(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4043516号
(P4043516)
(45)発行日　平成20年2月6日(2008.2.6)　(24)登録日　平成19年11月22日(2007.11.22)

(51)Int.Cl.　　F I
C12Q 1/68 (2006.01)　　C12Q 1/68 A
C12N 15/09 (2006.01)　　C12N 15/00 ZNAA

請求項の数 22　(全 38 頁)

(21)出願番号　特願平9-524645
(86)(22)出願日　平成9年1月3日(1997.1.3)
(65)公表番号　特表2000-502905(P2000-502905A)
(43)公表日　平成12年3月14日(2000.3.14)
(86)国際出願番号　PCT/US1997/000368
(87)国際公開番号　WO1997/024455
(87)国際公開日　平成9年7月10日(1997.7.10)
審査請求日　平成15年12月15日(2003.12.15)
(31)優先権主張番号　08/582,562
(32)優先日　平成8年1月3日(1996.1.3)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
クロンテック　ラボラトリーズ，インク．
アメリカ合衆国　９４３０３　カリフォルニア，パロ　アルト，イースト　メドウ　サークル　１０２０
(74)代理人
弁理士　五十嵐　和壽
(72)発明者　チエンチク，アレックス
アメリカ合衆国　９４３０６　カリフォルニア，パロ　アルト　＃３０，サン　アントニオ　ロード　６７０
(72)発明者　ジュー，ヨーク
アメリカ合衆国　９４０８６　カリフォルニア，サニベイル，アパートメント　＃２２１，サンタ　フェ　テラス　２５０
最終頁に続く

(54)【発明の名称】全長ｃＤＮＡクローニングのための方法及び組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＲＮＡ分子及びテンプレート切換えオリゴヌクレオチドに対して相補的なＤＮＡを調製する方法であって、該方法は
(a)ｃＤＮＡ合成プライマを前記ＲＮＡ分子にアニーリングし、第１のｃＤＮＡ鎖を合成してＲＮＡ－ｃＤＮＡ中間体を形成するステップ、
(b)前記ＲＮＡ－ｃＤＮＡ中間体をテンプレート切換えオリゴヌクレオチドに接触させるステップ、
ここにおいて、前記テンプレート切換えオリゴヌクレオチドは、その５′末端に予め選択した任意のヌクレオチド配列とその３′末端に少なくとも３つのリボグアニン残基を有しているものであり、その３′末端のリボグアニンは前記ＲＮＡ－ｃＤＮＡ中間体の第１のｃＤＮＡ鎖の３′末端でヌクレオチドと塩基対を形成するものであり、そして前記第１のｃＤＮＡ鎖の３′末端の延長のためのテンプレートとして機能するものである、そして
(c)第１のｃＤＮＡ鎖の３′末端を延長して、ＲＮＡ分子及びテンプレート切換えオリゴヌクレオチドに対して相補的なＤＮＡを調製するステップ
を含むことを特徴とする方法。
【請求項２】
さらに、前記テンプレート切換えオリゴヌクレオチドの予め選択したヌクレオチド配列の少なくとも一部に対して相補的なヌクレオチド配列を含む第２のオリゴヌクレオチドプライマを用いて第１のＤＮＡ鎖を増幅するステップを含んでいる請求項１の方法。

【請求項３】
ＲＮＡ分子が前記ＲＮＡの５′末端に付加された７－メチルグアノシンＣＡＰ構造を有している請求項１の方法。
【請求項４】
リボグアニン残基のリボースの３′－ＯＨ基がアミノ、ビオチン、ホスフェート、グリセロール、及びフルオロ基で構成されるグループから選択される化学基を含んでいる請求項１の方法。
【請求項５】
前記テンプレート切換えオリゴヌクレオチドが前記ＲＮＡの５′ＣＡＰ構造に結合する蛋白質を含んでいる請求項１の方法。
【請求項６】
蛋白質が真核性開始ファクター４Ｅ及び抗ＣＡＰ構造抗体からなるグループから選択される請求項５の方法。
【請求項７】
前記テンプレート切換えオリゴヌクレオチドが
$5'-dN_1-dN_2-\cdots dN_m-rN_1-rN_2-\cdots rN_{(n-2)}-rN_{(n-1)}-rN_n-3'$
の式で示され、
ｄＮがｄＡＭＰ、ｄＣＭＰ、ｄＧＭＰ及びｄＴＭＰで構成されるグループから選択されるデオキシリボヌクレオチドであり、ｍは０およびそれ以上の整数であり、
ｒＮがＡＭＰ、ＣＭＰ、ＧＭＰ及びＵＭＰから選択されるリボヌクレオチドであり、そしてｎが３以上の整数であり、$rN_{(n-2)}$、$rN_{(n-1)}$、rN_n、がＧＭＰである請求項１の方法。
【請求項８】
前記テンプレート切換えオリゴヌクレオチドが配列ＩＤ番号９，13，18，20，21，22，23，24，25，26，27，29，30，31，32，33，34，35，36，37，40，41，44，45，50，51，52，53，54，55，56，57，58，65，66，68，86，87，90，91，92，93，94，95，96，97，98，99，100，101，102，103，104，105，106，107及び108で構成されるグループから選択される請求項１の方法。
【請求項９】
ｃＤＮＡ合成プライマが少なくとも１つの標的ｍＲＮＡに相補的な配列を含んでいる請求項１の方法。
【請求項１０】
ｃＤＮＡ合成プライマがポリＡ＋ＲＮＡのポリ（Ａ）部分に対して相補的な配列を含んでいる請求項１の方法。
【請求項１１】
前記ｃＤＮＡ合成プライマが配列ＩＤ番号８，16，67，109，110及び111で構成されたグループから選択される請求項１の方法。
【請求項１２】
請求項１の方法において、全長アンカー化ｃＤＮＡが少なくとも１つのハプテン基を有しており、さらに、ハプテニル化されたアンカー化ｃＤＮＡをこのハプテニル化されたアンカー化ｃＤＮＡのハプテンの結合リガンドとインキュベートするステップを含んでいて、
前記結合リガンドは基質に接合されているものであり、前記インキュベートは、ハプテニル化されたアンカー化ｃＤＮＡプローブが基質の結合リガンドに結合された状態になるのに十分な条件下でインキュベートされていて、
その後、基質に結合したハプテニル化されたアンカー化ｃＤＮＡをすべての未結合分子から回収するステップと、そして
基質に結合したハプテニル化アンカー化ｃＤＮＡプローブを、前記ハプテニル化アンカー化ｃＤＮＡを放出するのに十分な条件の下でインキュベートするステップと
を含んでいる方法。
【請求項１３】

さらに、ステップ（ｃ）で発生された全長アンカー化ｃＤＮＡをＤＮＡポリメラーゼによって第２のｃＤＮＡ鎖が合成される条件下で処理して、前記全長アンカー化ｃＤＮＡ鎖をテンプレートとして用いて、それによって全長ｄｓ　ｃＤＮＡを発生させるステップを含んだ請求項１の方法。

【請求項１４】

さらに、ステップ（ｃ）で発生された前記全長アンカー化ｃＤＮＡを、前記テンプレート切換えオリゴヌクレオチドの少なくとも一部に対応したヌクレオチド配列を有するプライマ及び前記ｃＤＮＡ合成プライマの組み合わせと、ＰＣＲを実行するのに必要な有効な量の他の試薬で、ＰＣＲを実行して全長ｄｓ　ｃＤＮＡを発生させるのに十分な条件下でインキュベートするステップを含む請求項１の方法。

【請求項１５】

前記プライマが配列ＩＤ番号10，11，12，17，69，70，71，72，73，74，75，76，77，78，79，80，81，82及び83によって構成されるグループから選択される請求項14の方法。

【請求項１６】

さらに、前記全長ｄｓ　ｃＤＮＡをレポータ基でラベルするステップと、
前記ラベルされた全長ｄｓ　ｃＤＮＡを固体基質上で不動態化された特定の遺伝子の組に対応する定義されたオリゴヌクレオチド／ポリヌクレチドと、その一定の不動態化され定義されたオリゴヌクレオチド／ポリヌクレオチドを有する上記ラベルされた全長ｄｓ　ｃＤＮＡ内の一定のポリヌクレオチド配列間でのハイブリダイゼーションに起因する表面上でハイブリダイゼーションのパターンを形成するのに十分な条件下で接触させるステップと、そして
前記レポータ基の検出によってこれらのパターンを明らかにするステップとを含む請求項14の方法。

【請求項１７】

その５′末端に予め選択されたヌクレオチド配列を有し、さらにその３′末端に少なくとも３つのリボグアニン残基を有している請求項１で使用するテンプレート切換えオリゴヌクレオチドを１つあるいは複数のコンパートメントの中に含む、ｃＤＮＡを調製するためのキット。

【請求項１８】

前記テンプレート切換えオリゴヌクレオチドが
$5'-dN_1-dN_2-\cdots dN_m-rN_1-rN_2-\cdots rN_{(n-2)}-rN_{(n-1)}-rN_n-3'$
の式で示され、
ここでｄＮはｄＡＭＰ、ｄＣＭＰ、ｄＧＭＰ、ｄＧＭＰ及びｄＴＭＰで構成されるグループから選択されるデオキシリボヌクレオチドを示しており、ｍは０以上の整数を示しており、
ｒＮがＡＭＰ、ＣＭＰ、ＧＭＰ及びＵＭＰから選択されるリボヌクレオチドであり、そしてｎが３以上の整数であり、$rN_{(n-2)}$、$rN_{(n-1)}$、rN_n、がＧＭＰである請求項17のキット。

【請求項１９】

前記テンプレート切換えオリゴヌクレオチドが配列ＩＤ番号９，13，18，20，21，22，23，24，25，26，27，29，30，31，32，33，34，35，36，37，40，41，44，45，50，51，52，53，54，55，56，57，58，65，66，68，86，87，90，91，92，93，94，95，96，97，98，99，100，101，102，103，104，105，106，107及び108で構成されるグループから選択される請求項17のキット。

【請求項２０】

前記リボグアニン残基のリボースの３′－ＯＨ基がアミノ、ビオチン、ホスフェート、グリセロール、及びフルオロ基で構成されるグループから選択される化学基を含んでいる請求項17のキット。

【請求項２１】

前記テンプレート切換えオリゴヌクレオチドが前記ＲＮＡの５′ＣＡＰ構造に結合する蛋

白質を含んでいる請求項17のキット。
【請求項２２】
前記蛋白質が真核性開始ファクター４Ｅ及び抗ＣＡＰ構造抗体からなるグループから選択される請求項21のキット。
【発明の詳細な説明】
関連出願について
本願は1996年１月３日付けで出願された共係属中米国出願No.08/582,562の一部係属出願である。
発明の分野
本願は全長ｍＲＮＡの完全な配列情報を有する全長ｃＤＮＡを選択的に合成するためのより改良された技術に関するものである。
発明の背景
分子生物学の基本的な技術はポリ（Ａ）＋ＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を適切な宿主細胞内でｃＤＮＡライブラリあるいは表現を作るためにクローニング・ベクターに挿入することができる二本鎖相補性ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）に変換することである。ｃＤＮＡライブラリ構成技術における進歩は広い範囲での生物学的に重要な蛋白質の発見と調製を可能にしてくれている。
Ｗｕ編、Methods in Enzymology（1987）、vol.152で、過去15年間に用いられてきたｃＤＮＡライブラリを発生させるためのいくつかの手順についての広範な検討が行われている。ほとんどの場合、ｃＤＮＡライブラリ構成技術は開始物質としてポリ（Ａ）＋ＲＮＡを用いる。完全なポリ（Ａ）＋ＲＮＡはその３′末端のポリアデニル化された『末尾』及び５′末端での特徴的な『ＣＡＰ構造あるいはキャップ・サイト』によって特徴づけられる。ｃＤＮＡライブラリ構成のための最も重要な必要条件はポリ（Ａ）＋ＲＮＡを全長ｃＤＮＡに完全にコピーし、同時にｍＲＮＡによってコード表現されたその蛋白質の構造の完全な配列情報を保持することにある。
ポリ（Ａ）＋ＲＮＡをｃＤＮＡにコピーするためのひとつの一般化され、共通に用いられている方法は、オリゴｄ（Ｔ）プライマからのｍＲＮＡの３′末端から始まって５′末端までつながりｃＤＮＡ：ｍＲＮＡハイブリッド（Gublerら、1983）を発生させる逆トランスクリプターゼを用いる。このＲＮＡ鎖はその後ＲＮase　Ｈの作用でそのハイブリッドから取り除かれ、第２のＤＮＡ鎖がＤＮＡポリメラーゼＩを用いて合成される。その結果できるｄｓ　ｃＤＮＡ分子の不均一な混合物は種々の技術を用いて適切な遺伝子組換えＤＮＡベクター分子にクローンすることができる。残念なことに、大部分のｍＲＮＡの場合、逆トランスクリプターゼが効率的にそれらを全長ＤＮＡにコピーすることができないので、この方法では『全長』ｃＤＮＡを合成することができない。コピー作用の効率はｍＲＮＡの長さと逆比例するから、したがって、『全長』ｃＤＮＡ合成の問題はより長いｍＲＮＡの場合より深刻になる。さらに、現在の技術はｃＤＮＡの５′及び３′末端に欠失を発生させることができる。
別の方法で、ｍＲＮＡ分子のポリ（Ａ）末尾は先ず直線化ベクターＤＮＡとのオリゴ（ｄＴ）結合（ベクター・プライマー）にアニーリングされる（Okayamaら、Pruitt, International Patent, Appl. No.89110816.9）。そして、逆トランスクリプターゼで合成されるｃＤＮＡの第１の鎖はオリゴｄｔによって３′末端で終端されているので、ベクター・プライマへのサーキュレーションによるその後のクローニングがより容易になる。この方法は非全長ｃＤＮＡ合成の故に途中で切れたｃＤＮＡを含む多数のｃＤＮＡクローンも発生させる。
通常のｃＤＮＡライブラリを発生させるための現在の技術の使用の欠陥の結果として、ほとんどのｃＤＮＡクローンはｍＲＮＡの５′末端近くの配列を欠いている。これは機能性蛋白質をつくるために必要な重要な情報の喪失につながる。『全長』ｃＤＮＡクローニングのためのｃＤＮＡライブラリをより豊富にするための努力を通じて２つの選択手順が開発されている。ＣＡＰ反復手順（ＣＡＰture）においては、全長ｃＤＮＡ：ｍＲＮＡハイブリッドを生成するためにＲＮase Ａと組み合わせてキャップ結合蛋白質（真核開始ファ

クター４Ｅ）が用いられた（Ederyら、1995；Sonenbergら；米国特許No.5,219,989）。非全長ｃＤＮＡに対応するより短めの二重体が選ばれないのは、ｍＲＮＡのＣＡＰ構造がヌクレアーゼ措置によってＲＮＡモイアティから除外されるからである。
ＣＡＰture法は真正の５′末端を含んだクローンのためのｃＤＮＡライブラリを豊かにする可能性を持っていたが、全長ｃＤＮＡの収率は特に長いｃＤＮＡの場合非常に低い（１～５％）。収率の低さはこの技術の場合重大な欠陥である。
『オリゴ－キャッピング』方法においては、ｍＲＮＡのＣＡＰ構造がオリゴリボヌクレオチドと選択的に置換され、従って、後で全長ｃＤＮＡの合成のために用いられるキメラ性オリゴヌクレオチド／全長ｍＲＮＡ中間物を発生する（Maruyamaら、1994；Fromomt-Racineら、1993；Katoら、国際特許公報No.0 625 572 Ａ１出願番号No.93921061.3）。しかしながら、この方法は複雑で、アルカリ性ホスファターゼによるｍＲＮＡの措置、タバコ酸ピロホスホターゼによるｍＲＮＡのデキャッピング、そしてＴ４　ＲＮＡリガーゼによるｍＲＮＡの５′末端へのオリゴヌクレオチドの結束を含んでいる。これらの複数の酵素ステップはｍＲＮＡを劣化させ、それによってその後のクローニング手順のために不完全なｃＤＮＡフラグメントを発生させる。『オリゴ－キャッピング』法を用いて発生されたｃＤＮＡライブラリ内でのｃＤＮＡ挿入物のサイズ分布は通常３kb以下である。これは全長ｍＲＮＡサイズ分布をかなり下回っており（Katoら、1994）、『オリゴ－キャッピング』技術による『全長』クローニングの効率の低さを示している。
上の説明から分かるように、全長ｃＤＮＡクローンを含むｃＤＮＡライブラリを構成する従来の方法は効率の低さ、及び複数の、時間のかかるステップの使用という制約を有している。従って、ＲＮＡから質の高い全長ｃＤＮＡを発生させる単純な方法が非常に望ましい。

発明の要約

本発明はｍＲＮＡ分子の５′末端の完全な配列に対応する全長ｃＤＮＡあるいはｃＤＮＡフラグメントを合成する有利な方法を提供する。本発明による方法はＲＮＡを、ｍＲＮＡ－ｃＤＮＡハイブリッドを合成するためにプライマのテンプレート依存延長を行わせるのに十分な条件下で、ＲＮＡにアニールできるｃＤＮＡ合成プライマ、逆トランスクリプターゼ活性を有する適切な酵素、そしてテンプレート切換えオリゴヌクレオチドを接触させるステップを含んでいる。このテンプレート切換えオリゴヌクレオチドはＲＮＡ分子の５′末端でＣＡＰサイトとハイブリダイズし、テンプレート切換えオリゴヌクレオチドに対して相補的な一本鎖ｃＤＮＡの３′末端のＣＡＰ依存延長のための短い、延長テンプレートとして機能する。その結果作成される全長一本鎖ｃＤＮＡはＲＮＡ分子の完全な５′末端とテンプレート切換えオリゴヌクレオチドに対して相補的な配列を含んでおり、後で行われるｃＤＮＡ増幅での普遍的プライミング（priming）サイトとしての機能を果たすことができる。
本発明はこの方法に従って用いることができる新しいテンプレート切換えオリゴヌクレオチドにも関係している。このテンプレート切換えオリゴヌクレオチドを含むキットも本発明の範囲内に含まれている。

【図面の簡単な説明】

図１は本発明によるテンプレート切換え技術のメカニズムを示している。
図２は全長ＤＮＡの５′末端配列をクローニングするために本発明による方法と材料を用いた手順を示している。
図３は本発明による全長ｃＤＮＡライブラリ構成のための本発明によるＰＣＲ法及び材料を示している。
図４はＰＲＥアダプタープライマ戦略に基づいたＣＡＰ切換え全長ｃＤＮＡライブラリ構成技術を示している。

本発明の詳細な開示

本発明はナノグラム程度の量の総又はポリＡ＋ＲＮＡからｃＤＮＡライブラリを構成するための組成物及び方法に関するものである。この組成物及び方法はここに述べられているテンプレート切換えオリゴヌクレオチドを用いる。本発明による方法はｍＲＮＡ：ｃＤＮ

Ａハイブリッドを発生させるためにアニールされたプライマのテンプレートに依存した延長を可能ならしめるような条件下でＲＮＡをＲＮＡにアニールすることができるプライマ、逆トランスクリプタターゼ、及びテンプレート切換えオリゴヌクレオチドに接触させるステップを含んでいる。このテンプレート切換えオリゴヌクレオチドはＲＮＡ分子の５′末端でＣＡＰサイトにハイブリダイズすることができ、このテンプレート切換えオリゴヌクレオチドに相補的な一本鎖ｃＤＮＡの３′末端のＣＡＰ依存延長のための短い延長テンプレートとして機能することができる。その結果できる全長一本鎖ｃＤＮＡはＲＮＡ分子の完全な５′末端とテンプレート切換えオリゴヌクレオチドに対して相補的な配列を含んでいる。このテンプレート切換えオリゴヌクレオチド配列はその後で行われるｃＤＮＡの増幅における普遍的プライミング・サイトとして機能することができる。

具体的には、本発明はＲＮＡから全長一本鎖（ｓｓ）ｃＤＮＡ、あるいは一本鎖ｃＤＮＡを合成するための方法を提供する。この方法で合成されたｃＤＮＡは３′末端に任意のアンカー配列を有しており、その後にｍＲＮＡのキャップ・サイトから始まるＲＮＡ分子に相補的なヌクレオチド配列が続いている。好ましい実施の形態においては、本発明のプロセスは以下のステップを含んでいる。

1．ｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッドを発生させるためプライマのテンプレート依存延長を可能ならしめるのに十分な条件の下でｍＲＮＡにアニールされるｃＤＮＡ合成プライマ（ＣＤＳプライマ）と逆トランスクリプターゼ活性を有する酵素の存在下でポリ（Ａ）＋ＲＮＡ又は総ＲＮＡのサンプルを培養するステップと、

2．上記ステップ１で得られた第１鎖ｃＤＮＡ合成混合物を、テンプレートとしてテンプレート切換えオリゴヌクレオチドを用いて逆トランスクリプターゼによる全長ｃＤＮＡのＣＡＰ依存延長を行わせ、それによって上記テンプレート切換えオリゴヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を全長一本鎖ｃＤＮＡ（以下の『アンカー化されたｃＤＮＡ：ｍＲＮＡハイブリッド』と称する）の３′末端に付加させることができる本発明のテンプレート切換えオリゴヌクレオチド（『ＣＡＰ切換えヌクレオチドとも呼ばれる）で培養するステップ。このテンプレート切換えオリゴヌクレオチドはその５′末端に予め選択された任意のヌクレオチド配列と３′末端に少なくともひとつのリボグアニンを有している。

この方法のステップ１とステップ２は時間において分離されているだけである。好ましい実施の形態では、ステップ１の後にステップ２が来る。しかしながら、ステップ１からの第１鎖ｃＤＮＡ合成混合物はステップ２で用いられるテンプレート切換えオリゴヌクレオチドを含んでいる場合もある。また、テンプレート切換えオリゴヌクレオチドを第１鎖ｃＤＮＡ合成の時点、あるいはその後で反応混合物に加えることもできる。ひとつの好ましい実施の形態において、ｃＤＮＡ合成プライマは修正オリゴ（ｄＴ）プライマである。

本発明はまた、ステップ２でアンカー化されたｃＤＮＡ：ｍＲＮＡハイブリッドをテンプレートとして用いて標的ｍＲＮＡの５′末端に対応した全長ｃＤＮＡフラグメントを分離する方法も含んでいる。この方法は上記実施の形態のステップ１及び２を含み、その後に以下に述べるようなステップ３Ａあるいはステップ３Ｂを含んでいる。

３Ａ．ステップ２で発生されたアンカー化されたｃＤＮＡ：ｍＲＮＡハイブリッドを（ａ）上記テンプレート切換えオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列と部分的あるいは完全に対応したオリゴヌクレオチド・プライマ、（ｂ）標的ｍＲＮＡのヌクレオチド配列に対して相補的なオリゴヌクレオチド・プライマ、及び（ｃ）有効な量のポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を行わせるのに必要な他の試薬との組み合わせで培養するステップ。この培養はＰＣＲを行わせ、それによって標的ｃＤＮＡの５′末端全長プラグメントに対応する増幅生成物を発生させるのに十分な条件下で行われる。

３Ｂ．第１のアンカー化されたｃＤＮＡ鎖をテンプレートとして用いて、第２のｃＤＮＡ鎖が合成される条件下でステップ２のｃＤＮＡ：ｍＲＮＡハイブリッドを措置するステップ。

全長ｃＤＮＡを含むｃＤＮＡライブラリを発生させる方法も本発明の範囲内である。この方法はテンプレートとしてステップ２で発生されたアンカー化されたｃＤＮＡ：ｍＲＮＡハイブリッドとして用いる。この方法は上記実施の形態のステップ１及び２を含み、その

後以下に述べるようなステップ３Ｃ又は３Ｄが行われる。
３Ｃ．ステップ２で発生されたアンカー化ｃＤＮＡ：ｍＲＮＡハイブリッドをテンプレート切換えオリゴヌクレオチド及びｃＤＮＡ合成プライマの配列とそれぞれ部分的あるいは完全に対応したプライマ、及び有効な量のＰＣＲを行わせるのに必要な他の試薬との組み合わせで培養するステップ。この培養は全長ｄｓ ｃＤＮＡの代表的ライブラリに対応する増幅生成物を発生するためのＰＣＲを行わせるのに十分な条件下で行われる。
３Ｄ．第１のアンカー化ｃＤＮＡ鎖をテンプレートとして用いて第２のｃＤＮＡ鎖が合成される条件下でステップ２のアンカー化ｃＤＮＡ：ｍＲＮＡハイブリッドを処理するステップ。
本発明のひとつの側面で、ステップ２又は３で発生されたｃＤＮＡ生成物は遺伝子組換えクローニング媒体内に挿入することができ、その宿主はこの技術領域で良く知られた従来の方法によってこれらの媒体で形質変換することができる（Kimmelら、1987）。
本発明は通常の方法では合成が困難であった全長ｃＤＮＡの合成を可能にしてくれる。本発明は上に述べたような新しいステップ２を含んでおり、このステップ２はこの技術領域で良く知られた標準的なｃＤＮＡ調製／クローニング手順で用いることができる。本発明による方法でのテンプレート切換えオリゴヌクレオチドの使用はテンプレートＲＮＡの５′末端とは相補的でないｃＤＮＡのネガティブ選択を好適に可能にしてくれ、一方全長ｃＤＮＡは簡単に選択することができる。さらに、この方法はｃＤＮＡ合成及びクローニングをかなり単純化することができる。本発明によって調製された全長ｃＤＮＡライブラリから得られたｃＤＮＡクローンはその蛋白質の主要構造に関する情報を含んでいるので、本発明は又コード表現された蛋白質を生成するために前記全長ｃＤＮＡライブラリから得られたクローンを用いるプロセスにも関係している。
別の側面で、本発明はステップ３で発生された生成されるｃＤＮＡ生成物をｃＤＮＡ削除方法で用いるための開始物質として用いることもできる方法を提供してくれる。具体的には、本発明による方法はひとつのＤＮＡ群（テスター群）には大量に存在しているが、別のＤＮＡ群（ドライバー群）ではそれ程大量に存在していないｃＤＮＡ種を含んだｃＤＮＡ群を作成するためのｃＤＮＡ削除背順と組み合わせて用いることができる。好ましくは、本発明の方法および材料によって増幅されたテスター及びドライバーｄｓ ｃＤＮＡはChenchikら（米国特許No.5,563,340）で述べた抑制減算ハイブリダイゼーション技術と組み合わせて用いられる。例えば、Wiglerら（米国特許No.5,436,142）；Hampsonら（Nucl. Acids Res. 20：2899（1992））；Yangら（Anal. Biochem. 237：109－114（1996））；Balzerら（Nucl. Acids Res. 22：2853－2854（1994））その他が述べている減算ハイブリダイゼーションのその他の方法を用いることもできる。
本発明の方法で調製されたｄｓ ｃＤＮＡはハイブリダイゼーション・プローブとしても用いることができる。ここで用いられている『ハイブリダイゼーション・プローブ』という用語は健康な、あるいは病気にかかったり感染された生物から単離された、あるいはChenchikら（米国特許No.5,565,340）が述べているように差し引かれた総ＲＮＡからつくられるｃＤＮＡは放射性アイソトープ、蛍光物質、及びその他のレポータグループを用いて、通常の化学的あるいは酵素的ラベリング手順によってラベルすることができるという意味である。ラベルされたｃＤＮＡは先行技術で公知の標準的なハブリダイゼーション・アッセイで用いることができ、その場合、ラベルされたｃＤＮＡは固体表面上で不動態化された一定の組み合わせの遺伝子に対応する明確に定義されたオリゴヌクレオチド／ポリヌクレオチドと上記一定の不動態化された定義済みのオリゴヌクレオチド／ポリヌクレオチドと有するハイブリダイゼーション・プローブ内での一定のポリヌクレオチド配列間のハイブリダイゼーションによって起こされるハイブリダーゼーション・パターンの形成を可能にするのに十分な時間だけ接触させられる。シンチレーション・カウンティング、オートラジオグラフィ、蛍光測定、熱量測定、あるいは光放射測定など利用可能な従来の技術、ラベリング、ハイブリダイゼーション及び検出のための技術と条件については先行技術において公知である（例えば、Maniatisら、1989；Kellerら、1993参照）。
ラベルされたｃＤＮＡはひとつの生物の２つの異なった予め決められた状態でそれぞれ異

なって表現された遺伝子を特定するためにも用いることができる（例えば、Maniatisら、1989；国際特許ＷＯ95/21944参照）。
第１鎖ｃＤＮＡ合成－テンプレート切換え手順（ステップ２）後に発生された一本鎖ｃＤＮＡ，あるいは５′－ＲＡＣＥ増幅ステップ（ステップ３）後に発生されたｄｓ ｃＤＮＡはその分子を含むｓｓあるいはｄｓ核酸の混合物あるいはライブラリからの望ましい相補性標的核酸分子を選択的に回収するためのハイブリダイゼーション・プローブとして用いることもできる。上記ハイブリダイゼーション・プローブがハプテニル化され、1996年１月16日付けの米国特許No.5,484,702及び1996年３月19日付けの米国特許No.5,500,356に述べられているようなハイブリダイゼーション方式、あるいは1989年12月19日付けの米国特許No.4,888,274に述べられているようなRecA蛋白質媒介ハイブリダイゼーションに基づく標的核酸分子をより豊富に供給源を獲得するために用いられるための方法。
全長ｃＤＮＡクローンを含んだｃＤＮＡライブラリの調製のために有益なテンプレート切換えあるいは『ＣＡＰ切換え』オリゴヌクレオチドも本発明の範囲内である。ＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドは少なくとも２つの機能を有している。ひとつの機能は第１鎖ｃＤＮＡ合成後に全長ｍＲＮＡの５′末端で発生された逆トランスクリプターゼ－ｍＲＮＡ－ｃＤＮＡの全長中間物と選択的に相互作用する能力である。本発明によるＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドの第２の機能はＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドをテンプレートとして用いての逆トランスクリプターゼによる全長ｃＤＮＡの５′ｍＲＮＡ末端（ほとんどの場合ＣＡＰ依存）延長を可能にすることができる上記全長中間物からの逆トランスクリプターゼのための効率的なテンプレートとしての役割である。ＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドに相補的な配列はそれによって全長ｃＤＮＡの３′末端に付加することができる。
ｍＲＮＡのＣＡＰ構造への選択的結合にとって利点をもたらすことができるＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドの構造又は配列の修正も本発明の範囲内である。例えば、ひとつの修正はｍＲＮＡのＣＡＰ構造を結合させることができる蛋白質を有する共有結合で結合するＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドを含むこともできる（米国特許No.5,219,984参照）。
本発明は具体的には上記の方法の実施形態に関しており、ここでＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドは以下の式で示され：
5′-dN_1-dN_2-...dNm-rN_1-rN_2...rNn-3′
ここで、ｄＮはｄＡＭＰ，ｄＣＭＰ，ｄＧＭＰ及びｄＴＭＰから選択されるデオキシリボヌクレオチドを示し、ｍはゼロか又はゼロより大きく、好ましくは10～50の範囲の整数であり、ｒＮはＡＭＰ，ＣＭＰ、ＧＭＰ及びＵＭＰから選択されるリボヌクレオチド、好ましくはＧＭＰであり、ｎは１以上、好ましくは３～７の範囲の整数である。１～10ヌクレオチドのランダム・ヌクレオチド、ヌクレオチド類似物、あるいは異なったハプテン基（例えば、ビオチン、ジゴキシゲニン、及びフルオレスセインなど）との置換、一本鎖ＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチド配列５′－ｄN_1－ｄN_2...ｄＮｍ－ｒN_1－ｒN_2...ｒＮｎ－３′の延長を含む部分的に二重鎖の構成を有するＤＮＡを用いてのターミネータ・ヌクレオチド（例えば、３′－アミノＮＭＰ、３′－ホスフェートＮＭＰ、及び３′－フルオロ ＮＭＰ）の組み込み、制限サイトの組み込み、及びバクテリオファージＲＮＡポリメラーゼに関するプロモータ配列の組み込みなど、後でのｃＤＮＡの精製及びクローニングをしやすくしてくれるが、ＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドをテンプレートとして用いて逆トランスクリプターゼによる全長ｃＤＮＡのｍＲＮＡ ５′末端表現など未修正ＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドと同じ機能的活性を保持しているＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドの構造の修正におけるいくつかの自明で公知のものは本発明の範囲内である。
また、例えばＰＣＲ手順で用いるための本発明による新しいオリゴヌクレオチドを含んだライブラリ構成キットなどのｃＤＮＡライブラリ構成キットも本発明の範囲内である。
本発明はまた、本発明の方法に従って用いることができる新しいテンプレート切換えオリゴヌクレオチドにも関係している。
さらに、ひとつ、あるいは複数の容器に本発明のテンプレート切換えオリゴヌクレオチドを入れたキットも本発明の範囲に含まれる。
ＣＡＰ切換え技術：本発明による方法と素材は主にｃＤＮＡ合成における独特のＣＡＰ切

換えオリゴヌクレオチドの使用に基づいている。このｃＤＮＡ合成は高収率で全長ｄｓｃＤＮＡを発生するための第２のステップにおける第２鎖ｃＤＮＡ合成あるいはＰＣＲ増幅のいずれかと組み合わせられた逆トランスクリプターゼを用いポリＡ＋ＲＮＡから第１鎖ｃＤＮＡを合成するステップを含むこともできる。第１鎖ｃＤＮＡ合成反応混合物内に含まれた場合、ＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドは短い延長テンプレートをつくりだす。第１鎖ｃＤＮＡ合成の過程で、逆トランスクリプターゼ酵素はｍＲＮＡテンプレートの５′末端で停止する。この５′末端は通常すべての真核ｍＲＮＡの５′末端上に存在している７－メチルグアノシンＣＡＰ構造を含んでいる。そして、この酵素末端トランスフェラーゼ活性は少数の更に別のヌクレオチド、主にデオキシシチジンを新たに合成されたｃＤＮＡ鎖の３′末端に付加する。その３′末端にオリゴ（ｒＧ）配列を有するＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドはｃＤＮＡ鎖上に存在しているヌクレオチドのデオキシシチジンを大量に含んだ部分を有する塩基対で、延長テンプレートをつくりだす。そして、逆トランスクリプターゼはテンプレートを切換え、ＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドに対して相補的なｃＤＮＡの合成を引き続き行う。その結果できるｓｓ ｃＤＮＡはその３′末端にｍＲＮＡの完全な５′末端及びＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチド配列の両方と相補的な配列を組み込んでいる。

ここに、ドナーとして５′－キャップ全長ｍＲＮＡを、そしてアクセプタとして化学的に合成されたオリゴヌクレオチドを用いてのポリ（Ａ）＋ＲＮＡからの第１鎖ｃＤＮＡ合成の過程での効率的なテンプレート切換え反応を行わせることができるオリゴヌクレオチド構造（ＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチド）が認められる。全長ｃＤＮＡの３′末端にオリゴヌクレオチド配列を有するキメラ性ｃＤＮＡ生成物が遺伝子固有プライマとテンプレート切換えオリゴヌクレオチドの一部に対して相補的なプライマの組み合わせを用いた増幅（例えば５′－ＲＡＣＥ）によって明らかになった。本発明による、５′末端の任意の配列を、そして３′末端にランダム配列を有する一組のオリゴヌクレオチドは以下のポリヌクレオチド配列で示される。

CzR1 : 5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N)$_{12}$-3′

（配列ＩＤ番号１）

CzR2 : 5′-d(TGTAGCGTGAACACGACAGAA(N)$_{11}$)r(N)$_{1}$-3′

（配列ＩＤ番号２）

CzR3 : 5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA(N)$_{11}$)-3′

（配列ＩＤ番号３）

CzR4 : 5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAAGGATG(N)$_{8}$)r(N)$_{1}$-3′

（配列ＩＤ番号４）

Na21-N4 : 5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N)$_{4}$-3′

（配列ＩＤ番号５）

Na21-N8 : 5′-d(TGTAGCGTGAACACGACAGAA)r(N)$_{8}$-3′

（配列ＩＤ番号６）

Na21-N12 : 5′-d(TGTAGCGTGAACACGACAGAA)r(N)$_{16}$-3′

（配列ＩＤ番号７）

ここで、ｄ（）はデオキシリボヌクレオチド配列を示しており、（Ｎ）$_{11}$及び（Ｎ）$_{9}$はそれぞれ各塩基位置のランダム・デオキシリボヌクレオチド配列11あるいは９塩基長のｄＡＭＰ，ｄＧＭＰ，ｄＣＭＰ及びｄＴＴＰを示しており、ｒ（Ｎ）$_{1-16}$は各塩基位置でのランダム配列１～16塩基長のＡＭＰ，ＧＭＰ，ＣＭＰ及びＵＭＰを示している。

４つのヒトｃＤＮＡ（平滑筋α－アクチン、平滑筋γ－アクチン、シトスケリタルγ－アクチン及びトランスフェリン・リセプタと５′末端にキャップ構造を持っている、あるいは持っていないモデルＲＮＡ）の５′末端（５′－ＲＡＣＥ）の効率的な増幅と、そしてその後で行われる増幅生成物の配列分析に基づいて、非常に効率的なＣＡＰ依存テンプレート切換え反応を発生させるのに用いることができる保存性構造がオリゴヌクレオチドの３′末端に確認されている。このオリゴヌクレオチド配列も保存性及び非保存性領域の突然変異分析（追加的に分析されたＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチド、配列番号19～66参照）は最も効率的なＣＡＰ依存テンプレート切換えがその５′末端に任意の配列と３′末端の保存性オリゴ・リボ（Ｇ）配列を有する基本的なＤＮＡ－ＲＮＡキメラ性ＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドを用いた場合に達成されることを明らかにした。このオリゴヌクレオチドは以下の一般式で示され：

５′－ｄＮ$_{x}$－ｒＧ$_{y}$－３′

ここで、ｒＧ$_{y}$はオリゴｒＧ配列３～５塩基長を示している。オリゴｒＧ配列はＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドに関連した主要テンプレート切換え機能に関与している。上記任意のデオキシリボオリゴヌクレオチド配列はその後で行われるｃＤＮＡ合成及びクローニング・ステップのために有益になるように選択することができる。

加えて、テンプレート切換え反応は第１の鎖の逆転写中に未熟な段階で終端され、従ってｍＲＮＡ分子の５′末端に対して相補的な配列を持たないｃＤＮＡの場合と比較して、ｍＲＮＡの５′末端に相補的な配列を有するｃＤＮＡに対して最も高い効率を示す。ｍＲＮＡの５′末端のＣＡＰ構造の存在はテンプレート切換え反応にとっての必要条件ではなく、テンプレート切換え反応は５′末端上に存在するＣＡＰ構造を有するｍＲＮＡ上で合成された全長ＤＮＡ生成物に対して最も有効である。

テンプレート切換えオリゴヌクレオチドの構造の修正は本発明の範囲内にあると考えられる。特に、テンプレート切換え効率には影響を及ぼすが、しかしそのテンプレート切換えオリゴヌクレオチドが未修正テンプレート切換えオリゴヌクレオチドとほぼ同じ機能的活性を保持している修正、つまり、オリゴヌクレオチドをテンプレートとして用いた逆トランスクリプターゼによる全長ｃＤＮＡのＣＡＰ依存延長は本発明の意図する範囲内にある。修正オリゴヌクレオチドは未修正ＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドの代替物として用いることができる。以下のルールは本発明によれば有益であるこうした修正を要約して示している。

１ａ：より短い（１～２塩基）オリゴｒＧ３′末端配列、ひとつあるいは複数のｒＧ残基のｒＡ，ｒＣ又はｒＵとの置換、あるいはオリゴｒＧのオリゴｄＧとの置換はその塩基構造の効率を低下させ、より長め（７～９塩基）のオリゴｒＧ配列はテンプレート切換え効率にそれほどの影響は及ぼさない。

１ｂ：アミノ、ビオチン、ホスフェート、あるいはグリコシル各基によるリボース残基の３′－ＯＨ基での３′末端の修正はその後に行われるＰＣＲ増幅ステップ（ステップ３Ａ）でバックグランドを大幅に低下させる。

１ｃ：テンプレート切換えオリゴヌクレオチドの任意の部分の配列の変更、部分的なあるいは完全なデオキシリボヌクレオチドの制限サイトを含むリボヌクレオチドとの置換はテンプレート切換え効率に大きな影響は及ぼさない。そのテンプレート切換えオリゴヌクレオチドの３′末端でのより長めの任意の配列（約22～42塩基）の使用はテンプレート切換えの効率を低下させるが、より短めの配列（約15～17塩基）の使用はテンプレート切換えの効率をやや増大させるものの、後で行われるＰＣＲ増幅ステップ（ステップ３Ａ，３Ｃ）の効率を低下させる。

１ｄ：本開示で利点を受ける技術分野の当業者なら本発明のテンプレート切換えオリゴヌクレオチドの構造のの他の修正が容易に行えることはすぐ分かるであろう。これらの修正

はＣＡＰ依存テンプレート切換え反応の効率と特殊性を増大させることができる。例えば、アプテイマー（aptamer）（ランダム・オリゴヌクレオチド）選択技術（Kenanら、1994）を用いると、ｍＲＮＡ分子のＣＡＰ構造に効率的に結合するテンプレート切換えオリゴヌクレオチドの任意の部分のルボヌクレオチドあるいはデオキシリボヌクレオチドを見つけて、テンプレート切換え反応の効率を増大させることができる。ＣＡＰ構造に結合するテンプレート切換えオリゴヌクレオチドの親和性を増大させるために天然のヌクレオチドを修正ヌクレオチドと置換することで同じ結果を達成することができる。

キメラ性蛋白質－テンプレート切換えオリゴヌクレオチドはその蛋白質部分がＣＡＰ構造を認識し、それに結合するように構成することができ、それによってテンプレート切換えオリゴヌクレオチドの効率を向上させることができる。これらのキャップ結合蛋白質あるいは蛋白質部分は先行技術において公知であり、好ましくはＣＡＰ構造に対する抗体と真核性開始ファクター４Ｅ（ｅＩＦ－４Ｅ）を含んでいる。

本発明による方法及び素材を用いることのもうひとつの利点は先行技術で知られている通常のｃＤＮＡクローニング手順と共にこの新しい技術を用いることを可能にしてくれるこの手順の高度の柔軟性である。好適に、本発明は従来の手順で用いられている複数の酵素あるいは精製手順の必要性をなくすことができる。本発明は第１鎖ｃＤＮＡ合成の過程でｍＲＮＡ－ｃＤＮＡハイブリッドの５′末端へのテンプレート切換えオリゴヌクレオチドのＣＡＰに依存した自動的、及び直接的付加を行うことができるようにしてくれる。さらに、本発明による方法及び組成物はｃＤＮＡ合成及びクローニングのための技術で公知の手順と組み合わせることも可能である。個々のステップの順序やＣＤＳプライマの正確な構造、そしてｃＤＮＡライブラリ構成に用いられるベクターが変更可能であることは当業者には容易に分かるであろう。従って、ここに開示されているｍＲＮＡ分子の５′末端の完全な相補的ヌクレオチド配列を含んだ全長ｃＤＮＡあるいはｃＤＮＡフラグメントのクローニングを可能にしてくれる方法及び組成物の修正、置換、及び最適化は本発明の範囲に含まれる。以下にＲＮＡから全長ｃＤＮＡを効率的に発生させる好ましいステップのみについて述べる。

第１鎖ｃＤＮＡ合成：本発明の方法を従来の手順で用いることによって、ＤＮＡ合成プライマ：ｍＲＮＡを含むアニール化された複合体を逆転写のためのテンプレートとして用いることによって第１鎖ｃＤＮＡ合成を実行することができる。プライマの延長はその反応を行うのに必要な他の物質：例えば、デオキシリボヌクレオシド・トリホスフェートＡＴＰ，ＣＴＰ，ＧＴＰ及びＴＴＰ，Mg^{2+}、最適緩衝液などが十分に存在している条件の下で、逆トランスクリプターゼあるいはＤＮＡポリメラーゼ逆トランスクリプターゼ活性によって触媒することができる。逆トランスクリプターゼ活性を有する種々のＤＮＡポリメラーゼが第１鎖ｃＤＮＡ合成のために用いることができる。本発明による方法で用いることができるＤＮＡポリメターゼの実例としては高温菌及び古細菌、レトロウイルス、イースト、ニューロスポラ、ショウジョウバエ、霊長類、及びゲッ歯類などの生物から誘導されたＤＮＡポリメラーゼを含んでいる。好ましくは、ＤＮＡポリメラーゼはMoloneyマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）（米国特許No.4,493,531）あるいはＲＮaseＨ活性を欠いたＭ－ＭＬＶ逆トランスクリプターゼ（米国特許No.5,405,776）、ヒトＴ細胞白血病タイプＩ（ＨＴＬＶ－Ｉ）、仔ウシ白血病ウイルス（ＢＬＶ）、ロウス・サルコーマ・ウイルス（ＲＳＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）あるいはテルムス・アクアティカス（Ｔaq：Thermus aquaticus）あるいはテルムス・サーモフィラス（Ｔth：Thermus thermophilus）（米国特許No.5,322,770）から単離される。これらのＤＮＡポリメラーゼは生物自体から単離したものであってもよいし、いくつかの例では、市販のものを利用してもよい。本発明に従って用いた場合に有益なＤＮＡポリメラーゼはまたポリメラーゼをコード表現するクローンされた遺伝子を表現する細胞から得ることもできる。ｃＤＮＡ合成の開始物質としては、イースト菌及び植物や動物などの高等生物から得たポリ（Ａ）＋ＲＮＡまたは総ＲＮＡを用いることもできる。

本発明による方法の第１鎖ｃＤＮＡ合成ステップは反応混合物内に本発明によるテンプレート切換えオリゴヌクレオチドを含むこともできるが、第１鎖ｃＤＮＡ合成実行のための

必要な成分という訳ではない。テンプレート切換えオリゴヌクレオチドは第一鎖合成ステップの後に来るテンプレート切換えステップの最中に加えることができる。従って、テンプレート切換えオリゴヌクレオチド分子は第１鎖反応組成物内（例えば、ｃＤＮＡ合成プライマのＲＮＡへのアニーリング中、あるいはＲＮＡを逆トランスクリプターゼ活性を有する酵素と接触している時）に加えることができ、あるいは又、オリゴヌクレオチドは、第１鎖ｃＤＮＡ合成反応の過程、あるいはその終了後に加えることができる。

ｃＤＮＡクローニングのために用いられるべき戦略に基づいて、種々のｃＤＮＡ合成プライマ構造をポリ（Ａ）＋ＲＮＡをテンプレートとして用いた第１鎖ｃＤＮＡ合成のために用いることができ、さらに逆トランスクリプターゼ活性で触媒させることができる。ｃＤＮＡ合成プライマは一本鎖オリゴヌクレオチド、一本鎖部分を有する二本鎖オリゴヌクレオチド（Colecloughら、1985に述べられているようなプライマー制限－末端あるいはＰＲＥ、アダプタ）、あるいは一本鎖部分を有するｄｓベクターを示すベクター・プライマ（Okayamaら、1982）のいずれであっても良い。これら３つのケースのすべてで、ｃＤＮＡ合成プライマの一本鎖部分はポリ（Ａ）＋ＲＮＡとの結合及び第１鎖ｃＤＮＡ合成の開始に関与している。この方法のひとつの好ましい実施の形態においては、全長ｃＤＮＡライブラリ構成のために、プライマの３′末端にオリゴｄＴ末尾を含んだＣＤＳプライマがｍＲＮＡのポリ（Ａ）部分にアニールされる。５′ｃＤＮＡの急速な増幅あるいはクローニングのため、及び特定の遺伝子の選択的なクローニングのために、ＣＤＳプライマはクローンされるべき標的遺伝子の特定の配列に対応したランダム配列あるいは任意の配列を含んでいても良い。

本発明は特に上記の方法の実施の形態に関係しており、これらの実施の形態でＣＤＳプライマは以下のものにアニールされる。

１ａ．ポリ（Ａ）＋ＲＮＡのポリ（Ａ）末尾：このｃＤＮＡ合成プライマは一本鎖オリゴヌクレオチド、いずれかの部分が二本鎖になったＤＮＡフラグメント、あるいはいずれかの直線ベクター・プライマから選択することができる。ひとつの好ましい実施の形態で、オリゴヌクレオチド・プライマは配列：５′－ｄN_1－ｄN_2－...ｄＮｍ－ｄＴｎ－ｄN_1－ｄN_2...ｄＮｐ－３′を有しており、ここで、ｍは０以上、好ましくは０～20の整数を示し；ｎは８以上、好ましくは８～30の整数を示し；ｐは好ましくは０～３の範囲であり、ｄＮはｄＡＭＰ；ｄＣＭＰ，ｄＧＭＰ及びｄＴＭＰから選択され、あるいはそれらの代表的な混合物を示し；ｄＴはｄＴＭＰを示している。１～10のヌクレオチドを種々のハプテン基（ビオチン、ジオキシジェニン、フルオレスセインなど）を含んだヌクレオチド、ヌクレオチド類似物、リボヌクレオチド、非天然性ヌクレオチドとの置換、制限サイト、バクテリオファージＲＮＡポリメラーゼ・プロモータ領域の組み込みなど、後で行われる精製やｃＤＮＡの使用およびクローニングなどをし易くしてくれ、同時にプライマの主要活性、例えばポリ（Ａ）＋ＲＮＡのポリ（Ａ）部分からのプライミング活性を保持してくれるようなプライマの構造の修正は本発明の範囲に含まれる。部分的に二本鎖になったＤＮＡプライマあるいは上に述べたような一本鎖末尾配列５′－ｄN_1－ｄN_2...ｄＮｍ－ｄＴｎ－ｄN_1－ｄN_2－...ｄＮｐ－３′を有する線形プラスミド・ベクター、及びポリ（Ａ）＋ＲＮＡのポリ（Ａ）からの単一鎖ｃＤＮＡ合成に関するプライミング活性の使用も本発明の一部とみなされる。クローニング手順を単純化するために、ＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドはベクター・プライマの他の末端に取り付けることができる。この場合、ベクター・プライマはその一端にＣＤＳプライマに対応する配列を有しており、他端にはＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドを有することになる（ＣＡＰ切換えプライマ技術）。後で行われるｃＤＮＡ合成及び自動テンプレート切換えはOkayamaら、1982に述べられているように簡単にクローンできるｃＤＮＡ－ベクター・キメラ性生成物を発生させる。

１ｂ：ｍＲＮＡの内部非ポリ（Ａ）部分：これらのオリゴヌクレオチド・プライマは一般式ｄN_1－ｄN_2－．．．ｄＮｑで示され、ここでｄＮはｄＡＭＰ，ｄＣＭＰ，ｄＧＭＰ及びｄＴＭＰ、あるいはこれらの塩基のうちの２～４の混合物から選択されるデオキシリボヌクレオチドを示し，そしてｑは６以上、好ましくは６～50の範囲の整数を示す。これらのプライマはすべてのｍＲＮＡにアニールされるランダム配列、少なくとも１つの任意の

ｍＲＮＡにアニールされた任意の配列、あるいは少なくとも１つのｍＲＮＡに対して相補的な配列を持つことができる。また、これらのプライマの配列は後で行われる生成又はクローニング手順を容易に行うことができるようにするために制限サイトあるいは修正塩基（例えばビオチニル化されたもの）を含むことができる。

第２鎖ｃＤＮＡ合成及び／又はＰＣＲ増幅：ＣＡＰ切換え技術に基づく第１鎖ｃＤＮＡ合成はその３′末端にＣＤＳプライマが分岐し、さらにその５′末端でＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドが分岐した全長（あるいは全長フラグメントの対応する５′末端）ｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッド分子中間物を発生させる。こうした中間物は後で従来の手順を用いてクローニングを行うのに適したｄｓ　ｃＤＮＡ形態に簡単に転化することができる。これらの手順は公知であり、以下のステップを含んでいる。

1．　ｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッドのＣＤＳ及びＣＡＰ切換え部分に対応するＰＣＲプライマと有効量の他の試薬との組み合わせによるＰＣＲを行うのに必要な条件下での全長ｃＤＮＡの直接増幅。好ましくは、こうした条件とは長い核酸配列の増幅のために開発され、Cheng（国際特許（1995））及びBames（1995年７月25日付け米国特許No.5,436,149）に述べられている条件とする。

2．　基本的にはOkayamaら（1982）及びGublerら（1993）が述べているようなｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッドのｍＲＮＡ部分の第１鎖ｃＤＮＡとの置換。このプロセスはE.coli　ＲNase　Hなどのリボヌクレアーゼによる ＲＮＡの消化、ＤＮＡポリメラーゼＩの活性を有するＤＮＡポリメラーゼを用いての修復合成、そして結束などのステップを含んでいる。この手順は第１鎖ｃＤＮＡ合成に用いられるＣＤＳプライマの構造に依存している。第２鎖ｃＤＮＡ合成はテンプレートとしてｍＲＮＡ：ｃＤＮＡあるいはｍＲＮＡ：ｃＤＮＡベクター・キメラ性生成物を用い、第１鎖合成のためにベクター・プライマを用いて（ＣＡＰ切換えベクター・プライマ技術、上記参照）実行することができる。また、上に述べたＰＲＥアダプタ戦略によって発生されたｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッドは少なくともひとつの制限酵素でＰＲＥアダプタとＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドに対応する５′及び３′側鎖配列で消化して、同じ制限酵素で消化した通常のベクターに結束することができる。それがｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッドの内部での切断を行わない限り、どんな酵素でも用いることができる。

ベクターへのクローニング：ＰＲＥアダプタ戦略に基づいてベクター・プライマ（ＣＡＰスイッチーベクタープライマ）を用いる場合、第２鎖ｃＤＮＡ合成後に発生されるｄｓ　ｃＤＮＡがすでにそのｄｓ　ｃＤＮＡに挿入されており、このステップは必要としない。オリゴヌクレオチドＣＤＳプライマが用いられる場合、第２のステップでＰＣＲあるいはｍＲＮＡ置換戦略でっくられたｄｓ　ｃＤＮＡはアダプタと結束するか、あるいはＣＤＳ及びＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチド側鎖部分に対応する配列内で消化酵素によって消化し、それによって、同じ制限酵素によって消化した後にいずれかの従来のクローニング・ベクター（プラスミド、コスミド、ファージ、レトロウイルス・ベクターなどを含む）に結束されるｄｓ　ｃＤＮＡ分子を発生させることができる。

その後、全長ｃＤＮＡライブラリを含む遺伝子組換えＤＮＡ分子を全長ｄｓ　ｃＤＮＡの高頻度クローニング及びそれからの遺伝子組換え蛋白質の表現において有益な原核ホスト、及び場合によっては真核ホスト内に導入することができる。

本発明によってクローニングが行われると、通常の免疫アッセイでその生成物に対してつくられた標識化プローブ、モノクローナルあるいはポリクローナル抗体によって検出したり、例えば1994年８月９日付け国際特許ＷＯ95/04745でLiらによって述べられているハイブリダイゼーション選択方式で増幅させることができる。

要約：ｃＤＮＡ合成及びクローニングでのＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドの使用は全長ｃＤＮＡライブラリ構成の技術を大幅に単純化及び改善してくれる。主要な利点は以下の通りである。

1．　従来のＰＣＲに基づく標準ｃＤＮＡライブラリ構成技術のために必要なステップの数を大幅に減らしてくれる（５～７ステップを２～３ステップに減少）してくれる第１鎖ｃＤＮＡ合成と定義された配列のｃＤＮＡの３′末端への取り付けを含む１段階手順。ステ

ップ数が少なくなることは、本発明による新しい方法と物質が従来のｃＤＮＡ構成法より効率的で、より簡単であり、手間がかからず、そしてより生産性が高いことを意味している。

2．　本発明によれば、ＣＡＰ依存テンプレート切換えメカニズムは全長ｃＤＮＡを合成し、全長ｃＤＮＡを大部分含んだｃＤＮＡライブラリを発生させるためのかなり効率的な技術が可能になる。本発明による方法と物質はｃＤＮＡライブラリ内にクローンされるべき全長ｃＤＮＡを簡単に選択するための新しい方法を提供することができる。

ここで用いられている『全長相補的ＤＮＡ又はｃＤＮＡ；という用語はｍＲＮＡの５′末端の完全な配列情報を含む全長一本鎖（ｓｓ）あるいは二本鎖（ｄｓ）ｃＤＮＡ又はｃＤＮＡフラグメントを意味する。全長ｃＤＮＡは特定の（標的）ｍＲＮＡの５′末端、あるいは第１鎖ｃＤＮＡ合成のためのテンプレートとして用いられるポリＡ＋ＲＮＡの群全体の完全な配列情報を含むことができる。

ここで用いられている『全長ｃＤＮＡライブラリ』という用語はテンプレートとしてのポリＡ＋ＲＮＡから合成されたｓｓ又はｄｓ　ｃＤＮＡの群全体を意味している。全長ｃＤＮＡは先行技術で公知の種々の応用目的に用いることができ、さらにいずれかの適切なクローニング媒体にクローニングすることができ、そのクローニング媒体でホストを形質変換させることができる。

『テンプレート切換え』という用語はホスホジエチル結合によって相互に共有結合で結合されていない２つの連続的なテンプレートを用いてＤＮＡポリメラーゼによる相補的鎖のテンプレート依存合成のプロセスを意味している。この合成された相補的鎖は両方のテンプレートに相補的な単一の継続的鎖である。通常、第１のテンプレートはポリＡ＋ＲＮＡであり、第２のテンプレートはテンプレート切換え又は『ＣＡＰ切換え』オリゴヌクレオチドである。

ここで用いられている『任意の配列』あるいは『アンカー配列』とは天然又は修正ヌクレオチドの特定の配列を含むいずれかの定義された、あるいは予め選択したオリゴヌクレオチド、リボヌクレオチド、あるいは混合デオキシリボ／リボヌクレオチド配列を意味する。

ここで用いられている『ランダム配列』とは各ヌクレオチド位置にいずれかの天然または修正ヌクレオチドを含んだデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、あるいは混合デオキシリボ／リボヌクレオチド配列として定義されている。

ここで用いられている『全長アンカー化ｃＤＮＡ』は定義された任意の配列を３′末端に有する全長ｓｓ　ｃＤＮＡを意味している。

ここで用いられている『ｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッド』という用語はテンプレートとしてポリＡ＋ＲＮＡを用いた逆トランスクリプターゼによって触媒される第１鎖ｃＤＮＡ合成後の生成物を意味している。『ｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッド』は、そのｃＤＮＡ部分がテンプレートｍＲＮＡの５５′末端の完全な配列を含んでいれば全長である。

ここで用いられている『逆トランスクリプターゼ』という用語はテンプレートとしてポリＡ＋ＲＮＡあるいは総ＲＮＡを用いた第１鎖ｃＤＮＡ合成のために用いることがでいる逆トランスクリプターゼ活性を有するＤＮＡポリメラーゼを意味している。

ここで用いられている２つの配列は、それらの配列が相互にハイブリダイズして非平行（antiparallel）二本鎖核酸構造を形成することができる場合に『相補的』であるとされる。

ここで用いられている『ハプテン』という用語は核酸分子に結合され、他の分子、あるいは『結合リガンド』、例えば抗体、ストレプトアビジン及びビオチン、遷移金属、及び先行技術で公知の他のものによって認識及び結合されることができる分子を意味している。ハプテンの例としてはキレート基、ビオチン、フルオレッセイン、ジゴキシジェニン、抗原、及び先行技術で知られたその他のものを含む。

ここで用いられている『固体基質』という用語はいずれかの公知の方法で結合リガンドあるいはオリゴヌクレオチド／ポリヌクレオチド配列の不動態化のために用いることができる公知の基質を意味している。

ここで用いられている『レポータグループ』は従来の化学的あるいは酵素的ラベリング手順によって全長ｃＤＮＡに組み込まれた、そしてシンチレーション・カウンティング、オートラジオグラフィ、蛍光測定、熱量測定、光放出測定、及び先行技術で知られたその他の手段によって検出できるいずれかの基を意味している。
ここで用いられている『サブストラックテブハイブリダイゼーション』とはひとつのｃＤＮＡ群（テスター）内に存在しているが、別のｃＤＮＡ群（ドライバ）内にはそれ程豊富には存在しない、あるいは見いだされないｃＤＮＡ種が高度に増幅されて含まれているｃＤＮＡ群の回収を可能にしてくれる技術を意味している。サブストラックテブハイブリダジエーションの実例としては抑制サブストラックテブハイブリダイゼーション技術（Chenchikら、米国特許No.5,563,340）、表示相違分析（Wiglerら、米国特許No.5,436,142）、及びリンカー捕捉サブストラックション（Yangら、Anal．Biochem．237：109－114（1996））などを含んでいる。
ここで用いられている『ヌクレオチド類似物』はＤＮＡあるいはＲＮＡ内では通常見出されず、テンプレート切換え反応の効率を改善したり、あるいは発生されたアンカー化ｃＤＮＡの使用法を改善してくれるいくつかの追加的な特徴を有するヌクレオチドを指している。例えば、適切なヌクレオチド類似物はペプチド核酸、イノシン、５－ニトロインドール・デオキシリボフラノシル、５－メチルデオキシシトシン、及び５，６－ジヒドロ－５，６－ジヒドロオキシデオキシチミジンなど延期又は糖－ホスフェート基質の修正を含んでいる。当業者には他のヌクレオチド類似物も明らかであろう。
以下は本発明を実施するための手順を示す実施例である。これらの実施例は本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。すべてのパーセンテージは重量で表示されており、すべての混合比率は特に注意がない限り体積比である。
実施例１－ＣＡＰ切換え技術に基づく全長ｃＤＮＡの５′末端配列をクローニングするための好ましい方法
全長ｃＤＮＡの入手は遺伝子の特徴付けにおける最も重要で、往々にして最も困難な作業のひとつである。ｃＤＮＡライブラリ構成の伝統的な方法は通常部分的なｃＤＮＡフラグメントだけをつくりだす。コード表現配列の残りの部分を回収しやすくするために、ｃＤＮＡ末端（ＲＡＣＥ）を急速に増幅するためのイン・ビトロでの方法は1988年に提案された（Frohmanら、1988）。これまでいろいろな修正が行われているにも拘らず、現在のＲＡＣＥ技術は複雑で非効率的である。本発明による方法と物質は５′－ＲＡＣＥ手順を大幅に単純化し、より効率的にしてくれる方法を提供してくれる。図２はＣＡＰ切換え５′－ＲＡＣＥ手順を示すフロー・チャートを示しおり、好ましい手順を以下に述べる。例えば、第１鎖合成及びＰＣＲのための類似した酵素活性を有する他の酵素の使用、オリゴ（ｄＴ）プライマ及びＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドの他の配列の使用、第１鎖合成のためにオリゴ（ｄＴ）プライマの代わりに遺伝子固有プライマの使用など手順における自明の修正はすべて本発明の範囲内である。
ステップ１．第１鎖ｃＤＮＡ合成－テンプレート切換え手順
ｃＤＮＡ合成プライマ（オリゴｄ（Ｔ）プライマ）10pmol
CDS1：5′-d(TCTGAATTCAGCGGCCGC(T)$_{30}$-3′

（配列ＩＤ番号８）

（Ｖ＝Ｇ，Ａ又はＣ；Ｎ＝Ｇ，Ａ，Ｔ又はＣ）
及び50pmolのＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチド（ＣＳＯ１）：
CSO1：5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGGp)-3′

（配列ＩＤ番号９）

（ｐは３′ホスフェート基）
を５μｌの純水内で、混合物を70℃の温度下で２分間加熱し、その後氷上で２分間冷やして、１μｇのヒト胎盤ポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ Laboratories，Inc．Palo Alto，CA）にアニールした。その後、アニールされたプライマーＲＮＡを200単位のＭ－

ＮＬＶ　ＲNase　Ｈ－逆トランスクリプターゼ（SuperScriptII逆トランスクリプターゼ、Life Technologies）と混合して最終体積を10μｌとし、50mM　トリス塩酸（22℃でpH8.3）；75mM　ＫＣｌ；６mM　$MgCl_2$：１mM　ＤＴＴ；及びｄＡＴＰ，ｄＣＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＣＴＰ，及びｄＴＴＰを各１mMずつ含むようにした。第１鎖ｃＤＮＡ合成－テンプレート切換え反応はエア・インキュベータ内で42℃の温度下で1.5時間行われ、その後氷冷した。また、オリゴｄ（Ｔ）プライマの代わりにランダムｄ（Ｎ）$_6$プライマ（500ng）あるいはヒト・ベーター－アクチン抗センス遺伝子固有プライマ：

ACT1：5′-d(ACTCGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC)-3′

（配列ＩＤ番号10）

あるいはヒト・トランスフェリン・リセプタ抗センス遺伝子固有プライマ：

TFR1：5′-d(GTCAATGTCCCAAACGTCACCAGCGA)-3′

（配列ＩＤ番号11）

を有して第１鎖ｃＤＮＡを合成した。

その後、混合物を５mlの10mMトリシン－ＫＯＨ（22℃でpH8.5）及び0.1mM　ＥＤＡを加えて500倍に希釈し、氷上で冷却して、－20℃で保存した。

ステップ２．５′－ＲＡＣＥ　Advantage KlenTaqポリメラーゼ・ミックス（ＣＬＯＮＴＥＣＨ　Laboratories，Inc.）を用いてＰＣＲ増幅を行った。このキットはKlenTaq－１及びDeepVent　ＤＮＡポリメラーゼ（New England Bio Labs）、そしてTaqStart抗体（ＣＬＯＮＴＥＣＨ　Laboratories，Inc.）の混合物を含んでいる。TaqStart抗体は自動的ホット・スタートＰＣＲを可能にしてくれる。増幅は５μｌの希釈第１鎖ｃＤＮＡ；40mMトリシン－ＫＯＨ（22℃でpH9.2）；3.5mM　Mg（ＯＡｃ）$_2$；10mM　ＫＯＡｃ；75μg/ml　ＢＳＡ；ｄＡＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＣＴＰ及びｄＴＴＰを各200μM；ＣＡＰ切換えプライマ（ＣＳＰ１）、5′-d（CTAATACGACTCACTATAGGGC）-3′（配列ＩＤ番号12）及び遺伝子固有プライマ（ベーターアクチン又はトランスフェリン・リセプタに対するＧＳＰ１）各0.2μM、そして１μｌの50%KlenTaqポリメラーゼ・ミックスを含んだ50μｌ体積内で行われた。ＰＣＲ反応の温度パラメータは以下の通りであった：94℃で１分間、94℃で30秒間と72℃で５分間を５サイクル；そして94℃で30秒間と70℃で５分間を５サイクル；そして94℃で30秒間と68℃で５分間を25サイクル；そして68℃で最終延長が10分間。ＰＣＲ生成物は1.2%アガロース/ＥｔＢｒゲルを１×ＴＢＥ緩衝液に溶かしたもので検査した。ＤＮＡサイズ・マーカーとして１kb　ＤＮＡラッダー（Life Technologies）を用いた。

ヒト・ベーターアクチンとトランスフェリン・リセプタｃＤＮＡ　５′－ＲＡＣＥ反応の両方とも予想されたサイズの全長増幅５′－ＲＡＣＥ生成物に対応する単一バンドを発生する。その後で18のランダムに採り上げた５′－ＲＡＣＥクローンのクローニング及び配列分析の結果ベーターアクチン及びトランスフェリン・リセプタ５′末端フラグメントに対する同一性が裏づけられる。さらに、増幅された５′－ＲＡＣＥ生成物の５′末端配列はその後にＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドが続いた全長ベーターアクチン及びトランスフェリン・リセプタｍＲＮＡの配列と正確に対応している。この実施例はＣＡＰ切換え５′－ＲＡＣＥがｃＤＮＡの５′末端配列の増幅だけでなく、転写開始サイトの正確なマッピングにも効率的に使用できることを示している。

実施例２－全長ｃＤＮＡライブラリ構成のためのＣＡＰ切換えＰＣＲに基づく手法

本発明の方法と物質は10～100ngの総ＲＮＡをテンプレートとして用いたｃＤＮＡの構成のために有効に用いることができる。ヒト・バイオプシー組織、病原性微生物、異なった発展段階の組織などの10～50mgの『難しい』細胞からこの少量の総ＲＮＡを精製するために、先行技術で公知のいずれの従来の手順でも用いることができる。図３内のフロー・チャートはこの手順の主要ステップを示している。図３のいくつかの個別の、非基本的なステップ、ＣＤＳ構造の構造、ＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチド及びアダプタは全体的な手順の効率を変えないで変えることができる。例えば、アダプタ結束ステップ（ステップ３）の代わりに、ＰＣＲによって発生されたｄｓ　ｃＤＮＡはＣＤＳ及びＣＡＰ切換えオリ

ゴヌクレオチド側鎖部分に対応する配列内の稀少切断制限エンドヌクレアーゼによって消化し、ベクター内に直接クローンすることができる。また、ＴＡ－クローニング・ベクター、鈍化末端結束などのＰＣＲ生成物のための先行技術で公知の他の従来の手順もＣＡＰ切換え全長ｃＤＮＡライブラリのクローニングと発生のために用いることができる。本発明の方法及び物質の使用に基づく上記好ましいいずれのそうした変更も本発明の範囲内である。

ステップ１．第１鎖合成－テンプレート切換え　10pmolのｃＤＭＡ合成プライマ（オリゴｄ（Ｔ）プライマ）ＣＤＳ１；

5′-d(TCTAGAATTCAGCGGCCGC(T)$_{30}$VN)-3′

（配列ＩＤ番号８）

（ここで、Ｖ＝Ｇ又はＡ又はＣ；Ｎ＝Ｇ又はＡ又はＴ又はＣ）及び10pmolのＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチド（ＣＳＯ２）：

CSO2：5′-d(CTAATACGACTCATAGGGC)r(GGG)-3′

（配列ＩＤ番号13）

をその混合物を70℃の温度下で２分間加熱し、その後２分間氷冷して５μｌの純水中で100ngのヒト骨格筋総ＲＮＡ（ＣＬＯＮＴＥＣＫ　Laboratories, Inc.）にアニールした。第１鎖ｃＤＮＡ合成はそのアニールされたプライマーＲＮＡを200単位のＭ－ＭＬＶ　ＲＮase Ｈ－逆トランスクリプターゼ（SuperScriptII逆トランスクリプターゼ、Life Technologies）と混合して最終体積が50mM　トリス塩酸（22℃でpH8.3）；75mM　ＫＣｌ；6mM　$MgCl_2$；１mM　ＤＴＴ；及びｄＡＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＣＴＰ及びｄＴＴＰを含んで50μｌとなるようにすることによって開始された。第１鎖ｃＤＮＡ合成－テンプレート切換え反応はエア・インキュベータ内で42℃の温度下で1.5時間行われ、その後氷冷された。

ステップ２．ＰＣＲによる全長ｃＤＮＡの発生　Advantage Klen Taqポリメラーゼ・ミックス（ＣＬＯＮＴＥＣＨ　Labnoratories, Inc.）を用いて全長ｃＤＮＡのＰＣＲ増幅を行った。増幅は２μｌの第１鎖ｃＤＮＡ；40mMのトリシン－ＫＯＨ（22℃でpH9.2）；3.5mM　$Mg(OAc)_2$；10mM　ＫＯＡｃ；75μg/ml　ＢＳＡ；ｄＡＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＣＴＰ及びｄＴＴＰを各200μＭ；ＣＡＰ切換えプライマ（ＣＳＰ１）とＣＤＳ１プライマ１各0.2μM、そして１mlのKlentaqポリマー・ミックスを含んだ100μｌ体積中で行った。ＰＣＲ反応の温度パラメータは以下の通りであった。95℃で１分間、続いて95℃で15秒間と68℃で５分間を20～22サイクル；その後68℃で最終的延長を10分間。ＰＣＲ生成物は1.2％アガロース/ＥｔＢｒゲルを１×ＴＢＥ緩衝液に加えたものの中で検査した。ＤＮＡサイズ・マーカーとして１kb　ＤＮＡラッダー（Life Technologies）を用いた。

ステップ３．アダプタ結束　ＰＣＲステップで発生された50μｌのｄｓ　ｃＤＮＡを２μｌのプロティナーゼＫ（２mg/ml）と組み合わせて、45℃の温度下で１時間培養して、その後70℃の温度で10分間変性ステップを行った。その後、３μｌ（15単位）のＴ４　ＤＮＡポリメラーゼを反応混合物に加えて、さらに16℃の温度で30分間培養した。その後、半分の体積の４Ｍ酢酸アンモニウム（35μｌ程度）と3.7体積の95％エタノール（約260μｌ）を加えてｄｓ　ｃＤＮＡを沈殿させた。撹拌後、微量遠心分離装置内で20分間、14,000rpm内ですぐに遠心分離した。ペレットを撹拌せずに80％エタノールで洗浄して、上に述べたのと同様に10分間遠心分離した後、空気乾燥して、16μｌの純水内に溶解した。その後、16℃の温度で以下の条件下でｄｓ　ｃＤＮＡをアダプタに一昼夜かけて結束させた。16μｌのｄｓ　ｃＤＮＡ溶液、50mMトリス塩酸（22℃でpH7.8）、10mM　$MgCl_2$，１mM　ＤＴＴ，１mM　ＡＴＰ，５％ポリエチレン・グリコール（M. W. 8,000）、２μMのアダプタ、（Ａｄ１）：

Ad1：5′-d(AATTCGCGGCCGCGTCGAC)-3′

（配列ＩＤ番号14）

3′-d(GCGCCGGCGCAGCTGp)-5′

（配列ＩＤ番号15）

（ここでｐ＝３′ホスフェート基）、及び１単位のＴ４　ＤＮＡリガーゼ（Life Technologies）、総体積：30μｌ。その後、10mM　ＥＤＴＡを70μｌ加えて結束混合物を停止させた。このｄｓ　ｃＤＮＡを一度はフェノール／クロロホルム／イソアミル・アルコール（25：24：１、体積／体積）で、さらに一度クロロホルム／イソアミル・アルコール（24：１、体積／体積）で抽出して、その後３M酢酸ナトリウム10μｌと95％エタノール250μｌを加えて沈殿させた。撹拌した後、微量遠心分離装置内で20分間、14,000r.p.m. でチューブをすぐに遠心分離にかけた。ペレットは撹拌せずに80％エタノールで洗浄し、上に述べたのと同様に10分間遠心分離にかけ、空気乾燥させてから、20μｌの純水に溶解させた。アダプタ結束ｄｓ　ｃＤＮＡはその後37℃の温度で10分間、以下の条件下でホスホリル化した。最終体積30μｌ内にアダプタ結束ｄｓ　ｃＤＮＡ溶液20μｌ、50mMトリス塩酸（22℃でpH7.8）、10mM　$MgCl_2$，1mM　ＤＴＴ，１mM　ＤＴＴ，１mM　ＡＴＰ、30単位のＴ４ポリヌクレオチド・キナーゼ（Epicenter Technology）。その後、２μｌの0.2M　ＥＤＴＡを付加して、70℃の温度下で15分間熱不活性化させてホスホリル化反応を終わらせた。

ステップ４．ｃＤＮＡサイズ分留及びクローニング　前のステップで発生されたホスホリル化アダプタ結束ｄｓ　ｃＤＮＡを10mMトリス塩酸（pH7.4）、30mM　ＮａＣｌ，0.5mM　ＥＤＴＡで均衡させた1.2mlのSephacryl　S500　Ｏ（Pharmacia）ゲルろ過カラム上で分留した。これら分画内でのｃＤＮＡのサイズ分布を1.1％アガロース/ＥｔＢｒゲル・アガロースと１kb　ＤＮＡサイズ・マーカー（Life Technologies）を共に用いて分析した。0.5kbより長いｃＤＮＡサイズに対応する画分を一緒にプールして（総体積250μｌ）、1/10体積（25μｌ）の３M酢酸ナトリウム、1.5μｌの20mg/mlグリコーゲン及び2.5体積（400μｌ）の95％エタノールを加えて沈殿させた。

撹拌後、微量遠心分離装置内で20分間14,000r.p.mでチューブをすぐに遠心分離にかけた。ペレットを撹拌しないで80％エタノールで洗浄して、上に述べたのと同様に10分間遠心分離にかけ、その後15μｌの純水に溶解した。その後、ｄｓ　ｃＤＮＡを以下の条件下で一昼夜かけてλgt11　ＥｃｏＲＩベクター・アーム（ＣＬＯＮＴＥＣＨ　Laboratories, Inc.）に結束させた。総体積25μｌ中に５μｌのｄｓ　ｃＤＮＡ溶液、50mMトリス塩酸（22℃でpH7.8）、10mM　$MgCl_2$，１mM　ＤＴＴ，１mM　ＡＴＰ、５％ポリエチレン・グリコール（M. W. 8,000）、25μｇのλgt11　ＥｃｏＲＩアーム、及び2.5単位のＴ４　ＤＮＡリガーゼ（Life Technologies）。この結束混合物をその後、Sambrookら（1989）による実験室マニュアルに述べられているような標準手順でパッケージした。

本発明の方法及び物質を用いて発生されたライブラリの品質の高さを確認する目的で、挿入サイズを判定するため50の遺伝子組換えファージ・クローンをランダムに選択した。これら挿入物のサイズ分布は0.5～4.5kbの範囲で、2.0～3.0kbの範囲に最も集中しており、これはｃＤＮＡライブラリ構成のために用いられた総ＲＮＡ内の骨格筋ポリ（Ａ）＋ＲＮＡのサイズ分布に対応している。Delta Tth　ＤＮＡポリメラーゼ配列決定キット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ　Laboratories, Inc.）を用いて同じ50の挿入物を配列決定した。これらの配列のうちの10個はGenBankデータベースの検索で確認された。これらはトランスフェリン・リセプタ、リボソーム性蛋白質Ｌ７、ミオシン軽鎖２、ＬＩＭ領域蛋白質、ＡＴＰaseファクター６、チロクロームＣオキシダーゼ、シトスケリタルγ－アクチン、平滑筋α－アクチン及び平滑筋γ－アクチンであった。３つのｃＤＮＡに関しては、それらのクローンの配列はGenBankで発表されているものより長かった。７つのｃＤＮＡに関しては、それらの配列はキャップ・サイトから始まる全長ｍＲＮＡ配列に正確に対応していた。

これらのデータは本発明の方法と組成物が非常に高いレベルの全長ｃＤＮＡクローンを有する高品質ｃＤＮＡライブラリを発生させるためのｃＤＮＡライブラリ構成のために用いることができることを示している。

実施例３－ＰＲＥアダプター－プライマ戦略を用いてのＣＡＰ切換え全長ｃＤＮＡライブラリ構成

ＣＡＰ切換え法は先行技術で公知の標準的な従来の（ＰＣＲに基づかない）技術を有効に組み合わせることもできる。その結果、従来の手順はかなり単純化され、そして、ｃＤＮＡフラグメント・ライブラリではなく全長ｃＤＮＡが発生される。この実施例で、ｃＤＮＡ合成の開始物質として、ポリ（Ａ）＋ＲＮＡを用いた。図４のフロー・チャートは主としてColecloughら（1985）が述べた従来のＰＲＥアダプター－プライマ手順に基づいたＣＡＰ切換えｃＤＮＡライブラリ構成技術の主要ステップを示している。図４に示すような同様の酵素活性、ＣＤＳプライマ（ＰＲＥアダプタ・プライマ）、ＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチド及びベクターを有する酵素の選択、そしてクローニングに用いられる制限サイトの選択を本手順の有効性を変えないで変更できることは当業者には自明であろう。この手順におけるひとつの修正は先ず第２鎖合成（ステップ３）を実行して、その後制限消化を行い（ステップ２）、そしてベクターへのクローニング（ステップ４）を行う。別の修正では、制限消化（ステップ２）の代わりに実施例２で述べたアダプタ結束手順の使用を含めることができる。第１鎖ｃＤＮＡ合成（ステップ１）のためにＰＲＥアダプター－プライマの代わりにベクター・プライマを使用することも可能である。この場合、ベクター・プライマはひとつの末端に第１鎖合成を開始するためにオリゴｄ（Ｔ）配列を持つことができ、さらに別の末端に全長第１鎖ｃＤＮＡ合成が完了した後自動テンプレート切換えを行わせるためにＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチド配列を持つことができる。本発明による方法と物質を用いる好ましい手順におけるいずれのこうした変更も本発明の範囲内にある。

ステップ１．全長ｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッドの発生

10pmolのｃＤＮＡ合成プライマ（ＣＤＳ３）：

5′-d(TCTAGAATTCTCGAGGCGGCCGC(T)$_{30}$VN)-3′

（配列ＩＤ番号16）

3′-d(AGATCTTAAGAGCTCCGCCGGCG)-3′

（配列ＩＤ番号17）

（ここで、Ｖ＝Ｇ又はＡ又はＣ；Ｎ＝Ｇ又はＡ又はＴ又はＣ）及び10pmolのＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチド（ＣＳＯ３）：

5′-d(TGCTGCGAGAAGACGACAGAATTCGG)r(GGG)-3′

（配列ＩＤ番号18）

を12.5μｌの純水内で、70℃の温度下で加熱して５μｇのヒト骨格筋ポリ（Ａ）＋ＲＮＡ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ Laboratories, Inc.）にアニールし、その後氷上で２分間冷却した。その後、50mMトリス塩酸（22℃でpH8.3）、75mM ＫＣｌ，６mM $MgCl_2$，１mM ＤＴＴ及びｄＡＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＣＴＰとｄＴＴＰを各１mMずつ含む総体積25μｌ内で、アニールされたプライマＲＮＡを1000単位のＭ－ＭＬ Ｖ ＲNase Ｈ逆トランスクリプターゼ（SuperScriptII逆トランスクリプターゼ、Life Technologies）と混合することによって第１鎖ｃＤＮＡ合成－テンプレート切換えを開始した。この第１鎖ｃＤＮＡ合成－テンプレート切換え反応はエア・インキュベータ内で42℃の温度で1.5時間続けられてから、150μg/mlグリコーゲン、10mM ＥＤＴＡを合わせて75μｌ追加して停止させた。ｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッドは一度はフェノル／クロロフォルム／イソアミル・アルコール（25：24：１、体積／体積）、一度はクロロホルム／イソアミル・アルコール（24：１、体積／体積）で抽出され、その後半体積の４Ｍ酢酸アンモニウム（約40μｌ）と3.7体積の95％エタノール（約300μｌ）を加えて沈殿させた。攪拌後、チューブをすぐに微量遠心

分離装置内で20分間14,000r.p.mで遠心分離にかけた。ペレットを撹拌せずに80％エタノールで洗浄して、10分間程度遠心分離にかけてから、空気乾燥して、50μｌの純水中に溶解した。

ステップ２．制限消化　ステップ１で発生されたｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッドをＥｃｏＲＩ制限エンドヌクレアーゼによる非直接クローニングのために（直接クローニングに対してはＥｃｏＲＩ及びＮｏｔＩ又はＥｃｏＲＩ及びＸｈｏＩ）、50mMトリス塩酸（pH7.5）、100mM　ＮａＣｌ，10mM　$MgCl_2$，１mM　ＤＴＴ及び50単位のＥｃｏＲＩ制限エンドヌクレアーゼ（New England BioLabs）を含んだ100mlの反応混合物内で37℃の温度で１時間消化した。２mg/mlグリコーゲン、0.2M　ＥＤＴＡを合わせて５μｌを加えることでこの反応を停止した。

ＥｃｏＲＩ末端を有するｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッドを一度はフェノール／クロロホルム／イソアミル・アルコール（25：24：１、体積／体積）、一度はクロロホルム／イソアミル／アルコール（24：１、体積／体積）で抽出して、その後半体積の４Ｍ酢酸アセテート（約40μｌ）と3.7体積の95％エタノール（約300μｌ）を加えて沈殿させた。撹拌後、チューブをすぐに微量遠心分離装置内で20分間14,000r.p.mで遠心分離にかけた。ペレットを撹拌せずに80％エタノールで洗浄して、10分間程度遠心分離にかけてから、空気乾燥して、50μｌの純水中に溶解した。

ステップ３．ベクターへの結束　ＥｃｏＲＩで消化したｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッドはその後以下の条件下で16℃の温度で一昼夜かけてλgt11　ＥｃｏＲＩベクター・アーム（ＣＬＯＮＴＥＣＨ　Laboratories，Inc.）に結束させた。総体積20μｌ中に、50μｌのｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッド溶液、50mMトリス塩酸（22℃でpH7.8）、10mM　$MgCl_2$，１mM　ＤＴＴ，１mM　ＡＴＰ，５％ポリエチレン・グリコール（Ｍ．Ｗ．8,000）、25μｇのλgt11　ＥｃｏＲＩアーム、及び2.5単位のＴ４　ＤＮＡリガーゼ（Life Technologies）。

ステップ４．第２鎖ｃＤＮＡ合成　第２鎖ｃＤＮＡ合成は20μｌのベクター結束ｍＲＮＡ：ｃＤＮＡハイブリッド、20mMトリス　塩酸（22℃でpH7.5）、100mM　ＫＣｌ，10mM（$NH_4)_2SO_4$，0.15mM　β－ＮＡＤ，50μｇ/ml　ＢＳＡ，300単位/ml　Ｅ．coli　ＤＮＡポリメラーゼ１、12単位/ml　Ｅ．coli　ＲＮase　Ｈ及び60単位/ml　Ｅ．coli　ＤＮＡリガーゼを含む総体積100μｌ内で行われた。この反応混合物は16℃の温度下で1.5時間培養され、その後４μｌの２mg/mlグリコーゲン、0.2M　ＥＤＴＡを加えて反応を停止させた。ｄｓ　ｃＤＮＡは一度はフェノール／クロロホルム／イソアミル・アルコール（25：24：１、体積／体積）、一度はクロロホルム／イソアミル・アルコール（24：１、体積／体積）で抽出して、その後、半体積の４Ｍ酢酸アンモニウム（約35μｌ）と3.7体積の95％エタノール（約260μｌ）を加えて沈殿させた。撹拌後、チューブをすぐに微量遠心分離装置内で20分間14,000r.p.mで遠心分離にかけた。ペレットを撹拌せずに80％エタノールで洗浄して、10分間程度遠心分離にかけてから、空気乾燥して、50μｌの純水中に溶解した。

その後、全長ｃＤＮＡをSambrookら（1989）の実験室マニュアルに述べられている標準手順を用いてパッケージした。本発明による方法と物質を用いて発生されたライブラリの品質を確認するために、ＰＣＲに基づく技術に関して実施例２で行ったのと同じ品質管理実験を行った。全長ｃＤＮＡライブラリのサイズ分布と効率の高さは両方のライブラリに対して同様であった。

これらのデータは本発明の方法と組成物が非常に高いレベルで全長ｃＤＮＡクローンを含んだ高品質ｃＤＮＡライブラリを発生させるためにＰＲＥアダプタープライマ戦略に基づくｃＤＮＡライブラリ構成に用いることができることを示している。

実施例４．ＣＡＰ切換え技術を用いてのｄｓ　ｃＤＮＡ増幅のための好ましい方法とｃＤＮＡサブトラクションにおけるこのｄｓ　ｃＤＮＡの使用

本発明による方法と物質はナノグラム・レベルの総あるいはポリＡ＋ＲＮＡから高品質ｃＤＮＡをつくりだすためにも用いることができた。図１のフロー・チャート（ステップ１及び２）はこの手順の主要なステップを含んでいる。ＣＤＳプライマ、ＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチドの構造や異なった反応成分の添加時期などで手順全体の効率を変えなくて

も一定の修正が可能であることは当業者には明らかであろう。
本発明のひとつの実施の形態で、本発明の方法と物質によって増幅されたｄｓ ｃＤＮＡがｃＤＮＡ減算方法との組み合わせて用いられた。通常の方法でｃＤＮＡ合成のために総ＲＮＡが用いられた場合、リボソーム性ＲＮＡは、合成がオリゴ（ｄＴ）でプライムされた場合でもポリＡ＋ＲＮＡフラクションと共に転写される。このｃＤＮＡがｃＤＮＡ減算手順で用いられた場合、リボソーム性ＲＮＡの余剰分、ゲノム性ＤＮＡ及びポリＡ＋ＲＮＡフラクションに対応する低濃度のｃＤＮＡなどの不純物は減算的ハイブリダイゼーションの効率を低下させる。しかしながら、本発明の方法と物質によって発生されたｃＤＮＡは、総ＲＮＡが開始物質として用いられても減算的ハイブリダイゼーション手順のために直接用いることができる。ひとつの好ましい準実施の形態で、本発明の方法と物質によって増幅されたテスター及びドライバーｄｓ ｃＤＮＡは抑制減算的ハイブリダイゼーション技術（Chenchikら、米国特許No.5,565,340）との組み合わせで用いられた。例えば、Wiglerら（米国特許No.5,436,142）；Hampsonら（Nucl. Acids Res. 20：2899（1992））；Yangら（Anal. Biochem. 237：109－114（1996））；Balzerら（Nucl. Acids. Res. 22：2853－2854（1994））などによって述べられたその他の減算的ハイブリダイゼーション法もテスター及び／又はドライバーに対応し、本発明の訪欧で増幅されたｓｓ又はｄｓ ｃＤＮＡを用いて実施することができる。
ステップ１．第１鎖合成－テンプレート切換え 10pmolのｃＤＮＡ合成プライマ（オリゴｄ（Ｔ）プライマ）ＣＤＳ３：

5′-d(AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC(T)$_{30}$)-3′

（配列ＩＤ番号67）

及び10pmolのＣＡＰ切換えオリゴヌクレオチド（NalsmＧ３）：

5′-d(AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGC)r(GGG)-3′

（配列ＩＤ番号68）

を、５mlの純水中で、その混合物を70℃の温度下で２分間加熱して、２つの別個のチューブ内で各テスター及びドライバー総ＲＮＡ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ Laboratories, Inc.）内でアニールして、その後氷冷した。その後第１鎖ｃＤＮＡ合成を50mMトリス塩酸（22℃でpH8.3）、75mM ＫＣl，６mM $MgCl_2$，１mM ＤＴＴ、そしてｄＡＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＣ－ＴＰ及びｄＴＴＰ各１mMを含んだ最終体積10ml内で、上記のアニールされたプライマーＲＮＡを200単位のＭ－ＭＬＶ ＲＮase Ｈ－逆トランスクリプターゼ（SuperScriptII逆トランスクリプターゼ、Life Technologies）と混合することによって開始した。第１鎖ｃＤＮＡ合成－テンプレート切換え反応はエア・インキュベータ内で1.5時間、42℃の温度下で行われ、その後40mlのＴＥ緩衝液（10mMトリス［pH7.6］、１mM ＥＤＴＡ）を加えて希釈し、72℃の温度で７分間加熱した。
ステップ２．ｃＤＮＡ増幅
全長ｃＤＮＡのＰＣＲ増幅はAdvantage KlenTaqポリメラーゼ・ミックス（ＣＬＯＮＴＥＣＨ Laboratories, Inc.）を用いて行った。増幅は５mlの希釈された第１鎖ｃＤＮＡ，40mMトリシン－ＫＯＨ（22℃でpH9.2）、3.5mM Mg（ＯＡｃ）$_2$，10mM ＫＯＡｃ，75mg/ml ＢＳＡ，ｄＡＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＣＴＰ及びｄＴＴＰ各200mM，0.2mMのＰＣＲプライマ（Nalsm）：

5′-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3′

（配列ＩＤ番号69）

２mlのKlenTaqポリメラーゼ・ミックスを含む100ml体積内で行われた。ＰＣＲ反応の温度パラメータは以下の通りである。95℃で１分、その後に95℃で15秒と68℃で５分間を17～19サイクル、その後で68℃での最終延長10分間。ＰＣＲ生成物は１×ＴＡＥ緩衝液内に1.2%アガロース/ＥｔＢｒゲルを解かしたものの中で検査された。ＤＮＡサイズ・マーカーとして、１kb ＤＮＡラッダー（Life Technologies）を用いた。反応は２mlの0.5M ＥＤ

ＴＡを付加して停止した。
ステップ３．ｃＤＮＡの精製
それぞれ２つの試験管から組み合わせたテスター及びドライバーｃＤＮＡ生成物に等量のフェノール：クロロホルム：イソアミル・アルコール（25：24：１）を加える。よく撹拌する。その後、各フェーズを分離するために14,000rpmで10分間遠心分離にかける。最上（水性）層と取り除いて、それを清潔な1.5mlチューブ内に入れる。ｎ－ブタノール700mlを加え攪拌する。ブタノール抽出によりＰＣＲ生成物を40～70mlに濃縮することができる。その溶液を室温で14,000rpmで１分間遠心分離にかける。上部層（有機性ｎ－ブタノール）を取り除いて捨てる。40～70mlだけで反応を終了したくない場合は、同じ体積のｎ－ブタノールでブタノール抽出ステップを繰り返す。ゲルマトリックスを完全に再懸濁させるように0.75ml　ＣＨＲＯＭＡ　ＳＰＩＮ－1000（ＣＬＯＮＴＥＣＨ　Laboratories, Inc.）カラムを数回さかさまにする。カラムから一番上のキャップを取り除いて、その後下側のキャップを取り除く。カラムを1.5ml遠心分離管あるいは17×100mmチューブに入れる。チューブ内にすぐ集まるすべてのカラム緩衝液は捨てて、1.5mlの１×ＴＮＥ緩衝液（10mMトリス塩酸（pH8.0）、10mM　NaCl, 0.1mM　ＥＤＴＡ）を加える。緩衝液をカラム・マトリックス内でゲル・ビーズの表面が見えるまで重力でカラムから流れ出るようにする。サンプルをゲル・ベッドの平坦な表面に慎重に、そしてゆっくり与える。サンプルをカラムの内壁に沿って流れないようにする。25mlの１×ＴＮＥ緩衝液を加えて、その緩衝液がカラムから完全に流れ出るようにする。さらに150mlの１×ＴＮＥ緩衝液を加えて、カラムから完全に流れ出るようにする。カラムを清潔な1.5ml微量遠心分離管に移す。１×ＴＮＥ緩衝液を入れて、これを精製ｃＤＮＡフラクションとして回収する。精製されたｃＤＮＡフラクション内にＰＣＲ生成物が存在していることを確認するために、ステップ２で述べたようにアガロース/ＥｔＢｒゲル分析を行う。
ステップ４．ｃＤＮＡ減算
ＲｓａＩ消化とｃＤＮＡ減算をChenchikら（米国特許No.5,565,340）に詳しく述べられているように行う。
なお、ここに述べられている実施例と実施の形態は説明の目的のためだけに示されるものであって、種々の修正や変更は当業者にな明らかであろうし、さらに本願の精神と範囲内にあり、添付される特許請求の範囲にあるものである。

文　　献

Kimmel, A. R., S. L. Berger (1987) “Preparation of cDNA andGeneration of cDNA libraries : Overviews,” Meth. Enzymol.152 : 307－317.

Sonenberg, N., I. Edery, M. Altmann, 米国特許No.5,219,989、1993年６月15日発行。

Wu, R. 編集 (1987) 、Method in Enzymology, vol.152, Academic Press, pp.307－389.

Gulber, U., B. J. Hoffmann (1983) Gene 25 : 253－269.

OkayamaおよびBerg (1982) Mol. Cell. Biol. 2 : 161－170

Pruits, S. C, 国際特許出願No.89110816.9.

Edery, A. L. L Chu, N. Sonenberg, J. Pelletier (1995) Mol. Cell Biol. 15 : 3363－3371.

Maruyama, K, S. Sugano (1994) Gene 138 : 171－174.

Fromont-Racine, M., E. B. Pictet, T. Grande(1993) Nucl. Acids Res. 21 : 1683－1684.

Kato, S., S. Sekine, 国際特許公報No.0 625 572、A1. 1993年９月22日出願No.93921061;国際出願No.ＰＣＴ/ＪＰ93/01359.

Kato, S. (1984) Gene 150 : 243－250.

Telesnitsky, A., S. Guff (1993) Reverse Transcriptase (Skalka, A. M. 及びGoff, S. P編集) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Pring Harbor, New York, pp.49－83.

Kenan, D. J., D. E. Tsai, J. D. Keene (1994) Trends

Biochem. Sci. 19：57－64.

Coleclough及びErlits (1985) Gene 34：305－314.

Li, W. B., C. Gruner, J. Jessee, J. J. Lin, 国際特許出願№PCT/US94/09038, 広報№WO95/04745；出願日：1994年8月9日：開示日：1994年2月16日

Cheng S., 国際特許出願№95102114.9；公報№0 669 401 A2.

Barnes, W. M. 米国特許№5,436,149, 1995年7月25日発行

Fromann, M. A., M. K. Dush, G. R. Martin (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85：8998－9002.

Sambrok, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis (1989) Molecular Cloning：Laboratory Manual, Cold Spring Harbor LaboratoryPress, Cold Spring Harbor, NY.

Goff, S. P., Tanese N及びRoth, M. J. “Expression of enzymatically active transcriptase” 米国特許№4,943,531, 1990年7月24日発行.

Kotewics, M. L. 及びGerard, G. F. “CLonedgenes encoding reverse transcriptase lacking ＲＮＡＳＥ Ｈ activity”, 米国特許№5,405,776, 1995年4月11日発行。

Gelfand, D. H.“Reverse transcription with thermostable DNA polymerase - high temperature reverse transcription”, 米国特許№5,322,770, 1994年6月21日発行。

Li, W. B., Gruber, C. E. Jessee, J. A及びLin, J-J. “Method of nucleic sequence selection”, 米国特許№5,500,356, 1996年3月19日発行。

Ludwig, L. B. Method for preselting recombinant clones containing a specific nucleic acid sequence and subsequent transformation withpreselected clones, 米国特許№5,484,702, 1996年1月16日発行。

Chenchik, A., Diatchenko, L, Siebert, P., Lukianov, S., Lukianov, K. Gurskaya, N., Tarabykin, V. 及びSverdlow, E. Method for Suppressing DNA fragment Amplification During PCR, 米国特許№5,565,340, 発行日：1996年10月15日。

Wigler, M. 及びLisitsyn, N. Methods for Producing Probes Capable of Distinguishing Variant genomic Sequences, 米国特許№5,436,142, 発行日：1995年7月25日。

Hampson, I. N., Pope L., Cowling, G. J. 及びDexter T. M. (1992) Chemical crosslinking substraction (ＣＣＬＳ) : a new method for the generation of subtractive hybridization probes. Nucl. Acids. Res. 20：2899.

Yang, M. 及びSytkowski A. J., Cloning Differentially Expressed Genes by Linker Capture Subtraction. Anal. Biochem. 237：109－114.

Balzer, H. J. 及びBaumlein, H. An Improved Gene Expression Screen. Nucl. Acids Res. 22：2853－2854.

Keller, G. H. 及びManak, M. M. (1993) ＤＮＡ Probes. Background. Applications. Procedures. Second Edition. (Macmillan Publisher Ltd.) , Stockton Press, New York

Rosenberg, M., Debouck及びBergama, D. Differentially Expressed Genes in Healthy and Diseased Subjects. 国際特許№WO95/21944、国際公開日：1995年８月17日。

Radding, C. M., Honingberg, S. M., Weissman, S. Rigas, B., Wlcher, A. A. 及びWard, D. C. RecA Nucleoprotein Filament and Methods, 米国特許№4,888,274, 特許日：1989年12月19日。

配列のリスト

（１）一般情報

（ｉ）出願人情報：

出願人名称：クロンテック　ラボラトリーズ, インク.

街路住所：イースト　メドウ　サークル　1020

都市：パロ　アルト

州：カリフォルニイア

国：アメリカ合衆国

郵便番号：94303

電話番号：（415）424-8222 Fax：（415）424-1352

（ii）発明の名称：全長ｃＤＮＡクローニングの方法

（iii）配列の数：66

（iv）対応する住所

（Ａ）あて先：サリワンチック　アンド　サリワンチック

（Ｂ）街路：2421　エヌ. ダブリュ. 41スト　ストリート, スイート　エイ－１

（Ｃ）都市：ゲインズヴィル

（Ｄ）州：フロリダ

（Ｅ）国：アメリカ合衆国

（Ｆ）郵便番号：32606

（ｖ）コンピュータ読取方式：

（Ａ）メディア　タイプ：フロッピー　ディスク

（Ｂ）コンピュータ：アイビーエム　ピーシー　コンパティブル

（Ｃ）オペーレーティング　システム：ピーシーードス／エムエスードス

（Ｄ）ソフトウエア：パテントイン　リリース　#1.0, ヴァージョン　#1.25

（vi）現出願データ：

（Ａ）出願番号：アメリカ合衆国

（Ｂ）出願日：

（Ｃ）分類：

（viii）弁理士／代理人に関する情報：

（Ａ）氏名：サリワンチック, デービッド　アール.

（Ｂ）登録番号：31,794

（Ｃ）参考／処理番号：ＣＬ－７

（ix）電信電話情報：

（Ａ）電話：（904）375-8100

（Ｂ）ファックス：（904）372-5800

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１：CzR1

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N)$_{12}$-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．２：CzR2

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA(N)$_{11}$)r(N)$_{1}$-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．３：CzR3

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA(N)$_{11}$)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．４：CzR4

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAAGGATG(N)$_{8}$)r(N)$_{1}$-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．５：Na21-N4

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N)$_{4}$-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．６：Na21-N8

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N)$_{8}$-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．７：Na21-N12

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N)$_{12}$-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．８：CDS1：

5′-d(TCTAGAATTCAGCGGCCGC(T)$_{30}$VN)-3′

（ここで、ＶはＧ又はＡ又はＣ；ＮはＧ又はＡ又はＴ又はＣ）

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．９：CS01：

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGGp)-3′

（ここで、ｐは３′－リン酸基）

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１０：ＡＣＴ１：

5′-ACTCGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１１：ＴＦＲ１：

5′-GTCAATGTCCCAAACGTCACCAGAGA-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１２：ＣＳＰ１：

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１３：ＣＳＯ２：

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGG)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１４：Ａｄ１：

5′-d(AATTCGCGGCCGCGTCGAC)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１５：

3′-d(GCGCCGGCGCAGCTGp)-5′

（ここで、ｐは３′－リン酸基）

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１６：ＣＤＳ２：

5′-d(TCTAGAATTCTCGAGGCGGCCGC(T)$_{30}$VN)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１７：

3′-d(AGATCTTAAGAGCTCCGCCGGCG)-3′

（ここで、ＶはＧ又はＡ又はＣ；ＮはＧ又はＡ又はＴ又はＣ）

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１８：ＣＳＯ３：

5′-d(TGCTGCGAGAAGACGACAGAATTCGG)r(GGG)-3′

追加ＣＡＰスイッチ・オリゴヌクレオチド：

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．１９：Ｎａ２１-Ｇ

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(G)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．２０：Ｎａ２１-Ｇ３

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GGG)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．２１：Ｎａ２１-Ｎ４Ｇ３

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N$_4$G$_3$)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．２２：Ｎａ２１-ＧＣＧＧＣＮ４Ｇ３

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GCGGCN$_4$G$_3$)-3′

SEQ ID NO. 23 : Na21-GTAAG3

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GTAAG$_3$)-3′

SEQ ID NO. 24 : Na21-GATTG3

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GATTG$_3$)-3′

SEQ ID NO. 25 : Na21-TGTTG3

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(TGTTG$_3$)-3′

SEQ ID NO. 26 : Na21-CTAAG3

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(CTAAG$_3$)-3′

SEQ ID NO. 27 : Na21-GGTAG3

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GGTAG$_3$)-3′

SEQ ID NO. 28 : Na21-G2p

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GGp)-3′

SEQ ID NO. 29 : Na21-G3p

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GGGp)-3′

SEQ ID NO. 30 : Na21-G5p

5′-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GGGGGp)-3′

SEQ ID NO. 31 : Na21N-G3

5′-d(TGATGCGAGTAGACGACAGAA)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 32 : Na21N-G3p

5′-d(TGATGCGAGTAGACGACAGAA)r(GGGp)-3′

SEQ ID NO. 33 : Na21ND-G3p

5′-d(TGATGCGAGTAGACGACAGA)r(GGGp)-3′

SEQ ID NO. 34 : Na21B-G3p

5′-d(TACGATGCGAGTAGACGACAGAA)r(GGGp)-3′

SEQ ID NO. 35 : Na22-G3

5′-d(TGCTGCGAGAAGACGACAGAA)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 36 : Na22-G3p

5′-d(TGCTGCGAGAAGACGACAGAA)r(GGGp)-3′

SEQ ID NO. 37 : Na22M-G3

5′-d(TTGCTGGCAGAAGACGACAGA)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 38 : T7-G

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(G)-3′

SEQ ID NO. 39 : T7-G2

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GG)-3′

SEQ ID NO. 40 : T7-G3

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 41 : T7-G5

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGGGG)-3′

SEQ ID NO. 42 : T7-Gp

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(Gp)-3′

SEQ ID NO. 43 : T7-G2p

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGp)-3′

SEQ ID NO. 44 : T7-G3p

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGGp)-3′

SEQ ID NO. 45 : T7-G5p

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGGGGp)-3′

SEQ ID NO. 46 : T7-GCG

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GCG)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．47：T7-GCG2

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GCGG)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．48：T7-CG

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(CG)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．49：T7-DG

5′-d(CTAATACGACTCACTATA)r(GGGCG)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．50：T7-N9G3

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(N$_9$GGG)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．51：T7-GCG3

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GCGGG)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．52：T7-SUP1

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGCGCGGCCGCCCGGG)r(GCG3)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．53：T7-SUP2

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGG)r(GCG3)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．54：T7-G3-NH2

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGG-NH$_2$)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．55：T7-G3-BIO

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGG-BIO)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．56：T7-G3-GLY

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGG-GLY)-3′

（ここで、ＮＨ$_2$，ＢＩＯ及びＧＬＹは、それぞれ、リボース残基の３′位置に結合したアミノ、ビオチン及びグリセロール基）

SEQ ID NO. 57 : T7-GAG3p

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GAGGGp)-3′

SEQ ID NO. 58 : T7-GTG3p

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GTGGGp)-3′

SEQ ID NO. 59 : T7-GGAG2p

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGAGGp)-3′

SEQ ID NO. 60 : T7-GGTG2p

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGTGGp)-3′

SEQ ID NO. 61 : T7-GACG2p

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GACGGp)-3′

SEQ ID NO. 62 : T7-GATG2p

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GATGGp)-3′

SEQ ID NO. 63 : T7-GTTG2p

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GTTGGp)-3′

SEQ ID NO. 64 : T7-GAGTGp

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GAGTGp)-3′

SEQ ID NO. 65 : T7M-GGAG3p

5′-d(TCCTAATACGACTCACTATA)r(GGAGGGp)-3′

SEQ ID NO. 66 : T7-GAG3p

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GAGGGp)-3′

SEQ ID NO. 67 : CDS3

5′-d(AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC(T)$_{30}$)-3′

SEQ ID NO. 68 : NalamG3

5′-d(AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGC)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 69 : Nalam

5′-d(AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT)-3′

SEQ ID NO. 70 : Na21-Bio

5′-d(Bio-TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)-3′

SEQ ID NO. 71 : T7N

5′-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)-3′

SEQ ID NO. 72 : EXT7

5′-d(TGCCATCCTAATACGACTCACTA)-3′

SEQ ID NO. 73 : T7MFok

5′-d(CTAATACGACTCACGGATGGGC)-3′

SEQ ID NO. 74 : Na21N

5′-d(TGATGCGAGTAGACGACAGAA)-3′

SEQ ID NO. 75 : Na22

5′-d(TGCTGCGAGAAGACGACAGAA)-3′

SEQ ID NO. 76 : Na22M

5′-d(TTGCTGGCAGAAGACGACAGA)-3′

SEQ ID NO. 77 : Na21B

5′-d(TACGATGCGAGTAGACGACAGAA)-3′

SEQ ID NO. 78 : Fr1

5′-d(TGACCAGTGAGCAGAGTGACGA)-3′

SEQ ID NO. 79 : T3

5′-d(CCATCCAATTAACCCTCACTAAAGGGC)-3′

SEQ ID NO. 80 : Na1M

5′-d(AAGCAGAGGCAACAACGCAGA)-3′

SEQ ID NO. 81 : T7M2

5′-d(ACAAGACGAAGCACAAGAGGGC)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．８２：Na1M

5′-d(AAGCAGAGGCAACAACGCAGA)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．８３：T7T

5′-d(TTCCGCTTGTCTGCTGGGC)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．８４：RT7AS4

5′-d(CGTGCGGCCGCTTCGAG-NH_2)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．８５：3BPAS

5′-d(GAGCGGCCGCACGAG-NH_2)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．８６：RT7-G3

5′-r(CTAATACGACTCACTATAGGGCGGG)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．８７：RT7Fok-G3

5′-r(CTAATACGACTCACTATAGGGCGGATGGG)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．８８：RT7In3

5′-r(CTAATACGACTCACTATAGGGC)d(III)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．８９：RT7Un3

5′-r(CTAATACGACTCACTATAGGGC)d(UUU)-3′

（ここで、Ｉ，Ｕはそれぞれイノシン及びデオキシリボフラノシル－５－ニトロインドール・リン酸）

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．９０：Na1Sup2M

5′-(AAGCAGAGGCAACAACGCAGAGAGGGCAGCAGGCAGC)r(GGG)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．９１：RT7NS2M

5′-(AGACGAAGCACAAGAGGGCACGAGCGGCCGCACGGCG)r(GGG)-3′

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ．９２：RT7NSM-F

5′-(ATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCACGGCG)r(GGG-F)-3′

（ここで、Ｆはリボース残基の３′位置に結合したフルオロ基）

SEQ ID NO. 93 : Na1SMG3-F

5′-(AAGCAGAGTGCTAACAACGCAGAGTACGC)r(GGG-F)-3′

SEQ ID NO. 94 : T7-G3F

5′-(ATACGACTCACTATAGGGC)r(GGG-F)-3′

SEQ ID NO. 95 : T7-GCG3F

5′-(ATACGACTCACTATAGGGC)r(GCGGG-F)-3′

SEQ ID NO. 96 : T3-G3

5′-(ATTAACCCTCACTAAAGGGC)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 97 : T3-NSM

5′-(ATTAACCCTCACTAAAGGGCTCGAGCGGCCGCACGGCG)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 98 : Na1SM-GCG3

5′-d(AAGCAGTGGTATCAACGCAGACTAC)r(GCGGG)-3′

SEQ ID NO. 99 : Na1-GCG3

5′-d(AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT)r(GCGGG)-3′

SEQ ID NO. 100 : Na1Sup1

5′-d(AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTGGGCAGCAGGCA)r(GCGGG)-3′

SEQ ID NO. 101 : Na1M-G3

5′-d(AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGC)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 102 : Na1SMG3

5′-(AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGC)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 103 : Na1Sup1M

5′-d(AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTGGGCAGCAGCCAGC)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 104 : RT7NSM

5′-d(ATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCACGGCG)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 105 : RT7NS2

5′-d(ATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAG)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 106 : RT7Sup4

5′-d(ATACGACTCACTATAGGGCTCGGTCGGGCAGGCACGGCG)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 107 : 3BP-NSMT

5′-d(TTCCGCTTGTCTGCTGGGCTCGTGCGGCCGCTCGGCG)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 108 : RT7-NS3M

5′-d(AGACGAAGCACAAGAGGGCACGAGCAGCGGCACGGCG)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 109 : Fr-T30NN

5′-d(TGACCAGTGAGCAGAGTGACGAGTAC(T)$_{30}$VN)-3′

SEQ ID NO. 110 : T7-T30NN

5′-d(CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC(T)$_{30}$VN)-3′

SEQ ID NO. 111 : Bio-T7-T30NN

5′-d(Bio-AATACGACTCACTATAGGGC(T)$_{30}$VN)-3′

SEQ ID NO. 112 :

5′-d(TGCTGCGGAAGACGACAGAA)r(GGG)-3′

SEQ ID NO. 113 :

5′-d(TGCTGCGGAAGACGACAGAA)-3′

SEQ ID NO. 114 :

5′-d(AATTCGAGCGGCCGC(T)$_{30}$VN)-3′

（ここで、VはA，G又はC；及びNはA，G，C又はT）

【図１】

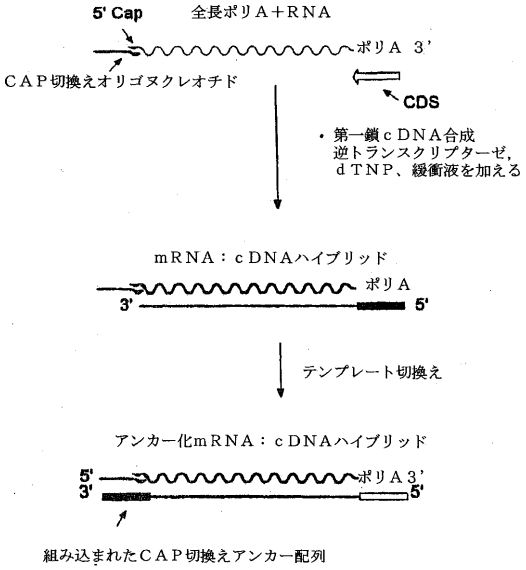


FIG. 1

【図２】

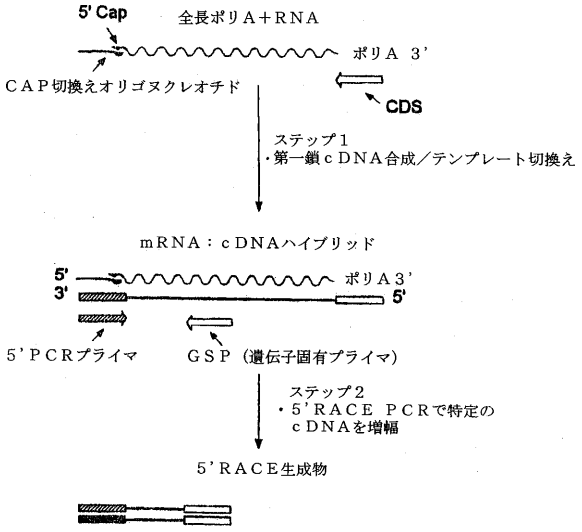


FIG. 2

【図３】

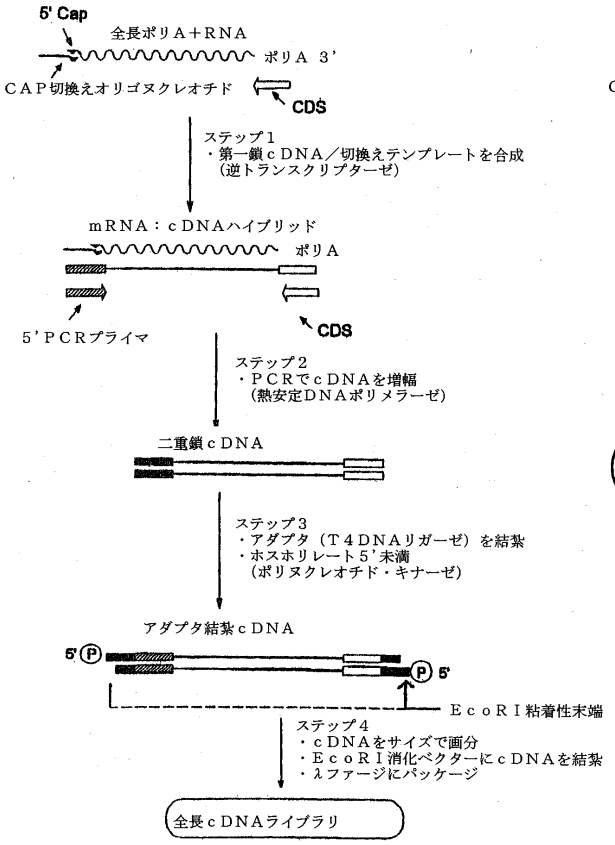


FIG. 3

【図４】

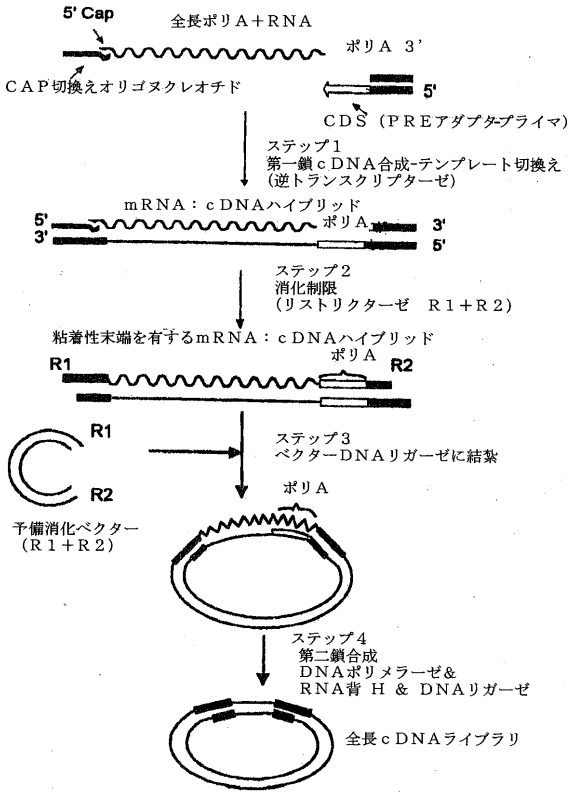


FIG. 4

フロントページの続き

(72)発明者 ディアチェンコ，リューダ
アメリカ合衆国 ９４３０６ カリフォルニア，パロ アルト ＃３０，サン アントニオ ロード ６７０
(72)発明者 シーバット，ポール
アメリカ合衆国 ９４０８６ カリフォルニア，サニベイル，チューラ ヴィスタ テラス １００５

審査官 引地 進

(56)参考文献 米国特許第５２１９９８９（ＵＳ，Ａ）
特開平６－１５３９５３（ＪＰ，Ａ）
EMBO J.，１９９５年，Vol.14，No.21，pp.5422-5432
Mol. Cell Biol.，１９９５年，Vol.15，No.6，pp.3363-3371
Nucleic Acids Res.，１９８８年，Vol.16，No.20，pp.9677-9686
PCR Methods & Applications，１９９３年，Vol.3，No.2，pp.95-99
Nuclec Acids Res.，１９９１年，Vol.19，No.19，pp.5227-5232
Proc. Natl. Acad. Sci. USA，１９９２年，Vol.89，No.20，pp.9823-9825

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12Q 1/00 - 1/70
C12N 15/00 - 15/90
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed
JSTPlus(JDream2)