(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2006-510348
(P2006-510348A)
(43)公表日　平成18年3月30日(2006.3.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA	4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B063
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	M	
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/543	575	
G01N 33/566	(2006.01)	G01N	33/566		

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 26 頁）

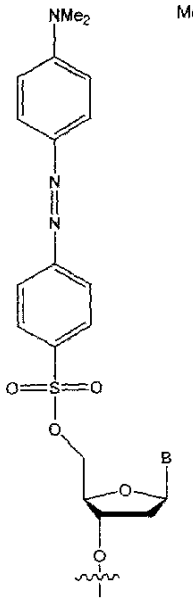
(21)出願番号　特願2004-523488 (P2004-523488)
(86)(22)出願日　平成15年7月17日 (2003.7.17)
(85)翻訳文提出日　平成17年3月9日 (2005.3.9)
(86)国際出願番号　PCT/US2003/022320
(87)国際公開番号　WO2004/010101
(87)国際公開日　平成16年1月29日 (2004.1.29)
(31)優先権主張番号　60/396,774
(32)優先日　平成14年7月18日 (2002.7.18)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　599108976
ザ・ボード・オブ・トラスティーズ・オブ・ザ・レランド・スタンフォード・ジュニア・ユニバーシティ
THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94306，パロ　アルト，エル　カミノ　リアル　1705
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷　道子

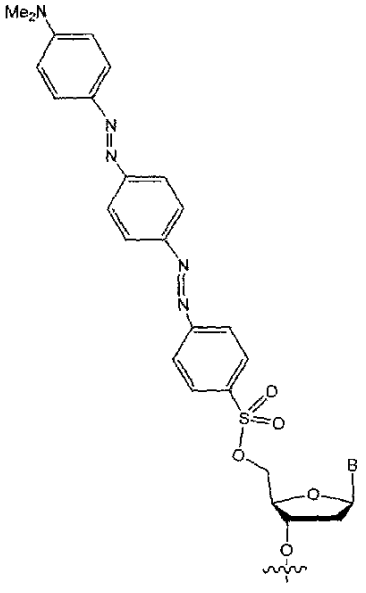
最終頁に続く

(54)【発明の名称】蛍光消光脱離基を用いる化学ライゲーションの検出

(57)【要約】
蛍光消光剤を脱離基として有する新規化合物が開示される。蛍光体および蛍光消光剤を含む核酸および他の分子が本発明の１の具体例として開示される。酵素を用いないオリゴヌクレオチドライゲーション反応における該オリゴヌクレオチドの使用は、さらにオリゴヌクレオチドが近くの蛍光体を有する場合に蛍光の増強を引き起こす。ライゲーション反応を溶液中、表面上、または細胞中で行うことができる。



(1)



(6)

【特許請求の範囲】
【請求項１】
蛍光体化合物を含む組成物であって、蛍光体化合物が蛍光体基および蛍光消光脱離基を含むものである組成物。
【請求項２】
蛍光体化合物が少なくとも約２倍の消光効率を有することにより特徴付けられるものである請求項１記載の組成物。
【請求項３】
蛍光体化合物が少なくとも約１００倍の消光効率を有することにより特徴付けられるものである請求項１記載の組成物。
【請求項４】
蛍光体化合物が少なくとも約１０００倍の消光効率を有することにより特徴付けられるものである請求項１記載の組成物。
【請求項５】
蛍光体化合物が有機化合物、有機金属化合物、核酸、ペプチド、蛋白、脂質または炭水化物である請求項１記載の組成物。
【請求項６】
蛍光体化合物が核酸である請求項１記載の組成物。
【請求項７】
核酸が１本鎖である請求項６記載の組成物。
【請求項８】
核酸が２本鎖である請求項６記載の組成物。
【請求項９】
消光脱離基が核酸の５’ヒドロキシル基に結合されている請求項６記載の組成物。
【請求項１０】
消光脱離基が核酸の５’ヒドロキシル基以外のヒドロキシル基に結合されている請求項６記載の組成物。
【請求項１１】
蛍光体基が消光脱離基から１、２または３ヌクレオチド離れて存在している請求項６記載の組成物。
【請求項１２】
蛍光体基がさらに求核基を含む請求項１記載の組成物。
【請求項１３】
求核基がホスホロチオエートまたはホスホロセレノエートである請求項１２記載の組成物。
【請求項１４】
蛍光体基がフルオレセイン、ＴＡＭＲＡ、Ｃｙ３、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、ＢＯＤＩＰＹ蛍光体、ＲＯＸ、ＪＯＥまたはオレゴングリーンである請求項１記載の組成物。
【請求項１５】
蛍光消光脱離基がダブシル基、ジマプダブシル（dimapdabsyl）基、アゾベンゼンースルホニル基、アミノベンゼンスルホニル基、ジアルキルアミノベンゼｂスルホニル基、ニトロベンゼンスルホニル基、フルオロベンゼンスルホニル基、シアノベンゼンスルホニル基、アレンスルホニル基、アリールアゾー置換ダブシル基または金粒子抱合スルホニル脱離基である請求項１記載の組成物。
【請求項１６】
蛍光体化合物がペプチドまたは蛋白である請求項１記載の組成物。
【請求項１７】
分子内化学ライゲーションを検出する方法であって、下記工程：
蛍光体化合物を含む組成物を提供し、ここに該化合物は蛍光体基、蛍光消光脱離基および求核基を含み；

分子内化学ライゲーションに適した条件下に該組成物を維持し；次いで
該組成物の蛍光を決定する
を含む方法。
【請求項１８】
維持工程の前に組成物の蛍光を決定することをさらに含む請求項１７記載の方法。
【請求項１９】
分子内化学ライゲーションが、分析対象不存在下よりも分析対象存在下において速い速度で起こる請求項１７記載の方法。
【請求項２０】
決定工程が、可視的検出、蛍光顕微鏡での検出、蛍光分光光度計での検出、フローサイトメーターでの検出または蛍光マイクロプレートリーダーでの検出を含む請求項１７記載の方法。
【請求項２１】
分子間化学ライゲーションを検出する方法であって、下記工程：
蛍光体化合物を含む第１の組成物を用意し、ここに該蛍光体化合物は蛍光体基および蛍光消光脱離基を含み；
求核化合物を含む第２の組成物を用意し、ここに該求核化合物は求核基を含み；
第１の組成物と第２の組成物を一緒にして反応混合物を得て；次いで
該反応混合物の蛍光を決定する
を含む方法。
【請求項２２】
一緒にする工程の前に第１の組成物の蛍光を決定することをさらに含む請求項２２記載の方法。
【請求項２３】
蛍光体化合物と求核化合物との間の分子内化学ライゲーションが、分析対象不存在下よりも分析対象存在下において速い速度で起こる請求項２１記載の方法。
【請求項２４】
決定工程が、可視的検出、蛍光顕微鏡での検出、蛍光分光光度計での検出、フローサイトメーターでの検出または蛍光マイクロプレートリーダーでの検出を含む請求項２１記載の方法。
【請求項２５】
目的の核酸配列を検出する方法であって、下記工程：
目的の核酸配列を含む疑いのある核酸分子を用意し；
目的の核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイゼーションする第１の核酸プローブを用意し；
目的の核酸配列の少なくとも一部分に第１の核酸プローブと隣接してハイブリダイゼーションする第２の核酸プローブを用意し；
核酸分子、第１の核酸プローブおよび第２の核酸プローブを一緒にして混合物を得て；
第１の核酸プローブと第２の核酸プローブとが核酸分子にハイブリダイゼーションするに適した条件下に混合物を維持し；次いで
混合物の蛍光を決定する
を含み、
第１の核酸プローブが蛍光体基および蛍光消光脱離基を含むものであり；第２の核酸プローブが求核基を含むものであり；第１の核酸プローブおよび第２の核酸プローブが核酸分子にハイブリダイゼーションする場合に、求核基が蛍光消光脱離基と置き換わることができるものである、方法。
【請求項２６】
蛍光消光脱離基が第１の核酸プローブの５’末端に共有結合しており、求核基が第２の核酸プローブの３’末端に共有結合している請求項２５記載の方法。

【請求項２７】
蛍光消光脱離基が第１の核酸プローブの３’末端に共有結合しており、求核基が第２の核酸プローブの５’末端に共有結合している請求項２５記載の方法。
【請求項２８】
蛍光消光脱離基が第１の核酸プローブの５’末端に共有結合しており、求核基が第２の核酸プローブの３’末端に共有結合している請求項２５記載の方法。
【請求項２９】
蛍光消光脱離基が蛍光体基から１ヌクレオチド離れて第１の核酸プローブに共有結合している請求項２５記載の方法。
【請求項３０】
蛍光消光脱離基が蛍光体基から２ヌクレオチド離れて第１の核酸プローブに共有結合している請求項２５記載の方法。
【請求項３１】
蛍光消光脱離基が蛍光体基から３ヌクレオチド離れて第１の核酸プローブに共有結合している請求項２５記載の方法。
【請求項３２】
核酸分子がＤＮＡである請求項２５記載の方法。
【請求項３３】
第１の核酸プローブがＤＮＡである請求項２５記載の方法。
【請求項３４】
第２の核酸プローブがＤＮＡである請求項２５記載の方法。
【請求項３５】
核酸分子がＲＮＡ、２’－Ｏ－メチル－ＲＮＡ、ホスホロチオエートＤＮＡ、ロックされた核酸（ＬＮＡ）またはＰＮＡである請求項２５記載の方法。
【請求項３６】
第１の核酸プローブがＲＮＡ、２’－Ｏ－メチル－ＲＮＡ、ホスホロチオエートＤＮＡ、ロックされた核酸（ＬＮＡ）またはＰＮＡである請求項２５記載の方法。
【請求項３７】
第２の核酸プローブがＲＮＡ、２’－Ｏ－メチル－ＲＮＡ、ホスホロチオエートＤＮＡ、ロックされた核酸（ＬＮＡ）またはＰＮＡである請求項２５記載の方法。
【請求項３８】
維持工程の前に混合物の蛍光を決定する工程をさらに含む請求項２５記載の方法。
【請求項３９】
決定工程が、可視的検出、蛍光顕微鏡での検出、蛍光分光光度計での検出、フローサイトメーターでの検出または蛍光マイクロプレートリーダーでの検出を含む請求項２５記載の方法。
【請求項４０】
目的の核酸配列を検出するためのキットであって：
目的の核酸配列の少なくとも一部分にハイブリダイゼーションする第１の核酸プローブ；および
目的の核酸配列の少なくとも一部分に第１の核酸プローブと隣接してハイブリダイゼーションする第２の核酸プローブ
を含み、
第１の核酸プローブが蛍光体基および蛍光消光脱離基を含むものであり；第２の核酸プローブが求核基を含むものであり；第１の核酸プローブおよび第２の核酸プローブが、目的の核酸配列を含む核酸分子にハイブリダイゼーションする場合に、求核基が蛍光消光脱離基と置き換わることができるものである、キット。
【請求項４１】
蛍光消光脱離基が第１の核酸プローブの５’末端に共有結合しており、求核基が第２の核酸プローブの３’末端に共有結合している請求項４０記載のキット。

【請求項４２】
蛍光消光脱離基が第１の核酸プローブの３’末端に共有結合しており、求核基が第２の核酸プローブの５’末端に共有結合している請求項４０記載のキット。
【請求項４３】
蛍光消光脱離基が蛍光体基から１ヌクレオチド離れて第１の核酸プローブに共有結合している請求項４０記載のキット。
【請求項４４】
蛍光消光脱離基が蛍光体基から２ヌクレオチド離れて第１の核酸プローブに共有結合している請求項４０記載のキット。
【請求項４５】
蛍光消光脱離基が蛍光体基から３ヌクレオチド離れて第１の核酸プローブに共有結合している請求項４０記載のキット。
【請求項４６】
第１の核酸プローブがＤＮＡである請求項４０記載のキット。
【請求項４７】
第２の核酸プローブがＤＮＡである請求項４０記載のキット。
【請求項４８】
第１の核酸プローブがＲＮＡ、２’－Ｏ－メチル－ＲＮＡ、ホスホロチオエートＤＮＡ、ロックされた核酸（ＬＮＡ）またはＰＮＡである請求項４０記載のキット。
【請求項４９】
第２の核酸プローブがＲＮＡ、２’－Ｏ－メチル－ＲＮＡ、ホスホロチオエートＤＮＡ、ロックされた核酸（ＬＮＡ）またはＰＮＡである請求項４０記載のキット。

【発明の詳細な説明】
【発明の詳細な説明】
【０００１】
関連出願の相互参照
本願は、参照により本明細書に記載されているものとされる２００２年７月１８日出願の米国仮出願第６０／３９６，７７４号に対して優先権を主張するものである。
【０００２】
政府援助による研究または開発に関する記述
米国政府は、National Institutes of Healthからの認可番号ＧＭ６２６５８およびU.S. Army Research Officeからの認可番号ＤＡＤＤ１９－００－１－０３６３－Ｐ０００００１に従って、本発明における権利を保有しうる。
【０００３】
発明の分野
本発明は、化学ライゲーションの検出方法に関する。一例は、核酸の検出方法を包含し、より詳細には、蛍光特性の変化を介する核酸のライゲーションの検出方法に関する。消光（quenching）基を脱離基として使用することによるライゲーションの検出方法が開示される。
【０００４】
関連技術の説明
疾病の分子的性質が研究されるにつれ、インビトロおよびインビボの両方において核酸を検出し分析する方法に対する必要性が増大している。ヒトゲノムの配列決定に関する最近の研究により、ゲノムおよびプロテオームの情報が激増した。この情報は、重要な、そして時々生命に関わる疾病の診断、予後および処置の相違を生じさせている。この情報を十分に活用するために、１個のヌクレオチドが相違する核酸の存在および不存在を検出し分析するためのより迅速かつ単純であるが正確な方法を開発する必要がある。ある場合には、核酸は微量または痕跡量しか存在しないこともあり、高感度であることも要求される。

【０００５】
例えば、細菌感染における薬剤耐性は、典型的には、遺伝学的に特徴づけられる。感染を特徴づけるための方法は、通常には、先ず生物を培養することを包含し、それには少なくとも数日、最悪の場合数ヶ月かかる。特別な例は結核の標準的な診断であり、Mycoplasma tuberculosis生物の増殖が遅く、抗生物質耐性の決定にさらに時間がかかるので、該診断には通常数週間かかる。細菌の培養が短時間（例えば２日）であっても、敗血症や壊死性の筋膜炎において生じるような他の急性感染を有する患者にとってはひどく長いものである。かくして、遺伝学的分析方法の重要性が増大しており、より迅速な方法は必要となっている。

【０００６】
標準的かつ通常に用いられる標的核酸検出方法は、化学、分子生物学およびバイオテクノロジーの分野におけるハイブリダイゼーションプローブとしてオリゴヌクレオチドを使用することを包含する。標的ＤＮＡまたはＲＮＡ鎖に相補的な配列を有し、適当にストリンジエントな条件下のハイブリダイゼーションにて標的ＤＮＡまたはＲＮＡ鎖にハイブリダイゼーションしうるようにオリゴヌクレオチドプローブを合成する。標準的方法は、ＤＮＡまたはＲＮＡ標的鎖を固体表面、膜、またはビーズに固定化することを必要とする。次いで、同定のためのレポーター基で標識したオリゴヌクレオチドプローブを添加し、それが、該標的に相補的な配列をコードする標的ＤＮＡまたはＲＮＡ鎖のいずれかの領域に非共有結合的に結合する。次に、残存している未結合オリゴヌクレオチドプローブを固定化標的オリゴヌクレオチドから洗い去り、結合プローブの存在を、結合したレポーター基により検出する。通常のレポーター基は、着色または蛍光生成物を生じる放射活性原子（）、蛍光または化学発光基、および酵素を包含する。この方法の多くのバリエーションが存在し、それらは当業者に知られており、サンドイッチハイブリダイゼーション複合体の使用、およびin situハイブリダイゼーション法を包含する。

【０００７】
標的核酸の検出に標準的なハイブリダイゼーション法を使用することにおける１の制限は、標的ＤＮＡまたはＲＮＡに対するオリゴヌクレオチドプローブの非特異的結合である。短いオリゴヌクレオチド（例えば６～１２量体）は、単一のヌクレオチドミスマッチの検出において長いものよりもずっと効果的であるが、長いオリゴヌクレオチドよりも鋳型に対するアフィニティーが低い。GryaznovおよびLestingerは１本の長いオリゴヌクレオチドプローブのかわりに２個またはそれ以上の短いオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる、標的核酸への核酸プローブの選択性増大方法を開発した（Gryaznov et al. Nucleic Acids Research, 22: 2366-2369, 1994; Lestingerらの米国特許第５６８１９４３号）。２個またはそれ以上の短いオリゴヌクレオチドプローブは親電子基（例えば、ブロモアセチド、トシル）または親核基（例えば、ホスホロチオエートモノエステル）のいずれかをそれらの末端に有するであろう。これらの短いオリゴヌクレオチドプローブは、相補的な鋳型上の隣接した位置に結合する塩基配列を含む。プローブの配置が鋳型に沿ったものである場合、オリゴヌクレオチドプローブは互いに近くに位置し、自発的にライゲーションし、不可逆的な共有結合を形成する。さらなる活性化剤または酵素を添加しなくてもオリゴヌクレオチドプローブは自発的にライゲーションする。

【０００８】
標準的なハイブリダイゼーション方法に対するこのような改良にもかかわらず、蛋白や固体支持体に非特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブにより疑陽性の結果が生じる可能性がある。静的な標識基を用いる標準的なハイブリダイゼーション方法は、それらが通常ストリンジェントな条件下の固体支持体上で行われなくてはならず、注意深い洗浄を必要とするという理由で、さらに制限を受ける（静的な標識とは、そのシグナルを変化させない蛍光標識のごとき標識をいう）。特に、固定された細胞における核酸を検出あるいはイメージングするために標準的なオリゴヌクレオチドプローブを用いる場合、細胞を注意深く調製し、非特異的シグナルを避けるように条件を正しく整えなければならない。典型的には、当業者に知られた方法を用いて細胞を先ず固定し、透過性にし、次いで、ホ

ルムアミドおよび／またはエタノールを用いて架橋する。次に、ハイブリダイゼーションを行い、その後、数回注意深く洗浄して未結合プローブを除去する。かくして、静的に標識されたオリゴヌクレオチドを用いる標準的なハイブリダイゼーション法は、細胞の調製のための時間を必要とし、エラーの可能性を増加させ、未結合プローブの洗浄が不可能な生きた細胞には使えない。

【０００９】

近年、蛍光強度またはエミッション波長の変化を用いる新たな核酸検出法が開発された。検出用核酸の蛍光変化法はいくつかの利点を有し、それらは、洗浄工程を用いずに未結合プローブ分子を所望標的に結合した分子から容易に識別できる、該方法を溶液または固体支持体のいずれにおいても使用することができるといった利点を包含する。最も重要なことは、それらをインタクトな細胞に適用できたことである。なぜなら洗浄が必要ないからである。そのうえ、消光の変化による単純な強度変化に依存する蛍光変化法は、より多くのスペクトル範囲がないので、複数分析対象の同時プロービングが可能であるという利点を有する。

【００１０】

もっともよく開発された消光をベースにした核酸検出方法は「分子ビーコン」法であり、それは、蛍光体および消光剤（quencher）を伴うステム中の標識されたヘアピン生成ＤＮＡｓからなる。ヘアピン生成ＤＮＡプローブが相補的配列に結合してヘアピン開口部を生じ、消光剤が蛍光体から離れる。これらの分子ビーコンを溶液または固体支持体上のいずれの方法にも使用できる。しかしながら、この方法は、蛍光変化が明らかに溶液条件、例えば温度、イオン強度に依存し、それゆえ条件を注意深くモニターしなければならないという理由で、制限される。もう１つの不利な点は、分子ビーコン法が、酵素による方法やいくつかの非酵素的自己ライゲーション法のごとき他のＤＮＡ－センシング方ほど配列選択的でないことである。分子ビーコン法は、生きた哺乳動物細胞中のＲＮＡをイメージングするために最近使用されたものであり、その結果が論じられている。なぜならこれらのプローブが分解されることによりあるいはＲＮＡでなく蛋白に結合することにより疑陽性を生じうるからである。実際に、特異的に蛋白に結合し発光するビーコンが知られている（Fang, X. et al., Anal. Chem. 72: 3280-3285 (2000)）。細胞中には多くのＤＮＡ結合蛋白およびＲＮＡ結合蛋白が存在し、その結果、プローブの非特異的結合により疑陽性が生じうる。

【００１１】

多色ヘアピン形オリゴヌクレオチドプローブ（分子ビーコン）が対立遺伝子の識別のために示唆された（S. Tyagi et al., Nature Biotechnology 16: 49-53, 1998）。ヘアピンプローブは、直鎖状プローブと比較して有意に向上した特異的を有すると報告された。しかしながら、報告された特異性はホスホロチオエート－ヨウ素自己ライゲーションプローブほど高くなかった。上記のごとく、かかるビーコンは蛋白に結合することにより疑陽性を生じる。

【００１２】

初期の研究において、ヌクレオシドＳ－アルキルホスホロチオエートの調製が１９６９年に提供された（A. F. Cook, J. Am. Chem. Soc. 92(1): 190-195, 1969）。ホスホロチオエート基は酸素アナログよりも高い求核性を有する。種々のハロゲン化合物との反応が記載された。チミジン３’－ホスホロチオエートの分子間求核反応が１９７１年に示唆された（S. Chladek and J. Nagyvary, J. Am. Chem. Soc. 94(6): 2079-2085, 1971）。Ｐ－Ｓ－Ｃ ５’結合を含むジヌクレオチドおよびトリヌクレオチドが得られた。それらの反応はオリゴヌクレオチドを用いて行われず、それらはＤＮＡｓまたはＲＮＡｓの検出に使用されず、さらにそれらは蛍光標識または消光剤の欠点を補填するものでもなかった。

【００１３】

米国特許第５４７６９２５号、第５６４６２６０号、第５６４８４８０号および第５９３２７１８号には、特別なヌクレオシド間結合を有するオリゴヌクレオチドの製造および使用が示唆されている。該オリゴヌクレオチドは慣用的なオリゴヌクレオチドと比較して

改善されたハイブリダイゼーション特性を有すると記載されている。

【００１４】

５’－Ｏ－トシル基の３’－ホスホロチオエートによる置換を介するオリゴヌクレオチドのカップリングがHerrleinら（J. Am. Chem. Soc. 117: 10151-10152, 1995）により示唆された。該アプローチは３つの異なる系：ニックトダンベルオリゴヌクレオチド（nicked dumbbell oligonucleotide）、接合部位において短いオリゴヌクレオチドオーバーラップを有する抱合体の環化、ならびに２本鎖末端におけるキャップの閉塞により説明された。Herrleinらは、ヨーダイドまたは消光脱離基のごとき他の脱離基を企図しておらず、彼らはＤＮＡまたはＲＮＡ配列を検出するためにカップリングを使用しなかった。

【００１５】

ホスホロチオエート基によるα－ハロアシル基の置換が、２つのオリゴヌクレオチドを結合させる非酵素的方法として米国特許第５４７６９３０号により示唆されている。標的ポリヌクレオチド上の隣接位置において結合させることにより２つのオリゴヌクレオチドが近接した位置に置かれる。消光脱離基は示唆されなかった。

【００１６】

５’－ヨードヌクレオチドが１本鎖および２本鎖ＤＮＡｓの効率的な非酵素的ライゲーションを可能にすることが示された（Y. Xu and E. T. Kool, Tetrahedron Lett. 38(32): 5595-5598, 1997）。ヨードチミジンホスホルアミダイトにより５’－ヨーダイドをオリゴヌクレオチド中に配置することが可能となった。消光脱離基はこの刊行物中に示唆されなかった。

【００１７】

迅速かつ正確な核酸の検出およびイメージングのための単純な方法に対する必要性がやはり存在する。さらに、未結合プローブの洗い流しに依存しない方法が望ましく、特に、生きた細胞に使用でき、配列中１個のヌクレオチドの違いに対して特異的である方法が望ましい。

【００１８】

最近、Sando and Koolは、溶液中および固体支持体上の脱離基としての消光剤の使用についての記載をインターネット上で公表した（J. Am. Chem. Soc. 124(10): 2096-2097, 2002;２００２年２月１３日にインターネット上に公表）。

【００１９】

発明の概要

蛍光体および脱離基としても作用する特別な消光剤を含むオリゴヌクレオチドが開示される。消光されたＤＮＡに対する求核攻撃は、消光剤基の遊離を引き起こし、消光剤基が存在しないことにより蛍光を発するライゲーションした分子を生じさせる。該オリゴヌクレオチドは酵素を用いない核酸ハイブリダイゼーションならびに野生型および変異核酸配列の検出において有用である。

【００２０】

図面は本願の一部をなし、本発明の特定の態様をさらに示すために包含される。これらの図面の１つまたはそれ以上と、本明細書中の特別な具体例の詳細な説明とを組み合わせて参照することにより、本発明がよりよく理解されうる。

【００２１】

配列表の説明

配列表は本願明細書の一部をなし、本発明の特定の態様をさらに示すために包含される。これらの配列の１つまたはそれ以上と、本明細書中の特別な具体例の詳細な説明とを組み合わせて参照することにより、本発明がよりよく理解されうる。

配列番号：１は１３量体：５’－ＴＧＴ＊ＧＧＧＣＡＡＧＡＧ－３’である。

配列番号：２は野生型５０量体標的配列である。

配列番号：３は変異トランスバージョン５０量体標的配列である。

配列番号：４は７量体ＭＵＴプローブである。

配列番号：５はＡＴＣＣ１１７７株中の１６Ｓ ｒＲＮＡ部位３１０－３１４である。

配列番号：６はＭＧ１６５５株中の１６Ｓ ｒＲＮＡ部位３１０－３１４である。
【００２２】
発明の詳細な説明
一般的には、本発明は、分子のライゲーションおよびその検出のための組成物および方法に関する。該組成物および方法をインビトロおよびインビボの両方において用いることができる。一般的には、分子は蛍光体および５’消光脱離基を含む。分子間様式で別の分子とライゲーションすると、あるいは分子内様式で自己ライゲーションすると、消光脱離基が置換され、蛍光体はもはや消光されない。分子の蛍光特性の変化を検出することができ、定量的および定性的なライゲーションのアッセイが提供される。
【００２３】
１の具体例において、蛍光体および消光脱離基を含む分子はいずれのタイプの分子であってもよい。例えば、分子は有機化合物、有機金属化合物、核酸、ペプチド、蛋白、脂質、炭水化物、または他のタイプの分子であってもよい。
【００２４】
消光脱離基および蛍光体を有する分子がさらに求核基を含む場合、脱離基の分子内置換は環状分子の生成を引き起こしうる。例えばこの方法を用いて環状核酸分子を得ることができる。さらにこの方法を用いて環状ペプチドおよび環状または架橋蛋白を得ることもできる。
【００２５】
消光基および蛍光体を有する分子は、求核基を有する分子に由来する別個の分子でありうる。これらの第１および第２の分子は同じタイプの分子（例えば、核酸、ペプチド、蛋白、有機化合物、有機金属化合物）でもよく、あるいは異なるタイプの分子でもよい。第１および第２の分子は溶液中にあってもよく、支持体に固定化されていてもよい。
【００２６】
消光脱離基の例を図２に示す（図において、それらはヌクレオシドの５’炭素に結合しているが、それらは求核基と反応するいずれの原子に結合してもよいことに注意）。図中の脱離基はイオウおよびそれに結合した３個の酸素原子、ならびにイオウに結合した炭素鎖を含む。一般的には、脱離基は（ａ）求核基による攻撃のために原子（脱離基が結合しているもの）を活性化させる能力および（ｂ）求核基が攻撃しない場合に脱離することにより定義される。
【００２７】
一般的には、求核基（本発明において企図されるもの）は、ホスホロチオエートおよびホスホロセレノエート基、チオールおよびチオエート基、ヒドロキシおよびオキシアニオン基、アミン、ヒドロキシルアミン、ヒドラジン、ヒドラジド、ホスフィン、チオアシッドおよびそれらの抱合塩基、セレノールおよびセレノエートを包含する。これらをいずれの分子または対象に結合させてもよい。
【００２８】
本発明の具体例を溶液中で相補的ＲＮＡｓまたはＤＮＡｓの存在下にて行うことができる。これにより２個の核酸分子の反応性末端が近くに置かれる。分子内様式の場合、１の反応性末端が他の反応性末端に隣接して結合する。
【００２９】
本発明の具体例は、先行技術に優る多くの利点を提供する。それはより小さいスペクトルウインドウを提供し、かくして、バックグラウンド蛍光をより問題のないものとし、多数の色を用いてより多くの数の同時検出イベントが行えるようにする。さらに、結果は肉眼で見えるものである。プローブが正しい標的を見出さない場合においてプローブは暗いままであり、その場合に蛍光励起によりプローブは発光するので、結果の解釈が簡単である。もう１つの利点は、望ましくないタンパク結合の結果としての疑陽性シグナルの可能性が低いことである。本発明の組成物および方法は過剰な洗浄または調製工程を必要としない。
【００３０】

本発明の１の具体例は消光剤で標識された核酸分子に関するものである。一般的には、核酸分子はいずれのタイプの核酸分子であってもよく、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、２’－Ｏ－メチル－ＲＮＡ、ホスホロチオエートＤＮＡ、ロックされた核酸（ＬＮＡ）、またはＰＮＡであってもよい。目下好ましい核酸分子はＤＮＡまたは２’－Ｏ－メチル－ＲＮＡである。好ましくは、消光基は核酸分子の５’ヒドロキシル基に結合したものである。一般的には、核酸分子は１本鎖または２本鎖であってよい。核酸分子が１本鎖であるのが目下好ましい。一般的には、核酸分子はいすれの長さのヌクレオチド塩基（２本鎖の場合には塩基対）であってもよい。例えば、長さは約４、約５、約６、約７、約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０、約２１、約２２、約２３、約２４、約２５、約３０、約４０、約５０塩基、約６０塩基、約７０塩基、約８０塩基、約９０塩基、約１００塩基、または２ないしこれらの長さの範囲のいずれかの長さでありうる。

【００３１】

一般的には、いずれの求核基を用いて消光脱離基を置換してもよい。例えば、求核基はホスホロチオエート、ホスホロセレノエート、または他の知られた求核基がある。求核基は核酸プローブ中の５’末端、３’末端、あるいは５’末端と３’末端との間にあってもよい。他のタイプの分子において、求核基はいずれの位置にあってもよい。

【００３２】

一般的には、蛍光消光剤を用いることができる。消光剤はダブシル（ジメチルアミノ－アゾベンゼン－スルホニル）基、ジマプダブシル（dimapdabsyl）（（ｐ－ジメチルアミノ－フェニルアゾ）アゾベンゼンスルホニル）基、他のアゾベンゼン－スルホニル基、アミノ、ジアルキルアミノ、ニトロ、フルオロおよびシアノ基のごとき他の置換基を伴うベンゼンスルホニル基、ならびに他のこれらの置換基を含むアレンスルホニル基であってもよい。スルホニル脱離基と抱合した金粒子も含まれる。ダブシル活性化５’ヒドロキシル基は、第２の核酸分子上に存在する求核基（または他の求核分子）による攻撃があった場合の脱離基である。例えば、３’－ホスホロチオエートを有する第２の核酸分子は、２つの核酸分子間に共有結合を形成する場合に、５’ダブシレート基と置き換わることができる。あるいはまた、３’ヒドロキシルが消光脱離基に結合していてもよい。一般的には、天然または合成のヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドを修飾して消光脱離基を含むようにすることができる。例えば、ダブシルチミジン誘導体を第１の核酸の５’末端に含ませることができる。さらに、５’末端に天然または合成ヌクレオチドを含むすでに単離されたあるいは合成されたＤＮＡまたはＲＮＡの５’末端にダブシルを付加することもできる。ペプチド上のヒドロキシル基にダブシルを付加することもできる。例えば、セリンまたはスレオニンのヒドロキシル基上に、システインのイオウ基上に、あるいはアミノ酸のカルボキシ基が還元された場合に生じるヒドロキシル基にダブシルを付加することもできる。蛍光消光脱離基が、修飾された核酸またはヌクレオシドの炭素上、例えばホモ－ｄＴ、ホモ－ｄＡ、ホモ－ｄＧまたはホモ－ｄＣの６’炭素上にあってもよい。

【００３３】

ダブシルは従来から蛍光消光剤として使用されてきた。しかしながら、それが脱離基として使用されたことはなかった。それはすでにアミンに結合されていたが、それは脱離基として作用し得ない。本発明の具体例を成功させるのは、脱離基として作用する能力である。それは求核基による攻撃を引き起こし、次いで、それが脱離し、蛍光の増加を引き起こす。

【００３４】

一般的には、いずれの蛍光体を用いてもよい。蛍光体の例は、フルオレセイン、ＴＡＭＲＡ、Ｃｙ３、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、ＢＯＤＩＰＹ蛍光体、ＲＯＸ、ＪＯＥ、およびオレゴングリーンを包含する。フルオレセインの混入の例は、ｄＵのフルオレセインＣ－５－アルケニルコンジュゲートである。核酸中への蛍光体の混入のための既知方法はいずれのものでも使用できる。蛍光体を消光剤の近くに置くことが好ましいが、そのことは必須で

はない。一般的には、蛍光特性の変化をモニターすることによるライゲーション検出を可能にするに十分であれば、蛍光体は消光剤からいずれの距離のところにあってもよい。例えば、蛍光体が消光剤で標識されたヌクレオチドから１、２、３ヌクレオチド離れたところにあってもよい。消光効率（すなわち、蛍光消光基不存在下で消光されていない蛍光を蛍光消光基存在下で消光されている蛍光で割ったもの）は、好ましくは、少なくとも約２倍、少なくとも約３倍、少なくとも約４倍、少なくとも約５倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約５０倍、少なくとも約６０倍、少なくとも約７０倍、少なくとも約８０倍、少なくとも約９０倍、少なくとも約１００倍、少なくとも約２００倍、少なくとも約３００倍、少なくとも約４００倍、少なくとも約５００倍、少なくとも約６００倍、少なくとも約７００倍、少なくとも約８００倍、少なくとも約９００倍、少なくとも約１０００倍、少なくとも約２０００倍、少なくとも約３０００倍、少なくとも約４０００倍、少なくとも約５０００倍である。

【００３５】

一般的には、生じた蛍光の増加をいずれの方法により検出してもよい。例えば、蛍光顕微鏡、蛍光分光光度計、または蛍光マイクロプレートリーダーを用いて蛍光を視覚的に検出することができる。さらに、フローサイトメトリー的方法を用いて蛍光をモニターすることができる。

【００３６】

蛍光体および消光脱離基を含む上記分子を、溶液中、表面上、固定化細胞中、または生きた細胞中で使用することができる。一般的には、細胞はいずれのタイプの細胞であってもよく、例えば、細菌細胞、植物細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、ＣＨＯ細胞、ヒト細胞、癌細胞、固定された細胞、ウイルス感染した細胞、酵母細胞、ミノカサゴ細胞、線虫細胞であってもよい。

【００３７】

蛍光体および消光脱離基を含む上記分子を、凍結乾燥状態で、または溶液として、あるいは固体支持体に結合させた状態で提供することができる。例えば、オリゴヌクレオチドを固体支持体に結合させてもよい。標的核酸配列中の特別な野生型または変異配列を検出するように設計されたキットの一部としてオリゴヌクレオチドを提供してもよい。該キットは対照標的配列、説明書、プロトコル、バッファー、細胞、および他の通常の生物学的成分を含んでいてもよい。

【００３８】

上記核酸分子を本発明の方法において用いて、細胞集団中の特別な変異の存在または不存在を検出することができる。さらに、核酸分子を本発明の方法において用いて、ユニークな核酸配列に結合する核酸分子を設計することにより、特定細胞タイプの存在または不存在を検出することができる。例えば、試料中に望ましくないあるいは病原性の微生物またはウイルスが存在する場合にのみオリゴヌクレオチドのライゲーションが起こる（それにより蛍光が生じる）、望ましくない細菌または他の有害微生物の検出方法を設計することができる。かかる微生物およびウイルスの膨大なアレイが存在する。例はMycobacterium tuberculosis、Mycobacterium avium、Mycobacterium intracellulare、Bordetella pertussis、Neisseria gonorrhea、Neisseria meningitidis、Escherichia coli 0157:H7、およびBacillus anthracisを包含する。

【００３９】

上記核酸分子を用いて、溶液中、固定された細胞中、インタクトな細胞中、生物の一部分中（例えば組織試料）、またはインタクトな細胞中における特別な遺伝学的配列を検出することができる。該分子を用いて、遺伝子発現を検出し、細胞における相違を識別し同定することができる。

【００４０】

本発明のさらなる具体例は、複数の核酸配列を同時に検出するための複数の異なった色

のプローブの使用を包含する。これを用いて、異なるタイプの細胞、正常細胞と疾病細胞（例えば、癌細胞またはウイルス感染細胞）、あるいは細胞中の複数のＤＮＡｓまたはＲＮＡｓを識別および同定することができる。

【００４１】

上記分子および方法を用いて、細胞中の遺伝子発現の経時変化、あるいは薬剤、薬剤候補物質または治療薬への曝露に応答した細胞中の遺伝子発現変化をモニターすることができる。

【００４２】

下記実施例は本発明の好ましい具体例を示すものである。本発明者らにより見出された方法を示す実施例に開示された手法が本発明の実施においてうまくいくこと、そしてその実施に関して好ましいモードを構成すると考えられることを、当業者は理解するはずである。しかしながら、本開示から、個々の具体例において多くの変更をなし得ること、そして本発明の範囲から逸脱することなく類似または同様の結果が得られることを理解するはずである。

【実施例】

【００４３】

実施例１：溶液中での反応

長さ５０ヌクレオチドの野生型および変異配列をＨ－ｒａｓ遺伝子から選択した。コドン１２における既知のＣからＡへのトランスバージョンを選択して７量体結合部位の中央にあるようにした。求核性の７量体配列は５’－ＣＣＧＴＣＧＧ－３’（配列番号：４）であり、中央のＴはＡトランスバージョンとハイブリダイゼーションするが、野生型Ｃとはハイブリダイゼーションしない。求核性配列は３’ホスホロチオエート基を含んでいた。親電子的な１３量体配列は５’－ＴＧＴ＊ＧＧＧＣＡＡＧＡＧ－３’（配列番号：１）であった。親電子的配列の脱離基としてダブシル基を５’ヒドロキシル上に用い、市販のｄＵのフルオレセインＣ－５－アルケニル抱合体（Ｔ＊で印を付けた）を用いて消光剤から２ヌクレオチド離れたところに蛍光体を配置した。野生型標的配列は３’－ＡＴＡＴＴＣＧＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＣＣＣＧＣＧＧＣＣＧＣＣＡＣＡＣＣＣＧＴＴＣＴＣＡＣＧＣＧＡＣＴＧ－５’（配列番号：２）であり、変異トランスバージョン標的配列は３’－ＡＴＡＴＴＣＧＡＣＣＡＣＣＡＣＣＡＣＣＣＧＣＧＧＣＡＧＣＣＡＣＡＣＣＣＧＴＴＣＴＣＡＣＧＣＧＡＣＴＧ－５’（配列番号：３）であり、ＣからＡへのトランスバージョンに下線を付した。

【００４４】

ゲル電気泳動を用いて反応をモニターした。ＰＡＧＥにより、標的配列が２つのオリゴヌクレオチドに対して完全に相補的である場合にはライゲーションした生成物が示され、単一のヌクレオチドミスマッチがある場合には生成物が示されなかった。７時間後の変換を評価したところ、配列が完全に相補的な場合に約８０％であった。出発物質は、ダブシル基による不完全な消光のためごく弱い蛍光を発したが、生成物は強い蛍光を発した。

【００４５】

５２０ｎｍにおける蛍光エミッション（４９５ｎｍで励起）を追跡することにより同じ反応をリアルタイムでモニターした。蛍光エミッションの変化は、約１００倍の強度の増加を示し、出発物質に関して９９％の消光効率を示した。温度を１５℃から３７℃に変化させると、反応速度が２５℃付近で最大となることが示され、その温度は標的の結合した２つのプローブの融解温度に近かった。野生型と比較した場合のピーク面積に基づけば配列の選択性は約３５倍であり、変異部位のＴ－ＡペアーまたはＴ－Ｃミスマッチが示された。

【００４６】

実施例２：固体支持体上での反応

多くの遺伝学的分析方法はビーズ、スライドグラスおよび他の表面に固定されたプローブを用いるので、固体支持体を用いて本発明を評価した。市販の逆（５’→３’）ホスホルアミダイトを用いた９０μｍビーズ（１０００Ａ孔サイズ）上の７量体ＭＵＴプローブ

（５’－ＣＣＧＴＣＧＧ－３’）を使用し、最後の３’ヒドロキシル基上に３’ホスホロチオエート基を配置した。ヘキサエチレングリコールリンカーを用いて、ポリマー表面付近での潜在的な混雑の問題を改善した。かかるビーズは、正しい標的ＤＮＡの存在下において、１３量体の消光された親電子プローブを自己ライゲーションさせる潜在能力を有する。このことによりビーズが蛍光を発すると期待される。なぜならダブシレート基が消失し、付近のフルオレセイン標識が消光を失うからである。蛍光顕微鏡下でイメージングすることにより固相自己ライゲーションをモニターした。結果は、溶液中と同様にポリスチレンビーズ上でも反応が進行することを示した。反応の開始時点において、ビーズは暗く、消光された１３量体プローブからの少量のエミッションにより溶液はかすかな緑色蛍光を示した。反応が進行するにつれ、ビーズは明るくなり、約２０時間後に最大値の半分に達した。この固体上では反応速度が遅いように見えるが、セレンのごとき異なる求核剤によりこのことが改善される可能性がある。そのうえ、リンカーの長さを増加させると、反応を隠す表面の効果が小さくなる可能性があると思われる。結局、多くの適用において、反応が完結する必要はないと考えられる。

【００４７】

実施例３：蛍光体としてのＴＡＭＲＡの使用

異なる蛍光体を用いて実施例１を繰り返した。異なる蛍光体の使用により、複数の遺伝子配列を同時に感受性にすることが可能になるであろう。ダブシルは種々の蛍光体に対する消光剤として報告されている。ダブシル／ＴＡＭＲＡ親電子プローブを用いてビーズ上で同じライゲーションを行った。結果は、新たな色素についてもライゲーションおよび非消光が成功することを示した。

【００４８】

実施例４：固定された細胞中のＲＮＡの染色

次に、ＱＵＡＬプローブを用いて細胞標本（例えば細菌細胞）中のＲＮＡｓを染色した。固定された細菌標本中のリボソームＲＮＡｓの染色に蛍光オリゴヌクレオチドを用いることについて、細菌３～４年間にかなりの数の文献が公表されている。これらの特別な染色は、顕微鏡観察およびフローサイトメトリー（ＦＣＭ）による株の同定に使用するために研究されてきた。リボソームＲＮＡｓを標的化することは、細菌の属および種ならびに亜種さえも同定することを可能にする。幸運なことに、細菌ｒＲＮＡｓ、特に大腸菌株に関しては利用可能な配列の情報が現時点において多い。リボソームＲＮＡを標的化することのさらなる利点は、標的化可能な２次構造がマッピングされていることである。さらに、それはコピー数が多く（１個の細胞中に３００００個程度のリボソーム）、そのことは可視シグナルを得る際に重要である。なぜなら細菌細胞は哺乳動物細胞よりも３オーダー小さいからである。

【００４９】

ｒＲＮＡ標的化に関する最近の文献に用いられている標準的なオリゴヌクレオチドプローブは約３０ヌクレオチドの長さである（それらの標準的なプローブは静的な蛍光のみを用いるものであり、よって、注意深い洗浄を必要とし、生きた細胞には使用できない）。最初の研究は、１１７７５Ｔ株の１６Ｓ ＲＮＡ中の残基９００付近に隣接した部位を標的化する、長さ１８ヌクレオチドおよび２０ヌクレオチドの自己ライゲーションプローブを用いるものであった。

【００５０】

ＱＵＡＬ親電子プローブは、上記のごとくダブシルにより消光され活性化されるフルオレセインを担持している。２つの異なる求核プローブを合成した。１のプローブ（Ｓ８００）は公表された配列に対して完全に相補的であり、それ自体ＱＵＡＬプローブにライゲーションすると考えられるものであり、対照プローブ（Ｓ３００）はｒＲＮＡ上の５００ヌクレオチド離れた異なる部位に対して相補的なものであった。細菌を増殖させ、スライドグラスに固定し（ホルムアルデヒド架橋し変性させた）、２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ７．２，０．９Ｍ ＮａＣｌバッファー中２５℃でハイブリダイゼーションさせた。顕微鏡下で経時的にスライドグラスをモニターした。洗浄を行わなかった。ダブシルによ

る効果的な消光によりプローブ溶液は相対的に暗く、細菌ｒＲＮＡｓが簡単にライトアップし、特定標的が存在する場合に蛍光をフォーカシングすると期待された。実際にこのことが観察された。マッチした求核プローブの存在下において特異的な強い緑色シグナルが見えたが、ミスマッチしたＳ３００プローブは可視シグナルを生じさせなかった。対照の場合のシグナルの不存在により、消光されたプローブの分解のごときささいな機構からは陽性シグナルは生じないことが確認された。さらに、近くに結合し、２次構造を最小化するように設計された未標識「ヘルパー」オリゴヌクレオチドは、ヘルパーおよび標的部位にもよるが、シグナルを５０倍まで向上させた。

【００５１】

重要なことは、標的およびプローブが等モル量存在する場合にライゲーションが化学量論的に高い変換率に達するのは長時間を要するという事実にもかかわらず、わずか３時間のハイブリダイゼーション後に自己ライゲーションシグナルが強かったことである。このことは、（ａ）標的よりもプローブが大過剰であったこと、および／または（ｂ）大量のＲＮＡおよびおそらくいくぶんかのターンオーバーの発生による明るいシグナルによるものとされた。

【００５２】

実施例５：固定されていない細胞におけるＲＮＡの染色

消光された自己ライゲーションによる方法は洗浄および酵素添加の必要がないので、該方法を用いてインタクトな細菌（固定されておらず、潜在的に生きている）中のＲＮＡｓを検出した。現在に至るまで、生きた細菌中のＲＮＡｓのイメージングについては、あったとしてもごくわずかの公表されたレポートしかない。標準的な蛍光プローブは、結合していても結合していなくてもシグナルを生じ、未結合プローブを洗い去ることが必要であったので、そのような用途には使用できなかった。標準的なエレクトロポレーション／トランスフェクション法を用いてＱＵＡＬプローブを細胞中に導入した。１０％グリセロール中それぞれ０．２μＭおよび０．６μＭの２種のプローブの存在下で細胞を２秒間エレクトロポレーション（E. coli Pulser (Bio-Rad)）した（ＱＵＡＬ親電子プローブ＋Ｓ８００完全相補的求核プローブ、あるいはＱＵＡＬプローブ＋Ｓ３００ミスマッチ求核プローブ）。細菌をハイブリダイゼーション溶液中室温で３時間放置し、次いで、顕微鏡下でイメージングした。結果は、３時間目に容易に見ることのできる緑色シグナルが存在し、それは固定された細菌を用いて得られるものと本質的に同じであることを示すものであった。対照プローブは類似のシグナルを生じなかった。

【００５３】

実施例６：細菌中のＲＮＡの遺伝学的イメージング

E. coli Ｋ１２株ＭＧ１６５５中のリボソームＲＮＡｓを標的としたプローブを設計した。１６Ｓ ＲＮＡｓの配列（長さ約１５４０ヌクレオチド）がこの株において知られている。４つの部位を選択した：１）ヌクレオチド１８１～２１５；２）ヌクレオチド２９８～３３５；３）ヌクレオチド３２０～３５６；および４）ヌクレオチド８３７～９１０。チオエート求核プローブ（それぞれ長さ１８～２０ヌクレオチド）およびダブシル置換親電子プローブ（それぞれ長さ１７～２０ヌクレオチド）を用いて４つのプローブペアーを構築した。親電子プローブは、市販のＣ５－アルケニル抱合体のようにダブシル末端基から３～４ヌクレオチドの範囲内のウラシルにおいてフルオレセイン標識されたものであった。

【００５４】

文献の方法に従ってパラホルムアルデヒドで細胞を固定し、プローブとともにインキュベーションした。プローブペアー＃４を用いた場合、１８時間のインキュベーション後にはっきりとした緑色シグナルが観察された。ダブシレートプローブのみとのインキュベーションではシグナルはほとんどないか、あるいはなかった。親電子プローブ＃３と一緒になったチオエートプローブ＃４もシグナルをほとんど発生しないか、あるいは発生しなかった。このことは、求核プローブと親電子プローブの隣接した標的化がシグナル発生に役立ち、プローブの非特異的結合はシグナル発生に不十分であることを示す。また、データ

は、これらの条件下においては標的配列の助けがなければプローブペアーの検出可能な量の反応が起こらないことを示す。

【００５５】

４つの１６Ｓ ｒＲＮＡ部位すべてにおけるマッチしたプローブペアーの試験により、すべての場合において有意なシグナルが明らかとなった。このことは、このアプローチにより複数の２次構造が標的化可能であることを強く示唆する。シグナルの量は様々であり、２次構造が結果に影響することが示される。

【００５６】

実施例７：エレクトロポレーションを用いない、インタクトな（パラホルムアルデヒドで固定されていない）細胞中のＲＮＡの染色

標準的な蛍光オリゴヌクレオチドプローブは、未結合または非特異的に結合したプローブの除去を可能にするためにハイブリダイゼーション後に注意深く洗浄することを要するので、細菌細胞の固定および透過性化を必要とする。本発明のアプローチにおいて、この洗浄を必要としない。かくして、インタクトな細菌細胞中のｒＲＮＡｓの標的化の可能性が評価された。取り込み促進のための０．０１％ ＳＤＳ存在下において、相補的ＦＡＭ－Ｇプローブおよび対照ＴＡＭ－Ｔプローブを、生きたＭＧ１６５５ E. coli細胞とともに３７℃でインキュベーションした。この希釈系面活性剤溶液はE. coliのバイアビリティーに影響しないことが報告されている。前もって固定し透過性化する工程を行わず、さらに後で洗浄工程も行わなかった。プローブ溶液中においてイメージを直接得た。ダブシルにより媒介される固定されていないE. coli細胞中の１６Ｓ ｒＲＮＡへの自己ライゲーション反応（界面活性剤導入）の実験の詳細は下記のごとし。

【００５７】

E. coli細胞（ＭＧ１６５５またはＡＴＣＣ１１７７５）をＬＢブロス（ＤＩＦＣＯ）中３７℃で増殖させた。６００ｎｍにおける光学密度が０．５に達した時、懸濁液を氷上で５分間冷却し、そのうち０．５ｍＬを１．５ｍＬのバイアル中に取り、４℃で１００００ｒｐｍ、５分間の遠心分離により細胞を集めた。上清を除去し、細胞を１００μＬのハイブリダイゼーションバッファー（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ７．２，０．９Ｍ ＮａＣｌおよび０．０１％ ＳＤＳ）に再懸濁した。懸濁液に２μＬの２０μＭダブシループローブ、６μＬの２０μＭホスホロチオエートプローブおよび１μＬの５００μＭヘルパーオリゴヌクレオチドを添加した。混合物を室温で３時間インキュベーションした。インキュベーション後、洗浄工程を行わずに懸濁液をスライドグラスに直接スポットし、マイクロカバースライドで覆った。超高圧水銀ランプ（Nikon model HB-10103AF）を用い、ＳＰＯＴ ＲＴデジタルカメラおよびＳＰＯＴ Ａｄｖａｎｃｅｄイメージングソフトウェアを用いて、蛍光顕微鏡（１００倍対物Plan Fluor apoを装備したNikon Eclipse E800）により蛍光イメージを得た。典型的な顕微鏡セッティングは下記のとおり。フルオレセイン：励起４６０～５００ｎｍ；ＴＡＭＲＡ：ＮＤフィルター８を用いて励起５３０～５６０ｎｍ。典型的なデジタルカメラセッティングは下記のとおり。フルオレセイン：露出時間グリーン６秒、バイニング２ｘ２、ゲイン１；ＴＡＭＲＡ：露出時間レッド３．５秒、バイニング２ｘ２，ゲイン２。

【００５８】

プローブ相補性から予想されたように、３時間後に細菌に関して明確な緑色シグナルが見られた。単一ミスマッチプローブペアーを用いた対照においてシグナルは見られなかった。白色光と蛍光イメージの重ね合わせにより二頂分布が示され、そのなかで約半分の細胞が染色され、半分が染色されていなかった。固定およびフローサイトメトリー分析を行うオリゴヌクレオチド／ｒＲＮＡハイブリダイゼーションに関する文献の報告もまたかかる二頂応答を明らかに示しており、約５０～７０％の細胞がシグナルを発している。この出所によらず、これらの実験は、インタクトで結合されていない細菌細胞がたった１個のヌクレオチドの分解能でもって染色されうることを確認するものである。

【００５９】

我々の知識では、このことは固定されていない微生物におけるin situハイブリダイゼ

ーションの最初の使用である。前もって調製することおよび後で洗浄することが必要なくなったことによりプロセスのスピードと単純化が大いに向上するので、このアプローチはｒＲＮＡをベースにした細菌の同定を、以前可能であったものよりもずっと簡単なものとする。そのうえ、ＱＵＡＬプローブは標準的な蛍光プローブよりもずっと高い配列特異性をもたらす。

【００６０】

実施例８：細胞のＲＮＡｓを同定する際の単一塩基特異性

固定されたE. coli調合物における２色ｒＲＮＡハイブリダイゼーションの試験を行った。パラホルムアルデヒド架橋を用いて標準的な固定プロトコルを行った。しかしながら、今回の実験において、未結合および非特異的結合したプローブを除去するためのハイブリダイゼーション後の洗浄を用いなかった。最初の実験は、１６Ｓ ＲＮＡ中のいくつかの部位は、ＤＮＡを添加しただけでＱＵＡＬプローブペアーとともにシグナルを発生しうることを示した。いくつかの部位は競合する２次構造により明らかに隠されていたが、例えば、部位３０５～３３５は２本鎖の３つの領域によりブロックされていると予想される。それらの場合に、Amamにより記載された未標識「ヘルパー」プローブを添加した。かかるヘルパーオリゴデオキシヌクレオチドは、強い２次構造の領域における標準的な蛍光プローブのハイブリダイゼーションを促進することが報告されている。ＱＵＡＬプローブを用いると、ダブシルプローブに隣接して結合するように設計された１７量体ヘルパーがシグナルを著しく増強することが観察された。

【００６１】

単一ヌクレオチド選択性を試験するために、プローブの１個の塩基を変化させ、生じた２種のシグナルがいずれであるかを区別するために異なる色の標識を付した。実験により、標的ＲＮＡに対して完全に相補的である場合にＦＡＭ標識またはＴＡＭＲＡ標識プローブのいずれかが明確なシグナルを生じることが明らかとなった。対照的に、反対側の標識のプローブ中の単一ヌクレオチドミスマッチは同じ条件下で観察可能なシグナルを生じさせなかった。求核プローブを欠く実験ではシグナルはほとんど無いかあるいは無く、偶発的な蛋白結合または非特異的ＲＮＡ結合からはシグナルが生じなかったことが示された。また、求核プローブおよび親電子プローブが１６Ｓ ＲＮＡ中の隣接していない部位に対して相補的である対照実験においてもシグナルは生じなかった。よって、データは、ＲＮＡ標的上で隣り合って結合する完全に相補的なプローブのみがシグナルを生じることを示す。結局、結果は、in situハイブリダイゼーションにおける単一ヌクレオチド特異性についての明解な例を示す。

【００６２】

上記実験は、プローブ配列を変更することにより配列特異性を試験するものであった。配列特異性をさらに試験するために、配列データベースにおいて以前のＭＧ１６５５株中の５’－ＧＣＣＡＣ（配列番号：６）と比較すると部位３１０～３１４において１６Ｓ ｒＲＮＡ（５’－ＧＣＡＡＣ（配列番号：５））中に単一ヌクレオチドの相違を有することが報告された別のE. coli株（ＡＴＣＣ１１７７）を得た。緑色および赤色の消光されたプローブ（元のＭＧ１６５５株の配列に相補的なＦＡＭ－Ｇプローブ、ＡＴＣＣ１１７７配列に相補的なＴＡＭ－Ｔプローブ）を調製して、報告された単一ヌクレオチドの相違を探索した。驚くべきことに、該混合プローブは、たとえ赤色プローブが報告されたｒＲＮＡ配列に相補的であるとしても、はっきりとした緑色シグナルを生じた。このことを別個に調べるために、細胞から全ＲＮＡを単離し、１６ＲＮＡ特異的プライマーを用いてＲＴ－ＰＣＲを行い、得られたＤＮＡを配列決定した。配列決定の結果は、データベースには位置３１２にＡがリストされているのとは対照的に、該ＲＮＡが位置３１２にＣを含むことを明確に示すものであった。よって、ＱＵＡＬプローブはさらに単一ヌクレオチド特異性を示すものであり、データベース中の単一ヌクレオチド配列決定のエラーの確認を可能にするものであった。

【００６３】

フルオレセイン標識またはＴＡＭＲＡ標識５’－ダブシルオリゴヌクレオチドの合成に

関する実験の詳細

ＵＬＴＲＡ ＭＩＬＤ ＳＹＳＴＨＥＳＩＳ（Glen Research）用のＰａｃ－保護ｄＡ、ｉＰｒ－Ｐａｃ－保護ｄＧ、およびアセチル－保護ｄＣホスホルアミダイトを、ダブシル基含有オリゴヌクレオチドの合成に用いた。フルオレセイン標識およびＴＡＭＲＡ標識を、それぞれフルオレセイン－ｄＴおよびＴＡＭＲＡ－ｄＴホスホルアミダイト（Glen Research）とともに導入した。メタノール中０．０５M炭酸カリウムにて、室温で１２時間インキュベーションすることにより脱保護およびＣＰＧ支持体からの開裂を行った。インキュベーション後、逆相ＨＰＬＣ（Allotec BDS-C18カラム、２５０mm、０．１M酢酸トリエチルアンモニウムｐＨ７．０／アセトニトリルで溶離）によりオリゴヌクレオチドを精製した。

【００６４】

細菌株

２種のE. coli株ＭＧ１６５５およびＡＴＣＣ１１７７５を用いた。E. coli ＭＧ１６５５株の７つのｒｒｓオペロン（ｒｒｓ　Ａ－Ｈ）をデータベース（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/chrom?gi=115&db=G）から得た。ＡＴＣＣ１１７７５株の７つのｒｒｓオペロン（ｒｒｓ　Ａ－Ｈ）の平均配列はＥＭＢＬデータバンクから取った（Ｘ８０７２５）。

【００６５】

細胞の固定

E. coli細胞（ＭＧ１６５５またはＡＴＣＣ１１７７５）をＬＢブロス（ＤＩＦＣＯ）中３７℃で増殖させた。６００nmにおける光学密度が０．５に達した時、懸濁液を氷上で５分間冷却し、そのうち０．５mＬを１．５mＬのバイアル中に取り、４℃で１０００ｒｐm、５分間の遠心分離により細胞を集めた。遠心後、上清を除去し、細胞を１mＬのＰＢＳで１回洗浄した。E. coli細胞を固定するために、細胞を１．０mＬの４％パラホルムアルデヒド／ＰＢＳ固定溶液（フィルター滅菌したもの、１Ｎ ＮａＯＨによりｐＨ８．０に調節）に再懸濁し、混合物を室温で１時間放置した。固定後、細胞を１０００ｒｐmで５分間遠心分離し、上清を除去し、１mＬのＰＢＳで洗浄した。最後の洗浄後、固定された細胞を１．０mＬの５０％エタノールに再懸濁し、次いで、－２０℃で保存した。

【００６６】

パラホルムアルデヒドで固定されたE. coli細胞中の１６Ｓ ｒＲＮＡ上でのダブシルにより媒介される自己ライゲーション反応

固定されたE. coliストック溶液のうち１００μＬを１．５mＬのバイアル中に取り、固定された細胞を１００００ｒｐmで５分間遠心分離することにより集めた。細胞を１００μＬのＰＢＳで１回洗浄し、１００μＬのハイブリダイゼーションバッファー（２０mＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ７．２，０．９M ＮａＣｌおよび０．０１％ ＳＤＳ）に再懸濁した。懸濁液に２μＬの２０μMダブシル－プローブ、６μＬの２０μMホスホロチオエートプローブ、および１μＬの５００μMヘルパーオリゴヌクレオチドを添加した。混合物を３７℃で１８時間インキュベーションした。インキュベーション後、洗浄工程を行わずに懸濁液をスライドグラスに直接スポットし、マイクロカバースライドで覆った。超高圧水銀ランプ（Nikon model HB-10103AF）を用い、ＳＰＯＴ ＲＴデジタルカメラおよびＳＰＯＴ Ａｄｖａｎｃｅｄイメージングソフトウェアを用いて、蛍光顕微鏡（１００倍対物Plan Fluor apoを装備したNikon Eclipse E800）により蛍光イメージを得た。典型的な顕微鏡セッティングは下記のとおり。フルオレセイン：励起４６０～５００nm；ＴＡＭＲＡ：ＮＤフィルター４および８を用いて励起５３０～５６０nm。典型的なデジタルカメラセッティングは下記のとおり。フルオレセイン：露出時間グリーン４秒、バイニング２ｘ２、ゲイン１；ＴＡＭＲＡ：露出時間レッド５秒、バイニング２ｘ２，ゲイン２。

【００６７】

実施例９：別の蛍光消光基の使用

ダブシルのかわりに他の消光脱離基も使用した。一定の用途の消光脱離基の選択は、一定のプローブ上で置換される対象色素を消光する能力、および活性化能に依存する。いくつかの脱離基はダブシルよりも反応性が低く、生じる自己ライゲーション反応は比較的遅いが、それを含むプローブは配列選択性が高い可能性がある。いくつかの脱離基はダブシルよりも反応性が高く、より早い速度が望ましい場合に自己ライゲーション速度を増加させるのに有用でありうる。

【００６８】

別の消光脱離基の例を図２および３に示す。示された構造において、消光脱離基はＤＮＡの５’ヒドロキシル基に結合しているが、他の位置での結合および他のタイプの分子（例えば、ペプチド、蛋白、炭水化物）における結合を行うこともできることが理解される。示された例において、５’末端塩基を一般的に「Ｂ」で表すが、Ａ、Ｃ、Ｇ、ＴまたはＵが示されていてもよいことが理解される。

【００６９】

本願の開示に照らして、過度の実験をすることなく、本願に開示されクレイムされたすべての組成物および／または方法を作り、実施することができる。本発明の組成物および方法を好ましい具体例にて説明してあるが、本発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく、本明細書記載の組成物および／または方法ならびに方法の工程または一連の工程にバリエーションを施してもよいことが当業者に明らかであろう。より詳細には、同一または類似の結果が達成される場合には、化学的かつ生理学的に関連した特定の作用剤を、本明細書記載の作用剤の代わりに用いてもよいことが明らかであろう。当業者に明らかなかかる類似の置換物および修飾物は本発明の精神、範囲および概念に含まれるとみなされる。

【図面の簡単な説明】

【００７０】

【図１】図１は、１のプローブ上の求核試薬を別のプローブ上の脱離基（Ｘ）を有する炭素と反応させることにより化学的自己ライゲーションを受ける２つの核酸プローブを用いる、目的ＤＮＡ配列の検出を示す。

【図２】図２は、核酸分子に結合した４つの蛍光消光脱離基を示す。構造１はｐ－ジメチルアラニン－スルホニル脱離基を示し、構造２はテトラメチル－フェニレンジアミン－スルホニル脱離基を示し、構造３はニトロベンゼン－スルホニル脱離基を示し、構造４はジニトロベンゼン－スルホニル脱離基を示す。

【図３】図３は、核酸分子に結合した２つの蛍光消光脱離基を示す。構造５はダブシル脱離基を示し、構造６は（ｐ－ジメチルアミノ－フェニルアゾ）アゾベンゼンスルホニル（ＤＩＭＡＰＤＡＢＳＹＬ）脱離基を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kool, Eric T.

<120> DETECTION OF CHEMICAL LIGATION USING FLUORESCENCE QUENCHING LEAVING GROUPS

<130> 12665.0024.NPUS01

<150> US 60/396774

<151> 2002-07-18

<160> 6

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 12

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> fluorescein C-5-alkenyl conjugate of dU

<400> 1

tgngggcaag ag 12

<210> 2
<211> 50
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
atattcgacc accaccaccc gcggccgcca cacccgttct cacgcgactg 50

<210> 3
<211> 50
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
atattcgacc accaccaccc gcggcagcca cacccgttct cacgcgactg 50

<210> 4
<211> 7
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
ccgtcgg 7

<210> 5

<211> 5

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 5

gcaac 5

<210> 6

<211> 5

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 6

gccac 5

【図１】

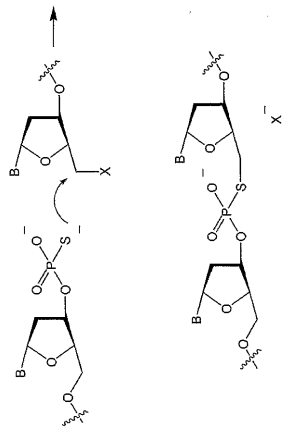


Fig. 1

【図２】

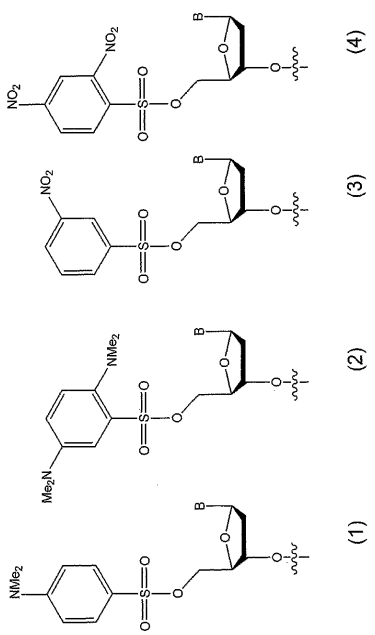
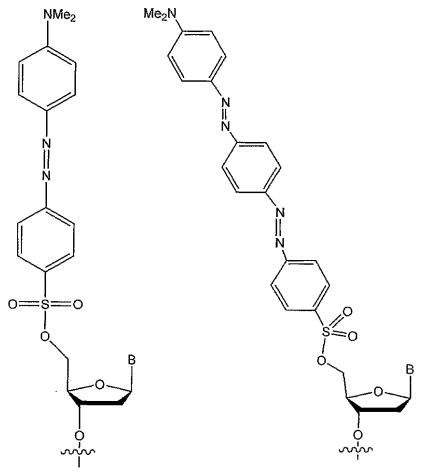


Fig. 2

【図３】



(1) (6)

Fig. 3

【手続補正書】
【提出日】平成17年5月26日(2005.5.26)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】変更
【補正の内容】
【配列表】
2006510348000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/22320

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C12Q 1/68
US CL : 435/6
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)
U.S. : 435/6

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)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SANDO et al. Quencher as Leaving Group: Efficient Detection of DNA-Joining Reactions. J. Am. Chem. Soc. 13 February 2002, Vol. 124, No. 10, pages 2096-2097.	1-49
A	LIVAK et al. Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. PCR Methods and Applications. June 1995, Vol. 4, No. 6, pages 357-362.	1-49

☐ 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

"B" earlier application or patent 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
02 February 2004 (02.02.2004)	21 JUL 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Kenneth R Horlick Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/22320

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
USPAT, DERWENT WPI, BIOSIS, MEDLINE
search terms: fluorophore, leaving group, quench, probe

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100116311
弁理士 元山 忠行
(74)代理人 100122301
弁理士 冨田 憲史
(74)代理人 100127638
弁理士 志賀 美苗
(72)発明者 エリック・ティ・クール
アメリカ合衆国９４３０５カリフォルニア州スタンフォード、エスプラナダ・ウェイ８５９番

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 CA09 HA14
4B063 QA01 QQ42 QR58 QS03 QS34 QX02