

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4646904号
(P4646904)

(45) 発行日 平成23年3月9日(2011.3.9)

(24) 登録日 平成22年12月17日(2010.12.17)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/542 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 M 1/00 (2006.01)
 C 1 2 M 1/34 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

GO 1 N 33/542 Z N A A
 C 1 2 N 15/00 A
 C 1 2 N 15/00 F
 C 1 2 M 1/00 A
 C 1 2 M 1/34 Z

請求項の数 16 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-508969 (P2006-508969)
 (86) (22) 出願日 平成16年3月2日(2004.3.2)
 (65) 公表番号 特表2006-520913 (P2006-520913A)
 (43) 公表日 平成18年9月14日(2006.9.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/006260
 (87) 国際公開番号 W02004/081520
 (87) 国際公開日 平成16年9月23日(2004.9.23)
 審査請求日 平成19年2月22日(2007.2.22)
 (31) 優先権主張番号 60/452,667
 (32) 優先日 平成15年3月7日(2003.3.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 506154188
 ユニバーシティー、オブ、メディシン、ア
 ンド、デンティストリー、オブ、ニュージ
 ャージー
 UNIVERSITY OF MEDIC
 INE AND DENTISTRY O
 F NEW JERSEY
 アメリカ合衆国ニュージャージー州、ニュ
 ーアーク、バーゲン、ストリート、65、
 ユニバーシティー ハイッ
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光学的にデコード可能なマイクロキャリア、アレイ及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

その表面に複数の消光された標識シグナル発生ヘアピン分子が固定された、コード化マイクロキャリアであって、前記分子は連結部分で分離された相互作用する親和性ペアをそれぞれ含み、該親和性ペアの一方には少なくとも1つの蛍光団が結合し、且つ該親和性ペアの他方には少なくとも1つのクエンチャーが結合し、ここで個々のヘアピン分子の親和性ペアの相互作用は、その環境条件の物理的又は化学的变化によって崩壊可能であり、少なくとも1つの親和性ペアの相互作用の崩壊は前記条件の第1のレベルにおいて起こり、少なくとも別の親和性ペアの相互作用の崩壊は前記条件の第2のレベルにおいて起こり、該崩壊は光学的に識別可能である、前記マイクロキャリア。

【請求項 2】

前記親和性ペアが相補的ヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載のマイクロキャリア。

【請求項 3】

前記連結部分がオリゴヌクレオチド配列である、請求項2に記載のマイクロキャリア。

【請求項 4】

分散型マイクロアレイでの使用に好適な、複数種の請求項1に記載のコード化マイクロキャリアの混合物であって、マイクロキャリアの各々の種がその表面に1種の捕捉プローブを固定しており、該混合物中のマイクロキャリアの各々の種を特定するためのコード体系は、3～8種のスペクトル分解が可能な蛍光団と、前記条件の検出可能な異なるレベル

において崩壊しうる少なくとも3つの親和性ペアとの1種の組み合わせを含む、前記混合物。

【請求項5】

前記親和性ペアが相補的ヌクレオチド配列を含む、請求項4に記載の混合物。

【請求項6】

個々のマイクロキャリアが光ファイバー束のファイバーの末端に固定されている、請求項4に記載の混合物。

【請求項7】

表面上に同一の捕捉プローブを固定した、同一にコード化された1種のマイクロキャリアが、複数で含まれる、請求項4に記載の混合物。

10

【請求項8】

捕捉プローブが分子ビーコンプローブである、請求項4に記載の混合物。

【請求項9】

請求項4に記載の混合物を用いた、分析対象中の複数の核酸配列に対するハイブリダイゼーションアッセイであって、以下のステップ：

- a) 該混合物と該分析対象とを接触させるステップ、
 - b) マイクロキャリアの分散型アレイを作製するステップ、
 - c) 該分析対象の核酸配列にハイブリダイズした捕捉プローブを有するマイクロキャリアを特定するステップ、
 - d) 該マイクロキャリアを光学的にデコードして、それらの捕捉プローブの配列を同定するステップ、
- を含む、前記アッセイ。

20

【請求項10】

ステップa) がステップb) に先行する、請求項9に記載のアッセイ。

【請求項11】

デコードのステップが温度の上昇による前記親和性ペアの崩壊を含む、請求項9に記載のアッセイ。

【請求項12】

デコードのステップが変性剤の添加による前記親和性ペアの崩壊を含む、請求項9に記載のアッセイ。

30

【請求項13】

前記分散型アレイが平面アレイである、請求項9に記載のアッセイ。

【請求項14】

平面アレイが光ファイバー束のファイバーの末端に固定されたマイクロキャリアを含む、請求項13に記載のアッセイ。

【請求項15】

前記分散型アレイが線形アレイである、請求項9に記載のアッセイ。

【請求項16】

ステップc) 及びd) がフローサイトメトリーを含む、請求項15に記載のアッセイ。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、マイクロキャリアのコード化及びデコードに関し、特にハイブリダイゼーションプローブを固定したマイクロビーズの混合物、及びそのようなマイクロキャリアのアレイ、特に分散型アレイに関する。

【背景技術】

【0002】

生物学的物質及び化学的物質の検出及び同定のためのアレイの使用は公知である。一例としては、平面固体表面（例えばシリコンチップ又はガラススライド）上の離れた既知の位置に固定された多数の異なるハイブリダイゼーションプローブを有する、固定化核酸ハ

50

ハイブリダイゼーションアレイがある。そのアレイのそれぞれの位置には、同じハイブリダイゼーションプローブが多数コピー、固定されている。平面アレイは、それぞれに固定化されたハイブリダイゼーションプローブを有する数百又は実に数千もの異なるエリアを含むことができる。核酸を含む分析対象がアレイに添加されたとき、異なる核酸配列は、異なる位置のプローブにハイブリダイズすることになる。特定の位置でのハイブリダイゼーションの検出は、分析対象のサンプル中の核酸配列（当該位置に固定されたプローブの配列と相補的である）の存在を示唆する。一般的には、このタイプのアレイは次の2つの方法のうちの1つで調製される。すなわち、フォトリソグラフィ技術によるもののよう、プローブがその場で合成されるか、又はプローブがあらかじめ合成され、その後固定される。ハイブリダイゼーションの検出は、いくつかの方法のいずれによっても達成され、該方法は、例えばハイブリダイゼーションステップに先立つ分析対象物質への検出標識の付加、二本鎖核酸に接触したときに蛍光を発する挿入色素の付加、後に続く発色ステップで用いるための分析対象物質への発色基の付加、又はサンドイッチハイブリダイゼーション（標的がアレイ上の捕捉プローブに結合し、標識された検出プローブが、結合した標的にハイブリダイズする）の実施によるものを含む。表面マイクロアレイは相当な変動を伴いがちであることが見出されてきた (Lee, M.-L. T.ら (2000)、Importance of Replication in Microarray Gene Expression Studies: Statistical Methods and Evidence from Repetitive cDNA Hybridizations、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97: 9834-9839)。

【0003】

アレイの別のタイプは、例えば核酸に対するハイブリダイゼーションプローブのような捕捉物質をその表面に固定しているマイクロキャリア（例えばマイクロビーズ）を利用する。個々のビーズはいずれかのハイブリダイゼーションプローブで被覆され、分析対象はそれぞれのプローブ配列を有する少なくとも1種のビーズ、通常複数種のビーズを含む混合物と接触させる。ビーズは分析対象でスラリー化することができ（このことは平面アレイが遭遇する変動のある程度を克服する）、その後、マイクロビーズの平面アレイに載せられる。あるいはまた、マイクロビーズは分析対象と接触させる前に平面アレイに載せられてもよい。マイクロビーズは分析対象と接触させ、洗浄し、平面アレイとして顕微鏡スライドに収められてもよい。平面アレイはまた、マイクロビーズを一層に固定するわずかに間の空いた透明板の対であってもよく、これは、それを通して分析対象及び洗浄溶液が流れることができるフローセルの一部である (Brenner, S.ら (2000)、Gene Expression Analysis by Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS) on Microbead Arrays、Nat. Biotechnol. 18: 630-634)。マイクロビーズはまた、多数の素線を有する光ファイバーケーブル束の個々の素線の末端に刻まれた窪みに収められてもよい (Ferguson, J. A.ら (1996)、A Fiber-Optic DNA Biosensor Microarray for the Analysis of Gene Expression、Nat. Biotechnol. 14: 1681-1684)。どのプローブが存在しているのかを位置によって特定できないこのような分散型アレイでは、特定のプローブを有するビーズを特定することができるコード体系が要求される。ビーズを平面アレイに載せるのではなく、例えば蛍光活性化細胞選別装置を用いて、個々のビーズを調べるためにフローサイトメトリーを用いることが可能である。ここで再び、コード体系が要求される。

【0004】

単純に異なる色の発色団でビーズを標識することは、十分なコードをもたらしえない。なぜなら、10種類よりも少ない、実際上7又は8種類の異なる発色団のみしか区別することができないからである。いくつかの複雑なビーズコード化法が考案されている。1つのコード体系では、ビーズに発色団の組み合わせを埋め込んでいる。色及び強度の組み合わせがコードを構成する (Spiro, A.ら (2000)、A Bead-Based Method for Multiplexed Identification and Quantitation of DNA Sequences Using Flow Cytometry、Appl. Environ. Microbiol. 66: 4258-4265)。コードを読み取るために、異なる波長でのレーザー光の複数回刺激及び読み取りにより個々のビーズを調べる。この体系は、大掛かりな装置を必要とし、リアルタイムでスペクトルを解析することができず、約百種類の別個のコード化ビーズに制限される。別のコード体系では、さまざまな金属の小さなストリップをマイ

10

20

30

40

50

クロキャリアに埋め込み、それぞれのマイクロキャリア中の金属のパターンを読み取る。この体系は複雑なマイクロキャリア製造を伴う。別の体系では、光電池により通電し、同定のために50桁の二進法コードを伝達する小型トランスポンダーを個々のマイクロキャリアに埋め込む。このようなマイクロキャリアは、あるステーションを通過してハイブリダイゼーションを検出し、さらに別のステーションを通過してマイクロキャリアをデコードすることが可能である。このトランスポンダーを用いた体系の欠点は、マイクロキャリアが真の球形ではなく、蛍光が、検出ステーションを通過するときのビーズの向きにある程度影響されることである。

【0005】

固定化オリゴヌクレオチドはコード化の目的に用いられてきた。そのようなシステムの1つは、16種の異なるオリゴヌクレオチドをコード化のために利用している。コード化は、コード化オリゴヌクレオチドの16種のそれぞれについて、特定の種類のコード化オリゴヌクレオチドを所定の種類のビーズの表面に固定化するかどうかをあらかじめ決めることにより実現する。決められるべき16の選択肢（それぞれ1つが個々のコード化オリゴヌクレオチドに対応する）があるので、異なるコードの数（従ってビーズ群の異なる種類の数）は、2の16乗で65,536通りである。混合物中のビーズはまず、束の中の光ファイバー素線の末端に固定される。素線の反対側の末端を、固定されたパターンで検出器に接続する。標識プローブを用いた一連の16回の別個のハイブリダイゼーション反応により、それぞれのビーズが調べられ、光ファイバー素線に連結した個々のビーズの特性が決定される。素線の束はその後分析対象と接触させることができる（Oliphantら（2002）、BeadAway™ Technology: Enabling an Accurate, Cost-Effective Approach to High-Throughput Genotyping, BioTechniques 32: S56-S61）。連続したハイブリダイゼーションに依る体系は複雑であり、面倒で、かつ費用がかかる。

【発明の開示】

【0006】

本発明の1つの態様は、検出可能な蛍光標識を物理的に引き起こされる蛍光の変化と組み合わせ、数百、そして更に数千もの異なるビーズをコード化し、且つ光学的にデコードすることを可能にするビーズのコード体系である。

【0007】

本発明の別の態様は、そのような組み合わせコード体系を利用したハイブリダイゼーションアレイ法及び試薬、特に分散型アレイ法及び試薬である。

【0008】

発明の概要

本発明は、ビーズコード体系を提供し、これにより数百、そして所望であれば数千又は数万の異なるコード化ビーズを、簡便且つ容易に標識し、並びに迅速且つ正確にデコードすることができる。コード試薬は、ビーズ表面に固定されたシグナル発生ヘアピンを含む。シグナル発生ヘアピンは、それらが相互作用しているかどうかによって光学的シグナルの強度が変化する一対の標識部分（好ましくは一方の末端の少なくとも1種の蛍光団と、それとヘアピン構造を形成する他方の末端のクエンチャー）を用いて標識された広範な分子であり、ヘアピン構造においては蛍光が消光される。該分子は立体構造の再構成を行うことが可能であり、それにより蛍光団とクエンチャーが離れ、このとき蛍光団の蛍光は消光されない。好適な分子の1つのタイプは、分子ビーコンプローブに類似するものであり、分子ビーコンプローブは例えばTyagiら、米国特許第5,925,517号に記載されている（その全体を参照により本明細書中に組み入れる）。消光は蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）によるもの（前記特許中に開示されている）であってもよく、又は物理的相互作用によるもの（Tyagiら、米国特許第6,150,097号に記載されている（その全体を参照により本明細書中に組み入れる））であってもよい。Dabcylは物理的相互作用によって消光しうるクエンチャーの一例である。市販されている「Black Hole Quenchers」は別の例である。

【0009】

米国特許第5, 925, 517号に開示されているヘアピンプローブは、互いに相互作用してヘアピン構造を作る一対の部分である「親和性ペア」により挟まれた一本鎖オリゴヌクレオチドループを含む。親和性ペアの1つのタイプは、互いにハイブリダイズして二本鎖システムを形成するオリゴヌクレオチド配列である。この特許中に開示されている他の親和性ペアとしては、タンパク質ーリガンド、抗体ー抗原、タンパク質サブユニット、及び核酸結合タンパク質ー結合部位がある。あるクエンチャーはそれ自身、蛍光団と親和性ペアを形成することができる。親和性ペアの形成若しくは崩壊は、プローブの立体構造及びその蛍光強度を変化させるか、別のタイプの標識ペアからの光学的シグナルを変化させるか、又は少なくとも一時的に局在化した反応（例えば発色）からのシグナル生成を変化させる（米国特許第5, 925, 517号に開示されている）。蛍光ではなく吸光度を測定することもできる。そのようなプローブの典型例は「分子ビーコンプローブ」であり、これは、相互にハイブリダイズする相補的配列（「アーム」）により挟まれる、所望の標的に対して相補的な中央一本鎖領域（「ループ」）を有するオリゴヌクレオチドである。これは、ヘアピン構造を形成し、一方のアーム上のクエンチャーが他のアーム上の蛍光団の蛍光を消光する。標的へのループのハイブリダイゼーションは、ステムハイブリッドを壊し、蛍光団をクエンチャーから引き離し、これによりそれらの相互作用を顕著に減少させて蛍光を生成させる。しかしながら、米国特許第5, 925, 517号に開示されているように、分子ビーコンプローブはまた、ステムハイブリッドを変性させるためにプローブを加熱することによっても、その閉じたヘアピン構造から、開いたランダムコイル構造に変化させられうる。

【0010】

本発明において有用なシグナル発生ヘアピンは、分子ビーコンプローブとの類似性を有する。これは、環境中の制御可能な物理的又は化学的变化によりその相互作用が崩壊しうる隣接する親和性ペアの相互作用に起因して、ヘアピン構造を呈する中央一本鎖ループを有する分子である。該分子のループ部分は親和性ペアを分離するスペーサーとして機能する。この部分はプローブとして機能する必要がなく、好ましい実施形態ではプローブとして機能しない。中央連結部分は、核酸配列、炭素鎖、又は、ループとして開裂し且つ閉鎖することができるいかなる他の分子構造であってもよい。親和性ペアは、一対の相互作用する部分であって、あらかじめ選択されたハイブリダイゼーションアッセイ条件下で、使用中に分子がヘアピン構造を呈するようにさせることができるが、その相互作用が環境中の物理的又は化学的变化によって崩壊しうるものである。例えば、親和性ペアがステムハイブリッドを形成する相補的アームにより構成されるとき、ステムハイブリッドは温度の上昇、塩濃度の低下、又は変性剤（例えばホルムアミド）の添加によって開裂しうる。ヘアピンは、親和性ペアの一方のメンバーに連結した少なくとも1つの蛍光団、及び親和性ペアの他方のメンバーに連結した少なくとも1つのクエンチャーを含み、それによって親和性ペアの相互作用の崩壊が刺激時にシグナル発生ヘアピンを蛍光性にするものである。先述のように、いくつかの場合には蛍光団ークエンチャーペアは親和性ペアとしても機能しうる。

【0011】

本発明のコード体系は、異なる条件下でその親和性ペアが崩壊する複数のシグナル発生ヘアピンの使用を含む。例えば、好ましいシグナル発生ヘアピンは所望の温度で融解するように容易に構築されうる相補的オリゴヌクレオチドアームを有する。3以上のそのような分子の群を、3つの異なる温度（例えば50℃、60℃及び70℃）で融解するように構築することができる。例えば40℃のハイブリダイゼーションアッセイ温度を用いると、3つ全てのシグナル発生ヘアピンはその親和性ペアによって閉じられ、全部が消光される。しかしながら、温度が徐々に上げられれば、まず、最初のヘアピンが開き（50℃）、次に第2が（60℃）、次に第3が開く（70℃）。蛍光は温度によって変化するであろう。同様の効果、すなわち蛍光強度の識別可能な変化は、定温での、化学的環境の進行性変化（例えばホルムアミドのような変性剤の濃度上昇、又はチオシアン酸グアニジンのような塩の濃度低下）を通じて起こりうる。好ましい実施形態では、物理的又は化学的変

化の効果は可逆的であり、ヘアピンは再使用することができる。

【0012】

本発明のコード体系はまた、複数の蛍光団の使用を含む。現在利用可能な検出装置は、複合スペクトルを2～8種の異なる色の蛍光団、いくつかのケースではさらに多く、例えば9又は10種の異なる色の蛍光団のスペクトルの寄与部分に分解することができる。

【0013】

本発明のコード体系は、その組み合わせによりそれぞれのビーズのタイプを一意的に特定する、選ばれた異なるシグナル発生ヘアピンを、マイクロビーズ上に固定することを含む。例えば、環境中の物理的又は化学的变化により特定可能な3つのヘアピン構造から出発し、5種の異なる色の蛍光団から出発したとすると、15の異なるシグナル発生ヘアピンを合成することができる（3種の物理的又は化学的に区別可能なヘアピンのそれぞれに対して5種の異なる色のシグナル発生分子）。コード化は、15種のシグナル発生ヘアピンに対して、特定の種類のシグナル発生ヘアピンを所定の種類のビーズの表面に固定するかどうかをあらかじめ決定することにより達成される。決められるべき15の選択肢（1つがそれぞれのシグナル発生ヘアピンに対応する）があるので、異なるコードの数（従って異なるタイプのビーズの数）は2の15乗で32, 768である。それぞれのビーズタイプ上に独自のハイブリダイゼーションプローブを固定すれば、32, 768種までのコード化ハイブリダイゼーションプローブが得られることになる。

【0014】

本発明のコード化ビーズが簡便で複雑でないことは高く評価されるであろう。所望のアレイのサイズに依存して、2又は3種の異なるヘアピン分子を構築すればよく、但し、例えば4又は5種というより多い数を利用しうる。オリゴヌクレオチド分子は一方の末端にクエンチャーを、他方の末端に官能化されたヌクレオチドを有するように合成することができる。Glen Research (Sterling, Virginia, USA) は、dabcylのようなクエンチャーをあらかじめ含んだ、オリゴヌクレオチド合成装置での使用のための支持体（カラム）を市販している。標識を完了させるためには、数種類の蛍光団のストックを維持すればよい。蛍光団の付加及びシグナル発生ヘアピンの固定は、例えばガラス又はポリスチレンマイクロビーズのような好適なマイクロビーズ上に、周知の方法により実現可能である。シグナル発生ヘアピンをマイクロビーズの表面に結合させるために、蛍光団又はクエンチャーのいずれかは、シグナル発生ヘアピン中の内部の位置に配置することができる。そうすると、例えば一級アミノ基、スルフヒドリル基、又はビオチン基のような官能基をシグナル発生ヘアピンの空いた方の末端に共有結合させることができる (Tyagi ら (2000)、Wavelength-Shifting Molecular Beacons, Nat. Biotechnol. 18: 1191-1196)。これらの官能基はそれから、スクシンイミドエステル基、マレアミド基、又はストレプトアビジン分子のいずれかを含むように修飾されたマイクロビーズの表面にシグナル発生ヘアピンを結合させるのに用いることができる。その表面に適当な結合基を含むマイクロビーズとの官能化シグナル発生ヘアピンの簡単なインキュベーションにより、シグナル発生ヘアピンをマイクロビーズ表面に連結することができる。ヘアピン形成オリゴヌクレオチドの設計は、分子ビーコンプローブについて周知の技術を用いて達成することができる。他のヘアピン分子の設計及び他の親和性ペアの連結は、当該技術分野の技術水準の範囲内である。ハイブリダイゼーションプローブの製造及び固定化は、当該技術分野において周知である。

【0015】

本発明のコード化ハイブリダイゼーションマイクロビーズは公知のアッセイ方法及びシステムに利用することができる。1つの好ましい実施形態は、非標識ハイブリダイゼーションプローブ（時に捕捉プローブと呼ばれる）を含むコード化マイクロビーズを、その中の核酸標的分子（例えばDNA又はcDNA又はmRNA）が光学的に検出可能なように標識された分析対象溶液中に懸濁することである。標識は蛍光標識が好ましい。分析対象分子の標識は異なっている必要はない：単一標識（好ましくはどのコード化標識とも異なっている）で十分である。最も好ましい実施形態は、ハイブリダイゼーションプローブと

して蛍光団／クエンチャー標識分子ビーコンプローブを用いることであり、ここで、標的にハイブリダイズしたときに分子ビーコンプローブは開裂し、消光ようになる。マイクロビーズの表面上に固定された分子ビーコンプローブは、それぞれが同じ蛍光団で標識された分子ビーコンでありうる。本発明は、いくつかの分析対象分子、又は標的がビーズにハイブリダイズしているかどうかを検出するいかなる特定の方法に限定されるものでもない。標的ハイブリダイゼーションを確認するためのいかなる他の好適な光学的検出システム及び方法も用いることができ、例えばS p i r oらによって開示された改変サンドイッチアッセイを用いることができる。また、引き続きプローブ標的ハイブリッドの物理的又は酵素的修飾は、例えばプローブの3'末端への単一蛍光標識ヌクレオチドの酵素的付加により行われてもよく、これは捕捉された標的鎖中の単一ヌクレオチド多型の存在を確認するための方法である(Chen J.ら(2000)、A Microsphere-Based Assay for Multiplexed Single Nucleotide Polymorphism Analysis Using Single Base Chain Extension、Genome Research 10: 549-557)。ハイブリダイゼーションが完了した後、ビーズは顕微鏡スライド若しくは他の好適な表面上に設置され、適当な波長の光で刺激され、パターン認識が可能な公知かつ利用可能な落射蛍光顕微鏡装置を用いて「読み取られ」ることができる。これは、どのビーズが標的を検出したかを特定する。本発明のデコードは、それらがどのビーズか、及び、それらの製造についての知識から、それらがどのハイブリダイゼーション配列を有するかを特定する。例えばシグナル発生ヘアピンが58、72及び82℃において融解するように構築され、分析対象ハイブリダイゼーションが50℃で行われるならば、スライドの温度はその使用に好適な速度(例えば1分間に数℃)で88℃まで上げられ、リアルタイムの蛍光曲線が個々のビーズについて得られる。コンピュータプログラムは、個々のマイクロビーズからのデータを、それぞれの温度間隔における個々の蛍光団に起因する蛍光寄与に分解することができ、並びにコンピュータプログラムは、それぞれの蛍光団について、温度(T)の変化に対する蛍光強度(I)の変化を迅速に計算することができ、これにより、シグナルヘアピンを標識するのに用いた個々の異なる色の蛍光団についてのTに対するd I / d Tのプロットのピークが、視野中のそれぞれのマイクロビーズ上にどのシグナル発生ヘアピンが存在するかを示すようになり、従って個々のビーズを特定し、それ故試験された分析対象中の個々のハイブリダイズした配列を特定する。多様な温度加熱装置が実験設備について周知である。例えば標準的なサーマルサイクラーの加熱ブロックを、落射蛍光顕微鏡のステージ上での使用に容易に適応させることができる。

【0016】

本発明のコード化ビーズの混合物を用いたハイブリダイゼーションアッセイの別の好ましい実施形態は、分析対象と混合するのに先行するかその後が続いてフローセル中にマイクロビーズの分散型平面アレイを組み込むBrennerらの方法である。組み込まれたアレイ中のビーズは、まずハイブリダイゼーションについて読み取られ、その後デコードされうる。例えば、上記のように温度を徐々に上げることができる。あるいはまた、水溶液勾配をセルに流すことができ、水溶液勾配は漸増濃度の変性剤(例えばホルムアミド若しくは尿素)、又は漸減濃度の塩(例えばチオシアン酸グアニジン若しくはトリフルオロ酢酸ナトリウム)を含む溶液若しくは溶液群であり、これにより短いステムハイブリッドが初めに開裂し、最も長い(より正確には最も強固な)ステムハイブリッドが最後に開裂し、前と同様に、利用可能な装置によって識別可能な蛍光パターンを与える。特定のビーズに対する分析対象のハイブリダイゼーションを検出することができ、そのビーズの経過を追跡することができ且つデコードすることができるいかなるアッセイも、本発明での使用のために好適である。

【0017】

本発明の1以上の実施形態の詳細は、添付の図面及び以下の詳細な説明中で説明されている。本発明の他の特徴、目的、及び利点は、詳細な説明及び図面から、並びに特許請求の範囲から明らかであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

詳細な説明

図1は本発明の固定化シグナル発生ヘアピン101の実施形態を示している。ヘアピン分子101は、相補的オリゴヌクレオチド配列として示されている親和性ペア105、106により挟まれた中央連結部分104を含む。中央連結部分はオリゴヌクレオチドでもよく、上述のようにそうでなくてもよい。連結部分104がオリゴヌクレオチド配列である場合には、ヘアピン101は意図されるハイブリダイゼーションアッセイ中でハイブリダイゼーションプローブとして機能しないことが好ましい。オリゴヌクレオチドアーム105、106はDNA、RNA又はその組み合わせでありうる。アーム105、106は、非天然ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、及び修飾ヌクレオチド間結合を含むことができる。同じことは、中央連結部位104がオリゴヌクレオチド配列である場合に、中央連結部位104にも適用される。親和性ペアとしては相補的オリゴヌクレオチドアームが好ましいが、アッセイ条件下で可逆的に互いに結合することにより相互作用し、その相互作用が環境中の物理的変化若しくは化学的変化のいずれかにより崩壊しうる部分のいかなるペアも、本発明のシグナル発生ヘアピンに用いることができる。親和性ペアのメンバー105に連結されているのはクエンチャー部分107である。親和性ペアのメンバー106に連結されているのは蛍光団108である。ヘアピン101が示された状態にあるとき、蛍光団108からの蛍光が大部分消光され、親和性ペア105、106の破壊が、蛍光がわずかしき消光されないのに十分な程度に蛍光団108をクエンチャー107から引き離すように、部分107、108が配置され、連結される。複数のクエンチャー部分を含めることができ、同様に複数の蛍光団部分を含めることができ、これは例えばFRETにより相互作用する蛍光団のペアを含む。蛍光団108及びクエンチャー107は、親和性ペアが相互に結合しているかどうかに依存してそれらが発生する検出可能なシグナルの強度を変化させる化学基のいかなるペアでもよい。先述のように、いくつかの実施形態においては、部分107、108は親和性ペアの少なくとも一部を構成することができる。

【0019】

最も好ましい実施形態では、親和性ペア及び連結部分は、例えばオリゴヌクレオチド合成装置を用いて容易に合成することができるオリゴヌクレオチドである。そのような構造の設計は、分子ビーコンプローブの設計から周知である。例えば以下を参照のこと：米国特許第5,925,517号；同第6,150,097号；Tyagi, S.およびKramer, F.R. (1996)、Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization、Nat. Biotechnol. 14: 303-308；Tyagiら (1998)、Multicolor Molecular Beacons for Allele Discrimination、Nat. Biotechnol. 16: 49-53；Marrasら (2002)、Efficiencies of Fluorescence Resonance Energy Transfer and Contact-Mediated Quenching in Oligonucleotide Probes、Nucleic Acids Res. 30: e122；Bonnet, G.ら (1999)、Thermodynamic Basis of the Enhanced Specificity of Structured DNA Probes、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 6171-6176。これらの参考文献のそれぞれはその全体が本明細書に組み入れられる。

【0020】

図1に示したように、ヘアピン101は、固体表面103（例えばガラス又はポリスチレンマイクロビーズの表面）にリンカー102を介して固定され、核酸分子を始めとする分子の固体表面への共有結合は周知である（Adessi, C.ら (2003)、Solid Phase DNA Amplification: Characterization of Primer Attachment and Amplification Mechanisms、Nucleic Acids Res. 28: e87；Call, D. R.ら (2001)、Fabrication of DNA Microarrays Using Unmodified Oligonucleotide Probes、BioTechniques 30: 368-379；Guo, Z.ら (1994)、Direct Fluorescence Analysis of Genetic Polymorphisms by Hybridization with Oligonucleotide Arrays on Glass Supports、Nucleic Acids Res. 22: 5456-5465）。ヘアピン構造、すなわち分子ビーコンプローブの結合を具体的に開示している参考文献には、例えば以下のものがある：Brown L. J.ら (2000)、Molecular Beacons Attached to Glass Beads Fluoresce upon Hybridization to Target DNA、Chem. Comm. 2000: 621-

622; Liu, X. および Tan, W. (1999)、A Fiber-Optic Evanescent Wave DNA Biosensor Based on Novel Molecular Beacons、Anal. Chem. 71: 5054-5059; Liu, X. ら (2000)、Molecular Beacons for DNA Biosensors With Micrometer to Submicrometer Dimensions、Anal. Biochem. 283: 56063; Steemers, F. J. ら (2000)、Screening Unlabeled DNA Targets with Randomly Ordered Fiber-Optic Gene Arrays、Nat. Biotechnol. 18: 91-94。
これらのそれぞれは参照によりその全体が本明細書中に組み入れられる。

【0021】

固体表面103は、いかなる好適なマイクロキャリアの表面でもよい。好ましい実施形態ではマイクロビーズを用い、これはいかなる好適な材質のものでもよい（例えばガラス又はポリスチレンのような有機ポリマー）。マイクロキャリアがどのように読み取られるかに応じて、その光学的性質（例えば透明度）は系の条件に適合させる必要があるかもしれない。

【0022】

図2A～2Cは、親和性ペアとして相補的アームを有し、蛍光団及びクエンチャーで標識されたオリゴヌクレオチドシグナル発生ヘアピンの融解挙動を示している。図2Aは温度の関数として蛍光強度を表している。シグナル発生ヘアピンはテキサスレッド標識TM72とした。図2Bは図2Aの曲線の一次導関数を表し、図2Cは二次導関数を表している。一次導関数は融解点における急勾配のピークを生じ、二次導関数は融解点（グラフがゼロを通るところ）の両側に上向きと下向きのピークを生じた。デコードに用いるためには一次導関数が最も有用であることが明らかになった。

【0023】

本発明者らは、本発明のコード化に用いるために、異なる融解点を有する一群のシグナル発生ヘアピンを設計した。図3はそれらのヘアピンのいくつかを特定するものであり、それらの配列（相補的アームは太字）、及び考えられるアッセイ条件（4 mM MgCl₂ 添加1×PCRバッファー（Applied Biosystems）50 μl）下で決定した融解点を示している。融解曲線は30秒毎に1℃の速度で、95℃から23℃まで温度を下げることで得た。データは温度毎に採取した。ヘアピンは、図1に示したように、蛍光団およびクエンチャーで全て末端標識した。クエンチャーとして、たいていはdabcylを用いたが、Black Hole Quencher No. 2（ヘアピンTM60、B及びTM86、Cに対して）も用いた。図3に示したように、種々の長さのアームと連結した9～12ヌクレオチド長のリンカー（ループ）を有する設計は、40℃にわたる融解温度幅をもたらした。

【0024】

本発明のコード体系は、デコード工程の間に物理的又は化学的条件が変化した場合に互いに区別することができる異なるヘアピンを、少なくとも2種、より大きなアレイに対しては3種以上（例えば4又は5種）有するシグナル発生ヘアピンを用いる。上記のように、3種の物理的又は化学的に区別可能なヘアピンと5種類の蛍光団のコード体系は、32、256の異なるマイクロキャリアのアレイに対して十分である。図4は、同じように標識した3つのヘアピンが、温度が変化するときいかに容易に区別可能であることを示している。3つのシグナル発生ヘアピンはTM47、TM72、及びTM90であり、全てテトラクロロフルオロセインで標識した。温度の関数としての蛍光強度の一次導関数は、3つの別個のピークを示し、最初のヘアピンは約50℃で開裂し、次に第2のヘアピンは約67℃で開裂し、第3のヘアピンは約84℃で開裂している。蛍光はApplied Biosystems 7700 Prism蛍光分光サーマルサイクラーを用いて測定した。明らかに認識されるように、温度の関数としての連続的な測定は必要がない。例えば40℃で1回測定し、さらに例えばそれぞれの融解点の5℃上で3回測定することで、それぞれのヘアピンが開いたときに蛍光強度が上昇していることが示される。

【0025】

温度は、ヘアピンコード化マイクロキャリアを区別するために用いることができる物理的又は化学的環境変化の1つの例である。別の例としては、種々の濃度のホルムアミドの

10

20

30

40

50

添加及び種々の濃度のチオシアン酸グアニジンの塩の添加が挙げられる。これら3つの例の比較は、図6A～6Cに表されている。図6Aは3種のヘアピン、すなわちTM60、TM72、およびTM85（全てテトラクロロフルオレセインで標識されている）についての融解曲線を表している。見て取れるように、3種のシグナル発生ヘアピンは、互いに約10℃離れた3つの温度において融解する（4mM $MgCl_2$ 、50mM KCl 、10mM $Tris-HCl$ 、pH8.0の存在下）。現時点において利用可能な装置を用いると、近い融解点を有するヘアピンを区別することはできないが、約10℃以上異なる融解点を有するヘアピンは信頼性をもって区別することが可能であり、本発明者らはそのようなヘアピンを用いる。

【0026】

図6Bは、ホルムアミドの量を増大させたときの、49℃の定温での同じ3種のシグナル発生ヘアピンについての蛍光強度曲線を示している（1mM $MgCl_2$ 、25mM KCl 、10mM $Tris-HCl$ 、pH8.0の存在下）。ホルムアミドによる識別について最適化していないにも拘らず、親和性ペアのホルムアミドによる開裂について3つの異なる区別可能な曲線が得られた。図6Cは、チオシアン酸グアニジンの量を低減したときの、73℃の定温での同じ3種のシグナル発生ヘアピンについての蛍光強度曲線を示している（10mM $Tris-HCl$ 、pH8.0の存在下）。この場合、蛍光強度は塩濃度の対数に対してプロットしてある。ここでもまた、チオシアン酸グアニジンによる識別について最適化していないにも拘らず、3つの異なる区別可能な曲線が得られた。図6Bおよび6Cは、環境の化学的構成の変化が、複数（この具体例では3種）のシグナル発生ヘアピンのタイプを区別するのに用いられうることを示している。この結果は、マイクロキャリアの分散型アレイの測定及びデコードについて、非常に興味深い可能性を開拓するものである。相補的アームのハイブリダイゼーションにより形成されたヘアピンステムのような核酸二重らせんの安定性に影響を与える環境条件は周知である。例えばTurner, D. H. (1999) Conformational Changes (Bloomfield, V. A.ら、8章のNUCLEIC ACIDS: STRUCTURE, PROPERTIES, AND FUNCTIONS)、University Science Books (Sausalito, California, USA))を参照。ここでは、塩イオン（例えばナトリウム及びマグネシウム）の濃度を変化させること；共溶媒（例えばエタノール及びホルムアミド）の濃度を変化させること；他の変性剤（例えば尿素及びカオトロピック剤）の濃度を変化させることの影響；並びに温度およびpHの変化の影響を検討している。Freifelder, D. (1982)、PHYSICAL BIOCHEMISTRY、第2版、W. H. Freeman and Company (New York, New York, USA)の19～29頁も参照のこと。他の親和性ペアも同様に環境変化の影響をうける（例えば抗体及び他のタンパク質に対しての変性剤）ことは当業者には理解されるであろう。永続的な変化を用いることもできるが、ビーズが後で再使用できないため、好ましいものではない。

【0027】

本発明は、マイクロキャリア（例えばマイクロビーズ）のコード化体系又は方法、コード化マイクロキャリアの混合物、並びにそのような混合物を用いたアレイ及びアレイ法を含む。上述のように、たった3種類のクエンチャー標識オリゴヌクレオチド及び5種の異なる蛍光団のストックから、15種類の異なるシグナル発生ヘアピンを調製することができる。これは 2^{15} の異なる組み合わせでマイクロビーズ上に固定することができる。限られた数の蛍光団及び限られた数の条件、例えば4種類の蛍光団と2種類の条件を用いて256コードが実現可能である。

【0028】

好ましい実施形態では、個々の異なるシグナル発生ヘアピンが単に色と物理的性質によりコード化されるが、本発明のコード体系においては、色強度を色の種類と組み合わせる用いることができる。例えば、当該技術分野において公知のように、強度比2:1を有する赤と黄の組み合わせは、強度比2:2又は1:2を有する赤と黄の組み合わせと区別することができる。

【0029】

図5は本発明者らの研究室のApplied Biosystems 7700の解析能力を示している。この機器は、7種類もの異なる色の蛍光団を含む複素スペクトルを、それぞれの異なる色の蛍光団の存在に起因するスペクトルに分解することができる。図5に示した例では、該機器は、6種のシグナル発生ヘアピン（2つはAlexa 546で標識され、2つはテトラクロロフルオレセイン（TET）で標識され、2つはテトラメチルローダミン（TAMRA）で標識されている）の混合物に由来するスペクトルを、個々の蛍光団に対する曲線に分解し、それらの曲線は、同じ蛍光団で標識された2種のシグナル発生ヘアピンのそれぞれについてのピークを示している。認識されるように、より簡潔なシステムも可能である。例えば、発光ダイオード又はフィルターホイールを刺激に用いることができ、フィルターホイールを検出に用いることが可能である。

10

【0030】

本発明のアッセイは、核酸分子若しくはその断片を含むか又は含むと推測される分析対象溶液を本発明に従いコード化されたマイクロキャリアの混合物と接触させるステップ、どのマイクロキャリアが分析対象分子若しくは標的とハイブリダイズしたかを決定するステップ、それらのマイクロキャリアをデコードするステップを含みうる。アッセイは、どの程度の分析対象が（もし存在するのであれば）個々のマイクロキャリアにハイブリダイズしているかを決定するのに先立ち、またマイクロキャリアをデコードするのに先立って、マイクロキャリア（好ましくはマイクロビーズ）を平面表面（例えば顕微鏡用スライド）に載せ、分散型アレイとするステップを含んでもよい。アッセイは、フローセル中の2つの平面表面の間にマイクロビーズの分散型アレイの位置を固定するステップを含んでもよく、これはアレイの固定後及び固定前の分析対象のハイブリダイゼーションにとって好適であり、また化学的環境を変化させること（例えば、勾配若しくは段階的な量での、漸減量のチオシアン酸グアニジンの添加）を含むデコードにとっても好適である。同様に、本発明のアッセイは、分析対象溶液と接触するのに先立つか、又はその後で、光ファイバー束のファイバーの末端にコード化マイクロビーズの混合物を捕捉するステップ、及び、どのファイバーが標的とハイブリダイズしたかを決定するステップを含んでもよい。本発明のデコードアレイは非常に迅速で簡便なので、マイクロビーズアレイはファイバー末端に恒久的に取り付けられている必要はなく、デコードは固定に引き続いて行うことができる。本発明のアッセイはコード化マイクロビーズを分析対象溶液と接触させるステップと、その後ビーズをフローサイトメトリーシステムに順次通過させるステップを含んでもよく、ここで個々のビーズはハイブリダイゼーションについて読み取られ、且つまたデコードされる。フローセルシステム及びフローサイトメトリーシステムの態様を有する他の選択肢は、マイクロキャリアの位置を、例えばデコードのために用いられる変性剤のような溶液が通過しうるキャピラリー管中などの線形アレイ中に固定することである。マイクロビーズ若しくは他のマイクロキャリアの分散型アレイを利用したいかなるアッセイ方法も、本発明に従ってコード化されたマイクロビーズの混合物とともに用いることができる。好ましい方法は、液相ハイブリダイゼーション反応速度論を利用して、固定に先立ってコード化マイクロビーズを分析対象溶液でスラリー化するステップを含む（Chenら(2000)）。好ましい方法はまた、平均化した結果を得るために、個々のマイクロビーズの複数コピー（例えば20～30コピー）を用いることを含む（Danowski, K. L.及びPantano, P. (2001), Evaluating the Chemical Spatial Resolution of Imaging Fiber Chemical Sensors, Microchem. J. 70: 51-61）。

20

30

40

【0031】

種々のタイプの機器及びソフトウェアが、デコード可能な分散型マイクロアレイを用いたアッセイを行うために利用可能である。既に引用した論文に加えて、以下のものを参照のこと：Albert, K. J.ら (2002)、Automatic Decoding of Sensor Types within Randomly Ordered, High-Density Optical Sensor Arrays, Anal. Bioanal. Chem. 373: 792-802；Kellar, K. L.及びIannone, M. A. (2002)、Multiplexed Microsphere-Based Flow Cytometric Assays, Exp. Hematol 30: 1227-1237；Tsagkatakis, I.ら (2001)、Spatial and Spectral Imaging of Single Micrometer-Sized Solvent Cast Fluorescent Plastics

50

zed Poly(vinylchloride) Sensing Particles, Anal. Chem. 73: 315-320 ; Walt, D. R. (2000)、Bead-Based Fiber-Optic Arrays, Science 287: 451-452 ; 及びYang, L.ら (2001)、BADGE, Beads Arrays for the Detection of Gene Expression, a High Throughput Diagnostic Bioassay, Genome Research 11: 1888-1898)。顕微鏡を用いた、温度変化を利用するデコードのために、プログラムされた又はプログラムすることができる可変温度顕微鏡ステージが必要である。様々なタイプの可変温度試料ホルダーが周知であり、そのような顕微鏡ステージの構築は当該技術分野の技術水準の範囲内である。

【0032】

本発明の多くの実施形態を記載した。それでも、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、種々の改変を加えうることが理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】図1は、ビーズの表面に固定された、本発明において有用なシグナル発生ヘアピン分子の実施形態を様式化した図である。

【図2A】図2A～2Cは、本発明において有用なシグナル発生ヘアピン分子の一実施形態の融解挙動を示している。図2Aはシグナルヘアピンの融解曲線である。

【図2B】図2Bは融解曲線の一次導関数である。

【図2C】図2Cは融解曲線の二次導関数である。

【図3】図3は、作製し、試験を行った一群のシグナル発生ヘアピンオリゴヌクレオチド分子の配列、標識及び融解温度を示した表である。

【図4】図4は、3種のシグナル発生ヘアピン分子（同じ蛍光団でそれぞれが標識され、それぞれが異なる融解温度を有する）の混合物がそれら3つの融解温度を経て徐々に加熱されたときに得られた蛍光曲線の一次導関数である。

【図5】図5は、6種の異なるシグナル発生ヘアピン（2つはAlexa 546で標識され、2つはテトラクロロフルオレセイン（TET）で標識され、2つはテトラメチルローダミン（TAMRA）で標識された）の混合物を用いて得られた結果を示している。それぞれの温度で得られた複素スペクトルを、3種類の蛍光団それぞれの蛍光についてのスペクトルに分解し、温度に対する個々の蛍光団の蛍光強度の一次導関数を温度の関数としてプロットした。混合物中の6種の異なるシグナル発生ヘアピンそれぞれの存在は、特定の温度での特定の色についての蛍光増加のピークによって示されている。

【図6A】図6A～6Cでは、温度の上昇（図6A）、ホルムアミド濃度の上昇（図6B）、及びチオシアン酸グアニジン濃度の低減（図6C）に反応した3つの異なるシグナル発生ヘアピンの挙動を比較している。

【図6B】図6A～6Cでは、温度の上昇（図6A）、ホルムアミド濃度の上昇（図6B）、及びチオシアン酸グアニジン濃度の低減（図6C）に反応した3つの異なるシグナル発生ヘアピンの挙動を比較している。

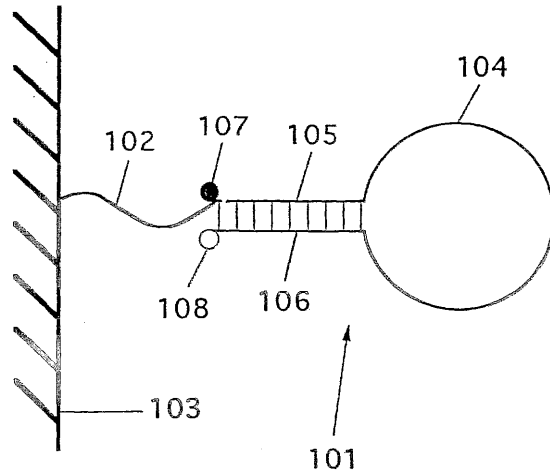
【図6C】図6A～6Cでは、温度の上昇（図6A）、ホルムアミド濃度の上昇（図6B）、及びチオシアン酸グアニジン濃度の低減（図6C）に反応した3つの異なるシグナル発生ヘアピンの挙動を比較している。

10

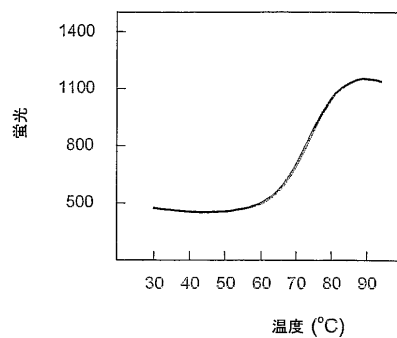
20

30

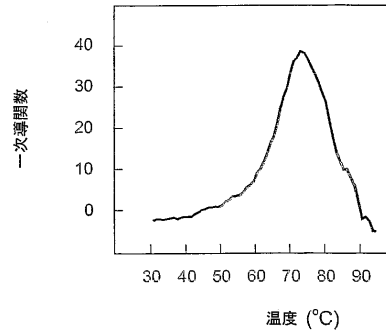
【図 1】



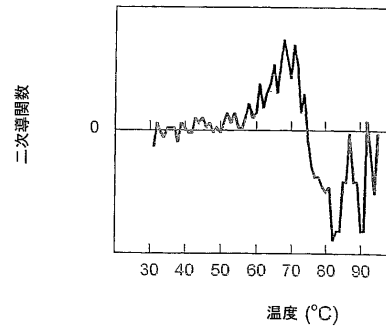
【図 2 A】



【図 2 B】



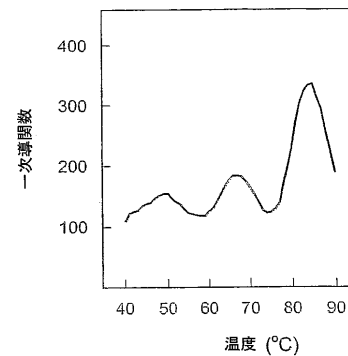
【図 2 C】



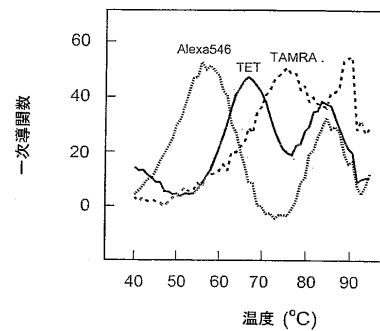
【図 3】

配列	名称	蛍光	クエンチャー	実際の Tm (°C)
CGCTCT CTCTCTGAGTCT AGAGCG	TM62	FAM	dabcyl	64
CGCCG TCTGTCTGAGTCT CGGCG	TM68	FAM	dabcyl	67.5
CGACCTGG CTGTCTGACT CCAGGTCG	TM74	FAM	dabcyl	73
CGGACGCG CTGTCTGAGTC CGCGTCCG	TM80	FAM	dabcyl	80
CCCCGCCG TATGTCTGAGTC GGGCGGGG	TM86	FAM	dabcyl	82
GGTG CTGTCTGAGTCT CACC	TM47	TET	dabcyl	50
ATGGG TGTCTGAGTCT CCCAT	TM60	TET	dabcyl	58.5
CGCTCG GTCTGTCTGAGTCTAT CGAGCG	TM72	TET	dabcyl	68
AGGACGCG CTGTCTGAGTC CGCGTCTCT	TM85	TET	dabcyl	79
CCCCGCCG CTGTCTGAGTC CGGGCGGGG	TM90	TET	dabcyl	84.5
CGCCCGCCG CTGTCTGAGTC CGGGCGGGG	TM93	TET	dabcyl	86.5
ATGGG TGTCTGAGTCT CCCAT	TM60	A546	dabcyl	58
ATGGG TGTCTGAGTCT CCCAT	TM60.B	A546	BHQ2	66
CGACCTGG CTGTCTGACT CCAGGTCG	TM74	A546	dabcyl	74
CCCCGCCG TATGTCTGAGTC GGGCGGGG	TM86.C	A546	BHQ2	84
CCCCGCCG CTGTCTGAGTC CGGGCGGGG	TM90	A546	dabcyl	86
ATGGG TGTCTGAGTCT CCCAT	TM60	Texas red	dabcyl	64
CGCTCG GTCTGTCTGAGTCTAT CGAGCG	TM72	Texas red	dabcyl	75.5
AGGACGCG CTGTCTGAGTC CGCGTCTCT	TM85	Texas red	dabcyl	84
CCCCGCCG TATGTCTGAGTC GGGCGGGG	TM86.A	Texas red	dabcyl	87
CGCCCGCCG CTGTCTGAGTC CGGGCGGGG	TM93	Texas red	dabcyl	91
ATGGG TGTCTGAGTCT CCCAT	TM60	TAMRA	dabcyl	59
CGACCTGG CTGTCTGACT CCAGGTCG	TM74	TAMRA	dabcyl	75
AGGACGCG CTGTCTGAGTC CGCGTCTCT	TM85	TAMRA	dabcyl	81
CCCCGCCG CTGTCTGAGTC CGGGCGGGG	TM93	TAMRA	dabcyl	91
CCCCGCCG CTGTCTGAGTC CGGGCGGGG	TM90	TAMRA	dabcyl	87

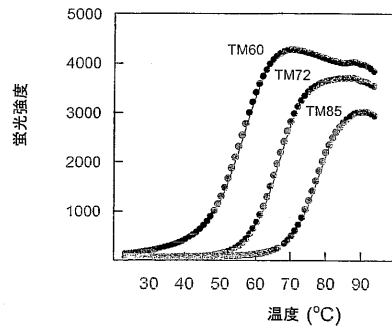
【図 4】



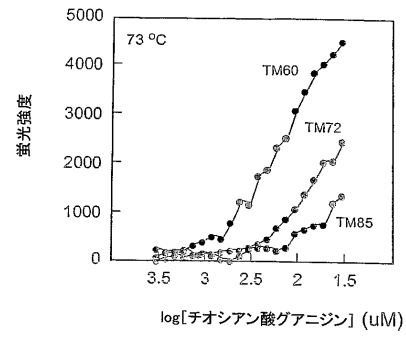
【図 5】



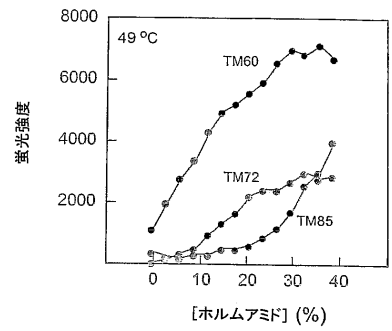
【図 6 A】



【図 6 C】



【図 6 B】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
G 0 1 N 33/543 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68 A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/543 5 7 5
G 0 1 N 37/00 (2006.01)		G 0 1 N 33/53 M
G 0 1 N 21/64 (2006.01)		G 0 1 N 37/00 1 0 2
		G 0 1 N 33/543 5 9 7
		G 0 1 N 21/64 C
		G 0 1 N 21/64 F

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(72)発明者 クラマー, フレッド, アール.

アメリカ合衆国 1 0 4 6 3 ニューヨーク州, リバーデール, ウェスト 2 3 1 ストリート
5 6 1

(72)発明者 ティアギ, サンジャイ

アメリカ合衆国 1 0 0 1 0 ニューヨーク州, ニューヨーク, アpartment 2 6 -エフ, ウ
ォーターサイド プラザ 2 0

(72)発明者 トランフィオ, ハイヤム, エルハッジ

アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク州, ニューヨーク, アpartment 6 -ケー, イー
スト 7 4 ティーエイチ ストリート 2 2 5

(72)発明者 マーラス, サルヴァトーレ, エー.

アメリカ合衆国 0 7 3 1 0 ニュージャージー州, ジャージー シティ, アpartment 5
1 0, リバー コート 1

審査官 浅野 美奈

(56)参考文献 特表2003-500001 (JP, A)

特表2002-535998 (JP, A)

特表2005-514038 (JP, A)

特表2004-500109 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/542

C12M 1/00

C12M 1/34

C12N 15/09

C12Q 1/68

G01N 21/64

G01N 33/53

G01N 33/543

G01N 37/00