

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4860869号
(P4860869)

(45) 発行日 平成24年1月25日(2012.1.25)

(24) 登録日 平成23年11月11日(2011.11.11)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 F

請求項の数 33 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2001-548754 (P2001-548754)	(73) 特許権者	508141634
(86) (22) 出願日	平成12年12月19日 (2000.12.19)		オックスフォード ジーン テクノロジー
(65) 公表番号	特表2003-523183 (P2003-523183A)		アイビー リミティド
(43) 公表日	平成15年8月5日 (2003.8.5)		イギリス国, オックスフォード オーエック
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/034677		クス5 1ピーエフ, ヤーントン, サンデ
(87) 国際公開番号	W02001/048242		イー レーン, ベッグブローク ビジネス
(87) 国際公開日	平成13年7月5日 (2001.7.5)		アンド サイエンス パーク, ザ ヒル
審査請求日	平成19年12月19日 (2007.12.19)		シュ ビルディング
(31) 優先権主張番号	60/173, 618	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成11年12月29日 (1999.12.29)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固相支持体上の複数のポリヌクレオチドを増幅し、検出する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の複数のターゲットポリヌクレオチドを検出する方法であって、

a) オリゴヌクレオチドプライマーのアレイを準備し、各アレイは固相支持体の離散領域上に固定化されたオリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも2つのグループを含有し、オリゴヌクレオチドプライマーの各グループは特定のターゲットポリヌクレオチドについて選択可能であり、そして特定のターゲットポリヌクレオチドの配列に対して相補的であるプライマー配列を含んでなり；

b) 試料を含んでなる反応混合物とアレイを接触させ、前記試料は複数のターゲットポリヌクレオチドを含有するか、あるいは含有することが推測され、前記反応混合物はポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションおよび増幅に適切な試薬をさらに含んでなり；

c) 第1ラウンドのポリメラーゼ伸介ポリヌクレオチド増幅を実行し、ここでターゲットポリヌクレオチドを初期の鋳型として、固定化されたプライマーから伸長される、検出可能な新生ポリヌクレオチドが合成され；

d) 溶液相プライマーの存在下、第2ラウンドのポリメラーゼ伸介ポリヌクレオチド増幅を実行し、ここで、(i) 溶液相プライマーをプライマーとして、及び工程c)の固定化された新生ポリヌクレオチド鎖を鋳型として、溶液相プライマーから伸長される検出可能な増幅産物が合成され、並びに(ii) 固定化されたプライマーをプライマーとして、及びターゲットポリヌクレオチドを鋳型として、固定化されたプライマーから伸長される検出可能な新生ポリヌクレオチドが合成され；そして

e) 対応する固定化されたプライマーを介して固相支持体の離散領域上に捕捉された、合成されたポリヌクレオチドの存在および量を検出すること；
を含んでなる、前記方法。

【請求項 2】

溶液相プライマーが、特定のターゲットポリヌクレオチドに特異的である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

溶液相プライマーが万能プライマーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

万能プライマーがオリゴ - dTプライマーである、請求項3に記載の方法。

10

【請求項 5】

万能プライマーがSP6プロモーター、T3プロモーターまたはT7プロモーターを含んでなる、請求項3に記載の方法。

【請求項 6】

反応混合物が新生ポリヌクレオチドの中に組込まれる検出可能な標識を含み、これにより新生ポリヌクレオチドが検出可能とされる、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

検出可能な標識が蛍光分子である、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

検出可能な標識がビオチニル化dNTPまたはジゴキシゲニンdNTPである、請求項6に記載の方法。

20

【請求項 9】

反応混合物が新生ポリヌクレオチドの中に組込まれた第2標識に特異的に結合する第1検出可能標識を含み、これにより新生ポリヌクレオチドが検出可能である、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

第2標識がビオチニル化dNTPであり、そして第1検出可能標識が蛍光分子または酵素的に活性化可能な分子に結合したストレプトアビジンである、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

第2標識がジゴキシゲニンdNTPであり、そして第1検出可能標識が蛍光分子または酵素的に活性化可能な分子に結合した抗ジゴキシゲニン抗体である、請求項9に記載の方法。

30

【請求項 12】

アレイが固定化オリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも100~100,000グループを含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

アレイが固定化オリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも1,000グループを含んでなる、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

アレイが固定化オリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも10,000グループを含んでなる、請求項13に記載の方法。

40

【請求項 15】

固相支持体が、ガラス、プラスチック、合成ポリマー、セラミックおよびナイロンから成る群から選択される物質から作られている、請求項1に記載の方法。

【請求項 16】

ポリメラーゼが、Taq DNAポリメラーゼ、TthI DNAポリメラーゼ、Tne DNAポリメラーゼ、Tma DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼまたは任意の他の熱安定性DNAポリメラーゼである、請求項1に記載の方法。

【請求項 17】

少なくとも2つの異なる生物学的源からの複数のターゲットポリヌクレオチドの発現パターンを検出し、比較する方法であって、

50

a) 固相支持体上に固定化されたオリゴヌクレオチドプライマーの複数のグループのアレイを準備し、オリゴヌクレオチドプライマーの各グループは特定のターゲットポリヌクレオチドについて選択され、そしてターゲットポリヌクレオチドの配列に対して相補的であるプライマーを含んでなり、ここで各生物学的源からのターゲットポリヌクレオチドは、共有結合された配列タグを含有し、ここで前記配列タグは、生物学的源ごとに異なるオリゴヌクレオチドであり、各ターゲットポリヌクレオチドを同定するために使用され；

b) 少なくとも2つの異なる生物学的源からの複数のターゲットポリヌクレオチドを含む試料とアレイを接触させ；

c) ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションおよび増幅に適切な条件下にポリメラーゼ仲介ポリヌクレオチド増幅の第1ラウンドを実行し、ここで異なる生物学的源からのターゲットポリヌクレオチドを初期の鋳型として、固定化されたプライマーから伸長する相補的新生ポリヌクレオチド鎖が合成され；

d) 溶液相配列タグの存在下でポリメラーゼ仲介ポリヌクレオチド増幅の第2ラウンドを実行し、ここで前記溶液相配列タグは生物学的源ごとに異なるオリゴヌクレオチドであり、前記溶液相配列タグをその中に有するポリヌクレオチドを同定するために使用され、前記溶液相配列タグをプライマーとして、及び工程c)の固定化された新生ポリヌクレオチド鎖を鋳型として、溶液相配列タグから伸長する新しい増幅生成物が合成され；そして

e) 異なる生物学的源からのターゲットポリヌクレオチドの固定化増幅生成物を検出し、比較すること；

を含んでなる、前記方法。

【請求項18】

異なる生物学的源が異なる細胞である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

異なる生物学的源が異なる組織である、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

異なる生物学的源が異なる個体である、請求項17に記載の方法。

【請求項21】

異なる生物学的源が異なる種である、請求項17に記載の方法。

【請求項22】

異なる生物学的源からのターゲットポリヌクレオチドの増幅生成物を異なる標識により検出する、請求項17に記載の方法。

【請求項23】

前記標識が蛍光分子である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記標識がピオチンまたはジゴキシゲニンである、請求項22に記載の方法。

【請求項25】

配列タグが万能プライマーである、請求項17に記載の方法。

【請求項26】

万能プライマーが、SP6プロモーター、T3プロモーターまたはT7プロモーターを含んでなる、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

請求項1～16のいずれか1項に記載の方法を実施するためのキットであって、

a) オリゴヌクレオチドプライマーの複数の固定化され且つ別々の集団を含んでなる固相支持体であって、各集団は異なるターゲットポリヌクレオチドに対してハイブリダイゼーションするように選択され、ここで各プライマーは、特定のターゲットポリヌクレオチドを用いてポリメラーゼ連鎖反応を実施し、ターゲットポリヌクレオチドを増幅するために適当である、前記固相支持体；

b) 溶液相プライマーであって、特定のターゲットポリヌクレオチドに特異的であり、且つ、ポリメラーゼ連鎖反応において、前記溶液相プライマーから伸長される検出可能な増幅産物の合成のためのプライマーとして機能し得る、前記溶液相プライマー；

10

20

30

40

50

- c) 固体支持体上でポリメラーゼ仲介増幅反応を実施するために必要な試薬：および
d) 支持体上の増幅されたポリヌクレオチドを検出する検出手段；

を含んでなる、前記キット。

【請求項 28】

検出手段が、増幅反応の間に増幅されたポリヌクレオチドの中に組込まれる標識を含んでなる、請求項27に記載のキット。

【請求項 29】

検出手段が第1標識を含んでなり、前記第1標識は増幅反応の間に増幅されたポリヌクレオチドの中に組込まれる第2標識に特異的に結合する、請求項27に記載のキット。

【請求項 30】

請求項 17 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するためのキットであって：

a) 固相支持体の離散領域上に固定化されたオリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも2つのグループを含むアレイであって、ここで前記オリゴヌクレオチドプライマーの各グループは、特定のターゲットポリヌクレオチドについて選択され、特定のターゲットポリヌクレオチドの配列に対して相補的なプライマーを含んでなり、並びに固体支持体上でその位置により同定可能であり、ここで各生物学的源からのターゲットポリヌクレオチドは、共有結合された配列タグを含み、ここで前記配列タグは生物学的源ごとに異なるオリゴヌクレオチドであり、各ターゲットポリヌクレオチドを同定するために使用される、前記アレイ；

b) 溶液相配列タグであって、生物学的源ごとに異なるオリゴヌクレオチドであり、前記溶液相配列タグをその中に有するポリヌクレオチドを同定するために使用され、プライマーとして使用される、前記溶液相配列タグ；

c) 前記アレイ上でポリメラーゼ仲介増幅反応を実施するために必要な試薬：および

d) 前記アレイ上の増幅されたポリヌクレオチドを検出するための検出手段；

を含んで成る、前記キット。

【請求項 31】

アレイが固定化オリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも100 ~ 100,000グループを含んでなる、請求項30に記載のキット。

【請求項 32】

アレイが固定化オリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも1,000グループを含んでなる、請求項30に記載のキット。

【請求項 33】

アレイが固定化オリゴヌクレオチドプライマーの少なくとも10,000グループを含んでなる、請求項30に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関係する出願に対する相互参照

この出願は、仮出願第60 / 173,618号、1999年12月29日出願の優先権を主張する。

【0002】

発明の技術分野

本発明は、一般に、核酸生物学的の分野に関する。さらに詳しくは、本発明は、診断および治療に使用するための生物学的試料における高い処理量の増幅、検出および遺伝子発現の比較のための方法および組成物を提供する。

【0003】

背景

少量の遺伝物質の検出は、生物学的研究および臨床的診断における主要な課題である。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、特定のポリヌクレオチド配列、例えば、ゲノムDNA、一本鎖cDNAまたはmRNAを高い感度および特異性でin vitro増幅する強力なツールを提供する。この1つの用途は、例えば、環境、食物および医学的源、およびその他からの生物学的試料中のターゲット遺伝子配列を増幅して、試料の中に存在する原因となる、病原性、腐

10

20

30

40

50

敗性またはインジケーター生物の同定を可能とすることである。

【0004】

基本的PCR技術は、米国特許第4,683,202号、第4,683,195号、および第4,800,159号（それらの開示は引用することによって本明細書の一部とされる）に記載されているように、典型的には問題のターゲット配列をフランクする特定の核酸配列に対してハイブリダイゼーションすることができる2つのオリゴヌクレオチドプライマーを含む。鋳型変性、プライマーのアニリングおよび鎖伸長の複数のサイクルを反復することによって、ターゲット配列を指数的に複製することができる。

【0005】

標準的PCR法を使用するときの主要な問題は汚染である。PCRは少量のターゲットポリヌクレオチドを検出し、増幅する感度のよい方法を提供するが、PCRは非特異的核酸配列を増幅することができ、これにより最終的検出およびアッセイにおいて誤った陽性生成物をつくる。標準的溶液相PCRにおいて、プライマーは鋳型に結合し、溶液中に新生鎖合成を開始し、反応混合物および生成物は最終的検出およびアッセイのために数回移動をしばしば必要とし、汚染の機会を増加させる。

【0006】

KohsakaおよびCarson (1994) 「J. Clin. Lab. Anal.」8:452 - 455は、移動なしに同一マイクロウェル中のターゲット遺伝子配列の増幅および検出を可能とする、固相PCRアプローチを記載している。2つのオリゴヌクレオチドプライマーの一方をマイクロタイタープレートのウェルに結合し、他方のプライマーは溶液中に止まる。固定化されたプライマーは鋳型に結合し、新生相補的鎖の伸長を開始する。新しく合成された鎖は、変性による鋳型の除去後、プレートに結合されたままであり、PCRの完結時に、標識化プローブで検出することができる。増幅前に既知量の内部競合的DNA鋳型を添加することによって、ターゲット核酸の定量に固相PCRアプローチを使用することもできる。例えば、米国特許第5,747,251号（その開示は引用することによって本明細書の一部とされる）参照。

【0007】

Kohsaka他の固相PCRは、96ウェルのマイクロタイタープレート上のウェル中で1つの単一ターゲットポリヌクレオチドを検出することに制限された。競合鋳型を使用する定量固相PCRは、1つの種または組織からのターゲットの検出に制限された。さらに、標識化プローブとのハイブリダイゼーションにより検出するために、プレートに結合される増幅された生成物は一本鎖でなくてはならず、これにより検出感度を制限する。

【0008】

米国特許第5,641,658号（Adams他）には、単一固相支持体に結合した2つのプライマーで核酸を増幅する方法を記載している。この方法はターゲット配列をフランクする2つのプライマーの選択、および固相支持体上への両方のプライマーの固定化を必要とする。プライマー対を使用して、支持体上のターゲットポリヌクレオチドを検出し、増幅する。増幅された生成物を支持体上に固定し、2つの隣接する鎖は、合理的に互いに離れている場合、さらに一緒にハイブリダイゼーションさせて「ループ」を形成することができる。2つのプライマーの増幅系は試料中の特定のターゲット核酸の存在または不存在下に感受性であることが約束されているが、各ターゲットについて2つの固定化されたプライマーの使用は支持体上のプライマーの注意した配置を必要とするので、プライマーアレイはループの形成を可能とし、しかも追加の鎖の増幅を妨害しないであろう。換言すると、これらの方法は高い密度、高い処理量のアッセイについて理想的ではなことがある。

【0009】

特定の生物学的試料における遺伝子の発現パターンは、ほとんどすべての生物学的機能および活性の分子的基本の洞察を提供する。異なる生物学的源における遺伝子発現レベルを検出し、比較する多数の方法がこの分野において知られている。このような比較の1つの標準的方法はノザンプロットである。この技術において、RNAを試料から抽出し、RNAの分析のために適当な種々のゲルのいずれか上に負荷し、次いで標準的方法に従い、これを展開してRNAをサイズにより分離する（例えば、下記の文献を参照のこと：Sambrook J.

10

20

30

40

50

他、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY（第2版、1989）。次いで、ゲルをプロットし（Sambrook、前掲、に記載されているように）、問題のRNAのためのプローブにハイブリダイゼーションさせる。

【0010】

Sutcliffeの米国特許第5,807,680号は、示差的に発現したmRNAを同時に同定し、それらの相対濃度を測定する方法を記載している。この技術は、アンカープライマーを使用するcDNAの形成に続くPCRを含み、組織により発現されたmRNAのほとんどすべてをゲル上に離散バンドとして可視化することができ、バンドの強度はmRNAの濃度にほぼ対応する。

【0011】

技術の他のグループは、相対的転写発現レベルの分析を使用する。包括的な、高い処理量の分析を可能とするために、4つのこのようなアプローチが開発された。第1に、試料中のRNAからcDNAを逆転写することができ（上記参考文献に記載されているように）、5'および3'末端を単一通過配列決定して、被験試料および対照試料中で発現された遺伝子の発現された配列タグを明らかにすることができる。異なる試料からタグの相対発現量を計数することによって、試料内の遺伝子転写物の相対発現量を概算することができる。

【0012】

第2に、遺伝子発現の系統的分析、または「SAGE」として知られている、EST上の変動が開発され、これは多数の転写物の定量的同時分析を可能とする。この技術は短い診断配列タグを単離し、配列決定してターゲット機能の特徴を示す遺伝子発現パターンを明らかにし、そして、例えば、正常細胞および腫瘍細胞における数千の遺伝子の、発現レベルを比較するために使用されてきている。例えば、下記の文献を参照のこと：Velculescu他、「Science」270：368 - 369（1995）；Zhang他、「Science」276：1268 - 1272（1997）。

【0013】

第3に、示差的表示に基づくアプローチが開発された。これらのアプローチにおいて、発現された遺伝子内のフラグメントの長さについての情報を結合させると、特異的配列デリミッターにより規定されたフラグメントを遺伝子のユニーク識別子として使用することができる。次いで細胞内の発現された遺伝子の相対発現量をその遺伝子に関連しフラグメントの相対発現量により推定することができる。この考えを利用するために開発されたいくつかのアプローチのいくつかの例は、ジーン・ロジック・インコーポレーテッド（Gene Logic, Inc.）が使用する示差的に発現された配列の制限酵素分析（「READS」）、およびデジタル・ジーン・テクノロジー・インコーポレーテッド（Digital Gene Technologies, Inc.）（カリフォルニア州パロアルト）が使用する全遺伝子発現分析（「TOGA」）であり、例えば、PCRによる示差的に発現された遺伝子を同定するためのデルタ・ディファレンシャル・ディスプレイ・キット（Delta（商標）Differential Display Kit）が販売されている。

【0014】

第4に、好ましい態様において、検出はハイブリダイゼーション分析の多数の技術の1つにより実行される。これらのアプローチにおいて、問題の試料からのRNAを通常逆転写して標識化cDNAを形成する。次いで、典型的には既知順序のチップまたは他の表面上に配置された既知配列のオリゴヌクレオチドまたはcDNAに対してcDNAをハイブリダイゼーションさせる。標識化cDNAがハイブリダイゼーションするオリゴヌクレオチドの位置はcDNAに対する情報を提供するが、ハイブリダイゼーションした標識化RNAまたはcDNAの量は問題のRNAまたはcDNAの相対発現量の推定値を提供する。さらに、この技術は2以上の異なる検出可能な標識との同時のハイブリダイゼーションを可能とする。次いで、ハイブリダイゼーションは試料の相対的発現の直接的比較を生ずる。

【0015】

DNAマイクロアレイ技術の最近の開発は、単一固相支持体上で複数のターゲット分子の大規模アッセイの実行を可能とする。米国特許第5,837,832号（Chee他）および関係する特許出願には、試料における特異的核酸配列のハイブリダイゼーションおよび検出のためのオ

10

20

30

40

50

リゴヌクレオチドプライマーのアレイの固定化が記載されている。マイクロアレイ分析の制限は、小さい体積および少量のみのマイクロアレイ検出に利用可能である核酸を検出するという困難を包含する。核酸ハイブリダイゼーションをベースとする技術として、マイクロアレイハイブリダイゼーションの感度は利用可能なターゲット核酸の数、すなわち、遺伝子発現の存在量により主として制限される。現在、核酸ターゲットに結合した標識化シグナル（例えば、蛍光タグからの）を増幅することによって、これらの制限をある程度克服することができる。

【0016】

発明の要約

本発明は、複数のポリヌクレオチドを高い処理量の方式で増幅し、検出する新規なアプローチを提供する。1つの面において、これらの方法は、固相核酸増幅に適当なプライマーの固相マイクロアレイを使用することによって、複数のターゲットポリヌクレオチドを検出することを包含する。各プライマーは特定のターゲット配列に対して特異的であり、そして異なるプライマーのグループはマイクロアレイ内の離散位置において固定化される。固定化されたプライマーは固相支持体上で特定のターゲットポリヌクレオチドの「in situ」ハイブリダイゼーションおよび増幅することができる。各プライマー部位における新生鎖は、増幅の間に鎖の中に組込まれた標識で定量的に検出可能である。1つの好ましい態様において、本発明を実行する増幅手段はPCRである。固相支持体上のマイクロアレイは約100,000までのグループのプライマーを含んでなることができる。それ自体、この方法は試料中の約100,000までのターゲットポリヌクレオチドを検出することができる。大部分の用途のために、多数のグループを検出することができるが、支持体上の存在できるグループの数に対する下限は存在しないことが明らかである。

【0017】

本発明の1つの態様によれば、各プライマー部位において固相に結合された単一相補的鎖を生ずる特定のターゲットポリヌクレオチドの非対称的PCRのために、固定化されたプライマーを単独で使用し、必要に応じて鎖の中に組込まれた標識で検出する。本発明の他の態様によれば、各ターゲットポリヌクレオチドのための他のプライマーを溶液の中に存在させ、こうしてターゲットポリヌクレオチドの両方の鎖を合成し、各プライマーの中に保持させて、検出を増強させることができる。溶液相プライマーは特定のターゲットポリヌクレオチドに対して特異的であるか、あるいは、ターゲットポリヌクレオチドのすべてまたは下位集団に結合することができる万能プライマーのいずれかであることができる。

【0018】

本発明は、また、少なくとも2つの異なる生物学的源からの複数のターゲットポリヌクレオチドの発現パターンを検出し、比較する方法が提供され、この方法は下記の工程を含んでなる：a) 少なくとも2つの異なる生物学的源からの複数のターゲットポリヌクレオチドを含んでなる試料を、固相支持体に固定化されたオリゴヌクレオチドプライマーの複数のグループのアレイと接触させ、オリゴヌクレオチドプライマーの各グループは特定のターゲットポリヌクレオチドについて選択されかつターゲットポリヌクレオチドの配列に対して相補的なプライマーを含んでなり、ここで各生物学的源からの前記ターゲットポリヌクレオチドは生物学的源に対してユニークである共有結合された配列を含有し；b) ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションおよび増幅に適当な条件下にポリメラーゼ仲介ポリヌクレオチド増幅の第1ラウンドを実行し、ここで異なる生物学的源からのターゲットポリヌクレオチドは、固定化されたプライマーから伸長する相補的新生ポリヌクレオチド合成のための初期の鋳型として働き；c) 各生物学的源に対してユニークである配列タグに対してハイブリダイゼーションする溶液相プライマーの存在下に、ポリメラーゼ仲介ポリヌクレオチド増幅の第2ラウンドを実行し、ここで配列タグはプライマーとして働き、そして工程b) からの固定化された新生ポリヌクレオチド鎖は溶液相配列タグから伸長する新しい増幅生成物の合成のための鋳型として働き；そしてd) 異なる生物学的源からのターゲットポリヌクレオチドの固定化増幅生成物を検出し、比較する。

【0019】

10

20

30

40

50

本発明は、さらに、本明細書に開示する対称PCRまたは非対称PCRアプローチを使用して、複数のターゲットポリヌクレオチドを検出するキットを提供する。キットはPCRプライマーのマイクロアレイと、PCR反応および検出に必要な試薬とを含んでなる。プライマーのマイクロアレイは、特定のターゲットポリヌクレオチド配列に対する調製されたプライマーの約100,000グループまでを含んでなることができる。本発明の1つの態様において、キットはPCR反応間に合成された鎖の中に組込むことができる標識化ヌクレオチドを含んでなる。

【0020】

好ましい態様の詳細な説明

本発明は、高い処理量の方式の、感度がよく、しかも簡単な核酸ターゲットを増幅し、検出する新規な方法および組成物を提供する。本発明は、基本的生物学的研究および医学的診断および療法の両方において実用性を見出す、ゲノム解析の種々の面において使用することができる。

【0021】

「ポリヌクレオチド」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーの形態であって、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドである。この用語はこの分子の一次構造のみを意味する。こうして、この用語は二本鎖および一本鎖のDNAおよびRNAを包含する。また、それは既知の型の修飾、例えば、この分野において知られている標識、メチル化、「キャップ」、1以上の天然に存在するヌクレオチドのアナログによる置換、ヌクレオチド間の修飾、例えば、荷電されていない結合を有するもの（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、およびその他）、ペンダント部分を含有するもの、例えば、タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リシン、およびその他を包含する）、インターカレーターを有するもの（例えば、アクリジン、プソラレン、およびその他）、キレーターを含有するもの（例えば、金属、放射性金属、およびその他）、アルキレーターを含有するもの、修飾された結合を含有するもの（例えば、アルファ芳香族核酸、およびその他）、ならびに非修飾形態のポリヌクレオチドを包含する。

【0022】

用語「プライマー」は、本明細書において使用するとき、ポリヌクレオチドに対して相補的であるプライマー伸長生成物の合成が触媒される条件下に置かれるとき、相補的鎖に沿ったポリヌクレオチド合成の開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドを意味する。このような条件は、適当な緩衝液（「緩衝液」はコファクターであるか、またはpH、イオン強度、およびその他に影響を与える代替物を包含する）中の適当な温度における、4つの異なるヌクレオシド三リン酸またはヌクレオシドアナログおよび1以上の重合因子、例えば、DNAポリメラーゼおよび/または逆転写酵素の存在を包含する。プライマーは、ポリメラーゼのための因子の存在下に伸長生成物の合成を開始するために十分に長くなくてはならない。典型的なプライマーは、ターゲット配列に対して実質的に相補的である、少なくとも約5ヌクレオチド長さの配列を含有するが、多少より長いプライマーが好ましい。通常プライマーは約15~26のヌクレオチドを含有するが、35ヌクレオチドまでの、より長いプライマーを使用することもできる。

【0023】

プライマーは、それをアニールすることができるターゲット配列、すなわち、増幅すべき特定の配列、に対して実質的に相補的である配列を常に含有する。プライマーは、必要に応じて、ターゲット配列に対して相補的である配列に加えて配列を含むことができる。このような配列は、プライマー中のターゲット-相補的配列から上流（すなわち、5'末端）に存在することが好ましい。例えば、1以上の制限酵素認識部位を含んでなる配列（「リナー」または「アダプター」）は、ターゲット-相補的配列から上流プライマーの中に存在するとき、増幅生成物のクローニングおよび引き続く操作を促進する。プライマーの中に含めるために有効な他の配列は、配列決定プライマーに対して相補的な配列およびプロモーター配列を特定する配列を包含する。用語「プロモーター配列」は核酸配列の一本

10

20

30

40

50

鎖を規定し、この一本鎖は認識された配列に結合するRNAポリメラーゼにより特異的に認識され、かつRNA転写物が産生される転写プロセスを開始する。原理的には、開始配列を認識することができる既知の入手可能なポリメラーゼが存在する、任意のプロモーター配列を使用することができる。既知の有用なプロモーターは、ある種のバクテリオファージポリメラーゼ、例えば、バクテリオファージT3、T7またはSP6により認識されるプロモーターである。

【0024】

本明細書において使用するとき、用語「タグ」または「配列タグ」または「プライマータグ配列」は、このようなタグをその中に支持するポリヌクレオチドのバッチを同定する働きをする特異的核酸配列を有するオリゴヌクレオチドを意味する。同一生物学的源からのポリヌクレオチドは特異的配列タグと共有結合的に標識されるので、引き続き分析において、ポリヌクレオチドはその由来源に従い同定可能である。また、配列タグは核酸増幅反応のプライマーとして働く。

10

【0025】

「マイクロアレイ」は、好ましくは離散領域の線形または二次元のアレイであり、各離散領域は、固体支持体の表面上に形成された、定められた領域を有する。マイクロアレイ上の離散領域の密度は、単一固相支持体表面上で検出すべきターゲットポリヌクレオチドの総数により決定され、好ましくは少なくとも約 $50 / \text{cm}^2$ 、より好ましくは少なくとも約 $100 / \text{cm}^2$ 、なおより好ましくは少なくとも約 $500 / \text{cm}^2$ 、最も好ましくは少なくとも約 $1,000 / \text{cm}^2$ である。本明細書において使用するとき、DNAマイクロアレイは、ターゲットポリヌクレオチドを増幅またはクローニングするために使用するチップまたは他の表面上に配置された、オリゴヌクレオチドプライマーのアレイである。プライマーの各特定のグループの位置は既知であるので、ターゲットポリヌクレオチドの同定はマイクロアレイ中の特定の位置に対するターゲットポリヌクレオチドの結合に基づいて決定することができる。

20

【0026】

「リンカー」は制限部位を含有する合成オリゴデオキシリボヌクレオチドである。リンカーをDNAフラグメントの末端上に平滑末端結合して制限部位をつくり、引き続いて制限部位を使用してフラグメントをベクター分子の中にクローニングすることができる。

【0027】

用語「標識」は、アッセイ試料中のターゲットポリヌクレオチドの存在を示す検出可能なシグナルを産生できる組成物を意味する。適当な標識は、放射性同位体、ヌクレオチド発色団、酵素、基質、蛍光分子、化学発光成分、磁気粒子、生物発光成分、およびその他を包含する。それ自体、標識は光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段により検出可能な任意の組成物である。

30

【0028】

用語「支持体」は、慣用支持体、例えば、ビーズ、粒子、ディップスティック、繊維、フィルター、膜およびシランまたはシリケートの支持体、例えば、ガラススライドを意味する。

【0029】

用語「増幅」は、広い意味において、増幅生成物をつくることを意味するために使用し、増幅生成物は、例えば、追加のターゲット分子、またはターゲット様分子またはターゲット分子に対して相補的な分子を包含することができ、このような分子は試料中のターゲット分子の存在によりつくられる。ターゲットが核酸である状況において、増幅生成物は酵素的にDNAまたはRNAポリメラーゼまたは転写酵素を使用して作ることができる。

40

【0030】

本明細書において使用するとき、「生物学的試料」は個体から単離された組織または流体の試料を意味し、これらは下記のものを含むが、これらに限定されない：血液、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、皮膚の外部切片、呼吸器、腸、および生殖管、涙、唾液、乳、細胞（血球を含むが、これに限定されない）、腫瘍、器官、およびまた *in vitro* 細胞培養構成成分の試料。

50

【0031】

用語「生物学的源」は、本明細書において使用するとき、ターゲットポリヌクレオチドが由来する源を意味する。源は前述した「試料」の任意の形態であることができ、下記のを包含するが、これらに限定されない：細胞、組織または流体。「異なる生物学的源」は、同一個体の異なる細胞／組織／器官、または同一種の異なる個体からの細胞／組織／器官、または異なる種からの細胞／組織／器官。

【0032】

本発明の1つの面において、1つの生物学的試料からのターゲットポリヌクレオチドの固相増幅を実行し、ここでオリゴヌクレオチドプライマーの複数のグループを固相支持体上に固定化する。好ましい態様において、グループ内のプライマーは配列が同一であり、そして1つの特定のターゲットポリヌクレオチドの定めた配列に対して相補的であるように選択または設計し、適当な条件下にターゲットポリヌクレオチドに対してハイブリダイゼーションすることができ、核酸合成（すなわち、鎖の伸長または拡張）のための開始プライマーとして適当である。各ターゲットポリヌクレオチドについて選択されたプライマーを、グループとして、固体支持体上に離散位置において固定化する。好ましくは、グループ間の距離は増幅された生成物を検出するために使用する検出手段の分解能より大きい。好ましい態様において、好ましい態様において、プライマーを固定化してマイクロアレイまたはチップを形成し、これらを自動化プロセスを介してプロセッシングし、分析することができる。核酸増幅手段に適当な条件下にターゲットポリヌクレオチドを固相増幅させるために、固定化されたプライマーを使用する。

【0033】

本発明の1つの面によれば、初期ターゲットポリヌクレオチドは、センス鎖（「陽性鎖」）と相補的鎖（「陰性鎖」）とを有する二本鎖形態である。増幅を実施する前に、ターゲットポリヌクレオチドを変性し、例えば、熱変性し、これにより2つの鎖を変性し、反応溶液中で分離する。好ましくは、本発明において使用するプライマーは、推定されるターゲットポリヌクレオチド濃度に対して非常に大きいモル過剰で存在して、2つのターゲットポリヌクレオチド鎖の還元と反作用させる。あるいは、初期ターゲットポリヌクレオチドは一本鎖であり、一本鎖のDNAまたはRNAである。

【0034】

本発明の1つの好ましい態様において、核酸増幅はポリメラーゼにより仲介される。より好ましくは、増幅はPCR反応に適当な条件下に実行する。当業者は理解するように、PCR反応は一般に変化する反応温度におけるアニーリング - 伸長 - 変性工程の複数のサイクルを含み、その間に鑄型として初期ターゲットポリヌクレオチドに基づいて新生鎖の複数のコピーを合成する。その結果、初期ターゲット配列は、PCR反応の条件および拘束に依存して、線形的または指数的に「増幅」される。

【0035】

本発明によるPCR反応間に、固定化されたプライマーのアレイを反応混合物中でターゲットポリヌクレオチドと接触させる。ターゲットポリヌクレオチドが二本鎖形態である場合、接触は変性後に実施する。アニーリングに適当な条件下に、一本鎖ターゲットポリヌクレオチド内の定められた配列領域に対して相補的な配列を含有する固定化されたシグナルプライマーに対して、一本鎖ターゲットポリヌクレオチドをハイブリダイゼーションさせる。鎖伸長に適当な条件（DNAポリメラーゼおよび遊離ヌクレオチドdNTPを包含するが、これらに限定されない）下に、各ターゲットポリヌクレオチド鎖は新生相補的鎖合成の開始鑄型として働き、この合成はアニーリングされたプライマーの3' - ヒドロキシルから開始され、ターゲット鑄型の5' 末端に及ぶ。鎖伸長が完結した後、反応条件を変性を可能とするように変化させ、その間にターゲット鎖および新生鎖は分離されるので、ターゲット鎖は試料溶液の中へ解放され、新生鎖は固定化されたプライマーを介して固体支持体上に保持される。

【0036】

本発明を実施するとき、固定化されたシグナルプライマーを単独で使用するか、あるいは

10

20

30

40

50

、新生固定化された鎖の3'末端において配列に対して相補的である反応溶液中のプライマーと組み合わせて使用することができる。さらに、溶液相プライマーは、すべてのターゲットポリヌクレオチド、または各々が特定のターゲット配列に対して特異的である特異的プライマーのプールを増幅することができる万能プライマーであることができる。

【0037】

本発明の1つの面において、使用する溶液相プライマーが存在しない。したがって、前述の初期増幅反応は、伸長後に変性工程を導入するか否かに依存して、一本鎖としてまたは初期ターゲットポリヌクレオチド鎖とアニールさせて、各プライマー部位において固体支持体に付着された新生鎖を産生する。そして、これらの新生鎖の存在は、さらに後述するように、適当な検出手段により検出することができる。

10

【0038】

本発明の他の面において、溶液相プライマーを複数のターゲットポリヌクレオチドの増幅のために固体支持体固定化プライマーと組み合わせて使用する。初期増幅反応に引き続いて、増幅反応の他のラウンドを実行し、その間に溶液相プライマーに対して3'末端において相補的な、以前に形成した新生鎖は、溶液相プライマーに対してアニールし、そしてターゲットポリヌクレオチドと実質的に同一な第2新生鎖を引き続いて合成するための鑄型として働く。その結果、二本鎖新生ポリヌクレオチドを形成し、固相支持体上に各プライマー部位において付着させることができる。

【0039】

本発明の固相増幅アプローチの実施例は図1および図2に描写されている。

20

【0040】

図1は、各組が特定のターゲット遺伝子に対して特異的な、3組の固定化5'末端プライマーを有する固相支持体上の、3つのターゲット遺伝子A、BおよびCの増幅および検出を描写する。追加のプライマーは溶液の中に存在しない。1Aにおいて、遺伝子A、BおよびCに対して特異的な固定化プライマーのアレイは閉じた矢印で描写されている。1Bにおいて、一本鎖ターゲットポリヌクレオチドは、アニリング条件下にそれらの相補的配列において固定化5'末端に対してハイブリダイゼーションする。次いで1Cにおいて、条件を伸長にシフトさせ、その間に5'末端プライマーは鑄型としてターゲットポリヌクレオチドを使用する新生鎖の合成のための開始部位として働く。その中に組込まれた標識、ビオチン-dCTPを有する新生鎖を合成し、こうして新生鎖は後に検出可能である。伸長が完結したとき、条件を変性にシフトさせ、その間に当初のターゲット鑄型鎖はアレイから溶液の中に解放され、標識化新生一本鎖は固定化5'末端プライマーを介して支持体に共有結合される。1Dにおいて、アニリングの第2ラウンドが起こり、こうしてターゲット鑄型鎖はそれ以上の増幅のための追加の固定化プライマーに対してハイブリダイゼーションする。1Eは固定化プライマー部位において生ずる増幅生成物を示し、あるものは一本鎖のビオチン標識化ポリヌクレオチドであり、そして他のものは二本鎖である。なぜなら、ターゲット鑄型は変性しない新生鎖とアニールしたままであるからである。固定化プライマーはターゲット鑄型の推定濃度よりも非常に高いモル過剰量で存在するで、それは溶液相プライマーが存在しない場合でさえ一本鎖および二本鎖の両方の増幅生成物を存在させる。

30

【0041】

図2は、固定化特異的5'末端プライマーおよび溶液相3'末端プライマーの両方を使用するターゲット遺伝子(A、BおよびC)の増幅および検出を描写する。3'-プライマーはポリアデニル化mRNA鑄型に対する結合のための万能プライマー、例えば、ポリ-dTであることができる。2A~2Cは本質的に1A~1Cに対応し、各固定化5'末端プライマー部位におけるPCRの第2ラウンド、および組込まれたビオチン標識で検出できる生ずる一本鎖新生鎖を図解する。変性後、ターゲット鑄型は新生鎖から分離され、溶液の中に解放される。2Dは第2ラウンドのPCRを描写し、その間に各新生鎖は溶液相万能プライマーから開始された、他の新生鎖合成のための鑄型として働く。その間に、当初のターゲット鑄型はそれ以上の増幅のための追加の固定化5'-プライマー部位に対してハイブリダイゼーションする。固定化プライマー部位上の二本鎖増幅生成物を生じ、各鎖は2Eに示すようにビオチニル化され

40

50

ている。

【0042】

本発明の固相増幅法を使用して、異なる生物学的源における遺伝子発現を検出し、比較する。この面において、増幅反応を実施するために、固定化プライマーを溶液相プライマーと組み合わせて使用する。1つの態様によれば、異なる源は同一被検体の異なる組織または細胞であることができる。選択的に、異なる源は同一種の2以上の被検体の匹敵する組織、例えば、健康な対照からの1つおよび患者からの他のものである。なお他の態様において、異なる源は2以上の異なる種または異なる動物からのも、例えば、ヒトの1つおよびマウスの他のものである。

【0043】

本発明による遺伝子発現の示差的分析は、本質的にプライマーの固相アレイ上で異なる生物学的源からのターゲットポリヌクレオチドと一緒に増幅することによって実行される。この態様において、各源からの初期ターゲットポリヌクレオチドのバッチをオリゴヌクレオチド配列で示差的に標識付けし、こうして目的の増幅生成物はこのような配列タグを有し、初期ターゲットの源を示す。「源タグ」で標識化した増幅生成物検出し、比較することによって、異なる源中のターゲットポリヌクレオチドの存在および相対存在量を決定し、比較することができる。

【0044】

本発明のこの態様において例示するように、異なる生物学的源からのオリジナルターゲットポリヌクレオチドはその中で発現された全mRNAである。この分野において知られている方法および物質を使用して、各源から全mRNAを単離する。次いで各生物学的源から単離されたmRNAの全プールを使用して特異的に標識付けされたcDNAのバッチを調製し、これを引き続く増幅のための「ターゲットポリヌクレオチド鋳型」として使用する。1つの態様において、逆転写された各バッチを特異的配列タグでそれらの3'末端において標識付けする。特異的配列タグは未修飾ターゲットポリヌクレオチドのいずれの中にも存在しない。例えば、検出すべきターゲットポリヌクレオチドがヒト細胞/組織からのものである場合、配列タグは細菌またはウイルスゲノムに由来することができ、そして配列はハイブリダイゼーション/増幅条件下にmRNAに転写されるヒト配列とアニールしない。このようにして、1つのバッチからの配列タグは交差ハイブリダイゼーションのために他のバッチの人工的増幅を引き起こさないであろう。

【0045】

さらに、cDNAターゲットの各バッチの配列タグはcDNAターゲットの他のバッチのそれと異なるので、それらを比較することができる。配列タグは、逆転写のための特別に設計されたプライマーを使用することによって、逆転写cDNAの中に導入することができる。例えば、プライマーは3'末端にポリ-dT部分を有し、そして5'末端に細菌SP6配列を有することができる。逆転写間に、mRNA鋳型のポリ-Aテイルとアニールするポリ-dT部分の5'末端から開始されるcDNA合成のための鋳型として、mRNAは働く。次いで、生ずるcDNA生成物は5'末端にSP6「配列タグ」を有し、これはcDNAのこのバッチに対してユニークである。同様に、他の源からのcDNAの異なるバッチを異なる配列タグ、例えば、細菌T7配列で「標識付け」することができる。

【0046】

例えば、SP6およびT7で示差的に標識付けされた、cDNAの2つの異なるバッチを、増幅および検出のための一緒に混合する。示差的に標識化される遊離SP6およびT7配列タグは、増幅反応混合物の中に存在する。例えば、2つの配列タグを直接的検出のために2つの異なる蛍光色素（例えば、1つの赤色色素および1つの緑色色素）で標識化することができるか、あるいは、引き続く色検出のために2つの異なる化学的成分（例えば、1つのビオチンおよび1つのジゴキシゲニン）で標識化することができる。配列タグが後に増幅反応におけるプライマーとして働くように、標識は配列タグの3'末端に存在しないことが重要である。

【0047】

本発明の好ましい増幅手段はPCR反応である。cDNAの2つの示差的に標識付けされたバッチ

10

20

30

40

50

の混合物を特異的プライマーの複数のグループの固相アレイと接触させ、各グループは前述の特定のターゲットcDNAに対応する。PCRの初期ラウンドにおいて、固定化プライマーは両方の源からのターゲットポリヌクレオチドとアニールし、鎖伸長のために十分な条件下に新生相補的鎖を合成する。新生相補的鎖はターゲット配列領域を通して伸び、ターゲットcDNA鑄型の末端における配列タグに対して相補的な配列を3'末端に含有する。例えば、第1新生鎖は、それを源1からのSP6標識付けcDNA鑄型上で増幅された場合、SP6配列に対して相補的な3'末端を有する；そして第2新生鎖は、それを源2からのT7標識付けcDNA鑄型上で増幅された場合、T7配列に対して相補的な3'末端を有する。こうして、固相アレイ上で固定化された各新生鎖はその源に対して特異的配列タグを「受け継ぐ」。

【0048】

PCRの引き続くラウンドにおいて、異なる源について標識付けされた新生鎖の第1組は新生鎖の第2組の合成のための鑄型として働く。この時、PCRの初期プライマーは溶液中で示差的に標識化された遊離配列タグ、例えば、蛍光標識化SP6プライマーおよびリサミン標識化T7プライマーである。したがって、標識化配列タグから伸長した新生鎖の第2組は、PCR反応の最初のラウンドにおけるターゲットcDNA鑄型の当初の源に対応して、示差的に標識化される。非結合試薬および変性しない当初鑄型を洗浄除去した後、各固定化プライマー部位は当初の生物学的源を示す標識を1つの鎖上に有する二本鎖ポリヌクレオチドを有する。それ自体、異なる標識の最終検出は異なる生物学的源における特定のターゲットポリヌクレオチドの存在および存在量を明らかにするであろう。

【0049】

当業者は理解するように、各生物学的源からの遺伝子発現の正確な量を測定することは不必要であるが、このような正確な測定は可能である。むしろ、本発明は異なる源における遺伝子発現の比較分析のアプローチを提供する。アレイ上の各プライマースポットにおいて、異なる標識の検出を使用して異なる生物学的源からの各ターゲットポリヌクレオチドの比を決定し、引き続いて相対存在量を決定する。

【0050】

異なる生物学的源の示差的発現分析の1例は図3に図解されている。

【0051】

図3は2つの異なる試料からのターゲット遺伝子の増幅および検出を描写し、各ターゲット遺伝子は試料特異的配列決定タグで標識付けされている。増幅反応は溶液相の、示差的に標識化された配列タグ、例えば、Cy3 - 配列タグ1およびCy5 - 配列タグ2の存在下に実施される。3Aにおいて、各遺伝子に対して特異的な5'末端プライマーを固体支持体上でグループで固定化する。3Bにおいて、以前に配列タグで5'末端において標識付けされたターゲット鎖を固定化5'末端プライマーに対してアニールし、PCR増幅の鑄型として働かせる。3Cにおいて、ターゲット鑄型に対して相補的な新生鎖は各固定化プライマー部位から開始され、ターゲット配列を通して配列タグに対して相補的である3'末端に伸びる。それ自体、各新生鎖もまた相補的タグ配列で標識付けされる。増幅の第1ラウンドが完結したとき、当初のターゲット鑄型は変性の間に新生鎖から解放される。次いで、3DはPCRの第2ラウンドを描写し、その間に各固定化新生鎖は鑄型として働き、そして溶液相、Cy3 - またはCy5 - 標識化配列タグは他の新生鎖合成のプライマーとして働く。その結果、対応するターゲット遺伝子が来る試料起源に依存して、新しい鎖の各々はCy3またはCy5標識を支持するであろう。また、3Dにおいて、当初のターゲット鑄型は追加の固定化5'末端プライマー部位に対してアニールして増幅の新しいラウンドを開始する。PCRの第2ラウンドが完結すると、変性が起こらないので、Cy3またはCy5 - 標識化新生鎖は固定化新生鎖にアニールしたままである。したがって、3Eに示すように、固定化増幅生成物をCy3またはCy5の存在について検出することができ、これらの存在は当初のターゲット遺伝子源を示す。

【0052】

本発明の示差的発現分析は生物学的研究の種々の面ならびに臨床的用途において実用性を有する。例えば、複数の系における問題の特定遺伝子の発現パターンを1つの試料混合物内で比較して、変動を最小にすることができる。それは、例えば、異なる種間のある種の

10

20

30

40

50

遺伝子の発現レベルの比較を可能とし、こうして問題の遺伝子の機能性の評価を可能とする。また、本発明は、ターゲット遺伝子の発現レベルを健康な個体に対して比較することによって、疾患を有する患者のある種の遺伝子欠陥の臨床的診断において有効である。その上、本発明を使用して、異なる細胞/組織/生物における遺伝子発現レベルを比較して、特定の生物学的経路におけるある種の遺伝子の役割を評価することができる。

【0053】

前述の増幅法は、単一固相支持体上の複数のターゲットポリヌクレオチドの高い処理量のアッセイに使用することができる。単一形態または対の、プライマーの複数のグループを固相支持体上に固定化して、前もって決定したパターンを有するマイクロアレイを形成する。プライマーの各グループは特定のターゲットポリヌクレオチドに対応し、マイクロアレイ内の離散位置を占有する。前述したように、複数のターゲットポリヌクレオチドを含有するか、あるいは含有することが推測される試料をPCR反応に適切な条件下にマイクロアレイと接触させるとき、各ターゲットポリヌクレオチドは増幅され、離散位置において付着され、マイクロアレイはそれに対して固定化された対応するプライマーを有する。

10

【0054】

本発明によれば、潜在的ターゲットポリヌクレオチドの数は、小さい密なマイクロアレイを製造しかつ分析する入手可能な技術によってのみ制限される。例えば、プライマー対の約100,000までの異なる集団を固体支持体上の離散位置に準備し、支持体をPCR溶液および試料と接触させることによって、既知の技術を使用して、約100,000までのポリヌクレオチドを単一固体支持体上で分析することができ、ここで試料は設計されたプライマーが検出するターゲットポリヌクレオチドの少なくとも1つのコピーを含んでなる。

20

【0055】

方法および材料

1. ターゲットポリヌクレオチド

本発明の目的に対して、ターゲットポリヌクレオチドは二本鎖DNA、一本鎖DNA、またはRNAであることができる。ターゲットポリヌクレオチドの例は、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、ミトコンドリアDNA、ウイルスDNA、増幅されたDNA、およびウイルスDNAを包含するが、これらに限定されない。二本鎖ターゲットポリヌクレオチドは増幅反応の開始において変性を行い、一本鎖鋳型を形成する。

【0056】

mRNAターゲットポリヌクレオチドは、逆転写により仲介される増幅のための鋳型として直接使用することができる。各固定化プライマー部位において発生する鎖伸長が完結した後、ハイブリダイゼーションしたRNA鋳型鎖を、例えば、RNアーゼHにより、破壊して、新生相補的DNA鎖を固相支持体に付着させて残す。第2プライマー（特異的または万能）が溶液相の中に存在する場合、第1新生cDNA鎖は他の新生鎖を合成する鋳型として働き、これにより各固定化プライマー部位において二本鎖新生DNA分子を形成するか、あるいは2つの固定化プライマーを結合する。

30

【0057】

選択的に、試料中のmRNAターゲットポリヌクレオチドをまず相補的DNAに逆転写し、引き続いてこのDNAは本発明の固相PCR反応のための初期鋳型として働く。逆転写は、例えば、ポリ-dT万能プライマーから開始させることができる。ポリ-dT万能プライマーは、また、本発明によるPCR増幅反応の溶液相中の万能プライマーとして使用することができる。ポリ-dT開始cDNA生成物は固相支持体上に固定化された特異的プライマーにその3'末端でアニールし、ポリ-A配列をその3'末端に有する新生相補的鎖の引き続く合成のための鋳型として働く。変性工程後、単一固定化新生鎖は溶液相中でポリ-dT万能プライマーに対してハイブリダイゼーションすることができ、固相支持体に固定された二本鎖新生ポリヌクレオチドのPCR増幅および形成の引き続くラウンドのための鋳型として働く。

40

【0058】

本発明の複数のポリヌクレオチドは1つの単一生物学的源からのものであるか、あるいは、複数の生物学的源、例えば、異なる種または組織からのものであることができる。例え

50

ば、詳細に前述したように、1つのPCR反応において、既知の検出法により2つの源の増幅された生成物の区別を可能とする条件下に、健康な個体から単離されたターゲットポリヌクレオチドの1集団を、問題の疾患を有する患者から単離されたターゲットポリヌクレオチドの他の目的と混合することができる。したがって、本発明はターゲットポリヌクレオチドの交差種の比較分析に使用することができる。

【0059】

2. オリゴヌクレオチドプライマー

本発明は、オリゴヌクレオチドプライマーの別々の、固定化されたグループを含んでなる調製された固体支持体を提供する。各プライマーは、特定のターゲットポリヌクレオチドの増幅を実施するために適当である。こうして、例えば、標準PCRプライマーの選択プログラム、例えば、プライマー3 (Massachusetts Institute of Technology (MIT) からの) を使用して、ターゲットポリヌクレオチド中の既知の配列に基づいて、プライマーを選択または設計することができる。

【0060】

固相支持体は約5~約100平方マイクロメートルの領域を提供することができ、その上で前もって決定したパターンに従い離散領域において単一プライマーの約100,000までのグループを固定化することができる。調製した固体支持体は、支持体上の任意の所定の位置にプライマーまたはプライマー対の配列の関連する書かれたまたは電子的記録を有することができ、こうして増幅されたターゲットの支持体上の位置をさらに同定することができる。

【0061】

マイクロアレイ上の引き続き計画した増幅反応の必要性により、特定のターゲットヌクレオチドに対応する各グループ内のプライマーの数を決定し、制限することができる。こうして、例えば、特に反応体積およびターゲット鑄型ポリヌクレオチド分子の期待する数、およびPCRの提案されたサイクル数が与えられると、マイクロアレイ上の特異的部位においてPCRを実施するために必要と思われるプライマーの数は、反応を成功させるために支持体上の各位置にどれだけ多くのオリゴヌクレオチドプライマーのコピーをグループとして適用するかを正確に決定する助けとなるであろう。好ましくは、プライマーの量(すなわち、プライマー分子数またはプライマー濃度)は所定の固体支持体上の各準備された位置においてほぼ同一であろう(例えば、約100,000までのターゲットポリヌクレオチドを増幅または検出するためにプライマーの1000~10,000、約100,000までの集団を有するDNAマイクロアレイのフォーマットにおいて)。

【0062】

検出すべきポリヌクレオチドに基づく特定の用途のために、プライマー配列を使用して固体支持体を調製することができる。特に増幅すべきターゲットポリヌクレオチドの配列および品質を考慮して、オリゴヌクレオチドプライマーは特定のPCRに適当な任意の長さを有することができる。1例として、プライマーは約4~約30ヌクレオチド長さであることができる。

【0063】

本発明の核酸プライマーは、変更が得られる収率または生成物に有意な程度に悪影響を及ぼさない程度に、核酸塩基の小さい欠失、付加および/または置換を含有することができることが理解される。

【0064】

オリゴヌクレオチドプライマーは、通常核酸の中に見出される天然に存在する複素環式塩基(ウラシル、シトシン、チミン、アデニンおよびグアニン)、ならびに修飾された塩基および塩基アナログを含むことができる。ターゲット配列に対するプライマーのハイブリダイゼーションと適合性の任意の修飾された塩基および塩基アナログは、本発明において有効である。プライマーの糖またはグリコシド部分は、デオキシリボース、リボース、および/またはこれらの糖の修飾された形態、例えば、2'-O-アルキルリボースを含むことができる。好ましい態様において、糖部分は2'-デオキシリボースである;しかし

10

20

30

40

50

ながら、ターゲット配列に対してハイブリダイゼーションするプライマーの能力と適合性である任意の糖を使用することができる。

【0065】

1つの態様において、プライマーのヌクレオシド単位は、この分野においてよく知られているように、ホスホジエステル主鎖により結合される。追加の態様において、ヌクレオシド間の結合はプライマーの特異的ハイブリダイゼーションと適合性であるこの分野において知られている任意の連鎖を包含することができ、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、スルファメート（例えば、米国特許第5,470,967号）およびポリアミド（すなわち、ペプチド核酸）を包含するが、これらに限定されない。ペプチド核酸は下記の文献に記載されている：Nielsen他（1991）「Science」254：1497 - 1500；米国特許第5,714,331号；およびNielsen（1999）「Cur. Opin. Biotechnol.」10：71 - 75。

10

【0066】

ある態様において、プライマーはキメラ分子であることができ、すなわち、2以上の型の塩基または糖サブユニットを含んでなることができ、および/または結合は同一プライマー内の2以上の型であることができる。プライマーは、この分野において知られているように、例えば、インターカレーターおよび/または小さいグループバインダー組込むことによって、そのターゲット配列に対するハイブリダイゼーションを促進する部分を含むことができる。

【0067】

塩基、糖、およびヌクレオシド間主鎖、ならびにプライマー上の任意のペンダント基の存在の変動は、配列特異的方式で、ターゲット配列に結合するプライマーの能力と適合性であろう。既知および発生すべき、多数の構造的修飾はこれらの拘束内で可能である。その上、プライマーを形成する種々の複素環式塩基、糖、ヌクレオシドおよびヌクレオチドを製造する方法、および前もって決定した特異的配列のオリゴヌクレオチドの製造は、十分に開発され、この分野において知られている。オリゴヌクレオチド合成の好ましい方法は、米国特許第5,419,966号において教示されている。

20

【0068】

特定のPCRまたは引き続く操作、例えば、増幅されたターゲットポリヌクレオチドの単離を助けるまたは促進する、任意の特別の追加の成分または配列を使用して、オリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。例えば、プライマーはターゲット配列に対して相補的であるものに加えて配列を含むことができる。このような配列は通常プライマー中のターゲット相補的配列から上流（すなわち、5'側に対して）に存在する。例えば、1以上の制限酵素認識部位を含んでなる配列（いわゆる「リンカー」または「アダプター」）は、プライマーの中のターゲット相補的配列から上流に存在するとき、増幅生成物のクローニングおよび引き続く操作を促進する。プライマーの中に含めるために有用な他の配列は、配列決定プライマーに対して相補的な配列、およびバクテリオファージRNAポリメラーゼ、例えば、T3RNAポリメラーゼ、T7RNAポリメラーゼおよびSP6RNAポリメラーゼのプロモーターを特定する配列を包含する。

30

【0069】

PCR増幅を実施するために溶液相プライマーをまた使用するとき、溶液相プライマーは万能プライマーであることができる。異なる万能プライマーを比較すべき組織または種の試料について使用することができる。これらの異なるプライマーを示差的に標識化し（例えば、1つについて緑色、他のについて赤色）、こうして検出の間に、1つの種または組織の試料からのターゲットを他の種または組織の試料からの対応するターゲットと区別することができる。

40

【0070】

野生型対応物に比較して特異的なヌクレオチド突然変異を含有する突然変異体ポリヌクレオチドを検出するように、本発明のオリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。野生型ポリヌクレオチドであるが、少なくとも3'末端のヌクレオチドが異なる配列に基づいて、プライマーを設計することができる。それ自体、これらの3'末端置換プライマ

50

ーは野生型ターゲットポリヌクレオチドに結合し、PCR増幅することができない。その代わりに、それらはヌクレオチド置換に合致する配列突然変異を有する突然変異体ポリヌクレオチドを認識し、増幅することができる。問題の領域に広がる3'末端置換プライマーのアレイを使用することによって、その領域内の突然変異を検出することができる。

【0071】

3. 固相支持体

本発明の固相支持体は、ヌクレオチドのハイブリダイゼーションおよび合成を支持するために適当な、任意の固体の材料および構造を有することができる。好ましくは、固相支持体は少なくとも1つの実質的に剛性の表面を含んでなり、その表面上にプライマーを固定化し、PCR反応を実行することができる。固相支持体は、例えば、ガラス、合成ポリマー、プラスチック、硬質非メッシュ状ナイロンまたはセラミックから作ることができる。他の適当な固体支持体材料は既知であり、当業者に容易に入手可能である。固体支持体のサイズはDNAマイクロアレイ技術に有効な、任意の標準マイクロアレイのサイズであり、そしてサイズは本発明の反応を実施するために使用する特定の装置に適合するように調整することができる。オリゴヌクレオチドを固定化する目的の固相支持体の誘導化するための方法および材料はこの分野において知られており、そして、例えば、米国特許第5,919,523号に記載されており、その開示は引用することによって本明細書の一部とされる。

【0072】

固体支持体を流体を含有する容器の中に準備するか、あるいはその一部分であることができる。例えば、固体支持体をチャンバーの中に入れることができる。このチャンバーは固体支持体のへりに沿ってシールをつくった側面を有し、支持体上にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含有する。特定の例において、チャンバーは長方形の支持体の各側に壁を有して、PCR混合物が支持体上に止まり、かつまたプライマーを提供するために有効な全表面をつくるようにする。

【0073】

4. プライマーの固定化

本発明のオリゴヌクレオチドプライマーは、固体支持体上の特定の位置にオリゴヌクレオチドを固定し、固定化し、準備し、および/または適用するための任意の入手可能な手段を使用して、固体支持体の表面に付着させ、固定化し、準備し、および/または適用することができる。例えば、下記の特許に記載されているように、写真平版(Affymetrix、カリフォルニア州サンタクララ)を使用して、チップまたは固体支持体上の特定の位置にオリゴヌクレオチドプライマーを適用することができる：米国特許第5,919,523号、第5,837,832号、第5,831,070号および第5,770,722号に記載されており、それらの開示は引用することによって本明細書の一部とされる。また、オリゴヌクレオチドプライマーは、米国特許第5,807,522号(1998)に記載されているように、固体支持体に適用することができる。さらに、ロボット・システム、例えば、ジェネティック・マイクロ・システムス(Genetic MicroSystems、マサチューセッツ州ウォバーン)、ジーンマシズ(GeneMachines、カリフォルニア州サンカルロス)またはカーテシアン・テクノロジー(Cartesian Technologies、カリフォルニア州アービン)により製作されているシステムを使用して、プライマーを固体支持体に適用することができる。

【0074】

5. PCR反応

本発明を実施するとき、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を実施するために必要な試薬と混合された適当なターゲットポリヌクレオチドを含んでなる反応混合物を、固体支持体上の各固定化されたプライマー対または単一プライマーの集団と接触させて配置する。適当なターゲットポリヌクレオチドは、二本鎖DNA、RNA鋳型の逆転写により発生した一本鎖cDNA、またはmRNA集団であることができる。反応混合物はターゲット鎖に対して相補的なポリヌクレオチドの合成を促進する酵素を含有する。適当なポリメラーゼは、熱安定性ポリメラーゼ酵素、例えば、Taq DNAポリメラーゼ、TthI DNAポリメラーゼ、Tne DNAポリメラーゼ、Tma DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼまたは

10

20

30

40

50

任意の他の熱安定性DNAポリメラーゼを包含する。また、反応混合物はポリメラーゼ連鎖反応間に新生鎖の中に組込むことができる標識分子を含有し、こうして増幅された生成物をPCR後に固体支持体で検出できるようにすることができる。標識はこの分野においてよく知られている方法に従い直接的または間接的に検出することができる。直接的検出に適切な標識は、任意の蛍光分子、例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサス・レッドまたはローダミンであることができる。また、間接的検出を促進する分子、例えば、ビオチンまたはジゴキシゲニンをPCR間に新生鎖の中に組込むことができる。ビオチンを引き続いて標識化ストレプトアビジンまたは標識化抗 - ビオチン抗体に結合させることによって検出することができる。同様に、組込まれたジゴキシゲニンは標識化または非標識化抗 - ジゴキシゲニン抗体により検出することができ、そして非標識化抗 - ジゴキシゲニン抗体は標識化抗 - 抗 - ジゴキシゲニン抗体を結合させることによって検出することができる。

10

【 0 0 7 5 】

PCRを実施する試薬がマイクロアレイ上の固定化されたプライマーと接触した後、例えば、自動化システム、例えば、in situ PCR装置を使用して、PCRの発生を促進する条件下にマイクロアレイを配置する。PCR手順のための反応条件はin situ PCR装置のマニュアルにより推奨される通りであることができ、使用する鋳型の特質またはプライマーおよび鋳型のハイブリダイゼーションを使用するとき予測される困難が分かったとき、適当に変化させることができる。温度およびサイクル数は、推奨されるように、また、プライマーの選択および鋳型配列、および他の関係する因子が分かったとき適当に、選択することができる。マイクロアレイ上のin situ型PCR反応は、本質的に下記の文献に記載されているように、実施することができる：Embretson他、「Nature」362：359 - 362（1993）；Gosden他、「Bio Techniques」15（1）：78 - 80（1993）；Heniford他、「Nucl. Acid Res.」21（14）：3159 - 3166（1993）；Long他、「Histochemistry」99：151 - 162（1993）；Nuvolo他、「PCR Methods and Applications」2（4）：305 - 312（1993）；Patterson他、「Science」260：976 - 979（1993）。

20

【 0 0 7 6 】

6. 標識化および検出

本発明のPCR法は、試料中の複数のターゲットポリヌクレオチドの検出を提供する。適当な標識化用試薬の存在下にPCRが完結した後、増幅され、標識化されたターゲットポリヌクレオチドをマイクロアレイ上の当初のプライマー位置の各々において検出することができる。増幅され、標識化されたターゲットポリヌクレオチドの検出は、標識化配列を検出するために使用し、例えば、増幅されたまたは新しく合成されたDNA鎖の中に組込まれた標識の検出を包含する、標準的方法により実施することができる。こうして、例えば、蛍光標識または放射能標識を直接的検出することができる。他の標識化技術は、鎖合成間にDNAの中に組込まれた標識、例えば、ビオチンまたはジゴキシゲニンを標識化された、または標識化された分子それ自体に結合することができる抗体または他の結合性分子（例えば、ストレプトアビジン）により検出することを必要とし、例えば、標識化分子は、例えば、蛍光分子（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサス・レッドおよびローダミン）に結合させた、または酵素的に活性化が可能な分子に結合した抗ストレプトアビジン抗体または抗ジゴキシゲニン抗体であることができる。新しく合成された分子上の標識がなんであって、かつ標識が直接的にDNAの中に存在するか、またはDNAに結合する（またはDNAに結合する分子に結合する）分子に結合されているかどうかにかかわらず、標識（例えば、蛍光、酵素的、化学発光、または比色）は、標識、または特定の標識を検出する他の適当な手段に依存して、レーザースキャナーまたはCCDカメラ、またはX線フィルムにより検出することができる。

30

40

【 0 0 7 7 】

ターゲットポリヌクレオチドは、PCRの間に増幅されたDNAの中に組込まれる標識化ヌクレオチド（例えば、直接的標識化のためにdNTP - 蛍光標識；間接的標識化のためにdNTP - ビオチンまたはdNTP - ジゴキシゲニン）を使用することによって検出することができる。間

50

接的に標識化されたDNAについて、検出は蛍光または酵素結合ストレプトアビジンまたは抗ジゴキシゲニン抗体により実施される。PCR法において、ポリヌクレオチドターゲットに対する新しく合成された補体の中に組込まれた標識を検出することによって、ポリヌクレオチドを検出する。この目的のために、前述したように、DNAが合成されているときDNAの中に組込むことができる任意の標識、例えば、フルオロ - dNTP、ビオチン - dNTP、またはジゴキシゲニン - ジゴキシゲニンを使用することができ、そしてそれらの標識はこの分野において知られている。溶液中で1以上の万能プライマーを使用して実施されるPCR増幅は、万能プライマーを検出することによって、固体支持体上の位置において増幅されたターゲットを検出するオプションを提供する。こうして、2以上の万能プライマーを使用する場合、異なる源からのターゲット鎖を固体支持体上で示差的に検出することができる。

10

【0078】

示差的発現系において、異なる生物学的源に由来する増幅生成物は、節「C. 異なる生物学的源からの示差的発現を比較する」に記載されているように、それらの由来に基づいて増幅された鎖を示差的に標識化することによって検出することができる。1つの面において、本発明において使用する検出法は単一源ターゲットについての検出法と異なり、示差的標識（例えば、赤色素および緑色素）を、増幅の間に新生鎖の中に組込むよりは、むしろ、溶液中のプライマータグ上に前もって組込む。あるいは、示差的標識に加えて、第3標識をまた新生鎖の中に組込むことができ、こうして示差的発現の比較に対する全体の感度は増強される。

【0079】

20

7. 検出キット

本発明は、本発明の方法を実施するキットを提供する。キットは、例えば、そうでなければ固体支持体上の検出が困難である、複数のターゲットポリヌクレオチドを検出する物質および試薬を含むことができる。キットは、例えば、固体支持体、ターゲットポリヌクレオチドの特定の組のためのターゲットポリヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応の試薬および成分、例えば、DNA合成のための酵素、標識化物質、および他の緩衝剤および洗浄のための試薬を含むことができる。また、キットは固体支持体上で特定のターゲットを増幅するためにキットを使用するための使用説明書を含むことができる。キットは固体支持体上に既に固定されたプライマーの組、例えば、ターゲットポリヌクレオチドの特定の組を増幅のためのプライマーの組を有する調製された固体支持体を含有する場合、このような調製された固体支持体の設計および構築は前述した通りである。このような固体支持体は、検出しようとするターゲットポリヌクレオチドに依存して個々のキットのためにあつらえて作ったものであることができる。また、固体支持体が *in situ* 型のPCR装置を使用してPCR増幅することができる場合、例えば、*in situ* 型または固相型のPCR手順を使用して、固体支持体上でPCRを実施するために必要な試薬をキットは含むことができる。支持体をPCRの試薬と接触させることができる。反応前に、潜在的に複数のターゲットポリヌクレオチドを含有する試料をPCR反応混合物に添加する。PCR試薬は、通常のPCR緩衝剤、熱安定性ポリメラーゼ（例えば、Taq DNAポリメラーゼ）、ヌクレオチド（例えば、dNTP）、および他の成分および標識化用分子（例えば、前述したように直接的または間接的標識化のための）を包含する。固体支持体は、固体支持体上に表示した位置に付着されたプライマーを提供する。PCRを実施するために、固定化プライマーを有する支持体を、PCRを実施のための試薬および反応混合物中のターゲットポリヌクレオチド鑄型と接触させ、PCR（例えば、*in situ* 型または固相型のPCR）条件に暴露する。キットに使用するための使用説明書は、例えば、上記方法の説明において示したような手順についての詳細な説明を含むことができる。固定化プライマーを単独で、または、代替的に、溶液相プライマーと一緒に使用するPCRの増幅の実行を支持するように、キットを組立てることができる。

30

40

【0080】

実施例

実施例1 ミクロアレイ上の4つのDNA鑄型の増幅

4つのcDNAターゲットポリヌクレオチド、ヒトG3PDH、PKC - 、c - Raf、およびサイクリ

50

ンAをマイクロアレイ上の増幅により検出のために選択した。この増幅は、プライマー対の両方のメンバーが支持体上に固定化されている対称PCR、またはプライマー対の一方のメンバーが固定化されており、そして他のメンバーが溶液の中に存在する、非対称PCRにより実施される。

【0081】

a. G3PDHの対称増幅

これらのターゲットポリヌクレオチドの仮定または推定した配列に基づいて、プライマー対の集団を4つのターゲットの各々について設計し、合成する。固体支持体に対するプライマーの付着を促進するためにアミンの5'末端の修飾を使用して、プライマーを合成した。シリ酸化ガラススライド (Sigma Chemicals、ミゾリー州セントルイス、から購入した) 上に、異なる濃度で、プライマーを対としてまたは単一プライマーとしてスポットした。

10

【0082】

準備されたプライマーを有するシリ酸化スライドを、室温において飽和NaClチャンパー中で一夜水和した。水和されたスライドを4×SSCで5分間リンスし、次いで水で洗浄した。スライドをSurModics (ウイスコンシン州マディソン) ブロッキング溶液 (0.1% SDSを含む) で50℃において15分間ブロックし、次いで水で2回洗浄し、次いで空気乾燥した。そこでスライドは使用できる状態にある。

【0083】

PCR溶液を下記の最終濃度に調製した: 200 μMの各dATP、dGTP、およびdTTP; 100 μMのdCTPおよび100 μMのピオチン - 14 - dCTP。また、反応溶液は1×Taq反応緩衝液 (1.5mMのMgCl₂を含む); DNA鋳型としてヒトG3PDH遺伝子プラスミド (100ngのファージミドDNAまたは500ngの一本鎖cDNAライブラリー) および2.5単位のTaq酵素を含有する。次のような70 μlの反応溶液が発生した:

20

7 μl	2mMのd3TP (dATP、dGTP、およびdTTP)
12.5 μl	0.4mMのdCTP
12.5 μl	0.4mMのピオチン - 14 - dCTP
7 μl	10×反応緩衝液 (w / 15mMのMgCl ₂)
5 μl	DNA鋳型
25.5 μl	水
0.5 μl	5単位 / μlのTaq DNAポリメラーゼ

30

70 μlの総体積について。

【0084】

HyBaidチャンパー (マサチューセッツ州フランクリン) をスライド上に配列された位置を中心にして配置し、反応溶液をチャンパーに移し、プラスチックカバーでシールした。PCR装置を予備加熱し、下記のサイクリングプロトコルを適用した:

開始	---	94℃	5分
主サイクル: (工程1~3)	35×反復する		
-1	---	94℃	30秒
-2	---	55℃	30秒
-3	---	72℃	30秒
最終エクステンション	---	72℃	7分
終了	---	4℃	保持

40

【0085】

PCRが完結した後、スライドをジゴキシゲニンブロッキング溶液 (Boehringer Mannheim、インジアナ州インディアナポリス) で室温において30分間ブロックした。スライドをストレプトアビジン (5 μg / ml) (ジゴキシゲニンブロッキング溶液中で1:250に希釈した) で室温において30分間おだやかに震盪しながら染色した。ジゴキシゲニン洗浄緩衝液を使用して、スライドを室温において15分間、2回洗浄した。スライドをジゴキシゲニンブロッキング溶液で室温において30分間ブロックした。

50

【 0 0 8 6 】

スライドをジゴキシゲニンブロッキング溶液中で1:100に希釈した第1抗体(ウサギ抗ストレプトアビジン)と室温において1時間インキュベートした。スライドをジゴキシゲニン洗浄緩衝液で室温において15分間、2回洗浄した。スライドをジゴキシゲニンブロッキング溶液中で1:100に希釈した第2抗体(Cy3結合ヤギ抗ウサギ抗体)と室温において30分間インキュベートした。スライドをジゴキシゲニン洗浄緩衝液で室温において15分間、2回洗浄した。スライドをジェネティック・マイクロシステム(Genetic MicroSystem)、GMS418からの緑色ビームで走査した。

【 0 0 8 7 】

対称PCRの結果を図4Aに示す。照明されたスポットは、ヒトG3PDHプライマーが固定化されているスポットにおけるhu G3PDH鋳型の増幅の成功を示す。対照的に、他の非ヒトG3PDHプライマーが固定化されているスポットにおいて、ターゲットヒトG3PDH鋳型の検出は見られない。

10

【 0 0 8 8 】

b. hu G3PDHの非対称増幅

4つのターゲットcDNA、hu G3PDH、PKC- α 、c-Raf、およびサイクリンAの各々についてプライマーの組を使用して、非対称PCR反応を実行した。装置上の各スポットは、図4Bに示めされたように定められた濃度で、ターゲットcDNAに対して特異的なプライマーの組を含有する。固定化プライマーに加えて、hu G3PDHアンチセンスプライマーをまた25pmolで反応溶液に添加した。鋳型として1pgのhu G3PDH cDNAを使用するPCR増幅を前述した条件下に実施した。

20

【 0 0 8 9 】

hu G3PDH cDNAの非対称PCRの結果を図4Bに示す。欄1~6のスポットしたプライマー濃度はそれぞれ3.125、6.25、12.5、25、50および100pmol/ μ lである。照明されたスポットは、hu G3PDHプライマーを含有するスポットにおいてhu G3PDHの増幅生成物のみを検出することができることを示し、アッセイの強い特異性を示唆する。さらに、非対称PCRの結果の解像能は図2Aに示す対称PCRの結果よりも高いように見え、非対称方法を使用するときのよりすぐれた感度を示唆する。

【 0 0 9 0 】

c. 1つのマイクロアレイ上の4つのターゲットcDNAの非対称増幅

30

1つの単一マイクロアレイ上で複数のターゲットポリヌクレオチドを検出するために、本発明の非対称方法をさらに試験した。

【 0 0 9 1 】

マイクロアレイおよびその上のプライマーは1bにおけるプライマーと同一であり、各スポットはターゲットcDNAに対して特異的な単一プライマーの組を含有し、決定された濃度を有する。反応溶液は、各々25pmolで、4つのターゲットcDNAの各々のためのアンチセンス鎖プライマーを含有した。また、反応溶液はPCR増幅のための鋳型として4つのcDNAの各々を含有した。PCR反応を実施例1aに記載されているように実施した。

【 0 0 9 2 】

図4Cに示す結果は、プライマーの最低濃度においてさえ、すべてのターゲット鋳型が首尾よく増幅されたことを示す。

40

【 0 0 9 3 】

実施例2 RNAターゲットの固相増幅

この実施例において、生物学的源中のmRNA発現の検出について、非対称PCR法を試験した。

【 0 0 9 4 】

5 μ gのmRNAをOVC1.1細胞から単離し、一本鎖cDNAの逆転写に使用した。SuperScript II キット(Life Technology Inc.)を使用して逆転写反応を実施した。反応溶液中で25pmolの万能プライマー(Uni-1)を使用する非対称PCRを実行するための鋳型として、0.5 μ gの調製したcDNAを使用し、そして4つのターゲット遺伝子、hu G3PDH、PKC- α 、サイク

50

リンAおよびc - Rafに対して特異的プライマーを種々の濃度でマイクロアレイの異なるスポット上に固定化した。上記実施例1(a)に記載されているような条件および手順に従い、PCR反応を実施した。

【0095】

結果を表5に示す。4つのターゲット遺伝子の発現パターンは異なる発現量を示し、G3PDHは最大量であり、そしてc - Rafは最小量である。

【0096】

実施例3 ハイブリダイゼーション前の固相増幅によるシグナルの増強

この実施例において、ハイブリダイゼーション前にPCRによる固相増幅を実施したとき発生したシグナルと、ハイブリダイゼーション単独により発生したシグナルを比較した。図6に図解されているように、マイクロアレイ上のハイブリダイゼーション前に固相PCRを実行しかつ実行しないで、卵巣癌腫細胞系統OVC1.1および胎児の脳の遺伝子発現分析からのシグナルを比較した。

【0097】

図6A～図6Bは、標準方法に従う酵素的標識化により全mRNAから調製した蛍光プローブとハイブリダイゼーションした、OVC1.1細胞からのアレイ因子を含有するDNAマイクロアレイを図解する。(下記の文献を参照のこと: Schena M.、およびDavis R.W.(1998)、「genes, Genomes and Chips. in DNA Microarray: A Practical Approach」(編者M. Schena)、Oxford University Press、英国オックスフォード)。図6Aは標準プロトコル後のハイブリダイゼーションシグナルを図解するが、図6Bは上記実施例1(a)に記載されている条件および手順に従い実施した固相PCR反応後のハイブリダイゼーションの結果を図解する。

【0098】

同一ラインに沿った他の実験の結果を図6C～図6Dに示す。図6Cは胎児の脳のcDNAターゲットを含んでなるマイクロアレイに対する蛍光標識化細胞のmRNAプローブのハイブリダイゼーション後のシグナルを図解するが、図6Dは本発明による固相PCR反応後のハイブリダイゼーションの結果を示す。

【0099】

実施例4 固相増幅後のハイブリダイゼーションシグナルの特異性

下記の実施例において、固相増幅後のハイブリダイゼーション反応の特異性を試験した。4つのcDNAターゲットポリヌクレオチド、ヒトG3PDH、PKC - 、c - Raf、およびサイクリンAをマイクロアレイ上の増幅による特異的検出について選択した。

【0100】

a. G3PDHの特異的増幅

アミン被覆ガラスチップを、ヒト遺伝子G3PDH、PKC - 、c - Raf、およびサイクリンAからの4つの異なるセンス鎖プライマーでスポットした。pG3PDHからの1pg(約 4×10^5 コピー)の一本鎖ファージミドDNAを25pMolのG3PDHアンチセンスプライマーとともに溶液中で使用するDNAポリメラーゼ連鎖反応により、ヒトG3PDHを特異的に増幅し、PCR後検出した。

【0101】

5 μ gのmRNAをOVC1.1細胞から単離し、一本鎖cDNAの逆転写に使用した。SuperScript IIキット(Life Technology Inc.)を使用して逆転写反応を実施した。0.5 μ gの調製したcDNAを鋳型として使用して、反応溶液中で25pMolの万能プライマー(Uni - 1)を用いる非対称PCRを実施し、そして4つのターゲット遺伝子、hu G3PDH、PKC - 、サイクリンAおよびc - Rafに対して特異的なプライマーを種々の濃度でマイクロアレイの異なるスポット上に固定化した。PCR反応を上記実施例1(a)に記載されている条件および手順に従い実施した。

【0102】

結果を図7に示す。欄1～6のスポットティングプライマー濃度はそれぞれ3.125、6.25、12.5、25、50および100pMol/ μ lである。照明されたスポットは、hu G3PDHプライマーを含有するスポットにおいてhu G3PDHの増幅生成物のみを検出することができることを示し

10

20

30

40

50

、アッセイの強い特異性を示唆する。

【 0 1 0 3 】

b. G3PDHおよびc - Rafの特異的増幅

アミン被覆ガラスチップを、ヒト遺伝子G3PDH、PKC - 、c - Raf、およびサイクリンAからの4つの異なるセンス鎖プライマーでスポットした。100ngのc - Raf DNA、およびpG3PDHからの1pg (約 4×10^5 コピー)の一本鎖ファージミドDNAを25pMolのG3PDHアンチセンスプライマーとともに、しかしc - Rafアンチセンスプライマーの不存在下に、溶液中で使用するDNAポリメラーゼ連鎖反応により、ヒトG3PDHを特異的に増幅し、PCR後検出した。

【 0 1 0 4 】

4つのターゲット遺伝子、hu G3PDH、PKC - 、サイクリンAおよびc - Rafに対して特異的プライマーを種々の濃度においてマイクロアレイの異なるスポット上に固定化した。PCR反応を上記実施例1(a)に記載されている条件および手順に従い実施した。結果を図8に示す。欄1~6のスポットティングプライマー濃度はそれぞれ3.125、6.25、12.5、25、50および100pmol / μ lである。照明されたスポットは、hu G3PDHプライマーを含有するスポットにおいてhu G3PDHの増幅生成物を検出することができることを示し、シグナルはc - Rafプライマーを含有するスポットにおいて検出されたc - Rafよりも強く、アッセイの強い特異性ならびにhu G3PDHに対する非対称PCRの感度の増強を示唆する。

10

【 0 1 0 5 】

c. G3PDH、PKC - 、c - Raf、およびサイクリンAの特異的増幅

アミン被覆ガラスチップを、ヒト遺伝子G3PDH、PKC - 、c - Raf、およびサイクリンAからの4つの異なるセンス鎖プライマーでスポットした。鋳型として4つの遺伝子集団および25pMolのG3PDHアンチセンスプライマーを溶液中で使用するDNAポリメラーゼ連鎖反応により、すべての4つの遺伝子を特異的に増幅し、PCR後検出した。

20

【 0 1 0 6 】

結果を図9に示す。欄1~6のスポットティングプライマー濃度はそれぞれ3.125、6.25、12.5、25、50および100pmol / μ lである。照明されたスポットは、すべての4つの増幅生成物を検出できることを示す。

【 0 1 0 7 】

d. 胎児の脳のcDNAライブラリー遺伝子発現分析に対する特異的増幅についての試験

マイクロアレイチップ上のDNA PCRの鋳型として、ヒトの胎児の脳のcDNAライブラリー (Stratagene) を使用した。4つのターゲット遺伝子、hu G3PDH、PKC - 、サイクリンAおよびc - Rafに対して特異的なプライマーを種々の濃度でスポットしたマイクロアレイ上で、0.05 μ gの調製したcDNAを鋳型として使用して、反応溶液中で25pMolの万能プライマー (Uni-1) を用いるPCR増幅を実施した。PCR反応を上記実施例1(a)に記載されている条件および手順に従い実施した。

30

【 0 1 0 8 】

結果を図10に示す。欄1~6のスポットティングプライマー濃度はそれぞれ3.125、6.25、12.5、25、50および100pmol / μ lである。データは同一DNA試料を使用するH01 ExpressChip (商標) (Mergen, Ltd.、カリフォルニア州サンレアンドロ) 上のハイブリダイゼーションの結果と合致した。

40

【 0 1 0 9 】

e. OVC1.1細胞遺伝子発現分析に対する特異的増幅についての試験

アミン被覆ガラスチップを、ヒト遺伝子G3PDH、PKC - 、c - Raf、およびサイクリンAからの4つの異なるセンス鎖プライマーでスポットした。pG3PDHからの1pg (約 4×10^5 コピー)の一本鎖ファージミドDNAを25pMolのG3PDHアンチセンスプライマーとともに溶液中で使用するDNAポリメラーゼ連鎖反応により、ヒトG3PDHを特異的に増幅し、PCR後検出した。

【 0 1 1 0 】

5 μ gのmRNAをOVC1.1細胞から単離し、SuperScript IIキット (Life Technology Inc.) を使用して一本鎖cDNAに逆転写した。0.05 μ gのcDNAを鋳型として使用して、反応溶液中で25pMolの万能プライマー (Uni-1) を用いる非対称PCRを実施し、そしてターゲット

50

遺伝子、hu G3PDH、PKC - 、およびサイクリンAのためのセンス鎖オリゴヌクレオチドプライマーを種々の濃度でマイクロアレイの異なるスポット上に固定化した。

【0111】

結果を図11に示す。欄1~6のスポットティングプライマー濃度はそれぞれ3.125、6.25、12.5、25、50および100pmol / μlである。照明されたスポットは、固相増幅による相対的シグナルの非常にわずかの歪みを示す。

【0112】

この明細書の中に引用したすべての刊行物および特許出願は、個々の刊行物または特許出願が特別にかつ個々に引用することによって本明細書の一部とされると示される場合、引用することによって本明細書の一部とされる。

【0113】

本発明を理解を明瞭にする目的で例示および実施例により多少詳細に記載したが、当業者にとって容易に明らかなるように、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱しないで本発明の教示を考慮すればある種の変化および変更が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1(1A~1E)は、固定化されたプライマーを使用して、ターゲットポリヌクレオチド(A、B、C)を増幅し、検出する固相増幅方法を概略的に描写する。

【図2】 図2(2A~2E)は、固定化されたプライマーを溶液相万能プライマーと組み合わせて使用して、ターゲットポリヌクレオチド(A、B、C)を増幅し、検出する固相増幅方法を概略的に描写する。

【図3】 図3(3A~3E)は、固定化されたプライマーを溶液相プライマーとして働く示差的に標識化された配列タグと組み合わせて使用して、2つの異なる生物学的源からのターゲットポリヌクレオチド(A、B、C)を増幅し、検出し、比較する固相増幅方法を概略的に描写する。

【図4】 図4(4A~4C)は、鋳型として4つのターゲットcDNAを使用する固相増幅実験の結果を示す。

【図5】 図5は、ターゲットmRNAの固相増幅の結果を示す。

【図6】 図6は、ハイブリダイゼーション前の固相PCR増幅によるハイブリダイゼーションシグナルの増強を示す。図6Aは標準プロトコル後のハイブリダイゼーションシグナルを図解するが、図6Bは固相PCR反応後のハイブリダイゼーションシグナルを図解する。図6Cは胎児の脳のcDNAターゲットを含んでなるマイクロアレイに対するハイブリダイゼーション後のシグナルを図解するが、図6Dは固相PCR反応後のハイブリダイゼーションシグナルの結果を図解する。

【図7】 図7は、鋳型としてG3PDHターゲットcDNAを使用する固相増幅後のハイブリダイゼーションの特異性を図解する。

【図8】 図8は、鋳型としてG3PDHおよびc-RafターゲットcDNAを使用する固相増幅後のハイブリダイゼーションの特異性を図解する。

【図9】 図9は、鋳型として4つの異なるターゲットcDNAを使用する固相増幅後のハイブリダイゼーションの特異性を図解する。

【図10】 図10は、鋳型として4つの異なるターゲットcDNAを使用する胎児の脳のライブラリーからのターゲットmRNAの固相増幅後のハイブリダイゼーションの特異性を図解する。

【図11】 図11は、鋳型として3つの異なるターゲットcDNAを使用するOVC1.1からのターゲットmRNAの固相増幅後のハイブリダイゼーションの特異性を図解する。

10

20

30

40

【図 1】

遺伝子 A : _____ 遺伝子 B : - - - - - 遺伝子 C : _____
 5'末端プライマー : → ピオチン-dCTP : ☆

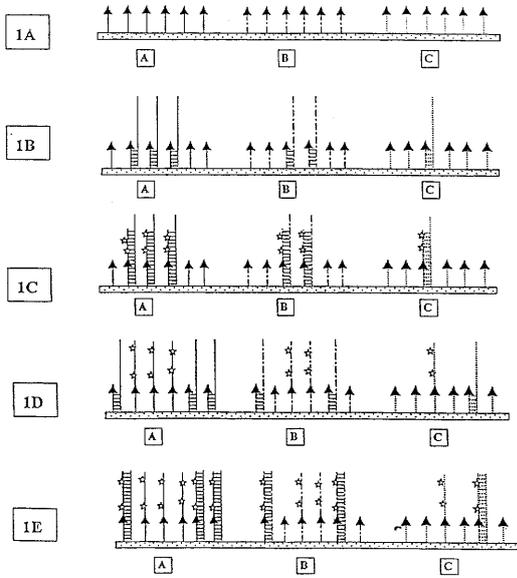


FIGURE 1

【図 2】

遺伝子 A : _____ 遺伝子 B : - - - - - 遺伝子 C : _____
 5'末端プライマー : → ピオチン-dCTP : ☆ 万能プライマー : →

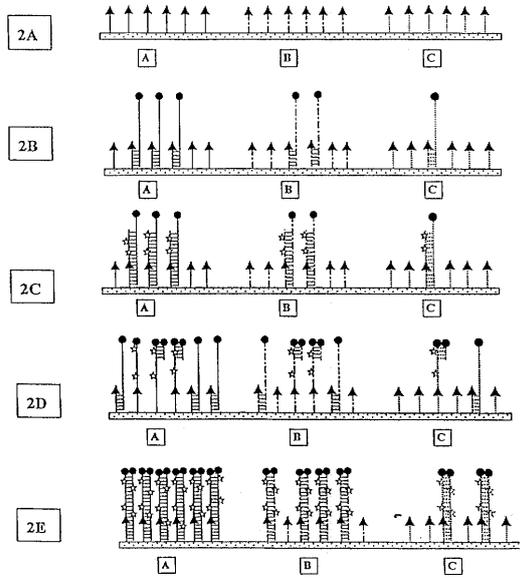


FIGURE 2

【図 3】

源 1 : 遺伝子 A : _____ 遺伝子 B : - - - - - 遺伝子 C : _____
 源 2 : 遺伝子 A : _____ 遺伝子 B : - - - - - 遺伝子 C : _____
 5'末端プライマー : → Cy3-配列タグ1 : ☆ Cy5-配列タグ2 : →

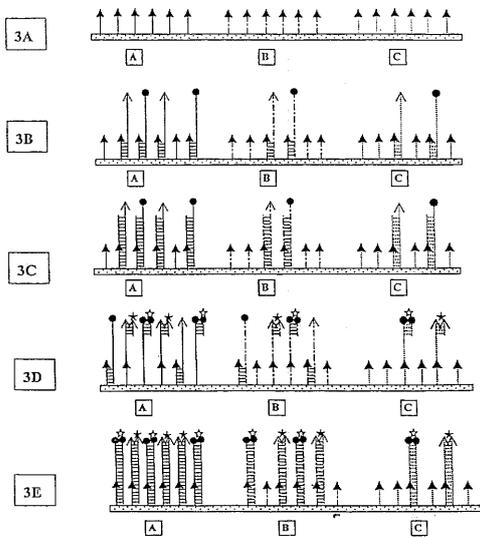


FIGURE 3

【図 4】

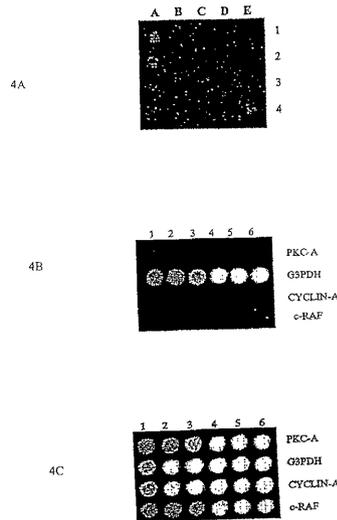


Figure 4

【 図 5 】

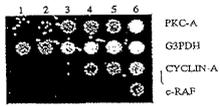
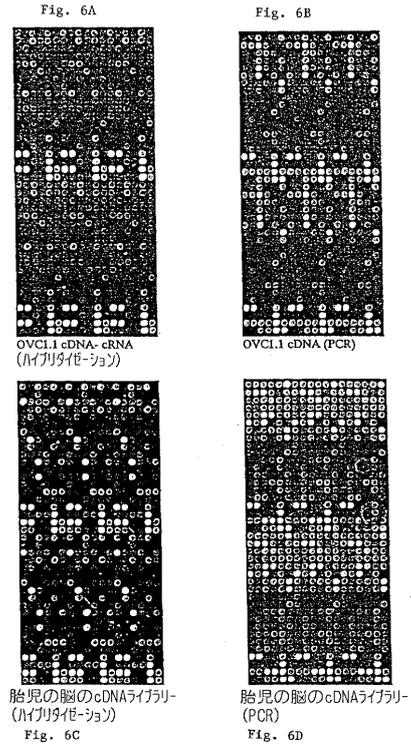


Figure 5

【 図 6 】



【 図 7 】

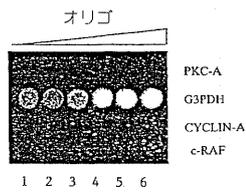


Fig. 7

【 図 10 】

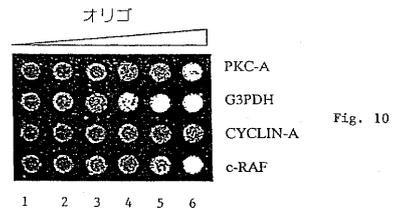


Fig. 10

【 図 8 】

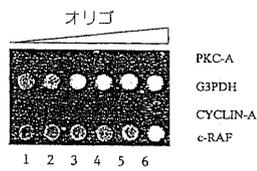


Fig. 8

【 図 11 】

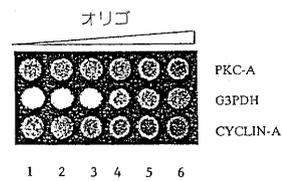


Fig. 11

【 図 9 】

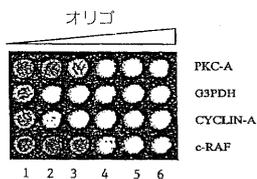


Fig. 9

フロントページの続き

- (74)代理人 100087413
弁理士 古賀 哲次
- (74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広
- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100141807
弁理士 川幡 兼介
- (72)発明者 ヒュー, キアンジン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 5 2, カストロ バレー, クロウ クリーク ロード
2 0 4 9 9
- (72)発明者 ペン, ツァオユアン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 3 0 6, パロ アルト, サン ジュード ストリート 8
6 5
- (72)発明者 ユー, ツァイリン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 7 7, サン リーンドロ, ベルパディア アベニュー 2
3 7 4

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 国際公開第98/044151(WO, A1)
国際公開第93/017126(WO, A1)
国際公開第97/027317(WO, A1)
特表平03-504324(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90