

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7257334号
(P7257334)

(45)発行日 令和5年4月13日(2023.4.13)

(24)登録日 令和5年4月5日(2023.4.5)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

C 1 2 Q 1/6869

Z

C 1 2 Q 1/6876(2018.01)

C 1 2 Q 1/6876

Z

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09

Z

請求項の数 22 (全18頁)

(21)出願番号 特願2019-563133(P2019-563133)

(86)(22)出願日 平成30年5月15日(2018.5.15)

(65)公表番号 特表2020-519299(P2020-519299
A)

(43)公表日 令和2年7月2日(2020.7.2)

(86)国際出願番号 PCT/EP2018/062545

(87)国際公開番号 WO2018/210823

(87)国際公開日 平成30年11月22日(2018.11.22)

審査請求日 令和3年11月18日(2021.11.18)

(31)優先権主張番号 1717417.8

(32)優先日 平成29年10月23日(2017.10.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

(31)優先権主張番号 17171168.2

(32)優先日 平成29年5月15日(2017.5.15)

最終頁に続く

(73)特許権者 521217482

ライトキャスト ディスカバリー リミテ
ッドLIGHTCAST DISCOVERY
LTDイギリス国 シービー3 0エフエイ ケ
ンブリッジ ジェイジェイ トムソン ア
ヴェニュー プロアーズ ビルディング
21-22

(74)代理人 100147485

弁理士 杉村 憲司

(72)発明者 バーナビー バルムフォース

イギリス国 ケンブリッジシャー シービ
ー3 0エフエー ケンブリッジ ジェイ
ジェイ トムソン アヴェニュー プロア
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 単一ヌクレオチド検出方法および関連するプローブ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(1) 核酸の漸進的な酵素消化により単一のヌクレオシド三リン酸のストリームを生成するステップと、

(2) ポリメラーゼの存在下で、単一のヌクレオシド三リン酸の少なくとも1つを、

(a) エキソヌクレアーゼ遮断部位、該遮断部位の5'側にある制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、かつ、単一のヌクレオシド三リン酸を捕捉するための単一のヌクレオチド捕捉部位、およびフルオロフォアを消光するように配置された前記認識部位の5'側に位置する少なくとも1つのフルオロフォア領域を含む、一本鎖の第1のオリゴヌクレオチドと、

(b) 前記第1のオリゴヌクレオチドからそれぞれ分離し、前記捕捉部位の3'および5'側に隣接する前記第1のオリゴヌクレオチド上の相補的領域にハイブリダイズすることができる一本鎖の第2のオリゴヌクレオチドおよび第3のオリゴヌクレオチドと、を含む、対応する生物学的プローブと反応させることにより、少なくとも1つのオリゴヌクレオチド使用プローブを生成するステップと、

(3) 使用プローブの前記第1のオリゴヌクレオチドの鎖を、前記認識部位で制限エンドヌクレアーゼにより切断して、フルオロフォアを有する第1のオリゴヌクレオチド成分を作成するステップと、

(4) 前記第1のオリゴヌクレオチド成分を、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素で消化して、検出可能な状態のフルオロフォアを生成し、

(5) ステップ(4)で放出されたフルオロフォアを検出するステップと、
を含み、

ステップ(2)および(3)が反復され、ステップ(4)がその反復の後にまたは反復と同時に行われる、核酸の配列決定方法。

【請求項2】

(1) 核酸の漸進的な酵素消化により単一のヌクレオシド三リン酸のストリームを生成するステップと、

(2) ポリメラーゼの存在下で、単一のヌクレオシド三リン酸の少なくとも1つを、

(a) エキソヌクレアーゼ遮断部位、該遮断部位の3'側にある制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、かつ、単一のヌクレオシド三リン酸を捕捉するための単一のヌクレオチド捕捉部位、およびフルオロフォアを消光するように配置された前記認識部位の3'側に位置する少なくとも1つのフルオロフォア領域を含む、一本鎖の第1のオリゴヌクレオチドと、

(b) 前記第1のオリゴヌクレオチドからそれぞれ分離し、前記捕捉部位の3'および5'側に隣接する前記第1のオリゴヌクレオチド上の相補的領域にハイブリダイズすることができる一本鎖の第2のオリゴヌクレオチドおよび第3のオリゴヌクレオチドと、を含む、対応する生物学的プローブと反応させることにより、少なくとも1つのオリゴヌクレオチド使用プローブを生成するステップと、

(3) 使用プローブの前記第1のオリゴヌクレオチドの鎖を、前記認識部位で制限エンドヌクレアーゼにより切断して、フルオロフォアを有する第1のオリゴヌクレオチド成分を作成するステップと、

(4) 前記第1のオリゴヌクレオチド成分を、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素で消化して、検出可能な状態のフルオロフォアを生成し、

(5) ステップ(4)で放出されたフルオロフォアを検出するステップと、
を含み、

ステップ(2)および(3)が反復され、ステップ(4)がその反復の後にまたは反復と同時に行われる、核酸の配列決定方法。

【請求項3】

ステップ(2)は、リガーゼの存在下で行われ、前記認識部位の近傍に実質的に二本鎖の使用プローブを作成する、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記エキソヌクレアーゼ遮断部位が、前記第1のオリゴヌクレオチドを閉ループにすることによって、または、その中に二本鎖領域を含めることによって、達成される、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記制限エンドヌクレアーゼが、第1のオリゴヌクレオチドのみを切断するように適合されたニッキングエンドヌクレアーゼである、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記使用プローブが、第2のオリゴヌクレオチド、ヌクレオシド三リン酸および第3のオリゴヌクレオチドからなる第4のオリゴヌクレオチドを含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記第2のオリゴヌクレオチドおよび前記第3のオリゴヌクレオチドがリンカー領域により連結されている、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記第4のオリゴヌクレオチドが閉ループを含む、請求項6または請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記第2および／または第3のオリゴヌクレオチドが前記制限エンドヌクレアーゼによ

10

20

30

40

50

る切断に対して耐性である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記フルオロフォア領域が、フルオロフォアを消光するクエンチャーを含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ（3）がステップ（2）よりも高い温度で行われること、および／または、ステップ（4）がステップ（3）よりも高い温度で行われる、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記プローブは、天然または合成の DNA または RNA の特徴的な核酸塩基および異なる特徴的なフルオロフォアの異なる 1 つに対して選択的な異なる捕捉部位をそれぞれ持つ最大 4 つの異なる第 1 のオリゴヌクレオチドの型のシステムを含む、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 13】

前記生物学的プローブが第 2 および第 3 のオリゴヌクレオチドの両方を含む、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

ステップ（1）が対応する微小液滴中に各単一のヌクレオシド三リン酸を含むことをさらに含み、ステップ（2）～（5）が各微小液滴で行われる、請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 15】

請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法のステップ（2）～（5）から本質的になることを特徴とする、生物学的サンプルまたは核酸分析物の単一ヌクレオチド三リン酸成分を分析、特徴付け、または定量する方法。

【請求項 16】

（a）エキソヌクレアーゼ遮断部位、該遮断部位の 5' 側にある制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、かつ、単一のヌクレオシド三リン酸を捕捉するための単一のヌクレオチド捕捉部位、およびフルオロフォアを消光するように配置された前記認識部位の 5' 側に位置する少なくとも 1 つのフルオロフォア領域を含む、一本鎖の第 1 のオリゴヌクレオチドと、

30

（b）前記捕捉部位のいずれかの側の第 1 オリゴヌクレオチド上の相補的領域にハイブリダイズすることができる一本鎖の別の第 2 のオリゴヌクレオチドおよび任意に別の第 3 のオリゴヌクレオチドと、を含む、多成分生物学的プローブ。

【請求項 17】

（a）エキソヌクレアーゼ遮断部位、該遮断部位の 3' 側にある制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、かつ、単一のヌクレオシド三リン酸を捕捉するための単一のヌクレオチド捕捉部位、およびフルオロフォアを消光するように配置された前記認識部位の 3' 側に位置する少なくとも 1 つのフルオロフォア領域を含む、一本鎖の第 1 のオリゴヌクレオチドと、

40

（b）前記捕捉部位のいずれかの側の第 1 オリゴヌクレオチド上の相補的領域にハイブリダイズすることができる一本鎖の別の第 2 のオリゴヌクレオチドおよび任意に別の第 3 のオリゴヌクレオチドと、を含む、多成分生物学的プローブ。

【請求項 18】

前記エキソヌクレアーゼ遮断部位が、第 1 のオリゴヌクレオチドを閉ループにすることにより達成される、請求項 16 または請求項 17 に記載の多成分生物学的プローブ。

【請求項 19】

前記第 1 のオリゴヌクレオチドが、フルオロフォア領域のフルオロフォアを消光するクエンチャーを含むこと、および／または前記第 2 のオリゴヌクレオチドと第 3 のオリゴヌクレオチドがオリゴヌクレオチドリンカー領域によって接続されている、請求項 16 から 18 のいずれか一項に記載の多成分生物学的プローブ。

50

【請求項 20】

アセンブリ内の各第1のオリゴヌクレオチドが、異なる特徴的な核酸塩基および異なる特徴的なフルオロフォアに対して選択的な異なる捕捉部位を有する、請求項16から19のいずれか1項に記載の型の多数の異なる第1のオリゴヌクレオチドのアセンブリを含む、多成分生物学的プローブキット。

【請求項 21】

前記第1のオリゴヌクレオチドは、第3のオリゴヌクレオチドを含む請求項16、18または19のうちのいずれか1つに規定される型のものであり、ポリメラーゼ、リガーゼ、制限エンドヌクレアーゼ、および3' - 5' エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素のうちの1つまたは複数をさらに含む、請求項20に記載の多成分生物学的プローブキット。

【請求項 22】

前記第1のオリゴヌクレオチドは、第3のオリゴヌクレオチドを含む請求項17、18または19のうちのいずれか1つに規定されるタイプのものであり、ポリメラーゼ、リガーゼ、制限エンドヌクレアーゼ、および5' - 3' エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素のうちの1つまたは複数をさらに含む、請求項20に記載の多成分生物学的プローブキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、単一ヌクレオチドを検出および特徴付けするための方法および関連する生物学的プローブに関する。特に、DNAまたはRNAのシーケンスでの使用に適する。

【背景技術】

【0002】

遺伝物質の次世代シーケンシングは、シーケンシングの単価がより高速なシーケンシングマシンの市場投入に合わせて低下するため、特に一般的な生物学、特に医学に大きな影響を与えている。

【0003】

我々のこれまでの出願、WO2014/053853、WO2014/053854、WO2014/167323、WO2014/167324、WO2014/111723、WO2015/121675、およびWO2017/005789では、単一ヌクレオチドの規則的なストリーム、好ましくは単一のヌクレオシド三リン酸のストリームを生成し、それぞれが微小液滴ストリームの対応する液滴に1つずつ捕捉され得る、ポリヌクレオチド検体の漸進的消化を含む新しいシーケンス方法を説明した。その後、各液滴を化学的および/または酵素的に操作して、元々含まれていた特定の単一ヌクレオチドを明らかにすることができる。一実施形態では、これらの化学的および/または酵素的操作は、分析物が構成される単一ヌクレオチドタイプの1つを選択的に捕捉できるようにそれぞれが適合される1つ以上の2成分オリゴヌクレオチドプローブタイプの使用を含む方法を含む。通常、このようなプローブタイプのそれぞれでは、2つのオリゴヌクレオチドコンポーネントの1つが特徴的なフルオロフォアを含み、プローブの未使用状態では、これらのフルオロフォアの蛍光能力は、自己消光により、または、近接するクエンチャー（消光剤）の存在により、消滅する。使用中、プローブが対応する単一ヌクレオチドを捕捉すると、その後のエクソヌクレオリシス（exonucleolysis）の影響を受けやすくなり、それにより、クエンチャーからおおよそ/または互いからフルオロフォアが遊離し、それらが自由に蛍光を発することが可能になる。この手段により、各液滴に存在する元の単一ヌクレオチドは、分光学的手段によって間接的に推測される。

【0004】

この方法の変形は、WO201405385およびWO2016012789を含む私たちの保留中の出願の他に記載されており、後者は、3成分プローブの使用を伴う。特に、WO2016012789号は、

（1）核酸の漸進的な酵素消化により単一のヌクレオシド三リン酸のストリームを生成するステップと、

10

20

30

40

50

(2) ポリメラーゼおよびリガーゼの存在下で、単一のヌクレオシド三リン酸の少なくとも1つを、(a) 例えば検出不可能な状態の特徴的なフルオロフォアで標識された一本鎖の第1のオリゴヌクレオチドと、(b) 第1オリゴヌクレオチド上の相補的領域にハイブリダイズできる一本鎖の第2および第3のオリゴヌクレオチドとを含む、対応するプローブと反応させることにより、少なくとも1つの実質的に二本鎖のオリゴヌクレオチド使用プローブを生成するステップと、

(3) 使用プローブを、二本鎖エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素で消化して、検出可能な状態のフルオロフォアおよび第1のオリゴヌクレオチドの配列相補体の少なくとも一部である一本鎖の第4のオリゴヌクレオチドを生成するステップと、

(4) 第4のオリゴヌクレオチドを別の第1のオリゴヌクレオチドと反応させて、使用プローブに対応する実質的に二本鎖のオリゴヌクレオチド産物を生成するステップと、

(5) サイクルで(3)と(4)のステップを繰り返し、

(6) (3)のステップの各反復で放出されるフルオロフォアの検出するステップと、により特徴づけられる改善された方法を記載する。この方法には、サイクル内で(3)および(4)のステップを繰り返すことにより、蛍光シグナルを強く成長させ、それによって全体的な感度を改善し、ヌクレオチド検出の信頼性を改善できるという利点がある。一実施形態では、第2および第3のオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド捕捉後に、有利にはエキソヌクレオリシスに対して耐性である閉ループ一本鎖オリゴヌクレオチド成分を形成するように連結される。

【0005】

他の先行技術に関しては、Nature Reviews Genetics 7(8) 632-644 (2006)のFanらが、ジェノタイピング、コピー数測定、シーケンシング、ヘテロ接合性喪失の検出、対立遺伝子特異的発現およびメチル化のための高度に平行なゲノムアッセイを可能にした方法およびプラットフォームの開発に関する一般的なレビューを提供している。このレビューの図2aは、分析対象物の一塩基多型(SNP)の部位の上流および下流をアニールし、それにより、その後、SNPの相補体であるヌクレオチドで満たされたギャップを残して、完全な環状プローブを形成し、その後、放出後に増幅され得る3'および5'端を持つ環状化可能なプローブの使用を模式的に示す。しかしながら、我々の方法とは異なり、充填プロセス中に捕捉されるヌクレオチドは、分析物自体から直接得られない。

【0006】

WO03080861は、放出されるとヌクレオチドに直接付着するヌクレオチド特異的反応性標識の存在下で、核酸分析物が漸進的な加ピロリン酸分解を受けるプロセスを開示している。これは、我々が採用する方法とはまったく異なるだけでなく、実際には、標識ヌクレオチドが続いて調査されるときに測定される蛍光信号は、関連するバックグラウンドノイズを超える信頼できる識別を可能にするには弱すぎる可能性がある。

【0007】

最後に、WO9418218は、DNA配列決定法を教示しており、そこでは分析物が漸進的なエキソヌクレオリシスにかけられ、検出される前に蛍光増強マトリックスに組み込まれる単一ヌクレオチド三リン酸または一リン酸のストリームを生成する。これは、私たちが説明したアプローチとはまったく異なるアプローチであるだけでなく、生成された信号は、弱すぎて確実に検出および識別することができない可能性がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上記のエキソヌクレアーゼ分解に基づく方法の1つの欠点は、蛍光シグナルの生成速度が消化段階の速度によって制限され、エキソヌクレアーゼの特異性が達成可能なシグナル対ノイズレベルを制限することである。これはメソッドの有用性にとって決して致命的ではないが、それにもかかわらず、蛍光のこの成長に関連するインキュベーション期間を短縮し、S/Nを改善して、より速く、より正確な配列決定を可能にすることは、特に長いシーケンシングリードが想定される場合、技術的な観点から非常に望ましいままである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

これは、使用プローブのエキソ核酸分解消化と、消光されたフルオロフォアを持つ鎖の選択的エンド核酸分解切断の組み合わせによって達成された。

したがって、本発明の第1の態様によれば、

(1) 核酸の漸進的な酵素消化により単一のヌクレオシド三リン酸のストリーム（流れ）を生成するステップと、

(2) ポリメラーゼの存在下で、単一のヌクレオシド三リン酸の少なくとも1つを、

(a) エキソヌクレアーゼ遮断部位（ブロックサイト）、前記遮断部位の5'側にある制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、かつ、単一のヌクレオシド三リン酸を捕捉するための単一のヌクレオチド捕捉部位、およびフルオロフォアを消光するように配置された前記認識部位の5'側に位置する少なくとも1つのフルオロフォア領域を含む、一本鎖の第1のオリゴヌクレオチドと、

(b) 前記第1のオリゴヌクレオチドからそれぞれ分離し、前記捕捉部位の3'および5'側に隣接する前記第1のオリゴヌクレオチド上の相補的領域にハイブリダイズすることができる一本鎖の第2および任意に第3のオリゴヌクレオチドと、

を含む、対応する生物学的プローブと反応させることにより、少なくとも1つのオリゴヌクレオチド使用プローブを生成するステップと、

(3) 使用プローブの前記第1のオリゴヌクレオチドの鎖を、前記認識部位で制限エンドヌクレアーゼにより切断して、フルオロフォアを有する第1のオリゴヌクレオチド成分を作成するステップと、

(4) 前記第1のオリゴヌクレオチド成分を、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素で消化して、検出可能な状態のフルオロフォアを生成し、

(5) ステップ(4)で放出されたフルオロフォアを検出するステップと、

により特徴づけられる、核酸の配列決定方法が提供される。

【0010】

本発明の第2の態様によれば、

(1) 核酸の漸進的な酵素消化により単一のヌクレオシド三リン酸のストリームを生成するステップと、

(2) ポリメラーゼの存在下で、単一のヌクレオシド三リン酸の少なくとも1つを、

(a) エキソヌクレアーゼ遮断部位、前記遮断部位の3'側にある制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、かつ、単一のヌクレオシド三リン酸を捕捉するための単一のヌクレオチド捕捉部位、およびフルオロフォアを消光するように配置された前記認識部位の3'側に位置する少なくとも1つのフルオロフォア領域を含む、一本鎖の第1のオリゴヌクレオチドと、

(b) 前記第1のオリゴヌクレオチドからそれぞれ分離し、前記捕捉部位の3'および5'側に隣接する前記第1のオリゴヌクレオチド上の相補的領域にハイブリダイズすることができる一本鎖の第2および任意に第3のオリゴヌクレオチドと、

を含む、対応する生物学的プローブと反応させることにより、少なくとも1つのオリゴヌクレオチド使用プローブを生成するステップと、

(3) 使用プローブの前記第1のオリゴヌクレオチドの鎖を、前記認識部位で制限エンドヌクレアーゼにより切断して、フルオロフォアを有する第1のオリゴヌクレオチド成分を作成するステップと、

(4) 前記第1のオリゴヌクレオチド成分を、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素で消化して、検出可能な状態のフルオロフォアを生成し、

(5) ステップ(4)で放出されたフルオロフォアを検出するステップと、

により特徴づけられる、核酸の配列決定方法が提供される。

【0011】

1つの好ましい実施形態では、ステップ(2)および(3)は、ステップ(5)での検出のために放出されるフルオロフォアの数著しく増加させるために、以下に説明するよ

10

20

30

40

50

うに繰り返される。

【0012】

本発明の方法のステップ（１）は、漸進的な酵素消化により核酸分析物から単一のヌクレオシド三リン酸のストリームを生成することを含む。一実施形態では、これは、分析物の漸進的なエキソヌクレオリシスと、それに続く、得られた単一ヌクレオシド三リン酸に対するキナーゼの作用によって達成することができる（例えば、BaoおよびRyuによる「Biotechnology and Bioengineering」（DOI 10.1002 / bit.21498）を参照）。しかしながら、好ましくは、ヌクレオシド三リン酸は、漸進的な加ピロリン酸分解により分析物検体から直接生成される。このステップで使用される分析物は、適切には二本鎖ポリヌクレオチドであり、その長さは原則として無制限であり得、例えば、ヒトの遺伝子または染色体断片で見つかった数百万個までのヌクレオチドが含まれる。しかしながら、典型的には、ポリヌクレオチドは少なくとも50、好ましくは少なくとも150ヌクレオチド対の長さ、適切には、500を超え、1000を超え、多くの場合、数千のヌクレオチド対の長さであろう。分析物自体は、好ましくは、天然起源のRNAまたはDNA（例えば、植物、動物、細菌またはウイルスに由来する）であるが、この方法は、合成で生成されたRNAまたはDNA、または核酸塩基が自然界で一般に出会わないヌクレオチドの全体または一部で構成される他の核酸、すなわち、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）およびウラシル（U）以外の核酸塩基の配列決定にも使用できる。そのような核酸塩基の例には、4-アセチルシチジン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウリジン、2-Ο-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノ-メチルウリジン、ジヒドロウリジン、2-Ο-メチルプソイドウリジン、2-Ο-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンチルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、5-メトキシウリジン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンチルアデノシン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5-オキシ酢酸、ウィブトキソシン、ウィブトシン、プソイドウリジン、クエオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、2-Ο-メチル-5-メチルウリジンおよび2-Ο-メチルウリジンを含む。DNAの場合、生成される単一のヌクレオシド三リン酸はデオキシリボヌクレオシド三リン酸であり、RNAの場合、それらはリボヌクレオシド三リン酸である。

【0013】

本方法の一実施形態では、ステップ（１）は、分析物を基板に付着させる第1のサブステップをさらに含む。通常、この基板は、マイクロ流体表面、マイクロビーズ、または透過膜を備えており、例えば、ガラス製または非分解性ポリマー製である。好ましくは、基板は、分析物を受け取るように特に適合された表面をさらに含む。分析物をそのような表面に付着させることができる多くの方法があり、そのいずれも原則としてこのサブステップで使用することができる。例えば、1つの方法は、エポキシシラン、アミノヒドロカルビルシランまたはメルカプトシランなどの官能化シランでガラス表面を下塗りすることを含む。そのように生成された反応部位は、その後、末端アミン、スクシニルまたはチオール基を含むように修飾された分析物の誘導体で処理することができる。

【0014】

ステップ（１）の別の実施形態では、分析物を熱リン酸化して、分析物の配列の順序に対応する単一のヌクレオシド三リン酸のストリームを生成する。そのような加ピロリン酸分解は、20から90℃の範囲の温度で、例えば、適切なポリメラーゼを含む反応媒体の存在下で、実施することができる。好ましくは、単一のヌクレオシド三リン酸が遊離されるにつれて反応ゾーンから連続的に除去されるように、連続流動の条件下で実施される。

最も好ましくは、酵素および他の典型的な添加剤を含む水性緩衝媒体を分析物が結合している表面上に連続的に流すことにより、加ピロリン酸分解を実施する。

【0015】

さらに別の実施形態では、使用酵素は、分析物の漸進的な3' - 5' 熱リン酸化消化を引き起こし、高忠実度で合理的な反応速度でヌクレオシド三リン酸のストリームを生じさせることができるものである。好ましくは、この消化速度は可能な限り速く、一実施形態では1秒あたり1 ~ 50ヌクレオシド三リン酸の範囲である。

【0016】

読み手が方向づけられるポリヌクレオチドの消化に適用されるような加ピロリン酸分解反応に関するさらなる情報は、例えば、J. Biol. Chem. 244 (1969) pp. 3019-3028にみられる。適切には、ピロリン酸消化は、例えばピロリン酸陰イオンおよびマグネシウム陽イオンをさらに含む媒体の存在下で、好ましくはミリモル濃度で、実施される。

【0017】

本発明の方法のステップ(2)では、少なくとも1つの単一のヌクレオシド三リン酸分子、好ましくはストリーム中の各単一のヌクレオシド三リン酸は、ポリメラーゼおよび任意でリガーゼの存在下でプローブと反応して、使用プローブ二重鎖を生成し、リガーゼがさらに使用される一実施形態では、別個の実質的に二本鎖のオリゴヌクレオチドである。好ましくは、このステップを実行する前に、ステップ(1)の生成物をピロホスファターゼで処理して、残留ピロリン酸塩をリン酸アニオンに加水分解する。

【0018】

ステップ(1)で使用されるポリメラーゼは、反応条件下でエキソヌクレアーゼ活性もエンドヌクレアーゼ活性も本質的に示さないものからなる群から適切に選択される。有利に使用することができるポリメラーゼの例には、大腸菌(例: クレノーフラグメントポリメラーゼ)、サーマスアクアティカス(例: Taq Pol)、バチルスステアロサーモフィルス、バチルスカルドベロックス、バチルスカルドテナックスなど、細菌から得られた原核生物 pol 1 酵素または酵素誘導体が含まれるが、これらに限定されない。必要に応じて、このステップで原則として適切なリガーゼを使用できる。

【0019】

ステップ(2)で使用される生物学的プローブは、2つまたは好ましくは3つのコンポーネント:

(a) 検出不可能な状態の特徴的なフルオロフォアで標識された一本鎖の第1のオリゴヌクレオチド、

(b) それぞれが第1のオリゴヌクレオチドから分離し、第1のオリゴヌクレオチド上の相補的領域にハイブリダイズすることができる一本鎖の第2および任意に第3の非標識オリゴヌクレオチド、で構成されている。3成分の実施形態の1つでは、第2および第3のオリゴヌクレオチドは別個の実体であるが、別の実施形態では、それらはリンカー領域によって連結されたオリゴヌクレオチド領域である。この後者の場合、一実施形態では、リンカー領域は、第2および第3のオリゴヌクレオチド領域の末端を連結する。リンカー領域は原則として任意の二価基であり得るが、それ自体が別のオリゴヌクレオチド領域であることが便利である。一実施形態では、このオリゴヌクレオチドリンカー領域は、第1のオリゴヌクレオチドに実質的にハイブリダイズすることができない。

【0020】

別々の第1、第2、および第3オリゴヌクレオチドは、ステップ(2)で第2および第3オリゴヌクレオチドがそれぞれ第1オリゴヌクレオチドの3' 側および5' 側フランキング領域にハイブリダイズできるように選択され、それ自体が、プローブによって検出されるヌクレオシド三リン酸によって運ばれるものに核酸塩基が相補的な単一ヌクレオチドを含む捕捉部位を含む制限エンドヌクレアーゼ認識部位の両側に並置されている。これにより、プローブはこの特定のヌクレオシド三リン酸に対して高度に選択的になる。したがって、例えば、分析物がDNAに由来し、第1、第2、および第3のオリゴヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドで構成される場合、捕捉部位がチミン核酸塩基を有するヌクレ

10

20

30

40

50

オチドを含む場合、捕捉部位はデオキシアデノシン三リン酸に対して高度に選択的である。したがって、本発明の1つの有用な実施形態では、ステップ(2)は、複数のプローブタイプで構成されるプローブシステムの存在下で実行することができる、例えば、それぞれが求められる様々な異なる核酸塩基のセットの異なる捕捉部位特性およびそれに付着する異なる検出可能な要素を有する第1のオリゴヌクレオチドを含む1、2、3、4またはそれ以上のプローブタイプを含む。

【0021】

典型的には、第1のオリゴヌクレオチドは最大150ヌクレオチド長、好ましくは10~100ヌクレオチドである。一実施形態では、第2のオリゴヌクレオチドは、第1のオリゴヌクレオチドの相補的な3'側隣接領域よりも少なくとも1ヌクレオチド短い。別の実施形態では、ヌクレオシド三リン酸がこの時点で捕捉されるのを防ぐために、第1のオリゴヌクレオチドの3'末端と第2のオリゴヌクレオチドの反対側のヌクレオチドとの間に少なくとも1つのヌクレオチドミスマッチがある。同様に、一実施形態では、第3のオリゴヌクレオチドは、第1のオリゴヌクレオチドの相補的な5'側隣接領域よりも少なくとも1ヌクレオチド長く、一方、この時点でヌクレオシド三リン酸が捕捉されるのを防ぐために、第3オリゴヌクレオチドの3'末端と第1オリゴヌクレオチドの反対側のヌクレオチドの間に少なくとも1つのヌクレオチドミスマッチがある。

【0022】

独自のユニークなおよび／または特徴的なタイプのフルオロフォアで構成されるフルオロフォア領域でラベル付けされていること、およびこれらのフルオロフォアは、プローブが未使用状態にあるときに実質的に検出できないように配置されていることが、第1のオリゴヌクレオチドの特徴である。好ましくは、それらは、フルオロフォアが検出されるように設計されている波長で本質的に蛍光を発しないように配置される。したがって、フルオロフォアは、電磁スペクトルの広い部分にわたって一般的な低レベルのバックグラウンド蛍光を示す場合があるが、通常、蛍光の強度が最大である特定の波長または波長エンベロープが1つまたは少数存在する。フルオロフォアが特徴的に検出されるのは、これらの最大値の1つ以上であり、本質的に蛍光は発生しないはずである。この特許の文脈では、「本質的に蛍光を発しない」という用語または同等の表現は、関連する特徴的な波長または波長エンベロープで、第1のオリゴヌクレオチドに結合したフルオロフォアの総数の蛍光強度が、同等の数の遊離フルオロフォアの対応する蛍光強度の25%未満、好ましくは10%未満、より好ましくは1%未満、最も好ましくは0.1%未満であることを意味する。

【0023】

原則として、任意の方法を使用して、第1のオリゴヌクレオチドの未使用状態でフルオロフォアが本質的に非蛍光性であることを確認できる。一実施形態では、これは、フルオロフォアを互いに近接して配置し、それらが互いに消光するようにすることにより達成される(自己消光配置)。別の実施形態では、フルオロフォア領域は、フルオロフォアに近接した別個のクエンチャーをさらに含み、それによって同じ結果を達成することができる。この特許の文脈において、フルオロフォア間またはフルオロフォアとクエンチャー間の「近接」を構成するものは、特定のフルオロフォアおよびおそらく第1のオリゴヌクレオチドの構造特性に依存するであろう。したがって、この用語は、2つの領域内のさまざまな要素の特定の構造的配置ではなく、必要な結果を参照して解釈されることを意図する。ただし、例示のみを目的として、隣接するフルオロフォアが特徴的なフェルスター(Förster)距離に対応する距離(通常は5nm未満)離れている場合、一般に十分な消光が達成されることが指摘されている。

【0024】

フルオロフォア自体に関しては、原則として、キサンテン部分を含むがこれらに限定されない、フルオレセイン、ローダミン、およびフルオレセインイソチオシアネート、ローダミンBなどの誘導体；クマリン部分(例えば、ヒドロキシー、メチルー、アミノクマリン)およびシアニン部分(Cy2、Cy3、Cy5、Cy7など)のような、当技術分野

10

20

30

40

50

で従来使用されているもののいずれかから選択することができる。具体的な例には、次の一般的に使用される色素：Alexa色素、シアニン色素、Atto Tec色素、およびローダミン色素に由来するフルオロフォアが含まれる。例えば、Atto633 (ATTO-TEC GmbH)、Texas Red (商標)、Atto 740 (ATTO-TEC GmbH)、Rose Bengal、Alexa Fluor (商標) 750 C₅-マレイミド (Invitrogen)、Alexa Fluor (商標) 532 C₂-マレイミド (Invitrogen) およびローダミン Red、C₂-マレイミドおよびローダミングリーン、ならびにQuasar 570などのホスホラマダイト色素も含まれる。あるいは、量子ドットまたはLI-COR Biosciencesが提供するような近赤外色素を使用することができ、この特許を解釈するために「フルオロフォア」であることが考慮されるべきである。フルオロフォアは、典型的には、当技術分野で公知の化学的方法を使用して、核酸塩基を介して第1のオリゴヌクレオチドに付着している。

10

【0025】

適切なクエンチャー（消光剤）には、フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) メカニズムで機能するものが含まれる。上記のフルオロフォアに関連して使用できる市販のクエンチャーの例には、DDQ-1、Dabcyl、Eclipse、Iowa Black FQおよびRQ、IR Dye-QC1、BHQ-0、BHQ-1、-2および-3、QSY-7および-21が含まれるが、これに限定されない。

【0026】

上記の2つの方法のどちらを採用するかに応じて、認識部位の3'側または5'側のいずれかにエキソヌクレアーゼ遮断部位を含むことが第1オリゴヌクレオチドの別の特徴である。一実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドは、片方または両方の末端に隣接するそのような遮断部位を含み得る。原則として、遮断部位は、その化学的構成により、その時点でエキソヌクレオリシスに耐性のある第1のオリゴヌクレオチドを与える任意の領域であり得る。そのような領域には、例えば、ホスホロチオエートリンカー、オリゴヌクレオチドスペーサー（例えば、スペーサー3、スペーサー9、スペーサー18、dスペーサーなど）、2'-O-メチルRNA塩基、逆塩基、デスチオピオチン-TEG、ジチオール、ヘキサンジオール、およびクエンチャー（BHQなど）が含まれてもよい。

20

【0027】

一実施形態では、エキソヌクレアーゼ遮断部位は、第1のオリゴヌクレオチドを環状、すなわち閉ループにすることにより達成することができる。別の実施形態では、第2および/または第3のオリゴヌクレオチドにも同様のエキソヌクレアーゼ遮断部位が提供される。

30

【0028】

上記の捕捉部位を含む制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含むことが、第1のオリゴヌクレオチドのさらに別の特徴である。この認識部位は、上記の2つの方法のどちらを採用するかに応じて、(1)エキソヌクレアーゼ遮断部位の5'側とフルオロフォア領域の3'側、または、(2)エキソヌクレアーゼ遮断部位の3'側およびフルオロフォア領域の5'側、のいずれかに配置される。1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドのタイプが使用される一実施形態では、それでも1つの制限エンドヌクレアーゼのみを使用する必要があるように、異なる標識の第1のオリゴヌクレオチドはそれぞれ同じ認識部位を含むことが好ましい。したがって、多くの用途において、認識部位は、場合によってはRNAまたはDNAの特徴的なヌクレオチドのそれぞれの少なくとも1つを含む配列から構成されることが好ましいだろう。

40

【0029】

ステップ(2)は、20から80℃の範囲の温度で、ストリーム中の各単一ヌクレオシド三リン酸を酵素および上記の1つ以上のプローブと接触させることにより適切に実行される。

【0030】

ステップ(2)の生成物は、上述のように、使用プローブであり、典型的には、その構成成分がそれぞれ(i)第1のオリゴヌクレオチド、(ii)単一のヌクレオシド三リン

50

酸に由来する追加のヌクレオチドを含む第2のオリゴヌクレオチド、および (i i i) 任意に第3のオリゴヌクレオチド、である実質的に二本鎖の二重鎖、である。ステップ (2) がリガーゼと第3のオリゴヌクレオチドの存在下で行われる場合、(i i) と (i i i) は一緒に別個の第4オリゴヌクレオチドを含み、使用プローブは認識部位の近傍で二本鎖になる。第2のオリゴヌクレオチドと第3のオリゴヌクレオチドがリンカー領域によって結合されている場合、閉ループでエキソヌクレオリシスに対して非常に耐性のある第4のオリゴヌクレオチドが得られることは明らかである。

【0031】

ステップ (3) では、使用プローブを 20 ~ 100 °C の範囲の温度で、制限エンドヌクレアーゼで処理する。一実施形態では、この制限エンドヌクレアーゼは、認識部位で第1のオリゴヌクレオチドに由来する鎖のみを切断するように設計されたニッキングエンドヌクレアーゼである。別の実施形態では、制限エンドヌクレアーゼは両方の鎖を切断できるものであり、第2および／または第3のオリゴヌクレオチドは、例えば、第2および第3のオリゴヌクレオチドのいずれかまたは両方にヌクレオチド鎖切断 (endonucleolytic) ブロッキング基を含めることにより、制限エンドヌクレアーゼによる切断に対して抵抗性にすることができる。一実施形態において、これらのブロッキング基は、ホスホロチオエート結合および当該分野で一般的に使用される他の骨格修飾、オリゴヌクレオチドスペーサー、リン酸基などから選択され得る。リガーゼを使用しない第3の実施形態では、制限エンドヌクレアーゼは両方の鎖を切断することができ、捕捉されたヌクレオチドの 3' 側に切断部位を有するものである (すなわち、ヌクレオチドの捕捉後に第2のオリゴヌクレオチドと第3のオリゴヌクレオチドの間に残っているニック)。

【0032】

本発明の方法、プローブおよびプローブと共に使用することができるニッキングエンドヌクレアーゼを含む適切な制限エンドヌクレアーゼの詳細は、関連するデータベースの <http://rebase.neb.com> で見つけることができる。

【0033】

ステップ (3) は、第1のオリゴヌクレオチドに由来する鎖が2つの別個の成分に切断されることをもたらし、そのうちの1つはフルオロフォア、および使用される場合はクエンチャーを保有する。その後、ステップ (4) で、この時点でエキソヌクレオリシス (exonucleolysis) の影響を受けやすいこの成分は、上記の特定の方法のいずれに従っているかによって、3' - 5' または 5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性を示す酵素によって消化される。したがって、エンドヌクレオリシスとその後のエキソヌクレオリシスが起これば、観察者は蛍光シグナルの発生と急速な成長を確認する。この蛍光の特性は、関連するプローブによって最初に捕捉された単一のヌクレオシド三リン酸の性質を間接的に反映する。ステップ (4) は、30 ~ 100 °C の範囲の温度で最も効果的に達成できる。

【0034】

一実施形態では、ステップ (3) はステップ (2) よりも高い温度で実行され、および／またはステップ (4) はステップ (3) よりも高い温度で実行されることが好ましい。

【0035】

その後、ステップ (5) で、例えば、ステップ (2) および (3) のさまざまな反復を介して、ステップ (4) で遊離したフルオロフォアが検出され、単一のヌクレオシド三リン酸に結合した核酸塩基の性質が推論によって決定される。ステップ (1) で生成されたストリーム中のすべての単一ヌクレオシド三リン酸に対して本発明の方法を体系的に実施することにより、元の核酸分析物の配列に特徴的なデータを生成および分析することができる。これを行う方法は、当技術分野で周知であり、例えば、反応媒体は、レーザーまたは同様の高強度電磁放射線源からの光で調べられ、さまざまなフルオロフォアの特徴的な蛍光波長または波長エンベロープに調整された光検出器または同等のデバイスを使用して、発生した蛍光が検出される。これにより、光検出器は、既知のアルゴリズムを使用してコンピューターで処理および分析できる特徴的な電気信号を生成する。

【0036】

上記のように、1つの好ましい実施形態では、ステップ（3）の終わりに、関連する捕捉ヌクレオチドを伴う第2のオリゴヌクレオチドおよび任意に第3のオリゴヌクレオチド、またはリガーゼが使用される場合、使用プローブに由来する第4のオリゴヌクレオチドは、別の対応する第1のオリゴヌクレオチド分子とハイブリダイズまたはそうでなければ複合し、それにより、元の使用プローブに対応する、すなわち同じ化学的および物理的構造を有する新しいオリゴヌクレオチド二重鎖を生成する。次いで、この生成物はステップ（3）の繰り返しを受け、それにより、検出可能な状態でさらなるフルオロフォアを放出し、捕捉ヌクレオチドおよび任意で関連する第3のオリゴヌクレオチドを有する第4のオリゴヌクレオチドまたは第2のオリゴヌクレオチドを再び再生する。この手段により、原則として、実質的にすべての関連する第1のオリゴヌクレオチドが消費されるまで、ステップ（2）および（3）を繰り返して蛍光シグナルをさらに増強させる。一実施形態では、ステップ（4）は、ステップ（2）および（3）の各反復と同時に実行され、一方、別の実施形態では、ステップ（2）および（3）が最初に繰り返されて、複数のニックの入った第1のオリゴヌクレオチドが生成され、その後、ステップ（4）でエキソヌクレオリシスに同時に供される。これらの実施形態のいずれかの結果として、観察者は、そうでなければ得られた可能性があるよりもはるかに大きな蛍光シグナルの増強を見る。

【0037】

特に好ましい一実施形態では、本発明の方法は、少なくとも一部が単一のヌクレオシド三リン酸を含む微小液滴のストリームで全体的または部分的に実行され、適切なストリームであり、その順序が分析物の元のヌクレオチド配列を反映する。このような方法は、たとえば、ステップ（1）で生成されたヌクレオシド三リン酸を、炭化水素またはシリコンオイルなどの非混和性キャリア溶媒に維持された対応する水性微小液滴のストリームに1つずつ挿入して、順序を維持することに役立つ。または、これは、例えば、適切な寸法の微小液滴ヘッドから溶媒のストリームの中に反応媒体を出現させることにより、消化（熱リン酸化）ゾーンの下流に微小液滴を直接作成することにより実現できる。あるいは、ステップ（1）からの反応媒体の小アリコート、溶媒中に懸濁した既存の水性微小液滴のストリームに定期的かつ連続的に注入することができる。この後者のアプローチが採用される場合、各微小液滴には、ステップ（2）から（4）を実行するために必要な酵素およびその他の試薬（バッファーなど）とともに、プローブのさまざまなコンポーネントが既に含まれていることとしてもよい。さらに別のアプローチでは、前の実施形態で作成された微小液滴を、そのような既存の微小液滴のストリームと合体させて、同様の結果を達成することができる。これらの微小液滴法では、ステップ（5）は、好ましくは、微小液滴を貯蔵領域に送達し、各微小液滴を調べて、遊離したフルオロフォアを識別することを含む。その後、各微小液滴から得られた結果は、元の核酸分析物の配列に特徴的なデータのストリームに組み立てられる。

【0038】

特定の微小液滴に複数のヌクレオシド三リン酸が含まれるリスクを回避するには、ステップ（1）で各ヌクレオシド三リン酸を、各充填された微小液滴が平均で1〜20、好ましくは2〜10の空の液滴によって分離されるような速度で放出することが好ましい。その後、溶媒中の充填および未充填の微小液滴のストリームは、流路、適切には微小流体流路に沿って、それらが個別の状態で維持され、互いに合体する機会がないように、ある速度および方法で流される。適切には、使用される微小液滴は、100ミクロン未満、好ましくは50ミクロン未満、より好ましくは20ミクロン未満、さらにより好ましくは15ミクロン未満の有限直径を有する。最も好ましくは、それらの直径は2〜20ミクロンの範囲である。一実施形態では、システム全体を通る微小液滴流量は、毎秒50〜3000個、好ましくは100〜2000個の微小液滴の範囲である。

【0039】

本発明の第3の態様では、（a）エキソヌクレアーゼ遮断部位、遮断部位の5'側にある制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、かつ、単一のヌクレオシド三リン酸を捕捉するための単一のヌクレオチド捕捉部位、およびフルオロフォアを消光するように配置された

認識部位の 5' 側に位置する少なくとも 1 つのフルオロフォア領域を含む、一本鎖の第 1 のオリゴヌクレオチドと、(b) 捕捉部位の両側の第 1 のオリゴヌクレオチド上の相補的領域にハイブリダイズすることができる一本鎖の第 2 および任意に第 3 のオリゴヌクレオチドと、を含むことを特徴とする多成分生物学的プローブも提供される。

【0040】

一実施形態では、エキソヌクレアーゼ遮断部位は、第 1 のオリゴヌクレオチドの 3' 末端に隣接して位置する。別の実施形態において、エキソヌクレアーゼ遮断部位は、第 1 のオリゴヌクレオチドを環状、すなわち閉ループにすることにより達成される。

【0041】

本発明の第 4 の態様では、(a) エキソヌクレアーゼ遮断部位、遮断部位の 3' 側にある制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、かつ、単一のヌクレオシド三リン酸を捕捉するための単一のヌクレオチド捕捉部位、およびフルオロフォアを消光するように配置された認識部位の 3' 側に位置する少なくとも 1 つのフルオロフォア領域を含む、一本鎖の第 1 のオリゴヌクレオチドと、(b) 捕捉部位の両側の第 1 のオリゴヌクレオチド上の相補的領域にハイブリダイズすることができる一本鎖の第 2 および任意に第 3 のオリゴヌクレオチドと、を含むことを特徴とする多成分生物学的プローブも提供される。

【0042】

一実施形態では、エキソヌクレアーゼ遮断部位は、第 1 のオリゴヌクレオチドの 5' 末端に隣接して位置する。別の態様では、エキソヌクレアーゼ遮断部位は、第 1 のオリゴヌクレオチドを環状、すなわち閉ループにすることにより達成される。

【0043】

好ましくは、第 2 および第 3 の実施形態の両方において、第 2 および第 3 のオリゴヌクレオチドの両方が存在する。

【0044】

これらの第 3 および第 4 の態様の両方の一実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチド上のフルオロフォアは、自己消光するために互いに近接して配置される。別の実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドは、フルオロフォア領域内のフルオロフォアを消光するクエンチャーを含む。適切なフルオロフォアおよびクエンチャーには、上記のものが含まれるが、これらに限定されない。別の実施形態では、第 2 および第 3 のオリゴヌクレオチドは、上で説明したようにリンカー領域によって接続され、リンカー領域自体は好ましくは別のオリゴヌクレオチド領域である。

【0045】

上で説明したように、DNA または RNA シーケンシングの目的で、本明細書に記載の生物学的プローブは、使用される捕捉部位およびフルオロフォアの特徴的な核酸塩基のみが異なる多数の異なる第 1 のオリゴヌクレオチドの型からなる対応する生物学的プローブシステムに組み立てることができる。一実施形態では、捕捉部位およびフルオロフォアの特徴である核酸塩基のみが異なる 1、2、3、4 またはそれ以上の異なる第 1 オリゴヌクレオチドの型を使用することができる。天然に存在する DNA または RNA の場合、これらの核酸塩基は A、G、C、および T または U で構成される。別の実施形態では、生物学的プローブシステムは、リガーゼ、ポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼ、および場合によっては 3' - 5' または 5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性を示す酵素の少なくとも 1 つをさらに含むキットとして明示される。

【0046】

上記の配列決定方法で使用される検出方法は、概して、上記の方法のステップ (2) から (5) のみをその単一のヌクレオシド三リン酸成分に適用することによって、生物学的サンプルまたはそれから得られる核酸分析物中の単一のヌクレオシド三リン酸の分析、特性評価、または定量化にも適用できる。そのような追加の用途において、これらのステップ (2) ~ (5) の性質および使用される生物学的プローブは、本明細書に記載されるように適切であろう。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】最終的な15分間の消化ステップでの蛍光強度の増加を、反応のdNTPコンポーネントの有無でモニターし、結果を図1にグラフで示した。

【図2】図2は、それぞれが単一のヌクレオチド塩基を含む微小液滴が上記のタイプのプローブと反応するように作られた微小流体配列決定装置を概略的に示す。

【発明を実施するための形態】

【0048】

ここで、以下の実施例を参照して本発明を説明する。

実施例1—プローブの調製と使用

以下のヌクレオチド配列を有する一本鎖の第1のオリゴヌクレオチド1を調製した：

5'-GCTGTGCCGGGCTCGTGTCTCTGCGTTTCTTGFFQGTGTGCATTGCATAGGTTTCACG
ATA-X-3'

ここで、A、C、G、およびTは、DNAの関連する特徴的な核酸塩基を持つヌクレオチドを表し、Fは、従来のアミン結合化学を使用してA t t o 7 0 0 色素で標識されたデオキシチミジンヌクレオチド（T）を表し、QはBHQ-2クエンチャーで標識されたデオキシチミジンヌクレオチドを表し、Xは逆3' dTヌクレオチドを表す。デオキシヌクレオシド三リン酸（dNTP）の混合物中のデオキシチミジン三リン酸ヌクレオチド（dTTP）の捕捉に選択的な、その5'末端から42番目の塩基に捕捉領域（Aヌクレオチド）、ニックング制限エンドヌクレアーゼNb.BsrDIの認識配列「NNCATTGC」をさらに含む。

【0049】

また、第1のオリゴヌクレオチドの捕捉部位に隣接する3'領域に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド領域を含む別の一本鎖オリゴヌクレオチド2、および単一塩基ミスマッチ、5'リン酸基、および3'逆方向dTヌクレオチドを有する第1オリゴヌクレオチドの捕捉部位に隣接する5'領域に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド領域を含む一本鎖オリゴヌクレオチド3が調整された。それらは次のヌクレオチド配列を有した：

オリゴヌクレオチド2：5'-CGTGAACCTATGCAA-3'

オリゴヌクレオチド3：5'-PGCGAACGTAAAATGTCATGGX-3'

ここで、Pは5'リン酸基を表し、Xは逆3' dTヌクレオチドを表す。

【0050】

次に、プローブを含む反応混合物を調製した。それは、以下の処方から得られたものに対応する組成を有していた：

20 uL 5×バッファー pH 8.0

10 uL オリゴヌクレオチド1、100 nM

10 uL オリゴヌクレオチド2、10 nM

10 uL オリゴヌクレオチド3、1000 nM

10 uL スペルミン溶液、10 mM

10 U Nb.BsrDIニックングエンドヌクレアーゼ

（例えば、New England Biolabs Inc.）

3.5 U 大腸菌リガーゼ

2.9 U Bstラージフラグメントポリメラーゼ

2.7 U プラチナPfxポリメラーゼ

6.7 U 耐熱性無機ピロホスファターゼ

10 uL dNTPの混合物、0.25 nM

100 μL 水

ここで、5×バッファーは次の混合物で構成されている：

25 μL 酢酸トリズマ、1 M、pH 8.0

50 uL 酢酸マグネシウム水溶液、1 M

25 uL 酢酸カリウム水溶液、1 M

50 uL Triton X-100界面活性剤（10%）

500 μ g BSA

1ml 水

【0051】

次に、混合物を37℃で10分間インキュベートし、その後さらに120分間温度を56℃に上げて、第1のオリゴヌクレオチドの切断を繰り返すことにより、dTTPの捕捉とオリゴヌクレオチド2のオリゴヌクレオチド3へのライゲーションにより、使用プローブを形成した。次いで、温度をさらに15分間72℃に上げて、フルオロフォアおよびクエンチャーを有する切断された第1のオリゴヌクレオチド成分の切断を可能にした。反応混合物中のAtto700色素の蛍光強度は、反応が進行するにつれてCLARIOStarマイクロプレートリーダー（例えば、BMGLabtech）を使用して測定された。

10

【0052】

最終的な15分間の消化ステップでの蛍光強度の増加を、反応のdNTPコンポーネントの有無でモニターし、結果を図1にグラフで示した。これから、プローブがdTTPを効率的に捕捉し、本発明のプロセスの周期的性質が蛍光シグナルの急速な成長につながる事がわかる。それどころか、反応混合物中にdNTPが存在しない比較実験では、オリゴヌクレオチド1上のAtto700色素は有意な程度に蛍光を示さなかった。

【0053】

実施例2—プローブを使用した液滴マイクロ流体法

図2は、それぞれが単一のヌクレオチド塩基を含む微小液滴が上記のタイプのプローブと反応するように作られた微小流体配列決定装置を概略的に示す。

20

【0054】

ヒトDNA由来の100ヌクレオチド塩基ポリヌクレオチド分析物の漸進的加ピロリン酸分解により得られた単一ヌクレオチド三リン酸のストリーム（流れ）を含む水性媒体1は、PDMSポリマーから製造された直径10ミクロンのマイクロ流体チューブを通して流れる。加ピロリン酸分解反応自体は、スクシニルブリッジにより分析物が予め付着しているガラスマイクロビーズ上に、Bstポリメラーゼと、ピロリン酸ナトリウムおよび塩化マグネシウムのそれぞれの濃度が1リットルあたり2ミリモルの溶液を含む、水性の緩衝（pH7.5）反応媒体のストリームを72℃で流すことにより実行される。マイクロビーズの下流にある「1」の単一ヌクレオチドの順序は、分析物の配列に対応する。「1」は、液滴ヘッド2から第1のチャンバー3に出現し、そこで1つ以上の不混和性ライトシリコンオイル4のストリームと接触する。これらのストリームの速度は、乱流混合を回避し、それぞれ直径が約8ミクロンの油に懸濁した水性球状液滴5を作成するように選択される。通常、速度は、隣接する満たされた液滴の間に平均で10個の空の液滴があるように調整される。次に、「5」のストリームは、同じ直径の第2のマイクロ流体チューブに沿って第2のチャンバー6に進み、5ミクロンの水性球状液滴7の第2のストリームも第2の液滴ヘッド8によって供給される。液滴5および7は順番に合体させられ、直径約9ミクロンの拡大水性液滴9を形成する。「7」のそれぞれは、「5」のそれぞれに存在する残留ピロリン酸アニオンを破壊するために無機ピロホスファターゼを含む。

30

【0055】

次いで、「9」のストリームは、マイクロ流体チューブを介して第3のチャンバー10に同じ速度で進められ、これらの液滴は、対応する液滴ヘッド12を通してそこに供給される5ミクロンの水性球状液滴11の第3のストリームと接触する。「9」のそれぞれがチャンバー6と10の間を移動するのにかかる時間は約2分である。

40

【0056】

次いで、液滴9および11を「10」で合体させて、液滴13（直径約10ミクロン）を生成する。「11」のそれぞれには、中温性リガーゼ、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する好熱性ポリメラーゼ、ニッキング制限エンドヌクレアーゼNb.BsrDI（例えば、new England Biolabs inc.）および実施例1に記載されたものと同様の4セットの一本鎖オリゴヌクレオチドを含むプローブシステムであり、各々は上記で説明した異な

50

るフルオロフォアで標識された異なる第 1 のオリゴヌクレオチドを有する。

【0057】

そのように形成された合体微小液滴 13 のストリームは、その後、37℃で10分間、続いて56℃で120分間、次いで72℃で15分間のインキュベーションに供される。この時間の終わりに、「13」が検出システム14に転送される。

【0058】

検出システム（図示せず）は、通常、各小滴がレーザーからの入射光で調べられる検出窓を含む。次に、この光の作用により、各液滴で放出されたフルオロフォアが、完全なプローブに最初に組み込まれた単一ヌクレオチド塩基に特徴的な方法で蛍光を発する（または、液滴が元々空だった場合、本質的にまったく蛍光を発しない）。次いで、この蛍光の有無は、上記の4つのオリゴヌクレオチドセットに関連する4つのフルオロフォアの4つの特徴的な波長で検出される。したがって、液滴が順番に調べられると、元のポリヌクレオチド分析物中のヌクレオチド塩基の配列が実際に読み取られ得る。

10

20

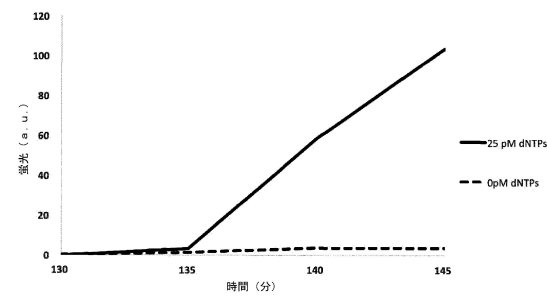
30

40

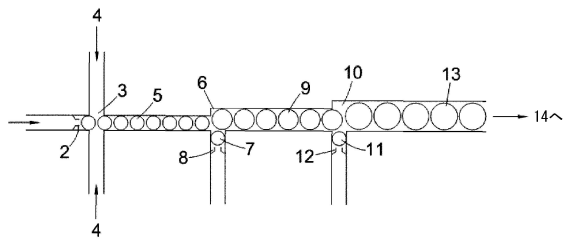
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

【配列表】

0007257334000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

ーズ ビルディング ベース4 イノベーション リミテッド内

(72)発明者 キャメロン アレクサンダー フレイリング

イギリス国 ケンブリッジシャー シービー3 0エフエー ケンブリッジ ジェイジェイ トムソン
アヴェニュー ブロアーズ ビルディング ベース4 イノベーション リミテッド内

(72)発明者 マーク デトレフゼン

イギリス国 ケンブリッジシャー シービー3 0エフエー ケンブリッジ ジェイジェイ トムソン
アヴェニュー ブロアーズ ビルディング ベース4 イノベーション リミテッド内

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 特表2016-515832 (JP, A)

国際公開第2016/012789 (WO, A2)

特表2015-532098 (JP, A)

Boris Breine, Single-molecule detection of deoxyribonucleoside triphosphates in micro
droplets, Nucleic Acids Research, 2019年07月18日, Vol. 47, No. 17, e101, p. 1-10,
doi:10.1093/nar/gkz611

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00

C12N 15/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)