(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4633716号
(P4633716)

(45)発行日　平成23年2月16日(2011.2.16)　(24)登録日　平成22年11月26日(2010.11.26)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
G01N 21/78	(2006.01)	G01N	21/78	C

請求項の数 23　(全 110 頁)

(21)出願番号	特願2006-514927 (P2006-514927)
(86)(22)出願日	平成16年5月20日 (2004.5.20)
(65)公表番号	特表2007-525948 (P2007-525948A)
(43)公表日	平成19年9月13日 (2007.9.13)
(86)国際出願番号	PCT/US2004/016118
(87)国際公開番号	WO2005/017181
(87)国際公開日	平成17年2月24日 (2005.2.24)
審査請求日	平成19年4月23日 (2007.4.23)
(31)優先権主張番号	60/471,827
(32)優先日	平成15年5月20日 (2003.5.20)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　505430285
インベスチゲン，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４５４７，　ハーキュリーズ，　アルフレッド　ノーベル　ドライブ　７５０
(74)代理人　100083895
弁理士　伊藤　茂
(72)発明者　コシンスキー，　ヘザー
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４５３０，　エル　セリト，　カーキーネス　アベニュー　２０３３
(72)発明者　ズウィック，　マイケル　エス.
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９５６８８，　ヴァカヴィル，　ギブスン　キャニオン　ロード　６９８６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ポリヌクレオチドを検出するためのシステム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

サンプル中の、標的核酸配列を含む標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出する方法であって、

ａ）サンプルと、該標的ポリヌクレオチドの標的核酸配列に相補的である核酸類似体と、光刺激に曝露された時の、色、吸光度、蛍光発光から選択される光学特性における変化率が標的ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドの存在、非存在によって異なるシアニン色素とを組み合わせ、混合物を生成する工程；

ｂ）該混合物を光刺激に暴露する工程；

ｃ）該色素の光学特性における変化率を観察し、既知量のポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドを含む類似の混合物中の色素の前記光学特性における変化率の基準値指標と比較し、該混合物の前記光刺激への暴露が前記変化率の相違を引き起こすか、または設定された時間での色素の前記光学特性の変化の相違を引き起こすかどうかを決定する工程；を含み、

ここで混合物の前記光刺激への暴露により引き起こされた色素の前記光学特性における、変化率の相違、または設定された時間での変化の相違を、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または量と相互に関連付ける、方法。

【請求項２】

前記の工程ｃ）が、サンプル中の特定の標的ポリヌクレオチドの存在または量と、該混合物中の色素の前記光学特性における変化の相対比率とを相互に関連付ける工程をさらに

含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記光刺激が白色光である、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記光刺激が特定波長または特定波長域の光である、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記光刺激が青色光である、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記光刺激が緑色光である、請求項４に記載の方法。
【請求項７】
前記核酸類似体がペプチド核酸（ＰＮＡ）またはロックされた核酸（ＬＮＡ）である請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記標的ポリヌクレオチドがＤＮＡである請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記標的ポリヌクレオチドがＲＮＡである請求項１に記載の方法。
【請求項１０】
前記核酸類似体または標的ポリヌクレオチドが、固体基質上に固定化されている、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
前記シアニン色素が、標的ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドが存在している時に、標的ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドが存在していない時より、前記光刺激に暴露された時に前記光学特性の大きな変化率を示す、請求項１記載の方法。
【請求項１２】
該色素がカルボシアニン色素である、請求項１記載の方法。
【請求項１３】
該色素がチアシアニン色素である、請求項１記載の方法。
【請求項１４】
該シアニン色素が、３，３’－ジエチルチアシアニンヨウ化物、３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物、３，３’－ジエチルチアジカルボシアニンヨウ化物および３，３’－ジエチルチアトリカルボシアニンヨウ化物からなる群より選ばれる、請求項１記載の方法。
【請求項１５】
該シアニン色素が、３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物である、請求項１記載の方法。
【請求項１６】
色素の前記光学特性を１回測定する、請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
色素の前記光学特性を複数回測定する、請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
前記光学特性の変化の相対比率が近似であるかまたは定量的である、請求項２記載の方法。
【請求項１９】
前記光学特性の変化の相対比率が定量的である、請求項２記載の方法。
【請求項２０】
前記基準値が計算または推察され、測定されない、請求項２記載の方法。
【請求項２１】
前記基準値が経験的に決定される、請求項２記載の方法。
【請求項２２】
一塩基変異多型（ＳＮＰ）を検出する方法であって、

請求項１に記載の方法に従って標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出する工程を包含し、該標的核酸配列はＳＮＰに対し特異的配列であり、該標的ポリヌクレオチドの存在または量で該ＳＮＰを同定する、方法。

【請求項２３】

サンプル中の生物を検出する方法であって、

請求項１に記載の方法に従ってサンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出する工程を包含し、該標的核酸配列は生物に対し配列特異的であり、該標的ポリヌクレオチドの存在または量で該生物の存在または量を同定する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

（関連特許）

本願は、２００３年５月２０日に出願した米国特許仮出願第６０／４７１，８２７号の利益を主張し、これら全ては参照として本明細書中に組み込まれる。

【０００２】

（技術分野）

本発明は、ポリヌクレオチド類を検出する方法、組成物および試験システムに関する。

【背景技術】

【０００３】

（発明の背景）

ポリヌクレオチド類を同定し、定量する大きな必要性がある。病原体、病原体感染、病気や症状に関連するヒト遺伝子、遺伝子組み換え生物（ＧＭＯ）、生物戦争の薬品、獣医学的用途、および農業的用途に関連する方法のような、現在一般的に知られている標的ポリヌクレオチド類を同定する方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、ＮＡＳＢＡ、ＴＭＡまたはｂＤＮＡのような方法に依存している。これらの方法は、熟練した人材と特別な装置を必要とする。したがって、標的ポリヌクレオチド類の簡便で経済的な検出、同定、および定量の方法についての要望が高まっている。本発明は、この要求およびその他の要求を満たす。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【０００４】

（発明の概要）

１つの態様では、本発明は、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出する方法に関する。他の態様では、１つの方法として以下のステップを含む。

【０００５】

配列特異的方法における標的ポリヌクレオチドの標的核酸配列を結合する核酸類似体と、光学特性における変化率が標的ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドの有無により相違する色素とを組み合わせ、混合物を生成する。混合物中の色素の光学特性における変化率を、既知量の標的ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドを含む類似した混合物における色素の光学特性における変化率の基準値指標と比較し、前記光学特性における変化の相対比率を決定する。混合物中の色素の光学特性における変化の相対比率は、サンプル中の特定の標的ポリヌクレオチドの存在または量と相関関係がある。

【０００６】

他の態様では、方法は下記のステップを含む。配列特異的方法における標的ポリヌクレオチドの標的核酸配列を結合するペプチド核酸（ＰＮＡ）と光学特性における変化率が標的ポリヌクレオチド／ＰＮＡハイブリッドの有無で相違する色素とを組み合わせ、混合物中の色素の光学特性における変化率を、既知量の標的ポリヌクレオチド／ＰＮＡハイブリッドを含む類似した混合物における色素の光学特性における変化率の基準値指標と比較し、前記光学特性における変化の相対比率を決定する。混合物中の色素の光学特性における変化の相対比率は、サンプル中の特定の標的ポリヌクレオチドの存在または量と相関関係

がある。

【０００７】

他の態様では、核酸類似体は、構造的にロックされた核酸（ＬＮＡ）、トレオース核酸（ＴＮＡ）または金属に結合した核酸であってもよい。

【０００８】

色素の光学特性における変化率は、標的ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドの有無、および混合物が光刺激を受けた時によって相違してもよい。

【０００９】

サンプルとしては、細胞組織、細胞の収集物、細胞溶解物、精製ポリヌクレオチドまたは単離ポリヌクレオチド、ウィルス、環境サンプル、工業サンプル、医療サンプル、食物サンプル、農業サンプル、獣医学的サンプル、家畜サンプル、水サンプル、土壌サンプル、空気サンプル、生物戦争の薬品に関与するサンプル、農業関連の薬品に関与するサンプルが挙げられる。

【００１０】

１つの態様では、標的ポリヌクレオチドはＤＮＡであってもよい。いくつかの変型として、標的ポリヌクレオチドは、全細胞ＤＮＡ、核ＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、リボソームＤＮＡ、葉緑体ＤＮＡまたはウィルスＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、人工ＤＮＡ、エピゲノムＤＮＡ、後成的ＤＮＡ、インビトロ増幅ＤＮＡまたはキメラＤＮＡから得られてもよい。

【００１１】

他の態様では、標的ポリヌクレオチドはＲＮＡでもよい。いくつかの変型として、ＲＮＡはリボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、Ａｍｏｒｅｄ　ＲＮＡ、ウィルスＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｓＩＲＮＡ、人工ＲＮＡまたはキメラＲＮＡから得られてもよい。

【００１２】

標的ポリヌクレオチドは、生体から得てもよい。一実施形態として、生体はヒトであってもよい。他の実施形態では、生体は病原体であってもよい。さらに別の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、ウィルス、菌または菌類のような病原体からのものでもよい。このようなウィルスや細菌の例として、炭疽菌、ボツリヌス菌、ブルセラ菌、コレラ菌、クロストリジウムーパーフリンジェンス、エボラウィルス、ペスト菌、コクシエラ・バーネッティ、天然痘ウィルス、Ｃ型肝炎ウィルス、Ｂ型肝炎ウィルスおよびヒト免疫不全ウィルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【００１３】

核酸類似体は標的核酸配列に部分的に相補的であってもよい。あるいは、核酸類似体は標的核酸配列に正確に相補的であってもよい。

【００１４】

核酸類似体は、約４を超える核酸塩基および／または約２４未満の核酸塩基の長さである。さらなる変型では、核酸類似体は約１２の核酸塩基の長さであってもよい。

【００１５】

核酸類似体または標的ポリヌクレオチドは、固体基質上に固定化されていてもよい。固定化は、ビオチンとストレプトアビジンとの間のように、非共有相互作用を介していてもよい。更なる変型として、核酸類似体は共有結合でビオチンに結合してもよい。更なる変型として、非共有相互作用は抗原／抗体相互作用でもよい。核酸類似体または標的ポリヌクレオチドは、また、固体基質に共有結合により結合してもよい。

【００１６】

更なる態様では、色素はシアニン色素である。シアニン色素として、３’，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物、３’，３’－ジエチルチアジカルボシアニンヨウ化物および３’，３’－ジエチルチアトリカルボシアニンヨウ化物が例示される。

【００１７】

色素は、核酸類似体／標的ポリヌクレオチドハイブリッドが存在しない場合より、核酸

類似体／標的ポリヌクレオチドハイブリッドが存在する場合のほうが、光学特性におけるより高い変化率を示してもよい。あるいは、色素は、核酸類似体／標的ポリヌクレオチドハイブリッドが存在しない場合より、核酸類似体／標的ポリヌクレオチドハイブリッドが存在する場合のほうが、光学特性におけるより低い変化率を示してもよい。

【００１８】

色素の光学特性における変化率は、色素の光学特性を測定することによって決定してもよい。そのような光学特性の例として、吸光度、蛍光発光、反射率または化学発光が挙げられる。光学特性は１回またはそれ以上で決定してもよい。

【００１９】

他の態様では、色素の光学特性は、測定は複数回行われる。別の態様としては、光学特性の測定は１回行われる。

【００２０】

別の態様において、本発明は、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出することによるサンプル中の生体を検出する方法であって、該標的ポリヌクレオチドの存在または量によって生体の存在または量を同定する方法に関する。

【００２１】

別の態様では、本発明は、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出することによるサンプル中の生体の綱を検出する方法であって、標的ポリヌクレオチドの存在または量によって生体の綱の存在または量を同定する方法に関する。

【００２２】

別の態様では、本発明は、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出することによるサンプル中の生体の菌株を検出する方法であって、標的ポリヌクレオチドの存在または量によって菌株の存在または量を同定する方法に関する。

【００２３】

別の態様では、本発明は、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出することによるサンプル中の遺伝子組み換え生物（ＧＭＯ）を検出する方法であって、標的ポリヌクレオチドの存在または量によって遺伝子組み換え生物の存在または量を同定する方法に関する。

【００２４】

本発明は、また、標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出することによって、被験体の疾患状態の存在を検出する方法であって、標的ポリヌクレオチドの存在または量が疾患状態を同定する方法に関する。

【００２５】

本発明は、また、標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出することによって、被験体の遺伝的変異の存在を検出する方法であって、標的ポリヌクレオチドの存在または量が遺伝的変異を同定する方法に関する。

【００２６】

他の態様では、本発明は、標的ポリヌクレオチドの存在または量による、病原体による宿主の感染の検出であって、標的核酸がリボ核酸（ＲＮＡ）であり、かつ標的ポリヌクレオチドの存在または量が病原体による宿主の感染を同定する検出に関する。

【００２７】

他の態様では、本発明は、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出することによるサンプル中の一塩基変異多型（ＳＮＰ）を検出する方法であって、標的ポリヌクレオチドの存在または量によってＳＮＰの存在または量を同定する方法に関する。

【００２８】

他の態様では、本発明は、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出することによるサンプル中の遺伝子配列を検出する方法であって、標的ポリヌクレオチドの存在または量によって遺伝子配列の存在または量を同定する方法に関する。

【００２９】

他の態様では、本発明は、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出す

ることによるサンプル中のインビトロ増幅配列を検出する方法であって、標的ポリヌクレオチドの存在または量によってインビトロ増幅配列の存在または量を同定する方法に関する。

【００３０】

他の態様では、本発明は、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出することによるサンプル中の塩基対変化を検出する方法であって、標的ポリヌクレオチドの存在または量によって塩基対変化の存在または量を同定する方法に関する。

【００３１】

本発明は、また、第一核酸類似体分子を使用した多重部位装置の第一部位での第一サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出し、かつ、第二核酸類似体分子を使用した多重部位装置の第二部位での第二サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出することによって、複数のサンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法に関する。１つの変型として、核酸類似体分子は、固体基質上に固定化されている。該方法は、複数のサンプル中における複数の標的ポリヌクレオチド配列を検出することを含む。あるいは、サンプルは固体基質上に固定化されていてもよい。

【００３２】

本発明は、また、標的ポリヌクレオチドを検出するキットに関する。該キットは、標的ポリヌクレオチドを含む１つまたは複数のサンプルと、標的ポリヌクレオチドの標的核酸配列に対して少なくとも部分的に相補的な１つまたは複数の核酸類似体と、１つまたは複数の色素とを含んでもよい。場合によっては、該キットは、刺激源を含んでもよい。該キットは、該キットを使用する説明書を含んでもよい。

【発明を実施するための最良の形態】

【００３３】

本発明は、核酸類似体を用いた、標的核酸配列を有するポリヌクレオチドの検出する方法、組成物および分析システムを提供する。

【００３４】

Ｉ．一般的な技術

本発明の実際の作業では、特に断らない限り、分子生物学（組み換え技術を含む）、細菌学、細胞生物学、生化学、免疫学、タンパク動態および質量分析（これらは当分野の技術範囲内である）の従来技術を使用するこのような技術は、たとえば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ＣｌｏｎＩｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ｔｈＩｒｄ ｅｄＩｔＩｏｎ，（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，２０００）Ｃｏｌｄ ＳｐｒＩｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ＣｌｏｎＩｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ｓｅｃｏｎｄ ｅｄＩｔＩｏｎ（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，１９８９）Ｃｏｌｄ ＳｐｒＩｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ；ＯｌＩｇｏｎｕｃｌｅｏｔＩｄｅ ＳｙｎｔｈｅｓＩｓ（Ｍ．Ｊ．ＧａＩｔ，ｅｄ．，１９８４）；Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ＢＩｏｌｏｇｙ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ；Ｃｅｌｌ ＢＩｏｌｏｇｙ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｎｏｔｅｂｏｏｋ（Ｊ．Ｅ．ＣｅｌｌＩｓ，ｅｄ．，１９９８）ＡｃａｄｅｍＩｃ Ｐｒｅｓｓ ＡｎＩｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，ｅｄ．，１９８７）；ＩｎｔｒｏｄｕｃｔＩｏｎ ｔｏ Ｃｅｌｌ ａｎｄ ＴＩｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｊ．Ｐ．Ｍａｔｈｅｒ ａｎｄ Ｐ．Ｅ．Ｒｏｂｅｒｔｓ，１９９８）Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ；Ｃｅｌｌ ａｎｄ ＴＩｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ：Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ（Ａ．Ｄｏｙｌｅ，Ｊ．Ｂ．ＧｒＩｆｆＩｔｈｓ，ａｎｄ Ｄ．Ｇ．Ｎｅｗｅｌｌ，ｅｄ．，１９９３－８）Ｊ．ＷＩｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ；Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（ＡｃａｄｅｍＩｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）；Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ ＥｘｐｅｒＩｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｄ．Ｍ．ＷｅＩｒ ａｎｄ Ｃ．Ｃ．Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ，ｅｄ．，）；Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ ＭａｍｍａｌＩａｎ Ｃｅｌｌｓ（Ｊ．Ｍ．ＭＩｌｌｅｒ ａｎｄ Ｍ．Ｐ．Ｃａｌｏｓ，ｅｄ．，１９８７）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｉｎ

Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ＢＩｏｌｏｇｙ（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，１９８７～２００４年5月1日補足を含む）；ＰＣＲ：Ｔｈｅ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ＣｈａＩｎ ＲｅａｃｔＩｏｎ、（ＭｕｌｌＩｓ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，１９９４）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｊ．Ｅ．ＣｏｌＩｇａｎ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，１９９１）ａｎｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ＢＩｏｌｏｇｙ（ＷＩｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，１９９９）などの文献に充分説明されている。これら全ては参照として本明細書中に組み込まれる。さらに、特に断らない限り、市販の分析キットおよび通常の試薬を使用した手順は製造者が規定したプロトコルに従って使用される。

【００３５】

ＩＩ．定義

用語「標的核酸配列」は、一般的に、本発明の方法、組成物および分析システムを使用して検出された核酸配列を言う。標的核酸配列の全てあるいは一部が、配列特異的ハイブリダイゼイションによって、核酸類似体と結合してもよい。標的核酸配列は、いかなる長さでもよいが、通常は、１Ｋｂ未満の長さ、塩基が５００基未満の長さ、塩基が２４基未満の長さ、あるいは塩基が１２基未満の長さである。さらなる実施形態においては、標的核酸配列は、１０、１２、１４または１８の塩基の長さでとすることが可能である。他の実施形態では、標的核酸は、塩基が少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１２、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１８、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５少なくとも４０、少なくとも４５あるいは少なくとも５０の長さでもとすることが可能である。本発明の標的核酸配列は、配列がコード化されたおよび／または配列がコード化されていないたんぱく質（たとえば、調節塩基配列、イントロン他）を含んでもよい。

【００３６】

用語「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチドのポリマー型を言い、いかなる長さでもよく、デオキシリボヌクレオチド類でも、リボヌクレオチド類でもまたそれらの類似体でもよい。以下にポリヌクレオチド類を例示するが、これらに限定されるものではない。すなわち、遺伝子、遺伝子フラグメント、エクソン、イントロン、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、リボザイム、ｃＤＮＡ、組み換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、核酸プローブ、プライマーおよび増幅ＤＮＡが挙げられる。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体のようなメチル化されたヌクレオチド類を含んでもよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分が割り込んでいてもよい。さらに、ポリヌクレオチドは、重合前あるいは後に、たとえば、ラベリング成分の接合のように、変性されてもよい。ポリヌクレオチドは、より長いポリヌクレオチドの増幅領域であってもよい。

【００３７】

用語「標的ポリヌクレオチド」は、標的核酸配列を含むポリヌクレオチドを言う。

【００３８】

用語「核酸類似体」は、グアニン、チミジン、アデノシン、シトシンまたはウラシルとは異なる１つまたはそれ以上の塩基を含む、および／またはＲＮＡ骨格のホスホリボースまたはＤＮＡ骨格のホスホデオキシリボースにおいて１つまたはそれ以上の相違のあるいかなる核酸類似体を含む。「核酸類似体」として、ペプチド核酸（ＰＮＡｓ）、Ｔｒｅｎｄｓ Ｉｎ ＢＩｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ２１：７４－８１，２００３，に開示されるロックされた核酸（ＬＮＡ）、金属に結合した核酸、アンソラキノン変性（Ｙａｍａｎａ ｅｔ ａｌ．，２００３に開示されるような）のような変性ポリヌクレオチド、Ｃｈａｐｕｔ ｅｔ ａｌ，，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ ＡｍｅｒＩｃａ７ ＣｈｅｍＩｃａｌ ＳｏｃＩｅｔｙ，１２５，８５６－８５７，（２００３）に開示されるようなトレオース核酸（ＴＮＡ）、およびキメラ核酸が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【００３９】
用語「ペプチド核酸」または「ＰＮＡ」は、核酸のデオキシリボースリン酸骨格が、たとえば、合成ペプチド様骨格と置き換わった核酸類似体であればいかなるものも含まれる。合成ペプチド様骨格として、たとえば、ｎ－（２－アミノエチル）－グリシン単位が挙げられ、たとえば、図２中に表されるもの（ＮＩｅｌｓｅｎら、１９９１）および米国特許第５，７８６，４６１号、第６，３５７，１６３号、第６，１０７，４７０号、第５，７７３，５７１号、第６，４４１，１３０号、第６，４５１，９６８号、第６，２２８，９８２号、第５，６４１，６２５号、第５，７６６，８５５号、第５，７３６，３３６号、第５，７１９，２６２号、第５，７１４，３３１号、第５，７１９，２６２号および第６，４１４，１１２号に開示されるものが挙げられるが、これらに限定されない。プリンおよびピリミジン塩基は、たとえばメチレンカルボニル結合のような、いかなる共有結合によって結合してもよい。本明細書において使用されるＰＮＡ分子は、ＰＮＡ骨格と核酸塩基との間にさらなる原子を有することができる。これらの類似体として、たとえば、Ｄ－リシン鎖、シクロペンタンやピロリジン環のような環状構造、および／または米国特許第６，４０３，７６３号、米国特許出願公開第２００３／０１６２６９９号、第２００３／０１５７５００号に記載のＰＮＡ分子を始めとするキラル置換基が挙げられる。ＰＮＡ骨格は、ペプチド骨格内に置換基または拡張部を含んでもよい。ＰＮＡは、たとえば米国特許第５，７０５，３３３号に開示されているペプチド系核酸類擬態（ＰＥＮＡＭＳ）、Ｄ－キラル中心や準キラル中心などの特異なキラル中心を有する原子、ＰＮＡ骨格中の原子置換基も含んでもよい。

【００４０】
用語「核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッド」および「ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッド」は、同義語であり、配列特異的方法でハイブリッド形成させた核酸類似体とポリヌクレオチドを言う。

【００４１】
用語「ＰＮＡ／ポリヌクレオチドハイブリッド」および「ポリヌクレオチド／ＰＮＡハイブリッド」は、同義語であり、配列特異的な方法でハイブリッド形成させたＰＮＡおよびポリヌクレオチドを言う。

【００４２】
「相補的」によって、単鎖の核酸類似体分子が塩基－特異的な方法によってポリヌクレオチドを結合する能力を有することになることを言う。核酸類似体分子は、全長のポリヌクレオチド鎖またはその一部のような、標的ポリヌクレオチドと結合するように合成される。「相補的」である核酸類似体分子は、１つまたはそれ以上の単一塩基対の不整合、付加および／または欠失部分を有していてもよいが、それでもなお、所定のハイブリダイゼイション条件下で標的ポリヌクレオチドと結合する能力がある。一実施形態において、相補的配列はワトソンクリック（Ａ－ＴまたはＡ－ＵおよびＣ－Ｇ）を介してハイブリッド形成してもよい。別の実施形態では、相補的配列は、核酸類似体とポリヌクレオチド核酸塩基との間で、ＨｏｏｇｓｔｅＩｎ塩基対形成を介してハイブリッド形成してもよい。

【００４３】
「正確に相補的」とは、単鎖の核酸類似体分子が標的核酸配列と結合する能力をもち、不整合を含まないことを言う。核酸類似体分子は、もし、核酸類似体と標的ポリヌクレオチドとの間に単一塩基対不整合が存在すれば、標的ポリヌクレオチドに対して正確に相補的ではない。

【００４４】
用語「比率」は、（たとえば組成物や化合物の特性の）変化を言う。比率は、特定の速度定数の観点から表されてもよい。比率は、特定の期間に渡る測定によって決定されてもよい。比率は、プロセス中の２つの異なる時点（たとえば、特定の刺激やある成分の追加などの前後）での測定によって、あるいは、少なくとも３回、少なくとも４回あるいは少なくとも５回の時点での測定によって決定されてもよい。比率は、定量的あるいは定性的な言葉（たとえば、変化は「早い」または「遅い」）で表されてもよい。比率は、特性や

化合物を基準値と、あるいは他の方法と比較することによって決定してもよい。

【００４５】

本明細書において、「相対比率」は、他のプロセスの比率と比較した一プロセスの比率を言う。「相対比率」は、概算（たとえば、１つのプロセスが他のプロセスの比率より「速い」または「遅い」）であってもよく、また定量的（たとえば、２つのプロセスの速度定数を測定して比較する）であってもよい。

【００４６】

本明細書において、用語「色素」は、測定しうる光学特性を有する化合物、または測定しうる光学特性を有する化合物に変換できる化合物を言う。測定しうる光学的特性として、色、吸光度、蛍光発光、反射率および化学発光が挙げられるが、これらに限定されるものではない。色素は、ある条件下で光学特性を発揮するもので、たとえば、ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドが結合される時、またはポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドの結合が外れた時がある。

【００４７】

「Ａｍｏｒｅｄ　ＲＮＡ™とは、細菌ウィルスタンパク質によるＲＮＡのカプシド形成に起因するリボヌクレアーゼ残基であるＲＮＡを言う。さらに「Ａｍｏｒｅｄ　ＲＮＡ™は、たとえば、米国特許第６，３９９，３０７号、第６，２１４．９８２号、第５，９３９，２６２号、第５，９１９，６２５号および第５，６７７，１２４号に記載するものも挙げられる。

【００４８】

本明細書で使用される「非特異的支持体ポリヌクレオチド」は、核酸類似体の特異的標的ポリヌクレオチドとの結合親和性を増加させるおよび／または分析システムの感度を増強する非標的ポリヌクレオチド分子を言う。

【００４９】

本明細書において、用語「核酸類似体結合部位」は、１つまたはそれ以上の核酸類似体分子が固体の基体に結合している点を言う。

【００５０】

本明細書において使用される用語「ＰＮＡ結合部位」は、１つまたはそれ以上のＰＮＡ分子が固体の基体に結合している点を言う。

【００５１】

「サンプル」は、全てのタイプ（たとえば、血液、血清、水、または尿）の液体サンプルおよび／または全てのタイプ（たとえば、細胞、食物、水、空気、土または粒子）の固体サンプルおよび／または全てのタイプの空中サンプルを言う。

【００５２】

用語「被検対象」は、脊椎動物、好ましくは哺乳類、さらに好ましくはヒトなどの動物を言う。また、用語「被検対象」植物をも言う。

【００５３】

用語「病原体」は、病気、疾患および／または病的状態および／または症状を引き起こす因子全てを言う。一例として、病原体は、自然界で見出されるまたは研究室で創り出される生体（または毒を伴う生体）であり、病状または症状中にまたはそれが進行する中で、または生体を再起不能にし、弱体化させ、殺すために病気を発症させるものであってもよい。病原体には、たとえば、ウィルス、細菌、菌類、真核生物および／または原核生物、生物学的兵器の薬剤、伝染性疾患、水性病原体および食物病原体が含まれるが、これらに限定されない。

【００５４】

用語「生物兵器薬剤」は、自然界で見出されるまたは研究室で創り出される生体（または毒を伴う生体）全てを意味し、他の生体を再起不能にするまたは殺すために病気を起こすことを第一の目的として使用されるものである。生物兵器薬剤の例として、病原性細菌、菌類、原生動物、リケッチア類およびウィルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【００５５】
本明細書において使用される用語「感染」は、宿主の中に病原体が存在することを言う。感染は、休眠状態であっても毒性のある状態であってもよい。一実施形態では、病原体の存在は、宿主ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチド発現における変化によって示される。感染は、飛沫、直接接触、動物または虫の媒介および汚染された食物または飲物などの経路を通して起こる。ただし、経路はこれらに限定されない。
【００５６】
本明細書で使用される用語「宿主反応ポリヌクレオチド」は、病原体による感染および／または接触のような刺激に反応して、宿主中で、変化したポリヌクレオチドまたは発現が変化したポリヌクレオチドを言う。
【００５７】
明細書で使用される用語「宿主」は、動物および植物を言う。動物には哺乳類が入る。哺乳類の例として、ヒト、非ヒト霊長類、変種の動物、マウス、およびラットが挙げられる。植物の例として、農作物が挙げられるが、これらに限定されない。
【００５８】
ＩＩＩ．ポリヌクレオチドの検出方法
本願は、核酸類似体を使用して、標的核酸配列を有するポリヌクレオチドを検出する方法、組成物、および分析システムを提供する。一実施形態では、（Ｉ）標的ポリヌクレオチドを含むと信じられる、あるいは含まないことが予想される）サンプルと、（ＩＩ）配列特異的方法でポリヌクレオチドの標的核酸配列に結合する核酸類似体と、（ＩＩＩ）ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドの存在下または非存在下で、光学特性における変化率が異なる色素とを組み合わせ、混合物を生成する。該混合物はさらに、非特異的植物ＤＮＡ、酵母ＤＮＡ、サケ血清ＤＮＡまたはｔＲＮＡのような（しかしこれらに限定されない）非特異的支持体ポリヌクレオチドを含んでもよい。混合物中の色素の光学特性における変化率は、既知量（０を含む）のポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドを含む類似した混合物中の色素の光学特性における変化率の基準値指標と比較して、光学特性における変化の相対比率を決定する。混合物中の色素の光学特性における変化の相対比率を、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または量と相互に関連付けて、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または量を決定する。
【００５９】
１つの態様では、本願は、ペプチド核酸（ＰＮＡ）分子を使用して、標的核酸配列を有するポリヌクレオチドを検出する方法、組成物および分析システムを提供する。一実施形態では、（Ｉ）標的ポリヌクレオチドを含む（と信じられる、あるいは含まないことが予想される）サンプルと、配列特異的方法でポリヌクレオチドの標的核酸配列に結合するペプチド核酸（ＰＮＡ）と、（ＩＩＩ）ポリヌクレオチド／ＰＮＡハイブリッドの存在下または非存在下で、光学特性における変化率が異なる色素とを組み合わせて、混合物を生成する。該混合物はさらに、非特異的植物ＤＮＡ、酵母ＤＮＡ、サケ血清ＤＮＡまたはｔＲＮＡのような（しかしこれらに限定されない）非特異的支持体ポリヌクレオチドを含んでもよい。混合物中の色素の光学特性における変化率は、既知量（０を含む）のポリヌクレオチド／ＰＮＡハイブリッドを含む類似した混合物中の色素の光学特性における変化率の基準値指標と比較して、光学特性における変化の相対比率を決定する。混合物中の色素の光学特性における変化の相対比率を、サンプル中の特異ポリヌクレオチドの存在または量と相互に関連付けて、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在または量を決定する。
【００６０】
基準値は、既知量を有する組成物または化合物の特性の固有値でとすることが可能である。たとえば、種々の実施形態において、基準値は、ポリヌクレオチド／核酸ハイブリッドは含まない混合物、ある量の（たとえば既知量）のポリヌクレオチド／核酸ハイブリッドを含む混合物、０量のポリヌクレオチド／核酸ハイブリッドを含む混合物、あるいは１つまたはそれ以上の成分（たとえば、核酸類似体、標的ポリヌクレオチドまたは色素）が抜けている反応混合物などの混合物を使用して、測定することができる。さらに、基準値

の例として、光刺激に曝されていない混合物の光学特性の固有値、別の実施形態では、光刺激に曝された混合物の光学特性の固有値が挙げられるが、これらに限定されない。前記の例示は、説明のためのものであり、本発明を限定する意図ではない。他の例示もこの開示によって導かれる熟練者には明らかである。基準値は、経験的に決定してもよい（たとえば、ある標的ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドの非存在下では、ある色素を含む組成物の光学的特性は変化しない、あるいは最小限変化することが知られていれば、基準値は、測定せずに計算あるいは推定してもよい）が、そのようにする必要がないことも明らかである。前記基準値は定数であってよい。「コントロール」サンプルをテストサンプルと同時に分析することが便利な場合もあるが、必ずしもそうする必要はない。基準値は、１回の時点で決定することができ、該値は、後の時点で比較のために記録される。上記した例示は、説明のためであり、限定のためではないことは理解されることになる。種々の基準値が明細書を通して記載されている。

【００６１】

一態様において、基準値は、ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドを含まない類似した混合物中の色素の光学特性における変化率の指標である。一実施形態では、基準値は、混合物中の全ての成分を組み合わせる前に色素の光学特性によって特徴づけられてもよい。他の実施形態では、基準値は規格値であってもよい。混合物が光刺激に曝された実施形態では、基準値は、光刺激に当てる前の色素の光学特性の指標であってもよい。基準値は、サンプル、核酸類似体および色素混合物中の色素の光学特性と同時に測定する必要がないことは明確に理解されることになる。さらに、基準値が定数でもよいことも理解される。

【００６２】

特定の例示に言及することは、本発明の理解を助けることになるだろう。ＰＮＡを使用するこの方法の液体系の変型を、実施例１と図４に示す。１０ｕＭのカリフラワーモザイクウィルス３５Ｓプロモーターに相補的なＰＮＡ分子（３５ＳＰＮＡ）と、１ｕＭの３５ＳプロモーターＤＮＡ（３５ＳＤＮＡ）とをマイクロチューブ中で混合し、１５０ｕＭの色素を加えた。該チューブを光刺激に曝し、１分間の色素の光学特性における変化である、色の変化を観察した（図４）。コントロールチューブ内では、標的ポリヌクレオチドは存在せず、２４時間後であっても色はピンクのままで（光刺激なし）、光学特性における変化率は非常に遅いことを示している。３５ＳＰＮＡが存在しないチューブ（チューブ３）においても、特定の標的がないチューブ（チューブ１）においても、光学特性における変化（この場合色の変化）がほとんどないことが観察される。

【００６３】

ＰＮＡプローブ遺伝子を使用したさらなる実施例を図１に示す。Ａ）１つまたはそれ以上の標的ポリヌクレオチド配列に相補的なＰＮＡ配列の個別アドレスを有する膜片をリシス／ハイブリダイゼイションチューブ１中に置く。Ｂ）サンプルをリシス／ハイブリダイゼイション緩衝液に加え、混合物を９５＞℃で３分間加熱し、Ｃ）室温にもどす。Ｄ）片を培養用の洗浄緩衝液を含む新しいチューブ（チューブ２）に移す。結合していないＤＮＡ、ＲＮＡおよび他の細胞残屑を取り除く。Ｅ）検出色素を含む新しいチューブ（チューブ３）に片を移し、約１分放置して培養する。Ｆ）チューブを洗浄緩衝液（チューブ４）中で容易に洗浄し、残っている結合していない色素を取り除く。Ｇ）この膜系において、色素はＰＮＡ／標的ポリヌクレオチド複合体にのみ結合する。塩基ハイブリダイゼイションのパターンに基づいて、特異的標的ポリヌクレオチドの存在が測定できる。公知のパターンのカードとの比較によって、物質の存在および同定が測定できる。

【００６４】

さらなる実施例を図２２に示す。１０ｕＭの標的核酸配列に相補的なＰＮＡ分子と１ｕＭの標的ポリヌクレオチドとをマイクロチューブ中で混合し、２ｕＭの色素と種々の量のＴｗｅｅｎ２０を加えた。チューブを光刺激に曝し、１０分の間に光学特性における変化を観察した（図２２）。１．０％を超えるＴｗｅｅｎ２０が存在すると、色素は含むが標的ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドは含まないサンプルでは、光学特性の変化

がほとんど観察されない。標的ポリヌクレオチド／核酸ハイブリッドを含むサンプルが光刺激に曝されると、色素の蛍光発光（あるいは他の光学特性）が変化する。標的ポリヌクレオチドの存在または量は、蛍光発光（または他の光学特性）における変化を観察することによって検出される。標的ポリヌクレオチドの存在または量は単測法によって成し遂げられることは認識されることになる。

【００６５】

別の実施形態では、複数の核酸類似体配列を混合物中で組み合わせ、多重化によって複数の標的ポリヌクレオチドを検出することができる。公知の核酸分析システムを伴う多重化反応は、たとえば、米国特許第５，５８２，９８９号の実施例にある。

【００６６】

特定の機構や理論に固着するのではないが、一態様において、核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドは、色素を伴う化学反応を触媒してもよい。色素は、触媒活性点として作用する核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドの副溝に結合する。光刺激を利用することで、混合物にエネルギーを与え、核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドが存在しない場合より、より速い速度で、核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッド中の色素の光学特性における変化を起こす。たとえば、３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物は、光刺激の利用が明確になる。色素の光学特性における変化率が高いほど、対応してサンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在が増す。

【００６７】

以下の項目で、さらに詳しく本発明の態様を記載する。

【００６８】

Ａ．核酸　類似体　配列の設計

本発明の用途では、核酸類似体は標的ポリヌクレオチド中の核酸配列に相補的あるいは正確に相補的になるように設計されてもよい。一実施形態において、核酸類似体は、長さが約４を超えるヌクレオチドで、リンカー、アミノ酸およびラベルを除いて、長さが約２４未満の核酸塩基である。他の実施形態では、核酸類似体は、長さが５～１００、８～６０または１０～２５核酸塩基であってもよい。他の実施形態では、核酸類似体は、リンカー、アミノ酸およびラベルを除いて、長さが約８、１０、１２、１４または１８核酸塩基であってもよい。他の実施形態では、標的核酸は、長さが少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１２、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１８、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、あるいは少なくとも５０塩基でとすることが可能である。核酸類似体は、ポリヌクレオチドの端から宙吊りになった配列のような、標的ポリヌクレオチドに非相補的な部分を有するように設計されてもよい。

【００６９】

核酸類似体分子の配列は、種々の方法で設計されてよい。実施例の方法によって、核酸類似体分子は、特異的な標的配列のＰＣＲ－ベース増幅および検出に使用される、公知のプライマーに基づく配列を有するように設計してもよいが、これらに限定されるのではない。核酸類似体分子は、また、ポリヌクレオチドのどんな標的核酸配列に対しても相補的あるいは正確に相補的に設計されてもよい。実施例によって、核酸類似体分子の配列は、病原体と合併したポリヌクレオチド、宿主中の病原菌の存在、病気遺伝子または遺伝子状態を検出するために使用されるＰＣＲプライマーの配列に基づいていてもよい。核酸類似体分子は、また、たんぱく質または未処理たんぱく質の活性または機能領域をエンコードした配列および／または非エンコード配列（たとえば、調節塩基配列、イントロン、その他）の全てまたは一部に相補的または正確に相補的であってもよい。

【００７０】

一実施形態において、核酸類似体は、正確な相補的配列を有するポリヌクレオチドと一塩基不整合を有するポリヌクレオチドとを区別するために使用することができる。限定されるものではないが、たとえば、本発明で使用される核酸類似体は、一塩基変異多型（Ｓ

ＮＰ）を検出するように設計されてもよい。核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリダイゼイションは、塩基不整合によって影響される。本発明の方法によれば、色素を添加すると、標的配列（たとえばＳＮＰ）と核酸類似体との間の一塩基不整合は、不整合を持たない核酸類似体と比較して、色素の光学特性において異なった変化の比率となる。診断および他の方法のためのＳＮＰの同定は、当業界において周知である。

【００７１】

他の実施形態では、核酸類似体は、生体の綱の存在または量を検出するように設計されてもよい。生体の綱は、全生体が核酸類似体配列に相補的または正確に相補的である１つまたはそれ以上の配列を有することを言う。そのような生体綱は、核酸配列に対する相補性に基づいた他の生体とは識別されうる。

【００７２】

一実施形態では、核酸類似体分子は、プリン含有率が約６０％未満で、連続して最高で４プリン塩基または３グアニン塩基を有する。プリンが多い核酸類似体分子は、凝集する傾向があり、水溶液に低溶解性を示す。核酸類似体分子は、逆リピート、ヘアピンおよびパリンドロームを有する自己相補的配列を最小するあるいは避けるように選択される。プローブのこれらのタイプは、凝集傾向を示すためである。

【００７３】

核酸類似体分子は、ポリヌクレオチドとどの方位でハイブリッド形成してもよいが、方位は逆平行が好ましい。逆平行は、アンチセンスおよびＤＮＡプローブタイプの適用に好ましい配置である。核酸類似体の方位が逆平行の場合、核酸類似体プローブのＮ－末端は、ＤＮＡの５’－末端と等価である。Ｎ’も５’も本発明で使用される。

【００７４】

この開示に導かれる当業者であれば、本明細書で挙げられた特定の核酸類似体に加えて、他の核酸類似体（将来発見されるまたは開発される核酸類似体も含めて）も本発明の方法で使用してもよいことは、認識するであろう。本明細書で記載された分析条件下でポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドを形成する核酸類似体は、本発明の方法に適しており、光学特性における変化率に影響を及ぼす。

【００７５】

本方法の使用に適する核酸類似体は、種々のスクリーニング方法を使用して同定することができる。１つの方法では、場合によっては種々の濃度で候補核酸類似体を含むサンプルを、相補的配列を有するポリヌクレオチドと、核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドが形成する条件下で、組み合わせるが、これらに限定されない。一実施形態では、次いで色素が添加される。次いで色素の光学特性変化率を測定する。この比率を核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドの存在しない色素の光学特性における変化率の基準値指標と比較する。さらなる実施形態では、基準値は、ポリヌクレオチドが存在しない場合の指標である。また別の実施形態では、基準値は、標的ポリヌクレオチド（単鎖または二本鎖）の存在下における指標である。添加の順序は重要なものではなく、成分は他の順序で加えることができることは理解されることになる。

【００７６】

他の実施形態では、基準値は、非ゼロ濃度のポリヌクレオチドの指標である。この実施形態では、基準値（たとえば、二本鎖ポリヌクレオチドは存在するが核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドは存在しない）と比較して、光学特性において経時的に異なる変化率を示す核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドが、請求の方法において使用するために選択される。光学特性における変化の相対比率を、特異的なポリヌクレオチドの存在または量と相互に関連付ける。

【００７７】

Ｂ．ペプチド核酸（ＰＮＡ）

１つの態様では、核酸類似体はＰＮＡである。ＰＮＡは、配列特異的ハイブリダイゼイションによって、標的ポリヌクレオチド中の全あるいは一部標的核酸配列にハイブリッド形成する。あるいは、一塩基対変化が識別できるように条件は様々であってよい。

【００７８】
ＰＮＡ分子は標的ポリヌクレオチドに対し素早くハイブリッド形成することができる。ポリヌクレオチドに対するＰＮＡハイブリダイゼイションは、塩濃度とは無関係である（ＤｅｍＩｄｏｖ ｅｔ ａｌ．，１９９４）。ＰＮＡは、ヌクレアーゼおよびプロテアーゼ攻撃に対し耐性を示し、従来のＤＮＡプローブよりポリヌクレオチドのほうにより特異的に結合する。短プローブは、高い配列特異性で使用することができる（ＲａｙおよびＮｏｒｄｅｎ、２０００）。さらに、ＰＮＡ／ポリヌクレオチドハイブリッドは、対応するＤＮＡ／ポリヌクレオチドハイブリッドより高い熱安定性を有し、ＰＮＡ／ポリヌクレオチドハイブリッドの融点は、イオン強度に対し比較的鈍感であり、低（＜１０ｍＭのＮａＣｌ）および中程度（５００ｍＭのＮａＣｌ）の塩濃度下での熱安定性と同じ安定性を示す。この低塩濃度下で形成するＰＮＡ／ポリヌクレオチドハイブリッドの能力は、ｓＲＮＡおよびｒＲＮＡの内部構造が２００ｍＭ未満の塩濃度で著しく不安定になるので、重要である。したがって、分析条件は、ＰＮＡ 分子の強ハイブリダイゼイションをなお促進しつつ、標的核酸の崩壊を助ける選択をすることができる（ＳｔｅｆａｎｏおよびＨｙｄＩｇ－ＮＩｅｌｓｅｎ，１９９７）。ＰＮＡ／ポリヌクレオチドハイブリダイゼイションは、塩基の不整合によって大きく影響され、ＰＮＡ分子は、一不整合のレベルまで配列識別を保つことができる。

【００７９】
ＰＮＡ分子は、たとえば、Ｅｕｒｏｇｅｎｔｅｃ（ＵＫ）、Ｂｌｕｅ Ｈｅｒｏｎ ＢＩｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｂｏｔｈｅｌｌ，ＷＡ）およびＡｐｐｌＩｅｄ ＢＩｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃ．（ＡＢＩ）から購入してもよいし、業界で知られている方法で合成してもよい。

【００８０】
Ｃ．ハイブリダイゼイション条件
一般にハイブリダイゼイションの設計および／または選択は、たとえば（ただしこれらに限定されるわけではない）、標的ポリヌクレオチドに対する核酸類似体分子の相補性の程度、利用される核酸類似体分子の長さ、標的ポリヌクレオチド自身などのいくつかのパラメータに支配される。好ましいハイブリダイゼイション条件としては、下記の１つまたはそれ以上を挙げることができる。すなわち、標的ポリヌクレオチドに対する核酸類似体の効率的な結合、ＲＮＡまたはＤＮＡ第二構造の最小化、ＲＮＡ崩壊の最小化および１つまたはそれ以上の塩基対変化の識別あるいは１つまたはそれ以上の塩基対変化の包含がある。

【００８１】
ハイブリダイゼイション反応は異なった「厳密性」の条件下で行うことができる。ハイブリダイゼイション反応の厳密性に影響する条件は、業界では周知である。たとえば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ＣｌｏｎＩｎｇ、４ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、ｔｈＩｒｄ ｅｄＩｔＩｏｎ（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、２０００）、Ｃｏｌｄ ＳｐｒＩｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓが参照される。関連する条件の例示として、塩濃度、ｐＨ（緩衝液）および温度が挙げられるが、これに限定されない。低塩濃度を利用するハイブリダイゼイション条件は、通常、ＤＮＡ不安定性とＰＮＡ／ポリヌクレオチド安定性とを高める。使用してもよい緩衝液の例として、Na_3PO_4、$NaHSO_4$、K_2HPO_4、K_2SO_4および$CaSO_4$が挙げられるが、これらに限定されない。一例として、緩衝液のモル濃度は、約１０ｍＭと約０．５Ｍとの間であり、ｐＨは約４から約１０の間あるいは約７．０あるいは約７．５などの約７から約１０の間であってもよい。一例として、Na_3PO_4は、たとえば、２．５ｍＭのように約０．５ｍＭから約０．５の間で使用してよく、ｐＨは約４から約１０の間、または約７あるいは約７．５のように約７から約１０の間であってよい。

【００８２】
サンプル条件の例として、（厳密性が高い順に）２５℃、３７℃、５０℃および６８℃の培養温度、１０ Ｘ ＳＳＣ、６ Ｘ ＳＳＣ、４ Ｘ ＳＳＣ、１ Ｘ ＳＳＣ、０

．１　Ｘ　ＳＳＣの緩衝液濃度（ここでの記載はＳＳＣが０．１５ＭのＮａＣｌで１５ｍＭの緩衝液の場合）および他の緩衝液系を使用した場合はこれと同等の濃度、０％、２５％、５０％および７５％ホルムアミド濃度、５分から２４時間の培養時間、１回、２回またはそれ以上の洗浄工程、１、２または１５分の洗浄培養時間、６　Ｘ　ＳＳＣ、１　Ｘ　ＳＳＣ、０．１　Ｘ　ＳＳＣの洗浄溶液または脱イオン水が挙げられるが、これらに限定されるものではない。好ましい実施形態では、ハイブリダイゼイションおよび洗浄条件は、高い厳密性で行われる。一例としてハイブリダイゼイションは、５０％ホルムアミド／４　Ｘ　ＳＳＣで行われ、次いで５０℃で２　ｘ　ＳＳＣ／ホルムアミドおよび１　ｘ　ＳＳＣで洗浄が行われる。

【００８３】

緩衝液は、イオンまたは他の化合物を含んでもよく、また異なった緩衝能を有していてもよい。あるいは、緩衝液中の成分は、たとえば、三重鎖ＤＮＡを安定化させる（Ａｒｙａ　ｅｔ　ａｌ，２００３）ネオマイシンや他のアミノグリコシド、または三重鎖の安定性を増強するナフタレンジイミド（ＧＩａｎｏｌＩｏ　ａｎｄ　ＭｃＬａｕｇｈｌＩｎ，２００１）、またはナフチルキノリンダイマー（Ｋｅｐｐｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ，１９９９）のように安定化能力を有してもよい。

【００８４】

Ｄ．色素

ポリヌクレオチドの存在または量は、１つまたはそれ以上の光学特性における変化率が、核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドの公知の濃度と比較して、核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドの存在下で異なる色素を使用して決定される。１つの態様では、光学特性は色、吸光度、蛍光発光、反射率または化学発光のおける変化である。また、光学特性は分析中、１回または複数回測定されてもよい。

【００８５】

色素の光学特性における変化率は、既知量の核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドまたはポリヌクレオチド／ＰＮＡハイブリッドを含む混合物中の色素の光学特性における変化率の基準値指標と比較して、光学特性における変化の相対比率を決定してもよい。基準値は、定量的であっても近似値（たとえば色の存在、不存在）であってもよい。あるいは基準値は数値であってもよい。他の例として、基準値は、サンプル用の色素の光学特性における変化率の測定の前、間または後に測定または決定してもよい。さらに他の例では、基準値は、レート定数のように一定値であってもよい。また、基準値は標的ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド／核酸ハイブリッドの非存在下（すなわち、既知量の核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドが０）での色素の光学特性における変化率であってもよい。

【００８６】

色素は、核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドが存在しない場合の基準値指標より、核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドが存在する場合の光学特性における変化率の方が高い場合がある。このようにして、ポリヌクレオチドの存在または量は、基準値と比較した光学特性における変化の相対比率の増加によって検出することができる。核酸類似体／ＤＮＡハイブリッドの存在下で光学特性がより素早く変化する色素の例として、多環芳香族化合物であるカルボシアニン色素が挙げられる。これらの色素は可視領域で極度に吸収し、溶液中の核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドに優先的に結合し、結合するときに色を変える。シアニン色素の例として、３，３’－ジエチルチアシアニンヨウ化物，３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物、３，３’－ジエチルチアジカルボシアニンヨウ化物および３，３’－ジエチルチアトリカルボシアニンヨウ化物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【００８７】

一例示的な実施形態では、本明細書に記載する分析条件下で、３，３’－ジエチルチアカルボシアニンは、標的核酸および相補的ＰＮＡの存在下、光刺激で、ショッキングピンクから透明に変わる。標的核酸が存在しない場合、色素の変化率はより遅い。また、光刺

激は標的核酸と相補的ＰＮＡの存在下で色素の蛍光発光を減少させる。光刺激が存在しない場合、標的核酸の存在下で、色素は直ちにショッキングピンクからどんよりしたピンクに変わり、標的核酸の存在下で色素の蛍光発光は減少する。

【００８８】

ここに記載した分析条件下で、３，３’－ジエチルチアジカルボシアニンは、標的核酸の存在下で、青色から紫に変わる。

【００８９】

ここに記載した分析条件下で、３，３－ジエチルチアトリカルボシアニンは、標的核酸の存在下でアクアブルーを保ち、標的核酸が存在しない場合、透明に変わる。

【００９０】

他のケースでは、核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドが存在しない場合より核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドが存在する場合のほうが、色素の光学特性における変化率は低い。このようにして、ポリヌクレオチドの存在または量は、核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドが存在しない場合の比率の基準値指標と比較して、光学特性における変化の相対比率の減少によって検出することができる。

【００９１】

色素は、たとえば、種々の方法で核酸を伴う分子の中から選択される。有益な色素として、副溝バインダー、主溝バインダー、インターカレータおよび他のポリヌクレオチド結合分子、その誘導体および共役物が挙げられる。本発明の方法で有用な色素のあるものは、核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドの副溝に結合する。これらの色素として、３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物、３，３’－ジエチルチアジカルボシアニンヨウ化物および３，３’－ジエチルチアトリカルボシアニンヨウ化物などのカルボシアニン色素が挙げられる。例として、以下が挙げられるが、これらに限定されるものではない。すなわち、臭化エチジウム（ＦｉｅｂＩｇ ｅｔ ａｌ．，１９９９）、フルオレッセイン、フェノチアジン色素、たとえば、メチレンブルー（Ｗａｇｎｅｒ，２００２），ＤＡＰＩ（ＫａｐｕｓｃＩｎｓｋＩ，１９９５）、チアゾールオレンジ（Ｂｏｇｅｒ ａｎｄ Ｔｓｅ，２００１，Ｃａｒｒｅｏｎｅｔａｌ．，２００４）、ヘキスト３３２５８（ＡｄｈＩｋａｒｙ ｅｔａｌ．，２００３、ＭａＩｔＩ ｅｔ ａｌ．，２００３，ＭｏｒｏｚｋＩｎら、２００３、ＴａｎＩｏｕｓら、２００４、Ｔａｗａｒ ｅｔ ａｌ．，２００３）、ＳＹＢＲグリーンＩＩ（ＭｏｒｏｚｋＩｎ ｅｔ ａｌ．，２００３）、ＢＥＢＯ、ＢＥＴＯ、ＢＯＸＴＯ、ＢＯ、ＢＯ－ＰＲＯ、ＴＯ－ＰＲＯ、ＹＯ－ＰＲＯ（Ｋａｒｌｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００３，ＥｒＩｋｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００３）、ＰＩｃｏＧｒｅｅｎ（Ｔｏｌｕ ａｎｄ Ｍｙｅｒｓ，２００３）、ＴＯ－ＰＲＯ－３（Ｓｏｖｅｎｙｈａｚｙ ｅｔ ａｌ．，２００３）、ビスシアニン色素（Ｓｃｈａｂｅｒｌｅ ｅｔ ａｌ．，２００３）、メチルグリーン－ピロニンＹ（Ｐｒｅｎｔｏ ａｎｄ Ｌｙｏｎ，２００３）、臭化エチジウムおよびアクリジンオレンジ（Ｊｏｈｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００３、ＬａｕｒｅｔｔＩら、２００３、Ｌｕｅｄｔｋｅ ｅｔ ａｌ．，２００３）、ニュートラルレッド（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００３）、ＢＯ（Ｋａｒｌｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００３）、モノ－およびビス－レクストロピシンおよびペンタアミジン（Ｐｕｃｋｏｗｓｋａ ｅｔ ａｌ．，２００４）、２－（メチルチオ）フェニルサリシルアルジミンシッフ塩基銅（ＩＩ）（Ｒｅｄｄｙ ｅｔ ａｌ．，２００４）、二官能性白金（ＩＩ）錯体（Ｍａ ａｎｄ Ｃｈｅ，２００３）、ビス（９－アミノアクリジン－４－カルボキシアミド）（ＷａｋｅｌＩｎ ｅｔ ａｌ．，２００３）、ビスカルボジイミダゾアクリゾン（Ｔａｒａｓｏｖ ｅｔ ａｌ．，２００３），平行または逆平行カルボキシアミド副溝バインダー（ＢｏｕｔｏｒＩｎｅ ｅｔ ａｌ．，２００３）、オリゴ（２’－Ｏ－メチルリボヌクレオチド）と副溝バインダーとの接合体（ＮｏｖｏｐａｓｈＩｎａ ｅｔ ａｌ．，２００３）、ピロール－イミダゾールポリアミン（ＢｒＩｅｈｎ ｅｔ ａｌ．，２００３，Ｄｅｒｖａｎ ａｎｄ Ｅｄｅｌｓｏｎ，２００３Ｒｅｄｄｙ ｅｔ ａｌ．，２００３，Ｒｅｎｎｅｂｅｒｇ ａｎｄ Ｄｅｒｖａｎ，２００３）、ピロール（Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．，、２０００）、ビス

ピロール（Ｃａｒｒａｓｃｏ ｅｔ ａｌ．，２００３）、ルテニウム錯体（Ｋｕｗａｂａｒａ ｅｔ ａｌ．，２００３）、タリウム（Ｏｕａｍｅｕｒ ｅｔ ａｌ．，２００３）、芳香族ジアミン（Ｎｇｕｙｅｎ ｅｔ ａｌ．，２００２）、シャールトルーシン（Ｂａｒｃｅｌｏ ｅｔ ａｌ．，２００２）白金錯体（ＳＩｌｖｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，２００２）Ｓ－３－ニトロ－２－ピリジンスルフェニル－Ｎ－アセチル－システイン（ＳｈＩｍ ｅｔ ａｌ．，２００４）、メチルスルホン酸エステル（Ｖａｒａｄａｒａｊａｎ ｅｔ ａｌ．，２００３）、ペプチドビス－インターカレータ（Ｇｕｅｌｅｖ ｅｔ ａｌ．，２００１）、メタロインターカレータ（Ｐｒｏｕｄｆｏｏｔ ｅｔ ａｌ．，２００１）、２，２’－ビナフタレン（Ｋｏｎｄｏ ｅｔ ａｌ．，２００４）、挿入核酸（ＣｈｒＩｓｔｅｎｓｅｎ ａｎｄ Ｐｅｄｅｒｓｅｎ，２００２，ＮＩｅｌｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，２００４）、ルテニウム（ＩＩ）錯体（ＬＩｕ ｅｔ ａｌ．，２００４）、環状ポリアミンネオトリエン／銅（ＩＩ）錯体（ＢＩｖｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００４）、２，６－ジスルホン酸アントラキノン（Ｗｏｎｇ ａｎｄ ＧｏｏｄＩｎｇ，２００３）、フェロセニルアントラセン、フェロセニルおよび他のナフタレンジイミド誘導体（ＧＩａｎｏｌＩｏ ａｎｄ ＭｃＬａｕｇｈｌＩｎ，２００１，Ｔａｋｅｎａｋａ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｔｏｋ ａｎｄ Ｆｅｎｋｅｒ，２００１）、ドキソルビシン（Ｐａｔｏｌｓｋｙ ｅｔ ａｌ．，２００２，ＸＩａｏ ｅｔ ａｌ．，２００３）、アクリジン－９－イルチオウレア（Ｂａｒｕａｈ ａｎｄ ＢＩｅｒｂａｃｈ，２００３）、ナフタレンジイミド（ＮｏｊＩｍａ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｎｕｎｅｚ ｅｔ ａｌ．，２０００）、ミトキサントロン（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００３）、クリプトおよびネオクリピトレピン（ＧｕＩｔｔａｔ ｅｔ ａｌ．，２００３）、イミノ２酢酸結合ポリアミド（Ｗｏｏｄｓら、２００２）、樹木状ポリアミン接合物（Ｂｒａｎａ ｅｔ ａｌ．，２００２）、ビス－インターカレータ デルター－デルタ［ｍｕ－Ｃ４９ｃｐｄｐｐｚ）（２）－（ｐｈｅｎ）（４）Ｒｕ（２）］（Ｏｎｆｅｌｔ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｏｎｆｅｌｔ ｅｔ ａｌ．，２００２）、ジターカリニウム（Ｂｅｒｇｅ ｅｔ ａｌ．，２００２）、８－メトキシソラレン（Ａｒａｂｚａｄｅｈ ｅｔ ａｌ．，、２００２）、ダウノマイシンおよびエリプチシン（Ｒｅｈａ ｅｔ ａｌ．，２００２）、１，４，５，８－ナフタレンテトラカルボキシジイミド（Ｇｕｅｌｅｖ ｅｔ ａｌ．，２００２）、クリトレピン（ＬＩｓｇａｒｔｅｎ ｅｔ ａｌ．，２００２）、ＡＭＡＣ（Ｆｅｒｒｙら、２００１）、（－）－６－［［（アミノアルキル）オキシ］メチル］－４－ジメトキシ－６，７－ジデオキシダウノンシノン（ｌ）（ＤＩｅｎｅｓ ａｎｄ Ｖｏｇｅｌ，１９９６）、ＮＬＣＱ－１（Ｐａｐａｄｏｐｏｕｌｏｕ ｅｔ ａｌ．，２０００）、ＹＯＹＯ－１（Ｗｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００１）、ＤＡＣＡ（ＨＩｃｋｓ ｅｔ ａｌ．，２００１）、シクロメチル化Ｒｈ（ＩＩＩ）（ＫＩｓｋｏ ａｎｄ Ｂａｒｔｏｎ，２０００）、ＣＩ－９５８（Ｄｅｅｓ ｅｔ ａｌ．，２０００）ピプラゾールアクリジン（Ｐｅｌｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，２０００）、シス－ジクロロ白金（ＩＩ）錯体（ＰｅｒｒＩｎ ｅｔ ａｌ．，２０００）、イミダゾアクリジノン（ＭａｚｅｒｓｋＩ ａｎｄ ＭｕｃｈｅｗＩｃｚ，２０００）、カルバゾール（ＳａｊｅｗＩｃｚ ａｎｄ Ｄｌｕｇｏｓｚ，２０００）、５，１１－ジメチル－５Ｈ－インドール［２，３－ｂ］キノリン（ＯｓＩａｄａｃｚ ｅｔ ａｌ．，２０００）、ＹＯＹＯ－３，ネトロプシン，ＳＮ６９９９，Ａ３ ａｎｄ ＳＮ６１１３（ＫＩｒｓｃｈｓｔｅＩｎ ｅｔ ａｌ．，２０００）、オキサゾールイエロー（Ｉｎｏｕｅ ｅｔ ａｌ．，１９９９）、ロジウム（Ｅ）の５，６－クリセンキノンジイミン錯体（Ｊａｃｋｓｏｎ ａｎｄ Ｂａｒｔｏｎ，２０００）、ネールブルー（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９９）、ウサムバレンシン（ＤａｓｓｏｎｎｅｖＩｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，１９９９）、３－メトシベンズアントロン（Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９９９）、１，８－ジヒドロキシアントラキノン（Ｍｕｅｌｌｅｒ ａｎｄ Ｓｔｏｐｐｅｒ，１９９９）、シクロプロパピロロインンドール（Ｄｅｍｐｃｙ ｅｔ ａｌ．，１９９９）、アントラセン（ＯｓｔａｓｚｅｗｓｋＩ ｅｔ ａｌ．，１９９８）、ピロリジンおよびイミダゾール（Ａｔｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，１９９８）、アントラサイクリン錯体（ＭＩｌａｎｏ ｅｔ ａｌ．

，１９９８）、アチゾールオレンジ－チアゾールブルー、アチゾールオレンジ－エチジウムおよびフルオレッセイン－エチジウム（Ｂｅｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９３ａ，Ｂｅｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９３ｂ）などのヘテロダイマーが挙げられる。さらに、企業（たとえば、Ｍｏｌｅｃｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ）は本発明の系と相溶性のある核酸株の多くのタイプを販売する色素に反応するシアニン色素および株の他の網がＪｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ ＡｍｅｒＩｃａｎ ＣｈｅｍＩｃａｌ ＳｏｃＩｅｔｙ１２５：４１３２－４１４５（２００３）およびＢＩｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ ＣｈｅｍＩｓｔｒｙ １３：３８７－３９１（２００２）に記載されている。付加的な色素の例として、第三銅（ＩＩ）錯体（Ｄｈａｒ ｅｔ ａｌ．，２００３），ジスタマイシンＡ（ＨＩｒａｋｕ ｅｔ ａｌ．，２００２、Ｗｏｏｄｓ ｅｔ ａｌ．，２００２）、インドール［２，３－ｂ］－キノリジニウムブロマイド（ＶＩｏｌａ、２００２）、エクテイナシジン（Ａｎｔｈｏｎｅｙ ａｎｄ Ｔｗｅｌｖｅｓ，２００１）、金属アンミン（Ｂａｒｒｙ ｅｔ ａｌ．，２００２）、２－フェニルキノリン－炭水化物ハイブリッド（ＴｏｓｈＩｍａ ｅｔ ａｌ．，１９９９）が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、色素は切断を促進する化合物ではない場合もある。

【００９２】

また、色素は、マラカイトグリーン、赤色の二ヒ素系色素およびフルオレッセインも挙げられる。ある実施形態では、色素はマラカイトグリーン赤色の二ヒ素系色素およびフルオレッセインではない場合もある。

【００９３】

当業者であれば、本方法で使用されてもよいそれらの色素をスクリーニングで同定してもよいことは、理解することになる。核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドと結合し、場合によっては、刺激が与えられた後、時間が経てば光学特性における変化を示す色素は、容易に識別され、選択される。

【００９４】

当業者であれば、この開示に導かれて、本明細書で挙げた色素に加えて、他の色素（将来発見され、または開発される色素も含めて）も本発明の方法で使用してもよいことは、認めることになる。本明細書に記載される分析条件下において、標的ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドの存在および非存在によって光学特性における変化率が異なる色素は、本発明の方法に適している。

【００９５】

適切な色素は、種々のスクリーニング方法で識別できる。たとえば、核酸類似体を含むサンプルと相補的配列を有するポリヌクレオチドとを、核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドが形成される条件下で組み合わされるが、これらに限定されない。一実施形態では、次に場合によっては、種々の濃度の候補色素が添加される。添加の順序は重要ではなく、成分を他の順序で添加することもできる。次いで経時的な光学特性における変化率を測定する。この比率を核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドの存在しない色素の光学特性における変化率の基準値指標と比較する。一実施形態では、基準値は、ポリヌクレオチドが存在しない場合の指標である。一実施形態では、基準値は、ポリヌクレオチド（単鎖または二本鎖）の存在下における指標である。他の実施形態では、基準値はポリヌクレオチドの非ゼロ濃度の指標である。基準値と比較して、光学特性において経時的に異なる変化率を示す色素が、請求の方法において使用するために選択される。光学特性における変化の相対比率を、特異的なポリヌクレオチドの存在または量と相互に関連付ける。

【００９６】

Ｅ．光刺激

光刺激は、サンプル、核酸類似体および色素の混合物に、混合物の製造時に同時にあるいは製造後特定の時間に与えることができる。光刺激によって、色素の光学特性における変化率の変化が起こる。

【００９７】

光刺激は、可視スペクトル内あるいは可視スペクトル外でなされる。光刺激は、多数の

波長の白色光でもよい。あるいは、光刺激は、特定の波長または波長範囲を有するものでもよい。また、光刺激は特定の輝度を有してもよい。

【００９８】

光源は、業界で知られている。異なった光源を使用すると、光源の輝度や波長の相違により、異なった反応速度となる。光源の例として、反応速度の小さい順に、ＳｙｌｖａｎＩａ　Ｃｏｏｌ　ＷｈＩｔｅＴ８－ＣＷ、Ｇｅｎｅｒａｌ　ＥｌｅｃｔｒＩｃＴ８－Ｃ５０およびＦｒＩｔｚ　Ａｕｒｏｒａ５０／５０が挙げられる。他の光源として、ＳｙｌｖａｎＩａ　ｄｕｌｕｘ　Ｓ９Ｗ　ＣＦ９ＤＳ／ｂｌｕｅおよびＯｓｒａｍ　Ｆ９ＴＴ／５０Ｋが挙げられる、これらはどちらも、光刺激反応においてＧｅｎｅｒａｌ　ＥｌｅｃｔｒＩｃ　Ｔ８－Ｃ５０より速い速度を示す。

【００９９】

当業者であれば、余分な実験をすることなしに、特定の色素または特定の核酸類似体、ポリヌクレオチドおよび色素混合物用の最適の光刺激を決定することは認識することになる。一組の温度および濃度条件が特定の混合物用に試験することができる。

【０１００】

ＩＶ．標的ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドの形成

標的ポリヌクレオチドの検出のための分析は、種々のハイブリダイゼイションスキームを使用して、行うことができる。一形式では、ポリヌクレオチド配列は、標的ポリヌクレオチドが直接核酸類似体にハイブリッド形成して、標的ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドを形成することによって識別してもよい。

【０１０１】

一形式において、核酸類似体はＰＮＡである。ＰＮＡ／ＰＮＡは、ＤＮＡ／ＤＮＡ間隔およびＰＮＡ／ＤＮＡ間隔とは異なる間隔を有する。ＰＮＡ／ＰＮＡおよびＰＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ハイブリッドの詳細な構造は、ＮＭＲおよびＸ線による結晶構造解析によって解明されている。ＰＮＡ／ＰＮＡ二重鎖ハイブリッドは、非常に広く深い主溝と、非常に狭く浅い副溝とを有し、二重鎖は１回転当たり１８塩基対という非常に大きなピッチと高いピッチ高さ（５７．６Å）を有する。ＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ハイブリッドに見られる正規のＢ－型螺旋は、１回転当たり１０塩基対のピッチおよび３４Åのピッチ高さを有する一方、ＰＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ハイブリッドは、１回転当たり１３塩基対および４２Åのピッチ高さを有する。ＰＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ハイブリッド中の塩基対は、ＤＮＡ二重螺旋と比べて異なった幾何学配置を有するので、ＰＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ハイブリッドの積み重ね相互作用の強さは、ＤＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ハイブリッドの強さとは異なることが予測される。１０、１２および１６ｍｅｒのＰＮＡ／ＤＮＡ二重鎖ハイブリッドのＣＤスペクトルは、これら二重鎖ハイブリッドが異なる塩基配置であることを示唆する。

【０１０２】

色素および核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッド上の色素の結合部位は、反応が進行するか否かに影響を与える。たとえば、ハイブリッドの主または副溝に結合する色素は、効率的に結合するために、ハイブリッドが一定の数の塩基対を含んでいることを必要とする。塩基対の最小の数は、当業者によって容易に決定することができる。

【０１０３】

１つの態様では、標的核酸類似体分子は部分的に相補的な核酸類似体に対し相補的である。核酸類似体は、図１８Ａに示すように、核酸類似体分子および標的ポリヌクレオチドの両方にハイブリッド形成する。これは、１つの工程または複数の工程で成し遂げてもよい。１つの工程の方法では、標的ポリヌクレオチドおよび核酸類似体は、１つの工程で組み合わされる。複数工程の方法では、標的ポリヌクレオチドおよび核酸類似体は、順番に組み合わされる。

【０１０４】

さらなる態様では、標的ポリヌクレオチドの存在が分岐反応十字架構造を形成することによって検出してもよく、その例を図１８Ｂに示す。この形式では、標的ポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドに対し部分的に相補的である、２個の中間体ポリヌクレオチ

ドにハイブリッド形成する。この中間体ポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドおよび第一核酸類似体分子にハイブリッド形成する分岐構造を形成する。中間体ポリヌクレオチドの標的ハイブリッド領域は、色素が単独で核酸類似体分子と結合するには短か過ぎるが、ハイブリッド形成の時、核酸類似体分子に結合するには充分長いように設計されてもよい。次いで色素の光学変化の比率が決定されてもよい。一実施形態では、一核酸類似体分子は、全ての分析で使用され、色素の光学特性において効果的な変化を得るために最適化される、汎用の核酸類似体であってもよい。汎用の核酸類似体は、いかなる標的核酸用にも使用することができ、中間体配列も様々である。このスキームは、固定化核酸類似体を使用する形式に適用することができる。

【０１０５】

他の形式では、複合核酸類似体分子が標的ポリヌクレオチドに隣接する領域を有する核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドを形成する。この形式では、核酸類似体分子のそれぞれは色素にとって短か過ぎて、結合して色素の光学特性の比率を変化させることはできないが、複数の核酸類似体分子が、光学特性における変化率を得る結果となるのに充分に長い領域を提供する。図１８Ｃに示すように、一分子としての標的ポリヌクレオチドは、結合して、隣接する配列にハイブリッド形成する３つの個別の核酸類似体分子によって核酸類似体／ポリヌクレオチド二重鎖を形成する。しかし、図１８Ｄに示すように、もし中心核酸類似体分子がハイブリッド形成することができなければ、光学特性における変化は観察されない。この形式では、核酸類似体分子の１つが固定化されていてもよい。

【０１０６】

Ｖ．標的ポリヌクレオチドの量の定量

方法、組成物および分析システムは、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの量を定量するために使用されてもよい。一実施形態では、標的ポリヌクレオチドの量は、核酸類似体分子の段階的希釈を行い、種々の量の標的ポリヌクレオチドサンプルを加え、そしてサンプルを既知の濃度のコントロールと比較することによって、検出してもよい。他の実施形態では、標的ポリヌクレオチドの量は、標的ポリヌクレオチドの段階希釈を作り、種々の量の核酸類似体分子を加え、そしてサンプルを既知の濃度のコントロールと比較することによって、検出してもよい。

【０１０７】

あるいは、標的ポリヌクレオチドの量は、時間に基づく分析の反応速度を測定することによって検出する。組み合わされた混合物中の色素の測定は、混合物の生成の後、あるいは光刺激を当てた後に、規則的な間隔で行われる。色素は、混合物が組み合わされた後または光刺激を当てた後に、異なった時間に検出してもよい。時間は、いかなる時間であってもよく、たとえば、光学特性における変化の全時間、または光学特性がある比率だけ変化するのに必要な時間たとえば、約２０％（これに限定されない）であってもよい。反応は、たとえば、２０％メタノール、１５％イソプロパノール、１５％ＤＭＳＯまたは１０％ブタノールなどの溶剤の添加によって凍らせる（さらなる変化を止める）こともできる。

【０１０８】

また、反応はある１つの範囲の緩衝液および溶剤を含むことができる。これらの緩衝液および溶剤は、リン酸緩衝液、水、０．１％ＳＤＳ、０．１％ＴｒＩｔｏｎＸ、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０、３％ブタノール、１０％メタノール、１０％イソプロパノール、１０％ＤＭＳＯ、１Ｘ血液溶解緩衝液（０．１５ＭのＮＨ４Ｃ１、１ＯｍＭのＮａＨＣ０３、０．１ｍＭのＥＤＴＡ、ｐＨ７．４）およびショ糖溶解緩衝液（０．３２Ｍのｓｕｃｒｏｓｅ、１０ｍＭのトリス、１％ＴｒＩｔｏｎＸ－１００、５ｍＭのＭｇＣ１２）が挙げられる。

【０１０９】

サンプル中のポリヌクレオチドの量は、光刺激に曝された後に決定してもよい。色素の光学特性における変化は、光学特性をスタートさせるために光刺激に予備曝露を行った後測定してもよい。測定は、光刺激に曝された後異なった時間（たとえば、３０秒の間隔で

行う）に行われてもよい。反応は、上記したように、凍らせる（更なる変化を止める）ことができる。

【０１１０】

光刺激への曝露によるサンプル中の変化は、数種の方法で観察することができる。光学特性における変化は、色、吸光度、蛍光発光、反射率、化学発光あるいはこれらの組み合わせとして観察してもよい。あるいは、光学特性における変化は、読み取り装置を用いて読み取ることができる。この変化は、Ｔｅｃａｎ　ＧｅｎＩｏｓまたはＴｅｃａｎ　ＳａｆＩｒｅなどの分光光度計を用いて測定する。特定の波長を、たとえば、フィルターによって観測する。陽性コントロールは、陰性テストより吸光度の変化を速く示す。変化率における相違として、あるいは、ある１つの設定された時間での変化の相違として測定することができる。もし、光刺激が使用され、蛍光性特性が観察されれば、サンプルに提供された光刺激は、観察された発光よりより高いエネルギー（より低い波長）である。励起は、たとえば、５３５ｎｍで起こり、発光は５９０ｎｍで読み取れる。蛍光発光は、変化率における相違として、設定された時間の変化の相違を測定してもよい。

【０１１１】

さらに、混合物は、光刺激に曝される前に起こる変化を有していてもよい。この相違は、分光光度計システム、蛍光発光システム、または化学発光法システムのいずれにおいても観察される。

【０１１２】

ＶＩ．分析形式

Ａ．液体系分析システム

実施例１～４で実際行ったように、標的ポリヌクレオチドを検出するための方法および分析システムは液体系である。サンプルと、配列特異的方法でポリヌクレオチドの標的核酸配列に結合する核酸類似体と、核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドの存在と非存在によって光学特性における変化率が相違する色素とを組み合わせ、液体溶液の混合物を生成する。混合物中の色素の光学特性における変化率を、既知量の核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドを含む類似する混合物中の色素の光学特性における変化率の基準値指標と比較して、光学特性における変化の相対比率を決定する。混合物中の色素の光学特性における変化の相対比率をサンプル中の特定のポリヌクレオチドの存在または量と相互に関連付け、サンプル中のポリヌクレオチドの存在または量を決定する。

【０１１３】

該方法および分析システムは、またマイクロチューブ、テストチューブおよび表面張力によって液体を収容するチップなどのいかなる容器中で製造されてもよい。また、該方法および分析システムは、マルチウェルプレートで製造されてもよい。該プレートは複数のウェルを有する。

一形式では、９６ウェルプレートが使用される。他の形式では、３８４プレートが使用される。分析形式としてマイクロウェル形式を採用する場合、液体は、マイクロタイタープレートの各ウェルの中に保持される。

【０１１４】

Ｂ．固体支持体系分析システム

該方法および分析システムは、固体をベースとする（たとえば、１つまたはそれ以上の成分が固体支持体上に固定化されている）。ほとんどの場合、核酸類似体または標的ポリヌクレオチドは固定化されている。核酸類似体または標的ポリヌクレオチド分子が結合する固体支持体は、多くのタイプがあり、キャスト膜（ニトロセルロース、ナイロン）、セラミック、トラックエッチング膜（ＴＥＭ）、ポリビニリデンジフルオライド、ラテックス、常磁性ビーズ、全てのタイプのプラスティック支持体、ガラス、または支持体マトリックス上の粉末状シリカまたはアルミナが挙げられるが、これらに限定されない。格子型を使用するなら、核酸類似体分子／固体支持体はマイクロアレイを形成する。他の変型では、核酸類似体または標的ポリヌクレオチド分子は共有結合で変性され、膜に結合するビオチンまたはアミド結合などの結合部位を含んでもよい。さらに他の変型では、核酸類似

体または標的ポリヌクレオチド分子は、１つまたはそれ以上の配列に対する配列特異的ハイブリダイゼイションを介して固定化されていてもよい。

【０１１５】

図１７は、活性化された光刺激、核酸類似体の表面への固定化の検出の概略図を示す。Ａ）ストレプトアビジンウェル。Ｂ）ビオチニル化核酸類似体をウェルに加え、放置して支持体に結合させる。Ｃ）ウェルを洗浄し、過剰の核酸類似体を取り除く。Ｄ）サンプルポリヌクレオチドを加え、特異的配列標的を相補的核酸類似体に結合させる。Ｅ）非特異的および過剰のポリヌクレオチドを洗浄して取り除く。Ｆ）色素を加え、光刺激に曝す。

【０１１６】

核酸類似体分子を支持体に結合させるいかなる方法であっても本発明では使用できる。１つの態様では、核酸類似体分子は、直接膜に結合してもよい。核酸類似体は、ＰＮＡ（たとえば、ＡＧＩｇｅｒ，Ｌｅｓｔｅｒ Ａ，ＫｌｅＩｂｅｒ Ｊａｎｄ Ｏｒｕｍ Ｈ，１９９８，ＰＮＡ ａｒｒａｙ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｄＩａｇｎｏｓｔＩｃｓ． ＮｕｃｌｅｏｔＩｄｅｓ ａｎｄ ＮｕｃｌｅｏｓＩｄｅ，１７（１７１７－１７２４））であってもよい。核酸類似体分子（水中）の溶液を、単に電荷を帯びた、または化学的に変性されたフィルターに塗布し、結び付け、空気乾燥する。このようにして得たフィルターをハイブリダイゼイションのために使用する。

【０１１７】

他の態様では、ビオチニル化した核酸類似体分子を、ストレプトアビジンを塗布した表面、たとえば、ビーズまたはウェル（たとえば、Ｃｈａｎｄｌｅｒ，Ｄ．Ｐ．、Ｓｔｕｌｔｓ，Ｊ．Ｒ．，Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｋ．Ｋ．，Ｃｅｂｕｌａ，Ｓ．，Ｓｃｈｕｃｋ，Ｂ．Ｌ．，ａｎｄ Ｂｒｏｃｋｍａｎ，Ｆ．Ｊ．，２０００．ＡｆｆＩｎＩｔｙ Ｃａｐｔｕｒｅ ａｎｄ Ｒｅｃｏｖｅｒｙ ｏｆ ＤＮＡ ａｔ Ｆｅｍｔｏｍｏｌａｒ ＣｏｎｃｅｎｔｒａｔＩｏｎｓ ｗＩｔｈ ＰｅｐｔＩｄｅ ＮｕｃｌｅＩｃ ＡｃＩｄ Ｐｒｏｂｅｓ．ＡｎａｌｙｔＩｃａｌ ＢＩｏｃｈｅｍ．２８３： ２４１－２４９，参照）に結合させる。ビオチン標識核酸類似体分子は、ストレプトアビジン標識ラテックスまたはポリカルボネートビーズと混合する。ビオチンは、ストレプトアビジンと強く結合し、核酸類似体分子を単方向の形でビーズと結合させる。次いでビーズを、メッシュサイズがビーズの直径より大きい２５－３０％の非帯電膜に塗布する。ビーズはメッシュの中に閉じ込められ始め、それにより、「結合した核酸類似体分子」の局部を作る。核酸類似体分子のポリプロピレン膜などの固体支持体への直接合成は、規格基準の９－フルオレニルメトキシカルボイル（Ｆｍｏｃ）タンパク合成化学（たとえば、ＭａｔｙｓＩａｋ Ｓ．，Ｒｅｕｔｈｎｅｒ Ｆ．，ａｎｄ ＨｏｈｅＩｓｅｌ ＪＤ．２００１ＡｕｔｏｍａｔＩｎｇ ｐａｒａｌｌｅｌ ｐｅｐｕｔＩｄｅ ｓｙｎｔｈｅｓＩｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｐｒｏｄｕｃｔＩｏｎ ｏｆ ｎｕｃｌｅＩｃ ａｃＩｄ ａｎａｌｏｇ ｌＩｂｒａｒｙ ａｒｒａｙｓ、ＢＩｏＴｅｃｈｎＩｑｕｅｓ３１：８９６－９０４参照）を使用して行ってもよい。

【０１１８】

他の態様では、核酸類似体分子を水中に含む溶液を直接ガラスまたは他の支持体に塗布し、空気乾燥させることによって、核酸類似体分子をガラスまたは他の固体支持体に固定化してもよい。

【０１１９】

他の変型では、核酸類似体分子は、正味の正電荷を生成するように設計され、帯電した膜に陰電気を帯びて結合してもよい。たとえば、核酸類似体分子の５’または３’末端が正電荷を帯びたリシンまたはグリシンを使用して、負電荷を帯びたナイロン膜に核酸類似体分子を結合させてもよい。負電荷を帯びた膜は、核酸類似体に対して相補的および／または正確に相補的であるいかなる核酸とも反発し、そのため、非特異的結合を最小限に抑える。

【０１２０】

いかなる標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリヌクレオチドの基であっても固体支持体

系システムによって検出する。この場合、固体支持体は、固体支持体上に固定化された複数の核酸類似体分子を含む。核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッド分子を形成しないコントロール核酸類似体はハイブリッド形成せず、固体支持体上に含まれる。

【０１２１】

固体支持体系分析システムは、少なくとも１つの標的ポリヌクレオチドを検出するために、使用されてもよい。他の変型では、固体支持体系システムは、少なくとも約８、少なくとも約１０、少なくとも約２０、少なくとも約３０、少なくとも約４０、少なくとも約５０、または少なくとも約６０の異なった標的ポリヌクレオチドの発現を検出または測定する。他の変型では、固体支持体系システムは、６０またはそれ以上の標的ポリヌクレオチドの発現を検出および識別する。

【０１２２】

一例として、固体支持体として膜を使用したこの分析の固体支持体系の変型を図３に示すが、これに限定されるものではない。該分析は、標的ポリヌクレオチドの存在を検出する。該システムは、特異的標的ポリヌクレオチドを少量でも数分以内で識別および／または定量し、大規模な装置を必要とせずに視覚的信号（たとえば、ピンクの比率が透明に変化する）で提供する。非常に速いサンプル溶解、ハイブリダイゼイションおよび色素の導入の後、光刺激が与えられ、膜上に着色されたパターンの変化率を観察する。膜上の着色バンドのパターンにおける変化率がユーザーに標的ポリヌクレオチドの存在および同定を容易に決定させる。場合によっては、該方法またはその変法は、小さな電池で駆動される携帯型の装置で行われてもよい。自動化されたロボットを使う型では、すべての工程を、人間によらず、機械で行うこともできる。

【０１２３】

固体支持体系分析システムは、マイクロタイタープレートを使用した設備であってもよい。業界で知られているあらゆるマイクロタイタープレートを使用してよい。分析成分は、そのような分析システム中に液体で留まる。一形式では、９６ウェルプレートが使用される。他の形式では、３８４プレートが使用される。分析をマイクロタイター形式で行う場合、固体表面に結合する成分以外は、全成分がマイクロタイタープレートの各ウェル中の溶液中に留まる。

【０１２４】

ＶＩＩ．標的ポリヌクレオチドおよび標的ポリヌクレオチド源

標的ポリヌクレオチドは、天然由来のもの、合成されたものおよび増幅されたものを始めとしていかなるポリヌクレオチドであってもよい。ポリヌクレオチドの他のタイプとして、一本鎖、二本鎖であってもよい。標的ポリヌクレオチドの限定的ではない例示として、ＤＮＡ、ＲＮＡ、調節ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、調節ミクロＲＮＡ、ｓＩＲＮＡ、人工ＲＮＡ、およびキメラＲＮＡが挙げられる。標的ポリヌクレオチドの他の限定的でない例示としてエピゲノムＤＮＡ、後成的ＤＮＡ、インビトロ増幅ＤＮＡおよびキメラＤＮＡが挙げられる。標的ポリヌクレオチドは、本明細書で開示される方法によって識別され、または定量されるＳＮＰが含まれる。

【０１２５】

本明細書に記載される方法、システムおよび分析は、様々な用途を有する。これらの用途の限定的でない例示として、生体、食品介在性病原体、環境病原体、水媒介性病原体あるいはアグロテロリズム（農業・畜産テロリズム）に関する病原体などの病原体を検出および定量することが挙げられる。他の限定的ではない用途として、性的に伝染した病気の診断のような病気の診断、抗生物質への耐性を有する遺伝子の検出、薬の感応性の固体素因を有する遺伝子の検出、効果のある薬の感応性に結び付けられる遺伝子のおける検出、遺伝子組み換え生物の検出、外来の動植物の検出が挙げられる。付加的な限定的でない用途として、農業用途および獣医学的用途が挙げられる。

【０１２６】

以下、実施例を記載するが、これは説明のためであり、これに限定されるものではない。

【０１２７】
Ａ．病原体
一態様において、本発明は、病原体の存在および／または病原体による宿主の感染を検出する方法、組成物および分析システムに関する。一般的に、病原体の存在および／または宿主中の病原体の存在は、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの分析によって検出される。さらに詳しくは、本発明は、核酸類似体分子に配列特異的ハイブリダイゼイションした標的ポリヌクレオチドと、それに色素を添加して形成した混合物による分析するための方法、物質の組成物および分析システムに関する。次いで、光学特性における色素変化の比率を観察し、標的ポリヌクレオチドの存在または量を検出する。
【０１２８】
該方法および分析システムによって検出される病原体または宿主中の病原体の存在の例示として、表皮ブドウ球菌、大腸菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＳＲＡ）、黄色ブドウ球菌、スタフィロコッカス－ホミニス、大便連鎖球菌、緑膿菌、スタフィロコッカス－カピティス、スタフィロコッカス－ワーネリ、肺炎桿菌、ヘモフィルスインフルエンザ、スタフィロコッカス－シミュランス、肺炎連鎖球菌およびカンジダ・アルビカンスが挙げられるが、これらに限定されるものではない。
【０１２９】
さらなる例示として、炭疽菌（アンスラックス）、ボツリヌス菌（ボツリヌス中毒症）、ブルセラ菌（ブルセラ症）、コレラ菌（コレラ）、ウェルシュ菌（ガス壊疽、クロストリジウム性筋壊死、壊疽性腸炎）、エボラウィルス（エボラ出血熱）、ペスト菌（ペスト）、コクシエラ・バーネッティ（キュー熱）および天然痘ウィルス（天然痘）が挙げられるが、これらに限定されない。炭疽菌による感染が検出されることが好ましい。
【０１３０】
炭疽菌用の宿主応答ポリヌクレオチド例として、Ｍｏｃｋ Ｍ, ＭＩｇｎｏｔ Ｔ Ａｎｔｈｒａｘ ｔｏｘＩｎｓ ａｎｄ ｔｈｅ ｈｏｓｔ：ａ ｓｔｏｒｙ ｏｆ ＩｎｔＩｍａｃｙ. Ｃｅｌｌ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ. ２００３年1月；５（１）：１５－２３. ａｎｄ Ｒｅｅｄ ＤＳ, Ｓｍｏｌｌ Ｊ, ＧＩｂｂｓ Ｐ, ＬＩｔｔｌｅ ＳＦ. Ｒｅｌａｔｅｄ ＡｒｔＩｃｌｅｓ, ＬＩｎｋｓ ＭａｐＩｎｇ ｏｆ ａｎｔＩｂｏｄｙ ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ ｔｏ ｔｈｅ ｐｒｏｔｅｃｔＩｖｅ ａｎｔＩｇｅｎ ｏｆ ａｎｔｈｒａｃＩｓ ｂｙ ｆｌｏｗ ｃｙｔｏｍｅｔｒＩｃ ａｎａｌｙｓＩｓ. Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ. ２００２年9月1日；４９（１）：１－７によって開示されたものが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは当業界で公知の方法によって容易に得られる。
【０１３１】
病原体はそれらの標的ポリヌクレオチドに基づく他の病原体から区別される。特異的な病原体は、他の病原体には見られない特異的な標的ポリヌクレオチドを有する。核酸類似体分子は、特異的な病原体を同定する１つまたはそれ以上の標的ポリヌクレオチドに相補的または正確に相補的に設計される。病原体の標的ポリヌクレオチドと接触すると、核酸類似体分子は、標的ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドとハイブリッド形成するが、標的ポリヌクレオチドを含まないポリヌクレオチドとはハイブリッド形成しない。したがって、特異的な標的ポリヌクレオチドを含む特異的な病原体は、は、標的ポリヌクレオチドを含まない病原体からは区別される。
【０１３２】
さらに、同じ病原体の異なる菌株も、区別される。同じ病原体の異なる菌株は、異なるポリヌクレオチド配列を有する。しばしば、該相違は、単一ヌクレオチドと同程度に僅かである。核酸類似体分子は、１つまたはそれ以上の病原体の特異的な菌株を同定する標的ポリヌクレオチドに相補的または正確に相補的に設計される。病原体の標的ポリヌクレオチドと接触すると、核酸類似体分子は、標的ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドとハイブリッド形成するが、ポリヌクレオチド標的ポリヌクレオチドを含まないとはハイブリッド形成しない。標的ポリヌクレオチドが特異的な病原体菌株に対し特異的な場合、核

酸類似体分子は、病原体菌株中に含まれる標的ポリヌクレオチドにハイブリッド形成するが、異なる菌株の標的ポリヌクレオチドにはハイブリッド形成しない。

【０１３３】

ＰＣＲ系検出用の臨床的に重要で参照となる病原体の例示を以下に記載する。すなわち、核酸類似体分子は、特異的な病原体ＰＣＲプライマー配列を有するように設計され、本明細書に記載する本発明の実施形態の多くで組み合わせて使用することができる。

【０１３４】

一実施形態では、病原体は表皮ブドウ球菌である。核酸類似体は、表皮ブドウ球菌を同定するために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計される。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、ＦｒａｎｃｏＩｓ，Ｐ．，Ｄ．ＰＩｔｔｅｔ，Ｍ．Ｂｅｎｔｏ，Ｂ．Ｐｅｐｅｙ，Ｐ．Ｖａｕｄａｕｘ，Ｄ．Ｌｅｗ，ａｎｄ Ｊ．Ｓｃｈｒｅｎｚｅｌ．２００３．ＲａｐＩｄ ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ＭｅｔｈＩｃＩｌｌＩｎ－ＲｅｓＩｓｔａｎｔ Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ ＤＩｒｅｃｔｌｙ ｆｒｏｍ ＳｔｅｒＩｌｅ ｏｒ ＮｏｎｓｔｅｒＩｌｅ ＣｌＩｎＩｃａｌ Ｓａｍｐｌｅｓ ｂｙ ａ Ｎｅｗ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ａｓｓａｙ．Ｊ ＣｌＩｎ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ４１（１）：２５４－６０．，ＦＩｔｚｐａｔｒＩｃｋ，Ｆ．，Ｈ．Ｈｕｍｐｈｒｅｙｓ，Ｅ．Ｓｍｙｔｈ，Ｃ．Ａ．Ｋｅｎｎｅｄｙ，ａｎｄ Ｊ．Ｐ．Ｏ’Ｇａｒａ．２００２．ＥｎｖＩｒｏｎｍｅｎｔａｌ ｒｅｇｕｌａｔＩｏｎｏｆ ｂＩｏｆＩｌｍ ＦｏｒｍａｔＩｏｎ ＩｎＩｎｔｅｎｓＩｖｅ ｃａｒｅ ｕｎＩｔ Ｉｓｏｌａｔｅｓ ｏｆ Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｅｐＩｄｅｒｍＩｄＩｓ．Ｊ Ｈｏｓｐ Ｉｎｆｅｃｔ５２（３）：２１２－８．，ａｎｄ Ｙｕｇｕｅｒｏｓ，Ｊ．，Ａ．Ｔｅｍｐｒａｎｏ，Ｂ．Ｂｅｒｚａｌ，Ｍ．Ｓａｎｃｈｅｚ，Ｃ．Ｈｅｒｎａｎｚ，Ｊ．Ｍ．Ｌｕｅｎｇｏ，ａｎｄ Ｇ．Ｎａｈａｒｒｏ．２０００．Ｇｌｙｃｅｒａｌｄｅｈｙｄｅ－３－ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ－ｅｎｃｏｄＩｎｇ ｇｅｎｅ ａｓ ａ ｕｓｅｆｕｌ ｔａｘｏｎｏｍＩｃ ｔｏｏｌ ｆｏｒ Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐｐ．Ｊ ＣｌＩｎ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ３８（１２）：４３５１－５．参照）。

【０１３５】

病原体は大腸菌であってもよい。核酸類似体は、大腸菌を同定するするために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計される。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、Ｈｅｌｌｅｒ，Ｌ．Ｃ．，Ｃ．Ｒ．ＤａｖＩｓ，Ｋ．Ｋ．Ｐｅａｋ，Ｄ．ＷＩｎｇｆＩｅｌｄ，Ａ．Ｃ．Ｃａｎｎｏｎｓ，Ｐ．Ｔ．Ａｍｕｓｏ，ａｎｄ Ｊ．ＣａｔｔａｎＩ．２００３．ＣｏｍｐａｒＩｓｏｎ ｏｆ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ＤＮＡ ＩｓｏｌａｔＩｏｎ ｆｒｏｍ Ｆｏｏｄ Ｓａｍｐｌｅｓ ｆｏｒ ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ＳｈＩｇａ ＴｏｘＩｎ－ＰｒｏｄｕｃＩｎｇ ＥｓｃｈｅｒＩｃｈＩａ ｃｏｌＩ ｂｙ Ｒｅａｌ－ＴＩｍｅ ＰＣＲ．Ａｐｐｌ ＥｎｖＩｒｏｎ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ６９（３）：１８４４－６．，Ｒａｈｍａｎ，．２００２．ＭｕｌｔＩｐｌｅｘ ＰＣＲ ｆｏｒ ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｓｔｘ ｇｅｎｅｓ ｏｆ ＥｓｃｈｅｒＩｃｈＩａ ｃｏｌＩ．ＩｎｄＩａｎ Ｊ Ｍｅｄ Ｒｅｓ １１５：２５１－４．，ａｎｄ Ｆｒａｈｍ，Ｅ．，ａｎｄ Ｕ．Ｏｂｓｔ．２００３．ＡｐｐｌＩｃａｔＩｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｆｌｕｏｒｏｇｅｎＩｃ ｐｒｏｂｅ ｔｅｃｈｎＩｑｕｅ （ＴａｑＭａｎ ＰＣＲ） ｔｏ ｔｈｅ ｄｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐｐ．ａｎｄ ＥｓｃｈｅｒＩｃｈＩａ ｃｏｌＩ Ｉｎ ｗａｔｅｒ ｓａｍｐｌｅｓ．Ｊ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ５２（１）：１２３－３１参照）。

【０１３６】

病原体は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＳＲＡ）であってもよい。核酸類似体は、黄色ブドウ球菌（ＭＳＲＡ）を同定するために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてよい。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、ｖａｎ Ｌｅｅｕｗｅｎ，Ｗ．Ｂ．，Ｃ．ｖａ

n Pelt, A. LuIjendIjk, H. A. Verbrugh, and W. H. Goessens. 1999. RapId DetectIon of methIc IllIn resIstance In Staphylococcus aureus Isolates by the MRSA-screen latex agglutInatIon test. J ClIn MIcrobIol37（9）：3029-30., FrancoIs, P., D. PIttet, M. Bento, B. Pepey, P. Vaudaux, D. Lew, and J. Schrenzel. 2003. RapId DetectIon of MethIcIllIn-ResIstant Staphylococcus aureus DIrectly from SterIle or NonsterIle ClInIcal Samples by a New Molecular Assay. J ClIn MIcrobIol41（1）：254-60, and Tsuruoka, M., andI. Karube. 2003. RapId hybrIdIzatIon at hIgh salt concentratIon and detectIon of bacterIal DNA usIng fluorescence polarIzatIon. Comb Chem HIgh Throughput Screen6（3）：225-34参照）。

【0137】

病原体はカンジダであってもよい。核酸類似体は、カンジダを同定するために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてよい。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、（Ahmad, S., Z. Khan, A. S. Mustafa, and Z. U. Khan. 2002. SemInested PCR for dIagnosIs of candIdemIa：comparIson wIth culture, antIgen detectIon, and bIochemIcal methods for specIes IdentIfIcatIon. J ClIn MIcrobIol40（7）：2483-9, and TIrodker, U. H., J. P. Nataro, S. SmIth, L. LasCasas, and K. D. FaIrchIld. 2003. DetectIon of fungemIa by polymerase chaIn reactIon In crItIcally Ill neonates and chIldren. J PerInatol23（2）：117-22参照）。

【0138】

病原体はカンジダ・アルビカンスであってもよい。核酸類似体は、カンジダ・アルビカンスを同定するために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてよい。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、WhIte, P. L., A. Shetty, and R. A. Barnes. 2003. DetectIon of seven CandIda specIes usIng the LIght-Cycler system. J Med MIcrobIol52（Pt3）：229-38., GrIjalva, M., R. Horvath, M. DendIs, J. Erny, and J. BenedIk. 2003. Molecular dIagnosIs of culture negatIve InfectIve endocardItIs：clInIcal valIdatIon In a group of surgIcally treated patIents. Heart89（3）：263-8., and WIllInger, B., A. ObradovIc, B. SelItsch, J. Beck-Mannagetta, W. BuzIna, H. Braun, P. Apfalter, A. M. HIrschl, A. MakrIstathIs, and M. Rotter. 2003. DetectIon and IdentIfIcatIon of fungI from fungus balls of the maxIllary sInus by molecular techn Iques. J ClIn MIcrobIol 41 （2）

：５８１－５．参照）。

【０１３９】

病原体は黄色ブドウ球菌であってもよい。核酸類似体は、黄色ブドウ球菌を同定するために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてよい。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、ＦｒａｎｃｏＩｓ，Ｐ．，Ｄ．ＰＩｔｔｅｔ，Ｍ．Ｂｅｎｔｏ，Ｂ．Ｐｅｐｅｙ，Ｐ．Ｖａｕｄａｕｘ，Ｄ．Ｌｅｗ，ａｎｄ Ｊ．Ｓｃｈｒｅｎｚｅｌ．２００３．ＲａｐＩｄＤｅｔｅｃｔ Ｉｏｎ ｏｆ ＭｅｔｈＩｃＩｌｌＩｎ－ＲｅｓＩｓｔａｎｔ Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ ＤＩｒｅｃｔｌｙ ｆｒｏｍ ＳｔｅｒＩｌｅ ｏｒ ＮｏｎｓｔｅｒＩｌｅ ＣｌＩｎＩｃａｌ Ｓａｍｐｌｅｓ ｂｙ ａ Ｎｅｗ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ａｓｓａｙ．Ｊ ＣｌＩｎ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ４１（１）：２５４－６０．，Ｐａｌｏｍａｒｅｓ，Ｃ．，Ｍ．Ｊ．Ｔｏｒｒｅｓ，Ａ．Ｔｏｒｒｅｓ，Ｊ．Ａｚｎａｒ，ａｎｄ Ｊ．Ｃ．Ｐａｌｏｍａｒｅｓ．２００３．ＲａｐＩｄ ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ａｎｄ ＩｄｅｎｔＩｆＩｃａｔＩｏｎ ｏｆ Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ ｆｒｏｍ ｂｌｏｏｄ ｃｕｌｔｕｒｅ ｓｐｅｃＩｍｅｎｓ ｕｓＩｎｇ ｒｅａｌ－ｔＩｍｅ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ＰＣＲ．ＤＩａｇｎ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ Ｉｎｆｅｃｔ ＤＩｓ４５（３）：１８３－９．，ａｎｄ Ｘｕ，Ｊ．，Ｂ．Ｃ．ＭＩｌｌａｒ，Ｊ．Ｅ．Ｍｏｏｒｅ，Ｋ．Ｍｕｒｐｈｙ，Ｈ．Ｗｅｂｂ，Ａ．Ｊ．Ｆｏｘ，Ｍ．Ｃａｆｆｅｒｋｅｙ，ａｎｄ Ｍ．Ｊ．Ｃｒｏｗｅ．２００３．Ｅｍｐｌｏｙｍｅｎｔ ｏｆ ｂｒｏａｄ－ｒａｎｇｅ１６Ｓ ｒＲＮＡ ＰＣＲ ｔｏ ｄｅｔｅｃｔ ａｅｔＩｏｌｏｇＩｃａｌ ａｇｅｎｔｓ ｏｆ ＩｎｆｅｃｔＩｏｎ ｆｒｏｍ ｃｌＩｎＩｃａｌ ｓｐｅｃＩｍｅｎｓ Ｉｎ ｐａｔＩｅｎｔｓ ｗＩｔｈ ａｃｕｔｅ ｍｅｎＩｎｇＩｔＩｓ－－ｒａｐＩｄ ｓｅｐａｒａｔＩｏｎ ｏｆ １６Ｓ ｒＲＮＡ ＰＣＲ ａｍｐｌＩｃｏｎｓ ｗＩｔｈｏｕｔ ｔｈｅ ｎｅｅｄ ｆｏｒ ｃｌｏｎＩｎｇ．Ｊ Ａｐｐｌ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ９４（２）：１９７－２０６．参照）。

【０１４０】

病原体は、スタフィロコッカスーホミニスであってもよい。核酸類似体は、スタフィロコッカスーホミニスを同定するために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてよい。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、Ｍａｒｓｏｕ，Ｒ．，Ｍ．Ｂｅｓ，Ｙ．Ｂｒｕｎ，Ｍ．Ｂｏｕｄｏｕｍａ，Ｌ．ＩｄｒＩｓｓＩ，Ｈ．ＭｅｕｇｎＩｅｒ，Ｊ．Ｆｒｅｎｅｙ，ａｎｄ Ｊ．ＥｔＩｅｎｎｅ．２００１．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｔｅｃｈｎＩｑｕｅｓ ｏｐｅｎ ｕｐ ｎｅｗ ｖＩｓｔａｓ ｆｏｒ ｔｙｐＩｎｇｏｆ ｃｏａｇｕｌａｓｅ－ｎｅｇａｔＩｖｅ ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃＩ．Ｐａｔｈｏｌ ＢＩｏｌ （ＰａｒＩｓ）４９（３）：２０５－１５．，Ｙｕｇｕｅｒｏｓ，Ｊ．，Ａ．Ｔｅｍｐｒａｎｏ，Ｂ．Ｂｅｒｚａｌ，Ｍ．Ｓａｎｃｈｅｚ，Ｃ．Ｈｅｒｎａｎｚ，Ｊ．Ｍ．Ｌｕｅｎｇｏ，ａｎｄ Ｇ．Ｎａｈａｒｒｏ．２０００．Ｇｌｙｃｅｒａｌｄｅｈｙｄｅ－３－ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｄｅｈｙｄｒｏｇｅｎａｓｅ－ｅｎｃｏｄＩｎｇ ｇｅｎｅ ａｓ ａ ｕｓｅｆｕｌ ｔａｘｏｎｏｍＩｃ ｔｏｏｌ ｆｏｒ Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐｐ．Ｊ ＣｌＩｎ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ３８（１２）：４３５１－５．，ａｎｄ ＷＩｅｓｅｒ，Ｍ．，ａｎｄ Ｈ．Ｊ．Ｂｕｓｓｅ．２０００．ＲａｐＩｄ ＩｄｅｎｔＩｆＩｃａｔＩｏｎ ｏｆ Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｅｐＩｄｅｍＩｄＩｓ．Ｉｎｔ Ｊ Ｓｙｓｔ Ｅｖｏｌ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ５０Ｐｔ３：１０８７－９３．参照）。

【０１４１】

病原体は大便連鎖球菌であってもよい。核酸類似体は、大便連鎖球菌を同定するために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてよい。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、Ｈｕｄｓｏｎ，Ｃ．Ｒ．，Ｐ．Ｊ．Ｆｅｄｏｒｋａ－Ｃｒａｙ，Ｍ．Ｃ．Ｊａｃｋｓｏｎ－Ｈａｌｌ，ａｎｄ Ｌ．Ｍ．ＨＩｏｔｔ．２００３．ＡｎｏｍａｌＩｅｓ Ｉｎ ｓｐｅｃＩ

es IdentIfIcatIon of enterococcI from veterInary sources usIng a commercIal bIochemIcal IdentIfIcatIon system. Lett Appl MIcrobIol36（4）：245－50.，DonabedIan，S.M.，L.A.Thal，E.Hershberger，M.B.PerrI，J.W.Chow，P.Bartlett，R.Jones，K.Joyce，S.RossIter，K.Gay，J.Johnson，C.MackInson，E.Debess，J.Madden，F.Angulo，and M.J.Zervos.2003.Molecular characterIzatIon of gentamIcIn－resIstant EnterococcI In the UnIted States：evIdence of spread from anImals to humans through food.J ClIn MIcrobIol41（3）：1109－13.，and Gauduchon，V.，L.Chalabreysse，J.EtIenne，M.Celard，Y.BenIto，H.LepIdI，F.ThIvolet－BejuI，and F.Vandenesch.2003.Molecular dIagnosIs of InfectIve endocardItIs by PCR amplIfIcatIon and dIrect sequencIng of DNA from valve tIssue.J ClIn MIcrobIol41（2）：763－6.参照）。

【0142】

病原体は緑膿菌であってもよい。核酸類似体は、緑膿菌を同定するために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてよい。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、Corbella，M.E.，and A.Puyet.2003.Real－TIme Reverse TranscrIptIon－PCR AnalysIs of ExpressIon of HalobenzoateandSalIcylate CatabolIsm－AssocIated Operons In Two StraIns of Pseudomonas aerugInosa.Appl EnvIron MIcrobIol 69（4）：2269－75.，Agarwal，G.，A.KapIl，S.K.Kabra，R.Chandra，B.Das，and S.N.DIwedI.2002.PhenotypIc&genotypIc varIants of Pseudomonas aerugInosa Isolated from chIldren wIth cystIc fIbrosIs In IndIa.IndIan J Med Res 116：73－81.，and DabrowskI，W.，U.Czekajlo－KolodzIej，D.Medrala，and S.GIedrys－Kalemba.2003.OptImIsatIonof AP－PCR fIngerprIntIng dIscrImInatory power for clInIcal Isolates of Pseudomonas aerugInosa.FEMS MIcrobIol Lett 218（1）：51－7.参照）。

【0143】

病原体はスタフィロコッカスーカピティスであってもよい。核酸類似体は、スタフィロコッカスーカピティスを同定するために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてよい。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、WIeser，M.，and H.J.Busse.2000.RapId IdentIfIcatIon of Staphylococcus epIdermIdIs. Int J Syst Evol MIcrobIol 50Pt3：1087－93.，and MartIneau，F.，F.J.PIcard，P.H.Roy，M.Ouellette，and M.G.Bergeron.1996.SpecIes－specIfIc and ubIquItous D

NA－based assays for rapId IdentIfIcatIon of Staphylococcus epIdemIdIs. J ClIn MIcrobIol 34（12）：2888－93. 参照）。

【0144】

病原体はスタフィロコッカス－ワーネリであってもよい。核酸類似体は、スタフィロコッカス－ワーネリを同定するために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてよい。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、WIeser, M., and H. J. Busse. 2000. RapId IdentIfIcatIon of Staphylococcus epIdermIdIs. Int J Syst Evol MIcrobIol 50Pt3：1087－93., and SashIhara, T., H. KImura, T. HIguchI, A. AdachI, H. MatsusalcI, K. Sonomoto, and A. IshIzalcI. 2000. A novel antIbIotIc, nukacIn ISK－1, of Staphylococcus warnerI ISK－1：clonIng of the structural gene and IdentIfIcatIon of the structure. BIoscI BIotechnol BIochem64（11）：2420－8. 参照）。

【0145】

病原体は、肺炎桿菌であってもよい。核酸類似体は、肺炎桿菌を同定するために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてよい。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、Perez－Perez, F. J., and N. D. Hanson. 2002. DetectIon of plasmId－medIated AmpC beta－lactamase genes In clInIcal Isolates by usIng multIplex PCR. J ClIn MIcrobIol 40（6）：2153－62, Steward, C. D., J. K. Rasheed, S. K. Hubert, J. W. BIddle, P. M. Raney, G. J. Anderson, P. P. WIllIams, K. L. BrIttaIn, A. OlIver, J. E. McGowan, Jr., and F. C. Tenover. 2001. CharacterIzatIon of clInIcal Isolates of KlebsIella pneumonIae from 19 laboratorIes usIng the NatIonal CommIttee for ClInIcal Laboratory Standards extended－spectrum beta－lactamase detect Ion methods. J ClIn MIcrobIol 39（8）：2864－72., and Carter, J. S., and D. J. Kemp. 2000. A colorImetrIc detect Ion system for CalymmatobacterIum granulomatIs. Sex Transm Infect76（2）：134－6. 参照）。

【0146】

病原体はヘモフィルスインフルエンザであってもよい。核酸類似体は、ヘモフィルスインフルエンザを同定するために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてよい。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、Shoma, S., M. Rahman, and M. YasmIn. 2001. RapId DetectIon of HaemophIlus Influenzae type b In BangladeshI chIldren wIth pneumonIa and menIngItIs by PCR and analysIs of antImIcrobIal resIstance. J Health Popul Nutr 19（4）：268－74., Corless, C. E., M. GuIver, R. Borrow, V. Edwards－Jones, A. J. Fox, and E. B. KaczmarslcI. 2001. SImulta

neous DetecIon of NeIsserIa menIngItIdIs, HaemophIlus Influenzae, and Streptococcus pneumonIae In suspected cases of menIngItIs and septIcemIa usIng real−tIme PCR. J ClIn MIcrobIol 39（4）：1553−8.，and Carter, J. S.，and D. J. Kemp. 2000. A colorImetrIc detectIon system for CalymmatobacterIum granulomatIs. Sex Transm Infect76（2）：134−6. 参照）。

【0147】

病原体はスタフィロコッカス−シミュランスであってもよい。核酸類似体は、スタフィロコッカス−シミュランスを同定するために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてよい。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、Yugueros, J.，A. Temprano, B. Berzal, M. Sanchez, C. Hernanz, J. M. Luengo, and G. Naharro. 2000. Glyceraldehyde−3−phosphate dehydrogenase−encodIng gene as a useful taxonomIc tool for Staphylococcus spp. J ClIn MIcrobIol 38（12）：4351−5, and Szweda, P.，R. Pladzylc, R. KotlowslcI, and J. Kur. 2001. ClonIng, ExpressIon, and purIfIcatIon of the Staphylococcus sImulans lysostaphIn usIng the InteIn−chItIn−bIndIng domaIn（CBD）system. ProteIn ExprPurIf22（3）：467−71. 参照）。

【0148】

病原体は肺炎連鎖球菌であってもよい。核酸類似体は、肺炎連鎖球菌を同定するために、ＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてよい。これらのＰＣＲプライマーの例は、業界で公開されている（たとえば、Xu, J.，B. C. MIllar, J. E. Moore, K. Murphy, H. Webb, A. J. Fox, M. Cafferkey, and M. J. Crowe. 2003. Employment of broad−range 16S rRNA PCR to detect aetIologIcal agents of InfectIon from clInIcal specImens In patIents wIth acute menIngItIs−−rapId separatIon of 16S rRNA PCR amplIcons wIthout the need for clonIng. J Appl MIcrobIol 94（2）：197−206.，GreIner, O.，P. J. Day, P. P. Bosshard, F. ImerI, M. Altwegg, and D. Nadal. 2001. QuantItatIve DetectIon of Streptococcus pneumonIae In nasopharyngeal secretIons by real−tIme PCR. J ClIn MIcrobIol 39（9）：3129−34.，and Corless, C. E.，M. GuIver, R. Borrow, V. Edwards−Jones, A. J. Fox, and E. B. KaczmarskI. 2001. SImultaneous DetectIon of NeIsserIa menIngItIdIs, HaemophIlus Influenzae, and Streptococcus pneumonIae In suspected cases of menIngItIs and septIcemIa usIng real−tIme PCR. J ClIn MIcrobIol 39（4）：1553−8. 参照）。

【０１４９】
病原体は、ＳＡＲＳの検出のためのコロナウィルス、ＲＮＡウィルスであってもよい。コロナウィルスの配列は、たとえば、伝染病予防本部（Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ ＤＩｓｅａｓｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ）のウェブサイトで見ることも可能である。これらの標的ポリヌクレオチドの例は、業界で公開されている（たとえば、ＫｓＩａｚｅｋ，Ｔ．Ｇ．，Ｄ．Ｅｒｄｍａｎ，Ｃ．Ｓ．ＧｏｌｄｓｍＩｔｈ，Ｓ．Ｒ．ＺａｋＩ，Ｔ．Ｐｅｒｅｔ，Ｓ．Ｅｍｅｒｙ，Ｓ．Ｔｏｎｇ，Ｃ．ＵｒｂａｎＩ，Ｊ．Ａ．Ｃｏｍｅｒ，Ｗ．ＬＩｍ，Ｐ．Ｅ．ＲｏｌｌＩｎ，Ｓ．Ｆ．Ｄｏｗｅｌｌ，Ａ．Ｅ．ＬＩｎｇ，Ｃ．Ｄ．Ｈｕｍｐｈｒｅｙ，Ｗ．Ｊ．ＳｈＩｅｈ，Ｊ．Ｇａｒｎｅｒ，Ｃ．Ｄ．Ｐａｄｄｏｃｋ，Ｐ．Ｒｏｔａ，Ｂ．ＦＩｅｌｄｓ，Ｊ．ＤｅＲＩｓＩ，Ｊ．Ｙ．Ｙａｎｇ，Ｎ．Ｃｏｘ，Ｊ．Ｍ．Ｈｕｇｈｅｓ，Ｊ．Ｗ．ＬｅＤｕｃ，Ｗ．Ｊ．ＢｅｌｌＩｎＩ，ａｎｄ Ｌ．Ｊ．Ａｎｄｅｒｓｏｎ．２００３．Ａ Ｎｏｖｅｌ ＣｏｒｏｎａｖＩｒｕｓ ＡｓｓｏｃＩａｔｅｄ ｗＩｔｈ Ｓｅｖｅｒｅ Ａｃｕｔｅ ＲｅｓｐＩｒａｔｏｒｙ Ｓｙｎｄｒｏｍｅ．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ １６：１６；Ｄｒｏｓｔｅｎ，Ｃ．，Ｓ．Ｇｕｎｔｈｅｒ，Ｗ．ＰｒｅＩｓｅｒ，Ｓ．Ｖａｎ Ｄｅｒ Ｗｅｒｆ，Ｈ．Ｒ．Ｂｒｏｄｔ，Ｓ．Ｂｅｃｋｅｒ，Ｈ．Ｒａｂｅｎａｕ，Ｍ．ＰａｎｎＩｎｇ，Ｌ．ＫｏｌｅｓｎＩｋｏｖａ，Ｒ．Ａ．ＦｏｕｃｈＩｅｒ，Ａ．Ｂｅｒｇｅｒ，Ａ．Ｍ．ＢｕｒｇｕＩｅｒｅ，Ｊ．ＣＩｎａｔｌ，Ｍ．ＥＩｃｋｍａｎｎ，Ｎ．ＥｓｃｒＩｏｕ，Ｋ．Ｇｒｙｗｎａ，Ｓ．Ｋｒａｍｍｅ，Ｊ．Ｃ．Ｍａｎｕｇｕｅｒｒａ，Ｓ．Ｍｕｌｌｅｒ，Ｖ．ＲＩｃｋｅｒｔｓ，Ｍ．Ｓｔｕｒｍｅｒ，Ｓ．ＶＩｅｔｈ，Ｈ．Ｄ．Ｋｌｅｎｋ，Ａ．Ｄ．Ｏｓｔｅｒｈａｕｓ，Ｈ．ＳｃｈｍＩｔｚ，ａｎｄ Ｈ．Ｗ．Ｄｏｅｒｒ．２００３．ＩｄｅｎｔＩｆＩｃａｔＩｏｎ ｏｆ ａ Ｎｏｖｅｌ ＣｏｒｏｎａｖＩｒｕｓ Ｉｎ ＰａｔＩｅｎｔｓ ｗＩｔｈ Ｓｅｖｅｒｅ Ａｃｕｔｅ ＲｅｓｐＩｒａｔｏｒｙ Ｓｙｎｄｒｏｍｅ．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ１０：１０参照）。

【０１５０】
病原体はボルデテラ－ペルツッシス（百日咳菌）、百日咳であってもよい。これらの標的ポリヌクレオチドの例は、業界で公開されている（Ｄｏｕｃｅｔ－ＰｏｐｕｌａＩｒｅ，Ｆ．，Ｎ．ＢｏｕｒｇｅｏＩｓ，Ｏ．Ｃｈａｒａｒａ，Ｍ．ＢｅｌｌａＩｃｈｅ，Ｆ．ＲＩｃｈａｒｄＩｎ，Ｊ．Ｌ．Ｓａｌｏｍｏｎ，Ｌ．ＢｅｒａｒｄＩ－ＧｒａｓｓＩａｓ，Ｊ．Ｃ．ＧｈｎａｓｓＩａ，ａｎｄ Ｐ．Ｆｏｕｃａｕｄ．２００２．［ＲｏｕｔＩｎｅ ｕｓｅ ｏｆ ｇｅｎｅ ａｍｐｌＩｆＩｃａｔＩｏｎ ｆｏｒ ｐｅｒｔｕｓｓＩｓ ｄＩａｇｎｏｓＩｓＩ Ｉｎ ｃｈＩｌｄｒｅｎ］．Ａｒｃｈ ＰｅｄＩａｔｒ ９（１１）：１１４５－５２；ＬＩｎｇａｐｐａ，Ｊ．Ｒ．，Ｗ．Ｌａｗｒｅｎｃｅ，Ｓ．Ｗｅｓｔ－Ｋｅｅｆｅ，Ｒ．Ｇａｕｔｏｍ，ａｎｄ Ｂ．Ｔ．Ｃｏｏｋｓｏｎ．２００２．ＤＩａｇｎｏｓＩｓ ｏｆ ｃｏｍｍｕｎＩｔｙ－ａｃｑｕＩｒｅｄ ｐｅｒｔｕｓｓＩｓ ＩｎｆｅｃｔＩｏｎ：ｃｏｍｐａｒＩｓｏｎ ｏｆ ｂｏｔｈ ｃｕｌｔｕｒｅ ａｎｄ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ－ａｎｔＩｂｏｄｙ ａｓｓａｙｓ ｗＩｔｈ ＰＣＲ ｄｅｔｅｃｔＩｏｎ ｕｓＩｎｇ ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓＩｓ ｏｒ ｄｏｔ ｂｌｏｔ ｈｙｂｒＩｄＩｚａｔＩｏｎ．Ｊ ＣｌＩｎ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ ４０（８）：２９０８－１２参照）。

【０１５１】
病原体は、フィトフトラ・ラム（オーク突然死病の原因）であってもよい。これらの標的ポリヌクレオチドの例は、業界で公開されている（たとえば、Ｌｅｖｙ，Ｌ．，ａｎｄ Ｖ．ＭａｖｒｏｄＩｅｖａ．２００３．ＥｖａｌｕａｔＩｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ＰＣＲ Ｄｅｔｅｃｔ Ｉｏｎ ａｎｄ ＤＮＡ ＩｓｏｌａｔＩｏｎ ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｕｓｅ Ｉｎ ｔｈｅ Ｐｈｙｔｏｐｈｔｈｏｒａ ｒａｍｏｒｕｍ．ＮａｔＩｏｎａｌ ＰＩｌｏｔ Ｓｕｒｖｅｙ，ｖｏｌ．２００３，ａｖａＩｌａｂｌｅ ａｔ ｔｈｅ Ｐｕｒｄｕｅ ＵｎＩｖｅｒｓＩｔｙ ｗｅｂｓＩｔｅ；ＭｃＰｈｅｒｓｏｎ，Ｂ．Ａ．，Ｄ．Ｍ．ＲＩｚｚｏ，Ｍ．Ｇａｒｂｅｌｏｔｔｏ，Ｐ．ＳｖＩｈｒａ，Ｄ．Ｌ．Ｗｏｏｄ，Ａ．Ｊ．Ｓｔｏｒｅｒ，Ｎ．Ｍ．Ｋｅｌｌｙ，Ｎ．Ｐａｌｋｏｖｓｋｙ，Ｓ．Ａ

. Tjosvold, R. B. StandIford, and S. T. KoIke. 2002. Sudden Oak Death In CalIfornIa, vol. 2003. Home&Landscape, avaIlable at the UnIversIty of CalIfornIa at DavIs websItes、参照）。

【0152】

病原体はノーウォークウィルスであってもよい。これらの標的ポリヌクレオチドの例は、業界で公開されている。（たとえば、Khan, A. S., C. L. Moe, R. I. Glass, S. S. Monroe, M. K. Estes, L. E. Chapman, X. JIang, C. Humphrey, E. Pon, J. K. Iskander, and et al. 1994. Norwalk vIrus−assocIated gastroenterItIs traced to Ice consumptIon aboard a cruIse shIp In HawaII：comparIson and applIcatIon of molecular method−based assays. J ClIn MIcrobIol 32（2）：318−22；Herwaldt, B. L., J. F. Lew, C. L. Moe, D. C. LewIs, C. D. Humphrey, S. S. Monroe, E. W. Pon, and R. I. Glass. 1994. CharacterIzatIon of a varIant straIn of Norwalk vIrus from a food−borne outbreak of gastroenterItIs on a cruIse shIp In HawaII. J ClIn MIcrobIol 32（4）：861−6参照）。

【0153】

病原体はであってもよい。核酸類似体はＨＩＶを同定するために使用されるＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてもよい。これらのＰＣＲプライマーの例は業界で公開されている（たとえば、SmIth, K. M., K. A. Crandall, M. L. KneIssl, and B. A. NavIa. 2000. PCR DetectIon of host and HIV−I sequence s from archIval braIn tIssue. J NeurovIrol 6（2）：164−71；CuchacovIch, R., S. QuInet, and A. M. Santos. 2003. ApplIcatIons of polymerase chaIn reactIon In rheumatology. Rheum DIs ClIn North Am29（1）：1−20, v；CunnIngham, P., D. MarrIott, C. HarrIs, S. Hancock, A. Carr, and D. Cooper. 2003. False negatIve HIV−1 provIrus DNA polymerase chaIn reactIon In a patIent wIth prImary InfectIon acquIred In ThaIland. J ClIn VIrol26（2）：163−9参照）。

【0154】

病原体はヒト型結核菌であってもよい。核酸類似体は結核菌を同定するために使用されるＰＣＲプライマーと類似または一致する配列あるいは配列の断片を有するように設計されてもよい。これらのＰＣＲプライマーの例は業界で公開されている。（たとえば、Torres, M. J., A. CrIado, M. RuIz, A. C. Llanos, J. C. Palomares, and J. Aznar. 2003. Improved real−tIme PCR for rapId DetectIon of rIfamp In and IsonIazId resIstance In MycobacterIum tuberculosIs clInIcal Isolates. DIagn MIcrobIol Infect DIs45（3）：207−12；Bhattacharya, B., K. Karak, A. G. Ghosal, A. Roy, S. D

as, P. Dandapat, D. Khetawat, D. K. Mondal, S. Bhattacharya, and S. ChakrabartI. 2003. Development of a new sensItIve and effIcIent multIplex polymerase chaIn reactIon (PCR) for IdentIfIcatIon and dIfferentIatIon of dIfferent mycobacterIal specIes. Trop Med Int Health8 (2) : 150－7 ; Kafwabulula, M., K. Ahmed, T. Nagatake, J. Gotoh, S. MItaraI, K. OIzumI, and A. Zumla. 2002. EvaluatIon of PCR－based methods for the dIagnosIs of tuberculosIs by IdentIfIcatIon of mycobacterIal DNA In urIne samples. Int J Tuberc Lung DIs6 (8) : 732－7参照)。

【0155】

他の実施形態では、核酸類似体は病原体のグループ全体に共通している標的ポリヌクレオチドに結合するように設計される。たとえば、核酸類似体は細菌（ＢＰ６）、グラム陽性細菌（ＢＰ１９）、グラム陰性細菌（ＢＰ３）および菌類（ＦＰ８を検出するように設計されてもよい。ＢＰ６、ＢＰ１９、ＢＰ３およびＦＰ８用の核酸類似体の配列の例を以下に示す。

【0156】

【表１】

BP6	oI2018	5'gaaSSMYcYaacacYtagcact (配列番号 3)
	oI2019	5'tacaaMgagYYgcWagacSgYgaS (配列番号 4)
BP19	oI2021	5'gcagYWaacgcattaagcact (配列番号 5)
	oI2022	5'acgacacgagctgacgacaa (配列番号 6)
BP3	oI2003	5'tctagctggtctgagaggatgac (配列番号 7)
	oI2004	5'gagttagccggtgcttcttct (配列番号 8)
FP8	OI2055	5'cctgcggcttaatttgactca (配列番号 9)
	OI2057	5'tagcgacgggcggtgtgta (配列番号 10)

核酸類似体は、敗血症の細菌による原因を診断する臨床的応用において、または、生成物の微生物含有量が、その生物またはまたは他の生成物の有効寿命および安定性を評価するのに重要である場合、無効性が評価される場合などの他の応用に使用することができる。

【0157】

標的ポリヌクレオチドは、大腸菌中の１６ＳＲＮＡのようなリボソームＲＮＡ配列に対して特異的であってもよい。リボソームＲＮＡは、それらの生体に対して特長的な特異配列を含む。リボソームＲＮＡ配列の特徴的な標的ポリヌクレオチドに相補的または正確に相補的である核酸類似体配列を使用することによって、病原体がそれらのリボソームＲＮＡ配列に基づいて識別される。病原体の異なる病原体または菌株の特徴的なリボソームＲＮＡ配列は、たとえば、（ＤＩnshaw Ｊ. Ｐatel, ＡsＩf Ｋ. ＳurＩ,

Ｆｅｎｇ ＪＩａｎｇ，ＬＩｃｏｎｇ ＪＩａｎｇ，ＰｅＩ ＦａｎＲ．Ａｊａｙ Ｋｕｍａｒ ａｎｄ ＳｙｌｖＩｅ ＮｏｎＩｎ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ，ＲｅｃｏｇｎＩｔＩｏｎ ａｎｄ ＡｄａｐｔＩｖｅ ＢＩｎｄＩｎｇ Ｉｎ ＲＮＡ Ａｐｔａｍｅｒ Ｃｏｍｐｌｅｘｅｓ Ｊ．Ｍｏｌ．ＢＩｏｌ．（１９９７）２７２，６４５－６６４）にある。

【０１５８】

Ｂ．宿主反応ポリヌクレオチド

標的ヌクレオチドは、また、宿主反応ポリヌクレオチドであってもよい。宿主が病原体に感染した後、宿主遺伝子は、病原体ごとに異なる反応を呈しつつ発現し、ｍＲＮＡ発現のパターン（遺伝子発現プロフィール）を作成する。発現のパターンが特異的な病原体による感染と関連する宿主遺伝子を、その剤の「診断的マーカー遺伝子」という。ｍＲＮＡは、普通、サンプル中の白血球に由来する。宿主反応および変化した遺伝子発現プロフィールを同定する方法は、たとえば、１）Ｄａｓ，Ｒ．，ＭｅｎｄＩｓ，Ｃ．，Ｙａｎ，Ｚ．，ＮｅＩｌｌ，Ｒ．，Ｂｏｙｌｅ，Ｔ．，ａｎｄ Ｊｅｔｔ，Ｍ．（１９９８）ＡｌｔｅｒａｔＩｏｎｓ Ｉｎ ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓＩｏｎ ｓｈｏｗ ｕｎＩｑｕｅ ｐａｔｔｅｒｎｓ Ｉｎ ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｔｏ ａｇｅｎｔｓ．Ｉｎ ＰｒｏｃｅｅＩｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ２１ｓｔ Ａｒｍｙ ＳｃＩｅｎｃｅ Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ，Ｆ－Ｐ９，ａｎｄ ＭｅｎｄＩｓ，Ｃ．，Ｄａｓ，Ｒ．，Ｙａｎｇ，Ｄ．，ａｎｄＪｅｔｔ，Ｍ．（１９９８）ＩｄｅｎｔＩｆＩｃａｔＩｏｎ ｏｆ ａｌｔｅｒａｔＩｏｎｓ Ｉｎ ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓＩｏｎ Ｉｎ ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｔｏ Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃａｌ ｅｎｔｅｒｏｔｏｘＩｎ Ｂ（ＳＥＢ）ｕｓＩｎｇ ｄＩｆｆｅｒｅｎｔＩａｌ ｄＩｓｐｌａｙ （ＤＤ）．Ｉｎ ｔｈｅ ＡＳＣＢ３８ｔｈ Ａｎｎｕａｌ ＭｅｅｔＩｎｇ，Ｓａｎ ＦｒａｎＣＩｓｃｏ，ＣＡ．にある。

【０１５９】

遺伝子発現をプロファイルする方法は、種々の医学的症状を診断するために開発されてきた。たとえば、米国特許第５，７２３，２９０号、ＥｂｅｒｗＩｎｅら、米国特許第６，２１８，１２２号、ＦｒＩｅｎｄら、ＷＯ９９／１０５３６号、ＹａｒｒａｍＩｌｌＩら、およびＷＯ９９／５７１３０号、Ｐｒａｓｈａｒらに記載されている。簡潔にに言えば、該方法は、選ばれた症状と関係がある、選ばれた細胞中のｍＲＮＡ発現レベルを得、確立されたコントロールに関して得られている相対レベルと比較することを含む。次いで、診断はｍＲＮＡ発現レベルの比較に基づいて行われる。ｍＲＮＡは業界で周知の様々な技術のいずれか１つによって細胞から単離されるが、通常、細胞を溶解し、次いでＲＮＡを濃縮あるいは精製する。次いで、遺伝子発現プロフィールが、たとえば、Ｐｒａｓｈａｒら、ＷＯ９７／０５２８６号；ＬＩａｎｇら、ＳｃＩｅｎｃｅ２５７：９６７－９７１（１９９２）；Ｉｖａｎｏｖａら、ＮｕｃｌｅＩｃ ＡｃＩｄｓ Ｒｅｓ．２３：２９５４－２９５９（１９９５）；ａｎｄ Ｐｒａｓｈａｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．ＳｃＩ．ＵＳＡ９３：６５９－６６３（１９９６）（これらに限定されない）に開示されるような、業界で既知の方法によって作成される。これらの技術は、通常、ノーザン解析、ＦＲＥＴ検出、オリゴヌクレオチドアレーに対するハイブリダイゼイション、ｃＤＮＡアレーに対するハイブリダイゼイション、ｃＤＮＡシークエンシング、ｃＤＮＡフィンガープリント法などを使用して、遺伝子発現プロフィールを作成する。しばしば、遺伝子発現プロフィールは、ｍＲＮＡ種の発現の代表といわれ、たとえば、スラブゲル電気泳動法、キャピラリーゲル電気泳動、ＨＰＬＣ、その他の分離方法によるサイズに基づいて分離された全細胞ｍＲＮＡから造られた標識ｃＤＮＡの断片のオートラジオグラフ中に見られる。

【０１６０】

本発明の分析システムおよび方法はｍＲＮＡ発現を評価する別の方法も提供する。以下にさらに記載するように、ｍＲＮＡ発現のレベル（たとえば、遺伝子発現プロフィール）は比較され、あるいは診断的マーカー遺伝子からのｍＲＮＡ発現における別の変型は、核酸類似体に対して相補的または正確に相補的の宿主反応ｍＲＮＡのハイブリダイゼイショ

ンを評価することによって検出する。

【０１６１】

Ｃ．食品介在性および環境病原体

いかなる食品介在性または環境病原体も本発明によって検出される。食品介在性病原体として、リステリア、カンピロバクター、大腸菌およびサルモネラ菌が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で開示する核酸類似体方法は、特異的な食品介在性病原体の容易な検出を可能にする。たとえば、リステリアは、サルモネラ菌から容易に区別される。リステリア・モノサイトゲネスの特異的な菌株のような食品介在性病原体の特異的な菌株を検出してもよい。

【０１６２】

食品介在性病原体に関連するいかなる標的ポリヌクレオチドも、本発明の方法によって識別される。特異的な病原体および病原体菌株を特徴付ける標的ポリヌクレオチドは、上述のように識別される。該方法は、リステリア、カンピロバクター、大腸菌およびサルモネラ菌と関連する標的ポリヌクレオチドを検出するために使用してもよい。たとえば、本明細書で開示された方法によって識別される特異的なリステリア遺伝子として、ｈｌｙ（リステリオリシンＯ）およびＩａｐ（会合たんぱく質）遺伝子およびｍＲＮＡ（それぞれ、ＨＬＹＰＮＡおよびＩＡＰＰＮＡ）が挙げられる。

【０１６３】

本発明によって、サルモネラ類に対応するポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドが検出される。サルモネラ類に特異的な配列は、業界において公知である（たとえば、Ｐｅｒｅｚ－Ｐｅｒｅｚ，Ｆ．Ｊ．，ａｎｄ Ｎ．Ｄ．Ｈａｎｓｏｎ．２００２．ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｐｌａｓｍＩｄ－ｍｅｄＩａｔｅｄ ＡｍｐＣ ｂｅｔａ－ｌａｃｔａｍａｓｅ ｇｅｎｅｓ Ｉｎ ｃｌＩｎＩｃａｌ Ｉｓｏｌａｔｅｓ ｂｙ ｕｓＩｎｇ ｍｕｌｔＩｐｌｅｘ ＰＣＲ．Ｊ ＣｌＩｎ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ ４０（６）：２１５３－６２．，ＯｌＩｖｅＩｒａ，Ｓ．Ｄ．，Ｃ．Ｒ．Ｒｏｄｅｎｂｕｓｃｈ，Ｍ．Ｃ．Ｃｅ，Ｓ．Ｌ．Ｒｏｃｈａ，ａｎｄ Ｃ．Ｗ．Ｃａｎａｌ．２００３．ＥｖａｌｕａｔＩｏｎ ｏｆ ｓｅｌｅｃｔＩｖｅ ａｎｄ ｎｏｎ－ｓｅｌｅｃｔＩｖｅ ｅｎｒＩｃｈｍｅｎｔ ＰＣＲ ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ ｆｏｒ Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ．Ｌｅｔｔ Ａｐｐｌ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ ３６（４）：２１７－２１．，ａｎｄ Ｓｔｒａｐｐ，Ｃ．Ｍ．，Ａ．Ｅ．Ｓｈｅａｒｅｒ，ａｎｄ Ｒ．Ｄ．Ｊｏｅｒｇｅｒ．２００３．Ｓｕｒｖｅｙ ｏｆ ｒｅｔａＩｌ ａｌｆａｌｆａ ｓｐｒｏｕｔｓ ａｎｄ ｍｕｓｈｒｏｏｍｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｐｒｅｓｅｎｃｅ ｏｆ ＥｓｃｈｅｒＩｃｈＩａ ｃｏＩｌ０１５７：Ｈ７，Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ，ａｎｄ ＬＩｓｔｅｒＩａ ｗＩｔｈ ＢＡＸ，ａｎｄ ｅｖａｌｕａｔＩｏｎ ｏｆ ｔｈＩｓ ｐｏｌｙｍｅｒａｚｅ ｃｈａＩｎ ｒｅａｃｔＩｏｎ－ｂａｓｅｄ ｓｙｓｔｅｍ ｗＩｔｈ ｅｘｐｅｒＩｍｅｎｔａｌｌｙ ｃｏｎｔａｍＩｎａｔｅｄ ｓａｍｐｌｅｓ．Ｊ Ｆｏｏｄ Ｐｒｏｔ６６（２）：１８２－７．参照）。

【０１６４】

他の実施形態では、大腸菌に対応するポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドが検出されてもよい。大腸菌に特異的な配列は、業界において公知である（たとえば、Ｈｅｌｌｅｒ，Ｌ．Ｃ．，　Ｃ．Ｒ．ＤａｖＩｓ，Ｋ．Ｋ．Ｐｅａｋ，Ｄ．ＷＩｎｇｆＩｅｌｄ，Ａ．Ｃ．Ｃａｎｎｏｎｓ，Ｐ．Ｔ．Ａｍｕｓｏ，ａｎｄ Ｊ．ＣａｔｔａｎＩ．２００３．ＣｏｍｐａｒＩｓｏｎ ｏｆ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ＤＮＡ ＩｓｏｌａｔＩｏｎ ｆｒｏｍ Ｆｏｏｄ Ｓａｍｐｌｅｓ ｆｏｒ ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ＳｈＩｇａ ＴｏｘＩｎ－ＰｒｏｄｕｃＩｎｇ ＥｓｃｈｅｒＩｃｈＩａ ｃｏｌＩ ｂｙ Ｒｅａｌ－ＴＩｍｅ ＰＣＲ．Ａｐｐｌ ＥｎｖＩｒｏｎ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ ６９（３）：１８４４－６．，Ｒａｈｍａｎ，Ｈ．２００２．ＭｕｌｔＩｐｌｅｘ ＰＣＲ ｆｏｒ ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｓｔｘ ｇｅｎｅｓ ｏｆ ＥｓｃｈｅｒＩｃｈＩａ ｃｏｌＩ．ＩｎｄＩａｎ Ｊ Ｍｅｄ Ｒｅｓ １１５：２５１－４．，ａｎｄ Ｆｒａｈｍ，Ｅ．，ａｎｄ Ｕ．Ｏｂｓｔ．２００３．ＡｐｐｌＩｃａｔＩｏｎ ｏｆ

the fluorogenIc probe technique（TaqMan PCR）to the detectIon of Enterococcus spp. and EscherIchIa colI In water samples. J MIcrobIol Methods52（1）：123－31. 参照）。

【0165】

他の実施形態では、カンピロバクター種に対応するポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドが検出されてもよい。カンピロバクター種に特異的な配列は、業界において公知である。（たとえば、Carter, J. S., and D. J. Kemp. 2000. A colorImetrIc DetetIon system for CalymmatobacterIum granulomatIs. Sex Transm Infect 76（2）：134－6., Moreno, Y., S. Botella, J. L. Alonso, M. A. Ferrus, M. Hernandez, and J. Hernandez. 2003. SpecIfIc detectIon of Arcobacter and Campylobacter straIns In water and sewage by PCR and fluorescent In sItu hybrIdIzatIon. Appl EnvIron MIcrobIol 69（2）：1181－6., and Bang, D. D., A. Wedderkopp, K. Pedersen, and M. Madsen. 2002. RapId PCR usIng nested prImers of the 16SrRNA and the hIppurIcase（hIpO）genes to detect Campylobacter jejunI and Campylobacter colI In envIronmental samples. Mol Cell Probes 16（5）：359－69. 参照）。

【0166】

他の実施形態では、バシラス種に対応するポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドが検出されてもよい。バシラス種に特異的な配列は、業界において公知である。（たとえば、Mantynen, V., and K. LIndstrom. 1998. A rapId PCR－based DNA test for enterotoxIc BacIllus cereus. Appl EnvIron MIcrobIol 64（5）：1634－9., Schraft, H., and M. W. GrIffIths. 1995. SpecIfIc olIgonucleotIde prImers for detectIon of lecIthInase－posIrIve BacIllus spp. by PCR. Appl EnvIron MIcrobIol 61（1）：98－102., and Ley, B. E., C. J. LInton, D. M. Bennett, H. Jalal, A. B. Foot, and M. R. MIllar. 1998. DetectIon of bacteraemIa In patIents wIth fever and neutropenIa usIng 16S rRNA gene amplIfIcatIon by polymerase chaIn reactIon. Eur J ClIn MIcrobIol Infect DIs17（4）：247－53参照）。

【0167】

シュードモナス種に対応するポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドが検出されてもよい。シュードモナス種に特異的な配列は、業界において公知である（たとえば、Xu, J., B. C. MIllar, J. E. Moore, K. Murphy, H. Webb, A. J. Fox, M. Cafferkey, and M. J. Crowe. 2003. Employment of broad－range 16S rRNA PCR to detect aetIologIcal agents of InfectIon from clInIcal specImens In patIents wIth acute menIngItIs－－rapId separatIon of 16S rRNA PCR amplIcons wIthout the

need for clonIng. J Appl MIcrobIol 94(2):197−206, Ley, B. E., C. J. LInton, D. M. Bennett, H. Jalal, A. B. Foot, and M. R. MIllar. 1998. DetectIon of bacteraemIa In patIents wIth fever and neutropenIa usIng 16S rRNA gene amplIfIcatIon by polymerase chaIn reactIon. Eur J ClIn MIcrobIol Infect DIs 17(4):247−53, and Johnsen, K., O. Enger, C. S. Jacobsen, L. ThIrup, and V. TorsvIk. 1999. QuantItatIve selectIve PCR of 16S rIbosomal DNA correlates well wIth selectIve agar platIng In descrIbIng populatIon dynamIcs of IndIgenous Pseudomonas spp. In soIl hot spots. Appl EnvIron MIcrobIol 65(4):1786−8参照)。

【0168】

また、標的ポリヌクレオチドはエンテロコッカス種に対応するポリヌクレオチド配列を有し、それが検出されてもよい。エンテロコッカス種に特異的な配列は、業界において公知である(たとえば、Hudson, C. R., P. J. Fedorka−Cray, M. C. Jackson−Hall, and L. M. HIott. 2003. AnomalIes In specIes IdentIfIcatIon of enterococcI from veterInary sources usIng a commercIal bIochemIcal IdentIfIcatIon system. Lett Appl MIcrobIol 36(4):245−50, DonabedIan, S. M., L. A. Thal, E. Hershberger, M. B. PerrI, J. W. Chow, P. Bartlett, R. Jones, K. Joyce, S. RossIter, K. Gay, J. Johnson, C. MackInson, E. Debess, J. Madden, F. Angulo, and M. J. Zervos. 2003. Molecular characterIzatIon of gentamIcIn−resIstant EnterococcI In the UnIted States:evIdence of spread from anImals to humans through food. J ClIn MIcrobIol 41(3):1109−13., andVakulenko, S. B., S. M. DonabedIan, A. M. VoskresenskIy, M. J. Zervos, S. A. Lerner, and J. W. Chow. 2003. MultIplex PCR for DetectIon of amInoglycosIde resIstance genes Inenterococc I. AntImIcrob Agents Chemother 47(4):1423−6参照)。

【0169】

標的ポリヌクレオチドは大腸菌O157に対応するポリヌクレオチド配列を有し、それが検出されてもよい。大腸菌O157に特異的な配列は、業界において公知である(たとえば、Pan TM, Chen LM, Su YC. IdentIfIcatIon of EscherIchIa colI O 157:H7 by multIplex PCR wIth promers specIfIc to thehlyA, eaeA, stxl, stx2, flIC and rfb genes, J Formos Med Assoc. 2002 Sep;101(9):661−4;Bopp DJ, Sauders BD, WarIng AL, Ackelsberg J, Dumas N, Braun−Howland E, DzIewulskID, Wallace BJ, Kelly M, Halse T, Musser KA, SmIth PF, Morse DL, LImberger RJ. DetectIon, IsolatIo

n, and Molecular SubtypIng of EscherIchIa colI O 157: H7 and Campylobacter jejunI AssocIated wIth a Large Waterborne Outbreak, J ClIn MIcrobIol. 2003 Jan;41(1):174-80;Ibekwe AM, GrIeve CM. DetectIon and quantIfIcatIon of EscherIchIa colI O 157:H7 In envIronmental samples by real-tIme PCR, J Appl MIcrobIol. 2003;94(3):421-31)参照)。

【0170】

標的ポリヌクレオチドは、リステリア種およびリステリア・モノサイトゲネスに対応するポリヌクレオチド配列を有していてもよい。リステリア種およびリステリア・モノサイトゲネスに特異的な配列は、業界で既知の(たとえば、Volokhov D, Rasooly A, Chumakov K, ChIzhIkov V. IdentIfIcatIon of LIsterIa specIes by mIcroarray-based assay. J ClIn MIcrobIol. 2002Dec;40(12):4720-8;CocolIn L, RantsIou K, IacumIn L, CantonI C, ComI G. DIrect IdentIfIcatIon In food samples of LIsterIa spp. and LIsterIa monocytogenes by molecular methods. Appl EnvIron MIcrobIol. 2002Dec;68(12):6273-82;Shearer AE, Strapp CM, Joerger RD. EvaluatIon of a polymerase chaIn reactIon-based system for detectIon of Salmonella enterItIdIs, EscherIchIa colI O157:H7, LIsterIa spp., and LIsterIa monocytogenes on fresh fruIts and vegetables. J Food Prot. 2001Jun;64(6):788-95;Bubert A, HeInI, Rauch M, Lehner A, Yoon B, Goebel W, Wagner M. DetectIon and dIfferentIatIon of LIsterIa spp. by a sIngle reactIon based on multIplex PCR. Appl EnvIron MIcrobIol. 1999Oct;65(10):4688-92;Jung YS, Frank JF, Brackett RE, Chen J. polymerase chaIn reactIon detectIon of LIsterIa monocytogenes on frankfurters usIng olIgonucleotIde prImers targetIng the genes encodIng Internal AB. J Food Prot. 2003Feb;66(2):237-41;and Pangallo D, KaclIkova E, Kuchta T, Dravoska H. DetectIon of LIsterIa monocytogenes by polymerase chaIn reactIon orIented to InlB gene. New MIcrobIol. 2001Oct;24(4):333-9参照)。

【0171】

大腸菌に対応するポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドが検出されてもよい。大腸菌に特異的な配列は、業界において公知である(たとえば、Casas N, Sunen E. DetectIon of enterovIruses, hepatItIs A vIrus and rotavIruses In sewage by means of anImmunomagnetIc capture reverse transcrIptIon-PCR assay. MIcrobIol Re

s. 2002;157(3):169-7;Schvoerer E, Ventura M, DubosO, Cazaux G, Serceau R, GoumIer N, DuboIs V, CamInade P, Fleury HJ, Lafon ME QualItatIve and quantItatIve molecular detectIon of enterovIruses In water from bathIng areas and from a sewage treatment plant;Res MIcrobIol. 2001 Mar;152(2):179-86. Bernhard AE, FIeld KG. IdentIfIcatIon of nonpoInt sources of fecal pollutIon In coastal waters by usIng host-specIfIc 16SrIbosomal DNA genetIc markers from fecal anaerobes. Appl EnvIron MIcrobIol. 2000 Apr;66(4):1587-94参照)。

【0172】

他の実施形態では、コレラ菌およびビブリオ-パラヘモリチカスに対応するポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドを検出してもよい。コレラ菌およびビブリオ-パラヘモリチカスに特異的な配列は、業界において公知である(たとえば、Myers ML, PanIcker G, Bej AK. PCR DetectIon of a Newly Emerged PandemIc VIbrIo parahaemolytIcus 03:K6Pathogen In Pure Cultures and Seeded Waters from the Gulf of MexIco. Appl EnvIron MIcrobIol. 2003 Apr;69(4):2194-200;Blackstone GM, Nordstrom JL, VIckery MC, Bowen MD, Meyer RF, DePaola A. DetectIon of pathogenIc VIbrIo parahaemolytIcus In oyster enrIchments by real tIme PCR. J MIcrobIol Methods. 2003 May;53(2):149-155;and Lyon WJ. TaqMan PCR for detectIon of VIbrIo cholerae O1, O139, non-O1, and non-O139 In pure cultures, raw oysters, and synthetIc seawater. Appl EnvIron MIcrobIol. 2001Oct;67(10):4685-93参照)。

【0173】

別の実施形態では、糸状菌に対応するポリヌクレオチド配列を有する標的ポリヌクレオチドを検出してもよい。糸状菌に特異的な配列は、業界において公知である(たとえば、Zur G, ShImonI E, Hallerman E, KashI Y. DetectIonof AlternarIa fungal contamInatIon In cereal graIns by a polymerase chaIn readtIon-base d assay. J Food Prot. 2002Sep;65(9):1433-40;JImenez L, Smalls S, Ignar R. Use of PCR analysIs for detectIng low levels of bacterIa and mold contamInatIon In pharmaceutIcal samples. J MIcrobIol Methods. 2000 Aug;41(3):259-65;and VanIttanalcom N, VanIttanakom P, Hay RJ. RapId IdentIfIcatIonof PenIcIllIum marneffeI by PCR-based detectIon ofspecIfIc sequences on the rRNA gene, J ClIn MIcrobIol. 2002May;40(5):1739-42参照)。

【0174】

標的ポリヌクレオチドはレジオネラに対応するポリヌクレオチド配列を有していてもよい。レジオネラに特異的な配列は、業界において公知である（たとえば、ＡｏｋＩ Ｓ，ＨＩｒａｋａｔａ Ｙ，ＭＩｙａｚａｋＩ Ｙ，ＩｚｕｍＩｋａｗａ Ｋ，ＹａｎａｇＩｈａｒａ Ｋ，Ｔｏｍｏｎｏ Ｋ，Ｙａｍａｄａ Ｙ，ＴａｓｈＩｒｏ Ｔ，Ｋｏｈｎｏ Ｓ，ＫａｍＩｈＩｒａ Ｓ．ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ＬｅｇＩｏｎｅｌｌａ ＤＮＡ ｂｙ ＰＣＲ ｏｆ ｗｈｏｌｅ－ｂｌｏｏｄ ｓａｍｐｌｅｓ Ｉｎ ａ ｍｏｕｓｅ ｍｏｄｅｌ．Ｊ Ｍｅｄ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ．２００３ Ａｐｒ；５２（Ｐｔ４）：３２５－９；Ｒａｇｇａｍ ＲＢ，ＬｅＩｔｎｅｒ Ｅ，Ｍｕｈｌｂａｕｅｒ Ｇ，Ｂｅｒｇ Ｊ，Ｓｔｏｃｈｅｒ Ｍ，ＧｒＩｓｏｌｄ ＡＪ，Ｍａｒｔｈ Ｅ，Ｋｅｓｓｌｅｒ ＨＨ．ＱｕａｌＩｔａｔＩｖｅ ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ＬｅｇＩｏｎｅｌｌａ ｓｐｅｃＩｅｓ Ｉｎ ｂｒｏｎｃｈｏａｌｖｅｏｌａｒ ｌａｖａｇｅｓ ａｎｄ Ｉｎｄｕｃｅｄ ｓｐｕｔａ ｂｙ ａｕｔｏｍａｔｅｄ ＤＮＡ ｅｘｔｒａｃｔＩｏｎ ａｎｄ ｒｅａｌ－ｔＩｍｅ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａＩｎ ｒｅａｃｔＩｏｎ．Ｍｅｄ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ（Ｂｅｒｌ）．２００２Ｏｃｔ；１９１（２）：１１９－２５；ａｎｄＡｌｅｘＩｏｕ－ＤａｎＩｅｌ Ｓ，ＳｔｙｌＩａｎａｋＩｓＡ，ＰａｐｏｕｔｓＩＡ，ＺｏｒｂａｓＩ，ＰａｐａＡ，Ｌａｍｂｒｏｐｏｕｌｏｓ ＡＦ，ＡｎｔｏｎＩａｄＩｓ Ａ．ＡｐｐｌＩｃａｔＩｏｎ ｏｆ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａＩｎ ｒｅａｃｔＩｏｎ ｆｏｒ ｄｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ＬｅｇＩｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈＩｌａ Ｉｎ ｓｅｒｕｍ ｓａｍｐｌｅｓ．ＣｌＩｎ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ Ｉｎｆｅｃｔ．１９９８ Ｍａｒ；４（３）：１４４－１４８参照）。

【０１７５】

また、宿主反応ｍＲＮＡは食品介在性病原体による感染に応えて検出してもよい。

【０１７６】

Ｄ．水媒介性病原体

本明細書で開示する方法は、水媒介性病原体の存在および計数のための素早く、感度の高い診断テストを提供する。水媒介性病原体としては、細菌、ウィルスおよび原生動物が挙げられる。水媒介性病原体の例示として、腸球菌、大腸菌、バシルス種、シュードモナス種、クリプトスポリジウムおよびジアルジアが挙げられる。水媒介性病原体は、どのような水サンプルからも得られる。たとえば、水泳プール、アクアティックパーク、井戸、家庭用水、貯水池、海辺、湖、大洋、魚や甲殻類の養殖場、農業用水、分析水、投薬用に再調製した水、水処理施設、観光船、スペースシャトルの排水およびボトル水が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７７】

本明細書で開示される方法は、水媒介性病原体を容易に検出することを可能にする。一例として、特異的な菌株が検出される。たとえば、他の菌株よりも検出できる腸球菌の特異的な菌株として、エンテロコッカス－アビウム、Ｅ．カセリフラブス、Ｅ．セコルム、Ｅ．コルンバ、Ｅ．ディスパル、Ｅ．デュランス、Ｅ．フェシウム、Ｅ．フェカーリス、Ｅ．ガリナルム、Ｅ．ヒラエ、Ｅ．マロドラタス、Ｅ．ムンティ、Ｅ．シュードビウム、Ｅ．ラフィノサス、Ｅ．サッカロリチカスおよびＥ．亜硫酸が挙げられる。

【０１７８】

水媒介性病原体に関連するいかなるポリヌクレオチドも本発明の方法によって識別される。該方法はエンテロコッカス種、大腸菌、バイシルス種、およびシュードモナス種と関連する遺伝子を検出するために使用されてもよい。これらはたとえば、ＥｓｃｈｅｒＩｃｈＩａ ｃｏｌＩ：Ｈｅｌｌｅｒ，Ｌ．Ｃ．，Ｃ．Ｒ．ＤａｖＩｓ，Ｋ．Ｋ．Ｐｅａｋ，Ｄ．ＷＩｎｇｆＩｅｌｄ，Ａ．Ｃ．Ｃａｎｎｏｎｓ，Ｐ．Ｔ．Ａｍｕｓｏ，ａｎｄＪ．ＣａｔｔａｎＩ．２００３，ＣｏｍｐａｒＩｓｏｎ ｏｆ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ＤＮＡ ＩｓｏｌａｔＩｏｎ ｆｒｏｍ Ｆｏｏｄ Ｓａｍｐｌｅｓ ｆｏｒ ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ＳｈＩｇａ ＴｏｘＩｎ－ＰｒｏｄｕｃＩｎｇ ＥｓｃｈｅｒＩｃｈＩａ ｃｏｌＩ ｂｙ Ｒｅａｌ－ＴＩｍｅ ＰＣＲ．Ａｐｐｌ ＥｎｖＩｒｏｎ ＭＩｃｒ

obIol 69(3):1844-6.;Rahman, H. 2002. MultIplex PCR for DetectIon of stx genes of EscherIchIa colI. IndIan J Med Res 115:251-4., and Frahm, E., and U. Obst. 2003. ApplIcatIon of the fluorogenIc probe technIque (TaqMan PCR) to the detectIon of Enterococcus spp. and EscherIchIa colIIn water samples. J MIcrobIol Methods 52(1):123-31. BacIllus spp:Mantynen, V., and K. LIndstrom. 1998. A rapId PCR-based DNA test for enterotoxIc BacIllus cereus. Appl EnvIron MIcrobIol 64(5):1634-9., Schaft, H., and M. W. GrIffIths. 1995. SpecIfIc olIgonucleotIde prImers fordetectIon of lecIthInase-posItIve BacIllus spp. by PCR. Appl EnvIron MIcrobIol 61(1):98-102., and Ley, B. E., C. J. LInton, D. M. Bennett, H. Jalal, A. B. Foot, and M. R. MIllar. 1998. DetectIon of bacteraemIa In patIents wIth fever and neutropenIa usIng 16S rRNA gene amplIfIcatIon by polymerase chaIn reactIon. Eur J ClIn MIcrobIol Infect DIs 17(4):247-53. Pseudomonas spp:Xu, J., B. C. MIllar, J. E. Moore, K. Murphy, H. Webb, A. J. Fox, M. Cafferkey, and M. J. Crowe. 2003. Employment of broad-range 16S rRNA PCR todetect aetIologIcal agents of InfectIon from clInIcal specImens In patIents wIth acute menIngItIs-rapId separatIon of 16S rRNA PCR amplIcons wIthout the need for clonIng. J Appl MIcrobIol94(2):197-206., Ley, B. E., C. J. LInton, D. M. Bennett, H. Jalal, A. B. Foot, and M. R. MIllar. 1998. DetectIon of bacteraemIa In patIents wIth fever and neutropenIa usIng 16S rRNA gene amplIfIcatIon by polymerase chaIn reactIon. Eur J ClIn MIcrobIol Infect DIs 17(4):247-53., and Johnsen, K., O. Enger, C. S. Jacobsen, L. ThIrup, and V. TorsvIk. 1999. QuantItatIve selectIve PCR of 16S rIbosomal DNA correlates well wIth selectIve agar platIng In descrIbIng populatIon dynamIcs of IndIgenous Pseudomonas spp. In soIl hot spots. Appl EnvIron MIcrobIol 65(4):1786-8. Enterococcus spp:Hudson, C. R., P. J. Fedorka-Cray, M. C. Jackson-Hall, and L. M. HIott. 2003. AnomalIes In specIes IdentIfIcatIonof enterococcI from veterInary sources usIng a commercIal bIochemIcal IdentIfIcatIon system. Lett Appl MIcrobIol 36(4):245-50., DonabedIan, S. M., L. A. Thal, E. H

ershberger, M. B. PerrI, J. W. Chow, P. Bartlett, R. Jones, K. Joyce, S. RossIter, K. Gay, J. Johnson, C. MackInson, E. Debess, J. Madden, F. Angulo, and M. J. Zervos. 2003. Molecular characterIzatIon of gentamIcIn−resIstant EnterococcI In the UnIted States:evIdence of spread from anImals to humans through food. J ClIn MIcrobIol 41(3):1109−13., and Vakulenko, S. B., S. M. DonabedIan, A. M. VoskresenskIy, M. J. Zervos, S. A. Lerner, and J. W. Chow. 2003. MultIplex PCR for detectIon of amInoglycosIde resIstance genes Inenterococc I. AntImIcrob Agents Chemother 47(4):1423−6に記載されている。たとえば、ここに記載の方法によって識別される特異的な腸球菌遺伝子として、腸球菌内に保存されている１６ＳリボソームＲＮＡ配列が挙げられる。

【０１７９】

また、宿主反応ｍＲＮＡは、水媒介性病原体による感染に応答して検出されてもよい。

【０１８０】

Ｅ．アグロテロリズム

核酸類似体は、アグロテロリズムに関係がある特異的な病原体のＰＣＲ系の検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計されてもよい。ＰＣＲ系の検出のための臨床的に重要で参照になる病原体の例示として、以下のものがあげられる。核酸類似体は、特異的なＰＣＲプライマー配列の配列を有するように設計されてもよい。これは、ここで記載の本発明の実施形態の多くで組み合わせて使用することができる。

【０１８１】

核酸類似体は、たとえば、トキソプラズマ−ゴンヂのＰＣＲ系検出に使用される、プライマーの配列またはその断片を有するように設計されてもよい。トキソプラズマ−ゴンヂは、非常に低い宿主特異性を有し、大半の哺乳動物に感染する可能性が考えられる。それは、また、鳥からの報告があり、実際に世界の全ての国で発見されている。殆どのアピコンプレックサ類と同様に、トキソプラズマは偏性細胞内寄生体である。トキソプラズマに感染しているヒトの大半において、該疾患の症状はない。しかし、ある条件下で、トキソプラズマは、肝炎、肺炎、視覚消失症、重度の神経性疾患をはじめとする重篤な症状を起こす。トキソプラズマのＰＣＲ系検出で使用されるプライマーは、業界において公知である（たとえば、AspInall, T. V., D. Marlee, J. E. Hyde, and P. F. SIms. 2002. Prevalence of Toxoplasma gondII In commercIal meat products as monItored by polymerase chaIn reactIon − food for thought? Int J ParasItol 32(9):1193−9., AspInall, T. V., E. C. Guy, K. E. Roberts, D. H. Joynson, J. E. Hyde, and P. F. SIms. 2003. Molecular evIdence for multIple Toxoplasma gondII InfecttIons In IndIvIdual patIents In England and Wales:publIc health ImplIcatIons. Int J ParasItol 33(1):97−103., Fuentes, I., J. M. RubIo, C. RamIrez, and J. Alvar. 2001. GenotypIc characterIzatIon of Toxoplasma gondII straIns assocIated wIth human toxoplasmosIs In SpaIn: dIrect analysIs from clInIcal samples. J ClIn M

IcrobIol 39（4）：1566－70.，and WarnekulasurIya，M. R.，J. D. Johnson，and R. E. HollIman. 1998. DetectIon of Toxoplasma gondII In cured meats. Int J Food MIcrobIol45（3）：211－5.参照）。

【0182】

他の実施形態では、核酸類似体は、シゲラ種、グラム陰性菌のＰＣＲ系検出に使用される、プライマーの配列またはその断片を有するように設計されてもよい。シゲラ種のＰＣＲ系検出において使用されるプライマーは、業界で公知である（Hartman，A. B.，EssIet，II，D. W. Isenbarger，and L. E. LIndler. 2003. EpIdemIology of TetracyclIne ResIstance DetermInants In ShIgella spp. and EnteroInvasIve EscherIchIa colI：CharacterIzatIon and DIssemInatIon of tet（A）－l. J ClIn MIcrobIol 41（3）：1023－32.，Lampel，K. A.，and P. A. OrlandI. 2002. polymerase chaIn reactIon detectIon of InvasIve ShIgella and Salmonella enterIca In food. Methods Mol BIol 179：235－44.，Wang，R. F.，W. W. Cao，and C. E. CernIglIa. 1997. A unIversal protocol for PCR DetectIon of 13specIes of foodbornes In foods. J Appl MIcrobIol 83（6）：727－36.，and Lampel，K. A.，J. A. Jagow，M. Trucksess，and W. E. HIll. 1990. Polymerase chaIn reactIon for detectIon of InvasIve ShIgellaflexnerI In food. Appl EnvIron MIcrobIol 56（6）：1536－40.参照）。

【0183】

他の実施形態では、核酸類似体は、サイクロスポーラ（Cyclospora cayetanensIs）のＰＣＲ系検出のために使用される、プライマーの配列またはその断片を有するように設計されてもよい。サイクロスポーラ（Cyclospora cayetanensIs）は、顕微鏡なしでは見るのには小さ過ぎる１つの細胞からなる寄生虫である。ヒトのケースで初めて知られたサイクロスポーラ感染によって発症した病気（すなわち、サイクロスポーラ症）は、１９７９年に報告された。症例は、１９８０年代半ばにより多く報告されるようになった。この数年間では、サイクロスポーラ症の集団発生が合衆国とカナダで報告されている。サイクロスポーラは、感染した排泄物で汚染された水や食物の摂取で広がる。サイクロスポーラ症の集団発生は、種々のタイプの生鮮食品と関連している。サイクロスポーラは、排便を通したのち伝染性が出るまで時間（数日または数週間）を必要とする。したがって、サイクロスポーラが１人の人から直接他の人に移ること可能性は低い。

【0184】

サイクロスポーラ（Cyclospora cayetanensIs）のＰＣＲ系検出において使用されるプライマーは、業界で公知である（たとえば、Eberhard，M. L.，N. J. PIenIazek，and M. J. Arrowood. 1997. Laboratory dIagnosIs of Cyclospora InfectIons. Arch Pathol Lab Med 121（8）：792－7.，PIenIazek N. J.，S. B. Slemenda，A. J. da SIlva，E. M. Alfano，and M. J. Arrowood. 1996. PCR confIrmatIon of InfectIon wIth Cyclospora cayetanensIs. Emerg Infect DIs 2（4）：35

7－9.，QuIntero－Betancourt，W.，E.R.Peele，and J.B.Rose.2002.CryptosporIdIum parvum and Cyclospora cayetanensIs：a revIew of laboratory methods for detect Ion of these waterborne parasItes.J MIcrobIol Methods 49（3）：209－24.，and Varma，M.，J.D.Hester，F.W.Schaefer，3rd，M.W.Ware，and H.D.LIndquIst.2003.DetectIon of Cyclospora cayetanensIs usIng a quantItatIve real－tIme PCR assay.J MIcrobIol Methods 53（1）：27－36.参照）。

【0185】

F．病気の診断

また、ここで開示される方法は、遺伝子（たとえば病気対立遺伝子）の存在または遺伝子の発現の変化の、素早く、感度の高い診断テストを提供する。検出される遺伝子配列は、遺伝子の病気、疾患および固体素因と関与していてもよい。標的ポリヌクレオチドの一例として、特異的なゲノム配列が含まれ、変異体、多型体、付加物、欠失体が挙げられる。標的ポリヌクレオチドの他の例として、特異的な病気または疾患において、発現が変化した（たとえば、発現がアップレギュレートされたあるいは抑制された）遺伝子を有するポリヌクレオチド配列がある。病気および疾患に関連した遺伝子の例として、癌、すい嚢胞性繊維症、ダウン症候群、遺伝子多型および突然変異を伴う病気に関与した遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝性のヘテロ接合、ファクターＩＩ、ファクターV、細胞組織移植用のＨＬＡ遺伝子タイプもまた識別される。

【0186】

核酸類似体は、癌または変異細胞の異常増殖に関与する標的ポリヌクレオチドのＰＣＲ系検出で使用されるプライマーの配列またはその断片を有するように設計されてもよい。標的ポリヌクレオチド癌または変異細胞の異常増殖に関与する遺伝子に対応するが検出される。癌に関与する多数の遺伝子が業界で公知である。

【0187】

一実施形態で、核酸類似体は、すい臓癌のＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列またはその断片を有するように設計されてもよい。ＤＰＣ４消失のようにすい臓癌のＰＣＲ系検出に使用されるプライマーは、業界で公知である（たとえば、Barber a，V.M.，M.MartIn，L.MarInoso，A.Munne，A.Carrato，F.X.Real，and M.Fabre.2000.The18q21 regIon In colorectal and pancreatIc cancer：Independent lossof DCC and DPC4 expressIon.BIochIm BIophys Acta 1502（2）：283－96，Bartsch，D.，P.Barth，D.BastIan，A.Ramaswamy，B.Gerdes，B.Chaloupka，Y.DeIss，B.SImon，and A.Schudy.1999.HIgher frequency of DPC4／Smad4 alteratIons In pancreatIc cancer cell lInes than In prImary pancreatIc adenocarcInomas.Cancer Lett 139（1）：43－9，and Bartsch，D.，S.A.Hahn，K.D.DanIchevslsI，A.Ramaswamy，D.BastIan，H.GalehdarI，P.Barth，W.SchmIegel，B.SImon，and M.Rothmund.1999.MutatIons of the DPC4／Smad4 gene In neuroendocrIne pancreatIc tumors.Oncogene18（14）：2367－71参照）。

【0188】

他の実施形態で、核酸類似体は、子宮頚部癌のＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列またはその断片を有するように設計されてもよい。子宮頚部癌のＰＣＲ系検出で使用されるプライマー。子宮頚部癌を伴う全遺伝子または一部に対応する標的ポリヌクレオチドもまた識別されてよい（たとえば、（ＳＩ，Ｈ．Ｘ．，Ｓ．Ｗ．Ｔｓａｏ，Ｃ．Ｓ．Ｐｏｏｎ，Ｌ．Ｄ．Ｗａｎｇ，Ｙ．Ｃ．Ｗｏｎｇ，ａｎｄＡ．Ｌ．Ｃｈｅｕｎｇ．２００３．ＶＩｒａｌ ｌｏａｄ ｏｆ ＨＰＶ Ｉｎ ｅｓｏｐｈａｇｅａｌ ｓｑｕａｍｏｕｓ ｃｅｌｌ ｃａｒｃＩｎｏｍａ．Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ １０３（４）：４９６－５００，ＳＩ，Ｈ．Ｘ．，Ｓ．Ｗ．Ｔｓａｏ，Ｃ．Ｓ．Ｐｏｏｎ，Ｌ．Ｄ．Ｗａｎｇ，Ｙ．Ｃ．Ｗｏｎｇ，ａｎｄ Ａ．Ｌ．Ｃｈｅｕｎｇ．２００３．ＶＩｒａｌ ｌｏａｄ ｏｆ ＨＰＶ Ｉｎ ｅｓｏｐｈａｇｅａｌ ｓｑｕａｍｏｕｓ ｃｅｌｌ ｃａｒｃＩｎｏｍａ．Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ １０３（４）：４９６－５００，ａｎｄ Ｃａｓｔｌｅ，Ｐ．Ｅ．，Ｍ．ＳｃＨＩｆｆｍａｎ，Ｐ．Ｅ．ＧｒａｖＩｔｔ，Ｈ．Ｋｅｎｄａｌｌ，Ｓ．ＦＩｓｈｍａｎ，Ｈ．Ｄｏｎｇ，Ａ．ＨＩｌｄｅｓｈｅＩｍ，Ｒ．Ｈｅｒｒｅｒｏ，Ｍ．Ｃ．ＢｒａｔｔＩ，Ｍ．Ｅ．Ｓｈｅｒｍａｎ，Ａ．ＬｏｒＩｎｃｚ，Ｊ．Ｅ．Ｓｃｈｕｓｓｌｅｒ，ａｎｄ Ｒ．Ｄ．Ｂｕｒｋ．２００２．ＣｏｍｐａｒＩｓｏｎｓ ｏｆ ＨＰＶ ＤＮＡ ｄｅｔｅｃｔＩｏｎ ｂｙ ＭＹ０９／１１ＰＣＲ ｍｅｔｈｏｄｓ．Ｊ Ｍｅｄ ＶＩｒｏｌ ６８（３）：４１７－２３参照）。

【０１８９】

核酸類似体は、胸部癌のＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列またはその断片を有するように設計されてもよい。胸部癌のＰＣＲ系検出で使用されるプライマー。標的ポリヌクレオチドは、胸部癌を伴う全遺伝子または一部に対応する配列を有するように選択されてもよい（たとえば、ＭＩｎ，Ｃ．Ｊ．，Ｌ．Ｔａｆｒａ，ａｎｄ Ｋ．Ｍ．Ｖｅｒｂａｎａｃ．１９９８．ＩｄｅｎｔＩｆＩｃａｔＩｏｎ ｏｆ ｓｕｐｅｒＩｏｒ ｍａｒｋｅｒｓ ｆｏｒ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａＩｎ ｒｅａｃｔＩｏｎ ｄｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｂｒｅａｓｔ ｃａｎｃｅｒ ｍｅｔａｓｔａｓｅｓ Ｉｎ ｓｅｎｔＩｎｅｌ ｌｙｍｐｈ ｎｏｄｅｓ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ５８（２０）：４５８１－４，Ａｂｂａｓｚａｄｅｇａｎ，Ｍ．Ｒ．，Ｊ．Ｐ．ＳｔｒｕｅｗＩｎｇ，Ｋ．Ｍ．Ｂｒｏｗｎ，Ｊ．Ｖ．ＳｎＩｄｅｒ，Ｆ．ＧｏｏｄｓａＩｄ，Ｒ．Ｇｏｒｅ－Ｌａｎｇｔｏｎ，ａｎｄ Ｍ．Ｒ．Ｈｕｇｈｅｓ．１９９７．Ａｕｔｏｍａｔｅｄ ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｐｒｅｖａｌｅｎｔ ｍｕｔａｔＩｏｎｓ Ｉｎ ＢＲＣＡ１ ａｎｄ ＢＲＣＡ２ ｇｅｎｅｓ，ｕｓＩｎｇ ａ ｆｌｕｏｒｏｇｅｎＩｃ ＰＣＲ ａｌｌｅｌＩｃ ｄＩｓｃｒＩｍＩｎａｔＩｏｎ ａｓｓａｙ．Ｇｅｎｅｔ Ｔｅｓｔ１（３）：１７１－８０，ａｎｄ Ｔａｍｕｒａ，Ｇ．，Ｃ．Ｍａｅｓａｗａ，Ｙ．ＳｕｚｕｋＩ，Ｍ．ＫａｓｈＩｗａｂａ，Ｍ．ＩｓｈＩｄａ，Ｋ．ＳａＩｔｏ，ａｎｄ Ｒ．Ｓａｔｏｄａｔｅ．１９９４．Ｉｍｐｒｏｖｅｄ ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｌｏｓｓ ｏｆ ｈｅｔｅｒｏｚｙｇｏｓＩｔｙ ａｔ ｒｅｔＩｎｏｂｌａｓｔｏｍａ ｇｅｎｅ ｌｏｃｕｓ Ｉｎ ｈｕｍａｎ ｂｒｅａｓｔ ｃａｒｃＩｎｏｍａ．Ｐａｔｈｏｌ Ｉｎｔ ４４（１）：３４－８参照）。

【０１９０】

核酸類似体は、メラノーマのＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列またはその断片を有するように設計されてもよい。メラノーマのＰＣＲ系検出で使用されるプライマー。標的ポリヌクレオチドは、メラノーマを伴う全遺伝子または一部に対応する配列を有するように選択されてもよい。たとえば、標的ポリヌクレオチドは、ＣＤＫＮ２における突然変異を含んでもよい（たとえば、Ｇｏｎｚａｌｇｏ，Ｍ．Ｌ．，Ｃ．Ｍ．Ｂｅｎｄｅｒ，Ｅ．Ｈ．Ｙｏｕ，Ｊ．Ｍ．ＧｌｅｎｄｅｎＩｎｇ，Ｊ．Ｆ．Ｆｌｏｒｅｓ，Ｇ．Ｊ．Ｗａｌｋｅｒ，Ｎ．Ｋ．Ｈａｙｗａｒｄ，Ｐ．Ａ．Ｊｏｎｅｓ，ａｎｄ Ｊ．Ｗ．ＦｏｕｎｔａＩｎ．１９９７．Ｌｏｗ ｆｒｅｑｕｅｎｃｙｏｆ ｐ１６／ＣＤＫＮ２Ａ ｍｅｔｈｙｌａｔＩｏｎ Ｉｎ ｓｐｏｒａｄＩｃ ｍｅｌａｎｏｍａ：ｃｏｍｐａｒ ａｔＩｖｅ ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ ｆｏｒ ｍｅｔｈｙｌａｔＩｏｎ ａｎａｌｙｓＩｓ ｏｆ ｐｒＩｍａｒｙ ｔｕｍｏｒｓ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ５７（２３）：５３

３６－４７，Ｃｈａｎ，Ｊ．，Ｅ．Ｓ．ＲｏｂＩｎｓｏｎ，Ｊ．ＡｔｅｎｃＩｏ，Ｚ．Ｗａｎｇ，Ｓ．ＫａｚＩａｎＩｓ，Ｌ．Ｄ．Ｃｏｌｅｔｔａ，Ｒ．Ｓ．ＮａＩｒｎ，ａｎｄ Ｊ．Ｒ．ＭｃＣａｒｒｅｙ．２００１．ＣｈａｒａｃｔｅｒＩｚａｔＩｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ＣＤＫＮ２Ａ ａｎｄ ＡＲＦ ｇｅｎｅｓ Ｉｎ ＵＶ－ＩｎｄｕｃｅｄｍｅｌａｎｏｃｙｔＩｃ ｈｙｐｅｒｐｌａｓＩａｓ ａｎｄ ｍｅｌａｎｏｍａｓ ｏｆ ａｎ ｏｐｏｓｓｕｍ（ＭｏｎｏｄｅｌｐｈＩｓｄｏｍｅｓｔＩｃａ）．ＭｏｌＣａｒｃＩｎｏｇ ３１（１）：１６－２６，ａｎｄ Ｐｏｌｌｏｃｋ，Ｐ．Ｍ．，Ｊ．Ｗｅｌｃｈ，ａｎｄ Ｎ．Ｋ．Ｈａｙｗａｒｄ．２００１．ＥｖＩｄｅｎｃｅ ｆｏｒ ｔｈｒｅｅ ｔｕｍｏｒ ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｌｏｃＩ ｏｎ ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ ９ｐ Ｉｎｖｏｌｖｅｄ Ｉｎ ｍｅｌａｎｏｍａ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ６１（３）：１１５４－６１参照）。

【０１９１】

さらに、核酸類似体は、結腸直腸癌のＰＣＲ系検出のために使用される、プライマーの配列またはその断片を有するように設計されてもよい。結腸直腸癌のＰＣＲ系検出で使用されるプライマー。標的ポリヌクレオチドは、結腸直腸癌を伴う全遺伝子または一部に対応する配列を有するように選択されてもよい（たとえば、ＡｏｋＩ，Ｙ．ＴａｋａｇＩ，Ｍ．Ｈａｙａｋａｗａ，Ｋ．ＹａｍａｇｕｃｈＩ，Ｍ．Ｆｕｔａｍｕｒａ，Ｋ．ＫｕｎＩｅｄａ，ａｎｄ Ｓ．ＳａｊＩ．２００２．ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｐｅｒＩｔｏｎｅａｌ ｍＩｃｒｏｍｅｔａｓｔａｓｅｓ ｂｙ ｒｅｖｅｒｓｅ ｔｒａｎｓｃｒＩｐｔａｓｅ－ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａＩｎ ｒｅａｃｔＩｏｎ ｔａｒｇｅｔＩｎｇ ｃａｒｃＩｎｏｅｍｂｒｙｏｎＩｃ ａｎｔＩｇｅｎ ａｎｄ ｃｙｔｏｋｅｒａｔＩｎ ２０ Ｉｎ ｃｏｌｏｎ ｃａｎｃｅｒ ｐａｔＩｅｎｔｓ．Ｊ Ｅｘｐ ＣｌＩｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２１（４）：５５５－６２．，Ｓｈｔｏｙｅｒｍａｎ－Ｃｈｅｎ，Ｒ．，Ｅ．ＦｒＩｅｄｍａｎ，Ａ．ＦＩｇｅｒ，Ｍ．Ｃａｒｍｅｌ，Ｙ．Ｐａｔａｅｌ，Ｐ．Ｒａｔｈ，Ｈ．Ｈ．ＦＩｄｄｅｒ，Ｓ．Ｂａｒ－ＭｅＩｒ，ａｎｄ Ｌ．Ｔｈｅｏｄｏｒ．２００１．Ｔｈｅ Ｉ１３０７Ｋ ＡＰＣ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈＩｓｍ：ｐｒｅｖａｌｅｎｃｅ Ｉｎ ｎｏｎ－ＡｓｈｋｅｎａＩＩ Ｊｅｗｓ ａｎｄ ｅｖＩｄｅｎｃｅ ｆｏｒ ａ ｆｏｕｎｄｅｒ ｅｆｆｅｃｔ．Ｇｅｎｅ ｔ Ｔｅｓｔ ５（２）：１４１－６．，ａｎｄ ＳｍＩｔｈ，Ｗ．Ｍ．，Ｎ．Ｊ．Ｖａｎ Ｏｒｓｏｕｗ，Ｅ．Ａ．Ｆｏｘ，Ｒ．Ｄ．Ｋｏｌｏｄｎｅｒ，Ｊ．ＶＩｊｇ，ａｎｄ Ｃ．Ｅｎｇ．１９９８．Ａｃｃｕｒａｔｅ，ｈＩｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ”ｓｎａｐｓｈｏｔ”Ｄｅｔｅｃｔｏｎ ｏｆ ｈＭＬＨｌ ｍｕｔａｔＩｏｎｓ ｂｙ ｔｗｏ－ｄＩｍｅｎｓＩｏｎａｌ ＤＮＡ ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓＩｓ．Ｇｅｎｅｔ Ｔｅｓｔ２（１）：４３－５３．参照）。

【０１９２】

核酸類似体は、網膜芽細胞腫のＰＣＲ系検出のために使用される、プライマーの配列またはその断片を有するように設計されてもよい。網膜芽細胞腫のＰＣＲ系検出で使用されるプライマー。標的ポリヌクレオチドは、網膜芽細胞腫を伴う全ての遺伝子または一部に対応する配列を有するように選択されてもよい（たとえば、ＡｃＩｋｂａｓ，１．，Ｉ．Ｋｅｓｅｒ，Ｓ．ＫＩｌＩｃ，Ｈ．ＢａｇｃＩ，Ｇ．Ｋａｒｐｕｚｏｇｌｕ，ａｎｄ Ｇ．ＬｕｌｅｃＩ．２００２．ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ＬＯＨ ｏｆ ｔｈｅ ＲＢ１ ｇｅｎｅ Ｉｎ ｂｌａｄｄｅｒ ｃａｎｃｅｒｓ ｂｙ ＰＣＲ－ＲＦＬＰ．Ｕｒｏｌ Ｉｎｔ ６８（３）：１８９－９２，Ｔａｍｕｒａ，Ｇ．，Ｃ．Ｍａｅｓａｗａ，Ｙ．ＳｕｚｕｋＩ，Ｍ．ＫａｓｈＩｗａｂａ，Ｍ．ＩｓｈＩｄａ，Ｋ．ＳａＩｔｏ，ａｎｄ Ｒ．Ｓａｔｏｄａｔｅ．１９９４．Ｉｍｐｒｏｖｅｄ ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｌｏｓｓ ｏｆ ｈｅｔｅｒｏｚｙｇｏｓＩｔｙ ａｔ ｒｅｔＩｎｏｂｌａｓｔｏｍａ ｇｅｎｅ ｌｏｃｕｓ Ｉｎ ｈｕｍａｎ ｂｒｅａｓｔ ｃａｒｃＩｎｏｍａ．Ｐａｔｈｏｌ Ｉｎｔ ４４（１）：３４－８，ａｎｄ Ｌｏｈｍａｎｎ，Ｄ．，Ｂ．Ｈｏｒｓｔｈｅｍｋｅ，Ｇ．ＧＩｌｌｅｓｓｅｎ－Ｋａｅｓｂａｃｈ，Ｆ．Ｈ．ＳｔｅｆａｎＩ，ａｎｄ Ｈ．Ｈｏｆｌｅｒ．１９９２．ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｓｍａｌｌＲＢ

1 gene deletIons In retInoblastoma by multIplex PCR and hIgh−resolutIon gel electrophoresIs. Hum Genet 89（1）：49−53参照）。

【0193】

さらに別の実施形態では、核酸類似体は、血友病のＰＣＲ系検出のために使用される、プライマーの配列またはその断片を有するように設計されてもよい。血友病のＰＣＲ系検出で使用されるプライマー。標的ポリヌクレオチドは、血友病を伴う全遺伝子または一部に対応する配列を有するように選択されてもよい（たとえば、MannuccI, P. M. 2002. Ham−wasserman lecture：hemophIlIa and related bleedIng dIsorders：a story of dIsmay and success. Hematology（Am Soc Hematol Educ Program）：l−9, and CItron, M., L. GodmIlow, T. Ganguly, and A. Ganguly. 2002. HIgh throughput mutatIon screenIng of the factor VIII gene （F8C） In hemophIlIa A：37 novel mutatIons and genotype−phenotype correlatIon. Hum Mutat 20（4）：267−74参照）。

【0194】

フェニルケトン尿症（ＰＫＵ）を伴う遺伝子に対応する配列を有する標的ポリヌクレオチドが選択されてもよい（たとえば、ProNIna, N., S. GIannattasIo, P. LattanzIo, R. Lugovska, P. Vevere, and A. Kornejeva. 2003. The molecular basIs of phenylketonurIa In LatvIa. Hum Mutat 21（4）：398−9, Sueoka, H., M. Nagao, and S. ChIba. 2000. RapId mutatIon screenIng of phenylketonurIa by polymerase chaIn reactIon−lInked restrIctIon enzyme assay and dIrect sequence of the phenylalanIne hydroxylase gene：clInIcal applIcatIon In northern Japan and northern ChIna. Genet Test4 （3）：249−56, and EIsensmIth, R. C., A. A. Goltsov, and S. L. Woo. 1994. A sImple, rapId, and hIghly InformatIve PCR−base procedure for prenatal dIagnosIs and carrIer screeIng of phenylketonurIa. Prenat DIagn 14（12）：1113−8.）. Alford, R. L., T AshIzawa, J. JankovIc, C. T. Caskey, and C. S. RIchards. 1996. Molecular DetectIon of new mutatIons, resolutIon of ambIguous results and complex genetIc counselIng Issues In HuntIngton dIsease. Am J Med Genet 66（3）：281−6, Vnencak−Jones, C. L. 2003. Fluorescence PCR and Gene Scan analysIs for the detectIon of CAG repeat expansIons assocIated wIth HuntIngton’s dIsease. Methods Mol BIol217：101−8, and Panagopoulos, I., C. Lassen, U. KrIstoffersson, and P. Aman. 1999. A novel PCR−based approach for the detectIon of the HuntIngton dIsease assocIated trInucleotIde repeat expansIon. Hum Mutat 13（3）：232−6参照

）。

【０１９５】

たとえばＣＡＧ反復の増加に起因する、ハンチントン病を伴う遺伝子に対応する配列を有する標的ポリヌクレオチドが選択されてもよい（たとえば、Ａｌｆｏｒｄ，Ｒ．Ｌ．，Ｔ．ＡｓｈＩｚａｗａ，Ｊ．ＪａｎｋｏｖＩｃ，Ｃ．Ｔ．Ｃａｓｋｅｙ，ａｎｄ Ｃ．Ｓ．ＲＩｃｈａｒｄｓ．１９９６．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｎｅｗ ｍｕｔａｔＩｏｎｓ，ｒｅｓｏｌｕｔＩｏｎ ｏｆ ａｍｂＩｇｕｏｕｓ ｒｅｓｕｌｔｓ ａｎｄ ｃｏｍｐｌｅｘ ｇｅｎｅｔＩｃ ｃｏｕｎｓｅｌＩｎｇ Ｉｓｓｕｅｓ Ｉｎ ＨｕｎｔＩｎｇｔｏｎ ｄＩｓｅａｓｅ．Ａｍ Ｊ Ｍｅｄ Ｇｅｎｅｔ ６６（３）：２８１－６，Ｖｎｅｎｃａｋ－Ｊｏｎｅｓ，Ｃ．Ｌ．２００３．Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ＰＣＲ ａｎｄ ＧｅｎｅＳｃａｎ ａｎａｌｙｓＩｓ ｆｏｒ ｄｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ＣＡＧ ｒｅｐｅａｔ ｅｘｐａｎｓＩｏｎｓ ａｓｓｏｃＩａｔｅｄ ｗＩｔｈ ＨｕｎｔＩｎｇｔｏｎ’ｓ ｄＩｓｅａｓｅ．Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ ＢＩｏｌ ２１７：１０１－８，ａｎｄ Ｐａｎａｇｏｐｏｕｌｏｓ，Ｉ．，Ｃ．Ｌａｓｓｅｎ，Ｕ．ＫｒＩｓｔｏｆｆｅｒｓｓｏｎ，ａｎｄ Ｐ．Ａｍａｎ．１９９９．Ａ ｎｏｖｅｌ ＰＣＲ－ｂａｓｅｄ ａｐｐｒｏａｃｈ ｆｏｒ ｔｈｅ ｄｅｔｅｃｔ Ｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ＨｕｎｔＩｎｇｔｏｎ ｄＩｓｅａｓｅ ａｓｓｏｃＩａｔｅｄ ｔｒＩｎｕｃｌｅａｔＩｄｅ ｒｅｐｅａｔ ｅｘｐａｎｓＩｏｎ．Ｈｕｍ Ｍｕｔａｔ １３（３）：２３２－６．参照）。

【０１９６】

血友病を伴う遺伝子に対応する配列を有する標的ポリヌクレオチドが選択されてもよい（たとえば、ＭａｎｎｕｃｃＩ，Ｐ．Ｍ．２００２．Ｈａｍ－ｗａｓｓｅｒｍａｎ ｌｅｃｔｕｒｅ：ｈｅｍｏｐｈＩｌＩａ ａｎｄ ｒｅｌａｔｅｄ ｂｌｅｅｄＩｎｇ ｄＩｓｏｒｄｅｒｓ： ａ ｓｔｏｒｙ ｏｆ ｄＩｓｍａｙ ａｎｄ ｓｕｃｃｅｓｓ．Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ（Ａｍ Ｓｏｃ Ｈｅｍａｔｏｌ Ｅｄｕｃ Ｐｒｏｇｒａｍ）：１－９，ａｎｄ ＣＩｔｒｏｎ，Ｍ．，Ｌ．ＧｏｄｍＩｌｏｗ，Ｔ．Ｇａｎｇｕｌｙ，ａｎｄ Ａ．Ｇａｎｇｕｌｙ．２００２．ＨＩｇｈ ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ｍｕｔａｔＩｏｎ ｓｃｒｅｅｎＩｎｇ ｏｆ ｔｈｅ ｆａｃｔｏｒ ＶＩＩＩ ｇｅｎｅ （Ｆ８Ｃ） Ｉｎ ｈｅｍｏｐｈＩｌＩａ Ａ： ３７ ｎｏｖｅｌ ｍｕｔａｔＩｏｎｓ ａｎｄ ｇｅｎｏｔｙｐｅ－ ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ ｃｏｒｒｅｌａｔＩｏｎ．Ｈｕｍ Ｍｕｔａｔ ２０（４）：２６７－７４．参照）。

【０１９７】

ＴａｙＳａｃｈ病を伴う遺伝子に対応する配列を有する標的ポリヌクレオチドが選択されてもよい（たとえば、ＲＩｃｅ，Ｊ．Ｅ．，Ｊ．Ａ．Ｓａｎｃｈｅｚ，Ｋ．Ｅ．ＰＩｅｒｃｅ，ａｎｄ Ｌ．Ｊ．Ｗａｎｇｈ． ２００２．Ｒｅａｌ－ｔＩｍｅ ＰＣＲ ｗＩｔｈ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｂｅａｃｏｎｓ ｐｒｏｖＩｄｅｓ ａ ｈＩｇｈｌｙ ａｃｃｕｒａｔｅ ａｓｓａｙ ｆｏｒ ｄｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ Ｔａｙ－ Ｓａｃｈｓ ａｌｌｅｌｅｓ Ｉｎ ｓＩｎｇｌｅ ｃｅｌｌｓ．Ｐｒｅｎａｔ ＤＩａｇｎ ２２（１２）：１１３０－４，Ｔａｍａｓｕ，Ｓ．，Ｈ．ＮＩｓｈＩｏ，Ｈ．ＡｙａｋＩ，Ｍ．Ｊ．Ｌｅｅ，Ｍ．ＭＩｚｕｔｏｒＩ，Ｙ．ＴａｋｅｓｈＩｍａ，Ｈ．Ｎａｋａｍｕｒａ，Ｍ．Ｍａｔｓｕｏ，Ｔ．Ｍａｒｕｏ，ａｎｄ Ｋ．ＳｕｍＩｎｏ．１９９９．Ｐｒｅｎａｔａｌ ｄＩａｇｎｏｓＩｓ ｏｆ ａ Ｊａｐａｎｅｓｅ ｆａｍＩｌｙ ａｔ ｒＩｓｋ ｆｏｒ Ｔａｙ－Ｓａｃｈｓ ｄＩｓｅａｓｅ．ＡｐｐｌＩｃａｔＩｏｎ ｏｆ ａ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ ｃｏｍｐｅｔＩｔＩｖｅ ａｌｌｅｌｅ－ｓｐｅｃＩｆＩｃ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａＩｎ ｒｅａｃｔＩｏｎ （ＰＣＲ） ｍｅｔｈｏｄ．Ｋｏｂｅ Ｊ Ｍｅｄ ＳｃＩ ４５（６）：２５９－７０，ａｎｄ Ｓｅｒｍｏｎ，Ｋ．，Ｗ．ＬＩｓｓｅｎｓ，Ｚ．Ｐ．Ｎａｇｙ，Ａ．ＶａｎＳｔｅＩｒｔｅｇｈｅｍ，ａｎｄ Ｉ．ＬＩｅｂａｅｒｓ．１９９５．ＳＩｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ ａｍｐｌ ＩｆＩｃａｔＩｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｔｗｏ ｍｏｓｔ ｆｒｅｑｕｅｎｔ ｍｕｔａｔ Ｉｏｎｓ ｏｆ ＩｎｆａｎｔＩｌｅ Ｔａｙ－Ｓａｃｈｓ ｄＩｓｅａｓｅ Ｉｎ ｓ

Ｉｎｇｌｅ ｂｌａｓｔｏｍｅｒｅｓ．Ｈｕｍ Ｒｅｐｒｏｄ １０（８）：２２１４－７．参照）。

【０１９８】

多発性硬化症（ＭＳ）を伴う遺伝子に対応する配列を有する標的ポリヌクレオチドが選択されてもよい。（たとえば、Ｌａｕｗｅｒｓ，Ｓ．，Ｙ．Ｖａｎｄｅｒ Ｈｅｙｄｅｎ，ａｎｄ Ｂ．Ｒｏｍｂａｕｔ．２００２．ｓｃｒｅｅｎＩｎｇ ａｎｄ ｏｐｔＩｍＩｓａｔＩｏｎ ｏｆ ａｎ ＥＬＩＳＡ ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ ｔｈｅ ｑｕａｎｔＩｔａｔＩｖｅ ｄｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｅｎｔｅｒｏｖＩｒｕｓ ｓｐｅｃＩｆＩｃ ＲＴ－ＰＣＲ ｐｒｏｄｕｃｔｓ ｂｙ ｍｅａｎｓ ｏｆ ａ ｔｗｏ－ｌｅｖｅｌ ｅｘｐｅｒＩｍｅｎｔａｌ ｄｅｓＩｇｎ．Ｊ Ｐｈａｒｍ ＢＩｏｍｅｄ Ａｎａｌ ２９（４）：６５９－６８，Ｐｅｒｒｏｎ，Ｈ．，Ｊ Ａ．Ｇａｒｓｏｎ，Ｆ．ＢｅｄＩｎ，Ｆ．Ｂｅｓｅｍｅ，Ｇ．Ｐａｒａｎｈｏｓ－Ｂａｃｃａｌａ，Ｆ．ＫｏｍｕｒＩａｎ－Ｐｒａｄｅｌ，Ｆ．Ｍａｌｌｅｔ，Ｐ．Ｗ．Ｔｕｋｅ，Ｃ．ＶｏＩｓｓｅｔ，Ｊ．Ｌ．Ｂｌｏｎｄ，Ｂ．Ｌａｌａｎｄｅ，Ｊ．Ｍ．ＳｅＩｇｎｅｕｒＩｎ，ａｎｄ Ｂ．Ｍａｎｄｒａｎｄ．１９９７．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ＩｄｅｎｔＩｆＩｃａｔＩｏｎ ｏｆ ａ ｎｏｖｅｌ ｒｅｔｒｏｖＩｒｕｓ ｒｅｐｅａｔｅｄｌｙ Ｉｓｏｌａｔｅｄ ｆｒｏｍ ｐａｔＩｅｎｔｓ ｗＩｔｈ ｍｕｌｔＩｐｌｅ ｓｃｌｅｒｏｓＩｓ．Ｔｈｅ ＣｏｌｌａｂｏｒａｔＩｖｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｇｒｏｕｐ ｏｎ ＭｕｌｔＩｐｌｅ ＳｃｌｅｒｏｓＩｓ．ＰｒｏｃＮａｔｌ Ａｃａｄ ＳｃＩ Ｕ Ｓ Ａ ９４（１４）：７５８３－８，ａｎｄ Ｋｕｈｎｅ，Ｂ．Ｓ．，ａｎｄ Ｐ．Ｏｓｃｈｍａｎｎ．２００２．ＱｕａｎｔＩｔａｔＩｖｅ ｒｅａｌ－ｔＩｍｅ ＲＴ－ＰＣＲ ｕｓＩｎｇ ｈｙｂｒＩｄＩｚａｔＩｏｎ ｐｒｏｂｅｓ ａｎｄ Ｉｍｐｏｒｔｅｄ ｓｔａｎｄａｒｄ ｃｕｒｖｅｓ ｆｏｒ ｃｙｔｏｋＩｎｅ ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓＩｏｎ ａｎａｌｙｓＩｓ．ＢＩｏｔｅｃｈｎＩｑｕｅｓ３３（５）：１０７８，１０８０－２，１０８４ｐａｓｓＩｍ．参照）。

【０１９９】

バーキットリンパ腫を伴う遺伝子に対応する配列を有する標的ポリヌクレオチドが選択されてもよい（たとえば、Ｗｕ，Ｙ．，Ｙ．Ｃｈｅｎ，Ｊ．Ｘｕ，ａｎｄ Ｌ．Ｌｕ．２００２．ＡｎｔＩｃａｎｃｅｒ ａｃｔＩｖＩｔＩｅｓ ｏｆ ｃｕｒｃｕｍＩｎ ｏｎ ｈｕｍａｎ Ｂｕｒｋｔｔ’ｓ ｌｙｍｐｈｏｍａ．Ｚｈｏｎｇｈｕａ Ｚｈｏｎｇ ＬＩｕ Ｚａ ＺｈＩ ２４（４）：３４８－５２，Ｂａｓｓｏ，Ｋ．，Ｅ．Ｆｒａｓｃｅｌｌａ，Ｌ．Ｚａｎｅｓｃｏ，ａｎｄ Ａ．Ｒｏｓｏｌｅｎ．１９９９．Ｉｍｐｒｏｖｅｄ ｌｏｎｇ－ｄＩｓｔａｎｃｅ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａＩｎ ｒｅａｃｔＩｏｎ ｆｏｒ ｔｈｅ ｄｅｔｅｃＩｏｎ ｏｆ ｔ（８；１４）（ｑ２４；ｑ３２）Ｉｎ ＢｕｒｋＩｔｔ’ｓ ｌｙｍｐｈｏｍａｓ．Ａｍ Ｊ Ｐａｔｈｏｌ １５５（５）：１４７９－８５，ａｎｄ Ａｓａｄａ，Ｍ．，Ｔ．ＭＩｙａｓｈＩｔａ，Ｆ．Ｂｅｓｓｈｏ，Ｎ．ＫｏｂａｙａｓｈＩ，ａｎｄ Ｓ．ＭＩｚｕｔａｎＩ．１９９１．ＭａｌＩｇｎａｎｔ ｃｅｌｌ ｄｅｔｅｃｔＩｏｎ Ｉｎ ＢｕｒｋＩｔｔ’ｓ ｌｙｍｐｈｏｍａ ｕｓＩｎｇ ｔｈＩｒｄ－ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔａｒＩｔｙ－ｄｅｔｅｒｍＩｎＩｎｇ ｒｅｇＩｏｎ（ＣＤＲＩＩＩ），ｃｌｏｎｅ－ｓｐｅｃＩｆＩｃ ｐｒｏｂｅ ｄｅｖｅｌｏｐｅｄ ｂｙ ｓｅｑｕｅｎｃＩｎｇ ＤＮＡ ｆｒｏｍ ｓｔｏｒｅｄ ｓｌＩｄｅｓ．Ｊｐｎ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ８２（７）：８４８－５３参照）。

【０２００】

嚢胞性線維症を伴う遺伝子に対応する配列を有する標的ポリヌクレオチドが選択されてもよい（たとえば、ＴｏｍａＩｕｏｌｏ，Ｒ．，Ｍ．ＳｐＩｎａ，ａｎｄ Ｇ．Ｃａｓｔａｌｄｏ．２００３．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｄＩａｇｎｏｓＩｓ ｏｆ ｃｙｓｔＩｃ ｆＩｂｒｏｓＩｓ：ｃｏｍｐａｒＩｓｏｎ ｏｆ ｆｏｕｒ ａｎａｌｙｔＩｃａｌ ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ．ＣｌＩｎ Ｃｈｅｍ Ｌａｂ Ｍｅｄ ４１（１）：２６－３２，Ｇｏｎｚａｌｅｚ－Ｇｏｎｚａｌｅｚ，Ｍ．Ｃ．，Ｍ．ＧａｒｃＩａ－Ｈｏｙｏｓ，Ｍ．

J. TrujIllo, M. RodrIguez de Alba, I. Lorda-Sanchez, J. DIaz-Recasens, E. Gallardo, C. Ayuso, and C. Ramos. 2002. Prenatal DetectIon of a cystIc fIbrosIs mutatIon In fetal DNA from maternal plasma. Prenat DIagn 22(10):946-8, and Corbetta, C., M. SeIa, A. BassottI, A. AmbrosIonI, A. GIunta, and R. Padoan. 2002. ScreenIng for cystIc fIbrosIs In newborn Infants:results of a pIlot programme based on a two tIer protocol(IRT/DNA/IRT)In the ItalIan populatIon. J Med Screen 9(2):60-3. 参照)。

【0201】

若年性糖尿病を伴う遺伝子に対応する配列を有する標的ポリヌクレオチドが選択されてもよい(たとえば、Knerr, I., R. Repp, J. Dotsch, N. GratzkI, J. Hanze, T. Kapellen, and W. Rascher. 1999. QuantItatIon of gene expressIon by real-tIme PCR dIsproves a "retrovIral hypothesIs"for chIldhood-onset dIabetes mellItus. PedIatr Res 46(1):57-60, Lauwers, S., Y. Vander Heyden, and B. Rombaut. 2002. screenIng and optImIsatIon of an ELISA method for the quantItatIve detectIon of enterovIrous specIfIc RT-PCR products by means of a two-level experImental desIgn. J Pharm BIomed Anal29(4):659-68, and SalmInen, K., K. Sadeharju, M. Lonnrot, P. Vahasalo, A. KupIla, S. Korhonen, J. Ilonen, O. SImell, M. KnIp, and H. Hyoty. 2003. EnterovIrous InfectIons are assocIated wIth the InductIon of beta-cell autoImmunIty In a prospectIve bIrth cohort study. J Med VIrol 69(1):91-8. 参照)。

【0202】

パーキンソン病を伴う遺伝子に対応する配列を有する標的ポリヌクレオチドが選択されてもよい(たとえば、HoenIcka, J., L. VIdal, B. Morales, 1. Ampuero, F. J. JImenez-JImenez, J. BercIano, T. delSer, A. JImenez, P. G. RuIz, and J. G. de Yebenes. 2002. MolecularfIndIngsInfamIlIal ParkInson dIsease In SpaIn. Arch Neurol 59(6):966-70.;LuckIng, C. B., and A. BrIce. 2003. SemIquantItatIve PCR for the detectIonof exon rearrangements In the ParkIn gene. Methods Mol BIol 217:13-26; Le, W. D., P. Xu, J. JankovIc, H. JIang, S. H. Appel, R. G. SmIth, and D. K. VassIlatIs. 2003. MutatIons In NR4A2 assocIated wIth famIlIal ParkInson dIsease. Nat Genet 33(1):85-9.; and Foroud, T., S. K. UnIackeL. LIu, N. Pankratz, A. Rudolph, C. Halter, C. Shults, K. Marder, P. M.

Conneally, and W. C. NIchols. 2003. HeterozygosIty for a mutatIon In the parkIn gene leads to later onset ParkInson dIsease. Neurology 60（5）：796－801参照）。

【0203】

アルツハイマー病を伴う遺伝子に対応する配列を有する標的ポリヌクレオチドが選択されてもよい（たとえば、Maresh, G. A., D. ErezyIlmaz, C. E. Murry, D. NochlIn, and A. D. Snow. 1996. DetectIon and quantItatIon of perlecan mRNA levels In AlzheImer's dIsease and normal aged hIppocampus by competItIve reverse transcrIptIon－polymerase chaIn reactIon. J Neurochem 67（3）：1132－44；and SmIth, M. J., R. J. Gardner, M. A. KnIght, S. M. Forrest, K. Beyreuther, E. Storey, C. A. McLean, R. G. Cotton, R. Cappal, and C. L. Masters. 1999. Early－onset AlzheImer's dIsease caused by a novel mutatIon at codon219of the presenIlIn－1 gene. Neuroreport 10（3）：503－7参照）。

【0204】

血栓症を伴う遺伝子に対応する配列を有する標的ポリヌクレオチドが選択されてもよい（たとえば、Sanders Sevall, J. 2000. Factor V LeIden genotypIng usIng real－tIme fluorescent polymerase chaIn reactIon. Mol Cell Probes 14（4）：249－53；FerreIra－Gonzalez, A., L. M. FIsher, C. M. Lehman, M. H. Langley, D. H. Lofland, Q. XIa, N. X. Nguyen, D. Modesto, J. B. WIlloughby, D. S. WIlkInson, and C. T. Garrett. 1997. DetectIon of a common mutatIon In factor V gene responsIble for resIstance to actIvate proteIn C causIng predIsposItIon to thrombosIs. J ClIn Lab Anal 11（6）：328－35；Warshawsky, I., C. Hren, L. SercIa, B. Shadrach, S. R. DeItcher, E. Newton, and K. Kottke－Marchant. 2002. DetectIon of a novel poInt mutatIon of the prothrombIn gene at posItIon 20209. DIagn Mol Pathol 11（3）：152－6. 参照）。

【0205】

肺結核に対する感受性を伴う遺伝子に対応する配列を有する標的ポリヌクレオチドが選択されてもよい（たとえば、Bellamy R. SusceptIbIlIty to mycobacterIal IfectIons：the Importance of host genetIcs. Genes Immun. 2003 Jan；4（1）：4－11；AwomoyI AA, Marchant A, Howson JM, McAdam KP, Blackwell JM, Newport MJ. InterleukIn－10, polymorphIsm In SLC11A1（formerly NRAMP1）, and susceptIbIlIty to tuberculosIs. J Infect DIs. 2002 Dec 15；186（12）：1808－14. Bellamy R. NRAMP1 and susceptIbIlIty to tuberculosIs. Int J tuberc Lung DI

ｓ．２００２Ｓｅｐ；６（９）：７４７参照）。

【０２０６】

ヒト免疫不全症ウィルス（ＨＩＶ）を伴う遺伝子に対応する配列を有する標的ポリヌクレオチドが選択されてもよい（たとえば、Ｉｆｅｒｇａｎ Ｉ，Ｂｅｒｎａｒｄ ＮＦ，Ｂｒｕｎｅａｕ Ｊ，Ａｌａｒｙ Ｍ，Ｔｓｏｕｋａｓ ＣＭ，Ｒｏｇｅｒ Ｍ．Ａｌｌｅｌｅ ｆｒｅｑｕｅｎｃｙ ｏｆ ｔｈｒｅｅ ｆｕｎｃｔＩｏｎａｌｌｙ ａｃｔＩｖｅ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈＩｓｍｓ ｏｆ ｔｈｅ ＭＤＲ－１ Ｇｅｎｅ Ｉｎ ｈＩｇｈ－ｒＩｓｋ ＨＩＶ－ｎｅｇａｔＩｖｅ ａｎｄ ＨＩＶ－ｐｏｓＩｔＩｖｅ ＣａｕｃａｓＩａｎｓ．ＡＩＤＳ．２００２Ｎｏｖ２２；１６（１７）：２３４０－２；ａｎｄ Ｆａｒｚａｎ Ｍ，ＭＩｒｚａｂｅｋｏｖ Ｔ，ＫｏｌｃｈＩｎｓｋｙＰ，Ｗｙａｔｔ Ｒ，Ｃａｙａｂｙａｂ Ｍ，Ｇｅｒａｒｄ ＮＰ，Ｇｅｒａｒｄ Ｃ，ＳｏｄｒｏｓｋＩ Ｊ，Ｃｈｏｅ Ｈ．ＴｙｒｏｓＩｎｅ ｓｕｌｆａｔＩｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ａｍＩｎｏ ｔｅｒｍＩｎｕｓ ｏｆ ＣＣＲ５ｆａｃＩｌＩｔａｔｅｓ ＨＩＶ－１ ｅｎｔｒｙ．Ｃｅｌｌ．１９９９Ｍａｒ５；９６（５）：６６７－７６参照）。本明細書の方法は、また、遺伝子の存在または遺伝子分析の他の種類における遺伝子の変化した発現のための素早く、感度の高い診断テストを提供する。たとえば、該方法は、実父確定検査あるいは法医学において、または親族または非親族の臓器提供者のマッチングにおいてヒトサンプルの同一性を判定するために使用してもよい。また、ウシの血統を同定するなど、非ヒトサンプルにおいて、診断を行ってもよい。

【０２０７】

Ｇ．性感染症

核酸類似体は性感染症（ＳＴＤ）を起こす病原体のＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列あるいは配列の断片を有するように設計されてもよい。ＰＣＲ系の検出のための臨床的に重要かつ参照となるＳＴＤの例示として、以下のものが挙げられる。核酸類似体は、特異的なＰＣＲプライマー配列の配列を有するように設計されてもよく、これは本明細書に記載する本発明の実施形態の多くにおいて組み合わせて使用することができる。

【０２０８】

一実施形態において、核酸類似体はクラミジアのＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計される。このようなプライマーの多くは業界で公知である（たとえば、Ｋｏｕｍａｎｓ，Ｅ．Ｈ．，Ｃ．Ｍ．Ｂｌａｃｋ，Ｌ．Ｅ．ＭａｒｋｏｗＩｔｚ，Ｅ．Ｕｎｇｅｒ，Ａ．ＰＩｅｒｃｅ，Ｍ．Ｋ．Ｓａｗｙｅｒ，ａｎｄ Ｊ．Ｒ．Ｐａｐｐ．２００３．ＣｏｍｐａｒＩｓｏｎ ｏｆ ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｄｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ＣｈｌａｍｙｄＩａ ｔｒａｃｈｏｍａｔＩｓ ａｎｄ ＮｅＩｓｓｅｒＩａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ ｕｓＩｎｇ ｃｏｍｍｅｒｃＩａｌｌｙ ａｖａＩｌａｂｌｅ ｎｕｃｌｅＩｃ ａｃＩｄ ａｍｐｌＩｆＩｃａｔＩｏｎ ｔｅｓｔ ｓ ａｎｄ ａ ｌＩｑｕＩｄ ｐａｐ ｓｍｅａｒ ｍｅｄＩｕｍ．Ｊ ＣｌＩｎ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ４１（４）：１５０７－１１；ＰｕｏｌａｋｋａＩｎｅｎ，Ｍ．，Ｅ．ＨＩｌｔｕｎｅｎ－Ｂａｃｋ，Ｔ．Ｒｅｕｎａｌａ，Ｓ．Ｓｕｈｏｎｅｎ，Ｐ．ＬａｈｔｅｅｎｍａｋＩ，Ｍ．ＬｅｈｔＩｎｅｎ，ａｎｄ Ｊ．Ｐａａｖｏｎｅｎ．１９９８．ＣｏｍｐａｒＩｓｏｎ ｏｆ ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅｓ ｏｆ ｔｗｏ ｃｏｍｍｅｒｃＩａｌｌｙ ａｖａＩｌａｂｌｅ ｔｅｓｔ，ａ ＰＣＲ ａｓｓａｙ ａｎｄ ａ ｌＩｇａｓｅ ｃｈａＩｎ ｒｅａｃｔＩｏｎ ｔｅｓｔ，Ｉｎ ｄｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｕｒｏｇｅｎＩｔａｌ ＣｈｌａｍｙｄＩａ ｔｒａｃｈｏｍａｔＩｓ ＩｎｆｅｃｔＩｏｎ．Ｊ ＣｌＩｎ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ ３６（６）：１４８９－９３；Ｂｅｔｓｏｕ Ｆ，Ｂｅａｕｍｏｎｔ Ｋ，Ｓｕｅｕｒ ＪＭ，ＯｒｆＩｌａ Ｊ．ＣｏｎｓｔｒｕｃｔＩｏｎ ａｎｄ ｅｖａｌｕａｔＩｏｎ ｏｆ Ｉｎｔｅｒｎａｌ ｃｏｎｔｒｏｌ ＤＮＡ ｆｏｒ ＰＣＲ ａｍｐｌＩｆＩｃａｔＩｏｎ ｏｆ ＣｈｌａｍｙｄＩａ ｔｒａｃｈｏｍａｔＩｓ ＤＮＡ ｆｒｏｍ ｕｒＩｎｅ ｓａｍｐｌｅｓ．Ｊ ＣｌＩｎ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ．２００３Ｍａｒ；４１（３）：１２７４－６；Ｋｎｏｘ Ｊ，

TabrIzI SN, MIller P, Petoumenos K, Law M, Chen S, Garland SM. EvaluatIon of self-collected samples In contrast to practItIoner-collected samples fordetectIon of ChlamydIa trachomatIs, NeIsserIa gonorrhoeae, and TrIchomonas vagInalIs by polymerase chaIn reactIon among women lIvIng In remote areas. Sex Transm DIs. 2002 Nov;29(11):647-54;MygInd T, BIrkelund S, BIrlcebaek N, Oestergaard L, Jensen J, ChrIstIansen G. DetermInatIon of PCR effIcIency In chelex-100 purIfIed clInIcal samples and comparIson of real-tIme quantItatIve PCR and conventIonal PCR for detectIon of ChlamydIa pneumonIae. BMC MIcrobIol. 2002Jul9;2(1):17参照)。

【0209】

他の実施形態では、核酸類似体は、トレポネーマーパリダムのPCR系検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計され、トレポネーマーパリダムのPCR系検出のために使用されるプライマーの配列を有する。トレポネーマーパリダムを同定するために使用されるプライマーの例は業界で公知である(たとえば、CenturIon-Lara, A., C. Castro, J. M. Shaffer, W. C. Van VoorhIs, C. M. Marra, and S. A. Lukehart. 1997. DetectIon of Treponema pallIdum by a sensItIve reverse transcrIptase PCR. J ClIn MIcrobIol35(6):1348-52;MartIn, A. A., H. LIu, M. Y. Sutton, B. SteIner, A. PIllay, and L. E. MarkowItz. 2001. amplIfIcatIon of the DNA polymerase I gene of Treponema pallIdum from whole blood of persons wIth syphIlIs. DIagn MIcrobIol Infect DIs40(4):163-6;Orton, S. L., H. LIu, R. Y. Dodd, and A. E. WIllIams. 2002. Prevalence of cIrculatIng Treponema pallIdum DNA and RNA In blood donors wIth confIrmed-posItIve syphIlIs テストs. TransfusIon42(1):94-9. 参照)。

【0210】

他の実施形態では、核酸類似体は、HIVのPCR系検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計される。PCR系分析によってHIVを同定するために使用されるプライマーの例は業界で公知である(たとえば、GIbney, L., M. Macaluso, K. KIrk, M. S. Hassan, J. Schwebe, S. H. Vermund, and P. Choudhury. 2001. Prevalence of InfectIous dIseases In BangladeshI women lIvIng adjacent to a truck stand:HIV/STD/hepatItIs/genItal tract InfectIons. Sex Transm Infect77(5):344-50;SpInIllo, A., M. DebIaggI, F. Zara, R. MaseratI, F. PolattI, and A. De Santolo. 2001. Factors assocIated wIth nucleIc acIds related to human ImmunodefIcIency vIrustype 1 In cervIco-vagI

nal secretIons. Bjog108（6）：634－41参照）。

【0211】

他の実施形態では、核酸類似体は、ヒトパピローマウィルスのＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計される。ＰＣＲ系分析によってＨＩＶを同定するために使用されるプライマーの例は業界で公知である（たとえば、WIner, R. L., S. K. Lee, J. P. Hughes, D. E. Adam, N. B. KIvIat, and L. A. Koutsky. 2003. GenItal human papIllomavIrus InfectIon: IncIdence and rIsk factors In a cohort of female unIversIty students. Am J EpIdemIol 157（3）：218－26；LevI, J. E., B. Kleter, W. G. QuInt, M. C. FInk, C. L. Canto, R. Matsubara, 1. LInhares, A. Segurado, B. Vanderborght, J. E. Neto, and L. J. Van Doorn. 2002. HIgh prevalence of human papIllomavIrus（HPV）InfectIons and hIgh frequency of multIple HPV genotypes In human ImmunodefIcIency vIrus－Infected women In BrazIl. J ClIn MIcrobIol 40（9）：3341－5；Skerlev, M., M. Grce, M. SIrotkovIae－SlcerIev, K. Husnjak, and J. LIpozencIc. 2002. Human papIllomavIrus male genItal InfectIons：clInIcal varIatIons and the sIgnIfIcance of DNA typIng. ClIn Dermatol20（2）：173－8参照）。

【0212】

他の実施形態では、核酸類似体は、ナイセリアーゴノレエのＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計される。ＰＣＲ系分析によってナイセリアーゴノレエを同定するために使用されるプライマーの例は業界で公知である（たとえば、Mgone, C. S., T. LupIwa, and W. Yeka. 2002. HIgh prevalence of NeIsserIa gonorrhoeae and multIple sexually transmItted dIsease s among rural women In the Eastern HIghlands ProvInce of Papua New GuInea, detected by polymerase chaIn reactIon. Sex Transm DIs29（12）：775－9；Gomes, J. P., L. TavIra, F. Exposto, E. PrIeto, and M. A. Catry. 2001. NeIsserIa gonorrhoeae and ChlamydIa trachomatIs InflactIons In patIents attendIng STD and famIly plannIng clInIcs In BIssau, GuInea－BIssau. Acta Trop80（3）：261－4；DIemert, D. J., M. D. LIbman, and P. Lebel. 2002. ConfIrmatIon by 16S rRNA PCR of the COBAS AMPLICOR CT／NG test for dIagnosIs of NeIsserIa gonorrhoeae InfectIon In a low－prevalence populatIon. J ClIn MIcrobIol 40（11）：4056－9参照）。

【0213】

他の実施形態では、核酸類似体は、陰部ヘルペスのＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計される。ＰＣＲ系分析によって陰部ヘルペスを同定するために使用されるプライマーの例は業界で公知である（たとえば、Wolff, M. H., J. SchmItt, M. Rahaus, H. Dudda, and W. Hatzm

ann. 2002. ClInIcal andsubclInIcal reactIvatIon of genItal herpes vIrus. IntervIrology 45（1）：20－3；Wald, A. 2002. TestIng for genItal herpes：how, who, and why. Curr ClIn Top Infect DIs22：166－80；Scoular, A. 2002. UsIng the evIdence base on genItal herpes：optImIsIng the use of dIagnostIc tests and InformaIon provIsIon. Sex Transm Infect 78（3）：160－5参照）。

【0214】

また、核酸類似体は、トリコモナスバギナリスのＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計されてもよい。ＰＣＲ系分析によってトリコモナスバギナリスを同定するために使用されるプライマーの例は業界で公知である（たとえば、Wendel, K. A., E. J. ErbeldIng, C. A. Gaydos, and A. M. Rompalo. 2002. TrIchomonas vagInalIs polymerase chaIn reactIon compared wIth standard dIagnostIc and therapeutIc protocols for detectIon and treatment of vagInal trIchomonIasIs. ClIn Infect DIs 35（5）：576－80；Wendel, K. A., E. J. ErbeldIng, C. A. Gaydos, and A. M. Rompalo. 2003. Use of urIne polymerase chaIn reactIon to defIne the prevalence and clInIcal presentatIon of TrIchomonas vagInalIs In men attendIng an STD clInIc. Sex Transm Infect 79（2）：151－153参照）。

【0215】

最後に、核酸類似体は、遺伝的な性感染症を検出するように設計されてもよい。ＰＣＲ系分析によって遺伝的な性感染症を同定するために使用されるプライマーの例は業界で公知である（たとえば、MItranI－Rosenbaum, S., R. TsvIelI, O. LavIe, R. Boldes, E. Anteby, S. ShImonovItch, T. LazarovItch, and A. FrIedmann. 1994. SImultaneous DetectIon of three common sexually transmItted agents by polymerase chaIn reactIon. Am J ObstetGynecol 171（3）：784－90参照）。

【0216】

H. 抗生物質に対する耐性

該方法、組成物および分析システムを、抗生物質に対する耐性を付与する遺伝子の発現における存在または変化を検出するために使用してもよい。標的ポリヌクレオチドは、抗生物質に対する耐性を病原体に付与する遺伝子に対応してもよい。あるいは、標的ポリヌクレオチドは、抗生物質の有効性に影響を及ぼす改変された代謝を有する宿主における遺伝子に対応してもよい。

【0217】

抗生物質に耐性を示す遺伝子の例として、以下のものを見つけることができる。ここでは例が挙げられるが、これらの例示に限定されるものではない。β－ラクタマーゼなどをエンコードする遺伝子は、ペニシリン、エリスロマイシン、セフォタキシム、アンピシリン、ピペラシリン、セフォペラゾーン、セフタジジム、セフェピム、モキサラクタム、イミペナムなど（これらに限定されない）、抗生物質に対する耐性を示す（たとえば、LIvermore, D. M. 1995. b－Lactamases In Laborat

ory and ClInIcal ResIstance. ClIn. MIcrobIol. RevIews. 8：557－584.，Hsueh, P.，Teng, L.，Lee, L.，Yang, P.，Ho, S.，and Luh, K, 1999. DIssemInatIon of HIgh－Level PenIcIllIn－, Extended－Spectrum CephalosporIn－, and ErythromycIn－ResIstant Streptococcus pneumonIae Clones In TaIwan. J. ClIn. MIcrobIol. 37：221－224.，Setchanova, L.，and Tomasz, A. 1999. Molecular CharacterIzatIon of PenIcIllIn－ResIstant Streptococcus pneumonIae Isolates from BulgarIa. J. ClIn. MIcrobIol. 37：638－648.，WIchelhaus, T. A.，Kern, S.，Schfer, V.，Brade, V. 1999. RapId DetectIon of EpIdemIc StraIns of MethIcIllIn－ResIstant Staphylococcus aureus. J. ClIn. MIcrobIol. 37：690－693.，and Jacoby G. A. 1994. GenetIc s of Extended－Spectrum Beta－Lactamases. Eur. J. ClIn. MIcrobIol. Infect. DIs. 13：suppl. 1：2－11参照）。

【0218】

遺伝子を付与する抗生物質の他の実施例として、シプロフロキサシン、オフロキサシン、ノルフロキサシン、エノキサシン、スパルフロキサシンのような、抗生物質に対する耐性を示すキノロン類耐性遺伝子が挙げられる（たとえば、MargerrIson, E. E. C.，Hopewell, R.，and FIsher, L. M. 1992. NucleotIde Sequence of the Staphylococcus aureus gyrB－gyrA Locus EncodIng the DNA Gyrase A and B ProteIns. J. BacterIol. 174：1596－1603.，McWhInney, P. H. M.，Patel, S.，WhIley, R. A.，HardIe, J. M.，GIllespIe, S. H.，and KIbbler, C. C. 1993. ActIvItIes of PotentIal TherapeutIc and ProphylactIc AntIbIotIcs agaInst Blood Culture Isolates of VIrIdans Group StreptococcI from NeutropenIc PatIents ReceIvIng CIprofloxacIn. AntImIcrob. Agents. Chemother. 37：2493－2495.，and YoshIda, H.，BogakI, M.，Nakamura, S.，Ubukata, K.，andKonno, M. 1990. NucleotIdes Sequence and CharacterIzatIon of the Staphylococcus aureus norA Gene, WhIch Confers ResIstance to QuInolones. J. BacterIol. 172：6942－6949参照）。

【0219】

抗生物質耐性遺伝子のさらなる例として、バンコマイシンおよびテイコプラニン（たとえば、Tremlett, C. H.，Brown, D. F. J, and Woodford, N. 1999. VarIatIon In Structure and LocatIon of VanA GlycopeptIde ResIstance Elements among EnterococcI from a SIngle PatIent. J. ClIn. MIcrobIol. 37：818－820.，and Arthur, M.，DepardIeu, F.，MolInas, C.，Reynolds, P.，and CourvalIn, P. 1995. The vanZ gene

of Tnl546from Enterococcus faecIum BM4147confers resIstance to teIcoplanIn. Gene, 154（1995）87－92. 参照）のような、トブラマイシン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、カナマイシン、アミカシンのような抗生物質に耐性を示すアミノグリコシド耐性遺伝子（GalImand M., Lambert, T., Gerbaud, G., and CourvalIn, P. 1993. CharacterIzatIon of the aac（6'）－Ib gene EncodIng an AmInoglycosIde 6'－N－Acetyltransferase In Pseudomonas aerugInosa BM2656. AntImIcrob. Agents. Chemother. 37：1456－1462., Lambert, T., Gerbaud, G., and CourvalIn, P. 1994. CharacterIzatIonof Transposon Tnl528, WhIch Confers AmIkacIn ResIstance by SynthesIs of AmInoglycosIde 3'－O－Phosphotransferase Type VI. AntImIcrob. Agents. Chemother. 38：702－706, and Shaw, K. J., Munayyer, H., Rather, P. N., Hare, R. S., and MIller, G. H. 1993. NucleotIde Sequence AnalysIs and DNA HybrIdIzatIon StudIes of the ant（4'）－IIa Gene from Pseudomonas aerugInosa. AntImIcrob. Agents. Chemother. 37：708－714参照）のような、抗生物質に耐性を示す、グリコペプチド耐性遺伝子が挙げられる。

【0220】

重大な関連のある耐性の特別のタイプが見られる場合もある。これらには、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌が含まれる（たとえば、Ito, T., K. Okuma, X. X. Ma, H. Yuzawa, and K. HIramatsu. 2003. InsIghts on antIbIotIc resIstance of Staphylococcus aureus from Its whole genome：genomIc Island SCC. Drug ResIst Update6（1）：41－52, Kuroda, M., T. Ohta, I. UchIyama, T. Baba, H. Yuzawa, 1. KobayashI, L. CuI, A. OguchI, K. AokI, Y. NagaI, J. LIan, T. Ito, M. KanamorI, H. Matsumaru, A Maruyama, H. MurakamI, A. Hosoyama, Y. MIzutanI－UI, N. K. TakahashI, T. Sawano, R. Inoue, C. KaIto, K. SekImIzu, H. HIrakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. YabuzakI, M. KanehIsa, A. YamashIta, K. OshIma, K. Furuya, C. YoshIno, T. ShIba, M. HattorI, N. Ogasawara, H. HayashI, and K. HIramatsu. 2001. Whole genome sequencIng of metIcIllIn－resIstant Staphylococcus aureus. Lancet357（9264）：1225－40, and Skurray, R. A., and N. FIrth. 1997. Molecular evolutIon of multIply－antIbIotIc－resIstant staphylococcI. CIba Found Symp207：167－83'参照）。

【0221】

検出される、抗生物質に対する耐性を付与する、他の遺伝子として、肺結核抗生物質耐性遺伝子が挙げられる（たとえば、Mokrousov, I., T. Otten, M. FIlIpenko, A. Vyazovaya, E. Chrapov, E. LImeschenko, L. Steldova, B. VyshnevskIy, and O. arvskaya. 2002. DetectIon of IsonIazId－resIsta

nt MycobacterIum tuberculosIs straIn s by a multIplex allele−specIfIc PCR assay targetIng katG codon315varIatIon. J ClIn MIcrobIol 40（7）：2509−12；Gong, G., H. Lee, G. H. Kang, Y. H. ShIm, J. Huh, and S. K. Khang. 2002. Nested PCR for dIagnosIs of tuberculous lymphadenItIs and PCR−SSCP for IdentIfIcatIon of rIfampIcIn resIstance In fIne−needle aspIrates. DIagn Cytopathol 26（4）：228−31；GarcIa de VIedma, D., M. del Sol DIaz Infantes, F. Lasala, F. Chaves, L. Alcala, and E. Bouza. 2002. New real−tIme PCR able to detect In a sIngle tube multIple rIfampIn resIstance mutatIons and hIgh−level IsonIazId resIstance mutatIons In MycobacterIum tube rculosIs. J ClIn MIcrobIol 40（3）：988−95）。

【0222】

Ｉ．薬物応答素因のための遺伝子のスクリーニング

該方法、組成物および分析システムは、素因を薬物応答に対して付与する遺伝子を検出するために使用されてもよい。標的ポリヌクレオチドは、薬物に対する素因を付与するポリヌクレオチドの如何なるものにも対応してよい。標的ポリヌクレオチドは、心血管系に影響する薬物に対する素因に関係する配列に対応してもよい（たとえば、Dudley, C., B. Keavney, B. CasadeI, J. Conway, R. BIrd, and P. RatclIffe. 1996. PredIctIon of patIent responses to antIhypertensIve drugs usIng genetIc polymorphIsms：InvestIgatIon of renIn−angIotensIn system genes. J Hypertens 14（2）：259−62；LIma, P. R., J. A. GontIjo, J. B. Lopes de FarIa, F. F. Costa, and S. T. Saad. 1997. Band3CampInas：a novel splIcIng mutatIon In the band3gene（AE1）assocIated wIth heredItary spherocytosIs, hyperactIvIty of Na+／LI+countertransport and an abnormal renal bIcarbonate handlIng. Blood 90（7）：2810−8；Sakaeda, T., T. Nalcamura, M. HorInouchI, M. Kakumoto, N. Ohmoto, T. SakaI, Y. MorIta, T. Tamura, N. Aoyama, M. HIraI, M. Kasuga, and K. Olcumura. 2001. MDR1 genotype−related pharmacokInetIcs of dIgoxIn after sIngle oral admInIstratIon In healthy Japanese subjects. Pharm Res 18（10）：1400−4. 参照）。また、標的ポリヌクレオチドは、遺伝子および固体の精神病薬物に対する素因に関係がある他のポリヌクレオチド配列に対応してもよい（たとえば、NIkoloff, D., J. C. ShIm, M. FaIrchIld, N. Patten, B. A. FIjal, W. H. Koch, A. MacPherson, D. Flockhart, Y. R. Yoon, J. S. Yoon, Y. H. KIm, and J. G. ShIn. 2002. AssocIatIon between CYP2D6 genotype and tardIve dyskInesIa In Korean schIzophrenIcs. PharmacogenomIcs J2（6）：400−7；BertIls

son, L., M. L. Dahl, and G. TybrIng. 1997. PharmacogenetIcs of antIdepressants:clInIcal aspects. ActaPsychIatr Scand Suppl391:14-21.;Chen, S., W. H. Chou, R. A. BlouIn, Z. Mao, L. L. HumphrIes, Q. C. Meek, J. R. NeIll, W. L. MartIn, L. R. Hays, and P. J. Wedlund. 1996. The cytochrome P4502D6(CYP2D6)enzyme polymorphIsm: screenIng costs and Influence on clInIcal outcomes In psychIatry. ClIn Pharmacol Ther60(5):522-34参照)。また、標的ポリヌクレオチドは、鎮痛剤に応答する素因に対応する遺伝子配列または他のポリヌクレオチド配列に対応してもよい(たとえば、Torres-Galvan, M. J., N. Ortega, F. Sanchez-GarcIa, C. Blanco, T. CarrIllo, andJ. Q uIralte. 2001. LTC4-synthase A-444C polymorphIsm:lack of assocIatIon wIth NSAID-Induced Isolated perIorbItal angIoedema In a SpanIsh populatIon. Ann Allergy Asthma Immunol87(6):506-10.参照)。

【0223】

J. 効果的な薬物応答に係わりのある遺伝子

本発明の方法、組成物および分析は、薬剤投与に対する反応の潜在的な兆候を知るために使用される遺伝子テストで使用されてもよい。該方法、組成物および分析は、現在、治療が有効に行われているかどうか、あるいは耐性(あるいは忍容性)が増強してゆくか否かを判定するために使用されてもよい。遺伝子発現テストは、腫瘍ができつつあるか、あるいは将来できるか、または治療に対して耐性があるかどうかを判定するために使用することができる。また、遺伝子系診断テストには、病気の進行または将来の疾患の可能性を事前スクリーニングすること、あるタイプの癌の遺伝的素因を事前スクリーニングすること、遺伝的ポリモルフィズムを同定することも含まれる。

【0224】

核酸類似体は、特異的な遺伝子の存在および発現を検出するように設計されてもよい。1つの態様では、該方法は、関係がある薬物を代謝できる酵素の発現レベルを測定するために使用されてもよい。多型性酵素は、薬物の効果を変え、それにより治療として使用される薬物の能力を変える。関連薬物の応答に影響し、それにより治療として使用されるべき薬物効果に影響する遺伝子中の遺伝的ポリモルフィズムを検出してもよい。

【0225】

一実施形態では、核酸類似体は、シトクロームCYP2D6をエンコードする配列あるいは配列の断片を検出するように設計される。シトクロームCYP2D6は、抗高血圧における治療に使用されるデブリソキンを代謝することができる。CYP2D6の発現の上昇は、デブリソキンに対し耐性を示す(たとえば、Mahgoub, A., J. R. Idle, L. G. DrIng, R. Lancaster, and R. L. SmIth. 1977. PolymorphIc hydroxylatIon of DebrIsoquIne In man. Lancet2(8038):584-6;and Wennerholm, A., I. Johansson, A. Y. Massele, M. Lande, C. Alm, Y. Aden-AbdI, M. L. Dahl, M. Ingelman-Sundberg, L. BertIlsson, and L. L. Gustafsson. 1999. Decreased capacIty for debrIsoquIne metabolIsm among black TanzanIans:analyses of the CYP2D6 genotype and phenotype. PharmacogenetIcs9(6):707-14参照)。

【0226】

シトクロームＣＹＰ２Ｄ６の存在または発現は、術後痛の治療のために使用されるスパルテインに対する耐性を測定するために使用される（たとえば、ＥＩｃｈｅｌｂａｕｍ，Ｍ．，Ｎ．Ｓｐａｎｎｂｒｕｃｋｅｒ，Ｂ．ＳｔｅＩｎｃｋｅ，ａｎｄ Ｈ．Ｊ．Ｄｅｎｇｌｅｒ．１９７９．ＤｅｆｅｃｔＩｖｅ Ｎ－ｏｘＩｄａｔＩｏｎ ｏｆ ｓｐａｒｔｅＩｎｅ Ｉｎ ｍａｎ：ａ ｎｅｗ ｐｈａｒｍａｃｏｂｅｎｅｔＩｃ ｄｅｆｅｃｔ．Ｅｕｒ Ｊ ＣｌＩｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ １６（３）：１８３－７；Ｂｒｏｌｙ，Ｆ．，Ｄ．Ｍａｒｅｚ，Ｎ．Ｓａｂｂａｇｈ，Ｍ．Ｌｅｇｒａｎｄ，Ｓ．ＭＩｌｌｅｃａｍｐｓ，Ｊ．Ｍ．Ｌｏ ＧｕＩｄＩｃｅ，Ｐ．Ｂｏｏｎｅ，ａｎｄ Ｕ．Ａ．Ｍｅｙｅｒ．１９９５．Ａｎ ｅｆｆＩｃＩｅｎｔ ｓｔｒａｔｅｇｙ ｆｏｒ ｄｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｋｎｏｗｎ ａｎｄ ｎｅｗ ｍｕｔａｔＩｏｎｓ ｏｆ ｔｈｅ ＣＹＰ２Ｄ６ ｇｅｎｅ ｕｓＩｎｇ ｓＩｎｇｌｅ ｓｔｒａｎｄ ｃｏｎ形式Ｉｏｎ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈＩｓｍ ａｎａｌｙｓＩｓ．ＰｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔＩｃ ｓ ５（６）：３７３－８４参照）。

【０２２７】

シトクロームＣＹＰ２Ｄ６の存在または発現は、鬱症状または心血管疾患に使用されるノルトリプチリンに対する耐性を測定するために使用されてもよい（たとえば、Ｄａｌｅｎ，Ｐ．，Ｍ．Ｌ．Ｄａｈｌ，Ｍ．Ｌ．ＲｕＩｚ，Ｊ．ＮｏｒｄＩｎ，ａｎｄ Ｌ．ＢｅｒｔＩｌｓｓｏｎ．１９９８．１０－ＨｙｄｒｏｘｙｌａｔＩｏｎ ｏｆ ｎｏｒｔｒＩｐｔｙｌＩｎｅ Ｉｎ ｗｈＩｔｅ ｐｅｒｓｏｎｓ ｗＩｔｈ ０，１，２，３，ａｎｄ １３ ｆｕｎｃｔＩｏｎａｌ ＣＹＰ２Ｄ６ ｇｅｎｅ ｓ．ＣｌＩｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｈｅｒ ６３（４）：４４４－５２；Ｙｕｅ，Ｑ．Ｙ．，Ｚ．Ｈ．Ｚｈｏｎｇ，Ｇ．ＴｙｂｒＩｎｇ，Ｐ．Ｄａｌｅｎ，Ｍ．Ｌ．Ｄａｈｌ，Ｌ．ＢｅｒｔＩｌｓｓｏｎ，ａｎｄ Ｆ．ＳｊｏｑｖＩｓｔ．１９９８．ＰｈａｒｍａｃｏｋＩｎｅｔＩｃｓ ｏｆｎｏｒｔｒＩｐｔｙｌＩｎｅ ａｎｄ Ｉｔｓ １０－ｈｙｄｒｏｘｙ ｍｅｔａｂｏｌＩｔｅ Ｉｎ ＣｈＩｎｅｓｅ ｓｕｂｊｅｃｔｓ ｏｆ ｄＩｆｆｅｒｅｎｔ ＣＹＰ２Ｄ６ ｇｅｎｏｔｙｐｅｓ．ＣｌＩｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｈｅｒ ６４（４）：３８４－９０参照）。

【０２２８】

シトクロームＰ４５９の存在または発現は、コデイン代謝変化を測定するために使用されてもよい（たとえば、ＳＩｎｄｒｕｐ，Ｓ．Ｈ．，ａｎｄ Ｋ．Ｂｒｏｓｅｎ．１９９５．Ｔｈｅ ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔＩｃｓ ｏｆ ｃｏｄｅＩｎｅ ｈｙｐｏａｌｇｅｓＩａ．ＰｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔＩｃｓ ５（６）：３３５－４６；ＭｏｒｔＩｍｅｒ，Ｏ．，Ｋ．Ｐｅｒｓｓｏｎ，Ｍ．Ｇ．Ｌａｄｏｎａ，Ｄ．ＳｐａｌｄＩｎｇ，Ｕ．Ｍ．Ｚａｎｇｅｒ，Ｕ．Ａ．Ｍｅｙｅｒ，ａｎｄ Ａ．Ｒａｎｅ．１９９０．ＰｏｌｙｍｏｒｐｈＩｃ ｆｏｒｍａｔＩｏｎ ｏｆ ｍｏｒｐｈＩｎｅ ｆｒｏｍ ｃｏｄｅＩｎｅ Ｉｎ ｐｏｏｒ ａｎｄ ｅｘｔｅｎｓＩｖｅ ｍｅｔａｂｏｌＩｚｅｒｓ ｏｆ ｄｅｘｔｒｏｍｅｔｈｏｒｐｈａｎ：ｒｅｌａｔＩｏｎｓｈＩｐ ｔｏ ｔｈｅ ｐｒｅｓｅｎｃｅ ｏｆ ＩｍｍｕｎｏＩｄｅｎｔＩｆＩｅｄ ｃｙｔｏｃｈｒｏｍｅＰ－４５０ＩＩＤ１．ＣｌＩｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｈｅｒ４７（１）：２７－３５参照）。

【０２２９】

他の実施形態では、核酸類似体は、シトクロームＣＹＰ２Ｃ９をエンコードする配列あるいは配列の断片を検出するように設計される。シトクロームＣＹＰ２Ｃ９は、抗凝血剤として使用されるワーファリンを代謝することができる（たとえば、ＡＩｔｈａｌ，Ｇ．Ｐ．，Ｃ．Ｐ．Ｄａｙ，Ｐ．Ｊ．Ｋｅｓｔｅｖｅｎ，ａｎｄ Ａ．Ｋ．Ｄａｌｙ．１９９９．ＡｓｓｏｃＩａｔＩｏｎ ｏｆ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈＩｓｍｓ Ｉｎ ｔｈｅ ｃｙｔｏｃｈｒｏｍｅ Ｐ４５０ ＣＹＰ２Ｃ９ ｗＩｔｈ ｗａｒｆａｒＩｎ ｄｏｓｅ ｒｅｑｕＩｒｅｍｅｎｔ ａｎｄ ｒＩｓｋ ｏｆ ｂｌｅｅｄＩｎｇ ｃｏｍｐｌＩｃａｔＩｏｎｓ．Ｌａｎｃｅｔ３５３（９１５４）：７１７－９；ＬｏｅｂｓｔｅＩｎ，Ｒ．，Ｈ．Ｙｏｎａｔｈ，Ｄ．Ｐｅｌｅｇ，Ｓ．Ａｌｍｏｇ，Ｍ．Ｒｏｔｅｎｂｅｒｇ，Ａ

. Lubetsky, J. RoItelman, D. Harats, H. HalkIn, and D. Ezra. 2001. InterIndIvIdual varIabIlIty In sensItIvIty to warfarIn--Nature or nurture?ClIn Pharmacol Ther 70(2):159-64参照)。

【0230】

また、シトクロームCYP2C9は、脳損傷を治療するために使用されるフェニトインを代謝することができる。(たとえば、van der WeIde, J., L. S. SteIjns, M. J. van Weelden, and K. de Haan. 2001. The effect of genetIc polymorphIsm of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoIn dose requIrement. PharmacogenetIcs 11(4):287-91;Brandolese, R., M. G. Scordo, E. SpIna, M. Gusella, and R. PadrInI. 2001. Severe phenytoIn IntoxIcatIon In a subject homozygous for CYP2C9*3. ClIn Pharmacol Ther70(4):391-4参照)。

【0231】

さらに、シトクロームCYP2C19は、発明者が酸逆流病を治療するために用いたオメプラゾールを代謝することができる(たとえば、see, e. g., BalIan, J. D., N. Sukhova, J. W. HarrIs, J. Hewett, L. PIckle, J. A. GoldsteIn, R. L. Woosley, and D. A. Flockhart. 1995. The hydroxylatIon of omeprazole correlates wIth S-mephenytoIn metabolIsm:a populatIon study. ClInPharmacol Ther 57(6):662-9;TybrIng, G., Y. BottIger, J. WIden, and L. BertIlsson. 1997. EnantIoselectIve hydroxylatIon of omeprazole catalyzed byCYP2C19 In SwedIsh whIte subject s. ClIn Pharmacol Ther62(2):129-37参照)。

【0232】

別の実施形態では、核酸類似体は、ジヒドロピリミジン脱水素酵素をエンコードする配列あるいは配列の断片を検出するように設計される。ジヒドロピリミジン脱水素酵素は、抗腫瘍性の病気の治療(種々の癌の治療)に使用されるフルオロウラシルを代謝することができる(たとえば、Tuchman, M., J. S. Stoeckeler, D. T. KIang, R. F. O'Dea, M. L. RamnaraIne, and B. L. MIrkIn. 1985. FamIlIal pyrImIdInemIa and pyrImIdInurIa assocIated wIth severe fluorouracIl toxIcIty. N Engl J Med 313(4):245-9;DIasIo, R. B., T. L. Beavers, and J. T. Carpenter. 1988. FamIlIal defIcIency of dIhydropyrImIdIne dehydrogenase. BIochemIcal basIs for famIlIal pyrImIdInemIa and severe5-fluorouracIl-Induced toxIcIty. J ClIn Invest81(1):47-51参照)。

【0233】

核酸類似体は、ブチリルコリンエステラーゼをエンコードする配列あるいは配列の断片を検出するように設計されてもよい。ブチリルコリンエステラーゼは、筋肉弛緩剤として使用されるサクシニールコリンを代謝することができる(たとえば、LockrIdge, O. 1990. GenetIc varIants of human serum

cholInesterase Influence metabolIsm of the muscle relaxantsuccInylcholIne. Pharmacol Ther47（1）：35－60；and Ceppa, F., S. GIdenne, A. BenoIs, E. Fontan, and P. Burnat. 2002. RapId IdentIfIcatIon of atypIcal varIant of plasma butyrylcholInesterase by PCR. ClIn Chem Lab Med 40（8）：799－801参照）。

【0234】

また、核酸類似体は、Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ２をエンコードする配列あるいは配列の断片を検出するように設計されてもよい。Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ２は、肺結核を治療するために使用されるイソニアジドを代謝することができる（たとえば、Furet, Y., Y. Bechtel, C. Le Guellec, P. R. Bechtel, E. Autret－Leca, and G. PaIntaud. 2002. ClInIcal relevance of N－acetyltransferase type 2（NAT2）genetIc polymorphIsm, TherapIe57（5）：427－31；KIta, T., Y. TanIgawara, S. ChIkazawa, H. Hatanaka, T. Sakaeda, F. Komada, S. Iwakawa, and K. Okumura. 2001. N－Acetyltransferase2 genotype correlated wIth IsonIazId acetylatIon In Japanese tuberculous patIents. BIol Pharm Bull 24（5）：544－9；and HIratsuka, M. 2002. Development of sImplIfIed and rapId detectIon assay for genetIc polymorphIsms InfluencIng drug response and Its clInIcal applIcatIons. Yakugaku ZasshI 122（7）：451－63参照）。

【0235】

また、Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ２は、抗高血圧症の治療のために使用されるヒドララジンを代謝することができる（たとえば、TImbrell, J. A., S. J. Harland, and V. FacchInI. 1980. PolymorphIc acetylatIonof hydralazIne. ClIn Pharmacol Ther 28（3）：350－5； and ZschIeschang, P., F. HIepe, E. GromnIca－Ihle, 1. Roots, and I. CascorbI. 2002. Lack of assocIatIon between arylamIne N－acetyltransferase 2（NAT2）polymorphIsm and systemIc lupus erythematosus. PharmacogenetIcs12（7）：559－63参照）。

【0236】

Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ２は、抗不整脈の治療に用いられるプロカインアミドを代謝することができる（たとえば、ReIdenberg, M. M., D. E. Drayer, M. Levy, and H. Warner. 1975. PolymorphIc acetylatIon procaInamIde In man. ClIn Pharmacol Ther 17（6）：722－30；and HIckman, D., J. R. Palamanda, J. D. Unadlcat, and E. SIm. 1995. Enzyme kInetIc propertIes of human recombInant arylamIne N－ acetyltransferase 2 allotypIc varIants expressed In EscherIchIa colI. BIochem Pharmacol 50（5）：697－703参照）。

【０２３７】
他の態様で、核酸類似体は、ウリジン二リン酸－グルクロノシルトランスフェラーゼ１Ａ１をエンコードする配列あるいは配列の断片を検出するように設計されてもよい。ウリジン二リン酸－グルクロノシルトランスフェラーゼ１Ａ１は、結腸直腸癌を治療するために使用されるイリノテカンを代謝することができる（たとえば、Ｉｙｅｒ，Ｌ．，Ｄ．Ｈａｌｌ，Ｓ．Ｄａｓ，Ｍ．Ａ．Ｍｏｒｔｅｌｌ，Ｊ．ＲａｍＩｒｅｚ，Ｓ．ＫＩｍ，Ａ．ＤＩ ＲＩｅｎｚｏ，ａｎｄ Ｍ．Ｊ．ＲａｔａＩｎ．１９９９．Ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ－ｇｅｎｏｔｙｐｅ ｃｏｒｒｅｌａｔＩｏｎ ｏｆ Ｉｎ ｖＩｔｒｏ ＳＮ－３８（ａｃｔＩｖｅ ｍｅｔａｂｏｌＩｔｅ ｏｆ ＩｒＩｎｏｔｅｃａｎ）ａｎｄ ｂＩｌＩｒｕｂＩｎ ｇｌｕｃｕｒｏｎＩｄａｔＩｏｎ Ｉｎ ｈｕｍａｎ ｌＩｖｅｒ ｔＩｓｓｕｅ ｗＩｔｈ ＵＧＴｌＡｌ ｐｒｏｍｏｔｅｒ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈＩｓｍ．ＣｌＩｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｈｅｒ ６５（５）：５７６－８２；Ａｎｄｏ，Ｙ．，Ｈ．Ｓａｋａ，Ｇ．ＡｓａＩ，Ｓ．ＳｕｇＩｕｒａ，Ｋ．ＳｈＩｍｏｋａｔａ，ａｎｄ Ｔ．ＫａｍａｔａｋＩ．１９９８．ＵＧＴｌＡｌ ｇｅｎｏｔｙｐｅｓ ａｎｄ ｇｌｕｃｕｒｏｎＩｄａｔＩｏｎ ｏｆ ＳＮ－３８，ｔｈｅ ａｃｔＩｖｅ ｍｅｔａｂｏｌＩｔｅ ｏｆ ＩｒＩｎｏｔｅｃａｎ．Ａｎｎ Ｏｎｃｏｌ ９（８）：８４５－７参照）。

【０２３８】
また、ウリジン二リン酸－グルクロノシルトランスフェラーゼ１Ａ１は、ギルバート症候群、軽度の肝臓疾患を治療するために使用されるビリルビンを代謝することができる（たとえば、Ｂｏｓｍａ，Ｐ．Ｊ．，Ｊ．Ｒ．Ｃｈｏｗｄｈｕｒｙ，Ｃ．Ｂａｋｋｅｒ，Ｓ．Ｇａｎｔｌａ，Ａ．ｄｅ Ｂｏｅｒ，Ｂ．Ａ．Ｏｏｓｔｒａ，Ｄ．ＬＩｎｄｈｏｕｔ，Ｇ．Ｎ．Ｔｙｔｇａｔ，Ｐ．Ｌ．Ｊａｎｓｅｎ，Ｒ．Ｐ．ＯｕｄｅＥｌｆｅｒＩｎｋ，ａｎｄ ｅｔ ａｌ．１９９５．Ｔｈｅ ｇｅｎｅｔＩｃ ｂａｓＩｓ ｏｆ ｔｈｅ ｒｅｄｕｃｅｄ ｅｘｐｒｅｓｓＩｏｎ ｏｆ ｂＩｌＩｒｕｂＩｎ ＵＤＰ－ｇｌｕｃｕｒｏｎｏｓｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ １ Ｉｎ ＧＩｌｂｅｒｔ’ｓ ｓｙｎｄｒｏｍｅ．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ３３３（１８）：１１７１－５；ＫＩｍ，Ｙ．Ｈ．，Ｊ．Ｅ．Ｙｅｏｎ，Ｇ．Ｍ．Ｊｕｎｇ，Ｈ．Ｊ．ＫＩｍ，Ｊ．Ｓ．ＫＩｍ，Ｋ．Ｓ．Ｂｙｕｎ，Ｙ．Ｔ．Ｂａｋ，ａｎｄ Ｃ．Ｈ．Ｌｅｅ．２００２．Ａ ｓｔｕｄｙ ｏｆ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈＩｓｍ Ｉｎ ＵＤＰ－ｇｌｕｃｕｒｏｎｏｓｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ １ （ＵＧＴ－ｌＡｌ） ｐｒｏｍｏｔｅｒ ｇｅｎｅ Ｉｎ Ｋｏｒｅａｎ ｐａｔＩｅｎｔｓ ｗＩｔｈ ＧＩｌｂｅｒｔ’ｓ ｓｙｎｄｒｏｍｅ．Ｔａｅｈａｎ Ｋａｎ Ｈａｋｈｏｅ ＣｈＩ ８（２）：１３２－８参照）。

【０２３９】
また、核酸類似体は、チオプリンＳ－メチルトランスフェラーゼをエンコードする配列あるいは配列の断片を検出するように設計されてもよい。チオプリンＳ－メチルトランスフェラーゼは、クローン病を治療するために使用されるメルカプトプリンを代謝することができる。

【０２４０】
（たとえば、ＷｅＩｎｓｈＩｌｂｏｕｍ，Ｒ．Ｍ．１９９２．ＭｅｔｈｙｌａｔＩｏｎ ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔＩｃｓ：ｔｈＩｏｐｕｒＩｎｅ ｍｅｔｈｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ａｓ ａ ｍｏｄｅｌ ｓｙｓｔｅｍ．ＸｅｎｏｂＩｏｔＩｃａ ２２（９－１０）：１０５５－７１；ａｎｄ Ｗｅｎｎｅｒｈｏｌｍ，Ａ．，Ｉ．Ｊｏｈａｎｓｓｏｎ，Ａ．Ｙ．Ｍａｓｓｅｌｅ，Ｍ．Ｌａｎｄｅ，Ｃ．Ａｌｍ，Ｙ．Ａｄｅｎ－ＡｂｄＩ，Ｍ．Ｌ．Ｄａｈｌ，Ｍ．Ｉｎｇｅｌｍａｎ－Ｓｕｎｄｂｅｒｇ，Ｌ．ＢｅｒｔＩｌｓｓｏｎ，ａｎｄ Ｌ．Ｌ．Ｇｕｓｔａｆｓｓｏｎ．１９９９．Ｄｅｃｒｅａｓｅｄ ｃａｐａＣＩｔｙ ｆｏｒ ｄｅｂｒＩｓｏｑｕＩｎｅ ｍｅｔａｂｏｌＩｓｍ ａｍｏｎｇ ｂｌａｃｋ ＴａｎｚａｎＩａｎｓ：ａｎａｌｙｓｅｓ ｏｆ ｔｈｅ ＣＹＰ２Ｄ６ ｇｅｎｏｔｙｐｅ ａｎｄ ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ．ＰｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔＩｃｓ ９（６）：７０７－１４参照）
また、チオプリンＳ－メチルトランスフェラーゼは、クローン病を治療するために使用

されるアザチオプリンを代謝することができる（たとえば、Ｋａｓｋａｓ，Ｂ．Ａ．，Ｅ．ＬｏｕＩｓ，Ｕ．ＨＩｎｄｏｒｆ，Ｅ．Ｓｃｈａｅｆｆｅｌｅｒ，Ｊ．Ｄｅｆｌａｎｄｒｅ，Ｆ．Ｇｒａｅｐｌｅｒ，Ｋ．ＳｃｈｍＩｅｇｅｌｏｗ，Ｍ．Ｇｒｅｇｏｒ，Ｕ．Ｍ．Ｚａｎｇｅｒ，Ｍ．ＥＩｃｈｅｌｂａｕｍ，ａｎｄ Ｍ．Ｓｃｈｗａｂ．２００３．Ｓａｆｅ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ｔｈＩｏｐｕｒＩｎｅ Ｓ－ｍｅｔｈｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ｄｅｆＩｃＩｅｎｔ Ｃｒｏｈｎ’ｓ ｄＩｓｅａｓｅ ｐａｔＩｅｎｔｓ ｗＩｔｈ ａｚａｔｈＩｏｐｒＩｎｅ．Ｇｕｔ ５２（１）：１４０－２；ａｎｄ Ｍａｒｒａ，Ｃ．Ａ．，Ｊ．Ｍ．ＥｓｄａＩｌｅ，ａｎｄ Ａ．Ｈ．ＡｎＩｓ．２００２．ＰｒａｃｔＩｃａｌ ＰｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔＩｃｓ：Ｔｈｅ Ｃｏｓｔ ＥｆｆｅｃｔＩｖｅｎｅｓｓ ｏｆ ｓｃｒｅｅｎＩｎｇ ｆｏｒ ＴｈＩｏｐｕｒＩｎｅ ｓ－Ｍｅｔｈｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ＰｏｌｙｍｏｒｐｈＩｓｍｓ Ｉｎ ＰａｔＩｅｎｔｓ ｗＩｔｈ ＲｈｅｕｍａｔｏｌｏｇＩｃａｌ ＣｏｎｄＩｔＩｏｎｓ Ｔｒｅａｔｅｄ ｗＩｔｈ ＡｚａｔｈＩｏｐｒＩｎｅ．Ｊ Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ ２９（１２）：２５０７－１２参照）。

【０２４１】

また、核酸類似体は、カテコール－Ｏ－メチルトランスフェラーゼをエンコードする配列あるいは配列の断片を検出するように設計されてもよい。カテコール－Ｏ－メチルトランスフェラーゼは、パーキンソン病を治療するために使用されるレボドーパを代謝することができる（たとえば、ＲｅＩｌｌｙ，Ｄ．Ｋ．，Ｌ．ＲＩｖｅｒａ－ＣａｌＩｍｌＩｍ，ａｎｄ Ｄ．Ｖａｎ Ｄｙｋｅ．１９８０．Ｃａｔｅｃｈｏｌ－Ｏ－ｍｅｔｈｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ ａｃｔＩｖＩｔｙ：ａ ｄｅｔｅｒｍＩｎａｎｔ ｏｆ ｌｅｖｏｄｏｐａ ｒｅｓｐｏｎｓｅ．ＣｌＩｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｈｅｒ ２８（２）：２７８－８６；ａｎｄ Ｗｅｎｎｅｒｈｏｌｍ，Ａ．，Ｉ．Ｊｏｈａｎｓｓｏｎ，Ａ．Ｙ．Ｍａｓｓｅｌｅ，Ｍ．Ｌａｎｄｅ，Ｃ．Ａｌｍ，Ｙ．Ａｄｅｎ－ＡｂｄＩ，Ｍ．Ｌ．Ｄａｈｌ，Ｍ．Ｉｎｇｅｌｍａｎ－Ｓｕｎｄｂｅｒｇ，Ｌ．ＢｅｒｔＩｌｓｓｏｎ，ａｎｄ Ｌ．Ｌ．Ｇｕｓｔａｆｓｓｏｎ．１９９９．Ｄｅｃｒｅａｓｅｄ ｃａｐａｃＩｔｙ ｆｏｒ ｄｅｂｒＩｓｏｑｕＩｎｅ ｍｅｔａｂｏｌＩｓｍ ａｍｏｎｇ ｂｌａｃｋ ＴａｎｚａｎＩａｎｓ：ａｎａｌｙｓｅｓ ｏｆ ｔｈｅ ＣＹＰ２Ｄ６ｇｅｎｏｔｙｐｅ ａｎｄ ｐｈｅｎｏｔｙｐｅ．ＰｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔＩｃｓ ９（６）：７０７－１４参照）。

【０２４２】

核酸類似体は、薬物耐性と関係がある遺伝的ポリモルフィズムを検出するように設計してもよい。一実施形態では核酸類似体は、心臓疾患の治療のために使用されるＡＣＥ阻害薬抗高血圧症薬の応答に影響しうるＡＣＥポリモルフィズムを検出するように設計されてもよいたとえば、Ｊａｃｏｂｓｅｎ，Ｐ．，Ｋ．ＲｏｓｓＩｎｇ，Ｐ．ＲｏｓｓＩｎｇ，Ｌ．Ｔａｒｎｏｗ，Ｃ．Ｍａｌｌｅｔ，Ｏ．ＰｏＩｒＩｅｒ，Ｆ．ＣａｍｂＩｅｎ，ａｎｄ Ｈ．Ｈ．ＰａｒｖＩｎｇ．１９９８．ＡｎｇＩｏｔｅｎｓＩｎ ｃｏｎｖｅｒｔＩｎｇ ｅｎｚｙｍｅ ｇｅｎｅ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈＩｓｍ ａｎｄ ＡＣＥ ＩｎｈＩｂＩｔＩｏｎ Ｉｎ ｄＩａｂｅｔＩｃ ｎｅｐｈｒｏｐａｔｈｙ．ＫＩｄｎｅｙ Ｉｎｔ ５３（４）：１００２－６；Ｋｏｈｎｏ，Ｍ．，Ｋ．Ｙｏｋｏｋａｗａ，Ｍ．ＭＩｎａｍＩ，Ｈ．Ｋａｎｏ，Ｋ．ＹａｓｕｎａｒＩ，Ｔ．ＨａｎｅｈＩｒａ，ａｎｄ Ｊ．ＹｏｓｈＩｋａｗａ．１９９９．ＡｓｓｏｃＩａｔＩｏｎ ｂｅｔｗｅｅｎ ａｎｇＩｏｔｅｎｓＩｎ－ｃｏｎｖｅｒｔＩｎｇ ｅｎｚｙｍｅ ｇｅｎｅ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈＩｓｍｓ ａｎｄ ｒｅｇｒｅｓｓＩｏｎ ｏｆ ｌｅｆｔ ｖｅｎｔｒＩｃｕｌａｒ ｈｙｐｅｒｔｒｏｐｈｙ Ｉｎ ｐａｔＩｅｎｔｓ ｔｒｅａｔｅｄ ｗＩｔｈ ａｎｇＩｏｔｅｎｓＩｎ－ｃｏｎｖｅｒｔＩｎｇ ｅｎｚｙｍｅ ＩｎｈＩｂＩｔｏｒｓ．Ａｍ Ｊ Ｍｅｄ １０６（５）：５４４－９参照）。

【０２４３】

ＡＣＥポリモルフィズムは、冠動脈アテローム性硬化症を治療するために使用されるフラバスタチンの応答に影響することができる（たとえば、ＭａｒＩａｎ，Ａ．Ｊ．，Ｆ．

SafavI, L. FerlIc, J. K. Dunn, A. M. Gotto, and C. M. Ballantyne. 2000. InteractIo s between angIotensIn−I convertIng enzyme InsertIon／deletIon polymorphIsm and response of plasma lIpIds and coronary atheroscleros Is to treatment wIth fluvastatIn: the lI poproteIn and coconary atherosclerosIs study. J Am Coll CardIol 35（1）：89−95；Bosse, Y., M. C. Vohl, M. Dumont, M. Brochu, J. Bergeron, J. P. Despres, and D. Prud'homme. 2002. Influence of the angIotensIn−convertIng enzyme gene InsertIon／deletIon polymorphIsm on lIpoproteIn／lIpId response togemfIbrozIl. ClIn Genet 62（1）：45−52参照）。

【0244】

他の実施形態では、核酸類似体は、抗炎症剤として使用されるロイコトリエン阻害剤の応答に影響しうるアラキドン酸5−リポキシゲナーゼポリモルフィズムを検出するよう設計されてもよい。（たとえば、Fowler, S. J., I. P. Hall, A. M. WIlson, A. P. Wheatley, and B. J. LIpworth. 2002. 5−LIpoxygenase polymorphIsm and In−vIvo response to leukotrIene receptor antagonIsts. Eur J ClIn Pharmacol 58（3）：187−90；and KoshIno, T., S. Takano, S. KItanI, N. OhshIma, Y. Sano, T. TakaIshI, K. HIraI, K. Yamamoto, and Y. MorIta. 1999. Novel polymorphIsm of the 5−lIpoxygenase actIvatIng proteIn（FLAP）promoter gene assocIated wIth asthma. Mol Cell BIol Res Commun 2（1）：32−5参照）。

【0245】

該核酸類似体は、喘息および肺の病気を治療するために使用されるB2−アゴニストの応答に影響しうるB2−アドレナリン様物質受容体ポリモルフィズムを検出するように設計されてもよい（たとえば、LIggett, S. B. 2000. beta（2）−adrenergIc receptor pharmacogenetIcs. Am J RespIr CrIt Care Med 161（3Pt2）：S197−201；DIshy, V., G. G. Sofowora, H. G. XIe, R. B. KIm, D. W. Byrne, C. M. SteIn, and A. J. Wood. 2001. The effect of common polymorphIsms of the beta2−adrenergIc receptor on agonIst−medIated vascular desensItIzatIon. N Engl J Med 345（14）：1030−5参照）。

【0246】

また、核酸類似体は、心臓疾患を治療するために使用されるACE阻害剤の応答に影響しうるブラジキニンB2受容体ポリモルフィズムを検出するように設計されてもよい（たとえば、Mukae, S., S AokI, S. Itoh, T. Iwata, H. Ueda, and T. KatagIrI. 2000. BradykInIn B（2）receptor gene polymorphIsm Is assocIated wIth angIotensIn−convertIng enzyme InhIbItor−related cough. HypertensIon 36（1）：127−31；Mukae, S., S. Itoh, S. AoKI, T. Iwata, K. NIs

hIo, R. Sato, and T. KatagIrI. 2002. AssocIatIon of polymorphIsms of the renIn-angIotensIn system and bradykInIn B2 receptor wIth ACE-InhIbItor-related cough. J Hum Hypertens 16(12):857-63参照。

【0247】

核酸類似体は、抗精神作用剤の応答に影響しうるドーパミン受容体（D2、D3、D4）ポリモルフィズムを検出するように設計されてもよい（たとえば、Arranz, M. J., J. Munro, J. BIrkett, A. Bolonna, D. Mancama, M. SodhI, K. P. Lesch, J. F. Meyer, P Sham, D. A. CollIer, R. M. Murray, and R. W. KerwIn. 2000. PharmacogenetIc predIctIon of clozapIne response. Lancet 355(9215):1615-6;1BasIle, V. S., M. MasellIs, F. BadrI, A. D. Paterson, H. Y. Meltzer, J. A. LIeberman, S. G. PotkIn, F. MaccIardI, and J. L. Kennedy. 1999. AssocIatIon of the MscI polymorphIsm of the dopamIne D3 receptor gene wIth tardIve dyskInesIa In schIzophrenIa. Neuropsychopharmacology 21(1):17-27参照）。

【0248】

該核酸類似体は、喘息および肺の病気を治療するために使用される結合型エストロゲンの応答に影響しうる、更年期、骨粗鬆症のホルモンの補充療法に使用される、エストロゲン受容体-αポリモルフィズムを検出するように設計されてもよい（たとえば、HerrIngton, D. M., T. D. Howard, G. A. HawkIns, D. M. ReboussIn, J. Xu, S. L. Zheng, K. B. BrosnIhan, D. A. Meyers, and E. R. Bleecker. 2002. Estrogen-receptor polymorphIsms and effects of estrogen replacement on hIgh-densIty lIpoproteIn cholesterol In women wIth coronary dIsease. N Engl J Med 346(13):967-74;OngphIphadhanakul, B., S. ChanprasertyothIn, P. PayatIkul, S. S. Tung, N. PIaseu, L. ChaIlurkt, S. ChansIrIkarn, G. PuavIlaI, and R. RajatanavIn. 2000. Oestrogen-receptor-alpha gene polymorphIsm affects response In bone mIneral densIty to oestrogen In post-menopausal women. ClIn EndocrInol (Oxf) 52(5):581-5参照）。

【0249】

また、核酸類似体は、心筋梗塞を治療するために使用されるアスピリンまたは糖たんぱく質IIb/IIIa阻害剤の応答に影響しうる糖たんぱく質IIb/IIIaポリモルフィズムの糖たんぱく質ナイアシンサブユニットを検出するように設計されてもよい（たとえば、MIchelson, A. D., M. 1. Furman, P. GoldschmIdt-Clermont, M. A. MascellI, C. HendrIx, L. Coleman, J. HamlIngton, M. R. Barnard, T. KIckler, D. J. ChrIstIe, S. Kundu, and P. F. Bray. 2000. Platelet GPIIIaP1(A) polymorphIsms dIsplay dIfferent sensItIvItIes to agonIsts. CIrculatIon 101(9):1013-8;AndrIolI, G., P. MI

nuz, P. Solero, S. PIncellI, R. OrtolanI, S. LussIgnolI, and P. BellavIte. 2000. DefectIve platelet response to arachIdonIc acId and thromboxane A(2) In subjects wIthP1(A2) polymorphIsm of beta(3) subunIt(glycoproteIn IIIa). Br J Haematol 110(4):911−8参照)。

【0250】

また、核酸類似体は、アルツファイマー病および鬱状態を治療するために使用される抗鬱剤の応答に影響しうるセロトニン(5−ヒドロキシトリプタミン)トランスポータポリモルフィズムを検出するように設計されてもよい(たとえば、KIm, D. K., S. W. LIm, S. Lee, S. E. Sohn, S. KIm, C. G. Hahn, and B. J. Carroll. 2000. SerotonIn transporter gene polymorphIsm and antIdepressant response. Neuroreport 11(1):215−9;and SmeraldI, E., R. ZanardI, F. BenedettI, D. DI Bella, J. Perez, and M. Catalano. 1998. PolymorphIsm wIthIn the promoter of the serotonIn transporter promoter and antIdepressant effIcacy of fluvoxamIne. Mol PsychIatry3(6):508−11参照)。

【0251】

核酸類似体は、心筋梗塞、高血圧症を治療するために使用される利尿剤の応答に影響しうるアデューシンポリモルフィズムを検出するように設計されてもよい(たとえば、ScIarrone, M. T., P. Stella, C. BarlassIna, P. Manunta, C. LanzanI, G. BIanchI, and D. CusI. 2003. ACE and alpha−adducIn polymorphIsm as markers of IndIvIdual response to dIuretIc therapy. HypertensIon 41(3):398−403;Psaty, B. M., N. L. SmIth, S. R. Heckbert, H. L. Vos, R. N. LemaItre, A. P. ReIner, D. S. SIscovIck, J. BIs, T. Lumley, W. T. Longstreth, Jr., and F. R. Rosendaal. 2002. DIuretIc therapy, the alpha−adducIn gene varIant, and the rIsk of myocardIal InfarctIon or stroke In persons wIth treated hypertensIon. Jama 287(13):1680−9参照)。

【0252】

さらに、核酸類似体は、冠動脈疾患、コレステロール、アテローム性硬化症を治療するために使用されるスタチンの応答に影響しうるアポリポ蛋白E(APOE)ポリモルフィズムを検出するように設計されてもよい(たとえば、Ordovas, J. M., J. Lopez−MIranda, F. Perez−JImenez, C. RodrIguez, J. S. Park, T. Cole, and E. J. Schaefer. 1995. Effect of apolIpoproteIn E and A−IV phenotypes on the low densIty lIpoproteIn response to HMG CoA reductase InhIbItor therapy. AtherosclerosIs 113(2):157−66;Gerdes, L. U., C. Gerdes, K. KervInen, M. SavolaInen, 1. C. Klausen, P. S. Hansen, Y. A. KesanIemI, and O. Faergeman. 2000. The apolIpoproteIn epsIlon4 allele determInes prognosIs and th

e effect on prognosIs of sImvastatIn In survIvors of myocardIal InfarctIon:a sub study of the ScandInavIan sImvastatIn survIval study.CIrculatIon101（12）:1366−71参照）。

【0253】

アルツハイマー病を治療するために使用されるタクリンの応答に影響しうるＡＰＯＥポリモルフィズム（たとえば、PoIrIer, J., M. C. DelIsle, R. QuIrIon, 1. Aubert, M. Farlow, D. LahIrI, S. HuI, P. Bertrand, J. Nalbantoglu, B. M. GIlfIx, and et al. 1995. ApolIpoproteIn E4 allele as a predIctor of cholInergIc defIcIts and treatment outcome In AlzheImer dIsease. ProcNatl Acad ScI U S A 92（26）:12260−4）

PoIrIer, J. 1999. ApolIpoproteIn E:a pharmacogenetIc target for the treatment of AlzheImer's dIsease. Mol DIagn 4（4）:335−41;SoInInen, H., O. Kosunen, S. HelIsalmI, A. Mannermaa, L. PaljarvI, S. TalasnIemI, M. Ryynanen, and P. RIekkInen, Sr. 1995. A severe loss of cholIneacetyltransferase In the frontal cortex of AlzheImer patIents carryIng apolIpoproteIn epsIlon 4 allele. NeuroscI Lett 187（2）:79−82参照）

さらに、核酸類似体は、ＨＩＶを治療するために抗ウィルス剤として使用されるアバカビルの応答に影響しうるＨＬＡポリモルフィズムを検出するように設計されてもよい（たとえば、Mallal, S., D. Nolan, C. WItt, G. Masel, A. M. MartIn, C. Moore, D. Sayer, A. Castley, C. Mamotte, D. Maxwell, I. James, and F. T. ChrIstIansen. 2002. AssocIatIon between presence of HLA− B*5701, HLA−DR7, and HLA−DQ3 and hypersensItIvIty to HIV−1 reverse−transcrIptase InhIbItor abacavIr. Lancet 359（9308）:727−32;and HetherIngton, S., A. R. Hughes, M. Mosteller, D. ShortIno, K. L. Baker, W. Spreen, E. LaI, K. DavIes, A. Handley, D. J. Dow, M. E. FlIng, M. Stocum, C. Bowman, L. M. Thurmond, and A. D. Roses. 2002. GenetIc varIatIon s In HLA−B regIon and hypersensItIvIty reactIons to abacavIr. Lancet359（9312）:1121−2参照）。

【0254】

また、核酸類似体は、冠状血管関連病およびアテローム性硬化症を治療するために使用されるスタチンの応答に影響しうるコレステロールエステル転移蛋白（ＣＥＴＰ）ポリモルフィズムを検出するように設計されてもよい（たとえば、KuIvenhoven, J. A., J. W. Jukema, A. H. ZwInderman, P. deKnIjff, R. McPherson, A. V. Bruschke, K. I. LIe, and J. J. KasteleIn. 1998. The role of a common varIant of the cholesteryl ester transfer proteIn gene In the progressIon of coronary atherosclerosIs. The RegressIon Growt

h EvaluatIon StatIn Study Group. N Engl J Med338(2):86−93;Rump, P., R. P. MensInk, and G. Hornstra. 2002. InteractIon between a common varIant of the cholesteryl ester transfer proteIn gene and the apolIpoproteIn E polymorphIsm:effects on plasma lIpIds and lIpoproteIns In a cohort of 7−year−old chIldren. Nutr Metab CardIovasc DIs 12(6):317−24;and van VenrooIj, F. V., R. P. Stolk, J. D. Banga, T. P. SIjmonsma, A. van Tol, D. W. Erkelens, and G. M. DallInga−ThIe. 2003. Common cholesteryl ester transfer proteIn gene polymorphIsms and the effect of atorvastatIn therapy In type 2 dIabetes. DIabetes Care 26(4):1216−23参照)。

【0255】

また、他の実施形態では、核酸類似体は、細菌感染を治療するために使用される抗生物質、エリスロマイシンの応答に影響しうるイオンチャネル関連ポリモルフィズムを検出するように設計されてもよい(たとえば、SestI, F., G. W. Abbott, J. WeI, K. T. Murray, S. Saksena, P. J. Schwartz, S. G. PrIorI, D. M. Roden, A. L. George, Jr., and S. A. GoldsteIn. 2000. A common polymorphIsm assocIated wIth antIbIotIc−Induced cardIac arrhythmIa. Proc Natl Acad ScI U S A97(19):10613−8;Abbott, G. W., F. SestI, I. SplawslcI, M. E. Buck, M. H. Lehmann, K. W. TImothy, M. T. KeatIng, and S. A. GoldsteIn. 1999. MIRPl formsIKr potassIum channels wIth HERG and Is assocIated wIth cardIac arrhythmIa. Cell 97(2):175−87参照)。

【0256】

また、核酸類似体は、グリオーマを治療するために使用されるカルムスチンの応答に影響しうるメチルグアニンメチルトランスフェラーゼポリモルフィズムを検出するように設計されてもよい(たとえば、Esteller, M., J. GarcIa−FoncIllas, E. AndIon, S. N. Goodman, O. F. HIdalgo, V. Vanaclocha, S. B. BaylIn, and J. G. Herman. 2000. InactIvatIon of the DNA−repaIr gene MGMT and the clInIcal response of glIomas to alkylatIng agents. N Engl J Med 343(19):1350−4;Gerson, S. L. 2002. ClInIcal relevance of MGMT In the treatment of cancer. J ClIn Oncol 20(9):2388−99参照)。

【0257】

また、核酸類似体は、パーキンソン病を治療するために使用されるレボドーパの応答に影響しうるパーキンポリモルフィズムを検出するように設計されてもよい(たとえば、LuckIng, C. B., A. Durr, V. BonIfatI, J. Vaughan, G. De MIchele, T. Gasser, B. S. HarhangI, G. Meco, P. Denefle, N. W. Wood, Y. AgId, and A. BrIce. 2000. AssocIatIon between early−onset ParkInson's dIsease and mutatIons In the pa

rkIn gene. French ParkInson's dIsease genetIcs Study Group. N Engl J Med 342(21):1560-7;BonIfatI, V., G. De MIchele, C. B. LuckIng, A. Durr, E. FabrIzIo, G. AmbrosIo, N. Vanacore, M. De MarI, R. MarconI, L. Capus, M. M. Bretteler, T. Gasser, B. Oostra, N. Wood, Y. AgId, A. FIlla, G. Meco, and A. BrIce. 2001. The parkIn gene and Its phenotype. ItalIan PD genetIcs Study Group, French PD genetIcs Study Group and the European ConsortIum on genetIcs SusceptIbIlIty In ParkInson's dIsease. Neurol ScI22(1):51-2参照)。

【0258】

核酸類似体は、パーキンソン病を治療するために使用される経口避妊剤の応答に影響しうるおよび血栓の進行の潜在的リスクを予期しうるプロトロンビンおよび第V因子ポリモルフィズムを検出するように設計されてもよい(たとえば、TassIn, J., A. Durr, A. M. Bonnet, R. GIl, M. VIdaIlhet, C. B. LuckIng, J. Y. Goas, F. DurIf, M. Abada, B. Echenne, J. Motte, A. Lagueny, L. Lacomblez, P. Jedynak, B. Bartholome, Y. AgId, and A. BrIce. 2000. Levodopa-responsIve dystonIa. GTP cyclohydrolase I or parkIn mutatIons? BraIn 123(Pt6):1112-21;MartInellI, I., E. SacchI, G. LandI, E. TaIolI, F. Duca, and P. M. MannuccI. 1998. HIgh rIsk of cerebral-veIn thrombosIs In carrIers of a prothrombIn-gene mutatIon and In users of oral contraceptIves. N Engl J Med 338(25):1793-7;and MartInellI, I., E. TaIolI, P. BuccIarellI, S. Akhavan, and P. M. MannuccI. 1999. InteractIon between the G20210A mutatIon of the prothrombIn gene and oral contraceptIve use In deep veIn thrombosIs. ArterIoscler Thromb Vase BIol 19(3):700-3参照)。

【0259】

また、核酸類似体は、アテローム性硬化症を治療するために使用されるスタチンの応答に影響しうるストロメリシン-1ポリモルフィズムを検出するように設計されてもよい(たとえば、LegnanI, C., G. PalaretI, G. Guazzaloca, B. CosmI, B. LunghI, F. Bernard, and S. CoccherI. 2002. Venous thromboembolIsm In young women;role of thrombophIlIc mutatIons and oral contraceptIve use. Eur Heart J23(12):984-90;LIggett, S. B. 2000. beta(2)-adrenergIc receptor pharmacogenetIcs. Am J RespIr CrIt Care Med 161(3Pt2):S197-201;HumphrIes, S. E., L. A. Luong, P. J. Talmud, M. H. FrIck, Y. A. KesanIemI, A. Pasternack, M. R. TaskInen, and M. Syvanne. 1998. The 5A/6A polymorphIsm In the promoter of thestromelysIn-1 (MMP-3) gene predIcts progressIon of angI

ographIcally determIned coronary artery dIsease In men In the LOCAT gemfIbrozIl study. LopId coronary AngIography TrIal. AtherosclerosIs 139（1）：49－56）. HumphrIes, S., C. Bauters, A. MeIrhaeghe, L. Luong, M. Bertrand, and P. Amouyel. 2002. The 5A6A polymorphIsm In the promoter of the stromelysIn－1（MMP3）promoter as a rIsk factor for restenosIs. Eur Heart J23（9）：721－5；and de Maat, M. P., J. W. Jukema, S. Ye, A. H. ZwInderman, P. H. Moghaddam, M. Beekman, J. J. KasteleIn, A. J. van Boven, A. V. Bruschke, S. E. HumphrIes, C. Kluft, and A. M. Henney. 1999. Effect of the stromelysIn－1 promoter on effIcacy of pravastatIn In coronary atherosclerosIs and restenosIs. Am J CardIol83（6）：852－6参照）。

【0260】

K．遺伝子組み換え生物

本明細書で開示する方法は、また、遺伝子組み換え生物（GMO）の存在のための素早く、感度の高い診断テストを提供する。GMOの例として、1つまたはそれ以上の遺伝子が変性され、付加され、あるいは削除された生体が挙げられるが、これらに限定されない。GMOは、1つまたはそれ以上の特異的な遺伝子の存在、1つまたはそれ以上の特異的な遺伝子の非存在、特異的な改変箇所、または1つまたはそれ以上の特異的な遺伝子の発現の変化によって特徴づけられてもよい。核酸類似体は、GMOに特徴的な標的ポリヌクレオチドを補完するように設計されてもよい。GMOの存在および数は、反応方法を使用して測定してもよい。

【0261】

L．外来動植物

本明細書で開示する方法は、また、外来の動植物の存在および計数のための素早く、感度の高い診断テストを提供する。特定の地域が原産でない生体が、原産の動植物に対する環境および生物学的危険源として存在する。核酸類似体は、外来の動植物に特徴的な標的ポリヌクレオチドを補完するように設計されてもよい。外来の動植物の存在および数は、反応方法を使用して測定してもよい。

【0262】

M．農業的利用

本明細書で開示する方法は、また、特異的な植物および植物品種群の存在および計数のための素早く、感度の高い診断テストを提供する。核酸類似体は、特異的な植物および植物品種群に特徴的な標的ポリヌクレオチドを補完するように設計されてもよい。植物および品種群の存在および数は、反応方法を使用して測定してもよい

N．獣医学的利用

本明細書で開示する方法、組成物および分析は、また、獣医学的利用における素早く、感度の高い診断テストを提供する。核酸類似体は、動物系の感染または遺伝子の病気または疾患に対応する標的ポリヌクレオチドを補完するように設計されてもよい。

【0263】

一実施形態では、方法、組成物および分析は、狂犬病ウィルスの存在またはそれによる感染を検出するために使用されてもよい。核酸類似体は、狂犬病のPCR系検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計されてもよい。PCR系分析によって狂犬病ウィルスを同定するために使用されるプライマーの例は、業界で公知である（たとえば、Ito M, Itou T, ShojI Y, SakaIT, Ito FH, Ara

ＩＹＴ，ＴａｋａｓａｋＩ Ｔ，Ｋｕｒａｎｅ Ｉ．ＤＩｓｃｒＩｍＩｎａｔＩｏｎ ｂｅｔｗｅｅｎ ｄｏｇ－ｒｅｌａｔｅｄ ａｎｄ ｖａｍｐＩｒｅ ｂａｔ－ｒｅｌａｔｅｄ ｒａｂＩｅｓ ｖＩｒｕｓｅｓ Ｉｎ ＢｒａｚＩｌ ｂｙ ｓｔｒａＩｎ－ｓｐｅｃＩｆＩｃ ｒｅｖｅｒｓｅ ｔｒａｎｓｃｒＩｐｔａｓｅ－ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａＩｎ ｒｅａｃｔＩｏｎ ａｎｄ ｒｅｓｔｒＩｃｔＩｏｎ ｆｒａｇｍｅｎｔ ｌｅｎｇｔｈ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈＩｓｍ ａｎａｌｙｓＩｓ．Ｊ ＣｌＩｎ ＶＩｒｏｌ．２００３ Ａｐｒ；２６（３）：３１７－３０；Ｂｌａｃｋ ＥＭ，ＬｏｗＩｎｇｓ ＪＰ，ＳｍＩｔｈ Ｊ，Ｈｅａｔｏｎ ＰＲ，ＭｃＥｌｈＩｎｎｅｙ ＬＭ．Ａ ｒａｐＩｄ ＲＴ－ＰＣＲ ｍｅｔｈｏｄ ｔｏ ｄＩｆｆｅｒｅｎｔＩａｔｅ ｓＩｘ ｅｓｔａｂｌＩｓｈｅｄ ｇｅｎｏｔｙｐｅｓ ｏｆ ｒａｂＩｅｓ ａｎｄ ｒａｂＩｅｓ－ｒｅｌａｔｅｄ ｖＩｒｕｓｅｓ ｕｓＩｎｇ ＴａｑＭａｎ ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ．Ｊ ＶＩｒｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２００２Ａｕｇ；１０５（１）：２５－３５；ＤａｖＩｄ Ｄ，Ｙａｋｏｂｓｏｎ Ｂ，Ｒｏｔｅｎｂｅｒｇ Ｄ，Ｄｖｅｒｅｓ Ｎ，ＤａｖＩｄｓｏｎ Ｉ，Ｓｔｒａｍ Ｙ．ＲａｂＩｅｓ ｖＩｒｕｓ ｄｅｔｅｃｔＩｏｎ ｂｙ ＲＴ－ＰＣＲ Ｉｎ ｄｅｃｏｍｐｏｓｅｄ ｎａｔｕｒａｌｌｙ Ｉｎｆｅｃｔｅｄ ｂｒａＩｎｓ．Ｖｅｔ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ．２００２ Ｊｕｎ ２０；８７（２）：１１１－８；Ｉｔｏ Ｍ，Ｉｔｏｕ Ｔ，ＳａｋａＩ Ｔ，Ｓａｎｔｏｓ ＭＦ，ＡｒａＩ ＹＴ，ＴａｋａｓａｋＩ Ｔ，Ｋｕｒａｎｅ Ｉ，Ｉｔｏ ＦＨ．ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｒａｂＩｅｓ ｖＩｒｕｓ ＲＮＡ Ｉｓｏｌａｔｅｄ ｆｒｏｍ ｓｅｖｅｒａｌ ｓｐｅｃＩｅｓ ｏｆ ａｎＩｍａｌｓ Ｉｎ ＢｒａｚＩｌ ｂｙ ＲＴ－ＰＣＲ，Ｊ Ｖｅｔ Ｍｅｄ ＳｃＩ．２００１Ｄｅｃ；６３（１２）：１３０９－１３参照）。

【０２６４】

他の実施形態では、方法、組成物および分析は、豚ストレス症候群を検出するために使用されてもよい。豚ストレス症候群は、リアノジン受容体（ＲＹＲ－１）－遺伝子－－ホモ接合またはヘテロ接合体の突然変異によって起こる。核酸類似体は、豚ストレス症候群のＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計されてもよい。ＰＣＲ系分析によって豚ストレス症候群を同定するために使用されるプライマーの例は、業界で公知である（たとえば、Ｌｅｅ ＳＨ，Ｃｈｏ ＫＫ，Ｋａｎｇ ＳＫ，ＫＩｍ ＣＷ，Ｐａｒｋ ＨＣ，Ｃｈｏｙ ＹＨ，ＣｈｏＩ ＹＪ．ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｐＩｇｓ ｒｅｓＩｓｔａｎｔ ｔｏ ｐｏｓｔ－ｗｅａｎＩｎｇ ｄＩａｒｒｈｅａｅａ，ｏｅｄｅｍａ ｄＩｓｅａｓｅ ａｎｄ ｐｏｒｃＩｎｅ ｓｔｒｅｓｓ ｓｙｎｄｒｏｍｅ ｂｙ ａｌｌｅｌｅ－ｓｐｅｃＩｆＩｃ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａＩｎ ｒｅａｃｔＩｏｎ．ＡｎＩｍ Ｇｅｎｅ ｔ．２００２Ｊｕｎ；３３（３）：２３７－９，Ｂｕ Ｈ，ＬＩｕ Ｊ，ＬＩ ＳＦ．ＴｈｅＲＹＲ１ ｇｅｎｏｔｙｐｅ ｏｆ ＣｈＩｎｅｓｅ Ｉｎｂｒｅｄ ｐＩｇｓ．Ｚｈｏｎｇｇｕｏ ＸＩｕ Ｆｕ Ｃｈｏｎｇ ＪＩａｎ ＷａＩ Ｋｅ Ｚａ ＺｈＩ．２０００ Ｓｅｐ；１４（５）：３１１－４参照）。

【０２６５】

該方法、組成物および分析は、高カリウム血性周期性四肢麻痺症（ＨｙＰＰ）を検出するために使用されてもよい。ＨｙＰＰは、アメリカンクウォーターホースまたはその交雑種の遺伝子病である。データは、ヘテロ接合体よりホモ接合体がより重度の疾患の臨床徴候を示すので、ＨｙＰＰは相互優性遺伝子の異常が遺伝することを示唆している。核酸類似体は、ＨｙＰＰのＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計されてもよい。

【０２６６】

他の実施形態では、方法、組成物および分析は、ＦｅＣＶ（ネココロナウィルス）を検出するために使用されてもよい。核酸類似体は、ネココロナウィルスのＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計されてもよい。ＰＣＲ系分析によってネココロナウィルスを同定するために使用されるプライマーの例は、業界で公知である

（たとえば、Ｋｅｎｎｅｄｙ Ｍ，ＣＩｔＩｎｏ Ｓ，ＭｃＮａｂｂ ＡＨ，Ｍｏｆｆａｔｔ ＡＳ，Ｇｅｒｔｚ Ｋ，ＫａｎＩａ Ｓ．ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｆｅｌＩｎｅ ＣｏｒｏｎａｖＩｒｕｓ Ｉｎ ｃａｐｔＩｖｅ ＦｅｌＩｄａｅ Ｉｎ ｔｈｅ ＵＳＡ．Ｊ Ｖｅｔ ＤＩａｇｎ Ｉｎｖｅｓｔ．２００２Ｎｏｖ；１４（６）：５２０－２；ＡｄｄＩｅ ＤＤ，ＪａｒｒｅｔｔＯ．Ｕｓｅ ｏｆ ａ ｒｅｖｅｒｓｅ－ｔｒａｎｓｃｒＩｐｔａｓｅ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａＩｎ ｒｅａｃｔＩｏｎ ｆｏｒ ｍｏｎＩｔｏｒＩｎｇ ｔｈｅ ｓｈｅｄｄＩｎｇ ｏｆ ｆｅｌＩｎｅ ＣｏｒｏｎａｖＩｒｕｓ ｂｙ ｈｅａｌｔｈｙ ｃａｔｓ．Ｖｅｔ Ｒｅｃ．２００１Ｍａｙ２６；１４８（２１）：６４９－５３；Ｈｅｒｒｅｗｅｇｈ ＡＡ，Ｍａｈｌｅｒ Ｍ，ＨｅｄｒＩｃｈ ＨＪ，Ｈａａｇｍａｎｓ ＢＬ，ＥｇｂｅｒＩｎｋ ＨＦ，ＨｏｒｚＩｎｅｋ ＭＣ，ＲｏｔｔＩｅｒ ＰＪ，ｄｅ Ｇｒｏｏｔ ＲＪ．ＰｅｒｓＩｓｔｅｎｃｅ ａｎｄ ｅｖｏｌｕｔＩｏｎ ｏｆ ｆｅｌＩｎｅ ＣｏｒｏｎａｖＩｒｕｓ Ｉｎ ａ ｃｌｏｓｅｄ ｃａｔ－ｂｒｅｅｄＩｎｇ ｃｏｌｏｎｙ．ＶＩｒｏｌｏｇｙ．１９９７Ａｕｇ４；２３４（２）：３４９－６３参照）。

【０２６７】

他の実施形態では、方法、組成物および分析は、ＦＩＰウィルスの存在、またはそれによる感染、偏在するネコ腸内コロナウィルス（ＦＥＣＶ）の突然変異を検出するために使用されてもよい。核酸類似体は、ＦＩＰウィルスのＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計されてもよい。ＰＣＲ系分析によってＦＩＰウィルスを同定するために使用されるプライマーの例は、業界で公知である（たとえば、Ｇｕｎｎ－Ｍｏｏｒｅ ＤＡ，Ｇｒｕｆｆｙｄｄ－Ｊｏｎｅｓ ＴＪ，Ｈａｒｂｏｕｒ ＤＡ．ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｆｅｌＩｎｅ ｃｏｒｏｎａｖＩｒｕｓｅｓ ｂｙ ｃｕｌｔｕｒｅ ａｎｄ ｒｅｖｅｒｓｅ ｔｒａｎｓｃｒＩｐｔａｓｅ－ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａＩｎ ｒｅａｃｔＩｏｎ ｏｆ ｂｌｏｏｄ ｓａｍｐｌｅｓ ｆｒｏｍ ｈｅａｌｔｈｙ ｃａｔｓ ａｎｄ ｃａｔｓ ｗＩｔｈ ｃｌＩｎＩｃａｌ ｆｅｌＩｎｅ ＩｎｆｅｃｔＩｏｕｓ ｐｅｒＩｔｏｎＩｔＩｓ．Ｖｅｔ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ．１９９８Ｊｕ１；６２（３）：１９３－２０５；Ｋｅｎｎｅｄｙ Ｍ，Ｂｏｅｄｅｋｅｒ Ｎ，ＧＩｂｂｓ Ｐ，ＫａｎＩａ Ｓ．ＤｅｌｅｔＩｏｎｓ Ｉｎ ｔｈｅ ７ａ ＯＲＦ ｏｆ ｆｅｌＩｎｅ ｃｏｒｏｎａｖＩｒｕｓ ａｓｓｏｃＩａｔｅｄ ｗＩｔｈ ａｎ ｅｐＩｄｅｍＩｃ ｏｆ ｆｅｌＩｎｅ ＩｎｆｅｃｔＩｏｕｓ ｐｅｒＩｔｏｎＩｔＩｓ．Ｖｅｔ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ．２００１Ａｕｇ８；８１（３）：２２７－３４参照）。

【０２６８】

また、該方法、組成物および分析は、ウマ伝染性貧血ウィルス（ＥＩＡＶ）の存在、またはそれによる感染を検出するために使用されてもよい。核酸類似体は、ＥＩＡＶのＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計されてもよい。ＰＣＲ系分析によってＥＩＡＶを同定するために使用されるプライマーの例は、業界で公知である（たとえば、Ｃｏｏｋ ＲＦ，Ｃｏｏｋ ＳＪ，ＬＩ ＦＬ，Ｍｏｎｔｅｌａｒｏ ＲＣ，Ｉｓｓｅｌ ＣＪ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ａ ｍｕｌｔＩｐｌｅｘ ｒｅａｌ－ｔＩｍｅ ｒｅｖｅｒｓｅ ｔｒａｎｓｃｒＩｐｔａｓｅ－ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａＩｎ ｒｅａｃｔＩｏｎ ｆｏｒ ｅｑｕＩｎｅ ＩｎｆｅｃｔＩｏｕｓ ａｎｅｍＩａ ｖＩｒｕｓ （ＥＩＡＶ）．Ｊ ＶＩｒｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２００２Ａｕｇ；１０５（１）：１７１－９；ＬａｎｇｅｍｅＩｅｒ ＪＬ，Ｃｏｏｋ ＳＪ，Ｃｏｏｋ ＲＦ，Ｒｕｓｈｌｏｗ ＫＥ，Ｍｏｎｔｅｌａｒｏ ＲＣ，Ｉｓｓｅｌ ＣＪ．ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｅｑｕＩｎｅ ＩｎｆｅｃｔＩｖｅ ａｎｅｍＩａ ｖＩｒｕｓ ＲＮＡ Ｉｎ ｐｌａｓｍａ ｓａｍｐｌｅｓ ｆｒｏｍ ｒｅｃｅｎｔｌｙ Ｉｎｆｅｃｔｅｄ ａｎｄ ｌｏｎｇ－ｔｅｒｍ Ｉｎａｐｐａｒｅｎｔ ｃａｒｒＩｅｒ ａｎＩｍａｌｓ ｂｙ ＰＣＲ．Ｊ ＣｌＩｎ ＭＩｃｒｏｂＩｏｌ．１９９６Ｊｕｎ；３４（６）：１４８１－７；Ｎａｇａｒａｊａｎ ＭＭ，ＳＩｍａｒｄ Ｃ．ＤｅｔｅｃｔＩｏｎ ｏｆ ｈｏｒｓｅｓ Ｉｎｆｅｃｔｅｄ ｎａｔｕｒａｌｌｙ ｗＩｔｈ ｅｑ

uIne IntectIous anemIa vIrus by nested polymerase chaIn reactIon. J VIrol Methods. 2001May；94（1－2）：97－109参照）。

【0269】

また、該方法、組成物および分析は、ブルセラ－オビスの存在、またはそれによる感染を検出するために使用されてもよい。核酸類似体は、ブルセラ－オビスのＰＣＲ系検出のために使用されるプライマーの配列を有するように設計されてもよい。ＰＣＲ系分析によってブルセラ－オビスを同定するために使用されるプライマーの例は、業界で公知である（たとえば、Manterola L, Tejero－Garces A, FIcapal A, Shopayeva G, Blasco JM, MarIn CM, Lopez－GonI I. EvaluatIon of a PCR test for the dIagnosIs of Brucella ovIs InfectIon In semen samples from rams., Vet MIcrobIol. 2003Mar20；92（1－2）：65－72；Hamdy ME, AmIn AS. DetectIon of Brucella specIes In the mIlk of Infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. Vet J. 2002May；163（3）：299－305；BrIcker BJ, HallIng SM. DIfferentIatIon of Brucella abortus bv. 1, 2, and 4, Brucella melItensIs, Brucella ovIs, and Brucella suIs bv. 1 by PCR. J ClIn MIcrobIol. 1994Nov；32（11）：2660－6参照）。

【0270】

前記の例は単なる例示である。標的ポリヌクレオチドは、業界で公知の遺伝子に付与する他の抗生物質への耐性に対応したポリヌクレオチドを含んでもよい。

【0271】

ＶＩＩＩ．キット

１つの態様で、本出願は標的ポリヌクレオチドを検出するためのキットを提供する。キットは、１つまたはそれ以上の本発明で有用な試薬、たとえば、色素、核酸類似体、光刺激源、緩衝液、コントロールとして用いられる標準物質、反応結果を説明するコントロールサンプルの陽性および陰性を示すキーを含んでもよい。場合によっては、１つまたはそれ以上の緩衝液が備わる。該キットはさらに、それぞれの組成物の適切な包装、説明書および／または下記する他の任意の成分を含んでもよい。

【0272】

Ａ．色素

キットは１つまたはそれ以上の色素をその中に備えてもよい。

【0273】

色素は、複数の量をプリパッケージの中に備えることもできるし、アリコートが均等に分けられ、出てくる単一チューブの中に備えることもできる。

【0274】

さらに、色素は、キットの他の成分から隔離され、組成物を容易に分取するために適当な包装中に包装されてもよい。

【0275】

Ｂ．核酸類似体

キットは、１つまたはそれ以上の核酸類似体を含んでもよい。

【0276】

核酸類似体は、本明細書で記載されたように、いかなる核酸類似体であってもよい。一実施形態では、核酸類似体はＬＮＡである。他の実施形態では、核酸類似体はＰＮＡである。

【0277】

核酸類似体は、標的核酸配列に対して相補的あるいは完全に相補的であるいかなる配列を有してもよい。配列は、業界で公知のいかなる配列であってもよい。一実施形態では、核酸類似体は、本明細書に記載された配列を有する。

【０２７８】

核酸類似体は、適切ないかなる容器中に備えられていてもよい。また、使用量に小分けされてもよく、単一チューブ中に分配されてもよい。容器はさらにキットの他の成分から隔離され、クレンジング組成物を容易に分取するために適当な包装中に包装されてもよい。他の実施形態では、２またはそれ以上の核酸類似体配列が同じ包装中に詰められていてもよい。

【０２７９】

また、キットは、サケ精子ＤＮＡのような、標的ポリヌクレオチドに対する核酸類似体の効果的なハイブリダイゼイションを容易にする賦形剤を含んでもよい。

【０２８０】

Ｃ．光刺激源

キットは、場合によっては、さらに光刺激源を含んでもよい。光源の限定的ではない例示として、ＳｙｌｂａｎＩａ　Ｃｏｏｌ　ＷｈＩｔｅ　Ｔ８－ＣＷ、Ｇｅｎｅｒａｌ　ＥｌｅｃｔｒＩｃ　Ｔ８－Ｃ５０およびＦｒＩｔｚ　Ａｕｒｏｒａ５０／５０、ＳｙｌｖａｎＩａ　ｄｕｌｕｘ　Ｓ９Ｗ　ＣＦ９ＤＳ／ｂｌｕｅおよびＯｓｒａｍＦ９ＴＴ／５０Ｋが挙げられる。

【０２８１】

Ｄ．ポリヌクレオチド操作成分

また、キットは、緩衝液、酵素、カラム、および他の素材などのポリヌクレオチドを操作するために使用される成分を含んでもよい。

【０２８２】

緩衝液、酵素、カラム、および他の素材は、細胞を洗浄したり、または細胞からＤＮＡまたはＲＮＡを抽出したりするために使用されるものを含むことができる。緩衝液、酵素、カラム、および他の素材は、また、ＤＮＡおよびＲＮＡを含むポリヌクレオチドを操作するために使用される成分も含むことができる。このような成分として、たとえば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ＣｌｏｎＩｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，ｔｈＩｒｄ　ｅｄＩｔＩｏｎ（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０００）Ｃｏｌｄ　ＳｐｒＩｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓに開示されているもの、あるいは本明細書で開示した他の文献に記載されたものが挙げられる。

【０２８３】

Ｅ．説明書

キットは、さらに、本明細書に記載した方法を実施するための説明書を含んでもよい。説明書は、分けて入れられても／または包装や容器の一部として、たとえば、容器の付けられたラベルとして、あるいは、書いたものまたは他の伝達手段で容器の一部に一体的に取り付けられるように含んでもよい。説明書は、利用方法および／またはキットの容器の取り外し方法、使用上の注意、材料の取り扱いに関する方法、期待できる結果、間違った使用に関する注意などをユーザーに知らせてもよい。

【０２８４】

Ｆ．キットの付加的な任意の成分

キットは、さらに、本明細書で開示した方法を実施するのに有用な成分を含んでもよい。付加的な成分として、耐薬品性汚物処理袋、チューブ、希釈剤、手袋、はさみ、マーカー、眼球保護器が例示される。

【実施例】

【０２８５】

以下の限定ではない実施例は、前記の発明を使用する方法をさらに詳しく記載するために提供する。これらの実施例は本発明の範囲を限定するために提供されるものではなく、目的を説明するためにあるものであると理解される。

【０２８６】
以下の実施例の核酸類似体およびＤＮＡ原液は、別段の記載がない限り、５ｍＭのリン酸緩衝液（ｐＨ７．５）中で製造した。ストック色素はメタノールまたはＤＭＳＯ中で製造した。
実施例１
ＰＮＡ／ポリヌクレオチド結合の検出のための液体系分析システム
ＰＮＡ／ポリヌクレオチド錯体が形成されると、指示薬色素の色が変化した。カリフラワーモザイクウィルス３５ＳプロモーターＤＮＡを特異的な標的ポリヌクレオチドとして使用した。色素は、３，３’－ジエチルチアカルボシアニンであった。
【０２８７】
テストチューブ中で、カリフラワーモザイクウィルス３５Ｓプロモーター（３５ＳＰＮＡに相補的なＰＮＡ分子１５μＭを５μＭの３５ＳプロモーターＤＮＡ（３５ＳＤＮＡ）に加えたＰＮＡ配列は、ＣＣＣＡＣＣＣＡＣＧＡＧＧ－ＬＹＳであった（配列番号１１）。５ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．５）中の１５０μＭの色素を加えた。３５ＳＰＮＡおよび色素はシステム中に過剰に存在する。
【０２８８】
色の変化でポリヌクレオチドの存在が示された。
【０２８９】
液体系システムは、合計体積５０ｕｌの５ｍＭのＰＯ４反応緩衝液で希釈された１ｕｌの２．５ｍＭ色素を使用してテストされた。該システムおよび方法はテストされ、ｐＨ４～１０の範囲で効果を示したが、システムはｐＨ５を超える範囲でより良好に実施された。開始時点で、４～１０のｐＨ範囲にわたる反応は、ＰＮＡ／標的ポリヌクレオチドハイブリッドを欠くコントロールとほとんど同じだがコントロールより振動が少なく見えた。光刺激に曝されると、反応が始まり透明になった。さらに光刺激に曝されると、ＰＮＡ／ポリヌクレオチドハイブリッドとの反応は、ｐＨ６～１０の間の同じ速度で完全に透明になった。ｐＨ４～５でのＰＮＡ／ポリヌクレオチドハイブリッドとの反応で、種々のピンクの影で残留色素があった。
【０２９０】
１０ｍＭ濃度の多数の緩衝液が使用された。緩衝液の中のいくつかは種々のｐＨでテストされた。ＮａＰ０４緩衝液は０．５Ｍ濃度までテストされた。至適な緩衝液と塩は、ＮａＰ０４、ＮａＨＳ０４、Ｋ２ＨＰ０４、Ｋ２ＳＯ４およびＣａＳ０４を任意に含んでいた。本方法の成果を発揮できなかった緩衝液および塩は、クエン酸ナトリウム、ＮａＣｌ、ＣａＨ２Ｐ０４、ＦｅＳ０４およびＭｇＳ０４を含む。本方法では、また、純水、０．１％ＳＤＳ、０．１％ＴｒＩｔｏｎＸ、０．１％Ｔｗｅｅｎ２０、３％ブタノール、１０％メタノール、１０％イソプルパノール、または１０％ＤＭＳＯ、１Ｘ血液溶解緩衝液（０．１５ＭのＮＨ$_4$Ｃｌ、１０ｍＭのＮａＨＣＯ$_3$、ｌｍＭのＥＤＴＡ）ｐＨ７．４、または蔗糖溶解緩衝液（０．３２Ｍのしょ糖、１０ｍＭのＴｒＩｓ、１％のＴｒＩｔＩｏｎＸ－１００、５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$）を使用してもよい。．
リン酸ナトリウム緩衝液はｐＨ４、５、５．５、６、７、８、９、１０でテストされた。他の緩衝液は全てｐＨ７．５でテストされた。リン酸ナトリウム緩衝液はｐＨ７で最も速い反応を示した。
【０２９１】
反応液１マイクロリッター当たり３００個の標的ポリヌクレオチドが検出された。１．５　×　１０^{14}標的ポリヌクレオチド／１反応の濃度（３　×　１０^{12}標的ポリヌクレオチド／１ｕｌの反応液）；１０^{8}増幅標的ポリヌクレオチド／１反応（２　×　１０^6　アンプリコン標的ポリヌクレオチド／１ｕｌの反応液）も検出された。
実施例２
ＰＣＲ反応におけるＰＮＡ分子の効果の測定
この実施例では、ＰＣＲ反応における種々のＰＮＡ分子の効果を示す。ＰＣＲ成分は以下の通り：

成分	体積	最終濃度
水	３８ｕｌ	－
上流のプライマー，５０μＭ	０．５ｕｌ	２５ｕＭ
下流のプライマー，５０μＭ	０．５ｕｌ	２５ｕＭ
$MgCl_2$，２５Ｍｍ	３ｕｌ	１．５ｍＭ
１０Ｘ反応緩衝液（プロゲマ）	５ｕｌ	１Ｘ
ＰＣＲヌクレオチド混合（プロゲマ），各ｄＮＴＰにつき１０ｍＭ	１ｕｌ	８００ｕＭ
貯蔵緩衝液Ｂ（プロゲマ）中のＴａｑＤＮＡポリメラーゼ，５ｕ／μｌ	０．５ｕｌ	０．０５ｕ／ｕｌ
ＢＳＡ	０．５ｕｌ	１０ｍｇ／ｍｌ

１０×反応緩衝液の組成：

ＴｒＩｓ－ＨＣｌ	１００ｍＭ
ＫＣｌ	５００ｍＭ
ＴｒＩｔｏｎＸ－１００	１％

プライマー配列は以下の通りであった。

【０２９２】

【表２】

プライマー	プライマー配列
OI 17	5' GCTCCTACAAATGCCATCA (配列番号 12)
OI 18	5' GATAGTGGGATTGTGCGTCA (配列番号 13)
PNA	5' CCCACCCACGAGGAACATC (配列番号 14)

熱サイクラープログラム（ＭＪ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ＰＴＣ－２００）

１分間９５°

４２サイクル：１０秒で９４°

１０秒で５３°

２０秒で７２°

４°に保つ。

【０２９３】

以下のサンプルをＰＣＲによって分析し、ＰＮＡ分子がＰＣＲ反応を阻害したかどうか判断した。

【０２９４】

１．１ｕｌのＢｔ／ＲＲとうもろこしＤＮＡ（Ｂｔ／ＲＲとうもろこしは遺伝的に変性されている）

２．１ｕｌのＢｔ／ＲＲとうもろこしＤＮＡ、１ｕｌのＰＮＡ（１００ｍＭ）

３．１ｕｌのＢｔ／ＲＲとうもろこしＤＮＡ、５ｕｌのＰＮＡ（１００ｍＭ）

４．１ｕｌの水

ＰＣＲの結果は、２％ＴＢＥＥアガロースゲル電気泳動法を使用して視覚化した。

【０２９５】

以下のサンプルを分析し、ＰＮＡの存在がＰＣＲを阻害するかどうか判断した。さらに、ＰＣＲ実施におけるＰＮＡおよびメタノールの効果を判断した。

【０２９６】

１．１ｕｌのＢｔ／ＲＲとうもろこしＤＮＡ

２．１ｕｌのＢｔ／ＲＲとうもろこしＤＮＡ、１ｕｌのＰＮＡ（１００ｍＭ）

３．１ｕｌのＢＩＲＲとうもろこしＤＮＡ、５ｕｌのＰＮＡ（１００ｍ）
４．１ｕｌのＢｔ／ＲＲとうもろこしＤＮＡ、１ｕｌのメタノール
５．１ｕｌのＢｔ／ＲＲとうもろこしＤＮＡ、５ｕｌメタノール
６．１ｕｌの水
ＰＣＲの結果は、２％ＴＢＥＥアガロースゲル電気泳動法を使用して視覚化した。

【０２９７】
結果は、１μｌのＰＮＡを反応に加える（チューブ２）と、ＰＮＡはＰＣＲを阻害しないことを示した。５μｌのＰＮＡを反応に加える（チューブ３）と、ＰＮＡはＰＣＲを阻害した。１μｌのＰＮＡを反応に加える（チューブ４）と、メタノールはＰＣＲを阻害しなかった。５μｌのＰＮＡを反応に加える（チューブ５と、メタノールはＰＣＲを阻害した。

【０２９８】
実施例３
ＤＮＡ分子の異なる濃度での３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物の光学特性における光で刺激された変化の経時変化を、特異的な標的ポリヌクレオチド配列およびＰＮＡ配列用に測定した。

【０２９９】
標的ポリヌクレオチドは、５’ＣＴＡＣＧＧＧＡＧＧＣＡＧＣＡＧＴＧ　３’（配列番号２）であり、相補的ＰＮＡ分子はＮ’ＣＡＣＴＧＣＴＧＣＣＴＣＣＣＣＧＴＡＧ－Ｌｙｓ（配列番号１）であった。標的ポリヌクレオチド濃度は、図５の説明に列挙されているものであった。ＰＮＡ濃度は、反応あたり１４．４ｐｍｏｌｅであった。色素の濃度は、反応あたり６ｎｍｏｌｅであった。

【０３００】
図５は、異なる濃度のＤＮＡが光刺激に曝された後の３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物色素発光の経時変化を示す。変化を活性化するため、混合波長光源を使用して、ＤＮＡ濃度を種々テストした分析感度。ポリヌクレオチド（この場合ＤＮＡ）の種々の濃度は、図の説明に記載する。説明中の濃度は、それぞれの反応における最終ＤＮＡ濃度を表す。（白四角）はプローブと色素だけを含むサンプルを表す。（白三角）は色素だけを含むサンプルを表す。（×）は緩衝液だけを含むサンプルを表す。

【０３０１】
図６は、異なるＤＮＡ濃度での発光における比率の変化を示す。色素は、より高いＤＮＡ濃度でより高い発光の変化率を示した。より高いＰＮＡ濃度での色素の光学特性における変化率を、より低いＰＮＡ濃度（あるいはＰＮＡが存在しない）での光学特性における変化率と比較することによって、標的ポリヌクレオチドの存在が検出され、図１０に示すように、定量することができた。ポリヌクレオチド濃度は、図５の説明で記載されたものと同じである。

【０３０２】
実施例４
この実施例では、色素の光学特性における変化率が光刺激の異なる波長から区別できることを説明する。

【０３０３】
２０ｐｍｏｌｅ／１反応で配列５’ＣＴＡＣＧＧＧＡＧＧＣＡＧＣＡＧＴＧ３’（配列番号２）を有する標的ポリヌクレオチドと、１４．４ｐｍｏｌｅ／１反応で配列Ｎ’ＣＡＣＴＧＣＴＧＣＣＴＣＣＣＣＧＴＡＧ－Ｌｙｓ（配列番号１）とを、３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物色素と組み合わせ、混合物を生成した。次いで該混合物を、１０分間、異なる光スペクトルによって造られた光刺激に曝し、色素発光における比率の変化を経時的に測定した。

【０３０４】
図７に、この試験の結果を示す。白色光刺激は、波長４００ｎｍ～７００ｎｍのＦｒＩｔｚ　Ａｕｒｏｒａ５０／５０可視光スペクトルを使用して発生させた。青色光刺激はブ

ルーフィルターを使用して発生させた。得られた青色光は、４５０ｎｍ～４８０ｎｍであった。緑色の光刺激は、緑色のフィルターを使用して発生させた。得られた緑色光は４５０ｎｍ～４８０ｎｍであった。赤色光刺激は、赤色のフィルターを使用して発生させた。得られた赤色光は６３０ｎｍ～７２０ｎｍであった。

【０３０５】

白色光刺激は、発光における比率の変化が最大であった。青色および緑色の波長は、発光における比率の変化は最初は遅かった。赤色の波長は発光における比率の変化が非常に遅かった。

【０３０６】

実施例５

この実施例では、本方法が核酸配列における相違を検出するために使用できることを確認する。

【０３０７】

２個のサンプルを用意した。第一のサンプルは、大豆ポリヌクレオチド中に見出されるＧＭＯ配列に相補的なＰＮＡ、ＧＭＯ大豆ポリヌクレオチドおよび３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物の混合物を含んでいた。

第二のサンプルは、大豆ポリヌクレオチドに見出されるＧＭＯ　配列に相補的なＰＮＡ、非ＧＭＯ大豆ポリヌクレオチドおよび３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物の混合物を含んでいた。光刺激に曝した時の発光における経時的な変化率を両サンプルで観察した。大豆ポリヌクレオチドは、両サンプルとも大豆葉から得られたものであった。両混合物において、ＤＮＡ濃度が２５ｎｇ／ｕｌで、１００μｌ反応液体積中１μｌの単離されたＤＮＡが使用された

発光における結果として得られた経時的な変化率を図８に示す。３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物の発光における比率の変化を、３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物と、遺伝子組み換え生物（ＧＭＯ）大豆３５Ｓポリヌクレオチドの領域に相補的なＰＮＡ分子と、遺伝子組み換え生物（ＧＭＯ）大豆ポリヌクレオチドまたは非ＧＭＯポリヌクレオチドとを含むサンプルで測定した。色素の発光における変化は、大豆に対するＰＮＡのハイブリダイゼイションに起因し、非ＧＭＯ大豆に対しては起こらなかった。該方法で大豆を検出したが、非ＧＭＯ大豆は検出されなかった。本方法は、ＤＮＡ中に存在するポリヌクレオチド配列の相違を検出する手段を提供する。

【０３０８】

実施例６

この実施例ではサンプル中のポリヌクレオチドの量を、ポリヌクレオチド濃度は未知で、光学特性における変化率を光学特性における既知の変化率のカーブと相互に関連付けるサンプル中の色素の光学特性における変化率を測定することによって測定できることを実証している。時間は固定されてもよく、変化は反応の特定の時間で測定されてもよい。変化率の測定は、光学特性における１回の変化を測定し、光学特性における変化を、既知の濃度の１つまたはそれ以上のサンプルと相互に関連付けてもよい。

【０３０９】

一連のポリヌクレオチド濃度で、発光における２０％変化に必要な時間を計算した。標的ポリヌクレオチド配列は、５’ＣＴＡＣＧＧＧＡＧＧＣＡＧＣＡＧＴＧ３’（配列番号２）、ＰＮＡ分子配列は、Ｎ’ＣＡＣＴＧＣＴＧＣＣＴＣＣＣＣＧＴＡＧ－Ｌｙｓ（配列番号１）であった。標的ポリヌクレオチド濃度の作用として、２０％減少に必要な時間を図１０に示す。データは、図６における比率の変化のデータに対応する。分析の一変型として、発光における２０％変化があった点で未知の濃度を有するサンプルを測定する。与えられたサンプル中のポリヌクレオチドの量は、標準曲線に当てはめて決定してもよい。

【０３１０】

実施例７

この実施例では、標的ポリヌクレオチドはＲＮＡであることを実証している。

【０３１１】

ＰＮＡ、ＲＮＡおよび３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物色素を組み合わせた。標的ＲＮＡ配列は、５’ＣＵＡＣＧＧＧＡＧＧＣＡＧＣＡＧＵＧ３’（配列番号１５）であり、ＰＮＡ配列は、ＲＮＡ配列に相補的な配列を有する汎用の細菌ＰＮＡプローブであった。混合物を光刺激に曝し、色素の発光における比率の変化を経時的に測定し、ＲＮＡポリヌクレオチド配列の代わりに、ＤＮＡポリヌクレオチド配列を含むサンプルと比較した。

【０３１２】

結果として得られた光学特性における経時的な比率の変化を図１１に示す。１反応当たりの２０ｐｍｏｌｅの標的ＤＮＡ（黒四角）およびＲＮＡ濃度が１反応当たり２０ｐｍｏｌｅ、１反応当たり１０ｐｍｏｌｅおよび１反応当たり２ｐｍｏｌｅの標的ＲＮＡ（黒丸）の比較。Ｙ軸は、プローブおよび色素だけと比べた場合の、蛍光発光における比率の変化を表す。ＲＮＡポリヌクレオチドは、色素の発光において経時的に変化していた。ＲＮＡの存在を色素の光学特性における変化率も続いて検出された。

【０３１３】

実施例８

この実施例では、本方法が汚染されたバックグラウンドの存在下であっても作用することを実証している

デリカテッセンの肉汁で汚染されたバックグラウンド中のサンプル中の３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物の発光における経時的な比率の変化を測定した。３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物色素およびＰＮＡ分子を用意した。標的ポリヌクレオチド配列は、５’ＣＴＡＣＧＧＧＡＧＧＣＡＧＣＡＧＴＧ３’（配列番号２）であり、ＰＮＡ配列は、ＣＡＣＴＧＣＴＧＣＣＴＣＣＣＣＧＴＡＧ－Ｌｙｓ（配列番号１）であった。

【０３１４】

汚染されていないもの、クリーンシステムにおける比率の変化（黒四角）およびバックグラウンド１□１、２□１、および４□１デリカテッセン肉洗浄で汚染されているサンプルにおける結果を図１２に示す（開放記号）。実施例では、ポリヌクレオチドの存在が汚染されたバックグラウンド中でも検出された。

【０３１５】

実施例９

図１３はシステム中のＰＮＡ「ウェッジ」の付加を示す。ビオチニル化ＰＮＡ（５’バイオ－ｏｏ－ｇａｔａｇｔｇｇｇａｔｔｇｔｇｃｇｔ）（配列番号１６）はストレプトアビジンに結合し、次いでポリヌクレオチドと反応している。ハイブリダイゼイション後、色素を光刺激に曝されたシステムに加え、比率の変化を経時的に測定した。ポリヌクレオチドは、合成されたポリヌクレオチドまたはアンプリコン標的ポリヌクレオチドであってもよい。「テストａ」は、３５Ｓ　ＰＮＡ５’ｂＩｏ－ｏｏ－ｇａｔａｇｔｇｇｇａｔｔｇｔｇｃｇｔ（配列番号１６）であり、１９５ｂｐアンプリコン標的ポリヌクレオチドを表す。「テストａ＋１」は、１９５ｂｐアンプリコン標的ポリヌクレオチド付きの３５ＳＰＮＡ５’ｂＩｏ－ｏｏ－ｇａｔａｇｔｇｇｇａｔｔｇｔｇｃｇｔ（配列番号１６）およびＰＮＡ５’ｔｃｔｔｃｔｔｔｔｔｔｃｃａｃｇ－ＬＹＳ　（配列番号１７）の両方を含む。「テスト／ａ＋２」は、１９５ｂｐアンプリコン標的ポリヌクレオチド付きの３５ＳＰＮＡ５’ｂＩｏ－ｏｏ－ｇａｔａｇｔｇｇｇａｔｔｇｔｇｃｇｔ（配列番号１６）とＰＮＡ５’ｔｃｔｔｃｔｔｔｔｔｔｃｃａｃｇ－ＬＹＳ（配列番号１７）とを含む。「テスト／ａ＋ｂ」は、１９５ｂｐアンプリコン標的ポリヌクレオチド付きの３５Ｓ　ＰＮＡ５’ｂＩｏ－ｏｏ－ｇａｔａｇｔｇｇｇａｔｔｇｔｇｃｇｔ（配列番号１６）、５’ｔｃｔｔｃｔｔｔｔｔｔｃｃａｃｇ－ＬＹＳ（配列番号１７）および５’ｔｃａｃａｔｃａａｔｃｃａｃｔ－ＬＹＳ（配列番号１８）を含む。「テスト／ａ＋ｂ　ｐｒｅ」は、１９５ｂｐアンプリコン標的ポリヌクレオチド付きの３５Ｓ　ＰＮＡ５’ｂＩｏ－ｏｏ－ｇａｔａｇｔｇｇｇａｔｔｇｔｇｃｇｔ（配列番号１６）、５’ｔｃｔｔｃｔｔｔｔｔｔｃｃａｃｇ－ＬＹＳ（配列番号１７）および５’ｔｃａｃａｔｃａａｔｃｃａｃｔ－ＬＹＳ（配列番号１８

）（式中５’ｔｃｔｔｃｔｔｔｔｔｃｃａｃｇ－ＬＹＳ（配列番号１７）および５’ｔｃａｃａｔｃａａｔｃｃａｃｔ－ＬＹＳ（配列番号１８）は、結合ＰＮＡとのハイブリダイゼイションの前にアンプリコン標的ポリヌクレオチドと培養されている）を含む。「テスト／０」はｒｅｐｒｅｓｅｎｔｓ相補的ポリヌクレオチド付きの３５ＳＰＮＡ５’ｂＩｏ－ｏｏ－ｇａｔａｇｔｇｇｇａｔｔｇｔｇｃｇｔ（配列番号１６）を表す。結合－ｏｏ－は、８－アミノ－３，６－ジオキサオクタン酸である。このおよび他の実施形態において、結合は業界で公知の化学結合であればいかなるものでもよい。核酸類似体の標的ポリヌクレオチド上の異なる部位への付加は、変化率を変えることができる。

【０３１６】

実施例１０

この実施例は、異なる波長での色素の光学特性における変化率を示す。

【０３１７】

図１４は、一連のサンプルの異なる波長の光刺激に対する曝露の比較を示す。標的ポリヌクレオチド、ＰＮＡおよび３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物色素の混合物を用意し、色素の光学特性における変化を観察した。標的ポリヌクレオチドは、５’ＣＴＡＣＧＧＧＡＧＧＣＡＧＣＡＧＴＧ３’（配列番号２）であり、ＰＮＡ分子は、ＣＡＣＴＧＣＴＧＣＣＴＣＣＣＣＧＴＡＧ－Ｌｙｓ（配列番号１）であった。

【０３１８】

図１４ａ）～ｄ）は、一連の波長での色素発光の経時変化を示し、ａ）混合光、ｂ）青色光源、４５０ｎｍ、ｃ）緑色光源、５１０ｎｍ、ｄ）赤色光源、６４５ｎｍである。ａ）～ｄ）のそれぞれについて、（黒四角）は陽性コントロールまたはテストサンプルを示し、（白四角）は、ＰＮＡプローブ単独を示し、（黒三角）は３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物色素単独を示し、（×）は緩衝液バックグラウンドを示す。発光は、図７に示される比率の変化に対応する。

【０３１９】

実施例１１

この実施例は、本方法が固体支持体に結合する前あるいは後にＰＮＡ／ポリヌクレオチドハイブリッドを生成することによる固体系フォーマットにおいて使用できることを示す。

【０３２０】

汎用の細菌ＰＮＡプローブおよびその相補的ポリヌクレオチドをこれらの実験で使用した。標的ポリヌクレオチドは、５’ＣＴＡＣＧＧＧＡＧＧＣＡＧＣＡＧＴＧ３’（配列番号２）であり、ＰＮＡ分子は５’ｂＩｏ－ＣＡＣＴＧＣＴＧＣＣＴＣＣＣＣＧＴＡＧ３’（配列番号１）であった。第一のサンプルにおいて、ビオチニル化ＰＮＡプローブを、ストレプトアビジン－ビオチン結合によってウェルに固定化した。次いで、ポリヌクレオチドおよび３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物色素を加えた。サンプルは光刺激に曝され、色素の蛍光性発光における比率の変化を測定した。

【０３２１】

第二のサンプルにおいて、ビオチニル化プローブおよび標的ポリヌクレオチドは、ハイブリッド形成することができ、いっしょになってＰＮＡ／ポリヌクレオチドハイブリッドを形成した。ＰＮＡ／ポリヌクレオチドハイブリッドを、次いで、ストレプトアビジンが塗布されたウェルに加えた。ハイブリッドはウェルの表面に結合した。

【０３２２】

図１５は、第一および第二サンプルで観察された発光における経時的な比率の変化を示す。テスト１（黒四角）では、プローブーバイオは、標的ＤＮＡおよび色素と反応する前に、ストレプトアビジン－ビオチン結合によってウェルに固定化した。テスト２（黒丸）では、ウェルに加える前に、ＰＮＡ分子と標的とが、溶液中でハイブリッド形成することができた。Ｙ軸は、プローブ単独と比べた蛍光発光における経時的比率の変化を表す。

【０３２３】

実施例１２

この実施例では、本方法が、血液サンプルから得られた標的ポリヌクレオチドを同定するおよび／または定量するために使用することができることを実証している。

【０３２４】

ヒトの血液を静脈穿刺によってＥＤＴＡチューブに集めた。１０μｌの雄の血液と１０μｌの雌の血液とを１８０μｌの溶解緩衝液（６Ｍのグアニジンチオシアネート、２０ｍＭのＥＤＴＡ、１０ｍＭのトリス、ＨＣｌ（ｐＨ６．５）、４０ｇ／ＬのＴｒＩｔｏｎＸ、１０ｇ／Ｌのジエタノールジチオスレイトール）を含むマイクロチューブに加えた。血液に加える前に、緩衝液を６０℃で加熱し、溶解させた。１０μｌの雌の血液を１９０μｌの同じ溶解緩衝液を含むマイクロチューブに加えた。室温で１０分間培養して反応させた。

【０３２５】

反応液を４０００ｒｐｍで５分間遠心分離した。上澄み液を廃棄し、ペレットを５００μｌの溶解緩衝液で洗浄した。ペレットを再び最高速度で２分間遠心分離した。上澄み液を廃棄し、上澄み液を５００μｌの洗浄緩衝液（２５％のエタノール、２５％のイソプロパノール、１００ｍＭのＮａＣｌ、１０ｍＭのトリス、ＨＣｌ（ｐＨ８．０））で洗浄した。反応物を、２分間、最高速度で遠心分離し、上澄み液を廃棄した。反応物を、ＰＮＡハイブリダイゼイション反応で使用されたリン酸緩衝液５ｍＭで２回洗浄した。最終の洗浄処理の後、反応物を２００μｌの５ｍＭリン酸緩衝液で再懸濁した。

【０３２６】

以下の表に、マイクロウェル中の反応のテスト条件を示す。２．５μｌの全血液は、５０μｌの反応体積中で使用された。これは、反応液１μｌにつき３００個の標的とｌｎｇのＤＮＡと同等である。

ＰＮＡ　配列５’ＢＩｏ－００－ＴＧＡＧＴＧＴＧＧＣＴＴＴＣＧ３’（配列番号１９）

【０３２７】

【表３】

	テスト	陰性コントロール	ＰＮＡなしのコントロール
サンプル	48μl のテスト	48μl の陰性	48μl の陰性
PNA	1μl	1μl	0
色素	1μl	1μl	1μl

発光データは、励起波長が５３５ｎｍで発光波長が５９０ｎｍのジュニオス可視分光光度計を使用して集めた。最初の０分を読んだ後、サンプルＡｕｒｏｒａ５０／５０からの光刺激に３０秒曝した。蛍光発光を３０秒毎に１０分間測定した。

【０３２８】

図１６に（黒四角）によって示される標的雄血液のサンプルが、分析によって検出されたことを示す。しかし、（白四角）で示される陰性コントロールとしての雌血液は、検出されなかった。

【０３２９】

実施例１４

多数の核酸配列が、標的ポリヌクレオチドを検出するために実際使用され、あるいは使用しうる。これらの配列を以下に列挙する。

【０３３０】

【表４】

PNA 名前	配列	
PPI2101bio	5'bio-oo-tgagtgtgtggctttcg （配列番号 19)	huSRY
PPI2024	5'cactgctgcctcccgtag-LYS （配列番号 1)	16S
PPI2024bio	5'bio-OO-actgctgcctcccgtag （配列番号 20)	
PPI2025bio4	5'bio-OOOO-tgcctcccgtag （配列番号 21)	
PPI2025bio6	5'bio-OOOOOO-tgcctcccgta （配列番号 22)	
PPI2025bio8	5'bio-OOOOOOOO-tgcctcccgta （配列番号 22)	
PPI2025bio10	5'bio-OOOOOOOOOO-tgcctcccgtag (配列番号 21)	
PPI2025 UL	5'tgcctcccgtag (配列番号 21)	
PPI18bio	5'bio-oo-gatagtgggattgtgcgt （配列番号 16)	35S
PPI359	5'cccacccacgagg-LYS 配列番号 11)	
PPI485	5'tcttctttttccacg-LYS （配列番号 17)	
PPI486	5'tcacatcaatccact-LYS （配列番号 18)	
PPI2202	bio-$(O)_{10}$-ctcattgatggt （配列番号 23)	HIV
PPI911	bio-$(O)_{10}$-cgcagaccacta (配列番号 24)	HCV

実施例１５

図１９に光刺激の異なった波長への曝露の効果を示す。

【０３３１】

１６ＳＰＮＡ（５’ｃａｃｔｇｃｔｇｃｃｔｃｃｃｇｔａｇ－ＬＹＳ）（配列番号１）、ポリヌクレオチド（５’ｃｔａｃｇｇｇａｇｇｃａｇｃａｇｔｇ）（配列番号２）および３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物色素を含む混合物を、全可視波長、青色光源（４５０ｎｍ）、緑色光源（５１０ｎｍ）、赤色光源（６４５ｎｍ）および非光刺激曝露を有する白色光刺激に曝す。混合光の光源は、ＦＩＴＺからのＡｕｒｏｒａ５０／５０である。青色、緑色、赤用に、フィルターをＡｕｒｏｒａ５０／５０上に置いた。マルチウェルプレート読み取り器（Ｔｅｃａｎ製）で読み取りを行った。

【０３３２】

光刺激に曝された混合物は、基準値と比べて、色素の光学特性において異なった変化率を示した。光刺激に曝されなかった混合物は、時間測定の間測定可能な変化はなかった。異なる波長は、光学特性における異なる変化の比率を示した。この実施例では、光線は、色素の光学特性における異なる変化の比率を起こすように使用されてもよいことを示す。

【０３３３】

実施例１６

ＰＮＡは固体基質上に固定化され、ＤＮＡの量が、色素の蛍光発光の比率における変化に基づいて検出された。

【０３３４】
以下の試薬がこの実施例で使用された。すなわち、ａ）１０μＭのプローブ－ＢＩＯ（実施例１４から）、ｂ）２ｍＭの色素ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物（ＤＭＳＯ中、１００Ｍのストック；５ｍＭ緩衝液中の２ｍＭ作用濃度）；ｃ）５ｍＭの緩衝液（ｐＨ５．５）（１００ｍＭのNa_2HPO_4・$7H_2O$、ｌｍｌ＋１００ｍＭの$Na_2H_2PO_4$・H_2Oが２４ｍｌ＋４７５ｍｌのH_2O、～ｐＨ５．５）；ｄ）１ＸＰＢＳ＋０．０５％のＴｗｅｅｎ２０（ＰＢＳＴ）（１×ＰＢＳ＝０．１３７ＭのＮａＣｌ＋２．６８ｍＭのＫＣ１＋４．３ｍＭのNaH_2PO_4＋１．４７ｍＭのKH_2PO_4）；ｅ）ストレプトアビジンマイクロタイタープレート（ＮＵＮＣ）；およびｆ）標的ポリヌクレオチドを含むか、あるいは欠くテストサンプルである。

【０３３５】
ウェルの数は計算した。各ウェルは２００μｌの１ＸＰＢＳＴで３回予備洗浄して用意した。ｌｕｌのＰＮＡプローブを、合計反応物５０ｕｌ中で使用した。３ｕｌのプローブを１４７ｕｌのＰＢＳＴに加えた。

【０３３６】
ＰＮＡプローブはマイクロタイターウェルの固体表面に結合した。混合物は、静かに振盪しながら室温で１時間培養した。

【０３３７】
【表５】

＋コントロール	テストサンプル	プローブのみ	緩衝液のみ
50ul	50ul	50ul	50ul緩衝液

次いで、ウェルを１００ｕｌのＰＢＳＴで３回洗浄した。液体を取り除いた。次いで、ウェルを５ｍＭのリン酸緩衝液で３回洗浄した。陽性コントロール用として、ｌｕｌの反応物を５ｍＭのリン酸緩衝液４９ｕｌ中に加え、次いで、陽性コントロールウェルに加えた。ｌｕｌのサンプルを４９ｕｌのリン酸緩衝液中に希釈し、次いでテストサンプルウェルに加えた。
プローブのみ、緩衝液のみのウェルに５０ｕｌのリン酸緩衝液を加えた。全てのウェルを、静かに振盪しながら、室温で３０分培養した。ウェルを上記したように、１００ｕｌのリン酸緩衝液で５回洗浄した。

【０３３８】
色素溶液を、ｌｕｌの２ｍＭ色素に１ウェルにつき４９ｕｌのリン酸緩衝液を使用して製造した。色素溶液を、陰性コントロール緩衝液のみのウェルを除いて、全てのウェルに加えた。５０ｕｌのリン酸緩衝液を緩衝液のみのウェルに加えた。

【０３３９】
色素の蛍光発光を観察した。Ａｕｒｏｒａ５０／５０光源からの光刺激に曝される前に、最初の蛍光発光の読み取りが検出された。マルチウェルプレート読み取り器を使用して、５３５ｎｍでの励起、および５９０ｎｍでの発光が毎２分ごとに観察された。

【０３４０】
実施例１７
Ａ．液体ＰＮＡサンプルを使用して、以下のプロトコルを行った。

【０３４１】
テストすべきサンプルの数に対し充分な数のウェル、およびコントロール用として３個のウェルを用意した。ＤＮＡまたはＲＮＡを単離した。

【０３４２】
各テスト反応物は、次のものを含んでいた。すなわち、１μＬのＰＮＡプローブ、４７μＬの緩衝液（５ｍＭ　２ｍｌ　１００ｍＭのNa_2HPO_4・$7H_2O$＋４８ｍｌのNaH_2PO_4・H_2O／Ｌ（ｐＨ５．５））および１μＬのテストサンプルである。サン

プルをＧｒｅＩｎｅｒ９６－ウェルストリッププレート（＃７０５０７０）中に置いた。
【０３４３】
プローブ、色素および緩衝液を組み合わせ、混合物を形成し、ウェルを以下のようにセットアップした。
【０３４４】
【表６】

＋コントロール	テストサンプル	PNAのみ	緩衝液のみ
1μL＋コントロール	1μLサンプル	1μL緩衝液	50μL緩衝液

４９ｕＬの混合物を、緩衝液のみのウェルを除いて、全ウェルに加えた。溶液を静かに混合した。
【０３４５】
光刺激に曝さずに吸光度または蛍光発光を以下の波長で測定した。すなわち、吸光度：５６２ｎｍ、蛍光発光：５３５ｎｍ、および蛍光発光励起：５９０ｎｍであった。
【０３４６】
Ａｕｒｏｒａ５０／５０を使用して、サンプルを光刺激に曝し、光刺激に３０秒毎に曝した後、吸光度または蛍光発光を測定した。
【０３４７】
Ｂ．固体表面上に固定化されたＰＮＡ分子を使用して、以下のプロトコルを行った。
【０３４８】
該プロトコルにおいて、以下の項目を使用した。ａ）１０ｕＭのＰＮＡ（ＡＢＩ）；ｂ）２ｍＭの３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物（ＳＩｇｍａ－ＡｌｄｒＩｃｈ、カタログ＃；１７３７３８）色素；ｃ）５ｍＭの１ＸＰＢＳ（０．１３７ＭのＮａＣｌ、２．６８ｍＭのＫＣｌ、４．３ｍのＭＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、１．４７ｍのＭＫＨ$_2$ＰＯ$_4$）＋０．０５％のＴｗｅｅｎ２０；ｄ）１ＸＰＢＳ（０．１３７ＭのＮａＣｌ、２．６８ｍＭのＫＣｌ、４．３ｍＭのＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$）、１．４７ｍＭのＫＨ$_2$ＰＯ$_4$）＋０．０５％のＴｗｅｅｎ２０；ｅ）標的ポリヌクレオチドを含むテストサンプル；およびｆ）ストレプトアビジン塗装プレート（Ｎｕｎｃｂｒａｎｄ　ＩｍｍｏｂＩｌＩｚｅｒ（登録商標）（カタログＮｏ．４３６０１４））。
【０３４９】
一変型では、ＰＮＡはポリヌクレオチドサンプルを導入する前に固定化した。３００μｌの１ＸＰＢＳＴで３回洗浄することによって、テストすべきサンプルの数（ｎ）に対し充分な数のウェルおよびコントロール用として３個のウェルを用意した。ＤＮＡまたはＲＮＡを単離した。テストすべきＤＮＡまたはＲＮＡを単離した。ビオチニル化ＰＮＡを、１０ｕＭのＰＮＡストックｌμｌをＩｎｔｏ４９μｌのＰＢＳＴに加えることによってストレプトアビジン塗布ウェルに固定化した。
【０３５０】
ＰＮＡマスターミックスを造り、それは（ｎ＋２）×１μｌの１０μＭのＰＮＡストック、および（ｎ＋２）×４９μｌのＰＢＳＴを含んでいた。緩衝液のみの場合を除いて、５０μｌのＰＮＡｍＩｘを全てのウェルに加えた。
【０３５１】
混合物を覆い、静かな振動器上で、１時間室温で培養した。
【０３５２】
各ウェルを２００μｌのＰＢＳＴで３回、次いで５ｍＭのリン酸緩衝液で３回洗浄し、核酸サンプルを固定化プローブに加えた。１μｌのサンプルを５ｍＭのリン酸緩衝液４９μｌに加えた。
【０３５３】
下記のコントロールウェルを用意した。

【０３５４】
【表７】

	テスト	＋コントロール	PNAのみ	緩衝液のみ
テストサンプル	1 μl	1 μl	0	0
5mMのリン酸緩衝液	49 μl	49 μl	50 μl	50 μl

ウェルを覆い、室温で３０分間静かに振盪することによって培養した。次いで各ウェルを５ｍＭのリン酸緩衝液１００μで６回洗浄した。２ｍＭの色素溶液ｌμｌを、１サンプルに付き５ｍＭのリン酸緩衝液４９μｌに加えることによって色素溶液を生成した。５ｍＭのリン酸緩衝液５０μｌを緩衝液のみのウェルに加えた。
【０３５５】
光刺激に曝される前に、吸光度または蛍光発光の最初の読み出しを、以下の波長：５６２ｎｍの吸光度、５３５ｎｍの蛍光発光および５９０ｎｍ蛍光性励起で検出した。
【０３５６】
Ａｕｒｏｒａ５０／５０を使用して、サンプルを光刺激に曝した。また、Ａｕｒｏｒａ５０／５０は、異なったカラーフィルター（青、緑、赤）とともに使用して、光刺激を２０分毎に曝露して関係する波長を特定することもできる。
【０３５７】
他の変型では、ＰＮＡを固定化し、標的ポリヌクレオチドを同時にハイブリッド形成した。３００μｌの１ＸＰＢＳＴで３回洗浄することによって、サンプルの数（ｎ）に対し充分な数のウェルとともにコントロール用として３個のウェルを用意した。ＤＮＡまたはＲＮＡを単離した。
【０３５８】
ＰＮＡプローブおよびサンプルの混合物を下記するようにして用意した。
【０３５９】
【表８】

	テスト	＋コントロール	PNAのみ	緩衝液のみ
PNA	1 μl	1 μl	1 μl	0
テストサンプル	1 μl	1 μl	0	0
5mMのリン酸緩衝液	48 μl	48 μl	49 μl	50 μl

混合物を覆い、室温で静かに振盪して１０～１２０分培養した（用途に依る）。混合物を５ｍＭのリン酸緩衝液１００μｌで６回洗浄した。色素を上記したように生成した。５０μｌの溶液を、緩衝液のみのウェルを除き、各ウェルに加えた。
【０３６０】
実施例１８
植物ＤＮＡを使用して以下のプロトコルを行った。
【０３６１】
ラインはＲＲ２７０１大豆であった。使用したＤＮＡは、６２ｎｇ／ｕｌを含む精製ＤＮＡ抽出物から得た。サンプルは、６２ｎｇ／ｕｌから０．　０６２ｎｇ／ｕｌまで順次希釈した。１ｕｌのこの希釈液を５０ｕｌの反応物において使用した。
【０３６２】
ストレプトアビジンプレートを、室温（ＲＴ）で、４００ｕｌのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）（＋０．５％のＴｗｅｅｎ（ＰＢＳＴ））を使用して３回洗浄した。全ての洗浄、ローディング、アンローディングは、ピペットを用いて行った。洗浄するため、４００ｕｌの溶液を直接ウェルに加えた。次いで溶液を同じピペットとティップを使用して吸

引した。

【０３６３】

ＰＮＡ　ｂＩｏ－１８（３５Ｓ）を水で１／１０（１ｕｌのＰＮＡストックに対し９ｕｌの水）に希釈した。（ＢＩＯ－００－ＧＡＴＡＧＴＧＧＧＡＴＴＧＴＧＣＧＴ（配列番号１６）（式中、００は２個の結合である。）１ｕｌの希釈ＰＮＡを４９ｕｌのＰＢＳＴ毎に加えた。マスターミックスは、結合すべき全ウェルに加えて１ウェル過剰に含むようにした。すなわち、もし１０ウェルを結合するつもりなら、充分なミックスは１１ウェルとした（１１ｕｌの希釈ＰＮＡ＋５３９ｕｌのＰＢＳＴ）。５０ｕｌのこのミックスを各ウェルに加えた。プレートを旋回シェーカ上で静かに振盪しながら、１時間室温で培養した。同時に、マイクロＰＣＲチューブ中、水中の各ＤＮＡサンプルの連続希釈（１／１０、１／１００、１／１０００）を造ることによって、ＤＮＡを製造した。チューブはサーマルサイクラー中に置き、変性プログラムを行った（９５Ｃ、５分間）。完了した時、チューブを必要なだけ氷上に置いた。培養後、プレートをＰＢＳＴで３回、上記したように洗浄した。次いで、プレートを５ｍＭのＰ０４緩衝液（ｐＨ５．７）で３回、上記したように洗浄した。１ｕｌのＤＮＡまたは希釈ＤＮＡサンプルを各ウェル（ＧＭ　ＤＮＡまたは非ＧＭ　ＤＮＡ、１サンプル／ウェル）に加えた。４９ｕｌのＰ０４緩衝液を加えた。プレートを静かに混合し、旋回シェーカ上で静かに振盪しながら、３０分、室温で培養した。培養後、プレートをＰ０４緩衝液で５回、上記したように洗浄した。１ｕｌの３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物（３ｍＭ）を４９ｕｌのＰ０４緩衝液に加えた（マスターミックスを全ウェルに加えて１個余分に含むように造った）。５０ｕｌの色素／緩衝液を、ピペットを使用して各ウェルに加えた。次いでプレートをＴｅｃａｎスキャナー中に置き、励起５３５ｎｍおよび発光５９０ｎｍで、反応のスペクトル発光をモニターした。最初の読み取りは時間０で行った。次いでプレートを光刺激に曝し、１分間隔で読み取った。データは、エクセルで解析し、％変化対式：１００－（サンプル／ＰＮＡ色素のみ）×１００を使用して得た時間に基づいてプロットした。

【０３６４】

図２０に、大豆ＤＮＡの異なる濃度の検出を示す。これらは＋によって示される。ＧＭＯ配列を持たない大豆ＤＮＡは、バックグラウンドのレベルに近かった。これらは－によって示される。本方法は、０．０６２５ｎｇのＧＭＯ大豆ＤＮＡを検出することができた。これは、おおよそ２１ゲノムに相当する。図２１は、光学特性における比率の変化対ＧＭＯ陽性大豆およびＰＮＡ標的配列を含まない野生の大豆のゲノムの数を示す。

【０３６５】

実施例１９

以下の反応は、リン酸緩衝液中の標的ポリヌクレオチドおよび種々の濃度のＴｗｅｅｎ２０を含むリン酸緩衝液中の標的ポリヌクレオチドの検出を示す。同様の実験をＮＰ－４０およびＴｒＩｔｏｎＸ－１００を含む他の非イオン系洗浄剤とともに行った。

【０３６６】

以下の項目を本プロトコルで使用した。ａ）１０μＭのＰＮＡ（ＡＢＩ）、ｂ）２ｍＭの３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物（ＳＩｇｍａ－ＡｌｄｒＩｃｈ、カタログ＃１７３７３８）色素、ｃ）５ｍＭの緩衝液（ｐＨ５．５）（２ｍｌのＮａ$_2$ＨＰ０$_4$・７Ｈ$_2$１００ｍＭ＋４８ｍｌのＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$・Ｈ$_2$０／Ｌ）、ｄ）テストサンプル

ウェルをテストすべきサンプルの数に加えてコントロール用に３個用意した。ＤＮＡまたはＲＮＡを単離した。各テスト反応は、１ｕＬのプローブ、４７μＬの緩衝液および１μＬのサンプルを含み混合物を形成した。

【０３６７】

【表９】

＋コントロール	テストサンプル	PNAのみ	緩衝液のみ
１μＬ＋コントロール	１μＬサンプル	１μＬ緩衝液	５０μＬ緩衝液

緩衝液のみのウェルを除いて、全てのウェルに４９μＬの混合物を加え、溶液を静かに

混合した。

【０３６８】

初期蛍光発光測定を、光刺激に曝さずに５３５ｎｍに設定された発光および、５９０ｎｍに設定された励起で行った。Ａｕｒｏｒａ５０／５０を使用してサンプルを光刺激に曝し、吸光度および／または蛍光発光を６０秒毎の光刺激の後に測定した。標準の５ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ５．５）を使用し、０．０５％、０．１％、０．５％、１．０％、１．５％および２％のＴｗｅｅｎ２０を含むリン酸緩衝液中の反応と比較した。

【０３６９】

図２２に異なった濃度のＴｗｅｅｎを使用した発光を示す。（黒四角）は標的ＤＮＡとの反応を表し、（白四角）は、プローブのみを表し、（白三角）は緩衝液中の色素を表し、（＊）は緩衝液のみを表す。

【０３７０】

図２３に異なる濃度のＴｗｅｅｎの発光における％変化を示す。

【０３７１】

実施例２０

この実施例は、反応はＰＮＡ以外の核酸類似体にも使用できることを実証している。本反応は、ロックされた核酸（ＬＮＡ）を使用する。リン酸緩衝液中のＴｗｅｅｎ２０もまた種々の濃度でテストした。

【０３７２】

以下のＬＮＡ配列を使用した。

【０３７３】

【表１０】

LNA-A　$Tg^mc^mCt^mc^mc^mCGTAG$ (配列番号 25)

LNA-B　$TGc^mCt^mCc^mCGTAG$ (配列番号 26)

LNA-C　$TGCCTCc^mCGTAG$ (配列番号 27)

小文字ｍは変性された配列を表す。

【０３７４】

反応は、前記実施例１９で開示した方法に従って、液状で実施した。

【０３７５】

図２４では、液反応中でのＰＮＡプローブのデータとＬＮＡプローブのデータを比較する。リン酸緩衝液中の標準的な反応で、リン酸緩衝液に加えられた種々の濃度のＴｗｅｅｎ２０を比較した。中黒の記号はテスト反応を表し、一方中白の記号は個々のプローブのみを表す。（黒四角、白四角）ＰＮＡ、（黒菱形、白菱形）ＬＮＡ－Ａ、（黒三角、白三角）ＬＮＡ－Ｂ、（黒丸、白丸）ＬＮＡ－Ｃ

図２５にＰＮＡ対ＬＮＡを使用した発光における比率の変化を示す。（黒四角）は、ＰＮＡプローブのみと比較した時の反応における比率の変化を表す。（黒菱形）は、ＬＮＡ－Ａプローブおよび色素のみと比較した時のＬＮＡ－Ａテスト反応における比率の変化を表す。（黒三角）は、ＬＮＡ－Ｂプローブのみと比較した時のＬＮＡ－Ｂテスト反応における比率の変化を表す。（黒丸）は、ＬＮＡ－Ｃプローブのみと比較した時のＬＮＡ－Ｃテスト反応における比率の変化を表す。

【０３７６】

実施例２１

本分析方法は、また、Ｃ型肝炎ウィルスを検出するために使用されてもよい。標準の方法を使用して、既知量のＣ型肝炎ウィルスが存在する血漿からＣ型肝炎ウィルスＲＮＡを単離した。この単離したＲＮＡを使用して、反応を液状で前記実施例１９に記載された方法に従って実施した。

【０３７７】

図２６に異なる量の血漿を使用したＣ型肝炎ウィルスプローブの検出結果を示す。光学特性の変化率は、少ないコピー数であってもウィルスで相違した。

【０３７８】

また、Ｃ型肝炎ウィルスのコピー数は、定量することもできる。図２７に、異なる数のＣ型肝炎ウィルスＲＮＡを分析に導入した時に得られた色素の発光を示す。通常、システム中のウィルスＲＮＡの数が少ないほど、１分後の蛍光性発光は弱い。

【０３７９】

実施例２２

この実施例は、本方法が、細菌中の標的ポリヌクレオチドを同定するおよび／または定量するために使用できることを実証している。

【０３８０】

ＴＳＢ（トリプチソイブロス）中で一晩培養した５００μｌの細菌（大腸菌またはバシラス－セレウスのいずれか）培養物を６０００ｒｐｍで５分間回転させることによってペレット化し、次いで５００μｌのリン酸緩衝液中に再懸濁し、次いで室温で５分間放置した。この後、１６Ｓ配列用にＰＮＡ（５’ｂＩｏ－ｏｏ－　ｇａｔａｇｔｇｇｇａｔｔｇｔｇｃｇｔ（配列番号１６）または非特異的なＨＣＶ陰性コントロール配列用に５’ＢＩｏ－００－ＴＧＡＧＴＧＴＧＧＣＴＴＴＣＧ３’（配列番号１９）のいずれか）および色素をシステムに加え、光刺激に曝し、目盛りを読んだ。

【０３８１】

以下の表に５０μｌの反応物の入っているマイクロウェルにおける反応のテスト条件を示す。

【０３８２】

【表１１】

	P/Oテスト	プローブのみ	色素のみ	細菌テスト	細菌色素
PNA	5μl	5μl		5μl	
オリゴ	5μl				
細菌培養物				43μl	43μl
色素	2μl	2μl	2μl	2μl	2μl
リン酸緩衝液	38μl	43μl	48μl		5μl

発光データは、５３５ｎｍの励起波長と５９０ｎｍの発光波長で、ＧｅｎＩｏｓ可視分光光度計を使用して収集した。最初の０分を読み取った後、サンプルをＡｕｒｏｒａ５０／５０光からの光刺激に６０秒間曝した。蛍光発光を１０分間、６０秒毎に測定した。

【０３８３】

図２８に、各サンプル毎に核酸類似体／ポリヌクレオチドハイブリッドの非存在のものと比較した蛍光発光における変化率を示す。標的大腸菌またはバシラス－セレウスのサンプル（それぞれ×および＋で示す）を、分析中の１６ＳＰＮＡプローブによって検出した。しかし、標的大腸菌またはバシラス－セレウス（それぞれ白菱形および黒三角で示す）は、分析中のウィルスＨＣＶＰＮＡプローブによって検出されなかった。黒の四角は標的ポリヌクレオチドとして１６Ｓ配列に対するオリゴを有する陽性コントロールを示す。

【０３８４】

実施例２３

オリゴヌクレオチド（５’ｔｇｔｇａａｃｇｃａ３’および５’ｔｇｃｇｔｔｃａｃａ３’）をアニーリング緩衝液（１０ｍＭのトリス、ｐＨ７．５～８．０、５０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ）１０ｍＭ中で混合し、熱サイクラー中で９５Ｃ、１０分加熱した。加熱後、オリゴ混合物を室温で１時間放置した。この混合物、１マイクロリッターを反応ごとに使用した。

【０３８５】

ＰＮＡ、Ｎ’ＢＩｏ－００－ｇａｔａｇｔｇｇｇａｔｔｇｔｇｃｇｔ、Ｃ（１）’およびＮ’ｔｃａｃａｔｃａａｔｃｃａｃｔ－ｌｙｓ、Ｃ’，（２）を使用して、１０ｍＭを

反応緩衝液（５ｍＭのＰ０４＋０．０５％のＴｗｅｅｎ）中で個々に混合した。それぞれの混合物１マイクロリッターを反応毎に使用した。

【０３８６】

１０ｍＭの３－３’－ジエチルチアカルボシアニン色素ストックを希釈して反応緩衝液中４ｍＭとした。この混合物１マイクロリッターを反応毎に使用した。

【０３８７】

【表１２】

参考文献

1. Chandler, D.P., J.R. Stults., K.K. Anderson, S. Cebula, B.L. Schuck., and F.J. Brockman. 2000. Affinity capture and recovery of DNA at femtomolar concentrations with peptide nucleic acid probes. Anal. Biochem. 283:241-249.

2. Das, R., Cummings, C., Mendis, C., Neill, R., Ludwig, G., Hoover, D., Paranavitana, C., Yang, D. H. C., Lindler, L., Huang, X., Henchal, E., and Jett, M. (2001). Global Gene Analysis of Various Biological Threat and Infectious Agents Using PBMC: Implications for Therapy and Rapid Diagnostics. In: Dianne McQuestion (ed) Proceedings, Chemical and Biological Defense Symposium.

3. Demidov, V. V., Potaman, V. N., Frank-Kamenetskii, M. D., Egholm, M., Buchard, O., Sonnichsen, S. H., and Nielsen, P. E. (1994). Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. Biochem Pharmacol 48, 1310-3.

4. Haaima, G., Lohse, A., Buchardt, O. and Nielsen, P. E. (1996). Peptide Nucleic Acids (PNA) containing thymine monomers derived from chiral amino acids. Hybridization and solubility properties of d-lysine PNA. Ang Chem 35, 1939-1941.

5. Jett, M., Das, R., Cummings, C., Mendis, C., Neill, R., Hoover, D., Lindler, L., Paranavitana, C., Huang, X., Ludwig, G., Henchal, E., and Yang, D.H.C. (2001). Identification Of Changes In Gene Expression Induced By Toxic Agents: Implications for Therapy And Rapid Diagnosis. In: Proceedings of NATO Conference: Operational Issues in Chemical and Biological Defense Human Factors in Medicine Panel. Wade (ed).

6. Mikheikin, A. L., Zhuze, A. L., and Zasedatelev, A. S. (2000). Binding of symmetrical cyanine dyes into the DNA minor groove. J Biomol Struct Dyn 18, 59-72.

7. Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H., and Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. Science 254, 1497-500.

8. Nielsen, P. E. (2001). Peptide nucleic acid: a versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology. Curr Opin Biotechnol 12, 16-20.

9. Ray, A., and Norden, B. (2000). Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. Faseb J 14, 1041-60.

10. Stefano, K. and Hyldig-Nielsen, J. J. (1997). Diagnostic Applications of PNA oligomers. In: Diagnostic Gene Detection and Quantification Technologies Minden (ed). pp. 19-39.

11. Wang, J., Palecek, E., Nielsen, P. E., Rivas, G., Cai, X., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., and Farias, P. A. M. (1996). Peptide Nucleic Acid Probes for Sequence-Specific DNA Biosensors. J Am Chem Soc 118, 7667-70.

【０３８８】

【表１３】

12. Wilhelmsson, L. M., Norden, B., Mukherjee, K., Dulay, M. T., and Zare, R. N. (2002). Genetic screening using the color change of a PNA-DNA hybrid-binding cyanine dye. Nucleic Acids Res 30, E3.

13. Institute of Food Technologists (2002). Emerging Microbiological Food Safety Issues: Implications for Control in the 21st Century.

14. Wagner, SJ. 2002. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes. Transfus. Med. Rev. 16:61-6.

15. Kapuscinski, J. 1995. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. Biotech. Histochem. 70:220-33.

16. Carreon, JR., Mahon, KP jr., Kelley, SO. 2004. Thiazole orange-peptide conjugates: sensitivity of DNA binding to chemical structure. Org. Lett. 6:517-9.

17. Morozkin, ES., Lakionov, PP., Rykova, EY., Vlassov, VV. 2003. Fluorometric quantification of RNA and DNA in solutions containing both nucleic acids. Anal. Biochem. 322:48-50.

18. Eriksson, M., Karlson, HJ., Westman, G., Akerman, B. 2003. Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: dissociation rates in free solution and electrophoresis gels. Nucleic Acids Res. 31:6235-42.

19. Karlsson, HJ., Eriksson, M., Perzon, E., Akerman, B., Lincoln, P., Westman, G. 2003. Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: syntheses and characterization of the DNA-binding. Nucleic Acids Res. 31:6227-34.

20. Schaberle, FA., Kuz'min, VA., Borissevitch, IE. 2003. Spectroscopic studies of the interaction of bichromophoric cyanine dyes with DNA. Effect of ionic strength. Biochim. Biophys. Acta. 1621:183-91.

21. Maiti, S., Chaudhury, NK., Chowdhury, S. 2003. Hoechst 33258 binds to G-quadruplex in the promoter region of human c-myc. Biochem. Biophys. Res. Commun. 310:505-12.

22. Tolun, G., Myers, RS. 2003. A real-time Dnase assay (ReDA) based on PicoGreen fluorescence. Nucleic Acids Res. 31:e111.

23. Sovenyhazy, KM., Bordelon JA., Petty, JT. 2003. Spectroscopic studies of the multiple binding modes of a trimethine-bridged cyanine dye with DNA. Nucleic Acids Res. 31:2561-9.

24. Prento, P., Lyon, HO. 2003. Methyl green-pyronin Y staining of nucleic acids: studies on the effects of staining time, dye composition and diffusion rates. Biotech. Histochem. 78:27-33.

25. Adhikary, A., Buschmann, V., Muller, C., Sauer, M. 2003. Ensemble and single-molecule fluorescence spectroscopic study of the binding modes of the bis-benzimidazole derivative Hoechst 33258 with DNA. Nucleic Acids Res. 31:2178-86.

【０３８９】

【表１４】

26. Johnson, IM., Kumar, SG., Malathi, R. 2003. De-intercalation of ethidium bromide and acridine orange by xanthine derivatives and their modulatory effect on anticancer agents: a study of DNA-directed toxicity enlightened by time correlated single photon counting. J. Biomol. Struct. Dyn. 20:677-86.

27. Wang, Z., Zhang, Z., Liu, D., Dong, S. 2003. A temperature-dependent interaction of neutral red with calf thymus DNA. Spectrochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc. 59:949-56.

28. Karlsson, HJ., Lincoln, P., Westman, G. 2003. Synthesis and DNA binding studies of a new asymmetric cyanine dye binding in the minor groove of [poly(dA-dT)]2. Bioorg. Med. Chem. 11:1035-40.

29. Puckowska, A., Bielawski, K., Bielawska, A., Midura-Nowaczek, K. 2004. Aromatic analogs of DNA minor groove binders-synthesis and biological evaluation. Eur. J. Med. Chem. 39:99-105.

30. Reddy, PA., Santra, BK., Nethaji, M., Chakravarty, AR. 2004. Metal-assisted light-induced DNA cleavage activity of 2-(methylthio)phenylsalicylaldimine Schiff base copper(II) complexes having planar heterocyclic bases. J. Inorg. Biochem. 98:377-86.

31. Tanious, FA., Hamelberg, D., Bailly, C., Czarny, A., Boykin, DW., Wilson, WD. 2004. DNA sequence dependent monomer-dimer binding modulation of asymmetric benzimidazole derivatives. J. Am. Chem. Soc. 126:143-53.

32. Ma, DL., Che, CM. 2003. A bifunctional platinum(II) complex capable of intercalation and hydrogen-bonding interactions with DNA: binding studies and cytotoxicity. Chemistry. 9:6133-44.

33. Wakelin, LP., Bu, X., Eleftheriou, A., Parmar, A., Hayek, C., Stewart, BW. 2003. Bisintercalating threading diacridines: relationships between DNA binding, cytotoxicity, and cell cycle arrest. J. Med. Chem. 46:5790-802.

34. Tarasov, SG., Casas-Finet, JR., Cholody, WN., Kosakowska-Cholody, T., Gryczynski, ZK., Michejda, CJ. 2003. Bisimidazoacridones: 2. Steady-state and time-resolved fluorescence studies of their diverse interactions with DNA. Photochem. Photobiol. 78:313-22.

35. Tawar, U., jain, AK., Chandra, R., Singh, Y., Dwarakanath, BS., Chaudhury, NK., Good, L., Tandon, V. 2003. Minor groove binding DNA ligands with expanded A/T sequence length recognition, selective binding to bent DNA regions and enhanced fluorecent properties. Biochemistry. 18:13339-46.

36. Boutorine, AS., Ryabinin, VA., Novopashima, DS., Venyaminova, AG., Helene, C., Sinyakov, AS. 2003. Stabilization of DNA double and triple helices by conjugation of minor groove binders to oligonucleotides. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 22:1267-72.

【０３９０】

【表１５】

37. Novopashima, D., Sinyakov, A., Ryabinin, V., Venyaminova, A., Boutorine, A., 2003. Conjugates of oligo(2'-O-methylribonucleotides) with minor groove binders as new sequence-specific agents recognizing both grooves of double-stranded DNA. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 22:1179-82.

38. Dhar, S., Senapati, D., Das, PK., Chattopadhyay, P., Nethaji, M., Chakravarty, AR. 2003. Ternary copper complexes for photocleavage of DNA by red light: direct evidence for sulfur-to-copper charge transfer and d-d band involvement. J. Am. Chem. Soc. 125:12118-24.

39. Hiraku, Y., Oikawa, S., Kawanishi, S. 2002. Distamycin A, a minor groove binder, changes enediyne-induced DNA cleavage sites and enhances apoptosis. Nucleic Acids Res. Suppl. 2002:95-6.

40. Dervan, PB., Edelson, BS. 2003. Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides. Curr. Opin. Struct. Biol. 13:284-99.

41. Reddy, PM., Jindra, PT., Satz, AL., Bruice, TC. 2003. Sequence selective recognition in the minor groove of dsDNA by pyrrole, imidazole-substituted bis-benzimidazole conjugates. J. Am. Chem. Soc. 125:7843-8.

42. Briehn, CA., Weyermann, P., Dervan, PB. 2003. Alternative heterocycles for DNA recognition: the benzimidazole/imidazole pair. Chemistry. 9:2110-22.

43. Renneberg, D., Dervan, PB. 2003. Imidiazopyridine/Pyrrole and hydroxybenzimidazole/pyrrole pairs for DNA minor groove recognition. J. Am. Chem. Soc. 125:5707-16.

44. Kuwabara, T., Noda, T., Ohtake, H., Ohtake, T., Toyama, S., Ikariyama, Y. Classification of DNA-binding mode of antitumor and antiviral agents by the electrochemiluminescence of ruthenium complex. Anal. Biochem. 314:30-7.

45. Ouameur, AA., Nafisi, Sh., Mohajerani, N., Tajmir-Riahi, HA. 2003. Thallium-DNA complexes in aqueous solution. Major or minor groove binding. J. Biomol. Struct. Dyn. 20:561-5.

46. Carrasco, C., Helissey, P., Haroun, M., Baldeyrou, B., Lansiaux, A., Colson, P., Houssier, C., Giorgi-Renault, S., Bailly, C. 2003. Design of a composite ethidium-netropsin-anilinoacridine molecule for DNA recognition. Chembiochem. 3:50-61.

47. Nguyen, B., Lee, MP., Hamelberg, D., Joubert, A., Bailly, C., Brun, R., Neidle, S., Wilson, WD. J. Am. Chem. Soc. 124:13680-1.

hh) Barcelo, F., Capo, D., Portugal, J. 2002. Thermodynamic characterization of the multivalent binding of chartreusin to DNA. Nucleic Acids Res. 30:4567-73.

【０３９１】

【表１６】

48. Silverman, AP., Bu, W., Cohen, SM., Lippard, SJ. 2002. 2.4-A crystal structure of the asymmetric platinum complex [Pt(ammine)(cyclohexylamine)]2+ bound to a dodecamer DNA duplex. J. Biol. Chem. 277:49743-9.

49. Viola, G., Dall'Acqua, F., Gabellini, N., Moro, S., Vedaldi, D., Ihmels, H. 2002. Indolo[2.3-b]-quinolizinium bromide: an efficient intercalator with DNA-photodamaging properties. Chembiochem. 3:550-8.

50. Anthoney, DA., Twelves, CJ. 2001. DNA: still a target worth aiming at? A review of new DNA-interactive agents. Am. J. Pharmacogenomics. 1:67-81.

51. Shim, YH., Arimondo, PB., Laigle, A., Garbesi, A., Lavielle, S. 2004. Relative DNA binding affinity of helix 3 homeodomain analogs, major groove binders, can be rapidly screened by displacement of prebound ethidium bromide. A comparative study. Org. Biomol. Chem. 2:915-21.

52. Varadarajan, S., Shah, D., Dande, P., Settles, S., Chen, FX., Fronza, G., Gold, B. 2003. DNA damage and cytotoxicity induced by minor groove binding methyl sulfonate esters. Biochemistry. 42:14318-27.

53. Guelev, V., Lee, J., Ward, J., Sorey, S., Hoffman, DW., Iverson, BL. 2001. Peptide bis-intercalator binds DNA via threading mode with sequence specific contacts in the major groove. Chem. Biol. 8:415-25.

54. Huang, X., Suleman, A., Skibo, EB. 2000. Rational design of pyrrolo. Bioorg. Chem. 28:324-37.

55. Proudfoot, EM., Mackay, JP., Karuso, P. 2001. Probing site specificity of DNA binding metallointercalators by NMR spectroscopy and molecular modeling. Biochemistry. 40:4867-78.

56. Kondo, S., Kinjo, T., Yano, Y. 2004. Synthesis of a novel intercalator based on 2,2'-binaphthalene bearing dimethylammonium groups. Bioorg. Med. Chem. Lett. 14:1641-3.

57. Nielsen, CB., Petersen, M., Pedersen, EB., Hansen, PE., Christensen, UB. 2004. NMR structure determination of a modified DNA oligonucleotide containing a new intercalating nucleic Acid. Bioconjug. Chem. 15:260-9.

58. Liu, F., Wang, K., Bai, G., Zhang, Y., Gao, L. 2004. The pH-Induced Emission Switching and Interesting DNA-Binding Properties of a Novel Dinuclear Ruthenium(II) Complex. Inorg. Chem. 43:1799-806.

59. Biver, T., Secco, F., Tine, MR., Venturini, M. 2004. Kinetics and equilibria for the formation of a new DNA metal-inetercalator: the cyclic polyamine Neotrien/copper(II) complex. J. Inorg. Biochem. 98:33-40.

【０３９２】

【表１７】

60. Lauretti, F., Lucas de Melo, F., Benati, FJ., de Melto Volotao, E., Santos, N., Linhares, RE., Nozawa, C. 2003. Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels. J. Virol. Methods. 114:29-35.

61. Wong, EL., Gooding, JJ. 2003. Electronic detection of target nucleic acids by a 2,6-disulfonic acid anthraquinone intercalator. Anal. Chem. 75:3845-52.

62. Luedtke, NW., Liu, Q., Tor, Y. 2003. RNA-ligand interactions: affinity and specificity of aminoglycoside dimers and acridine conjugates to the HIV-1 Rev response element. Biochemistry. 42:11391-403.

63. Yamana, K., Kawakami, N., Ohtsuka, T., Sugie, Y., Nakano, H., Saito, I. 2003. Electrochemical detection of single-base mismatches in DNA by a redox-active intercalator conjugated oligonucleotide. Nucleic Acids Res. Suppl. 2003:89-90.

64. Takanaka, S., Ohtuka, K., Miyahara, H., Nojima, T., Takagi, M. 2002. An anthracene derivative carrying ferrocenyl moieties at its 9 and 10 positions as a new electrochemically active threading intercalator. Nucleic Acids Res. Suppl. 2002:291-2.

65. Xiao, Y., Kharitonov, AB., Patolsky, F., Weizmann, Y., Willner, I. 2003. Electrocatalytic intercalator-induced winding of double-stranded DNA with polyaniline. Chem. Commun. (Camb). 7:1540-1.

66. Baruah, H., Bierbach, U. 2003. Unusual intercalation of acridin-9-ylthiourea into the 5'GA/TC DNA base step from the minor groove: implications for the covalent DNA adduct profile of a novel platinum-intercalator conjugate. Nucleic Acids Res. 31:4138-46.

67. Nojima, T., Kondoh, Y., Takenaka, S., Ichilhara, T., Takagi, M., Tashiro, H., Matsumoto, K. 2001. Detection of DNA hybridization by use of a lanthanide fluorescent intercalator that specifically binds to double stranded DNA. Nucleic Acids Res. Suppl. 2001:105-6.

68. Wang, S., Peng, T., Yang, CF. 2003. Electrochemical determination of interaction parameters for DNA and mitoxantrone in an irreversible redox process. Biophys. Chem. 104:239-48.

69. Guittat, L., Alberti, P., Rosu, F., Van Miert, S., Thetiot, E., Pieters, L., Gabelica, V., De Pauw, E., Ottaviani, A., Riou, JF., Mergny, JL. 2003. Interactions of cryptolepine and neocryptolepine with unusual DNA structures. Biochimie. 85:535-47.

70. Barry, CG., Turney, EC., Day, CS., Saluta, G., Kucera, GL., Bierbach, U. 2002. Thermally inert metal ammines as light-inducible DNA-targeted agents. Synthesis, photochemistry, and photobiology of a prototypical rhodium(III)-intercalator conjugate. Inorg. Chem. 41:7159-69.

71. Christensen, UB., Pedersen, EB. 2002. Intercalating nucleic acids containing insertions of 1-O-(1-pyrenylmethyl)glycerol: stabilization of dsDNA and discrimination of DNA over RNA. Nucleic Acids Res. 30:4918-25.

【０３９３】

【表１８】

72. Patolsky, F., Katz, E., Willner, I. 2002. Amplified DNA detection by electrogenerated biochemiluminescence and by the catalyzed precipitation of an insoluble product on electrodes in the presence of the doxorubicin intercalator. Angrew. Chem. Int. Ed. Engl. 41:3398-402.

73. Woods, CR., Ishii, T., Boger, DL. 2002. Synthesis and DNA binding properties of iminodiacetic acid-linked polyamides: characterization of cooperative extended 2:1 side-by-side parallel binding. J. Am. Chem. Soc. 124:10676-82.

74. Woods, CR., Faucher, N., Eschgfaller, B., Bair, KW., Boger, DL. 2002. Synthesis and DNA binding properties of saturated distamycin analogs. Bioorg. Med. Chem. Lett. 12:2647-50.

75. Brana, MF., Dominguez, G., Saez, B., Romerdahl, C., Robinson, S., Barlozzari, T. 2002. Synthesis and antitumor activity of new dendritic polyamines-(imide-DNA-intercalator) conjugates: potent Lck inhibitors. Eur. J. Med. Chem. 37:541-51.

76. Onfelt, B., Gostring, L., Lincoln, P., Norden, B., Onfelt, A. 2002. Cell studies of the DNA bis-iintercalator Delta-Delta [mu-C4 (cpdppz)(2)-(phen)Ru(2)](4+): toxic effects and properties as a light emitting DNA probe in V79 Chinese hamster cells. Mutagenesis. 17:317-20.

77. Berge, T., Jenkins, NS., Hopkirk, RB., Waring, MJ., Edwardson, JM., Henderson, RM. 2002. Structural perturbations in DNA caused by bis-intercalation of ditercalinium visualized by atomic force microscopy. Nucleic Acids Res. 30:2980-6.

78. Arabzadeh, A., Bathaie, SZ, Farsam, H., Amanlou, M., Saboury, AA., Shockravi, A., Moosavi-Movahedi, AA. 2002. Studies on mechanism of 8-methoxypsoralen-DNA interaction in the dark. Int. J. Pharm. 237:47-55.

79. Reha, D., Kabekac, M., Ryjacek, F., Sponer, J., Sponer, JE., Elstner, M., Suhai, S., Hobza, P. 2002. Intercalators. 1. Nature of stacking interactions between intercalators (ethidium, daunomycin, ellipticine, and 4',6-diaminide-2-phenylindole) and DNA base pairs. Ab initio quantum chemical, density functional theory, and empirical potencial study. J. Am. Chem. Soc. 124:3366-76.

80. Guelev, V., Sorey, S., Hoffman, Dw., Iverson, BL. 2002. Changing DNA grooves--a 1,4,5,8-naphthalene tetracarboxylic diimide bis-intercalator with the linker (beta-Ala)(3)-Lys in the minor groove. J. Am. Chem. Soc. 124:2864-5.

81. Lisgarten, JN., Coll, M., Portugal, J., Wright, CW., Aymami, J. 2002. The antimalarial and cytotoxic drug cryptolepine intercalates into DNA at cytosine-cytosine sites. Nat. Struct. Biol. 9:57-60.

82. Ferry, DM., Van Zijl, PL., Wilson, WR. 2001. Sensitive liquid chromatographic assay for the basic DNA intercalator (N, N-dimethylaminoethyl)-9-amino-5-methylacridine-4-

83. carboxamide and its nitroarylmethyl quaternary prodrugs in biological samples. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 763:149-56.

【０３９４】

【表１９】

84. Tok, JB., Fenker, J. 2001. Novel synthesis and RNA-binding properties of aminoglycoside dimers conjugated via a naphthalene diimide-based intercalator. Bioorg. Med. Chem. Lett. 11:2987-91.

85. Dienes, Z., Vogel, P. 1996. Asymetric Synthesis and DNA Intercalation of (-)-6-[[(Aminoalkyl)oxy]methyl]-4-demethoxy-6,7-dideoxydaunomycinones(1)(,). J. Org. Chem. 61:6958-6970.

86. Papadopoulou, MV., Ji, M., Rao, MK., Bloomer, WD. 2000. 4-[3-(2-Nitro-1-imidazolyl)propylamino-7-chloroquinoline hydrochloride (NLCQ-1), a novel bioreductive agent as radiosensitizer in vitro and in vivo: comparison with tirapazamine. Oncol. Res. 12:325-33.

87. Boger, DL, Tse, WC. 2001. Thiazole orange as the fluorescent intercalator in a high resolution fid assay for determining DNA binding affininty and sequence selectivity of small molecules. Bioorg. Med. Chem. 9:2511-8.

88. Gianolio, DA., McLaughlin, LW. 2001. Tethered naphthalene diimide intercalators enhance DNA triplex stability. Bioorg. Med. Chem. 9:2329-34.

89. Onfelt, B., Lincoln, P., Norden, B. 2001. Enantioselective DNA threading dynamics by phenazine-linked. J. Am. Chem. Soc. 123:3630-7.

90. Wong, M., Kong, S., Dragowska, WH., Bally, MB. 2001. Oxazole yellow homodimer YOYO-1-labeled DNA: a fluorescent complex that can be used to asses structural changes in DNA following formation and cellular delivery of cationic lipid DNA complexes. Biochim. Biophys. Acta. 1527:61-72.

91. Hicks, KO., Pruijn, FB., Baguley, BC., Wilson, WR. 2001. Extravascular transport of the DNA intercalator and topoisomerase poison N-[2-(Dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide (DACA): diffusion and metabolism in multicellular layers of tumor cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. 297:1088-98.

92. Kisko, JL, Barton, JK. 2000. Recognition of DNA base pair mismatches by a cyclometalated Rh(III) intercalator. Inorg. Chem. 39:4942-9.

93. Dees, EC., Whitfield, LR., Grove, WR., Rummel, S., Grochow, LB., Donehower, RC. 2000. A phase I and pharmacologic evaluation of the DNA intercalator CI-958 in patients with advanced solid tumors. Clin. Cancer Res. 6:3885-94.

94. Pelley, R., Ganapathi, R., Wood, L., Rybicki, L., McLain, D., Budd, GT., Peereboom, D., Olencki, T., Bukowski, RM. 2000. A phase II pharmacodynamic study of pyrazoloacridine in patients with metastatic colorectal cancer. Cancer Chemother. Pharmacol. 46:251-4.

【０３９５】

【表２０】

95. Perrin, LC., Prenzler, PD., Cullinane, C., Phillips, DR., Denny, WA., McFadyen, WD. 2000. DNA targeted platinum complexes: synthesis, cytotoxicity and DNA interactions of cis-dichloroplatinum(II) complexes tethered to phenazine-1-carboxamides. J. Inorg. Biochem. 81:111-7.

96. Mazerski, J., Muchewicz, K. 2000. The intercalation of imidazoacridinones into DNA induces conformational changes in their side chain. Acta. Biochim. Pol. 47:65-78.

97. Sajewicz, W., Dlugosz, A. 2000. Cytotoxicity of some potential DNA intercalators (carbazole, acridine and anthracene derivatives) evaluated through neutrophil chemiluminescence. J. Appl. Toxicol. 20:305-12.

98. Osiadacz, J., Majka, J., Czarneski, K., Pecynska-Czoch, W., Zakrzewska-Czerwinska, J., Kaczmarek, L., Sokalski, WA. 2000. Sequence-selectivity of 5,11-dimethyl-5H-indolo[2,3-b]quinoline binding to DNA. Footprinting and molecular modeling studies. Bioorg. Med. Chem. 8:937-43.

99. Kirschstein, O., Sip, M., Kitter, L. 2000. Quantitative and sequence-specific analysis of DNA-ligand interaction by means of fluorescent intercalator probes. J. Mol. Recognit. 13:157-63.

100. Numez, ME., Noyes, KT., Gianolio, DA., McLaughlin, LW., Barton, JK. 2000. Long-range guanine oxidation in DNA restriction fragments by a triplex-directed naphathalene diimide intercalator. Biochemistry. 39:6190-9.

101. Jackson, BA., Barton, JK. 2000. Recognition of base mismatches in DNA by 5,6-chrysenequinone diimine complexes of rhodium(III): a proposed mechanism for preferential binding in destabilized regions of the double helix. Biochemistry. 39:6176-82.

102. Chen, QY., Li, DH., Zhao, Y., Yang, HH., Zhu, QZ., Xu, JG. 1999. Interaction of a novel red-region fluorescent probe, Nile blue, with DNA and its application to nucleic acids assay. Analyst. 124:901-6.

103. Dassonneville, L., Wattez, N., Mahieu, C., Colson, P., Houssier, C., Frederich, M., Tits, M., Angenot, L., Bailly, C. 1999. The plant alkaloid usambarensine intercalates into DNA and induces apoptosis in human HL60 leukemia cells. Anticancer Res. 19:5245-50.

104. Toshima, K., Takano, R., Maeda, Y., Suzuki, M., Asai, A., Matsumura, S. 1999. 2-Phenylquinoline-Carbohydrate Hybrids: Molecular Design, Chemical Synthesis, and Evaluation of a New Family of Light-Activatable DNA-Cleaving Agents. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 38:3733-3735.

105. Yang, X., Liu, WH., Jin, WJ., Shen, GL., Yu, RQ. 1999. DNA binding studies of a solvatochromic fluorescence probe 3-methoxybenzanthrone. Spectochim. Acta. A Mol. Biomol. Spectrosc. 55A:2719-27.

106. Mueller, SO., Stopper, H. 1999. Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta. 1428:406-14.

【０３９６】

【表２１】

107. Inoue, T., Sugiura, Y., Saitoh, J., Ishiguro, T., Otsuka, M. 1999. Flurorescence property of oxazole yellow-linked oligonucleotide. Triple helix formation and photocleavage of double-stranded DNA in the presence of spermine. Bioorg. Med. Chem. 7:1207-11.

108. Dempcy, RO., Kutyavin, IV., Mills, AG., Lukhtanov, EA., Meyer, RB. 1999. Linkers designed to intercalate the double helix greatly facilitate DNA alkylation by triplex-forming oligonucleotides carrying a cyclopropapyrroloindole reactive moiety. Nucleic Acids Res. 27:2931-7.

109. Keppler, M., Zegrocka, O., Strekowski, L., Fox, KR. 1999. DNA triple helix stabilization by a naphthylquinoline dimmer. FEBS Lett. 447:223-6.

110. Ostaszewki, R., Wilczynska, E., Wolszczak, M. 1998. The synthesis of a new type of anthracene DNA intercalator. Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:2995-6.

111. Atwell, GJ., Fan, JY., Tan, K., Denny, WA. 1998. DNA-Directed alkylating agents.7. Synthesis, DNA interaction, and antitumor activity of bis(hydroxymethyl)- and bis(carbamate)-substituted pyrrolizines and imidazoles. J. Med. Chem. 41:4744-54.

112. Milano, MT., Hu, GG., Williams LD., Bernhard, WA. 1998. Migration of electrons and holes in crystalline d(CGATCG)-anthracycline complexes X-irradiated at 4K. Radiat. Re. 150:101-14.

113. Benson, SC., Mathies, RA., Glazer, AN. 1993. Heterodimeric DNA-binding dyes designed for energy transfer: stability and applications of the DNA complexes. Nucleic Acids Research. 21:5720-5726.

114. Benson, SC., Singh, P., Glazer, AN. 1993. Heterodimeric DNA-binding dyes designed for energy transfer: synthesis and spectroscopic properties. Nucleic Acids Research. 21:5727-5735.

115. Smith, JO., Olson, DA., Armitage, BA. 1999. Molecular recognition of PNA-containing hybrids: Spontaneous assembly of helical cyanine dye aggregates on PNA templates. J. Am. Chem. Soc. 121:2686-2695.

各公報、特許または特許出願が、特異的で個別に参照として組み込んでいるのと同程度に全目的のために、ここで引用した全ての公報、特許および特許出願は、その全てが参照として本明細書中に組み込まれる。上記した発明の理解を明らかにするために、説明および実施例によって詳しく記載したが、開示の趣旨および範囲から逸脱しない限り、本発明の教示に照らしてある変更や変形が加えられることは、当業者には容易に明らかである。

【図面の簡単な説明】

【０３９７】

【図１】ＰＮＡを使用した一分析システムの１つの変型の概略図である。

【図２】ＤＮＡ分子とサンプルＰＮＡ分子との構造上の相違を示す。

【図３】光によって活性化されたＰＮＡ系分析システムの概略図である。

【図４】光によって活性化された分析反応を示す。

【図５】標的ポリヌクレオチドの様々な濃度について、ＰＮＡおよび光刺激に曝された後の３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物色素発光の経時変化を示す。

【図６】様々なＤＮＡ濃度における３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物色素

発光の比率の変化を示す。
【図７】刺激作用について様々な波長の光刺激を使用したテストサンプルにおける３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物発光の比率の変化を比較する。
【図８】ＧＭＯ大豆からのＤＮＡと非ＧＭＯ大豆からのＤＮＡとのサンプルにおける色素発光の比率の変化を比較する。
【図９】混合波長光源を使用した種々のテストＤＮＡ濃度に関する試験感度を示す。それぞれの線は、種々のＤＮＡ濃度で光刺激に曝露した後の色素の発光における比率の変化を示す。ＰＮＡはＮ’ＣＡＣＴＧＣＴＧＣＣＴＣＣＣＣＧＴＡＧ－Ｌｙｓであった。（配列番号１）ポリヌクレオチド配列は、５’ＣＴＡＣＧＧＧＡＧＧＣＡＧＣＡＧＴＧ３’であった。（配列番号２）
【図１０】様々な標的ポリヌクレオチド濃度において、３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物発光の２０％変化が起こる時間を示す。
【図１１】ＤＮＡサンプルおよび種々のＲＮＡ濃度のサンプルにおける色素発光の比率の変化を示す。
【図１２】ＰＮＡと、デリ洗浄バックグラウンドの非存在下または存在下のＤＮＡとを含むサンプル中の３，３’－ジエチルチアカルボシアニンヨウ化物の経時的な発光の比率の変化を比較する。
【図１３】ＰＮＡ「ウェッジ」の付加を示す。
【図１４】図１４Ａ～Ｄは、一連のサンプルに様々な波長を当てた後の発光を比較する。
【図１５】汎用細菌ＰＮＡプローブを使用した固定化反応を経時的に示す。
【図１６】ヒトＳＲＹ検出を示す。
【図１７】光によって活性化された、核酸類似体の表面固定化検出の概略図を示す。
【図１８－１】図１８Ａ～Ｄは、ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドを導入した様々なスキームを示す。
【図１８－２】図１８Ａ～Ｄは、ポリヌクレオチド／核酸類似体ハイブリッドを導入した様々なスキームを示す。
【図１９】光刺激の様々な波長の効果を示す。
【図２０】大豆ＤＮＡの様々な濃度の検出結果を示す。
【図２１】光学特性における比率の変化に対するＧＭＯ陽性大豆のゲノム数を示す。
【図２２】Ｔｗｅｅｎ２０の様々な濃度における効果を示す。
【図２３】Ｔｗｅｅｎ２０の様々な濃度における発光の比率の変化を示す。
【図２４】様々な濃度のＴｗｅｅｎ２０の液体系で、ＰＮＡプローブを使用した反応とＬＮＡプローブを使用した反応とを比較する。
【図２５】ＰＮＡを使用した発光対ＬＮＡを使用した発光における比率の変化を示す。
【図２６】様々な量のウィルスＲＮＡを使用したＣ型肝炎ウィルスの検出結果を示す。
【図２７】光刺激に曝露して１分後の血漿中の様々な量のコピーの発光を示す。
【図２８】ＨＣＶまたは細菌特異体である、細菌および核酸類似体を使用した発光の比率の変化を示す。
【図２９】短核酸類似体または複数の短核酸類似体を使用した発光の比率の変化を示す。

【図１】

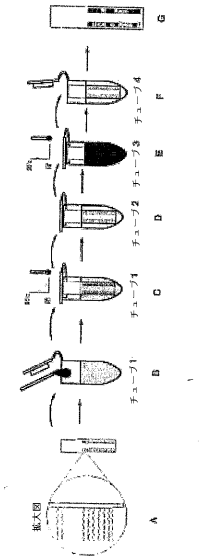


Figure 1

【図２】

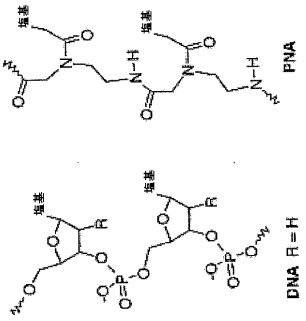


Figure 2

【図３】

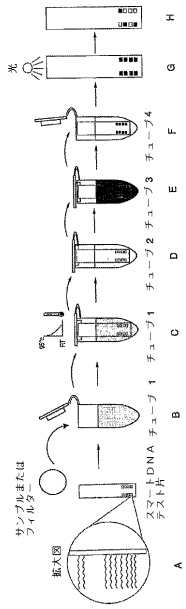


Figure 3

【図４】

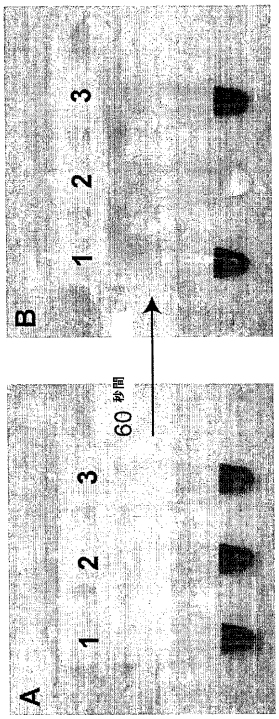


Figure 4

【図５】

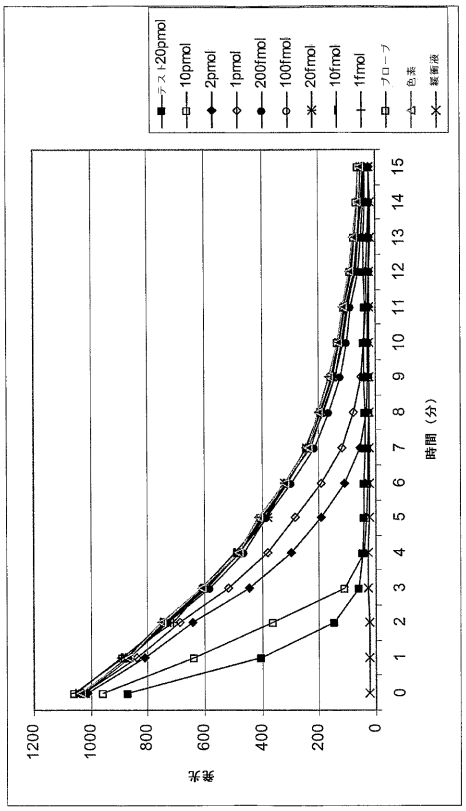


Figure 5

【図６】

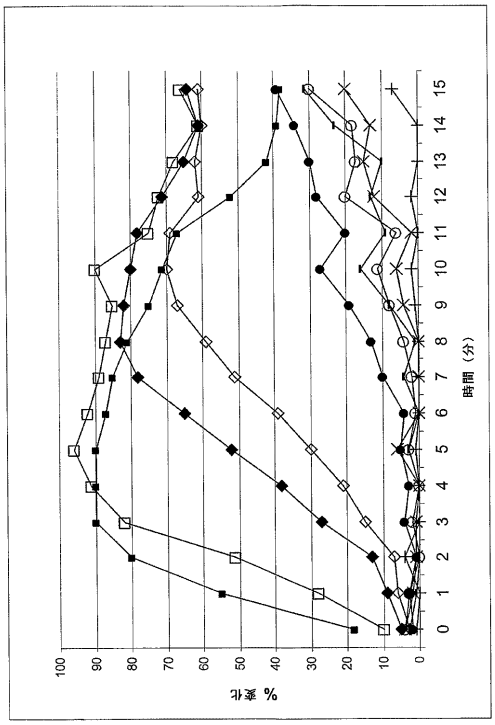
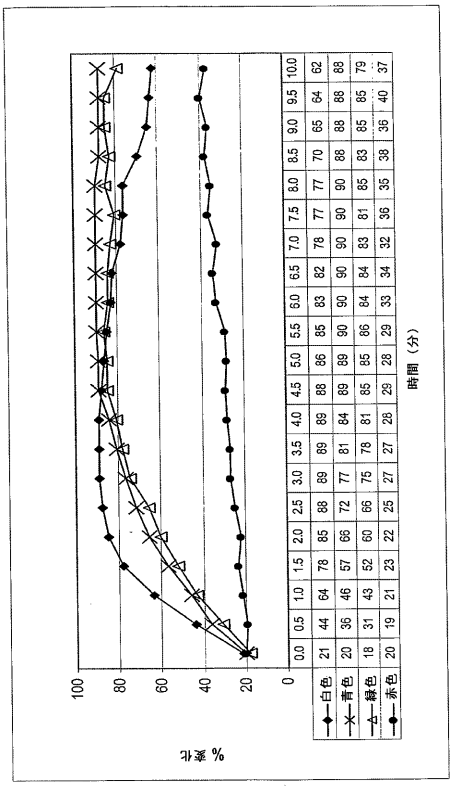


Figure 6

【図７】



	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
白色	21	44	64	78	85	88	89	89	89	88	86	85	83	82	78	77	77	70	65	64	62
青色	20	36	46	57	66	72	77	81	84	89	89	90	90	90	90	90	90	88	88	88	88
緑色	18	31	43	52	60	66	75	78	81	85	85	86	84	84	83	81	85	83	85	85	79
赤色	20	19	21	23	22	25	27	28	29	28	29	29	33	34	32	36	35	38	35	40	37

Figure 7

【図８】

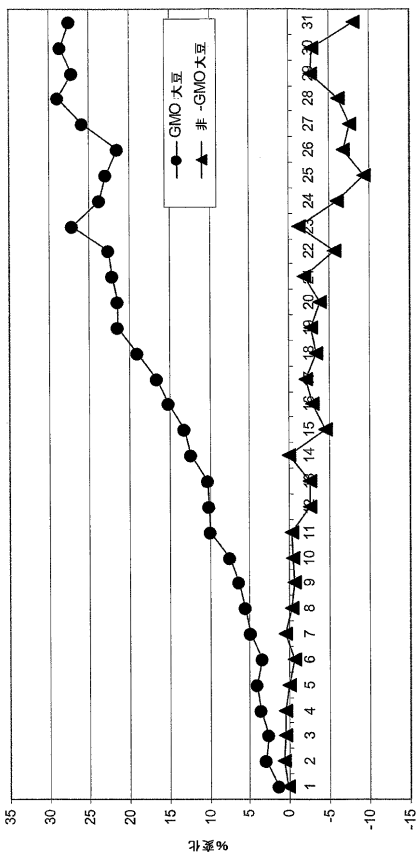


Figure 8

【図９】

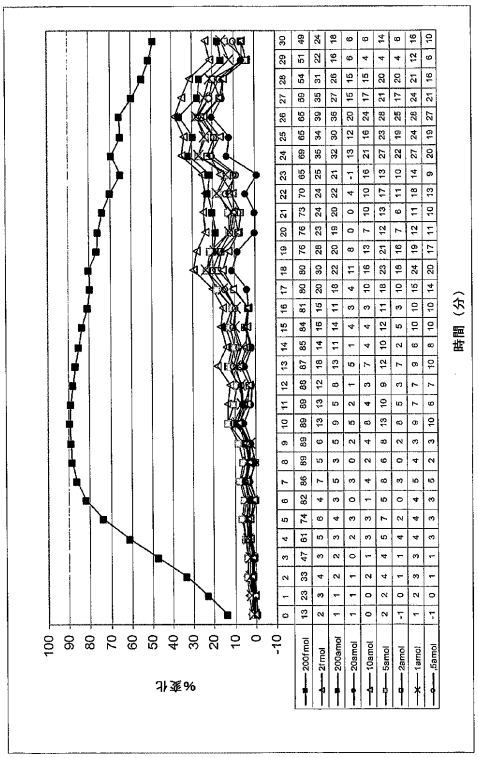


Figure 9

【図１０】

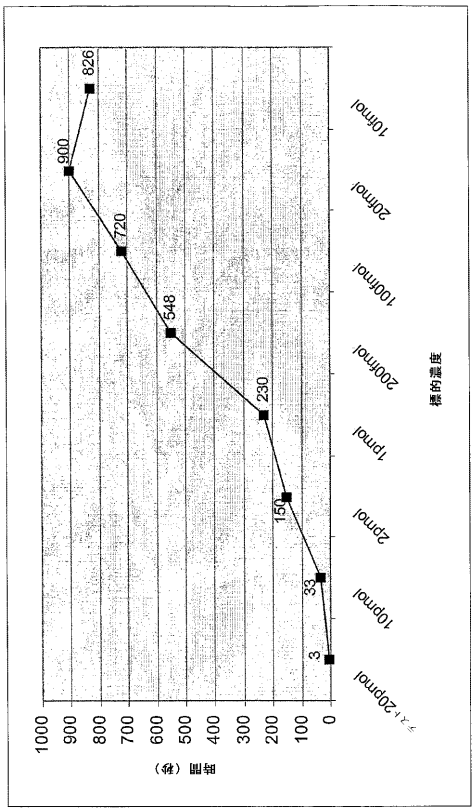


Figure 10

【図１１】

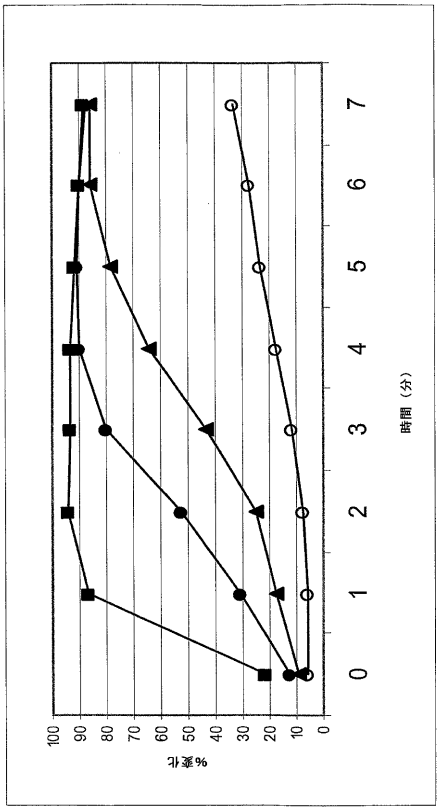


Figure 11

【図１２】

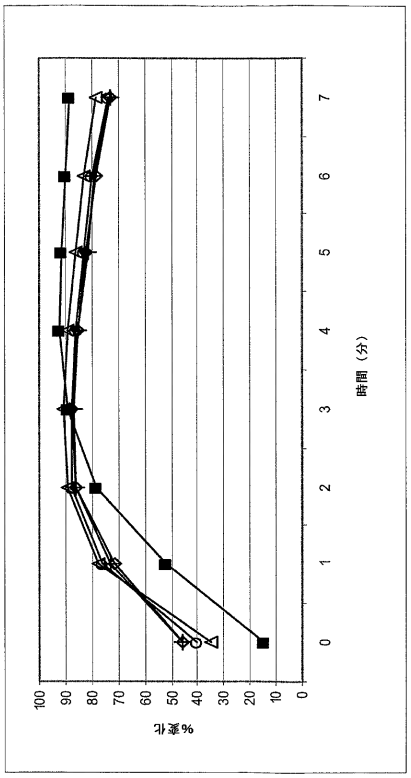


Figure 12

【図１３】

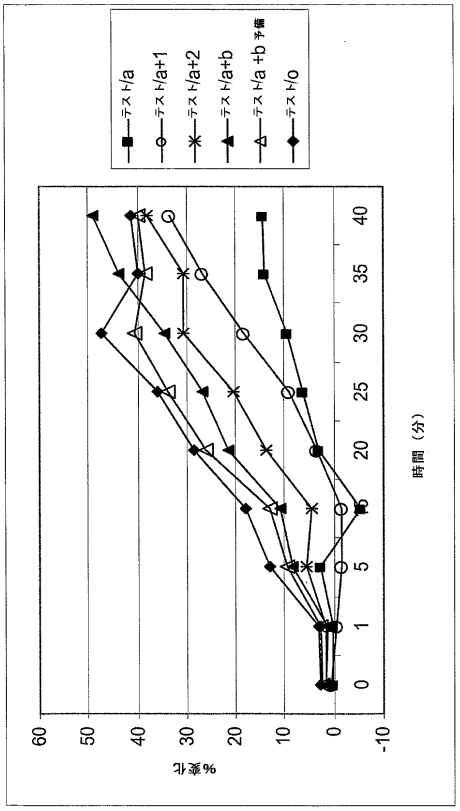


Figure 13

【図１４】

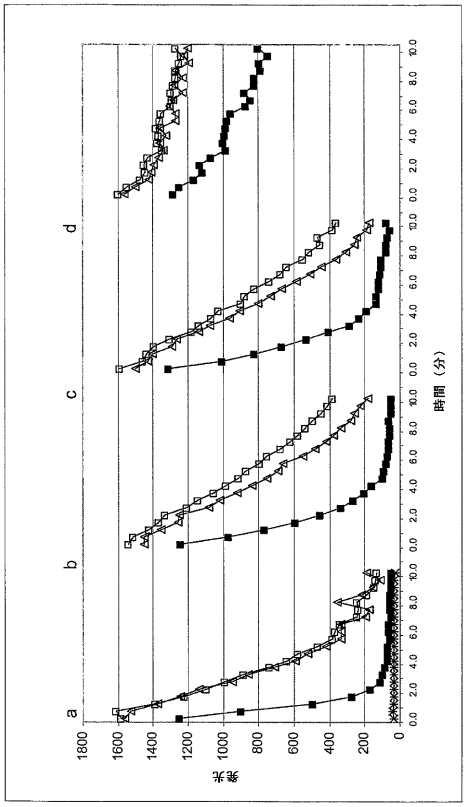


Figure 14

【図１５】

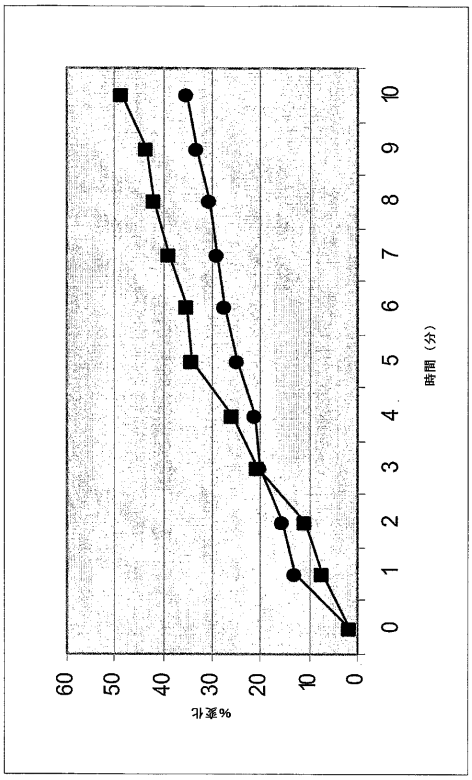


Figure 15

【図１６】

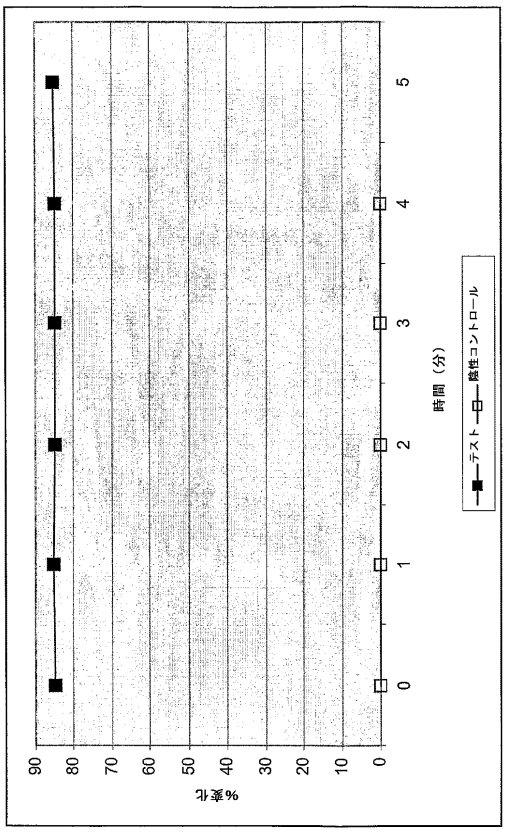


Figure 16

【図１７】

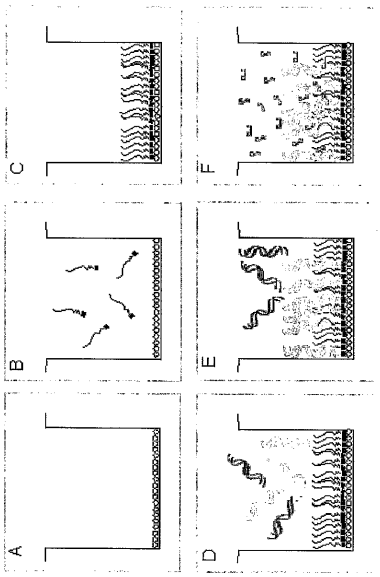


Figure 17

【図１８－１】

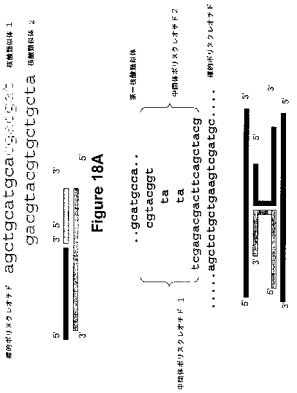


Figure 18A

Figure 18B

【図１８－２】

agctctgctgtaaagtcgatgcgtaaagtgcct 標的
ポリヌクレオチド
tcgagacgacattcagctacg
核酸類似体 1　核酸類似体 2　核酸類似体 3

Figure 18C

agctctgctgtTaagtcgatgcgtaaagtgcct 標的
ポリヌクレオチド
tcgagac　　cagctacg
　　gacattt
核酸類似体 1　核酸類似体 2　核酸類似体 3

Figure 18D

【図１９】

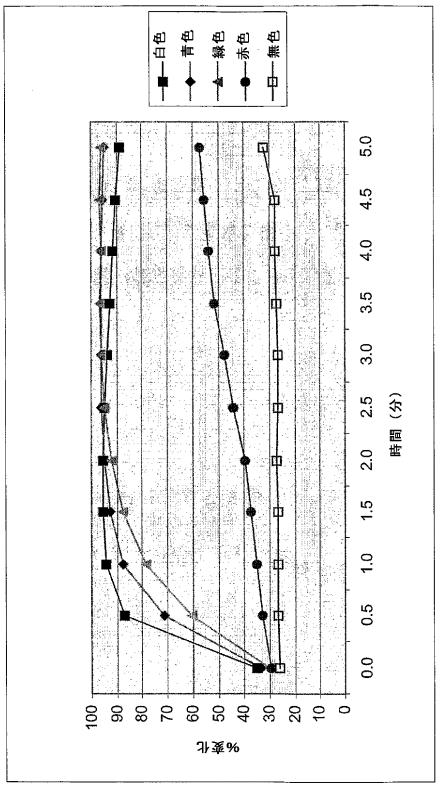


Figure 19

【図２０】

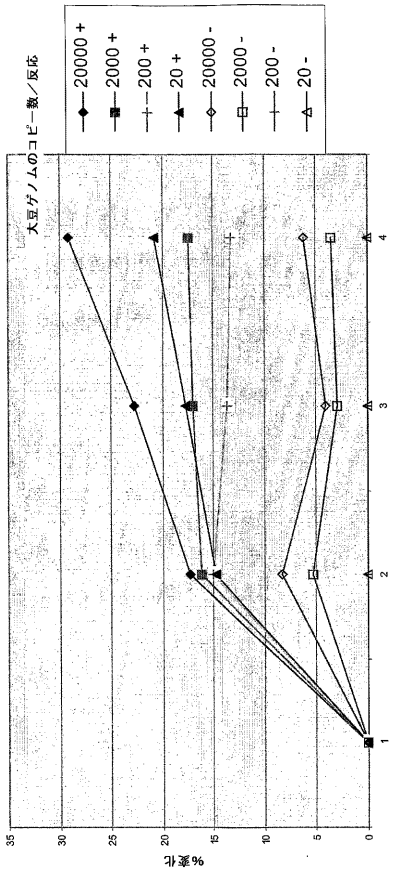


Figure 20

【図２１】

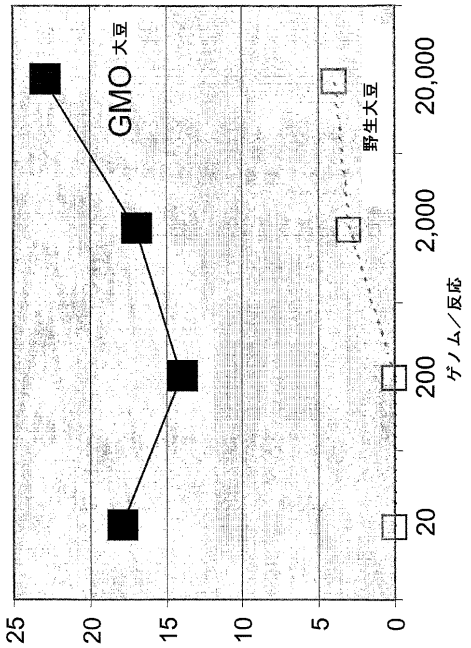


Figure 21

【図２２】

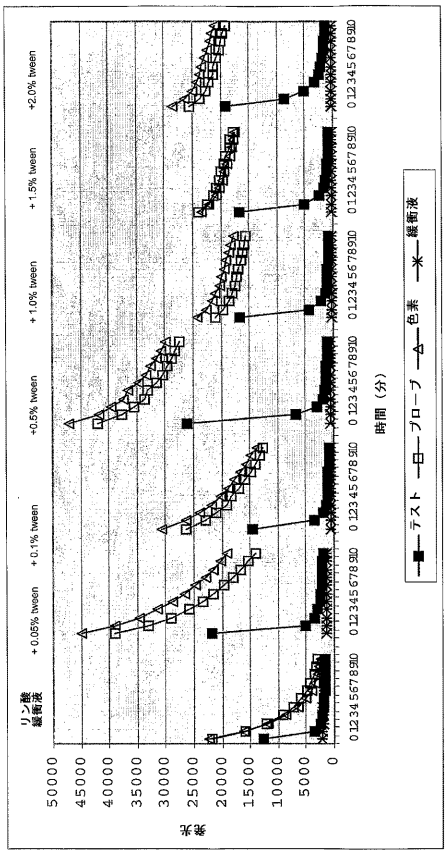


Figure 22

【図２３】

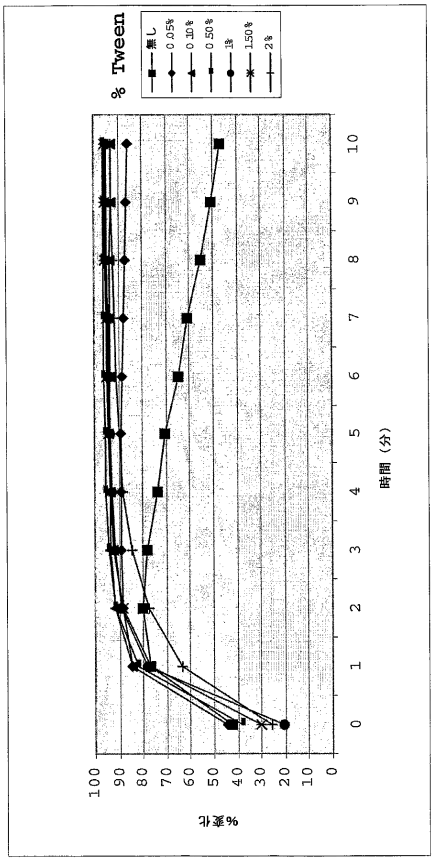


Figure 23

【図２４】

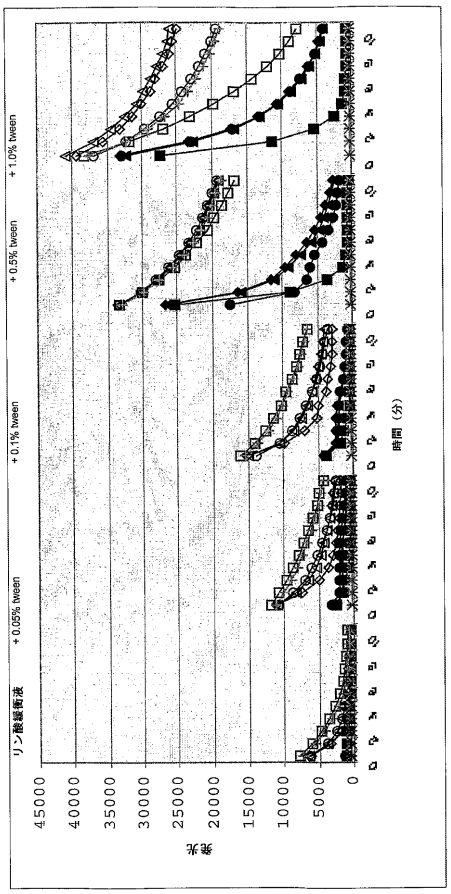


Figure 24

【図２５】

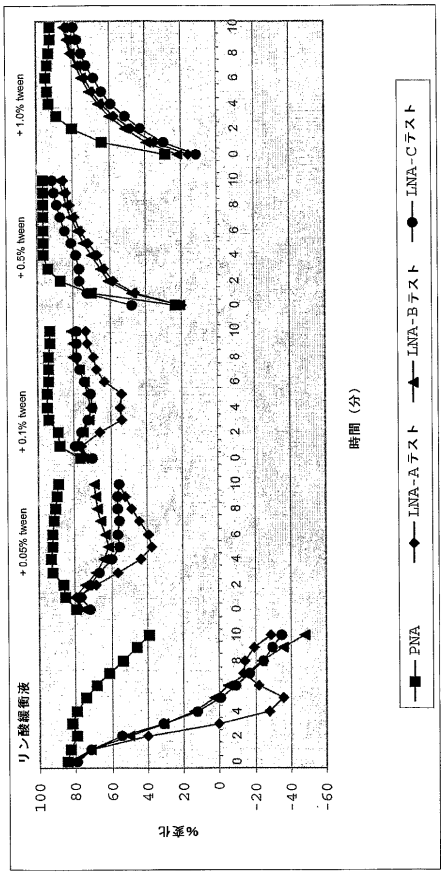


Figure 25

【図２６】

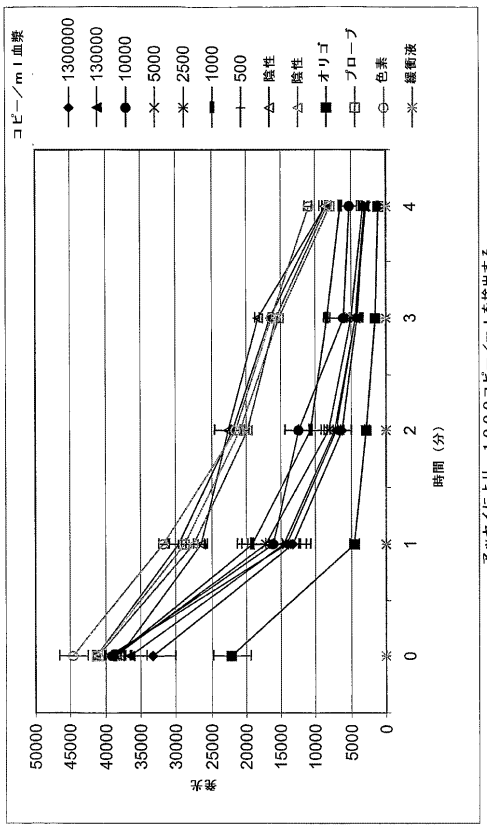


Figure 26

【図２７】

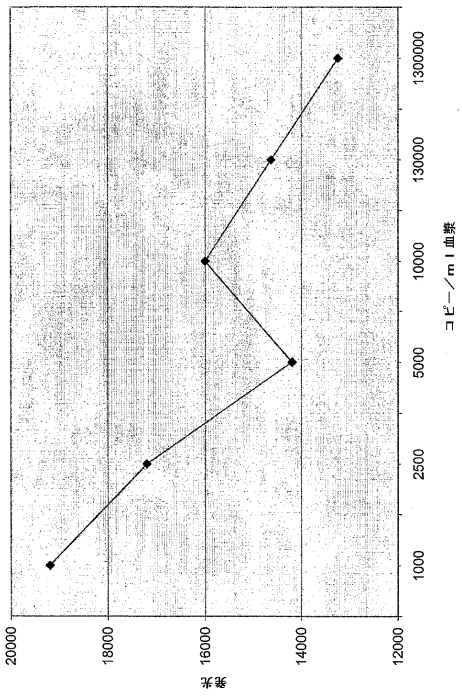


Figure 27

【図２８】

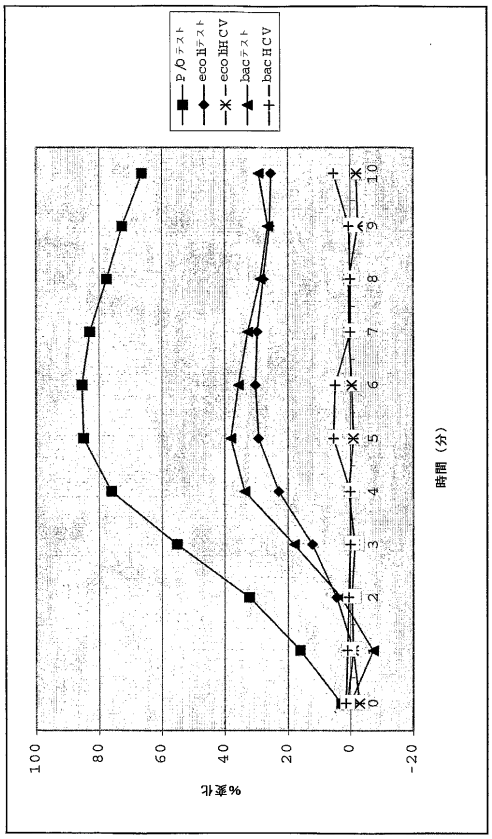


Figure 28

【図２９】

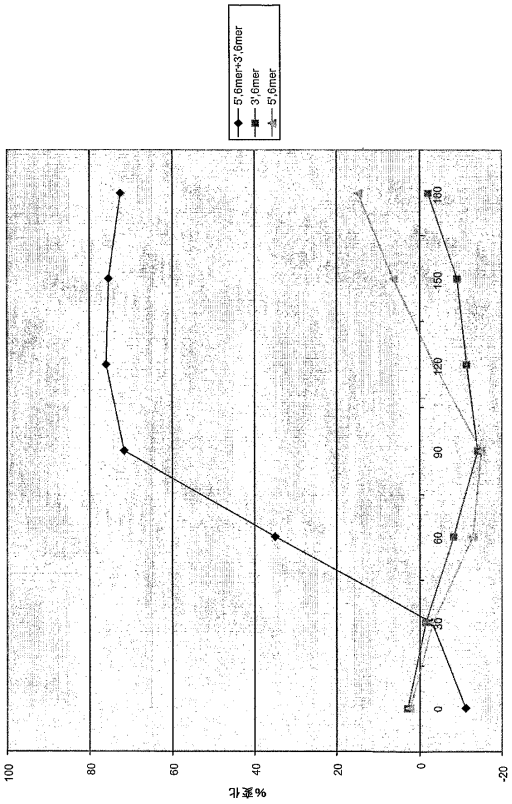


Figure 29

【配列表】

0004633716000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 チョイ, ケー. イョン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５０１, アラメダ, ブリッグス アベニュー ３２２１, アパートメント イー

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 特表２００７－５３５８９３（ＪＰ，Ａ）
Nucleic Acids Research, ２００２年, Vol.30, No.2, p.e3(1-4)
中井貴司他, 日本化学会第８３春季年会（２００３）講演予稿集ＩＩ, ２００３年 3月 3日, 第945頁、１G2-42
J. Am. Chem. Soc., １９９９年, Vol.121, p.2686-2695

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12Q 1/68
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPI(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)