

(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2004-69713

(P2004-69713A)

(43) 公開日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 2GO45
C 1 2 N 15/09	GO 1 N 33/53	M 4BO24
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 4BO63
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/566	
GO 1 N 33/58	GO 1 N 33/58 Z N A A	

審査請求 有 請求項の数 2 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-311216 (P2003-311216)	(71) 出願人	503320533
(22) 出願日	平成15年9月3日 (2003.9.3)		アールピー・テクノロジーズ・インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願平6-513274の分割		R-P TECHNOLOGIES, INC.
原出願日	平成5年11月23日 (1993.11.23)		アメリカ合衆国ウィスコンシン州53744-5285、マディソン、ピー・オー・ボックス45285
(31) 優先権主張番号	07/980, 283	(71) 出願人	503320522
(32) 優先日	平成4年11月23日 (1992.11.23)		キャサリン・エイ・ロイヤー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		Catherine A. ROYER
			アメリカ合衆国ウィスコンシン州53705、マディソン、ヒリントン・ウェイ424番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的なDNA結合タンパクの量および機能に関する臨床診断用のキット

(57) 【要約】

【課題】 特異的なDNA結合タンパクの量および機能に関する臨床診断用のキットの提供。

【解決手段】 蛍光標識されたオリゴヌクレオチドおよび容器からなることを特徴とする、特異的なDNA結合タンパクの量および機能に関する臨床診断用のキット。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

特異的な DNA 結合タンパクの量および機能に関する臨床診断用のキットであって、蛍光標識されたオリゴヌクレオチドおよび容器からなることを特徴とするキット。

【請求項 2】

前記オリゴヌクレオチドが配列 5'-GGTCACTGTGACC-3'を有する請求項 1 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標識した巨大分子からの蛍光発光の偏光の測定を用いる該標識巨大分子の第二の巨大分子への結合を評価することに関する。すなわち、本発明は、そのような結合を定量的に測定する分析方法に向けられている。本発明はまた、蛍光偏光の測定を用いる結合分析を行う装置にも向けられている。

10

【背景技術】

【0002】

巨大分子の分析において標識オリゴヌクレオチドをプローブとして使用することは分子生物学における重要な技術である。オリゴヌクレオチドは、ラジオアイソトープ、酵素または蛍光分子で標識されてきた。

【0003】

オリゴヌクレオチドが比較的 low molecular weight であり、また、それらの自動化合成用の機器化の利用性が普及した故に、オリゴヌクレオチドは、しばしば、それらが会合できる巨大分子類の検出、定量評価のためのプロット - ハイブリダイゼーション操作またはゲル遅延 (gel-retardation) 分析に使用されている。これらの巨大分子類は、蛋白、RNA 分子または DNA 分子のいずれであってもよい。

20

【0004】

標準的なプロット - ハイブリダイゼーション操作において、標的巨大分子はゲル・マトリックス、一般的には、アガロースまたはポリアクリルアミド中で電気泳動により分離される。ついで、ゲル・マトリックス中のその相対的空間位置を保持するような方法で膜に移され、それを膜に安定に固定する。別法として、巨大分子は、あらかじめ電気泳動することなく、膜に付着させることができる。膜上での巨大分子の存在は、それに標識オリゴヌクレオチドを結合させ、その複合体をオートラジオグラフィに付すか、オリゴヌクレオチドがラジオアイソトープで標識されている場合は、シンチレーション計数することにより測定される。

30

【0005】

標準的なゲル遅延分析法において、ラジオアイソトープまたは他の検出できる基 (moiety) で標識されたオリゴヌクレオチドは、一般的には、アガロースまたはポリアクリルアミド製のゲル・マトリックス中で、非変性条件下、電気泳動に付される。標識オリゴヌクレオチドは、また、該オリゴヌクレオチドと結合できる蛋白と会合し、その混合物が、一般的には隣のレーンでゲル上の電気泳動に付され、非会合オリゴヌクレオチドと対比される。その高分子量および少ない陰性帯電故に、蛋白は非会合オリゴヌクレオチドよりもゲル中にて低い移動度を示す。オリゴヌクレオチドが蛋白と安定な複合体を形成する場合も、非会合オリゴヌクレオチドよりも低い移動度を示す。蛋白の存在下および非存在下におけるオリゴヌクレオチドの移動度を比較することにより、2つの分子間で複合体が形成されたか否かを定量的に測定できる。これらの基本的方法は、基本的遺伝子研究、遺伝子工学、医学および農学テストにおける非常に多くの種類の測定に使用されている。

40

【0006】

本発明は、オリゴヌクレオチドに共有的に結合した外因性発蛍光団の蛍光の偏光を測定することを特徴とする核酸と蛋白または他の巨大分子との間の複合体形成を検出し、定量する方法に関する。該オリゴヌクレオチドはオリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリ

50

ボヌクレオチドまたは両方のコポリマーであってよい。ヌクレオチド塩基は、主鎖と同様、誘導化できる。オリゴヌクレオチドは一本鎖、二本鎖または三本鎖であってよい。オリゴヌクレオチドの長さは特定の実験を行って決定されるが、好ましくは40残基長以下、さらに好ましくは25残基長以下、最も好ましくは8~10残基長以下である。

【0007】

発蛍光団は、標準的な自動化DNA合成技術および蛍光標識されたアミノ・リンカー化合物（例えば、カリフォルニア州、ラ・ジョーラ、クローンテック社（Clontech, Inc., La Jolla, CA）から入手可能）を用い、オリゴヌクレオチドのいずれの部位にも組み込むことができる。別法として、非標識アミノ・リンカー化合物を組み込んだ後、蛍光化合物で標識することができる。フルオレセイン、エオシン、クマリンおよびダンシル誘導体を包含する種々の発蛍光団が使用できる。オリゴヌクレオチドの短鎖周囲の高速旋光が、オリゴヌクレオチドに共有的に結合した該プローブの蛍光偏光の低い値をもたらす。この値は蛍光標識されたオリゴヌクレオチドを適当な波長の平面偏励起光で励起し、励起光の偏光面に対して平行および垂直平面で偏光された発光をモニターすることにより得られる。蛍光偏光は：

10

$$P = (I_H - I_L) / (I_H + I_L)$$

（式中、 I_H は、励起光の偏光面に平行な平面で偏光された発光強度であり、 I_L は励起光の偏光面に垂直な平面で偏光された発光強度である。）に従って計算される。

発光の異方性は、

$$2/3 [1 / (1 / p - 1 / 3)]$$

20

である。この値は総蛍光発光強度に関する未だ直線的な偏光に近似する。

【0008】

蛍光偏光は、薬物、ステロイドおよびその他の抗原の臨床検出用の一連の特許された検定の基礎となっている（特許文献1~9参照）。多くの変形があるが、これらの検定のいずれもが、目的とする薬物が検定溶液中に存在する場合の特異的または非特異的抗体との相互反応を変化させるときの、フルオレセインの蛍光偏光中の1つの大きな変化の観察に依存している。もし、薬物の存在が、例えば、フルオレセイン-抗体複合体の解離をもたらせば、蛍光偏光が大きな減少を示す。これらの検定の感度は10 pM以下である。ユリオス（Urios）とチッタノヴァ（Cittanova）は、蛍光偏光測定を行うため、抗体の蛍光標識したFabフラグメントの使用を記載している（非特許文献1参照）。彼等の検定の感度は2.5 μMである。蛍光標識オリゴヌクレオチド・プローブの使用はムラカミ（Murakami）らにより報告された（非特許文献2参照）。彼等の報告した感度は100 nMであった。ギードロック（Giedroc）らは一本鎖DNA分子の存在の評価において蛍光異方性を使用した（非特許文献3参照）。彼等の検定は2~8 μMのオリゴヌクレオチド濃度で行われた。

30

【特許文献1】米国特許第4269511号明細書

【特許文献2】米国特許第4516856号明細書

【特許文献3】米国特許第4585862号明細書

【特許文献4】米国特許第4668640号明細書

【特許文献5】米国特許第4784961号明細書

40

【特許文献6】米国特許第4902630号明細書

【特許文献7】米国特許第4952691号明細書

【特許文献8】米国特許第5066426号明細書

【特許文献9】欧州特許出願第8610202035.2号明細書

【非特許文献1】ユリオス,ピー（Urios, P）およびシタノヴァ,エヌ（Cittanova, N.）（1990）Anal. Bioc. 185 308-12

【非特許文献2】ムラカミ,エイ（Murakami, A.）, ナカウラ,エム（Nakaura, M.）, ナカツジ,ワイ（Nakatsuji, Y.）, ナガハラ,エス（Nagahara, S.）, トラン-コン,キュー（Tran-Cong, Q.）（1991）ヌークレイック・アシズ・リサーチ（Nucl. Acids Res.）, 19、4907-4912

50

【非特許文献3】ジエドロク, ディ・ピー (Giedroc, D.P.), カン, アール (Khan, R.) およびバーナート, ケイ (Barnhart, K.) (1991) バイオケミストリー (Biochem.) 30 8230-42

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、2の巨大分子の相互の結合が、プローブ部位からの蛍光発光の偏光を測定することによって液相で検出できる方法を提供することにある。好ましくは、該プローブを1の巨大分子に結合させ、蛍光偏光の増加によって結合を直接測定する。本発明の第2の目的は、非常に少量の試料にて蛍光偏光測定を定量的に行うことができるように、かかる測定を高感度で行うのに適した装置を提供することにある。該装置の好ましい具体例において、1フェムトモルもの少量の発蛍光団の蛍光発光の偏光の検出ができる。

10

【0010】

本発明の第3の目的は、第2のポリヌクレオチド、または別法として蛋白のいずれかに共有結合した発蛍光団からの発光の偏光を定量することによって、かかるポリヌクレオチド等へのポリヌクレオチドの結合を測定することに基づく診断方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、蛍光標識オリゴヌクレオチドと蛋白および核酸のごときもう1つの巨大分子との間の会合を迅速かつ正確に、溶液中で高感度をもって測定できる方法を提供する。特に、本発明は、オリゴヌクレオチドに共有結合した外因性蛍光プローブの蛍光の偏光を測定することによって、各々が非常に低濃度で、オリゴヌクレオチドと標的的巨大分子の間の複合体の形成(すなわち、安定で、特異的な非共有結合的会合)の検出に関する。蛍光偏光検出は、相互作用する巨大分子の不存在下で蛍光標識オリゴヌクレオチドの回転相関時間と比較して、蛋白または他の巨大分子がそれと複合体化した場合に回転粒子の大きさの増加の結果としての、オリゴヌクレオチドに共有結合したプローブの回転相関時間の増加に基づくものである。適当な装置を用いて、蛍光偏光の測定を非常に迅速に、通常5~10分のオーダーで行うことができる。対照的に、前記したプロットハイブリダイゼーションまたはゲル遅延分析は丸一日かかり、終了するのにしばしば非常に長くかかる。巨大分子分析における蛍光偏光測定の別の使用が記載されている(15-17)。しかしながら、これらの方法は、実際的な適用に有用な適度な感度を与えるものではない。生体巨大分子はしばしば極端に少量で見い出され、ナノモルレベル未満の分析感度を要する。本発明で記載する方法は、十分に必要とされる範囲内であり、他の報告されているものの少なくとも10,000倍大きい感度であるピコモルレベルで行う測定を可能とする。巨大分子分析の別の方法は、大いに定性的であり、従って、不正確である。本発明の方法は、より正確な定量的測定を与える。

20

30

【0012】

高感度、かくして、低濃度の相互作用分子の正確な定量分析に対する高いシグナル・ノイズ比が、Orientalの矩形ないし丸い溶融シリカ繊維の光学ケーブルを通して試料室に連絡したILC300ワットのキセノンアーク灯/ISAモノクロメーター励起源を用いて達成される。発光における交差したT-フォーマットにおける試料ホールダーに設けられかつ励起において平行の向きのフィルム偏光子が検出を10ピコモル限界まで可能にする。蛍光は励起源強度に比例するので、レーザー励起源を使用すると、感度が10ないし100倍となり、十分にピコモル下の範囲の試料濃度となることが予想される。

40

【0013】

その他いくつかの具体的な装置を用いることができる。図5および図6に例示するような、固定した偏光エレメントを用いるT字フォーマットを回転可能な発光偏光子を用いるL字フォーマットに変えることができる。レーザー照射手段の使用は、(レーザー光はその特性により平面偏光されているため)励起偏光子エレメントおよび励起光をフォーカス

50

するためのレンズの必要性を排除する。数種の波長に整調できるレーザー、例えば、ダイ・レーザーの使用は、本発明の検定にて蛍光標識として用いることができる化合物にてより大きな適応性を有する装置を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明の好ましい具体例は、図5および図6を参照することで認識できる蛍光発光の偏光の測定装置であって、

コリメーターレンズ(3)および励起フォーカスレンズ(4)を通して、光を収集し、試料チャンバー上に該光をフォーカスさせ、さらに第1の偏光手段を通して、照射手段(6)からの光を平面偏光させて試料チャンバー(7)を照射するように照射手段(1)が配置されており、該レンズおよび第1の偏光手段が該照射手段と該試料チャンバーを結ぶ線分上に取り付けられ、さらに該試料チャンバーが2つのさらなる偏光手段(8および8a)の間に取り付けられ、該偏光手段がそれらと試料チャンバーを含む線分が該照射手段から該試料チャンバーに至る光路に垂直であるように配置され、該偏光手段が該第2の偏光手段の偏光面が該第1の偏光手段の偏光面に平行であるように、さらに該第2の偏光手段の偏光面が該第3の偏光手段の偏光面に垂直であるように取り付けられる光の排除用筐体からなり、該筐体中に該試料チャンバーから該検出手段に至る該偏光手段を通過する光を収集し、定量するための検出手段(12および12a)が配置されている装置である。発光偏光子と検出手段の間に、発光偏光子から検出手段に至る狭範囲の波長の光を選択的に通過させるための発光フィルター(9、9a)および試料チャンバーから検出手段上に現れる光をフォーカスするための発光レンズ(10、10a)を挿入する。さらに、シャッター(11、11a)を発光レンズと検出手段の間に挿入して検出手段への入光を調整し、照射手段と試料室(図6の11b)の間に挿入し、試料室への入光を調整できる。別の仕切り室(13)にて、シャッターおよびモノクロメーター(monochromater)(設置されているならば)を駆動させるためのモーター、およびデータ収集および処理のための電気装置からなる付加的構成部分が収められている。

10

20

【0015】

別の好ましい具体例において、本発明は、図7および図8を参考にすることにより理解できる蛍光発光の偏光を測定するための装置であって、

光を排除する筐体と、その内部に配置された照射手段(1)、発光フィルター(7)および検出手段(11)とからなり、該照射手段(1)は、励起光を試料チャンバー上にフォーカスするための励起レンズ(3)を通し、さらには励起フィルター(4)を通して、かつ最後に固定された平面偏光手段を通して、試料チャンバー(6)を照射するように配置され、該励起フィルターが狭範囲の波長の光だけを通し、該平面偏光手段は該試料チャンバー(5)に入射する光を平面偏光させるものであり、エレメント3および4および5が、各々、該照射手段から該試料チャンバーに至る光路中に配置され、該試料チャンバーが回転可能な偏光手段(8)に対して相対的に取り付けられ、該回転可能な平面偏光手段が、該回転可能な平面偏光手段を通過する光を平面偏光させるためのものであり、該照射手段から該試料チャンバーを介して該回転可能な偏光手段に至る経路が試料チャンバーと頂点で直角を形成し、該発光フィルター(7)は試料チャンバーと該回転可能な平面偏光手段の間に挿入され、該発光フィルターが狭範囲の波長の光だけを通過させ、該検出手段(11)は該回転可能な偏光手段を介して該試料チャンバーから該検出手段に通過する光線量を収集して定量する装置を提供する。所望により、光源と励起レンズの間に特定波長の光を選択するためのモノクロメーター(2)を挿入し、試料チャンバーを照準してもよい。該発光偏光子と該検出手段の間に、該試料チャンバーから該検出手段中に入る光をフォーカスするための発光レンズ(9)、さらに光の該検出手段への入射を調整するための発光シャッター(10)を挿入する。所望により、該照射手段と該試料仕切り室の間に、該試料仕切り室に至る光の入射を調整するための励起シャッター(図8中、13)を挿入してもよい。該装置の他の構成部分は、別々に、発光偏光子を回転させるためのモーターならびにシャッターおよびモノクロメーターを制御するための電気装置およびモーターを

30

40

50

含め、データ処理のための電気装置を有する。

【0016】

図6および図8を参考にすることにより、光源がレーザーである場合、レーザー光は内方向に偏光されるため、励起偏光子が必要でないことが容易に認識できる。同様に、レーザー光はその特性により励起コリメーターおよびフォーカスレンズが不要である。

【0017】

当該分野における周知技法により、蛍光標識は巨大分子に共有結合させることができる。オリゴヌクレオチドプローブはその主鎖に沿って有機塩基の位置で標識されるか、またはいずれか末端で標識できる。オリゴヌクレオチドの発蛍光団での末端標識は、該発蛍光団のN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを、オリゴヌクレオチドの合成の間に生成されるオリゴヌクレオチドの5'-アミノ基に化学結合させることにより、またはオリゴヌクレオチドの合成にて発蛍光団で誘導されるホスホルアミダイト試薬を用いることにより行うことができる。オリゴヌクレオチドはまた、末端トランスフェラーゼを用いて蛍光標識したヌクレオチドと連結させることにより3'末端で標識できる。

10

【0018】

本発明は、蛋白、オリゴヌクレオチド、DNA、RNAおよび生物学的または合成の他の巨大分子の分析に有用であると考えられる。本発明に記載の技法は液相にて行われるため、該方法は、ポリヌクレオチドと他の巨大分子の間の複合体形成を促進するかまたは干渉する溶液のそれら変数、例えば、pH、塩濃度または共同因子の存在を同定するのに有用である。本明細書に記載の技法の感度は、複合体形成が1 μ Mより小さい巨大分子の濃度で分析できるものである。該検定は、1 μ Mの巨大分子の濃度で容易に実施でき、10~100 μ Mの範囲の濃度で行うことができる。

20

【0019】

フルオロセインに限定されるものではないが、エオシンおよびクマリンを包含する広範囲の発蛍光団を用いて標識したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いてもよい。発蛍光団の強度は本発明を限定しない。本発明は巨大分子の存在、定性または定量測定、または分子間の特異的変数もしくは定数の測定を包含し、蛍光標識したオリゴヌクレオチドの蛍光偏光の測定に利用される。

【0020】

本発明はこのように記載され、該発明の好ましい具体例を以下の実施例にて説明する。これらの実施例は単なる例示であり、何ら本発明の範囲を限定するものではない。

30

【0021】

実施例1：蛋白-核酸相互作用をアッセイするための蛍光異方性測定の利用

蛍光修飾されたオリゴヌクレオチドの蛍光偏光を用いてオリゴヌクレオチドと蛋白との間の複合体が研究された。これは、クレノウフラグメントと5-ジメチルアミノナフタレン-1-スルホンアミドで標識されたプライマーとの相互作用の研究に関するものであった(12)。しかしながら、これらの研究の目的は、該複合体に関する特別な構造上の情報を得ることであった。研究に用いた蛍光発色団および手段の選択のために、このアッセイの感度は約10 μ Mであり、本発明の検出限界よりも100000倍感度が低かった。実際のところ、検出に必要な濃度が、分子種間の解離定数の値よりも少なくとも100000倍大きかったため、それらの研究において、その著者らは蛋白とオリゴヌクレオチドとの間の相互作用の強度を確実に定量することができなかった。

40

【0022】

lacプロモーター配列を含む32塩基対の2本鎖オリゴデオキシヌクレオチドに共有結合した7-ジメチルアミノ-3-(4'-マレイミジルフェニル)-4-メチルクマリンの蛍光偏光を用いてcAMP受容体蛋白とそのlacプロモーター配列との間の複合体形成がモニターされた(13)。この特別なアッセイにおける検出濃度の限界(10 μ M)は、相互作用エネルギーよりも数オーダー大きかった。さらに、それは、ピコモル濃度において分析対象を検出することができる本発明記載のアッセイ感度よりも1000倍大きい。

50

【0023】

本発明の方法論は、1本鎖または2本鎖オリゴヌクレオチドと蛋白または他の高分子との相互作用による、1本鎖または2本鎖オリゴヌクレオチドに結合した蛍光プローブの蛍光の異方性または偏光の変化を観察することに基づく。蛋白-DNA相互作用をモニターする実験の最初のセットにおいて、オリゴデオキシリボヌクレオチドは25量体であり、それは、自動DNA合成において蛍光標識されたホスホラミダイト試薬を用いてセンス鎖の5'-末端がフルオレセインで標識されたものであった。該オリゴデオキシリボヌクレオチドは市販されていた。該センス鎖の配列は以下のごとし(F=フルオレセイン)：

【0024】

中央部のCTAGAATTCTAG配列は、コリプレッサー(co-repressor)であるトリプトファンの存在下で、標的配列に高い親和性(ゲル遅延アッセイにより0.5 nMと決定、カレイ(Carey))(1988年)で結合するトリプトファンリプレッサー蛋白の特異的オペレーター結合部位である。よって、これらの研究に用いる蛋白は、過剰発現され、チョウ(Chou)ら(10)により改変されたパルー(Paluh)およびヤノフスキー(Yanofsky)の方法(9)を用いて精製されたトリプトファンリプレッサーである。

【0025】

2本鎖オリゴデオキシリボヌクレオチドのアンチセンス鎖を標識しなかった。500 mM KCl、10 mM ホスフェート、0.1 mM EDTA, pH 7.0中に最終濃度約10~100 μMとなるように溶解することにより、2本の鎖をアニーリングさせた。260 nmにおける光学密度より評価された2本の鎖の等モル混合物および鎖の配列を調製し、85 °Cで10分間加熱し、次いで、ゆっくりと室温まで冷却した。

【0026】

フルオレセイン標識された2本鎖オリゴデオキシリボヌクレオチドを、通常は、全体積700 μl中、最終濃度0.2 nMにまで希釈し、小体積用1.2 mlの石英キュベットに入れた。希釈に用いるアッセイ緩衝液は、10 mMリン酸カリウム、0.1 mM EDTA, pH 7.6であり、さらに10%グリセロールを含有し、いくつかの場合には0.4 mMトリプトファンを含有していた。希釈後、KCl濃度は減少し、1 mMよりも十分低くなった。その溶液を、各偏光測定5分前に平衡化させた。

【0027】

蛍光偏光または異方性を、ISS KOALATM自動蛍光計を用いたL-フォーマットまたは我々のオリジナルの試料ホルダーおよび超高感度測定用ポーラライザー配置を用いたT-フォーマットにおいて測定した。励起光を488 nmにセットし、ホヤ・オプティクス(Hoya optics)製のY520長経路フィルターを通してエミッションをモニターした。10 nM未満の濃度においては無視できない緩衝液からのバックグラウンド蛍光を、特性の揃ったキュベット中における試料および緩衝液の水平ならびに垂直成分の連続的測定により差し引いた。

【0028】

測定感度および精度

体積変化によりオリゴデオキシリボヌクレオチドの全濃度が10%以上減少しないように、極めて少量の蛋白(2 μl)を連続的に添加することによりアッセイを行った。図1Aおよび1Bのプロットは、2量体として表された蛋白濃度の対数に対してプロットした場合、フルオレセイン標識オリゴデオキシリボヌクレオチドおよび0.4 mM L-トリプトファンを含む溶液への蛋白の連続的添加により、蛍光の異方性がS字型に増加することを示す。各測定を4回繰り返し、結果を平均した。各測定における誤差は、+/-0.002 偏光単位であった。20 pMのオリゴデオキシリボヌクレオチドのうち10%のみが蛋白に結合する場合にはいつでも、異方性の値の変化は測定誤差を十分に超えるものであることが理解できる。

【0029】

我々は、ナノモル以下の量のオリゴデオキシリボヌクレオチドを検出でき、その蛋白へ

10

20

30

40

50

の結合が測定誤差よりも15倍大きい信号の変化を発生させることを、図1Aにおいて示す。

【0030】

実施例2：蛋白-核酸相互作用の熱力学モデルを評価するための蛍光異方性測定の利用
これらのデータを、図1Cおよび1Dに示す2つの熱力学的モデルにおいて分析した。第1のモデル(1C)は、分子種が遊離蛋白、遊離DNAおよび蛋白-DNA複合体のみである単純な蛋白-DNA結合モデルである。第2のモデル(図1D)においては、1量体-2量体平衡が蛋白-DNA結合平衡に加重されている。これら2つのモデルおよび数値平衡分析プログラムBIOEQS(20)を用いたデータの適合を、図1Aおよび1Bに示す。単純結合モデルを用いて得られたトリプトファンリプレッサー-2量体-DNA相互作用に関する解離定数は、0.83 nMであることがわかった。関連平衡モデルを用いたデータの適合は、2量体-DNA解離定数0.23 nMおよび2量体-1量体解離定数3.5 nMを与えた。データの質は、単純結合モデルを排除するに十分であり、その適合は、関連平衡の場合にはずっと高度な質である(図1Aおよび1Bと比較)。厳格な信頼性レベル試験により、+/-0.3 kcalにおいて67%限界の2量体-DNA親和性に関する X^2 の急激なくぼみが明らかになる(図2)。よって、低濃度における複合体形成が検出されうるのみならず、データの質は、データの適合から親和性を決定でき、別の熱力学的モデルの効果の評価が行えるに十分である。

10

【0031】

実施例3：溶液中の多成分系の分析における蛍光異方性測定の利用

20

DNAオリゴヌクレオチド濃度の変更およびインビボにおいて見られる濃度(約1 μ M)に対する蛋白滴定の効果を図3に示す。比較的高分子の、よって、比較的高い異方性の複合体は、これらの蛋白およびDNAが比較的高濃度である場合に好ましいことが理解できる。これは、溶液に基づくアッセイであるため、いかなる成分の濃度であっても容易に変更することができる。かくして、図4において、アッセイ緩衝液からのトリプトファン省略の影響を理解することができる。20 nMのオリゴデオキシリボヌクレオチドを用いて、トリプトファンコリプレッサー不存在下、リプレッサー蛋白2量体中、上記約1 μ Mの蛋白濃度において、結合が観察されるだけである。

【0032】

よって、我々は、これらのアッセイを用いて、蛋白と核酸との間の複合体の形成に対する特異的リガンドまたは他の薬剤の影響を定量的にアッセイできることを示した。

30

【0033】

図1ないし4に示す結果は、蛍光標識されたオリゴデオキシリボヌクレオチドの蛍光の偏光または異方性を用いて、オリゴデオキシリボヌクレオチドと蛋白および他の大型の生物学的分子との相互作用を、高感度かつ高精度で検出できることを明確に示す。フルオレセインの蛍光シグナルは、全体積500 μ l中、10 pM程度の低濃度において検出された。10フェムトモルの蛍光標識された標的配列を用いて1フェムトモルの特定のDNA結合蛋白が容易に検出され、オリゴヌクレオチドのうちの10%の結合は、正確に測定できるシグナルの変化を生じることが示される。高感度であることおよび高いデータの質は、複合体形成の検出のための手段、さらには相互作用のエネルギー強度の極めて正確な決定ならびに熱力学的結合モデル間の区別のための手段を提供する。このアッセイは非常に迅速で、1ポイントあたりわずか5~10分しかかからない。このアッセイは溶液に基づくので、小型のリガンドおよび薬剤、pH、塩、温度、および他の溶液の条件の影響を容易に評価することができる。例えば、粗細胞抽出物またはインビトロ翻訳アッセイが、特定のDNA配列に結合する能力のある蛋白因子を含んでいるかどうかを確認するのに約10分を要するであろう。完全な滴定曲線およびその分析には45分を要する。使用容易なこと、溶液に基づく性質および迅速性により、このアッセイは、電気泳動またはフィルター結合に基づく方法よりも優位に改善されている。このアッセイを、転写因子の研究に、そして遺伝子発現の調節における薬剤および他の小型の分子の役割の研究に、広く適用することができる。さらなる適用は、転写因子または他のDNA結合蛋白の機能をアッセイ

40

50

するための臨床向けの試験を包含する。

【0034】

実施例4：核酸間の相互作用をアッセイするための蛍光異方性測定の使用

他の相補的な一本鎖DNAまたはRNA・オリゴヌクレオチドに対する一本鎖オリゴヌクレオチドの結合は、この方法学を用いても検出できる。蛍光の異方性における有意な変化の実証は、5'-フルオレセインで標識した自己相補的な20merのオリゴデオキシリボヌクレオチド、すなわち、

5'-F-CGAACTAGTTAACTAGTACG-3'

(Fとはフルオレセインを示す)を用いて行った。自己での二本鎖複合体の形成による、該変性一本鎖オリゴデオキシリボヌクレオチドの自己の二本鎖形態への変換上で、該異方性の変化が起こる。試験は3回行った。各試験において、2つの試料を比較した。2つの各試料は、pH7.6、500μlの10mMのKPO₄、0.1mMのEDTA中、50nM濃度の標識オリゴデオキシリボヌクレオチドを含有する。2つの試料の1つ(高塩濃度)は、さらに1MのKClを含有する。該高塩濃度試料を95℃に加熱し、室温に冷却した。高塩濃度での該加熱および冷却により、大部分の一本鎖オリゴデオキシリボヌクレオチドが二本鎖形態に変換する。形態におけるこの変化により、ブラウン運動が低下し、続いて異方性が上昇する。蛍光異方性測定は、各々の一对の試料に対して行った。表Iに示すこれらの測定結果は、二本鎖複合体の形成における測定誤差にわたり、少なくとも20倍蛍光異方性が上昇することを実証している。

10

【0035】

20

【表1】

表 I
溶液中におけるオリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーションの検出

試験番号	異方性	
	加熱前の低塩濃度	加熱後の高塩濃度
1	0.046 +/- 0.001	0.067 +/- 0.000
2	0.042 +/- 0.001	0.065 +/- 0.000
3	0.044 +/- 0.001	0.066 +/- 0.001

【0036】

30

ハイブリダイゼーション・アッセイにも通常用いられるような、該オリゴヌクレオチドが8-10塩基長であった場合や、該標的配列が一本鎖プラスミドDNAであった場合には、該変化ははるかに大きくなっていたであろう。かくして、該二本鎖の20merの形成の検出は、小さなオリゴヌクレオチドが大きな一本鎖DNA分子に結合する場合に典型的に含まれている大きさの相違よりかなり小さなものである。

【0037】

核酸の測定に基づく該アッセイは、特定の突然変異の存在の遺伝子マッピングおよび臨床測定に適用できる。それは、また、アンチ-センスDNA/RNA核酸による翻訳阻害、臨床診断における適用の潜在性を有する技術、または他の生物医療分野の評価にも用いることができる。本明細書中に記載している該蛍光異方性測定は、自動アッセイを単純化するであろう特徴を有する完全に溶液ベース(すなわち、固形支持体を必要としない)である。結論として、本発明は、迅速、正確、再現性があり、単純な、核酸と他の巨大分子との相互作用のための定量アッセイに関する。

40

【0038】

実施例6：組織生検におけるDNA結合蛋白質の機能のための臨床アッセイ

本発明の方法は、臨床的な設定での使用が見い出されることが期待される。エストロゲン受容体はDNA結合蛋白質であって、その二機能性は肺ガンの原因論に含まれているとされている。本明細書に記載するのは、肺組織からの生検中の機能性エストロゲン受容体をアッセイするのに用いることができる方法である。

【0039】

50

フラナガン (Flanagan)ら (19)により記載されているごとき、温和な摩砕および遠心分離により生検組織から細胞抽出物が調製されるであろう。共通のエストロゲン反応性要素 (estrogen response element) (ERE) を形成する二本鎖オリゴデオキシリボヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド対の自動合成により調製できる。センス鎖用の好ましい配列は、

5'-F-GGTCACCTGTGACC-3'

であり、式中、該発蛍光団 (F) は、合成の最終的なヌクレオチド付加工程における蛍光-標識ホスホルアミダイト・リンカーの使用によって取り込まれる。このオリゴヌクレオチドは自己相補的である。溶液中における該オリゴヌクレオチドのアニールングにより、各5'末端が発蛍光団で標識された二本鎖オリゴヌクレオチド (*ERE) が提供される。

10

【0040】

該蛍光偏光測定を行うための緩衝液は、0.2 mMのEDTAを含む、pH 7.9、10%のグリセリン、80 mMのKClである。測定は、室温にて行われる。EREオリゴヌクレオチドを含有しない細胞抽出物の蛍光強度 (バックグラウンド) で予備実験を行う。これらの値は、細胞抽出物を含有するこれら試料の偏光解消の算出に用いる測定値から減ずる。細胞抽出物を含有しない溶液中の*ERE・オリゴデオキシリボヌクレオチドの蛍光偏光の予備測定も行う。次いで、アリコートした細胞抽出物を1 pMの該*EREオリゴデオキシリボヌクレオチドと混合し、該蛍光偏光を再度測定する。細胞抽出物の存在下で得た該偏光値と、無*EREの値との比較により、試料中に存在するエストロゲン受容体の結合機能の測定が供される。

20

【0041】

対照実験として、機能的なエストロゲン受容体を含有することが既知の細胞から調製した細胞抽出物を用いた結果を得、臨床試料から調製した抽出物からの結果と比較すべきである。

【0042】

該実験を最も明解に記載するために、試料製剤の例を表IIに掲載する。

【0043】

【表2】

表 II

臨床試料におけるEREのエストロゲン受容体への結合を測定するための試料製剤

30

[ERE]	生検			バックグラウンド		
	*ERE	抽出物	緩衝液	*ERE	抽出物	緩衝液
1 pM	5 ^a	0	995	0	0	1000
1 pM	5	100	895	0	100	900
1 pM	5	250	745	0	250	750
1 pM	5	500	455	0	500	500
1 pM	5	950	45	0	950	50

40

[ERE]	対照			バックグラウンド		
	*ERE	抽出物	緩衝液	*ERE	抽出物	緩衝液
1 pM	5	0	995	0	0	1000
1 pM	5	100	895	0	100	900
1 pM	5	250	745	0	250	750
1 pM	5	500	455	0	500	500
1 pM	5	950	45	0	950	50

^a 全ての量は μl

【0044】

50

試料中のエストロゲン受容体量を定量するため、該細胞抽出物を種々の量の標識 * E R E で滴定し、既知量の精製エストロゲン受容体および * E R E を用いて得たスタンダード曲線で該結果を比較する。

【 0 0 4 5 】

実施例 7 : 組織生検由来の m R N A へのオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによる遺伝子における特異的突然変異についての臨床検査

コレステロールレセプター遺伝子における特異的突然変異は、高コレステロール血症を誘発することが見いだされた。その症状は、循環中のコレステロールレベルを制御するための測定が行われない場合、動脈疾患により患者を早期に死亡させる。新生児期または出生前の遺伝子試験による症状の早期検出、かくして、早期介入は、罹患している個々のためのより良好な予後のために提供すると予想される。したがって、この実施例には、オリゴヌクレオチドプローブへの結合のための m R N A のアッセイによるコレステロールレセプター遺伝子における突然変異の検出方法が記載される。この方法は、もちろん、他の突然変異の検出に一般化される。

10

【 0 0 4 6 】

当該技術分野で知られている方法によって 5' 末端が標識された 8 - 1 0 塩基オリゴヌクレオチドは、家族性高コレステロール血症を有する患者において突然変異されていることが予め示された野生型コレステロールレセプター遺伝子の m R N A 転写物のこれらの部分と相補的であるように設計される。各オリゴヌクレオチドは、その長さおよび G C 含量を変化させることによって、1つのミスマッチ塩基対を除いては、全体的に相補的である配列への結合時に T m (オリゴとハイブリダイズした相補鎖との間の二本鎖の融解温度) の同様の低下を提供するように設計する。野生型 m R N A が各オリゴヌクレオチドに大部分ハイブリダイズされたままであるが、高コレステロール血症の原因であると観察された突然変異を予防する患者のパネルの肝臓生検から得られた m R N A が突然変異領域における野生型配列に相補的なオリゴヌクレオチドによってハイブリダイズされない温度を測定するための実験を行う。

20

【 0 0 4 7 】

組織 1 0 0 m g から、一般的に、約 1 ピコモルの特異的な 1 キロベース m R N A が得られる。1 m l の容量において、これは、1 n M の特異的 m R N A に相当する。1 : 1 ハイブリダイゼーションについて、1 n M 蛍光標識オリゴヌクレオチドを使用する。この試料の大きさは、容易に検出されるシグナルを提供する；かくして、より小さな試料を使用することができる。単独で、約 1 n M の野生型 m R N A と混合した、および、約 1 n M の臨床試料由来の m R N A と混合したオリゴヌクレオチドの蛍光偏光は、各々、最初の実験で、野生型および突然変異 m R N A 配列にオリゴヌクレオチドを結合させる際に最大の相違を提供することが判明した温度で測定される。野生型 m R N A を含有する組織は、オリゴヌクレオチド単独について観察されたものよりも大きな偏光を示すが、突然変異 m R N A を含有する組織は、オリゴヌクレオチド単独のものと同等の偏光を示すことが観察される。

30

【 0 0 4 8 】

対照実験として、標識オリゴヌクレオチドの不在下での m R N A 調製物の蛍光発光を、発光偏光の各平面において測定する。ハイブリダイゼーション実験で行われた各測定から、これらのバックグランド値を引く。

40

【 0 0 4 9 】

実施例 8 : 高感度の蛍光偏光測定用装置

第 5 図に示された線図は、本発明を実施するのに必要な感度を有する装置を製造するための I S S コアラ (K o a l a ^{T M}) 蛍光測定法に対して行われた変更を示す。変更は、(1) 光路を 3 0 c m から 2 0 c m に減縮させ；(2) 1 c m の試料ホルダー内に発光レンズを設置し；(3) グラン・トンプソン (G l a n T h o m p s o n) 偏光子を試料ホルダー上に直接装着した U V 用フィルム偏光子に置き換えることを含む。これらの改良は、劇的に、装置の感度を増大させる。これらの変更によって達成された感度の増大を示すために行われた試験

50

において、以下の配列を有する蛍光的に標識化された 25mer オリゴヌクレオチドを使用した。

5'-F-ATCGAACTAGTTAACTAGTACGCAA-3'

第III表に示すとおり、本発明者らは、当該図面に示したアルゴンイオン源よりもむしろキセノンアークランプ励起源を使用して、500 μ l中9pMの濃度のオリゴヌクレオチドを検出することができた。これは、変更していない装置と比較して10倍の感度の増大を示す。本発明者らが偏光において10%の変化を検出することができるのであれば、本発明者らは、溶液中の0.9pMのタンパクまたは核酸または合成ポリマーを検出することができる。感度のこのレベルは、450アトモルの巨大分子に相当する。

【0050】

【表3】

第III表

変更したフルオロメーターおよび試料セルを使用する感度限界アッセイ

溶液	強度 (数)
9 p M F - 2 5 m e r	1 9 6 7 . 8 + / - 1 . 2
緩衝液バックグラウンド	2 4 3 . 9 + / - 0 . 4

【0051】

変更した装置の感度は、2つのさらなる変更によって改良することができる。(1)シャープな帯域励起フィルターを含むことは、10倍のファクターだけ感度を増加させる。(2)ここに記載した試験で使用されるキセノンアークランプをアルゴンイオンレーザー光源に代えることは、励起ビームの増大した強度ならびにその単色性および偏光した性質によりさらに100倍だけ強度を増大させる。本発明者らは、バックグラウンド制限され、かつ、基本的なISS装置におけるモノクロメーターは、迷光拒絶時に良好ではないので、バックグラウンド強度のほとんどは、走査された励起光から生じる。レーザーについては、488nm光だけであり、かくして、他の波長の迷光は、試料中に入らない。第二に、レーザー光は、平面偏光され、励起偏光子の必要性をなくす。最後に、蛍光強度は、励起源強度に正比例しており、レーザーは、小さなレーザーでさえ、キセノンアークランプよりも大きな力を与える。変更されたデザインにおいて、ランプ励起源の使用が検出レベルをノイズ制限よりもむしろバックグラウンド制限させるので、利得の付随増加による希釈は、感度を増大させなかった。かくして、感度の10増大のもう1つのファクターは、励起する迷光を消失させることができる場合に、利用可能である。

【0052】

かかる本発明の記載により、本明細書に記載された物質および方法の様々な変更は、当業者である本発明の実施者に明らかである。本発明についてのかかる変更は、特許請求の範囲に記載される発明の範囲内であると解される。

【0053】

引用文献

本明細書中で、以下の引用文献が引用される。以下の引用文献の各々は、出典明示により本明細書の一部とする。

米国特許

1. 第4,269,511号 5/1981 アーウィン (Erwin)。
2. 第4,516,856号 5/1985 ポペルカ (Popelka)。
3. 第4,585,862号 4/1986 ワン,シー-エイチ (Wang, C-H)ら。
4. 第4,668,640号 5/1987 ワン,シー-エイチら。
5. 第4,784,961号 11/1988 ラッセル (Russell)。
6. 第4,902,630号 2/1990 ベネット,エル・ジー (Bennet, L.G.)
およびチアペッタ,ジー (Chiapetta, G.)。
7. 第4,952,691号 8/1990 ワンら。
8. 第5,066,426号 11/1991 ワンら。

10

20

30

40

50

他の文献

9. パルー, ジェイ・エル (Paluh, J. L.) およびヤノフスキー, シー (Yanofsky, C.) (1982) ニュークリック・アシックス・リサーチ (Nucl. Acids Res.) 14、7851 - 60。

10. チョウ, ダブリュ-ワイ (Chou, W-Y)、ブーバー, シー (Buber, C.) およびマシューズ・ケイ・エス (Matthews K. S.) (1989) ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、264、18309 - 13。

11. ケアリー, ジェイ (Carey, J.)、(1988) プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) 85、975 - 9。

12. ゲスト, シー・アール、ホクストラセル, アール・エイ (Hochstrasser, R. A.)、デュピュイ, シー・ジー (Dupuy, C. G.)、アレン, ディ・ジェイ (Allen, D. J.)、ベンコヴィク, エス・ジェイ (Benkovic, S. J.) およびミラー・ディ・ピー (Miller D. P.) (1991) バイオケミストリー (Biochemistry) 30、8759 - 70。

13. ハイドック, ティ (Heyduk, T.) およびリー, ジェイ・シー (Lee, J. C.) (1990) プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス、871744 - 8。

14. ビーチャム, ジェイ・エム (Beecham, J. M.)、(1992) メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) 第210巻、第37 - 53頁。

15. ユーリオス, ピー (Urios, P) およびシタノヴァ, エヌ (Cittanova, N.) (1990) Anal. Biochem. 185 308 - 12。

16. ジエドロク, ディ・ピー (Giedroc, D. P.)、カン, アール (Khan, R.) およびバーナート, ケイ (Barnhart, K.) (1991) バイオケミストリー (Biochem.) 30 8230 - 42。

17. ムラカミ, エイ (Murakami, A.)、ナカウラ, エム (Nakaura, M.)、ナカツジ, ワイ (Nakatsuji, Y.)、ナガハラ, エス (Nagahara, S.)、トラン・コン, キュー (Tran-Cong, Q.)、および18. マキノ, ケイ (Makino, K.) (1991) ニュークリック・アシックス・リサーチ、19、4907 - 4912。

19. ピー・エム・フラナガン (P. M. Flanagan) ら (1992) プロシーディングズ・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユー・エス・エイ (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A)、89: 7659 - 7663。

20. シー・エイ・ロイヤー (C. A. Royer) ら、(1990) アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.) 191: 287 - 294。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1A】精製されたトリプトファンリプレッサー蛋白での、trpオペレーター配列を含有するフルオレセイン標識二本鎖オリゴヌクレオチドの力価測定を示す。緩衝液の条件は、0.4 mM L-トリプトファン存在下における10 mMリン酸、0.1 mM EDTA、10%グリセロール (pH 7.6) であった。試料の全容量は700 μl であった。フルオレセイン標識オリゴヌクレオチドの濃度は200 pM であった。蛍光の異方性を、モノマーとして表した蛋白濃度の対数の関数としてプロットする。点を結ぶ線は、モノマー/ダイマー平衡がダイマー-DNA結合平衡にカップリングしたモデルにてのデータの非線形解析を表す。

【図1B】精製されたトリプトファンリプレッサー蛋白での、trpオペレーター配列を含有するフルオレセイン標識二本鎖オリゴヌクレオチドの力価測定を示す。緩衝液の条件は、0.4 mM L-トリプトファン存在下における10 mMリン酸、0.1 mM EDTA、10%グリセロール (pH 7.6) であった。試料の全容量は700 μl であった。フルオレセイン標識オリゴヌクレオチドの濃度は200 pM であった。蛍光の異方性を、モノマーとして表した蛋白濃度の対数の関数としてプロットする。点を結ぶ線は、モノマー/

10

20

30

40

50

ダイマー平衡がダイマー-DNA結合平衡にカップリングしたモデルにてのデータの非線形解析を表す。

【図1C】単純な結合スキームおよび蛋白-蛋白および蛋白-DNA結合相互作用スキームについての自由エネルギーダイアグラムを示す。データは、図1Aおよび1Bに示すごとく、これらの2つのモデルを用いて適合させた。

【図1D】単純な結合スキームおよび蛋白-蛋白および蛋白-DNA結合相互作用スキームについての自由エネルギーダイアグラムを示す。データは、図1Aおよび1Bに示すごとく、これらの2つのモデルを用いて適合させた。

【図2】図1Cで与えられた熱力学的モデルについての、 X^2 (縦軸)とkcal単位の自由エネルギー (横軸)とのプロットを示す。

10

【図3】trpオペレーター配列を含有する合成オリゴヌクレオチドに対するtrpリプレッサーの結合プロフィールのオリゴヌクレオチドの濃度への依存性を示す。形成された複合体の化学量論は、蛋白およびオリゴヌクレオチドの絶対的および相対的濃度のわずかに関数となっている。かくして、第1プラトーは低DNA濃度においてより明らかな地点にて到達し、続いて、より高秩序の複合体が形成されるに従って異方性がさらに増加する。DNA濃度は200pM、1nM、および20nMであった。

【図4】オペレーターオリゴヌクレオチドに対するtrpリプレッサー蛋白の結合のトリプトファンの濃度への依存性を示す。中抜き丸印は、4.0mMトリプトファンの存在下における1nMオリゴヌクレオチドへの蛋白の結合を表し、中抜き三角印は0.4mMトリプトファンの存在下における結合を示し、中抜き菱形は40 μ Mトリプトファンの存在下における結合を示し、また、塗りつぶした丸印はトリプトファンコリプレッサーの不存在下における結合プロフィールを示す。

20

【図5】ランプをベースとした、T-フォーマットの高感度偏光フルオロメーターの平面図。

【図6】レーザーをベースとした、T-フォーマットの高感度偏光フルオロメーターの平面図。

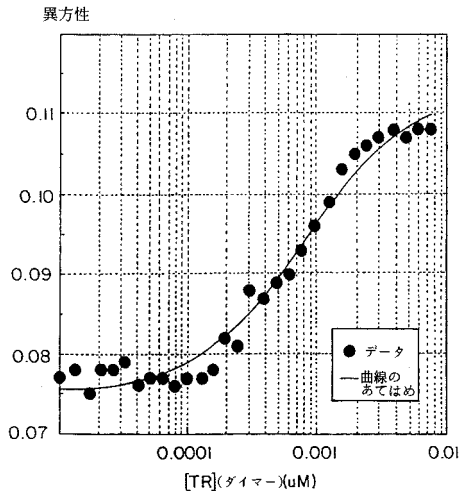
【図7】ランプをベースとした、L-フォーマットの高感度偏光フルオロメーターの平面図。

【図8】レーザーをベースとした、L-フォーマットの高感度偏光フルオロメーターの平面図。

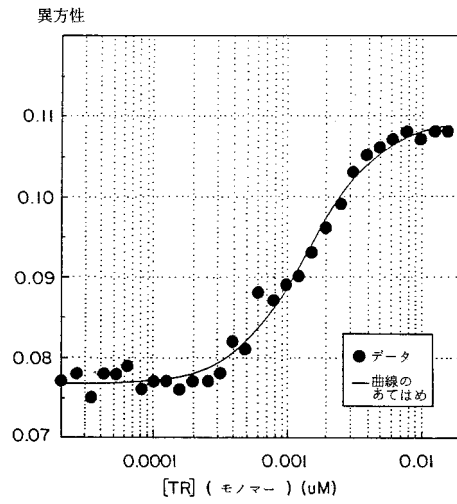
30

【図9】繊維オプティックのランプをベースとしたT-フォーマットの高感度偏光フルオロメーターの詳細な平面図であり、特に、試料室およびフィルム偏光子の配置の詳細を示す。

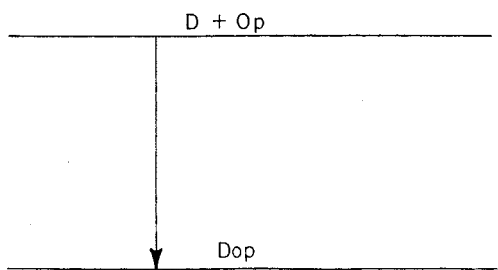
【 図 1 A 】



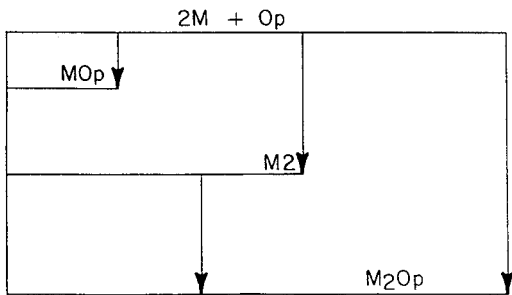
【 図 1 B 】



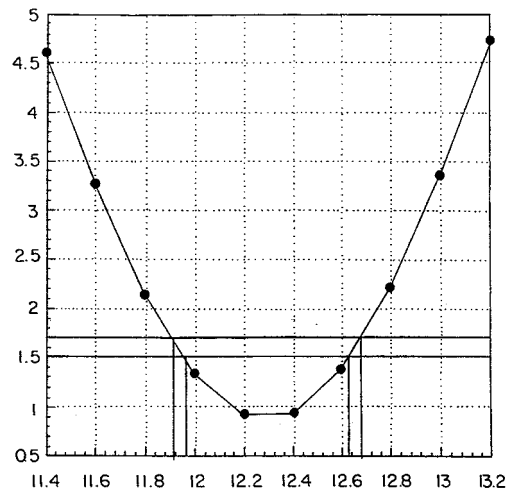
【 図 1 C 】



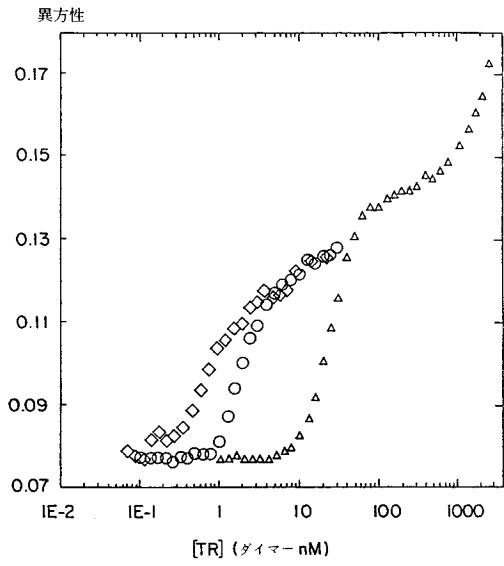
【 図 1 D 】



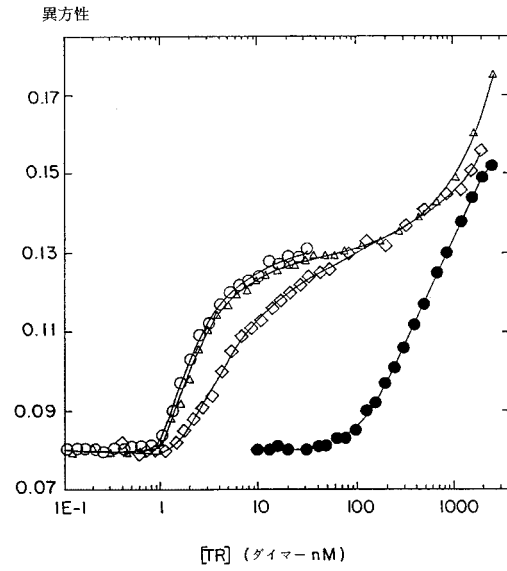
【 図 2 】



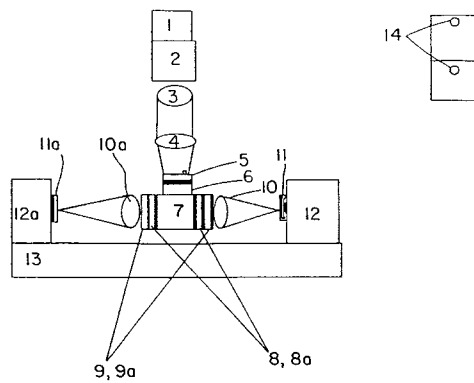
【 図 3 】



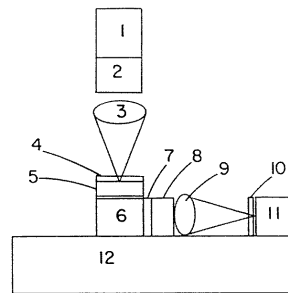
【 図 4 】



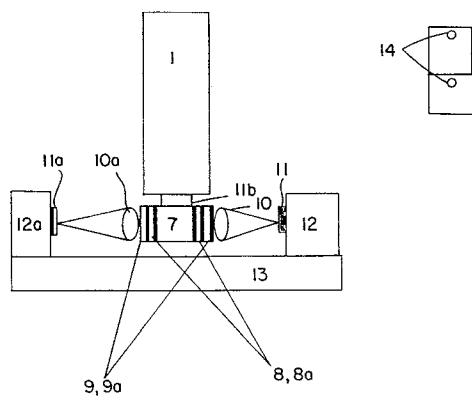
【 図 5 】



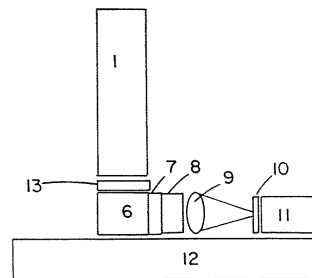
【 図 7 】



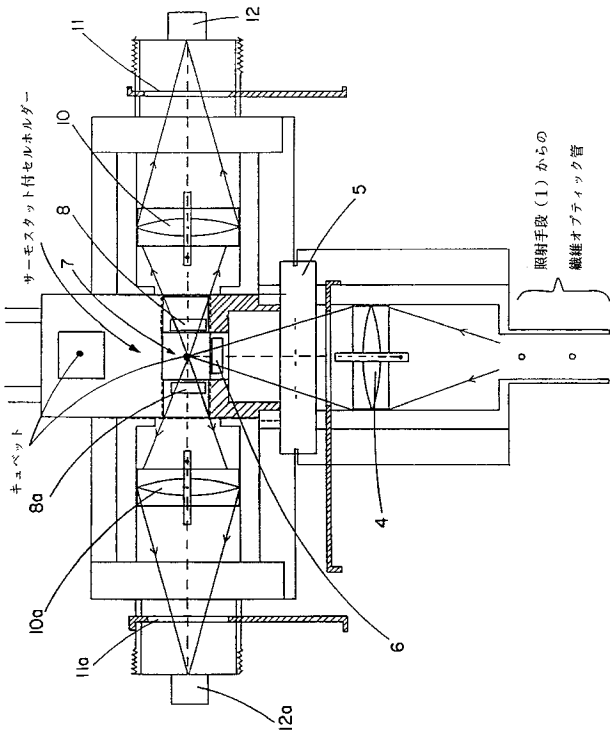
【 図 6 】



【 図 8 】



【図 9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/00 A

(74)代理人 100062144
弁理士 青山 稔

(74)代理人 100081422
弁理士 田中 光雄

(72)発明者 キャサリン・エイ・ロイヤー
アメリカ合衆国ウィスコンシン州5 3 7 0 5、マディソン、ヒリントン・ウェイ4 2 4 番

Fターム(参考) 2G045 DA12 DA13 DA14 DA36 DA77 FA12 FA15 FB02 FB03 FB07
FB12

4B024 AA11 CA04 CA05 CA09 HA14

4B063 QA18 QQ42 QR32 QR55 QS03 QS34 QX02