

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3605607号
(P3605607)

(45) 発行日 平成16年12月22日(2004.12.22)

(24) 登録日 平成16年10月8日(2004.10.8)

(51) Int. Cl.⁷

F I

GO 1 N 33/58
C 1 2 Q 1/68
// GO 1 N 33/53
GO 1 N 33/543
GO 1 N 37/00

GO 1 N 33/58 A
C 1 2 Q 1/68 A
GO 1 N 33/53 M
GO 1 N 33/543 5 4 1 Z
GO 1 N 37/00 1 0 2

請求項の数 30 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2002-509534 (P2002-509534)
(86) (22) 出願日 平成13年7月11日(2001.7.11)
(65) 公表番号 特表2004-502950 (P2004-502950A)
(43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)
(86) 国際出願番号 PCT/US2001/021846
(87) 国際公開番号 W02002/004681
(87) 国際公開日 平成14年1月17日(2002.1.17)
審査請求日 平成15年2月14日(2003.2.14)
(31) 優先権主張番号 60/217,782
(32) 優先日 平成12年7月11日(2000.7.11)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 596057893
ノースウエスタン ユニバーシティ
アメリカ合衆国, イリノイ 60208-
1111, エバンストン, クラーク スト
リート 633
(74) 代理人 100068755
弁理士 恩田 博宣
(74) 代理人 100105957
弁理士 恩田 誠
(72) 発明者 レッシンガー、ロバート エル.
アメリカ合衆国 60091 イリノイ州
ウィルメット サード ストリート 3
16

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 銀染色の増強による検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

シグナルを増幅する方法であって、

- (a) 沈積銀を有する基材を提供する工程と；
- (b) ナノ粒子ー銀サンドイッチを有する基材を生産するために、沈積銀を有する基材を、オリゴヌクレオチドを結合させたナノ粒子を含む溶液と接触させる工程と；
- (c) 前記サンドイッチを有する基材を洗浄する工程と；
- (d) 前記サンドイッチのナノ粒子上への銀沈積を促進し、銀ーナノ粒子ー銀サンドイッチを生産するために、前記サンドイッチを有する基材を銀イオンおよび還元剤と接触させる工程と；
- (e) 銀ーナノ粒子ー銀サンドイッチを有する基材を洗浄する工程と；から成る方法。

【請求項 2】

ナノ粒子は金、銀、白金またはそれらの混合物から成る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

オリゴヌクレオチドを結合させたナノ粒子は、金ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体または複合体から成る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

銀イオンが酢酸銀、乳酸銀または硝酸銀を含む銀塩に由来する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

還元剤がヒドロキノン、n-没食子プロピル、p-フェニレンジアミン、またはホルムア

ルデヒドから成る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (b) の接触が約 5 ～ 30 分間に及ぶ間行なわれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

工程 (b) の接触が約 10 分間行なわれる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

工程 (d) の接触が約 5 ～ 10 分間に及ぶ間行なわれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

工程 (d) の接触が約 5 分間行なわれる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

基材に結合された沈積銀が、アレイの形で配置される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

工程 (c) の洗浄が水で行なわれる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

基材はガラスである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

銀を含む表面上で銀沈積を促進する方法であって、

(a) 銀が結合された表面を提供する工程と；

(b) ナノ粒子ー銀サンドイッチを有する表面を生産するために、前記表面をオリゴヌクレオチドを結合させたナノ粒子を含む溶液と接触させる工程と；

(c) 前記ナノ粒子ー銀サンドイッチを有する表面を洗浄する工程と；

(d) 前記ナノ粒子ー銀サンドイッチの前記ナノ粒子上への銀沈積を促進するために、還元条件下で前記ナノ粒子ー銀サンドイッチを有する表面を銀イオンを含む溶液と接触させる工程と；

(e) 沈積銀を有する表面を洗浄する工程と；から成る方法。

【請求項 14】

前記表面が細胞または組織から成る、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

ナノ粒子は金、銀、白金またはそれらの組み合わせから成る、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

オリゴヌクレオチドを結合させたナノ粒子は、オリゴヌクレオチドを結合させた金ナノ粒子から成る、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

オリゴヌクレオチドを結合させた金のナノ粒子は、金ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体または複合体から成る、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

銀イオンが酢酸銀、乳酸銀または硝酸銀を含む銀塩に由来する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 19】

還元剤がヒドロキノン、n-没食子プロピル、p-フェニレンジアミン、またはホルムアルデヒドから成る、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 20】

工程 (b) の接触が約 5 ～ 30 分間に及ぶ間行なわれる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 21】

工程 (b) の接触が約 10 分間行なわれる、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

工程 (d) の接触が約 5 ～ 10 分間に及ぶ間行なわれる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 23】

工程 (d) の接触が約 5 分間行なわれる、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

10

20

30

40

50

基材に結合された沈積銀が、アレイの形で配置される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 25】

シグナル増幅のためのキットであって、

- (a) オリゴヌクレオチドを結合させたナノ粒子を入れた容器と；
- (b) 銀塩を入れた容器と；
- (c) 還元剤を入れた容器と；から成るキット。

【請求項 26】

ナノ粒子は金、銀、白金またはそれらの混合物から成る、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 27】

ナノ粒子はオリゴヌクレオチドを結合させた金ナノ粒子から成る、請求項 26 に記載のキ
ット。 10

【請求項 28】

オリゴヌクレオチドを結合させたナノ粒子は、金ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体ま
たは複合体から成る、請求項 27 に記載のキット。

【請求項 29】

銀イオンが酢酸銀、乳酸銀または硝酸銀を含む銀塩に由来する、請求項 25 に記載のキ
ット。

【請求項 30】

還元剤がヒドロキノン、n-没食子プロピル、p-フェニレンジアミン、またはホルムアル
デヒドから成る、請求項 25 に記載のキット。 20

【発明の詳細な説明】

【0001】

(相互参照)

本願は、2000年7月11日出願の米国仮出願第60/217,782の優先権の利益
を主張する。

【0002】

(発明の属する技術分野)

本発明は、いくつかの分野、特に固体表面に固定された特定の核酸、タンパク質、炭水化
物、または有機化合物の検出に関する。より詳細には、本発明は、固定化標的が金属ナノ
粒子プローブに認識され、かつ検出シグナルがナノ粒子プローブ上への銀の還元的沈積に
より増幅される検出系に関する。 30

【0003】

(発明の背景)

(a) 金ナノ粒子プローブ

生体ポリマーの検出用のリポーターとしての金ナノ粒子プローブの使用については、表面
抗原に対する免疫細胞化学プローブとしてナノ粒子を使用した、W. P. Faulk お
よび G. M. Taylor によって初めて説明された [Immunochemistry,
8, 1081 (1971)]。それ以来、粒子を観察するために電子顕微鏡検査また
は光学顕微鏡検査を使用して、様々なタンパク質の検出のために金コロイドが広く使用さ
れている [概説としては Hacker, G. W. の Colloidal Gold; 40
Principles, Methods, and Applications, Vol.
1, Academic Press, Inc. (1998) p 297 および Ga
rzon, S. および Bendayan, M. の Immuno-Gold Elec
tron Microscopy in Virus Diagnosis and Rese
arch, Ed. Hyatt, A. D. and Eaton, B. T., CRC P
ress, Ann Arbor, (1993) p 137 を参照されたい] 最近、オリ
ゴヌクレオチドや核酸の検出用プローブとしての金ナノ粒子またはクラスター共役体の応
用が示唆されており [Kidwell, D. A., および Conyers, S. M
., 米国特許第5,384,265号 (1995); Hainfeld, J. F.
., ら、米国特許第5,521,289号 (1996)]、また説明されてもいる [T 50

omlinson, S., ら, Analytical Biochemistry, 17], 217 (1988); Mirkin ら, Nature, 15, 607 (1996); . Storhoff, J. J. ら, J Am. Chem. Soc., 120, 1959 (1998)]。

【0004】

(b) シグナルの銀による増強

組織中のタンパク質 [Danscher, G. Histochemistry, 71, 1 (1981); Holgate, C. S. ら J. Histochem. Cytochem. 31, 938 (1983)]、固定化生体系にてインサイチュで視覚化される核酸 [Gassell, G. J., ら, J. Cell Biology, 126, 863 (1994); Zehbe, I. ら, Am J. of Pathology, 150, 1553 (1997); Hacker, G. W., Eur. J. Histochem 42, 111 (1998)]、およびガラス表面上のオリゴヌクレオチドアレイ上に捕捉されたオリゴヌクレオチドを標的とした金プローブ [T. A. Taton, CA. Mirkin, R. L. Letsinger, Science, 289, 1757 (2000)] に対して金マーカーを使用するアッセイの感度を、銀染色により著しく高めることができることが分かっている。このプロセスでは、表面に捕捉された金粒子を、銀イオンと還元剤（例えばヒドロキノン）を含む溶液で処理する。銀が金粒子上に沈積されるように金は銀イオンの還元を触媒し、初期に沈積された銀はそれ自体銀イオンのさらなる還元を触媒する。結果として、視覚化できる金属の量が大幅に増加する。しかしながら、不都合なことに、沈積銀により触媒される銀の還元は、ある時間が経過すると終わるため、達成可能な増幅の程度は限定される。ガラスプレート上での金ナノ粒子の視覚化を増強することに従事すると、標的配列によって捕捉された金プローブの特性であるスポットが暗く観察される。実際、初期に沈積した金の量が少なすぎて裸眼では見ることができない場合に、良好な銀スポットを観察することができる。一般に、銀染色工程の反応時間は、約5分またはそれ未満と短い。銀溶液への長時間の曝露は、銀金属の非選択的沈積と高いバックグラウンドにつながる。非触媒的還元を最小限にするために、使用に直前に銀イオン溶液と還元剤が混合される。

【0005】

(c) オリゴヌクレオチドアレイとポリヌクレオチドアレイ

生物学の最近の主な新機軸では、固体表面へ結合されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのアレイを使用する。これらのオリゴマーは相補的DNAまたはRNA標的配列を結合させるための捕捉プローブとして機能する。そのような捕捉された配列は、該配列に予め取り付けられておいた蛍光標識によってまたは標的のセグメントに結合する蛍光もしくは比色プローブによって認識される。Eric Lander [Nature Genetics Supplement, 21, 3 (1999)] に述べられているように、「アレイは…DNAおよびRNA変異型を観察する体系的方法を提供することにより、一番大きな希望を提供する。アレイは分子生物学的研究でも臨床診断でも標準ツールになっているように思われる。アレイの有望性は、公共セクターと民間セクターの両方からの大きな関心と投資を引きつけている。」

【0006】

アレイ技術は実際に、遺伝変異と遺伝子発現についての我々の理解の進展を非常に加速している。しかしながら、現在の方法論にはいくつかの制限があり、そのうちの重要なものの1つは、チップアレイ上の蛍光標識標的を検出する際の感度が比較的低いことである。通常、ピコ (10^{-12}) モルかそれより高い濃度範囲の標的を使用しなければならない。従って、アト (10^{-18}) モルやzepto (10^{-21}) モルの天然標的の遺伝子分析では、PCRによる標的の増幅が必要となる。この手順には時間と労力が要求されると共に、標的の増幅が試験配列にエラーを生じさせることがある。

【0007】

チップ上に配列されたポリヌクレオチドの、より感度が高く簡単かつ安価な検出方法が必

10

20

30

40

50

要とされている。プローブとして金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を使用し、銀イオン還元によりシグナルを増幅することで、検出技術に進歩がなされており、これにより50 fM (フェムトモル、 10^{-15}) 濃度のポリヌクレオチドの測定が容易に検出できる[この方法論についてはT. A. Taton, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, Science, 289, 1757 (2000)を参照されたい]。我々は本願において、金ナノ粒子と他の金属ナノ粒子を使用して、アッセイに必要な標的濃度をさらに大幅に減少させる発見について説明している。

【0008】

(発明の概要)

本発明は、銀スポットの生成が生体ポリマー（例えばタンパク質と核酸）および小分子を含めた分子の存在を示すリポーターの役割を果たす、検出系での銀沈積の増強によるシグナルの増幅方法に関する。検出系には、インサイチュでの（例えば細胞上または組織サンプル中での）分子の検出と、検出すべき分子（標的分子）を基材に結合させるか、基材に結合させた別の分子（捕捉分子）によって捕捉するアッセイを含む。本発明は、固体表面上の個別の位置に配列された複数の標的分子の検出に関する、診断用途およびスクリーニング用途に特に有用性がある。したがって、本発明は、マイクロアレイまたはマイクロチップ上で行なわれた試験の感度を大幅に向上する手段を提供する。そのプロセスは、実施の簡単さと経済性、ならびにシグナルの大幅な増強（したがって感度の実現）をその特徴とする。

【0009】

本発明は、(1) オリゴヌクレオチドでコーティングされた金ナノ粒子が、ガラス基板かプレート上にハイブリダイゼーションにより固定した金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体に予め沈積させておいた銀に結合するという発見および(2) 結果として生じる金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド-銀-（金-オリゴヌクレオチド）構造体が、銀イオンの還元による銀のさらなる沈積の触媒として機能するという発見に基づいている。1つ目の発見は驚くべきものである、というのは、表面に結合されたオリゴヌクレオチドは、ガラス表面やガラス表面上に固定されたオリゴヌクレオチドへのナノ粒子の非特異的結合を防ぐものであり、ナノ粒子の銀表面との相互作用も防ぐだろうと予想されるからである。実際に他の研究では、混合物を乾燥させたときでさえ、金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体が融合して個々のナノ粒子間の金-金結合を形成するのをオリゴヌクレオチドが防ぐことが示されている。2つ目の発見は、本来固定されたナノ粒子の部位で金属の量を本質的に増加させる手段を提供するため重要である。銀とのハイブリダイゼーションまたは相互作用により結合していない、オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体をガラス表面から一掃する緩衝液の条件の開発と相まって、上記の知見は、非常に低い標的濃度でポリヌクレオチド標的を測定する機会を開いた。

【0010】

従って、本発明の1つの目的は、検出シグナルを増幅する方法であって、

(a) 沈積銀を有する基材を提供する工程と；

(b) ナノ粒子-銀サンドイッチを有する基材を生産するために、沈積銀を有する基材を、オリゴヌクレオチドを結合させたナノ粒子を含む溶液と接触させる工程と；

(c) 前記サンドイッチを有する基材を洗浄する工程と；

(d) 前記サンドイッチのナノ粒子上への銀沈積を促進するために、前記サンドイッチを有する基材を銀イオンおよび還元剤と接触させる工程と；から成る方法を提供することである。

【0011】

オリゴヌクレオチドを結合させたナノ粒子は、金、銀、白金またはそれらの組み合わせから成る。それらのナノ粒子は、金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体または複合体の形をしていてよい。

【0012】

本発明の別の目的は、銀を含む表面上で銀沈積を促進する方法であって、

- (a) 銀が結合された表面を提供する工程と；
- (b) ナノ粒子ー銀サンドイッチを有する表面を生産するために、前記表面をオリゴヌクレオチドを結合させたナノ粒子を含む溶液と接触させる工程と；
- (c) 前記ナノ粒子ー銀サンドイッチを有する表面を洗浄する工程と；
- (d) 前記ナノ粒子ー銀サンドイッチの前記ナノ粒子上への銀沈積を促進するために、還元条件下で前記ナノ粒子ー銀サンドイッチを有する表面を銀イオンを含む溶液と接触させる工程と；
- (e) 沈積銀を有する表面を洗浄する工程と；から成る方法を提供することにある。

【0013】

この方法によれば、表面は、標的分子のインサイチュ検出用の細胞または組織から成ってよい。オリゴヌクレオチドを結合させたナノ粒子は、共役体または複合体の形をしたオリゴヌクレオチドを結合させた金ナノ粒子から成ることが好ましい。本発明を実施するにあたっては、金ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体が好ましい。

10

【0014】

本発明のさらなる目的は、検出シグナル増幅のためのキットであって、

- (a) オリゴヌクレオチドを結合させたナノ粒子を入れた容器と；
- (b) 銀塩を入れた容器と；
- (c) 還元剤を入れた容器と；から成るキットを提供することである。

【0015】

キットは銀染色検出シグナルを増幅する際に使用される説明書を含んでもよい。オリゴヌクレオチドを結合させたナノ粒子は、共役体または複合体の形をしたオリゴヌクレオチドを結合させた金ナノ粒子から成ることが好ましい。本発明を実施するにあたっては、金ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体が好ましい。

20

【0016】

(発明の詳細な説明)

本発明は、標的物質を検出するためのシグナル増幅方法に関する。詳細には、本発明は、銀染色検出に基づく、シグナルの増幅と、微量の標的分子（例えば核酸）の検出のためのアッセイ感度の向上とを提供する。本発明を実施する際には、従来の銀染色の適用後に創作的方法を使用し、これが銀ー金（オリゴヌクレオチド）ー銀アセンブリ（本明細書では銀ー金ー銀サンドイッチアセンブリと称する）の生成につながる。

30

【0017】

従来の銀染色につながり、従来の銀染色を含む前工程には、例えば以下のことが含まれ得る：ガラス表面に結合させたオリゴヌクレオチド捕捉プローブによる標的オリゴヌクレオチドの捕捉、洗浄、結合された標的オリゴヌクレオチドのハイブリダイズしていない部分と相補的なナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体の添加、洗浄、銀染色溶液（ Ag^+ と還元剤（Sigma社より入手可能）の添加、洗浄、乾燥、および裸眼または簡単な平床式スキャナ使用して得られた画像による観察。この手順はTatonら、Science, 289, 1757 (2000) に説明された。Tatonらは、得られる金のスポットは弱すぎてオリゴヌクレオチド中の100 nMの標的濃度では直接観察することができないが、従来の銀沈積が強い暗色のスポットを可能にすることを示した。従来の銀染色を使用するこの系の検出限界は50 fM濃度であり、この濃度では非常に弱いスポットが観察される。銀溶液に再び暴露しても、スポットの強度がさらに顕著に増強されることはなかった。

40

【0018】

本発明の銀ー金ー銀サンドイッチ法による銀シグナルの増幅の場合、従来の染色の前もっての適用からの銀染色を含むガラスプレートを、オリゴヌクレオチドを結合させたナノ粒子、好ましくは金ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体または金ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド複合体の増幅水溶液にさらに暴露する。オリゴヌクレオチド配列は、標的オリゴヌクレオチド配列や最初のプローブ上の配列に関連づける必要はない。金ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体では、増幅溶液は通常約1 nM～5 nMのナノ粒子ーオリゴヌクレオ

50

チド共役体を含む。増幅溶液は、緩衝液塩類のような塩類や、リン酸塩、クエン酸塩、H E P E S および N E S のような界面活性剤を含んでよく、好ましくは約7のpHを有する。本発明を実施するにあたって、0.1Mの水性NaClと10mMのリン酸塩(pH7.0)を含む水性増幅溶液が特に有用であることが分かった。金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド複合体では、増幅溶液は同じである。銀染色を増幅溶液に暴露するいかなる適切な態様を使用してもよい。代表的な例としては、噴霧、浸漬などが含まれる。

【0019】

約5〜30分後、好ましくは約10分後に、結合していないナノ粒子共役体または複合体は、プレートを適切な水溶液、好ましくは水で洗浄することにより除去される。任意選択で、プレートは空気乾燥のような任意の適切な方法で乾燥される。プレートはその後、適切な時間の間、一般に約5〜約10分間、好ましくは約5分間、銀染色溶液に再び暴露される。いかなる適切な銀染色方法を使用してもよいことが理解されよう。有用な銀染色方法および組成物の適当ではあるが非限定的な例が、例えばM. A. Hayat, 編, 称 *immunogold-silver staining* CRC Press (1995) に説明されている。一般に、銀染色溶液には、酢酸銀(好ましい場合)、乳酸銀および硝酸銀のような銀塩の形をした銀イオンが含まれる。これらの溶液には、使用の直前に溶液に混合される還元剤も含まれる。還元剤の適当ではあるが非限定的な例としては、ヒドロキノン、n-没食子プロピル、p-フェニレンジアミンおよびホルムアルデヒドが含まれる。所望の場合、銀染色プロセスを媒介するためにアラビアゴムのような他の作用物質を使用してもよい。銀染色溶液と基材を接触させるいかなる適切な態様を使用してもよい。代表的な例としては、噴霧、浸漬などが含まれる。

10

20

【0020】

水(好ましい場合)または他の適切な溶液(例えば0.1M NaClと10mM リン酸塩(pH7.0)を含む水溶液)で洗浄して、未反応の銀染色溶液を除去した後、再び暴露したプレートを視覚的に観察するか、または平床型スキャナによってコピーする。この処理は、スポットの暗さの大幅な増大につながる。そのプロセスを望ましいだけ繰り返して、沈積銀の量とスポットの暗さをさらに増強する。この創作的増幅方法により、25fMの標的濃度を使用するアッセイに対して暗い銀スポットを容易に観察することができる。2サイクルの新しいナノ粒子-銀サンドイッチ手順により、1fMの標的溶液を認識することができる。また、3サイクルで、0.1fMの溶液が陽性〜弱いスポットを与える。各場合で1μlの標的溶液を使用して、上記実験を実行した。0.1fM溶液のアッセイの場合、これは適用サンプル中の約60個の標的分子に相当する。

30

【0021】

検出できる変化として銀染色を観察できるいかなる基材を使用してもよい。適切な基材としては、透明な固体表面(例えばガラス、石英、プラスチックおよび他のポリマー)が挙げられる。基材は任意の形または厚さであってよいが、一般に平坦で薄い。ガラス(例えばガラススライド)またはプラスチック(例えば微量定量プレートのウェル)のような透明基材が好ましい。

【0022】

本発明の銀染色シグナル増幅方法は、特定の特性を満たすナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体または複合体の使用に依存している。第1に、ナノ粒子は試験中のチップの表面にくっつかない。Frens (Frens, G., Nat. Phys. Sci., 241, 20-22 (1973)) のクエン酸塩還元法によって調製された通常のナノ粒子は、上記アッセイ用の基材として使用されるオリゴヌクレオチド誘導化ガラスプレートに無差別に結合するため、十分ではない。その場合、後続の銀増強により暗色領域として偽陽性が生じてしまう。第2に、ナノ粒子は、後に洗浄した時に、付着したナノ粒子が銀領域に結合したまま溶液中に懸濁されたナノ粒子はきれいに除去されるよう、沈積銀の表面に結合する。第3に、ナノ粒子は、銀染色条件下で銀イオンを還元するための作用物質として機能する。本発明を実行するにあたっての有用なナノ粒子は、Storhoffら J. Am. Chem. Soc. 120, 1958 (1999) に説明されているよ

40

50

うな硫黄を介して表面にリンクされたオリゴヌクレオチドでコーティングされたナノ粒子（特定の例としては、例えば以下の実施例1の共役体Iを参照）（ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体）や、実施例1で説明されている共役体I I Iのような表面に吸着された天然型オリゴヌクレオチドでコーティングされたナノ粒子（ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド複合体）である。いずれのタイプのナノ粒子も、低い塩溶液または中程度の塩溶液（例えば0.1 M以下）で十分に機能するが、高い塩濃度（高い塩濃度ではオリゴヌクレオチドの単なる吸着によって形成された複合体は不安定であり、凝集する）で行われる試験には、硫黄アンカーを含む共役体が特に好ましい。当業者には、上記に列挙した基準を満たす任意のナノ粒子調製物がサンドイッチアセンブリを形成する際の間作用物質として有用であり、上記方法を最初の銀沈積により視覚化された任意の標的に対する銀シグナルの増幅に適用できることが理解されるであろう。金ナノ粒子が特に好ましいが、銀ナノ粒子や白金ナノ粒子を含めた銀の還元を触媒するいかなるナノ粒子も使用できる。

【0023】

本発明の実施に使用するのに適したナノ粒子の調製、該ナノ粒子へのオリゴヌクレオチドの取付、平床型スキャナ技術、ならびに従来の銀染色を使用した核酸検出のための種々のアッセイ形式が、同時係属出願である2001年1月12日出願の第09/760,500号、2000年6月26日出願の第09/603,830号、1999年6月25日出願の第09/344,667号、1999年1月29日出願の第09/240,755号、1996年7月29日出願の第60/031,809号；2000年4月26日出願の第60/200,161号、1997年7月21日出願の国際出願第PCT/US97/12783号、2000年6月26日出願の第PCT/US00/17507号、および2001年1月12日出願の第PCT/US01/01190号、発明の名称「ナノ粒子を付着したオリゴヌクレオチドおよびその使用方法（Nanoparticles Having Oligonucleotides Attached Thereto And Use Therefor）」に説明されており、これらの内容全体は引用により本明細書に組み込まれる。

【0024】

実施例

実施例1：オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子の調製

オリゴヌクレオチドと5'-メルカプトアルキルーオリゴヌクレオチドを、Storhoffら[J. Am. Chem. Soc., 120, 1959-964 (1998)]に説明されているようなホスホアミダイト化学を使用して調製した。金ナノ粒子（直径約13 nm）はFrens, G., Nat. Phys. Sci., 241, 20-22 (1973)に説明されているように調製した。

【0025】

サンドイッチ銀ー金ー銀増幅図式で使用されるナノ粒子共役体(I)を調製するために、5'-メルカプトアルキルオリゴヌクレオチドIIを製造し、Storhoffら[J. Am. Chem. Soc., 120, 1959-964 (1998)]に説明されている一般的なリンク法により金ナノ粒子につないだ。ナノ粒子ーオリゴヌクレオチド複合体(I I I)を、0.26 A₂₆₀ ユニットのオリゴヌクレオチドIVを含む1 μLの水溶液を100 μLのクエン酸塩安定化金コロイド(Grabarら[J. Anal. Chem., 67, 735-743 (1995)]に説明されているように調製)と混合し、溶液を一晩静置することにより調製した。

【0026】

I. 金ナノ粒子とIIから形成された共役体

II. 5'-HS(CH₂)₆OP(O)(O)O-(A)₂₀TGGGTAGCAGACCTC (配列番号1)

I I I. 金ナノ粒子とIVから形成された複合体

IV. 5'-GCTCTAGAA TGAACGGTGG AAGGC GGCAGG (配列番号2)

10

20

30

40

50

【0027】

実施例2：銀シグナルのサンドイッチ増幅

本実施例では、実施例1のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体(I) または複合体(III) と、T. A. Tatonら, Science, 289, 1757-60 (2000) に説明されている銀染色法を使用して行ったオリゴヌクレオチドアッセイからの銀スポットを含むガラススライドとを使用して、4つの別個の実験を行った。銀スポットを担持したガラスプレートを、金ナノ粒子共役体I (図2, 4, 5) または金ナノ粒子複合体III (図3) の溶液に10分間暴露し、1M NaNO₃ ナノピュア水溶液で洗浄し、室温で5分間、2つの市販のSilver Enhancer 溶液(カタログ番号55020および55145、Sigma 社、ミズーリ州セントルイス) の5分間 10
新たに混合した試料の1:1混合物に暴露し、ナノピュア水、チオ硫酸ナトリウム溶液、ナノピュア水による最終洗浄を含めた銀染色工程についてのSigma 社のプロトコルに従った。プレートを乾燥させ、視覚的におよびHewlett Packard Scanner [5200C型] を使用した記録用コピーの両方により観察した。スポットの直接の目視観察は、スキャナを使用して得られた印刷と一致した。図は拡大してある。

【0028】

図2は、ナノ粒子オリゴヌクレオチド共役体I を使用した最初の実験の結果を示す。この実験では、2枚のプレート(各々が、薄い標的溶液の予めのハイブリダイゼーションおよび銀染色から得られた非常に弱い銀スポットを含んでいる)を使用した。スポットをさらに増強しようとして、プレート(a)を第2ラウンドの従来の銀染色に供したが、シグ 20
ナルの増強はわずかで、ほとんど起こらなかった。プレート(b)を金サンドイッチ増幅のための条件に供した。これは、弱い銀スポットを含むプレートをナノ粒子共役体I の溶液に10分間暴露し、その後水で洗浄し、4分間従来の銀染色を行う必要がある。プレート(a)に対するプレート(b)のスポットの暗さは、新しい金属サンドイッチまたはシグナル増強法の能力を明らかに実証している。

【0029】

図3は、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド複合体III を使用した実験の結果を示す。プレート(a)は、従来の銀染色を使用したサンプルについて得られたシグナルを示す。プレート(b)は金サンドイッチ技術によって達成可能な増強を示す。各場合に2つのサンプルスポットを示すことに注意する。いずれの場合も2つのサンプルスポットが示されて 30
いることに留意する。プレート(b)では、プレート(a)に対応する弱い銀スポットを含むプレートを、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド複合体III の溶液に暴露し、洗浄後、従来の銀染色に供した。この場合、上述のように調製した3部のコロイドIII を7部の10mMリン酸緩衝液(pH7)と混合した。その後、プレートをこのコロイド溶液に10分間暴露し、ナノピュア水で洗浄し、上述のように4分間銀染色混合物に暴露した。

【0030】

図4は、25fM濃度の63ヌクレオチドから成る標的オリゴヌクレオチド5'GTAGGC GAA CCC TGC CCA GGT CGA CAC ATA GGT GAG GTC TGC TAC CCA CAG CCG GTT AGG TGC 40
3' (配列番号3) のアッセイから得られた弱い銀シグナルを増強するための金ナノ粒子-オリゴヌクレオチドI を用いた実験の結果を示す。銀増幅のみを使用する本発明者らの標準アッセイは、非常に弱いスポット(プレート(a))を与えることに留意する。プレート(a)は、25fMの標的オリゴヌクレオチドの25溶液を使用した試験についての従来の銀染色の結果を示す。プレート(b)は、最初の銀染色の後に、ナノ粒子-共役体Iのコロイド溶液に10分間暴露し、その後銀染色した場合の同じ試験についての結果を示す。この場合、金溶液は0.1M NaCl-10mM リン酸緩衝液で6倍に希釈された。金属サンドイッチ増強法の後の、25fM濃度で捕捉された標的に対する強いシグナルに留意する。

【0031】

図5は、1 f M濃度の6 3 m e r 標的〔配列番号3〕を使用して行ったアッセイから得られた銀染色を増強するためのナノ粒子ーオリゴヌクレオチド共役体 I を使用した実験の結果を示す。この場合、銀染色用の本発明者らの標準法ではいかなるスポットも示されなかった。しかしながら、金ー銀処理を使用した二重増強は、図に示すように強いシグナルを示した。この実験は、標準法で銀増幅に暴露したプレートを、連続して、(1) 金ナノ粒子共役体 I (1 0 M N a C l および1 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 0) に1 . 5 n M ナノ粒子) で1 0 分間処理し、(2) 1 M N a N O ₃ で洗浄し、(3) S i l v e r E n h a n c e r 溶液 (カタログ番号5 0 2 0 およびS 5 1 4 5 (S i g m a 社) の混合物でS i g m a 社のプロトコルにより処理し、(4) 1 M 硝酸ナトリウムで洗浄し、(5) 工程 (1) ~ (4) を繰り返す、(6) チオ硫酸ナトリウムで洗浄し、(7) 10 水で洗浄することにより行った。

【図面の簡単な説明】

【図1】固体表面に固定された金ナノ粒子の検出シグナルの増幅の略図。工程 (a) は従来の銀染色である。工程 (c) で、オリゴヌクレオチドを担持する金ナノ粒子を銀表面に結び付ける。工程 (e) は、先の銀表面に結合された金ナノ粒子の従来の銀染色である。

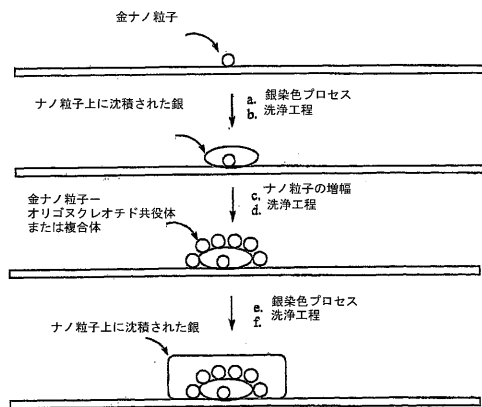
【図2】本発明の増幅方法を適用するかまたは適用しない、2 枚のプレートの例証図。プレート (a) はさらにスポットを増強するために第2 ラウンドの従来の銀染色に供した。シグナルの増強はわずかで、ほとんど起こらなかった。プレート (b) は本発明のシグナル増幅方法に供した。

【図3】本発明の増幅方法を適用するかまたは適用しない、2 枚のプレートの例証図。プレート (a) は従来の銀染色を使用したサンプルについて得られたシグナルを示す。プレート (b) は本発明のシグナル増幅方法の適用によって達成可能な増強を示す。 20

【図4】本発明の増幅方法を適用するかまたは適用しない、2 枚のプレートの例証図。プレート (a) は2 5 f M の標的オリゴヌクレオチド溶液を使用した試験についての従来の銀染色の結果を示す。プレート (b) は最初の銀染色に続いて本発明のシグナル増幅方法を行った同じ試験についての結果を示す。

【図5】本発明のシグナル増幅方法の適用後のプレートの例証図。ガラス板上に金ナノ粒子プローブとオリゴヌクレオチド標的 (6 3 m e r) を固定した時の、2 サイクルのナノ粒子ーオリゴヌクレチド (共役体 I) / 銀染色法の後得られたスポット。標的オリゴヌクレオチドの濃度はこの場合たった1 f M であった。 30

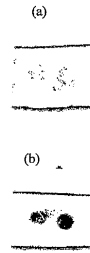
【図 1】



固体表面上に固定された金ナノ粒子に対する検出シグナルの増幅の略図。
工程「a」は従来の銀染色である。工程「c」で、オリゴヌクレオチドを担持する金ナノ粒子を銀表面に結び付ける。
工程「e」は先の銀表面に結合された金ナノ粒子の従来の銀染色である。

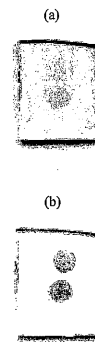
【図 2】

- (a) 二重銀染色後の銀シグナル
(b) 1回目の銀染色工程後に、Iで処理し、2回目の銀染色を行った銀シグナル



【図 3】

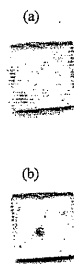
- (a) 非常に薄いDNAサンプルについての従来の銀染色工程の2つのスポット
(b) ナノ粒子-オリゴヌクレオチド複合体IIIを用いたさらなる進展後の同じスポット



【図 4】

2.5 fMの63merオリゴヌクレオチド標的溶液を使用したアッセイについての銀スポット

- a) 従来の銀染色のスポット
b) 金試薬が共役体Iである銀-金-銀法のスポット



【図 5】

ナノ粒子プローブを用いた1 fM濃度のオリゴヌクレオチドのアッセイについての、従来の銀染色によって得られた銀残基を増幅することにより得られた銀スポット。最初の銀スポットは見えなかった。増幅は2サイクルの金ナノ粒子（試薬I）／銀法により遂行した。



フロントページの続き

(72)発明者 ガリメラ、ビスワナダム
アメリカ合衆国 60201 イリノイ州 エバンストン メイプル アベニュー 1915 エ
ングルハート ホール アpartment 323

審査官 山村 様子

(56)参考文献 Eur .J.Histchem.,Vol.42,No.2(1998) p.111-120
Science,Vol.289 (2000.09.08) p.1757-1760

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
G01N 33/48-98
C12Q 1/68