

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532044

(P2004-532044A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.21)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 M	
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/566	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 69 頁)

(21) 出願番号 特願2003-500296 (P2003-500296)  
 (86) (22) 出願日 平成14年5月24日 (2002.5.24)  
 (85) 翻訳文提出日 平成15年11月25日 (2003.11.25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2002/002443  
 (87) 国際公開番号 W02002/097132  
 (87) 国際公開日 平成14年12月5日 (2002.12.5)  
 (31) 優先権主張番号 0112868.5  
 (32) 優先日 平成13年5月25日 (2001.5.25)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

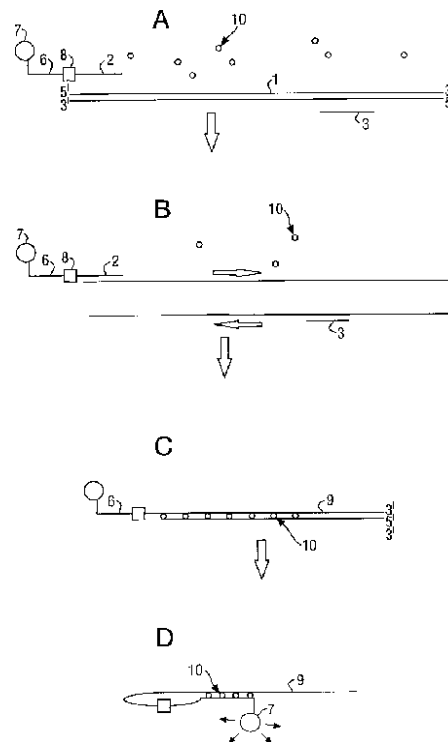
(71) 出願人 390040604  
 イギリス国  
 THE SECRETARY OF ST  
 ATE FOR DEFENCE IN  
 HER BRITANNIC MAJES  
 TY'S GOVERNMENT OF  
 THE UNETED KINGDOM  
 OF GREAT BRITAIN AN  
 D NORTHERN IRELAND  
 イギリス国 ウィルシャー エスピー4  
 オージェイキュー ソールズベリー ポート  
 ンダウン ディーエステーエル  
 (74) 代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 禎男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 検出システム

(57) 【要約】

試料中の標的核酸配列の存在を検出する方法であって、(a)DNA二重らせん結合剤と、(b)核酸ポリメラーゼと、(c)増幅産物内の相補的領域に対してハイブリダイズすることができるように、一本鎖の形にあるときに前記標的配列に対してハイブリダイズすることができ且つ化学結合基によって標識を有するプローブに5' 端に結合している増幅プライマーを含み、標識した前記プローブが前記標的核酸配列と同様の配列である試薬との存在下に該試料に対して核酸増幅を行い、且つ該標識が該DNA二重らせん結合剤から蛍光を吸収することができ、或いはそれに蛍光エネルギーを供与することもできるステップと、前記試料の蛍光をモニタするステップとを含む、前記方法。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

試料中の標的核酸配列の存在を検出する方法であって、

(a)DNA二重らせん結合剤、

(b)核酸ポリメラーゼ、

(c)一本鎖の形にあるときに前記標的配列に対してハイブリダイズすることができ且つ化学結合基によって標識を有するプローブに5'端で結合している増幅プライマーを含む試薬、

の存在下に該試料に対して核酸増幅を行うステップであって、

標識した前記プローブが前記標的核酸配列と同様の配列であり、但し、増幅産物内の相補的領域に対してハイブリダイズすることができ、及び、該標識が該DNA二重らせん結合剤から蛍光を吸収し又は該DNA二重らせん結合剤に蛍光エネルギーを供与し得るステップ；及び、

前記試料の蛍光をモニタするステップ、

を含む、前記方法。

10

**【請求項 2】**

(a)該標的核酸配列と、該DNA二重らせん結合剤と、該核酸ポリメラーゼと、該試薬とを含む疑いがある試料に添加するステップ；

(b)該プライマーが該標的核酸配列にハイブリダイズするとともに該プローブを含む増幅産物が形成される条件に前記試料を供するステップ；

(c)該標識したプローブが該増幅産物の相補的領域にハイブリダイズする条件に前記試料を供するステップ；及び

(d)ステップ(b)と(c)の少なくとも1つのステップの間に前記試料の蛍光をモニタするステップ、

を含む、請求項1記載の方法。

20

**【請求項 3】**

該増幅産物が該プローブを含む、請求項1記載の方法。

**【請求項 4】**

該DNA二重らせん結合剤が挿入色素である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 5】**

該DNA二重らせん結合剤が供与標識を含み、該プローブがその受容標識を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

30

**【請求項 6】**

該DNA二重らせん結合剤が受容標識を含み、該プローブがその供与標識を含んでいる、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 7】**

該受容標識が固有の波長でエネルギーを放出する蛍光分子である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 8】**

該受容標識がローダミン色素又はCy5である、請求項7記載の方法。

40

**【請求項 9】**

該受容標識が暗受容体である、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 10】**

該暗受容体がDABCYL、メチルレッド、QSY-7ジアリールローダミン色素及び6-(ジメチルアミノ)-2-[4-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-1,3-ブタジエニル]-1-エチルキノリニウムペルクロレート(CAS No.181885-68-7)のいずれか1種より選ばれる、請求項9記載の方法。

**【請求項 11】**

該増幅反応が該ポリメラーゼ鎖反応(PCR)を含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

50

## 【請求項 12】

該受容体分子が蛍光分子であり、該供与体分子と該受容体分子双方の蛍光がモニタされ、発光間の関係が計算される、請求項 1 ~ 8 と請求項 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 13】

該試料からの蛍光シグナルを該増幅反応全体にモニタし、その結果を該試料中に存在している標的配列の量を定量するために用いる、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 14】

該増幅反応が、標識したプローブに結合していない対応する追加の増幅プライマーの存在下に行われる、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 15】

核酸増幅を検出する方法であって、

(a) 核酸ポリメラーゼ、

(b) DNA二重らせん結合剤、

(c) 一本鎖の形にあるときに標的配列に対してハイブリダイズすることができ且つ化学結合基によって第二標識を有するプローブに 5' 端で結合している増幅プライマーを含む試薬、

の存在下に標的ポリヌクレオチドに対して核酸増幅を行うステップであって、標識した前記プローブが前記標的配列と同様の配列であり、但し、増幅産物の相補的領域に対してハイブリダイズすることができ、及び、該 DNA二重らせん結合剤又は第二標識の一方が、前記供給分子から蛍光エネルギーを吸収することができる受容標識を含む該 DNA二重らせん結合剤又は第二標識のもう一方に蛍光エネルギーを供与することができる供与標識を含み、前記プライマーが前記標的ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができるステップ；及び、

該増幅反応中に蛍光の変化をモニタするステップ、

を含む、前記方法。

## 【請求項 16】

該増幅が、DNA鎖内の該標的ヌクレオチド配列のみが増幅されるように設計されている一対のプライマーを用いて行われる、請求項 15 記載の方法。

## 【請求項 17】

該プローブが RNA のスプライス領域か又は DNA のイントロンに特異的であるので、増幅した RNA 又は増幅した DNA の 1 つだけが検出及び/又は定量される、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 18】

標的核酸配列の特性を求める方法であって、

(a) DNA二重らせん結合剤と、該標的配列の領域と同様である配列を含むプローブに 5' 端で化学結合によって結合された増幅プライマーを含み且つ標識を更に含み、前記 DNA二重らせん結合剤と該標識の一方が供与標識であり、もう一方が受容標識であり、該供与標識が該受容標識に蛍光エネルギーを供給することができる試薬との存在下に前記配列を増幅し、プローブ領域を組込んでいる増幅産物を形成するステップ、

(b) 増幅産物をその該プローブ領域が該増幅産物の該相補的領域に対してハイブリダイズする条件に供するステップ、及び

(c) 試料の蛍光をモニタするとともに該試料に対する該プローブ領域のハイブリダイゼーション又は該プローブ領域と該標的核酸配列間に形成される該二重らせんの不安定化の結果として蛍光が変化する前記配列の特有の具体的な反応条件を求めるステップ、

を含む、前記方法。

## 【請求項 19】

多型性及び/又は対立遺伝子変異を検出する方法であって、前記多型性又は変異を含むことが疑われる配列を請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて増幅するステップと、該プローブ領域が該増幅産物内のその相補的配列から融解する温度を生成した該蛍光シグナルを用いて測定するステップと、それを多型性又は対立遺伝子変異の存在に関係づ

10

20

30

40

50

けるステップとを含む、前記方法。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 19のいずれか 1 項に記載の方法において用いられるキットであって、標的配列に特異的なプローブに化学結合によって 5' 端に結合される増幅プライマーを含み、該プローブが供与標識と受容標識のどちらか一方として作用することができる第一標識を含む試薬と、第二標識が供与標識と受容標識のどちらか一方として作用することができる第二標識を含むDNA挿入剤とを含み、該第一標識と第二標識が供与体 受容体対を形成する、前記キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、試料中の標的ポリヌクレオチドを、例えば、増幅反応をモニタすることにより、好ましくは定量的方法で、検出する方法、及びその方法に用いられるキットを提供する。該方法は、多型性又は対立遺伝子変異のような配列特性の検出に適するので、診断法に用いることができる。

既知の蛍光ポリメラーゼ鎖反応(PCR)モニタリング法には、わずかな第2世代のPCRサーマルサイクリング装置に使用し得る鎖特異的と一般の双方のDNAインターカレーター法が含まれている。

一般蛍光PCR法は、二本鎖DNA化学種に結合されている場合に強い蛍光を示すDNA挿入色素を利用するものである。増幅中DNAのバルク濃度が上昇することによる蛍光の増大は、反応の進行を測定するとともに初期の標的分子コピー数を求めるために使用し得る。更に、温度変化が制御された蛍光をモニタリングすることにより、DNA融解曲線が、例えば、PCRサーマルサイクリングの終わりに生じ得る。

これらの一般蛍光PCR法は、核酸のバルク濃度の上昇を時間による損失を伴わずにモニタする。1回の蛍光の読み取りは、反応毎に同じ時点で測定し得る。アンプリコンからのアーチファクトを識別し、且つアンプリコンを識別するために終点融解曲線分析を使用し得る。アガロースゲル電気泳動では肉眼で見えるようにすることができない濃度で産物のピークを見ることができる。

一般的なDNA融解曲線分析はPCRサーマルサイクリングを最適化するのに強力なツールであることがわかった。アンプリコンの融解温度を求めることにより、後のPCRサイクルの変性温度をその温度まで下げることが可能である。ゲノムDNAではなく第1世代反応産物からの増幅を最適化することにより、後のサイクルで生じるアーチファクトの生成が減少する。プライマーオリゴヌクレオチドとその補体の融解温度はそのアニーリング温度を求め

るために用いることができ、実験的最適化の要求が少なくなる。しかしながら、一般インターカレーター法は、準鎖特異的にすぎないので、鎖特異的検出を必要とする場合にはほとんど用いられない。

【0002】

蛍光PCR鎖特異的法は、増幅反応の進行をモニタするために追加の核酸反応成分を利用するものである。これらの方法は、検出の基準として蛍光エネルギー転移(FET)を用いることができる。1種以上の核酸プローブを蛍光分子で標識し、その一方がエネルギー供与体分子として作用することができ、もう一方がエネルギー受容体分子である。これらは、それぞれリポーター分子と消光分子としてしばしば知られる。供与体分子は、通常は蛍光発光波長を示す個々の光の波長で励起する。受容体分子は、この発光波長で励起し、種々の距離依存性エネルギー転移機序により供与体分子の発光エネルギーを受容し得る。起こり得る蛍光エネルギー転移の個々の例は、蛍光共鳴エネルギー転移又は“FRET”である。一般に、受容体分子は密接に近接している(例えば、同じ分子、又は隣接分子について)供与体分子の発光エネルギーを受容する。FET又はFRET検出の基準は供与体発光波長の変化をモニタすることである。受容体が蛍光分子である場合、受容体発光波長をモニタすることができる。

2種類のFET又はFRETプローブが一般に用いられ、供与体を受容体から分離するために核酸プローブの加水分解を用いるものと、供与体分子と受容体分子の空間的關係を変えるた

10

20

30

40

50

めにハイブリダイゼーションを用いるものがある。

加水分解プローブは、TaqMan(登録商標)プローブとして市販されている。これらは、供与体分子と受容体分子で標識されるDNAオリゴヌクレオチドからなっている。プローブは、PCR産物の1つの鎖の特定の領域に結合するように設計されている。この鎖に対するPCRプライマーをアニールした後、Taq酵素は5' → 3' ポリメラーゼ活性を有するDNAを伸長させる。Taq酵素は、5' → 3' エクソヌクレアーゼ活性も示す。TaqMan(登録商標)プローブは、Taqエクステンションを開始することを妨げるリン酸化により3' 端で保護される。TaqMan(登録商標)プローブが産物鎖に対してハイブリダイズする場合には、伸長しているTaq分子はプローブを加水分解することができ、検出の基準として供与体を受容体から遊離させる。この場合のシグナルは累積し、供与体と受容体の遊離分子の濃度は増幅反応の各サイクルと共に増大する。

10

#### 【0003】

シグナル生成がプローブ加水分解反応の発生に左右されるという事実は、この方法に時間の損失が伴うことを意味する。更に、プローブが存在することによりPCR法の円滑な操作が中断されてしまう。

更に、加水分解が、特に多数の、例えば、50サイクルを超える増幅サイクルを必要とする場合、非特異的であり得ることがわかった。その場合には、プローブの非特異的加水分解が過度の高シグナルを生じる。

これは、そのような手法がIdaho Technologies Inc.製のRapidCycler(登録商標)やLightCycler(登録商標)のような急速熱風サーマルサイクラーの開発において重要になってきて

20

いる急速PCR法とほとんど適合しないことを意味している。他の急速PCR装置は、例えば、同時係属英国出願第2334904号に記載されている。従来の熱循環より急速循環の利点は他の所でも報告されている。そのような手法は、例えば、寿命又は深刻な損傷の損失が避けられるならば結果の速度が重要である生物学的闘争の検出システムに特に有効である。

更に、シグナル生成は、概してアンプリコン又はプローブの融解温度よりプローブの加水分解に左右されるので、融解のヒステリシスに関する情報は重要ではない。

ハイブリダイゼーションプローブは、多くの外観に利用できる。分子ビーコンは、5' と3' の相補的配列を有するオリゴヌクレオチドであり、ヘアピンループを形成する。末端蛍光標識は、FRETの場合、ヘアピン構造が形成されるときに生じるように密接に近接している。相補的配列に対して分子ビーコンがハイブリダイズした後、蛍光標識が分離するので

30

、FRETは起こらず、これが検出の基準である。一対の標識したオリゴヌクレオチドを用いることもできる。これらは、供与体分子と受容体分子と一緒に架橋しているPCR産物鎖について密接に近接してハイブリダイズするので、FRETが起こり得る。高FRETが検出の基準である。このタイプの変異体には、1つの隣接したプローブを有する標識した増幅プライマーを用いた変異体が含まれる。

#### 【0004】

2つのプローブ、又は2つの標識分子を含む分子ビーコン型のプローブの使用は、プロセスに係するコストが増大する。更に、この方法にはかなり長く知られた配列の存在を必要とするので、特に相互に密接に接近して結合するのに十分長い2つのプローブが既知である。これは、有効なプローブを設計するために使用し得る生物における保存配列の長さ

40

がHIVウイルスのような比較的短いものである診断用においては問題となるものである。更に、一対のプローブの使用には、より複雑な実験設計が必要である。例えば、プローブの融解物によって示されるシグナルは双方のプローブからの融解の関数である。小さな不適合又はプローブの一方がスプライス領域を横切って結合することを必要とする場合(例えば、イントロンの両側の配列がプローブ部位として用いることができる試料におけるDNAに匹敵するRNAを検出する)の実験により、もう一方のプローブが最初に融解する場合には不正確な結果が生じ得る。

同時係属国際出願第99/28500号には、具体的な標的核酸配列の存在を検出する方法であって、a)その試料に前記配列に特異的なプローブを付加するステップであって、該プローブがDNA二重らせん結合剤に蛍光を供与するか又はそれから蛍光エネルギーを吸収すること

50

ができる部分をもっている、前記ステップと、b)その混合物を増幅反応に供するステップと、c)該標的配列に対して該プローブをハイブリダイズし、該試料からの該蛍光をモニタするステップとを含む、前記方法が記載されている。その場合、反応は前記試料の蛍光を測定することにより、プローブに対してハイブリダイズしかつDNA二重らせん結合剤とプローブの蛍光部分との間にFET又はFRETの相互作用を生じるより多くの産物が形成される反応の過程でこれが変わるので、モニタすることができる。

同時係属国際特許出願第PCT/GB99/00504号には、試料中の標的配列の量を定量するように適合することができる具体的な核酸配列の存在を検出する同様の分析が記載されている。この分析においては、増幅反応が一組のヌクレオチドを用いて行われ、少なくとも一方が蛍光的に標識されている。従って、増幅産物は蛍光標識がその中に組込まれている。反応は、増幅産物に対してハイブリダイズすることができ、且つ前記蛍光標識ヌクレオチドから蛍光を吸収することができるし、それに蛍光エネルギーを供与することもできる反応性分子を含むプローブの存在下に行われる。その場合、反応は、前記試料の蛍光を測定することにより、プローブに対してハイブリダイズし且つそれらの間でFET又はFRET相互作用を生じるより多くの産物が形成する反応の過程でこれが変わるので、モニタすることができる。

10

#### 【0005】

国際特許出願第01/11078号には、試料中の標的核酸配列の存在を検出する他の関連した方法が記載されている。この分析においては、第一段階で標的配列が一本鎖になるので、それに対して試薬のプライマー領域がハイブリダイズすることができる。従って、これにより、標識したヌクレオチドを含み且つ産物の下流領域に相補的な5'端の上流に標識したプローブ領域をもつ相補鎖を作成するために鎖のエクステンションを始めることができる。エクステンション相が完了すると、産物は鋳型鎖から熔融相中で分離されるので、一本鎖になる。この形での標識したプローブ領域はねじれるとともに産物鎖の相補的領域に対してハイブリダイズすることができ、そのときFET又はFRETによって蛍光エネルギーをもう一方の標識に供与することができる標識がそのようにするので、試料からの蛍光シグナルが変化する。シグナルのこの変化は、反応全体にモニタすることができ、増幅反応の進行がモニタされる。

20

スコルピオンプローブシステムの使用を含む分析は、英国特許第2338301号とNucleic Acids Research, 2000, vol. 28, no. 19, 3752-3761に開示されている。スコルピオンプローブシステムは、結合部分によってプローブ部分に結合したプライマー部分を含んでいる。プローブシステムは、供与部分と受容部分の双方を含んでいる。この分析においては、第一段階で標的配列を一本鎖にするのでプライマー部分は標的配列に対してハイブリダイズすることができる。従って、これにより、産物の下流領域に対して相補的である5'端の上流にプローブ部分をもつ相補鎖を作成する鎖のエクステンションを始めることができる。エクステンション相が完了すると、融解相の間に鋳型細胞から産物を分離するので、一本鎖になる。この形での標識したプローブ領域はねじれるとともに産物鎖の相補的領域に対してハイブリダイズすることができる。産物鎖の相補的領域に対してプローブ部分をハイブリダイズすると、供与部分と受容部分との間の空間的關係が変わるので、試料からの蛍光シグナルが変化する。

30

40

#### 【0006】

そこで、出願人は、代替的改良分析を見出した。

本発明は、試料中の標的核酸配列の存在を検出する方法であって、

(a)DNA二重らせん結合剤と、(b)核酸ポリメラーゼと、(c)一本鎖の形にあるときに前記標的配列に対してハイブリダイズすることができ且つ化学結合基によって標識を有するプローブに5'端で結合している増幅プライマーを含む試薬、との存在下に該試料に対して核酸増幅を行うステップであって、標識した前記プローブが前記標的核酸配列と同様の配列であり、但し、増幅産物内の相補的領域に対してハイブリダイズすることができ、及び、該標識が該DNA二重らせん結合剤から蛍光を吸収し又は該DNA二重らせん結合剤に蛍光エネルギーを供与し得るステップ；及び、前記試料の蛍光をモニタするステップ、を含む、上

50

記方法を提供する。

本発明は、国際出願第01/11078号の従来技術より安価で簡便であり、驚くべきことに効果的である。本発明においては、DNA二重らせん結合剤は、非結合状態で反応混合物に添加され、その結合剤を国際出願第01/11078号のようにヌクレオチドか又は英国特許第2338301号のようにプローブシステムに結合する要求を不要にする。

本発明の分析においては、第一段階で標的配列を一本鎖にするので、試薬のプライマー領域はそれにハイブリダイズすることができる。従って、これにより、相補鎖を作成するために鎖のエクステンションを始めることができる。プライマー鎖は、産物の下流領域に相補的な5'端の下流に標識したプローブ領域を有する。DNA二重らせん結合材料(好ましくは挿入色素)は、そのように形成された二重らせんの中に入り込む。エクステンション相が完了すると、溶融相中にその鑄型細胞から産物が分離されるので、一本鎖になる。この形の標識したプローブ領域はねじれるとともに産物鎖の相補的領域に対してハイブリダイズすることができるので、産物のプローブ領域と相補的領域の間にDNA二重らせん結合剤が入り込む。DNA二重らせん結合剤とプローブ標識が相互に接近することにより、蛍光エネルギー(供与体)を受容部分にFET又はFRETによって供与することができる蛍光部分がそのようにするので、試料からの蛍光シグナルが変化する。このシグナルの変化は、増幅反応の進行をモニタするために反応全体にモニタすることができる。

10

#### 【0007】

増幅の第二段階と続いての段階においては、産物鎖はそれ自体エクステンション用鑄型鎖として作用することができる。しかしながら、前記プローブに相補的な配列が作製される前にプローブとプライマー間の化学結合がエクステンション反応を停止させる。従って、プローブ領域は一本鎖のままである。

20

本発明の方法は、

(a)標的核酸配列を含むことが疑われる試料にDNA二重らせん結合剤と、核酸ポリメラーゼと、試薬とを添加するステップと、

(b)プライマーが標的核酸配列に対してハイブリダイズしかつプローブを含む増幅産物が形成される条件に前記試料を供するステップと、

(c)標識したプローブが増幅産物の相補的領域に対してハイブリダイズする条件に前記試料を供するステップと、

(d)ステップ(b)とステップ(c)の少なくとも1つのステップの間、前記試料の蛍光をモニタするステップと

30

を含むことが好ましい。

必要とされる場合、標識したプローブ領域に結合していない対応する増幅プライマーが増幅反応中に存在してもよい。このプライマーは、結果として、用いられる検出装置の動的範囲にシグナルを仲介する働きをすることができる従来の非標識増幅産物を作製する。プローブ/プライマーの複合構造の存在によって悪影響することがある反応効率を改善することができる。

供与標識から蛍光を吸収することができる受容標識がこの機能を行う場合、供与体からの蛍光が低下する。この低下を検出することができ、これはプローブ領域の結合を意味する

40

。最も好ましくは、蛍光を吸収することができる標識(受容体)は、それ自体蛍光分子であり、固有の波長で蛍光を放出する。そのようなプローブには、ローダミン色素又はCy5が含まれる。この場合、供与標識と異なる波長を有する受容体分子からの蛍光の増加は、プローブの結合を意味する。また、受容体は蛍光を発しない(暗受容体)。そのような受容体には、DABCYL、メチルレッド、QSY-7ジアリールローダミン色素又は6-(ジメチルアミノ)-2-[4-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-1,3-ブタジエニル]-1-エチルキノリニウムペルクロレート(CAS No.181885-68-7)が含まれる。

#### 【0008】

適切には、DNA二重らせん結合剤は供与標識を含み、受容標識はプローブ上に与えられる。この場合、また、受容体が蛍光を発する場合には、このように標識した増幅産物の存在

50

は、同じ産物鎖の下流領域に主として結合している、プローブ上の受容体分子からの蛍光をモニターすることにより検出することができる。この場合、増幅産物からのシグナルは、蛍光標識のバックグラウンドシグナルと、また、非特異的増幅産物とも区別することができる。また、DNA二重らせん結合剤は受容標識を含むことができ、プローブは供与標識を含んでいる。

本発明のシステムにおいては、一般インターカレーターシグナルの上昇(DNAが増幅した場合)と2つの蛍光部分が密接に近接している場合にだけ生じる配列特異的シグナル(即ち、プローブが増幅産物に対してハイブリダイズする場合)との間で区別される。配列特異的シグナルが標識した増幅産物によってのみ生成するという事実は、システムが多量のバックグラウンドDNAを含む反応混合物中の特定の標的配列を検出する点で非常に特異的であることを意味する。これは、非特異的増幅産物がプローブ領域に対してハイブリダイズしないので、測定シグナルに寄与しないためである。配列特異的シグナルに加えて一般インターカレーターシグナルを測定することは、有益なことである。一般インターカレーターシグナルは反応混合物中の増幅度に比例するので、増幅の効率又は遮断を示すために用いることができる。

この種類の分析は、安価な試薬を用いて行うことができる。単一の標識プローブは、受容体分子と供与体分子双方を含むものより経済的である。

増幅は、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)又はリガーゼ鎖反応(LCR)、鎖置換分析(SDA)又はNASBAのような既知の増幅反応、好ましくはPCRを用いて適切に行われる。

好ましくは、供与部分と受容部分の双方の蛍光がモニタされ、発光間の関係が計算される。

プローブに沿った標識の位置は重要でないが、一般にプローブの末端領域に位置する。1つを超える標識を試薬に用いることができるが、1つがより安価であるので好ましい。FRETのようなFETのオーダーでは、供与部分の蛍光発光は受容部分より波長が短くなければならない。

【0009】

従って、適切な組合わせを次の表に示す。

供与体	受容体
SYBRゴールド	ローダミン
SYBRグリーンI	ローダミン
フルオレセイン	ローダミン
SYBRゴールド	Cy5
SYBRグリーンI	Cy5
フルオレセイン	Cy5
フルオレセイン	エチジウムブロミド
フルオレセイン	Dabcyl
フルオレセイン	メチルレッド
フルオレセイン	QSY-7ジリアルローダミン色素*
SYBRゴールド	Cy5.5

\* Molecular Probes、英国から入手できる

当業者は、他の多くのそのような組合わせが可能であることを認識している。

好ましくは、供与体及び/又は受容体として用いられる分子は尖った発酵ピークを生じ、発光の波長の重なりがほとんど又は全くない。これらの状況によって、増幅産物によって生成されるシグナルからの“鎖特異的ピーク”を分割することは必要としない。鎖特異的シグナル(即ち、受容体部分によって生じる)のみの簡単な測定によって標的配列によるFET又はFRETの程度に関する情報が得られる。

しかしながら、供与部分と受容部分からの蛍光シグナルのスペクトルの重なりがある場合には、例えば、スペクトル間の関係を経験的に求めるとともにこの関係を用いて2つのシ



グナルからのシグナルを標準化することにより結果とみなすことができる。

標識プローブをプライマーから分離する化学結合は、ヌクレオチド配列を結合することができるがDNAポリメラーゼによって認識されないいずれの分子も適切である。この要求を満たす広範囲の化学リンカーは利用できる。

#### 【0010】

リンカーの形成に用いることができる化学剤と反応の種類は、例えば、国際出願第95/08642号に記載されている。特に、化学リンカーは、2つのポリヌクレオチド配列と、プライマーと、プローブとを共に結合する原子群を含んでいる。リンカーは、慣用的方法のいずれによってもそれぞれのポリヌクレオチド配列に結合することができる。

一般的に言えば、リンカーは、プローブとプローブの配列にそれぞれ結合することができること又は個々のヌクレオチドに結合してからプローブ又はプライマー配列が引き続き作成されることによって第一官能基と第二官能基を有する有機化合物から得られる。リンカーは、一般的にはヌクレオチドに結合しないように設計されている。

リンカーの合成は、例えば、S. Agrawal et al, *Nucleic Acids Research*, 1986, 14, 62 27や国際出願第88/02004号 (*Applied Biosystems*); J. L. Ruth & D. E. Bergstrom, *J. Org. Chem.*, 1978, 43, 2870; D. E. Bergstrom & M. K. Ogawa, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1978, 10, 8106; C. F. Bigge, P. Kalaritis, J. R. Deck & M. P. Mertes, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1980, 102, 2033; 欧州特許出願第063,879号に詳述されている。プローブとプライマーを結合する化学結合基を有する試薬の構造と合成については、国際特許出願第01/11078号に詳述されている。

特に、リンカーは複数の形のエチレングリコール、例えば、ヘキサエチレングリコール (HEG) を含んでいる。そのようなリンカーは、構造  $-(\text{CHOH}-\text{CHOH})_n$  (ここで、 $n$  は 1 より大きい整数、例えば、1 ~ 10、適切には 6 である。) を有するものである。

プローブとプライマーを結合するリンカー基を含むそのような試薬は、Oswel Research Products Ltd, 英国から入手することができる。

本発明の方法は、その用途が非常に広い。本方法は、以下に詳述されるように、試料中の標的核酸配列に関して定量データと定性データ双方を作成するために使用し得る。特に、本発明は定量的増幅を提供するだけでなく、更に又は或いは、二重らせん不安定化温度又は融点のような確認データを得るために使用し得る。

#### 【0011】

本発明の方法においては、標識したプローブは増幅プライマーと共に欠くことができないものである。増幅反応の過程全体に存在する。本工程は検出を均質な方法で行うことを可能にするので、増幅とモニタリングはすべての試薬が最初に添加される単一の容器で行うことができる。後続の試薬添加ステップを必要としない。一部の不均質系においては本発明の方法を用いることができる。固体支持体の存在下に本方法を行うことは求められていないことに留意すること(後述されるようにこれは任意であるが)。

プローブは増幅反応全体に存在するので、蛍光シグナルは増幅反応の進行をモニタさせることができる。これにより、試料中に存在する標的配列の量を定量するための手段が与えられてもよい。

蛍光受容部分を用いる場合には、増幅反応の各サイクル中に、標的配列を含むアンプリコン鎖とプローブ領域が受容体シグナルを生成する。試料中のそのアンプリコンの量が増加するにつれて、受容体シグナルも強くなる。サイクルに対する増加率をプロットすることにより、増強の出発点を求めることができる。

標識したプローブはDNA又はRNAのような核酸分子を含むことができ、後者が一本鎖の形にあるときに標的核酸配列に対してハイブリダイズする。この場合、標的核酸を一本鎖にする条件が用いられる。また、プローブは、二本鎖の形で標的配列を結合するペプチド核酸又は他の核酸類似体のような分子を含むことができる。

特に、用いられる増幅反応は、試料中に存在する標的核酸配列のいずれかが一本鎖になる条件、例えば、PCR又はLCRに試料を供するステップを必要とする。次に、適切なハイブリダイゼーション条件が起こるならば増幅反応の過程でプローブ領域はそれを含むアンプリ

コン鎖の下流領域に対してハイブリダイズすることが可能である。

好適実施態様においては、これらの条件が増幅反応の各サイクル中に適合されるようにプローブを設計することができる。従って、増幅反応の各サイクル中のある時点でプローブは標的配列に対してハイブリダイズし、FET又はFRETの結果としてシグナルを生成する。増幅が進行するにつれて、プローブ領域が下流反応から分離又は融解するので、受容標識によって生成したシグナルが供与体分子又は受容体分子を含むかによって減弱又は増強する。例えば、受容体である場合、増幅の各サイクルにおいて受容標識からの蛍光ピークが生成する。ピークの強さは、プローブを含むより多くのアンプリコン鎖が利用できることから増幅が進行するにつれて増強する。

#### 【0012】

各サイクルの間、試料からの受容体標識の蛍光をモニタすることにより、増幅反応の進行を様々な方法でモニタすることができる。例えば、融解ピークによって得られるデータは、例えば、融解ピークの下面積を計算し、このデータをサイクル数に対してプロットすることにより分析することができる。

蛍光は、既知の蛍光光度計を用いて適切にモニタされる。これらの、例えば、光電子倍増電圧の形のシグナルは、データプロセッサボードに送られ、各試料チューブに付随したスペクトルに変換される。複数のチューブ、例えば、96チューブを同時に評価することができる。このようにして反応全体に頻繁な間隔で、例えば、10分毎に1回データを集めることができる。

このようにして生成したスペクトルを、各シグナリング部分(即ち、DNA二重らせん結合剤及び/又はプローブ標識)の代表的なピークを形成するために、例えば、色素のような予め選択した蛍光部分の“適合部”を用いて分割することができる。各シグナルの強さの値を表し、必要な場合には、相互に商として表されるピークの下面積を求めることができる。シグナルの強さ及び/又は比率の微分は、FET又はFRETの変化を反応によって又は温度のような異なる反応条件で記録されることを可能にする。上記の変化は、プローブと標的配列間の結合現象に関係する。微分ピークの下面積の全体は、FET又はFRET効果の強さの値を計算することを可能にする。

これらのデータは、試料中に存在する標的核酸の量を定量する1つの手段を与える。

プライマー/標識したプローブ試薬は、溶液中に遊離していてもよく、固体支持体、例えば、産物を分離するのに有効な磁気ビーズのようなビーズの表面、又は表面プラズモン共鳴検出器の導波管や、例えば、DNAアレイのような検出装置の表面上に固定化されてもよい。選択は、調べられる具体的な分析の種類や用いられる具体的な検出手段に左右される。

#### 【0013】

プローブは、増幅反応に用いられるDNAポリメラーゼによって加水分解され、よって受容体分子を遊離するように設計することができる。これにより、累積したシグナルが得られ、システム内に存在する遊離プローブ標識の量が各サイクルと共に増加する。この分析においては、シグナルはプローブの加水分解に左右されないためプローブがこのように消費されることは必要でない。

適切には、プローブは、標的配列からそのまま遊離されるので、適切なハイブリダイゼーション条件が増幅反応中に適合する場合に再び結合することができるように設計される。これは、例えば、増幅反応のエクステンション相の間であってもよい。しかしながら、シグナルはプローブ加水分解に左右されないため、プローブは増幅サイクル中の段階で標的配列からハイブリダイズし融解するように設計されてもよい。特に、プローブは、増幅反応による妨害が最も少なくなることが確実になるので、反応のエクステンション温度より低い温度でハイブリダイズするように設計されることが好ましい。

これにより、反応の各段階に存在する増幅産物の量に直接関係がある完全に可逆的なシグナルが得られる。更に、検出されるアンプリコンと共に欠くことのできないプローブがそれに対して急速にハイブリダイズすることができるので、反応速度が、例えば、急速PCRにおいて最も重要である場合に有利である。

10

20

30

40

50

このように作成されたデータは、様々な方法で説明することができる。最も簡単な形においては、増幅反応の過程又は最後の受容体分子の蛍光の増強は、存在する標的配列の量の増加を示し、増幅反応が進行したので、標的配列は実際に試料中に存在したことを示している。しかしながら、上記のように、増幅反応全体にモニタすることにより定量化も可能である。最後に、以下で更に述べる配列についての情報を得るために、終点測定としてか又は全体に、確認データ、特に融点分析を得ることが可能である。

#### 【0014】

従って、本発明の好適実施態様は、核酸増幅を検出する方法であって、(a)核酸ポリメラーゼと、(b)DNA二重らせん結合剤と、(c)一本鎖の形にあるときに標的配列に対してハイブリダイズすることができ且つ化学結合基によって第二標識を有するプローブに5'端で結合している増幅プライマーを含む試薬、の存在下に該標的ポリヌクレオチドに対して核酸増幅を行うステップであって、標識した前記プローブが前記標的配列と同様の配列であり、但し、増幅産物の相補的領域に対してハイブリダイズすることができ、及び、該DNA二重らせん結合剤又は第二標識の一方が、前記供給分子から蛍光エネルギーを吸収することができる受容標識を含む該DNA二重らせん結合剤又は第二標識のもう一方に蛍光エネルギーを供与することができる供与標識を含み、前記プライマーが前記標的ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができるステップ；及び、該増幅反応中に蛍光の変化をモニタするステップ、を含む、前記方法を含む。

適切には、受容標識はそれ自体蛍光であり、固有の波長で蛍光エネルギーを放出する。増幅は、当該技術において十分に理解されるようにDNA鎖内の標的ヌクレオチド配列のみが増幅されるように設計される一対のプライマーを用いて適切に行われる。核酸ポリメラーゼは、Taqポリメラーゼのような耐熱性ポリメラーゼが適切である。

増幅反応を行うことができる適切な条件は、当該技術において周知である。最適条件は、含まれる具体的なアンプリコン、用いられるプライマーの種類、用いられる酵素によってそれぞれの場合に変えることができる。最適条件は、当業者がそれぞれの場合に求めることができる。典型的な変性温度は約95 であり、典型的なアニーリング温度は約55 であり、エクステンション温度は約72 である。

#### 【0015】

本発明の具体的な実施態様においては、標識したプローブは、薬剤発見に用いることができる、RNA転写物を、例えば、発現実験において定量するために用いることができる。特に、この実施態様は、真核生物由来組織での発現実験に適切である。真核細胞においてタンパク質をエンコードするDNAは、イントロンと、DNA配列の非コード領域と、タンパク質配列をエンコードするエキソンとを含むことができる。非コードイントロン配列は、細胞“スプライシング”プロセス中のDNA配列に由来するRNA配列から除去される。PCRプライマーは、通常はコード領域で標的にし、逆転写酵素PCRが全核酸抽出物に用いられる場合、DNA依存性増幅とRNA依存性増幅双方によって産物が得られる。従って、PCRだけが発現実験に用いられる場合、ゲノムDNAと発現RNAによって生じる増幅を含む。

イントロンを横切ってコードエキソンの隣接した末端領域に結合するように設計された標識したプローブは、イントロン領域のために相互作用が制限されている。スプライスRNAはこれらの領域が除去されているので、コードエキソンの隣接した末端領域は1つの連続配列を形成し、プローブ領域の効率のよい結合を可能にする。

逆に、イントロン領域を結合するように設計される場合には、プローブ領域はゲノムDNAの増幅産物だけを検出することができる。そのようなプローブから生成されたシグナルは、DNA濃度にだけ関係し、試料のRNA濃度には関係しない。2種類の試薬を用いることも可能であり、各々が異なるプローブとプライマーをもち、一方がRNAのスプライス領域とともに用いるのに適した試薬であり、一方がDNA中のイントロンに適した試薬である。

従って、他の実施態様においては、プローブ領域はRNAのスプライス領域か又はDNA中のイントロンに特異的であるので、増幅されたRNA又は増幅されたDNAの一方だけが検出及び/又は定量される。

#### 【0016】

10

20

30

40

50

或いは又は更に、本発明の方法は、配列の特性を求めるためのハイブリダイゼーション分析に使用し得る。従って、他の態様においては、本発明は、核酸配列の特性を求める方法であって、(a)DNA二重らせん結合剤と、その標的配列の領域と同様である配列を含むプローブに5'端で化学結合によって結合された増幅プライマーを含み且つ標識を更に含み、前記DNA二重らせん結合剤と該標識の一方が供与標識であり、もう一方が受容標識であり、該供与標識が該受容標識に蛍光エネルギーを供給することができる試薬との存在下に前記配列を増幅し、プローブ領域を組込んでいる増幅産物を形成するステップと、(b)増幅産物をその該プローブ領域が該増幅産物の該相補的領域に対してハイブリダイズする条件に供するステップと、(c)試料の蛍光をモニタするとともに該試料に対する該プローブ領域のハイブリダイゼーション又は該プローブ領域と該標的核酸配列間に形成される該二重らせんの不安定化の結果として蛍光が変化する前記配列の特性の具体的な反応条件を求めるステップとを含む、前記方法を提供する。

10

適切な反応条件としては、温度、電気化学、又は具体的な酵素又は化学剤の存在に対する応答が含まれる。これらの性質が変わるにつれて蛍光の変化をモニタすることにより、配列の正確な種類に特有の情報を得ることができる。例えば、温度の場合には、加熱の結果として試料中の配列からプローブが分離する温度を求めることができる。これは、全般的な診断において多型性及び/又は対立遺伝子変化を、例えば、検出、所望される場合には定量するものに非常に有効であり得る。“多型性”とは、配列に、特に本来起こることができる転位、転換、挿入、欠失又は逆位が含まれる。

融解のヒステリシスは、標的配列が唯一の塩基対によって変化する場合には異なる。従って、例えば、試料が単一の対立遺伝子変異体だけを含む場合、プローブ領域の融解温度は他の唯一の対立遺伝子変異体を含む試料中に見られるものと異なる。双方の対立遺伝子変異体を含む試料は、対立遺伝子変異体のそれぞれに対応する2つの融点を示す。

20

従って、本発明の他の実施態様においては、多型性及び/又は対立遺伝子変異を検出する方法は、前記多型性又は変異を含むことが疑われる配列を本発明の方法を用いて増幅するステップと、該プローブ領域が該増幅産物内のその相補的配列から融解する温度を生成した該蛍光シグナルを用いて測定するステップと、それを多型性又は対立遺伝子変異の存在に関係づけるステップとを含んでいる。

#### 【0017】

同様の問題は、電気化学的性質についても、ある種の酵素又は化学剤の存在するときにも適用される。標識したプローブは、電気化学電位を印加することができる固体表面上に固定化することができる。標的配列の下流は、配列の正確な種類によっては具体的な電気化学値においてプローブに結合するか又はプローブから再瞬間標識される。

30

更に、プローブハイブリダイゼーションの速度論は、標的配列濃度を絶対的な事項で定量することを可能にする。試料からの蛍光の変化は、試料に対するプローブ領域のハイブリダイゼーション率を計算することを可能にすることができる。ハイブリダイゼーション率の増加は、試料中に存在する標的配列の量に関係する。増幅反応が進行するにつれて標的配列の濃度が増大するので、プローブ領域のハイブリダイゼーションは更に急速に起こる。従って、このパラメータは定量化の基準として用いることができる。このデータ処理の方式は、情報を与えるためにシグナルの強さに直接依存しないという点で有効である。

40

本発明の他の実施態様においては、本発明の方法において用いられるキットであって、標的配列に特異的なプローブに化学結合によって5'端に結合される増幅プライマーを含み、該プローブが供与標識と受容標識のどちらか一方として作用することができる第一標識を含む試薬と、第二標識が供与標識と受容標識のどちらか一方として作用することができる第二標識を含んでいるDNA挿入剤とを含み、該第一標識と第二標識が供与体受容体対を形成する、前記キットである。

所望される場合には、プローブはビーズ、例えば、磁気ビーズのような支持体、又は消散波検出装置の導波管のような検出器に用いられる支持体に固定化することができる。キットの他の潜在的成分には、DNAポリメラーゼのような増幅反応に用いられる試薬が含まれる。

50

非蛍光受容体分子の使用は、同時係属特許出願第PCT/GB99/0504号に記載される分析に用いることができる。

ここで、添付の概略図を参照する実施例によって本発明を特に記載する。

#### 【0018】

図1は、本発明の方法で行われる分子相互作用を示す概略図である。示される増幅反応において、DNA分子(1)は増幅プライマー対(2)、(3)と接触させることにより増幅用に調製される。プライマーの1つ(2)は、化学結合(8)によって受容標識(7)を含むプローブ(6)に結合する。蛍光供与部分(10)は、反応混合物中に供給される。

DNA分子(1)を一本鎖にし(図1B)、プライマー(2、3)は周知の増幅反応においてそれぞれ前進プライマーと逆向きプライマーとして結合する。

次の増幅反応の過程で、アンプリコン産物(9)が構築される(図1C)。

この産物が次の増幅相で融解する場合、受容標識(7)を含むプローブ領域(6)はアンプリコン鎖の中の相補的領域を結合する(図1D)。インターカレーター部分(10)はプローブと産物の間に入り込む。蛍光インターカレーター部分(10)と受容標識(7)との間のFRET相互作用は、受容体に特有の波長でシグナルを生成する。

次に、受容体分子(7)からのシグナルを従来の蛍光検出装置を用いてモニタすることができる。

当業者は、第二プライマー(3)の使用が本発明に必須でないことを理解する。更に、当業者は、プローブ上の標識が供与標識であってもよく、インターカレーター部分が受容標識であってもよいことを理解する。

#### 【0019】

##### PCR増幅反応

PCR反応混合物は使用濃度が調製された次の試薬を含有した。

組成は、50 mM Trizma pH 8.8、25 mM、3 mM 塩化マグネシウム、8% w/vグリセロール、250 ng/μl 非アセチル化ウシ血清アルブミン、200 μM dNTPのPCRヌクレオチド、0.01単位/μl ウラシル-n-グルコシラーゼ、0.04単位/μl Taq(エキソ5' -3' 欠失)DNAポリメラーゼ、0.03 μM TaqStart抗Taq抗体とした。

Taq DNAポリメラーゼとTaqStart抗Taq抗体を、混合物に添加する前に10分間共にインキュベートした。

SYBRGoldを反応中の蛍光供与標識として基準溶液 1 : 20,000 ~ 1 : 200,000希釈液の最終濃度まで含めた。

反応の過程で試薬が加水分解しないことを確実にするためにTaq DNAポリメラーゼを用いた。本発明の方法に用いられる保持時間が非常に短いことからこのポリメラーゼの使用は必要ないことがわかった。

#### 【0020】

##### 標的鋳型

数種の標的鋳型と関連がある遺伝子を調べた。これらを次に示す。

標的鋳型	遺伝子
ヒト胎盤DNA	ABIヒト アクチンアンプリコン
ダイズ	Le1レクチン
遺伝的に修飾されたダイズ	CP4 EPSPS
髄膜炎菌	porA
トラコーマ・クラミジア	Ctプラスミド

プローブとプライマーを含む新規な外注オリゴヌクレオチド試薬を各標的遺伝子に対して調製した。各試薬は一般構造: FL PROBE HEG PRIMERをもち、ここで、FLは蛍光部分であり、PROBEはプローブ配列であり、HEGはHEG(ヘキサエチレングリコール)であり、PRIMERは適切な標的配列に対してハイブリダイズするプライマー配列である。試薬はOswel Research Products Ltd.英国から入手できる。本発明の方法に用いるのに適した同じ一般構造を有する試薬は、国際出願第01/11078号の教示に従って調製することができる。

各遺伝子に対応する試薬の構造を次に示す。

10

20

30

40

50

遺伝子試薬構造

アクチン \$atgccctccccatgccatctgcgt\*cagcggaaaccgctcattgccaatgg(配列番号1)

レクチン \$tgccctcttctcgcaccaatgaca\*cttgcattgtgtttgtggctt(配列番号2)

CP4 \$ccttcattgttcggcggctcgcg\*aigcgcgtttaccgct(配列番号3)

PorA \$tcagcggcagcgtccaattcg\*acttgcctgttttgggccc(配列番号4)

PorA \$ccaaacgcacttccgccatcg\*tcagccaagcggccagac(配列番号5)

Ct \$tatgcttacacatttatcgactgggtgattacagc\*ttttcgtctctttttcgcagc(配列番号6)

10

\$ - 5' Cy5 標識

\* - HEG 結合基

【0021】

検出される遺伝子配列の濃度は、所望されるように変えた。試薬の最終濃度は0.2 μMであった。

本発明の方法の性能を、類似のTaqman(登録商標)分析を用いた実験と国際出願第99/28500号の実験を繰り返すことにより従来技術の方法と比較した。

ダーマルサイクラーリアルタイムPCR装置と消耗品をRocheから入手した。装置を従来の方法を用いて調整した。個々の産物とSYBRGoldによる色調整プログラムを行うことは非常に有益であることがわかった。Cy5による色調整プログラムを行うことも有益であることがわかった。

20

熱サイクルプロトコル：

本発明と国際出願第99/28500号の場合：

キャリアオーバーを防止するために50 で1分間保持した。

初期変性のために95 で1分間保持した。

(95 、5秒間；60 、5秒間；74 、5秒間；5秒間エクステンション、蛍光を集める)を50サイクル。

Taqman(登録商標)分析の場合：

キャリアオーバーを防止するために50 で1分間保持した。

30

初期変性のために95 で1分間保持した。

(95 、5秒間；60 、20~120秒間；ステップの終わりに蛍光を集める)を50サイクル。

これにより、本発明の方法が従来技術のTaqman(登録商標)分析を用いるよりかなり速いことがわかる。

サーマルサイクラーPCR装置は3つの検出器を用い、F1、F2、F3と示される。F1は、SYBRGoldとフルオレセインの発光を検出するように最適化された520 nmで作動する。F2はLC640で生成するシグナルを検出するように最適化された640 nmで作動する。F3は、LC705で検出するように最適化された705 nmで作動する。

SYBRGold挿入色素によって生成する非鎖特異的増幅シグナルを検出するためにF1(520 nm/フルオレセイン)光学検波器を用いた。プローブのCy5部分によって生成するシグナルを用いて個々の産物の増幅を検出するためにF3(705 nm/LC705色素)光学検波器を用いた。プローブシステムは、オリゴヌクレオチド合成中に取り込まれた色素の収量を良くするためにLC705の代わりにCy5を用いた。

40

【0022】

実施例1 - アクチン遺伝子の検出と定量化

図2は、本発明の方法を用いて種々の濃度のヒトDNAとしてのアクチン系に対するサイクル数の関数としてF3検出器で測定した蛍光を示すグラフである。各組のデータは、試料中のDNAの濃度によって、ある数のサイクルに対して低レベルのバックグラウンド応答を示している。各組のデータの中で、試料中のヒトDNA濃度によってはあるサイクル数で実測蛍光が劇的に増加している。蛍光は、プライマーの下流で増幅産物に結合する試薬のプ

50

ローブ部分によって生じる。この結合プロセスによって、Cy5部分がSYBRGold化学種に近接する。SYBRGold化学種は、蛍光を受け、放出された光はCy5部分によって吸収される。次にCy5自体が光を出し、F3検出器によって検出される。サイクル数が更に増加するにつれて、蛍光は最大に達し、徐々に低下する。これは、プローブ部分が増幅産物によって置きかえられるためであると思われる(化学を報告している二重ハイブプローブにも見られる“フック効果”としばしば呼ばれる)。

図2Aのデータセットの分析により、図2Bに示される定量化曲線が得られる。曲線の相関係数はほぼ1.0であり、本発明の方法が核酸配列の定量化と同定に優れていることがわかる。

図3は、アクチン遺伝子について国際出願第99/28500号の分析を用いて得られる比較データを示すグラフである。図3Aは、DNAの濃度の関数としてのアクチン系に対するサイクル数の関数として測定蛍光を示す図である。従来技術のシステムから得られたデータは、本発明の方法から得られたものよりノイズが多い。更に、本発明の方法を用いた応答勾配の方が尖っており、本発明の方法を用いたサイクル閾値の方がわずかに低い。

図4は、従来方法に従ってTaqman(登録商標)分析を用いて得られた比較データを示すグラフである。応答曲線は、本発明と比べて相対的に低い。更に、Taqman(登録商標)方法は、本発明に比べて非常にゆっくりである。

#### 【0023】

実施例2 - porA遺伝子の同定と定量化

図5は、本発明の方法を用いて種々の濃度のヒトDNAとしての髄膜炎系に対するサイクル数の関数としてF3検出器で測定した蛍光を示す図である。データは、構造配列番号5の試薬を用いている。各組のデータは、試料中のDNA濃度によるあるサイクル数に対して低レベルのバックグラウンド応答を示している。それぞれの組のデータの中で、試料中のヒトDNAの濃度に依存するあるサイクル数では実測蛍光が劇的に増大している。

図6は、porA遺伝子について国際出願第99/28500号の分析を用いて得られた比較データを示すグラフである。

図7は、従来技術のTaqman(登録商標)方法を用いて得られた比較データを示すグラフである。また、応答曲線は、本発明に比べて相対的に低い。更に、Taqman(登録商標)方法は、本発明に比べて非常にゆっくりである。Taqman(登録商標)応答曲線は、ノイズが多く、そのようなデータから作成された定量化曲線は、本発明の方法より相関係数が低い。

#### 【0024】

実施例3 - Ctプラスミド遺伝子の同定と定量化

図8は、本発明の方法を用いて種々の濃度のヒトDNAとしてのクラミジア系に対するサイクル数の関数としてF3検出器で測定した蛍光を示すグラフである。各組のデータは、試料中のDNAの濃度によってはあるサイクル数に対して低レベルのバックグラウンド応答を示す。それぞれの組のデータの中で、試料中のヒトDNA濃度に依存するあるサイクル数で実測蛍光が劇的に増大する。

図9は、従来技術のTaqman(登録商標)方法を用いて得られた比較データを示すグラフである。また、応答曲線は、本発明に比べて相対的に低い。更に、Taqman(登録商標)方法は、本発明に比べて非常にゆっくりである。

#### 【0025】

実施例4 - CP4 EPSPS遺伝子の同定と定量化

図10は、本発明の方法を用いて種々の濃度の修飾遺伝子としての遺伝的に修飾したダイズ系に対するサイクル数の関数としてF3検出器で測定した蛍光を示す図である。図は、また、種々の濃度の修飾遺伝子に対するサイクル数の関数としてレクト系で生成した蛍光を示すグラフである。それぞれの組のデータの中で、試料中の関連した遺伝子の濃度に依存するあるサイクル数で実測蛍光が劇的に増大する。レクト系は対照として効果的に作用し、予想されるように蛍光とサイクル数応答曲線は、修飾した遺伝子の濃度とほとんど無関係である。修飾した遺伝子系の場合には、修飾した遺伝子の濃度の増大が蛍光が劇的に増強するサイクル数での低下が生じることがわかる。

図11は、従来技術のTaqman(登録商標)方法を用いて得られた比較データを示すグラフである。また、応答曲線は、本発明と比べて相対的に低い。更に、Taqman(登録商標)方法は、本発明に比べて非常にゆっくりである。

ほとんどすべての状況において、従来技術のTaqman(登録商標)方法を用いて得られたデータは、本発明の方法を用いて得られたものよりノイズが多い。更に、応答曲線は本発明より低く、本発明の方法を用いて得られたデータから作成された定量化曲線はTaqman(登録商標)方法から得られたものより相関係数が大きい。

本発明は、また、潜在的に非常に高速である方法を提供する。本発明の方法に示されるデータは、可能な最も速い操作方式での機器化を用いて得られた。相対的に短いプローブの長さが高速応答を生じるのを援助すると思われる。従って、本方法が行われる装置の現在の仕様書によって本方法の速度が制限されることは予想される。

10

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】本発明の方法で行われる分子相互作用を示す概略図である。

【図2】種々の濃度のヒトDNAとしての アクチン系に対するサイクル数の関数としてF3検出器で本発明の方法に従って測定した蛍光を示すグラフである。

【図3】種々の濃度のヒトDNAとしての アクチン系に対するサイクル数の関数として従来技術の比較法に従ってF3検出器で測定した蛍光を示すグラフである。

【図4】種々の濃度のヒトDNAとしての アクチン系に対するサイクル数の関数として従来技術のTaqman(登録商標)法を用いてF1検出器で測定した蛍光を示すグラフである。

20

【図5】種々の濃度の髄膜炎遺伝子としての髄膜炎系に対するサイクル数の関数としてF3検出器で本発明の方法に従って測定した蛍光を示すグラフである。

【図6】種々の濃度の髄膜炎遺伝子としての髄膜炎系に対するサイクル数の関数としてF3検出器で従来技術の比較法に従って測定した蛍光を示す図である。

【図7】種々の濃度の髄膜炎遺伝子としての髄膜炎系に対するサイクル数の関数としてF1検出器で従来技術のTaqman(登録商標)法を用いて測定した蛍光を示す図である。

【図8】種々の濃度のクラミジア遺伝子としてのクラミジア系に対するサイクル数の関数としてF3検出器で本発明の方法に従って測定した蛍光を示す図である。

【図9】種々の濃度のクラミジア遺伝子としてのクラミジア系に対するサイクル数の関数としてF1検出器で従来技術のTaqman(登録商標)法を用いて測定した蛍光を示す図である。

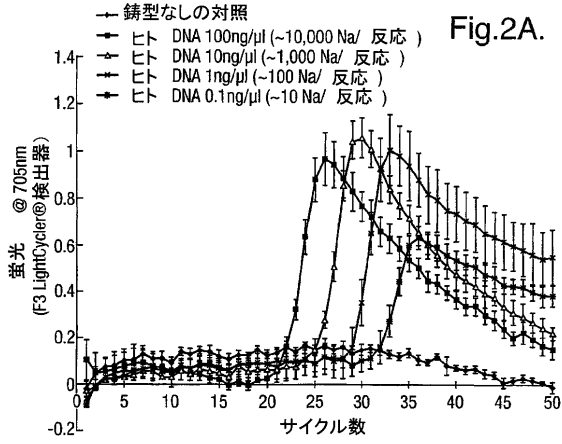
30

【図10】種々の濃度の修飾遺伝子としての遺伝的に修飾したダイズ系のサイクル数の関数としてF3検出器で本発明の方法に従って測定した蛍光を示す図である。

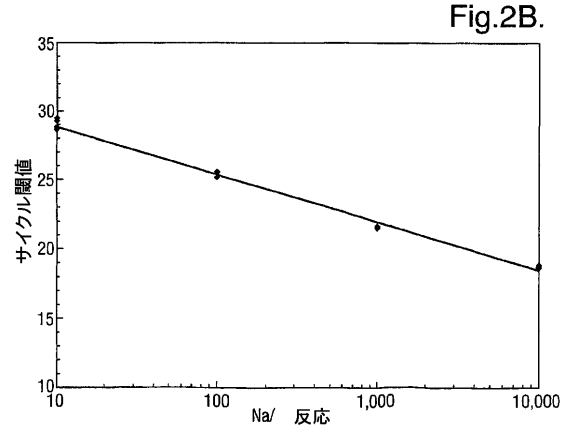
【図11】種々の濃度の修飾遺伝子としてのGMダイズ系に対するサイクル数の関数としてF1検出器で従来技術のTaqman(登録商標)法を用いて測定した蛍光を示す図である。



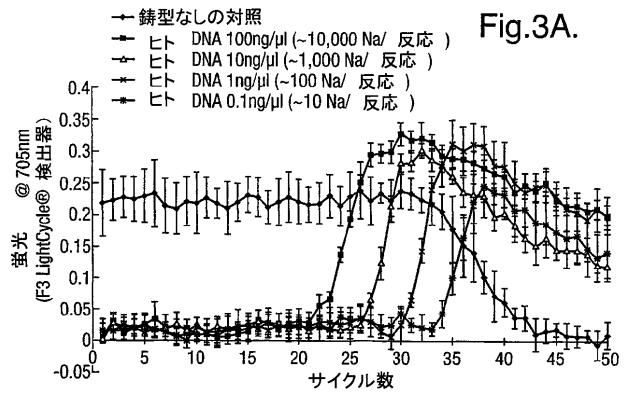
【 図 2 A 】



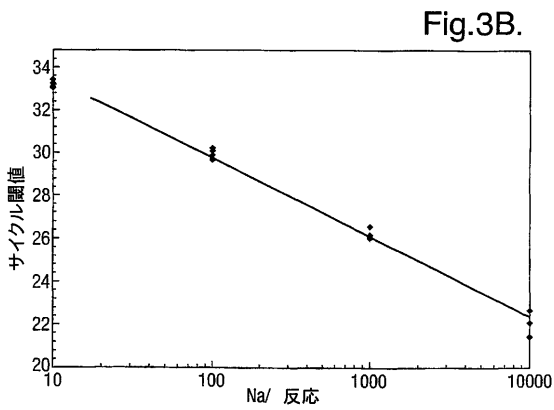
【 図 2 B 】



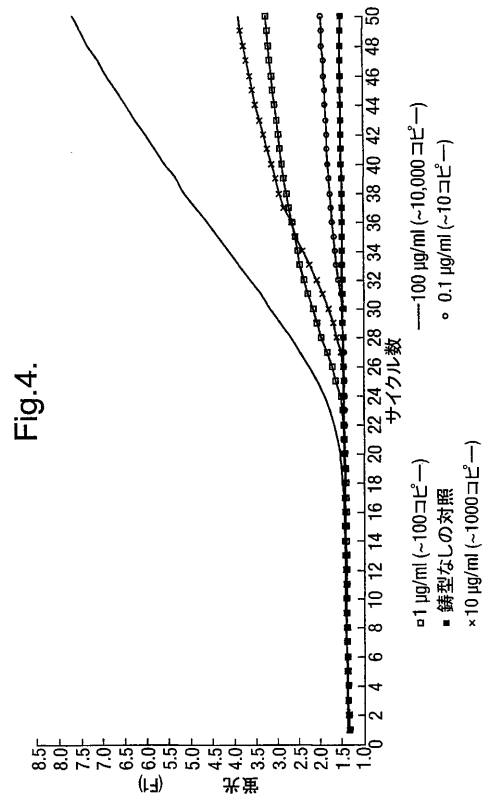
【 図 3 A 】



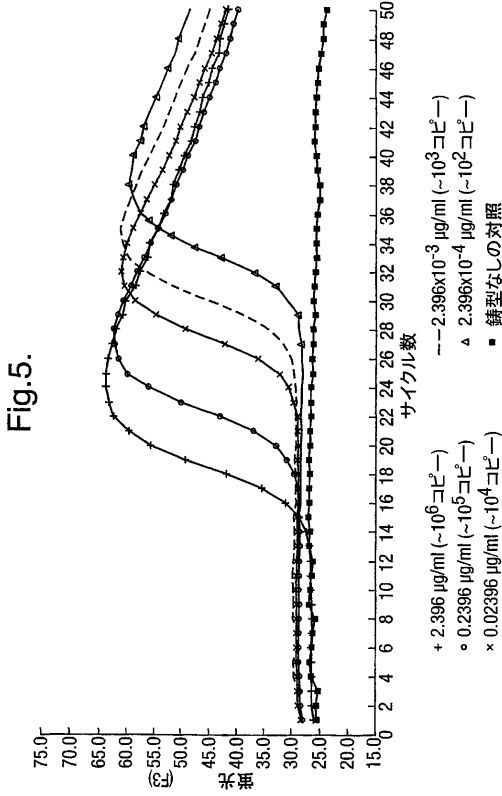
【 図 3 B 】



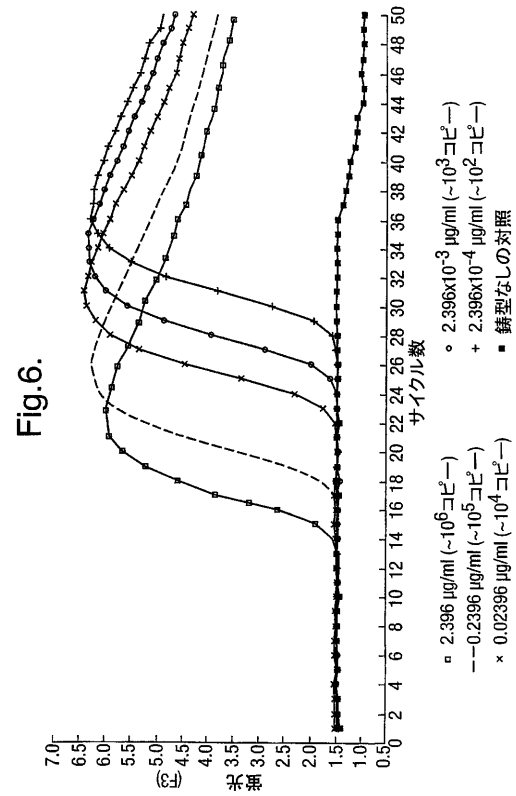
【 図 4 】



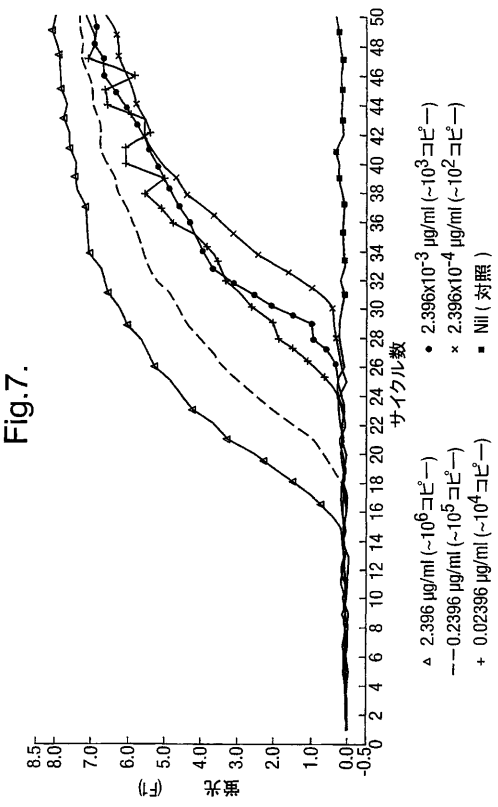
【 図 5 】



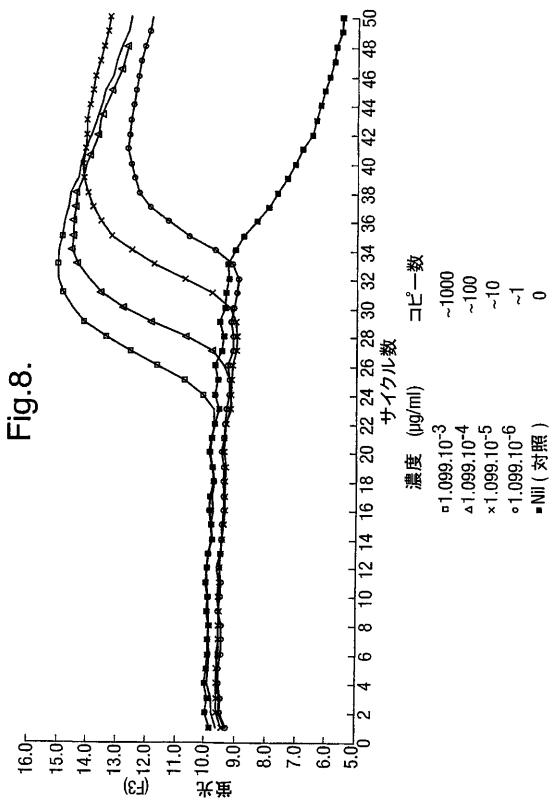
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

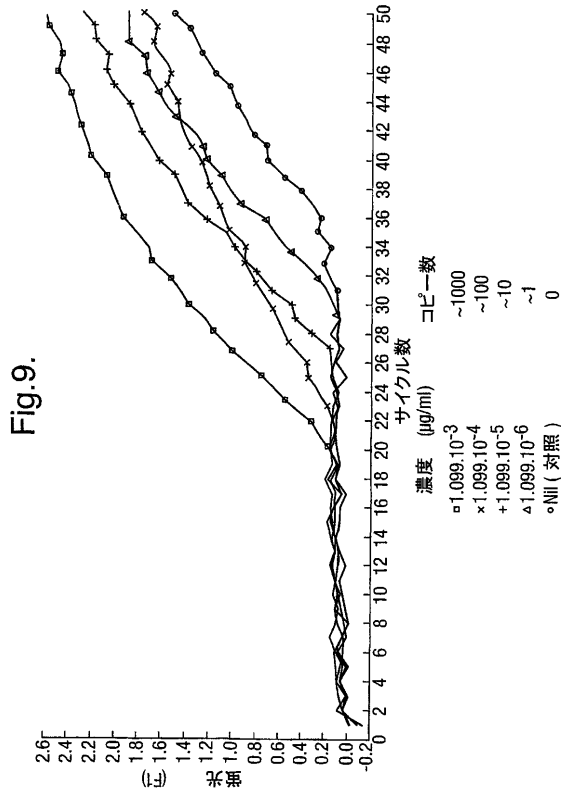


Fig.9.

【 図 10 】

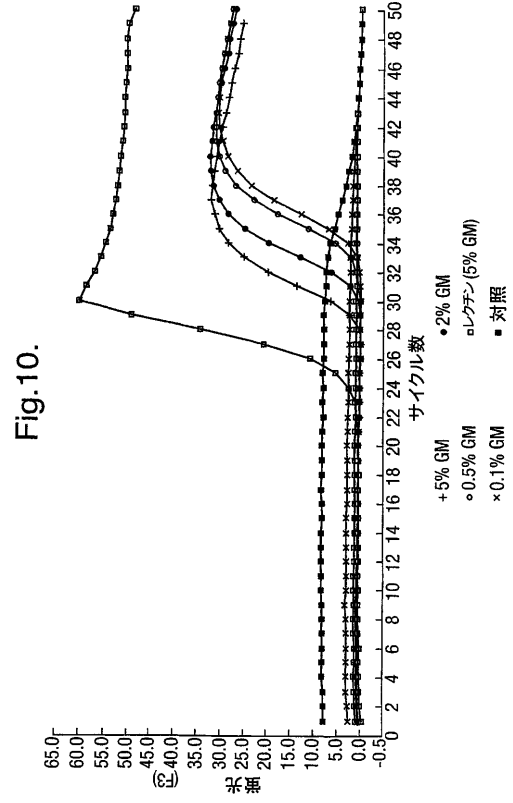


Fig.10.

【 図 11 】

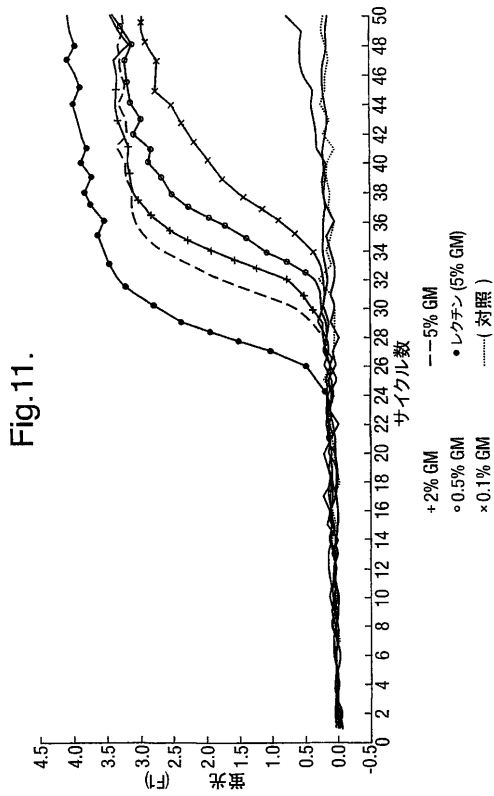


Fig.11.

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
5 December 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/097132 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/GB02/02443
- (22) International Filing Date: 24 May 2002 (24.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0112868.5 25 May 2001 (25.05.2001) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE SECRETARY OF STATE DSTL [GB/GH]; Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JQ (GB).
- (72) Inventor; and  
(75) Inventor/Applicant (for US only): LEE, Martin, Alan [GB/GH]; DSTL, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JQ (GB).
- (74) Agent: SKELTON, Stephen, Richard; D/IPR, Formalities Section, Poplar 2, MOD Abbey Wood #2218, Bristol BS34 8JH (GB).
- (81) Designated States (national): AU, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/097132 A2

(54) Title: DETECTION SYSTEM

(57) Abstract: A method for detecting the presence of a target nucleic acid sequence in a sample, said method comprising: performing nucleic acid amplification on the sample in the presence of (a) a DNA duplex binding agent, (b) a nucleic acid polymerase and (c) a reagent comprising an amplification primer which can hybridise to said target sequence when in single stranded form and which is connected at its 5' end to a probe which carries a label by way of a chemical linking group, said labelled probe being of a sequence which is similar to that of the said target nucleic acid sequence, such that it can hybridise to a complementary region in an amplification product, and wherein the label is able to absorb fluorescence from or donate fluorescent energy to the DNA duplex binding agent; and monitoring fluorescence of said sample.

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

1

## Detection System

The present invention provides a method for detecting a target polynucleotide in a sample, for example by monitoring an amplification reaction, preferably in a quantitative manner, as well as to kits for use in these methods. The method is also suitable for the detection of sequence characteristics such as polymorphisms or allelic variation and so may be used in diagnostic methods.

Known fluorescence polymerase chain reaction (PCR) monitoring techniques include both strand specific and generic DNA intercalator techniques that can be used on a few second-generation PCR thermal cycling devices.

Generic fluorescence PCR methods utilise DNA intercalating dyes that exhibit increased fluorescence when bound to double stranded DNA species. An increase in fluorescence due to a rise in the bulk concentration of DNA during amplifications can be used to measure reaction progress and to determine the initial target molecule copy number. Furthermore, by monitoring fluorescence with a controlled change of temperature, DNA melting curves can be generated, for example, at the end of PCR thermal cycling.

These generic fluorescence PCR methods monitor the rise in bulk concentration of nucleic acids without any time penalty. A single fluorescent reading can be taken at the same point in every reaction. End point melting curve analysis can be used to discriminate artefacts from amplicon, and to discriminate amplicons. Peaks of products can be seen at concentrations that cannot be visualised by agarose gel electrophoresis.

It has been found that DNA melting curve analysis in general is a powerful tool in optimising PCR thermal cycling. By determining the melting temperatures of the amplicons, it is possible to lower the denaturing temperatures in later PCR cycles to this temperature. Optimisation for amplification from first generation reaction products rather than the genomic DNA, reduces artefact formation occurring in later cycles. Melting temperatures of primer oligonucleotides and their complements

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

2

can be used to determine their annealing temperatures, reducing the need for empirical optimisation.

The generic intercalator methods however are only quasi-strand-specific and are therefore not very useful where strand specific detection is required.

Fluorescence PCR strand specific methods utilise additional nucleic acid reaction components to monitor the progress of amplification reactions. These methods may use fluorescence energy transfer (FET) as the basis of detection. One or more nucleic acid probes are labelled with fluorescent molecules, one of which is able to act as an energy donor and the other of which is an energy acceptor molecule. These are sometimes known as a reporter molecule and a quencher molecule respectively. The donor molecule is excited with a specific wavelength of light for which it will normally exhibit a fluorescence emission wavelength. The acceptor molecule is excited at this emission wavelength such that it can accept the emission energy of the donor molecule by a variety of distance-dependent energy transfer mechanisms. A specific example of fluorescence energy transfer which can occur is Fluorescence Resonance Energy Transfer or "FRET". Generally the acceptor molecule accepts the emission energy of the donor molecule when they are in close proximity (e.g. on the same, or a neighbouring molecule). The basis of FET or FRET detection is to monitor the changes at donor emission wavelength. Where the acceptor is also a fluorescent molecule, the acceptor emission wavelengths may also be monitored.

There are two commonly used types of FET or FRET probes, those using hydrolysis of nucleic acid probes to separate donor from acceptor, and those using hybridisation to alter the spatial relationship of donor and acceptor molecules.

Hydrolysis probes are commercially available as TaqMan™ probes. These consist of DNA oligonucleotides which are labelled with donor and acceptor molecules. The probes are designed to bind to a specific region on one strand of a PCR product. Following annealing of the PCR primer to this strand, Taq enzyme extends the DNA with 5' to 3' polymerase activity. Taq enzyme also

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

3

exhibits 5' to 3' exonuclease activity. TaqMan™ probes are protected at the 3' end by phosphorylation to prevent them from priming Taq extension. If the TaqMan™ probe is hybridised to the product strand than an extending Taq molecule may also hydrolyse the probe, liberating the donor from acceptor as the basis of detection. The signal in this instance is cumulative, the concentration of free donor and acceptor molecules increasing with each cycle of the amplification reaction.

10 The fact that signal generation is dependent upon the occurrence of probe hydrolysis reactions means that there is a time penalty associated with this method. Furthermore, the presence of the probe may interrupt the smooth operation of the PCR process.

15 In addition, it has been found that hydrolysis can become non-specific, particularly where large numbers of amplification cycles, for instance more than 50 cycles, are required. In these cases, non-specific hydrolysis of the probe will result in an unduly elevated signal.

20 This means that such techniques are not very compatible with rapid PCR methods which are becoming more prominent with the development of rapid hot air thermal cyclers such as the RapidCycler™ and LightCycler™ from Idaho Technologies Inc.

25 Other rapid PCR devices are described for example in co-pending British Patent No. 2334904. The merits of rapid cycling over conventional thermal cycling have been reported elsewhere. Such techniques are particularly useful for example in detection systems for biological warfare where speed of result is important if loss of life or serious injury is to be avoided.

30 Furthermore, hydrolysis probes do not provide significant information with regard to hysteresis of melting since signal generation is, by and large, dependent upon hydrolysis of the probe rather than the melt temperature of the amplicon or probe.

35 Hybridisation probes are available in a number of guises. Molecular beacons are oligonucleotides that have complementary 5' and 3' sequences such that they form hairpin loops. Terminal fluorescent labels are in close proximity for FRET to occur when

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

4

the hairpin structure is formed. Following hybridisation of molecular beacons to a complementary sequence the fluorescent labels are separated, so FRET does not occur, and this forms the basis of detection.

5

Pairs of labelled oligonucleotides may also be used. These hybridise in close proximity on a PCR product strand bringing donor and acceptor molecules together so that FRET can occur. Enhanced FRET is the basis of detection. Variants of this type include using a labelled amplification primer with a single adjacent probe.

10

The use of two probes, or a molecular beacon type of probe which includes two labelling molecules increases the cost involved in the process. In addition, this method requires the presence of a reasonably long known sequence so that two probes which are long enough to bind specifically in close proximity to each other are known. This can be a problem in some diagnostic applications, where the length of conserved sequences in an organism which can be used to design an effective probe may be relatively short such as the HIV virus.

15

20

Furthermore, the use of pairs of probes involves more complex experimental design. For example, a signal provided by the melt of a probe is a function of the melting off of both probes. The study of small mismatches or where one of the probes is required to bind across a splice region (for example to detect RNA as compared to DNA in a sample where the sequence on either side of an intron can be utilised as the probe site) can yield incorrect results if the other probe melts first.

25

30

Co-pending international application WO99/28500 describes a method for detecting the presence of a particular target nucleic acid sequence, the method comprising a) adding to the sample a probe specific for said sequence, the probe bearing a moiety able to either donate fluorescence to, or absorb fluorescent energy from, a DNA duplex binding agent, b) subjecting the mixture to an amplification reaction, c) hybridising the probe to the target sequence and monitoring the fluorescence from the sample. The reaction can then be monitored by measuring the fluorescence of said sample as this will alter during the course

35

40



WO 02/097132

PCT/GB02/02443

5

of the reaction as more product is formed which hybridises to the probe and gives rise to a FET or FRET interaction between the DNA duplex binding agent and the fluorescent moiety on the probe.

5

Co-pending International Patent application No. PCT/GB99/00504 describes a similar assay for detecting the presence of particular nucleic acid sequences which may be adapted to quantify the amount of the target sequence in the sample. In this assay, an amplification reaction is effected using a set of nucleotides, at least one of which is fluorescently labelled. Thus the amplification product has fluorescent label incorporated in it. The reaction is effected in the presence of a probe which can hybridise to the amplification product and which includes a reactive molecule which is able to absorb fluorescence from or donate fluorescent energy to said fluorescent labelled nucleotide. The reaction can then be monitored by measuring the fluorescence of said sample as this will alter during the course of the reaction as more product is formed which hybridises to the probe and gives rise to a FET or FRET interaction between them.

International Patent Application WO01/11078 describes a further related method for detecting the presence of a target nucleic acid sequence in a sample. In this assay, in a first stage, the target sequence is made single stranded so that the primer region of the reagent can hybridise to it. This can thus initiate extension of the strand to generate a complementary strand which will include labelled nucleotides and will also have a labelled probe region upstream of its 5' end which is complementary to a downstream region of the product. Once the extension phase is complete, the product is separated from its template strand during a melt phase and so becomes single stranded. In this form, the labelled probe region is able to twist over and hybridise to the complementary region of the product strand whereupon the label which is able to donate fluorescent energy (donor) to the other label by means of FET or FRET does so, thus changing the fluorescent signal from the sample. This change in signal can be monitored throughout the reaction in order to monitor the progress of the amplification reaction.

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

6

Assays comprising the use of Scorpion probe systems are disclosed in GB2338301 and Nucleic Acids Research, 2000, vol. 28, no. 19, 3752-3761. The Scorpion probe systems comprise a primer portion attached to a probe portion by a linking moiety. The probe systems comprise both donor and acceptor moieties. In this assay, in a first stage, the target sequence is made single stranded so that the primer portion can hybridise to the target sequence. This can thus initiate extension of the strand to generate a complementary strand which will have the probe portion upstream of its 5' end which is complementary to a downstream region of the product. Once the extension phase is complete, the product is separated from its template strand during a melt phase and so becomes single stranded. In this form, the labelled probe region is able to twist over and hybridise to the complementary region of the product strand. The hybridisation of the probe portion to the complementary region of the product strand alters the spatial relationship between the donor and acceptor moieties and thus the fluorescent signal from the sample is changed.

The applicants have now found an alternative improved assay.

The present invention provides a method for detecting the presence of a target nucleic acid sequence in a sample, said method comprising:

performing nucleic acid amplification on the sample in the presence of (a) a DNA duplex binding agent, (b) a nucleic acid polymerase and (c) a reagent comprising an amplification primer which can hybridise to said target sequence when in single stranded form and which is connected at its 5' end to a probe which carries a label by way of a chemical linking group, said labelled probe being of a sequence which is similar to that of the said target nucleic acid sequence, such that it can hybridise to a complementary region in an amplification product, and wherein the label is able to absorb fluorescence from or donate fluorescent energy to the DNA duplex binding agent; and monitoring fluorescence of said sample.

The present invention is cheaper and simpler than the prior art assay of WO01/11078 and is surprisingly effective. In the

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

7

present invention, the DNA duplex binding agent is added to the reaction mixture in an unbound state, dispensing with the need to attach the agent either to a nucleotide, as in WO01/11078, or to the probe system as in GB2338301.

5

In the assay of the present invention, in a first stage, the target sequence is made single stranded so that the primer region of the reagent can hybridise to it. This can thus initiate extension of the strand to generate a complementary strand. The primer strand will also have a labelled probe region upstream of its 5' end which is complementary to a downstream region of the product. DNA duplex binding material (preferably an intercalating dye) will become entrapped within the duplex so formed. Once the extension phase is complete, the product is separated from its template strand during a melt phase and so becomes single stranded. In this form, the labelled probe region is able to twist over and hybridise to the complementary region of the product strand, thus entrapping DNA duplex binding agent between probe region and complementary region of the product strand. Due to the mutual proximity of the DNA duplex binding agent and the probe label, the fluorescent moiety which is able to donate fluorescent energy (donor) to the acceptor moiety by means of FET or FRET does so, thus changing the fluorescent signal from the sample. This change in signal can be monitored throughout the reaction in order to monitor the progress of the amplification reaction.

In the second and subsequent stages of the amplification, the product strand may itself act as a template strand for extension. However, the chemical link between probe and primer will halt the extension reaction before a sequence complementary to said probe is produced. Thus the probe region remains single stranded.

It is preferred that the method of the present invention comprises:

- (a) adding to a sample suspected of containing the target nucleic acid sequence, the DNA duplex binding agent, the nucleic acid polymerase and the reagent;
- (b) subjecting said sample to conditions under which the primer

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

8

hybridises to the target nucleic acid sequence and an amplification product comprising the probe is formed;  
(c) subjecting said sample to conditions under which the labelled probe hybridises to a complementary region in the amplification product; and  
5 (d) monitoring fluorescence of said sample during at least one of steps (b) and (c).

If required, a corresponding amplification primer which is not attached to a labelled probe region may also be present during the amplification reaction. This primer would result in the production of a conventional unlabelled amplification product which may serve to mediate the signal into the dynamic range of the detector device being used. It may also improve reaction efficiency which may be adversely affected by the presence of a  
15 complex probe/primer structure.

When the acceptor label which is able to absorb fluorescence from the donor label performs this function, fluorescence from the donor is reduced. This reduction may be detected and this  
20 indicates binding of the probe region.

Most preferably, the label which is able to absorb fluorescence (acceptor) is itself a fluorescent molecule which emits  
25 fluorescence at a characteristic wavelength. Such probes include a rhodamine dye or Cy5. In this case, increase in fluorescence from the acceptor molecule, which is of a different wavelength to that of the donor label, will also indicate binding of the probe. Alternatively, the acceptor does not fluoresce (dark  
30 acceptor). Such acceptors include DABCYL, methyl red, QSY-7 diarylrhodamine dyes and 6-(dimethylamino)-2-[4-(4-(dimethylamino)phenyl)-1,3-butadienyl]-1-ethyl quinolinium perchlorate (CAS number 181885-68-7).

Suitably, the DNA duplex binding agent comprises a donor label and the acceptor label is provided on the probe. In this case, and if the acceptor fluoresces, then the presence of the thus labelled amplification product can be detected by monitoring  
35 fluorescence from the acceptor molecule on the probe, which predominantly binds to a downstream region of the same product strand. In this case, signal from the amplification product can  
40

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

9

be distinguished from background signal of the fluorescent label and also from any non-specific amplification product. Alternatively, the DNA duplex binding agent may comprise an acceptor label and the probe comprises the donor label.

5

In the system of the present invention there is discrimination between the rise in the generic intercalator signal (as the DNA is amplified) and the sequence specific signal which is only generated when the two fluorescent moieties are in close proximity (i.e. when probe hybridises to amplification product). The fact that the sequence specific signal is produced only by labelled amplification product means that the system is highly specific in terms of detecting specific target sequences in reaction mixtures that contain large amounts of background DNA. This is because non-specific amplification product will not hybridise to the probe region and so does not contribute to the measured signal. The measurement of the generic intercalator signal in addition to the sequence specific signal may be beneficial. The generic intercalator signal is proportional to the degree of amplification in the reaction mixture and thus may be used to indicate the efficiency or blockage of amplification.

An assay of this nature can be carried out using inexpensive reagents. Single labelled probes are more economical than those which include both acceptor and donor molecules.

Amplification is suitably effected using known amplification reactions such as the polymerase chain reaction (PCR) or the ligase chain reaction (LCR), strand displacement assay (SDA) or NASBA, but preferably PCR.

Preferably, the fluorescence of both the donor and the acceptor moieties are monitored and the relationship between the emissions calculated.

35

The position of the label along the probe is immaterial although in general, they will be positioned at an end region of the probe. More than one label may be used in the reagent, but one is preferred since it is cheaper.

40

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

10

In order for FET, such as FRET, to the fluorescent emission of the donor moiety must be of a shorter wavelength than the acceptor moiety.

5 Suitable combinations are therefore set out in the following Table:

Donor	Acceptor
SYBRGold	Rhodamine
SYBRGreen I	Rhodamine
Fluorescein	Rhodamine
SYBRGold	Cy5
SYBRGreen I	Cy5
Fluorescein	Cy5
Fluorescein	Ethidium bromide
Fluorescein	Dabcyl
Fluorescein	Methyl Red
Fluorescein	QSY-7 Diaryl rhodamine dyes*
SYBRGold	Cy5.5

\* Available from Molecular Probes, UK.

10 Those skilled in the art will realise that many other such combinations are possible.

Preferably, the molecules used as donor and/or acceptor produce sharp emission peaks, and there is little or no overlap in the  
 15 wavelengths of the emission. Under these circumstances, it may not be necessary to resolve the "strand specific peak" from the signal produced by amplification product. A simple measurement of the strand specific signal alone (i.e. that provided by the acceptor moiety) will provide information regarding the extent  
 20 of the FET or FRET caused by the target reaction.

However, where there is a spectral overlap in the fluorescent signals from the donor and acceptor moieties, this can be accounted for in the results, for example by determining  
 25 empirically the relationship between the spectra and using this relationship to normalise the signals from the two signals.

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

11

The chemical link separating the labelled probe from the primer is suitably any molecule that can link nucleotide sequences but which is not recognised by a DNA polymerase. A wide range of chemical linkers which would fulfil this requirement are available.

Examples of the types of chemical and reactions which may be used in the formation of linkers are described for example in WO 95/08642. In particular, the chemical linker comprises a group of atoms joining the two polynucleotide sequences, primer and probe, together. The linker can be joined to the respective polynucleotide sequences by any of the conventional methods.

Generally speaking, the linker will be derived from an organic chemical having a first and a second functional group by means of which it can be attached to the probe and the primer sequences respectively or to individual nucleotides from which the probe or primer sequence is then generated subsequently. The linker is generally designed not to bind to nucleotides.

The synthesis of linkers is discussed in detail in, for example, S. Agrawal et al, Nucleic Acids Research, 1986, 14, 6227 and WO-88/02004 (Applied Biosystems); J. L. Ruth and D. E. Bergstrom, J. Org. Chem., 1978, 43, 2870; D. E. Bergstrom and M. K. Ogawa, J. Amer. Chem. Soc., 1978, 10, 8106; and C. F. Bigge, P. Kalaritis, J. R. Deck and M. P. Mertes, J. Amer. Chem. Soc., 1980, 102, 2033; and European Patent Application No. 063,879. The reader is also directed to International Patent Application WO01/11078 for a more detailed discussion of the structure and synthesis of reagents having chemical linking groups that join a probe and primer.

In particular, the linkers will comprise a multiple form of ethylene glycol, for example hexaethylene glycol (HEG). Such linkers may be of structure  $-(\text{CHOH}-\text{CHOH})_n-$  where  $n$  is an integer in excess of 1, for example from 1-10 and suitably 6.

Such reagents comprising linker groups that link a probe and primer can be obtained from Oswel Research Products Ltd, UK.

40

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

12

The method of the present invention is extremely versatile in its applications. The method can be used to generate both\* quantitative and qualitative data regarding the target nucleic acid sequence in the sample, as discussed in more detail hereinafter. In particular, not only does the invention provide for quantitative amplification, but also it can be used, additionally or alternatively, to obtain characterising data such as duplex destabilisation temperatures or melting points.

10 In the method of the invention, the labelled probe is integral with an amplification primer and so is present throughout the course of the amplification reaction. The process allows the detection to be effected in a homogenous manner, in that the amplification and monitoring can be carried out in a single  
15 container with all reagents added initially. No subsequent reagent addition steps are required. It may be possible to use the method of the present invention in some heterogeneous systems. Note that there is no need to effect the method in the presence of solid supports (although this is an option as  
20 discussed further hereinafter).

Since the probe is present throughout the amplification reaction, the fluorescent signal may allow the progress of the amplification reaction to be monitored. This may provide a  
25 means for quantitating the amount of target sequence present in the sample.

If a fluorescent acceptor moiety is used, then during each cycle of the amplification reaction, amplicon strands containing the  
30 target sequence and a probe region generate an acceptor signal. As the amount of such amplicons in the sample increases, so the acceptor signal will increase. By plotting the rate of increase over cycles, the start point of the increase can be determined.

35 The labelled probe may comprise a nucleic acid molecule such as DNA or RNA, which will hybridise to the target nucleic acid sequence when the latter is in single stranded form. In this instance, conditions will be used which render the target nucleic acid single stranded. Alternatively, the probe may  
40 comprise a molecule such as a peptide nucleic acid or another



WO 02/097132

PCT/GB02/02443

13

nucleic acid analogue which also binds the target sequence in double stranded form.

In particular, the amplification reaction used will involve a  
5 step of subjecting the sample to conditions under which any of  
the target nucleic acid sequence present in the sample becomes  
single stranded, such as PCR or LCR. It is possible then for  
the probe region to hybridise to the downstream region of the  
10 amplicon strand containing it during the course of the  
amplification reaction provided appropriate hybridisation  
conditions are encountered.

In a preferred embodiment, the probe may be designed such that  
these conditions are met during each cycle of the amplification  
15 reaction. Thus at some point during each cycle of the  
amplification reaction, the probe will hybridise to the target  
sequence, and generate a signal as a result of the FET or FRET.  
As the amplification proceeds, the probe region will be  
separated or melted from the downstream sequence and so the  
20 signal generated by the acceptor label will either reduce or  
increase depending upon whether it comprises the donor or  
acceptor molecule. For instance, where it is an acceptor, in  
each cycle of the amplification, a fluorescence peak from the  
acceptor label is generated. The intensity of the peak will  
25 increase as the amplification proceeds because more amplicon  
strands including probes becomes available.

By monitoring the fluorescence of the acceptor label from the  
sample during each cycle, the progress of the amplification  
30 reaction can be monitored in various ways. For example, the  
data provided by melting peaks can be analysed, for example by  
calculating the area under the melting peaks and this data  
plotted against the number of cycles.

35 Fluorescence is suitably monitored using a known fluorimeter.  
The signals from these, for instance in the form of photo-  
multiplier voltages, are sent to a data processor board and  
converted into a spectrum associated with each sample tube.  
Multiple tubes, for example 96 tubes, can be assessed at the  
40 same time. Data may be collected in this way at frequent  
intervals, for example once every 10ms, throughout the reaction.

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

14

The spectra generated in this way can be resolved, for example, using "fits" of pre-selected fluorescent moieties such as dyes, to form peaks representative of each signalling moiety (i.e. DNA duplex binding agent and/or probe label). The areas under the peaks can be determined which represents the intensity value for each signal, and if required, expressed as quotients of each other. The differential of signal intensities and/or ratios will allow changes in FET or FRET to be recorded through the reaction or at different reaction conditions, such as temperatures. The changes, as outlined above, are related to the binding phenomenon between the probe and the target sequence. The integral of the area under the differential peaks will allow intensity values for the FET or FRET effects to be calculated.

These data provide one means to quantitate the amount of target nucleic acid present in the sample.

The primer/labelled probe reagent may either be free in solution or immobilised on a solid support, for example on the surface of a bead such as a magnetic bead, useful in separating products, or the surface of a detector device, such as the waveguide of a surface plasmon resonance detector and, for example, a DNA array. The selection will depend upon the nature of the particular assay being examined and the particular detection means being employed.

The probe may be designed such that it is hydrolysed by the DNA polymerase used in the amplification reaction thereby releasing the acceptor molecule. This provides a cumulative signal, with the amount of free probe label present in the system increasing with each cycle. However, it is not necessary in this assay for the probe to be consumed in this way as the signal does not depend upon the hydrolysis of the probe.

Suitably, the probe is designed such that it is released intact from the target sequence and so is able to bind again when suitable hybridisation conditions are met during the amplification reaction. This may be, for example, during the extension phase of the amplification reaction. However, since

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

15

the signal is not dependent upon probe hydrolysis, the probe may be designed to hybridise and melt from the target sequence at any stage during the amplification cycle. In particular, the probe may preferably be designed to hybridise at temperatures  
5 below the extension temperature of the reaction as this will ensure that interference with the amplification reaction is minimised.

This provides a fully reversible signal which is directly  
10 related to the amount of amplification product present at each stage of the reaction. Furthermore, it is advantageous where speed of reaction is of the greatest importance, for example in rapid PCR, since a probe which is integral with the amplicon strand being detected will be able to hybridise rapidly to it.

15 The data generated in this way can be interpreted in various ways. In its simplest form, an increase in fluorescence of the acceptor molecule in the course of or at the end of the amplification reaction is indicative of an increase in the  
20 amount of the target sequence present, suggestive of the fact that the amplification reaction has proceeded and therefore the target sequence was in fact present in the sample. However, as outlined above, quantification is also possible by monitoring the amplification reaction throughout. Finally, it is possible  
25 to obtain characterisation data and in particular melting point analysis, either as an end point measure or throughout, in order to obtain information about the sequence as will be discussed further below.

30 Thus, a preferred embodiment of the invention comprises a method for detecting nucleic acid amplification comprising: performing nucleic acid amplification on a target polynucleotide in the presence of (a) a nucleic acid polymerase, (b) a DNA duplex  
35 binding agent and (c) a reagent comprising an amplification primer which can hybridise to said target sequence when in single stranded form and which is connected at its 5' end to a probe which carries a second label, by way of a chemical linking group, said labelled probe being of a sequence which is similar  
40 to that of the said target sequence, such that it can hybridise to a complementary region in an amplification product, and wherein one of the DNA duplex binding agent or second label

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

16

comprises a donor label which is able to donate fluorescent energy to the other of the DNA duplex binding agent or second label which comprises an acceptor label able to absorb fluorescent energy from said donor molecule, said primer being  
5 capable of hybridising to said target polynucleotide; and monitoring changes in fluorescence during the amplification reaction.

Suitably, the acceptor label is itself fluorescent and emits  
10 fluorescent energy at a characteristic wavelength. The amplification is suitably carried out using a pair of primers which are designed such that only the target nucleotide sequence within a DNA strand is amplified as is well understood in the art. The nucleic acid polymerase is suitably a  
15 thermostable polymerase such as *Taq* polymerase.

Suitable conditions under which the amplification reaction can be carried out are well known in the art. The optimum conditions may be variable in each case depending upon the  
20 particular amplicon involved, the nature of the primers used and the enzymes employed. The optimum conditions may be determined in each case by the skilled person. Typical denaturation temperatures are of the order of 95°C, typical annealing temperatures are of the order of 55°C and extension temperatures  
25 are of the order of 72°C.

In a particular embodiment of the invention the labelled probe may be used to quantitate RNA transcripts, for example in expression experiments, that may be used in drug discovery. In  
30 particular this embodiment is suitable for expression studies in tissues from eukaryotic organisms. DNA encoding proteins in eukaryotic cells may contain introns, non-coding regions of DNA sequence, and exons that encode for protein sequence. Non-coding intron sequences are removed from RNA sequences that are derived  
35 from the DNA sequences during cellular "splicing" processes. PCR primers are normally targeted at coding regions and when reverse transcriptase PCR is used on total nucleic acid extracts, products will result from both DNA dependent amplification and RNA dependent amplification. Thus PCR alone,

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

17

when used for expression studies, will contain amplification resulting from genomic DNA and expressed RNA.

5 A labelled probe that is designed to bind across introns, on adjacent terminal regions of coding exons, will have limited interaction because of the intron region. Spliced RNA has these regions removed and therefore the adjacent terminal regions of coding exons form one continuous sequence allowing efficient binding of the probe region.

10

Conversely, the probe region may detect only an amplification product of genomic DNA if it is designed such that it binds an intron region. Signal generated from such a probe would relate only to the DNA concentration and not the RNA concentration of the sample. It is also possible to use two reagents, each having different probes and primers, one reagent suitable for use with the splice region of the RNA and one reagent suitable for the intron in the DNA.

20

Thus in a further embodiment, the probe region is specific either for a splice region of RNA or an intron in DNA, so that only one of amplified RNA or amplified DNA is detected and/or quantitated.

25

Alternatively or additionally, the method of the invention can be used in hybridisation assays for determining characteristics of a sequence. Thus in a further aspect, the invention provides a method for determining a characteristic of a nucleic acid sequence, said method comprising (a) amplifying said sequence in the presence of a DNA duplex binding agent and a reagent comprising an amplification primer linked by way of a chemical link at its 5' end to a probe which comprises a sequence which is similar to that of a region of the target sequence and which further comprises a label, where one of said DNA duplex binding agent and the label is a donor label and the other is an acceptor label, the donor label being able to donate fluorescent energy to the acceptor label; so as to form an amplification product incorporating a probe region, (b) subjecting amplification product to conditions under which the probe region thereof will hybridise to the complementary region of the amplification product, and (c) monitoring fluorescence of said

40

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

18

sample and determining a particular reaction condition, characteristic of said sequence, at which fluorescence changes as a result of the hybridisation of the probe region to the sample or destabilisation of the duplex formed between the probe  
5 region and the target nucleic acid sequence.

Suitable reaction conditions include temperature, electrochemical, or the response to the presence of particular enzymes or chemicals. By monitoring changes in fluorescence as  
10 these properties are varied, information characteristic of the precise nature of the sequence can be achieved. For example, in the case of temperature, the temperature at which the probe separates from the sequences in the sample as a result of heating can be determined. This can be extremely useful in for  
15 example, to detect and if desired also to quantitate, polymorphisms and/or allelic variation in genetic diagnosis. By "polymorphism" is included transitions, transversions, insertions, deletions of inversions which may occur in sequences, particularly in nature.

20 The hysteresis of melting will be different if the target sequence varies by only one base pair. Thus for example, where a sample contains only a single allelic variant, the temperature of melting of the probe region will be a particular value which  
25 will be different from that found in a sample which contains only another allelic variant. A sample containing both allelic variants which show two melting points corresponding to each of the allelic variants.

30 Thus, in a further embodiment of the present invention a method for detecting a polymorphism and/or allelic variation, said method comprising amplifying a sequence suspected of containing said polymorphism or variation using a method of the present  
35 invention, measuring the temperature at which the probe region melts from its complementary sequence within the amplification product using the fluorescent signal generated, and relating this to the presence of a polymorphism or allelic variation.

40 Similar considerations apply with respect to electrochemical properties, or in the presence of certain enzymes or chemicals. The labelled probe may be immobilised on a solid surface across

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

19

which an electrochemical potential may be applied. Downstream target sequence will bind to or be repulsed from the probe at particular electrochemical values depending upon the precise nature of the sequence.

5

In addition, the kinetics of probe hybridisation will allow the determination, in absolute terms, of the target sequence concentration. Changes in fluorescence from the sample can allow the rate of hybridisation of the probe region to the sample to be calculated. An increase in the rate of hybridisation will relate to the amount of target sequence present in the sample. As the concentration of the target sequence increases as the amplification reaction proceeds, hybridisation of the probe region will occur more rapidly. Thus this parameter may also be used as a basis for quantification. This mode of data processing useful in that it is not reliant directly on signal intensity to provide the information.

In a further embodiment of the invention, a kit for use in the method of the present invention which kit comprises a reagent comprising an amplification primer linked at its 5' end by way of a chemical link, to a probe specific for a target nucleotide sequence, wherein the probe comprises a first label which may act as one of either a donor and acceptor label; and a DNA intercalating agent comprising a second label, which second label may act as one of either a donor and acceptor label, wherein the first and second labels form a donor-acceptor pair.

If desired, the probe can be immobilised on a support such as a bead, for example a magnetic bead, or a support used in a detector, such as the waveguide of an evanescent wave detector device. Other potential components of the kit include reagents used in amplification reactions such as a DNA polymerase.

The use of a non-fluorescent acceptor molecule may also be used in the assay described in co-pending International Patent Application No PCT/GB99/0504.

The present invention will now be particularly described by way of example with reference to the accompanying diagrammatic drawings in which:

40

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

20

Figure 1 shows diagrammatically the molecular interactions which take place in the method of the invention.

5 Figure 2 shows fluorescence as measured in accordance with a method of the present invention by the F3 detector as a function of cycle number for the beta-actin system for various concentrations of human DNA

10 Figure 3 shows fluorescence as measured by the F3 detector in accordance with a comparative prior art method as a function of cycle number for the beta-actin system for various concentrations of human DNA

15 Figure 4 shows fluorescence as measured by the F1 detector using a Taqman™ method of the prior art as a function of cycle number for the beta-actin system for various concentrations of human DNA

20 Figure 5 shows fluorescence as measured in accordance with a method of the present invention by the F3 detector as a function of cycle number for a meningitis system for various concentrations of meningitis gene

25 Figure 6 shows fluorescence as measured by the F3 detector in accordance with a comparative prior art method as a function of cycle number for the meningitis system for various concentrations of meningitis gene

30 Figure 7 shows fluorescence as measured by the F1 detector using a Taqman™ method of the prior art as a function of cycle number for the meningitis system for various concentrations of meningitis gene

35 Figure 8 shows fluorescence as measured in accordance with a method of the present invention by the F3 detector as a function of cycle number for a chlamydia system for various concentrations of chlamydia gene

40 Figure 9 shows fluorescence as measured by the F1 detector using a Taqman™ method of the prior art as a function of cycle number for the chlamydia system for various concentrations of chlamydia gene

45 Figure 10 shows fluorescence as measured in accordance with a method of the present invention by the F3 detector as a function of cycle number for a genetically modified soybean system for various concentrations of modified gene; and

50 Figure 11 shows fluorescence as measured by the F1 detector using a Taqman™ method of the prior art as a function of cycle



WO 02/097132

PCT/GB02/02443

21

number for the GM soybean system for various concentrations of modified gene.

Figure 1 shows diagrammatically the molecular interactions which take place in the method of the invention. In the illustrated amplification reaction, a DNA molecule (1) prepared for primers (2), (3). One of the primers (2) is linked to a probe (6) which includes an acceptor label (7) by way of a chemical link (8). A fluorescent donor moiety (10) is provided in the reaction mixture.

The DNA molecule (1) is rendered single stranded (Figure 1B) whereupon the primers (2,3) bind as forward and reverse primers respectively in an amplification reaction as is well known.

During the course of the subsequent amplification reaction, an amplicon product (9) is built up (Figure 1C).

When this product is melted during the subsequent phase of the amplification, the probe region (6) comprising an acceptor label (7) binds the complementary region within the amplicon strand (Figure 1D). Intercalator moieties (10) are entrapped between the probe and the product. The FRET interaction between the fluorescent intercalator moieties (10) and the acceptor label (7) generates a signal at the wavelength characteristic of the acceptor.

The signal from the acceptor molecule (7) can then be monitored using conventional fluorescence detection devices.

The person skilled in the art will realise that the use of the second primer (3) is not essential to the present invention. Furthermore, those skilled in the art will realise that the label on the probe may be a donor label and the intercalator moiety may be an acceptor label.

#### PCR Amplification Reaction

PCR reaction mixtures contained the following reagents with working concentrations being prepared.

The composition was:

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

22

50mM Trizma pH 8.8 at 25°C, 3mM Magnesium Chloride, 8% w/Vol.  
 Glycerol, 250ng/μl non-acetylated bovine serum albumin, 200μM  
 dNTP's PCR nucleotides, 0.01units/μl uracil-n-glycosylase,  
 0.04units/μl Taq (exo 5'-3' deficient) DNA polymerase and 0.03μM  
 5 TaqStart anti-Taq antibody.

The Taq DNA polymerase and the TaqStart anti-Taq antibody were  
 incubated together for 10 minutes before addition to the  
 mixture.

10

SYBRGold was included as the fluorescent donor label in the  
 reactions to a final concentration of 1:20,000 to 1:200,000  
 dilution of the reference solution.

15

The Taq DNA polymerase was used to ensure that the reagent was  
 not hydrolysed during the course of the reaction. The use of  
 this polymerase was not found to be necessary because of the  
 very short hold times used in the method of the present  
 invention.

20

#### Target template

Several target templates and associated genes were investigated.  
 These are listed below.

25

Target template	Gene
Human placental DNA	ABI human beta-actin amplicon
Soybean	Iel lectin
Genetically modified soybean	CP4 EPSPS
Neisseria meningitidis	porA
30 Chlamydia trachomatis	Ct plasmid

35

Custom novel oligonucleotide reagents comprising probes and  
 primers were made for each target gene. Each reagent has the  
 generic structure: FL - PROBE - HEG - PRIMER, where FL is the  
 fluorescent moiety, PROBE is the probe sequence, HEG is HEG  
 (hexaethylene glycol) and PRIMER is the primer sequence which  
 hybridises to the appropriate target sequence. The reagents are  
 available from Oswel Research Products Ltd., UK. Reagents with  
 the same generic structure suitable for use in the method of the

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

23

present invention may be made in accordance with the teaching of WO01/11078.

The structure of the reagent corresponding to each gene is listed below:

**Gene Reagent structure**

Actin #atgccctccccatgccatcctgcgt\*cagcggaaaccgctcattgccaatgg (Seq.No.1)  
 Lectin #tgccttctttctcgcaccaattgaca\*octgcabtggtttgtgctt (Seq.No.2)  
 CP4 #ccttcattctcggcggtctcgc\*atgcgcgtttccacgct (Seq.No.3)  
 PorA #tcagcggcagcgtccaattcg\*acttgctgttttgggcoq (Seq.No.4)  
 PorA #ccaasgcacttccgcctcgc\*tcagccaagcgcagac (Seq.No.5)  
 Ct #tatgcttacacattatcgactgggtgattacagc\*tttctctctttttctgcagc (Seq.No.6)

§ - 5' Cy5 label  
 \* - HEG linking group

The concentration of the gene sequence to be detected was varied as desired. The final concentration of the reagent was 0.2µM.

The performance of the method of the present invention was compared to methods of the prior art by repeating the experiments using analogous Taqman™ assays and those of WO99/28500.

The ThermalCycler real-time PCR instrument and consumables were obtained from Roche. The instrument was calibrated using conventional techniques. It was found to be extremely beneficial to run the colour calibration program with specific product and SYBRGold. It was also found to be beneficial to run the colour calibration program with Cy5.

The thermal cycling protocols were:

For the method of the present invention and that of WO99/28500:  
 50°C hold for 1 minute for carry-over prevention  
 95°C hold for 1 minute for initial denaturation  
 50 cycles of (95°C, 5 seconds; 60°C 5 seconds; 74°C 5 seconds, 5 seconds extension, collect fluorescence)

For the Taqman™ assays:

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

24

50°C hold for 1 minute for carry-over prevention  
95°C hold for 1 minute for initial denaturation  
50 cycles of (95°C, 5 secs.; 60°C 20-120 secs.; collect  
fluorescence at end of step)

5

This shows that the method of the present invention is considerably faster than that using the prior art Taqman<sup>™</sup> assays.

10 The ThermalCycler PCR instrument uses three detectors, denoted F1, F2 and F3. F1 operates at 520nm, optimised to detect the emissions of SYBRGold and Fluorescein. F2 operates at 640nm optimised to detect the signal generated by LC640. F3 operates at 705nm, optimised to work with LC705.

15

The F1 (520nm/Fluorescein) optical detector was used for detecting the non-strand specific amplification signal generated by the SYBRGold intercalating dye. The F3 (705nm/LC705 dye) optical detector was used for detecting the amplification of specific product using the signal generated by the Cy5 moiety of the probe. The probe system used Cy5 instead of LC705 because of the better yield of incorporated dye during oligonucleotide synthesis.

20

25 **Example 1 - detection and quantification of beta-actin gene**

Figure 2 shows fluorescence as measured by the F3 detector as a function of cycle number for the beta-actin system for various concentrations of human DNA using the method of the present invention. Each set of data shows a low-level background response for a given number of cycles, dependent on the concentration of DNA within the sample. Within each set of data, the observed fluorescence increases dramatically at a certain cycle number dependent on the concentration of human DNA in the sample. The fluorescence is generated by the probe section of the reagent binding to the amplification product downstream of the primer. This binding process brings the Cy5 moiety into proximity of the SYBRGold species. The SYBRGold species undergoes fluorescence, with the emitted light being adsorbed by the Cy5 moiety. The Cy5 itself then emits light which is

40

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

25

detected by the F3 detector. As the cycle number further increases, the fluorescence reaches a maximum and then decreases slowly. It is believed that this is due to the probe section being displaced by amplification product (often referred to as the "hook effect" that is also observed in dual-hybe probe reporting chemistries).

Analysis of the data sets of Figure 2A produces a quantification curve as shown in Figure 2B. The correlation co-efficient for the curve is near to 1.0, showing that the method of the present invention is excellent for quantification and identification of a nucleic acid sequence.

Figure 3 shows comparative data obtained using assays of WO99/28500 for the beta-actin gene. Figure 3A shows the measured fluorescence as a function of cycle number for the beta-actin system as a function of concentration of DNA. The data obtained from the prior art system are noisier than those obtained from the method of the present invention. Furthermore, the gradient of response is sharper using the method of the present invention and the cycle threshold value is also slightly lower using the method of the present invention. A comparison of Figures 2B and 3B confirms this observation.

Figure 4 shows comparative data obtained using the Taqman™ assays in accordance with a prior art method. The response curves are relatively shallow compared to those of the present invention. Furthermore, the Taqman™ methodology is very slow compared to that of the present invention.

30

#### Example 2 - identification and quantification of porA gene

Figure 5 shows fluorescence as measured by the F3 detector as a function of cycle number for the meningitis system for various concentrations of human DNA using the method of the present invention. The data shown use the reagent of structure Seq. No. 5. Each set of data shows a low-level background response for a given number of cycles, dependent on the concentration of DNA within the sample. Within each set of data, the observed fluorescence increases dramatically at a certain cycle number dependent on the concentration of human DNA in the sample.

40

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

26

Figure 6 shows comparative data obtained using assays of WO99/28500 for the porA gene.

5 Figure 7 shows comparative data obtained using the Taqman™ methodology of the prior art. Again, the response curves are relatively shallow compared to those of the present invention. Furthermore, the Taqman™ methodology is very slow compared to that of the present invention. The Taqman™ response curves are  
10 noisier and the quantification curve generated from such data produces a lower correlation co-efficient than the present method.

**Example 3 - identification and quantification of Ct plasmid gene**

15 Figure 8 shows fluorescence as measured by the F3 detector as a function of cycle number for the chlamydia system for various concentrations of human DNA using the method of the present invention. Each set of data shows a low-level background  
20 response for a given number of cycles, dependent on the concentration of DNA within the sample. Within each set of data, the observed fluorescence increases dramatically at a certain cycle number dependent on the concentration of human DNA in the sample.

25 Figure 9 shows comparative data obtained using the Taqman™ methodology of the prior art. Again, the response curves are relatively shallow compared to those of the present invention. Furthermore, the Taqman™ methodology is very slow compared to  
30 that of the present invention.

**Example 4 - identification and quantification of CP4 EPSPS gene**

35 Figure 10 shows fluorescence as measured by the F3 detector as a function of cycle number for the genetically modified soybean system for various concentrations of the modified gene using the method of the present invention. The figure also shows the fluorescence generated by the lect system as a function of cycle  
40 number for various concentrations of the modified gene. Within each set of data the observed fluorescence increases dramatically at a certain cycle number dependent on the

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

27

concentration of the relevant gene in the sample. The lect system is effectively acting as a control, the fluorescence versus cycle number response curve as expected being virtually independent of the concentration of the modified gene. In the case of the modified gene system, it can be seen that an increase in concentration of the modified gene causes a decrease in the cycle number at which the fluorescence dramatically increases.

10 Figure 11 shows comparative data obtained using the Taqman™ methodology of the prior art. Again, the response curves are relatively shallow compared to those of the present invention. Furthermore, the Taqman™ methodology is very slow compared to that of the present invention.

15 It should be noted that in virtually all circumstances the data obtained using the Taqman™ methodology of the prior art is noisier than those obtained using the method of the present invention. Furthermore, the response curves are shallower than those of the present invention and the quantification curves generated from the data obtained using the method of the present invention have higher correlation co-efficients than those obtained from the Taqman™ methodology.

25 The present invention also provides a method which is potentially very fast. The data presented herein for the method of the present invention were obtained using the instrumentation at the fastest possible mode of operation. It is believed that the relatively short probe length helps to produce a fast response. It is thus anticipated that the speed of the present method is limited by the current specification of the instrument on which the method is performed.

30

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

28

## Claims

1. A method for detecting the presence of a target nucleic acid sequence in a sample, said method comprising:
- 5 performing nucleic acid amplification on the sample in the presence of (a) a DNA duplex binding agent, (b) a nucleic acid polymerase and (c) a reagent comprising an amplification primer which can hybridise to said target sequence when in single stranded form and which is
- 10 connected at its 5' end to a probe which carries a label by way of a chemical linking group, said labelled probe being of a sequence which is similar to that of the said target nucleic acid sequence, such that it can hybridise to a
- 15 complementary region in an amplification product, and wherein the label is able to absorb fluorescence from or donate fluorescent energy to the DNA duplex binding agent; and monitoring fluorescence of said sample.
- 20 2. A method according to claim 1, said method comprising:
- (a) adding to a sample suspected of containing the target nucleic acid sequence, the DNA duplex binding agent, the nucleic acid polymerase and the reagent;
- 25 (b) subjecting said sample to conditions under which the primer hybridises to the target nucleic acid sequence and an amplification product comprising the probe is formed;
- (c) subjecting said sample to conditions under which the labelled probe hybridises to a complementary region in the
- 30 amplification product; and
- (d) monitoring fluorescence of said sample during at least one of steps (b) and (c).
3. A method according to claim 1 wherein the amplification
- 35 product comprises the probe.
4. A method according to any one of claims 1 to 3 wherein the DNA duplex binding agent is an intercalating dye.
- 40 5. A method according to any one preceding claim wherein the DNA duplex binding agent comprises a donor label and the



WO 02/097132

PCT/GB02/02443

29

probe comprises the acceptor label.

6. A method according to any one of claims 1 to 4 wherein the DNA duplex binding agent comprises an acceptor label and the probe comprises the donor label.  
5
7. A method according to any one preceding claim wherein the acceptor label is a fluorescent molecule which emits energy at a characteristic wavelength.  
10
8. A method according to claim 7 wherein the acceptor label is a rhodamine dye or Cy5.
9. A method according to any one of claims 1 to 6 wherein the acceptor label is a dark acceptor.  
15
10. A method according to claim 9 wherein the dark acceptor is selected from any one of DABCYL, Methyl Red, a QSY-7 diarylrhodamine dye and 6-(dimethylamino)-2-[4-[4-(dimethylamino)phenyl]-1,3-butadienyl]-1-ethyl quinolinium perchlorate (CAS number 181885-68-7)..  
20
11. A method according to any one of the preceding claims wherein the amplification reaction comprises the polymerase chain reaction (PCR).  
25
12. A method according to any one of claims 1 to 8 and 11 wherein the acceptor molecule is a fluorescent molecule and wherein fluorescence of both the donor and the acceptor molecules are monitored and the relationship between the emissions calculated.  
30
13. A method according to any one of the preceding claims wherein the fluorescent signal from the sample is monitored throughout the amplification reaction and the results used to quantitate the amount of target sequence present in the sample.  
35
14. A method according to any one of the preceding claims wherein the amplification reaction is performed in the presence of an additional corresponding amplification  
40

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

30

primer which is not attached to a labelled probe.

15. A method for detecting nucleic acid amplification comprising: performing nucleic acid amplification on a target polynucleotide in the presence of (a) a nucleic acid polymerase, (b) a DNA duplex binding agent and (c) a reagent comprising an amplification primer which can hybridise to said target sequence when in single stranded form and which is connected at its 5' end to a probe which carries a second label, by way of a chemical linking group, said labelled probe being of a sequence which is similar to that of the said target sequence, such that it can hybridise to a complementary region in an amplification product, and wherein one of the DNA duplex binding agent or second label comprises a donor label which is able to donate fluorescent energy to the other of the DNA duplex binding agent or second label which comprises an acceptor label able to absorb fluorescent energy from said donor molecule, said primer being capable of hybridising to said target polynucleotide; and monitoring changes in fluorescence during the amplification reaction.
16. A method according to claim 15 wherein the amplification is carried out using a pair of primers which are designed such that only the target nucleotide sequence within a DNA strand is amplified.
17. A method according to any one of the preceding claims wherein the probe is specific either for a splice region of RNA or an intron in DNA, so that only one of amplified RNA or amplified DNA is detected and/or quantitated.
18. A method for determining a characteristic of a target nucleic acid sequence, said method comprising (a) amplifying said sequence in the presence of a DNA duplex binding agent and a reagent comprising an amplification primer linked by way of a chemical link at its 5' end to a probe which comprises a sequence which is similar to that of a region of the target sequence and which further comprises a label, where one of said DNA duplex binding agent and the label is a donor label and the other is an

WO 02/097132

PCT/GB02/02443

31

acceptor label, the donor label being able to donate  
fluorescent energy to the acceptor label; so as to form an  
amplification product incorporating a probe region, (b)  
subjecting amplification product to conditions under which  
5 the probe region thereof will hybridise to the  
complementary region of the amplification product, and  
(c) monitoring fluorescence of said sample and determining a  
particular reaction condition, characteristic of said  
sequence, at which fluorescence changes as a result of the  
10 hybridisation of the probe region to the sample or  
destabilisation of the duplex formed between the probe  
region and the target nucleic acid sequence.

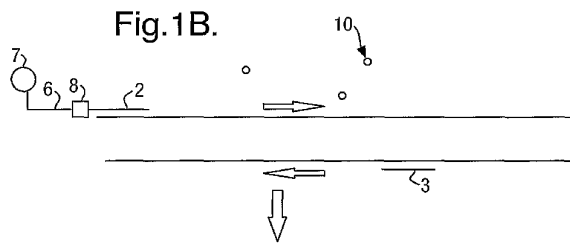
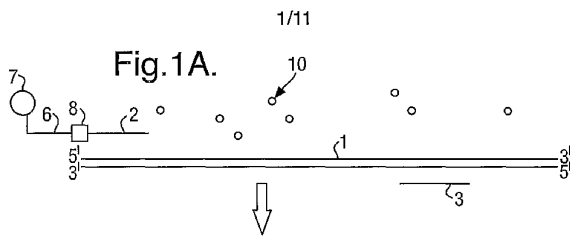
19. A method for detecting a polymorphism and/or allelic  
15 variation, said method comprising amplifying a sequence  
suspected of containing said polymorphism or variation  
using a method as defined in any one of claims 1 to 16,  
measuring the temperature at which the probe region melts  
from its complementary sequence within the amplification  
20 product using the fluorescent signal generated, and  
relating this to the presence of a polymorphism or allelic  
variation.

20. A kit for use in the method of any one of the preceding  
25 claims which kit comprises a reagent comprising an  
amplification primer linked at its 5' end by way of a  
chemical link, to a probe specific for a target nucleotide  
sequence, wherein the probe comprises a first label which  
may act as one of either a donor and acceptor label; and a  
30 DNA intercalating agent comprising a second label, which  
second label may act as one of either a donor and acceptor  
label, wherein the first and second labels form a donor-  
acceptor pair.

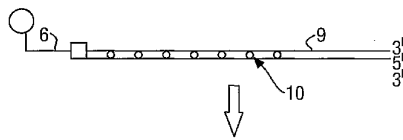
35

WO 02/097132

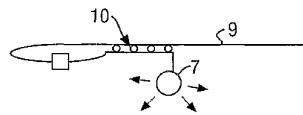
PCT/GB02/02443



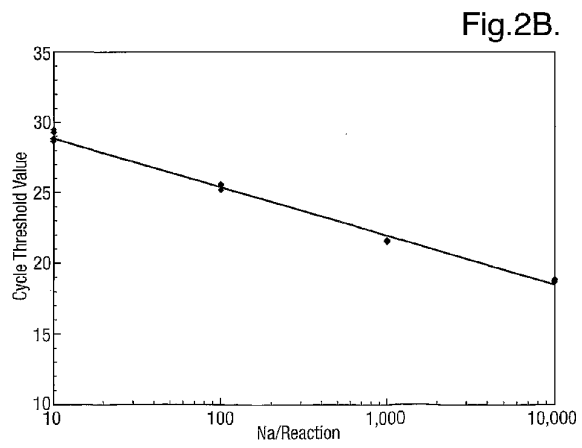
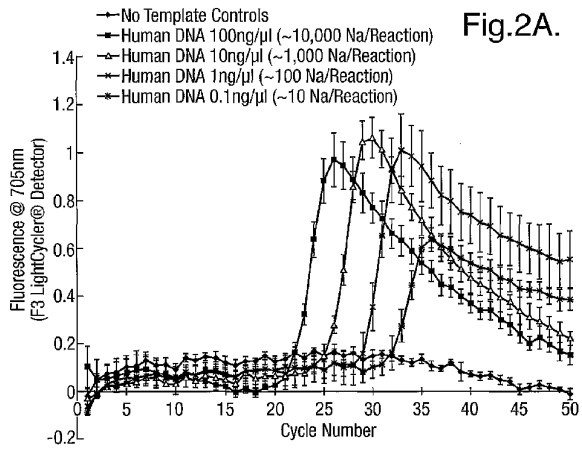
**Fig.1C.**

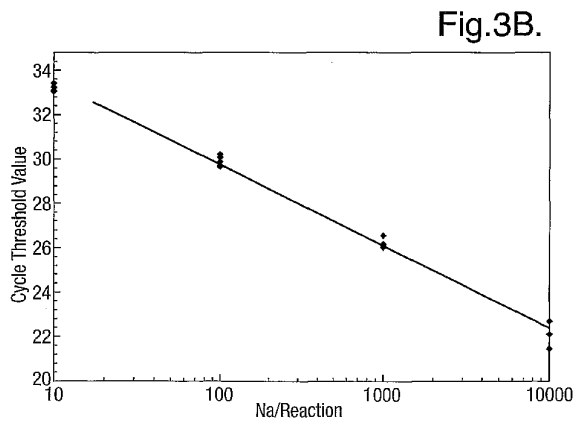
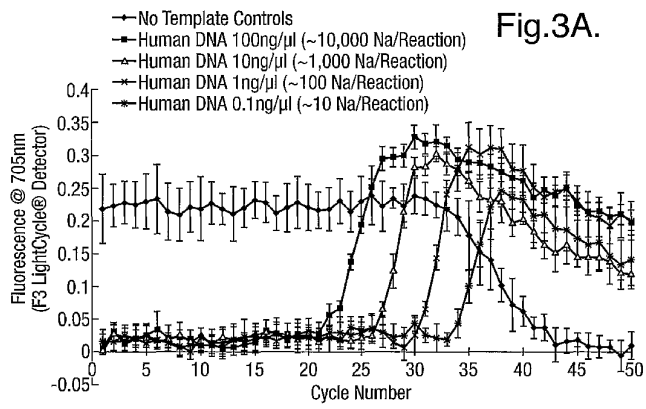


**Fig.1D.**

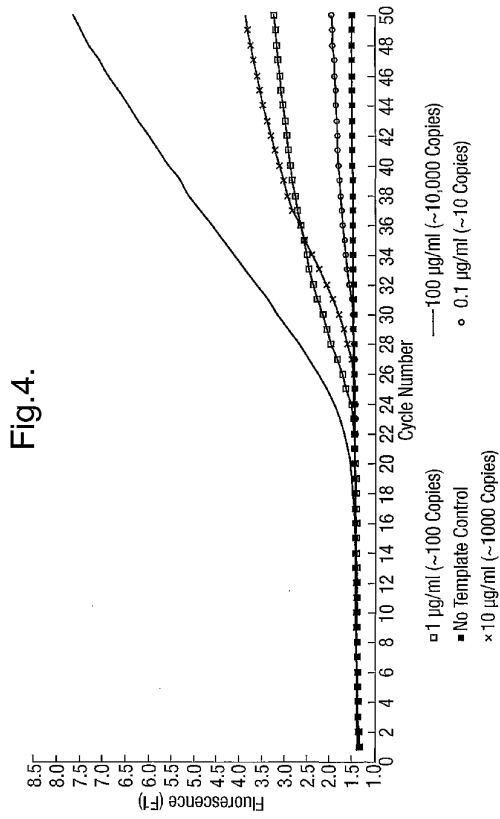


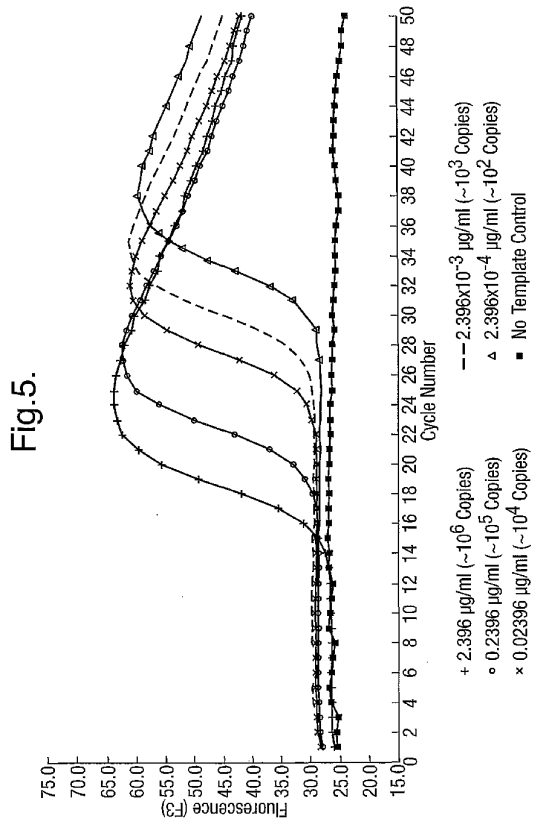
2/11



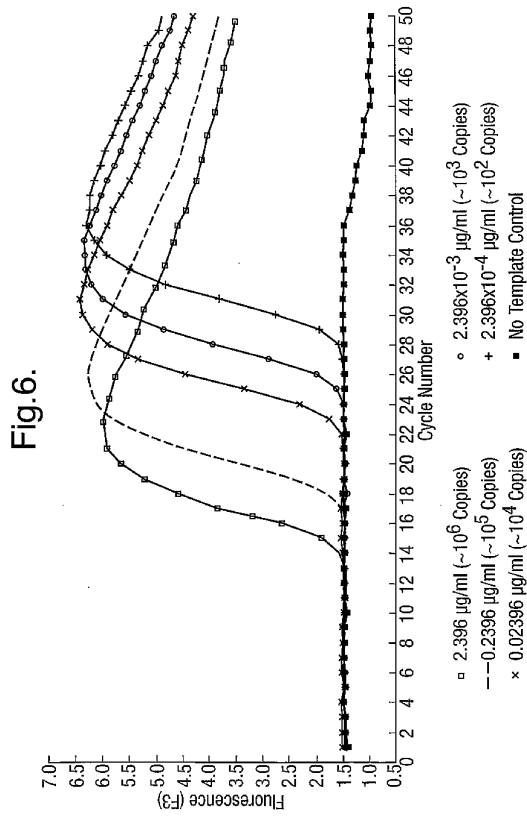


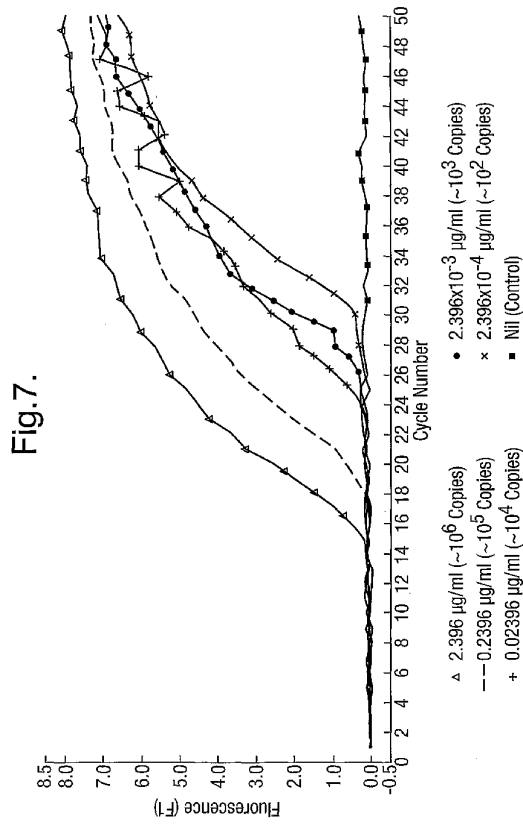
4/11

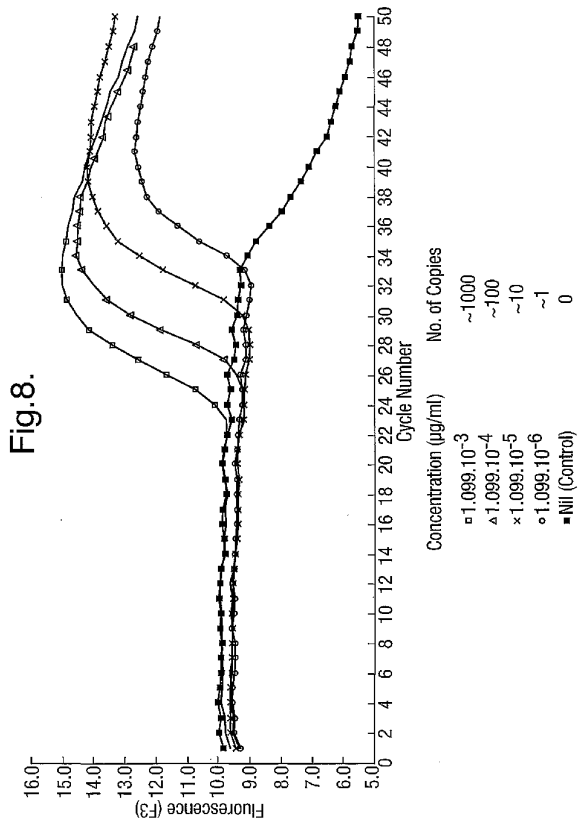




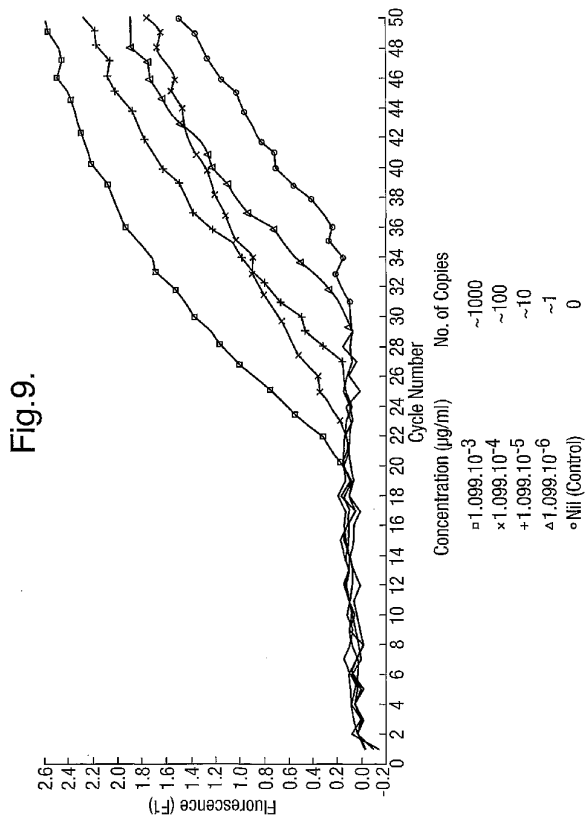


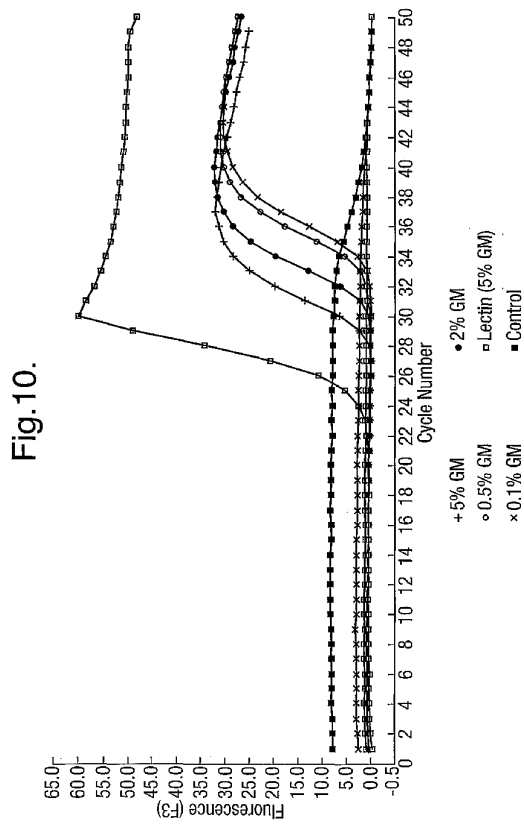






9/11

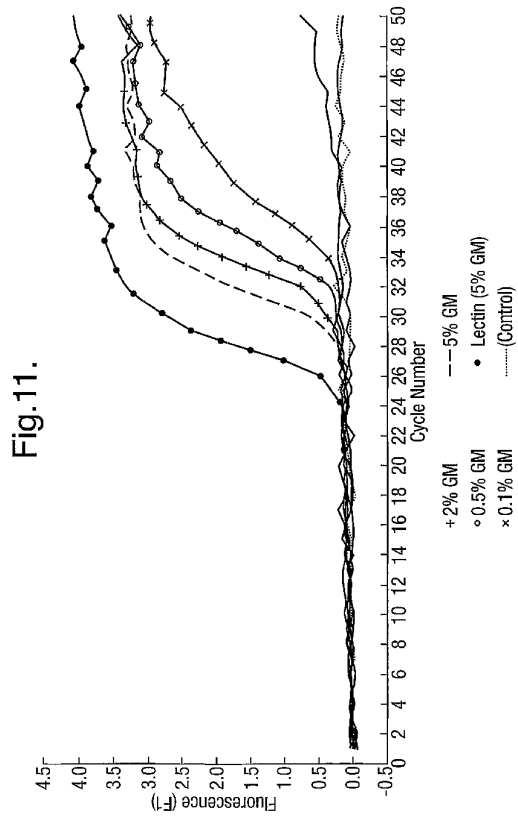




WO 02/097132

PCT/GB02/02443

11/11



【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
5 December 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/097132 A3

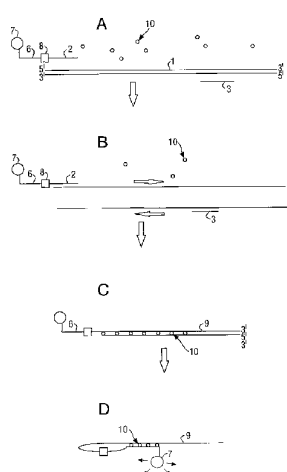
- (51) International Patent Classification<sup>7</sup>: C12Q 121/68
- (74) Agent: SKELTON, Stephen, Richard; D/PR, 1 Formalities Section, Poplar 2, MOD Abbey Wood #2218, Bristol BS34 8JH (GB).
- (21) International Application Number: PCT/GB02/02443
- (22) International Filing Date: 24 May 2002 (24.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0112868.5 25 May 2001 (25.05.2001) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE SECRETARY OF STATE DSTL [GB/GB]; Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JQ (GB).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): LEE, Martin, Alan [GB/GB]; DSTL, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JQ (GB).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: NUCLEIC ACID DETECTION METHOD



WO 02/097132 A3



(57) Abstract: A method for detecting the presence of a target nucleic acid sequence in a sample, said method comprising: performing nucleic acid amplification on the sample in the presence of (a) a DNA duplex binding agent; (b) a nucleic acid polymerase; and (c) a reagent comprising an amplification primer which can hybridise to said target sequence when in single stranded form and which is connected at its 5' end to a probe which carries a label by way of a chemical linking group, said labelled probe being of a sequence which is similar to that of the said target nucleic acid sequence, such that it can hybridise to a complementary region in an amplification product, and wherein the label is able to absorb fluorescence from or donate fluorescent energy to the DNA duplex binding agent; and monitoring fluorescence of said sample.

WO 02/097132 A3



**Published:**

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

**(88) Date of publication of the international search report:**  
12 September 2003



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat. Application No. PCT/GB 02/02443
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12Q1/68  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 512 334 A (HOFFMANN LA ROCHE) 11 November 1992 (1992-11-11) claims 1-20; figure 3	1-20
Y	WO 01 11078 A (LEE MARTIN ALAN ;SECR DEFENCE (GB); LESLIE DARIO LYALL (GB)) 15 February 2001 (2001-02-15) page 9; claims 1-17; figure 1	1-20
A	THELWELL NICOLA ET AL: "Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection," NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 28, no. 19, 1 October 2000 (2000-10-01), pages 3752-3761, XP002247004 ISSN: 0305-1048	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *** document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 July 2003		24/07/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5618 Patentlaan 2 NL-2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 940-2040, Tx. 31 651 epo n, Fax (+31-70) 940-3018		Authorized officer:  Seroz, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern Application No PCT/GB 02/02443
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 28500 A (FUERST RODERICK ;LEE MARTIN ALAN (GB); SECR DEFENCE (GB); BIO GENE) 10 June 1999 (1999-06-10)	
A	WO 99 42611 A (LEE MARTIN ALAN ;SECR DEFENCE (GB); LESLIE DARIO LYALL (GB)) 26 August 1999 (1999-08-26)	
A	WO 99 66071 A (ZENECA LTD) 23 December 1999 (1999-12-23)	

Form PCT/ISPC/10 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Item	Application No
Information on patent family members				PCT/tb 02/02443	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
EP 0512334	A	11-11-1992	US 5994056 A	30-11-1999	
			AT 184322 T	15-09-1999	
			AT 223970 T	15-09-2002	
			AU 665185 B2	21-12-1995	
			AU 1513892 A	05-11-1992	
			BR 9201618 A	15-12-1992	
			CA 2067909 A1	03-11-1992	
			CA 2218818 A1	03-11-1992	
			DE 69229929 D1	14-10-1999	
			DE 69229929 T2	18-05-2000	
			DE 69232773 D1	17-10-2002	
			DK 512334 T3	03-04-2000	
			EP 1256631 A1	13-11-2002	
			EP 0512334 A2	11-11-1992	
			EP 0872562 A1	21-10-1998	
			ES 2137164 T3	16-12-1999	
			ES 2183256 T3	16-03-2003	
			JP 3136129 B2	19-02-2001	
			JP 10201464 A	04-08-1998	
			JP 3007477 B2	07-02-2000	
			JP 5184397 A	27-07-1993	
			NO 921731 A	03-11-1992	
			NZ 242565 A	26-07-1994	
US 6171785 B1	09-01-2001				
ZA 9202990 A	27-01-1993				
WO 0111078	A	15-02-2001	AU 6455800 A	05-03-2001	
			CA 2381037 A1	15-02-2001	
			EP 1198593 A1	24-04-2002	
			WO 0111078 A1	15-02-2001	
			JP 2003506068 T	18-02-2003	
WO 9928500	A	10-06-1999	AU 743543 B2	31-01-2002	
			AU 1342599 A	16-06-1999	
			CA 2311952 A1	10-06-1999	
			EP 1049802 A1	08-11-2000	
			GB 2346972 A, B	23-08-2000	
			WO 9928500 A1	10-06-1999	
			GB 2333359 A	21-07-1999	
			JP 2003500001 T	07-01-2003	
			NZ 504818 A	25-10-2002	
			US 2002119450 A1	29-08-2002	
WO 9942611	A	26-08-1999	AU 746149 B2	18-04-2002	
			AU 2538399 A	06-09-1999	
			CA 2321185 A1	26-08-1999	
			CN 1297488 T	30-05-2001	
			CZ 20002958 A3	13-02-2002	
			EP 1055002 A1	29-11-2000	
			NO 9942611 A1	26-08-1999	
			HU 0101385 A2	28-08-2001	
			JP 2003512808 T	08-04-2003	
			NZ 506333 A	25-10-2002	
			RU 2199588 C2	27-02-2003	
			SK 12212000 A3	10-09-2002	
			US 6287781 B1	11-09-2001	
WO 9966071	A	23-12-1999	AU 1250799 A	05-01-2000	

Form PCT/ISA/W210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT relation on patent family members		Intern. Application No. PCT/GB 02/02443	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9966071	A	CA 2377508 A1	23-12-1999
		EP 1088102 A1	04-04-2001
		WO 9966071 A1	23-12-1999
		GB 2338301 A ,B	15-12-1999
		US 6326145 B1	04-12-2001
		US 2003087240 A1	08-05-2003

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,P T,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 リー マーティン アラン

イギリス ウィルシャー エスピー4 0ジェイキュー ソールズベリー ポートン ダウン デ  
ィーエステーエル

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 HA11 HA14

4B063 QA01 QQ42 QR41 QR56 QR62 QR66 QS03 QS25 QS34 QS36

QX02