

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2007 年 1 月 25 日 (25.01.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/010998 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) G01N 33/532 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/314419
- (22) 国際出願日: 2006 年 7 月 20 日 (20.07.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2005-210667 2005 年 7 月 20 日 (20.07.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (Japan Science and Technology Agency) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 謝 敏 ▲ 玉 ▼ (XIE, Minjue) [CN/JP]; 〒3670021 埼玉県本庄市東台 1-1-30-207 Saitama (JP). 福井 孝一 (FUKUI, Koichi) [JP/JP]; 〒1690074 東京都新宿区北新宿 3-3-7-102 Tokyo (JP). 堀江 祐範 (HORIE, Masanori) [JP/JP]; 〒3670061 埼玉県本庄市小島 1-1-31-202 Saitama (JP). 景山 義隆 (KAGEYAMA, Yoshitaka) [JP/JP]; 〒1560052 東京都世田谷区経堂 5-15-18-109 Tokyo (JP). 松本 和子 (MATSUMOTO, Kazuko) [JP/JP]; 〒1550032

東京都世田谷区代沢 3-9-12-105 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 佐伯 憲生 (SAEKI, Norio); 〒1030027 東京都中央区日本橋三丁目 15 番 8 号 アミノ酸会館ビル 4 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

[続葉有]

(54) Title: HIGH SENSITIVE DETECTION METHOD FOR TARGET MOLECULE EXPLOITING SPECIFIC BINDING AND KIT FOR THE METHOD

(54) 発明の名称: 特異的結合を利用した標的分子の高感度検出法、そのキット

(57) Abstract: Disclosed is a label which is highly sensitive, can provide a narrow distribution in values of measurements, can be determined stably and is excellent in handling property. Also disclosed is a labeling method using the label. Further disclosed is an analysis method. A determination method using an oligonucleotide as a novel label; a labeled chemical substance; and an oligonucleotide for use as a label; and a kit for the determination. The determination method may be a method for cleaving a nucleic acid with a nuclease using an oligonucleotide bound to a chemical substance as a label. The method may be a method for cleaving a nucleic acid with a flap endonuclease. The method may be a method for detection, identification or quantification by invader method. The method may be a method for detection, identification or quantification of a target molecule in a sample, comprising the steps of contacting a chemical substance bound to an oligonucleotide as a label (referred to as "a labeled chemical substance", hereinbelow) with a sample which contains the target molecule or which is suspected to contain the target molecule to form a complex of the labeled chemical substance and the target molecule and then determining the oligonucleotide in the complex by invader method.

(57) 要約: 本発明は、より高感度で、測定のパラッキもなく、安定した測定が可能で、かつ操作性の優れた標識、及びそれを用いた標識化方法、並びに、分析方法を提供する。本発明は、新規な標識としてのオリゴヌクレオチドを用いた測定方法、標識化学物質、及び標識用オリゴヌクレオチド、並びにそのための測定用キットに関する。より詳細には、本発明は、化学物質に結合したオリゴヌクレオチドを標識として使用し、当該オリゴヌクレオチドをヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法、より詳細にはフラップエンドヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法、さらに詳細にはインベーター法により検出、同定又は定量する方法に関する。さらに詳細には、本発明は、標識としてのオリゴヌクレオチドが結合した化学物質（以下、標識化学物質という。）を標的分子を含有するか、又は含有している可能性のある試料に接触させ、当該標識化学物質と試料中の標的分子との複合体を形成させ、当該複合体におけるオリゴヌクレオチドをインベーター法により測定することからなる、試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法、標識化学物質、及び標識用オリゴヌクレオチド、並びにそのための測定用キットに関する。

WO 2007/010998 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

特異的結合を利用した標的分子の高感度検出法、そのキット 技術分野

[0001] 本発明は、新規な標識としてのオリゴヌクレオチドを用いた測定方法、標識化学物質、及び標識用オリゴヌクレオチド、並びにそのための測定用キットに関する。より詳細には、本発明は、化学物質に結合したオリゴヌクレオチドを標識として使用し、当該オリゴヌクレオチドをヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法、より詳細にはフラップエンドヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法、さらに詳細にはインベードー法により検出、同定又は定量する方法に関する。さらに詳細には、本発明は、標識としてのオリゴヌクレオチドが結合した化学物質（以下、標識化化学物質という。）を標的分子を含有するか、又は含有している可能性のある試料に接触させ、当該標識化化学物質と試料中の標的分子との複合体を形成させ、当該複合体におけるオリゴヌクレオチドをインベードー法により測定することからなる、試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法、標識化学物質、及び標識用オリゴヌクレオチド、並びにそのための測定用キットに関する。

背景技術

[0002] 多くの化学物質が個体の活動や維持に関わっており、特に生物体においてはタンパク質を多くの化学物質が生命の成長や維持や活動に関わっている。これらの化学物質の物理的又は化学的な挙動が少しずつではあるが解明されてきている。とりわけ、抗原と抗体や、リガンドと受容体のような特異的な相互関連性の解明が行われてきており、健康の維持だけでなく、病気の診断や治療のためにこれらの特異的な相互関連性が注目されてきている。

とりわけ、抗原抗体反応は、対応する抗原と抗体のみが選択的に反応する極めて特異性の高い反応であるだけでなく、生体内で生ずる抗原抗体反応をそのまま試験管内で再現することができることから、病気の診断や治療に広く利用されてきている。

しかしながら、化学物質の挙動、特に生命体内における化学物質の挙動を直接検出することは不可能であり、これらの化学物質の挙動を観察するための標識化が行

われてきた。

[0003] 標識化は、標的となる化学物質を検出、同定又は定量化するなどの各種の当該化学物質に関する情報を得るために、当該化学物質の一部を改変して測定可能な目印をつけることである。標識化した化学物質の生化学分野における最初の例は、1904年のノーブ(F.Knoop)の実験であると言われている。これは、脂肪酸の末端のメチル基をフェニル基に代えた脂肪酸をウサギに投与し、尿中のフェニル酢酸などを分析して、脂肪酸の生体内における β 酸化説を提唱したものである。

現在では、標識として重水素、 ^{13}C や ^{14}C 、 ^{32}P などの同位元素、特に放射性同位元素が使用されている。放射性同位体は化学物質の化学的な特性を大きく変えることなく、化学物質を追跡することが可能であり、また検出も容易であるが、放射性であることが大きな問題となっている。

同位体の標識のほかに、官能基を導入する標識化も行われている。官能基としては、紫外や可視部に吸収を有する基や、蛍光性の基などが使用されている。しかし、これらの官能基は化学物質の物理的又は化学的特性を変化させたり、また非生物系のものが多く、生体内への適用には問題が生じている。

このように標識は化学物質の各種の挙動を測定するために極めて重要であり、多種多様な標識が開発されてきている。例えば、抗原抗体反応を利用したイムノアッセイでは、放射性同位元素を用いたラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素を用いたエンザイムイムノアッセイ(EIA)、蛍光物質を用いた蛍光イムノアッセイ(FIA)などの標識化イムノアッセイが一般化してきている。

[0004] 近年になって、標識としてDNAなどの核酸を用いる方法も開発され、当該DNAをPCR法により増幅して感度を上げることを試みたものである。この方法は、元々はDNAの5'末端側に抗体を結合させてDNAを検出するために使用されていた抗体結合型DNA(特許文献1参照)を、イムノアッセイに適用したものであり、抗体にDNAを結合させこれをPCR法により増幅させて、当該抗体の検出感度の上昇試みたものである(特許文献2、及び非特許文献1参照)。この方法は、現在ではイムノPCR法としてイムノアッセイの分野で使用されてきている(特許文献3及び4参照)。

イムノPCR法は原理的には無限に増幅可能であり、感度的には有利な方法では

あるが、操作が煩雑であり、また定量化が困難であり、測定値のバラツキが大きく、従来からのELISA法に比べても実用性が十分なものではない。

- [0005] 一方、ヒトゲノムの解析に伴い、遺伝子多型が注目され、RFLP (制限酵素切断断片長多型) 法、ダイレクトシーケンス法、ASO (Allele Specific Oligonucleotide) ハイブリダイゼーション法、RNaseA切断法、DOL (Dye-labeled Oligonucleotide Ligation) 法、TaqMan PCR法、MALDI-TOF/MS法 (Matrix Assisted Laser Desorption-time of Flight/Mass Spectrometry) 法、DNAチップ法、インベーター法などの各種の方法が開発されてきたが、これらの方法の多くはPCR法による増幅を必要とするものであった。この中で、インベーター法は、被検体DNAは勿論のこと、シグナルプローブもインベーターオリゴにも標識化は必要でなく、標識化を必要とするものはフレットプローブのみである。そして、当該フレットプローブは、フラップ部分の塩基配列だけと関わり、とりわけフラップ部分の塩基とも無関係であり、被検体DNAの塩基配列に全く影響されず、被検体と関係無く任意に決定できるフラップ部分の塩基に基づくものであることから、大量生産ができ、プローブ作製コストを大幅に減少することができるという利点があった。

- [0006] 特許文献1:特開平3-231151号公報

特許文献2:米国特許第5, 665, 539号明細書

特許文献3:特表平8-502413号公報

特許文献4:特開2003-504073号公報

非特許文献1:Lab. Clin. Pract., 20: 110-114; 2002

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、より高感度で、測定の変動もなく、安定した測定が可能で、かつ操作性の優れた標識、及びそれを用いた標識化方法、並びに、分析方法を提供するものである。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、遺伝子多型の検出法であるインベーター法の高感度化の開発を行ってきたが、このインベーター法を応用することにより各種の物質の標識化ができるこ

とを見出した。インバーダー法は、ゲノム中の1塩基多型を検出するために開発された方法であり、もっぱら被検体DNA中の1塩基の多型をインバーダーオリゴにより検出するものであり、その概要を説明しておく。インバーダー法は、SNPタイピング法の1種として広く知られている方法であり、例えば、中村祐輔編集「SNP遺伝子多型の戦略」(株式会社中山書店、2000年)にも、その方法の詳細が記載されている。図1にインバーダー法による核酸1塩基多型解析法の概略を模式図として示す。

この方法は、被検体DNA(target DNA)の中に図1に示されるように「N」の位置でSNPになっている塩基が存在していることを判定する方法である。このためにシグナルプローブ(primary probe)とインバーダープローブ(secondary probe)、及び検出用のフレットプローブ(FRET probe)(蛍光共鳴エネルギー移動プローブ(FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)プローブ))を用いる。シグナルプローブは被検体DNAのSNPの位置から5'側において相補的な塩基配列を有し、さらに「フラップ(flap)」と呼ばれる塩基配列部分を有している。このフラップの部分の塩基配列は、フレットプローブの3'側の塩基配列と相補的な塩基配列となっている。また、インバーダーオリゴは被検体DNAの3'側において相補的な塩基配列を有するものである。SNPの位置(図1中の「N」で示されている位置。)における被検体DNAの塩基「N」は1塩基多型部位の塩基、A、T、G、Cのひとつであり、シグナルプローブの塩基「N₁」はNと正常な塩基対を形成できる塩基であり、そして、インバーダープローブの塩基「N₂」は任意な塩基である。フレットプローブは、3'側にフラップ部分が結合するための1本鎖部分を有するプローブであり、フレットプローブの5'側はその全部又は一部が2本鎖を形成するようになっている。図1では5'側の全部が2本鎖を形成するように示されているが必ずしも全部が2本鎖になる必要はないが、ここでは説明のために図1に従って説明する。そして、フレットプローブの5'側の末端部分には発光色素「Ln」及び消光物質「Q」が結合されている。消光物質「Q」が発光色素「Ln」の一定の距離内に存在しているときは、発光色素の発光が消光され、発光を観察することはできない。

[0009] インバーダー法では、まず、被検体DNAにシグナルプローブ及びインバーダーオリゴが結合するが、この際にシグナルプローブの塩基「N₁」と被検体DNAの塩基「N

」との塩基対の間にインベーターオリゴの塩基「N₂」がインベーター(侵入者)のように割り込んでくるようになる。このような状態を示しているのが図1の最上段に示している状態である。このような3塩基がからんでいる状態に特異的に作用する解裂酵素(structure-specific 5' nuclease)を作用させると、この解裂酵素はシグナルプローブを塩基「N₁」の位置で切断して、フラップ部分のみの断片を形成させる。そして、このフラップ部分はフレットプローブの3'側に結合する。この状態を示しているのが、図1の中段である。このとき、フラップ部分の塩基「N₁」を含む先端部分が、フレットプローブの2本鎖の部分に割り込むような状態になる。この状態は先程のインベーターの状態と同様であり、解裂酵素による特異的な切断位置になる。そして、当該解裂酵素によりフレットプローブの5'末端側がフラップ部分に割り込まれた部分から切断される。切断されたフレットプローブの5'側には、発光色素「Ln」が結合されており、この切断により発光色素「Ln」は消光物質「Q」から離れることになり、その結果発光色素「Ln」の発光を観察することができるようになる。このような状態を示しているのが図1の最下段に示している状態である。発光色素「Ln」は消光物質「Q」から開放され、本来の発光を示すことになる。シグナルプローブの塩基「N₁」が被検体DNAの塩基「N」と正常な塩基対を形成することができない場合には、インベーターのような状態にならないので、解裂酵素による切断は起こらない。したがって、被検体DNAの塩基「N」がシグナルプローブの塩基「N₁」と正常な塩基対を形成することができる塩基であるか否かを発光により判定することができることになる。

本発明におけるインベーター法は、従来のインベーター法とは異なり、被検体DNAの1塩基多型(SNP)を検出することを目的とするものではないので、以下の説明では、ここで使用した「被検体DNA」の代わりに「ターゲットDNA」という用語を使用する。

[0010] このように、従来のインベーター法は、被検体としてゲノムDNAを使用するものであり、当該ゲノムDNA中の1塩基多型を検出するものであったが、当該被検体として抗体や抗原などの化学物質に結合させたDNAなどの核酸(オリゴヌクレオチド)を用いることにより、煩雑なPCR法を行うことなく高感度で当該核酸を検出・同定することができ、化学物質の標識化合物として利用することができることを見出した。

[0011] 即ち、本発明は、オリゴヌクレオチドを化学物質の標識として使用することを第一の特徴とし、さらに当該オリゴヌクレオチドをヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法、好ましくはインバーダー法により検出、同定又は定量することを第二の特徴とするものである。

本発明の第一の特徴点は、PCR法を適用することができない程度の短いオリゴヌクレオチドを標識として使用することである。イムノーPCRに関する米国特許第5665539号では、2.67kbのDNAを標識として、約30merのプライマーを使用して261bpのフラグメントを増幅しているが、本発明のオリゴヌクレオチドは、インバーダー法におけるシグナルプローブ(primary probe)として使用する場合には、約10～100mer、好ましくは約20～60mer程度で十分であり、従来のイムノーPCR法における標識としてのオリゴヌクレオチドとは、その長さにおいて明確に区別できるものである。当該オリゴヌクレオチドは、前記の説明におけるインバーダー法のシグナルプローブ(primary probe)、インバーダーオリゴ(secondary probe)、又はターゲットDNAのいずれのものとしてもよいが、好ましくは当該オリゴヌクレオチドは前記したインバーダー法におけるターゲットDNA又はシグナルプローブ(primary probe)として使用されるものである。

また、本発明の第二の特徴点は、当該オリゴヌクレオチドをヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法、好ましくはフラップエンドヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法、より好ましくはインバーダー法により検出、同定又は定量することである。本発明の方法におけるヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法をインバーダー法を例として説明すれば、方法としては従来のインバーダー法と方法としては同様であるが、従来のインバーダー法のように被検体DNA(target DNA)における1塩基の相補性を検出するためのものではなく、標識としてのオリゴヌクレオチドの存在又は非存在、さらにその存在量を検定する方法である点において相違するものである。

本発明のこれらの2つの特徴点のいずれか又は両方を備えたものであれば、その手段の如何を問わず本発明の範囲に包含されるものである。

[0012] 本発明をより具体的に説明する。

本発明は、化学物質に結合したオリゴヌクレオチドを標識として使用し、当該オリゴ

ヌクレオチドをヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により、より詳細にはフラップエンドヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により、さらに詳細には当該オリゴヌクレオチド中の1塩基の存在をインベーター法により検出、同定又は定量する方法に関する。より詳細には、本発明は、標識としてのオリゴヌクレオチドが結合した化学物質(以下、標識化化学物質という。)を標的分子を含有するか、又は含有している可能性のある試料に接触させ、当該標識化化学物質と試料中の標的分子との複合体を形成させ、当該複合体におけるオリゴヌクレオチドをヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により、より詳細にはフラップエンドヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により、さらに詳細には、当該オリゴヌクレオチド中の1塩基の存在をインベーター法により測定することからなる、試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法に関する。

また、本発明は、イムノアッセイにおいて、標識としてオリゴヌクレオチドを使用し、当該オリゴヌクレオチドをヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により、より詳細にはフラップエンドヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により、さらに詳細には、当該オリゴヌクレオチド中の1塩基の存在をインベーター法により検出、同定又は定量する方法に関する。即ち、本発明は、イムノアッセイにおける新規な標識の使用、及びその解析方法を提供するものである。

さらに、本発明は、結合アッセイや競合アッセイなどの各種の標的分子をアッセイ(分析)する方法において、標識としてオリゴヌクレオチドを使用し、当該オリゴヌクレオチドをヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により、より詳細にはフラップエンドヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により、さらに詳細には、当該オリゴヌクレオチド中の1塩基の存在をインベーター法により検出、同定又は定量することからなる標的分子をアッセイ(分析)する方法に関する。即ち、本発明は、各種のアッセイにおける新規な標識の使用、及びその解析方法を提供するものである。

[0013] また、本発明は、10～100mer、好ましくは10～60mer、10～40mer、より好ましくは20～60merのオリゴヌクレオチドからなる化学物質の標識剤に関する、及び10～100mer、好ましくは10～60mer、10～40mer、より好ましくは20～60merのオリゴヌクレオチドの標識としての使用(use)に関する。さらに、オリゴヌクレオチドをイン

ベアダー法におけるターゲットDNAとして使用する場合には、この整数倍の長さを有するものを使用することができる。

さらに、本発明は、10～100mer、好ましくは10～60mer、10～40mer、より好ましくは20～60merのオリゴヌクレオチドが標識として化学物質に結合している標識化された化学物質に関する。

また、本発明は、10～100mer、好ましくは10～60mer、10～40mer、より好ましくは20～60merのオリゴヌクレオチドが標識として化学物質に結合している標識化された化学物質を少なくとも1種含有してなる、オリゴヌクレオチドを標識として使用するヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法、好ましくはフラップエンドヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法、より好ましくはインベアダー法による測定用キットに関する。

さらに、本発明は、インベアダー法におけるシグナルプローブ (primary probe)、インベアダーオリゴ (secondary probe)、ターゲットDNA、及びフレットプローブからなる群から選ばれるオリゴヌクレオチドの少なくとも1種のオリゴヌクレオチドを含有してなる、オリゴヌクレオチドを標識として使用するインベアダー法による測定用キットに関する。

[0014] 本発明の態様をより詳細に説明すれば、以下のとおりとなる。

(1)

化学物質に結合したオリゴヌクレオチドを標識として使用し、当該オリゴヌクレオチドを利用してヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により、試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法。

(2)

標識としてのオリゴヌクレオチドが結合した化学物質(以下、標識化化学物質という。)を、試料中に標的分子を含有するか、又は含有している可能性のある試料に接触させ、当該標識化化学物質と試料中の標的分子との複合体を形成させ、当該複合体におけるオリゴヌクレオチドをヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により測定することからなる、前記(1)に記載の試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法。

(3)

試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法において、標識としてオリゴヌクレオチドを使用し、当該オリゴヌクレオチドの存在をヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により測定するからなる、前記(1)又は(2)に記載の試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法。

(4)

オリゴヌクレオチドが、1本鎖のDNAである前記(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(5)

オリゴヌクレオチドが、10～1000merのDNAである前記(1)～(4)のいずれかに記載の方法。

(6)

オリゴヌクレオチドが、10～100merのDNAである前記(5)に記載の方法。

(7)

オリゴヌクレオチドが、10～60merのDNAである前記(5)に記載の方法。

(8)

オリゴヌクレオチドが、10～40merのDNAである前記(5)に記載の方法。

(9)

化学物質が、タンパク質、ビオチン、アビジン、又は核酸である前記(1)～(8)のいずれかに記載の方法。

(10)

化学物質が、ビオチンである前記(9)に記載の方法。

(11)

標識のオリゴヌクレオチドが、化学物質に直接結合している前記(1)～(10)のいずれかに記載の方法。

[0015] (12)

ヌクレアーゼにより切断される核酸が、標識のオリゴヌクレオチドである前記(1)～(11)のいずれかに記載の方法。

(13)

ヌクレアーゼにより切断される核酸が、標識のオリゴヌクレオチドに基づいて生成された核酸である前記(1)～(11)のいずれかに記載の方法。

(14)

ヌクレアーゼにより切断される核酸が、発光物質及び消光物質が結合した核酸である前記(1)～(13)のいずれかに記載の方法。

(15)

発光物質が、希土類蛍光錯体ラベル剤を有するものである前記(14)に記載の方法。

(16)

希土類蛍光錯体ラベル剤が、Eu錯体、Tb錯体、Sm錯体、又はDy錯体からなるラベル剤である前記(15)に記載の方法。

(17)

ヌクレアーゼが、フラップエンドヌクレアーゼである前記(1)～(16)のいずれかに記載の方法。

(18)

ヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法が、インバーダー法である前記(1)～(17)のいずれかに記載の方法。

(19)

標識のオリゴヌクレオチドが、インバーダー法におけるターゲットDNAである前記(18)に記載の方法。

(20)

ターゲットDNAが、シグナルプローブがハイブリダイズし得る塩基配列を1カ所又は2カ所以上有するものである前記(19)に記載の方法。

(21)

シグナルプローブが、2個のフラップを生成し得る塩基配列を有するものである前記(19)又は(20)に記載の方法。

(22)

シグナルプローブが、隣接するシグナルプローブのインベーターオリゴとして機能し得る塩基配列を有するものである前記(19)又は(20)に記載の方法。

(23)

試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法が、イムノアッセイである前記(1)～(22)のいずれかに記載の方法。

(24)

イムノアッセイが、サンドイッチアッセイである前記(23)に記載の方法。

(25)

試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法が、結合アッセイである前記(1)～(22)に記載の方法。

(26)

標識としてのオリゴヌクレオチドが結合した化学物質が、ビオチン化DNAである前記(23)～(25)のいずれかに記載の方法。

[0016] (27)

10～100merのオリゴヌクレオチドからなる化学物質の標識剤。

(28)

オリゴヌクレオチドが、10～60merのオリゴヌクレオチドである前記(27)に記載の標識剤。

(29)

オリゴヌクレオチドが、10～40merのオリゴヌクレオチドである前記(27)に記載の標識剤。

(30)

オリゴヌクレオチドが、1本鎖のDNAである前記(27)～(29)のいずれかに記載の標識剤。

(31)

前記(27)～(29)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの塩基配列を2回以上繰り返して有していることを特徴とするオリゴヌクレオチドからなる化学物質の標識剤。

(32)

塩基配列の繰り返しが2回から10回である前記(31)に記載の標識剤。

(33)

10～100merのオリゴヌクレオチドの標識としての使用。

(34)

オリゴヌクレオチドが、10～60merのオリゴヌクレオチドである前記(33)に記載の使用。

(35)

オリゴヌクレオチドが、10～40merのオリゴヌクレオチドである前記(33)に記載の使用。

(36)

オリゴヌクレオチドが、1本鎖のDNAである前記(33)～(35)のいずれかに記載の使用。

(37)

前記(33)～(35)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの塩基配列を2回以上繰り返して有していることを特徴とするオリゴヌクレオチドの標識としての使用。

(38)

塩基配列の繰り返しが2回から10回である前記(37)に記載の使用。

(39)

10～100merのオリゴヌクレオチドが標識として化学物質に結合している標識化された化学物質。

(40)

オリゴヌクレオチドが、10～60merのオリゴヌクレオチドである前記(39)に記載の標識化された化学物質。

(41)

オリゴヌクレオチドが、10～40merのオリゴヌクレオチドである前記(39)に記載の標識化された化学物質。

(42)

オリゴヌクレオチドが、1本鎖のDNAである前記(39)～(41)のいずれかに記載の

標識化された化学物質。

(43)

前記(39)～(41)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの塩基配列を2回以上繰り返して有していることを特徴とするオリゴヌクレオチドが標識として化学物質に結合している標識化された化学物質。

(44)

塩基配列の繰り返しが2回から10回である前記(43)に記載の標識化された化学物質。

(45)

化学物質が、ビオチンである前記(39)～(44)のいずれかに記載の標識化された化学物質。

[0017] (46)

10～100merのオリゴヌクレオチドが標識として化学物質に結合している標識化された化学物質を少なくとも1種含有してなる、オリゴヌクレオチドを標識として使用するヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法による測定用キット。

(47)

オリゴヌクレオチドが、10～60merのオリゴヌクレオチドである前記(46)に記載の測定用キット。

(48)

オリゴヌクレオチドが、10～40merのオリゴヌクレオチドである前記(46)に記載の測定用キット。

(49)

オリゴヌクレオチドが、1本鎖のDNAである前記(46)～(48)のいずれかに記載の測定用キット。

(50)

10～100merのオリゴヌクレオチドの塩基配列を2回以上繰り返して有していることを特徴とするオリゴヌクレオチドが標識として化学物質に結合している標識化された化学物質を少なくとも1種含有してなる、オリゴヌクレオチドを標識として使用するヌ

レアーゼを使用して核酸を切断する方法による測定用キット。

(51)

塩基配列の繰り返しが2回から10回である前記(50)に記載の測定用キット。

(52)

オリゴヌクレオチドを標識として使用するヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法が、前記(1)～(26)のいずれかに記載の方法である前記(46)～(51)のいずれかに記載の測定用キット。

(53)

標識化された化学物質が、ビオチンである前記(46)～(52)のいずれかに記載の測定用キット。

(54)

インベーター法におけるシグナルプローブ(primary probe)、インベーターオリゴ(secondary probe)、ターゲットDNA、及びフレットプローブからなる群から選ばれるオリゴヌクレオチドの少なくとも1種のオリゴヌクレオチドを含有してなる、オリゴヌクレオチドを標識として使用するインベーター法による測定用キット。

(55)

標識化された化学物質が、ビオチンである前記(54)に記載の測定用キット。

[0018] 本発明における「ヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法」(以下では、本発明の「核酸切断法」と言うこともある。)としては、ヌクレアーゼによる核酸、例えば、DNA、RNA、PNAなどを特定の位置で切断することができる方法であればよく、より詳細には、ヌクレアーゼによる核酸の切断により、当該核酸中に結合されている蛍光物質などの発光物質と、当該発光物質による発光を消光する消光物質(クエンチャー)とを分離することができ、当該分離の結果として発光物質による発光を外部から観察又は測定することが可能な方法である。ヌクレアーゼによる核酸の切断により蛍光物質などの発光物質による発光を外部から観察又は測定することが可能な方法における、核酸としては、例えば、インベーター法によるフレットプローブや、タックマンPCR法におけるタックマンプローブなどが知られており、このようなプローブを本発明の方法に使用することができるが、本発明の方法はこのようなプローブの使用に限定される

ものではない。

本発明のこの方法におけるヌクレアーゼとしては、核酸を切断することができるものであれば特に制限はないが、エンドヌクレアーゼやエキソヌクレアーゼのいずれであってもよく、二本鎖の核酸に作用する酵素であっても、三本鎖に作用する酵素であっても、一本鎖の核酸に作用する酵素であってもよい。また、核酸の高次構造を認識する酵素であってもよい。本発明のこの方法におけるヌクレアーゼは、核酸を切断することができ、その結果として前記した発光物質と消光物質を分離（距離的な隔たりを設けられるようにして、発光物質による発光が消光物質により消光されない状態にすること。）することができるものであればよいが、好ましくは本発明の標識として使用されるオリゴヌクレオチドを切断することなく、発光物質と消光物質が結合している核酸を選択的に切断することができるヌクレアーゼが挙げられる。

本発明のこの方法におけるヌクレアーゼとしては、例えば各種の制限酵素を使用することもできる。例えば、タックマンプローブのように両末端の発光物質と消光物質とがそれぞれ結合しているプローブを用いて、その中間部位を制限酵素などで切断することにより、タックマンプローブ中の発光物質と消光物質を分離し、その結果、測定系からの発光を観測することもできる。しかしながら、このような単純な方法では、ひとつの標識としてのオリゴヌクレオチドから、一つの発光物質が放出されるだけであり、十分な感度が得られない場合がある。高速度で高感度な測定を行うためには、本発明の標識として使用されるオリゴヌクレオチドを切断することなく、発光物質と消光物質が結合している核酸を選択的に切断することができる方法が好ましいことになる。このような方法では、一つの標識としてのオリゴヌクレオチドから多数の発光物質の放出が可能となり、高感度な測定が可能となる。

したがって、本発明の「ヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法」の特に好ましい態様としては、インベーター法のように、一つのターゲットDNAから多数のフラップを生じさせることができる方法が挙げられることになる。このような方法により、高速度で、高感度で、定量的な測定が可能となる。しかも、PCR法のような煩雑な操作も必要とせず、PCR法のような長い核酸を必要とすることもない。例えば、10～100mer、好ましくは10～40mer、10～30mer程度の比較的短い核酸を標識として使用し

たとしても、本発明のこの方法によれば、十分な感度を得ることが可能となる。

以下の説明においては、本発明の「ヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法」として、インベーター法による方法を例として説明するが、本発明の方法は、このような方法に限定されるものではない。

[0019] 本発明におけるオリゴヌクレオチドとしては、インベーター法における場合には、シグナルプローブ (primary probe)、インベーターオリゴ (secondary probe)、又はターゲットDNAのいずれかに使用可能なものであれば、その長さ、塩基配列において特に制限はなく、相補配列においてハイブリダイズが可能であれば、DNAでもRNAであってもよいが、DNAが好ましい。本発明のオリゴヌクレオチドは、インベーター法におけるターゲットDNA又はシグナルプローブ (primary probe) が好ましく、ターゲットDNAが特に好ましく、その長さは特に制限はないが、従来のイムノPCR法に使用される核酸類との区別のためには、10～100mer、好ましくは10～60mer、10～40mer、より好ましくは20～40merのオリゴヌクレオチドが好ましい。例えば、本発明のオリゴヌクレオチドをインベーター法におけるターゲットDNAを例にして説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。本発明オリゴヌクレオチドの塩基配列は特に制限はないが、本発明のオリゴヌクレオチドをシグナルプローブとして使用する場合には、フラップ部分が5～50mer、好ましくは10～40mer、より好ましくは10～20mer程度となるように設計され、残りの部分がターゲットDNAと相補的な配列となるように設計される。この場合にはインベーターオリゴ (secondary probe) は、ターゲットDNAの残りの部分と相補的な配列であり、さらにインベーターとしての1塩基を有するものである。

本発明におけるこのようなシグナルプローブ (primary probe)、インベーターオリゴ (secondary probe)、ターゲットDNA、及びフレットプローブの関連性をより具体的な塩基配列をもとにして図2として説明する。この例では、本発明の標識としてのオリゴヌクレオチドは、シグナルプローブ (primary probe) として、ターゲットDNAの5'末端側にハイブリダイズし、フラップ部分がハイブリダイズせずに残される。そして、インベーターオリゴ (secondary probe) がターゲットDNAの3'側にハイブリダイズし、解裂箇所 (Cleavage site) に1塩基が浸入し、解裂され、フラップが生じる。このフラップがフレット

プローブにハイブリダイズして、同様に1塩基が浸入して、フレッツプローブの標識サイト(この例では、BPTA-Tb³⁺結合サイト)が解裂し、蛍光が観察されることになる。

また、本発明のオリゴヌクレオチドをインベーター法におけるターゲットDNAとして使用する場合を例にして説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。この場合も本発明オリゴヌクレオチドの塩基配列は特に制限はないが、本発明のオリゴヌクレオチドとしては、10～200mer、好ましくは10～60mer、より好ましくは20～60merのオリゴヌクレオチド、又はこれを同じ配列を有する整数倍、例えば2倍、3倍、さらにそれ以上の長さのオリゴヌクレオチドを使用することもできる。このような場合には、本発明のオリゴヌクレオチドとしては、10～1000mer、好ましくは10～500merのオリゴヌクレオチドを使用することもできる。このような長さのオリゴヌクレオチドは、従来のイムノ-PCR法で使用されているオリゴヌクレオチドと同程度の長さになるが、本発明のオリゴヌクレオチドは明確な繰り返しの塩基配列、又はその相補的な配列を有する点において相違するものである。また、さらに長いオリゴヌクレオチド、例えば生体由来の1kb以上のような長いヌクレオチドを使用することもできる。

[0020] 本発明におけるターゲットDNAの塩基配列の特徴を挙げれば、次の(1)～(5)のようになる。

(1) 自分自身が構造の一部で二本鎖を形成しない。またターゲットDNA同士がダイマーを形成しない。ターゲットDNAの内部やターゲットDNA間に相補的な配列がない。

(2) 10～100塩基、好ましくは10～40塩基からなる配列が、0～50塩基の適当なスペースを置いて反復した配列を有する。この反復配列の繰り返し数は1～10が好ましい。

(3) 1ユニットが隣接した2つのブロックの配列からなり、各々の配列が10～100塩基、好ましくは10～40塩基であり、このユニットが0～50塩基の適当なスペースを置いて反復した配列を有する。この反復配列の繰り返し数は1～10が好ましい。

(4) 上記2つのブロックがインベーターオリゴおよびシグナルプローブとのハイブリダイゼーションし、各領域のT_m値がそれぞれ50～65℃程度となるような塩基配列が好ましいが、この範囲に限定されるものではなく、使用する酵素の至適温度にT_mを

合わせることができる。

(5) インバーダーオリゴまたはシグナルプローブが正しくオーバーラップし、三重鎖が形成できる。インバーダーオリゴまたはシグナルプローブがターゲットDNA上にミスマニースリングしないことが好ましい。

このような特徴を備えていれば、任意の塩基配列を設定することができ、本発明のオリゴヌクレオチドは特定の塩基配列であるものに限定されるものではない。

本発明のオリゴヌクレオチドの塩基配列の例を次ぎに示しておくが、これに限定されるものではない。

ターゲット領域が1カ所の場合では、

(1) 5'-AATCAAATCCAGTACCTGTGAATCAGGCT CCGGATTTGCTGAAGTGC
AG-3'

インバーダーオリゴ相補領域 シグナルプローブ相補領域

(T_m:60°C) (T_m:58°C)

(2) 5'-CAAGCAATGGATGATTGATGCTGTCCC CCGGACGATATTGAACAAT
GGTTCACCTGAA-3'

インバーダーオリゴ相補領域 シグナルプローブ相補領域

(T_m:61°C) (T_m:61°C)

(3) 5'-GAATCGCACTATTGCCCATGATGACAATCG GTCCAGTAAGCGACTTG
CAGGC-3'

インバーダーオリゴ相補領域 シグナルプローブ相補領域

(T_m:63°C) (T_m:62°C)

[0021] ターゲット領域が2カ所以上ある場合では、

(4) ターゲット単位間のスペースが0merのもの例としては、

5'-GTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTGGTGTCT
GCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTG-3' (86mer)

(5) ターゲット単位間のスペースが5merのもの例としては、

5'-GTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTGATCGTG
TGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTG-3' (91mer)

(6)ターゲット単位間のスペースが10merのものの例としては、

5'-GTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTGATCGTACGATGTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTG-3' (96mer)

(7)ターゲット単位間のスペースが34merのものの例としては、

5'-GTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTGAATCAATCCAGTACCTGTGAATCAGGCTCCGGAGTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTG-3' (120mer)

などが挙げられる。また、シグナルプローブがインバーダーオリゴの機能を備えているシグナルプローブを使用する場合の例としては、

(8)ターゲット配列に5回の繰り返しを有する例として、

5'-GTGTCTGCGGGAGTGTGTCTGCGGGAGTGTGTCTGCGGGAGTGTGTCTGCGGGAGTGTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTG-3' (99mer)

のものが挙げられる。

[0022] エクソヌクレアーゼ (Exonuclease) 用のフレットプローブ (FRET probe) の例としては、

5'-(FAM)-ACTCCCGCAGACAC-(Dabcyl)-3'

が挙げられ、これに対応するターゲットDNAの配列の例としては、

5'-GTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTG-3'

(下線部は、前記のフレットプローブとの相補領域を示している。)

が挙げられる。また、上記の相補配列を2～5回繰り返したものも使用することができる。

[0023] 本発明の方法では、ターゲット領域を2カ所以上繰り返して有するオリゴヌクレオチドを使用することができ、このような繰り返しを有するオリゴヌクレオチドを使用することにより、標識としての一つのオリゴヌクレオチドから複数のフラップを短時間で得ることができ、高速度で高感度な測定が可能となる。このような繰り返しを有するオリゴヌクレオチドは、公知の各種の方法により製造することができる。

例えば、6～10個の繰り返し配列をもつマルチターゲットDNAの製造方法を具体的に例に基づいて説明する。

まず、以下の(1)～(3)の3種類のオリゴヌクレオチドを自動合成機により製造する。

(1) 5'末端に制限酵素NdeI認識配列、3'末端にBamHI認識配列をもつ。

5'-GGAATTCCATATGGTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTT
TTCTTTGATCGTATGCAGTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCT
TTTCTTTGGGATCCCG-3' (117mer)

下線部はインバーダーオリゴおよびシグナルプローブとの相補領域であり、2個の繰り返しを有し、ターゲット間のスペースは10merである。

(2) 5'末端に制限酵素BamHI認識配列、3'末端にXhoI認識配列をもつ。

5'-CGGGATCCGTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTT
TGATCGTATGCAGTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCT
TTGCTCGAGCGG-3' (113mer)

下線部はインバーダーオリゴおよびシグナルプローブとの相補領域であり、2個の繰り返しを有し、ターゲット間のスペースは10merである。

(3) 両'末端にBamHI認識配列をもつ。

5'-CGGGATCCGTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTT
TGATCGTATGCAGTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCT
TTGGGATCCCG-3' (112mer)

下線部はインバーダーオリゴおよびシグナルプローブとの相補領域であり、2個の繰り返しを有し、ターゲット間のスペースは10merである。

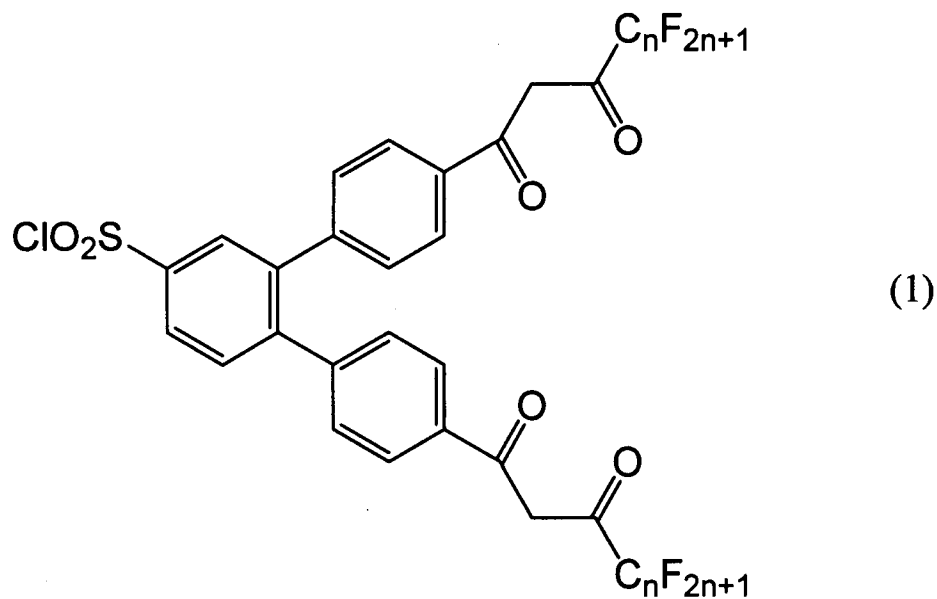
- [0024] 次に前記(1)の合成オリゴヌクレオチド、及び発現ベクターpET 22b(Merck)を、NdeIおよびBamHIで切断し、ベクター中に合成オリゴヌクレオチド(1)をライゲーションして、合成オリゴヌクレオチド(1)をベクター中に組み込む。合成オリゴヌクレオチド(1)が組み込まれたベクターと合成オリゴヌクレオチド(2)を、BamHIおよびXhoIで切断し、合成オリゴヌクレオチド(2)をライゲーションして、合成オリゴヌクレオチド(2)をベクター中に組み込む。さらに、これを、BamHIで切断し、切断箇所に合成オリゴヌクレオチド(3)をライゲーションして、合成オリゴヌクレオチド(3)をベクター中に組

み込む。この操作により、6カ所のターゲット領域を有するオリゴヌクレオチドを製造することができることになるが、合成オリゴヌクレオチド(3)は、両末端の制限酵素サイトが同一のため、複数個が同時に入る可能性があり、ターゲット領域が6カ所以上のオリゴヌクレオチドをこの方法により同時に製造することができる。ダイレクトPCRによる長さから、ベクター内に入ったターゲット配列の繰り返し回数を推定できるので、いくつかのクローンから目的の長さのオリゴヌクレオチドを取得することができる。

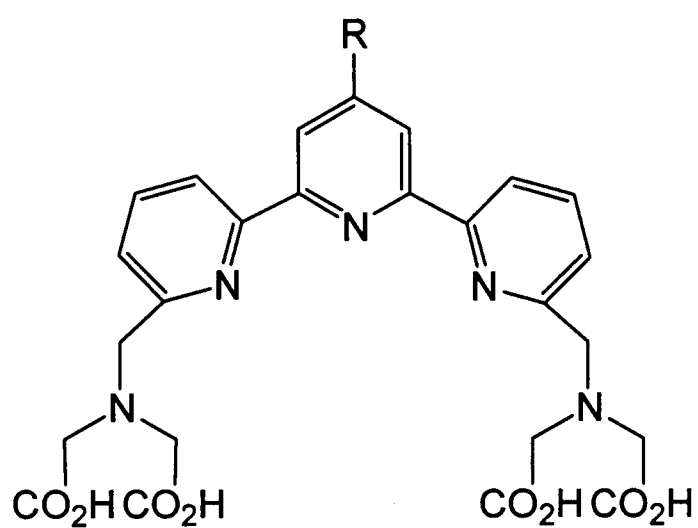
そして、ベクター上の配列にプライマーを設計して、ターゲット領域のPCRを行い、続いて、片側のプライマーのみを用いたPCRを行い、1本鎖DNAとする。このとき、ビオチン標識プライマーを用いれば、ビオチン標識ターゲットができる。

[0025] 本発明のインバーダー法におけるフレットプローブの発光物質としては、蛍光物質が好ましく、このような蛍光物質としては、例えば、FAM(モノ-5(又は6)-カルボキシフルオレセン)のような蛍光染料であってもよいが、検出感度を向上させるためには、フレットプローブにおける発光色素として希土類蛍光錯体ラベル剤、例えば、配位子として次の一般式(1)～(6)

[0026] [化1]

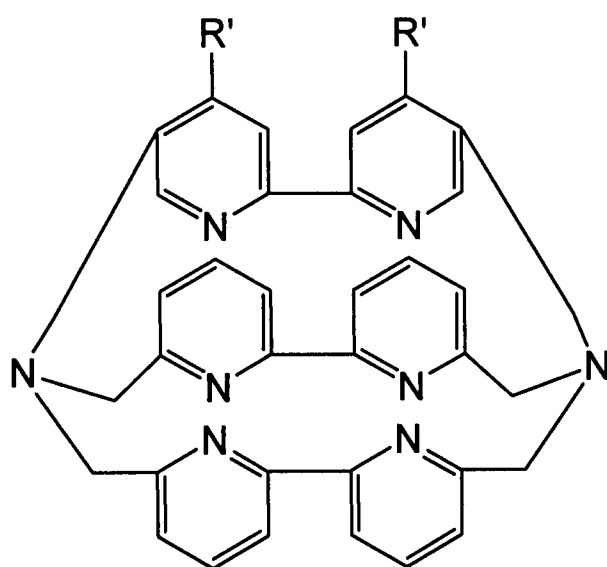


[0027] [化2]



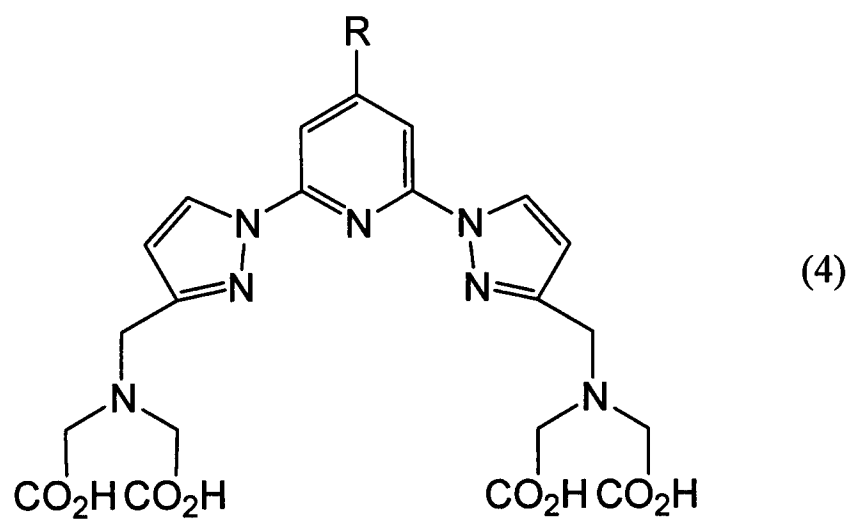
(2)

[0028] [化3]

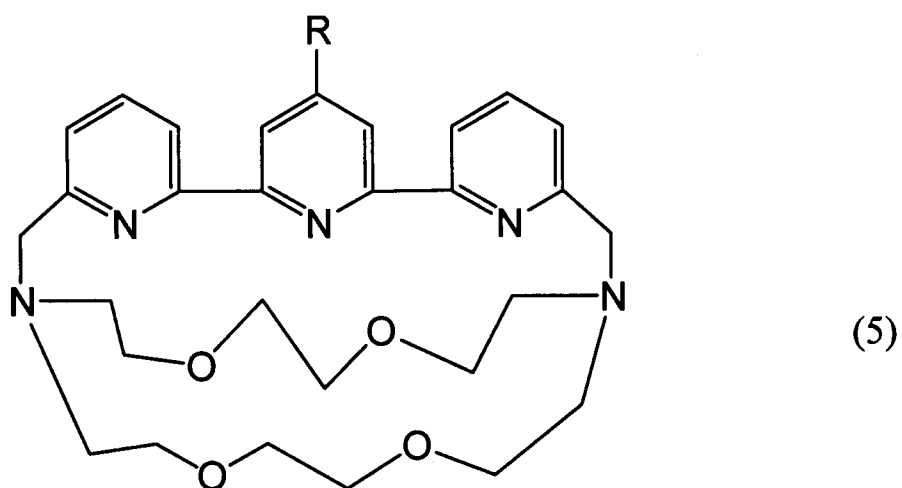


(3)

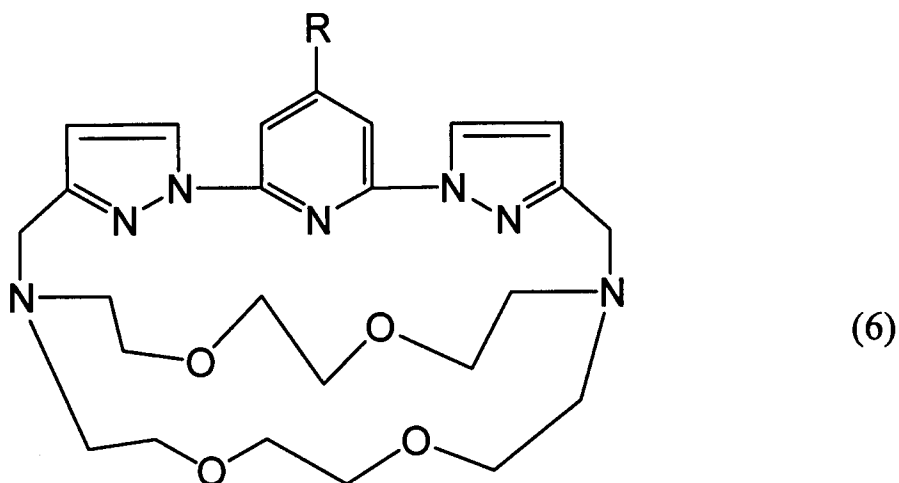
[0029] [化4]



[0030] [化5]

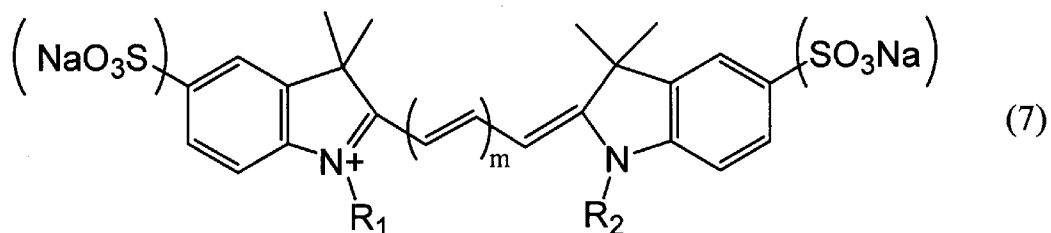


[0031] [化6]

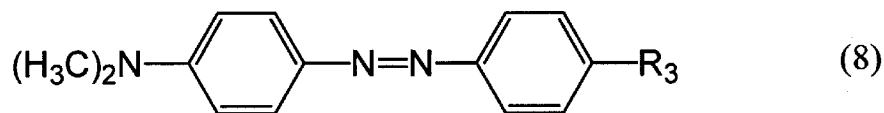


[0032] (式(1)～(6)中、 n は1～4の整数を示し、 R は置換基を有するアリアル基を示し、 R' はアミノ基、水酸基、カルボキシル基、スルホン酸基、又はイソチオシアネート基を示す。)で表される配位子のいずれか1種を含有する、サマリウム(Sm)、ユウロピウム(Eu)、テルビウム(Tb)、又はジスプロシウム(Dy)などからなる希土類元素の希土類蛍光錯体ラベル剤が好ましい(特開2003-325200号及び特願2005-106860号参照)。また、フレットプローブにおける消光物質としては、蛍光クエンチャーラベル剤が好ましく、例えば、次の一般式(7)～(9)

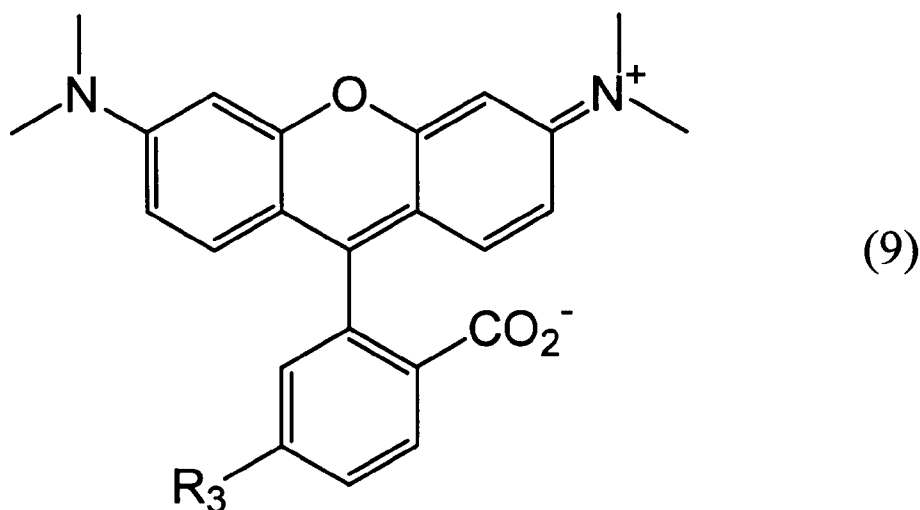
[0033] [化7]



[0034] [化8]



[0035] [化9]



[0036] (式(7)～(9)中、 m は1～4の整数を表し、 R_1 、 R_2 のいずれか一方は担体又は核酸に固定するためのリンカー基を表し、他方は水素原子又はアルキル基を表し、 R_3 は担体又は核酸に固定するためのリンカー基を表す。)で表される蛍光クエンチャーラベル剤の使用が好ましい(特開2003-325200号及び特願2005-106860号参照)。ここに、特開2003-325200号及び特願2005-106860号の記載を参照して本明細書に取り込む。

[0037] 本発明における標識化される化学物質としては、特に制限はなく、標識化が可能な各種の化学物質が包含される。本発明の化学物質としては、例えば、抗原、抗体、ビオチン、アビジンなどのタンパク質、ビタミン、ホルモン、脂質、糖質、糖鎖、芳香族化合物、酵素、アプタマーなどの核酸、低分子リガンドまたはリガンドレセプター(抗体を除く)からなる群などが挙げられる。ここで言う低分子リガンドとは、糖鎖、芳香族化合物、ガングリオシド、オリゴサッカライド、アミノ酸数が2～10のペプチドなどの有機化合物等を指し、例えば、mycペプチド、サイロキシン、トリヨードサイロニン、ガングリオシド G_{M2} 、セロビオース、シアル酸を末端に有する糖鎖などがある。リガンドレセプターとは、細胞あるいは細胞中、または細胞間に存在する特定のリガンドと特異的に結合する物質を指し、例えば、セルロース結合蛋白質、シアル酸結合レクチン、アルブミンレセプターなどがある。低分子リガンドまたはレセプターの例をさらに挙げると、例えば、インシュリン、インシュリンレセプター、EGF、EGフレセプター、HGF、HGFレ

セプター、TSH、TSHレセプターなどのホルモンまたはホルモンレセプター、IL-8などのサイトカインあるいはケモカインに対するレセプター、アセチルコリンレセプター、ヒスタミンレセプターなどの低分子リガンドに対するレセプターなどがある。

また、プロテインキナーゼC、cAMP依存性プロテインキナーゼ、cGMP依存性プロテインキナーゼ、カルモジュリン依存性リン酸化酵素、チロシンリン酸化酵素などの酵素もリガンドレセプター反応により測定でき、本発明の化学物質として使用できる。さらに、各種糖鎖、ガングリオシドに対する種々のレクチンも、本発明の化学物質として使用できる。レクチンの例としては、細胞上で種々の蛋白質と結合したD-マンノースに対するコンカナバリンA、ジ-N-アセチルキトビオースに対する小麦胚凝集素、シアル酸に対するカプトガニ由来シアル酸結合レクチンなどが挙げられる。

核酸としては、種々のデオキシリボ核酸(dATP、dGTP、dTTP、dCTP、dUTP)が連続したDNA、また、種々のリボ核酸(rATP、rGTP、rTTP、rCTP、rUTP)が連続したRNA、また、PNAやLNA、更にはこれらのキメラ体を本発明の化学物質として使用することができる。本発明の化学物質として核酸を使用する場合には、本発明の標識としてのオリゴヌクレオチドと連続した配列となることがあり、標識化化学物質の全体が核酸となる場合もある。

また、本発明の化学物質は、担体や微粒子などに固定化されているものであってもよい。

[0038] 本発明における標識としてのオリゴヌクレオチドと化学物質との「結合」としては、化学物質と標識としてのオリゴヌクレオチドが直接的に結合したものであってもよいし、またリンカーのような両者を結合させるための基を介して間接的に結合したものであってもよい。このような「結合」としては、共有結合などの化学結合が好ましいが、これに限定されるものではなく、吸着などの物理的な結合であってもよく、両者が測定系において分離されないものであればよい。

本発明におけるインバーダー法としては、前記で例示してきた基本的な方法に限定されるものではなく、インバーダー塩基の存在によりフラップが生じて、このフラップにより測定可能となる状態を形成することができる方法であればよい。即ち、塩基配列中の1部、好ましくは1塩基部分に3重鎖部分を形成させ、この部分を特異的な解

裂酵素 (structure-specific 5' nuclease) (以下、具体的な酵素としてFENと言うこともある。)により解裂させることができ、当該解裂によりフレットプローブが認識できる(部分的にハイブリダイズ可能な)オリゴヌクレオチドを遊離することができる方法を包含している。この方法により、ターゲットDNAなどの標識用のオリゴヌクレオチドと、観測系の対象となるフレットプローブとを全く分離して取り扱うことが可能となり、測定の感度やS/N比などを標識物とは分離して考慮することが可能となる。

本発明における複合体とは、標識としての本発明のオリゴヌクレオチドが結合した化学物質(標識化化学物質)と、化学的又は物理的に結合して一体となる物質であり、例えば、抗原と抗体の結合体、リガンドと受容体との結合体、酵素などのタンパク質の多量体などが例示される。

本発明におけるイムノアッセイとしては、標識を用いる抗原抗体反応に基づく分析方法であれば特に制限はなく、サンドイッチアッセイなどのいずれの方法であってもよい。また、ストレプトアビジン-ビオチン系を使用するものであっても、使用しないものであってもよいが、汎用性をもたせるためにはビオチンに結合したものが好ましい。

また、本発明のアッセイとしては、前記したイムノアッセイに限定されるものではなく、リガンドと受容体などの結合アッセイや競合アッセイなどの各種のアッセイを包含するものである。

したがって、本発明における試料としては、本発明の標識化化学物質と化学的又は物理的に結合して複合体を形成し得る物質が含有されている、又は含有されている可能性があるものは全て包含している。

さらに、本発明の標識は、アッセイに使用されるものに限定されるものではなく、トレーサーとして使用される場合も包含するものである。したがって、本発明の標識化化学物質は、複合体を形成しない場合も包含している。

[0039] 本発明の方法は、従来の同位体や蛍光物質などの標識を使用する方法において、従来の標識に代えて本発明のオリゴヌクレオチドを使用することにより、従来の方法と同様に使用することができる。これらの具体的な例については、後述する実施例においてより詳細に説明する。

化学物質、例えばビオチンと本発明のオリゴヌクレオチド標識とを結合させる方法と

しては、従来のDNAの標識化方法のような技術をそのまま使用することができる。特にビオチンと本発明のオリゴヌクレオチドの結合体は、汎用性のある標識試薬として有用であり、従来のアビジン-ビオチン系を使用するアッセイ系と同様に使用することができる。

後述する実施例においては、インベーター法におけるターゲットDNAを本発明のオリゴヌクレオチドとして使用例を示しているが、本発明の方法はこれに限定されるものではなく、シグナルプローブを本発明のオリゴヌクレオチドとして使用することも可能であり、またインベーターオリゴを標識として使用することも可能である。

[0040] また、インベーターオリゴによる3重鎖部分がFENにより切断され、フラップが生じることになるのであるが、このような3重鎖部分を1カ所だけでなく2カ所以上設けるように設計することもできる。例えば、基本的なインベーター法では図3に示されるように、1カ所がFENにより切断され、1個のフラップが生じる。図3においては、ターゲットDNAとシグナルプローブとの相補的な配列部分である N_1 から3'末端までがターゲットDNAとハイブリダイズし、さらに、インベーターオリゴとターゲットDNAとの相補的な配列部分である5'末端から N_2 の手前の塩基までが、ターゲットDNAとハイブリダイズする。そして、インベーターオリゴの末端の塩基 N_2 が3重鎖部分を形成し、この結果、本発明の1個のオリゴヌクレオチドからFENにより1個のフラップが生じる(図3の下側を参照)。このような使用方法においては、原理的には、1つの標識オリゴヌクレオチドから1個のフラップが生じることになる。

より具体的には、例えば、ターゲットDNAとして、

5'-GTGTCTGCGGGAG-T-CGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTG-3'

を用い、シグナルプローブとして、

5'-AACGAGGCGCAC-ACTCCCGCAGACAC-3'

を用い、インベーターオリゴとして、

5'-CAAAGAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG-C-3'

を用いることにより、フラップ(下線部分)を生じさせることができる。

1つの標識オリゴヌクレオチドからさらに多数のフラップを生じさせることが可能である。例えば、標識オリゴヌクレオチドをPCR法などにより増幅することも不可能ではな

いが、操作として煩雑になるだけでなく、PCR法による増幅に定量性が担保されない場合には、定量化が困難となる。さらに、PCR法により増幅する場合には、最低100 bp程度の長さが必要であり、より長いオリゴヌクレオチドを標識として用いなければならないという問題が生じる。

- [0041] 1つの標識オリゴヌクレオチドから多数のフラップを生じさせるもっと簡便な方法としては、2つのフラップが生じるシグナルプローブを使用する方法が挙げられる。例えば、図4に示すように、1つのシグナルプローブとターゲットDNAから、シグナルプローブの5'側フラップを切断するための解裂酵素としてFENを、3'フラップを切断するための解裂酵素としてHef (Helicase-associated Endonuclease for Fork-structured DNA, *Pyrococcus furiosus*由来 (Komori et al. (2002) *Genes Genet. Syst.* 77:227-241))を用いることにより、2つのフラップを生じさせることができる。このためには、ターゲットDNAとして、例えば、

5'-GTTTCTTTTCGACGCACTACTACTT-TGAGGGCGTCTGTG-TTCATCAT
CACGCAGCTTTTCTTTG-3'

を用い、シグナルプローブとして、

5'-AACGAGGCGCAC-ACTCCCGCAGACAC-AACGAGGCGCAC-3'

を用いることにより、2個のフラップ(下線部分)を生じさせることができる。即ち、1個の標識オリゴヌクレオチドから、2倍の標識化物を得ることができようになり、標識の感度が増加することになる。

- [0042] 前記した方法では、3'フラップを切断するための解裂酵素としてHefを用いた方法であるが、単純に2個以上のシグナルプローブが結合するようにすることもできる。例えば、図5に示されるように、ターゲットDNAを複数のシグナルプローブが結合できるように、シグナルプローブの結合部位が複数個繰り返す様に設計することもできる。これは前記した1個のフラップを生じさせる従来にインバーダー法の単純な繰り返しである。この方法では、標識として使用されるオリゴヌクレオチドの長さは、その繰り返しの数だけ長くなるが、5'側フラップを切断するための解裂酵素としてFENだけを用いて1度に多数のフラップを得ることが可能となり、標識としての感度を飛躍的に高くすることも可能となる。

同様に、前記した5'側フラップを切断するための解裂酵素としてFENを、3'フラップを切断するための解裂酵素としてHefを用いて、2つのフラップを同時に生じさせる方法を、繰り返して使用できるように、本発明のオリゴヌクレオチドを設計することができる。例えば、前記した図4の方法を単純に繰り返して、図6に示すように設計することもできる。

[0043] さらに、図5に示される単純な繰り返し方法においては、繰り返しの数だけのインベーターオリゴが必要になるが、当該インベーターオリゴを、省略することも可能である。例えば、シグナルプローブと相補的な配列を繰り返して合成したオリゴヌクレオチドをターゲットDNAとして用いており、そこにはシグナルプローブが結合する部位とインベーターオリゴが結合する部位が設けられている(図5参照)が、このとき、シグナルプローブの3'末端側にさらに1塩基を付加し、この部分が隣り合う相補配列と3重鎖を形成するようにする。即ち、シグナルプローブの結合部位をそのままインベーターオリゴの結合部位として使用する。このようすを概念的に図7に示す。この手法ではインベーターオリゴを用いず、シグナルプローブのターゲットDNAとの結合部分がインベーターオリゴの役割も果たすことになる。例えば、ターゲットDNAとして、



を用い、シグナルプローブとして、



を用いることにより、シグナルプローブを隣接するシグナルプローブのインベーターオリゴとして使用する。この場合には最初のシグナルプローブにはインベーターオリゴが存在していないので、フラップを生じさせることはできないが、それ以降のシグナルプローブからはフラップが生じることになる。

この方法において、さらにインベーターオリゴを使用することもできることは当然である。このようなインベーターオリゴを使用することにより、最初のシグナルプローブからもフラップを生じさせることができるようになる。

[0044] 本発明の標識としてオリゴヌクレオチドの塩基配列については、インベーターオリゴなどにより3重鎖の箇所を発生させることができる十分な長さがあればよく、その配列

は任意に設計することができる。そして、当該オリゴヌクレオチドは合成により人為的に製造したものであってもよく、また天然のものであってもよい。天然の生体由来のオリゴヌクレオチドを本発明の標識オリゴヌクレオチドとして使用する場合には、シグナルプローブやインベーターオリゴの塩基配列を、それに対応するように設計すればよい。生体由来の比較的長いオリゴヌクレオチドを本発明の標識として利用する場合には、対応するシグナルプローブやインベーターオリゴを設計する部位が沢山有るので、これらの適当な部位の1カ所以上を任意に選択することができる。前記した応用例を適宜組み合わせて使用することもできる。

さらに、本発明の方法においては、化学物質に結合させたオリゴヌクレオチド自体を直接インベーター法におけるオリゴヌクレオチドとして、例えば、シグナルプローブやターゲットDNAとして使用する方法について説明してきたが、これに限定されるものではない。例えば、化学物質に結合した本発明の標識としてのオリゴヌクレオチドと相補的な塩基配列を有するDNAとハイブリダイズさせて、標識としたオリゴヌクレオチドとハイブリダイズしたDNAだけを分離し、これをインベーター法におけるシグナルプローブやターゲットDNAやインベーターオリゴとして使用することもできる。より具体的には、例えば10～100mer、好ましく10～50mer、より好ましくは10～20mer程度のより短いDNAを本発明の標識としてのオリゴヌクレオチドとし、当該オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ可能な配列を含む第二のオリゴヌクレオチドであって、インベーター法におけるシグナルプローブやターゲットDNAやインベーターオリゴとして使用するに十分な長さを有するDNAとハイブリダイズさせ、測定系においてハイブリダイズしない第二のオリゴヌクレオチドを分離し、次いでハイブリダイズした第二のDNAを乖離させて分離し、得られたハイブリダイズした第二のオリゴヌクレオチドをインベーター法により解析することもできる。

これらの点以外に種々の点において改良を加えることも可能であるが、本発明の特徴はオリゴヌクレオチドを標識として使用すること、そして、それを「ヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法」、好ましくはフラップエンドヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法、より好ましくはインベーター法により解析することである。その他の点において改良を加えられたとしても、これらの方法は全て本発明の実施の態様とし

て、本発明に包含されるものであることは当業者であれば容易に理解されることである。

[0045] 本発明の測定用キットは、第一の態様においては、10～100mer、好ましくは10～60mer、10～40mer、より好ましくは20～40mer、又はこれらの整数倍の長さを有するオリゴヌクレオチドが標識として化学物質に結合している標識化された化学物質を少なくとも1種含有してなる、オリゴヌクレオチドを標識として使用するインベーター法による測定用キットに関するものである。このような本発明のオリゴヌクレオチドで標識化された化学物質としては、抗体や受容体などのタンパク質、各種の抗原、蛍光物質、放射性同位体を含有する化学物質、ビオチンやアビジンのような特異的な親和性を有する化学物質などが挙げられる。なかでも、ビオチンは現在のアッセイ系でよく使用されている物質であり、現在使用されているアッセイ系に容易に適用可能であることから、本発明のオリゴヌクレオチドが結合したビオチンが特に好ましいが、これに限定されるものではない。本発明の測定用キットは、このような本発明のオリゴヌクレオチドで標識化された化学物質の少なくとも1種を含有するものであり、そのほかに、測定に必要な物質、例えば、抗体、抗原、バッファー溶液、アビジンなどや、インベーター法の解析に必要な各種のプローブを含有させることができる。

また、本発明の測定用キットの第二の態様は、少なくともインベーター法におけるシグナルプローブ(primary probe)、インベーターオリゴ(secondary probe)、及び／又はターゲットDNA、及び／又はフレットプローブを含有してなる、オリゴヌクレオチドを標識として使用するインベーター法による測定用キット。このような測定用キットは、ターゲットDNAを除けばゲノムのSNP解析用のキットをそのまま適用することもできるが、SNP解析用のキットは非常に沢山の種類の標的DNAを短時間に解析するためのものであるが、本発明のキットは塩基配列の確定しているターゲットDNAを検出、同定又は定量化するためのものであり、標的DNAが確定されているものであるという点において基本的に相違するものである。即ち、本発明のこの測定用キットは、既知の塩基配列を有するプローブの検出、同定又は定量化のためのキットであり、測定対象とするDNAが特定されている測定用キットである。本発明のこの測定用キットは、インベーター法におけるシグナルプローブ(primary probe)、インベーターオリゴ(sec

ondary probe)、及びターゲットDNAの3種類のプローブを全て含有していてもよい。この場合には、それらのなかの1種、好ましくはターゲットDNAを目的の化学物質に結合させて使用することになる。また、すでに本発明のオリゴヌクレオチドが結合した化学物質を使用する測定系においては、シグナルプローブ(primary probe)、インベーターオリゴ(secondary probe)、及びターゲットDNAの3種類のプローブのうちの1種が欠如したもの、例えば、シグナルプローブ(primary probe)、及びインベーターオリゴ(secondary probe)の組み合わせ、インベーターオリゴ(secondary probe)、及びターゲットDNAの組み合わせであってもよい。さらに、前記応用例のように、インベーターオリゴを使用する必要性の無い場合には、インベーターオリゴの無い組み合わせであってもよい。本発明の測定用キットのなかには前記したオリゴヌクレオチドのほか、3重鎖を特異的に解裂させるためのFENやHefのような解裂酵素、フレッツプローブ、バッファー溶液などの他の必要なものが含有されていてもよい。

[0046] 本発明のインベーター法による解析に当たっては、フラップの発生を必要としているが、これを解析するためのフレッツプローブは必ずしも必須のものではなく、発生したフラップを解析する他の手段があれば特にフレッツプローブを使用する必要性は無い。しかしながら、フレッツプローブを使用する解析法はSNPの解析用のインベーター法として広く使用されてきており、フレッツプローブを使用する解析方法が経済的にも利点が多い。

一般にフレッツプローブは、発光物質と消光物質を有しており、本発明のフレッツプローブとしては、測定可能である限りにおいて任意の発光物質と任意の消光物質が使用可能である。本発明のオリゴヌクレオチドを標識として使用する方法においては、当該オリゴヌクレオチドをフレッツプローブにより測定するものであることから、測定系全体の感度や測定レンジは、フレッツプローブの性質によるところが大きく、フレッツプローブの選択はある意味では重要である。感度や特異性の大きいフレッツプローブの使用が特に好ましい。好ましいフレッツプローブとしては、発光物質として、前記したサマリウム(Sm)、ユウロピウム(Eu)、テルビウム(Tb)、又はジスプロシウム(Dy)などからなる希土類元素の希土類蛍光錯体ラベル剤を用いるものが好ましく、特にユウロピウム(Eu)錯体を用いるものが好ましい。

発明の効果

[0047] 本発明は、オリゴヌクレオチドをアッセイなどの測定系における標識物質として使用するという新規な概念を提供するものである。イムノーPCR法のように長いDNAを標識として使用することは知られていたが、PCR法という煩雑で熟練を要する操作が必要であるばかりでなく、測定レンジがせまく、かつPCRが可能な塩基の長さが必要であり、標識自体が非常に大きな分子種とならざるを得なかった。これに対して、本発明の標識は、より短いオリゴヌクレオチドを使用するものであり、標識としての大きさも小さく、対象となる化学物質の特性に与える影響も小さく、対象となる化学物質の特性を大きく変化させることなく測定が可能であり、測定レンジも広いものとなる。

さらに、本発明の方法では、「ヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法」、好ましくはインバーダー法を応用することにより、極めて高感度で測定することができ、かつ発生させるフラップの数を増加させることにより、さらに高感度の測定が可能となり、従来測定法における測定限界をさらに改善することもできる。

また、本発明の方法は、放射性物質や毒性の高い物質を使用する必要が無く、安全な測定が可能である。

さらに、本発明の方法は、発生するフラップを測定するものであるから、煩雑な操作や熟練を必要とする操作は必要無く、簡便な手法で安全で確実な測定結果を安定して得ることができる。

また、本発明の方法は、従来のSNP解析方法としてのインバーダー法を応用することができ、プレート及びチップ上で大量の検体を処理することも可能である。

図面の簡単な説明

[0048] [図1]図1は、インバーダー法の概要を模式的に示したものである。

[図2]図2は、インバーダー法の概要をより具体的な塩基配列に基づいて例示したものである。

[図3]図3は、本発明の方法におけるフラップの生成を模式的に例示したものである。

[図4]図4は、本発明の方法における2個のフラップを生成させる方法を模式的に示したものである。

[図5]図5は、本発明の方法におけるインバーダーオリゴとシグナルプローブとの相補

的配列を繰り返したターゲットによるインバーダー法の例を模式的に示したものである。

[図6]図6は、本発明の方法における両端にフラップを付加したシグナルプローブによるインバーダー法の例を模式的に示したものである。

[図7]図7は、本発明の方法におけるシグナルプローブ自身がインバーダーオリゴを兼ねた場合のシグナルプローブとの相補的配列を繰り返すようにしたインバーダー法の例を模式的に示したものである。

[図8]図8は、本発明の方法(図8中の黒丸印)及び従来のELISA法(図8中の黒四角印)による、ウサギIgGの検量線を比較してグラフで示したものである。

[図9]図9は、本発明の方法によるウサギIgGを抗原とした、直接アッセイ法における検量線をグラフで示したものである。

[図10]図10は、本発明の方法(図10中の黒丸印)及び従来のELISA法(図10中の黒四角印)による、ヒトTNF- α を抗原としたサンドイッチイムノアッセイ法における検量線をグラフで示したものである。

[図11]図11は、希土類蛍光錯体を用いた本発明の方法(図11中の黒丸印)及び従来の酵素測定法(図11中の黒四角印)による、ヒトTNF- α を抗原としたサンドイッチイムノアッセイ法における検量線をグラフで示したものである。

[図12]図12は、本発明の方法(図12中の黒丸印)及び従来の酵素測定法(図12中の黒四角印)による、ラクトフェリン糖類に対するレクチンの親和性の検量線を比較してグラフで示したものである。

[図13]図13は、本発明の方法による、HT1080細胞におけるアクチンタンパク質の発現量を解析した結果をグラフで示したものである。

[図14]図14は、本発明の方法による、HT1080細胞におけるアクチンタンパク質の発現量の検量線をグラフで示したものである。

[図15]図15は、本発明の方法により、ラミニンを用いたレセプター・リガンド・バインディング・アッセイを行った結果を示すグラフである。

[図16]図16は、本発明の方法により、細胞のマトリックスメタロプロテイナーゼ(Matrix metalloproteinase) 2 (MMP2)の発現量を測定した結果を示すグラフである。

[図17]図17は、本発明の方法により、細胞のGAPDH (Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase) の発現量を測定した結果を示すグラフである。

[図18]図18は、本発明の方法により、細胞中のパピローマウイルスの検出、同定を行った結果を示すグラフである。

[図19]図19は、ビオチンを結合したトロンビンアプタマーによるトロンビンの検出・定量を行った結果を示すグラフである。

[図20]図20は、3'末端側に本発明のターゲット配列を結合したアプタマーによるトロンビンの検出・定量を行った結果を示すグラフである。

[図21]図21は、本発明のターゲット領域が2カ所あるターゲットDNAによる検出感度の試験を行った結果を示すグラフである。

[図22]図22は、本発明のシグナルプローブが、インバーダーオリゴを兼ねるものであって、ターゲット領域が5回繰り返されるターゲットDNAによる検出感度の試験を行った結果を示すグラフである。

[0049] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1

[0050] ウサギIgG (Rabbit IgG)を抗原としたサンドイッチイムノアッセイ

抗ウサギIgG抗体を固相化した後、非特異反応を防ぐために、1%BSA及び0.2%グリシンでブロッキングした。これに、ウサギIgGを0.005pg/mL～50000pg/mLのそれぞれの濃度で反応させた後、ビオチン標識した抗ウサギIgG抗体でサンドイッチし、ビオチン化DNA (ターゲットDNA)をアビジンを介して結合させた。これを10回洗浄した後、50mlの後述するプローブミックスを入れ、63℃で1時間反応させ、FAMの蛍光強度を測定した。

ここで使用した標識DNAはインバーダー法による解析ではターゲットDNAとして用いられるものであり、その配列は、

5'-AAGGA GAAGG TGTCT GCGGG AGTCG ATTTC ATCAT CACGC AGCT
T TTCTT TG-3'

であった。

また、プローブミックスにおけるシグナルプローブ (primary probe)、インバーダーオリゴ (secondary probe)、及びフレットプローブ (FRET probe) の配列は、シグナルプローブ (primary probe) :

5'-AACGA GGCGC ACACT CCCGC AGACA C-3'

インバーダーオリゴ (secondary probe) :

5'-CAAAG AAAAG CTGCG TGATG ATGAA ATCGC-3'

フレットプローブ (FRET probe) :

5'-GCTTG TCTCG GTTTT TCCGA GACAA GCGTG CGCCT CGTT-3'

フレットプローブ (FRET probe) は、5' 末端側にFAMが結合し、5' 末端から3番目の塩基に消光物質としてDABCYLが結合している。

使用したプローブミックスは、

PH FEN	10ng/mL
FAMフレットプローブ	125nM
シグナルプローブ	125nM
インバーダーオリゴ	50nM
MgCl ₂	7.5mM
tRNA	5ng/mL
トリス-HCl (pH7.4)	10mM
ツウィーン20	0.05%

からなるものであった。

結果を図8にグラフで示す。図8の縦軸はFAMの蛍光強度を示し、横軸は添加したウサギIgGの濃度 (pg/mL) を示す。図8中の黒丸印が本発明の実施例1の結果を示し、黒四角印は後述するELISA法の結果を示す。この結果、図8に示すようにウサギIgGの検出限界が5pg/mLで、検出範囲は50000pg/mLから5pg/mLまで、平均CV%は3であった。

なお、検出限界は、ネガティブコントロール (NC) の蛍光強度にその時の標準偏差 (n=4) の3倍を加えた値が検量線と一致する時の濃度とした。

[0051] 比較例1

実施例1に記載した方法において、標識としてオリゴヌクレオチドを使用するに代えて、従来の酵素標識法(ELISA法)で行った。

この結果を実施例1の本発明の方法と比較して図8に黒四角印で示す。この結果、酵素測定法(ELISA法)では検出限界が449pg/mLで、検出範囲は50000pg/mLから500pg/mLまで、平均CV%は9であった。

本発明の方法が酵素測定法より検出感度は1桁上げ、傾きが大きくて低濃度にも測定できることが分かった。

実施例 2

[0052] ウサギIgGを抗原とした、直接アッセイ

0.05pg/mL～500000pg/mLの各濃度のウサギIgGを固相化した後、非特異反応を防ぐために、1%BSA及び0.2%グリシンでブロッキングした。ビオチン標識抗ウサギIgG抗体を反応させた後、ビオチン化DNA(ターゲットDNA)をアビジンを介して結合させた。その後、実施例1と同様に、10回洗浄後、50mlのプローブミックスを入れ、63℃で30分時間を反応させ、FAMの蛍光強度を測定した。

結果を図9にグラフで示す。図9の縦軸はFAMの蛍光強度を示し、横軸は添加したウサギIgGの濃度(pg/mL)を示す。この結果、図9に示すようにウサギIgGの検出限界が6pg/mLで、検出範囲は500000pg/mLから6pg/mLまでで、平均CV%は1.7であった。

実施例 3

[0053] ヒトTNF- α を抗原としたサンドイッチイムノアッセイ

TNF- α 抗体で固相化したマイクロプレートに希釈した各濃度のTNF- α およびビオチン化TNF- α 抗体を室温で2時間インキュベートし、抗原-抗体複合体を形成させた。100ng/mLのストレプトアビジンを加え、室温で1時間インキュベートした後、バッファーA(0.05% Tween-20を含有する0.05M Tris-HClバッファー(pH7.8))で3回洗浄後、バッファーB(0.05M Tris-HClバッファー(pH7.8))で1回洗浄した(以下、洗浄は同様に行った。)。実施例1と同様に、0.1nMのビオチン化DNA(ターゲットDNA)をアビジンを介して結合させた。洗浄した後、さらに水で3回洗浄し、プローブミックス50mLを入れ、63℃で1時間反応させた。カメレオン(

Chameleon) (HIDEX製)により励起波長(Ex.)485nmで、発光波長(Em.)530nmでFAMの蛍光強度を測定した。

結果を図10にグラフで示す。図10の縦軸はFAMの蛍光強度を示し、横軸は添加したTNF- α の濃度(pg/mL)を示す。実施例3の結果を図10の黒丸印で示す。この結果、図10に示すようにTNF- α の検出限界が0.65pg/mL、検出範囲は1000pg/mLから0.65pg/mLまで、平均CV%は3.2であった。

[0054] 比較例2

実施例3に記載した方法において、標識としてオリゴヌクレオチドを使用するに代えて、従来の酵素標識法(ELISA法)で行った。酵素測定では抗原-抗体複合体複合体にstreptavidin-HRPを加え室温で30時間インキュベートした後、TMBと室温で30分反応した。停止溶液(Stop solution)を加えた後、カメレオン(Chameleon)でOD450nmを測定した。

この結果を実施例3の本発明の方法と比較して図10に黒四角印で示す。この結果、酵素測定法(ELISA法)では検出限界が26pg/mLで、検出範囲は1000pg/mLから26pg/mLまで、平均CV%は4.5であった。

この結果、本発明の方法は従来の酵素測定法(ELISA法)に比較して、優れた感度を有するものであることが分かった。

実施例 4

[0055] 蛍光色素として希土類蛍光錯体を用いた実験

実施例1に記載のFAMフレットプローブの代わりに、5'末端に蛍光色素としてDTBTAのユウロピウム錯体(Eu-DTBTA)を結合し、5'末端から4番目の塩基に消光物質としてBHQ2(登録商標)を結合したフレットプローブを用いて時間分解蛍光測定した以外は、実施例3に記載の内容と同様の手順、条件でアッセイを実施した。時間分解蛍光測定は、カメレオン(Chameleon) (HIDEX製)により励起波長(Ex.)340nmで、発光波長(Em.)616nm、遅延時間100 μ s、ウィンドウ時間400 μ sでEu-DTBTAの蛍光強度を測定した。

結果を図11にグラフの黒丸印で示す。図11の縦軸はEu-DTBTAの蛍光強度を示し、横軸は添加したTNF- α の濃度(pg/mL)を示す。この結果、図11に示すよ

うにTNF- α の検出限界が検出限界が1.9pg/mLであり、検出範囲は1000pg/mLから1.9pg/mLまで、平均CV%は7であった。

[0056] 比較例3

実施例4に記載した方法において、標識としてオリゴヌクレオチドを使用するに代えて、従来の酵素標識法(ELISA法)で行った。

この結果を実施例4の本発明の方法と比較して図11に黒四角印で示す。この結果、酵素測定法(ELISA法)では検出限界が20pg/mLで、検出範囲は1000pg/mLから20pg/mLまで、平均CV%は4.5であった。

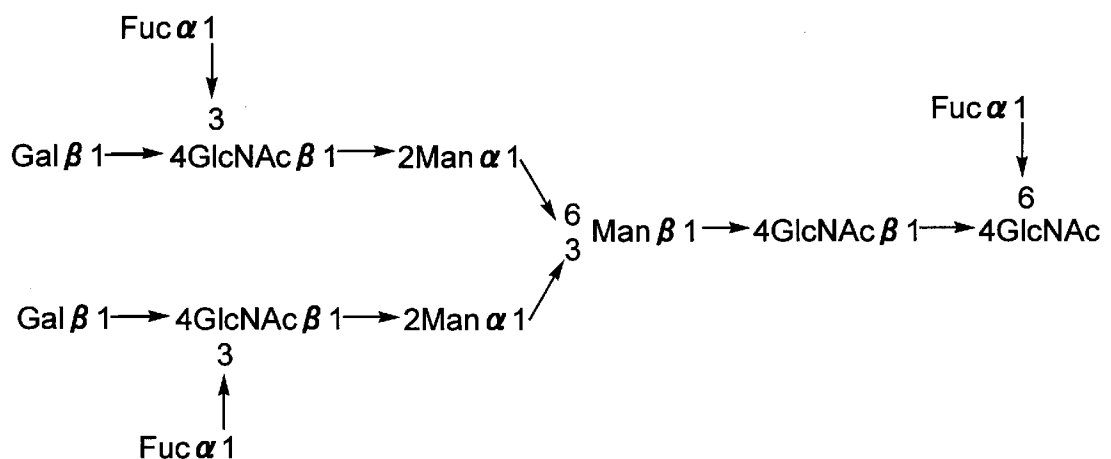
この結果、本発明の方法は、従来の酵素測定法(ELISA法)に比較して、優れた感度を有するものであることがわかった。

実施例 5

[0057] 糖タンパク質糖鎖とレクチンとの結合アッセイとその定量法

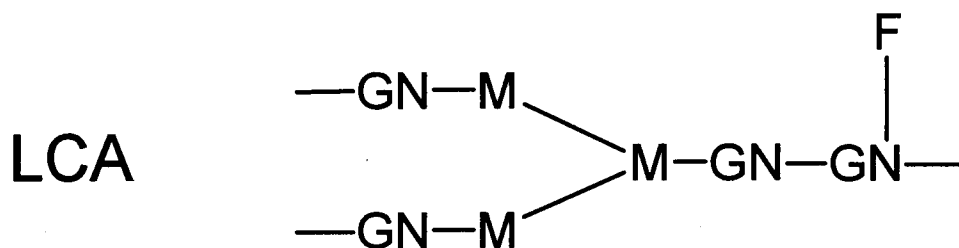
糖タンパク質のモデルとして、牛乳由来ラクトフェリンを用いた。ラクトフェリンは、次に示す糖鎖構造(Matsumotoら、Journal of Biochemistry, 91(1),143-155, 1982)を持ち、

[0058] [化10]



[0059] これはレンズマメレクチン(LCA)が認識する次に示す、

[0060] [化11]



[0061] 糖鎖構造(谷口ら、生物物理化学、35(3)、199-204、1991)と一致することから、LCAを用いた本発明の方法によるラクトフェリンの結合アッセイを試みた。

96穴フルオロヌンクモジュールマイクロプレート(Nunc製)に0.05M炭酸バッファー(pH9.3)で希釈した各濃度のラクトフェリン(和光製)を1ウエル当たり100 μ lで4℃で一晩コーティングした。バッファーA(0.05% Tween-20を含有する0.05M Tris-HClバッファー(pH7.8))で3回洗浄した後、バッファーB(0.05M Tris-HClバッファー(pH7.8))で1回洗浄した(以下、洗浄は同様に行った。)。1%B SA(sigma製)で室温で、1時間インキュベートしブロッキングを行い、洗浄した後、5 μ g/mlのビオチン化LCAと室温で1時間インキュベートし、ビオチン化LCA-ラクトフェリン複合体を形成させた。100ng/mlのストレプトアビジンを加え、37℃で1時間インキュベートした後、実施例1と同様にして、0.01nMのビオチン化DNA(ターゲットDNA)と室温で30分反応した。洗浄した後、さらに水で3回洗浄した。実施例1と同様に、プローブミックス50mLを入れ、63℃で1時間反応させた。カメレオン(Chameleon)(HIDEX製)により励起波長(Ex.)485nm、発光波長(Em.)530nmでFAMの蛍光強度を測定した。

結果を図12にグラフで示す。図12の縦軸はFAMの蛍光強度を示し、横軸は添加したラクトフェリンの濃度(pg/mL)を示す。黒丸印が本発明の実施例5の結果を示し、黒四角印は後述するELISA法の結果を示す。この結果、図12に示すように検出限界が7.3pg/mL、検出範囲は10000pg/mLから7.3pg/mLまで、平均CV%は3.3であった。

[0062] 比較例4

実施例5に記載した方法において、標識としてオリゴヌクレオチドを使用するに代えて、従来の酵素標識法(ELISA法)で行った。酵素測定ではビオチン化LCA-ラク

トフェリン複合体にストレプトアビジン-HRPを加え37℃で1時間インキュベートした後、TMBと室温で30分反応した。停止溶液(Stop solution)を加えた後、カメレオン(Chameleon)でOD450nmを測定した。

この結果を実施例5の本発明の方法と比較して図12に黒四角印で示す。この結果、酵素測定法では検出限界が65pg/mLで、検出範囲は10000pg/mLから100pg/mLまで、平均CV%は13.2であった。

本発明の方法が、酵素測定法より検出感度は1桁上げ、ばらつきも少ないことが分かった。

- [0063] 実施例5に記載した方法の応用例としては、癌化した細胞や、種々の疾患時には糖タンパク質や糖脂質などの糖鎖構造が変化することが知られている。この糖鎖の変化をレクチンを用いて検出し、癌や肝疾患の診断に用いる報告がすでになされている。従来技術として、ウェスタンブロット法やレクチンカラムによる検出が一般的であるが、抗体-レクチン酵素免疫法(谷口ら、生物物理化学、35(3), 199-204)として、いわばELISAの変法のような形で迅速に特定の糖鎖をもつ糖たんぱく質を検出する方法も開発されている。今回、検出法としてレクチンとInvader法を組み合わせることにより、抗体-レクチン酵素免疫法よりも高感度に、ウェスタンブロット法よりも容易に(ウェスタンブロットではおおよそ6~7時間の工程が必要であるが、本法では5時間程度である)多検体を同時に扱い、迅速に診断を行う事ができる。また、生化学実験などでも、迅速に従来よりも微量の糖鎖の検出を行う事ができる。

実施例 6

- [0064] 本発明の方法による細胞タンパクの発現アッセイ

(1) HT-1080細胞によるアクチンタンパク質の発現の検出

0.55×10⁵個/ウェルのHT-1080細胞(human fibrosarcoma)を、96穴マイクロプレートに入れ、5%ホルマリン水溶液中、室温で15分間インキュベートして、細胞コーティングした。次に細胞コーティングしたウェルをPBSバッファーで洗浄した後、0.01% Triton X-100を含有するPBSバッファーで5分間インキュベートした。再度PBSバッファーで洗浄した後、マウス抗ヒトアクチン平滑筋(mouse anti-human actin, smooth muscle)抗体(1:10)(UK-Serotec Ltd)及び抗体なし陰性コントロー

ルを室温で2時間インキュベートした。

再度PBSバッファーで洗浄後、ビオチン化抗マウスIgG (1:100)を加え、室温で1時間インキュベートして、ビオチン化抗原—抗体複合体を形成させた。

得られたビオチン化抗原—抗体複合体を本発明の方法により検出する為に、100 Ong/mlのストレプトアビジンを加え、室温で1時間インキュベートした後、バッファーA (0.05% Tween-20を含有する0.05M Tris-HClバッファー (pH7.8))で3回洗浄後、バッファーB (0.05M Tris-HClバッファー (pH7.8))で1回洗浄した(以下、洗浄は同様に行った。)。

次に、実施例1と同様にして、0.1nMのビオチン化DNA (ターゲットDNA)と室温で30分反応させた。これを洗浄した後、さらに水で3回洗浄した。

実施例1と同様にして、プローブミックス50mLを入れ、63℃で25分反応させた後、カメレオン (Chameleon) (フィンランド、HIDEX製)により励起波長 (Ex.)485nm、発光波長 (Em.)530nmでFAMの蛍光強度を測定した。

結果を図13にグラフで示す。図13の縦軸はFAMの蛍光強度を示し、横軸は添加したビオチン化抗マウスIgGを添加した場合 (Positive)と、添加しない場合 (Negative)を示す。この結果、本発明の方法による定量では、陰性コントロールに比べて、陽性コントロールのHT 1080細胞質に発現したアクチンタンパク質が入っている細胞の蛍光強度が上昇していることが認められた。

[0065] (2) HT-1080細胞によるアクチンタンパク質の定量法

細胞数 0.55×10^5 個、 0.275×10^5 個、 0.1375×10^5 個、及び 0.034×10^5 個/ウェルの細胞 (HT-1080)を96穴マイクロプレートに入れ、それぞれを5%ホルマリン水溶液中で、室温で30分間インキュベートして、細胞コーティングした後、前記(1)に記載したと同様に行ってタンパク質の定量化を試みた。

結果を図14のグラフで示す。図14の縦軸はアクチンタンパク質の発現強度 (蛍光強度)を示し、横軸は細胞数 ($\times 10^5$ 細胞/ウェル)を示す。この結果、図14に示されるように、本発明のこの方法では、蛍光強度はアクチンタンパク質の濃度にほぼ比例して観測され、定量測定にも使えることが確認された。

実施例 7

[0066] 本発明の方法によるアポトーシスの検出

アポトーシス(apoptosis)は、apo (off、離れる)とptosis (falling、落ちる)を合成した術語で、“生”の象徴であるmitosis (有糸分裂)に対比させられている。アポトーシスは、生体の中で不要となった細胞を除去する生体制御機構であり、突然変異や傷害を受けて異常となった細胞を排除する生体防御の意義も兼ね備えている。すなわち、正常・異常細胞の自己消去機能による“生の更新”がアポトーシスの本質といえる。形態発生学の領域のみならず、医学の分野においても、病態の成立機序、診断や治療に関するアポトーシスの生物学的意義が論じられている。アポトーシスに関する研究を行うためには、アポトーシスを正確かつ鋭敏に検出する手技の確立が重要であり、これを簡便に検出する方法として本発明の方法を説明する。

(1) 早期アポトーシスの検出

アポトーシスの初期段階では、細胞膜の完全性は保たれているが、膜のリン脂質の非対称性が失われる。それに伴い、細胞膜の内側に局在する陰性荷電リン脂質のホスファチジルセリンが細胞表面に露出する。 Ca^{2+} 依存性のリン脂質結合タンパクであるアネキシンV (Annexin V) が、ホスファチジルセリンに選択的に結合することを利用してアポトーシスを検出する。本発明では、ビオチン化アネキシンVを用いて、ビオチン化合成DNA (ターゲットDNA) をアビジンを介して結合させる。これを実施例1と同様にして、本発明の方法により早期アポトーシス細胞を検出する。

実施例6で用いたHT-1080 細胞にマグノロール (Magnolol) を投与することでアポトーシスが誘導された報告 (Biol Pharm Bull 2002;25, 1546-1549 Ikeda K et al) があることから、HT-1080細胞を用いて早期アポトーシスの検出を以下の手順で行った。

1×10^5 個/ウェルのHT-1080細胞 (human fibrosarcoma) を、96穴マイクロプレートに入れ、炭酸ガス培養器にて37℃で一晩インキュベートし、0 μM 及び75 μM のマグノロール (Wako製) を入れ、さらに、炭酸ガス培養器にて37℃で一晩インキュベートした。次にマグノロールを含む培養液を捨て、200 μl 1×結合バッファー (BioVision製) を入れ、さらに5 μl のビオチン化アネキシンV (BioVision製)、5 μl のヨウ素化プロピジウム (propidium iodide) (BioVision製) を加え、暗室室温で5分インキュ

ベートした。次に1×結合バッファーで一回洗浄した後、5%ホルマリンPBS溶液、室温で15分インキュベートし、細胞コーティングした。次に細胞コーティングしたウェルをPBSバッファーで洗浄した後、1%BSA含有PBSバッファー中、室温で1時間インキュベートしブロッキングを行った。

固定化されたビオチン化アネキシンVを本発明の方法により検出する為に、1000ng/mlのstreptavidinを加え、室温で1時間インキュベートした後、バッファーA(0.05% Tween-20含有0.05M Tris-HClバッファー(pH7.8))で3回洗浄後、バッファーB(0.05M Tris-HCl バッファー(pH7.8))で1回洗浄した。

次に、実施例1と同様にして、0.1nMのビオチン化DNA(ターゲットDNA)と室温で30分反応した。これを上記と同様にバッファーAで3回洗浄後、バッファーBで1回洗浄した後、さらに水で3回洗浄した。

実施例1と同様にして、プローブミックス50mLを入れ、63℃で60分反応させた後、蛍光プレートリーダー(カメレオン;フィンランド、HIDEX社製)により励起波長(Ex.) 485nm、発光波長(Em.) 530nmでFAMの蛍光強度を測定した。

その蛍光強度測定の結果、マグノロールを入れなかった陰性(0 μ M)と比べて、マグノロールを入れた陽性(75 μ M)の蛍光強度が上昇していることを確認し、早期アポトーシス細胞を検出できることが確認された。

[0067] (2) 後期アポトーシスの検出

アポトーシスは、ネクローシス(necrosis)と異なる細胞死としてアポトーシスが進行すると、原形質膜の完全性が失われ、核のクロマチンの凝縮(margination)に基づいて行われる。そして、エンドヌクレアーゼ活性によるヌクレオソーム(約180塩基対)単位のDNA断片化がアポトーシスを特徴づけている。

この方法では、DNAの二本鎖切断端(double-stranded break)に末端デオキシヌクレオチルトランスフェラーゼ(terminal deoxynucleotidyl transferase)(TdT)を用いてビオチン標識化デオキシウリジントリホスフェイト(deoxyuridine triphosphate)(dUTP)を付加させ、ビオチン化DNA(ターゲットDNA)をアビジンを介して結合させた。これを実施例1と同様にして、本発明の方法によって後期アポトーシス細胞を検出する。

6 μ mラット胸腺(後期アポトーシスを含む陽性コントロール)スライド(Trevigen製)をキシレンに5分間、2回:100%エタノール1分間、2回:99%エタノールに1分間、3回:水で1分間、5回の順で脱パラフィン・親水化した。次にプロテインK(Protein K)に常温に20分間浸した後、水で2分間、2回洗浄した。次にクエンチング溶液(Trevigen製)に5分間浸した後、PBSバッファーで1分間した後、TdTラベリングバッファー(Trevigen製)に常温で5分間浸漬した。次に50 μ lのTdT酵素(Trevigen製)とラベリングバッファー(陽性)、又はラベリングバッファーのみ(陰性、酵素なし)を入れ、湿潤箱中で37°C1時間ハイブリダイゼーションした。次に、TdT停止液(Trevigen製)中に5分間浸漬し、PBSバッファーで5分間、1回洗浄した。次に、50 μ lの抗BrdU (anti-BrdU) (Trevigen製)を入れ、湿潤箱中で37°Cで1時間ハイブリダイゼーションした。更に0.05%Tween20を含有するPBSバッファーで5分間、3回洗浄した。その後、ダコペンで標本の周囲を囲み、次の反応を行った。

得られた断片化DNAとビオチン標識化デオキシウリジントリホスフェイト複合体を本発明のインベーター法により検出する為に、1000ng/mlのストレプトアビジンを加え、室温で1時間インキュベートした後、バッファーA(0.05%Tween-20を含有する0.05M Tris-HClバッファー(pH7.8))で3回洗浄後、バッファーB(0.05M Tris-HCl バッファー(pH7.8))で1回洗浄した。次に0.1nMのビオチン化合成DNAと室温で30分間反応した。上記バッファーAで3回洗浄後、バッファーBで1回洗浄した後、さらに水で3回洗浄した。次にプローブミックスを入れ、63°Cで90分間反応させた。次に20 μ lの反応液を、384穴の黒色マイクロプレートに入れ、蛍光プレートリーダー(カメレオン;フィンランド、HIDEX社製)により励起波長(Ex.)485nm、発光波長(Em.)530nmでFAMの蛍光強度を測定した。

その蛍光強度測定の結果、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(terminal deoxynucleotidyl transferase) (TdT)を入れなかった陰性と比べて、TdTを入れた陽性の蛍光強度が上昇していることを確認し、後期アポトーシス細胞を検出できることが確認された。

実施例 8

[0068] レセプター-リガンド・バインディング・アッセイ

本発明の方法において、化学物質としてリガンド分子を用いて、本発明を行う。これにより、細胞のレセプター発現、その活性の測定、レセプター（例えばオーファンレセプター）のリガンド探索、または特定のリガンドに対するレセプター探索等への応用が可能となる。

例えば、ラミニンは、細胞接着因子の一つであり、細胞表面にあるレセプター（ラミニンレセプター）を介して作用を示すことが知られている。これまでの研究により、ラミニンのアミノ酸配列のうち、 β 鎖929-933番目に当たるTyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR)配列が、ラミニンレセプターとの結合を与えることが報告されている。実際、この配列のみの5アミノ酸のペプチドでも、レセプターと結合しラミニンの作用を阻害することが報告されている。そこで、本配列を持つリガンドをプローブとして、レセプター-リガンド・バインディング・アッセイを行う。

[0069] 1×10^5 個/ウェルのHT-1080細胞(human fibrosarcoma)を、96穴マイクロプレートに入れ、一晚培養し、それぞれ0、5 μ g/Wellのビオチン化YIGSRペプチドを入れ、37°Cで1時間インキュベートした。PBSバッファー3回洗浄した後、5%ホルマリンPBS溶液中、室温で15分インキュベートし、細胞コーティングした。次に細胞コーティングしたウェルをPBS バッファー洗浄した後、1%BSA含有PBSバッファー中で、室温1時間インキュベートしブロッキングを行った。

レセプター-リガンド複合体を本発明の方法で検出するために、1000ng/mlのストレプトアビジンを加え、室温で1時間インキュベートした後、バッファーA(0.05% Tween-20含有0.05M Tris-HClバッファー(pH7.8))で3回洗浄後、バッファーB(0.05M Tris-HClバッファー(pH7.8))で1回洗浄した。次に0.1nMのビオチン化合成DNAと室温で30分反応した。上記バッファーA3回洗浄およびバッファーB洗浄後、さらに水で3回洗浄した。

実施例1と同様にして、プローブミックス50mLを入れ、63°Cで60分反応させた後、蛍光プレートリーダー(カメレオン;フィンランド、HIDEX社製)により励起波長(Ex.) 485nm、発光波長(Em.) 530nmでFAMの蛍光強度を測定した。

その結果を図15に示す。図15の縦軸はFAMの蛍光強度を示し、横軸は調製したビオチン化YIGSRペプチドの有無を示す。図15に示すように、ネガティブコントロー

ルのビオチン化YIGSRペプチドなしと比較して、5 μ gのビオチン化YIGSRペプチドを入れたものの蛍光強度が増大することが観察され、レセプターの検出が可能であることが確認された。

実施例 9

[0070] mRNAアッセイ

本発明の方法において、化学物質としてmRNAの全部又は一部に相補的な配列を持つDNA(又はRNA)を配する。これにより、細胞での遺伝子発現パターンおよび発現量の測定を本発明の方法により行うことができる。

例えば、マトリックスメタロプロテイナーゼ(Matrix metalloproteinase) (MMP)類はコラーゲンなどの細胞外マトリックスの分解を行う酵素である。本酵素類は、ガン細胞の浸潤・転移の関係しており、ガン細胞で高度に発現していることが知られている。特に、MMP-2(または、ゼラチナーゼA、72-kDaゼラチナーゼ、または72-kDa type IVコラゲナーゼ)は、HT-1080細胞等の繊維肉腫細胞で構成的に発現していることが報告されている。そこで、MMP-2のmRNAをターゲットとしてmRNAアッセイを行う。

96穴プレートの各ウェルに細胞HT-1080を 1.1×10^5 個を取り、5%ホルマリン水溶液中で15分インキュベートして、細胞コーティングを行った。次いで、これをPBSバッファーで洗浄した後、95°Cに温めたターゲットレトリバルソリューション(Target Retrieval Solution) (Dako社製)の40分間浸し、次いで0.2N HClで20分処理してターゲット遺伝子を賦活化した。これをDEPC水で1分間、3回洗浄した後、95%エタノールで1分間、100%エタノールで1分間処理して脱水し、冷風で風乾した。

ビオチン化MMP2、及び内因性コントロールGAPDH(Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase)プローブ(センス及びアンチセンス、各々2 μ g/mL)を、RNAインサイチュウハイブリダイゼーション(RNA in-situ Hybridization)溶液で希釈して10 μ Lとして添加し、ハイブリスリップハイブリダイゼーションカバー(Hybrislip Hybridization cover)でカバーして37°Cで1晩ハイブリダイゼーションさせた。次いで、40°Cに温めた50倍に希釈したストリンジェント洗浄溶液(Stringent wash solution)中でカバーをはずした後、20分間40°Cでインキュベートした。その後、再度、新鮮な洗浄溶液中

で、20分間40℃でインキュベーションした。

次いで、室温でTBSバッファー(50mM Tris-HCl, 159mM NaCl, PH 7.6)に5分間浸した。1000ng/mLのストレプトアビジンを加え、室温で1時間インキュベートした後、バッファーA(0.05%のツウィーン-20を含有する0.05M Tris-HCl バッファー(pH 7.8))で3回洗浄した後、バッファーB(0.05M Tris-HCl buffer (pH7.8))で1回洗浄した(以下洗浄は同様に行った)。

次いで、0.1nMのビオチン化DNA(ターゲットDNA)と室温で30分反応させた後、洗浄し、さらに水で3回洗浄した。

次いで、実施例1と同様にしてプローブミックス50mLを添加して、63℃で60分反応させた。次いで、カメレオン(Chameleon (HIDEX 製))により励起波長(Ex.)485nm、発光波長(Em.)530nmでFAMの蛍光強度を測定した。

MMP2の結果を図16に、GAPDHの結果を図17にそれぞれ示す。図16及び図17の縦軸は蛍光強度を示し、それぞれの図の左側はセンス鎖の場合を、右側はアンチセンス鎖の場合を示す。この結果、図16及び図17に示すように、本発明の方法の定量では、センスと比べて、アンチセンス(mRNAに相補的な)プローブを加えた細胞の蛍光強度が1.5倍または2倍上昇していることが示された。

実施例 10

[0071] 本発明の方法による細胞内のDNAを抽出することなく、細胞内の特異的DNAの検出

細胞のDNAを抽出せず、本発明のビオチン化プローブを用いて、細胞内の特異的DNAの発現の検出、同定を試みた。以下の実験例では、特異的DNAとして、細胞内のシングルコピーのウイルスのDNAの検出、同定を行った。

パピローマ16ウイルスが、1～2コピー感染したSiHa細胞を貼付したスライド(Dako製)をキシレンに5分間、2回、100% エタノール1分間、2回、99%エタノールに1分間、3回、水で1分間、5回の順で脱パラフィン・親水化した。

次いで、95℃で、ターゲットリトリバル溶液(Target Retrieval Solution)(Dako製)に40分間浸した後、漬けたまま常温に20分間、放置し、ターゲット遺伝子を賦活化した。水で1分間、5回洗浄した後、常温に風乾し、ダコペンで標本の周囲を囲った。

ビオチン標識ヒトHPV16配列がある陽性プローブ (Dako製)、及びHPV16配列を含まない陰性プローブ (Dako製) を入れ、カバーガラスをかけ、湿潤箱中で37℃で一晩ハイブリダイゼーションさせた。

次いで、TBST (Dako製) 中に10分間浸し、カバーガラスをはずした後、55℃に温め、50倍希釈ストリンギェント洗浄溶液 (Stringent wash solution) (Dako 製) に30分、55℃でインキュベートした。

TBSTに室温で5分間浸した。1000ng/mLのストレプトアビジンを加え、室温で1時間インキュベートした後、バッファーA (0.05%のツウイーン20を含む0.05M Tris-HCl バッファー (pH7.8)) で3回洗浄した後、バッファーB (0.05M Tris-HCl バッファー (pH7.8)) で1回洗浄した (以下、洗浄は同様に行った。)。0.1nMのビオチン化合成DNAと室温で30分間反応させた。洗浄した後、さらに水で3回洗浄した。図19に示したように、実施例1と同様にプローブミックス試薬を入れ、63℃で90分間反応させた。次に20mLの反応液を、384穴の黒色マイクロプレートに入れ、蛍光プレートリーダー (カメレオン; フィンランド、HIDEX社製) により励起波長 (Ex.) 485nm、発光波長 (Em.) 530nmでFAMの蛍光強度を測定した。

結果を図18に示す。図18の縦軸は蛍光強度を示し、図18の左側はネガティブの場合を、右側はポジティブの場合を示す。この結果、図18に示されるように、本発明の方法による定量化では、陰性 (ネガティブ) に比べて、陽性 (ポジティブ) の蛍光強度は約3倍以上に上昇することが示された。このことから、本発明の方法によれば、従来法より高感度な検出が可能となり、スライド塗抹標物に少ないコピーウイルスのDNAを検出することができる。

実施例 11

[0072] アプタマーによる測定

アプタマーは、核酸 (一本鎖DNAまたはRNA) で構成される抗体様分子で、立体構造によりターゲットとなる分子と特異的に結合する。15~30mer程度の核酸であるため、一度配列が決定されれば人工的に、高い再現性で合成することができる。いわば「試験管内でできる人工抗体」といえる。

前記してきた本発明の方法において、化学物質をアプタマーに置き換えることによ

り、検出の迅速化、再現性の向上を図ることが可能となる。

この実験では、アプタマーのモデルとして、トロンビンアプタマーを用いた。トロンビンアプタマーは長さ15merの1本鎖DNAアプタマーで、 α -トロンビンと特異的に結合する。その配列は公知であり(Bock et al. (1992), Nature 355:564-566)、酵素標識によるELISAによる測定データのデータもすでに報告されている(Paborsky et al. (1993), J Biol Chem. 268:20808-20811)。これに、(1)5'末端にビオチン標識したもの、(2)3'末端側に本発明のインバーダー法のターゲット配列を結合したもの、の2種類のアプタマーを作製し、それぞれの親和性の測定を行った。

[0073] (1)ビオチンを結合したトロンビンアプタマー(5'-Biotin-GGTTGGTGTGGTTGG-3')によるトロンビンの検出

96穴マイクロプレートにセレクションバッファー(20mM Tris-アセテート(pH7.4), 140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2)中に溶解した α -トロンビンを、それぞれ0.25、2.5、25、250、及び2500nMの濃度でコーティングし、1%BSAによりブロッキングを行った後、500nMのビオチン標識アプタマーと37℃で1時間インキュベートした。0.05%Tween 20を含むセレクションバッファで3回洗浄した後、30 $\mu\text{g/ml}$ のストレプトアビジンと室温で1時間インキュベートした。3回の洗浄の後、50nMのビオチン結合ターゲットDNAと室温で30分反応させた。さらに3回の洗浄を行い、PH FENを含む50 μl のプロブミックスを注ぎ、63℃、1時間インバーダー反応を行った後、FAMの蛍光を測定した。

結果を図19にグラフで示す。この結果、 α -トロンビン濃度が2.5nM以上で、濃度に比例してFAM蛍光強度の増加が見られ、抗体の代わりにアプタマーを用いた場合にも正しく標的物質を検出できることが示された。

[0074] (2)3'末端側に本発明のインバーダー法のターゲット配列を結合したアプタマーによるトロンビンの検出

5'-GGTTGGTGTGGTTGG GTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCA
GCTTTTCTTTG-3'

Thrombin aptamer

target配列

(下線部は、本発明のインバーダー法におけるターゲット配列であることを示す。)

96穴マイクロプレートにセクションバッファ中に溶解した α -トロンビン、それぞれ0.25、2.5、25、250、及び2500nMの濃度でコーティングし、1%BSAによりブロッキングを行った後、500nMのターゲット配列融合アプタマーと37°Cで1時間インキュベートした。0.05%Tween20を含むセクションバッファで3回洗浄した後、PH-FENを含む50 μ lのプローブミックスを注ぎ、63°C、1時間反応を行った後、FAMの蛍光を測定した。

結果を図20にグラフで示す。その結果、 α -トロンビン濃度が2.5nM以上で、濃度に比例してFAM蛍光強度の増加が見られ、抗体の代わりにアプタマーを用いた場合にも正しく標的物質を検出できることが示された。本方法は、ターゲット配列に直接アプタマー配列を融合した一本鎖DNAを使用しているため、ビオチン-アビジンを用いた方法よりもより迅速簡便に測定を行う事ができる。また、アプタマー融合ターゲットの合成も、ビオチン結合抗体あるいはビオチン結合アプタマーに比べ容易である。

実施例 12

[0075] マルチターゲットDNAによる感度試験

ターゲット領域を複数箇所有するターゲットDNA(マルチターゲットDNA)を用いて、検出感度を比較した。

(1) ターゲット領域が2カ所あるターゲットDNAによる試験

ターゲット単位間のスペースが5merのものの例として、次の91merの塩基配列を有するターゲットDNAを使用した。

5'-GTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTGATCGTG
TGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTG-3' (91mer)

シグナルプローブとして、

5'-AACGA GGCGC ACACT CCCGC AGACA C-3'

を使用し、インバーダーオリゴとしては、

5'-CAAAG AAAAG CTGCG TGATG ATGAA ATCGC-3'

を使用した。

比較として、ターゲット領域が1カ所である従来のターゲットDNAを使用して、それ

ぞれインバーダー法による蛍光感度を比較した。実験条件は次のとおりであった。

ターゲットDNAの濃度 : 10pM
tRNA : 50ng
フレットプローブ (FAM) : 125nM
シグナルプローブ : 250nM
インバーダーオリゴ : 50nM
FEN (PHFEN) : 40ng
反応条件 : 63°C、60分
試行回数 : 3回

結果を図21に示す。図21の縦軸は蛍光強度を示し、横軸は、左側から、コントロール (No Target)、ターゲット領域が1カ所である従来のターゲットDNAの場合 (Mono)、ターゲット領域を2カ所有するターゲットDNAの場合 (Multi) をそれぞれ示す。

この結果、ターゲット領域を2カ所にすることにより、インバーダーアッセイではFAMの蛍光感度は、約1.55倍に増加した。

[0076] (2) シグナルプローブが、インバーダーオリゴを兼ねるものであって、ターゲット領域が5回繰り返されるターゲットDNAによる試験

ターゲット単位間のスペースは0merであり、これが5回繰り返される例として、次の99merの塩基配列を有するターゲットDNAを使用した。

5'-GTGTCTGCGGGAGTGTGTCTGCGGGAGTGTGTCTGCGGGAGTGTGTCTGCGGGAGTGTGTCTGCGGGAGTCGATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTG-3' (99mer)

シグナルプローブとして、

5'-AACGA GGCGC ACACT CCCGC AGACA CC-3'

を使用した。このシグナルプローブはインバーダーオリゴを兼ねているが、最初のフラップの作成のために、次のインバーダーオリゴ、

5'-CAAAG AAAAG CTGCG TGATG ATGAA ATCGC-3'

を使用した。

比較として、ターゲット領域が1カ所である従来のターゲットDNAを使用して、それ

ぞれインバーダー法による蛍光感度を比較した。実験条件は次のとおりであった。

ターゲットDNAの濃度 : 10pM
tRNA : 50ng
フレットプローブ (FAM) : 125nM
シグナルプローブ : 250nM
インバーダーオリゴ : 50nM
FEN (PHFEN) : 40ng
反応条件 : 63°C、60分
試行回数 : 3回

結果を図22に示す。図22の縦軸は蛍光強度を示し、横軸は、左側から、コントロール (No Target)、ターゲット領域が1カ所である従来のターゲットDNAの場合 (Mono)、ターゲット領域を2カ所有するターゲットDNAの場合 (Multi) をそれぞれ示す。

この結果、ターゲット領域を2カ所にすることにより、インバーダーアッセイではFAMの蛍光感度は、約1.5倍に増加した。

実施例 13

[0077] ビオチン化DNA (ターゲットDNA) の製造

自動合成装置 (ABI394) を用いて、固相法により合成した。

まず、CPG (controlled pore glass) の多孔質ガラスビーズの固相担体に、デオキシチミジンが結合したジメトキシトリチル体 (DMTr-dT-CPG) 出発物質とした。3%トリクロロ酢酸 (TCA) を6秒流し、5秒待つというサイクルを5回行うことでDMTr基をはずした。ついでシトシンホスホロアミダイトを反応させ、つぎに I_2 で酸化してリン酸トリエステル (DMTr-dT-(O=P-OR)-dC-CPG) とした。以上のサイクルを繰り返して、3'→5'の方向に1塩基ずつ延長し(5') DMTr-AGAAG GTGTC TGC GG GAGTC GATTT CATCA TCACG CAGCT TTTCT TTGAG GCT-CPG (3') 塩基配列を有するDNAを得た。

さらに、ビオチンホスホロアミダイト (Biotin phosphoramidite (1-Dimethoxytrityloxy-2-(N-biotinyl-4-aminobutyl)-propyl-3-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosph

oramidite)を加え、2分間反応させ。その後、28%アンモニア水で55℃、5時間反応させ、CPGより脱離させた。得られたビオチン化DNAはHPLCで精製し、分光光度計で260nmの値を測定することにより保持時間7.41分でシングルピークであることを確認した。最後に、残ったDMTrを外し、カラムで脱塩して凍結乾燥して、本発明のビオチン化DNA(ターゲットDNA)を製造した。

産業上の利用可能性

[0078] 本発明は、安全で、簡便で、高感度で、確実で、かつ測定レンジの広い新規な標識を用いた方法を提供するものであり、生理活性物質などの挙動を測定するための新規な手法を提供するものである。本発明の方法により、例えば、各種の抗体や抗原などの生理活性物質の存在、定量化などを行うことができ、病気の診断や治療に有用なだけでなく、病気の発症原因の解明や、各種のスクリーニング方法における新規な標識として極めて有用なものであり、本発明は産業上の利用可能性を有するものである。

配列表フリーテキスト

[0079] 配列番号1: 本発明の標識としてのオリゴヌクレオチドの例である。
配列番号2: 本発明の方法におけるシグナルプローブの例である。
配列番号3: 本発明の方法におけるインバーダーオリゴの例である。
配列番号4: 本発明の方法におけるフレットプローブの例である。

請求の範囲

- [1] 化学物質に結合したオリゴヌクレオチドを標識として使用し、当該オリゴヌクレオチドを利用してヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により、試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法。
- [2] 標識としてのオリゴヌクレオチドが結合した化学物質(以下、標識化化学物質という。)を、試料中に標的分子を含有するか、又は含有している可能性のある試料に接触させ、当該標識化化学物質と試料中の標的分子との複合体を形成させ、当該複合体におけるオリゴヌクレオチドをヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により測定することからなる、特許請求の範囲第1項に記載の試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法。
- [3] 試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法において、標識としてオリゴヌクレオチドを使用し、当該オリゴヌクレオチドの存在をヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により測定することからなる、特許請求の範囲第1項又は第2項に記載の試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法。
- [4] オリゴヌクレオチドが、1本鎖のDNAである特許請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載の方法。
- [5] オリゴヌクレオチドが、10～1000merのDNAである特許請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載の方法。
- [6] オリゴヌクレオチドが、10～100merのDNAである特許請求の範囲第5項に記載の方法。
- [7] オリゴヌクレオチドが、10～60merのDNAである特許請求の範囲第5項に記載の方法。
- [8] オリゴヌクレオチドが、10～40merのDNAである特許請求の範囲第5項に記載の方法。
- [9] 化学物質が、タンパク質、ビオチン、アビジン、又は核酸である特許請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の方法。
- [10] 化学物質が、ビオチンである特許請求の範囲第9項に記載の方法。
- [11] 標識のオリゴヌクレオチドが、化学物質に直接結合している特許請求の範囲第1項

～第10項のいずれかに記載の方法。

- [12] スクレアーゼにより切断される核酸が、標識のオリゴヌクレオチドである特許請求の範囲第1項～第11項のいずれかに記載の方法。
- [13] スクレアーゼにより切断される核酸が、標識のオリゴヌクレオチドに基づいて生成された核酸である特許請求の範囲第1項～第11項のいずれかに記載の方法。
- [14] スクレアーゼにより切断される核酸が、発光物質及び消光物質が結合した核酸である特許請求の範囲第1項～第13項のいずれかに記載の方法。
- [15] 発光物質が、希土類蛍光錯体ラベル剤を有するものである特許請求の範囲第14項に記載の方法。
- [16] 希土類蛍光錯体ラベル剤が、Eu錯体、Tb錯体、Sm錯体、又はDy錯体からなるラベル剤である特許請求の範囲第15項に記載の方法。
- [17] スクレアーゼが、フラップエンドヌクレアーゼである特許請求の範囲第1項～第16項のいずれかに記載の方法。
- [18] スクレアーゼを使用して核酸を切断する方法が、インバーダー法である特許請求の範囲第1項～第17項のいずれかに記載の方法。
- [19] 標識のオリゴヌクレオチドが、インバーダー法におけるターゲットDNAである特許請求の範囲第18項に記載の方法。
- [20] ターゲットDNAが、シグナルプローブがハイブリダイズし得る塩基配列を1カ所又は2カ所以上有するものである特許請求の範囲第19項に記載の方法。
- [21] シグナルプローブが、2個のフラップを生成し得る塩基配列を有するものである特許請求の範囲第19項又は第20項に記載の方法。
- [22] シグナルプローブが、隣接するシグナルプローブのインバーダーオリゴとして機能し得る塩基配列を有するものである特許請求の範囲第19項又は第20項に記載の方法。
- [23] 試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法が、イムノアッセイである特許請求の範囲第1項～第22項のいずれかに記載の方法。
- [24] イムノアッセイが、サンドイッチアッセイである特許請求の範囲第23項に記載の方法。

- [25] 試料中の標的分子を検出、同定又は定量する方法が、結合アッセイである特許請求の範囲第1項～第22項に記載の方法。
- [26] 標識としてのオリゴヌクレオチドが結合した化学物質が、ビオチン化DNAである特許請求の範囲第23項～第25項のいずれかに記載の方法。
- [27] 10～100merのオリゴヌクレオチドからなる化学物質の標識剤。
- [28] オリゴヌクレオチドが、10～60merのオリゴヌクレオチドである特許請求の範囲第27項に記載の標識剤。
- [29] オリゴヌクレオチドが、10～40merのオリゴヌクレオチドである特許請求の範囲第27項に記載の標識剤。
- [30] オリゴヌクレオチドが、1本鎖のDNAである特許請求の範囲第27項～第29項のいずれかに記載の標識剤。
- [31] 特許請求の範囲第27項～第29項のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの塩基配列を2回以上繰り返して有していることを特徴とするオリゴヌクレオチドからなる化学物質の標識剤。
- [32] 塩基配列の繰り返しが2回から10回である特許請求の範囲第31項に記載の標識剤。
- [33] 10～100merのオリゴヌクレオチドの標識としての使用。
- [34] オリゴヌクレオチドが、10～60merのオリゴヌクレオチドである特許請求の範囲第33項に記載の使用。
- [35] オリゴヌクレオチドが、10～40merのオリゴヌクレオチドである特許請求の範囲第33項に記載の使用。
- [36] オリゴヌクレオチドが、1本鎖のDNAである特許請求の範囲第33項～第35項のいずれかに記載の使用。
- [37] 特許請求の範囲第33項～第35項のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの塩基配列を2回以上繰り返して有していることを特徴とするオリゴヌクレオチドの標識としての使用。
- [38] 塩基配列の繰り返しが2回から10回である特許請求の範囲第37項に記載の使用。
- [39] 10～100merのオリゴヌクレオチドが標識として化学物質に結合している標識化さ

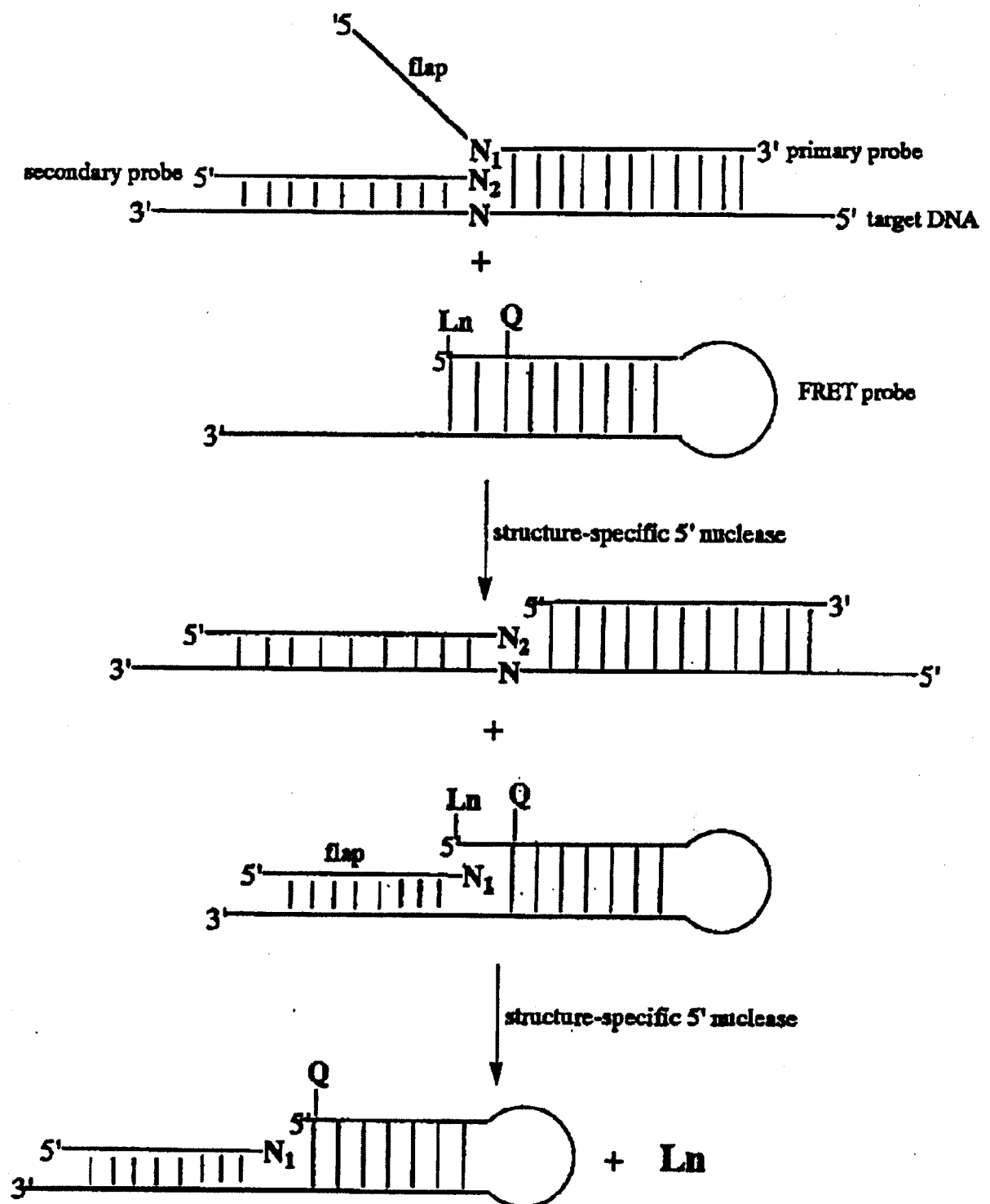
れた化学物質。

- [40] オリゴヌクレオチドが、10～60merのオリゴヌクレオチドである特許請求の範囲第39項に記載の標識化された化学物質。
- [41] オリゴヌクレオチドが、10～40merのオリゴヌクレオチドである特許請求の範囲第39項に記載の標識化された化学物質。
- [42] オリゴヌクレオチドが、1本鎖のDNAである特許請求の範囲第39項～第41項のいずれかに記載の標識化された化学物質。
- [43] 特許請求の範囲第39項～第41項のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドの塩基配列を2回以上繰り返して有していることを特徴とするオリゴヌクレオチドが標識として化学物質に結合している標識化された化学物質。
- [44] 塩基配列の繰り返しが2回から10回である特許請求の範囲第43項に記載の標識化された化学物質。
- [45] 化学物質が、ビオチンである特許請求の範囲第39項～第44項のいずれかに記載の標識化された化学物質。
- [46] 10～100merのオリゴヌクレオチドが標識として化学物質に結合している標識化された化学物質を少なくとも1種含有してなる、オリゴヌクレオチドを標識として使用するヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法による測定用キット。
- [47] オリゴヌクレオチドが、10～60merのオリゴヌクレオチドである特許請求の範囲第46項に記載の測定用キット。
- [48] オリゴヌクレオチドが、10～40merのオリゴヌクレオチドである特許請求の範囲第46項に記載の測定用キット。
- [49] オリゴヌクレオチドが、1本鎖のDNAである特許請求の範囲第46項～第48項のいずれかに記載の測定用キット。
- [50] 10～100merのオリゴヌクレオチドの塩基配列を2回以上繰り返して有していることを特徴とするオリゴヌクレオチドが標識として化学物質に結合している標識化された化学物質を少なくとも1種含有してなる、オリゴヌクレオチドを標識として使用するヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法による測定用キット。
- [51] 塩基配列の繰り返しが2回から10回である特許請求の範囲第50項に記載の測定

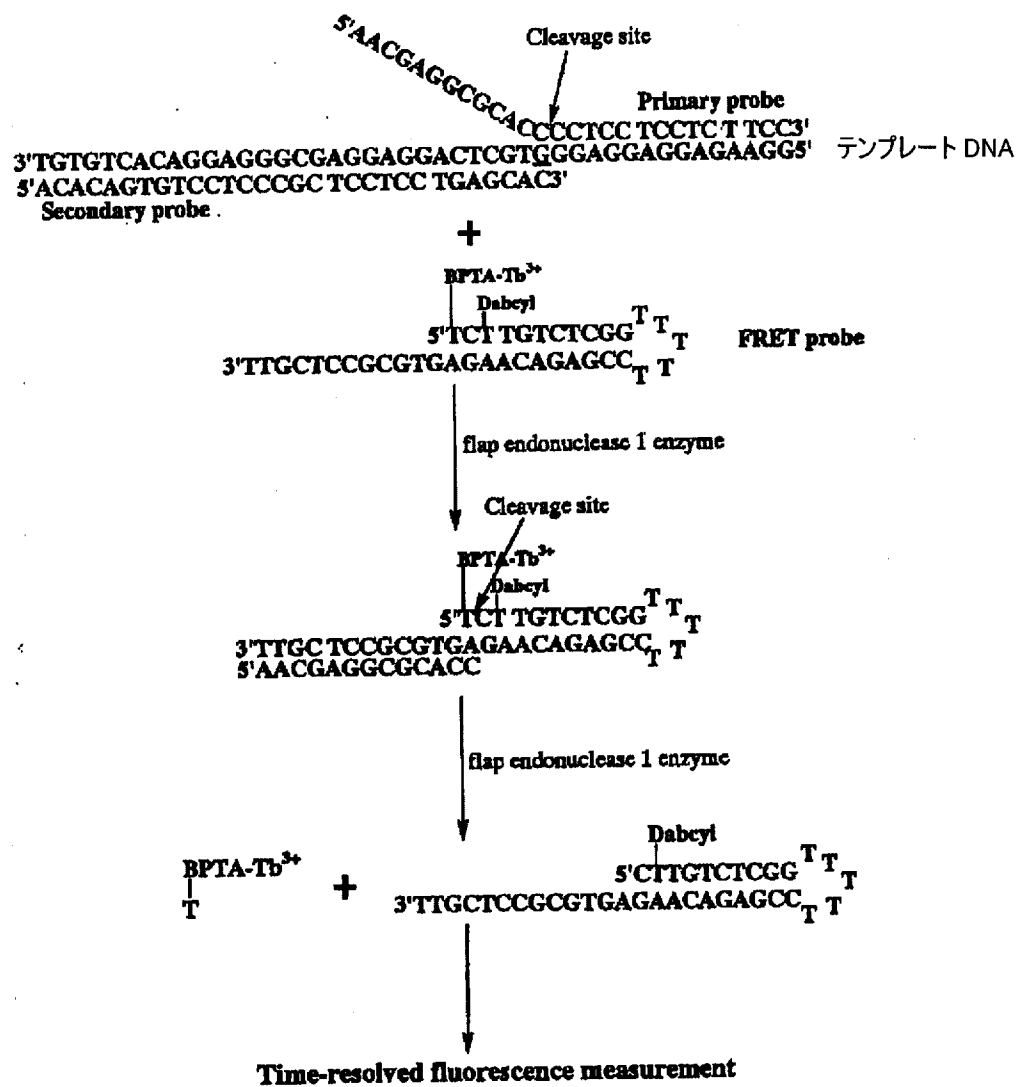
用キット。

- [52] オリゴヌクレオチドを標識として使用するヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法が、特許請求の範囲第1項～第26項のいずれかに記載の方法である特許請求の範囲第46項～第51項のいずれかに記載の測定用キット。
- [53] 標識化された化学物質が、ビオチンである特許請求の範囲第46項～第52項のいずれかに記載の測定用キット。
- [54] インベーター法におけるシグナルプローブ (primary probe)、インベーターオリゴ (secondary probe)、ターゲットDNA、及びフレットプローブからなる群から選ばれるオリゴヌクレオチドの少なくとも1種のオリゴヌクレオチドを含有してなる、オリゴヌクレオチドを標識として使用するインベーター法による測定用キット。
- [55] 標識化された化学物質が、ビオチンである特許請求の範囲第54項に記載の測定用キット。

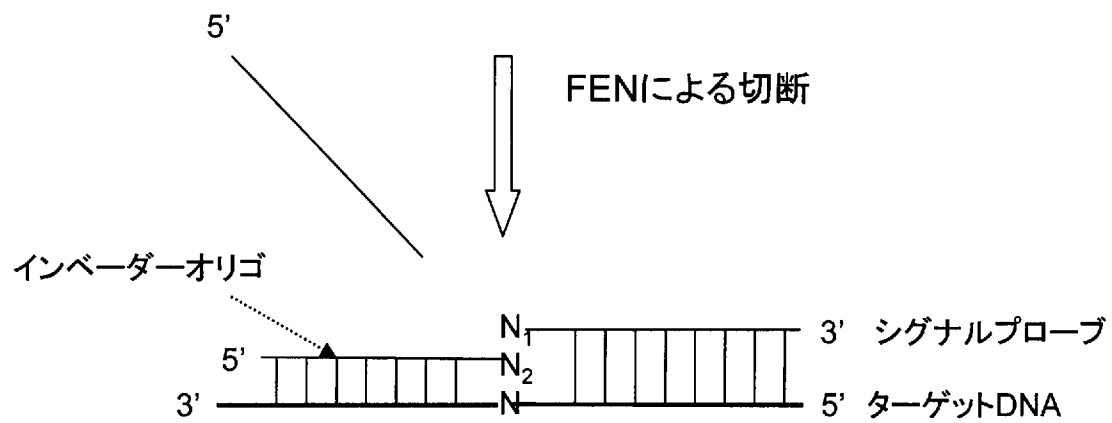
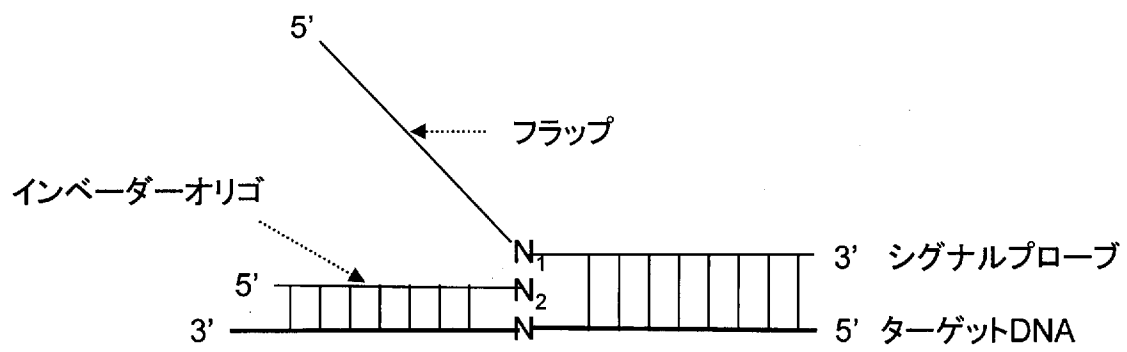
[図1]



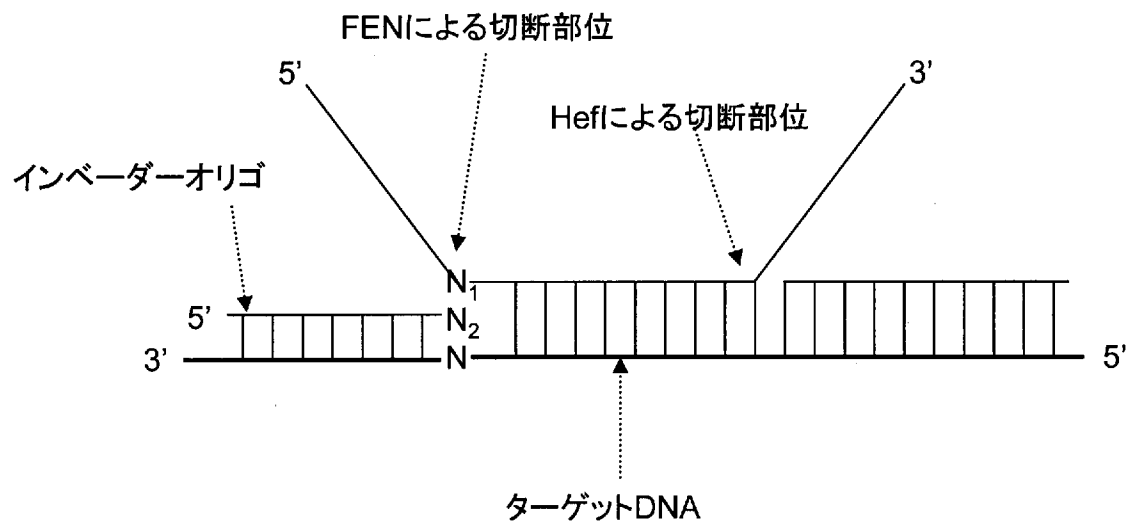
[図2]



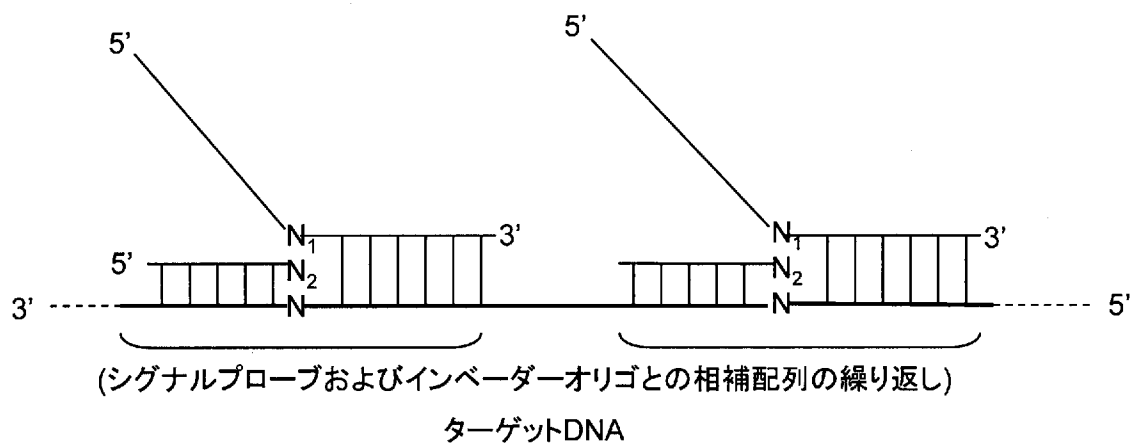
[図3]



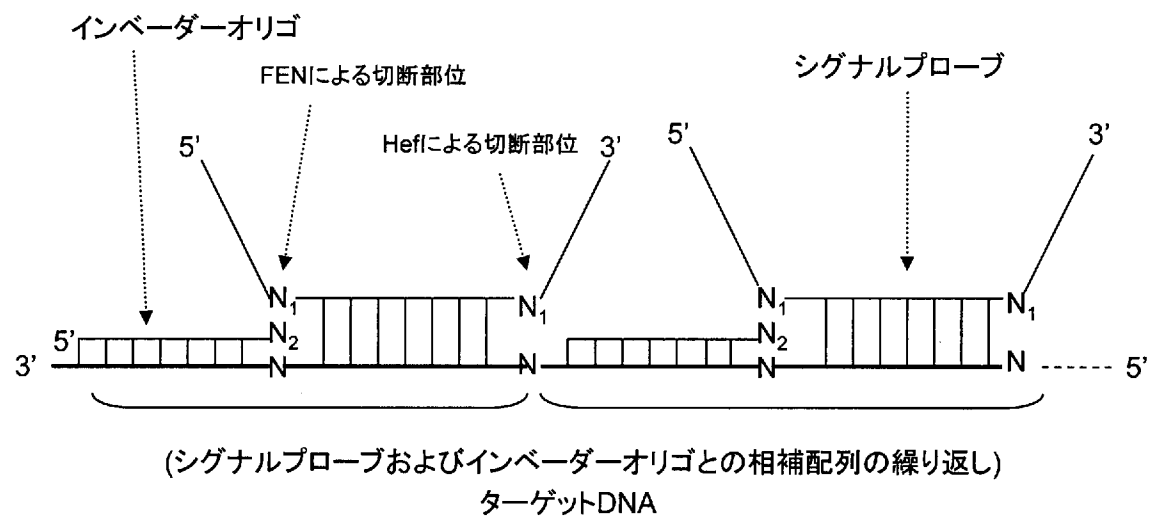
[図4]



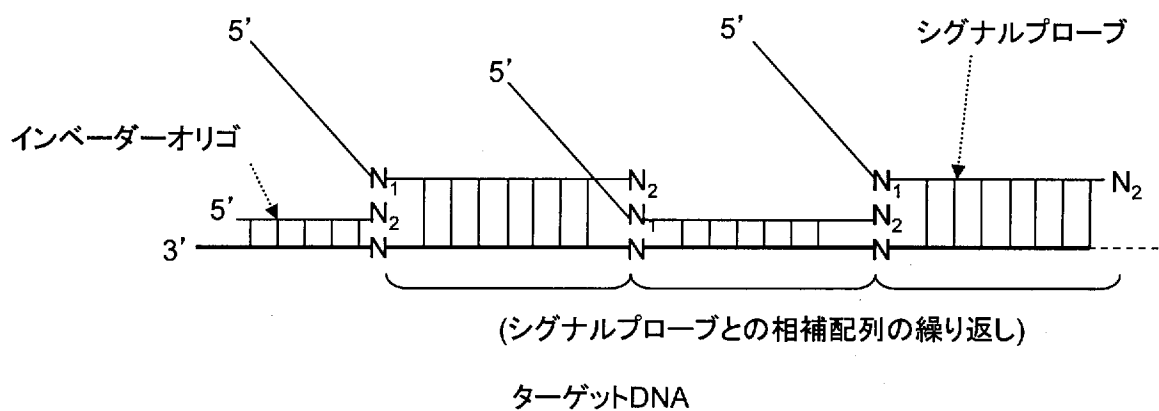
[図5]



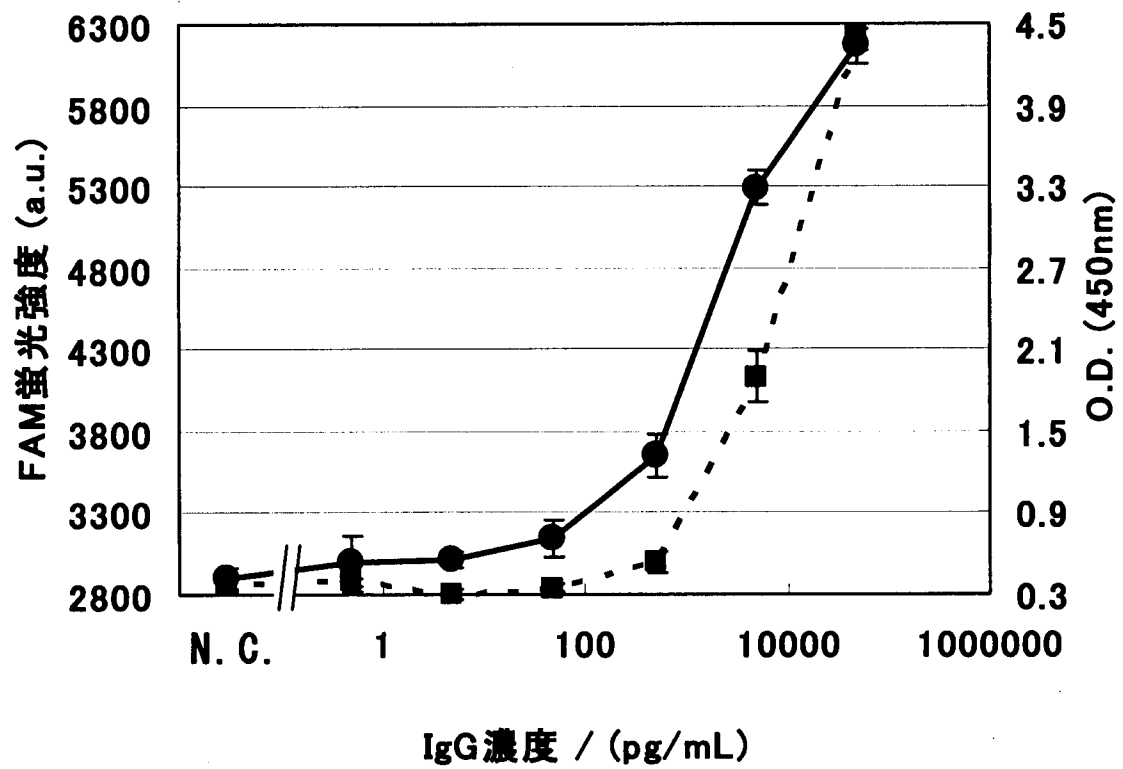
[図6]



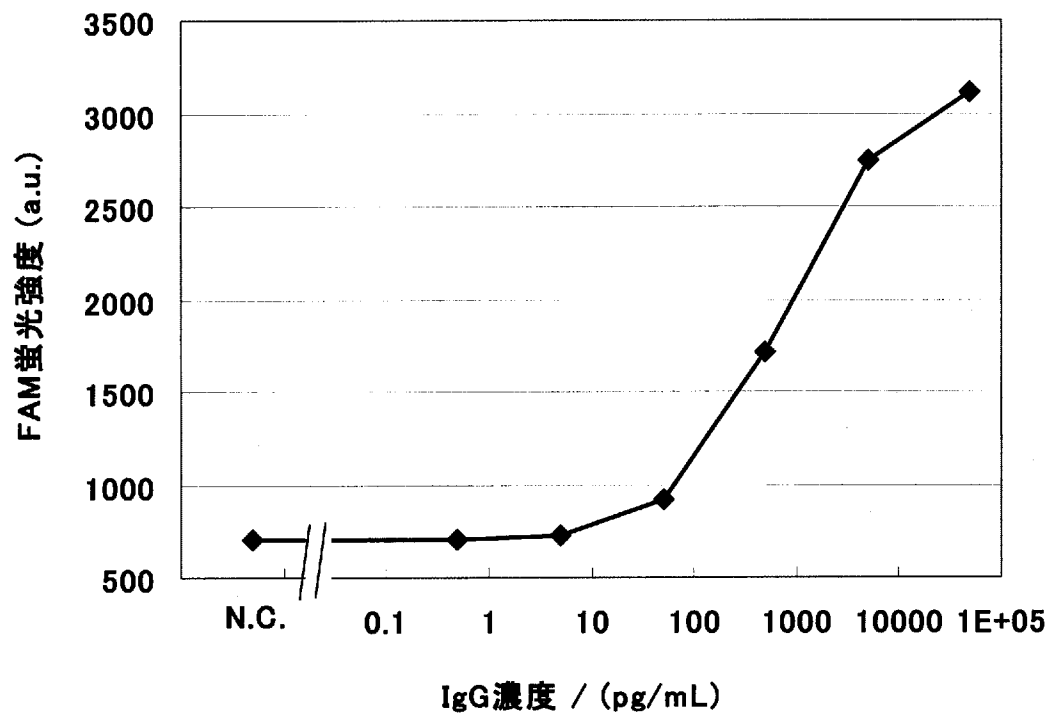
[図7]



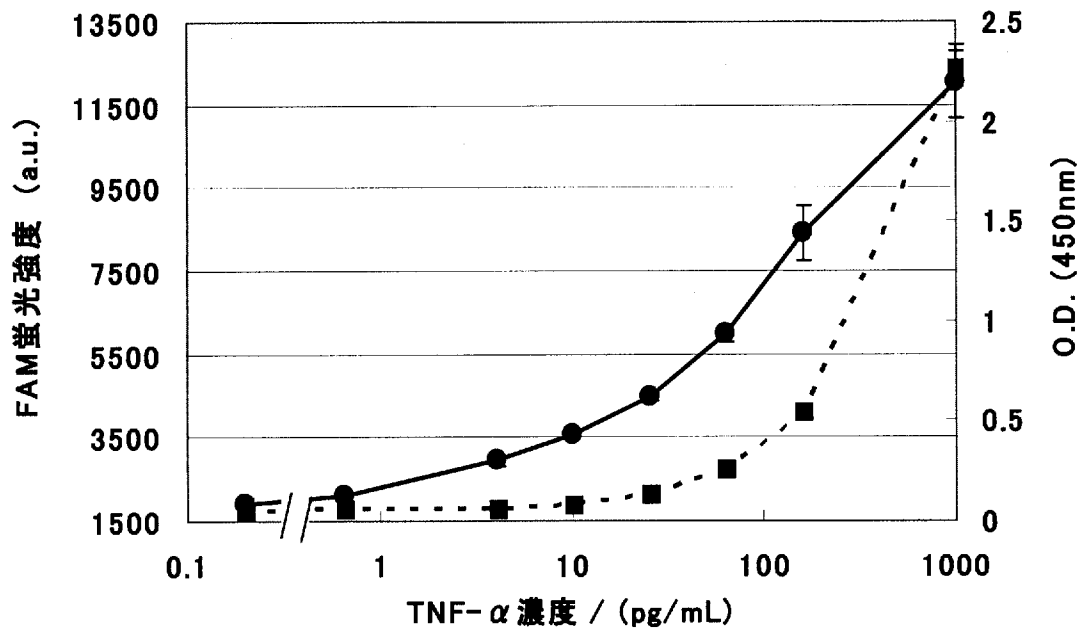
[図8]



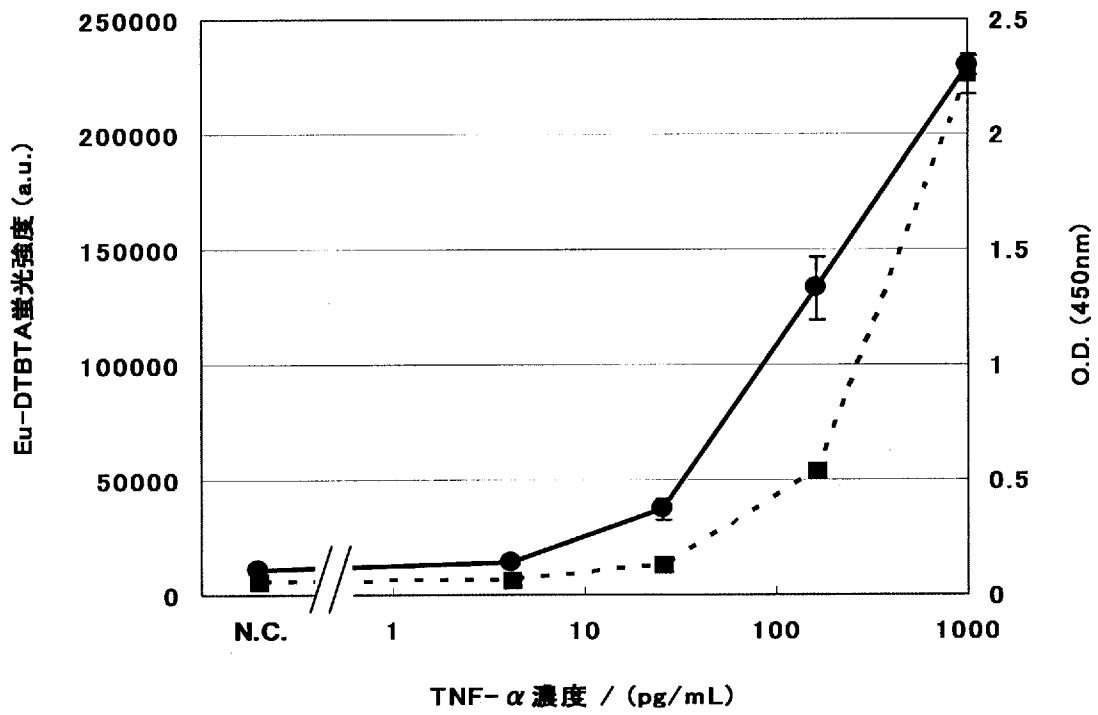
[図9]



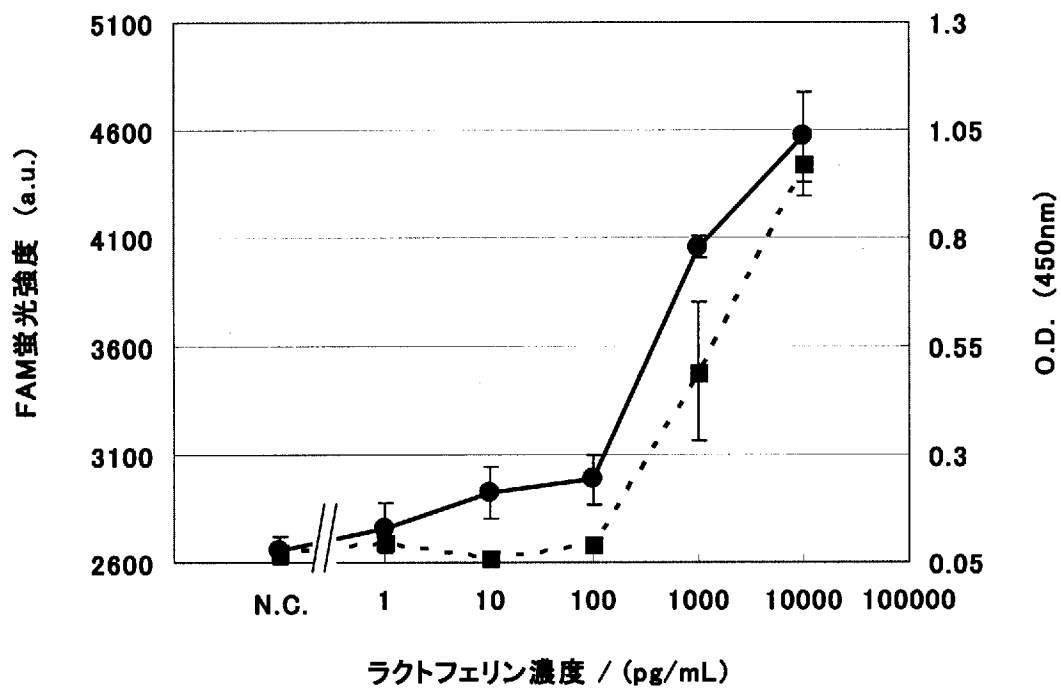
[図10]



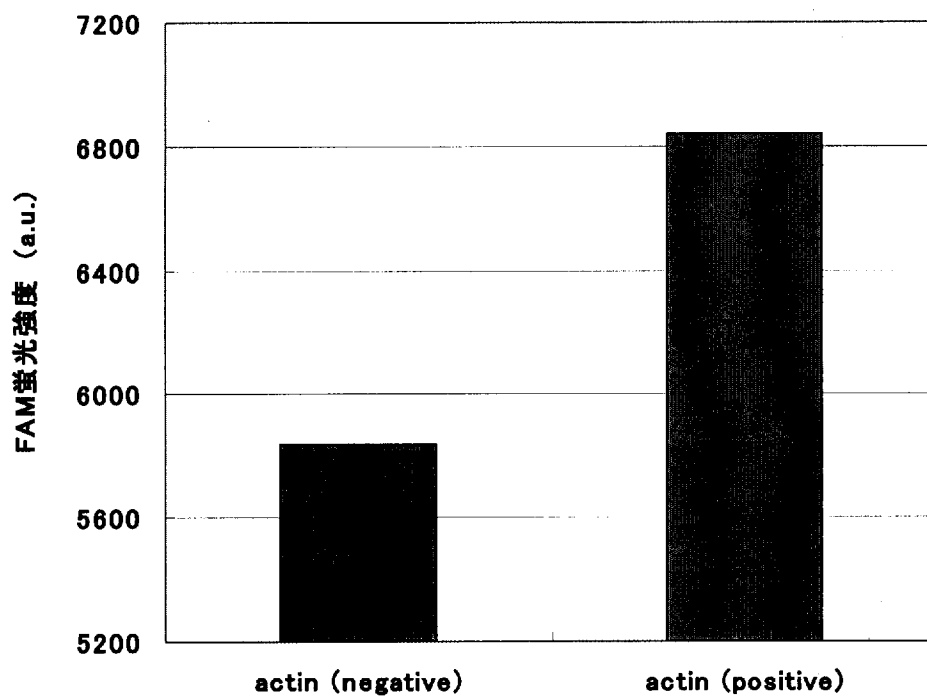
[図11]



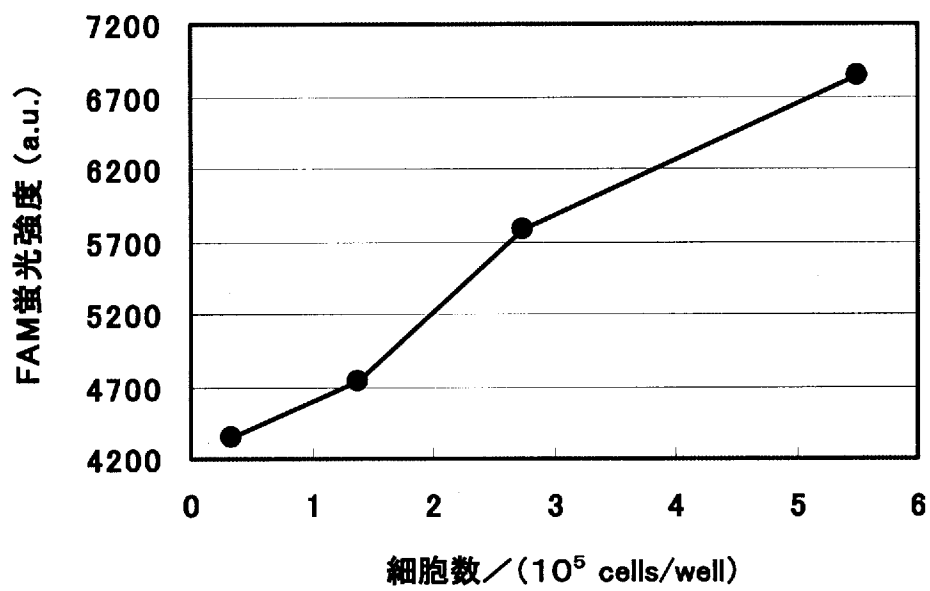
[図12]



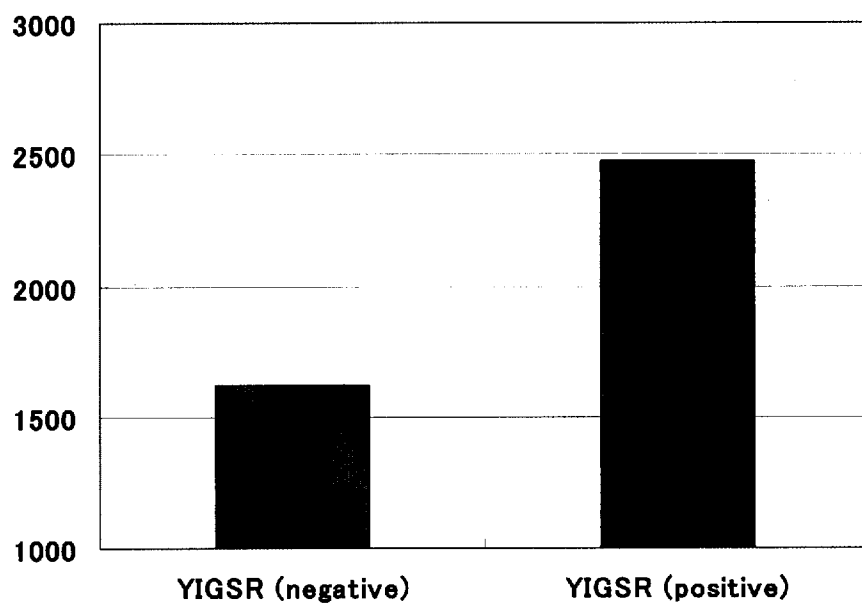
[図13]



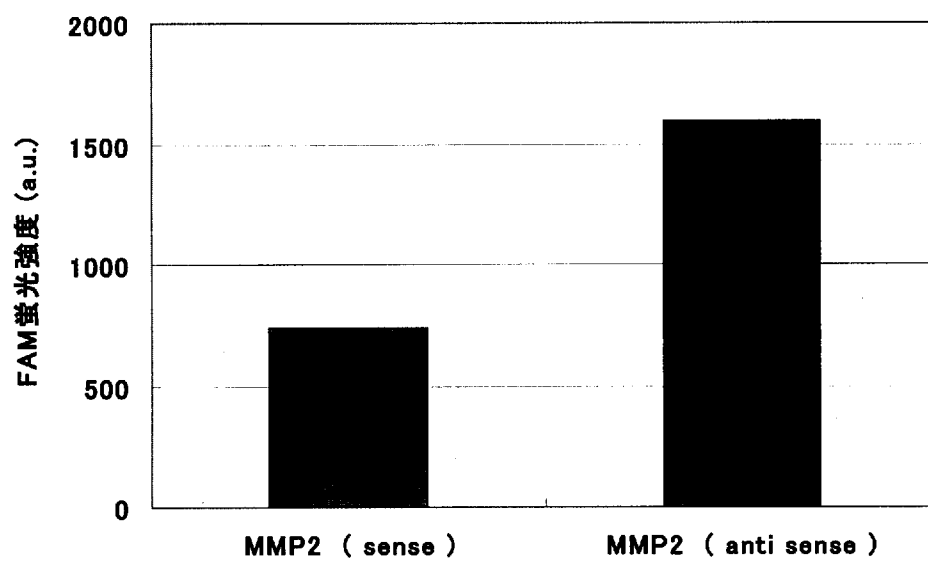
[図14]



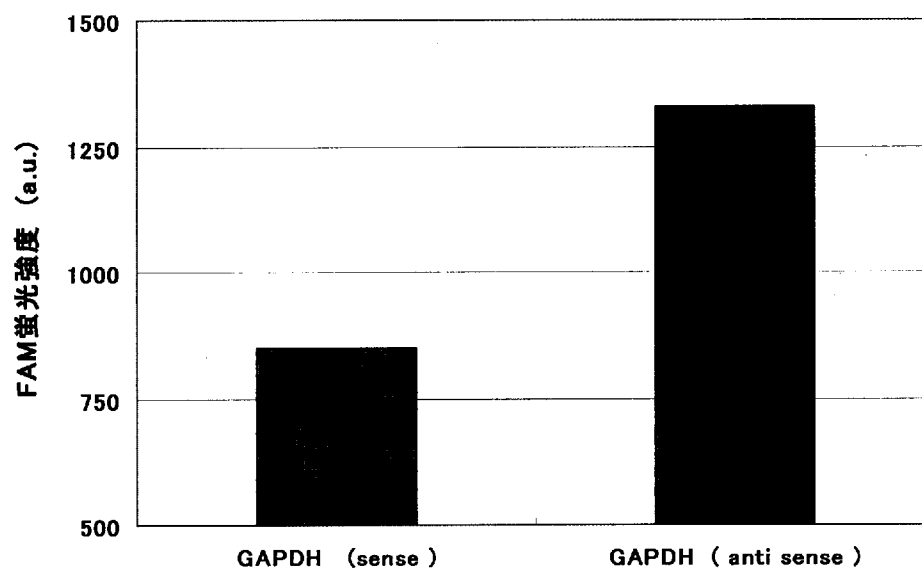
[図15]



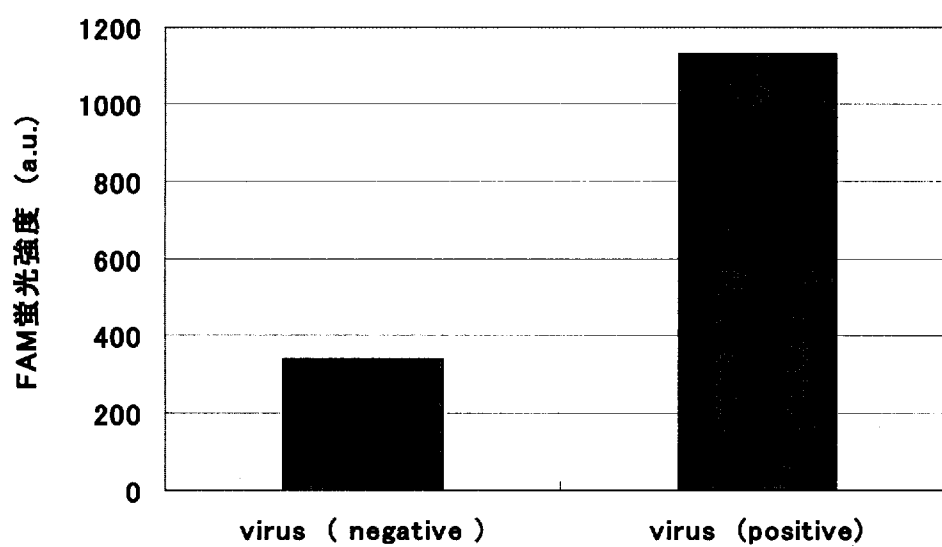
[図16]



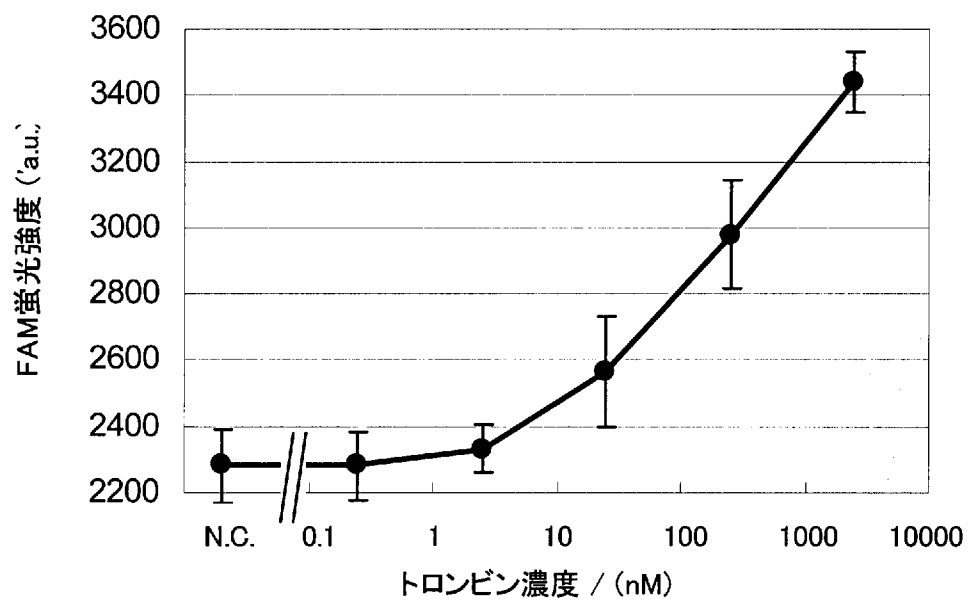
[図17]



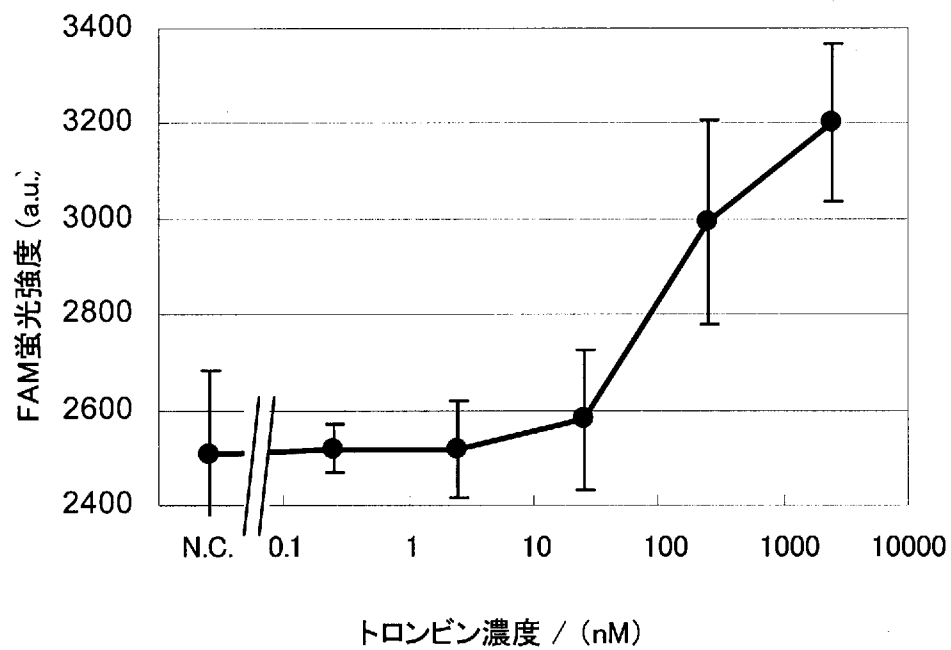
[図18]



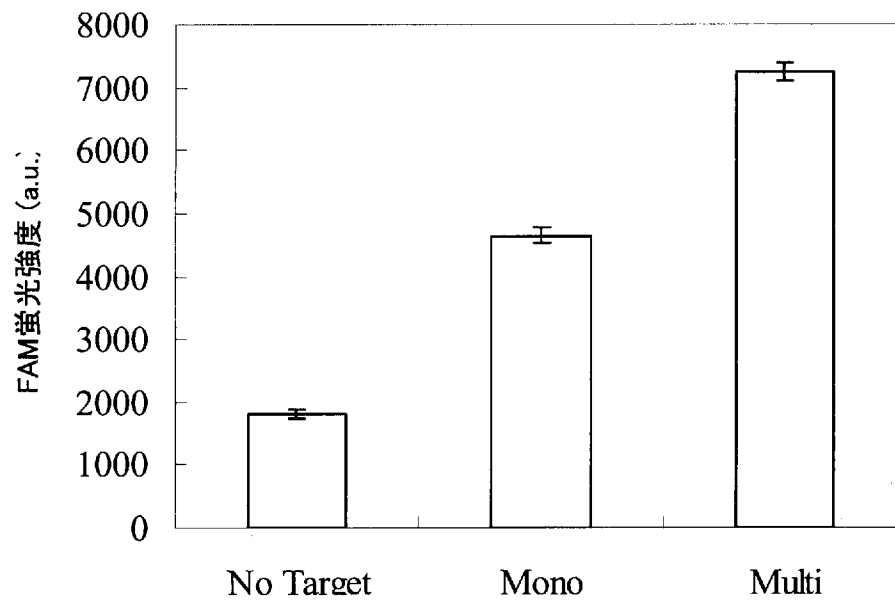
[図19]



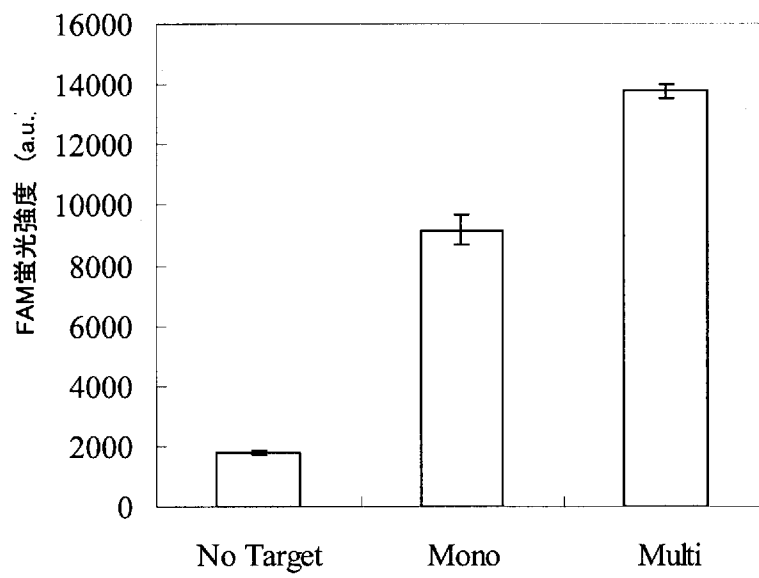
[図20]



[図21]



[図22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/314419

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01) i, C12Q1/68(2006.01) i, G01N33/532(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/532

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Naoki WATANABE, "Seitainai Biryo Busshitsu no Kokando Kenshutsuho no Kaihatsu to Rinsho Oyo", lab.Clin.Pract., 2002, Vol.20, No.2, pages 110 to 114	1-26,46-52
Y	JP 03-231151 A (TAKARA SHUZO CO., LTD.), 15 October, 1991 (15.10.91), (Family: none)	1-26,46-52
Y	US 2004/214176 A1 (BECKMAN COULTER INC., US), 28 October, 2004 (28.10.04), & WO 2004/094670 A2	1-26,46-52

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 October, 2006 (03.10.06)

Date of mailing of the international search report
10 October, 2006 (10.10.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/314419

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-26, 46-52

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/314419

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The inventions of claims 1-26 and 46-52 relate to the detection, identification or quantification of a target molecule in a sample by a method for cleaving a nucleic acid with a nuclease using an oligonucleotide bound to a chemical substance as a label. The inventions of claims 27-45 relate to use of an oligonucleotide having a length of 10 to 100-mer as a label. The common matter between these two groups of inventions resides in a fact that these inventions use an oligonucleotide as a label. However, use of an oligonucleotide as a label is already known, as disclosed in JP 3-231151 A. Thus, this common matter cannot be regarded as a special technical feature.

In addition, the inventions of claims 54-55 relate to the determination by invader method using an oligonucleotide as a label. The common matter between this group of inventions and the above two groups of inventions also appears to be a known matter, and therefore cannot be regarded as a special technical feature.

Such being the case, since it does not appear that there is a technical relationship among these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features, these inventions are not considered to be so linked as to form a single general inventive concept. Consequently, the present application includes three different groups of inventions.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/532(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/532

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	渡辺直樹, 生体内微量物質の高感度検出法の開発と臨床応用, lab.Clin.Pract., 2002, Vol.20, No.2, p.110-114	1-26, 46-52
Y	JP 03-231151 A (TAKARA SHUZO CO LTD) 1991.10.15, (ファミリーなし)	1-26, 46-52
Y	US 2004/214176 A1 (BECKMAN COULTER INC, US) 2004.10.28, & WO 2004/094670 A2	1-26, 46-52

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 3 . 1 0 . 2 0 0 6

国際調査報告の発送日

1 0 . 1 0 . 2 0 0 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

飯室 里美

4 B

2 9 3 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
（特別ページ）参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 1 - 2 6、4 6 - 5 2

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

請求の範囲1-26、46-52に係る発明は、化学物質に結合したオリゴヌクレオチドを標識として使用し、ヌクレアーゼを使用して核酸を切断する方法により、試料中の標的分子を検出、同定又は定量することに関し、請求の範囲27-45に係る発明は、10～100merのオリゴヌクレオチドを標識として利用することに関するものである。両者は、オリゴヌクレオチドを標識として利用することに関するものであるという点で共通しているが、特開平3-231151号公報等に記載されるように、オリゴヌクレオチドを標識として利用することは、既に知られているから、上記共通点は、特別な技術的特徴であるとは言えない。

さらに、請求の範囲54-55に係る発明は、オリゴヌクレオチドを標識として使用するインベーター法による測定に関するものであるが、該発明と上記発明との共通点についても、上記で述べたとおり、既に公知の事項であると認められるから、特別な技術的特徴であるとは認められない。

したがって、上記発明群は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められず、本出願には、3発明が包含されていることになる。