

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



|  |           |   |
|--|-----------|---|
| <p>(51) 国際特許分類6<br/>C12Q 1/68</p>  | <p>A1</p> | <p>(11) 国際公開番号<br/>WO95/18236</p> <p>(43) 国際公開日<br/>1995年7月6日(06.07.95)</p>   |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP94/02276</p> <p>(22) 国際出願日 1994年12月27日(27.12.94)</p> <p>(30) 優先権データ<br/>特願平5/338528 1993年12月28日(28.12.93) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)<br/>ダイキン工業株式会社(DAIKIN INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP)<br/>〒530 大阪府大阪市北区中崎西二丁目4番12号<br/>梅田センタービル Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)<br/>木河浩司(KIGAWA, Koji)(JP/JP)<br/>〒567 大阪府茨木市島1-5-28 マンションしま303号 Osaka, (JP)</p> <p>山中美圭代(YAMANAKA, Mikayo)(JP/JP)<br/>〒591 大阪府堺市長曾根町633 パナハイツ霧島103号 Osaka, (JP)</p> <p>木原佳代(KIHARA, Kayo)(JP/JP)<br/>〒564 大阪府吹田市朝日が丘町20-5<br/>エルデコート朝日が丘402号 Osaka, (JP)</p> <p>向井恵吏(MUKAI, Eli)(JP/JP)<br/>〒663 兵庫県西宮市甲子園二番町1-38 Hyogo, (JP)</p>   |           | <p>小幡和哲(OBATA, Kazuaki)(JP/JP)<br/>〒560 大阪府豊中市岡上の町2-5-5-1033 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人<br/>弁理士 山本秀策(YAMAMOTO, Shusaku)<br/>〒540 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号<br/>クリスタルタワー15階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国<br/>AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(KE, MW, SD, SZ).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書<br/>請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。</p> |
| <p>(54) Title : IN-SITU HYBRIDIZATION METHOD USING RecA PROTEIN AND RecA PROTEIN HAVING MARKER OR LIGAND FOR USE IN SAID METHOD</p> <p>(54) 発明の名称 RecAタンパク質を用いるインシチュハイブリダイゼーション法および該方法に使用する標識またはリガンドを有するRecAタンパク質</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A method for detecting the presence of a target double-stranded nucleic acid sequence in an immobilized cell or cell structure, which method involves the step of immobilizing a cell or a cell structure in such a manner as to permit the invasion by a nucleic acid probe and the step of preparing a probe-RecA composite comprising a single-stranded probe and a RecA protein bonded to each other stably. The presence of a target double-stranded nucleic acid sequence is detected by binding the probe-RecA composite to a target double-stranded nucleic acid sequence through the reaction therebetween under the condition where the target nucleic acid sequence does not undergo denaturation and detecting the RecA protein contained in the composite. The invention method provides a diagnostically important method whereby the position of a specified gene or a regulatory region thereof in a chromosome or the presence of a virus-origin nucleic acid sequence can be determined or visualized readily at a high sensitivity.</p> |           |   |

(57) 要約

固定された細胞または細胞構造体に含まれる2本鎖標的核酸配列の存在を検出する方法が提供される。該方法は、細胞または細胞構造体を、核酸プローブが侵入し得るように固定し、固定された細胞または細胞構造体を得る工程；1本鎖プローブとRecAタンパク質が安定に結合したプローブ・RecA複合体を形成する工程を含み、2本鎖標的核酸配列が変性しない条件下で、上記プローブ・RecA複合体と2本鎖標的核酸配列とを反応させて結合し、プローブ・RecA複合体に含まれるRecAタンパク質を検出することにより2本鎖標的核酸配列の存在を検出する。

本発明により、染色体中の特定の遺伝子やその調節領域の位置や、ウィルス由来の核酸配列の存在を高感度かつ簡便に測定または視覚化し得る、診断上重要な方法が提供される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

|    |           |    |             |    |          |    |            |
|----|-----------|----|-------------|----|----------|----|------------|
| AM | アルメニア     | EE | エストニア       | LK | スリランカ    | RU | ロシア連邦      |
| AT | オーストリア    | ES | スペイン        | LR | リベリア     | SD | スーダン       |
| AU | オーストラリア   | FI | フィンランド      | LT | リトアニア    | SE | スウェーデン     |
| BB | バルバドス     | FR | フランス        | LU | ルクセンブルグ  | SG | シンガポール     |
| BE | ベルギー      | GA | ガボン         | LV | ラトヴィア    | SI | スロヴェニア共和国  |
| BF | ブルキナ・ファソ  | GB | イギリス        | MC | モナコ      | SK | スロヴァキア共和国  |
| BG | ブルガリア     | GE | グルジア        | MD | モルドバ     | SN | セネガル       |
| BJ | ベナン       | GN | ギニア         | MG | マダガスカル   | SZ | スワジランド     |
| BR | ブラジル      | GR | ギリシャ        | ML | マリ       | TD | トゴ         |
| BY | ベラルーシ     | HU | ハンガリー       | MN | モンゴル     | TG | トーゴ        |
| CA | カナダ       | IE | アイルランド      | MR | モーリタニア   | TJ | タジキスタン     |
| CF | 中央アフリカ共和国 | IS | アイスランド      | MW | マラウイ     | TM | トルクメニスタン   |
| CG | コンゴ       | IT | イタリア        | MX | メキシコ     | TT | トリニダード・トバゴ |
| CH | スイス       | JP | 日本          | NE | ニジェール    | UA | ウクライナ      |
| CI | コート・ジボアール | KE | ケニア         | NL | オランダ     | UG | ウガンダ       |
| CM | カメルーン     | KG | キルギスタン      | NO | ノルウェー    | US | 米国         |
| CN | 中国        | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | NZ | ニュージーランド | UZ | ウズベキスタン共和国 |
| CZ | チェッコ共和国   | KR | 大韓民国        | PL | ポーランド    | VN | ヴェトナム      |
| DE | ドイツ       | KZ | カザフスタン      | PT | ポルトガル    |    |            |
| DK | デンマーク     | LI | リヒテンシュタイン   | RO | ルーマニア    |    |            |

## 明細書

RecAタンパク質を用いるインシチュハイブリダイゼーション法および該方法に使用する標識またはリガンドを有するRecAタンパク質

### 5 技術分野

本発明は、細胞または細胞構造体に存在する2本鎖標的核酸配列を検出するのに有用なRecAタンパク質を利用するインシチュハイブリダイゼーション法、該方法の実施に使用するキット、および、標識またはリガンドを有するRecAタンパク質に関する。

### 背景技術

インシチュハイブリダイゼーション法は、細胞内に存在するDNAやRNAなどの標的核酸配列に直接核酸プローブをハイブリダイズさせる方法である。この方法は、透過性を高めた、固定した細胞または細胞構造体（核やミトコンドリア等の器官、細菌やウイルス等の寄生体など）、または固定された染色体標本などの生物材料に適用され、それらに含まれる核酸配列を標的にする。その結果、標的核酸配列の存在を、その存在する場所で、即ち、インシチュに測定し得、標的核酸配列の局在についての情報が得られることから、発生生物学、細胞生物学、遺伝学（とりわけ遺伝子マッピング）、病理学、

遺伝子診断等の生体臨床医学の広い分野に適用可能である。

インシチュハイブリダイゼーション法は、一般に、2本鎖の核酸、代表的には、病原体やウイルスの特定の配列、および、染色体DNAの特定遺伝子を標的にする。従来のインシチュ  
5 ハイブリダイゼーション法では、1本鎖の標識された核酸プローブを使用し、このプローブを透過性を高めた細胞に添加し、2本鎖の標的核酸配列が変性するのに十分な温度に加熱した後、所定の条件下でこのプローブと変性した標的核酸配列とをハイブリダイズさせる。その後、標的核酸配列と結合  
10 しなかった未反応のプローブを除去し、細胞中の標的核酸配列に結合したプローブの標識を検出する。

インシチュハイブリダイゼーション法は、染色体DNA上の特定の遺伝子配列の位置や既知の遺伝子との距離のマッピング  
(Fan, Y. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87、6223、1990他)、  
15 サテライトDNAやその他の反復配列の染色体上での配置の研究  
(杉本憲治ら、臨床分子医学、1、348、1993他)、染色体異常の解析 (Hopman, A. H. N. ら、Histochemistry、89、307、1988他)、DNA損傷部位の解析 (Baan, R. A. ら、Prog. Clin. Biol. Res.、340A、101、1990他) やフローサイトメーターを用いた  
20 染色体量の解析 (Trask, B. ら、Hum. Genet.、78、251、1988他)、  
遺伝子のコピー数の解析 (Kallioniemi, O. P. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、89、5321、1992や、Kallioniemi, A. ら、Science、258、818、1992他) 等の染色体DNA研究に広く利用されている。また、宿主染色体に組み込まれたウイルス核酸配列

の局在に関する研究に利用されている (Lawrence, J. B. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87、5420、1990他)。さらに、断面化した核を3次元的に再構成することによる染色体の位置研究にも使用されている。

- 5        インシチュハイブリダイゼーション法のその他の一般的な応用例としては、診断手段としての宿主細胞中のウイルスの検出がある (Han, K. H. ら、J. Virol. Methods、37、89、1992他)。感染細胞中のウイルス粒子の数が非常に少ない場合は、インシチュポリメラーゼチェーンリアクション(インシチュPCR)法  
10        によってあらかじめウイルス配列を増幅する (Hasse, A. T. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87、4971、1990)。

- しかしながら、従来のインシチュハイブリダイゼーション法には種々の制約がある。例えば、2本鎖標的核酸配列を変性させる必要がある。この変性は、通常、標的核酸配列または該核酸配列を含む試料を、特定の薬剤存在下または非存在  
15        下で加熱処理することにより行われる。この加熱処理は、しばしば、試料中の核酸に予期できない変化を生じさせる。この変化は、DNAの構造的変化、反復配列を介した核酸間のランダムな再結合などを含む。さらに、変性操作は余分の時間や  
20        労力を必要とする。

      あるいは、標的核酸配列のコピー数が極めて少ない場合には、長いハイブリダイゼーション時間が必要で、プローブと標的核酸配列とのハイブリダイゼーションが効率良く起こらない。このような場合、あらかじめ標的核酸配列をインシチ

ユPCR法で増幅することによりある程度解消し得る。しかし、インシチュPCR法は繁雑であり、染色体DNA配列の局在の解析に関する研究には不適切である。

上記の制約を解決して、標的核酸配列を変性せずに、少ないコピー数の標的配列を高精度で検出できる方法として、Zarling, D.A.らによるW093/05177に記載された、RecAタンパク質を用いるインシチュハイブリダイゼーション法が開発された。この方法は、標的核酸配列に相補的な配列を有する、標識またはリガンドを有する1本鎖核酸プローブと、RecAタンパク質とが安定に結合したプローブ・RecA複合体を使用し、標的核酸配列が変性しない条件下で、この複合体と標的核酸配列をハイブリダイスさせ、標的核酸配列と結合した、標識またはリガンドを有するプローブを検出することによって、該標的配列を検出する。この方法では、使用される核酸プローブが、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識等の検出可能な標識、または、ビオチンやジゴキシゲニンなどそれらに特異的なリポーター分子と結合し得るようなリガンドを有する。

化学発光剤、酵素標識などの標識、およびビオチンやジゴキシゲニンなどのリガンドを有するプローブを使用する場合は、RecAタンパク質が結合した該プローブを、標的核酸配列が変性しない条件下で、2本鎖の標的核酸配列と結合させ、未反応のプローブを除去した後に、化学発光工程、酵素反応工程、または、標識付アビジン、ストレプトアビジンまたは

抗ジゴキシゲニン抗体などのリポーター分子との反応などを  
含む2次反応により標的核酸配列を検出する。蛍光剤を使用  
する場合は、共焦点レーザー顕微鏡などきわめて高感度の検  
出機器を用いて標的核酸配列を検出する。Zarlingらの方法で  
5 は、標識またはリガンドを有しないプローブは使用できない。

標識またはリガンドを有するプローブを調製するためには、  
ニックトランスレーション法やランダムプライミング法など  
公知の方法が用いられる。しかし、これら方法により、プロ  
ープに取り込み得る標識またはリガンドの数は、数10～数10  
10 0塩基に約1つであり、プローブに取り込み得る標識またはリ  
ガンド量には限界があった。従って、得られるシグナルの強  
さは必ずしも十分ではなく、例えば、通常の蛍光顕微鏡を使  
用して検出する場合、プロピジウムイオダイドなどでカウン  
ター染色を施した場合、単一コピーの遺伝子はほとんど検出  
15 できない。また、プローブに取り込まれた標識またはリガ  
ンドにより、プローブと標的核酸配列とのハイブリダイゼー  
ション反応が阻害される場合は、検出感度がさらに低下する。  
さらに、複数の異なる標的核酸配列を同時に検出する場合は、  
あらかじめそれぞれの標的核酸配列に相補的な各プローブに、  
20 異なるタイプの標識もしくはリガンドを結合させる必要があ  
った。

### 発明の開示

本発明は、上記従来課題を解決するものであり、その目

的とするところは、RecAタンパク質が安定に結合したプローブ・RecA複合体を用い、2本鎖標的核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体に含まれるRecAタンパク質を検出することにより該標的核酸配列の存在を検出することを特徴とする、  
5 高感度で簡便なインシチュハイブリダイゼーション法を提供することにある。

本発明者らは、上記のZarlingらの方法に従って得られた、標的核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体中に、RecAタンパク質が安定に保持されていることを見いだした。RecAタンパク質がプローブに結合した状態では、例えば、標的核酸配列を、プローブに結合したビオチンやジゴキシゲニン等それらに特異的なリポーター分子と結合し得るようなリガンドで検出する場合、前記リポーター分子とリガンドの反応効率が低下し、蛍光顕微鏡など通常の検出手段では検出感度が低下すると考えられる。本発明者らは、このような観点から、  
10 タンパク質分解酵素や界面活性剤など種々の洗浄液を用いて、2本鎖標的核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体中のRecAタンパク質を除去しようと試みた。しかし、該複合体中のRecAタンパク質を標的核酸配列および上記複合体に影響を及ぼすことなくRecAタンパク質を除去し得なかった。そこで、  
15 プローブ・RecA複合体に含まれる標識またはリガンドを有するプローブを検出するかわりに上記複合体に含まれるRecAタンパク質を検出することを考えた。

そして次に発明者らは、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、



放射性標識などの検出可能な標識、またはビオチンやジゴキシゲニン等それらに特異的なリポーター分子と結合し得るようなリガンドを有するRecAタンパク質を調製した。このような標識またはリガンドを有するRecAタンパク質を用いた場合

5 ても、標的となる2本鎖核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体（2本鎖標的核酸配列・プローブ・RecA複合体）を効率よく形成させることができ、かつ該複合体に含まれる標識

10 またはリガンドを有するRecAタンパク質を検出することにより、より高感度にかつ簡便に特異性高く該標的核酸配列の存在を検出できることを見いだした。

また、標的となる2本鎖核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体（2本鎖標的核酸配列・プローブ・RecA複合体）に、抗RecA抗体を反応させて、標的となる2本鎖核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体（2本鎖標的核酸配列・プローブ

15 ・RecA複合体）に含まれるRecAタンパク質を検出することにより、該標的核酸配列の存在を検出することも可能であることを見いだして、本発明を完成するに至った。

本発明は、固定された細胞または細胞構造体に含まれる2本鎖標的核酸配列の存在を検出する方法に関し、該方法は以下の工程を包含する：細胞または細胞構造体を、核酸プローブが侵入し得るように固定し、固定された細胞または細胞構造体を得る工程、ここで、該細胞または細胞構造体は、該細胞または細胞構造体に含まれるその構成成分および核酸構造

20 とともに、本来の形態学的な関係を保持している；1本鎖

プローブとRecAタンパク質が安定に結合したプローブ・RecA複合体を形成する工程、ここで、該1本鎖プローブは該2本鎖標的核酸配列に相補的な配列を有する；該プローブ・RecA複合体を、該固定された細胞または細胞構造体に、該2本鎖標的核酸配列と接触し得る条件下で添加する工程；該2本鎖標的核酸配列が変性しない条件下で、該プローブ・RecA複合体と該2本鎖標的核酸配列とを反応させて結合する工程；該2本鎖標的核酸配列と結合しなかったプローブ・RecA複合体を除去する工程；および該2本鎖標的核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体に含まれるRecAタンパク質を検出し、それによって該2本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程。

#### 発明を実施するための最良の形態

本明細書で使用する用語「細胞」は、動物細胞、植物細胞などの真核細胞、細菌などの原核細胞などを包含し、また、例えば、動物細胞において、精子、卵子などの生殖細胞、体細胞など、形態学および構造的に異なる任意の種類を包含する。さらに、これら細胞を含む動植物組織サンプルをも包含する。

本明細書で使用する用語「細胞構造体」は、前記細胞内に存在する、細菌、ウィルス、または核やミトコンドリアなどの器官、染色体、あるいは、ウィルス、細菌などの血液サンプルなどの生体由来の試料に存在する寄生体を包含する。

前記細胞または細胞構造体に含まれる、標的となる2本鎖

核酸配列は、代表的には、染色体DNA、ウィルス、および、前記寄生体の中で病原体となるまたは病原に関連する2本鎖核酸である。

5 前記の細胞または細胞構造体は、例えば、培養細胞、動物組織、生物体液などの生物材料から得られ得る。

前記固定された細胞または細胞構造体を得る工程は、従来のインシチュハイブリダイゼーション法において用いられている方法と同様の方法で実施され得る。簡単に言えば、細胞または細胞構造体は、該細胞または細胞構造体に含まれるその構成成分および核酸構造とともに、本来の形態学的な関係を保持しながら有機溶媒、酸または架橋剤などにより固定され、該細胞または細胞構造体の、標的配列に相補的な配列を有するプローブに対する透過性が増加する。一般的な固定剤として、酢酸、各種塩類、メタノール、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドなどが使用され得る。

15 前記の細胞または細胞構造体は、一般的には、1種または複数の薬剤の存在下または非存在下で処理され、タンパク質および/または脂質を除去し得る。該薬剤は、酸、アルコール、界面活性剤、およびこれらの組み合わせを包含し、該処理は、プロテアーゼ、リパーゼなどによる酵素処理、熱処理、洗淨処理、および、これらの処理の組み合わせを包含する。代表的な処理方法としては、メタノール：酢酸で1回または20 数回洗淨することが知られている。

前記細胞が動物組織の場合は、該動物組織は、ホルマリン、

グルタルアルデヒドなどの従来の固定法により固定された後に、ろうに埋め込み、または、凍結した後、切片にし、透過性を増すために、スライドガラス等の固体支持体上でメタノール：酢酸などで処理され固定され得る。

- 5 前記細胞構造体は、標的遺伝子配列の細胞内局在を決定したり、細胞内のウイルス、細菌や寄生体等の感染生物の存在及び／または局在を検出するのに使用され得る。核やミトコンドリアなどの細胞構造体は、等密度遠心法のような一般的な分画法によって濃縮され、そして十分に精製した状態で調製され得る。その後濃縮された調製物を前記のように固定して透過性を増すような処理をして、溶液中で、またはスライドガラス等の固体支持体上に固着され、乾燥させて使用し得る。

- 15 核などの細胞構造体は、細胞を75mMのKCl溶液で前処理した後、メタノール：酢酸処理によって細胞質を取り除いて調製され得る。すなわち、細胞を低速で遠心分離することにより集めた後、75mMのKCl溶液に懸濁し、核が適度に膨張するまで5分～20分間放置してから氷冷したメタノール：酢酸を加えて遠心する。氷冷したメタノール：酢酸を加えて細胞をゆるやかに攪拌して遠心する操作を繰り返して、核から細胞質を除去し得る。このようにして単離された核はメタノール：酢酸に再懸濁し、その内の約10 $\mu$ lをスライドガラスなどの固体支持体の上に滴下して乾燥し固着され得る。固定された核は、室温～-80 $^{\circ}$ Cで保存し得る。あるいは、上記集めた細胞
- 20

は、リン酸緩衝溶液(PBS)を用いて洗浄後、100%メタノール  
または70%エタノールで処理することにより固定し得、固定  
された細胞は-20℃で保存し得る。この保存された固定細胞  
は、細胞懸濁液の状態、溶液中でのハイブリダイゼーショ  
ン反応に使用され得る。

5

染色体などの細胞構造体は、Trask, B. J.ら、Methods in C  
ell Biology、35、16、1991に記載の通常の方法で、例えば、  
リンパ球の中期細胞から得られ、この染色体は、通常メタノ  
ール：酢酸で処理された後にスライドガラス等の上に滴下さ  
れ、乾燥して固着され得る。

10

ミトコンドリア、ウイルス粒子など、細胞および血液サン  
プルから単離された細胞構造体もまた、常法により、前記同  
様に固定され得る。

本発明の方法に用いられる前記核酸プローブは、1本鎖の  
核酸であり、通常は、1本鎖のDNAである。標的核酸配列の一  
方または両方の鎖に相補的な2本鎖プローブを変性すること  
によっても調製し得る。市販されている種々のサテライトDN  
A配列など、多くの1本鎖または2本鎖プローブを本発明に使  
用し得る。あるいは、当該技術分野で公知のプローブ調製法  
により、例えば、ウイルス、特異的な配列を有するプラスミ  
ドやコスミドまたはその他のベクターから直接調製され得る。  
必要に応じて、ベクターからプローブDNA部分を制限酵素で切  
り出し、電気泳動によって特異的な制限酵素断片を単離する  
ことにより調製され得る。このようにして得られたプローブ

15

20

は通常 2 本鎖の状態であるが、必要に応じて M13 フェージベクターのような 1 本鎖ベクターにサブクローニングされ得る。あるいは、オリゴヌクレオチド合成法によって 1 本鎖プローブを調製し得る。長いプローブを調製する場合は、プローブのサブフラグメントを合成した後、それらのサブフラグメントをつなぎ合わせて調製され得る。

前記核酸プローブは、標的核酸配列とプローブとの間の配列特異的なハイブリダイゼーション反応を確実に実施するために、好適には、標的核酸配列と少なくとも 90～95% のホモロジーを持つ核酸配列を有する。この 1 本鎖プローブの長さは、通常、約 100～1,500 塩基であり得、より短い、またより長いポリヌクレオチドプローブも使用され得る。

本発明に使用される前記核酸プローブは、標準的な条件では 300ng 以下で使用され、好ましくは 5～100ng の量で使用され得る。

前記核酸プローブは、標識またはリガンドを有する必要はないが、必要に応じて、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識などの検出可能な標識や、ビオチンやジゴキシゲニンなど、それらに特異的なリポーター分子と結合し得るリガンドを有し得る。この標識またはリガンドを有するプローブを、検出可能な標識またはリガンドを有する、RecA タンパク質、抗 RecA 抗体、または抗 RecA 抗体に結合し得る 2 次抗体と組み合わせて用いることにより標識またはリガンドのシグナルを増幅し得る。

本明細書で使用する用語「RecAタンパク質」は、大腸菌RecAタンパク質の機能のすべてを、またはその機能の大部分を有する、大腸菌RecAタンパク質と実質的に同等のRecA様組換えタンパク質の一群を指し、例えば、大腸菌RecAタンパク質 (Shibata, T.ら、Methods in Enzymology、100、197、1983)、その類似タンパク質であるT4ファージ由来のuvsXタンパク質 (Yonesaki, T.ら、Eur. J. Biochem.、148、127、1985)、枯草菌 (Bacillus subtilis) 由来のRecタンパク質 (Lovett, C. M.ら、J. Biol. Chem.、260、3305、1985)、黒穂菌 (Ustilago) 由来のRec1タンパク質 (Kmiec, E. B.ら、Cell、29、367、1982)、酵母、マウス、ヒト由来のRecA様タンパク質 (Shinohara, A.ら、Nature Genetics、4、239、1993)、Thermus aquaticus (Angov, E.ら、J. Bacteriol.、176、1405、1994) や Thermus thermophilus (Kato, R.ら、J. Biochem.、114、926、1993) 等の高温菌由来の耐熱性RecA様タンパク質などを包含する。これらの内で、最もよく機能が研究されているのは大腸菌由来のRecAタンパク質である。大腸菌由来のRecAタンパク質としては、その野生型のみならず多くの変異型 (例えば RecA803 : Madiraju, M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、85、6592、1988 や RecA441 : Kawashima, H.ら、Mol. Gen. Genet.、193、288、1984) も使用し得る。

RecAタンパク質は、常法 (例えば、Shibata, T.ら、Methods in Enzymology、100、197、1983) により大腸菌から精製して使用し得る。または、市販のRecAタンパク質 (例えばファ

ルマシア社製)を使用し得る。

前記RecAタンパク質は、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンなどの検出可能な標識またはリガンドを有し得る。蛍光剤として、フルオレセインイソチオシアネート、カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル(Cy3<sup>TM</sup>、Cy5<sup>TM</sup>など)、ローダミン、テキサスレッド(スルフォローダミン)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、7-アミノ-4-メチルクマリリン-3-酢酸などを使用し得る。酵素標識としては、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼなどを使用し得る。

前記標識またはリガンドを有するRecAタンパク質の調製は、抗体などのタンパク質に標識あるいはリガンドを結合させる方法に準じて実施し得る。例えば、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)やテトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)などの蛍光剤(蛍光色素)は、松橋ら、生物化学実験法15「免疫学実験入門」、137ページ(学会出版センター)の方法に準じて前記RecAタンパク質に結合され得る。また、Cy3<sup>TM</sup>やCy5<sup>TM</sup>等のカルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル類の蛍光剤は、例えば、Southwickらの方法(Southwick, P. L.ら、Cytometry、11、418、1990)に準じてRecAタンパク質に結合され得る。あるいは、FluoroLink-Ab<sup>TM</sup> Cy3<sup>TM</sup> Labeling KitやFluoroLink-Ab<sup>TM</sup> Cy5<sup>TM</sup> Labeling Kit(BIOLOGICAL DETECTION SYSTEMS, INC.製)などの市販のキ



ットを用いて結合され得る。前記RecAタンパク質に結合する前記蛍光剤の量は、RecAタンパク質モノマーあたり1~10分子、好ましくは1~6分子である。

5           アクリジニウムエステル等の化学発光剤は、例えば、Simpson, J. S. A.らの方法。(Simpson, J. S. A.ら、Bioluminescence and Chemiluminescence. Basic Chemistry and Analytical Applications. New York: Academic Press 1981、673ページ) に準じて前記RecAに結合され得る。

10           アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼなどの酵素標識は、例えば、松橋ら、生物化学実験法15「免疫学実験入門」、151ページ(学会出版センター)の方法に準じて前記RecAタンパク質に結合され得る。RecAタンパク質に結合する酵素標識の数量は、RecAタンパク質モノマーあたり1~3分子、好ましくは1~2分子である。

15            $^{125}\text{I}$ や $^{131}\text{I}$ 等の放射性標識は、例えば、松橋らの生物化学実験法15「免疫学実験入門」、143ページ(学会出版センター)の方法に準じて前記RecAタンパク質に結合され得る。あるいは、種々の放射性標識を有するアミノ酸存在下で培養した大腸菌から精製することにより、放射性標識を有するRecA  
20           タンパク質を調製し得る。

          ビオチン化RecAタンパク質は、例えば、生化学実験法11「エンザイムイムノアッセイ」、24ページ(東京化学同人)の方法に準じて調製され得る。前記RecAタンパク質に結合するビオチンの量は、RecAタンパク質モノマーあたり1~10分子、

好ましくは1～6分子である。

ジゴキシゲニン化RecAタンパク質は、ジゴキシゲニン-3-0  
-サクシニル-ε-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシ-サクシイミ  
ドエステル (DiG-NHS)等を用いて定法(ベーリンガーマンハイ  
ム社製のキット)によって調製され得る。前記RecAタンパク質  
5 に結合するジゴキシゲニンの量は、RecAタンパク質モノマー  
あたり1～10分子、好ましくは1～6分子である。

前記の標識またはリガンドを有するRecAタンパク質は、標  
識またはリガンドを有しない通常のRecAタンパク質と混合し  
10 て使用され得る。

前記プローブ・RecA複合体を形成する工程は、Zarlingらに  
よるW093/05177、およびW093/05178の記載に準じて実施され  
得る。好ましくは、ATP $\gamma$ S、GTP $\gamma$ S、rATP、rATP再生系(ベ  
ーリンガーマンハイム社製)存在下のrATP、dATP、ATP $\gamma$ Sと  
15 rATPとの混合物、ATP $\gamma$ SとADPとの混合物、GTP $\gamma$ SとADPとの  
混合物、GTP $\gamma$ SとGDPとの混合物などのコファクターの存在下  
で実施され得る。好ましいコファクターは、ATP $\gamma$ S、rATPま  
たはGTP $\gamma$ Sである。前記コファクターは、約0.12～12.0mM、  
好ましくは0.24～7.0mMの濃度範囲で使用され得る。

20 前記プローブ・RecA複合体の調製に用いるプローブは、1  
本鎖または2本鎖いずれの形態でも使用され得、代表的には、  
約95～100℃の温度範囲で約5分間熱変性し、約20秒から1分  
間氷冷した後、前記RecAタンパク質との結合反応に使用され  
得る。必要に応じて、RecAタンパク質との結合反応前に約20

秒間0~4℃で遠心される。変性されたプローブは-20℃のフリーザーで保存し得るが、好ましくは、氷水中で直ちに前記コファクターを含む標準的なRecA反応溶液（Ferrin, L. J.ら、Science、254、1494、1991やSena, E. P.ら、Nature Genetics、3、365、1993等）および前記RecAタンパク質と混合する。この混合液を37℃で10~15分間保温することによって、1本鎖プローブにRecAタンパク質を安定に結合させる。この反応で1本鎖プローブの約3塩基に対し、RecAタンパク質が1分子の割合で結合し、1本鎖プローブがRecAタンパク質でコートされる。

前記プローブと反応させるRecAタンパク質の濃度は、プローブの大きさや量によって変化し得、好ましくは約0.5~100 μMの範囲である。RecAタンパク質（モノマー）とプローブ中の塩基との混合比率は、約5:1~1:3の範囲で、好ましくは、3:1~1:2.5の範囲で結合反応を実施し得る。前記プローブ・RecA複合体形成反応は、必要に応じて、single-strand binding protein (SSB)、バクテリオファージT4遺伝子32タンパク質 (T4 gene32 protein) などのタンパク質の共存下で実施し得、それによって反応を促進し得る。

プローブに結合しなかった遊離のRecAタンパク質の影響を除去するために、例えば、サケ精子DNA、酵母または大腸菌由来のtRNAなどのキャリアーDNAまたはRNAをプローブ・RecA複合体形成後に加えて、プローブに結合しなかった遊離のRecAタンパク質をこのキャリアーに結合させ、固定された上記細

胞または細胞構造体に含まれる標的核酸配列以外の核酸等へのRecAタンパク質の非特異的な結合を防ぎ得る。この処理は、  
蛍光顕微鏡観察などのバックグラウンドのノイズシグナル減少に有用である。あるいは、通常のカラムクロマトで遊離の  
5 RecAタンパク質と前記プローブ・RecA複合体を分離して遊離  
のRecAタンパク質を除去し得る。検出可能な標識またはリガ  
ンドを有するRecAタンパク質を使用してプローブ・RecA複  
合体を調製する場合は、前記のキャリアーDNAまたはRNAを用  
いる後処理が有効である。

10 また、プローブ・RecA複合体の調製に用いるプローブとRe  
cAタンパク質の比率を調節することによりこの工程を省略す  
ることも可能である。

あるいは、前記の検出可能な標識またはリガンドを有する  
プローブ・RecA複合体は、標識またはリガンドを有さないRe  
15 cAタンパク質を、1本鎖プローブに安定に結合した後、前記  
の方法に従って、検出可能な標識またはリガンドを、プロ  
ーブ・RecA複合体中のRecAタンパク質に結合することにより調  
製し得る。

前記プローブ・RecA複合体を、固定された細胞または細胞  
20 構造体に、前記2本鎖標的核酸配列と接触し得る条件下で添  
加する工程、および、前記プローブ・RecA複合体と2本鎖標  
的核酸配列とを反応させて結合する工程は、前記Zarlingらの  
記載に準じて実施し得る。すなわち、該標的核酸配列が変性  
しない条件、例えば、2本鎖DNAの変性がおこる温度以下で、

前記プローブ・RecA複合体を標的核酸配列を含む細胞または細胞構造体に添加し、2本鎖の標的核酸配列と、プローブ・RecA複合体とを塩基配列特異的なハイブリダイゼーション反応により結合させる。

- 5 前記ハイブリダイゼーション反応は、該プローブ・RecA複合体と標的核酸配列との相同部位で結合がおこるまで、約1〜24時間、好ましくは2〜18時間、37°Cに保持することにより実施され得る。前記ハイブリダイゼーション反応は、必要に応じて、single-strand binding protein(SSB)、トポイソメラーゼIやトポイソメラーゼIIなどのタンパク質の共存下で実施し得、それによって反応を促進し得る。標的核酸配列に結合しなかったプローブ・RecA複合体は、公知の洗浄方法により除去し得る。但し、例えば、タンパク質分解酵素や、RecAタンパク質を可溶化する界面活性剤を高濃度に含む洗浄液の使用は望ましくない。
- 10
- 15

- 前記のハイブリダイゼーション反応を行う前に、必要に応じて、前記固定された細胞または細胞構造体は、前記プローブ・RecA複合体を添加する工程に先だって、10mMのトリス酢酸緩衝液(pH 7.5)中で、4〜60°Cで処理したり、ペプシンやproteinaseK等のタンパク質分解酵素で処理することにより、ハイブリダイゼーション反応の反応効率を高め得る。また、標的核酸配列を含む細胞または細胞構造体をRNA分解酵素、nickase(DNaseI等)やリガーゼにより処理しておいてもよい。
- 20

あるいは、必要に応じて、ハイブリダイゼーション反応を

行う前に、前記固定された細胞または細胞構造体を、カゼイン、スキムミルク、および、牛血清アルブミン、キャリアーDNA、および、キャリアーRNAからなる群から選ばれる少なくとも一種を含む、前処理用ブロッキング液で処理し得る。前  
5 処理用ブロッキング液に含まれるこれらの物質は、RecAタンパク質に結合している標識またはリガンド、および/またはRecAタンパク質それ自身が、固定した細胞または細胞構造体、および/または固体支持体に非特異的に結合するのを防止する。また、FITC、TRITCやCy3<sup>TM</sup>、Cy5<sup>TM</sup>などのカルボキシメチ  
10 ルインドシアニンサクシニミジルエステル類などの蛍光剤を有するRecAタンパク質を使用する場合には、標識またはリガンドを有しない通常のRecAタンパク質を前処理用ブロッキング液に添加しておいてもよい。この処理は、代表的には、前記前処理用ブロッキング液を前記固定された細胞または細胞  
15 構造体に添加することにより実施され得る。

前記固定された細胞または細胞構造体は、懸濁液の状態、前記プローブ・RecA複合体とハイブリダイゼーション反応させ得る。すなわち、プローブ・RecA複合体を含むハイブリダイゼーション反応溶液に、固定された細胞または細胞構造  
20 体を懸濁させて1~24時間、好ましくは2~18時間、例えば、37℃に保持することにより実施し得る。反応後、洗浄液に細胞を懸濁させ、洗浄して未反応のプローブ・RecA複合体を除去する。

スライドガラス等の固体支持体上に固着された細胞または

細胞構造体と前記プローブ・RecA複合体とを反応する場合は、通常、約10～20 $\mu$ lのプローブ・RecA複合体を含む反応溶液を、スライドガラス上の固着させた前記細胞または細胞構造体に添加して実施し得る。得られた反応溶液にカバーガラスを被せ、湿気を含んだ密閉容器に入れて、例えば、37 $^{\circ}$ Cで約1～24時間、好ましくは2～18時間ハイブリダイズさせる。反応後、数回洗浄して未反応のプローブ・RecA複合体を取り除く。

前記のハイブリダイゼーションに用いる反応溶液は、代表的には、反応溶液中の各構成成分の最終濃度が、以下の範囲になるように調製し得る；1～100mMトリス酢酸緩衝液、2～20mM酢酸マグネシウム、0～100mM酢酸ナトリウム、0.4～1.0mMジチオスレイトール、0～100mM EGTA、0～50mMスベルミジン、0～10%グリセロール、0.24～7.0mM ATP $\gamma$ S、rATPまたはGTP $\gamma$ S、0.5～160 $\mu$ M RecAタンパク質（標識またはリガンドを有するRecAタンパク質のみ、標識またはリガンドを有するRecAタンパク質および通常のRecAタンパク質との混合物、あるいは標識またはリガンドを有しない通常のRecAタンパク質のみ）、1反応あたり5～100ngのプローブ、1反応あたり0～10 $\mu$ gキャリアーDNAもしくはRNA）。

前記2本鎖標的配列の存在を検出する工程は、例えば、FITC、TRITCやCy3<sup>TM</sup>、Cy5<sup>TM</sup>等のカルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル類等の蛍光剤を有するRecAタンパク質を検出する場合は、標的となる2本鎖核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体に含まれるこれら蛍光標識を有する

RecAタンパク質由来の蛍光シグナルを、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡やフローサイトメーター (FACS=fluorescence activated cell sorter)で検出することにより実施し得る。

5 アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼまたはβ-ガラクトシダーゼなどの酵素標識を有するRecAタンパク質を検出する場合は、公知の方法、例えば、特公表平4-505556号に記載の方法により、ニトルブルーテトラゾリウムや5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェートなどの不溶性色素を生産する発色性の基質、AMPPD(TROPIX社製)などの化学発光性の  
10 基質を用いて実施し得る。

放射性標識を有するRecAタンパク質を検出する場合は、公知の方法、例えば、吉田勉弘、蛋白質核酸酵素、38、558、1993に記載の、オートラジオグラフィーを行うことにより実施し得る。

15 ビオチンやジゴキシゲニンなどのリガンドを有するRecAタンパク質を検出するには、FITC-アビジンなどのような、検出可能な標識を有するアビジン/ストレプトアビジン、および、抗ジゴキシゲニン抗体と結合することにより実施し得る。

あるいは、前記2本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程  
20 は、プローブ・RecA複合体に、標識またはリカンドを有する、または、有しない抗RecA抗体を反応させて検出し得る。標識またはリガンドを有する抗RecA抗体を使用する場合は、標的核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体に含まれるRecAタンパク質と、検出可能な標識またはリガンドを有する抗RecA



抗体を反応させた後、未反応の抗RecA抗体を除去してから、前記の標識またはリガンドの検出方法に準じて、RecAタンパク質に結合した標識またはリガンドを有する抗RecA抗体を検出することにより、該標的配列を検出し得る。

- 5 抗RecAポリクローナル抗体は、例えば、松橋らの生物化学実験法15「免疫学実験入門」など、常法により、容易に調製し得る。そして、抗RecAモノクローナル抗体は、例えば、牧野らの方法（Makinoら、*J. Biol. Chem.*、260、15402、1985）により調製し得る。検出可能な標識またはリガンドを有する
- 10 抗RecA抗体の調製は、前記の検出可能な標識またはリガンドを有するRecAタンパク質の調製法と同様の方法で調製し得る。

- あるいは、前記2本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程は、抗RecA抗体および抗RecA抗体と結合し得る2次抗体を用いて行われ得る。該2次抗体は、検出可能な標識またはリガ
- 15 ンドを有し得る。抗RecA抗体を認識して結合できる2次抗体としては、例えば、抗RecA抗体がマウス由来である場合は、抗マウスIgG抗体を使用し得、抗RecA抗体がウサギ由来である場合は、抗ウサギIgG抗体を使用し得、抗RecA抗体がヤギ由来である場合は、抗ヤギIgG抗体などを使用し得、通常は、市販
- 20 の標識抗血清（例えば、FITC標識抗マウスIgG抗体やFITC標識抗ウサギIgG抗体等）を使用し得る。これらの抗RecA抗体を認識して抗RecA抗体に結合し得る、検出可能な標識またはリガンドを有する2次抗体の調製は、前記の検出可能な標識またはリガンドを有するRecAタンパク質の調製法と同様の方法で

調製し得る。

また、上記の検出方法を組み合わせ、標識またはリガンドを有するRecAタンパク質、標識またはリガンドを有する抗RecA抗体、および、抗RecA抗体と結合可能な標識またはリガンドを有する2次抗体を組み合わせることで使用することにより、シグナルを従来法よりもはるかに強く増幅することが可能である。

本発明は、また、別の局面で、前記方法を実施するための、検出可能な標識またはリガンドを有するRecA抗体を含むキットを提供する。

10 本発明はまた、前記方法を実施するための、プローブと検出可能な標識またはリガンドを有するRecAタンパク質とが安定に結合したプローブ・RecA複合体を含むキットを提供する。

本発明はまた、前記方法を実施するための、RecAタンパク質および検出可能な標識またはリガンドを有する抗RecA抗体を含むキットを提供する。

15 本発明はまた、前記方法を実施するための、プローブとRecAタンパク質とが安定に結合したプローブ・RecA複合体、および検出可能な標識またはリガンドを有する抗RecA抗体を含むキットを提供する。

20 本発明によるキットは、以下の試薬を包含し得る：(1)例えば、75mM KCl、酢酸などを含む70～100%のアルコール溶液からなる、細胞または細胞構造体固定用試薬；(2)例えば、0～0.5% TritonX-100、0.1～10% スキムミルク、カゼイン、牛血清アルブミン、0～5mg/ml キャリアーDNAおよび／またはRNA、

0~10mg/mlの標識またはリガンドを有しない通常のRecAタンパク質などを含む10~100mMトリス酢酸緩衝液(pH7.5)からなる前処理用ブロッキング液；(3)例えば、0~15mM酢酸マグネシウム、0~50mM酢酸ナトリウム、0~1mMジチオスレイトール、0~100mM EGTA [エチレングリコール-ビス(β-アミノエチルエーテル) N,N,N',N'-4酢酸]、0~50mMスペルミジンなどを含む10~100mMトリス酢酸緩衝液(pH7.5)からなる、細胞処理液；(4)例えば、使用時に以下のような組成の反応溶液を調製するために希釈されるべき濃厚な保存反応溶液；2~20mM 酢酸マグネシウム、0~100mM 酢酸ナトリウム、0.4~1mMジチオスレイトール、0~100mM EGTA、0~10%グリセロール、0~50mM スペルミジン、0.24~7.0mM ATPγSもしくはGTPγSを含む、10~100mMトリス酢酸緩衝液(pH7.5)。；(5)例えば、0.1~40μg/μlのRecAタンパク質溶液。ここで、RecAタンパク質は、標識またはリガンドを有しまたは有さず、あるいは、標識またはリガンドを有するRecAタンパク質と有さないRecAタンパク質との混合物である；(6)例えば、5~100ng/μlの濃度の1本鎖または2本鎖のプローブを含むプローブ溶液。プローブの例として各染色体特有のαサテライトDNA配列由来、ガン遺伝子配列由来、ガン抑制遺伝子配列由来やウイルス遺伝子配列由来のプローブなどが考えられる；(7)例えば、約0.01~5mg/ml濃度のサケ精子DNAおよび/または大腸菌や酵母由来のtRNAを含む、キャリアーDNAまたはRNA溶液；(8)例えば、以下の組成を有するプローブ・RecA複合体溶液；0.5~5

00ng/ $\mu$ lの1本鎖プローブ、0.01~200 $\mu$ g/ $\mu$ lの標識またはリガンドを有するRecAタンパク質および/または通常のRecAタンパク質、2~75mM酢酸マグネシウム、0~1.0M酢酸ナトリウム、0.4~5mMジチオスレイトール、0~1.0M EGTA、0~500

5 mMスペルミジン、0~50%グリセロール、0.24~70mM ATP $\gamma$ SまたはGTP $\gamma$ Sを含む0.01~1Mトリス酢酸緩衝液(pH7.5)。この液は、あらかじめ1本鎖DNAに、標識またはリガンドを有するRecAタンパク質および/または通常のRecAタンパク質を安定に結合したプローブ・RecA複合体を含む溶液で、前記(4)(5)

10 (6)および必要に応じて(7)を混合して調製する；(9)例えば、10~1000 $\mu$ g/mlの濃度の、標識またはリガンドを有する抗RecA抗体を含む、抗RecA抗体溶液；(10)例えば、0~1000 $\mu$ g/mlの濃度の、標識またはリガンドを有し、そして抗RecA抗体と結合し得る2次抗体を含む2次抗体溶液；(11)希釈して使用

15 される濃厚な保存洗浄液；(12)例えば、0.1~10%スキムミルク、カゼイン、牛血清アルブミン、4 $\times$ SSC(20 $\times$ SSC:3M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸ナトリウム、pH7.5を希釈した液)、0~0.5%TritonX-100などを含む、抗体反応の前処理用ブロッキング液；(13)RecAタンパク質または抗RecA抗体に結合したリガンドや酵素等と反応する、検出可能なリポーターシステ

20 ム；(14)例えば、100mgのp-フェニレンジアミンジヒドロクロリドを10mlのPBSに溶解した後、pH9の0.5M carbonate-bicarbonate bufferでpH8に調製し、90mlのグリセロールを加えてから0.22 $\mu$ mのフィルターで濾過して得た、蛍光剤の退色を防

ぐ抗退色試薬溶液。必要に応じてプロピディウムイオダイド (PI) や 4',6-ジアミディノ-2-フェニルインドール (DAPI) などのカウンター染色剤を含有し得る。

本発明は、また、別の局面で、前記の方法に使用し得る、  
5 標識またはリガンドを有する RecA タンパク質を提供する。該 RecA タンパク質は、好ましくは、フルオレセインイソチオシアネート、Cy3<sup>TM</sup>、Cy5<sup>TM</sup> などのカルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、ローダミン、テキサスレッド (スルフォローダミン)、テトラメチルローダミンイソチオ  
10 シアネート、および、7-アミノ-4-メチルクマリリン-3-酢酸からなる群から選択される蛍光剤を、RecA タンパク質モノマーあたり 1~6 分子を含み、または、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼまたは  $\beta$ -ガラクトシダーゼからなる群から  
15 選択される酵素標識を、RecA タンパク質モノマーあたり 1~3 分子含み、または、ビオチン、ジゴキシゲニンの群から選択されるリガンドを、RecA タンパク質モノマーあたり 1~6 分子含む。

本発明により、染色体中の、特定の遺伝子やその調節領域の位置や、ウィルス由来の核酸配列の存在をシグナル増幅なしで高感度にかつ簡便に測定または視覚化し得る、診断上重  
20 要な方法が提供される。

本発明により、p53 のようなガン抑制遺伝子等の単一コピー遺伝子を、高感度で簡便に検出できる。さらに、本発明の方法は、Kallioniemi, A. らによって開発された CGH 法 (compara

tive genomichybridization 法) (Kallioniemi, A.ら、Science、258、818、1992) にも適用し得る。

本発明の方法は、以下の遺伝子および配列を標的とし得る：  
5 (1)特定の有用な遺伝子産物をコードする遺伝子；(2)例えば、リボゾーム遺伝子、ガン遺伝子、ガン抑制遺伝子など、重要な細胞制御機能を果たしている遺伝子；(3)反復配列およびそれに関連する配列；(4)活性遺伝子産物の発現を阻害する遺伝子の欠陥；(5)既知の遺伝子マップ位置にあるマーカー  
10 プローブ領域と関連する遺伝子または配列；(6)B型肝炎ウイルスなどの、クロマチンに組み込まれたウイルス遺伝子配列およびウイルス粒子中のウイルス遺伝子配列。

さらに、本発明の方法は、染色体の倍数性の変化や欠失、挿入、転座、逆位、重複や増幅等の多様な染色体異常の検出に使用し得る。例えば、特定の領域に相補的なプローブとFITC標識を有するRecAタンパク質とを安定に結合させたプローブ・RecA複合体、および、別の領域に相補的なプローブとTRITC標識とを有するRecAタンパク質を安定に結合したプローブ・RecA複合体を用いて、同時にハイブリダイゼーション反応  
15 を行うことにより、それぞれの領域を蛍光顕微鏡を用いて適切な励起波長で検出し得る。即ち、2種類の識別可能な蛍光シグナルの位置から、染色体中の2つの異なる遺伝子領域の相対的な方向と距離を判定することによって遺伝子異常を検出し得る。  
20

あるいは、本発明の方法は、倍数性の変化や多様な遺伝子

異常、または生物、器官、組織および細胞中のウイルス、細菌および寄生性病原体を高感度に検出し得、種々の診断に利用し得る。感染したウイルス等の核酸の局在は、蛍光顕微鏡で検出し得、あるいは、FACS (fluorescence activated cell  
5 sorter) などにより短時間で感染細胞を測定し得、感染のレベルや検体細胞中に占める感染細胞の割合などを検出し得る。従って、例えば本方法を用いて感染細胞の減少を測定することにより、抗ウイルス剤療法の経過を評価し得る。

本発明によれば、検出可能な標識またはリガンドを含まないプローブを用いて、標的核酸配列が変性しない条件で、ハイブリダイゼーションを行うので、標識またはリガンドによる前記ハイブリダイゼーション反応の妨害がなく、また、1分子あたり、1~6分子の標識またはリガンドを有するRecAタンパク質が、最大約3塩基に1分子程度の割合でプローブに結合  
10 し得るので、プローブそのものに直接標識またはリガンドを導入する場合よりも数倍~数100倍の標識またはリガンドをプローブに付加できることになり、標的核酸配列あたり、従来法よりもはるかに強いシグナルが得られる。また、このRecAタンパク質を検出するので、コピー数の少ない標的配列を極  
15 めて高感度に特異性高く検出できる。

(以下余白)

## 実施例

本発明を説明するために以下に実施例を示す。これらの実施例は、本発明の例示であり、本発明を限定するものではない。

5

### 実施例 1

#### 蛍光剤を有するRecAタンパク質の調製

RecAタンパク質として、市販されている大腸菌由来のRecAタンパク質（ファルマシア社製）、または、通常の大腸菌からZarlingらの方法（WO 93/05177）により精製したRecAタンパク質を使用した。使用されたRecAタンパク質の分子量、1  
10 本鎖DNA依存ATPase活性、DNase活性、strand transfer能やダブルDループ形成能は、すべて公知の方法（WO 93/05177; Sena, E. P. ら、Nature Genetics、3、365、1993; Shibata, T. ら、  
15 Methods in Enzymology、100、197、1983等）であらかじめ測定した。

Cy3<sup>TM</sup>もしくはCy5<sup>TM</sup>は、それぞれBIOLOGICAL DETECTION SYSTEMS, INC. 社製のFluorolink-Ab<sup>TM</sup> Cy3<sup>TM</sup> Labeling KitまたはFluorolink-Ab<sup>TM</sup> Cy5<sup>TM</sup> Labeling Kitを用いてRecAタンパク質に結合させた。  
20

即ち、まず、100 $\mu$ lカップリングバッファー（1M sodium carbonate buffer、pH9.3）の入ったバイアルに、1 mlのpH7.2に調整したリン酸緩衝溶液（PBS）に溶解したRecAタンパク質1 mgを加えて混合した。この混合液を、Cy3<sup>TM</sup>またはCy5<sup>TM</sup>の入



ったバイアル(1mgタンパク質反应用色素、1バイアル)に移して混合し、室温で30分間反応させた。得られた反応液をキットに含まれているゲル濾過カラムにアプライし、キットに付属の溶出バッファー(PBS、pH7.2)を用いて溶出することにより、RecAと結合しなかった遊離のCy3<sup>TM</sup>もしくはCy5<sup>TM</sup>と、Cy3<sup>TM</sup>またはCy5<sup>TM</sup>と結合したRecAタンパク質を含む画分とを分離した。

このようにして得られたCy3<sup>TM</sup>またはCy5<sup>TM</sup>と結合したRecAタンパク質を含む溶液の、波長280nm、552nmまたは652nmにおける吸光度値A<sub>280</sub>、A<sub>552</sub>(Cy3<sup>TM</sup>の場合)、またはA<sub>652</sub>(Cy5<sup>TM</sup>の場合)から計算した結果、得られたCy3<sup>TM</sup>またはCy5<sup>TM</sup>を有するRecAタンパク質には、RecAタンパク質モノマーあたり、それぞれCy3<sup>TM</sup>またはCy5<sup>TM</sup>が1~2分子結合していることが判明した(反応に用いるRecAタンパク質の量を、1mgタンパク質反应用色素1バイアルあたり、0.3~2.0mgに変化させることにより、RecAタンパク質モノマーあたりCy3<sup>TM</sup>またはCy5<sup>TM</sup>が1~6分子結合したものを、必要に応じて随時調製することができる)。

FITCは以下のようにしてRecAタンパク質に結合させた。即ち、RecAタンパク質1mgを含む1mlのpH7.2に調整したPBSを、100 $\mu$ lのカップリングバッファーの入ったバイアルに加えて混合した。この混合液を20 $\mu$ gのFITC(RecAタンパク質重量の1/50)の入ったバイアルに移して混合し、室温で20分間反応させた。得られた反応液をセファデックスG-25カラム(ファ

ルマシア製) にアプライし、溶出バッファー (PBS、pH7.2) を用いて溶出することにより、RecAタンパク質と結合しなかった遊離のFITCと、FITCが結合したRecAタンパク質を含む画分とに分離した。得られたFITCが結合したRecAタンパク質を含む溶液の、波長280nmおよび495nmにおける吸光度値A<sub>280</sub>とA<sub>495</sub>から計算して、得られたFITCを有するRecAタンパク質は、RecAタンパク質モノマーあたりFITCが1~2分子結合していることが判明した(反応に用いるFITCの量を、RecAタンパク質1mgあたり、10~80μgに変化させることにより、RecAタンパク質モノマーあたりFITCが1~6分子結合したものを、必要に応じて随時調製することができる)。

TRITCは上記のFITCと同様の方法でRecAタンパク質に結合させた。即ち、1mgのRecAタンパク質を、40μgのTRITCと反応させてTRITCを有するRecAタンパク質を得た。上記同様TRITCが結合したRecAタンパク質を含む溶液の吸光度値を測定したところ、得られたTRITCを有するRecAタンパク質には、RecAタンパク質モノマーあたりTRITCが1~2分子結合していることが判明した(反応に用いるTRITCの量を、RecAタンパク質1mgあたり、20~200μgに変化させることにより、RecAタンパク質モノマーあたりTRITCが1~6分子結合したものを、必要に応じて随時調製することができる)。

## 実施例 2

### 蛍光剤を有する抗RecA抗体の調製

抗RecA抗体は、公知の方法、例えば、生物化学実験法15 免疫学実験入門、学会出版センターに記載の方法で調製した。即ち、まず、RecAタンパク質を腹腔内に反復注射したマウス（1回につき100～200 $\mu$ g RecA/1匹）から抗RecA抗体を含む抗血清を得た。得られた抗血清をpH7.2の0.01M PBSに対して一晩透析した。透析した抗血清をDEAE-セルロースカラムにアプライし、pH7.2の0.01M PBSで溶出して抗RecA抗体(IgG分画)を含む溶液を得た。得られた抗RecA抗体を含む溶液を濃縮して約1mg/mlの抗RecA抗体を含む液を得た。この濃縮液に、1/10容量のカップリングバッファーを加えた。得られた溶液に、タンパク質の1/100重量の、FITCをカップリングバッファーに溶解して添加し、7～9 $^{\circ}$ Cで6時間反応させた。得られた反応液を、セファデックスG-25カラム（ファルマシア社製）にアプライし、溶出バッファー（0.01M PBS、pH7.2）を用いて溶出することにより、抗RecA抗体と結合しなかった遊離のFITCと、FITCと結合した抗RecA抗体を含む画分とを分離した。

得られたFITCが結合した抗RecA抗体を含む溶液の、波長280nmおよび495nmにおける吸光度値A<sub>280</sub>およびA<sub>495</sub>から計算して、FITCを有する抗RecA抗体は、RecAタンパク質モノマーあたりFITCが3～4分子結合していることが判明した。

上記と同様に、抗RecA抗体量の1/40重量のTRITCを用いて得た、TRITCを有する抗RecA抗体は、RecAタンパク質モノマーあたり、2～3分子のTRITCが結合していることが判明した。

また、実施例1と同様の方法で、BIOLOGICAL DETECTION S

SYSTEMS, INC. 社製の Fluorolink-Ab<sup>TM</sup> Cy3<sup>TM</sup> Labeling Kit または Fluorolink-Ab<sup>TM</sup> Cy5<sup>TM</sup> Labeling Kit を用いて、Cy3<sup>TM</sup> もしくは Cy5<sup>TM</sup> を抗 RecA 抗体に結合した。上記のように 1 mg/ml に調製した抗 RecA 抗体溶液の 1 ml を使用して、得られた Cy3<sup>TM</sup> または Cy5<sup>TM</sup> を有する抗 RecA 抗体は、RecA タンパク質モノマーあたり、Cy3<sup>TM</sup> または Cy5<sup>TM</sup> がそれぞれ 4~5 分子結合していることが判明した。

### 実施例 3

10 Cy3<sup>TM</sup> が結合した RecA タンパク質を用いた インシチュハイブリダイゼーション法による 1 番染色体サテライト III 配列の検出

#### (1) ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

ヒトの 1 番染色体サテライト III 配列を含むプラスミド pUC 1.77 (Cooke, H. J. ら、Nucleic Acids Res.、6、3177、1979) を、bio-14-dATP (Gibco-BRL 社製) 存在下で、BRL 社製のニックトランスレーションキットを使用してビオチンラベルすることにより、1 番染色体サテライト III 配列を含むビオチン化 DNA プロブを調製した。得られたビオチン化 DNA プロブ溶液に 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウムを加えた後、2 倍量の冷エタノールを加えてビオチン化 DNA プロブを沈殿させて回収した後、トリス塩酸 EDTA 緩衝液 (0.1 mM EDTA を含む pH7.5 の 10 mM トリス塩酸) に懸濁した。

得られた懸濁液を、滅菌水またはトリス塩酸 EDTA 緩衝液で希釈し、0.6 ml 容量のマイクロ遠心チューブに入れて沸騰水中

で5分間加熱処理することにより、ビオチン化DNAプローブを変性した。チューブを氷水中に移して急冷した後、1 $\mu$ lの10 $\times$  RecA反応溶液(20mM酢酸マグネシウム、500mM酢酸ナトリウム、10mMジチオスレイトール、1mM EGTA(エチレンジグリコールビス( $\beta$ -アミノエチルエーテル)N,N,N',N'-4酢酸)、および50%グリセロールを含むpH7.5の100mMトリス酢酸緩衝液)、1 $\mu$ lのATP $\gamma$ S溶液またはGTP $\gamma$ S溶液(各48.6mM濃度)、4 $\mu$ gのRecAタンパク質、および、2 $\mu$ gの実施例1で得られたCy3<sup>TM</sup>を有するRecAタンパク質からなる溶液を含む、0.6ml容量のマイクロ遠心チューブに、上記のようにして得た50ngの変性ビオチン化DNAプローブを含む溶液を加え、全量が10 $\mu$ lになるように滅菌水で希釈し、37 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた。

その後、ビオチン化DNAプローブと同様に変性して得た40 $\mu$ g/mlのサケ精子DNA溶液の1 $\mu$ lを加え、さらに37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた。得られた反応液に、1 $\mu$ lの100mM酢酸マグネシウム溶液を加えてよく混合し、ハイブリダイゼーション反応溶液を得た。

## (2)HEp-2細胞核の調製

ヒト喉頭ガン由来のHEp-2細胞(ATCC CCL23)を、常法により、10%牛胎児血清、ピルビン酸ナトリウム、および抗生物質(ペニシリン、ストレプトマイシン)を添加したMEM培地(Gibco-BRL社製)で培養した。得られたHEp-2細胞をトリプシン-EDTA処理し、処理された細胞を低速遠心分離で集めて、37 $^{\circ}$ Cの温浴中で75mMのKCl溶液に徐々に懸濁し、経時的に顕微鏡で確

認しながら、5～20分間保温し、適度に核を膨張させた。その後、氷冷したメタノール：酢酸(3:1)混合液を加えて、0～4℃で遠心分離した。上清を除去してから、さらに氷冷したメタノール：酢酸(3:1)混合液を加えてゆるやかに混合した後遠心分離した。この操作を約8回繰り返すことにより細胞質を除去して核を固定した。

得られた核を、氷冷したメタノール：酢酸(3:1)混合液に再懸濁し、約 $1\sim 2 \times 10^8$ 核/ml濃度の懸濁液を得た。得られた懸濁液を10 $\mu$ lずつスライドガラスに滴下した。滴下した懸濁液を風乾した後、室温～-80℃で保存した。

### (3)未変性の標的核酸配列とのハイブリダイゼーション反応と検出

上記(2)のように調製したスライドガラス上の標的核酸配列を含む試料に、0.5 $\mu$ g/mlのprotenaseK溶液(ベーリンガーマンハイム社製、PBSに溶解したもの)100 $\mu$ lを添加し、この上にパラフィルムを被せて37℃で3分間処理した。proteinaseK溶液を除去してから、PN(0.5%Nonidet P-40を含むpH8.0の0.1Mリン酸緩衝液)で洗浄した。次に、100 $\mu$ lの前処理用ブロッキング液(5%スキムミルク、0.1% TritonX-100、0.02%アジ化ナトリウムを含む、pH7.5の10mMトリス酢酸緩衝液)を添加した後、パラフィルムを被せて室温～37℃で20～60分間処理することにより試料をブロッキングした。前処理用ブロッキング液を除去した後、pH7.5の10mMトリス酢酸緩衝液で軽く洗浄し、上記(1)で調製した10 $\mu$ lのハイブリダイゼーション反応

溶液を試料の上に添加した。

次いで、気泡が入らないように注意してカバーガラスを被せ、湿気を含んだ密閉容器に入れて37°Cのインキュベーター中で2時間反応させた。得られた反応試料を、37°Cに保温した

5 1.75×SSC(20×SSC:3M塩化ナトリウム、0.3Mクエン酸ナトリウム、pH7.5を希釈して調製した)を用いて、10分間ずつ3回洗浄した。次に反応試料を含むスライドガラスをブロッキング液(4×SSC、0.1%TritonX-100、5%スキムミルク、0.02%アジ化ナトリウム)に浸して室温で20分間反応することにより、試料

10 をブロッキングした。次に、5μg/mlのFITCアビジン(Vector社製、DCSグレード、カタログ番号:A-2011、ロット番号:C0527、F/P値:4.6)を含むブロッキング液(4×SSC、0.1% TritonX-100、5%スキムミルク、0.02%アジ化ナトリウム)に浸し、室温で20分間反応させ、標的核酸配列が結合したプローブ・RecA複合体中に含まれるビオチン化プローブにFITCアビジンを結合させた。その後、スライドガラスを、4×SSC、0.1%TritonX-100を含む4×SSC、および4×SSCの順に室温で各1

15 0分間ずつ洗浄した。

さらに、滅菌水で軽く洗浄した後、抗退色試薬(100mgのp-フェニレンジアミンジヒドロクロリドを10mlのPBSに溶解した後、pH9の0.5Mcarbonate-bicarbonate bufferでpH8に調製し、90mlのグリセロールを加えてから0.22μmのフィルターで濾過した液。必要に応じてプロピディウムイオダイド(PI)や4',6'-ジァミディノ-2-フェニルインドール(DAPI)等のカウンター

20

染色剤を添加する)を1滴添加してカバーガラスを被せた。

この試料をまずG励起フィルター (BP-545) と補助励起フィルター E0530を組み合わせたオリンパス社製の蛍光顕微鏡で観察し、Cy3<sup>TM</sup>が結合したRecAタンパク質由来のCy3<sup>TM</sup>のシグナルを検出した。次にIB励起フィルター (BP-495) と補助吸収フィルター (G520)を組み合わせて、標的核酸配列・プローブとの複合体中に含まれるビオチン化プローブ由来のFITCのシグナルを検出した。この結果、Cy3<sup>TM</sup>のシグナルの方がFITCのシグナルより強く、かつCy3<sup>TM</sup>のシグナルとFITCのシグナルが全く同じ位置に重なっていることが判明した。このことから、得られた標的核酸・プローブ複合体中にRecAタンパク質が除去されずにそのまま残っていることが確認できたと同時に、Cy3<sup>TM</sup>が結合したRecAタンパク質を用いて標的核酸・プローブ複合体を2時間以内に効率よく形成させることができ、この標的核酸・プローブ複合体中に含まれるCy3<sup>TM</sup>が結合したRecAタンパク質を検出することにより、ハイブリダイゼーション反応・洗浄後の染色工程なしに、標的核酸配列である1番染色体サテライトIII配列の存在を、Zarlingらの方法よりもより高感度により簡便にかつ同程度の特異性で検出できることが実証できた。尚、コファクターとしてATP $\gamma$ Sを用いた場合も、GTP $\gamma$ Sを用いた場合も結果に差はなかった。

#### 実施例 4

FITCが結合したRecAタンパク質を用いたインシチュハイブリ



ダイゼーション法による1番染色体サテライトIII配列の検出

## (1)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

1番染色体サテライトIII配列を含むプラスミドpUC1.77(Cooke, H. J.ら、Nucleic Acids Res.、6、3177、1979)から、dNTP(dATP、dTTP、dGTP、dCTP)存在下でBRL社製のニクトラ  
5      ンスレーションキットを使用して、1番染色体サテライトIII  
配列を含むDNAプローブを調製した。得られたDNAプローブは  
標識およびリガンドを含んでいない。得られたDNAプローブ溶  
液に1/10容量の3M酢酸ナトリウム溶液を添加した後、2倍量の  
10      冷エタノールを加えてDNAプローブを沈殿させて回収し、0.1  
mM EDTAを含むpH7.5の10mMトリス塩酸緩衝液に懸濁した。

この懸濁液を同一組成のトリス塩酸緩衝液または滅菌水で  
希釈し、0.6ml容量のマイクロ遠心チューブに入れて沸騰水中  
で5分間加熱処理してプローブを変性した後、チューブを氷  
15      水中に移して急冷した。1 $\mu$ lの10 $\times$  RecA反応溶液(20mM酢酸  
マグネシウム、500mM酢酸ナトリウム、10mMジチオスレイトール、  
1mM EGTA、50%グリセロールを含むpH7.5の100mMトリス  
酢酸緩衝液)、1 $\mu$ lのATP $\gamma$ S溶液またはGTP $\gamma$ S溶液(48.6mM濃  
度の保存溶液)(あるいは、rATP、dATP、ATP $\gamma$ SなどとADPの混  
20      合物を用いてもよい)、1.6 $\mu$ gのRecAタンパク質、および、実  
施例1で得られた0.8 $\mu$ gのFITCが結合したRecAタンパク質か  
らなる溶液を含む、0.6ml容量のマイクロ遠心チューブに、上  
記のようにして得た20ngの変性DNAプローブを含む溶液を加え、  
全量が10 $\mu$ lになるように滅菌水で希釈し、37 $^{\circ}$ Cで15分間反応

させた。

その後、DNAプローブと同様に変性して得た40 $\mu$ g/mlのサケ精子DNA溶液の1 $\mu$ lを加え、さらに37°Cで10分間反応させた。得られた反応液に、1 $\mu$ lの100mM酢酸マグネシウム溶液を加えてよく混合し、ハイブリダイゼーション反応溶液を得た。

#### (2)HEp-2細胞核の調製

実施例3(2)に記載した方法と同様の方法で調製した。

#### (3)未変性の標的核酸とのハイブリダイゼーション反応および検出

実施例3(3)に記載した方法と同様の方法で、上記(1)で調製したハイブリダイゼーション反応溶液および上記(2)で調製したスライドガラス上の試料を反応させて、1.75xSSC、0.1% TritonX-100を含む1.75xSSC、1.75xSSCの順で各10分間ずつ37°Cで洗浄した。次に滅菌水で軽く洗浄した後、前記抗退色試薬(PIを含む)を1滴添加して標的核酸配列に結合したプローブ・RecA複合体中のRecAタンパク質に結合したFITCシグナルを、IB励起フィルター(BP-495)を取り付けたオリンパス社製の蛍光顕微鏡で検出した。

この結果より、20ngのプローブとFITCが結合したRecAタンパク質を用いて、2時間以内に標的核酸・プローブ複合体を効率よく形成させることができ、該標的核酸・プローブ複合体中に含まれるFITCを有するRecAタンパク質を検出することにより、ハイブリダイゼーション反応・洗浄後の染色工程なしに、標的核酸配列の存在を、カウンター染色を施した場合も、

通常の蛍光顕微鏡で容易に検出できることが判明した。これ  
によって本方法を用いることにより、Zarlingらの方法に比べ  
より高感度により簡便に標的核酸配列の存在を検出できるこ  
とが実証できた。尚、コファクターとしてATP $\gamma$ Sを用いた場  
5 合も、GTP $\gamma$ Sを用いた場合も結果に差はなかった。

### 実施例 5

#### FITCを有するRecAタンパク質を用いたインシチュハイブリダ イゼーション法によるガン抑制遺伝子p53の検出

#### 10 (1)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

ガン抑制遺伝子p53のcDNAから調製したONCOR社製のピオチ  
ン化プローブ(ONCOR社製、カタログ番号:P1710-BIO、ロット  
番号:3C114)20ngを使用して、実施例4(1)に記載の方法と同  
様の方法でハイブリダイゼーション反応溶液を調製した。

#### 15 (2)HEp-2細胞核の調製

実施例3(2)に記載の方法と同様の方法でHEp-2細胞核を調  
製した。

#### (3)未変性の標的核酸とのハイブリダイゼーション反応および 検出

20 実施例4(3)に記載の方法と同様の方法で、未変性の標的核  
酸とのハイブリダイゼーション反応および検出を行った。20  
ngのp53プローブとFITCを有するRecAタンパク質を用いて、2  
時間以内に標的核酸・プローブ複合体を効率よく形成させる  
ことができ、該標的核酸・プローブ複合体中に含まれるFITC

が結合したRecAタンパク質を検出することにより、ハイブリダイゼーション反応・洗浄後の染色工程なしに、標的核酸配列（単一コピーであるp53遺伝子配列）の存在を、カウンター染色を施した場合も、通常の蛍光顕微鏡で容易に検出できることが判明した。

#### (4)Zarlingらの方法による検出

p53のcDNAから調製した50ngのONCOR社製のビオチン化プローブ、6 $\mu$ gのRecAタンパク質、および、20ngのビオチン化プローブ、2.4 $\mu$ gRecAタンパク質を使用して、ZarlingらによるWO 93/05177の実施例2に開示される方法に従って、プローブ複合体を調製した。この複合体を、実施例3(2)に記載の方法と同様の方法で調製した試料に添加して、ZarlingらによるWO 93/05177の実施例3Bに記載の方法と同様の方法で2時間ハイブリダイズし、次いで洗浄を行った。ただし、ハイブリダイゼーション反応の前に10mMトリス酢酸緩衝液（pH7.5）中で60 $^{\circ}$ C、45分間の前処理を行った。前処理用ブロッキング液によるブロッキング処理は行わなかった。

次いで、上記実施例3(3)に記載の方法で、標的核酸配列・プローブ複合体中に含まれるビオチン化プローブにFITCアビジン（Vector社製、DCSグレード、カタログ番号：A-2011、ロット番号：C0527、F/P値：4.6）を結合させ、IB励起フィルター（BP-495）を取り付けたオリンパス社製の蛍光顕微鏡で観察し、ビオチン化プローブ由来のFITCのシグナルを検出した。50ngのビオチン化p53プローブを使用した場合は、カウンター

染色しなければ、非常に弱いながらも一応通常の蛍光顕微鏡でシグナルを検出できたが、カウンター染色した場合はビオチン化p53プローブ由来のFITCのシグナルを全く検出できなかった。

- 5           また20ngのビオチン化p53プローブを使用した場合には、カウンター染色しない場合においてもビオチン化p53プローブ由来のFITCのシグナルを全く検出できなかった。この結果は、本発明による方法が、Zarlingらの方法に比べより高感度により簡便に、単一コピーであるp53遺伝子を検出できることを示
- 10           す。尚、コファクターとしてATP $\gamma$ Sを用いた場合も、GTP $\gamma$ Sを用いた場合も結果に差はなかった。

#### 実施例 6

FITCを有するRecAタンパク質を用いたインシチュハイブリダイゼーション法によるメタノール固定した肝臓ガン由来細胞懸濁液中のHBV核酸配列の検出

15

##### (1)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

全HBV(B型肝炎ウイルス)DNA配列を含むプラスミドpAM6(ATCC 45020)を、dNTP存在下でBRL社製のニクトランスレーションキットを使用して断片化することにより、HBV配列を含むDNAプローブを調製した。このDNAプローブは、検出可能な標識やリガンドを有していない。このようにして調製した20ngのHBVプローブを使用して、実施例4(1)に記載の方法と同様の方法でハイブリダイゼーション反応溶液を調製した。

20

## (2) 固定した肝臓ガン由来細胞懸濁液の調製

肝臓ガン由来で、HBV核酸配列の一部が染色体に組み込まれていることが知られている“Alexander”細胞(ATCC CRL8024)を、HEp-2細胞と同様にして培養し、遠心分離によって細胞を集めPBSで洗浄した。遠心分離してPBSを除去した後、沈澱した細胞を、100%冷メタノール(または、70%エタノール等の適当な固定液)を加えて固定した。細胞濃度が $2 \times 10^6$ 個/mlになるように調製して $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。対照として、HEp-2細胞の懸濁液を同様の方法で固定して調製した。

## 10 (3) 細胞懸濁液中での未変性の標的核酸とのハイブリダイゼーション反応と検出

上記(2)で調製した、約 $1 \times 10^6$ 個の細胞を含む細胞懸濁液を、0.6ml容量のマイクロ遠心チューブに分取し、 $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ で遠心分離して上清を除去した。沈澱として集められた細胞を風乾した後、 $200 \mu\text{l}$ の前処理用ブロッキング液を加えて細胞を懸濁し、室温 $\sim 37^{\circ}\text{C}$ で20 $\sim$ 30分間保持することによりブロッキングした。この液を遠心分離して前処理用ブロッキング液を除去し、次いで、pH7.5の10mMトリス酢酸緩衝液で細胞を洗浄した。上記(1)で調製したハイブリダイゼーション反応溶液 $10 \mu\text{l}$ を細胞に添加して懸濁した後、 $37^{\circ}\text{C}$ の温浴中で2時間反応させた。

得られた反応液を遠心分離して上清を除去した。次いで、 $37^{\circ}\text{C}$ に保温した $1.75 \times \text{SSC}$ を $200 \mu\text{l}$ 加えて細胞を懸濁後、 $37^{\circ}\text{C}$ の温浴中で5分間保温し、その後、遠心分離して上清を除去

した。0.1%TritonX-100を含む1.75xSSC、1.75xSSCの順でさらに2回洗浄した。そして30 $\mu$ lの抗退色試薬(PI等のカウンター染色剤は含まない)を加えて細胞を懸濁し、このうち2 $\mu$ lをスライドガラスに滴下し、カバーガラスを被せてIB励起フィルター(BP-495)を取り付けたオリンパス社製の蛍光顕微鏡でFITCシグナルを観察した。その結果、Alexander細胞からは、ハイブリダイゼーション反応・洗浄後の染色工程なしに、FITCのシグナルを検出できたが、HEp-2細胞からは全くシグナルは検出されなかった。

この結果から、細胞懸濁液を使用した場合でも、本方法により高感度により簡便に特異性高く標的核酸配列の存在を検出できることが実証された。尚、コファクターとしてATP $\gamma$ Sを用いた場合も、GTP $\gamma$ Sを用いた場合も結果に差はなかった。

15

#### 実施例 7

FITCを有するRecAタンパク質を用いたインシチュハイブリダイゼーション法による中期細胞由来の染色体標本中の1番染色体サテライトIIIDNAの検出

(1)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

20 実施例4(1)に記載の方法と同様の方法で調製した。

(2)染色体標本の調製

染色体標本を、例えば、Trask, B. J. ら、Methods in Cell Biology、35、16、1991に記載される常法に従って、健常人の血液から分離したリンパ球を培養してコルセミド処理した後

実施例 3 (2)と同様の方法で固定することによって調製した。

(3)未変性の標的核酸とのハイブリダイゼーション反応と検出

5 実施例 4 (3)に記載の方法と同様の方法で行った。20ngのプロ  
ローブとFITCが結合したRecAタンパク質を用いて、2時間以内  
に染色体標本中の標的核酸と標的核酸・プローブ複合体を効  
率よく形成させることができ、FITCを検出することにより、  
ハイブリダイゼーション反応・洗浄後の染色工程なしに、染  
10 色体標本中の標的核酸配列である1番染色体サテライトIII配  
列の存在を、カウンター染色を行った場合も、通常の蛍光顕  
微鏡で容易に検出できることが判明し、本発明による方法が  
染色体標本にも適用できることが確認できた。尚、コファク  
ターとしてATP $\gamma$ Sを用いた場合も、GTP $\gamma$ Sを用いた場合も結  
果に差はなかった。

15

### 実施例 8

FITCを有する抗RecA抗体を用いる標的核酸配列(1番染色体サ  
テライトIII配列)の検出

(1)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

20 検出可能な標識またはリガンドを有しない2.4 $\mu$ gのRecAタ  
ンパク質を使用して、実施例 4 (1)に記載の方法と同様の方法  
でハイブリダイゼーション反応溶液を調製した。

(2)HEp-2細胞核の調製

実施例 3 (2)に記載の方法と同様の方法でHEp-2細胞核を調  
製した。



(3)未変性の標的核酸とのハイブリダイゼーション反応と検出

上記(2)で調製した試料に、10 $\mu$ lの上記(1)で調製したハイブリダイゼーション反応溶液を添加した。気泡が入らないように注意してカバーガラスを被せ、湿気を含んだ密閉容器に入れて37 $^{\circ}$ Cのインキュベーター中で2時間反応させた。この  
5 反応試料を、37 $^{\circ}$ Cに保温した1.75 $\times$ SSC中で10分間ずつ3回洗浄した。次に試料を含むスライドガラスをブロッキング液(4 $\times$ SSC、0.1%Triton X-100、5%スキムミルク、0.02%アジ化ナトリウム)に浸して室温で20分間反応することにより試料を  
10 ブロッキングした。

ブロッキング液を除去した後、100 $\mu$ lの抗RecA抗体溶液(実施例2で得られた、FITCが結合した抗RecA抗体を15 $\mu$ g/mlの濃度でブロッキング液に溶解したもの)を添加し、パラフィルムを被せて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。この試料を含むスライド  
15 ドガラスを、4 $\times$ SSC、0.1%Triton X-100を含む4 $\times$ SSC、4 $\times$ SSCの順に室温で各10分間ずつ洗浄した。さらに滅菌水で軽く洗浄した後、上記の抗退色試薬を1滴添加してカバーガラスを被せてIB励起フィルター(BP-495)を取り付けたオリンパス社製の蛍光顕微鏡で観察し、FITCシグナルを検出することにより1番染色体サテライトIIIDNAの存在を検出できた。得られたシグナルは、実施例4で得られたシグナルよりもさらに強かった。尚、コファクターとしてATP $\gamma$ Sを用いた場合もGTP $\gamma$ Sを用いた場合も結果に差はなかった。  
20

### 実施例 9

#### 抗RecA抗体を認識し得る2次抗体を用いた標的核酸配列(1番染色体サテライトIII配列)の検出

##### (1)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

- 5 実施例 8 (1)に記載した方法と同様の方法でハイブリダイゼーション反応溶液を調製した。

##### (2)HEp-2細胞核の調製

実施例 3 (2)に記載の方法と同様の方法でHEp-2細胞核を調製した。

- 10 (3)未変性の標的核酸とのハイブリダイゼーション反応と検出

上記(2)で調製した試料に、10 $\mu$ lの上記(1)で調製したハイブリダイゼーション反応溶液を添加した。気泡が入らないように注意してカバーガラスを被せ、湿気を含んだ密閉容器に入れて37 $^{\circ}$ Cのインキュベーター中で2時間反応させた。得られた反応試料を、37 $^{\circ}$ Cに保温した1.75 $\times$ SSC中で10分間ずつ3  
15 回洗浄した。次に試料を含むスライドガラスをブロッキング液(4 $\times$ SSC、0.1%Triton X-100、5%スキムミルク、0.02%アジ化ナトリウム)に浸して室温で20分間反応させてブロッキングを行った。ブロッキング液を除去した後、100 $\mu$ lの抗RecA抗体溶液(実施例2で得られたFITCが結合した抗RecA抗体を15  
20  $\mu$ g/mlの濃度でブロッキング液に溶解したもの。FITCが結合していない抗RecA抗体を使用してもよい)を添加し、パラフィルムを被せて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。この試料を含むスライドガラスを、4 $\times$ SSC、0.1%Triton X-100を含む4 $\times$ SSC、4 $\times$

SSCの順に室温で各10分間ずつ洗浄した。さらにもう1度スライドガラスをブロッキング液に浸して室温で20分間反応させて再度ブロッキングを行った。

5           ブロッキング液を除去した後、100 $\mu$ lのFITCが結合したヤギ抗マウスIgG抗体溶液(シグマ社製のヤギ抗マウスIgG抗体を、0.1%Tween-20、2%正常ヤギ血清(Gibco社製)を含むPBSで1/1000希釈した溶液)を添加し、パラフィルムを被せて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。この試料を含むスライドガラスを、0.1%Tween-20を含むPBSを用いて室温で5分間ずつ3回洗浄した。さら  
10           に、滅菌水で軽く洗浄した後、上記の抗退色試薬を1滴添加してカバーガラスを被せてIB励起フィルター(BP-495)を取り付けたオリンパス社製の蛍光顕微鏡で観察し、FITCシグナルを検出することにより1番染色体サテライトIII DNAの存在を検出した。

15           得られたシグナルは、実施例4や8で得られたシグナルよりも強かった。尚、コファクターとしてATP $\gamma$ Sを用いた場合も、GTP $\gamma$ Sを用いた場合も結果に差はなかった。

### 実施例 10

20           ジゴキシゲニンを有するRecAタンパク質を用いるインシチュハイブリダイゼーション法による多剤耐性(MDR1)遺伝子の検出

(1)ジゴキシゲニンを結合させたRecAタンパク質の調製

          ベーリンガーマンハイム社製のDIG抗体ラベリングキットを

用いて、ジゴキシゲニンをRecAタンパク質に結合させた。

即ち、まずRecAタンパク質1mgを1mlのリン酸緩衝溶液(PBS)に溶解し、得られた溶解液に、43.5 $\mu$ lのジゴキシゲニン-3-O-サクシニル- $\epsilon$ -アミノカプロン酸-N-ヒドロキシ-サクシイミドエステル(DIG-NHS)溶液(2 $\mu$ g/ $\mu$ l)を加えて、ゆるやかに攪拌しながら室温で2時間反応させた。ここで、1モルのRecAタンパク質は、5モルのDIG-NHSと反応する。

得られた反応液を、セファデックスG-25にアプライし、溶出緩衝液(PBS、pH7.2)を用いて溶出することにより、RecAと結合しなかった遊離のDIG-NHS、およびDIG-NHSと結合したRecAタンパク質とを分離した。

#### (2)ハイブリダイゼーション反応溶液の調製

BRL社製のニックトランスレーションキットを使用して、dNTP(dATP、dTTP、dGTP、dCTP)の存在下で、多剤耐性(MDR1)遺伝子由来のcDNA配列を含むプラスミドpMDRA1(Kioka, Nら、Biochem. Biophys. Res. Commu., 162, 224, 1989)から、多剤耐性(MDR1)遺伝子由来のcDNA配列を含むDNAプローブを調製した。得られたDNAプローブは、検出可能な標識またはリガンドを含んでいない。得られたDNAプローブを含む溶液に、0.3M酢酸ナトリウムを含むエタノールを添加することにより、DNAプローブを沈澱させて回収した。回収したDNAプローブをトリス塩酸EDTA緩衝液(10mMトリス塩酸、0.1mMEDTA、pH7.5)に懸濁し、Microcon-100(アミコン社製)を用いて精製することにより、DNAプローブ溶液を得た。

得られたDNAプローブ溶液を、滅菌水またはトリス塩酸EDT  
A緩衝液で希釈し、0.6ml容量のマイクロ遠心チューブに入れ  
た。このチューブを沸騰水中で5分間保持することによりDNA  
プローブを変性した。変性後、このチューブは氷水中に移し  
5 て急冷した。

別に、0.6ml容量のマイクロ遠心チューブに、1 $\mu$ lの10 $\times$ R  
ecA 反応溶液(100mMトリス酢酸緩衝液pH7.5、20mM酢酸マグネ  
シウム、500mM酢酸ナトリウム、10mMジチオスレイトール、5  
0%グリセロール)、1 $\mu$ lのATP $\gamma$ S溶液またはGTP $\gamma$ S溶液(4.8  
10 6mMに調製した保存溶液)、114ngのSSB(single-strand bindi  
ng protein、ファルマシア社製)、および1.6 $\mu$ gのRecAタンパ  
ク質と0.8 $\mu$ gのDIG-NHSとを結合して得たRecAタンパク質を添  
加し混合した。なお、上記ATP $\gamma$ S溶液またはGTP $\gamma$ S溶液の代  
わりに、rATP、dATP、またはATP $\gamma$ SとADPの混合物を必要に応  
15 じて使用した。

このマイクロ遠心チューブに、上記のようにして変性させ  
たDNAプローブを20ng加え、さらに全量が10 $\mu$ lになるように  
滅菌水を添加した後、37 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた。

得られた反応液に、1 $\mu$ lの酢酸マグネシウム溶液(100 mM)  
20 を加えてよく混合することにより、ハイブリダイゼーション  
反応溶液を得た。

### (3)HEp-2細胞核の調製

実施例3(2)に記載した方法と同様の方法で調製した。

### (4)未変性の標的配列とのハイブリダイゼーション反応と検出

上記(3)で得たスライドガラス上のHEp-2細胞核に、100 $\mu$ l  
のRNase溶液(ベーリンガーマンハイム社製のRNAaseを、グリ  
セロールを含まない1 $\times$ RecA反応溶液に、50 $\mu$ g/mlの濃度にな  
るように溶解した液)を添加し、パラフィルムを被せて、37 $^{\circ}$ C  
5 で60分間処理した。処理後、RNase溶液を除去し、グリセロール  
を含まない1 $\times$ RecA反応溶液で洗浄し、次に室温で10分間、  
10%のホルマリン溶液(和光純薬社製)で試料を処理した。

次いで、この試料を、グリセロールを含まない1 $\times$ RecA反応  
溶液で洗浄し、100 $\mu$ lの前処理用ブロッキング液(5%スキムミ  
10 ルク、10mMトリス酢酸緩衝液、0.1% Triton X-100、0.02%ア  
ジ化ナトリウム)を添加し、パラフィルムを被せた後、室温 $\sim$   
37 $^{\circ}$ Cで20 $\sim$ 60分間保持することにより試料をブロッキングし  
た。

次いで、前処理用ブロッキング液を除去し、グリセロール  
15 を含まない1 $\times$ RecA反応溶液を用いて軽く洗浄した後、(2)で  
調製したハイブリダイゼーション反応溶液10 $\mu$ lを試料の上に  
添加した。気泡が入らないように注意してカバーガラスを被  
せ、湿気を含んだ密閉容器に入れて37 $^{\circ}$ Cのインキュベーター  
中で2時間保持することによりハイブリダイゼーション反応を  
20 行った。得られた反応試料は、37 $^{\circ}$ Cに保温した1.75 $\times$ SSCを用  
いて10分間ずつ3回洗浄した。

次に反応試料を含むスライドガラスをブロッキング液(4 $\times$   
SSC、0.1%Triton X-100、5%スキムミルク、0.02%アジ化ナト  
リウム)に浸して室温で20分間反応することにより、試料をブ

5                    ロッキングした。次いで、試料を含むスライドガラスを20  $\mu$   
g/mlの抗ジゴキシゲニン-フルオレッセン(ベーリンガーマン  
ハイム社製)を含むブロッキング液に浸して37°Cで20分間反応  
させ、標的核酸配列に結合したプローブ・RecA複合体中に含  
5                    まれるDIG-NHSを結合させたRecAタンパク質に、抗ジゴキシゲ  
ニン-フルオレッセンを結合させた。その後、スライドガラ  
スを、4 $\times$  SSC、0.1% Triton X-100を含む4 $\times$  SSC、および4 $\times$  S  
SCの順に室温で各10分間ずつ洗浄した。次に滅菌水で軽く洗  
10                    浄した後、実施例3に記載の抗退色試薬を1滴添加してカバー  
ガラスを被せた。この試料をIB励起フィルター(BP-495)を取  
り付けたオリンパス社製の蛍光顕微鏡で観察し、標的核酸  
(多剤耐性(MDR1)遺伝子由来のcDNA配列)・プローブ複合体  
中に含まれるDIG-NHSを結合させたRecAタンパク質由来のフル  
オレッセン(FITC)のシグナルを検出した。

15                    この結果から、DIG-NHSを結合させたRecAタンパク質を用い  
ても標的核酸・プローブ複合体を効率よく形成させることが  
でき、該標的核酸・プローブ複合体中に含まれるDIG-NHSを結  
合させたRecAタンパク質を検出することにより、単一コピー  
である標的配列(多剤耐性(MDR1)遺伝子由来のcDNA配列)の  
20                    存在をZarlingらの方法に比べより簡便により高濃度に検出で  
きることを実証できた。

尚、補因子としてATP $\gamma$ Sを用いた場合も、GTP $\gamma$ Sを用いた  
場合も結果に差はなかった。

### 請求の範囲

1. 固定された細胞または細胞構造体に含まれる2本鎖標的核酸配列の存在を検出する方法であって、該方法は以下の工程を包含する：細胞または細胞構造体を、核酸プローブが侵入し得るように固定し、固定された細胞または細胞構造体を得る工程；1本鎖プローブとRecAタンパク質が安定に結合したプローブ・RecA複合体を形成する工程、ここで、該1本鎖プローブは2本鎖標的核酸配列に相補的な配列を有する；該プローブ・RecA複合体を、該固定された細胞または細胞構造体に、該2本鎖標的核酸配列と接触し得る条件下で添加する工程；該2本鎖標的核酸配列が変性しない条件下で、該プローブ・RecA複合体と該2本鎖標的核酸配列とを反応させて結合する工程；該2本鎖標的核酸配列と結合しなかったプローブ・RecA複合体を除去する工程；および該2本鎖標的核酸配列と結合したプローブ・RecA複合体に含まれるRecAタンパク質を検出し、それによって該2本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程。

2. 前記2本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程が、検出可能な標識またはリガンドを有するRecAタンパク質を用いて行われる、請求項1に記載の方法。

3. 前記標識またはリガンドが、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンからなる群から選択される、請求項2に記載の方法。

4. 前記プローブ・RecA複合体を形成する工程が、ATP $\gamma$ S、



GTP $\gamma$ S、rATP、dATP、ATP $\gamma$ SとrATPとの混合物、ATP $\gamma$ SとADPとの混合物、GTP $\gamma$ SとADPとの混合物、および、GTP $\gamma$ SとGDPとの混合物からなる群から選択されるコファクターの存在下で行われる、請求項1または2に記載の方法。

5           5. 前記蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネート、カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、ローダミン、テキサスレッド（スルフォローダミン）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、および、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸からなる群から選択される、請求  
10           項3に記載の方法。

6. 前記標識が蛍光剤であり、前記2本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程が、蛍光顕微鏡またはフローサイトメーターにより行われる、請求項2に記載の方法。

7. 前記酵素標識が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシ  
15           シダーゼまたは $\beta$ -ガラクトシダーゼからなる群から選択される、請求項3に記載の方法。

8. 前記2本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程が、抗RecA抗体を用いて行われる、請求項1に記載の方法。

9. 前記抗RecA抗体が、検出可能な標識またはリガンドを  
20           有する請求項8に記載の方法。

10. 前記標識またはリガンドが、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンからなる群から選択される、請求項9に記載の方法。

11. 前記蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネート、

カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、  
ローダミン、テキサスレッド（スルフォローダミン）、テト  
ラメチルローダミンイソチオシアネート、および、7-アミ  
ノ-4-メチルクマリン-3-酢酸からなる群から選択され  
5 る、請求項10に記載の方法。

12. 前記標識が蛍光剤であり、前記2本鎖標的核酸配列  
の存在を検出する工程が、蛍光顕微鏡またはフローサイトメ  
ーターにより行われる、請求項8に記載の方法。

13. 前記酵素標識が、アルカリホスファターゼ、ペルオ  
キシダーゼまたは $\beta$ -ガラクトシダーゼからなる群から選択  
10 される、請求項10に記載の方法。

14. 前記2本鎖標的核酸配列の存在を検出する工程が、  
抗RecA抗体および抗RecA抗体と結合し得る2次抗体を用いて  
行われる、請求項1に記載の方法。

15. 検出可能な標識またはリガンドを有するRecAタンパ  
ク質を含む、請求項1または2に記載の方法を実施するた  
めのキット。

16. 前記標識またはリガンドが、蛍光剤、化学発光剤、  
酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンからなる  
20 群から選択される、請求項15に記載のキット。

17. 前記蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネート、  
カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、  
ローダミン、テキサスレッド（スルフォローダミン）、テト  
ラメチルローダミンイソチオシアネート、および、7-アミノ

-4-メチルクマリン-3-酢酸からなる群から選択される、請求項 16 に記載のキット。

18. 前記酵素標識が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼまたは $\beta$ -ガラクトシダーゼからなる群から選択される、請求項 16 に記載のキット。

19. プローブと検出可能な標識またはリガンドを有する RecAタンパク質とが安定に結合したプローブ・RecA複合体を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法を実施するためのキット。

20. 前記標識またはリガンドが、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンからなる群から選択される、請求項 19 に記載のキット。

21. 前記蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネート、カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、ローダミン、テキサスレッド（スルフォローダミン）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、および、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸からなる群から選択される、請求項 20 に記載のキット。

22. 前記酵素標識が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼまたは $\beta$ -ガラクトシダーゼからなる群から選択される、請求項 20 に記載のキット。

23. RecAタンパク質および検出可能な標識またはリガンドを有する抗RecA抗体を含む、請求項 8 または 9 に記載の方法を実施するためのキット。

24. 前記標識またはリガンドが、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンからなる群から選択される、請求項23のキット。

5 25. 前記蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネート、カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、ローダミン、テキサスレッド（スルフォローダミン）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、および、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸からなる群から選択される、請求項24に記載のキット。

10 26. 前記酵素標識が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼまたは $\beta$ -ガラクトシダーゼからなる群から選択される、請求項24に記載のキット。

15 27. プローブとRecAタンパク質とが安定に結合したプローブ・RecA複合体、および検出可能な標識またはリガンドを有する抗RecA抗体を含む、請求項8または9に記載の方法を実施するためのキット。

28. 前記標識またはリガンドが、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンからなる群から選択される、請求項27に記載のキット。

20 29. 前記蛍光剤が、フルオレセインイソチオシアネート、カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、ローダミン、テキサスレッド（スルフォローダミン）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、および、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸からなる群から選択される、請求

項 28 に記載のキット。

30. 前記酵素標識が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼまたは $\beta$ -ガラクトシダーゼからなる群から選択される、請求項 28 に記載のキット。

5 31. 請求項 1 または 2 の方法に使用し得る、標識またはリガンドを有する RecA タンパク質。

32. 前記標識またはリガンドが、蛍光剤、化学発光剤、酵素標識、放射性標識、ビオチン、ジゴキシゲニンからなる群から選択される、請求項 31 に記載の RecA タンパク質。

10 33. フルオレセインイソチオシアネート、カルボキシメチルインドシアニンサクシニミジルエステル、ローダミン、テキサスレッド（スルフォローダミン）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、および、7-アミノ-4-メチルクマリル-3-酢酸からなる群から選択される蛍光剤を、RecA タンパク質モノマーあたり 1~6 分子含む、請求項 32 に記載の RecA

15 タンパク質。

34. アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼまたは $\beta$ -ガラクトシダーゼからなる群から選択される酵素標識を、RecA タンパク質モノマーあたり 1~3 分子含む、請求項 32 項

20 に記載の RecA タンパク質。

35. ビオチン、ジゴキシゲニンの群から選択されるリガンドを、RecA タンパク質モノマーあたり 1~6 分子含む、請求項 32 項に記載の RecA タンパク質。

36. 前記固定化された細胞または細胞構造体を前処理用

ブロッキング液で処理する工程をさらに包含する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

- 5 37. 前記ブロッキング液が、カゼイン、スキムミルク、牛血清アルブミン、前記細胞または細胞構造体に含まれる核酸およびプローブとハイブリダイズしないキャリアーDNA、および、キャリアーRNAからなる群から選択される少なくとも一種を含む、請求項 36 に記載の方法。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/02276

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X<br>A    | JP, A, 1-289499 (Aplaid Biosystems, Inc.),<br>November 21, 1989 (21. 11. 89),<br>Official Gazette<br>Official Gazette of page 7<br>Official Gazette of page 6<br>& EP, B1, 322311 | 31-32, 35<br>33-34    |
| A         | WO, A1,91/17267 (S.R.I. International),<br>November 14, 1991 (14. 11. 91),<br>& EP, A, 481065 & JP, A, 4-507198<br>& US, A, 5223414   | 1 - 37                |
| A         | WO, A1, 87/01730 (Earl University),<br>March 26, 1987 (26. 03. 87),<br>& EP, A, 236491  | 1 - 37                |
| A         | US, A, 4888274 (Earl University),<br>December 19, 1989 (19. 12. 89) (Family: none)  | 1 - 37                |
| A         | WO, A1, 93/05177 (Daikin Industries, Ltd.),<br>March 18, 1993 (18. 03. 93),   | 1 - 37                |

 Further documents are listed in the continuation of Box C.
  See patent family annex.

|   |  |
|---|--|
| * Special categories of cited documents:  | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date  | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family  |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  |  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |  |

|  |  |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search<br>April 12, 1995 (12. 04. 95) | Date of mailing of the international search report<br>May 2, 1995 (02. 05. 95) |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office<br>Facsimile No.          | Authorized officer<br><br>Telephone No.  |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/02276

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
|           | & EP, A, 614492 & JP, A, 6-510200  |                       |



|  |   |                    |
|--|---|--------------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  |   |                    |
| Int. Cl <sup>6</sup> C12Q1/68  |   |                    |
| B. 調査を行った分野  |   |                    |
| 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))   |   |                    |
| Int. Cl <sup>6</sup> C12Q1/68  |   |                    |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの   |   |                    |
| 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)   |   |                    |
| C. 関連すると認められる文献  |   |                    |
| 引用文献の<br>カテゴリー*  | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号   |
| X<br>A   | JP, A, 1-289499 (アブライド バイオシステムズ<br>インコーポレーテッド),<br>21. 11月, 1989 (21. 11. 89),<br>公報<br>公報第7頁<br>公報第6頁<br>&EP, B1, 322311 | 31-32, 35<br>33-34 |
| A  | WO, A1, 91/17267 (エス・アール・アイ・インターナシヨ<br>ナル),   | 1-37               |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。  |   |                    |
| * 引用文献のカテゴリー<br>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの<br>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの<br>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)<br>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献<br>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの<br>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの<br>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの<br>「&」 同一パテントファミリー文献 |   |                    |
| 国際調査を完了した日   | 国際調査報告の発送日  |                    |
| 12. 04. 95   | 02.05.95  |                    |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/JP)<br>郵便番号100<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号   | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br><br>佐伯裕子 ㊟  | 4 B 9 4 5 3        |
|  | 電話番号 03-3581-1101 内線  | 3 4 4 8            |

C (続き) . 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
|                 | 14. 11月. 1991 (14. 11. 91),<br>&EP, A, 481065 & JP, A, 4-507198<br>&US, A, 5223414              |                  |
| A               | WO, A1, 87/01730 (エール・ユニバーシティ),<br>26. 3月. 1987 (26. 03. 87)<br>&EP, A, 236491                  | 1-37             |
| A               | US, A, 4888274 (エール・ユニバーシティ),<br>19. 12月. 1989 (19. 12. 89) (ファミリーなし)                           | 1-37             |
| A               | WO, A1, 93/05177 (ダイキン工業株式会社),<br>18. 3月. 1993 (18. 03. 93)<br>&EP, A, 614492 & JP, A, 6-510200 | 1-37             |