

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5651022号  
(P5651022)

(45) 発行日 平成27年1月7日(2015.1.7)

(24) 登録日 平成26年11月21日(2014.11.21)

(51) Int.Cl.

C 12 Q 1/68  
C 12 N 15/09

F 1

(2006.01)  
(2006.01)C 12 Q 1/68  
C 12 N 15/00Z N A A  
A

請求項の数 26 (全 61 頁)

(21) 出願番号 特願2010-550908 (P2010-550908)  
 (86) (22) 出願日 平成21年3月13日 (2009.3.13)  
 (65) 公表番号 特表2011-514163 (P2011-514163A)  
 (43) 公表日 平成23年5月6日 (2011.5.6)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2009/037194  
 (87) 國際公開番号 WO2009/117327  
 (87) 國際公開日 平成21年9月24日 (2009.9.24)  
 審査請求日 平成24年3月2日 (2012.3.2)  
 (31) 優先権主張番号 61/036,953  
 (32) 優先日 平成20年3月15日 (2008.3.15)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 510248464  
 ホロジック、インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国 O 1 7 3 0 マサチュー  
 セツツ州、ベッドフォード、クロズビー  
 ドライブ 35  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (74) 代理人 100122389  
 弁理士 新井 栄一  
 (74) 代理人 100111741  
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】增幅反応中の核酸分子を分析するための組成物及び方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

標的核酸を分析する方法であって、

a) 合成プローブ及び熱安定性 F E N - 1 エンドスクレアーゼの存在下にて、前記合成プローブが增幅反応中に切断されて切断断片を生成する条件下で、標的核酸をポリメラーゼ連鎖反応により增幅する工程であって、

前記合成プローブが分析物特異的部分及び非標的的部分を含むフットプリントプローブであり、前記非標的的部分が前記標的核酸に対して非相補的であり、前記分析物特異的部分の長さが 12 ヌクレオチド以下であり、前記分析物特異的部分が前記標的核酸に対して相補的である最高 12 ヌクレオチドを含み、

前記增幅が等温反応で行われる場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記等温反応を実施する温度より少なくとも 5 低い前記標的に対する計算  $T_m$  値を有し、又は前記增幅反応が熱サイクル反応である場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記熱サイクルで用いられる最低温度より少なくとも 5 低い前記標的に対する計算  $T_m$  値を有する、

上記工程と、

b) 前記增幅反応中に前記切断断片を検出する工程と、  
を含む方法。

## 【請求項 2】

前記增幅が等温反応で行われる場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的

10

20

部分が、前記等温反応を実施する温度より少なくとも 8 低い前記標的に対する計算  $T_m$  値を有し、又は前記增幅反応が熱サイクル反応である場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記熱サイクルで用いられる最低温度より少なくとも 8 低い前記標的に対する計算  $T_m$  値を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記增幅が等温反応で行われる場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記等温反応を実施する温度より少なくとも 10 低い前記標的に対する計算  $T_m$  値を有し、又は前記增幅反応が熱サイクル反応である場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記熱サイクルで用いられる最低温度より少なくとも 10 低い前記標的に対する計算  $T_m$  値を有する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記合成プローブが標識されていない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記合成プローブが非天然ヌクレオチドを含まない、及び / 又は副溝バインダー部分を含まない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記合成プローブの前記非標的部位の長さが少なくとも 10 ヌクレオチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記標的核酸が RNA であり、前記方法が前記增幅前に又は前記增幅と同時に前記 RNA を逆転写する工程を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記增幅がプライマーオリゴヌクレオチドを使用するものであり、前記合成プローブの前記分析物特異的部分が、前記標的核酸に対する少なくとも 1 つのプライマーオリゴヌクレオチドの計算  $T_m$  値より少なくとも 5 低い前記標的核酸に対する計算  $T_m$  値を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記合成プローブの前記分析物特異的部分が、前記標的核酸に対する少なくとも 1 つのプライマーオリゴヌクレオチドの計算  $T_m$  値より少なくとも 8 低い前記標的核酸に対する計算  $T_m$  値を有する、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記合成プローブの前記分析物特異的部分が、前記標的核酸に対する少なくとも 1 つのプライマーオリゴヌクレオチドの計算  $T_m$  値より少なくとも 10 低い前記標的核酸に対する計算  $T_m$  値を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記プローブの前記分析物特異的部分が、11 以下のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記プローブの前記分析物特異的部分が、10 以下のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記プローブの前記分析物特異的部分が、9 以下のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記プローブの前記分析物特異的部分が、8 以下のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記プローブの前記分析物特異的部分が、7 以下のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

50

前記プローブの前記分析物特異的部分が、6以下 のヌクレオチドを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

前記プローブが切断される前に切断構造が形成され、前記切断構造が、a)前記標的核酸の第1の領域における前記合成プローブ、及びb)前記標的核酸の第1の領域の下流に存在する前記標的核酸の第2の領域における第2のオリゴヌクレオチドと、前記標的核酸との会合により形成される、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

前記標的核酸の第2の領域が第1の領域に隣接している、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記切断構造において、第2のオリゴヌクレオチドの3'末端において少なくとも1個のヌクレオチドが、前記プローブと前記標的核酸とのハイブリダイゼーション領域と重複する、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

前記切断構造において、第2のオリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドが、前記標的核酸に対して非相補的である、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

第2のオリゴヌクレオチドが前記増幅で用いられるプライマーオリゴヌクレオチドでもある、請求項17に記載の方法。

【請求項22】

前記切断断片の検出が、1つ以上の前記切断断片を合成検出オリゴヌクレオチドと会合させることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項23】

前記合成検出オリゴヌクレオチドが標識を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記標識が蛍光標識である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記合成検出オリゴヌクレオチドが蛍光クエンチャー部分を更に含む、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記切断断片が、前記合成検出オリゴヌクレオチドと会合したとき、前記熱安定性FEN-1エンドヌクレアーゼにより切断可能な切断構造を形成する、請求項22に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2008年3月15日出願の米国特許仮出願第61/036,953号の優先権を主張し、該出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、検出アッセイ(例えば切断アッセイ)と組み合わせて増幅反応を実施するためのシステム、方法及びキットであって、該検出アッセイが比較的短い(例えば6~12塩基)分析物特異的領域('ASR')を有するプローブを使用して、核酸修飾酵素(例えばFEN-1エンドヌクレアーゼ)が認識可能な最小量の二本鎖を提供するシステム、方法及びキットを提供する。いくつかの実施形態では、かかるアッセイは標的を定量するために用いられ、他の実施形態では、かかるアッセイは遺伝子型同定のために用いられる。特定の実施形態では、かかる短いプローブの使用によりダイナミックレンジの広いアッセイが可能になる。

【背景技術】

【0003】

10

20

30

40

50

核酸の定量は、生物学及び医学分野で重要な役割を果たしている。例えば核酸の定量は、癌の診断及び予後診断、ウイルス診断、並びに治療効果の判断（例えばHCV及びHIVに対する）において重要である。HCVのRNAの定量は、IFNを服用している患者にとって重要である。IFN療法の効果は、IFN療法中にウイルスの量をモニタすることにより直接見出すことができる。これによって各患者の臨床症状に合わせたより有効なIFN療法を行うことが可能になる。標的核酸の定量は、将来の疾患診断にとって重要である。例えば、外因性刺激に起因する疾患の場合、外因性刺激に応答するmRNAの発現レベルを調べることによって、より早期の診断が可能となる。

#### 【0004】

ポリメラーゼ連鎖反応を核酸の定量に用いることができる。しかしPCRを用いる場合、増幅された核酸の絶対量は、増幅開始時点で存在していた標的核酸の量を正確に反映している訳ではない。第1に、PCRによる増幅産物の量は一般的に各サイクル毎に指数関数的に増加するが、増幅産物の量が一定レベルを超えると増加速度が低下し、ついには停止する。したがって、増幅産物の最終量は、反応開始時の標的核酸の量に関係なく一定である。この現象はプラトー効果と呼ばれ、PCRによる増幅産物を定量するときには考慮すべきものである。

#### 【0005】

「リアルタイムPCR」として知られている技術が、標的配列の定量に広く用いられている（例えばBustin, Journal of Molecular Endocrinology (2000) 25, 169-193; Bustin and Nolan, Journal of Biomolecular Techniques 15:1 55-166; ABI “Essentials of Real Time PCR” Part Number 4371089 Revision A; ABI Primer Express Software 3.0 “Getting Started Guide” Part Number 4362460 Rev. B, January 2005参照）。この技術では、各増幅標的の検量線を最初に作成する。段階希釈した標的核酸を準備し、各サンプルをPCRに供し、一般的に増幅された物質の量に比例して蓄積するシグナル（例えば蛍光）を検出することにより、産物の蓄積をリアルタイムで、すなわち増幅過程中に検出する。バックグラウンド蛍光又は「基準」を上回る増幅産物に特異的なシグナルが最初に検出されるサイクルである、閾値サイクル（C<sub>t</sub>サイクル）を決定する。異なる段階希釈物のC<sub>t</sub>値を縦軸上にプロットし、各希釈物中の標的核酸の初期コピー数を横軸にプロットして、その標的物質の検量線を作成する。対象となる未知のサンプル（例えば未知の量の同じ標的物質を含有していると思われるサンプル）を同条件下でPCRに供し、未知の物質のC<sub>t</sub>値を決定する。次いでその標的の検量線を用いて、未知のサンプルの初期コピー数を決定する。

#### 【0006】

一般的に用いられている均質な蛍光レポーティング法が2種存在する。「非特異的」検出は、増幅産物の蓄積を示すが正しい又は対象とするアンプリコンに対して特異的ではなく、一方「特異的」検出は特定の対象とする産物の蓄積を立証する。非特異的検出は、臭化エチジウム又はSYBR Green等のインターラーチューション色素を用いてもよく、該色素はPCR反応中に生成される任意の二本鎖DNAに結合し、強い蛍光を発する。かかる色素は熱サイクル前にPCR試薬に添加される。本質的に非特異的であるが、DNA融解曲線を用いて増幅産物の種類（identity）を調べることができる。色素インターラーチューション法を用いることの利点としては、1) 色素を用いて任意の二本鎖DNA配列の増幅をモニタすることができ、2) プローブが必要なく、アッセイのセットアップコスト及びランニングコストを低減できることが挙げられる。

#### 【0007】

反応レポーティング法としてインターラーチューション色素を用いることの主な問題点は、該色素が擬陽性シグナルを生じさせる可能性があること、すなわち色素は配列選択性無しに任意の二本鎖DNAに結合するため、非特異的な二本鎖DNAの存在下でシグナルが生

10

20

30

40

50

じることである。非特異的DNAとしては、混入DNA、「プライマーダイマー」アーチファクトDNA、又は反応に加えられるプライマーを用いて増幅することができる対象とする標的以外の任意のDNAを挙げることができる。

【0008】

非特異性に加えて、インターラーション色素は正しい標的でさえも定量をより複雑にする場合がある。なぜならばシグナルの量は産物のコピー数ではなく増幅反応中に生成される二本鎖DNAの質量に依存するためである。より長い増幅産物はより大きな質量を有し、より多くの色素分子に結合することができるため、同じコピー数のより短い産物よりも強いシグナルが生じことがある。対照的に、蛍光性プローブを用いるときには、アンプリコンの長さにかかわらず増幅分子の各コピーにつき1つの蛍光物質が消光状態から解き放たれる。

【0009】

テンプレート又は標的特異的分析は一般的に、各PCRアッセイにつき1つ以上の特注蛍光プローブを設計及び合成する必要がある。プライマー配列は正しい増幅産物にも誤った増幅産物にも同様に組み込まれるため、プローブは一般的にプライマー間に存在する標的配列の領域にハイブリダイズするよう設計され、その結果プローブのハイブリダイゼーションの成功は対象とする標的配列が増幅されたことを裏付ける。大部分のレポーティング系は、検出の基礎として蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)、又はドナー分子及びクエンチャーモル子の間の類似の相互作用を利用している。一般的に蛍光シグナルは、アンプリコン特異的プローブがその相補的標的にハイブリダイズした場合にのみ生じる。T A Q 20 M A N 及び他の5'スクレアーゼ検出アッセイ等の一般的な実施形態では、5'スクレアーゼはハイブリダイズしているプローブを切断して蛍光物質をクエンチャーモル子から分離する。しかし一部の反応設計では、プローブは切断されず正しい標的の存在下では立体構造が変化する。かかるプローブの立体構造の変化により蛍光物質がクエンチャーモル子から分離されて、特異的標的の増幅の成功の指標である蛍光増加が生じる。

【0010】

特異的化学反応は、例えばミスプライミング又はプライマーダイマーアーチファクトに起因する非特異的増幅によるシグナルが生じず、蛍光検出器に検出されないと有利である。これを用いればアンプリコンの種類(identity)を確かめるためのPCR後のサザンプローティング、配列解析、又は融解曲線の必要がない。インターラーション色素の別の利点は、異なる識別可能なレポーター色素でプローブを標識することができる点であり、これにより1回のPCR反応においていくつかの異なる配列から生じる増幅産物を検出することが可能になる(マルチプレックス)。プローブに基づく特異的検出化学反応の1つの主な問題点は、検出される異なる配列毎に異なるプローブの合成が必要なことである。(ABI "Essentials of Real Time PCR" Part Number 4371089 Revision A)。その上高価な色素で標識された様々な特注プローブ、クエンチャーモル子、及び任意的に副溝バインダーを使用する必要があるため、プローブに基づくアンプリコン特異的リアルタイムPCR分析に加えて著しい追加費用がかかる。別の問題点は、密接に関連する配列を識別することが困難である点である。PCR及び加水分解プローブを用いる対立遺伝子の判別は、一般的に、「間違った」標的にハイブリダイズしたとき3'末端がミスマッチであり、その結果対立遺伝子の増幅を妨げるプライマー(例えば増幅することを意図していない対立遺伝子にハイブリダイズしたとき、一方の対立遺伝子を増幅することを意図するプライマー)、又は対象としない対立遺伝子にはそれほどアニールしないよう設計された加水分解プローブのいずれかを用いることが必要である。かかるミスマッチが存在する場合でさえもプライマー伸長及びプローブ切断の両方が生じる場合があるため、上記両方のアプローチからは不完全な判別しか得られない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

10

20

30

40

50

上記点を考慮して、リアルタイムで、標的特異的に核酸を定量するための比較的単純で安価で均質な方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

発明の概要

いくつかの実施形態では、本発明は対象となる標的核酸を分析するための検出技術を提供する。本明細書に記載するように、検出技術は必要に応じて定量的又は半定量的であり得る、リアルタイム検出能を有する。システム、組成物（例えば、キット、反応混合物等）、及び方法が提供される。システム、組成物及び方法は、他の既知の技術又は将来開発されるであろう技術と併用してもよい。いくつかの実施形態では、本発明は、例えば検出酵素を用いて検出するのに必要な最小構造（例えば二本鎖）を提供するフットプリントプローブの使用を含む検出システムを提供する。

10

【0013】

いくつかの実施形態では、本発明は標的核酸の分析方法であって、核酸二本鎖を含む構造を認識する5'ヌクレアーゼを選択する工程と、5'ヌクレアーゼのためのフットプリント二本鎖長を決定する工程と、合成フットプリントプローブ及び5'ヌクレアーゼの存在下で、前記合成フットプリントプローブが標的増幅反応中に切断されて切断断片を生成する条件下で標的核酸を増幅する工程であって、前記合成フットプリントプローブが分析物特異的部分及び非標的的部分を含み、前記非標的的部分が前記標的核酸に対して実質的に非特異的であり、前記分析物特異的部分が前記5'ヌクレアーゼのためのフットプリント二本鎖長より長くない前記標的核酸とのプローブ-標的二本鎖を形成する、上記工程とを含む方法を提供する。好ましい実施形態では、本方法は増幅反応中に切断断片を検出することを更に含む。特に好ましい実施形態では、標的増幅反応はポリメラーゼ連鎖反応である。好ましい実施形態では、5'ヌクレアーゼは、天然FEN-1エンドヌクレアーゼ、改変型FEN-1エンドヌクレアーゼ、及び少なくとも1種のエンドヌクレアーゼの少なくとも一部を含むキメラタンパク質から成る群から選択される。

20

【0014】

いくつかの実施形態では、本発明は標的核酸を分析する方法であって、a)合成プローブ及びFEN-1ヌクレアーゼの存在下で、前記合成プローブが増幅反応中に切断されて切断断片を生成する条件下で標的核酸を増幅する工程であって、前記合成プローブがFEN-1エンドヌクレアーゼのためのフットプリントプローブであり、前記フットプリントプローブが分析物特異的部分及び非標的的部分を含み、前記非標的的部分が前記標的核酸に対して実質的に非特異的であり、前記増幅反応が等温反応である場合、前記フットプリントプローブの分析物特異的部分が、前記等温反応が実施される温度より少なくとも5'、より好ましくは8'、更により好ましくは10'低い標的に対する計算 $T_m$ 値を有し、又は増幅反応が熱サイクル反応である実施形態では、前記フットプリントプローブの分析物特異的部分が前記熱サイクルで用いられる最低温度より少なくとも5'、より好ましくは8'、更により好ましくは10'低い前記標的に対する計算 $T_m$ 値を有し、前記フットプリントプローブは副溝バインダー部分を含まない、上記工程を含む方法を提供する。好ましい実施形態では、本方法は前記増幅反応中に切断産物を検出することを更に含む。

30

【0015】

特に好ましい実施形態では、本発明は核酸増幅アッセイ及び検出アッセイの使用を含む方法であって、前記増幅アッセイ又は検出アッセイの少なくとも1つが12ヌクレオチド以下の分析物特異的領域を有するフットプリントプローブの使用を含み、5'ヌクレアーゼ（例えば古細菌若しくは真核生物のFEN-1ヌクレアーゼ、又はウイルス若しくは真正細菌DNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ）の使用を更に含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、フットプリントプローブのASRは標的核酸に対して完全に相補的である12ヌクレオチドを含み、いくつかの実施形態では、プローブのASRはその1つ以上が標的核酸鎖中の対応するヌクレオチドに対して相補的ではない12ヌクレオチドを含む。

40

50

## 【0016】

いくつかの実施形態では、本発明は標的核酸を分析する方法であって、a) プローブ及びエンドヌクレアーゼの存在下で、前記プローブが増幅反応中に切断されて切断断片を生成する条件下にて標的核酸を増幅する工程であって、前記プローブが分析物特異的部分（すなわち標的結合領域）及び非標的的部分を含み、前記非標的的部分が前記標的核酸に対して実質的に非相補的であり、前記標的結合部分が前記標的核酸に対して相補的である12以下のヌクレオチドを含む、上記工程と、b) 前記増幅反応中に切断断片を検出する工程とを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、プローブは合成プローブである。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼはFEN-1エンドヌクレアーゼ（例えば、熱安定性FEN-1エンドヌクレアーゼ、例として古細菌種由来のFEN-1エンドヌクレアーゼが挙げられるがこれに限定されない）である。10

## 【0017】

本方法は、実施される分析の性質により制限されない。いくつかの実施形態では、分析は、増幅反応中に切断断片を検出することにより標的核酸の存在を検出することを含む。いくつかの実施形態では、分析は標的核酸の多型（例えば一塩基多型、欠失、挿入、反復配列等）の存在を同定することを含む。いくつかの実施形態では、分析は、標的核酸が由来する生物の種類を判定することを含む。例えばいくつかの実施形態では、生物は界、門、綱、目、科、属、種、亜種、又は個体レベルで同定される。いくつかの実施形態では、分析は標的核酸の量を検出することを含む。いくつかの実施形態では、検出される量はサンプル中に最初に存在する標的核酸の量である。20

## 【0018】

本発明は、標的核酸の源又は性質により制限されない。いくつかの実施形態では、標的核酸はサンプルから単離されている。本発明はサンプルの性質により制限されない。サンプルとしては、細胞サンプル（例えば生物、培養細胞、幹細胞、腫瘍細胞、病原体、単細胞生物由来）、組織サンプル、流体サンプル（例えば血液、血清、血漿、尿、唾液等）、培養サンプル、及び環境サンプルが挙げられるが、これらに限定されない。標的核酸は、生物、例えば動物（例えばヒト等の哺乳類）、植物、細菌、ウイルス、及び真菌が挙げられるがこれらに限定されない生物由来であってもよい。標的核酸は、DNA若しくはRNA又はこれらの組み合わせを含んでいてもよい。標的核酸は、天然核酸分子若しくは合成核酸分子又はこれらの組み合わせを含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、標的核酸がRNAである又はRNAを含む場合、例えば逆転写酵素で逆転写されることにより、RNAをDNAに変換する。標的核酸は、その構造の1つ以上のヌクレオチド又は他の部分に対する共有又は非共有修飾を含んでいてもよい。例えばいくつかの実施形態では、核酸は1つ以上のヌクレオチドがメチル化されており、分析は標的核酸中のメチル化ヌクレオチドの存在、頻度（degree）、又は位置を決定することを含む。30

## 【0019】

いくつかの実施形態では、本方法により使用される増幅反応はポリメラーゼ連鎖反応であるが、他の温度サイクル又は等温増幅技術を使用してもよい。増幅技術の多くがポリメラーゼを使用する。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは熱安定性ポリメラーゼである。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を欠く。増幅技術の多くが1つ以上のプライマーを使用する。したがっていくつかの実施形態では、本方法は第1及び第2のプライマーオリゴヌクレオチドを利用する。また必要な場合又は望ましい場合、更なるプライマーオリゴヌクレオチドを使用してもよい。40

## 【0020】

いくつかの実施形態では、プローブ切断は切断構造の形成及び前記切断構造の切断により達成される。いくつかの実施形態では、切断構造はプローブが切断される前に形成され、前記切断構造は、a) 標的核酸の第1の領域におけるプローブ、及びb) 標的核酸の第2の領域に会合する第2のオリゴヌクレオチドであって、第2の領域が標的核酸の長さに沿って第1の領域の3'に存在する第2のオリゴヌクレオチドと、標的核酸との会合により形成される。いくつかの実施形態では、標的核酸の第1及び第2の領域は互いに隣接し50

ている。いくつかの実施形態では、切断構造中の第2のオリゴヌクレオチドの3'末端における少なくとも1個のヌクレオチドが、プローブと標的核酸との間のハイブリダイゼーション領域と重複している。いくつかの実施形態では、第2のオリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドは、切断構造中で標的核酸に対して相補的ではない。いくつかの実施形態では、第2のオリゴヌクレオチドはまた増幅工程で用いられるプライマーでもある。

【0021】

いくつかの実施形態では、切断構造は、米国特許第7,312,033号、同第7,306,917号、同第7,297,780号、同第7,273,696号、同第7,256,020号、同第7,195,871号、同第7,150,982号、同第7,101,672号、同第7,087,381号、同第7,067,643号、同第7,060,436号、同第7,045,289号、同第7,011,944号、同第6,932,943号、同第6,913,881号、同第6,875,572号、同第6,872,816号、同第6,780,982号、同第6,780,585号、同第6,759,226号、同第6,709,819号、同第6,709,815号、同第6,706,471号、同第6,692,917号、同第6,673,616号、同第6,635,463号、同第6,562,611号、同第6,555,357号、同第6,458,535号、同第6,372,424号、同第6,358,691号、同第6,355,437号、同第6,348,314号、同第6,214,545号、同第6,194,149号、同第6,090,606号、同第6,090,543号、同第6,001,567号、同第5,994,069号、同第5,985,557号、同第5,888,780号、同第5,846,717号、同第5,843,669号、同第5,843,654号、同第5,837,450号、同第5,719,028号、同第5,614,402号、及び同第5,541,311号、並びに米国特許出願公開第20080015349号、同第20080014124号、同第20070292856号、同第20070207455号、同第20070202517号、同第20070111200号、同第20070087345号、同第20070049745号、同第20060252032号、同第20060246475号、同第20060240452号、同第20060199202号、同第20060183207号、同第20060160074号、同第20060147955号、同第20060147938号、同第20050277138号、同第20050196750号、同第20050186588号、同第20050181435号、同第20050164177号、同第20050158716号、同第20050130179号、同第20050106596号、同第20050074788号、同第20050048527号、同第20040219576号、同第20040203035号、同第20040096874号、同第20040014067号、同第20030219784号、同第20030143535号、同第20030134349号、同第20030124526号、同第20030113237号、同第20030113236号、同第20030104470号、同第20030104378号、同第20030092039号、同第20030082544号、同第20030072689号、同第20020156255号、同第20020142454号、及び同第20020128465号（これらは各々その全文が、参照として本明細書に組み込まれる）の1つ以上に記載されている構造である、又はこれらの1つ以上に記載されている試薬若しくはアプローチを使用する。これらの特許及び公開出願はまた、酵素、設計、製造、及び検出システム、並びに本発明の方法、組成物及びシステムで有用である他の成分についても記載している。

【0022】

いくつかの実施形態では、プローブの標的結合部分は、前記標的核酸に対して相補的である11以下（例えば10、9、8、7、6等）のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、プローブは標識されている。他の実施形態では、プローブは標識されていない。いくつかの実施形態では、プローブは非天然ヌクレオチドを含まない。いくつかの実施形態では、プローブは天然に存在するヌクレオチドから成る。いくつかの実施形態では、プローブは3'末端にポリメラーゼによるプローブの伸長を防ぐ部分を有する。プローブ

10

20

30

40

50

の非標的部分は任意の所望の長さであってもよい。いくつかの実施形態では、プローブの非標的部分は単一ヌクレオチドである。他の実施形態では、プローブの非標的部分は2以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、. . . 、40、. . . 50、. . . 等）のヌクレオチド長である。

#### 【0023】

いくつかの実施形態では、検出工程は検出オリゴヌクレオチドを利用する。例えばいくつかの実施形態では、切断断片の検出は、1つ以上の前記切断断片と合成検出オリゴヌクレオチドとを会合させることを含む。いくつかの実施形態では、合成検出オリゴヌクレオチドはヘアピン構造を形成する自己相補性領域を有する。いくつかの実施形態では、合成検出オリゴヌクレオチドは標識（例えば蛍光標識）を含む。いくつかの実施形態では、合成検出オリゴヌクレオチドは蛍光クエンチャー部分を更に含む。いくつかの実施形態では、切断フラップは、テンプレートとして検出オリゴヌクレオチドを用いる切断フラップの伸長により検出される。いくつかの実施形態では、切断フラップは、テンプレートとして検出オリゴヌクレオチドを用いる切断フラップの別の分子へのライゲーションにより検出される。いくつかの実施形態では、切断断片は、合成検出オリゴヌクレオチドと会合したとき、FEN-1エンドヌクレアーゼにより切断可能な切断構造を形成する。いくつかの実施形態では、検出は切断構造（合成検出オリゴヌクレオチドを含む）を切断して検出可能なシグナルを生じさせることを含む。

#### 【0024】

いくつかの実施形態では、未知の標的核酸を既知の合成対照標的核酸と組み合わせて分析して、例えば未知の標的核酸の量を決定する。

#### 【0025】

本発明はまた、本明細書に記載される方法のいずれかを実施するのに有用な、必要な、又は十分な1つ以上の成分を含む組成物及びシステムを提供する。例えばいくつかの実施形態では、組成物は、a) 標的核酸と、b) 増幅プライマーと、c) ポリメラーゼと、d) FEN-1エンドヌクレアーゼと、e) 分析物特異的部分及び非標的部分を含む非標識合成プローブであって、前記非標的部分が標的核酸に対して実質的に相補的ではなく、前記標的結合部分が標的核酸に対して相補的である12以下のヌクレオチドを含む、上記非標識合成プローブとを含む。いくつかの実施形態では、組成物は反応混合物である。いくつかの実施形態では、組成物はキットである（例えば、各々が1つ以上の成分を収容している1つ以上の容器を備える）。いくつかの実施形態では、本発明のシステムは、前記組成物と、サンプル精製若しくは加工試薬若しくは設備、検出設備、コントロールソフトウェア、及びデータ解析システム等の1つ以上の追加成分とを含む。

#### 【0026】

いくつかの実施形態では、本組成物は、a) 標的核酸と、b) 増幅プライマーと、c) ポリメラーゼと、d) FEN-1エンドヌクレアーゼと、e) 分析物特異的部分及び非標的部分を含む非標識合成プローブであって、前記非標的部分が標的核酸に対して実質的に相補的ではない、上記非標識合成プローブとを含む。本発明はまた標的核酸を分析する方法であって、かかる組成物を準備する工程と、増幅反応中にプローブと標的核酸との間に切断構造を形成する工程と、プローブをFEN-1エンドヌクレアーゼで切断して、プローブの非標的部分を含む切断構造を生成する工程と、切断産物を検出する工程とを含む方法を提供する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0027】

【図1】図1は、PCRと、侵入的切断用フットプリントプローブを用いる侵入的切断反応との組合せを含む本発明の実施形態の概略図を提供する。

【図2A】図2Aは、図1に係るアッセイにおいて10及び11ヌクレオチドのASR（それぞれ計算 $T_m$ 値34.2及び36.2、最近接モデル及びDNA二本鎖形成のための公開されているパラメータを用いて計算、Allawi and SantaLucia Jr. 1994）を示す。

10

20

30

40

50

ia, Biochemistry, 36: 10581 (1997)、及び Santa Lucia, Proc Natl Acad Sci USA., 95 (4): 1460 (1998) )を有するフットプリントプローブの図1に係るアッセイにおける使用を示す図を提供する。図2A及び2Bに示すアッセイでは、標的核酸は別個の反応でPCRにより増幅させた。ポリメラーゼ酵素を熱で失活させ、PCRのアリコートをFRETカセットを有さず、図示した侵入的切断構造を用いるINVADE Rアッセイ反応で用いた。指示した温度でPfu FEN-1エンドヌクレアーゼを用いて反応を実行した(勾配サーマルサイクラー内にて)。次いで適切なFRETカセットを反応に添加し、最初のINVADE Rアッセイ反応で切断されたプローブの量をFRETカセットの切断を測定することにより決定した。これらのデータは、10又は11ヌクレオチドのASRを含むプローブが反応温度の範囲全体にわたって類似する広い性能曲線及び反応温度とは独立した性能を有することを示す。

【図2B】図2Bは、図1に係るアッセイにおいて9ヌクレオチドのASR(図2Aの説明に記載されている方法に従って計算した $T_m$ 値45.6)を有するフットプリントプローブの性能を示す。これらのデータは、9ヌクレオチドのASRを含むプローブも反応温度の範囲全体にわたって機能し、反応温度が上昇するにつれて性能は穏やかに低下することを示す。本発明を特定の作用機序に限定するものではないが、このプローブが10及び11ASRプローブより高い $T_m$ を有するが、温度が上昇するにつれて性能の低下を示すという所見は、性能低下がプローブのASRのようなプローブを安定化させる酵素の能力低下と関連していることを示唆する。

【図3】図3は、分析物特異的領域の計算 $T_m$ 値の変動を示すフットプリントプローブの表を示す。これらのプローブはMBG等の二本鎖安定化部分を含んでいなかった。示した $T_m$ は図2Aの説明に記載されている方法に従って計算された。図3に示した各プローブは50で侵入的切断反応において機能し(52における試験も同じ結果を示した)、これは約12以下のヌクレオチドのASRを含むフットプリントプローブを設計し、 $T_m$ を反応温度(1又は複数)に一致させる必要なく使用することができるることを示す。

【図4】図4は、miR 155マイクロRNAを検出するためにフットプリントプローブを用いてリアルタイムPCR+侵入的切断を用いた結果(パネルA)と、TAQMANアッセイ(パネルB)の結果とを比較する。これらのデータは、PCR+侵入的切断アッセイではシグナル蓄積が速く、TAQMANアッセイでは標的なし対照でバックグラウンドが現れ始めるが、フットプリントプローブを用いる反応ではバックグラウンドが現れないことを示す。反応は実施例3に記載するように実施した。

【図5】図5は、フットプリントプローブを用いるPCR+侵入的切断を用いて第5因子標的配列におけるSNPを増幅し遺伝子型を同定するためのオリゴヌクレオチド配列を示す。

【図6-1】図6は、図8に示すアッセイ設計を用いるPCR+侵入的切断アッセイの結果と、TAQMANアッセイを用いる同対立遺伝子の遺伝子型同定結果とを比較する。図6A~CはPCR+侵入的切断結果(実施例3に記載されているように実施した)を示すものであり、図6Aは突然変異体第5因子標的配列の検出プロットを示し、図6Bは野性型第5因子標的配列の検出プロットを示し、図6Cは不均一な第5因子標的配列の検出プロットを示す。

【図6-2】図6D~FはTAQMANアッセイ結果を示すものであり、図6Dは突然変異体第5因子標的配列の増幅プロットを示し、図6Eは野性型第5因子標的配列の増幅プロットを示し、図6Fは不均一な第5因子標的配列の増幅プロットを示す。

【図7】図7は、フットプリントプローブを用いるPCR+侵入的切断(実施例3に記載されているような)による(7B)、及びTAQMANアッセイ(7A)による、第5因子遺伝子におけるSNPを検出するためのスキャッタープロットを比較する。

【図8】図8A~8Dは、PCR増幅をINVADE Rアッセイを用いる増幅後検出と組み合わせた「INVADE Rプラス」アッセイを用いた単一塩基変異の検出結果(パネル8A)と、フットプリントプローブを用いるリアルタイムPCR+侵入的切断を用いたV

10

20

30

40

50

ZVの野性型又はOKa変異体の検出(パネルB、C、標的なし対照を用いたD)とを比較する。

【図9】図9A～9Bは、1ヌクレオチドが標的とミスマッチであり、フットプリントプローブはASR中に11ヌクレオチドしか有しない12ヌクレオチドを含むフットプリントプローブと比較した、ASR中に12の相補的ヌクレオチドを含むフットプリントプローブを用いるヒトm i R - 21マイクロRNAの検出において得られた結果(実施例3に記載されているような条件を用いて)を示す。11の相補的ヌクレオチドに加えて2つのミスマッチヌクレオチドを有するプローブ(合計でASR中に13ヌクレオチド)についても試験した。パネルAは試験分子の概略図を示し、パネルBは600又は6000コピーのm i R - 21 RNAを有するサンプルから得られたデータを示す。

【図10】図10A～10Bは、1ヌクレオチドが標的とミスマッチであり、フットプリントプローブはASR中に10ヌクレオチドしか有しない11ヌクレオチドを含むフットプリントプローブと比較した、ASRに11の相補的ヌクレオチドを含むフットプリントプローブを用いるh s a - m i R - 17 - 3 pマイクロRNAの検出において得られた結果を示す(実施例3に記載されているような条件を用いて)。パネルAは試験分子の概略図を示し、パネルBは $6 \times 10^6$ コピーのh s a - m i R - 17 - 3 pマイクロRNAを有するサンプルから得られたデータを示す。これらの例は、FEN-1酵素にとって最適な長さ付近のASRを有する(例えば11又は12ヌクレオチド)と最も強い検出シグナルがもたらされ、一方適切な長さのASRを有するがミスマッチを含むプローブを用いると最適な長さ未満のASRを有するプローブを用いて得られるよりも強いシグナルがもたらされることを示す。

【図11-1】図11Aはヒトm i R - 21標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示し、図11Bはヒトm i R - 155標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示し、図11Cはヒトm i R - 126標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示す。

【図11-2】図11DはヒトU6-snRNA標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示し、図11EはヒトU24-snRNA標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示す。

【図12A】図12は、図11に示すアッセイ設計を用いるPCR-侵入的切断組合せアッセイの結果を示し、これはフットプリントプローブの使用を含む。各標的について得られたデータを、蛍光対サイクル数としてプロットした。各標的について、コピー数対標的レベルの最線形回帰(most linear fit)を与える閾値を割り当てた(各図の下方パネル参照)。各標的についての結果を以下の図に示す:m i R - 155(図12A)；

【図12B】m i R - 21(図112B)；

【図12C】m i R - 126(図12C)；

【図12D】U6(図12D)；及び

【図12E】U24(図12E)。

【図13-1】図13AはU6-DNA標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示し、図13Bは第5因子DNA標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示し、図13Cは第2因子DNA標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示す。

【図13-2】図13DはGA-21-R-DNA標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示し、図13EはヒトU6-RNA標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示す。

【図14-1】図14は、実施例2のPCR及び侵入的切断アッセイの組み合わせとフットプリントプローブを用いて第2因子を検出した結果を示す。図14A～Bは、侵入的オリゴヌクレオチド及びAfu FEN-1酵素の両方が存在する実施例2の結果を示す。

【図14-2】図14C～Dは侵入的オリゴヌクレオチド及びAfu FEN-1酵素が存在しない結果を示す。

10

20

30

40

50

【図15A】図15は、実施例2のフットプリントプローブを用いるPCR及び侵入的切断アッセイの組み合わせを用いて第5因子を検出した結果を示す。図15A～Bは、全ての反応成分が存在する実施例2の結果を示す。

【図15B】全ての反応成分が存在する実施例2の結果を示す。

【図15C】図15C～Dは侵入的オリゴヌクレオチド及びAfu FEN-1酵素が存在しない結果を示す。

【図15D】侵入的オリゴヌクレオチド及びAfu FEN-1酵素が存在しない結果を示す。

【図15E】図15E～Fは、y軸の最大が60,000ではなく10,000であることを除いて図15C～Dと同じ結果を示す。

【図15F】y軸の最大が60,000ではなく10,000であることを除いて図15C～Dと同じ結果を示す。

【図16-1】図16は、実施例2のフットプリントプローブを用いるPCR及び侵入的切断アッセイの組み合わせを用いてGA-21-Rを検出した結果を示す。図16A～Bは、侵入的オリゴヌクレオチド及びAfu FEN-1酵素の両方が存在する実施例2の結果を示す。

【図16-2】図16C～Dは侵入的オリゴヌクレオチド及びAfu FEN-1酵素が存在しない結果を示す。

【図17-1】図17は、実施例2のフットプリントプローブを用いるPCR及び侵入的切断アッセイの組み合わせを用いてU6 RNAを検出した結果を示す。図17A～Bは、侵入的オリゴヌクレオチド及びAfu FEN-1酵素の両方が存在する実施例2の結果を示す。

【図17-2】図17C～Dは侵入的オリゴヌクレオチド及びAfu FEN-1酵素が存在しない結果を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0028】

###### 定義

本発明の理解を助けるために、いくつかの用語及び語句を以下に定義する。

##### 【0029】

例えば標的核酸と、ある構造、例えば二本鎖を形成するよう構成されている核酸プローブに関して本明細書で使用する「酵素フットプリントプローブ」又は「フットプリントプローブ」という用語は、構造に対して選択したレベルの酵素反応を必要とする最小構造を形成するよう選択されたプローブを指す。いくつかの実施形態では、フットプリントプローブは最適な性能（例えば認識、結合、切断等）に必要な最小構造を提供するよう選択され、いくつかの実施形態では、フットプリントプローブは、性能が例えば制限される、低下する、又はそうでなければその用途においてよりストリンジェントになるように、最適な性能に必要な最小構造より小さな構造を提供するよう選択される。

##### 【0030】

一例であり、本発明を任意の特定の核酸修飾酵素に限定するものではないが、特定の5'ヌクレアーゼ、例えばFEN-1エンドヌクレアーゼは、標的核酸にアニールしたプローブを最適に認識及び切断するために、プローブと標的鎖との間の二本鎖が少なくとも約12塩基対であることを好むことが決定できた。一般的に、より長いプローブ-標的二本鎖は、必ずしも酵素活性を低下させるものではないが、活性を更に増加させることもない（例えばFEN-1エンドヌクレアーゼの結合又は切断活性）。酵素の対象活性（例えばFEN-1酵素によるプローブ切断）を上昇させることなく追加の二本鎖長を提供するプローブは、一般にこの酵素に対するフットプリントプローブの定義外である。例えばプローブ-標的二本鎖が少なくとも12塩基対長であるときに最大活性を有するFEN-1エンドヌクレアーゼでは、より長い塩基対、例えば15若しくは16、又はそれ以上の塩基対のプローブ/標的二本鎖を提供するプローブは、一般にこの特定の酵素に対するフットプリントプローブとはみなされない。仮にプローブ-標的二本鎖が少なくとも15塩基対

10

20

30

40

50

長であるときにのみ、異なる F E N - 1 エンドヌクレアーゼが最大活性を有するとすれば（例えば異なる供与源由来の F E N、又は大きなフットプリントを有するよう改変されている、又はフットプリントがより小さなフットプリントから拡大されるよう決定された条件で用いられる）、第 2 の F E N - 1 に対するフットプリントプローブは 15 ヌクレオチド以下の A S R を有するプローブであろう。

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用する「フットプリント二本鎖長」という用語は、二本鎖を認識する核酸修飾酵素、例えば F E N - 1 エンドヌクレアーゼが反応条件で十分な活性を示す最小長の二本鎖を指す。例えば上述のようにプローブ - 標的二本鎖が少なくとも 12 塩基対長であるとき最大活性を有する F E N - 1 エンドヌクレアーゼでは、F E N - 1 酵素のフットプリント二本鎖長は 12 塩基対である。フットプリントプローブは一般に、プローブが用いられる酵素の最大のフットプリント二本鎖長であるが、それを超えない長さを有する A S R を提供する。

【 0 0 3 2 】

本明細書で使用する「ダイナミックレンジ」という用語は、検出アッセイ（例えば核酸検出アッセイ）において有用な定量範囲を指す。例えば、ウイルス検出アッセイのダイナミックレンジは、ウイルス粒子の最小数（例えばコピー数）とウイルス粒子の最大数との間の範囲であって、アッセイがそれらを判別することができる範囲である。

【 0 0 3 3 】

本明細書で使用する「被験体」及び「患者」という用語は、植物、微生物、及び動物（例えばイヌ、ネコ、家畜、及びヒト等の哺乳類）を含む任意の生物を指す。

【 0 0 3 4 】

「プライマー」という用語は、プライマー伸長が開始される条件下に置かれたとき、合成開始点として作用し得るオリゴヌクレオチドを指す。オリゴヌクレオチド「プライマー」は、精製された制限酵素消化物として天然に存在してもよく、又は合成で生成してもよい。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドプライマーはテンプレート核酸とともに用いられ、プライマー伸長はテンプレート依存性であり、その結果テンプレートの相補体が形成される。

【 0 0 3 5 】

本明細書で使用する「切断構造」という用語は、二本鎖を含む構造を形成する、少なくとも 1 つのプローブオリゴヌクレオチドと標的核酸との相互作用により形成される構造を指し、得られた構造は切断手段（酵素が挙げられるがこれに限定されない）により切断可能である。切断構造は、切断試薬による特異的切断の基質であり、二次構造を問わず核酸分子を切断する（すなわち二本鎖構造の形成を必要としない）ホスホジエステラーゼ等の試薬による非特異的切断の基質である核酸分子とは対照的である。

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用する「侵入的切断構造」という用語は、i ) 標的核酸、i i ) 上流核酸（例えば I N V A D E R オリゴヌクレオチド）、及び i i i ) 下流核酸（例えばプローブ）を含む切断構造を指し、前記上流及び下流核酸は標的核酸の隣接領域にアニールし、上流核酸の 3' 部分と、下流核酸と標的核酸との間に形成される二本鎖との間に重複部が形成される。重複部は、上流核酸の重複塩基（1 又は複数）が標的核酸と相補的又は非相補的であっても、またそれらの塩基が天然塩基又は非天然塩基であっても、上流核酸と下流核酸の 1 つ以上の塩基が標的核酸の塩基に対して同位置を占有している場合に生じる。いくつかの実施形態では、下流二本鎖と重複する上流核酸の 3' 部分は、例えば米国特許第 6,090,543 号（全文が本明細書に参照することにより援用される）に開示されているような、芳香環構造等の非塩基化学部分である。いくつかの実施形態では、例えば核酸ステムループ等の共有結合によって、又は非核酸化学結合（例えば多炭素鎖）によって、1 つ以上の核酸が互いに結合していくてもよい。

【 0 0 3 7 】

本明細書で使用する「切断手段」又は「切断試薬」という用語は、切断構造を切断でき

10

20

30

40

50

る任意の手段を指し、例えば酵素が挙げられるがこれに限定されない。「構造特異的ヌクレアーゼ」又は「構造特異的酵素」は、核酸分子中の特定の二次構造を認識し、これらの構造を切断する酵素である。本発明の切断試薬は、切断構造の存在に応答して核酸分子を切断し、必ずしも切断試薬が切断構造内の任意の特定の位置で切断構造を切断する必要はない。

【0038】

切断試薬としては、Third Wave Technologies, Inc. (Madison, WI) 製の CLEAVASE 酵素、FEN-1 エンドヌクレアーゼ (RAD2 及び XPG タンパク質、天然若しくは改変型 FEN-1 酵素、又は 1 つ以上の FEN-1 酵素の少なくとも一部を含むキメラ酵素を含む)、並びに 5' ヌクレアーゼ活性を含む酵素、例えば真正細菌 Pol A ポリメラーゼ等、限定されるものではないが、Taq DNA ポリメラーゼ、Tth DNA ポリメラーゼ、及び大腸菌 DNA ポリメラーゼ I 等を含む種々の供給元から提供されるヌクレアーゼ活性を挙げることができる。切断試薬はまた、5' ヌクレアーゼ活性を有するが合成活性を欠く改変型 DNA ポリメラーゼも含む。本発明の方法及びキットで用いるのに好適な切断試薬の例は、米国特許第 5,614,402 号；同第 5,795,763 号；同第 5,843,669 号；同第 7,122,364 号；同第 7,150,982 号、並びに PCT 出願 WO 98/23774 号；WO 02/070755 A2 号；及び WO 0190337 A2 号（全文を本明細書に参照することにより援用する）に提供されている。

【0039】

5' ヌクレアーゼ等の酵素に関して使用される「熱安定性」という用語は、高温、すなわち約 55°C 以上で酵素が機能する又は活性を有する（すなわち触媒作用を行い得る）ことを示す。いくつかの実施形態では、酵素は 65°C 以上の高温（例えば 75°C, 85°C, 95°C 等）で機能する又は活性を有する。

【0040】

本明細書で使用する「切断産物」という用語は、切断試薬と切断構造との反応（すなわち切断試薬による切断構造の処理）により生じる産物を指す。

【0041】

本明細書で使用する「特異的にハイブリダイズする」という用語は、所与のハイブリダイゼーション条件下で、プローブ又はプライマーが実質的に、標的配列を含むサンプル中の標的配列にのみ検出可能にハイブリダイズする（すなわち非標的配列にはほとんどハイブリダイゼーションしない、又は検出不可能である）ことを意味する。核酸（例えば標的）及びプライマー又はプローブの変性とアニーリングサイクルを含む增幅方法では、所与のハイブリダイゼーション条件としては、増幅方法におけるアニーリング工程の条件、すなわち予測  $T_m$  値に基づいて選択されたアニーリング温度、及び選択したポリメラーゼ酵素に好適な塩条件が挙げられる。

【0042】

本明細書で使用する「増幅（された）」という用語は、分子、部分又は効果の存在量の増加を指す。標的核酸は、例えば PCR 等のインビトロ複製により増幅し得る。シグナル、例えば検出可能な事象又は産物は、標的核酸の存在を示す。

【0043】

本明細書で使用するとき、核酸増幅手段に関して用いられる「増幅方法」という用語は、対象核酸の存在量を特異的に増幅させるプロセスを意味する。いくつかの増幅方法（例えばポリメラーゼ連鎖反応、すなわち PCR）は、熱変性、オリゴヌクレオチドプライマーのテンプレート分子へのアニーリング、及びアニーリングしたプライマーの核酸ポリメラーゼによる伸長の反復サイクルを含む。これらの各工程に必要な条件及び時間は当該技術分野において周知である。いくつかの増幅方法は単一温度で実施され、「等温」と見なされる。増幅産物の蓄積は指数関数的であっても直線的であってもよい。いくつかの増幅方法（「標的増幅」方法）は、例えばそれを多数回コピーすることにより、標的配列の存在量を増幅させるが（例えば、PCR、NASBA、TMA、鎖置換増幅、リガーゼ

10

20

30

40

50

ゼ連鎖反応、LAMP、ICAN、RPA、SPIA、HAD等)、いくつかの増幅方法は、標的配列を含んでいてもよいが、その増幅が反応における特定の標的配列の存在を示す、核酸種の存在量を増幅させる(例えば、ローリングサークル増幅、RAM増幅)。後者的方法は時に「シグナル増幅」方法と称される。いくつかのシグナル増幅方法は、出発核酸を変換することにより、例えば出発核酸を切断して切断産物を形成する、又は例えば重合若しくはライゲーションにより出発核酸を伸長させることにより、核酸種の存在量を増加させることができる。標的増幅方法をシグナル分子に適用することもでき(例えばPCRを用いて多コピーのライゲーション、切断、又は非標的コピー反応産物を生成することができる)、逆も同様である。

## 【0044】

10

本明細書で使用する「ポリメラーゼ連鎖反応」及び「PCR」という用語は、DNAのセグメントがインビトロで標的核酸から複製される酵素反応を指す。この反応は一般にテンプレート依存性DNAポリメラーゼにより標的核酸の各鎖上でプライマーを伸長させて、その鎖の一部の相補的コピーを生成することを含む。連鎖反応は、例えば加熱によりDNA鎖を変性させ、続いて冷却してプライマーをアニーリング及び伸長させるという反復サイクルを含み、結果としてプライマー結合部位に隣接し、該部位を含む標的核酸の領域のコピーが指指数関数的に蓄積する。RNA標的核酸がPCRにより増幅される場合、一般にそれを最初に逆転写してDNAコピー鎖を生成する。

## 【0045】

20

本明細書で使用する「プライマーのアニーリング」という用語は、オリゴヌクレオチドプライマーがテンプレート核酸鎖にハイブリダイズするのを可能にする条件を指す。プライマーのアニーリング条件は、プライマーの長さ及び配列によって変化し、一般にプライマーの実測又は計算 $T_m$ 値に基づく。例えば熱サイクルを含む増幅方法におけるアニーリング工程は、かかるアニーリングを可能にするのに十分な時間にわたり、熱変性工程後の温度をプライマー配列の $T_m$ に基づく温度に低下させることを含む。

## 【0046】

本明細書で使用する「増幅可能な核酸」という用語は任意の増幅方法により増幅することができる核酸に関して用いられる。「増幅可能な核酸」は通常「サンプルテンプレート」を含むことが意図される。

## 【0047】

30

核酸増幅又はシグナル増幅の検出に関して本明細書で使用する「リアルタイム」という用語は、反応が進行している間、例えばインキュベーション又は熱サイクル中に、反応における産物又はシグナルの蓄積を検出又は測定することを指す。かかる検出又は測定は連続的に行ってもよく、あるいは増幅反応が進行している間の別個の複数の時点で行ってもよく、あるいはこれらの組み合わせであってもよい。例えばポリメラーゼ連鎖反応では、検出(例えば蛍光の検出)を熱サイクルの全て又は一部の間に連続的に行ってもよく、あるいは1回以上のサイクル中の1つ以上の時点で一過的に行ってもよい。いくつかの実施形態では、PCRのリアルタイム検出は、複数のサイクルの各々における又は全サイクルにおける同時点(例えばサイクル中のある時点、又はサイクル中の温度工程)の蛍光レベルを測定することにより達成される。増幅のリアルタイム検出はまた、増幅反応「中」の検出と称してもよい。

40

## 【0048】

本明細書で使用する「逆転写」及び「逆転写する」という用語は、テンプレート依存性ポリメラーゼを使用してRNAテンプレートに対して相補的なDNA鎖を生成することを指す。

## 【0049】

本明細書で使用する「核酸の存在量」という用語は、サンプル又はアリコート中に存在する特定の標的核酸配列の量を指す。この量は一般に質量(例えば $\mu\text{g}$ )、単位体積当たりの質量(例えば $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )、コピー数(例えば、1000コピー、1アトモル)、又は単位体積当たりのコピー数(例えば1000コピー/ $\text{mL}$ 、1アトモル/ $\mu\text{L}$ )で表さ

50

れる。核酸の存在量はまた、既知の濃度又はコピー数の標準量に対する量としても表すことができる。核酸の存在量の測定は、サンプルの物理的密度、光学密度、屈折特性、染色特性を含む核酸の存在量の好適な定量的表現として当業者に理解される任意の基準でもよいし、又は検出可能な標識、例えば蛍光標識の強度に基づいていてもよい。

【0050】

「アンプリコン」又は「増幅産物」という用語は、P C Rプロセス等の増幅プロセスにより生成された核酸（一般にDNA）のセグメントを指す。この用語はまた、N A S B A、T M A等のR N Aポリメラーゼを使用する増幅方法により生成されるR N Aセグメントに関しても用いられる。

【0051】

熱サイクル増幅反応に関して用いられる「増幅プロット」という用語は、増幅の指標であるシグナルのプロット、例えば蛍光シグナル対サイクル数のプロットを指す。非熱サイクル増幅反応に関して用いられる場合には、増幅プロットは一般に時間の関数としてのシグナルの蓄積のプロットを指す。

【0052】

増幅プロットに関して用いられる「基準」という用語は、インキュベーション前、又はP C Rの場合最初のサイクル中に、組み立てられた増幅反応から検出されるシグナルを指し、そこではシグナルはほとんど変化しない。

【0053】

熱サイクルである増幅反応中のリアルタイム検出に関して本明細書で使用する「C<sub>t</sub>」又は「閾値サイクル」という用語は、検出されたシグナル（例えば蛍光）が一定の閾値を超える部分（fractional）サイクル数を指す。

【0054】

対照反応に関して本明細書で使用する「テンプレートなし対照」及び「標的なし対照」（又は「N T C」）という用語は、テンプレート若しくは標的核酸を含まない反応又はサンプルを指す。それを用いて増幅品質を検証する。

【0055】

検出反応に関して使用する「受動参照」という用語は、データ解析中にそれに対してレポーターシグナル（例えば別の色素）を正規化し得る内部参照を提供する、色素等の参照物質を指す。正規化は一般に濃度又は体積の変化によりもたらされる変動を補正するため必要である。

【0056】

「R<sub>n</sub>」又は「正規化されたレポーター」は、受動参照色素の蛍光発光強度で除したレポーター色素の蛍光発光強度を指す。

【0057】

「R<sub>n</sub> +」は、テンプレート又は標的を含む全ての成分を含有する反応のR<sub>n</sub>値を指す。

【0058】

R<sub>n</sub> - は未反応サンプルのR<sub>n</sub>値を指す。R<sub>n</sub> - 値は、リアルタイム反応、例えばリアルタイムP C R実行の初期サイクル（蛍光の検出可能な増加前のサイクルから）、又は任意のテンプレートを含まない反応から得ることができる。

【0059】

「R<sub>n</sub>」又は「デルタR<sub>n</sub>」は、所与の増幅条件、例えばP C R条件のセットにより生じるシグナルの大きさを指す。R<sub>n</sub>値は、以下の式により決定される：(R<sub>n</sub> +) - (R<sub>n</sub> -)。既知の濃度の標準Aサンプルを用いて標準曲線を構築する。様々な濃度の標準で実行することにより、それから未知のサンプルの量を推定することができる標準曲線が作成される。

【0060】

増幅反応のリアルタイム検出に関して用いられる「閾値」という用語は、調節可能な因子を乗じた初期P C RサイクルのR<sub>n</sub>の平均標準偏差を指す。閾値はP C R産物の指數関

10

20

30

40

50

数的増加に関連する領域に設定すべきである。

【0061】

定量アッセイに関して用いられる「未知」という用語は、未知の量のテンプレートを含有するサンプルを指し、一般に例えばリアルタイムPCR及び/又はIN VADERアッセイ反応等の定量アッセイの性能により、その量を決定することが望まれるサンプルを指す。

【0062】

本明細書で使用する「サンプルテンプレート」という用語は、「標的」の存在について分析されるサンプルに由来する核酸を指す。対照的に、「バックグラウンドテンプレート」は、サンプル中に存在してもしなくてもよいサンプルテンプレート以外の核酸に関して用いられる。バックグラウンドテンプレートの存在はほとんどの場合故意によるものではない。それはキャリーオーバーの結果である場合もあり、又はサンプルから分離して精製しようとする核酸混入物の存在によるものである場合もある。例えば検出対象以外の生物由来の核酸が試験サンプル中にバックグラウンドとして存在する場合がある。

【0063】

プライマー、プローブオリゴヌクレオチド、又はIN VADERオリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドに関して用いられる「分析物特異的領域」又は「ASR」及び「分析物特異的部分」という用語は互換的に用いられ、標的核酸又は標的核酸のセット中の特定の核酸配列に特異的にハイブリダイズするよう選択されるオリゴヌクレオチドの領域/部分を指す。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの分析物特異的領域は、それがハイブリダイズする標的核酸のセグメントと完全に相補的であってもよく、他の実施形態では、分析物特異的領域はそれがハイブリダイズする標的核酸のセグメントに対して1つ以上のミスマッチを含んでいてもよい。更に他の実施形態では、分析物特異的領域は1つ以上の塩基類似体、例えば標的鎖中の塩基との間に変更された水素結合を有する、又は水素結合を有しない化合物を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの配列全体が分析物特異的領域であり、他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは分析物特異的領域、及び標的核酸と相補的ではない1つ以上の領域（例えば非相補的フラップ領域）を含む。

【0064】

核酸基質に関して用いられる「実質的に一本鎖」という用語は、鎖内塩基対合相互作用により結合された2本の核酸鎖として存在する二本鎖基質と対照的に、基質分子が主に一本鎖核酸として存在することを意味する。

【0065】

本明細書で使用する「解放（liberating）」という用語は、放出された断片がもはや残りのオリゴヌクレオチドに共有結合しないように、例えば5'ヌクレアーゼの作用により、オリゴヌクレオチド等のより大きな核酸断片から核酸断片を遊離させることを指す。

【0066】

本明細書で使用する「微生物」という用語は、小さ過ぎて肉眼で観察することができない生物を意味し、細菌、ウイルス、原生生物、真菌、及び纖毛虫が挙げられるがこれらに限定されない。

【0067】

「微生物遺伝子配列」という用語は、微生物に由来する遺伝子配列を指す。

【0068】

「細菌」という用語は任意の細菌種を指す。

【0069】

互換的に用いられる「古細菌」、「古細菌種」、「古細菌の」、及び「始原菌」という用語は、生物の古細菌ドメイン又は界のメンバーとして分類される任意の生物を指す。

【0070】

「ウイルス」という用語は、自律複製できない（すなわち複製に宿主細胞の機構の使用

10

20

30

40

50

を必要とする)偏性、極微の細胞内寄生生物を指す。

【0071】

「多剤耐性」又は「複数剤耐性」という用語は、前記微生物の処理で用いられる1種超の抗生物質又は抗微生物剤に対して耐性である微生物を指す。

【0072】

「標的核酸の供与源」という用語は、核酸(RNA又はDNA)を含有する任意のサンプルを指す。標的核酸の特に好ましい供与源は、血液、唾液、脳脊髄液、胸水、乳、リンパ、痰、及び精液が挙げられるがこれらに限定されない生体サンプルである。

【0073】

第1及び第2の標的核酸を「含有すると思われる」サンプルは、標的核酸分子のいずれかを含有していてもよく、両方を含有していてもよく、どちらも含有していなくてもよい。

10

【0074】

「反応物質」という用語は、本明細書では最も広義で用いられる。反応物質は、例えば酵素反応物質、化学反応物質、又は光(例えば紫外線、特に短い波長の紫外線はオリゴヌクレオチド鎖を破壊することが知られている)を含んでいてもよい。オリゴヌクレオチドと反応してオリゴヌクレオチドをより短くする(すなわち切断)又はより長くすることができる任意の試薬が、「反応物質」という用語に包含される。

【0075】

本明細書で使用するとき、タンパク質に関して用いられる「一部」という用語は(「所与のタンパク質の一部」のように)、ポリペプチドのアミノ酸の完全鎖より短いタンパク質断片又はアミノ酸配列を指す。同様に、核酸に関して用いられるとき(「所与の核酸又はオリゴヌクレオチドの一部」のように)、この用語は核酸の断片、又は核酸若しくはオリゴヌクレオチドのヌクレオチドの完全鎖より短いヌクレオチド配列を指す。一部は、1アミノ酸又はヌクレオチド残基からアミノ酸又はヌクレオチド配列全体のサイズ範囲であってもよい。

20

【0076】

「二本鎖」という用語は、一方の鎖上のヌクレオチドの塩基部分が第2の鎖上に配置された相補的塩基に水素結合によって結合している核酸の状態を指す。二本鎖形態である条件は、核酸の塩基の状態が反映される。塩基対合により、核酸鎖はまた一般に主溝及び副溝を有する二重らせんの三次構造であると見なされる。二本鎖になっている最中にらせん形態であると仮定するのは暗黙の理解である。

30

【0077】

「テンプレート」という用語は、その相補的コピーがテンプレート依存性核酸ポリメラーゼの活性によってヌクレオシド三リン酸から構築される核酸鎖を指す。二本鎖内で、テンプレート鎖は、慣例により、「下」鎖として表され、記載される。同様に、非テンプレート鎖は「上」鎖として表され、記載されることが多い。

【0078】

本明細書で使用する「サンプル」という用語は最も広義で用いられる。例えば、いくつかの実施形態では、検体又は培養物(例えば微生物培養物)を含むことを意味するが、他の実施形態では、生体及び環境サンプル(例えば標的核酸、遺伝子、又はテンプレートを含むと思われる)の両方を含むことを意味する。いくつかの実施形態では、サンプルは合成源の検体を含んでいてもよい。サンプルは未精製であってもよく、部分的に若しくは完全に精製されているか、さもなくば加工されていてもよい。

40

【0079】

本発明は、用いられる又は分析される生体サンプルの種類に限定されない。本発明は、ヒト(例えば成人、乳幼児、若しくは胚)、又は動物(例えばウシ、家禽、マウス、ラット、イヌ、ブタ、ネコ、ウマ等)から得られる組織(例えば器官(例えば心臓、肝臓、脳、肺、胃、腸、脾臓、腎臓、膀胱、及び生殖器官(例えば卵巣)、腺、皮膚、及び筋肉組織)、細胞(例えば血液細胞(例えばリンパ球若しくは赤血球)、筋肉細胞、腫瘍細胞、

50

及び皮膚細胞)、気体、体液(例えば血液若しくはその一部、血清、血漿、尿、精液、唾液等)、又は固体(例えば糞便)サンプルが挙げられるがこれらに限定されない種々の生体サンプルに有用である。いくつかの実施形態では、生体サンプルは、乳製品、野菜、肉及び屠殺獣の肉以外の有用物、並びに廃棄物等の固形食及び/又は飼料製品及び/又は成分であってもよい。生体サンプルは、有蹄動物、クマ、魚類、ウサギ目、げっ歯類等が挙げられるがこれらに限定されない家畜、未馴化又は野生動物の種々の科の全てから得ることができる。

【0080】

生体サンプルはまた、生検及び組織切片(例えば腫瘍、新生物、発疹、感染部の生検若しくは切片、又はパラフィン包埋切片)、医学的又は病院サンプル(例えば限定されるものではないが、血液サンプル、唾液、口腔スワブ検体、脳脊髄液、胸水、乳汁、初乳、リンパ、痰、嘔吐物、胆汁、精液、卵母細胞、子宮頸部細胞、羊水、尿、糞便、毛髪、及び汗)、研究室サンプル(例えば細胞成分分画)、並びに法医学的サンプル(例えば血液又は組織(例えば飛沫又は残留物)、核酸を含む毛髪及び皮膚細胞)、並びに考古学的サンプル(例えば化石化した生物、組織、又は細胞)も挙げられる。

【0081】

環境サンプルとしては、表面物質、土壤、水(例えば淡水又は海水)、藻類、地衣類、地質サンプル、核酸を含む物質を含む空気、結晶、及び工業サンプル、並びに食品及び乳加工用具、装置、設備、器具、使い捨て製品及び使い捨てではない商品から得られるサンプル等の環境物質が挙げられるがこれらに限定されない。

【0082】

他の種類の生体サンプルとしては、細菌(例えば放線細菌(例えば、アクチノミセス属、アルスロバクター属、コリネバクテリウム属(例えばジフテリア菌)、マイコバクテリウム属(例えば結核菌及びハンセン菌)、プロピオン酸菌属(例えばアクネ菌)、ストレプトミセス属、クラミジア属(例えばトラコーマ病原体及びクラミジア肺炎病原体)、シアノバクテリア、ディノコッカス属(例えばサーモス属(例えばサーマス・アクアチクス)、ファーミキューテス門(例えばバチルス属(例えば炭疽菌、セレウス菌、バチルス・チューリングンシス、及び枯草菌)、リステリア属(例えばリステリア菌)、スタフィロコッカス属(例えば黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、及び溶血性連鎖球菌)、フソバクテリウム門、プロテオバクテリア(例えばリケッチャ目、スフィンゴモナス目、ボルデテラ(例えば百日咳菌)、ナイセリア目(例えば淋菌及び髄膜炎菌)、エンテロバクター目(例えばエシェリキア属(例えば大腸菌)、クレブシエラ属、プレシオモナス属、プロテウス属、サルモネラ属、シゲラ属、及びエルニシア属)、レジオネラ目、パスツレラ目(例えばインフルエンザ菌)、シュードモナス属、ビブリオ属(例えばコレラ菌及びビブリオ・バルニフィカス)、カンピロバクター目(例えばカンピロバクター属(例えばジェジュニ菌)、及びヘリコバクター属(例えばピロリ菌))、及びスピロヘータ鋼(例えばレプトスピラ属、ボレリア・ベルグドルフェリ、及び梅毒トレポネーマ)；古細菌(例えば好塩菌及びメタン細菌)；真核生物(例えば動物界(例えば環形動物門、節足動物門(例えば鋸角類、多足類、昆虫類、及び甲殻類)、軟体動物門、線形動物門(例えば線虫及び旋毛虫)、及び脊索動物(例えば条鰓亜綱、両生綱、鳥綱、軟骨魚綱、は虫綱、及び哺乳綱(例えば靈長目、げっ歯目、ウサギ目、及び食肉目))))；真菌類(例えば皮膚生菌類、フサリウム属、アオカビ属、及びサッカロミセス属)；植物界(例えば被子植物及びユリ綱)、及び原生生物界(例えばアピコンプレックス門(例えばクリプトスパリジウム属、プラスモジウム属(例えば熱帯熱マラリア原虫、及びトキソプラズマ)、及びメタモナーダ門(例えばランブル鞭毛虫)))；並びにウイルス(例えばd s DNAウイルス(例えばバクテリオファージ、アデノウイルス科、ヘルペスウイルス科、パピローマウイルス科、ポリオーマウイルス科、及びポックスウイルス科)、s s DNAウイルス(例えばパルボウイルス科)、d s RNAウイルス(レオウイルス科など)、(+) s s RNAウイルス(例えばコロナウイルス科、アストロウイルス科、プロモウイルス科、コモウイルス科、フラビウイルス科、ピコルナウイルス科、及びトガウイルス科)、(-) s s

10

20

30

40

50

R N A ウイルス（例えばボルナウイルス科、フィロウイルス科、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科、ブニヤウイルス科、及びオルトミクソウイルス科）、s s R N A 逆転写ウイルス（例えばレトロウイルス科）、及びd s D N A 逆転写ウイルス（例えばヘパドナウイルス科及びカリモウイルス科）が挙げられる。

【0083】

サンプルは、任意の所望の方法又は好適な方法により調製できる。いくつかの実施形態では、米国特許出願公開第20050186588号（その全文を参照することにより本願に援用する）に記載されている方法を用いて体液又は他のサンプルから直接核酸を分析する。

【0084】

しかしながら上記例は、本発明に適用可能なサンプルの種類（例えば標的配列、遺伝子、又はテンプレートを含むと思われるサンプル（例えばその存在又は非存在を本発明の組成物及び方法を用いて決定できる））を限定すると解釈されるものではない。

【0085】

本明細書で使用する用語「ヌクレオチド類似体」、「非天然」、又は「天然に存在しない」という用語は、天然ヌクレオチド及び塩基以外のヌクレオチドを指す。かかる類似体並びに非天然塩基及びヌクレオチドとしては、修飾天然ヌクレオチド及び天然に存在しないヌクレオチドが挙げられ、例えば7-デアザプリン（すなわち7-デアザ-d A T P及び7-デアザ-d G T P）等のスタッキング相互作用の変化している類似体；代替水素結合構造を有する塩基類似体（例えばイソ-C及びイソ-G、並びに米国特許第6,001,983号（S. Benner）に記載されている他の非標準的塩基対、並びに米国特許第5,912,340号（Igor V. Kutyavina）に記載されている選択的に結合している塩基類似体）；非水素結合類似体（例えば、B. A. Schweitzer and E. T. Kool, J. Org. Chem., 1994, 59, 7238-7242, B. A. Schweitzer and E. T. Kool, J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 1863-1872に記載されている2,4-ジフルオロトルエン等の無極性芳香族ヌクレオシド類似体）；5-ニトロインドール及び3-ニトロピロール等の「ユニバーサル」塩基；並びにユニバーサルプリン及びピリミジン（それぞれ「K」及び「P」ヌクレオチド；P. Kongら, Nucleic Acids Res., 1989, 17, 10373-10383, P. Kongら, Nucleic Acids Res., 1992, 20, 5149-5152）が挙げられるがこれらに限定されない。ヌクレオチド類似体としては、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドの修飾型が挙げられる。「非天然」及び「天然に存在しない」塩基及びヌクレオチドは、自然界で絶対に見られない塩基に特に限定される訳ではない。核酸損傷等の天然プロセスは、本明細書で定義される「天然」ヌクレオチドのセットの一部であるとは一般に見なされない塩基を「天然に」発生させ得る。例えばイソ-Gは酸化的に損傷を受けたD N Aで見出され得る。かかる非天然塩基とその複製及び他の核酸合成中の挙動は、D N A損傷研究等の状況で広く研究されているが、化合物は時に異なる用語を用いて記載される。例えば、イソグアノシン塩基を含むリボヌクレオチドは文献中ではi G；イソG；イソ-G；イソグアノシン；2-ヒドロキシアデニン；2-オキソアデニン；2-ヒドロキシA；及び2-OH-Aのように様々に称されている。イソグアノシン塩基を含むデオキシリボヌクレオシドは、i G；イソG；イソd G；デオキシイソ-G；デオキシイソグアノシン；2-ヒドロキシデオキシアデノシン；2-ヒドロキシd A；及び2-OH-A d eのように様々に称されている。

【0086】

更に他のヌクレオチド類似体としては、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドの修飾型が挙げられる。本発明の種々のオリゴヌクレオチド（例えば一次プローブ又はIN VADERオリゴ）はヌクレオチド類似体を含有していてもよい。

【0087】

本明細書で使用する「核酸配列」及び「核酸分子」という用語は、オリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

、ヌクレオチド、又はポリヌクレオチド、及びその断片又は一部を指す。この用語は、上に列挙したものを含み、また4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、シュードイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシル-メチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチル-アミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルシュード-ウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチル-グアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチル-シトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシ-アミノ-メチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシブトキソシン、シュードウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、シュードウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、2,6-ジアミノプリン、並びにピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、例えはグアニン類似体6アミノ1H-ピラゾロ[3,4d]ピリミジン4(5H)オン(ppG又はPPG、またSuperG)及びアデニン類似体4アミノ1H-ピラゾロ[3,4d]ピリミジン(ppA又はPPA)が挙げられるがこれらに限定されないDNA及びRNAヌクレオチドの類似体を含む配列を包含する。キサンチン類似体1H-ピラゾロ[5,4d]ピリミジン4(5H)-6(7H)-ジオン(ppX)を用いてもよい。これらの塩基類似体は、オリゴヌクレオチド中に存在するとき、ハイブリダイゼーションを強化し、ミスマッチの識別を改善する。天然に存在する塩基、修飾塩基、及び塩基類似体の全ての互変異性体型を本発明のオリゴヌクレオチド複合体に含んでいてもよい。本発明で有用な他の修飾塩基としては、6-アミノ-3-プロパ-1-イニル-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、PPP；6-アミノ-3-(3-ヒドロキシプロパ-1-イニル)1-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、HOPPP；6-アミノ-3-(3-アミノプロパ-1-イニル)-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4--オン、NH<sub>2</sub>PPP；4-アミノ-3-(プロパ-1-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、PPPA；4-アミノ-3-(3-ヒドロキシプロパ-1-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、HOPPPA；4-アミノ-3-(3-アミノプロパ-1-イニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、NH<sub>2</sub>PPPA；3-プロパ-1-イニルピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミノ、(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPPA；2-(4,6-ジアミノピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-3-イル)エチン-1-オール、(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPPAOH；3-(2-アミノエチニル)ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4,6-ジアミン、(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>PPPANH<sub>2</sub>；5-プロパ-1-イニル-1,3-ジヒドロピリミジン-2,4-ジオン、PU；5-(3-ヒドロキシプロパ-1-イニル)-1,3-ジヒドロピリミジン-2,4-ジオン、HOPU；6-アミノ-5-プロパ-1-イニル-3-ジヒドロピリミジン-2-オン、PC；6-アミノ-5-(3-ヒドロキシプロパ-1-イニ)-1,3-ジヒドロピリミジン-2-オン、HOPC；及び6-アミノ-5-(3-アミノプロパ-1-イニ)-1,3-ジヒドロピリミジン-2-オン、NH<sub>2</sub>PC；5-[4-アミノ-3-(3-メトキシプロパ-1-イニル)ピラゾール[3,4-d]ピリミジニル]-2-(ヒドロキシメチル)オキソラン-3-オール、CH<sub>3</sub>OPPPA；6-アミノ-1-[4-ヒドロキシ-5-(ヒドロキシメチル)オキソラン-2-イル]-3-(3-メトキシプロパ-1-イニル-1)-5-ヒドロピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン、CH<sub>3</sub>OPPG；4,(4,6-ジアミノ-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-3-イル)-ブタ-3-イン-1-オール、SuperA；6-アミノ-3-(4-ヒドロキシ-ブタ-1-イニル)-1,5-ジヒドロ-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-オン；5-(4-ヒドロキシ-ブタ-10

20

20

30

40

50

- 1 - イニル) - 1 H - ピリミジン - 2 , 4 - ジオン、SuperT ; 3 - ヨード - 1 H - ピラゾロ [ 3 , 4 - d ] ピリミジン - 4 , 6 - ジアミン ( ( NH<sub>2</sub> )<sub>2</sub> PPAI ) ; 3 - プロモ - 1 H - ピラゾロ [ 3 , 4 - d ] ピリミジン - 4 , 6 - ジアミン ( ( NH<sub>2</sub> )<sub>2</sub> PPABr ) ; 3 - クロロ - 1 H - ピラゾロ [ 3 , 4 - d ] ピリミジン - 4 , 6 - ジアミン ( ( NH<sub>2</sub> )<sub>2</sub> PPAC1 ) ; 3 - ヨード - 1 H - ピラゾロ [ 3 , 4 - d ] ピリミジン - 4 - イルアミン ( PPAI ) ; 3 - プロモ - 1 H - ピラゾロ [ 3 , 4 - d ] ピリミジン - 4 - イルアミン ( PPABr ) ; 及び 3 - クロロ - 1 H - ピラゾロ [ 3 , 4 - d ] ピリミジン - 4 - イルアミン ( PPAC1 ) が挙げられる。

## 【0088】

上述の修飾塩基に加えて、本発明のオリゴヌクレオチドは糖又はグリコシド部分の骨格、好ましくは全てのヌクレオチド間結合が天然に存在するホスホジエステル結合である 2 - デオキシリボフラノシドを有していてもよい。しかしながら別の実施形態では、2 - デオキシ - - D - リボフラノース基が、他の糖、例えば - D - リボフラノースで置換されている。更にリボース部分の 2 - OH が C<sub>1</sub> ~ 6 アルキル基 ( ( 2 - ( O - C<sub>1</sub> ~ 6 アルキル ) リボース ) 又は C<sub>2</sub> ~ 6 アルケニル基 ( 2 - ( O - C<sub>2</sub> ~ 6 アルケニル ) リボース ) でアルキル化されている、あるいはフルオロ基により置換されている ( 2 - フルオロリボース ) 、 - D - リボフラノースが存在してもよい。本発明で有用な関連するオリゴマー形成糖は「ロック」されている、すなわち C - 4' と C - 2' の酸素原子との間にメチレン架橋を含むものである。オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに適合する他の糖部分を用いてもよく、それは当業者に既知であり、例えば - D - アラビノフラノシド、 - 2' - デオキシリボフラノシド、又は 2' , 3' - ジデオキシ - 3' - アミノリボフラノシドが挙げられるがこれらに限定されない。 - D - アラビノフラノシドを含むオリゴヌクレオチドは、米国特許第 5 , 177 , 196 号に記載されているように調製することができる。2' , 3' - ジデオキシ - 3' - アミノリボフラノシドを含むオリゴヌクレオチドは、Chenら Nucleic Acids Res. 23 : 2661 - 2668 ( 1995 ) に記載されている。ロック核酸の合成手順 ( Singhら, Chem. Comm. , 455 - 456 ( 1998 ) ; Wengel J. , Acc. Chem. Res. , 32 : 301 - 310 ( 1998 ) ) 及び 2' - ハロゲン - 2' - デオキシリボフラノシドを含むオリゴヌクレオチド ( Palissaら, Z. Chem. , 27 : 216 ( 1987 ) ) もまた記載されている。本明細書に記載されている修飾オリゴヌクレオチドのリン酸骨格はまた、オリゴヌクレオチドがホスホロチオエート結合及び / 又はメチルホスホネート及び / 又はホスホロアミデートを含むように修飾され得る ( Chenら, Nucleic Acids Res. , 23 : 2662 - 2668 ( 1995 ) )。オリゴヌクレオチド結合の組み合わせはまた本発明の範囲内である。更に他の骨格修飾が当業者に既知である。

## 【0089】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されている修飾塩基は PNA 及び DNA / PNA キメラに組み込まれて T<sub>m</sub> の平衡を保ち、ミスマッチの識別が改善された修飾オリゴヌクレオチドを提供する。DNA 及び DNA 類似体の種々の修飾形態は、プローブ及びプライマーとしての DNA 分子の使用の不利点のいくつかを克服する試みで用いられている。特にペプチド核酸 ( PNA 、ポリアミド核酸としても知られている ) である。Niel senら Science 254 : 1497 - 1500 ( 1991 )。PNA は、DNA 及び RNA の糖 - リン酸骨格特徴の代わりに、ポリアミド骨格により結合されている、DNA 及び RNA で見られるような複素環式塩基単位を含む。PNA は、相補的 DNA 及び RNA 標的配列にハイブリダイズすることができ、実際対応する核酸プローブより強くハイブリダイズする。PNA オリゴマーの合成、及び PNA オリゴマーの合成で用いる反応性モノマーの合成は、米国特許第 5 , 539 , 082 号；同第 5 , 714 , 331 号；同第 5 , 773 , 571 号；同第 5 , 736 , 336 号、及び同第 5 , 766 , 855 号に記載されている。PNA 及び DNA / RNA キメラ合成と PNA 合成用モノマーへの別のアプローチが要約されている。Uhlmannら Angew. Chem. Int. E 50

d. 37 : 2796 - 2823 (1998)。したがって、DNA、PNA、又はDNA/PNAキメラのT<sub>m</sub>の平衡を保つための、通常の塩基、非置換ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン塩基(例えばPPG及びPPA)、3-置換ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン、修飾プリン、修飾ピリミジン、5-置換ピリミジン、ユニバーサル塩基、糖修飾、骨格修飾、又は副溝バインダーの任意の組み合わせの使用は本発明の範囲内である。核酸、PNA、及びPNA/DNAキメラ合成に必要な修飾塩基モノマー単位の合成に必要な合成方法は当該技術分野において利用可能であり、本出願及びUhlmannら Angle w. Chem. Int. Ed. 37 : 2796 - 2823 (1998)の方法を参照のこと。

## 【0090】

10

核酸配列又は分子は、ゲノム又は合成供与源のDNA又はRNAであってもよく、それは一本鎖又は二本鎖であってもよく、センス鎖又はアンチセンス鎖を表す。したがって、核酸配列はdsDNA、ssDNA、混合ssDNA、混合dsDNA、ssDNAにされたdsDNA(例えば融解、変性、ヘリカーゼ等により)、A-、B-、又はZ-DNA、三本鎖DNA、RNA、ssRNA、dsRNA、ssRNA及びdsRNAの混合物、ssRNAにされたdsRNA(例えば融解、変性、ヘリカーゼ等により)、メッセンジャーRNA(mRNA)、リボソームRNA(rRNA)、トランスクアーナ(tRNA)、触媒RNA、snRNA、マイクロRNA、又はタンパク質核酸(PNA)であってもよい。

## 【0091】

20

本発明は、利用される核酸の種類又は供与源(例えば配列又は分子(例えば標的配列及び/又はオリゴヌクレオチド))により制限されるものではない。例えば核酸配列は、増幅された配列又は創製された配列(例えば合成による核酸配列の増幅又は創製(例えば重合(例えばプライマー伸長(例えばRNA-DNAハイブリッドプライマー技術))及び逆転写(例えばRNAをDNAに)及び/又は増幅(例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、ローリングサークル増幅(RCA)、核酸配列に基づく増幅(NASBA)、転写媒介増幅(TMA)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、サイクリングプローブ技術、Q-ベータレプリカーゼ、鎖置換増幅(SDA)、分岐DNAシグナル増幅(bDNA)、ハイブリッドキャプチャー、及びヘリカーゼ依存性増幅)であってもよい。

## 【0092】

30

「ヌクレオチド」及び「塩基」という用語は、本明細書で特に指示しない限り、核酸配列に関して用いるときは互換的に用いられる。

## 【0093】

本明細書で使用する「オリゴヌクレオチド」という用語は、2以上のヌクレオチド(例えばデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド)、好ましくは少なくとも5ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約10~15ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約15~30ヌクレオチド、又はそれ以上(例えばオリゴヌクレオチドは典型的には200残基長未満(例えば15~100ヌクレオチド))を含む分子として定義されるが、本明細書で使用するとき、この用語はまたより長いポリヌクレオチド鎖を包含することも意図される。正確な大きさは多くの要因に依存し、その要因は最終的なオリゴヌクレオチドの機能又は用途に依存する。オリゴヌクレオチドはその長さにより呼ばれることが多い。例えば24残基のオリゴヌクレオチドは「24mer」と呼ばれる。オリゴヌクレオチドは、自己ハイブリダイズにより、又は他のポリヌクレオチドへのハイブリダイズにより二次構造及び三次構造を形成することができる。かかる構造としては、二本鎖、ヘアピン、十字型、屈曲、及び三本鎖が挙げられるがこれらに限定されない。オリゴヌクレオチドは、化学合成、DNA複製、逆転写、PCR、又はこれらの組み合わせを含む任意の方法で作製することができる。いくつかの実施形態では、侵入的切断構造を形成するオリゴヌクレオチドは反応により作製される(例えば酵素伸長反応におけるプライマーの伸長)。

## 【0094】

あるモノヌクレオチドペントース環の5'リン酸がホスホジエステル結合を介して一方

50

向にその近傍の 3' 酸素に結合する方法で、モノヌクレオチドが反応してオリゴヌクレオチドになるため、オリゴヌクレオチドの末端は、5' リン酸がモノヌクレオチドペントース環の 3' 酸素に結合しない場合「5' 末端」と呼ばれ、その 3' 酸素が次のモノヌクレオチドペントース環の 5' リン酸に結合しない場合「3' 末端」と呼ばれる。本明細書で使用するとき、核酸配列は、より大きなオリゴヌクレオチド内部である場合でさえも 5' 及び 3' 末端を有すると言うことができる。核酸鎖に沿った第 1 の領域は、5' から 3' への方向に核酸鎖に沿って移動するとき、第 1 の領域の 3' 末端が第 2 の領域の 5' 末端の前にある場合、別の領域の上流にあると言われる。

## 【0095】

2 種の異なる重複しないオリゴヌクレオチドが同じ線状相補的核酸配列の異なる領域に 10 アニールし、あるオリゴヌクレオチドの 3' 末端が他の 5' 末端の方向を指すとき、前者を「上流」オリゴヌクレオチド、後者を「下流」オリゴヌクレオチドと呼ぶことがある。同様に、2 つの重複するオリゴヌクレオチドが同じ線状相補的核酸配列にハイブリダイズし、第 1 のオリゴヌクレオチドの 5' 末端が第 2 のオリゴヌクレオチドの 5' 末端の上流に存在し、第 1 のオリゴヌクレオチドの 3' 末端が第 2 のオリゴヌクレオチドの 3' 末端の上流に存在するように第 1 のオリゴヌクレオチドが位置付けられているとき、第 1 のオリゴヌクレオチドを「上流」オリゴヌクレオチドと呼ぶことができ、第 2 のオリゴヌクレオチドを「下流」オリゴヌクレオチドと呼ぶことができる。

## 【0096】

本明細書で使用する「相補的」又は「相補性」という用語は、塩基対合ルールにより関連づけられているポリヌクレオチド（例えば 2 以上のヌクレオチド配列（例えばオリゴヌクレオチド又は標的配列））に関して用いられる。例えば配列「5' - A - G - T - 3'」は配列「3' - T - C - A - 5'」と相補的である。相補性は「部分的」であってもよく、この場合一部の核酸塩基のみが塩基対合ルールに従ってマッチする。あるいは、核酸塩基間に「完全」又は「全」相補性が存在してもよい。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーション効率及び強度に大きな影響を与える。これは 2 以上の核酸鎖の会合に依存する增幅反応、及び検出法において特に重要である。個々のヌクレオチドに関して、特にポリヌクレオチドに関して、いずれの用語を使用してもよい。例えばオリゴヌクレオチド内の特定のヌクレオチドを、オリゴヌクレオチド及び核酸配列の残りとの間の相補性と対比させて又は比べて、別の核酸配列（例えば標的配列）に対する相補性又は相補性の欠如について言及してもよい。

## 【0097】

本明細書で使用する核酸配列の相補体は、ある配列の 5' 末端が他の配列の 3' 末端と対になるように核酸配列を整列させたとき、「逆平行会合」の状態であるオリゴヌクレオチドを指す。上述のようにヌクレオチド類似体は、本発明の核酸に含まれてもよく、本発明の核酸を含んでもよい。相補性は完全である必要はなく、安定な二本鎖はミスマッチ塩基対又は非マッチ塩基を含んでいてもよい。核酸技術の当業者は、例えばオリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドの塩基組成及び配列、ミスマッチ塩基対のイオン強度及び発生率を含む多数の変数を考慮して経験的に二本鎖の安定性を決定することができる。

## 【0098】

「相同性」という用語は相補性の程度を指す。部分的相同性又は完全相同性（すなわち同一性）が存在する場合がある。部分的に相同な配列は、別の配列と 100% 未満同一である配列である。「実質的に相同性」である部分的に相補的な配列は、完全に相補的な核酸分子が標的核酸にハイブリダイズするのを少なくとも部分的に阻害する核酸分子である。標的配列に対して完全に相補的な配列のハイブリダイゼーション阻害は、低ストリンジエンシー条件下でハイブリダイゼーションアッセイ（例えばサザンプロット、ノーザンプロット、溶液ハイブリダイゼーション等）を用いて調べることができる。実質的に相同な配列又はプローブは、低ストリンジエンシー条件下で完全に相同な核酸分子の標的への結合（例えばハイブリダイゼーション）と競合し、阻害する。これは低ストリンジエンシー条件が、非特異的な結合を許容するという訳ではない（例えば低ストリンジエンシー条件

10

20

30

40

50

が 2 つの配列の互いの結合が特異的（例えば選択的）相互作用であるような条件である場合もある）。非特異的結合の非存在は、実質的に非相補的である（例えば同一性約 30 % 未満）第 2 の標的を用いることにより試験できる。非特異的結合の非存在下ではプローブは第 2 の非相補的標的にハイブリダイズしない。

## 【 0 0 9 9 】

c DNA 又はゲノムクローン等の二本鎖核酸配列に関して用いるとき、「実質的に相同」という用語は、上記のように低ストリンジエンシー条件下で二本鎖核酸配列のいずれかの鎖又は両方の鎖にハイブリダイズすることができる任意のプローブを指す。

## 【 0 1 0 0 】

一本鎖核酸配列に関して用いられるとき、「実質的に相同」という用語は、上記のように低ストリンジエンシー条件下で一本鎖核酸配列にハイブリダイズすることができる（例えば相補的な）任意のプローブを指す。

## 【 0 1 0 1 】

「標的核酸」及び「標的配列」という用語は、検出又は分析される核酸を指す。したがって「標的」は、他の核酸又は核酸配列と区別される。例えば增幅反応に関して用いられるとき、これらの用語は反応により増幅される核酸又は核酸の一部を指してもよく、一方、多型に関して用いられるとき、これらの用語は疑わしい多型を含む部分を指してもよい。侵入的切断反応に関して使用するとき、これらの用語は少なくとも第 1 の核酸分子（例えばプローブオリゴヌクレオチド）と少なくとも部分的に相補的であり、また第 2 の核酸分子（例えば IN V A D E R オリゴヌクレオチド）と少なくとも部分的に相補的であってもよい配列を含む核酸分子を指す。一般に標的核酸（例えばサンプル（例えば生体サンプル又は環境サンプル）内に存在する、サンプルから単離される、サンプルから濃縮した、サンプルから増幅された、又はサンプル内の）は、標的領域内に位置し、切断試薬により切断可能な第 1 及び第 2 の核酸分子（例えばプローブオリゴヌクレオチド及び IN V A D E R オリゴヌクレオチド）と組み合わせて侵入的切断構造の形成の成功によって同定可能である。生物由来の標的核酸は、ゲノム DNA 及び RNA に限定されない。生物由来の標的核酸は、任意の核酸種を含んでいてもよく、例えばゲノム DNA 及び RNA、メッセンジャー RNA、構造 RNA、リボソーム RNA、及び t RNA、並びに s n RNA、s i RNA、及びマイクロ RNA (m i RNA) 等の小 RNA が挙げられるがこれらに限定されない。例えばその全文を参照することにより本願に援用する、2003年12月18日に出願された同時係属米国特許出願第 10 / 740,256 号参照。「セグメント」は標的配列内の核酸領域として定義される。

## 【 0 1 0 2 】

本明細書で使用する「プローブオリゴヌクレオチド」という用語は、標的核酸と相互作用して検出可能な複合体を形成するオリゴヌクレオチドを指す。T A Q M A N アッセイ及び IN V A D E R アッセイ等の 5' ヌクレアーゼ切断アッセイでは、プローブオリゴヌクレオチドは標的核酸にハイブリダイズし、プローブオリゴヌクレオチド内で切断が生じる。いくつかの実施形態では、プローブと標的との複合体はそれが存在して間検出されるが、いくつかの実施形態では、複合体の形成は、例えばプローブ / 標的複合体の形成の結果として生じる事象（例えば切断事象）の検出により、それがもはや存在していなくても検出することができる。

## 【 0 1 0 3 】

「IN V A D E R オリゴヌクレオチド」という用語は、プローブと標的核酸との間のハイブリダイゼーション領域付近の位置で標的核酸にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであって、プローブと標的との間のハイブリダイゼーション領域に重複する部分（例えば化学部分、又はヌクレオチド、標的に相補的又は非相補的のいずれでも）を含むオリゴヌクレオチドを指す。いくつかの実施形態では、IN V A D E R オリゴヌクレオチドは、プローブオリゴヌクレオチドの 5' 末端に位置する配列と実質的に同じ配列を 3' 末端に含む。

## 【 0 1 0 4 】

10

20

30

40

50

本明細書で使用する「カセット」という用語は、プローブオリゴヌクレオチドの切断に応答して検出可能なシグナルが生じるよう構成されているオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドの組み合わせを指す。好ましい実施形態では、カセットはプローブオリゴヌクレオチドの切断により生じた切断産物にハイブリダイズして、第2の侵入的切断構造を形成し、その結果カセットは次いで切断され得る。

【0105】

いくつかの実施形態では、カセットはヘアピン部分（すなわちカセットオリゴヌクレオチドのある部分が反応条件下で同じオリゴヌクレオチドの第2の部分にハイブリダイズして二本鎖を形成する領域）を含む單一オリゴヌクレオチドである。他の実施形態では、カセットは反応条件下で二本鎖を形成できる相補的部分を含む少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含む。好ましい実施形態では、カセットは標識を含む。特に好ましい実施形態では、カセットは、蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）効果を生じさせる標識部分を含む。

10

【0106】

オリゴヌクレオチドは、そのオリゴヌクレオチドが他のオリゴヌクレオチド（又は標的核酸配列）より高いモル濃度で存在する場合、別のオリゴヌクレオチド（又は標的核酸配列）に対して「過剰」に存在すると言われる。プローブオリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドが相補的標的核酸配列の濃度に対して過剰に切断反応中に存在するとき、反応を用いて存在する標的核酸配列の量を示すことができる。典型的には、過剰に存在するとき、プローブオリゴヌクレオチドは少なくとも100倍モル濃度過剰に存在し、標的核酸配列が約10 fmol以下で存在するとき典型的には少なくとも1ピコモルの各プローブオリゴヌクレオチドが用いられる。

20

【0107】

本明細書で使用する「遺伝子」という用語は、ポリペプチド、前駆体、又はRNA（例えばrRNA、tRNA）の産生に必要なコード配列を含む核酸（例えばDNA）配列を指す。ポリペプチドは、完全長ポリペプチド又はポリペプチド断片の所望の活性又は機能特性（例えば酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達、免疫原性等）が保持される限り、完全長コード配列又はコード配列の任意の部分によりコードされ得る。この用語はまた、遺伝子が完全長mRNAの長さに一致するよう、構造遺伝子のコード領域、並びにいずれかの末端から約1kb以上の距離で5'及び3'末端の両方においてコード領域に隣接して位置する配列も包含する。コード領域の5'に位置しmRNA上に存在する配列は、5'非翻訳配列と呼ばれる。コード領域の3'又は下流に位置しmRNA上に存在する配列は、3'非翻訳配列と呼ばれる。「遺伝子」という用語は、遺伝子のcDNA及びゲノム形態の両方を包含する。遺伝子のゲノム形態又はクローンは、「インtron」又は「介在領域」又は「介在配列」と命名された非コード配列で中断されているコード領域を含む。インtronは、核RNA（例えばhnRNA）に転写される遺伝子のセグメントであり、インtronは調節エレメント（例えばエンハンサ）を含んでいてもよい。インtronは核又は一次転写産物から除去される、又は「切り出される」。したがってインtronはメッセンジャーRNA（mRNA）転写産物中には存在しない。mRNAは翻訳中に新生ポリペプチドにおけるアミノ酸の配列又は順序を特定するために機能する。

30

【0108】

本明細書で使用する「異種遺伝子」という用語は、その天然環境には存在しない遺伝子を指す。例えば、異種遺伝子はある種から別の種へ導入された遺伝子を含む（例えばヒト宿主内に存在するウイルス又は細菌遺伝子（例えば染色体外又は宿主DNAに組み込まれる））。異種遺伝子はまた、いくつかの方法で改変されている生物由来の遺伝子を含む（例えば、突然変異している、複数のコピーに付加されている、非天然制調節配列に結合している等）。いくつかの実施形態では、異種遺伝子は、異種遺伝子配列が典型的には染色体内の遺伝子配列と天然では会合することが見出されていないDNA配列に結合する、又は自然界には見られない染色体の部分と会合する（例えば遺伝子が通常発現しない遺伝子座で発現している遺伝子）という点で内因性遺伝子と区別できる。

40

50

## 【0109】

本明細書で使用する「遺伝子発現」という用語は、遺伝子の「転写」によってRNA(例えばmRNA、rRNA、tRNA、又はsnRNA)に、タンパク質をコードしている遺伝子の場合はmRNAの「翻訳」によってタンパク質になる、遺伝子にコードされている遺伝情報を変換するプロセスを指す。遺伝子発現はこのプロセスの多くの段階で制御され得る。「アップレギュレーション」又は「活性化」は、遺伝子発現産物(例えばRNA又はタンパク質)の産生を増加させる制御を指し、一方「ダウングリュレーション」又は「抑制」はその産生を減少させる制御を指す。アップレギュレーション又はダウングリュレーションに関する分子(例えば転写因子)は、それぞれ「活性化因子(アクチベーター)」及び「リプレッサー」と呼ばれることが多い。

10

## 【0110】

インtronを含むことに加えて、遺伝子のゲノム形態はまたRNA転写産物上に存在する配列の5'及び3'末端の両方に位置する配列を含んでいてもよい。これらの配列は「フランкиング」配列又は領域と称される(例えば、これらのフランкиング配列はmRNA転写産物上に存在する非翻訳配列の5'又は3'に位置し得る)。5'フランкиング領域は、遺伝子の転写をコントロールする又は影響を与えるプロモータ及びエンハンサ等の調節配列を含んでいてもよい。3'フランкиング領域は、転写の終結、転写後切断、及びポリアデニル化を指示する配列を含んでいてもよい。

## 【0111】

「野性型」という用語は、天然に存在する供与源から単離された遺伝子又は遺伝子産物を指す。野性型は、集団中で最も頻繁に見られ、したがって任意に設計された遺伝子の「正常」又は「野性型」形態である。対照的に、「改変」又は「突然変異」という用語は、野性型遺伝子又は遺伝子産物と比べて、配列又は機能特性が改変されている(例えば特徴が変化している)遺伝子又は遺伝子産物を指す。天然に存在する突然変異体を単離できることに留意すべきである(例えば野性型遺伝子又は遺伝子産物と比べて特徴が変化している(例えば核酸配列が変化している)という事実により同定される)。

20

## 【0112】

核酸に関して用いられる「単離」という用語は(例えば「単離オリゴヌクレオチド」又は「単離ポリヌクレオチド」又は「単離核酸配列」)は、天然源では通常会合している少なくとも1成分又は混入物質から分離された核酸配列を指す。したがって、単離核酸は自然界で見られるものとは異なる形態又は状態で存在する。対照的に、非単離核酸は、自然界で存在する状態で見られるDNA及びRNA等の核酸である。例えば、所与のDNA配列(例えば遺伝子)は周辺の遺伝子と近接して宿主細胞の染色体上に見られ、特定のタンパク質をコードしている特定のmRNA配列等のRNA配列は多くのタンパク質をコードしている多数の他のmRNAとの混合物として細胞内に見られる。しかしながら、所与のタンパク質をコードしている単離核酸としては、一例として、核酸が天然細胞とは異なる染色体上の位置に存在する、又はさもなければ自然界で見られるものとは異なる核酸配列に隣接する場合、所与のタンパク質を通常発現する細胞内のかかる核酸が挙げられる。単離核酸、オリゴヌクレオチド、又はポリヌクレオチドは、一本鎖又は二本鎖形態で存在してもよい。単離核酸、オリゴヌクレオチド、又はポリヌクレオチドを利用してタンパク質を発現させるとき、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドは最低限センス鎖又はコード鎖を含む(例えばオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドは一本鎖であってもよい)が、センス鎖及びアンチセンス鎖の両方を含んでいてもよい(例えばオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドは二本鎖であってもよい)。

30

## 【0113】

本明細書で使用する「精製された」又は「精製する」という用語は、サンプル(例えば分子(例えば核酸又はアミノ酸配列))に関して用いられるとき、その天然環境からサンプルを取り出す(例えば単離及び/又は分離する)ことを指す。用語「実質的に精製された」とは、その天然環境から取り出されており(例えば単離及び/又は精製)、天然に会合している他の成分の少なくとも60%を含まない、好ましくは75%を含まない、又は

40

50

最も好ましくは 90 % を含まない、又はそれ以上を含まないサンプル（例えば分子（例えば核酸又はアミノ酸配列））を指す。「単離ポリヌクレオチド」又は「単離オリゴヌクレオチド」はしたがって、天然で会合している他の成分を含まない（例えば 60 %、75 %、又はより好ましくは 90 % 以上）ようにされている場合、実質的に精製されていることになる。

【0114】

本発明は、（例えば精製された又は実質的に精製された分子（例えば核酸配列）を生成するための）精製の任意の特定の手段に限定されない。実際、遠心分離（例えば等密度、沈降速度、勾配、及び分画遠心）、電気泳動（例えばゲル及びキャピラリー電気泳動）、ゲル濾過、マトリックス捕捉、電荷捕捉、質量捕捉、抗体捕捉、磁気分離、フローサイトメトリー、及び配列特異的ハイブリダイゼーションアレイ捕捉が挙げられるがこれらに限定されない種々の精製技術を利用することができます。

10

【0115】

本明細書で使用する「ハイブリダイゼーション」という用語は、相補的核酸の対合に関して用いられる。ハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーション強度（例えば核酸間の会合強度）は、核酸間の相補性の程度、必要とされる条件のストリンジエンシー、形成されるハイブリッドの  $T_m$ 、及び核酸中の G : C 比等の要因に影響を受ける。その構造内に相補的核酸の対合を含む單一分子を「自己ハイブリダイズしている」と言う。

【0116】

本明細書で使用する「 $T_m$ 」という用語は「融解温度」に関して用いられる。融解温度は、二本鎖核酸分子の集団の半分が一本鎖に解離した状態になる温度である。「計算  $T_m$  値」は、反応条件（例えば混合物中の塩濃度、相補鎖の濃度）の要因に加えて、相補的核酸の物理的配列から計算することにより決定される融解温度を指す。核酸の  $T_m$  を計算するためのいくつかの式が当該技術分野において周知である。標準的な参考文献により指示されているように、核酸が 1 M NaCl 水溶液中に存在するとき、 $T_m$  値の単純な推定は以下の等式により計算できる： $T_m = 81.5 + 0.41(\%G + C)$ （例えば Young and Anderson, (1985) Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach (Hames & Higgins 編) pp 47-71, IRL Press, Oxford 参照）。 $T_m$  を計算するための他の計算法も当該技術分野において既知であり、構造及び環境、並びに配列特徴を考慮したものである（例えば Al lawi, H. T. and Santalucia, J., Jr. Biochemistry 36, 10581-94 (1997) 及び Santalucia, Proc Natl Acad Sci USA., 95 (4) : 1460 (1998) 参照）。

20

30

【0117】

本明細書で使用する「INVADE R アッセイ試薬」という用語は、標的配列を検出するための 1 つ以上の試薬を指し、前記試薬は標的配列の存在下で侵入的切断構造の形成に関与し得る核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、INVADE R アッセイ試薬は予め形成された構造の侵入的切断構造を形成するために必要な核酸分子の全てを含み、いくつかの実施形態では、INVADE R アッセイ試薬は、侵入的切断構造の形成において用いられる核酸分子の形成を可能にする 1 つ以上の追加試薬（例えばプライマー、重合化酵素、リガーゼ、ヌクレアーゼ）を提供する、又はこれらと併用される。

40

【0118】

いくつかの実施形態では、INVADE R アッセイ試薬は侵入的切断構造（例えば切断試薬）の存在を検出するための試薬を更に含む。いくつかの実施形態では、核酸分子は第 1 及び第 2 のオリゴヌクレオチドを含み、第 1 オリゴヌクレオチドは標的核酸の第 1 の領域に対して相補的な 5' 部分を含み、第 2 のオリゴヌクレオチドは 3' 部分と 5' 部分とを含み、前記 5' 部分は第 1 の領域の下流であり第 1 の領域に隣接している標的核酸の第 2 の領域に対して相補的である。いくつかの実施形態では、第 2 のオリゴヌクレオチドの 3' 部分は標的核酸に対して相補的ではない 3' 末端ヌクレオチドを含む。好ましい実施

50

形態では、第2のオリゴヌクレオチドの3'部分は、標的核酸に対して相補的ではない単一ヌクレオチドから成る。INVAADERアッセイ試薬は、例えば米国特許第5,846,717号、同第5,985,557号、同第5,994,069号、同第6,001,567号、同第6,913,881号、同第6,090,543号、WO97/27214号、WO98/42873号、米国特許出願公開第20050014163号、同第20050074788号、同第2005016596号、同第20050186588号、同第20040203035号、同第20040018489号、同第20050164177号、米国特許出願第11/266,723号、Lyamichevら、Nat. Biotech., 17:292(1999)、及びHallら、PNAS, USA, 97:8272(2000)に見出すことができ、これらは全ての目的のためにその全文を10参照することにより本願に援用する。

#### 【0119】

いくつかの実施形態では、INVAADERアッセイ試薬は、二本鎖領域を含む介在領域により分離されている第1及び第2の非連続一本鎖領域を含む標的核酸配列を検出するよう構成されている。特定の実施形態では、INVAADERアッセイ試薬は、標的核酸配列の第1及び第2の非連続一本鎖領域に結合できる架橋オリゴヌクレオチドを含む。特に好みの実施形態では、前記INVAADERアッセイ試薬の前記第1及び/又は前記第2のオリゴヌクレオチドのいずれか又は両方が架橋オリゴヌクレオチドである。

#### 【0120】

いくつかの実施形態では、INVAADERアッセイ試薬は固体支持体を更に含む。例えばいくつかの実施形態では、アッセイ試薬の1つ以上のオリゴヌクレオチド(例えば架橋又は未架橋の、第1及び/又は第2のオリゴヌクレオチド)が前記固体支持体に結合している。アッセイ試薬の1つ以上のオリゴヌクレオチドは、固体支持体に直接的又は間接的に(例えばスペーサ分子(例えばオリゴヌクレオチド)を介して)結合していてもよい。代表的な固相侵入的切断反応は、米国特許出願公開第20050164177号及び同第20030143585号に記載されており、その全文を参照することにより本願に援用する。

#### 【0121】

本明細書で使用する「固体支持体」は、アッセイ条件下でその形状を維持し、液相から分離することができる任意の物質である。その形状を維持する支持体は剛性である必要はない。実際、液相から分離することができる限り炭水化物鎖等の可撓性ポリマーを固体支持体として用い得ることも想定されている。本発明は利用される固体支持体の種類に限定されない。実際、種々の固体支持体が本発明で有用であると想定されており、例えばビーズ、平面、制御化多孔性ガラス(CPG)、ウェハー、ガラス、シリコン、ダイヤモンド、グラファイト、プラスチック、常磁性ビーズ、磁気ビーズ、ラテックスビーズ、超常磁性ビーズ、複数のビーズ、マイクロ流体チップ、シリコンチップ、顕微鏡用スライド、マイクロプレートウェル、シリカゲル、高分子膜、粒子、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスピーズ、綿、プラスチックビーズ、アルミナゲル、多糖類、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ナイロン、セファロース、ポリ(アクリレート)、ポリスチレン、ポリ(アクリルアミド)、ポリオール、アガロース、寒天、セルロース、デキストラン、デンプン、フィコール、ヘパリン、グリコーゲン、アミロペクチン、マンナン、イヌリン、ニトロセルロース、ジアゾセルロース又はデンプン、高分子微粒子、高分子膜、高分子ゲル、ガラススライド、スチレン、マルチウェルプレート、カラム、マイクロアレイ、ラテックス、ヒドロゲル、多孔質3D親水性ポリマーマトリックス(例えば、HYDROGEL, Packard Instrument Company, Meriden, Conn.)、光ファイバー束及びビーズ(例えばBEADARRAY( Illumina, San Diego, CA.))、米国特許出願公開第20050164177号に記載)、小粒子、膜、フリット、スライド、微小チップ、アルカンチオール-金層、非多孔質表面、アドレス指定可能な(addressable)アレイ、及びポリヌクレオチド固定化媒体(例えば米国特許出願公開第20050191660号に記載)が挙げら

10

20

30

40

50

れるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態では、固体支持体は結合層又は物質（例えば金、ダイヤモンド、又はストレプトアビシン）でコーティングされている。

【0122】

いくつかの実施形態では、IN VADERアッセイ試薬は緩衝溶液を更に含み、いくつかの好ましい実施形態では、緩衝溶液は二価カチオン（例えばMn<sup>2+</sup>及び/又はMg<sup>2+</sup>イオン）源を含む。集合的にIN VADERアッセイ試薬を構成する個々の成分（例えばオリゴヌクレオチド、酵素、緩衝剤、標的核酸）を「IN VADERアッセイ試薬成分」と称する。

【0123】

いくつかの実施形態では、IN VADERアッセイ試薬は第1の標的核酸（例えばスタッカーオリゴヌクレオチド）の第1の部分の上流の標的核酸の第3の部分に対して相補的な第3のオリゴヌクレオチドを更に含む。更に他の実施形態では、IN VADERアッセイ試薬は標的核酸を更に含む。いくつかの実施形態では、IN VADERアッセイ試薬は第2の標的核酸を更に含む。更に他の実施形態では、IN VADERアッセイ試薬は第2の標的核酸の第1の領域に対して相補的な5'部分を含む第3のオリゴヌクレオチドを更に含む。いくつかの特定の実施形態では、第3のオリゴヌクレオチドの3'部分は第2の標的核酸に共有結合している。他の特定の実施形態では、第2の標的核酸は5'部分を更に含み、ここで第2の標的核酸の5'部分は第3のオリゴヌクレオチドである。更に他の実施形態では、IN VADERアッセイ試薬はARRESTOR分子（例えばARRESTORオリゴヌクレオチド）を更に含む。

10

【0124】

いくつかの実施形態では、1つ以上のIN VADERアッセイ試薬又はIN VADERアッセイ試薬成分は、予め分配された形式で提供されてもよい（例えば再測定又は再分配すること無しに手順の工程で使用するために予め測定されている）。いくつかの実施形態では、選択されたIN VADERアッセイ試薬成分は混合され、共に予め分配される。好ましい実施形態では、事前分配アッセイ試薬成分は予め分配されており、反応容器（例えば反応チューブ又はウェル（例えばマイクロタイタープレート）が挙げられるがこれらに限定されない）内に提供される。特定の好ましい実施形態では、IN VADERアッセイ試薬は、米国特許第6,627,159号、同第6,720,187号、同第6,734,401号、同第6,814,935号、及び米国特許出願公開第2002/0064885号（それぞれその全文を参照することにより本願に援用する）に記載されているもの等のマイクロ流体デバイス内に提供される。特に好ましい実施形態では、事前分配IN VADERアッセイ試薬成分は反応容器内で乾燥している（例えば乾燥又は凍結乾燥）。

20

【0125】

いくつかの実施形態では、IN VADERアッセイ試薬又はIN VADERアッセイ試薬成分はキットとして提供される。本明細書で使用する「キット」という用語は、物質を供給するための任意の供給システムを指す。反応アッセイについて、かかる供給システムとしては、ある位置から別の位置へ反応試薬（例えばオリゴヌクレオチド、酵素等、適切な容器内のもの）及び/又は補助物質（例えば緩衝剤、アッセイを実施するための説明書に記載されているなど）を保管する、輸送する、又は供給することを可能にするシステムが挙げられる。例えばキットは、関連反応試薬及び/又は補助物質を収容している1つ以上の筐体（例えば箱）を含む。本明細書で使用する「細分化キット」という用語は、それぞれキット成分全体の一部を収容している2以上の別個の容器を備える供給システムを指す。容器は、一緒に又は別々に対象レシピエントに供給することができる。例えば第1の容器はアッセイで用いられる酵素を収容してもよく、第2の容器はオリゴヌクレオチドを収容する。「細分化キット」という用語は、連邦食品医薬品化粧品法（Federal Food, Drug, and Cosmetic Act）の第520条（e）項に規定されている分析物特異的試薬を含むキットを包含することを意図するが、これに限定されない。実際、それぞれキット成分全体の一部を収容している2以上の別個の容器を備える任意の供給システムが「細分化キット」という用語に含まれる。対照的に、「組合せキット

30

40

50

ト」は单一容器（例えば所望の成分のそれぞれを収容している单一箱）内に反応アッセイの成分の全てが収容されている供給システムを指す。「キット」という用語は、細分化キット及び組合せキットの両方を含む。

【0126】

いくつかの実施形態では、本発明は、本発明を実施するために必要な1つ以上の成分を備えるIN VADERアッセイ試薬キットを提供する。例えば、本発明はIN VADERアッセイを実施するために必要な酵素及び／若しくは反応成分を保管又は供給するためのキットを提供する。キットは、例えば試薬自体、緩衝剤、対照試薬（組織サンプル、陽性及び陰性対照標的オリゴヌクレオチド等）、固体支持体、標識、文章及び／又は絵による説明書、並びに製品情報、阻害剤、標識試薬及び／又は検出試薬、包装用環境制御物質（例えば氷、乾燥剤等）等が挙げられるがこれらに限定されないアッセイに必要な又は望ましい任意の及び全ての成分を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、キットは必要な成分の部分集合であって、ユーザが残りの成分を補充することが予想されるキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは各容器が供給される成分の部分集合を収容している2以上の別個の容器を備える。例えば第1の容器（例えば箱）は酵素（例えば好適な保管緩衝剤及び容器内の構造特異的切断酵素）を収容していてもよく、第2の箱はオリゴヌクレオチド（例えばIN VADERオリゴヌクレオチド、プローブオリゴヌクレオチド、対照標的オリゴヌクレオチド等）を含有していてもよい。

10

【0127】

いくつかの好ましい実施形態では、IN VADERアッセイ試薬は核酸切断産物を検出するための試薬を更に含む。いくつかの実施形態では、IN VADERアッセイ試薬中の1つ以上のオリゴヌクレオチドが標識を含む。いくつかの好ましい実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドは標識を含む。他の好ましい実施形態では、第3のオリゴヌクレオチドは標識を含む。特に好ましい実施形態では、試薬は蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）効果を生じさせる部分で標識された第1及び／又は第3のオリゴヌクレオチドを含む。

20

【0128】

本明細書で使用する「標識」という用語は、検出され得る又は検出可能な反応を導くことができる任意の部分（例えば化学種）を指す。いくつかの好ましい実施形態では、標識の検出は定量可能な情報を提供する。標識は、例えば放射性標識（例えば放射性核種）、リガンド（例えばビオチン又はアビジン）、発色団（例えば検出可能な色を付与する色素又は粒子）、ハプテン（例えばジゴキシゲニン）、質量標識（mass label）、ラテックスビーズ、金属粒子、常磁性標識、発光化合物（例えば生物発光、リン光、又は化学発光標識）、あるいは蛍光化合物等の任意の既知の検出可能な部分であってよい。

30

【0129】

標識は、オリゴヌクレオチド又は他の生物分子に直接又は間接的に結合することができる。直接標識は、共有結合、又は水素結合、疎水性及びイオン性相互作用等の非共有結合性相互作用を含む、標識をオリゴヌクレオチドに結合させる結合又は相互作用によって、あるいはキレート錯体又は配位錯体の形成によって行い得る。間接標識は、直接又は間接的に標識されている抗体又は追加のオリゴヌクレオチド（1又は複数）等の架橋部分又は「リンカー」の使用によって生じ得る。

40

【0130】

標識は単独で、又は標識（例えば発光標識）の発光スペクトルを抑制（例えば消光）、励起、又は転移（例えばシフト）（例えば蛍光共鳴エネルギー転移（FRET））することができる部分と組み合わせて用いてもよい。

【0131】

本明細書で使用する「FRET」という用語は、蛍光共鳴エネルギー転移を指し、これは部分（例えばフルオロフォア）がエネルギーを、例えば自身の中で、又はフルオロフォアから非フルオロフォア（例えばクエンチャー分子）へ転移させるプロセスである。いくつかの状況では、FRETは、短距離（例えば約10nm以下）の双極子-双極子相互作用を介して低エネルギーアクセプタフルオロフォアへエネルギーを転移するドナーフルオ

50

ロフォアを励起することを含む。他の状況では、FRETはドナーからの蛍光エネルギーの喪失、及びアクセプタフルオロフォアにおける蛍光の増加を含む。FRETの更に他の形態では、エネルギーは励起されたドナーフルオロフォアから非蛍光分子（例えば消光分子）へ交換され得る。FRETは当業者に既知であり、既に報告されている（例えばstryerら, 1978, Ann. Rev. Biochem., 47: 819; Selvin, 1995, Methods Enzymol., 246: 300; Orpana, 2004 Biomol Eng 21, 45-50; Olivier, 2005 Mutant Res 573, 103-110（その全文を参照することにより本願に援用する）参照）。

## 【0132】

10

本明細書で使用する「非標識」という用語は、プローブオリゴヌクレオチドに関して用いられるとき、検出を促進するための任意の非核酸部分、例えば発光団又はフルオロフォアを含まないプローブオリゴヌクレオチドを指す。非標識プローブは、ポリメラーゼによる伸長を防ぐために3'プロッキング基等の修飾を含んでいてもよい。

## 【0133】

本明細書で使用する「ドナー」という用語は、第1の波長で吸収し、第2のより長い波長で放射する部分（例えばフルオロフォア）を指す。「アクセプタ」という用語は、フルオロフォア、発光団、又はクエンチャー等の部分であって、ドナー基に近接するとき（典型的には1~100nm）ドナーから放射されたエネルギーの一部又は大部分を吸収することができる部分を指す。アクセプタは、ドナーの発光スペクトルに重なる吸収スペクトルを有していてもよい。一般にアクセプタがフルオロフォアである場合、第3の更に長い波長で再放射し、発光団又はクエンチャーである場合、光子を放射すること無しにドナーから吸収されたエネルギーを放出する。いくつかの好ましい実施形態では、ドナー及び/又はアクセプタ部分のエネルギーレベルの変化が検出される（例えばドナー及び/若しくはアクセプタ部分の間のエネルギー転移、又はドナー及び/若しくはアクセプタ部分からのエネルギー転移を測定することによる（例えば発光を検出することにより））。いくつかの好ましい実施形態では、アクセプタ部分の発光スペクトルは、部分からの放射（例えば光及び/又はエネルギーの放射）が互いに区別できる（例えばスペクトルとして分解される）ように、ドナー部分の発光スペクトルと異なる。

20

## 【0134】

30

いくつかの実施形態では、ドナー部分は複数のアクセプタ部分と組み合わせて用いられる。好ましい実施形態では、ドナー部分がクエンチャーに近接するとき（例えば1~100nm、又はより好ましくは1~25nm、又は更に好ましくは約10nm以下）、その励起がアクセプタ部分ではなくクエンチャー部分に転移し、クエンチャー部分が除去されたとき（例えばプローブの切断により）、ドナー部分の励起がアクセプタ部分に転移するように、ドナー部分は非蛍光クエンチャー部分及びアクセプタ部分と組み合わせて用いられる。いくつかの好ましい実施形態では、アクセプタ部分からの発光が検出される（例えば波長シフト分子ビーコンを用いて）（例えばTyagiら, Nature Biotechnology 18: 1191 (2000); Mhlanga and Malmburg, 2001 Methods 25, 463-471; Olivier, 2005 Mutant Res 573, 103-110、及び米国特許出願公開第20030228703号参照（それぞれその全文を参照することにより本願に援用する））。

40

## 【0135】

好適なフルオロフォアとしては、フルオレセイン、ローダミン、REDMOND RED色素、YAKIMA YELLOW色素、ヘキサクロロフルオレセイン、TAMRA色素、ROX色素、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、及びCy7、4,4-ジフルオロ-5,7-ジフェニル-4-ボーラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸、4,4-ジフルオロ-5,p-メトキシフェニル-4-ボーラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸、4,4-ジフルオロ-5-スチリル-4-ボーラ-3a,4-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸、カルボキシ-X-

50

ローダミン、N, N, N', N' - テトラメチル - 6 - カルボキシローダミン、テキサスレッド、エオシン、フルオレセイン、4, 4 - ジフルオロ - 5, 7 - ジフェニル - 4 - ボーラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン - 3 - プロピオン酸、4, 4 - ジフルオロ - 5, p - エトキシフェニル - 4 - ボーラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン 3 - プロピオン酸及び4, 4 - ジフルオロ - 5 - スチリル - 4 - ボーラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン - プロピオン酸、6 - カルボキシフルオレセイン (6 - F A M)、2', 4', 1, 4, - テトラクロロフルオレセイン (T E T)、2, 4', 5, 7', 4 - ヘキサクロロフルオレセイン (H E X)、2', 7' - ジメトキシ - 4', 5' - ジクロロ - 6 - カルボキシローダミン (J O E)、2' - クロロ - 5' - フルオロ - 7', 8' - 縮合フェニル - 1, 4 - ジクロロ - 6 - カルボキシフルオレセイン (N E D)、2' - クロロ - 7' - フェニル - 1, 4 - ジクロロ - 6 - カルボキシフルオレセイン (V I C)、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C)、5, 6 - カルボキシメチルフルオレセイン、テキサスレッド、ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1, 3 - ジアゾール - 4 - イル (N B D)、クマリン、塩化ダンシル、アミノメチルクマリン (A M C A)、エリトロシン、B O D I P Y 色素、C A S C A D E B L U E 色素、O R E G O N G R E E N 色素、ピレン、リサミン、キサンテン、アクリジン、オキサジン、フィコエリトリン、Q U A N T U M 色素、チアゾールオレンジ - エチジウムヘテロダイマー等が挙げられるがこれらに限定されない。好適なクエンチャーピーとして、シアニン色素、例えばC y 3、C y 3.5、C y 5、C y 5.5、及びC y 7、ローダミン色素、例えばテトラメチル - 6 - カルボキシローダミン (T A M R A)、及びテトラブロパノ - 6 - カルボキシローダミン (R O X)、D A B S Y L 色素、D A B C Y L 色素、シアニン色素、ニトロチアゾールブルー (N T B)、アントラキノン、マラカイトグリーン、ニトロチアゾール、又はニトロイミダゾール化合物、Q S Y 7 (M o l e c u l a r P r o b e s, E u g e n e, O R)、E C L I P S E クエンチャー (N a n o g e n, S a n D i e g o, C A) 等が挙げられるがこれらに限定されない。F R E T 構成に使用するための部分の対又は群の選択における種々の分子の吸収及び放射スペクトル等の因子の分析は、当業者に周知である。

### 【0136】

標識又は検出可能な反応 (例えば標識により提供される) の検出は、当該技術分野において周知である多数の技術、システム、及び方法を用いて測定し得る。例えば、標識は検出可能な蛍光 (例えば単純蛍光、F R E T、時間分解蛍光、蛍光消光、蛍光偏光等)、放射活性、化学発光、電気化学発光、R A M A N、比色分析、重力測定、ハイブリダイゼーション (例えばハイブリダイゼーション保護アッセイにおける配列に対する)、X線回折又は吸収、磁性、酵素活性、質量又は質量により影響を受ける挙動の特徴 (例えばM A L D I 飛行時間型質量分析) 等を提供するため、標識を検出することができる。

### 【0137】

本明細書で使用する「相互作用標識」という用語は、検出可能な効果を生じさせるように相互作用する2以上の成分を有する標識を指す。相互作用は、相互作用の任意の特定の性質に限定されない。標識成分の相互作用は、例えば2成分間の共有結合性接触又は非共有結合性接触 (例えばタンパク質 - タンパク質接触、又は近接部分間の衝突エネルギー転移) 等の直接接触を介していくてもよく、共鳴エネルギー転移 (例えば1つ以上の色素間、又は色素とクエンチャーピー部分との) を含んでいてもよく、例えばある標識の部位で生じる反応の産物が別の標識の部位に拡散して検出可能な効果を生じさせる、拡散効果を含んでいてもよい。相互作用性標識の成分は同じであってもよく (例えば2以上の同分子又は原子)、異なっていてもよい。

### 【0138】

標識は荷電部分 (正電荷又は負電荷) であってもよく、或いは電荷的中性であってもよい。標識は、標識を含む配列が検出可能である限り核酸又はタンパク質配列を含んでいてもよく、又はそれから成ってもよい。いくつかの実施形態では、標識は核酸又はタンパク質ではない。

### 【0139】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、標識は検出用粒子を含む。例えばいくつかの実施形態では、粒子はリン光体粒子である。リン光体粒子の例としては、アップコンバートリン光体粒子（例えばOstermayer, Preparation and properties of infrared-to-visible conversion phosphors. Metall. Trans. 752, 747-755 (1971) 参照）が挙げられるがこれに限定されない。いくつかの実施形態では、希土類でドープされたセラミック粒子をリン光体粒子として用いる。リン光体粒子は、アップコンバートリン光体技術（UPT）が挙げられるがこれらに限定されない任意の好適な方法により検出することができ、該技術ではアップコンバートリン光体が低エネルギー赤外線（IR）を高エネルギー可視光に転移させる。機序の理解は本発明を実施するために必須ではないが、本発明は任意の特定の作用機序に限定される訳ではなく、いくつかの実施形態では多光子吸収及びその後のドーパント依存性リン光の放射によりUPTが赤外光を可視光にアップコンバートする（例えば米国特許第6,399,397号；van De Rijkel, Nature Biotechnol. 19(3):273-6 (2001)；Corstjensら, IEEE Proc. Nanobiotechnol. 152(2):64 (2005) 参照、それぞれその全文を参照することにより本願に援用する）。

#### 【0140】

本明細書で使用するシグナル（例えば1つ以上の標識のシグナル）に関して「区別できる」という用語は、例えば蛍光放射波長、色、吸収、質量、大きさ、蛍光偏光特性、電荷等のスペクトル特性により、又は化学試薬、酵素、抗体等の別の部分と相互作用する能力により、互いに識別され得るシグナルを指す。

#### 【0141】

本明細書で使用する「合成」という用語は、オリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド（例えばプローブ）に関して用いられるとき、例えば酵素又は化学合成反応等の無細胞インビトロ反応において作製された核酸を指す。合成核酸の酵素的形成の例としては、制限酵素消化、重合（テンプレート又は非テンプレート）、ライゲーション等による形成が挙げられる。核酸の化学合成の例としては、例えばホスホジエステル及びホスホトリエステル法、ホスホロアミダイト及びH-ホスホネート化学法等が挙げられるがこれらに限定されない。例えばMethods in Molecular Biology, Vol 20: Protocols for Oligonucleotides and Analogs pp. 165-189 (S. Agrawal編, Humana Press, 1993)；Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein編, 1991)；Uhlmann and Peyman, 前掲. Agrawal and Iyer, Curr. Op. in Biotech. 6:12 (1995)；Anti-sense Research and Applications (Crooke and Lebleu; 編, CRC Press, Boca Raton, 1993), Beauchage and Caruthers, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862 (1981), 及びAgrawal and Zamecnik, 米国特許第5,149,798号 (1992) 参照。いくつかの実施形態では、合成オリゴヌクレオチドは予め形成されている反応に導入されるが、いくつかの実施形態では、合成オリゴヌクレオチドは、例えばポリメラーゼ、リガーゼ、切断酵素等の作用により、反応中に形成される又は修飾される。

#### 【0142】

本明細書で使用する酵素に関する「FEN-1」という用語は、真核生物又は古細菌生物由来の非ポリメラーゼフラップエンドヌクレアーゼを指す。

#### 【0143】

本明細書で使用するFEN-1活性という用語は、フラップエンドヌクレアーゼ（FEN）、ニックエキソヌクレアーゼ（EXO）、及びギャップエンドヌクレアーゼ（GEN）活性が挙げられるがこれらに限定されないFEN-1酵素の任意の酵素活性を指す（例

10

20

30

40

50

えば Shenz, BioEssays Volume 27, Issue 7, Pages 717 - 729 参照、参照することにより本願に援用する)。

【0144】

本明細書で使用するとき「多型の存在を同定する」という用語は、遺伝的変異があると疑われる点の位置でヌクレオチドの同一性を推定する任意の方法を指す。いくつかの実施形態では、特定の多型又は突然変異の存在は間接的に検出される、例えば多型の存在は検出可能な事象を生じさせる(例えばプローブハイブリダイゼーション、プローブ切断、核酸標的又はシグナル増幅等)が、他の実施形態では、多型又は突然変異の存在は特定のヌクレオチド又はヌクレオチド配列の非存在から推定され得る(例えばその位置における突然変異又は多型ヌクレオチドの存在の指標としての核酸配列のある位置における野性型ヌクレオチドの非存在)。

10

【0145】

本明細書で使用する「生物の種類を判定する(同定する)」とは、例えば関連生物の集団の中の変異体として、特有の個々の生物を同定すること、及び/又は種、属、科、目等により生物を分類することが挙げられるがこれらに限定されない、対象生物に身元(種類)を割り当てる任意の方法を包含する。生物の種類は、表現型又は遺伝子型によるものであってもよい。

【0146】

発明の説明

本発明は、増幅された核酸、例えばPCRで増幅されたDNAを検出するための均質なリアルタイムアッセイに関する。いくつかの実施形態では、用いられるプローブはフルオロフォア等の検出可能な部分を含むが、いくつかの実施形態では、プローブはフルオロフォア及びクエンチャー部分等の相互作用検出系を含む。更に他の実施形態では、本発明の方法及びシステムは、分析物特異的プローブの切断産物を検出するよう構成されている検出系と共に、非標識の分析物特異的プローブを使用する。

20

【0147】

本発明は、短い分析物特異的領域を有する酵素フットプリントプローブを用いるリアルタイム検出方法を提供する。本発明のフットプリントプローブは、標準的な方法、例えば最近接モデル及びDNA二本鎖形成のための公開されているパラメータ(Allawi and Santa Lucia, Biochemistry, 36: 10581 (1997), 及び Santa Lucia, Proc Natl Acad Sci USA., 95 (4): 1460 (1998))を用いて計算されるプローブの融解温度を遙かに上回る温度であるアッセイ条件下で一般に用いられる。

30

【0148】

検出及び特性決定におけるフットプリントプローブの使用は、より選択的アッセイをもたらす。本発明を任意の特定の作用機序に限定するものではないが、データは、選択性が、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件(例えば高反応温度)の使用だけではなく、形成される任意の二本鎖が酵素認識及び切断に都合のよいフットプリントを供給しなければならないという事実からも生じることを示唆している。

【0149】

本発明の1つの驚くべき結果は、フットプリントプローブが正しい長さのASRを含んでプローブ-標的二本鎖を形成する限り、フットプリントプローブの機能はプローブの正確な配列にそれ程依存しない、又は全く依存しないことである。この配列に対する依存性を有しないことの重要な局面は、分析物特異的領域のT<sub>m</sub>(例えばASRの配列含量により決定される)が、検出反応がプローブ-標的二本鎖の計算T<sub>m</sub>値を実質的に上回る温度で実施される場合でさえも、本発明の検出反応におけるプローブの性能に影響を与えないことである。したがって、好ましい実施形態では、ほぼ長さのみに基づいてプローブを選ぶことができ(例えば検出アッセイで用いられる酵素の既知のフットプリントであるよう選択された長さ、例えばAfu FEN-1エンドヌクレアーゼでは12以下のヌクレオチド)、検出アッセイを進行させる前に分析物特異的領域のT<sub>m</sub>を計算することさえ必要

40

50

ではない。

【0150】

本発明のこの態様は、複雑なソフトウェア及びプローブ修飾を用いて特定の反応温度で使用可能なプローブを選択及び構築するという従来のプローブに基づくアッセイとは劇的に逸脱している。例えば多くの先行技術のアッセイ、例えばT A Q M A N 5'スクレアーゼアッセイでは、又はI N V A D E R 及びI N V A D E R P L U Sアッセイのいくつかの実施形態では、新規標的用にアッセイを設計する第1段階としてアッセイのための特定の操作温度が選択される。反応温度は第1段階として選択されることが多く、その結果多くの異なる実験を例えば同じサーマルサイクラー又はインキュベータ内で一緒に実施できるよう設計することができる。一旦操作温度が選択されると、アッセイのプローブ、プライマー、及び/又は他の核酸成分を、選択した温度条件における性能について設計する。異なる標的配列では、プローブ及びプライマーを、例えば長さ、G - C 塩基対含量、及び/又はM G B若しくはペプチド核酸等の安定化部分の結合により調整する。同じ温度で操作するために選択されたプローブの長さは、標的核酸の配列に応じて非常に異なることがある（例えばG - C リッチである場合、又はA - T リッチである場合）。 10

【0151】

同じ温度で（又は同じ熱サイクルセットの温度で）操作されるよう構成された多数のアッセイを成功するよう設計するために、複雑なソフトウェアを設計プロセスで用いることが多い。例えば、A p p l i e d B i o s y s t e m s は、予め選択した熱サイクル温度プロファイルで実行するためのT A Q M A N 及び類似の5'スクレアーゼP C Rアッセイ（例えばS t r a t a g e n e , L a J o l l a , C A による、プローブに基づくF U L L V E L O C I T Yアッセイ）で使用するためのプライマー、及びプライマー/プローブの組み合わせを設計するための「P r i m e r E x p r e s s」ソフトウェアパッケージを供給している。T h i r d W a v e T e c h n o l o g i e s は、選択用I N V A D E R C r e a t o rソフトウェア、又は予め選択した温度（例えば63）で実行するための検出アッセイ用I N V A D E Rオリゴヌクレオチド/プローブの組み合わせを供給している。 20

【0152】

本発明の組成物、方法、システム、及びキットは、かかる複雑なアッセイ設計工程及びソフトウェアの必要性がない。 30

【0153】

フットプリントの大きさの同定

上述のように、本発明は酵素フットプリントプローブを使用する。二本鎖を認識する核酸修飾酵素用の認識フットプリントの同定は、F E N - 1 エンドスクレアーゼ等の5'スクレアーゼについて本明細書に記載されている。しかしながら、本発明はこれらの酵素と共に使用するために設計されたフットプリントプローブに限定されない。当業者は、他の核酸修飾酵素の活性要件の分析に同じ原理を適用することができる。 40

【0154】

D N Aとの複合体でのパイロコッカス・フリオサス由来の構造特異的5' フラップエンドスクレアーゼ（F E N - 1）の3次元モデルが提唱されている（例えば米国特許出願第10/783,557号、及びA l l a w i l a , J o u r n a l o f M o l e c u l a r B i o l o g y v . 3 2 8 ( 3 ) : 5 3 7 - 5 5 4 ( 2 0 0 3 ) 参照）。モデルは酵素の既知のX線構造、並びに酵素とD N Aとの間の距離制限の形で利用されている種々の生化学的及び分子動態データに基づく。5' フラップエンドスクレアーゼと重複フラップ基質の糖 - リン酸骨格との間の接触は、メチルホスホネット又は2' - O - メチル置換基を有する基質に対する酵素活性アッセイを用いて同定した。酵素フットプリントは切断部位の2 ~ 4 塩基対上流及び8 ~ 9 塩基対下流に伸長し、したがって二本鎖D N Aの10 ~ 13 塩基対を包含する。フットプリントデータは、下流二本鎖が酵素のヘリックス - ヘアピン - ヘリックスモチーフと相互作用するようにD N A結合溝内で基質が結合しているモデルと一致する。 50

## 【0155】

しかし、上流二本鎖を提供するプローブ又はヘアピンと併用されるとき、6～12ヌクレオチドの範囲の下流二本鎖を提供するプローブ（すなわち、6～12ヌクレオチドの標的特異的配列を有するプローブ）は、FEN-1及びポリメラーゼ由来の5'ヌクレアーゼを用いて試験するとき、分析物特異的配列の長さが約12ヌクレオチドに近づくにつれて酵素認識及び/又は切断速度の増加を示すが、その長さを超える二本鎖では切断の改善は見られないことが見出されている（例えばKaiserら、J Biol Chem, Vol. 274, Issue 30, 21387-21394, July 23, 1999参照）。したがって、本発明の好ましい実施形態では、FEN-1及びポリメラーゼ由来の5'ヌクレアーゼと共に使用するためのフットプリントプローブは、最高約12ヌクレオチド長の分析物特異的領域を提供する。上述のように、特定の実施形態では、最高12ヌクレオチドのうち1つ以上は標的鎖に対して非相補的であってもよい。好ましい実施形態では、フットプリントプローブは上流二本鎖を提供するオリゴヌクレオチド（例えばプライマー又はINVADERオリゴヌクレオチド）と併用される。10

## 【0156】

増幅アッセイにおけるフットプリントプローブの使用

ここでは、高融解温度を有するプライマーの存在下でさえ、また熱サイクルで用いられる「アニーリング温度」がフットプリントプローブのASRの計算 $T_m$ 値（例えば最近接モデル及びDNA二本鎖形成のための公開されているパラメータ等の当該技術分野において標準的である方法を用いて計算される、Allawi and Santa Lucia, Biochemistry, 36:10581 (1997)、及びSanta Lucia, Proc Natl Acad Sci USA., 95(4):1460 (1998)）を優に上回る反応でさえも、短いフットプリントプローブを増幅アッセイで用い得ることを示す。本発明を任意の特定の作用機序に限定するものではないが、FEN-1酵素は計算 $T_m$ 値を優に上回る温度で短いプローブのアニーリング及び切断を促進する因子であり得ると思われる。事実、本明細書に提供される実験データは、本発明の方法を実施できる温度が、用いられるプローブのASRの計算 $T_m$ 値にほとんど依存しない、又は全く依存しないことを示す。20

## 【0157】

いくつかの実施形態では、検出反応の過程において切断され、6～12ヌクレオチドの短い分析物特異的領域を有するプローブを、プローブのすぐ下流（標的鎖に沿って下流、及びプローブのASRの5'末端の上流）にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと併用する。切断構造を形成するために、上流核酸（例えばINVADERオリゴヌクレオチド）を提供して短いプローブの切断を促進する。30

## 【0158】

本発明の方法、組成物、及びシステムは、特定の実施形態に関連して、例えば標的増幅のポリメラーゼ連鎖反応法に関して、発明の説明及び発明の概要（参照することにより本明細書に援用する）に記載されるが、本発明はこれらの実施形態に限定されないことが理解される。以下で論じる実施形態は一例として提供され、本発明を限定するものではない。40

## 【0159】

いくつかの実施形態及び本発明の態様について以下で論じる。

## 【0160】

特異性の改善されたアッセイ

本発明の態様は、リアルタイムでPCRアッセイ等の標的増幅アッセイを検出するためのシステム及び方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は検出アッセイ（例えば切断アッセイ）と組み合わせた標的増幅アッセイを実施するためのシステム、方法及びキットを提供し、前記検出アッセイは比較的短い（例えば6～12塩基）の分析物特異的領域を有するプローブを用いる。好ましい実施形態では、これらのプローブは、検出試薬、例えばFEN-1ヌクレアーゼ等の切断試薬により有効に認識可能な二本鎖の最小長又50

はおよそ最小長であるプローブ／分析物二本鎖を提供するよう構成されており、その結果プローブの分析物特異的部分に対して配列中にミスマッチを有する標的にアニールしたプローブは、十分な効率で切断されない又は全く切断されない。かかる実施形態では、ミスマッチの標的核酸にハイブリダイズしたプローブからの検出可能な切断が、プローブの分析物特異的部分に完全に相補的である標的核酸にハイブリダイズしているプローブからの検出可能な切断に比べて減少しており、それによりこのアッセイがより高い特異性及び／又はより低いバックグラウンドを有する。

#### 【0161】

本発明は、本発明のフットプリントプローブの使用によって特異性の改善された及び／又はバックグラウンドの低下した任意の特定の作用機序に限定されるものではない。改善された特異性の他の態様は、ストリングエントなハイブリダイゼーション条件で（例えばプローブの分析物特異的部分の計算  $T_m$  値より高い温度で）使用される短いプローブにより提供されるより選択的なハイブリダイゼーションであり、その結果完全にマッチするプローブのみが標的鎖にアニーリングする傾向がある。一方いくつかの実施形態では、改善された結果は完全にマッチしているプローブ／標的二本鎖と不完全にマッチしているプローブ／標的二本鎖との切断酵素による判別に起因する場合がある。改善された特異性の別の態様は、例えば FEN-1 酵素等の 5' ヌクレアーゼによるプローブの効率的切断にとつて最小の二本鎖長又はおよそ最小の二本鎖長である対象標的との二本鎖を提供するよう構成されているプローブの使用を通じたものである。かかる実施形態では、プローブの分析物特異的部分が 1 つ以上のヌクレオチド位置において標的とミスマッチである場合、二本鎖の 5' ヌクレアーゼ切断は実質的に減少する、又は切断されない。特に好ましい実施形態では、FEN-1 は古細菌種由来の熱安定性 FEN-1 である。

#### 【0162】

切断構造（例えば侵入的切断構造）の切断効率に対するプローブ／標的二本鎖長（例えば INVADER オリゴヌクレオチド又はプライマーオリゴヌクレオチドにより提供されるような「上流二本鎖」に対して「下流二本鎖長」とも呼ばれる）の効果は、種々の 5' ヌクレアーゼ酵素について研究されている。例えば Kaiserら, J. Biol. Chem. Jul 23; 274 (30): 21387-94 (1999) (参照することにより本明細書に援用する) 参照。Kaiser は、上流二本鎖（例えば INVADER オリゴヌクレオチド／標的二本鎖）が 6 塩基対の長さである重複フラップ基質について、6 ~ 16 塩基対の下流二本鎖長を有する基質を用いてプローブ／標的二本鎖の効果を調べた。実験では、A. fulgidus (AfuFEN)、P. furiosus (PfuFEN)、M. jannaschii (MjaFEN)、及び M. thermoautotrophicum (MthFEN) 由来の 4 種の古細菌 FEN-1 酵素、T. aquaticus (TaqPol) 及び T. thermophilus (TthPol) 由来の 2 種の真正細菌ポリメラーゼ I 酵素、並びに TaqPol の 5' ヌクレアーゼドメイン (TaqExo と称される) について調べた。TaqPol を除く全ての酵素が、10 ~ 16 塩基対の範囲の長さの下流二本鎖長に依存しない速度で重複フラップ基質を切断し、TaqPol は 12 塩基対の基質より約 5 倍遅く 10 塩基対の基質を切断した。大部分の酵素では、切断活性は 8 塩基対の下流二本鎖基質で減少し、二本鎖長が 6 bp に減少すると著しく低下したが、MjaFEN 及び MthFEN の FEN-1 酵素は 6 塩基対の下流二本鎖を有する基質を切断することができた。したがって、ミスマッチ標的核酸に短いプローブがアニールした場合でさえ、マッチ標的配列にハイブリダイズしている同じプローブと比べて 5' ヌクレアーゼによる切断が低下するという点で、短い分析物特異的領域を有するプローブの使用は、ハイブリダイゼーションの機構を超える更に高水準の判別を提供する。したがって、これらの酵素では、プローブの分析物特異的部分において標的核酸に相補的な 12 以下の塩基を有するプローブの使用は、これらの酵素のうち 1 種を切断反応に用いるとき、より慣用的な設計のプローブの使用に対して著しい利点を提供する。

#### 【0163】

短い分析物特異的領域を含むプローブは、例えば INVADER アッセイ等の侵入的切

10

20

30

40

50

断アッセイの特定の実施形態で用いられている。例えば米国特許第5,985,557号(Prudentら)参照。しかしながら、PCR等の増幅反応におけるリアルタイム検出法用のプローブ設計のために長年にわたって確立されたルールの観点では、このような短いASRを有するプローブ、特にMGB等の二本鎖安定化部分を欠くプローブが、プローブの融解温度を優に上回る温度で実施されるアッセイにおけるリアルタイム検出で機能するようになり得ることは驚くべきである。これらのプローブの性能は、PCR増幅等の反応に関して特に驚くべきことであり、ここで高T<sub>m</sub>値を有するプライマーの伸長はプローブ結合部位を完全に塞ぐと予想される。本発明を任意の特定の作用機序に限定するものではないが、いくつかの実施形態では、本発明の反応における酵素、例えばFEN-1酵素は、プライマー伸長が結合部位を塞ぐ前に短いプローブがアニールすることができ、融解温度より数度以上高い温度で用いることができるよう、フットプリントプローブ-標的二本鎖を安定化することができる。

#### 【0164】

背景技術のセクションで論じたように、PCRにおけるリアルタイム検出で一般に用いられている方法は、反応において蛍光標識分析物特異的加水分解プローブを用いることである。最も一般的に用いられている方法では、5'スクレアーゼ「ニック翻訳」活性(例えばTaq DNAポリメラーゼ)などのポリメラーゼが用いられ、ポリメラーゼがPCRプライマーを伸長し、ハイブリダイズしたプローブに遭遇したときにプローブの切断が生じる(例えば米国特許第5,210,015号、及びHollandら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276(1991)参照)。いくつかの種類の5'スクレアーゼPCR反応では、ポリメラーゼ及び5'スクレアーゼは別々のタンパク質(例えばPfu DNAポリメラーゼ及びPfu FEN-1エンドスクレアーゼ)として提供される。後者の構成では、ポリメラーゼは、FEN-1酵素により認識される構造を生成するように、プローブが部分的に置換される点までプライマーを伸長し、次いでFEN-1がプローブ分子を切断する(例えば米国特許第6,528,254号、及び同第6,548,250号、FULL VELOCITY Q-PCR Master Mix Instruction Manual Revision #114005, Stratagene Corp., FULL VELOCITY QRT-PCR Master Mix Instruction Manual Revision # Revision #114005, Stratagene Corp.)。

#### 【0165】

上記方法の両方において、加水分解プローブがプライマー伸長前に標的鎖にアニーリングすることがアッセイ設計において必須であると考えられる。この理由のために、これらのリアルタイムPCR法(FULL VELOCITY法を含む)で用いるための加水分解プローブは、増幅反応で用いられるプライマーより安定に(すなわちより高い融解温度、すなわちT<sub>m</sub>で)標的核酸に結合するよう選択される。例えば米国特許第5,210,015号、Applied Biosystems製Primer Express(登録商標)オリゴ設計ソフトウェア、Stratagene's "Introduction to Quantitative PCR" Methods及びApplications Guide, IN #70200-00/Revision #084001 Copyright 2004年, Stratagene参照。

#### 【0166】

いくつかのリアルタイムPCRアッセイ設計では、プローブの安定性は、プライマーを上回るT<sub>m</sub>値を有するよう選択された長さ及び配列組成を有する分析物特異的プローブ配列を選択することにより保証される。他のアッセイ設計では、より短いプローブが用いられるが、プローブの融解温度はプローブに二本鎖安定化部分を付着させることにより上昇する。具体的には、副溝バインダー(「MGB」)等の二本鎖DNAに結合する部分(例えば米国特許第6,312,894号、Kutyavinaら, Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, No. 2 655-661、及びABI Primer Express manual, 前掲)が、リアルタイムPCRで用

10

20

30

40

50

いるための加水分解プローブに一般的に用いられている。M G B のオリゴヌクレオチドへの複合体化は、オリゴヌクレオチドとその標的との間に形成されるハイブリッドの安定性を劇的に増加させる（例えば米国特許第 6,312,894 号、K u t y a v i n ら、前掲参照）。安定性の増加（すなわちハイブリダイゼーションの程度の増加）は、同一の長さ及び配列の非複合体化オリゴヌクレオチドにより形成されるものに比べて、かかるM G B - オリゴヌクレオチド複合体により形成されるハイブリッド二本鎖の融解温度が高いことに現れる。この効果は、短いオリゴヌクレオチド（例えば長さ約 21 ヌクレオチド未満）で特に顕著であり、かかる複合体化した短いオリゴヌクレオチドプローブ（約 12 ヌクレオチド以上）が均質な 5' ヌクレアーゼ P C R アッセイの設計要件を満たす、すなわちプライマーより安定な標的核酸に結合することを可能にする。

10

#### 【 0 1 6 7 】

T A Q M A N 5' ヌクレアーゼプローブ切断アッセイに基づくリアルタイム P C R 検出用プローブ及びプライマーの設計を指導する P r i m e r E x p r e s s ソフトウェアバージョン 3.0 「 G e t t i n g S t a r t e d 」は、プローブは常にプライマーより高い  $T_m$  値を有するべきであると指示している。例えば、標準的な（非 M G B ）プローブは 68 ~ 70 の  $T_m$  値を有することが最適であると教示されるが、プライマーは 58 ~ 60 の  $T_m$  値を有することが最適であると教示される。M G B をプローブとして用いるとき（例えば対立遺伝子判別）、マニュアルは、 $T_m$  値が 65 ~ 67 であるプローブを 58 ~ 60 の  $T_m$  値を有するプライマーと共に使用すべきであると指示している。M G B を安定化しようとすると、マニュアルは、リアルタイム 5' ヌクレアーゼアッセイ検出で用いられるプローブが、共に使用されるプライマーの  $T_m$  値より少なくとも 5 ~ 10 高い  $T_m$  値を有するべきであると指示している。ポリメラーゼ及び 5' ヌクレアーゼ切断活性が別々の酵素として提供されるアッセイでも、同じことが推奨されている（例えば F U L L L V E L O C I T Y Q - P C R and Q R T - P C R M a s t e r M i x I n s t r u c t i o n M a n u a l s , 前掲参照）。

20

#### 【 0 1 6 8 】

上で述べたように、本発明は、例えば F E N - 1 酵素用に最小のフットプリント二本鎖を提供するよう選択された短い分析物特異的領域を有する加水分解プローブを含む改善されたリアルタイム検出アッセイを提供する。典型的に T A Q M A N アッセイ及び F U L L V E L O C I T Y 法で用いられる加水分解プローブと対照的に、本発明のフットプリントプローブは反応における F E N - 1 酵素を好適に機能させる最小長のプローブ / 標的二本鎖を提供するよう選択される。本発明のフットプリントプローブは、共に用いられる P C R プライマーより実質的に低い融解温度を有する。いくつかの好ましい実施形態では、プローブは 12 ヌクレオチド以下の分析物特異的部分を有する。標識及び他のかかる成分はプローブ / 標識二本鎖の安定性に影響を与える場合があるが、特に好ましい実施形態では、本発明のプローブは二本鎖の安定性を高める目的のために提供される非核酸部分（例えば副溝バインダー）を含まない。

30

#### 【 0 1 6 9 】

本明細書に提供される例は、本発明の短いフットプリントプローブが、ほとんどバックグラウンド無しにリアルタイム P C R 検出において明らかなシグナルを提供することを示す（例えば標的なし対照におけるシグナルの蓄積がほとんど無い、例えば図 4 参照）。

40

#### 【 0 1 7 0 】

##### より迅速な検出を提供するアッセイ

本発明の別の態様は、標準的な加水分解プローブに基づく方法と比べたとき、より迅速な增幅反応のリアルタイム検出を提供する。上で論じたように、T A Q M A N 型アッセイでは、プライマーが P C R のサイクルにおいて標的に沿って伸長したとき加水分解プローブを切断する。したがって、シグナル蓄積速度は、P C R の温度サイクリングに関連し、それにより制限される。

#### 【 0 1 7 1 】

P C R 中の加水分解プローブの切断により可能になる二次的な切断事象を提供するアッ

50

セイが記載されている。例えば米国特許第6,893,819号を参照。ここでは加水分解プローブからの5'フラップは、一旦切断されると、検出反応でプライマーとして用いられる。例えばフラップ-プライマーは伸長して別のプローブを含む第2の切断構造を形成し、別のフラップを遊離させる。しかしながら、かかるアッセイでは、元の加水分解事象の切断産物である5'フラップは、第2の反応で消費され、追加反応には寄与しない。

#### 【0172】

本発明の態様は、検出可能なシグナルの蓄積が同時PCRアッセイの熱サイクリングに依存しない又は制限されない、検出アッセイを提供することである。例えば、本発明の好ましい実施形態では、切断産物は標的鎖にアニールしたとき分析物特異的プローブから遊離し、次いで切断産物は、例えば図1に記載するFRETカセットとの、多くの次の切断構造の形成に関与する。いくつかの実施形態では、最初の切断産物は第2の及び次の切断構造の切断の際に更に変化しないが、他の実施形態では、最初の切断産物の任意の変化（例えば異なる切断、プライマー伸長）は、変化した最初の切断産物が第2の及び次の切断構造の形成に関与することを妨げない。

10

#### 【0173】

特に好ましい実施形態では、第2の及び次の切断構造は、それらがPCR温度サイクリングに依存すること無しに形成及び解離できるように構成され、その結果多くの切断構造が、少なくとも一部の検出切断構造が形成され得る範囲内である反応温度の全ての時点で形成及び切断され得る。このように構成されるとき、検出切断構造の多くのコピーが、反応温度が同時PCRの熱サイクルで変化(move)しているときでさえ、最初の切断産物の各コピーについて切断され得る。この方法では、検出アッセイによるシグナル増幅は、アンプリコンの蓄積よりも急速に、そして標準的な加水分解プローブ切断で可能であるよりも又は最初の切断産物が再利用されず消費される二次検出アッセイで可能であるよりも急速に蓄積する。急速なシグナル蓄積により、より感受性の強い検出が可能になり、結果が出るまでの時間がより早くなる。

20

#### 【0174】

##### コストの低いアッセイ

上述のように、リアルタイムPCRのためのプローブに基づく特異的検出化学の主な問題点の1つは、異なる分析物配列の各々について、高価な色素、クエンチャー、及び任意的にMBGを含む種々の特注プローブを使用する必要があることである。いくつかの実施形態では、本発明は、標識されたオリゴヌクレオチドを用いる二次検出反応に加えて、非標識の分析物特異的プローブを使用することを含むリアルタイム検出法を提供し、その結果高価な部分で標識された分析物特異的プローブを作製する必要がなくなる。

30

#### 【0175】

##### ダイナミックレンジの改善されたアッセイ

本発明の方法は、標的核酸の種類に限定されない。例えば、標的核酸としては、例えばRNAゲノムを有するウイルスから調製された核酸物質を挙げることができる。典型的には、RNA標的配列は逆転写酵素の作用によりcDNA分子に変換され、次いで核酸検出アッセイにより検出される。本発明の方法の組み込みにより、RNA標的配列の検出のダイナミックレンジは未だ実現不可能な幅に増加する。

40

#### 【0176】

いくつかの実施形態では、標的配列は合成配列である。例えば酵素的反応で生じた断片（例えば制限酵素断片、侵入的切断反応から切断されたフラップ等）を標的配列と見なすことができる。いくつかのかかる実施形態では、かかる分子の検出は、それから合成配列が生成される別個の標的核酸を間接的に検出する。例えば、侵入的切断反応では、一次反応から切断されたフラップは、FRETカセットである第1及び第2のプローブを用いて検出される。FRETカセットは、切断されたフラップが第1及び第2のプローブに示差的にハイブリダイズするようにいくつかの特徴（例えば長さ等）が異なる。両方のFRETカセット（又は第3、第4等）を用いることにより、反応のダイナミックレンジが改善される。

50

## 【0177】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、検出のダイナミックレンジを更に増加させる方法と併用される。例えば米国特許出願第11/338,244号（参照することにより本明細書に援用する）参照。例えばいくつかの実施形態では、本発明は、標的核酸の領域の増幅の示差的レベル（例えば増幅無し、1つ以上の効率における直線的増幅、及び／又は1つ以上の効率における指数関数的増幅）を利用して検出のダイナミックレンジを広げる方法と併用される。いくつかの実施形態では、本発明は、標的核酸（1又は複数）の1つ以上の分析物特異的領域に対して異なるハイブリダイゼーション特性を有するプローブの使用によって検出のダイナミックレンジを広げる方法と併用される。いくつかの好ましい実施形態では、異なるプローブは異なるASRを有し、例えば検出試薬による切断のために、最適及び／又は準最適のフットプリントの範囲を提供する。好ましい実施形態では、2以上の方法の組み合わせを使用する。例えばいくつかの好ましい実施形態では、2以上のプローブ（例えば3、4等）を、異なるレベルの増幅によって得られた第1及び第2のアンプリコンと接触させる。いくつかのかかる実施形態では、各プローブは同種のシグナルを生じ、その結果反応により生じる全シグナルが簡単に検出される。集合的シグナルにより、広いダイナミックレンジにわたって標的核酸を検出することが可能になる。例えば、本発明の開発中に実施された実験は、サンプル中に元々存在する標的核酸のコピー数が810g超異なるサンプルに由来する標的核酸を検出する能力を示していた。

10

## 【0178】

本発明の組成物、方法、システム、及びキットは、広範な核酸標的の検出及び定量に有用である。本発明の組成物及び方法は、ウイルス標的核酸（例えばウイルス病原体）の定量に特に有用である。広い範囲のウイルス濃度（例えばウイルス量）の検出について臨床又は研究の必要がある代表的なウイルス核酸としては、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）及び他のレトロウイルス、C型肝炎ウイルス（HCV）、B型肝炎ウイルス（HBV）、A型肝炎ウイルス（HAV）、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）、エブスタインバーウィルス（EBV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、水痘帶状疱疹ウイルス（VZV）、バクテリオファージ（例えばファージラムダ）、アデノウイルス、及びレンチウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。他の実施形態では、本発明の組成物及び方法は、細菌（例えば商業的及び研究的用途で重要な病原体又は細菌）の検出における用途が見出されている。例としては、クラミジア種（Chlamydia sp.）、淋菌（N. gonorrhoea）、及びB群連鎖球菌（group B streptococcus）が挙げられるがこれらに限定されない。

20

## 【0179】

本発明の方法及び組成物を用いる標的核酸の定量は、種々の臨床及び研究用途で利用されている。例えばいくつかの実施形態では、本発明のダイナミックレンジの増加した検出アッセイは、ヒトサンプル中のウイルス病原体の検出及び定量に利用されている。本発明の検出アッセイは、尿、糞便、リンパ液、全血、及び血清が挙げられるがこれらに限定されない種々の精製及び未精製サンプルと共に用いるのに好適である。好ましい実施形態では、本発明の検出アッセイは宿主細胞の存在下で使用するのに好適である。

30

## 【0180】

40

他の実施形態では、本発明の検出アッセイは、薬物スクリーニング（例えばウイルス病原体に対する薬物のスクリーニング）、疾患の動物モデル、及び標的核酸のインピトロ定量（例えば細菌、ウイルス、又はゲノム核酸）が挙げられるがこれらに限定されない研究用途における用途が見出されている。

## 【0181】

本発明のプローブオリゴヌクレオチドは、以下に記載のものが挙げられるがこれらに限定されない種々の核酸検出アッセイにおける用途が見出されている。ハイブリダイゼーションを使用する任意の核酸検出法が本発明のシステム及び方法から利益を受け得ることを理解すべきである。

以下、本発明の実施形態を示す。

50

(1) 標的核酸を分析する方法であって、a) 合成プローブ及びFEN-1エンドヌクレアーゼの存在下にて、前記合成プローブが増幅反応中に切断されて切断断片を生成する条件下で、標的核酸を増幅する工程であって、前記合成プローブが分析物特異的部分及び非標的的部分を含むフットプリントプローブであり、前記非標的的部分が前記標的核酸に対して実質的に非相補的であり、前記分析物特異的部分の長さが12ヌクレオチド以下であり、前記分析物特異的部分が前記標的核酸に対して相補的である最高12ヌクレオチドを含む、上記工程と；b) 前記増幅反応中に前記切断断片を検出する工程と、を含む方法。

(2) 前記分析が、前記増幅反応中に前記切断断片を検出することにより前記標的核酸の存在を検出することを含む、(1)に記載の方法。

(3) 前記分析が、前記標的核酸における多型の存在を同定することを含む、(1)に記載の方法。

(4) 前記分析が、標的核酸が由来する生物を同定することを含む、(1)に記載の方法。

(5) 前記分析が、前記標的核酸の量を検出することを含む、(1)に記載の方法。

(6) 前記標的核酸がサンプルから単離されている、(1)に記載の方法。

(7) 前記サンプルが、細胞サンプル、組織サンプル、流体サンプル、培養サンプル、及び環境サンプルから成る群から選択される、(6)に記載の方法。

(8) 前記標的核酸が、動物、植物、細菌、ウイルス、及び真菌から成る群から選択される生物に由来する、(1)に記載の方法。

(9) 前記標的核酸がDNAである、(1)に記載の方法。

(10) 前記標的核酸がRNAである、(1)に記載の方法。

(11) 前記増幅前に又は前記増幅と同時に前記RNAをDNAに逆転写する工程を更に含む、(10)に記載の方法。

(12) 前記増幅がポリメラーゼ連鎖反応を含む、(1)に記載の方法。

(13) 前記増幅がポリメラーゼを使用する、(1)に記載の方法。

(14) 前記ポリメラーゼが熱安定性ポリメラーゼである、(13)に記載の方法。

(15) 前記ポリメラーゼが5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を欠いている、(13)に記載の方法。

(16) 前記FEN-1エンドヌクレアーゼが熱安定性FEN-1エンドヌクレアーゼである、(1)に記載の方法。

(17) 前記FEN-1エンドヌクレアーゼが古細菌種由来である、(1)に記載の方法。

(18) 前記増幅が第1及び第2のプライマーオリゴヌクレオチドを使用する、(1)に記載の方法。

(19) 前記プローブが切断される前に切断構造が形成され、前記切断構造がa)前記標的核酸の第1の領域における前記プローブ、及びb)第1の領域の下流に存在する前記標的核酸の第2の領域と会合する第2のオリゴヌクレオチドと、前記標的核酸との会合により形成される、(1)に記載の方法。

(20) 第2の領域が第1の領域に隣接している、(19)に記載の方法。

(21) 前記切断構造における第2のオリゴヌクレオチドの3'末端において少なくとも1個のヌクレオチドが、前記プローブと前記標的核酸とのハイブリダイゼーション領域と重複する、(19)に記載の方法。

(22) 第2のオリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドが、前記切断構造における前記標的核酸に対して非相補的である、(21)に記載の方法。

(23) 第2のオリゴヌクレオチドが前記増幅で用いられるプライマーでもある、(19)に記載の方法。

(24) 前記プローブの前記標的結合部分が、前記標的核酸に対して相補的である11以下のヌクレオチドを含む、(1)に記載の方法。

(25) 前記プローブの前記標的結合部分が、前記標的核酸に対して相補的である10以下のヌクレオチドを含む、(1)に記載の方法。

10

20

30

40

50

- (26) 前記プローブの前記標的結合部分が、前記標的核酸に対して相補的である9以下のヌクレオチドを含む、(1)に記載の方法。
- (27) 前記プローブの前記標的結合部分が、前記標的核酸に対して相補的である8以下のヌクレオチドを含む、(1)に記載の方法。
- (28) 前記プローブの前記標的結合部分が、前記標的核酸に対して相補的である7以下のヌクレオチドを含む、(1)に記載の方法。
- (29) 前記プローブの前記標的結合部分が、前記標的核酸に対して相補的である6以下のヌクレオチドを含む、(1)に記載の方法。
- (30) 前記プローブが標識されていない、(1)に記載の方法。
- (31) 前記プローブが非天然ヌクレオチドを含まない、(1)に記載の方法。 10
- (32) 前記プローブの前記非標的部分の長さが少なくとも10ヌクレオチドである、(1)に記載の方法。
- (33) 前記切断断片の検出が、1つ以上の前記切断断片を合成検出オリゴヌクレオチドと会合させることを含む、(1)に記載の方法。
- (34) 前記合成検出オリゴヌクレオチドがヘアピン構造を形成する自己相補性領域を有する、(33)に記載の方法。
- (35) 前記合成検出オリゴヌクレオチドが標識を含む、(33)に記載の方法。
- (36) 前記標識が蛍光標識である、(35)に記載の方法。
- (37) 前記合成検出オリゴヌクレオチドが蛍光クエンチャーパートを更に含む、(36)に記載の方法。 20
- (38) 前記切断断片が、前記合成検出オリゴヌクレオチドと会合したとき、前記FEN-1エンドヌクレアーゼにより切断可能な切断構造を形成する、(33)に記載の方法。
- (39) 前記検出が、前記合成検出オリゴヌクレオチドを含む前記切断構造を切断して、検出可能なシグナルを生成することを含む、(38)に記載の方法。
- (40) 合成対照標的核酸の既知の量も分析する、(1)に記載の方法。
- (41) 分析された合成対照標的核酸を用いて前記標的核酸の量を決定する、(40)に記載の方法。
- (42) a) 標的核酸と、b) 増幅プライマーと、c) ポリメラーゼと、d) FEN-1エンドヌクレアーゼと、e) 分析物特異的部分及び非標的的部分を含む非標識合成プローブであって、前記非標的部分が前記標的核酸に対して実質的に非相補的であり、前記分析物特異的部分の長さが12ヌクレオチド以下であり、前記分析物特異的部分が前記標的核酸に対して相補的である最高12ヌクレオチドを含む非標識合成プローブとを含む組成物。 30
- (43) 前記組成物が反応混合物である、(42)に記載の組成物。
- (44) 前記組成物がキットである、(42)に記載の組成物。
- (45) 前記キットが、標的核酸、増幅プライマー、ポリメラーゼ、FEN-1エンドヌクレアーゼ、及び非標識合成プローブの1以上を収容している複数の容器を備える、(44)に記載の組成物。
- (46) 前記標的核酸が、動物、植物、細菌、ウイルス、及び真菌から成る群から選択される生物に由来する、(42)に記載の組成物。
- (47) 前記標的核酸がDNAである、(42)に記載の組成物。 40
- (48) 前記標的核酸がRNAである、(42)に記載の組成物。
- (49) 逆転写酵素を更に含む、(42)に記載の組成物。
- (50) 前記ポリメラーゼが熱安定性ポリメラーゼである、(42)に記載の組成物。
- (51) 前記ポリメラーゼが5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性を欠いている、(50)に記載の組成物。
- (52) 前記FEN-1エンドヌクレアーゼが熱安定性FEN-1エンドヌクレアーゼである、(42)に記載の組成物。
- (53) 前記FEN-1エンドヌクレアーゼが古細菌種由来である、(42)に記載の組成物。
- (54) 前記標的核酸の存在下にて前記プローブと共に切断構造を形成するよう構成され 50

ている第2のオリゴヌクレオチドを更に含み、前記切断構造が、a)前記標的核酸の第1の領域における前記プローブ、及びb)第1の領域の下流にある前記標的核酸の第2の領域と会合する第2のオリゴヌクレオチドと、前記標的核酸との会合により形成される、(42)に記載の組成物。

(55) 第2の領域が第1の領域に隣接している、(54)に記載の組成物。

(56) 前記切断構造における第2のオリゴヌクレオチドの3'末端において少なくとも1個のヌクレオチドが、前記プローブと前記標的核酸とのハイブリダイゼーション領域と重複している、(54)に記載の組成物。

(57) 第2のオリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドが、前記切断構造における前記標的核酸に対して非相補的である、(54)に記載の組成物。 10

(58) 前記プローブの前記分析物特異的部分が、前記標的核酸に対して相補的である1以下2のヌクレオチドを含む、(42)に記載の組成物。

(59) 前記プローブの前記分析物特異的部分が、前記標的核酸に対して相補的である10以下2のヌクレオチドを含む、(42)に記載の組成物。

(60) 前記プローブの前記分析物特異的部分が、前記標的核酸に対して相補的である9以下のヌクレオチドを含む、(42)に記載の組成物。

(61) 前記プローブの前記分析物特異的部分が、前記標的核酸に対して相補的である8以下のヌクレオチドを含む、(42)に記載の組成物。

(62) 前記プローブの前記分析物特異的部分が、前記標的核酸に対して相補的である7以下のヌクレオチドを含む、(42)に記載の組成物。 20

(63) 前記プローブの前記分析物特異的部分が、前記標的核酸に対して相補的である6以下のヌクレオチドを含む、(42)に記載の組成物。

(64) 前記プローブが標識されていない、(42)に記載の組成物。

(65) 前記プローブが非天然ヌクレオチドを含まない、(42)に記載の組成物。

(66) 前記プローブの前記非標的的部分の長さが少なくとも10ヌクレオチドである、(42)に記載の組成物。

(67) 前記プローブの前記非標的的部分に対して相補的である領域を有する合成検出オリゴヌクレオチドを更に含む、(42)に記載の組成物。

(68) 前記合成検出オリゴヌクレオチドがヘアピン構造を形成する自己相補性領域を有する、(67)に記載の組成物。 30

(69) 前記合成検出オリゴヌクレオチドが標識を含む、(67)に記載の組成物。

(70) 前記標識が蛍光標識である、(69)に記載の組成物。

(71) 前記合成検出オリゴヌクレオチドが蛍光ケンチャー部分を更に含む、(70)に記載の組成物。

(72) (42)に記載の組成物を含むシステム。

(73) 検出器を更に含む、(72)に記載のシステム。

(74) 前記検出器が蛍光シグナルを検出する、(73)に記載のシステム。

(75) a) 標的核酸と、b) 増幅プライマーと、c) ポリメラーゼと、d) FEN-1エンドヌクレアーゼと、e) 分析物特異的部分及び非標的的部分を含む非標識合成プローブであって、前記非標的的部分が前記標的核酸に対して実質的に非相補的である非標識合成プローブと、を含む組成物。 40

(76) 標的核酸を分析する方法であって、(75)に記載の組成物を準備する工程と、増幅反応中に前記プローブと前記標的核酸との間に切断構造を形成する工程と、前記プローブを前記FEN-1エンドヌクレアーゼで切断して、前記プローブの前記非標的部分を含む切断産物を生成する工程と、前記切断産物を検出する工程とを含む方法。

(77) 標的核酸を分析する方法であって、a) 合成プローブ及びFEN-1エンドヌクレアーゼの存在下にて、前記合成プローブが増幅反応中に切断されて切断断片を生成する条件下で、標的核酸を増幅する工程であって、前記合成プローブが前記FEN-1エンドヌクレアーゼのためのフットプリントプローブであり、前記フットプリントプローブが分析物特異的部分及び非標的的部分を含み、前記非標的的部分が前記標的核酸に対して実質的に

非相補的であり、前記增幅反応が等温反応である場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記等温反応を実施する温度より少なくとも5 低い前記標的に対する計算T<sub>m</sub> 値を有し、又は前記增幅反応が熱サイクル反応である場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記熱サイクルで用いられる最低温度より少なくとも5 低い前記標的に対する計算T<sub>m</sub> 値を有し、前記フットプリントプローブが副溝バインダー部分を含まない、上記工程と、b) 前記增幅反応中に前記切断断片を検出する工程と、を含む方法。

(78) 前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記等温反応を実施する温度より少なくとも8 低い前記標的核酸に対する計算T<sub>m</sub> 値を有し、又は前記增幅反応が熱サイクル反応である場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記熱サイクルで用いられる最低温度より少なくとも8 低い前記標的核酸に対する計算T<sub>m</sub> 値を有する、(77) に記載の方法。

(79) 前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記等温反応を実施する温度より少なくとも10 低い前記標的に対する計算T<sub>m</sub> 値を有し、又は前記增幅反応が熱サイクル反応である場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記熱サイクルで用いられる最低温度より少なくとも10 低い前記標的に対する計算T<sub>m</sub> 値を有する、(77) に記載の方法。

(80) 標的核酸を分析する方法であって、

a) 核酸二本鎖を含む構造を認識する5'ヌクレアーゼを選択する工程と、

b) 前記5'ヌクレアーゼのためのフットプリント二本鎖長を決定する工程と、

c) 合成フットプリントプローブ及び前記5'ヌクレアーゼの存在下にて、前記合成プローブが標的增幅反応中に切断されて切断断片を生成する条件下で、標的核酸を增幅する工程であって、前記合成プローブが分析物特異的部分及び非標的的部分を含み、前記非標的的部分が前記標的核酸に対して実質的に非相補的であり、前記分析物特異的部分が前記5'ヌクレアーゼ酵素のための前記フットプリント二本鎖長より長くない前記標的核酸とのプローブ-標的二本鎖を形成する工程と、

d) 前記增幅反応中に前記切断断片を検出する工程と、

を含む方法。

(81) 前記標的增幅反応がポリメラーゼ連鎖反応である、(80) に記載の方法。

(82) 前記5'ヌクレアーゼが、天然FEN-1エンドヌクレアーゼ、改変型FEN-1エンドヌクレアーゼ、及び少なくとも1種のFEN-1エンドヌクレアーゼの少なくとも一部を含むキメラタンパク質から成る群から選択される、(80) に記載の方法。

### 【実施例】

#### 【0182】

以下の開示では、以下の略称を使用する：Ex.（実施例）；Fig.（図）；（摂氏温度）；g（重力場）；hr（時間）；min（分）；olio（オリゴヌクレオチド）；rxn（反応）；vol（体積）；w/v（重量/体積）；v/v（体積/体積）；BSA（ウシ血清アルブミン）；CTAB（セチルトリメチルアンモニウムプロミド）；HPLC（高速液体クロマトグラフィー）；DNA（デオキシリボ核酸）；p（プラスミド）；μl（マイクロリットル）；ml（ミリリットル）；ng（ナノグラム）；μg（マイクログラム）；mg（ミリグラム）；M（モル濃度）；mM（ミリモル濃度）；μM（マイクロモル濃度）；pmol（ピコモル）；amol（アトモル）；zmol（ゼットモル）；nm（ナノメートル）；kdal（キロダルトン）；OD（光学密度）；EDTA（エチレンジアミン四酢酸）；FIITC（フルオレセインイソチオシアネート）；FAM（フルオレセイン）；SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）；NaPO<sub>4</sub>（リン酸ナトリウム）；NP-40（Nonidet P-40）；Tris（トリス（ヒドロキシメチル）-アミノメタン）；PMSF（フェニルメチルスルホニルフルオリド）；TBE（トリス-ホウ酸-EDTA、すなわちHClではなくホウ酸で滴定され、EDTAを含有しているトリス緩衝液）；PBS（リン酸緩衝生理食塩水）；PPBS（1mM PMSFを含有しているリン酸緩衝生理食塩水）；PAGE（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）

10

20

30

40

50

; Tween (ポリオキシエチレン - ソルビタン) ; Red 又は RED (REDMOND RED 色素、Epoch Biosciences, Bothell WA) Z 28 (ECLIPSE クエンチャー、Epoch Biosciences, Bothell, WA) ; Promega (Promega, Corp., Madison, WI) ; Glen Research (Glen Research, Sterling, VA) ; Coriell (Coriell Cell Repositories, Camden, NJ) ; Third Wave Technologies (Third Wave Technologies, Madison, WI) ; Microsoft (Microsoft, Redmond, WA) ; Qiagen (Qiagen, Valencia, CA)。

10

### 【0183】

以下の実施例は本発明の特定の好ましい実施形態及び様態を示し、更に例証するためには提供され、その範囲を限定するものとしては解釈されない。

### 【0184】

[実施例 1] PCR 中の INVAADER アッセイにおけるフットプリントプローブの使用

この実施例は、INVAADER アッセイ及び PCR の組み合わせから構成される定量アッセイについて記載する。INVAADER アッセイは、短い分析物特異的領域（例えば 11 又は 12 塩基）を有するフットプリントプローブを用いて実施される。本発明のかかる短い酵素フットプリントプローブの使用により、INVAADER - PCR 組合せアッセイのダイナミックレンジが増加する。任意の特定の機序に限定されるものではなく、また本発明の実施に必須ではないが、INVAADER アッセイ等の侵入的切断アッセイにおいて短い分析物特異的領域を有するプローブを使用することにより、標的検出のダイナミックレンジを増加させることができると考えられている。なぜなら切断されたプローブは PCR 反応に干渉しないためである。例えば、切断されたプローブは、短いため、1) 安定にハイブリダイズせず、それ故 PCR プライマー伸長を阻害しない、そして 2) PCR 反応の一部として不適切に伸長されないと考えられている。

20

### 【0185】

この実施例では、以下の 6 種の標的を用いた：m i R - 2 1 ; m i R - 1 2 6 ; m i R - 2 1 ; m i R - 1 5 5 ; U 6 RNA ; 及び U 2 4 RNA。以下の 10 × オリゴミックスを各標的に用いた：4 μM のリバースプライマー；4 μM のフォワードプライマー；4 μM のプライマー - スタッカー；5 μM のプローブオリゴ；及び 2.5 μM の FRET オリゴ。以下の 10 × 反応緩衝液を各反応に用いた：100 mM の MOPS、pH 7.5；75 mM の MgCl<sub>2</sub>；及び 250 μM の dNTP。200 ng / μL の AfuFEN-1 エンドヌクレアーゼ；1.33 ユニット / μL の Go Taq ポリメラーゼ；80 ユニット / μL の MMLV 逆転写酵素；及び 7 mM の DTT から構成されている 40 × 酵素ミックスも各反応に用いた。

30

### 【0186】

各標的に対する特異的プローブ、プライマー、侵入的オリゴヌクレオチド、及び FRET カセット配列を図 11 に示す。具体的には、図 11 A はヒト m i R - 2 1 標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示し；図 11 B はヒト m i R - 1 5 5 標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示し；図 11 C はヒト m i R - 1 2 6 標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示し；図 11 D はヒト U 6 s n RNA 標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示し；図 11 E はヒト U 2 4 s n RNA 標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示す。図 11 A に関しては、一例として、配列の同一性は以下の通りである：プローブ（配列番号 1）；m i R - 2 1 標的配列（配列番号 2）；フォワードプライマー（配列番号 3）；リバースプライマー / 侵入的オリゴヌクレオチド（配列番号 4）；プライマー - スタッカー（配列番号 5）；及び FRET カセット配列（配列番号 6）。プライマー - スタッカーに関しては（図 11 A ~ C に示す配列番号 5）、この配列は RT - プライマー / マイクロ RNA ハイブリッドを安定化するために機能する。一般に、この配列がないと、検出レベル

40

50

は著しく低下する場合がある（約100倍）。プライマー-スタッカーではなく、ループ状に折り畳まれて5'末端にヘアピンを形成するリバースプライマーを使用することができる。

#### 【0187】

反応は以下のように設定した。各mRNA標的のプレミックスを1pMで調製し、U6及びU24 RNA標的のプレミックスを5pMで調製した。次に1×濃度及び5×希釈の10μLの標的のアリコートを2つずつ96ウェルプレート中に調製した。次に10μLのtRNA標的なし対照（20ng/μL tRNA）を試験する各オリゴミックスに添加した。次いで、反応ミックスを各ウェルに添加し、その反応ミックスは以下の成分から構成されていた：2μLの10×オリゴミックス、2μLの10×反応緩衝液；0.5μLの40×酵素ミックス；及び5.5μLの水。最後にプレートを1200rpmで30秒間回転させ、次いで以下のようにプログラムされたリアルタイムPCRサーモサイクラーに入れた：42 - 30分；95 - 2分；及び40サイクルの（95 - 20秒50 - 45秒60 - 30秒）。データ収集は各50 - 45秒工程の終わりに設定した。

#### 【0188】

データを図12A～Eに示すように蛍光対サイクル数としてプロットした。コピー数対サイクル閾値の最線形回帰（most linear fit）を与える閾値を割り当てる（各図の下方パネル参照）。各標的の結果を以下の図に示す；mIR-155（図12A）；mIR-21（図12B）；mIR-126（図12C）；U6（図12D）；及びU24（図12E）。これらのデータは、本発明の方法を用いて広範な初期標的数にわたって標的RNAの容易且つ迅速な検出を示す。

#### 【0189】

##### [実施例2] PCR-侵入的切断反応の種々の成分の効果

この実施例は、アッセイの種々の成分を試験するために、特定の成分を除く又は含むことを除いて、実施例1と同種のPCR-侵入的切断反応について記載する。この実施例では、以下の標的を使用した：U6 RNA；GA-21-DNA；第5因子DNA；及び第2因子DNA。以下の10×オリゴミックスを各標的のために調製した：4μMのリバースプライマー；4μMのフォワードプライマー；0.4μMの侵入的オリゴ（指示したように特定の条件では省略）；6.7μMのプローブオリゴ；及び2.5μMのFRETオリゴ。以下の構成を有する10×反応緩衝液を各反応に用いた：100mMのMOPS、pH7.5；75mMのMgCl<sub>2</sub>；及び250μMのdNTP（指示したように特定の条件では省略）。200ng/μLのAfufEN-1（指示したように特定の条件では省略）；1.33ユニット/μLのGoTaqポリメラーゼ（天然Taqポリメラーゼ、Promega Corp.）；80ユニット/μLのMMLV逆転写酵素（DNA標的では省略）；及び7mM DTTから構成されていた40×酵素ミックスも各反応に用いた。

#### 【0190】

各標的に対する特異的プローブ、プライマー、侵入的オリゴヌクレオチド、及びFRETカセット配列を図13に示す。具体的には、図13AはU6 DNA標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示し；図13Bは第5因子DNA標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示し；図13Cは第2因子DNA標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示し；図13DはGA-21-R DNA標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示し；図13EはヒトU6 RNA標的を増幅及び検出するためのオリゴヌクレオチド配列を示す。

#### 【0191】

反応は以下のように設定した。1nMの合成標的又は100ngのゲノム標的でプレミックスを調製した。次に1×濃度及び5×希釈の10μLの標的のアリコートを2つずつ96ウェルプレート中に調製した。次に10μLのtRNA標的なし対照ミックス（20ng/μL tRNA）も試験する各オリゴミックスに対して調製した。10μLの反応

ミックスを各ウェルに添加し、その反応ミックスは以下の成分から構成されていた：2  $\mu$  Lの10  $\times$  オリゴミックス、2  $\mu$  Lの10反応緩衝液；0.5  $\mu$  Lの40  $\times$  酶素ミックス；及び5.5  $\mu$  Lの水。次にプレートを1200 rpmで30秒間回転させ、次いで以下のようにプログラムされたリアルタイムPCRサーモサイクラーに入れた：95 - 2分；及び40サイクルの(95 - 20秒 50 - 45秒 60 - 30秒)。データ収集は各50 - 45秒工程の終わりに設定した。

#### 【0192】

データを図14～17に示すように蛍光対サイクル数としてプロットした。第2因子標的の結果を図14A～Dに示す。図14A～Bは、侵入的オリゴヌクレオチド及びFEN-1酵素の両方が存在するこの実施例の結果を示し、図14C～Dは侵入的オリゴヌクレオチド及びFEN-1酵素が存在しない結果を示す。第2因子の各ウェルの標的レベルを以下の表1に示す。ここで用いられる「Cleavase」とは、Afu FEN-1エンドヌクレアーゼを指す。

#### 【表1】

第2因子：ウェル当たりの標的レベル

ウェル番号		標的レベル( $\mu$ g)							
	1	13	25	37	1.00E-06				
	2	14	26	38	1.00E-07				
	3	15	27	39	1.00E-08				
	4	16	28	40	1.00E-09				
	5	17	29	41	1.00E-10				
	6	18	30	42	1.00E-11				
	7	19	31	43	1.00E-12				
	8	20	32	44	1.00E-13				
	9	21	33	45	1.00E-14				
	10	22	34	46	1.00E-15				
	11	23	35	47	1.00E-16				
	12	24	36	48	0.00E+00				
Cleavase	+	+	-	-					
侵入的オリゴ	+	+	-	-					
標的はFII DNAを35サイクルのPCRを行ったPCRアンブリコンの10倍希釈物である 約1 $\mu$ g									

10

20

30

#### 【0193】

第5因子標的の結果を図15A～Fに示す。図15A～Bは、全ての反応成分が存在する実施例の結果を示す。図15C～Dは、侵入的オリゴヌクレオチド及びFEN-1酵素が存在しない結果を示す。図15E～Fは、y軸の最大が60,000ではなく10,000であることを除いて図15C～Dと同じ結果を示す。

#### 【0194】

トウモロコシの導入遺伝子GA-21-R標的の結果を図16A～Dに示す。図16A～Bは、侵入的オリゴヌクレオチド及びFEN-1酵素の両方が存在する実施例の結果を示し、図16C～Dは侵入的オリゴヌクレオチド及びFEN-1酵素が存在しない結果を示す。GA-21-Rの各ウェルの標的レベルを以下の表2に示す。

40

## 【表2】

ウェル当たりのG A - 2 1 - R 標的数

Afu	侵入的オリゴ		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-	-	A	6.00E+10	6.00E+09	6.00E+08	6.00E+07	6.00E+06	6.00E+05	6.00E+04	6.00E+03	6.00E+02	6.00E+01	6.00E+00	0
-	-	B	6.00E+10	6.00E+09	6.00E+08	6.00E+07	6.00E+06	6.00E+05	6.00E+04	6.00E+03	6.00E+02	6.00E+01	6.00E+00	0
+	+	C	6.00E+10	6.00E+09	6.00E+08	6.00E+07	6.00E+06	6.00E+05	6.00E+04	6.00E+03	6.00E+02	6.00E+01	6.00E+00	0
+	+	D	6.00E+10	6.00E+09	6.00E+08	6.00E+07	6.00E+06	6.00E+05	6.00E+04	6.00E+03	6.00E+02	6.00E+01	6.00E+00	0
			標的コピー											
			-／反応											

## 【0195】

U6 標的の結果を図17 A ~ D に示す。図17 A ~ B は、侵入的オリゴヌクレオチド及びFEN-1 酵素が両方存在するこの実施例の結果を示し、図17 C ~ D は侵入的オリゴヌクレオチド及びFEN-1 酵素が存在しない結果を示す。U6 の各ウェルの標的レベルを以下の表3 に示す。ここで用いられる「Cleavase」とは、AfuFEN-1 エンドヌクレアーゼを指す。

## 【表3】

ウェル当たりのU6 RNA 標的数

切断酵素	侵入型オリゴ													
-	-	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	
-	-	W13	W14	W15	W16	W17	W18	W19	W20	W21	W22	W23	W24	
+	+	W25	W26	W27	W28	W29	W30	W31	W32	W33	W34	W35	W36	
+	+	W37	W38	W39	W40	W41	W42	W43	W44	W45	W46	W47	W48	
切断酵素	侵入型オリゴ	反応当たりの反応当たりの												
-	-	U6コピー												
-	-	6.00E+09	6.00E+08	6.00E+07	6.00E+06	6.00E+05	6.00E+04	6.00E+03	6.00E+02	60	6.0	0.6	-	
-	-	6.00E+09	6.00E+08	6.00E+07	6.00E+06	6.00E+05	6.00E+04	6.00E+03	6.00E+02	60	6.0	0.6	-	
+	+	6.00E+09	6.00E+08	6.00E+07	6.00E+06	6.00E+05	6.00E+04	6.00E+03	6.00E+02	60	6.0	0.6	-	
+	+	6.00E+09	6.00E+08	6.00E+07	6.00E+06	6.00E+05	6.00E+04	6.00E+03	6.00E+02	60	6.0	0.6	-	

## 【0196】

上記結果を鑑みて、ポリメラーゼ酵素が5'ヌクレアーゼ活性を含む場合でさえも、FEN-1 酵素及び侵入的オリゴが存在しないときには実質的にシグナルが生じないことが明らかである。

## 【0197】

[実施例3] PCR 中にSNP を検出するために構成されたINVADE R アッセイにおける短いプローブの使用

この実施例は、遺伝子型同定のためにPCR中に実施される侵入的切断アッセイにおける短い分析物特異的領域(この実施例では12塩基)を有するプローブの使用について記載する。この実施例における標的は第5因子である。第5因子のSNPを検出するための特異的プローブ、プライマー、侵入的オリゴヌクレオチド、及びFRET カセット配列を図5に示す。

## 【0198】

野性型及び突然変異体反応を以下のように設定した。ゲノムDNA(1ng/μL)又はtRNA 標的なし対照(20ng/μL tRNA)の10μLのアリコートを96ウェルプレートに入れた。10μLの反応混合物を各ウェルに添加し、ここで前記反応混合物(並びに40×酵素ミックス)は実施例1に記載の通りである。10×オリゴ混合物(反応混合物の一部)は、表4に示す以下の配列で構成されている。

10

20

30

40

## 【表4】

## 10×オリゴミックス

	10×Q-INVADER FV オリゴミックス	10X 濃度 ( $\mu$ M)
	オリゴ番号	
2749-70-07		4
2749-70-06		4
2749-70-05		0.4
2749-70-04		5
2749-70-03		5
Arm 6 FAM FRET		2.5
Arm 4 Yellow FRET		2.5

10

## 【0199】

プレートを1200 rpmで30秒間回転させ、以下のようにプログラムされたリアルタイムPCRサーモサイクラーに入れた：95 - 2分；及び50サイクルの(95 - 20秒 52 - 60秒)。データを各52 - 45秒工程の終わりに収集した。

## 【0200】

図6に示すように、データを蛍光データ対サイクルとしてプロットする。突然変異体標的検出の結果を図6Aに示し、野性型標的検出の結果を図6Bに示し、不均一な標的検出の結果を図6Cに示す。各標的について、各遺伝子型に対する最小交差反応性を与えるサイクル閾値( $C_t$ )を割り当てる。Ludererら, Clinical Chemistry 50, No. 4 (2004) : 787-788に記載されているTAQMANアッセイを用いた同じ対立遺伝子の検出のデータを図6D~Fに示す。

20

## 【0201】

図7は、ここに記載のように、フットプリントプローブを用いるPCR+侵入的切断におけるFAM  $C_t$ 対Yellow  $C_t$ のスキャッタープロット(パネルB)と比べた、Ludererらのデータのスキャッタープロット(パネルA)を示す。遺伝子型は $C_t$ 色素割当に基づいて決定される。パネルA及びBの両方において、突然変異体はプロットの上方左角に示され、野性型はプロットの下方右角に示される。パネルAでは、不均一な標的の結果を上方右側に示し、一方パネルBでは、不均一な標的の結果をプロットの下方左角に示し、標的なし対照は同様に逆側である(パネルAの下方左側、及びパネルBの上方右角)。

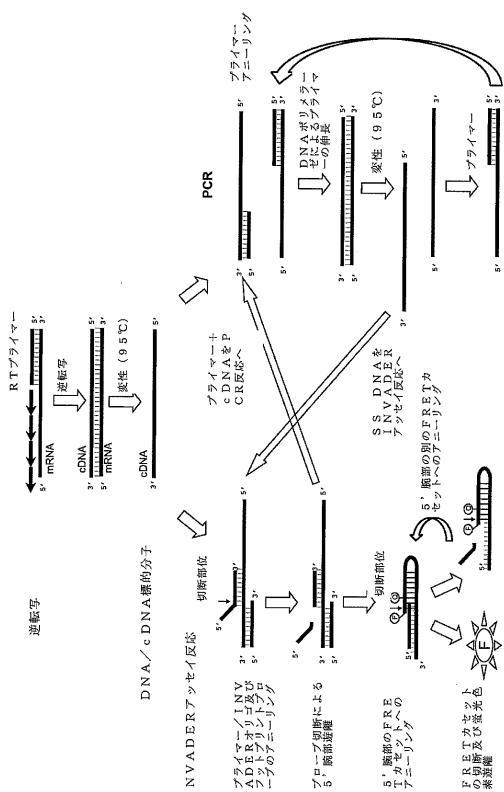
30

## 【0202】

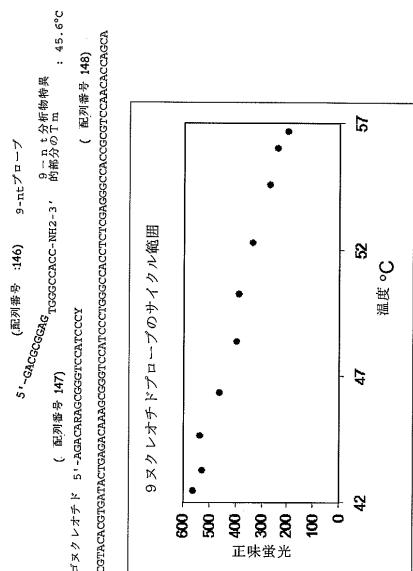
上記明細書で言及された全ての刊行物及び特許を参考することにより本明細書に援用する。本発明の趣旨及び範囲を逸脱することなく記載されている本発明の組成物及び方法の種々の修正及び変形は当業者に明らかである。本発明は特に好ましい実施形態に関連して記載しているが、本発明はかかる特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことを理解すべきである。実際、関連分野の当業者に明らかである本発明を実施するために記載されている方法の種々の修正は、以下の特許請求の範囲の範囲内であることが意図される。

40

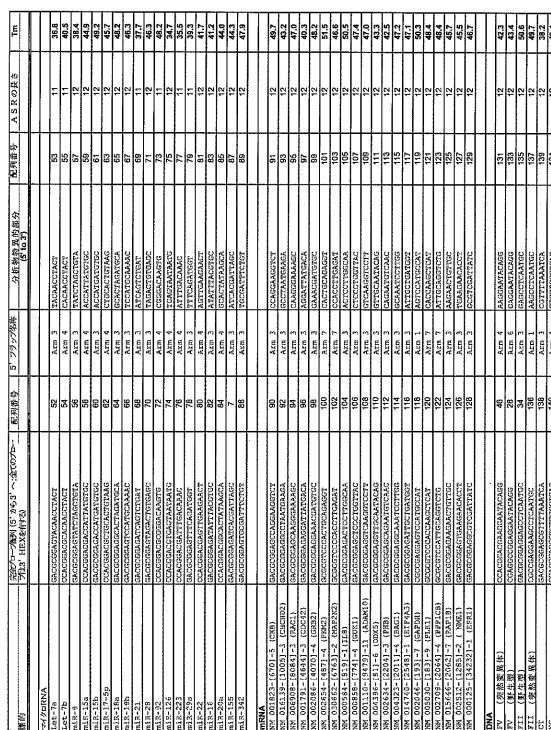
【図1】



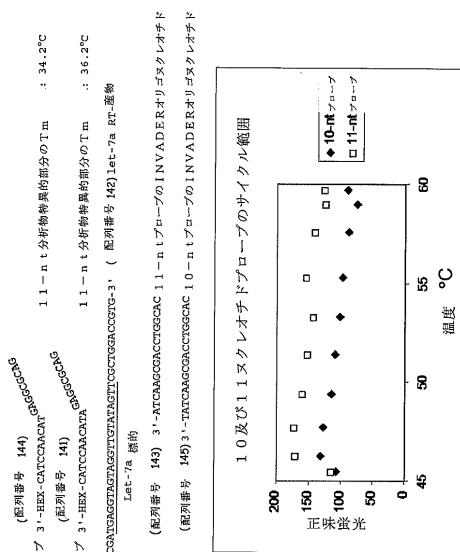
## 【図2B】



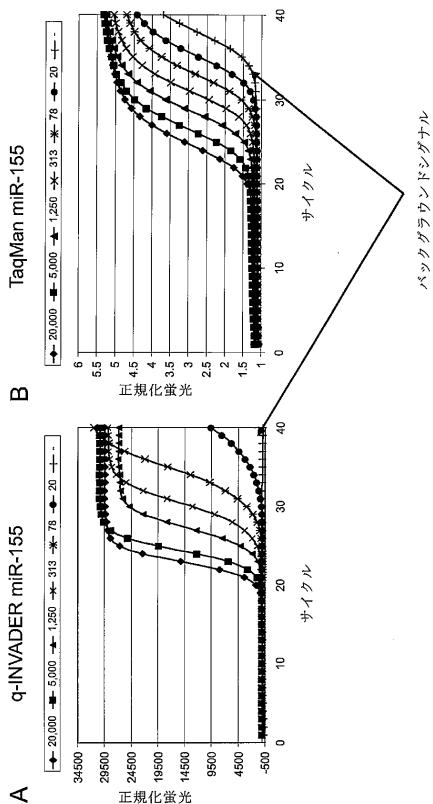
【 四 3 】



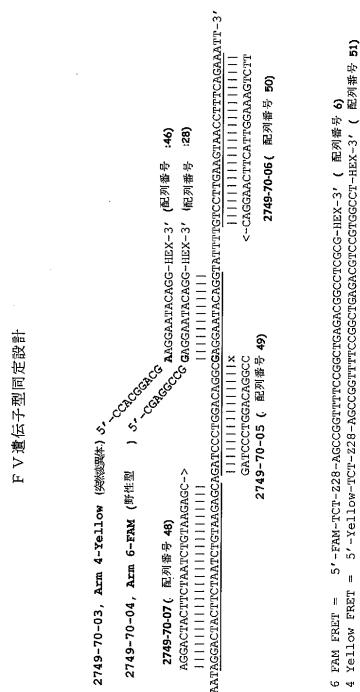
## 【図2A】



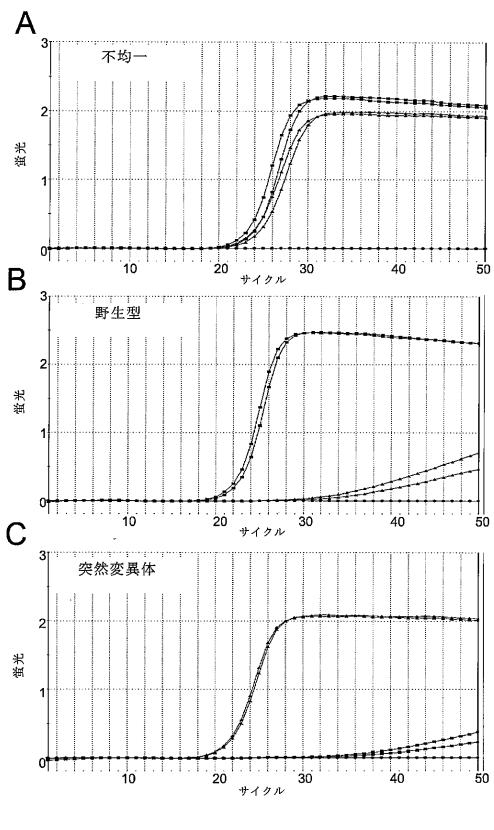
【図4】



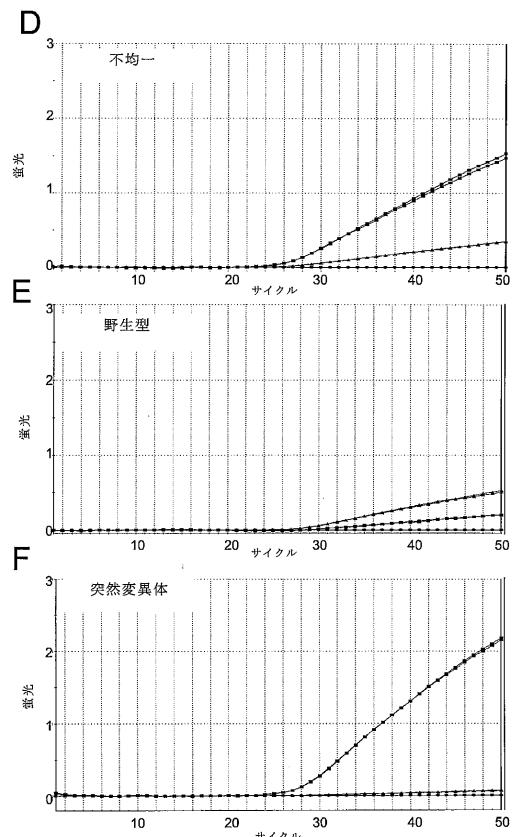
【 四 5 】



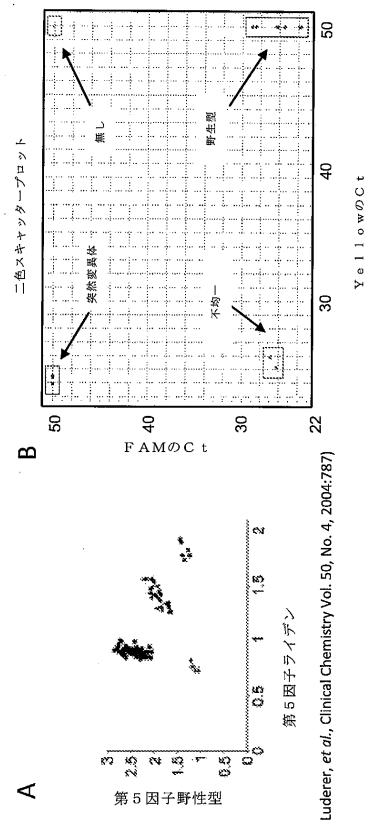
### 【図 6 - 1】



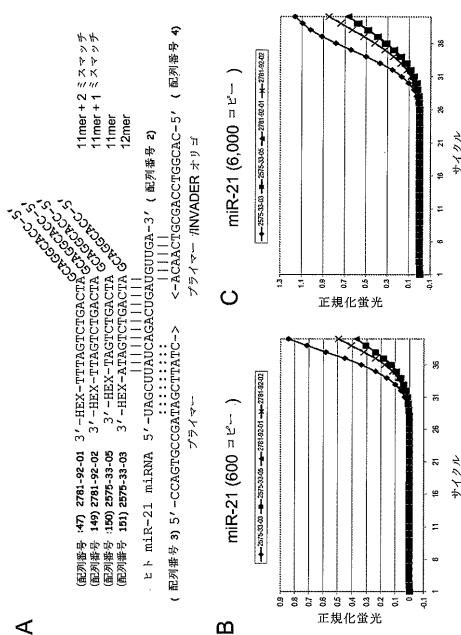
### 【図 6 - 2】



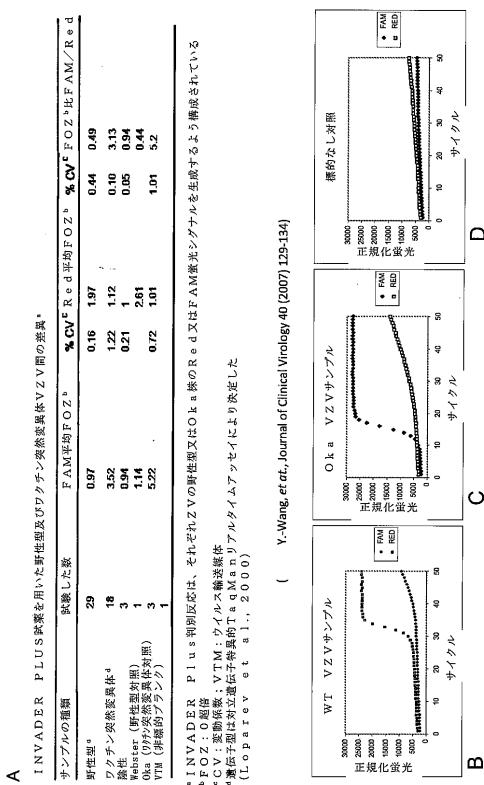
【 四 7 】



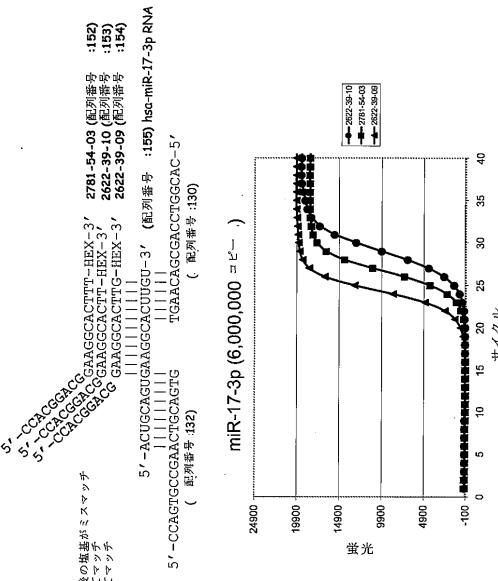
【 図 9 】



【 义 8 】



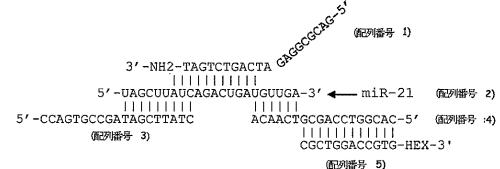
【図10】



VAL(非標的ランク) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

【 図 1 1 - 1 】

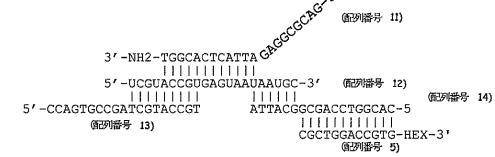
#### A. ヒト miR-21 設計



## B. ヒト miR-155 設計



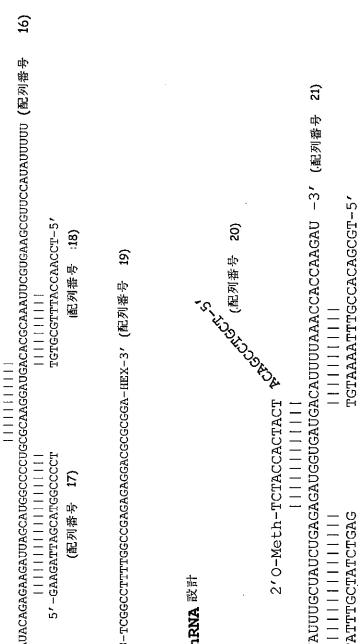
### C. ヒト -miR-126 設計



FRET: miR-21,155 および 126

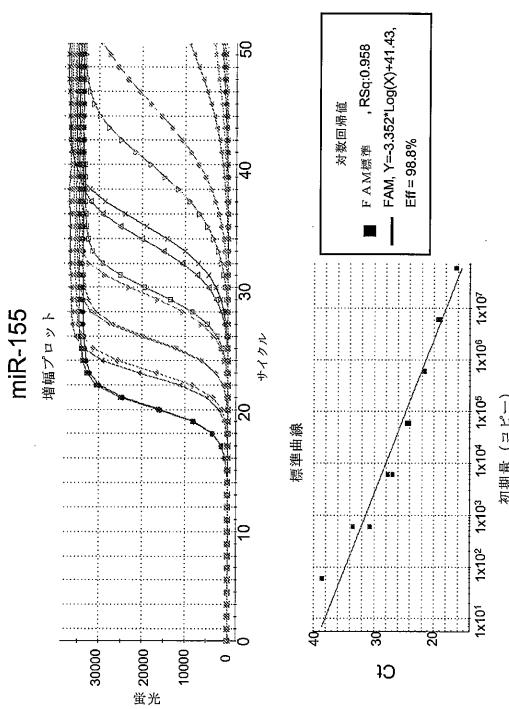
5' - FAM-TCT-Z28-AGCCGGTTTCCGGCTGAGACTCCGCGTCCGT-HEX-3' (序列番号 6)

### 【 図 1 1 - 2 】

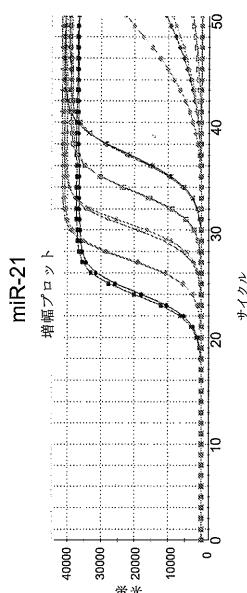


REDB-TC-TCT-222-8-TGGCCGAGAGATGTCGAGCT-HEX-3' (配列番号: 24)

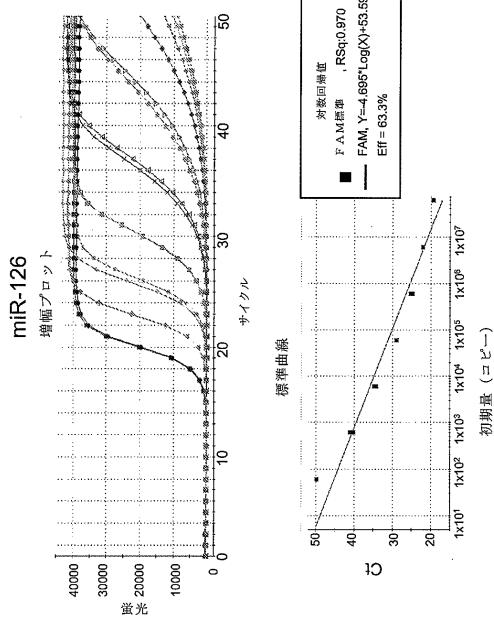
【 12A 】



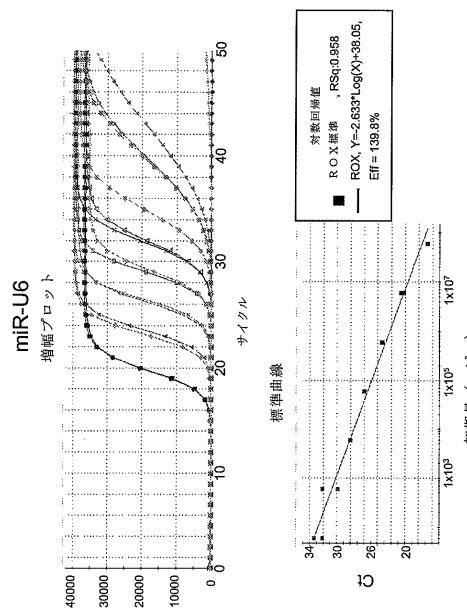
( 12 B )



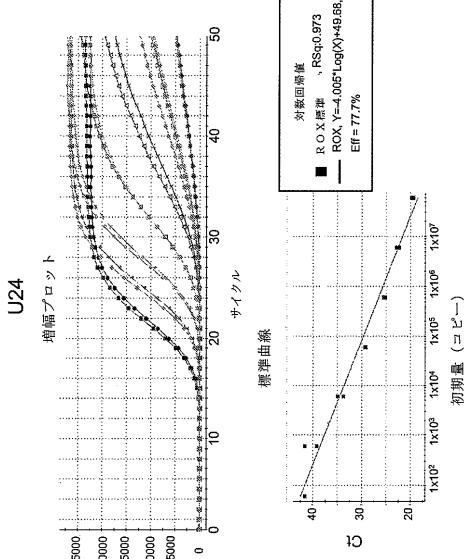
【図12C】



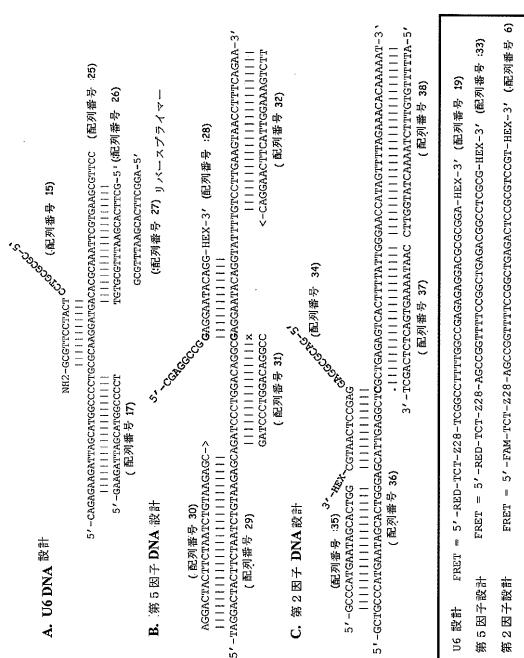
【図12D】



【図12E】

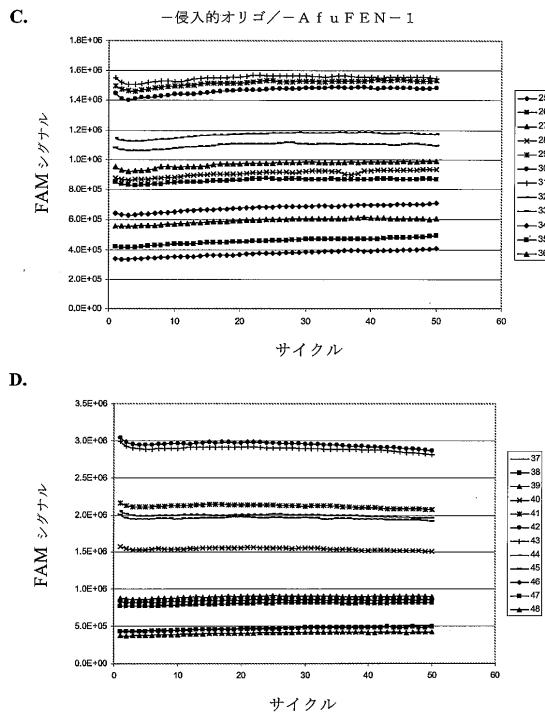


### 【図 1.3 - 1】

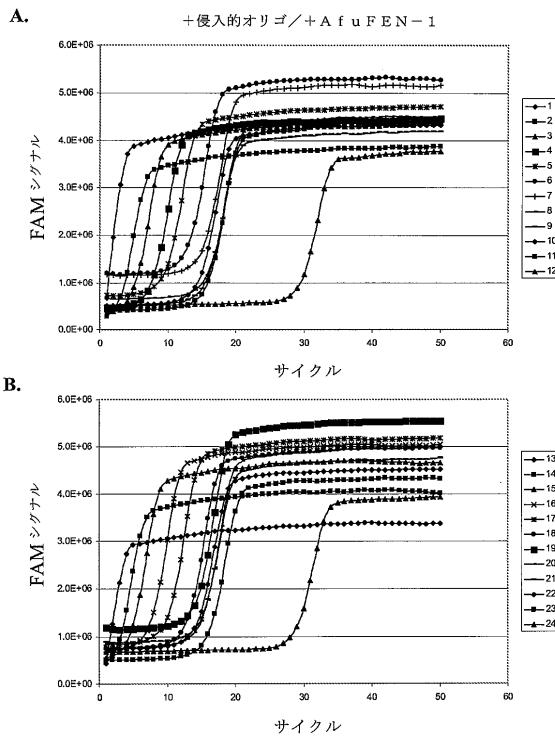


【図 1-3-2】

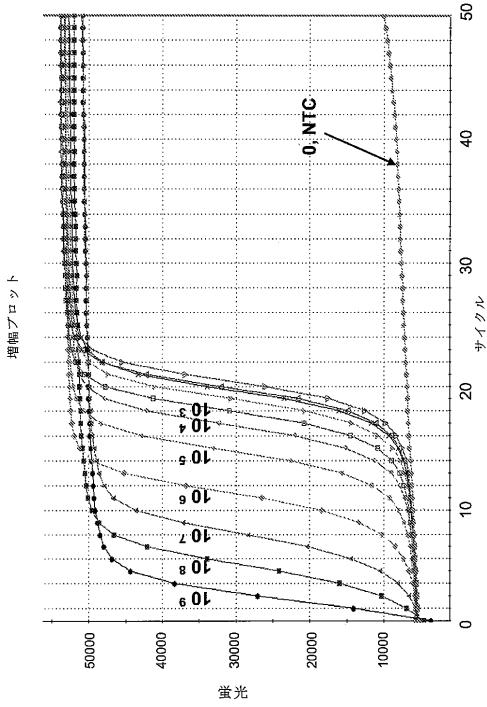
【図 1-4-2】



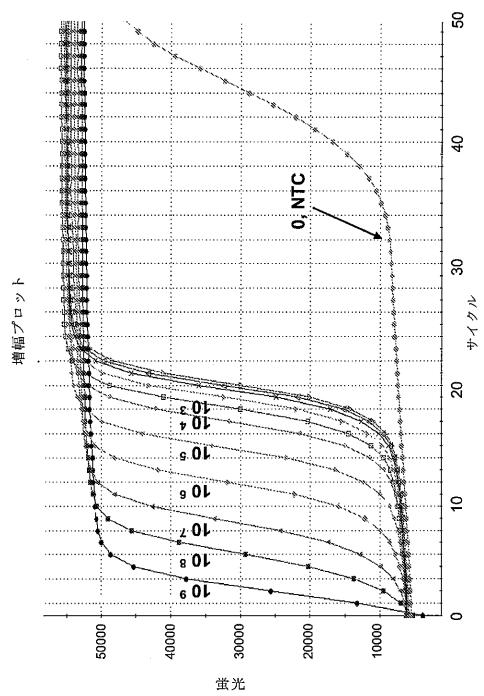
【図 1-4-1】



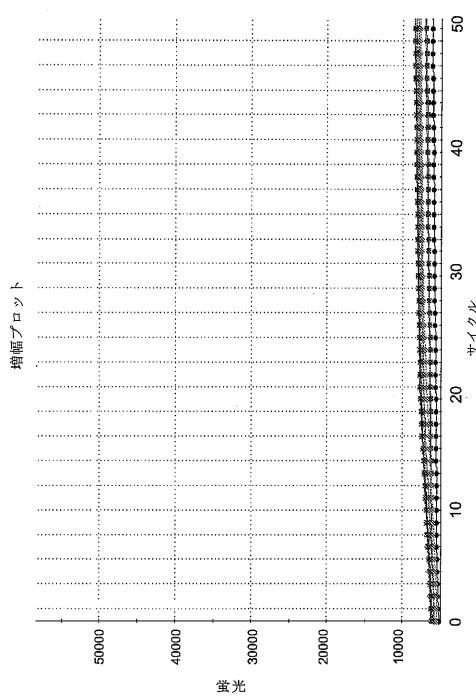
【図 15A】



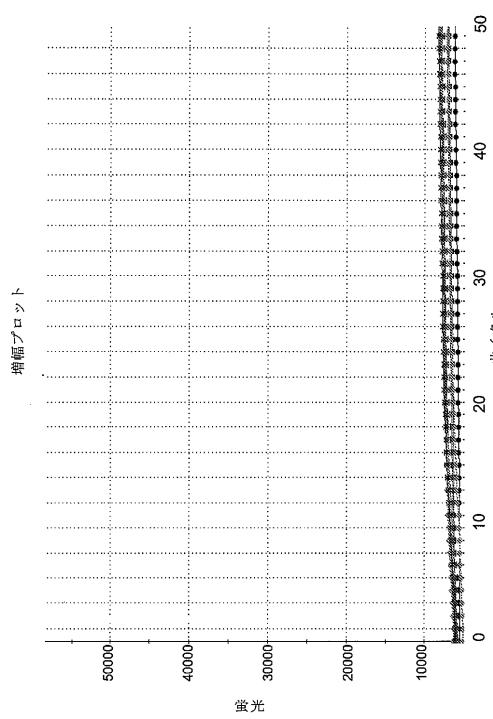
【図15B】



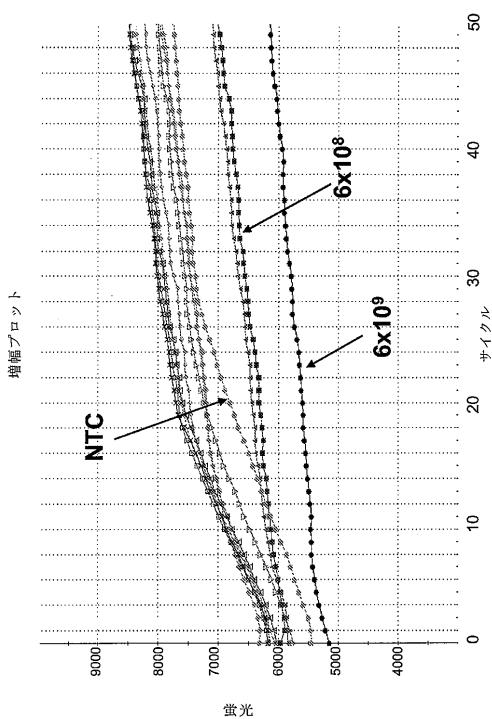
【図15C】



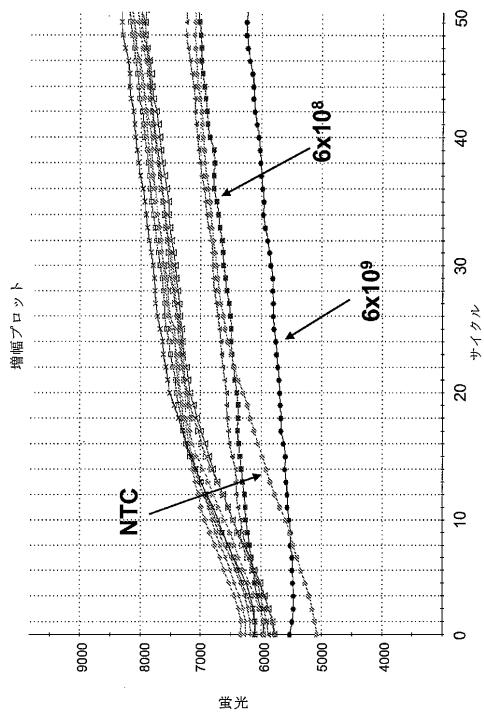
【図15D】



【図15E】



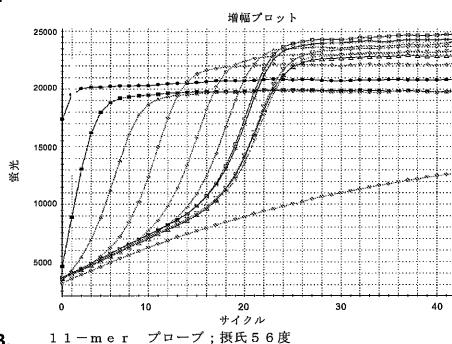
【図15F】



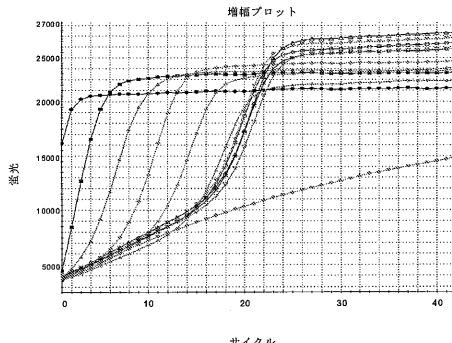
【図16-1】

+侵入的オリゴ/+A f u F E N - 1

A. 10-mer プローブ; 摂氏56度



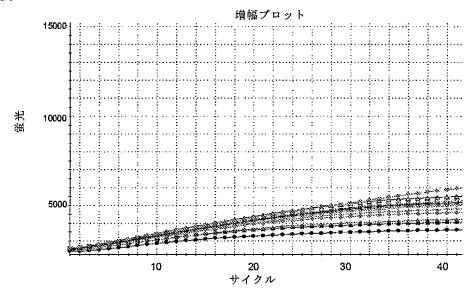
B. 11-mer プローブ; 摂氏56度



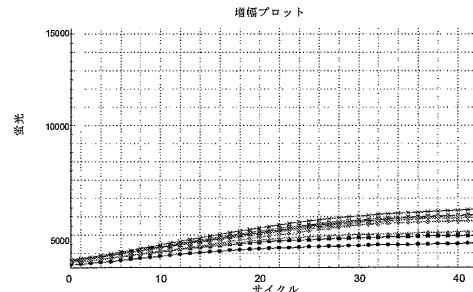
【図16-2】

-侵入的オリゴ/-A f u F E N - 1

C. 10-mer プローブ; 摂氏56度



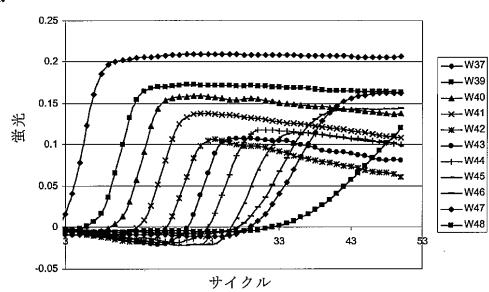
D. 11-mer プローブ; 摂氏56度



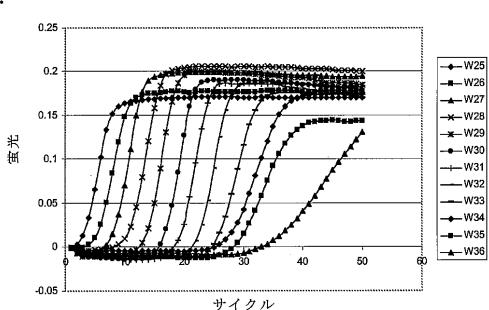
【図17-1】

+侵入的オリゴ/+A f u F E N - 1

A.



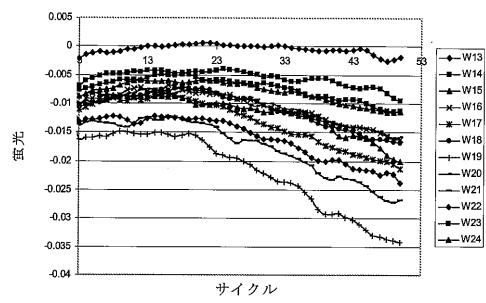
B.



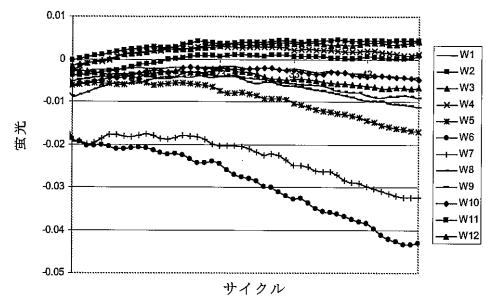
## 【図 1 7 - 2】

- 侵入的オリゴノ- A f u F E N - 1

C.



D.



## 【配列表】

0005651022000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 アラワイ , ハテム , ティー .

アメリカ合衆国 53719 ウィスコンシン州 , マディソン , クオーツ レーン 2325

(72)発明者 リヤミチョフ , ヴィクター , アイ

アメリカ合衆国 53711 ウィスコンシン州 , マディソン , キャリーデイル コート 252

3

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 米国特許出願公開第2006/0147955(US, A1)

特表2003-513639(JP, A)

米国特許出願公開第2006/0110748(US, A1)

J Clin. Microbiol., 2006, 44(9), pp.3443-3447

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00 - 15/90

CAPLUS / MEDLINE / BIOSIS (STN)

JSTPLUS / JMEDPLUS / JST7580 (JDreamIII)