

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4766750号  
(P4766750)

(45) 発行日 平成23年9月7日(2011.9.7)

(24) 登録日 平成23年6月24日(2011.6.24)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 Q	1/68	(2006.01)	C 12 N	15/00	F
G O 1 N	33/53	(2006.01)	C 12 Q	1/68	A
G O 1 N	33/566	(2006.01)	G O 1 N	33/53	M
G O 1 N	37/00	(2006.01)	G O 1 N	33/566	

請求項の数 72 (全 110 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-606786 (P2000-606786)
(86) (22) 出願日	平成12年3月17日 (2000.3.17)
(65) 公表番号	特表2003-520570 (P2003-520570A)
(43) 公表日	平成15年7月8日 (2003.7.8)
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/007006
(87) 国際公開番号	W02000/056927
(87) 国際公開日	平成12年9月28日 (2000.9.28)
審査請求日	平成19年3月14日 (2007.3.14)
(31) 優先権主張番号	60/125,357
(32) 優先日	平成11年3月19日 (1999.3.19)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	500056220 コーネル リサーチ ファンデーション インク. アメリカ合衆国、ニューヨーク州 148 50, イサカ, パイン ツリー 395 , スイート 310
(73) 特許権者	305023366 リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ ミネソタ アメリカ合衆国、ミネソタ州 55114 -8658, セント ポール, ウエストゲ ート ドライブ 1000, スイート 1 60

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】位置特定可能なアレイによるリガーゼ検出反応を用いた核酸配列差異の検出

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の段階を含む、多数の標的ヌクレオチド配列において一つ又は複数の单塩基の変化、挿入、欠失、又は転座により異なる、多数の配列の一つ又は複数を同定する方法：

多数の配列差異を伴う一つ又は複数の標的ヌクレオチド配列を含む可能性がある試料を提供する段階；

各セットが(a)標的特異的部分及び位置特定可能なアレイ特異的部分を有する第一のオリゴヌクレオチドプローブ、並びに(b)標的特異的部分及び検出可能なレポーター標識を有する第二のオリゴヌクレオチドプローブにより特徴付けられ、特定のセット中のオリゴヌクレオチドプローブは、対応する標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接してハイブリダイズされる場合は相互ライゲーションに適しているが、試料中に存在する任意の他のヌクレオチド配列にハイブリダイズされる場合にはこのようなライゲーションを妨害するミスマッチを有する、多数のオリゴヌクレオチドプローブセットを提供する段階；

リガーゼを提供する段階；

混合物を形成するために、試料、多数のオリゴヌクレオチドプローブセット、及びリガーゼを混合する段階；

ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドのいずれもが標的ヌクレオチド配列から分離される変性処理、および、オリゴヌクレオチドプローブセットが、その各々の標的ヌクレオチド配列が試料中に存在する場合は隣接した位置で塩基特異的に当該標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズし、互いにライゲーションして(a)位置特定可能なアレイ特異的部分

10

20

、(b)互いに結合した標的特異的部分、及び(c)検出可能なレポーター標識を含むライゲーション産物配列を形成し、また、オリゴヌクレオチドプローブセットがその各々の標的ヌクレオチド配列以外のサンプル中のヌクレオチド配列にハイブリダイズしうるものの、一つまたは複数のミスマッチが存在するために相互にライゲーションせず変性処理中に個別に分離される、ハイブリダイゼーション処理を含む、一つ又は複数のリガーゼ検出反応サイクルに混合物を供する段階；

特定の部位に固定された、位置特定可能なアレイ特異的部分に相補的なヌクレオチド配列を有する、異なる捕獲用オリゴヌクレオチドを伴う固体支持体を提供する段階；

前述の供する段階の後に、混合物を、負電荷を遮蔽しかつ塩基特異的方法で捕獲用オリゴヌクレオチドに対し位置特定可能なアレイ特異的部分をハイブリダイズさせるのに有效な条件下で、固体支持体と接触させ、これにより、位置特定可能なアレイ特異的部分を固体支持体上に相補的捕獲用オリゴヌクレオチドを伴う位置で捕獲する段階であって、該接觸が、(i)二価のカチオン含有化合物の存在下で、(ii)6.0又はそれ以下のpHで、且つ(iii)遊離カルボン酸基をキャッピングする中和剤を用いて実施される、段階；並びに

固体支持体上に特定の部位で捕獲されたライゲーション産物配列のレポーター標識を検出し、これにより、試料中の一つ又は複数の標的ヌクレオチド配列の存在を示す段階。

#### 【請求項2】

セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、ライゲーション接合部の完全な相補性により対応する標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接してハイブリダイズされる場合は、ライゲーション接合部での相互ライゲーションに適しているが、セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、試料中に存在する任意の他のヌクレオチド配列にハイブリダイズされる場合には、ライゲーション接合部の塩基にこのようなライゲーションを妨害するミスマッチを有する、請求項1記載の方法。

#### 【請求項3】

ミスマッチが、ライゲーション接合部の3'側塩基にある、請求項2記載の方法。

#### 【請求項4】

セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、ライゲーション接合部の完全な相補性により対応する標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接してハイブリダイズされる場合は、ライゲーション接合部での相互ライゲーションに適しているが、セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、試料中に存在する任意の他のヌクレオチド配列にハイブリダイズされる場合には、ライゲーション接合部の塩基に隣接した塩基にこのようなライゲーションを妨害するミスマッチが存在する、請求項2記載の方法。

#### 【請求項5】

ミスマッチが、ライゲーション接合部の3'側塩基に隣接した塩基にある、請求項4記載の方法。

#### 【請求項6】

試料が、多数の配列差異を伴う多数の標的配列の一つ又は複数を未知量含有する可能性があり、以下の段階を更に含む、請求項1記載の方法：

前記検出後に、試料から生成された捕獲されたライゲーション産物配列の量を、既知量の標的ヌクレオチド配列を含む試料から作製された捕獲されたライゲーション産物配列の検量線と比較することにより、試料中の標的ヌクレオチド配列の量を、定量する段階。

#### 【請求項7】

試料が、多数の配列差異を伴う多数の標的ヌクレオチド配列の一つ又は複数を未知量含有する可能性があり、以下の段階を更に含む、請求項1記載の方法：

既知量の一つ又は複数のマーカー標的ヌクレオチド配列を提供する段階；

前記混合が、試料、マーカー標的ヌクレオチド配列、多数のオリゴヌクレオチドプローブセット、多数のマーカー特異的オリゴヌクレオチドプローブセット、及びリガーゼを混合物を生成するために混合することを含み、各セットが、(a)マーカー標的ヌクレオチド配列に相補的な標的特異的部分及び固体支持体上の捕獲用オリゴヌクレオチドに相補的な位置特定可能なアレイ特異的部分を有する第一のオリゴヌクレオチドプローブ、並びに(b)

10

20

30

40

50

)マーカー標的ヌクレオチド配列に相補的な標的特異的部分及び検出可能なレポーター標識を有する第二のオリゴヌクレオチドプローブにより特徴付けられ、特定のマーカー特異的オリゴヌクレオチドセット中のオリゴヌクレオチドプローブが、対応するマーカー標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接してハイブリダイズされる場合は相互ライゲーションに適しているが、試料中に存在する任意の他のヌクレオチド配列又は追加されたマーカー配列にハイブリダイズされる場合にはこのようなライゲーションを妨害するミスマッチが存在する多数のマーカー特異的オリゴヌクレオチドプローブセットを提供する段階；

固体支持体上の特定部位に捕獲されたライゲーションされたマーカー特異的オリゴヌクレオチドセットのレポーター標識を検出し、これにより試料中の一つ又は複数のマーカー標的ヌクレオチド配列の存在を示す段階；並びに

10

既知量のマーカー標的ヌクレオチド配列から生成された捕獲されたライゲーション産物の量を、捕獲された他のライゲーション産物の量と比較することにより、試料中の標的ヌクレオチド配列の量を定量する段階。

#### 【請求項 8】

一つ又は複数のマーカー標的ヌクレオチド配列が、一つ又は複数の単独のヌクレオチド部位で試料中の標的ヌクレオチド配列と異なる、請求項 7 記載の方法。

#### 【請求項 9】

オリゴヌクレオチドプローブセット及びマーカー特異的オリゴヌクレオチドプローブセットが、多数のオリゴヌクレオチドプローブ群を形成し、各群が、単独のヌクレオチド部位で複数の対立遺伝子差異を識別するように設計された一つ又は複数のオリゴヌクレオチドプローブセットを含み、各群のオリゴヌクレオチドプローブセットにおいて、第一のオリゴヌクレオチドプローブが、共通の標的特異的部分を有し、かつ第二のオリゴヌクレオチドプローブが、塩基特異的方法で、所定の対立遺伝子又はマーカーヌクレオチド配列にハイブリダイズする異なる標的特異的部分を有する、請求項 8 記載の方法。

20

#### 【請求項 10】

オリゴヌクレオチドプローブセット及びマーカー特異的オリゴヌクレオチドプローブセットが、多数のオリゴヌクレオチドプローブ群を形成し、各群が、単独のヌクレオチド部位で複数の対立遺伝子差異を識別するために設計された一つ又は複数のオリゴヌクレオチドプローブセットを含み、各群のオリゴヌクレオチドプローブセットにおいて、第二のオリゴヌクレオチドプローブが、共通の標的特異的部分を有し、かつ第一のオリゴヌクレオチドプローブが、異なる標的特異的部分を有し、これが所定の対立遺伝子又はマーカーヌクレオチド配列に、塩基特異的方法でハイブリダイズする、請求項 8 記載の方法。

30

#### 【請求項 11】

試料が、多数の配列差異を伴う多数の標的ヌクレオチド配列の2つ以上を未知量潜在的に含み、以下の段階を更に含む、請求項 1 記載の方法：

検出後に、試料中の各々の多数の標的配列により形成された捕獲されたライゲーション産物配列の相対量を比較することにより、試料中の各々の多数の標的ヌクレオチド配列の相対量を定量し、これにより試料中の2つ以上の標的ヌクレオチド配列の相対レベルの定量的尺度を提供する段階。

40

#### 【請求項 12】

重複する標的特異的部分を伴うオリゴヌクレオチドプローブを有するオリゴヌクレオチドプローブセットにより、単独の標的ヌクレオチド配列中の、2個以上の隣接するヌクレオチド部位もしくは重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とするヌクレオチド部位での複数の対立遺伝子差異、又は、複数の標的ヌクレオチド配列中の、2個以上の隣接するヌクレオチド部位もしくは重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とするヌクレオチド部位での複数の対立遺伝子差異が識別される、請求項 1 記載の方法。

#### 【請求項 13】

オリゴヌクレオチドプローブセットの標的特異的部分が、実質的に同じ融解温度を有し、その結果これらは標的ヌクレオチド配列に同様のハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする、請求項 1 記載の方法。

50

**【請求項 1 4】**

単独の標的ヌクレオチド配列中の一つもしくは複数のヌクレオチド部位での複数の対立遺伝子差異、又は複数の標的ヌクレオチド配列中の一つもしくは複数の位置での複数の対立遺伝子差異が識別され、これらのオリゴヌクレオチドプローブセットが、多数のオリゴヌクレオチドプローブ群を形成し、各群は、単独のヌクレオチド部位での複数の対立遺伝子差異を識別するように設計された一つ又は複数のオリゴヌクレオチドプローブセットを含み、各群のオリゴヌクレオチドプローブにおいて、第二のオリゴヌクレオチドプローブが共通の標的特異的部分を有し、かつ第一のオリゴヌクレオチドプローブが塩基特異的方法で所定の対立遺伝子にハイブリダイズする異なる標的特異的部分を有し、上記検出において、異なる部位で固体支持体上に捕獲された各群のライゲーション産物配列の標識が検出され、これにより試料中の、一つ又は複数の標的ヌクレオチド配列中の一つ又は複数のヌクレオチド部位での一つ又は複数の対立遺伝子の存在を示す、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 1 5】**

所定のセット中のオリゴヌクレオチドプローブが、ライゲーション接合部の完全な相補性により対応する標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接してハイブリダイズされる場合は、ライゲーション接合部での相互ライゲーションに適しているが、試料中に存在する任意の他のヌクレオチド配列とハイブリダイズされる場合には、第一のオリゴヌクレオチドプローブが、ライゲーション接合部の塩基にこのようなライゲーションを妨害するミスマッチを有する、請求項 1 4 記載の方法。

**【請求項 1 6】**

単独の標的ヌクレオチド配列中の、2個以上の隣接するヌクレオチド部位もしくは重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とするヌクレオチド部位での複数の対立遺伝子差異、又は複数の標的ヌクレオチド配列中の、2個以上の隣接するヌクレオチド部位もしくは重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とするヌクレオチド部位での複数の対立遺伝子差異が、重複する標的特異的部分を伴うオリゴヌクレオチドプローブを有するオリゴヌクレオチドプローブ群で識別される、請求項 1 4 記載の方法。

**【請求項 1 7】**

セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、ライゲーション接合部の完全な相補性により対応する標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接してハイブリダイズされる場合は、ライゲーション接合部での相互ライゲーションに適しているが、セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、試料中に存在する任意の他のヌクレオチド配列とハイブリダイズされる場合には、ライゲーション接合部の塩基にこのようなライゲーションを妨害するミスマッチが存在する、請求項 1 6 記載の方法。

**【請求項 1 8】**

単独の標的ヌクレオチド配列中の重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とする一つもしくは複数のヌクレオチド部位での挿入、欠失、マイクロサテライト反復、転座、もしくは他のDNA再編成からなる複数の対立遺伝子差異、又は複数の標的ヌクレオチド配列中の重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とする一つもしくは複数のヌクレオチド部位での挿入、欠失、マイクロサテライト反復、転座、もしくは他のDNA再編成からなる複数の対立遺伝子差異が識別され、オリゴヌクレオチドプローブセットが、多数のオリゴヌクレオチドプローブ群を形成し、各群が、重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要としている一つ又は複数のヌクレオチド部位での挿入、欠失、マイクロサテライト反復、転座、及び他のDNA再編成からなる群より選択される複数の対立遺伝子差異を識別するように設計された一つ又は複数のオリゴヌクレオチドプローブセットを含み、各群のオリゴヌクレオチドプローブセットにおいて、第二のオリゴヌクレオチドプローブが、共通の標的特異的部分を有し、かつ第一のオリゴヌクレオチドプローブが塩基特異的方法で所定の対立遺伝子とハイブリダイズする異なる標的特異的部分を有し、上記検出において、固体支持体上の異なる位置で捕獲された、各群のライゲーション産物配列の標識が検出され、これにより、試料中の、一つ又は複数の標的ヌクレオチド配列における挿入、欠失、マイクロサテライト反復、転座、及び他のDNA再編成からなる群より選択

10

20

30

40

50

される一つ又は複数の対立遺伝子差異の存在を示す、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 19】**

オリゴヌクレオチドプローブセットが、重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とする一つ又は複数のヌクレオチド部位での挿入、欠失、及びマイクロサテライト反復からなる群より選択される複数の対立遺伝子差異を識別するために設計され、各群のオリゴヌクレオチドプローブセットにおいて、第二のオリゴヌクレオチドプローブが共通の標的特異的部分を有し、かつ第一のオリゴヌクレオチドプローブが、塩基特異的方法で所定の対立遺伝子にハイブリダイズするように、異なる長さの反復配列を含む異なる標的特異的部分を有する、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 20】**

過剰量の正常配列の存在下での、単独の標的ヌクレオチド配列における、複数の隣接するヌクレオチド部位での、もしくは重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とするヌクレオチド部位での、少量の複数の対立遺伝子差異、又は過剰量の正常配列の存在下での、複数の標的ヌクレオチド配列における、重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とする複数のヌクレオチド部位での、少量の複数の対立遺伝子差異が識別され、オリゴヌクレオチドプローブセットは多数のオリゴヌクレオチドプローブ群を形成し、各群は、単独のヌクレオチド部位での複数の対立遺伝子差異を識別するために設計された一つ又は複数のオリゴヌクレオチドプローブセットを含み、群内の一又は複数のセットは、共通の第二のオリゴヌクレオチドプローブを共有し、及び第一のオリゴヌクレオチドプローブは、塩基特異的方法で正常な対立遺伝子を除く所定の対立遺伝子にハイブリダイズする異なる標的特異的部分を有し、上記検出において、異なる位置で固体支持体上に捕獲された各群のライゲーション産物配列の標識が検出され、これにより試料中の、一つ又は複数の標的ヌクレオチド配列の一つ又は複数のヌクレオチド部位での一つ又は複数の少量の対立遺伝子の存在を示す、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 21】**

セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、ライゲーション接合部での完全な相補性により、対応する標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接するようにハイブリダイズされる場合は、ライゲーション接合部での相互ライゲーションに適しているが、セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、試料中の任意の他のヌクレオチド配列にハイブリダイズされる場合には、第一のオリゴヌクレオチドプローブは、ライゲーション接合部の塩基にこのようなライゲーションを妨害するミスマッチを有する、請求項 20 記載の方法。

**【請求項 22】**

過剰量の正常配列の存在下での、単独の標的ヌクレオチド配列における、複数の隣接するヌクレオチド部位での、もしくは重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とするヌクレオチド部位での少量の複数の対立遺伝子差異、又は過剰量の正常配列の存在下での、複数の標的ヌクレオチド配列における、重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とする複数のヌクレオチド部位での少量の複数の対立遺伝子差異が、試料中で定量される方法であり、以下の段階を更に含む、請求項 21 記載の方法：

既知量の一つ又は複数のマーカー標的ヌクレオチド配列を提供する段階；

各セットが、(a)マーカー標的ヌクレオチド配列に相補的な標的特異的部分及び位置特定可能なアレイ特異的部分を有する第一のオリゴヌクレオチドプローブ、並びに(b)マーカー標的ヌクレオチド配列に相補的な標的特異的部分及び検出可能なレポーター標識を有する第二のオリゴヌクレオチドプローブにより特徴付けられ、特定のマーカー特異的オリゴヌクレオチドセット中のオリゴヌクレオチドプローブは、対応するマーカー標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接してハイブリダイズされる場合は相互ライゲーションに適しているが、試料中に存在する任意の他のヌクレオチド配列又は追加されたマーカー配列にハイブリダイズされる場合にはこのようなライゲーションを妨害するミスマッチを有する、多数のマーカー特異的オリゴヌクレオチドプローブセットを提供する段階；

各群が、マーカーヌクレオチド配列を含む、単独のヌクレオチド部位での複数の対立遺伝子差異を識別するために設計された一つ又は複数のオリゴヌクレオチドプローブセット

10

20

30

40

50

又はマーカー特異的オリゴヌクレオチドプローブセットを含み、ここで群内の一つ又は複数のセットが、共通の第二のオリゴヌクレオチドプローブを共有し、かつ第一のオリゴヌクレオチドプローブは、塩基特異的方法で、正常な対立遺伝子を除く所定の対立遺伝子又はマーカーヌクレオチド配列とハイブリダイズする異なる標的特異的プローブ部分を有し、上記混合は、試料、マーカー標的ヌクレオチド配列、多数のオリゴヌクレオチドプローブセット、多数のマーカー特異的オリゴヌクレオチドプローブセット、及びリガーゼを混合物を形成するために混合することを含む、多数のオリゴヌクレオチドプローブ群を提供する段階；

固体支持体上に特定部位で捕獲された、ライゲーションされたマーカー特異的オリゴヌクレオチドセットのレポーター標識を検出し、これにより試料中の一つ又は複数のマーカー標的ヌクレオチド配列の存在を示す段階；並びに 10

既知量のマーカー標的ヌクレオチド配列により作製された捕獲されたライゲーション産物の量を、少量の未知の試料から作製された他の捕獲されたライゲーション産物の量と比較することにより、試料中の標的ヌクレオチド配列の量を定量する段階。

#### 【請求項 2 3】

セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、ライゲーション接合部の完全な相補性により、選択された条件下で、対応する標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接するようにハイブリダイズされる場合は、ライゲーション接合部での相互ライゲーションに適しているが、セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、試料中に存在する任意の他のヌクレオチド配列とハイブリダイズされる場合には、第一のオリゴヌクレオチドプローブがライゲーション接合部の塩基にこのようなライゲーションを妨害するミスマッチを有する、請求項 2 2 記載の方法。 20

#### 【請求項 2 4】

単独の標的ヌクレオチド配列中の一つもしくは複数のヌクレオチド部位での複数の対立遺伝子差異、又は複数の標的ヌクレオチド配列中の一つもしくは複数の位置での複数の対立遺伝子差異が識別され、オリゴヌクレオチドセットが多数のオリゴヌクレオチドプローブ群を形成し、各群が、単独のヌクレオチド部位での複数の対立遺伝子差異を識別するために設計された一つ又は複数のオリゴヌクレオチドプローブセットを含み、各群のオリゴヌクレオチドプローブ中で、第一のオリゴヌクレオチドプローブは、共通の標的特異的部分を有し、かつ第二のオリゴヌクレオチドプローブは、所定の対立遺伝子に塩基特異的方法でハイブリダイズする異なる標的特異的部分を有し、上記検出において、特定部位で固体支持体上に捕獲された各群のライゲーション産物配列の異なるレポーター標識が検出され、これにより試料中の、一つ又は複数の標的ヌクレオチド配列中の一つ又は複数のヌクレオチド部位の一つ又は複数の対立遺伝子の存在を示す、請求項 1 記載の方法。 30

#### 【請求項 2 5】

セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、ライゲーション接合部の完全な相補性により対応する標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接してハイブリダイズされる場合は、ライゲーション接合部での相互ライゲーションに適しているが、セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、試料中に存在する任意の他のヌクレオチド配列にハイブリダイズされる場合には、第二のオリゴヌクレオチドプローブは、ライゲーション接合部の塩基にこのようなライゲーションを妨害するミスマッチを有する、請求項 2 4 記載の方法。 40

#### 【請求項 2 6】

単独の標的ヌクレオチド配列中の、2個以上の隣接するヌクレオチド部位での、もしくは重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とするヌクレオチド部位での複数の対立遺伝子差異、又は複数の標的ヌクレオチド配列中の、2個以上の隣接するヌクレオチド部位での、もしくは重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とするヌクレオチド部位での複数の対立遺伝子差異が識別され、オリゴヌクレオチドプローブ群が、重複している標的特異的部分を伴うオリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項 2 4 記載の方法。

#### 【請求項 2 7】

10

20

30

40

50

セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、ライゲーション接合部の完全な相補性により、対応する標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接するようにハイブリダイズされる場合は、ライゲーション接合部位での相互ライゲーションに適しているが、セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、試料中に存在する任意の他のヌクレオチド配列にハイブリダイズされる場合には、第二のオリゴヌクレオチドプローブは、ライゲーション接合部の塩基にこのようなライゲーションを妨害するミスマッチを有する、請求項 2 6 記載の方法。

**【請求項 2 8】**

単独の標的ヌクレオチド配列における一つもしくは複数のヌクレオチド部位での複数の対立遺伝子差異、又は複数の標的ヌクレオチド配列における一つもしくは複数の位置での複数の対立遺伝子差異を識別し、オリゴヌクレオチドセットが多数のプローブ群を形成し、各群が、単独のヌクレオチド部位での複数の対立遺伝子差異を識別するために設計された一つ又は複数のオリゴヌクレオチドプローブセットを含み、異なる群のオリゴヌクレオチドプローブにおいて、第二のオリゴヌクレオチドプローブが共通の標的特異的部分を有するか、もしくは第一のオリゴヌクレオチドプローブが、共通の標的特異的部分を有し、上記検出において、固体支持体上に特定の位置で捕獲された各群の多数の標識されたライゲーション産物配列のひとつが検出され、これにより、試料中の一つ又は複数の標的ヌクレオチド配列中の一つ又は複数のヌクレオチド部位での一つ又は複数の対立遺伝子の存在を示す、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 2 9】**

所定のセット中のオリゴヌクレオチドプローブが、ライゲーション接合部の完全な相補性により対応する標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接してハイブリダイズされる場合は、ライゲーション接合部での相互ライゲーションに適しているが、セット中のオリゴヌクレオチドが、試料中に存在する任意の他のヌクレオチド配列にハイブリダイズされる場合には、第一又は第二のオリゴヌクレオチドプローブは、ライゲーション接合部の塩基にこのようなライゲーションを妨害するミスマッチを有する、請求項 2 8 記載の方法。

**【請求項 3 0】**

ひとつの標的ヌクレオチド配列中の、2個以上の隣接するヌクレオチド部位もしくは重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とするヌクレオチド部位での、複数の対立遺伝子差異、又は、複数の標的ヌクレオチド配列中の、2個以上の隣接するヌクレオチド部位もしくは重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とするヌクレオチド部位での、複数の対立遺伝子差異を識別し、オリゴヌクレオチドプローブ群が重複する標的特異的部分を伴うプローブを含む、請求項 2 8 記載の方法。

**【請求項 3 1】**

セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、ライゲーション接合部の完全な相補性により対応する標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接してハイブリダイズされる場合は、ライゲーション接合部での相互ライゲーションに適しているが、セット中のオリゴヌクレオチドが、試料中に存在する任意の他のヌクレオチド配列にハイブリダイズされる場合には、第一又は第二のオリゴヌクレオチドプローブは、ライゲーション接合部の塩基にこのようなライゲーションを妨害するミスマッチを有する、請求項 3 0 記載の方法。

**【請求項 3 2】**

単独の標的ヌクレオチド配列中の単独のコドンについての全ての可能な单塩基突然変異、単独の標的ヌクレオチド配列中の複数のコドンについての全ての可能な单塩基突然変異、及び複数の標的ヌクレオチド配列中の複数のコドンについての全ての可能な单塩基突然変異が識別され、オリゴヌクレオチドセットが多数のオリゴヌクレオチドプローブ群を形成し、各群が、単独のコドンについての全ての可能な单塩基突然変異を識別するように設計された一つ又は複数のオリゴヌクレオチドプローブセットを含み、各群のオリゴヌクレオチドプローブにおいて、第二のオリゴヌクレオチドプローブは、それらのライゲーション接合部でそれらの5'側塩基のみが異なり、かつ異なるレポーター標識を含み、第一のオリゴヌクレオチドプローブは、それらのライゲーション接合部でそれらの3'側塩基のみが異なり、かつ異なる位置特定可能なアレイ特異的部分を含むか、又は第一のオリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチドプローブは、ライゲーション接合部の塩基に隣接するそれらの3'側塩基のみが異なり、かつ異なる位置特定可能なアレイ特異的部分を含む、請求項29記載の方法。

**【請求項33】**

セット中のオリゴヌクレオチドプローブが、ライゲーション接合部の完全な相補性により対応する標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接してハイブリダイズされる場合に、ライゲーション接合部での相互ライゲーションに適しているが、セット中のオリゴヌクレオチドが、試料中に存在する任意の他のヌクレオチド配列にハイブリダイズされる場合には、第一のオリゴヌクレオチドプローブは、ライゲーション接合部の3'側塩基もしくはライゲーション接合部のこの塩基に隣接する3'側塩基にミスマッチを有するか、又は第二のオリゴヌクレオチドプローブは、ライゲーション接合部の5'側塩基にこのようなライゲーションを妨害するミスマッチを有する、請求項29記載の方法。

10

**【請求項34】**

単独の標的ヌクレオチド配列中の単独のコドンについての全ての可能な单塩基突然変異、又は複数の標的ヌクレオチド配列中の2個以上の隣接するコドンもしくは重複するオリゴヌクレオチドプローブセットを必要とするヌクレオチド部位での全ての可能な单塩基突然変異が識別され、オリゴヌクレオチドプローブ群が、重複している標的特異的部分を伴うオリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項33記載の方法。

**【請求項35】**

変性処理が約80～105で行われる、請求項1記載の方法。

**【請求項36】**

20

変性処理及びハイブリダイゼーション処理を含む各サイクルが、約30秒～約5分間の長さである、請求項1記載の方法。

**【請求項37】**

前記供する段階が2サイクルから50サイクル繰り返される、請求項1記載の方法。

**【請求項38】**

前記供する段階の総時間が1分から250分間である、請求項1記載の方法。

**【請求項39】**

リガーゼが、サーマスアクアティカヌクリガーゼ、サーマスサーモフィラスリガーゼ、大腸菌リガーゼ、T4リガーゼ、サーマス種AK16リガーゼ、アキフェクスエオリクスリガーゼ、サーモトガマリチマリガーゼ、及びピロコッカヌクリガーゼからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

30

**【請求項40】**

検出可能なレポーター標識が、発色団、蛍光部分、酵素、抗原、重金属、磁気プローブ、色素、りん光基、放射性物質、化学発光部分、及び電気化学的検出部分からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

**【請求項41】**

オリゴヌクレオチドプローブの標的特異的部分が各々、40～85のハイブリダイゼーション温度を有する、請求項1記載の方法。

**【請求項42】**

オリゴヌクレオチドプローブの標的特異的部分が、20ヌクレオチド長から28ヌクレオチド長を有する、請求項1記載の方法。

40

**【請求項43】**

混合物が担体DNAを更に含む、請求項1記載の方法。

**【請求項44】**

前記供する段階が、特定のオリゴヌクレオチドプローブセットについて、特定のオリゴヌクレオチドプローブセットのオリゴヌクレオチドプローブがライゲーションする部位でミスマッチを生じたライゲーション産物配列の形成速度が、特定のオリゴヌクレオチドプローブセットのマッチしたライゲーション産物配列の形成速度の0.005未満であるような形成速度を達成する、請求項1記載の方法。

**【請求項45】**

50

以下の段階を更に含む、請求項 1 記載の方法：

混合前に、試料中の標的ヌクレオチド配列を増幅する段階。

【請求項 4 6】

前記増幅が、ポリメラーゼに基づく増幅法に試料を供することにより実施される、請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 7】

前記ポリメラーゼに基づく増幅法が、DNAポリメラーゼにより実施される、請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 8】

固体支持体が、プラスチック、セラミック、金属、樹脂、ゲル、ガラス、シリコン、及びそれらの複合材からなる群より選択される材料から製造される、請求項 1 記載の方法。 10

【請求項 4 9】

前記検出が、以下の段階を含む、請求項 1 記載の方法：

特定部位で固体支持体をスキャンする段階；及び

オリゴヌクレオチドプローブセットのライゲーションが生じたかどうかを確定し、かつ同定されたライゲーションを、標的ヌクレオチド配列の有無と関連付ける段階。

【請求項 5 0】

多数の捕獲用オリゴヌクレオチドが各々、異なるヌクレオチド配列を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5 1】 20

各捕獲用オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドを内部挿入又は欠失を伴わずに1端で互いに並置したときに、ヌクレオチド総数の4個毎に少なくとも1個につき、アレイ上のその隣接する捕獲用オリゴヌクレオチドと異なる、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 2】

各捕獲用オリゴヌクレオチドが、隣接する捕獲用オリゴヌクレオチドから、ライゲーションされたオリゴヌクレオチドプローブセットが前記接触中にそれにハイブリダイズしないような障壁オリゴヌクレオチドにより隔てられた、隣接する捕獲用オリゴヌクレオチドを有する、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 3】

オリゴヌクレオチドプローブセットが、捕獲用オリゴヌクレオチドがオリゴヌクレオチドプローブセットの位置特定可能なアレイ特異的部分にハイブリダイズする温度より低い温度で標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズする、請求項 1 記載の方法。 30

【請求項 5 4】

以下の段階を更に含む、請求項 1 記載の方法：

混合物を一連のリガーゼ検出反応サイクルに供した後、混合物を化学的又は酵素的に処理し、ライゲーションしていないオリゴヌクレオチドプローブを破壊する段階。

【請求項 5 5】

前記処理がエキソヌクレアーゼにより実施される、請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 6】

以下の段階を更に含む、請求項 1 記載の方法：

捕獲用オリゴヌクレオチドに結合したオリゴヌクレオチドを除去し、固定された捕獲用オリゴヌクレオチドを伴う固体支持体の再使用を可能にする段階。 40

【請求項 5 7】

固体支持体が、異なる位置で固定化された異なる捕獲用オリゴヌクレオチドを含み、該異なる捕獲用オリゴヌクレオチドは異なる位置特定可能なアレイ特異的部分に相補的であり、これにより異なるオリゴヌクレオチドプローブセットが、固体支持体上の異なる部位で捕獲されかつ検出される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5 8】

固体支持体が、固体支持体上に固定された同一の捕獲用オリゴヌクレオチドを含み、該捕獲用オリゴヌクレオチドは全ての位置特定可能なアレイ特異的部分に相補的であり、ま 50

たオリゴヌクレオチドプローブセットに結合した標識は異なっており、これにより異なるオリゴヌクレオチドプローブセットが異なる標識により検出されかつ識別される、請求項1記載の方法。

【請求項 5 9】

二価のカチオンが、 $Mg^{+2}$ 、 $Ca^{+2}$ 、 $Mn^{+2}$ 及び $CO^{+2}$ からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 6 0】

二価のカチオンが $Mg^{+2}$ である、請求項5 9記載の方法。

【請求項 6 1】

中和剤が、エタノールアミン、ジエタノールアミン、プロパノールアミン、ジプロパノールアミン、イソプロパノールアミン、及びジイソプロパノールアミンからなる群より選択される、請求項1記載の方法。 10

【請求項 6 2】

中和剤がエタノールアミンである、請求項6 1記載の方法。

【請求項 6 3】

前記接触が、固体支持体の存在下での混合物の混合により実施される、請求項1記載の方法。

【請求項 6 4】

位置特定可能なアレイ特異的部分が、前記接触中に、温度60から70で、捕獲用オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる、請求項1記載の方法。 20

【請求項 6 5】

前記検出が、ライゲーションされないオリゴヌクレオチドプローブに対する比が1:300未満で、ライゲーション産物の存在を示す、請求項1記載の方法。

【請求項 6 6】

前記検出が、ライゲーションされないオリゴヌクレオチドプローブに対する比が1:900未満で、ライゲーション産物の存在を示す、請求項6 5記載の方法。

【請求項 6 7】

前記検出が、ライゲーションされないオリゴヌクレオチドプローブに対する比が1:3000未満で、ライゲーション産物の存在を示す、請求項6 6記載の方法。

【請求項 6 8】

前記検出が、ライゲーションされないオリゴヌクレオチドプローブに対する比が1:9000未満で、ライゲーション産物の存在を示す、請求項6 7記載の方法。 30

【請求項 6 9】

前記検出が、標的ヌクレオチド配列の非標的ヌクレオチド配列に対する比が1:20未満で、非標的ヌクレオチド配列と1塩基差異で異なる標的ヌクレオチド配列が存在することを示す、請求項1記載の方法。

【請求項 7 0】

前記検出が、標的ヌクレオチド配列の非標的ヌクレオチド配列に対する比が1:50未満で、非標的ヌクレオチド配列と1塩基差異で異なる標的ヌクレオチド配列が存在することを示す、請求項6 9記載の方法。 40

【請求項 7 1】

前記検出が、標的ヌクレオチド配列の非標的ヌクレオチド配列に対する比が1:100未満で、非標的ヌクレオチド配列と1塩基差異で異なる標的ヌクレオチド配列が存在することを示す、請求項7 0記載の方法。

【請求項 7 2】

前記検出が、標的ヌクレオチド配列の非標的ヌクレオチド配列に対する比が1:200未満で、非標的ヌクレオチド配列と1塩基差異で異なる標的ヌクレオチド配列が存在することを示す、請求項7 1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

本出願は、1999年3月19日付けで申請した米国の仮特許出願第60/125,357号における恩典を主張する。

【0002】

本発明は、国立衛生研究所(NIH)の助成金(GM-41337-06、GM-43552-05、GM-42722-07およびGM-51628-02)ならびにNISTの助成金(1995-08-0006F)を受け、政府資金により開発した。米国政府は権利の一部を有するものとする。

【0003】

発明の分野

本発明は、ライゲーション期(phase)、捕獲期、および検出期を利用した核酸配列差の検出に関する。ライゲーション期では、標的配列に特異的な部分および位置特定可能な部分を有するオリゴヌクレオチドプローブと、標的配列に特異的な部分および検出可能な標識を有する別のオリゴヌクレオチドプローブとの間のライゲーション検出反応を利用する。捕獲期では、ライゲーションしたオリゴヌクレオチドプローブと、位置特定可能なアレイに特異的な部分に対して少なくとも一部が相補的な捕獲用オリゴヌクレオチドを整然と並べて固定化した固相支持体との間でハイブリッドを形成させる。検出期では、固相支持体とハイブリッドを形成したライゲーションオリゴヌクレオチドプローブの標識を検出する。

【0004】

発明の背景

多型度の高い遺伝子座の大規模多重分析は、実父確定検査および法科学(Reynoldsら, Anal. Chem., 63:2~15(1991))、臓器移植におけるドナーとレシピエントの組み合わせ(Buyseら, Tissue Antigens, 41:1~14(1993))ならびにGyllenstenら, PCR Meth. Appl. 1:91~98(1991)、遺伝病の診断、予後ならびに出生前カウンセリング(Chamberlainら, Nucleic Acids Res., 16:11141~11156(1988))ならびにL.C.Tsui, Human Mutat., 1:197~203(1992))、および発癌性変異の研究(Hollsteinら, Science, 253:49~53(1991))などにおける個人の同定に役立てるために必要とされている。また、核酸分析による感染症診断の費用効果は、パネルテストの多重度により大きく変動する。上述の適用の多くでは、空間的に近接する場合もある様々な遺伝子座における一塩基の差の識別を基礎としている。

【0005】

多数の配列からなる領域を含む試料中の一つまたは複数のポリヌクレオチド配列の存在を検出するには、様々なDNAハイブリダイゼーション法を利用することができる。断片の捕獲および標識に基づく簡単な方法では、特定の配列を含む断片を、固定化したプローブに対するハイブリダイゼーションで捕獲する。捕獲断片は、検出可能なレポーター部分を含む別のプローブとのハイブリダイゼーションで標識される。

【0006】

広く用いられている他の方法にはサザンプロット法がある。本方法では、試料中のDNA断片の混合物をゲル電気泳動で分画した後にニトロセルロースフィルターに固定する。ハイブリダイゼーション条件下でフィルターを一つまたは複数の標識プローブと反応させることで、プローブ配列を含むバンドの存在を同定することができる。本方法は、制限酵素によるDNA切断物中の断片(任意のプローブ配列を含む)の同定、および制限断片長多型(「RFLP」)の分析に特に有用である。

【0007】

ポリヌクレオチド試料に含まれる任意の配列または配列群の存在を検出する別の方法には、ポリメラーゼ連鎖反応(ムリス(Mullis)らによる米国特許第4,683,202号、およびサイキ(R.K.Saiki)らによる論文(Science 230:1350(1985)))による配列(または配列群)の選択的な増幅がある。本方法では、特定配列(または配列群)の反対側の端に相補的なプライマーを用いて、プライマーから開始される連続的な複製を加熱サイクルで進める。増幅後の配列は、種々の方法で容易に同定することができる。本方法は例えば、

体液試料中の病原体配列の検出といった、ポリヌクレオチド試料に含まれる低コピー配列を検出すする際に特に有用である。

#### 【 0 0 0 8 】

さらに最近では、プローブライゲーション法で既知の標的配列を同定する方法が、ホワイトリー (N.M.Whiteley) らによる米国特許第4,883,750号、ワー (D.Y.Wu) らによる論文 (Genomics 4:560 (1989) ) 、ランデグレン (U.Landegren) らによる論文 (Science 241:1077 (1988) ) 、およびワインディーン (E.Winn-Deen) らによる論文 (Clin. Chem. 37:1522 (1991) ) に記載されている。オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ (OLA) として知られている方法では、対象標的領域にまたがる2本のプローブまたはプローブエレメントと標的領域との間でハイブリッドを形成させる。プローブエレメントが、隣接する標的塩基と、プローブエレメントの直面する端で対合する（塩基対を形成する）と、2本のエレメントを例えればリガーゼで処理してライゲーションさせることができる。ライゲーションしたプローブエレメントを対象として次にアッセイを行い、標的配列の存在を明らかにする。10

#### 【 0 0 0 9 】

本アプローチの変法では、ライゲーションプローブエレメントを、相補的なプローブエレメント対の鑄型としてはたらかせる。変性、ハイブリダイゼーションおよびライゲーションのサイクルを2通りの相補的なプローブエレメント対の存在下で続けることで、標的配列は幾何級数的（すなわち指數関数的）に増幅されて、微量の標的配列が検出および/または増幅される。本方法はリガーゼ連鎖反応（「LCR」）と呼ばれる (F.Barany 「Genetic Disease Detection and DNA Amplification Using Cloned Thermostable Ligase」 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 88:189 ~ 93 (1991) および、F.Barany, 「The Ligase Chain Reaction (LCR) in a PCR World」 (PCR Methods and Applications, 1:5 ~ 16 (1991) )20

。

#### 【 0 0 1 0 】

検出可能な標識をもち、[電荷] / [並進運動に伴う摩擦抵抗] 比が顕著な配列特異的プローブと標的をハイブリダイズさせて相互にライゲーション可能であるグロスマン (Grossman) らによる米国特許第5,470,705号において、核酸配列差の多重検出に関する他の方式が開示されている。本方法はグロスマンらによる論文（「High-density Multiplex Detection of Nucleic Acid Sequences: Oligonucleotide Ligation Assay and Sequence-coded Separation」Nucl.Acids Res. 22 (21) :4527 ~ 34 (1994) ）において、囊胞性線維症の膜貫通調節遺伝子を対象とした大規模多重分析に使用されている。30

#### 【 0 0 1 1 】

ジョー (Jou) らによる論文（「Deletion Detection in Dystrophin Gene by Multiple x Gap Ligase Chain Reaction and Immunochromatographic Strip Technology」 Human Mutation 5:86 ~ 93 (1995) ）では、複数のエキソンの特定領域を増幅して、各エキソンに対するプローブ上の様々なハプテンの差に特異的な抗体を有する免疫クロマトグラフィー・ストリップ上で増幅産物を読み取る、いわゆる「ギャップリガーゼ連鎖反応」のプロセスの利用について記載されている。40

#### 【 0 0 1 2 】

例えば遺伝子スクリーニングの分野において、標的ポリヌクレオチドに含まれる多くの配列のそれぞれの有無の検出に有用な方法はますます必要とされている。例えば囊胞性線維症には400種もの多様な変異が関与している。この疾患の遺伝的素因に対するスクリーニングでは、被験者のゲノムDNA中に含まれる遺伝子配列上の多様な変異を調べることで「囊胞性線維症」陽性者を同定することが最適である。生じうるあらゆる変異部位の有無を1回のアッセイで調べることが理想的であろう。しかしながら、上述の先行技術の方法を簡便かつ自動化された1回のアッセイで特定配列群の検出に応用することは困難である。

#### 【 0 0 1 3 】

固相ハイブリダイゼーションアッセイでは、複数の液体処理段階が必要であり、一部の50

インキュベーション温度および洗浄温度を注意深く制御して、一ヌクレオチドのミスマッチを識別するために必要な厳密さを保たなければならない。本方法の多重化は、最適なハイブリダイゼーション条件がプローブ配列により大きく変わることから困難である。

#### 【0014】

対立遺伝子に特異的なPCR産物は一般にサイズが同じであり、任意の増幅用チューブは、各反応チューブと関連するゲル・レーンにおける産物バンドの有無により評価される (Gibbsら, Nucleic Acids Res., 17:2437 ~ 2448 (1989))。このような方法は、多様なプライマーの組み合わせを用いた複数の反応チューブ中の試験試料の分離を必要とすることから、アッセイに要する費用は増大する。PCRでもまた、競合する対立遺伝子用プライマーに様々な蛍光色素を結合させることで、1本の反応チューブで対立遺伝子を識別することができる (F.F.Chehabら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 86:9178 ~ 9182 (1989)) が、このような方式による多重分析は、既存の装置および色素化学の知見を利用して経済的な方法でスペクトルに分解可能な色素種がそれほど多くないことから規模の拡大は限られる。大きな側鎖をもつように修飾した塩基の取り込みを、電気泳動の移動度を元に対立遺伝子のPCR産物を識別する際に利用することができるものの、本方法は、修飾塩基がポリメラーゼにより良好に取り込まれることと、これらの基の一つのサイズが異なる比較的大きなPCR産物を分解する電気泳動の能力による制限を受ける (Livakら, Nucleic Acids Res., 20:4831 ~ 4837 (1989))。各PCR産物は一つの変異のみを探索するために用いられ、多重化は困難である。

#### 【0015】

対立遺伝子特異的プローブのライゲーションでは、固相捕獲法 (U.Landegrenら, Science, 241:1077 ~ 1080 (1988) ; Nickersonら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 87:8923 ~ 8927 (1990)) またはサイズに依存した分離法 (D.Y.Wuら, Genomics, 4:560 ~ 569 (1989) および、F.Barany, Proc.Natl.Acad.Sci., 88:189 ~ 193 (1991)) を利用して対立遺伝子のシグナルを分解することが一般的である。しかし後者の方法は、ライゲーション用プローブのサイズ幅が狭いことから多重化において制限を受ける。ギャップリガーゼ連鎖反応では、追加的なステップ、すなわちポリメラーゼによる伸長が必要である。より複雑な多重化に対して電荷/並進運動に伴う摩擦抵抗の比が顕著なプローブを使用する場合は、電気泳動時間を長くする必要があるほか、別の検出法の利用が求められる。

#### 【0016】

したがって、ポリヌクレオチド試料に含まれる複数の特定配列の有無を検出するための迅速な単回アッセイが必要であることは変わらない。

#### 【0017】

##### 核酸分析のためのオリゴヌクレオチドアレイの利用

固相支持体に固定化したオリゴヌクレオチドが整然と並んだアレイは、DNAの配列決定、分類 (sorting) 、単離および操作における利用が提案されている。任意の長さのあらゆるオリゴヌクレオチドプローブに対する、クローン化された1本鎖DNA分子のハイブリダイゼーションでは、分子内に存在する対応する相補的DNAセグメントを理論的に同定可能であることが認められている。このようなアレイでは、個々のオリゴヌクレオチドプローブは、固相支持体上のあらかじめ決めた様々な位置に固定化される。DNA分子中のあらゆるオリゴヌクレオチドセグメントは、このようなアレイを利用して調べることができる。

#### 【0018】

オリゴヌクレオチドアレイを用いてDNA分子の配列を決定する手順の一例が、ドルマナク (Drmanac) らによる米国特許第5,202,231号に開示されている。この特許は、複数のオリゴヌクレオチドを結合させた固相支持体に対する標的DNAの利用に関する。配列は、標的DNAセグメントとオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションおよびハイブリッドを形成したオリゴヌクレオチドの重複セグメントの集合により読み取られる。アレイには11 ~ 22程度のヌクレオチドの長さのあらゆるオリゴヌクレオチドを利用することができるが、この種のアレイの構築法に関する情報は極めて少ない。本件に関しては、チェトベリン (A.B.Chetverin) らによる論文 ('Sequencing of Pools of Nucleic Acids on Oligonu

10

20

30

40

50

cleotide Arrays」 BioSystems, 30:215 ~ 31 (1993) )、クラプコ (Khrapko) らによる国際公開公報第92/16655号、クズネツオバ (Kuznetsova) らによる論文 (「DNA Sequencing by Hybridization with Oligonucleotides Immobilized in Gel. Chemical Ligation as a Method of Expanding the Prospects for the Method」 Mol.Biol. 28 (20) ; 290 ~ 99 (1994) )、リビッツ (M.A.Livits) らによる論文 (「Dissociation of Duplexes Formed by Hybridization of DNA with Gel-Immobilized Oligonucleotides」 J.Biomolec. Struct. & Dynam., 11 (4) :783 ~ 812 (1994) )も参照されたい。

#### 【 0 0 1 9 】

サザン (Southern) による国際公開公報第89/10977号では、既知の点変異、ゲノムフィンガープリント法、連鎖解析および配列決定に関する核酸試料の分析に利用するハイブリダイゼーション反応が可能なオリゴヌクレオチドアレイをもつ支持体の利用について開示されている。ヌクレオチド塩基を、特定のパターンで支持体上に配してマトリックスを作製することができる。国際公開公報第89/10977号では、ペンプロッターまたはマスキングにより集合させるオリゴヌクレオチドを有する支持体に水酸基リンカーを利用することができますが記載されている。10

#### 【 0 0 2 0 】

キャンター (Cantor) による国際公開公報第94/11530号もまた、ハイブリダイゼーションによる配列決定のプロセスを実施するためのオリゴヌクレオチドアレイの利用に関する。オリゴヌクレオチドは突出部分をもつ2本鎖であり、この突出部分に標的核酸が結合して2本鎖の非突出部分とライゲーションされる。このようなアレイは、ビオチン化されたオリゴヌクレオチドを捕獲するストレプトアビジン被覆濾紙を用いて構築され、集合後に結合させる。20

#### 【 0 0 2 1 】

チェトベリン (Chetverin) による国際公開公報第93/17126号では、核酸を分類して調べる目的で分化した2成分からなるオリゴヌクレオチドアレイを使用している。このアレイでは、不变ヌクレオチド配列が、可変ヌクレオチド配列に隣接して結合しており、いずれの配列も共有結合部を介して固相支持体に結合される。不变ヌクレオチド配列には、ハイブリッドを形成した鎖をPCRで增幅可能とするプライミング領域がある。次に、可変領域に対するハイブリダイゼーションによる分類を行う。2成分アレイ上における断片化核酸の、配列決定、単離、分類、および操作についても開示されている。感度を強化した一つの態様では、固定化されたオリゴヌクレオチドには、それとハイブリッドを形成して、カバーされていないオリゴヌクレオチドの部分を残す短い相補的領域がある。このアレイを次にハイブリダイゼーション条件下におくと、固定化されたオリゴヌクレオチドに相補的な核酸がアニールする。次にDNAリガーゼを用いて、短い相補的領域と、アレイ上有る相補的な核酸をライゲーションする。オリゴヌクレオチドアレイの調製法に関してはほとんど開示されていない。30

#### 【 0 0 2 2 】

フォドル (Fodor) らによる国際公開公報第92/10588号では、オリゴヌクレオチドアレイに対するハイブリダイゼーションによる核酸の配列決定、フィンガープリント法、およびマッピングのプロセスが開示されている。オリゴヌクレオチドアレイは、大規模かつ多様なオリゴヌクレオチドの合成が可能な極めて大規模に固定化された重合体合成により調製される。この手法では、基盤表面を機能状態とし、オリゴヌクレオチドを基盤上に集合させるためのリンカー基を導入する。オリゴヌクレオチドを結合させる領域には、選択的に活性化される保護基が(基盤または各ヌクレオチドサブユニット上に)ある。通常本方法では、曝露領域を脱保護するための多様な形状のマスクを用いて、光によるアレイの画像化が必要である。脱保護領域では保護されたヌクレオチドと化学反応が起きて、オリゴヌクレオチド配列が伸長することで画像化される。2成分マスキング法を用いることで、任意の時間内に2種またはそれ以上のアレイを構築することができる。検出は、ハイブリッドが形成された領域の位置を決めることでなされる。これについては、フォドルらによる米国特許第5,324,633号および第5,424,186号、ピルング (Pirring) らによる米国特許4050

第5,143,854号および5,405,783号、ピルングによる国際公開公報第90/15070号、ピース (A.C.Pease) らによる論文 (「Light-generated Oligonucleotide Arrays for Rapid DNA Sequence Analysis」 Proc.Natl.Acad.Sci USA 91:5022~26 (1994) ) も参照されたい。ビーティー (K.L.Beattie) らによる論文 (「Advances in Genosensor Research」 Clin.Chem., 41 (5):700~09 (1995) ) では、集合済みのオリゴヌクレオチドプローブを固相支持体に結合させる方法について説明されている。

## 【0023】

アレイに対するハイブリダイゼーションに基づく上述の配列決定法には欠点が多い。第一に、極めて多数のオリゴヌクレオチドを合成する必要がある。第二に、正しくハイブリダイズしたもの、相応に対合した2本鎖、および誤対合したもの、の識別が困難である。  
さらに、ある種のオリゴヌクレオチドは、標準的な条件下でハイブリッドを形成しにくく、オリゴヌクレオチドが同定能力を得るようになるためには、詳細なハイブリダイゼーション条件の検討が必要となる。

## 【0024】

本発明は、先行技術における欠点を克服することを目的としている。

## 【0025】

## 発明の概要

本発明は、多数の標的ヌクレオチド配列において一つ又は複数の单一塩基の変化、挿入、欠失、又は転座により異なる多数の配列の、一つ又は複数を同定する方法に関する。本方法は、ライゲーション期、捕獲期、および検出期を含む。

## 【0026】

ライゲーション期には、複数の配列差を有する一つ又は複数のヌクレオチド配列を含むと考えられる試料を提供することが必要である。ライゲーション期では複数のオリゴヌクレオチドセットを利用する。各セットには、標的特異的な部分および位置特定可能なアレイに特異的な部分を有する第1オリゴヌクレオチドプローブ、ならびに、標的特異的な部分および検出可能なレポーター標識を有する第2オリゴヌクレオチドプローブが含まれる。特定のセットの第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブは、対応する標的ヌクレオチド配列上で互いに隣接してハイブリッドを形成することで相互のライゲーションに適した状態となる。しかし、第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブは、試料中に存在する別のヌクレオチド配列とハイブリダイズすると、上述のライゲーションと干渉するミスマッチを生じる。またリガーゼも利用する。試料、複数のオリゴヌクレオチドプローブのセット、およびリガーゼをブレンドして混合物とする。この混合物を対象に、1回の変性処理および1回のハイブリダイゼーション処理を含む1回または複数回のリガーゼ検出反応サイクルを行う。変性処理では、ハイブリダイズしたあらゆるオリゴヌクレオチドが標的ヌクレオチド配列から分離される。またハイブリダイゼーション処理では、オリゴヌクレオチドプローブセットを、その各々の標的ヌクレオチド配列が試料中に存在する場合は隣接する位置において塩基特異的に当該標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズさせ、それらを相互にライゲーションして(a)位置特定可能なアレイ特異的部分、(b)相互に結合した標的特異的部分、および(c)検出可能なレポーター標識、を含むライゲーション産物配列を形成する。オリゴヌクレオチドプローブセットは、各標的ヌクレオチド配列以外の試料中のヌクレオチド配列とハイブリダイズすることもあるが、1か所または複数のミスマッチがあるために相互にライゲーションされることなく、変性処理中にそれぞれ分離する。

## 【0027】

次の処理過程は捕獲期である。捕獲期では、捕獲用オリゴヌクレオチドを特定部位に固定した固相支持体を利用する。捕獲用オリゴヌクレオチドは、位置特定可能なアレイ特異的部分と相補的である。ライゲーション期後の混合物を、位置特定可能なアレイ特異的部分と捕獲用オリゴヌクレオチドが塩基特異的にハイブリダイズするのに効果的な条件下で固相支持体に接触させる。この結果、位置特定可能なアレイ特異的部分は、相補的な捕獲用オリゴヌクレオチドを伴う部位で固相支持体上に捕獲される。

## 【0028】

捕獲期の後は検出期である。検出期では、ライゲーション産物配列のレポーター標識が、固相支持体上の特定部位で捕獲される。固相支持体に結合したレポーター標識の存在が検出されれば、試料中に一つまたは複数のヌクレオチド配列がそれぞれ存在することが明らかとなる。

## 【0029】

本発明はまた、リガーゼ、複数のオリゴヌクレオチドセットおよび捕獲用オリゴヌクレオチドを固定化した固相支持体を含む、本発明の方法を実施するためのキットに関する。

## 【0030】

本発明の別の局面は、固相支持体上でオリゴヌクレオチドアレイを形成させる方法に関する。本方法では、各々オリゴヌクレオチドの結合に適したアレイ位置を有する固相支持体が提供される。各アレイ位置においてオリゴヌクレオチドを固相支持体にカップリングさせるのに適したリンカーまたは表面（非加水分解性とすることができる）を固相支持体に結合させる。多量体ヌクレオチドを結合させる選択されたアレイ位置を活性化し、活性化されたアレイ位置に多量体ヌクレオチドを結合させる一連のサイクルを介して固相支持体上にオリゴヌクレオチドアレイを調製することができる。

10

## 【0031】

さらに本発明の別の局面は、固相支持体それ自体におけるオリゴヌクレオチドアレイに関する。固相支持体は、オリゴヌクレオチドの結合にそれぞれ適したアレイ位置を有する。オリゴヌクレオチドを固相支持体にカップリングさせるのに適したリンカーまたは支持体（非加水分解性とすることができる）を、個々のアレイ位置で固体支持体に結合させる。オリゴヌクレオチドアレイは、16個を上回るヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドで占められる少なくとも一部のアレイ位置を有する固相支持体上に配される。

20

## 【0032】

本発明のある局面は、表面が多孔性である固相支持体を提供することを含む。

## 【0033】

本発明の別の局面では、陰電荷を有効にマスクする条件下で前記混合物と固相支持体を接触させることを含む。

## 【0034】

本発明には、先行技術のシステムを超えるいくつかの利点、特に、複雑な遺伝子系の多重分析を行う能力を含む。この結果、試料中の多くのヌクレオチド配列差を一度に検出することができる。本発明は、例えば癌変異、遺伝性（生殖系列）変異、および感染症の検出に有用である。この技術はまた、環境モニタリング、法医学、および食品産業と関連して利用することができる。

30

## 【0035】

また本発明は、正常配列が大勢を占める中における変異の定量検出法を提供し、集中してクラスターを形成した変異の検出が可能であり、位置特定可能なアレイを用いた検出が可能であり、自動化に適している。PCRの感度とLDRの特異性を組み合わせることで、対立遺伝子に特異的なPCRの段階で遭遇する多くの問題-偽陽性シグナルの発生、多重化におけるプライマーどうしの干渉、定量データの入手限界、および自動化に対する適切さなどが克服されている。また、单一塩基変異を識別するLDRの特異性に依拠することで、オリゴヌクレオチドプローブアレイに主要な固有の問題（すなわち、ヘテロ接合体試料中のあらゆる位置における单一塩基変異の識別不能）が克服されている。PCR/LDRは、癌の検出に関する現在のニーズ-クローンマーカーとして役立ち得る変異の定量化および微小残存病変ならびに微小転移の検出-に応えている。

40

## 【0036】

様々な試料の分析を実施する際に、アレイを含む固相支持体を再利用することができる。このため、作製する必要がある固相支持体の量が減り、各試料の分析にかかる費用が軽減される。

## 【0037】

50

本発明はまた、オリゴヌクレオチドの合成および、固相支持体へのオリゴヌクレオチドの結合に際して自由度が大きい。オリゴヌクレオチドは、固相支持体とは別に合成した後に支持体上の固有の表面に結合させることができる。本方法は、完全長のオリゴヌクレオチドまたはペプチドヌクレオチド類似体(PNA)の固相支持体への結合に利用することができる。あるいは、固相支持体上のオリゴマーの長さを短くする目的で、より短いヌクレオチドまたは類似体のセグメント(二量体、三量体、四量体など)が、セグメントの濃縮やブロック合成法に利用することができる。

#### 【0038】

##### 発明及び図面の詳細な説明

本発明は、複数の標的ヌクレオチド配列中の一つもしくは複数の单一塩基の変化、挿入、欠失、もしくは転移によって異なる一つもしくは複数の配列の多重性を同定する方法に関する。方法は、ライゲーション期、捕獲期、および検出期を含む。

#### 【0039】

ライゲーション期には、複数の配列の差異を伴う潜在的に一つもしくは複数のヌクレオチド配列を含む試料の提供が必要である。複数のオリゴヌクレオチドセットをこの段階で用いる。各々のセットは、標的特異的部分および位置特定可能なアレイ特異的部分を有する第1のオリゴヌクレオチドプローブ、ならびに標的特異的部分および検出可能なレポーター標識を有する第2のオリゴヌクレオチドプローブを含む。特定のセットにおける第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブは、対応する標的ヌクレオチド配列上で相互に隣接してハイブリダイズする場合に、ともにライゲーションすることに関して好適である。  
しかしながら、第1および第2のオリゴヌクレオチドプローブは、試料中の別のヌクレオチド配列にハイブリダイズする際には、このようなライゲーションを阻害するミスマッチを有する。リガーゼも利用する。混合物の調製には、試料、複数のオリゴヌクレオチドプローブのセット、およびリガーゼを混合して混合物を調製する。この混合物を、変性処理およびハイブリダイゼーション処理を含む一つもしくは複数の、リガーゼによる検出反応サイクルにかける。変性処理は、標的ヌクレオチド配列由来のハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドのいずれをも分離させることを含む。ハイブリダイゼーション処理は、隣接した位置のオリゴヌクレオチドプローブのセットを塩基特異的な方法で、試料中にそれぞれの標的ヌクレオチド配列が存在する場合には、それにハイブリダイゼーションさせること、およびそれらを互いにライゲーションして、(a)位置特定可能なアレイ特異的部分(b)互いに結合した標的特異的部分、および(c)検出可能なレポーター標識を含むライゲーション産物の配列を生成させることを含む。該オリゴヌクレオチドプローブのセットは、それぞれの標的ヌクレオチド配列以外の試料中のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることもあるが、この場合一つ以上のミスマッチの存在によって互いにライゲーションせずに変性処理中に個々に分離する。

#### 【0040】

この方法の次の段階は捕獲期である。この段階は、特定部位に固定化した捕獲オリゴヌクレオチドを有する固体支持体を提供することを含む。捕獲オリゴヌクレオチドは、位置特定可能なアレイ特異的部分に相補的である。混合物は、ライゲーション期を経た後、位置特定可能なアレイ特異的部分にハイブリダイズさせることに関して有効な条件下で、塩基特異的な方法で捕獲オリゴヌクレオチド固体支持体に接触させる。その結果、位置特定可能なアレイ特異的部分は、相補的な捕獲オリゴヌクレオチドを有する部位において固体支持体上に捕獲される。

#### 【0041】

本発明の1つの局面は、多孔性表面を有する固体支持体を提供することを含む。

#### 【0042】

本発明の別の局面は、陰性電荷のマスクに有効な条件下で前記混合物を固体支持体と接触させることを含む。

#### 【0043】

捕獲期の次は検出期である。該方法のこの段階では、ライゲーション産物の配列のレボ

10

20

30

40

50

ーター標識を、固体支持体上の特定部位に捕獲する。固体支持体に結合したレポーター標識の存在が検出された場合には、試料中に一つ以上のヌクレオチド配列がそれぞれ存在することが示される。

#### 【0044】

しばしば、複数の異なる単一塩基の変異、挿入、もしくは欠失が、目的配列の同一ヌクレオチド位置で起こることがある。この方法は、第2のオリゴヌクレオチドプローブが共通でありかつ検出可能な標識を含み、かつ第1のオリゴヌクレオチドプローブが異なる位置特定可能なアレイ特異的部分および標的特異的部分を有するオリゴヌクレオチドセットを有する。第1のオリゴヌクレオチドプローブは、ミスマッチなしに被検配列にハイブリダイズする場合には、第1のライゲーション接合部で第2の隣接したオリゴヌクレオチドプローブにライゲーションさせるために好ましい。隣接する異なる第1のオリゴヌクレオチドプローブは、接合部位に別の識別塩基を含み、ミスマッチを含まないハイブリダイゼーションのみが接合部位置でライゲーション可能となる。各々の第1の隣接したオリゴヌクレオチドは、異なる位置特定可能なアレイ特異的部分を含み、従って、特定の塩基の変化が異なるアドレスでの捕獲によって識別される。このスキームでは、少なくとも1つの塩基により、他の核酸と異なる別の核酸配列の多重検出を行うために、複数の異なる捕獲オリゴヌクレオチドを、固体支持体上の異なる位置に結合させてある。または、第1のオリゴヌクレオチドプローブは、共通の位置特定可能なアレイ特異的部分を含み、第2のオリゴヌクレオチドプローブは異なる検出可能な標識および標的特異的部分を有する。

#### 【0045】

このような配置により、少なくとも1つの塩基が他の核酸と異なる別の核酸配列の多重検出が可能となる。このような多重検出を実施する際には、該核酸配列が同一もしくは異なる対立遺伝子上に存在する。

#### 【0046】

本発明はまた、リガーゼを含む本発明の方法を実施するためのキット、複数の異なるオリゴヌクレオチドプローブのセット、および捕獲オリゴヌクレオチドを固定化した固体支持体に関する。標的ヌクレオチド配列の予備的增幅に用いるプライマーもキットに含まれる。增幅をポリメラーゼ連鎖反応で実施する場合には、ポリメラーゼもキットに含まれる。

#### 【0047】

図1および2には、キャピラリー電気泳動もしくはゲル電気泳動/蛍光の定量化を利用した先行技術のリガーゼによる検出反応と比較した本発明の方法の流れ図を示す。図1は生殖系列の変異検出に関し、図2は癌の検出を示す。

#### 【0048】

図1は、リ-フラウメニ症候群 (Li-Fraumeni syndrome) の原因となるp53変異等の生殖系列における点突然変異の検出を示す。段階1において、DNA試料の調製後、Taq (すなわち、Thermus aquaticus) ポリメラーゼを用いホットスタートの条件下でエキソン5~8をPCR増幅した。反応の最後に、100℃で10分間加熱しTaqポリメラーゼを失活させる。段階2では、該産物を対立遺伝子特異的および共通のLDRプローブを含む新しいLDR緩衝液で20倍に希釈する。チューブは、通常、各プライマーを約100~200フェムトモル含む。段階3では、リガーゼによる検出反応は、Taqリガーゼの添加によりホットスタート条件下で開始する。LDRプローブは、接合部部位における完全な相補性を示す標的配列の存在下でのみ隣接したプローブとライゲーションする。産物は2つの異なる形態で検出される。第1の形態4aでは、当先行技術分野において用いられる、蛍光標識されたLDRプローブは、異なる長さのポリAもしくは酸化ヘキサエチレン・テールを含む。従って、僅かに異なる易動度を有する正常DNAに対するライゲーションで生じる各々のLDR産物はピークのラダーを与える。生殖系列の突然変異によって、電気泳動像に新たなピークが生成する。新しいピークのサイズは、概ねもとの試料に存在する変異の量に相当する。ホモ接合体の正常で0%、ヘテロ接合体のキャリアーで50%、ホモ接合体の変異体では100%である。第2の形態4bにおいては、本発明に従って、各々の対立遺伝子特異的プローブは、例えば、付加的な24ヌク

10

20

30

40

50

レオチド塩基をその5'末端に含む。これらの配列は、位置特定可能なアレイ上で相補的アドレス配列に特異的にハイブリダイズする单一の位置特定可能な配列である。LDR反応では、各々の対立遺伝子特異的プローブは、対応する標的配列の存在下で隣接する蛍光標識した共通プローブに対してライゲーションを行うことができる。野生型および変異体の対立遺伝子は、アレイ上の隣接したアドレスに捕獲される。未反応のプローブを洗い流す。黒いドットは、野性型対立遺伝子に関して100%のシグナルを示す。白いドットは、変異体の対立遺伝子に関して0%のシグナルを示す。斜線で示されたドットは、生殖系列の突然変異における1つの位置での各々の対立遺伝子に関して50%のシグナルを示す。

#### 【 0 0 4 9 】

図2は、p53腫瘍抑制性遺伝子における体細胞変異の検出を表すが、いずれも通常、低感度の変異検出に関するものである。段階1では、DNA試料を調製し、蛍光PCRプライマーを用いてエキソン5~9を3つの断片としてPCRで増幅する。これにより、段階2でのキャピラリー電気泳動もしくはゲル電気泳動を用いたPCR産物の蛍光の定量化が可能となる。段階3では、マーカーDNAの1/100希釈（3つの断片の各々に対し）で産物が急増する。癌細胞では観察されない変異を含むが、適当なLDRプローブで容易に検出されること以外は、このDNAは、野性型DNAに相同である。段階4の混合したDNA産物を変異体もしくはマーカー対立遺伝子に対してのみ特異的な全LDRプローブを含む緩衝液で20倍に希釈する。段階5では、リガーゼ反応を、Taqリガーゼの添加によりホットスタート条件下で開始した。接合部部位における完全な相補性を与える標的配列の存在下でのみ、隣接したプローブに対してLDRプローブのライゲーションが起こる。図1に記載される同一の2つの形態で、産物が検出される。段階6aの当先行技術分野において用いられる形態では、産物はキャピラリー電気泳動もしくはゲル電気泳動で分離し、蛍光シグナルを定量する。変異体ピークのマーカーピークに対する比は、100分割したもとの試料に存在する癌の突然変異量の概算を与える。段階6bの形態では、本発明に基づいて、位置特定可能なアレイ上の相補的配列に対する特異的ハイブリダイゼーションで産物を検出する。マーカードットに対する変異体ドットの蛍光シグナル比は、100分割したもとの試料に存在する癌の突然変異量の概算を与える。

#### 【 0 0 5 0 】

本発明のリガーゼによる検出反応の方法は、図3~10を参照することによって最もよく理解される。一般的には、これは、Baranyらの国際公開公報第90/17239号；F.Baranyらの「耐熱性DNAリガーゼをコードする遺伝子のクローニング、過剰発現および塩基配列（Cloning、OverexpressionandNucleotideSequenceofaThermostableDNALigase-encodingGene）」（Gene.109:1-11（1991））、およびF.Baranyらの「クローニング耐熱のリガーゼを用いた遺伝病の検出およびDNA増幅（GeneticDiseaseDetectionandDNAAmplificationUsingClonedThermostableLigase）」（Proc.Natl.Acad.Sci.USA.88:189-193（1991））等に記載されており、これらの開示は参考として本明細書に組み入れられる。本発明のリガーゼによる検出反応には、2セットの相補的オリゴヌクレオチドを用いることができる。これは、直ぐ上に示した3つの参考文献に記載のリガーゼ連鎖反応として知られるものであり、参考として本明細書に組み入れられる。または、リガーゼによる検出反応は、オリゴヌクレオチドライゲーション・アッセイとして知られる单一サイクルを含む。Landegrenらの「リガーゼによる遺伝子検出技術（ALigase-MediatedGeneDetectionTechnique）」（Science241:1077-80（1988）；Landegrenらの「DNA診断薬-分子技術と自動化（DNADiagnostics-MolecularTechniquesandAutomation）」、Science242:229-37（1988）；およびLandegrenらの米国特許第4,988,617号を参考のこと。

#### 【 0 0 5 1 】

方法のリガーゼによる検出反応期の際、ハイブリダイゼーションは50~85℃で起こるが、変性処理は80~105℃で実施する。各々のサイクルは、変性処理および全体として約1~5分の加熱ハイブリダイゼーション処理を含む。通常、ライゲーションによる検出反応は、2~50サイクルの繰り返し変性とハイブリダイゼーションを行うことを含む。該方法のリガーゼによる検出反応段階にかかる全体の時間は1~250分である。

10

20

30

40

50

## 【0052】

オリゴヌクレオチドプローブのセットは、リボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、修飾デオキシリボヌクレオチド、ペプチドヌクレオチド類縁体、修飾ペプチドヌクレオチド類縁体、修飾リン酸塩・糖鎖骨格オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体、およびその混合物の形態であってもよい。

## 【0053】

一つの変法において、オリゴヌクレオチドプローブのセットのオリゴヌクレオチドは、各々が66~70 のハイブリダイゼーションもしくは融解温度（すなわち、T<sub>m</sub>）を有する。これらのオリゴヌクレオチドは20~28ヌクレオチドの長さである。

## 【0054】

DNAアレイ上にライゲーション産物を捕獲する前に位置特定可能なヌクレオチドアレイ特異的な部分を含む未変換のLDRオリゴヌクレオチドプローブを化学的もしくは酵素的に破壊することが望ましい。これを行わない場合、このような未変換のプローブは、相補的配列を含む固体支持体のアレイ上のアドレスで、結合に関してライゲーション産物と競合する。破壊はエキソヌクレアーゼIII等 (L-HGuo and R.Wu, *Methods in Enzymology* 100:60-96 (1985)、これは参照として本明細書に組み入れられる) のエキソヌクレアーゼを利用し、端でロックされ、互いにプローブのライゲーションには含まれないLDRプローブと組み合わせることによって達成できる。プロッキング部分は、レポーター基もしくはホスホロチオエート基を含むことができる (T.T.Nikiforow らの「单一鎖PCR産物の調製のためのホスホロチオエートプライマーおよびエキソヌクレアーゼ加水分解の利用と固相ハイブリダイゼーションによる検出 (The Use of Phosphorothioate Primers and Exonuclease Hydrolysis for the Preparation of Single-stranded PCR Products and their Detection by Solid-phase Hybridization)」、*PCR Methods and Applications* 3:p.285-291 (1994)、これは参照として本明細書に組み入れられる)。LDR法の後に、ライゲーションの起こらなかったプローブは、反応混合物をエキソヌクレアーゼと反応させて選択的に破壊する。ライゲーションの起こったプローブは、エキソヌクレアーゼ反応の開始に必要なフリーの3'末端の除去により保護される。このアプローチにより、特にLDR反応が少量の産物のみを形成する場合にシグナル対雑音比の増加が起こる。ライゲーションの起こらなかったオリゴヌクレオチドは、捕獲に関して捕獲オリゴヌクレオチドと競合するので、このようなライゲーションの起こったオリゴヌクレオチドとの競合はシグナルを低下させる。このアプローチの別の利点は、ハイブリダイズしていない標識を含む配列が分解し、したがって、標的に依存しないバックグラウンドシグナルを生じづらくなることである。何故ならば、洗浄によってDNAアレイからより容易に除去され得るからである。

## 【0055】

上記のオリゴヌクレオチドプローブのセットは、検出に好ましいレポーター標識を有する。有用な標識は、発色基、蛍光部分、酵素、抗原、重金属、磁気プローブ、色素、熒光基、放射線物質、化学発光部位、および電気化学的検出部位を含む。捕獲オリゴヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、修飾デオキシリボヌクレオチド、ペプチドヌクレオチド類縁体、修飾ペプチドヌクレオチド類縁体、修飾リン酸塩-糖骨格オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド類縁体、およびその混合物の形態であり得る。本発明の方法が複数のオリゴヌクレオチドセットの使用を含む場合、第2のオリゴヌクレオチドプローブは同一でもよいが、第1のオリゴヌクレオチドプローブの位置特定可能なアレイ特異的部分は異なっている。または、第1のオリゴヌクレオチドプローブの位置特定可能なアレイ特異的部分は同一でもよいが、第2のオリゴヌクレオチドプローブのレポーター標識は異なる。

## 【0056】

本発明のライゲーションによる検出反応期前に、好ましくは、最初の標的核酸の増幅法で試料を増幅する。これにより、試料中の標的ヌクレオチド配列の量が増加する。例えば、最初の標的核酸の増幅が、ポリメラーゼ連鎖反応法、配列の自己複製、もしくはQ-レプリカーゼによって媒介されるRNA増幅を用いて達成される。ポリメラーゼ連鎖反応法は

10

20

30

40

50

、好ましい増幅法であり、H.Erlich らの「ポリメラーゼ連鎖反応における最近の進歩(Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction)」(Science 252:1643-50 (1991); M.Innisらの「PCRプロトコール:方法と応用の指針(AGuide to Methods and Applications)」(Academic Press: New York (1990)); および R.Saikiらの「耐熱性DNAポリメラーゼによるDNAのプライマー特異的な酵素的増幅(Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase)」(Science 239:487-91 (1988))等に詳細に記載されており、これらは参照として本明細書に組み入れられる。参考として本明細書に組み入れられるJ.Guatelliらの「レトロウイルスの複製をモデルにしたマルチ酵素反応による核酸の等熱インピトロ増幅(Isothermal, invitro Amplification of Nucleic Acids by a Multienzyme Reaction Modeled After Retroviral Replication)」(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-78 (1990))には、配列の自己複製法に関して記載がある。Q レプリカーゼによって媒介されるRNA増幅は、F.Kramerらの「複製可能なRNAレポーター(Replicatable RNA Reporters)」(Nature 339:401-02 (1989))に開示されており、これは参考として本明細書に組み入れられる。

## 【0057】

本発明のポリメラーゼ連鎖反応法の使用およびその後のリガーゼによる検出法の使用を図3に示す。ここで二つの多型におけるホモもしくはヘテロ接合性(すなわち、対立遺伝子としての差異)は、同一遺伝子上にある。または、このような対立遺伝子の差異は異なる遺伝子上にあってもよい。

## 【0058】

図3に示されるように、標的核酸が二本鎖DNA分子の形態である場合、変性して鎖を分離させる。これは、80~105 度程の温度に加熱することによって達成する。次に、ポリメラーゼ連鎖反応のプライマーを加え、通常、20~85 度程の温度で鎖にハイブリダイズさせる。また、耐熱性ポリメラーゼ(例えば、Thermus aquaticusポリメラーゼ)を添加し、温度を50~85 度に調整して、プライマーがハイブリダイズする核酸の長さに沿ってプライマーを伸長させる。ポリメラーゼ連鎖反応の伸長の段階後に、得られた二本鎖分子を80~105 度に加熱し、分子を変性させ鎖を分離させる。これらのハイブリダイゼーション、伸長、および変性の段階を、何回も繰り返して標的を適当なレベルに増幅する。

## 【0059】

方法のポリメラーゼ連鎖反応期が完了すると、図3に示すライゲーションによる検出反応期が開始される。二本鎖DNA分子の状態であれば、80~105 度、好ましくは94 度で標的核酸を変性させた後、標的ヌクレオチド配列の一方の鎖に対するライゲーションによる検出反用のオリゴヌクレオチドプローブをリガーゼ(例えば、図3に示す耐熱性リガーゼ様のThermus aquaticusリガーゼ)とともに加える。次に、オリゴヌクレオチドプローブを標的核酸分子にハイブリダイズさせ、通常、45-85 度、好ましくは65 度でライゲーションを行う。ライゲーション接合部に完全な相補性があれば、オリゴヌクレオチドはともにライゲーションすることができる。置換可能なヌクレオチドがTまたはAであるとき、標的ヌクレオチド配列にTが存在すれば、位置特定可能なアレイ特異的部分Z1を有するオリゴヌクレオチドプローブがレポーター標識Fを有するオリゴヌクレオチドプローブにライゲーションし、また標的ヌクレオチド配列にAが存在すれば、位置特定可能なアレイ特異的部分Z2を有するオリゴヌクレオチドプローブがレポーター標識Fを有するオリゴヌクレオチドプローブにライゲーションする。同様に、変化可能なヌクレオチドがAまたはGであるときには、標的ヌクレオチド配列にTが存在すれば、位置特定可能なアレイ特異的部分Z4を有するオリゴヌクレオチドプローブがレポーター標識Fを有するオリゴヌクレオチドプローブにライゲーションし、また標的ヌクレオチド配列にCが存在すれば、位置特定可能なアレイ特異的部分Z3を有するオリゴヌクレオチドプローブがレポーター標識Fを有するオリゴヌクレオチドプローブとライゲーションする。ライゲーション後に、材料を再び変性させてハイブリダイズしている鎖を分離する。ハイブリダイゼーション/ライゲーションおよび変性の段階は、一つもしくは複数のサイクル(例えば、1~50サイクル)を経て標的シグナルを増幅する。蛍光ライゲーション産物(同様に、位置特定可能なアレ

10

20

30

40

50

イ特異的部分を有する、ライゲーションされなかったオリゴヌクレオチドプローブ)は、位置特定可能なアレイ上の特定のアドレスにおけるZ1、Z2、Z3、およびZ4部位に相補的な捕獲プローブへのハイブリダイゼーションにより捕獲される。次に、オリゴヌクレオチドの一方に前もって存在する標識Fで、ライゲーションの起こったオリゴヌクレオチドの存在を検出する。図3において、ライゲーション産物の配列は、位置特定可能なアレイ特異的部分Z1およびZ3に相補的な捕獲オリゴヌクレオチドでアレイのアドレスにハイブリダイズするが、ライゲーションの起こらなかった位置特定可能なアレイ特異的部分Z2およびZ4を有するオリゴヌクレオチドプローブは、その相補的捕獲オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする。しかしながら、ライゲーション産物の配列のみが標識Fを有するので、それらのみの存在が検出される。

10

## 【0060】

図4は、本発明のPCR/LDRの段階に関する流れ図であり、与えられた部位がいずれの塩基あっても識別できる。位置特定可能なアレイ特異的部分Z1、Z2、Z3、およびZ4に相補的なアドレスの蛍光シグナルの出現は、標的ヌクレオチド配列における、それぞれ、A、G、C、およびT対立遺伝子の存在を示す。ここで、標的ヌクレオチド配列A、およびC対立遺伝子の存在は、部位Z1およびZ3にそれぞれ相補的な捕獲オリゴヌクレオチドプローブで固体支持体上のアドレスの蛍光で示される。図4では、位置特定可能なアレイ特異的部分が識別オリゴヌクレオチドプローブ上にあり、識別塩基がこれらのプローブの3'末端にあることに注目されたい。

## 【0061】

20

図5は、本発明の2カ所の近接部位における可能な塩基の存在の検出に関するPCR/LDRの段階の流れ図である。ここで、LDRプライマーは重複していてもよいが、接合部に完全な相補性がある場合にライゲーションが可能である。このことが、重複プライマーが互いに阻害を起こす対立遺伝子特異的PCR等のほかのアプローチと、LDRが異なる点である。図5においては、第1のヌクレオチドの位置は、AおよびCの対立遺伝子でヘテロ接合体であるが、第2のヌクレオチドの位置はG、CおよびTの対立遺伝子でヘテロ接合体である。図4に示すように、位置特定可能なアレイ特異的部分は識別オリゴヌクレオチドプローブ上にあり、識別塩基はこれらのプローブの3'末端にある。レポーター基(例えば、蛍光標識)は、共通オリゴヌクレオチドプローブの3'末端にある。例えば、各々の個体が、2つの正常遺伝子および2つの偽遺伝子を有し、2カ所のスプライス部位(ヌクレオチド656)に3つの可能な単一塩基(G、A、およびC)が存在する場合の21ヒドロキシラーゼ遺伝子について、これが可能である。また、これを用いて薬剤耐性(例えば、AZTに対する)株の出現を示すHIV感染における低レベルの変異を検出できる。図5に戻って、位置特定可能なアレイ特異的部分Z1、Z2、Z3、Z4、Z5、Z6、Z7、およびZ8に相補的なアドレスの蛍光シグナルの出現は、ヘテロ接合体の部位のAおよびC対立遺伝子における、それぞれ、A、G、C、およびTの存在、およびヘテロ接合体部位のG、C、およびT対立遺伝子における、それぞれA、G、C、およびTの存在を示す。

30

## 【0062】

30

図6は、本発明のPCR/LDRの段階に関する流れ図であり、挿入(左上部のプローブセット)および欠失(右下部のプローブセット)を識別する。左では、正常配列がポリAテールに5つのAを含む。変異体の配列は、さらに2つのAがテール内に挿入されている。したがって、位置特定可能なアレイ特異的部分Z1(正常の配列を表す)およびZ3(2塩基対の挿入を表す)を有するLDR産物は、共通プライマーにライゲーションすることによって蛍光標識されている。LDR法(例えば、耐熱性リガーゼ酵素を用いる)は、單一ヌクレオチド反復における单一塩基の挿入もしくは欠失を簡単に識別できるが、対立遺伝子特異的PCRでは、このような差異を識別できない。なぜならば、3'塩基が両方の対立遺伝子に存在するためである。右では、正常配列は5つの(CA)反復(すなわち、CACACACACA)である。変異体では、正常配列と比較して2つ少ないCA塩基を含む(すなわち、CACACA)。これらは、特定位置特定可能なアレイ特異的部分Z8(正常の配列を表す)およびZ6(2つのCA欠失を表す)アドレスにおける、蛍光LDR産物として検出される。また、さまざまな感染因子

40

50

の薬剤に対する耐性は、本発明を用いて調べることができる。図6では、Z1およびZ3に相補的な捕獲オリゴヌクレオチドを有するアドレスにおける蛍光標識Fで示されるライゲーション産物の配列の存在は、正常および変異体のポリA配列の両方の存在を示す。同様に、Z6およびZ8に相補的な捕獲オリゴヌクレオチドを有するアドレスの蛍光標識Fで示されるライゲーション産物の配列の存在は、正常なCAの繰り返し配列および繰り返しユニットが1つ欠失した配列の両方の存在を示す。

#### 【0063】

図7は、過剰の正常配列の存在における低レベルの変異を検出する位置特定可能なアレイ特異的部分を用いた 本発明のPCR/LDRの段階に関する流れ図である。図7は、K-ras遺伝子のグリシン(Gly)をコードするコドン12の配列GGTを示す。ごく一部の細胞が、アスパラギン酸(Asp)をコードするGATにおけるGからAへの変異を含む。野生型のLDRプローブ(すなわち、正常配列)は、反応から除外される。正常LDRプローブ(識別塩基=Gを有する)を含む場合、これらを共通プローブに対してライゲーションすることによって、変異体の標的に由来するシグナルより強めることができる。代わりに、図7に示されるように、蛍光標識Fを有するライゲーション産物の配列の存在は、位置特定可能なアレイ特異的部分Z4に相補的な捕獲オリゴヌクレオチドを有するアドレスにおけるアスパラギン酸をコードする変異体の存在を示す。

#### 【0064】

図8は、本発明のPCR/LDRの段階に関する流れ図であり、位置特定可能なアレイ特異的部分が、共通のオリゴヌクレオチドプローブに配置されおり、識別オリゴヌクレオチドプローブはレポーター標識を有する。対立遺伝子の差異は、異なる蛍光シグナルF1、F2、F3、およびF4で識別される。この方法により、より高密度なアレイの使用が可能となる。なぜならば、各々の位置は、特定の基で発光すると予測されるからである。エミッഷョンスペクトルにおいて最小重複を有し、多重走査が必要な蛍光基を必要とするという不利な点を有する。これは低レベルの対立遺伝子(例えば、癌に関連した変異)の検出に理想的といえるほど好適ではない。

#### 【0065】

図9は、本発明のPCR/LDRの段階に関する流れ図であり、隣接および近傍の対立遺伝子の両方が検出される。隣接した変異は、互いの右隣にあり、1セットのオリゴヌクレオチドプローブが接合部の3'末端の塩基を識別する(異なる位置特定可能なアレイ特異的部分Z1、Z2、Z3、およびZ4の使用によって)が、もう一方のオリゴヌクレオチドプローブのセットは、接合部の5'末端の塩基を識別する(異なる蛍光レポーター標識F1、F2、F3、およびF4の使用)。図9では、疾患遺伝子(例えば、囊胞性線維症CFTR)のGlyおよびアルギニン(Arg)をコードするコドンが、それぞれ、生殖系列の突然変異の候補である。図9の検出結果は、Gly(GGA;ライゲーション産物の配列を有する部位Z2および標識F2で示される)がグルタミン酸(Glu)(GAA;部位Z2および標識F1を有するライゲーション産物の配列で示される)に突然変異を起こしており、Arg(CGG;部位Z7および標識F2を有するライゲーション産物の配列で示される)がトリプトファン(Trp)(TGG;部位Z8および標識F2を有するライゲーション産物の配列で示される)に突然変異を起こしていることを示している。したがって、患者は、複合ヘテロ接合型の個体である(すなわち、両方の遺伝子に変異体対立遺伝子を有する)。

#### 【0066】

図10は、本発明のPCR/LDRの段階に関する流れ図であり、單一コドンに関して可能な單一塩基の変異すべてが検出される。通常アミノ酸のコドンは3番目の塩基が縮重しているのでこれら可能な変異すべてについて、蛋白質レベルで最初の2つの位置を決定できる。これらのアミノ酸には、アルギニン、ロイシン、セリン、トレオニン、プロリン、アラニン、グリシン、およびバリンを含む。しかしながら、幾つかのアミノ酸については、コドンの3つの塩基すべてを調べるので、3箇所の隣接した位置の変異を識別するオリゴヌクレオチドプローブが必要となる。図10に示すように、3'末端に対する最後から2番目の位置に4種の可能な塩基を含む4つのオリゴヌクレオチドプローブを設計し、また3'末端に4種

10

20

30

40

50

の考え得る塩基を含む別の4つの捕獲オリゴヌクレオチドを設計し、この問題を解決する。レポーター標識のみを有する共通オリゴヌクレオチドプローブはコドンの縮重に対応し、同一のアレイアドレスで捕獲され異なるライゲーション産物の配列間の識別ができる2つの蛍光基を有している。例えば、図10に示されるように、グルタミン(Gln)をコードするコドン(すなわち、CAAおよびCAG)の存在が、部位Z1および標識F2を含むライゲーション産物の配列の存在によって示される。同様に、ヒスチジン(His)をコードする変異(コドンCACでコードされる)に対するGlnの存在は、部位Z1および標識F2を有するライゲーション産物の配列の存在ならびに部位Z7および標識F2を有するライゲーション産物の配列の存在によって示される。プライマーZ1およびZ7が同一の配列を有するという事実に起因し、このアッセイに冗長性が内在する。

10

## 【0067】

本発明の特に重要な局面は、試料中の標的ヌクレオチド配列の量が定量可能であることである。内部(すなわち、該試料を用いた増幅・検出により得られる標準材料)もしくは外部(すなわち、得られる標準物質は増幅されないが該試料を用いて検出される)標準を得ることによって、これを様々な方法で達成することができる。

## 【0068】

ある定量法に従って、レポーター標識により生成したシグナルは、分析試料より生産されたライゲーション産物の配列の捕獲によって生じ検出されるものである。このシグナル強度は、生成した既知の量の標的ヌクレオチド配列を有する試料中に存在するライゲーション産物の配列の捕獲によって生じるシグナルによって得られる検量線と比較する。その結果、分析試料中の標的ヌクレオチド配列の量を調べることができる。本技術は、外部標準の使用を含む。

20

## 【0069】

本発明の別の定量法は、内部標準に関する。ここでは、既知の量の一つもしくは複数のマーカー標的ヌクレオチド配列を試料に添加する。さらに、複数のマーカー特異的オリゴヌクレオチドプローブのセットをリガーゼ、上記のオリゴヌクレオチドプローブのセットおよび試料とともに混合物に添加する。マーカー特異的オリゴヌクレオチドプローブのセットは、(1)マーカー標的ヌクレオチド配列に相補的な標的特異的部分ならびに支持体上の捕獲オリゴヌクレオチドに相補的な位置特定可能なアレイ特異的部分を有する第1のオリゴヌクレオチドプローブ、(2)マーカー標的ヌクレオチド配列に相補的な標的特異的部分ならびに検出可能なレポーター標識を有する第2のオリゴヌクレオチドプローブを含む。特定のマーカー特異的オリゴヌクレオチドセットにおけるオリゴヌクレオチドプローブは、対応するマーカー標的ヌクレオチド配列上で相互に隣接してハイブリダイズし、互いにライゲーションすることにおいて適切である。しかしながら、試料中の他のヌクレオチド配列または添加したマーカー配列にハイブリダイズする場合には、このようなライゲーションを阻害するミスマッチが存在する。固体支持体上に捕獲されたライゲーション産物の配列の存在は、レポーター標識の検出によって同定される。次に、既知の量のマーカー標的ヌクレオチド配列から生成し捕獲されたライゲーション産物の量を捕獲された他のライゲーション産物の配列の量と比較することによって、試料中の標的ヌクレオチド配列の量を決定する。

30

## 【0070】

本発明の別の定量法は、複数の配列上の差異を有する2つもしくはそれ以上の複数の標的ヌクレオチド配列を含む試料の解析を含む。ここでは、標的ヌクレオチド配列に対応するライゲーション産物の配列が、上記のいずれかの技術によって検出・識別される。次に、生成し捕獲されたライゲーション産物の配列の相対量を比較して、試料中の標的ヌクレオチド配列の相対量を定量する。これは、試料における標的ヌクレオチド配列の相対的レベルの定量的尺度を提供する。

40

## 【0071】

本発明のリガーゼによる検出反応法の段階の前に、リガーゼ連鎖反応法を行い、オリゴヌクレオチド産物を増幅することもできる。本方法は、F.Baranyらの「耐熱性DNAリガーゼ

50

ゼをコードする遺伝子のクローニング、過剰発現および塩基配列（Cloning、OverexpressionandNucleotideSequenceofaThermostableDNALigase-encodingGene）」, Gene.109:1-11 (1991)、およびF.Baranyらの「クローン化耐熱のリガーゼを用いた遺伝病の検出およびDNA増幅（GeneticDiseaseDetectionandDNAAmplificationUsingClonedThermostableLigase）」(Proc.Natl.Acad.SciUSA88:189-93 (1991))に完全な記載があり、これらは参考として本明細書に組み入れられる。増幅にリガーゼ連鎖反応を用いる代わりに、転写に基づく増幅法を利用することもできる。

## 【0072】

好ましい耐熱性リガーゼはThermusaquaticus由来のものである。本酵素はこの生物から単離できる(M.Takahashiら「好熱性DNAリガーゼ（ThermophilicDNALigase）」(J.Biol.Chem.259:10041-47 (1984))；これは参考として本明細書に組み入れられる)。または、リコンビナントで調製することもできる。このような単離法は、リコンビナントThermusaquaticusリガーゼの產生(およびThermusthermophilusリガーゼ)とともに、Baranyらの国際公開公報第90/17239号、およびF.Baranyらの「耐熱性DNAリガーゼをコードする遺伝子のクローニング、過剰発現および塩基配列（Cloning、OverexpressionandNucleotideSequenceofaThermostableDNALigase-encodingGene）」(Gene.109:1-11 (1991))等に開示されており、参考として本明細書に組み入れられる。これらの文献は、このリガーゼおよびこれをコードするDNAの完全な配列情報を含む。他の好ましいリガーゼとしては、E.coliリガーゼ、T4リガーゼ、Thermusspp.AK16リガーゼ、Aquifexaeolicusリガーゼ、Thermotogamaritimaリガーゼおよび、Pyrococcusリガーゼを含む。

## 【0073】

ライゲーション増幅混合物は、サケ精子DNA等の担体DNAを含んでいてもよい。

## 【0074】

好ましくは加熱ハイブリダイゼーション処理であるハイブリダイゼーションの段階では、ライゲーション接合部における識別ヌクレオチドに基づくヌクレオチド配列間での識別を行う。標的ヌクレオチド配列間の差異は、例えば、単一核酸塩基の差、核酸の欠失、再構成である。1塩基以上を含むこのような配列の差異も検出できる。好ましくは、オリゴヌクレオチドプローブのセットは実質的に同一の長さを有し、それらを実質的に同様なハイブリダイゼーション条件で標的ヌクレオチド配列にハイブリダイズする。その結果、本発明の方法は、感染性疾患、遺伝病、および癌を検出できる。また、環境モニタリング、法医学、および食品科学においても有用である。

## 【0075】

広く多様な感染性疾患は、本発明の方法で検出できる。通常、これらは細菌、ウイルス、寄生虫、および真菌性の感染因子によっておこる。また、さまざまな感染因子の薬剤に対する耐性は、本発明を用いて調べることができる。

## 【0076】

本発明で検出する細菌性感染因子は、大腸菌、サルモネラ菌(Salmonella)、赤痢菌(Shigella)、クレブシエラ(Klebsiella)、シュードモナス(Pseudomonas)、リステリア菌(Listeriamonocytogenes)、結核菌(Mycobacteriumtuberculosis)、ミコバクテリアアビウム-イントラセルラ(Mycobacteriumavium-intracellulare)、エルシニア(Yersinia)、フランシセラ(Francisella)、パストレラ(Pasteurella)、ブルセラ(Brucella)、クロストリジウム(Clostridia)、百日咳菌(Bordetellapertussis)、バクテロイド(Bacteroides)、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、スタフィロコッカスニューモニア(Streptococcuspneumonia)、B-溶連菌(B-Hemolyticstrep.)、コリネバクテリア(Corynebacteria)、レジオネラ(Legionella)、ミコプラズマ(Mycoplasma)、ウレアプラズマ(Ureaplasma)、クラミジア(Chlamydia)、淋菌(Neisseriagonorrhoea)、髄膜炎菌(Neisserimeningitides)、ヘモフィルスインフルエンザ(Hemophilus influenza)、エンテロコッカスファエカリス(Enterococcusfaecalis)、プロテウスブルガリス(Proteusvulgaris)、プロテウスマリabilis(Proteusmirabilis)、ヘリコバクターピロリ(Helicobacterpylori)、梅毒トレポネーマ(Treponemapalladium)、ボレリア

10

20

30

40

50

バーグドーフェリ (*Borreliaburgdorferi*)、ボレリアレクレンティス (*Borreliarecurrentis*)、リケッチャ (*Rickettsial*) の病原、ノカルジア (*Nocardia*)、およびアシトノマイセス (*Actinomycetes*) を含む。

#### 【 0 0 7 7 】

本発明で検出される真菌性感染因子は、クリプトコッカスネオフォルマンス (*Cryptococcusneofmans*)、プラストミセスデルマティティディス (*Blastomycesdermatitidis*)、ヒストプラズマカプスラタム (*Histoplasmacapsulatum*)、コクシジウムイミティス (*Coccidioidesimmitis*)、パラコクシシオイデスブラシリアンシス (*Paracoccidioidesbrasiliensis*)、カンジダアルビカンス (*Candidaalbicans*)、アスペルギルスフミガーツス (*Aspergillusfumigatus*)、フィコマイセテス (*Phycomycetes*) (リゾpus (*Rhizopus*)<sup>10</sup>)、スポロスリックスシェンキー (*Sporothrixschenckii*)、クロモミコシス (*Chromomycosis*)、およびマズロミコシス (*Maduromycosis*) を含む。

#### 【 0 0 7 8 】

本発明で検出されるウイルス性感染因子は、ヒト免疫不全症ウイルス、ヒトT細胞リンパ球親和性ウイルス、肝炎ウイルス（例えば、B型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルス）、エピスタイン・バーウイルス、サイトメガロウイルス、ヒトパピローマウイルス、オルトミクソウイルス、パラミクソウイルス、アデノウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、ポリオウイルス、トガウイルス、バンヤウイルス、アレナウイルス、ルベラウイルス、およびレオウイルスを含む。

#### 【 0 0 7 9 】

本発明で検出される寄生性作用因子は、プラスモジウムファルシパラム (*Plasmodiumfalciparum*)、プラスモジウムマラリア (*Plasmodiummalaria*)、プラスモジウムビバックス (*Plasmodiumvivax*)、プラスモジウムオーバル (*Plasmodiumovale*)、オンコバルバボルプラス (*Onchoceravolvulus*)、レーシュマニア (*Leishmania*)、トリパンソーマ (*Trypanosoma*) 種、住血吸虫 (*Schistosoma*) 種、エンタモエバヒストリチカ (*Entamoebabiotolytica*)、クリプトスピロジウム (*Cryptosporidium*)、ギアルディア (*Giardia*) 種、トリチモナス (*Trichomonas*)、バラチジウムコーライ (*Balatidiumcoli*)、ウチエレリアバンクロフティ (*Wuchereriabancrofti*)、トキソプラズマ (*Toxoplasma*) 種、エンテロビウスバーミキュラシス (*Enterobiusvermicularis*)、アスカリスマブリコイデス (*Ascarislumbricoides*)、トリチュリストリチウラ (*Trichuristrichiura*)、ドラカムクルスメディネシス (*Dracunculusmedinesis*)、吸虫 (*trematodes*)、ジフィロボツリウムラタン (*Diphyllobothriumlatum*)、条虫 (*Taenia*) 種、ニューモシスティスカリニー (*Pneumocystiscarinii*)、及びネカター・アメリカニス (*Necatoramericanus*) を含む。<sup>20</sup>

#### 【 0 0 8 0 】

本発明はまた、感染性因子による薬剤耐性の検出にも有用である。例えば、バンコマイシン耐性エンテロコッカスファエシウム (*Enterococcusfaecium*)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、ペニシリン耐性肺炎連鎖球菌 (*Streptococcuspneumoniae*)、多剤耐性結核菌 (*Mycobacteriumtuberculosis*)、およびAZT耐性ヒト免疫不全ウイルスはいずれも本発明で同定できる。

#### 【 0 0 8 1 】

遺伝性疾患は、本発明の方法で検出できる。これは染色体および遺伝的異常の出生前スクリーニングもしくは遺伝病の出生後スクリーニングで実施可能である。検出可能な遺伝病の例としては、21ヒドロキシラーゼ欠損、囊胞性線維症、脆弱X症候群、ターナー症候群、デュシェーヌ筋ジストロフィー、ダウン症候群もしくはその他のトリソミー、心臓疾患、単一遺伝子疾患、HLAタイピング、フェニルケトン尿症、鎌状細胞貧血、ティ-サックス病、タラセミア、クラインフェルトラー症候群、ハンチントン病、自己免疫疾患、脂肪代謝異常症、肥満症、血友病、先天性代謝異常、および糖尿病があげられる。<sup>40</sup>

#### 【 0 0 8 2 】

本発明の方法で検出される癌は、通常、癌遺伝子、腫瘍抑制性遺伝子、もしくはDNA増幅に関する遺伝子、複製、組換え、もしくは修復を含む。これらの例は、BRCA1遺伝子<sup>50</sup>

、p53遺伝子、家族性大腸ポリポーラス、Her2/Neu増幅、Bcr/Ab1、K-ras遺伝子、ヒトパピローマウイルスのタイプ16および18、白血病、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、脳腫瘍、中枢神経系腫瘍、膀胱腫瘍、メラノーマ、肝癌、骨肉腫およびその他の骨癌、睾丸癌および卵巣癌、耳鼻咽喉科の腫瘍、およびヘテロ接合性の消失を含む。

#### 【0083】

環境モニタリングの分野においては、本発明は、都市廃水浄化システムおよび貯水器等の天然の、および工学的な生態系ならびに微小生態系もしくは生物的環境浄化を行っている汚染域における病原性および常在微生物の検出、同定、およびモニタリングに用いられる。集団動態研究における特異的標的微生物のモニタリング、または環境および工業用植物における改変微生物における遺伝学的検出、同定、もしくはモニタリングのいずれかのために、非生体物質を代謝する遺伝子を含むプラスミドの検出をおこなうことも可能である。10

#### 【0084】

本発明は、軍人、および犯罪捜査におけるヒトの識別、父性検査および家族関係解析、HLA適合性タイピング、および血液、精子、もしくは移植臓器の汚染スクリーニングを含む多様な法医学的分野においても用いることができる。

#### 【0085】

食品および飼料工業においては、本発明は広く多様な応用を有する。例えば、ビール、ワイン、チーズ、ヨーグルト、パン、その他の産生に関わる酵母等の産生用微生物の同定および特徴付けに用いることができる。利用に関する別の分野は、産物の品質管理および検定ならびに工法（例えば、家畜、殺菌、および食肉加工）における汚染に関する。その他の利用としては、育種目的の植物、球根、および種子の特徴付け、植物特異的病原体の存在同定、ならびに家畜感染の検出および同定があげられる。20

#### 【0086】

望ましくは、オリゴヌクレオチドプローブは、ライゲーション接合部において完全な相補性に基づき、対応する標的ヌクレオチド配列上で相互に隣接してハイブリダイズする場合の、ライゲーション接合部におけるライゲーションに好ましいものである。しかしながら、該セットにおけるオリゴヌクレオチドプローブは、試料中の他のいずれかのヌクレオチド配列にハイブリダイズする場合には、ライゲーションを阻害するライゲーション接合部位置の塩基にミスマッチが存在する。最も好ましくは、ミスマッチはライゲーション接合部の3'塩基に隣接した位置の塩基に存在する。または、ミスマッチは、ライゲーション接合部の塩基に隣接した塩基にあってもよい。30

#### 【0087】

本発明の方法は、第1および第2のヌクレオチド配列を100アトモルから250フェムトモルの量で試料中に検出することができる。LDR段階を第1のポリメラーゼ特異的増幅段階とカップルさせ、本発明の完全な方法では、単一分子程度を含む試料において標的ヌクレオチド配列を検出することができる。さらに、ピコモル量であることの多いPCR増幅産物は上記範囲で容易に希釈できる。このリガーゼによる検出反応では、ミスマッチライゲーション産物の配列の形成速度は、マッチしたライゲーション産物の配列の形成速度の0.005より低い。40

#### 【0088】

ライゲーション期が完了すると、捕獲期が開始される。本方法の捕獲期では、混合物は25～90、好ましくは60～80の温度で、かつ10～180分間、好ましくは60分までの時間、固体支持体と接触させる。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション中にライゲーション混合物を混合すること、または容積排除、カオトロピック薬剤、テトラメチルアンモニウム塩、もしくはN,N,N,トリメチルグリシン（ベタインー水和物）を添加することによって加速もしくは改善される。アレイが数十から数百のアドレスからなる場合、正しいライゲーション産物が適当なアドレスでハイブリダイズする機会を有することが重要である。これは、用いる高い温度におけるオリゴヌクレオチドの熱運動、アレイ表面と接触する液体の機械的運動、もしくは電界によるアレイ全域にわたるオリゴヌクレオ50

チドの運動によって達成することができる。ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイズしていないプローブを除去し、捕獲されたプローブの検出の最適化を図るために、アレイを緩衝液で洗浄する。または、アレイを順次洗浄する。

#### 【0089】

好ましくは、固体支持体は、アクリルアミドとカルボン酸塩、アルデヒド、もしくはアミノ基を含む機能性のモノマーとの組み合わせで構成される親水性ポリマーの多孔性表面を有する。この表面は、支持体を、ポリアクリルアミドをベースとしたゲルでコーティングするによって形成する。好ましい配合は、アクリルアミド/アクリル酸およびN,N-ジメチルアクリルアミド/モノメタクリル酸グリセロールの混合物を含む。クロスリンクカーナ, N'-メチレンビスアクリルアミドは、50:1以下のレベル、好ましくは500:1以下のレベルで存在する。10

#### 【0090】

固体支持体をライゲーション混合物に接触させている間の陰性電荷のマスキングに関する一態様は、二価カチオンの利用によって達成される。二価カチオンは、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、もしくはCo<sup>2+</sup>でよい。通常、二価カチオンによるマスキングは、カチオンを含むハイブリダイゼーション緩衝液により10mMの最小濃度で室温で15分間、固体支持体のプレハイブリダイゼーションを行うことによって実施する。

#### 【0091】

固体支持体をライゲーション混合物に接触させている間の陰性電荷のマスキングに関する別の態様は、pH6.0もしくはそれ以下のpHで接触させることによって実施する。これは、固体支持体に接触させる前もしくは接触中にライゲーション混合物に緩衝液を添加することにより達成される。好ましい緩衝液は、2-(N-モルフォリノ)エタンスルfonyl酸(MES)、リン酸ナトリウム、およびリン酸カリウムを含む。20

#### 【0092】

固体支持体をライゲーション混合物に接触させている間の陰性電荷のマスキングに関する別の態様は、ポリマーの親水性を維持しながら遊離のカルボン酸基を中和剤でキャッピングすることによって実施する。好ましい中和剤は、エタノールアミン、ジエタノールアミン、プロパノールアミン、ジプロパノールアミン、イソプロパノールアミン、およびジイソプロパノールアミンを含む。通常、中和剤によるマスキングは、1-[(3-ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩およびN-ヒドロキシコハク酸イミドを用い固体支持体内でカルボン酸基を活性化した後、クロロフォルム、ジクロロメタン、もしくはテトラヒドロフラン等の極性非プロトン性溶媒中で中和剤溶液による処理を行うことによって実施する。30

#### 【0093】

本発明による陰性電荷のマスキングによって、ライゲーションの起こらなかったオリゴヌクレオチドプローブの存在下におけるライゲーションされた産物の存在を検出する能力が向上する。特に、ライゲーションの起こらなかったオリゴヌクレオチドプローブに対する比が1:300未満、好ましくは1:900未満、さらに好ましくは1:3000未満、最も好ましくは1:9000未満である場合のライゲーション産物の存在の検出に、本発明は効果的である。40

#### 【0094】

さらに、本発明による陰性電荷のマスキングによって、非標的ヌクレオチド配列とは異なる標的ヌクレオチド配列の存在を非標的ヌクレオチド配列から单一塩基の差によって検出する能力が向上する。特に、標的ヌクレオチド配列の非標的ヌクレオチド配列に対する比が1:20未満、好ましくは1:50未満、より好ましくは1:100未満、最も好ましくは1:200未満である場合の標的ヌクレオチド配列の検出に、本発明は有効である。50

#### 【0095】

安定にハイブリダイズする捕獲オリゴヌクレオチドおよび位置特定可能なヌクレオチド配列の選択が重要である。このために、オリゴヌクレオチドセットおよび捕獲オリゴヌクレオチドを、位置特定可能なアレイ特異的部分に捕獲オリゴヌクレオチドがハイブリダイズする温度以下の温度で標的ヌクレオチド配列にオリゴヌクレオチドセットがハイブリダ

イズするように設計する必要がある。オリゴヌクレオチドをこのように設計しなかった場合、標的にハイブリダイズする同一のオリゴヌクレオチドセットから隣接した未反応のオリゴヌクレオチドを捕獲してしまうことで偽陽性シグナルが生じる。

#### 【 0 0 9 6 】

特定のオリゴヌクレオチドセットのライゲーションが起こり、ライゲーションが被検試料中の標的ヌクレオチド配列の有無と相關する場合には、本方法の検出期は走査と同定を含む。走査は、走査電子顕微鏡法、共焦点顕微鏡法、電荷結合素子、走査トンネル電子顕微鏡法、赤外線顕微鏡法、原子間力顕微鏡法、電導度、および蛍光もしくは熒光撮像技術によって実施可能である。相關付けはコンピュータで行う。

#### 【 0 0 9 7 】

10

本発明の別の局面は、固体支持体上のオリゴヌクレオチドのアレイ形成法に関する。この方法は、各々がオリゴヌクレオチドの付加に適切である部位のアレイを有する支持体を提供することを含む。各々のアレイ位置において支持体へのオリゴヌクレオチドの結合に好ましいリンカー、もしくは支持体（好ましくは非加水分解性）は固体支持体に結合している。固体支持体上のオリゴヌクレオチドのアレイは、多量体ヌクレオチドの付加のための選択されたアレイ位置の活性化および活性アレイ位置における多量体ヌクレオチドの付加の一連のサイクルによって形成される。

#### 【 0 0 9 8 】

本発明のさらに別の局面は、支持体上のオリゴヌクレオチドのアレイそのものに関する。固体支持体は、オリゴヌクレオチドの付加に各々好適である部位のアレイを有する。オリゴヌクレオチドの固体支持体への結合に好ましいリンカー、もしくは支持体（好ましくは非加水分解性）は、アレイの各々の位置において固体支持体に結合している。オリゴヌクレオチドのアレイは、固体支持体上の16ヌクレオチド以上を有するオリゴヌクレオチドで占められる少なくとも一部のアレイの位置に配置される。

20

#### 【 0 0 9 9 】

アレイ形成法においては、異なる多量体オリゴヌクレオチドセットに由来する多量体オリゴヌクレオチドは、固体支持体上の異なるアレイ位置で結合する。その結果、支持体は異なる位置に結合した多量体オリゴヌクレオチドの異なる基を有する位置のアレイを含む。

#### 【 0 1 0 0 】

30

異なる1,000のアドレスは、LDRオリゴヌクレオチドプローブの標的特異的配列（例えば、約20～25mer）と共有結合でライゲーションしたユニークな捕獲オリゴヌクレオチド（例えば、24mer）であってもよい。捕獲オリゴヌクレオチドプローブの配列は、試料中に存在するゲノム上の標的配列もしくは他の配列のいずれかに対して如何なる相同性をも示さないものである。次に、このオリゴヌクレオチドプローブを、位置特定可能なアレイ特異的部分、位置特定可能な固体支持体アレイ上の捕獲オリゴヌクレオチドに相補的な配列に捕獲させる。この概念を、可能な2つの形態で示し、例えば、p53R248変異（図13A-C）の検出があげられる。

#### 【 0 1 0 1 】

40

図13A～Cには、p53腫瘍抑制性遺伝子のコドン248における生殖系列変異の存在を同定するためのオリゴヌクレオチドプローブの設計に関するほかの2つの形態を示す。野性型配列はアルギニン（R248）をコードするが、癌の変異では、トリプトファン（R248W）をコードする。下部の図は捕獲オリゴヌクレオチドの模式図である。太い水平の線は位置特定可能なアレイを含むメンブレンもしくは表面を表す。細い曲線は、柔軟なリンカーアームを示す。比較的太い線は、CからN方向で固体表面に結合した捕獲オリゴヌクレオチド配列を示す。例示の目的において、セクションBにおけるリンカーアームが「引き延ばされた」ように捕獲オリゴヌクレオチドを垂直に描いている。アームは柔軟なため、塩基対相補性により捕獲オリゴヌクレオチドは各々において5'をCにおいて3'をNにハイブリダイズすることができる。オリゴヌクレオチドがN末端においてメンブレンに結合する場合、同一方向のオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションが可能となる。この場合、DNA/PNAハ

50

イブリダイゼーションは、5'から3'、および3'から5'への標準的な逆平行にある。他の修飾された糖リン酸骨格も同様に用いられる。図13Bは、3'末端における塩基CもしくはTの識別を含むことにより野生型および変異体p53を識別するように設計された2つのLDRプローブを示す。正しい標的DNAおよびTthリガーゼの存在においては、識別プローブは共有結合で下流の共通オリゴヌクレオチドに結合する。下流のオリゴヌクレオチドは、蛍光標識されている。識別オリゴヌクレオチドは、各々の5'末端における単一の位置特定可能なアレイ特異的部分Z1およびZ2の存在によって識別される。黒いドットは、標的依存性のライゲーションが起こっていることを示す。ライゲーション後に、オリゴヌクレオチドプローブを、アレイ上での單一アドレスにおける相補的な位置特定可能アレイ特異的部分によって捕獲してもよい。ライゲーションしたオリゴヌクレオチドプローブおよび未反応のオリゴヌクレオチドプローブのいずれもが、オリゴヌクレオチドアレイによって捕獲される。  
未反応の蛍光標識した共通プライマーおよび標的DNAを、高温（約65～80）および低塩濃度で洗い流す。変異シグナルは、位置特定可能なアレイ特異的部分Z1に相補的な捕獲オリゴヌクレオチドにおける蛍光シグナルの検出によって識別するが、野性型シグナルは、位置特定可能なアレイ特異的部分Z2に相補的な捕獲オリゴヌクレオチドに出現する。ヘテロ接合性は、位置特定可能なアレイ特異的部分Z1およびZ2に相補的な捕獲オリゴヌクレオチドにおける同程度のシグナルによって示される。シグナルは蛍光撮影装置を用いて定量される。この形態では各々の対立遺伝子に関して單一アドレスを用い、低レベルのシグナル（30～100アトモルのLDR産物）の非常に正確な検出の達成に好適である。図13Cは、  
識別シグナルが蛍光撮影装置を用いて定量できることを示す。この形態では、異なる蛍光基をF1およびF2を5'末端に有することによってオリゴヌクレオチドプローブを識別する單一アドレスを用いる。オリゴヌクレオチドプローブのいずれかが、位置特定可能なアレイ特異的部分Z1を3'末端に含む共通の下流オリゴヌクレオチドプローブにライゲーションすることができる。この形態においては、野性型および変異体LDR産物の両方がアレイ上の同一のアドレスに捕獲され、それらの異なる蛍光で識別される。この形態では、アレイのより効率的な利用が可能であり、数百もの潜在する生殖系列の突然変異を検出する場合には好適である。  
10  
20

#### 【0102】

固体支持体は、広く多様な材料から作製することが可能である。基質は、生物学的、非生物学的、有機、無機、もしくはこれらのいずれの組み合わせでもよく、粒子、鎖、沈殿、ゲル、シート、管状材料、球状、容器、毛細管、パッド、スライス、フィルム、プレート、スライド、ディスク、メンブレン、その他として存在するものである。基質は、盤、四角形、円形、その他等の通常の形状を有する。基質は、好ましくは平坦なものであるが、様々な異なる表面配置をとってもよい。例えば、基質は合成の起こる隆起もしくは陥没した領域を有していてもよい。基質およびその表面は、好ましくはその上で本明細書に記載の反応を起こさせる固い支持体を形成する。また、基質およびその表面は、適当な光吸収特性を提供するように選択したものである。例えば、基質は、重合LangmuirBlodgettフィルム、機能化ガラス、Si、Ge、GaAs、GaP、SiO<sub>2</sub>、SiN<sub>4</sub>、修飾シリコン、または広く多様なゲルのいずれか、もしくは（ポリ）テトラフルオロエチレン、（ポリ）ビニリデンジフルオリド、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリエチレン、ポリプロピレン、塩化ボリビニル、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（メチルメタクリレート）、もしくはその組み合わせ等のポリマーでもよい。当業者であれば、他の基質材料についても、本開示の記載により容易に理解できる。好ましい態様においては、基質は平坦なガラスもしくは单一結晶シリコンである。  
30  
40

#### 【0103】

幾つかの態様においては、所望の表面特性を与えるように、基質表面を既知の技術を用いてエッティングする。例えば、トレンチ、V字溝、丘段構造、切り上がりプラットフォーム等の方法で形成し、合成領域は光源等からの集光を最大限にするための反射「鏡」構造で得られる照射光の焦点内により近接して配置する。

#### 【0104】

固体基質上の表面は、常にではないが通常は、基質と同一材料で構成する。従って、表面は、広汎な材料、例えば、ポリマー、プラスチック、セラミック、多糖、シリカもしくはシリカをベースにした材料、炭素、金属、無機ガラス、メンブレン、もしくはそれらの組み合わせのいずれかで構成される。基質表面にしっかりと結合した結合部材で表面を官能基化する。好ましくは、表面の官能基は、シラノール、オレフィン、アミノ、ヒドロキシル、アルデヒド、ケト、ハロ、ハロゲン化アシルもしくはカルボキシル基等の反応基である。ある場合においては、このような官能基は予め基質に内在する。例えば、シリカをベースとした材料はシラノール基を有し、多糖はヒドロキシル基を有し、また合成ポリマーは、それを生じるモノマーに依存して多様な官能基を含む。または、基質が所望の官能基を含まない場合には、このような基は、1段階もしくは複数の段階において基質に結合させることができる。

10

## 【0105】

好適に修飾されたガラス、プラスチック、または炭水化物による表面もしくは多様なメンブレンを含む多様な市販材料を用いることができる。材料に依存して、表面の官能基（例えば、シラノール、ヒドロキシル、カルボキシル、アミノ）は（おそらく、コーティング・ポリマーの一部として）最初から存在する、もしくは、官能基の導入のために別の方（例えば、プラズマアニメーション、クロム酸酸化、官能基化側鎖のアルキルトリクロロシランによる処理を必要とする）。複数の方法でヒドロキシル基を安定なカルバミン酸（ウレタン）結合に組み込む。アミノ官能基は直接アセチル化することができるが、カルボキシル基は活性化（例えば、N,N'-カルボジイミダゾールもしくは水溶性カルボジイミド）し、アミノで官能基化した化合物と反応させる。図11に示すように、固体支持体は出発官能基Xを有するメンブレンもしくは表面であってもよい。官能基の変換は、基Y<sup>\*</sup>との共有結合における1つのパートナーを表す基X<sup>\*</sup>を提供する（必要に応じて）多様な方法で行うことができる。図11は、PEG（すなわち、ポリエチレングリコール）のグラフトを具体的に示すが、同一レパートリーの反応を、炭水化物（ヒドロキシルを有する）、リンカー（カルボキシルを有する）、および/もしくは好ましい官能基（アミノもしくはカルボキシル）によって伸長したオリゴスクレオチドを付加させるために用いることができる（ただし、必要であれば）。ある場合においては、基X<sup>\*</sup>もしくはY<sup>\*</sup>は予め活性化される（別の反応で単離可能な種）。または、活性化はインサイチューで起こる。図11に記載のPEGを参照すると、YおよびY<sup>\*</sup>は同一（同一二元官能基）でも異なって（異質二元官能基）いてもよい。後者の場合、Yはさらに化学的コントロールを行うために保護することができる。未反応のアミノ基をアセチル化、スクシニル化でプロックし、過剰のハイブリダイズしていないDNAを「排除する」中性もしくは陰性に荷電した環境を保つ。負荷レベルは、標準的な分析法で調べることができる。Fieldsらの「固相ペプチド合成の原理および実施（Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis）」（合成ペプチド：ユーザー指針（Synthetic Peptides: A User's Guide） G.Grant, Editor, W.H.Freeman and Co.: New York .p.77-183 (1992)）、これは参考として本明細書に組み入れられる。

20

## 【0106】

シリカをベースとした支持体表面に官能基を付加する一つのアプローチとしては、所望の官能基（例えば、オレフィン、アミノ、ヒドロキシル、アルデヒド、ケト、ハロ、ハロゲン化アシルもしくはカルボキシル）を有する分子、もしくは所望の官能基を含む別の分子Bに結合することのできる分子Aのいずれかでシラン化することがあげられる。前者の場合、ガラスもしくはシリカをベースとした支持体の、例えば、アミノ基による官能基化は、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-アミノプロピルメチルジエトキシシラン、3-アミノプロピルジメチルエトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルメチルジメトキシシラン、N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメトキシシラン、アミノフェニルトリメトキシシラン、4-アミノブチルジメチルメトキシシラン、4-アミノブチルトリエトキシシラン、アミノエチルアミノメチルフェネチルトリメトキシシラン、もしくはその混合物等のアミン化合物で実施する。後者の場合には、分子Aは、好ましくはビニル、アクリレート、メタクリレート、もしくは

30

40

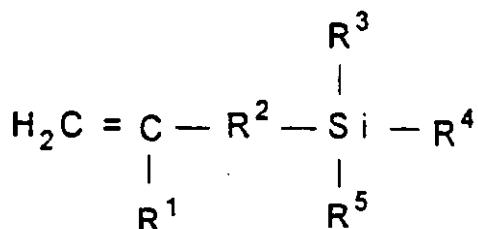
50

アリル等のオレフィン基を含むが、分子Bはオレフィン基および所望の官能基を含む。この場合、分子AおよびBは、互いに重合する。ある場合においては、その性質を修飾するために（例えば、生体適合性を付与するおよび機械的安定性を向上させるために）。シラン化した表面を修飾することが好ましい。これは、分子A、B、およびCを含むポリマーネットワークを得るために、分子Bとともにオレフィン分子Cを添加することによって達成できる。

## 【0107】

分子Aは、以下の化学式で定義される：

## 【化1】



10

式中、R<sup>1</sup>はHもしくはCH<sub>3</sub>である。

R<sup>2</sup>は(C=O)-O-R<sup>6</sup>で、官能置換基を有するもしくは有さない脂肪族基、官能置換基を有するもしくは有さない芳香族基、または官能置換基を有するもしくは有さない脂肪族/芳香族基の混合したものである。

20

R<sup>3</sup>はO-アルキル、アルキルもしくはハロゲン基である。

R<sup>4</sup>は、O-アルキル、アルキルもしくはハロゲン基である。

R<sup>5</sup>はO-アルキル、アルキルもしくはハロゲン基であり、また

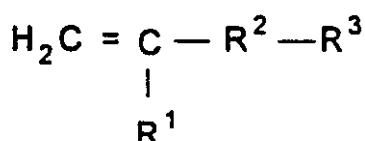
R<sup>6</sup>は、官能置換基を有するもしくは有さない脂肪族基、官能置換基を有するもしくは有さない芳香族基、または官能置換基を有するもしくは有さない脂肪族/芳香族基の混合したものである。分子Aの例は、3-(トリメトキシシリル)プロピルメタクリレート、N-[3-(トリメトキシシリル)プロピル]-N'-(4-ビニルベンジル)エチレンジアミン、トリエトキシビニルシシラン、トリエチルビニルシシラン、ビニルトリクロロシシラン、ビニルトリメトキシシラン、およびビニルトリメチルシシランを含む。

## 【0108】

30

分子Bは、上記の一つもしくは複数の官能基を含むモノマーである。分子Bは、以下の化学式で定義される：

## 【化2】



式中、(i) R<sup>1</sup>はHもしくはCH<sub>3</sub>であり、

R<sup>2</sup>は(C=O)、および

40

R<sup>3</sup>はOHもしくはClである；

または

(ii) R<sup>1</sup>はHもしくはCH<sub>3</sub>、およびR<sup>2</sup>は(C=O)-O-R<sup>4</sup>、官能置換基を有するもしくは有さない脂肪族基、官能置換基を有するもしくは有さない芳香族基、または官能置換基を有するもしくは有さない脂肪族/芳香族基の混合したものである。また、R<sup>3</sup>はOH、COOH、NH<sub>2</sub>、ハロゲン、SH、COC<sub>1</sub>、もしくは活性エステル等の官能基、およびR<sup>4</sup>は官能置換基を有するもしくは有さない脂肪族基、官能置換基を有するもしくは有さない芳香族基、または官能置換基を有するもしくは有さない脂肪族/芳香族基の混合したものである。分子Bの例は、アクリル酸、アクリルアミド、メタクリル酸、ビニル酢酸、4-ビニル安息香酸、イタコン酸、アリルアミン、アリルエチルアミン、4-アミノスチレン、2-アミノエチルメタクリレー

50

ト、塩化アクリロイル、塩化メタクリロイル、クロロスチレン、ジクロロスチレン、4-ヒドロキシスチレン、ヒドロキシメチルスチレン、ビニルベンジルアルコール、アリルアルコール、2-ヒドロキシエチルメタクリラート、もしくはポリ(エチレングリコール)メタクリレートを含む。

#### 【0109】

分子Cは、分子A、分子B、もしくは両方に重合可能な分子であり、選択的に上記の一つもしくは複数の官能基を含む。分子Cは、アクリル酸、メタクリル酸、ビニル酢酸、4-ビニル安息香酸、イタコン酸、アリルアミン、アリルエチルアミン、4-アミノスチレン、2-アミノエチルメタクリレート、塩化アクリロイル、塩化メタクリロイル、クロロスチレン、ジクロロスチレン、4-ヒドロキシスチレン、ヒドロキシメチルスチレン、ビニルベンジルアルコール、アリルアルコール、2-ヒドロキシエチルメタクリラート、ポリ(エチレングリコール)メタクリレート、アクリル酸メチル、メチルメタクリレート、エチルアクリレート、エチルメタクリレート、スチレン、1-ビニルイミダゾール、2-ビニルピリジン、4-ビニルピリジン、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメタクリルアクリレート、N,N'-メチレンジアクリルアミド、N,N'-フェニレンジアクリルアミド、3,5-ビス(アクリロイルアミド)安息香酸、ペンタエリスリトールトリアクリレート、トリメチロールプロパントリメタクリレート、ペンタエリスリトールテトラアクリレート、トリメチロールブロパンエトキシレート(14/3E0/OH)トリアクリレート、トリメチロールプロパンエトキシレート(7/3E0/OH)トリアクリレート、トリエチロールプロパンプロポキシレート(1P0/OH)トリアクリレート、もしくはトリメチロールプロパンプロポキシレート(2P0/PHトリアクリレート)等のモノマーもしくはクロスリンカーであってもよい。  
10

#### 【0110】

通常、官能基は最終的には支持体に結合するオリゴヌクレオチドのための出発点として働く。これらの官能基は、固体支持体に結合する有機基に反応性であるか、またはリンカーもしくはハンドルの利用によってこのような基に反応性となるように修飾することができる。官能基は、支持体にさまざまな所望の性質を付与することができる。

#### 【0111】

支持体を(必要に応じて)官能基化した後、相補的オリゴヌクレオチド捕獲プローブの担体部位として働く活性化された官能基を含むテーラーメイドのポリマーネットワークを支持体に植え込む。従って、このアプローチの利点としては、捕獲プローブの負荷容量を有意に増加させることができ、中間体としての固相対液相の物理的性質が制御しやすくなる。最適化を受けるパラメータは、官能基を含むモノマーの種類と濃度、および用いるクロスリンカーの種類と相対的濃度を含む。  
30

#### 【0112】

リンカー分子は本発明に必要な要素ではないものと理解されるが、官能基化した基質表面は、好ましくはリンカー分子層とともに提供される。作製した基質においてポリマーが基質に暴露された分子と自由に相互作用できるように、リンカー分子は、好ましくは充分な長さのものである。充分に暴露されるように、リンカー分子は、6~50原子の長さであることが必要である。リンカー分子、例えば、アリールアセチレン、2~10モノマーウニットを含むエチレングリコールオリゴマー、ジアミン類、2価酸、アミノ酸類、もしくはその組み合わせである。  
40

#### 【0113】

別の態様においては、リンカー分子をその親水性/疎水性の性質に基づいて選択し、特定の受容体に対する合成ポリマーの提示について改善する。例えば、親水性受容体の場合には、親水性リンカー分子は、受容体が合成ポリマーにより近接して近づくことが可能であることが好ましい。

#### 【0114】

もう一つの別の態様においては、リンカー分子は中間位置に光開裂性の基を有するものとして提供される。光開裂性の基は、保護基とは異なる波長で開裂することが好ましい。これにより、異なる光波長に暴露する方法で合成完了後に、さまざまなポリマーの除去を  
50

可能にする。

【0115】

リンカーモノマーは、炭素と炭素の間の結合で、例えば、(ポリ)トリフルオロクロロエチレン表面を用いて、もしくは、好ましくは、シロキサン結合(例えば、ガラスもしくは酸化シリコン表面を用いて)で基質に結合できる。基質表面とのシロキサン結合は、一様においては、トリクロロシリル基を有するリンカーモノマーの反応によって形成する。リンカーモノマーは、選択的に整列アレイ(すなわち、重合化単層にその頭部が平らに並んだものとして)に結合していてもよい。別の様においては、リンカーモノマーは基質表面に吸着している。

【0116】

しばしば、DNAもしくはPNA合成の出発リンカーモノマーの付加前に、相補的官能基化をPEGスペーサーに導入することが望ましい(G.Baranyらの「固相ペプチド合成のための新規ポリエチレングリコール-ポリスチレン(PEG-PS)グラフト支持体(Novel PolyethyleneGlycol-polyStyrene(PEG-PS)Graft Supports for Solid-phase Peptide Synthesis)」(ed.C.H.Schneider and A.N.Eberle., Leiden, The Netherlands:Escom Science Publishers 267-268 (1993)) ;Zaiipskyらの「固相ペプチド合成のためのポリエチレングリコール-ポリスチレングラフト樹脂支持体の調製および応用(Preparation and Application of PolyethyleneGlycol-polyStyrene Graft Resin Supports for Solid-phase Peptide Synthesis)」(Reactive Polymers 22:243-58 (1994)) ;J.M.Harris, ed.「ポリ(エチレングリコール)の化学:生物技術および生物医学的応用(Poly(EthyleneGlycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications)」((1992)、Plenum Press: New York);これらは参考として本明細書に組み入れられる)。必要に応じて、同様にデキストラン層を導入する(Cassらの「パイロット、新規ペプチドリード最適化技術とその応用-一般的ライプラリー法として、ペプチド-化学、構造および生物学、第13回米国ペプチドシンポジウム(Pilot, A New Peptide Lead Optimization Technique and Its Application as a General Library Method, in Peptides-Chemistry, Structure and Biology: Proceedings of the Thirteenth American Peptide Symposium)」(R.S.Hodges and J.A.Smith, Editor. (1994)、Escom: Leiden, The Netherlands);Lofasらの「リガンドの迅速かつ高効率の共有結合による固定化のための金表面プラズマ共鳴センサー上の新規ハイドロゲルマトリックス(ANovel Hydrogel Matrix on Gold Surface Plasma Resonance Sensors for Fast and Efficient Covalent Immobilization of Ligands)」(J.Chem.Soc., Chem. Commun., pp. 1526-1528 (1990))、これらは参考として本明細書に組み入れられる)。インドール部分で効率的かつ特異的捕獲ができるので、特に好ましいリンカーモノマーは、酸が希釈された(with dilute acid)トリス(アルコキシ)ベンジルカルボニウムイオンである。DNAオリゴヌクレオチドは、アミノ酸のトリプトファン残基で合成しこれを停止することができ、また、トリス(アルコキシ)ベンジルエステル(超感受性酸不安定('HAL'))もしくはトリス(アルコキシ)ベンジルアミド('PAL')リンカーモノマーによる修飾を受けた支持体に効率的に結合することができる(F.Albericio et al., J.Org.Chem. 55:3730-3743 (1990); F.Albericio and G.Barany, Tetrahedron Lett., 32:1015-1018 (1991))、これらは参考として本明細書に組み入れられる)。他の潜在的に迅速な化学は、チオールとプロモアセチルもしくはマレイミド官能基との反応を含む。一つの変法として、アミノ官能基化DNAの末端を無水臭化酢酸で修飾し、プロモアセチル官能基を、支持体上に容易に導入したチオール基で捕獲する。または、プローブの末端にライゲーションしたN-アセチル、S-トリチルシステイン残基は、開裂および脱保護の後に、支持体上のマレイミド基で捕獲できる遊離のチオールを与える。図12に示されるように、化学的に合成したプローブをそのいずれかの末端に伸長させる。さらに提案される化学のバリエーションは容易に理解できる。図12Aは、プローブ上のアミノ基は、無水臭化酢酸で修飾され、プロモアセチル官能基は支持体上のチオール基で捕獲されることを示す。図12Bは、プローブの末端にライゲーションしたN-アセチル、S-トリチルシステイン残基は、開裂および脱保護の後に、支持体上のマレイミド基で捕獲される遊離のチオールを与えることを示す。図12Cは、プローブは希酸によるHAL-修飾固体支持体の処理後に捕獲されるオリゴトリプトファン

10

20

30

40

50

ルのテール (n=1~3) を含むことを示す。

**【0117】**

本発明のアレイを調製するためにDNAオリゴヌクレオチドもしくはPNAオリゴマーを固体支持体に付加させることが必要である。これは、前もって合成されたプローブを付加する、もしくは直接組立ててから支持体に側鎖の脱保護（オリゴマーが遊離しないように）を行うことのいずれかのよって達成する。さらに、支持体の環境としては効率的なハイブリダイゼーションが可能であること等が必要である。このために、2つの要因が存在する。

(1) 支持体材料が充分に親水性である性質（例えば、PEGもしくは炭水化物部分）および  
 (2) 支持体骨格からプローブを隔てる柔軟なリンカーアーム（例えば、酸化ヘキサエチレンもしくはより長いPEG鎖）。多くの表面上「平坦な表面」は分子レベルでは非常に厚いものであることに注意する。最後に、支持体材料が非特異的結合もしくは固有蛍光による有意なバックグラウンドシグナルを与えないことが重要である。  
10

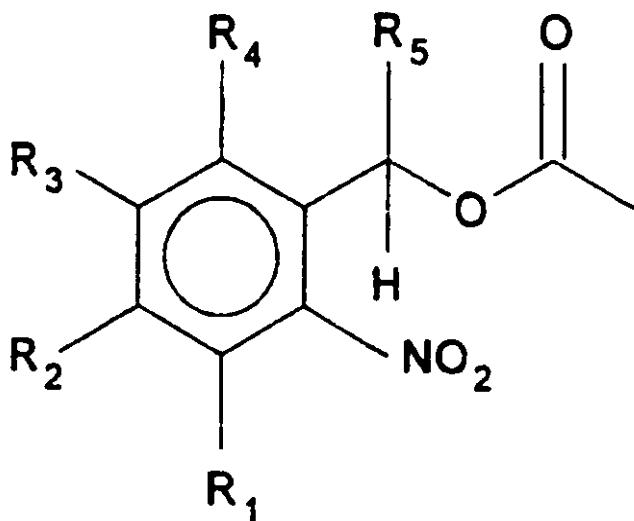
**【0118】**

本明細書において用いられるリンカーモノマーは、保護基を結合した官能基として提供される。好ましくは、保護基は基質と逆側のリンカーモノマーの遠位もしくは末端にある。保護基は、陰性保護基（すなわち、保護基は、リンカーモノマーが暴露されたときのモノマーに対する反応性を弱める）もしくは陽性保護基（すなわち、保護基は、リンカーモノマーが暴露されたときのモノマーに対する反応性を強める）のいずれかである。陰性保護基の場合、別の再活性化段階が必要である。幾つかの態様においては、これは加熱によって行う。  
20

**【0119】**

リンカーモノマーの保護基は、好ましくはo-ニトロベンジル誘導体もしくはベンジルスルフオニル等のニトロ芳香族化合物を含む広く多様な光反応性の陽性基から選択される。好ましい態様においては、6-ニトロベラチルオキシカルボニル（「NVOC」）、2-ニトロベンジルオキシカルボニル（「NBOC」）、ベンジルオキシカルボニル（「BOC」）、フルオレニルメトキシカルボニル（「FMOC」）、もしくは $\alpha$ -ジメチルジメトキシベンジルオキシカルボニル（「DDZ」）が用いられる。ある態様においては、ニトロ基に対してオルソのベンジル水素を含むニトロ芳香族化合物が用いられる。すなわち、次の式で表される化学物質である：

**【化3】**



式中、R1はアルコキシ、アルキル、ハロ、アリール、アルケニル、もしくは水素；R2はアルコキシ、アルキル、ハロ、アリール、ニトロ、もしくは水素；R3はアルコキシ、アルキル、ハロ、ニトロ、アリール、もしくは水素；R4はアルコキシ、アルキル、水素、アリー

50

ル、ハロ、もしくはニトロ; およびR5はアルキル、アルキニル、シアノ、アルコキシ、水素、ハロ、アリール、もしくはアルケニルである。用いられる他の物質としては、o-ヒドロキシ- -メチルシナモイル誘導体があげられる。光除去性の保護基は、例えば、Patchomik、J.Am.Chem.Soc. 92:6333 (1970) およびAmitらJ.Org.Chem. 39:192 (1974) に記載されており、両方とも参考として本明細書に組み入れられる。

#### 【0120】

別の態様においては、陽性の反応基は溶液中の試薬との反応において活性化される。例えば、カルボニルに結合した場合には、5-プロモ-7-ニトロインドリン基は420nmの光に暴露することによって反応が起こる。

#### 【0121】

第2の別の態様においては、リンカー分子の反応基はシナメート基を含む広く多様な陰性の光反応基から選択される。

#### 【0122】

または、反応基は電子線リソグラフィー、X線リソグラフィー、もしくはその他の照射法によって活性化もしくは不活性化される。電子線リソグラフィーに好ましい反応基はスルフォニル基である。用いられる他の方法は、例えば、電流源への暴露を含む。その他の反応基および活性化法が、本開示の図に示されている。

#### 【0123】

結合分子は、好ましくは、例えば、半導体工業で既知であり、例えば、SzeのVLSITechnology、McGraw-Hill (1983)、およびMeadらのIntroductiontoVLSISystems、Addison-Wesley (1980)、(これらは、すべての目的において参考として本明細書に組み入れられる)に記載のタイプの光リソグラフィー技術を用いた好ましいマスク法で光に暴露する。保護基の除去に必要な光の波長に対し透過性である基質であれば、保護基を含む表面もしくは基質の背面のいずれかに光を当てる。

#### 【0124】

マスクは、ある態様においては、不透明材料の層で選択的にでコートされた透明な支持体材料である。不透明材料部分は、基質表面上の所望の精密パターンにおける不透明材料を残し、除去される。マスクを基質表面と直接接触させる。マスクの「開口部」は、基質から光除去性の保護基を除去することが好ましい基質上の位置に対応する。並列マークを用い、その前のパターン化段階の順次マスクを正確に重層する通常の並列化技術を用いて、もしくはより洗練された技術を用いて並列化を行う。例えば、Flandersら「新規干渉並列化技術 (ANewInterferometricAlignmentTechnique)」(App.Phys.Lett. 31:426-428 (1977)) (これは参考として本明細書に組み入れられる)に記載のもの等の干渉技術が用いられる。

#### 【0125】

基質に当てた光のコントラストを向上させるためには、幾つかの態様に従ってコントラストを亢進する材料をマスクおよび基質の間に入れることが好ましい。このようなコントラストを亢進する層は、キノンジアザイドもしくは目的波長で一過的に漂白される材料等の光で分解される分子を含み得る。材料の一過的漂白によって、光を当てる場所での浸透がより大きくなり、従ってコントラストが亢進する。または、コントラストの亢進は被覆ファイバーオプティックス束によっても得られる。

#### 【0126】

光は、通常の白熱光源、レーザー、レーザーダイオード等に由来するものであってもよい。非平行光源を用いる場合には、基質上に光が広がるのを防ぐ厚い、もしくは多重層のマスクを用いることが好ましい。さらに、幾つかの態様においては、合成を制御するために異なる波長に感應する基を利用することができる。例えば、異なる波長に感應する基を用いて、ポリマー合成もしくは特定のマスキング段階を省くように分枝位置を選択することも可能である。

#### 【0127】

または、基質は変調レーザーもしくはダイオード光源下で変換される。このような技術

10

20

30

40

50

は、例えば、Feyrerらの米国特許第4,719,615号に記載され、参照として本明細書に組み入れられる。別の態様においては、レーザー・ガルバノメトリック・スキャナーを利用する。別の態様においては、通常の液晶（本明細書において「光バルブ」と称する）またはファイバーオプティックによる光源上もしくは接触して合成がおこる。適当に調整した液晶によって、光を選択的に制御し、光が選択された基質領域に接触できるようにする。または、光が選択的にあたる一連の光ファイバーの端で合成が起こる。光に当てる位置をコントロールする他の手段については、当業者であれば、理解できる。

## 【0128】

ペプチド合成のリンカーおよびハンドルの開発は、Fieldsらの「固相ペプチド合成の原理および実際（Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis）」Synthetic Peptides: A User's Guide, G. Grant, Editor, W.H. Freeman and Co.: New York, p. 77-183 (1992); G. Barany らの「固相ペプチド合成のためのハンドルおよび支持体における最近の進歩」、ペプチド-化学・構造および生物学、第13回米国ペプチドシンポジウム、R.S. Hodges and J.A. Smith, Editor, Escom Science Publishers: Leiden, The Netherlands pp. 1078-80 (1994) に記載されており、これらは参考として本明細書に組み入れられる。この技術は容易にDNAおよびPNAに利用可能である。PALの開発 (Albericio ら「穏和な条件におけるC末端ペプチドアミドの固相合成のための5-(4-(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)アミノメチル-3,5-ジメトキシフェノキシ)吉草酸 (PAL) ハンドルの調製および応用 (Preparation and Application of the 5-(4-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)Aminomethyl-3,5-Dimethoxyphenoxy)Valeric Acid (PAL) Handle for the Solid-phase Synthesis of C-terminal Peptide Amides under Mild Conditions)」J. Org. Chem. 55: 3730-3743 (1990); これは参考として本明細書に組み入れられる; およびエステル (HAL) (Albericio ら、「保護ペプチドセグメントの固相合成のための超感受性酸不安定 (HAL) トリス (アルコキシ) ベンジルエステルのアンカーリング (Hypersensitive Acid-labile (HAL) Tris(alkoxy)Benzyl Ester Anchoring for Solid-phase Synthesis of Protected Peptide Segments)」Tetrahedron Lett., 32: 1015-1018 (1991); これは参考として本明細書に組み入れられる; C末端のペプチドアミド、および所謂セグメント濃縮法の構築単位として用いることのできる保護されたペプチド酸をそれぞれ与える酸による開裂で生じる結合は、特に興味深い。PALもしくはHAL結合の開裂から酸において生じた安定化カルボニウムイオンは、トリプトファンルペプチドによって停止することができる。この反応はペプチド合成には好ましくはなく、適当なスランベンジャーの使用によってこれを（部分的には）防ぐことができるが、HAL修飾表面でオリゴTrp末端標識DNAおよびPNA分子を化学的に捕獲する有益な応用法がある。

## 【0129】

オリゴヌクレオチドアレイを作製する複数のアプローチが当技術分野で知られている。Southern ら「オリゴヌクレオチド配列のアレイに対するハイブリダイゼーションによる核酸配列の分析・比較: 実験モデルを用いた評価 (Analyzing and Comparing Nucleic Acid Sequences by Hybridization onto Arrays of Oligonucleotides: Evaluation using Experimental Models)」Genomics, 13: 1008-1017 (1992); Fodor ら「生物学的チップを用いた多重バイオケミカルアッセイ (Multiplexed Biochemical Assays with Biological Chips)」、Nature, 364: 555-556 (1993); Khrapko ら「オリゴヌクレオチドマトリックスでのハイブリダイゼーションによるDNAシーケンシングの方法 (A Method for DNA Sequencing by Hybridization with Oligonucleotide Matrix)」、J. DNA Seq. Map., 1: 375-388 (1991); Van Ness ら「オリゴデオキシヌクレオチドプローブをベースにしたハイブリダイゼーションアッセイのための多目的固体支持体システム (A Versatile Solid Support System for Oligodeoxynucleotide Probe-based Hybridization Assays)」、Nucleic Acids Res., 19: 3345-3350 (1991); Zhang ら「膜結合性修飾オリゴヌクレオチドを用いる癌および遺伝病の単一塩基変異分析 (Single-base Mutational Analysis of Cancer and Genetic Diseases Using Membrane Bound Modified Oligonucleotides)」、Nucleic Acids Res., 19: 3929-3933 (1991); K. Beattie、「ゲノセンサー研究における進歩 (Advances in Genosensor Research)」、Clin. Chem., 41 (5): 700-06 (1995) は参考として本明細書に組み入れられる。これらのアプローチは3つのカテゴリーに分類される

10

20

30

40

50

。(1)標準的<sup>10</sup>方法によるオリゴヌクレオチド合成および空間的アレイにおける、ある時間でのそれらの結合、(2)短いオリゴヌクレオチド合成を可能とするシリコンチップの光リソグラフィーによるマスキングおよび光化学的脱保護、(Fodorら 生物学的チップを用いた多重バイオケミカルアッセイ (Multiplexed Biochemical Assays with Biological Chips) )、Nature.364:555-556 (1993) およびR.J.Lipshutzら「遺伝的多様性に対するオリゴヌクレオチドプローブアッセイの利用 (Using Oligonucleotide Probe Arrays To Assess Genetic Diversity)」、Biotechniques. 19:442-447 (1995) 、これは参照として本明細書に組み入れられる);および(3)未マスク部位における単一塩基の添加による短いオリゴヌクレオチド合成を可能とする物理的マスキング (Southernら「オリゴヌクレオチド配列のアレイに対するハイブリダイゼーションによる核酸配列の分析・比較:実験モデルを用いた評価 (Analyzing and Comparing Nucleic Acid Sequences by Hybridization onto Arrays of Oligonucleotides: Evaluation using Experimental Models)」Genomics.13:1008-1017 (1992); Maskosら「ガラス支持体上で合成した大型アレイを用いたオリゴヌクレオチド再会合の研究 (A Study of Oligonucleotide Reassociation Using Large Arrays of Oligonucleotides Synthesized on Glass Support)」、Nucleic Acids Res.. 21:4663-4669 (1993) 、は参照として本明細書に組み入れられる)。

#### 【0130】

オリゴヌクレオチドアレイの構築に関してはかなりの進歩が見られ、あるものは独立の256のアドレスを含むが、ハイブリダイゼーションで特異的DNA配列を検出することにおいてはこれらの方法はあまり好適ではない。特に、より長いオリゴヌクレオチドを含むアレイは、現在のところ、一度に一箇所のアドレスに付加することによってしか合成されないので、潜在的サイズにおいて制限を受ける。現行法では、オリゴヌクレオチドを順次付加するには約1時間かかる。従って、1,000アドレスのアレイでは、調製に24時間通じて行つたとしても40日以上を要する。8merから10merの短いオリゴヌクレオチドを含むアレイは、産業上の応用には適さない。なぜならば、単一塩基の違いを効果的に検出するためにより長い分子が必要となるからである。<sup>20</sup>

#### 【0131】

これら従来の方法も、本発明の検出法のオリゴヌクレオチドアレイを有する該支持体を調製するために依然として有用である。しかしながら、より好ましいアプローチがある。<sup>30</sup>

#### 【0132】

相対的に小さいが、明確に区別される部位のオリゴヌクレオチドもしくはPNAオリゴマー負荷に好ましい支持体を調製することが望ましい。現在の市販の蛍光撮影装置では、50平方μmのピクセル当たり3アトモル程度の低いシグナルを検出することができる。従って、合理的なアドレスもしくはアレイ上の「スポット」は、約4×4ピクセル、もしくは200平方μmである。より小さいアドレスはCCDで検出することができる。このようなアドレスの検出限界は「スポット」当たり約48アトモルであり、これは蛍光DNAシークエンシング装置を用いたときの100アトモルの検出限界に匹敵する。200平方μm当たり負荷することのできるオリゴヌクレオチドの容量は、潜在的なシグナル対雑音比の指標を与える。20フェムトモルは約400:1のシグナル対雑音比を与えるが、200フェムトモルは約4000:1の良好なシグナル対雑音比を可能とする。オリゴヌクレオチドもしくはPNAオリゴマーは、ハイブリダイゼーションを容易にするために、柔軟な「リンクアーム」および固体支持体の「外側」もしくは「表面」上に存在する必要がある。支持体は、非蛍光性であり、ハイブリダイゼーションを阻害することなく、また非特異的結合による高バックグラウンドシグナルを与えることのないものであることが必要である。<sup>40</sup>

#### 【0133】

固体支持体上の相補的捕獲オリゴヌクレオチドアドレスは、DNAもしくはPNAのいずれかである。PNAによる捕獲は、DNAによる捕獲より好適である。何故ならば、PNA/DNAデュプレックスはDNA/DNAデュプレックスよりも約1/塩基対強いからである。M.Egholmら「ワトソン・クリックの水素結合の規則に従って相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするPNA (PNA Hybridizes to Complementary Oligonucleotides Obeying the Watson-Crick Hydro

10

20

30

40

50

gen-bondingRules)」、Nature.365:566-568 (1993) は参照として本明細書に組み入れられる。従って、 $T_m=72$  である24merのDNA/DNA二重鎖は、「予測される」 $T_m = 96$  を有する一方がPNAである二重鎖に対応する（実際の融解点は、上記の「経験則」より僅かに低く、融解点が80 を越えるとより不正確になる）。さらに、DNA/DNAとPNA/DNAとの融解の差は、低塩でさらに低くなる。

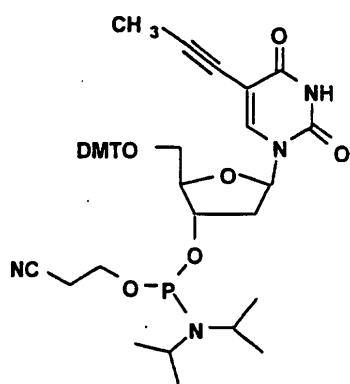
## 【0134】

DNA/DNAデュプレックスの融解温度は、 $[4n(G*C) + 2m(A*T)]$  で見積もることができます。オリゴヌクレオチド捕獲は、形成したデュプレックスと互いにハイブリダイズする相補的位置特定可能なアレイ特異的部分との間のG\*C/A\*T含量の差より生じる $T_m$ 差を狭めることによって、捕獲オリゴヌクレオチドを最適化できる。チミンの代わりに5-プロピニル-dUを用いることでDNAデュプレックスの $T_m$ を、平均置換当たり1.7 増加させることができます。Froehler ら「2'-デオキシウリジンおよび2'-デオキシシチジンのC-5プロピン類縁体を含むオリゴヌクレオチド (Oligonucleotides Containing C-5 Propyne Analogs of 2'-deoxyuridine and 2'-deoxycytidine)」、TetrahedronLett., 33:5307-5310 (1992) およびJ. Sagi らの TetrahedronLetters. 34:2191 (1993) は参照として本明細書に組み入れられる。捕獲スキームにおける同一置換は、デュプレックス等の成分間の $T_m$ 差を低め、全デュプレックスの $T_m$ を上げることが必要である。以下の構造を有するS-プロピニル-dUのホスホアミダイト誘導体は、直ぐ上のFroehlerおよびSagiの文献に従って調製できる。これらは、参考として本明細書に組み入れられる。

## 【化4】

10

20

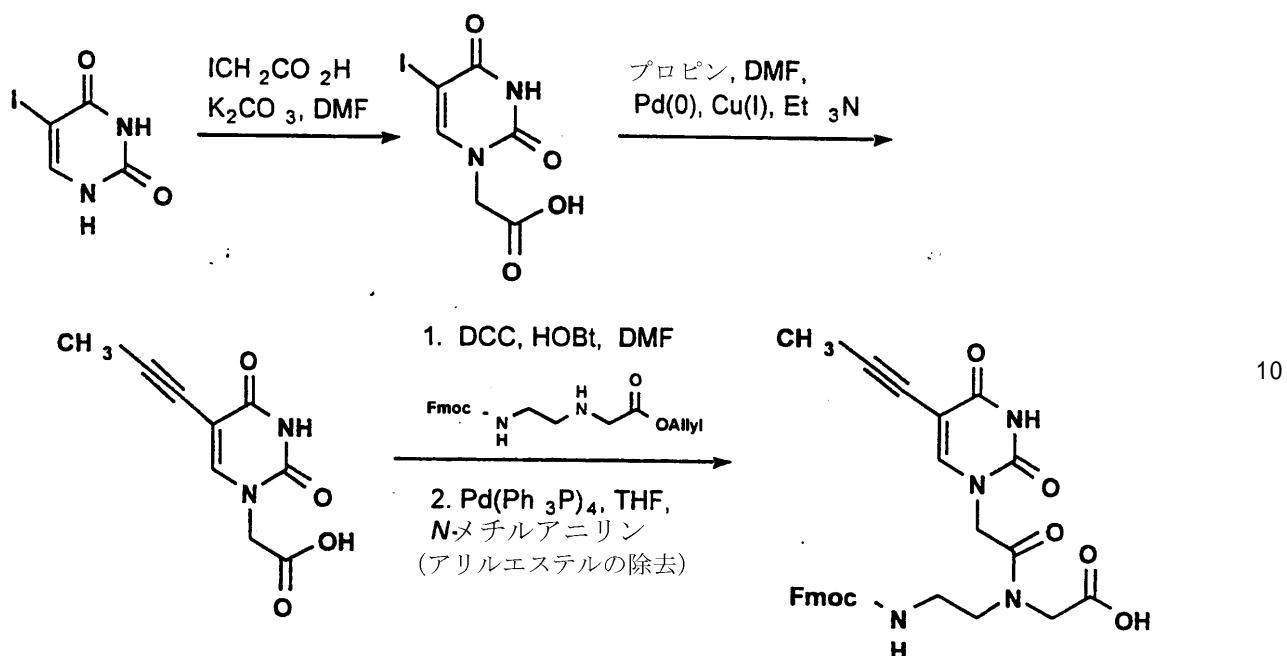


30

## 【0135】

Fmocアミノ保護基を有する5-プロピニルウラシルPNAモノマーは、以下の合成で得られる（ここで、DMFはN,N'-ジメチルホルムアミド、DCCはN,N'-ジクロロヘキシリカルボジイミド、HOEtは1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、およびTHFはテトラヒドロフランである）：

## 【化5】



## 【0136】

Egholmら「ペプチド核酸(PNA)。アキラル性のペプチド骨格を有するオリゴヌクレオチド類縁体(PeptideNucleicAcids(PNA).OligonucleotideAnalogueswithanAchiralPeptideBackbone)」、J.Am.Chem.Soc.、114:1895-1897(1992)及びEgholmら「シトシンとチミンを含むペプチド核酸(PNA)によるDNA中のグアニンとアデニンの認識(RecognitionofGuanineandAdenineinDNAbyCytosineandThymineContainingPeptideNucleicAcids(PNA))」、J.Am.Chem.Soc.、114:9677-9678(1992)に記載の方法を用いて、これらは参考として本明細書に組み入れられる。上記の合成スキームには、5'-プロピニルウラシル塩基の成分を有するPNAモノマーの調製を示している。5'-ヨードウラシルは、まずヨード酢酸でアルキル化し、次にプロピニル基をPd/Cu触媒で塩基部分にライゲーションする。スキームの残余の段階は上記の参考文献による方法に従う。これらモノマーを合成DNAおよびPNA鎖に組み込むことができる。

## 【0137】

アレイ合成の一般的な好ましいアプローチには2つある。第1のアプローチにおいては、完全長のDNAオリゴヌクレオチドもしくはPNAオリゴマーを調製し、次に共有結合で、固体支持体もしくはメンブレンと結合する。第2のアプローチでは、支持体に多量体を順に付加し、特異的に設計したPNAオリゴマーもしくはDNAオリゴヌクレオチドを構築する。これらの多量体を、固体支持体もしくはメンブレン表面に列もしくは行に特異的付加する。得られた「チエッカーボード」パターンが完全長のPNAもしくはDNAの単一の位置特定可能なアレイを生成する。

## 【0138】

図14～図16に完全長のDNAオリゴヌクレオチドもしくはPNAオリゴマーの調製、次に、結鎖固体支持体への完全長の分子への結合に関する異なる方法を示す。

## 【0139】

図14A～Eには、個々の完全長オリゴヌクレオチドをグリッドの適当な位置にカップリングさせることによるDNAもしくはPNAオリゴヌクレオチドアレイ構築法を示す。図14Aのアレイは、アレイ表面の200 μm × 200 μmの16の領域にオリゴヌクレオチドが結合して生成したオリゴヌクレオチドのパターンを示す。各々個々の200 μm × 200 μmの領域は、表面に結合した単一の配列を含むDNAもしくはPNAを含む。個々の四角形の領域は、隣接した四角形から200 μm離れている。従って、図14Aのアレイは、3mm × 3mmの領域に64(8 × 8)の異なるオリゴヌクレオチドを支持する。アレイの構築を多重化するために、800 μmの距離離れている16の四角形に、同時に特異的オリゴヌクレオチドを結合させた。したがって、図14B-14Eに示されるように、8 × 8グリッドをたった4段階で構築できる。これらの図において

20

30

40

50

、黒い四角形は、本合成段階における異なる位置を表すが、斜線の四角は、それ以前の段階で合成した領域を表す。最初の段階(図14B)では、同時にAI、EI、I1、MI、A5、E5、I5、M5、A9、E9、I9、M9、A13、E13、I13、およびM13の位置でオリゴヌクレオチドを固定化する。次の段階(図14C)では、装置を再並列させ列Cを開始する。行1が完了した後、次の段階(図14D)では行3を開始する。最後に、 $8 \times 8$ グリッドを完成させるために最後の16オリゴヌクレオチドを固定化する(図14E)。従って、 $8 \times 8$ アレイの構築を、64個の個々のスポットティング反応段階で行う代わりに4合成段階に減らすことができる。この方法は、容易に拡張でき、同時に96オリゴマーのスポットティングが可能である装置を用いて、迅速により大きなアレイを構築できる。

## 【0140】

10

図15A～Eは、図14に記載のアレイの構築法の透視図を表す。図15A～Eにおいては、4つの異なる24merをスポットティング可能である装置を用いた $4 \times 4$ (16)アレイの構築が同時に描かれている。第1に、図15Aに示されるように、装置で、AI、EI、A5、およびE5の位置で4つのオリゴマーを結合させる。次に、図15Bで示すように、装置を水平に移動させて、4つのオリゴマーをC1、G1、C5、およびG5の位置で結合させる、次に、図15Cで示すように、装置の位置調整をし、A3、E3、A7、およびE7の位置で4つのオリゴマーを結合させる。最後に、図15Dに示されるように、装置で残余の4オリゴマーをC3、G3、C7、およびG7の位置で結合させる。図15Eの透視図に示されるように、完成したアレイは、16の24merを含む。

## 【0141】

20

図16A～Cには、図14に示されるアレイグリッドGの異なる位置に同時に16の異なるオリゴヌクレオチドのカップリングが可能である添加装置2の図を示す。上面図の黒い四角形(図16A)は、互いに空間的に $600 \mu\text{m}$ 離れた16個の $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ の領域を表す。該装置には、異なるオリゴヌクレオチドを含むチューブでアレイ上の上記の異なる位置の漏斗形のチェンバーを満たすことが可能な16個の入力ポートがある。装置の側面図(それぞれ図16Aのライン16B-16Bおよび16C-16Cを含む図16B～C)は漏斗形のチェンバー4が装置下のアレイ上の適当な領域に並列していることを示す。さらに、2つのバルブ6および8(図16A～Cの斜線の四角形)は、独立した16個の反応チェンバーにおいて液体の流れを制御する。一つのバルブ6は入力ポート10からの流体の流入を制御し、反応チェンバー4への添加と除去を行うために、もう一方のバルブ8は減圧ライン12にライゲーションする。装置はまずアレイの適当な $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ 領域にわたって並列する。次に、全装置がアレイに確実な加圧を行い、上記各々の位置で密閉反応チェンバーを形成する。アレイ上の各々の位置の周りに存在する $10 \mu\text{m}$ の隆起堤Rによって、オリゴマーがアレイ上の隣接領域に漏れることを防ぐ密着シールの形成を確保する。次に、減圧ライン12へのバルブ8を開け、溶液流入ポート10のバルブ10を閉める。これによって反応チェンバー4から空気を除去し、チェンバー内を陰圧にする。次に、減圧ライン12へのバルブ8を閉め、溶液流入ポート10のバルブ10を開ける。陰圧により、溶液が反応チェンバーに流れ込む。この段階では、反応チェンバー4内の気泡形成の可能性を確実に除き、 $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ の領域におけるオリゴヌクレオチドの分布を確実にする。オリゴヌクレオチドを活性化アレイ表面に結合させた後、入力バルブ6を閉め、減圧ライン12へのバルブ8を開ける。過剰な溶液を反応チェンバーから完全に除去するために装置をアレイ表面から持ち上げる。今度は第2の装置を再並列させ、次にアレイ上の16個の位置の合成をおこなう。

## 【0142】

30

図15～図26には、順に支持体にPNAもしくはDNA多量体を添加することにより、固体支持体上にPNAオリゴマーもしくはDNAオリゴヌクレオチドを構築するための異なる方法を示す。

## 【0143】

40

多量体によるアレイ構築の例として、このような構築を四量体で達成することができる。4塩基を四量体として配置する可能な265( $4^4$ )通りの方法のうち、単一の配列を有する36通りのものが選択される。選択された四量体の各々が、他のすべてのものと少なくとも

50

2塩基異なり、2つの二量体で互いに相補的なものはない。さらに、自己対合もしくはアドレス間のヘアピン形成を起こす四量体は除かれている。

【0144】

最終的な四量体は、表1のリストに示してあり、任意に1~36までの番号付けを行った。必要となることもある24mer捕獲オリゴヌクレオチドアドレスの配列の設計モジュールとして、この四量体の単一セットを用いる。段階的に（1度に1塩基）、もしくは同時（四量体構築単位）合成法で、この構造を組み立てる。四量体の多くの他のセットは、上記の規則に従って設計される。このセグメント・アプローチは四量体のみに限定されるものではなく、他のユニット、すなわち、二量体、三量体、五量体、もしくは六量体でも用いることができる。

【0145】

【表1】

互いに少なくとも2塩基異なる四量体PNA配列および相補的DNA配列のリスト

番号	配列 (N-C)	相補鎖 (5'-3')	G + C
1.	TCTG	CAGA	2
2.	TGTC	GACA	2
3.	TCCC	GGGA	3
4.	TGCG	CGCA	3
5.	TCGT	ACGA	2
6.	TTGA	TCAA	1
7.	TGAT	ATCA	1
8.	TTAG	CTAA	1
9.	CTTG	CAAG	2
10.	CGTT	AACG	2
11.	CTCA	TGAG	2
12.	CACG	CGTG	3
13.	CTGT	ACAG	2
14.	CAGC	GCTG	3
15.	CCAT	ATGG	2
16.	CGAA	TTCG	2
17.	GCTT	AAGC	2
18.	GGTA	TACC	2
19.	GTCT	AGAC	2
20.	GACC	GGTC	3
21.	GAGT	ACTC	2
22.	GTGC	GCAC	3
23.	GCAA	TTGC	2
24.	GGAC	GTCC	3
25.	AGTG	CACT	2
26.	AATC	GATT	1
27.	ACCT	AGGT	2
28.	ATCG	CGAT	2
29.	ACGG	CCGT	3
30.	AGGA	TCCT	2
31.	ATAC	GTAT	1
32.	AAAG	CTTT	1
33.	CCTA	TAGG	2
34.	GATG	CATC	2
35.	AGCC	GGCT	3
36.	TACA	TGTA	1

四量体の番号付けスキームでは、各々のアドレスが6つの数字で略称されることに注目すること（例えば、下記の表2第2列）。36の四量体単一セットで設計された24merアドレスの概念（表1）から、可能な構造は膨大な数となる（ $36^6=2,176,782,336$ ）。

【0 1 4 6】

図17には、少なくとも2塩基互いに異なる36の四量体で多数の可能な設計のうちの1つを示す。チェッカーボード・パターンは、256の可能な全四量体を示す。四角形は、チェッカーボードにおける左の最初の2塩基とそれに続く上部の2塩基を表す。各々の四量体は少なくとも互いに2塩基異なる必要があり、非相補的である必要がある。四量体を白いボックスで示し、その相補鎖を（番号）としてリストに載せた。従って、このスキームにおいて

10

20

30

40

50

て、相補的配列GACC ( 20 ) およびGGTC ( 20' ) はお互いに排除的である。さらに、四量体は、非回文構造的でなくてはならない、例えば、TCGA ( 黒い対角線のボックス ) 、および非繰り返しでなくてはならない、例えば、CACA ( 黒い対角線のボックス、上部の左から下部右 ) 。36の四量体とは、僅か1塩基しか異ならないその他の配列はいずれも、明るい灰色で斜線付けされている。4つの潜在的四量体 ( 白いボックス ) は、すべてがA\*TもしくはすべてがG\*Cである塩基のいずれかであるために選択されなかった。しかしながら、下記に示されるように、A\*T塩基のT<sub>m</sub>値をほぼG\*C塩基のレベルに上げることは可能である。従って、すべてがA\*TもしくはすべてがG\*C塩基である四量体 ( 白ボックス中のものを含む ) は、潜在的に四量体設計用いることができる。さらに、捕獲オリゴヌクレオチドアドレスの配列内で、およびオリゴヌクレオチドプローブの位置特定可能なアレイ特異的部分であれば、チミンは5-プロピニルウリジンで置換できる。これにより、A\*T塩基対のT<sub>m</sub>は約1.7增加する。従って、個々の四量体のT<sub>m</sub>値は、約15.1 から15.7 となるはずである。完全長24merのT<sub>m</sub>値は95 以上となるはずである。

## 【 0 1 4 7 】

この概念を例示する目的で、36の四量体配列のうちで6つからなるサブセットを用いて、アレイ:1=TGCG;2=ATCG;3=CAGC;4=GGTA;5=GACC;および6=ACCTを構築した。所望の24merの位置特定可能なアレイ特異的部分および24merの相補的捕獲オリゴヌクレオチドのアドレス配列設計モジュールとして、この単一の四量体セットを用いることができる。この様は、5つの位置特定可能なアレイ特異的部分（表2のリストに載せた配列）の合成を含む。四量体の番号付けスキームで、各々の部位の略称（「Zip#」と称する）が6つの数字で示されている（「zipコード」と称する）ことに注目すること。

## 【 0 1 4 8 】

## 【表 2 】

5つのDNA/PNAオリゴヌクレオチドアドレス配列の全リスト

Zip #	Zip コード	配列 (5' → 3' 又は NH <sub>2</sub> → COOH)	G+C
Zip11	1-4-3-6-6-1	TGCG-GGTA-CAGC-ACCT-ACCT-TGCG ( 配列番号 : 1 )	15
Zip12	2-4-4-6-1-1	ATCG-GGTA-GGTA-ACCT-TGCG-TGCG ( 配列番号 : 2 )	14
Zip13	3-4-5-6-2-1	CAGC-GGTA-GACC-ACCT-ATCG-TGCG ( 配列番号 : 3 )	15
Zip14	4-4-6-6-3-1	GGTA-GGTA-ACCT-ACCT-CAGC-TGCG ( 配列番号 : 4 )	14
Zip15	5-4-1-6-4-1	GACC-GGTA-TGCG-ACCT-GGTA-TGCG ( 配列番号 : 5 )	15

これらのオリゴマーは各々、5'末端に酸化ヘキサエチレン・リンカーアーム ( P.Grossman ら Nucl.AcidsRes. 、22:4527-4534 ( 1994 ) は参照として本明細書に組み入れられる ) 、およびスライドグラス表面への結合に好適である最終的なアミノ官能基、もしくは別の物質を含む。結合方法は、フリーの表面官能基に依存する ( Y.Zhang ら、 NucleicAcidsRes. 、19:3929-3933 ( 1991 ) および Z.Guo ら、 NucleicAcidsRes. 、34:5456-5465 ( 1994 ) は参考として本明細書に組み入れられる ) 。

## 【 0 1 4 9 】

合成オリゴヌクレオチド ( 正常および相補的方向、捕獲ハイブリダイゼーションもしくはハイブリダイゼーション/ライゲーションのいずれか ) は、天然の塩基もしくはヌクレオチド類似体のいずれかを有するDNAもしくはPNAのいずれかとして調製する。このような類似体は完全な相補性で天然の塩基と対をなすが、T<sub>m</sub>値は増加する ( 例えば、5-プロピニルウラシル ) 。

## 【 0 1 5 0 】

捕獲オリゴヌクレオチドは各々、配列が大きく差なり、交叉反応性の機会を最小にする

10

20

30

40

50

。図17および表1を参照のこと。段階的に合成を行い、塩基を1つ1つ導入するのではなく、保護されたPNA四量体を構築単位として用いることができる。これらは簡単に調製できる。対応する保護されたオリゴヌクレオチド中間体は、ヌクレオチド間のリン酸結合を附加的に保護する必要がある。所与の任意のアドレスにおいて、24merの構築は、6つの合成段階のみを必要とし、段階的合成と比較して全体的な収率の改善を伴う。このアプローチは、全体として配列表面にモノマーを1つ1つ付加する際におこる支持体上の誤った配列の存在を排除する。従って、従来技術との違いは、擬似シグナルの可能性の減少である。さらに、各々のアドレスにおける誤った配列は、より短いものであり、少なくとも4塩基少ないので、これらが正しいハイブリダイゼーションの阻害を起こすリスクはない。このことは「キャッシング」段階は必要ではないことを意味する。

10

#### 【0151】

下記の説明のように、マスキング技術によって、同時に複数のアドレスを構築することが可能となる。アレイ製造段階の直接の結果として、さらに複数の利点に気づく。各々の24merのアドレスは直ぐ近傍の24merとは3つの四量体もしくは少なくとも6塩基分異なる。低塩では、PNA/DNAハイブリッドにおける各々の塩基のミスマッチによって、融解温度が8

低下する。従って、正しいPNA/DNAハイブリダイゼーションのT<sub>m</sub>は、不正確なハイブリダイゼーションよりも少なくとも48℃高くなる。また、隣接した24merは、12mer離れており、これはいずれともハイブリダイズせず、検出プロフィールの「デッド」ゾーンを表している。PNAアドレスは、丈夫で再利用可能なアレイを与える。

#### 【0152】

20

以下の記載では、36の単一PNA四量体の調製について開示し、アレイの機械的/化学的調製方法を示す。この技術を用い、PNA24merの25アドレスを有する5×5アレイを作製することができる。または、36の四量体すべてを組み込んで、1,296アドレスからなる完全サイズのアレイを作製することができる。

#### 【0153】

図18A-Gは、PNA四量体を付加して単一24merアドレスの5×5アレイの作製を示す模式図である。製造装置では、マルチチェンバー装置もしくは表面を90°回転させて、列もしくは行のいずれかにPNA四量体を付加することができる。円形のマニホールドによって四量体付加の円形状による交換が可能となる。従って、複雑な単一アドレスを、単純なアルゴリズムを用いて組み立てることができる。最初の四量体付加においては、PNA四量体1、2、3、4、および5は、それぞれ図18Aに示されるように、5列の各々の表面に結合する。図18Bに示されるように、チェンバーを90°回転させた後、PNA四量体6、5、4、3、および2を隣接した行に添加する。図18Cに示されるように、第3の段階では、四量体3、4、5、6、および1（円形状交換であることに注意）を列に添加する。第4の段階では、図18Dに示されるように、四量体2、1、6、5、および4を隣接した行に添加する、等々。この段階を、下記の図23E～Gに示す方法で継続する。図の下部は、各々位置における単一24merを生成する四量体配列を表す。真ん中の行の配列は、1-4-3-6-6-1;2-4-4-6-1-1;3-4-5-6-2-1;4-4-6-6-3および5-4-1-6-4-1は完全長で表2に示す。円形状交換による四量体の付加を用いて、より大きなアレイを生成する。四量体付加は、円形状パターンに制限されるものではなく、他の多数の組み合わせで付加し、少なくとも3つの四量体が互いに異なり、少なくとも6塩基に変換される単一アドレスを形成することができる。

30

#### 【0154】

40

本発明は、対立遺伝子特異的PCR、ディファレンシャルハイブリダイゼーションもしくはシークエンシング・バイ・ハイブリダイゼーションを利用する既存の変異検出法より特異性が高い。これらの方法は、ハイブリダイゼーションのみに頼って、他は同一の2つのオリゴヌクレオチドにおける単一塩基の違いを識別する。このようなハイブリダイゼーションのシグナル対雑音比は、アレイにおける最も密接に関連した2つの捕獲オリゴヌクレオチドで達成可能のものよりも顕著に低い。3つの行および3つの列に別の四量体を付加することによって各々のアドレスを設計するので、与えられたアドレスは隣接したものから少なくとも3つの四量体が異なる。各々の四量体は少なくとも2塩基他の四量体のいずれもと

50

異なるので、与えられたアドレスは少なくとも6塩基別のアドレスと異なる。しかしながら、実際には、ほとんどのアドレスが、かなり多くの塩基について他のほとんどのアドレスと異なる。

#### 【 0 1 5 5 】

この概念を2つのアドレスZip12およびZip14を用いて下記に例示する。これら2つのアドレスは、図18および図20（下記）に模式図的に表した25アドレスの中で最も関連している。これらの2つのアドレスは、それぞれ異なる位置（下線で示す）で共通の四量体を有する。

Zip 12 (2-4-4-6-1-1) = 24 mer

5' - ATCG GGTA GGTA ACCT TGCG TGCG-3' ( 配列番号 : 6)

Zip 14 (4-4-6-6-3-1) = 24 mer

5' - GGTA GGTA ACCT ACCT CAGC TGCG-3' ( 配列番号 : 7)

10

#### 【 0 1 5 6 】

さらに、それらは共通に1つながりの12ヌクレオチド、および共通の最後4ヌクレオチドを含む（下線で示す）。

Zip 12 (2-4-4-6-1-1) = 24 mer

5' - ATCG GGTA GGTA ACCT TGCG TGCG-3' ( 配列番号 : 8)

20

Zip 14 (4-4-6-6-3-1) = 24 mer

5' - GGTA GGTA ACCT ACCT CAGC TGCG-3' ( 配列番号 : 9)

#### 【 0 1 5 7 】

それぞれは、オリゴヌクレオチド間で少なくとも8つの差異を含む。下線付けされたヌクレオチドにおいてZip12もしくはZip14に相補的なオリゴヌクレオチドを、より低い温度で（例えば、37℃）これらのアドレスの両方にハイブリダイズさせことができるが、完全に相補的なオリゴヌクレオチドのみが高い温度で（例えば、70℃）ハイブリダイズする。

#### 【 0 1 5 8 】

さらに、Zip3等の他の捕獲オリゴヌクレオチドについては、共通ヌクレオチド数はさらに低い（下線で示す）。

Zip 12 (2-4-4-6-1-1) = 24 mer

5' - ATCG GGTA GGTA ACCT TGCG TGCG-3' ( 配列番号 : 10)

30

Zip 3 (3-6-5-2-2-3) = 24 mer

5' - CAGC ACCT GACC ATCG ATCG CAGC-3' ( 配列番号 : 11)

#### 【 0 1 5 9 】

したがって、ハイブリダイゼーション中にZip3からZip12を識別する能力は、既存の方法を用いて達成可能なものよりも有意に高い。

40

#### 【 0 1 6 0 】

列もしくは行のいずれかにPNA四量体を送る前に、異なるチェンバーと壁（各々200μm厚）を有するマルチチェンバー装置を、図19Aの修飾ガラスもしくはシリコン表面に押しつける。表面は10μmの隆起を生ずる（黒い線）ようにエッティングされ、チェンバー間の漏れを防止する。最初、アレイ表面に柔軟なスペーサー（リンカー）を結合させる。第1の段階では、図19Bに示されるように、PNA四量体、1、2、3、4、および5はそれぞれ、各々5つの列の表面に結合する。次に、マルチチェンバー装置を90°回転する。図19Cに示されるように、四量体6、5、4、3、および2を隣接した行に付加する。24merのPNAオリゴマーを合成するために、該段階を合計3回繰り返す。与えられた行もしくは列内で各々の完成

50

した24merは単一のPNA配列を表し、従って所望の位置特定可能なアレイを得ることができる。より小さいオリゴヌクレオチド配列は、同一方向に3回の合成を行って得られるハーフサイズの12merを表す。各々の24merは隣接したものとは3つの四量体が異なり、各々の四量体は、他のものとは少なくとも2塩基異なるので、各々の24merは隣とは少なくとも6塩基異なる（すなわち、25%のヌクレオチドの違い）。従って、間違ったアドレスではその24塩基において6ミスマッチを有し、したがって、特に75~80 のハイブリダイゼーション条件下では間違ったアドレスには捕獲されないのである。さらに、特定のより小さな12mer配列は、グリッド上のいずれかの位置の24mer配列内に見出されるが、位置特定可能なアレイ特異的部分は50 以上 の温度では12mer配列にハイブリダイズしないのである。

## 【0161】

10

出発表面は遊離アミノ基を含み、非開裂性アミド結合を支持体のPNAのC末端にライゲーションし、PNA鎖がそのアドレスに保持されるようにセグメント濃縮アセンブリーを完了し直交側鎖脱保護する必要がある。200 μmの空間と200 μmバリヤーを含む単純マスキング装置は、異なった列（図20A）において、5つの四量体の各々が固体支持体に結合できるように設計される。第1の四量体セットの付加後に、マスキング装置を90°回転し、第2の5つの四量体のセットを付加する（図20B）。これは行に付加した後に列に付加することと比較することができる。行および列の交点は、さらに付加を含み、同様に、各々の交点は、単一配列の8merを含む。この手順で合計6サイクル繰り返すことによって、単一の24merを含む25の四角形、および共通12merを含む残余の四角形が生成する（図20Cおよび21A~F）。シリコンもしくはガラス表面は、緊密なシールを確実にするために、10 μmの隆起を含み、真空中でチェンバーを満たす。円形のマニホールド（図26）により、5つの行（もしくは列）に送達する前に6つの四量体の円形状交換が可能となる。この設計によって、幾つかの配列が隣接した配列の同一の3つの四量体を含む場合であっても、常に少なくとも3つの四量体が互いに異なる単一の24merが生成する。このマスキング装置は、アレイがモノマーに対し四量体で作られることを除けば、概念的にはSouthernら、Genomics 13:1008-1017 (1992) およびMaskosら、NucleicAcidsRes. 21:2267-2268 (1993) (参照として本明細書に組み入れられる) に開示されるマスキング技術と同様である。

## 【0162】

20

または、各々の位置を分離するマスクを用いて、不完全な12mer配列の產生を防止する。第1段階（図19Dに記載の）では、PNA四量体1、2、3、4、および5は、それぞれ、5つの列の各々において表面に結合させる。次に、マルチチェンバー装置を90°回転させる。図19Eに示すように、四量体6、5、4、3、および2を隣接した行に付加する。24merのPNAオリゴマーを合成するために、この段階を合計3回繰り返す。与えられた行および列内の各々の完成した24merは、単一のPNA配列を表し、従って位置特定可能なアレイを得ることができる。さらに、各々の24merは、PNAオリゴマーを結合していない200 μm領域で隣接したオリゴマーから分離されている。

## 【0163】

30

シリコンもしくはガラス表面は光化学的にチエッカーボード・パターンにおいて10 μmの隆起の直交グリッドを生ずるようにエッティングする（図20を参照のこと）。四角形（200 μm × 200 μm）を一つおきに活性化し、C<sub>18</sub>アルキル・スペーサーおよびPEG親水性リンカー（MW400~4,000）の付加を可能にすると、側面において少なくとも1つの空の四角形および2つの隆起で隔てられようになる。

## 【0164】

40

PNA四量体を用いた通常のアレイの例が得られる。1回につき36の列もしくは行のいずれかに36の異なる四量体を付加する。いずれかの四量体をいずれかの行に付加するもっとも単純な方法は、小型バルブにチューブをつないで、36の全四量体溶液を唯一の開口部を有する円形のマニホールドへ結合させることである。円形のマニホールドの反対側は、個々の行（もしくは列）に通じる36の小型バルブのいずれかに結合する。従って、マニホールドおよび小型バルブをチェンバー（行）の方へ回転させて、1度につきいずれかの四量体をポンプでいずれかの行に送ることができる。これは、物理的回転を必要とする機械装置でもよ

50

く、もしくは一連の流入（四量体）および流出（行）チャネルと電子マイクロバルブを用いて達成することもできる。この段階は非常に迅速で（次の使用のためのマニホールドのすすぎを含め5秒）あり、36行すべてに付加するのに約 $36 \times 5 = 180$ 秒かかる。

#### 【0165】

行もしくは列を充填する潜在的にさらに迅速な方法は、同時にすべてを充填することである。これを、 $5 \times 5$ アレイに関し図20に例示する。シリコンもしくはガラス表面は、緊密なシールを確実にするために、 $10 \mu\text{m}$ の隆起を含み、上記の真空技術を用いてチェンバーを満たす。円形のマニホールドにより、5つの行（もしくは列）に送達する前に6つの四量体の円形状交換が可能となる。図20においては、第1の段階は5、4、3、2、1である。マルチチェンバー装置を回転させて、順方向で、もしくは逆方向のいずれかで添加を継続することができる。この例においては、2、3、4、5、6の順方向で第2の段階を行う。第3の段階では、円形状交換（リバース）1、6、5、4、3で行う。第4の段階では、（フォワード）4、5、6、1、2である。第5の段階では（リバース）4、3、2、1、6である。第6の段階では（フォワード）5、6、1、2、3である。これは、36の四量体を36の行（もしくは列）に拡張することができる。このアプローチでは、アドレスの作製に関して、あらゆる位置で $36^6 = 2,176,782,336$ から单一位置で $36^6 = 2,176,782,336$ であるアレイの潜在的なバリエーションを第1のアドレスで定められる1,295位置に制限する。これは必要な異なるアドレス数を大幅に上回る。さらに、各々のアドレスはあらゆる他アドレスと少なくとも6ヌクレオチド異なる。

#### 【0166】

複数のシリコンチップは同一ウェーハー上に作製できるので、これらのアレイいずれもが群として生産されることに注目されたい。与えられた行もしくは列に同一四量体を添加する必要があるので、このことは四量体の概念では特によく当てはまる。従って、1つの行で10のアレイ・ラインをカバーし、ゆえに1回に $10 \times 10$ グリッド=100アレイが作製される。

#### 【0167】

または、図20を参照として記載される段階を実施し、1サイクル減らして20merオリゴヌクレオチドを作製することができる。捕獲オリゴヌクレオチドは、選択されたハイブリダイゼーション条件下で相補的位置特定可能なアレイ特異的部分を捕獲するのに充分長なくてはならない。

#### 【0168】

図21A～Fは、位置特定可能なアレイの合成（説明文）模式的断面図を示す。図21Aは、柔軟なスペーサー（リンカー）のアレイ表面への付加を示す。図21Bは、第1行のオリゴヌクレオチド四量体の合成を示す。第1の行のみが、四量体1を含み、可視的である。マルチチェンバー装置を配置し、各々が異なる四量体を含む付加的な行は、第1の行の後に位置する。図21Cは、第1列のオリゴヌクレオチド四量体の合成を示す。マルチチェンバー装置もしくは表面は90°回転されている。四量体9、18、7、および12を隣接チェンバーに添加する。図21Dは、オリゴヌクレオチド行の第2ラウンドの合成を示す。第1行は、四量体2を含む。図21Eはオリゴヌクレオチド合成の第2ラウンドの合成を示す。四量体34、11、14、および23を第2ラウンドで隣接したチェンバーに添加する。図21Fは、PNA行の第3ラウンドの合成を示す。第1行は四量体16、7、20、および29を付加する四量体3を含む。与えられた行もしくは列内の24merの全オリゴヌクレオチドは単一で、従って位置特定可能なアレイを得ることができることに注目されたい。各々の24merは隣接したものとは3つの四量体分異なるので、四量体は少なくとも2塩基互いに異なるので、各々の24merは少なくとも6塩基分異なる。各々のミスマッチは有意にTmを下げ、24塩基における6ミスマッチの存在によって35でのクロスハイブリダイゼーションが起こらないようにする。より小さい12merの配列は互いに同一であるが、24mer配列とは共通では全くないことに注目されたい。特定の12mer配列がグリッド上のいずれかの位置の24mer内に見出される場合でも、例えば17-1-2-3-28-5、オリゴヌクレオチドは、50以上の温度で12merにハイブリダイズしない。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 6 9 】

図22A～Cには、図19～21に記載のアレイグリッドGの構築が可能であるマスキング装置2の設計を示す。図22Aは、装置2およびアレイグリッドGの配置の上面図であり、側面図22B～22Cは、それぞれ、図22Aのライン22B-22Bおよびライン22C-22Cを含む。マスキング装置は200 μmの空間および200 μmのバリアーを含み、5つの四量体の各々を異なった行の固体支持体に結合させることができるとなる。第1の四量体セットの添加後、マスキング装置を90°回転し、第2の5つの四量体セットを添加する。これは行に付加した後に列に付加することと比較することができる。行および列の交点は、さらに付加を含み、同様に、各々の交点は、単一配列の8merを含む。この手順で合計6サイクル繰り返すことによって、単一24merを含む空間的に分離した25の四角形、および共通の12merを含む残りの四角形を生成する。シリコンもしくはガラス表面は、緊密なシールを確実にするために、10 μmの隆起Rを含み、チェンバー内を陰圧にするためにチェンバー4を減圧ライン12への開口バルブ8を用いて満たす。緊密シールを形成するためにマルチチェンバー装置をメンブレンもしくは活性化した固体表面に押しつける。1つのチェンバーが隣のチェンバーと相互汚染することを避けるために、バリアーをゴムもしくはその他の材料で被覆した。メンブレンもしくは支持体表面が溶解剤によって適切に濡らされていることを確かめることも必要である。減圧ライン12へのバルブ8を閉じ、次に表面の活性化を行い、脱保護し、開口バルブ6でライン10を通じて四量体をチェンバー4に加える。チェンバーを乾かし、メンブレンを90°回転し、再び固定する。四量体の第2ラウンドでは、上記の真空および四量体添加段階で、添加を行う。バルブのブロック組立物（図25A～C）により、適当な行に各々の四量体を送達する。または、円筒形のマニホールド（図26A～D）では、5つの行（または、列）への送達の前に、6つの四量体の円形状交換を可能にする。幾つかの配列が隣接した配列に同一の3つの四量体を含む場合であっても、この設計で常に少なくとも3つの四量体分互いに異なっている単一の24merが生成する。

## 【 0 1 7 0 】

図23A～Cは、図19（図19D～19E）に記載されるアレイ構築法の透視図を表す。第1の段階では、図23Aに示されるように、PNA四量体1、2、3、4、および5は、それぞれ、5つの列各々の表面に結合している。列の5つの位置各々は隔てられており、オリゴヌクレオチドが結合していないものの間で200 μmのギャップがある。次に、図23Bに示されるように、マルチチェンバー装置を90°回転する。四量体6、5、4、3および2は、隣接した列で添加する。行の5つの位置の各々は隔てられており、オリゴヌクレオチドが結合していないものの間で200 μmのギャップがある。図23Cに示されるように、完成した各々の24merは、与えられた行および列内で単一のPNA配列を表す。図19～22に示される設計とは異なり、分離した位置のマスクを用いるため、このアレイの設計では各々完全な24mer間にハーフサイズの12merを含まない。

## 【 0 1 7 1 】

図24A～Cは、図23に記載のアレイグリッドGの構築が可能であるマスキング装置2の設計を示す。図24Aは装置2およびアレイグリッドGの配置の上面図であり、側面図24Bおよび24Cは、それぞれ、図24Aのライン24B-24Bおよびライン24C-24Cを含む。マスキング装置は200 μmの空間及び200 μmのバリアーを含み、5つの四量体の各々をアレイグリッドG上の異なった位置の固体支持体に結合させることができるとなる。第1の四量体セットの添加後、マスキング装置もしくは表面を90°回転し、第2の5つの四量体セットを添加する。この手順で合計6サイクル繰り返すことによって、単一24merを含む空間的に分離した25の四角形、および共通の12merを含む残りの四角形を生成する。シリコンもしくはガラス表面は、緊密なシールを確実にするために、10 μmの隆起Rを含み、チェンバー2内を陰圧にするためにチェンバー4を真空を用いて開始する方法によって満たす。この真空は、減圧ライン12へのバルブ8を開口することによって得られる。緊密シールを形成するためにマルチチェンバー装置をメンブレンもしくは活性化した固体表面に押しつける。1つのチェンバーが隣のチェンバーと相互汚染することを避けるために、バリアーをゴムもしくはその他の材料で被覆する。メンブレンもしくは支持体表面が溶解剤によって適切に濡らされているこ

10

20

30

40

50

とを確かめることも必要である。減圧ライン12へのバルブ8を閉じ、次に表面の活性化を行い、脱保護し、開口バルブ6でライン10を通じて四量体をチェンバー4に加える。チェンバーを乾かし、メンブレンを90°回転し、再び固定する。四量体の第2ラウンドでは、上記の真空および四量体添加段階で、添加を行う。バルブのブロック組立物（図25A～C）により、適当な行に各々の四量体を送達する。または、円筒形のマニホールド（図26A～D）では、5つの行（または、列）への送達の前に、6つの四量体の円形状交換を可能にする。この設計で常に少なくとも如何なるオリゴヌクレオチドも存在しない領域で互いに隔てられた単一の24merが生成する。

#### 【0172】

図25A～Cには、共通のチェンバー18によって6つの入力ポート10が5つの出力ポート16とライゲーションしているバルブブロック組立物14を示す。6つの入力ポート10および5つの出力ポート16の各々は、それぞれ、液体の流れを制御するバルブ6およびバルブ20を含む。6つの入力チューブ10は異なる溶液を含み、バルブのブロック組立物14は、一回につき5つの出力ポート16の一つへの入力液体のいずれか1つの送液が可能である。入力ポート10の1つのバルブ6および出力ポート16のバルブ20の1つを同時に開口し、チェンバー18を液体で満たし、開口バルブ20にライゲーションした出力ポート16に排出させることのよって、これを達成することができる。バルブブロック組立物14は、バルブ24および8によって、それぞれ、溶媒22のソースおよび真空12のソースにライゲーションし、送液間において中心チェンバー18のクリーニングを行う。溶媒をチェンバー18に満たし、真空を用いて、全液体をチェンバーから除去する。これによって、次の送液段階で液体の相互汚染を防ぐようにチェンバー18を準備する。

#### 【0173】

図26A～Dには、入力液体の異なる6本のチューブを異なる5本の出力チューブに送る円筒形のマニホールド組立物114を示す。マニホールドそれ自体は、それぞれの半分がそれを軸に独立に回転する共通の中心スパーク134でつながった分離した2つの半分114Aと114Bを含む。下部の114Bは、それを穿孔する6つのチャネル130を有する円筒形ブロックである（図26Bのライン26C-26Cを含む図26Bの下面図である図26Cを参照のこと）。6つのチャネル130の各々は、6つの異なる入力チューブ110に結合している。入力チューブ110は、バルブ124を有するバルブ108および溶媒ライン122を有する減圧ライン112に至るバルブ136を有するライン138を通じて試薬、溶媒、もしくは真空のいずれかに至る入力チャネル130にライゲーションしたバルブ106を含む。これにより、異なる液体がマニホールドのチャネル130および132に入り、送液間で過剰液体を含むチャネル130および132を洗浄することが可能となる。マニホールド上部（図26Bのライン26A-26Aを含む図26Bの上面図である図26Aを参照のこと）も、それを穿孔する5つのチャネル132を有する円筒形のブロックである。5つのチャネル132は、各々異なる出力チューブ116にライゲーションする。マニホールドの2つの半分114Aと114Bは独立に回転することができ、異なる入力チャネル130は、異なる出力チャネル132へとライゲーションする。これにより、入力液体の6つのチューブが同時に、5つの出力チューブへと移送することを可能にする。各々の入力ポート110を出力ポート116と並列させるために、マニホールドの下部半分の114Bは、60°回転する。このようにして、各々入力ポート110を出力ポート116のいずれかと並列させることができる。図26A～Dの円形のマニホールドは、入力ポートを出力ポートに接続する5つのチャネルを有しているので、前者が同時に6つの入力液体のうちの5つを5つの出力ポートへ送液可能であることにおいて、図26A～Cのバルブブロック組立物とは異なる。この概念は、36の四量体を同時に36の位置へ送達することに、容易に拡張できる。

#### 【0174】

本発明は、先行技術のシステムに比べ数々の利点を含む。

#### 【0175】

本発明のDNAアレイを含む固体支持体によって、ライゲーション産物の配列をアレイ上の特異的位置にハイブリダイゼーションさせて、捕獲された標識が発するシグナルの位置が配列の存在を示すようにすることによって、配列を検出する。特異的多重LDR産物のハ

10

20

30

40

50

イスループット検出のために、位置特定可能なアレイ特異的部分は、固体支持体上の設計したアドレスに各々のLDR産物を導く。他のDNAチップアプローチでは、溶液対表面のハイブリダイゼーションにおける、融解温度の微妙な差で密接に関連した配列の識別を試みるが、本発明では、溶液をベースとしたLDR反応において、ハイブリダイゼーション前に、所望の特異性を達成する。従って、本発明では、互いに非常に異なる配列を有する捕獲オリゴヌクレオチドのアレイの設計を可能にする。各々のLDR産物は単一の位置特定可能なアレイ特異的部分を有し、これは固体支持体上の特異的アドレスで捕獲オリゴヌクレオチドにより選択的に捕獲される。固体支持体上の相補的捕獲オリゴヌクレオチドが修飾DNAもしくはPNAのいずれかであれば、LDR産物はより高い温度でも捕獲することができる。このことはハイブリダイゼーション時間の短縮および非特異的結合の減少等の付加的な利点をもたらす。その結果、シグナル対雑音比が改善される。

## 【0176】

本発明の別の利点は、緊密なクラスターを成す変異、単一塩基の変化、および短い反複ならびに欠失の検出がPCR/LDRによって可能であることである。これらは、対立遺伝子特異的PCRもしくはハイブリダイゼーションによる検出法では不可能である。

## 【0177】

本発明に従えば、DNA合成の誤りによる偽ハイブリダイゼーションシグナルを避けることができる。不正確なアドレスに対するハイブリダイゼーションTm値と大きく異なるように、アドレスを設計することができる。対照的に、直接ハイブリダイゼーションのアプローチは微妙な差に依存する。本発明では、DNA合成の誤り、バンドの広がり、もしくはバンドの偽の移動のいずれかにより生じるゲル電気泳動もしくはキャピラリー電気泳動の誤ったデータ読み取りの問題をも排除する。

## 【0178】

ライゲーション産物の存在を検出するための捕獲オリゴヌクレオチドの使用により、ディファレンシャルハイブリダイゼーションを用いてオリゴヌクレオチドにおける単一塩基の違いを検出する必要性を排除する。対立遺伝子特異的PCR、ディファレンシャルハイブリダイゼーションもしくはシークエンシング・バイ・ハイブリダイゼーション法等に基づく当先行技術分野における他の既存の方法では、新しく解析する配列の各々に対し個々に最適化されたハイブリダイゼーション条件が必要となる。複数の変異を同時に検出しようとするときには、ハイブリダイゼーション条件の最適化は困難もしくは不可能となる。対照的に、本発明は、標的配列に非依存性でかつ均一なハイブリダイゼーション条件下で、特異性の高い正しいシグナルを検出する一般的な方法である。本発明は、当先行技術分野の範囲内で現在利用可能な方法によるよりも有意に高い忠実度で、異なるオリゴヌクレオチド配列間における差を識別する、柔軟な方法をもたらす。

## 【0179】

本発明のアレイは汎用性であり、癌の変異、遺伝性の（生殖系列）変異、およびおよび感染性疾患の検出に有用である。さらなる利点としては、アレイの再使用が可能であり、試料当たりのコストが削減される。

## 【0180】

本発明は、また、オリゴヌクレオチドの合成および支持体への結合において柔軟性が高い。オリゴヌクレオチドは、支持体とは別に合成し、次に支持体上の特有の表面に結合できる。中間体の骨格保護（例えば、PNA）を必要としないオリゴヌクレオチドの多量体セグメントを合成し、固体支持体上に結合させることができる。他の利点は、これらの合成アプローチを捕獲オリゴヌクレオチドのアドレスの設計に組みこめることである。このような固体支持体の生産は、自動生産が可能であり、人間の関与の必要性およびその結果おこる汚染の懸念を回避することができる。

## 【0181】

本発明のアレイの重要な利点は、以前に結合した捕獲オリゴヌクレオチドと共に再使用可能のことである。このように再使用できるように固体支持体を調製するためには、捕獲されたオリゴヌクレオチドを固体支持体に結合する結合成分を除去することなしに、捕獲

10

20

30

40

50

されたオリゴヌクレオチドを除去する必要がある。この課題を達成するために、多様な方法を用いることができる。例えば、固体支持体を95～100℃で蒸留水中で処理する、室温で0.01N\_NaOHに曝す、90～95℃で50%ジメチルホルムアミドと接触させる、もしくは90～95℃で50%ホルムアミドにより処理することができる。通常、この方法を用い、約5分以内に捕獲されたオリゴヌクレオチド除去できる。これらの条件は、DNA-DNAハイブリダイゼーションを破壊するのに適切なものである。DNA-PNAハイブリダイゼーションでは他の破壊条件が必要となる。

## 【0182】

以下の実施例により本発明を説明するが、これらの実施例にのみ限定されるものではない。

10

## 【0183】

## 実施例

実施例1 - 捕獲オリゴヌクレオチドの固体支持体への固定化

固定化のための固体支持体は、ガラス、特に顕微鏡スライドであった。空間的位置特定可能なアレイにおける、ガラス（例えば、顕微鏡スライド）、又はシリコン（例えば、チップ）、メンブレン（例えば、ナイロン・メンブレン）、ビーズ（例えば、常磁性ビーズもしくはアガロース・ビーズ）、もしくはプラスチック支持体（例えば、ポリエチレン・シート）のようなその他の支持体への捕獲オリゴヌクレオチドの固定化は、5つの段階からなる。

## 【0184】

20

## A. 支持体のシラン化

シラン化試薬は、3-アミノプロピルトリエトキシシラン（「APTS」）であった。又は、3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン（K.L.Beattieら、「ゲノセンサー研究の進歩（Advances in Genosensor Research）」, Clin.Chem., 41:700-706(1995); U.Maskosら、「ガラス支持体におけるオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション：オリゴヌクレオチド合成のための新規なリンカー及びインサイチューで合成されたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション特性（Oligonucleotide Hybridizations on Glass Supports:a Novel Linker for Oligonucleotide Synthesis and Hybridization Properties of Oligonucleotides Synthesized in situ）」, Nucleic Acids Res., 20:1679-1684(1992); C.F.Mandeniusら、「偏光解析法及びその他の関連技術において使用するための生物学的分子のシリコン表面へのカップリング（Coupling of Biomolecules to Silicon Surfaces for Use in Ellipsometry and Other Related Techniques）」, Methods Enzymol., 388-394頁(1988)（参照として本明細書に組み込まれる））又は3-(トリメトキシシリル)プロピルメタクリレート（M.Gladら、「ポリシロキサンでコーティングされた多孔性シリカにおける分子インプリントング及び酵素捕獲のためのシランモノマーの使用（Use of Silane Monomers for Molecular Imprinting and Enzyme Entrapment in Polysiloxane-coated Porous Silica）」, J.Chromatogr.347:11-23(1985); E.Hedborgら、「電解効果装置と組み合わされた分子プリンティングされたポリマー・メンブレンの研究（Some Studies of Molecularly-imprinted Polymer Membranes in Combination with Field-effect Devices）」, Sensors and Actuators A 37-38:796-799(1993); 及びM.Kempeら、「酵素リボヌクレアーゼAを使用した表面インプリントング法（An Approach Towards Surface Imprinting Using the Enzyme Ribonuclease A）」, J.Mol.Recogn.8:35-39(1995)（参照として本明細書に組み込まれる））も、初期シラン化試薬として使用されうる。シラン化の前に、支持体を清浄化し、支持体の表面を疎水性にした。ガラススライド（Fisher Scientific, Extra thick microslides, frosted cat.#12-550-11）を、濃NH<sub>4</sub>OH水-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O（1:1:5, v/v/v）中で80℃で5分間インキュベートし、蒸留水で灌いだ。次いで、文献に記載されたようにして（C.F.Mandeniusら、「偏光解析法及びその他の関連技術において使用するための生物学的分子のシリコン表面へのカップリング（Coupling of Biomolecules to Silicon Surfaces for Use in Ellipsometry and Other Related Techniques）」, Methods Enzymol., 388-394頁(1988); Grahamら、「ファイバー・オプティック・エバネッセント波バイオセンサ

30

40

50

ーにおける遺伝子プローブ・アッセイ (Gene Probe Assay on a Fibre-Optic Evanescent Wave Biosensor)」, Biosensors & Bioelectronics, 7:487-493(1992); Jonssonら, 「よく特徴決定されたシリカ表面におけるフィブロネクチンの吸収挙動 (Adsorption Behavior of Fibronectin on Well Characterized Silica Surfaces)」, J. Colloid Interface Sci., 90:148-163(1982) (参照として本明細書に組み込まれる) )、支持体を蒸留水、エタノール、及びアセトンで洗浄した。2% (v/v) 3-アミノプロピルトリエトキシシラン (Sigma, St. Louis, MO) を含む無水アセトン (99.7%) 溶液中で、室温で、一夜、支持体をシラン化した (Z.Guoら, 「ガラス支持体上のオリゴヌクレオチドアレイとのハイブリダイゼーションによる遺伝子多型の直接蛍光分析 (Direct Fluorescence Analysis of Genetic Polymorphisms by Hybridization with Oligonucleotide Arrays on Glass Supports)」, Nucl. Acids Res., 22:5456-65(1994) (参照として本明細書に組み込まれる) )。次いで、支持体を無水アセトンで十分に洗浄し、真空デシケーターで80°で乾燥させた。

#### 【0185】

B. 官能基 (例えば、カルボキシル基又はアミノ基) によるシラン化固体支持体の誘導体化  
シラン化試薬がAPTSである場合には、所望のアミノ官能性が直接導入された。官能基 (例えば、重合可能アクリレートで表面を官能化するための3-(トリメトキシシリル)プロピルメタクリレート (M.Gladら, 「ポリシロキサンでコーティングされた多孔性シリカにおける分子インプリントング及び酵素捕獲のためのシランモノマーの使用 (Use of Silane Monomers Imprinting and Enzyme Entrapment in Polysiloxane-coated Porous Silica)」, J.Chromatogr. 347:11-23(1985); E.Hedborgら, 「電解効果装置と組み合わされた分子プリンティングされたポリマー・メンブレンの研究 (Some Studies of Molecularly-imprinted Polymer Membranes in Combination with Field-effect Devices)」, Sensors and Actuators A 37-38:796-799(1993); 及びM.Kempeら, 「酵素リボヌクレアーゼAを使用した表面インプリントング法 (An Approach Towards Surface Imprinting Using the Enzyme Ribonuclease A)」, J.Mol.Recogn. 8:35-39(1995) (参照として本明細書に組み込まれる) ) を既に含有している適当なシラン化試薬プライマーを選択することにより、又はアミノ官能表面を所望の官能基を含有している試薬と反応させることにより (例えば、写真石版術において使用される保護されたアミノ基の局所的な光による光脱保護 (Fodorら, 「光による空間的位置特定可能なパラレル化学合成 (Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis)」, Science, 251:767-773(1991); Fodorら, 「生物学的チップを用いた複合生化学的アッセイ (Multiplexed Biochemical Assays with Biological Chips)」, Nature, 364:555-556(1993) (参照として本明細書に組み込まれる) の後)、その他の官能基を導入することもできる。

#### 【0186】

#### C. 官能基の活性化

固体支持体上の官能基はアミノ基であった。直径1mm、3.25mm間隔のドットの5×5アレイを有する組立て式マスクを使用して、1~2%トリエチルアミン (生成する酸を除去するため) を補足された、70mg/mlアジピン酸ジスクシニミジルエステル (Hillら, 「タンパク質の二官能クロスリンク試薬としてのジスクシニミジルエステル (Disuccinimidyl Esters as Bifunctional Crosslinking Reagents for Proteins)」, FEBS Lett, 102:282-286(1979); Hortonら, 「Covalent Immobilization of Proteins by Techniques which Permit Subsequent Release」, Methods Enzymol., 130-141(1987) 頁 (参照として本明細書に組み込まれる) ) を含有する無水ジメチルホルムアミド (「DMF」) 溶液を、少量 (典型的には0.2~1.0 μl)、ギルソン (Gilson) P-10ピペットを使用して手動で固体支持体に適用した。適用後、フード内で、室温で、30分間、反応を進行させ、その後、再びアジピン酸ジスクシニミジルエステルを適用した。計1時間の反応時間の後、支持体を無水DMFで洗浄し、真空デシケーター内で室温で乾燥させた。

#### 【0187】

官能基がカルボキシル基である場合には、固体支持体を1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸 (「EDC」) と反応させることができる (Frankら, 「分

10

20

30

40

50

節固体支持体としてのセルロースペーパーディスク上での連続流動条件下での同時複合ペプチド合成 (Simultaneous Multiple Peptide Synthesis Under Continuous Flow Conditions on Cellulose Paper Discs as Segmental Solid Support) , Tetrahedron, 44:6031-6040(1988) (参照として本明細書に組み込まれる) )。この反応の前に、0.1N HClで簡単に処理することにより、固体支持体の表面をプロトン化した。前記の組立て式マスクを使用して、1M EDC (Sigma, St. Louis, MO) 、1mM 5'アミノ修飾オリゴヌクレオチド、及び20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=8.3) を含有する新鮮な溶液を、少量 (典型的には0.2~1.0 μl) 、手動で固体支持体に適用した。反応を1時間進行させ、その後、支持体を蒸留水で洗浄し、真空デシケーター内で室温で乾燥させた。

## 【0188】

10

D. 予め活性化された固体支持体へのアミノ官能化捕獲オリゴヌクレオチドのカップリング  
EDCで活性化された固体支持体以外の支持体の場合には、やはり前記の組立て式マスクを使用して、1nmol / μlの5'アミノ修飾オリゴヌクレオチド (即ち、表2の配列) を含む20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH8.3) を、少量 (0.2~1.0 μl) 、活性化された支持体へ適用した。反応を室温で1時間進行させた。

## 【0189】

E. 固体支持体上の残存反応基の不活性化

反応生成物が、非捕獲プローブ依存的に固体支持体上に非特異的に捕獲されるのを防止するため、相補的オリゴヌクレオチドプローブの捕獲後、固体支持体の表面上の残存反応基を不活性化せることが必要である場合がある。この点に関して、支持体を、0.1N水酸化ナトリウム中で、室温で、5分間インキュベートした。又は、0.2Mリジン (pH=9.0) 中で不活性化を実施することもできる。不活性化後、支持体表面を中和するため、0.1Nリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) で支持体を洗浄した。蒸留水での最後の洗浄後、支持体を乾燥させ、真空デシケーター内で室温で保存した。

## 【0190】

20

実施例2-アッセイシステムの設計

GeneAmp In Situ PCR System 1000 (登録商標) (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA) (G.J.Nuovo, PCR in situ Hybridization, New York:Raven Press(第2版、1994年) (参照として本明細書に組み込まれる) )を使用して、ハイスループット式に、ハイブリダイゼーションを試験し、続いて捕獲されたオリゴヌクレオチドプローブ捕獲オリゴヌクレオチドハイブリッドを洗浄するための、半自動カスタム設計アッセイシステムを作成した。システムの概略フローチャートが、図27に示されている。システムは、試料担荷装置及び多重ポートシステムを介して、一連の液体槽、そして廃液槽と接続されたフロースルー・ハイブリダイゼーションチャンバーからなっている。液体輸送は、ポンプにより調節される。ポンプを、組立てラインの末端に設置し、システムの漏出及び汚染を防止するための軽度の真空を維持する条件下で作動させた。ハイブリダイゼーションチャンバー及び液体槽は、GeneAmp In Situ PCR System 1000 (登録商標) 内で正確に調和するよう設計されていたため、アッセイのハイブリダイゼーション段階及び洗浄段階の間、温度は正確に調節され維持され得た。

## 【0191】

30

システムの個々の部分を、以下のセクションにおいて詳細に説明する。

## 【0192】

40

## A. ハイブリダイゼーションチャンバー

ハイブリダイゼーションチャンバーは、フロースルーの特徴に順応するよう修飾されたインサイチューPCR試薬収納システムである。収納システムは、ガラス顕微鏡スライド (76 × 25 × 1.2 ± 0.02mm) と、薄いステンレス・スチール・クリップによりスライドに取り付けられたシリコン・ゴム隔壁とから構成されている。金属クリップの内側の卵形の縁は、ハイブリダイゼーション・プローブ及び洗浄液の収納を保証する、水及び気体が通過しない封を作出するために十分な力で、シリコン・ディスクの端を、スライドに押し付ける。包含量は、およそ50 μlである。固定化された捕獲オリゴヌクレオチドのアッセイは、シ

50

リコン・ディスクにより覆われたスライドの中央部分（およそ13mm×15mm）に含まれる。異なる部材の組立ては、In Situ PCR Systemの製造業者より提供される組立てツールにより容易となる。組立て後、12"のチューブ及び多重試料ルアー・アダプター（multiple sample luer adapter）を有する2つの25G3/4注射針（Becton Dickinson,Rutherford,NJ）の挿入により、ハイブリダイゼーションチャンバーの入口及び出口を作出する。プローブ-標的ハイブリッドの洗浄中の上方側方（up-and-across）流動パターンを保証するため、斜めに注射針を挿入する。

## 【0193】

## B. 液体槽

異なる洗浄溶液を収納する槽は、GeneAmp In Situ PCR System 1000（登録商標）のサーマル・ブロック（thermal block）の垂直溝と調和するよう、カスタム設計された。各槽は、シリコン・シーラント（Dow Corning,Midland,MI）を使用して相互に接着させた、組立て式シリコン・ガスケット（Nunc, Inc., Naperville, IL）を収納する2つのガラス顕微鏡チャンバー・スライド（25×75×1mm）からなっている。12"長のチューブ及び多重試料ルアー・アダプターを有する21G3/4"注射針（Becton Dickinson,Rutherford,NJ）のシリコン・ガスケットへの挿入により、出口を作出した。空気入口を作出するため、チューブを有しない第2の21G3/4"注射針（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ）を、シリコン・ガスケットへ挿入した。液体槽は、漏出不可であり、サーマル・ブロックの溝内に正確に調和しており、含まれた液体への良好な熱伝達を保証するため金属フィンに取り付けられている。各槽の容量は、およそ2mlである。

10

20

## 【0194】

## C. マルチポートシステム及び試料担荷装置

液体槽、試料担荷装置、及びハイブリダイゼーションチャンバーは、手動で調節される一方の液体の流動を可能にするマルチポートシステムを通じて接続されている。システムは、雄雌接続により相互に接続された、ルアー・アダプターを有する一連の3方向ナイロン・トップコック（Kontes Scientific Glassware/Instruments,Vineland,NJ）からなっている。液体槽からの雌ルアー・アダプターは、雄雄ルアー・アダプター・カップラー（Biorad,Richmond,CA）を介してマルチポート雌ルアー・アダプターと接続されている。試料担荷装置は、液体槽と接続されたポートと、ハイブリダイゼーションチャンバーと接続されたポートとの間に設置されている。それは、ルアー・アダプターを介してマルチポートシステムと直接接続された1mlシリンジ（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ）からなる。液体の流動は、所望の方向にトップコック上のハンドルを回すことにより手動で調節されうる。

30

## 【0195】

## D. 廃液槽

ハイブリダイゼーションチャンバーからの出口チューブは、プランジャーが固定された位置に取り付けられている、ルアー・アダプターを有する20mlシリンジ（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ）からなる廃液槽と接続されている。ポンプとの接続は、12"長のチューブ及び多重試料ルアー・アダプターを有する21G3/4"注射針の、プランジャーのシリコン・ガスケットへの挿入により、確立されている。ポンプを作動させると、シリンジ内にわずかな真空が生じ、それが、液体槽から、ハイブリダイゼーションチャンバーを経由して、廃液槽へと液体を流動させる。

40

## 【0196】

## E. ポンプ

システムにおける液体の流動を調節するため、蠕動ポンプP-1（Pharmacia,Piscataway, NJ）を使用した。それは、システム内のわずかな真空を維持するため、組立てラインの末端に設置された。ポンプの入口チューブは、3方向ナイロン・トップコックを介して、廃液槽の出口チューブと接続されていた。この構造により、重力による排液を可能とする、廃液槽内の真空の放出が確立される。

## 【0197】

50

### 実施例3-ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件

異なる捕獲オリゴヌクレオチドの捕獲特異性を調査するため、6テトラマーのうちの3個（即ち、24ヌクレオチドのうちの12個）を共有する2つの捕獲オリゴヌクレオチドプローブを使用して、ハイブリダイゼーション実験を実施した。この実験は、異なる捕獲オリゴヌクレオチドを区別することが最も困難な例を表している。一般的に、位置特定可能なアレイ上の異なる増幅産物を分離するためには、より少ないテトラマーを共有する他の捕獲オリゴヌクレオチドが選択されるであろう。

#### 【0198】

典型的には、文献記載の常法をわずかに修飾した方法に従い、それぞれ10pmolのオリゴヌクレオチドcomp12及びcomp14（表3参照）を、T4ポリヌクレオチドキナーゼ（New England Biolabs, Beverly, MA）10単位、[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 2.22MBq、50mMトリス-HCl（pH8）、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EDTA、及び10mMジチオトレイトールを収納する20μlの容量で、5'末端標識した。超微細DNA等級セファデックス（Sephadex）G-25（Pharmacia, Piscataway, NJ）を収納するカラムでの濾過により、取り込まれなかった放射性ヌクレオチドを除去した。セファデックスは、10mM酢酸アンモニウム中で4℃一夜、予め膨張させた。標識されたオリゴヌクレオチドプローブを真空で乾燥させ、ハイブリダイゼーション溶液（0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [pH7.2]、1%結晶等級BSA、1mM EDTA、7%SDS）に溶解させた。標識されたオリゴヌクレオチドプローブcomp12及びcomp14の比活性は、それぞれ、 $2.86 \times 10^6$  cpm/pmol及び $2.43 \times 10^6$  cpm/pmolであった。

#### 【0199】

#### 【表3】

使用されたオリゴヌクレオチド（5'から3'）

12	アミノリンクスペーサー-18- ATC GGG TAG GTA ACC TTG CGT GCG ( 配列番号 : 12)
14	アミノリンクスペーサー-18- GGT AGG TAA CCT ACC TCA GCT GCG ( 配列番号 : 13)
comp 12	CGC ACG CAA GGT TAC CTA CCC GAT ( 配列番号 : 14)
comp 14	CGC AGC TGA GGT AGG TTA CCT ACC ( 配列番号 : 15)

#### 【0200】

前セクションに記載されたようにして、アミノリンク捕獲オリゴヌクレオチド12及び14（表3参照）400ピコモルを、カルボキシル官能化ガラス顕微鏡スライド及びアミノ官能化ガラス顕微鏡スライドの両方に沈積させ、反応させた。相補的オリゴヌクレオチドプローブcomp12とのハイブリダイゼーションにより、左上及び右下の斜めの位置について陽性のシグナルが生じ、相補的オリゴヌクレオチドプローブcomp14とのハイブリダイゼーションにより、左下及び右上の斜めの位置について陽性のシグナルが生じるよう、2×2マトリックスアレイで捕獲オリゴヌクレオチドを固定化した。

#### 【0201】

放射標識オリゴヌクレオチドプローブcomp12及びcomp14（表3参照）を、それぞれ2.5pmol/100μl及び4.1 pmol/100μlの濃度でハイブリダイゼーション溶液に溶解させた。ハイブリダイゼーション溶液は、アッセイシステム内輸送中のプローブの視覚的モニタリングを容易とする、2%プロモフェノールブルー・マーカー5μlを補足されていた。次いで、放射標識プローブ100マイクロリットルを注入し、ハイブリダイゼーションチャンバーへとポンプで送った。ハイブリダイゼーションを70℃で15分間実施した。

#### 【0202】

ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイゼーションチャンバーを、低ストリンジェンシーア洗浄緩衝液（2×SSC緩衝液は300mM塩化ナトリウム及び30mMクエン酸ナトリウムを収納する）、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム（「SDS」）2mlで2回、高ストリンジェンシーア洗浄緩衝液（0.2×SSC、0.1%SDS）（1×SSC緩衝液は150mM塩化ナトリウム及び15mMクエ

10

20

30

40

50

ン酸ナトリウムを含有する)2mlで2回、70℃で連続的に洗浄した。

【0203】

実施例4-捕獲されたオリゴヌクレオチドプローブの検出

洗浄後、捕獲オリゴヌクレオチド-オリゴヌクレオチドプローブ・ハイブリッド、シリコン・ディスク、注射針、及び金属カバー・クリップを、ガラス顕微鏡スライドから除去し、残存している液体をキムワイプ(Kimberly-Clark,Roswell,GA)を使用して吸収した。ホスフォールイメージヤー(phosphor imager)(Molecular Dynamics,Sunnyvale,CA)を使用して、捕獲されたオリゴヌクレオチドプローブを可視化し定量した。ガラス顕微鏡スライドをホスフォールイメージヤー・スクリーンに21時間曝露した後、試験された異なる固体支持体についてのデータを収集した。得られた画像を図28に示す。定量データは、表4A及び4Bに示す。

【0204】

使用された条件下においては、NH<sub>2</sub>官能化スライドについて得られたシグナル及び交差反応性データの方が、COOH官能化スライドについて得られたものよりも優れていた。

【0205】

【表4A】

捕獲されたオリゴヌクレオチドプローブ12の定量

スライド上の 官能基	プローブ	捕捉オリゴヌクレオチド12 におけるオリゴヌクレオチド プローブ(pic)*	(amol)	捕捉オリゴヌクレオチド14 におけるオリゴヌクレオチド プローブ(pic)*	(amol)	平均交差 反応性
-COOH	12	105,333	9.0			0.37
-COOH	12	55,957	4.8			
-COOH	12			36,534	3.1	
-COOH	12			23,707	2.0	
-NH <sub>2</sub>	12	353,569	30			0.015
-NH <sub>2</sub>	12	10,421,092	889			
-NH <sub>2</sub>	12			64,999	5.5	
-NH <sub>2</sub>	12			95,414	8.1	

10

20

\* pic = 相対ホスフォールイメージヤーカウント

【0206】

【表4B】

捕獲されたオリゴヌクレオチドプローブ14の定量

スライド上の 官能基	プローブ	捕捉オリゴヌクレオチド12 におけるオリゴヌクレオチド プローブ(pic)*	(amol)	捕捉オリゴヌクレオチド14 におけるオリゴヌクレオチド プローブ(pic)*	(amol)	平均交差 反応性
-COOH	14			35,610	4.0	0.19
-COOH	14			43,362	4.9	
-COOH	14	5,587	0.6			
-COOH	14	9,379	1.1			
-NH <sub>2</sub>	14			245,973	28	0.049
-NH <sub>2</sub>	14			115,529	13	
-NH <sub>2</sub>	14	9,775	1.1			
-NH <sub>2</sub>	14	8,065	0.9			

40

\* pic = 相対ホスフォールイメージヤーカウント

【0207】

実施例5-捕獲オリゴヌクレオチドの固定化パラメータの最適化

文献記載の方法に従い、ポリマーをスライド上に沈積させた(Barnardら、「不連続の感

50

知部位を有するファイバーオプティック・センサー (A Fibre-Optic Sensor With Discrete Sensing Sites)」, Nature 353:338-40(1991); Bonkら, 「ポリマーでコーティングされたイメージング・オプティカル・ファイバー・バンドル上のアリルアジドによるパターン化センサー・アレイの組立て (Fabrication of Patterned Sensor Arrays With Aryl Azides on a Polymer-coated Imaging Optical Fiber Bundle)」, Anal. Chem. 66:3319-20(1994); Smithら, 「ポリ-N-アクリルピロリドン-ペプチド化学における新規な樹脂 (Poly-N-acrylpyrrolidone-A New Resin in Peptide Chemistry)」, Int. J. Peptide Protein Res., 13:109-12(1979) (参照として本明細書に組み込まれる) )。

## 【0208】

アミノリング捕獲オリゴヌクレオチド12及び14 (表3参照) 400ピコモルを、4つの同一の光沈積ポリマー・スポットを収納するガラス顕微鏡スライドに $2 \times 2$ パターンで沈積させ、反応させた。相補的オリゴヌクレオチドプローブcomp12とのハイブリダイゼーションにより、上及び下の位置について陽性のシグナルが生じ、相補的オリゴヌクレオチドプローブcomp14とのハイブリダイゼーションにより、左及び右の位置について陽性のシグナルが生じるよう、オリゴヌクレオチドをスポットした。

## 【0209】

放射標識オリゴヌクレオチドプローブcomp12 (表3参照) を、2.4 pmol/100 μlの濃度でハイブリダイゼーション溶液に溶解させた。アッセイシステム内輸送中のプローブのモニタリングを容易にするため、プロモフェノールブルー・マーカー (2% 溶液5 μl) をハイブリダイゼーション溶液に添加した。

## 【0210】

放射標識プローブcomp12 100マイクロリットルを、ハイブリダイゼーションチャンバーへとポンプで送った。ハイブリダイゼーションを70℃で15分間実施した。ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイゼーションチャンバーを、低ストリンジエンシー洗浄緩衝液 ( $2 \times$  SSC、0.1% SDS) 1mlで3回、高ストリンジエンシー洗浄緩衝液 (0.2×SSC、0.1% SDS) 1mlで3回、70℃で連続的に洗浄した。

## 【0211】

ガラス顕微鏡スライドをホスフォールイメージヤー・スクリーンに24時間曝露した後、試験された全ての異なる固体支持体についてのデータを収集した。得られた画像を図29に示す。定量データを、表5に示す。

## 【0212】

## 【表5】

捕獲されたオリゴヌクレオチドプローブの定量

クロスリンクカー	クロスリンクカー の割合	プローブ 12 (pic) <sup>*</sup>	プローブ 12 (amol)
EGDMA	2	1,055,100	80
		1,390,499	106
HDDMA	2	633,208	48
		286,9371	218
EGDMA	4	4,449,001	338
		2,778,414	211

EFDMA = エチレングリコールジメタクリレート

HDDMA = ヘキサンジオールジメタクリレート

\* pic = 相対ホスフォールイメージヤーカウント

## 【0213】

固定化化学は、効率的な核酸增幅産物の捕獲にとって必要な適当な物理的特性を提供する、テーラーメイドの特別ポリマー・マトリックスの使用を可能にする。固定化された捕獲オリゴヌクレオチドの特異性は、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーションにより单一のミスマッチ、欠失、及び挿入を区別する現行の方法 (K.L.Beattieら「ゲノセンサー研究の進歩 (Advances in Genosensor Research)」, Clin. Chem. 41:700-06(1995) (参

10

20

30

40

50

照として本明細書に組み込まれる))と比較して良好であった。最後に、本発明のアッセイシステムが、核酸オリゴマーの普遍的な同定を可能にすることが証明された。

#### 【0214】

##### 実施例6-位置特定可能なオリゴヌクレオチドプローブの固体支持体への捕獲

異なる捕獲オリゴヌクレオチド固定化法の後、ポリマーでコーティングされたスライドを、位置特定可能なオリゴヌクレオチドプローブの捕獲能について試験した。次いで、3-(トリメチルオキシシリル)プロピルメタクリレートによるシラン化の後、モノマーをスライド上で重合させた。1つの例においては、ポリエチレングリコール含有クロスリンクターを用いて、COOH官能基を有するポリマー層を形成させた。もう一つの例においては、OH官能基を形成させるため、ポリエチレングリコール-メタクリレート・モノマーを、スライド上に重合させた。COOH官能基を有するスライドを、実施例1のEDC活性化法を使用して活性化した。  
10

#### 【0215】

OH官能基を有するスライドは、0.2M 1,1'-カルボニルジイミダゾール(「CDI」)(Sigma Chemical Co., St.Louis, Mo.)を含む「水の含有量の低い(low water)」アセトン(J.T.Baker, Phillipsburg, N.J.)を含有する密閉された50mLプラスチック・ディスポーザブル・チューブ(Corning Inc., Corning, N.Y.)内でのインキュベーションにより、室温で一夜活性化した。次いで、「水の含有量の低い」アセトンでスライドを洗浄し、室温で真空中で乾燥させた。  
20

#### 【0216】

アミノ結合捕獲オリゴヌクレオチド14を、両スライド上の予め印を付けた位置に手動でスポットした(1スライド当たり4ドット)。反応はフード内で実施され、スポットされたオリゴヌクレオチドの量は $2 \times 0.2 \mu\text{l}$ (0.8nmol/ $\mu\text{l}$ )であった。全反応時間は1時間であった。次いで、予め印を付けた各ドットにプロピルアミンを数滴適用することにより、15分間、スライドをクエンチした。クエンチした後、スライドを0.1Nリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)中で5分間インキュベートし、二重蒸留H<sub>2</sub>Oで洗浄し、真空で乾燥させた。  
15

#### 【0217】

スライド上の相補的捕獲オリゴヌクレオチドを、放射標識オリゴヌクレオチドプローブcomp14(表3)とハイブリダイズさせた。放射標識オリゴヌクレオチドプローブcomp14 10 0マイクロリットル(2.8pmol; 6,440,000cpm/pmol)を、ハイブリダイゼーションチャنبーにポンプで送った。ハイブリダイゼーションを、0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>[pH7.2]、1%結晶等級BSA、1mM EDTA、7%SDS中で、70℃で15分間実施した。ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイゼーションチャنبーを、低ストリンジェンシー洗浄緩衝液(2×SSC、0.1%SDS)2mLで2回、高ストリンジェンシー洗浄緩衝液(0.2×SSC、0.1%SDS)2mLで2回、70℃で連続的に洗浄した(1×SSC緩衝液は150mM塩化ナトリウム及び15mMクエン酸ナトリウムを含有する)。  
30

#### 【0218】

ガラス顕微鏡スライドをホスフォールイメージヤー・スクリーンに30分間曝露した後、両スライドについてのデータを収集した。ガラス顕微鏡スライドをホスフォールイメージヤー・スクリーンに30分間曝露した後、データを収集した。表6及び図30を参照のこと。  
40

#### 【0219】

##### 【表6】

OH官能化スライドにおける捕獲オリゴヌクレオチドプローブ14の定量

スライドグラス上の 官能基	プローブ	捕捉 オリゴ14における オリゴスクレオチドプローブ	
		(pic)*	(fmol)
-OH	14	1,864,879	10.9
-OH	14	1,769,403	10.3

\* pic = 相対ホスフォールイメージャーカウント

#### 【 0 2 2 0 】

この試験において、OH官能基を含有するポリマーでコーティングされたスライドの方が、COOH官能基を含有するポリマーでコーティングされたスライドよりも良好な結果が得られた。

#### 【 0 2 2 1 】

20%アミン含有モノマーで重合され、4%EGDMA又はHDDMAでクロスリンクされた予め調製された（ポリHEMA）含有ポリマーでは、放射標識ライゲーション産物配列（ホスフォールイメージヤー・スクリーンに23時間曝露した後にのみ可視化された（表5））約275amolを捕獲することが可能であった。ポリエチレンメタクリレートポリマー製剤を使用すると、ライゲーション産物配列約10.6fmolを捕獲することが可能であった。シグナルは、30分間の曝露の後に検出され得た。

#### 【 0 2 2 2 】

##### 実施例7- メンブレン支持体を使用して捕獲されたオリゴスクレオチドの検出

メンブレン支持体を使用した異なる捕獲オリゴスクレオチドの捕獲特異性を調査するため、捕獲オリゴスクレオチドプローブ12及び14（表3参照）を使用してハイブリダイゼーション実験を実施した。

#### 【 0 2 2 3 】

OH官能化ナイロン・メンブレンの細片（Millipore, Bedford, Massachusetts）を、0.2Mカルボニルジイミダゾールを含む「水の含有量の低い」アセトン溶液に一夜浸した。細片をアセトンで洗浄し、真空中で乾燥させた。2つの容量の0.2μl（1mM）の捕獲オリゴスクレオチド12及び14を含む20mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>（pH8.3）（表3）を、特別なプロッティング装置（1mm unetics, Cambridge, Massachusetts）を使用してメンブレンに負荷した。相補的オリゴスクレオチドプローブを、実施例3の記載のようにして放射性標識した。オリゴスクレオチドプローブを真空で乾燥させ、ハイブリダイゼーション緩衝液（0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [pH7.2]、1%結晶等級BSA、1mM EDTA、7%SDS）200μlに入れた。Hybaidハイブリダイゼーション・オープン内の1.5mlエッペンドルフチューブ内で、ハイブリダイゼーション緩衝液800μl中で、60°で、15分間、メンブレンをプレハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション・コンパートメントの総容量を減少させるため、不活性カルナウバロウ（Strahl & Pitsch, Inc., New York, New York）500μlをチューブに充填した。プレハイブリダイゼーション後、放射標識プローブ200μlを添加した。60°で15分間、メンブレンをハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを、低ストリンジエンシー洗浄緩衝液（2×SSC、0.1%SDS）1mlで15分間を2回、高ストリンジエンシー洗浄緩衝液（0.2×SSC、0.1%SDS）1mlで15分間を2回、60°で洗浄した。ホスフォールイメージヤー（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）を使用して、捕獲されたオリゴスクレオチドプローブを定量した。ホスフォールイメージヤー・スクリーンに45分間曝露した後、データを収集した。結果を表7に示す。捕獲オリゴスクレオチド12及び14の活性は、それぞれ、112pic/amol及び210pic/amolである。

#### 【 0 2 2 4 】

#### 【表 7】

メンブレン上の捕獲されたオリゴスクレオチドの定量

10

20

30

40

メンブレン上の 官能基	プローブ	捕捉オリゴスクレオチド12 におけるオリゴスクレオチド プローブ	捕捉オリゴスクレオチド14 におけるオリゴスクレオチド プローブ	平均交差 反応性
	(pic)*	(fmol)	(pic)*	(fmol)
-OH	12	13,388,487	119.5	337,235
-OH	12	13,299,298	118.7	3.01
-OH	14	179,345	0.85	1,989,876
-OH	14			9.48
			3,063,387	0.071
				14.59

\* pic = 相対ホスフォールイメージャーカウント

【0225】

10

一連の同様の実験において、ハイブリダイゼーション温度及びハイブリダイゼーション時間をさらに探索した。表8に示されたデータ（捕獲オリゴスクレオチド12及び14の活性は、それぞれ、251pic/amol及び268pic/amolである）は、以下の条件で得られた結果を表している。ハイブリダイゼーション緩衝液800 μl中で65 °Cで15分間のプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション緩衝液1ml中で65 °Cで15分間のハイブリダイゼーション、低ストリンジエンシー洗浄緩衝液1mlでの65 °Cで5分間の2回の洗浄、及び高ストリンジエンシー洗浄緩衝液1mlでの65 °Cで5分間の2回の洗浄。

【0226】

【表8】

メンブレン上の捕獲されたオリゴスクレオチドの定量

20

メンブレン上の 官能基	プローブ	捕捉オリゴスクレオチド12 におけるオリゴスクレオチド プローブ	捕捉オリゴスクレオチド14 におけるオリゴスクレオチド プローブ	平均交差 反応性
	(pic)*	(fmol)	(pic)*	(fmol)
-OH	12	41,023,467	163.4	541,483
-OH	12	31,868,432	127.0	2.16
-OH	14	294,426	1.10	19,673,325
-OH	14			73.41
			18,302,187	0.016
				68.29

\* pic = 相対ホスフォールイメージャーカウント

【0227】

30

表9に示されたデータ（捕獲オリゴスクレオチド12及び14の活性は、それぞれ、487pic/amol及び506pic/amolである）は、以下の条件で得られた結果を表している。ハイブリダイゼーション緩衝液150 μl中で70 °Cで15分間のプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション緩衝液200 μl中で70 °Cで15分間のハイブリダイゼーション、低ストリンジエンシー洗浄緩衝液800 μlでの70 °Cで5分間の2回の洗浄、及び高ストリンジエンシー洗浄緩衝液800 μlでの70 °Cで5分間の2回の洗浄。

【0228】

【表9】

メンブレン上の捕獲されたオリゴスクレオチドの定量

40

メンブレン上の 官能基	プローブ	捕捉オリゴスクレオチド12 におけるオリゴスクレオチド プローブ	捕捉オリゴスクレオチド14 におけるオリゴスクレオチド プローブ	平均交差 反応性
	(pic)*	(fmol)	(pic)*	(fmol)
-OH	12	34,648,385	71.15	1,158,832
-OH	12	52,243,549	107.28	2.38
-OH	14	1,441,691	2.85	56,762,990
-OH	14			112.18
			45,769,158	0.028
				90.45

\* pic = 相対ホスフォールイメージャーカウント

【0229】

表10に示されたデータは、以下の条件で得られた結果を表している。ハイブリダイゼー

50

ション緩衝液150 μl中で70 °Cで15分間のプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション緩衝液200 μl中で70 °Cで5分間のハイブリダイゼーション、低ストリンジエンシー洗浄緩衝液800 μlでの70 °Cで5分間の2回の洗浄、及び高ストリンジエンシー洗浄緩衝液800 μlでの70 °Cで5分間の2回の洗浄。

【0230】

【表10】

#### メンブレン上の捕獲されたオリゴヌクレオチドの定量

メンブレン上の 官能基	プローブ	捕捉オリゴヌクレオチド12 におけるオリゴヌクレオチド プローブ	(pic)*	(fmol)	捕捉オリゴヌクレオチド14 におけるオリゴヌクレオチド プローブ	(pic)*	(fmol)	平均交差 反応性	10
-OH	12	26,286,188	53.98		389,480	0.80		0.013	
-OH	12	34,879,649	71.62						
-OH	14	539,486	1.07		45,197,674	89.32		0.011	
-OH	14				54,409,947	107.53			

\* pic = 相対ホスフォールイメージャーカウント

【0231】

表11に示されたデータは、以下の条件で得られた結果を表している。ハイブリダイゼーション緩衝液150 μl中で70 °Cで5分間のプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション緩衝液200 μl中で70 °Cで1分間のハイブリダイゼーション、低ストリンジエンシー洗浄緩衝液800 μlでの70 °Cで2分間の2回の洗浄、及び高ストリンジエンシー洗浄緩衝液800 μlでの70 °Cで5分間の2回の洗浄。

【0232】

【表11】

#### メンブレン上の捕獲されたオリゴヌクレオチドの定量

メンブレン上の 官能基	プローブ	捕捉オリゴヌクレオチド12 におけるオリゴヌクレオチド プローブ	(pic)*	(fmol)	捕捉オリゴヌクレオチド14 におけるオリゴヌクレオチド プローブ	(pic)*	(fmol)	平均交差 反応性	30
-OH	12	5,032,835	10.33		56,777	0.12		0.012	
-OH	12	4,569,483	9.38						
-OH	14	540,166	1.07		41,988,355	82.98		0.017	
-OH	14				20,357,554	40.23			

\* pic = 相対ホスフォールイメージャーカウント

【0233】

これらのデータは、捕獲オリゴヌクレオチドプローブのその相補的配列とのハイブリダイゼーションが特異的であったことを証明している。ガラススライドで実施された前実験と比較して、有意に多い量（即ち、amol量と比較してfmol量）のオリゴヌクレオチドプローブが、メンブレン支持体に再現可能に捕獲された。これらの2つの極めて密接に関連した捕獲オリゴヌクレオチドプローブについて、約1%という平均交差反応性値が得られた。しかし、アレイ内の他の捕獲オリゴヌクレオチド対については、これらの値は有意に優れていたと考えられる。一般的に、そのような値は、当分野において既知の既存の方法の使用、即ち対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション（「ASO」）又はシーケンシング・バイ・ハイブリダイゼーション（「SBH」）のようなディファレンシャル・ハイブリダイゼーション法によっては達成され得ない。

【0234】

#### 実施例8-ガラス表面の洗浄

濃縮NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O (1:5:5, v/v/v) 水溶液中80 °Cで5分間ガラススライド（Fisher Scientific, Extra thick microslides, frosted cat. #12-550-11）をインキュベートし滅菌水ですすいだ。濃縮HCl-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O (1:1:5, v/v/v) 水溶液中80 °Cで5分間2回目のイン

キュベーションを行った。参照として本明細書に組み入られる、U. ジョーンソン (U. Jo nsson) らの「よく特徴づけられたシリカ表面上でのフィブロネクチンの吸収挙動」コロイド界面科学雑誌 (J. Colloid Interface Sci.)、第90巻：第148-163頁 (1982年) を参照せよ。スライドを滅菌水、メタノール、ならびにアセトンでよくすすぎ、室温で風乾させた。

## 【0235】

実施例9-メタクリロイルオキシプロピルトリメトキシシラン (Methacryloyloxypropyl trimethoxysilane)によるシラン化

実施例8に基づき調製した、洗净済みスライドを2.6mlのメタクリロイルオキシプロピルトリメトキシシラン (Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, Wis. cat.#23,579-2) 、0.26mlのトリエチルアミンおよび130mlのトルエンから構成される溶液中室温で24~4時間インキュベートした。参照として本明細書に組み入られる、E. ヘッドボーグ (E. H edborg) らのセンサーズ アクチュエーターズ A (Sensors Actuators A) 第37-38巻：第796-799頁 (1993年) を参照せよ。スライドをアセトン、メタノール、滅菌水、再度メタノールならびに再度アセトンでよくすすぎ、室温で風乾させた。図31を参照せよ。

## 【0236】

実施例10-ジクロロジメチルシランによるシラン化

実施例8に基づき調製した洗净済みスライドを12mlのジクロロジメチルシランおよび120mlのトルエンを含む溶液中室温で15分間インキュベートした。スライドをアセトン、メタノール、滅菌水、再度メタノール、ならびに再度アセトンでよくすすぎ風乾させた。

## 【0237】

実施例11-メタクリル酸誘導体ガラスを用いたポリ(エチレングリコール)メタクリレートの重合

3.5mlのアセトニトリル中2.2gのポリ(エチレングリコール)メタクリル酸 (Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, Wis. cat.#40,953-7) および50mgの2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオニトリル)を氷上で冷却し3分間アルゴン気流でバージ(purge)させた。次の段階をアルゴン大気下、グローブボックス中で行った。実施例8および9に基づき調製したメタクリル酸誘導体ガラススライド上に5~15滴の重合混合液を載せた。メタクリル酸誘導体ガラススライドならびに重合混合液の上に実施例10に基づきシラン化させておいた2枚目のスライドガラスをかぶせ、この2枚のガラススライドを強く加圧してクリップで固定した。次にスライドを減圧乾燥機に移した。重合反応を熱分解的に55°で、または光分解的に366nmで開始させた。図32を参照せよ。

## 【0238】

実施例12-メタクリル酸誘導体ガラスを用いたアクリル酸およびトリメチロールプロパンエトキシレート14/3 E0/OH)トリアクリレートの重合

3.5mlのアセトニトリル中0.5gのアクリル酸 (Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, Wis. cat.#14,723-0)、1.83gのトリメチロールプロパンエトキシル酸 (14/3 E0/OH)トリアクリル酸 (Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, Wis. cat.#23,579-2)、および50mgの2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオニトリル)を氷上で冷却し3分間アルゴン気流でバージさせた。次の段階を実施例11で記載されるように、グローブボックス中で行った。次にスライドを減圧乾燥機に移し実施例11に記載されるように重合させた。図33を参照せよ。

## 【0239】

実施例13-メタクリレート誘導体ガラスを用いたポリ(エチレングリコール)メタクリル酸およびトリメチロールプロパンエトキシル酸(14/3 E0/OH)トリアクリル酸の重合

3.5mlのアセトニトリル中0.55gのポリ(エチレングリコール)メタクリル酸 (Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, Wis. cat.#40,953,7)、1.64gのトリメチロールプロパンエトキシル酸 (14/3 E0/OHトリアクリレート (Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, Wis. cat.#23,579-2)、および50mgの2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオニトリル)を氷上で冷却し3分間アルゴン気流でバージさせた。次の段階を実施例11で記載さ

10

20

30

40

50

れるように、グローブボックス中で行った。次にスライドを減圧乾燥機に移し実施例11に記載されるように重合させた。図34を参照せよ。

#### 【0240】

##### 実施例14-材料および方法

オリゴヌクレオチド合成および精製。オリゴヌクレオチドを注文合成品としてIDT社(Oralville, IA)から入手するか、標準的なホスホラミダイト化学を用いてABI394 DNAシンセサイザー(PE Biosystems Inc.; Foster City, CA)を用いて内部で合成した。スペーサーホスホラミダイト18、3'-アミノモディファーカ3 CPG、および3'-フルオレセインCPGをグレンリサーチ(Glen Research)(Sterling, VA)より購入した。その他の試薬は全てPEバイオシステムズ(Biosystems)より購入した。3'-アミノ修飾化および/または蛍光標識化オリゴヌクレオチドを25にて2時間濃縮NH<sub>4</sub>OH水溶液で処理し支持体から切断した。無水DMF(28 μl)のテキサスレッド-Xサクシニミジルエステル(500 μg)(Molecular Probes; Eugene, OR)溶液を含むチューブに0.2M NaHCO<sub>3</sub>(150 μl)およびオリゴヌクレオチド(200 μg)を添加することによりテキサスレッド標識を行った。続いて終夜25で攪拌し、3M NaCl(20 μl)および氷冷エタノール(500 μl)を添加し、30分間ドライアイスエタノール槽にて冷却および12,000 gで30分間遠心してほとんどの未反応標識を除去した。上清を除去し、沈澱したオリゴヌクレオチドを70%エタノール(100 μl)で洗浄し、乾燥させた。Zip13に対する相補配列を含んだ完全長LDR産物を刺激するフルオレセイン標識された70-merであるFAMcZip13-Prdを、1000細孔径CPG上に合成した。配列は：

5'-

フルオレセイン-**CGCACGATAGGTGGTCTACCGCTGATATAAACTTGTGGGGA**

**GCTAGTGGCGTAGGCAAGAGTGCC-3'** (配列番号：16)

であった(位置特定可能なアレイ特異的部分を太字で示す)。標識化および未標識化オリゴヌクレオチドを12%変性ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動によって精製した。バンドを紫外線陰影によって可視化し、ゲルから切断して、0.5M NaCl、5mM EDTA、pH8.0中で終夜溶出させた。説明書に従いC18セッブ-パックス(Sep-Paks)(Waters Corporation; Milford, MA)にてオリゴヌクレオチド溶液を脱塩し、続いてオリゴヌクレオチドを乾燥濃縮させ(Speed-Vac)-20で保存した。

#### 【0241】

##### ポリマー被覆スライド

顕微鏡用スライド(Fisher Scientific, プレクリーン、3インチ×1インチ×1.2mm)を2%メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン-0.2%トリエチルアミンのCHCl<sub>3</sub>溶液に25で30分間浸し、次にCHCl<sub>3</sub>で洗浄した(15分間を2回)。モノマー溶液[20L:8%アクリルアミド-2%アクリル酸-0.02%N,N'-メチレン-ビスアクリルアミド(モノマー:架橋剤の比率が500:1)-0.8%過硫酸ラジカル重合開始剤]をスライドの一端に滴下し予めシラン化(5% (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiCl<sub>2</sub>クロロホルム溶液)しておいたカバーガラス(24×50mm)を用いて押し広げた。ホットプレートにて70で4.5分間スライドを加熱することにより重合を行った。ホットプレートからスライドを取り除き、単端カミソリ刃ですぐにカバーガラスを剥離させた。被覆スライドを脱イオン化水ですすぎ、大気中で乾燥させ、周囲条件下で保存した。

#### 【0242】

##### 位置特定可能アレイ

ポリマー被覆スライドを20mM N-ヒドロキシサクシニミドを含む0.1M 1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸の0.1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH6.0溶液に25で30分間浸すことにより予め活性化させておいた。活性化スライドを水ですすぎ、65のオープンで乾燥させた；これらはドライエライト(Drierite)入り乾燥器中25で6ヶ月またはそれ以上の期間の保存に対し安定であった。

#### 【0243】

10

20

30

40

50

手動によるスポットティングは、0.2M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH8.3 の捕獲オリゴヌクレオチドストック液 (500 μM) からレイニンピペットマン (Rainin Pipetman) を用いて0.2 μl のアリコート (aliquot) を採取し、前活性化重合体表面上に3×3 アレイで置くことにより行った。結果として得られるアレイを水-ホルムアミド (1:1) を含む加湿容器中65 °C で1時間インキュベートした。自動装置によるスポットティングは、大気調整容器 (controlled atmosphere chamber) 中で針型スポットターを装備した自動装置を用いて10~50nl の捕獲オリゴヌクレオチド (同緩衝液中1.5mM) のアリコートを25 °C であらかじめ活性化しておいた表面に置くことで行った。4スポット群からなるアドレスを持つ、2組の3×3アレイを各スライドに置いた。いずれかの方法を用いてスポットした後、300mM バイシン (bicinchoninic acid) 、pH8.0-300mM NaCl-0.1% SDS にスライドを65 °C で30分間浸し、水ですすいで乾燥させることにより未結合オリゴヌクレオチドを重合表面から除去した。このアレイを必要となるまでスライドボックスに25 °C で保存した。

## 【0244】

## K-ras DNA試料のPCR増幅

パラフィン油下10mM トリス・HCl、pH8.3-1.5mM MgCl<sub>2</sub>-50mM KCl、800 μM dNTPs、2.5 μM フォワードプライマーならびにリバースプライマー（各プライマー-12.5 pmol；表12を参照せよ）およびパラフィン包埋腫瘍または細胞株から抽出した1~50ng の染色体DNAを含む20Lの反応混合液中でPCR増幅を行った。94 °C で2分間の変性段階に続き、0.2ユニットのTaq DNA ポリメラーゼ (PE Biosystems) を添加した。

## 【0245】

## 【表12】

PCR/LDR/アレイハイブリダイゼーションによるK-ras 変異検出のために設計されたプライマーおよびプローブ

プライマー/プローブ	配列 (5'→3')
K-ras エクソン1 フォワード	<b>ATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAA</b> (配列番号：17)
K-ras エクソン1 リバース	CTGCACCAAGTAATATGCATATTAAAACAAG (配列番号：18)
cZip1-K-ras c12.2WtG	<b>GCTGAGGTGCGATGCTGAGGTCGCAAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG</b> (配列番号：19)
cZip3-K-ras c12.2D	<b>GCTGCGATCGATGGTCAGGTGCTGAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGA</b> (配列番号：20)
cZip5-K-ras c12.2A	<b>GCTGTACCCGATCGCAAGGTGGTCAAACCTTGTGGTAGTTGGAGCTGC</b> (配列番号：21)
cZip11-K-ras c12.2V	<b>CGCAAGGTAGGTGCTGTACCCGCAAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGT</b> (配列番号：22)
K-ras c12 Com-2	pTGGCGTAGGCAAGAGTGCCT- フルオレセイン (配列番号：23) pTGGCGTAGGCAAGAGTGCCT- テキサスレッド (配列番号：24)
cZip13-K-ras c12.1S	<b>CGCACCGATAGGTGGTCTACCGCTGATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTA</b> (配列番号：25)
cZip15-K-ras c12.1R	<b>CGCACCGATAGGTGGTCTACCGCTGATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTC</b> (配列番号：26)
cZip21-K-ras c12.1C	<b>GGTCAGGTTACCGCTGCGATCGCAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTT</b> (配列番号：27)
K-ras c12 Com-1	pGTGGCGTAGGCAAGAGTGCC- フルオレセイン (配列番号：28) pGTGGCGTAGGCAAGAGTGCC- テキサスレッド (配列番号：29)
cZip23-K-ras c13.4D	<b>GGTCCGATTACCGGTCCGATGCTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGA</b> (配列番号：30)
cZip25-K-ras c13.4WtG	<b>GGTCTACCTACCCGCACGATGGTCTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGG</b> (配列番号：31)
K-ras c13 Com-4	pCGTAGGCAAGAGTGCCTTGAC- テキサスレッド (配列番号：33) pCGTAGGCAAGAGTGCCTTGAC- フルオレセイン (配列番号：32)

これらのPCRプライマーはN-rasおよびH-rasの共増幅を伴うことなくK-rasのエクソン1を増幅するために特異的に設計された。対立遺伝子特異的LDRプローブはそれらの5'末端（太字）に24merの位置特定可能アレイ部分および3'末端（下線）に識別塩基を含めた。共

10

20

30

40

50

通LDRプローブは5'リン酸基および3'末端にフルオレセインまたはテキサスレッド標識のどちらかを含めた。

#### 【0246】

94 15秒および60 2分の40ラウンドによる熱サイクルに続き、65 5分の最終伸長段階によって増幅を行った。PCR後、1μlのプロテナーゼK(18mg/ml)を添加し、反応溶液を70 で10分間加熱および95 で5分間加熱することにより反応停止させた。予想される大きさの増幅産物の存在を確認するために各PCR産物1μlを3%アガロースゲルで解析した。

#### 【0247】

##### K-ras DNA試料のLDR

10

パラフィン油下20mM トリス・HCl, pH8.5-5mM MgCl<sub>2</sub>-100mM KCl, 10mM DTT, 1mM NAD<sup>+</sup>, 8pmol 全LDRプローブ(500fmolの各識別プローブ+4pmolの蛍光標識共通プローブ)、および細胞株または腫瘍試料からのPCR産物1pmolを含む20μl体積量でLDR反応を行った。7つの変異特異的プローブ、3つの共通プローブ、およびコドン12またはコドン13のいずれかに対する野生型判別プローブを含む、各2つのプローブ混合液を調製した(図35Cおよび表12)。

#### 【0248】

反応混合液を94 で2分間予め加熱処理し、続いて25fmolの野生型Tth DNAリガーゼを添加した。LDR反応を94 15秒および65 4分の20ラウンドサイクルで行った。各反応溶液の2μlずつを2Lのゲルローディング緩衝液[8%ブルーデキストラン、50mM EDTA, pH8.0-ホルムアミド(1:5)]と混合し、94 で2分間変性して、氷上で冷却した。各混合液の1μlを10%変性ポリアクリルアミドゲルに添加しABI 377 DNAシーケンサーにより1500ボルトで電気泳動した。

20

#### 【0249】

##### K-ras LDR産物とDNAアレイのハイブリダイゼーション

最終緩衝液濃度が300mM MES, pH6.0-10mM MgCl<sub>2</sub>-0.1% SDSである緩衝液を作成するため40μlの1.4×ハイブリダイゼーション緩衝液でLDR反応液(17μl)を希釈した。1×ハイブリダイゼーション緩衝液中でアレイを25 で15分間プレインキュベーションを行った。カバーウェルズ(Coverwells)(Grace, Inc; Sunriver, OR)に希釈LDR反応液を充填しアレイに装着した。このアレイを加湿培養チューブに設置し回転ハイブリダイゼーションオープン中65 および20rpmで1時間インキュベートした。ハイブリダイゼーション後、アレイを25 で10分間300mM バイシン、pH8.0-10mM MgCl<sub>2</sub>-0.1% SDSで洗浄した。蛍光シグナルを顕微鏡/CCDを用いて測定した(「画像解析」を参照せよ)。

30

#### 【0250】

##### 合成LDR産物とDNAアレイのハイブリダイゼーション

4,500fmolの全フルオレセイン標識共通LDRプローブおよび9×500fmolの各未標識識別LDRプローブを含む位置特定可能なアレイ特異的部分を組み合わせた100amol, 1fmol, 3fmol, 10fmol, または30fmolのFAMcZip13-Prd(アドレス13に相補的な合成70merLDR産物)を含む4通りのハイブリダイゼーション混合液を、55μlの300mM MES、pH6.0-10mM MgCl<sub>2</sub>-0.1% SDSに調製した。前節に記載される手順に従いハイブリダイゼーションを行い、フルオロイメージヤー(FluorImager)および落射蛍光顕微鏡のデータを取得し解析を行った(「画像解析」を参照せよ)。

40

#### 【0251】

##### LDRおよび連続希釈G12V/G12とDNAアレイのハイブリダイゼーション

これらの実験は20μl体積量で行った。G12V変異を含むPCR増幅SW620細胞株DNAを100nM(2,000fmol)の野生型(G12)DNAおよび100nM(2,000fmol)のG12V識別プローブならびにテキサスレッド標識共通プローブの両方を含むLDR混合液に5nM(100fmol=1/20)から0.050nM(1fmol=1/2,000)で希釈した。LDRおよびハイブリダイゼーションは上述のようにを行い、顕微鏡/CCDによるイメージ化は「画像解析」に詳述されるように行った。

#### 【0252】

50

## 画像解析

モレキュラーダイナミクスフルオロイメージヤー595 (Molecular Dynamics FluorImage r 595) (Sunnyvale, CA) またはプリンストンインストルメントTE/CCD-512 TKBMIカメラ (Princeton Instruments TE/CCD-512 TKBMI camera) (Trenton, NJ) を装備したオリンパスAX70 落射蛍光顕微鏡 (Melville, NY) を用いてアレイを画像化した。フルオロイメージヤーによるフルオレセイン標識プロープの解析については、530 / 30発光フィルターを用いて488nm励起を使用した。走査空間解像度はピクセルあたり100 μmとした。結果として得られる画像を機器に備え付けられているImageQuaNTソフトウェアを用いて解析した。落射蛍光顕微鏡に100W水銀ランプ、FITCフィルターキューブ (励起480/40、二色性ビームスプリッター595、発光645/75) 、および100mmマクロ対物レンズを装着した。マクロ対物レンズにより直径15mmの対象領域の照射および12.3 × 12.3mmマトリックスのCCDへの7 × 7mmアレイ領域の投射が可能となる。カメラを供給したWinview32 (Winview32) ソフトウェアを用いて画像を16ビットモードで収集した。サイオンイメージ (Scion Image) (Scion Corporation, Frederick, MD) を用いて解析を行った。

【0253】

## 実施例15-捕獲アドレスの設計

本発明のアプローチは「アドレス」とよばれる24塩基で設計された捕獲配列に依存しており、これらはお互いに非常に異なっておりまた標的配列または染色体上のその他の配列に対するいかなる相同性も欠損している(表13)。

【0254】

## 【表13】

### 原型アレイに用いられるアドレス配列

Zip番号	ターミネーター順序*	ZIPコード配列 (5'→3')†
Zip1	1-6-3-2-6-3	TGCG-ACCT-CAGC-ATCG-ACCT-CAGC-スペーサー-NH <sub>2</sub> (配列番号: 34)
Zip3	3-6-5-2-2-3	CAGC-ACCT-GACC-ATCG-ATCG-CAGC-スペーサー-NH <sub>2</sub> (配列番号: 35)
Zip5	5-6-1-2-4-3	GACC-ACCT-TGCG-ATCG-GGTA-CAGC-スペーサー-NH <sub>2</sub> (配列番号: 36)
Zip11	1-4-3-6-6-1	TGCG-GGTA-CAGC-ACCT-ACCT-TGCG-スペーサー-NH <sub>2</sub> (配列番号: 37)
Zip13	3-4-5-6-2-1	CAGC-GGTA-GACC-ACCT-ATCG-TGCG-スペーサー-NH <sub>2</sub> (配列番号: 38)
Zip15	5-4-1-6-4-1	GACC-GGTA-TGCG-ACCT-GGTA-TGCG-スペーサー-NH <sub>2</sub> (配列番号: 39)
Zip21	1-2-3-4-6-5	TGCG-ATCG-CAGC-GGTA-ACCT-GACC-スペーサー-NH <sub>2</sub> (配列番号: 40)
Zip23	3-2-5-4-2-5	CAGC-ATCG-GACC-GGTA-ATCG-GACC-スペーサー-NH <sub>2</sub> (配列番号: 41)
Zip25	5-2-1-4-4-5	GACC-ATCG-TGCG-GGTA-GGTA-GACC-スペーサー-NH <sub>2</sub> (配列番号: 42)

\* 対応するアドレス配列中のテトラマーオリゴヌクレオチドセグメントの順番。36セット

10

20

30

40

50

全てから無作為に選別した6テトラマーは以下の通りである；1=TGCG；2=ATCG；3=CAGC；4=GGTA；5=GACC；6=ACCT。緊密な配列である{Zip1,3,5}{Zip11,13,15}および{Zip21,23,25}は1、3、5番目テトラマー配置が異なっているが、2、4、6番目テトラマー配置は同一である。

<sup>†</sup>スペーサー $\text{NH}_2=\text{PO}_4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_6\text{PO}_3(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

#### 【0255】

各アドレス配列は完全長24merが70～82(Oligo 6.0, Molecular Biology Insights, Inc., Plymouth MN and Cascade, COを用いて算出)の範囲で同様のTm値を持つような6セットのテトラマーの組合せである。各テトラマーがその他のものと少なくとも2塩基異なり、自己相補でなくまた他のいかなるテトラマーに対しても相補ではない。36テトラマーの開始群を作製した(表1および13を参照せよ)。各アドレス配列が少なくとも3つの交互テトラマー単位までその他全てのものから異なるようにテトラマーを組み合わせた(表13)。これにより各アドレスがその他全てのものとは少なくとも6塩基まで異なり、しかるにオリゴヌクレオチドプローブの最も緊密な位置特定可能アレイ特異的部分ですら交差ハイブリダイゼーションするのを防ぐことが保証される(正確なハイブリダイゼーションのTm値はどの不正確なハイブリダイゼーションのものより少なくとも24高い)。シグナルが検出されるそれらのアドレスの位置から各変異の存在および型を決定した。異なる変異特異的LDRプローブを同セットアドレス相補配列に付加させることができるので、このアレイは普遍的であり、任意の遺伝子中の変異を検出するためにプログラムすることができる。

10

#### 【0256】

##### 実施例16-アレイ調製

様々な型の2次元および3次元マトリックスを以下に関して調べた：(i)表面調製の容易度；(ii)ヌクレオチド負荷容量；(iii)オリゴヌクレオチドの結合に加えハイブリダイゼーションならびに洗浄に求められる条件に対する安定性；および(iv)蛍光検出の適合性。位置特定可能アレイを構築する好ましい方法論はガラス固相支持体に容易に架橋されたアクリルアミド／アクリル酸共重合のフィルムをまず作成し、次に重合体表面全体に無作為に拡散した遊離カルボキシル基を活性化して、共有アミド結合を形成するためにアミン末端化捕獲オリゴヌクレオチドを添加することを含む(図34A-Bおよび36A)。記載されるカップリング化学は迅速で直接的、効率的であり、手動および自動スポット操作に適応しやすい。活性表面およびオリゴヌクレオチド結合表面は共に長期保存に対して安定である。

20

#### 【0257】

##### 実施例17-ハイブリダイゼーション条件の至適化

モデル位置特定可能アレイにおける蛍光標識70merプローブハイブリダイゼーションを緩衝液、金属補因子、体積、pH、時間、および混合の力学の機能として測定した(表14)。緊密なアドレスについてさえ、シグナル-ノイズ比率が少なくとも50:1であり交差ハイブリダイゼーションは無視できるかまたは不在であった。これらの実験から異なるアドレスはおよそ同比率でハイブリッドを形成する、つまり、1アドレスあたりに結合するオリゴヌクレオチド量で標準化した場合に蛍光シグナルレベルは比較的均一であることが示唆される。マグネシウムはハイブリッドを形成させるには必須であり、この二価陽イオン存在下で1fmol以下のプローブを検出することができた(表14；図37)。pHが8.0から6.0に低下することによりハイブリダイゼーションシグナルが倍加されるが、大量のポリマーマトリックス中の未結合アクリル酸基から生じる負電荷(それ故オリゴヌクレオチドとの反発的相互作用が減少する)が遮蔽されることによる可能性が高い。この仮説を確証するために、標準的なカップリング条件の下、捕獲オリゴヌクレオチドが既に結合しているアレイ上の遊離カルボキシル基をエタノールアミンで保護した。pH8.0での保護したアレイのハイブリダイゼーションはpH6.0における保護なしでの同アレイと一致する結果が得られた。確実なハイブリダイゼーションを得るためにには連続して混合することが重要であることが判明し、時間経過検証から標準として選択された65で1時間が導き出された。ハイ

30

40

50

プリダイゼーション体積を減少させることによりハイブリダイゼーションシグナルが改善されたが、これは相対的にプローブ濃度が増加したためである。連続して混合することができる特殊化した小体積ハイブリダイゼーション容器を用いることによりさらなる改善が達成されうる。

## 【0258】

## 【表14】

ハイブリダイゼーションシグナルにおけるハイブリダイゼーション条件の効果

ハイブリダイズ形成 緩衝液	体積 (L)	混合 <sup>†</sup>	時間 (分)	相対的シグナル	
緩衝液A	55	Inter.	30	1	10
緩衝液A-MgCl <sub>2</sub>	55	Inter.	30	<0.01	
緩衝液A	20	Inter.	30	2.5	
緩衝液B	55	Inter.	30	2	
緩衝液B	20	Inter.	30	3	
緩衝液B	55	Cont.	30	4	
緩衝液B	55	Cont.	60	8	20
緩衝液A+被覆表面	55	Cont.	60	8	
緩衝液B-MgCl <sub>2</sub>	55	Cont.	60	<0.01	
緩衝液B	55	Cont.	180	10	

\*ハイブリダイゼーションは1pmolのFAMcZip13-Prdおよび手動でスポットしたアレイで行った。緩衝液は、緩衝液A：300mM バイシン、pH8.0-10mM MgCl<sub>2</sub>-0.1% SDS；<sup>†</sup>緩衝液B：300mM MES、pH6.0-10mM MgCl<sub>2</sub>-0.1% SDS。

混合は、断続性(Inter.)：10分毎に1回試料を手動で混合；連続性(Cont.)；ハイブリダイゼーションオーブン内20rpmで試料を攪拌。

## 【0259】

実施例18-K-ras LDR産物のアレイハイブリダイゼーション

位置特定可能アレイの検出に共役するPCR/LDR增幅を、モデルシステムとしてK-ras遺伝子を用いて検証した。K-ras DNA隣接コドン12および13を選択的に增幅させるためにエクソン特異的なPCRプライマーを用いた。結腸直腸癌のK-ras遺伝子に最もよく見いだされる7つの変異を検出するためにLDRプローブを設計した(図35C、表14)。例えば、コドン12の2番目であるGGTはアスパラギン酸をコードするGATに変異しうるが、これは5'末端に位置特定可能アレイ特異的部分の相補鎖をもつcZip13および蛍光標識した共通プローブの3'末端に識別塩基、Aを連結することにより検出される(図35C)。

## 【0260】

既知K-ras変異を含む細胞株またはパラフィン包埋腫瘍に由来する9つの各DNA試料についてPCR/LDR反応を行った。LDRが成功したことを確認するために各反応液からアリコート(2μl)を搾取しシーケンス機器で電気泳動を行った。次に3×3位置特定可能アレイによるLDR産物混合液のハイブリダイゼーションを行い(各アドレスを4つ組にスポットした)、蛍光スポットの位置を検出することによって異なる変異を判別した(図36Bおよび図39)。野生型試料のWt(G12)およびWt(G13)は予想通りそれぞれZip1ならびにZip25における4つの同じハイブリダイゼーションシグナルを示した。変異試料は細胞株または腫瘍に存在する野生型DNAと同様に、変異に一致するハイブリダイゼーションシグナルを示した。この唯一の例外はG12V試料で、G12V K-ras対立遺伝子に対しホモ接合性の細胞株(SW620)

10

20

30

40

50

に由来する細胞株であった。実験は手動ならびに自動でスポットしたアレイおよびフルオレセインまたはテキサスレッドいずれかで標識したLDRプローブを用いて数回繰返した。これらいずれの実験においても偽陽性または偽陰性シグナルは出現しなかった。アレイ上に見られる最少量のノイズは埃、搔き傷、および／または重合体中の小泡に帰することができる。これらの不備は4つ組のスポットパターンで再現されるものよりも弱く散発的であるため容易に判別される；このようなノイズは製造条件をより厳密にすることにより最小化される。

#### 【 0 2 6 1 】

##### 実施例19-アレイ捕獲感受性

LDR反応後、過剰の未ライゲーション識別プローブは、正しくライゲーションした蛍光標識LDR産物と、アレイ上の正確なアドレスとのハイブリダイゼーションに関して競合する。捕獲感受性を測定するために、標準的な条件で、全セットのK-ras LDRプローブ（全9,000fmolの識別および共通プローブを組み合わせた）存在下100amol（=1/90,000）から30（=1/300）fmolの標識化合成70merのFAMcZip13-Prd（これは完全長LDR産物を刺激する；配列に関して材料と方法を参照せよ）を用い4つ組でDNAアレイをハイブリダイゼーションさせた。フルオロイメージヤー（FluorImager）を用いたアレイ解析は4,500fmolのFAM標識LDRプローブおよびハイブリダイゼーション溶液中に位置特定可能アレイ特異的部分を含む4,500fmolのプローブ存在下最少3fmol（=1/3,000）のFAMcZip13-Prd標識プローブから開始した場合に、3：1以上のシグナル対ノイズ比率が得られることを示している。蛍光を定量する顕微鏡／CCD計測手段を用いた結果はより著しいものであった：1fmol（=1/9,000）の標識化プローブ（図37、右側）で開始することで3：1のシグナル対ノイズ比率を維持することができ、その限界はさらに至適化した後100amolまで伸展することができる予測される。所定のアレイの、いずれかの機器により定量した蛍光に関して、捕獲数値は添加される標識化FAMcZip13-Prd量に伴い直線的に変化した。同アレイに対し、同濃度で同プローブを再度ハイブリダイゼーションする再現性は±5%以内であった。アレイ間の蛍光シグナルにおける差異は結合した捕獲オリゴヌクレオチド量の差異を反映しており、これは手動によるスポット操作特有の不正確さおよび／または重合体の均一性における差異によるものである。

#### 【 0 2 6 2 】

##### 実施例20-PCR/LDR/アレイハイブリダイゼーションによる低存在量変異の検出

PCR / LDR / アレイハイブリダイゼーションを用いて野生型DNAの低レベル変異検出の限界値を測定するために、連続希釈系を調製し解析した。1：20から1：500の範囲の比率でPCR增幅した純G12V DNAを野生型K-ras DNA中に希釈した。2,000fmolのG12V変異に対する各識別および共通プローブをそれぞれ含む2プローブのセットを用いて、2,000fmolの全DNAに対し2つ組LDR反応を行った。1：200の希釈度で陽性ハイブリダイゼーションシグナルを定量することができるが明らかとなった（図38）；シグナルは1：500の希釈度においても判別可能であるが、後者の場合重合体の埃または気泡によるノイズレベルによって結果の正確な定量性は妨げられた。純野生型DNA対照はハイブリダイゼーションシグナルを示さなかった。これらの結果は明らかにPCR/LDRと組み合わせた場合、位置特定可能アレイハイブリダイゼーションは全DNAの1%しか存在しない遺伝子多型を検出しうることを示している。これらの結果は、26プローブセットおよび産物のゲル電気泳動に基づく解析を用いたPCR/LDRはシグナル対ノイズが少なくとも3：1の比率で、野生型が500倍まで過剰に存在する中で任意のK-ras変異をも検出することができることを示す早期の研究と一致している。

#### 【 0 2 6 3 】

##### 実施例21- -メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン（-methacryloxypropyltrimethoxysilane）で被覆したグラススライド表面上でのアクリルアミド-アクリル酸重合体の重合反応

1%（v/v）濃度のアクリル酸を作成するために10mlの19%アクリルアミド-1%ビスマスアクリルアミド（w/v）溶液に100mgのビスマス-アクリロイルシスタミン（Sigma）を添加した。

10

20

30

40

50

$\mu\text{l}$ の2% (w/v) 過硫酸アンモニウム (Biorad)、および100  $\mu\text{l}$ アリコートあたり1  $\mu\text{l}$ のTEMEDを添加した後混合液を重合させた。実施例9に記載されるように、25  $\mu\text{l}$ のTEMED活性化溶液を -メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン被覆グラススライドにアプライし、実施例10に記載されるようにジクロロジメチルシランで被覆したグラススライド下で重合させた。

#### 【0264】

実施例22-アクリルアミド-ビスアクリルアミド-アクリル酸共重合体への色素および色素標識オリゴヌクレオチドの付着

実施例9に記載されるように -メタクリルオキシプロピルトリメトキシシランでシラン化した固相支持体にアクリルアミド-ビスアクリルアミド-アクリル酸共重合体から構成される楔形ゲルを調製した。1mlのアクリルアミド-ビスアクリルアミド-アクリル酸 (9.5% : 0.5% : 1% w/v) 溶液に33  $\mu\text{l}$ の2% 過硫酸アンモニウムを添加した。100  $\mu\text{l}$ アリコートに1  $\mu\text{l}$ のTEMEDを添加し20  $\mu\text{l}$ のこの混合液をシラン化した固相支持体にアプライした。

#### 【0265】

0.1M フルオレセインアミン (Research Organics)、0.1M プトレセイン (putrescine) 含有0.1M ボディピー (Bodipy) -FL-NHS (Molecular Probes)、およびアミノ誘導体化フルオレセイン標識オリゴヌクレオチドを含む .1Mリン酸緩衝液 pH7 および50mM EDC ( Pierce) を楔形ゲルにアプライした。加湿容器で室温にて30分間カップリング反応を進めた。相対蛍光単位をモレキュラーダイナミクス595フルオロイメージヤーによる光電子増倍管で、488nm励起、513nm発光および700V電位にて測定した。表15は表面に結合する色素についての相対蛍光度を示している。ゲルの類比深度領域において、ボディピー (Bodipy) FL はプトレセインを介してマトリックスに結合しているにも関わらずRFUが最も高かったが、一方でフルオレセインアミンはマトリックスと直接結合しているにも関わらずシグナルはより低かった。ボディピーFLはフルオレセインに比べpH感受性が低いことが分かっており、これがほぼ5倍のRFUの違いを説明している。表面に結合したフルオレセイン標識オリゴヌクレオチドはフルオレセインより5倍以上RFUが低下した。フルオレセイン標識アミノオリゴヌクレオチドで最も低いシグナルが観察された。色素はオリゴヌクレオチドより効率的にマトリックスに結合するように思われるが、これはより容易にマトリックスに浸透するためである可能性がある。図40のように楔形ゲルの最大深度勾配に沿った相対蛍光単位 (RFU) を測定し色素のマトリックス浸透能力を示した。ゲルの厚さが増加するにつれフルオレセインアミンのRFUが増加する。

#### 【0266】

#### 【表15】

アクリルアミド/アクリル酸共重合体に結合する色素およびオリゴヌクレオチド相対蛍光の定量

色素	付着	積分シグナル (全 RFU*)	標準偏差
ボディピー -FL-NHS	プトレセイン	3895940	701
フルオレセイン	アミン	825186	239
フルオレセイン	アミノオリゴヌクレオチド	144178	326

\* RFU=相対蛍光単位

#### 【0267】

実施例23-野生型対立遺伝子および変異対立遺伝子のPCR/LDR検出のためのBRCA1およびBRCA2のエクソン増幅

50ngのDNA、2.5mMの各dNTP、1 × TCK緩衝液 (20mM トリシン、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ウシ血清アルブミン、および50mM 酢酸カリウム)、および .25U Taqポリメラーゼを含む20  $\mu\text{l}$ の反応混合液から開始して染色体DNAからの增幅を行った。BRCA1エクソン20およびBRCA2エクソン11を增幅するために、8pmolの各BRCA1エクソン2プライマーと共に4pmolの各フォワードプライマーならびにリバースプライマープライマーを用いた。チューブにミネラルオイル

10

20

30

40

50

を充填し94 °で1.5分間前保温した。必要単位のポリメラーゼを導入するために1×緩衝液で希釈したポリメラーゼ1μlを添加してホットスタートを行った。40サイクルで各セグメントを増幅した。各サイクルは94 °15秒の融解段階、および55 °2分の混合アニール-伸長段階からなる。最終サイクル後、55 °でさらに5分間反応を継続した。PCR後、プロテナーゼKで70 °10分間および90 °15分間処理した。

#### 【0268】

変異対立遺伝子と野生型を判別するために、変異対立遺伝子から野生型を、各対立遺伝子について異なる蛍光色素をもつ異なる大きさのバンドとしてゲル上で検出可能に設計された競合LDRに対する錫型としてPCR産物を用いた。共通プローブを5'リン酸化しC3スペーサーにてその3'末端を遮断した(Bk)。連結反応には500fmolの各識別プローブおよび750 fmolの各共通プローブを用い、10サイクルで94 °にて15秒間の変性および65 °で2分間のライゲーション反応を行った。10%アクリルアミドゲルを用いた電気泳動によりLDR産物を分離しABI 373蛍光シーケンサーで検出した。ABI TAMRA-350 サイズ基準をLDR試料に添加した。

#### 【0269】

アレイ上の特異的な相補物のアドレスに捕獲できるように、位置特定可能なアレイ特異的部分を含めるようLDRプローブを再設計した。2種類の方法を開発した。一つ目は、各対立遺伝子を同定するための異なる色素を持つLDR標的に対して、一つのアドレスをアレイ上に設置する方法である(表16)。

#### 【0270】

#### 【表16】

BRCA1およびBRCA2の3つの特異的変異を検出するためのプローブ。LDR標的あたりのアレイ上のあるアドレスとのハイブリダイゼーションによる捕獲、および各対立遺伝子間を識別するための異なる蛍光色素からのシグナル。

変異	プローブ	配列	
BRCA1エクソン2 185delAG	共通 BC1X2PZip1R	Phos-TGTCCCATCTGGTAAGTCAGCACAAAC-GCTGAGGTCGATGCTGAGGTGCGA-Block (配列番号: 43)	10
野生型 BC1X2FIWT		Fluor-AACATTAATGCTATGCAGAAAATCTTAGAG (配列番号: 44)	20
変異 BC1X2TetMT		Tet-GTCATTAATGCTATGCAGAAAATCTTAG (配列番号: 45)	
BRCA1エクソン20 5382insC	共通 BC1X20PZip3R	Phos-AGGACAGAAAGGTAAAGCTCCCTCC-GCTGCGATCGATGGTCAGGTGCTG-Block (配列番号: 46)	30
野生型 BC1X20FIWT		Fluor-CAAAGCGAGCAAGAGAACCCC (配列番号: 47)	
変異 BC1X20TetMT		Tet-ACAAAGCGAGCAAGAGAACCCCC (配列番号: 48)	40
BRCA2エクソン11 6174delT	共通 BC2X11PZ5R	Phos-GGAAAATCTGTCCAGGTATCAGAT-GCTGTACCCGATGCGAAGGTGGTC-Block (配列番号: 49)	
野生型 BC2X11FIWT		Fluor-CAACTTGTGGGATTTTAGCACAGCAAGT (配列番号: 50)	
変異 BC2X11EMT		Tet-TACTTGTGGGATTTTAGCACAGCAAG (配列番号: 51)	

#### 【0271】

これらのプローブは野生型PCR産物および変異PCR産物とハイブリダイゼーションするが、両プローブが間隙または重複なく完全に一致する場合にのみライゲーションする（図41）。識別プローブの各位置特定可能アレイ特異的部分はLDR産物をアレイ上の特異的アドレスへと配向させる。2つめの方法は、変異の存在および不在を判別する全てのLDRプローブに、各LDR産物を個々のアドレスに配向させる特有の位置特定可能アレイ特異的部分を持たせることである（表17）。

【0272】

【表17】

BRCA1およびBRCA2の3つの特異的変異を検出するためのプローブ。単一の蛍光色素に由来する対立遺伝子シグナルあたりのある特有のアレイアドレスとのハイブリダイゼーションによるアレイ上の捕獲。

変異	プローブ	配列
BRCA1 エキソン2 185delAG	共通 BC1X2PF	Phos-TGTCCCATCTGGTAAGTCAGCACAAAC-Fluor (配列番号： 52)
野生型 BC1X2WTZip2R		GCTGGCGACGATTACCAAGGTCGAT- AACATTAATGCTATGCAGAAAATCTTAGAG (配列番号： 53)
変異体 BC1X2MTZip4R		GCTGGCTGCGATAGGTAGGTTACC- GTCATTAATGCTATGCAGAAAATCTTAG (配列番号： 54)
BRCA1 エキソン20 5382insC	共通 BC1X20PF	Phos-AGGACAGAAAGGTAAAGCTCCCTCC-Fluor (配列番号： 55)
野生型 BC1X20WTZip12R		GCGAGCGAAGGTTACCTACCCGAT- CAAAGCGAGCAAGAGAATCCC (配列番号： 56)
変異体 BC1X20MTZip13R		GCGACGATAGGTGGTCTACCGCTG- ACAAAGCGAGCAAGAGAATCCCC (配列番号： 57)
BRCA2 エキソン11 6174delT	共通 BC2X11PF	Phos-GGAAAATCTGTCCAGGTATCAGAT-Fluor (配列番号： 58)
野生型 BC2X11WTZip14R		GCGAGCTGAGGTAGGTTACCTACC- CAACTTGTGGGATTTTAGCACAGCAAGT (配列番号： 59)
変異体 BC2X11MTZip15R		GCGATACCAGGTGCGATACCGGTC- TACTTGTGGGATTTTAGCACAGCAAG (配列番号： 60)

【0273】

一つの色素のみが必要とされる（図43）。ゲルで大きさによってこれらの産物を分離し、変異の存在または不在を確認することができる（図44）。PCR産物を、单一および二重

10

20

30

40

50

の色素プローブを用いたアプローチの両方を用いて、並行して変異についてLDRによってスクリーニングした。同一の試料から得られたLDR産物を両ゲルにロードし、両方とも一致した量の各LDR産物を示す。産物がゲル上で完全には分離しない可能性があるため、二重色素アプローチは、ゲル上での変異産物対野性型産物を視覚的に判別することをより容易にする。しかし、位置特定可能なアレイ特異的部分のアレイ上へのハイブリダイゼーションがアレイ上で完全な物理的な分離を許せば、この場合単一の色素で十分である。アレイは、再現性を確認するため、それぞれ4つを一群としてスポットした、複数のアドレス（表18）を伴うよう作成された（図44）。

## 【0274】

## 【表18】

アレイに結合する捕獲プローブ

	プローブ	配列
1	AmSpZip1	アミノリンカースペーサー TCGCACCTCAGCATCGACCTCAGC (配列番号：61)
2	AmSpZip2	アミノリンカースペーサー ATCGACCTGGTAATCGTCGCCAGC (配列番号：62)
3	AmSpZip3	アミノリンカースペーサー CAGCACCTGACCATCGATCGCAGC (配列番号：63)
4	AmSpZip4	アミノリンカースペーサー GGTAACCTACCTATCGCAGCCAGC (配列番号：64)
5	AmSpZip5	アミノリンカースペーサー GACCACCTTCGCATGGGTACAGC (配列番号：65)

## 【0275】

100W水銀バーナー、フルオレセインならびにローダミンフィルターキューブおよびプリンストンインストルメント TEK512/CCDカメラ（Princeton Instruments TEK512/CCD camera）を用いてオリンパスプロビスAX70（Olympus Provis AX70）顕微鏡でアレイを画像化した。

## 【0276】

TET標識LDR産物から独立してFAM標識LDR産物を画像化した。8ビットグレースケールへ変換する前にLDRシグナルをより狭域に絞るため、16ビットグレースケールを再調整した。フォトショップ（Photoshop）を用いて、FAM（野性型）を緑色に、およびTET（変異）を赤色にして8ビット画像に色付けをした（図45）。最後にこれらの画像を重ね合わせ、アドレスに野性型対立遺伝子および変異対立遺伝子の両方が存在すると黄色になるような併用画像を作成した。野性型対立遺伝子が各試料に存在し、LDR産物の位置特定可能特異的部分に相補的なアドレスのみが検出可能なシグナルを有していた。従って、位置特定可能アレイのハイブリダイゼーションは極めて特異的である。アレイにハイブリダイゼーションする各試料のゲルレーンを示す。各試料の変異の存在は、対応するアレイアドレスおよびゲルバンドの記載に下線を引くことで指示する。それぞれの場合において、アレイはゲルの結果を再現した。二重標識法は同アレイアドレス上で野性型および変異対立遺伝子の存在を同定することができ、この方法はホモ接合体個体またはヘテロ接合体個体を同定することができる。

## 【0277】

実施例24-アレイの調製およびハイブリダイゼーション反応における使用

単層被覆支持体と比較した場合、ガラス顕微鏡スライド上を重合体コーティングすることにより捕獲プローブの結合容量が増加した。この結果のために、20 μmまでの厚さの中性重合体層で支持体を調製した。この重合体はモノメタクリル酸グリセロールを混入した

10

20

30

40

50

、アクリルアミドに基づく材料であった。酸化させると、モノメタクリル酸グリセロールのビシノールジオールがアルデヒドに転換し、これはアミン末端オリゴヌクレオチド捕獲プローブの固定点としてはたらく。

#### 【0278】

表面に重合体を固定するために、参照として本明細書に組み込まれるS. サバード (S. Savard) らの手順、「水溶液中のシラン加水分解および濃縮 (Hydrolysis and Condensation of Silanes in Aqueous Solution)」、ポリム コンポス (Polym Compos) 第5巻：第242-249ページ (1984年) に従い、まずガラスを3- (トリメトキシシリル) プロピルメタクリレートでシラン化した。3- (トリメトキシシリル) プロピルメタクリレート (0.04 M) の希HCl水溶液、pH2~4を25 ℃にて30分間激しく攪拌する。清浄な3×1"顕微鏡スライド (実施例8に従い調製) を25 ℃で30分間、時々攪拌しながらこの溶液中でインキュベートし、脱イオン水ですすぎ、窒素で風乾し、24時間以内に使用する。

#### 【0279】

1インチおよび1000インチのステンレススチール製楔をメタクリレート処理したスライドおよび疎水性にした (10% v/vジクロロジメチルシランのトルエン溶液) 2枚目の顕微鏡スライドの間3箇所の端に設置する。E. N. チモフ (E. N. Timofeev) ら、「アクリル共重合体ゲルへの短いオリゴヌクレオチドの位置選択的固定化 (Regioselective Immobilization of Short Oligonucleotides to Acrylic Copolymer Gels)」核酸リサーチ (Nucleic Acids Res.) 第24巻：第3142-3148頁 (1996年)、これは参照として本明細書に組み入れられる。楔で固定された3端を顕微鏡スライドの1カ所1インチを空けたクランプの位置に保持する。次に、このように形成された孔をN,N-ジメチルアクリルアミド (0.9M)、モノメタクリル酸グリセロール (0.1M) (Polysciences, Inc. Warrington, PA)、N,N-メチレン-ビスアクリルアミド架橋剤 (0.0027M) を含む重合可能な溶液、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (0.2% v/v) および要時調製した10%過硫酸アンモニウム (2% v/v) で充填し重合反応を開始する。25 ℃にて30分間重合反応を行い、「サンドイッチ」を解離させる。重合体フィルムを脱イオン水ですすぎ、乾燥させてさらに使用するまで4℃で保存する。

#### 【0280】

前記参照で実行されているように、N,N-ジメチルアクリルアミドと共重合した特別に設計した前駆体である、ゲル形態のアルデヒドを作成するためにNaIO<sub>4</sub>による酸化反応を利用して、従来の手法を用いる。本発明におけるアルデヒドを、メタクリル酸グリセロールのビシノールジオールをNaIO<sub>4</sub> (0.1M、25 ℃、1時間) で処理することにより作製する。マトリックスを含むアルデヒドを脱イオン水中に浸水させる (25 ℃、1時間)。スライドを浴槽から取り出し、水和させた表面から過剰の水を窒素気流にて噴き落とす。重合体を乾燥させる (25 ℃、30分間)。0.5 μl容量の注射器を用いて、0.1 μlの末端1級アミンを含む蛍光標識24mer捕獲オリゴヌクレオチドプローブ (pH約5の0.2M 酢酸ナトリウム緩衝液中に500 μM) をアルデヒド化表面に付着させる。アドレスを含む液体の上に0.1 μlのシアノ水素化ホウ酸ナトリウム (0.1M) を直接付着させる。加湿容器内で24時間還元アミノ化反応を行う (25 ℃)。カップリング反応後、マトリックスを65 ℃で30分間、300mM NaCl および0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含むビシン緩衝液 (300mM, pH8) に浸す。このスライドを脱イオン水にてすすぎ、窒素で風乾して乾燥器にて保存する。

#### 【0281】

実施例14に従いハイブリダイゼーションを行う。

#### 【0282】

4×倍率で水銀蒸気ランプを用いて、ユニバーサルイメージング (Universal Imaging) のスポットカメラ (Spot Camera) により蛍光画像を取得する。ローダミン標識相補的配列に対する露光時間は10秒とする。メタモルフ (Metamorph) を用いてバックグラウンドを上回る光シグナル量を定量する。オリジナル画像を50%まで縮小し、400ピクセル径の円を組み込む。

#### 【0283】

10

20

30

40

50

表19は上述の方法で調製したスライドの捕獲性能を示している。

【0284】

【表19】

捕獲プローブの蛍光定量

プローブ	捕獲オリゴヌクレオチド11 における蛍光カウント	捕獲オリゴヌクレオチド13 における蛍光カウント
スライド1	11	$3.92 \times 10^6$
スライド2	11	$2.04 \times 10^6$
スライド3	11	$2.55 \times 10^6$
スライド1	13	検出不可能な読みとり
スライド2	13	検出不可能な読みとり
スライド3	13	検出不可能な読みとり

【0285】

変異を検出する本アプローチは3つの直交する要素をもつ：(i)一次PCR増幅(ii)溶液相LDRの検出：および(iii)固相ハイブリダイゼーションでの捕獲。従って、各段階でのバックグラウンドシグナルを最小化することができ、結果として本発明方法の全体的な感度および精度は他のストラテジーによって供給されるものより有意に向上する。例えば、「シーケンシング・バイ・ハイブリダイゼーション(Sequencing by hybridazation)」法は(i)複数ラウンドのPCRまたはPCR/T7転写反応；(ii)PCR増幅産物の断片化処理またはこれら一本鎖化；および(iii)長時間のハイブリダイゼーション時間(10時間またはそれ以上)を必要とし、これらの処理量が限定される(Guoら、Nucleic Acids Res.、第22巻：第5456-5465頁(1994年)；Haciaら、Nat. Genet.、第14441-447頁(1996年)；Cheeら、Science、第274巻：第610-614頁(1996年)；Croninら、Human Mutation、第7巻：第244-255頁(1996年)；Wangら、Science、第280巻：第1077-1082(1998年)；Schenaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第93巻：第10614-10619頁(1996年)；およびShalonら、Genome Res.、第6巻：第639-645頁(1996年)、これらは参照として本明細書に組み入れられる)。加えて、これらのアレイに固定されたプローブは広範囲なTm値を有するので、0から44の温度でハイブリダイゼーションを行う必要がある。結果として、例えば反復配列中の小規模な挿入および欠失によるハイブリダイゼーションのミスマッチおよび非特異的結合のために、バックグラウンドノイズおよび偽シグナルが増加する(Haciaら、Nat. Genet.、第14441-447頁(1996年)；Croninら、Human Mutation、第7巻：第244-255頁(1996年)；Wangら、Science、第280巻：第1077-1082頁(1998年)；およびSouthern, E. M.、Trends in Genet.、第12巻：第110-115頁(1996年)、これは参照として本明細書に組み入れられる)。一方、本発明の方法により、単一の反応で多重PCRが可能となり(Belgraderら、Genome Sci. Technol.、第1巻：第77-87頁(1996年)、これらは参照として本明細書に組み入れられる)、産物を一本鎖型に変換するための付加的な段階が必要とされず、反復配列中の滑り(slippage)を含む全ての点変異を容易に判別することができる(Dayら、Genomics、第29巻：第152-162頁(1995年)、これは参照として本明細書に組み入れられる)。選択的DNAアレイは、配列の多様性または試料中に存在する標的の量が原因でハイブリダイゼーション効率のばらつきを被る。類似の熱力学的性質をもつ多岐にわたるアドレス配列を設計する本手法を用いることによって、ハイブリダイゼーションを65で行うことができ、結果としてより厳密および迅速なハイブリダイゼーションが得られる。変異検出段階からハイブリダイゼーション段階を切り離すことで、ゲルに基づくLDR検出を用いて既に達成されているように、LDR産物の定量化の見通しを与える。

【0286】

ガラス表面に直接スポットした、またはインサイチュで合成したアレイと比較して、重合体表面にスポットしたアレイは单一捕獲の有意な改善をもたらす(Drobyshevら、Gene、第188巻：第45-52頁(1997年)；Yershovら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第93巻：

10

20

30

40

50

第4913-4918頁（1996年）；およびParinovら、Nucleic Acids Res.、第24巻：第2998-3004頁（1996年）、これらは参照として本明細書に組み入れられる）。しかし、その他に記載される重合体は、用いるアドレスが8merから10merに限定されるが、本発明の重合体表面によって容易に24mer捕獲オリゴヌクレオチドを浸透させ共有結合させることが可能となる。さらに、60から75ヌクレオチド塩基長のLDR 産物が浸透し、続いて正しいアドレスにハイブリダイゼーションすることも見出される。付加的な長所として、この重合体はほとんどのあるいは全くバックグラウンド蛍光を生じず、蛍光標識オリゴヌクレオチドの非特異的な結合を示さない。最後に、個々のアドレスにスポットし共有結合させた捕獲オリゴヌクレオチドは近隣のスポットに「漏洩」しないため、例えばゲルパッドを切除することにより物理的に位置を分離する必要性が排除される。

10

## 【0287】

本発明は文献中に前出する、アレイに基づく他の検出システムから実質的に異なる、高処理量の変異検出に関するストラテジーに関連する。溶液中で行われるポリメラーゼ連鎖反応／リガーゼ検出反応（PCR/LDR）アッセイと一致して、本発明のアレイにより、遺伝性でその遺伝子について配列の50%として存在するか、散発性で野生型配列の1%またはそれ以下で存在するかどうかに関わらず、单一塩基変異の正確な検出が可能となる。熱安定性DNAリガーゼが変異判別の特異性を供給する一方で、LDRプローブの多岐にわたる位置特定可能アレイ特異的部分が各LDR産物をDNAアレイ上の指定されたアドレスへと導くため、この感度が得られる。アドレス配列は一定でありこれらの相補的配列を任意の組み合わせのLDRプローブに付加することができるため、本発明の位置特定可能なアレイは汎用性がある。従って、広範囲な遺伝性変異を検出するために単一のアレイ設計をプログラムすることができる。

20

## 【0288】

多種多様な遺伝子にある多くの潜在的部位における変異の迅速な検出のための確実な方法は、癌患者の診断および治療の改善において非常に有望である。唾液、痰、尿、および糞便中に排出される細胞の変異解析に関する非侵襲性試験は高危険率群の監視を有意に単純化および改善し、内視鏡試験の費用および不快さを減少させ、癌の、早期かつ治療可能な段階でのより効果的な診断へと結び付けることができる。現れる変異の検出の実行可能性が、既知のおよび遺伝学的に特徴付けられている腫瘍を持つ患者において明確に示されているが（Sidranskyら、Science、第256巻：第102-105頁（1992年）、Nollauら、Int. J. Cancer、第66巻：第332-336頁（1996年）；Calasら、Cancer Res.、第54巻：第3568-73頁（1994年）；Hasegawaら、Oncogene、第10巻：第1413-16頁（1995年）；およびWuら、「癌の分子マーカの早期検出（Early Detection of Cancer Molecular Markers）」（Lipmanら、編集）（1994年）、これらは参照として本明細書に組み入れられる）、効果的な前駆症状診断は無数の潜在的低頻度変異を最小の偽陽性および偽陰性で同定する必要があると思われる。さらに、治療に対する反応の可能性についての臨床的情報を有する腫瘍内の遺伝学的变化を決定するための技術の統合によって、治療のために、より進行性の腫瘍をもつ患者をどのように選択するかを根本的に改变させることができた。大規模な臨床試験で多くの候補遺伝子を試験することが、信頼性のある遺伝子マーカーの同定および確認に必要である。100,000を超えるアドレスをもつ高価な微細加工チップを作製することはできるが、これらの内、このような臨床試験で正確に変異プロファイルを記録することが必要とされるような、低頻度の変異を検出する能力を示すものはない（Haciaら、Nat. Genet.、第14441-447頁（1996年）；Cheeら、Science、第274頁：610-614（1996年）；Koza Iら、Nat. Med.、第2巻：第753-759頁（1996年）；およびWangら、Science、第280頁：第1077-1082頁（1998年）、これらは参照として本明細書に組み入れられる）。本発明の汎用性の位置特定可能なアレイによるアプローチは、多種多様な遺伝子の様々なコドンにおける低頻度の変異を迅速かつ確実に同定すること、また同様に、腫瘍の成長に付随する様々な遺伝子の欠失および増幅を定量することのできる可能性を有している。加えて、mRNA発現プロファイリングに関して、LDR汎用性アレイはK-ras、N-ras、およびH-rasのような高度に類似する遺伝子を判別することができる。さらに、特定遺伝子または特定の変異タンパ

30

40

50

ク質を標的とする新規治療法が開発されるにつれ、迅速および正確な高処理量の遺伝子試験の重要性は疑い無く増加するであろう。

**【0289】**

本発明は例証を目的として詳細に記載されているが、そのような詳細は単に例証の目的のためにあるものであり、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく当業者により変法が作製できることが理解される。

**【図面の簡単な説明】**

**【図1】** 先行技術および本発明のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）/リガーゼ検出反応（LDR）の各プロセスを示す流れ図であり、点変異などの生殖系列上の変異の検出に関するものである。 10

**【図2】** 先行技術および本発明のPCR/LDRプロセスを示す流れ図であり、癌に関連した変異の検出に関するものである。

**【図3】** 同一遺伝子の2種の多型（すなわち対立遺伝子の差）におけるホモ接合体またはヘテロ接合体の検出を目的とした、対立遺伝子特異的なプローブ上のアドレスを用いる本発明のPCR/LDRプロセスを示す略図である。

**【図4】** 任意の部位において生じうるすべての塩基を識別する対立遺伝子特異的なプローブのアドレスを用いる本発明のPCR/LDRプロセスを示す略図である。

**【図5】** 近傍の2か所の部位に存在しうる任意の塩基の有無の検出を目的として、対立遺伝子特異的なプローブのアドレスを用いる本発明のPCR/LDRプロセスを示す略図である。 20

**【図6】** 挿入および欠失を識別する対立遺伝子特異的なプローブのアドレスを用いる本発明のPCR/LDRプロセスを示す略図である。

**【図7】** 正常配列が大半を占める中で、数度が低い変異（コドン内）を検出するために対立遺伝子特異的なプローブのアドレスを用いる本発明のPCR/LDRプロセスを示す略図である。

**【図8】** アドレスを共通のプローブ上に置き、対立遺伝子の差を異なる蛍光シグナル（F1、F2、F3、およびF4）で識別する本発明のPCR/LDRプロセスを示す略図である。

**【図9】** 隣接する対立遺伝子および近傍の対立遺伝子とともに検出する本発明のPCR/LDRプロセスを示す略図である。

**【図10】** 一つのコドンに対して生じうるすべての一塩基変異を検出する本発明のPCR/LDRプロセスを示す略図である。 30

**【図11】** 共有結合による修飾、移動（grafting）、および固相支持体へのオリゴマー結合の化学反応を示す。

**【図12A～図12C】** オリゴヌクレオチドの共有結合を介した固相支持体への結合に対して本明細書で提案される化学反応を示す。

**【図13A～図13C】** オリゴヌクレオチドプローブの捕獲に関する別のフォーマットを示す。図13Bでは、位置特定可能なアレイに特異的な部分が、対立遺伝子特異的なプローブ上にある。各対立遺伝子は、それぞれアドレスZ1およびZ2上の蛍光シグナルの捕獲により識別される。図13Cでは、位置特定可能なアレイに特異的な部分は共通プローブ上にあり、各対立遺伝子は各2本の対立遺伝子に対応する蛍光シグナルF1およびF2の捕獲により識別される。 40

**【図14A～図14E】** 完全長が各24merのオリゴマーを、固相支持体上の様々な部位にスポットティングすることでオリゴマーの8×8アレイを構築する手順を示す。

**【図15A～図15E】** 図14A～Eに示した8×8アレイ構築手順の斜視図である。

**【図16A～図16C】** 完全長が各24merのオリゴマーを、図14A～Eから図15A～Eの手法に従って固相支持体上にスポットティングする際に使用する装置の図である。

**【図17】** 一連の固有の24merを作製する際に使用することが可能な、少なくとも2塩基が異なる36種の四量体を使用した本発明によるデザインを示す。

**【図18A～図18G】** PNAの四量体を付加して、固有の25merのアドレスをもつ5×5アレイの作製法を示す略図である。 50

【図19A～図19E】 6種類の四量体を連続的にカップリングすることで24merの8×8のアレイを構築する手順を示す。

【図20A～図20C】 図19B～Cに示した8×8アレイの構築手順の斜視図である。

【図21A～図21F】 図19B～Cに示した位置特定可能なアレイ合成の切断面を示す。

【図22A～図22C】 図19B～C、図20A～C、および図21A～Gに示した固相支持体上における24merの8×8アレイ合成に使用する装置の略図である。

【図23A～図23C】 図19(図19D～E)に示した8×8アレイの構築手順の斜視図である。

【図24A～図24C】 図19D～Eおよび図23A～Cに示した固相支持体上における24merの5×5アレイの合成に使用する装置の略図である。 10

【図25A～図25C】 6種の供給溶液を5つの出力ポートに分けることが可能なバルブプロックアセンブリの略図である。

【図26A～図26D】 6種の供給溶液を5つの出力ポートに同時に排出することが可能な円形マニホールドの図である。

【図27】 本発明のプロセスを実施するアッセイシステムを示す略図である。

【図28】 様々な誘導体を導入した表面のホスホイメージャー(phosphor imager)によるデータを示す。

【図29】 重合体マトリックスの様々な架橋条件のホスホイメージャーによるデータを示す。

【図30】 水酸基により機能を付与したスライドのホスホイメージャーによるデータを示す。 20

【図31】 3-メタクリロイロキシプロピルトリメトキシシランでシラン処理したガラス製スライドを作製する反応式を示す。

【図32】 3-メタクリロイロキシプロピルトリメトキシシランでシラン処理したガラス製スライド上で、重合体化したポリ(エチレングリコール)メタクリレートを合成する反応式を示す。

【図33】 3-メタクリルロイロキシプロピルトリメトキシシランでシラン処理したガラス製スライド上で、重合体化したアクリル酸およびトリメチロールプロパンエトキシレート(14/3 EO/OH)トリアクリレートを合成する反応式を示す。 30

【図34A～図34B】 3-メタクリロイロキシプロピルトリメトキシシランでシラン処理したガラス製スライド上で、重合体化したポリ(エチレングリコール)メタクリレートおよびトリメチロールプロパンエトキシレート(14/3 EO/OH)トリアクリレートを合成する反応式を示す。

【図35A～図35C】 位置特定可能なアレイを用いたPCR/LDRによる変異検出法を示す。図35Aは、変異の識別に使用するLDRプローブの略図を示す。個々の対立遺伝子特異的なプローブは、5'端に位置特定可能な配列の相補的部分(Z1またはZ3)を有し、また3'端に識別用塩基を有する。共通LDRプローブは、5'端がリン酸化されており、3'端に蛍光標識を有する。このプローブは、標的DNA上で互いに隣接してハイブリッドを形成し、接合部が完全に相補的である場合にのみリガーゼによってニックが埋められる。図35Bは、変異の存在および種類が、LDR反応産物と位置特定可能なDNAアレイ間のハイブリダイゼーションにより決定されることを示す。このプローブの位置特定可能なアレイ特異的部分の配列は十分異なるようにデザインされている。そのため、任意の部分に対して正しい相補性塩基を含むプローブのみがそのアドレスにおいて結合状態を保つ。図35Cは、K-ras遺伝子を含む染色体DNAの略図である。エキソンには影をつけてあり、コドン12および13の位置を明示してある。K-ras遺伝子のDNAで隣接するコドン12および13を選択的に增幅する目的でエキソンに特異的なプローブを使用した。プローブは図35Aの上部に示すように、これら2つのコドンにおける7通りの変異をLDRにより検出するようにデザインした。 40

【図36A～図36B】 DNAアレイ上にあるK-rasの変異の検出を示す。図36Aは、ゲルを用いた位置特定可能なアレイの略図である。-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシランで処理した顕微鏡用スライドガラスを、アクリルアミド/アクリル酸の共重合体

マトリックスを共有結合を介して結合させる基盤として使用する。アミン修飾した捕獲用オリゴヌクレオチドは、N-ヒドロキシコハク酸イミドで活性化させた表面に分散した位置に結合させる。3×3の格子内の各位置は、各アドレス（および対応するK-ras変異配列または野生型配列）に対応する。図36Bは、各LDR反応でハイブリッドを形成したアレイと、2秒間の露光によって検出された蛍光シグナルを示す。9枚すべてのアレイで、各腫瘍または細胞系列の試料に対し、正確な変異型および/または野生型が同定された。一部のパネルでみられる小さなスポット-例えばG13D変異を含むパネルの中央付近にみられるスポット-は、不正なハイブリダイゼーションを意味するものではなく、不完全な重合体によるノイズである。

【図37】 2種の異なる検出装置を用いた位置特定可能なアレイの捕獲感度の判定を示す。この際、後述する4通りのハイブリダイゼーションを行った。グラフは、フルオルイメージヤー（fluorimager）（左）または、蛍光顕微鏡（epifluorescence microscope）/CCD（右）を用いて捕獲した70merの相補配列の定量結果を示す。各点は、個々のアレイに対するハイブリダイゼーションを表す。  
10

【図38】 位置特定可能なアレイ捕獲を対象としたPCR/LDRを用いて、野生型DNAが多数を占める中にわずかに存在するK-ras変異DNAの検出を示す。G12V変異を含む細胞系列SW620に由来するDNA、および正常リンパ球に由来するDNAを対象としたPCRでK-ras遺伝子の第1エキソンを増幅した。G12V増幅断片の10、20、40、または100 fmolに加えて、PCRで増幅した野生型断片2,000 fmolを含む混合物を調製し、G12V変異に特異的なプローブを用いたLDRで変異型DNAを決定した（識別用プライマーと共に通プライマーを各2,000 fmol）。画像データは、CCDの露光時間を5~25秒間として収集した。データは、蛍光シグナル強度を撮像時間で割って基準化した。各データポイントは、4枚の独立したDNAアレイのハイブリダイゼーションに由来する平均シグナルから平均背景シグナルを差し引いた値を表す。  
20

【図39】 位置特定可能なアレイ捕獲を用いたPCR/LDRによるK-ras変異の検出を示す。

【図40】 BRCA 1遺伝子およびBRCA 2遺伝子における3種類の特異的変異を検出するためのプローブのライゲーションを示す。

【図41】 BRCA 1遺伝子およびBRCA 2遺伝子における3種類の特異的変異を検出するためのプローブのライゲーションを示す。

【図42】 LDRにより検出されたBRCA 1遺伝子およびBRCA 2遺伝子における3種類の特異的変異の同定（ゲル使用）を示す。  
30

【図43】 アレイのアドレス上にカップリングさせたオリゴヌクレオチドを示す。標識は、表16に示した通りにスポットしたオリゴヌクレオチドを示す。

【図44】 BRCA 1遺伝子およびBRCA 2遺伝子における3種類の特異的変異のLDRによる検出を示す。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Cornell Research Foundation, Inc.  
University of Minnesota  
Board of Supervisors of Louisiana State University

<120> DETECTION OF NUCLEIC ACID SEQUENCE DIFFERENCES USING  
THE LIGASE DETECTION REACTION WITH ADDRESSABLE ARRAYS

<130> 19603/3350

<140>

<141> 10

<150> 60/125,357

<151> 1999-03-19

<160> 65

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 1  
tgccgggtaca gcacacctac tt tgcg 24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 2  
atcgggtagg taacaccttgcg tt tgcg 24

<210> 3

<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 3  
cagcggtaga ccacctatcg tgcg 24

<210> 4 10  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 4  
ggtaggtaac ctacctcagc tgcg 24

<210> 5 20  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 5  
gaccggatgc gacccggta tgcg 24

<210> 6 30  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 6

atcgggttagg taaccttgcg tgcg

24

<210> 7  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 7  
ggtaggtaac ctacctcagc tgcg

10

24

<210> 8  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 8  
atcgggttagg taaccttgcg tgcg

20

24

<210> 9  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 9  
ggtaggtaac ctacctcagc tgcg

30

24

<210> 10  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 10  
atcgggtagg taaccttgcg tgcg

24

<210> 11  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 11  
cagcacctga ccatcgatcg cagc

24

<210> 12  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 12  
atcgggtagg taaccttgcg tgcg

24

<210> 13  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 13  
ggtaggttaac ctacctcagc tgcg

24

<210> 14  
<211> 24

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
      oligonucleotide

<400> 14  
cgcacgcaag gttacctacc cgat 24

<210> 15  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 10

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
      oligonucleotide

<400> 15  
cgcagctgag gtaggttacc tacc 24

<210> 16  
<211> 65  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 20

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
      oligonucleotide

<400> 16  
cgcacgatacg tgggtctacc gctgatataaa acttgtgggg agctagtggc gtaggcaaga 60  
gtgcc 65

<210> 17  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 30

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
      oligonucleotide

<400> 17

ataaggcctg ctgaaaatga ctgaa

25

<210> 18  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 18  
ctgcaccagt aatatgcata ttaaaaacaag

30

10

<210> 19  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 19  
gctgaggatcg atgctgaggt cgcaaaactt gtggtagttg gagctgg

47

20

<210> 20  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 20  
gctgcatatcg atggtcaggt gctgaaaactt gtggtagttg gagctga

47

30

<210> 21  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 21  
gctgtacccg atcgcaaggt ggtcaaactt gtggtagttg gagctgc

47

<210> 22  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 22  
cgcaaggtag gtgctgtacc cgcaaaactt gtggtagttg gagctgt

47

<210> 23  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 23  
tggcgttaggc aagagtgcct

20

<210> 24  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 24  
tggcgttaggc aagagtgcct

20

<210> 25  
<211> 50

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
      oligonucleotide

<400> 25  
cgcacgatag gtggcttacc gctgtataaa acttgtggta gttggagcta                   50

<210> 26  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
      oligonucleotide

<400> 26  
cgcacgatag gtggcttacc gctgtataaa acttgtggta gttggagtc                   50

<210> 27  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
      oligonucleotide

<400> 27  
ggtcaggta ccgctgcgat cgcaatataaa acttgtggta gttggagctt               50

<210> 28  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
      oligonucleotide

<400> 28  
gtggcgtagg caagagtgcc   20

<210> 29  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 29  
gtggcgttagg caagagtgcc

20

10

<210> 30  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 30  
ggtccgatta ccgggtccgat gctgtgtgg agttggagct ggtga

45

20

<210> 31  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 31  
ggtctaccta cccgcacgat ggtctgtgg agttggagct ggtgg

45

30

<210> 32  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:

oligonucleotide

<400> 32  
cgtaggcaag agtgccttga c 21

<210> 33  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 10

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 33  
cgtaggcaag agtgccttga c 21

<210> 34  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 20

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 34  
tgcgacacctca gcatcgacct cagc 24

<210> 35  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 30

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 35  
cagcacacctga ccatcgatcg cagc 24

<210> 36  
<211> 24  
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 36

gaccaccttg cgatcgggta cagc

24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 37

tgcgggtaca gcacacctt tgcg

24

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 38

cagcggtaga ccacctatcg tgcg

24

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 39

gaccggatcg cgacacctggta tgcg

24

<210> 40  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 40  
tgcgatcgca gcggttaacct gacc

24

10

<210> 41  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 41  
cagcatcgga ccggtaatcg gacc

24

20

<210> 42  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 42  
gaccatcggt cgggttaggt gacc

24

30

<210> 43  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 43  
tgtcccatct ggtaagtcag cacaaacgct gaggtcgatg ctgagggtgcg a 51

<210> 44  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide 10

<400> 44  
aacattaaatg ctatgcagaa aatcttagag 30

<210> 45  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide 20

<400> 45  
gtcattaaatg ctatgcagaa aatcttag 28

<210> 46  
<211> 49  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide 30

<400> 46  
aggacagaaaa ggtaaagctc cctccgctgc gatcgatggt caggtgctg 49

<210> 47  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence



<210> 51  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 51  
tac ttgtggg attttttagca cagcaag 27 10

<210> 52  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 52  
tgtcccatct ggtaagtca gacaaac 27 20

<210> 53  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 53  
gctggcgacg attaccaggc cgataaacatt aatgctatgc agaaaaatctt ag 52 30

<210> 54  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 54  
gctggctgcg ataggttagt taccgtcatt aatgttatgc agaaaaatctt 50

<210> 55  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide 10

<400> 55  
aggacagaaa ggtaaagctc cctcc 25

<210> 56  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide 20

<400> 56  
gcgagcgaag gttacctacc cgatcaaagc gagcaagaga atc 43

<210> 57  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide 30

<400> 57  
gcgacgatag gtggtctacc gctgacaaag cgagcaagag aatcc 45

<210> 58  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
 oligonucleotide

<400> 58  
 gggaaatctg tccaggttcc agat 24

<210> 59  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 10

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
 oligonucleotide

<400> 59  
 gcgagcttagt gtaggttacc tacccaactt gtgggatttt tagcacacgc a 51

<210> 60  
<211> 49  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 20

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
 oligonucleotide

<400> 60  
 gcgataccagg tgcgataacc ggtctacttg tgggattttt agcacacgc 49

<210> 61  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 30

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
 oligonucleotide

<400> 61  
 tcgcacacctca gcatcgacct cagc 24

<210> 62

<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 62  
atcgacacctgg taatcgatcg cagc 24

<210> 63 10  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 63  
cagcacacctga ccatcgatcg cagc 24

<210> 64 20  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

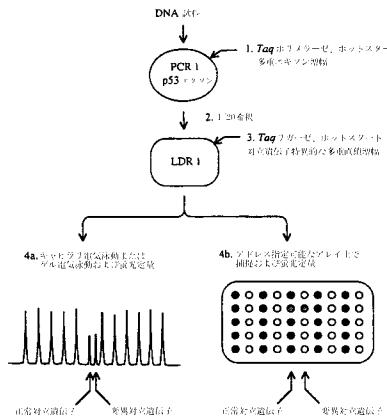
<400> 64  
ggtaaacctac ctatcgccgc cagc 24

<210> 65 30  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

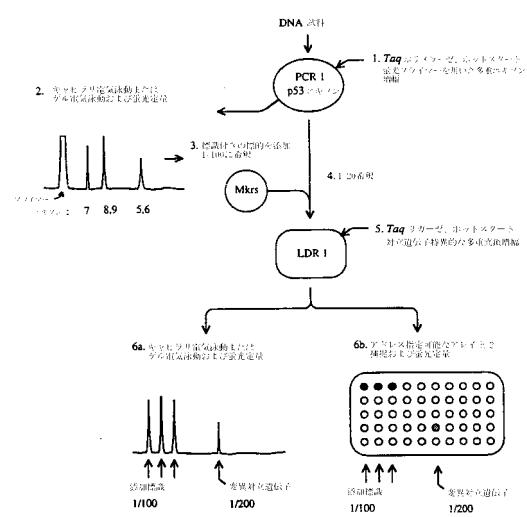
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:  
oligonucleotide

<400> 65  
gaccacaccttc gcatcggtt cagc 24

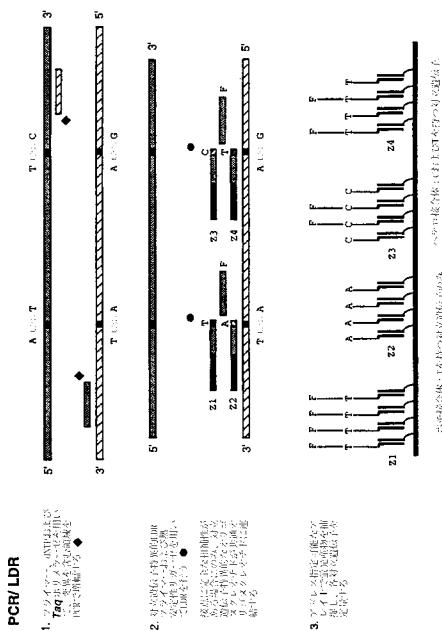
【図1】



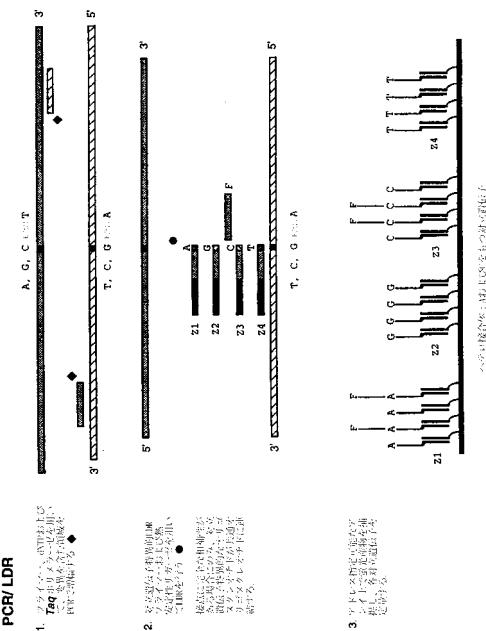
【図2】



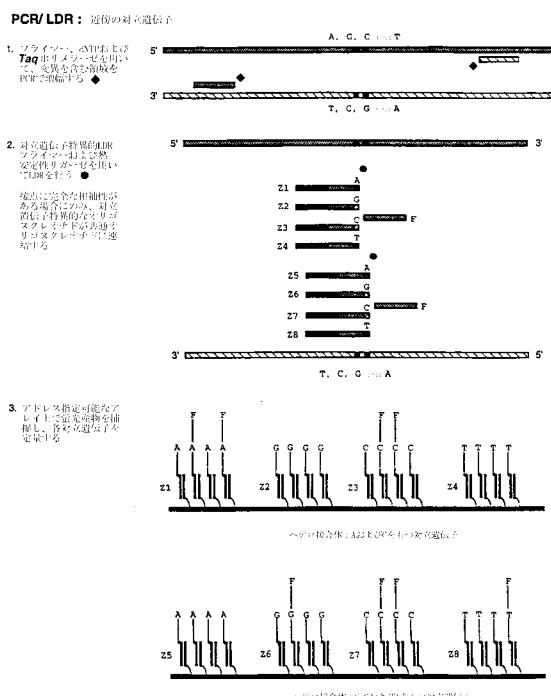
【図3】



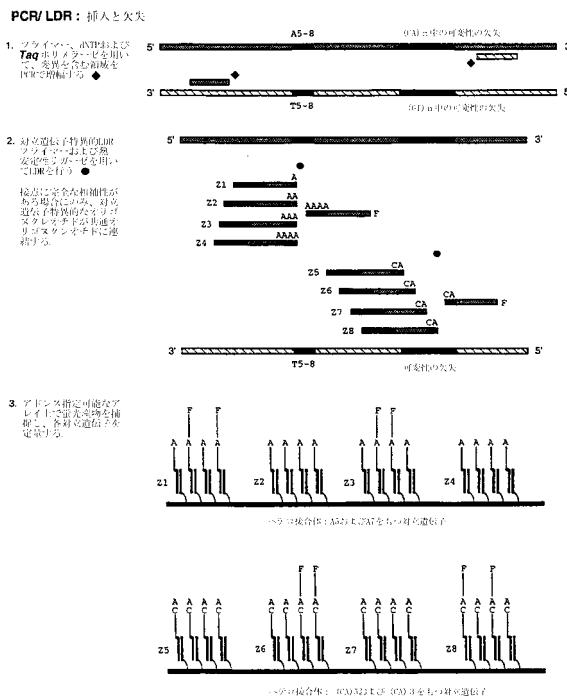
【図4】



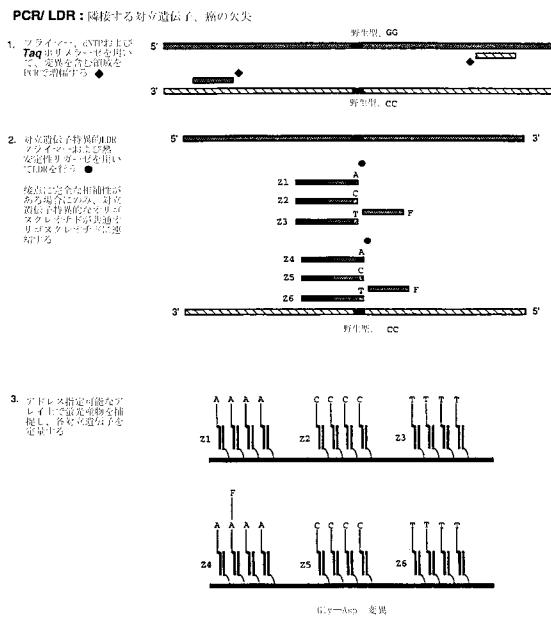
【図5】



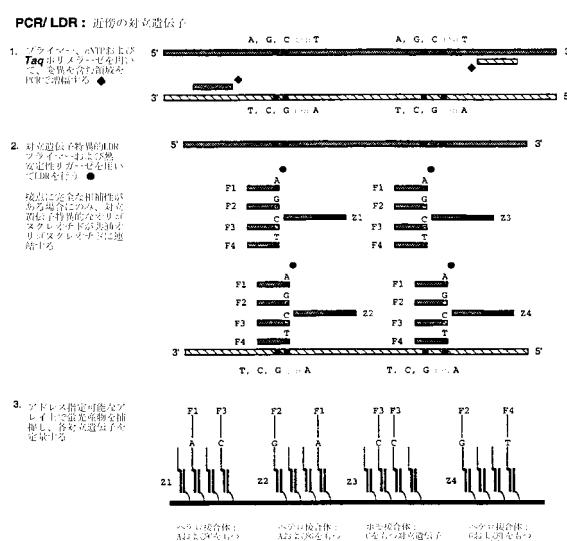
【図6】



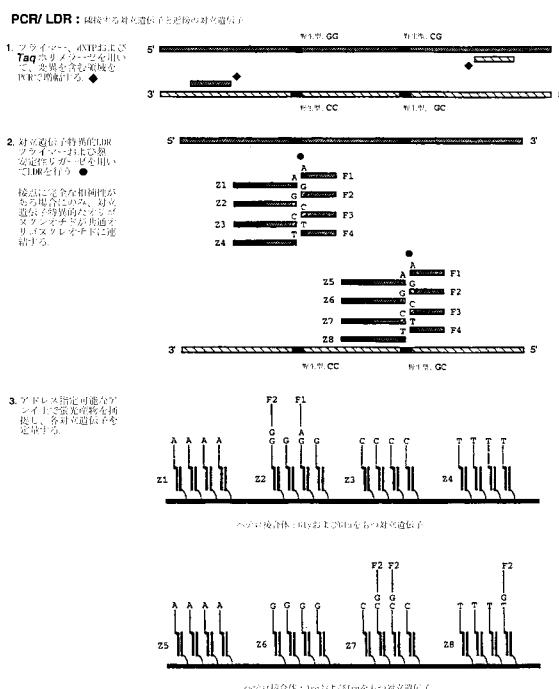
【図7】



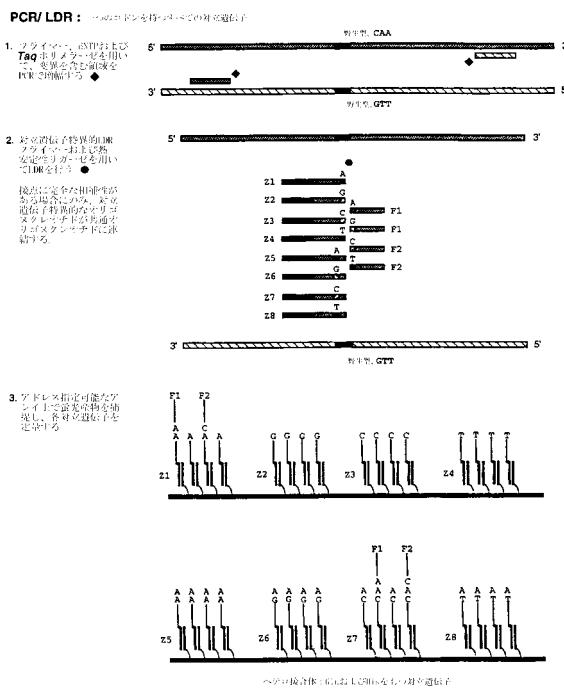
【図8】



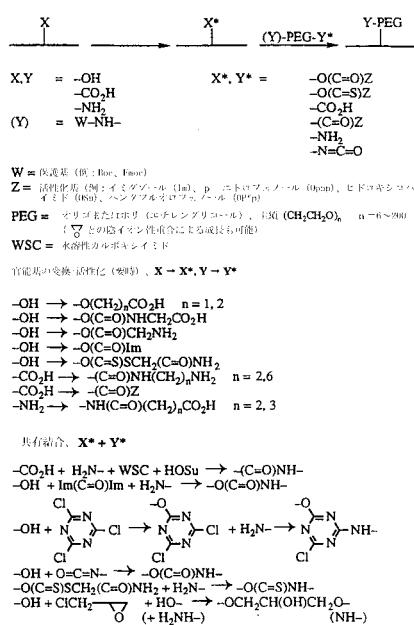
【図9】



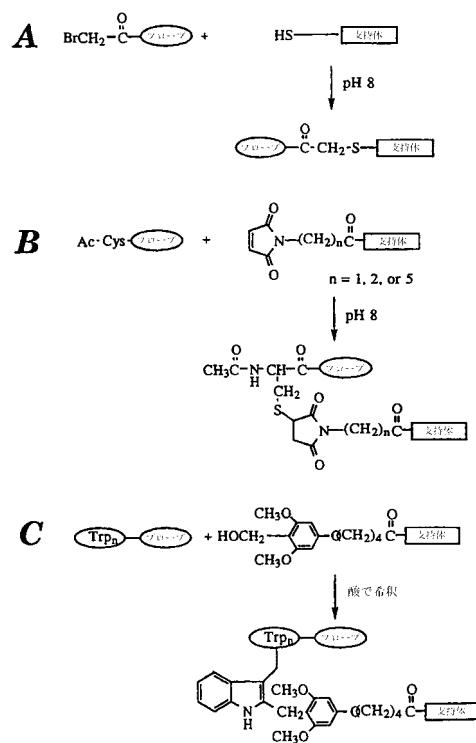
【図10】



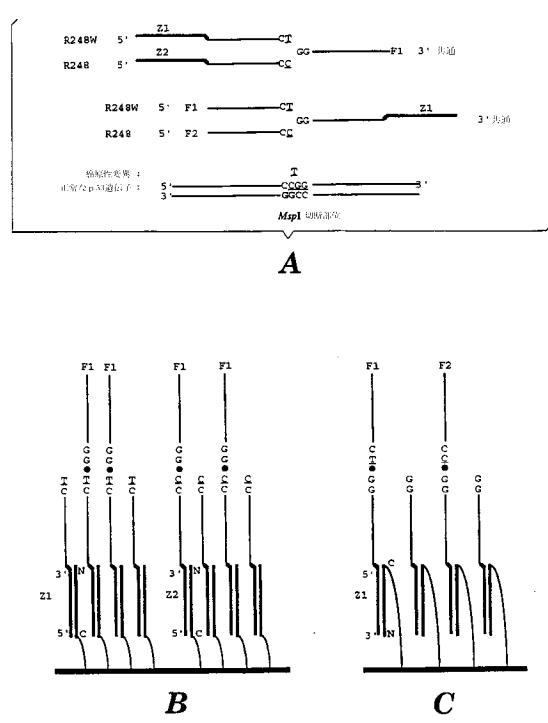
【図11】



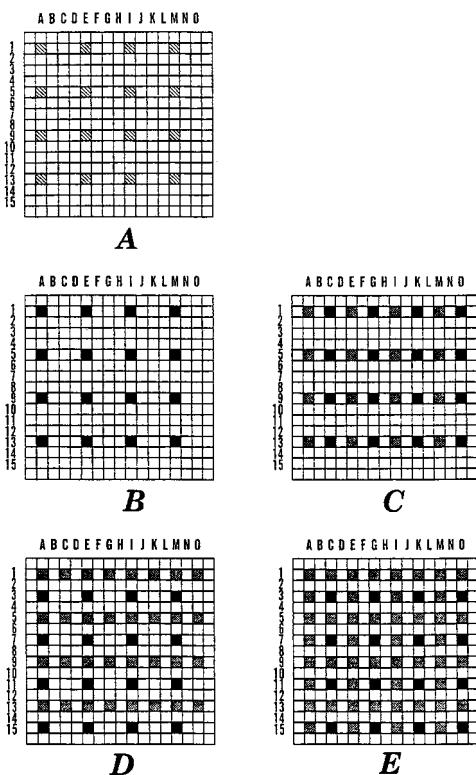
【図12】



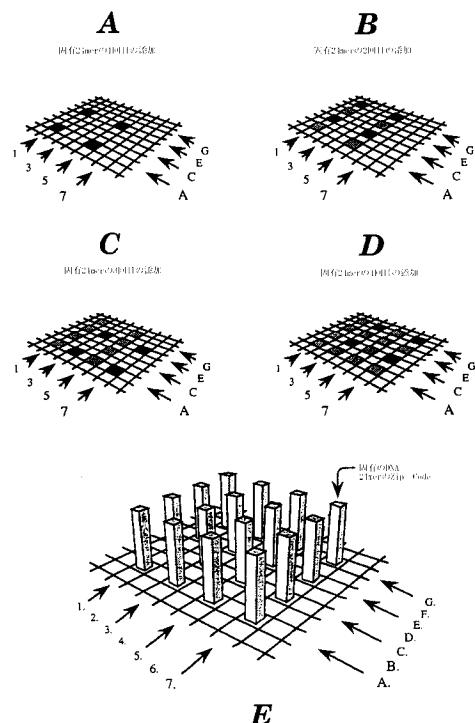
【図13】



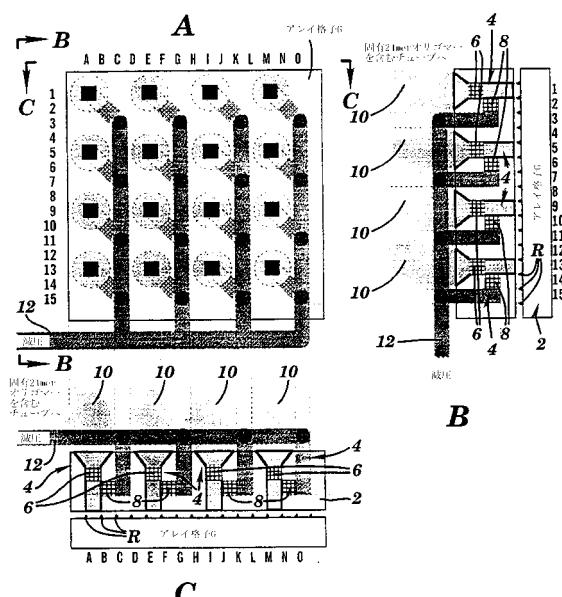
【図14】



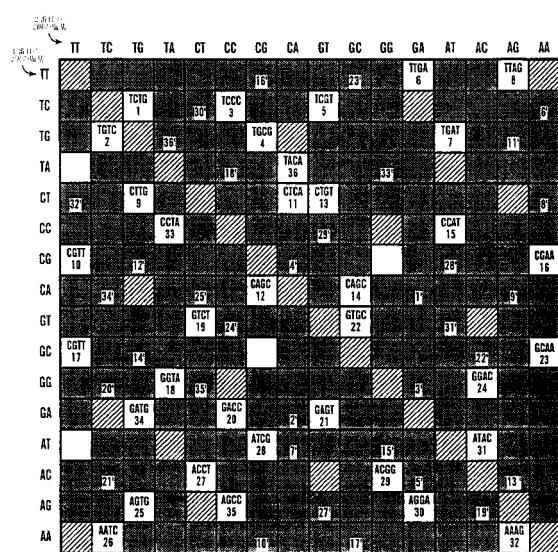
【図15】



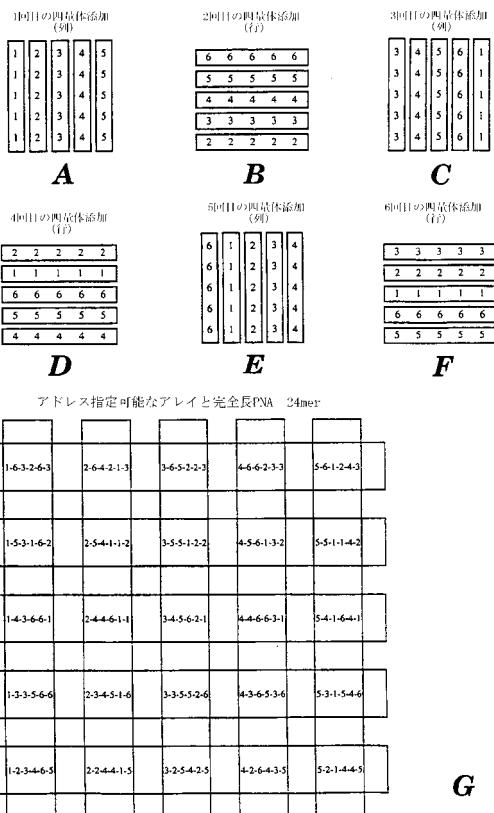
【図16】



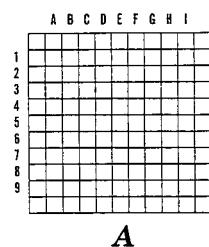
【図17】



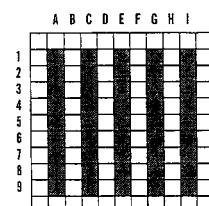
【図18】



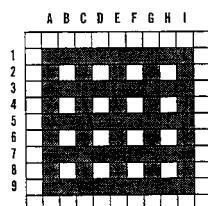
【図19】



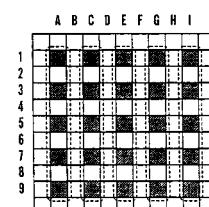
A



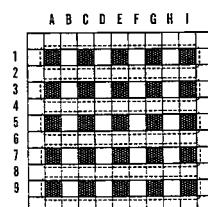
B



C

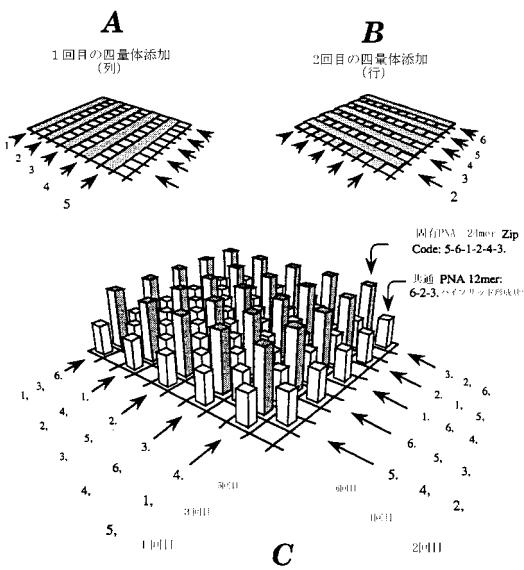


D

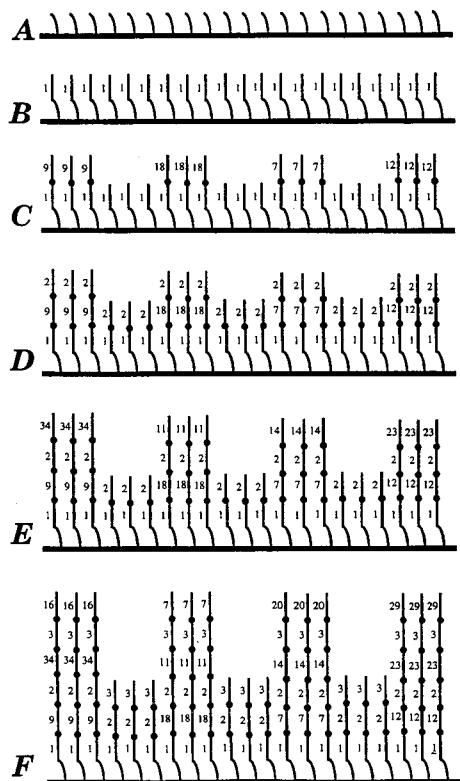


E

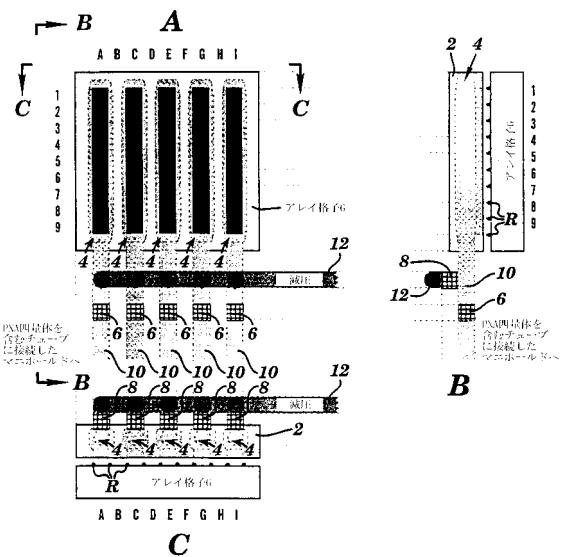
【図20】



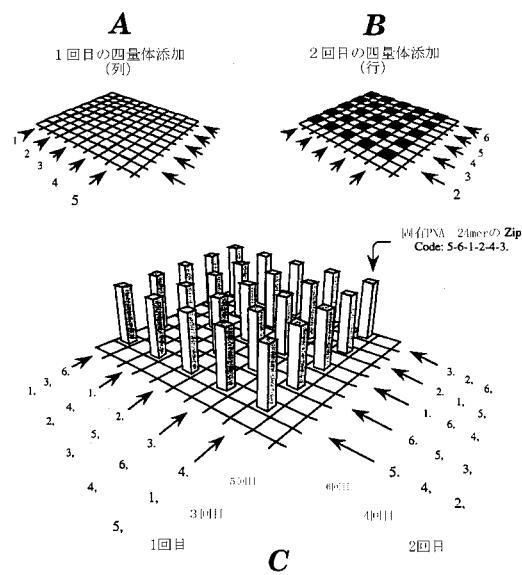
【図21】



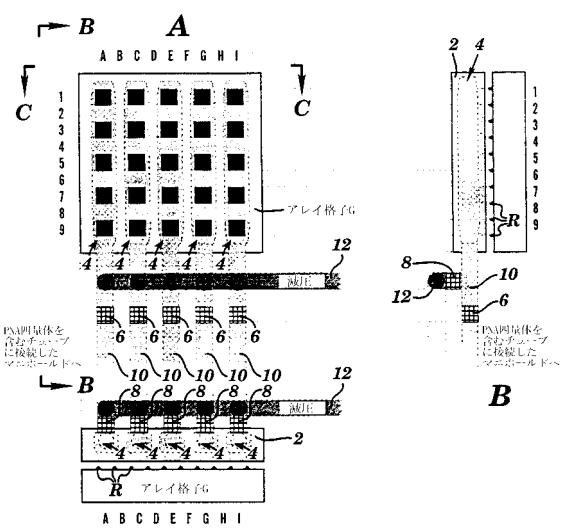
【図22】



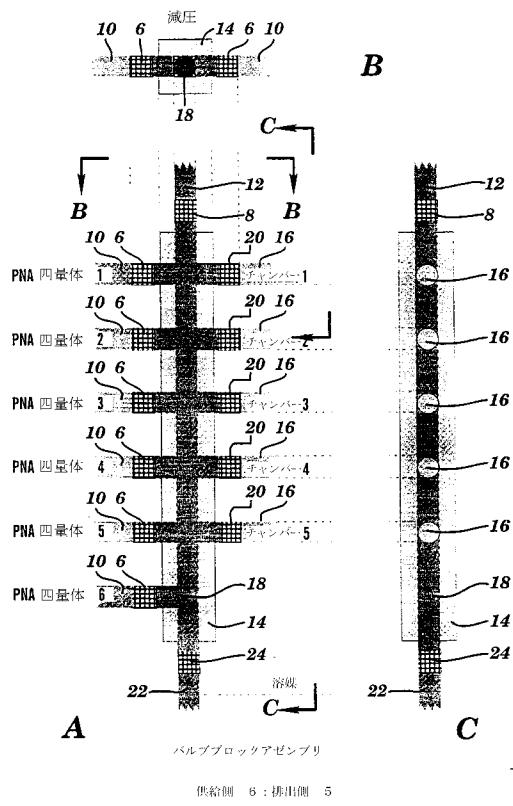
【図23】



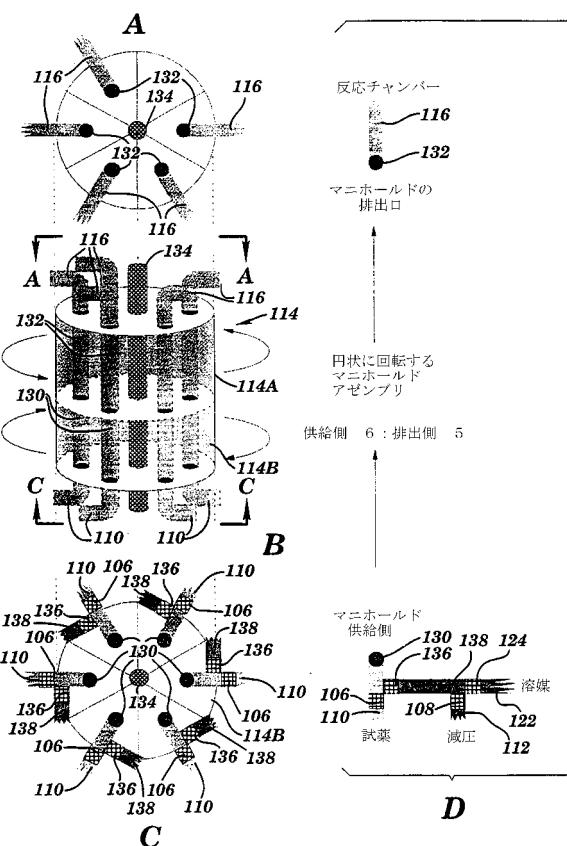
【図24】



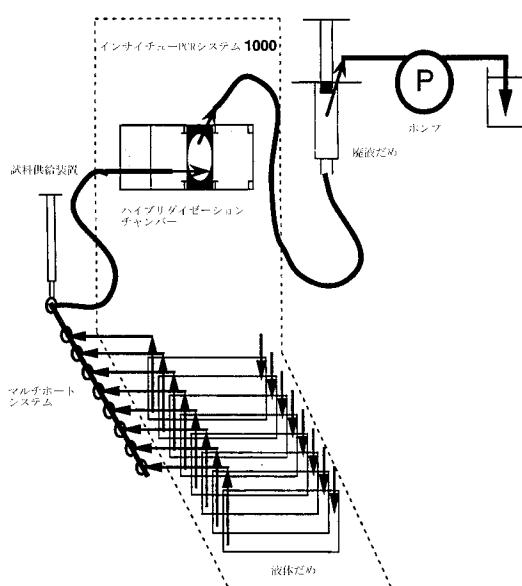
【図25】



【図26】



【図27】



【 図 2 8 】

-COOH; ツ 12

-COOH; 14

-NH<sub>2</sub>; フローラル12

-NH<sub>2</sub>; 14

【図29】

2% EGDMA

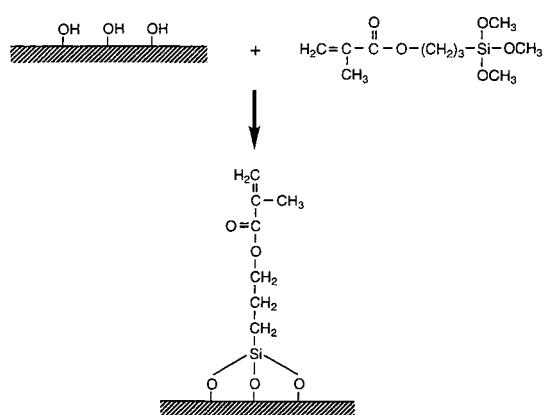
2% HDDMA

4% EGDMA

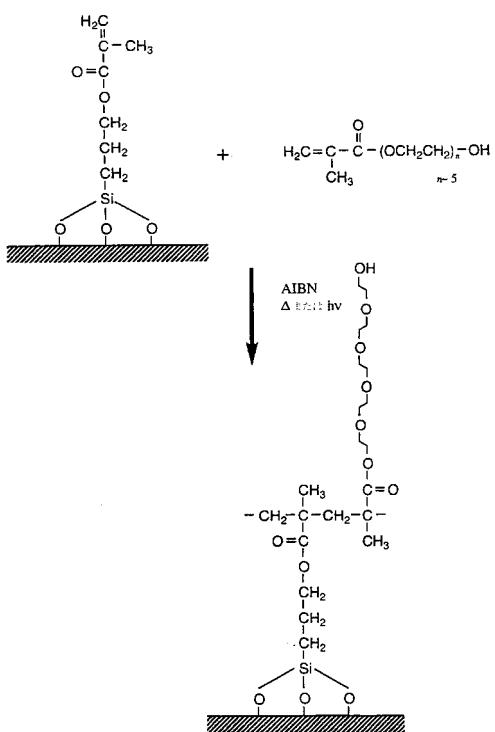
【図30】

1  
2

【図31】

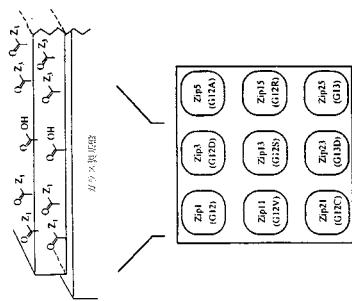
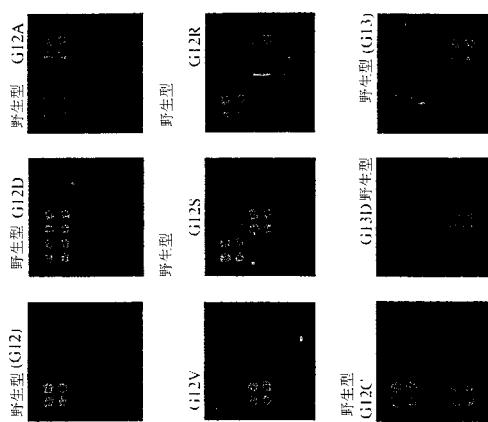


【図32】

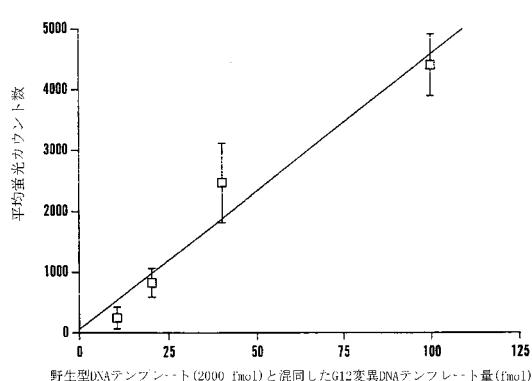




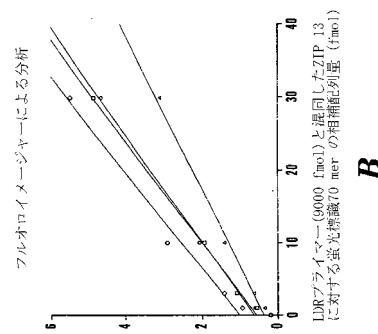
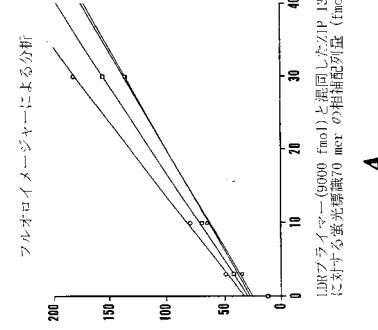
【図36】



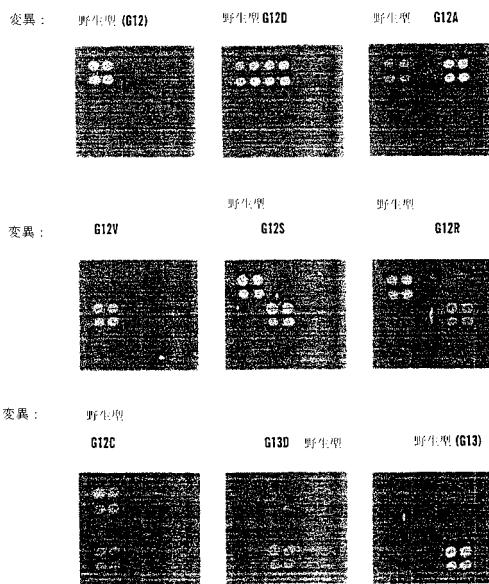
【図38】



【図37】

**B****A**

【図39】



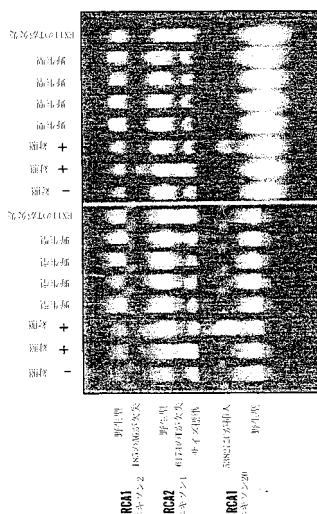
【図40】

変異	LDRプライマーの整列
<b>BRCA1 のエキソン 2</b>	野生型 FAM ————— GAG 185のAGが欠失 变異型 TET ————— G TG ————— A1
<b>BRCA1 のエキソン 20</b>	野生型 FAM ————— TCCC 5382にCが挿入 变異型 TET ————— TCCCC A ————— A5
<b>BRCA2 のエキソン 11</b>	野生型 FAM ————— AGT 6174のTが欠失 变異型 TET ————— AG GGA ————— A3

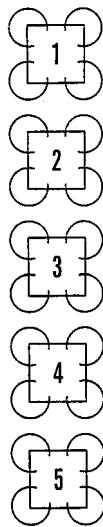
【図41】

変異	LDRプライマーの整列
<b>BRCA1 のエキソン 2</b>	野生型 A2 ————— GAG 185のAGが欠失 变異型 A4 ————— G TG ————— FAM
<b>BRCA1 のエキソン 20</b>	野生型 A12 ————— TCCC 5382にCが挿入 变異型 A13 ————— TCCCC A ————— FAM
<b>BRCA2 のエキソン 11</b>	野生型 A14 ————— AGT 6174のTが欠失 变異型 A15 ————— AG GGA ————— FAM

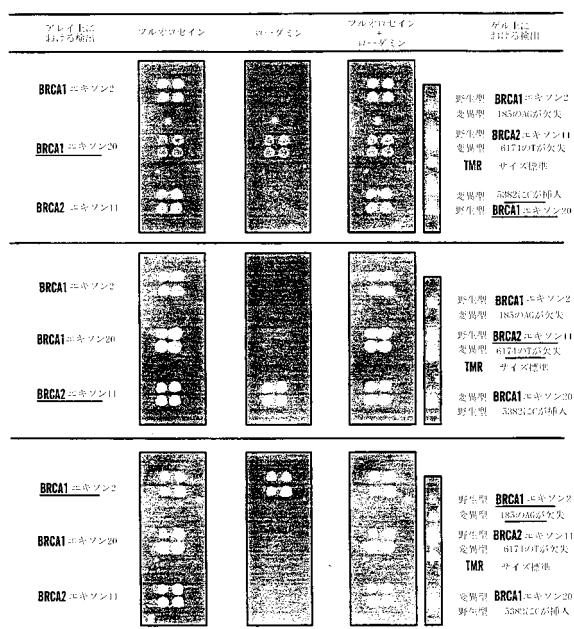
【図42】



【図43】



【図44】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

G 0 1 N 37/00 1 0 2

(73)特許権者 501368698

ボード オブ スーパーバイザーズ オブ ルイジアナ ステイト ユニバーシティ アンド ア  
グリカルチュラル アンド メカニカル カレッジ  
アメリカ合衆国 ルイジアナ州 バトン ルージュ デビッド ボイド ホール 203

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(72)発明者 バラニー フランシス

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニューヨーク イースト 63ドストリート 450 アバ  
ートメント #12シー

(72)発明者 ジェリー ノーマン ピー.

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニューヨーク 1シー イースト 83 ストリート 308

(72)発明者 ウィトウスキ ナンシー イー.

アメリカ合衆国 ミネソタ州 エディナ タラ ロード 7224

(72)発明者 デイ ジョセフ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州ペインティッド ポスト ポンドビュー 11

(72)発明者 ハンマー ロバート ピー.

アメリカ合衆国 ルイジアナ州 バトン ルージュ トゥレイン ドライブ 4967

(72)発明者 バラニー ジョージ

アメリカ合衆国 ミネソタ州 ファルコン ヘイツ ノース プライアーアベニュー 1313

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 国際公開第97/031256 (WO, A1)

国際公開第98/003673 (WO, A1)

DNA Sequence. 1991, Vol.1, No.6, p.375-388

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00-15/90

PubMed

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq