(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年10月28日(28.10.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/215428 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01)　*C12Q 1/6883* (2018.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2021/015991

(22) 国際出願日：　2021年4月20日(20.04.2021)

(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 2020-076369　2020年4月22日(22.04.2020)　JP

(71) 出願人: 日華化学株式会社(**NICCA CHEMICAL CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒9108670 福井県福井市文京４丁目２３番１号 Fukui (JP). 国立大学法人福井大学(**UNIVERSITY OF FUKUI**) [JP/JP]; 〒9108507 福井県福井市文京３丁目９番１号 Fukui (JP).

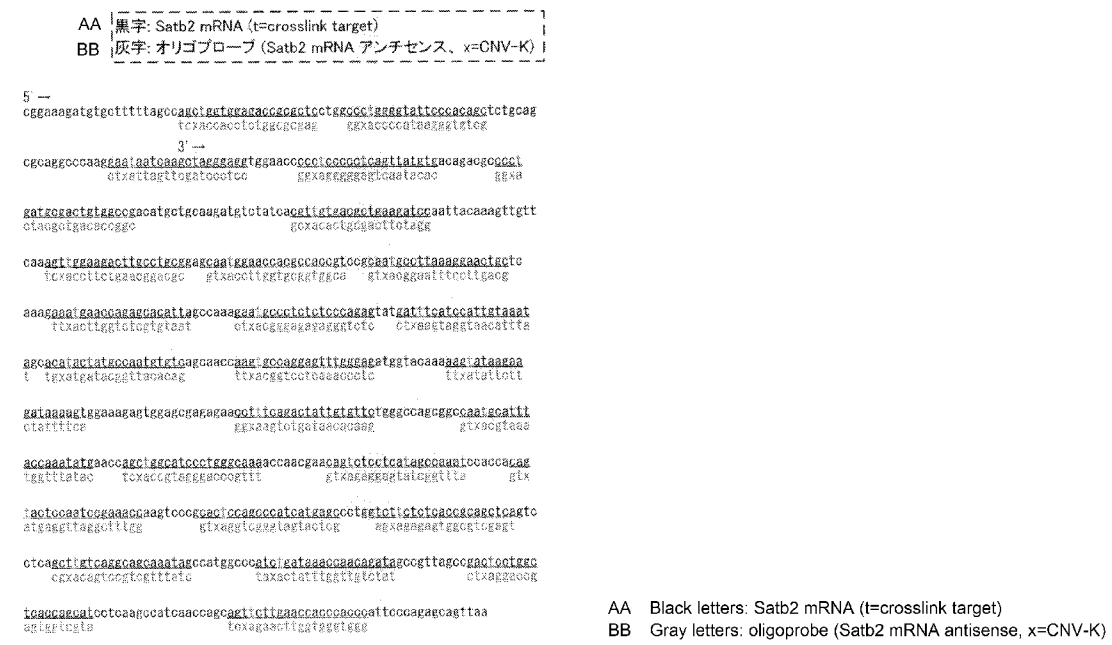
(72) 発明者: 岡部 綾子(**OKABE Ayako**); 〒9108670 福井県福井市文京４丁目２３番１号 日華化学株式会社内 Fukui (JP). 中社 彩香(**NAKASHA Ayaka**); 〒9108670 福井県福井市文京４丁目２３番１号 日華化学株式会社内 Fukui (JP). 法木 左近(**NORIKI Sakon**); 〒9108507 福井県福井市文京３丁目９番１号 国立大学法人福井大学内 Fukui (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 快友国際特許事務所(**KAI-U PATENT LAW FIRM**); 〒4516009 愛知県名古屋市西区牛島町６番１号 名古屋ルーセントタワー９階 Aichi (JP).

(54) **Title:** NUCLEIC ACID DETECTION METHOD AND OLIGONUCLEOTIDE PROBE

(54) 発明の名称： 核酸の検出方法及びオリゴヌクレオチドプローブ

[図1]



AA　Black letters: Satb2 mRNA (t=crosslink target)
BB　Gray letters: oligoprobe (Satb2 mRNA antisense, x=CNV-K)

(57) **Abstract:** Provided is a method for detecting a target sequence, said method comprising: a hybridization step for contacting an oligonucleotide probe, which has a sequence hybridizable with a target sequence of a nucleic acid present in a test sample and, in the hybridizable sequence, at least one covalent bonding group crosslinkable by light irradiation with a target base in the target sequence when specifically hybridized with the target sequence, with the nucleic acid to form an authentic hybridization product; a light irradiation step for, after the hybridization step, irradiating the test

WO 2021/215428 A1

[続葉有]

(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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

sample with light and thus crosslinking between the covalent bonding group and the target sequence in the authentic hybridization product to form an authentic hybridization product having a crosslinked structure; and a denaturation step for, after the light irradiation step, imparting to the test sample denaturation conditions, which allow the maintenance of the crosslinked authentic hybridization product and the dissociation of a non-specific hybridization product, to thereby separate the oligonucleotide probe derived from the non-specific hybridization product.

(57) 要約:標的配列の検出方法として、被験試料中に存在する核酸の標的配列に対するハイブリダイズ用配列と、前記ハイブリダイズ用配列中に前記標的配列と特異的にハイブリダイズしたとき前記標的配列における標的塩基と光照射により架橋可能である少なくとも一つの共有結合性基と、を有するオリゴヌクレオチドプローブと、前記核酸と、を接触させて真正ハイブリダイズ産物を形成するハイブリダイゼーション工程と、前記ハイブリダイゼーション工程後の被験試料に対して光照射して、前記真正ハイブリダイズ産物における共有結合性基と標的配列との間を架橋して架橋構造を有する真正ハイブリダイズ産物を形成する光照射工程と、前記真正架橋ハイブリダイズ産物を維持し非特異的ハイブリダイズ産物を解離させることができる変性条件を光照射工程後の被験試料に付与して、非特異的ハイブリダイズ産物に由来する前記オリゴヌクレオチドプローブを分離する変性工程と、を備える、方法を提供する。

明　細　書

発明の名称 ： 核酸の検出方法及びオリゴヌクレオチドプローブ

技術分野

[0001] （関連出願の相互参照）

本出願は、２０２０年４月２２日付けで出願された日本国特許出願２０２０－７６３６９に基づく優先権を主張するものであり、ここに、本明細書の一部を構成するものとして、この日本国特許出願の内容を援用する。

本明細書は、核酸の検出方法及びオリゴヌクレオチドプローブに関する。

背景技術

[0002] オリゴヌクレオチドプローブは、遺伝子の変異や増幅が観察される疾患における有用な診断ツールとなってきている。例えば、細胞や組織などの検体から抽出されたＤＮＡやｍＲＮＡ等とのハイブリダイゼーションは、こうしたＤＮＡ等の検出によって診断が可能となる感染症や腫瘍等の診断において有用である（特許文献１）。

[0003] ハイブリダイゼーションは、有用な方法ではあるが、依然として種々の問題がある。例えば、ハイブリダイゼーション効率を十分に高くするために、低温でのハイブリダイゼーションを行うとハイブリダイゼーションの特異性が低下してしまう。一方、より高温でのハイブリダイゼーションを行えば特異性は向上するが感度は低下することがある。一つの解決策として、Ｔｍの高いプローブを設計して、ハイブリダイゼーション効率の確保とハイブリダイゼーション特異性との両立を図ろうとしているのが現状である。また、特異性を向上させるには、ハイブリダイゼーション後に、高ストリンジェンシーな条件で十分な洗浄を行うことも一つの方法である。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開２０１５－１４２５７４号公報

発明の概要

[0005] しかしながら、Ｔｍの高温化のためにプローブ長を長くすることにより、標的配列に対する特異性が低下するという問題が生じてしまう。また、高ストリンジェンシー条件での洗浄を用いたとしても、非特異的なハイブリダイズ産物が残存してしまうことや特異的なハイブリダイズ産物を洗浄してしまったりするなど、疾患の検査の正確度を著しく低下させるおそれがあった。一方で、特異的なハイブリダイズ産物のみを残存させるようなストリンジェンシー条件を設定することは容易ではない。またTmの高温化のためペプチド核酸（PNA）が開発されているが、ペプチド核酸を用いた場合でも、高ストリンジェンシーな条件での洗浄は困難であった。

[0006] 以上のことから、プローブのＴｍ高温化によるハイブリダイズ時の低ストリンジェンシー及び洗浄時の高ストリンジェンシーの組み合わせによって、検査の正確度を向上させること及び再現性を確保することは困難であった。

[0007] ハイブリダイゼーションによる検査、例えばin situ ハイブリダイゼーション等において、従来のストリンジェンシー調節に大きく依存することなく、正確度及び再現性に優れる検査を実現する核酸の検出方法の確立が求められる。

[0008] 本明細書は、正確度及び再現性の高い診断を実現する核酸の検出方法を提供する。また、かかる検出方法に用いるオリゴヌクレオチドプローブを提供する。

[0009] 本発明者らは、光架橋可能な官能基をオリゴヌクレオチドプローブ内に備え、ハイブリダイゼーション工程後に光架橋により架橋したハイブリダイズ産物を取得し、その後、被験試料にハイブリダイズ産物の変性条件を付与することで、上記課題を解決できるという知見を得た。こうした知見に基づいて、本明細書は以下の手段を提供する。

[0010] ［１］核酸の検出方法であって、

被験試料中に存在する核酸の標的配列に対するハイブリダイズ用配列と、前記ハイブリダイズ用配列中に前記標的配列と特異的にハイブリダイズしたとき前記標的配列における標的塩基と光照射により架橋可能である少なくと

も一つの共有結合性基と、を有するオリゴヌクレオチドプローブと、前記核酸と、を接触させて真正ハイブリダイズ産物を形成するハイブリダイゼーション工程と、

前記ハイブリダイゼーション工程後の被験試料に対して光照射して、前記真正ハイブリダイズ産物における共有結合性基と標的配列との間を架橋して架橋構造を有する真正ハイブリダイズ産物を形成する光照射工程と、

前記真正架橋ハイブリダイズ産物を維持し非特異的ハイブリダイズ産物を解離させることができる変性条件を光照射工程後の被験試料に付与して、非特異的ハイブリダイズ産物に由来する前記オリゴヌクレオチドプローブを分離する変性工程と、

を備える、方法。

［２］前記変性工程は、さらに、真正ハイブリダイズ産物のハイブリダイゼーションの解離も促進して、前記真正ハイブリダイズ産物に由来する前記オリゴヌクレオチドプローブと前記真正架橋ハイブリダイズ産物とを分離することを含む工程である、［１］に記載の方法。

［３］前記ハイブリダイゼーション工程は、in situハイブリダイゼーションを行う工程である、［１］又は［２］に記載の方法。

［４］前記ハイブリダイゼーション工程は、培養細胞又は癌患者等から採取された組織切片内に対して前記オリゴヌクレオチドプローブを供給して実施する工程である、［３］に記載の方法。

［５］前記変性工程は、前記ハイブリダイゼーション工程後の被験試料に対して６０体積％を超える濃度でのホルムアミドの水系媒体混液による変性を含む、［１］～［４］のいずれかに記載の方法。

［６］前記変性工程は、室温以上の液体を用いる変性を含む、［１］～［５］のいずれかに記載の方法。

［７］前記変性工程は、ホルムアミド以外の変性剤を含む変性液による変性を含む、［１］～［６］のいずれかに記載の方法。

［８］ホルムアミド以外の変性剤がテトラメチルアンモニウムクロライドで

ある、［７］に記載の方法。

［９］前記光照射工程は、極大波長３４０～３８０ｎｍの光を照射する工程である、［１］～［８］のいずれかに記載の方法。

［１０］前記ハイブリダイズ用配列が、５塩基以上２００塩基以下である、［１］～［９］のいずれかに記載の方法。

［１１］前記標的配列は、ヒトＨＥＲ２タンパク質ｍＲＮＡにおけるＲＮＡ配列である、［１］～［１０］のいずれかに記載の方法。

［１２］前記標的配列は、Ｓａｔｂ２タンパク質ｍＲＮＡにおけるＲＮＡ配列である、［１］～［１０］のいずれかに記載の方法。

［１３］前記標的配列は、ＥＢＥＲ小ＲＮＡにおけるＲＮＡ配列である、［１］～［１０］のいずれかに記載の方法。

［１４］前記標的配列は、２８ＳｒＲＮＡにおけるＲＮＡ配列である、［１］～［１０］のいずれかに記載の方法。

［１５］前記変性工程は、前記ハイブリダイゼーション工程後の被験試料に対して８０体積％のホルムアミドの水系媒体混液による変性を含む、［１］～［１４］のいずれかに記載の方法。

［１６］核酸を検出するためのオリゴヌクレオチドプローブであって、

前記核酸の標的配列とハイブリダイズ可能なハイブリダイズ用配列と、前記ハイブリダイズ用配列中に前記標的配列と特異的にハイブリダイズしたとき前記標的配列における標的塩基と光照射により架橋可能である少なくとも一つの共有結合性基と、を備え、

前記ハイブリダイズ用配列及び少なくとも一つの共有結合性基は、前記ハイブリダイズ用配列と前記標的配列とがハイブリダイズした真正ハイブリダイズ産物であって前記光照射により架橋した真正架橋ハイブリダイズ産物が維持されるが、非特異的ハイブリダイズ産物ハイブリダイズ産物を選択的に除去可能に構成されている、プローブ。

［１７］標識オリゴヌクレオチドの検出キットであって、

［１６］に記載のオリゴヌクレオチドプローブと、

６０体積％を超える濃度のホルムアミドの水系媒体混液と同等以上の変性剤と、

を備える、キット。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]Ｓａｔｂ２タンパク質ｍＲＮＡに対するプローブの設計を示す図である。

[図2]マウスから採取した大脳切片におけるＳａｔｂ２タンパク質ｍＲＮＡＣＩＳＨを示す図であり、（Ａ）は、共有結合性基を有するプローブによる共有結合を伴うハイブリダイゼーション（８０体積％ホルムアミド水溶液で変性・洗浄後）を示し、（Ｂ）は、共有結合性基を有するプローブによる共有結合を伴うハイブリダイゼーション（８０体積％ホルムアミドＴＢＳ溶液で変性・洗浄後）を示す。

[図3]ＨＥＲ２タンパク質ｍＲＮＡ ＣＩＳＨによるハイブリダイゼーションを示す図であり、（Ａ）は、ＨＥＲ２陽性細胞中の共有結合性基を有するプローブによる共有結合を伴うハイブリダイゼーション（８０体積％ホルムアミド水溶液で変性・洗浄後）を示し、（Ｂ）は、ＨＥＲ２陰性細胞での共有結合性基を有するプローブによる共有結合を伴うハイブリダイゼーション（８０体積％ホルムアミド水溶液で変性・洗浄後）を示す。

[図4]ＥＢＥＲ（ＥＢウイルス産生小ＲＮＡ）ＣＩＳＨによるハイブリダイゼーションを示す図であり、（Ａ）は、共有結合性基を有するプローブによる共有結合を伴うハイブリダイゼーション（８０体積％２×ＳＳＣ溶液、５５℃での変性・洗浄後）を示し、（Ｂ）は、、共有結合性基を有しないプローブによる共有結合を伴うハイブリダイゼーション（８０体積％２×ＳＳＣ溶液、５５℃での変性・洗浄後）を示す。

[図5]ＥＢＥＲ（ＥＢウイルス産生小ＲＮＡ）ＣＩＳＨによるハイブリダイゼーションを示す図であり、（Ａ）は、共有結合性基を備えるプローブによる共有結合を伴う室温ハイブリダイゼーション（５０体積％ホルムアミド２×ＳＳＣ（室温）による変性・洗浄後）を示し、（Ｂ）は、市販ＰＮＡプロー

ブによる５５℃ハイブリダイゼーション（ストリンジェントバッファ、５５℃による変性・洗浄後）を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 本明細書の開示は、核酸の検出方法及びオリゴヌクレオチドプローブに関する。本明細書に開示される核酸の検出方法（以下、単に、本検出方法ともいう。）によれば、真正架橋ハイブリダイズ産物が、高い特異性で不可逆的に標的配列に結合されている。したがって、真正架橋ハイブリダイズ産物を維持し非特異的ハイブリダイズ産物を解離させることができる変性条件であれば、容易に真正架橋ハイブリダイズ産物を非特異的ハイブリダイズ産物から分離し、検出することができる。すなわち、上記変性条件によれば、ストリンジェンシー強度に大きく依存することなく、優れた正確度及び再現性で、標的配列を備える核酸を検出できる。結果として、高い感度で真陽性を検出し、高い特異度で真陰性を検出できる。

[0013] 以下では、本明細書の開示の代表的かつ非限定的な具体例について、適宜図面を参照して詳細に説明する。この詳細な説明は、本開示の好ましい例を実施するための詳細を当業者に示すことを単純に意図しており、本開示の範囲を限定することを意図したものではない。また、以下に開示される追加的な特徴ならびに発明は、さらに改善された核酸の検出方法を提供するために、他の特徴や開示とは別に、又は共に用いることができる。

[0014] また、以下の詳細な説明で開示される特徴や工程の組み合わせは、最も広い意味において本開示を実施する際に必須のものではなく、特に本開示の代表的な具体例を説明するためにのみ記載されるものである。さらに、上記及び下記の代表的な具体例の様々な特徴、ならびに、独立及び従属クレームに記載されるものの様々な特徴は、本開示の追加的かつ有用な実施形態を提供するにあたって、ここに記載される具体例のとおりに、あるいは列挙された順番のとおりに組合せなければならないものではない。

[0015] 本明細書及び／又はクレームに記載された全ての特徴は、実施例及び／又はクレームに記載された特徴の構成とは別に、出願当初の開示ならびにクレ

ームされた特定事項に対する限定として、個別に、かつ互いに独立して開示されることを意図するものである。さらに、全ての数値範囲及びグループ又は集団に関する記載は、出願当初の開示ならびにクレームされた特定事項に対する限定として、それらの中間の構成を開示する意図を持ってなされている。

[0016] 以下、本明細書に開示される核酸の検出方法及びオリゴヌクレオチドプローブ等について詳細に説明する。

[0017] なお、本明細書において、被験試料とは、特に限定されないで、標的とする核酸の検出が要請される試料であればよい。したがって、被験試料は、検出しようとする核酸が含有される可能性のある試料であればよく、天然ないし生体から採取したままの試料のほか、こうした試料につき、試料中のＤＮＡないしＲＮＡを抽出した試料及びこうした試料中のＤＮＡ又はＲＮＡを、公知の核酸増幅方法等によりその含有量を増大させたり逆転写させたりした試料が含まれる。被験試料は、例えば、ヒトや家畜などの動物から人為的に採取され又は自然に分離された、血液、尿などの各種の生体液体試料、細胞試料及び組織試料並びにこれらについて核酸の抽出・増幅・逆転写等された加工試料など、いわゆる医療上や衛生上の検体試料が挙げられる。また、被験試料には、植物又はその他の生物から人為的に採取された又は自然に分離された種々の部分又は形態の生体試料又は加工試料が含まれる。さらに、被験試料には、非医療目的であって、核酸を含む可能性のある試料が含まれる。

[0018] また、本明細書において、核酸とは、生体が保持するＤＮＡ及びＲＮＡである天然核酸のほか、本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドプローブとの架橋結合性を有している限りこれらの構成部分に対する修飾を含む修飾ＤＮＡ及びＲＮＡを含む。また、ＤＮＡとしては、生体が保持しうる天然由来のＤＮＡ又は外部から人工的に導入されたＤＮＡであれば特に限定されないが、ゲノムやプラスミドなどのベクター上におけるＤＮＡが含まれる。また、ＲＮＡとしては、生体が保持しうる天然由来のＲＮＡ又は外部から導入さ

れたＲＮＡであれば特に限定されないが、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｓｉＲＮＡやｍｉＲＮＡなどのｎｃＲＮＡ、リボザイム及び二本鎖ＲＮＡ等が含まれる。

[0019] 例えば、標的配列としては、特に限定しないで、公知の核酸の検出方法の対象となる核酸における標的配列が含まれる。標的配列としては、例えば、その生物における特定の遺伝子に関連する核酸及びその他の配列上の特徴、その生物個体を特徴付ける遺伝子に関連する核酸上の変異及びその他の配列上の特徴、その動物や植物における疾患や病原体を特徴付ける遺伝子に関連する核酸、当該核酸上の変異、その他の配列上の特徴等の少なくとも一部の配列である。

[0020]（核酸の検出方法）

本明細書に開示される核酸の検出方法は、被験試料中に存在する核酸の標的配列に対するハイブリダイズ用配列と、前記ハイブリダイズ用配列中に前記標的配列と特異的にハイブリダイズしたとき前記標的配列における標的塩基と光照射により架橋可能である少なくとも一つの共有結合性基と、を有するオリゴヌクレオチドプローブを用いる。以下、オリゴヌクレオチドプローブにつき説明し、その後、本検出方法について説明する。

[0021]（オリゴヌクレオチドプローブ）

本明細書に開示されるオリゴヌクレオチドプローブ（以下、本プローブともいう。）は、天然核酸又は修飾核酸として知られる骨格を有する一本鎖核酸として準備される。デオキシリボース又はリボース以外の核酸骨格としては、例えば、Ｄ－トレオニノールなどの公知の骨格が挙げられる。本プローブは、例えば、修飾されていてもよいデオキシリボース及び／又はリボースがリン酸ジエステル結合又はその他の類似する連結基による結合によって連結された骨格を有している。本プローブは、また、塩基としては、典型的には、後述する共有結合性基を除いては、被験試料中のＤＮＡとハイブリダイズ可能な天然ＤＮＡを構成する塩基を備えている。

[0022] 本プローブは、公知のオリゴヌクレオチドプローブと同様、標的配列に対

するハイブリダイズ用配列を有している。ここで、標的配列の長さは、特に限定するものではなく、用途や標的とする核酸の種類によっても異なるが、例えば、１０ｍｅｒ以上３００ｍｅｒ以下程度であり、また例えば、１０ｍｅｒ以上３００ｍｅｒ以下、また例えば、１０ｍｅｒ以上２００ｍｅｒ以下、また例えば、１０ｍｅｒ以上１００ｍｅｒ以下であり、また例えば、１０ｍｅｒ以上５０ｍｅｒ以下であり、また例えば、５ｍｅｒ以上５０ｍｅｒ以下である。また例えば、２０ｍｅｒ以上２００ｍｅｒ以下であり、また例えば、２０ｍｅｒ以上１００ｍｅｒ以下であり、また例えば、２０ｍｅｒ以上８０ｍｅｒ以下であり、また例えば、２０ｍｅｒ以上７０ｍｅｒであり、また例えば、２０ｍｅｒ以上５０ｍｅｒ以下である。本検出方法によれば、ハイブリダイズ用配列の長さが１００ｍｅｒ又は５０ｍｅｒ以下であっても、完全マッチした場合においてのみ真正架橋ハイブリダイズ産物が形成され、後述する変性工程によって真正架橋ハイブリダイズ産物以外は効果的に除去されるため、結果として、高いＳ／Ｎ比を確保することができる。

[0023] ハイブリダイズ用配列は、標的配列に対して特異的にハイブリダイズ可能な程度な相補性を有している。後段で説明するように、本プローブは、ハイブリダイズ用配列中の塩基を置換するように少なくとも１個の共有結合性基を備えるため、当該共有結合性基の位置に対応する少なくとも１個の塩基を除く塩基配列は、標的配列に対して例えば、９０％以上の同一性、また例えば、９５％以上の同一性、また例えば、９８％以上の同一性、また例えば、９９％以上の同一性、また例えば、１００％の同一性を備える。なお、同一性については後段で説明する。

[0024] なお、当業者であれば、塩基長ほか、ハイブリダイズ時のＴｍを適宜考慮して、標的配列及びハイブリダイズ用配列を設定することができる。

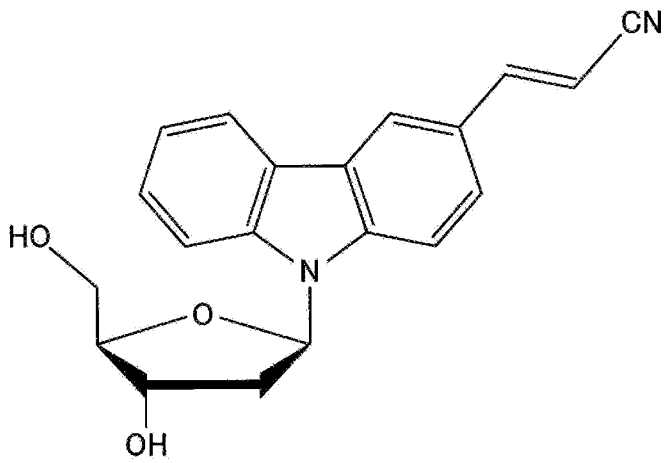
[0025] 本プローブは、ハイブリダイズ用配列において、ハイブリダイズ用配列中に前記標的配列と特異的にハイブリダイズしたとき前記標的配列における標的塩基と光照射により架橋可能である少なくとも一つの共有結合性基を備えることができる。かかる共有結合性基は、塩基配列における骨格、例えば、

デオキシリボース又はリボースに対して結合して備えられている。

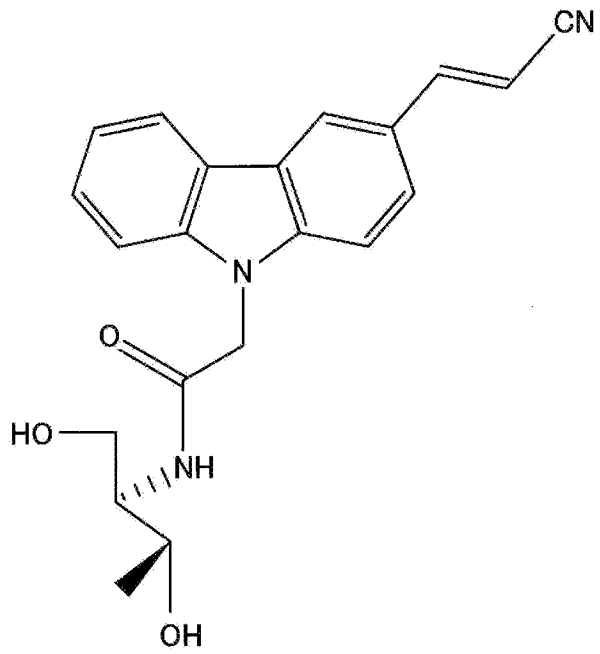
[0026] 共有結合性基は、特に限定するものではないが、例えば、特開２０１６－１４５２２９号公報、特開２０１７－２１０４４８号公報及び特開２０１９－２６５６９号公報等に開示される公知の光架橋性の架橋性官能基が挙げられる。これらはいずれも光照射により、当該共有結合性基と対合する標的配列中の塩基の３’側に隣接する塩基位置（＋１位：対合塩基から塩基一個分３’側にずれた位置）のピリミジン塩基のピリミジン環との間で架橋構造を形成する。

[0027] 例えば、特開２０１６－１４５２９９号公報に開示される共有結合性基を備えるデオキシリボヌクレオシドを以下に示す。本プローブが、ＤＮＡプローブの場合、かかるヌクレオシドを、（１’－５’）－リン酸ジエステル結合で隣接するヌクレオシドで結合されて備えている。

[0028] [化1]



[化2]



[0029] 架橋構造を形成するピリミジン塩基は、特に限定しないが、ＤＮＡであれば、チミン（Ｔ）又はシトシン（Ｃ）であり、ＲＮＡであれば、シトシン（Ｃ）又はウラシル（Ｕ）である。なお、これらの塩基は、共有結合性基と光架橋が可能な限り修飾されていてもよく、５－メチルシトシン、５－ヒドロキシメチルシトシン等が挙げられる。

[0030] 共有結合性基は、標的配列中の例えば、標的配列中のピリミジン塩基の５’側に隣接する塩基位置（－１位）の塩基に対合する任意の塩基を置換するようにハイブリダイズ用配列に備えられる。換言すると、共有結合性基は、ハイブリダイズ用配列において、プリン塩基（アデニン（Ａ）又はグアニン（Ｇ））の３’側に隣接する塩基位置（＋１位）の任意の塩基を置換するように備えられる。また、共有結合性基は、標的配列中のピリミジン塩基の３’側に隣接する塩基位置（＋１位）の塩基に対合する任意の塩基を置換するようにハイブリダイズ用配列に備えられる。換言すると、共有結合性基は、ハイブリダイズ用配列において、プリン塩基（アデニン（Ａ）又はグアニン（Ｇ））の５’側に隣接する塩基位置（-1位）の任意の塩基を置換するように備えられる。

[0031] 共有結合性基は、例えば、デオキシリボース、リボース及びＤ－トレオニノールなどの骨格において塩基が結合される部分に、塩基を代替して備えられる。

[0032] 当業者であれば、ＤＮＡやＲＮＡ中に共有結合性基を備える本プローブを、特開２０１６－１４５２２９号公報、特開２０１７－２１０４４８号公報及び特開２０１９－２６５６９号公報等において記載されており、これらの公報及び本願出願時のＤＮＡ等の合成技術に関する技術常識及び周知技術に基づいて容易に合成することができる。

[0033] 本プローブにおける共有結合性基の個数は、特に限定するものではないが、ハイブリダイズ用配列の長さによっても、また、標識要素の種類や感度によっても異なる。共有結合性基は、例えば、ハイブリダイズ用配列が１０～１００ｍｅｒ程度のとき、例えば、１個以上１０個以下であり、また例えば、１個以上６個以下であり、また例えば、１個以上５個以下であり、また例えば、１個以上４個以下であり、また例えば、１個以上３個以下であり、また例えば、１個以上２個以下である。一つのプローブ中に２個以上の共有結合性基が連続する部位を備える場合であって、さらに追加の共有結合性基を備える場合、連続する共有結合性基から少なくとも１０塩基以上離間して追加の共有結合性基を備えることが好ましい。

[0034] また、本プローブにおける共有結合性基の位置は、特に限定するものではないが、例えば、５’末端側及び／又は３’末端側であり、本プローブの標的配列に対するハイブリダイゼーションをできるだけ抑制しない位置とすることができる。典型的には、５’末端側領域又は３’末端側領域である。ここで、５’末端側領域とは、例えば、５’末端の端末からハイブリダイズ用配列の全塩基数の２０％以内の数の塩基内であり、３’末端側領域とは、例えば、3’末端の端末からハイブリダイズ用配列の全塩基数の２０％以内の数の塩基内である。また、共有結合性基は、例えば、５’末端側であれば、末端より内側にあればよく、３’末端側であれば、少なくとも１個以上内側に存在していればよい。

[0035] 一方、共有結合性基の位置は、例えば、ハイブリダイズ用配列が１０ｍｅｒ以上１００ｍｅｒ程度であれば、そのハイブリダイズ用配列の中央部分、すなわち、本プローブの５’末端及び３’末端からそれぞれハイブリダイズ用配列の塩基長の２５％を超える範囲内にあってもよい。ハイブリダイズ用配列が一定の長さ以上であれば、ハイブリダイズ用配列の中央部分にあっても、標的配列との特異的ハイブリダイゼーションを阻害しないで真正ハイブリダイズ産物及び真正架橋ハイブリダイズ産物を形成できる。

[0036] 本プローブは、例えば、長い標的配列、典型的には数百ｍｅｒ～数千ｍｅｒを超える標的配列に対して、１０～１００ｍｅｒ程度のハイブリダイズ用配列を備える複数（例えば数本～数十本程度）のプローブセットとして準備してもよい。長いプローブは、配列特異性は高いが、概してＳ／Ｎ比が悪いが、１０～１００ｍｅｒの本プローブは、配列特異性は低いものの、完全マッチのときに光架橋し、その後、変性により、非特異的ハイブリダイズ産物や未架橋真性ハイブリダイズ産物を除去できるため、複数のプローブで長い標的配列を検出するようにしても、高いＳ／Ｎ比を確保でき、偽陽性の検出結果を回避又は十分に抑制できる。加えて、１０～１００ｍｅｒ程度のプローブは、長いプローブに比較すると合成コストも低く、かつ細胞への浸透性も良好である。

[0037] 本プローブは、必要に応じて、標識要素を備えることができる。標識要素は、それ自体で又は励起等によってシグナルを発生することができるシグナル発生要素であるもののほか、さらに、それ自体はシグナルを発生しないが、シグナル発生要素と結合可能なシグナル発生要素と結合可能な結合要素であってもよい。こうしたシグナル発生要素及び結合要素は、本技術分野において当業者において周知であり、必要に応じて当業者は、標識要素を選択し、本プローブに付与することができる。

[0038] （ハイブリダイゼーション工程）

本検出方法は、本プローブと、被験試料中の標的核酸と、を接触させて真正ハイブリダイズ産物を形成するハイブリダイゼーション工程を備えること

ができる。ハイブリダイゼーション工程において、標的核酸と本プローブとを接触させることで、本プローブと標的核酸とが特異的にハイブリダイズした真正ハイブリダイズ産物を得ることができる。

[0039] ハイブリダイゼーション工程における温度、ｐＨ、塩濃度、時間等の条件は、本プローブのＴｍや、被験試料の種類等に応じて適宜そのストリンジェンシーを設定することができる。例えば、温度は、本プローブのＴｍ以上とすることで、高ストリンジェンシーとなり、ハイブリダイゼーションの特異性は向上する一方ハイブリダイゼーション効率は低下する傾向となる。逆に、Ｔｍよりも低くすることで、低ストリンジェンシーとなり、ハイブリダイゼーション特異性は低下するが、ハイブリダイゼーション効率が向上する傾向となる。また、塩濃度やｐＨによっても、ストリンジェンシーを調節できる。

[0040] 本検出方法では、後段の光照射工程により真正ハイブリダイズ産物を光架橋し、さらに変性工程を実施して真正架橋ハイブリダイズ産物を高選択的に維持できる。このため、ハイブリダイゼーション工程を、高ストリンジェンシーで必ずしも行う必要がない。したがって、ハイブリダイゼーション工程は、例えば、後段で説明する室温にて行うことができるほか、２５℃以上４０℃以下、また例えば、３０℃以上４０℃以下で実施することができる。

[0041] なお、ハイブリダイゼーション工程を実施するのにあたり、用いる被験試料や検出方法によって、標的核酸と本プローブとのハイブリダイゼーションを可能とするための前処理が必要となる場合がある。被験試料や検出方法等に応じて前処理は、当業者には周知であり、当業者であれば、周知技術に基づいて前処理方法及びハイブリダイズ条件を決定できる。

[0042] ハイブリダイゼーション工程では、本プローブの共有結合性基の光架橋を回避する必要がある。したがって、共有結合性基の種類に応じ、必要に応じて、光を遮断した状態でハイブリダイゼーション工程を実施する。

[0043] ハイブリダイゼーション工程の実施態様は、本検出方法が適用される核酸の検出方法に応じて様々である。そのような核酸の検出方法としては、例え

ば、本プローブを固定したアレイやストリップなど固相体を用いた検出方法、in situハイブリダイゼーションを行うＩＳＨ、ＦＩＳＨによる検出方法であってもよい。

[0044] in situハイブリダイゼーションは、採取した細胞若しくは培養細胞又は生体組織切片等に対して実施することができる。in situ ハイブリダイゼーションの適用先としては、例えば、乳癌患者から採取された細胞若しくはその培養細胞又は乳癌患者から採取された組織切片内に対して本プローブを供給して実施することができる。また、エプスタイン・バール・ウイルス（ＥＢＶ）感染を保持する細胞若しくはその培養細胞又はＥＢＶ感染疾患が原因でる悪性腫瘍疾患患者から採取された組織切片等が挙げられる。

[0045] 核酸のハイブリダイゼーション工程は、さらに、液相におけるハイブリダイゼーション、本プローブを固定したカラムやストリップなどを用いたクロマトグラフィーによるハイブリダイゼーション等が挙げられる。これらの方法は、本願出願時においていずれも周知である。当業者であれば、周知技術に基づいて、適用する検出方法の種類に応じて適切なハイブリダイゼーション工程を実施できる。

[0046]（光照射工程）

本工程は、前記ハイブリダイゼーション工程後の被験試料に対して光照射して、前記真正ハイブリダイズ産物における共有結合性基と標的配列との間を架橋して架橋構造を有する真正ハイブリダイズ産物（本明細書における真正架橋ハイブリダイズ産物という。）を形成する工程である。先のハイブリダイゼーション工程では、真正ハイブリダイズ産物ほか、ミスマッチを含むがハイブリダイズした非特異的なミスハイブリダイズ産物も形成されうる。

[0047] 光照射工程では、共有結合性基を含むハイブリダイズ用配列が標的配列に適切にハイブリダイズして、標的配列の対合塩基の＋１位側にあるピリミジン塩基との間で高い特異性で架橋構造を形成する。ミスマッチがある場合には、ハイブリダイズ用配列と標的配列の架橋対象であるピリミジン塩基が架橋可能な位置関係を構成しにくく、適切な光照射を行っても、架橋構造が形

成され難い。このため、真正ハイブリダイズ産物において特異的に架橋構造が形成される。したがって、本検出方法によれば、偽陰性の検出結果を抑制でき、それにより検査感度を高めることができる。

[0048] 架橋構造を形成するための光照射条件は、用いる共有結合性基の種類等によって決定される。例えば、特開２０１６－１４５２２９号公報に開示される共有結合性基を用いる場合には、３３０～３８０ｎｍ、同３４０～３８０ｎｍ、同３５０～３８０ｎｍに有する光とすることができる。また、特開２０１９－２６５６９号公報に開示される共有結合性基を用いる場合には、例えば、３５０～６００ｎｍ、また例えば、４００～６００ｎｍ、また例えば、４００～５５０ｎｍ、また例えば、４００～４５０ｎｍの光を照射することができる。

[0049] 光照射工程における温度や時間は特に限定するものではないが、例えば、０℃～５０℃また例えば、０～４０℃、また例えば、０～３０℃、また例えば、０～２０℃、また例えば、０～１０℃、また例えば、０～５℃である。また、時間は、例えば、１～１２０秒間、また例えば、１～６０秒間などとすることができる。

[0050] なお、光照射工程では、光反応を利用しているため、ｐＨ、塩濃度等には特に制約はなく、ハイブリダイズ産物などのほか、生体材料が安定的に存在可能なｐＨ及び塩濃度の条件を採用することができる。

[0051] （変性工程）

本工程は、真正架橋ハイブリダイズ産物を維持し非特異的ハイブリダイズ産物を解離させることができる変性条件を光照射工程後の被験試料に付与して、非特異的ハイブリダイズ産物に由来する前記オリゴヌクレオチドプローブを分離する工程である。こうした変性条件は、例えば、ＤＮＡ等の二本鎖を解離できる各種条件が適用される。

[0052] 本工程によれば、上記した変性条件により、非特異的ハイブリダイズ産物を容易に真正架橋ハイブリダイズ産物から分離し除去（洗浄）することができる。従来、非特異的ハイブリダイズ産物と真正ハイブリダイズ産物との安

定性に大きな相違がない場合には、高いストリンジェンシーで洗浄すると、真正ハイブリダイズ産物をも変性させて洗浄してしまうことがあり、逆に低いストリンジェンシーで洗浄すると、十分に非特異的ハイブリダイズ産物を洗浄できないという問題があった。しかしながら、真正架橋ハイブリダイズ産物は、共有結合による架橋構造を備えているため、当該産物は、塩基対合によるハイブリダイズ産物を解離させるような変性条件でももはや解離しない。このため、強度の高い変性条件を適用しても真正架橋ハイブリダイズ産物を保持できるため、容易に、変性条件を設定し、確実に、真正架橋ハイブリダイズ産物のみを維持することができる。

[0053] 変性工程は、さらに、未架橋の真正ハイブリダイズ産物のハイブリダイゼーションの解離も促進して、未架橋の真正ハイブリダイズ産物に由来する前記オリゴヌクレオチドプローブと前記真正架橋ハイブリダイズ産物とを分離するように実施することができる。本検出方法によれば、ストリンジェンシーの高低というよりもむしろ、架橋／非架橋のハイブリダイズ産物を区別できるような強度の高い変性条件も使用できて、この結果、偽陽性の検出結果を抑制することができ、それにより、検査の特異度を向上させることができる。

[0054] 本検出方法によれば、上記のとおり、偽陽性の検出結果も抑制されるため、結果として、正確に、真陽性及び真陰性を検出できる正確度を向上させることができる。本検出方法が、例えば、シグナル強度に基づく検査結果から、複数段階のレベルに分類評価を実施する方法であったとしても、感度、特異度、正確度の向上は、検査の正確度及び精度に貢献することができる。

[0055] 従来、プローブごとに洗浄のために好適なストリンジェンシー条件は異なるところ、本検出方法では、真正架橋ハイブリダイズ産物を維持すればよいため、プローブごとに変性条件を変更するなどの細かい条件設定や、また異なる変性条件での複数回の操作などの必要もなく、複数の本プローブを同時に適用する場合でも、同一の変性条件を適用できるため、複数の標的核酸を同時に検出する検出方法にも有用である。

[0056] 変性工程において、非特異的ハイブリダイズ産物ひいては真正ハイブリダイズ産物の解離を促進する変性強度は、変性剤のほか、温度、塩濃度、ｐＨ等によって調節することができる。変性剤強度や変性剤濃度が高いほど、温度が高いほど、ｐＨが高いほど、塩濃度（イオン強度）が低いほど、変性強度は強くなる。変性条件は、変性剤、温度、塩基及びｐＨ等の各種要因を単独で又は２種以上組み合わせて用いることができる。

[0057] 変性剤としては、ＤＮＡやＲＮＡのハイブリダイゼーションを解離するものとして知られる公知の変性剤を利用できる。特に限定するものではないが、こうした変性剤としては、例えば、溶媒を用いることができる。溶媒としては、例えば、ホルムアミド、ジメチルホルムアミドなどアルデヒド類、ピリジン類、ピペリジン類、ジメチルスルホキシド、テトラヒドロフラン及びアセトニトリル等が挙げられる。

[0058] 変性要因として溶媒を用いる場合、変性剤の種類のほか、変性剤の濃度及び同時に用いる希釈剤によっても、変性条件を調整することができる。変性剤としての溶媒は、特に限定するものではないが、例えば、４０体積％以上、また例えば、５０体積％以上、また例えば、６０体積％、また例えば、７０体積％以上、また例えば、８０体積％以上、また例えば、９０体積％以上、また例えば、９５体積％以上、また例えば、１００体積％の溶液として用いることができる。好適には、７０体積％以上、８０体積％以上である。また、希釈剤としては、例えば、生体適合性のある、リン酸緩衝生理食塩水などの緩衝液であってもよいが、よりストリンジェンシーの高い水（純水など）の水系媒体とすることができる。すなわち、水系媒体混液とすることができる。変性剤として溶媒を用いる場合には、希釈剤の種類によっても、例えば、緩衝液に替えて純水を用いることによっても、予想を超えて変性条件の強度を大きくすることができる。

[0059] 例えば、溶媒であるホルムアミド（ＦＡ）を用いる場合、５０体積％ＦＡ水溶液又は緩衝液溶液、６０体積％ＦＡ水溶液又は緩衝液溶液、７０体積％ＦＡ水溶液又は緩衝液溶液、８０体積％ＦＡ水溶液又は緩衝液溶液などを用

いることができる。好ましくは、５０体積％以上のＦＡ水溶液又は緩衝液溶液であり、さらに好ましくは、６０体積％以上のＦＡ水溶液又は緩衝液溶液であり、さらに、好ましくは８０体積％以上のＦＡ水溶液又は緩衝液溶液である。また、ＦＡを用いない場合には、ＦＡが、例えば、６０体積％以上又は６０体積％超の水溶液又は緩衝液溶液などの水系媒体混液、８０体積％以上又は８０体積％超の水溶液又は緩衝液溶液などの水系媒体混液と同等以上の変性効果を有する変性剤（変性液）を用いることが好適である。

[0060] 他の変性剤としては、尿素、テトラメチルアンモニウムクロライドなどのアルキルアミン類、ＮａＯＨなどのアルカリ、ヨウ化物イオン、グアニジン、過酸化物、チオ硫化物等が挙げられる。これらの変性剤は、ｐＨや塩基等を調整することができる。これらの変性剤は、適当な溶媒に溶解して用いることができる。溶媒としては、例えば、生体適合性のあるリン酸緩衝生理食塩水などの緩衝液、純水などの水性媒体のほか、既に説明した変性剤としての溶媒などを用いることができる。

[0061] 変性工程に適用する温度条件は、当該条件単独で、変性工程を実施することができるが、他の全ての変性要因において温度条件を伴う。したがって、変性工程に適用する温度条件は、変性工程に適用される変性要因の種類やその程度などの変性強度に応じて適宜設定される。例えば、変性要因として、溶媒などの変性剤等の変性剤を用いる場合、適用される温度条件は、特段の温度制御をすることなく、本検出方法を実施する場所の温度であって、特段の加温も冷却もしない温度（本明細書において、当該温度を室温ともいう。）以上で実施することができる。本明細書において「室温」とは、例えば、１℃以上３５℃以下であり、また例えば、１℃以上３０℃以下であり、また例えば、１℃以上３０℃以下であり、また例えば、１０℃以上３０℃以下であり、また例えば、１５℃以上２５℃以下である。かかる室温での変性工程は、特に、in situハイブリダイゼーションなどを実施した組織などの被験試料に対する障害が抑制されている点において好適であるほか、特別な温度制御装置等を要しない点において有利である。変性工程における温度条件は、

例えば、２０℃以上、また例えば、３０℃以上、また例えば、３５℃以上、また例えば、４０℃以上、また例えば、５０℃以上などとすることができる。一方、上限としては、例えば、７０℃以下、また例えば、６０℃以下などとすることができる。温度条件は、また例えば、室温を超えた温度であってもよく、４０℃以上６０℃以下であってもよい。

[0062] また、変性要因として、温度を用いる場合、例えば、３０℃以上９０℃以下、また例えば、４０℃以上９０℃以下、５０℃以上９０℃以下、７０℃以上９０℃以下などとすることができる。例えば、７０℃以上９０℃以下の強い温度条件を採用する場合には、変性剤を使用しなくても、水又は緩衝液のみであっても、真正架橋ハイブリダイズ産物のみを維持することができる。

[0063] こうした変性工程は、ハイブリダイズ産物等に対して、１種又は２種以上の変性要因を適宜組み合わせて適用することで実施できる。変性工程を実施することで、ハイブリダイゼーションの解離が促進されて、非特異的ハイブリダイズ産物を構成していたプローブが除去され、さらに、真正ハイブリダイズ産物を構成していたプローブも除去されうるため、確実に真正架橋ハイブリダイズ産物を残すことができて、容易にバックグラウンドや偽陽性の要因が取り除かれる。

[0064] 変性工程後における真正架橋ハイブリダイズ産物については、ハイブリダイゼーション工程の実施形態等に応じて、その検出工程が適宜実施される。検出工程は、典型的には、プローブに予め付与された標識要素を利用して公知の方法にて行われる。

[0065] 以上説明した本検出方法によれば、非特異的ハイブリダイズ産物や真正ハイブリダイズ産物を、Ｔｍを高温化するための長いプローブを用いることなく、しかも、ストリンジェンシー強度に依存することなく除去できて、真正架橋ハイブリダイズ産物を高い確度で検出することができる。

[0066] （オリゴヌクレオチドプローブ）

本明細書に開示される、核酸を検出するためのオリゴヌクレオチドプローブは、上記したとおりの構成を備えることができる。そして、本プローブは

、ハイブリダイズ用配列及び少なくとも一つの共有結合性基が、真正架橋ハイブリダイズ産物が維持されるが、非特異的ハイブリダイズ産物ハイブリダイズ産物を選択的に除去可能に備えられている。こうすることで、本検出方法において、検出の正確度と再現性を向上させることができる。本プローブは、また、本検出方法の変性工程に有用な変性剤と組み合わせたキットとしても提供される。かかる変性剤は、例えば、６０体積％以上のホルムアミド水系媒体混液と同等以上の変性剤と、を備えることができる。

実施例

[0067] 以下、本明細書の開示をより具体的に説明するために具体例としての実施例を記載する。以下の実施例は、本明細書の開示を説明するためのものであって、その範囲を限定するものではない。

実施例 １

[0068] （乳癌患者から採取した組織切片における細胞内２８ＳｒＲＮＡ ＦＩＳＨ）

ヒト２８ＳｒＲＮＡの塩基配列から、以下に示す共有結合性基の架橋対象となるチミン（Ｔ）と架橋されるように、以下に示す３種の長さの異なるハイブリダイズ用配列を設定した。下線を施した塩基は、後段で説明する共有結合性基による置換部位である。

[0069] ハイブリダイズ用配列１（３４ｍｅｒ）：tgctactaccaccaagatctgcacctgcggcggc（配列番号１）

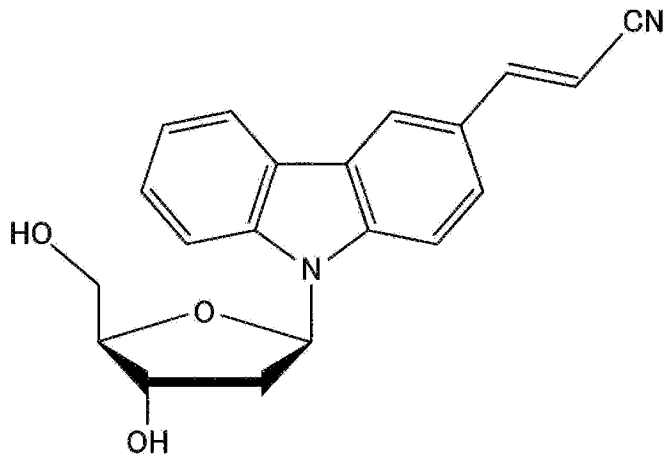
ハイブリダイズ用配列２（２５ｍｅｒ）：gctactaccaccaagatctgcacct（配列番号２）

ハイブリダイズ用配列３（１７ｍｅｒ）：tgctactaccaccaaga（配列番号３）

[0070] 上記３種の配列おいて、以下に示す位置に、一つの共有結合性基（Ｘ）を導入することした。また、５’末端をＣｙ３で修飾した３種のＤＮＡオリゴヌクレオチドプローブ１～３を合成した。なお、Ｘは、以下の構造式で表される。

[0071]

[化3]



[0072] ハイブリダイズ用配列１Ｘ（３４ｍｅｒ）：
Cy3-tgctactaccaccaagatctgcaxctgcggcggc（配列番号４）
ハイブリダイズ用配列２Ｘ（２５ｍｅｒ）：Cy3-gctactaccaccaagatctgcaxct（配列番号５）
ハイブリダイズ用配列３Ｘ（１７ｍｅｒ）：Cy3-tgctactaccaccaxga（配列番号６）

[0073] 乳癌患者から採取した組織のパラフィン切片を常法に従い、脱パラフィン及び除タンパク質を行い、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、アルデヒドを中和した。ブロッキングDNAを含まないホルムアミドベースの緩衝液を用いて、プローブの終濃度が1μg/mlとなるように調製したプローブ溶液を、８０℃で３分間加熱後、氷上で急冷してプローブを一本鎖化し、その５０μｌを切片上に滴下し、カバーガラスをかぶせて、３７℃のオーブンで１時間静置してハイブリダイゼーションを行った。

[0074] ハイブリダイゼーション後、カバーガラスをはずし、組織切片に対して３６６ｎｍの波長のＵＶ光を６０秒間照射して、その後、５０℃に温めた５０体積%ホルムアミド／ＳＳＣまたは８０体積%ホルムアミド／ＳＳＣで３回、続けてＳＳＣで２回、超純水で１回、それぞれ1～3分程度浸漬して洗浄後、グリセロールで封入した。

[0075] これらの切片につき、Ｃｙ３シグナルを観察したところ、いずれの長さの

プローブであっても、５０体積％ＦＡ変性及び８０体積％ＦＡ変性のいずれにおいても、良好なシグナルを細胞質内に確認できた。なお、対照として合成した共有結合性基を備えないプローブを用いた場合、５０体積％ＦＡ変性では、プローブは除去されないで維持されたが、８０体積％ＦＡ洗浄では、プローブは全て洗浄されてしまいシグナルをほとんど確認できなかった。

[0076] また、３４ｍｅｒ、２５ｍｅｒ及び１７ｍｅｒであるプローブ１～３は、いずれも、８０体積％ＦＡ変性後のシグナルを呈したが、１７ｍｅｒであるプローブ３のシグナルが最も弱く、３４ｍｅｒ及び２５ｍｅｒのプローブ１、２のシグナルはほぼ同等であった。以上のことから、２０ｍｅｒ以上程度のハイブリダイズ用配列が好適であることがわかった。また、ハイブリダイズ用配列１（３４ｍｅｒ）においてＸ位置を３’末端から３個目のＧをＸに置換したハイブリダイズ配列１Ｘ’を有するＤＮＡプローブ４を合成し、ＤＮＡプローブ１と同４とを用いて、同時に、同じ乳癌患者由来の組織切片に対して、上記と同様にしてハイブリダイゼーション、光照射及び８０体積％ＦＡ洗浄を行って、切片のシグナルを観察した。その結果、両者のシグナルは同等であった。以上のことから、共有結合性基は、３’末端側になくても、十分に真正架橋ハイブリダイズ産物を形成できることがわかった。

[0077] また、５０体積％ＦＡ洗浄及び８０体積％ＦＡ洗浄では、８０体積％ＦＡ洗浄の方がより画像が鮮明であった。このことは、非特異的ハイブリダイズ産物がきちんと除去されていること等によってＳ／Ｎ比が向上した結果であると考えられた。

実施例 2

[0078]（２５ｍｅｒのプローブを用いた光照射条件の検討）

実施例１で合成したプローブ２を用いて、ＵＶ照射時間の異なる２８ＳｒＲＮＡ ＦＩＳＨを実施して、照射時間の影響について評価した。光照射条件を、０．１秒、５秒、６０秒及び３００秒と設定する以外は、実施例１と同様にしてＦＩＳＨを行った。

[0079] その結果、明らかに、照射時間の延長とともにシグナル強度が増大する傾

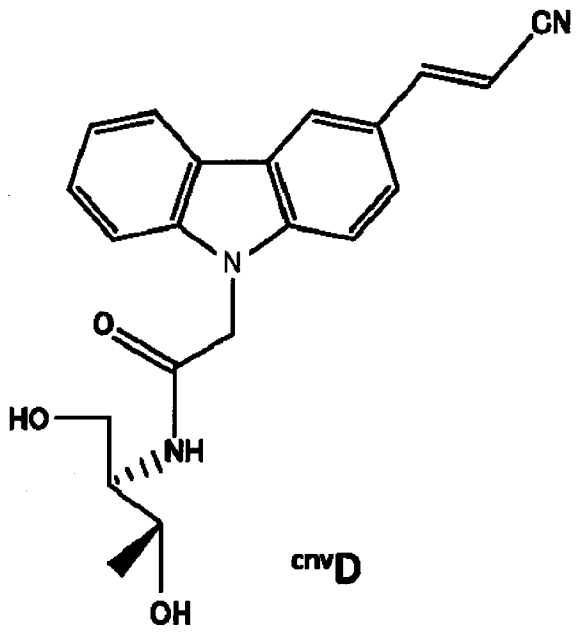
向があった。一方、６０秒以上では、シグナル強度は大きく増大しなかった。

実施例 3

[0080]（共有結合性基の検討）

実施例１で合成したプローブ２と、プローブ２に導入された共有結合性基Xと同位置に下記構造式で表される、Ｄ－トレオニノール骨格を有する別の共有結合性基Dを導入したプローブ５と、を用いて、実施例１に準じて２８Ｓｒ ＲＮＡ ＦＩＳＨを実施して、共有結合性基の種類の影響について評価した。光照射時間は５秒または６０秒に設定し、洗浄には８０体積％ＦＡを用い、実施例１と同様にしてＦＩＳＨを行った。

[0081] [化4]



[0082] その結果、ＵＶ照射時間5秒および６０秒のどちらにおいても、プローブ２よりもプローブ５の方がシグナルが強かった。このことは、主骨格がデオキシリボースである共有結合性基X（ＣＮＶ－Ｋ)を導入したプローブ２よりも、Ｄ－トレオニノールが主骨格である共有結合性基D（ＣＮＶ－Ｄ）を導入したプローブ５の方が、より効率良く２８ＳｒＲＮＡと真正架橋ハイブリダイズ産物を形成した結果であると考えられた。

実施例 4

[0083] （マウスから採取した大脳切片におけるＳａｔｂ２タンパク質ｍＲＮＡ ＣＩＳＨ）

標的配列としてのＳａｔｂ２ｍＲＮＡ（約７００塩基）に対して、図１に示すように、２０ｍｅｒ程度の２６本のプローブ（配列番号７～３２）を設計し、標的配列中のチミン（Ｔ）と光架橋可能に実施例１と同様に共有結合性基Ｘを導入した。また、ＤＮＡプローブの５’末端にＤＩＧを付加した。

[0084] マウス脳の凍結切片を３７℃で３０分解凍後、４％パラホルムアルデヒドで３７℃、１０分間浸漬し、後固定した。TBS緩衝液で5分間の浸漬を2回実施後、２ｍｇ／ｍＩグリシン/ＰＢＳ溶液に３０分浸漬後してアルデヒドを中和し、５５℃の４０体積％の脱イオン化ホルムアミド/４×ＳＣＣ溶液に３０分間浸漬した。その後、この切片に、上記した各プローブをそれぞれ１μｇ／ｍＩ含むハイブリダイゼーション溶液を８０℃で５分加熱して、その５０μＩを供給し、３７℃で１時間ハイブリダイゼーションさせた。

[0085] その後、この切片を載せたスライドを氷上に載置して３６６ｎｍ（１０００ｍＶ）の波長を1分照射した。さらに、５０℃の８０体積％ホルムアミド/TBS緩衝液溶液又は同温度の８０体積％ホルムアミド水溶液でそれぞれ３分間浸漬変性・洗浄することを３回繰り返した。

[0086] その後、ＴＢＳ緩衝液で３分浸漬洗浄することを２回、同緩衝液で１分浸漬洗浄することを１回行い、アルカリホスファターゼ標識抗体の２００倍希釈液を５０μＩを滴下し、室温で３０分放置し、ＴＢＳ緩衝液で３分洗浄することを２回、超純水で１分洗浄することを２回行い、ＢＣＩＰ／ＮＢＴ溶液を添加し、暗所で６０分反応させたのち、流水洗浄し、脱水して、封入した。

[0087] これらの切片試料につき、青から青紫色の発色を確認した結果を図２に示す。図２（Ｂ）に示すように、８０体積％ホルムアミド緩衝液溶液を用いた場合には、大脳皮質にＳａｔｂ２特異的シグナルの痕跡を認めたものの、明瞭ではなかった。これに対して、図２（Ａ）に示すように、より変性強度の

強い８０体積%ホルムアミド水溶液を用いた場合には、非特異的シグナルを低下させて、大脳皮質に明瞭なＳａｔｂ２特異的シグナルを確認することができた。

実施例 5

[0088] （乳がん培養細胞におけるＨＥＲ２タンパク質ｍＲＮＡ ＣＩＳＨ）

ＨＥＲ２ｍＲＮＡ中のＥｘｏｎ１５から１７にまたがる標的配列に対して、以下の２つのプローブがハイブリダイズするように設計した。なお、プローブは、以下の配列中Ｘとしては、標的配列中のウラシル（Ｕ）またはシトシン（Ｃ）と光架橋可能に実施例１と同様に共有結合性基Ｘを導入し、5’末端には、ＤＩＧを付加した。

プローブ１：GTCCACACAGGAGTGGGTGCAXTT（配列番号３３）

プローブ２：CGTCAGAGGGCTGGCTCTCTGXTC（配列番号３４）

[0089] ２種類の乳がん細胞（ＢＴ４７４：ＨＥＲ２陽性、ＢＴ２０：ＨＥＲ２陰性）を培養しセルブロックを作成した。パラフィン包埋後、薄切したスライドを用意した。ＨＥＲ２タンパク質に対する免疫染色を実施し、それぞれについてＨＥＲ２陽性または陰性であることを確認した後、共有結合性基Xを含むプローブ１および２を用いてＩＳＨを実施した。

[0090] 脱パラフィン・親水化し、標本を６０℃のオーブンで温めてパラフィンを融解後、クリアプラス（脱パラフィン剤、株式会社ファルマ）で６回、１００％ＥｔＯＨで３回、９５％ＥｔＯＨで２回、８０％ＥｔＯＨで１回、さらに、純水で５回洗浄した。さらに、プロティンキナーゼ溶液を供給して室温で３０分間処理後、純水で２回洗浄した。その後、９５％ＥｔＯＨに浸漬し、ドライヤーで乾燥させた。

[0091] ２種類のプローブを１μｇ／ｍｌで含有するハイブリダイゼーション溶液（４０体積%ホルムアミドを含むTE緩衝液）を８０℃で３分間加熱後急冷して、当該溶液５０μｌを、前記組織に供給後、カバーガラスをかけ、５５℃の恒温槽で１時間静置してハイブリダイゼーションさせた。

[0092] ハイブリダイゼーション後、氷上にて３６６ｎｍ（１０００ｍＶ）を１分

照射して、その後、８０体積％ホルムアミド２×ＳＳＣ溶液（５５℃）に３分間浸漬して変性・洗浄した。

[0093] その後、２×ＳＳＣで１回、ＴＢＳで２回洗浄後、抗ＤＩＧ１次抗体溶液を滴下し、室温で３０分静置した。ＴＢＳで３回洗浄後、１次抗体に特異的に結合するアルカリフォスファターゼ標識ポリマーを滴下し室温で３０分静置した。ＴＢＳで３回洗浄後、ＢＣＩＰ／ＮＢＴを滴下し、暗所で一晩反応後、流水洗浄し、脱水後、封入した。結果を図３に示す。

[0094] 図３に示すように、共有結合性基Ｘを含むプローブを用いたＩＳＨにて、ＨＥＲ２陽性細胞では、明らかなシグナルが確認された。一方、ＨＥＲ２陰性細胞ではシグナルは確認されなかった。ＩＳＨにて得られた結果は、事前に実施した免疫染色の結果と一致しており、ＨＥＲ２ｍＲＮＡを特異的に検出できていることがわかった。

実施例 6

[0095] （ＥＢＥＲ（ＥＢウイルス産生小ＲＮＡ）－ＩＳＨ）［１］

ＥＢＥＲ１中の約１００ｍｅｒからなる標的配列に対して、以下の２つのプローブがハイブリダイズするように設計した。なお、プローブは、以下の配列中Ｘとしては、標的配列中ウラシルの実施例１で用いたユニットを用いて合成し、５‘末端には、ＤＩＧを付加した。なお、Ｘに替えてグアニン又はアデニンを備える以外は同様にして比較例のプローブを合成した。

[0096] プローブ１：GTCTCCTCCCTAGCAAAXCC（配列番号３５）

プローブ２：GTCTGGGAAGACAACCAXAG（配列番号３６）

[0097] 胃がん患者から採取したＥＢウイルス感染組織を、脱パラフィン・親水化し、標本を６０℃のオーブンで温めてパラフィンを融解後、クリアプラス（脱パラフィン剤、株式会社ファルマ）で６回、１００％ＥｔＯＨで３回、９５％ＥｔＯＨで２回、８０％ＥｔＯＨで１回、さらに、純水で５回洗浄した。さらに、プロティンキナーゼ溶液を供給して室温で３０分間処理後、純水で２回洗浄した。その後、９５％ＥｔＯＨに浸漬し、ドライヤーで乾燥させた。

[0098] ２種類のプローブを１μｇ／ｍｌで含有するハイブリダイゼーション溶液（４０体積％ホルムアミドを含むTE緩衝液）を８０℃で３分間加熱後急冷して、当該溶液５０μｌを、前記組織に供給後、カバーガラスをかけ、室温で１時間静置してハイブリダイゼーションさせた。同様にして、比較例のプローブについても、ハイブリダイゼーションを実施した。

[0099] ハイブリダイゼーション後、氷上にて３６６ｎｍ（１０００ｍＶ）を１分照射して、その後、５０体積％ホルムアミド２×ＳＳＣ溶液（室温）及び８０体積％ホルムアミド２×ＳＳＣ溶液（５５℃）に３分間浸漬して変性・洗浄した。

[0100] その後、２×ＳＳＣで１回、ＴＢＳで２回洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗体溶液を滴下し、室温で３０分静置した。ＴＢＳで２回、超純水で２回洗浄後、ＢＣＩＰ／ＮＢＴを滴下し、暗所で６０分反応後、流水洗浄し、脱水後、グリセルゲルにて封入した。結果を図４に示す。

[0101] 図４に示すように、共有結合性基Ｘを含むプローブを用いた場合、５０体積％ホルムアミド２×ＳＳＣ（室温）でも８０体積％ホルムアミド２×ＳＳＣ溶液（５５℃）でも発色したが、８０体積％ホルムアミドのほうが、染色される領域は減少していた。一方、比較例のＤＮＡプローブの場合、５０体積％ホルムアミド２×ＳＳＣ（室温）では発色したが、８０体積％ホルムアミド２×ＳＳＣ溶液（５５℃）では、全く発色しなかった。以上のことから、８０体積％ホルムアミド２×ＳＳＣ溶液（５５℃）のより強度の強い変性条件による変性によって架橋真性ハイブリダイズ産物のみが検出されることがわかった。

[0102] 以上のことから、共有結合性基Ｘを備えるプローブと同Ｘを備えないプローブの変性耐性を確認できた。高い確度で標的配列を検出するには、共有結合性基を備えるプローブと高強度の変性条件が必要であることがわかった。

実施例 7

[0103] （ＥＢＥＲ（ＥＢウイルス産生小ＲＮＡ）－ＩＳＨ）［２］

実施例6と同様に共有結合性基Ｘを備えるプローブと、市販のＥＢＥＲ検出

キット（Ｄａｋｏ、ＰＮＡプローブ）とについて、検出性能を評価した。共有結合性基Ｘを備えるプローブに関しては、変性条件を、８０体積％ホルムアミド２×ＳＳＣ溶液（室温）とし、他の操作は、実施例６と同様とした。

[0104] ＰＮＡプローブキットについては、添付のプロトコールに従った。なお、このプロトコールによれば、ハイブリダイゼーションは、５５℃で３０分間であり、洗浄は、５５℃のストリンジェント緩衝液を用い、アルカリフォスファターゼによる発色反応を用いるものであった。

[0105] 共有結合性基Ｘを備えるプローブとＰＮＡプローブキットによる処理を施した切片につき、評価を行った。結果を図５に示す。図５に示すように、共有結合性基Ｘを備えるプローブでは、室温によるハイブリダイゼーション及び室温による変性による処理であったが、明瞭な染色を確認できた。また、ＰＮＡプローブキットについては、５５℃のハイブリダイゼーション及び５５℃の洗浄によれば、共有結合性基Ｘを備えるプローブと同等の検出結果を得ることができた。しかしながら、ＰＮＡキットでは、室温によるハイブリダイゼーションでは、バックグラウンドが高すぎて検出が特異的検出が不可能であった。

[0106] 以上のことから、共有結合性基Ｘを備えるプローブは、温度制御を容易にしつつかつ確度の高い標的核酸の検出が可能であることがわかった。

配列表フリーテキスト

[0107] 配列番号１～３６：プローブ

請求の範囲

[請求項1] 核酸の検出方法であって、

被験試料中に存在する核酸の標的配列に対するハイブリダイズ用配列と、前記ハイブリダイズ用配列中に前記標的配列と特異的にハイブリダイズしたとき前記標的配列における標的塩基と光照射により架橋可能である少なくとも一つの共有結合性基と、を有するオリゴヌクレオチドプローブと、前記核酸と、を接触させて真正ハイブリダイズ産物を形成するハイブリダイゼーション工程と、

前記ハイブリダイゼーション工程後の被験試料に対して光照射して、前記真正ハイブリダイズ産物における共有結合性基と標的配列との間を架橋して架橋構造を有する真正ハイブリダイズ産物を形成する光照射工程と、

前記真正架橋ハイブリダイズ産物を維持し非特異的ハイブリダイズ産物を解離させることができる変性条件を光照射工程後の被験試料に付与して、非特異的ハイブリダイズ産物に由来する前記オリゴヌクレオチドプローブを分離する変性工程と、

を備える、方法。

[請求項2] 前記変性工程は、さらに、真正ハイブリダイズ産物のハイブリダイゼーションの解離も促進して、前記真正ハイブリダイズ産物に由来する前記オリゴヌクレオチドプローブと前記真正架橋ハイブリダイズ産物とを分離することを含む工程である、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記ハイブリダイゼーション工程は、in situハイブリダイゼーションを行う工程である、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] 前記ハイブリダイゼーション工程は、培養細胞又は癌患者から採取された組織切片内に対して前記オリゴヌクレオチドプローブを供給して実施する工程である、請求項３に記載の方法。

[請求項5] 前記変性工程は、前記ハイブリダイゼーション工程後の被験試料に対して６０体積％を超える濃度でのホルムアミドの水系媒体混液によ

る変性を含む、請求項１～４のいずれかに記載の方法。

[請求項6] 前記変性工程は、室温以上の液体を用いる変性を含む、請求項１～５のいずれかに記載の方法。

[請求項7] 前記変性工程は、ホルムアミド以外の変性剤を含む変性液による変性を含む、請求項１～６のいずれかに記載の方法。

[請求項8] ホルムアミド以外の変性剤がテトラメチルアンモニウムクロライドである、請求項７に記載の方法。

[請求項9] 前記光照射工程は、極大波長３４０～３８０ｎｍの光を照射する工程である、請求項１～８のいずれかに記載の方法。

[請求項10] 前記ハイブリダイズ用配列が、５塩基以上２００塩基以下である、請求項１～９のいずれかに記載の方法。

[請求項11] 前記標的配列は、ヒトＨＥＲ２タンパク質ｍＲＮＡにおけるＲＮＡ配列である、請求項１～１０のいずれかに記載の方法。

[請求項12] 前記標的配列は、Ｓａｔｂ２タンパク質ｍＲＮＡにおけるＲＮＡ配列である、請求項１～１０のいずれかに記載の方法。

[請求項13] 前記標的配列は、ＥＢＥＲ小ＲＮＡにおけるＲＮＡ配列である、請求項１～１０のいずれかに記載の方法。

[請求項14] 前記標的配列は、２８ＳｒＲＮＡにおけるＲＮＡ配列である、請求項１～１０のいずれかに記載の方法。

[請求項15] 前記変性工程は、前記ハイブリダイゼーション工程後の被験試料に対して８０体積％のホルムアミドの水系媒体混液による変性を含む、請求項１～１４のいずれかに記載の方法。

[請求項16] 核酸を検出するためのオリゴヌクレオチドプローブであって、

前記核酸の標的配列とハイブリダイズ可能なハイブリダイズ用配列と、前記ハイブリダイズ用配列中に前記標的配列と特異的にハイブリダイズしたとき前記標的配列における標的塩基と光照射により架橋可能である少なくとも一つの共有結合性基と、を備え、

前記ハイブリダイズ用配列及び少なくとも一つの共有結合性基は、

前記ハイブリダイズ用配列と前記標的配列とがハイブリダイズした真正ハイブリダイズ産物であって前記光照射により架橋した真正架橋ハイブリダイズ産物が維持されるが、非特異的ハイブリダイズ産物ハイブリダイズ産物を選択的に除去可能に構成されている、プローブ。

[請求項17] 前記少なくとも一つの供給結合性基は、

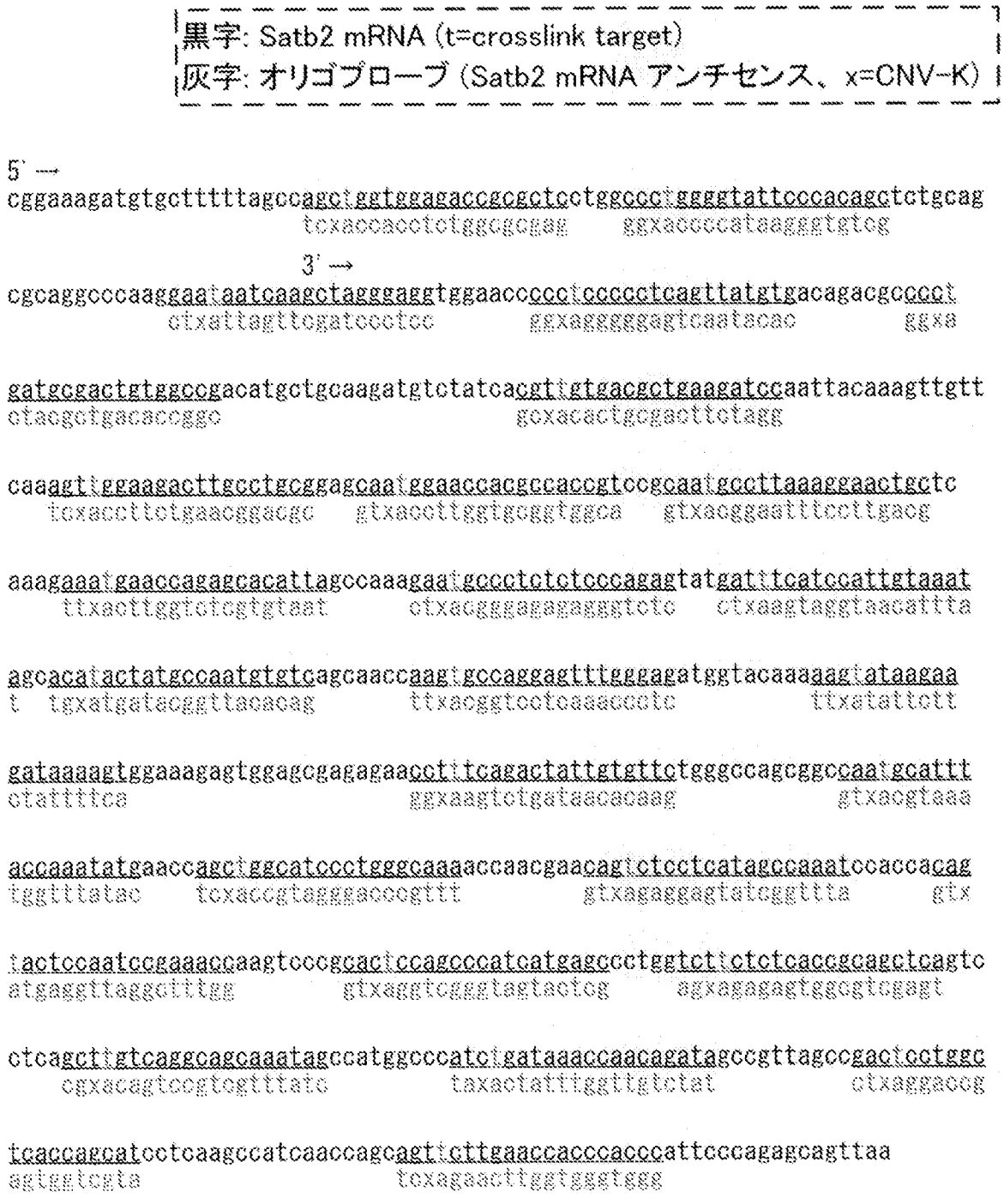
標識オリゴヌクレオチドの検出キットであって、

請求項１６に記載のオリゴヌクレオチドプローブと、

６０体積％を超える濃度のホルムアミドの水系媒体混液と同等以上の変性剤と、

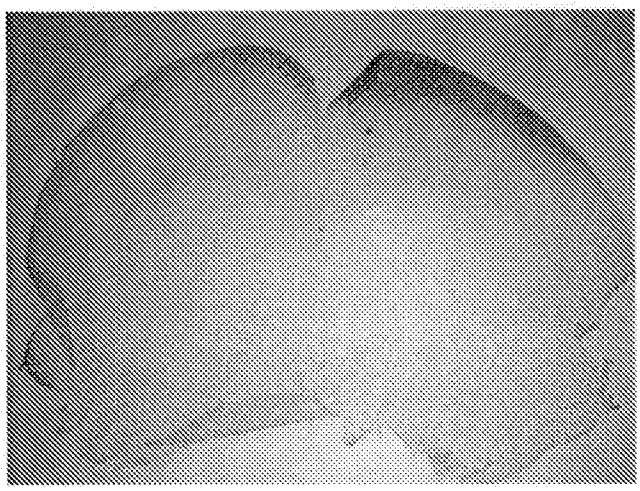
を備える、キット。

[図1]

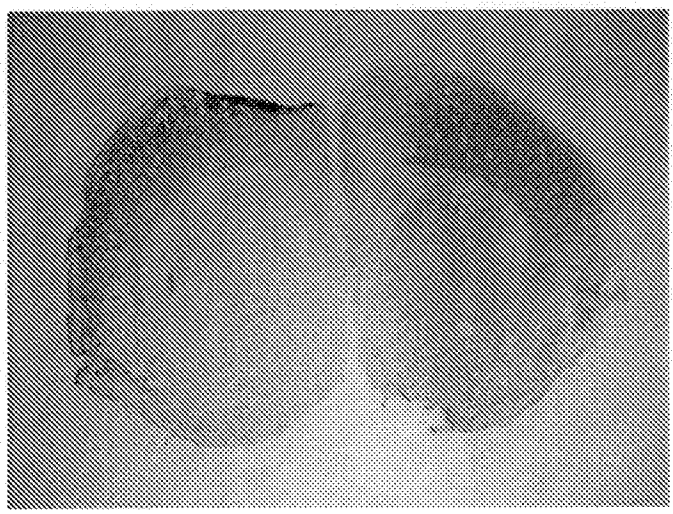

黒字: Satb2 mRNA (t=crosslink target)
灰字: オリゴプローブ (Satb2 mRNA アンチセンス、x=CNV-K)
5' →
3' →

[図2]

(A)

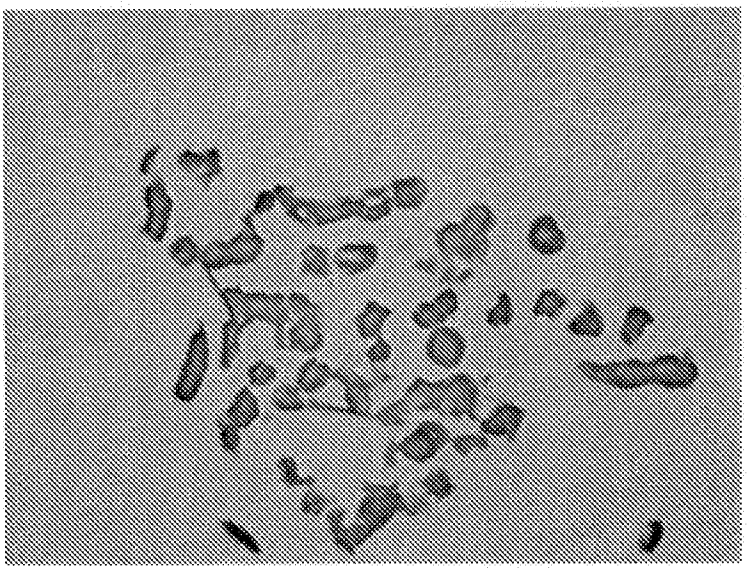


(B)

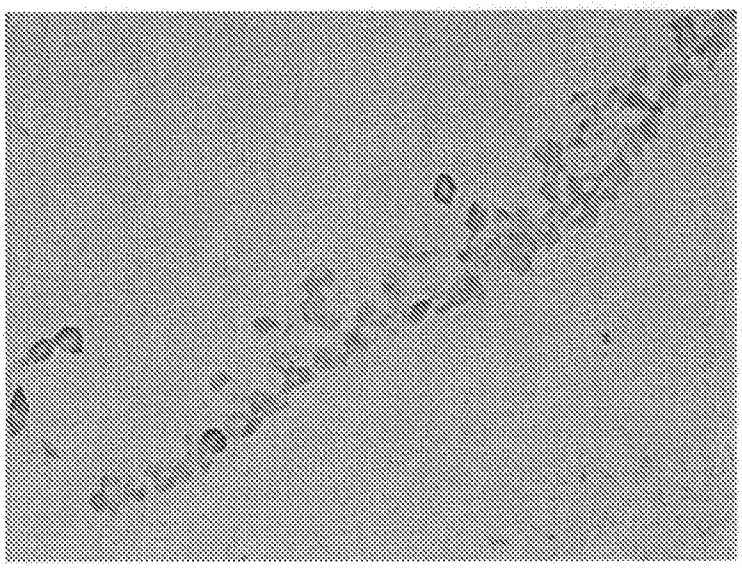


[図3]

(A)

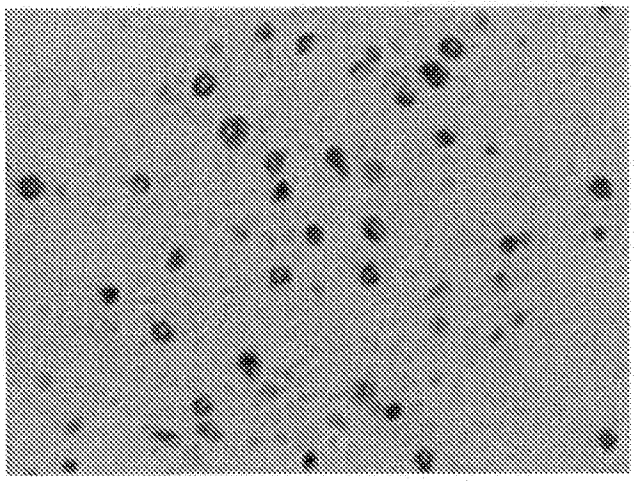


(B)

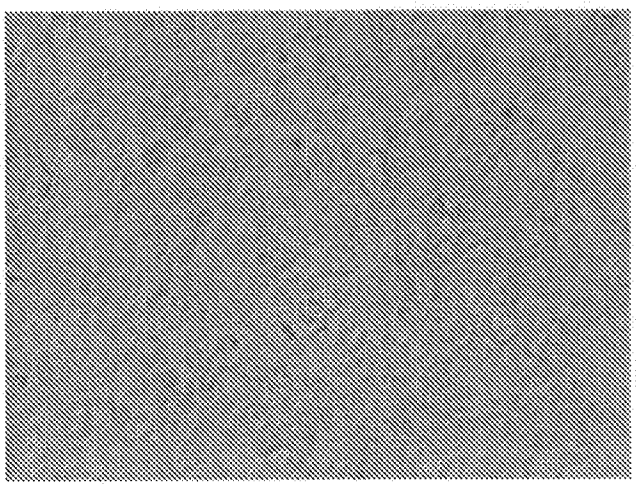


[図4]

(A)

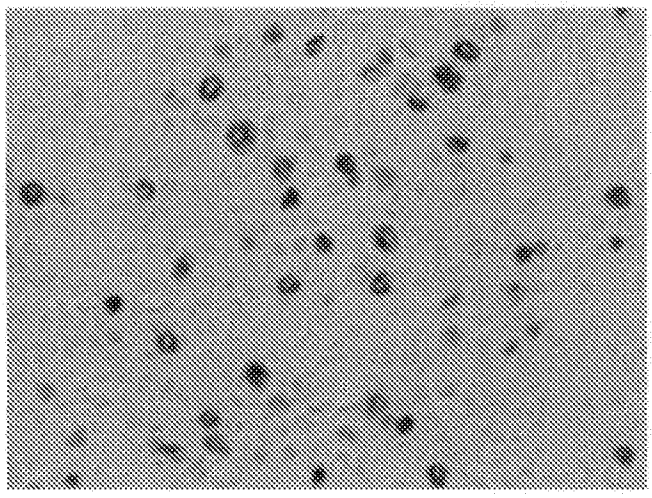


(B)

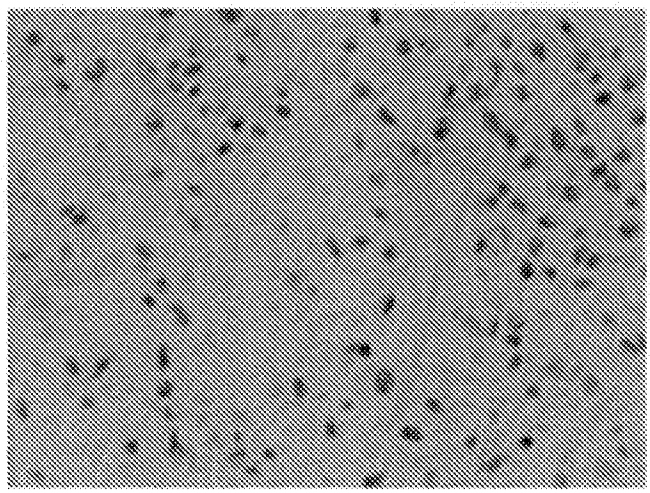


[図5]

(A)



(B)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/015991

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N 15/09(2006.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i
FI: C12Q1/6883 Z ZNA; C12N15/09 Z

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; C12Q1/6883

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE:/EMBASE:/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FUJIMOTO, K. et al., "RNA fluorescence in situ hybridization using 3-cyanovinylcarbazole modified oligodeoxyribonucleotides as photo-cross-linkable probes", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016, vol. 26, pp. 5312-5314, abstract, p. 5312, left column, lines 1-3, p. 5313, left column, line 7 to right column, line 12	1-6, 9-17
Y	abstract, p. 5312, left column, lines 1-3, p. 5313, left column, line 7 to right column, line 12	7-15
Y	JP 10-503655 A (THE REGENS OF THE UNIVERSITY OF CALFORNIA) 07 April 1998 (1998-04-07) p. 30, lines 2-3	7-15
Y	JP 2003-535599 A (TM BIOSCIENCE CORPORATION) 02 December 2003 (2003-12-02) paragraph [0007]	7-15

☒ 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	Date of mailing of the international search report
30 June 2021 (30.06.2021)	13 July 2021 (13.07.2021)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/015991

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2015-073523 A (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 20 April 2015 (2015-04-20) claims, examples	16
X	JP 2002-524091 A (NAXCOR, INC.) 06 August 2002 (2002-08-06) claims, examples	16
X	FUJIMOTO, K. et al., "RNA fluorescence in situ hybridization hybridisation using photo-cross-linkable beacon probes containing pyranocarbazole in living E. coli", Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2019, vol. 29, pp. 2173-2177, abstract, fig. 1, 2	16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/015991

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 10-503655 A	07 Apr. 1998	WO 1996/004402 A1 p. 28, lines 32-34	
JP 2003-535599 A	02 Dec. 2003	WO 2001/094625 A2 p. 2, lines 3-11	
JP 2015-073523 A	20 Apr. 2015	(Family: none)	
JP 2002-524091 A	06 Aug. 2002	WO 2000/014281 A2 claims, examples	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/015991

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/09(2006.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i
FI: C12Q1/6883 Z ZNA; C12N15/09 Z

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（ＩＰＣ））

C12N15/09; C12Q1/6883

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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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	関連する請求項の番号
X	FUJIMOTO, K. et al., RNA fluorescence in situ hybridization using 3-cyanovinylcarbazole modified oligodeoxyribonucleotides as photo-cross-linkable probes, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016, Vol.26, PP.5312-5314 ABSTRACT, P.5312左欄第1-3行, P.5313左欄第7行－右欄第12行	1-6, 9-17
Y	ABSTRACT, P.5312左欄第1-3行, P.5313左欄第7行－右欄第12行	7-15
Y	JP 10-503655 A (ザ　リージェンツ　オブ　ザ　ユニバーシティ　オブ　カリフォルニア) 07.04.1998 (1998-04-07) P.30第2-3行	7-15
Y	JP 2003-535599 A (ティーエム　バイオサイエンス　コーポレイション) 02.12.2003 (2003-12-02) [0007]	7-15
X	JP 2015-073523 A (国立大学法人　東京大学) 20.04.2015 (2015-04-20) 特許請求の範囲、実施例	16

☑ 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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
30.06.2021	13.07.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
馬場　亮人 4B 4043
電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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	関連する請求項の番号
X	JP 2002-524091 A (ナックスコー・インコーポレイテッド) 06.08.2002 (2002-08-06) 特許請求の範囲、実施例	16
X	FUJIMOTO, K. et al., RNA fluorescence in situ hybridization hybridisation using photo-cross-linkable beacon probes containing pyranocarbazole in living E. coli, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2019, Vol.29, P.2173-2177 abstract、Fig.1,2	16

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/015991

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 10-503655 A	07.04.1998	WO 1996/004402 A1 P.28第32-34行	
JP 2003-535599 A	02.12.2003	WO 2001/094625 A2 P.2第3-11行	
JP 2015-073523 A	20.04.2015	（ファミリーなし）	
JP 2002-524091 A	06.08.2002	WO 2000/014281 A2 Claims, Examples	