

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-163072

(P2015-163072A)

(43) 公開日 平成27年9月10日(2015.9.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3

審査請求 有 請求項の数 8 O L 外国語出願 (全 57 頁)

(21) 出願番号	特願2015-72533 (P2015-72533)	(71) 出願人	511286517 ヴェンタナ メディカル システムズ, インク. アメリカ合衆国 アリゾナ 85755, ツーソン, イースト イノベーション パーク ドライヴ 1910
(22) 出願日	平成27年3月31日 (2015. 3. 31)	(74) 代理人	110002077 園田・小林特許業務法人
(62) 分割の表示	特願2012-555165 (P2012-555165) の分割	(72) 発明者	ファレル, マイケル アメリカ合衆国 アリゾナ 85704, ツーソン, プラシタ デル カルド 8662
原出願日	平成23年2月25日 (2011. 2. 25)		
(31) 優先権主張番号	61/308, 670		
(32) 優先日	平成22年2月26日 (2010. 2. 26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリタグプローブ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 核酸の検出のためのプローブ及びプローブシステムの提供。

【解決手段】 第一の標的核酸配列の検出のためのシステムにおいて、前記第一の標的核酸配列に相補的な核酸配列を含む第一の標的プローブ部分、及び少なくとも一つの検出プローブ核酸配列に相補的であって、前記標的核酸配列に非相補的である、複数の第一の検出標的配列を含む第一の検出標的部分、を含む第一の核酸分子、及び前記第一の核酸分子の前記検出標的部分中の前記検出標的配列に相補的である第一の検出プローブ部分と、前記検出プローブ部分の5'又は3'の何れかに少なくとも一つの第一の検出可能な部分を含む第一の検出可能な成分部分を含む第二の核酸分子とを含むシステム。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的核酸配列に相補的な核酸配列を含む標的プローブ部分と

少なくとも一つの検出プローブ配列に相補的で、かつ前記標的核酸配列に非相補的である複数の配列を含む検出標的部分とを含み、前記プローブ部分と前記検出部分が操作可能に結合している核酸分子。

【請求項 2】

前記核酸分子が、RNA 及び DNA からなる群から選択される核酸である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

前記核酸分子の前記標的プローブ部分が、LNA 及び PNA からなる群から選択される核酸アナログを含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

少なくとも一つの検出プローブ配列に相補的である前記複数の配列が、実質的に同一である反復配列である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記検出標的部分が、実質的に同一である約 5 回より大きい反復配列を含む、請求項 4 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

前記検出標的部分が、実質的に同一である約 10 回より大きい反復配列を含む、請求項 4 に記載の核酸分子。

【請求項 7】

実質的に同一である前記反復配列が、長さが約 10 から約 100 ヌクレオチドである、請求項 4 に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記標的プローブ部分が、長さが約 10 から約 200 ヌクレオチドである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 9】

前記標的プローブ部分が、前記標的核酸配列に対して 99% より多く相補的である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 10】

前記標的核酸配列が、細胞の標的核酸配列である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 11】

前記標的核酸配列が、一次プローブ配列の一部である、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 12】

前記一次プローブ配列が、細胞の標的核酸配列に相補的な部分と、前記細胞の標的核酸配列に相補的ではないアダプター部分を含み、前記核酸分子の前記標的プローブ部分が前記アダプター部分に相補的である、請求項 11 に記載の核酸分子。

【請求項 13】

第一の標的核酸配列の検出のためのシステムにおいて、

前記第一の標的核酸配列に相補的な核酸配列を含む第一の標的プローブ部分、及び少なくとも一つの検出プローブ核酸配列に相補的であって、前記標的核酸配列に非相補的である、複数の第一の検出標的配列を含む第一の検出標的部分、

を含む第一の核酸分子、及び

前記第一の核酸分子の前記検出標的部分中の前記検出標的配列に相補的である第一の検出プローブ部分と、

前記検出プローブ部分の 5' 又は 3' の何れかに少なくとも一つの第一の検出可能な部分を含む第一の検出可能な成分部分

を含む第二の核酸分子とを含むシステム。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記第二の核酸分子の前記検出可能な成分部分が、複数の検出可能部分を含み、前記検出可能な部分が核酸分子に組み込まれている、請求項 1 3 に記載のシステム。

【請求項 1 5】

前記検出可能な部分が直接的に検出可能である、請求項 1 3 に記載のシステム。

【請求項 1 6】

前記検出可能な部分が間接的に検出可能である、請求項 1 3 に記載のシステム。

【請求項 1 7】

前記検出可能な部分が、シグナル発生部分及び一对の結合部分の第一のメンバーからなる群から選択される、請求項 1 4 に記載のシステム。

【請求項 1 8】

前記シグナル発生部分が、量子ドット、フルオロフォア、蛍光タンパク質、酵素、及びコロイド金からなる群から選択される、請求項 1 7 に記載のシステム。

【請求項 1 9】

一对の結合部分の前記第一のメンバーがハプテンである、請求項 1 7 に記載のシステム。

。

【請求項 2 0】

前記ハプテンが、ピオチン、2,4-ジニトロフェニル(DNP)、フルオレセイン誘導体、ジゴキシゲニン(DIG)、5-ニトロ-3-ピラゾールカルバミド(ニトロピラゾール、NP)、4,5,-ジメトキシ-2-ニトロシンナミド(ニトロシンナミド、NCA)、2-(3,4-ジメトキシフェニル)-キノリン-4-カルバミド(フェニルキノロン、DPQ)、2,1,3-ベンゾオキサジアゾール-5-カルバミド(ベンゾフラザン、BF)、3-ヒドロキシ-2-キノキサリンカルバミド(ヒドロキシキノキサリン、HQ)、4-(ジメチルアミノ)アゾベンゼン-4'-スルホンアミド(DABSYL)、ロテノンイソキサゾリン(Rot)、(E)-2-(2-(2-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[b][1,4]ジアゼピン-4-イル)フェノキシ)アセトアミド(ベンゾジアゼピン、BD)、7-(ジエチルアミノ)-2-オキソ-2H-クロメン-3-カルボン酸(クマリン 343、CDO)、2-アセトアミド-4-メチル-5-チアゾールスルホンアミド(チアゾールスルホンアミド、TS)、及びp-メトキシフェニルピラゾポドフィルアミド(Podo)からなる群から選択される、請求項 1 9 に記載のシステム。

【請求項 2 1】

前記第二の核酸分子が、少なくとも5つの検出可能な部分を含む、請求項 1 3 に記載のシステム。

【請求項 2 2】

前記第二の核酸分子が、少なくとも10の検出可能な部分を含む、請求項 1 3 に記載のシステム。

【請求項 2 3】

一对の結合部分の前記第一のメンバーに結合する特異的結合剤を更に含む、請求項 1 7 に記載のシステム。

【請求項 2 4】

前記特異的結合剤が、一对の結合部分の前記第一のメンバーに結合し、シグナル発生部分を含む特異的結合部分を含む、請求項 2 3 に記載のシステム。

【請求項 2 5】

特異的結合部分が、アビジン及び抗原結合分子からなる群から選択される、請求項 2 4 に記載のシステム。

【請求項 2 6】

前記抗原結合分子が抗体又はその断片である、請求項 2 5 に記載のシステム。

【請求項 2 7】

前記抗体又はその断片がハプテンに結合する、請求項 2 6 に記載のシステム。

【請求項 2 8】

前記特異的結合剤は、量子ドット、フルオロフォア、蛍光タンパク質、酵素、及びコロ

10

20

30

40

50

イド金からなる群から選択されるシグナル発生部分を含む、請求項 2 3 に記載のシステム。

【請求項 2 9】

前記第二の核酸分子が、RNA 及び DNA からなる群から選択される核酸である、請求項 1 3 に記載の核酸分子。

【請求項 3 0】

前記第二の核酸分子が、LNA 及び PNA ヌクレオチドからなる群から選択される核酸アナログを含む、請求項 1 3 に記載のシステム。

【請求項 3 1】

前記標的核酸配列が、細胞の標的核酸配列である、請求項 1 3 に記載のシステム。

10

【請求項 3 2】

前記標的核酸配列が、第一の一次プローブ配列の一部である、請求項 1 3 に記載のシステム。

【請求項 3 3】

前記第一の一次プローブ配列が、細胞の標的核酸配列に相補的な部分と、前記細胞の標的核酸配列に相補的ではないアダプター部分を含み、前記核酸分子の前記標的プローブ部分が前記アダプター部分に相補的である、請求項 3 2 に記載のシステム。

【請求項 3 4】

少なくとも第三及び第四の核酸分子を更に含み、

該第三の核酸分子が、

第二の標的核酸配列に相補的な核酸配列を含む第二の標的プローブ部分、及び

少なくとも一つの検出プローブ核酸配列に相補的であって、前記標的核酸配列に非相補的である、複数の第二の検出標的配列を含む第二の検出標的部分を含み、及び

20

該第四の核酸分子が、

前記第三の核酸分子の前記第二の検出部分中の前記第二の検出配列に相補的である第二の検出プローブ部分、及び

前記検出プローブ部分の 5' 又は 3' の何れかに少なくとも一つの第二の検出可能な部分を含む第二の検出可能な成分部分

を含む、請求項 2 4 に記載のシステム。

【請求項 3 5】

前記第二の標的核酸配列が、第二の細胞の標的核酸配列である、請求項 3 4 に記載のシステム。

30

【請求項 3 6】

前記第二の標的核酸配列が、第二の一次プローブ配列の一部である、請求項 3 4 に記載のシステム。

【請求項 3 7】

前記第二の一次プローブ配列が、細胞の標的核酸配列に相補的な部分と、前記細胞の標的核酸配列に相補的ではないアダプター部分を含み、前記核酸分子の前記標的プローブ部分が前記アダプター部分に相補的である、請求項 3 6 に記載のシステム。

【請求項 3 8】

サンプル中に第一の標的核酸配列を検出するための方法において、

前記第一の核酸分子の前記検出標的部分が前記標的核酸配列にハイブリダイズする条件下で、前記サンプルを、前記第一の標的核酸配列に相補的な核酸配列と、少なくとも一つの検出プローブ核酸配列に相補的であり、前記標的核酸配列に非相補的である複数の第一の検出標的配列を含む検出標的部分を含む、標的プローブ部分を含む第一の核酸分子と接触させ、

40

前記第二の核酸分子の前記検出プローブ部分が前記第一の核酸分子の前記第一の検出標的配列にハイブリダイズするような条件下で、前記第一の核酸分子を、各々が前記第一の核酸分子の前記検出配列に相補的な検出プローブ部分、及び前記検出プローブ部分の 5' 又は 3' の何れかの少なくとも一つの第一の検出可能な部分を含む検出可能な成分部分を

50

含む、複数の第二の核酸分子と接触させ、

前記少なくとも一つの第一の検出可能な部分を検出することを含む方法。

【請求項 39】

前記検出が直接検出である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記検出が間接検出である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 41】

前記サンプルが、組織サンプル、生物サンプル、固体基材上のサンプル、マイクロタイタプレート上のサンプル、及び磁性粒子上のサンプルからなる群から選択される、請求項 38 に記載の方法。

10

【請求項 42】

前記標的核酸配列が、ゲノム DNA、核 DNA、RNA、mRNA、及び細胞質核酸からなる群から選択される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 43】

前記標的核酸が組織又は生物から単離される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 44】

前記検出が、比色検出、放射検出、蛍光検出、顕微鏡的検出からなる群から選択される検出を含む、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 45】

前記検出が、前記サンプルを、前記第二の核酸分子上の前記少なくとも一つの検出可能な部分に結合する特異的結合剤と接触させることを含む、請求項 38 に記載の方法。

20

【請求項 46】

前記第一の核酸分子の前記標的プローブ部分と、前記標的核酸配列と、前記第二の核酸の前記検出プローブ部分と、前記第一の核酸分子の前記検出標的配列が、摂氏約 10 度以内の融点を有する、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 47】

前記標的核酸配列が、細胞の標的核酸配列である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 48】

前記標的核酸配列が、一次プローブ配列の一部である、請求項 38 に記載の方法。

30

【請求項 49】

前記一次プローブ配列が、細胞の標的核酸配列に相補的な部分と、前記細胞の標的核酸配列に相補的ではないアダプター部分を含み、前記核酸分子の前記標的プローブ部分が前記アダプター部分に相補的である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

サンプルを、第二の標的核酸配列に相補的な核酸配列と、少なくとも一つの検出プローブ核酸配列に相補的であり、前記標的核酸配列に非相補的である複数の第二の検出標的配列を含む検出標的部分を含む標的プローブ部分を含む第三の核酸分子とを、前記第一の核酸分子の前記標的プローブ部分が前記標的核酸配列にハイブリダイズする条件下で接触させ、

40

前記第三の核酸分子を、各々が前記第三の核酸分子の前記検出配列に相補的な検出プローブ部分と、前記検出プローブ部分の 5' 又は 3' の何れかの少なくとも一つの第二の検出可能な部分を含む検出可能な成分部分を含む複数の第四の核酸分子とを、前記第四の核酸分子の前記検出プローブ部分が前記第三の核酸分子の前記第二の検出標的配列にハイブリダイズするような条件下で接触させ、

前記少なくとも一つの第二の検出可能な部分を検出することを含む請求項 38 に記載の方法。

【請求項 51】

前記第一及び第二の標的核酸配列が同一分子の一部である、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

50

前記第一及び第二の検出可能部分が同一である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記第二の標的核酸配列が第二の細胞の標的核酸配列である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記第二の標的核酸配列が、第二の一次プローブ配列の一部である、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記第二の一次プローブ配列が、細胞の標的核酸配列に相補的な部分と、前記細胞の標的核酸配列に相補的ではないアダプター部分を含み、前記核酸分子の前記標的プローブ部分が前記アダプター部分に相補的である、請求項 5 4 に記載の方法。

10

【請求項 5 6】

第一の核酸分子が

前記標的核酸配列に相補的な核酸配列を含む標的プローブ部分、及び

少なくとも一つの検出プローブ核酸配列に相補的であって、前記標的核酸配列に非相補的である、複数の検出標的配列を含む、長さが約 200 ヌクレオチドより大きい検出標的

第二の核酸分子が

前記第一の核酸分子の前記検出部分中の前記検出配列に相補的である検出プローブ部分、及び

20

前記検出プローブ部分の 5' 又は 3' の何れかに少なくとも一つの検出可能な部分を含む検出可能な成分部分

を含むキット。

【請求項 5 7】

少なくとも一つの検出可能な部分に結合する特異的結合剤を更に含む、請求項 5 6 に記載のキット。

【請求項 5 8】

前記特異的結合剤がシグナル発生部分にコンジュゲートした特異的結合部分を含む、請求項 5 7 に記載のキット。

【請求項 5 9】

第二の標的プローブ部分及び第二の検出標的部分を含む少なくとも第二の核酸分子を更に含む、請求項 5 6 に記載のキット。

30

【請求項 6 0】

前記標的核酸配列が、細胞の標的核酸配列である、請求項 5 6 に記載のキット。

【請求項 6 1】

前記標的核酸配列が、一次プローブ配列の一部である、請求項 5 6 に記載のキット。

【請求項 6 2】

前記一次プローブ配列が、細胞の標的核酸配列に相補的な部分と、前記細胞の標的核酸配列に相補的ではないアダプター部分を含み、前記核酸分子の前記標的プローブ部分が前記アダプター部分に相補的である、請求項 6 1 に記載のキット。

40

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2010年2月26日出願の保留中の米国仮特許出願第61/308670号に対する優先権を主張し、その内容はその全体がここに参照により援用される。

【技術分野】

【0002】

発明の分野

本発明は、核酸の検出のためのプローブ及びプローブシステム、特に標的核酸プローブ

50

の検出配列にハイブリダイズする複数の検出配列及び検出核酸プローブを含み、かつ複数の検出可能な部分、例えばハプテンを更に含む標的核酸プローブを含むプローブ及びプローブシステムを提供する。

【0003】

発明の背景

分子細胞遺伝学的手法、例えば、蛍光インサイツハイブリダイゼーション(FISH)、発色インサイツハイブリダイゼーション(CISH)銀インサイツハイブリダイゼーション(SISH)は、分子技術による染色体の視覚的評価(核型分析)を分子技術と組み合わせる。分子細胞遺伝学的手法は、細胞内で、核酸プローブのその相補的核酸に対するハイブリダイゼーションに基づいている。特定の染色体領域に対するプローブは、中期染色体上又は間期の核内で(例えば組織サンプル内)、その相補配列を認識してハイブリダイズするであろう。プローブは、診断や研究の様々な目的のために開発されている。例えば、特定のプローブは、従来の細胞遺伝学的染色の方法を模倣し、染色体分析のために個々の染色体の識別を可能にする染色体の縞模様を生成する。他のプローブは単一染色体に由来し、標識された場合、細胞内の特定の染色体を識別するための「染色体の塗料」として、使用することができる。更に他のプローブは特定の染色体構造、例えば染色体のセントロメア又はテロメアを同定する。

10

【0004】

一意的なプローブは特定の染色体領域又はゲノム中で単一コピーDNA配列へハイブリダイズする。これらが、目的の症候群又は状態に関連付けられた染色体の重要な領域又は遺伝子を識別するために使用するプローブである。中期染色体上で、そうしたプローブは各染色分体へハイブリダイズし、通常、染色体あたり2つの小さな離散信号を与える。

20

【0005】

一意的な配列プローブのハイブリダイゼーションは、微小欠損症候群、染色体転座、遺伝子増幅及び異数性症候群、腫瘍性疾患並びに病原体感染症など、構成的な遺伝子異常を含む、多数の疾患や症候群に関連付けられている染色体異常の検出を可能としている。最も一般的にはこれらの技術は、顕微鏡スライドの標準的細胞遺伝学的調製物に適用される。さらに、これらの方法は、ホルマリン固定された組織、血液及び骨髄の塗抹標本、および直接固定された細胞もしくは他の核の分離株のスライドに使用することができる。

30

【0006】

例えば、これらの技術は癌の診断および予後の両方の腫瘍細胞を特徴付けるためにしばしば使用されている。多数の染色体異常が、癌の発症と関連している(例えば、特定の骨髄性疾患に関連付けられてトリソミー8など異数性;慢性骨髄性白血病におけるBCR/ABL転位などの転座;及び悪性形質転換に関連付けられた特定の核酸配列の増幅)。分子技術は、そうした後天性の染色体異常の検出及び特徴付けにおいて、標準的な細胞遺伝学的検査を強化することができる。例えば、FISHは非分裂性細胞における早期再発や残存病変を探すために使用されてきた。癌細胞の免疫細胞化学的検出及びFISH技術が、確定された細胞集団における染色体異常を研究するために組み合わせられている。

【0007】

本開示は、診断及びインサイツハイブリダイゼーションの研究用途で使用するために、改善されたプローブとそのようなプローブを作成する方法を提供する。

40

【発明の概要】

【0008】

本発明は、核酸の検出のためのプローブ及びプローブシステム、特に、標的核酸プローブの検出配列にハイブリダイズする、複数の検出配列及び検出核酸プローブを含み、かつ複数の検出可能な部分、例えばハプテンを更に含む標的核酸プローブを含むプローブ及びプローブシステム、を提供する。幾つかの実施態様において、本発明は標的核酸配列に相補的な核酸配列を含む標的プローブ部分、少なくとも一の検出プローブ配列に相補的で、かつ標的核酸配列に非相補的である複数の配列を含む検出標的部分、操作可能に結合しているプローブ部分と検出部分、を含む核酸部分を提供する。幾つかの実施態様において

50

、核酸分子は、RNA及びDNAからなる群から選択される核酸である。幾つかの実施態様において、核酸分子の標的プローブ部分は、LNAおよびPNAからなる群から選択される核酸アナログを含む。幾つかの実施態様において、少なくとも1つの検出プローブ配列に相補的な複数の配列は、実質的に同一である反復配列である。幾つかの実施態様において、検出標的部分は、実質的に同一である約5回より大きい反復配列を含む。幾つかの実施態様において、検出標的部分は、実質的に同一である約10回より大きい反復配列を含む。幾つかの実施態様において、実質的に同一である反復配列は、長さが約10から約100ヌクレオチドである。幾つかの実施態様において、標的プローブ部分は、長さが約10から約200ヌクレオチドである。幾つかの実施態様において、標的プローブ部分は、標的核酸配列に99%以上相補的である。幾つかの実施態様において、標的核酸配列は、細胞の標的核酸配列である。幾つかの実施態様において、標的核酸配列は、一次プローブ配列である。幾つかの実施態様において、一次プローブ配列は、細胞標的核酸配列に相補的な部分、及び細胞標的核酸配列に相補的ではないアダプター部分を含み、及び核酸分子の標的プローブ部分はアダプター部分に相補的である。

【0009】

幾つかの実施態様において、本発明は、第一の標的核酸配列に相補的な核酸配列を含む第一の標的プローブ部分を含む第一の核酸分子、及び少なくとも1つの検出プローブ核酸配列に相補的で標的核酸配列に非相補的である複数の第一の検出標的配列を含む第一の検出標的部分、及び第1の核酸分子の検出標的部分の検出標的配列に相補的な第一の検出プローブ部分、及び検出プローブ部分の5'または3'のいずれかに少なくとも1つの第一の検出可能な部分を含む第一の検出可能な成分部分を含む第二の核酸分子、を含む第一標的核酸配列を検出するためのシステムを提供する。幾つかの実施態様において、第二の核酸分子の検出可能な成分部分は、検出可能な部分が核酸分子に組み込まれている、複数の検出可能な部分を含む。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は直接検出可能である。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は間接的に検出可能である。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は、シグナル発生部分と一対の結合部分の第一のメンバーからなる群から選択される。幾つかの実施態様において、シグナル発生部分は、量子ドット、フルオロフォア、蛍光タンパク質、酵素、及びコロイド金からなる群から選択される。幾つかの実施態様において、一対の結合部分の第一のメンバーは、ハプテンである。幾つかの実施態様において、ハプテンは、ピオチン、2,4-ジニトロフェニル(DNP)、フルオレセイン誘導体、ジゴキシゲニン(DIG)、5-ニトロ-3-ピラゾールカルバミド(ニトロピラゾール、NP)、4,5,-ジメトキシ-2-ニトロシンナミド(ニトロシンナミド、NCA)、2-(3,4-ジメトキシフェニル)-キノリン-4-カルバミド(フェニルキノロン、DPQ)、2,1,3-ベンゾオキサジアゾール-5-カルバミド(ベンゾフラザン、BF)、3-ヒドロキシ-2-キノキサリンカルバミド(ヒドロキシキノキサリン、HQ)、4-(ジメチルアミノ)アゾベンゼン-4'-スルホンアミド(DABSYL)、ロテノイソキサゾリン(Rot)、(E)-2-(2-(2-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[b][1,4]ジアゼピン-4-イル)フェノキシ(phenoxy))アセトアミド(ベンゾジアゼピン、BD)、7-(ジエチルアミノ)-2-オキソ-2H-クロメン-3-カルボン酸(クマリン343、CDO

)、2-アセトアミド-4-メチル-5-チアゾールスルホンアミド(チアゾールスルホンアミド、TS)、及びp-メトキシフェニルピラゾポドフィルアミド(p-Mehtoxyphenylpyrazopodophyllamide)(Podophyllin)からなる群から選択される。幾つかの実施態様において、第二の核酸分子は、少なくとも5つの検出可能な部分を含む。幾つかの実施態様において、第二の核酸分子は、少なくとも10の検出可能な部分を含む。幾つかの実施態様において、システムは、一対の結合部分の第一のメンバーに結合する特異的結合剤をさらに含む。幾つかの実施態様において、特異的結合剤は、一対の結合部分の第一のメンバーに結合しシグナル発生部分を含む特異的結合剤を含む。幾つかの実施態様において、特異的結合部分は、アビジンおよび抗原結合分子からなる群から選択される。幾つかの実施態様において、抗原結合分子は、抗体またはその断片である。幾つかの実施態様において、抗体

10

20

30

40

50

またはその断片は、ハプテンに結合する。幾つかの実施態様において、特異的結合部分は、量子ドット、フルオロフォア、蛍光タンパク質、酵素、及びコロイド金からなる群から選択されるシグナル発生部分を含む。幾つかの実施態様において、第二の核酸分子は、RNA及びDNAからなる群から選択される核酸である。幾つかの実施態様において、第二の核酸分子は、LNAおよびPNAヌクレオチドからなる群から選択される核酸アナログを含む。幾つかの実施態様において、標的核酸配列は、細胞の標的核酸配列である。幾つかの実施態様において、標的核酸配列は、第一の一次プローブ配列の一部である。幾つかの実施態様において、第一の一次プローブ配列は、細胞標的核酸配列に相補的な部分、及び細胞標的核酸配列に相補的ではないアダプター部分を含み、及び核酸分子の標的プローブ部分はアダプター部分に相補的である。幾つかの実施態様において、システムは、少なくとも第三及び第四の核酸分子、第三の核酸分子は、第二の標的核酸配列に相補的な核酸配列と、少なくとも1つの検出プローブ核酸配列に相補的で、標的核酸配列に非相補的である、複数の第二の検出配列を含む第二の検出標的部分を含む、第三の核酸分子、及び第三の核酸分子の第二の検出部分に第二の検出配列に相補的な第二の検出プローブ部分を含む、第四の核酸分子、及び検出プローブ部分の5'又は3'の何れかに少なくとも1つの第二の検出可能な部分を含む第二の検出可能な成分部分を更に含む。幾つかの実施態様において、第二の標的核酸配列は、第二の細胞の標的核酸配列である。幾つかの実施態様において、第二の標的核酸配列は、第二の一次プローブ配列である。幾つかの実施態様において、第二の一次プローブ配列は、細胞標的核酸配列に相補的な部分、及び細胞標的核酸配列に相補的ではないアダプター部分を含み、及び核酸分子の標的プローブ部分はアダプター部分に相補的である。

【0010】

幾つかの実施態様において、本発明は、第一の核酸分子が標的核酸配列にハイブリダイズする条件下で、サンプルを、第一の標的核酸配列と相補的な核酸配列を含む標的プローブ部分と、少なくとも1つの検出プローブ核酸配列に相補的であって標的核酸配列に非相補的である、複数の第一の検出標的配列を含む検出標的部分を含む第一の核酸分子と接触させること；第二の核酸分子の検出プローブ部分が第一の核酸分子の第一の検出標的配列にハイブリダイズするような条件下で、第一の核酸分子を、各々が第一の核酸分子の検出配列に相補的な検出プローブ部分、及び検出プローブ部分の5'又は3'の何れかの少なくとも1つの第一の検出可能部分を含む検出可能成分部分を含む複数の第二の核酸分子と接触させること；及び少なくとも1つの第一の検出可能部分を検出することを含む、サンプル中の第一の標的核酸を検出する方法を提供する。幾つかの実施態様において、検出は、直接検出である。幾つかの実施態様において、検出は、間接検出である。幾つかの実施態様において、サンプルは、組織サンプル、生物サンプル、固体基材上のサンプル、マイクロタイタープレート上のサンプル、及び磁性粒子上のサンプルからなる群から選択される。幾つかの実施態様において、標的核酸配列は、ゲノムDNA、核DNA、RNA、mRNA、及び細胞質核酸からなる群から選択される。幾つかの実施態様において、標的核酸は、組織または生物から単離される。幾つかの実施態様において、検出は、比色検出、放射検出、蛍光検出、顕微鏡的検出からなる群から選択される検出を含む。幾つかの実施態様において、検出は、第二の核酸分子上の少なくとも1つの検出可能な部分に結合する特異的結合剤とサンプルを接触させることを含む。幾つかの実施態様において、第一の核酸分子の標的プローブ部分、及び標的核酸配列、及び第二の核酸の検出プローブ部分、及び第一の核酸分子の検出標的配列は、摂氏約10度以内の融点を有する。幾つかの実施態様において、標的核酸配列は、細胞の標的核酸配列である。幾つかの実施態様において、標的核酸配列は、一次プローブ配列である。幾つかの実施態様において、一次プローブ配列は、細胞標的核酸配列に相補的な部分、及び細胞標的核酸配列に相補的ではないアダプター部分を含み、及び核酸分子の標的プローブ部分はアダプター部分に相補的である。幾つかの実施態様において、本方法は、第一の核酸分子の標的プローブ部分が標的核酸配列にハイブリダイズする条件下で、サンプルを、第二の標的核酸配列と相補的な核酸配列を含む標的プローブ部分と、少なくとも1つの検出プローブ核酸配列に相補的であって標的

核酸配列に非相補的である、複数の第二の検出標的配列を含む標的プローブ部分を含む第三の核酸分子と接触させること；第四の核酸分子の検出プローブ部分が第三の核酸分子の第二の検出標的配列にハイブリダイズするような条件下で、第三の核酸分子を、各々が第三の核酸分子の検出配列に相補的な検出プローブ部分、及び検出プローブ部分の5'又は3'の何れかの少なくとも1つの第二の検出可能部分を含む検出可能成分部分を含む複数の第四の核酸分子と接触させること；及び少なくとも1つの第二の検出可能部分を検出することを更に含む。幾つかの実施態様において、第一及び第二の標的核酸配列は、同じ分子の一部である。幾つかの実施態様において、第一及び第二の検出可能な部分は同一である。幾つかの実施態様において、第二の標的核酸配列は、第二の細胞の標的核酸配列である。幾つかの実施態様において、第二の標的核酸配列は、第二の一次プローブ配列である。幾つかの実施態様において、第二の一次プローブ配列は、細胞標的核酸配列に相補的な部分、及び細胞標的核酸配列に相補的ではないアダプター部分を含み、及び核酸分子の標的プローブ部分はアダプター部分に相補的である。

10

【0011】

幾つかの実施態様において、本発明は、標的核酸配列に相補的な核酸配列を含む標的プローブ部分を含む第一の核酸分子、少なくとも1つの検出プローブ核酸配列に相補的で、標的核酸配列に非相補的である複数の検出標的配列を含む、長さがおよそ200ヌクレオチドよりも大きい検出標的部分、第1の核酸分子の検出部分での検出配列に相補的な検出プローブ部分を含む第二の核酸分子、及び検出プローブ部分の5'または3'の何れかの少なくとも1つの検出可能部分を含む検出可能な成分部分、を含むキットを提供する。幾つかの実施態様において、キットは、少なくとも一つの検出可能な部分に結合する特異的結合剤をさらに含む。幾つかの実施態様において、特異的結合剤はシグナル発生部分にコンジュゲートした特異的結合部分を含む。幾つかの実施態様において、キットは、第二の標的プローブ部分及び第二の検出標的部分を含む少なくとも第二の核酸分子を含む。幾つかの実施態様において、標的核酸配列は、細胞の標的核酸配列である。幾つかの実施態様において、標的核酸配列は、一次プローブ配列である。幾つかの実施態様において、一次プローブ配列は、細胞標的核酸配列に相補的な部分、及び細胞標的核酸配列に相補的ではないアダプター部分を含み、及び核酸分子の標的プローブ部分はアダプター部分に相補的である。

20

【図面の簡単な説明】

30

【0012】

【図1】図1は、本発明の一実施態様の概略図を与える。

【図2】図2は、3つの異なるポリタグ(PolyTag)リボプローブによる18SrRNAの検出のためのドットプロット染色である。

【図3】図3aと図3bは、アクチンmRNAの検出の蛍光顕微鏡写真である。

【図4】図4は、第17染色体セントロメアの検出の顕微鏡写真である。

【図5】図5と図5bは、5コピー(5a)又は10-コピー(5b)のssDNAのポリタグプローブによるPTEN遺伝子を検出するためのSISHアッセイの結果の顕微鏡写真である。

【図6】図6は、一次プローブと続くポリタグプローブとのハイブリダイゼーションによる、PTEN遺伝子を検出するためのSISHアッセイの結果の顕微鏡写真である。

40

【0013】

定義

特に説明がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じの意味を持つ。分子生物学の一般的な用語の定義は、オックスフォード大学出版局により出版されたBenjamin Lewin, Genes V, 1994 (ISBN 0-19-854287-9)；ブラックウェルサイエンス社(Blackwell Science Ltd.,)により出版された、Kendrewら(編), The Encyclopedia of Molecular Biology, 1994 (ISBN 0-632-02182-9)；及びVCH出版社(VCH Publishers, Inc.)により出

50

版されたRobert A. Meyers (編), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)に見いだすことができる。

【0014】

文脈が明確に示さない限り、単数形「a」、「an」および「the」は、複数の指示物を含む。同様に、単語「or」は、文脈が明確に示さない限り、「and」を含む。用語「複数」は、フレーズの「一以上」、つまり、二又はそれ以上と同義に用いられる。さらに、核酸又はポリペプチドについて与えられる、全ての塩基の大きさ又はアミノ酸の大きさ、及び全ての分子量又は分子量の値は、概算値であり、説明のために提供されることが理解されるべきである。用語「含む (comprises)」は「含む (includes)」を意味する。略語「例えば (e.g.)」は、ラテン語の例えば (exempli gratia) に由来し、本明細書では非限定的な例を示すために用いられる。略語「例えば (e.g.)」は、用語「例えば (for example)」と同義である。本明細書に記載されるものと類似又は同等な方法及び材料が、本開示の実施又は試験において使用可能であるが、適切な方法及び材料は以下に記載される。

10

【0015】

本開示の様々な実施態様の総括を容易にするため、以下の特定用語の説明が与えられる。

【0016】

抗体：「抗体」は、まとめて、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様分子（一例として、Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、およびIg M、それらの組み合わせ、および任意の脊椎動物、例えば、ヒト、ヤギ、ウサギ、およびマウス等の哺乳類における免疫応答中に産生される同様の分子を含むが、それらに限定されない）、及び、他の分子（例えば、対象の分子の結合定数、すなわち、生物試料における他の分子の結合定数よりも少なくとも 10^3 M^{-1} より大、少なくとも 10^4 M^{-1} より大、または少なくとも 10^5 M^{-1} より大である結合定数を有する抗体および抗体断片）への結合を実質的に除いて、対象の分子（または対象の極めて類似する分子の群）に特異的に結合する、抗体断片を指す。

20

【0017】

より具体的には、「抗体」は、抗原のエピトープを特異的に認識して結合する少なくとも1つの軽鎖もしくは重鎖免疫グロブリン可変領域を含んでなるポリペプチドリガンドを指す。抗体は重鎖および軽鎖からなり、これらの各々は可変重 (V_H) 領域および可変軽 (V_L) 領域と呼ばれる可変領域を有する。一緒になって、 V_H 領域および V_L 領域は抗体により認識される抗原を結合することに関与する。

30

【0018】

これには、インタクトな免疫グロブリンならびに当該技術分野において周知であるそれらの変異体及び一部が包含される。抗体断片には、タンパク質分解抗体断片 [例えば、当該技術分野において既知であるような $F(ab')_2$ 断片、 Fab' 断片、 $Fab'-SH$ 断片および Fab 断片]、組換え抗体断片（例えば sFv 断片、 $dsFv$ 断片、二重特異性の sFv 断片、二重特異性 $dsFv$ 断片、 $F(ab)'$ 断片、単鎖 Fv タンパク質（「 $scFv$ 」）、ジスルフィド安定化 Fv タンパク質（「 $dsFv$ 」）、ダイアボディ、及びトリアボディ（当該技術分野で知られている）及び、ラクダ科動物抗体が挙げられる（例えば、米国特許第6015695号；同6005079号 - 同5874541号；同5840526号；同5800988号；及び同5759808号を参照のこと）。 $scFv$ タンパク質は、免疫グロブリンの軽鎖可変領域および免疫グロブリンの重鎖領域が、リンカーによって結合される融合タンパク質であるが、 $dsFvs$ において、鎖は突然変異してジスルフィド結合を導入し、鎖の関連を安定化している。該用語は、キメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）、ヘテロ共役体（例えば、二重特異性抗体）等の遺伝子組み換え形態も含む。Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)、Kuby, J., *Immunology*, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997も参照されたい。

40

【0019】

50

典型的に、天然に存在する免疫グロブリンはジスルフィド結合により相互に連結される重(H)鎖および軽(L)鎖を有する。2つのタイプの軽鎖、ラムダ()およびカッパ()がある。抗体分子の機能活性を決定する5つの主要な重鎖クラス(もしくはアイソタイプ): I g M、I g D、I g G、I g AおよびI g Eがある。

【0020】

各重鎖および軽鎖は、定常領域および可変領域を含有する(これらの領域ははまた、「ドメイン」としても知られている)。組み合わせ、重鎖および軽鎖可変領域は抗原に特異的に結合する。軽鎖および重鎖可変領域は、「相補性決定領域」もしくは「CDR」とも呼ばれる3つの超可変領域により遮られる「フレームワーク」領域を含有する。フレームワーク領域およびCDRの範囲は特定されている(引用することにより本明細書に組み込まれる、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991を参照)。Kabatデータベースは、現在、オンラインで維持されている。異なる軽鎖もしくは重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。構成する軽鎖および重鎖の組み合わせられたフレームワーク領域である抗体のフレームワーク領域は、3次元空間においてCDRを配置しそして並べる働きをする。

10

【0021】

CDRは、抗原のエピトープへの結合に主に関与する。各鎖のCDRは、N末端から開始して順次番号が付され、CDR1、CDR2およびCDR3と典型的に呼ばれ、そしてまた特定のCDRが位置する鎖によっても典型的に同定される。従って、 V_H CDR3はそれが存在する抗体の重鎖の可変ドメインに位置し、一方、 V_L CDR1はそれが存在する抗体の軽鎖の可変ドメインからのCDR1である。RETに結合する抗体は特定の V_H 領域および V_L 領域配列、従って、特定のCDR配列を有する。異なる特異性(すなわち、異なる抗原に対する異なる結合部位)を有する抗体は、異なるCDRを有する。抗体ごとに異なるのはCDRであるが、CDR内の限られた数のアミノ酸位置のみが抗原結合に直接関与する。CDR内のこれらの位置は、特異性決定残基(SDR)と呼ばれる。

20

【0022】

「結合または安定な結合」は、2つの物質又は分子間の結合、例えば、一つの核酸分子(例えば、結合領域)のその他(又はそれ自身)に対するハイブリダイゼーションを指す。核酸分子は、標的核酸分子に結合する又は安定に結合する。十分な量の核酸分子が塩基対を形成するか、又はその標的核酸分子へハイブリダイズし、その結合の検出を可能にする。

30

【0023】

「結合領域」は、標的分子に固有である標的核酸分子のセグメントまたは部分であり、いくつかの例では反復的な(または他の望ましくない)核酸配列を含まないか又は実質的に含まない。結合領域の核酸配列及びその対応する標的核酸分子は、2つが適切なハイブリダイゼーション条件下でインキュベートされる場合、2つの分子はハイブリダイズし、検出可能な複合体を形成するように、十分な核酸配列相補性を有する。標的核酸分子は複数の異なる結合領域、例えば、少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも1000の一意的な結合領域を含むことができる。特定の実施例では、結合領域は、典型的には長さが数百塩基対から数千塩基対である。しかし、幾つかの実施例では、結合領域は、より短く、例えば50から200塩基対の長さである。標的核酸配列由来の結合領域を得る場合、標的配列は哺乳類細胞などの細胞内ではその天然型で、又はクローニング型で(例えばバクター中に)得ることができる。

40

【0024】

核酸分子は、例えば、ワトソン-クリック塩基対、フーグスティーン塩基対、または逆フーグスティーン塩基対を形成することにより、鎖がお互いに結合(ハイブリダイズ)し、2つの分子が十分な数の相補性ヌクレオチドを共有し、安定な2本鎖又は3本鎖を形成する場合、別の核酸分子と相補的であると言われる。安定な結合は、核酸分子が、必要な条件下で標的核酸配列(例えば、ゲノム標的核酸配列)に検出可能に結合したままである

50

場合に生じる。

【0025】

相補性とは、一方の核酸分子（例えば標的核酸プローブ）の塩基が二番目の核酸分子（例えばゲノム標的核酸分子）の塩基と塩基対を形成する度合いである。相補性は便宜上パーセンテージにより、すなわち、2つの分子間又は2つの分子の特定領域又はドメイン内で塩基対を形成するヌクレオチドの割合により、記述される。

【0026】

本開示において、「十分な相補性」とは、十分な数の塩基対が1つの核酸分子又はその領域と標的核酸配列（例えば、ゲノム標的核酸配列）との間に存在し、検出可能な結合を獲得することを意味する。結合条件の確立に関わる定性的及び定量的な検討事項の徹底した処置が、Beltz et al. *Methods Enzymol.* 100:266-285, 1983, and by Sambrook et al. (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に与えられる。

10

【0027】

「コンピュータに実装されたアルゴリズム」は、ユーザの指示で計算装置により行われ又は実行されるアルゴリズム又はプログラム（コンピュータ可読媒体で実行可能なコードのセット）である。本開示の文脈において、コンピュータに実装されたアルゴリズムは、特定の特徴を持つポリヌクレオチド配列の選択、例えば標的核酸配列の反復性（又は別の所望されない、例えばバックグランドを生じる）核酸配列又は一意的結合領域の同定などを容易にする（例えば自動化する）ために使用することができる。典型的には、ユーザは、配列データベースにアクセスすることができるコンピュータへコマンドを入力することでアルゴリズムの実行を開始して、一又は複数の選択閾値を設定する。配列のデータベースはコンピュータの記憶媒体内に包含することができ、又は遠隔地に格納され、イントラネット又はインターネット経由で近くまたは遠隔地にあるコンピュータや記憶媒体との間の接続を介してアクセスすることができる。アルゴリズムを開始した後に、例えば、選択条件を満たす1つまたはそれ以上のポリヌクレオチド配列を選択するために、アルゴリズム又はプログラムがコンピュータによって実行される。最も一般的には、選択されたポリペプチド配列は、（例えば、画面上に）表示されるか又は（例えば、印刷形式またはコンピュータ可読媒体上に）出力される。

20

【0028】

用語「コンジュゲートする、連結する、結合する、又はリンクする」とは、一つの分子を別の分子に共有結合性にリンクして、より大きな分子を作ること指す。例えば、二本のポリペプチドを一本の連続したポリペプチド分子にすること、又はハプテン又は他の分子を、例えばs c F v抗体などのポリペプチドに共有結合すること。特定の文脈において、その用語は、抗体など特異的結合分子を量子ドットなどのシグナル発生部分に結合させるための参照が含まれる。結合は、化学的または組換え手段によりどちらかによる。「化学的手段」は、1つの分子を生成せしめるために2つの分子間で形成される共有結合があるような抗体部分とエフェクター分子との間の反応をさす。

30

【0029】

用語「連結された」とは、第一の原子もしくは分子に適用する場合、第二の原子もしくは分子に「連結される」ことは、直接連結される及び間接的に連結されるの両方であることができる。二次抗体は、間接的連結の例を提供する。間接的連結の1つの具体例はウサギ抗ハプテン一次抗体であり、それはマウス抗ウサギIgG抗体により結合され、次にそれは検出可能な標識に共有結合されているヤギ抗マウスIgG抗体により結合される。

40

【0030】

第一及び第二の核酸（例えば、結合領域と標的核酸配列）に関して「対応する」という用語は、その第一及び第二の核酸が、第一及び/又は第二の核酸の全配列の少なくとも一部分において実質的な配列同一性又は相補性を有することを示す。従って、もし結合領域が、標的核酸配列の少なくとも一部と（例えば、もしそれが少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、あるいは100%、同一又は相補的な

50

らば)実質的な配列同一性または相補性を有する場合(例えば、逆相補性)、結合領域は、標的核酸配列に対応している。例えば、結合領域が、二本鎖標的核酸配列(例えば、ゲノム標的DNA配列)の一方の鎖に実質的な配列同一性を有している場合、又は結合領域が、一本鎖標的核酸配列(例えば、RNAまたはRNAウイルスゲノム)に実質的に相補的である場合、結合領域は、標的核酸配列に対応することができる。

【0031】

「ゲノム」は生物の全遺伝子構成成分である。真核生物の場合には、ゲノムは、細胞の染色体の一倍体セットに含まれている。原核生物の場合には、ゲノムは単一の染色体に含まれ、場合によっては、エピソードなど1つまたは複数の染色体外遺伝的要素(例えば、プラスミド)に含まれる。ウイルスゲノムは、特定のウイルスに応じて、1つ以上の一本鎖または二本鎖DNA又はRNA分子の形を取ることができる。

10

【0032】

用語「ハプテン」は、典型的には抗体と特異的に結合することができる小分子であるが、典型的には担体分子との組み合わせ以外で免疫原性であることが実質的に不可能である分子を指す。

【0033】

用語「単離された」とは、生物学的成分(例えば核酸分子、タンパク質、又は細胞)に関して、生物の細胞、又は生物それ自体において(ここでは他の染色体及び染色体外DNAやRNA、タンパク質及び細胞、及びオルガネラなどの成分が天然に生じる)、他の生物学的成分から実質的に分離又は精製されている生物学的成分を指す。「単離された」核酸分子は、標準的な精製方法で精製された核酸分子を含む。その用語はまた、増幅またはクローニングすることによって調製された核酸、並びに化学的に合成された核酸を包含する。

20

【0034】

「標識」は、その分子の検出を容易にするために、直接的または間接的に別の分子にコンジュゲートした検出可能な化合物又は組成物である。特異的な、非限定的な標識の例として、蛍光及び蛍光発生部分、発色部分、ハプテン、アフィニティタグ、および放射性同位元素を含む。標識は直接的に検出可能(例えば、光学的に検出可能)であるか又は間接的に検出可能(例えば、同様に検出可能な1つまたは複数の追加の分子との相互作用を介して)である。本明細書で開示されるプローブの文脈において典型的な標識は以下に記載される。核酸を標識するための方法、様々な目的のために有用な標識の選択の指針は、例えば、Sambrook and Russell, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) 及びAusubel et al., in *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences (1987,更新を含む)に議論されている。

30

【0035】

用語「多重」は、複数の異なるコンジュゲートを用いて、所望されるように、サンプル中の複数の標的を実質的に同時か又は逐次に、検出されることを可能にする実施態様を指す。多重化とは、核酸、一般的には、DNA、RNA、ペプチド、タンパク質を、両方個別に、かつ任意の及び全ての組み合わせで、同定及び/又は定量することを含み得る。多重化とはまた、その解剖学的文脈において、細胞内の遺伝子、メッセンジャー及びタンパク質の2つ以上を検出することを含めることができる。

40

【0036】

「核酸」とは、一本鎖又は二本鎖の何れかの形態のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドポリマーで、他に限定されない限り、天然に存在するヌクレオチドと同様の方法で核酸にハイブリダイズする天然ヌクレオチドのアナログを包含する。用語「ヌクレオチド」は、限定されないが、糖に結合した塩基(ピリミジン、プリン又はそれらの合成アナログ)、又はペプチド核酸(PNA)にあるようなアミノ酸に結合した塩基を包含するモノマーを含む。ヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの1つのモノマーである。ヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチドの塩基配列を意味する。

50

【0037】

核酸「セグメント」は、標的核酸分子の補欠部分又は部分配列である。核酸セグメントは、様々な方法で標的核酸分子から仮想的に又は実際に派生させることができる。例えば、標的核酸分子（例えば、ゲノムの標的核酸分子など）のセグメントは、制限断片である核酸セグメントを生成する1つまたは複数の制限酵素で消化することによって得ることができる。核酸セグメントはまた、増幅により、ハイブリダイゼーション（例えば、サブトラクティブハイブリダイゼーション）により、人工合成により、又は配列が標的核酸分子に対応する一以上の核酸を生成する任意の別の方法により、標的核酸分子から生成することができる。核酸セグメントの特定な例は結合領域である。

【0038】

「プローブ」又は「核酸プローブ」とは、標的核酸分子（例えば、ゲノムの標的核酸分子）とハイブリダイズすることが可能で、かつ標的へハイブリダイズした場合に、直接的又は間接的のどちらかで検出されることが可能である核酸分子である。従って、プローブは、標的の核酸分子の検出、及び幾つかの例では、定量化を許容する。特定の実施例では、プローブは、標的核酸分子由来の結合領域を含み、標的核酸分子の少なくとも一部分に特異的にハイブリダイズすることが可能である複数の核酸分子を包含する。プローブは、「標識核酸プローブ」と呼ぶことができ、プローブが直接的又は間接的に検出可能な部分又は「標識」へ結合され、プローブを検出可能な状態にすることを意味している。

【0039】

用語「量子ドット」は、量子閉じ込めに起因する大きさに依存する電子のおよび光学的特性を示すナノスケール粒子を指す。量子ドットは例えば半導体材料（例えばカドミウムセレニドおよび硫化鉛）から、および晶子（分子ビームエピタクシーを介して成長した）等から構成されてきた。種々の表面化学および蛍光特性を有する様々な量子ドットがインビトロジェンコーポレーション（Invitrogen Corporation）、ユージーン、オレゴン州から市販されている（例えば、米国特許第6815064号、同第6682596号および同第6649138号明細書を参照にされたい。その各々の特許は引用により本明細書に編入する）。また量子ドットはエビデントテクノロジーズ（Evident Technologies）（トロイ、ニューヨーク州）からも市販されている。他の量子ドットには、ZnSSe、ZnSeTe、ZnSTe、CdSSe、CdSeTe、ScSTe、HgSSe、HgSeTe、HgSTe、ZnCdS、ZnCdTe、ZnCdTe、ZnHgS、ZnHgSe、ZnHgTe、CdHgS、CdHgSe、CdHgTe、ZnCdSSe、ZnHgSSe、ZnCdSeTe、ZnHgSeTe、CdHgSSe、CdHgSeTe、InGaAs、GaAlAsおよびInGaN量子ドットのような合金量子ドットがある（合金量子ドットおよびその作成法は、例えば米国特許出願公開第2005/0012182号及び国際公開第2005/001889号に開示されている）。

【0040】

「サンプル」は、被験者から得た、ゲノムDNA、RNA（mRNAを含む）、タンパク質、又はそれらの組み合わせを含む生物学的標本である。例としては、限定されないが、染色体の調製物、末梢血、尿、唾液、組織生検、手術標本、骨髄、羊水のサンプル、および剖検材料が含まれる。一例において、サンプルはゲノムDNA又はRNAを含む。幾つかの例において、サンプルとは、例えば、顕微鏡スライドに置くことができる細胞遺伝学的調製物である。特定の例において、サンプルは直接使用されるか、または（例えば、ホルマリンを使用して）例えば固定することにより、使用する前に操作することができる。

【0041】

用語「シグナル発生部分」は、アッセイによって検出可能なシグナルを発生する組成物または分子を指す。

用語「特異的結合部分」は、結合対のメンバーを指す。特異的結合対は、それらが、別の分子への結合を実質的に排除してお互いに結合することを特徴とする一対の分子である（例えば、特異的結合対は、生物学的サンプル中の他の分子との結合対の2つのメンバー

10

20

30

40

50

のどちらかについての結合定数よりも、少なくとも 10^3 M^{-1} より大きい、 10^4 M^{-1} より大きい、又は 10^5 M^{-1} より大きい結合定数を有し得る)。特異的結合部分の特定の例は、特異的結合タンパク質（例えば、抗体、レクチン、ストレプトアビジンなどのアビジン、プロテイン A）、核酸配列、及びタンパク質 - 核酸を含む。特異的結合部分は、そうした特異的結合タンパク質が特異的に結合している分子（又はその一部）を含むことができる。

【0042】

用語「特異的結合剤」は、シグナル発生部分にコンジュゲートした特異的結合部分を含む分子を指す。

【0043】

「被検体」は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物（例えば、獣医学的被検体）などの任意の多細胞脊椎動物生物を含む。

【0044】

「標的の核酸配列又は分子」は、核酸分子の定義された領域又は特定の部分、例えば、ゲノム（例えば、目的の遺伝子を含む遺伝子又は哺乳動物のゲノム DNA など）である。標的核酸配列が標的ゲノム配列である一例において、そのような標的は、（例えば、正常細胞内で）染色体上の位置により定義されることができ、例えば、細胞遺伝学的命名法に従い、染色体上の特定の位置を参照することにより；遺伝地図上の位置への参照により；仮想的又は集合したコンティグへの参照により；その特異的な配列または機能により；その遺伝子またはタンパク質名により；又はゲノムの他の遺伝子配列の中からそれを一意的に同定する任意の他の手段によって定義することができる。いくつかの例では、標的核酸配列は、哺乳類又はウイルスのゲノム配列である。別の例では、標的核酸配列は、RNA 配列である。

【0045】

「細胞標的核酸配列」は、原核細胞、真核細胞、組織、ウイルス、またはその他の生物学的実体に存在するか又は抽出された、標的核酸配列（例えば、ゲノム DNA 配列又は RNA 配列）である。標的核酸配列はまた、プローブ配列（例えば、細胞標的核酸配列に結合する部分を有する第一のプローブ配列）内、またはアッセイで使用するために合成された他の核酸配列内に存在してもよい。

【0046】

いくつかの例では、標的核酸配列（例えばゲノム核酸配列）の変化は疾患又は病気と「関連する」。すなわち、標的核酸配列の検出は、疾患又は病気に関してサンプルの状態を推論するために使用することができる。例えば、標的核酸配列は2つ（又はそれ以上の）区別可能な形態で存在し得、第一の形態は疾患又は病気の非存在と関連し、第二（又は異なる）形態は疾患又は病気の存在と関連する。二つの異なる形態は、例えばポリヌクレオチド多型などによって、定性的に区別することができ、及び/又は二つの異なる形態は、例えば細胞内に存在する標的核酸配列のコピー数などによって、定量的に区別することができる。

【0047】

「ベクター」は、ベクターに対して天然型ではない他の（外来の）核酸配列のための担体としてはたらく任意の核酸である。適切な宿主細胞に導入されると、ベクターはそれ自身（それによって、外来の核酸配列）を複製し得、又は外来核酸配列の少なくとも一部を発現し得る。一つの文脈において、ベクターは直鎖状または環状核酸であって、その中へ、複製（例えば生産）及び/又は標準的な組換え核酸技術（例えば制限酵素消化）を用いて操作する目的のため、目的の標的核酸配列が導入（例えば、クローニング）される。ベクターは、宿主細胞内で複製することを可能とする核酸配列、例えば複製起点などを含めることができます。ベクターはまた、当技術分野で知られている1つ以上の選択マーカー遺伝子および他の遺伝的要素を含めることができる。一般的なベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ファージ、ファージミド、人工染色体（例えば、BAC、PAC、HAC、YAC）及びこれらの型のベクターの1つ以上の特徴を取り込んだハイブリッドを含

10

20

30

40

50

有する。典型的には、ベクターは、標的核酸配列の挿入を容易にする 1 カ所又は複数の固有の制限部位（場合によってはマルチクローニングサイト）を含む。

【0048】

発明の詳細な説明

本発明は、例えば、タンパク質、核酸、脂質、ホルモンなどを含む生体分子を含む生物学的サンプル中の標的生体分子の検出のためのプローブ及びプローブシステムを提供する。好ましい実施態様では、プローブ及びプローブシステムは、生物学的サンプル中の DNA や RNA などの標的核酸を検出するために使用される。更に好ましい実施態様では、プローブ及びプローブシステムは、インサツハイブリダイゼーション法、例えば、蛍光インサツハイブリダイゼーション（FISH）、比色インサツハイブリダイゼーション（CISH）、及び銀インサツハイブリダイゼーション（SISH）のために利用される。幾つかの実施態様において、生物学的サンプルは組織切片（生検によって得られたような）、または細胞診標本（例えばパパニコロウスメアまたは血液塗抹など）が含まれる。開示されたコンジュゲートを使用することができる他の型のアッセイは、当業者に容易に明らかであり、特定の実施例は以下に議論される。

10

【0049】

本発明の 1 つの非限定的な実施態様は、図 1 に記載されている。図 1 を参照すると、サンプルは標的核酸 1 を含む。本発明の標的核酸プローブ 5 は、標的プローブ部分 10 及び、複数の検出配列 20 を含む検出配列部分 15 を含む。標的核酸プローブ 5 の標的プローブ部分 10 は、標的核酸 1 の領域に相補的であり、適切な条件下で核酸 1 を標的にハイブリダイズする。検出配列 20 は、検出配列部分 15 が、検出配列 20 である複数の反復配列を含むように、好ましくは同一配列を有する。幾つかの実施態様において、そのシステムは、検出プローブ部分 30 と検出可能成分部分 35 を含む、検出プローブ 25 を更に含む。検出プローブ部分 30 は、検出プローブ部分 30 が適切な条件下で検出配列 20 にハイブリダイズするように、標的核酸プローブ 5 の検出配列 20 に相補的である核酸配列を含む。検出可能な成分部分 35 は、好ましくは複数の検出可能な部分 40 を含む。例えば、示された実施態様において、検出可能な部分 40 は好ましくはハプテンである。更に図 1 を参照し、幾つかの実施態様において、本発明のシステムは、検出可能な部分 40 に結合する特異的結合剤 45 を更に含む。幾つかの実施態様において、特異的結合剤 45 は、検出可能なシグナルを作り出すシグナル発生部分 50 を含み、例えば、シグナル発生部分

20

30

【0050】

本発明のプローブ及びプローブシステムは以下により詳述される。

A. ポリタグプローブシステム

本発明は、核酸の検出のためのプローブ及びプローブシステム、特に、標的核酸プローブの検出配列にハイブリダイズする、複数の検出配列及び検出核酸プローブを含み、かつ複数の検出可能な部分、例えばハプテンを更に含む標的核酸プローブを含むプローブ及びプローブシステム、を提供する。本明細書に開示されたプローブ及びプローブシステムは、標的核酸配列、例えば、疾患に関連するか又は病原菌に関連したゲノム標的核酸配列、又は RNA 標的核酸配列などを検出するために用いることができる。例えば、プローブは、中期又は間期の核の染色体調製物、又は組織切片へプローブのハイブリダイゼーションを含む、インサツハイブリダイゼーション手法において用いることができる。

40

【0051】

1. 標的核酸プローブ

幾つかの実施態様において、本発明は、標的核酸プローブを提供する。幾つかの実施態様において、標的核酸プローブは、標的プローブ部分及び検出標的部分を含む核酸分子である。

【0052】

幾つかの実施態様において、標的プローブ部分は、標的核酸配列（例えば、細胞の標的核酸配列又はプローブなどの人工核酸配列）に相補的である核酸配列を含む。幾つかの実

50

施態様において、標的プローブ部分は、ハイブリダイゼーション、例えば、インサイツハイブリダイゼーション、サザンブロット法、またはノーザンブロット法に適した条件下で、標的核酸配列にハイブリダイズする。好ましくは、標的プローブ部分は、RNA（リボ核酸）、DNA（デオキシリボ核酸）、LNA（ロックト核酸）、PNA（ペプチド核酸）、またはそれらの組み合わせなどの任意の適切な核酸を含み、デオキシリボヌクレオチドなどの標準ヌクレオチド、及びヌクレオチドアナログを含み得る。幾つかの実施態様において、標的核酸プローブの標的プローブ部分は、細胞標的核酸配列に相補的である。幾つかの実施態様において、標的核酸プローブは、細胞の標的核酸配列に直接ハイブリダイズされる。別の実施態様において、標的核酸プローブの標的プローブ部分は、一次プローブなどの人工標的核酸配列に相補的である。これらの実施態様において、細胞の標的核酸配列とアダプター部分に相補的である細胞標的プローブ部分を含む一次プローブは、細胞の標的核酸配列にハイブリダイズされる。標的核酸プローブは、好ましくは、一次プローブのアダプター部分に相補的でありハイブリダイズすることができる標的プローブ部分（一次プローブの標的プローブ部分）を含む。従って、一次プローブは細胞標的核酸配列にハイブリダイズされ、その後、標的核酸プローブは一次プローブにハイブリダイズされる。これらの実施態様は、所望の標的核酸配列を検出するためのプローブシステムの柔軟な設計を可能にする。一次プローブが利用されている実施態様では、一次プローブのアダプター部分は異なるアダプター部分に特異的な一連の標準的核酸プローブを使用することができる。一次プローブは、細胞の標的核酸配列に特異的な部分と、特定の標準化された標的核酸プローブに特異的であるアダプター部分とともに合成される。このシステムは、異なるアダプター部分を持つ一次プローブ、及び異なるアダプター部分の各々に特異的な一連の標的核酸プローブを用いて多重化を可能とする。

【0053】

幾つかの実施態様において、標的プローブ部分は、標的核酸配列に80%以上相補的であり、好ましくは、標的核酸配列に90%以上相補的であり、より好ましくは、標的核酸配列に99%以上相補的であり、最も好ましくは、標的核酸配列に約100%相補的である。標的プローブ部分の長さは可変できる。幾つかの実施態様において、標的プローブ部分は、長さ約10、20、50、100、または200ヌクレオチドの標的核酸に相補的である配列を含む。幾つかの実施態様において、標的核酸に相補的である標的プローブ部分は、最大で長さが約20、50、100、200、1000、または5000ヌクレオチドである。幾つかの実施態様において、標的核酸に相補的である標的プローブ部分は、長さが約10から約500、約10から約200、又は約10から約100ヌクレオチドである。一般に、これらの標的プローブ部分の設計は、当該分野で標準的である実践を用いて遂行される。例えば、得られたプローブが、標的核酸に結合することを犠牲にして自分自身に折り重なるか、またはお互いにハイブリダイズするような自己相補性を有する配列は一般的に回避される。

【0054】

標的プローブ部分の長さを選択する際の1つの考慮事項は、標的核酸を含むサンプルの複雑さである。例えば、ヒトゲノムは、長さが約 3×10^9 塩基対である。任意の10ヌクレオチド配列は、30億塩基対において約2861回の頻度で現れる。この長さの標的プローブ部分は、ヒトゲノムの大きさの配列を持つ標的内にいる10ヌクレオチド領域に一意的に結合する機会が乏しいであろう。しかし仮に、標的配列がプラスミド3キロバイト以内であった場合は、そのようなオリゴヌクレオチドは、一意的に結合することが非常に合理的な機会がある可能性がある。これと同じ計算により、16ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド（すなわち、16量体）が 3×10^9 塩基対に一回現れることが、数学的に可能性がある配列の長さの最小値であることが分かる。このレベルの特異性はまた、2つ以上の短い核酸配列が協調的な方法で（すなわち、それらが両方もしくは全てがそれらの意図した標的配列に結合している場合にのみ、意図した複合体を生成することができるように）結合するように形成されている場合、2つ以上の短い核酸配列によって提供される場合があり、ここでその短い配列の組み合わせが所望の特異性を提供する。

【 0 0 5 5 】

標的プローブ部分の長さを選択する際の第二の考慮事項は、標的プローブ部分が機能することが期待されるであろう温度範囲である。平均塩基含有量（50%のG-C塩基）の16量体は、とりわけ、プローブとその標的の濃度、反応の塩濃度、及びヌクレオチドの正確な順序に依存する、約41の計算される T_m を有するであろう。実際問題として、長い標的プローブ部分は、通常、ハイブリダイゼーションの特異性を高めるために選択される。例えば、長さが20から25ヌクレオチドの標的プローブ部分は、 T_m の近傍（ T_m の約5以内）の温度で行う反応で使用した場合、非常に特異的である可能性があるため、使用することができる。

【 0 0 5 6 】

好ましい実施態様において、標的プローブ部分がユーザーによって定義された適切な条件下で、標的核酸にハイブリダイズするように、標的核酸プローブの標的プローブ部分はこれらの考慮事項を考慮して設計されている。

【 0 0 5 7 】

標的プローブ部分は、手動で、又は、温度、長さ、GC含量などの所望のパラメータに基づいて、プライマーの選択を最適化する、コンピュータ実装されたアルゴリズムの支援を受けて選択することができる。インターネットを介して又はパーソナルコンピュータ上で使用する数多くのコンピュータに実装されたアルゴリズムが入手できる。例えば、標的核酸配列（例えば、ゲノム標的核酸配列）から複数の結合領域を生成するため、反復的な（または他の望ましくない、例えば、バックグラウンドを生み出す）核酸配列を欠いた配列の領域が、例えば手動で、あるいはコンピューター・アルゴリズムを使用して、同定される。数キロから数百キロベースまたがる標的核酸配列内（例えば、ゲノム標的核酸配列）において、実質的に又は完全に反復が無い（または他の望ましくない、例えば、バックグラウンドを生じる）核酸配列である典型的な多くの結合領域が同定される。

【 0 0 5 8 】

幾つかの実施態様において、標的核酸プローブは、標的プローブ部分に対する5'又は3'の何れか、好ましくは標的プローブ部分の3'の検出標的部分を更に含む。幾つかの好ましい実施態様において、標的核酸プローブの検出対象部分は、1つまたは複数の検出標的配列を含む。幾つかの実施態様において、検出標的配列は、検出標的配列が検出プローブとのハイブリダイゼーションによって検出できるように、検出プローブ核酸配列（詳細は後述）に相補的な配列である。

【 0 0 5 9 】

幾つかの実施態様において、検出部分は、複数の検出標的配列を含む。幾つかの実施態様において、検出標的配列が同じ検出プローブとハイブリダイズすることができるように、与えられた標的核酸プローブにおける検出標的配列は同一または実質的に同一である。他の実施態様において、検出標的配列の配列は検出標的配列が2つ以上の異なる検出プローブにハイブリダイズするように変更される。本発明は、以下の指定範囲にある範囲においてサポートを提供することが理解されるであろう。検出部分内に含まれる検出標的配列の数は変わることがある。従って、幾つかの実施態様において、検出部分は約5、10、20、30、50、又は100より大きい検出標的配列、最大約100の検出標的配列を含む。幾つかの実施態様において、検出部分は約5から30の間、5から50の間、10から50の間、10から100の間、10から200の間、20から40の間、20から50の間、20から100の間、又は20から200の間の検出標的配列を含む。標的部分の長さは変えることができる。幾つかの実施態様において、検出部分の全長は、長さが約20から約2000ヌクレオチド、約100から約2000ヌクレオチド、約20から約500ヌクレオチド、約100から約2000ヌクレオチド、約100から約1500ヌクレオチド、約100から約1000ヌクレオチド、約200から約2000ヌクレオチド、約200から約1500ヌクレオチド、約200から約1000ヌクレオチド、又は約200から約500ヌクレオチドである。検出標的配列の長さは変えることができる。幾つかの実施態様において、検出標的配列は、長さが約10、20、50、又は75ヌ

10

20

30

40

50

クレオチドより長く、最大で約100又は200ヌクレオチドである。幾つかの実施態様において、検出標的配列は、スペーサー配列によって分離されている。幾つかの実施態様において、スペーサー配列は長さが約10ヌクレオチドから最大で約20、50、又は100ヌクレオチドに及ぶ。幾つかの実施態様において、スペーサー配列は、制限エンドヌクレアーゼの1以上の制限部位を含む。

【0060】

検出標的配列は、標的プローブ部分の設計について説明したもののような考慮事項を用いている。幾つかの実施態様において、検出標的配列は、効率的及び/又は特異的に検出プローブとハイブリダイズするように設計されている。幾つかの実施態様において、標的核酸プローブの標的核酸配列へのハイブリダイゼーション及び検出プローブの検出標的配列へのハイブリダイゼーションが、実質的に同一の条件、例えば、温度、時間、緩衝液、及び塩濃度、のもとで起きるように、検出標的配列（及び対応する検出プローブ配列）の塩基組成が選択される。

10

【0061】

標的核酸プローブは、任意の公知の方法により合成することができる。幾つかの実施態様において、標的核酸プローブをコードする配列は、プラスミド発現ベクターにクローニングされる。標的核酸プローブは、標的核酸プローブをコードするRNA分子を提供するために、好ましくはRNAポリメラーゼによりベクターから転写される。幾つかの実施態様において、標的核酸プローブは、例えば、ホスホロアミダイトアナログを用いて、化学的に合成される。幾つかの実施態様において、DNAプローブは、プラスミドDNAの増殖、精製、制限酵素消化によって合成され、標的核酸プローブをコードするDNA分子を提供する。二本鎖DNAは、続いてハイブリダイゼーションプロトコルにおける使用のための一本鎖に溶融させることができる。幾つかの実施態様において、標的核酸プローブは、非対称PCRにより合成される。幾つかの実施態様において、一方のプライマーは、例えば、核酸アナログ（例えば、LNA）である可能性がある。このプロセスは、ロックトヌクレオチド及び標準的dNTPから作成される検出標的部分を含む標的的特異的部分を有するプローブを生成する。幾つかの実施態様において、LNA含有プライマーは、望まれるストランドの精製を容易にするためにビオチンを含む。

20

【0062】

2. 検出プローブ及び特異的結合剤

30

幾つかの実施態様において、本発明は、検出プローブを提供する。幾つかの実施態様において、検出プローブは、検出プローブ部分及び検出可能な成分部分を含む核酸分子である。幾つかの実施態様において、検出プローブの検出可能な成分部分は、特定の結合剤で検出可能である複数の検出可能な部分を含む。

【0063】

幾つかの実施態様において、検出プローブ部分は、上述したように、検出標的配列に相補的である核酸配列を含む。幾つかの実施態様において、検出プローブ部分の核酸配列は、ハイブリダイゼーションに適した条件、例えば、インサイツハイブリダイゼーション、サザンブロッティング法、またはノーザンブロット法に適した条件下で、検出標的配列にハイブリダイズする。好ましくは、検出プローブ部分は、RNA、DNA、LNA、PNA、またはそれらの組み合わせなどの任意の適切な核酸を含み、デオキシリボヌクレオチドなどの標準ヌクレオチド、並びにヌクレオチドアナログを含み得る。LNA及びPNAはDNAとDNAもしくはDNAとRNAとの間に形成されたものよりも安定している（すなわち、 T_m が増大した）ハイブリダイゼーション複合体を形成する核酸アナログの2つの例である。LNA及びPNAアナログは、プローブとして用いることができるハイブリッド核酸分子を提供するために、化学合成中に伝統的なDNA及びRNAのヌクレオシドと組み合わせることができる。LNA及びPNAアナログの使用は、ハイブリダイゼーションのパラメーター、例えばハイブリダイゼーション複合体の T_m などを変更することができる。これは、標的核酸配列への標的プローブ部分のハイブリダイゼーションに必要な条件と同一又は類似している条件の下で、ターゲット核酸プローブの検出標的配列にハ

40

50

イブリダイズする検出プローブの設計を可能にする。

【0064】

検出プローブ部の長さは変えることができるが、標的核酸プローブの検出標的配列に対する相補性のために設計される。幾つかの実施態様において、検出標的配列は、長さが約10、20、50、又は75ヌクレオチドより大きく、最大で約100又は200ヌクレオチドである。検出プローブ部分は、好ましくは、標的プローブ部分の設計について説明したもののような考慮事項を用いて設計される。幾つかの実施態様において、標的プローブ部分は、効率的及び/又は特異的に検出標的配列とハイブリダイズするように設計される。幾つかの実施態様において、標的核酸プローブの標的核酸配列へのハイブリダイゼーション及び検出プローブの検出標的配列へのハイブリダイゼーションが、実質的に同一の条件、例えば、温度、時間、緩衝液、及び塩濃度、のもとで起きるように、検出プローブ部分（及び対応する検出標的配列）の塩基組成が選択される。

10

【0065】

幾つかの実施態様において、検出可能な成分部分は、1つ以上の検出可能な部分を含む。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は直接検出可能であり、他の実施態様において、検出可能な部分は、間接的に検出可能である。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は、検出プローブに組み込まれる。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は、検出可能なシグナルを生成するシグナル生成部分である。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は検出プローブの合成に用いられるヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログに結合している。例えば、望まれる検出可能な部分に結合しているヌクレオシドホスホロアミダイトは、当技術分野で知られているように、化学合成を介して検出プローブを合成するために使用される。幾つかの実施態様において、検出可能な成分部分は、複数の検出可能な部分を含む。例えば、幾つかの実施態様において、検出可能な成分部分は、約5から約50、約5から約25、約5から約20、約5から約15、又は約5から約10の検出可能な部分を含む。標的核酸プローブ上の複数の検出標的配列の組み合わせは、各標的核酸プローブへの複数の検出プローブのハイブリダイゼーションを可能にすることが認識されるであろう。各検出プローブが複数の検出可能な部分を含む場合、検出シグナルの増幅が起きる。

20

【0066】

幾つかの実施態様において、検出可能な部分を間接的に検出される。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は、第一及び第二のメンバーを含む結合分子対の第一のメンバーである。これらの実施態様において、結合対の第一のメンバーにコンジュゲートしたヌクレオチドは、好ましくは、結合対の第一のメンバーにコンジュゲートしたヌクレオシドホスホロアミダイトの使用を介して、検出プローブに組み込まれる。シグナル発生部分にコンジュゲートした結合対の第二のメンバー（すなわち特異的結合部分）を含む特異的結合剤は、結合対の第一のメンバーへの結合を介して検出プローブを検出するために使用される。適切な結合分子対の例としては、アビジン及びビオチン及びハプテン及び抗ハプテン抗体を含むが、これらに限定されない。例えば、幾つかの実施態様において、検出プローブの検出可能な成分の部分は、複数のビオチン化ヌクレオチドを含む。これらのビオチン化ヌクレオチドは、直接検出可能な部分にコンジュゲートしたアビジンを含んでなる化合物を使用することによって検出される。他の実施態様において、検出プローブの検出可能な成分部分は、複数のハプテニル化(haptenylated)ヌクレオチドを含む。これらのハプテニル化ヌクレオチドは、直接検出可能な部分にコンジュゲートした抗ハプテン抗体を含んでなる化合物を使用することによって検出される。

30

40

【0067】

従って、幾つかの実施態様において、本発明は、結合分子対の第一のメンバーに結合している1つ以上のヌクレオチドを含む検出プローブを提供する。幾つかの実施態様において、結合分子対の第一のメンバーは、ハプテンである。幾つかの実施態様において、検出プローブの検出可能な成分部分は、ハプテン分子（例えばニトロ芳香族化合物（例えば、ジニトロフェニル(DNP)）、ビオチン、フルオレセイン、ジゴキシゲニンなど）に共

50

有結合した d N T P を組込んだ核酸分子である。(例えば、標識プローブへの組み込みを容易にするために)ハプテン及び他の標識を d N T P にコンジュゲートするための方法は、当技術分野で周知である。方法の例については、例えば、米国特許第 5 2 5 8 5 0 7 号、同 4 7 7 2 6 9 1 号、同 5 3 2 8 8 2 4 号、及び同 4 7 1 1 9 5 5 号を参照のこと。実際に、数多くの標識された d N T P が、例えば、Invitrogen Detection Technologies (モレキュラープローブ (Molecular Probes)、ユージーン、オレゴン州) から市販されている。標識は、直接的または間接的に d N T P の上の任意の位置、例えば、リン酸 (例えば、 γ 、 β 、又は α リン酸) や糖などで d N T P へ結合させることができる。

【0068】

様々なハプテンが検出プローブの検出可能な成分部分で使用することができる。そのようなハプテンは、限定されないが、ピラゾール、特にニトロピラゾール;ニトロフェニル化合物;ベンゾフラザン;トリテルペン;尿素及びチオ尿素類、特にフェニル尿素、更に具体的にはフェニルチオ尿素;ロテノン及びロテノン誘導体、ここではロテノイドとも言う;オキサゾール及びチアゾール、特にオキサゾール及びチアゾールスルホンアミド;クマリンおよびクマリン誘導体;ポドフィロトキシン及びポドフィロトキシン誘導体に代表されるシクロリグナン;及びそれらの組み合わせが挙げられる。ハプテンの具体的な例としては、限定されないが、2,4-ジニトロフェニル (DNP)、ビオチン、フルオレセイン誘導体 (FITC、TAMRA、テキサスレッドなど)、ジゴキシゲニン (DIG)、5-ニトロ-3-ピラゾールカルバミド (ニトロピラゾール、NP)、4,5,-ジメトキシ-2-ニトロシンナミド (ニトロシンナミド、NCA)、2-(3,4-ジメトキシフェニル)-キノリン-4-カルバミド (フェニルキノロン、DPQ)、2,1,3-ベンゾオキサジアゾール-5-カルバミド (ベンゾフラザン、BF)、3-ヒドロキシ-2-キノキサリンカルバミド (ヒドロキシキノキサリン、HQ)、4-(ジメチルアミノ)アゾベンゼン-4'-スルホンアミド (DABSYL)、ロテノイソキサゾリン (Rot)、(E)-2-(2-(2-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[b][1,4]ジアゼピン-4-イル)フェノキシ(phenoxy))アセトアミド (ベンゾジアゼピン、BD)、7-(ジエチルアミノ)-2-オキソ-2H-クロメン-3-カルボン酸 (クマリン 343、CDO)、2-アセトアミド-4-メチル-5-チアゾールスルホンアミド (チアゾールスルホンアミド、TS)、及び p-メトキシフェニルピラゾポドフィルアミド (p-Mehtoxyphenylpyrazopodophyllamide) (Pod o) が挙げられる。これらのハプテンとそれらのプローブにおける使用については、共同所有の出願である、米国特許出願公開第 2 0 0 8 0 3 0 5 4 9 7 号、同 2 0 0 8 0 2 6 8 4 6 2 号、及び同 2 0 0 8 0 0 5 7 5 1 3 号により詳細が説明されている。

【0069】

検出プローブの検出可能な成分部分がハプテンを含む実施態様では、結合分子対の第二のメンバーは、好ましくは、抗原結合分子などのハプテンに結合する分子である。適切な抗原結合分子の例としては、限定されないが、抗体、免疫グロブリン又は免疫グロブリン様分子 (一例として、限定するものでないが、IgA、IgD、IgE、IgG および IgM を含む)、抗体断片、例えば、当該技術分野において知られている F(ab')₂ 断片、抗体断片 Fab' 断片、Fab'-SH 断片など、組換え抗体断片 (例えば sFv 断片、dsFv 断片、二重特異性の sFv 断片、二重特異性 dsFv 断片、F(ab')₂ 断片、単鎖 Fv タンパク質 (「scFv」)、ジスルフィド安定化 Fv タンパク質 (「dsFv」)、ダイアボディ、及びトリアボディ (当該技術分野で知られている) 及び、ラクダ科動物抗体が挙げられる (例えば、米国特許第 6 0 1 5 6 9 5 号; 同 6 0 0 5 0 7 9 号 - 同 5 8 7 4, 5 4 1 号; 同 5 8 4 0 5 2 6 号; 同 5 8 0 0 9 8 8 号; 及び同 5 7 5 9 8 0 8 号を参照のこと)。好ましい実施態様において、検出可能なシグナルを生成する検出可能な部分は、抗原結合分子に、付着するか、そうでなければ共有結合している。適切な第二の結合対のメンバーは、限定されないが、検出可能なシグナルを生成する検出可能な部分にコンジュゲートしている抗 DNP 抗体、抗ビオチン抗体、抗 FITC 抗体、抗 DIG 抗体、抗 NP 抗体、抗 NCA 抗体は、抗 DPQ 抗体、抗 BF 抗体、抗 HQ 抗体、抗ダブシル抗体、抗 Rot 抗体、抗 BD 抗体、抗 CDO 抗体、抗 TS 抗体、および抗 Pod o

10

20

30

40

50

抗体が挙げられる。更なる実施態様において、結合分子対の第二のメンバーは、検出可能な部分を含まない抗八ブテン一次抗体である。これらの実施態様において、シグナルを発生する検出可能な部分を含む二次抗体（例えば、ヤギ抗マウスIgG抗体など）は、検出可能なシグナルを発生するために利用される。

【0070】

上述したように、検出プローブは、直接的に検出可能であるか又は間接的に検出可能であってよい。幾つかの直接的検出の実施態様では、検出プローブは、検出可能なシグナルを発生する検出可能な部分（例えば、シグナル発生部分）を含み、一方幾つかの間接的検出の実施態様では、検出可能なシグナルを発生するシグナル発生部分にコンジュゲートしている結合分子対（例えば二次抗体など）のメンバーを含む特異的結合剤が利用されている。これらの実施態様では、検出可能なシグナルを発生する様々なシグナル発生部分が、検出プローブに組み込まれ得、又は結合対のメンバーにコンジュゲートされ得る。

10

【0071】

好ましい実施態様において、シグナル生成部分は、光子（無線周波数、マイクロ波周波数、赤外線周波数、可視周波数と紫外線周波数の光子を含む）の吸収、放出及び/又は散乱を含む、任意の公知又は未発見のメカニズムによって検出することができる。シグナル生成部分は着色、蛍光、燐光及び発光分子や物質を含む。一つの物質を別の物質に変換し、（例えば、無色の物質を着色物質に変換したり、又はその逆であったり、又は沈殿物を生成するか、サンプルの濁度を増加させるなどにより）検出可能な差を与える触媒（酵素など）、及び常磁性分子及び磁性分子または物質を包含する。

20

【0072】

シグナル発生部分の特定の例においては、蛍光分子（又は蛍光色素）が含まれる。多数の蛍光色素が、当業者に知られており、例えばインビトロジェンから選択することができる。例えば、The Handbook--A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Invitrogen Detection Technologies、モレキュラープローブ（Molecular Probes）、ユージーン、オレゴン州）を参照。核酸分子又は抗原結合分子などのタンパク質に結合させる（例えば、化学的にコンジュゲートさせる）ことができる特定の蛍光色素は、限定されないが、以下を包含する；4-アセトアミド-4'-イソチオシアン酸スチルベン-2,2'-ジスルホン酸、アクリジン及びアクリジンイソチオシアネートなどのアクリジン及び誘導体、5-((2-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸（EDANS）、4-アミノ-N-[3-(ビニルスルホニル)フェニル]ナフタルイミド-3,5ジスルホン酸（ルシファーイエローVS）、N-(4-アニリノ-1-ナフチル)マレイミド；アントラニルアミド；ブリリアントイエロー、例えば、クマリン、7-アミノ-4-メチルクマリン（AMC、クマリン120）などのクマリン及び誘導体、7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン（7-amino-4-trifluoromethylcoumarin）（クマリン151）；シアノシン；4',6-ジアミジノ-2-フェニリンドール（DAPI）；5',5"-ジプロモピロガロール-スルホンフタレイン（プロモピロガロールレッド）；7-ジエチルアミノ-3-(4'-イソチオシアナトフェニル)-4-メチルクマリン；ジエチレントリアミンペンタアセテート；4,4'-ジイソチオシアナトジヒドロスチルベン-2,2'ジスルホン酸；4,4'-ジイソチオシアナトスチルベン-2,2'ジスルホン酸；5-[ジメチルアミノ]ナフタレン-1-スルホニルクロライド（DNS、塩化ダンシル）；4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸（DABCYL）；4-ジメチルアミノフェニルアゾフェニル-4'-イソチオシアネート（DABITC）；エオシンおよびエオシンイソチオシアネートなどのエオシンおよび誘導体；エリトロシンBおよびエリトロシンイソチオシアネートなどのエリトロシンおよび誘導体；エチジウム；5-カルボキシフルオレセイン（FAM）、5-(4,6-ジクロロトリアジン-2-イル)アミノフルオレセイン（DTAF）、2'7'-ジメトキシ-4'5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン（JOE）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、およびQFITC（XRITC）などのフルオレセインおよび誘導体；2,7-ジフルオロフルオレセイン（OREGON GREENTM）；フルオレスカミン；IR144；IR1446；マラカ

30

40

50

イトグリーンイソチオシアネート；4-メチルウンベリフェロン；オルト-クレゾールフタレイン；ニトロチロシン；パラローザニリン；フェノールレッド；B-フィコエリスリン；o-フタルジアルデヒド；ピレン酪酸、1-ピレン酪酸スクシンイミジルなどのピレンおよび誘導体；リアクティブレッド4（シバクロンTMプリリアントレッド3B-A）；6-カルボキシ-X-ローダミン（ROX）、6-カルボキシローダミン（R6G）などのローダミン及び誘導体；リサミンローダミンBスルホニルクロリド、ローダミン（Rhod）、ローダミンB、ローダミン123、ローダミンXイソチオシアネート、ローダミングリーン、スルホローダミンB、スルホローダミン101、スルホローダミン101の塩化スルホニル誘導体（テクサスレッド）、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン（TAMRA）；テトラメチルローダミン；テトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）；リボフラビン；ロゾール酸およびテルビウムキレート誘導体。

10

20

30

40

50

【0073】

他の適切なフルオロフォアは、約617nmで放射するチオール反応性ユウロピウムキレート（Heyduk and Heyduk, *Analyt. Biochem.* 248:216-27, 1997; *J. Biol. Chem.* 274:3315-22, 1999）、並びにGFP, *Lissamine*TM、ジエチルアミノクマリン、フルオレセインクロトリアジニル、ナフトフルオレセイン、4,7-ジクロロローダミン及びキサテン（Leeらによる米国特許第5800996号に記載された）及びそれらの誘導体を包含する。当業者に既知である他のフルオロフォア、例えば、Invitrogen Detection Technologies, モレキュラープローブ（Molecular Probes）（ユージーン、オレゴン州）から入手可能なものもまた使用でき、色素のALEXA FLUORTM系（例えば、米国特許第5696157号、同6130101号、及び同66716979号に記載される）、色素のBODIPY系（ジピロメテンボロンジフルオリド色素（dipyrometheneboron difluoride dyes）、例えば、米国特許第4774339号、同5187288号、同5248782号、同5274113号、同5338854号、同5451663号、及び同5433896号に記載される）、カスケードブルー（米国特許第5132432号に記載されるスルホン化ピレンのアミン反応性誘導体）、及びマリーナブルー（米国特許第5830912号）を包含する。

【0074】

上記の蛍光色素に加えて、蛍光標識は、半導体ナノ結晶などの蛍光ナノ粒子が可能であり、例えば、QUANTUM DOTTM（例えば、QuantumDot Corp, Invitrogen Nanocrystal Technologies、ユージーン、オレゴン州から入手される；米国特許第6815064号；同6682596号；及び同6649138号も参照）。半導体ナノ結晶は、大きさに依存する光学的および/または電気的特性を有する微細な粒子である。半導体ナノ結晶は、一次エネルギー源で照射されている場合、エネルギーの二次電子放出は、半導体ナノ結晶で使用される半導体材料のバンドギャップに対応する周波数で発生する。この放出は、特定の波長または蛍光色の光として検出することができる。異なるスペクトル特性を持つ半導体ナノ結晶は、例えば、米国特許第6602671号に記載されている。半導体ナノ結晶は、様々な生体分子（dNTP及び/又は核酸を含む）、及び基質に対して、例えば、Bruchez et al. (1998) *Science* 281:2013-6, Chan et al. (1998) *Science* 281:1;及び米国特許第6274323号に記載された技術によって結合することができる。

【0075】

様々な組成物の半導体ナノ結晶の形成は、例えば、米国特許第6927069号；同6914256号；同6855202号；同6709929号；同6689338号；同6500622号；同6306736号；同6225198号；同6207392号；同6114038号；同6048616号；同5990479号；同5690807号；同5571018号；同5505928号；同5262357号及び米国特許出願公開第2003/0165951号並びにPCT出願公開番号第99/26299号（1999年5月27日公開）に開示されている。半導体ナノ結晶の別個の集団を、その異なるスペクトル特性に基づいて識別可能であるように生成することができる。例えば、半導体ナノ結

晶は、その組成、サイズまたはサイズおよび組成に基づいて異なる色の光を発するように生成することができる。例えば、サイズに基づいて異なる波長（565 nm、655 nm、705 nm、又は800 nmの発光波長）で発光する量子ドットは、本明細書に開示されたプローブにおいて蛍光標識として適しており、インビトロジェンから入手される。

【0076】

更なるシグナル発生部分は、例えば、放射性同位元素（ ^3H 、 ^{35}S 及び ^{32}P など）、 Gd^{3+} などの放射性金属イオン又は常磁性金属イオンのDOTA及びDPTAキレートなどの金属キレート、及びリポソームを包含する。

【0077】

シグナル発生部分はまた、酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -ラクタマーゼを含む。検出可能な標識が酵素を含む場合、色素原、蛍光発生化合物、又は発光性化合物が、酵素と組み合わせて使用することができ、検出可能なシグナルを生成する（多くのそうした化合物が、例えば、インビトロジェン社、ユージーン、オレゴン州から市販されている）。発色化合物の特定の例としては、ジアミノベンジジン（DAB）、4-ニトロフェニルリン酸（pNPP）、ファーストレッド（fast red）、プロモクロロインドリルリン酸（BCIP）、ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）、BCIP/NBT、ファーストレッド、APオレンジ、APブルー、テトラメチルベンジジン（TMB）、2,2'-アジノ-ジ（3-エチルベンゾチアゾリンスルホン酸（ABTS）、*o*-ジアニシジン、4-クロロナフトール（4-CN）、ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド（ONPG）、*o*-フェニレンジアミン（OPD）、5-プロモ-4-クロロ-3-インドイル- β -ガラクトピラノシド（X-Gal）、メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド（MU-Gal）、*p*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド（PNP）、5-プロモ-4-クロロ-3-インドイル- β -D-グルクロニド（X-Gluc）、3-アミノ-9-エチルカルバゾール（AEC）、フクシン、ヨードニトロテトラゾリウム（INT）、テトラゾリウムブルー、及びテトラゾリウムバイオレッドを包含する。

【0078】

あるいは、酵素は、金属組織学的検出方式で使用することができる。例えば、SISHの方法はハイブリダイズしたゲノムの標的核酸配列の同定及び局在についての金属組織学的検出方式を含む。金属組織学的検出方法は、水溶性金属イオン及び酵素の酸化還元に不活性な基質と組み合わせて、アルカリフォスファターゼ等の酵素を使用することを包含する。基質は酵素により酸化還元活性剤に変換され、その酸化還元活性剤は金属イオンを還元し、それを検出可能な沈殿物を形成させる。（例えば、米国特許出願公開第2005/0100976、PCT国際公開第2005/003777及び米国特許出願公開第2004/0265922を参照）。金属組織学的検出方法には、オキシドレダクターゼ酵素（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼなど）を、水溶性金属イオン、酸化剤及び還元剤と一緒に使用することを含み、再び検出された沈殿物を形成する。（例えば、米国特許第6670113を参照）。

【0079】

幾つかの実施態様において、シグナル生成部分は、蛍光タンパク質である。[0319] 蛍光タンパク質はまた、可視化を容易にするために、担体として使用することができ、又は担体に結合させることができる。例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）は、もともとはオワンクラゲの発光器官から単離された。キメラGFP融合は、細胞への遺伝子導入によりインサイトで発現させることができ、適切な標的化シグナルによって、細胞内の特定の部位に局在化させることができる。青、シアン、黄緑色の発光を伴うスペクトルの変異が首尾よくオワンクラゲGFPから生成されるが、何一つ529 nmより長い発光極大を示すものは無かった。GFP様タンパク質が、生物学的用途のために利用可能な色の範囲を著しく拡大した花虫綱（サンゴ動物）から単離されている。配列データベースに寄託された「GFP様タンパク質」のファミリーは、現在およそ30の有意に異なるメンバー

10

20

30

40

50

を有している。蛍光タンパク質は、発色団の自己触媒的合成によって自発的に蛍光を発することができるタンパク質を指す。赤色波長又は遠赤色波長（赤色蛍光タンパク質又はRFP）で蛍光を発するタンパク質が知られている。RFPは、多色標識実験及び蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）実験の両方において、より短い波長で蛍光を発する他の蛍光タンパク質との組み合わせで使用することができる。市販のRFPは、2つの野生型GFP様タンパク質に由来する。DsRed（drFP583）は、558nmと583nmで、それぞれ励起極大及び発光極大を持つ。遠赤外蛍光タンパク質は、571nmで吸収する色素タンパク質の変異誘発によって生成された。HcRed1（Clontech）は、588nmと618nmで、それぞれ励起極大及び発光極大を持つ。最長波長（導入されている任意の変異なし）で蛍光を発する蛍光タンパク質は、イソギンチャクEntacmaea quadricolorからクローニングされた、eqFP611である。このタンパク質は、559nmで吸収し、611nmで発光する。

10

20

30

40

50

【0080】

検出プローブは、任意の適切な、既知の核酸合成法により合成することができる。幾つかの実施態様において、検出プローブは、ホスホラミダイトヌクレオシド及び/又はホスホラミダイトヌクレオシドアナログを用いて化学的に合成される。例えば、幾つかの実施態様において、検出プローブは、標準RNAまたはDNAホスホラミダイトヌクレオシドを用いて合成される。幾つかの実施態様において、検出プローブは、LNAホスホラミダイト、又はPNAホスホラミダイト単独で、又は標準的なホスホラミダイトヌクレオシドとの組み合わせのいずれかを用いて合成される。幾つかの実施態様において、検出可能な部分は、化学合成中に検出プローブに組み込まれる。例えば、幾つかの実施態様において、ハプテンなどの検出可能な部分は、所望の検出可能部分を含む塩基性ホスホラミダイトに導入される。別の方法は、検出プローブ合成のために用いることができる。例えば、LNAアナログ又はLNAアナログと標準ヌクレオチドの組み合わせから作られたプライマーは、プローブの残りの転写に使用することができる。その他の例として、検出可能な部分を含むプライマーは、プローブの残りの転写のために利用されている。さらに他の実施態様では、例えば転写又は化学合成によって生成されたプローブのセグメントが、酵素的又は化学的ライゲーションによって連結され得る。

【0081】

B. プローブ及びプローブシステムの使用

本発明は、開示されたプローブ及びプローブシステムを使用する方法を提供する。例えば、プローブは標的核酸分子を検出するために使用することができる。一例において、本方法は、サンプル中の核酸分子と標的核酸プローブとのハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な条件下で、核酸分子を含むサンプルと開示された標的核酸プローブの一つ以上を接触させることを含む。次いで、検出プローブと標的核酸プローブとの間のハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な条件下で、サンプルを検出プローブと接触させる。検出プローブは、その後、例えば、検出プローブに組み込まれた化合物の結合パートナーを含む化合物をサンプルに接触させることにより、又は直接検出プローブをアッセイすることにより、検出される。

【0082】

本発明のプローブ及びプローブシステムは、インサイツハイブリダイゼーション手順（例えば、蛍光インサイツハイブリダイゼーション（FISH）、発色インサイツハイブリダイゼーション（CISH）及び銀インサイツハイブリダイゼーション（SISH））のような、核酸検出のために使用することができる。相補的な核酸分子間のハイブリダイゼーションは、相補的なヌクレオチド単位間のワトソン-クリック型、フーグスティーン型または逆転フーグスティーン型水素結合を含む水素結合を介して媒介される。例えば、アデニン及びチミンは、水素結合の形成を介して対になる相補的核酸塩基である。本開示のプローブの特定の位置にあるヌクレオチド単位が、DNAまたはRNA分子（例えば、標的核酸配列）の同じ位置にあるヌクレオチド単位と水素結合することが可能である場合、オリゴヌクレオチドは、その位置でお互いに相補的である。プローブ及びDNA又はRN

Aは、各分子において十分な数の対応する位置が、互いに水素結合し、検出可能な結合を生成することができるヌクレオチド単位によって占有されている場合、互いに相補的である。プローブは、特異的にハイブリダイズ可能な、標的核酸配列（例えば、ゲノム標的核酸配列）と100%相補的である必要はない。その配列が複雑な混合物中（例えば、全細胞DNA又はRNA）に存在する場合には、プローブが標的核酸配列に結合し、二重鎖を作り、又は標的核酸配列にのみハイブリダイズするか又は実質的にそれのみにハイブリダイズするために、十分な相補性が必要である。

【0083】

インサイツハイブリダイゼーションは、標的核酸配列（例えば、ゲノムの標的核酸配列）を含むサンプルを、中期または間期の染色体調製物（例えば、スライド上にマウントされた細胞または組織サンプルなど）の関連で、標的核酸配列（例えば、ゲノムの標的核酸配列）に対して特異的にハイブリダイズできるか又は特異的であるプローブ（例えば、上述の標的核酸プローブ）に、接触させることを包含する。スライドは、例えば、パラフィン又は均一なハイブリダイゼーションを妨げる可能性がある他の材料を除去するために、必要に応じて前処理される。染色体サンプルおよびプローブの両方は、二本鎖核酸を変性させるため、例えば加熱により処理される。（適当なハイブリダイゼーション緩衝液中に調製された）プローブとサンプルは、ハイブリダイゼーションが起こることを可能にするため（典型的には平衡に達するまで）の条件下で十分な時間において混ぜ合わされる。染色体の調製物は、過剰な標的核酸プローブを除去するために洗浄され、染色体標的の特異的標識の検出が行われる。本発明のいくつかの実施態様によれば、検出は、標的核酸プローブ二対する検出プローブのハイブリダイゼーションによって促進される。検出プローブは、直接検出又は間接的検出にによって検出することができる。

10

20

【0084】

例えば、幾つかの直接検出の実施態様では、検出プローブは、1つまたはそれ以上の蛍光化合物で標識され、サンプルは蛍光顕微鏡又はイメージングにより解析される。幾つかの間接的な検出の実施態様では、検出プローブは、検出可能な部分（すなわち、蛍光色素又は量子ドット）にコンジュゲートした結合対の第二のメンバー（すなわち、抗ハプテン抗体又はアビジン）を含む化合物とサンプルを接触させることにより検出される、結合対の第一のメンバー（すなわち、ハプテン又はビオチン）を含む検出可能な部分を複数含む。インサイツハイブリダイゼーションの方法の一般的な記述については、例えば米国特許第4888278号を参照。蛍光インサイツハイブリダイゼーション（FISH）、発色インサイツハイブリダイゼーション（CISH）及び銀ハイブリダイゼーションのための多数の手順が、当技術分野で知られている。例えば、FISHを実施するための方法は、米国特許第5447841号、同5472842号、同5427932号、及び例えば、Pinkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83:2934-2938, 1986; Pinkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9138-9142, 1988; 及びLichter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9664-9668, 1988に記載される。CISHは、例えば、Tanner et al., Am. J. Pathol. 157:1467-1472, 2000及び米国特許第6942970号に記載される。更なる検出方法が、米国特許第6280929号に与えられている。インサイツハイブリダイゼーションによって、ウイルスを検出するための典型的な手順は、Poddighe et al., J. Clin. Pathol. 49:M340-M344, 1996に見いだすことができる。

30

40

【0085】

多数の試薬および検出方式が、感度、解像度、または他の望ましい特性を向上させるためにFISH、CISH、及びSISHの方法と併せて用いることができる。上で議論したように、FISHを行う際にフルオロフォア（蛍光色素とQUANTUM DOTS™を含む）で標識した検出プローブは、直接光学的に検出することができる。あるいは、検出プローブは、ハプテンなどの非蛍光分子（例えば、以下の非限定的な例など：ビオチン、ジゴキシゲニン、DNP、およびそれらの様々なオキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアシル、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素、チオ尿素、ロテノン、クマリン、クマリン系化合物、ポドフィロトキシン、ポドフィロトキシン系化合物、およびそれ

50

らの組み合わせ)、リガンド又は他の間接的に検出可能な部分で標識することができる。このような非蛍光分子で標識した検出プローブ(及びそれらが結合する標的核酸配列)は、サンプル(例えば、プローブが結合した細胞又は組織サンプル)を標識検出試薬、例えば、選択されたハプテン又はリガンドに特異的な抗体(又は受容体、又は他の特異的結合パートナー)と接触させることによって検出することができる。検出試薬は、蛍光色素(例えば、QUANTUM DOTTM)又は他の間接的に検出可能部分で標識することができ、又は一つ又は複数の更なる特異的結合剤(例えば、二次的又は特異的抗体)と接触することができる、それらは順にフルオロフォアで標識することができる。任意で、検出可能な標識は、抗体、受容体(または他の特異的結合剤)に直接結合される。あるいは、検出可能な標識がリンカー、例えば、ヒドラジドチオールリンカー、ポリエチレングリコールリンカーなど、又は匹敵する反応性を持った他の柔軟な連結部分を介して結合剤に結合される。例えば、抗体、レセプター(又は他の抗リガンド)、アビジン等の特異的結合剤は、ヘテロ二官能性ポリエチレングリコール(PEG)リンカーなどのヘテロ二官能性アルキレングリコールリンカーを介して、フルオロフォア(又は他の標識)で共有結合性に修飾することができる。ヘテロ二官能性リンカーは、例えば、カルボニル反応性基、アミン反応性基、チオール反応性基及び光反応性基から選択された2つの異なる反応性の基を結合し、その第一番目は標識に結合し、その第二番目は特異的結合剤に結合する。

10

【0086】

他の例において、検出プローブ、又は特異的結合剤(抗体、例えば、一次抗体、レセプター又は他の結合剤など)は、蛍光性又は発色性の組成物を、蛍光性、着色された、或いはそうでなければ検出可能なシグナル(例えば、SISHにおける検出可能な金属粒子の蒸着など)へと変換することが可能な酵素を含む。上に示したように、酵素は、関連するプローブ又は検出試薬へリンカーを介して直接または間接的に結合することができる。適切な試薬の例(例えば、結合試薬)及び化学物質(例えば、リンカー及び結合化学物質)は、米国特許出願公開第2006/0246524号;同2006/0246523号及び米国特許出願第60/739794号に記載されている。

20

【0087】

標識された検出プローブ及び/又は標識された結合対を適切に選択することにより、多重検出方式を作り出すことができ、1回のアッセイによって(例えば、単一の細胞又は組織サンプルに関して、又は複数の細胞又は組織サンプルに関して)、複数の標的核酸配列(例えば、ゲノムの標的核酸配列)の検出を容易にすることが可能であることが当業者によって理解されるであろう。例えば、第一の標的核酸プローブに対応する第一の検出プローブは、ビオチンなどの第一のハプテンで標識することができ、第二の標的核酸配列に対応する第二の検出プローブは、DNPなどの第二のハプテンで標識することができる。サンプルをプローブセットへ曝露後、結合したプローブはサンプルを第一の特異的結合剤(この場合は、第一のフルオロフォア、例えば、585nmで発光する第一のスペクトル的に異なるQUANTUM DOTTM)、及び第二の特異的結合剤(この場合、第二のフルオロフォア(例えば、705nmで発光する第二のスペクトル的に異なるQUANTUM DOTTM)で標識された、抗DNP抗体又は抗体断片)と接触させることによって検出することができる。更なる一对のプローブ/結合剤が、スペクトル的に異なるフルオロフォアを使用する多重検出方式に加えられる。直接的及び間接的な数多くの変法(一工程、二工程又はそれ以上)が想定されることが可能であり、その全てが本開示によるプローブ及びアッセイに関連して適している。

30

40

【0088】

標準的な蛍光顕微鏡は、量子ドットバイオコンジュゲートなどの蛍光化合物を組み込んだ試薬及びプローブの検出のための安価なツールである。量子ドットコンジュゲートは事実上光に安定しているため、顕微鏡で目的の領域を見つけて、適切にサンプルに焦点を当てるために時間を費やすことができる。量子ドットコンジュゲートは、明るい光に安定した発光が必要とされるときはいつでも有用であり、とりわけ、一つの励起源/フィルターのみでが使用可能で、かつ色の最小限のクロストークが要求される多色用途で特に有用で

50

ある。

【0089】

C. 標的

標的核酸分子は、DNA又はRNAなどの任意の選択された核酸であって良い。特定の実施態様では、標的配列は、例えばヒトゲノムなどの真核生物のゲノム由来のゲノム標的配列又はゲノムのサブシーケンスである。幾つかの実施態様において、標的核酸は、細胞質のRNAである。幾つかの実施態様において、標的核酸分子は、病原体、例えばウイルス、細菌、又は例えばウイルスゲノムに由来する細胞内寄生体から選択される。幾つかの実施態様において、標的核酸配列は、真核細胞（例えば、哺乳動物）又はウイルスゲノム配列などのゲノム配列である。固有の非反復DNAの少なくとも一部分を含有する、本質的に任意のゲノムの標的配列に対応する、標的核酸プローブを作成することができる。例えば、ゲノムの標的配列は、哺乳動物（例えば、ヒト）、真菌又は細胞内寄生体のゲノムなどの真核生物のゲノムの一部であって良い。あるいは、ゲノム標的配列は、ウイルス又は原核生物ゲノム（例えば、細菌ゲノムなど）、又はその一部とすることができる。特定の実施例において、ゲノム標的配列は、感染性の生物（例えば、ウイルス、細菌、真菌）に関連付けられている。

10

【0090】

幾つかの実施態様において、標的核酸分子は、疾患に関連した（例えば、相関し、因果的に関与したなどの）配列とすることができる。幾つかの実施態様において、疾患や病気に関連した標的核酸が選択され、ハイブリダイゼーションによる検出を、疾患又は病気に関連する情報（サンプルが得られた患者の診断又は予後情報など）を推測するために用いることができる。所定の実施態様において、選択された標的核酸分子は、腫瘍性疾患（又は癌）に関連付けられた標的核酸分子である。幾つかの実施態様において、ゲノム標的配列は、癌に関連する少なくとも一つの少なくとも一つの遺伝子（例えば、HER2、c-Myc、N-Myc、Ab1、Bc12、Bc16、R1、p53、EGFR TOP2A、MET、又は他の受容体及び/又はシグナル伝達分子をコードする遺伝子等）、又は癌に関連した染色体領域を組み込むことができる。幾つかの実施態様において、標的核酸配列は、癌と相関している染色体の構造異常、例えば、転座、欠失、又は二重化（例えば、遺伝子増幅又はポリソミー）に関連付けることができる。幾つかの実施態様において、標的核酸配列は、少なくともいくつかの腫瘍細胞で二重化又は欠失しているゲノム配列を網羅している。標的核酸配列の大きさは実質的に変えることができ、例えば、少なくとも長さが20塩基対、少なくとも長さが100塩基対、少なくとも長さが1000塩基対、少なくとも全長が5000塩基対、少なくとも全長が10000塩基対、又は少なくとも全長が25000塩基対など。

20

30

【0091】

標的核酸配列（例えば、ゲノムの標的配列）は、任意の数の塩基対にまたがることができる。幾つかの実施態様において、標的核酸配列は、少なくとも1000塩基対に及ぶ。特定の実施例において、標的核酸配列（例えば、ゲノム標的核酸配列）は、長さが少なくとも10000塩基対、少なくとも50000塩基対、少なくとも100000塩基対、少なくとも150000塩基対、少なくとも250000塩基対、又は少なくとも500000塩基対（例えば、100kbから600kb、200kbから500kb、又は300kbから500kb）である。実施例において、標的核酸配列が、真核生物のゲノム（例えば、哺乳動物のゲノム、例えば、ヒトゲノムなど）由来である場合、標的配列は、典型的には、生物のゲノムのごく一部（又は単一染色体の小さな部分）を表している（例えば、生物のゲノムDNA（又は単一染色体）の20%未満、10%未満、5%未満、2%未満、又は1%未満）。標的配列（例えば、ゲノム標的核酸配列）が、感染性生物（ウイルスなど）に由来する幾つかの例では、標的配列は感染性生物のゲノムのより大きな割合（例えば50%以上）又は実に全てを表わすことができる。

40

【0092】

特定の非限定的な例として、腫瘍（例えば、癌）に関連した標的核酸配列（例えば、ゲ

50

ノムの標的核酸配列)が選択される。多数の染色体異常(転座やその他の再配列、倍加又は欠失を含む)が新生物細胞、特に癌細胞(例えば、B細胞及びT細胞白血病、リンパ腫、乳癌、結腸癌、神経癌等)で同定されている。従って、幾つかの例において、サンプルの細胞の少なくともサブセットにおいて、標的核酸配列(例えば、ゲノムの標的核酸配列)の少なくとも一部が倍加されるか又は削除される。

【0093】

癌遺伝子が関与する転座は、いくつかのヒト悪性腫瘍について知られている。例えば、染色体18q11.2のブレークポイント領域に位置するS Y T遺伝子が関与する染色体再配列は、滑膜肉腫、軟部組織腫瘍に共通している。t(18q11.2)転座は、例えば、異なる標識を持つプローブを使用して、同定することができる：第一のプローブは、S Y T遺伝子から遠位方向に伸びる標的核酸配列から生成される核酸分子を含み、第二のプローブは3'又はS Y T遺伝子の近位に伸びる標的核酸配列から生成される核酸が含まれる。これらの標的核酸配列(例えば、ゲノムの標的核酸配列)が、インサイツハイブリダイゼーションの方法で使用される場合、S Y T遺伝子領域でt(18q11.2)を欠く正常細胞は、S Y Tの2つのインタクトなコピーを反映する、2つの融合(近接する2つの標識により作成された)シグナルを示す。t(18q11.2)を持つ異常な細胞は単一の融合シグナルを示す。

10

【0094】

腫瘍性形質転換に関与する遺伝子の倍加の多数の例が観察され、ここで開示されたプローブを使用するインサイツハイブリダイゼーションにより細胞遺伝学的に検出することができる。一例において、標的核酸配列(例えば、ゲノムの標的核酸配列)は、一以上の悪性腫瘍(例えば、ヒト悪性腫瘍)において倍加された遺伝子(例えば、オンコジーン)を含むように選択される。例えば、HER2は、c-erbB2又はHER2/neuとしても知られ、細胞増殖の制御に役割を果たす遺伝子である(代表的なヒトHER2ゲノム配列は、GENBANKTM受入番号NC_000017、ヌクレオチド35097919-35138441に与えられる)。その遺伝子はチロシンキナーゼファミリーのメンバーである185kdの膜貫通細胞表面レセプターをコードする。HER2は、ヒトの乳癌、卵巣癌、および他の癌で増幅される。従って、HER2遺伝子(あるいはそのHER2遺伝子を含む17番染色体の領域)を、HER2に特異的な結合領域を持つ核酸分子を含むプローブを生成するために、ゲノムの標的核酸配列として使用することができる。

20

30

【0095】

他の実施例において、腫瘍抑制遺伝子であって、悪性腫瘍細胞で欠失した(失われた)標的核酸配列(例えば、ゲノムの標的核酸配列)が選択される。例えば、染色体9p21に位置するp16領域(D9S1749、D9S1747、p16(INK4A)、p14(ARF)、D9S1748、p15(INK4B)、及びD9S1752を含む)が、特定の膀胱癌で欠失している。第1染色体短腕の遠位領域を含む染色体欠失(例えば、SHGC57243、TP73、EGFL3、ABL2、ANGPTL1、及びSHGC-1322を包含する)、及び19番染色体の動原体周辺領域(例えば、19p13-19q13)(例えば、MAN2B1、ZNF443、ZNF44、CRX、GLTSCR2、及びGLTSCR1を包含する)は、中枢神経系の所定の型の固形腫瘍の特徴的な分子構造である。

40

【0096】

前述の例は例示の目的のためにのみ提供されており、限定を意図するものではない。腫瘍性形質転換及び/又は増殖と相関する他の多くの細胞遺伝学的異常は、当業者に知られている。標的核酸配列(例えばゲノム標的核酸配列)は、腫瘍性変性と相関し、開示の方法において実用的であり、そのために開示されたプローブを調製することができ、またEGFR遺伝子を含む(7p12;例えば、GENBANKTM受入番号NC_000007,ヌクレオチド55054219-55242525),C-MYC遺伝子(8q24.21;例えば、GENBANKTM受入番号NC_000008,ヌクレオチド128817498-128822856),D5S271(5p15.2),リボ蛋白リ

50

パーゼ (LPL) 遺伝子 (8 p 22 ; 例えば、GENBANKTM 受入番号 NC__00000008 , 又クレオチド 19841058 - 19869049) , RB1 (13 q 14 ; 例
 えば、GENBANKTM 受入番号 NC__0000013 , 又クレオチド 47775912
 - 47954023) , p53 (17 p 13 . 1 ; 例えば、GENBANKTM 受入番号
 NC__0000017 , 相補体 , 又クレオチド 7512464 - 7531642)) , N -
 MYC (2 p 24 ; 例えば、GENBANKTM 受入番号 NC__0000002 , 相補体 ,
 又クレオチド 151835231 - 151854620) , CHOP (12 q 13 ; 例
 えば、GENBANKTM 受入番号 NC__0000012 , 相補体 , 又クレオチド 56196
 638 - 56200567) , FUS (16 p 11 . 2 ; 例えば、GENBANKTM 受
 入番号 NC__0000016 , 又クレオチド 31098954 - 31110601) , FK 10
 HR (13 p 14 ; 例えば、GENBANKTM 受入番号 NC__0000013 , 相補体 ,
 又クレオチド 40027817 - 40138734) ならびに例えば : ALK (2 p 23
 ; 例えば、GENBANKTM 受入番号 NC__0000002 , 相補体 , 又クレオチド 29
 269144 - 29997936) , Ig 重鎖 , CCND1 (11 q 13 ; 例えば、GE
 N B A N K TM 受入番号 NC__0000011 , 又クレオチド 69165054 . . . 69
 178423) , BCL2 (18 q 21 . 3 ; 例えば、GENBANKTM 受入番号 NC
 __0000018 , 相補体 , 又クレオチド 58941559 - 59137593) , BCL
 6 (3 q 27 ; 例えば、GENBANKTM 受入番号 NC__0000003 , 相補体 , 又ク
 レオチド 188921859 - 188946169) , MALF1 , AP1 (1 p 32 -
 p 31 ; 例えば、GENBANKTM 受入番号 NC__0000001 , 相補体 , 又クレオチ
 ド 59019051 - 59022373) , TOP2A (17 q 21 - q 22 ; 例えば、
 G E N B A N K TM 受入番号 NC__0000017 , 相補体 , 又クレオチド 3579832
 1 - 35827695) , TMPRSS (21 q 22 . 3 ; 例えば、GENBANKTM
 受入番号 NC__0000021 , 相補体 , 又クレオチド 41758351 - 4180194
 8) , ERG (21 q 22 . 3 ; 例えば、GENBANKTM 受入番号 NC__000002
 1 , 相補体 , 又クレオチド 38675671 - 38955488) ; ETV1 (7 p 21
 . 3 ; 例えば、GENBANKTM 受入番号 NC__0000007 , 相補体 , 又クレオチド
 13897379 - 13995289) , EWS (22 q 12 . 2 ; 例えば、GENBA
 N K TM 受入番号 NC__0000022 , 又クレオチド 27994271 - 2802650
 5) ; FLI1 (11 q 24 . 1 - q 24 . 3 ; 例えば、GENBANKTM 受入番号 N 30
 C__0000011 , 又クレオチド 128069199 - 128187521) , PAX3
 (2 q 35 - q 37 ; 例えば、GENBANKTM 取得番 NC__0000002 , 相補体 ,
 又クレオチド 222772851 - 222871944) , PAX7 (1 p 36 . 2 - p
 36 . 12 ; 例えば、GENBANKTM 受入番号 NC__0000001 , 又クレオチド 1
 8830087 - 18935219) , PTEN (10 q 23 . 3 ; 例えば、GENBA
 N K TM 受入番号 NC__0000010 , 又クレオチド 89613175 - 8971638
 2) , AKT2 (19 q 13 . 1 - q 13 . 2 ; 例えば、GENBANKTM 受入番号 N
 C__0000019 , 相補体 , 又クレオチド 45431556 - 45483036) , MY
 CL1 (1 p 34 . 2 ; 例えば、GENBANKTM 受入番号 NC__0000001 , 相補
 体 , 又クレオチド 40133685 - 40140274) , REL (2 p 13 - p 12 ; 40
 例 えば、GENBANKTM 受入番号 NC__0000002 , 又クレオチド 6096225
 6 - 61003682) および CSF1R (5 q 33 - q 35 ; 例えば、GENBANK
TM 受入番号 NC__0000005 , 相補体 , 又クレオチド 149413051 - 1494
 73128) を含有する。開示された標的核酸プローブ又は方法は、上記の遺伝子の何れ
 かの少なくとも何れか一つ (またはそれ以上、規定通りに) を含む、ヒト染色体のそれぞ
 れの領域を含めることができる。例えば、一部開示されたプローブ又は方法についての標
 的核酸配列は、合計で少なくとも 100000 塩基対 (例えば、少なくとも 250000
 塩基対、又は少なくとも 500000 塩基対) 又は 100000 塩基対と 500000 塩
 基対の間の合計において、上記の遺伝子及び十分な付加的な連続ゲノム配列 (遺伝子の 5
 '、遺伝子の 3' 又はその組合わせの何れであろうと) のいずれか一つを含む。 50

【 0 0 9 7 】

所定の実施態様において、標的核酸分子に対して特異的なプローブが（同じ又は異なるが類似のサンプル中で）染色体特異的（セントロメアなど）プローブなど染色体番号の指標を提供する第二のプローブと組み合わせ、アッセイされる。例えば、少なくともHER2遺伝子を含む第17染色体の領域に対して特異的なプローブ（HER2プローブ）は、第17染色体のセントロメア（17p11.1-q11.1）に位置するアルファサテライトDNAにハイブリダイズするCEP17プローブと組み合わせ使用することができる。CEP17プローブを包含することで、HER2遺伝子の相対的コピー数が決定されることが可能となる。例えば、正常なサンプルはHER2/CEP17の比が2未満であろうが、HER2遺伝子が倍加したサンプルはHER2/CEP17の比が2.0以上であろう。同様に、任意の他の選択されたゲノムの標的配列の位置に対応するCEPセントロメアプローブはまた、同一（又は別の）染色体上の一意的な標的に対するプローブと組み合わせ使用することができる。

10

【 0 0 9 8 】

他の実施例において、標的核酸配列（例えば、ゲノムの標的核酸配列）が、疾患又は病気に関連付けられているウイルス又は他の微生物から選択される。細胞又は組織サンプル中のウイルス又は微生物由来の標的核酸配列（例えば、ゲノム標的核酸配列）の検出は、生物の存在を示す。例えばプローブは、発癌性または病原性ウイルス、バクテリアまたは細胞内寄生虫（例えば、熱帯熱マラリア原虫および他のマラリア原虫種、リーシュマニア（sp.）、クリプトスポリジウム、赤痢アメーバ及びランブル鞭毛虫、並びに、トキソプラズマ属、アイメリア属、タイレリア属およびバベシア属の種）から選択することができる。

20

【 0 0 9 9 】

幾つかの実施例において、標的核酸配列（例えばゲノムの標的核酸配列）は、ウイルスゲノムである。例示的なウイルスおよび相当するゲノム配列（GENBANKTM括弧内に参照配列受入番号記載）は、ヒトアデノウイルスA（NC_001460）、ヒトアデノウイルスB（NC_004001）、ヒトアデノウイルスC（NC_001405）、ヒトアデノウイルスD（NC_002067）、ヒトアデノウイルスE（NC_003266）、ヒトアデノウイルスF（NC_001454）、ヒトアストロウイルス（NC_001943）、ヒトBKポリオマウイルス（V01109；GI：60851）ヒトボカウイルス（NC_007455）、ヒトコロナウイルス229E（NC_002645）、ヒトコロナウイルスHKU1（NC_006577）、ヒトコロナウイルスNL63（NC_005831）、ヒトコロナウイルスOC43（NC_005147）、ヒトエンテロウイルスA（NC_001612）、ヒトエンテロウイルスB（NC_001472）、ヒトエンテロウイルスC（NC_001428）、ヒトエンテロウイルスD（NC_001430）、ヒトエリスロウイルスV9（NC_004295）、ヒト泡沫状ウイルス（NC_001736）、ヒトヘルペスウイルス1（単純ヘルペスウイルス1型）（NC_001806）、ヒトヘルペスウイルス2（単純ヘルペスウイルス2型）（NC_001798）、ヒトヘルペスウイルス3（水痘帯状疱疹ウイルス）（NC_001348）、ヒトヘルペスウイルス4の1型（エプスタインバーウイルス1型）（NC_007605）、ヒトヘルペスウイルス4の2型（エプスタインバーウイルス2型）（NC_009334）、ヒトヘルペスウイルス5病原菌AD169（NC_001347）、ヒトヘルペスウイルス5病原菌Merlin Strain（NC_006273）、ヒトヘルペスウイルス6A（NC_001664）、ヒトヘルペスウイルス6B（NC_000898）、ヒトヘルペスウイルス7（NC_001716）、ヒトヘルペスウイルス8のM型（NC_003409）、ヒトヘルペスウイルス8のP型（NC_009333）、ヒト免疫不全ウイルス1（NC_001802）、ヒト免疫不全ウイルス1（NC_001722）、ヒトメタ肺炎ウイルス（NC_004148）、ヒトパピロマウイルス-1（NC_001356）、ヒトパピロマウイルス-18（NC_001357）、ヒトパピロマウイルス-2（NC_001352）、ヒトパピロマウイルス54（NC_00

30

40

50

1676), ヒトパピロウイルス61 (NC__001694), ヒトパピロウイルス - cand90 (NC__004104), ヒトパピロウイルスRTX7 (NC__004761), ヒトパピロウイルス10型 (NC__001576), ヒトパピロウイルス101型 (NC__008189), ヒトパピロウイルス103型 (NC__008188), ヒトパピロウイルス107型 (NC__009239), ヒトパピロウイルス16型 (NC__001526), ヒトパピロウイルス24型 (NC__001683), ヒトパピロウイルス26型 (NC__001583), ヒトパピロウイルス32型 (NC__001586), ヒトパピロウイルス34型 (NC__001587), ヒトパピロウイルス4型 (NC__001457), ヒトパピロウイルス41型 (NC__001354), ヒトパピロウイルス48型 (NC__001690), ヒトパピロウイルス49型 (NC__001591), ヒトパピロウイルス5型 (NC__001531), ヒトパピロウイルス50型 (NC__001691), ヒトパピロウイルス53型 (NC__001593), ヒトパピロウイルス60型 (NC__001693), ヒトパピロウイルス63型 (NC__001458), ヒトパピロウイルス6b型 (NC__001355), ヒトパピロウイルス7型 (NC__001595), ヒトパピロウイルス71型 (NC__002644), ヒトパピロウイルス9型 (NC__001596), ヒトパピロウイルス92型 (NC__004500), ヒトパピロウイルス96型 (NC__005134), ヒトパラインフルエンザウイルス1 (NC__003461), ヒトパラインフルエンザウイルス2 (NC__003443), ヒトパラインフルエンザウイルス3 (NC__001796), ヒトパレコウイルス (NC__001897), ヒトパレコウイルス4 (NC__007018), ヒトパレコウイルスB19 (NC__000883), 呼吸系発疹ウイルス (NC__001781), ヒトライノウイルスA (NC__001617), ヒトライノウイルスB (NC__001490), ヒトスプマウイルス (NC__001795), ヒトT-リンパ向性ウイルス1 (NC__001436), ヒトT-リンパ向性ウイルス2 (NC__001488) を含有する。

【0100】

特定の例において、標的核酸配列 (例えば、ゲノムの標的核酸配列) は、発癌性ウイルス、例えばイプシュタイン-パーウイルス (EBV) またはヒトパピロウイルス (HPV、例えばHPV16、HPV18) に由来する。他の実施例において、標的核酸配列 (例えば、ゲノム標的核酸配列) は、病原性ウイルス、例えば呼吸器合胞体ウイルス、肝炎ウイルス (例えば、C型肝炎ウイルス)、コロナウイルス (例えば、SARSウイルス)、アデノウイルス、ポリオマウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、または単純疱疹ウイルス (HSV) に由来する。

【0101】

D. キット

幾つかの実施態様において、本発明は、本明細書に開示された少なくとも1つの標的核酸プローブ、及び任意で、少なくとも1つの一次プローブを含むキットを提供する。例えば、FISH、CISH、及び/又はSISHなどのハイブリダイゼーション手順のためのキットは、本明細書に記載される少なくとも一つの標的核酸プローブ、及び任意で、少なくとも一つの一次プローブを含む。幾つかの実施態様において、キットはさらに、少なくとも一つの標的核酸プローブと組み合わせて使用するための1つ以上の検出プローブを含む。幾つかの実施態様において、キットはさらに、一以上の検出プローブと組み合わせて使用するための少なくとも特異的結合剤を含む。従って、キットは、1つ以上の標的核酸プローブ、1つ以上の検出プローブ、及び1つ以上の特異的結合剤を含むことができる。

【0102】

キットはまた、インサイツハイブリダイゼーションアッセイを実施するための、又はプローブを作成するための一以上の試薬を含み得る。例えば、キットは、一以上のバッファ、標識されたdNTP、標識酵素 (ポリメラーゼなど)、プライマー、核酸分解酵素フリーの水、及び標識化プローブを作成するためのインストラクションとともに、少なくとも

も一つの核酸分子（又はそのような分子の集団）を含めることができる。

【0103】

一実施例において、キットは、バッファー及びインサイツハイブリダイゼーションを行うための他の試薬、例えばパラフィン前処理バッファー、プロテアーゼ、及びプロテアーゼバッファ、プレハイブリダイゼーションバッファー、ハイブリダイゼーションバッファー、洗浄バッファ、対比染色、封入剤、またはそれらの組み合わせなどと一緒、1つ以上の標的核酸プローブ、1つ以上の検出プローブ及び1つ以上の特異的結合剤を含む。キットには、必要に応じてさらに、ハイブリダイゼーションおよびプローブの信号を評価するための対照のスライドを含めることができる。

【0104】

E. 自動化

当業者は、ハプテンコンジュゲートを使用するための本明細書に開示される方法の実施態様が自動化することができることを理解するであろう。ベントナ・メディカル・システムズ社 (Ventana Medical Systems, Inc.) は、米国特許第 5 6 5 0 3 2 7 号、第 5 6 5 4 2 0 0 号、第 6 2 9 6 8 0 9 号、第 6 3 5 2 8 6 1 号、第 6 8 2 7 9 0 1 号及び第 6 9 4 3 0 2 9 号、及び米国特許出願公開第 2 0 0 3 0 2 1 1 6 3 0 号及び第 2 0 0 4 0 0 5 2 6 8 5 号を含む、自動化された分析を実行するためのシステムおよび方法を開示する数々の米国特許の譲受人であり、それらの各々が参照により本明細書に援用される。高分子ハプテン染色手順の特定の実施態様が、様々な自動化工程を使用して行うことができる。

【0105】

典型的な作業実施態様に関する更なる詳細は、実施例に記載される。

【実施例】

【0106】

実施例 1

ポリタグプローブを使用する固定組織中の mRNA の検出

ホルマリン固定パラフィン包埋異種移植組織は、キシレンを使用して脱パラフィン処理し、ホルマリン、酸変性 (0.3 M の HCl)、クエン酸ナトリウム/Tween 20 緩衝液及びプロテアーゼによる逐次処理によりハイブリダイゼーション用に調整した。調製後、ポリタグリボプローブ (配列番号: 7-18; 1 µg/ml でホルムアミドを含むハイブリダイゼーション緩衝液で希釈) が組織上に沈着され、65 °C で 6 時間のハイブリダイゼーション前に 80 °C で変性させた。非結合及び非特異的に結合したプローブは 3 回の高ストリンジェンシー洗浄 (0.1 x SSC、75 °C) で除去した。調製後、ハプテン標識抗ポリタグ検出オリゴヌクレオチド (配列番号: 24; 5 µg/ml でホルムアミドを含むハイブリダイゼーション緩衝液で希釈) が組織上に沈着され、37 °C で 1 時間のハイブリダイゼーション前に 60 °C で変性させた。非結合及び非特異的に結合した検出オリゴは 2 回の低ストリンジェンシー洗浄 (2 x SSC、37 °C) で除去した。mRNA 標的に結合したハプテンはカゼイン (20 nM) を含む緩衝希釈剤で希釈した量子ドット (インビトロジェン) にコンジュゲートした同族マウス抗ハプテンモノクローナル抗体を用いて検出した。核は DAPI を用いて対比染色した。スライドはエタノールを増加した洗浄を用いて脱水し、Cytoseal 60 封入剤を使用してカバーガラスをかけた。蛍光シグナルは、干渉分光イメージングを用いて捕獲した。図 3 を参照。

【0107】

実施例 2

スライド・ガラスに固定した RNA のポリタグプローブによる検出

ドットプロット染色。1 マイクログラムから 1 ナノグラムのインビトロで転写された RNA 標的が Spotting Solution II (Genorama) に希釈され、1 µl がアミノシランコーティングされたマイクロアレイスライド (Genorama) 上に沈着され、乾燥後、UV 光を用いて架橋された。スライドは、カゼインを含む緩衝抗体希釈を用いてブロックし、ポリタグリボプローブ (配列番号: 19-21; 1 µg/ml でホルムアミドを含むハイブリダイゼーション緩衝液で希釈) がスライド上に沈着され

10

20

30

40

50

、65 で6時間のハイブリダイゼーション前に80 で変性させた。非結合及び非特異的に結合したプローブは3回の高ストリンジェンシー洗浄(0.1×SSC、75)で除去した。ハプテン標識抗ポリタグ検出オリゴヌクレオチド(配列番号:27、30及び[追加gina配列番号];5ug/mlでホルムアミドを含むハイブリダイゼーション緩衝液で希釈)が組織上に沈着され、37 で1時間のハイブリダイゼーション前に60 で変性させた。非結合及び非特異的に結合した検出オリゴは2回の低ストリンジェンシー洗浄(2×SSC、37)で除去した。mRNA標的に結合したハプテンはカゼイン(20nM)を含む緩衝希釈剤で希釈した量子ドット(インビトロジェン)にコンジュゲートした同族マウス抗ハプテンモノクローナル抗体を用いて検出した。スライドはエタノールを増加した洗浄を用いて脱水し、Cytoseal60封入剤を使用してカバーガラスをかけた。干渉分光イメージングを用いて捕獲したQdotシグナルは、別々の検体のチャンネルにデコンボリューションされ、ImageProソフトウェアを使用して可視化するために重ね合わせた。図2を参照。

【0108】

実施例3

ポリタグプローブによる固定組織中の核DNAの検出

第17染色体セントロメア特異的ポリタグプローブ(配列番号6)は、T7RNAポリメラーゼによる直鎖状プラスミドの転写により生成された。ガラス顕微鏡スライド上の5uMの薄片中のホルマリン固定パラフィン包埋組織は、以下に記載されるようにハイブリダイゼーションと検出工程を受けた。上記のように脱パラフィン後、スライドは90 20
で12分間クエン酸塩/Tween20緩衝液で処理され、37度で8分間プロテアーゼで処理した。ホルムアミド含有緩衝液中に処方されたポリタグプローブは、スライドに適用され、その後8分間92 に加熱し、二本鎖DNA標的を変性させた。8時間のハイブリダイゼーション後、スライドは2×SSCにより8分間72 で二回洗浄した。

【0109】

同様に処方されたハプテン標識化検出オリゴが追加された(配列番号24)。55 への8分間の加熱後に、ハイブリダイゼーションを1時間37 で進行させた。37 で2×SSCで2回洗浄した後に、ハイブリダイズしたプローブをウサギ抗DNPモノクローナル抗体を用いて検出し、その後洗浄し、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ抗体が適用された。ペルオキシダーゼのシグナルは銀沈着により検出された。図4を参照。

【0110】

実施例4

標的核酸及び検出プローブセット

標的核酸プローブ(RNA)が、プローブ配列をコードするDNA鋳型からプローブを転写することによって合成した。以下の検出標的配列(ポリタグとも呼ばれる)は、標的プローブ配列(標的DNAにハイブリダイズする配列)と操作可能に結合して配置され、完全長標的核酸プローブに10回から40回反復された。

10

20

30

ポリタグ ソフィア

配列番号 1: (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU) N

ポリタグ ラクエル:

配列番号 2

(AGAACAAGAAUACUACCGUCAUGCACUUGAUCCGGCACGGUCACUAGU) N

10

ポリタグ QINGXIA:

配列番号 3 (UUACACCUCACCGACAAUAGAAGAUCGUCCUGGCACUGAACUUGCCU) N

ポリタグ EVA:

配列番号 4 (UCCGCAGUAACGCUUAAUCGCUCCAGACGACACCCAUGG) N

20

ポリタグ GINA:

配列番号 5

(UGCGCAAGAACTCATGGCTAACGGACACCGCAAUACAAUGAUACCUGUCGCCUUCGCGUAU
GCAU)

【 0 1 1 1 】

第 1 7 染色体セントロメアに特異的な R N A 標的核酸プローブ :

30

配列番号 6

CACAGAACUAAACAGAAGCAUUCUCAGAACCCUCUUCGUGAUGUUUGCAUUAACUCACAGU
GC

(CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU) 56

アクチン m R N A に特異的な R N A 標的核酸プローブ :

1. 配列番号 7

UGGGCAUGGGUCAGAAGGAUCCUAUGUGGGCGACGAGGCCAGAGCAAGAGAGGCAUCCUC
ACCCUGAAGUACCCCAUC (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

2. 配列番号 8

GAGCACGGCAUCGUCACCAACUGGGACGACAUGGAGAAAUCUGGCACCACACCUUCUACAA
UGAGCUGCGUGUGGCUC (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

10

3. 配列番号 9

CGAGGAGCACCCCGUGCUGCTUGACCGAGGCCCCCTUGAACCCCAAGGCCAACCGCGAGAA
GAUGACCCAGAUCATGUUUG (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

4. 配列番号 10

AGACCUUCAACACCCAGCCAUGUACGUUGCUAUCAGGCUGUGCUAUCUCCUGUACGCCUCU
GGCCGUACCACUGGCAUC (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

20

5. 配列番号 11

GUGAUGGACUCCGGUGACGGGGUCACCCACACUGUGCCCAUCUACGAGGGGUAUGCCCUCCC
CCAUGCCAUCCUGCGUCU (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

30

6. 配列番号 12

GGACCUGGCUGGCCGGGACCUGACUGACUACCUCAUGAAGAUCUCACCGAGCGCGGCUACA
GCUUCACCACCACGGCCG (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

7. 配列番号 13

AGCGGGAAAUCGUGCGUGACAUUAAGGAGAAGCUGUGCUACGUCGCCCTUGGACUUCGAGCA
AGAGAUGGCCACGGCUGCU (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

40

8. 配列番号 14

UCCAGCUCCUCCCUGGAGAAGAGCUACGAGCUGCCTGACGGCCAGGUCAUCACCAUUGGCAA
 UGAGCGGUUCCGCUGCCC (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

9. 配列番号 15

UGAGGCACUCUCCAGCCUCCUCCUCCUGGGCAUGGAGUCCUGUGGCAUCCACGAAACUACCU
 UCAACUCCAUCAUGAAGU (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

10

10. 配列番号 16

GUGACGUGGACAUCCGCAAAGACCUGUACGCCAACACAGUGCUGTUCUGGCGGCACCACCAU
 GUACCCUGGCAUUGCCGAC (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

11. 配列番号 17

AGGAUGCAGAAGGAGAUACACUGCCCUGGCACCCAGCACAAUGAAGAUC AAGAUC AUUGCUCUCC
 UCCUGAGCGCAAGUACUC (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

20

12. 配列番号 18

CGUGUGGAUCGGCGGCUCCAUCCUGGCCUCGCUUGUCCACCUCCAGCAGAUGUGGAUCAGC
 AAGCAGGAGUUAUGACGAGU (CAUCAGCAGGACGCACUGACCACCAUGAAGGUGCUCUUCU)_N

30

ここで、 $n = 56$ 、すなわちポリタグの56反復。

【0112】

ヒト18リボソームRNAに特異的なRNA標的核酸プローブ：

配列番号 19

CGGAACUGAGGCCAUGAUUAAGAGGGACGGCCGGGGGCAUUCGUAUUGCGCCGCUAGAGGUG
 AAAUUCUUGGACCGGCGC (AGAACAAGAAUACUACCGUCAUGCACUUGAUCCGGCACGGUCA
 CUAGU)_N

配列番号 20

CGGAACUGAGGCCAUGAUUAAGAGGGACGGCCGGGGGCAUUCGUAUUGCGCCGCUAGAGGUG
 AAAUUCUUGGACCGGCGC (UUACACCUCACCGACAAUAGAAGAUCGUCCUGGCACUGAACUU
 GCCU)_N

10

配列番号 21

CGGAACUGAGGCCAUGAUUAAGAGGGACGGCCGGGGGCAUUCGUAUUGCGCCGCUAGAGGUG
 AAAUUCUUGGACCGGCGC (UGCGCAAGAACTCATGGCTAACGGACACCGCAAUACAAUGAUA
 CCUGUCGCCUUCGCGUAUGCAU)_N

20

ここで、 $n = 40$ 、すなわちポリタグの40反復。

【0113】

検出オリゴヌクレオチドは、標準的ホスホラミダイト及び製造業者によって提供される
 プロトコルを使用してマーメイド・オリゴヌクレオチドシンセサイザー (Mermaid
 Oligonucleotide Synthesizer) で合成した。Rで示される
 ハプテンが、望まれるハプテンを含む脱塩基ホスホラミダイトに導入された。ソフィア (Sophia)
 検出プローブが、DNP (ジニトロフェノール) で標識され、585 nM
 で発光するQdotsに結合した抗DNP抗体で使用された。ラクエル (Raquel)
 検出プローブが、TS (チアゾールスルホンアミド) で標識され、655 nMで発光する
 Qdotsに結合した抗TS抗体で使用された。Qingxia検出プローブが、DC (ジエチル
 クマリン) で標識され、605 nMで発光するQdotsに結合した抗DC抗体
 で使用された。エバ (Eva) 検出プローブが、BF (ベンゾフラザン) で標識され、5
 25 nMで発光するQdotsに結合した抗BZ抗体で使用された。

30

【0114】

Sophie:

配列番号 22

Sophie 5:
RTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTAGAAGAGCACCTTCATGGTGGTCAGTGCGTCCTGCTGATG

配列番号 23

Sophie 10:
RTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTAGAAGAGCAC
CTTCATGGTGGTCAGTGCGTCCTGCTGATG

10

配列番号 24

Sophie 15:
RTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATT
TTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTAGAAGAGCACCTTCATGGTGGTCAGTGCGTCCTGCTGATG

Raquel:

配列番号 25

Raquel 5:
RTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRACTAGTGACCGTGCCGGATCAAGTGCATGACGGTAGTATTCTTGTT
CT

20

配列番号 26

Raquel 10:
RTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRACTAGTGACCG
TGCCGGATCAAGTGCATGACGGTAGTATTCTTGTTCT

配列番号 27

Raquel 15:
RTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATT
TTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRACTAGTGACCGTGCCGGATCAAGTGCATGACGGTAGTATTCTTGTTCT

30

QingXia:

配列番号 28

QingXia 5:
RTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRAGGCAAGTTCAGTGCCAGGACGATCTTCTATTGTCGGTGAGGTGTA
A

配列番号 29

QingXia 10:
RTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRAGGCAAGTTC
GTGCCAGGACGATCTTCTATTGTCGGTGAGGTGTAA

40

配列番号 30

QingXia 15:
RTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRATT
TTRTATTTTTRTATTTTTRTATTTTTRAGGCAAGTTCAGTGCCAGGACGATCTTCTATTGTCGGTGAGGTGTAA

配列番号 37 R25_810: AGAAGTATCGTTCCGATCTAACGCG

配列番号 38 R25_998: ACGCTATTACGATTACGACGTGCGA

配列番号 39 R25_1486: TACGATCGCATCGAGTCGCAGATAT

配列番号 40 R25_1426: CGCACGCATAGTTAGTCGGATATAC

配列番号 41 R30_587: CTAGCTCCGATCCGTGATAACGTGC

配列番号 42 R30_927: ATGTTACGACCGGCGATCTTATACG

配列番号 43 R30_1: (GTACATCCTCCGGTTGCGAATATAGCGAAC)

10

20

【 0 1 1 6 】

ハプテン標識化 L N A 検出プローブでの使用に適した配列：

配列番号 44 SSophia 1 CTAGATCTCTCGAGACATGC

配列番号 45 SSophia 2 TTCTAGATCTCTCGAGACATGCACA

【 0 1 1 7 】

実施例 5

一本鎖 DNA ポリタグプローブを用いた検出

A) 一本鎖 DNA ポリタグプローブの構築

この実施例では、細胞又は組織中の核酸標的を検出するためのポリタグシステムのアプリケーションを説明する。固有配列の 5 つのコピーの直接反復（配列 K K 5）が、ヒトゲノムに有意な配列相同性を持たずに化学的に合成された。ポリタグ K K は、プラスミドベクター p u c 1 9 にクローニングされ、クローンの配列は配列決定により確認された。K K 5 を重複させることによる 1 0 コピーの直接反復型が、標準的な分子生物学的技術を用いて構築された。

【 0 1 1 8 】

ヒトの P T E N 遺伝子が目的とする遺伝子として選択され、イントロン配列のみが、P C R プライマーの設計および増幅のために選択された。全ては設計されたプライマー（プライマー配列と対応する P C R アンプリコン配列は以下に一覧される）を持つ約 2 0 0 塩基対である、3 6 の DNA 断片が増幅された。リン酸基を T 4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて DNA 断片の 5 ' 末端に付加した後、DNA 断片がアガロースゲルから精製された。P T E N P C R 断片は、制限酵素 S m a I で直線化した K K 5 又は K K 1 0 配列と T 4 DNA リガーゼにより連結された。一本鎖 DNA、P T E N ポリタグプローブは、1) 鋳型としての連結産物とともに、K K 配列（K K 5 R p）に相補的である一つの共通 5' リン酸化プライマーを有する（P T E N P C R 断片を生成するために以前使用された）P T E N 特異的順方向プライマーと一緒に連結された、K K 5 又は K K 1 0 配列を持つ

30

40

50

P T E N断片のP C R増幅、2) 酵素が好ましくは、5'リン酸基を持つD N A鎖を分解するゆえの、P T E Nに対する一本鎖D N Aポリタグプローブを生成したP C R断片のラムダエキソヌクレアーゼ処理、により作成された。

【0119】

B) 目的の核酸標的の検出のためのポリタグssDNAプローブの使用の例。

この例において、P T E NポリタグssDNAプローブ(プローブ)がパラフィン包埋組織スライド上のヒト細胞由来のその標的を検出するために用いられた: 36のP T E N P C R断片のうち30(P T E N P C R配列リストの番号1-30)がこの例において用いられた。組織は、脱パラフィンされ、水和され、ハイブリダイズされた。ハイブリダイゼーションは、6時間45で行われ、ブロッキングD N Aは使用されなかった。2 x S S Cによるポストプローブハイブリダイゼーション洗浄が72で8分間行われ、合計3回繰り返した。K K検出オリゴハイブリダイゼーション及び洗浄についての手順は、1) 55で8分間変性させ; 2) 45で1時間ハイブリダイゼーションし; 3) 45で3回、2 x S S Cで洗浄する。S I S Hによるシグナルの検出は公開されている。5つのコピーのポリタグと10コピーのポリタグプローブは明瞭で強いシグナルを与えた。5つのコピーについての結果は図5 aを、10コピーについての結果は図5 bを参照。検出手順は、ベンタナ・メディカル・システムズのB e n c h M a r k X Tプラットフォーム上で自動化され、そして、それは手動検出システム並びに、他の半自動または全自動検出システムに普遍的に適応する必要がある。

10

【0120】

ポリタグ設計の変形として、30から80ヌクレオチド長のユニークなアダプター配列の1コピーが標的核酸(ポリタグ配列とは異なるもの)に結合された; ポリタグ増幅器(ポリタグ+アダプター配列と相補的なアダプター配列領域)を、次に標的配列にハイブリダイズさせる。具体的には、ハイブリダイゼーションは、標的核酸プローブ上のアダプター配列とポリタグプローブ上のアダプター配列領域との間で起きる。この設計はパラフィン包埋ヒト組織スライド上でP T E N遺伝子を検出するために使用された。一本鎖ポリタグ増幅器が構築され、P C R増幅によるアダプターがタグ付けされた遺伝子特異的な一本鎖D N Aプローブが構築され、(A)で説明したように、適切なテンプレートとプライマーを用いたラムダエキソヌクレアーゼ処理が続いた。

20

【0121】

組織は、脱パラフィンされ、水和され、そしてハイブリダイズされた。ハイブリダイゼーションは、6時間45で行われ、ブロッキングD N Aは使用されなかった。2 x S S Cによるポストプローブハイブリダイゼーション洗浄が72で8分間行われ、合計3回繰り返した。ポリタグ増幅器のハイブリダイゼーションおよび洗浄の手順は、プローブに対するものと似ているが、わずか1時間のハイブリダイゼーションの時間である。K K検出オリゴハイブリダイゼーション及び洗浄についての手順は、1) 55で8分間変性させ; 2) 45で1時間ハイブリダイゼーションし; 3) 45で3回、2 x S S Cで洗浄する。S I S Hによるシグナルの検出は公開されている。ポリタグプローブ(10コピー)は明瞭で強いシグナルを与えた。図6を参照。検出手順は、ベンタナ・メディカル・システムズのB e n c h M a r k X Tプラットフォーム上で自動化されたが、それは手

30

40

【0122】

C) 核酸配列

ポリタグ KK5 配列 (配列番号 46):

5' TCCGTGATAACGTGCGATATCTAGCTCCGATCCGTGATAACGTGCGATATCTAGCTCACGTCCGTG
ATAACGTGCGATATCTAGCTCCACTCCGTGATAACGTGCGATATCTAGCTCGACTCCGTGATAACGTG
CGATATCTAGCTCCTG

KK 検出オリゴ配列 (配列番号 47):

5' XTATTTTXTATTTTXTATTTTXTATTTTXTATTTTXTATTTTXTATTTTXTATTTTXTATTTTXTA 10
TTTTXTATTTTXTATTTTXTATTTTXTATTTTXTGAGCTAGATATCGCACGTTATCACGGA

[Xは、ハプテン2,4-ジニトロフェノール(DNP)を示す。].

KK5Rp (配列番号 48):

5' [Phos]TGCCTGCAGGTCGACAGGAGCTAG

アダプター配列 A (配列番号 49):

ACCGTCTCGATTACCGAGAGTGCGCTGAACCGGAATGTACGATCAATTAGGCGTCGTCCGATCGTAGA 20
TTACTAACTGCT

ヒト PTEN PCR 配列番号 1 to 36:>PTEN-PCR01 (配列番号 50)

GGCTGCTCCTCTTTACCTTTCTGTCACTCTCTTAGAACGTGGGAGTAGAC
GGATGCGAAAATGTCCGTAGTTTGGGTGACTATAACATTTAACCCCTGGTC
AGGTTGCTAGGTCATATATTTTGTGTTTCTTTCTGTGTATTCAACCTAG
GGTGTGTTTGGCTAGACGGAACCTTGCCTGGTTGCAAGTGTCAAGCCAC
CGATTG

10

>PTEN-PCR02 (配列番号 51)

ATTGCTGCTCACCGTTTTTAGGTTTCAGGTCCTCTGACACCTTTTGGTAT
CGTTAATTTTACTGATTTGTGTAGAATGTCAGTTGTATTTTACCAGCTAA
TATCTAGAAATGCTGGCAAGAGGGGTTTACTCCAGCTTTAGATTGTAGGT
ATGTTAGCTTTTTTTCATACAGTGTATTAATTTACTGAGTCAGCTTGCTG
AATAAGACAGAAGCCCA

20

>PTEN-PCR03 (配列番号 52)

GGGCTTCAAAGTTAGTGGTCATCGAAAAGCATTAAATCTTTGCAGTTTCA
GGTACAACACATGGTTTTGTATTAGGGATGGGGATGGGGCCCTCTTTTTG
CAGAAATGGGGAAAGTATTGACAGGAATTGAGAGCTATTGGTAGGCCAGTG
TATAAGGTATGTGAAAACAGAATTAAGTTATTGGTCTGAAGTACTGAAG
CA

30

>PTEN-PCR04 (配列番号 53)

AGCGTATGTTGGTCTCTACACATGAAATTTGTGTGACTTAAAACCTTCTC
TAAAACGTACTTTTAGTTATGATATGCATAGAAAGCAGTATCAAATATT
GCGTCAAATGACTAATAACACTTAATTTCTAGAGTTGTGGTTTTATTGAG
CCAAAAGTTGATATGAAAAAAGTCAGTAAGGAAAGTCAGTGAAGTGCTT
GC

>PTEN-PCR05 (配列番号 54)

TTGCTGCCAGTGTAAGTTTTGCACAGCAGTATAGTCATCAATGCAGATT
TACATTGCTTATAATACTAAGTAAATACTAAATGATTAAAGATAATAA
AATATGGTGAGGTATAACCACCTTCATTTTAACTTAGTTTTAGAAGATA
GTAAAGAAAGATTCCTTTATTACCTTTTTTAGAATTTTATTTTAAATAACA
TGGGAAAGGCAACTGGT

40

>PTEN-PCR06 (配列番号 55)

AATTTGTGAGACTGGGGTCAGTCAGTTCTGTTTTACAATTGCTTTCTATT
TGGTAGCTTTGAAATTAATTTAGTTGCTTATCAGAGAGAATAATGTTGAG
GTTAGACTAACCTTAAATTGGTAAGGCTTTGCTGAGCAAAGTATAACTG
TAAGTCTTTTATAGGGTGCATTACTGCCACATATACGTTCTTCCATAGGT
GGTT

10

>PTEN-PCR07 (配列番号 56)

TGGTCCATGTCTAGGTTGTAGAATTGAATTGTGCATTTTGGCATCTGAGC
ACAGCTGAGTTTTCTAAATCAATCTCTCCTTGCACCTAGTTTTTGCTT
TAGATCACTACCTAAGACTTACTGTTGATTTAATATTAGAGCACTTAAGC
ATAGCTTTGACTTTTATTTTCTTTGATTTTGTAGATTTTTCAGGCTGAAG
TACAATAAGGTTCTC

>PTEN-PCR08 (配列番号 57)

AAATCCCTCTCTTTGTGAGACTTCTTTTTGAGTATTCTGGTACTCTAA
ACTGATTGGAGATGAAATTAGATAGAATTGAAAAGTACTTTTAAAATG
AAATTTGGGGATGTCATTAAGCTTGATTTTTTAGGTTTTTTTTTAGTG
TGTATTATAAATTATTTTACACTGATTGTCAGCGATAAAATGGAATGCCT

20

>PTEN-PCR09 (配列番号 58)

AAAATCAGTACCTTTGCCCCAGGTGTGATATTTAAGAAGGTCAACTTAC
TAAATCAGTGATGGAGTTAGTCCTAACATCTGGGTGTTCTGACTGCTGCT
AGGCCAGTATTCTTTATATGATAATAAGAACTTTGTCCACAGAAGATATC
CCTAATAACAAAAAGGTTTATTTGAAGAGGACTCATGTGTTCTTTGGCT
GATTGTGAAAGTGTGCT

30

>PTEN-PCR10 (配列番号 59)

AGTTGTTGAACTGTTGGGAGTTACTTTTCTTACTATTTTGTATTTAA
TGTATTCTTTGACCTTATGCTTTTTTATTCTAAAGCTGCTTTTATTATAG
TCAGATATGATGAAGTTAAATGTACAATGTAAAATTGCAAATTTCCAACG
AGCTATACAACTTAAATATTTCTAAGTAAAGAAAATAGGGCTGACTCTA
AGGTTCTTTG

40

>PTEN-PCR11 (配列番号 60)

TAGGTTAGCCCAGAGATGGGAAGATGCCAAGAAGGTAGCTTTAGTGGATT
CTGAATTTTTTGGTTTTGTTTTGTTTTTAGGGCAGGCAAATGTAATTACA
AAAGGGTTCTAGGAATAGATTGCTGTGATTTTTTTTTCTGTTTGCATGATT
TTACAGTTTGCTTTGCCTCTCACTTTTGAATGCAGAATAAAATGTCAAGG
CC

10

>PTEN-PCR12 (配列番号 61)

TGCACTTTGTCTGTTGCCTTAATTAATGGTGAAATCATCAGAAATATTTA
TTTTCCATACTTATACATTTATTAAGCTTGTTCATTTTTTTATTTTG
TGATTTTTTAAGTGGATTTAAGATAACCTAAACATTAGAGAGGATTTTCA
TGGTTTTGATTCATGAAATCATAATGTTATACAAACCTAACTGAAGTGTT
AGAGCC

>PTEN-PCR13 (配列番号 62)

TGGCTGAGAACTAAAGATTGTGTAATAAACGCCTGGCCTTCAGTCATTTG
GTTTTTTTTTCCCTCGATTGTTTGGATAGTAACTGGACATCATGTTTT
AACTTGAGAAATTAAGTTATACAAGATTTTGATATTTTAACTAGTTTTC
CTAACTGGTTGAGATATATAAGAATTTAGTATTACAGGACTCAATCAGGG
AACTG

20

>PTEN-PCR14 (配列番号 63)

GGTGAGAACTGAATTGGAGGCTATGAAAAAATACCTTTTGGGCCTTTCT
GAATAGACATATATACATAAATTATATCTCTTACATTAAGTGAGGCACAT
ATGTAGGTGAGATTTTTACCTGAATATTAAGTTTAAAGTCGTTACCT
ATTCTGTTTACTTAATAGTATTTAAAGGGTGTGAGAGGTGTTATGTGTTT
CTGTCCCT

30

>PTEN-PCR15 (配列番号 64)

GGTTAATCACCTCTGGCAAATAAATGATAAAAGCATAGCTTTTGTAAAGC
AGAATGATATTACAGAAGTTAACTTATAAATCTAAGTGTATTAAAGACAC
TTAGGAAATTTATGATAATGCTGGGTCAGCATTACAGTTTTAACTTTTTA
CAGTTTTTCATATGCTTTTTTTGTGATTTTGTGTAGAAAATTAACAGTT
GGCATTGGCTTAGTT

40

>PTEN-PCR16 (配列番号 65)

TGTTGCCAAATGAACGAGTTTGTAGTATTGCTAACAAGGAGAAGAATTAC
TAGCAAGTCTTGATGTTACTTTTGAAGAGTGTGATGATTGCATTTAGGAA
GATATCTAAACTTCTGTTTCAAAGCAAAAAGTATGTGCAAATTTCTTACT
CATGACAAATTCATATAATATAAAAACATGAAAGTTGTGAGGTCAGGTTG
TTTGGA

10

>PTEN-PCR17 (配列番号 66)

TGCTCACAAGAACCCTAACTGTGTGTTACTTGAAAGCACTGATGGAAATC
AGGGAAAAAGCTCCAGAAGTTCTACGAAATAAAATTAATGATAAAGTC
CTGGTATCTGCTAACTTGCCTTCCATTCCCTGTTATCTTTTCTTCTTAGTC
TGACTTCATTAATTCTTTCACCCTGGCTACTGGTTTAGCTCAGTGTTTTA
TGAGCCAGGCAG

>PTEN-PCR18 (配列番号 67)

AGGAAGGTGAGAATCTGAAGAAAATGAAACCTTAAAAAGATTGAATTCCT
GGACTCCATTTAAAGGAGTAAATAGCTCACGAACAAGACTTGCTGCTCTG
CAAAGTCTTCCATGTTGATCCTGGTCTTTGACTCCTTATCTGTCTGATTA
AATTGAATTCGCTGCCGTGGCATCCTTAAAGCTGGACCTTACTTTGTCAG
TCCTGCCT

20

>PTEN-PCR19 (配列番号 68)

AGTGCAGTAAAAGTGCAGTGTCCAAATAGCCCTTGTAACAAAACCTTTCT
CTTTCTCCTGGGTGCCAATTTGACATTTAATCAGTTTTGTTTCTAGCAGT
GTTCAATTTATTAGATTATAAGTCTTTTTTTTTCTTTATATTATTCTAAGA
TCAAAAATATATAAAGATATACACAGGAGTCCTGCTGCTACCTGTTCTTG

30

>PTEN-PCR20 (配列番号 69)

CTTGTCTTTTCAGGCAGGTGTCAATTTTGGGGTTTTGTTTTGATTTTTGG
TTTTTGACATAAAGTACTTTAGTTCTGTGATGTATAAACCGTGAGTTTCT
GTTTTTCTCATATACCTGAATACTGTCCATGTGGAAGTTACCTTTTATCT
TTACCAGTATTAACACATAAATGGTTATAACATAAATACATTGACCACCTT
TTATTACTCCAGCT

40

>PTEN-PCR21 (配列番号 70)

TGATGGGAACAGCAGGTTGATATAGCTTGTGATAACACTTCTAAAGAAAA
AGCAATGAGCCATAGAAAAAGAAAAAGATACATTTTGAATTAAGGAAGA
TGGTGAATCTGGGAAGTGAGCAGTACAGTCACCAGACGTGTATCCTCTCC
TATGGTACAGAAGTGTTTATTGGGTCTCTTTATGGCCTGCATGATATATC
CCACAAGATGACCTACTTCA

10

>PTEN-PCR22 (配列番号 71)

ACCTTTATGCCTCTGAAGGAAAAGATTTATACATTCAGCTTGTAATTAGT
AATCAAGACTGAGGTTTAGTCTATCTAGCTTCACAATCTATCTAGTTTGT
TTTGTCTAGCCATATGATTTCTTCAAATATGCCATTTCTTAAAAAAAAT
GTTTTATGTATCCCGATTAATATTTAGCCAGTGGTTCTTTTAGCCGATGG
ATCTTGTCACCTCTT

20

>PTEN-PCR23 (配列番号 72)

TTTTGATTGGGGATAAATTGGCCAATAAAGCTTTGATAGCCTCTATTGCC
CAGGCCCTCCTCTTCTTTTATGAGAGAAAGGATGAACAGTGACCAGAAA
TAAAGGTATTGTTTTTTCTATCAACTAAAATGGAAATAAATAATTCCTA
AGTAATTTGCCTGTTAGGATTAAGTCTCCAAGAGAATGGCTGTGCCTAG
TACCTAAGTG

>PTEN-PCR24 (配列番号 73)

ACTTCTCCTTTTGAGGTTACCGCTACGATTGGGAATTAATGTAAAAAAT
AAGCCAAAAGAAAGTGAGGGAAAAGTGAACCAAGCTGTAATTTTTTTACT
CTTTTTTATTGTTGTTGTTATTGTTGCTGTTTTTTACTATCTTGATTGCA
ACAGTTTGGCTTATATATATAGCATTGGAATTGACAGTAAGAAAGCCAC

30

>PTEN-PCR25 (配列番号 74)

TGCTTTTCCTTCCCTAATCCCTCAGGGGTGGGATAGAGAGCACAGTGGCC
TCCCAGGGAGGTAGAAGCTGCTCCAGACTAACAATCAGAGCTGCCAGTTC
TTAATCCCCAAGACCGCCAGACTTCACAAAGACATACCGAGGTCTGTGCT
GTCAGTGCCCCACTACTACTCCCTTAAGTAGCCCCACATTCTTGTGCT
TGTTT

40

>PTEN-PCR26 (配列番号 75)

GATATTTTGCAGCATGTGAAGCTTTTTAAAAAGTTAGGCTTATTGAAGTA
TAATTTACACACAAAGTACAAAAAAGACTGTGTTCTCAAATCTGT
GAGTCATTAATGGGTTTAGATGTTTATATATTGAAATTATTGGAAGTAAG
GTATGTTTATATTAGAAAGATTTGTAGTCTAGATTATCCAAGTTTTGGGA
GTATTACCTCTCTGCT

>PTEN-PCR27 (配列番号 76)

TTTTCCGCCTTCCATTGTGTCAGACTTATAAGGCAATCAGCCAACTGTG
GGCATGAAATCCTTGGGAGGAAAGAGAAGGAAGTGGGAGGGGCAGCCATG
GTGAATGTTTCCCTAAGTTATAGTCAAGTTCTTTGAGAGAACATAACCTC
ATCCCCTTTTTAAACTGTTGTAATACTTTCTTTTAAATAGATTGTTTATT
CTCCTGCAAGTCTCACAGTT

10

>PTEN-PCR28 (配列番号 77)

AATCTCTGACTCTCCTGTACCTTGTCCCTCACTAGGATTCGGTATCCACGG
CAAAAAGATCTATTAATAGTTGGTATCAGGCCTGTACATGTGTTAAGAGA
AAGATGAGGAAAGAAGTATCTGCTTCTAATCTCTTGAAATTATCTCCAAA
TTGAAATGGTATTTTGGTTGCCTAACAGCCTGAAGATGACAAATATCCCC

20

>PTEN-PCR29 (配列番号 78)

GGTTCTCTTTGTTAAAGCAGGCATTTTTTCAGATTTGTCTTTTGTCCCTAGG
GCATGGTTTTTAACTTCAAGGTTGCCCTTTCCAATGTCTCAGCTAAGTAT
CTGGGGTGTTCCATGAGGTCTCTTCCACTTTGCCTAGGCCAGAACTCCAG
CTTCTCCCAGTATTATATTTTCGTTACCTCTGGCGTCATCTCCGTTATGCT
TTCAGATCCTGC

30

>PTEN-PCR30 (配列番号 79)

TGTTGGCACAGATTCATGTTACTTGATCTGCTTTAAATGACTTGGCATCT
AGCCCATATTTGAGCCATAACCGTGTGGTAATTTGAAGTGTAATTCACA
GTAGAGCTTCTGTTAAAGCACTAATAGCATCTTCCATGGAGGTATACTTC
AGAGTGAATATAATTTGTTTATCCTGTGTCTCTAGAGCTATTGACTGAA
AAAGCTG

40

>PTEN-PCR31 (配列番号 80)

AGAGTTTTAAGGACTGCCCACCTGATTGATAGAGCTAGTTGACCTTATCT
TTAACTTTTTGTTTTTCTTTTGACTTTGGGAGTAGAGATGTGAAAAGGTA
AAAAGGAAGGAAGGAAGAGAAAACCTAACTCTTTTTGCCCATGAAGACTG
TTTTTCCTTCTCAAAATATTGACTATTTTCTGATTTGTAAAAATCGGCAC
ATAAAACGTGT

10

>PTEN-PCR32 (配列番号 81)

AGGGGTCTTTCTCTTTTCTGATAAACCTCTCCTACAAAGAGCCTTGTTG
CGGATACCATAGTGTTTCTTTGGAGGAAAATAAAAACCTACAAAGCTTTGT
ATTTTTTGCACAACCTGGATTCAGAATATAAGTAATAAAAAAGGACAAGAA
CTTTCAAAAGCTAGAAGCCATTAACTGAGTCACTTCAGGGTTAGACTAT
CAGAACTGGG

>PTEN-PCR33 (配列番号 82)

AGGACACCAAAGACAAATTCGGCCTTTTTCAAATTTTATTCTAGTTTAA
CATATTCAAAGAAAGGGAAGGAAATTCTTTTCAATTCCTGTGTGTAGTGAC
TTCCTGCTTTAAGAACCTTAGGACTTCAGCTGTACTATCAGTATTGTAGGC
CACTTAACATTATTATGGTTAAAGTTGGCATTGGAGAGAGCCTAGGAACC
TAACTGCCTGTTTGT

20

>PTEN-PCR34 (配列番号 83)

GACCATCCACTGTTTATGCCAATATTCCCTTACGTTTTGCTTTTTTGCT
TGTTTCGTTTTAACCTCTCAAATTTTACTGACTTCAGAAGTTTCTAGAAC
TAAGTTATAGCATGTTTTGAGTTCTAATGTCACCTTCCGATCTTCTTTAC
CTTTTTTCTACCTCTGTTTGTATTTCTGGTTCTGGTTAAGTGAGTCTGGT
AAGCAGCAG

30

>PTEN-PCR35 (配列番号 84)

GAGACTTATCACTACCAAACCACAAAGAATTTAAAAGAAACTGTCAGTAG
 GTATAGGTGGAAGGAGGGCATTATCAGAGATTTTAATTTAAGAAGAAAG
 TCTTCATCCTTATCCTACCAACCCCATTCCTGAGCATATTTATCATT
 CTAGTCCCAGCATATTTGCTCCCATATTTCTATGCTTACCTGTGAAGAT

>PTEN-PCR36 (配列番号 85)

CATTACTTCCACTTTCCGTCCATATAGTCCTCTTAACAGTAATATTTGAG
 AGGCATTTTTATTAAAGCAGTCTTAAGGAGTGTTCGTCAAACCACATGTT
 CTGGGATCCTGAGAAAGTAGGGGAAGTTTAGAGAACTGAAGCTGCACAAA
 ACTAATGTTTATTTTCTGTTGTGTTGTCCTGAGACCAGCTTCTTAGATTG
 TGT

10

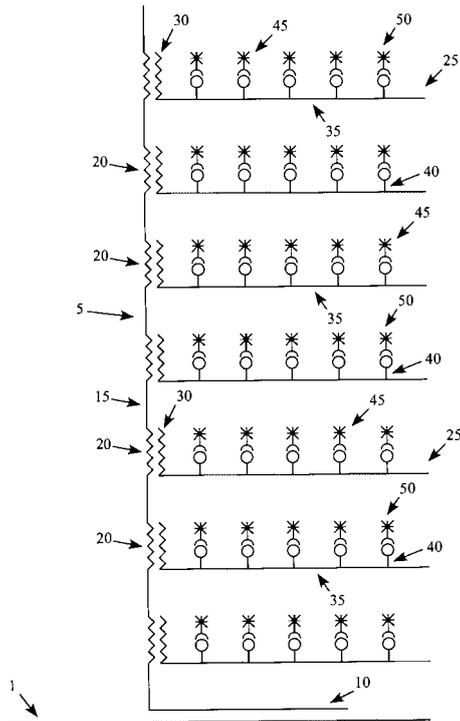
【 0 1 2 3 】

上記の明細書に記載されている全ての刊行物および特許は、参照により本明細書に援用される。本発明の記載された方法及びシステムの様々な変更及び変形は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、当業者には明らかであろう。本発明は特定の好ましい実施態様に関連して説明されてきたが、請求された発明が不当にそのような特定の実施態様に限定されるべきではないことを理解すべきである。実際に、関連する分野の当業者に明らかである本発明を実施するための記載された方法の様々な変更は、以下の特許請求の範囲内にあるものとする。

20

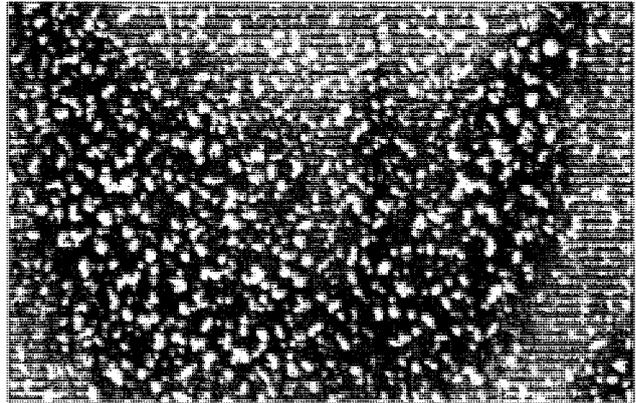
【 図 1 】

図1



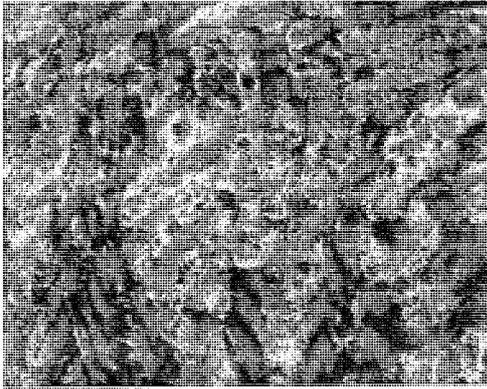
【 図 2 】

図2

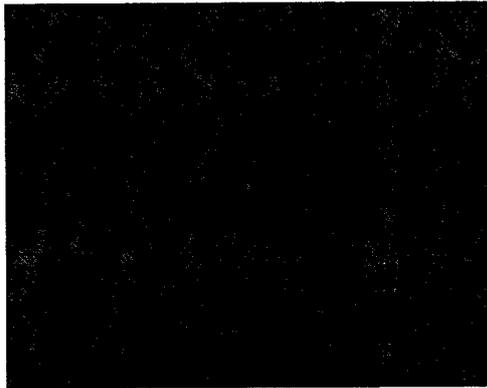


【 図 3 】

図3

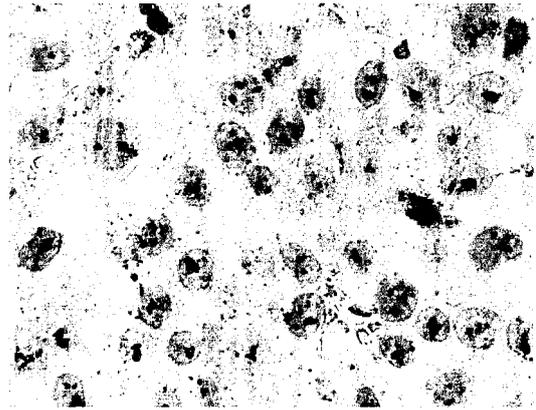


3b



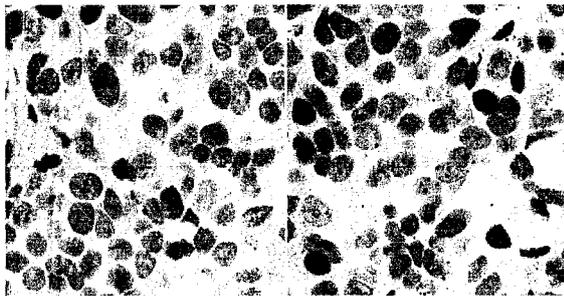
【 図 4 】

図4



【 図 5 】

図5

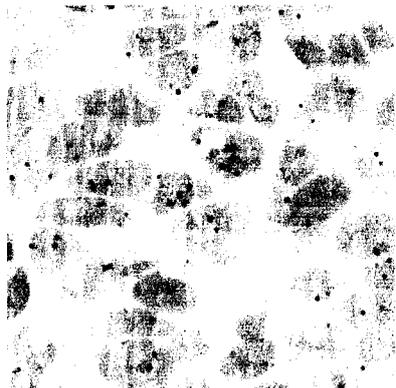


5a

5b

【 図 6 】

図6



【配列表】

2015163072000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年4月17日(2015.4.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

第一の標的核酸配列の検出のためのシステムにおいて、

前記第一の標的核酸配列に相補的な核酸配列を含む第一の標的プローブ部分、及び少なくとも一つの検出プローブ核酸配列に相補的であって、前記標的核酸配列に非相補的である、複数の第一の検出標的配列を含む第一の検出標的部分、

を含む第一の核酸分子、及び

前記第一の核酸分子の前記検出標的部分中の前記検出標的配列に相補的である第一の検出プローブ部分と、

前記検出プローブ部分の5'又は3'の何れかに少なくとも一つの第一の検出可能な部分を含む第一の検出可能な成分部分

を含む第二の核酸分子とを含むシステム。

【請求項2】

前記第二の核酸分子の前記検出可能な成分部分が、複数の検出可能な部分を含み、前記検出可能な部分が核酸分子に組み込まれている、請求項1に記載のシステム。

【請求項3】

前記検出可能な部分が、シグナル発生部分及び一对の結合部分の第一のメンバーからなる群から選択される、請求項2に記載のシステム。

【請求項4】

前記第二の核酸分子が、少なくとも5つの検出可能な部分を含む、請求項1に記載のシステム。

【請求項5】

一对の結合部分の前記第一のメンバーに結合する特異的結合剤を更に含み、前記特異的結合剤が、一对の結合部分の前記第一のメンバーに結合し、シグナル発生部分を含む特異的結合部分を含む、請求項3に記載のシステム。

【請求項6】

前記標的核酸配列が、第一の一次プローブ配列の一部であり、前記第一の一次プローブ配列が、細胞の標的核酸配列に相補的な部分と、前記細胞の標的核酸配列に相補的ではないアダプター部分を含み、前記核酸分子の前記標的プローブ部分が前記アダプター部分に相補的である、請求項1に記載のシステム。

【請求項7】

少なくとも第三及び第四の核酸分子を更に含み、

該第三の核酸分子が、

第二の標的核酸配列に相補的な核酸配列を含む第二の標的プローブ部分、及び

少なくとも一つの検出プローブ核酸配列に相補的であって、前記標的核酸配列に非相補的である、複数の第二の検出配列を含む第二の検出標的部分を含み、及び

該第四の核酸分子が、

前記第三の核酸分子の前記第二の検出標的部分中の前記第二の検出配列に相補的である第二の検出プローブ部分、及び

前記検出プローブ部分の5'又は3'の何れかに少なくとも一つの第二の検出可能な部分を含む第二の検出可能な成分部分

を含む、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 8】

前記第二の標的核酸配列が、第二の一次プローブ配列の一部であり、前記第二の一次プローブ配列が、細胞の標的核酸配列に相補的な部分と、前記細胞の標的核酸配列に相補的ではないアダプター部分を含み、前記核酸分子の前記標的プローブ部分が前記アダプター部分に相補的である、請求項 7 に記載のシステム。

フロントページの続き

(72)発明者 ジャン, ジュー

アメリカ合衆国 アリゾナ 8 5 7 3 7, ツーソン, エヌ. シルバー フェザント ループ
1 1 3 3 5

(72)発明者 デイ, ジェイアール., ウィリアム エー.

アメリカ合衆国 アリゾナ 8 5 7 0 4, ツーソン, イー. チョラ エステート ドライブ
1 9 5 2

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 CA11 HA12

4B063 QA08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR56 QS32 QX02

【外国語明細書】
2015163072000001.pdf