ 番号	TRITON* X-100 濃度(V/V)	o-ジBr AE		o-ジMe AE		2,7-ジMe AE	
		RLU (標準ハイブリッド) (パーセント)*	RLU (標準プローブ) (パーセント)*	RLU (標準ハイブリッド) (パーセント)*	RLU (標準プローブ) (パーセント)*	RLU (標準ハイブリッド) (パーセント)*	RLU (標準プローブ) (パーセント)*
1	0.000	0.586	0.345	2.207	1.586	1.534	0.019
2	0.500	2.534	0.153	9.638	0.397	12.552	0.638
3	1.000	5.172	0.110	20.741	1.017	23.500	5.724
4	2.000	22.155	0.253	72.379	2.224	51.569	31.103
5	4.000	87.414	5.172	121.552	23.103	73.672	62.569

チューブ 番号	TRITON* X-100 濃度(V/V)	標準 AE		ナフチル AE		1-メチル AE	
		RLU (標準ハイブリッド) (パーセント)*	RLU (標準プローブ) (パーセント)*	RLU (標準ハイブリッド) (パーセント)*	RLU (標準プローブ) (パーセント)*	RLU (標準ハイブリッド) (パーセント)*	RLU (標準プローブ) (パーセント)*
6	0.000	0.431	0.048	1.759	1.569	3.155	0.053
7	0.500	2.672	0.021	7.552	1.793	17.293	0.397
8	1.000	8.052	0.062	16.759	2.017	41.759	5.397
9	2.000	38.672	0.603	46.638	2.483	62.276	36.466
10	4.000	80.845	5.086	90.052	13.207	92.500	80.603

* 100%RLU は、ミセルの不在下での標識プローブおよび標識ハイブリッド条件の各々から得られた化学発光に割り当てられる。100% (標準AE標識ハイブリッド) = 195,434 RLU および 100% (標準AE標識プローブ) = 108,408 RLU, 100% (o-diBrAE標識ハイブリッド) = 167,288 RLU, 100% (o-diBrAE標識プローブ) = 85,761 RLU, 100% (o-diMeAE標識ハイブリッド) = 22,401 RLU, 100% (o-diMeAE標識プローブ) = 7,281 RLU, 100% (2,7-diMeAE標識ハイブリッド) = 204,263 RLU, 100% (2,7-diMeAE標識プローブ) = 189,596 RLU, 100% (ナフチルAE標識ハイブリッド) = 170,933 RLU, 100% (ナフチルAE標識プローブ) = 25,897 RLU, 100% (1-MeAE標識ハイブリッド) = 177,881 RLU, 100% (1-MeAE標識プローブ) = 146,316 RLU.

図17は、同一条件下で、同一プローブに結合した同一のA E誘導体はプローブがハイブリダイズしないこれらの条件下で異なって応答することを実証する。標準A E—およびオージブromo A E 標識遊離プローブは共により高濃度のTRITON^R X-100で強く停止される一方、オージメチルA EおよびナフチルA E誘導体は幾分弱い強さで停止され、1—メチルA Eおよび2, 7—ジメチルA E 標識プローブはこれらの条件下ではるかに弱い強さで停止される。

実施例15

標識プローブおよび標識プローブ：分析物結合体を判別できる表面活性剤ミセルの能力は、使用する表面活性剤および標識化合物の構造の両方に依存することができる。CPC：TRITON^R X-100混合ミセルは、実施例14の条件下で、プローブが2, 7—ジメチルA E

で標識されている場合にプローブとハイブリッドとの間の良好な判別を可能にしない一方、BTCから形成されたミセルはこれらの種の間の良好な判別を可能にする。2, 7—ジメチルA E 標識プローブ単独または同一に標識されたプローブ：分析物ハイブリッドのいずれかを含有する分析チューブを構築した。ハイブリダイゼーションは実施例14と同様に行った。BTCの濃度は、0%、0.5%、1%、1.5%および2% (w/v) であった。ミセルの形成および検出は実施例14に記載したように行った。結果を以下および図18に示す。

チューブ番号	濃度BTC % (W/V)	RLU標識 ハイブリッド (パーセント)*	RLU標識 プローブ (パーセント)*
1	0.000	100.000	100.000
2	0.500	45.900	1.060
3	1.000	46.200	1.110
4	1.500	49.800	1.730
5	2.000	49.900	1.840

* 100%RLU は、ミセルの不在下での標識プローブおよび標識ハイブリッド条件の各々から得られた化学発光に割り当てられる。100% (標識ハイブリッド) =181,604 RLU および100% (標識プローブ) =179,031 RLU

分かるように、標識プローブおよび標識ハイブリッドの間の検出可能な判別はこれらの条件下でミセルの不在下では存在しない。しかし、0.5% (w/v) BTC程度の少量の添加により、ハイブリッドに付随した標識の化学発光を厳格に停止することなく、遊離プローブに結合した2, 7—ジメチルA Eを強力に低する。この効果は、BTC濃度の増加と共に持続する。対照的に、BTCミセルは標準A E標識プローブとハイブリッドとの間を十分に判別しない(図8を参照)。即ち、与えられた組成のミセルが標識されたプローブと標識されたハイブリッドとを判別できる能力は、A E誘導体の構造、特にアクリジニウム環の置換基の存在および性質に依存する。

本開示から、異なるイオン性、両イオン性および／または非イオン性界面活性剤、および／または異なる疎水性の「テイル」を有する界面活性剤を、与えられた標識プローブと標識プローブ：分析物結合体とを判別する能力についてスクリーニングすることは、当業者にとって通常の事項であろう。同様に、与えられた固定された組成のミセルによって識別され得る遊離プローブおよびプローブ：分析物結合体の能力について、プローブ分子に結合した異なる種類の標識をスクリーニングすることも通常のスクリーニング事項であろう。

実施例16

この実施例は、アクリジニウムエステル誘導体以外の標識が本発明の方法で機能できる能力を例示する。NH₂S-誘導体化されたローダミンをApplied Biosystems社から購入し（Foster City, CA）、上記したようにリンカーを介してヌクレオチドに結合した。標識したヌクレオチドを次いで、上記実施例2で使用したプローブとして同一の配列を有する合成オリゴヌクレオチドプローブ中に取り込んだ。標的DNA分析物は実施例2で使用したものと同一であった。ハイブリダイゼーションは以下のように行った：8 mlの11 mMのコハク酸リチウム緩衝液（pH 5.2）に100 μ lのプローブ（640ピコモル）を添加した。プローブ：分析物ハイブリッドを含有するチューブ中に、次いで1 mlのこの溶液を6.5 μ lの標的（2550ピコモル）に添加した。ハイブリダイゼーションを室温で10分間および60℃で20分間進行させた。標識プローブまたは標識ハイブリッドを、0.4%（w/v）CTABまたは0.4%（w/v）CPCおよび0%、0.5%、1%、2%および4%のTRITON^R X-100を含有するチューブに添加した。ミセルの形成および検出は実施例1と同様に行った。

チューブ 番号	濃度TRITON ^R X-100% (V/V)	0.4%(W/V)CPC		0.4%(W/V)CTAB	
		RLU(標識 ハイブリッド) (パーセント)*	RLU(標識 プローブ) (パーセント)*	RLU(標識 ハイブリッド) (パーセント)*	RLU(標識 プローブ) (パーセント)*
1	0	0.370	0.280	0.990	1.020
2	0.500	0.520	0.460	1.430	1.720
3	1.000	0.910	0.720	1.690	2.380
4	2.000	2.840	0.950	3.600	6.000
5	4.000	23.500	6.650	11.500	34.800

データおよび図19に要約したように、ローダミンは、ハイブリッドプローブ：分析物複合体を検出するための方法として、本発明においてミセルと一緒に使用することができる。ローダミンで標識したハイブリダイズしていないプローブの化学発光効力はこれらの条件下で強く停止されるが、標識ハイブリダイズは検出可能なままである。即ち、本発明の方法はアクリジニウムエステル以外の標識とともに使用することができる。また、プローブにローダミン標識を結合するために使用したリンカーは、先の実施例でプローブにAE誘導体を結合するために使用したリンカーとは異なるので、この実施例は、標的への標識の結合方法を本発明の有用性を失うことなく本分析において変更することができることを実証する。

実施例17

本発明のもう一つ別の側面をこの実施例で例示する。カチオン性ミセルはイオン相互作用を通じてその表面付近でアニオンを濃縮することが知られている。本発明の実施例で使用した検出工程において、ペルオキシドイオン（OOH⁻）が化学発光標識と反応して光放出を開始するために使用される。即ち、カチオン性ミセルの存在下で、化学発光反応を開始するのに必要なペルオキシドイオンの濃度は、カチオン性ミセルの不在下で同一の化学発光収量を有する反応を開始するのに必要な濃度よりも低いことが予測される。プローブおよび標的オリゴヌクレオチドは実施例2のものであった；そしてプローブは上記したように標準AEで標識した。ハイブリダイゼーションは実施例12に記載したように実施した。ミセルの形成は実施例1と同様とした。検出工程も以下の相違を有するが実施例1と同様であった：過酸化水素溶液を、完全濃度、10倍希釈または30倍希釈のいずれかで添加した。

以下に示す結果は、ペルオキシドイオンが通常の条件下でよりも低い濃度で利用可能な場合に、ハイブリダイズしないプローブ：分析物複合体の化学発光がミセルの不在下で減少することを示す。対照的に、カチオン性ミセルの存在下では、プローブ：分析物複合体の化学発光はペルオキシドの濃度が低下するにつれてより穏やかに低下する。即ち、カチオ

ン性ミセルの存在下で、化学発光反応を開始するのに必要なペルオキシドイオンの濃度は、ミセルの不在下で同一の化学発光収量を有する反応を開始するのに必要な濃度よりも低い。さらに、標識ハイブリッドから検出された化学発光を遊離標識プローブからの化学発光と比較することによって測定した分析のシグナル／ノイズ比は、ペルオキシドイオン濃度を低下することによって改善される。

標準H ₂ O ₂ 溶液の希釈 (0.1%(V/V) H ₂ O ₂ 、 0.001Nの HNO ₃ 中)	ミセル	標識 プローブ (RLU)	標識 ハイブリッド (RLU)	ブランク	% プローブ	% ハイブリッド	% ハイブリッド %プローブ
1	No	1,824,820	1,851,006	499	100	100	1.0
1/10	No	1,075	833	117	0.053	0.039	0.74
1/30	No	217	129	115	0.0056	0.0008	0.14
1	Yes	27,158	756,883	182	1.48	40.9	27.6
1/10	Yes	5,765	361,820	442	0.29	19.5	67.2
1/30	Yes	760	27,341	124	0.035	1.47	42

実施例 17

核酸プローブと核酸分析物との間の単一の塩基ミス対合などの変異を検出することができる本発明の分析の能力を本実施例で実証する。配列番号12 (WP) のプローブオリゴヌクレオチドを合成する。さらに、(相補鎖上の) 同一の相対位置に単一の塩基ミス対合を有する一対の標的オリゴヌクレオチドも合成した(配列番号10 (WT) および13 (MT))。標準AE標識を上記したようにプローブ分子に結合した；この実験では、標識は以下に星印で示すように、ヌクレオチド置換の部位のちょうど3'側の位置に置いた。これらのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションから生じる構造は以下に示す。以下に示したプローブおよび標的の各々の組み合わせを別のチューブ中に作製した；第3のチューブは「野生型」プローブのみを含んだ。ハイブリダイゼーションおよびミセルの形成は実施例14に記載したように実施した。検出は実施例1に記載したようにした。

5'-CCAGACATAGTTATCT-ATCAATACATGGATGAT-3' (「野生型」標的) 配列番号10

3'-GGTCTGTATCAATAGA*TAGTTATGTACCTACTA-5' (「野生型」プローブ) 配列番号12

3' から5' 方向に記載

5'-CCAGACATAGTTATCT-GTCAATACATGGATGAT-3' (「ミス対合」標的) 配列番号13

3'-GGTCTGTATCAATAGA*TAGTTATGTACCTACTA-5' (「野生型」プローブ) 配列番号12

3' から5' 方向に記載

標準AE結合プローブを、AE標識が結合するプローブ位置に対応する位置に、プローブに関して、正確に相補的なヌクレオチド配列または単一の塩基ミス対合を有するヌクレオチド配列を有する標的オリゴヌクレオチドのいずれかにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションを実施例14に記載したように実施した。3セットのチューブに0.4% (w/v) CPCを与えた；各セット内のチューブに0%、0.5%、1%、2%および4%のTRITON^R X-100を与えた。ミセルの形成を実施例1と同様にした。各セット内の全チューブに、完全に対合したハイブリッド、変異対合したハイブリッド、または標識したプローブのみのいずれかを付与した。検出を実施例1と同様に行った。結果を以下および図20に示す。

プローブ 番号	濃度 TRITON ^R X-100(V/V)	RLU(完全に 適合した標識) ハイブリッド (パーセント)*	RLU (標識プローブ) (パーセント)*	RLU (ミス対合した ハイブリッド (パーセント)*
1	0.000	0.608	0.000	0.067
2	0.500	5.833	0.000	0.132
3	1.000	16.417	0.000	0.345
4	2.000	55.467	0.383	8.207
5	4.000	80.767	5.585	36.850

10

* 100%RLU は、ミセルの不在下での標識プローブおよび標識ハイブリッド条件の各々から得られた化学発光に割り当てられる。100% (完全に対合した標識ハイブリッド) =246,540 RLU および100% (標識プローブ) =32,381 RLU、100% (ミス対合した標識ハイブリッド) =206,470 RLU

結果が示すように、標識したハイブリダイズしないプローブの化学発光は全ての濃度のTRITON^R X-100で強く停止される。先の実施例で実証されているように、完全に適合した標識したハイブリッドの化学発光は、TRITON^R X-100の濃度の増加とともに、洗浄剤ミセルの不在下でのハイブリッドの化学発光収量の約80%まで増加した。

20

意外なことに、プローブへの標識付着の領域に単一のミス対合を含有する標識ハイブリッドからの化学発光の放出もまた、TRITON^R X-100の濃度が増加するにつれて増加したが、完全に対合したハイブリッドのものより程度は少なかった。両親媒性物質の性質および濃度を変化させることによって、この分析は完全に対合したハイブリッドおよび単一の塩基ミス対合したハイブリッド並びに遊離プローブとの間を感受的に判別することが予測されるであろうことは当業者に直ちに自明であろう。

実施例 18

30

洗浄剤以外の両親媒性分子が本発明の組成および方法で 사용할 ことができるかどうかを試験するために、標準A Eー標識プローブおよび未標識の標的オリゴヌクレオチド (配列番号7および配列番号8) を実施例2と同様にハイブリダイズさせた。ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) に対するカチオン性脂質ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDAB) の1:2.5のモル比から成る脂質調製物 (LipofectACER^R, Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) の100マイクロリットルの指示量を標識プローブ単独または標識プローブ:分析物複合体のいずれか2μlに添加した。得られた溶液を穏やかにボルテックスし、室温で10分間放置してリポソームを形成した。化学発光の検出は実施例2と同様であった。結果を以下に示す。

%Lipofectase (W/V)	正味プローブ	正味ハイブリッド	%ハイブリッド/ %プローブ
0	598974	561333	1
0.00014	368846	474019	1.4
0.00028	217526	455460	2.3
0.0014	145189	421212	3.1
0.0028	99553	314165	3.4
0.028	21811	299358	14.7
0.07	13741	310431	23.9

10

上記および図21に示すように、結果は、標識プローブおよび標識プローブ：分析物複合体の両方の化学発光効力が低濃度の混合カチオン性脂質調製物の添加により最初は減少することを示す。約0.0028% (w/v) 以上のリポソーム濃度で、標識プローブ：分析物複合体の化学発光は本質的に一定のままである一方（リポソームの不在下で約55%のプローブ：分析物複合体の化学発光）、標識プローブ単独の化学発光はこの濃度範囲で減少し続ける。試験した実験条件下で、遊離標識プローブと標識プローブ：分析物複合体の判別は0.7% (w/v) のLipofectASE^R調製物で最大であった。即ち、本発明は水性環境中で溶解性が小さい洗浄剤および脂質の両方で実施できることをこれらのデータは実証する。

20

上記実施例は、本発明の特定の態様を、本発明をこれらの態様に限定することなく記載することを意図するものであることは理解されるであろう。他の態様が以下の請求の範囲の中に含まれる。

配列表

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION

- (i) APPLICANT: Gen-Probe Incorporated
- (ii) TITLE OF THE INVENTION: MICELLE PROTECTION ASSAY
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 13
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
- (A) ADDRESSEE: Lyon & Lyon 10
- (B) STREET: 633 West Fifth Street
- (C) CITY: Los Angeles
- (D) STATE: California
- (E) COUNTRY: USA
- (F) ZIP: 90071-2066
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
- (A) MEDIUM TYPE: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM Compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: DOS
- (D) SOFTWARE: WORD PERFECT (VERSION 5.1) 20
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
- (A) APPLICATION NUMBER:
- (B) FILING DATE:
- (C) CLASSIFICATION:
- (vii) PRIOR APPLICATION DATA:
- (A) APPLICATION NUMBER: 08/484,320
- (B) FILING DATE: 06/07/95
- (C) APPLICATION NUMBER: 08/475,334
- (D) FILING DATE: 06/07/95 30
- (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
- (A) NAME: Schneider, Carol A.
- (B) REGISTRATION NUMBER: 34,923
- (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 219/066-PCT
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
- (A) TELEPHONE: 213-489-1600
- (B) TELEFAX: 213-955-0440
- (C) TELEX: 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

GCTCGTTGCG GGACTTAACC CAACAT

26

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGC

26

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

CTAAAGCGCT TTCCACCACA AGAC

24

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

GTCTTGTGGT GGAAAGCGCT TTAG

24

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

CAGAACTCCA CACCCCCGAA G

21

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

CTTCGGGGGT GTGGAGTTCT G

21

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 27 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

GGGGTTCTTT TCGCCTTTCC CTCACGG

27

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 27 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

CCGTGAGGGA AAGGCGAAAA GAACCCC

27

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 30 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

CCAGATGTGT TCAACTAGGA GTCCTGATCC 30 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 33 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

CCAGACATAG TTATCTATCA ATACATGGAT GAT 33 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 33 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

ATCATCCATG TATTGACAGA TAACTATGTC TGG 33 30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 33 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

ATCATCCATG TATTGATAGA TAACTATGTC TGG 33 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 33 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

CCAGACATAG TTATCTGTCA ATACATGGAT GAT 33 50

【図 1 B】

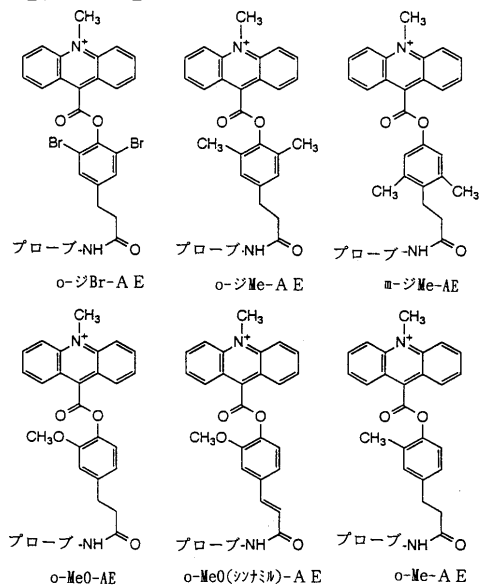


FIG. 1B.

【図 2 A-1】

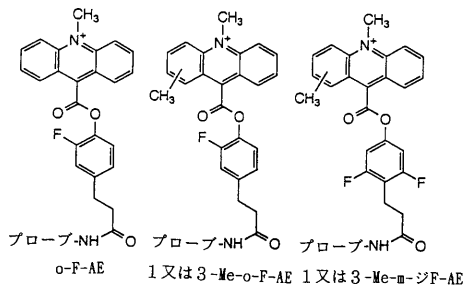
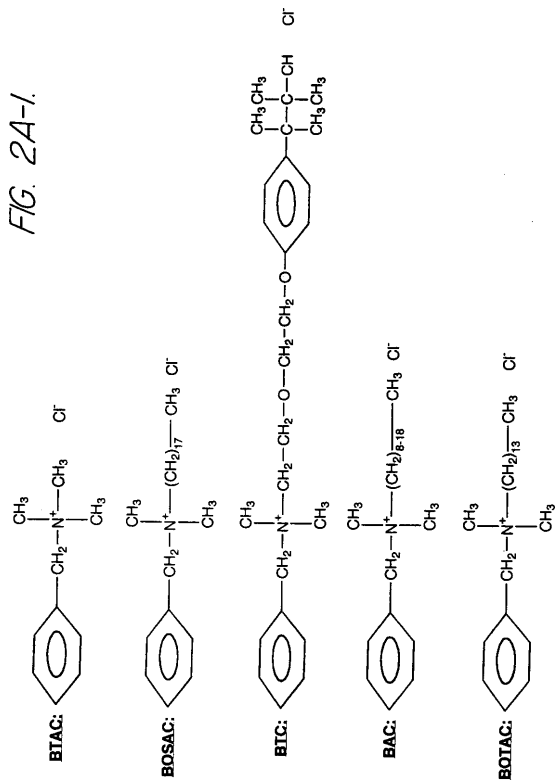


FIG. 2A-1.



【図 2 A - 2】

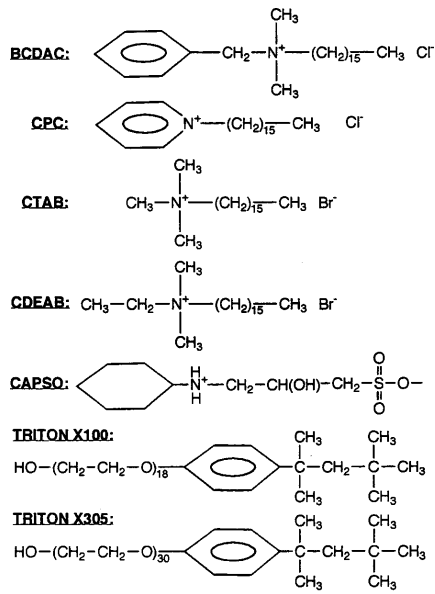


FIG. 2A-2.

【図 2 B】

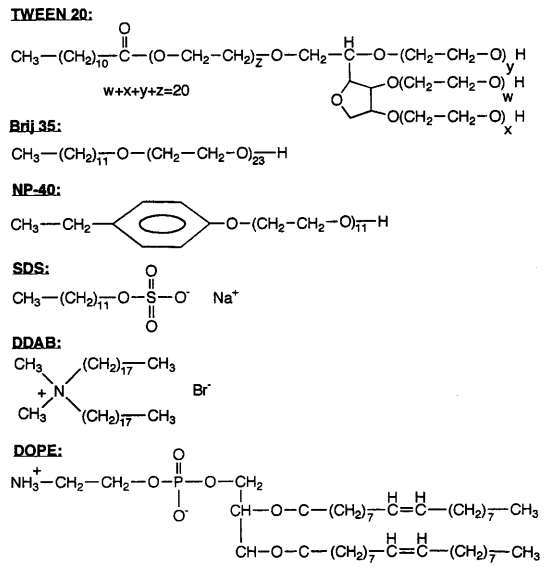
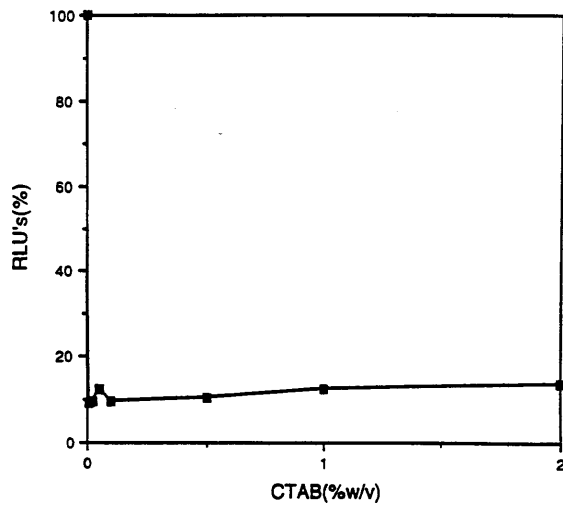


FIG. 2B.

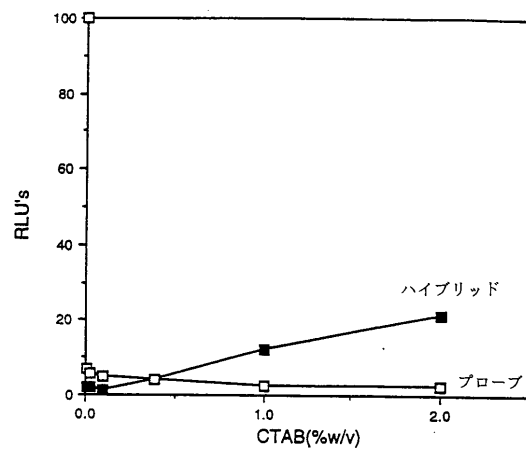
【図 3】

FIG. 3.



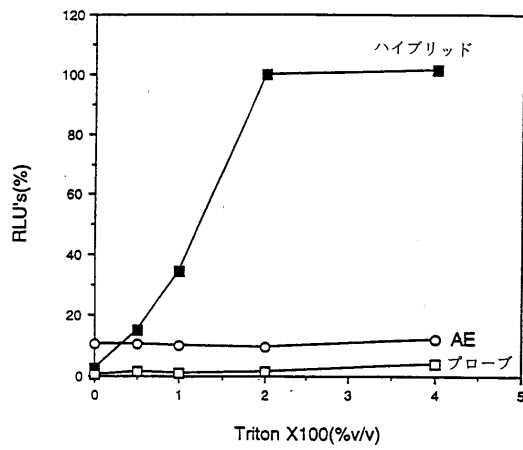
【図 4】

FIG. 4.



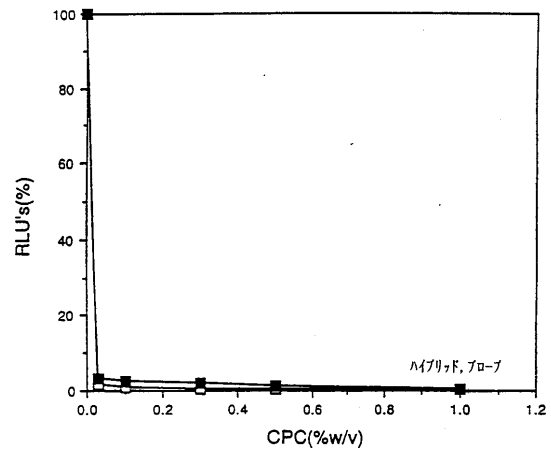
【図 5】

FIG. 5.



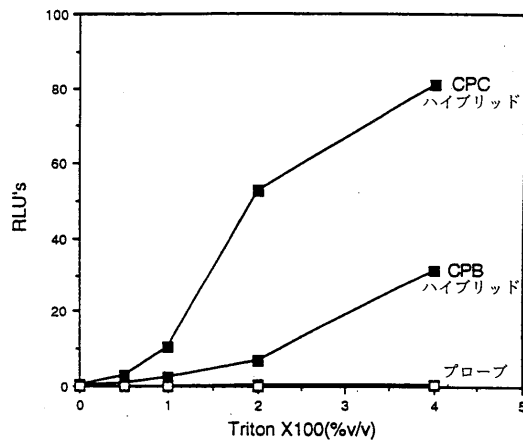
【図 6】

FIG. 6.

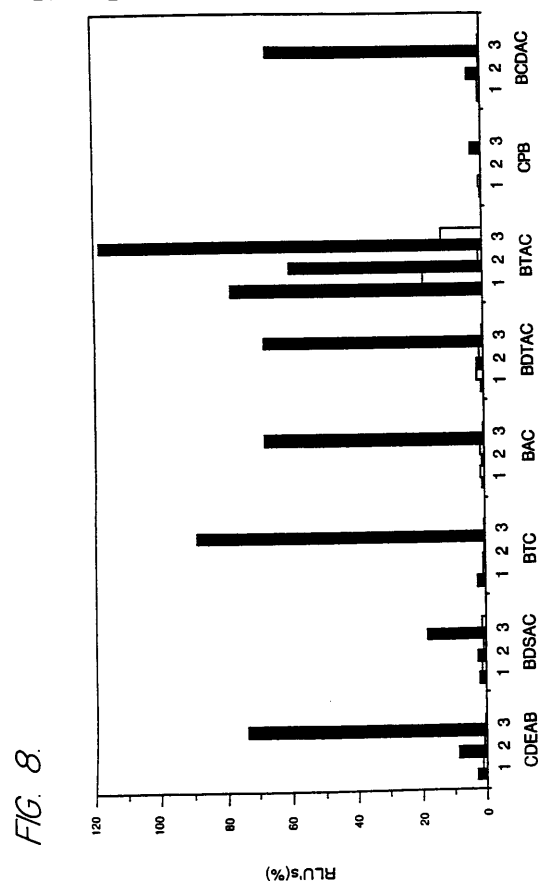


【図 7】

FIG. 7.

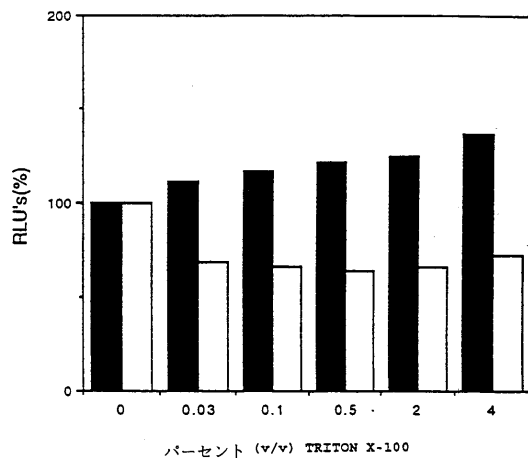


【図 8】



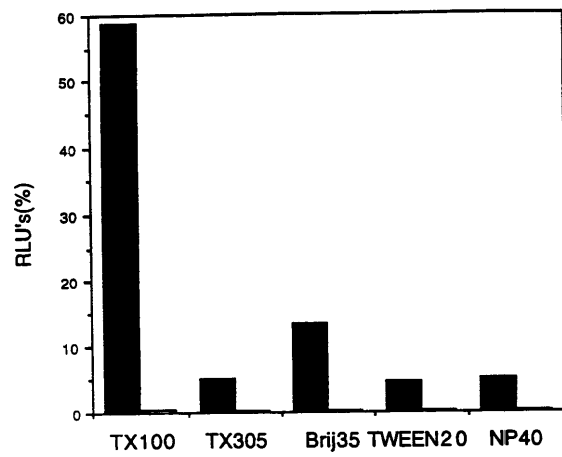
【図 9】

FIG. 9.



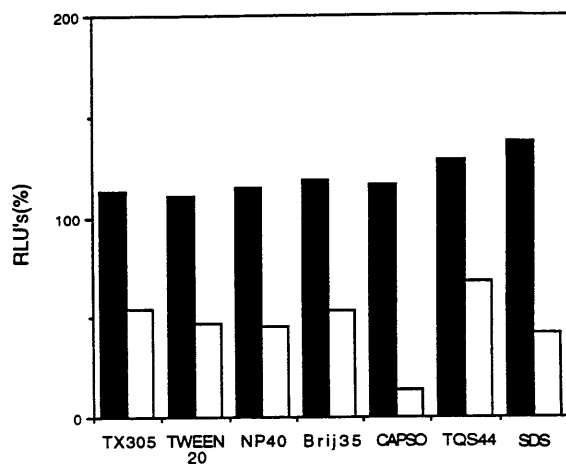
【図 10】

FIG. 10.



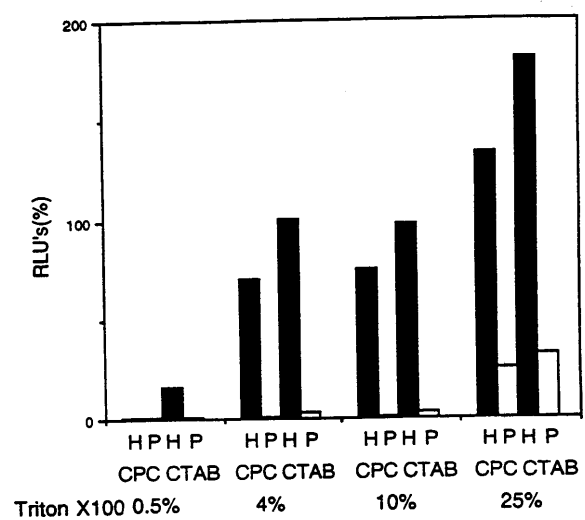
【図 11】

FIG. 11.



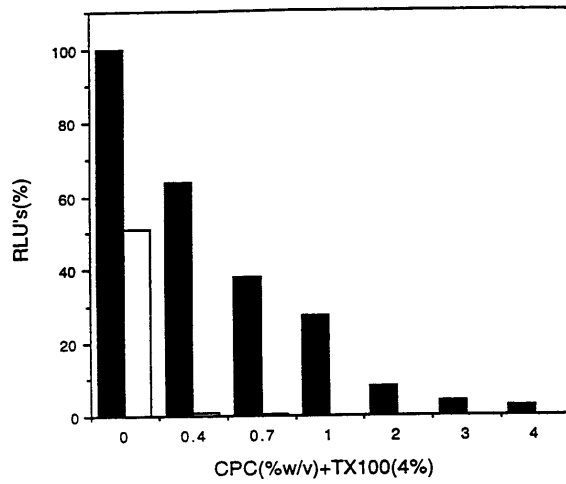
【図 12】

FIG. 12.



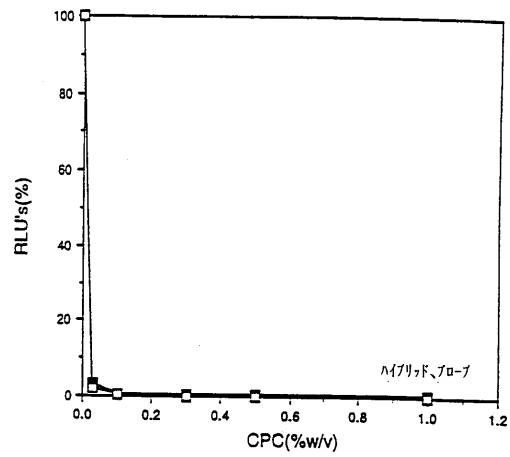
【図 13】

FIG. 13.



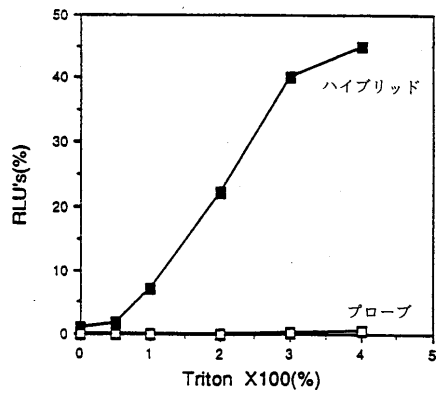
【図 14】

FIG. 14.



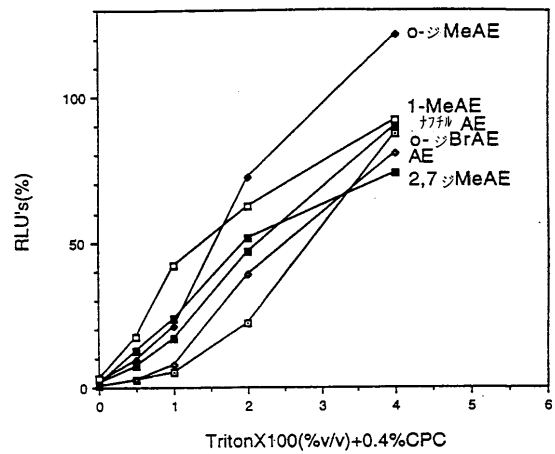
【図 15】

FIG. 15.



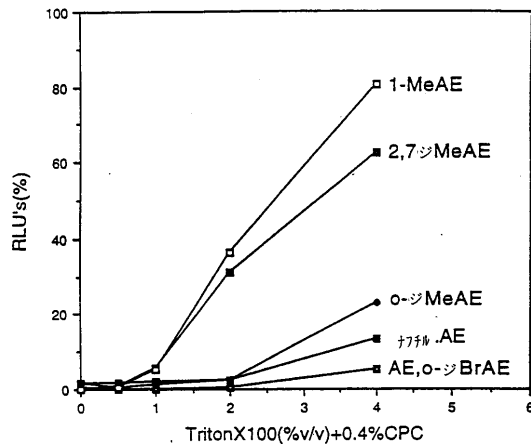
【図 16】

FIG. 16.



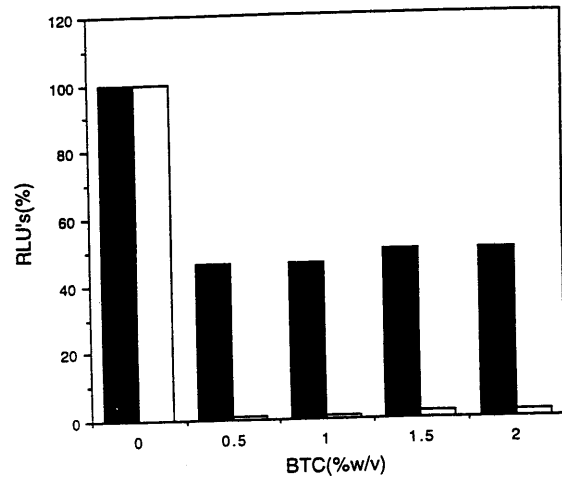
【図 17】

FIG. 17.



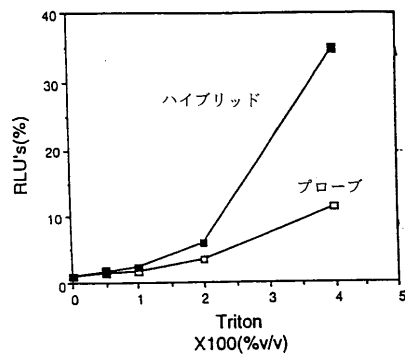
【図 18】

FIG. 18.



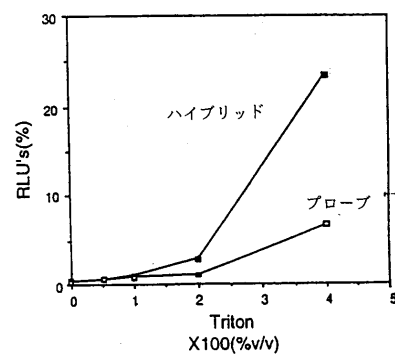
【図 19 A】

FIG. 19A.



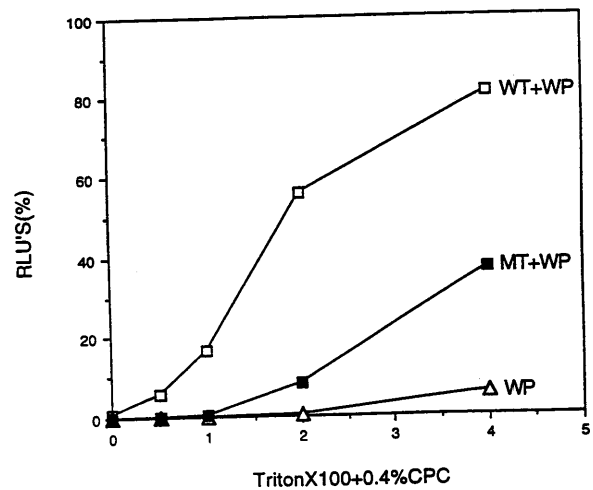
【図 19 B】

FIG. 19B.



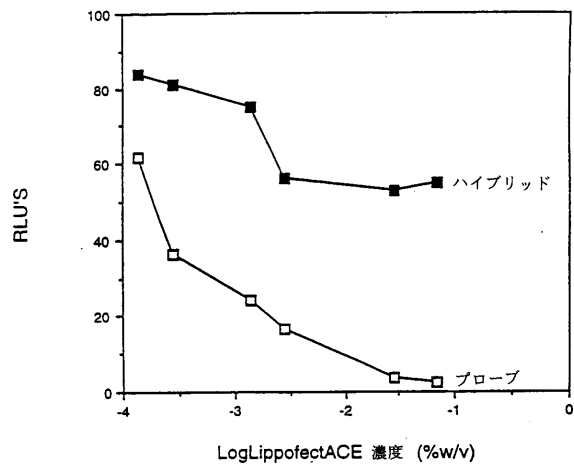
【図 20】

FIG. 20.



【図 21】

FIG. 21.



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>G 0 1 N 33/533 (2006.01)</i>		G 0 1 N 33/533	
<i>G 0 1 N 33/542 (2006.01)</i>		G 0 1 N 33/542	A
<i>G 0 1 N 33/543 (2006.01)</i>		G 0 1 N 33/543	5 7 5
<i>G 0 1 N 33/566 (2006.01)</i>		G 0 1 N 33/566	
<i>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</i>		C 1 2 N 15/00	A

(74)代理人

弁理士 藍原 誠

(72)発明者 ベッカー, マイケル・マクレラン

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 3 1, サン・ディエゴ, メドウデイル・レーン 1 2 8 1
9

審査官 引地 進

(56)参考文献 米国特許第 0 4 6 4 0 8 9 8 (J P, A)

特表平 0 2 - 5 0 3 1 4 7 (J P, A)

特開平 0 2 - 0 6 9 5 9 0 (J P, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12Q 1/68

G01N 33/48 - 33/98

C12N 15/00 - 15/90

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

EPAT(QUESTEL)