

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-507309
(P2025-507309A)

(43)公表日 令和7年3月18日(2025.3.18)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/6853(2018.01)	C 1 2 Q	1/6853	Z Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851	Z	
C 1 2 Q	1/6825(2018.01)	C 1 2 Q	1/6825	Z	
C 1 2 Q	1/6844(2018.01)	C 1 2 Q	1/6844	Z	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全54頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-546274(P2024-546274)	(71)出願人	595117091 ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー BECTON, DICKINSON AND COMPANY アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー 07417-1880 フランクリン・レイクス ベクトン・ドライブ 1
(86)(22)出願日	令和5年2月13日(2023.2.13)	(74)代理人	100103610 弁理士 ▲吉▼田 和彦
(85)翻訳文提出日	令和6年8月5日(2024.8.5)	(74)代理人	100109070 弁理士 須田 洋之
(86)国際出願番号	PCT/US2023/062485	(74)代理人	100119013 弁理士 山崎 一夫
(87)国際公開番号	WO2023/154920	(74)代理人	100123777
(87)国際公開日	令和5年8月17日(2023.8.17)		
(31)優先権主張番号	63/309,827		
(32)優先日	令和4年2月14日(2022.2.14)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV)		

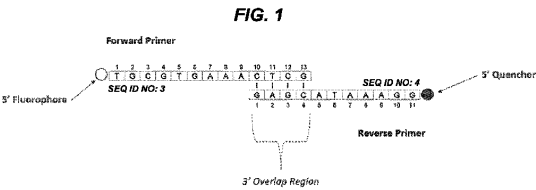
最終頁に続く

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸増幅のための内部対照

(57)【要約】

本明細書に開示されるものには、増幅反応をモニターする際に使用するのに好適な方法、キット、及び反応混合物が含まれる。一部の実施形態は、互いにハイブリダイズすることが可能であり、クエンチ可能な標識又はクエンチャーをそれぞれ含む、第1及び第2の品質管理プライマーを提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

増幅反応をモニターするための方法であって、

(a) 互いにハイブリダイズすることが可能な 3' 重複領域をそれぞれ含む第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマーを提供するステップ、ここで、前記第 1 の品質管理プライマー及び前記第 2 の品質管理プライマーのそれぞれは 35 ヌクレオチド長以下であり、前記第 1 の品質管理プライマーはクエンチ可能な標識を含む；

(b) 前記第 1 の品質管理プライマー及び前記第 2 の品質管理プライマーを接触させるステップであって、それにより、前記第 1 及び第 2 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域間でのハイブリダイゼーションによって二重鎖を形成させる、前記ステップ；

(c) 前記二重鎖を増幅条件にかけるステップであって、それにより、伸長された二重鎖を生成する、前記ステップ；並びに

(d) 前記伸長された二重鎖の生成を決定するための前記増幅反応の間に前記第 1 の品質管理プライマーの前記クエンチ可能な標識から生成されるシグナルを検出するステップ、ここで前記増幅反応の間の前記シグナルの低下は、前記伸長された二重鎖の生成を示すを含む、方法。

【請求項 2】

前記クエンチ可能な標識はフルオロフォアである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記クエンチ可能な標識は、前記第 1 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域の外側にある、請求項 1～2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

前記クエンチ可能な標識は、前記第 1 の品質管理プライマーの 5' 末端にある、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記クエンチ可能な標識は、前記第 1 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域中にある、請求項 1～2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 2 の品質管理プライマーはクエンチャーを含む、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記クエンチャーは、前記第 2 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域の外側にある、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記クエンチャーは、前記第 2 の品質管理プライマーの 5' 末端にある、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記クエンチャーは、前記第 2 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域中にある、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 1 の品質管理プライマー、前記第 2 の品質管理プライマー、又はその両方は、1 種又は複数種の修飾ヌクレオチドを含む、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 1 及び第 2 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域はそれぞれ、1 種又は複数種の修飾ヌクレオチドを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 1 種又は複数種の修飾ヌクレオチドは、スパーサー、脱塩基部位、非メチル化 RNA 塩基、2'-O-メチル化ヌクレオチド、及びそれらのあらゆる組合せを含む、請求項 10～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 1 種又は複数種の修飾ヌクレオチドの少なくとも 1 種は 2' - O - メチル化ヌクレオチドである、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 1 の品質管理プライマー、前記第 2 の品質管理プライマー、又はその両方は、1 種又は複数種のポリメラーゼストッパーを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記第 1 及び第 2 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域はそれぞれ、1 種又は複数種のポリメラーゼストッパーを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 1 種又は複数種の修飾ヌクレオチドの少なくとも 1 種は 2' - O - メチル化ヌクレオチドである、請求項 14 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記第 1 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域は、前記第 2 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域に相補的である、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記第 1 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域は、前記第 2 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域に完全に相補的である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記第 1 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域及び前記第 2 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域は、同じ長さを有する、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記第 1 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域及び前記第 2 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域の 1 種又は複数種は、約 2 ~ 約 10 ヌクレオチド長である、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記第 1 及び第 2 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域は、4 又は 5 ヌクレオチド長である、請求項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

(b) 前記第 1 の品質管理プライマー及び前記第 2 の品質管理プライマーを接触させるステップは、前記増幅条件下で実行される、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

(d) 前記増幅反応の間に前記第 1 の品質管理プライマーの前記クエンチ可能な標識から生成される前記シグナルを検出するステップは、前記増幅反応の間の 2 つ又はそれより多い異なる時点で前記シグナルを検出することを含む、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記増幅反応の間の前記シグナルの前記低下は、前記増幅反応の間の経時的な低下を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記増幅反応の間の前記シグナルの前記低下は、前記増幅反応の間の約 10 分の期間にわたる低下を含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記期間は、前記増幅反応の開始から約 3 分 ~ 約 12 分である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

前記増幅反応の前、前記増幅反応の後、又はその両方に前記第 1 の品質管理プライマーの前記クエンチ可能な標識の前記シグナルを検出するステップを含む、請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

前記増幅反応はリアルタイム増幅反応である、請求項 1～27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記増幅反応は PCR 反応である、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記増幅反応は、以下のもの：古細菌ポリメラーゼ増幅（AP A）、ループ媒介性等温増幅（LAMP）、ヘリカーゼ依存性増幅（HDA）、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）、鎖置換増幅（SDA）、核酸配列ベース増幅（NASBA）、転写媒介性増幅（TMA）、ニッキング酵素増幅反応（NEAR）、ローリングサークル増幅（RCA）、多置換増幅（MDA）、ラミフィケーション（RAM）、環状ヘリカーゼ依存性増幅（cHDA）、単一プライマー等温増幅（SPIA）、シグナル媒介性 RNA 増幅技術（SMART）、自家持続配列複製（3SR）、ゲノム指数関数的増幅反応（GEAR）及び等温多置換増幅（IMDA）の 1 種又は複数種を含む、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 31】

前記増幅反応は等温増幅反応である、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

前記増幅条件は、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、dNTP、及び緩衝剤の 1 種又は複数種を含む、請求項 31 に記載の方法。

20

【請求項 33】

前記超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号 1 又はその機能的断片のアミノ酸配列と少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を有し、任意に、前記超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記等温増幅反応は、約 30℃～約 72℃の一定温度を含み、任意に、前記等温増幅反応は、約 67℃の一定温度を含む、請求項 31～33 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】

前記等温増幅反応は、約 5 分～約 60 分の期間にわたって実施される、請求項 31～34 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 36】

前記等温増幅反応は、無ヘリカーゼ、無一本鎖結合タンパク質、無切断剤、及び無リコンビナーゼ等温増幅条件で実施される、請求項 31～35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 37】

前記第 1 の品質管理プライマーの前記クエンチ可能な標識から生成される前記シグナルの検出は、いかなるプローブの使用も含まない、請求項 1～36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 38】

（c）前記二重鎖を前記増幅条件にかけるステップは、標的核酸及び 1 種若しくは複数種の追加のプライマー及び／又は前記標的核酸に特異的な 1 種若しくは複数種のプローブを前記増幅条件にかけることを含む、請求項 1～37 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 39】

前記第 1 の品質管理プライマーは、前記増幅条件下で前記標的核酸にハイブリダイズしない、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記第 2 の品質管理プライマーは、前記増幅条件下で前記標的核酸にハイブリダイズしない、請求項 38～39 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 41】

前記方法は、前記第 1 の品質管理プライマーにハイブリダイズすることが可能な鋳型核

50

酸を使用することを含まない、請求項 1～40 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 42】

前記方法は、前記第 2 の品質管理プライマーにハイブリダイズすることが可能な鋳型核酸を使用することを含まない、請求項 1～41 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 43】

増幅反応をモニターするためのキットであって、

互いにハイブリダイズすることが可能な 3' 重複領域をそれぞれ含む第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマーであり、前記第 1 の品質管理プライマー及び前記第 2 の品質管理プライマーのそれぞれは 35 ヌクレオチド長以下であり、前記第 1 の品質管理プライマーはクエンチ可能な標識を含む、前記第 1 の品質管理プライマー及び前記第 2 の品質管理プライマーを含む、キット。

【請求項 44】

前記クエンチ可能な標識はフルオロフォアである、請求項 43 に記載のキット。

【請求項 45】

前記クエンチ可能な標識は、前記第 1 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域の外側にある、請求項 43～44 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 46】

前記クエンチ可能な標識は、前記第 1 の品質管理プライマーの 5' 末端にある、請求項 45 に記載のキット。

【請求項 47】

前記クエンチ可能な標識は、前記第 1 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域中にある、請求項 43～44 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 48】

前記第 2 の品質管理プライマーはクエンチャーを含む、請求項 43～47 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 49】

前記クエンチャーは、前記第 2 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域の外側にある、請求項 48 に記載のキット。

【請求項 50】

前記クエンチャーは、前記第 2 の品質管理プライマーの 5' 末端にある、請求項 49 に記載のキット。

【請求項 51】

前記クエンチャーは、前記第 2 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域中にある、請求項 48 に記載のキット。

【請求項 52】

前記第 1 の品質管理プライマー、前記第 2 の品質管理プライマー、又はその両方は、1 種又は複数種の修飾ヌクレオチドを含む、請求項 43～51 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 53】

前記第 1 及び第 2 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域はそれぞれ、1 種又は複数種の修飾ヌクレオチドを含む、請求項 52 に記載のキット。

【請求項 54】

前記 1 種又は複数種の修飾ヌクレオチドは、スパーサー、脱塩基部位、非メチル化 RNA 塩基、2'-O-メチル化ヌクレオチド、及びそれらのあらゆる組合せを含む、請求項 52～53 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 55】

前記第 1 の品質管理プライマー、前記第 2 の品質管理プライマー、又はその両方は、1 種又は複数種のポリメラーゼストッパーを含む、請求項 43～51 のいずれか 1 項に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 56】

前記第1及び第2の品質管理プライマーの前記3'重複領域はそれぞれ、1種又は複数種のポリメラーゼストッパーを含む、請求項55に記載のキット。

【請求項 57】

前記1種又は複数種のポリメラーゼストッパーの少なくとも1種は2'-O-メチル化ヌクレオチドである、請求項55～56のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 58】

前記第1の品質管理プライマーの前記3'重複領域は、前記第2の品質管理プライマーの前記3'重複領域に相補的である、請求項43～57のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 59】

前記第1の品質管理プライマーの前記3'重複領域は、前記第2の品質管理プライマーの前記3'重複領域に完全に相補的である、請求項58に記載のキット。

【請求項 60】

前記第1の品質管理プライマーの前記3'重複領域及び前記第2の品質管理プライマーの前記3'重複領域は、同じ長さを有する、請求項43～59のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 61】

前記第1の品質管理プライマーの前記3'重複領域及び前記第2の品質管理プライマーの前記3'重複領域の1種又は複数種は、約2～約10ヌクレオチド長である、請求項43～60のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 62】

前記第1及び第2の品質管理プライマーの前記3'重複領域は、4又は5ヌクレオチド長である、請求項43～61のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 63】

超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、dNTP、及び緩衝剤の1種又は複数種を含む、請求項43～62のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 64】

前記超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号1又はその機能的断片のアミノ酸配列と少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を有し、任意に、前記超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含む、請求項63に記載のキット。

【請求項 65】

前記第1の品質管理プライマー及び前記第2の品質管理プライマーは、凍結乾燥形態又はフリーズドライ形態である、請求項43～64のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 66】

超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、dNTP、及び緩衝剤の前記1種又は複数種は、凍結乾燥形態又はフリーズドライ形態である、請求項63～65のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 67】

1種若しくは複数種の追加のプライマー及び／又は標的核酸に特異的な1種若しくは複数種のプローブをさらに含む、請求項43～66のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 68】

互いにハイブリダイズすることが可能な3'重複領域をそれぞれ含む第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーであり、前記第1の品質管理プライマー及び前記第2の品質管理プライマーのそれぞれは35ヌクレオチド長以下であり、前記第1の品質管理プライマーはクエンチ可能な標識を含む、前記第1の品質管理プライマー及び前記第2の品質管理プライマー；

標的核酸；並びに

1種若しくは複数種の追加のプライマー及び／又は前記標的核酸に特異的な1種若しくは複数種のプローブ

10

20

30

40

50

を含む、反応混合物。

【請求項 69】

前記第 1 及び第 2 の品質管理プライマーの前記 3' 重複領域間のハイブリダイゼーションによって形成される二重鎖を含む、請求項 68 に記載の反応混合物。

【請求項 70】

ポリメラーゼ活性を有する酵素、dNTP、及び緩衝剤の 1 種又は複数種を含み、任意に、前記酵素は超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素である、請求項 68～69 のいずれか 1 項に記載の反応混合物。

【請求項 71】

前記超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号 1 又はその機能的断片のアミノ酸配列と少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を有し、任意に、前記超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 70 に記載の反応混合物。

10

【請求項 72】

前記第 1 の品質管理プライマー及び前記第 2 の品質管理プライマーは、前記標的核酸にハイブリダイズすることができない、請求項 68～71 のいずれか 1 項に記載の反応混合物。

【請求項 73】

前記 1 つ若しくは複数の追加のプライマー及び／又は 1 つ若しくは複数のプローブは、前記第 1 の品質管理プライマー、前記第 2 の品質管理プライマー、又はその両方にハイブリダイズすることができない、請求項 68～72 のいずれか 1 項に記載の反応混合物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2022 年 2 月 14 日に提出された、米国特許仮出願第 63/309,827 号に対する、米国特許法第 119 条(e)に基づく利益を主張するものであり、この関連出願の全内容は、あらゆる目的で参照により本明細書に組み込まれる。

配列表の参照

本出願は、電子形式の配列表と共に提出されている。配列表は、2023 年 2 月 13 日に作成された、68EB-317346-WO という名称のファイルとして提供され、サイズは 8.0 キロバイトである。配列表の電子形式での情報は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

本開示は一般に、分子生物学に関する。より具体的には、本明細書に開示されるものには、核酸増幅をモニターするための方法及び組成物が含まれる。

【背景技術】

【0002】

核酸増幅アッセイにおける内部対照(「IC」)のためには、2 種の主な戦略が使用されている：競合及び非競合内部対照手法。2 種の戦略間の主な相違は、内部対照成分が内部対照及び標的増幅のためのプライマーの 1 種の共通のセットを共有するかどうかである。

40

競合 IC 戦略を使用する場合、同じプライマーによってフランキングされた標的及び IC 断片の同時的増幅と共に、標的と IC との間には常にいくつかの競合が存在する。IC 増幅による競合は、標的増幅効率を低下させ、それにより、より低い検出限界をもたらす。したがって、競合 IC 法は、高感度の検出限界を達成するために、IC に対するより多くの最適化を必要とする。非競合手法では、標的及び IC は、それぞれ異なるプライマーセットを使用して増幅される。各反応の反応速度はプライマーに関する競合によって影響されないが、IC 増幅は、プライマー及び DNA ポリメラーゼに関する標的と IC 反応との競合を制限するために、制御された濃度の IC 特異的プライマー及び／又は IC 鋳型によって制限されなければならない。したがって、IC のヌクレオチド組成、コピー数

50

、及びサイズを慎重に考慮しなければならない。

現在の競合及び非競合ＩＣ法における標的増幅の競合によって呈される課題を克服すること、及び核酸増幅に関する品質管理を実施する際の複雑性を低減させることが必要である。

【発明の概要】

【０００３】

本明細書に開示されるものには、増幅反応をモニターするための方法が含まれる。一部の実施形態では、方法は、（a）互いにハイブリダイズすることが可能な３’重複領域をそれぞれ含む第１の品質管理プライマー及び第２の品質管理プライマーであり、第１の品質管理プライマー及び第２の品質管理プライマーのそれぞれが３５ヌクレオチド長以下であり、第１の品質管理プライマーがクエンチ可能な標識を含む、第１の品質管理プライマー及び第２の品質管理プライマーを提供するステップ；（b）第１の品質管理プライマー及び第２の品質管理プライマーを接触させ、それにより、第１及び第２の品質管理プライマーの３’重複領域間のハイブリダイゼーションによって二重鎖を形成させるステップ；（c）二重鎖を増幅条件にかけることによって、伸長された二重鎖を生成するステップ；並びに（d）伸長された二重鎖の生成を決定するための増幅反応の間に第１の品質管理プライマーのクエンチ可能な標識から生成されたシグナルであり、増幅反応の間のシグナルの低下が伸長された二重鎖の生成を示す、シグナルを検出するステップを含む。

【０００４】

クエンチ可能な標識は、フルオロフォアであってもよい。品質管理プライマー上のクエンチ可能な標識の位置は変化してもよい。一部の実施形態では、クエンチ可能な標識は、第１の品質管理プライマーの３’重複領域の外側にある。一部の実施形態では、クエンチ可能な標識は、第１の品質管理プライマーの５’末端にある。一部の実施形態では、クエンチ可能な標識は、第１の品質管理プライマーの３’重複領域中にある。

第２の品質管理プライマーは、クエンチャーを含んでもよい。一部の実施形態では、クエンチャーは、第２の品質管理プライマーの３’重複領域の外側にある。一部の実施形態では、クエンチャーは、第２の品質管理プライマーの５’末端にある。一部の実施形態では、クエンチャーは、第２の品質管理プライマーの３’重複領域中にある。一部の実施形態では、第２の品質管理プライマーは、クエンチャーを含まない。一部の実施形態では、第１及び第２の品質管理プライマーはいずれもクエンチャーを含まない。

【０００５】

第１の品質管理プライマー、第２の品質管理プライマー、又はその両方は、１種又は複数種の修飾ヌクレオチドを含んでもよい。例えば、第１及び第２の品質管理プライマーの３’重複領域はそれぞれ、１種又は複数種の修飾ヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態では、１種又は複数種の修飾ヌクレオチドは、スパーサー、脱塩基部位、非メチル化RNA塩基、２’-O-メチル化ヌクレオチド、及びそれらのあらゆる組合せを含む。一部の実施形態では、１種又は複数種の修飾ヌクレオチドのうちの少なくとも１種は、２’-O-メチル化ヌクレオチドである。一部の実施形態では、第１の品質管理プライマー、第２の品質管理プライマー、又はその両方は、１種又は複数種のポリメラーゼストッパーを含む。一部の実施形態では、第１及び第２の品質管理プライマーの３’重複領域はそれぞれ、１種又は複数種のポリメラーゼストッパーを含む。一部の実施形態では、１種又は複数種のポリメラーゼストッパーのうちの少なくとも１種は、２’-O-メチル化ヌクレオチドである。

【０００６】

第１の品質管理プライマーの３’重複領域は、第２の品質管理プライマーの３’重複領域に相補的であってよい。一部の実施形態では、第１の品質管理プライマーの３’重複領域は、第２の品質管理プライマーの３’重複領域に完全に相補的である。一部の実施形態では、第１の品質管理プライマーの３’重複領域及び第２の品質管理プライマーの３’重複領域は、同じ長さを有する。一部の実施形態では、第１の品質管理プライマーの３’重複領域、第２の品質管理プライマーの３’重複領域、又はその両方は、約２～約１０ヌクレオ

チド長、例えば、4又は5ヌクレオチド長である。

【0007】

一部の実施形態では、(b)第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーを接触させるステップは、増幅条件下で実行される。一部の実施形態では、(d)増幅反応の間に第1の品質管理プライマーのクエンチ可能な標識から生成されるシグナルを検出するステップは、増幅反応の間の2つ又はそれより多い異なる時点でシグナルを検出するステップを含む。一部の実施形態では、増幅反応の間のシグナルの低下は、増幅反応の間の経時的な低下を含む。一部の実施形態では、増幅反応の間のシグナルの低下は、増幅反応の間の約10分の期間にわたる低下を含む。一部の実施形態では、期間は、増幅反応の開始から約3分～約12分である。方法は、増幅反応の前、増幅反応の後、又はその両方に第1の品質管理プライマーのクエンチ可能な標識のシグナルを検出するステップを含んでもよい。

10

【0008】

増幅反応は、例えば、PCR反応を含む、リアルタイム増幅反応であってもよい。一部の実施形態では、増幅反応は、以下のもの：古細菌ポリメラーゼ増幅(APA)、ループ媒介性等温増幅(LAMP)、ヘリカーゼ依存性増幅(HDA)、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)、鎖置換増幅(SDA)、核酸配列ベース増幅(NASBA)、転写媒介性増幅(TMA)、ニッキング酵素増幅反応(NEAR)、ローリングサークル増幅(RCA)、多置換増幅(MDA)、ラミフィケーション(RAM)、環状ヘリカーゼ依存性増幅(cHDA)、単一プライマー等温増幅(SPIA)、シグナル媒介性RNA増幅技術(SMART)、自家持続配列複製(3SR)、ゲノム指数関数的増幅反応(GEAR)及び等温多置換増幅(IMDA)の1種又は複数種を含む。増幅反応は、例えば、等温増幅反応であってもよい。一部の実施形態では、増幅条件は、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、dNTP、及び緩衝剤の1種又は複数種を含む。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号1のアミノ酸配列又はその機能的断片と少なくとも約90%又は少なくとも約95%同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含む。

20

【0009】

等温増幅反応は、限定されるものではないが、約67℃の一定の温度を含む、約30℃～約72℃の一定の温度を含んでもよい。等温増幅反応を、例えば、約5分、6分、7分、8分、9分、10分、15分、20分、30分、40分、50分、又は60分の期間にわたって実施することができる。一部の実施形態では、等温増幅反応は、無ヘリカーゼ、無一本鎖結合タンパク質、無切断剤、及び無リコンビナーゼ等温増幅条件で実施される。

30

【0010】

一部の実施形態では、第1の品質管理プライマーのクエンチ可能な標識から生成されるシグナルの検出は、いかなるプローブの使用も含まない。一部の実施形態では、(c)二重鎖を増幅条件にかけるステップは、標的核酸及び1種若しくは複数種の追加のプライマー及び／又は標的核酸に特異的な1種若しくは複数種のプローブを増幅条件にかけることを含む。一部の実施形態では、第1の品質管理プライマーは、増幅条件下で標的核酸にハイブリダイズしない。一部の実施形態では、第2の品質管理プライマーは、増幅条件下で標的核酸にハイブリダイズしない。一部の実施形態では、方法は、第1の品質管理プライマーにハイブリダイズすることが可能な鋳型核酸を使用することを含まない。一部の実施形態では、方法は、第2の品質管理プライマーにハイブリダイズすることが可能な鋳型核酸を使用することを含まない。

40

本明細書に開示されるものには、増幅反応をモニターするためのキットが含まれる。例えば、キットは、互いにハイブリダイズすることが可能な3'重複領域をそれぞれ含む第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーであって、第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーのそれぞれが35ヌクレオチド長以下であり、第1の品質管理プライマーがクエンチ可能な標識を含む、第1の品質管理プライマー及び第2の

50

品質管理プライマーを含んでもよい。

【0011】

クエンチ可能な標識は、フルオロフォアであってもよい。一部の実施形態では、クエンチ可能な標識は、第1の品質管理プライマーの3'重複領域の外側にある。一部の実施形態では、クエンチ可能な標識は、第1の品質管理プライマーの5'末端にある。一部の実施形態では、クエンチ可能な標識は、第1の品質管理プライマーの3'重複領域中にある。一部の実施形態では、第2の品質管理プライマーは、クエンチャーを含む。一部の実施形態では、クエンチャーは、第2の品質管理プライマーの3'重複領域の外側にある。一部の実施形態では、クエンチャーは、第2の品質管理プライマーの5'末端にある。一部の実施形態では、クエンチャーは、第2の品質管理プライマーの3'重複領域中にある。

10

【0012】

一部の実施形態では、第1の品質管理プライマー、第2の品質管理プライマー、又はその両方は、1種又は複数種の修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域はそれぞれ、1種又は複数種の修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、1種又は複数種の修飾ヌクレオチドは、スパーサー、脱塩基部位、非メチル化RNA塩基、2'-O-メチル化ヌクレオチド、及びそれらのあらゆる組合せを含む。一部の実施形態では、1種又は複数種の修飾ヌクレオチドのうちの少なくとも1種は、2'-O-メチル化ヌクレオチドである。一部の実施形態では、第1の品質管理プライマー、第2の品質管理プライマー、又はその両方は、1種又は複数種のポリメラーゼストッパーを含む。一部の実施形態では、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域はそれぞれ、1種又は複数種のポリメラーゼストッパーを含む。一部の実施形態では、1種又は複数種のポリメラーゼストッパーのうちの少なくとも1種は、2'-O-メチル化ヌクレオチドである。

20

一部の実施形態では、第1の品質管理プライマーの3'重複領域は、第2の品質管理プライマーの3'重複領域に相補的である。一部の実施形態では、第1の品質管理プライマーの3'重複領域は、第2の品質管理プライマーの3'重複領域に完全に相補的である。一部の実施形態では、第1の品質管理プライマーの3'重複領域及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域は、同じ長さを有する。一部の実施形態では、第1の品質管理プライマーの3'重複領域及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域の1種又は複数種は、約2〜約10ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域は、4又は5ヌクレオチド長である。

30

【0013】

キットは、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、dNTP、及び緩衝剤の1種又は複数種を含んでもよい。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号1又はその機能的断片のアミノ酸配列と少なくとも約90%又は少なくとも約95%同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含む。

一部の実施形態では、第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーは、凍結乾燥又はフリーズドライ形態である。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、dNTP、及び緩衝剤の1種又は複数種は、凍結乾燥又はフリーズドライ形態である。キットは、1種若しくは複数種の追加のプライマー及び／又は標的核酸に特異的な1種若しくは複数種のプローブを含んでもよい。

40

【0014】

本明細書に開示されるものには、反応混合物が含まれる。一部の実施形態では、反応混合物は、互いにハイブリダイズすることが可能な3'重複領域をそれぞれ含む第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーであって、第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーのそれぞれが35ヌクレオチド長以下であり、第1の品質管理プライマーがクエンチ可能な標識を含む、第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマー；標的核酸；並びに1種若しくは複数種の追加のプライマー及び／又は標的核酸に特異的な1種若しくは複数種のプローブを含む。

50

反応混合物は、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域間のハイブリダイゼーションによって形成される二重鎖を含んでもよい。反応混合物は、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、dNTP、及び緩衝剤の1種又は複数種を含んでもよい。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号1又はその機能的断片のアミノ酸配列と少なくとも約90%又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含む。

一部の実施形態では、第1の品質管理プライマーは、標的核酸にハイブリダイズすることができない。一部の実施形態では、第2の品質管理プライマーは、標的核酸にハイブリダイズすることができない。一部の実施形態では、1つ若しくは複数の追加のプライマー及び／又は1つ若しくは複数のプローブは、第1の品質管理プライマー、第2の品質管理プライマー、又はその両方にハイブリダイズすることができない。

10

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】3'重複領域で互いにハイブリダイズして二量体を形成することが可能なフォワードICプライマー（5'末端でフルオロフォアと結合する）及びリバースICプライマー（5'末端でクエンチャーと結合する）によって形成される本明細書に開示されるDIMER内部対照（DIMER-IC）の非限定的で例示的な実施形態を示す図である。

【図2】古細菌ポリメラーゼ増幅（APA）反応が、鑄型としてフォワード及びリバースICプライマーによって形成される二量体を使用して伸長された二重鎖を産生するように進行するにつれて、フォワードICプライマーと結合した蛍光が、時間と共にクエンチされる、本明細書に開示されるDIMER-IC法の非限定的で例示的な実施形態を図示する図である。

20

【図3A-3B】本明細書に記載のDIMER-IC法によって産生される逆位増幅曲線を図示する図である。図3Aは、HEXフルオロフォア（FP1+RP2は4bpの3'重複を含み、FP1+RP3は5bpの3'重複を含む）を使用する結果を図示する図である。図3Bは、Syto61挿入色素（FP1+RP2は4bpの3'重複を含み、FP1+RP3は5bpの3'重複を含む）を使用する結果を図示する図である。

【図4】フォワード及び／又はリバースICプライマーの3'重複領域中の1種又は複数種のヌクレオチドが修飾（例えば、2'-O-メチル化）を含む、非限定的で例示的な実施形態を図示する図である。

30

【図5A-5B】一部の実施形態におけるフォワード及び／又はリバースICプライマーの3'重複領域中の修飾ヌクレオチドが、どのようにして意図しないプライマー伸長を阻害することができるのかを示す図である。

【図6A-6C】フォワード及び／又はリバースICプライマーと結合したクエンチ可能な標識及びクエンチャーのための代替的な位置を示す非限定的な図である：重複領域の両外側（図6A）、重複領域の両内側（図6B）、又は一方（例えば、クエンチャー）がリバースプライマーの5'末端にあり、一方（例えば、フルオロフォア）が内部にある（図6C）。

【発明を実施するための形態】

40

【0016】

以下の詳細な説明では、本明細書の一部を形成する添付の図面が参照される。図面では、状況が別様に指示しない限り、類似の記号は典型的には類似の成分を識別する。詳細な説明、図面、及び特許請求の範囲に記載の例示的な実施形態は、限定を意味するものではない。本明細書に提示される主題の趣旨又は範囲から逸脱することなく、他の実施形態を使用することができ、他の変更をなすことができる。本明細書で一般的に説明され、図に例示されている本開示の態様は、幅広く様々な異なる構成で配置、置換、組合せ、分離、及び設計することができ、それらのすべては、本明細書において明示的に企図されており、本明細書の開示の一部をなすことが容易に理解されるだろう。

【0017】

50

本明細書で参照されている本出願のすべての優先出願、特許、公開特許出願、他の出版物、及び GenBank の配列、並びに他のデータベースは、関連技術に関してそれらの全体が参照により組み込まれる。

本明細書に開示されるものには、核酸増幅反応の進行を評価する、モニターする、観察する、及び／又は追跡するための方法、組成物、キット、及び反応混合物が含まれる。

【0018】

本明細書に開示されるものには、増幅反応の進行を評価する、モニターする、観察する、及び／又は追跡するための方法が含まれる。一部の実施形態では、方法は、(a) 互いにハイブリダイズすることが可能な 3' 重複領域をそれぞれ含む第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマーであり、第 1 の品質管理プライマーがクエンチ可能な標識を含む、第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマーを提供するステップ；(b) 第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマーを接触させることによって、第 1 及び第 2 の品質管理プライマーの 3' 重複領域間のハイブリダイゼーションによって二重鎖を形成させるステップ；(c) 二重鎖を増幅条件にかけることによって、伸長された二重鎖を生成するステップ；並びに (d) 伸長された二重鎖の生成を決定するための増幅反応の間に第 1 の品質管理プライマーのクエンチ可能な標識から生成されたシグナルであり、増幅反応の間のシグナルの低下が伸長された二重鎖の生成を示す、シグナルを検出するステップを含む。一部の実施形態では、第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマーのそれぞれは、35ヌクレオチド長以下である。

10

【0019】

本明細書に開示されるものには、増幅反応の進行を評価する、モニターする、観察する、及び／又は追跡するためのキットが含まれる。一部の実施形態では、キットは、互いにハイブリダイズすることが可能な 3' 重複領域をそれぞれ含む第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマーであって、第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマーのそれぞれが 35ヌクレオチド長以下であり、第 1 の品質管理プライマーがクエンチ可能な標識を含む、第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマーを含む。

20

本明細書に開示されるものには、反応混合物が含まれる。一部の実施形態では、反応混合物は、互いにハイブリダイズすることが可能な 3' 重複領域をそれぞれ含む第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマーであって、第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマーのそれぞれが 35ヌクレオチド長以下であり、第 1 の品質管理プライマーがクエンチ可能な標識を含む、第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマー；標的核酸；並びに 1 種若しくは複数種の追加のプライマー及び／又は標的核酸に特異的な 1 種若しくは複数種のプローブを含む。

30

【0020】

本明細書に記載の方法、組成物及びキットは、核酸増幅の進行を評価する、モニターする、観察する、及び／又は追跡するための現在利用可能な方法、組成物及びキットを超える様々な利点を有する。利点としては、限定されるものではないが、ユニバーサル IC 系について可能な、より低いオリゴヌクレオチド複雑性、プローブ又は標的鑄型に関する要件がないこと、プライマー濃度及び 3' 重複サイズによる系の直接管理（すなわち、より高い互換度）；少ない阻害効果（例えば、分子ビーコンプローブが必要とされず、したがって、ポリメラーゼ阻害が少ない）、並びに非特異的産物形成（例えば、プライマーの 2'-O-メチル（2'-OM）修飾に起因する）の可能性が低いことが挙げられる。

40

【0021】

定義

別様の定義がない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。例えば、Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor,

50

NY 1989)を参照。本開示の目的のために、以下の用語を下記に定義する。

本明細書で使用される場合、用語「プライマー」とは、目的の特定の領域で、又はその近くで（例えば、隣接して）、標的核酸にハイブリダイズ又はアニーリングすることが可能なヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドを指す。

本明細書で使用される場合、用語「クエンチ可能な標識」とは、シグナルがクエンチャーによって低下し得る、検出可能なシグナルを産生することができる分子を指す。本明細書で使用される場合、用語「クエンチャー」とは、近隣のクエンチ可能な標識、例えば、フルオロフォアによって放出される蛍光と干渉する、又はそれを吸収する分子を指してもよい。

【0022】

本明細書で使用される場合、用語「二重鎖」とは、実質的に相補的である又は完全に相補的であるポリヌクレオチド鎖間での安定な二重鎖の形成を可能にする、ワトソン・クリック塩基対合又は他のあらゆる様式のいずれかによって、互いに塩基対を形成する2種の実質的に相補的な、又は完全に相補的なポリヌクレオチド中の領域（例えば、第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域）を指す。例えば、2個の鎖のそれぞれの上の19塩基のみがワトソン・クリック塩基対合（すなわち、完全に相補的）を形成することができる場合に、21個のヌクレオチド単位を有するポリヌクレオチド鎖は、21個のヌクレオチド単位の別のポリヌクレオチド鎖と、「二重鎖」が19塩基対を有するように塩基対合することができる。残りの塩基は、例えば、5'及び3'突出部として存在してもよい。さらに、二重鎖内で、完全な（例えば、100%の）相補性は必要とされない。例えば、19塩基対からなる二重鎖におけるミスマッチは、94.7%の相補性をもたらす。一部の実施形態では、二重鎖は、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域間のハイブリダイゼーションによって形成される。一部の実施形態では、相補性は、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域中に4～5個のヌクレオチドを含む。

本明細書に提供されるものには、一部の実施形態では、リアルタイム分析物検出のために標的ヌクレオチド鑄型内の目的の領域を等温増幅するための古細菌ポリメラーゼ増幅（「APAA」）を使用することができる方法、組成物、キット、及び反応混合物が含まれる。例えば、本明細書に開示されるものには、例えば、プローブを用いない「統合型」検出形式と共に、増幅を開始させるための品質管理プライマー間の3'重複（例えば、意図的なプライマー-二量体形成）を利用する、内部対照（「IC」）アッセイとして、増幅反応をモニター又は評価するための方法が含まれる。

【0023】

本明細書に開示されるように、品質管理フォワード及びリバースプライマーは、一部の実施形態では、3'末端で相補性（例えば、少なくとも4（例えば、4～6）塩基対の重複）を含んでもよく、他の標的鑄型の非存在下でのこれらのプライマー間の指數的増幅を一貫してもたらしることができる。一部の実施形態では、この増幅の速度及びロバスト性は、3'重複領域のサイズと相関し（より長い塩基対重複は増幅速度の増大と相関する）、並びに溶液中でのこれらのプライマーの全体的濃度と相関する（より高い濃度は増幅速度の増大と相関する）。

【0024】

APAAアンプリコンは、短く、一部の実施形態では、合計長さにおいて35塩基対（35bp）以下である。これは、上記の二量体に基づく内部対照構造についても同様に当てはまる。アッセイの複雑性を低減させるために、専用の対照プローブの必要性は、本明細書に記載の一部の実施形態では有利に除去された。例えば、5'クエンチ可能な標識（例えば、フルオロフォア）で一方のプライマーをタグ付けし、5'クエンチャーで他方のプライマーをタグ付けすることにより、増幅と相関したシグナル応答（同じAPAA反応内へのDNA挿入色素の含有によって示される）を産生させた。いかなる特定の理論によっても束縛されるものではないが、DIME-IC対照アンプリコン（例えば、伸長された二重鎖）の生成は、フルオロフォア及びクエンチャーを十分近くに持って行き、蛍光出力（

したがって、観察可能な増幅応答)を低減させ得る。これは、標準的な挿入曲線応答と比較した場合、「逆」指数的な増幅曲線をもたらすことに留意されたい。

本明細書に記載の方法を使用して増幅反応をモニターするための累積システムの利点の1つは、アッセイ複雑性の低減である：シグナルは2個のプライマーのみから生成される(プローブも専用の鋳型も必要とされない)。この複雑性の低減は、品質管理プライマー及び標的-分析物アッセイが共通の反応ベッセル中で同時に増幅している場合、A P Aの性能を改善するのに役立ち得る。

【0025】

本明細書に開示される増幅反応を評価する、モニターする、観察する、及び／又は追跡するための方法、組成物、キット、及び反応混合物を、例えば、反応の増幅効率をモニターするために使用することができる。本明細書で使用される場合、用語「増幅効率」は、その通常の意味を有するものとし、また、核酸を合成するための増幅反応の能力の決定も指す。増幅阻害剤の存在、不足している又は欠陥のある増幅反応成分、ヌクレアーゼの夾雑、及び欠陥のある装置は、増幅効率の低下の原因の非限定例を含み、本明細書に開示される方法、組成物、キット及び反応混合物によって検出することができる。一部の実施形態では、本明細書に提供される方法、組成物、キット及び反応混合物を、定量化のために使用することができ、例えば、伸長された二重鎖の産生を、リアルタイム定量的PCR又は等温増幅適用における定量標準として使用することができる。

【0026】

品質管理プライマー

本明細書に提供されるものには、品質管理プライマー(「内部対照プライマー」又は「ICプライマー」とも呼ばれる)が含まれる。例えば、一对の品質管理プライマーは、互いにハイブリダイズすることが可能な3'重複領域をそれぞれ含む第1の品質管理プライマー(例えば、フォワードプライマー)及び第2の品質管理プライマー(例えば、リバースプライマー)を含んでもよい。本明細書に記載される場合、第1の品質管理プライマーは、フォワードプライマー又はリバースプライマーであってよく、同様に、第2の品質管理プライマーは、フォワードプライマー又はリバースプライマーであってもよい。プライマー対において、第1の品質管理プライマーがフォワードプライマーである場合、第2の品質管理プライマーはリバースプライマーであり、その逆も同様である。品質管理プライマーの長さは変化してもよく、例えば、品質管理プライマーは、35ヌクレオチド長以下であってよい。一部の実施形態では、品質管理プライマー(例えば、フォワードプライマー)は、クエンチ可能な標識を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法、組成物、キット、及び反応混合物は、互いにハイブリダイズすることが可能な3'重複領域をそれぞれ含む第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーであって、第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーのそれぞれが35ヌクレオチド長以下であり、第1の品質管理プライマーがクエンチ可能な標識を含む、第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーを提供することを含む。

【0027】

クエンチ可能な標識は、例えば、フルオロフォアであってもよい。本明細書で使用される場合、用語「フルオロフォア」は、その通常の意味を与えられるものとし、また、その光放出特性によって存在を検出することができるあらゆるリポーター基も指す。フルオロフォアの非限定例としては、Cy2(商標)(506)、YO-PRO(商標)-1(509)、YOYO(商標)-1(509)、カルセイン(517)、FITC(518)、FluorX(商標)(519)、Alexa(商標)(520)、ローダミン110(520)、Oregon Green(商標)500(522)、Oregon Green(商標)488(524)、RiboGreen(商標)(525)、Rhodamine Green(商標)(533)、ローダミン123(529)、Magnesium Green(商標)(531)、Calcium Green(商標)(533)、TO-PRO(商標)-1(533)、TOTO1(533)、JOE(548)、BODIPY530/550(550)、Dil(565)、BODIPY TMR(5

68)、BODIPY558/568(568)、BODIPY564/570(570)、Cy3(商標)(570)、Alexa(商標)546(570)、TRITC(572)、Magnesium Orange(商標)(575)、フィコエリトリンR&B(575)、ローダミンファロイジン(575)、Calcium Orange(商標)(576)、パイロニンY(580)、ローダミンB(580)、TAMRA(582)、Rhodamine Red(商標)(590)、Cy3.5(商標)(596)、ROX(608)、Calcium Crimson(商標)(615)、Alexa(商標)594(615)、Texas Red(615)、ナイルレッド(628)、YO-PRO(商標)-3(631)、YOYO(商標)-3(631)、R-フィコシアニン(642)、C-フィコシアニン(648)、TO-PRO(商標)-3(660)、TOTO3(660)、DiD DilC(5)(665)、Cy5(商標)(670)、チアジカルボシアニン(671)、Cy5.5(694)、HEX(556)、TET(536)、バイオサーチブルー(447)、CAL Fluor Gold 540(544)、CAL Fluor Orange 560(559)、CAL Fluor Red 590(591)、CAL Fluor Red 610(610)、CAL Fluor Red 635(637)、FAM(520)、フルオレセイン(520)、フルオレセイン-C3(520)、Pulsar 650(566)、Quasar 570(667)、Quasar 670(705)及びQuasar 705(610)が挙げられる(括弧内の数値は、応答するフルオロフォアのナノメートルでの最大放出波長である)。一部の実施形態では、フルオロフォアはCy5(商標)である。一部の実施形態では、フルオロフォアはヘキサクロロフルオレセイン(HEX)である。

10

20

【0028】

異なる実施形態では、品質管理プライマー中のクエンチ可能な標識の位置は変化してもよい。例えば、クエンチ可能な標識は、品質管理プライマー(例えば、第1の品質管理プライマー)の3'重複領域の外側にあってもよい。一部の実施形態では、クエンチ可能な標識は、品質管理プライマーの5'末端にある。一部の実施形態では、クエンチ可能な標識は、品質管理プライマーの3'重複領域中にある。

【0029】

第2の品質管理プライマーは、クエンチャーを含んでもよい。クエンチングは、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)によって媒介され得る。FRETは、ドナー(例えば、フルオロフォア)及びアクセプター(例えば、クエンチャー)の遷移双極子間の古典的な双極子-双極子相互作用に基づくものであり、ドナー-アクセプター距離に依存する。FRETは、典型的には、100 Åまでの距離にわたって起こり得る。FRETはまた、ドナー-アクセプターのスペクトル重複並びにドナー及びアクセプターの遷移双極子モーメントの相対的配向に依存する。フルオロフォアのクエンチングは、フルオロフォアと別のフルオロフォア又は非蛍光分子との間の非蛍光複合体の形成の結果としても起こり得る。この機構は、「接触クエンチング」、「静的クエンチング」又は「基底状態複合体形成」として知られる。いかなる特定の理論によっても束縛されるものではないが、クエンチャー部分は、蛍光の検出可能な変化を観察するために本明細書に開示される方法の一部の実施形態では必要とされず、近接塩基クエンチング効果は、核酸増幅反応の評価、モニタリング、観察、及び/又は追跡を可能にする蛍光の検出可能なシフトをもたらすのに十分なものであると考えられる。クエンチャー部分は、本明細書に開示される一部の実施形態では、蛍光クエンチングを惹起するのに必要とされない。例えば、蛍光クエンチングは、アンブリコン形成時に、相補的グアニンヌクレオチドがフルオロフォア標識されたC塩基と正反対に組み込まれ、したがって、「近接G塩基」クエンチングによって蛍光シグナルをクエンチングするように、フルオロフォアを、品質管理プライマー(例えば、第1の品質管理プライマー)中のシトシンヌクレオチド(例えば、5'シトシン)に結合させることによって達成され得る。

30

40

【0030】

クエンチャーの例としては、限定されるものではないが、Iowa Black FQ

50

、I o w a B l a c k R Q、B l a c k H o l e Q u e n c h e r - 1 (B H Q - 1)、B l a c k H o l e Q u e n c h e r - 2 (B H Q - 2)、T M R、Q S Y - 7、及びD a b c y lが挙げられる。品質管理プライマー中のクエンチャーの位置は変化してもよい。例えば、クエンチャーは、品質管理プライマー（例えば、第2の品質管理プライマー）の3'重複領域の外側にあってもよい。一部の実施形態では、クエンチャーは、品質管理プライマーの5'末端にある。一部の実施形態では、クエンチャーは、品質管理プライマーの3'重複領域中にある。

【0031】

品質管理プライマー（例えば、第1及び第2の品質管理プライマー）の長さは、例えば、約8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100ヌクレオチド、又はこれらの値のいずれか2つの間の数値若しくは範囲を含む、約5～約100ヌクレオチドで変化してもよい。一部の実施形態では、第1及び第2の品質管理プライマーはそれぞれ、10～約50ヌクレオチド、例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は50ヌクレオチドの長さを有する。一部の実施形態では、第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーのそれぞれは、35ヌクレオチド長以下である。

10

【0032】

修飾

品質管理プライマーは、修飾ヌクレオチドを含んでもよい、又はそれからなってもよい。第1の品質管理プライマー、第2の品質管理プライマー、又はその両方は、1種又は複数種の修飾ヌクレオチドを含んでもよい。例えば、第1の品質管理プライマーの3'重複領域、第2の品質管理プライマーの3'重複領域、又はその両方は、1種又は複数種の修飾ヌクレオチドを含んでもよい。修飾の位置は、異なる実施形態では異なってもよい。一部の実施形態では、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域はそれぞれ、1種又は複数種の修飾ヌクレオチドを含む。

20

【0033】

ヌクレオチド（又は塩基）は、本明細書に記載の、又は当技術分野で公知のあらゆる修飾に従って修飾されていてもよい。修飾は、プライマー合成の間に作製されたものを含んでもよい、及び／又は合成後修飾を含んでもよい。修飾は、内部修飾、品質管理プライマーの3'末端領域での修飾、及び／又は品質管理プライマーの5'末端領域での修飾を含んでもよい。一部の実施形態では、品質管理プライマーは、修飾ヌクレオチド及び未修飾ヌクレオチドの混合物を含む。一部の実施形態では、品質管理プライマーは、未修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、品質管理プライマーは、修飾ヌクレオチドから本質的になる、又はそれらからなる。

30

【0034】

修飾及び修飾塩基は、例えば、リン酸化（例えば、3'リン酸化、5'リン酸化）；付着化学又はリンカー修飾（例えば、A c r y d i t e（商標）、アデニル化、アジド（N H Sエステル）、ジゴキシゲニン（N H Sエステル）、コレステリル- T E G、I - L i n k e r（商標）、アミノ修飾因子（例えば、アミノ修飾因子C6、アミノ修飾因子C12、アミノ修飾因子C6 d T、U n i - L i n k（商標）アミノ修飾因子）、アルキン（例えば、5'ヘキシニル、5-オクタジイニル d U）、ビオチン化（例えば、ビオチン、ビオチン（アジド）、ビオチン d T、ビオチン- T E G、デュアルビオチン、P Cビオチン、デスチオビオチン- T E G）、チオール修飾（例えば、チオール修飾因子C3 S - S、ジチオール、チオール修飾因子C6 S - S）；スペーサー（C3スペーサー、P Cスペーサー、ヘキサンジオール、スペーサー9、スペーサー18、1'、2'-ジデオキシリボース（d S p a c e r）；修飾塩基（例えば、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン（2-アミノ-d A）、5-ブロモ d U、デオキシウリジン、逆位 d T、逆位ジデオキ

40

50

シー T、ジデオキシシー C、5-メチル d C、デオキシイノシン、Super T（登録商標）、Super G（登録商標）、ロックド核酸（LNA）、5-ニトロインドール、2'-O-メチル RNA 塩基、ヒドロキシメチル d C、UNA アンロックド核酸（例えば、UNA-A、UNA-U、UNA-C、UNA-G）、Iso-d C、Iso-d G、フルオロ C、フルオロ U、フルオロ A、フルオロ G）；ホスホロチオエート結合修飾（例えば、ホスホロチオエート化 DNA 塩基、ホスホロチオエート化 RNA 塩基、ホスホロチオエート化 2'-O-メチル塩基、ホスホロチオエート化 LNA 塩基）；及びクリック化学修飾を含んでもよい。一部の実施形態では、修飾及び修飾塩基は、ウラシル塩基、リボヌクレオチド塩基、O-メチル RNA 塩基、ホスホロチオエート結合、3'リン酸基、スパーサー塩基（例えば、C3 スパーサー又は他のスパーサー塩基）を含む。1 種又は複数種の修飾ヌクレオチドは、スパーサー、脱塩基部位、非メチル化 RNA 塩基、2'-O-メチル化ヌクレオチド、及びそれらのあらゆる組合せを含んでもよい。

10

【0035】

2'-O-メチル RNA 塩基を含むプライマーを、直接合成することができる。2'-O-メチル RNA 塩基をプライマーに含めて、例えば、DNA ポリメラーゼによる読取りを阻害することができる。一部の実施形態では、品質管理プライマーは、1 つ又は複数のホスホロチオエート（PS）結合（例えば、ホスホロチオエート結合修飾）を含む。PS 結合は、プライマーのリン酸骨格の非架橋酸素を硫黄原子に置換する。この置換は、典型的には、ヌクレオチド間結合をヌクレアーゼ分解に対して耐性にする。ホスホロチオエート結合を、品質管理プライマーの 5' 末端又は 3' 末端の最後の約 3~5 ヌクレオチドの間に導入して、例えば、エキソヌクレアーゼ分解を阻害することができる。一部の実施形態では、プライマー全体にわたって含まれるホスホロチオエート結合は、エンドヌクレアーゼによる攻撃の低減を支援することができる。品質管理プライマーは、例えば、3'リン酸基を含んでもよい。3'リン酸化は、ある特定の 3'-エキソヌクレアーゼによる分解を阻害することができ、ある特定の場では、DNA ポリメラーゼによる伸長を阻止するために使用することができる。一部の実施形態では、品質管理プライマーは、1 つ又は複数のスパーサー塩基（例えば、1 つ又は複数の C3 スパーサー）を含む。C3 スパーサーホスホラミダイトを、プライマーの内部又は 5' 末端に組み込むことができる。複数の C3 スパーサーをプライマーのいずれかの末端に付加して、例えば、フルオロフォア又は他のペンダント基を付着させるための長鎖親水性スパーサーアームを導入することができる。一部の実施形態では、1 種又は複数種の修飾ヌクレオチドのうちの少なくとも 1 種は、C3 スパーサー、ヘキサンジオール、d Spacer、PC スパーサー、スパーサー 9、スパーサー 18、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、ジデオキシシチジン、逆位 d T、Iso-d G、Iso-d C、逆位ジデオキシシー T、及び 5-ニトロインドールである。1 種又は複数種の修飾ヌクレオチドのうちの少なくとも 1 種は、2'-O-メチル化ヌクレオチドであってよい。一部の実施形態では、2'-O-メチル化ヌクレオチドは、2'-O-メチルウリジン、2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチルシチジン、及び 2'-O-メチルグアノシン水和物のうちの 1 種又は複数種を含む。図 4~図 5 B に示されるように、第 1 及び第 2 の品質管理プライマーの 3' 重複領域中のヌクレオチド修飾は、一部の実施形態では、IC プライマーとランダムオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの結果としての意図しないプライマー伸長を阻害することができる。

20

30

40

【0036】

品質管理プライマー（例えば、第 1 の品質管理プライマー及び／又は第 2 の品質管理プライマー）は、1 種又は複数種のポリメラーゼストッパーを含んでもよい。第 1 及び第 2 の品質管理プライマーの 3' 重複領域はそれぞれ、1 種又は複数種のポリメラーゼストッパーを含んでもよい。本明細書で使用される場合、「ポリメラーゼストッパー」は、ポリマー化を終結させるか、又は阻害することができる分子（例えば、修飾ヌクレオチド）である。一部の実施形態では、1 種又は複数種のポリメラーゼストッパーのうちの少なくとも 1 種は、2'-O-メチル化ヌクレオチドである。2'-O-メチル化ヌクレオチドの非限定例としては、2'-O-メチルウリジン、2'-O-メチルアデノシン、2'-O-メチ

50

ルシチジン、及び 2'-O-メチルグアノシンが挙げられる。

【0037】

品質管理プライマー重複、二重鎖、及び伸長された二重鎖

一部の実施形態では、本明細書に提供される方法、組成物、反応混合物、及びキットは、互いにハイブリダイズすることが可能な 3' 重複領域をそれぞれ含む第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマーを含む。一部の実施形態では、第 1 の品質管理プライマーの 3' 重複領域は、第 2 の品質管理プライマーの 3' 重複領域に相補的である。第 1 の品質管理プライマーの 3' 重複領域は、第 2 の品質管理プライマーの 3' 重複領域に完全に相補的であってよい。

【0038】

配列に関する相補性は一般に、互いにハイブリダイズすることになるヌクレオチド配列を指す。本明細書で使用される場合、用語「アニーリングする」又は「ハイブリダイズする」とは、2つの分子間の安定複合体の形成を指してもよい。ハイブリダイゼーション条件のストリンジエンシーを変更して、様々な量の配列ミスマッチを許容することができる。一部の実施形態では、第 1 及び第 2 の品質管理プライマーの 3' 重複領域は、互いに少なくとも 75% 相補的である。例えば、第 1 及び第 2 の品質管理プライマーの 3' 重複領域は、互いに少なくとも 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% 相補的であってよい、又は相補的である。

【0039】

完全に相補的とは一般に、例えば、各塩基が順番に（例えば、5' から 3' へと読んで）第 2 の鎖の対応する順番の塩基と対合する第 1 の鎖のヌクレオチド配列を指し、完全に相補的であるとみなされる配列内には、ギャップも、追加の配列も、非対合塩基も存在しない。本明細書で使用される場合、完全に相補的とは、第 1 の鎖の（例えば、第 1 の品質管理プライマーの 3' 重複領域中の）ヌクレオチド配列のすべての連続塩基が、第 2 の鎖の（例えば、第 2 の品質管理プライマーの 3' 重複領域中の）ヌクレオチド配列の対応する連続塩基と相補的であることを指す。完全に相補的な配列は、約 5 ～ 約 25 連続塩基長、例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は 25 連続塩基長であってよい。一部の実施形態では、第 1 の品質管理プライマーの 3' 重複領域及び第 2 の品質管理プライマーの 3' 重複領域は、同じ長さを有する。一部の実施形態では、第 1 の品質管理プライマーの 3' 重複領域、第 2 の品質管理プライマーの 3' 重複領域、又はその両方は、2 ～ 約 10 ヌクレオチド長（例えば、約 2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 ヌクレオチド長）である。第 1 及び第 2 の品質管理プライマーの 3' 重複領域は、例えば、4 又は 5 ヌクレオチド長であってよい。

【0040】

一部の実施形態では、方法は、第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマーを接触させ、それにより、第 1 及び第 2 の品質管理プライマーの 3' 重複領域間のハイブリダイゼーションにより二重鎖を形成させるステップ；二重鎖を増幅条件にかけ、それにより、伸長された二重鎖を生成するステップ；並びに第 1 の品質管理プライマー及び第 2 の品質管理プライマーの接触を増幅条件下で実行するステップのうちの 1 つ又は複数を含む。

【0041】

本明細書に記載されるように、品質管理プライマーを、核酸増幅反応を評価する、モニターする、観察する、及び／又は追跡するための本明細書に開示される方法、組成物、キット及び反応混合物において使用することができる。核酸増幅反応は、鋳型としての標的核酸及び標的核酸に特異的な 1 種又は複数種のプライマーを含む 1 種又は複数種の増幅反応であってもよい、又はそれを含んでもよい。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法（例えば、二重鎖を増幅条件にかけるステップにおける）は、標的核酸及び 1 種

10

20

30

40

50

若しくは複数種の追加のプライマー及び／又は標的核酸に特異的な1種若しくは複数種のプローブを増幅条件にかけるとを含む。一部の実施形態では、第1の品質管理プライマー、第2の品質管理プライマー、又はその両方は、増幅条件下で標的核酸にハイブリダイズしないことが有利である。一部の実施形態では、方法は、第1の品質管理プライマー、第2の品質管理プライマー、又はその両方にハイブリダイズすることが可能な核酸（例えば、鋳型核酸）を使用することを含まない。例えば、方法は、一部の実施形態では、第1の管理プライマー、第2の管理プライマー、又はその両方に実質的に相補的又は完全に相補的である鋳型核酸を使用することを含まない。一部の実施形態では、第1及び第2の品質管理プライマーは、標的核酸に相補的ではなく、標的核酸配列に由来する増幅反応をプライミングすることができないことが有利である。一部の実施形態では、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域は、標的核酸に相補的ではない。一部の実施形態では、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域は、標的核酸に完全に相補的ではない。例えば、第1及び第2の品質管理プライマーは、標的核酸配列に対する2、3、4、又は5個以下の相補的ヌクレオチドを含んでもよい。

10

【0042】

核酸増幅

本明細書に開示されるものには、増幅反応を評価する、モニターする、観察する、及び／又は追跡するための方法が含まれる。方法は、(a)互いにハイブリダイズすることが可能な3'重複領域をそれぞれ含む第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーであって、第1の品質管理プライマーがクエンチ可能な標識を含む、第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーを提供するステップ；(b)第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーを接触させ、それにより、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域間のハイブリダイゼーションにより二重鎖を形成させるステップを含んでもよい。一部の実施形態では、方法は、二重鎖を増幅条件にかけ、それにより伸長された二重鎖を生成するステップを含む。一部の実施形態では、第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーのそれぞれは、35ヌクレオチド長以下である。

20

【0043】

本明細書に開示されるものには、核酸増幅の反応混合物が含まれる。一部の実施形態では、反応混合物は、互いにハイブリダイズすることが可能な3'重複領域をそれぞれ含む第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーであって、第1の品質管理プライマーがクエンチ可能な標識を含む、第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマー；標的核酸；並びに1種若しくは複数種の追加のプライマー及び／又は標的核酸に特異的な1種若しくは複数種のプローブを含む。本明細書で使用される場合、標的核酸に特異的なプライマー又はプローブは、標的核酸又はその相補体若しくは逆相補体の少なくとも一部に相補的又は完全に相補的であるプライマー又はプローブである。一部の実施形態では、第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーのそれぞれは、35ヌクレオチド長以下である。反応混合物は、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域間のハイブリダイゼーションによって形成される二重鎖を含んでもよい。反応混合物は、DNAポリメラーゼ活性を有する酵素（例えば、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素）、dNTP、及び緩衝剤の1種又は複数種を含んでもよい。一部の実施形態では、反応混合物は、逆転写酵素を含む。超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号1又はその機能的断片のアミノ酸配列と少なくとも約90%又は少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有してもよい。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含む、又はそれからなる。一部の実施形態では、第1の品質管理プライマー、第2の品質管理プライマー、又はその両方は、標的核酸にハイブリダイズすることができない。一部の実施形態では、1つ若しくは複数の追加のプライマー及び／又は1つ若しくは複数のプローブは、第1の品質管理プライマー、第2の品質管理プライマー、又はその両方にハイブリダイズすることができない。

30

40

【0044】

本明細書で使用される場合、核酸増幅とは、配列特異的方法を使用して標的核酸配列又

50

はその相補体若しくは断片の複数コピーを取得するためのあらゆる公知の手順を指してもよい。核酸増幅の例としては、限定されるものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、古細菌ポリメラーゼ増幅（APAA）、ループ媒介性等温増幅（LAMP）、鎖置換増幅（SDA）（例えば、多置換増幅（MDA））、レプリカーゼ媒介性増幅、免疫増幅、核酸配列ベース増幅（NASBA）、自家持続配列複製（3SR）、ローリングサークル増幅（RCA）、ヘリカーゼ依存性増幅（HDA）、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）、ニックング酵素増幅反応（NEAR）、ラミフィケーション（RAM）、環状ヘリカーゼ依存性増幅（cHDA）、単一プライマー等温増幅（SPIA）、シグナル媒介性RNA増幅技術（SMART）、ゲノム指数関数的増幅反応（GEAR）及び等温多置換増幅（IMDA）、並びに転写媒介性増幅（TMA）が挙げられる。一部の実施形態では、上記核酸増幅法の2種又はそれより多くを、連続的に実施することができる。用語「等温増幅反応」は、その通常の意味が与えられるものとし、また、温度が反応中に有意に変化しない反応を含むものとする。一部の実施形態では、等温増幅反応の温度は、増幅が起こる主な酵素反応ステップの間に、10℃より大きく、例えば、5℃以下及び2℃以下で逸脱しない。核酸の等温増幅の方法に応じて、異なる酵素を増幅に使用することができる。例示的な等温増幅組成物及び方法は、WO 2017/176404に記載されており、その内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0045】

増幅反応は、リアルタイム増幅反応、例えば、リアルタイムPCR反応であってもよい。PCRは、標的配列にフランキングする2種又はそれより多い拡張可能な配列特異的オリゴヌクレオチドプライマーを使用する標的配列（例えば、標的核酸）の増幅を含む。目的の標的配列を含有する核酸は、標的配列の増幅をもたらす、プライマー、熱安定性DNAポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼ）及び種々のdNTPの存在下での複数ラウンドの温度サイクル（変性、アニーリング及び伸長）のプログラムにかけられる。PCRは、DNA分子の規定の領域の相補鎖が熱安定性DNAポリメラーゼによって同時に合成される複数ラウンドのプライマー伸長反応を使用する。各サイクルの終わりに、それぞれの新しく合成されたDNA分子は、次のサイクルのための鋳型として作用する。反復ラウンドのこれらの反応の間に、新しく合成されたDNA鎖の数は指数的に増加し、例えば、20～30回の反応サイクルの後、初期の鋳型DNAは数千倍又は数百万倍に複製されている。PCRは、増幅後のプロセッシングにとって好適な二本鎖増幅産物を生成することができる。増幅産物を、例えば、アガロースゲル電気泳動を用いた可視化、プローブに基づく比色検出を使用する酵素免疫アッセイ形式、蛍光放出技法、又は当業者には公知の他の検出手段によって検出することができる。PCR法の例としては、限定されるものではないが、リアルタイムPCR、エンドポイントPCR、増幅断片長多型PCR（AFLP-PCR）、Alu-PCR、非対称性PCR、コロニーPCR、DD-PCR、縮重PCR、ホットスタートPCR、インサイチュールPCR、逆位PCR、ロングPCR、多重PCR、ネステッドPCR、PCR-ELISA、PCR-RFLP、PCR一本鎖コンフォメーション多型（PCR-SSCP）、定量的競合的PCR（QC-PCR）、cDNA末端の急速増幅-PCR（RACE-PCR）、多型DNAのランダム増幅-PCR（RAPD-PCR）、リアルタイムPCR、反復性遺伝子外パンドローム-PCR（Rep-PCR）、逆転写酵素PCR（RT-PCR）、TAIL-PCR、タッチダウンPCR及びベクトレットPCRが挙げられる。

20

30

40

【0046】

定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（QRT-PCR）とも呼ばれる、リアルタイムPCRを使用して、所与の核酸分子の特定の部分を同時に定量化及び増幅することができる。それを使用して、特定の配列が試料中に存在するかどうか、それが存在する場合、存在する配列のコピー数を決定することができる。用語「リアルタイム」とは、PCRの間の定期的モニタリングを指してもよい。ABI 7700及び7900HT Sequence Detection Systems（Applied Biosystem

50

s、Foster City、Calif.）などのある特定のシステムは、所定のポイント又はユーザーにより定義されたポイントでそれぞれの熱サイクルの間にモニタリングを行う。蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）プローブを用いたPCRのリアルタイム分析は、サイクル間の蛍光色素シグナルの変化を測定する。リアルタイム手順は、PCRの一般的なパターンに従うが、核酸は増幅の各ラウンドの後に定量化される。定量化方法の2種の例は、dsDNA中に挿入する蛍光色素（例えば、SYBR Green）の使用、及び相補的DNAとハイブリダイズした場合に蛍光を発する修飾DNAオリゴヌクレオチドプローブの使用である。挿入剤は、未結合の場合は比較的低い蛍光を有し、二本鎖核酸に結合する際には比較的高い蛍光を有する。そのため、挿入剤を使用して、核酸増幅反応の間の二本鎖核酸の蓄積をモニターすることができる。本明細書に開示される実施形態において有用なそのような非特異的色素の例としては、SYBR Green I（Thermo Fisher）、ヨウ化プロピジウム、臭化エチジウムなどの挿入剤が挙げられる。

10

【0047】

「増幅する」、「増幅」、「増幅反応」、又は「増幅すること」という用語は、標的核酸のコピーを増殖させるためのあらゆるin vitroプロセスを指す。増幅は、標的核酸の指数関数的増加を指すこともある。しかしながら、「増幅すること」は、標的核酸の数の線形増加を指すこともできるが、1回限りの単一プライマー伸長ステップとは異なる。一部の実施形態では、前増幅としても知られている限定的増幅反応を実施することができる。前増幅とは、少数回のサイクル、例えば10サイクルが実施されるため、限定的な量の増幅が生じる方法である。前増幅は、ある程度の増幅を可能にするが、指数関数期の前に増幅を停止させ、典型的には、所望のヌクレオチド配列の約500コピーを産生させる。前増幅を使用すると、ある特定の増幅反応における反応物の枯渇に関連する不正確性を制限することができ、標的のヌクレオチド配列又は種存在量による増幅の偏りを低減させることもできる。一部の実施形態では、1回限りのプライマー伸長は、線形増幅又は指数関数的増幅の前段階として実施される。

20

【0048】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、プライマー及びその対応する標的核酸を接触させると、相補的配列は、互いにアニーリング又はハイブリダイズする。プライマーは、目的の配列又はその付近（例えば、隣接する、当接するなど）の標的核酸にアニーリングすることができる。標的にアニーリングしたプライマーは、プライマー-標的ハイブリッド、ハイブリダイズしたプライマー-標的、又はプライマー-標的二重鎖と呼ばれる場合がある。目的のヌクレオチド配列を参照する場合の「付近」又は「隣接」という用語は、プライマーの末端と標的の1つ又は複数のヌクレオチド（例えば、ヌクレオチド配列）との間の距離（例えば、塩基数）又は領域を指す。一般に、隣接は、目的のヌクレオチド又はヌクレオチド配列から約1ヌクレオチド～約50ヌクレオチドの範囲、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド、又はこれらの値のいずれか2つの間の数値若しくは範囲である。一部の実施形態では、1セットのプライマー（例えば、1対のプライマー、フォワードプライマー及びリバースプライマー、第1のオリゴヌクレオチド及び第2のオリゴヌクレオチド）は、目的のヌクレオチド又はヌクレオチド配列から約1～20ヌクレオチド以内にアニーリングし、増幅産物を産生させる。一部の実施形態では、プライマーは、目的のヌクレオチド又はヌクレオチド配列内にアニーリングする。アニーリングした後、各プライマーは、ポリメラーゼにより標的（つまり、鋳型鎖）に沿って伸長され、相補鎖が生成される。例えば、検出可能な量の増幅産物が生成されるまで、プライマーアニーリング及び伸長の数回のサイクルを実施することができる。一部の実施形態では、標的核酸がRNAである場合、標的RNAのDNAコピー（cDNA）は、逆転写により、増幅ステップの前又は増幅ステップ中に合成される。本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、品質管理プライマーは接触され、ハイブリダイズして二重鎖を形成する。品質管理プライマーのそれぞれは、核酸伸長反応のための鋳型並びにプライマーとして働くことができる。

30

40

50

【0049】

増幅反応の成分は、例えば、1種又は複数種のプライマー（例えば、個々のプライマー、プライマー対、プライマーセット、オリゴヌクレオチド、及びマルチプレックス増幅のための複数種のプライマーセットなどを含む品質管理プライマー、追加のプライマー及び／又はプローブ）、核酸標的（例えば、試料に由来する標的核酸）、1種又は複数種のポリメラーゼ、ヌクレオチド（例えば、dNTPなど）、及び好適な緩衝液（例えば、デタージェント、還元剤、一価イオン、及び二価イオンを含む緩衝液）を含んでもよい。増幅反応は、逆転写酵素及び／又は逆転写プライマーをさらに含んでもよい。増幅反応は、本明細書に記載の検出剤の1種又は複数種などの、1種又は複数種の検出剤をさらに含んでもよい。一部の実施形態では、1種又は複数種の増幅試薬は、プライマー、標的核酸、ポリメラーゼ、ヌクレオチド、及び好適な緩衝液、並びに任意に、検出剤を含む、それらからなる、又はそれらから本質的になる。一部の実施形態では、1種又は複数種の増幅試薬は、プライマー、標的核酸、ポリメラーゼ、逆転写酵素、逆転写プライマー、ヌクレオチド、及び好適な緩衝液、並びに任意に、検出剤及び／又は逆転写プライマーを含む、それらからなる、又はそれらから本質的になる。増幅に対する有意な効果を有しない、及び／又は検出可能な産物を生成するのに必要ではない追加の成分又は特徴が含まれていてもよい。例えば、等温条件下で増幅を達成し、約20、15若しくは10分又はそれより短い時間内に検出可能な増幅産物を生成する本明細書の成分及び条件の能力に対する有意な効果を有しない追加の成分又は特徴が含まれていてもよい。そのような追加の成分又は特徴は、非必須成分と称することができ、典型的な反応成分及び／又は塩、緩衝液、デタージェント、イオン、油、タンパク質、ポリマーなどの一般的な添加剤を含んでもよい。

10

20

【0050】

核酸増幅を、天然ヌクレオチド、例えば、dNTP、及び／又は誘導体化ヌクレオチドの存在下で実施することができる。天然ヌクレオチドは、一般に、アデニル酸、グアニル酸、シチジル酸、チミジル酸、又はウリジル酸を指す。誘導体化ヌクレオチドは、一般に、天然ヌクレオチド以外のヌクレオチドである。ヌクレオチドは、典型的には、以下のように指定される。リボヌクレオシド三リン酸は、NTP又はrNTPと呼ばれ、Nは、A、G、C、Uであってもよい。デオキシヌクレオシド三リン酸基質はdNTPと呼ばれ、NはA、G、C、T、又はUであってもよい。単量体ヌクレオチドサブユニットは、本明細書では、DNA又はRNAに特に言及することなく、A、G、C、T、又はUとして表記される場合がある。一部の実施形態では、検出可能な標識（例えば、蛍光標識又は比色標識）を含む類似体などの、天然に存在しないヌクレオチド又はヌクレオチド類似体を使用することができる。例えば、核酸増幅は、標識dNTP、例えば、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{125}I 、若しくは ^{35}S などの放射性標識；アルカリホスファターゼなどの酵素標識；フルオレセインイソチオシアネート（FITC）などの蛍光標識；又はビオチン、アビジン、ジゴキシゲニン、抗原、ハプテン、若しくは蛍光色素などの他の標識の存在下で実施することができる。一部の実施形態では、核酸増幅は、修飾dNTP、例えば、熱活性化dNTP（例えば、Trilink社からのCleanAmp（商標）dNTP）の存在下で実施される。

30

【0051】

1種又は複数種の増幅試薬は、非酵素成分及び酵素成分を含んでもよい。非酵素成分としては、例えば、プライマー、ヌクレオチド、緩衝液、塩、還元剤、デタージェント、及びイオンを挙げることができる；一般的には、タンパク質（例えば、核酸結合タンパク質）、酵素、又は酵素活性を有するタンパク質、例えば、ポリメラーゼ、逆転写酵素、ヘリカーゼ、トポイソメラーゼ、リガーゼ、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、ニックング酵素、及びリコンビナーゼなどを含まない。酵素成分は、一部の実施形態では、他のタンパク質（例えば、核酸結合タンパク質及び／又は酵素活性を有するタンパク質）、例えば、ヘリカーゼ、トポイソメラーゼ、リガーゼ、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、ニックング酵素、リコンビナーゼなどを除外する。増幅条件は、酵素活性、例えば、ポリメラーゼにより提供される酵素活性を含んでもよい。

40

50

一部の実施形態では、酵素活性は、ポリメラーゼ及び逆転写酵素により提供される。一部の実施形態では、酵素活性は、他の酵素、例えば、ヘリカーゼ、トポイソメラーゼ、リガーゼ、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、ニックング酵素、リコンビナーゼなどにより提供される酵素活性を含まない。ポリメラーゼ活性及び逆転写酵素活性は、別々の酵素若しくは別々の酵素タイプ（例えば、ポリメラーゼ及び逆転写酵素）により提供してもよく、又は単一の酵素若しくは酵素タイプ（例えば、ポリメラーゼ）により提供してもよい。

【0052】

従来の核酸増幅法は、典型的には、熱サイクルプロセス、核酸変性、鎖解巻、鎖分離、及び／若しくは鎖交換を促進するタンパク質（例えば、酵素）（例えば、ヘリカーゼ、リコンビナーゼ）、並びに／又はエンドヌクレアーゼ剤（例えば、制限酵素、ニックング酵素）を必要とし、最低でも20～30分間の反応時間を必要とすることが多い。本明細書で提供される核酸増幅法は、熱サイクルをせずに、試料核酸の熱変性及び／若しくは酵素変性をせずに、鎖解巻、鎖分離、及び／若しくは鎖交換を促進するタンパク質（例えば、酵素）を添加せずに、エンドヌクレアーゼ剤を用いずに、並びに／又は約10～15分以内の反応時間で実施することができる。本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、増幅反応は、等温増幅反応である。一部の実施形態では、核酸の増幅は、非熱サイクルタイプのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を含む。一部の実施形態では、核酸の増幅は、等温増幅プロセスを含む。一部の実施形態では、核酸の増幅は、等温ポリメラーゼ連鎖反応（iPCR）を含む。

【0053】

等温増幅条件は、一般に、増幅プロセスに熱サイクル（つまり、上限温度と下限温度との間のサイクル）成分を含まず、したがって、等温増幅反応の間に、温度は、反応中に有意に変化しない（例えば、反応中に本質的に同じ温度を保持する）。例えば、等温増幅反応の温度は、増幅が起こる主な酵素反応ステップの間に、10℃より大きく、例えば、5℃以下及び2℃以下で逸脱しなくてもよい。等温増幅の方法に応じて、異なる酵素を増幅のために使用することができる。核酸増幅は、典型的には、増幅されているヌクレオチド配列に相補的な配列を含む核酸アンプリコン（コピー）の酵素的合成を含む。増幅方法を、例えば、単一のベッセル、単一のチャンバー、及び／又は単一の容積（つまり、連続容積）で実施することができる。一部の実施形態では、増幅及び検出（例えば、本明細書に記載の検出ステップ／方法）は、単一のベッセル、単一のチャンバー、及び／又は単一の容積（つまり、連続容積）で実施される（例えば、同時に）。増幅条件は、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、dNTP、及び緩衝剤の1種又は複数種を含んでもよい。超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号1又はその機能的断片のアミノ酸配列と少なくとも約90％又は少なくとも約95％同一であるアミノ酸配列を有してもよい。超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含んでもよい。

【0054】

等温増幅反応を、本質的に一定の温度で行うことができる。一部の実施形態では、増幅反応は、正確に1つの温度に維持される。一部の実施形態では、等温増幅プロセスでは、例えば、環境又は装置ベース変数のため、温度の小さな変動（例えば、±1～5℃など）が生じる場合がある。一部の実施形態では、反応容積全体は、本質的に一定の温度に保たれ、本明細書での等温反応は一般に、反応ベッセル内で生成される温度勾配及び／又は対流に基づく温度サイクルに依拠する増幅条件を含まないことが有利であり得る。一部の実施形態では、等温増幅反応は、約55℃の温度～約75℃の温度を含む、約30℃～約75℃の温度で行われる。例えば、等温増幅反応は、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、若しくは75℃の温度若しくはこれらの値のおよその温度、又はこれらの値のいずれか2つの間の数値の温度で行うことができる。一部の実施形態では、等温増幅反応は、約55℃の温度～約65℃の温度、例えば、約60℃又は約65℃の温度で行われる。一部の実施形態では、温度要素（例えば、熱源

）は、本質的に一定の温度、例えば、約 75℃若しくはそれを下まわる、例えば、約 70℃若しくはそれを下まわる、約 65℃若しくはそれを下まわる、又は約 60℃若しくはそれを下まわる、本質的に一定の温度に維持される。等温増幅反応は、約 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、若しくは 60 分間、又はこれらの値のいずれか 2 つの間の数値若しくは範囲の期間にわたって実施することができる。等温増幅反応は、無ヘリカーゼ、無一本鎖結合タンパク質、無切断剤、及び無リコンビナーゼ等温増幅条件で実施することができる。

【0055】

本明細書に記載の増幅プロセス（例えば、等温増幅）を、好適な持続期間にわたって行うことができる。一部の実施形態では、増幅プロセスは、検出可能な核酸増幅産物が生成されるまで行われる。核酸増幅産物は、あらゆる好適な検出プロセス及び／又は本明細書に記載の検出プロセスにより検出することができる。一部の実施形態では、増幅プロセスは、約 30 分、約 20 分以内又はそれより短い時間の長さにわたって行われる。例えば、増幅プロセスは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、若しくは 20 分間以内に、又はこれらの値のおよその時間以内に行うことができる。一部の実施形態では、増幅は、約 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、若しくは 5 分以内に、又はそれより短い時間内、又はこれらの値のいずれか 2 つの間の数値若しくは範囲の時間内に検出可能な核酸増幅産物を生成する。

【0056】

一部の実施形態では、核酸標的及び二重鎖（例えば、第 1 及び第 2 の品質管理プライマーの 3' 重複領域間でのハイブリダイゼーションによって形成される二重鎖）を、核酸を変性させる作用剤又は条件に曝露させずに増幅することができる。一部の実施形態では、核酸標的及び二重鎖を、増幅ステップ（及び／又は他のステップ）中に鎖分離を促進する作用剤又は条件に曝露させずに増幅することができる。一部の実施形態では、核酸標的及び二重鎖を、増幅ステップ（及び／又は他のステップ）中に解巻を促進する作用剤又は条件に曝露させずに増幅することができる。核酸を変性させ、及び／又は鎖分離を促進し、及び／又は解巻を促進する作用剤又は条件としては、限定されるものではないが、熱条件（例えば、高温）、pH 条件（例えば、高 pH 又は低 pH）、化学剤、及びタンパク質（例えば、酵素剤）が挙げられる。

【0057】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法（例えば、増幅ステップ）は、熱変性（例えば、核酸を含有する溶液を、例えば、75℃を上まわる、80℃を上まわる、90℃を上まわる、95℃を上まわる、又はそれよりも高い温度などの高温に加熱すること）も、タンパク質に基づく（例えば、酵素的な）核酸の変性も含まない。タンパク質に基づく（例えば、酵素的な）変性は、核酸を、ヘリカーゼ、トポイソメラーゼ、リガーゼ、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、ニッキング酵素、リコンビナーゼ、RNA レプリカーゼ、及び核酸結合タンパク質（例えば、一本鎖結合タンパク質）の 1 種又は複数種と接触させることを含んでいてもよい。一部の実施形態では、方法は、ヘリカーゼ、トポイソメラーゼ、リガーゼ、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、ニッキング酵素、リコンビナーゼ、RNA レプリカーゼ、及び／又は核酸結合タンパク質（例えば、一本鎖結合タンパク質）を含まない。一部の実施形態では、方法は、挿入剤、アルキル化剤、及び／又はホルムアミド、グリセロール、尿素、ジメチルスルホキシド（DMSO）、及び／若しくは N, N, N-トリメチルグリシン（ベタイン）などの化学薬品を含まない。一部の実施形態では、方法は、核酸を変性作用剤（例えば、ホルムアミド）と接触させることを含まない。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法（例えば、増幅ステップ）及び組成物は、核酸を変性させる（例えば、鎖分離を促進し、及び／若しくは解巻を促進する）作用剤及び／若しくは条件、又は酸及び／若しくは低 pH 条件以外の作用剤及び／若しくは条件を含まない。一部の実施形態では、増幅ステップは

、ポリメラーゼ（例えば、超好熱菌ポリメラーゼ）以外の、核酸を変性させる（例えば、鎖分離を促進する、及び／又は解巻を促進する）作用剤及び／又は条件を含まない。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法及び組成物は、ポリメラーゼ（例えば、超好熱菌ポリメラーゼ）及び／又は低 pH 条件（例えば、酸との接触）以外に、核酸を変性させる（例えば、鎖分離を促進する、及び／又は解巻を促進する）作用剤及び／又は条件を含まない。核酸鎖を低 pH 条件下で（例えば、酸性溶解緩衝液との接触により）解離させ、その後の迅速な増幅及び検出を容易にする、核酸検出のための組成物、キット、及び方法は、2023年2月3日に出願された、「METHOD FOR SEPARATING GENOMIC DNA FOR AMPLIFICATION OF SHORT NUCLEIC ACID TARGETS」という題名の PCT 特許出願第 PCT/US 23/61978 号に記載されており、その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0058】

一部の実施形態では、核酸標的及び二重鎖（例えば、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域間でのハイブリダイゼーションによって形成される二重鎖）を、鎖分離及び／又は解巻を促進する増幅ステップ（及び／又は他のステップ）中に作用剤又は条件に曝露させずに増幅することができる。例えば、核酸を、ヘリカーゼに曝露させずに増幅することができる。ヘリカーゼは、二本鎖核酸を一本鎖に解巻させ、分離させることができる酵素である。ヘリカーゼの使用を含まない増幅条件は、本明細書では無ヘリカーゼ増幅条件と称することができる。

20

【0059】

核酸標的（第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域間でのハイブリダイゼーションによって形成される二重鎖を含む）を、増幅反応の前に、及び／又はその間に、ヘリカーゼ、リコンビナーゼ、核酸結合タンパク質（例えば、一本鎖結合タンパク質又は一本鎖 DNA 結合タンパク質（SSB））、リガーゼ、RNA レプリカーゼ、制限酵素、ニックング酵素、エキソヌクレアーゼ、DNAse、RNAse、及びトポイソメラーゼの1種又は複数種と接触させずに、又はそれに曝露させずに増幅することができる。リコンビナーゼの非限定例としては、Cre リコンビナーゼ、Hin リコンビナーゼ、Tre リコンビナーゼ、FLP リコンビナーゼ、RecA、RAD51、RadA、T4 uvs X が挙げられる。一部の実施形態では、核酸を、リコンビナーゼアクセサリタンパク質、例えば、リコンビナーゼ負荷因子（recombinase loading factor）（例えば、T4 uvs Y）に曝露させずに増幅することができる。一部の実施形態では、核酸は、SSB、例えば、T4 gp32 に曝露させずに増幅される。エキソヌクレアーゼの非限定例としては、DNAse、RNAse（例えば、RNAse H）、5'-3'エキソヌクレアーゼ（例えば、エキソヌクレアーゼ II）、3'-5'エキソヌクレアーゼ（例えば、エキソヌクレアーゼ I）、及びポリ（A）特異的3'-5'エキソヌクレアーゼが挙げられる。

30

【0060】

核酸標的（第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域間でのハイブリダイゼーションによって形成される二重鎖を含む）を、核酸を不安定化させる作用剤又は条件に曝露させて、又は曝露させずに増幅することができる。本明細書で使用される場合、「不安定化」という用語には、その通常の意味が与えられるものとし、また、傾斜、回転、捻れ、スリップ、及びフリップ効果の1種又は複数種による、核酸分子の全体的な組織性及び幾何学的配向性（例えば、二重らせん構造）の破壊を指す。不安定化は、一般に、核酸鎖の融解又は分離（例えば、変性）を指すものではない。核酸不安定化は、例えば、挿入剤若しくはアルキル化剤などの作用剤、及び／又はホルムアミド、尿素、ジメチルスルホキシド（DMSO）、若しくはN,N,N-トリメチルグリシン（ベタイン）などの化学薬品に曝露させることにより達成することができる。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法は、1種又は複数種の不安定化剤の使用を含む。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法は、不安定化剤の使用を除外する。

40

50

【0061】

一部の実施形態では、核酸標的及び二重鎖（例えば、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域間でのハイブリダイゼーションによって形成される二重鎖）を、切断又は消化させずに鋳型核酸として増幅することができる。例えば、増幅は、1種又は複数種の作用剤に予め曝露させずに行ってもよく、無傷の核酸が増幅される。一部の実施形態では、増幅は、増幅中に1種又は複数種の切断剤に曝露させずに行ってもよい。用語「切断剤」とは、1つ又は複数の特異的又は非特異的部位で核酸を切断することができる作用剤（例えば、化学薬品又は酵素）を指す。特異的切断剤は、多くの場合、特定のヌクレオチド配列に従って特定の部位を特異的に切断する。切断剤としては、限定されるものではないが、エンドヌクレアーゼ（例えば、制限酵素、ニッキング酵素など）；エキソヌクレアーゼ（DNAse、RNAse（例えば、RNAse H）、5'-3'エキソヌクレアーゼ（例えば、エキソヌクレアーゼ I I）、3'-5'エキソヌクレアーゼ（例えば、エキソヌクレアーゼ I）、及びポリ（A）特異的3'-5'エキソヌクレアーゼ）；並びに化学切断剤が挙げられる。

10

【0062】

増幅核酸（例えば、増幅標的核酸及び／又は伸長された二重鎖）を、本明細書では核酸増幅産物又はアンプリコンと称することができる。増幅された二重鎖は、伸長された二重鎖と称することができる。増幅産物は、天然に存在するヌクレオチド、天然に存在しないヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、及びそれらの組合せを含んでもよい。増幅産物は、典型的には、試料核酸の配列（例えば、標的核酸）又はその相補体中と同一又は実質的に同一であるヌクレオチド配列を有する。増幅産物中の「実質的に同一の」ヌクレオチド配列は、一般に、増幅されているヌクレオチド配列又はその相補体に対して高度の配列同一性（例えば、約75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は99%よりも高い配列同一性）を有することになり、変動は、ポリメラーゼフィデリティー不良又は他の変数の結果であることがある。

20

【0063】

一部の実施形態では、核酸増幅産物は、試料核酸中の標的配列と相補的であるか、又は完全に相補的であるポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、二重鎖と部分的に相補的であるか、又は完全に相補的であるポリヌクレオチドを含む。完全に相補的とは、一般に、例えば、各塩基が順番に（例えば、5'から3'へと読んで）第2の鎖の対応する順番の塩基と対合する第1の鎖のヌクレオチド配列を指し、完全に相補的であるとみなされる配列内には、ギャップも、追加の配列も、非対合塩基も存在しない。別の言い方をすれば、完全に相補的とは、第1の鎖のヌクレオチド配列のすべての連続塩基が、第2の鎖のヌクレオチド配列の対応する連続塩基と相補的であることを指す。核酸増幅産物は、増幅反応に使用される1種又は複数種のプライマーと完全に相補的な又は相補的な配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、第1のプライマー配列と完全に相補的であるか又は同一である第1のヌクレオチド配列、及び第2のプライマー配列と完全に相補的であるか又は同一である第2のヌクレオチド配列を含む。

30

40

【0064】

核酸増幅産物は、少なくとも50塩基長であってもよい。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、約15～約40塩基長、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、若しくは40塩基長であるか、又は約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、若しくは40塩基長である。一部の実施形態では、増幅産物は、約20～約40塩基長、例えば、約20～約30塩基長である。一部の実施形態では、所与の標的配列に関する核酸増幅産物は、同じ長さ又は実質的に同じ長さを有する（例えば、1～5塩基以内）。したがって、所与の標的配列の

50

核酸増幅産物は、単一のシグナル（例えば、電気泳動ゲルのバンド）を生成することができ、一般に、複数の長さを示す複数のシグナル（例えば、電気泳動ゲルのラダー又はスメア）を生成しない。マルチプレックス反応では、異なる標的配列の核酸増幅産物は異なる長さを有してもよい。

【0065】

核酸増幅産物はスパーサー配列を含んでいてもよい。本明細書に記載のように、増幅産物中のスパーサー配列は、試料核酸中の標的配列の一部と連続的に相補的であるか又は実質的に同一である配列（1つ又は複数の塩基）であり、増幅反応に使用された1種又は複数種のプライマーと相補的であるか又は実質的に同一である増幅産物中の配列によりフランキンクされている。増幅産物中の配列によりフランキンクされたスパーサー配列は、一般に、第1の配列（第1のプライマーと相補的な又は実質的に同一な）と第2の配列（第2のプライマーと相補的な又は実質的に同一な）との間に位置する。したがって、増幅産物は、典型的には、第1の配列、続いてスパーサー配列、続いて第2の配列を含む。スパーサー配列は、一般に、プライマーの配列と相補的でもなく、実質的に同一でもない。スパーサー配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10塩基を含む、約1～10塩基であってもよく又は含んでいてもよい。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、第1のプライマー配列と連続的に相補的であるか又は同一である第1のヌクレオチド配列、第2のプライマー配列と連続的に相補的であるか又は同一である第2のヌクレオチド配列、及びスパーサー配列からなるか又はから本質的になる。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、第1のプライマー配列及び第2のプライマー配列と連続的に相補的でも同一でもないあらゆる追加の配列を含まず（例えば、5'末端及び／若しくは3'末端に、又は産物内に）、スパーサー配列、例えば、テイル又はループプライマー、ライゲーション、又は他の機序により増幅産物に組み込まれた追加の配列の一部ではない。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、一般に、第1のプライマー配列及び第2のプライマー配列と連続的に相補的でも同一でもない追加の配列を含まず（例えば、5'末端及び／若しくは3'末端に、又は産物内に）、スパーサー配列、例えば、テイル又はループプライマー、ライゲーション、又は他の機序により増幅産物に組み込まれた追加の配列の一部ではない。しかしながら、そのような実施形態では、核酸増幅産物は、例えば、増幅プロセスにおけるエラー又は乱雑性により産物に導入されたいくつかのミスマッチ（つまり、非相補的な）塩基又はもう1つの余分な塩基を含んでいてもよい（例えば、5'末端及び／若しくは3'末端に、又は産物内に）。

【0066】

本明細書に記載の方法及び成分を、1種より多い目的の核酸の増幅（例えば、1種より多い標的配列の増幅）が起こるマルチプレックス増幅を評価及び／又はモニターするために使用することができる。例えば、マルチプレックス増幅は、同じ試料から複数種の配列を増幅すること、又は試料中のいくつかの配列の1種を増幅することを指すことができる。マルチプレックス増幅は、複数の試料に存在する1種又は複数種の配列を同時に又は段階的に増幅することを指してもよい。一部の例では、増幅反応は、少なくとも2種の標的配列を検出するように準備されるが、試験されている試料には標的配列の1種のみが存在してもよく、そのため両方の配列が増幅可能であるが、1種の配列のみが増幅される。一部の例では、2種の標的配列が存在する場合、増幅反応は、両方の標的配列の増幅をもたらしてもよい。適切なプライマー及び酵素を含むマルチプレックス増幅反応は、標的配列の1種、一部、又はすべての増幅をもたらしてもよい。一部の例では、増幅反応は、1対のプライマーを用いて2種の配列を検出するように準備されてもよく、一方の配列は標的配列であり、一方の配列は対照配列（例えば、標的配列と同じプライマーにより増幅可能であり、標的とは異なるスパーサー塩基又は配列を有する合成配列）である。一部の実施形態では、対照配列は、第1及び第2の品質管理プライマーのハイブリダイゼーションによって形成される二重鎖を含む。一部の例では、増幅反応は、対応するプライマー対を用いて複数セットの配列を検出するように準備されていてもよく、各セットは標的配列及び対照配列を含む。

【0067】

プライマー

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、二重鎖を増幅条件にかけるステップは、標的核酸及び1種若しくは複数種の追加のプライマー及び／又は標的核酸に特異的な1種若しくは複数種のプローブを増幅条件にかけることを含んでもよい。

【0068】

核酸増幅は一般に、1種又は複数種のプライマーの存在下で実施される。プライマー（例えば、1種又は複数種の追加のプライマー）は一般に、特定の目的の領域（すなわち、標的核酸）で又はその付近で（例えば、隣接して）標的核酸にハイブリダイズ又はアニーリングすることが可能なヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドであると特徴付けられる。プライマーは、例えば、標的核酸のヌクレオチド配列の特異的決定、又は標的核酸若しくはその特徴の検出（例えば、配列の存在又は非存在）を可能にすることができる。プライマーは天然に存在してもよく又は合成であってもよい。特異的又は特異性という用語は、一般に、標的ポリヌクレオチドに対するプライマーなど、1つの分子と別の分子との結合又はハイブリダイゼーションを指す。つまり、特異的又は特異性という用語は、そうした2つの分子のいずれかと他の分子との実質的により低い認識、接触、又は複合体形成と比較した、2つの分子間の安定複合体の認識、接触、及び形成を指す。アニーリング又はハイブリダイズという用語は、一般に、2つの分子間の安定複合体形成を指す。プライマー、オリゴ、又はオリゴヌクレオチドという用語は、プライマーを参照する場合、本明細書では同義的に使用することができる。

10

20

【0069】

プライマーは、好適なプロセスを使用して設計及び合成してもよく、標的配列にハイブリダイズし、本明細書に記載の増幅プロセスを実施するのに好適なあらゆる長さのものであってもよい。プライマーは、多くの場合、標的核酸の配列に応じて設計される。プライマーは、一部の実施形態では、約5塩基長～約30塩基長、例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29又は30塩基長であってもよい。一部の実施形態では、プライマーは、28塩基長未満、例えば、約8～約16塩基長又は約10～約12塩基長である。プライマーは、天然に存在するヌクレオチド及び／又は天然に存在しないヌクレオチド（例えば、修飾ヌクレオチド、標識ヌクレオチド）又はそれらの混合物で構成されていてもよい。本明細書に記載の方法と共に使用するのに好適なプライマーを、あらゆる好適な技法を使用して合成及び標識することができる。例えば、プライマーを、自動化合成装置を使用して、固相ホスホラミダイトリエステル法に従って化学合成することができる。プライマーの精製を、例えば、天然アクリルアミドゲル電気泳動又はアニオン交換HPLCによって行うことができる。

30

【0070】

プライマーは、修飾ヌクレオチドを含んでもよい、又はそれからなってもよい。ヌクレオチド（又は塩基）は、本明細書に記載の、又は当技術分野で公知のあらゆる修飾に従って修飾されていてもよい。修飾は、プライマー合成の間に作製されたものを含んでもよい、及び／又は合成後修飾を含んでもよい。修飾は、内部修飾、プライマーの3'末端での修飾、及び／又はプライマーの5'末端での修飾を含んでもよい。一部の実施形態では、プライマーは、修飾ヌクレオチド及び未修飾ヌクレオチドの混合物を含む。一部の実施形態では、プライマーは、未修飾ヌクレオチドを含む。修飾及び修飾塩基としては、例えば、リン酸化（例えば、3'リン酸化、5'リン酸化）；付着化学又はリンカー修飾（例えば、Acrydite（商標）、アデニル化、アジド（NHSEステル）、ジゴキシゲニン（NHSEステル）、コレステリル-TEG、E-Linker（商標）、アミノ修飾因子（例えば、アミノ修飾因子C6、アミノ修飾因子C12、アミノ修飾因子C6dT、Uni-Link（商標）アミノ修飾因子）、アルキン（例えば、5'ヘキシニル、5'-オクタジニルdT）、ビオチン化（例えば、ビオチン、ビオチン（アジド）、ビオチンdT、ビオチン-TEG、デュアルビオチン、PCビオチン、デスチオビオチン-TEG

40

50

)、チオール修飾（例えば、チオール修飾因子 C3S-S、ジチオール、チオール修飾因子 C6S-S）；フルオロフォア（例えば、Freedom（商標）色素、Alexa Fluor（登録商標）色素、LI-COR IRDyes（登録商標）、ATTO（商標）色素、ローダミン色素、WellRed色素、6-FAM（アジド）、Texas Red（登録商標）-X（NHSエステル）、Lightcycler（登録商標）640（NHSエステル）、Dy750（NHSエステル））；Iowa Black（登録商標）ダーククエンチャー修飾（例えば、Iowa Black（登録商標）FQ、Iowa Black（登録商標）RQ）；ダーククエンチャー修飾（例えば、Black Hole Quencher（登録商標）-1、Black Hole Quencher（登録商標）-2、Dabcyl）；スペーサー（C3スペーサー、PCスペーサー、ヘキサンジオール、スペーサー9、スペーサー18、1'、2'-ジデオキシリボース（d Spacer））；修飾塩基（例えば、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン（2-アミノ-dA）、5-プロモドU、デオキシウリジン、逆位dT、逆位ジデオキシ-T、ジデオキシ-C、5-メチル dC、デオキシイノシン、SuperT（登録商標）、SuperG（登録商標）、ロックド核酸（LNA）、5-ニトロインドール、2'-O-メチルRNA塩基、ヒドロキシメチル dC、UNAアンロックド核酸（例えば、UNA-A、UNA-U、UNA-C、UNA-G）、Iso-dC、Iso-dG、フルオロC、フルオロU、フルオロA、フルオロG）；ホスホロチオエート結合修飾（例えば、ホスホロチオエート化DNA塩基、ホスホロチオエート化RNA塩基、ホスホロチオエート化2'-O-メチル塩基、ホスホロチオエート化LNA塩基）；及びクリック化学修飾を挙げることができる。一部の実施形態では、修飾及び修飾塩基としては、ウラシル塩基、リボヌクレオチド塩基、O-メチルRNA塩基、ホスホロチオエート結合、3'リン酸基、スペーサー塩基（C3スペーサー又は他のスペーサー塩基など）が挙げられる。例えば、プライマーは、1つ又は複数のO-メチルRNA塩基（例えば、2'-O-メチルRNA塩基）を含んでいてもよい。2'-O-メチルRNAは、一般に、tRNA及び他の低分子RNAに見出されるRNAの転写後修飾である。2'-O-メチルRNA塩基を含むプライマーを直接合成することができる。この修飾は、例えば、RNA:RNA二重鎖のTmを増加させ、一本鎖リボヌクレアーゼ及びDNaseの存在下での安定性を提供することができる。2'-O-メチルRNA塩基をプライマーに含めて、例えば、安定性及び標的配列との結合親和性を増加させることができる。一部の実施形態では、プライマーは、1つ又は複数のホスホロチオエート連結（例えば、ホスホロチオエート結合修飾）を含んでいてもよい。ホスホロチオエート（PS）結合は、プライマーのリン酸骨格の非架橋酸素を硫黄原子に置換する。この修飾は、典型的には、ヌクレオチド間結合をヌクレアーゼ分解に対して耐性にする。ホスホロチオエート結合を、プライマーの5'末端又は3'末端の最後の約3~5ヌクレオチドの間に導入して、例えば、エキソヌクレアーゼ分解を阻害してもよい。一部の実施形態では、プライマー全体にわたって含まれるホスホロチオエート結合は、エンドヌクレアーゼによる攻撃の低減を支援することができる。プライマーは、例えば、3'リン酸基を含んでいてもよい。3'リン酸化は、ある特定の3'-エキソヌクレアーゼによる分解を阻害することができ、ある特定の 경우에는、DNAポリメラーゼによる伸長を阻止するために使用することができる。一部の実施形態では、プライマーは、1つ又は複数のスペーサー塩基（例えば、1つ又は複数のC3スペーサー）を含む。C3スペーサーホスホラミダイトを、プライマーの内部又は5'末端に組み込むことができる。複数のC3スペーサーをプライマーのいずれかの末端に付加して、例えば、フルオロフォア又は他のペンダント基を付着させための長鎖親水性スペーサーアームを導入することができる。

【0071】

プライマー（例えば、品質管理プライマー又は標的配列特異的プライマー）は、DNA塩基、RNA塩基、又はその両方を含んでもよい。一部の実施形態では、プライマーは、DNA塩基及びRNA塩基の混合物を含む。DNA塩基及び／又はRNA塩基は、修飾又は未修飾であってもよい。一部の実施形態では、プライマーは、DNA塩基（例えば、修

飾DNA塩基及び／又は未修飾DNA塩基）からなる。一部の実施形態では、プライマーは、RNA塩基（例えば、修飾RNA塩基及び／又は未修飾RNA塩基）からなる。一部の実施形態では、プライマーはRNA塩基を含まない。一部の実施形態では、プライマーは、3'末端にRNA塩基を含まない。一部の実施形態では、プライマーは、3'末端にDNA塩基（又は修飾DNA塩基）を含む。一部の実施形態では、プライマーは、キメラプライマーではない。キメラプライマーは、DNA及びRNA塩基を含むプライマーである。一部の実施形態では、プライマーは、同種のプライマー（例えば、同種のDNAプライマー）である。同種のDNAプライマーは、未修飾DNA塩基、修飾DNA塩基、又は修飾DNA塩基及び未修飾DNA塩基の混合物を含んでもよく、RNA塩基を含まない。

【0072】

10

一部の実施形態では、プライマーは、切断剤認識部位を含まない。例えば、プライマーは、ニックング酵素認識部位を含まなくてもよい。一部の実施形態では、プライマーは、テイルを含まない。一部の実施形態では、プライマーは、ニックング酵素認識部位を含むテイルを含まない。

【0073】

一部の実施形態では、プライマー配列の全部又は一部は、標的核酸と相補的であってもよく又は完全に相補的であってもよい。配列に関する相補性とは、一般に、互いにハイブリダイズすることになるヌクレオチド配列を指す。ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを変更して、様々な量の配列ミスマッチを許容することができる。一部の実施形態では、標的及びプライマー配列は、互いに少なくとも75%相補的である。例えば、標的及びプライマー配列は、互いに75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%相補的であってもよい、又は少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%相補的であってもよい。標的核酸配列と相補的であるプライマーは、典型的には、標的核酸配列の相補体（例えば、アンチセンス鎖）とも相補的であるか、又は完全に相補的である。標的核酸のアンチセンス鎖と相補的であるプライマーは、互いに75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一であってもよい、少なくとも約75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一であってもよい、少なくとも約75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一であってもよい、又は少なくとも約75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%同一であってもよい。2つのヌクレオチド配列が相補的であるかどうかを、共有される同一のヌクレオチド配列のパーセントによって決定することができる。

20

30

40

【0074】

本明細書に記載されるように、1対のプライマーは、フォワードプライマー及びリバープライマー（例えば、標的核酸のセンス鎖及びアンチセンス鎖に結合するプライマー）を含んでもよい。3'重複領域での相補性のため、フォワード品質管理プライマーは、対応するリバー品質管理プライマーに結合することができ、フォワード及びリバー品質管理プライマーは1対の品質管理プライマーである。一部の実施形態では、プライマーは、1対のプライマー（つまり、フォワードプライマー及びリバープライマー）からなる。したがって、一部の実施形態では、標的配列の増幅は、1対のプライマーを使用して実施され、

50

標的配列の増幅には追加のプライマー又はオリゴヌクレオチドは含まれていない（例えば、増幅反応成分は、所与の標的配列に対する追加のプライマー対、ネステッドプライマー、バンパープライマー（b u m p e r p r i m e r）、プライマー以外のオリゴヌクレオチド、及びプローブなどを含まない）。一部の実施形態では、プライマーは、1対のプライマーからなるが、一部の実施形態では、増幅反応は、マルチプレックス増幅などにおいて、異なる標的配列を増幅するための追加のプライマー対を含んでいてもよい。一部の実施形態では、プライマーは1対のプライマーからなるが、一部の実施形態では、増幅反応は、増幅の一部とはみなされない検出プロセスのための追加のプライマー、オリゴヌクレオチド、又はプローブを含んでいてもよい。一部の実施形態では、プライマーはセットで使用される。増幅プライマーセットは、所与の標的配列に対する1対のフォワードプライマー及びリバースプライマーを含んでいてもよい。マルチプレックス増幅の場合、第1の標的配列を増幅するプライマーはプライマーセットであるとみなされ、第2の標的配列を増幅するプライマーは異なるプライマーセットであるとみなされる。

10

【0075】

一部の実施形態では、増幅反応成分は、試料核酸の第1の鎖（例えば、センス鎖、フォワード鎖）の標的配列（例えば、標的核酸）に相補的な第1のプライマー（第1のオリゴヌクレオチド）、及び試料核酸の第2の鎖（例えば、アンチセンス鎖、リバース鎖）の標的配列に相補的な第2のプライマー（第2のオリゴヌクレオチド）を含む。一部の実施形態では、第1のプライマー（第1のオリゴヌクレオチド）は、試料核酸の第1の鎖の標的配列と完全に相補的な第1のポリヌクレオチドを含み、第2のプライマー（第2のオリゴヌクレオチド）は、試料核酸の第2の鎖の標的配列と完全に相補的な第2のポリヌクレオチドを含む。プライマー標的に関して完全に相補的であるとは、一般に、各塩基が標的配列内の対応する順番の塩基と順番に対合し、完全に相補的であるとみなされる配列内にはギャップも、追加の配列も、非対合塩基も存在しない、プライマーのヌクレオチド配列を指す。別の言い方をすれば、完全に相補的とは、一般に、プライマー中のヌクレオチド配列のすべての連続塩基が、標的中のヌクレオチド配列の対応する連続塩基と相補的であることを指す。

20

【0076】

プライマーは、プライマーに対して機能的特徴を追加しない1種又は複数種の追加の塩基を含んでもよい（例えば、5'及び／若しくは3'末端に、又はプライマー内に）。例えば、テイルプライマー又はループプライマーに存在する追加の配列は一般に、機能的特徴を追加し、そのような実施形態ではプライマーから除外されない。一部の実施形態では、プライマーは、1つ又は複数のイノシン、脱塩基部位、ロックド核酸、副溝結合剤、二重鎖安定剤（例えば、アクリジン、スベルミジン）、Tm修飾因子、又はプライマーの結合特性を変化させるあらゆる修飾因子などの修飾を含んでいてもよい。一部の実施形態では、プライマーは、検出可能な分子又は実体（例えば、フルオロフォア、放射性同位元素、比色試薬、粒子、及び酵素など）を含んでいてもよい。

30

【0077】

ポリメラーゼ

一部の実施形態では、増幅反応成分は、1種又は複数種のポリメラーゼを含む。ポリメラーゼは、核酸標的配列（例えば、プライマーがアニーリングするもの）に対するプライマー分子、例えば、本明細書に記載の増幅プライマーの3'ヒドロキシル末端を伸長するヌクレオチドの特異的組込みを触媒することが可能なタンパク質である。ポリメラーゼは、例えば、高温反応温度（例えば、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、85℃、90℃、95℃、又は100℃を上まわる）で活性を示すことができる好熱性又は超好熱性ポリメラーゼを含んでもよい。超好熱性ポリメラーゼは、超好熱菌ポリメラーゼと呼ばれる場合がある。ポリメラーゼは、鎖置換能力を有していてもよく又は有していてもよい。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、単一の合成で約1〜約50ヌクレオチド、例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、若しくは50ヌクレオチド、又は単一の合成でこうした値のいずれか2つの間の数値若しくは範囲のヌ

40

50

クレオチドを組み込むことができる。

【0078】

増幅反応条件は、限定されるものではないが、9 ° N DNAポリメラーゼ；9 ° Nm（商標）DNAポリメラーゼ；Therminator（商標）DNAポリメラーゼ；Therminator（商標）II DNAポリメラーゼ；Therminator（商標）III DNAポリメラーゼ；Therminator（商標）γ DNAポリメラーゼ；Bst DNAポリメラーゼ；Bst DNAポリメラーゼ（大型断片）；Phi 29 DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI（例えば、大腸菌）、DNAポリメラーゼI、大型（クレノウ）断片；クレノウ断片（3' - 5' exo-）；T4 DNAポリメラーゼ；T7 DNAポリメラーゼ；Deep Vent R（商標）（exo-）DNAポリメラーゼ；Deep Vent R（商標）DNAポリメラーゼ；DyNAzyme（商標）EXT DNA；DyNAzyme（商標）II Hot Start DNAポリメラーゼ；Phusion（商標）高フィデリティーDNAポリメラーゼ；Vent R（登録商標）DNAポリメラーゼ；Vent R（登録商標）（exo-）DNAポリメラーゼ；RepliPhi（商標）Phi 29 DNAポリメラーゼ；rBst DNAポリメラーゼ、大型断片（IsoTherm（商標）DNAポリメラーゼ）；Master Amp（商標）AmpliTherm（商標）DNAポリメラーゼ；Tag DNAポリメラーゼ；Tth DNAポリメラーゼ；Tfl DNAポリメラーゼ；Tgo DNAポリメラーゼ；SP6 DNAポリメラーゼ；Tbr DNAポリメラーゼ；DNAポリメラーゼベータ；及びThermoPhi DNAポリメラーゼを含む、1種又は複数種のDNAポリメラーゼを含んでもよい。

【0079】

DNAポリメラーゼは、超好熱菌DNAポリメラーゼ、例えば、高温で熱安定性である超好熱菌DNAポリメラーゼ、又はそのバリエーション若しくは機能的断片であってもよい。例えば、超好熱菌DNAポリメラーゼは、95 °Cで約5～10時間の半減期及び100 °Cで約1～3時間の半減期を有してもよい。一部の実施形態では、増幅反応成分は、古細菌由来の1種又は複数種の超好熱菌DNAポリメラーゼ、例えば、サーモコッカス（Thermococcus）（例えば、サーモコッカセアエン・アルカエアン（Thermococcaceae archaean））、パイロコッカス属（Pyrococcus）、メタノコッカス科（Methanococcaceae）、1種若しくは複数種のメタノコッカス属（Methanococcus）、サーマス属（Thermus）、又はそれらの組合せに由来するDNAポリメラーゼを含む。一部の実施形態では、増幅反応条件は、サーマス・サーモフィルス（Thermus thermophilus）由来の1種又は複数種の超好熱菌DNAポリメラーゼを含む。

【0080】

超好熱菌DNAポリメラーゼの機能的断片は一般に、全長ポリメラーゼの1つ又は複数の機能、例えば、DNAを重合させる能力（例えば、増幅反応における）を保持する。機能的断片は、例えば、機能（例えば、増幅反応におけるDNAの重合）を、全長ポリメラーゼの機能レベルの少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、又は95%のレベルで実施することができる。ポリメラーゼ活性のレベルは、例えば、本明細書に開示される増幅反応をモニターするための方法などの、検出可能な核酸増幅法を使用して評価することができる。一部の実施形態では、超好熱菌DNAポリメラーゼは、配列番号1のアミノ酸配列又は配列番号1の機能的断片を含む。一部の実施形態では、超好熱菌DNAポリメラーゼは、配列番号2のアミノ酸配列又は配列番号2の機能的断片を含む。一部の実施形態では、増幅反応条件は、配列番号1又はその機能的断片のアミノ酸配列と少なくとも約90%同一、95%同一、又は99%同一であるアミノ酸配列を含むポリメラーゼを含む。一部の実施形態では、増幅反応条件は、配列番号2又はその機能的断片のアミノ酸配列と少なくとも約90%同一、95%同一、又は99%同一であるアミノ酸配列を含むポリメラーゼを含む。

【0081】

10

20

30

40

50

ポリメラーゼは、逆転写能力を有してもよい。そのような場合、増幅反応は、例えば、別々の逆転写酵素を使用せず、単一ステップでRNA標的を増幅することができる。逆転写酵素能力を有するポリメラーゼの非限定的な例としては、Bst（大型断片）、9°NDNAポリメラーゼ、9°Nm（商標）DNAポリメラーゼ、Therminator（商標）、及びTherminator（商標）IIなどが挙げられる。一部の実施形態では、増幅反応条件は、1種又は複数種の別々の逆転写酵素を含む。一部の実施形態では、1種よりも多くのポリメラーゼが増幅反応に含まれていてもよい。例えば、増幅反応は、逆転写酵素活性を有するポリメラーゼ、及び逆転写酵素活性を有さない第2のポリメラーゼを含んでいてもよい。

一部の実施形態では、エキソヌクレアーゼ活性を有する1種又は複数種のポリメラーゼが増幅中に使用される。一部の実施形態では、エキソヌクレアーゼ活性を有しないか又は低い1種又は複数種のポリメラーゼが増幅中に使用され、例えば、ポリメラーゼは、ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性を低減又は排除する1つ又は複数の修飾（例えば、アミノ酸置換）を含む。例えば、エキソヌクレアーゼ活性が低い修飾ポリメラーゼは、非修飾ポリメラーゼと比較して10%又はそれよりも低いエキソヌクレアーゼ活性を有してもよい。例えば、エキソヌクレアーゼ活性が低い修飾ポリメラーゼは、非修飾ポリメラーゼと比較して約10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、又は1%未満のエキソヌクレアーゼ活性を有してもよい。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性を有しないか若しくは低く、及び／又は3' - 5'エキソヌクレアーゼ活性を有しないか若しくは低い。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、一本鎖依存性エキソヌクレアーゼ活性を有しないか若しくは低く、及び／又は二本鎖依存性エキソヌクレアーゼ活性を有しないか若しくは低い。ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性を低減又は排除することができる修飾の非限定的な例としては、配列番号1の141位、143位及び458位の1つ又は複数の位置における1つ又は複数のアミノ酸置換を含む。配列番号1における位置に対応するアミノ酸位置を、例えば、アミノ酸配列アラインメントを実施することによって同定することができる。修飾は、141位の天然アミノ酸のアラニンへの置換、例えば、D141A；143位の天然アミノ酸のアラニンへの置換、例えば、E143A；143位の天然アミノ酸のアスパラギン酸への置換、例えば、E143D；485位の天然アミノ酸のロイシンへの置換、例えば、A485L；又はそれらの組合せを含んでもよい。一部の実施形態では、修飾は、D141A、E143A及びA485Lのうちの1種、2種又はそれよりも多くを含む。

【0082】

検出及び定量化

本明細書に開示される方法は、伸長された二重鎖の生成を決定するための増幅反応の間に第1の品質管理プライマーのクエンチ可能な標識から生成されるシグナルを検出することを含んでもよく、ここで、増幅反応の間のシグナルの低下は、伸長された二重鎖の生成を示す。一部の実施形態では、増幅反応の間に第1の品質管理プライマーのクエンチ可能な標識から生成されるシグナルを検出するステップは、増幅反応の間の2つ又はそれよりも多い異なる時点でシグナルを検出するステップを含んでもよい。増幅反応の間のシグナルの低下は、増幅反応の間の経時的な低下を含んでもよい。増幅反応の間のシグナルの低下は、増幅反応の間の約10分間（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10分、又はこれらの値のいずれか2つの間の数値若しくは範囲）の期間にわたる低下を含んでもよい。この期間は、増幅反応の開始から、約3分～約12分（例えば、約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12分又はこれらの値のいずれか2つの間の数値若しくは範囲）であってもよい。方法は、増幅反応の前、増幅反応の後、又はその両方に第1の品質管理プライマーのクエンチ可能な標識のシグナルを検出するステップを含んでもよい。一部の実施形態では、第1の品質管理プライマーのクエンチ可能な標識から生成されるシグナルの検出は、いかなるプローブの使用も含まない。本明細書に記載の方法は、追加のプライマー及び／又はプローブを必要とすることなく増幅反応のモニタリングにおける複雑性の低減を有利に提供することができる。

10

20

30

40

50

【0083】

本明細書に記載の方法は、増幅産物（例えば、伸長された二重鎖及び／又は標的核酸アンプリコン）を検出及び／又は定量化することを含んでもよい。増幅産物は、例えば、本明細書に記載のいずれかの検出法又は定量化法を含む、あらゆる好適な検出法及び／又は定量化法により検出及び／又は定量化することができる。検出法及び／又は定量化法の非限定的な例としては、以下のものが挙げられる：分子ビーコン（例えば、リアルタイム、エンドポイント）、側方流動、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）、蛍光偏光（FP）、表面捕捉、5' - 3' エキソヌクレアーゼ加水分解プローブ（例えば、TAQMAN）、挿入／結合色素、吸光度法（例えば、比色分析、濁度）、電気泳動（例えば、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動）、質量分析、核酸シーケンシング、デジタル増幅、プライマー伸長法（例えば、iPLEX（商標））、Affymetrix社の分子反転プローブ（MIP）技術、制限断片長多型（RFLP解析）、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド（ASO）分析、メチル化特異的PCR（MSPCR）、パイロシーケンス分析、アシクロプライム分析、リバースドットプロット、GeneChipマイクロアレイ、ダイナミックアレル特異的ハイブリダイゼーション（DASH）、ペプチド核酸（PNA）及びロックド核酸（LNA）プローブ、AlphaScreen、SNPstream、遺伝子ビット分析（GBA）、マルチプレックスミニシーケンシング、Snapshot、GOODアッセイ、マイクロアレイminiseq、アレイプライマーエクステンション（APEX）、マイクロアレイプライマーエクステンション、Tagアレイ、コードマイクロスフェア、鋳型指向性組込み（TDI、Template-directed incorporation）、比色オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ（OLA）、配列コードOLA、マイクロアレイライゲーション、リガーゼ連鎖反応、パッドロックプローブ、インベーターアッセイ、少なくとも1種のプローブを使用したハイブリダイゼーション、少なくとも1種の蛍光標識プローブを使用するハイブリダイゼーション、クローニング及びシーケンシング、ハイブリダイゼーションプローブ及び定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（QRT-PCR）の使用、ナノポアシーケンシング、チップ、及びそれらの組合せ。一部の実施形態では、核酸増幅産物の検出は、リアルタイム検出法の使用を含む（つまり、産物は、増幅プロセス中に検出及び／又は継続的にモニターされる）。一部の実施形態では、核酸増幅産物の検出は、エンドポイント検出法の使用を含む（つまり、産物は、増幅プロセスの完了又は停止後に検出される）。核酸検出法は、標的配列に直接組み込まれているか、又は標的に対する相補的配列を含むプローブに組み込まれている標識ヌクレオチドの使用を採用することもできる。このような標識は、性質が放射性及び／又は蛍光性であってもよく、本明細書で考察されている様式のいずれかで解像することができる。一部の実施形態では、核酸増幅産物の定量化は、下記に記載の1つ又は複数の検出法を使用して達成することができる。一部の実施形態では、検出法は、シグナル強度の測定、並びに／又は核酸増幅産物の定量化のための標準曲線及び／若しくはルックアップテーブルの作成（又は参照）と併せて使用することができる。

【0084】

核酸増幅産物（例えば、伸長された二重鎖）の検出は、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の使用を含んでもよい。FRETは、2種の発色団：ドナー分子及びアクセプター分子の間のエネルギー移動機序である。手短に言えば、ドナーフルオロフォア分子は、特定の励起波長で励起される。ドナー分子がその基底状態へと戻る際のその後のドナー分子からの発光は、長距離双極子間相互作用により励起エネルギーをアクセプター分子へと移動させることができる。アクセプター分子の発光強度をモニターすることができ、発光強度は、ドナーとアクセプターとの間の距離、ドナー発光スペクトルとアクセプター吸収スペクトルとの重複、及びドナー発光双極子モーメント及びアクセプター吸収双極子モーメントの向きの関数である。FRETは、分子ビーコンについて記載したように、例えば、DNA-DNA相互作用の分子動力学の定量化に有用であり得る。特定の産物の産生をモニターするために、プローブの一方の末端をドナー分子で標識し、他方の末端をアクセプター分子で標識することができる。プローブ-標的ハイブリダイゼーションにより、ドナ

ーとアクセプターとの距離又は向きが変化し、FRET変化が観察される。一部の実施形態では、クエンチ可能な標識は、ドナー分子である。一部の実施形態では、アクセプター分子は、クエンチャーであってもよい。

【0085】

核酸増幅産物（例えば、標的核酸の増幅に由来する増幅産物）の検出は、分子ビーコン、例えば、一方の末端にフルオロフォアを、反対側の末端にクエンチング色素を含有するヘアピン形状のオリゴヌクレオチドの使用を含んでもよい。ヘアピンのループは、標的配列に相補的なプローブ配列を含んでいてもよく、ステムは、プローブ配列の両側に位置する相補的なアーム配列のアニールリングにより形成される。フルオロフォア及びクエンチング分子は、各アームの反対側の末端に共有結合で連結されていてもよい。オリゴヌクレオチドがその相補的標的にハイブリダイズすることを防止する条件下では、又は分子ビーコンが溶液中で遊離している場合は、蛍光分子及びクエンチング分子は互いに近接して蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を防止する。分子ビーコンが標的分子（例えば、核酸増幅産物）に遭遇すると、ハイブリダイゼーションが生じる可能性があり、ループ構造が、安定でより剛性の立体構造へと変換され、フルオロフォア分子及びクエンチャー分子の分離が引き起こされ、蛍光がもたらされる。プローブが特異的であるため、蛍光の発生は、一般に、意図されている増幅産物の合成のみによるものである。一部の場合では、分子ビーコンプローブ配列は、標的核酸中の配列と同一であるか又は相補的である、増幅産物中の配列にハイブリダイズする。一部の場合では、分子ビーコンプローブ配列は、標的核酸中の配列と同一でも相補的でもない、増幅産物中の配列にハイブリダイズする（例えば、テイル増幅プライマー又はライゲーションにより増幅産物に付加された配列にハイブリダイズする）。

10

20

【0086】

核酸増幅産物の検出は、蛍光偏光（FP）、表面捕捉、5' - 3' エキソヌクレアーゼ加水分解プローブ（例えば、TAQMAN）、挿入及び／若しくは結合色素、質量分析、核酸シーケンシング、デジタル増幅（例えば、デジタルPCR）、並びに／又は吸光度法（例えば、比色分析、濁度）の使用を含んでもよい。一部の実施形態では、核酸増幅産物の検出は、核酸を特異的に染色する色素の使用を含む。例えば、挿入色素は、DNA又はRNAに結合すると蛍光の増強を呈する。色素としては、DNA又はRNA挿入フルオロフォアが挙げられ、例えば、SYTO（登録商標）82、アクリジンオレンジ、臭化エチジウム、Hoechst色素、PicoGreen（登録商標）、ヨウ化プロピジウム、SYBR（登録商標）I（非対称性シアニン色素）、SYBR（登録商標）II、TOTO（チアゾールオレンジ二量体）、及びYOYO（オキサゾールイエロー二量体）を含んでもよい。色素は、種々の検出法と共に使用した場合、核酸検出の感度を増加させるための機会を提供する。例えば、ゲル電気泳動後のアガロースゲル中のDNAを染色するために、臭化エチジウムを使用することができる；細胞のDNA倍数性を決定するためには、ヨウ化プロピジウム及びHoechst 33258をフローサイトメトリーにおいて使用することができる；レーザー誘導蛍光検出を用いたキャピラリー電気泳動による二本鎖DNAの分析においては、SYBR（登録商標）Green 1を使用することができる；マッチドイオン対ポリヌクレオチドクロマトグラフィー後の二本鎖DNAの検出を増強するためには、PicoGreen（登録商標）を使用することができる。

30

40

【0087】

本明細書に提供されるものは、増幅反応の進行を評価する、モニターする、観察する、又は追跡するための方法、キット、及び反応混合物である。別の態様では、本明細書に開示される方法、キット、及び反応混合物を使用して、反応の増幅効率を決定することができる。増幅効率を妨げ得る因子の非限定例としては、増幅阻害剤（例えば、ヘモグロビン、フミン酸、フルボ酸、二価カチオン、キレート化分子）、増幅反応成分の非存在及び／又は欠陥、並びに酵素及び他のタンパク質（例えば、ヌクレアーゼ）が挙げることができる。

【0088】

50

本明細書に記載の方法、キット、及び反応混合物を使用して、増幅反応成分の非存在及び／又は増幅反応成分の欠陥（例えば、品質）の存在を決定することができる。成分の品質は、バッチ間で、又は時間と共に変化し得る。したがって、成分の品質を、本明細書に記載の方法を使用して各バッチ中の成分の性能を評価することによって、又は経時的にバッチ中の成分の性能を評価することによって制御することができる。例えば、参照バッチ及び試料バッチ中で産生される２種のポリメラーゼの性能を、開示される方法を使用して評価することができる。試料バッチ中のポリメラーゼの性能を、参照バッチ中のポリメラーゼのものと比較して、試料バッチ中のポリメラーゼが使用に適しているかどうかを決定することができる。或いは、ポリメラーゼの活性を、所定の時間の経過の前後で比較して、ポリメラーゼの活性が時間と共に低下するかどうかを決定することができる。一部の実施形態では、開示される方法は、１種又は複数種の増幅成分の保存可能期間を決定することができる。例えば、ポリメラーゼの活性は、初期の産生から所定の時間間隔で評価される。活性が、ある特定の期間後に所定のレベルより下に低下する場合、その時間はポリメラーゼの保存可能期間と決定することができる。

10

【００８９】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法、キット、及び反応混合物を使用して（例えば、内部対照として）、増幅効率、例えば、増幅効率を妨げる増幅阻害剤の存在をモニターすることができる。一般に、内部対照は、試料の阻害活性（例えば、増幅阻害剤の存在）をモニターするために使用される。内部対照は、（i）試料中に含まれると疑われる標的核酸配列とは無関係の鋳型並びに（ii）鋳型を増幅及び検出するためのプライマー及びプローブを含んでもよい。内部対照の増幅効率は、試料中に含まれる標的核酸配列の増幅によって影響されず、逆も同様であることが有利である。内部対照の増幅は、試料が増幅反応に対する阻害活性を有しない、すなわち、試料が増幅反応を阻害する物質を含有しないことを示す。

20

【００９０】

本明細書に記載の第１及び第２の品質管理プライマーは、従来の内部対照の成分、すなわち、鋳型、プライマー対及びプローブの代わりとなり得る。第１及び第２の品質管理プライマーの３'重複領域間でのハイブリダイゼーションによって形成される二重鎖の増幅が、標的核酸配列の増幅と同時に起こり得るように、本明細書に記載の第１及び第２の品質管理プライマーを、試料中の標的核酸配列の増幅反応にさらに添加することができる。伸長された二重鎖の産生は、増幅反応に対する阻害物質が試料中に存在するかどうかの決定を可能にし得る。

30

【００９１】

本明細書に記載の方法、キット、及び反応混合物を、定量化標準として使用することができる。例えば、定量的リアルタイムPCR反応では、標的核酸配列の定量化は、既知の標準の希釈系列を使用して増幅反応を実施して、標的核酸配列の初期量の対数値がCt値に対してプロットされる標準曲線を得ること、次いで、未知の試料から得られるCt値と、標準曲線とを比較して、試料中の標的核酸配列の量を算出することによって達成される。第１及び第２の品質管理プライマーは、有利には、標準の代わりに使用することができる。

40

【００９２】

標的核酸

本明細書で使用される場合、標的核酸は、本明細書に開示される品質管理法及び組成物を使用して評価及び／又はモニターされる増幅反応における増幅にかけられる目的の核酸である。用語「核酸」及び「核酸分子」は、本明細書では互換的に使用される。この用語は、DNA（例えば、相補的DNA（cDNA）及びゲノムDNA（gDNA）など）、RNA（例えば、メッセージRNA（mRNA）、短鎖阻害性RNA（siRNA）、リボソームRNA（rRNA）、tRNA、マイクロRNA、及び／又はDNA若しくはRNA類似体（例えば、塩基類似体、糖類似体、及び／又は非天然骨格などを含む）、RNA／DNAハイブリッド、及びポリアミド核酸（PNA）などのあらゆる組成の核酸を指

50

し、これらはすべて、一本鎖の形態であってもよく又は二本鎖の形態であってもよく、別様の限定がない限り、天然に存在するヌクレオチドと同様の様式で機能することができる天然ヌクレオチドの既知類似体を包含することができる。核酸は、プラスミド、ファージ、自律複製配列（ARS）、セントロメア、人工染色体、染色体、或いは *in vitro* 又は宿主細胞、細胞、細胞核、ミトコンドリア、若しくは細胞の細胞質にて複製し得るか又は複製され得る他の核酸であってもよく又はそれらに由来してもよい。特に限定のない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと同様の様式で代謝される天然ヌクレオチドの既知類似体を含む核酸を包含する。

【0093】

標的核酸は、標的配列、標的ポリヌクレオチド、及び／又は標的ポリヌクレオチド配列と称してもよく、二本鎖及び一本鎖核酸分子を含んでもよい。標的核酸は、例えば、DNA又はRNAであってもよい。標的配列は、核酸配列のセンス鎖又はアンチセンス鎖のいずれを指してもよく、また、標的核酸に存在する配列、元の標的配列の増幅コピー又は増幅産物を指してもよい。標的配列は、より大きなポリヌクレオチド内の部分配列であってもよい。例えば、標的配列は、増幅のために標的化される、核酸断片、染色体、プラスミド内の短い配列（例えば、20～50塩基）であってもよい。一部の実施形態では、標的配列とは、核酸を増幅するために使用されるオリゴヌクレオチド（例えば、プライマー）と相補的である標的核酸中の配列を指す。したがって、標的配列は、増幅のために標的化される配列全体を指してもよく、又はオリゴヌクレオチドが結合する標的核酸中の部分配列を指してもよい。増幅産物は、標的配列、並びに少なくとも1つの他の配列、又は他のヌクレオチドを含むより大きな分子であってもよい。一部の実施形態では、増幅産物は、標的配列とほぼ同じ長さであるか、又は標的配列と正確に同じ長さである。一部の実施形態では、増幅産物は、標的配列を含む。一部の実施形態では、増幅産物は、標的配列からなる。

【0094】

標的核酸は、例えば、ゲノム核酸、プラスミド核酸、ミトコンドリア核酸、細胞核酸、細胞外核酸、細菌核酸、及びウイルス核酸を含んでもよい。一部の実施形態では、標的核酸は、ゲノムDNA、染色体DNA、プラスミドDNA、ミトコンドリアDNA、遺伝子、あらゆるタイプの細胞RNA、メッセンジャーRNA、細菌RNA、ウイルスRNA、又は合成オリゴヌクレオチドを含んでもよい。ゲノム核酸は、あらゆるゲノム、例えば、動物ゲノム、植物ゲノム、昆虫ゲノム、ウイルスゲノム、及び細菌ゲノム、例えば、胞子に存在するゲノムに由来するあらゆる核酸を含んでもよい。一部の実施形態では、ゲノム標的核酸は、特定のゲノム遺伝子座又は複数のゲノム遺伝子座内に存在してもよい。ゲノム遺伝子座は、オープンリーディングフレームDNA、非転写DNA、イントロン配列、エクソン（*exon*）配列、プロモーター配列、エンハンサー配列、フランキング配列、又は所与のゲノム遺伝子座に関連すると考えられるあらゆる配列のいずれか又は組合せを含んでもよい。標的核酸は、マイクロRNA（*miRNA*）又は小分子干渉RNA（*siRNA*）を含んでもよい。

【0095】

核酸は、あらゆる好適な生物学的検体又は試料から得ることができ、対象から得られた試料から単離されることが多い。対象は、ヒト、非ヒト動物、植物、細菌、真菌、ウイルス、又は原生生物を含むがこれらに限定されない、あらゆる生体又は非生体生物であってもよい。哺乳類、爬虫類、鳥類、両生類、魚類、有蹄動物、反芻動物、ウシ亜科動物（例えば、ウシ）、ウマ科動物（例えばウマ）、ヤギ様及びヒツジ様動物（例えば、ヒツジ、ヤギ）、イノシシ科動物（例えばブタ）、ラクダ科動物（例えば、ラクダ、ラマ、アルパカ）、サル、類人猿（例えば、ゴリラ、チンパンジー）、クマ科動物（例えば、クマ）、家禽、イヌ、ネコ、マウス、ラット、魚類、イルカ、クジラ、及びサメを含むがこれらに限定されない、あらゆるヒト又は非ヒト動物を選択することができる。対象は、雄であってもよく又は雌であってもよく、対象は、あらゆる年齢（例えば、胎芽、胎仔、幼仔、子供、成体）であってもよい。

【0096】

試料又は試験試料は、限定されるものではないが、血液又は血液産物（例えば、血清又は血漿など）、臍帯血、骨髓、絨毛膜絨毛、羊水、脳脊髄液、脊髄液、洗浄液（例えば、気管支肺胞、胃、腹膜、管、耳、関節鏡（arthroscopic））、生検試料、腸穿刺試料、細胞（例えば、血液細胞）又はその一部（例えば、ミトコンドリア、核、又は抽出物など）、雌生殖管の洗浄液、尿、糞便、喀痰、唾液、鼻粘膜、前立腺液、洗浄物、精液、リンパ液、胆汁、涙、汗、母乳、乳房液、硬組織（例えば、肝臓、脾臓、腎臓、肺、又は卵巣）、又はそれらの組合せを含む、対象又はその一部から単離されるか又は得られるあらゆる検体であってもよい。血液という用語は、従来定義されているように、全血、血液産物、又は血清、血漿、若しくは軟膜などの血液のあらゆる画分を包含する。血漿とは、抗凝固剤で処理された血液の遠心分離から得られる全血の画分を指す。血清とは、血液試料が凝固した後に残る流体の水様部分を指す。流体試料又は組織試料は、病院又は診療所が一般に従う標準的プロトコールに準じて収集されることが多い。

10

【0097】

試料又は試験試料は、孢子、ウイルス、細胞、原核生物若しくは真核生物に由来する核酸、又はあらゆる遊離核酸を含む試料を含んでもよい。例えば、本明細書に記載の方法は、孢子の外側にある核酸を検出するために使用することができる（例えば、溶解を必要とせずに）。試料は、上記に記載の対象に由来するものなど、標的配列を含むと疑われるあらゆる物質から単離することができる。一部の実施形態では、標的配列は、空気、植物、土壌、又は生物有機体を含むと疑われる他の物質に存在する。

20

生物学的試料から核酸を単離、抽出及び／又は精製するためのあらゆる好適な方法を使用することができ、その非限定例としては、当技術分野におけるDNA調製方法、並びにQiagen社のQIAamp Circulating Nucleic Acidキット、QIAamp DNAミニキット若しくはQIAamp DNA血液ミニキット（Qiagen、ヒルデン、ドイツ）、Genomic Prep（商標）血液DNA単離キット（Promega、マディソン、ウィスコンシン州）、及びGFX（商標）ゲノム血液DNA精製キット（Amersham、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）など又はそれらの組合せなどの種々の市販試薬又はキットが挙げられる。

【0098】

試料は、試料核酸（例えば、複数種の試料核酸）を含んでもよい。「複数種」という用語は、本明細書では2種又はそれよりも多くを意味するために使用される。したがって、一部の実施形態では、試料は、2種若しくはそれよりも多くの（例えば、3種若しくはそれよりも多くの、5種若しくはそれよりも多くの、10種若しくはそれよりも多くの、20種若しくはそれよりも多くの、50種若しくはそれよりも多くの、100種若しくはそれよりも多くの、500種若しくはそれよりも多くの、1,000種若しくはそれよりも多くの、又は5,000種若しくはそれよりも多くの）試料核酸（例えば、DNA/RNA）を含む。本開示の方法は、試料に（例えば、DNA/RNAなどの核酸の複雑な混合物に）存在する標的核酸を検出するための非常に高感度な方法として使用することができる。一部の実施形態では、試料は、5種、10種、20種、25種、50種、100種、500種、 10^3 種、 5×10^3 種、 10^4 種、 5×10^4 種、 10^5 種、 5×10^5 種、 10^6 種、又は 10^7 種、50種、又はそれよりも多くの、配列が互いに異なるDNA/RNAを含む。一部の実施形態では、試料は、細胞（例えば、真核細胞、哺乳動物細胞、若しくはヒト細胞）又は細胞ライセート（例えば、真核細胞ライセート、哺乳類細胞ライセート、ヒト細胞ライセート、原核細胞ライセート、若しくは植物細胞ライセートなど）に由来するDNA/RNAを含む。

30

40

【0099】

ここで使用される「試料」という用語には、その通常の意味が与えられるものとし、RNA及び／又はDNAを含むあらゆる試料を含むものとする（例えば、標的DNA及び／又は標的RNAがRNA及び／又はDNAの集団中に存在するか否かを決定するための）。試料は、いかなる供給源に由来してもよく、例えば、試料は、精製されたDNA及び／

50

又はRNAの合成的組合せであってもよい；試料は、細胞ライセート、DNA/RNA富化細胞ライセート、又は細胞ライセートから単離及び／若しくは精製されたDNA/RNAであってもよい。試料は、患者に由来してもよい（例えば、診断目的の場合）。試料は、透過化細胞、架橋細胞、組織切片、又はそれらの組合せに由来してもよい。試料は、架橋し続いて脱脂し、屈折率が均一になるように調整することにより調製された組織に由来してもよい。試料は、標的核酸（例えば、標的DNA/RNA）及び複数種の非標的DNA/RNAを含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的DNA/RNAは、 10 、 20 、 25 、 50 、 100 、 500 、 10^3 、 5×10^3 、 10^4 、 5×10^4 、 10^5 、 5×10^5 、 10^6 、又は 10^7 個の非標的DNA/RNA当たり1コピーで試料中に存在する。

10

【0100】

患者に関連する試料は、血液及び生物学的起源の他の液体試料、生検検体又は組織培養物又はそれらに由来する細胞及びそれらの子孫などの固体組織試料、並びに調達後に何らかの方法（試薬による処理など）で操作されているか；洗浄されているか；又はある特定の細胞集団（例えば、がん細胞）若しくは特定タイプの分子（例えば、RNA）が富化された試料を包含する。試料は、血液、血漿、血清、吸引液、脳脊髄液（CSF）などの臨床試料を含むがそれらに限定されない生物学的試料を含んでいてもよく、又は、であってもよく、外科的切除により得られる組織、生検により得られる組織、培養物中の細胞、細胞上清、細胞ライセート、組織試料、器官、及び骨髓なども含む。生物学的試料は、それら（例えば、がん性細胞、感染細胞など）に由来する生物学的流体、例えば、そのような細胞から得られるRNAを含む試料（例えば、RNAを含む細胞ライセート又は他の細胞抽出物）を含んでいてもよい。

20

【0101】

試料の供給源は、罹患した（又は罹患が疑われる）細胞、流体、組織、若しくは器官であってもよく、又は正常な（非罹患の）細胞、流体、組織、若しくは器官であってもよい。一部の実施形態では、試料の供給源は、病原体に感染した（又は感染が疑われる）細胞、組織、又は器官である。例えば、試料の供給源は、感染していてもよく又はしていなくてもよい個体であってもよく、試料は、その個体から収集されるいかなる生物学的試料（例えば、血液、唾液、生検、血漿、血清、気管支肺泡洗浄液、喀痰、糞便試料、脳脊髄液、細針吸引物、スワブ試料（例えば、頬側スワブ、子宮頸部スワブ、鼻腔スワブ）、間質液、滑液、鼻汁、涙、軟膜、粘膜試料、上皮細胞試料（例えば、上皮細胞擦過物）など）であってもよい。試料は、無細胞液体試料であってもよく、又は細胞を含む液体試料であってもよい。病原体は、ウイルス、真菌、原生動物、プラスモジウム（*Plasmodium*）寄生虫、トキソプラズマ（*Toxoplasma*）寄生虫、及びシストソーマ（*Schistosoma*）寄生虫などであってもよい。「蠕虫」としては、回虫、糸状虫、及び植物食性線虫（線虫類）、吸虫（吸虫類（*Tematoda*））、鉤頭虫類、及び条虫（条虫類）が挙げられる。原生動物感染症としては、ジアルジア種（*Giardia* spp.）、トリコモナス種（*Trichomonas* spp.）による感染症、アフリカトリパノソーマ症、アメーバ赤痢、バベシア症、バランチジウム症、シャーガス病、コクシジウム症、マラリア、及びトキソプラズマ症が挙げられる。寄生虫／原生動物病原体などの病原体の例としては、熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）、プラスモディウム・ビバックス（*Plasmodium vivax*）、トリパノソーマ・クルージ（*Trypanosoma cruzi*）、及びトキソプラズマ・ゴンディ（*Toxoplasma gondii*）が挙げられるが、これらに限定されない。真菌病原体としては、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、ヒストプラズマ・カプスラーツム、コクシジオイデス・イミチス、ブラストミセス・デルマティティディス、クラミジア・トラコマティス、カンジダ・アルビカンズ（*Candida albicans*）が挙げられるが、これらに限定されない。病原性ウイルスとしては、例えば、免疫不全ウイルス（例えば、HIV）、インフルエンザウイルス、デング熱、ウエストナイルウイルス、ヘルペスウイルス、黄熱病ウイルス、C型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス

30

40

50

、B型肝炎ウイルス、及びパピローマウイルスなどが挙げられる。病原性ウイルスとしては、パポウイルス（例えば、HPV、ポリオーマウイルス）；ヘパドナウイルス；ヘルペスウイルス（例えば、HSV（例えば、HSV I、HSV II）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、エプスタインバーウイルス（EBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、ヘルペスリンパ向性ウイルス、バラ色糺糖疹（Pityriasis Rosea）、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス）；アデノウイルス（例えば、アタデノウイルス、アビアデノウイルス、イクタデノウイルス（*ichtadenovirus*）、マストアデノウイルス、シアデノウイルス）；ポックスウイルス（例えば、天然痘、ワクシニアウイルス、牛痘ウイルス、サル痘ウイルス、オルフウイルス、偽牛痘、ウシ丘疹性口内炎ウイルス；タナ痘ウイルス、ヤバサル腫瘍ウイルス；伝染性軟属腫ウイルス（MCV））；パルボウイルス（例えば、アデノ随伴ウイルス（AAV）、パルボウイルスB19、ヒトボカウイルス、ブファウイルス（*bufavirus*）、ヒトparv4 G1）；ジェミニウイルス科；ナノウイルス科；及びフィコドナウイルス科などのDNAウイルスを挙げるができる。病原体の非限定的な例としては、マイコバクテリウム・ツベルクロシス（*Mycobacterium tuberculosis*）及びストレプトコッカス・アガラクチア（*Streptococcus agalactiae*）、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）、レジオネラ・ニューモフィラ、ストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）、大腸菌（*Escherichia coli*）、ナイセリア・ゴノレア、ナイセリア・メニンギティディス、肺炎球菌（*Pneumococcus*）、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、ヒストプラズマ・カプスラーツム、B型インフルエンザ菌（*Hemophilus influenzae B*）、梅毒トレポネーマ、ライム病スピロヘータ、シュードモナス・エルギノーサ（*Pseudomonas aeruginosa*）、マイコバクテリウム・レプレ（*Mycobacterium leprae*）、ブルセラ・アボルタス（*Brucella abortus*）、狂犬病ウイルス、ヒト血清パルボ様ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒトT細胞白血球ウイルス、マウス白血病ウイルス、おたふくかぜウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス、イボウイルス、ブルータングウイルス、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、シミアンウイルス40、マウス乳がんウイルス、デング熱ウイルス、風疹ウイルス、トキソプラズマ・ゴンディ、ランゲルトリパノソーマ（*Trypanosoma rangeli*）、トリパノソーマ・クルージ、ローデシアトリパノソーマ（*Trypanosoma rhodesiense*）、トリパノソーマ・ブルセイ（*Trypanosoma brucei*）、マンソン住血吸虫（*Schistosoma mansoni*）、日本住血吸虫（*Schistosoma japonicum*）、バベシア・ボビス（*Babesia bovis*）、アイメリア・テネラ（*Eimeria tenella*）、回旋糸状虫（*Onchocerca volvulus*）、熱帯リーシュマニア（*Leishmania tropica*）、旋毛虫（*Trichinella spiralis*）、タイレリア・パルバ（*Theileria parva*）、胞状条虫（*Taenia hydatigena*）、ヒツジ条虫（*Taenia ovis*）、無鉤条虫（*Taenia saginata*）、単包条虫（*Echinococcus granulosus*）、メソセストイド・コルティ（*Mesocystoides corti*）、マイコプラズマ・アルスリチジス（*Mycoplasma arthritidis*）、M. ハイオリニス（*M. hyorhynis*）、M. オラーレ（*M. orale*）、M. アルギニニ（*M. arginini*）、アコレプラズマ・レイドロウイ（*Acholeplasma laidlawii*）、M. サリバリウム（*M. salivarium*）、及びM. ニューモニエ（*M. pneumoniae*）が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0102】

キット

本明細書に開示されるものには、増幅反応の進行を評価する、モニターする、観察する

、又は追跡するためのキットが含まれる。キットは、互いにハイブリダイズすることが可能な3'重複領域をそれぞれ含む第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーであって、第1の品質管理プライマーがクエンチ可能な標識を含む、第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーを含んでもよい。一部の実施形態では、第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーのそれぞれは、35ヌクレオチド長以下である。

【0103】

クエンチ可能な標識は、フルオロフォアであってもよい。クエンチ可能な標識は、第1の品質管理プライマーの3'重複領域の外側にあってもよい。クエンチ可能な標識は、第1の品質管理プライマーの5'末端にあってもよい。クエンチ可能な標識は、第1の品質管理プライマーの3'重複領域中にあってもよい。第2の品質管理プライマーは、クエンチャーを含んでもよい。クエンチャーは、第2の品質管理プライマーの3'重複領域の外側にあってもよい。クエンチャーは、第2の品質管理プライマーの5'末端にあってもよい。クエンチャーは、第2の品質管理プライマーの3'重複領域中にあってもよい。

10

【0104】

第1の品質管理プライマー、第2の品質管理プライマー、又はその両方は、1種又は複数種の修飾ヌクレオチドを含んでもよい。第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域はそれぞれ、1種又は複数種の修飾ヌクレオチドを含んでもよい。1種又は複数種の修飾ヌクレオチドは、スパーサー、脱塩基部位、非メチル化RNA塩基、2'-O-メチル化ヌクレオチド、及びそれらのあらゆる組合せを含んでもよい。1種又は複数種の修飾ヌクレオチドのうちの少なくとも1種は、2'-O-メチル化ヌクレオチドであってもよい。第1の品質管理プライマー、第2の品質管理プライマー、又はその両方は、1種又は複数種のポリメラーゼストッパーを含んでもよい。一部の実施形態では、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域はそれぞれ、1種又は複数種のポリメラーゼストッパーを含んでもよい。一部の実施形態では、1種又は複数種のポリメラーゼストッパーのうちの少なくとも1種は、2'-O-メチル化ヌクレオチドであってもよい。

20

【0105】

第1の品質管理プライマーの3'重複領域は、第2の品質管理プライマーの3'重複領域に相補的であってもよい。第1の品質管理プライマーの3'重複領域は、第2の品質管理プライマーの3'重複領域に完全に相補的であってもよい。一部の実施形態では、第1の品質管理プライマーの3'重複領域及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域は、同じ長さを有する。第1の品質管理プライマーの3'重複領域及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域の1種又は複数種は、約2〜約10ヌクレオチド長であってもよい。第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域は4又は5ヌクレオチド長であってもよい。

30

【0106】

キットは、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、dNTP、及び緩衝剤の1種又は複数種を含んでもよい。超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号1又はその機能的断片のアミノ酸配列と少なくとも約90%又は少なくとも約95%同一であってもよいアミノ酸配列を有する。超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含んでもよい。キットは、例えば、反応に使用される修飾ヌクレオチド、ベッセル、キュベット、若しくは他の容器、又は凍結乾燥若しくは加熱乾燥された成分を再水和するための水若しくは緩衝液のバイアルをさらに含んでもよい。使用される緩衝液は、例えば、ポリメラーゼ活性及びプライマーアニリング活性の両方に適したものであってもよい。キットは、1種若しくは複数種の追加のプライマー及び／又は標的核酸に特異的な1種若しくは複数種のプローブを含んでもよい。

40

【0107】

また、キットは、あらゆる数の別々のベッセル、チャンバー、容器、パケット、チューブ、バイアル、及びマイクロタイタープレートなど中に成分の1種又は複数種を含んでもよく、又は成分をそのような容器中で種々の組合せで一緒にしてもよい。キットの成分は、例えば、1つ又は複数の容器に存在してもよい。一部の実施形態では、成分のすべ

50

てが1つの容器に提供されている。一部の実施形態では、酵素（例えば、ポリメラーゼ及び／又は逆転写酵素）は、プライマーとは別々の容器に提供されていてもよい。成分は、例えば、凍結乾燥されていてもよく、加熱乾燥されていてもよく、フリーズドライされていてもよく、又は安定緩衝液中に存在してもよい。一部の実施形態では、ポリメラーゼ及び／又は逆転写酵素は、単一の容器中に凍結乾燥形態又は加熱乾燥形態で存在し、プライマーは、異なる容器において、凍結乾燥されているか、加熱乾燥されているか、フリーズドライされているか、又は緩衝液中に存在するかのいずれかである。一部の実施形態では、ポリメラーゼ及び／又は逆転写酵素並びにプライマーは、単一の容器中に凍結乾燥形態又は加熱乾燥形態で存在する。

【0108】

本明細書に記載の組成物（例えば、乾燥組成物）は、「乾燥形態」で、又は液体媒体に懸濁していない形態で提供することができる。組成物の「乾燥形態」としては、乾燥粉末、凍結乾燥組成物、噴霧乾燥組成物、又は沈殿組成物を挙げることができる。「乾燥形態」組成物としては、スクロース、ラクトース、トレハロース、デキストラン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、及びマンニトールなどの糖及びそれらの対応する糖アルコール；アルギニン及びヒスチジンなどのアミノ酸； $MgSO_4$ などのリオトロピック塩；プロピレングリコール、グリセロール、ポリ（エチレングリコール）、又はポリプロピレングリコールなどのポリオール；及びそれらの組合せなどの1種又は複数種の凍結乾燥保護剤を挙げることができる。追加の例示的な凍結乾燥保護剤としては、ゼラチン、デキストリン、加工デンプン、及びカルボキシメチルセルロースが挙げられる。本明細書で使用される場合、「凍結乾燥」、「凍結乾燥された」、及び「フリーズドライ」という用語は、乾燥しようとする物質をまず凍結させ、次いで氷又は凍結溶媒を真空環境での昇華により除去するプロセスを指す。「凍結乾燥物」は、凍結乾燥された物質を指す。本明細書に開示されるように、乾燥組成物は、1種又は複数種の添加剤及び1種又は複数種の増幅試薬を含んでもよい。

【0109】

乾燥組成物は、凍結又は凍結乾燥又は噴霧乾燥されていてもよい。乾燥組成物は、加熱乾燥されていてもよい。乾燥組成物は、1種又は複数種の添加剤（例えば、ポリマー、糖、又は糖アルコール）を含んでもよい。糖又は糖アルコールは、スクロース、ラクトース、トレハロース、デキストラン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、又はそれらのあらゆる組合せを含んでもよい。ポリマーは、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルセルロース、フィコール、アルブミン、ポリペプチド、コラーゲンペプチド、又はそれらのあらゆる組合せを含んでもよい。1種又は複数種の添加剤は、1種又は複数種のアミノ酸を含んでもよい。1種又は複数種の添加剤は、Tween 80、Tween 20及び／又はTriton X-100を含んでもよい。一部の実施形態では、1種又は複数種の添加剤は、反応組成物の凍結乾燥及び／又は乾燥ペレットの溶解を支援する。1種又は複数種の添加剤は、乾燥組成物（例えば、乾燥ペレット）中に約0.01%の濃度で非イオン性表面活性剤を含んでもよい。

凍結若しくは凍結乾燥若しくは噴霧乾燥若しくは加熱乾燥された組成物、又は凍結若しくは凍結乾燥若しくは噴霧乾燥された組成物を調製するための水性組成物は、以下のものの1種又は複数種を含んでもよい：（i）エチレングリコール、グリセロール、ジメチルスルホキシド、及びジメチルホルムアミドなどの非水性溶媒。（ii）Tween 80、Brij 35、Brij 30、Lubrol-px、Triton X-10；ポロキサマーとしても知られているPluronic F127（ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー）、ポロキサミン、及びSDSなどの界面活性剤。（iii）トレハロース、スクロース、ラクトース、及びマルトースなどのジサッカリド。（iv）ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルセルロース、フィコ

ール、及びアルブミンなどのポリマー（異なるMWを有してもよい）。（v）グリシン、プロリン、4-ヒドロキシプロリン、L-セリン、グルタミン酸、アラニン、リジン、サルコシン、ガンマーアミノ酪酸などのアミノ酸。第1の品質管理プライマー及び第2の品質管理プライマーは、凍結乾燥又はフリーズドライ形態であってもよい。超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、dNTP、及び緩衝剤の1種又は複数種は、凍結乾燥又はフリーズドライ形態であってもよい。

【0110】

キットは、本明細書に記載の1つ若しくは複数の方法を実施するための使用指示書、及び／又は本明細書に記載の1種若しくは複数種の成分の説明書を含んでいてもよい。使用指示書及び／又は説明書は印刷物の形態であってもよく、キット添付文書に含まれていてもよい。また、キットは、そのような使用指示書又は説明書を提供するインターネット上の場所の書面による記載を含んでいてもよい。一部の実施形態では、キットは、検出法に使用される試薬、例えば、FRET、側方流動デバイス、ディップスティック、蛍光色素、コロイド金粒子、ラテックス粒子、分子ビーコン、又はポリスチレンビーズに使用される試薬を含む。

【実施例】

【0111】

上記で考察されている実施形態の一部の態様を、以下の実施例においてさらに詳細に開示するが、これらはいかなる点でも本開示の範囲を限定することを意図するものではない。

【0112】

（実施例1）

DIMER内部対照

この実施例は、増幅反応のモニタリングを記載する。

フォワード及びリバースICプライマーを、増幅反応において使用した。フォワードICプライマーは、その5'末端にフルオロフォアが結合しており、リバースICプライマーは、その5'末端でクエンチャーと結合している（図1）。反応の開始時に、フォワード及びリバースICプライマーは、個別に溶液中にあり、したがって、フォワードICプライマー上のフルオロフォアは、完全に発光している（高いシグナルを生成している）（図2）。古細菌ポリメラーゼ増幅（APAA）反応が進行するにつれて、Dimer-ICアンプリコン（例えば、伸長された二重鎖）は、シグナルの低下を引き起こすFRETクエンチングが起こり得るように、フルオロフォア及びクエンチャーをごく近くに持って行く。したがって、図2に示されるように、最終的には「逆位」増幅曲線が産生される。

【0113】

図3A～図3Bは、本明細書に開示されるDimer-ICシステムを使用して観察された逆位増幅曲線を示す：

フォワードプライマー（FP1）+リバースプライマー（RP3）（5bp重複）、
フォワードプライマー（FP1）+リバースプライマー（RP2）（4bp重複）、
フォワードプライマーのみの対照（FP1のみ）（増幅はないと予想される）。

挿入色素シグナル（同じ反応において実行される）は、増幅が意図された通りに起こったことを示していた。

図4は、一対の品質管理プライマー：（1）配列番号3の配列を有するフォワード品質管理プライマーFP3及びヌクレオチド位置10での内部2'OM修飾並びに（2）配列番号5の配列を有するリバース品質管理プライマーRP4及びヌクレオチド位置9での内部2'OM修飾を示す。

【0114】

一部の場合、他のオリゴを用いた品質プライマーによる意図しないプライマー伸長を、品質管理プライマー中への2'OM修飾を有する1種又は複数種のヌクレオチドの含有によって防止することができる。図5Aに示されるように、非ICプライマーオリゴヌクレオチドを用いたフォワード品質管理プライマー（FP3）のヌクレオチド位置12～13

で起こる意図しないハイブリダイゼーションからの核酸伸長は、DNAポリメラーゼが、FP3中の位置10での2'-OM修飾ヌクレオチドを読み通すことができないため、停止される。一部の実施形態では、意図しないプライマー伸長（例えば、ヒトgDNA上での）及び意図しないリバースプライミングによる（反応中に存在する他のプライマーの1種による）その後の増幅を、品質管理プライマーの1個又は複数個の位置での修飾ヌクレオチド（例えば、2'-OM修飾を有するヌクレオチド）の含有によって同様に防止する（又は有意に低減させる）ことができる。図5Bに示されるように、DNAポリメラーゼが、描写されるフォワード品質管理プライマーFP3中のヌクレオチド位置10を読み通すことができないことにより、この品質管理プライマーは非特異的増幅に対してはるかに強くなる。

10

【0115】

図6A～図6Cに示されるように、クエンチ可能な標識及びクエンチャーを、品質管理プライマーの様々な領域に、例えば、第1及び第2の品質管理プライマーの3'重複領域の外側及び／又は内側に置くことができる。いかなる特定の理論によっても束縛されるものではないが、フォワード品質管理プライマーの3'重複領域中にクエンチ可能な標識を置き、リバース品質管理プライマーの3'重複領域中にクエンチャーを置くことは、接触クエンチング（FRETクエンチングとは対照的である）をもたらし、シグナルのより大きな変化をもたらし得ることが予想される（図6B）。

前述の実施形態の少なくとも一部では、ある実施形態で使用された1種又は複数種の要素は、そのような置き換えが技術的に実行不可能でない限り、別の実施形態で互換的に使用することができる。当業者であれば、特許請求されている主題の範囲から逸脱することなく、上記に記載の方法及び構造に対して、種々の他の省略、追加、及び改変をなすことができることを理解するだろう。そのような改変及び変更はすべて、添付の特許請求の範囲により規定される主題の範囲内に入ることが意図されている。

20

【0116】

本明細書における実質的にあらゆる複数及び／又は単数の用語の使用に関して、当業者であれば、状況及び／又は応用に依じて、複数から単数へと及び／又は単数から複数へと言い換えることができる。明確性のため、種々の単数／複数の入れ替えは、本明細書では明示的に記載されている場合がある。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、状況が明らかに別様に指示しない限り、複数の参照を含む。本明細書における「又は」へのあらゆる言及は、別様の記載のない限り、「及び／又は」を包含することが意図されている。

30

【0117】

当業者であれば、一般に、本明細書及び特に添付の特許請求の範囲（例えば、添付の特許請求の範囲の本文）で使用されている用語は、一般に「オープン」用語（例えば、「含むこと（including）」という用語は「含むが、それに限定されない」と解釈されるべきであり、「有すること（having）」という用語は「少なくとも有する」と解釈されるべきであり、「含む（includes）」という用語は「含むが、それに限定されない」と解釈されるべきである、など）であることが意図されていることを理解するだろう。さらに、当業者であれば、導入された請求項記載において特定の数が意図されている場合、そのような意図は請求項に明示的に記載されることになり、そのような記載がない場合にはそのような意図は存在しないことが理解されるであろう。例えば、理解を助けるために、以下の添付の特許請求の範囲には、請求項記載を導入するために「少なくとも1つ」及び「1つ又は複数」という導入語句の使用を含む場合がある。しかしながら、そのような語句の使用は、同じ請求項が、「1つ又は複数」又は「少なくとも1つ」という導入語句、及び「a」又は「an」などの不定冠詞を含む（例えば、「a」及び／又は「an」は「少なくとも1つ」又は「1つ又は複数」を意味すると解釈されるべきである）場合であっても、不定冠詞「a」又は「an」による請求項記載の導入が、そのような導入された請求項記載を含むあらゆる特定の請求項を、1つのみのそのような記載を含む実施形態に限定することを意味するものであると解釈されるべきではない。請求項記載

40

50

を導入するために使用される定冠詞の使用にも同じことが当てはまる。加えて、導入された請求項記載において特定の数が明示的に記載されている場合であっても、当業者であれば、そのような記載は、少なくとも記載された数を意味すると解釈されるべきであることを認識するであろう（例えば、「2つの記載」の基本記載は、他の修飾語がない場合、少なくとも2つの記載、又は2つ若しくはそれよりも多くの記載を意味する）。さらに、「A、B、及びCなどの少なくとも1つ」と類似する慣例が使用される場合、一般に、そのような構成は、当業者であればその慣例を理解するだろうという意味で意図されている（例えば、「A、B、及びCの少なくとも1つを有する系」は、Aのみ、Bのみ、Cのみ、A及びBを共に、A及びCを共に、B及びCを共に、並びに／又はA、B、及びCを共に有する系などを含むが、それらに限定されないだろう）。「A、B、又はCなどの少なくとも1つ」と類似する慣例が使用される場合では、一般に、そのような構成は、当業者であればその慣例を理解するだろうという意味で意図されている（例えば、「A、B、又はCの少なくとも1つを有する系」は、Aのみ、Bのみ、Cのみ、A及びBを共に、A及びCを共に、B及びCを共に、並びに／又はA、B、及びCを共に有する系などを含むが、それらに限定されないだろう）。さらに、当業者であれば、明細書、特許請求の範囲、又は図面のいずれにおいても、2つ又はそれよりも多くの代替用語を提示する事実上あらゆる選言的な単語及び／又は語句は、そうした用語、そうした用語のいずれか、又は両用語の1つを含む可能性を企図すると理解されるべきであることを理解するだろう。

10

【0118】

加えて、本開示の特徴又は態様がマーカッシュ群の観点で記載されている場合、当業者であれば、それにより本開示が、マーカッシュ群のあらゆる個々のメンバー又はメンバーの部分群の観点でも記載されていることを認識するだろう。

20

当業者であれば理解することになるように、書面による説明を提供するという観点など、ありとあらゆる目的のために、本明細書に開示のすべての範囲は、ありとあらゆる考え得る部分範囲及びそれらの部分範囲の組合せも包含する。列挙されている範囲はいずれも、十分に説明されているように、同じ範囲を少なくとも二等分、三等分、四等分、五等分、十等分などに分割することができるものであると容易に認識することができる。非限定的な例として、本明細書で考察されている各範囲は、下位三分の一、中位三分の一、及び上位三分の一などに容易に分割することができる。また、当業者であれば理解することになるように、「～まで」、「少なくとも」、「よりも大きい」、及び「未満」などのすべての文言は、記載されている数値を含み、上記で考察されているように後に部分範囲へと分割することができる範囲を指す。最後に、当業者であれば理解することになるように、範囲は、各々個々のメンバーを含む。したがって、例えば、1～3つの項目を含む群は、1、2、又は3つの項目を含む群を指す。同様に、1～5つの項目を含む群は、1、2、3、4、又は5つの項目を含む群を指す、などである。

30

【0119】

種々の態様及び実施形態が本明細書に開示されているが、当業者であれば、他の態様及び実施形態は明らかであろう。本明細書で開示される種々の態様及び実施形態は、例示を目的とするものであり、限定を意図するものではなく、真の範囲及び趣旨は以下の特許請求の範囲により示される。

40

【図面】
【図 1】

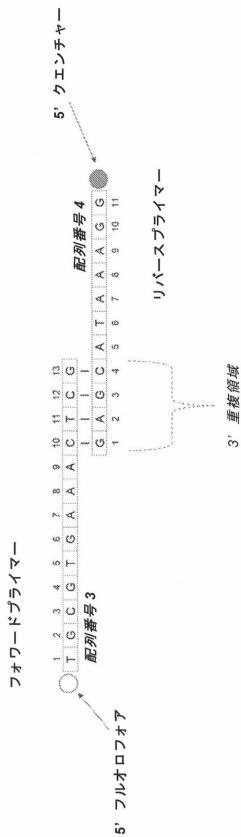


FIG. 1

【図 2 - 1】

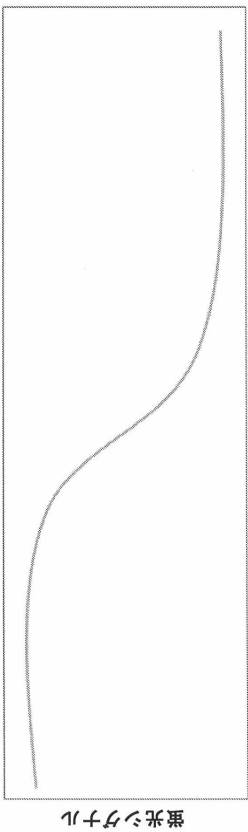
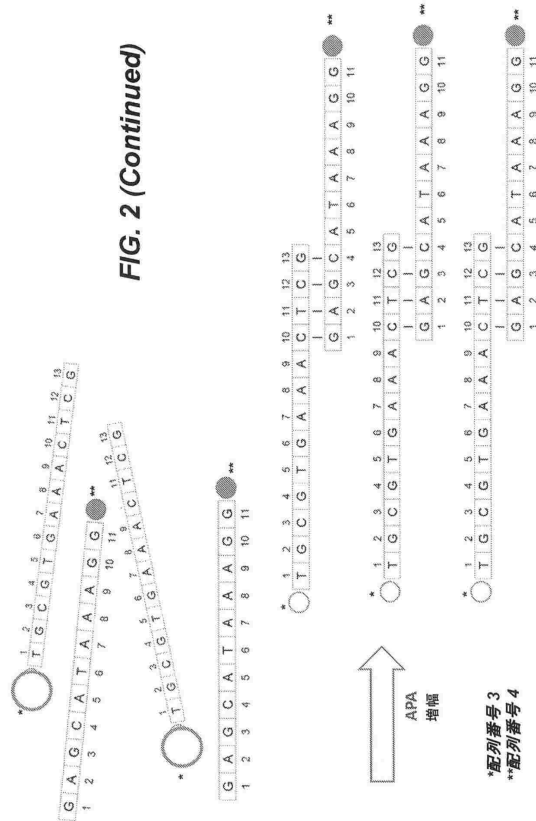


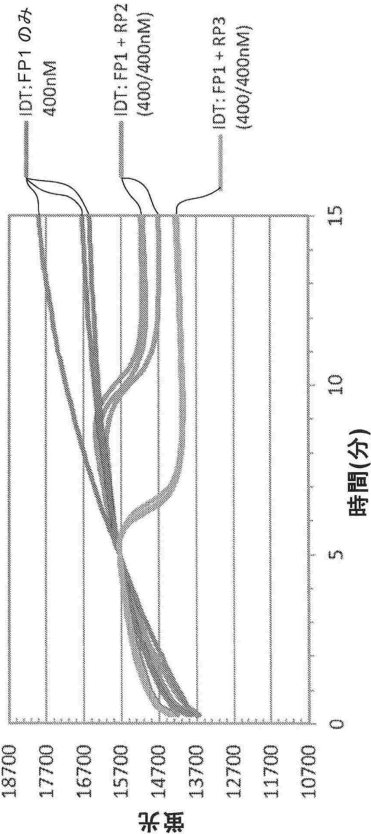
FIG. 2

【図 2 - 2】

FIG. 2 (Continued)



【図 3 A】



Hex:
クエンチャー/フルオロフォア

FIG. 3A

【図 3 B】

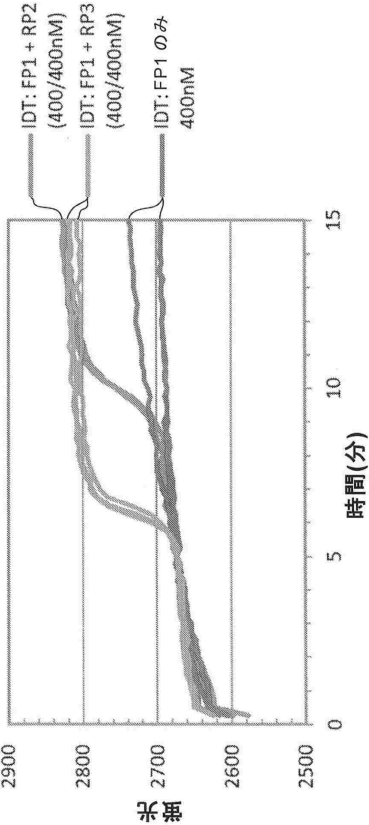


FIG. 3B

【図 4】

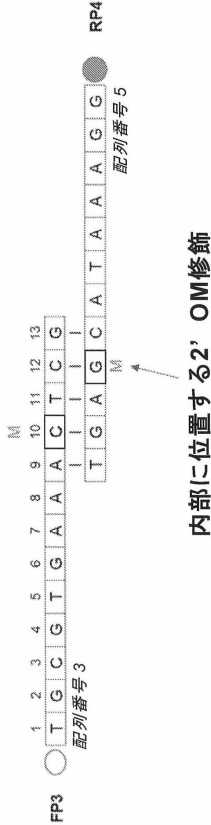


FIG. 4

【図 5 A】

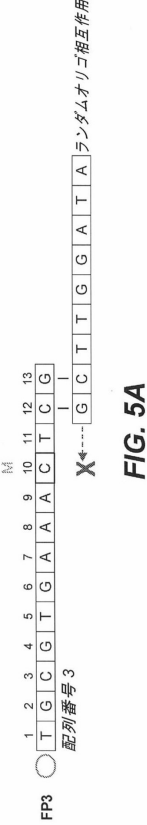


FIG. 5A

【図 5 B】

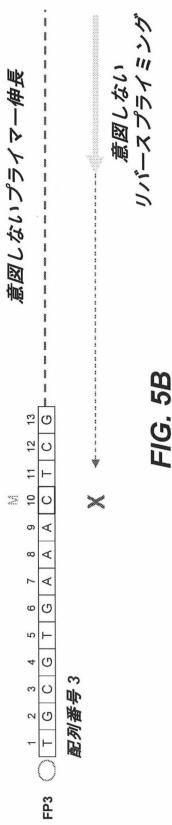


FIG. 5B

【図 6 A】

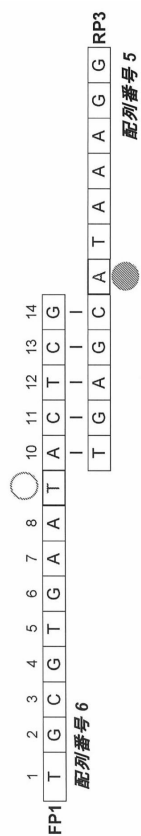


FIG. 6A

【図 6 B】

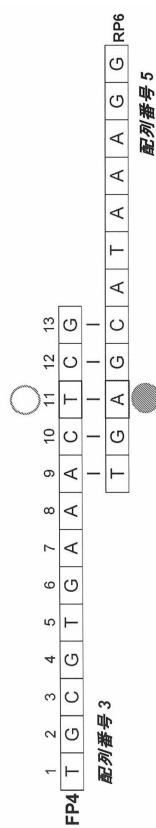


FIG. 6B

10

20

【図 6 C】

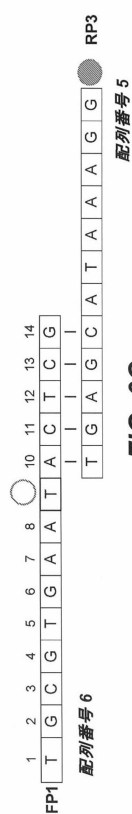


FIG. 6C

30

40

50

【配列表】
2025507309000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062485

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6844
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
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 practicable, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/163064 A1 (UNIV KEIO [JP]; NIKON CORP [JP]) 29 August 2019 (2019-08-29) the whole document figure 8 ----- -/--	43-73

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family 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 application or patent 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 (as specified)

"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

"T" 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

"Y" 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 May 2023

Date of mailing of the international search report

25/05/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ulbrecht, Matthias

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/062485

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062485

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEGGATE JOHANNA ET AL: "An Internal Amplification Control System Based on Primer-Dimer Formation for PCR Product Detection by DNA Hybridization", JOURNAL OF FOOD PROTECTION, vol. 69, no. 9, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 2280-2284, XP055903831, Retrieved from the Internet: URL:https://meridian.allenpress.com/jfp/article/69/9/2280/171449/An-Internal-Amplification-Control-System-Based-on> abstract table 1 page 2281, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 4	43-73
A	MARY KATHERINE JOHANSSON ED - VLADIMIR V DIDENKO (ED): "Choosing Reporter-Quencher Pairs for Efficient Quenching Through Formation of Intramolecular Dimers", 1 January 2006 (2006-01-01), FLUORESCENT ENERGY TRANSFER NUCLEIC ACID PROBES : DESIGNS AND PROTOCOLS; IN: METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY; ISSN 1064-3745; VOL. 1045; FLUORESCENT ENERGY TRANSFER NUCLEIC ACID PROBES : DESIGNS AND PROTOCOLS; [METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY; ISSN 1064-37, XP008170702, ISBN: 978-1-58829-380-0 the whole document	1-73
A	ROHAN T. RANASINGHE ET AL: "Fluorescence based strategies for genetic analysis", CHEMICAL COMMUNICATIONS, no. 44, 1 January 2005 (2005-01-01), page 5487, XP055009074, ISSN: 1359-7345, DOI: 10.1039/b509522k the whole document	1-73

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 Q 1/6876(2018.01)

F I

C 1 2 Q

1/6876

Z

テーマコード (参考)

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,
ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C
O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX
,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T R I T O N

3. B R I J

4. P L U R O N I C

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100123766

弁理士 松田 七重

(72)発明者 リチャート グレゴリー エイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サンディエゴ トレヤナ ロード 1 1 0 1 1

(72)発明者 トラ シドニー ブライス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サンディエゴ トレヤナ ロード 1 1 0 1 1

(72)発明者 タイラー エジャン マリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サンディエゴ トレヤナ ロード 1 1 0 1 1

(72)発明者 チャン ホンファ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サンディエゴ トレヤナ ロード 1 1 0 1 1

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ53 QR08 QR55 QR62 QS25 QS26 QS34

QS36 QX02