

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3779144号

(P3779144)

(45) 発行日 平成18年5月24日(2006.5.24)

(24) 登録日 平成18年3月10日(2006.3.10)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 Q 1/68 (2006.01)
 G O 1 N 21/78 (2006.01)
 G O 1 N 33/50 (2006.01)
 G O 1 N 33/566 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 1 2 Q 1/68 A
 G O 1 N 21/78 C
 G O 1 N 33/50 P
 G O 1 N 33/566

請求項の数 10 外国語出願 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2000-291720 (P2000-291720)
 (22) 出願日 平成12年9月26日(2000.9.26)
 (65) 公開番号 特開2001-161377 (P2001-161377A)
 (43) 公開日 平成13年6月19日(2001.6.19)
 審査請求日 平成13年9月5日(2001.9.5)
 (31) 優先権主張番号 09/406074
 (32) 優先日 平成11年9月27日(1999.9.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 595117091
 ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパ
 ニー
 BECTON, DICKINSON A
 ND COMPANY
 アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー O
 7 4 1 7 - 1 8 8 0 フランクリン・レイ
 クス ベクトン・ドライブ 1
 1 BECTON DRIVE, FRA
 NKLIN LAKES, NEW JE
 RSEY O 7 4 1 7 - 1 8 8 0, UN
 ITED STATES OF AMER
 ICA

(74) 代理人 100099623
 弁理士 奥山 尚一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸検出のための万能プローブおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リポータープローブと、アダプターオリゴヌクレオチドとを含んでなるシグナルプライマーであって、

a) 前記リポータープローブは、相補的配列とハイブリッド形成していない場合には、Gカルテット、ヘアピン、三重らせん、ランダムコイルからなる群から選択されるコンフォメーション構造を取り、ここで、前記コンフォメーション構造は、リポータープローブに結合された蛍光ドナー/消光剤色素対を空間的に十分近接させ、ドナー蛍光を消光させる

b) 前記アダプターオリゴヌクレオチドは、前記リポータープローブにハイブリッド形成している部分と、標的配列に相補的な一本鎖部分とを含む

ことを特徴とするシグナルプライマー。

【請求項 2】

リポータープローブにハイブリッド形成している前記部分が、標的に相補的な配列の一部を含む請求項 1 に記載のシグナルプライマー。

【請求項 3】

a) シグナルプライマーと標的配列とをハイブリッド形成させるステップと、ここで、シグナルプライマーは、相補的配列とハイブリッド形成していない場合には二次構造を形成するリポータープローブと、二次構造の形成が阻害される様にリポータープローブとハイブリッド形成させたアダプターオリゴヌクレオチドとを含み、

b) 標的に依存する方法で、アダプターオリゴヌクレオチドからリポータープローブを分離するステップと、

c) 標的配列の存在の指標として二次構造の形成を検出するステップとを含む核酸標的配列の検出方法。

【請求項 4】

二次構造の形成が、蛍光の変化により検出される請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

リポータープローブがドナー/消光剤色素対により標識され、二次構造の形成がドナー蛍光の減少により検出される請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

前記シグナルプライマーの前記アダプターオリゴヌクレオチドが、前記レポータープローブへのハイブリッド形成のためのアダプター配列を含み、ここで、前記アダプター配列は、第二の標的配列の検出のための第二のシグナルプライマーに含まれる第二のアダプターオリゴヌクレオチドのアダプター配列に同一である請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

a) シグナルプライマーを標的配列とハイブリッド形成させるステップと、ここで、シグナルプライマーは第二のオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成されたアダプターオリゴヌクレオチドを含み、第二のオリゴヌクレオチドは、相補的配列とハイブリッド形成していない場合には二次構造を形成するリポータープローブと相補的であり、

b) 標的に依存する方法で、アダプターオリゴヌクレオチドから第二のオリゴヌクレオチドを分離するステップと、

c) 標的配列の存在の指標として二次構造の形成を検出するステップとを含む核酸標的配列の検出方法。

【請求項 8】

第二のオリゴヌクレオチドとリポータープローブのハイブリッド形成が、蛍光の変化により検出される請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

リポータープローブがドナー/消光剤色素対により標識され、第二のオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成がドナー蛍光の増加により検出される請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

前記シグナルプライマーの前記アダプターオリゴヌクレオチドが、第二のオリゴヌクレオチドにハイブリッド形成するためのアダプター配列を含み、ここで、前記アダプター配列は、第二の標的配列の検出のための第二のシグナルプライマーに含まれる第二のアダプターオリゴヌクレオチドのアダプター配列に同一である請求項 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸標的配列を検出するための材料と方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

標識オリゴヌクレオチドプローブの配列特異性ハイブリッド形成は、選択されたヌクレオチド配列の検出および同定の手段として長い間利用されてきた。蛍光標識によるこのようなプローブの標識方法は、プローブのハイブリッド形成の検出を助ける比較的鋭敏な非放射性手段を提供してきた。最近開発された検出方法は、プローブのハイブリッド形成の検出に蛍光強度を直接検出するのではなく、蛍光エネルギー移動 (fluorescence energy transfer; FET) の方法を利用している。蛍光エネルギー移動は、ドナー蛍光体と消光剤色素 (蛍光体でも、蛍光体でなくてもよい。) の間で発生し、一方 (消光剤) の吸収スペクトルがもう一方 (ドナー) の発光スペクトルとオーバーラップし、この2つの色素が近接したときに発生する。これらの特性を有する色素は、ドナー/消光剤色素対またはエネルギー移動色素対と呼ばれる。ドナー蛍光体の励起状態エネルギーは、共鳴双極子により引き起こさ

10

20

30

40

50

れる双極子相互作用により、近くの消光剤に移動される。その結果、ドナー蛍光体の消光が起こる。場合によっては、消光剤も蛍光体の場合、その蛍光強度が増強されることもある。エネルギー移動効率は、ドナーと消光剤の距離に高度に依存しており、これらの関係を予測する式がForster(1948. *Ann. Phys.* 2, 55-75)により開発されている。エネルギー移動効率が50%であるドナーと消光剤色素の距離はForster距離(R_0)と呼ばれる。蛍光消光の機序として他に、例えば、電荷移動消光および衝突消光等がある。

【0003】

近接する2つの色素の相互作用により消光を引き起こすことに基づくエネルギー移動とその他の機序は、均一方式で実施できるため、ヌクレオチド配列を検出または同定する魅力的な手段である。均一分析方式は、1つの蛍光体標識の蛍光の検出に基づく従来のプローブハイブリッド形成分析法よりも簡単である。なぜならば、一般に、不均一分析はハイブリッド形成していない遊離標識からハイブリッド形成した標識を分離する更なるステップを必要とするからである。典型的には、FETおよび関連方法は、2つの相補的オリゴヌクレオチドがハイブリッド形成により結合された時に、一方または両方の色素標識の蛍光特性の変化を監視することに基づくものである。この方式において、蛍光特性の変化は、エネルギー移動量の変化として、あるいは蛍光消光量の変化として測定され、典型的には、一方の色素の蛍光強度の増加として示される。この方法においては、ハイブリッド形成しないオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成したオリゴヌクレオチドを分離せずに、目的のヌクレオチド配列を検出することが可能である。一方はドナー蛍光体で、もう一方は消光剤で標識された2つの別々の相補的オリゴヌクレオチドの間でハイブリッド形成を生じることができる。一本鎖オリゴヌクレオチドと比べ、二本鎖型ではドナー蛍光の減少(消光の増加)および/またはエネルギー移動の増加が起こる。FETハイブリッド形成分析法に関する幾つかの方式が、*Nonisotopic DNA Probe Techniques*(1992. Academic Press, Inc., pags. 311-352)に概説されている。あるいは、オリゴヌクレオチドがハイブリッド形成していない場合と、相補的配列とハイブリッド形成した場合とで、一方または両方の蛍光特性に検出可能な差が生じるように、ドナーと消光剤を1つのオリゴヌクレオチドに結合させることができる。この方式においては、典型的には、オリゴヌクレオチドがハイブリッド形成するとドナー蛍光は増加し、エネルギー移動/消光は減少する。例えば、両端に標識された自己相補的オリゴヌクレオチドがヘアピン構造を形成すると、これによって2つの蛍光体(即ち、5'末端と3'末端)が近接し、エネルギー移動と消光が起こる。自己相補的オリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドの中の相補的配列がハイブリッド形成すると、ヘアピン構造は破壊され、2つの色素間距離が拡大するため消光は減少する。ヘアピン構造の欠点は、安定性が非常に高く、非消光ハイブリッド形成型への変換がしばしば遅く、僅かにそちらに偏るだけで、一般的に性能は低い。TyagiおよびKramer(1996. *Nature Biotech.* 14, 303-308)は、ステムを形成するヘアピン構造の自己相補的アームの間のループ中に検出配列を含む上記の様に標識されたヘアピン構造を報告している。塩基対合したステムは、検出配列が標的とハイブリッド形成し、消光の減少を引き起こすためには融解しなくてはならない。「二重ヘアピン」プローブとそれを利用する方法が、B. Bagwell, et al. (1994. *Nucl. Acids Res.* 22, 2424-2425; 米国特許No.5,607,834)に報告されている。これらの構造はヘアピン構造内に標的結合配列を含んでおり、従って、標的とヘアピン構造の自己相補的配列との間に競合的ハイブリッド形成が関与している。Bagwellは、ミスマッチによりヘアピン構造を不安定化させることにより、不利なハイブリッド形成速度論の問題を解決している。

【0004】

核酸増幅を検出するためにエネルギー移動またはその他の蛍光消光の機序を利用する均一方法も報告されている。L. G. Lee, et al. (1993. *Nucl. Acids Res.* 21, 3761-3766)は、PCR中に標的増幅に特異的に二重標識検出プローブが切断されるリアルタイム検出方法を開示している。検出プローブが増幅プライマーの下流でハイブリッド形成されると、Taqポリメラーゼの5'-3'エキソヌクレアーゼ活性が検出プローブを消化し、エネルギー移動対を形成する2つの蛍光色素を分離する。

10

20

30

40

50

【0005】

増幅プライマーのハイブリッド形成部位下流の標的配列とハイブリッド形成するシグナルプライマー(しばしば検出プローブとも呼ばれる。)が、核酸増幅の均一検出法に関して報告されている(米国特許No.5,5547,861、引用する事により本明細書の一部を成す事とする)。シグナルプライマーは、増幅プライマーの伸長と同様の方法で、ポリメラーゼにより伸長される。増幅プライマーの伸長により、標的の増幅に従属して、シグナルプライマーの伸長生成物が置換され、標的増幅の指標として検出可能な二本鎖二次増幅生成物が生成される。一本鎖シグナルプライマーと共に利用するための均一検出方法の例が、米国特許No.5,550,025(親油性色素と制限部位を含む)と米国特許No.5,593,867(蛍光偏光検出法)に記載されている。より最近では、FET法を用いる核酸と標的の検出用にシグナルプライマーが改変されている。米国特許No.5,691,145に、一本鎖シグナルプライマーの標的結合配列の5'末端にドナー/消光剤色素対を付着させたGカルテット構造が開示されている。標的増幅時に相補的鎖が合成されると、Gカルテット構造が展開され、ドナーと消光剤色素間の距離が広がり、ドナー蛍光に検出可能な増加が生じる。ドナー/消光剤色素対で標識された一部が一本鎖、一部が二本鎖のシグナルプライマーも最近報告されている。例えば、EP 0 878 554 には、一本鎖制限エンドヌクレアーゼ認識部位を挟むドナー/消光剤色素対を有するシグナルプライマーが開示されている。標的が存在すると、制限部位は二本鎖となり、制限エンドヌクレアーゼにより切断可能となる。切断により色素対は分離され、ドナー消光が減少する。EP 0 881 302に、分子間塩基対合構造を付けたシグナルプライマーが報告されている。分子間塩基対合構造に結合されたドナー/消光剤色素対のドナー色素は、その構造が折り畳まれている時は消光しているが、標的が存在すると、分子間塩基対合構造と相補的配列が合成される。これによって、分子間塩基対合構造は展開され、ドナーと消光剤色素は分離され、ドナー消光の減少を引き起こす。Nazarenko, et al.(米国特許No.5,866,336)により、類似の方法が報告されており、この場合、増幅プライマーがドナー/消光剤色素対を有するヘアピン構造により形成されている。

10

20

【0006】

エネルギー移動およびその他の蛍光消光検出方法は、特異的プローブのハイブリッド形成による標的配列の検出にも応用されている。日本特許No.93015439 Bに、エネルギー移動対を形成する2つの標識を付けた一本鎖ポリヌクレオチドプローブと一本鎖標的をハイブリッド形成させる事により、ポリヌクレオチドを測定する方法が開示されている。二本鎖ハイブリッドは、制限酵素により標識間で切断され、標識の一方の蛍光が測定される。この方法の欠点は、プローブ中の制限部位が、検出される標的配列の中にも存在しなくてはならない点である。S. S. Gosh, et al.(1994. Nucl. Acids Res. 22, 3155-3159)が、蛍光共鳴エネルギー移動を用いて分析される、制限酵素により触媒される蛍光体標識オリゴヌクレオチドの切断を報告している。これらの分析において、相補的オリゴヌクレオチドがハイブリッド形成されると、二本鎖制限部位を生じ、2つの鎖にそれぞれ蛍光体標識が1つつ付いている。

30

【0007】

(発明の概要)

本発明は、核酸標的配列を検出するためにシグナルプライマーを利用している。シグナルプライマーは、2つのオリゴヌクレオチドから成り、一部一本鎖、一部二本鎖である。第一のオリゴヌクレオチドは、アダプターオリゴヌクレオチドと呼ばれる。アダプターオリゴヌクレオチドは、アダプターオリゴヌクレオチドの3'末端が標的配列とハイブリッド形成する一本鎖尾部領域を形成する様に、相補的な第二のオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成している。標的配列とハイブリッド形成する一本鎖3'尾部の部分は、標的結合配列と呼ばれる。標的結合配列と3'一本鎖尾部の5'方向のアダプターオリゴヌクレオチドの領域は、シグナルプライマーが標的とハイブリッド形成するための選択された反応条件下で第二のオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成し、分子間塩基対合した、一部二本鎖のシグナルプライマー分子を形成する。第二のオリゴヌクレオチドがハイブリッド形成するアダプターオリゴヌクレオチドの配列(5'アダプター配列)は、標的とハイブリッド形

40

50

成しない配列から成る。5'アダプター配列は、異なる標的結合配列を持つ多様なアダプターオリゴヌクレオチドにおいて同一となるように選択できる(すなわち「万能」(universal)5'アダプター配列)。これによって、下記の様に、種々の標的の検出が簡易化される。

【0008】

従って、本発明のシグナルプライマーの利点は、第二のオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成するための共通の5'アダプター配列をアダプターオリゴヌクレオチドの中に異なる標的結合配列を種々の標的結合配列に結合することができるため、種々の標的配列の検出に単一の標識リポータープロープ(下記)が利用できる点である。これによって、リポータープロープの合成が簡易化され、それにかかる費用が削減される。アダプターオリゴヌクレオチドは、異なる標的を認識する標的結合配列を持たなくてはならないが、本発明において利用するためにラベリングする必要がないため、リポータープロープよりも合成が簡単で、費用がかからない。

10

【0009】

本明細書に使用されている幾つかの用語を以下の様に定義する。

増幅プライマーは、プライマー伸長による標的配列の増幅のためのプライマーである。SDAの場合、増幅プライマーの3'末端(標的結合配列)は、標的配列の3'末端でハイブリッド形成する。増幅プライマーは、その5'末端付近に制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含む。米国特許No.5,455,166;米国特許No.5,270,184およびEP 0 674 315に記載されているように、認識部位は、認識部位が半修飾(「ニックング」)された時、DNA二重らせんの鎖の1本を切断する制限エンドヌクレアーゼのためのものである。半修飾された認識部位は、1本の鎖に少なくとも1個の誘導されたヌクレオチドが含まれており、その誘導されたヌクレオチドが、制限エンドヌクレアーゼに認識部位の両方の鎖の切断ではなく、2本の鎖の内1本のニックングを引き起こす、制限エンドヌクレアーゼの二本鎖認識部位である。増幅プライマーは、3'-OH基も含み、これは、増幅プライマーの標的結合配列が標的配列とハイブリッド形成すると、DNAポリメラーゼにより伸長可能である。大多数のSDA反応に関して、増幅プライマーは標的配列の指数的増幅に関与している。

20

【0010】

増幅反応を誘導するために、特別な配列または構造は必要ないので、PCRの増幅プライマーは標的結合配列のみから成る。これと対照的に、3SRとNASBAの増幅プライマーは、5'末端付近にRNAポリメラーゼプロモーターを含む。プロモーターは、標的配列に付けられ、標的の複数のRNAコピーの転写を命令することにより、増幅反応を引き起こす働きをする。

30

【0011】

伸長生成物は、プライマーまたはプライマーの一部およびプライマー結合部位下流の標的配列と相補的な新しく合成された鎖を含む核酸である。伸長生成物は、標的配列とプライマーのハイブリッド形成と、標的配列を鋳型として用いるポリメラーゼによるプライマーの伸長の結果生じる。

【0012】

標的または標的配列という言葉は、増幅または検出される核酸配列を意味する。これらには、増幅される元の核酸配列、その相補的鎖および複製または増幅により生成される元の配列のコピーの両鎖が含まれる。標的配列は、ハイブリッド形成されるプライマーの伸長の鋳型とも呼ばれる。

40

【0013】

本発明のシグナルプライマーは、2つのオリゴヌクレオチドを含む。シグナルプライマーにおいて、第一のオリゴヌクレオチド(アダプターオリゴヌクレオチド)の標的配列とハイブリッド形成する一本鎖3'「尾部」を形成する様に、オリゴヌクレオチドがハイブリッド形成している。第二のオリゴヌクレオチドは、標的結合配列に隣接する5'方向にある第一のオリゴヌクレオチドにおいて5'アダプター配列と塩基対合(すなわちハイブリッド形成)している。本明細書に使用されている様に、「標的結合配列に隣接する5'方向」という言葉は、標的結合配列の全てまたは一部が3'尾部に一本鎖のままで残っており、標的

50

とハイブリッド形成するために利用可能であることを意味する。すなわち、シグナルプライマーにおいて、標的結合配列の一部が隣接する二本鎖部分の分子間塩基対合に関与していても、標的結合配列全体が一本鎖3'尾部を形成していてもよい。シグナルプライマーの二本鎖部分の残りは、標的と相補的ではない。シグナルプライマーの分子間塩基対合部分のミスマッチによって、標的配列が存在する時の蛍光の変化量が減じる可能性があるが、分析の鋭敏度が問題でなければ、許容可能な程度である。一本鎖尾部の標的結合配列におけるミスマッチも許容可能であり、単一のヌクレオチド多型性の検出に利用できるが、やはり特定の環境において分析の鋭敏度および/または特異性を減じる。しかし、ハイブリッド形成に関与する配列を完全にマッチさせれば、反応速度論に大きな悪影響を及ぼさずに、分析の特異性が改善される。

10

【0014】

第一の実施例において、本発明のシグナルプライマーの第二のオリゴヌクレオチドはリポータープローブである。リポータープローブは、少なくとも1つのドナー/消光剤色素対、すなわち蛍光ドナー色素とそのドナー蛍光体に対する消光剤を含む。リポータープローブの配列は、アダプターオリゴヌクレオチドの5'アダプター配列とハイブリッド形成していない時には、リポータープローブが自然に、ドナーと消光剤色素を近接させ、ドナー蛍光の消光を引き起こす様なコンフォメーションを取るよう選択される。リポータープローブは規則正しい二次構造(例えば、Gカルテット、ヘアピンまたは三重らせん)、ランダムコイルまたはドナーおよび消光剤色素を蛍光消光を引き起こす位十分近接させるその他の全てのコンフォメーションに折り畳まれる。しかし、リポータープローブがアダプターオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成すると、リポータープローブは直鎖状にされるかまたは展開され、ドナー/消光剤色素対は消光が消滅または減じるように空間的に分離される。標的が存在すると、リポータープローブはアダプターオリゴヌクレオチドから分離され、消光されるコンフォメーションを取る。アダプターオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成したりリポータープローブとアダプターオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成していないリポータープローブの蛍光消光の程度の差を、シグナルプライマーがその標的結合配列を介して結合する標的の存在の有無の指標として利用できる。要約すると、リポータープローブがアダプターオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成するとリポータープローブの色素は十分に分離されるので、ドナーは検出可能な蛍光を生じ、アダプターオリゴヌクレオチド中の相補的配列からリポータープローブが分離されると、置換されたりリポーター

20

30

【0015】

あるいは、本発明のリポータープローブは、アダプターオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成していなくてもよい。第二の実施例において、本発明のシグナルプライマーは、未標識の第二のオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成したアダプターオリゴヌクレオチドから成る。ハイブリッド形成していないリポータープローブも折り畳まれ、消光したコンフォメーションで存在している。未標識の第二のオリゴヌクレオチドとリポータープローブは十分に相補的なので、選択された反応条件でハイブリッド形成する。未標識の第二のオリゴヌクレオチドの分離によるシグナルプライマーの二重鎖が標的依存的に崩壊されると、この時点で一本鎖となった未標識の第二のオリゴヌクレオチドはリポータープローブ中の相補的配列とハイブリッド形成することができる。置換された未標識の第二のオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成する前には、リポータープローブは規則正しい二次構造、ランダムコイルまたはその他のコンフォメーションに折り畳まれているため、ドナーおよび消光剤色素は近接しており、ドナーの消光は増加する。未標識の第二のオリゴヌクレオチドのハイブリッド形成により、リポータープローブは直鎖状にされるかまたは展開され、2つの色素間距離は開き、蛍光消光は減少する。消光の減少により、標的配列の存在の指標として検出されるドナーまたは消光剤の蛍光パラメータに検出可能な変化が生じる。色素対の両方が、置換される未標識の第二のヌクレオチドとのハイブリッド形成に関与するリポータープローブ中の配列に結合されていても、あるいは色素対の一方が、未標識の第二のオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成しないリポータープローブの一部に、例

40

50

えば、未標識の第二のオリゴヌクレオチドと相補的でないリポータープローブの一本鎖尾部または内部の配列に結合されていてもよい。

【0016】

ドナー蛍光体およびその対応する消光剤は、アダプターオリゴヌクレオチドまたは未標識プローブとのハイブリッド形成を阻害しない(下記に説明されている)、リポータープローブがアダプターオリゴヌクレオチドまたは未標識プローブとハイブリッド形成した時に検出可能なドナー蛍光を生じる、また折り畳まれた状態とハイブリッド形成した状態でリポータープローブに変化が生じた時、蛍光パラメータに変化を生じる全ての相対位置でリポータープローブに結合することができる。リポータープローブがシグナルプライマーのアダプターオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成している本発明の実施例においては、塩基対合オリゴヌクレオチドの分離による二重鎖の標的依存性の崩壊により、リポータープローブは規則正しい二次構造、ランダムコイルまたはその他のコンフォメーションに折り畳まれ、これによってドナー色素と消光剤色素は近接し、ドナーの消光が増加する。消光の増加によりドナーまたは消光剤のいずれかの蛍光パラメータに検出可能な変化が生じ、これは標的配列の存在の指標として検出される。色素対の両方を、シグナルプライマーの二本鎖部分の分子間水素結合の形成に参与する配列に結合させることができる。あるいは、色素対の片方を、アダプターとハイブリッド形成しないリポータープローブの一部に、例えば、標的ともアダプターオリゴヌクレオチドとも相補的でないリポータープローブの一本鎖3'尾部において結合することもできる。

10

【0017】

一般に、アダプターと未標識オリゴヌクレオチドまたはリポータープローブの間、あるいは未標識の第二のオリゴヌクレオチドとリポータープローブの間の分子間塩基対合に参与する配列の全長は重要ではない。適切な長さは、選択された反応条件において、一部二本鎖の分子を維持するための安定した塩基対合に必要なヌクレオチドの数によって決定される。好都合には、塩基対合に参与する配列は、典型的には、8から75ヌクレオチド長である。最大長は、オリゴヌクレオチドの合成および回収の容易さあるいは効率等の実際的問題によってのみ限定される。

20

【0018】

シグナルプライマーの二本鎖領域の配列は、少なくともその一部が標的と相補的でない様に、またそれを崩壊する反応の温度で比較的安定である様に選択される。しかし、標的とのハイブリッド形成が許容できない程遅い位安定であっても、あるいは相補的鎖合成のために、ポリメラーゼがアダプターオリゴヌクレオチドから第二のオリゴヌクレオチドを置換できない程安定であってもならない。好ましくは、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドの間の配列に参与するシグナルプライマーの二本鎖部分の T_m は、置換反応が起こる温度以上であるが、それより低くてもよい。このセグメントの T_m が反応温度より低い場合には、標的の存在と無関係に検出用核酸分子の半分以上が完全に一本鎖となる。これにより分析の鋭敏度は低下するが、比較的大量の標的が存在する場合には許容可能である。典型的には、第一のオリゴヌクレオチドと第二のオリゴヌクレオチドのハイブリッド形成に参与するシグナルプライマーの二本鎖部分の T_m は、第二のオリゴヌクレオチドを置換する反応温度と等しいか、それよりも約30℃まで高い。最も好ましくは、 T_m は第二のオリゴヌクレオチドを置換する反応よりも約10~20℃高い。

30

40

【0019】

第二のオリゴヌクレオチド(リポータープローブまたは未標識の第二のオリゴヌクレオチド)は、アダプターオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成するとき、アダプターオリゴヌクレオチドの一部が3'「尾部」として一本鎖の状態に残る様に選択される。シグナルプライマーの一本鎖尾部部分は、検出される標的配列と相補的で、シグナルプライマーと標的配列とハイブリッド形成させる役目を果たす。尾部の配列は、好ましくは、選択された反応条件で標的と安定した二重らせんを形成し、本発明の技術において公知の所望の検出特異度を提供するように選択される。標的とのハイブリッド形成を有利にするには、第一のオリゴヌクレオチドの一本鎖標的結合尾部領域の配列も好ましくは、標的結合配列

50

/標的_mの T_m が反応温度と等しいか、それ以上となる様に選択される。標的結合領域の配列は、検出される配列によって決定されるが、検出用核酸の標的結合配列の T_m は、例えば、その長さを調節することにより調節することが可能である。

【0020】

米国特許5,547,861号に記載されているように、本発明のシグナルプライマーは、蛍光パラメータの変化を伴う二次増幅生成物を産生する増幅反応において、シグナルプライマーとして利用できる。アダプターオリゴヌクレオチドの3'末端から成るシグナルプライマーの一本鎖尾部は、プライマー伸長が可能である。本発明の第一の実施例の核酸増幅反応におけるシグナルプライマーの利用が、図1により詳細に示されており、以下の様に要約できる。この第一の実施例において、第二のオリゴヌクレオチドは、リポータープローブがアダプターオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成している時は、ドナー/消光剤色素対が空間的に分離されており、ドナー蛍光が検出可能であるように結合されているドナー/消光剤色素対を含むリポータープローブである。アダプターオリゴヌクレオチドの一本鎖尾部を介して、シグナルプライマーは増幅プライマー下流の標的配列の一本の鎖とハイブリッド形成する。増幅プライマーとシグナルプライマーのアダプターオリゴヌクレオチドは共に、標的配列を鋳型として用いてDNAポリメラーゼにより伸長される。シグナルプライマーの第一の伸長生成物は、まだリポータープローブとハイブリッド形成したままで、上流の増幅プライマーの伸長により鋳型から置換される。シグナルプライマーは、標的から第一のシグナルプライマー伸長生成物が置換された後も、まだ一部二本鎖のままである。伸長され、置換されたシグナルプライマーは次に第二の増幅プライマーのハイブリッド形成と伸長のための鋳型となり、最初にシグナルプライマー伸長生成物の一本鎖部分を二本鎖とする。アダプターオリゴヌクレオチドと相補的な新しい鎖の重合により、ポリメラーゼの鎖置換活性に従属して、アダプターオリゴヌクレオチドからリポータープローブが置換される。リポータープローブは、規則正しい二次構造、ランダムコイルまたはドナーおよび消光剤色素を近接させるその他のコンフォメーションに自然に折り畳まれる配列を含むため、アダプターオリゴヌクレオチドから分離されるとこの様な折り畳みが発生する。これによって、蛍光消光が増加し、蛍光消光度の変化に伴う適切な蛍光パラメータの変化が、標的配列の増幅の指標として検出できる。

【0021】

二本鎖標的配列の第二の相補的鎖とハイブリッド形成する第二のシグナルプライマーをこの反応に任意で含めることが可能である。第二のシグナルプライマーは、第二の増幅プライマー下流の標的配列の第二の鎖とハイブリッド形成し、伸長され、第二の増幅プライマーの伸長により置換される。第二のシグナルプライマー伸長生成物の一本鎖部分は、第一の増幅プライマーのハイブリッド形成と伸長により二本鎖にされ、リポータープローブが置換される。

【0022】

上記に説明され、図1に示される反応図は、第二のオリゴヌクレオチドが標識されていない場合も同様である。しかし、未標識の第二のオリゴヌクレオチドのアダプターオリゴヌクレオチドからの標的依存性の分離は直接検出することはできない。図2に示すように、未標識の第二のオリゴヌクレオチドのアダプターオリゴヌクレオチドからの分離は、折り畳まれ、消光したコンフォメーションで存在しているリポータープローブとのハイブリッド形成により検出される。未標識プローブと相補的リポータープローブとのハイブリッド形成により、リポータープローブは展開または直線化され、ドナーおよび消光色素間距離は拡大し、蛍光消光は減少する。第二のオリゴヌクレオチドとリポータープローブのハイブリッド形成は、標的の存在を示す指標であり、蛍光消光度の変化を伴う蛍光パラメータの変化として検出される。

【0023】

どちらの実施例においても、所望により標的の1本の鎖あたり複数のシグナルプライマーを利用でき、それぞれが同じ鎖の他の配列の下流の標的配列とハイブリッド形成し、全てのシグナルプライマーは、増幅プライマーの下流でハイブリッド形成される。この方法に

10

20

30

40

50

において、各シグナルプライマーは、上流の検出用核酸の伸長により置換され、最も5'末端のシグナルプライマーは増幅プライマーにより置換される。複数のシグナルプライマーを利用する事により、標的あたりのシグナルプライマーの発生が増加または増幅し、分析の鋭敏度が増加する利点がある。

【0024】

本発明の複数のシグナルプライマーは、複数の異なる標的配列の同時検出にも利用できる。この場合、アダプターオリゴヌクレオチドの5'アダプター配列は、好ましくは、検出されるそれぞれの標的に関して異なる。各標的特異性アダプターオリゴヌクレオチドの5'アダプター配列特異性リポータープローブを識別可能なドナー/消光剤色素対で標識する事により、各標的の存在を、各標的に対するリポータープローブにおける蛍光消光度の変化を検出することにより決定する事ができる。

10

【0025】

図1および2に示す様に、シグナルプライマーの一本鎖部分は、増幅プライマーのハイブリッド形成および伸長により二本鎖型に変換される。また、ポリメラーゼによる鎖置換により、ポリメラーゼがその相補的鎖を合成するのに伴い、アダプターオリゴヌクレオチドからリポータープローブまたは未標識の第二のオリゴヌクレオチドが置換される。ポリメラーゼの鎖置換活性がアダプターオリゴヌクレオチドからリポータープローブを分離するにつれ、リポータープローブは折り畳まれ、ドナーおよび消光剤色素間距離は小さくなり、これによってドナー蛍光の消光は増加する。即ち、この様に生成された一本鎖の置換されたリポータープローブは、自己ハイブリッド形成することも、あるいは分子内相互作用により色素間距離を縮小させることも可能である。一本鎖の置換されたオリゴヌクレオチド未標識の第二のオリゴヌクレオチドである場合、溶液または固相に付着された折り畳まれ消光した状態のリポータープローブとハイブリッド形成できる様になる。置換された未標識の第二のオリゴヌクレオチドとリポータープローブのハイブリッド形成により、リポータープローブの少なくとも一部は展開され、それによってドナーおよび消光剤間距離は開き、ドナー蛍光の消光は減少する。いずれの実施例においても、ドナーまたは消光剤色素のいずれかの蛍光の変化を、標的配列の増幅の指標として、監視または検出することができる。リポータープローブの置換の場合、ドナー蛍光度の減少または消光剤蛍光度の増加が、標的増幅が発生している、あるいは発生した事を示す指標として検出および/または監視できる。未標識の第二のオリゴヌクレオチドの置換に関しては、ドナー蛍光度の増加または消光剤蛍光度の減少が、標的増幅が発生している、あるいは発生したことを示す指標として検出および/または監視できる。ドナー蛍光体とその消光剤の近接により影響を受けるその他の蛍光パラメータ(例えば、蛍光寿命またはドナーおよび/またはアクセプターの蛍光強度比の変化)も、いずれの実施例においても監視することが可能である。

20

30

【0026】

SDAの他に、本発明のシグナルプライマーを、その他のプライマー伸長増幅方法(例えば、PCR、3SR、TMAまたはNASBA)においてシグナルプライマーとして利用するために改変できることは明らかである。例えば、本方法を、PCR増幅プライマーと5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失した鎖置換DNAポリメラーゼ(例えば、Promega社のSequencing Grade TaqまたはNew England BioLabs社のEso-VentまたはExoDeepVent)をPCRにおいて利用することにより、PCRにおいて利用するために改変することができる。これらのシグナルプライマーは、伸長され、標的から置換され、本質的にSDAで説明した様に、リポータープローブまたは未標識の第二のオリゴヌクレオチドの置換により二本鎖にされる。SDA系の場合と同様に、リポータープローブまたは未標識の第二のオリゴヌクレオチドが置換されることにより、ドナー/アクセプター色素対の近接度と蛍光消光度に変化が引き起こされる。蛍光度の様な蛍光パラメータに伴う変化は、標的増幅の指標の役割を果たす。

40

【0027】

本発明の方法を3SR、TMAまたはNASBA用に改変するために、鎖置換活性を有する5' 3'エキソヌクレアーゼ活性欠失逆転写酵素を利用し、シグナルプライマーとRNAポリメラーゼプロモーターを含む増幅プライマー下流のRNA標的をハイブリッド形成させる。前記と同

50

様の反応方法において、ハイブリッド形成したリポータープローブまたは未標識の第二のオリゴヌクレオチドを含むハイブリッド形成したシグナルプライマーは、1)伸長され、2)上流の増幅プライマーの伸長により置換される。置換された伸長生成物は次に、第二の増幅プライマーのハイブリッド形成と伸長により完全に二本鎖とされる。これによって、リポータープローブまたは未標識の第二のオリゴヌクレオチドはシグナルプライマーのアダプターオリゴヌクレオチドから置換され、リポータープローブのドナーおよび消光剤色素間距離が変わり、ドナー蛍光体の蛍光消光度に変化が生じる。3SRまたはNASBAのシグナルプライマーは、RNAポリメラーゼプロモーター配列を含まず、従って、増幅プライマーとしての機能を果たすことができず、非特異的バックグラウンドシグナルは減少する。これは、SDAにおけるシグナルプライマーと類似しており、ニッキング可能なRERSを含まないため、非特異的標的の指数的バックグラウンド増幅に大きく寄与することはない。

10

【0028】

バックグラウンドの減少には、上流の増幅プライマーの伸長に基づく置換によりシグナルプライマー伸長生成物を標的配列から分離し、本発明のシグナルプライマーを上記の様に利用することが好ましい。しかし、種々の核酸増幅反応における利用が公知の増幅プライマーも、本発明のシグナルプライマーに関して説明されているように、5'分子間塩基対合配列の付加により改変できることは明らかである。この実施例において、5'二本鎖部分と共に増幅プライマー伸長生成物は、標的鎖の変性(例えば、PSAにおける様に加熱)または酵素的消化(例えば、3SRにおける様にリボヌクレアーゼ)により、上流の非増幅プライマー(例えば、SDAにおける様にバンパープライマー)の伸長に基づく置換によって標的配列から分離できる。5'二本鎖部分とドナー/アクセプター色素対を含む増幅プライマーにより、反応に更なるシグナルプライマーは不要となるが、本実施例においてバックはグラウンドが高くなる可能性があるため、分析の鋭敏度が低くなる可能性がある。

20

【0029】

PCRの場合、増幅プライマーは、リポータープローブまたは未標識の第二のオリゴヌクレオチドに相補的な配列を標的結合配列の5'に付加することにより、アダプターオリゴヌクレオチドとなる様に修飾される。次に、リポータープローブまたは未標識の第二のオリゴヌクレオチドを付加した5'配列とハイブリッド形成させる。このプライマーは、上記PCRシグナルプライマーと構造的に同じである。しかし、機能的には、伸長され、置換される下流のプライマーが存在せず、増幅プライマーそのものが蛍光に変化を引き起こす点が異なる。3SE、NASBAおよびTMAの場合、第二のオリゴヌクレオチドに相補的な配列を、増幅プライマーのプロモーターの5'に配置し、第二のオリゴヌクレオチドを、第二のオリゴヌクレオチドが置換され、アダプターオリゴヌクレオチドが増幅サイクルの二本鎖DNA部分において全体的に二本鎖となるように、それとハイブリッド形成させる。プロモーター配列を含まない(例えば、NASBAの場合の様に)第二の増幅プライマーは、標的結合配列5'のハイブリッド形成した第二のオリゴヌクレオチドに相補的な配列を更に、あるいは代わりに含むことが可能である。

30

【0030】

別の実施例において、本発明のシグナルプライマーは標的オリゴヌクレオチドを検出するために増幅に依らない分析方法において利用できる。第一の増幅に依らない実施例において、アダプターオリゴヌクレオチドの3'一本鎖標的結合配列は、シグナルプライマーの塩基対合二重鎖部分が5'オーバーハングを形成するように、標的オリゴヌクレオチドの3'末端とハイブリッド形成する。標的配列は、プライマー伸長反応においてプライマーとして機能し、鋳型として5'オーバーハング(即ち、第二のオリゴヌクレオチドと塩基対合するアダプターオリゴヌクレオチドの配列)を用いて標的配列を伸長する鎖置換ポリメラーゼを用いて、アダプターオリゴヌクレオチドと相補的な鎖を合成する。検出用核酸の標的結合配列が標的配列の一部とのみハイブリッド形成する場合には、標的配列も5'オーバーハングを形成し、シグナルプライマーのアダプターオリゴヌクレオチドも鋳型として標的の5'オーバーハングを用いて同様に伸長される。シグナルプライマーの標的結合配列が、標的配列の全長と相補的な場合、標的だけが伸長される。いずれの場合でも、上記の様

40

50

にシグナルプライマーの第二のオリゴヌクレオチドはこの様にしてアダプターオリゴヌクレオチドから置換され、蛍光パラメータに変化を生じる。蛍光パラメータの変化を伴う第二のオリゴヌクレオチドの置換を伴う伸長は、標的が存在する場合に限り発生し得る。

【0031】

本発明の特徴は、最初に検出用核酸の塩基対合配列とハイブリッド形成する必要がない点である。多くの従来の分析方法では、最初に競合的ハイブリッド形成が起こるため、標的に対するプローブまたはプライマーの親和性が低下し、分析鋭敏度が低下している。これに反して、本発明のシグナルプライマーは最初競合的に結合していないので、その後の競合的ハイブリッド形成反応の全てにおいて分子間ハイブリッド形成により有利となっている。一本鎖3'尾部の長さは、シグナルプライマーの二重鎖部分の熱力学特性に影響を及ぼさずに調節でき、従って、シグナルプライマーの二重鎖部分をデザインし直すことなく、最適にすることができる。これによって、従来の技術と比べ、プライマーのデザインは大幅に簡易化される。

【0032】

リポータープローブまたは未標識の第二のオリゴヌクレオチドの置換による蛍光の変化は、選択された反応終点で検出できる。しかし、完全または一部置換された第二のオリゴヌクレオチドは、ハイブリッド形成とプライマー伸長と同時に産生されるので、蛍光の変化を反応の発生と同時に、すなわち“リアルタイム”で監視することも可能である。この均一リアルタイム分析方法は、存在する初期標的の量に関する半定量的または定量的情報を提供する。例えば、第二のオリゴヌクレオチドの置換反応(標的増幅の一部として、あるいは非増幅検出方法のどちらでも)時に蛍光度が変化する速度は、初期標的の量の指標である。その結果、初期標的配列コピー数が多く存在する程、蛍光は選択された閾値により迅速に到達する(即ち、短時間で確実性が得られる)。更に、第二のオリゴヌクレオチドの置換反応過程の蛍光パラメータの変化速度は、初期標的の量を少なく含む試料よりも、初期標的の量を多く含む試料においてより迅速である。本発明の技術において公知のこれらおよびその他の測定値を、存在する標的の量または標的増幅の指標とすることが可能である。初期標的の量は、典型的には、既知量の標的に関する実験結果の比較により決定される。

【0033】

本発明の技術において公知の多くのドナー/消光剤色素対が、本発明において有用である。これらには、例えば、フルオレセインイソシアネート(FITC)/テトラメチルローダミンイソシアネート(TRITC)、FITC/Texas RedTM(Molecular Probes社)、FITC/N-ヒドロキシスクシンイミジル 1-ピレンブチレート(PYB)、FITC/エオシンイソシアネート(EITC)、N-ヒドロキシスクシンイミジル 1-ピレンスルホネート(PYS)/FITC、FITC/ローダミンX、FITC/テトラメチルローダミン(TAMRA)等が挙げられる。特定のドナー/消光剤対の選択は重要ではない。エネルギー移動消光機序にとって、ドナー蛍光体の発光波長が、消光剤の励起波長とオーバーラップすることだけが必要である。すなわち、エネルギー移動、電荷移動、または蛍光消光を十分可能にするために2つの色素間に十分なスペクトルのオーバーラップが無くては成らない。p-(ジメチルアミノフェニル)安息香酸(CABCYL)は、隣接する蛍光体、例えば、フルオレセインまたは5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン(EDANS)から蛍光を有効に消光する非蛍光消光剤色素である。特定のドナー/消光剤色素対が、上記および以下の具体例に例示されているが、その他の色素対も本発明において有用であることは、本技術に精通する者にとって明らかである。本発明の検出用核酸において蛍光消光を生じる色素対は全て、消光機序に関わりなく、本発明の方法における使用に適している。末端および内部標識法も本技術において公知であり、検出用核酸においてそれぞれの部位でドナーおよび消光剤色素を結合するためにルーチンに利用できる。

【0034】

(具体例1)

合成標的配列の検出のために、本発明のシグナルプライマーを含む鎖置換増幅反応を、本質的に米国特許No.5,547,861に記載されている方法により実施した。1番目の反応は、合成標的配列の増幅に適切なコピー数 10^6 個の標的配列SDA増幅プライマーおよび標的に特異

10

20

30

40

50

的な標的結合配列とリポータープローブに相補的な5'配列を持つアダプターオリゴヌクレオチドとフルオレセインとダブシルで標識されたリポータープローブから成る本発明のシグナルプライマー(UDP1)を含んだ。リポータープローブの配列は、その相補的配列とハイブリッド形成していない時は、自然にヘアピン構造に折り畳まれ、リポータープローブが相補的配列とハイブリッド形成した時と比べ、2つの色素を近接させ、蛍光消光を増加させる様に選択された。シグナルプライマーの配列は以下の通りであった(5'から3'末端方向に表示)。アダプターオリゴヌクレオチドの標的結合配列はイタリック体で表示され、アダプターオリゴヌクレオチドとリポータープローブ中の相補的配列には下線が付けられている。リポータープローブの5'および3'配列はハイブリッド形成しヘアピン構造を形成する。

【0035】

【化1】

アダプターオリゴヌクレオチド(配列番号1)

TCGGGTGGCTCCTTCTGATAATGACTCACTGAGCTGGAACGTCGT

リポータープローブ(配列番号2)

フルオレセイン-CAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCGATAATGCTG-ダブシル

【0036】

2番目の反応は、標的を含まず、1番目の反応と同様のシグナルプライマーを含んだ。3番目の反応は対照反応で、コピー数 10^6 個の標的配列とリポータープローブのみ(すなわちアダプターオリゴヌクレオチドを含まない)を含んだ。図3に示すように、標的を含まないと、反応を通して、蛍光は高い状態を維持し(比較すると消光していない)、シグナルプライマーにおいてアダプターオリゴヌクレオチドからリポータープローブが置換されなかったことを示した。しかし、標的が存在すると、ドナー蛍光は最初高かったが(比較すると消光していない)、リポータープローブが置換され、比較的より消光したコンフォメーションを取るため、増幅反応の経過と共に減少した。シグナルプライマーが存在しないと、増幅反応を通してドナー蛍光は消光したままであった。これらの結果から、本発明のシグナルプライマーは、蛍光消光度の変化を監視することにより、核酸標的配列を検出するために利用できることが証明された。

【0037】

(具体例2)

リポータープローブが相補的配列とハイブリッド形成している時よりも、相補的配列とハイブリッド形成していない時にはドナー色素と消光剤色素をより近接させるGカルテット構造を自然に形成するリポータープローブ配列(UDP5)を用いて、具体例1を繰り返した。

【0038】

【化2】

アダプターオリゴヌクレオチド(配列番号3)

CCCCAAACCCAAAACCCAAAACCCACTCACTGAGCTGGAACGTCGT

リポータープローブ(配列番号4)

フルオレセイン-GGGTTTTGGGTTTTGGGTTTTGGG-ダブシル

【0039】

この場合も、シグナルプライマーのアダプターオリゴヌクレオチドからリポータープローブが置換されるにつれ、標的増幅によりドナー蛍光は減少した。リポータープローブ単独では標的を認識できず、標的が存在しないとドナー蛍光に変化は観察されなかった。これらの結果を図4に示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

【 配 列 表 】

<110> Nadeau, James G.

Linn, C. Preston

Pitner, J. Bruce

Dean, Cheryl H.

Walker, G. Terrance

10

<120> Universal Probes and Methods for Detection of Nucleic Acids

<130> P000873

<140> JP P2000-291720

<141> 2000-09-26

20

<150> US 09/406,074

<151> 1999-09-27

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

30

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: hypothetical
synthetic sequence for purposes of examples

<400> 1

tcgggtggct cttctgata atgactcact gagctggaac gtcgt 45

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence 10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hypothetical
synthetic sequence for purposes of examples

<400> 2

cagcattatc agaaggagcc acccgataat gctg 34 20

<210> 3

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 30

<223> Description of Artificial Sequence: hypothetical
synthetic sequence for purposes of examples

<400> 3

cccaaaacce aaaacccaaa acccactcac tgagctggaa cgtcgt 46

<210> 4

40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: hypothetical synthetic sequence for purposes of examples

<400> 4

gggttttggg ttttgggittt tggg

24

10

【図面の簡単な説明】

【図1】シグナルプライマーの第二のオリゴヌクレオチドがリポータープローブである、鎖置換増幅(SDA)反応における核酸標的配列の検出を示す。

【図2】シグナルプライマーの第二のオリゴヌクレオチドが未標識プローブである、鎖置換増幅(SDA)反応における核酸標的配列の検出を示す。

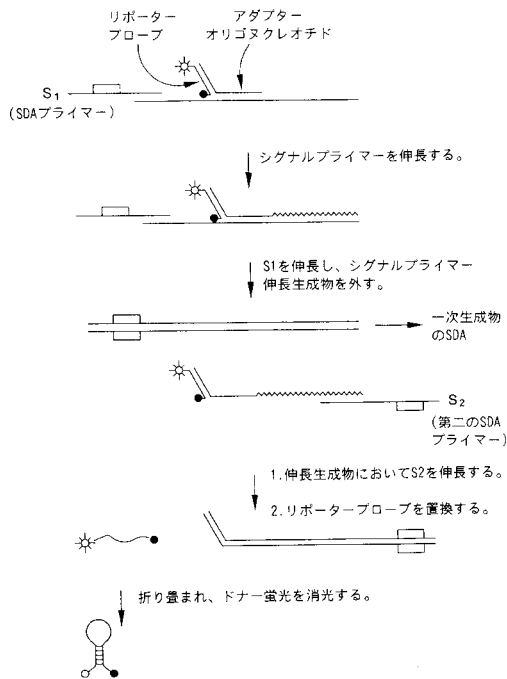
20

【図3】相補的配列とハイブリッド形成していない時、ヘアピン構造を自然に形成する配列から成るリポータープローブを利用した、具体例1の結果を示す。

【図4】相補的配列とハイブリッド形成していない時、Gカルテット構造を自然に形成する配列から成るリポータープローブを利用した、具体例2の結果を示す。

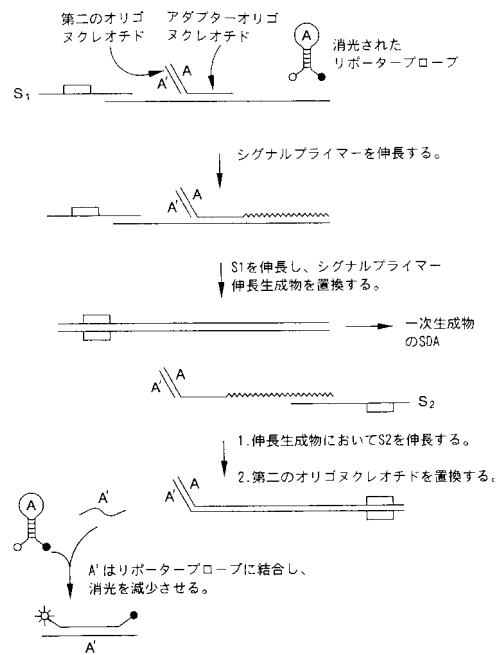
【図1】

FIG-1



【図2】

FIG-2



【 図 3 】

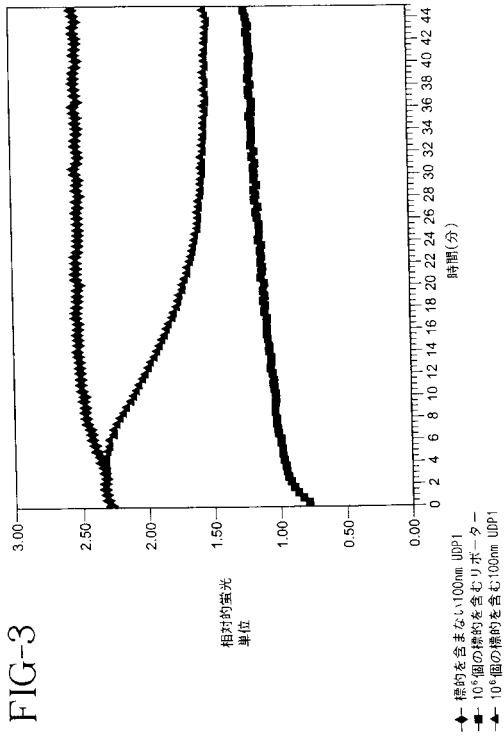


FIG-3

【 図 4 】

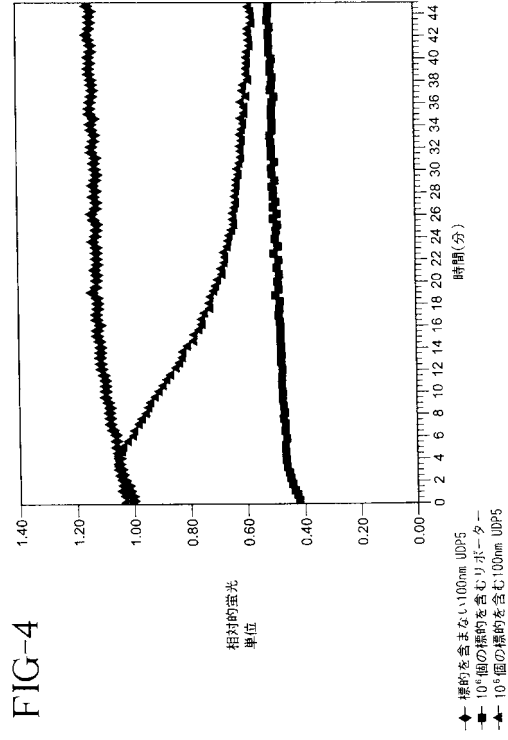


FIG-4

フロントページの続き

- (74)代理人 100096769
弁理士 有原 幸一
- (74)代理人 100107319
弁理士 松島 鉄男
- (72)発明者 ジェイムズ・ジー・ナデュー
アメリカ合衆国ノースカロライナ州27514, チャペル・ヒル, コーカー・レイン 710
- (72)発明者 シー・プレストン・リン
アメリカ合衆国ノースカロライナ州27707, ダラム, トロッター・リッジ・ロード 4110
- (72)発明者 ジェイ・ブルース・ピトナー
アメリカ合衆国ノースカロライナ州27707, ダラム, クインスマーア・ロード 2903
- (72)発明者 シェリル・エイチ・ディーン
アメリカ合衆国ノースカロライナ州27614, ローリー, トレイルズ・エンド・コート 205
- (72)発明者 ジー・テランス・ウォーカー
アメリカ合衆国ノースカロライナ州27514, チャペル・ヒル, マウント・ポラス・ロード 209

審査官 田中 晴絵

- (56)参考文献 特許第3061372(JP, B1)
Nature Biotechnology, 1996, Vol.14, No.3, p.303-308

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C12Q 1/68
EUROPAT(QUESTEL)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)