(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3590633号
(P3590633)
(45)発行日　平成16年11月17日(2004.11.17)　(24)登録日　平成16年8月27日(2004.8.27)

(51)Int.Cl.[7]	F I	
C12Q 1/68	C12Q 1/68	A
C12N 15/09	C12N 15/00	A

請求項の数 20　(全 12 頁)

(21)出願番号	特願平7-521755
(86)(22)出願日	平成7年2月16日(1995.2.16)
(65)公表番号	特表平9-509063
(43)公表日	平成9年9月16日(1997.9.16)
(86)国際出願番号	PCT/SE1995/000163
(87)国際公開番号	WO1995/022623
(87)国際公開日	平成7年8月24日(1995.8.24)
審査請求日	平成13年12月11日(2001.12.11)
(31)優先権主張番号	9400522-0
(32)優先日	平成6年2月16日(1994.2.16)
(33)優先権主張国	スウェーデン(SE)

(73)特許権者
ランデグレン，ウルフ
スウェーデン国エス－７５６　４６ウプサラ、エクソプスベーゲン１６番
(74)代理人
弁理士　青山　葆
(74)代理人
弁理士　田中　光雄
(72)発明者　ランデグレン，ウルフ
スウェーデン国エス－７５６　４６ウプサラ、エクソプスベーゲン１６番
(72)発明者　キアトコウスキー，マレク
スウェーデン国エス－７５６　５２ウプサラ、ロブソーンガルベーゲン１７番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】鎖形成による標的配列との連鎖能を有する環化用核酸プローブ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

試料を検出可能なプローブと接触させて、該プローブを標的配列にハイブリダイズさせ、ハイブリダイズしたプローブを検出することによる試料中の標的核酸配列の検出方法であって、

ａ）標的配列の２つの少なくとも実質的に隣接する領域に少なくとも部分的に相補的であり、かつ、該領域にハイブリダイズする能力を有する、２つの遊離核酸末端部分を有する検出可能なプローブを準備し、

ｂ）ハイブリダイジング条件下、プローブ末端を標的配列にハイブリダイズさせ、

ｃ）ハイブリダイズしたプローブの末端をお互いに共有連結させて、鎖形成により標的分子と連鎖する環化した構造を形成し、

ｄ）標的配列を非ハイブリダイジング条件および／またはエキソヌクレアーゼ活性に付して、いずれの非環化プローブも標的配列から除去し、これにより、標的分子に結合した環化プローブだけを保持し、

ｅ）所望により、工程ｂ）～ｄ）を１回以上繰り返し、

ｆ）残存プローブの存在を検出すること

からなることを特徴とする、試料中の標的核酸配列の検出方法。

【請求項２】

工程ｆ）が、さらに、標的核酸配列の存在の表示として残存プローブの位置を決定することを含む請求項１記載の方法。

【請求項３】
プローブが、標的分子にハイブリダイズしてプローブ末端間に空間を残すように設計され、該空間おいて標的分子にハイブリダイズするように設計される少なくとも１つのさらなるプローブが準備され、ハイブリダイズしたプローブが共有的に相互連結される請求項１または２記載の方法。
【請求項４】
プローブが、標的分子にハイブリダイズして隣接するプローブ末端間に少なくとも１つの小さなギャップを残すように設計され、該ギャップが、プローブ末端を共有的に相互連結する前に、伸長反応によって充填される請求項１、２または３記載の方法。
【請求項５】
ブローブ末端の共有連結が酵素的、リボザイム媒介または化学的ライゲーションによって行われる請求項１、２、３または４記載の方法。
【請求項６】
標的分子がDNAまたはRNA配列である請求項１～５のいずれか１項記載の方法。
【請求項７】
プローブがオリゴヌクレオチドである請求項１～６のいずれか１項記載の方法。
【請求項８】
プローブが、スタビライザーオリゴヌクレオチド配列の、プローブの中間セグメントへのハイブリダイゼーションによって安定化される請求項７記載の方法。
【請求項９】
プローブが核酸以外の組成物を有する中間セグメントからなる請求項１～６のいずれか１項記載の方法。
【請求項１０】
中間セグメントがタンパク、ポリペプチド、炭水化物および合成ポリマー残基から選択される請求項９記載の方法。
【請求項１１】
プローブが10～_200塩基の全長を有する請求項１～10のいずれか１項記載の方法。
【請求項１２】
標的配列が一本鎖形態である請求項１～11のいずれか１項記載の方法。
【請求項１３】
プローブが固相に固定化される請求項１～12のいずれか１項記載の方法。
【請求項１４】
標的配列が固相に固定化される請求項１～11のいずれか１項記載の方法。
【請求項１５】
試料がDNAライブラリーであり、検出工程が、固定化された環化プローブを切断し、プローブ／標的DNA複合体を変性条件に付して、標的DNA分子を放出させ、次いで、標的DNAを用いて細菌を形質転換することからなる請求項14記載の方法。
【請求項１６】
環化され、かつ、標的配列と鎖形成することができるように標的核酸配列の２つの少なくとも実質的に隣接する個々の領域と少なくとも部分的に相補的であり、かつ、該領域にハイブリダイズする能力を有する２つの遊離核酸末端部分を有する構築物、ならびに、クロモフォア、フルオロフォア、発光体、放射性標識、親和性基および酵素から選択される少なくとも１つの検出可能な素子で標識された中間部分からなる核酸検出試薬。
【請求項１７】
構築物が、タンパク、ポリペプチド、炭水化物および合成ポリマー残基から選択されるような核酸以外の組成物の中間セグメントからなる請求項16記載の試薬。
【請求項１８】
請求項１６または１７記載の試薬、ならびに、標的配列へのハイブリダイゼーション後に試薬末端をお互いに連結させるためのライゲート手段からなる標的核酸配列検出用試薬キット。

【請求項１９】
標的核酸配列の固体支持体への選択的捕捉方法であって、
ａ）標的配列の２つの少なくとも実質的に隣接する領域に少なくとも部分的に相補的であり、該領域にハイブリダイズする能力を有する２つの遊離核酸末端部分を有するプローブを準備し（ここで、該プローブは、固体支持体に固定化されている）、
ｂ）ハイブリダイジング条件下、プローブ末端を標的配列にハイブリダイズさせ、
ｃ）ハイブリダイズしたプローブの末端をお互いに共有連結させて、鎖形成により標的分子と連鎖する環化した構造を形成し、
ｄ）捕捉された標的配列を有する支持体を非ハイブリダイジング条件に付して、鎖形成していない標的配列を支持体から取り出すこと
からなる標的核酸配列の固体支持体への選択的捕捉方法。
【請求項２０】
さらに、ｅ）プローブを、該プローブのハイブリダイゼーションに関係しない一部分において切断して、標的分子を放出させる工程を含む請求項19記載の方法。
【発明の詳細な説明】
本発明は、特定の核酸配列の新規検出方法ならびにそのための検出試薬およびキットに関する。
別々のDNA分子を連結することができる酵素の単離は、組換えDNA技術の研究にとって重要であった。これらの酵素、いわゆるリガーゼを用いると、異なるゲノムから誘導された遺伝素子を微生物中で一緒に発現させることができる。リガーゼ補助反応（ligase－assisted reactions）は、遺伝子検出において増加する役割を果たすようにもなった。かかる反応において用いられる原理は、並列に位置した標的配列に相補的な２つのプローブセグメントが、DNAリガーゼの作用により隣接プローブ配列に連結されるということである。これは、単一プローブの標的配列へのハイブリダイゼーションが遊離プローブ分子の除去後に検出される、より慣用的な検出スキームとは対照的である。
リガーゼ補助検出法の１つのタイプは、US－Ａ－4,988,617に開示されており、これは、配列の少なくとも１つの標的ヌクレオチド位置における既知の起こり得る突然変異を有する核酸試験物質の領域において核酸配列を決定するためのアッセイに関する。該アッセイは、２つのオリゴヌクレオチドプローブを、すぐ隣りの、セグメント連結部の近くに起こり得る突然変異を含有する実質的に相補的な試験DNAまたはRNA分子のセグメントとアニーリングさせ、連結剤、通常、リガーゼを添加することからなる。該条件は、標的ヌクレオチドが正しく塩基対合している場合、該プローブが共有的に連結し、セグメント連結部の近くでミスマッチヌクレオチドのために正しく塩基対合していない場合、プローブがリガーゼによって共有的に連結されるのが不可能であるように選択される。連結の存在または不在は、標的ヌクレオチドの配列の表示として検出される。
EP－Ａ－185　494には、同様のリガーゼ補助検出法が開示されている。しかしながら、この方法では、ライゲーション生成物の形成は、前記US－Ａ－4,988,647におけると同様に適正に機能するためのリガーゼについての連結領域における正しい塩基の対合の必要条件よりも高いストリンジェンシー条件下での２つの隣接プローブのハイブリダイゼーション能に左右される。リガーゼ補助検出に関する他の文献は、例えば、EP－Ａ－320　308、EP－Ａ－324　616、EP－Ａ－473　155、EP－Ａ－336　731、US－A4,883,750およびUS－A5,242,794である。
他の分子遺伝的検出反応に比べてリガーゼベースの検出ストラテジーの重要な利点は、少なくとも３つある：
（ｉ）該反応は、本質的に、非常に特異的である。ライゲーション反応は、標的配列上の２つの異なるプローブ配列の同時発生（coincidence）に基づいており、これは、非ストリンジェント反応条件下でさえ適切な標的分子の不在下で生じる見込みがない。この理由のために、該反応は、標準化された自動化スキームにおいて適当である。
（ii）該ライゲーション反応を用いて、２つのプローブ間の連結部のすぐ周囲の位置でハイブリダイゼーションの正確さを評価することができる。リガーゼの基質要求のために、

末端にミスマッチしたプローブは、実質的に減少した割合で連結される。この方法では、対立遺伝子配列変異体を区別することができる。
（iii）ライゲーションの作用は、アッセイにおいて予め存在しない固有の分子を生じる。この環境は、例えばライゲーション時に増加したハイブリダイゼーション安定性を利用することによって、用いることができる。
JP－A－4262799およびJP－A－4304900には、共に、標本試料中の標的核酸配列を検出するために増幅反応と組合せたライゲーション反応の使用が開示されている。該方法は、リガーゼの存在下、該試料を、標的核酸配列の存在の結果として環化される（cyclizedまたはcircularized）ように設計された配列を有する直鎖状プローブポリヌクレオチドと接触させることからなる。次いで、環化されたポリヌクレオチドが酵素的重合反応において鋳型として用いられる。環化されたプローブに少なくとも部分的に相補的であるプライマーを核酸ポリメラーゼおよびヌクレオチド三リン酸と一緒に添加することによって、プローブに相補的であり、かつ、鋳型に少なくとも部分的に相補的な反復配列を有する一本鎖核酸が形成される。次いで、増幅において取り込まれた標識核酸三リン酸を介して、または、増幅産生物へのハイブリダイジング能を有する添加した標識核酸プローブによって、増幅産生物が検出される。
この従来技術は、前記で検討されたように、自体高い特異性のために準備するリガーゼベースの検出工程からなり、該方法の特異性は、むしろ、増幅産生物の発生および検出における特異性に左右されるであろう。
対照してみると、本発明は、環化可能なDNAプローブの有効な特異性および結合安定性が完全に利用されるプローブ環化に基づく方法を提供するものである。
かくして、本発明の概念によると、有効な使用は、標的配列の存在下で環化されるように設計されたプローブが、標的含有核酸鎖、例えばDNAまたはRNAの周囲で閉じられ、その結果、環状プローブが、検出されるべき標的核酸と連鎖し（interlock）、これにより該標的核酸に有効に連結されるであろうという事からなっている。すなわち、DNAなどの二本鎖核酸の螺旋性のために、環化されたプローブは、標的鎖の周囲で螺旋状をなし、「南京錠（padlock）」と同様の方法で、連形成（catenation）によりプローブを標的分子に位相的に連結するであろう。プローブ分子の標的配列へのかかる共有的鎖形成により、厳しい洗浄条件に耐えるハイブリッドが形成され、さらに以下に説明するような遺伝的アッセイにおいて非特異的シグナルを減少させるのに供する。したがって、非特異的方法でハイブリダイズするプローブは、標的を非ハイブリダイジング条件および／またはエキソヌクレアーゼ活性に付すことによって有効に除去される。該環状プローブが正確に検出可能であり、例えば、適当に標識されているという条件で、該環状プローブが検出されて、標的分子の存在を示すことができる。該標的は、増幅されないが、非特異的シグナルの有効な減少により非常に感度の良い検出が可能である。
前記ストラテジーの変形例では、該プローブは、プローブ末端間に空間を持って標的配列にハイブリダイズするように設計され、空間を持って標的配列をハイブリダイズするように設計される少なくとも１つの他のまたは中間のプローブが準備される。次いで、これらのプローブを相互連結させて、環化された分子を形成する。
別の変形例では、該プローブは、プローブ末端間に１個～数個のヌクレオチドの小さなギャップを持って標的配列にハイブリダイズするように設計される。次いで、このギャップを、当該技術分野で自体公知であるように、プローブ末端をお互いに連結させる前に、たとえばDNAポリメラーゼによるような酵素補助伸長反応によって充填する。かかるギャップが４つのヌクレオチド全てを含有するわけではない場合、増加した特異性が得られることは容易に明らかである。
前記変形例は、共に、検出の増加した特異性を提供するであろう。
本発明のこの提案された方法は、前記の従来技術の方法よりも高い特異性を有しているが、より容易に行われる。さらに、当該新規方法は、プローブ分子の一部分のみが標的分子を有する剛直な二本鎖DNA分子を形成するために必要であるので、非常に短い合成プローブを用いてさえ行われるが、一方、プローブ分子の残りは、非常に可撓性であり、所望に

より枝分かれしていてもよい一本鎖DNAまたは他のスペーサー物質である。対照するに、従来技術における同様に、複製されるであろうプローブは、100ヌクレオチドより多くの長さを必要とし、非ヌクレオチドセグメントを有さず、かつ、分枝位置を有しないことを必要とすると思われる。

したがって、本発明の１つの態様は、試料を検出可能なプローブと接触させて、プローブを標的配列にハイブリダイズさせ、ハイブリダイズしたプローブを検出することによる試料中の標的核酸配列の検出方法であって、

ａ）標的配列の２つの少なくとも実質的に隣接する領域に少なくとも部分的に相補的であり、かつ、該領域へのハイブリダイズ能を有する２つの核酸末端部分を有する、所望により枝分かれしていてもよい検出可能なプローブを準備し、

ｂ）ハイブリダイジング条件下、該プローブを標的配列にハイブリダイズさせ、

ｃ）ハイブリダイズしたプローブの末端をお互いに共有的に連結して、鎖形成により標的分子と連鎖する環化した構造を形成し、

ｄ）標的配列を非ハイブリダイジング条件および／またはエキソヌクレアーゼ活性に付して、いずれの非環化プローブも標的配列から除去し、これにより、標的分子に結合した環化したプローブだけを保持し、

ｅ）所望により、工程ｂ）～ｄ）を１回以上繰り返し、

ｆ）標的核酸配列の存在の表示として残存プローブの存在、および、所望によりその位置を検出すること

からなることを特徴とする、試料中の標的核酸配列の検出アッセイ方法に関する。

本発明の他の態様は、少なくとも１つの検出可能なタグで標識された中間部分、ならびに環化した構造を形成するように標的核酸配列の２つの少なくとも実質的に隣接する各領域に少なくとも部分的に相補的かつ該領域へのハイブリダイズ能を有する２つの核酸末端部分を有する構築物からなる核酸検出薬、またはプローブに関する。

好ましくは、該プローブは、約200塩基（すなわち、ヌクレオチド）以上を含有せず、例えば、約10～約100塩基、好ましくは、約20～約100塩基を含有する。

該プローブは、完全にDNAもしくはRNAまたは類似体からなるが、しかしながら、そのハイブリダイジング末端だけが核酸または類似体からなることで充分である。プローブ分子の残り、すなわち、中間部分は、他の所望の組成物を非常によく有する。

該プローブ分子は、遊離していても固相に固定化されていてもよい。後者の場合、本発明の方法は、溶液から標的核酸配列を選択的に単離するためにも用いられる。これは、DNAまたはRNAライブラリーをスクリーニングするためなどの調製的目的のために用いられる。

本発明のさらに別の態様は、前記核酸試薬、および標的配列へのハイブリダイゼーション後に該試薬末端をお互いに結合させ合うためのライゲート手段からなる、試料中の標的核酸配列の検出用キットに関する。

以下、添付図面を引用して、本発明をより詳細に説明する。

第１図は、本発明に従って、標的核酸配列にハイブリダイズされ、環化されたプローブ系を示す略図である。

第２図は、標的配列に鎖形成した環化プローブの略図である。

第３図は、２つのプローブからなる検出カセットの例示的な図である。

第４図は、単一のプローブからなる検出カセットの例示的な図である。

第５図は、本発明の方法に従った、および、他の条件下でのプローブの標的分子へのハイブリダイゼーションの結果を示す４つのブロッティング膜の写真である。

第６図は、プローブとハイブリダイズし、種々の条件下で処理した標的分子を有する８つのブロッティング膜を示す第５図と同様の写真である。

第７図は、環化可能なプローブ、または該環化可能なプローブの各ハイブリダイジング末端セグメントに対応する２つの直線プローブとハイブリダイズした４つのブロッティング膜の写真である。

第８図は、第６図において用いられたプローブが、第６図における標的分子の制限フラグ

メントに環化されたブロッティング膜の写真である。
第１図では、プローブ１およびプローブ３と記される、検出薬の２つの末端セグメントを介して、DNA鎖などの標的核酸配列にハイブリダイズした本発明の検出薬を示し、該プローブ１および３は、標的分子の２つの各非隣接配列に相補的である。プローブ２と記されるさらなるプローブは、プローブ１およびプローブ３に並列に位置するプローブ末端を用いて標的分子の中間セグメントにハイブリダイズされる。図示したケースでは、検出薬は、任意のスタビライザー配列によって安定化されて、プローブ１およびプローブ３の末端が直接お互いに接触するのを防止する。該プローブ間の検出試薬のセグメントは、フルオロフォアなどの少なくとも１つの検出可能な素子を含んでもよい。
プローブ１、２および３が標的分子にハイブリダイズした後またはそれと同時に、該プローブ末端は、お互いに連結して、例えば、リガーゼによってライゲートされて、共有的に閉じられた環状分子を形成する。リガーゼの例は、T4　DNAリガーゼ、T7　DNAリガーゼ、イー・コリ（E.coli）DNAリガーゼ、およびサーマス・サーモフィラス（Thermus thermophilus）DNAリガーゼである。かかる共有的閉鎖の別の方法は、例えば、リボゾームおよび化学的結合である。検出薬の長さおよびプローブセグメントの合わせた長さを適当に選択することによって、形成された分子円は、標的分子の周囲に巻き付き、該分子と連結するであろう。次いで、円形化された分子は、標的分子の周囲で螺旋状をなし、連鎖するであろう。環化した分子は、ハイブリダイズした非環化プローブを放出または分解する条件下でも標的分子に連結されたままであり、これにより、選択的に検出可能であり、試料中の標的分子の存在を示すであろう。これにより、不適切な配列への起こり得るハイブリダイゼーションの影響は、完全に除去されるであろう。
ハイブリダイズしているが環化していないプローブを変性または分解する条件としては、熱、アルカリ、他の変性薬またはエキソヌクレアーゼ活性が挙げられ、後者は、環化されないプローブの遊離末端を攻撃する。
中間プローブ２は、特異性の観点から優れているが、かかる中間プローブは、重要ではなく、本発明の方法は、該中間プローブなしで容易に行われ、すなわち、プローブ１および３は、標的分子上で端と端をつないでハイブリダイズするように設計され、これにより、これらの２つの末端がライゲートして、検出薬を環化する。
後者の単一プローブのケースは、第２図に示されており、これは、直線プローブＰを示し、その末端は、標的配列鎖Ｓの隣接領域に相補的であり、その結果、それらは、お互いに並列に位置した標的配列にハイブリダイズする。隣接するプローブ末端は、リガーゼなどによってジャンクションＴでお互いに結合して、プローブＰを環化する。図面から判明するように、DNAなどの二本鎖核酸の螺旋性により、プローブのハイブリダイジング部分は、標的鎖の周囲で螺旋状をなし、これにより、標的鎖に確実に結合され、相補的DNA鎖間での塩基の対合を妨害する条件でさえ除去することができない。記号Ｆは、例えばフォトダイオードまたはCCD検出器などの当該技術分野で知られている好適な検出手段によって連鎖プローブを検出させるプローブＰ上のフルオロフォアなどの標識を示す。
検出シグナルは、環化工程およびハイブリダイジング工程を１回以上繰り返すことによって増加する。これにより、一方では、対立遺伝子特異的プローブは、確実に、標的分子上にあり、そこでライゲートするであろうし、他方では、環化プローブがデハイブリダイジング工程の間に分子に沿ってある程度動くかまたはさまよい、標的配列を非環化プローブによって新たなハイブリダイゼーションに利用可能にするので、ある条件下で、ますます、プローブが標的分子上で連続的に連鎖されることが可能である。環化したプローブのかかる多導入についても、もちろん、標的配列は、標的分子の末端から充分な距離、通常、標的配列が支持体に結合するかおよび如何に結合しているかに依存して、最も近い末端から少なくとも約200塩基対であることが必要である。標的配列が溶液中で遊離している場合、特に長期変性洗浄の場合、長い距離が必要とされる。
ハイブリダイジング条件下で慣用的標識連鎖プローブを検出するよりも、標的を非ハイブリダイジング条件に付した後に共有的に閉じられた環状分子を検出する方が優れている点は、２、３ある。第１に、末端にミスマッチしたプローブは、リガーゼに対して乏しい基

質であるので、ライゲーション反応は、全ゲノムDNAにおいて単一の合成プローブ分子を用いて検出の顕著な特異性を提供する。第２に、プローブが標的配列の周囲を回転するかまたは該標的配列と鎖形成し、標的配列に共有的に連結され、これにより、変性に対して実質的に鈍感になる。さらに、検出試薬の末端は、洗浄において補助するかまたは洗浄に取って代わるエキソヌクレアーゼ消化に対して利用可能ではなくなる。第３に、１つの分子上に２つの末端プローブ配列が同時に存在することは、ハイブリダイゼーション工程で速度的な利点を与える。最後に、対立遺伝子配列変異体は、リガーゼによって区別することができる。

検出試薬は、例えば、5'－リン酸化オリゴヌクレオチドである。しかしながら、既に前記したとおり、真のプローブセグメントがヌクレオチドまたはPNA（ペプチド核酸）などの所望により機能的に類似した構築物からなり、一方、既に前記したとおり、中間体セグメントが全体的または部分的に例えばペプチドまたはタンパクから選択された残基、炭水化物または他の天然もしくは合成ポリマーを含む他の化学的組成物を有することは、本発明の目的に対して充分である。非ヌクレオチド性質を有するかかる中間構築物は、標識またはタグの導入の安定および容易さに関して好ましく、また、非ヌクレオチド中間構築物が二次構造を示さないか、またはミスハイブリダイゼーションの原因とならないので好ましい。

用いる場合、スタビオライザー配列は、40または50ヌクレオチドのようなプローブの合計と同一の長さを有するのが好ましい。次に、第１図に示す湾曲した、例えば３ヌクレオチドのオーダーのセグメントを必要とするであろう。

プローブ配列の合計の長さは、鎖が10または10塩基の倍数離れて同一面上で二重螺旋のままであるようなものが好ましい。10塩基は、DNA二重螺旋の約１回転を表す。

検出試薬は、遊離分子であっても、または、支持体に固定化されていてもよい。

DNAまたはRNAであって、検出されるべき特異的配列を含有する標的核酸分子は、環化されたプローブが標的分子と連鎖するかまたは鎖形成することを必要とする二重螺旋を確実に形成できるように充分な長さを有する。標的分子は、遊離分子であるが、検出試薬が遊離分子である場合、標的分子は、支持体に固定化されるのが好ましい。プローブおよび標的分子が共に遊離分子である場合、標的分子を用いるプローブ環化および鎖形成は、例えば、電気泳動的分離によって、または、安定な複合体の形成を検出するための当該技術分野において自体公知である他の技術によって検出される。ハイブリダイゼーションにおいて、標的分子は、一本鎖形態で提供されるのが好ましい。

第３図および第４図は、本発明の検出試薬からなる「検出カセット」の２つの特定の実施例を示す。第３図では、検出試薬は、中間17－merと一緒に環化されるべき安定化した92－merであり（第１図におけると同様）、一方、第４図では、検出試薬は、端と端をつないで環化されるべき70－merである。

標識またはタグは、例えば、フルオロフォア、色素、酵素、発光体、放射性標識または親和性基などの、当該技術分野で慣用的に用いられるものである。プローブが枝分かれの位置を含有する場合、検出可能な基は、環化プローブから突出している枝に結合するのが好都合である。核酸分子の場合、かかる枝は、検出可能な基を環化された分枝に鋳型依存性で高特異性でかつ共有的に付加させるであろう。

本発明の検出試薬および方法の使用により、組織切片における、または、細胞学的調製物における、ならびに分裂中期もしくは細胞分裂間期染色体におけるin situでの標的配列が検出される。高い特異性のために、空間的な情報を保存し、対立遺伝子配列変異体の間で分別する能力を有する多くの標的配列が同時に分析される。したがって、本発明の方法は、染色体または染色糸のレベルで診断的スクリーニングのために有用であろう。増加したシグナルは、検出可能な分子の、結合したプローブのリンカーセグメントへの二次的ライゲーションによって得られる。

前記のとおり、発明の概念は、特定の標的配列を有するクローンを単離するために、核酸ライブラリーをスクリーンする調製的目的のためにも用いられる。このために、検出試薬またはプローブは、膜などの固相に固定化される。該プローブは、例えば、第一アミンで

修飾されたヌクレオチド炭素（Ｃ）残基が間に入ったエチレングリコール残基のもののような、第一アミン基を含有する非ヌクレオチドセグメントによって分離された２つの標的相補性領域からなる。プローブ上のこれらのアミノ基は、膜と反応し、高い密度で共有結合する。

標的相補性領域についてスクリーンされるべき核酸ライブラリーは、M13ベクターにおいて、または環状プラスミドとして挿入体を刺激させるプラスミドもしくはファファージミド（phagemid）ベクターにおいて、クローン化されたDNAである。

一本鎖または二本鎖環状分子のかかるライブラリーをスクリーンするために、該ライブラリーをプローブ含有膜と一緒にインキュベートし、洗浄後、特異的にハイブリダイズしたプローブ末端をライゲートする。非特異的に結合した分子を除去する非常にストリンジェントな洗浄の後、プローブの１本の腕を、例えば酵素的に切断し、次の変性工程で標的配列含有分子を放出する。標的配列含有分子が一本鎖化されると、これらは、例えば、プライマー、T7ポリメラーゼおよびT4　DNAリガーゼを用いて溶液中で修復され、次いで、これを用いて、細菌を形質転換する。次いで、これらの細菌は、特異的な標的配列を増殖するであろう。

本発明で用いられる環化可能な試薬またはプローブが全ヒトDNAにおける固有の配列の位置を検出するのに充分な特異性を提供し、それらが非常に小さな標的配列を認識するという事実により、非増幅ゲノムDNA分子の性質の研究が可能になり、悪性化の研究に関係するメチル化などの特性の検出を可能にする。

本発明は、以下の限定されない特定の実施例によって、単なる例として、説明されるであろう。

実施例１

M13mp18ポリリンカーの検出

市販のDNAシンセサイザーを用いて、以下の配列:5'P－TGG TGT TTC CTA TGA（TTC* TT）$_{1}$ $_{0}$AAG AAA TAT CAT CTT－OH3'（ここで、Ｃ* は、ヘキサメチレンジアミン連鎖を介してビオチニル化されたシトシン残基である）を有するオリゴヌクレオチドを合成した。該オリゴヌクレオチドの２つの末端は、一本鎖の環状バクテリオファージM13mp18のポリリンカーを用いてお互いに隣接して塩基対合する能力を有していた。

前記オリゴヌクレオチド0.1pmolを、10μｌ中に5mM ATP、One－Phor－Allバッファー（10mM　トリス－Ac,pH7.5、10mM Mg（Ac）$_{2}$、50mM KAc;ファルマシア・エルケイビー・バイオテクノロジー・アクチボラゲット（Pharmacia LKB Biotechmology AB）、スウェーデン国ウプサラ）１μｌ、T4 DNAリガーゼ（5U/μｌ、ファルマシア・エルケイビー・バイオテクノロジー・アクチボラゲット）１μｌを含有する溶液中0.36pmolで添加したM13mp18のポリリンカーにハイブリダイズさせた。一晩インキュベートした後、非ハイブリダイジング条件下で洗浄を行い、放射性標識の存在を検出して、オリゴヌクレオチドが一本鎖M13分子に強く連結していることが判明した。

実施例２

CF突然変異デルタ508の検出

A.　慣用の方法で、CF突然変異デルタ508またはこの配列の正常な変異株を含むDNAフラグメントをpUC19ベクター中でクローン化させた。得られた２つの組換えプラスミドを、ドット当たり35ngのプラスミド（正常または突然変異株）ならびに膜ストリップ当たり２つのドット、すなわち、正常なDNAについてのドットおよび突然変異DNAについてのドットの慣用のドット－ブロット法によって、Ｅ、Ｆ、ＧおよびＨと記した４つの膜ストリップに結合させた。膜の上に沸騰水を注ぎ、最終濃度0.1%までSDSを添加することによって、該膜を洗浄した。次いで、該膜を10分間放置し、次いで、該膜を、リン酸塩緩衝化生理食塩水（PBS）中、室温で10分間すすいで、膜に固定化されなかったプラスミドを除去した。

自体慣用的な方法で、スペーサーセグメントを含有し、以下の配列を有する30ntのビオチン標識オリゴヌクレオチドプローブを調製した:5'P－TGG TGT TTC CTA TGA－ X －AAG AAA TAT CAT CTT3'（ここで、Ｘは、結合構造－（PEG）$_{2}$－CB－（PEG）$_{2}$－CB－（PEG）$_{2}$－CB－（PEG）$_{2}$－CB－（PEG）$_{2}$であり、ここで、PEGは、ポリエチレングリコール残基

を表し、CBは、シー・サンド（C.Sund）ら［Nucleos.Nucleot.7、655（1988）］によって開示されているようなビオチン残基がビオチン－NHSエステル［クローンテク・ラボラトリーズ（Clonetech Laboratories）］によってカップリングされるアミノ機能（NH_2）を有する炭素（Ｃ）残基を表す）。

エイ・ジュシュケ
(A. Jäschke)
ら［テトラヘドロン・レターズ（Tetrahedron Lett.）34（２）、301－４（1993）］によって開示されているようなPEGホスホルアミダイト法を用いて、オリゴヌクレオチド合成の間に、ポリエチレングリコール（PEG）残基を導入した。該分子を、酵素T4ポリヌクレオチドキナーゼによって分子の5'－末端に^{32}P基を付加することによって放射性標識化した。

プローブのDNA末端を、100bp標的正常配列を用いて端と端をつないで塩基対合するように設計した。対照的に、突然変異標的は、プローブセグメントのジャンクションに対応して３つのヌクレオチドを欠いており、これらの酵素的連結を支持していない。該プローブ15pmolを、500μg/mlの一本鎖プラスミドDNA（サケ精子DNA）、5 x SSPE（1 x SSPE＝180mM NaCl、10mM NaH_2PO_4、1mM EDTA、pH7.4）、および5 x デンハート（Denhardt）ブロッキング溶液［マニアティス（Maniatis）ら、モレキュラー・クローニング；ア・ラボラトリー・マニュアル（Molecular Cloning;A Laboratory Manual）、コールド・スプリング・ハーバー・プレス（Cold Spring Harbour Press）1982に定義されている］を含有する500μｌの容量の水中で30分間、標的配列とハイブリダイズさせた。

0.2M NaCl,1mM ATP、1 x One－Phor－Allバッファー［ファルマシア・エルケイビー・バイオテクノロジー・アクチボラゲット］、および0.15U/μl T4 DNAリガーゼ［ファルマシア・エルケイビー・バイオテクノロジー・アクチボラゲット］の500μｌ中、膜ストリップＥおよびＧを用いてライゲーションを行った。

次いで、膜ストリップＧおよびＨを1mlの1 x SSPE、２％SDS中で30分間洗浄し、一方、膜ストリップＥおよびＦを500μｌの0.2M NaOHで５分間処理して、DNAを変性させた。次いで、膜を1mlの1 x SSPE、２％SDS中で30分間洗浄し、次いで、0.1μg/500μｌのストレプトアビジン－ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（HRP）コンジュゲート［シグマ（Sigma）］をも含有する溶液（5 x SSPE、5 x デンハート・ブロッキング溶液）中に５分間浸漬した。PBS中で30分間すすいだ後、膜を、溶液Ｂ［アマーシャム（Amersham）、イギリス国］と混合したECL溶液Ａの溶液中に１分間おき、次いで、3MM紙上で数秒間放置して乾燥させた。次いで、膜をプラスチックフィルム中におき、Ｘ－omat－Ｓフィルム上におき、１秒間－１分間曝露した。結果を第５図に示す。ここで、該図面において、正しい標的配列についてのドットは、右であり（Ｎと記す）、突然変異配列についてのドットは、左である（Ｍと記す）。

第４図から、非変性正常条件下で処理された膜ストリップ（ストリップＧおよびＨ）上で、標的配列の両方の対立遺伝子変異体がリガーゼ処理されたか否かを検出したことが判明する。

しかしながら、膜をアルカリ変性剤で洗浄すると、唯一の正しいシグナル、すなわち、正常なDNAの検出が得られたが（リガーゼ処理膜Ｅ）、一方、リガーゼを添加しなかった場合、アルカリ処理後に標的配列も検出されなかった（膜Ｆ）。

かくして、リガーゼの添加によるハイブリダイゼーションおよび変性剤による洗浄により、望ましい、すなわち、正常なDNA配列だけが確実に検出された。

B. 35ngプラスミドの２つのドット（正常または突然変異体）を用いて８つの膜ストリップ（番号１－８）を調製し、実質的に前記に従って、種々のハイブリダイジング／洗浄条件に付した。膜１－５を、各々、１、５、10および15pmolのプローブとハイブリダイズさせ、次いで、膜５以外をリガーゼで処理し、５分間、0.2M NaOHで洗浄した。膜６－８を全て、15pmolのプローブとハイブリダイズし、リガーゼで処理し、次いで、各々、異なる薬物、すなわち、沸騰している0.5 x SSPE（６）、沸騰している0.1%SDS（７）または0.2M NaOH（８）で洗浄した（10分間）。結果を第５図に示す。ここで、正しい標的配列に

ついてのドット（Ｎ）は、図面の右側のものであり、一方、突然変異的配列についてのドット（Ｍ）は、左側のもののである。
第６図に示すとおり、検出は、膜をアルカリまたは沸騰SDSで洗浄した場合、リガーゼ依存性であるが、一方、非ストリンジェント洗浄（膜６）は、正しくない標的配列にハイブリダイズしたプローブを除去しなかった。
Ｃ．　各々、正常なプラスミドドットおよび突然変異プラスミドドットを用いて４つの膜ストリップを調製し、前記セクションＡで調製したビオチン標識プローブ（ストリップ１および２）およびプローブの２つのオリゴヌクレオチドセグメントに対応する２つの線状プローブ（ストリップ３および４）とハイブリダイズさせた。次いで、膜ストリップ１および３をリガーゼで処理し、次いで、全ての膜を0.2M NaOHで洗浄した。結果を第６図に示す。「Ｎ」および「Ｍ」は、各々、正常なプラスミドおよび突然変異プラスミドを記す。第７図から明らかなように、洗浄後、リガーゼ処理した環化されたプローブだけが膜上に残存した。
実施例３
標的配列から標的分子の末端までの距離の効果
実施例２における標的分子を、制限酵素によって、分子末端から、各々、約850、650、550および200塩基対の距離にある標的配列を有するフラグメントに切断した。実施例2Aに記載したと同様の場合、プラスミドをナイロン膜上に固定化し、実施例２における環化可能なオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによってプローブし、ライゲーション工程に付すかまたは付さず、次いで、0.2M NaOHにおける変性洗浄に付した。結果を第８図に示す。ここで「∞」は、切断されなかった分子を示し、「Ｎ」および「Ｍ」は、各々、正常なプラスミドおよび突然変異プラスミドを示す。結果は、標的分子の末端までの距離が約200塩基対より小さい場合、環化されたプローブは、洗浄工程の間に標的分子から滑り落ちる傾向にあるであろう。
本発明は、もちろん、前記に詳細に説明した、および図面に示された具体例に制限されるものではなく、多くの変形および変更は、以下の請求の範囲に定義されたような本発明の概念の範囲内で行われることができる。

【図１】

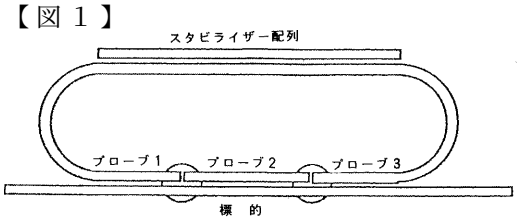

FIG.1

【図３】

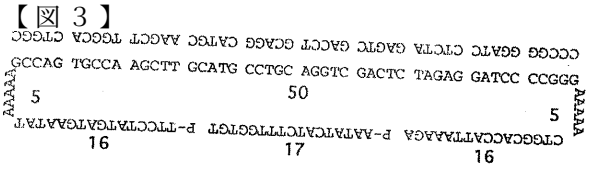

FIG.3

【図２】

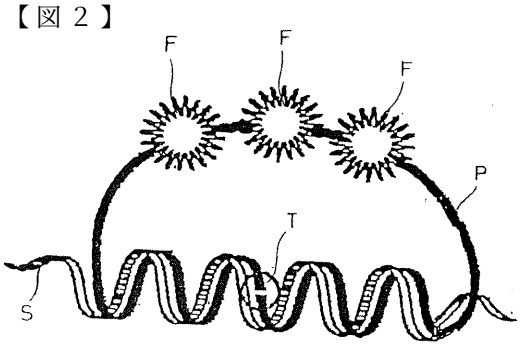

FIG.2

【図４】

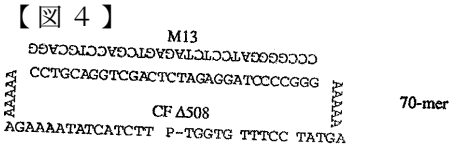

FIG.4

【図７】

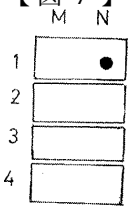

FIG.7

【図５】

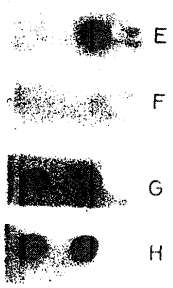

FIG.5

【図６】

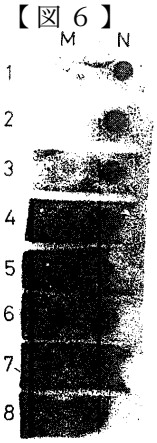

FIG.6

【図８】

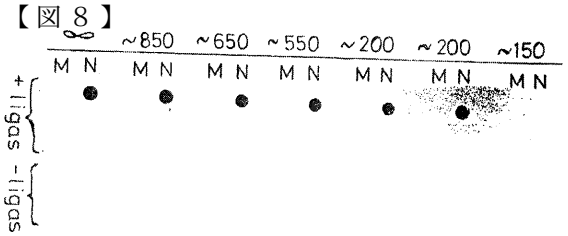

FIG.8

フロントページの続き

審査官　高堀　栄二

(56)参考文献　特開平４－３０４９００（ＪＰ，Ａ）
特開平４－２６２７９９（ＪＰ，Ａ）
Science,Vol.265(1994.Sep.)p.2085-2088

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed