

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4657454号
(P4657454)

(45) 発行日 平成23年3月23日 (2011.3.23)

(24) 登録日 平成23年1月7日 (2011.1.7)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 26 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願2000-594952 (P2000-594952)
 (86) (22) 出願日 平成11年12月10日 (1999.12.10)
 (65) 公表番号 特表2002-534986 (P2002-534986A)
 (43) 公表日 平成14年10月22日 (2002.10.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1999/029253
 (87) 国際公開番号 W02000/043544
 (87) 国際公開日 平成12年7月27日 (2000.7.27)
 審査請求日 平成18年11月16日 (2006.11.16)
 (31) 優先権主張番号 09/233, 413
 (32) 優先日 平成11年1月19日 (1999.1.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500137976
 アベンティス・ファーマスーティカルズ・
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国ニュージャージー州088
 07,ブリッジウォーター,コーポレイト
 ドライブ55
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100091731
 弁理士 高木 千嘉
 (74) 代理人 100080355
 弁理士 西村 公佑

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチドの伸長の制御方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリヌクレオチドの混合物中における標的ポリヌクレオチド配列に沿ったオリゴヌクレオチドプライマーの選択的伸長方法であって、その方法が、

(a) 前記混合物、修飾を有するオリゴヌクレオチドプライマー、およびその修飾に対する抗体を組合せて用意し、ここで抗体はオリゴヌクレオチドに結合して、オリゴヌクレオチドと標的ポリヌクレオチドとのハイブリダイズを阻害することで、標的ポリヌクレオチド配列に沿ったオリゴヌクレオチドの伸長を抑制するものであり、そして

(b) 前記組合せの温度を、抗体を不可逆的に変性して、特定の標的ポリヌクレオチド配列に沿ってオリゴヌクレオチドプライマーを選択的に伸長させるのに十分なレベルに調整することからなる方法。

【請求項 2】

鋳型ポリヌクレオチドに沿ったオリゴヌクレオチドの伸長を制御する方法であって、その方法が、

(a) 媒体中にて (i) 鋳型ポリヌクレオチド、(ii) その鋳型ポリヌクレオチドとハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであって、そのオリゴヌクレオチドは修飾部分を含むもの、(iii) 鋳型ポリヌクレオチドに沿ったオリゴヌクレオチドの伸長に必要な全ての試薬、および (iv) 前記修飾部分に対する抗体であって、該抗体が修飾部分に結合して、オリゴヌクレオチドと鋳型ポリヌクレオチドとのハイブリダイズを阻害することで、鋳型ポリヌクレオチドに沿ったオリゴヌクレオチドの伸長を抑制するもの、を組合せて用意し、そし

10

20

て

(b) その組合せの温度を上昇させてオリゴヌクレオチドから抗体を不可逆的に解離させ、鋳型ポリヌクレオチドに沿ってオリゴヌクレオチドを伸長させることからなる方法。

【請求項 3】

修飾部分が修飾ヌクレオチドである請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

修飾ヌクレオチドが、非天然のヌクレオチドであるか、または鎖の伸長ができないように修飾を導入した 3' - ヒドロキシル基を有する天然のヌクレオチドであって、該 3' - ヒドロキシル基に導入された修飾は、鋳型ポリヌクレオチドに沿ってオリゴヌクレオチドを伸長させる前に除去される、請求項 3 に記載の方法。

10

【請求項 5】

3' - ヒドロキシル基に導入された修飾が、エステル、アミド、スルフェートまたはグリコシドを形成する修飾である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

鋳型ポリヌクレオチドが DNA または RNA である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

ポリメラーゼ連鎖反応、単一プライマー増幅または転写をベースにした核酸増幅からなる群から選択される核酸増幅方法の一部である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

(a) (i) 標的ポリヌクレオチド配列を含有すると推測される媒体、(ii) その標的ポリヌクレオチド配列の増幅を実施するために必要な全ての試薬を組合せて用意し、ここでその試薬はヌクレオチドポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸および標的ポリヌクレオチド配列に沿って伸長可能な少なくとも 1 つのプライマーを含むものであり、そして

20

(b) 前記組合せを標的ポリヌクレオチド配列の増幅条件に付することからなり、

前記プライマーが修飾部分を含み、そして抗体が修飾部分に結合して、プライマーと標的ポリヌクレオチドとのハイブリダイズを阻害することで、標的ポリヌクレオチド配列に沿ったプライマーの伸長を抑制しうるものであり、温度サイクル過程における温度上昇により抗体をプライマーから不可逆的に放出して、これによりプライマーを標的ポリヌクレオチド配列と結合させ、これに沿って伸長させることを特徴とする、標的ポリヌクレオチド配列の増幅方法。

30

【請求項 9】

修飾部分が修飾ヌクレオチドである請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

修飾ヌクレオチドが、非天然のヌクレオチドであるか、または鎖の伸長ができないように修飾を導入した 3' - ヒドロキシル基を有する天然のヌクレオチドであって、該 3' - ヒドロキシル基に導入された修飾は、プライマーを伸長させる前に除去される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

3' - ヒドロキシル基に導入された修飾が、エステル、アミド、スルフェートまたはグリコシドを形成する修飾である、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

標的ポリヌクレオチドが DNA または RNA である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

唯一つのプライマーを使用し、且つ、標的配列が、該プライマーがハイブリダイズするその 3' 末端の配列とハイブリダイズしうる少なくとも 10 塩基配列をその 5' 末端に含むことを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

第 1 および第 2 プライマーを用いて、伸長した第 1 プライマーが第 2 プライマーの鋳型であり、伸長した第 2 プライマーが第 1 プライマーの鋳型であることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

50

【請求項 15】

標的ポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列（標的配列）の増幅方法であって、その方法が

（a）第1オリゴヌクレオチドプライマー（第1プライマー）を標的配列の3'末端とハイブリダイズさせ、

（b）ポリメラーゼおよびヌクレオチド三リン酸の存在下にて第1プライマーを少なくとも標的配列に沿って伸長させて、伸長した第1プライマーを形成させ、ここで第1プライマーが（1）伸長した第1プライマーまたは（2）伸長した第2オリゴヌクレオチドプライマー（第2プライマー）とハイブリダイズして、これに沿って伸長しうるものであり、伸長した第2プライマーが標的配列と相補的なポリヌクレオチド（相補的ポリヌクレオチド）とハイブリダイズしてこれに沿って伸長しうる第2プライマーの伸長の結果として生じたものであり、

（c）伸長した第1プライマーを標的配列から解離させ、

（d）第1プライマーまたは第2プライマーを伸長した第1プライマーの3'末端とハイブリダイズさせ、

（e）第1プライマーまたは第2プライマーを伸長した第1プライマーに沿って伸長させる、

（f）伸長した第1プライマーまたは伸長した第2プライマーを伸長した第1プライマーから解離させ、

（g）第1プライマーを伸長した第1プライマーまたは伸長した第2プライマーの3'末端とハイブリダイズさせ、そして

（h）工程（e）～（g）を反復温度サイクルにより繰り返すことからなり、第1プライマーおよび第2プライマーの少なくとも1つが、標的ポリヌクレオチドと結合する部分に修飾ヌクレオチドを含み、その修飾ヌクレオチドに対する抗体を前記組合せ中に包含させ、その抗体は修飾ヌクレオチドに結合して、プライマーと標的ポリヌクレオチドとのハイブリダイズを阻害することで、標的配列に沿って前記プライマーの少なくとも1つが伸長するのを抑制しうるものであり、且つ抗体を前記温度サイクル過程における温度上昇によりプライマーの少なくとも1つから不可逆的に放出させ、これによりプライマーの少なくとも1つを標的ポリヌクレオチド配列と結合させてこれに沿って伸長させることを特徴とする方法。

【請求項 16】

修飾ヌクレオチドが、非天然のヌクレオチドであるか、または鎖の伸長ができないように修飾を導入した3'-ヒドロキシル基を有する天然のヌクレオチドであって、該3'-ヒドロキシル基に導入された修飾は、プライマーを伸長させる前に除去される、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

3'-ヒドロキシル基に導入された修飾が、エステル、アミド、スルフェートまたはグリコシドを形成する修飾である、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

標的ポリヌクレオチドがDNAまたはRNAである請求項15に記載の方法。

【請求項 19】

第1プライマーのみを用いて、標的配列がその5'末端において、そのプライマーとハイブリダイズする標的配列の3'末端の配列とハイブリダイズしうる少なくとも10塩基配列を含むことを特徴とする、請求項15に記載の方法。

【請求項 20】

第1プライマーおよび第2プライマーが異なり、伸長した第1プライマーが第2プライマーの鋳型であり、そして伸長した第2プライマーが第1プライマーの鋳型であることを特徴とする請求項15に記載の方法。

【請求項 21】

修飾ヌクレオチドがオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端部分にある請求項15に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 2 2】

標的ポリヌクレオチドの標的配列の検出方法であって、その方法が (a) (i) 第 1 オリゴヌクレオチドプライマー (第 1 プライマー) を標的配列の 3 末端とハイブリダイズさせ、

(ii) ポリメラーゼおよびヌクレオチド三リン酸の存在下にて第 1 プライマーを少なくとも標的配列に沿って伸長させて、伸長した第 1 プライマーを形成させ、第 1 プライマーが (1) 伸長した第 1 プライマーまたは (2) 伸長した第 2 オリゴヌクレオチドプライマー (第 2 プライマー) とハイブリダイズして、これに沿って伸長しうるものであり、伸長した第 2 プライマーが標的配列と相補的なポリヌクレオチド (相補的ポリヌクレオチド) とハイブリダイズしてこれに沿って伸長しうる第 2 プライマーの伸長の結果として生じたものであり、

(iii) 伸長した第 1 プライマーを標的配列から解離させ、

(iv) 第 1 プライマーまたは第 2 プライマーを伸長した第 1 プライマーの 3 末端とハイブリダイズさせ、

(v) 第 1 プライマーまたは第 2 プライマーを伸長した第 1 プライマーに沿って伸長させ、

(vi) その伸長した第 1 プライマーまたは伸長した第 2 プライマーを伸長した第 1 プライマーから解離させ、

(vii) 第 1 プライマーを伸長した第 1 プライマーまたは伸長した第 2 プライマーの 3 末端とハイブリダイズさせ、そして

(viii) 工程 (v) ~ (vii) を繰り返すことからなる方法により標的配列を増幅させ、次いで

(b) 伸長した第 1 プライマーおよび / または伸長した第 2 プライマーを検出することからなり、

第 1 プライマーおよび第 2 プライマーの少なくとも 1 つが、標的ポリヌクレオチドと結合する部分に修飾ヌクレオチドを含み、その修飾ヌクレオチドに対する抗体を前記組合せ中に包含させ、その抗体は修飾ヌクレオチドに結合して、プライマーと標的ポリヌクレオチドとのハイブリダイズを阻害することで、標的配列に沿って前記プライマーの少なくとも 1 つが伸長するのを抑制しうるものであり、且つ抗体を前記温度サイクル過程における温度上昇により前記プライマーの少なくとも 1 つから不可逆的に放出させ、これにより前記プライマーの少なくとも 1 つを標的ポリヌクレオチド配列と結合させてこれに沿って伸長させることを特徴とする方法。

【請求項 2 3】

工程 (v) ~ (vii) の繰り返しを反復温度サイクルにより実施される請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

標的ポリヌクレオチドが DNA または RNA である請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

第 1 プライマーのみを用いて、標的配列がその 5 末端において、その第 1 プライマーとハイブリダイズする標的配列の 3 末端の配列とハイブリダイズしうる少なくとも 10 塩基配列を含むことを特徴とする、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 6】

第 1 プライマーおよび第 2 プライマーが異なり、伸長した第 1 プライマーが第 2 プライマーの鋳型であり、そして伸長した第 2 プライマーが第 1 プライマーの鋳型であることを特徴とする請求項 2 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の背景】

1. 本発明の技術分野

10

20

30

40

50

著しく高い疾病率および死亡率は、感染症と関連する。より早く正確な診断方法が、疾病のより優れたモニタリングおよび治療に必要とされている。DNAプローブ、核酸ハイブリダイゼーションおよびインビトロでの増幅技術を用いた分子的手法は、患者の診断に使われているある慣用法に利点をもたらす将来有望な方法である。

【0002】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法として知られたDNAの特異的断片の酵素学的増幅方法は、今までに記述されている。このインビトロにおける増幅方法は、変性、オリゴヌクレオチドプライマーのアニ-リング、および好熱菌のポリメラーゼによるプライマー伸長の繰り返しサイクルをベースとし、その結果、隣接領域のコピー数が急激に増加することになる。DNAの反対のストランドにアニ-ルしている、異なったPCRプライマーは、ポリメラーゼが触媒する1個のプライマーの伸長産物が、もう一方の鎖の鋳型として役立ち、不連続断片を蓄積させ、その断片の長さはオリゴヌクレオチドプライマーの各5'-末端の間の距離により決定され得るように、位置している。

10

【0003】

核酸シーケンスを増幅させるための他の方法も記述されている。この方法はシングルプライマー増幅と称される。この方法は、標的シーケンスが比較的短い相補的シーケンスの隣接に位置するステムループまたは逆リピート構造を有する標的シーケンスの増幅を提供する。ポリヌクレオチド検体の存在をに関して、このような標的シーケンスを作成するいろいろな方法もまた記述されてきた。

【0004】

上記の増幅法は、一つの特異的なヌクレオチドシーケンスをもつと推測されるサンプルを、約95℃に熱し、次いで、1、2℃低い温度と約95℃の間で、繰り返し熱的に循環させることを必要とする。より高い温度では二重螺旋が変性し、そしてより低い温度ではプライマーのハイブリダイゼーションおよび鎖伸長ができる。

20

【0005】

上記の方法は、ごく少量の標的DNA分子を、高感度で検出する非常に強力な技術である。最初の標的DNA分子の数と特異的に増幅された産物の数との間の相関関係は、多くの可変因子により影響を受ける。緩衝液または温度条件における小さな差異は、反応から反応への増幅効率に多大な影響を与えることができる。さらに、DNA標的の臨床サンプルは、酵素的増幅を抑制することができる阻害因子を含み得る。その上、このような臨床的なサンプルもまた、無関係なDNAを含み、そしてそれらは標的DNA分子に対して大過剰に存在することができる。

30

【0006】

上記の増幅方法は、無関係なDNA、すなわち標的DNAではないDNA、およびプライマーが非特異的または非選択的に結合するDNAの、このように増幅に使用されるプライマーのランダムな部分的ハイブリダイゼーションにより、妨害されてしまう。このように、この酵素とプライマーに対する、標的DNAおよび無関係なDNAとの競合が、創出される。その結果、標的DNA分子の増幅の効率が減少する。いくらよく見ても、これでは増幅した標的DNAと増幅した無関係のDNAを識別するのは困難なことになる。標的DNAの検出を完全に阻害するために、無関係なDNAを実質的な程度まで増幅することで、標的DNAの特異的な増幅を妨害できる。

40

【0007】

この問題に対するひとつのアプローチは、ポリメラーゼを活性化するために必要である重要な試薬、例えばポリメラーゼ酵素またはマグネシウムを添加する前に、95℃に反応混合物を加熱することにより、低温で非特異的にハイブリダイズしたプライマーの鎖伸長を回避することである。これは、高温に至るまで、いろいろな反応成分を分離するワックスの一層を用いることにより、達成され得る。あるいはまた、ポリメラーゼに対する阻害抗体を、低温で添加することができる。その抗体は高温で変性し、そして酵素を再活性化させる。他の方法では、PCR反応におけるポリメラーゼとしてAmpli Taq Gold酵素を使用することが挙げられる。一つのオリゴヌクレオチドプライマーの鎖伸長を含む他の方法は

50

、核酸の違いを検出する方法で、短く言えば、分岐点移動法は、二つの相対する核酸シーケンスの違いを検出する。その方法では、もし、二つの相対する核酸シーケンス間で違いがみられるならば、二重螺旋形での核酸シーケンスの両方から成る安定な4分子複合体が形成される。通常は、その複合体は一つのホリデイ連結を構成する。その複合体中の少なくとも1対の非相補的ストランドの両方が、標識されている。複合体の部分としての標識の会合は、二つの相対したシーケンス間での違いの存在の表示として測定される。この方法は標的核酸シーケンスにおける変異の存在を検出するのに用いることができる。

【0008】

二つの相対したDNAシーケンス間での違いを検出する上記の方法において、非特異的プライミングは、DNA分岐点移動の阻害により変異を検出する問題になりうる。全ての増幅産物は、テイル・プライマーの“テイル”シーケンスを取込み、そしてそれ故に、両方の特異的PCR産物およびお互いとで、4ストランドDNA複合体との形成に参加することができる。連結の両端のシーケンスは、お互い完全に異なっているので、このような複合体は、分岐点移動により、ストランドは決して分離せず、したがって非特異的なシグナルを生むことは決してない。この問題を多少とも解決するための方法のひとつは、2段階PCR法またはネステッドPCRの使用である。しかし、1セットのプライマーのみを用いたシングルPCR反応を使った上記の方法を行うことが大変望ましい。

上記の問題を回避するために、上記に述べた方法よりも安価でより制御しやすい方法が望まれている。

【0009】

2. 関連する技術の記載

米国特許No. 5,338,671 (Scalice, et al.)は、熱安定性DNAポリメラーゼおよびポリメラーゼを阻害する抗体とを用いてDNAの増幅について論述している。

ポリメラーゼ連鎖反応試薬の貯蔵中におけるプライマーのダイマー化を阻害する組成物と方法については、米国特許No.5,565,339 (Bloch, et al) (Bloch I)に開示されている。ポリメラーゼ連鎖反応におけるグリースまたはワックスの使用は、米国特許No. 5,411,876 (Bloch, et al.) (Bloch II)に記述されている。

米国特許No. 5,599,660 (Ramanujam, et al.)は、ワックスに埋め込まれた、不活性な生物学的試薬および化学的試薬のシーケンシャルデリバリーのための方法と調製を開示している。

【0010】

DNA増幅における非特異的プライミングを減らすための方法が、米国特許 No. 5,348,853 (Wang, et al.)に開示されている。

Taq DNAポリメラーゼを直接中和するモノクローナル抗体により促進され、ホットスタートPCRにおいて使用するTaq Start AntibodyTMは、Kellogg, et al., BioTechniques (1994) 16(6): 1134-1137に記述されている。

反応組成物およびテスト・キットおよびそれに有用なテスト・デバイスに減量剤を入れた、標的核酸の共増幅は、米国特許No. 5,705,366 (Backus)において論述されている。

親和性固定化されたTaq DNAポリメラーゼの熱による活性化はNilsson, et al., in Bio Techniques (1997) 22(4): 744-751に記述されている。

Dang, et al., J. Mol. Biol. (1996) 264:268-278では、PCRによる低コピー数の標的を検出するのを促進するTaqポリメラーゼのオリゴヌクレオチド阻害剤について論述している。

【0011】

PCRの特異性を増強する簡単な操作は、Weighardt, et al., PCR Methods and Applications (1993) 3:77-80に記述されている。

Birch, et al., Nature (1996) 381:445-446に、AmpliTaq Gold enzymeを用いた簡便なホットスタートPCRが論述されている。

Chou, et al., NucleicAcids Research (1992) 20:1717-1723により、ワックス・ビーズ

10

20

30

40

50

を用いたホットスタート法が開示されている。

W. B. Barnesは、Proc Nat. Acad. Sci. USA(1994)91:2216-2220に、-バクテリオファージ・テンプレートから高い忠実度および高収量で35 k bまでのPCR増幅ができることについて論述されている。

PCIT出願WO 96/03526A1 (Niveleau)では修飾したヌクレオチドを用いた核酸の増幅方法、および抗体を使用した増幅産物の検出を論述している。

Backman等は、米国特許No.5,792,607においてポリメラーゼ連鎖反応およびリガーゼ連鎖反応の両方に適用できる標的核酸増幅のための方法およびキットを開示している。

【0012】

核酸シーケンスの増幅、検出および/またはクローニングのプロセスは、米国特許 No. 4,683,195. に開示されている。

米国特許 No. 5,508,178 (Rose, et al.)では、一つのポリヌクレオチド・プライマーを用いた核酸の増幅について記述している。

プライマーとしてランダムシークエンスのオリゴヌクレオチドを用いる核酸シーケンスの増幅は米国特許 No.5,043,272(Hartley)に記述されている。

Nickel, et al., J. Biol. Chem. (1992) 267:848-854 では、細胞のDNAポリメラーゼおよびDNAプライマーゼと、アジドチミジン トリホスフェートとの相互作用について記述している。

EP 0439182 (Beckman, et al.) は、ポリメラーゼ連鎖反応およびリガーゼ連鎖反応の両方に適用できる標的核酸を増幅する方法を論述している。

【0013】

【発明の概要】

最も広範な特徴において、本発明は、ポリヌクレオチドの混合物中で、特異的な標的ポリヌクレオチドシークエンスに沿ったオリゴヌクレオチドプライマーを選択的に伸長する方法に関する。上記混合物、一つの修飾を有するオリゴヌクレオチドプライマー、およびその修飾のための結合物質からなる一つの組み合わせが提供され、そこではその結合物質がそのオリゴヌクレオチドに結合し、標的のポリヌクレオチドシークエンスに沿ったオリゴヌクレオチドの伸長を阻害している。その組み合わせの温度は、その結合物質を不可逆的に変性させるのにそして特異的な標的ポリヌクレオチドシークエンスに沿ってオリゴヌクレオチドプライマーの伸長を可能にする十分な程度まで、連続的または循環的に調節される。

【0014】

本発明の他の特徴は、鋳型であるポリヌクレオチドに沿って、オリゴヌクレオチドの伸長を制御する方法である。一つの組み合わせは一つのメジウムで提供される。その組み合わせは、(i)鋳型ポリヌクレオチド(ii)少なくとも一部が修飾された部分から成るオリゴヌクレオチドである鋳型ポリヌクレオチドの一部にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド(iii)鋳型ポリヌクレオチドに沿ったオリゴヌクレオチドの伸長に必要とされる全ての試薬、および(iv)修飾された部分に対する結合物質からなる。その結合物質は、修飾された部分に結合することができ、そしてオリゴヌクレオチドの鋳型ポリヌクレオチドに沿った伸長を阻害することができる。その組み合わせは、結合物質をオリゴヌクレオチドから不可逆的にリリースし、そしてオリゴヌクレオチドの、鋳型ポリヌクレオチドに沿った伸長ができる条件に付される。

【0015】

本発明の他の特徴は、標的ポリヌクレオチドシークエンスの増幅方法である。(i)標的ポリヌクレオチドシークエンスを含むと推測されるメジウム(ii)標的ポリヌクレオチドシークエンスの増幅を行う必要がある全ての試薬、すなわちヌクレオチドポリメラーゼから成る試薬、ヌクレオチドトリホスフェートおよび標的ポリヌクレオチドシークエンスに沿って伸長することのできる少なくとも一つのオリゴヌクレオチドプライマーからなる試薬からなる一つの組み合わせが提供される。そのオリゴヌクレオチドプライマーは修飾された部分からなる。その修飾された部分に対する結合物質は、その組み合わせに含まれる。

その結合物質は修飾された部分に結合し、そしてプライマーの標的シーケンスに沿った伸長を阻害することができる。その組み合わせは、標的ポリヌクレオチドシーケンスを増幅するための条件に付される。このような条件下では、結合物質は、温度サイクルの間に、不可逆的にプライマーからリリースされ、その結果、プライマーが結合され、標的ポリヌクレオチドシーケンスに沿って延びることができる。

【0016】

本発明の他の特徴は、標的ポリヌクレオチドのポリヌクレオチドシーケンス（“標的シーケンス”）を増幅する方法である。最初のオリゴヌクレオチドプライマー（“第1プライマー”）は、標的シーケンスの3'末端にハイブリダイズする。第1プライマーは、ポリメラーゼおよびヌクレオチドトリフォスフェートの存在下で、少なくとも、第1プライマーが伸長できる標的シーケンスに沿って伸長する。第1プライマーは、ハイブリダイズして(1)伸長された第1プライマーまたは(2)伸長した第2オリゴヌクレオチドプライマー（“第2プライマー”）に沿って伸長することができる。伸長した第2プライマーは、第2プライマーの伸長物が、ハイブリダイズし、標的シーケンスに相補的であるポリヌクレオチド（相補的ポリヌクレオチド）に沿って伸長することができる。伸長した第1プライマーは標的シーケンスから分離する。第1または第2のプライマーは、伸長した第1プライマーの3'末端にハイブリダイズし、そして第1プライマーまたは第2プライマーは、伸長した第1プライマーに沿って伸長する。伸長した第1プライマーまたは伸長した第2のプライマーは、伸長した第1プライマーから解離する。第1プライマーは伸長した第1プライマーまたは伸長した第2プライマーの3'末端にハイブリダイズする。温度サイクルの繰り返しにより、第1および/または第2プライマーと伸長したプライマーを含むハイブリダイゼーション段階が、繰り返される。そのプライマーは、一部が標的ポリヌクレオチドに結合する修飾されたヌクレオチドを含む。修飾されたヌクレオチドに対する抗体はその組み合わせに含まれる。抗体は修飾したヌクレオチドに結合することができ、そしてプライマーが標的シーケンスに沿って伸長することを妨げる。抗体は、温度サイクルの間、プライマーから不可逆的にリリースされ、それによりプライマーが標的ポリヌクレオチドシーケンスに結合し、それに沿って伸長させることができる。

【0017】

本発明の他の特徴は、標的ポリヌクレオチドの標的シーケンス（“標的シーケンス”）を検出する方法である。標的シーケンスは、上記のシーケンスに似た方法に従属する。伸長した第1のプライマーおよび/または伸長した第2プライマーが検出される。そのプライマーは、その一部が標的ポリヌクレオチドに結合する、修飾されたヌクレオチドを含有する。修飾されたヌクレオチドの抗体は、その組み合わせに含まれる。抗体は、修飾されたヌクレオチドに結合することができ、そしてプライマーが標的シーケンスに沿って伸長されるのを防ぐ。抗体は、温度サイクルの間、プライマーから不可逆的にリリースされ、その結果、プライマーの結合および標的のポリヌクレオチドシーケンスに沿った伸長を妨害する。

【0018】

本発明のもうひとつの特徴は、(a)少なくとも一部分が鋳型ポリヌクレオチドの一部分にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであって、修飾した部分を含有するオリゴヌクレオチド、(b)鋳型ポリヌクレオチドに沿ったオリゴヌクレオチドの伸長のための試薬および(c)修飾した部分に対する抗体からなる包装した組み合わせでのキットである。抗体は、修飾した部分に結合することができ、そしてオリゴヌクレオチドが鋳型ポリヌクレオチドに沿って伸長するのを妨げる。

【0019】

【課題を解決するための手段】

本発明では、オリゴヌクレオチドプライマーの未熟なハイブリダイゼーションおよび伸長が、易熱性結合物質（例えば蛋白質）によるオリゴヌクレオチドプライマーとの特異的結合によって抑制される。本オリゴヌクレオチドプライマーは、通常は（必然的ではないが）鋳型のポリヌクレオチドと結合するオリゴヌクレオチドプライマーの部分に修飾部分を

10

20

30

40

50

含む。前記結合部分は本修飾部分に特異的で、オリゴヌクレオチドプライマーと結合し、それによってポリメラーゼの嵌合およびオリゴヌクレオチドの早すぎる活性化および／またはそれに続く伸長を防止する。プライマーの活性化およびハイブリダイズしたプライマーの伸長は結合物質（これは易熱性である）の結合によって阻止される。反応媒体の温度の上昇はこの結合物質を不活化させる。結合物質の不活化は、結合物質とオリゴヌクレオチドプライマーの複合体の解離、オリゴヌクレオチドプライマーの遊離、特異的なプライマー - 鋳型ポリヌクレオチドハイブリッドの形成、オリゴヌクレオチドプライマーの3' 終末部の活性化および鋳型ポリヌクレオチドに対応するプライマーの伸長をもたらす。

【0020】

本発明は、増幅プロセスの開始前に増幅に必要なすべての試薬を1つの反応混合物に加えることを可能にする。検出のための増幅生成物の分析、配列分析などが本方法によって極めて簡略化される。結合物質は高い温度で不可逆的に不活性になるので、結合物質によって増幅反応の後の分析は干渉されない。したがって本発明は、非特異的な増幅生成物の主たる原因である低温での非特異的プライミングを排除する。本方法は、一般に使用するポリメラーゼに左右されない。しかしながら下記で説明するように、ある環境下ではエキソヌクレアーゼが必要であろう。

【0021】

本発明は、一本鎖DNAと特異的に結合する抗体を使用するよりも利点を提供する。サンプル調製時にサンプルDNAの一本鎖種を生成することは一般的である。これはDNA抗体の結合に競合し、したがって非特異的プライマー伸長を起こす活性なプライマーの早すぎる遊離を生じる可能性がある。本発明のまた別の利点は、オリゴヌクレオチドプライマー内に修飾部分を作ることが必要とされるだけであるということである。この修飾部分は、鋳型ポリヌクレオチドの対応する部分と結合するオリゴヌクレオチドの部分内に存在するか、またはこの修飾部分はその3' 終末部、3' 末端または5' 末端に存在するであろう。本方法は、増幅反応混合物の低温での混合を可能にし、したがって増幅工程を簡略化させる。

【0022】

本発明の方法は単独で用いて上記の利点を達成できる。しかしながら、本方法を他の“ホットスタート”法と併用して実施することも本発明の範囲内である。例えば、本方法をワックスビーズと一緒に用いてもよい。

【0023】

本発明では、標的ポリヌクレオチド配列の増幅は、修飾部分を有するオリゴヌクレオチドおよび結合物質（前記修飾部分に特異的に結合する）を用いて実施される。結合物質とオリゴヌクレオチドプライマーとの複合体の形成は、オリゴヌクレオチドプライマーが鋳型ポリヌクレオチドに沿って伸長される能力を抑制する。増幅試薬のすべてをサンプルと一緒に混合したとき、混合物中に存在する任意の鋳型ポリヌクレオチドに対応するプライマーの伸長は、前記結合物質とオリゴヌクレオチドプライマーとの複合体の存在のために抑制される。温度が上昇するにつれ、結合物質はプライマーとの複合体から解離する。オリゴヌクレオチドプライマー（その前に未結合であれば）は鋳型ポリヌクレオチドと結合し、鎖が伸長される。無関係のDNAから生じるバックグラウンド生成物は極めて減少する。なぜならば鎖の伸長は高い温度でのみ惹起され、この高い温度では結合は比較的選択的であるからである。

【0024】

反応媒体は、結合物質がオリゴヌクレオチドプライマーとの複合体から解離する制御条件に付され、それによって、オリゴヌクレオチドプライマーはポリヌクレオチド鋳型に沿って伸長するために制御された状態で遊離される。

【0025】

本方法は、オリゴヌクレオチドの鎖の伸長が鋳型に対応して惹起される多数の方法に利用される。そのような方法の1つは、標的ポリヌクレオチド配列の増幅、例えば温度サイク

10

20

30

40

50

リングを用いて実施される増幅である。本方法の使用によって、有意義な結果を提供するために十分に低いバックグラウンドを増幅方法が提供するためにこれまで必要とされていたネスティッド (nested) プライマーまたは他の手段を使用する必要がなくなった。

本発明の個々の実施態様をさらに説明する前に、多数の用語を定義する。

【0026】

オリゴヌクレオチドの鎖の伸長：鋳型ポリヌクレオチド（ヌクレオチドの鎖）に沿ったオリゴヌクレオチドの伸長で、鋳型ポリヌクレオチドの相補物である鎖の伸長生成物を生じる。前記ポリヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドが前記ポリヌクレオチドの少なくとも一部分とハイブリダイズし、前記の部分に沿って伸長されるので鋳型である。一般に、プライマーの伸長反応では、プライマーは、ポリヌクレオチド内の少なくとも鋳型配列とハイブリダイズし、前記鋳型配列に沿って伸長（鎖が伸長）される。伸長されたプライマーは“鎖の伸長生成物”である。鋳型ポリヌクレオチドに対応するオリゴヌクレオチドプライマーの鎖の伸長を実施するための試薬には、ヌクレオチドポリメラーゼおよびヌクレオシド三リン酸が含まれる。鎖の伸長工程は、例えばポリヌクレオチドの増幅、ある遺伝子またはそのフラグメントのクローニングを目的とする mRNA に相補的な cDNA の生成のような工程で利用される。

10

【0027】

増幅という場合には、鎖の伸長は温度サイクリング、すなわち反応混合物の温度を上昇させてハイブリダイズしたポリヌクレオチド配列を変性させ、反応混合物の温度を低下させてオリゴヌクレオチドプライマーをその対応する標的ポリヌクレオチド配列と結合させ、さらに続いて標的ポリヌクレオチド配列に沿って伸長させ、上記のサイクルを繰り返す。しかしながら、標的ポリヌクレオチドは温度サイクリングを実施せずに増幅させてもよい。

20

【0028】

オリゴヌクレオチドプライマーの鎖の伸長を利用する重要な方法の1つは、核酸またはポリヌクレオチド（例えば標的ポリヌクレオチド配列）を増幅させるための方法である。そのような方法は、一般に1つまたは2つ以上の核酸もしくはポリヌクレオチド分子のコピーの生成、または核酸もしくはポリヌクレオチド分子（通常は媒体中に存在する標的ポリヌクレオチド配列）の相補物の1つまたは2つ以上のコピーの生成をもたらす。

【0029】

個々の二本鎖DNA配列の酵素的増幅を目的とするそのような方法の1つは、上記で説明したポリメラーゼ連鎖反応（PCR）として知られている。このin vitro増幅方法は、変性、少なくとも2つの異なるオリゴヌクレオチドプライマーのアニールリング、および耐熱性の鋳型依存性ポリヌクレオチドポリメラーゼによるプライマーの伸長、すなわちそのようなプライマーの“鎖の伸長”の反復サイクルを基にしており、これによって指数関数的なコピー増加、すなわち前記プライマーに接する標的ポリヌクレオチド配列の“上記プライマーの鎖の伸長生成物”を生じる。2つの異なるPCRプライマー（これらはDNAの対抗する鎖とアニールする）は、一方のプライマーのポリメラーゼ触媒伸長生成物が他方の鋳型鎖として機能できるように配置され、オリゴヌクレオチドプライマーの5'末端間の距離によってその長さが規定される別個の二本鎖フラグメントの蓄積をもたらす。

30

40

【0030】

増幅のための別の方法は上記で述べたが、シングルポリヌクレオチドプライマーを用いる一本鎖ポリヌクレオチドの増幅を含む。増幅されるべき一本鎖ポリヌクレオチドは互いに相補的な2つの非連続配列を含み、したがって一緒にハイブリダイズしてステム-ループ構造を形成することができる。この一本鎖ポリヌクレオチドは既に標的ポリヌクレオチド配列の部分であるか、または標的ポリヌクレオチド配列の存在の結果として生成される。

【0031】

オリゴヌクレオチドプライマーの鎖の伸長を含むまた別の方法は、核酸中の違いを検出する方法である。一般に、この方法では2つの関連する核酸配列を含むと思われる媒体は、2つの部分的二重体を提供するために以下のように処理される。この二重体の各々は、一

50

方の端に非相補的な末端部分を有する完全に適合した二重体を含む。この部分的二重体は、その異なる部分を除いて、前記二重体の一方の二重体の鎖の一方 (S 1) が二重体の他方の鎖の一方 (S 1') と相補的で、さらに二重体の一方の二重体の鎖の他方 (S 2) が二重体の他方の鎖の他方 (S 2') と相補的であるという点で関連性を有する。S 1 と S 1' が結合し、S 2 と S 2' がそれぞれ結合できる条件に前記媒体を曝す。この関連核酸配列間に違いが存在する場合、S 1、S 1'、S 2 および S 2' を含む安定な複合体が形成される。安定な複合体が形成されたか否かが決定されるが、安定な複合体の存在は、この関連核酸配列間に相違が存在することを示唆する。

【0032】

修飾部分 修飾を含む部分であって、前記修飾によって、そのような修飾を含まない部分とそのような修飾を含む部分とが区別される。

10

ヌクレオチド 塩基・糖・リン酸の結合体、例えば核酸ポリマー（すなわち DNA および RNA）のノマーユニット。

天然のヌクレオチド 天然に一般に見出されるヌクレオチド。そのような天然のヌクレオチドはアデニン、ウリジン、シチジン、チミジン、グアニンなどの塩基を含む。

【0033】

非天然ヌクレオチド いくつかの修飾によって天然のヌクレオチドと異なる修飾ヌクレオチド中のユニット。本発明の目的のための非天然ヌクレオチドの特性は、修飾オリゴヌクレオチドの定義で下記に詳細に説明されている。結合物質が結合していないときは、非天然ヌクレオチドは、修飾オリゴヌクレオチド鑄型ポリヌクレオチドとハイブリダイズする能力、鑄型ポリヌクレオチドに沿って伸長する能力に顕著な程度には影響を与えないかまたは全く影響しないであろう。非天然ヌクレオチドが前記の能力に影響を与える事例では、前記非天然ヌクレオチドはプライマーの 3' 末端から遠位に存在するか、または伸長前にプライマーから除去されるべきである。前記の非天然ヌクレオチドの例はエテノ-dA である。

20

【0034】

ヌクレオシド 塩基・糖結合体すなわちリン酸部分を欠くヌクレオチド。

標的ヌクレオチドの標的配列 - 特定されるべきヌクレオチドの配列で、通常ポリヌクレオチド分析物の一部分（標的ポリヌクレオチド）または全体の中に存在する。前記ポリヌクレオチド分析物がどのようなものであるかは、標的ポリヌクレオチド内に含まれる標的配列を増幅するために必要な種々のプライマーおよび他の分子の調製が十分に実施できる程度に既知である。一般に、プライマーの伸長では、増幅プライマーは標的ポリヌクレオチド内の少なくとも標的配列とハイブリダイズし、これに沿って伸長（鎖が伸長）し、したがって標的配列は鑄型として機能する。伸長したプライマーは鎖の“伸長生成物”である。標的配列は通常は2つの規定配列の間に存在するが、必ずしもその必要があるわけではない。一般に、プライマーは、規定配列または前記標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部分（通常はその3' 末端の少なくとも10ヌクレオチドセグメント、好ましくは15、より好ましくは20~50ヌクレオチドセグメント）とハイブリダイズする。標的配列は、通常は約30~5000またはそれ以上のヌクレオチド、好ましくは50~1000ヌクレオチドを含む。標的ポリヌクレオチドは、一般に大きな分子の一部分であるか、または実質的に完全な分子（ポリヌクレオチド分析物）であろう。標的ポリヌクレオチド配列内の最少ヌクレオチド数が、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの存在がサンプル中のポリヌクレオチド分析物の存在の特異的指標であることを担保できるように選択される。非常に大ざっぱに言えば、配列の長さは通常は $1.6 \log L$ ヌクレオチドより大で、ここで L は、サンプルの生物学的供給源のゲノムにおける塩基対数である。標的ポリヌクレオチドの最大ヌクレオチド数は、通常はポリヌクレオチド分析物の長さ、並びに単離時の剪断または他のプロセスおよびアッセイのためにサンプルを調製するために必要な他の一切の処理による破壊され易さ、並びに前記配列の検出および/または増幅の効率によって決定される。

30

40

【0035】

50

オリゴヌクレオチド 一本鎖ポリヌクレオチドで通常は合成ポリヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、通常は長さが約 5 から約 150 またはそれ以上のヌクレオチド、好ましくは約 10 ~ 約 100 ヌクレオチド、より好ましくは約 15 から約 50 ヌクレオチドを含む。多様な周知の技術をオリゴヌクレオチドの調製に用いることができる。そのような配列は、生物学的合成または化学的合成によって得ることができる。短い配列 (約 100 ヌクレオチドまで) のためには、生物学的合成に比べて化学的合成がしばしば経済的である。より長い配列のためには、分子生物学で利用される標準的複製方法が用いられ、例えば文献に記載されたように (J. Messing, Methods Enzymol. 101: 20-78(1983))、一本鎖 DNA のためには M13 が使用される。

【0036】

標準的なクローニング技術の他に、*in vitro* 酵素法、例えばポリメラーゼ触媒反応を用いることができる。RNA の調製には、T7 RNA ポリメラーゼおよび適当な DNA 鋳型が用いられる。DNA の場合には、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) およびシングルプライマー増幅が便利である。

【0037】

ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド合成の他の化学的方法には、ホスホトリエステリおよびホスホジエステル法 (Narang, et al., Meth. Enzymol. 68:90 (1979)) および支持体上での合成 (Beaucage, et al., Tetrahedron Letters 22:1859-1862 (1981)) がホスホルアミデート法 (M.H. Caruthers, et al., Methods in Enzymology, 154: 287-314(1988); in "Synthesis and Applications of DNA and RNA", S.A. Narang, editor, Academic Press, New York, (1987) およびその中に含まれる文献) と同様に含まれる。

【0038】

オリゴヌクレオチドの終末部 本明細書で用いられるように、この用語は、オリゴヌクレオチドの 3' または 5' 末端の終末ヌクレオチドを指す。

オリゴヌクレオチドプライマー 例えば核酸の増幅において鋳型ポリヌクレオチドを基にする鎖の伸長で通常用いられるオリゴヌクレオチド。オリゴヌクレオチドプライマーは通常は合成デオキシヌクレオチドで、一本鎖であり、標的ポリヌクレオチドの規定配列とハイブリダイズできる配列をその 3' 末端に含んでいる。通常は、オリゴヌクレオチドプライマー (特にその 3' 末端) は、前記規定配列に対して好ましくは少なくとも 70%、より好ましくは少なくとも 90%、もっとも好ましくは 100% 相補的である。標的ヌクレオチド配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーのハイブリダイズ可能な配列中のヌクレオチド数は、オリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせるために用いられるストリンジェンシー条件が過剰な非特異的ランダムハイブリダイゼーションを防止することができるようなものでなければならない。オリゴヌクレオチドプライマー中のヌクレオチド数は、前記プライマーが結合する標的オリゴヌクレオチドの規定配列と同じ、すなわち少なくとも 12 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約 15 ヌクレオチド、一般には約 12 から約 50 ヌクレオチド、好ましくは約 15 から約 30 ヌクレオチドであらう。

【0039】

修飾オリゴヌクレオチド 修飾を含むオリゴヌクレオチド。すなわち、非修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドと比較したとき、1つまたは2つ以上の (i) 4種の一般的に認識されているヌクレオチドとは異なる天然のヌクレオチドを有し、したがってそのようなヌクレオチドに関して修飾されているか、または本明細書では時に“ヌクレオチド類似体”と称する (ii) 化学的な修飾を有する非天然のヌクレオチド (修飾ヌクレオチド) を有するオリゴヌクレオチド。修飾を含む天然または非天然ヌクレオチドが結合物質と結合するとき、オリゴヌクレオチドプライマーは、それが結合するポリヌクレオチドに沿って伸長することができない。したがって、結合物質とオリゴヌクレオチドプライマーとの複合体が解離し、結合物質が不可逆的に変性するまで、鎖の伸長は実質的レベルでは発生しない。

【0040】

修飾オリゴヌクレオチドのための修飾ヌクレオチドは、結合物質と十分に結合してオリゴヌクレオチドが実質的なレベルで鋳型ポリヌクレオチドに沿って伸長できないように選択される。結合物質は、修飾ヌクレオチドに対して少なくとも約 10^{-8} 、通常は約 10^{-9} から約 10^{-11} の結合親和性をもたねばならない。

【0041】

修飾オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド、好ましくは約1から約3の修飾ヌクレオチドを好ましくは連続配列内に有する。修飾ヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドプライマーが鋳型ポリヌクレオチドの対応する部分と結合する前記プライマーの部分内に存在するか、または修飾ヌクレオチドは3'末端部、3'末端または5'末端に存在するであろう。修飾ヌクレオチドが、標的ポリヌクレオチドと結合するオリゴヌクレオチドの部分内に存在する場合、前記修飾ヌクレオチドはオリゴヌクレオチドと標的ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに干渉するものであってはならない。修飾ヌクレオチドがそのようなハイブリダイゼーションに干渉する場合は、一般に前記修飾ヌクレオチドは、一切の伸長反応の前にオリゴヌクレオチドから除去される。いくつかの実施態様では、修飾ヌクレオチドは、3'末端から少なくとも1~20ヌクレオチド、より通常は約1から2ヌクレオチド離れている。しかしながら、下記でさらに詳述するように、修飾ヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの3'末端部または終末部近くに位置し、そのような修飾ヌクレオチドがオリゴヌクレオチドと標的ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに干渉する場合には、ハイブリダイゼーションの前に修飾ヌクレオチドをオリゴヌクレオチドから切断するために酵素が反応混合物に添加される。

本発明の目的を達成するためのいずれの修飾も利用できる。前記修飾は、結合物質を調製または入手するためのものである。修飾は、結合物質が修飾オリゴヌクレオチドに結合することを可能にするものでなければならない。

【0042】

ある実施態様では、修飾ヌクレオチドは、例えばエステル、アミド、スルフェートまたはグリコシドの形成によって修飾された3'ヒドロキシル規定配列をもち、したがって鎖の伸長ができない天然のヌクレオチドである。好ましくは、そのような修飾ヌクレオチドは易熱性または光感受性で、したがって、事例に応じて反応媒体の温度を高めたとき、または媒体を照射したときに修飾ヌクレオチドは除去できる。別の実施態様では、そのような修飾ヌクレオチドは酵素によって除去できる。そのような修飾ヌクレオチドの他の除去方法も当業者には上記の開示から考えられるであろう。例えば修飾がエステルである場合は、除去は、熱耐性エステラーゼ酵素を使用して本発明にしたがって達成できる。また別には、3'ヒドロキシル基のグリコシドが用いられる場合は、前記グリコシド結合は熱耐性グリコシダーゼによって切断される。例えば、 β -ガラクトシル基が修飾オリゴヌクレオチドの3'末端に結合され、耐熱性 β -ガラクトシダーゼを反応媒体中で用いることができる。

【0043】

また別の実施態様では、修飾オリゴヌクレオチドが結合物質と結合していないとき、または鋳型ポリヌクレオチドと結合していないときに、修飾ヌクレオチドが3'エキソヌクレアーゼ活性をもつ酵素によって除去できるように修飾が選択される。この方法での修飾ヌクレオチドの選択の因子の1つは、増幅に用いられるポリメラーゼの特異性である。このアプローチでは、修飾オリゴヌクレオチドは、通常はその3'末端に1つまたは2つ以上の修飾ヌクレオチドを含むものである。結合物質と修飾オリゴヌクレオチドとの複合体の解離に続いて、修飾オリゴヌクレオチドは3'エキソヌクレアーゼ活性をもつ酵素とともに加熱することによって分解される。ホスホロチオエートを用いて修飾オリゴヌクレオチドの一部分をホスホロチオエート基を過ぎたところで分解に対して抵抗性を付与してもよい。

【0044】

通常でないヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを生成するための天然ヌクレオチドの化学的修飾は、限定的ではない例示として下記に記載されている。エテノアデノシンは、6

10

20

30

40

50

- アミノ基と1位の環内窒素との間にエチレン架橋を有し、これは一切の可能な水素結合を阻止する。他の修飾には、グアニンの6-酸素、チミンの4-酸素、プリン5位の環内窒素、またはピリミジンの3位の環内窒素におけるアルキル化、またはグアニンの2-アミノ基もしくはシトシンの4-アミノ基の除去が含まれる。プリンまたはピリミジン以外の複素環基もまた用いることができる。それに関しては、修飾オリゴヌクレオチドの固形相合成に便利な形態で、通常はホスホルイミデートとして購入できる誘導体を使用するのが好ましい。他の複素環には、例えばトリアジン、非置換ピリミジン、ピリジン、デアザプリン、ピリドピロールなどが含まれる。修飾オリゴヌクレオチドの個々の構造は、前記修飾オリゴヌクレオチドがハイブリダイズしていないとき、または前記修飾オリゴヌクレオチドが鎖の伸長を維持できないときに酵素がそれを除去できるかぎり重要な問題ではない。

10

【0045】

本発明のまた別の適当な修飾は、ある規定部分が天然のヌクレオチドへ取り込まれたことによる修飾をもつ天然のヌクレオチドである。そのような規定部分の1つは小さな有機分子である。本方法で特に有用なそのような小分子の典型的な例には、例示すればフルオレセイン、ジギトキシン、ピオチンなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。そのような修飾オリゴヌクレオチドは当分野で周知の方法によって調製できる。例えば以下を参照されたい：“PCR Primer, A Laboratory Manual”. C.W. Duekster(Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press(1995)。

【0046】

20

適当な修飾のまた別の例は(ただしこれらに限定されない)、リボースで修飾されているヌクレオチドである。リボヌクレオチドで終わるオリゴヌクレオチドはほとんどのポリメラーゼで伸長されないため、リボヌクレオチドは候補物質である。リボヌクレオチドを用いる場合には、修飾オリゴヌクレオチドが相補鎖とハイブリダイズしていないときには外側から分解して修飾オリゴヌクレオチドからリボヌクレオチドを除去できるが、プライマーがハイブリダイズしていないときに容易にリボヌクレオチドを除去できない酵素を加える必要がある。リボースの修飾の他の例には、3'-ヒドロキシが水素以外の官能基(例えばアジド基)によって置換されているものを含む3'-デオキシ誘導体が含まれる。

【0047】

多くの修飾ヌクレオチドおよびそのような修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドは一般に入手可能であり、または文献に記載されている。例えば、エテノ-デオキシA、O-6-メチルデオキシGおよびO-4-メチルデオキシTが市販されている(Oligos Etc., Wilsonville, Oregon)。非水素結合ヌクレオシドが文献に報告されており(Moran et al., Nucleic Acids Research 24(11):2044-2052(1996))、4-メチルインドール-ヌクレオシド、-ナフタレンヌクレオシド、-ピレンヌクレオシドなどが含まれる。N3-(D-リボフラノシド)誘導体(例えば4-アミノ-1-(2-デオキシ-リボフラノシル)-2(1H)-ピリジノン)およびそのような修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドが報告されている(Charcruk et al., Helv. Chim. Acta 70(3):717-725(1987))。Huang et al.は、アラビノシルシトシン5'-トリホスフェートおよび他の修飾ヌクレオシドを考察している(Cancer Res. 51:6110-6117(1991))。Solomon et al.は、2-ヒドロキシピリジンおよび2-ヒドロキシキノリンのC-連結デオキシリボシドを報告した(Tetrahedron Letters 32(28):3297-3300(1991)、さらにSolomon et al.の文献も参照されたい：J. Org. Chem. 58:2232-2243(1993))。他の修飾ヌクレオシドおよび修飾オリゴヌクレオチドは周知の合成技術を用いて合成できる。

30

40

【0048】

一般にオリゴヌクレオチドの製造のために上記で述べたような多様な周知の技術によって、化学的な修飾を修飾されるべきオリゴヌクレオチドに導入することができる。生物学的合成または化学的合成のいずれも用いることができる。あるアプローチでは、ホスホトリエステルおよびホスホジエステル法(Narang et al., 上掲書)が用いられ、さらに、支持体上での合成(Beaucage et al., 上掲書)がホスホリアミド法(M.H. Caruthers et al.,

50

上掲書)が、文献(“Synthesis and Applications of DNA and RNA”, S.A. Narang(Ed.), Academic Press, New York, (1967) およびその中で引用された文献)に記載された他の方法と同様に用いられる。修飾ヌクレオチドをその表面に結合させた制御ポアガラスが、ホスホルアミド法を用いる固相DNA合成のために利用可能である。したがって、自動および手動合成の両合成を実施できる。2つ以上の修飾ヌクレオチドを含む修飾オリゴヌクレオチドは、3'-ヒドロキシル(これに別の修飾ヌクレオチドを付加することができる)をもつ修飾ヌクレオチドを付加し、これを繰り返すことによって同様な態様で製造できる。

【0049】

標準的なクローニング技術の他に、*in vitro*酵素法(例えばポリメラーゼ触媒反応)を用いることができる。RNAの調製には、T7 RNAポリメラーゼおよび適当なDNA鋳型が用いられる。DNAの場合には、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)およびシングルプライマー増幅が便利である。

別のアプローチでは、液相にただ1つの修飾ヌクレオチドを添加することによって天然のヌクレオチドの3'-ヒドロキシル基を誘導できる。

【0050】

本発明で用いることができる修飾ヌクレオチドを開示している上記に引用した文献のいくつかは、修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドの合成もまた開示している。例えば以下を参照されたい: Solomon et al., J. Org. Chem. 58:2232-2243およびCharczuk et al., Helv. Chim. Acta 70(3):717-725(1987)。

【0051】

結合物質 - 本発明では、結合物質とは、修飾オリゴヌクレオチド、より具体的には修飾オリゴヌクレオチドの修飾ヌクレオチドに特異的に結合することができる物質である。本結合物質は、通常は蛋白質、通常は抗体、特異的結合蛋白質、特異的レセプターなどである。結合物質は、修飾オリゴヌクレオチドから温度に応じて解離することができるものである。通常は、結合物質は、高温(すなわち結合物質が熱変性を受ける温度)でそのような複合体から不可逆的に解離する。好ましくは、結合物質は修飾オリゴヌクレオチドとの複合体から約45 から約90、より好ましくは約45 から約60 の温度で解離する。好ましくは、この温度は結合物質を変性させるために十分である。

【0052】

抗体 - 別の分子の固有の空間的および極性構造と特異的に結合し、したがって前記構造に相補的と定義される免疫グロブリン。前記抗体はモノクローナルでもポリクローナルでもよい。さらに前記抗体は、当分野で周知の技術、例えばホストの免疫および血清の採集(ポリクローナル)により、または持続的なハイブリッド細胞株の調製および分泌蛋白質の採集(モノクローナル)により、または天然の抗体の少なくとも特異的結合に必要なアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列もしくはその変異型のクローニングおよび発現によって製造できる。抗体は完全な免疫グロブリンまたはそのフラグメントを含むことができる。前記免疫グロブリンには、種々のクラスおよびアイソタイプ、例えばIgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgMなどが含まれる。そのフラグメントには、Fab、Fv、F(ab)₂、Fab など、およびその単鎖類似体が含まれる。さらに、凝集物および免疫グロブリン共役物またはそのフラグメントも、特定の分子に対する結合親和性が維持されるかぎり適切な場合には使用できる。

【0053】

一般にモノクローナル抗体の調製では、免疫原がマウスに注射され、十分な時間が経過したときマウスを屠殺し、脾細胞を採取する。所望の免疫グロブリンをコードする脾細胞の染色体を、脾細胞とミエローマ細胞またはリンパ球を一般にはポリエチレングリコールの存在下で融合させることによって不朽化させる。得られた細胞(これは融合ハイブリドーマを含む)を選別培養液(例えばHAT-培養液)で増殖させ、生存細胞を限定希釈条件を用いて前記の培養液で増殖させる。細胞を適当な容器(例えばマイクロタイターのウェル)で増殖させ、上清を所望の特異性をもつモノクローナル抗体についてスクリーニング

10

20

30

40

50

する。

【 0 0 5 4 】

モノクローナル抗体の収量を高めるために種々の方法が存在する。例えばハイブリドーマ細胞を前記細胞を受容する哺乳類ホストの腹腔へ注入し、腹水を採集する。腹水のモノクローナル抗体採集量が不十分な場合、抗体はホストの血液から採集される。モノクローナル抗体の単離および精製のために種々の一般的な方法があり、モノクローナル抗体が他の蛋白質および他の夾雑物から分離される（例えば上掲書（Kohler and Milstein）を参照されたい）。

【 0 0 5 5 】

ホスホロチオエート 少なくとも1つのホスフェートの酸素が硫黄によって置換されたヌクレオチドリン酸である。1つから5つのホスフェートの酸素が硫黄によって置換され、好ましくは1つから2つのホスフェートの酸素が置換される。これらの硫黄含有修飾オリゴヌクレオチドは既知の技術にしたがって調製できる。例えば以下を参照されたい：WO 9008838号、WO 8911486号、米国特許4910300号、EP 318245号（これらの文献は参照により本明細書に含まれる）。

【 0 0 5 6 】

ヌクレオシド三リン酸 5 三リン酸置換基をもつヌクレオシド。このヌクレオシドは、プリンまたはピリミジン誘導体の窒素塩基のペントース糖誘導体である。窒素塩基はペントース糖（通常はデオキシリボースまたはリボース）の1 - 炭素に共有結合されている。プリン塩基はアデニン（A）、グアニン（G）、イノシン並びにその誘導体および類似体を含む。ピリミジン塩基はシトシン（C）、チミン（T）、ウラシル（U）、並びにその誘導体および類似体を含む。ヌクレオシド三リン酸は、デオキシリボヌクレオシド三リン酸（例えば d A T P、d C T P、d G T P および d T T P）およびリボヌクレオシド三リン酸（例えば r A T P、r C T P、r G T P および r U T P）を含む。“ヌクレオシド三リン酸”という用語はまたその誘導体および類似体を含み、これら誘導体および類似体は、その未誘導ヌクレオシド三リン酸と同様な態様で認識され重合される誘導体によって例示される。そのような誘導体または類似体の例は、例えばレポーター基で修飾された（例えばビオチン化、アミン修飾、放射能標識、アルキル化など）もので（ただしこれらに限定されない）、それらはまたホスホロチオエート誘導体、ホスファイト誘導体、環原子修飾誘導体などを含む。レポーター基は、蛍光基（例えばフルオレセイン）、化学発光基（例えばルミノール）、テルビウムキレーター（例えばN - （ヒドロキシエチル）エチレンジアミントリ酢酸で、これは遅発性蛍光によって検出できる）などであろう。“ヌクレオシド三リン酸”という用語はその誘導体および類似体を含む。

【 0 0 5 7 】

ヌクレオチドポリメラーゼ DNAの鋳型に沿ってヌクレオチドの伸長物を形成するための触媒（通常は蛋白質酵素）であり、この場合、伸長物は鋳型に対して相補的である。ヌクレオチドポリメラーゼは、鋳型依存性ポリヌクレオチドポリメラーゼで、オリゴヌクレオチドの3 末端を伸長させるために構築ブロックとしてヌクレオシド三リン酸を利用し、ポリヌクレオチドの一本鎖部分（これとオリゴヌクレオチドはハイブリダイズして二重体を形成する）と相補的な配列を提供する。

【 0 0 5 8 】

本発明で有用なヌクレオチドポリメラーゼは本方法で用いられる条件下で安定でなければならず、通常は耐熱性ヌクレオチドポリメラーゼである。そのような酵素は任意の供給源、例えば細胞、細菌（例えば大腸菌（E.coli））、植物、動物、ウイルス、好熱菌などから得られ、ここで、前記ポリメラーゼを化学的または遺伝子工学によって修飾して熱安定性および/または活性の増加を提供することが可能である。

【 0 0 5 9 】

通常はこの触媒は酵素（例えばDNAポリメラーゼ）である。そのような酵素には、p f u DNAポリメラーゼ（天然およびリコンビナント）（Stratagene, La Jolla, CA）、U l t m a DNAポリメラーゼ（Perkin Elmer, Foster City, CA）、r B S T DNAポリ

10

20

30

40

50

メラーゼ (Epicentre Technologies, Madison, WI)、V E N T D N A ポリメラーゼ (New England Biolabs, Beverly, MA)、T l i D N A ポリメラーゼ (Promega Corp., Madison, WI)、および P w o D N A ポリメラーゼ (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) などが含まれる。さらに文献 ("PCR Primer", 上掲書、4 ~ 5 ページ) で詳述されている酵素もまた参照されたい (これらには以下が含まれている: T t h D N A ポリメラーゼ、T f l D N A ポリメラーゼ、T b r D N A ポリメラーゼ、Hot T u b D N A ポリメラーゼなど)。さらにまた本発明の範囲内に含まれるものは、上記の酵素の 2 つまたは 3 つ以上の組み合わせ、例えば T a q および P f u (100 : 1) などである。

【0060】

3 から 5 方向のエキソヌクレアーゼ 本発明の目的のための酵素は、3 から 5 方向のエキソヌクレアーゼであるか、または 3 から 5 方向のエキソヌクレアーゼ活性を有するべきであると考えられる。この場合、本発明で意図される反応条件下では、前記酵素は、修飾オリゴヌクレオチドが標的ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズしていないときは、前記修飾ヌクレオチドの 3' 末端からヌクレオチドの除去または切断を触媒し、さらにまたヌクレオチドポリメラーゼとしても機能できる (後者の意味ではこの酵素は 3 から 5 方向のエキソヌクレアーゼを含むポリメラーゼと考えられる)。この酵素は、修飾ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドプライマーのヌクレオチドを少なくとも修飾ヌクレオチドまで切断する。そのような意味では、分解された修飾オリゴヌクレオチドはその 3' 終末部で伸長可能で、標的ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズしたとき、オリゴヌクレオチドプライマーとして機能することができる。上記で述べたヌクレオチドポリメラーゼのいくつかはまた 3 から 5 方向のエキソヌクレアーゼ活性を有する。

【0061】

ポリヌクレオチド分析物 アッセイで測定されるべき化合物または組成物、すなわち重合ヌクレオチドで、無傷の天然の状態では、これは 20 ~ 500000 またはそれ以上のヌクレオチドを含み、単離された状態では、約 30 ~ 50000 またはそれ以上のヌクレオチド、通常は約 100 ~ 20000 ヌクレオチド、より好ましくは 500 ~ 10000 ヌクレオチドを有する。したがって、天然の状態から分析物を単離することはしばしばフラグメント化をもたらすことが明らかである。ポリヌクレオチド分析物には、精製または未精製形の任意の供給源に由来する以下を含む核酸が含まれる: DNA (d s DNA および s s DNA)、c DNA および他の合成 DNA、および RNA (t - RNA、m - RNA、r - RNA を含む)、ミトコンドリア DNA および RNA、染色体、プラスミド生物学的材料由来の (例えば微生物 (例えば細菌、酵母、ウイルス、ウイロイド、粘菌、カビ)、植物、動物、ヒト) のゲノムおよびそのフラグメントなど。ポリヌクレオチド分析物は、複合混合物 (例えば生物学的サンプル) 中のマイナーな部分であってもよい。分析物は、多様な生物学的材料から当分野で周知の方法によって得ることができる。そのような生物学的材料のいくつかを例示すれば、米国特許 5508178 号 (Rose et al.) に開示されたようなものであるが、ただしこれに限定されない (この文献は参照により本明細書に含まれる)。

【0062】

完全にまたは部分的に連続して - 本発明で用いられる試薬が同時ではなく混合されるときは、1 つまたは 2 つ以上の試薬が残りの試薬の 1 つまたは 2 つ以上とともに混合され、サブコンビネーションを作ることができる。続いて各サブコンビネーションを本方法の 1 つまたは 2 つ以上の工程に付すことができる。したがって、サブコンビネーションの各々を 1 つまたは 2 つ以上の所望の結果を達成する条件下で保温することができる。

【0063】

ハイブリダイゼーション (ハイブリダイズする) - ヌクレオチド配列の場合には、これらの用語は本明細書では互換的に用いられる。2 つのヌクレオチド配列が互いにハイブリダイズする能力は、2 つのヌクレオチド配列の相補性の程度に依存し、これは順次適合する相補的なヌクレオチド対に依存する。もう一方の配列と相補的なヌクレオチドがある配列で多ければ多いほど、ハイブリダイゼーションのための条件はよりストリンジェントにな

り、2つの配列の結合はより特異的になるであろう。高いストリンジェンシーは、温度の上昇、補助溶媒の増加、塩濃度の低下などによって達成される。

【0064】

相同または実質的に同一 一般に、同一であるかまたは各々が同じポリヌクレオチド配列とハイブリダイズすることができる2つのポリヌクレオチド配列は相同である。2つの配列が各々少なくとも90%、好ましくは100%の同じまたは類似の塩基配列を有するとき(この場合チミン(T)およびウラシル(U)を同じと考える)、この2つの配列は相同または実質的に同一である。したがって、リボヌクレオチドA、U、CおよびGは、デオキシヌクレオチドdA、dT、dCおよびdGにそれぞれ類似と考えられる。相同な配列はともにDNAであるか、または一方がDNAで他方がRNAであろう。

10

【0065】

相補的 一方の配列が他方の配列と反対方向で結合できるときは2つの配列は相補的である。この場合、各配列の3'末端は他方の配列の5'末端と結合し、一方の配列の各A、T(U)、GおよびCは、他方の配列のT(U)、A、CおよびGとそれぞれ結合する。配列のコピー - ある配列から派生した、一本鎖ポリヌクレオチドの完全なコピーで、前記一本鎖ポリヌクレオチドと相補的である配列。

【0066】

特異的結合対のメンバー (“sbpメンバー”) 2つの異なる分子の一方の分子であって、特異的に他方の分子と結合し、それにより他方の分子の固有の空間的および極性構造と相補的であると定義される、表面または空洞内の領域を有するもの。この特異的結合対の両メンバーはリガンドとレセプター(アンチリガンド)と称される。これらは免疫学的ペア(例えば抗原-抗体)のメンバーでもよく、またはオペレーター-リプレッサー、ヌクレアーゼ-ヌクレオチド、ピオチン-ストレプトアビジン、ホルモン-ホルモンレセプター、核酸二重体、IgG-蛋白A、DNA-DNA、DNA-RNAなどでもよい。

20

【0067】

リガンド そのためのレセプターが天然に存在するか、または調製できる任意の化合物。レセプター (“アンチリガンド”) 分子の固有の空間的および極性構造、例えばエピソード部位または決定基部位を認識することができる任意の化合物または組成物。レセプターを例示すれば、天然に存在するレセプター(例えばタイロキシン結合グロブリン、抗体、酵素、Fabフラグメント、レクチン、核酸、リプレッサー、保護酵素、蛋白A、補体成分C1q、DNA結合蛋白質またはリガンドなどが含まれる。

30

【0068】

小さな有機分子 分子量が1500未満、好ましくは100~1000、より好ましくは300~600の化合物で、例えばピオチン、フルオレセイン、ローダミンおよび他の染料、テトラサイクリンおよび他の蛋白質結合分子およびハプテンなどである。この小さな有機分子はヌクレオチド配列を標識または支持体に結合させるための手段を提供することができる。

【0069】

支持体または表面 - 多孔性または非多孔性の水不溶性材料。支持体は親水性または親水性にすることが可能であり、無機粉末たとえばシリカ、硫酸マグネシウムおよびアルミナ; 天然のポリマー材料とくにセルロース性材料およびセルロースから誘導される材料、たとえば繊維を含む紙、たとえばろ紙、クロマトグラフィー用の紙等; 合成もしくは改良した天然に存在するポリマーたとえばニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリ塩化ビニル、ポリアクリルアミド、架橋デキストラン、アガロース、ポリアクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリエチレンテレフタレート、ナイロン、ポリビニルブチレート等が包含され、それら単独でまたは他の材料たとえばバイオガラスとして市販されているガラス、セラミックス、金属等と接合して使用される。天然または合成アッセムブリーたとえばリポソーム、リン脂質ベジクルおよび細胞も使用することができる。

40

【0070】

50

sbp メンバーの支持体または表面への結合は、文献中に一般に利用できるよく知られた技術により達成することができる。たとえば、"Immobilized Enzymes" Ichiro Chibata, Halsted Press, New York, 1978 および Cuatrecasas, J.Biol.Chem. 245: 3059, 1970 を参照されたい。表面は多くの形状の任意の一つ、たとえばストリップ、ロッド、ビーズを含めた粒子等とすることができる。

【 0 0 7 1 】

標識またはレポーターグループもしくはレポーター分子 - シグナル産生システムのメンバー。通常、標識またはレポーターグループもしくは分子はポリヌクレオチドプロローブまたはオリゴヌクレオチドプライマーに接合または結合されて、直接検出できるかまたは検出可能なシグナルを産生する特異的結合反応を介して検出可能である。標識には、増幅もしくはリゲーションの鑄型を提供できるか、またはレプレッサータンパク質のようなリガンドとして働くことができるポリヌクレオチドプライマーまたは特異的なポリヌクレオチド配列が包含される。好ましくは、オリゴヌクレオチドプライマーは標識を有するかまたは標識をもつことができる。一般に検出可能な任意の標識が使用できる。標識は同位元素でも非同位元素でもよく、通常は非同位元素であり、また触媒たとえば酵素、触媒をコードするポリヌクレオチド、プロモーター、染料、蛍光分子、化学ルミネッセンス、補酵素、酵素物質、放射能基、小さな有機分子、増幅可能なポリヌクレオチド配列、粒子たとえばラテックスまたは炭素粒子、金属ゾル、クリスタライト、リポソーム、細胞等とすることが可能であり、これらはさらに、染料、触媒または他の検出可能なグループ等によって標識されてもよい。標識はシグナル産生システムのメンバーであり、それ単独でまたはシグナル産生システムの他のメンバーとともに検出可能なシグナルを発生することができる。標識は直接ヌクレオチド配列に結合してもよくまたヌクレオチド配列に結合する sbp メンバーに相補的な sbp メンバーに結合することによってそれに結合できるようになってもよい。

【 0 0 7 2 】

シグナル産生システム - シグナル産生システムは 1 または 2 以上の成分を有し、少なくとも 1 つの成分は標識またはレポーターグループである。シグナル産生システムはサンプル中の標的ポリヌクレオチド配列またはポリヌクレオチドアナライトの存在または量に関連するシグナルを発生する。シグナル産生システムには測定可能なシグナルを産生するのに要求される試薬すべてを包含する。標識がヌクレオチド配列に接合していない場合は、通常、ヌクレオチド配列に結合するかまたはその一部である sbp メンバーに相補性の sbp メンバーに結合する。シグナル産生システムの他の成分はデベロッパ溶液中に包含され、物質、エンハンサー、アクティベーター、化学ルミネセンス化合物、補因子、インヒビター、スカベンジャー、金属イオン、シグナル発生物質の結合に要求される特異的結合物質等が包含される。シグナル産生システムの他の成分には、補酵素、酵素産物、他の酵素および触媒と反応する物質等であってもよい。触媒産生システムは外部手段により、電磁照射線の使用により、望ましくは肉眼検査によって検出可能なシグナルを提供する。シグナル産生システムについては、さらに詳細に米国特許第 5,508,178 号 (Rose ら) に記載されている。この関連する開示は引用により本明細書に導入される。

【 0 0 7 3 】

補助材料 - 本発明により実施される方法およびアッセイには様々な補助材料が頻繁に使用される。たとえば、緩衝剤は通常、アッセイメジウムおよびアッセイ成分の安定剤とともに、アッセイメジウム中に存在させる。これらの添加物に加えて多くの場合、タンパク質たとえばアルブミン、有機溶媒たとえばホルムアミド、四級アンモニウム塩、ポリカチオンたとえばデキストラン硫酸、界面活性剤とくに非イオン界面活性剤、結合エンハンサーたとえばポリアルキレングリコール等が包含される。

【 0 0 7 4 】

上述のように、本発明の方法はその最も広い態様において、ポリヌクレオチドの混合物中、標的ポリヌクレオチド配列に沿ってオリゴヌクレオチドプライマーの選択的な伸長を提供する。この方法の特定の適用は核酸の増幅においてであり、修飾からなる部分を有し、

10

20

30

40

50

その核酸にハイブリダイズ可能な修飾オリゴヌクレオチドが用いられる。修飾は結合物質によって結合され、増幅に使用されるポリメラーゼによって伸長され得ない修飾オリゴヌクレオチドになる。

【0075】

この方法においては、オリゴヌクレオチドプライマーは、ポリヌクレオチドの混合物中で標的ポリヌクレオチド配列に沿って制御可能および選択的に伸長する。混合物は非天然ヌクレオチドと非天然ヌクレオチドに特異的な結合物質からなる修飾オリゴヌクレオチドとの組み合わせで提供される。修飾オリゴヌクレオチドプライマーの制御された放出は、修飾オリゴヌクレオチドプライマーとの複合体から結合物質の不可逆的放出に十分なレベルに、混合物の温度を調整することによって達成される。オリゴヌクレオチドプライマーンはインシトゥで放出され、オリゴヌクレオチドプライマーは選択的に標的配列に結合し、それに沿って伸長される。オリゴヌクレオチドプライマーの無関係なポリヌクレオチドへの結合は実質的に低下する。したがって、通常複合体からプライマーの放出に必要な温度より低い温度で起こる反応混合物中の標的オリゴヌクレオチド配列以外の任意のポリヌクレオチドに沿ったオリゴヌクレオチドプライマーの伸長は回避される。

【0076】

本発明の一実施態様を図1に掲げる。この実施態様においては、PCR増幅による標的ポリヌクレオチド配列(TPS)の増幅は一例として選択され限定ではない。TPSは適当な緩衝水性メジウム中で、TPSの二重鎖の一方または他方にハイブリダイズできる修飾オリゴヌクレオチドOP1およびオリゴヌクレオチドプライマーOP2と混合される。OP1は修飾ヌクレオチドMN1含有する。また、反応混合物中にはタンパク性結合物質(BS)、たとえばMN1に対する抗体が包含される。BSはMN1に結合し、MO1がTPSに沿って伸長されるのを防止する。したがってOP1は、BSによって結合された場合は、TPSに沿って伸長することはできないし、またそれがハイブリダイズする可能性がある無関係なすべてのDNAに沿って伸長することができない。メジウム中にはまた、ヌクレオシドトリホスフェート(NTP)およびヌクレオチドポリメラーゼNPも包含される。メジウムの温度は比較的低温、たとえば約20 ~ 45 である。反応メジウムの温度が上昇すると、結合物質BSはOP1から解離し、変性する。したがって、温度を上昇させるにつれて(で表示)、BSのOP1との複合体は解離し、BSは変性して遊離のオリゴヌクレオチドプライマーOP1および変性した結合物質DBSを与える。次のサイクル時に温度が約50 ~ 80 に下降されると、ヌクレオシドトリホスフェートおよびヌクレオチドポリメラーゼの存在下には、OP1はTPS鎖にハイブリダイズし、それに沿って伸長し、それは選択的にTPS鎖にハイブリダイズし、伸長したOP1(EOP1)を産生する。高温では、ヌクレオチド配列の互いの結合はさらに選択的で、比較的低濃度で存在するOP1はTPSに選択的に結合し、無関係なDNAに結合する量は実質的にきわめて低下する。その結果、バックグラウンド産物は著しく減少する。OP2もまたTPS鎖に沿って伸長され、それはTPSにハイブリダイズして伸長したOP2(EOP2)を産生する。熱サイクリングにより、TPSの多重コピーの産生を生じる。したがって、温度の制御は、BSとTPSの間の複合体の制御された変性によりTPSに沿った優先的なOP1の伸長を生じる。本発明の適用によるPCRにおいて達成される効果を増強させるために、OP2もまた修飾され、修飾ヌクレオチドMN2を含有する。

【0077】

図2を参照すると、TPSは適当な緩衝水性メジウム中で2つの異なるオリゴヌクレオチドプライマー、それぞれ二重鎖TPSの一つの鎖にハイブリダイズすることができる修飾オリゴヌクレオチドプライマーOP1および修飾オリゴヌクレオチドプライマーOP2と混合する。反応混合物中にはまた、結合物質BS1とともに結合物質BS2も存在させる。結合物質は、OP1における修飾ヌクレオチドがOP2中の修飾ヌクレオチドと同一であるかまたは異なるかに依存して、同種または異種である。BS1はMN1に結合し、OP1がTPSに沿って伸長するのを防止し、BS2はMN2に結合し、OP2がTPSに沿って伸長するのを防止する。したがって、OP1はBS1によって結合された場合、T

P S に沿って伸長できないし、またそれがハイブリダイズする可能性がある無関係な任意のDNAに沿って伸長することもできない。同様に、O P 2 もB S 2 により結合された場合、T P S に沿って伸長することはできないし、またそれがハイブリダイズする可能性がある無関係な任意のDNAに沿って伸長することもできない。またメジウム中にはヌクレオシドトリホスフェート(N T P) およびヌクレオチドポリメラーゼN P も包含される。メジウムの温度は、たとえば約20 ~ 45 と比較的低い。結合物質B S 1 およびB S 2 は、反応メジウムの温度が上昇するに従い、それぞれO P 1 およびO P 2 から解離し、変性する。したがって、温度が上昇すると(で表示)、B S 1 とO P 1 およびB S 2 とO P 2 の複合体は解離し、B S 1 およびB S 2 は変性して遊離のオリゴヌクレオチドプライマーO P 1 およびO P 2 ならびに変性した結合物質D B S 1 およびD B S 2 を与える。次のサイクル時に温度が約50 ~ 80 に下降すると、ヌクレオシドトリホスフェートおよびヌクレオチドポリメラーゼの存在下には、O P 1 はT P S 鎖にハイブリダイズし、それに沿って伸長し、伸長したO P 1 (E P O 1) を産生し、O P 2 もT P S 鎖にハイブリダイズして伸長したO P 2 (E O P 2) を産生する。図1の実施態様として上述したように、連続的な熱サイクルはこのようにしてT P S の多重コピーの産生を招来する。

10

【0078】

本発明を核酸のP C R 増幅に適用する場合、一般的に反応メジウムは2 ないし3 種の温度の間を循環させる。本発明における一般原理は標的ポリヌクレオチド配列上でのオリゴヌクレオチドプライマーの伸長は結合が比較的に選択的である場合、高温でのみ起こることである。すなわち、無関係なポリヌクレオチド配列に沿ったオリゴヌクレオチドプライマーの伸長は最小限になる。したがって反応混合物の温度は、修飾オリゴヌクレオチドプライマーから結合物質が解離するのに十分なレベルに調整される。一般に、温度は約40 ~ 約100 、好ましくは50 ~ 約90 に上昇させる。この解離工程の時間は通常、約2 ~ 約300秒、さらに通常には約30 ~ 約240秒である。この工程ののち、本発明の方法を実施するには、メジウムを2 ないし3 種の温度の間で循環させる。この方法の温度は、一般的に約10 ~ 約105 、さらに通常には約40 ~ 約99 、好ましくは50 ~ 約98 である。正確な温度は塩濃度、p H、使用された溶媒、標的ポリヌクレオチド配列およびプライマー長および組成に依存して変動させることができる。解離工程は増幅反応における初期サイクルの部分であることは本発明の範囲内にある。

20

【0079】

伸長工程には約30 ~ 約75 の比較的低い温度を使用することが可能であり、一方、変性およびハイブリダイゼーションは約50 ~ 約105 の温度で実施することができる。上述のように反応メジウムは初期には約20 ~ 約45 、好ましくは約25 ~ 約35 である。約50 ~ 約80 、好ましくは50 ~ 約70 の比較的に低い温度がハイブリダイゼーションまたはアニーリング工程には使用され、一方変性は、約80 ~ 約100 、好ましくは90 ~ 約95 の温度で実施され、伸長は約70 ~ 約80 、通常は約72 ~ 約74 の温度で行われる。

30

【0080】

増幅は所望のコピー数を達成するのに十分な時間行われる。一般に、この方法を行うための時間は1 サイクルあたり約10秒から約10分であり、1 回から約60回またはそれ以上の任意の数のサイクルを使用できるが、通常は10 ~ 約50回、多くの場合約20 ~ 約45回である。便宜上、サイクルの時間および回数を最小限にすることが通常望ましい。一般的に与えられた程度の増幅のための時間は、たとえばポリヌクレオチドポリメラーゼを飽和させるのに十分なヌクレオシドトリホスフェートの濃度を選択することにより、ポリヌクレオチドポリメラーゼおよびポリヌクレオチドプライマーの濃度を増大させることにより、および迅速な熱平衡が達せられる反応容器を使用することにより最小限にすることができる。本発明の方法における増幅を実施するための時間は一般的に約5 ~ 約200分である。便宜上、この時間は通常最小限にすることが望ましい。

40

【0081】

増幅を含めて本発明による方法を実施するには水性のメジウムが使用される。他の極性補

50

溶媒、通常 1 ~ 6 個さらに通常には 1 ~ 4 個の炭素原子を有する酸化有機溶媒たとえばアルコール、エーテル等も使用できる。これらの補溶媒を使用する場合、通常約 70 重量 % 未満さらに通常には約 30 重量 % 未満を存在させる。

【 0 0 8 2 】

メジウムの pH は、通常約 4.5 ~ 約 9.5 の範囲、さらに通常には約 5.5 ~ 約 8.5 の範囲、好ましくは約 6 ~ 約 8 の範囲である。pH および温度はそれぞれの場合により、結合物質と修飾オリゴヌクレオチドプライマーおよび内部でハイブリダイズした任意の配列の解離、オリゴヌクレオチドプライマーの標的ポリヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーション、標的ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプライマーの 3'-末端の分解、プライマー（単数または複数）の伸長、ならびに伸長プライマー（単数または複数）の解離が、同時にまたは順次起こるように選択され変動される。場合によっては、上記工程が順次または同時に実施されることを所望するか否かに依存して、これらの工程の速度、効率および特異性の至適化に矛盾を生じることがある。測定時の所望の pH の達成およびその pH の維持には、様々な緩衝剤を使用することができる。緩衝剤の例にはホウ酸塩、リン酸塩、炭酸塩、トリス、バルビタール等が包含される。使用する特定の緩衝剤は本発明の必須事項ではないが個々の方法においてある緩衝剤が他に比べて好ましいことはある。

10

【 0 0 8 3 】

ヌクレオチドポリメラーゼの濃度は連鎖の伸長の達成に十分なように選択される。ポリメラーゼの濃度は通常、経験的に決定される。好ましくはさらに濃度を 5 倍以上、好ましくは 2 倍に上昇させても増幅に要する時間は低下しないような十分の濃度が使用される。主要な律速因子は一般に試薬の価格である。

20

【 0 0 8 4 】

本発明の一態様によれば、上に説明したように、3' から 5' へのエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素が必要である。この環境下において、このような酵素の濃度は、修飾ヌクレオチド（単数または複数）を含有するオリゴヌクレオチドプライマーの分解の要求レベルが実現するのに十分でなければならぬが、プライマーの前以ての分解が起こる濃度であってはならない。この濃度は通常反応容量 100 μ l あたり約 0.1 ~ 約 10 単位、好ましくは、反応容量 100 μ l あたり 1 ~ 約 5 単位である。

【 0 0 8 5 】

コピーされる標的ポリヌクレオチド配列の量は、サンプル中 1 または 2 分子のような低量でもよいが、一般的にはサンプル中約 $10 \sim 10^{10}$ 、さらに好ましくは約 $10 \sim 10^8$ 分子、好ましくはサンプル中少なくとも約 10^{-21} M であり、 $10^{-10} \sim 10^{-19}$ M，さらに通常は $10^{-14} \sim 10^{-19}$ M である。

30

【 0 0 8 6 】

修飾オリゴヌクレオチドの量は特定の増幅または本発明が適用される他の反応に必要なオリゴヌクレオチドプライマーの量によって支配される。オリゴヌクレオチドプライマー（単数または複数）の量は、少なくとも所望のコピー数と同じであり、通常約 $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$ モル/サンプルである（式中、サンプルは約 1 ~ 約 1,000 μ l）。通常、プライマー（単数または複数）は少なくとも約 0.1 μ M、好ましくは約 0.5 \times M 存在させる。好ましくはオリゴヌクレオチドプライマー（単数または複数）の濃度は標的ポリヌクレオチド配列の濃度よりも実質的に過剰であり、好ましくは少なくとも約 1×10^{14} 倍以上とする。

40

【 0 0 8 7 】

結合物質の量は修飾オリゴヌクレオチドプライマーの量によって支配される。一般的に、結合物質は少なくとも修飾オリゴヌクレオチドプライマーの量に関し当量存在させ、実質的にすべての修飾オリゴヌクレオチドプライマーが結合物質によって結合されるように修飾オリゴヌクレオチドプライマーの量に対して過剰に存在させることができる。結合物質の量は好ましくは修飾オリゴヌクレオチドプライマーの濃度より少なくとも 1 ~ 2 倍多くする。

50

【0088】

メジウム中のデオキシヌクレオシドトリホスフェートの濃度は広範囲に変動させることができるが、好ましくはこれらの試薬は過剰量存在させる。デオキシヌクレオシドトリホスフェートは通常約 10^{-6} ～約 10^{-2} M、好ましくは約 10^{-5} ～ 10^{-3} M存在させる。

【0089】

混合物を形成させるための様々な試薬の混合順序は様々である。一般的には、標的ポリヌクレオチドは、このようなポリヌクレオチドを得るために予め処理したこのようなポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドアナライトを含むサンプルから得られる。一般的に、オリゴヌクレオチドプライマーはデオキシヌクレオシドトリホスフェートおよび結合物質と混合される。次に、ヌクレオチドポリメラーゼを加え、ついで標的ポリヌクレオチドを添加する。しかしながら、上述のすべてを同時に添加する方法、ならびに他の段階的または連続順序による添加も使用することができる。

10

【0090】

この方法の試薬の濃度および添加順序ならびに条件は一般的に、伸長したプライマー（単数または複数）のコピー数およびこのようなコピーが形成される速度ならびに複製の忠実度を最大限にしようとする希望によって支配される。一般的に、伸長したプライマーのコピー数を少なくとも約 10^2 のファクター、好ましくは約 10^4 のファクター、さらに好ましくは約 10^6 のファクターで増大させることが望ましい。

【0091】

ポリヌクレオチドアナライトの検出に適用して本発明の方法を実施する場合、メジウム、pH、温度および時間に関して考慮すべき点は上述の通りである。

20

【0092】

様々な試薬の濃度は一般的に、興味のあるポリヌクレオチドアナライトの濃度範囲によって決定されるが、多くの試薬の最終的な濃度は通常、興味ある範囲にわたってアッセイの感度を至適にするように経験的に決定される。アッセイ中における他の試薬の濃度は一般的に上に掲げたのと同じ原理に従って決定される。主要な考慮事項は伸長されたプライマー（単数または複数）の十分なコピー数がポリヌクレオチドアナライト配列に関して産生され、このようなコピーが容易に検出可能であり、標的ヌクレオチド配列の正確な測定値を提供することである。

【0093】

伸長されたプライマー（単数または複数）のコピー数は、多くの方法によって検出することができる。たとえば本発明の方法においては、オリゴヌクレオチドプライマー分子は、レポーター分子たとえばリガンド、小さな有機分子、ポリヌクレオチド配列、タンパク質、支持体、オペレーター/レプレッサーペアのメンバー、インターカレーション染料等で標識することができる。核酸配列を特異的に検出する任意の標準方法を使用することができる。連鎖の伸長を検出するためにはゲル電気泳動を使用してもよい。

30

【0094】

核酸を検出する一つの方法は核酸プローブを使用する方法である。プローブを利用する一つの方法は米国特許第 4,868,104 号に記載されている。この開示は引用により本明細書に導入される。

40

【0095】

他のアッセイフォーマットおよび検出フォーマットは、米国特許第 5,508,178号および米国特許第 5,439,998 号に開示されている。これらは引用により本明細書に導入される。

【0096】

特定の標識またはレポーター分子およびそれらの検出の例については米国特許第 5,439,998 号に見いだされる。この関連する開示は引用によって本明細書に導入される。

【0097】

シグナルの検出は、使用されるシグナル産生システムの本質に依存する。標識またはレポーターグループが酵素である場合には、システム産生システムの付加的なメンバーには酵素物質等が包含される。酵素反応の産物は好ましくは、分光光度測定法によって検出する

50

ことができるルミネセンス産物、蛍光産物もしくは非蛍光染料または他の分光光度測定法または電気測定法により検出できる産物である。標識が蛍光分子である場合には、メジウムを照射して蛍光を測定することができる。標識が放射性グループである場合には、メジウムをカウントし、放射能カウントを測定することができる。

【0098】

本発明の方法は標的ポリヌクレオチド配列がDNAまたはRNAである場合に適用を有する。

【0099】

本発明の一態様においては、1種または2種以上の試薬たとえば修飾オリゴヌクレオチドおよび/またはオリゴヌクレオチドプライマーはラベル(レポーター分子)で標識される。レポーター分子はたとえば検出可能なグループまたはバインダーたとえばビオチンまたは標的配列にハイブリダイズする配列以外のヌクレオチド配列である。伸長されたプライマー(単数または複数)はプローブに共有結合によって結合するレポーター分子により検出することができる。プローブはプライマーが結合する配列以外の標的ヌクレオチド配列の部分に対して相同性であるかまたは相補性であるヌクレオチド配列を有する。

【0100】

本発明はまた、米国特許第5,508,178号に記載されたような単一オリゴヌクレオチドプライマーを用いる増幅ならびに転写ベースの増幅(たとえばNASBAのような)または転写仲介増幅(TMA)への適用を有する。

【0101】

本発明はまた、関連した核酸配列における差異を検出する方法への適用を有する。この方法はオリゴヌクレオチドプライマーの連鎖伸長を包含する。略述すれば、同じ反応メジウム中で試薬の組み合わせを形成させてPCRに付す。組み合わせは(i)突然変異を有する可能性がある標的核酸配列を含有するサンプル、(ii)サンプル中における存在が知られていない場合には別個に添加してもよく、突然変異を欠く標的核酸に相当し、野生型核酸であってもよい参照核酸配列、(iii)ヌクレオチドポリメラーゼ、(iv)ヌクレオシドトリホスフェート、および(v)その1種は異なる標識でラベルされている3種のオリゴヌクレオチドプライマーからなる。上述のように、メジウムは参照核酸配列ならびに標的核酸配列を含んでいてよい。また別法として上記それぞれのPCR反応、すなわち標的核酸配列および参照核酸配列のPCRは別個におこなってもよい。すなわち、上記試薬の組み合わせにおいて、PCR反応混合物は標的核酸配列または参照核酸配列の一方または他方を含有することになる。個々の配列のPCRに続いて、反応混合物を混合する。PCRにおいて、メジウムを加熱および冷却の多重温度サイクルに付し、同時にすべての増幅反応を達成する。この実施態様においては好ましくは各サイクルはメジウムの約90 ~ 約100 への約2秒 ~ 約3分の加熱、メジウムの約60 ~ 約70 への約5秒 ~ 約3分の冷却、およびメジウムの約70 ~ 約75 への約10秒 ~ 約3分の加熱を包含するが、プライマー配列の長さにより異なる温度が要求されることもある。上記からの反応メジウム、またはPCR反応を別個に行った場合は合わせたPCR反応混合物を、二重鎖分子の変性に十分な時間、好ましくは約90 ~ 約99 に約10秒 ~ 約2分加熱し、ついで約40 ~ 約80 、好ましくは約60 ~ 約70 に冷却し、この温度に少なくとも1分、好ましくは約20分 ~ 2時間保持する。

【0102】

メジウムの冷却後(図3参照)に1)参照または突然変異配列ならびに5'-末端、A2およびB2の任意の組み合わせを有する単一鎖、および2)参照または突然変異配列および5'-末端、A1またはB1の任意の組み合わせを有する単一鎖から形成されるすべての可能な部分および完全二重鎖が形成される。この場合、鎖はさらにL1またはL2(L1およびL2が異なる場合)のいずれかによって標識されていてよい。形成される部分二重鎖中にテーリングされた部分二重鎖A'およびB'があり、これらは互いに結合して複合体Cを形成することができる。これは突然変異が存在する場合は二重鎖DおよびEに解離しない。ついで、このような複合体の存在の決定により、標的核酸配列における突然変異の

10

20

30

40

50

存在が確立される。

【0103】

図3には同時に起こる上記反応を段階的な様式で記述する。本発明のこの適用における実施態様では、3種の修飾オリゴヌクレオチドが使用され、それぞれ、OP4、OP5およびOP6と命名される。図3に示した実施態様においては、限定ではなく例示のために、2セットの修飾オリゴヌクレオチドOP5を使用し、1つのセットはL1で標識し、他方のセットはL2で標識する。テーリングされた標的部分二重鎖A'は、突然変異Mを有する標的核酸二重鎖Aから産生され、テーリングされた参照部分二重鎖B'は参照核酸二重鎖Bから産生される。

【0104】

図4の実施態様においては、標的核酸Aおよび参照核酸Bを適当な緩衝水性メジウム中で修飾オリゴヌクレオチド、OP4、OP5-L1およびOP5-L2、ならびにOP6と混合する。本発明によれば、OP4は修飾ヌクレオチドMN4を含有し、OP5-L1は修飾ヌクレオチドMN5を含有する。同様に、OP6は修飾ヌクレオチドMN6を含有し、OP5-L2は修飾ヌクレオチドMN5を含有する。反応メジウムはまた、それぞれの修飾ヌクレオチドMN4、MN5およびMN6に対する結合物質BS4、BS5およびBS6を含有する。結合物質はMN4、MN5およびMN6が同種または異種であるかに依存して同種または異種である。BS4はMN4に結合し、OP4がAに沿って伸長するのを防止し、BS5はMN5に結合し、OP5-L1がAに沿って伸長するのを防止する。したがって、OP4はBS4によって結合された場合、Aに沿って、またはそれがハイブリダイズする無関係なDNAに沿って伸長することができない。同様に、OP5-L1はBS5によって結合された場合、Aに沿ってまたはそれがハイブリダイズする無関係なDNAに沿って伸長することができない。BS6はMN6に結合し、OP6がBに沿って伸長するのを防止し、BS5はMN5に結合し、OP5-L2がBに沿って伸長するのを防止する。したがって、OP4はBS4に結合された場合、Bに沿って、またそれがハイブリダイズする無関係なDNAに沿って伸長することができない。同様に、OP5-L2はBS5によって結合された場合、Bに沿って、またそれがハイブリダイズする無関係なDNAに沿って伸長することができない。また、メジウムにはヌクレオシドトリホスフェート(NTP)およびヌクレオチドポリマーゼNPが包含される。メジウムの温度は、たとえば約20～約45であり比較的低い。結合物質BS4、BS5およびBS6はそれぞれOP4、OP5-L1、OP5-L2およびOP6から解離し、反応メジウムの温度の上昇に従い変性する。したがって、温度が上昇するにつれて(で表示)、BS4のOP4との複合体、BS5のOP5-L1およびOP5-L2との複合体、ならびにBS6のOP6との複合体は解離して、BS4、BS5およびBS6は変性して、遊離のオリゴヌクレオチドプライマーOP4、OP5-L1、OP5-L2およびOP6、ならびに変性した結合物質DBS4、DBS5およびDBS6を与える。

【0105】

温度が約50～80に下降すると、OP4、OP5およびOP6はAおよびB上のそれぞれの結合部位に結合する。ヌクレオシドトリホスフェートおよびヌクレオチドポリマーゼの存在下には、OP4、OP5およびOP6は、それぞれがハイブリダイズする各AまたはB鎖に沿って伸長する。高温ではヌクレオチド配列の互いの結合はさらに選択的であるので、比較的低濃度で存在するOP4、OP5およびOP6はそれらの各AまたはB鎖に選択的に結合し、OP4、OP5およびOP6が無関係なDNAに結合するレベルは実質的に低下する。すなわち、本発明では一貫してバックグランド産物は大幅に減少する。

【0106】

図3に示すように、AはプライマーOP4およびOP5を用いるポリマーゼ連鎖反応により増幅され、アンプリコンAAを産生する。プライマーOP5は標識L1を含有し、プライマーOP4は標的配列とハイブリダイズできる3'-末端部分Paおよび標的配列とハイブリダイズできない5'-末端部分B1からなる。増幅はヌクレオチドポリマーゼおよびヌクレオシドトリホスフェートの存在下に温度サイクリングを用いて実施される。アン

10

20

30

40

50

プリコン A A は 2 本の鎖、プライマー O P 5 に由来する標識鎖およびプライマー O P 4 に由来する非標識鎖を有する。非標識鎖はプライマー O P 4 の 5'-末端部分 B 1 を有し、標識鎖は B 1 に相補性の相当する 3'-末端部分 A 2 を有する。再び図 3 を参照すると、アンプリコン A A の標識鎖に沿ったプライマー O P 6 の連鎖伸長が起こり、テーリングされた標的部分二重鎖 A ' が生成する。

【 0 1 0 7 】

プライマー O P 6 は、3'-末端部分 P a からなり、これはプライマー O P 4 の P a と同一であり、A A の標識鎖に結合する。O P 6 は、5'-末端部分 A 1 を有し、これはアンプリコン A A と相補性ではない。図 3 の実施態様においては重要な鎖は標識鎖の相補性鎖であり、そのコピーではない。テーリングされた標的部分二重鎖 A ' の相補性非標識鎖は 5'-末端部分 A 1 を有し、これは A ' の標識鎖の 3'-末端部分 A 2 に相補性ではない。

10

【 0 1 0 8 】

上述のように、この P C R 増幅は、参照核酸配列 B の増幅とは別個に行うことができる。別法として、P C R 増幅は標的核酸配列 A および参照核酸配列 B の両者の存在下に実施してもよい。

【 0 1 0 9 】

図 3 を再び参照すれば、参照核酸配列 B は突然変異 M を除いて A と同一な配列からなる。プライマー O P 5 は L 1 とは異なる標識 L 2 を含有する。アンプリコン B B は 2 本の鎖、プライマー O P 5 - L 2 の伸長に由来する標識鎖およびプライマー O P 6 の伸長に由来する非標識鎖を有する。非標識鎖はプライマー O P 6 の末端部分 A 1 を、標識鎖は A 1 に相補性の相当する末端部分 B 2 を有す。

20

【 0 1 1 0 】

アンプリコン B B の標識鎖に沿ったプライマー O P 4 の連鎖伸長はテーリングされた参照部分二重鎖 B ' を産生する。上述のように、プライマー O P 4 は部分 P a からなり、これは、B B の標識鎖、およびアンプリコン B B には結合しない部分 B 1 に結合する。プライマー O P 4 の伸長産物は 5'-末端部分 B 1 を有し、これは B ' の標識鎖の末端部分 B 2 に相補性でない。明らかなように、A ' および B ' はそれらの標識鎖のそれぞれが突然変異 M を除いて他方の非標識鎖に相補性である点で類似している。

【 0 1 1 1 】

部分二重鎖 A ' および B ' は、たとえば約 30 ~ 約 75 、好ましくは約 60 ~ 約 70 の温度の条件下に少なくとも約 1 分好ましくは約 15 ~ 約 120 分置くと、結合し、分岐遊走行を受け、この場合、複合体 C を形成する。A ' のオリゴヌクレオチドテール A 1 は相当する B ' のオリゴヌクレオチドテール B 2 にハイブリダイズし、同様に、A ' のオリゴヌクレオチドテール A 2 は B ' のオリゴヌクレオチドテール B 1 にハイブリダイズする。

30

【 0 1 1 2 】

複合体 C 内の分岐遊走は上述の温度条件下に続き、突然変異 M が存在しなければ複合体 C は二重鎖 D および E に分離し、その場合、分岐遊走および鎖の解離は阻害される。ついで複合体 C を検出すれば、その存在は突然変異 M の存在に直接関係する。

【 0 1 1 3 】

図 3 に示す実施態様においては、標識 L 1 および L 2 は複合体 C からなる部分二重鎖に導入され、複合体 C の検出手段を提供する。これは例示であり限定ではなく、複合体 C を検出する他の便利な方法、たとえばその複合体の受容体の利用も使用することができる。このアプローチでは、sbp メンバーまたはレポーター分子からなる唯 1 個の標識 L 1 または L 2 が要求される。sbp メンバーの受容体ならびに L 1 および L 2 以外の特性によって複合体 C に結合することができる受容体はいずれも複合体 C に結合することが可能で、検出手段を提供する。

40

【 0 1 1 4 】

本発明が使用される核酸における差異の検出を実施するための条件は、上述の増幅の場合に類似する。一般的に、メジウムを約 90 ~ 約 100 の温度に約 2 ~ 約 500 秒の間加熱し、ついで約 20 ~ 約 80 に約 5 ~ 約 2000 秒冷却し、これに続いて約 40 ~ 約 85 に約 5 ~ 約

50

2000秒間加熱する。好ましくは、メジウムは約90 ～ 約100 の加熱に約10秒～ 約3分の期間、約50 ～ 約65 の冷却に約10秒～ 約2分の期間、および約70 ～ 約80 の加熱に約30秒～ 約5分の期間付す。

【0115】

便宜上、本発明で使用する試薬の予め定められた量をパッケージした組み合わせとしたキットで提供することができる。キットは、1種または2種以上の修飾オリゴヌクレオチドプライマー、修飾オリゴヌクレオチドプライマーのための1種または2種以上の結合物質、ヌクレオチドトリホスフェートおよびヌクレオチドポリメラーゼをパッケージした組み合わせからなる。一実施態様においては、ヌクレオチド類縁体は化学修飾を有する天然のヌクレオチドである。キットにヌクレオチドポリメラーゼが包含され、ヌクレオチドポリメラーゼが 3' 5'エキソヌクレアーゼ活性をもたない場合には、キットにはさらに 3' 5'エキソヌクレアーゼ活性のみを有する酵素を包含させる。この場合、1種または2種以上の修飾ヌクレオチドを修飾オリゴヌクレオチドプライマーの 3'-末端において除去することが重要である。

10

【0116】

標的ポリヌクレオチド配列の増幅用キットには上記品目に加えてPCRを実施するために、両者とも修飾された2つのオリゴヌクレオチドプライマーを包含させる。オリゴヌクレオチドプライマーは、上記標的配列に沿った一方の伸長産物が他方の伸長の鋳型として働く点で類似する。

【0117】

サンプル中のポリヌクレオチドアナライトのアッセイにおいては本発明の方法に有用なキットには、上述の他の試薬に、ポリヌクレオチドアナライトから標的ポリヌクレオチド配列を形成するための試薬をパッケージした組み合わせを包含させることができる。さらに、オリゴヌクレオチドプライマーは標識できるか、またはその配列を標識するかもしくは支持体に結合させるグループとともに提供することができる。キットにはさらに、増幅された標的ポリヌクレオチド配列に結合できる標識ポリヌクレオチドプローブを包含させることができる。キットにはさらにシグナル産生システムのメンバー、および各種の緩衝化されたメジウムを包含させることができる。一部のメジウムに1種または2種以上の上記試薬を含有させてもよい。

20

【0118】

キット中の各種試薬の相対量は、本発明の方法の間に起こる必要がある反応を実質的に至適化し、さらに、アッセイの感度を実質的に至適化する試薬の濃度を提供するように広範囲に変動させることができる。

30

【0119】

適当な環境下には、キット中の1種または2種以上の試薬は乾燥粉末として、通常は賦形剤を含めて凍結乾燥し、溶解時に本発明による方法またはアッセイを実施するのに適当な濃度を有する試薬溶液を提供する粉末として提供することができる。それぞれの試薬は別個の容器に充填し、また一部の試薬は交差反応性と保存寿命が許容されるならば1つの容器に混合することもできる。キットには、さらに上述のような本発明による方法の説明書を包含させることができる。

40

【0120】

【実施例】

下記の実施例により本発明をさらに説明する。

特に明記しない限り、温度は摂氏()であり、部および割合は重量部および重量%である。

本明細書において次の定義および略語を用いる。

Tris HCl - トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン-HCl (1Mのストック溶液)、BioWhittaker, Walkersville, MDから入手

DTT - 1,4-ジチオスレイトール、Sigma Chemical Company, St. Louis, MOから入手

50

H P L C	-	高速液体クロマトグラフィー	
D P P	-	4,7 - ジフェニルフェナンストロリン、Aldrich Chemical Company, Milwaukee WIから入手	
B S A	-	ウシ血清アルブミン、Sigma Chemical Company, St. Louis MOから入手	
E L I S A	-	“Enzyme-Immunoassay,” Edward T. Maggio, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1980)に記載されるエンザイム結合イムノアッセイ	
b p	-	塩基対	
w t (W T)	-	野生型	
d d c	-	ジデオキシシチジン	
g	-	グラム	10
m m o l	-	ミリモル	
n m o l	-	ナノモル	
m M	-	ミリモル濃度	
n M	-	ナノモル濃度	
D M F	-	ジメチルホルムアミド	
T H F	-	テトラヒドロフラン	
L S I M S	-	液体二次イオン化質量分析法	
N M R	-	核磁気共鳴法	
T M S C I	-	テトラメチルシリルクロリド	
E D A C	-	1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸	20
M E S	-	2 - (N - モルホリノ)エタンスルホン酸	
S P D P	-	N - スクシンイミジル 3 - (2 - ピリジルチオ) - プロピオン酸塩	
スルホ - S M C C	-	スルホスクシンイミジル - 4 - (N - マレインイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボン酸塩	
T C E P	-	トリス - カルボキシエチルホスフィン	
S a v	-	ストレプトアビジン	
d d	-	二重蒸留	
M O P S	-	3 - (N - モルホリノ)プロパンスルホン酸	
S A T A	-	N - スクシンイミジル S - アセチルチオアセテート	
E D T A	-	エチレンジアミンテトラ酢酸	30
R . B .	-	丸底	
R L U	-	相対発光値	

【0121】

試薬の調製

ビーズ：

Acc-Ab_{Dig} - 抗Dig抗体と共役したアクセプタービーズ(MAD)(1ビーズ当たり377抗体分子を有する)を次のように調製した：

機械攪拌機と滴下漏斗を取り付けた3口丸底フラスコ中にてデキストランT-500(Pharmacia, Uppsala, Sweden)(50g)をH₂O 150ml中に溶解することによりヒドロキシプロピルアミノデキストラン(1NH₂/7グルコース)を調製した。上述の溶液にZn(BF₄)₂ 18.8gを添加し、温水槽を用いて温度を87にした。温度を87～88に維持しながら、エピクロロヒドリン(350ml)を約30分間にわたり攪拌しながら滴下して添加した。温度を80～95の範囲に維持しながら混合物を4時間攪拌し、次いで混合物を室温まで冷却した。クロロデキストラン生成物は、穏やかに攪拌しながらエタノール3Lをゆっくり注ぐことにより沈殿させ、濾過により回収し、そして真空オープン中で一晩乾燥した。

【0122】

クロロデキストラン生成物は水200L中に溶解し、濃アンモニア水(36%)2Lに添加した。この溶液を室温で4日間攪拌し、次いでロータリーエバポレーター上で約190mlまで濃縮した。濃縮物は二つのバッチに等分し、各バッチは急速に攪拌したメタノー

ル 2 L 中にゆっくり注ぐことにより沈殿させた。最終生成物を濾過により回収し、真空中で乾燥した。

上述のように調製したヒドロキシプロピルアミノデキストラン (1 NH₂/7 グルコース) は、50 mM MOPS, pH 7.2 中に 12.5 mg/mL にて溶解した。溶液を室温で 8 時間攪拌し、冷却下で保存し、そして使用する直前に Sorval RC-5B 遠心分離機において 15,000 rpm にて 45 分間遠心して微量の固体物質を除去した。この溶液 10 mL に水 1 mL 中のスルホ-SMCC 23.1 mg を添加した。この混合物を室温で 1 時間インキュベートし、さらに精製せずに用いた。

【0123】

C-28 チオキセンを次のように調製した：

乾燥 DMF (200 mL) 中の 4-ブロモアニリン (30 g, 174 mmol) 溶液に、1-ブロモテトラデカン (89.3 mL, 366 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (62.2 mL, 357 mmol) を添加した。反応溶液はアルゴン下で 90 °C にて 16 時間加熱し、その後室温まで冷却した。この反応溶液に、再度 1-ブロモテトラデカン (45 mL, 184 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (31 mL, 178 mmol) を添加し、反応混合物を 90 °C にて 15 時間加熱した。冷却後、反応溶液を真空中で濃縮し、残留物を CH₂Cl₂ (400 mL) で希釈した。CH₂Cl₂ 溶液は、1 N NaOH 水溶液 (2 回)、H₂O そしてブラインで洗浄し、Na₂SO₄ 上で乾燥し、次いで真空中で濃縮して、暗褐色の油 (約 110 g) を得た。ヘキサンで溶出する Waters 500 Prep LC システムによるシリカゲル上の調製カラムクロマトグラフィーにより黄色の油を得て、これは主に生成物 (4-ブロモ-N,N-ジ-(C₁₄H₂₉)-アニリン) と微量成分の 1-ブロモテトラデカンを含有していた。後者の成分は、減圧蒸留 (沸点 105 ~ 110 °C, 0.6 mm) により混合物から除去し、褐色の油として生成物 50.2 g (51%) が残った。乾 THF (30 mL) 中のマグネシウムターニング (9.60 g, 395 mmol) の混合物に、アルゴン下で THF (250 mL) 中の上述の置換アニリン生成物 (44.7 g, 79 mmol) を滴下して添加した。ヨウ素の結晶 2 ~ 3 個を添加して、Grignard 試薬の生成を開始させた。反応混合物が暖まり、そして環流し始めたら、添加速度を調節して、穏やかな環流を維持した。添加完了後、混合物は環流にてさらに 1 時間加熱した。冷却した上清溶液は、カニユーラを介して別の漏斗に移し、アルゴン下で -30 °C にて THF (300 mL) 中のフェニルグリオキサール (11.7 g, 87 mmol) 溶液に滴下して添加した (2.5 時間以上)。反応混合物を 1 時間にわたり徐々に 0 °C まで暖め、さらに 30 分間攪拌した。生じた混合物は、氷水 (800 mL) と酢酸エチル (250 mL) の混合物に注いだ。有機相を分離して、水相を酢酸エチルで抽出した (3 回)。合わせた有機相を H₂O (2 回)、次いでブラインで洗浄し、MgSO₄ 上で乾燥した。溶媒を蒸発させ、濃緑色の油状液体として粗製生成物 48.8 g を得た。この液体のフラッシュカラムクロマトグラフィー (ヘキサン, 酢酸エチル : ヘキサン 1.5 : 98.5, 3 : 97, 5 : 95 を用いた勾配溶出) はベンゾイン生成物 24.7 g (50%) (MS (C₄₂H₆₉NO₂); [M-H⁺] 618.6, ¹NMR (250 MHz, CDCl₃)) を与え、これは期待されるベンゾイン生成物と一致していた。乾トルエン (500 mL) 中の上述のベンゾイン生成物 (24.7 g, 40 mmol) に、2-メルカプトエタノール (25 g, 320 mmol) および TMSCI (100 mL, 788 mmol) を連続的に添加した。反応溶液をアルゴン下で環流にて 23 時間加熱し、次いで室温まで冷却した。これに、追加的に TMSCI (50 mL, 394 mmol) を添加し、反応溶液を環流にてさらに 3 時間加熱した。生じた溶液を冷却し、2.5 N NaOH 冷水溶液を用いて塩基性にして、次いで CH₂Cl₂ で抽出した (3 回)。合わせた有機相を飽和 NaHCO₃ 水溶液 (2 回) とブラインで洗浄し、真空中で濃縮して、褐色の油状液体を得た。Waters 500 Prep LC システムを使用したシリカゲル上の調製カラムクロマトグラフィー (ヘキサン, 酢酸エチル : ヘキサン 1.5 : 98.5, 3 : 97, 5 : 95 を用いた勾配溶出) は橙黄色の油として C-28 チオキセン 15.5 g (60%) (MS (C₄₄H₇₁NOS); [M-H⁺] 661.6, ¹NMR (250 MHz, CDCl₃)) を与え、これは期待される C-28 チオキセン生成物である 2-(4-(N,N-ジ-(C₁₄H₂₉))-アニリノ

10

20

30

40

50

) -3-フェニルチオキセンと一致していた。

【0124】

カルボキシル化学発光体（アクセプター）ビーズ（TARビーズ）：

次の色素組成物を用いた：20% C-28チオキセン（上述のように調製）、1.6% 1-クロロ-9,10-ビス(フェニルエチニル)アントラセン（1-Cl-BPEA）（から入手）および2.7%ブルレン（Aldrich Chemical Companyから入手）。粒子はラテックス粒子である（Seradyn Particle Technology, Indianapolis IN）。色素組成物（240～250 mM C-28チオキセン，8～16 mM 1-Cl-BPEAおよび20～30 mM ブルレン）は、1994年8月23日に特許された米国特許第5,340,716号（第'716特許）第48欄第24～45行（本明細書にて引用することにより組み入れる）に記載されるのと同様な方法でラテックス粒子に組込まれた。着色法は、ラテックスビーズ（10%固体）をエチレングリコール（65.4%），2-エトキシエタノール（32.2%）および0.1N NaOH（2.3%）の混合物中に添加することを含む。ビーズを混合し、連続的に攪拌しながら95℃で40分間加熱した。ビーズを攪拌しながら、3つの化学発光色素を連続的に攪拌しながら95℃まで30分間加熱して2-エトキシエタノール中に溶解した。両方のインキュベーションの終了時に、色素溶液をビーズ懸濁物中に注ぎ、生じた混合物を連続的に攪拌しながらさらに20分間インキュベートした。20分間インキュベートした後、ビーズを油浴槽から取り出し、40±10℃まで冷却した。次いでビーズは、43ミクロンメッシュポリエステルフィルターに通して、洗浄した。着色粒子は、Microgon（Microgon Inc., Laguna Hills, CA）を使用して、エチレングリコールおよび2-エトキシエタノール（70%/30%）から構成される溶媒混合物で洗浄した。ビーズは、ビーズグラム当たり溶媒混合物500 mLで洗浄した。これは次に、10% エタノール水（pH 10～11）により洗浄した。洗浄容量はビーズグラム当たり400 mLである。次いで、ビーズを収集し、%固体、色素含量、粒径、シグナルおよびバックグラウンド発生について試験した。

【0125】

上述のように調製したカルボキシルアクセプタービーズ（水4.5 mL中99 mg）を攪拌しながら徐々に上述のMADアミノデキストラン5.5 mLに添加し、次いで1 mL of 50 mM MES，pH 6中の200 mg/mL NHSを1 mL，水中の200 mg/mL EDACを1 mLおよび450 μLを添加し、最終的にpH 6にした。混合物は暗室中にて室温で一晩インキュベートし、次いでDMSO 0.5 mL中の無水コハク酸200 mgと室温で30分間反応させた。新たに開封したSurfact-Amps Tween-20（Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois）を添加し、ビーズをSorvall RC-5B遠心分離機にて15,000 rpmで30分間遠心分離し、3部の50 mM MOPS，50 mM EDTA，0.1% Surfact-Amps Tween-20（Pierce Chemical Company），pH 7.2 10 mLを用いて遠心分離により洗浄し、同じ溶液3 mLに再懸濁した。

【0126】

モノクローナル抗ジゴキシンAb（上述のように調製）は、ABx樹脂（Baker Chemical Company, Phillipsburg, NJ）により精製し、0.15 M NaCl，5 mM Na₂HPO₄，pH 7.4中で透析した。抗ジゴキシンAbは、SATA（エタノール中1.25 mg/mL，2当量）10.2 μLを含む62.2 μL（4.28 mg）と混合し、室温で1時間インキュベートし、そして冷却した2 Lの150 mM NaCl，10 mM Na₂HPO₄，1 mM EDTA，pH 7に対して2回透析することによりチオール化した。チオアセチル化抗体は、ヒドロキシルアミン 62.2 μL（1 M H₂NOH，50 mM MOPS，25 mM EDTA，pH 7）を添加し、アルゴンを用いて泡立て、そして室温で1時間インキュベートして脱アセチル化した。生成物はPharmacia PD-10カラム（G-25）に適用して、50 mM MOPS，50 mM EDTA，pH 7.2を用いて溶出し、アルゴンを用いて泡立てた。先に溶出した2.5 mL画分と3つの1 mL画分を集めて合わせた。抗体の回収は、A₂₈₀により3.66 mgまたは86%であった。Surfact-Amps Tween-20（10%）を添加して、最終濃度0.2%にした。

【0127】

上述のチオール化抗体（1.71 mg 抗体）のアリコート1.4 mLは、上述のように調製したレイニイミド化ビーズ300 μ L（10 mg）に十分な10% Tween-20を足したものに即座に添加して、最終濃度0.2%の混合物にした。試験管をアルゴンでパージして、暗室中にて室温で一晩インキュベートした。上述のものに、水中の1 M $\text{HSCCH}_2\text{COOH}$ 3.4 μ Lを添加した。室温にて30分後、 ICH_2COOH （水中、1 M）6.8 μ Lを添加した。30分後、0.17 M グリシン、0.1 M NaCl 、0.1%（v/v） Tween-20、10 mg/mL BSA、pH 9.2 3.5 mLを添加し、ビーズを遠心分離（15,000 rpmにて30分間）し、同じ緩衝液5 mL中で3時間インキュベートし、遠心分離し、3部の緩衝液C 5 mLを用いて遠心分離して洗浄し、緩衝液C 5 mL中に再懸濁し、冷蔵下にて保存した。緩衝液C中で測定したビーズのサイズは301 \pm 56 nmであった。結合能は、 ^{125}I -ジゴキシンを用いて測定したところ、ビーズ当たり377抗体分子に相当していた。

10

【0128】

シリコンテトラ-*t*-ブチルフタロシアニンは次のように調製した：

新たに切断した金属ナトリウム（5.0 g，208 mmol）は、磁気攪拌機、還流コンデンサ、乾燥管およびガス泡立て器を取り付けた2リットルの3口フラスコ中の無水エーテル300 mLに添加した。ナトリウムが完全に溶解した後、漏斗を用いて4-*t*-ブチル-1,2-ジシアノベンゼン（38.64 g，210 mmol，TCI Chemicals，Portland ORから入手）を添加した。混合物が透明になり、温度が約50℃まで上昇した。この時点で、無水アンモニア気体流を連続的にガラス泡立て器を通じて反応混合物に1時間導入した。次いでアンモニア気体の流れを持続させながら、反応混合物を還流下で4時間加熱した。反応過程において、固体として沈殿しはじめた。生じた懸濁物を蒸発させて乾燥させ（ハウスバキューム）、残留物を水（400 mL）中に懸濁して濾過した。固体を乾燥した（60℃，ハウスバキューム， P_2O_5 ）。生成物（1,3-ジイミノイソインドリン，42.2 g）のおおよその収率を定量した。この物質はさらに精製せずに次の工程にて用いた。コンデンサおよび乾燥管を取り付けた1リットルの3口フラスコに、上述の生成物（18 g，89 mmol）およびキノリン（200 mL，Aldrich Chemical Company，St. Louis MOから入手）を添加した。注射器を用いて四塩化ケイ素（11 mL，95 mmol，Aldrich Chemical Company）を、攪拌溶液に10分間にわたり添加した。添加終了後、反応混合物は油浴槽中にて180～185℃まで1時間加熱した。反応は室温まで冷却し、濃塩酸を注意して添加して、反応混合物を酸性（pH 5～6）にした。暗褐色の反応混合物を冷却し、濾過した。固体を水100 mLで洗浄し、乾燥した（ハウスバキューム，60℃， P_2O_5 ）。固体物質を1リットルの丸底フラスコに入れ、濃硫酸（500 mL）を攪拌しながら添加した。混合物を60℃にて4時間攪拌し、次いで砕いた氷（2000 g）で注意して希釈した。生じた混合物を濾過して、固体を水100 mLで洗浄し、そして乾燥した。紺青色の固体を1リットルの丸底フラスコに移し、濃アンモニア（500 mL）を添加し、混合物を加熱し、そして還流下で2時間攪拌し、室温まで冷却して、次いで濾過した。固体を水50 mLで洗浄し、真空下で乾燥し（ハウスバキューム，60℃， P_2O_5 ）、紺青色の固体として生成物、シリコンテトラ-*t*-フタロシアニン12 gを得た。3-ピコリン（12 g，Aldrich Chemical Companyから入手）、トリ-*n*-ブチルアミン（無水，40 mL）およびトリ-*n*-ヘキシルクロロシラン（11.5 g）は、磁気攪拌機及び還流コンデンサを取り付けた1リットルの3口フラスコ中の上述の生成物12 gに添加した。混合物を還流下で1.5時間加熱し、次いで室温まで冷却した。ピコリンを高真空下（オイルポンプ，約1 mmHg）にて留去して、乾燥させた。残留物を CH_2Cl_2 中に溶解して、シリカゲルカラム（ヘキサン）を用いて精製し、紺青色の固体として純粋な生成物、ジ-（トリ-*n*-ヘキシルシリル）-シリコンテトラ-*t*-ブチルフタロシアニン10 gを得た。（MS：[M-H]⁺ 1364.2，吸収スペクトル：メタノール：674nm（（180,000）：トルエン678nm，¹NMR（250 MHz， CDCl_3 ）：（：-2.4(m, 12H)，-1.3(m, 12H)，0.2-0.9 (m, 54H)，1.8(s, 36H)，8.3(d, 4H) および9.6 (m, 8H)）は上記の期待される生成物と一致してい

20

30

40

50

た。

【0129】

Sens-Sav - ストレプトアビジンと共役した感光剤ビーズ (2300 SAV/ビーズ)
感光剤ビーズは、機械攪拌機、1つの口に取り付けた温度計を備えたガラス栓および反対側の口に漏斗を備えた3口丸底フラスコにカルボン酸修飾ビーズ600 mLを入れて調製した。フラスコを油浴槽に浸して、 94 ± 1 に維持した。ビーズは、口漏斗を通じてフラスコに添加し、ビーズコンテナをエトキシエタノール830 mL、エチレングリコール1700 mLおよび0.1 N NaOH 60 mLですすぎ、洗浄液を炉とを通じてフラスコに添加した。ビーズを 94 ± 1 の温度で40分間、765 rpmにて攪拌した。

10

【0130】

シリコンテトラ - t - ブチルフタロシアニン (10.0 g) をベンジルアルコール300 mL中に 60 ± 5 にて溶解し、85 mLを 120 ± 10 まで加熱した注射器によりセプタムを通じて毎分3 mLの速度で上述の丸底フラスコに添加した。フタロシアニン溶液の残りの85 mLを次いで上述のように添加した。最初からフタロシアニンを含んでいるシリンジおよびフラスコは、ベンジルアルコール40 mLですすぎ、丸底フラスコに移した。15分後、脱イオン水900 mLおよび0.1 N NaOH 75 mLを40分間にわたり滴下して添加した。油浴槽の温度を 40 ± 10 まで徐々に下げ、攪拌を中断した。次いでビーズは43ミクロンポリエステルフィルターを通して濾過し、エタノール：水が100：0から10：90を用いる接線流濾過装置 (Microgon Inc., Laguna Hills, CA) に供し、次いで43ミクロンポリエステルフィルターで濾過した。

20

【0131】

スルホ - SMCC (11.55 mg) を蒸留水0.5 mL中に溶解した。10秒間にゆっくりと上述の溶液を攪拌アミノデキストラン (Molecular Probes, Eugene, Oregon Molecular Probes, Eugene, Oregon) 溶液 (50 mM MOPS, pH 7.2 中、12.5 mg/mL) に添加した。混合物を室温で1時間インキュベートした。

【0132】

上記攪拌溶液に、上述のように調製した蒸留水中の感光剤ビーズの20 mg/mLを5 mL (100 mg) 添加した。次いで、200 mg/mL NHSを1 mL (6 N NaOHでpHを6.0に調節した50 mM MOPS中にて新たに調製)。200 mgのEDAGは、蒸留水1 mL中に溶解し、この溶液を攪拌しながらゆっくりと感光剤ビーズに添加した。pHは、1 N HCl 450 μ Lを添加することにより6.0に調整し、混合物を暗室中で一晩インキュベートした。DMSO 0.5 mL中の無水コハク酸100 mgの溶液を感光剤ビーズに添加し、混合物を暗室中にて室温で30分間インキュベートした。この溶液に、10% Tween-20を0.13 mL添加して、Tween-20の最終濃度を0.1%にした。ビーズは、上述のように15,000 rpmにて45分間遠心分離した。上清は捨て、ビーズは緩衝液 (50 mM MOPS, 50 mM EDTAおよび0.1% Tween-20, pH 7.2) 10 mL中に再懸濁した。混合物を超音波処理してビーズを拡散させた。ビーズを上述のように30分間遠心分離し、上清を捨て、そしてビーズを再懸濁した。この手法を総計3回繰り返した。次いで、ビーズを上述の緩衝液2.5 mL中に40 mg/mLにて再懸濁し、アルゴンで飽和させ、Tween-20を添加して濃度0.1%にした。ビーズは4 にて保存した。

30

40

【0133】

ビーズ100 mgに対してストレプトアビジン25 mgを用いて、ストレプトアビジンを上記ビーズに結合させた。ストレプトアビジン25 mg (50 mg Aston固体、Aston, Wellesley, MAから入手) を1 mM EDTA, pH 7.5

1 mL中に溶解し、エタノール中の2.5 mg/mL 77 μ Lをこれに添加した。混合物を室温で30分間インキュベートした。脱アセチル化溶液は、1 M

ヒドロキシアミン - HCl, 50 mM Na₂PO₄, 25 mM EDTA, pH 7.0 含有するよう調製した。この脱アセチル化溶液0.1 mLを上述の溶液に添加し、室温で1

50

時間インキュベートした。生じたチオール化ストレプトアビジンは、Pharmacia PD10カラム上で精製し、そして50 mM MOPS, 50 mM EDTA, pH 7.2を含有する緩衝液で洗浄した。試料の体積は、上記カラム緩衝液1.5 mLを添加して2.5 mLにした。試料をカラムに詰め、カラム緩衝液3.5 mLを用いて溶出した。チオール化ストレプトアビジンは、50 mM MOPS, 50 mM EDTA, 0.1% Tween-20, pH 7.2を1.5 mL添加することにより5 mLにした。チオール化ストレプトアビジン溶液5 mLをアルゴン下にて感光剤ビーズ5 mLに添加して、よく混合した。ビーズはアルゴンで1分間覆い、管を密封し、そして反応混合物を暗室下にて室温で一晩インキュベートした。

【0134】

上記ビーズに、50 mM MOPS, 50 mM EDTA, 0.1% Tween-20, pH 7.2を7.5 mL添加し、ビーズを1 mg/mLにした。残留したマレインイミドは、最終濃度2 mMにてメルカプト酢酸を添加してキャッピングした。混合物は暗室下にて室温で30分間インキュベートした。残留したチオールは、最終濃度10 mMにてヨード酢酸を添加してキャッピングし、混合物は暗室下にて室温で30分間インキュベートした。ビーズは上述のように総計3回、15,000 rpmにて30分間遠心分離した。

【0135】

実施例 1

ヒトBRCA1遺伝子エキソン11の多型部位の検出

BRCA1遺伝子のエキソン11の長さ450塩基対の配列の増幅は二段階で実行された。第1のPCR増幅は、2個の5'末端付加プライマーを用いて実施した。プライマーは標的遺伝子配列に相補的である3'部分と、標的遺伝子配列に無関係の配列からなる5'部分（以下で下線付）から構成されている。2個のプライマーは示される通り、その3'末端において、天然のヌクレオチドを蛍光修飾したdTに置換することによって修飾された。プライマーはOligosなど入手した。

【0136】

第1のPCR増幅に続いて、第2の増幅はプライマーを用いて実施した。前方プライマーは第1前方プライマーの5'末端の配列に相補的な配列からなり、ビオチンまたはデボキシゲニン（ディグ）で5'標識された。後方プライマーは、第1PCR後方プライマーの5'末端に相補的な3'配列と、標的遺伝子にも第1PCRプライマーにも相補的でない配列からなる5'末端から構成された。2個の後方プライマーの5'末端はお互いに無関係で、変更された配列の検出に用いられる4本鎖DNA構造を形成しうる増幅産物が形成されるよう設計された。プライマーの配列は以下の通りである。

【0137】

第1PCR前方プライマー：

5'-GTTTTCCAGTCACGACGAGGCTTTAAGTATCCATNG-3' (SEQ ID NO:1)

第1PCR後方プライマー：

5'-AGGAAACAGCTATGACCATCAAAACCTAGACCTCCTTNG-3' (SEQ ID NO:2)

上記配列の下線部分は、“末端”配列を表す。下線のない部分は、標的遺伝子に相補的である。NはC6 dTフルオレセインを表す。

【0138】

第2PCR前方プライマー：

5'-ビオチン-GTTTTCCAGTCACGACG-3' (SEQ ID NO:3)

5'-ディグ-GTTTTCCAGTCACGACG-3' (SEQ ID NO:4)

第2PCR後方プライマー：

5'-ACCATGCTCGAGATTACGAGGAAACAGCTATGACCAT-3' (SEQ ID NO:5)

5'-GATCCTAGGCCTCACGTATTAGGAAACAGCTATGACCAT-3' (SEQ ID NO:6)

上記配列の各々の下線部分は、“末端”配列を表す。下線のない部分は、第1PCR反応の増幅産物に相補的である。

【0139】

PCRワックスジェムを用いたホットスタート法によるPCR増幅は、次のように設計した：10 mM Tris-HCl緩衝液、pH 8.3、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.2 mg/ml BSA、0.25 mM 各dNTP、0.5 μMの各プライマーを含む部分反応混合液のアリコート2

5 μlを、PCRジェム(Perkin-Elmer社より；カタログ番号N-808-0150)を含むPCRチューブに移した。チューブはワックスを融解させるため、85 °Cで2分間インキュベートし、ワックスバリアーを形成するために室温まで冷却した。10 mM Tris-HCl、pH 8.3、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、5ユニットのPfu DNAポリメラーゼ(Stratagene；カタログ番号600159-81)またはTaq DNAポリメラーゼ(Stratagene, La Jolla, CA)を含む第2反応混合液20 μlを各チューブに添加した。標的核酸を含むと推測される試料5 μlがチューブを添加し、反応チューブは温度サイクル(Trio thermoblock, Biometra Inc., Tampa, FL, カタログ番号050090005)に供せられた。

【0140】

本発明の方法を用いて実施した反応は、以下のように設計された。すなわち、試料5 μlが、すなわち、10 mM Tris-HCl、pH 8.3、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.2 mg/ml BSA、0.25 mM 各dNTP、0.5 μM 各プライマー、2.5ユニットのPfuポリメラーゼまたはTaq DNAポリメラーゼを含有し、12.5 μMの抗蛍光モノクロ

ーナル抗体(抗デゴキシシン抗体に関して上述した方法と同様の既知の方法によって調製された)を含むまたは含まない反応混合液に加えられた。反応混合液(全量25 μl)は上記のように温度サイクルに供された。第1PCR増幅反応のための温度サイクリングは、以下の通りであった。すなわち、94 °C 4分間；94 °C 30秒間、64 °C 1分間、72 °C 1分間を35サイクル。第1増幅反応の反応混合液の一部は、第2増幅反応に用いられた。第2PCR増幅のための温度サイクリングは、以下の通りであった。すなわち、94 °C 4分間、次に94 °C 30秒間、64 °C 1分間、72 °C 1分間を20サイクル。

【0141】

2個のゲノムDNA試料(Myriad Genetics, Salt Lake City, UT)が解析に用いられた。すなわち、多型部位に関してヘテロ接合体の細胞と、ホモ接合体の細胞から精製されたゲノムDNAである。DNA試料は2倍体細胞由来であり、分析の目的は試験した配列がホモ接合体かヘテロ接合体かを調べることであったため、本実施例では対照DNA増幅産物を付加せずに実施した。

【0142】

増幅に続いて、2 μLのテスト増幅反応混合液は4 μL緩衝液と混合された。その混合液は以下のインキュベーション条件に供せられた。すなわち、増幅産物を変性させるための95 °C 2分間、続いて、アニールし、4本鎖DNA構造を形成し、分枝点移動するための65 °C 30分間である。50 μLの粒子混合物(固定化ストレプトアビジンを含む感光剤粒子2.5 μLおよび固定化抗デゴキシシン抗体を含む化学発光剤粒子1.25 μL)が各反応チューブに加えられた。チューブはシグナルを読みとるためにリーダーに移され、37 °Cで30分間インキュベートし、シグナルを読んだ(1秒照射、1秒読み取りを3サイクル)。その結果を、表1および2に示す。

【0143】

【表1】

表 1

Pfu DNAポリメラーゼを用いて産生した増幅産物：

シグナル読み取り (RLU)

DNA試料	ワックスジェムあり ¹	抗体あり ²	抗体なし ³
ヘテロ接合体	591296	872780	1630000
ホモ接合体	60692	69318	868996
な し	7618	10084	16840

10

1 既知の方法

2 本発明の方法

3 コントロール

【 0 1 4 4 】

【 表 2 】

表 2

Taq DNAポリメラーゼを用いて産生した増幅産物：

シグナル読み取り (RLU)

DNA試料	ワックスジェムあり ¹	抗体あり ²	抗体なし ³
ヘテロ接合体	89626	134662	346000
ホモ接合体	22602	18958	273350
な し	5758	7238	14022

20

1 既知の方法

2 本発明の方法

3 コントロール

30

【 0 1 4 5 】

上記の結果は、増幅前にプライマーに結合している抗体（本例では抗蛍光抗体）が、標的遺伝子依存的または非依存的に、非特異的増幅の顕著な減少を引き起こしたことを示している。本実施例は、本発明の方法が特定の熱安定DNAポリメラーゼに限定されないことを示している。

【 0 1 4 6 】

40

実施例 2 ヒト嚢胞性繊維症遺伝子のエキソン 1 0

8 試料のヒトゲノムDNA（4つの野生型ホモ接合体と、1つの野生型アリルと3塩基の欠失を持つアリル、F 5 0 8を持つ4つのヘテロ接合体）は、220塩基長の生成物を生じるために、後述するプライマーを用いて増幅された。ゲノムDNA試料はMayo Foundation (Rochester, MN) から入手した。

前方プライマー配列：

5'-CTCAGTTTTCTGGATTATGCCNNA-3' (SEQ ID NO: 7)

N=エテノ-dA

等モルの混合物（それぞれ125 μM）の5 ビオチン化および5 ジゴキシゲニン標識前方プライマーをPCRに用いている。

50

第1後方プライマー配列:

5'-ACCATGCTCGAGATTACGAGCTAACCGATTGAATATGGAGCCNNG-3' (SEQ ID NO: 8)

第2後方プライマー配列:

5'-GATCCTAGGCCTCACGTATTCTAACCGATTGAATATGGAGCCNNG-3' (SEQ ID NO: 9)

上記において、末端 (tail) 配列は下線で示した: N=エテノ-dA

【0147】

等モルの混合物 (それぞれ 125 μ M) の2つの後方プライマーをPCRに用いている。20 μ l PCR反応溶液は200 μ MのそれぞれのデオキシNTP、10 ngゲノムDNAおよび1UのPfu DNAポリメラーゼを含む。緩衝液は10 mMトリス塩酸 (pH 8.3)、50 mM 塩化カリウム、4 mM 塩化マグネシウムおよび200 μ g/ml BSA (緩衝液A)を含む。2セットのPCR反応液は室温で用意された。それらのセットの一方は抗エテノ・モノクローナル抗体 (P. Lorenz 博士、ドイツより供与) を250 nM含む。Pfu DNAポリメラーゼは、反応溶液に最後に加えられる成分である。反応は温度サイクルを始める前に30分室温で予めインキュベートした。バイオトラトリオ (Biotra Trio) 温度サイクラーにおいて、最初に94 でのゲノムDNAの変性を4分間行い、94 における変性段階30秒、64 のアニール段階1分および72 の伸長段階1分からなる合計40サイクルを実施した。

【0148】

PCR増幅の直後に、全ての反応液を分枝点移動させた。分枝点移動のプロトコールは94 にて変性工程を2分間、65 にて再アニール/ストランド伸長工程30分間からなる。

各分枝点移動の反応液のアリコート2 μ l (試料の一部) は、感光剤 - ストレプトアビジンビーズ2.5 μ l (5 μ g) と化学発光剤 - 抗ジゴキシゲニン抗体ビーズ1.25 μ l (2.5 pg) 含有するの緩衝液A 50 μ lに添加され、37 にて30分インキュベートした。次いでシグナルはシグナルリーダーを用いて読み取った。結果を表3に示す。

【0149】

【表3】

表 3
シグナル測定 (RLU)

試 料	抗エテノ抗体なし ¹	抗エテノ抗体あり ²
野生型/野生型	9626	7896
野生型/野生型	7240	8588
野生型/野生型	7984	7496
野生型/野生型	7972	7116
Δ F508/野生型	262268	374424
Δ F508/野生型	258164	374000
Δ F508/野生型	100208	385916
Δ F508/野生型	169350	384366

1 コントロール

2 本発明の方法

【0150】

結果として抗エテノ抗体の存在がより高く、より画一的なポジティブシグナルが生じた。この効果は酵素とプライマーに対する所望のアンプリコンと通常競合する非特異的PCR生成物の量を減少したためであると推測される。

【0151】

実施例3 ヒト嚢胞性繊維症遺伝子のエキソン11

16試料のヒトゲノムDNA(6つの野生型ホモ接合体と、8つの野生型アリルとG542X、G551D、R553XまたはR560Tの点突然変異を保持するアリルを含む8つのヘテロ接合体および2つの二重変異体)は、333塩基長の生成物を生じるために、後述するプライマーを用いて増幅した。ゲノムDNA試料はMayo Foundation(Rochester, MN)から入手した。

10

前方プライマー配列:

5'-GCCTTTCAAATTCAGATTGAGCNNA-3' (SEQ ID NO: 10)

式中、N=エテノ-dA

等モルの混合物(それぞれ125nM)の5'ビオチン化および5'ジゴキシゲニン標識化前方プライマーをPCRに用いた。

第1後方プライマー配列:

5'-ACCATGCTCGAGATTACGAGACATTTACAGCAAATGCTTGCNNA-3' (SEQ ID NO: 11)

第2後方プライマー配列:

5'-GATCCTAGGCCTCAGTATTGACATTTACAGCAAATGCTTGCNNA-3' (SEQ ID NO: 9)

上記において、“末端(tail)”配列に下線を施し、N=エテノ-dA

20

全ての実験条件はエキソン10の実施例2に示されたものと厳密に同じである。結果を表4に示す。

【0152】

【表4】

表 4
シグナル測定 (RLU)

試料	抗エテノ抗体なし ¹	抗エテノ抗体あり ²
野生型／野生型	6430	4130
野生型／野生型	5208	4380
野生型／野生型	6436	4656
野生型／野生型	7282	4486
野生型／野生型	7258	5488
野生型／野生型	8406	5442
G542X／野生型	37588	85638
G542X／野生型	60706	101896
G551D／野生型	23340	85816
G551D／野生型	31388	153038
R553X／野生型	13660	81996
R553X／野生型	20978	99774
R560T／野生型	30374	129776
R560T／野生型	42100	128442
G551D／R553X	38908	151542
G551D／R553X	35964	166728

1 コントロール

2 本発明の方法

【0153】

抗エテノ抗体が存在する場合、ヘテロ接合体でのシグナルにおける重要な増加が再び観察された。野生型試料のバックグラウンドのシグナルはやや低下した。

【0154】

実施例4 修飾型前方および後方プライマーと、修飾型前方プライマーおよび非修飾型後方プライマーの比較

下記の2つの実験は、全ての分枝点移動プライマーが修飾され、使用した対応する抗体と結合し得る場合に、本発明の利点が達成されたことを示している。下記の実施例において、前方および後方"分枝点移動"PCRプライマーは修飾され、それ故に抗体と結合することが可能である。特異性において改善が得られた。

ヒト嚢胞性繊維症遺伝子のエキソン10の増幅における実験条件は実施例2に示されたものと厳密に同じである。

7試料のヒトゲノムDNAは3つの野生型ホモ接合体(3)、3つの(F508(3)、および1つの(I507のヘテロ接合体(突然変異体は共に3塩基欠失である)を包含する。抗エテノモノクローナル抗体は、全ての反応液中に存在する。

表5は、2セットのPCRプライマーの比較実験を示す。一方のセット(左欄)において、前方および後方プライマーは実施例2に示されているように3'末端にてエテノ基で修飾されており、もう一方のセット(右欄)は前方標識プライマーのみが3'末端にてエテノ基で修飾されており、5'後方プライマーは修飾されていない(これらの3' - 末端に

10

20

30

40

50

は N N A が存在しない)。

【 0 1 5 5 】

【 表 5 】

表 5

シグナル測定 (RLU)

試料	前方プライマー：3'-エテノ 後方プライマー：3'-エテノ	前方プライマー：3'-エテノ 後方プライマー：非3'-エテノ
野生型／野生型	3494	29464
野生型／野生型	4488	91644
野生型／野生型	3944	69822
Δ F 508／野生型	679646	1030254
Δ F 508／野生型	625680	971278
Δ F 508／野生型	617978	1043210
Δ I 507／野生型	579500	998724

10

20

【 0 1 5 6 】

上記の実験は、修飾型前方プライマーと非修飾型後方プライマーを使用した場合と比較して、本発明の方法が修飾型前方および後方プライマーを使用して、より良好な結果を達成したことを示す。

【 0 1 5 7 】

実施例 5 従来法と比較した本発明の方法

本発明の方法の使用は、他の方法と共に、エテノ修飾プライマーセット Ex11-f2e/r1e を用い、抗エテノアデニンモノクローナル抗体 (MAb) の存在下または非存在下にて、両者ともワックスジェム非存在下で実施した。また、2つの他のコントロールは、対応する非エテノ化プライマーセット Ex11-f2/r1 を使用し、ホットスタート法を用いず、またはワックスジェムを用いて実施した。f2/r1 プライマーセットは CFTR エキソン 11 配列の 173 塩基部位に位置し、その結果、エキソン 11 の 217 塩基および後方プライマーの 20 塩基を含め、計 237 塩基の増幅産物を生成する。

30

用いた Ex11-f2e/r1e プライマーは下記の通りである：

前方プライマー (エテノ修飾)：

5'-ピオチン-TAGAAGGAAGATGTGCCTTTCANNA (SEQ ID NO: 12)

5'-ジゴキシゲニン-TAGAAGGAAGATGTGCCTTTCANNA (SEQ ID NO: 13)

式中、N = エテノ dA

後方プライマー (エテノ修飾)：

5'-GATCCTAGGCCTCACGTATTGACATTTACAGCAAATGCTTGCNNA-3' (SEQ ID NO: 9)

5'-ACCATGCTCGAGATTACGAGGACATTTACAGCAAATGCTTGCNNA-3' (SEQ ID NO: 11)

40

式中、N = etheno dA

非エテノプライマーは、N N A - 3' 末端が欠損している以外はエテノプライマーと同じである。

1つの野生型およびヘテロ (R553D/(F508の混合)) はそれぞれ5条件 (つまり、非エテノ化/ワックスなし、エテノ/ワックスなし、およびエテノ/MAbホットスタート、非エテノ/ワックスあり、およびエテノ/ワックスありにおいて3回アッセイした。加えて、水ブランクおよびヘテロ (G551 D/WT) のポジティブコントロールを各反応セットに包含させた。

【 0 1 5 8 】

試薬の調製：

50

10×緩衝液D: 100mM Tris-HCl, pH 8.3, RTにて, 500mM KCl, 40mM MgCl₂, 2mg/ml BSA

1×dNTP混合物: ddH₂O 2.5mM 各々ATP, CTP, GTP, & TTP

1×プライマーセット: ddH₂O中 6.25μM 前方プライマー混合物 / 6.25μM 後方プライマー混合物

標的DNA: 1×-TE緩衝液中 10ng/μl

1×-TE緩衝液 = 10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM Na₂EDTA

【0159】

反応プロトコル

下記の表は、2ストリップの反応チューブ（8チューブ/ストリップ）に対するコントロール混合物（NM = ホットスタートなし）およびMAb混合物（MM = MAb添加）溶液を調製するための試薬の体積を示している。Pfu DNAポリメラーゼは最後に添加した。水、緩衝液、ヌクレオチド、およびMAb*を含むまたは含まないプライマーとを混合し、室温にて10分間インキュベートした。このインキュベーションの間に、ワックスジェム混合物（WM = ワックスジェム、ホットスタート）の下層（BL）および上層（TL、Pfuポリメラーゼなし）を調製した。インキュベーション完了後、それぞれの適当なストリップチューブを配置する直前に、各混合物に（即ち、NM, MMおよびWMのTL）にPfuポリメラーゼを添加した。

10

*MAbとプライマーの容積比1:1（即ち、8.4ピコモル MAb / 20μlチューブ, ~0.42μM MAb）は抗体の結合部位とエテノアデニンダイマーを有するプライマー末端の比率を1:2にした。即ち、等量のMAbはエテノアデニンを有するプライマー全量の50%の力価に相当する。

20

【0160】

層	試 薬	容 量	コ メ ン ト
<u>非ホットスタートミックス：</u>			
(NM)	d d H ₂ O	112.6 μ l	
(2セット)	10×緩衝液D	16.8 μ l	
	1× Σ d NTP's	13.44 μ l	
	Σ プライマー	6.72 μ l	エキソン11-セットD (f2/r1)
			またはエキソン11-セットD-エテノ(f2e/r1e)
	Pfu DNA ポリメラーゼ	1.68 μ l	
		151.2 μ l	(チューブ当たり18 μ l) + 2 μ l DNA

10

または

<u>MABホットスタートミックス：</u>			
(MM)	d d H ₂ O	105.8 μ l	
(1セット)	10×緩衝液D	16.8 μ l	
	1× Σ d NTP's	13.44 μ l	
	Σ プライマー	6.72 μ l	エキソン11-セットD (f2e/r1e)
	抗エテノMAB	6.72 μ l	12.5 μ M MAb

上記を室温にて10分間インキュベーションし、下記のを添加した：

20

Pfu DNAポリメラーゼ	1.68 μ l
	151.2 μ l (チューブ当たり18 μ l) + 2 μ l DNA

または

<u>ワックスジェムホットスタートミックス (下層)：</u>			
(WM-BL)	d d H ₂ O	106.92 μ l	BioWhittaker (#16-001Y)
(2セット)	10×緩衝液D	16.2 μ l	
	1× Σ d NTP's	25.92 μ	Pharmacia (#27-2035-02)
	Σ プライマー	12.96 μ l	エキソン11-セットD(f2/r1)
			または エキソン11-セットDe (f2e/r1e)
		129.6 μ l	(チューブ当たり18 μ l BL)

30

ワックス相： Perkin-Elmer Ampliwax PCR Gems

<u>ワックスジェムホットスタートミックス (上層)：</u>			
(WM-BL)	d d H ₂ O	110.16 μ l	
(2セット)	10×緩衝液D	16.2 μ l	
	Pfu DNA ポリメラーゼ	3.24 μ l	
		180.0 μ l	(チューブ当たり14.4 μ l TL) + 3.6 μ l DNA

40

【 0 1 6 1 】

WM-BLのアリコート18 μ lを3ストリップのうちの1つの各チューブに添加した。ストリップを密封し、温度サイクラーに移した。ワックスビーズは85 2分のインキュベーションにより融解し、次いで室温まで冷却することによりワックスバリアを形成させた。WM-TL 14.4 μ lをWMストリップ中の各相当するチューブに添加した。試験DNA試料(詳しくは下記参照)、3.6 μ lをこのストリップチューブに添加し、穏やかに攪拌して混合した。

50

試験DNA試料、2 μ l (詳しくは下記参照)を各ストリップの1つのチューブに添加した。

NMまたはMMのアリコート18 μ lをこれらの2つのストリップの各チューブに添加し(気泡を防ぐ)、穏やかに攪拌して混合した。

【0162】

DNA試験試料:

チューブ#	DNA I.D. #	遺伝子型	コメント	期待された結果
1	C1/IMR91	WT/WT	WT	—
2	C1/IMR91	WT/WT	WT	—
3	C1/IMR91	WT/WT	WT	—
4	ブランク	H2O AL 100797	ネガティブコントロール	—
5	C4/07552	R553X/ Δ F508	実施例10及び11変異体	+
6	C4/07552	R553X/ Δ F508	実施例10及び11変異体	+
7	C4/07552	R553X/ Δ F508	実施例10及び11変異体	+
8	C3/08338	G551D/WT	実施例11変異体	+

10

20

【0163】

他の方法は、Biometra trio温度サイクラーで下記の順にて実施した:

95 4分; 94 30秒; 64 1分; 72 1分を40サイクル; 次いで95 2分にて増幅産物を変性させ、引き続いて65 30分にて再度アニーリングさせ、4重鎖構造の形成および分枝点移動させた。

各分枝点移動反応のアリコート2 μ lを、感光剤 - Sav ビーズ2.33 μ gおよび化学発光体 - 抗DIG抗体ビーズ1.16 μ gを含む緩衝液A 50 μ lと合わせて37 にて30分インキュベートした。次いで、シグナルは、シグナルリーダー(照射1秒、読み取り1秒を3サイクル)を用いて読み取った。

嚢胞性繊維症遺伝子エクソン11の結果を表6に示す。

30

【0164】

【表6】

表 6

チューブ#	DNA I. D. #	遺伝子型	シグナル 数値(RLU)	期待された 結 果	観察結果	
非エテノ／ワックスなし						
1	C1/IMR91	WT/WT	63026	—	FP	
2	C1/IMR91	WT/WT	34164	—	FP	
3	C1/IMR91	WT/WT	38302	—	FP	10
4	ブランク	H2O AL 100797	9214	—	—	
5	C4/07552	R553X/ΔF508	65254	+	+	
6	C4/07552	R553X/ΔF508	75200	+	+	
7	C4/07552	R553X/ΔF508	97054	+	+	
8	C3/08338	G551D/WT	72384	+	+	
エテノ／ワックスなし						
1	C1/IMR91	WT/WT	5850	—	—	20
2	C1/IMR91	WT/WT	6774	—	—	
3	C1/IMR91	WT/WT	6068	—	—	
4	ブランク	H2O AL 100797	8404	—	—	
5	C4/07552	R553X/ΔF508	108688	+	+	
6	C4/07552	R553X/ΔF508	88624	+	+	
7	C4/07552	R553X/ΔF508	95486	+	+	
8	C3/08338	G551D/WT	102846	+	+	30
エテノ／MAb						
1	C1/IMR91	WT/WT	4968	—	—	
2	C1/IMR91	WT/WT	5138	—	—	
3	C1/IMR91	WT/WT	5340	—	—	
4	ブランク	H2O AL 100797	7682	—	—	
5	C4/07552	R553X/ΔF508	338170	+	++	
6	C4/07552	R553X/ΔF508	317508	+	++	40
7	C4/07552	R553X/ΔF508	321056	+	++	
8	C3/08338	G551D/WT	289190	+	++	

【 0 1 6 5 】

【 表 7 】

表 6 (続き)

チューブ#	DNA I. D. #	遺伝子型	シグナル 数値(RLU)	期待された 結 果	観察結果
非エテノ／ワックス					
1	C1／IMR91	WT／WT	13588	—	—／HB
2	C1／IMR91	WT／WT	20320	—	—／HB
3	C1／IMR91	WT／WT	13012	—	—／HB
4	ブランク	H2O AL 100797	10014	—	—／HB
5	C4／07552	R553X／ Δ F508	170658	+	+
6	C4／07552	R553X／ Δ F508	167804	+	+
7	C4／07552	R553X／ Δ F508	192894	+	+
8	C3／08338	G551D／WT	172868	+	+

10

エテノ／ワックス

1	C1／IMR91	WT／WT	50947	—	—
2	C1／IMR91	WT／WT	7754	—	—
3	C1／IMR91	WT／WT	5078	—	—
4	ブランク	H2O AL 100797	6104	—	—
5	C4／07552	R553X／ Δ F508	340588	+	++
6	C4／07552	R553X／ Δ F508	350484	+	++
7	C4／07552	R553X／ Δ F508	400650	+	++
8	C3／08338	G551D／WT	356344	+	++

20

略号：

— ネガティブ + ポジティブ
 FP 偽ポジティブ FN 偽ネガティブ
 HB 高バックグラウンド

30

【 0 1 6 6 】

【 表 8 】

表 7

表6に示した各3点試料の結果の平均値：

反 応 I. D.	バックグラウンド シグナル (RLU)	ポ ジ テ ィ ブ シグナル(RLU)	シグナル／バック グラウンド比 (相対比)
非エテノ／ワックスなし	45164±15607	79169±16267	1.75± 0.70
エテノ／ワックスなし	6231± 483	97599±10198	15.66± 2.04
エテノ／MAb	5149± 186	325578±11048	63.24± 3.14
非エテノ／ワックスあり	15640± 4063	177119±13736	11.32± 3.07
エテノ／ワックスあり	5975± 1540	363907±32203	60.90±16.60

10

【 0 1 6 7 】

結論：

非ホットスタート法を用いた場合には、野性型とポジティブ試料の間に顕著な違いが表れなかった ($S/B = 1.8 \pm 0.7$)。エテノ修飾プライマーまたはワックスジェム単独のいずれかの使用は、陰性試料のバックグラウンドレベルの顕著な低下、および陽性試料のシグナルのわずかな増強の両方のために、中程度の識別の結果となった (それぞれ $S/B = 15.7 \pm 2.0$ または 11.3 ± 3.1)。エテノ修飾プライマーとワックスジェムまたはモノクローナル抗体のいずれかを組み合わせることは、陽性試料のシグナルに顕著な増強を提供し、その結果として相当の S/B 比が得られた (60.9 ± 16.6 または 63.2 ± 3.1)。エテノ修飾プライマーと MAb を使用した場合、高い S/B 比および最も低い CV (5.0% 、残りの4種の手法； $13 \sim 40\%$ と比較) が得られた。

20

【 0 1 6 8 】

要約すると、抗エテノアデニンモノクローナル抗体を用いた結果、低バックグラウンド、陽性試料の高いシグナルおよび高い S/B 比が得られ、誤りが少なくなったが、これはモノクローナル抗体の非存在下にてワックスジェムを含むエテノ修飾プライマーを用いて観察されたものと少なくとも同程度であった。さらに、エテノ修飾プライマーとモノクローナル抗体を使用することは、作業の簡略化、必要とされるより少ない反応容量および増幅産物の回収の容易さの点において、ワックスジェムの使用と比較してより簡便なホットスタート法であることが示された。

30

【 0 1 6 9 】

本明細書にて引用されている全ての刊行物および特許出願明細書は、それぞれ各刊行物または特許出願明細書が特定の、且つ別個に引用されることにより組み入れられることが示されているかのように、引用することにより本明細書に組み入れられる。本明細書の開示の一部は、著作権保護の対象となりうる題材を含むものである。

本著作権者は、米国特許庁の特許ファイルまたは記録において出される特許文献または特許の開示いずれかのファクシミリ複製には異議を唱えないが、すべての著作権は保留するものとする。

40

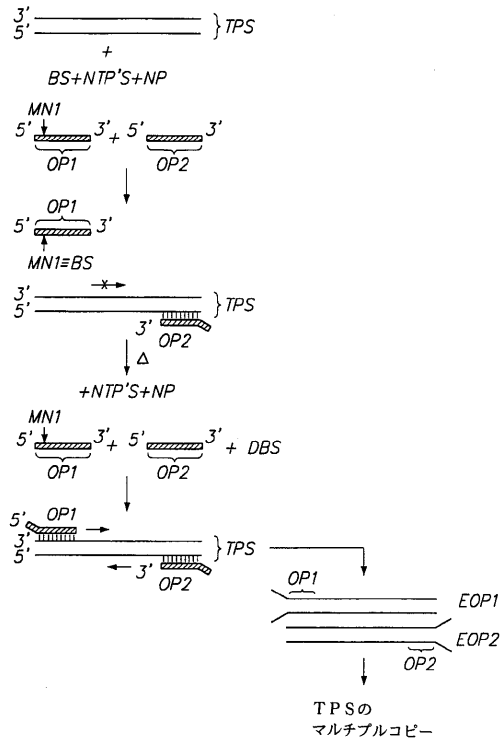
【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の実施態様を示す模式図である。

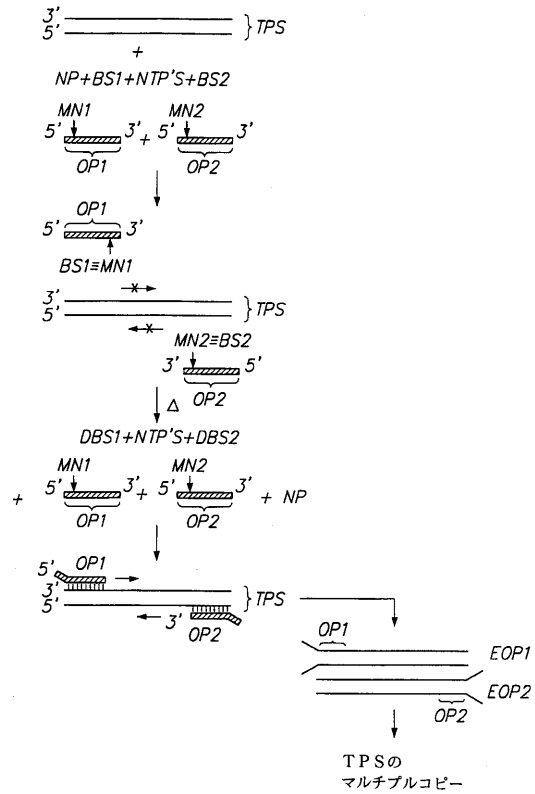
【図 2】 本発明のまた別の実施態様を示す模式図である。

【図 3】 本発明のまた別の実施態様を示す模式図である。

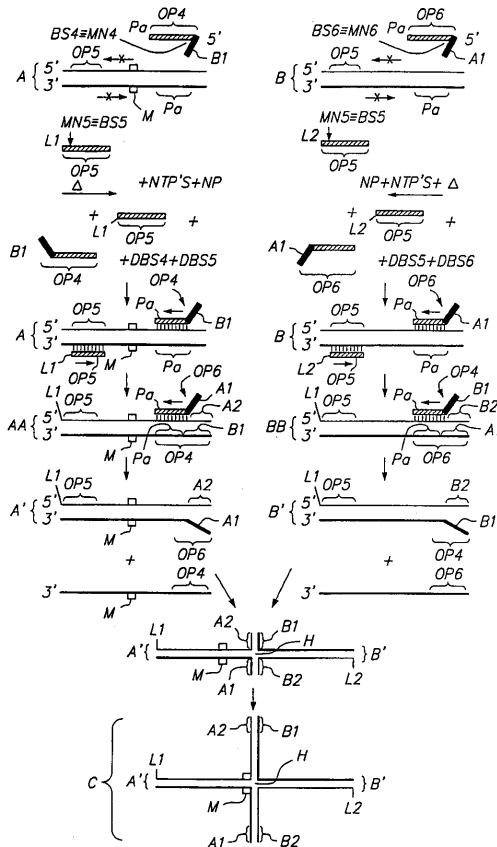
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

- (72)発明者 ヌーリス・クアン
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 3 0 6 . パロアルト . ラモーナストリート 2 8 7 6
- (72)発明者 イェン・ピン・リウ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 0 1 4 . クパーティーノ . サンセットスプリングコート 1 1
 5 2 5
- (72)発明者 アーラ・リシャンスキ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 2 6 . サンホゼ . メリディアンウェイ 8 4 0 . アパートメ
 ント 1 1 0
- (72)発明者 マーク・テイラー
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 0 . マウンテンビュー . イーストエルカミーノリール 8
 7 0 . ナンバー 1 1 7

審査官 高山 敏充

- (56)参考文献 特表平 1 0 - 5 0 5 2 3 0 (J P , A)
 特開平 0 2 - 2 6 8 6 8 3 (J P , A)
 特開平 0 6 - 2 0 9 7 7 5 (J P , A)
 国際公開第 9 8 / 0 2 8 4 4 3 (W O , A 1)
 国際公開第 9 7 / 0 2 3 6 4 6 (W O , A 1)
 米国特許第 0 5 3 4 8 8 5 3 (U S , A)
 国際公開第 9 7 / 0 2 8 2 7 9 (W O , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus(JDREAMII)

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)