

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5822843号
(P5822843)

(45) 発行日 平成27年11月24日(2015.11.24)

(24) 登録日 平成27年10月16日(2015.10.16)

(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
G O 1 N	33/542	(2006.01)	G O 1 N	33/542	A

請求項の数 21 (全 64 頁)

(21) 出願番号	特願2012-545829 (P2012-545829)	(73) 特許権者	507292955
(86) (22) 出願日	平成22年3月26日 (2010. 3. 26)		シージーン アイエヌシー
(65) 公表番号	特表2013-514803 (P2013-514803A)		大韓民国 138-828 ソウル ソン
(43) 公表日	平成25年5月2日 (2013. 5. 2)		パグ オグムーロ 91 タエウォン
(86) 国際出願番号	PCT/KR2010/001873		ビルディング 8階・9階
(87) 国際公開番号	W02011/078441	(74) 代理人	100107515
(87) 国際公開日	平成23年6月30日 (2011. 6. 30)		弁理士 廣田 浩一
審査請求日	平成24年8月15日 (2012. 8. 15)	(74) 代理人	100107733
(31) 優先権主張番号	10-2009-0127880		弁理士 流 良広
(32) 優先日	平成21年12月21日 (2009.12.21)	(74) 代理人	100115347
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		弁理士 松田 奈緒子
		(72) 発明者	チュン・ジョン ユーン
			大韓民国 ソウル 138-172 ソン
			パグ ソンパ 2-ドン 166 カラ
			ク サミク マンション 208-202
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T S Gプライマーターゲット検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ターゲットシグナル発生プライマー (Target Signal Generating primer、T S Gプライマー) を利用してDNAまたは核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法であって、

(a) ターゲット核酸配列を T S G プライマーとハイブリッド形成させる工程であって、前記 T S G プライマーは、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列、及び(i i) レポーター分子及びクエンチャー分子を含み、前記 T S G プライマーがヘアピループ構造を有さず、前記 T S G プライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成されない場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、ヘアピループ構造の助け無しに前記 T S G プライマーで3次元的に互いに隣接し、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルをクエンチングして、前記 T S G プライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成される場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記 T S G プライマーで3次元的に離隔され、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルを脱消光して、これにより、前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生されて取得される工程と、

(b) 工程(a) の結果物をプライマー伸長条件下で鋳型依存的核酸ポリメラーゼと接触させる工程であって、前記 T S G プライマーの3' - 末端で3' - 伸長反応が発生する工程と、

(c) 前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを検出する工程であって、これによ

り、前記シグナルは、DNAまたは核酸混合物内にターゲット核酸配列が存在することを示す工程と、
を含むことを特徴とする方法。

【請求項2】

前記鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、5' 3'ヌクレアーゼ活性を有して、前記鋳型依存的核酸ポリメラーゼのポリメラーゼ活性により前記TSGプライマーの3'-末端が伸長されて、前記鋳型依存的核酸ポリメラーゼの5' 3'ヌクレアーゼ活性により前記TSGプライマーの5'-末端が切断され、これにより前記レポーター分子または前記クエンチャー分子が前記TSGプライマーから放出されて、ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生される請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

前記方法は、ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを増幅させるために、前記工程(a)-(b)または(a)-(c)を少なくとも2回反復する工程と、その反復サイクルの間に変性過程とをさらに含む請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記TSGプライマーの前記レポーター分子または前記クエンチャー分子は、5'-末端またはその5'-末端から1~5ヌクレオチド離隔された位置にある請求項1または2に記載の方法。

【請求項5】

前記クエンチャー分子は、蛍光であり、工程(c)で検出されるターゲット核酸配列の存在を示すシグナルは、前記蛍光クエンチャー分子から出るシグナルである請求項1に記載の方法。

20

【請求項6】

前記鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼである請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記TSGプライマーは、その3'-末端部位に前記鋳型依存的核酸ポリメラーゼの3' 5'エキソヌクレアーゼ活性に対して耐性を有するバックボーンを含む少なくとも1個のミスマッチヌクレオチドを有する請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記方法は、固相で行われて、前記TSGプライマーは、その5'-末端を介して固相基質の表面に固定化される請求項1に記載の方法。

30

【請求項9】

前記ターゲット核酸配列は、少なくとも2種の核酸配列を含み、前記TSGプライマーは、少なくとも2種のプライマーを含む請求項1または8に記載の方法。

【請求項10】

前記ターゲット核酸配列は、ヌクレオチド変異を含む請求項1または8に記載の方法。

【請求項11】

ターゲットシグナル発生プライマー(Target Signal Generating primer、TSGプライマー)を利用した増幅反応を通じてDNAまたは核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法であって、

40

(a)前記ターゲット核酸配列を増幅できる正方向プライマー及び逆方向プライマーとしての二つのプライマーを含む一対のプライマーと前記ターゲット核酸配列をハイブリッド形成させる工程であって、前記二つのプライマーのうち、少なくとも一つは、TSGプライマーであり、前記TSGプライマーは、(i)前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列及び(ii)レポーター分子及びクエンチャー分子を含み、前記TSGプライマーがヘアピループ構造を有さず、前記TSGプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成されない場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、ヘアピループ構造の助け無しに前記TSGプライマーで3次的に互いに隣接し、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルをクエンチングし

50

て、前記 T S G プライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成される場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記 T S G プライマーで 3 次元的に離隔され、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルを脱消光して、これにより、前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生されて取得される工程と、
 (b) 工程 (a) の結果物をプライマー伸長条件下で鋳型依存的核酸ポリメラーゼと接触させる工程であって前記二つのプライマーの 3 ' - 末端で 3 ' - 伸長反応が発生する工程と、

(c) 工程 (b) の結果物を変性させる工程と、
 (d) 前記工程 (a) - (c) を少なくとも 2 回反復し、前記ターゲット核酸配列及び前記ターゲット核酸配列の存在を示す前記シグナルを全て増幅する工程と、

(e) 前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを検出する工程であって、前記シグナル検出は、工程 (d) の前記反復の各サイクルにおいて、工程 (d) の前記反復の終了時点で、または前記反復の間の指定時間間隔のそれぞれで行われて、このようなシグナルは、ターゲット核酸配列の存在を示す工程と、
 を含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 2】

前記鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、5 ' 3 ' ヌクレアーゼ活性を有して、前記鋳型依存的核酸ポリメラーゼのポリメラーゼ活性により前記 T S G プライマーの 3 ' - 末端が伸長されて、前記鋳型依存的核酸ポリメラーゼの 5 ' 3 ' ヌクレアーゼ活性により前記 T S G プライマーの 5 ' - 末端が切断され、これにより前記レポーター分子または前記クエンチャー分子が前記 T S G プライマーから放出されて、ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生される請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記 T S G プライマーの前記レポーター分子または前記クエンチャー分子は、5 ' - 末端またはその 5 ' - 末端から 1 ~ 5 ヌクレオチド離隔された位置にある請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記クエンチャー分子は、蛍光であり、工程 (e) で検出されるターゲット核酸配列の存在を示すシグナルは、前記蛍光クエンチャー分子から出るシグナルである請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、3 ' 5 ' エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼである請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記方法は、固相で行われて、前記二つのプライマーのうち、少なくとも一つは、その 5 ' - 末端を介して固相基質の表面に固定化されて、前記固定化されたプライマーは、T S G プライマーである請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

ターゲットシグナル発生プライマー (Target Signal Generating primer、T S G プライマー) を利用して D N A または核酸混合物からターゲット核酸配列を検出するためのキットであって、

(a) T S G プライマーであって、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列及び (i i) レポーター分子及びクエンチャー分子を含み、前記 T S G プライマーがヘアピンループ構造を有さず、前記 T S G プライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成されない場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、ヘアピンループ構造の助け無しに前記 T S G プライマーで 3 次元的に互いに隣接し、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルをクエンチングして、前記 T S G プライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成される場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記 T S G プライマーで 3 次元的に離隔され、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルを脱消光して、これにより、

10

20

30

40

50

前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生されて取得される T S G プライマーと、

(b) 鋳型依存的核酸ポリメラーゼであって、前記 T S G プライマーと前記ターゲット核酸配列間のハイブリッド形成結果物に作用し、前記 T S G プライマーの 3 ' - 末端に 3 ' - 伸長反応を発生させることができる鋳型依存的核酸ポリメラーゼと、を含むことを特徴とするキット。

【請求項 1 8】

前記キットは、前記ターゲット核酸配列を増幅できる正方向プライマー及び逆方向プライマーとしての二つのプライマーを含む一対のプライマーを含み、前記二つのプライマーのうち、少なくとも一つは、前記 T S G プライマーである請求項 1 7 に記載のキット。

10

【請求項 1 9】

前記鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、5 ' 3 ' ヌクレアーゼ活性を有して、そのポリメラーゼ活性により T S G プライマーの 3 ' - 末端に 3 ' - 伸長反応及びその 5 ' 3 ' ヌクレアーゼ活性により T S G プライマーの 5 ' - 末端に 5 ' - 切断反応の両方を発生させる請求項 1 7 または 1 8 に記載のキット。

【請求項 2 0】

前記 T S G プライマーの前記レポーター分子または前記クエンチャー分子は、5 ' - 末端またはその 5 ' - 末端から 1 ~ 5 ヌクレオチド離隔された位置にある請求項 1 7 から 1 9 のいずれかに記載のキット。

【請求項 2 1】

前記鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、3 ' 5 ' エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼである請求項 1 7 または 1 8 に記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、T S G プライマー (T a r g e t S i g n a l G e n e r a t i n g P r i m e r) を利用したターゲット核酸配列の検出に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ターゲット核酸増幅過程は、ターゲット核酸を検出するための大部分の技術に広く関与している。核酸増幅は、分子生物学分野で利用される極めて重要 (p i v o t a l) な過程であって、多様な増幅方法が提示された。例えば、M i l l e r , H . I . ら (特許文献 1) は、プロモーター/プライマー配列をターゲット一本鎖 DNA (s s DNA) にハイブリッド形成させた後、前記配列の多い RNA コピーを転写する過程を含む核酸配列増幅方法を開示している。他の公知の核酸増幅方法は、転写に基づく増幅システムを含む (非特許文献 1 ; 及び特許文献 2 (G i n g e r a s T . R . e t a l . ,)) 。

30

【0 0 0 3】

ポリメラーゼ連鎖反応 (以下、' P C R ' という) として公知された、最もよく利用される核酸増幅方法は、二本鎖 DNA の変性、DNA 鋳型へのオリゴヌクレオチドプライマーのアニーリング及び DNA ポリメラーゼによるプライマー伸長の反復されたサイクル過程を含む (M u l l i s ら、特許文献 3 ~ 5 ; 非特許文献 2) 。

40

【0 0 0 4】

P C R 関連技術は、ターゲット DNA 配列の増幅だけではなく、生物学と医学の研究分野で科学的応用又は方法に広く利用されており、例えば、ターゲット配列の検出、逆転写酵素 P C R (R T - P C R) 、ディファレンシャルディスプレイ (D i f f e r e n t i a l D i s p l a y) P C R (D D - P C R) 、公知あるいは未知の遺伝子の P C R を利用したクローニング、c DNA 末端の高速増幅 (R A C E) 、任意的プライミング P C R (A P - P C R) 、マルチプレックス (m u l t i p l e x) P C R 、S N P ゲノムタイプング、及び P C R 関与ゲノム分析 (非特許文献 3) がある。

50

【 0 0 0 5 】

一方、現在まで提示された核酸増幅に基づいたターゲット核酸検出方法は、以下の通りである。

【 0 0 0 6 】

1. ポストPCR検出方法

典型的にポストPCR方法は、ターゲット核酸配列を分析するために、核酸増幅及び以後の増幅産物の検出を含む。従来のポストPCR検出方法によると、増幅産物を大きさの差によって分離するか（一般に、ゲル電気泳動を利用して行う）、または増幅産物の固定化により分離しなければならない。しかし、分離過程は、持ち込み物による汚染及び低い処理性のような深刻な問題を引き起こす。

【 0 0 0 7 】

2. リアルタイム検出方法

ポストPCR方法の問題点を克服するために、リアルタイムで増幅された産物を検出するリアルタイムPCR方法が提示されて、汚染から自由になって、ターゲット核酸配列を定量的に分析することができるようになった。

【 0 0 0 8 】

2.1 標識プライマーベースの方法

2.1.1 サンライズプライマー方法

この方法は、5'末端にヘアピンループを形成し、蛍光団及びクエンチャーの一对を互いに隣接させ、減少された蛍光を示すサンライズプライマー (Sunrise primer) を利用する。このようなプライマーがPCR産物に取り込まれた場合、テイル部分が二本鎖になって、ヘアピンが解けて蛍光を増加させる（非特許文献4、及び特許文献6）。しかし、サンライズプライマー方法は、プライマーがターゲット核酸配列に相補的な配列及びその5'-末端にヘアピンループを形成できる配列を含むように複雑にデザインしなければならず、このような側面で便宜性が大きく劣る。また、プライマーにおいて、ヘアピンループの存在は、ターゲット核酸に対するハイブリッド形成効率を減少させる。

【 0 0 0 9 】

2.1.2 スコーピオンプライマー方法

この方法は、統合 (integrated) シグナリングシステムを含むスコーピオンプライマーを利用する。前記プライマーは、鑄型結合領域及びテイルを有して、テイルはリンカーとターゲット結合領域を含む。ターゲット結合領域は、プライマーの伸長産物で相補的な配列とハイブリッド形成される。その後、ターゲット特異ハイブリッド形成イベントは、シグナリングシステムとカップリングされて、ハイブリッド形成は、検出可能な変化を引き起こす。テイルドプライマーのリンカーは、プライマー鑄型のテイル領域のポリメラーゼ-媒介連鎖複写を妨害する（非特許文献5、特許文献7）。テイルドプライマーは、アンプリコン-依存的シグナルを発生させるためのリンカーと、プライマー伸長産物とハイブリッド形成されるターゲット結合領域をプライマーに含ませる必要があるため、サンライズプライマー方法と同様に、プライマーのデザイン及び合成に困難がある。また、プライマーにおいて、ヘアピンループの存在は、ターゲット核酸に対するハイブリッド形成効率を減少させる。

【 0 0 1 0 】

2.1.3 単一標識プライマー方法 (Lux方法)

単一標識プライマー方法は、単一蛍光標識を含むプライマーを利用する方法であって、ターゲット配列とのハイブリッド形成によるプライマー上の蛍光特性の変化を観察し、ターゲット配列を検出する（特許文献8）。また、この方法は、効率的なシグナルの発生のためには、プライマーがヘアピンループ構造を備えなければならない。それだけではなく、標識の種類、蛍光標識周囲のプライマーの配列、プライマー上の蛍光標識の位置、周囲の他の成分など、多様な要素によりプライマー上の蛍光特性が変わる可能性があり、これは、プライマーデザインの最適化を難しくする。

【 0 0 1 1 】

2.1.4 ライオン方法 (Lion method; 3' 5'ヌクレアーゼ活性を利用する)

この方法は、プライマーの3'-末端に少なくとも一つのヌクレオチドを人為的にミスマッチさせた標識プライマーを利用する。ハイブリッド形成がなされるに十分な条件下で標識プライマー及び試料がインキュベーションされて、次いで試料は、3' 5'校正活性を有する核酸ポリメラーゼに露出されて、これにより、標識または標識システムの一部が放出される(特許文献9)。

【0012】

しかし、ミスマッチプライマーは、その3'末端にミスマッチヌクレオチドを含むように複雑にデザインしなければならない。しかも、3'末端が非ターゲット配列とミスマッチされる場合も、ミスマッチプライマーは、3' 5'校正活性を有する核酸ポリメラーゼにより、擬陽性シグナルを発生する可能性が高い。

10

【0013】

2.2 標識プローブベースの方法

2.2.1 分子ビーコン (Molecular beacon) 方法

分子ビーコンは、蛍光及びクエンチング染料を含むが、クエンチング染料が蛍光染料に隣接している場合にのみ、FRET (fluorescence resonance energy transfer) が発生する。分子ビーコンは、溶液内で単一に存在する場合、ヘアピン構造を形成するようにデザインされており、これにより二つの染料が近接するようになる。

20

分子ビーコンがターゲットとハイブリッド形成される場合、蛍光及びクエンチャー染料は、離隔される。FRETは発生せず、蛍光染料は、照射 (irradiation) により光を放出する(非特許文献6及び7)。

【0014】

しかし、分子ビーコン方法には幾つかの短所がある。

【0015】

第一に、ヘアピン構造の二つの逆反復 (inverted repeat) は、ターゲット核酸に相補的カウンターパートを有しなければならず、これは、ターゲットにおいても逆反復の存在を要求する。第二に、相補的核酸配列を有するヘアピン構造のループ部位の T_m 及びステム部位の T_m は、注意を払って均衡を合わせることが必要であり、これは、非特異的アンフォルディング (unfolding) 無しにターゲットが存在する時、ヘアピンプローブの特異的アンフォルディングが可能であるようにする分析温度を調節しなければならない。最後に、この方法は、ターゲット核酸配列を増幅するために、追加的にプライマーを必要とする。

30

【0016】

2.2.2 ハイブリッド形成プローブ方法

この方法は、四つのオリゴヌクレオチドを利用する：二つのプライマー及び二つのプローブ。ハイブリッド形成プローブは単一標識を有して、一つは供与体蛍光団、他の一つは、受容体蛍光団を有する。二つのプローブの配列は、これらがヘッドツテイル方式 (head to tail arrangement) でターゲット配列にハイブリッド形成されるように選択されて、二つの染料を互いに近接するようにして、FRETが起こるようにする。プローブの一つにある受容体染料は、エネルギーを転移させて、他の一つは、異なる波長で蛍光を放出させる。蛍光の量は、PCR過程の間に生成されるターゲットDNAの量に正比例する(非特許文献6、8及び9)。

40

【0017】

しかし、この方法は、マルチプレックス検出に適しておらず、ターゲット核酸配列を増幅するために、追加的にプライマーを必要とする。

【0018】

2.2.3 TaqManプローブ方法 (5' 3'ヌクレアーゼ活性を利用する)

TaqManプローブは、PCR産物の内部にハイブリッド形成されるように製作され

50

る。PCRの間、即ち、ポリメラーゼがTaqManプローブの結合された鋳型を複製すると、ポリメラーゼの5'エキソヌクレアーゼ活性は、プローブを切断させる。これは、蛍光とクエンチング染料を離隔して、FRET (fluorescence resonance energy transfer) は、それ以上起こらない (非特許文献6及び8、並びに特許文献10)。

【0019】

しかし、この方法は、三つのオリゴヌクレオチド (一つの二重標識プローブ及び二つのプライマー) を利用するという側面で限界点を有する。この方法は、プローブのデザイン及び合成、そして反応条件の最適化を複雑にする。

【0020】

2.2.4 セルフ-クエンチングプローブ方法 (5' 3'ヌクレアーゼ活性を利用する)

セルフ-クエンチングプローブ方法は、PCR産物の内部領域にハイブリッド形成される配列を有する二重標識プローブを利用する (特許文献11)。

【0021】

TaqManプローブ方法と同様に、セルフ-クエンチングプローブ方法は、同時アッセイ (homogeneous assay) のために、三つのオリゴヌクレオチド (一つの二重-標識プローブ及び二つのプライマー) を利用する必要があり、これは、プローブデザイン及び反応条件の最適化を非常に複雑にする。

【0022】

以上のように、今まで開発された従来のターゲット検出方法の大部分は、本質的な欠点を有して、これは、克服することが難しいと考えられる。

【0023】

したがって、技術的、時間的及び費用的に効果的な、ターゲット核酸配列を検出する新規なアプローチが要求される。

【0024】

本明細書全体にかけて多数の特許及び文献が参照されて、その引用が表示されている。引用された特許及び文献の開示内容は、その全体が本明細書に参照として取り込まれ、本発明の属する技術分野の水準及び本発明の内容がより明確に説明される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0025】

【特許文献1】国際公開第89/06700号パンフレット

【特許文献2】国際公開第88/10315号パンフレット

【特許文献3】米国特許第4,683,195号明細書

【特許文献4】米国特許第4,683,202号明細書

【特許文献5】米国特許第4,800,159号明細書

【特許文献6】米国特許第6,117,635号明細書

【特許文献7】米国特許第6,326,145号明細書

【特許文献8】米国特許第7,537,886号明細書

【特許文献9】米国特許第6,248,526号明細書

【特許文献10】米国特許第5,210,015号明細書

【特許文献11】米国特許第5,723,591号明細書

【非特許文献】

【0026】

【非特許文献1】Kwoh, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86: 1173-1177 (1989)

【非特許文献2】Saiki et al., Science 230, 1350-1354 (1985)

【非特許文献3】McPherson and Moller, PCR. BIOS

10

20

30

40

50

Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, NY (2000)

【非特許文献4】Nazarenko et al., Nucleic Acids Research, vol. 25 no. 12: 2516-2521 (1997)

【非特許文献5】Whitcomb et al., Nature Biotechnology, vol. 17 AUGUST: 804-807 (1999)

【非特許文献6】Indian J Med Res, 124: 385-398 (2006)

【非特許文献7】Tyagi et al., Nature Biotechnology, vol. 14 MARCH: 303-308 (1996)

10

【非特許文献8】Indian J Med Res 124: 303-308 (2006)

【非特許文献9】Bernad et al., Clin Chem, 46: 147-148 (2000)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0027】

本発明者らは、従来のターゲット核酸配列のリアルタイム検出技術の問題点を解決するために鋭意研究した。本発明者らは、ターゲット核酸配列に対するハイブリッド形成及び伸長反応に依存的にシグナルを発生させる新規なTSGプライマー(Target Signal Generating Primer)を開発して、このTSGプライマーを利用してターゲット核酸配列の検出のための多様なプロトコールを立案した。その結果、本発明者らは、本発明の新規なプロトコールまたは方法が、ターゲット核酸配列の検出、特に、リアルタイム検出において優れた作動性を示し、また、液相だけではなく固相でもより強く迅速な方式でターゲット核酸配列を示すシグナルを発生させるということを確認した。

20

【0028】

したがって、本発明の目的は、TSGプライマー(Target Signal Generating Primer)を利用して、DNAまたは核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法を提供することにある。

30

【0029】

本発明の他の目的は、増幅反応において、TSGプライマー(Target Signal Generating Primer)を利用して、DNAまたは核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法を提供することにある。

【0030】

本発明のまた他の目的は、TSGプライマー(Target Signal Generating Primer)を利用して、DNAまたは核酸混合物からターゲット核酸配列を検出するためのキットを提供することにある。

【0031】

本発明の他の目的及び利点は、発明の詳細な説明、請求の範囲及び図面により、さらに明確にされる。

40

【図面の簡単な説明】

【0032】

本発明の基本原理は、図1~4に要約した。

【図1a】TSGプライマーを利用して、ターゲット核酸配列を検出するアッセイに係わる工程を模式的に示す。図1aは、ターゲット核酸配列の検出のための標準的な構造を有するTSGプライマーの利用を示す。

【図1b】TSGプライマーを利用して、ターゲット核酸配列を検出するアッセイに係わる工程を模式的に示す。図1bは、ターゲット核酸配列の検出において、プライマーアニーリング特異性のために、二重プライミングオリゴヌクレオチド(DPO)構造を有する

50

T S G プライマーの利用を示す。

【図 2 a】本発明の T S G プライマー及び 5' 3' ヌクレアーゼ活性のない鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用して、リアルタイム方式でターゲット核酸を検出するためのリアルタイム P C R 増幅を模式的に示す。図 2 a は、リアルタイム P C R 増幅のために標準的な構造を有する T S G プライマーの利用を示す

【図 2 b】本発明の T S G プライマー及び 5' 3' ヌクレアーゼ活性のない鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用して、リアルタイム方式でターゲット核酸を検出するためのリアルタイム P C R 増幅を模式的に示す。図 2 b は、リアルタイム P C R 増幅において、プライマーアニーリング特異性のために、二重プライミングオリゴヌクレオチド (D P O) 構造を有する T S G プライマーの利用を示す。

10

【図 3 a】本発明の T S G プライマー及び 5' 3' ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用して、リアルタイム方式でターゲット核酸を検出するためのリアルタイム P C R 増幅を模式的に示す。図 3 a は、リアルタイム P C R 増幅のために標準的な構造を有する T S G プライマーの利用を示す。

【図 3 b】本発明の T S G プライマー及び 5' 3' ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用して、リアルタイム方式でターゲット核酸を検出するためのリアルタイム P C R 増幅を模式的に示す。図 3 b は、リアルタイム P C R 増幅において、プライマーアニーリング特異性のために、二重プライミングオリゴヌクレオチド (D P O) 構造を有する T S G プライマーの利用を示す。

【図 4 a】固相基質に固定化させた T S G プライマーを利用してターゲット核酸配列を検出するアッセイに係わる工程を模式的に示す。図 4 a は、ターゲット核酸配列の検出のために標準的な構造を有する T S G プライマーの利用を示す。

20

【図 4 b】固相基質に固定化させた T S G プライマーを利用してターゲット核酸配列を検出するアッセイに係わる工程を模式的に示す。図 4 b は、ターゲット核酸配列の検出において、プライマーアニーリング特異性のために、二重プライミングオリゴヌクレオチド (D P O) 構造を有する T S G プライマーの利用を示す。

【図 5】変性、ハイブリッド形成及びプライマー伸長の反復無しに、核酸合成反応を行う間、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性のない鋳型依存的 D N A ポリメラーゼを利用することにより、T S G プライマーのハイブリッド形成及び伸長だけで *S . p n e u m o n i a e* を検出した結果を示す。¹⁾ D N A ポリメラーゼは、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性のないストッフェル切片である (5' 3' E x o -) 。²⁾ 鋳型は、*S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e* 遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドである。³⁾ T S G プライマーは、同一な配列を有するが、括弧内の表示分、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔された距離が異なる。⁴⁾ R F U 値は、40分に測定した値である。⁵⁾ R F U は、鋳型がある場合の R F U 値から、鋳型がない場合の R F U 値を引いて計算した。

30

【図 6】変性、ハイブリッド形成及びプライマー伸長の反復無しに、核酸合成反応を行う間、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性のない鋳型依存的 D N A ポリメラーゼを利用することにより、T S G プライマーのハイブリッド形成及び伸長だけで *S . a u r e u s* を検出した結果を示す。¹⁾ D N A ポリメラーゼは、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性のないストッフェル切片である (5' 3' E x o -) 。²⁾ 鋳型は、*S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s* 遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドである。³⁾ T S G プライマーは、同一な配列を有するが、括弧内の表示分、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔された距離が異なる。⁴⁾ R F U 値は、40分に測定した値である。⁵⁾ R F U は、鋳型がある場合の R F U 値から、鋳型がない場合の R F U 値を引いて計算した。

40

【図 7】T S G プライマー及び 5' 3' エキソヌクレアーゼ活性のない鋳型依存的 D N A ポリメラーゼを利用して、*S . p n e u m o n i a e* を検出するためのリアルタイム P C R 増幅の結果を示す。¹⁾ D N A ポリメラーゼは、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性のないストッフェル切片である (5' 3' E x o -) 。²⁾ 鋳型は、*S t r e p t*

50

*ococcus pneumoniae*のゲノムDNAである。³⁾ TSGプライマーは、同一な配列を有するが、括弧内の表示分、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔された距離が異なる。

【図8】TSGプライマー及び5' 3'エキソヌクレアーゼ活性のない鑄型依存的DNAポリメラーゼを利用して、*S. aureus*を検出するためのリアルタイムPCR増幅の結果を示す。¹⁾ DNAポリメラーゼは、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性のないストッフエル切片である(5' 3' Exo-)。²⁾ 鑄型は、*Staphylococcus aureus*のゲノムDNAである。³⁾ TSGプライマーは、同一な配列を有するが、括弧内の表示分、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔された距離が異なる。

10

【図9】TSGプライマー及び5' 3'エキソヌクレアーゼ活性のない鑄型依存的DNAポリメラーゼを利用して、*N. gonorrhoeae*を検出するためのリアルタイムPCR増幅の結果を示す。¹⁾ DNAポリメラーゼは、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性のないストッフエル切片である(5' 3' Exo-)。²⁾ 鑄型は、*Neisseria gonorrhoeae*のゲノムDNAである。³⁾ TSGプライマーは、同一な配列を有するが、括弧内の表示分、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔された距離が異なる。

【図10】TSGプライマー及び5' 3'エキソヌクレアーゼ活性のない鑄型依存的DNAポリメラーゼを利用して、*N. meningitidis*を検出するためのリアルタイムPCR増幅の結果を示す。¹⁾ DNAポリメラーゼは、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性のないストッフエル切片である(5' 3' Exo-)。²⁾ 鑄型は、*Neisseria meningitidis*のゲノムDNAである。³⁾ TSGプライマーは、同一な配列を有するが、括弧内の表示分、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔された距離が異なる。

20

【図11】TSGプライマー及び5' 3'エキソヌクレアーゼ活性のない鑄型依存的DNAポリメラーゼを利用して、*S. aureus*を検出するためのリアルタイムPCR増幅の結果を示す。¹⁾ DNAポリメラーゼは、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性のないストッフエル切片である(5' 3' Exo-)。²⁾ TSGプライマーは、括弧内の表示のように、レポーター分子及びクエンチャー分子間が21ヌクレオチド離隔された距離を有する。³⁾ 鑄型は、表示したように、一連に希釈した*Staphylococcus aureus*のゲノムDNAである。

30

【図12】変性、ハイブリッド形成及びプライマー伸長を反復して核酸合成反応を行う間、5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する鑄型依存的核酸ポリメラーゼまたは5' 3'ヌクレアーゼ活性のない鑄型依存的核酸ポリメラーゼを利用することによる、TSGプライマーから出るシグナルの発生及び蓄積の結果を示す。¹⁾ TSGプライマーは、同一な配列を有するが、括弧内の表示分、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔された距離が異なる。²⁾ 5' 3' Exo-は、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性のないストッフエル切片である。³⁾ 5' 3' Exo+は、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有するTaq DNAポリメラーゼである。⁴⁾ 鑄型は、*Streptococcus pneumoniae*遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドである。

40

【図13】TSGプライマー及び5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する鑄型依存的DNAポリメラーゼを利用して、*S. pneumoniae*を検出するためのリアルタイムPCR増幅の結果を示す。¹⁾ DNAポリメラーゼは、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有するTaq DNAポリメラーゼである(5' 3' Exo+)。²⁾ 鑄型は、*Streptococcus pneumoniae*のゲノムDNAである。³⁾ TSGプライマーは、同一な配列を有するが、括弧内の表示分、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔された距離が異なる。

【図14】TSGプライマー及び5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する鑄型依存的DNAポリメラーゼを利用して、*S. aureus*を検出するためのリアルタイムPCR増幅の結果を示す。¹⁾ DNAポリメラーゼは、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を

50

有するTaq DNAポリメラーゼである(5' 3' Exo+)²⁾ 鋳型は、*Staphylococcus aureus*のゲノムDNAである。³⁾ TSGプライマーは、同一な配列を有するが、括弧内の表示分、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔された距離が異なる。

【図15】TSGプライマー及び5' 3'エキソヌクラーゼ活性を有する鋳型依存的DNAポリメラーゼを利用して、*N. gonorrhoeae*を検出するためのリアルタイムPCR増幅の結果を示す。¹⁾ DNAポリメラーゼは、5' 3'エキソヌクラーゼ活性を有するTaq DNAポリメラーゼである(5' 3' Exo+)²⁾ 鋳型は、*Neisseria gonorrhoeae*のゲノムDNAである。³⁾ TSGプライマーは、同一な配列を有するが、括弧内の表示分、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔された距離が異なる。

10

【図16】TSGプライマー及び5' 3'エキソヌクラーゼ活性を有する鋳型依存的DNAポリメラーゼを利用して、*N. meningitidis*を検出するためのリアルタイムPCR増幅の結果を示す。¹⁾ DNAポリメラーゼは、5' 3'エキソヌクラーゼ活性を有するTaq DNAポリメラーゼである(5' 3' Exo+)²⁾ 鋳型は、*Neisseria meningitidis*のゲノムDNAである。³⁾ TSGプライマーは、同一な配列を有するが、括弧内の表示分、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔された距離が異なる。

【図17】TSGプライマー及び5' 3'エキソヌクラーゼ活性を有する鋳型依存的DNAポリメラーゼを利用して、*S. aureus*を検出するためのリアルタイムPCR増幅の結果を示す。¹⁾ DNAポリメラーゼは、5' 3'エキソヌクラーゼ活性を有するTaq DNAポリメラーゼである(5' 3' Exo+)²⁾ TSGプライマーは、括弧内の表示のように、レポーター分子及びクエンチャー分子間が21ヌクレオチド離隔された距離を有する。³⁾ 鋳型は、表示したように、一連に希釈した*Staphylococcus aureus*のゲノムDNAである。

20

【発明を実施するための形態】

【0033】

本発明は、二重標識システムを有するターゲットシグナル発生プライマー(Target Signal Generating primer、TSGプライマー)及び鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用して、リアルタイム方式でターゲット核酸配列を検出する新規な方法に関する。

30

【0034】

本発明によると、TSGプライマー(Target Signal Generating Primer)と命名されたシグナルがクエンチングされた状態の二重標識プライマーがターゲット核酸配列にハイブリッド形成されると、シグナル脱消光現象が発生されて、次いで前記二重標識プライマーが伸長され、ターゲット核酸配列に対する相補的な配列が合成され、最終的にターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを検出することができる。即ち、TSGプライマーでシグナル脱消光を引き起こす構造変化(conformational change)及び3'-伸長反応の両方が起こる。

【0035】

40

本発明者らは、ヘアピンループ構造のように如何なる修飾された構造を有しないプライマーであるTSGプライマーが、ハイブリッド形成及びプライマー伸長によってクエンチング状態から脱消光状態に転換されることにより、シグナルを発生させることができるということを最初に発見した。TSGプライマー及びこれを利用したリアルタイム方法は、本発明者らにより最初に提示された。

【0036】

TSGプライマーの利点の一つは、TSGプライマー3'-末端における伸長が反応条件(例えば、反応温度)の変化によるシグナル強度の変化(variation)を抑制して、これは、TSGプライマー3'-末端の伸長は、反応温度変化によりシグナルがほとんど影響を受けないか、影響を受けないようにして、より信頼性がある安定的なシグ

50

ナル結果が得られるようにするということである。特に、T S Gプライマー3' - 末端の伸長は、T S Gプライマーがターゲット核酸配列を増幅する。

【0037】

増幅反応、特に、P C Rベースのリアルタイム検出方法において、本発明のT S Gプライマーは、シグナル発生だけではなく、ターゲット増幅にも寄与し、ターゲット配列に対する同時的(homogeneous)アッセイを成功裏に達成する。

【0038】

興味深いことに、T S Gプライマーを利用した本発明の新規なリアルタイムP C R検出方法は、標準的なリアルタイムP C Rアプローチと明白に異なる方式で作用して、これは、従来技術の欠点を克服して、リアルタイム検出の効率性を向上させる。

10

【0039】

T S Gプライマーベースの方法と分子ビーコン及びT a q M a nプローブ方法のような従来プローブベースの方法の最も目立つ相違点は、標識プローブは、ターゲット配列を増幅せずにターゲットシグナルのみを発生させることができるが、T S Gプライマーは、ターゲットシグナルを発生させるだけではなく、ターゲット配列も増幅させることができるということである。プローブベースの方法は、ターゲット増幅のために追加的なプライマーの使用を必要とするが、このような点は、本発明と明白に異なる事項である。標識プローブを利用する従来の方法は、増幅のために追加的なプライマーを必要とするため、プローブデザイン、プライマーデザイン、配列選択及び反応最適化に対する困難がある。その反面、T S Gプライマー方法は、追加的なプローブを必要としないため、このような問題が最小化できる。

20

【0040】

また、T S Gプライマーは、伸長産物または増幅産物内に含まれるが(incorporated)、標識プローブは、如何なる産物にも含まれないため、T S Gプライマー方法は、直接的に増幅産物を測定するが、標識プローブ方法から出るシグナルは、増幅産物を直接的に反映しない。

【0041】

また、ターゲット配列と標識プローブのハイブリッド形成は、標識プローブ及び増幅産物の濃度によって変わり、これは、定量分析を難しくする。定量分析の正確性を向上させるために過剰量の標識プローブが利用できるとしても、それらは、高いバックグラウンド問題を引き起こす可能性が非常に高い。その反面、T S Gプライマー方法は、標識プライマーを利用してターゲット増幅を直接的に測定することができて、これは、より高い精度でターゲット配列の定量分析を可能にする。

30

【0042】

一方、サンライズ方法及びスコピオン方法のような幾つかの従来のプライマーベースのリアルタイム検出方法は、ターゲット配列とのハイブリッド形成以前に、蛍光をクエンチングするためのヘアピン構造を形成していなければならない。

【0043】

しかし、標識プライマーベースの方法におけるヘアピン構造の利用は、ハイブリッド形成効率だけではなく、増幅効率も減少させる。また、標識プライマーに適用されたヘアピン構造は、追加的な配列を必要として、したがって、プライマーは、ターゲット相補的な配列及びヘアピン形成配列を全部考慮してデザイン及び製作されなければならない。このような背景から、ヘアピン構造を有する標識プライマーをデザインすることは難しい。その反面、T S Gプライマーは、ヘアピン構造の関与無しにターゲットシグナルを発生させて、ヘアピン構造に伴う欠点を克服することができる。

40

【0044】

シグナル発生に対する基本的メカニズムの観点で、プライマーの単一標識を利用したL u x方法と、プライマーの二重相互作用的標識システムを利用する本発明とは、異なっている。プライマーの単一標識分子から出るシグナルは、標識の種類、標識周囲のプライマーの配列、プライマー上の標識の位置、周辺の他の要素など、多様な要素によって影響を

50

受け、これは、Lux方法の欠点と見なされる。

【0045】

上述したように、本発明のTSGプライマーベースのリアルタイム検出方法は、従来のプライマー及びプローブベースの方法と差別化される一部技術的特徴（特に、シグナル発生の原理、オリゴヌクレオチドの構造及びオリゴヌクレオチドの機能）を有する。本発明の技術的特徴は、従来のリアルタイム方法の限界を克服するようにして、より効果的な方式でターゲット核酸配列が検出される。

【0046】

驚いたことに、本発明者らは、5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼにより、ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されたプライマーの5'-末端部位で5'-切断反応が起こり、前記5'-切断反応がターゲット配列の検出に絶妙に適用して、ターゲット配列に対するシグナルを発生させるということを見出した（PCT/KR2009/007064参照）。

【0047】

5'-末端部位にレポーター分子及びクエンチャー分子を有するTSGプライマーがターゲット配列（即ち、鋳型）にハイブリッド形成される場合、5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼによりその5'-末端部位で5'-切断反応が起こり、その後、レポーター分子及びクエンチャー分子が互いに離隔されて、これは、TSGプライマーのシグナル脱消光を引き起こす。

【0048】

5'-切断反応が発生するTSGプライマーの比率は、鋳型依存的核酸ポリメラーゼの5' 3'ヌクレアーゼ活性、反応条件及びレポーター分子及びクエンチャー分子間の距離によって変わる。

【0049】

5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼ及び5'-末端部位にレポーター分子またはクエンチャー分子を有するTSGプライマーを利用する場合、5'-切断反応が生じるということを考慮すると、本発明は、ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを二つの異なる方式で提供することができる：（i）ターゲット核酸配列とのハイブリッド形成による構造変化により引き起こされた、TSGプライマー上の相互作用の標識システムのシグナル脱消光（*unquenching*）を利用したシグナル発生；及び（ii）5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用したTSGプライマー5'-末端部位における5'-切断反応によるシグナル発生。

【0050】

5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用する本発明において、TSGプライマーの5'-末端部位（より好ましくは、5'-末端）がターゲット核酸配列に相補的な場合にのみ5'-切断反応が起こることが好ましい。

【0051】

本発明によると、極めて向上された効率性及び信頼度でターゲット核酸配列をリアルタイムで検出することができる。本発明者らが知る限りでは、このような科学的結果及び技術的な戦略は、本発明者らによって最初に提示された。

【0052】

本発明の一様態によると、本発明は、ターゲットシグナル発生プライマー（*Target Signal Generating primer*、TSGプライマー）を利用してDNAまたは核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法であって、（a）ターゲット核酸配列をTSGプライマーとハイブリッド形成させる工程であって、前記TSGプライマーは、（i）前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列、及び（ii）レポーター分子及びクエンチャー分子を含み、前記TSGプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成されない場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記TSGプライマーで3次元的に互いに隣接し、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルをクエンチングして、前記TSGプライマ

10

20

30

40

50

ーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成される場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に離隔され、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルを脱消光(unquenching)して、これにより、前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生されて取得される工程と、

(b)工程(a)の結果物をプライマー伸長条件下で鋳型依存的核酸ポリメラーゼと接触させる工程であって、前記T S Gプライマーの3'-末端で3'-伸長反応が発生する工程と、

(c)前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを検出する工程であって、これにより、前記シグナルは、DNAまたは核酸混合物内にターゲット核酸配列が存在することを示す工程と、を含む方法を提供する。

10

【0053】

本発明者らは、従来のターゲット核酸配列のリアルタイム検出技術の問題点を解決するために鋭意研究した。本発明者らは、ターゲット核酸配列に対するハイブリッド形成及び伸長によってシグナルを発生できる新規なT S Gプライマー(Target Signal Generating Primer)を考案して、このT S Gプライマーを利用してターゲット核酸配列の検出のための多様なプロトコールを立案した。その結果、本発明者らは、本発明の新規なプロトコールまたは方法が、ターゲット核酸配列の検出、特に、リアルタイム検出において優れた作動性を示し、また、液相だけではなく固相でもより強く迅速な方式でターゲット核酸配列を示すシグナルを発生させるということを確認した。

20

【0054】

本発明によると、ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されるT S Gプライマーは、レポーター分子及びクエンチャー分子を含む相互作用的標識システムを有する。前記T S Gプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成されない場合、前記レポーター分子及びクエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に互いに隣接し、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルをクエンチングして；反対に、前記T S Gプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成される場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に離隔され、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルを脱消光(unquenching)して、これにより、前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生されて取得される。このように、T S Gプライマーは、二重機能を有する：(i)ターゲット核酸配列に対するシグナル発生；及び(ii)ターゲット核酸配列に相補的な配列の合成。

30

【0055】

したがって、本発明で利用されるプライマーは、'ターゲットシグナル発生プライマー(Target Signal Generating primer、T S Gプライマー)'と命名されて、本発明の方法は、'T S Gプライマーターゲット検出アッセイ(T S G primer Target Detection Assay)'と命名される。

【0056】

本発明によると、まず、ターゲット核酸配列をT S Gプライマーとハイブリッド形成させる。

40

【0057】

本明細書で使用される用語'ターゲット核酸'、'ターゲット核酸配列'または'ターゲット配列'は、検出しようとする核酸配列を意味し、ハイブリッド形成、アニーリングまたは増幅条件下でプライマー及びプローブとアニーリングまたはハイブリッド形成される。

【0058】

本明細書で使用される用語'プライマー'は、オリゴヌクレオチドを意味するもので、核酸鎖(鋳型)に相補的なプライマー伸長産物の合成が誘導される条件、即ち、ヌクレオ

50

チドとDNAポリメラーゼのような重合剤の存在、そして適した温度とpHの条件で合成の開始点として作用できる。好ましくは、プライマーは、増幅において最大効率を有する一本鎖である。好ましくは、プライマーは、オリゴデオキシリボヌクレオチドである。本発明で利用されるプライマーは、天然(naturally occurring) dNMP(即ち、dAMP、dGMP、dCMP及びdTMP)、修飾ヌクレオチドまたは非天然ヌクレオチドが含まれる。また、プライマーは、リボヌクレオチドも含むことができる。

【0059】

プライマーは、重合剤の存在下で伸長産物の合成をプライミングさせることができるほど十分長くなければならない。プライマーの適した長さは、多数の要素、例えば、温度、
10 応用分野及びプライマーのソース(source)によって決定される。本明細書で使用された用語‘アニーリング’または‘プライミング’は、鋳型核酸にオリゴデオキシヌクレオチドまたは核酸が並置(apposition)されることを意味し、前記並置は、ポリメラーゼがヌクレオチドを重合させて、鋳型核酸またはその一部分に相補的な核酸分子を形成するようにする。

【0060】

本明細書で使用された用語‘ハイブリッド形成、ハイブリダイゼーション(hybridization)’は、相補的な一本鎖核酸が二本鎖核酸を形成することを意味する。ハイブリッド形成は、二つの核酸鎖間の相補性が完全である場合(Perfect match)に起こるか、または一部ミスマッチ(mismatch)塩基が存在しても起こ
20 れる。ハイブリッド形成に必要な相補性の程度は、ハイブリッド形成条件によって変わり、特に温度によって調節され得る。

【0061】

本明細書で使用された用語‘アニーリング’と‘ハイブリッド形成’には差がなく、本明細書で混用される。

【0062】

本明細書で使用される用語‘TSGプライマー’は、セルフクエンチング、セルフ脱消光及び伸長ができるプライマーを意味する。特に、本発明で使用されるTSGプライマーは、ターゲット配列に相補的な配列の合成及びターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを発生させることのできる二重標識プライマーを意味し、ターゲット核酸配列にハイブリ
30 ッド形成されない場合、相互作用標識システムのクエンチングが誘導されて、ターゲット核酸配列にハイブリッド形成される場合は、相互作用標識システムの脱消光が誘導されて、結局ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを発生させる。

【0063】

本明細書で使用される用語‘正方向プライマー’は、3' 5'方向に配列されたターゲット核酸配列の一つの鎖に相補的なプライマー(5' 3'方向)を意味する。逆方向プライマーは、前記核酸配列の他の一つの鎖に相補的な配列を有する。

【0064】

本明細書でTSGプライマーのレポーター分子及びクエンチャー分子を言及しながら使用される用語‘3次元的に隣接(Three-dimensionally adjacent)’は、ヘアピンループのようなプライマーの如何なる分子内構造の助け無しに、
40 レポーター分子及びクエンチャー分子が構造的に互いに近接していることを意味する。

【0065】

TSGプライマーは、(i)ターゲット核酸配列に対する相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列、及び(ii)二重相互作用標識システムを含む。本明細書で使用される用語‘相補的’は、所定のアニーリング条件または厳格条件(stringent conditions)下でプライマーがターゲット核酸配列に選択的にハイブリッド形成するほど十分相補的なことを意味し、用語‘実質的に相補的(substantially complementary)’及び‘完全に相補的(perfectly complementary)’を包括する意味を有して、好ましくは、完全に相補的なことを
50

意味する。

【0066】

択一的に、T S Gプライマーは、その5' - 末端にターゲット核酸配列と非相補的な非ハイブリッド形成ヌクレオチド配列を追加的に有することができる。好ましくは、前記T S Gプライマーの前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子の一つは、非ハイブリッド形成ヌクレオチド配列に位置して、他の一つは、ハイブリッド形成ヌクレオチド配列に位置する。T S Gプライマーの非ハイブリッド形成ヌクレオチド配列は、好ましくは、ヘアピンループ構造を形成せず、ヘアピンループのような分子内構造の形成に関与しない。T S Gプライマーの非ハイブリッド形成ヌクレオチド配列は、好ましくは、制限酵素部位を有しない。

10

【0067】

好ましくは、T S Gプライマーは、ヘアピンループ構造を形成しない。

【0068】

本発明の好ましい具現例によると、二重標識システムは、T S Gプライマーのターゲット相補的な配列に位置する。

【0069】

本発明の好ましい具現例によると、T S Gプライマーの5' - 末端または5' - 末端部位は、ターゲット核酸配列に完璧に相補的な配列を有する。

【0070】

T S Gプライマーは、レポーター分子及びクエンチャー分子を含む相互作用の標識システムを有する。

20

【0071】

前記相互作用の標識システムは、供与体分子及び受容体分子間にエネルギーが非放射能的(non-radioactively)に伝達されるシグナル発生システムである。相互作用の標識システムの代表的例として、FRET(fluorescence resonance energy transfer)標識システムは、蛍光レポーター分子(供与体分子)及びクエンチング分子(受容体分子)を含む。FRETでエネルギー供与体は、蛍光性であるが、エネルギー受容体は、蛍光性または非蛍光性である。

【0072】

相互作用の標識システムの他の形態において、エネルギー供与体は、非蛍光性、例えば、発色団(chromophore)であり、エネルギー受容体は、蛍光性である。相互作用の標識システムのまた他の形態において、エネルギー供与体は、発光性、例えば、生物発光性、化学発光性または電気化学発光性であり、受容体は、蛍光性である。

30

【0073】

より好ましくは、ターゲット核酸配列を示すシグナルは、相互作用の標識システムにより発生されて、最も好ましくは、FRET標識システムである。

【0074】

FRET標識をT S Gプライマーに利用時、二つの標識(蛍光レポーター分子及びクエンチャー分子)は、T S Gプライマーがターゲット核酸配列にハイブリッド形成されてストレッチ形態(stretch conformation)を有する場合、互いに離隔されてシグナルの脱消光が発生される。T S Gプライマーがターゲット核酸配列にハイブリッド形成されず、ツイスト形態(twist conformation)である場合は、二つの標識は、互いに隣接し、シグナルのクエンチングが発生される。

40

【0075】

本明細書において、用語‘クエンチング(quenching)’及び‘脱消光(unquenching)’は、総体的な概念として解釈される。例えば、‘脱消光’は、‘クエンチング’に比べ、クエンチングの効率または水準が低いと解釈できる。即ち、レポーター分子から出るシグナルのクエンチングは、前記シグナルの完全な消滅のみを意味するものではなく、クエンチング現象がない場合と比較し、相対的にシグナルが減少されることを包括する意味を有する。また、レポーター分子から出るシグナルの脱消光は、前記

50

シグナルの完全な回復のみを意味するものではなく、クエンチング現象がある場合と比較し、相対的にシグナルが増加されることを包括する意味を有する。

【0076】

上述のように、シグナルのクエンチング程度の差異によってターゲット核酸配列を示すシグナルを取得することができる。例えば、ターゲット核酸を検出するために、前記蛍光レポーター分子から出る相対的な蛍光強度を測定する場合、蛍光レポーター分子及びクエンチャー分子が空間的に（または3次的に）互いに隣接するようになるため、ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されないTSGプライマーは、相対的に低い蛍光強度を示す（クエンチング状態）。ターゲット核酸配列にTSGプライマーがハイブリッド形成される場合、蛍光レポーター分子及びクエンチャー分子が空間的に互いに離隔されるため、相対的に高い蛍光強度を示す（脱消光状態）。 10

【0077】

前記クエンチング - 脱消光現象が生じ得るなら、レポーター分子及びクエンチャー分子は、TSGプライマーのどのような位置（site）にも配置できる。

【0078】

本発明の好ましい具現例によると、レポーター分子及びクエンチャー分子は、互いに4～50ヌクレオチド離隔された位置にある。

【0079】

本発明の好ましい具現例によると、レポーター分子及びクエンチャー分子は、互いに最大50ヌクレオチド離隔されて、より好ましくは、互いに最大40ヌクレオチド、さらに好ましくは、互いに最大30ヌクレオチド、最も好ましくは、互いに最大25ヌクレオチド離隔される。 20

【0080】

本発明の好ましい具現例によると、レポーター分子及びクエンチャー分子は、少なくとも4ヌクレオチド離隔されて、より好ましくは、少なくとも6ヌクレオチド、さらに好ましくは、少なくとも10ヌクレオチド、最も好ましくは、少なくとも15ヌクレオチド離隔される。

【0081】

本発明の好ましい具現例によると、TSGプライマーのレポーター分子または前記クエンチャー分子は、5'-末端またはその5'-末端から1～5ヌクレオチド離隔された位置にある。例えば、レポーター分子は、TSGプライマーの5'-末端またはその5'-末端から1～5ヌクレオチド離隔された位置にあり、クエンチャー分子は、レポーター分子から4～50ヌクレオチド離隔された位置にある。 30

【0082】

本発明の好ましい具現例によると、TSGプライマーのレポーター分子は、5'-末端またはその5'-末端から1～10ヌクレオチド離隔された位置、より好ましくは、5'-末端に位置する。

【0083】

本発明の好ましい具現例によると、TSGプライマーのクエンチャー分子は、5'-末端またはその5'-末端から1～10ヌクレオチド離隔された位置、より好ましくは、5'-末端に位置する。 40

【0084】

本発明に利用できるレポーター分子及びクエンチャー分子は、当業界に公知されている如何なるものでも利用できる。その例は、下記の通りである：Cy2TM（506）、YOPROTM-1（509）、YOYOTM-1（509）、Calcein（517）、FITC（518）、FluorXTM（519）、AlexaTM（520）、Rhodamine 110（520）、5-FAM（522）、Oregon GreenTM 500（522）、Oregon 25 GreenTM 488（524）、RiboGreenTM（525）、Rhodamine GreenTM（527）、Rhodamine 123（529）、Magnesium GreenTM（531）、C 50

alcium GreenTM (533)、TO-PROTM-1 (533)、TOTO1 (533)、JOE (548)、BODIPY 530/550 (550)、DiI (565)、BODIPY TMR (568)、BODIPY 558/568 (568)、BODIPY 564/570 (570)、Cy3TM (570)、AlexaTM 546 (570)、TRITC (572)、Magnesium OrangeTM (575)、Phycocerythrin R&B (575)、Rhodamine Phalloidin (575)、Calcium OrangeTM (576)、Pyronin Y (580)、Rhodamine B (580)、TAMRA (582)、Rhodamine RedTM (590)、Cy3.5TM (596)、ROX (608)、Calcium CrimsonTM (615)、AlexaTM 594 (615)、Texas Red (615)、Nile Red (628)、YO-PROTM-3 (631)、YOYOTM-3 (631)、Rphycocyanin (642)、C-Phycocyanin (648)、TO-PROTM-3 (660)、TOTO3 (660)、DiD DiIc (5) (665)、Cy5TM (670)、Thiadicarbocyanine (671) 及び Cy5.5 (694)。括弧の数字は、ナノメートル単位で表示した最大発光波長である。

10

【0085】

適したレポーター-クエンチャー対は、下記のようなたくさんの文献に開示されている：Pesceら、editors, FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (Marcel Dekker, New York, 1971); Whiteら、FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH (Marcel Dekker, New York, 1970); Berlman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2nd EDITION (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, COLOUR AND CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, INDICATORS (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE (Interscience Publishers, New York, 1949); Haugland, R. P., HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, Sixth Edition, Molecular Probes, Eugene, Oregon, 1996; U.S. Pat. Nos. 3,996,345 及び 4,351,760。

20

30

【0086】

本発明において、広範囲波長または特定波長の蛍光をクエンチングできる非蛍光ブラッククエンチャー分子が利用できるということは、注目すべきことである。

40

【0087】

THDプライマーに適用されるFRET標識において、レポーターは、FRETの供与体を含み、クエンチャーは、FRETのその他のパートナー(受容体)を含む。例えば、フルオレセイン色素(fluorescein dye)は、レポーター分子として利用されて、ロダミン色素(rhodamine dye)は、クエンチャー分子として利用される。

【0088】

ターゲット核酸配列とのハイブリッド形成に続けて、ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されたTSGプライマーを伸長させるために、プライマー伸長条件下で工程(a)

50

の結果物を鋳型依存的核酸ポリメラーゼと接触させる。

【0089】

表現「プライマー伸長条件下で」は、鋳型依存的核酸ポリメラーゼによりTSGプライマーの3'-末端で伸長反応が発生するに十分な条件を意味する。このような条件は、従来の核酸ポリメラーゼによるプライマー伸長のための条件に従うことができる。例えば、条件は、Joseph Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)で確認することができる。実施例から分かるように、条件には、適する時間の間、相対的に高温(例えば、50 ~ 75)におけるターゲット核酸配列、TSGプライマー、熱安定性DNAポリメラーゼ(例えば、Taq DNAポリメラーゼ)、dNTPs及びMgCl₂のインキュベーションが含まれる。

10

【0090】

TSGプライマーの伸長は、本発明で重要な工程である。TSGプライマーの伸長反応により伸長産物が生成される場合、伸長産物内に含まれたTSGプライマー配列とターゲット核酸配列のより安定的なハイブリッド形成を引き起こす。また、TSGプライマーの伸長反応は、TSGプライマーの標識が伸長産物内に含まれるようにして、これにより、増幅産物の量に比例し、シグナルの強度が増加する。本発明で発生されるこのようなカップリング現象は、より正確なターゲット核酸配列の定量分析を可能にする。本発明によると、標識プローブとは異なって、TSGプライマー自体が非特異的に非ターゲット配列にハイブリッド形成される場合、高温(例えば、50 ~ 85)のような厳格条件(stringent conditions)下でシグナル検出を行うことにより、如何なる擬陽性シグナルも生じないようにすることができる。また、TSGプライマーの伸長は、ターゲット核酸配列を増幅させて、ターゲット増幅とシグナル増幅を同時的に可能にする。

20

【0091】

本発明によると、鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、当業界に知られた如何なる核酸ポリメラーゼも含む。

【0092】

本発明の重要な長所の一つは、ヌクレアーゼ活性無しに、鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用してターゲットシグナルを発生させるということである。

30

【0093】

本発明の好ましい具現例によると、本発明で利用される鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、ヌクレアーゼ活性がない。

【0094】

本発明の好ましい具現例によると、本発明で利用される鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、5' 3'ヌクレアーゼ活性がない。

【0095】

本発明で利用される鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、如何なる核酸ポリメラーゼも可能であり、例えば、E. coli DNAポリメラーゼIの'Klenow'断片、熱安定性DNAポリメラーゼ及びバクテリオファージT7 DNAポリメラーゼを含む。好ましくは、ポリメラーゼは、多様なバクテリア種から得ることができる熱安定性DNAポリメラーゼである。

40

【0096】

本発明の好ましい具現例によると、本発明で利用される鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、5' 3'ヌクレアーゼ活性を有して、前記鋳型依存的核酸ポリメラーゼのポリメラーゼ活性により前記TSGプライマーの3'-末端が伸長されて、前記鋳型依存的核酸ポリメラーゼの5' 3'ヌクレアーゼ活性により前記TSGプライマーの5'-末端が切断され、これによりレポーター分子またはクエンチャー分子が解離されて、ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生される。

50

【0097】

好ましくは、5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、熱安定性DNAポリメラーゼであり、これは、多様なバクテリア種から得ることができて、例えば、*Thermus aquaticus* (Taq)、*Thermus thermophilus*、*Thermus filiformis*、*Thermus flavus*、*Thermus antranikianii*、*Thermus caldophilus*、*Thermus chliarophilus*、*Thermus igniterrae*、*Thermus lacteus*、*Thermus oshimai*、*Thermus ruber*、*Thermus rubens*、*Thermus scotoductus*、*Thermus silvanus*、*Thermus species Z* 10
05及び*Thermus species sps 17*を含む。最も好ましくは、5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、Taq DNAポリメラーゼである。

【0098】

興味深いことに、本発明者らは、ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されたTSGプライマーを5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼと接触させることだけで、その3'-末端が伸長されるだけでなく、その5'-末端部位(例えば、5'-末端)が切断されるということを見出した。また、TSGプライマー5'-末端部位の切断反応は、本発明のシグナル発生に關与する。

【0099】

要するに、本発明がTSGプライマーの5'-切断反応と連關されて実施される場合、本発明は、ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを二つの異なる方式で提供することができる：(i)ターゲット核酸配列とのハイブリッド形成による構造変化により引き起こされた、TSGプライマー上の相互作用的標識システムのシグナル脱消光(unquenching)を利用したシグナル発生；及び(ii)5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用したTSGプライマー5'-末端部位における5'-切断反応によるシグナル発生。

【0100】

本発明の好ましい具現例によると、TSGプライマーは、その5'-末端または5'-末端部位にターゲット核酸配列とマッチする配列を有する。

【0101】

本明細書において、TSGプライマーを言及しながら使用された用語'5'-末端部位'は、TSGプライマーの5'-末端からある長さの連続的な配列を含む部位または領域を意味する。好ましくは、TSGプライマーの5'-末端部位は、その5'-末端及び5'-末端から離隔された1~10ヌクレオチドを含む配列を有する(より好ましくは、1~7ヌクレオチド、さらに好ましくは、1~5ヌクレオチド、よりさらに好ましくは、1~3ヌクレオチド)。

【0102】

択一的に、本発明では、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用することができる。

【0103】

本発明の好ましい具現例によると、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用する場合、TSGプライマーは、その3'-末端部位または3'-末端に少なくとも一つのミスマッチヌクレオチド配列を含む。

【0104】

本発明の好ましい具現例によると、TSGプライマーがその3'-末端部位または3'-末端に少なくとも一つのミスマッチヌクレオチド配列を含む場合、ミスマッチヌクレオチド配列は標識を有しない。

【0105】

ミスマッチヌクレオチドの数は、1~5、好ましくは、1~4、より好ましくは1~3

10

20

30

40

50

、さらに好ましくは1～2、最も好ましくは、1である。プライマーに少なくとも二つのミスマッチヌクレオチドがある場合、ミスマッチヌクレオチドは、連続的または不連続的に位置することができる。

【0106】

本発明の好ましい具現例によると、3' 5'エキソヌクラーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用する場合、TSGプライマーは、その3'-末端部位に鋳型依存的核酸ポリメラーゼの3' 5'ヌクラーゼ活性に対して耐性を有するバックボーンを含む少なくとも一つのミスマッチヌクレオチドを有する。

【0107】

本発明の好ましい具現例によると、3' 5'エキソヌクラーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用する場合、TSGプライマーは、その3'-末端に、鋳型依存的核酸ポリメラーゼの3' 5'ヌクラーゼ活性に対して耐性を有するバックボーンを含む単一マッチ決定ヌクレオチド(Single match-determinant nucleotide)を有する。

【0108】

TSGプライマーの3'-末端の単一マッチ決定ヌクレオチドは、反対鎖に存在するマッチヌクレオチドにハイブリッド形成される場合にのみ、塩基対を形成する。しかし、反対鎖に存在するヌクレオチドが単一マッチ決定ヌクレオチドに相補的ではない場合、TSGプライマーの単一マッチ決定ヌクレオチドは、塩基対を形成できない。

【0109】

本発明において、TSGプライマーの3'-末端が塩基対を形成しなかった場合、TSGプライマーの3'-末端の単一マッチ決定ヌクレオチドは、3' 5'ヌクラーゼ活性に対して耐性を有するバックボーンを含むため、切断反応が発生されず、これにより、伸長反応も発生されない。

【0110】

TSGプライマーの伸長は、伸長されたTSGプライマーがない場合と比較し、ターゲット配列とのより高い安定的ハイブリッド形成を提供する。したがって、温度を調節することにより、伸長産物(即ち、ターゲット配列)の存在は、シグナル変化を分析して検出することができる。

【0111】

好ましくは、本発明は、ヌクレオチド変異の検出において非常に有用である。より好ましくは、本発明により検出されるヌクレオチド変異は、塩基置換であり、さらに好ましくは、SNP(一塩基多型、single nucleotide polymorphism)及び点突然変異である。

【0112】

本発明の好ましい具現例によると、ヌクレオチド変異は、TSGプライマーの3'-末端の単一マッチ決定ヌクレオチドの向かい側に位置させることができる。

【0113】

3' 5'ヌクラーゼ活性に対して耐性を有するバックボーンは、当業界に知られた如何なるものも含む。例えば、前記ヌクレオチドは、多様なホスホロチオエート連結(linkage)、ホスホネート連結、ホスホロアミデート連結及び2'-カーボヒドレート修飾を含む。本発明の好ましい具現例によると、3' 5'ヌクラーゼに対して耐性を有するバックボーンを含むヌクレオチドは、ホスホロチオエート連結、アルキルホスホトリエステル連結、ヒドロゲンホスホネート連結、アルキルホスホロアミデート連結、アリールホスホロアミデート連結、ホスホロセネート連結、2'-O-アミノプロピール修飾、2'-O-アルキル修飾、2'-O-アリール修飾、2'-O-ブチル修飾、アノマオリゴデオキシヌクレオチド及び1-(4'-チオ-D-リボフラノシル)修飾である。

【0114】

本発明の好ましい具現例によると、3' 5'エキソヌクラーゼ活性を有する鋳型依

10

20

30

40

50

存的核酸ポリメラーゼは、熱安定性DNAポリメラーゼであり、これは、多様なバクテリア種から得ることができ、*Thermococcus litoralis*、*Thermococcus barossi*、*Thermococcus gorgonarius*、*Thermotoga maritima*、*Thermotoga neapolitana*、*Thermosiphon africanus*、*Pyrococcus furiosus* (Pfu)、*Pyrococcus woesei*、*Pyrococcus horikoshii*、*Pyrococcus abyssi*、*Pyrodictium occultum*、*Aquifex pyrophilus*及び*Aquifex aeolicus*のDNAポリメラーゼを含む。最も好ましくは、3' 5'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、Pfu DNAポリメラーゼである。

10

【0115】

本発明の好ましい具現例によると、本発明は、ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを増幅させるために、前記工程(a) - (b)または(a) - (c)を少なくとも2回反復する工程と、その反復サイクルの間に変性過程とをさらに含む。サイクル反復回数は、特に制限されず、典型的に少なくとも2回、好ましくは、少なくとも5回、より好ましくは、少なくとも10回である。変性は、工程(a)で形成された二本鎖二合体が一本鎖核酸の状態にする。変性に対する方法は、熱、アルカリ、ホルムアミド、ウレア及びグリコサル処理、酵素方法(例えば、ヘリカーゼ反応)、及び結合タンパク質を含むが、これらに限定されるものではない。例えば、変性は、80乃至105範囲の温度に熱を加えて達成できる。このような処理を達成するための一般的な方法は、Joseph S

20

【0116】

最終的に、ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが検出される。シグナルの検出は、反復の各サイクルで(即ち、リアルタイム方式)、反復の終了時点で(即ち、エンドポイント方式)、または、反復の間、指定時間間隔のそれぞれで実施できる。好ましくは、シグナル検出は、反復の各サイクルで行って、これは、検出の正確性を向上させる。

30

【0117】

各標識に対するシグナルは、従来の方法により検出されるかまたは測定することができる。例えば、蛍光シグナルは、従来の方法、例えば、蛍光強度測定器を利用して検出するか測定することができる。

【0118】

本発明の長所は、シグナル検出工程でも明確に現れる。シグナル検出が高温(例えば、50~85)のような高厳格条件(High stringent conditions)下で行われる場合、非-ターゲット核酸配列に非特異的にハイブリッド形成されて発生され得る擬陽性シグナルが完璧に除去できる。

【0119】

本発明の好ましい具現例によると、レポーター分子及びクエンチャー分子から構成された標識システムにおいて、レポーター分子のシグナルの変化を測定するか分析して、シグナル検出が実施される。

40

【0120】

本発明の好ましい具現例によると、クエンチャー分子が蛍光である場合、シグナル検出は、クエンチャー分子のシグナル変化、またはクエンチャー分子及びレポーター分子のシグナル変化を測定して、シグナル検出が実施される。

【0121】

本発明の好ましい具現例によると、クエンチャー分子は蛍光であり、検出されるターゲット核酸配列の存在を示すシグナルは、蛍光クエンチャー分子から出るシグナルである。

【0122】

50

本発明の目立つ特徴の一つは、液相及び固相の両方において成功的なシグナルが得られるということである。本発明の方法は、大きく二種の相、即ち、液相及び固相で実施することができる。

【0123】

I. 液相におけるターゲット検出

1. T S Gプライマー及び核酸ポリメラーゼを利用したターゲット検出

第一のプロトコールによると、T S Gプライマー及び鑄型依存的核酸ポリメラーゼを利用して、ターゲット核酸配列を検出する(図1a及び1b参照)。

【0124】

第一のプロトコールは、以下の工程を含む：

(a) ターゲット核酸配列をT S Gプライマーとハイブリッド形成させる工程であって、前記T S Gプライマーは、(i)前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列、及び(ii)レポーター分子及びクエンチャー分子を含み、前記T S Gプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成されない場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に互いに隣接し、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルをクエンチングして、前記T S Gプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成される場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に離隔され、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルを脱消光して、これにより、前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生されて取得される工程と、

(b) 工程(a)の結果物をプライマー伸長条件下で鑄型依存的核酸ポリメラーゼと接触させる工程であって、前記T S Gプライマーの3'-末端で3'-伸長反応が発生する工程と、

(c) 前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを検出する工程であって、これにより、前記シグナルは、DNAまたは核酸混合物内にターゲット核酸配列が存在することを示す工程。

【0125】

本発明の好ましい具現例によると、工程(c)におけるシグナル検出は、リアルタイム方式、エンド-ポイント方式または指定時間間隔方式で行われる。

【0126】

2. T S Gプライマー及び5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する核酸ポリメラーゼを利用したターゲット検出

第二のプロトコールによると、T S Gプライマー及び5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する核酸ポリメラーゼを利用してターゲット核酸配列を検出する。

【0127】

好ましくは、第二のプロトコールは、以下の工程を含む：

(a) ターゲット核酸配列をT S Gプライマーとハイブリッド形成させる工程であって、前記T S Gプライマーは、(i)前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列、及び(ii)レポーター分子及びクエンチャー分子を含み、前記T S Gプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成されない場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に互いに隣接し、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルをクエンチングして、前記T S Gプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成される場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に離隔され、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルを脱消光して、これにより、前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生されて取得される工程と、

(b) 工程(a)の結果物をプライマー伸長及び切断条件下で、5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する鑄型依存的核酸ポリメラーゼと接触させる工程であって、前記T S Gプライマーの3'-末端で3'-伸長反応が発生し、前記T S Gプライマーの5'-末端部位で5'-切断反応が発生し、これにより前記レポーター分子または前記クエンチャー分子が

10

20

30

40

50

前記 T S G プライマーから放出されて、ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生される工程と、

(c) 前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを検出する工程であって、これにより、前記シグナルは、DNA または核酸混合物内にターゲット核酸配列が存在することを示す工程。

【0128】

本発明の好ましい具現例によると、本発明は、ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを増幅させるために、前記工程(a) - (b) または (a) - (c) を少なくとも2回反復する工程と、その反復サイクルの間に変性過程とをさらに含む。

【0129】

本発明の好ましい具現例によると、工程(c)におけるシグナル検出は、リアルタイム方式、エンド-ポイント方式または指定時間間隔方式で行われる

【0130】

3. T S G プライマー、カウンターパートプライマー及び核酸ポリメラーゼを利用したターゲット検出

本発明の第三のプロトコールは、(i) 鑄型依存的核酸ポリメラーゼ及び(ii) ターゲット核酸配列を増幅できる T S G プライマー及びそのカウンターパートプライマー (Counterpart primer) で構成された一対のプライマーを利用してターゲット核酸配列を検出して、このようなターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを増幅すると同時に、ターゲットも増幅させる (図 2 a 及び 2 b 参照)。

【0131】

カウンターパートプライマーは、T S G プライマーであるか、T S G プライマーではない。

【0132】

好ましくは、この第三のプロトコールは、以下の工程を含み、T S G プライマーを利用した増幅反応を通じて DNA または核酸混合物内でターゲット核酸配列を検出する：

(a) 前記ターゲット核酸配列を増幅できる正方向プライマー及び逆方向プライマーとしての二つのプライマーを含む一対のプライマーと前記ターゲット核酸配列をハイブリッド形成させる工程であって、前記二つのプライマーのうち、少なくとも一つは、T S G プライマーであって、前記 T S G プライマーは、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列及び(ii) レポーター分子及びクエンチャー分子を含み、前記 T S G プライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成されない場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記 T S G プライマーで3次元的に互いに隣接し、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルをクエンチングして、前記 T S G プライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成される場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記 T S G プライマーで3次元的に離隔され、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルを脱消光して、これにより、前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生されて取得される工程と

(b) 工程(a)の結果物をプライマー伸長条件下で鑄型依存的核酸ポリメラーゼと接触させる工程であって、前記二つのプライマーの3'-末端で3'-伸長反応が発生する工程と、

(c) 工程(b)の結果物を変性させる工程と、

(d) 前記工程(a) - (c) を少なくとも2回反復し、前記ターゲット核酸配列及び前記ターゲット核酸配列の存在を示す前記シグナルを全て増幅する工程と、

(e) 前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを検出する工程であって、前記シグナル検出は、工程(d)の前記反復の各サイクルにおいて、工程(d)の前記反復の終了時点で、または前記反復の間の指定時間間隔のそれぞれで行われて、このようなシグナルは、ターゲット核酸配列の存在を示す工程。

【0133】

4. T S G プライマー、カウンターパートプライマー及び5' 3'ヌクレアーゼ活性を

10

20

30

40

50

有する核酸ポリメラーゼを利用したターゲット検出

本発明の第四のプロトコールは、(i) 5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼ及び(i i)ターゲット核酸配列を増幅できるT S Gプライマー及びそのカウンタープライマーで構成された一对のプライマーを利用してターゲット核酸配列を検出し、このようなターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを増幅すると同時に、ターゲットも増幅させる(図3 a及び3 b参照)。

【0134】

好ましくは、第四のプロトコールは、以下の工程を含む：

(a) 前記ターゲット核酸配列を増幅できる正方向プライマー及び逆方向プライマーとしての二つのプライマーを含む一对のプライマーと前記ターゲット核酸配列をハイブリッド形成させる工程であって、前記二つのプライマーのうち、少なくとも一つは、T S Gプライマーであって、前記T S Gプライマーは、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列及び(i i) レポーター分子及びクエンチャー分子を含み、前記T S Gプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成されない場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に互いに隣接し、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルをクエンチングして、前記T S Gプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成される場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に離隔され、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルを脱消光して、これにより、前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生されて取得される工程と、
 (b) 工程(a)の結果物をプライマー伸長及び切断条件下で、鋳型依存的核酸ポリメラーゼと接触させる工程であって、前記T S Gプライマーの3' - 末端で3' - 伸長反応が発生し、前記T S Gプライマーの5' - 末端部位で5' - 切断反応が発生し、これにより前記レポーター分子または前記クエンチャー分子が前記T S Gプライマーから放出されて、ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生される工程と、
 (c) 工程(b)の結果物を変性させる工程と、
 (d) 前記工程(a) - (c)を少なくとも2回反復し、前記ターゲット核酸配列及び前記ターゲット核酸配列の存在を示す前記シグナルを全て増幅する工程と、
 (e) 前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを検出する工程であって、前記シグナル検出は、工程(d)の前記反復の各サイクルにおいて、工程(d)の前記反復の終了時点で、または前記反復の間の指定時間間隔のそれぞれで行われて、このようなシグナルは、ターゲット核酸配列の存在を示す工程。

【0135】

II. 固相におけるターゲット検出

本発明の格別な長所は、マイクロアレイのような固相においてもターゲット核酸配列を検出するに非常に効果的であるという点である。

【0136】

本発明の好ましい具現例によると、本発明は固相で行われて、T S Gプライマーは、その5' - 末端を介して固相基質の表面に固定化される。

【0137】

1. T S Gプライマー及び核酸ポリメラーゼを利用したオン - チップ(O n - C h i p) ターゲット検出

この第一の固相プロトコールによると、T S Gプライマー及び鋳型依存的ポリメラーゼを利用して、ターゲット核酸配列を固相で検出する(参照図4 a及び4 b)。

【0138】

好ましくは、第一のプロトコールは、以下の工程を含む：

(a) 前記ターゲット核酸配列を前記T S Gプライマーとハイブリッド形成させる工程であって、前記T S Gプライマーは、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列及び(i i) レポーター分子及びクエンチャー分子を含み、前記T S Gプライマーは、その5' - 末端を介して固相基質の表面に固定化されて、前記T S

Gプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成されない場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に互いに隣接し、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルをクエンチングして、前記T S Gプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成される場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に離隔され、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルを脱消光して、これにより、前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生されて取得される工程と、

(b)工程(a)の結果物をプライマー伸長条件下で鋳型依存的核酸ポリメラーゼと接触させる工程であって、前記T S Gプライマーの3'-末端で3'-伸長反応が発生する工程と、

10

(c)前記固相で前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを検出する工程であって、これにより、前記シグナルは、DNAまたは核酸混合物内にターゲット核酸配列が存在することを示す工程。

【0139】

2. T S Gプライマー、カウンターパートプライマー及び核酸ポリメラーゼを利用したオン-チップ(On-Chip)ターゲット検出

本発明の第二の固相プロトコールは、(i)鋳型依存的核酸ポリメラーゼ及び(ii)ターゲット核酸配列を増幅できるT S Gプライマー及びそのカウンターパートプライマー(Counterpart primer)で構成された一对のプライマーを利用してターゲット核酸配列を検出して、このようなターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを増幅すると同時に、ターゲットも増幅させる。

20

【0140】

即ち、第二の固相プロトコールは、オン-チップリアルタイムPCR技術を実現する。

【0141】

好ましくは、第二の固相プロトコールは、以下の工程を含む：

(a)前記ターゲット核酸配列を増幅できる正方向プライマー及び逆方向プライマーとしての二つのプライマーを含む一对のプライマーと前記ターゲット核酸配列をハイブリッド形成させる工程であって、前記二つのプライマーのうち、少なくとも一つは、T S Gプライマーであって、前記T S Gプライマーは、(i)前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列及び(ii)レポーター分子及びクエンチャー分子を含み、前記二つのプライマーの少なくとも一つは、その5'-末端を介して固相基質の表面に固定化されて、前記固定化されたプライマーは、T S Gプライマーであって、前記T S Gプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成されない場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に互いに隣接し、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルをクエンチングして、前記T S Gプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成される場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に離隔され、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルを脱消光して、これにより、前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生されて取得される工程と

30

(b)工程(a)の結果物をプライマー伸長条件下で鋳型依存的核酸ポリメラーゼと接触させる工程であって、前記二つのプライマーの3'-末端で3'-伸長反応が発生する工程と、

40

(c)工程(b)の結果物を変性させる工程と、

(d)前記工程(a)-(c)を少なくとも2回反復し、前記ターゲット核酸配列及び前記ターゲット核酸配列の存在を示す前記シグナルを全て増幅する工程と、

(e)前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを検出する工程であって、前記シグナル検出は、工程(d)の前記反復の各サイクルにおいて、工程(d)の前記反復の終了時点で、または前記反復の間の指定時間間隔のそれぞれで行われて、このようなシグナルは、ターゲット核酸配列の存在を示す工程。

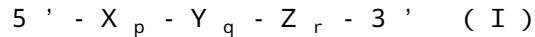
【0142】

50

本発明の好ましい具現例によると、前記 T S G プライマーは、その 5' - 末端を介して固相基質の表面に固定化されて、他の一つのプライマーは、固定化されておらず、T S G プライマーではない。

【0143】

本発明の好ましい具現例によると、T S G プライマー及びカウンターパートプライマーは、下記一般式 I の二重プライミングオリゴヌクレオチド (D P O) 構造を有する：



(式中、 X_p は、ターゲット核酸と相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を有する 5' - 第 1 プライミング部位 (5' - first priming portion) であり、 Y_q は、少なくとも三つ以上のユニバーサル塩基を含む分割部位 (separation portion) であり、 Z_r は、ターゲット核酸と相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を有する 3' - 第 2 プライミング部位 (3' - second priming portion) であり、 p 、 q 及び r は、ヌクレオチドの数を示し、 X 、 Y 及び Z は、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドであり、5' - 第 1 プライミング部位の T_m は、3' - 第 2 プライミング部位の T_m より高く、前記分割部位は、前記三つの領域のうち、最も低い T_m を有して、前記分割部位は、ターゲット核酸配列に対するアニーリングに関して、5' - 第 1 プライミング部位を 3' - 第 2 プライミング部位から分割し、これにより、前記オリゴヌクレオチドの前記アニーリング特異性が、前記 5' - 第 1 プライミング部位及び前記 3' - 第 2 プライミング部位により二重的に決定されるようにして、これは結局、前記 T S G プライマーの全体アニーリング特異性を向上させる。) 10

【0144】

D P O 構造は、D S O (dual specificity oligonucleotide) のプライマー形態であって、本発明者らにより最初に提示された (W O 2 0 0 6 / 0 9 5 9 8 1 ; Chun et al., Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene, Nucleic Acid Research, 35 : 6 e 4 0 (2007) 参照)。 20

【0145】

D P O は、ハイブリッド形成またはアニーリングが分割領域により互いに離隔された 5' - 高 T_m 特異性部位 (または 5' - 第 1 プライミング部位) 及び 3' - 低 T_m 特異性部位 (または 3' - 第 2 プライミング部位) により二重的に決定されるようにする新規な概念を具現したもので、非常に驚くべきハイブリッド形成特異性を示す (参照 : W O 2 0 0 6 / 0 9 5 9 8 1 ; Kim et al., Direct detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by multiplex PCR using dual-priming oligonucleotide primers, Journal of Virological Methods, 149 : 76 - 84 (2008) ; Kim, et. al., Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay, Journal of Virological Methods, doi : 10.1016/j.jviromet.2008.11.007 (2008) ; Horii et. al., Use of dual priming oligonucleotide system to detect multiplex sexually transmitted pathogens in clinical specimens, Letters in Applied Microbiology, doi : 10.1111/j.1472-765X.2009.02618x (2009)))。上述のように、D P O は、互いに異なるハイブリッド形 30 40 50

成特性を有する二つのプライマー断片を究極的に有するようになる：初期の安定したハイブリッド形成に關与する5' - 第1プライミング部位；及びターゲット特異性を決定する3' - 第2プライミング部位。

【0146】

本発明の前記DPO構造を有するプライマーを利用して増幅（特に、マルチプレックス増幅）する場合は、擬陽性及び擬陰性結果無しに成功裏にアンプリコン（amplicon）を得ることができる。

【0147】

本発明の好ましい具現例によると、分割部位に位置するユニバーサル塩基は、デオキシイノシン、イノシン、7 - デアザ - 2' - デオキシイノシン、2 - アザ - 2' - デオキシイノシン、2' - OMeイノシン、2' - Fイノシン、デオキシ3 - ニトロピロール、3 - ニトロピロール、2' - OMe 3 - ニトロピロール、2' - F 3 - ニトロピロール、1 - (2' - デオキシ - D - リボフラノシル) - 3 - ニトロピロール、デオキシ5 - ニトロインドール、5 - ニトロインドール、2' - OMe 5 - ニトロインドール、2' - F 5 - ニトロインドール、デオキシ4 - ニトロベンズイミダゾール、4 - ニトロベンズイミダゾール、デオキシ4 - アミノベンズイミダゾール、4 - アミノベンズイミダゾール、デオキシネブラリン、2' - Fネブラリン、2' - F 4 - ニトロベンズイミダゾール、PNA - 5 - イントロインドール、PNA - ネブラリン、PNA - イノシン、PNA - 4 - ニトロベンズイミダゾール、PNA - 3 - ニトロピロール、モルフォリノ - 5 - ニトロインドール、モルフォリノ - ネブラリン、モルフォリノ - イノシン、モルフォリノ - 4 - ニトロベンズイミダゾール、モルフォリノ - 3 - ニトロピロール、ホスホルアミデート - 5 - ニトロインドール、ホスホルアミデート - ネブラリン、ホスホルアミデート - イノシン、ホスホルアミデート - 4 - ニトロベンズイミダゾール、ホスホルアミデート - 3 - ニトロピロール、2' - O - メトキシエチルイノシン、2' - O - メトキシエチルネブラリン、2' - O - メトキシエチル 5 - ニトロインドール、2' - O - メトキシエチル 4 - ニトロベンズイミダゾール、2' - O - メトキシエチル 3 - ニトロピロール、及び前記塩基の組み合わせからなる群から選択される。より好ましくは、分割領域に位置するユニバーサル塩基は、デオキシイノシン、イノシン、1 - (2' - デオキシ - D - リボフラノシル) - 3 - ニトロピロールまたは5 - ニトロインドールであり、最も好ましくは、デオキシイノシンである。

【0148】

好ましくは、前記分割部位は、少なくとも3ユニバーサル塩基を有する連続したヌクレオチドを含み、より好ましくは、少なくとも4ユニバーサル塩基、最も好ましくは、少なくとも5ユニバーサル塩基である。

【0149】

好ましくは、DPO構造の5' - 第1プライミング部位の長さは、3' - 第2プライミング部位より長い。前記5' - 第1プライミング部位は、好ましくは、15 ~ 60ヌクレオチドの長さを有して、より好ましくは、15 ~ 40ヌクレオチド、さらに好ましくは、15 ~ 25ヌクレオチドの長さを有する。3' - 第2プライミング部位は、好ましくは、3 ~ 15ヌクレオチドの長さを有して、より好ましくは、5 ~ 15ヌクレオチド、最も好ましくは、6 ~ 13ヌクレオチドの長さを有する。前記分割部位は、好ましくは、3 ~ 10ヌクレオチド、より好ましくは、4 ~ 8ヌクレオチド、最も好ましくは、5 ~ 7ヌクレオチドの長さを有することが好ましい。本発明の好ましい具現例によると、前記5' - 第1プライミング部位は、40 ~ 80 の T_m を有して、より好ましくは、45 ~ 65 の T_m を有する。3' - 第2プライミング部位は、好ましくは、10 ~ 40 の T_m を有する。前記分割部位は、好ましくは、3 ~ 15 の T_m を有する。

【0150】

本発明の好ましい具現例によると、前記3' - 第1プライミング部位は、40 ~ 80 の T_m を有して、より好ましくは、45 ~ 65 の T_m を有する。前記5' - 第2プライミング部位は、好ましくは、10 ~ 40 の T_m を有する。前記分割部位は、好ま

10

20

30

40

50

しくは、3 ~ 15 の T_m を有する。

【0151】

本発明の好ましい具現例によると、本発明の前記増幅に利用される二つのプライマーは、二つともDPO構造を有する。

【0152】

プライマーを利用してターゲット核酸配列を検出する従来技術は、使用されるプライマー及びプローブの内在的な限界のため、エラーシグナルを完璧に除去することができない。しかし、そのような意図的デザインのDPO構造を含むプライマーは、ごく向上された特異度でターゲット核酸配列にハイブリッド形成されて、エラーシグナル無しにターゲット核酸配列が検出されるようにする。

10

【0153】

本明細書において、プライマーを言及しながら使用される用語‘標準的な’は、DPO構造を有しない全てのプライマーを意味する。それらは、本明細書において標準的なプライマーとして説明される。

【0154】

本発明の好ましい具現例によると、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子の一つは、5' - 第1プライミング部位に位置して、他の一つは、前記5' - 第1プライミング部位、前記3' - 第2プライミング部位または前記分割部位に位置する。

【0155】

本発明は、検出及び/または増幅しようとするターゲット核酸配列に対して、ある特定配列または長さを必要としない。

20

【0156】

mRNAを初期物質として利用する場合、アニーリング工程の実施以前に逆転写工程が必須的であり、これの詳細な内容は、Joseph Sambrookら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); 及び Noonan, K. F.ら, Nucleic Acids Res. 16:10366 (1988)に開示されている。逆転写反応のためには、ランダムヘキサマーまたはmRNAにハイブリッド形成されるオリゴヌクレオチドdTプライマーが利用される。

30

【0157】

オリゴヌクレオチドdTプライマーは、dTMPsから構成されて、dTプライマーがプライマーとしての役割ができる範囲内でこれのdTMPsの一つまたはそれ以上は、他のdNMPで代替できる。逆転写は、RNase H活性を有する逆転写酵素で実施できる。RNase H活性を有する酵素を利用する場合、慎重に反応条件を選択することにより、別途のRNase H切断過程を省くことができる。

【0158】

特に、本発明で検出及び/または増幅可能なターゲット核酸配列は、あらゆる天然(Naturally occurring)の原核細胞核酸、真核細胞(例えば、原生動物と寄生動物、菌類、酵母、高等植物、下等動物、及び哺乳動物と人間を含む高等動物)核酸、ウイルス(例えば、ヘルペスウイルス、HIV、インフルエンザウイルス、Epstein-Barrウイルス、肝炎ウイルス、ポリオウイルスなど)核酸、またはウイロイド核酸を含む。

40

【0159】

少なくとも二つのターゲット核酸配列が同時に検出(マルチプレックス)されるという点で本発明の利点がさらに目立つ。

【0160】

本発明の好ましい具現例によると、ターゲット核酸配列は、少なくとも2種の核酸配列を含み(より好ましくは、少なくとも3種、さらに好ましくは、少なくとも5種)、TSGプライマーは、少なくとも2種のプライマーを含む(より好ましくは、少なくとも3種

50

、さらに好ましくは、少なくとも5種)。本発明の好ましい具現例によると、T S Gプライマーと一緒に対をなしてターゲット核酸配列を増幅できるカウンターパートプライマーは、少なくとも2種のプライマーを含む(より好ましくは、少なくとも3種、さらに好ましくは、少なくとも5種)。

【0161】

例えば、5種のT S Gプライマー(それぞれの異なる発光波長を有する蛍光レポーター分子が含まれている)、5種のカウンターパートプライマー及び核酸試料が含まれた反応容器を利用して本発明が実施される場合、5種の異なるターゲット核酸配列に該当する5種の異なる蛍光シグナルが発生し、リアルタイム方式で5種の異なるターゲット核酸配列が同時に検出される。この場合、使用されたクエンチャー分子は、全て互いに異なる特性を有するように選択することができる。択一的に、使用されたクエンチャー分子の全てまたは一部は、同じ特性を有するように選択することができる。

10

【0162】

また、本発明は、ヌクレオチド変異の検出において非常に有用である。本発明で使用される用語‘ヌクレオチド変異(nucleotide variation)’は、連続的DNA断片または配列の類似したDNA断片において、特定位置に存在するDNA配列のヌクレオチド多様性を意味する。このような連続的DNA断片は、一つの遺伝子または一つの染色体のある他の部位を含む。例えば、本発明で検出されるヌクレオチド変異は、SNP(一塩基多型、Single Nucleotide Polymorphism)、欠失、挿入、置換及び転座を含む。ヌクレオチド変異の例は、ヒトゲノムにある多様な変異(例えば、MTHFR(methylenetetrahydrofolate reductase)遺伝子の変異)、薬剤耐性病原体のヌクレオチド変異及び癌発生関連ヌクレオチドの変異を含む。

20

【0163】

本発明の好ましい具現例によると、本発明で利用されるターゲット核酸配列は、前増幅された(pre-amplified)核酸配列である。前増幅された核酸配列の利用は、本発明のターゲット検出の感度と特異度を大きく増加させる。少量のターゲット核酸配列を適切な水準で前増幅し、次いで本発明によって検出すると、本発明のターゲット検出の感度及び特異度が向上される。興味深いことに、前増幅に利用されたプライマーの下流にある配列にハイブリッド形成されるT S Gプライマーを利用する場合、前記T S Gプライマーは、nestedプライマー役割をして、本発明のターゲット検出の特異性を増加させる。

30

【0164】

本発明の好ましい具現例によると、増幅反応を利用してターゲット核酸配列を検出するために本発明に前増幅された核酸配列を利用する場合、本発明で利用されるプライマー対は、nested増幅のためのプライマー対である。

【0165】

本発明の他の様態によると、本発明は、
(a) T S Gプライマーであって、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列及び(ii) レポーター分子及びクエンチャー分子を含み、前記T S Gプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成されない場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に互いに隣接し、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルをクエンチングして、前記T S Gプライマーがターゲット核酸配列とハイブリッド形成される場合、前記レポーター分子及び前記クエンチャー分子は、前記T S Gプライマーで3次元的に離隔され、前記クエンチャー分子は、前記レポーター分子から出るシグナルを脱消光して、これにより、前記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルが発生されて取得されるT S Gプライマーと、

40

(b) 鋳型依存的核酸ポリメラーゼであって、前記T S Gプライマーと前記ターゲット核酸配列間のハイブリッド形成結果物に作用し、前記T S Gプライマーの3'-末端に3'

50

- 伸長反応を発生させることができる鋳型依存的核酸ポリメラーゼと、を含み、T S G プライマー (Target Signal Generating primer) を利用してDNAまたは核酸混合物からターゲット核酸配列を検出するためのキットを提供する。

【0166】

本発明のキットは、上述の本発明の検出方法を実施できるように構成されたものであるため、その中腹する内容は、本明細書の過度なる複雑性を避けるために、その記載を省く。

【0167】

本発明のキットは、バッファー、DNAポリメラーゼ助因子及びデオキシリボヌクレオチド-5'-トリホスフェートのようなターゲット増幅PCR反応(例えば、PCR反応)に必要な試薬を選択的に含むことができる。選択的に本発明のキットは、多様なポリヌクレオチド分子、逆転写酵素、多様なバッファー及び試薬、及びDNAポリメラーゼ活性を抑制する抗体を含むことができる。

【0168】

また、キットは、陽性対照群及び陰性対照群反応を実施するために必要な試薬を含むことができる。ある一つの特典反応で使用される試薬の最適量は、本明細書の開示事項を習得した当業者により容易に決定できる。典型的に、本発明のキットは、上記言及された構成成分を含む別途の包装または区分で製作される。

【0169】

本発明の特徴と利点は、下記のように要約できる：

(a) 本発明は、ターゲット核酸配列を検出するための新規なリアルタイムPCR方法に関するものである。T S G プライマーは、二重相互作用的標識システムから出るターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを発生させることができ、PCR反応の間、その3'-伸長反応によりターゲット核酸配列を増幅させることができる。したがって、本発明は、リアルタイム方式でターゲット増幅と同時にターゲット核酸配列を検出する新規な方法を提供することができる。

(b) T S G プライマーの伸長反応は、伸長産物内に二重標識T S G プライマーが含まれるようにして、これにより、増幅産物の量に比例し、シグナルの強度が発生する。本発明に適用されるこのようなカップリング現象は、より正確なターゲット核酸配列の定量分析を可能にする。

(c) 標識プローブとは異なって、T S G プライマー自体が如何なるプライマー伸長反応無しに非特異的に非ターゲット配列にハイブリッド形成される場合、高温のような厳格条件(Stringent conditions)下でシグナル検出を行うことにより、擬陽性シグナルが生じないようにすることができる。

(d) 本発明のシグナル発生は、ヌクレアーゼ活性による切断反応無しに、ターゲット核酸配列とのハイブリッド形成によってのみ達成できる。この場合、本発明は、5' 3'ヌクレアーゼ活性または3' 5'ヌクレアーゼ活性を有する核酸ポリメラーゼを必ずしも必要とせず、したがって、様々な応用のために多様な核酸ポリメラーゼを利用することができる。

(e) 5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する核酸ポリメラーゼを利用する場合、本発明は、ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されるT S G プライマーの5'-切断反応からシグナルを得ることができ、これは、ターゲット検出効率を向上させる。

(f) 従来のリアルタイムPCR方法は、標識プローブまたはヘアピン構造のように複雑に修飾されたプライマー構造を必要とし、これは、プローブ及びプライマーのデザイン、合成または配列の選択を難しくした。しかし、本発明のT S G プライマーは、追加的な標識プローブまたは複雑に修飾されたプライマー構造無しに、ターゲット増幅だけでなく、シグナル増幅にも利用でき、リアルタイムPCRのためのプライマーのデザイン、合成及び配列の選択が非常に簡単且つ容易である。したがって、本発明は、従来リアルタイムPCR技術に比べ、より便利な方式で実施できる新規なリアルタイムPCR方法を提供す

10

20

30

40

50

る。

(g) 従来のプローブベースのリアルタイムPCR方法は、プライマーだけではなく、プローブに対するハイブリッド形成条件を最適化することが必要であるため、従来のプローブベースのリアルタイムPCR方法の最適化は非常に難しかった。ヘアピンループを形成するテイルを有するプライマーを利用する従来のリアルタイムPCR方法は、プライマーにおけるヘアピンループ形成及び修飾を考慮して反応条件を最適化する必要がある。しかし、本発明は、如何なる構造的修飾無しに、プライマーに対する最適化だけを考慮すればよいため、このような従来のリアルタイムPCR方法の最適化に係わる問題点及び短所から完璧に自由である。

(h) 従来のリアルタイムPCR方法は、プライマーまたはプローブのデザイン及び最適化が難しいため、マルチプレックスアッセイに適切ではない。それに対し、本発明は、リアルタイムPCRにおいて、追加的なプローブまたは複雑に修飾されたプライマー構造無しに、標識されたプライマーだけを利用するため、マルチプレックス方式で卓越にリアルタイムターゲット検出が可能である。

(i) 従来のリアルタイムPCRプローブと比較し、TSGプライマーは、進行過程の間伸長されて、伸長されたTSGプライマーは、ターゲット核酸配列に対してより高い結合力を示す。従来のリアルタイムPCRプライマーは、ヘアピン構造のように複雑に修飾された構造を必要とし、これは、ターゲット核酸配列との結合を妨害する。その反面、TSGプライマーは、そのような修飾を必要としないため、TSGプライマーがターゲット核酸配列とのよりよい結合効率を有する。この特徴は、本発明の方法によるターゲット検出効率の向上に寄与する。

(j) 本発明の方法は、標準的なPCR反応に利用できるようにデザインされたプライマーを標識化して、この標識プライマーをTSGプライマーとしてリアルタイムPCR反応に適用することにより、リアルタイムPCR反応を容易に実施することができる。要するに、従来のPCR反応でアンプリコンを生成させるプライマーを適した標識で容易に標識した後、本発明によってリアルタイムPCR反応によるターゲット核酸配列の検出に利用する。したがって、本発明の方法は、リアルタイムPCRアッセイの開発において、時間及び費用面で効率的である。

(k) 上記論議のように、本発明で使用されるDPO構造を有するプライマーは、結合特異性の向上をもたらし、これにより、リアルタイムPCR反応において、プライマーの非ターゲット結合に係わる擬陽性シグナルが除去される。

【実施例】

【0170】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明するが、これら実施例は、本発明をより具体的に説明するためのものであって、本発明の範囲がこれら実施例に限定されないことは、本発明の属する技術分野で通常の知識を有する者にとっては自明なことであろう。

【0171】

実施例1：ターゲット核酸配列の検出に5' 3'エキソヌクレアーゼ活性のないDNAポリメラーゼを利用したTSGプライマーの評価

5' 3'エキソヌクレアーゼ活性のない鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用する場合、TSGプライマーのターゲットハイブリッド形成及び伸長だけで、本発明のTSGプライマーがターゲット核酸配列を検出するに十分なシグナルを発生できるかどうかを評価した。

【0172】

この評価を実験するために、本発明者らは、*Streptococcus pneumoniae* 遺伝子または*Staphylococcus aureus* 遺伝子をターゲット鋳型として利用した。実験の便宜のために、*S. pneumoniae* 遺伝子または*S. aureus* 遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドを鋳型として利用した。5' 3'エキソヌクレアーゼ活性のない Stoffel 断片 (Stoffel fragment) をDNAポリメラーゼとして利用した。レポーター分子及びクエンチャー分子間の

10

20

30

40

50

離隔された程度の異なる二つのTSGプライマーを各ターゲットに対してそれぞれ実験した。6-FAM(6-carboxyfluorescein)を蛍光レポーター分子として利用して、TSGプライマーの5'-末端に位置させた。BHQ-1(Black Hole Quencher 1)をクエンチャー分子として利用した。変性、ハイブリッド形成及びプライマー伸長の反復無しに核酸合成反応を行った。指定時間間隔(pre determined time interval)でシグナルを測定した。

【0173】

A. S. pneumoniae 遺伝子の検出のための核酸合成反応

S. pneumoniae 遺伝子のターゲット核酸配列を鋳型として利用する場合、本実施例で利用された合成鋳型及びTSGプライマーの配列は、下記の通りである：

SP__T105 5'-TTACTGAAAGACAATGAAGACAACCTAACAGGGGAAGATGTTTCGCGAAGGCTTAACTGCAGTTATCTCAGTTAAACACCCAAATCCACAGTTTGAAGGACAAACC-3'(SEQ ID NO:1)

SP__TSG(9) 5'-[6-FAM]TCCTTCAAAC[T(BHQ-1)]GTGGATTTGGGTGT-3'(SEQ ID NO:2)

SP__TSG(21) 5'-[6-FAM]TCCTTCAAACGTGGATTTGGG[T(BHQ-1)]GT-3'(SEQ ID NO:3)

(括弧内の数字9または21は、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔されたヌクレオチド数を意味する。)

【0174】

鋳型(SEQ ID NO:1)2pmole、10xストッフエルバッファー(Stoffel buffer)[100mM Tris-HCl(pH8.3)及び100mM KClを含有した]2μL、Ampli Taq(登録商標)DNAポリメラーゼ、ストッフエルフラグメント(Applied Biosystems、US)1unit、4種のdNTPs(dATP、dCTP、dGTP及びdTTP)それぞれ200μM、5mM MgCl₂及びTSGプライマー(SEQ ID NO:2または3)5pmoleを含有した20μLの最終容量で、TSGプライマーを利用した核酸合成反応を行った；前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー(CFX96、Bio-Rad)に設置し；前記反応混合物を95℃で2分間変性させて、50℃で40分間インキュベーションした。1分間隔で発生したシグナルを検出した。

【0175】

図5に示されたように、二つのTGSプライマーのそれぞれは、鋳型のない場合(No.2及び4)より、鋳型のある場合(No.1及び3)がより高い蛍光強度を示した。したがって、TSGプライマーが核酸合成反応の間、TSGプライマーのハイブリッド形成及び伸長を通じて、S. pneumoniae 遺伝子を検出するに十分なシグナルを提供するということが分かる。

【0176】

鋳型の有無において、クエンチャー分子から9ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー(SEQ ID NO:2)より、クエンチャー分子から21ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー(SEQ ID NO:3)がさらに明らかなシグナル強度の差異(即ち、RFU値の差異)を示したことは、注目すべきことである。

【0177】

B. S. aureus 遺伝子の検出のための核酸合成反応

S. aureus 遺伝子のターゲット核酸配列を鋳型として利用する場合、本実施例で利用された合成鋳型及びTSGプライマーの配列は、下記の通りである：

SA__T200 5'-GCCAATAAAACTAGGAGGA AATTTAAATGTTAGAATTTGAACAAGGATTTAATCATTTAGCGACTTTAAAGGTCATTTGGTGTAGGTGGTGGCGGTAAACAACGCCCGTAA

CCGAATGATTGACCAACGGGAATGAATAATGTTGAATTTATC
GCTATCAACACAGACGGTCAAGCTTTAACTTATCTAAAG
CTGAATCTAAA - 3' (SEQ ID NO: 4)

SA__TSG(6) 5' - [6-FAM]CATTC CG [T(BHQ-1)]GGT
CAATCATTCGGTT - 3' (SEQ ID NO: 5)

SA__TSG(21) 5' - [6-FAM]CATTC CGTGGTCAATCATTC
CGG [T(BHQ-1)]T - 3' (SEQ ID NO: 6)

(括弧内の数字6または21は、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔されたヌクレオチド数を意味する。)

【0178】

銑型 (*S. aureus* 0.2 pmole) 及び TSG プライマー (SEQ ID NO: 5 または 6) を除いては、*S. pneumoniae* 検出に利用された同一なプロトコルで核酸合成反応を行った。

【0179】

図6に示されたように、二つの TGS プライマーのそれぞれは、銑型のない場合 (No. 2 及び 4) より、銑型のある場合 (No. 1 及び 3) がより高い蛍光強度を示した。したがって、TSG プライマーが核酸合成反応の間、TSG プライマーのハイブリッド形成及び伸長を通じて、*S. aureus* 遺伝子を検出するに十分なシグナルを提供するということが分かる。

【0180】

銑型の有無において、クエンチャー分子から6ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有する TSG プライマー (SEQ ID NO: 5) より、クエンチャー分子から21ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有する TSG プライマー (SEQ ID NO: 6) がさらに明らかなシグナル強度の差異 (即ち、RFU 値の差異) を示したことは、注目すべきことである。

【0181】

実施例2: ターゲット核酸の検出のためのリアルタイムPCR反応条件下で、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性のないDNAポリメラーゼを利用した TSG プライマーの評価
リアルタイムPCR反応の間、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性のない銑型依存的核酸ポリメラーゼを利用する場合、本発明の TSG プライマーがターゲット核酸配列を検出するに十分なシグナルを発生できるかどうかを実験した。

【0182】

この評価を実験するために、TSG プライマーを含むプライマー対を利用し、*S. pneumoniae*, *S. aureus*, *Neisseria gonorrhoeae* 及び *Neisseria meningitidis* 遺伝子の検出のためのリアルタイムPCR反応をそれぞれ行った。5' 3' エキソヌクレアーゼ活性のないストッフェル断片 (Stoffel fragment) をDNAポリメラーゼとして利用した。レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔された程度の異なる二つの TSG プライマーを各ターゲット遺伝子に対してそれぞれ実験した。

【0183】

A. *S. pneumoniae* 遺伝子の検出のためのリアルタイムPCR

S. pneumoniae 遺伝子のターゲット核酸配列を銑型として利用する場合、本実施例で利用された正方向プライマー及び TSG プライマー (逆方向プライマー) の配列は、下記の通りである:

SP__F1 5' - GGTTTCCGTACAGCCTTGAI III IIGTTATCA
ATG - 3' (SEQ ID NO: 7)

SP__TSG(9) 5' - [6-FAM]TCCTTCA AAC [T(BHQ-1)]
GTGGATTTGGGTGT - 3' (SEQ ID NO: 2)

SP__TSG(21) 5' - [6-FAM]TCCTTCA AACTGTGGATTT
GGG [T(BHQ-1)]GT - 3' (SEQ ID NO: 3)

(I は、デオキシイノシンを示し、括弧内の数字 9 または 21 は、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔されたヌクレオチド数を意味する。)

【 0184 】

S . p n e u m o n i a e ゲノム DNA 10 ng、10 x ストッフエルバッファー (Stoffel buffer) [100 mM Tris - HCl (pH 8 . 3) 及び 100 mM KCl を含有した] 2 μ L、Ampli Taq (登録商標) DNA ポリメラーゼ、ストッフエルフラグメント (Applied Biosystems、USA) 1 unit、4 種の dNTPs (dATP、dCTP、dGTP 及び dTTP) それぞれ 200 μ M、5 mM MgCl₂、正方向プライマー (SEQ ID NO : 7) 5 pmol e 及び逆方向プライマーとして TSG プライマー (SEQ ID NO : 2 または 3) 5 pmol e を含有した 20 μ L の最終容量で、S . p n e u m o n i a e の検出のためのリアルタイム PCR 反応を行った ; 前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー (CFX 96、Bio - Rad) に設置し ; 前記反応混合物を 95 で 2 分間変性させて、94 で 30 秒、55 で 60 秒及び 72 で 10 秒過程を 30 回行った。各サイクルのアニーリング工程 (55) で発生されたシグナルを検出した。

10

【 0185 】

図 7 に示されたように、TSG プライマー及び 5' - 3' ヌクレアーゼ活性のない鑄型依存的 DNA ポリメラーゼを利用したリアルタイム PCR 反応において、S . p n e u m o n i a e 鑄型がある場合は、S . p n e u m o n i a e に対する蛍光シグナルが観察されたが (No . 1 及び 3)、その反面、ターゲット鑄型のない陰性対照群では、蛍光シグナルが現れなかった (No . 2 及び 4)。

20

【 0186 】

クエンチャー分子から 9 ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有する TSG プライマー (SEQ ID NO : 2) より、クエンチャー分子から 21 ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有する TSG プライマー (SEQ ID NO : 3) がさらに低い Ct 値とさらに高い RFU 値を示した。

【 0187 】

B . S . a u r e u s 遺伝子の検出のためのリアルタイム PCR

S . a u r e u s のターゲット核酸配列を鑄型として利用する場合、本実施例で利用された正方向プライマー及び TSG プライマー (逆方向プライマー) の配列は、下記の通りである :

30

SA__F1 5' - TGTTAGAAATTTGAACAAGGATTTAAIIIIITAGCGACTTT - 3' (SEQ ID NO : 8)

SA__TSG (6) 5' - [6 - FAM] CATTCCG [T (BHQ - 1)] GGTCAATCATTCGGTT - 3' (SEQ ID NO : 5)

SA__TSG (21) 5' - [6 - FAM] CATTCCGTGGTCAATCATTCGG [T (BHQ - 1)] T - 3' (SEQ ID NO : 6)

(I は、デオキシイノシンを示し、括弧内の数字 6 または 21 は、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔されたヌクレオチド数を意味する。)

【 0188 】

40

鑄型 (S . a u r e u s)、正方向プライマー (SEQ ID NO : 8) 及び逆方向プライマーである TSG プライマー (SEQ ID NO : 5 または 6) を除いては、S . p n e u m o n i a e 検出に利用された同一なプロトコールでリアルタイム PCR 反応を行った。

【 0189 】

図 8 に示されたように、TSG プライマー及び 5' - 3' ヌクレアーゼ活性のない鑄型依存的 DNA ポリメラーゼを利用したリアルタイム PCR 反応において、S . a u r e u s 鑄型がある場合は、S . a u r e u s に対する蛍光シグナルが観察されたが (No . 1 及び 3)、その反面、ターゲット鑄型のない陰性対照群では、蛍光シグナルが現れなかった (No . 2 及び 4)。

50

【0190】

クエンチャー分子から6ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー(SEQ ID NO:5)より、クエンチャー分子から21ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー(SEQ ID NO:6)がさらに低いCt値とさらに高いRFU値を示した。

【0191】

C. N. gonorrhoeae 遺伝子の検出のためのリアルタイムPCR

N. gonorrhoeaeのターゲット核酸配列を鋳型として利用する場合、本実施例で利用された正方向プライマー及びTSGプライマー(逆方向プライマー)の配列は、下記の通りである:

NG_F1 5' - TACGCCTGCTACTTTTCACGCTIIIIIGTAAT
CAGAT - 3' (SEQ ID NO:9)

NG_TSG(4) 5' - [6-FAM]CTCAT[T(BHQ-1)]GGCGT
GTTTCGCATATTTAAG - 3' (SEQ ID NO:10)

NG_TSG(22) 5' - [6-FAM]CTCATTTGGCGTGTTCGCAT
TATT[T(BHQ-1)]AAG - 3' (SEQ ID NO:11)

(Iは、デオキシイノシンを示し、括弧内の数字4または22は、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔されたヌクレオチド数を意味する。)

【0192】

鋳型(N. gonorrhoeae)、正方向プライマー(SEQ ID NO:9)及び逆方向プライマーであるTSGプライマー(SEQ ID NO:10または11)を除いては、S. pneumoniae検出に利用された同一なプロトコールでリアルタイムPCR反応を行った。

【0193】

図9に示されたように、TSGプライマー及び5' 3'ヌクレアーゼ活性のない鋳型依存的DNAポリメラーゼを利用したリアルタイムPCR反応において、N. gonorrhoeae鋳型がある場合は、N. gonorrhoeaeに対する蛍光シグナルが観察されたが(No.1及び3)、その反面、ターゲット鋳型のない陰性対照群では、蛍光シグナルが現れなかった(No.2及び4)。

【0194】

また、図9に示されたように、クエンチャー分子から4ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー(SEQ ID NO:10)より、クエンチャー分子から22ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー(SEQ ID NO:11)がさらに低いCt値とさらに高いRFU値を示した。

【0195】

D. N. meningitidis 遺伝子の検出のためのリアルタイムPCR

N. meningitidisのターゲット核酸配列を鋳型として利用する場合、本実施例で利用された逆方向プライマー及びTSGプライマー(正方向プライマー)の配列は、下記の通りである:

NM_R1 5' - CCATAACCTTGAGCAATCCAIIIIICCTGAC
GTTC - 3' (SEQ ID NO:12)

NM_TSG(7) 5' - [6-FAM]CTTATCGC[T(BHQ-1)]TT
CTGAAGCCATTG - 3' (SEQ ID NO:13)

NM_TSG(20) 5' - [6-FAM]CTTATCGCTTTCTGAAGCC
AT[T(BHQ-1)]G - 3' (SEQ ID NO:14)

(Iは、デオキシイノシンを示し、括弧内の数字7または20は、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔されたヌクレオチド数を意味する。)

【0196】

鋳型(N. meningitidis)、逆方向プライマー(SEQ ID NO:12)及び正方向プライマーであるTSGプライマー(SEQ ID NO:13または1

10

20

30

40

50

4)を除いては、*S. pneumoniae* 検出に利用された同一なプロトコールでリアルタイムPCR反応を行った。

【0197】

図10に示されたように、TSGプライマー及び5' - 3'ヌクレアーゼ活性のない鋳型依存的DNAポリメラーゼを利用したリアルタイムPCR反応において、*N. meningitidis* 鋳型がある場合は、*N. meningitidis* に対する蛍光シグナルが観察されたが(No. 1及び3)、その反面、ターゲット鋳型のない陰性対照群では、蛍光シグナルが現れなかった(No. 2及び4)。

【0198】

また、図10に示されたように、クエンチャー分子から7ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー(SEQ ID NO: 13)より、クエンチャー分子から20ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー(SEQ ID NO: 14)がさらに低いCt値とさらに高いRFU値を示した。

【0199】

実施例3: *S. aureus* の検出のために、TSGプライマー及び5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性のないDNAポリメラーゼを利用したリアルタイムPCRの感度

TSGプライマー及び5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性のないDNAポリメラーゼを利用したリアルタイムPCRの感度は、*S. aureus* 遺伝子のターゲット核酸配列を検出することにより確認した。この実験のために、リアルタイムPCR反応に逆方向プライマーとしてTSGプライマー(SEQ ID NO: 6)を利用した。100pgから10fgまで連続的に希釈させた(10倍ずつ希釈)*S. aureus* ゲノムDNAを鋳型として利用した。

【0200】

本実施例で利用された正方向プライマー及びTSGプライマー(逆方向プライマー)の配列は、下記の通りである:

SA__F1 5' - TGTTAGAA TTTGAACAAGGATTTAAIIIIIT
AGCGACTTT - 3' (SEQ ID NO: 8)

SA__TSG(21) 5' - [6 - FAM]CATTCCTGGTCAATCATT
CGG[T(BHQ-1)]T - 3' (SEQ ID NO: 6)

(Iは、デオキシイノシンを示し、括弧内の数字21は、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔されたヌクレオチド数を意味する。)

【0201】

連続的に希釈させた*S. aureus* ゲノムDNA(100pgから10fgまで; 10倍ずつ希釈)、10xストップエルバッファー(Stoffel buffer)[100mM Tris-HCl(pH8.3)及び100mM KClを含有した]2μL、Ampli Taq(登録商標)DNAポリメラーゼ、ストップエルフラグメント(Applied Biosystems, USA)1unit、4種のdNTPs(dATP、dCTP、dGTP及びdTTP)それぞれ200μM、5mM MgCl₂、正方向プライマー(SEQ ID NO: 8)5pmole及び逆方向プライマーとしてTSGプライマー(SEQ ID NO: 6)5pmoleを含有した20μLの最終容量でリアルタイムPCR反応を行った; 前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー(CFX96、Bio-Rad)に設置し; 前記反応混合物を95で2分間変性させて、94で30秒、55で60秒及び72で10秒過程を40回行った。各サイクルのアニーリング工程(55)で発生されたシグナルを検出した。

【0202】

図11に示されたように、一連に希釈させた*S. aureus* ゲノムDNAを利用してリアルタイムPCRを行う場合、100fgまで希釈させた場合にもターゲット核酸配列が検出された(No. 1~4)。

【0203】

実施例4: 5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利

10

20

30

40

50

用した T S G プライマー 5' - 末端部位の 5' - 切断反応によるシグナル発生

本発明者らは、鋳型依存的核酸ポリメラーゼの 5' 3'ヌクレアーゼ活性によりターゲット核酸配列にハイブリッド形成された標識プライマーの 5' - 末端部位で 5' - 切断反応が起こり、前記 5' - 切断反応がターゲット配列の検出に絶妙に適用され、ターゲット配列に対するシグナルを発生させるということを見出した (P C T / K R 2 0 0 9 / 0 0 7 0 6 4 参照)。

【 0 2 0 4 】

したがって、本発明者らは、5' 3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼにより T S G プライマーの 5' - 末端部位で 5' - 切断反応が起こり、これによりシグナルが発生されるかどうか実験した。

【 0 2 0 5 】

この評価を実験するために、本発明者らは、実験便宜上、S . p n e u m o n i a e をターゲットとして、S . p n e u m o n i a e 遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドを鋳型として利用した。レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔された程度の異なる二つの T S G プライマーをそれぞれ実験した。6 - F A M (6 - c a r b o x y f l u o r e s c e i n) を蛍光レポーター分子として利用し、T S G プライマーの 5' - 末端に位置させた。B H Q - 1 (B l a c k H o l e Q u e n c h e r 1) をクエンチャー分子として利用した。変性、ハイブリッド形成及びプライマー伸長を反復して、核酸合成反応を行った。各反復のハイブリッド形成工程でシグナルを測定した。5' 3'エキソヌクレアーゼ活性のないストップエル切片 (S t o f f e l f r a g m e n t) 及び 5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する T a q DNAポリメラーゼを DNAポリメラーゼとして利用した。

【 0 2 0 6 】

本実施例で利用された合成鋳型及び T S G プライマーの配列は、下記の通りである：

S P _ T 1 0 5 5' - T T A C T G A A A G A C A A T G A A G A C A A C C T A A C A G G G G A A G A T G T T C G C G A A G G C T T A A C T G C A G T T A T C T C A G T T A A A C A C C C A A A T C C A C A G T T T G A A G G A C A A A C C - 3' (S E Q I D N O : 1)

S P _ T S G (9) 5' - [6 - F A M] T C C T T C A A A C [T (B H Q - 1)] G T G G A T T T G G G T G T - 3' (S E Q I D N O : 2)

S P _ T S G (2 1) 5' - [6 - F A M] T C C T T C A A A C T G T G G A T T T G G G [T (B H Q - 1)] G T - 3' (S E Q I D N O : 3)

(括弧内の数字 9 または 2 1 は、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔されたヌクレオチド数を意味する。)

【 0 2 0 7 】

A . 5' 3'エキソヌクレアーゼ活性のない DNAポリメラーゼを利用して、変性、ハイブリッド形成及びプライマー伸長を反復した核酸合成反応

鋳型 (S E Q I D N O : 1) 2 p m o l e 、 1 0 × ストップエルバッファー (S t o f f e l b u f f e r) [1 0 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 3) 及び 1 0 0 m M K C l を含有した] 2 μ L 、 A m p l i T a q (登録商標) DNAポリメラーゼ、ストップエルフラグメント (A p p l i e d B i o S y s t e m s 、 U S A) 1 u n i t 、 4 種の d N T P s (d A T P 、 d C T P 、 d G T P 及び d T T P) それぞれ 2 0 0 μ M 、 5 m M M g C l 2 及び T S G プライマー (S E Q I D N O : 2 または 3) 5 p m o l e を含有した 2 0 μ L の最終容量で核酸合成反応を行った；前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー (C F X 9 6 、 B i o - R a d) に設置し；前記反応混合物を 9 5 で 2 分間変性させて、9 4 で 3 0 秒及び 5 0 で 6 0 秒過程を 4 0 回行った。各サイクルのアニーリング工程 (5 0) で発生されたシグナルを検出した。

【 0 2 0 8 】

ノーマライゼーション (n o r m a l i z a t i o n) 以後の結果を図 1 2 に示したよ

うに、5' 3'ヌクレアーゼ活性のないストッフェル切片 (Stoffel fragment) をDNAポリメラーゼとして利用する場合、鑄型があってもシグナルの差異は現れなかった (No. 1及び5)。

【0209】

このような結果は、ハイブリッド形成及びプライマー伸長だけで発生されたシグナルの強度が、反応サイクルの増加によって変化されず、これは、核酸反応の間、鑄型が増幅されなかったからであることを示す。

【0210】

したがって、核酸合成反応のサイクル反復において、TSGプライマーのハイブリッド形成及びプライマー伸長だけでは、ターゲット核酸配列があっても、検出可能なシグナルが蓄積されないことが分かる (No. 1及び5)。

【0211】

B. 5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを利用して、変性、ハイブリッド形成及びプライマー伸長を反復した核酸合成反応

鑄型 (SEQ ID NO: 1) 2 pmole、2 x Diastar Taq PCRマスターミックス (Solgent, Korea) [12 mM MgCl₂、Diastar Taq PCRバッファー、Diastar Taq DNAポリメラーゼ2 U及びdNTPミックスを含有した] 10 µL及びTSGプライマー (SEQ ID NO: 2または3) 5 pmoleを含有した20 µLの最終容量で核酸合成反応を行った；前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー (CFX96、Bio-Rad) に設置し；前記反応混合物を95 °Cで15分間変性させて、94 °Cで30秒及び50 °Cで60秒過程を40回行った。各サイクルのアニーリング工程 (50 °C) で発生されたシグナルを検出した。

【0212】

図12に示されたように、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有するTaq DNAポリメラーゼをDNAポリメラーゼとして利用する場合、S. pneumoniaeに対するシグナルの差異が観察された (No. 3及び7)。

【0213】

このような結果は、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する鑄型依存的核酸ポリメラーゼを利用してTSGプライマーの5' - 末端部位における5' - 切断反応を発生させることができることを示す。したがって、サイクル毎にTSGプライマーから放出された標識切片からシグナルが発生され、蓄積されて、ターゲット核酸配列の存在を示す観察可能なシグナルが結果として生じる (No. 3及び7)。

【0214】

一方、クエンチャー分子から21ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー (SEQ ID NO: 3) より、クエンチャー分子から9ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー (SEQ ID NO: 2) がさらに低いCt値を示した。このような結果は、TSGプライマーのレポーター及びクエンチャー間の距離が短いほど、レポーター及びクエンチャー間の距離が長いものに比べ、クエンチングする程度において、5' - 切断反応前後に大きい差を示すということ

【0215】

実施例5：ターゲット核酸の検出のためのリアルタイムPCR反応条件下で5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを利用したTSGプライマーの実験

5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する鑄型依存的核酸ポリメラーゼを利用して、リアルタイムPCR反応の間、本発明のTSGプライマーがターゲット核酸配列を検出するに十分なシグナルを発生できるかどうか評価した。

【0216】

この評価を実験するために、本発明者らは、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する鑄型依存的核酸ポリメラーゼ及び反応条件を除いて、実施例2で利用されたものと同

10

20

30

40

50

な鑄型及びプライマーを利用した。

【0217】

A. S. pneumoniaeの検出のためのリアルタイムPCR

S. pneumoniaeゲノムDNA 10ng、2×DiasStarTaq PCRマスタミックス(Solgent、Korea) [12mM MgCl₂、DiasStarTaq PCRバッファー、DiasStarTaq DNAポリメラーゼ2U及びdNTPミックスを含有した] 10μL、正方向プライマー(SEQ ID NO:7) 5pmole及び逆方向プライマーとしてTSGプライマー(SEQ ID NO:2または3) 5pmoleを含有した20μLの最終容量でリアルタイムPCRを行った; 前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー(CFX96、Bio-Rad)に設置し; 前記反応混合物を95 で15分間変性させて、94 で30秒及び55 で60秒及び72 で10秒過程を30回行った。各サイクルのアニール

10

【0218】

図13に示されたように、S. pneumoniae鑄型のある場合は、S. pneumoniaeに対する蛍光シグナルが観察されたが(No.1及び3)、その反面、鑄型のない陰性対照群では、蛍光シグナルが現れなかった(No.2及び4)。

【0219】

また、クエンチャー分子から9ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー(SEQ ID NO:2)より、クエンチャー分子から21ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー(SEQ ID NO:3)がさらに低いCt値とさらに高いRFU値を示した。

20

【0220】

B. S. aureusの検出のためのリアルタイムPCR

鑄型(S. aureus)、正方向プライマー(SEQ ID NO:8)及び逆方向プライマーとしてTSGプライマー(SEQ ID NO:5または6)を除いては、S. pneumoniae検出に利用されたプロトコールでリアルタイムPCR反応を行った。

【0221】

図14に示されたように、S. aureus鑄型のある場合は、S. aureusに対する蛍光シグナルが観察されたが(No.1及び3)、その反面、鑄型のない陰性対照群では、蛍光シグナルが現れなかった(No.2及び4)。また、クエンチャー分子から6ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー(SEQ ID NO:5)より、クエンチャー分子から21ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー(SEQ ID NO:6)がさらに低いCt値とさらに高いRFU値を示した。

30

【0222】

C. N. gonorrhoeaeの検出のためのリアルタイムPCR

鑄型(N. gonorrhoeae)、正方向プライマー(SEQ ID NO:9)及び逆方向プライマーであるTSGプライマー(SEQ ID NO:10または11)を除いては、S. pneumoniae検出に利用されたプロトコールでリアルタイムPCR反応を行った。

40

【0223】

図15に示されたように、N. gonorrhoeae鑄型のある場合は、N. gonorrhoeaeに対する蛍光シグナルが観察されたが(No.1及び3)、その反面、鑄型のない陰性対照群では、蛍光シグナルが現れなかった(No.2及び4)。また、クエンチャー分子から4ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー(SEQ ID NO:10)より、クエンチャー分子から22ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有するTSGプライマー(SEQ ID NO:11)がさらに低いCt値とさらに高いRFU値を示した。

50

【0224】

D. N. meningitidisの検出のためのリアルタイムPCR

鋳型 (*N. meningitidis*)、逆方向プライマー (SEQ ID NO: 12) 及び逆方向プライマーである TSGプライマー (SEQ ID NO: 13 または 14) を除いては、*S. pneumoniae* 検出に利用されたプロトコールでリアルタイムPCR反応を行った。

【0225】

図16に示されたように、*N. meningitidis* 鋳型のある場合は、*N. meningitidis* に対する蛍光シグナルが観察されたが (No. 1 及び 3)、その反面、鋳型のない陰性対照群では、蛍光シグナルが現れなかった (No. 2 及び 4)。また、クエンチャー分子から7ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有する TSGプライマー (SEQ ID NO: 13) より、クエンチャー分子から20ヌクレオチド離隔された位置にレポーター分子を有する TSGプライマー (SEQ ID NO: 14) がさらに低い Ct 値とさらに高い RFU 値を示した。

【0226】

結論として、5' - 3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的 DNAポリメラーゼを利用する場合、ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを二つの異なる方式で示すことができる: (i) ターゲット核酸配列とのハイブリッド形成による構造変化により引き起こされた、TSGプライマー上の相互作用的標識システムのシグナル脱消光によるシグナル発生; 及び (ii) 5' - 3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用した TSGプライマー 5' - 末端部位における 5' - 切断反応によるシグナル発生。

【0227】

実施例6: *S. aureus* の検出のために、TSGプライマー及び5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する DNAポリメラーゼを利用したリアルタイムPCRの感度

TSGプライマー及び5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する DNAポリメラーゼを利用したリアルタイムPCRの感度は、*S. aureus* 遺伝子のターゲット核酸配列を検出することにより確認した。この評価を実験するために、本発明者らは、5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼ及び反応条件を除いては、実施例3で利用されたものと同様な鋳型及びプライマーを利用した。

【0228】

連続的に希釈させた *S. aureus* ゲノムDNA (100 pg から 10 fg まで; 10倍ずつ希釈)、10x Quantitect マルチプレックスPCR マスターミックス (Qiagen) [11mM MgCl₂、Quantitect マルチプレックスPCR バッファー、Hotstart Taq DNAポリメラーゼ及びdNTPミックスを含有した] 10 µL、正方向プライマー (SEQ ID NO: 8) 5 pmole 及び逆方向プライマーとして TSGプライマー (SEQ ID NO: 6) 5 pmole を含有した 20 µL の最終容量でリアルタイムPCR反応を行った; 前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー (CFX96、Bio-Rad) に設置し; 前記反応混合物を 95 ° で 15分間変性させて、94 ° で 30秒、55 ° で 60秒及び 72 ° で 10秒過程を 40回行った。各サイクルのアニーリング工程 (55 °) で発生されたシグナルを検出した。

【0229】

図17においても、図11で述べたように、連続的に希釈させた *S. aureus* ゲノムDNAを利用してリアルタイムPCRを行う場合、100 fg まで希釈させた場合にもターゲット核酸配列が検出された (No. 1 ~ 4)。

【0230】

実施例7: チップにおけるターゲット核酸配列の検出のための TSGプライマーの評価

S. pneumoniae 遺伝子のターゲット核酸を鋳型として利用する場合、本実施例で利用された合成鋳型及び TSGプライマーの配列は、下記の通りである:

SP__T105 5' - T T A C T G A A A G A C A A T G A A G A C A A C C T A A C

A G G G G A A G A T G T T C G C G A A G G C T T A A C T G C A G T T A T C T C A
G T T A A A C A C C C A A A T C C A C A G T T T G A A G G A C A A A C C - 3' (

SEQ ID NO: 1)
S P _ T S G (2 1) _ S 5' - [A m i n o C 6] T T T T T [T (F l u o r e s
c e i n e)] C C T T C A A A C T G T G G A T T T G G G [T (B H Q - 1)] G T
(SEQ ID NO: 15)

(括弧内の数字21は、レポーター分子及びクエンチャー分子間の離隔されたヌクレオチド数を意味する。)

【0231】

A. チップスライド上におけるTSGプライマーの固定化

Genoramaスポットティング溶液タイプIでTSGプライマー(SEQ ID NO: 15)が最終濃度50 μMになるように溶解させた。溶解されたTSGプライマーを常温、70%相対湿度でガラススライド(Genorama, Estonia)上にスポットティング(spotting)した。37℃恒湿器で2時間スライドをインキュベーションした。その後、スライドを1%アンモニア溶液に10分間放置して、常温で蒸留水で洗浄した。

【0232】

B. チップ上における核酸合成反応

鋳型(SEQ ID NO: 1) 2 pmole、10×ストップエルバッファー(Stoffel buffer) [100 mM Tris-HCl (pH 8.3) 及び100 mM KClを含有した] 2 μL、Ampli Taq (登録商標) DNAポリメラーゼ、ストップエルフラグメント(Applied Biosystems, USA) 1 unit、4種のdNTPs (dATP、dCTP、dGTP及びdTTP)それぞれ200 μM及び5 mM MgCl₂を含有した20 μLの最終容量で核酸合成反応を行った；前記反応混合物をスライドに移した。前記スライドをin situ PCR器(GeneAmp in situ, Perkin Elmer)に位置させた；変性のために、前記スライドを95℃で2分間インキュベーションして、50℃で40分間インキュベーションした。核酸合成反応後、前記スライドを洗浄して(70℃で)、マイクロアレイスキャナー(ScanArray 4000, Perkin Elmer)を利用して、スライドのシグナルを検出してイメージを分析した。

【0233】

以上、本発明の望ましい具現例を詳細に記述したが、当業界の通常の知識を有する者にとっては、このような具体的な記述はただ望ましい具現例に過ぎなく、これに本発明の範囲が限定されないことは明らかである。従って、本発明の実質的な範囲は、添付の請求項とその等価物により定義されると言える。

10

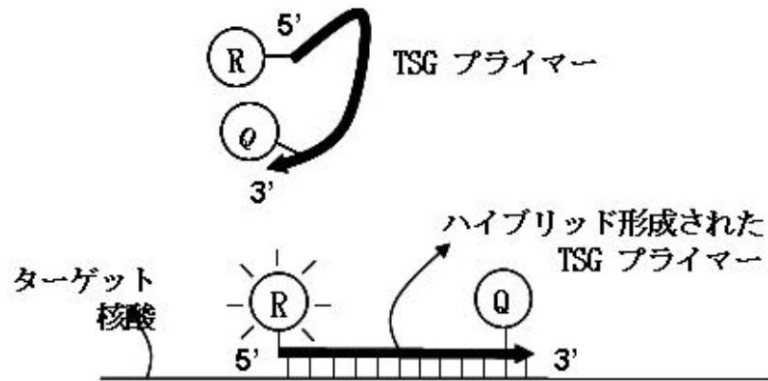
20

30

【図1a】

リアルタイムシグナル発生

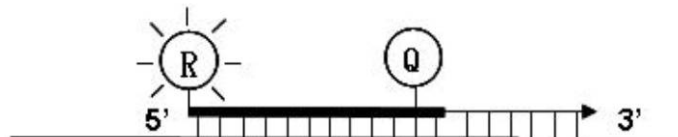
A-1. TSG プライマーのハイブリッド形成及びシグナル発生



ターゲット核酸の存在を示す検出可能なシグナルは、TSG プライマー及びターゲット核酸間のハイブリッド形成により得られる。

↓ 5' → 3' ヌクレアーゼ活性のない核酸ポリメラーゼ

A-2. TSG プライマーの伸長



TSG プライマーは、伸長産物内に含まれて、安定化されている。

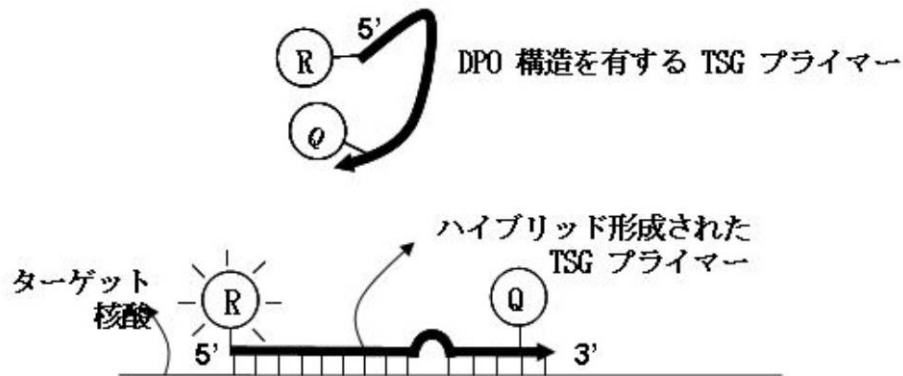
Ⓡ : レポーター分子

Ⓚ : クエンチャー分子

【図1b】

リアルタイムシグナル発生

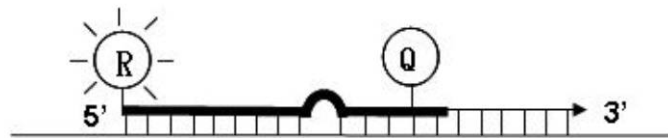
B-1. TSG プライマーのハイブリッド形成及びシグナル発生



ターゲット核酸の存在を示す検出可能なシグナルは、TSG プライマー 及びターゲット核酸間のハイブリッド形成により得られる。

↓ 5' → 3' ヌクレアーゼ活性のない核酸ポリメラーゼ

B-2. TSG プライマーの伸長



TSG プライマーは、伸長産物内に含まれて、安定化されている。

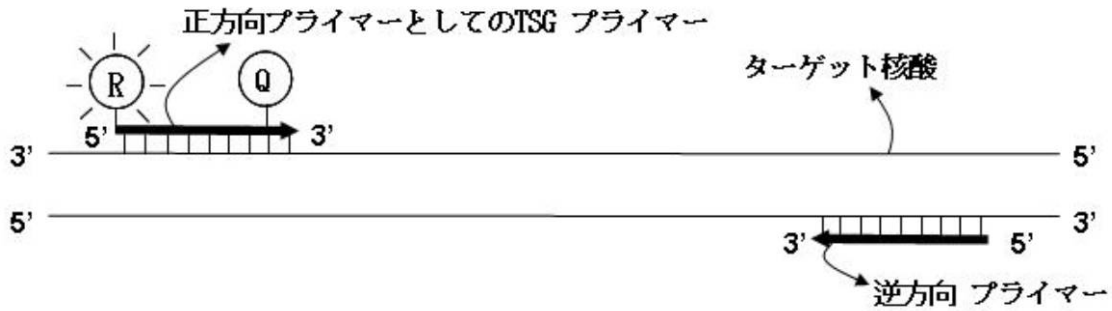
Ⓡ : レポーター分子 Ⓚ : クエンチャー分子

DPO : 二重プライミングオリゴヌクレオチド

【図2a】

TSG プライマーを利用したリアルタイムPCR

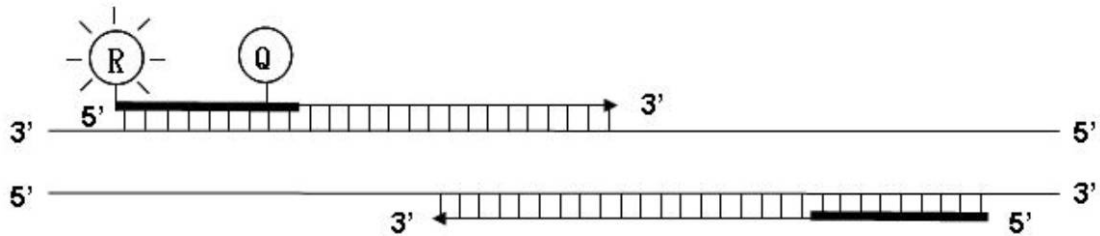
A-1. ハイブリッド形成及びシグナル発生



ターゲット核酸の存在を示す検出可能なシグナルは、TSG プライマー 及びターゲット核酸間のハイブリッド形成により得られる。

↓ 5' → 3' ヌクレアーゼ活性のない核酸ポリメラーゼ

A-2. TSG プライマーの伸長



↓ 変性、ハイブリッド形成及び伸長の反復

ターゲット核酸のリアルタイム増幅及び検出

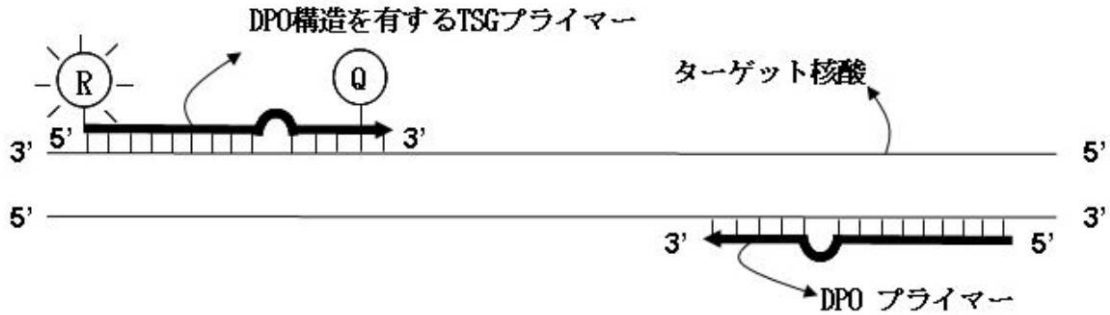
Ⓡ : レポーター分子

Ⓚ : クエンチャー分子

【図2b】

TSGプライマーを利用したリアルタイムPCR

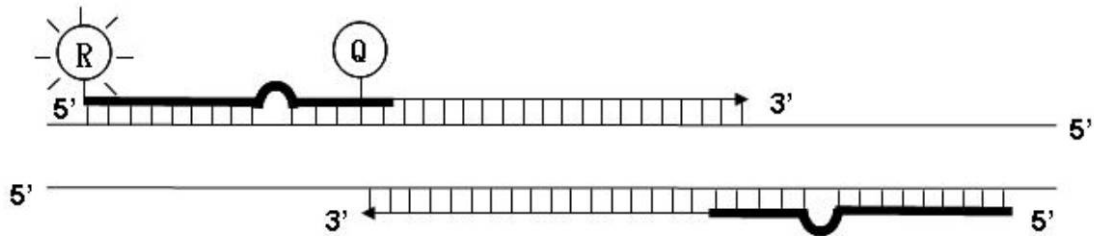
B-1. ハイブリッド形成及びシグナル発生



ターゲット核酸の存在を示す検出可能なシグナルは、TSGプライマー及びターゲット核酸間のハイブリッド形成により得られる。

↓ 5' → 3' ヌクレアーゼ活性
のない核酸ポリメラーゼ

B-2. TSGプライマーの伸長



↓ 変性、ハイブリッド形成及び伸長の反復

ターゲット核酸のリアルタイム増幅及び検出

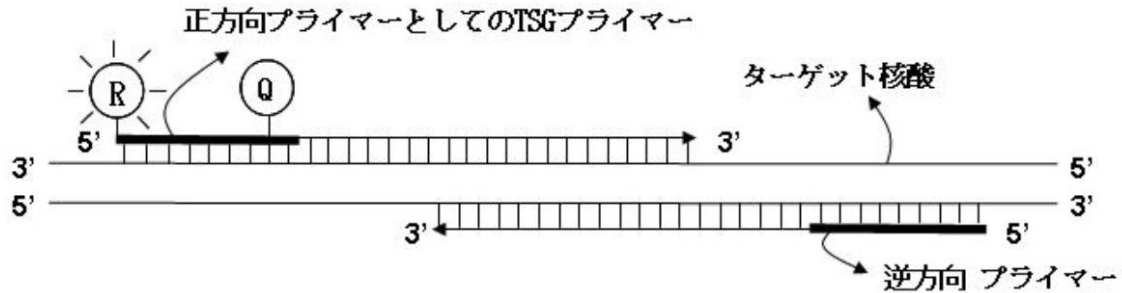
Ⓡ : レポーター分子 Ⓚ : クエンチャー分子

DPO : 二重プライミングオリゴヌクレオチド

【図3a】

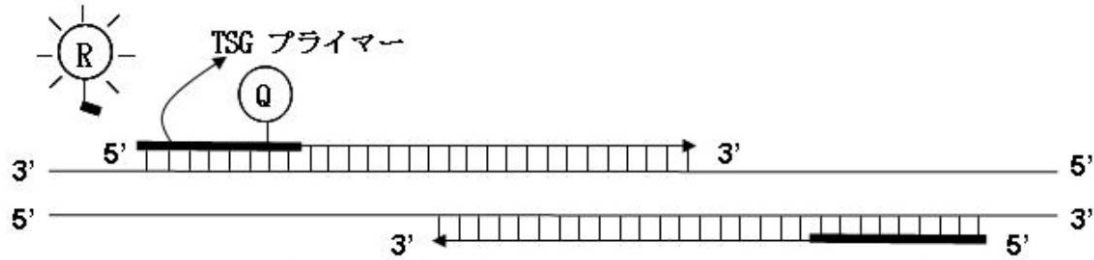
TSGプライマー 及び5' →3'ヌクレアーゼ活性を有する核酸
ポリメラーゼを利用したリアルタイムPCR

A-1. ハイブリッド形成及びシグナル発生



ターゲット核酸の存在を示す検出可能なシグナルは、TSGプライマーのハイブリッド形成及び伸長により得られる。

A-2. TSGプライマーの5'切断及び3'伸長



ターゲット核酸の存在を示す検出可能なシグナルは、TSGプライマーの5'切断反応により得られる。



変性、ハイブリッド形成、切断及び伸長の反復

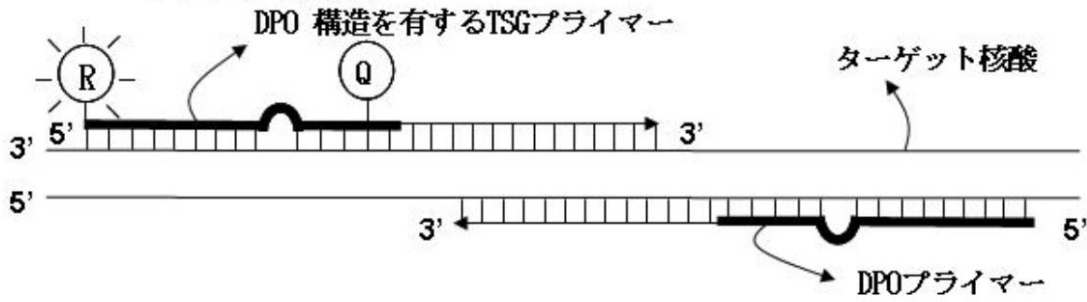
ターゲット核酸のリアルタイム増幅及び検出

Ⓡ : レポーター分子

Ⓚ : クエンチャー分子

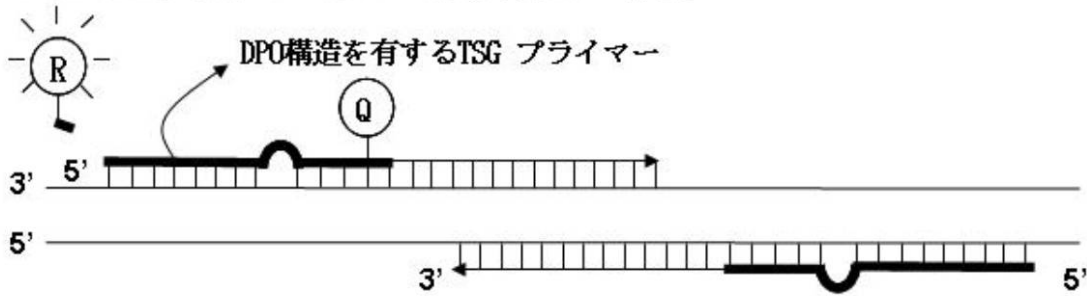
【図3b】

B-1. ハイブリッド形成



ターゲット核酸の存在を示す検出可能なシグナルは、TSGプライマーのハイブリッド形成及び伸長により得られる。

B-2. TSGプライマーの5'切断及び3'伸長



ターゲット核酸の存在を示す検出可能なシグナルは、TSGプライマーの5'切断反応により得られる。



変性、ハイブリッド形成、切断及び伸長の反復

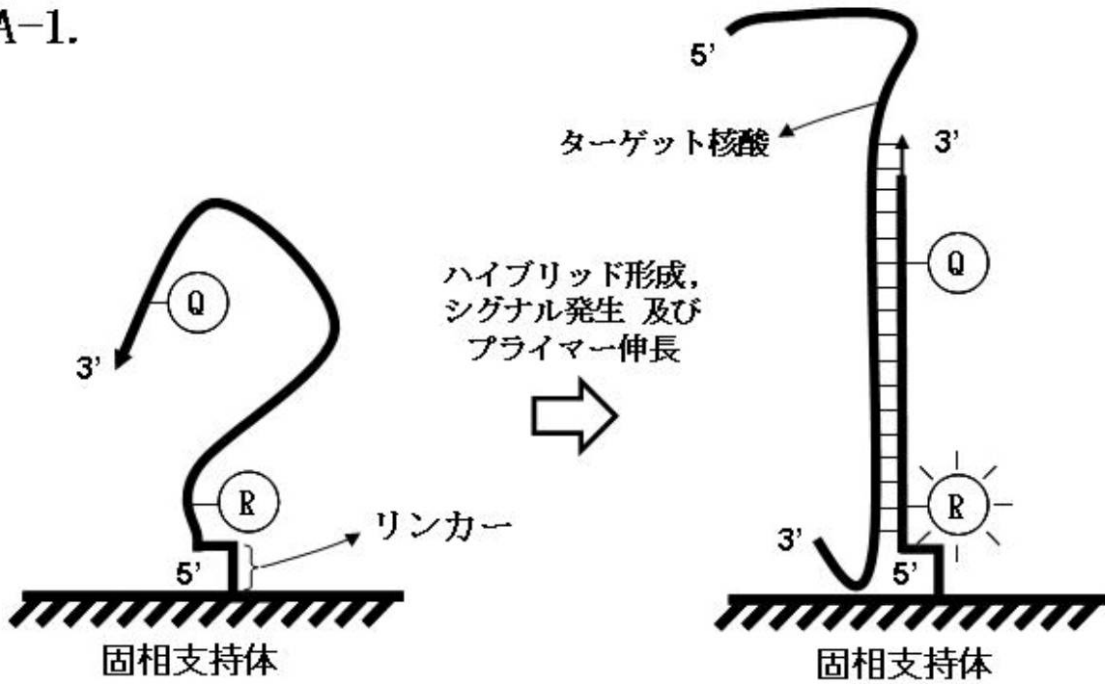
ターゲット核酸のリアルタイム増幅及び検出

Ⓡ : レポーター分子 Ⓚ : クエンチャー分子

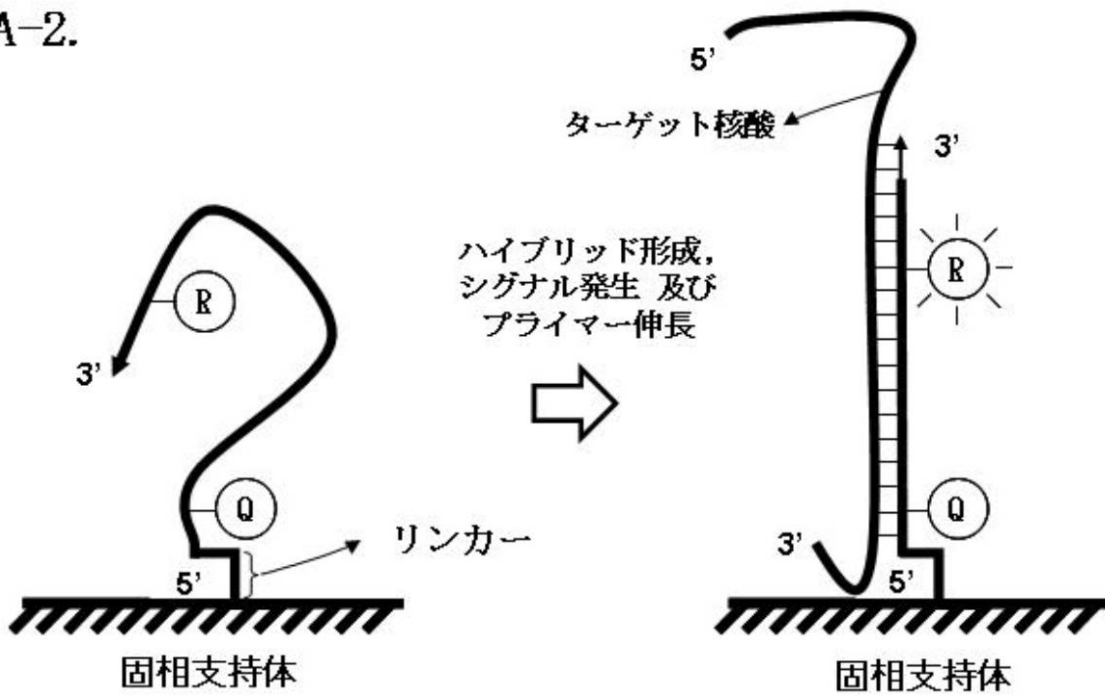
DPO : 二重プライミングオリゴヌクレオチド

【図4a】

A-1.



A-2.

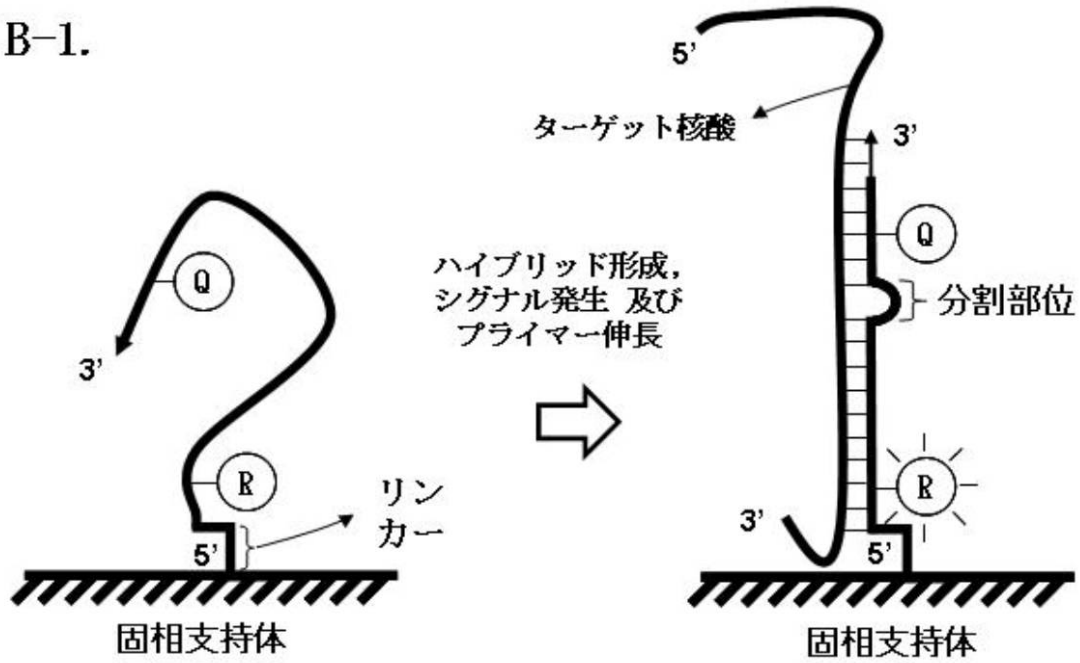


Ⓡ : レポーター分子

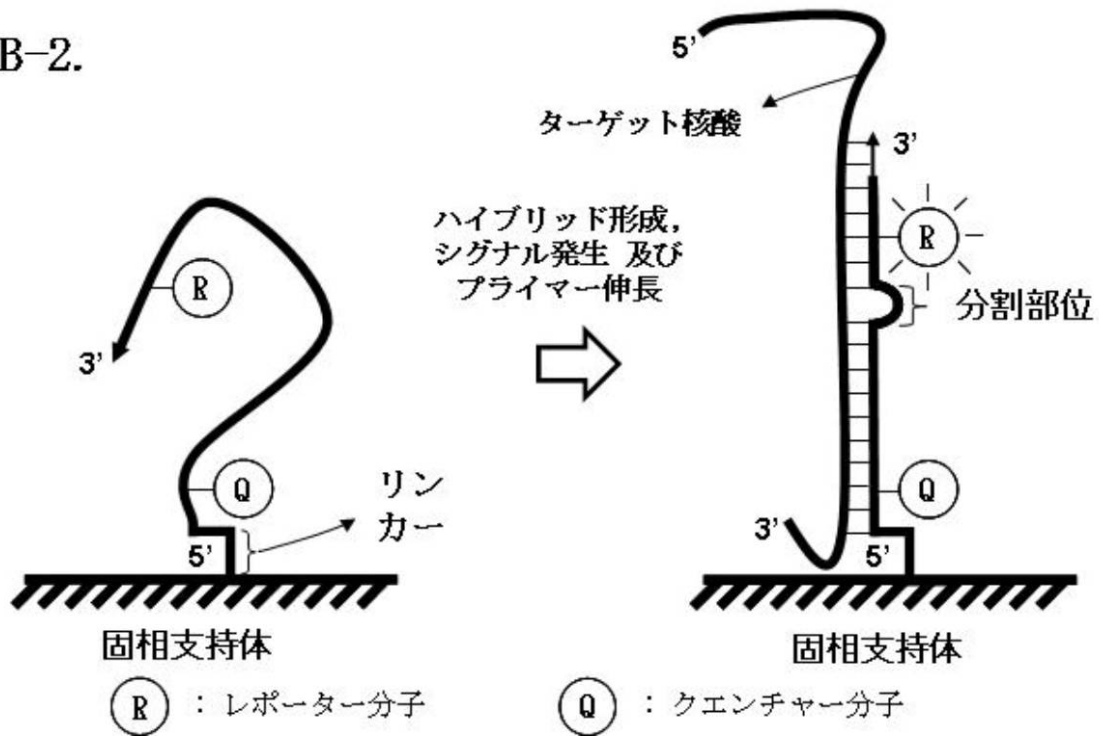
Ⓚ : クエンチャー分子

【図4b】

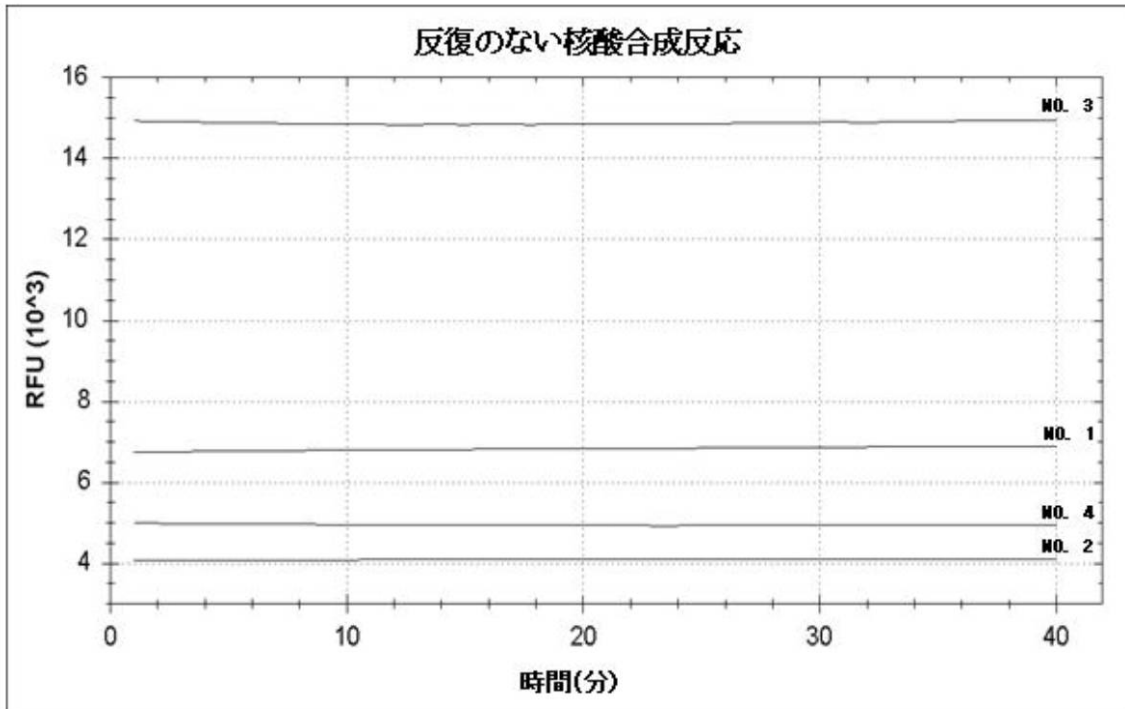
B-1.



B-2.

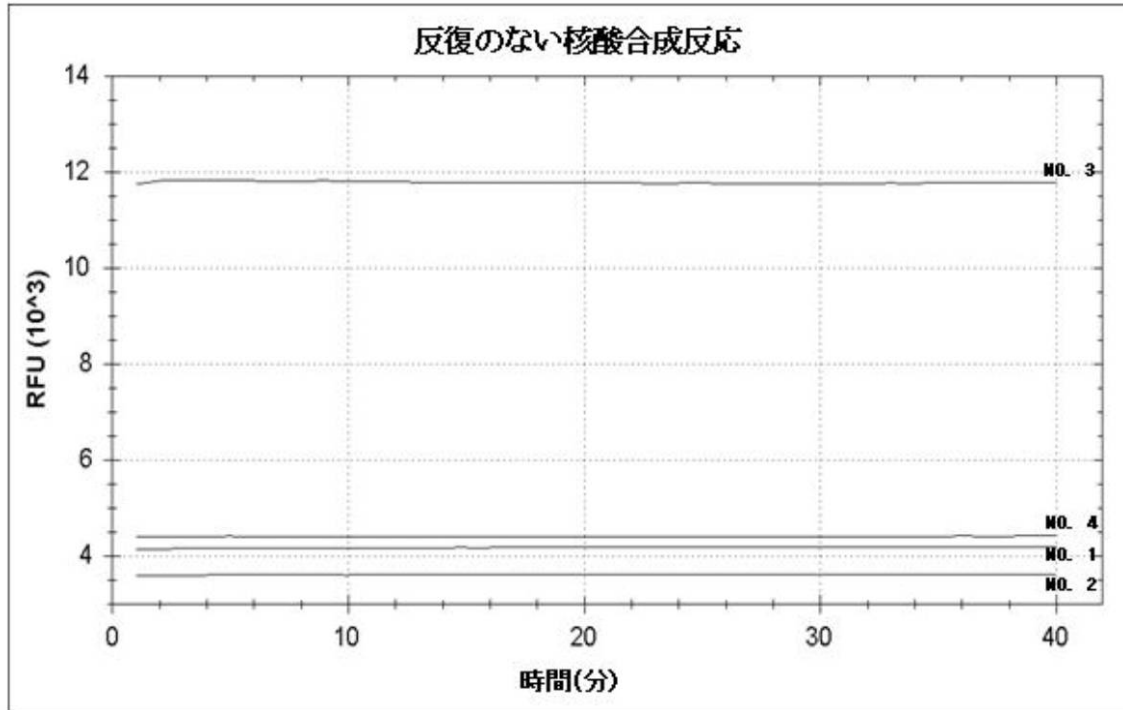


【 図 5 】



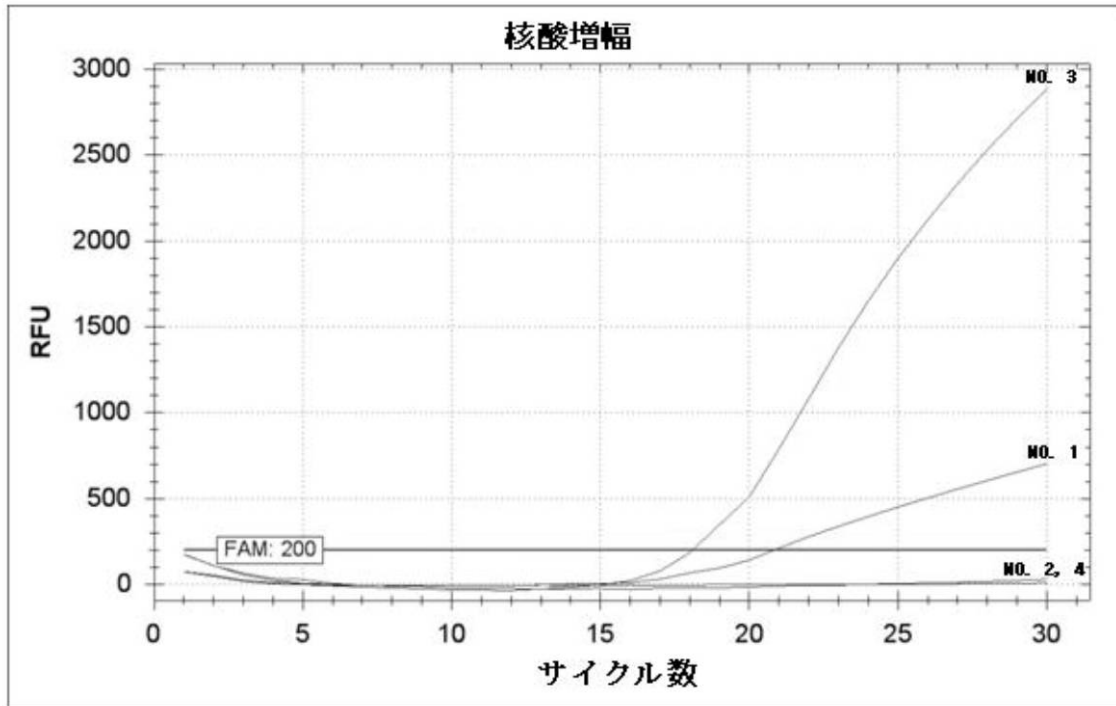
No.	DNA ポリメラーゼ ¹⁾	鑄型 ²⁾	TSG プライマー ³⁾	RFU ⁴⁾	Δ RFU ⁵⁾
1	5' → 3' Exo ⁻	+	SP_TSG(9)	6905	2794
2	5' → 3' Exo ⁻	-	SP_TSG(9)	4111	
3	5' → 3' Exo ⁻	+	SP_TSG(21)	14935	9991
4	5' → 3' Exo ⁻	-	SP_TSG(21)	4944	

【 図 6 】



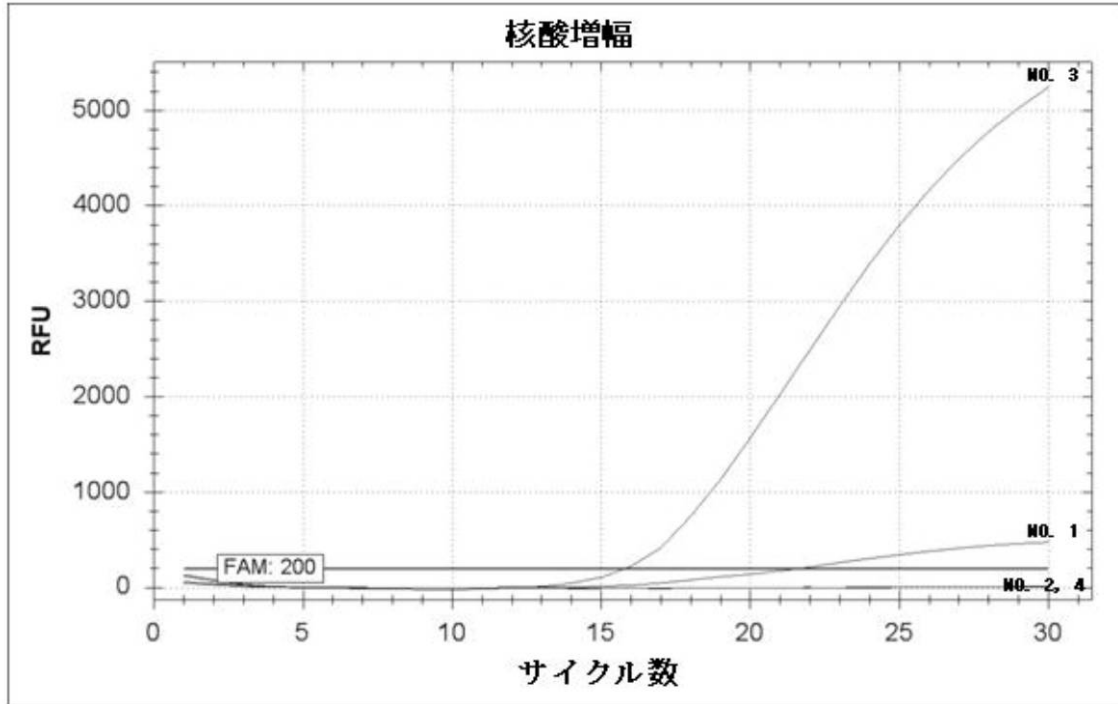
No.	DNA ポリメラーゼ ¹⁾	鑄型 ²⁾	TSG プライマー ³⁾	RFU ⁴⁾	Δ RFU ⁵⁾
1	5' → 3' Exo ⁻	+	SA_TSG(6)	4194	559
2	5' → 3' Exo ⁻	-	SA_TSG(6)	3635	
3	5' → 3' Exo ⁻	+	SA_TSG(21)	11788	7365
4	5' → 3' Exo ⁻	-	SA_TSG(21)	4423	

【 図 7 】



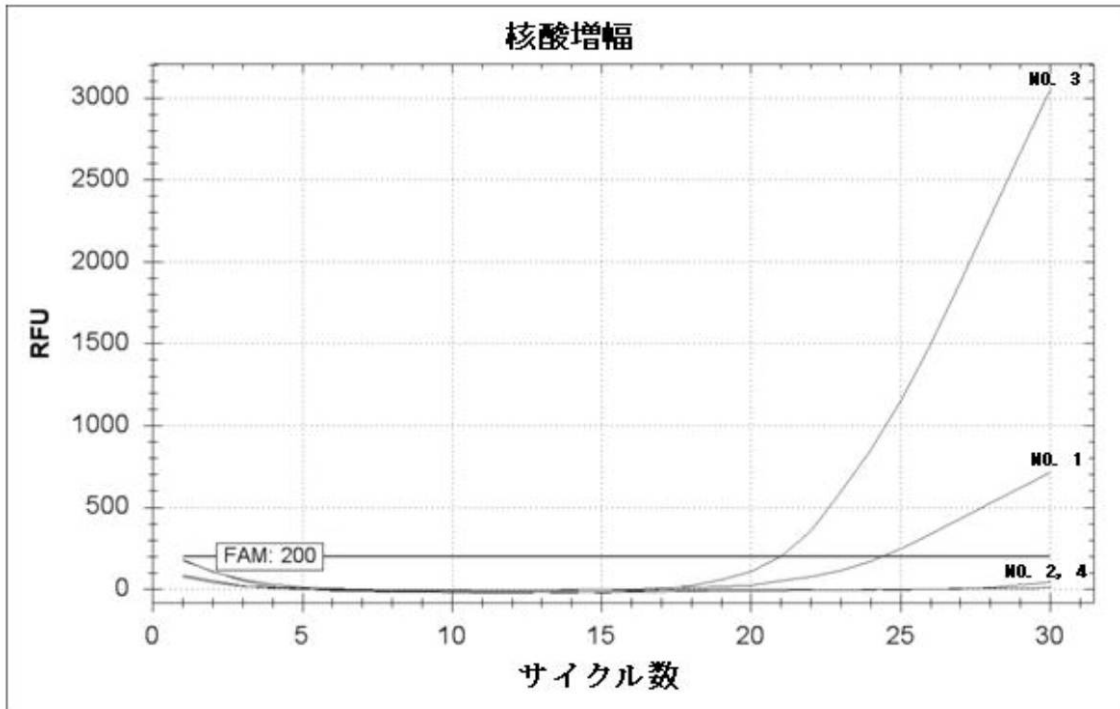
No.	DNA ポリメラーゼ ¹⁾	鑄型 ²⁾	TSG プライマー ³⁾	Ct 値
1	5' → 3' Exo ⁻	+	SP_TSG(9)	20.83
2	5' → 3' Exo ⁻	-	SP_TSG(9)	-
3	5' → 3' Exo ⁻	+	SP_TSG(21)	18.09
4	5' → 3' Exo ⁻	-	SP_TSG(21)	-

【 図 8 】



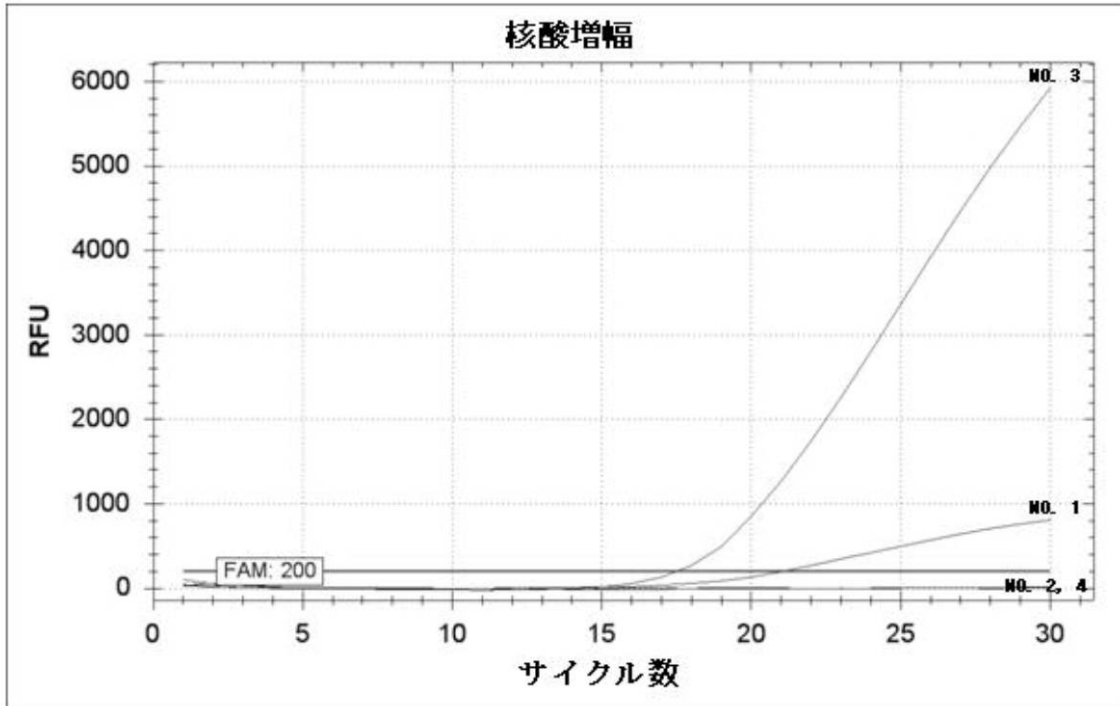
No.	DNAポリメラーゼ ¹⁾	鑄型 ²⁾	TSGプライマー ³⁾	Ct 値
1	5' → 3' Exo ⁻	+	SA_TSG(6)	21.63
2	5' → 3' Exo ⁻	-	SA_TSG(6)	-
3	5' → 3' Exo ⁻	+	SA_TSG(21)	15.79
4	5' → 3' Exo ⁻	-	SA_TSG(21)	-

【 図 9 】



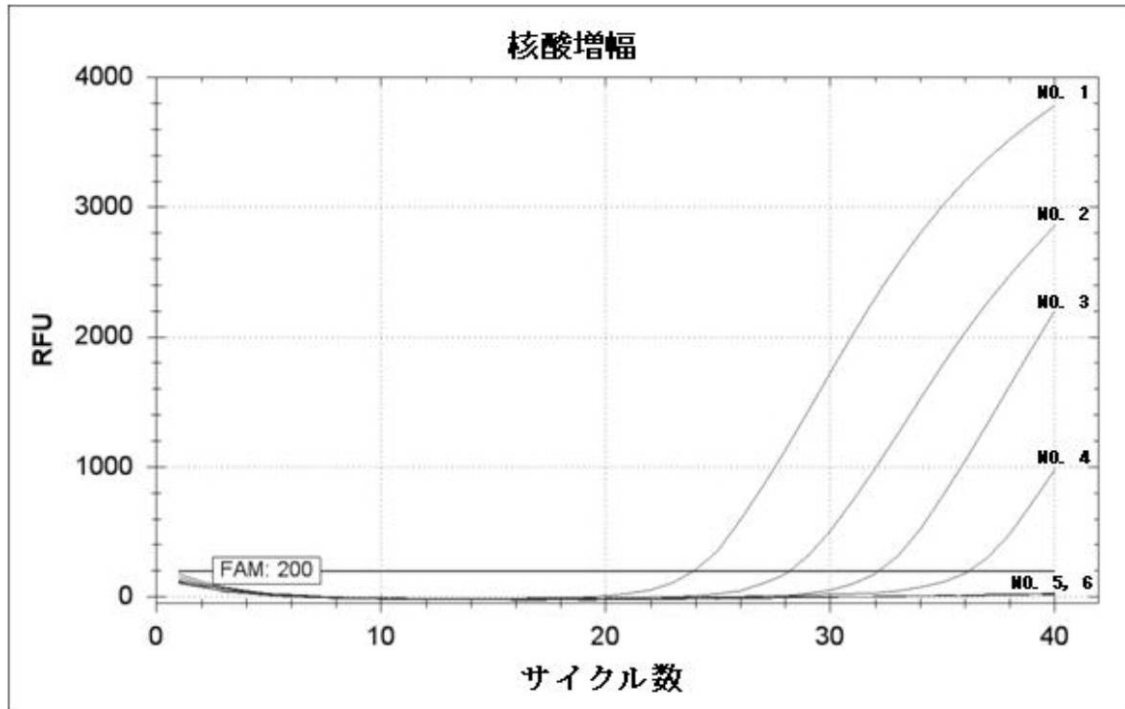
No.	DNA ポリメラーゼ ¹⁾	鑄型 ²⁾	TSG プライマー ³⁾	Ct 値
1	5' → 3' Exo ⁻	+	NG_TSG(4)	24.37
2	5' → 3' Exo ⁻	-	NG_TSG(4)	-
3	5' → 3' Exo ⁻	+	NG_TSG(22)	20.98
4	5' → 3' Exo ⁻	-	NG_TSG(22)	-

【 図 10 】



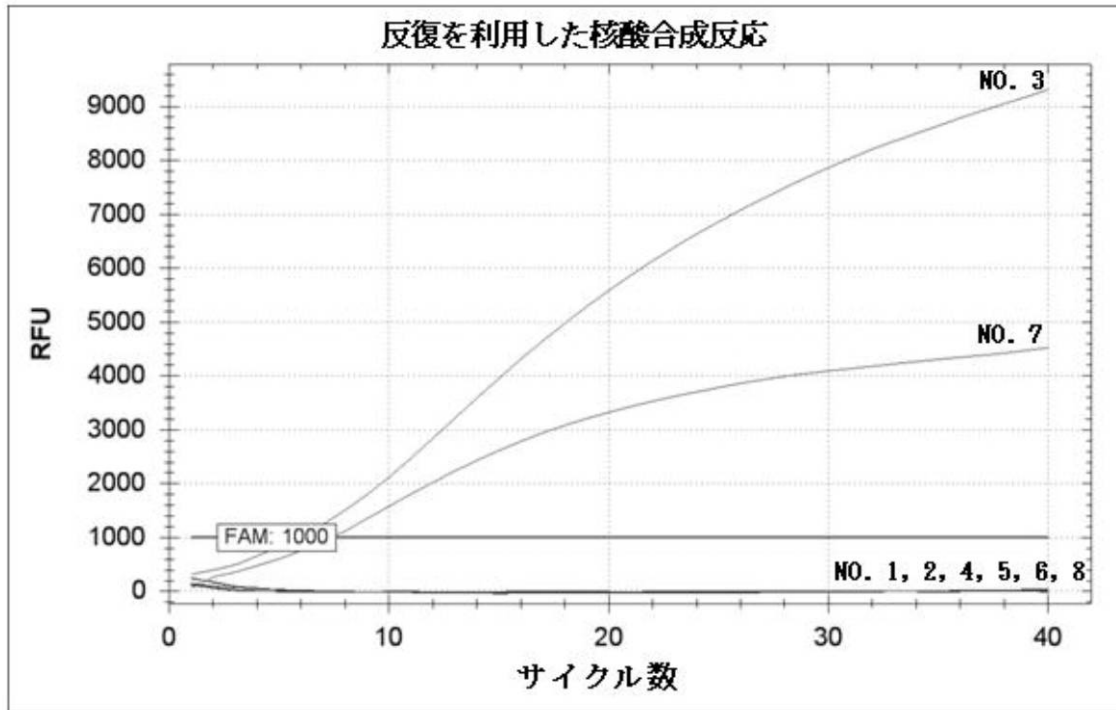
No.	DNAポリメラーゼ ¹⁾	鑄型 ²⁾	TSG プライマー ³⁾	Ct 値
1	5' → 3' Exo ⁻	+	NM_TSG(7)	21.05
2	5' → 3' Exo ⁻	-	NM_TSG(7)	-
3	5' → 3' Exo ⁻	+	NM_TSG(20)	17.49
4	5' → 3' Exo ⁻	-	NM_TSG(20)	-

【 図 1 1 】



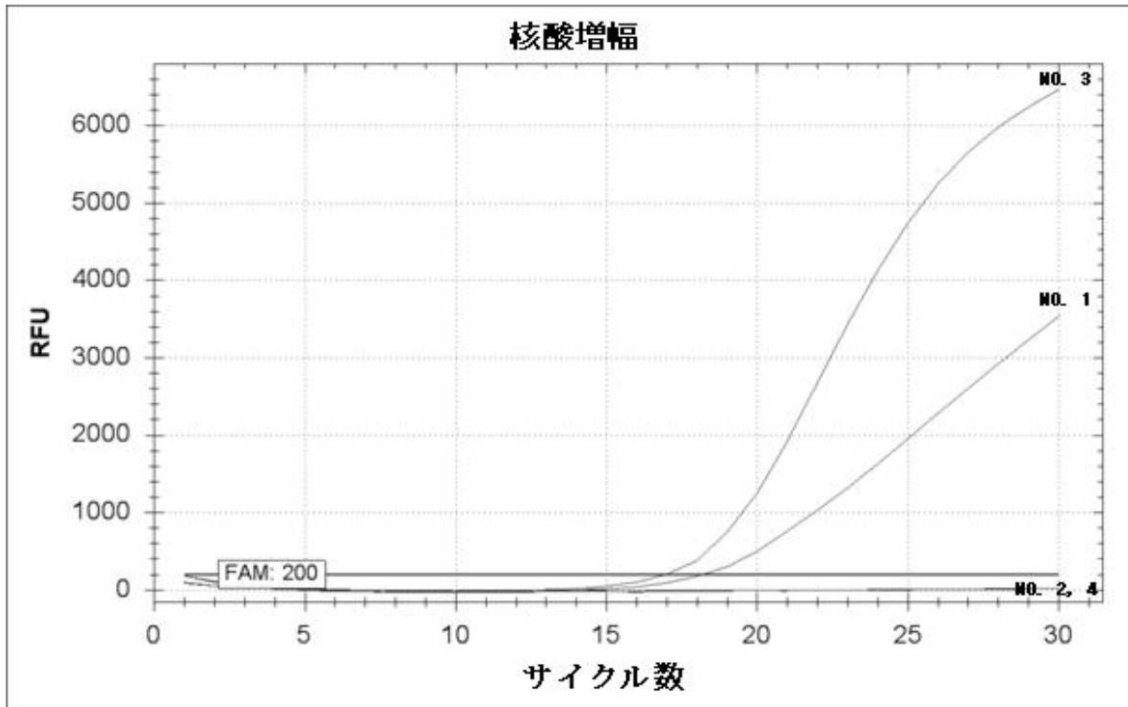
No.	DNAポリメラーゼ ¹⁾	TSGプライマー ²⁾	鋳型 ³⁾	Ct 値
1	5' → 3' Exo ⁻	SA_TSG(21)	100 pg	23.92
2	5' → 3' Exo ⁻	SA_TSG(21)	10 pg	28.19
3	5' → 3' Exo ⁻	SA_TSG(21)	1 pg	32.16
4	5' → 3' Exo ⁻	SA_TSG(21)	100 fg	36.16
5	5' → 3' Exo ⁻	SA_TSG(21)	10 fg	-
6	5' → 3' Exo ⁻	SA_TSG(21)	-	-

【 図 1 2 】



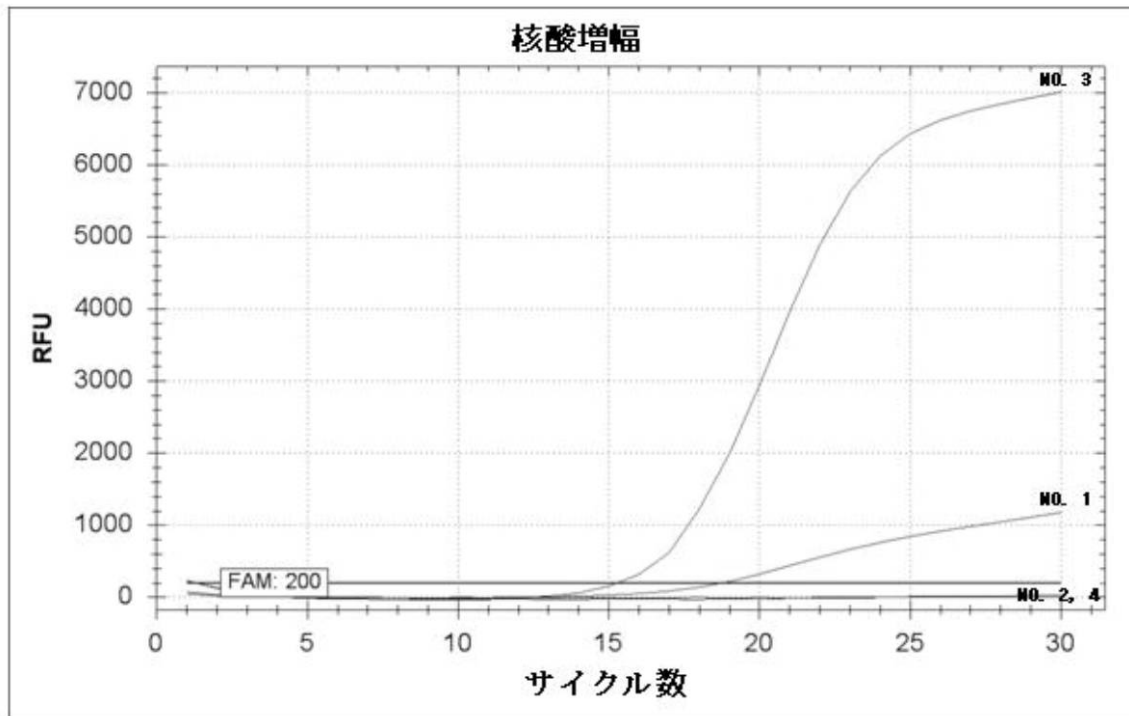
No.	TSG プライマー ¹⁾	DNAポリメラーゼ	鑄型 ⁴⁾	Ct 値
1			+	-
2	SP_TSG(9)	5' → 3' Exo ⁻ ²⁾	-	-
3	SP_TSG(9)	5' → 3' Exo ⁺ ³⁾	+	5.85
4			-	-
5	SP_TSG(21)	5' → 3' Exo ⁻	+	-
6			-	-
7	SP_TSG(21)	5' → 3' Exo ⁺	+	7.36
8			-	-

【 図 1 3 】



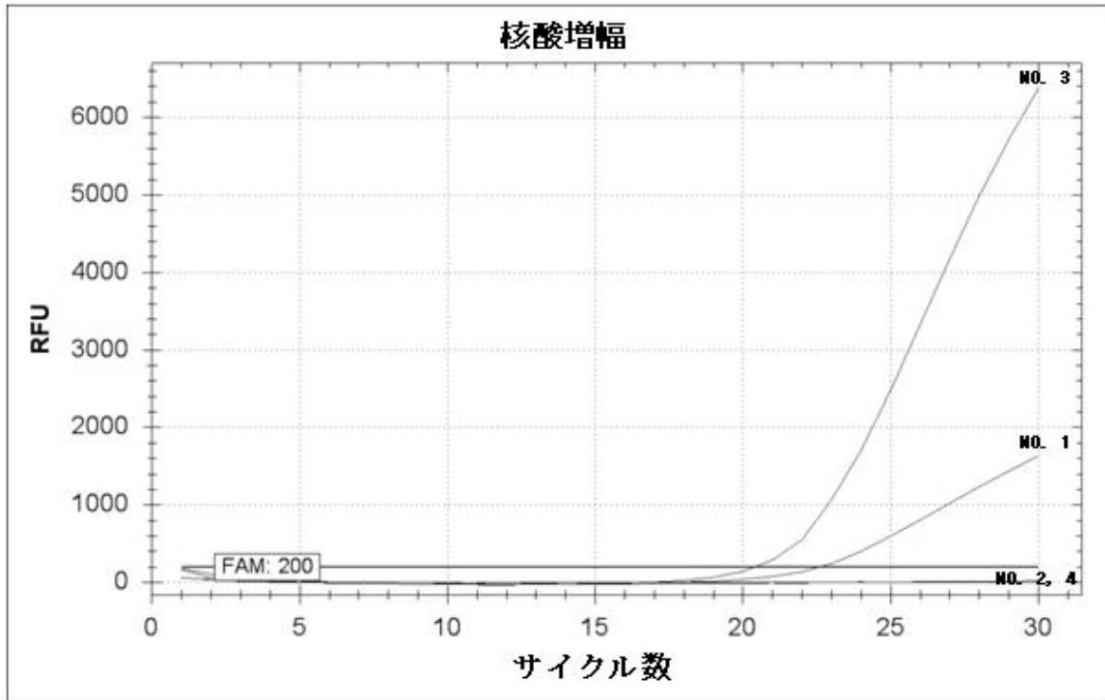
No.	DNAポリメラーゼ ¹⁾	鋳型 ²⁾	TSG プライマー ³⁾	Ct 値
1	5' → 3' Exo ⁺	+	SP_TSG(9)	18.19
2	5' → 3' Exo ⁺	-	SP_TSG(9)	-
3	5' → 3' Exo ⁺	+	SP_TSG(21)	16.96
4	5' → 3' Exo ⁺	-	SP_TSG(21)	-

【 図 1 4 】



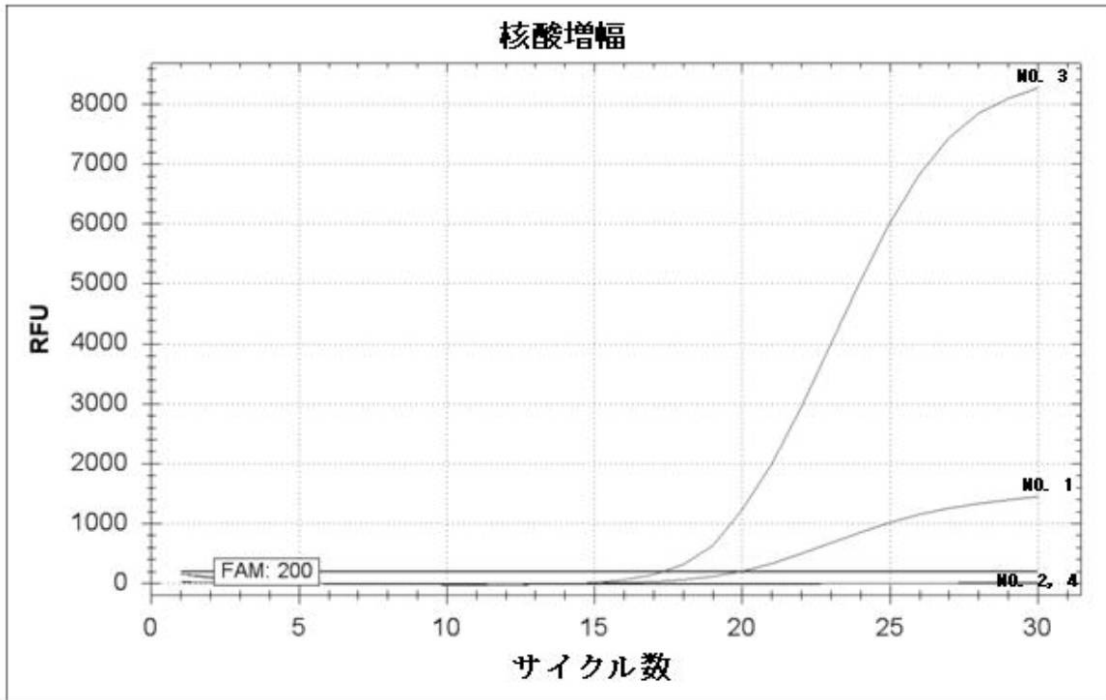
No.	DNAポリメラーゼ ¹⁾	鑄型 ²⁾	TSG プライマー ³⁾	Ct 値
1	5' → 3' Exo ⁺	+	SA_TSG(6)	18.73
2	5' → 3' Exo ⁺	-	SA_TSG(6)	-
3	5' → 3' Exo ⁺	+	SA_TSG(21)	15.26
4	5' → 3' Exo ⁺	-	SA_TSG(21)	-

【 図 1 5 】



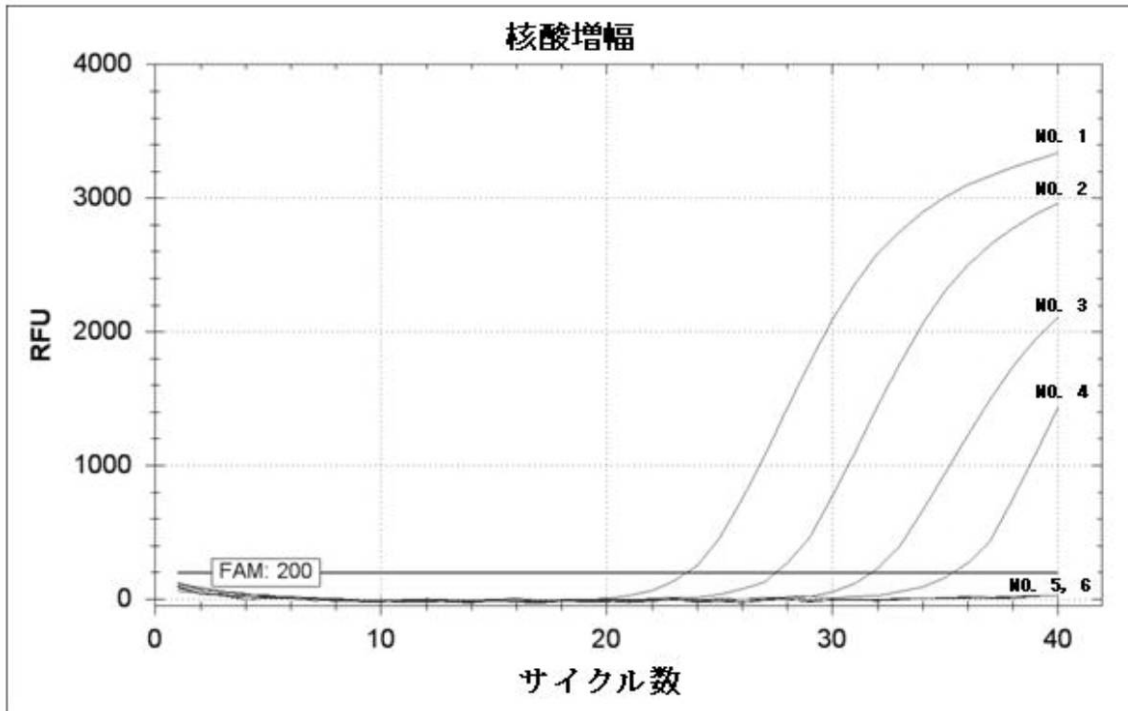
No.	DNAポリメラーゼ ¹⁾	鑄型 ²⁾	TSG プライマー ³⁾	Ct 値
1	5' → 3' Exo ⁺	+	NG_TSG(4)	22.59
2	5' → 3' Exo ⁺	-	NG_TSG(4)	-
3	5' → 3' Exo ⁺	+	NG_TSG(22)	20.39
4	5' → 3' Exo ⁺	-	NG_TSG(22)	-

【 図 16 】



No.	DNAポリメラーゼ ¹⁾	鑄型 ²⁾	TSGプライマー ³⁾	Ct 値
1	5' → 3' Exo ⁺	+	NM_TSG(7)	19.94
2	5' → 3' Exo ⁺	-	NM_TSG(7)	-
3	5' → 3' Exo ⁺	+	NM_TSG(20)	17.30
4	5' → 3' Exo ⁺	-	NM_TSG(20)	-

【 図 17 】



No.	DNAポリメラーゼ ¹⁾	TSGプライマー ²⁾	鑄型 ³⁾	Ct 値
1	5' → 3' Exo ⁺	SA_TSG(21)	100 pg	23.55
2	5' → 3' Exo ⁺	SA_TSG(21)	10 pg	27.50
3	5' → 3' Exo ⁺	SA_TSG(21)	1 pg	31.74
4	5' → 3' Exo ⁺	SA_TSG(21)	100 fg	35.34
5	5' → 3' Exo ⁺	SA_TSG(21)	10 fg	-
6	5' → 3' Exo ⁺	SA_TSG(21)	-	-

【 配列表 】

[0005822843000001.app](#)

フロントページの続き

(72)発明者 ファン・イン テク

大韓民国 ソウル 134-020 カンドン-グ チョンホ-ドン 52-17 テチュン ヘ
オルム アpartment 505ホ

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特開平11-313685(JP,A)

特表2003-500038(JP,A)

特表2001-513623(JP,A)

特表2005-528121(JP,A)

国際公開第2008/104791(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/68

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/

WPIDS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)

PubMed