

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4481491号
(P4481491)

(45) 発行日 平成22年6月16日(2010.6.16)

(24) 登録日 平成22年3月26日(2010.3.26)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 25 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2000-541335 (P2000-541335)	(73) 特許権者	509017413
(86) (22) 出願日	平成11年4月1日(1999.4.1)		ジェネティック アナリシス アーエス
(65) 公表番号	特表2003-516710 (P2003-516710A)		ノルウェー国 1 4 3 2 アス サゲリン
(43) 公表日	平成15年5月20日(2003.5.20)		アー、フレデリク アー ダールス フ
(86) 国際出願番号	PCT/GB1999/001025		エイ 2 0
(87) 国際公開番号	W01999/050448	(74) 代理人	100065651
(87) 国際公開日	平成11年10月7日(1999.10.7)		弁理士 小沢 慶之輔
審査請求日	平成17年11月18日(2005.11.18)	(72) 発明者	ルデイ ナツト
(31) 優先権主張番号	9807045.1		ノルウェー エヌー1 0 6 3 オスロ エ
(32) 優先日	平成10年4月1日(1998.4.1)		ドヴァルト ムンクス ヴエイ 8 3
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(72) 発明者	ヤコブセン ケテイル シグルド
前置審査			ノルウェー エヌー0 8 8 2 オスロ プ
			レッケリア 1 0 エム
		審査官	清水 晋治
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸分子中の標的ヌクレオチド配列の検出方法であって、

- (a) 該核酸分子中の標的領域にオリゴヌクレオチドプローブをハイブリッド形成させ、
 (b) 該標的ヌクレオチド配列の存在下で、ハイブリッド形成された該オリゴヌクレオチドプローブを選択的に標識づけし、
 (c) 該標識されたオリゴヌクレオチドと該核酸分子との間に形成された複合体を変性し、
 (d) 前記工程 (a) - (c) からの標識された及び標識されないオリゴヌクレオチドと、該標的領域と同じ又は実質的に同じである配列とを、該標識されたオリゴヌクレオチドが該配列にハイブリッドを形成するような条件下でインキュベーションし、そして
 (e) 続いて該標識を検出する
- ことを特徴とする標的ヌクレオチド配列の検出方法。

【請求項 2】

(d) 段階の上記配列が上記オリゴヌクレオチドプローブに対し完全に相補的であることを特徴とする請求項 1 の方法。

【請求項 3】

上記オリゴヌクレオチドプローブの長さが、20 ないし 30 のヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

上記オリゴヌクレオチドプローブが標識されたヌクレオチドの挿入によって標識づけられることを特徴とする請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

上記標識されたヌクレオチドが標識されたジデオキシヌクレオチドである請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

選択的標識づけが 1 個またはそれ以上の標識されたジデオキシヌクレオチドと 1 個またはそれ以上の標識されていないジデオキシヌクレオチドとの存在下で行われることを特徴とする請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

選択的標識づけが 1 個の標識されたジデオキシヌクレオチドと 3 個の標識されていないジデオキシヌクレオチドとの存在下で行われることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

上記オリゴヌクレオチドプローブが非標的ヌクレオチド配列に対し 3' 末端で 1 個またはそれ以上の不適合をもって設計されていることを特徴とする請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

複数の標識づけ段階を連続して実施することを特徴とする請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

上記標識されたオリゴヌクレオチドに対して相補的な配列を固体支持体上に固定化することを特徴とする請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

上記固体支持体が膜ストリップまたは核酸チップであることを特徴とする請求項 10 の方法。

【請求項 12】

(a) ないし (e) の段階の前に、上記標的配列を含む上記核酸分子の増幅を先行させることを特徴とする請求項 1 ないし 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

上記標的配列を含む上記核酸分子が競争者核酸分子と共に増幅されることを特徴とする請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

上記競争者核酸分子が、競争者オリゴヌクレオチドプローブに対し相補的である識別配列を含むことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

上記競争者オリゴヌクレオチドプローブが、上記競争者核酸分子とハイブリッドを形成した後、選択的に標識づけされることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

標識された競争者オリゴヌクレオチドを相補的配列に対しハイブリッド形成し、続いて標識ラベルを検出することを更に含む請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

上記オリゴヌクレオチドプローブに対して相補的である配列を、固体支持体上に別々に予め決められた位置で固定化することを特徴とする請求項 1 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

単一のサンプル中に存在する複数の異なる標的ヌクレオチド配列を同時に検出することを特徴とする請求項 1 ないし 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

各標的ヌクレオチド配列が特定の生物又は生物群に特有である、請求項 18 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 0】

請求項 1 ないし 1 9 のいずれか 1 項に記載の検出方法を含む、標的ヌクレオチド配列の量、又は標的ヌクレオチド配列を含有する細胞の数を決定する方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 ないし 1 9 のいずれか 1 項に記載の検出方法を含む、サンプル中のバクテリアの存在を検出する方法。

【請求項 2 2】

バクテリアがシアノバクテリアである請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

請求項 1 ないし 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するためのキットであって、
(a) 標的ヌクレオチド配列を含む標的核酸分子にハイブリッド形成することができるオリゴヌクレオチドプローブ、
(b) 該オリゴヌクレオチドプローブの選択的標識づけのための手段；及び
(c) 該オリゴヌクレオチドプローブにハイブリッド形成する該標的核酸分子内の標的領域と同じ又は実質的に同じであるヌクレオチド配列を含むキット。

10

【請求項 2 4】

上記ヌクレオチド配列を固体支持体上に固定化することを特徴とする、請求項 2 3 に記載のキット。

【請求項 2 5】

上記成分 (a) が、標的ヌクレオチド配列を含む標的核酸分子にハイブリッド形成することができるオリゴヌクレオチドプローブを含み、各標的ヌクレオチド配列が特定の生物又は生物群に特有である、請求項 2 3 又は 2 4 に記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、核酸の検出方法、特に核酸の定量検出方法に関する。

【0002】

有機体、例えば診療用サンプル中の病原体、または食物または環境資料中の汚染物質、例えば水資源中の毒素生産シアノバクテリアの存在、または転写レベル中の変化を示すための mRNA の存在などを示すものとして、核酸の検出、特に定量的な検出は非常に価値のある微生物学的手段である。更に、核酸分析を診断または討論に使用するかまたは多形現象の研究に使用する場合、陽性の同定を与えるためには単一の塩基の変異または不適正の検出で十分であるから、標的とする核酸の完全な配列は不必要であろう。そのような単一の塩基の変異または不適正は、例えば対立変異または多形現象、点突然変異または遺伝子物質の何らかの削除または挿入などから起り、その場合、特別の塩基の単独異常または種類を検出することが必要とする情報を与えるであろう。

30

【0003】

水中のバクテリアを検出するための方法を開発する我々の仕事を通して、我々は環境、農業、食物、獣医、健康及び医療の分野で広く応用するのに適する、そして実際分子生物学一般の手段として適する新規な核酸の検出方法を開発した。

40

【0004】

目標とする配列に対しハイブリッド形成のための合成オリゴヌクレオチドプローブ、特にラベルされたプローブの製造を含む核酸の分析、PCR による目標核酸配列の試験管中での増幅及び他の関連する増幅方法及び (オートメーション化した) 直接 DNA 配列のために使用できる多くの技術がある。これらは環境モニターにおける核酸の検出及び特性決定のための新規なアプローチの開発を導いた (Bej, A.K. 及び Mahbubani, M.H. [1994] in PCR Technology: Current Innovations P327-339, 及び Bowman, J.P. Sayler, G.S. [1996] 著、環境微生物学への分子アプローチ P63-97 参照) 増幅された DNA の定量のために 3 つの主たる戦略がある。即ち、電気泳動による大きさの分離、プローブを捕捉するためのハイブリッド形成、及び実時間検出である。ゲル電気泳動法に伴う問題は単一反応における

50

多くの標識物質の検出及び結果の解釈である。多様な増幅のサイズ分離検出もまた、異なる大きさをもつアンプリコンの増幅比はDNAの量に依存しているので確立するのが困難である。

【0005】

捕捉されたプローブの分析は完全に増幅された断片のハイブリッド形成に基づいている。明らかにこの定量法は相同アンプリコン、例えば競合増幅の産物の分離及び定量には適さない。異なるアンプリコンが相同部位でサンドイッチ状ハイブリッドを形成し捕捉部位が識別される場合でも、標的断片と非標的断片の両方を捕捉することになる。

【0006】

ABI PRISM™7700配列検出システム (Perkin Elmer, Foster City, カリフォルニア) はPCR増幅の実時間定量を与える。しかしながら、複合定量は使用するフルオロクロムの数及びそれらのオーバーラップする蛍光スペクトルによって限定される。

10

【0007】

核酸検出方法においては常にその特異性を増大すること、即ち非特異結合または非特異背景シグナルの検出を減らすことが目的である。別のしかし関連する目標は検出方法の感度を増大すること、即ち非常に少ない量の標的核酸の測定を可能にすることである。

【0008】

もし、その方法が単独の反応で数個の、好ましくは10個以上の多数の多形部位の検出及び定量ができるならば例えば単独の複合定量で数個の異なる標的有機体の検出及び定量ができるならば非常に有利であろう。

20

【0009】

我々は、単一の反応で多数の多形性部位を検出し定量することのできる非常に良好な感度と特異性を有する便利な検出方法を開発した。特に、アガロースゲル電気泳動法または増幅DNAの定量での直接検出を使用する方法よりもこの方法は非常な有利さを示す。

【0010】

本発明は即ち核酸分子中で標的ヌクレオチド配列を検出する方法を提供し、該方法は

(a) 核酸分子にオリゴヌクレオチドプローブを結合し、

(b) 該標的ヌクレオチド配列中の結合オリゴヌクレオチドプローブに選択的に標識をつけ、

(c) 標識されたオリゴヌクレオチドを相補的配列とハイブリッド形成し、

30

(d) 続いて標識ラベルを検出することからなる。

【0011】

本発明方法はすべての標的ヌクレオチド配列、例えばDNA配列、特にPCR増幅サイクルから生じるDNAの検出に使用することができる。DNAは未変性DNA、または逆転写酵素によるmRNAから形成されたcDNAであって良い。DNAは1本鎖でも2本鎖でも、線状または環状であっても良い。標的核酸はRNA、例えばmRNAまたは特に細胞中に多重コピーで存在する、例えば細胞3,000 - 20,000のコピーで存在するリボソマルRNAであって良い。

【0012】

本発明においては、“ヌクレオチド配列”という語はその長さで唯一のヌクレオチドの“配列”を表わし、そこでは例えば点変異または多形現象の検出の場合に興味のある核酸は検出を望まない他の(非標的配列)とは唯一のヌクレオチドによって異なっている。もっと通常には、検出すべきヌクレオチド配列は特別な核酸または核酸群、または特別の生物体または生物体群に特有であり、そこで、多数の異なる分子または生物体を含むサンプル中の該標的物質(例えば核酸または生物体)の存在を検出すること、例えば診断用または環境サンプル中の特別のバクテリアを検出することが望まれる。

40

【0013】

オリゴヌクレオチドプローブは5ないし50、好ましくは10ないし40より好ましくは20ないし30のヌクレオチドを含む。プローブは標的核酸、即ち標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子に結合するために選択される。オリゴヌクレオチドは標的核酸と適当なハ

50

イブリッド形成するために便利で十分な大きさであるが、また不必要な化学合成を避けるために適当に短いものである。オリゴヌクレオチド生成方法は専門分野で標準のものである。

【0014】

上に述べたように、標的核酸はDNA、cDNAまたはRNAであって良い。オリゴヌクレオチドプローブは、標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子中の標的領域に結合するように設計される。“標的領域”とはここでは、オリゴヌクレオチドプローブに結合する核酸配列の意味に使用している。この標的領域は、特別の核酸又は核酸群または生物体などを特定する“記名配列”の形であってもよいし、あるいは多形現象、点突然変異、挿入または削除を検出しようとするならば興味のある単独の塩基の位置にすぐ先行している核酸の

10

【0015】

勿論、標的ヌクレオチド配列と非標的ヌクレオチド配列との間に選択性を導入するために、サンプル中で非標的分子のどこにも標的領域が存在しないことが望ましい。この結合の特異性はプローブ中に所望の標的領域に対する相補性または実質的相補性の領域をとり込むこと及び/または非標的配列に対する不適正をとり込むことによって達成される。相補性領域はプローブの末端又は内部切片、またはその両方に存在して良い。

【0016】

核酸検出方法は、標的核酸配列とのハイブリッド形成の前にオリゴヌクレオチドプローブに標識づけすることを含むのが便利である。しかしながら我々の方法ではプローブに標識づけすることは、プローブが結合されるべき核酸分子の配列に依存する。換言すれば、プローブの標識づけは鋳型配列に依存性（即ち配列特異性）であり、標識の挿入は標的分子中の所望のまたは選択された“配列”の存在においてのみ起り、それは標的ヌクレオチド配列それ自身または標的領域であり、あるいはそれは選択的に起り、即ちオリゴヌクレオチドプローブ中に標識を挿入する段階は（即ち“ミニ配列決定原理”に基づいて）識別されるであろう。このことはプロセスに選択性（特異性）の余分の次元を加えることになる。オリゴヌクレオチドプローブ結合は最初に非標的核酸に対して識別するが、非標的配列に対するいくつかの結合が予想される。もしプローブそれ自身が結合の前に標識されるならば、それ以上の識別は不可能であろう。

20

【0017】

一方で本発明は、標的ヌクレオチド配列の存在下でオリゴヌクレオチドプローブ中に選択的に（配列特異的に）標識を挿入する段階を追加する。この選択性は、例えば、標的ヌクレオチド配列が存在するときのみ標識の挿入によって達成されるか、または標的ヌクレオチド配列が識別されるような、選択的または識別的方法で標識を挿入することまたはその両方によって達成される。

30

【0018】

選択的標識づけは、標識されたヌクレオチドを使用して、即ちオリゴヌクレオチドプローブ中に標識されたヌクレオチドを挿入（または非挿入）することによって達成されるのが便利である。換言すれば、選択的標識づけは、標識されたヌクレオチドを挿入するポリメラーゼ酵素を使用してオリゴヌクレオチドプローブの鎖を延長することによって起るであろう。RNA標的の場合にはポリメラーゼは逆転写酵素である。鎖伸長（即ち塩基挿入）のための条件及び適するポリメラーゼ酵素は専門分野で公知であり文献に広く記載されている。

40

【0019】

オリゴヌクレオチドの選択的標識づけは、好ましくは標識されたジデオキシヌクレオチドの挿入によって達成される。

【0020】

ここで使用される“ジデオキシヌクレオチド”の語は、3'-ヒドロキシル基が存在しないか、変性されているすべての2'-デオキシヌクレオチドを含み、従ってこれはポリメラーゼの存在下でオリゴヌクレオチドプローブに付加されることができ、さらに続い

50

て重合反応に入ることはできない。このことは、プローブ中に1つの塩基のみが付加されることを意味する。

【0021】

この方法での連鎖停止は反応を制御することができ、望むならば分析を定量的にする（後述部参照）。

【0022】

有利には、上記のように、本発明は標識挿入するためのオリゴヌクレオチドプローブの鎖の伸張を含む。本発明は標識されたヌクレオチドを選択的方法で（即ち標識に基づいてその存在か不存在かを識別するかまたは特別の標識の選択的検出によって）挿入するかあるいは、ヌクレオチドの挿入が（標識されているかいないか）標的ヌクレオチド配列の存在においてのみ起る（より正確には挿入の効率が、標的ヌクレオチド配列が存在しない場合に大きく減少する）という選択的な方法で行われるという両方によって選択的標識を可能にしている。

10

【0023】

そのような方法の例として、もし標的配列が鍵となる識別性塩基であるならば、例えば核酸分子中でプローブが結合するべき標的領域にすぐに隣接する塩基がシトシン残基であるならば、標識されたジデオキシグアニントリホスフェート（ddGTP）を挿入のために反応混合物中に加えるであろう。もしプローブが核酸に非標的配列において結合してしまったら、次のヌクレオチドが鍵となる塩基と同じということは起らないし標識されたddGTPはオリゴヌクレオチドに挿入されるということは起らない、即ちオリゴヌクレオチドの挿入は標的の存在下でのみ（またはほとんどまたは実質的に）存在下でのみ起る。上記の識別方法は、もし鍵塩基がグアニン、アデニン、チミンまたはウラシルであるならば必要な変更を加えて適用する。

20

【0024】

更に標識されたジデオキシヌクレオチドの起こり得る、間違っただ挿入を減らすために、反応混合物に標識されていないジデオキシヌクレオチドトリホスフェートも添加して良い。上記の標識されたddGTPを加えるという例を使用して、標識されていないddCTP、ddATP及びddTTPが加えられるであろう（この場合標的核酸分子はDNA）。もし唯1つのddNTPが存在するならば、塩基のペアリングルールにも拘らず鍵となる塩基がその未変性の塩基ペアである所に低い頻度で挿入される危険性がある。これは分析においてバックグラウンドまたはノイズの信号を引き起こすであろう。他のddNTPsの包含はこれらが通常の塩基ペアリングルールに従って（c - G及びA - T / U）優先的に挿入されるであろう。そして標識されたddNTPの間違った挿入が有意に減少するであろうということを意味する。このように標識されていないddNTPsの使用は本発明の好ましい実施態様を意味する。

30

【0025】

本発明の更に好ましい実施態様において標識づけ反応の選択性は鍵塩基のすぐ上流の不適正の挿入によって更に増大される。このように、オリゴヌクレオチドプローブは非標的ヌクレオチド配列に対する3' - 末端で1つまたは複数の不適正を有するように設計され、そして不適正の存在はオリゴヌクレオチド伸張の見込みを減少するであろう。従って、結合されたオリゴヌクレオチドの末端の後の次の塩基が偶然に鍵塩基と同じものであったとしても、非標的配列への標識されたddNTPの挿入は減少しそこではプローブとそれが結合された核酸との間に不適正が優先的に存在する。

40

【0026】

多数の適するラベルと標識づけ方法が知られており文献に記載されている。検出する、または信号を発生するラベルまたはリポーター分子はどれでも使用できる。比色性、化学発光性、色素形成性、放射性及び蛍光性のラベルが便利であるが酵素または抗体をベースとする標識方法または信号発生システムもまた使用される。このように、ここで使用される“ラベル”の語は、直接検出する信号を与える部分のみでなく信号を発生するかまたは信号発生反応に関与する如何なる部分をも包含する。フルオレセインまたは他の蛍光的

50

に標識された ddNTPs は特に適当であり、これは直接蛍光によって検出でき、または間接的に抗体相互作用によって検出可能である。これらは、例えばNEN/Dupontから市販されている。ddNTPs は例えばSyväl;nen, A.C.他によるGenomics 8, [1990], 684-692に記載されているように〔³ 5 S〕、〔³ H〕または〔³ 2 P〕によって標識することができる。

【0027】

選択性を増大するために、1つ以上の標識段階を行うことができる。換言すれば、選択的標識段階を1回または数回繰り返す。即ち循環して行う。サイクルの回数を増加すると選択性が増大し、定量的に分析を行う時も(下記参照)、プローブのラベル飽和の改善によって、その方法の定量範囲が増大する。循環式標識づけを容易にするために、ラベル挿入段階で熱安定性ポリメラーゼ酵素を使用する。選択的標識づけ段階のサイクルの数は1ないし50、例えば10ないし30が便利であるが、これは選択によって変えられる。所定のシステムのための適する、または便利なサイクルの数は通常の実験によって決められる。

10

【0028】

多数の単一ヌクレオチド多形現象を検出するミニ配列決定方法は知られており、それは単一ヌクレオチドの蛍光で標識されたジデオキシヌクレオチドとの伸長反応を含む(Patinen, T.他著, 診断の化学(1996) Vol. 42, 9, 1391-1397参照)。この場合、ミニ配列決定反応生成物はゲル電気泳動によって分析された。これに対して、本発明方法は、検出と分析より前に、標識されたオリゴヌクレオチドとその相補的核酸配列との間のハイブリッド形成反応を含む。

20

【0029】

このように、選択的標識づけ段階に続いて標識されたオリゴヌクレオチドプローブが相補的ヌクレオチド配列に対してハイブリッド形成する。一般に、これは前段階の反応混合物から標識されたオリゴヌクレオチドプローブを分離することを含む。標識されたヌクレオチドの挿入によるラベルの挿入はそのように標識されたオリゴヌクレオチドプローブを標的核酸分子に対してハイブリッド形成する結果になる。プローブを分離するためのストランドの分離は、専門分野で公知の変性方法、例えば、高温加熱、高いpH(アルカリ性)での処理などを使用して達成される。(c)段階、プローブに対して相補的な配列へのハイブリッド形成はその後に行われる。本発明によるこの“相補的配列”はプローブに対して絶対的な、または実質的な相補性の領域を含有または包含するどんなヌクレオチド配列であってもよく、プローブの“相補的配列”への結合が起りうるものである。相補的配列はDNAまたはPNAのようなその変形であっても良い。便利には、相補的配列はプローブの補体の形をとっても良い(即ちプローブに対して完全に相補的な配列)。しかしながら、これは絶対に重要ではないこと、及びプローブの“相補的配列”への結合がまだ起っている限り、“補体”はより長い配列中に含まれてもよく、部分的または不完全であってもよく、及び/または配列の変形(即ち完全な相補性よりも少ないもの)を含有してもよいということが理解されるであろう。

30

【0030】

好ましい実施態様においては相補的配列は固体支持体上に固定化される。補体を付着することのできる適する固定化支持体はその分野で知られており、現在、固定化、分離などのために広く使用され、または提案されている公知の支持体またはマトリックスのどんなものでも包含する。これらは、粒子、シートゲル、フィルター、膜、繊維、毛細管、チップ、マイクロタイターストリップ、チューブ、プレート、ウエルなどの形状をとることができる。固体支持体にオリゴヌクレオチドを固定化または付着させる方法は同様に業界で公知である。特に好ましい方法は現在分子生物学操作において一般的であるように、薄膜ストリップ(NENから市販され、Gene Screenとして知られている)の上に相補的配列をスポットしその後紫外線架橋するものまたはDNAチップ(マイクロチップ、ガラスチップ、など)である。このような固定支持体の使用、特に分析の初期段階で使用されるオリゴヌクレオチドプローブに対して相補的である多数の例えば250までの異なるオリゴヌク

40

50

レオチドの列を担持することのできるチップの使用は本発明の特に好ましい実施態様である。

【 0 0 3 1 】

ハイブリッド形成段階 (c) は標識されたプローブの定量的分離を可能にする。これは定量分析の意味で有利である。

【 0 0 3 2 】

ハイブリッド形成段階に続いて、オリゴヌクレオチドプローブ上のラベルを検出する。上記のように、ラベルに関連して、選択されたラベルに依存して業界で知られているどんな方法によってでも検出を行うことができる。望むならば、その分野で記載されているように信号増幅も使用してよい (例えば、P. Komminoth 及び M. Werner 著、標的と信号増幅、その場でのハイブリッド形成の感度増大へのアプローチ、1997 Histochem, Cell Biol. 108:325-333参照)。検出はまた定性、定量または半定量でも良い。このように、例えば、比色により、色素形成によりまたは蛍光のような視覚により、またはラベルから検出する他の信号により標的ヌクレオチド配列の存在又は不存在の表示を簡単なイエスまたはノーで与えることができる。しかしながら、有利には、サンプル中に存在する標的ヌクレオチドの量を量的に測定することができるような検出法である。これは存在する標的の量の絶対的表示でありまたは他の定量的または半定量的表示法、例えばサンプル中の全核酸に対するパーセンテージ、比率または類似の表示法である。

10

【 0 0 3 3 】

標的ヌクレオチド配列の量は更に問題の標的を含有する生物体または細胞の数の量に関する。このように、更に別の見方においては、本発明は、上に記載した核酸検出分析を使用して、標的ヌクレオチド配列の量、または標的ヌクレオチド配列を含有する細胞の数を決定する方法を提供する。

20

【 0 0 3 4 】

上記の通り、標的核酸はどんな DNA または RNA 分子でもよい。それは直接標的細胞または生物体の核酸であってよい。しかしながら本発明の分析方法を使用して検出の前に核酸を増幅するのが望ましく、有利には標的核酸は試験管中での増幅反応によるアンプリコンである。しかし増幅は、生体中でのクローン化方法を含む別の方法によっても起こすことができる。線状または指数方法の両方を含む試験管中の増幅のどんな方法でも使用できる。代表的な方法は PCR、NASBA 及びリガーゼ鎖反応を含む。便利さの理由で、PCR 及びその変形が一般に選ばれる方法である。

30

【 0 0 3 5 】

定量分析に関連して、試験管中での定量的増幅方法を本発明の検出分析と組み合わせる。特に、本発明方法の好ましい実施態様ではオリゴヌクレオチドプローブ結合段階を競合 PCR 反応より先行させる。種々の競合 PCR の方法が存在し文献に記載されている。公知の技術のどれでも使用できる。(例えば Srebert, P. D. Larrick, J.W [1992] Nature, 369, 557, -558 参照)

【 0 0 3 6 】

そのような方法では、標的ヌクレオチド配列を含む核酸は標的分子として同じプライマー型配列を含む選択した競争者分子と共に増幅される。このようにして競争者は PCR プライマー結合と増幅のために標的と競争する。競争者は標的から区別するための方法を含み、便利には、上記の検出分析に関連して記載した “ 標的特異 ” オリゴヌクレオチドプローブに類似する競争者特異オリゴヌクレオチドプローブに結合するための識別配列を含む (即ち上記の (a) 段階のプローブ)。

40

このように識別配列は上記のオリゴヌクレオチドプローブの “ 標的領域 ” に類似している。標準カーブと比較するために既知の量の単独競争者を加えるかまたは種々の量、例えば一連の希釈された、種々の量の競争者を使用して一連の増幅を行ってもよい。興味のある核酸分子中の標的ヌクレオチド配列 (そして競争者中の同じ配列) に側面を接する配列に相補的なプライマーを加えそして PCR 増幅を行う。競合 PCR は、より正確な分析結果を与えることに関連する構造をもって実施すべき検出を可能にする。標準カーブは、そ

50

の分野で公知の標準技術を使用して形成される。

【 0 0 3 7 】

そのような競合 P C R 段階でアンプリコンは標的及び競争者の両方の D N A から誘導されて生成される。競争者のアンプリコンは上記のように、標的アンプリコンと類似の方法で検出分析操作に提供される。増幅された競争者配列は、検出に際して、標的核酸分子中の標的領域と同じ方法で行動する既知の識別配列を含む。例えば、競争者のこの識別領域に選択的に結合するオリゴヌクレオチドプローブを、標的分子の標的領域へのプローブと同時に反応混合物に添加する。両方のオリゴヌクレオチドは、各々の標的配列に結合された時、標識された d d N T P で伸長される単独塩基の形に設計されている。競争者に結合した後に標識された競争者オリゴヌクレオチドプローブに対する相補的配列も好ましくは、
10
固定化して与えられ、検出の前にこの相補的配列に対して標識されたオリゴヌクレオチドプローブがハイブリッドを形成する。標的及び競争者両方のオリゴヌクレオチドのラベルがその後、検出されそして特に、既知の量の競争者をシステム中に加えて与えられたもののサンプル中に存在していた標的核酸の量を評価するために使用した測定信号の相対的強度を測定する。本発明のこの状況は図 1 に示されている。競争者と標的配列のラベルが相違する必要はない。実際、それらは同じものであるのが好ましい。競争者と標的との区別は複数の標的配列の間の区別と同様に、好ましくは空間的に達成される。例えばマイクロチップアレー上の各オリゴヌクレオチドプローブに対する相補的配列の位置が知られており、各位置での信号の強さが測定される。

【 0 0 3 8 】

下記の実施例に記載したように、特別の分析に使用される競争者の最適量を定めるために適定実験を使用することができる。選ばれた競争者の量は低い頻度の標的核酸分子の検出及び再現しうる増幅を可能にするのが好ましい。適する濃度は 6×10^{-8} ないし 6×10^{-10} pmol、好ましくは 4×10^{-4} ないし 8×10^{-9} pmol で変動しうる。
20

【 0 0 3 9 】

飽和レベルが達成されるので P C R の十分なサイクルを実施するのが好ましい。この方法で増幅された D N A は、P C R の前に存在していたものと同じ比率で競争者 D N A に対して実質的に同じ比率の標的 D N A を含有する。

【 0 0 4 0 】

競争者と標的 D N A が P C R によって等しく効率的に増幅されるような条件を与えることが有利であり、従って各断片の大きさ及び G C - 含量が実質的に等しく保たれるのが望ましい。ある例においては、P C R のためにあまり利用できないゲノム D N A のあるものを作ることでできるサンプルの細胞溶解の効率を考慮する必要がある。更に、最初のサイクルで標的 D N A は染色体 D N A の部分であってもよく、一方競争者 D N A は、例えば、小さいプラスミドの形であってもよい。このように初期の P C R サイクルの比増幅効率を調整することが必要であろう。
30

【 0 0 4 1 】

本発明のこの状況で、別の増幅戦略を使用することもできる。例えば N A S B A 及びリガーゼ鎖反応である。

【 0 0 4 2 】

適するポリメラーゼはどれでも使用できる。しかし、各サイクルでさらにポリメラーゼ、例えばクレノー断片を添加することなしにくりかえし温度サイクルを行うことができるために Taq ポリメラーゼのような好熱性酵素を使用するのが好ましい。
40

【 0 0 4 3 】

上記のように、標的核酸はサンプル中で m R N A から合成された c D N A になり、そして本発明の方法は、特有の m R N A に基づいて診断に利用することができる。そのような予備合成は、便利には、続く増幅段階（例えば P C R）で使用するものと同じ緩衝液及び塩基のシステム中で逆転写酵素で予備処理することによって実施することができる。P C R 過程は、ストランド分離を行うために加熱を必要とするので、逆転写酵素は最初の P C R サイクルで不活性化される。m R N A が標的核酸であれば、すべての m R N A をその末端が
50

リ A 配列を通して回収するために、最初のサンプルを固定化ポリ d T オリゴヌクレオチドと処理するのが有利である。それとは別に、RNA を特殊な RNA 配列を通して回収するために特殊なオリゴヌクレオチド配列を使用してもよい。オリゴヌクレオチドはその後、国際特許出願 WO - A - 90 / 11446 号に記載されているように cDNA 合成のためのプライマーとして役立てることができる。

【0044】

標的及び競争者核酸の PCR (または他の試験管中) 増幅は特殊性の最初のレベルを与えるがこの反応で、低レベルの非標的 / 非競争者分子が増幅される。従って本発明により標的及び競争者アンプリコン中の記名配列に基づいてオリゴヌクレオチドの選択的標識づけを行う。定量は標的の競争者のみに対する信号の比率に基づき、最初の反応で増幅された非標的 / 非競争者分子によって影響されない。

10

【0045】

PCR または鎖伸長に基づく他の試験管中での増幅反応に続いて主たる検出分析が行われる時、前段階反応の例えば PCR 生成物から dNTPs を分離するかまたは ddNTPs を終了する代わりに、標的 / 競争者核酸に結合しているオリゴヌクレオチドのこの後の延長反応に dNTPs が確実に巻き込まれることのないように、これを不活性化する必要がある。PCR 生成物から dNTPs を物理的に分離することができる。例えば、ゲル電気泳動法、沈殿法、親和性精製法、クロマトグラフィーまたは濾過によって分離できる。しかしながら、ホスファターゼによって反応性燐酸基を除去することにより dNTPs を不活性化するのが好ましく、それによってヌクレオチドは有意の鎖伸長のためにもはや使用

20

【0046】

本発明方法で使用するための標的核酸は、その分野での便利な技術によって得られるかまたは製造できる。細胞及び生物体から核酸を分離するために多くの違った方法が文献に記載されており、これらのうちのどれでも使用できる。

【0047】

例えば環境サンプルから核酸を抽出する方法が、Bowman, J.P. 及び Sayler, G.S. 著 “環境微生物学への分子アプローチ” (1996), 63-97 頁中に記載されている。しかし、本発明方法の特に好ましい実施態様では上記の検出方法を、Rudi その他著、Appl, Environ. Microbiol. (1998), 64(1) P.34-77 に我々によって記載された; 細胞と核酸を組み合わせ

30

て分離するための固相法と組み合わせて行う。

【0048】

この報告に記載されている細胞のサンプルから核酸を分離する方法は、

- (a) サンプル中の細胞をサンプルから分離するために固体支持体に結合させること、
- (b) 分離された細胞を溶解すること、及び
- (c) 該溶解された細胞から放出された核酸を同じ固体支持体に結合させることからなっている。

【0049】

結合された核酸を直接本発明の検出分析法に使用してもよいしまたはこれを支持体からはずしてもよい。

40

【0050】

本発明の検出分析法は、核酸検出を望む如何なる手続きにおいても有利に応用することができる。例えば DNA または RNA 同定を基礎とする如何なる過程でも、例えば診断、有機物または病原体による汚染または感染の検出、医療用モニター、討論、食物及び環境の安全及びモニター、または異なる細胞または細胞タイプ間の区別のため、突然変異の検出、組織中のタイプなどにおける多形現象の分析に使用でき、そして一般的な分子生物学の手段として使用できる。完全な核酸ベース分析は、サンプルの調整、DNA の増幅、選択的標識づけ及び検出からなり、特に水資源中の毒素生成シアノバクテリアの量を測定する際に特に利益をもたらす。この分離及び検出を組み合わせた方法は本発明の特に好ましい実施態様である。この分析は、低検出限界が 200 セル / ml、好ましくは 100 セル / ml

50

(10^5 セル/mlの他の背景シアノバクテリアに対して特別のシアノバクテリアの場合)であり、定量の範囲は数量の3のオーダーより大きい。本発明方法は原則的には上に記載したが、下記に更に詳細に、自動化に適し、日常の環境モニターのための高い全体的システムを開発するための手段を記載する。

【0051】

例えば、シアノバクテリアによって形成される水ブルームは比較的高い頻度で毒性をもち(25ないし70%)、家畜や人間に対して潜在的な健康傷害を起こす。これは特にMicrocystis属に属するシアノバクテリアのブルームの場合である。この属の種類は数種の毒素を精製しヘパトトキシックミクロシスチンは最も強力である。従って、このバクテリアを信頼できて速やかにそして便利な方法で検出し定量できる方法を開発することができたならば非常に望ましいであろう。

10

【0052】

本発明方法はこれに関して、興味のある異なるバクテリアのゲノム内での記名配列に対するオリゴヌクレオチドを選択することにより数種の異なる微生物のために1回の手順で単一のサンプルを分析することができるので特に適している。明確なバクテリア群のための記名配列は広く知られており文献に公表されている。シアノバクテリアのためには、16S rRNA配列に基づく分類情報を使用することができる。(例えば、J.R.Marchesi, T. Sato, A.J.Weightman, T.A.Martin, J.C.Fry, S.J.Hiom 及び W.G.Wade [1998] 著、バクテリア16S rDNAのためにコードする遺伝子を増幅する、有益なバクテリア特異PCRプライマーの設計と評価。Appl. Environ. Microbiol. 64:795-799;Turner,S. [1998] 著 藻類及びそのプラスチドの起源、pp13-53 Ed.Bhattacharya, D.NY:Springer出版 及びGiovanni,S.J., Turner,S., Olsen,G.J., Barns, S., Lane, D.J.及び Pace,N.R. [1998] J.Bacteriol, 170 pp3584-92参照)

20

【0053】

下記の実施例では、複合シアノバクテリア群の分析のための完全に統合された分析法を記載してある。本発明の方法は他の微生物群の研究で使用するのにも同様に適している。

【0054】

異なる標識をつけたオリゴヌクレオチドに対する相補的配列は予め決められた方法で単独マイクロチップ上に配置され、好ましくは各バクテリアグループのための信号に対する競争者の信号の比との比較によって、異なるバクテリアのレベルの定量を可能にする。そのような複合定量分析は好ましくはガラスチップ上に固定化した高密度オリゴヌクレオチド列を使用し、続いて蛍光ラベルの直接検出を行う(例えばSchena,M. 他Science(1996)270:467-470;及び R.J.Kozal, N.Shah, N.Shen, R.Yang及び S.P.A.Fodor著、遺伝子の多様性にアクセスするためのオリゴヌクレオチドプローブ列の使用、Bio Techniques 19:442-447参照)

30

【0055】

本発明はまた、本発明方法と実施するためのキットをも包含する。これらは通常少なくとも下記の要素を包含する。

(a) 標的ヌクレオチド配列を含有する標的核酸分子に結合することのできるオリゴヌクレオチドプローブ(即ち核酸分子内の標的領域に向かって);

40

(b) オリゴヌクレオチドプローブの選択的標識づけの手段、及び

(c) 好ましくは固体支持体上に固定化された、オリゴヌクレオチドプローブに対して相補的なヌクレオチド配列。

【0056】

選択的標識づけのための手段は、便利にはポリメラーゼ酵素及び少なくとも標識されたヌクレオチド、好ましくは標識されたddNTPからなり、任意に対応する標識のないヌクレオチドも存在してよい。

【0057】

上に記載した本発明を下記の実施例によって、シアノバクテリア検出の分野で図面を参照して説明するが、実施例は本発明を限定するものではない。

50

【 0 0 5 8 】

図 1 は標識づけ定量分析を概略的に示すものである。既知の濃度の DNA を精製した標的 DNA に加え、同じプライマーペアと一緒に増幅した (A)。2 つのオリゴヌクレオチド、即ち 1 つの競争者の内部切片に対して相補的であるもの及び 1 つの標的内部切片に対して相補的であるもの、を蛍光で標識されたジデオキシシトシンによって熱環状化によって特異的に配列伸長した (B)。標識されたプライマーをそれらの固定化補体に混成した (C)。最後に標識ラベルの発色検定を行い (D) そして信号の比強度を決定した。

【 0 0 5 9 】

図 2 (A) は *Mycrocystis aeruginosa* NIVA-CYA 43, P から分離された DNA の希釈シリーズ上の競合 PCR から得られたゲルの結果を示している。 (B) は標識分析の結果を示し、 (C) は全信号強度に関する標的信号の強度を示すグラフである。

10

【 0 0 6 0 】

分析は精製 DNA の希釈シリーズについて実施した。DNA の量はゲノムコピー (多分ゲノムコピー重量 5 fg) として与えられている。パネル A では、競合 PCR 反応からの生成物 10 μ l を 1.5 % アガロースゲル (エチジウムブロマイド 30 μ g/ml を含む) 上の各レーンにのせ、1 $\times$ TBE を使用して 100 ボルトで 1 時間電気泳動を行った。生成物を紫外線トランスイルミネーションによって目視した。パネル B に示した標識分析は実施例に記載したようにして行ったものである。パネル C では、標的と競争者両方の全信号強度に関して測定したパネル A での標的のための信号強度 (8 ビットグレースケールでの平均ピクセル値における、信号と背景との差として測定した) を示す (●)。パネル B での標識分析の各値は (▲) で示してある。写真は Cohu ハイ パフォーマンス CCD カメラを用いてとり、デジタルカラープリンター (Mavigraph UP-D1500CNE、ソニー、日本製) でプリントした

20

【 0 0 6 1 】

図 3 は、全信号強度に対する標的スポットの信号強度のパーセンテージを示すグラフであり、すべての実験の平均値及び標準偏差のための誤差バー (自由度 3) を示してある。異なる水性環境での *Mycrocystis aeruginosa* NIVA-CYA 43 の希釈シリーズについて競争者 6 $\times$ 10⁻⁹ pmol を用いた完全な分析である。細胞は無菌水、*Anabaena lemmermannii* NIVA-CYA 83/1 含有水 (10⁵ セル/ml)、*Planktothrix agardhii* NIVA-CYA 29 含有水 (10⁵ セル/ml)、及びノルウェーのアケルスヴァットネット湖からの水 (1996 年 5 月 30 日採取) 中に希釈した。実施例に記載したように固相細胞濃縮及び DNA 精製を含む完全分析を行った。

30

【 0 0 6 2 】

図 4 (A) は実施例に記載したように固相細胞濃縮及び DNA 精製に続く標識分析の結果を示している。ノルウェーのアケルスヴァット湖からの水 (1996 年 5 月 30 日採集) に *Mycrocystis aeruginosa* NIVA-CYA 43 をとかした希釈シリーズについて競争者 6 $\times$ 10⁻⁸ pmol を用いて完全分析を行った。

(B) は、全信号強度に対する標的スポットの信号強度のパーセンテージを示すグラフである。写真は Cohu ハイ パフォーマンス CCD カメラでとり、そしてデジタルカラープリンター (Mavigraph UP-D1500CNE) でプリントした。

40

【 0 0 6 3 】

図 5 (A) はプローブをつけた膜ストリップを示し、(B) は各プローブの信号強度を示す。(C) は異なるプローブの系統分類上の位置を示す

【 0 0 6 4 】

プローブは次のような順序で膜上にスポットした：

第 1 列 - pK0, pAP, 及び pMI3, ; 第 2 列 - pMI2, pDK, 及び pPL2 ; 第 3 列 - pPL 1, pAL, 及び pNOS ; 第 4 列 - pUN

テストした菌株は次のものである。

膜 a1 ; *Aphanizomenon gracile* NIVA-CYA 103, a2 ; *Anabaena lemmermannii* NIVA-CYA 266/1, a3 ; *Nostoc* sp NIV-CYA 123, b1 ; *Phormidium* sp NIVA-CYA 203, b2 ; *Planktoth*

50

rix prolifica NICA-CYA 320, b3; Microcystis aeruginosa NIVA-CYA 143, c1; Microcystis flos-aquae NIVA-CYA 144, c2; Pseudanabaena limnetica NIVA-CYA 276/6, 及び c3; Chlorobium. 各スポットについて信号強度を測定した。異なる菌株及びプローブの系統分類上の位置は系統樹によって目視する。系統樹はキムラディスタンスを使用して、隣接するアルゴリズムで構築した。系統樹中の各枝は65%以上のブーツストラップ支持体を使用した。

【0065】

図6は7ヶ所のノルウェーの湖の水のプロフィール分析を示す。湖は比較的低い生物量(mesotroph)を含むものから高い有機物(eutroph)含有量を有する湖までにわたっている。一般的なプローブpUNに対する信号強度は、サンプル中の異なる遺伝子タイプの比較豊富量を得るために、プローブ標識効率での差を訂正するための純粋培養液から得られたファクターで増大させた。

〔実施例1〕

有機体及びサンプルの調製

使用した有機体はノルウェー水研究所からのものである。培養は媒体z8中で実施した。証明は蛍光ランプに菌株を30µm²s⁻¹で暴露することによって与えられた。2種類のMicrocystis

aeruginosa株(NIVA-CYA 228/1及び43)を分析の展開における鋳型として使用した。この系はまたノルウェーのアケルスヴァネット湖から採集された実験的に変更された水サンプルについても試験した。細胞数はFuchst-Rosenthal計数室(Carl Hecht、ゾントハイム、ドイツ)内で顕微鏡により計数した。

DNAは単藻類培養の細胞ペレットからの標準フェノール/クロロフォルムプロトコールで精製するか、または固相細胞濃縮及びDNA精製プロトコールによって精製した。(Rudi, K., Larsen F. 及び Jakobsen K.J. 応用及び環境微生物学(1998), 64, 第1巻, 34-37頁参照)。固相プロトコールでは水溶液1mlからのシアノバクテリアの細胞を50%イソプロパノール0.75M酢酸アンモニウム及び1U(ビーズを200µl溶解した緩衝液)ディナビーズDNA DIRECT(Dynal A/S、オスロ、ノルウェー)を含む緩衝液中のパラマグネチックビーズ(最終容積2ml)上に20分間吸着させた。マグネチックビーズと吸着されたバクテリアを2mlミクロ遠心分離機チューブの側壁にMPC-Qマグネット(Dynal A/S)によって吸引した。次に20µlの4Mグアニジンチオシアネート-1%サルコシル液を添加し、65で10分間培養を続けた。96%エタノール40µlを加えてDNAをビーズ上に沈殿させ続いて室温で5分間培養した。最後にDNAとビーズの複合体を各洗浄の間にマグネットを使用して70%エタノール500µlで2回洗浄した。残存エタノールを除去するために複合体を65で5分間乾燥した。全部のビーズとDNA複合体を増幅反応に使用した。

競合PCR(図1Aに図示)

Microcystis

からのゲノムDNAの選択的増幅のために、我々は16SrDNAプライマー5'-AGCCAAGTCTGCCGTCAAATCA-3'(CH)及び5'-ACCGCTACACTGGGAATTCCTG-3'(CI(Rudi, K. et al. In Appl. Environ. Microbiol. 63, 2593-2599)を使用した。競争者5'-AGCCAAGTCTGCCGTCAAATCAAGCTGCCTCACTGCGGAGCTCGGACCAGGAATTCCTAGTACGGT-3'は、循環標識づけ反応に使用した

PCRプライマーCH-CI及びプライマーDK(下記参照)に対して相補的配列をもつオリゴヌクレオチドである。増幅反応はGene Amp 2400サーモサイクラー(Perkin Elmer, Norwalk, Conn)を使用して、10pmolのプライマー、6×10⁻⁹pmolの競争者、各々200µMのデオキシヌクレオチドトリホスフェート、10mMのトリス-HCl(pH8.8)、1.5mMのMgCl₂、50mMのKCl、0.1%トリトンX-100、1UのDynaZyme DNAポリメラーゼ(Finnzymes Oy, Espoo, フィンランド)及び最終容積50ml中の精製DNAを含むものであった。増幅の前にDNAを94で4分間変性し、増幅後、72で7分間の伸展段階を包含した。パラメーターを使用して94で30秒、58で30秒及び72で30秒の周期で40サイクル実施した。

循環標識づけ(図1Bに図示)

循環標識反応で、競合反応からのPCR生成物5µlを使用した。デオキシヌクレオチド

トリホスフェートを100mMトリスHCl (pH8.0) 50mM MgCl₂ 及び 1 U シュリンブアルカリホスファターゼ (USB, クリーブランド、OH) の添加によって脱リン酸し、続いて37 °C で 1 時間培養した。最後に96 °C で 10 分間加熱することによりホスファターゼを不活性化した。

競争者に対して相補的なプライマー5' -GTCCGAGCTCCGAGTGAGGCAG-3' (DK) 3pmol、Microcystis ampliconに対して相補的なプライマー5' -TCTGCCAGTTTCCACCGCCTTTAGGT-3' (DB) 3 pmol、ddATP 10pmol、ddGTP 10pmol、ddTTP (ベーリンガー、マンハイム、ドイツ) 10pmol、蛍光-12- ddCTP (NEN, ボストン、マサチューセッツ) 7pmol、サーモンシクエナーゼ反応緩衝液1.25 µl、酵素希釈緩衝液1.1 µl、サーモシクエナーゼ (Amersham インターナショナル plc、バッキンガムシャー イギリス) 0.15ml 及びホスファターゼ処理PCR生成物6ml を含有する容積20ml について循環標識づけ反応を実施した。パラメータを使用し95 °C で30秒間及び50 °C で4分間の25サイクルで標識づけを行った。

ハイブリッド形成及び発色検出 (図 1 C 及び D に図示)

1 ml (100pmol / ml) のプライマー5' -ACCTAAAGCGGTGGAACTGGCAGA-3' (DA) 及び5' -CTGCCTCACTGCGGAGCTCGGAC-3' (DJ) を膜ストリップ (0.4 × 2 cm) GeneScreen (NEN) 上にスポットしその後5000ジュール / cm² で紫外線架橋させた。プライマー D A はプライマー D B に相補しプライマー D J はプライマー D K に相補する。0.7 × SSC、1 × SPEP、5 × Denhardt's 及び100 µg / ml の非相同 DNA を含有する予備ハイブリッド形成溶液中で37 °C で 2 時間ストリップを予備ハイブリッド形成した。循環標識づけ反応からの生成物を 2 ml ミクロ遠心分離チューブ中のハイブリッド形成溶液 (0.7 × SSC、1 × SPEP、1 × Denhardt's 10 % デキストランサルフェート及び100 µg / ml 非相同 DNA) 0.5ml 中に添加し、95 °C で 5 分間変性した。ストリップを加え、37 °C でゆるやかな倒置法で 2 時間培養を続けた。膜ストリップを50ml (1 × SSC 及び 1 % SDS) 中で洗浄し次に50ml (0.1 × SSC 及び 0.1 % SDS) 中で、最後に 2 回50ml (0.10M トリス - HCl [pH7.5] 及び 0.15M NaCl) 中で洗浄した。核洗浄は室温で短い渦動によって行った。

抗体検出のために、膜ストリップを20ml (0.10M トリス - HCl [pH7.5]、0.15M NaCl 及び 0.5 % スキムミルク) 溶液で 1 時間ブロックし、1 / 1000 抗蛍光 - HRP コンジュゲート (NEN) を含む同じ緩衝液10ml 中で更に 1 時間培養した。膜ストリップを50ml の (0.10M トリス - HCl [pH7.5] 及び 0.15M NaCl) 溶液中で短い渦動により 3 回洗浄した。発色反応は製造者 (NEN) の支持に従って、HRP の発色検出のためのRENAISSANCE 4CN プラスを用いて 5 分間実施した。

信号の比強度はCCDビデオカメラ (Cohu ハイパフォーマンス CCD カメラ、日本) を使用して測定し、ゲル - プロANALYZER ソフトウェア (Media Cybernetics, Silver Spring Md.) を使用して分析した。

精製 DNA を含む規定サンプルについての検出分析

滴定実験によって競争者の最適濃度 (検出下限を得るためと再現可能な増幅のための両方) がサンプル当たり 6×10^{-9} pmol (即ち 3600 分子) であることが分かった。従って、*Microcystis aeruginosa* NIVA-CYA 43 からの精製 DNA についての分析試験に 6×10^{-9} pmol の競争者を使用した。約 10^7 ないし 10^8 ゲノムコピー (推定ゲノムサイズ 5 ± 3 Mb (9b)) からの *Microcystis* DNA の希釈シリーズを競合 PCR 分析 (図 2 A) 及びその後の標識分析 (図 2 B) の両方に使用した。

標的物質の競争者生成物に対する比の測定はアガロースゲル電気泳動法として 10^5 ないし 10^2 ゲノムコピーの範囲で与えられた (図 2 C)。これに対して本発明の課題である標識分析では 10^7 ないし 10^2 ゲノムコピーより大きい定量範囲を与えた。これは、アガロースゲル電気泳動検定と比較して動的範囲で約 100 倍の増加である。10 コピーというような少ない量でも、発色検出反応の培養時間を 5 ないし 30 分間増加することにより標識分析で検出することができた。発色検出反応のライブビデオ捕捉がこのレベルまでの定量範囲を与えるために使用される。即ち、標的及び競争者のスポットの色密度のため、0 ないし 30 分間の時間曲線を比信号強度の外挿のために使用できる。しかし競争者のスポットは 30 分後には色密度が飽和する。

標識づけ反応中のサイクル数による定量範囲への効果

循環標識づけ反応は、増幅したDNAの直接検出に比較して分析の定量的範囲を増大した。競合PCRのためには - 標的濃度のための対数スケールを使用して - 、競争者と標的の信号の比率は比較的せまい定量範囲をもつS-字状の曲線となった (Fig. 2C 参照)。僅か数回の標識づけサイクルでも循環標識づけ分析を実施することによりS-字状曲線が得られた。然し標識づけサイクルの数を増加することにより競争者または標的オリゴヌクレオチドは各希釈シリーズの最終点でラベルで飽和されて (即ちすべてのプローブが標識されて)、その結果、より広い定量範囲をもつカーブを導き出した (図2C参照)。サイクルの数を増加することで更に、カーブの中間部で両方のオリゴヌクレオチドがラベルで飽和されるために中間部が平坦になったカーブを与えた。

水サンプル中の *Microcystis* の定量

Microcystis aeruginosa (NIVA-CYA 43 及び 228 / 1 株) の希釈シリーズ (105 - 10° セル / ml) について固相細胞濃縮及びDNA精製を含む完全定量分析を実施した。反応特異性のコントロールとして *Planktothrix agardhii* NIVA - CYA 83 / 1 (フィラメント状及びヘテロシスト含有) を使用した。*Microcystis* 培養液を純水、105セル / ml の *Planktothrix agardhii* NIVA - CYA 29 含有水、105セル / ml の *Anabaena lemmermannii* NIVA - CYA 29 (フィラメント状) と *Anabaena lemmermannii* NIVA - CYA 83 / 1 含有水及びノルウェーのアチルスヴァトネット湖から採集した水で希釈した。

テストした異なる条件によって分析の特異性または感度に重大な相違はなかった。6 × 10⁻⁹ pmol の競争者を使用してすべての場合に105セル / ml 以上ないし102セル / ml に至る定量範囲を得た (*Microcystis aeruginosa* NIVA - CYA 43 の結果を図3に示してある)。発色検出反応のための培養時間を5分から30分間に延長することにより10セル / ml まで検出することができた。

完全検出分析 (固相細胞濃縮及びDNA精製を含む) のための検出曲線は精製DNAの希釈シリーズのために得られた曲線と大体同じスロープを持ち (図2Cと3を比較)、細胞濃縮及びDNA精製方法 (サンプル調整法) がサンプルの組成によって影響されないことを示している。更に、これらの結果は固相細胞濃縮及びDNA精製方法が水サンプルから直接定量分析に使用できることを示している。

検出限界は使用した競争者の量に依存するが競争者の下限は (6 × 10⁻⁹ pmol) である。競争者の量を (6 × 10⁻⁸ pmol) に10倍に増加すると、検出限界も約10倍に増加する結果となった (図4)。然し、6 × 10⁻¹⁰ pmol へ量を下げると再現性のない結果を与えた。従って、我々は、水サンプルについての完全分析のための低い検出限界と再現可能な検出を得るためには6 × 10⁻⁹ pmol が競争者の最適である結論した。

水中のシアノバクテリア定量のための完全分析

Microcystis 属に属するシアノバクテリアは数種類の異なるタイプの毒素を生成し、ヘパトトキシックミクロシスチンが最も重大である。この毒素は肝臓を痛める急性中毒をひき起こすのみでなく低い量で長期間さらされると発癌性腫瘍の促進剤ともなる。このように、この毒素を生産する生物体の存在をスクリーンするための連続的モニターシステムが重要である。

オーストラリアの健康管理当局 (ニューサウスウェールズ、青緑色藻類調査委員会 1992) はすでに水中のシアノバクテリア細胞数に基づいて3段階の警報システムを採用している。レベル1は500 - 2000セル / ml で、このレベルで水当局は警告を出し水サンプルのモニターのための採集を増加させる。レベル2は2000 - 15000セル / ml で、この点で素性試験を行う。レベル3は15000セル / ml 以上で、もし活性炭を使用しなければ、この水は人間の消費には安全でないと宣言される。検出限界が *Microcystis* について100セル / ml であり、定量範囲は数量の3次数よりも多いのでここに記載する本発明方法は、低濃度の *Microcystis* をモニターするのにも飲料水中の潜在的な毒性のある水ブルームを検出するのにも両方に適するものである。

複合分析の開発

固相細胞濃縮とDNA精製法を含む一般的なサンプル調製と検出方法での特異性とを組み合わせることで複合検出が可能である。競合PCRを使用して、競合反応に例えばユニバーサル16SrDNAプライマーを使用して複数の標的を定量できる。続いて、異なるオリゴヌクレオチドプローブを決められたバクテリアグループのための記名配列に基づいて標識づけすることができる。そして最後にバクテリア群の各々のための信号と競争者の信号との比を比較することができる。

実施例 2

形態学/細胞学に基づく伝統的な分類とちがって、核酸配列に基づく分類は生物体の進化論や発生学を反映している。

16SrDNA-標的のプローブは、多数のシアノバクテリア群、Microcystis, Planktotothrix, Anabaena及びAphanizomenonを検出するために構成された。プローブは又、異なる系統深さの群を区別するためにも構成された。1つのプローブがNostoc群(これはAnabaena及びAphanizomenonを包含する)を検出するために構成され、そして1つのプローブはすべてのユーバクテリア(Chloroplastsを包含する)を検出するために構成された。構成されたプローブの特異性を単藻類の培養液について試験した。この情報を続いて7つの湖群中の生物体標的の比較分布及び豊富さを決定するために使用した。

生物体及びサンプル調製

ノルウェーの水研究所から得た下記の単藻類培養液を使用した: Aphanizomenon gracile NIVA-CYA 103, Anabaena lemmermannii NIVA-CYA 266/1, Nostoc sp. NIVA-CYA 124, Phormidium sp. NIVA-CYA 203, Planktotothrix prolifica NIVA-CYA 320, Microcystis aeruginosa NIVA-CYA 143, Microcystis flos-aquae NIVA-CYA 144, Pseudanabaena limnetica NIVA-CYA 276/6.

培養は媒体Z8[ノルウェー水研究所、オスロ(1990)の藻類の培養液コレクション、菌株のカatalog]中で実施した。蛍光ランプによる照明で菌株を30µEm-2S-1で暴露した。濃厚な培養液の1定分量(約107セル/mlを含有)1mlをマイクロ遠心分離器中5000rpmで10分間ペレット化し、すぐに-80で凍結した。凍結ペレットからマグネチックビーズベースのDNA, Direkt DNA分離キット(Dynal A/S, オスロ、ノルウェー)と共に、シアノバクテリアから精製するために変性したプロトコールを使用してDNAを精製した[Rudi, K., Kroken, M., Dahlberg, O. J., Daggersdal, A., Jakobsen, K. S., 及びLarsen, F. (1997) Biotechniques 22, 506-11参照]野外から採集したサンプルは直ちに、下記の細胞濃縮段階に記載したようにイソプロパノール中に保存した。その後サンプルを実験室に運搬して更に加工した。DNAは固相細胞濃縮法及び前にRudiらによって開発された(1998)DNA精製プロトコールによって精製された。固相プロトコールにおいては、0.8mlの水溶液からの細胞を、50%イソプロパノール、0.75M酢酸アンモニウム及び1U(200µl溶解緩衝液中のビーズ)Dynabeads DNA DIRECT(Dynal A/S, オスロ、ノルウェー)を含む緩衝液中でパラマグネチックビーズ(最終容積2ml)上に20分間吸着させた。マグネチックビーズと吸着されたバクテリアを2mlのマイクロ遠心分離チューブの側面にMPC-Qマグネット(Dynal A/S)によって吸引した。続いて4Mグアニジンチオシアネート-1%サルコシルを20µl加え、65で10分間培養を継続した。96%エタノールを40µl添加することによりDNAをビーズ上に沈澱させ続いて室温で5分間培養を続けた。最後にDNAとビーズの複合体を70%エタノール500mlで2回、各洗滌の間にマグネットを使用して洗滌した。残存エタノールを除くために複合体を65で5分間乾燥した。ビーズとDNAの全複合体を次に増幅反応に使用

10

20

30

40

50

5]及び0.15M NaCl)溶液50mlで2回洗滌した。各洗滌は室温で短い渦動によって実施した。

抗体検出のために膜ストリップを20mlの液(0.10M トリス-HCl[pH 7.5], 0.15M NaCl及び0.5%スキムミルクを含む)で1時間ブロックし、1/1000の抗蛍光-HRPコンジュゲート(NEN)を含む同じ緩衝液20ml中で更に1時間培養した。膜ストリップを短い渦動によって3回、50mlの0.10M トリス-HCl[pH 7.5]と0.15M NaClを含む溶液で洗滌した。発色反応はHRPの発色検出のためのRENAISSANCE 4CNP Plusを用いて5分間、製造者の指示に従って行った(NEN)。比信号強度をアグファスナップスキャナー600を用いて膜をスキャンすることにより測定し、ゲルプロアナライザーソフトウェア(Media Cybernetics, Silver Spring, Md)を使用して分析した。

10

純粋培養液についてのプローブ標識分析の確認

主たる系統を代表する8種類の異なるシアノバクテリア菌株にプローブ標識分析を適用した。プローブの特異性の追加コントロールとしてグループ外の*Chlorobium* sp.も含ませた。単藻類培養液から精製した約5%のDNAを一般的なプライマーペアCC-CDと共に50µl PCR反応容積で増幅した。増幅反応を確認するために標識づけの前に生成物を1.5%エチジウムブロマイドで着色したアガロースで目視できるようにした。すべてのサンプルを均一に増幅し、目に見える追加バンドなしに約600bpで強いバンドを生成した。

プローブ標識分析に関連して、試験した菌株について一般的プローブpUNは比較的均一に標識された(但し*Pseudanabaena* *Pimnetica* *NIVA-CYA 276/6*を例外として)(図5A参照)。このプローブはグループ外の*Chlorobium* sp.にも標識された。プローブpPL2を除いて、異なるシアノバクテリア特異プローブがその系統分類上の位置から期待されるような信号を与えた(図5B及びC参照)。pPL2の低い特異性は、使用したハイブリッド形成温度がこのプローブに最適ではなかったという事実によるものである。然し一般的に分析中でノイズに対して高い信号比であった。例えば、*M. aeruginosa*株の*NIVA-CYA 143*と*144*の間には唯1つの塩基ペアの差異があるのみである。ノイズに対する信号灯80をもって*NIVA-CYA 143*と*144*とをプローブpM12が区別した。蛍光標識されたジデオキシヌクレオチドの挿入効率は配列に依存する。プローブと標的のハイブリッド形成効率によりプローブの標識づけにも差がある。プローブ領域を攻撃する配列に加えて塩基の組成や融点がプローブのハイブリッド形成に影響を与える。この仕事中に開発されたプローブのための一般的プローブpUNの標識づけに関して決定されたように、異なる標識づけ効率は1.0ないし5の範囲である。それぞれのプローブのための効率は下記の通りであった:pKO-1.7、pM13-2.2、pM12-1.4、pDK-1.9、pPL1-4.0、pAL-1.6、pAP-3.3、pNOS-4.3、pPL2-4.9

20

30

選ばれた7地域からのシアノバクテリアの分布

異なる7地域から採取した水サンプル、中位のレベルの植物生体量（中栄養分）をもつ水から高い生体量含有（良好栄養分）水までの範囲での水サンプルについてテストした。

各採取場所から3個のサンプルを採取した。3個のサンプルすべてについて並行して上記の手順で細胞濃縮とDNA精製を実施した。リボソマルDNAを90%、9%及び1%精製原料から増幅した。増幅反応は、90%の精製DNAのためにはØstensenjøvatnet v オスロ、Gjersjøen及びÅrungenについて得られた。9%の原料のためにはランゲンからのサンプルを除くすべてのサンプルを増幅した。1%のためには、すべてのサンプルから増幅反応が得られた。

調査した各々の地域について（3個の採集されたサンプルに基づいて）プローブ標識づけのための平均信号強度及び標準偏差を計算した。異なるプローブは等しい効率で標識されるのではないからこの価は、純粋培養液の分析から得られた比標識効率に基づいて調整した（図6）。この図中の棒は、サンプル中の決まった遺伝子タイプの大体の比組成を示している。補正のために使用した培養液のあるものには他給栄養のバクテリアの未知の成分があるのでそれぞれの生物体の定量は過大評価であるかもしれない。

プローブ標識分析の更なる評価として、サンプルを顕微鏡によってしらべた。従って、各地域の主要な菌株については、スカルベルク等によって与えられた基準に従って、形態学及び細胞学上の特徴に基づいて決定した[Skulberg, O. M., Charmichael, W. W., Codd, G. A. 及びSkulberg R1 (1993) 水産物及び飲料水中の藻類毒素、145-164頁、Ed. Falconer I. R., ロンドンアカデミックプレス社]。遺伝子の、そして顕微鏡的な分析によって決められたように、一般にサンプル中の生物体群の間には良好な相関関係があった。然し、遺伝子分析で使用した16SrDNA遺伝子は、菌株レベルで区別するための十分な配列変形をもっていない。更に、我々はプローブ標識分析によって、形態学的に定義されたAnabaena属とAphanizomenon属を区別することができなかった。この理由は、識別のために使用した2つの位置が種の指定に従っていないからである。これは各々の位置について数個の独立の代替があったこと、2個のプローブの間に16SrDNA中で再組み合わせ事件があったこと、または種の定義が系統発生的に適合していなかったことなどの理由によるものであろう。分類体系的なプローブpNOSは一方でAnabaena及びAphanizomenonを含むNostoc群について特異的であると思われた

Planktothrix特異プローブpPL1はGjersøen湖のためのプローブ標識分析で比較的強い信号を与えた。他方、この湖からの水の顕微鏡検査よってはこの生物体を検出できなかった。この差は、顕微鏡分析のためのサンプルは分析の前に2µmのプランクトンネットを通して濃縮されたが遺伝子分析のためにはサンプルを直接分析したという事実によって説明できるであろう。更にシアノバクテリアは湖中に均一に分布していないのでこれもプローブ標識試験と顕微鏡試験との相違を説明できるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】 標識づけ定量分析を示す概略説明図である。

【図2】 (A) ミクロシスチスDNAの希釈シリーズについて競合PCRから得られたゲルの結果を示す。

(B) 上記の標識分析の結果を示す。

(C) 全信号強度に関して、標的の信号強度を示すグラフである。

【図3】 全信号強度に関して標的スポットの信号強度の百分率を示すグラフである。

【図4】 (A) 実施例に記載の標識分析の結果を示す。

(B) 全信号強度に対する標的スポットの信号強度の百分率を示すグラフである。

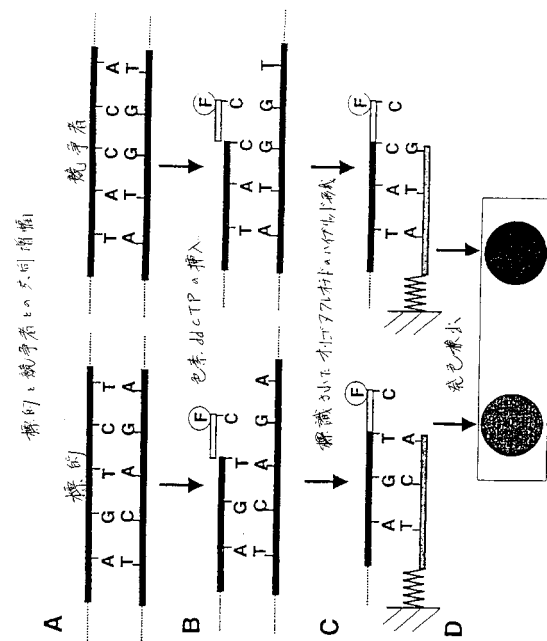
【図5】 (A) プローブをつけた膜片を示す。

(B) 各プローブの信号強度を示す。

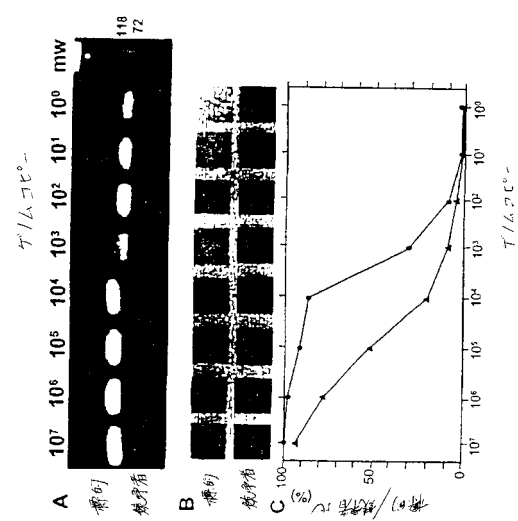
(C) 種々のプローブの系統分類上の位置を示す。

【図6】 ノルウェーの7ヶ所の湖の水のプロフィール分析を示す。

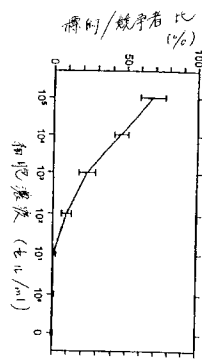
【図1】



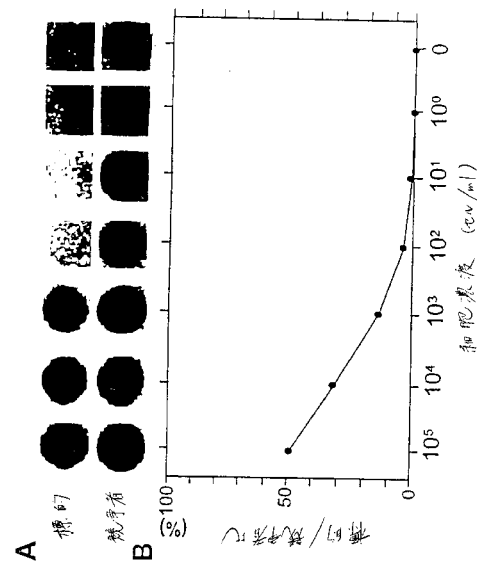
【図2】



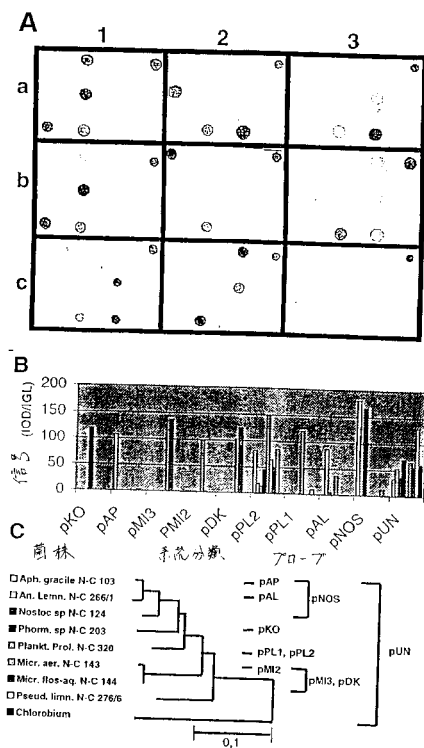
【図3】



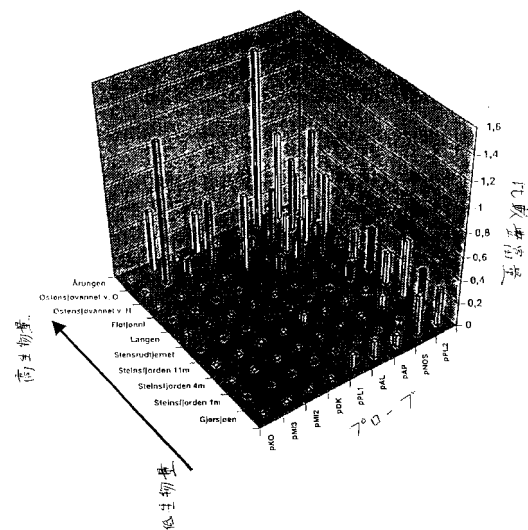
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

- (56)参考文献 Genetic analysis, techniques and applications. 1992, Vol.9, No.4, p.107-112
Clinical chemistry. 1996, Vol.42, No.9, p.1391-1397
Journal of virological methods. 1994, Vol.47, No.1-2, p.1-13
Applied and environmental microbiology. 1998 Jul;64(7):2639-43Appl Environ Microbiol.
1998 Jul, Vol.64, No.7, p.2639-2643
社団法人 日本生化学会 編, 新生物化学実験講座2 核酸III - 組換えDNA技術 -, 東京化学同人, 1992年, 第1版, p. 323 - 324
Molecular biotechnology. 1994, Vol.1, No.2, p.117-124
Nucleic acids research. 1992, Vol.20, No.10, p.2471-2483

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12Q 1/68
C12N 15/00-15/90
PubMed
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq