

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6583796号
(P6583796)

(45) 発行日 令和1年10月2日 (2019. 10. 2)

(24) 登録日 令和1年9月13日 (2019. 9. 13)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/6848 (2018. 01)

C 1 2 Q 1/6848 Z

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/09 Z N A Z

請求項の数 18 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2016-552118 (P2016-552118)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月30日 (2015. 9. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2015/077745
 (87) 国際公開番号 W02016/052619
 (87) 国際公開日 平成28年4月7日 (2016. 4. 7)
 審査請求日 平成30年7月20日 (2018. 7. 20)
 (31) 優先権主張番号 特願2014-200258 (P2014-200258)
 (32) 優先日 平成26年9月30日 (2014. 9. 30)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 日本国 (JP)

(73) 特許権者 503359821
 国立研究開発法人理化学研究所
 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 林 哲太郎
 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発
 法人理化学研究所内
 (72) 発明者 笹川 洋平
 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発
 法人理化学研究所内
 (72) 発明者 二階堂 愛
 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発
 法人理化学研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸の増幅方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

鋳型 RNA、プライマー、DNA 鎖特異的 RNA : DNA ハイブリッド鎖分解酵素、RNAase H マイナス型逆転写酵素、及び RNAase H マイナス型逆転写酵素の基質を含む混合物をインキュベートする工程を含み、DNA 鎖特異的 RNA : DNA ハイブリッド鎖分解酵素が、RNA と DNA とのハイブリッド鎖の DNA 鎖を切断する活性を有する酵素であり、DNA 鎖特異的 RNA : DNA ハイブリッド鎖分解酵素が非特異的 DNA 分解酵素である場合は、前記混合物がさらに一本鎖 DNA 結合タンパク質を含む、核酸の増幅方法。

【請求項 2】

RNAase H マイナス型逆転写酵素の RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性により鋳型 RNA の相補鎖 DNA (cDNA) を合成し、DNA 鎖特異的 RNA : DNA ハイブリッド鎖分解酵素により RNA と cDNA とのハイブリッド鎖のうちの cDNA 鎖を無作為に切断し、前記の切断部位が起点となり、RNAase H マイナス型逆転写酵素の鎖置換活性により 3' 側の cDNA 鎖が RNA から剥がされ、RNAase H マイナス型逆転写酵素により剥がされた部分に新たな cDNA 鎖が合成される工程を含む、請求項 1 に記載の核酸の増幅方法。

【請求項 3】

前記混合物が DNA 鎖特異的 RNA : DNA ハイブリッド鎖分解酵素として二本鎖特異的 DNA 分解酵素を含み、二本鎖特異的 DNA 分解酵素が、RNA と DNA とのハイブリッ

10

20

ド鎖のDNA鎖を切断する活性を有し、RNAとDNAとのハイブリッド鎖のRNA鎖、一本鎖DNA及び一本鎖RNAを切断する活性を実質的に有さない酵素である、請求項1又は2に記載の核酸の増幅方法。

【請求項4】

前記混合物がDNA鎖特異的RNA：DNAハイブリッド鎖分解酵素として非特異的DNA分解酵素を含み、非特異的DNA分解酵素が、RNAとDNAとのハイブリッド鎖のDNA鎖を切断する活性を有し、RNAとDNAとのハイブリッド鎖のRNA鎖、及び一本鎖RNAを切断する活性を実質的に有さない酵素である、請求項1又は2に記載の核酸の増幅方法。

【請求項5】

DNA鎖特異的RNA：DNAハイブリッド鎖分解酵素が、60未満でもDNA分解活性を有する酵素である、請求項1から4の何れか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項6】

二本鎖特異的DNA分解酵素が、甲殻類由来の二本鎖特異的DNA分解酵素である、請求項3に記載の核酸の増幅方法。

【請求項7】

二本鎖特異的DNA分解酵素が、エビ由来の二本鎖特異的DNA分解酵素である、請求項6に記載の核酸の増幅方法。

【請求項8】

非特異的DNA分解酵素が、ほ乳類由来の非特異的DNA分解酵素である、請求項4に記載の核酸の増幅方法。

【請求項9】

非特異的DNA分解酵素が、ウシ由来の非特異的DNA分解酵素である、請求項8に記載の核酸の増幅方法。

【請求項10】

プライマーが、ランダムプライマー、オリゴdTプライマー又は配列特異的プライマーの1種以上である、請求項1から9の何れか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項11】

プライマーが、カチオンユニットの修飾によってTm値が上昇しているプライマーである、請求項1から10の何れか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項12】

プライマーが、Zip Nucleic Acid (ZNA) プライマーである、請求項1から11の何れか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項13】

混合物がさらに、一本鎖DNA結合タンパク質を含む、請求項1から12の何れか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項14】

鋳型RNAが、1細胞から数百細胞相当の微量RNAである、請求項1から13の何れか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項15】

DNAシーケンスライブラリ作製に供するcDNAの増幅のために行う、請求項1から14の何れか1項に記載の核酸の増幅方法。

【請求項16】

DNA鎖特異的RNA：DNAハイブリッド鎖分解酵素、RNase Hマイナス型逆転写酵素、及びRNase Hマイナス型逆転写酵素の基質を少なくとも含み、DNA鎖特異的RNA：DNAハイブリッド鎖分解酵素が非特異的DNA分解酵素である場合は、さらに一本鎖DNA結合タンパク質を含む、請求項1から15の何れか1項に記載の核酸の増幅方法を行うためのキット。

【請求項17】

さらに一本鎖DNA結合タンパク質を含む、請求項16に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

さらにプライマーを含む、請求項 16 または 17 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、DNA鎖特異的RNA：DNAハイブリッド鎖分解酵素と鎖置換活性を用いた核酸の増幅方法に関する。より詳細には、本発明は、RNAを鋳型として、DNA鎖特異的RNA：DNAハイブリッド鎖分解酵素、およびRNase Hマイナス型逆転写酵素を用いて核酸を増幅する方法に関する。さらに本発明は、上記の核酸の増幅方法を行うためのキットに関する。

10

【背景技術】

【0002】

これまでに多数の核酸増幅方法が報告されている。例えば、Polymerase Chain Reaction (PCR)(非特許文献1)、Strand Displacement Amplification (SDA)(非特許文献2)、Multiple Displacement Amplification (MDA)(非特許文献3)、Rolling-Circle Amplification (RCA)(非特許文献4)、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)(非特許文献5)、Smart Amplification Process (Smart Amp)(非特許文献6)、Helicase-Dependent Amplification (HDA)(非特許文献7)、Ligase Chain Reaction (LCR)(非特許文献8)などが挙げられる。これらは、DNAを鋳型とした増幅法であり、PCR、HDA、LCRを除けば、全てがDNAポリメラーゼの鎖置換活性を利用したものである。鎖置換反応を利用した増幅系の中核となるのがSDAである(非特許文献2)。SDAは、二本鎖DNAを制限酵素等で片側鎖に切断点(ニック)を入れる。このニックを起点としてDNAポリメラーゼの鎖置換活性で3'側のDNA鎖を剥がし、新たな相補鎖DNAを合成する。SDAは、この反応を連続的に起こすことで、相補鎖DNAを増幅させる技術である。また、ランダムヘキサマープライマーを利用したMDAは、鋳型DNA上に無作為かつ複数箇所にプライマーがアニーリングすることで、無作為な鎖置換反応を起こすことができ、非常に増幅率の高い方法となっている(非特許文献3)。しかし、DNAを鋳型とするこれらの増幅法を用いてRNA配列を増幅させるには、RNAをDNAに変換する逆転写反応を経る必要がある。また、SDAは、制限酵素を使って鋳型DNAにニックを挿入する必要があるため、制限酵素認識配列やデオキシイノシンなどを鋳型に付加する必要がある。また、LAMP、Smart Ampは、1ターゲットに対して4~5個の配列特異的なプライマーが必要となる。このため特殊なオリゴプライマーの合成や配列特異的なプライマーの設計などが必要となる。さらに、PCRをはじめとするDNAを鋳型とする増幅法では、以前に行ったPCR増幅産物や逆転写産物などのサンプルへのキャリーオーバーによって生じる偽陽性や、試薬中に混入しているDNA、作業環境から混入するDNAなどに由来する非特異的産物が問題となっている(非特許文献9及び10)。特にMDAにおいては、プライマーがDNAに対して無作為にアニーリングするため、混入DNA由来の非特異的産物が増えることが懸念される。RNAを鋳型とする増幅技術として、制限酵素認識配列を持つ特殊なDNAヘアピンプライマーを利用する方法が提案されている。本方式では、鋳型となるRNAに結合させたDNAヘアピンプライマーに切断点を生じさせ、鎖置換反応を起こすことで相補鎖DNAを増幅させる。しかしながら、この方式は、鋳型RNAの3'末端にDNAヘアピンプライマーをライゲーションさせる前処理が必要となり、ライゲーションの条件によって補足できない分子が生じる可能性がある。また鋳型RNAの3'末端から増幅するため、全長にわたって均等に増幅することが方式上難しいと考えられる。

20

30

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. Mullis K他、Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263-

50

73.

【非特許文献 2】Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme /DNA polymerase system. Walker GT, 他、Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jan 1;89(1):392-6.

【非特許文献 3】Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. Dean FB, 他、Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr 16;99(8):5261-6.

【非特許文献 4】Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. Lizardi PM, 他、Nat Genet. 1998 Jul;19(3):225-32.

【非特許文献 5】Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Notomi T, 他、Nucleic Acids Res. 2000 Jun 15;28(12):E63.

【非特許文献 6】Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. Mitani Y, 他、Nat Methods. 2007 Mar;4(3):257-62. Epub 2007 Feb 18.

【非特許文献 7】Helicase-dependent isothermal DNA amplification. Myriam Vincent, 他、EMBO Rep. 2004 August; 5(8): 795-800.

【非特許文献 8】Genetic disease detection and DNA amplification using cloned the rmostable ligase. Barany F. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jan 1;88(1):189-93.

【非特許文献 9】An Efficient Multistrategy DNA Decontamination Procedure of PCR Reagents for Hypersensitive PCR Applications. Champlot S, 他、PLoS One. 2010 Sep 28;5(9).

【非特許文献 10】Novel Sensitive Real-Time PCR for Quantification of Bacterial 16S rRNA Genes in Plasma of HIV-Infected Patients as a Marker for Microbial Translocation. Kramski M, 他、J Clin Microbiol. 2011 Oct;49(10)

【非特許文献 11】A Novel Method for SNP Detection Using a New Duplex-Specific Nuclease From Crab Hepatopancreas. Shagin DA, 他、Genome Res. 2002 Dec;12(12):1935-42

【非特許文献 12】The Enzyme and the cDNA Sequence of a Thermolabile and Double-Strand Specific DNase from Northern Shrimps (*Pandalus borealis*). Nilsen IW, 他、PLoS One. 2010 Apr 22;5(4):e10295.

【非特許文献 13】Experimental Murine Endometriosis Induces DNA Methylation and Altered Gene Expression in Eutopic Endometrium1. Lee B, 他、Biol Reprod. 2009 Jan;80(1):79-85.

【非特許文献 14】Versatile synthesis of oligodeoxyribonucleotide-oligospermine conjugates. Voirin E, Behr JP, 他、Nat Protoc. 2007;2(6):1360-7.

【非特許文献 15】Oligonucleotide-oligospermine conjugates (zip nucleic acids): a convenient means of finely tuning hybridization temperatures. Noir R, 他、J Am Chem Soc. 2008 Oct 8;130(40):13500-5.

【非特許文献 16】Zip Nucleic Acids: new high affinity oligonucleotides as potent primers for PCR and reverse transcription. Moreau V, 他、Nucleic Acids Res. 2009 Oct;37(19)

【非特許文献 17】DNA "melting" proteins. IV. Fluorescence measurements of binding parameters for bacteriophage T4 gene 32-protein to mono-, oligo-, and polynucleotides. Kelly RC, 他、J Biol Chem. 1976 Nov 25;251(22):7240-50.

【非特許文献 18】Reverse Transcriptase (RT) Inhibition of PCR at Low Concentrations of Template and Its Implications for Quantitative RT-PCR. Chandler DP, 他、Appl Environ Microbiol. 1998 Feb;64(2):669-77.

【非特許文献 19】Increased Yield of PCR Products by Addition of T4 Gene 32 Protein to the SMART-PCR cDNA Synthesis System. Villalva C, 他、Biotechniques. 2001 Jul;31(1):81-3, 86.

10

20

30

40

50

【非特許文献 2 0】An Optimized Protocol for First Strand cDNA Synthesis from Laser Capture Microdissected Tissue. Boylan S, 他、Lab Invest. 2001 Aug;81(8):1167-9.

【非特許文献 2 1】Extra-embryonic endoderm cells derived from ES cells induced by GATA factors acquire the character of XEN cells. Shimosato D, 他、BMC Dev Biol. 2007 Jul 3;7:80.

【非特許文献 2 2】Characterization of SYBR Gold nucleic acid gel stain: a dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators. Tuma RS, 他、Anal Biochem. 1999 Mar 15;268(2):278-88.

【非特許文献 2 3】CRYSTALLINE DESOXYRIBONUCLEASE II. DIGESTION OF THYMUS NUCLEIC ACID (DESOXYRIBONUCLEIC ACID) THE KINETICS OF THE REACTION. Kunitz M, J Gen Physiol. 1950 Mar;33(4):363-77.

【非特許文献 2 4】The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. The initial reaction products produced from covalently closed circular DNA. Campbell VW, 他、J Biol Chem. 1980 Apr 25;255(8):3726-35.

【非特許文献 2 5】Crystal structure of a replication fork single-stranded DNA binding protein (T4 gp32) complexed to DNA. Shamoo Y, 他、Nature. 1995 Jul 27;376(6538):362-6.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

遺伝子発現解析を行うためにはRNAから相補的DNA(cDNA)への変換が必要である。DNAを鋳型とする増幅技術はあるが、特殊な配列を付加するなどの前処理を施さない無処置なRNAを直接鋳型とした増幅技術はない。本発明は、DNAを鋳型とする既存の増幅方法ではなく、RNAを鋳型とする核酸の増幅方法を提供することを解決すべき課題とする。本発明は、操作の簡素化だけでなく、試薬・作業環境からの混入DNAを起因とする非特異的増幅リスクの排除、微量RNAの検出感度の上昇と増幅バイアスの低減を実現することができるRNAを鋳型とする核酸の増幅方法を提供することを解決すべき課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、RNAを鋳型としてcDNAを増幅させる増幅逆転写法(RT-RamDA法またはRamDA法とも称する)を発明した。RT-RamDA法によれば、cDNAの収率を市販のキットよりも10~100倍に増やすことができ、微量RNAからの遺伝子発現解析において低発現遺伝子の捕捉や検出遺伝子数の拡充が可能となることが判明した。またRamDA法により増幅したcDNAはRNAシーケンス法など様々な遺伝子解析に適用させることが可能で、分子生物学の基礎技術として幅広い活用が期待される。また、DNAを鋳型とする既存の増幅系とは異なりRNAを鋳型とすることにより、操作の簡素化だけでなく、試薬・作業環境からの混入DNAを起因とする非特異的増幅リスクの排除、増幅バイアスの低減を実現することができる。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0006】

すなわち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) 鋳型RNA、プライマー、DNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素、RNase Hマイナス型逆転写酵素、及び基質を含む混合物をインキュベートする工程を含み、DNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素が、RNAとDNAとのハイブリッド鎖のDNA鎖を切断する活性を有する酵素である、核酸の増幅方法。

(2) RNase Hマイナス型逆転写酵素のRNA依存性DNAポリメラーゼ活性により鋳型RNAの相補鎖DNA(cDNA)を合成し、DNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素によりRNAとcDNAとのハイブリッド鎖のうちのcDNA鎖を

無作為に切断し、前記の切断部位が起点となり、RNase Hマイナス型逆転写酵素の鎖置換活性により3'側のcDNA鎖がRNAから剥がされ、RNase Hマイナス型逆転写酵素により剥がされた部分に新たなcDNA鎖が合成される工程を含む、(1)に記載の核酸の増幅方法。

(3) 前記混合物がDNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素として二本鎖特異的DNA分解酵素を含み、二本鎖特異的DNA分解酵素が、RNAとDNAとのハイブリッド鎖のDNA鎖を切断する活性を有し、RNAとDNAとのハイブリッド鎖のRNA鎖、一本鎖DNA及び一本鎖RNAを切断する活性を実質的に有さない酵素である、(1)又は(2)に記載の核酸の増幅方法。

(4) 前記混合物がDNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素として非特異的DNA分解酵素を含み、非特異的DNA分解酵素が、RNAとDNAとのハイブリッド鎖のDNA鎖を切断する活性を有し、RNAとDNAとのハイブリッド鎖のRNA鎖、及び一本鎖RNAを切断する活性を実質的に有さない酵素である、(1)又は(2)に記載の核酸の増幅方法。

(5) DNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素が、60未満でもDNA分解活性を有する酵素である、(1)から(4)の何れかに記載の核酸の増幅方法。

(6) 二本鎖特異的DNA分解酵素が、甲殻類由来の二本鎖特異的DNA分解酵素又はその改変体である、(3)に記載の核酸の増幅方法。

(7) 二本鎖特異的DNA分解酵素が、エビ由来の二本鎖特異的DNA分解酵素又はその改変体である、(6)に記載の核酸の増幅方法。

(8) 非特異的DNA分解酵素が、ほ乳類由来の非特異的DNA分解酵素又はその改変体である、(4)に記載の核酸の増幅方法。

(9) 非特異的DNA分解酵素が、ウシ由来の非特異的DNA分解酵素又はその改変体である、(8)に記載の核酸の増幅方法。

(10) プライマーが、ランダムプライマー、オリゴdTプライマー又は配列特異的プライマーの1種以上である、(1)から(9)の何れかに記載の核酸の増幅方法。

(11) プライマーが、カチオンユニットの修飾によってTm値が上昇しているプライマーである、(1)から(10)の何れかに記載の核酸の増幅方法。

(12) プライマーが、Zip Nucleic Acid (ZNA) プライマーである、(1)から(11)の何れかに記載の核酸の増幅方法。

(13) 混合物がさらに、一本鎖DNA結合タンパク質を含む、(1)から(12)の何れかに記載の核酸の増幅方法。

(14) 鋳型RNAが、1細胞から数百細胞相当の微量RNAである、(1)から(13)の何れかに記載の核酸の増幅方法。

(15) DNAシーケンスライブラリ作製に供するcDNAの増幅のために行う、(1)から(14)の何れかに記載の核酸の増幅方法。

(16) DNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素、およびRNase Hマイナス型逆転写酵素を少なくとも含む、(1)から(15)の何れかに記載の核酸の増幅方法を行うためのキット。

(17) さらに一本鎖DNA結合タンパク質を含む、(16)に記載のキット。

【発明の効果】

【0007】

本発明の核酸の増幅方法によれば、RNAを鋳型として核酸を増幅できることから、操作の簡素化だけでなく、試薬・作業環境からの混入DNAを起因とする非特異的増幅リスクを排除でき、増幅バイアスの低減を実現することができる。さらに本発明の核酸の増幅方法によれば、既存の逆転写cDNA合成キットと比べて10倍以上の収量を得ることができ、条件によっては100倍以上の増幅も可能である。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、RT-RamDA(RamDA)法の模式図を示す。

【図2】図2は、二本鎖特異的DNA分解酵素(d s D N a s e)と非特異的DNA分解酵素(D N a s e I)は、二本鎖DNAだけでなくRNA:DNAハイブリッド鎖中のDNAも切断することを示す。蛍光オリゴヌクレオチドを用いたFRET解析により、d s D N a s e、及びD N a s e Iの逆転写バッファー条件下でのヌクレアーゼ特性を検証した。d s D N a s e、D N a s e Iに加えて、熱不安定な性質をもつ H L - d s D N a s e、そして、D N a s eを含まないバッファーコントロール(b u f f e r)の4条件で、経時的なヌクレアーゼ活性を測定した。A、Cは、二本鎖DNA中のDNA、Bは、RNA:DNAハイブリッド鎖中のDNA、Dは、ハイブリッド鎖中のRNAでの活性を示す。E、Fはそれぞれ、一本鎖のDNAと一本鎖RNAでの結果を示す。測定は、37で70秒毎に1回の検出を50回行った。エラーバーは、標準偏差を示す(N = 3)。

10

【図3】図3は、d s D N a s eの活性により、cDNAの断片化と増幅が起きることを示す。Aでは、5 ngの人工合成RNA、Th r RNA(2,052b)を鋳型に用いて、標準の逆転写法(R a m D A(-))と、標準の逆転写法にd s D N a s e、Z N A - ランダムヘキサマープライマー、T4ジーン32プロテインを添加したR a m D A(+)とのcDNAパターンをアガロースゲル電気泳動で調べた。s s D N A l a d d e rは、d s D N A l a d d e rを熱変性させたものである。矢印は、それぞれ2 kbを示す。図中の「-」は、R a m D A(-)、 「+」は、R a m D A(+)を示す。Bでは、1細胞相当のt o t a l RNA量であるマウスES細胞由来の10 pg t o t a l RNAに添加した100 fgの人工合成RNA、D a p RNA(96,725コピー)及びTh r RNA(89,991コピー)のcDNA量をqPCRで検出した。qPCRには、逆転写産物の1/50量を用いた。横軸は、3'末端からの距離を示す。検出用のqPCRプライマーは、D a p、Th r、それぞれ、5'から3'にかけての12領域で設計した。d T:オリゴdTプライマー、N6:ランダムヘキサマープライマー、N6Z:Z N A - ランダムヘキサマープライマー。エラーバーは、標準偏差を示す(N = 3)。

20

【図4】図4は、RT-R a m D A法は熱不安定性のd s D N a s eとR N a s e H マイナス型逆転写酵素で作用することを示す。Aでは、マウスES細胞由来の10 pg t o t a l RNAを鋳型としたcDNAの検出量をqPCRを用いた相対定量値として示す。値は、R a m D A(-)条件の各遺伝子における検出cDNA量(コピー数)を基準とした相対値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す(N = 4)。Bでは、20 ngのM i l l e n n i u m RNA Markers(0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、9 kb)を鋳型にし、各種逆転写酵素キットを用いて合成したcDNAのアガロースゲル電気泳動パターンを示す。a-jは、Cのグラフ中のa-jと一致している。RNA:DNAハイブリッド鎖を形成しているバンドは、一本鎖cDNAよりも明るく染色されている(非特許文献21)。伸長反応は、42 2.5分で行った。Cでは、マウスES細胞由来の10 pg t o t a l RNAを鋳型としたcDNAの検出量をqPCRを用いた相対定量値として示す。図中の「-」は、R a m D A(-)、 「+」は、R a m D A(+)を示し、各酵素のR a m D A(-)の値を1とした。a-c、h、iのR a m D A(+)で2倍以上の増幅が見られる。エラーバーは、標準偏差を示す(N = 4)。

30

40

【図5】図5は、特定の遺伝子においてR a m D A-B、-Cは、非常に高い増幅率を示すことを示す。Aでは、マウスES細胞由来の10 pg t o t a l RNAを鋳型としたcDNAのqPCRによる検出量(上段)とR a m D A(-)を1とした時の相対値(下段)を示す。エラーバーは標準偏差を示す(N = 4)。Bでは、熱サイクル化の効果を示す。マウスES細胞由来の10 pg t o t a l RNAを鋳型としたcDNAのqPCRによる検出量(上段)と等温条件でのR a m D A(-)を1とした時の相対値(下段)を示す。エラーバーは標準偏差を示す(N = 3)。図中の「R a m D A(-) i s o」、「R a m D A(+) i s o」は、等温条件(R a m D A-Aと同条件)、「R a m D A(-) c y c l e」、「R a m D A(+) c y c l e」は、熱サイクル条件を示す。

【図6】図6は、T r i s - H C l及びK C l濃度依存的にD N a s e Iのヌクレアー

50

ゼ活性が落ちることを示す。蛍光オリゴヌクレオチドを用いたFRET解析により、DNase Iのヌクレアーゼ活性を測定した。蛍光オリゴヌクレオチドは、FAMラベルプローブの1色を用いて、37℃の条件下で1分ごとに蛍光量を測定した。ヌクレアーゼ活性は、反応初期(5-10分)の蛍光増加率から算出した。DNase I buffer(50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 2 mM MgCl₂)中での二本鎖DNAに対する活性を1とした相対値。

N = 3の平均値を元に算出。#は、DNase I buffer。##は、一般的な逆転写bufferと同じTris-HCl, KCl濃度。dsDNA: 二本鎖DNA, DNA in RNA:DNA hybrid: RNAとDNAハイブリッド鎖中のDNA、ssDNA: 一本鎖DNA、ssRNA: 一本鎖RNA。

【図7】図7は、DNase Iを用いたRT-RamDA法(RamDA-D)が、特定の反応液組成に限定されないことを示す。マウスES細胞由来の10pg total RNAを鋳型として、DNase Iを用いたRT-RamDA法のcDNAの収量をqPCRを用いて定量した。#は、DNase I bufferと同じ反応液組成。##は、一般的な逆転写反応液と同じTris-HCl, KCl濃度。###は、: FirstStrand buffer等、一般的な逆転写反応液と同じ組成。FS: First-Strand Buffer. PS: PrimeScript Buffer (for Real Time)。PrimeScript Buffer (for Real Time)を用いたRamDA(-)をコントロール(*)とし、コントロールでの各遺伝子のcDNA検出量を1とした時の相対値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す(N = 4)。DNase Iの一本鎖DNAに対する活性の高いDNase I bufferと同じ組成(#)であっても増幅は起こる。一本鎖DNAに対する活性の低い条件(##)よりもむしろ増幅率は高い。

【図8】図8は、T4ジーン32プロテインが、DNase IによるcDNAの断片化を抑制していることを示す。Aでは、5 ngのThr RNA(2,052 bp)を鋳型に用いて、非添加の標準逆転写サンプル、T4ジーン32プロテイン単独添加、DNase I、または、dsDNase単独添加、DNase I、または、dsDNaseとT4ジーン32プロテインを同時添加した条件でcDNA分布パターンを比較した。逆転写反応は、通常の2倍量にあたる6 µlの反応容量で、オリゴdTプライマーのみを用いて行った。cDNAの分布パターンは2%アガロースゲル電気泳動で調べた。Bは、A中のcDNAの1/20量をBioAnalyzer RNA 6000ピコキット(Agilent Biotechnology)を用いて解析した結果を示す。図中の数値は、cDNA濃度の相対値を示す。T4GP32: T4ジーン32プロテイン。

【図9】図9は、T4ジーン32プロテインが、cDNAの増幅とその安定性に寄与していることを示す。Universal Human Reference RNA (UHRR) 10 pgに添加した100 fgの人工合成RNA、Dap RNA(96,725コピー)、Thr RNA(89,991コピー)のcDNA量を示す。逆転写反応は、オリゴdTプライマーのみで行い、cDNA収量の定量はqPCRを用いて行った。DNase I、dsDNaseは、それぞれ、0.2 U, 0.4 Uを、T4ジーン32プロテインは、100 ngを1反応に用いた。qPCRは、逆転写産物の1/50量を用いて行った。検出用のqPCRプライマーは、Dap、Thr、それぞれ、5'から3'にかけての12領域で設計した。Aは、各領域でのcDNAの検出量(コピー数)を示す。横軸は、3'末端からの距離を示す。(): コントロール(非添加の標準逆転写サンプル)、エラーバーは、標準偏差(N = 3)を示す。Bは、非添加コントロールサンプル(*)の各領域での検出量を1とした時の相対値を示す。Cは、同一RNA上での検出量の相対値(増幅率)の変動を示す。T4GP32: T4ジーン32プロテイン。

【図10】図10は、蛍光オリゴヌクレオチドを用いたFRET解析により、逆転写反応液中のT4ジーン32プロテインのヌクレアーゼ活性への作用を示す。蛍光オリゴヌクレオチドは、FAMまたは、HEXラベルプローブの二色を使用し、37℃の条件下で1.5分ごとに蛍光量を測定した。ヌクレアーゼ活性は、反応初期(1.5-9分)の蛍光増加率から算出した(N = 3の平均値)。逆転写バッファーには、PrimeScript bufferを用いた。Aは、DNase I buffer中でのDNase Iの二本鎖DNAに対する活性を1とした時の相対値を示す。Bは、各反応条件における、RNA: DNAハイブリッド鎖中のDNA分解活性または、二本鎖DNA分解活性に対する、一本鎖DNAの分解活性比を示す

10

20

30

40

50

。dsDNA：二本鎖DNA，DNA in hybrid：RNAとDNAハイブリッド鎖中のDNA、ssDNA：一本鎖DNA、ssRNA：一本鎖RNA。

【図11】図11は、マウスES細胞の1細胞溶解液を用いたRamDA-Dの反応時間依存的なcDNA収量の増大を示す。RamDA-Dの反応温度条件のうち37における反応時間を30分、60分、120分と延長し増幅率への影響を調べた。RamDA-D(-)の反応時間30分をコントロール(*)とし、qPCRによる各遺伝子のcDNA検出量を1とした時の相対値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す(N=4)

【図12】図12は、RamDA-Dは、逆転写酵素を限定せず、100細胞相当量の鋳型RNAでも増幅することを示す。PrimeScriptのRamDA(-)条件をコントロール(*)とし、qPCRによる各遺伝子のcDNA検出量を1とした時の相対値を示す。鋳型RNAには、マウスES細胞由来のtotal RNA(10pg、200pg、1ng)を用いた。PS: PrimeScript RT Enzyme, SSII: SuperScript II RT Enzyme, SSIII: SuperScript III RT Enzyme, SSIV: SuperScript IV RT Enzyme。エラーバーは、標準偏差を示す(N=4)。

【発明を実施するための形態】

【0009】

以下、本発明についてさらに具体的に説明する。

本発明による核酸の増幅方法は、鋳型RNA、プライマー、DNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素、RNase Hマイナス型逆転写酵素、及び基質を含む混合物をインキュベートすることによって行う方法であり、Reverse Transcription with Random Displacement Amplification(RT-RamDA)法とも称する。本発明の核酸の増幅方法は、鎖置換反応を利用したRNAを直接鋳型とする増幅逆転写法であり、インビトロで行うことができる。本発明の方法は、エンドヌクレアーゼである二本鎖特異的DNA分解酵素(double-strand specific DNase: dsDNase)、又は非特異的DNA分解酵素(DNase I)などのDNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素のヌクレアーゼ活性を利用してRNA:cDNAハイブリッド鎖のcDNA側を切断し、無作為に鎖置換反応を起こすことによって、逆転写反応中にcDNAを増幅させる技術である。

【0010】

本明細書において、増幅とは、核酸の配列のコピー(複製物)の数を増加させることを言う。また、増幅の形態としては、線形増幅、リアルタイム増幅、定量的増幅、半定量的増幅、競合増幅などを挙げることができるが、特に限定されない。

【0011】

本発明で使用する混合物は、鋳型RNA、プライマー、DNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素、RNase Hマイナス型逆転写酵素、及び基質を含む混合物であるが、好ましくは水溶液であり、好ましくは塩を含む水性緩衝液である。

【0012】

本発明のRT-RamDA法の一態様の概要を以下に記載する(図1)。

1. RNase Hマイナス型逆転写酵素のRNA依存性DNAポリメラーゼ活性により鋳型RNAの相補鎖DNA(cDNA)を合成する。

2. 二本鎖特異的DNA分解酵素(dsDNase)又は非特異的DNA分解酵素(DNase I)などのDNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素のヌクレアーゼ活性によりRNAとcDNAとのハイブリッド鎖のうちのcDNA鎖に無作為に切断点(ニック)が入られる。

3. ニック部位が起点となり、RNase Hマイナス型逆転写酵素の鎖置換活性により3'側のcDNA鎖が剥がされる。剥がされた部分には逆転写酵素により新たなcDNAが合成される。剥がされたcDNAは一本鎖DNA結合タンパク質であるT4ジーン32プロテイン(T4GP32)によって、ヌクレアーゼ活性から保護される。これが連続的に起きることで、cDNAの収量を10倍以上に増やすことが可能となる。

【0013】

本発明の核酸の増幅方法では、RNAとDNAとのハイブリッド鎖がDNA鎖特異的R

RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素の標的となるため、また、鎖置換増幅反応の鋳型がRNAであることから、使用できる逆転写酵素は、RNase H活性のないものに限定される。RNase H活性とは、RNA:DNAハイブリッド鎖中のRNA鎖のみを無作為に切断するリボヌクレアーゼ活性である。RNase Hは非特異的なエンドヌクレアーゼであり、加水分解によってRNA切断を触媒する。

また、本発明で使用するRNase Hマイナス型逆転写酵素は、鎖置換活性を有する。RNase Hマイナス型逆転写酵素の鎖置換活性により3'側のcDNA鎖がRNAから剥がされ、剥がされた部分に新たなcDNA鎖が合成される。

【0014】

逆転写とは、逆転写酵素(RNA依存性DNAポリメラーゼ)が、鋳型RNAの相補鎖DNA(cDNA)の形成を触媒するプロセスである。逆転写酵素としては、多数の酵素が同定されており、例えば、HIV逆転写酵素、AMV逆転写酵素、M-MLV逆転写酵素、Ctherm.ポリメラーゼ、及びTthポリメラーゼなどがあるが、本発明においては、RNase Hマイナス型逆転写酵素を使用する。

【0015】

本発明では、DNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素を使用する。本明細書において用いる「DNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素」なる用語は、RNAとDNAとのハイブリッド鎖(RNA:DNAハイブリッド鎖)中のDNA鎖を切断する活性を有する酵素を指す。DNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素としては、二本鎖特異的DNA分解酵素又は非特異的DNA分解酵素を使用することができる。二本鎖特異的DNA分解酵素としては、カニ由来の二本鎖特異的DNA分解酵素(二本鎖特異的ヌクレアーゼ;DSN)が知られている。この酵素は二本鎖DNAだけでなく、RNA:DNAハイブリッド鎖中のDNA鎖のみを無作為に切断する。本発明においては、この活性を利用することで、逆転写中に形成されるRNA:cDNAハイブリッド鎖のcDNA側を切断し、RNAを鋳型に鎖置換増幅を起こす方法を考案した。しかしながら、カニ由来DSNの活性化温度は、60以上と非常に高温で一般的な逆転写反応には不向きである(非特許文献11)。そこで、低温でも活性のあるエビ由来の熱不安定性dsDNaseを用いることで、逆転写反応とDNaseによる切断の両立を可能とした(非特許文献12)。一方で、DNase Iのような非特異的DNA分解酵素を用いる際は、一本鎖DNA、すなわち鎖置換反応によって剥がされた増幅cDNAや逆転写プライマーが分解されてしまう恐れがある。しかしながら、用いるバッファの組成などの反応条件によってはたとえ酵素が一本鎖DNAを分解する活性を保持していてもそれが問題とならない可能性がある。使用する酵素や反応条件が適切であるかどうかを本明細書の開示に従って核酸増幅反応を実施することによって確認することができる。また、一本鎖DNA結合タンパク質を添加することで、一本鎖DNAの分解活性を抑制させ、逆転写酵素の鎖置換反応によるcDNA合成と増幅を進行させることができる。一本鎖DNA結合タンパク質としては、一本鎖DNAに結合して本発明の方法による核酸増幅の効率を上昇させる任意のタンパク質を使用することができ、例えば、任意の起源由来のT4ジーン32プロテイン、RecA、SSB(Single-Stranded DNA Binding Protein)又はその改変体を使用することができる。これにより、むしろdsDNaseを用いた方法よりも増幅率を上げることが可能である。また、dsDNaseやDNase Iを用いる利点として、反応液中の混入DNA、例えば、細胞溶解サンプルにおいては、ゲノムDNAなどの除去も平行して行うことができる。これまでRT-qPCRにおいて、DNase IやdsDNaseによる混入DNAの除去法が報告されているが、その多くはヌクレアーゼの不活性化が必須となっており、RT-RamDA法の様に逆転写反応のみの1ステップで行うことはできなかった(非特許文献13)。

【0016】

RT-RamDA法と同様に鎖置換反応を用いたDNAの増幅法は、これまでに多くの報告が為されている(例えば、非特許文献2~6)。しかしながら、SDAに代表されるこれらの増幅法の多くは、鋳型DNAにニックを挿入するために制限酵素を用いたり、複

10

20

30

40

50

数の配列特異的プライマーを併用する必要がある。このため、鋳型DNAに、制限酵素認識配列やデオキシノシンの付加、配列特異的プライマーの設計・合成が必須となる。また、ターゲットとなる遺伝子も限定される。さらに既存の増幅法のほとんどが、DNAを鋳型としているため、RNA配列を増幅させるには、RNAをDNAに変換する逆転写反応を経る必要がある。また、以前に行ったPCR増幅産物や逆転写産物などのサンプルへのキャリーオーバーによって生じる偽陽性や、試薬中に混入したDNAや作業環境から混入するDNAなどに由来する非特異的産物が問題となっている（非特許文献9及び10）。特にMDAにおいては、プライマーがDNAに対して無作為にアニーリングするため、混入DNA由来の非特異的産物が増えるリスクが高い。一方、本発明のRT-RamDA法は、配列非依存的な鎖置換反応を用いており、配列特異的なプライマーや特殊なプライマーの設計・合成は不要となるだけでなく、全遺伝子をターゲットとすることができる。さらにRNAを直接鋳型とすることで、逆転写から増幅までがわずか1ステップで終了する上、DNAは鋳型となりにくいため混入DNAによる非特異的産物の増幅も低減することができる。

【0017】

本発明で使用する二本鎖特異的DNA分解酵素としては、好ましくは、RNAとDNAとのハイブリッド鎖のDNA鎖を切断する活性を有し、RNAとDNAとのハイブリッド鎖のRNA鎖、一本鎖DNA及び一本鎖RNAを切断する活性を実質的に有さない酵素を挙げることができる。二本鎖特異的DNA分解酵素は、好ましくは、60未満でもDNA分解活性を有する酵素である。

【0018】

二本鎖特異的DNA分解酵素は、原核生物又は真核生物に由来する酵素を使用することができるが、好ましくは、甲殻類由来の二本鎖特異的DNA分解酵素又はその改変体を使用することができる。

【0019】

二本鎖特異的DNA分解酵素（二本鎖特異的ヌクレアーゼ；DSNとも言う）としては、これまでに以下のものが知られている（特開2014-103867号公報）

(1) *Solenocera melantho* (ナミクダヒゲエビ) DNase

(2) *Penaeus japonicus* (クルマエビ) DNase

(3) *Paralithodes camtschaticus* (タラバガニ) DSN

(4) *Pandalus borealis* (ホッコクアカエビ) dsDNase

(5) *Chionoecetes opilio* (ズワイガニ) DSN

(6) その他のDSNホモログ

上記の中でも、タラバガニDSNとズワイガニDSNは至適活性温度が60前後で耐熱性があるのに対して、ホッコクアカエビdsDNaseは至適温度が37の易熱性酵素である。

本発明においては、エビ由来の二本鎖特異的DNA分解酵素又はその改変体であることがさらに好ましい。

【0020】

本明細書において、改変体とは、天然由来の二本鎖特異的DNA分解酵素のアミノ酸配列を改変することによって得られる酵素を意味する。具体的には、天然由来の二本鎖特異的DNA分解酵素のアミノ酸配列と80%以上（好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上）の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、二本鎖特異的DNA分解活性を有する酵素、並びに天然由来の二本鎖特異的DNA分解酵素のアミノ酸配列において1又は数個（例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個）のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加を有するアミノ酸配列からなり、二本鎖特異的DNA分解活性を有する酵素である。

【0021】

二本鎖特異的DNA分解酵素としては、市販品を使用することができる。市販品としては、dsDNase (ArcticZymes)、HI-dsDNase (ArcticZymes)、dsDNase (Thermo scientific

c)、Shrimp DNase, Recombinant (affymetrix)、Atlantis dsDNase (Zymo Research)、Thermolabile Nuclease (Roche)などを挙げることができる。

【0022】

本発明で使用する非特異的DNA分解酵素としては、RNAとDNAとのハイブリッド鎖のDNA鎖を切断する活性を有し、RNAとDNAとのハイブリッド鎖のRNA鎖、一本鎖RNAを切断する活性を実質的に有さず、好ましくは、一本鎖DNAを切断する活性がRNAとDNAとのハイブリッド鎖のDNA鎖を切断する活性に比較して低くなる酵素を挙げることができる。非特異的DNA分解酵素は、好ましくは、60未満でもDNA分解活性を有する酵素である。

【0023】

非特異的DNA分解酵素は、原核生物又は真核生物に由来する酵素を使用することができるが、好ましくは、ほ乳類由来の非特異的DNA分解酵素又はその改変体を使用することができる。

【0024】

本発明においては、ウシ由来の非特異的DNA分解酵素又はその改変体であることがさらに好ましい。

【0025】

本明細書において、改変体とは、天然由来の非特異的DNA分解酵素のアミノ酸配列を改変することによって得られる酵素を意味する。具体的には、天然由来の非特異的DNA分解酵素のアミノ酸配列と80%以上（好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上）の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、非特異的DNA分解活性を有する酵素、並びに天然由来の非特異的DNA分解酵素のアミノ酸配列において1又は数個（例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個）のアミノ酸の欠失、置換及び/又は付加を有するアミノ酸配列からなり、非特異的DNA分解活性を有する酵素である。

【0026】

本発明で用いるプライマーは、デオキシヌクレオチドおよび/またはリボヌクレオチドにより構成されており、与えられた条件下で標的核酸との塩基対結合を行うことができる程度の鎖長を有するものである。プライマーの鎖長は特に限定されないが、好ましくは5～50塩基、より好ましくは5～30塩基である。プライマーとしては、好ましくはランダムプライマー、オリゴdTプライマー又は配列特異的プライマーの1種以上を使用することができる。ランダムプライマーを使用する場合、その長さは5～10塩基程度が好ましく、6～8塩基程度がより好ましい。オリゴdTプライマーを使用する場合、その長さは10～50塩基が好ましく、15～30塩基がより好ましい。配列特異的プライマーを使用する場合、その長さは5～30塩基が好ましく、7～20塩基がより好ましい。

【0027】

プライマーは、オリゴヌクレオチドの合成に用いることのできる任意の方法、例えば、リン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスホネート法等により合成できる。本発明によるプライマーは、例えば、ABI社(Applied Biosystem Inc.)のDNAシンセサイザー394型を用いてホスホアミダイト法により合成することができる。

【0028】

好ましくは、カチオンユニットの修飾によってTm値が上昇しているプライマーを使用することができる。例えば、Zip Nucleic Acid (ZNA) プライマーを使用することができる。ZNAは、カチオンユニットによってオリゴヌクレオチドのTm値を上昇させる作用を持っている（非特許文献14～16）。ZNAプライマーなどのカチオンユニットの修飾によってTm値が上昇しているプライマーを使用することによって、増幅効率を上げることができる。特に、ZNAで修飾したランダムヘキサマープライマーを使用することによって、逆転写中の反応温度であってもプライマーが鋳型RNAにアニールでき、より効率的な鎖置換増幅が可能となる。

10

20

30

40

50

【0029】

本明細書で言う基質とは、RNAse Hマイナス型逆転写酵素の基質であり、4種のデオキシリボヌクレオチド(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)の混合物を使用することができる。但し、基質としては、dATP, dCTP, dGTP, dTTPの混合物に限定されるわけではなく、ジデオキシヌクレオチド三リン酸を添加してもよく、また修飾されたデオキシリボヌクレオチドを使用してもよい。

【0030】

本発明においては、反応のための混合物にT4ジーン32プロテインなどの一本鎖DNA結合タンパク質を含めてもよい。T4ジーン32プロテインは、増幅の均一性を上げるための補助因子として使用することができる。一本鎖DNA結合タンパク質であるT4ジーン32プロテインは、一本鎖DNAのみならず、RNAに対しても作用することが知られている(非特許文献17~20)。T4ジーン32プロテインを用いることで、鋳型RNAの高次構造を緩め、鋳型全長に対してより均一な鎖置換反応を行うことができる。また、非特異的DNA分解酵素を用いる反応の際には、増幅cDNAの分解を防ぐことができる。

【0031】

本発明による核酸の増幅反応は、等温条件で行ってもよいし、熱サイクル条件で行ってもよい。

【0032】

等温条件で行う場合には、例えば、25 ~ 50 の間の所定の温度、好ましくは30 ~ 45 の間の所定の温度、より好ましくは35 ~ 40 の間の所定の温度、例えば37 において一定時間(例えば5分~3時間以内、好ましくは10分~150分)行うことができる。例えば37 において反応を行う場合には、反応液を、例えば、25 で所定の時間(例えば、5分~15分間)、次いで30 で所定の時間(例えば、5分~15分間)インキュベートしてから、37 にして反応を行うことができる。また、37 でインキュベートした後に、50 で所定の時間(例えば、5分~15分間)、次いで85 で所定の時間(例えば、5分~15分間)インキュベートしてもよい。

【0033】

熱サイクル条件で行う場合には、例えば、20 以上30 未満の所定の温度T1(例えば、25)と、30 以上45 以下の所定の温度T2(例えば、37)とを組み合わせ、T1で所定の時間(例えば1分~3分、一例として2分)とT2で所定の時間(例えば1分~3分、一例として2分)とを一サイクルとして、これを好ましくは10サイクル~40サイクル、より好ましくは15サイクル~35サイクル繰り返すことにより反応を行うことができる。なお、上記した熱サイクルに先立って、例えば、25 で所定の時間(例えば、5分~15分間)、次いで30 で所定の時間(例えば、5分~15分間)、次いで37 で所定の時間(例えば、1分~5分間)インキュベートしてもよい。また、上記した熱サイクルの後に、50 で所定の時間(例えば、5分~15分間)、次いで85 で所定の時間(例えば、5分~15分間)インキュベートしてもよい。

【0034】

本発明による核酸の増幅方法は、微量のRNA(例えば、1細胞から数百細胞相当の微量RNA)を用いたRT-qPCR法の一部として使用することができる。

本発明による核酸の増幅方法は、微量のRNA(例えば、1細胞から数百細胞相当の微量RNA)を用いたRNAシーケンス法に利用することができる。

本発明による核酸の増幅方法を利用することによって、大量細胞中の1細胞を検出することが可能である。具体的には、大量細胞中の標的細胞でのみ発現する遺伝子の特異的に増幅することで、大量のRNA中に含まれるわずかな標的細胞遺伝子の検出が可能となり、標的細胞の含有の有無を判定できる。

【0035】

本発明はさらに、上記した本発明による核酸の増幅方法を行うためのキットに関する。本発明のキットは、少なくとも、二本鎖特異的DNA分解酵素又は非特異的DNA分解酵

10

20

30

40

50

素などのDNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素、およびRNase H マイナス型逆転写酵素を含む。好ましくは、本発明のキットはさらに一本鎖DNA結合タンパク質(例えば、T4ジーン32プロテイン)を含む。本発明のキットは、さらに所望により、核酸増幅反応を実施するのに必要な他の試薬、緩衝液など含むものでもよい。他の試薬としては、プライマー、及びデオキシリボヌクレオチド三リン酸などを挙げることができる。

本発明を以下の実施例により説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0036】

RT-RamDA法とは、鋳型RNA、プライマー、二本鎖特異的DNA分解酵素又は非特異的DNA分解酵素などのDNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素、RNase H マイナス型逆転写酵素、及び基質を含む混合物をインキュベートする工程を含む、核酸の増幅方法である。RT-RamDA法においては、RNase H マイナス型逆転写酵素のRNA依存性DNAポリメラーゼ活性により鋳型RNAの相補鎖DNA(cDNA)を合成し、DNA鎖特異的RNA:DNAハイブリッド鎖分解酵素によりRNAとcDNAとのハイブリッド鎖のうちのcDNA鎖を無作為に切断し、前記の切断部位が起点となり、RNase H マイナス型逆転写酵素の鎖置換活性により3'側のcDNA鎖がRNAから剥がされ、RNase H マイナス型逆転写酵素により剥がされた部分に新たなcDNA鎖が合成される。

RamDA-Aは、二本鎖特異的DNA分解酵素とT4ジーン32プロテインを用いてRT-RamDA法を行う態様である。

RamDA-Bは、T4ジーン32プロテインなしで二本鎖特異的DNA分解酵素を用いたRT-RamDA法を行う態様である。

RamDA-Cは、RT-RamDA熱サイクル法であり、RamDA-Bと同様の反応溶液組成で、反応温度条件を改変し、アニール行程と伸長反応行程を小刻みに繰り返して反応を行った態様である。

RamDA-Dは、非特異的DNA分解酵素とT4ジーン32プロテインを用いてRT-RamDA法を行う態様である。

【0037】

(材料および方法)

細胞培養

Total RNAの抽出用に、5G6GRマウスES細胞を用いた。この細胞株は、直鎖化したGata6-GR-IRES-PuroベクターをEB5 ES細胞にランダムに組み込んで作成したものである(非特許文献20)。細胞は、Feeder-freeなゼラチン被覆ディッシュ上で、10%ウシ胎児血清入りGlasgow minimal essential medium (GMEM; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)、1000 U/ml leukemia inhibitory factor (ESGRO; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)、100 µmol/l 2-メルカプトエタノール(Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)、1×non-essential amino acids (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA)、1 mmol/l ビルビン酸ナトリウム(Life Technologies)、2 mmol/l L-グルタミン(Nacalai Tesque)、0.5×ペニシリン/ストレプトマイシン(Life Technologies)、及び10 µg/ml プラスチジン(Life Technologies)の条件で培養を行った。

【0038】

RNA抽出

Total RNAは、RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)を用いて精製した。RNAの定量と品質チェックは、Quantus Fluorometer (Promega Corp., Madison, WI, USA)とRNA 6000 Nano Kit (Agilent Biotechnology, Santa Clara, CA, USA)を用いて行った。人工合成RNAは、pGIBS-DAP、pGIBS-THRプラスミド(American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA)からMEGAscript T

10

20

30

40

50

3 kit (Life Technologies)を用いて合成した。

【 0 0 3 9 】

マウス E S 細胞 1 細胞溶解液の調整

培養細胞は、TrypLE Express (Life Technologies)を用いて 3 7 で 3 分間反応させ、1 細胞へ解離した。解離後は、直ちにPBS (-)へ置換し反応を止めた。セルソーターを使用して細胞だけを的確に分取するため、解離細胞の生細胞核を、Vybrant Dye Cycle (Life Technologies)を用いて染色標識した。染色条件は、試薬添付の方法を踏襲した。S H 8 0 0 セルソーター (Sony Corp., Tokyo, Japan)を用いてVybrant Dye Cycle (検出フィルター: BP450/50) 陽性、死細胞蛍光マーカー色素のPI (検出フィルター: BP585/40) 陰性を生細胞分画とし、この分画から 5 0 細胞を 1 μ l のLysis buffer (1 U RNasein plus (Promega)、 0 . 3 % NP40 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA), RNase free water (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan))に分取した。分取後は、直ちにスピンドウンと振とう攪拌を行い、 - 8 0 で保存した。逆転写反応に使用する際は、融解後に 4 9 μ l のLysis bufferを加え 5 0 倍希釈した細胞溶解液 1 μ l を1細胞溶解液として用いた。

10

【 0 0 4 0 】

F R E T アッセイ

F R E T 解析は、Inge W. Nilsen et al (非特許文献 1 2)の方法を改変して行った。0 . 6 μ l の oligonucleotide probe mix (6 p m o l オリゴDNA 又はRNA (Sigma-Aldrich)、 1 $\times$ First-Strand buffer (Life Technologies)、 RNase free water (TaKaRa))を調整し、 7 0 5 分で変性した後、ゆっくりと室温に戻した。解析に用いたオリゴヌクレオチドの組み合わせは、以下の通りである (配列番号1から 1 0)。

20

【 0 0 4 1 】

二本鎖 DNA 用デュアルプローブ:

FAM-CGCCATCGGAGGTTC-BHQ1

HEX-GAACCTCCGATGGCG-BHQ1

【 0 0 4 2 】

R N A : D N A ハイブリッド用デュアルプローブ:

FAM-CGCCATCGGAGGTTC-BHQ1

HEX-rGrArArCrCrUrCrCrGrArUrGrGrCrG-BHQ1

30

【 0 0 4 3 】

一本鎖 DNA 用シングルプローブ:

HEX-GAACCTCCGATGGCG-BHQ1

【 0 0 4 4 】

一本鎖 R N A 用シングルプローブ:

HEX-rGrArArCrCrUrCrCrGrArUrGrGrCrG-BHQ1

【 0 0 4 5 】

補正用シングル F A M プローブ:

FAM-CGCCATCGGAGGTTC-BHQ1

GAACCTCCGATGGCG

40

【 0 0 4 6 】

補正用シングル H E X プローブ:

CGCCATCGGAGGTTC

HEX-GAACCTCCGATGGCG-BHQ1

【 0 0 4 7 】

次に 5 . 4 μ l の酵素溶液 (1 $\times$ First-Strand buffer、 0 . 1 2 U 各ヌクレアーゼ、RNase free water)を調整した。各ヌクレアーゼは、それぞれ、DNase I Amplification Grade (Life Technologies)、 dsDNase (ArcticZymes AS, Tromso, Norway)、 HL-dsDNase (ArcticZymes)を用いた。コントロールには、酵素の代わりにRNase free waterを加えた。室温に戻したoligonucleotide probe mix 0 . 6 μ l と酵素溶液 5 . 4 μ l をPloxiP

50

late-384F Plus(PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA)上で混合し、EnVision(PerkinElmer)で測定した。測定は、37 の条件下でFAM、HEXの蛍光強度を70秒に1回の割合で50回の測定を行った。FAMとHEXの蛍光の漏れ込みは、それぞれの補正用シングルプローブの蛍光量を用いて補正した。

【0048】

T4ジーン32プロテインのヌクレアーゼ活性への作用の検証実験(図10)においては、0.6 μlのoligonucleotide probe mix (6 pmolオリゴDNA又はRNA(Sigma-Aldrich)、1×PrimeScript Buffer (for Real Time) (TaKaRa)、RNase free water)と5.4 μlの酵素溶液(1×PrimeScript Buffer (for Real Time)又は、1×DNase I reaction Buffer (Life Technologies)、0.12 U各ヌクレアーゼ、RNase free water)を調整した。各ヌクレアーゼは、それぞれ、DNase I Amplification Grade、dsDNaseを用いた。T4ジーン32プロテイン添加サンプルには、180 ngのT4ジーン32プロテイン(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)を酵素溶液に加えた。コントロールには、酵素の代わりにRNase free waterを加えた。測定は、90秒に1回の割合で50回の測定を行った。酵素活性は、反応初期(1.5分~9分)の蛍光増幅率を用いて算出した。

10

【0049】

KCl、Tris-HCl濃度依存的なDNase Iのヌクレアーゼ活性の測定実験(図6)においては、0.6 μlのoligonucleotide probe mix (6 pmolオリゴDNA又はRNA(Sigma-Aldrich)、1×DNase I reaction Buffer (Life Technologies)、RNase free water)と5.4 μlの酵素溶液(自家調整反応液、0.12 U DNase I Amplification Grade、RNase free water)を調整した。自家調整反応液は、条件に応じて図6中の終濃度になるように調整した。測定は、60秒に1回の割合で50回の測定を行った。酵素活性は、反応初期(5分~10分)の蛍光増幅率を用いて算出した。解析に用いたオリゴヌクレオチドの組み合わせは、以下の通りである(配列番号11から16)

20

【0050】

二本鎖DNA用シングルプローブ:

FAM-CGCCATCGGAGGTTC-BHQ1

GAACCTCCGATGGCG-BHQ1

【0051】

RNA:DNAハイブリッド用シングルプローブ:

FAM-CGCCATCGGAGGTTC-BHQ1

rGrArCrCrUrCrCrGrArUrGrGrCrG-BHQ1

30

【0052】

一本鎖DNA用シングルプローブ:

FAM-CGCCATCGGAGGTTC-BHQ1

【0053】

一本鎖RNA用シングルプローブ:

FAM-rCrGrCrCrArTrCrGrGrArGrGrTrTrC-BHQ1

40

【0054】

逆転写反応

RT-RamDA法(RamDA-A):

鋳型RNAは、1 μl Lysis buffer (1 U RNasein plus (Promega)、10% Roche lysis buffer (Roche)、0.3% NP40 (Thermo Fisher)、RNase free water)に希釈し、65 で2分間の変性処理を行い、使用まで氷上で保管した。逆転写酵素反応液は、ReverTra Ace qPCR RT KIT (TOYOBO Co. Ltd., Osaka, Japan)を改変して用いた。1 μlの変性済み希釈鋳型RNAに2 μl RT mix (1.5×ReverTra Ace RT buffer(TOYOBO)、0.6 pmolオリゴ(dT)18プライマー(Thermo Fisher)、7.8 pmolランダムヘキサマープライマー(TaKaRa)、1.5×ReverTra Ace enzyme mix(TOYOBO)、RNase free water)、または、2 μl RamDA-A mix (1.5×ReverTra Ace

50

RT buffer、0.6 pmol オリゴ(dT)18プライマー、7.8 pmol ZNA-ランダムヘキサマープライマー([Z][Z]NNNNNN; Sigma-Aldrich)、0.4 U dsDNase (ArcticZymes)、100 ng T4ジーン32プロテイン、1.5 x ReverTra Ace enzyme mix、RNase free water)をそれぞれ加え、MixMate(Eppendorf, Westbury, NY, USA)で2,000 rpm、30秒の撹拌後、サーマルサイクラーC1000(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA))を用いて25 10分、30 10分、37 30分、50 5分、85 5分で反応を行った。

【0055】

T4ジーン32プロテインなしのRT-RamDA法(RamDA-B)：

鋳型RNAを1 µl lysis buffer (1 U RNasein plus、0.3% NP40、RNase free water)に希釈し、70 で90秒の変性処理を行った。氷上で冷却後、2 µl RT mix (1.5 x ReverTra Ace RT buffer、0.6 pmol オリゴ(dT)18プライマー、7.8 pmol ランダムヘキサマープライマー、1.5 x ReverTra Ace enzyme mix、RNase free water)、または、2 µl RamDA-B mix (1.5 x ReverTra Ace RT buffer、0.6 pmol オリゴ(dT)18プライマー、7.8 pmol ZNA-ランダムヘキサマープライマー([Z][Z]NNNNNN; Sigma-Aldrich)、0.1 U dsDNase)をそれぞれ加え、RamDA-Aと同様の操作を行った。

【0056】

RT-RamDA熱サイクル法(RamDA-C)：

RamDA-Bと同様の反応溶液組成で、温度条件を変えて逆転写反応を行った。反応条件は以下の通りである。25 10分、30 10分、37 2分の後、25 2分、37 2分を29サイクル行った。その後50 5分、85 5分で処理した。

【0057】

RT-RamDA非特異的DNA分解酵素(DNase I)法(RamDA-D)：

鋳型RNAは、1 µl Lysis buffer (1 U RNasein plus、10% Roche lysis buffer、0.3% NP40、RNase free water)に希釈し、70 で90秒間の変性処理を行い、使用まで氷上で保管した。逆転写酵素反応液は、PrimeScript RT reagent Kit(Perfect Real Time) (TaKaRa)を改変して用いた。1 µlの変性済み鋳型RNAに2 µl RT mix (1.5 x PrimeScript Buffer (for Real Time)、0.6 pmol オリゴ(dT)18プライマー、8 pmol ランダムヘキサマープライマー、1.5 x PrimeScript RT Enzyme Mix I、RNase free water)、または、2 µl RamDA-D mix (1.5 x PrimeScript Buffer (for Real Time)、0.6 pmol オリゴ(dT)18プライマー、8 pmol ランダムヘキサマープライマー、0.2 U DNase I, Amplification Grade、100 ng T4ジーン32プロテイン、1.5 x PrimeScript RT Enzyme Mix I、RNase free water)をそれぞれ加え、25 10分、30 10分、37 60分、50 5分、85 5分で反応を行った。

【0058】

RamDA-Dを用いた逆転写反応液の組成検討実験：

Tris-HCl, KCl, NaCl, MgCl₂の濃度を変更した自家調整逆転写反応液または、First-Strand Bufferを用いる際は、これらをRamDA-D mix中のPrimeScript Buffer (for Real Time)と置き換え、さらに dNTP Mix (Life Technologies) を終濃度で0.5 mM加えて反応を行った。各bufferの組成は、表1に記載する。

【0059】

【表 1】

表 1 自家調整反応液及び市販酵素添付の反応液組成

1 X Concentration (mM)

Buffer	Tris-HCl pH8.4	Tris-HCl pH8.3	KCl	NaCl	MgCl ₂
図 7-a	20.0		50.0	0.0	2.0
図 7-b	20.0		62.5	0.0	2.0
図 7-c	20.0		75.0	0.0	2.0
図 7-d	35.0		50.0	0.0	2.0
図 7-e	35.0		62.5	0.0	2.0
図 7-f	35.0		75.0	0.0	2.0
図 7-g	50.0		50.0	0.0	2.0
図 7-h	50.0		62.5	0.0	2.0
図 7-i	50.0		75.0	0.0	2.0
図 7-j		50.0	75.0	0.0	3.0
図 7-k		50.0	75.0	10.0	3.0
図 7-l		50.0	75.0	20.0	3.0
DNase I reaction Buffer (Life Technologies)	*20.0		*50.0		*2.0
First-Strand Buffer (Life Technologies)		*50.0	*75.0		*3.0
PrimeScript Buffer (for Real Time) (TaKaRa)		—	—	—	—

*: カタログ値、—: 未公開

【0060】

RamDA-Dを用いた人工合成RNA(DAP, THR)の系:

RamDA-D mix中の逆転写プライマーを、0.6 pmolのオリゴ(dT)18プライマーのみとし、条件に応じてRamDA-D mixの組成を変更した。また逆転写反応の温度条件は、RamDA-Aと同様とした。

【0061】

RamDA-Dにおける、逆転写酵素の検討:

SuperScript II、SuperScript III、SuperScript IV条件は、RamDA-D mix中の逆転写酵素をPrimeScript RT Enzyme Mix Iの代わりに、30 U SuperScript II(Life Technologies), 30 U SuperScript III(Life Technologies), 30 U SuperScript IV(Life Technologies)と6 UのRNasein plusを加えた。逆転写反応液はPrimeScript Buffer (for Rea

10

20

30

40

50

l Time)を共通で使用した。

【 0 0 6 2 】

d s D N a s e の比較：

R a m D A - A の反応液条件で、ヌクレアーゼを 0 . 2 U 4 3 k D a dsDNase(ArcticZymes)、0 . 2 U 4 7 k D a dsDNase(Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA)、0 . 2 U duplex specific nuclease (DSN; Evrogen JSC, Moscow, Russia)にそれぞれ置き換えて比較した。反応温度条件は、R a m D A - A に準じて行い、q P C Rでc D N Aの増幅率を定量した。

【 0 0 6 3 】

逆転写酵素の比較：

1 0 種類の q P C R用 R Tキット、Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher)、ReverTra Ace qPCR RT Kit(TOYOBO)、PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa)、AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit(Agilent Biotechnology)、Quantitect Rev. Transcription Kit(Qiagen)、GoScript Reverse Transcription System(Promega)、iScript Select cDNA Synthesis Kit(Bio-Rad)、ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit(New England Biolabs, MA, UK)、SuperScript III(Life Technologies)、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche)を用いて比較した。

【 0 0 6 4 】

伸長活性試験には、p o l y - A 付加された様々な長さの R N A (0 . 5 - 9 k b a s e) を含むMillennium RNA Markers(Life Technologies)を用いて逆転写反応を行った。逆転写混合物の調整は、各キットに供給されている試薬を使用し、試薬の配合はキット推奨の条件を用いて 1 0 μ l の反応系で行った。ただし、逆転写プライマーは、全てのキットでオリゴ (d T) 1 8 プライマーを用いた。1 . 5 μ l のRNA-primer mix (2 0 n g M illennium RNA Markers、2 5 p m o l オリゴ (d T) 1 8 プライマー、lysis buffer (R a m D A - A 条件))を 6 5 2 分で変性させ、8 . 5 μ l の逆転写 m i x と混合し、4 2 2 . 5 分、8 5 5 分の条件で反応を行った。反応後はアガロースゲル電気泳動で解析した。

【 0 0 6 5 】

R a m D A 法の適応試験には、マウス E S 細胞由来の 1 0 p g t o t a l R N A を用いて逆転写反応を行った。逆転写混合物の調整は、それぞれのキットに供給されている試薬を使用し、配合はキット推奨の条件を用いて 3 μ l の反応系にダウンスケールしたものを使用した。ただし、逆転写プライマーは、R a m D A (-) 条件では、0 . 6 p m o l オリゴ (d T) 1 8 プライマー、7 . 8 p m o l ランダムヘキサマープライマー、R a m D A (+) 条件では、0 . 6 p m o l オリゴ (d T) 1 8 プライマー、7 . 8 p m o l Z N A -ランダムヘキサマープライマーを用いた。また R a m D A (+) では、さらに 0 . 2 U dsDNase (ArcticZymes)、1 0 0 n g T 4 ジーン 3 2 プロテインを添加した。反応温度条件は、2 5 1 0 分、3 0 1 0 分、4 2 3 0 分、5 0 5 分、8 5 5 分で行い、q P C Rでc D N Aの増幅率を定量した。

【 0 0 6 6 】

試薬の調整、及び反応は全て、0 . 2 m l Hi-Tube Flat Cap Recovery (TaKaRa)、EU Semi-domed 8-cap strip (BIOplastics BV, Landgraaf, Netherlands)、または、RP,LF, SEMI Sk, cutable, 96 well plate (BIOplastics BV)上で行った。

【 0 0 6 7 】

定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (q P C R)

人工合成 R N A (D A P , T H R) の系では、逆転写反応液をnuclease free water (Qiagen)で希釈し、1 / 5 0 量を q P C R 反応液に用いた。マウス E S 細胞由来の 1 0 p g t o t a l R N A の系は、nuclease free waterで希釈し、1 / 6 量、1 / 8 量、または 1 / 1 0 量を q P C R 反応液に用いた。q P C R はLightCyclar 480 (Roche)、または、ABI 7900HT (Life Technologies)を用いて、以下の条件で行った。q P C R 反応液 1 0 μ l (1 x Quantitect SybrGreen master mix (Qiagen)、5 p m o l フォワードプ

10

20

30

40

50

ライマー、 5 pmol リバースプライマー、 $3\text{ }\mu\text{l}$ 希釈 cDNA、nuclease free water) を $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 分 で酵素を活性化したのち、 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 秒 の変性、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 分 の伸長反応を 40 サイクル行った。融解曲線分析は、 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 秒 、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 秒 、 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 秒 で行った。絶対定量用の検量線作成には、standard DNA として、人工合成 RNA 用に DAP 及び THR の dsDNA 混合溶液の 5 倍希釈シリーズ (31250 、 6250 、 1250 、 250 、 50 、 10 、 0 コピー)、total RNA 用に mouse genomic DNA (clonetechn) の 5 倍希釈シリーズ (31250 、 6250 、 1250 、 250 、 50 、 10 、 0 コピー) をそれぞれ用いた。cDNA は ssDNA であるため、定量値の算出には検出値 (dsDNA コピー) $\times 2$ で算出した。各プライマー配列は、表 2 に記載する。データ解析は、LightCycler 480 Software, Version 1.5(Roche)、または SDS Software 2.1(Life Technologies) を用いて行った。

10

【0068】

【表 2】

表 2：プライマー配列（配列番号 17 から 80）

アクセシ ョン番号	プライマ ー名	フォワードプライマー配列 (5' → 3')	リバースプライマー配列 (5' → 3')	3' 末端から の位置 (nt)	
NM_008143	Gnb211	TGACCAGAGATGAGACCAACTATGG	AAGTGGGAGTGACCTCTCAGAGC	1016	
NM_028016	Nanog	TGATTCTTCTACCAGTCCCAACAA	TGAGAGAACACAGTCCGCATCTT	1807	
NM_013633	Oct3/4	CCCGGAAGAGAAAGCGAACT	CGGGCACTTCAGAAACATGG	620	
NM_011443	Sox2	TCTTGCTGGGTTTTGATTCTGC	CAAATCCGAATAAACTCCTTCCTTG	543	10
NM_009556	Rex1	CTCAAGCCGGGTGCAAGA	GCCCCGTGGACAAGCATGT	893	
NM_018796	Eef1b2	CCTTCGCCATGGGATTCTG	CGCCAGGTAATCGTTGAGCA	1619	
NM_007505	Atp5a1	GTACCCTCCTCCACCGGG	GCCATTGCTGAGGTACACAG	289	
NM_011655	Tubb5	CAGTCTGAGACCGGCCAG	TGTGCACGATTTCCCTCATG	2505	
	Dap_1856	AAATTAGTCATTGCGGGACCG	TCGTTCTGCCAATTTAAGCTTC	1856	
	Dap_1795	GAACACCACATTTTGACCTTGTAGG	GAAAGCATCTGACTCAACAGGCA	1797	
	Dap_1653	GATTGATTTAACAACGCCGAA	TCCGTGCTCTAATGCAATTTTGTG	1653	20
	Dap_1334	GAAAAGCAGCAAGGACATCCG	TGCTCCGCTCCTCTTGCTC	1334	
	Dap_1209	GTCAGGCGTTAACTGTCAGTCG	TTTATCCCCCGTCTAATCAATG	1209	
	Dap_962	TTTCAATCCGGCCCTTAGG	AGTGCATTGGCAGCGATCAG	962	
	Dap_785	ACTGCGGAAATCTTGTGCG	CGAAGAAGGTCACGGAATTCG	785	
	Dap_686	TTTTGGCGCCACAGTGAT	GACAACTTCGCTATTGTGCCG	686	
	Dap_539	AGCTGAAGCAGCCCGCATA	GCGGTCTGGAAGCGTTAGC	539	
	Dap_367	AATGCGGCTGCACTGGTG	CGTCTTTATATTTATGGATTCCGGC	367	
	Dap_152	TTCCGTTTCTACTCCTCTGACGAA	GGCATACTCCACGCCCG	152	30
	Dap_86	TAAAGAAGCGGGCGTGGAGTA	TTTGATCCTCAGCATCCGTT	86	
	Thr_2022	CTCGAGATGTGGAAGGACTTATCC	CATGTAAAGTTAGCGCCGTGT	2022	
	Thr_1831	AATGGTTATGGCTGTGGCAAAG	CAGCAGCGGAAGGTTACCTG	1831	
	Thr_1606	AATTGTCCGTTCCATCTGTGAGA	GTAAGGGTTGACTGAGTTGACAAGG	1606	
	Thr_1411	GAAAAACGGCACAGGCCTTC	CGATTGCCGCCGCAC	1411	
	Thr_1065	CTGAAAGATCCGAACACAGCG	TCAGTCGGCAATGTGACAGG	1065	
	Thr_858	AGCTGACCGTCTTTGAAAGCG	TTCCGGCGACTGTTTCTGTTT	858	
	Thr_767	AGTGGCTAAACGGACCGCA	CACCTTCACATGGACAGGAGG	767	40
	Thr_613	ATGCTGGCGTTCTCTCGT	TGGGTCTCGTCATCCTCATG	613	
	Thr_544	CTCGTCGGCGGACTTGTG	GGACGCGGATCATTTGGG	544	
	Thr_439	GTGCTGACAAGAGACGCGAGA	TTTACGGCATCGGCATATGG	439	
	Thr_295	ATGTTCCATCAGCCGTACCG	GGCGACGTGCTCTACTTTTGA	295	
	Thr_200	CGGAGCAGGCCCAACG	GGGAAATGAAGCGCGAGC	200	

【 0 0 6 9 】

ゲル電気泳動

逆転写反応液をそれぞれRNase-free TE 緩衝液(Life Technologies)で 20 μl に希釈

50

し、70 10分間の変性処理後直ちに氷上で冷却した。DNAラダーマーカには、1 μ lのE-Gel 1 Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies)をRNase-free TE 緩衝液で20 μ lに希釈し、熱変性したものをssDNAラダー、熱変性していないものをdsDNAラダーとして用いた。ただし、Millennium RNA Markersを用いた系では、希釈後の熱変性処理を除いた。逆転写反応液とラダーマーカは、E-Gel EX Agarose Gels、2% (Life Technologies)に充填後、E-Gel iBase Power System (Life Technologies)で10分間泳動した。泳動像は、FAS-Digi (NIPPON Genetics Co.Ltd, Tokyo, Japan)で撮影した。

【0070】

(結果)

dsDNase、及びDNase Iは、RNA：DNAハイブリッド鎖中のDNAを選択的に切断する

最初にdsDNaseやDNase Iが、標準的な逆転写バッファー条件下でRNA：DNAハイブリッド鎖のDNAを選択的に切断する活性をもっているのか確かめた。

カニ由来の二本鎖特異的ヌクレアーゼは、RNA：DNAハイブリッド鎖のDNAを切断する活性があることが知られている(非特許文献11)。しかしながら、この酵素は逆転写中の温度では活性をほとんど持たない(非特許文献11)。そこで、熱不安定性で知られているエビ由来のdsDNaseに着目した(非特許文献12)。この酵素は、37

付近で活性を有しており、二本鎖DNAを特異的に切断するため、プライマーやcDNAを消化することなく混入したDNAやゲノムDNAなどを除去する作用がある(非特許文献12及び13)。しかしながら、鎖置換反応を行うために必須なRNA：DNAハイブリッド鎖のDNAを切断する活性についての報告はまだない。そこで、Fluorescence resonance energy transfer (FRET)を用いた解析を行った。すると、二本鎖DNAに対する活性の半分程度であるが、dsDNaseには、RNA：DNAハイブリッド鎖のDNA側を選択的に切断する活性があることがわかった(図2A~C)。また、RNA：DNAハイブリッド鎖中のRNA鎖、一本鎖DNA、一本鎖RNAに対しては、ほぼ活性を有していないことも確認した(図2D~F)。dsDNaseをさらに熱不安定性にしたHeat-labile double-strand specific DNase (HL-dsDNase)でも同様の結果を得たが、ヌクレアーゼ活性は、dsDNaseよりも低いことがわかった(図2A~C)。一方で、非特異的DNA分解酵素であるDNase Iを用いた場合、dsDNaseと同様にRNA：DNAハイブリッド鎖中のDNAを選択的に切断する活性を示したが、一本鎖DNAに対する活性も低いながら示した(図2B, E)。このため、まずは一本鎖DNAに対して分解活性を示さないdsDNaseを用いたRT-RamDA法の検証を行うことにした。

【0071】

cDNAの断片化と鎖置換反応により増幅する

dsDNaseが、実際に逆転写反応で合成されたcDNAに作用し断片化されているのか、また、それにより鎖置換反応が起こりcDNAが増幅されているのか、これらを確かめるために、poly-A付加された約2 kbの人工合成RNAを鋳型に用いて逆転写し、ゲル電気泳動によるcDNAの断片化の有無と、RT-qPCRを用いてcDNA量の収量を測定した。その結果、標準の逆転写法(RamDA(-))では、オリゴdTプライマー、ランダムヘキサマープライマーいずれも、断片化はほとんど起きていないことが分かった。一方で、RamDA(+)では、cDNAが断片化し、スメアーな電気泳動像が得られた(図3A)。これは、dsDNaseによるRNA：cDNAハイブリッド鎖中のcDNA側の切断作用によるものであることが示唆された。次に、鎖置換反応による増幅を定量的に検出するため、qPCRによるcDNAの絶対定量を行った。鋳型RNAには、人工合成RNAのDap(1, 910b)とThr(2, 052b)をそれぞれ100fg(Dap: 96, 725コピー、Thr: 89, 991コピー)ずつマウスES細胞由来の10pg total RNA(1細胞相当量)に混ぜて逆転写を行った。qPCRによる定量は、それぞれの人工合成RNAに対して、3'末端から5'末端

10

20

30

40

50

にかけて12カ所の領域でqPCRプライマーを設計し、各領域における検出量を測定した。その結果、Dap、Thrともに、RamDA(-)コントロール条件では、オリゴdTプライマー及び、ランダムヘキサマープライマー、どちらの条件においても全領域でほぼ一定の検出量を示した(図3B)。一方でRamDA(+)においては、ランダムヘキサマープライマーだけでなく、オリゴdTプライマーを用いた条件であっても、3'側から500nt以上の領域でcDNAの検出量がRamDA(-)コントロールと比べて、安定して10倍近く増加していることが分かった(図3B)。また、増加量は、3'末端付近で相対的に少ないことが分かった(図3B)。これらのことから、RamDA(+)におけるcDNA検出量の増加は、鎖置換反応による増幅であること、さらに、dsDNaseによって形成されたcDNA側のニックが鎖置換反応の起点となっていることが示唆された。

10

【0072】

RT-RamDA法に利用できるdsDNase酵素と逆転写酵素

RT-RamDA法に利用できるdsDNase酵素と逆転写酵素を調べるため、他のdsDNaseや種々の逆転写酵素を用いた条件でも増幅効果が得られるかどうかを確かめた。まず、dsDNaseについては、ArcticZymes社が販売するdsDNase(43kDa)とaffymetrix社のdsDNase(47kDa)、Evrogen社のduplex specific nuclease(DSN)の3つの酵素で比較を行った。1細胞相当のtotal RNA量であるマウスES細胞由来の10pg total RNAを用いて逆転写を行ったところ、両dsDNase添加サンプルでcDNAの検出量に大きな増加が見られた(図4A)。活性温度の違いによりDSNの増幅率は僅かであったが、二本鎖特異的DNaseであれば、特定の酵素に限定されないことがわかった。

20

【0073】

次に、市販の逆転写酵素を用いてRT-RamDA法による増幅効果の有無を検証した。最初に酵素の伸長活性を調べるため、poly-A付加されたMillennium RNA Markers(Life Technologies)をオリゴdTプライマーで逆転写を行い性能試験を行った。その結果、わずか2分30秒の伸長時間にも関わらず、ほとんどの酵素で2kb以上の伸長活性があることが分かった(図4B)。また、RNase H活性を持たない逆転写酵素は、明瞭なラダーパターン(図4B、a-c、h、i)を示し、RNase H活性を持つ逆転写酵素では、暗くスメアーなパターン(図4B、e-g、j)を示した。DNA染色色素として使用しているSYBR Gold(Life Technologies)は、一本鎖DNAの場合、蛍光強度が二本鎖DNAと比べておよそ半分となる(非特許文献22)。このことから、泳動パターンの違いは、RNA:DNAハイブリッド鎖の有無を示しているものと推測される。

30

【0074】

次に、それぞれの逆転写酵素について、RT-RamDAコンポーネント(dsDNase、T4ジーン32プロテイン、ZNA-ランダムヘキサマープライマー)の添加あり(+)、なし(-)の条件でマウスES細胞由来の10pg total RNAを用いて逆転写を行いcDNAの収量をqPCRで比較した。その結果、RNase H活性のない全ての逆転写酵素においてRamDA(+)で、検出量の増加がみられた(図4C、a-c、h、i)。一方で、RNase H活性のある逆転写酵素では、検出量の増加が見られないか、もしくは、低下していた(図4C、e-g、j)。また公称では、RNase H活性について言及されていないが、AffinityScriptも、RamDA(+)で、わずかな増幅を示した(図4B d)。しかしながら、電気泳動像では、スメアーなパターンを示していたことから、弱いながらもRNase H活性を有しているものと推測された(図4B d)。これらの結果から、RT-RamDA法の増幅作用は、特定のdsDNaseや特定の逆転写酵素に限定されるものではなく、37℃付近に活性を持つdsDNase酵素とRNase H活性のない逆転写酵素であれば、広く汎用的に使える技術であることがわかった。また、RNase H活性があると増幅効果が見られないことから、直接RNAを鋳型として鎖置換増幅が起きていることが示された。

40

【0075】

50

RT - RamDA法の反応効率を高める方法について

本発明者らは、増幅率の向上に着目した派生法、T4ジーン32プロテインなしのRT - RamDA法 (RamDA - B) とRT - RamDA熱サイクル法 (RamDA - C) を開発した。鎖置換反応において、鋳型の二次構造形成は、増幅の障害となる。本発明者らは、この二次構造を緩める役割としてRT - RamDA法 (RamDA - A) にT4ジーン32プロテインを導入した。しかしながら、同時にDNA:RNAハイブリッド鎖の不安定化をもたらし、dsDNaseの活性を抑制していることが推測された。そこで、T4ジーン32プロテインなしのRamDA - Bを試みることにした。マウスES細胞由来の10 pg total RNAを鋳型にcDNA合成を行ったところ、RamDA - Bの条件でGnb211、Oct3/4の検出量が標準逆転写法 (RamDA (-)) と比べて40倍以上になることが分かった (図5A)。一方で、Nanog、Sox2、Eef1b2などでは、RamDA - Aと大きな差が見られなかった (図5A)。

【0076】

次に、RamDA - Bにおいて、反応温度条件のみを改変し、アニール行程と伸長反応行程を小刻みに繰り返す、RamDA - Cを試した。すると、RamDA - Cでは、標準逆転写法と比べてGnb211、Oct3/4の検出量が100倍以上になることがわかった (図5B、RamDA (+) cycle)。一方で、標準逆転写法においては、熱サイクルの効果は見られなかった (図5B、RamDA (-) cycle)。また、RamDA - Aについても熱サイクル化による効果は見られなかった (非掲載)。これらのことから、RamDA - B法において、プライマーの再アニーリングがcDNAの増幅に非常に有効であることが示唆された。特に、ZNA - ランダムヘキサマープライマーは、カチオンユニットを2つ付加したもので、通常のランダムヘキサマープライマーよりTm値が約26 程高く設計されている (非特許文献14)。このため37 の反応中においても、効率的にアニーリングすることが可能となり、さらに熱サイクル化することで、アニーリングがより促進されたものと考えられる。

【0077】

DNase Iを用いたRT - RamDA法について

RT - RamDA法において、dsDNaseを用いる最大の理由は、dsDNaseが、一本鎖DNAである増幅cDNA、逆転写プライマーに対してヌクレアーゼ活性を持たないためである。しかしながら、非特異的DNA分解酵素であるDNase I自体も、そもそも二本鎖DNAと比べて一本鎖DNAに対するヌクレアーゼ活性が低く (非特許文献12)、さらに、K⁺、Na⁺など一価の陽イオン依存的にヌクレアーゼ活性が下がることが知られている (非特許文献23、24)。一方で、逆転写に使用される一般的な反応液組成 (First-Strand buffer (Life Technologies)、PrimeScript Buffer (for cDNA synthesis) (TaKaRa)、Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis RT-Buffer (Thermo Fisher)、M-MuLV Reverse Transcriptase Reaction Buffer (New England Biolabs)、AffinityScript RT Buffer (Agilent Biotechnology) など) は、50 mM Tris-HCl、75 mM KCl、3 mM MgCl₂とTris-HClとKClの濃度が高い。つまり、逆転写反応液条件下では、DNase Iの一本鎖DNAに対するヌクレアーゼ活性が低くRT - RamDA法が機能するのではないかと予測された。実際にFRET解析を用いて、DNase I reaction Buffer (Life Technologies) の組成である20 mM Tris-HCl、50 mM KCl、2 mM MgClを基準にTris-HCl、KClの濃度を上げてヌクレアーゼ活性を測定してみたところ、Tris-HCl、KClともに高濃度条件下では、二本鎖DNAだけでなく、一本鎖DNA、RNA:DNAハイブリッド鎖中DNAに対するDNase Iのヌクレアーゼ活性が大きく阻害されることが分かった (図6)。逆転写反応液と同等のTris-HCl、KCl濃度では、DNase I reaction Bufferの条件と比べて、それぞれ、43%、16%、14%と活性が抑制されていた (図6、# #)。

【0078】

次に、非特異的DNA分解酵素を用いたRT - RamDA法の有効性、取り分け、反応液中の塩濃度と増幅率の関係性を調べた。DNase I reaction Bufferの組成から逆転写反

10

20

30

40

50

反応液の組成へと塩濃度を変化させ、RT-RamDA法が機能するかqPCRを用いて検証したところ、意外なことに、一本鎖DNAに対するヌクレアーゼ活性が高いDNase I reaction Bufferの条件であっても、RT-RamDA法による増幅が十分量起こることが分かった(図7)。さらに、KCl、Tris-HClの濃度を変更しても増幅率にあまり影響がなかった(図7、a-i)。一方で、逆転写反応液の組成条件におけるNaCl濃度には、増幅率が大きく影響することが分かった(図7、j-l)。このため、NaClを含まない反応液組成が望ましいと推測される。また、自家調整反応液を用いた場合でも、市販のFirst-Strand buffer (Life Technologies)や、PrimeScript Buffer (for Real Time) (TaKaRa)と比較して遜色のない増幅率を示した(図7、j、FS,PS)。このことから、RT-RamDA法の反応液は、特定の反応液組成に限定されることはなく、さらに、塩濃度依存的なヌクレアーゼ活性には非依存的にRT-RamDA法が機能することが分かった。これらのことから、反応液中の塩濃度以外のファクターが、cDNAの分解を抑制している可能性が示唆された。

10

【0079】

T4ジーン32プロテインは、cDNAの保護と増幅の安定化に寄与する

T4ジーン32プロテインは、一本鎖DNAに結合することで、ヌクレアーゼから一本鎖DNAを保護する作用が報告されている(非特許文献25)。そこで、poly-A付加された人工合成RNAを鋳型に、オリゴdTプライマーのみを用いたRT-RamDA法によるcDNAの断片化状態をT4ジーン32プロテインありなしで検証した(図8)。その結果、DNase I、dsDNase共に、T4ジーン32プロテインと組み合わせることで、その泳動パターンから、DNase単独の条件よりもcDNAの断片化が抑制されることが分かった(図8、A)。BioAnalyzerの分析においては、同様の結果を得ただけでなく、DNaseを作用させることで、cDNAの収量が10倍近く増えることが分かった(図8、B)。これは、鎖置換反応によりcDNAがグローバルに増幅されていることを示唆するものと考えられる。次に、qPCRを用いて、鋳型RNAにおける3'末端から5'末端への増幅率を検証した(図9)。その結果、DNase Iを単独で用いた場合、ほとんど増幅は見られなかったが、T4ジーン32プロテインと組み合わせた場合、10倍近い増幅が観察された(図9、A、B)。さらに、3'末端側での増幅率が、dsDNaseと比較して改善されていることが分かった(図9、A)。一方、dsDNaseの場合、一本鎖DNAに対する分解活性が元々ないため、単独で作用させるだけでも高い増幅率を示した。しかしながら、同一RNA上での増幅率の変動が大きいという結果となった(図9、A、C)。この条件は、RamDA-Bとほぼ同等の条件であることから、T4ジーン32プロテインがないと、遺伝子間だけでなく、同一遺伝子内での増幅の変動が大きくなることが示唆された。これらのことから、DNase Iを用いたRamDA-Dにおいて、T4ジーン32プロテインは、cDNAの分解を抑制し、遺伝子間、遺伝子内での増幅率の安定化に寄与する2つの役割をもつことが示唆された。

20

30

【0080】

T4ジーン32プロテインは、RNA:DNAハイブリッド鎖中のDNAに対するヌクレアーゼ活性と一本鎖DNAに対する活性の比を改善させる作用をもつ

DNase Iを用いたRT-RamDA法が機能するには、増幅cDNAの分解量が、RNA:cDNA鎖へのニック形成による鎖置換増幅量よりも小さいこと、つまり、一本鎖DNAに対するヌクレアーゼ活性が、RNA:DNAハイブリッド鎖中のDNAに対する活性よりも十分に小さいことが重要と言える。cDNAの断片化と増幅率の実験(図8、9)から、T4ジーン32プロテインがこれに寄与していることが推測された。そこで、FRET解析を用いて逆転写反応液中のT4ジーン32プロテインのヌクレアーゼ活性への作用を検証した(図10)。その結果、逆転写反応液中にT4ジーン32プロテインを加えることで、一本鎖DNAに対する活性が、25%に減少することが分かった。一方、二本鎖DNAに対してはほぼ変動がなく、RNA:DNAハイブリッド鎖中のDNAに対する活性は、60%ほどであった(図10、A)。次にRNA:DNAハイブリッド鎖中のDNAへのヌクレアーゼ活性に対する一本鎖DNAへの活性の比を検証した。すると

40

50

、T4ジーン32プロテインを加えることで、40%から14%へと活性比が改善することが分かった(図10、B)。この比の改善が、RT-RamDA法を有効にするためのキーファクターであると推測される。一方でdsDNaseの場合は、T4ジーン32プロテインの非存在下においても活性比は7%程度しかなく、このため、T4ジーン32プロテインなしのRamDA-B、-Cが十分に機能するものと考えられる(図10、B)。

【0081】

RamDA-Dは、反応時間依存的な増幅率をしめす

反応時間依存的に増幅率の改善が見込まれるのか、マウスES細胞の1細胞溶解液を鋳型に用いて検証した(図11)。qPCRを用いてcDNAの収量の相対値をみたところ、37における反応時間を30、60、120分と増やすことで、収量も約10、20、30倍と増えることが分かった(図11)。このような現象は、dsDNaseを用いたRamDA-Aでは見られなかった(データ非掲載)。dsDNaseは、逆転写反応液中、特にT4ジーン32プロテイン存在下で、著しくヌクレアーゼ活性が阻害されており、RNA:DNAハイブリッド鎖中のDNAへのヌクレアーゼ活性は、DNase Iと比べて6%程度しかなかった(図10、A)。このことが、DNase IとdsDNaseを用いた際の増幅率の違いとなっているのかもしれない。一方で、RamDA-Dは、細胞溶解液の様な不純物を含むクルードサンプルにおいても問題無く機能することが確認された。さらに逆転写反応中での二本鎖DNAに対するヌクレアーゼ活性についてもdsDNaseと比べてDNase Iを用いた方が高いことから、増幅率だけでなく、コンタミネーション除去能力についてもRamDA-Dが有効であることが示唆された(図10、A)。

【0082】

RamDA-Dは、特定のRNase Hマイナス型逆転写酵素に限定されない。また、100細胞相当量のRNAに対しても機能する

RamDA-Dが、特定のRNase Hマイナス型逆転写酵素に限定されるのかどうかを確かめるため、PrimeScript RT Enzyme Mix I以外にSuperScriptシリーズ(Life Technologies)の逆転写酵素を用いて検証を行った(図12)。その結果、SuperScript II, IIIでcDNAの増幅が確認できた。なかでもSuperScript IIは、PrimeScript RT Enzyme Mix Iに匹敵する増幅率を示した(図12、SSII)。さらにMaxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher)や ReverTra Ace qPCR RT Kit(TOYOBO)を用いた場合でもRamDA-Dが機能することを確認した(データ非掲載)。これらのことから、RamDA-Dは、特定のRNase Hマイナス型逆転写酵素に限定されないことがわかった。さらに、200 pg, 1 ngと、1細胞相当量である10 pg total

RNAよりも多いRNA量からでも問題なくRamDA-Dが機能することが分かった(図12、200 pg, 1ng)。このことから、少なくとも100細胞相当量の鋳型RNA量を用いても十分に増幅性能が担保されていることが示唆された。

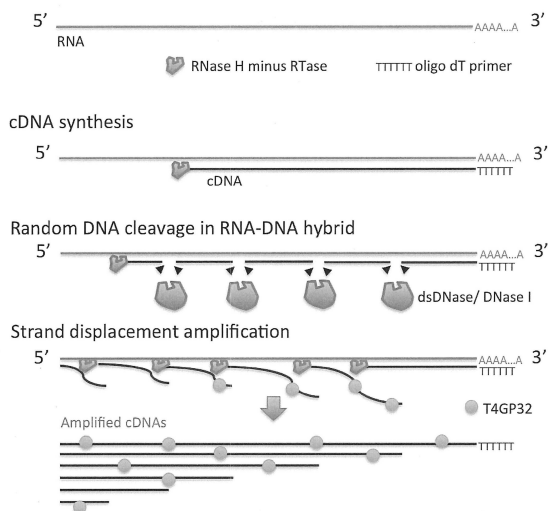
【0083】

以上のことから、RT-RamDA法は、微量RNAの増幅技術としては、非常に有用な手段となり得るもので、特にRamDA-Cの増幅率は、特定のターゲット遺伝子を検出する解析において、非常に大きなアドバンテージとなるはずである。一方で、RamDA-Cは遺伝子間での増幅率の変動が大きいと、均一な増幅が必要な解析では、T4ジーン32プロテインを加えたRamDA-Aが有効である。さらに、T4ジーン32プロテインと非特異的DNA分解酵素であるDNase Iを用いたRamDA-Dは、増幅率が高く、遺伝子間、遺伝子内の増幅変動も少ない。その上、逆転写反応中の二本鎖DNAに対するヌクレアーゼ活性も二本鎖特異的DNA分解酵素と比べて高い状態で維持されていることから、DNAのコンタミネーションの影響をより低減させる効果が期待される。これらのことから、RamDA-Dは、RamDA-A、-B、両方の優位性を兼ね備えた方法であり、微量なRNAをターゲットとした逆転写法として非常に有効かつ簡便な方法である。

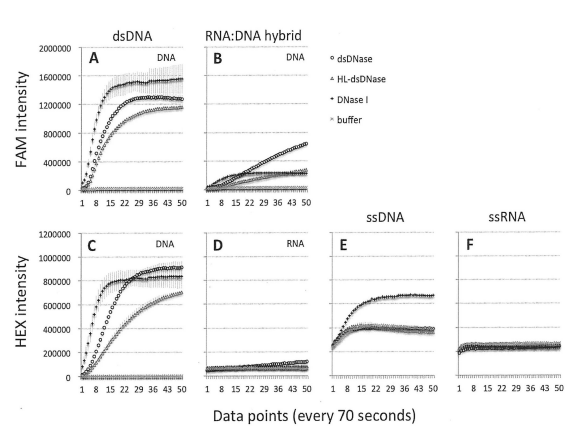
【 0 0 8 4 】

本願は、特願 2 0 1 4 - 2 0 0 2 5 8 (2 0 1 4 年 9 月 3 0 日出願) に基づく優先権を主張する出願であり、特願 2 0 1 4 - 2 0 0 2 5 8 に記載の内容は全て、引用により本明細書中に取り込むものとする。また、本明細書で引用する特許文献、特許出願及び文献に記載の内容は全て、引用により本明細書中に取り込むものとする。

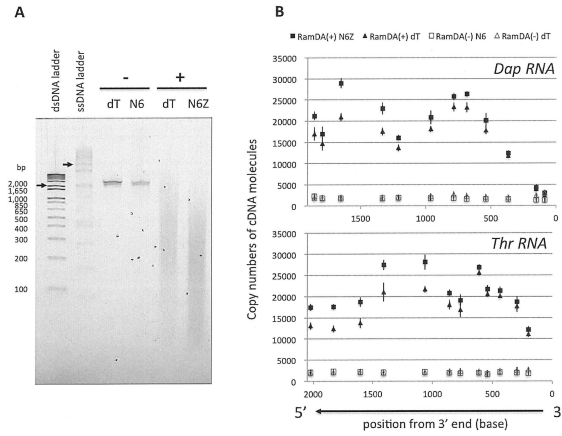
【 図 1 】



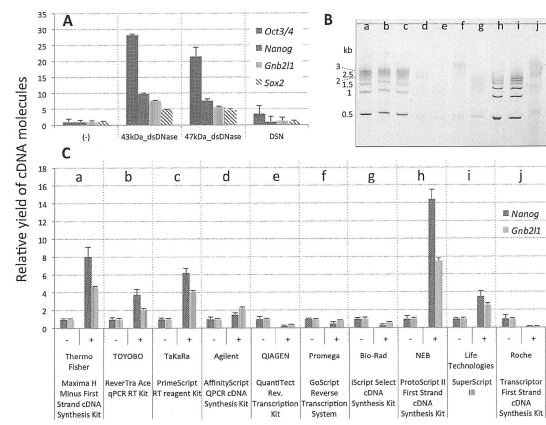
【 図 2 】



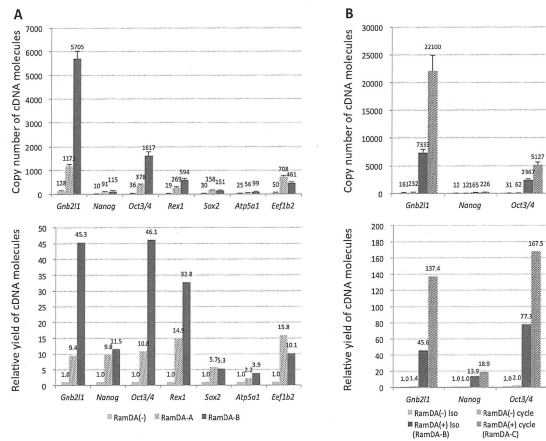
【 図 3 】



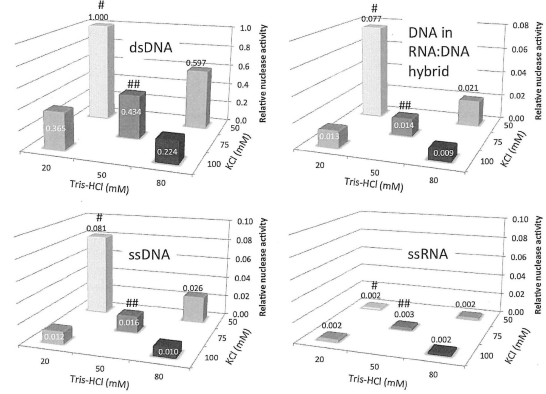
【 図 4 】



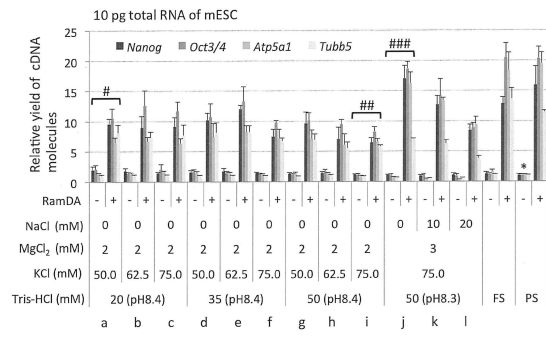
【 図 5 】



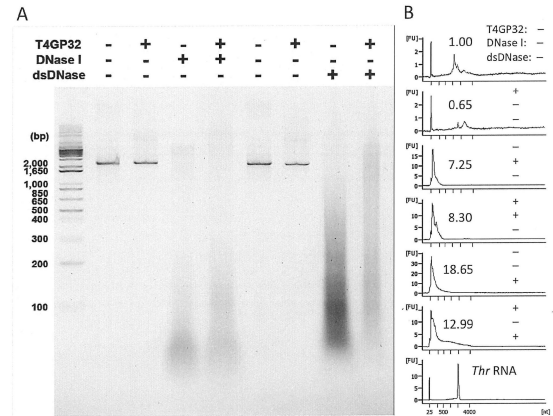
【 図 6 】



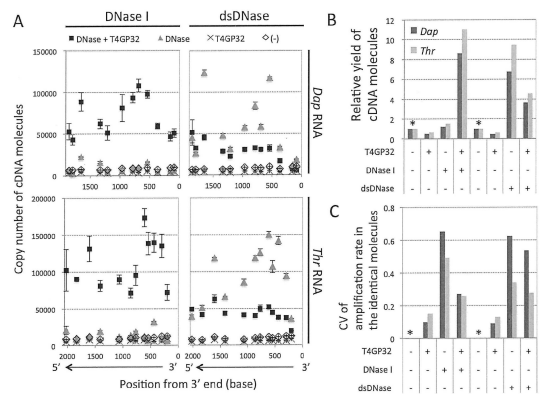
【 7 】



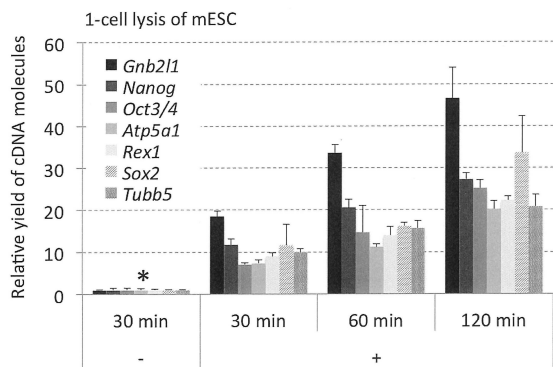
【 8 】



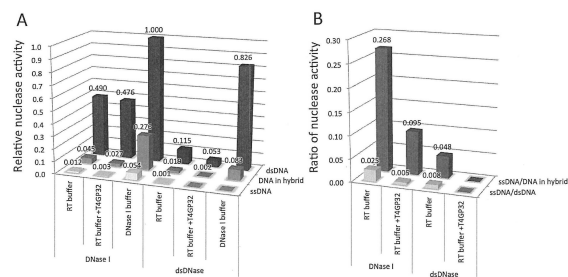
【 9 】



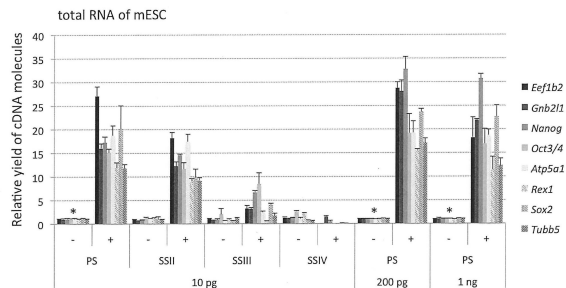
【 1 1 】



【 1 0 】



【 1 2 】



【配列表】

0006583796000001.app

フロントページの続き

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願 (AMEDの再生医療実現拠点ネットワークプログラム (課題名「iPS・分化細胞集団の不均質性を1細胞・全遺伝子解像度で高速に測定する技術の開発」) 及び創薬等支援技術基盤プラットフォーム (課題名「超微量RNAシーケンス技術の支援と高度化」) の成果 産業技術力強化法第19条の適用を受けるもの)

早期審査対象出願

審査官 松原 寛子

- (56)参考文献 特開2014-103867(JP, A)
実験医学, 2013年, Vol.31, No.15, p.2358-2364
PLOS ONE, 2010年, Vol.5, No.4, e10295

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/6848
C12N 15/09
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)