

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5438320号
(P5438320)

(45) 発行日 平成26年3月12日 (2014. 3. 12)

(24) 登録日 平成25年12月20日 (2013. 12. 20)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 9/99 (2006. 01)	C 1 2 N 9/99
C 1 2 Q 1/48 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/48 Z

請求項の数 40 (全 68 頁)

(21) 出願番号	特願2008-534568 (P2008-534568)	(73) 特許権者	310009775
(86) (22) 出願日	平成18年9月29日 (2006. 9. 29)		アブライド バイオシステムズ リミテッ
(65) 公表番号	特表2009-509565 (P2009-509565A)		ド ライアビリティー カンパニー
(43) 公表日	平成21年3月12日 (2009. 3. 12)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カー
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/037829		ルズバッド バン アレン ウェイ 5 7
(87) 国際公開番号	W02007/041201		9 1
(87) 国際公開日	平成19年4月12日 (2007. 4. 12)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成21年9月28日 (2009. 9. 28)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/723, 383	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成17年10月3日 (2005. 10. 3)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸を増幅するための組成物、方法およびキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

D N A ポリメラーゼおよび D N A ポリメラーゼインヒビターを含む複合体であって、該 D N A ポリメラーゼインヒビターがヌクレオチド配列および少なくとも 2 つのクエンチャーを含み、該ヌクレオチド配列が第 1 の領域、第 2 の領域、第 3 の領域、および、任意選択的に第 4 の領域を含み、該第 1 の領域が該第 3 の領域に相補的であり、該第 1 の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第 3 の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第 1 の領域および該第 3 の領域がヌクレオチドアナログを含み、該第 1 の領域が第 1 のクエンチャーを含み、該第 2 の領域が第 2 のクエンチャーを含む、複合体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の複合体であって、該複合体はさらに、ヌクレオチド三リン酸 (N T P)、ヌクレオチドアナログ、または N T P およびヌクレオチドアナログを含む、複合体。

【請求項 3】

ヌクレオチド配列および少なくとも 2 つのクエンチャーを含む D N A ポリメラーゼインヒビターであって、該ヌクレオチド配列が第 1 の領域、第 2 の領域、第 3 の領域、および、任意選択的に第 4 の領域を含み、該第 1 の領域が該第 3 の領域に相補的であり、該第 1 の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第 3 の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第 1 の領域および該第 3 の領域がヌクレオチドアナログを含み、該第 1 の領域が第 1 のクエンチャーを含み、該第 2 の領域が第 2 のクエンチャーを含む、D N A ポリメラーゼインヒビター。

10

20

【請求項4】

請求項3に記載のDNAポリメラーゼインヒビターであって、前記ヌクレオチド配列が、5'-TC T G G G A T A (デアザー d A) T T (デアザー d A) T G G T A (デアザー d A) A T A T G (T n) C (デアザー d A) T A T T T A T T (デアザー d A) T A (デアザー d A) T T A T C-3'を含み、T nがT T、T T T、T T T T、T T T T T、またはT T T T T Tを含む、DNAポリメラーゼインヒビター。

【請求項5】

非特異的蛍光を減少させるための方法であって、

DNAポリメラーゼ、ヌクレオチド配列および少なくとも2つのクエンチャーを含むDNAポリメラーゼインヒビター、ヌクレオチド三リン酸(NTP)、標的核酸、プライマー、核酸色素、および、任意選択的に、ヌクレオチドアナログを含む反応組成物を第1の温度で形成する工程であって、該ヌクレオチド配列が第1の領域、第2の領域、第3の領域、および、任意選択的に第4の領域を含み、該第1の領域が該第3の領域に相補的であり、該第1の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第3の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第1の領域および該第3の領域がヌクレオチドアナログを含み、該第1の領域が第1のクエンチャーを含み、該第2の領域が第2のクエンチャーを含み、該ヌクレオチド配列が少なくとも1つの二本鎖セグメントを含み、該DNAポリメラーゼおよびDNAポリメラーゼインヒビターが会合して複合体を形成し、該少なくとも2つのクエンチャーが該DNAポリメラーゼインヒビターの該ヌクレオチド配列の二本鎖セグメントに会合した該核酸色素の蛍光を阻害する、工程と、

該反応組成物を第2の温度に加熱して該複合体を解離する工程と、

該反応組成物を少なくとも1つの増幅サイクルに供して複数のアンプリコンを生成する工程と、

該反応組成物中の複数のアンプリコンに会合した該核酸色素の蛍光を検出する工程とを含む、方法。

【請求項6】

標的核酸を増幅するための方法であって、

DNAポリメラーゼ、ヌクレオチド配列および少なくとも2つのクエンチャーを含むDNAポリメラーゼインヒビター、ヌクレオチド三リン酸(NTP)、標的核酸、プライマー、核酸色素、および、任意選択的に、ヌクレオチドアナログを含む反応組成物を第1の温度で形成する工程であって、該ヌクレオチド配列が第1の領域、第2の領域、第3の領域、および、任意選択的に第4の領域を含み、該第1の領域が該第3の領域に相補的であり、該第1の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第3の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第1の領域および該第3の領域がヌクレオチドアナログを含み、該第1の領域が第1のクエンチャーを含み、該第2の領域が第2のクエンチャーを含み、該ヌクレオチド配列が少なくとも1つの二本鎖セグメントを含み、該DNAポリメラーゼおよび該DNAポリメラーゼインヒビターが会合して複合体を形成し、該少なくとも2つのクエンチャーが該ヌクレオチド配列の二本鎖セグメントに関連した蛍光を阻害する、工程と、

該反応組成物を第2の温度に加熱して該複合体を解離する工程と、

該反応組成物を少なくとも1つの増幅サイクルに供して複数のアンプリコンを生成する工程と、

を含む、方法。

【請求項7】

ヌクレオチド配列および少なくとも2つのクエンチャーを含むDNAポリメラーゼインヒビターを含むキットであって、該ヌクレオチド配列が第1の領域、第2の領域、第3の領域、および、任意選択的に第4の領域を含み、該第1の領域が該第3の領域に相補的であり、該第1の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第3の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第1の領域および該第3の領域がヌクレオチドアナログを含み、該第1の領域が第1のクエンチャーを含み、該第2の領域が第2のクエンチャーを含む、キット。

【請求項8】

酵素および酵素インヒビターを含む複合体であって、該酵素インヒビターがヌクレオチド配列および少なくとも2つのクエンチャーを含み、該酵素および酵素インヒビターは、リガーゼおよびリガーゼインヒビター、RNAポリメラーゼおよびRNAポリメラーゼインヒビター、切断酵素および切断酵素インヒビター、ならびにヘリカーゼおよびヘリカーゼインヒビターからなる群より選択され、該ヌクレオチド配列が第1の領域、第2の領域、第3の領域、および、任意選択的に第4の領域を含み、該第1の領域が該第3の領域に相補的であり、該第1の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第3の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第1の領域および該第3の領域がヌクレオチドアナログを含み、該第1の領域が第1のクエンチャーを含み、該第2の領域が第2のクエンチャーを含む、複合体。

10

【請求項9】

ヌクレオチド配列および少なくとも2つのクエンチャーを含む酵素インヒビターであって、該酵素インヒビターは、リガーゼインヒビター、ヘリカーゼインヒビター、RNAポリメラーゼインヒビター、および切断酵素インヒビターからなる群より選択され、該ヌクレオチド配列が第1の領域、第2の領域、第3の領域、および、任意選択的に第4の領域を含み、該第1の領域が該第3の領域に相補的であり、該第1の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第3の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第1の領域および該第3の領域がヌクレオチドアナログを含み、該第1の領域が第1のクエンチャーを含み、該第2の領域が第2のクエンチャーを含む、酵素インヒビター。

20

【請求項10】

非特異的蛍光を減少させるための方法であって、

酵素、ヌクレオチド配列および少なくとも2つのクエンチャーを含む酵素インヒビター、標的核酸、プライマー、および核酸色素を含む反応組成物を第1の温度で形成する工程であって、該酵素は、リガーゼ、ヘリカーゼ、RNAポリメラーゼ、および切断酵素からなる群より選択され、該酵素インヒビターは、リガーゼインヒビター、ヘリカーゼインヒビター、RNAポリメラーゼインヒビター、および切断酵素インヒビターからなる群より選択され、該ヌクレオチド配列が第1の領域、第2の領域、第3の領域、および、任意選択的に第4の領域を含み、該第1の領域が該第3の領域に相補的であり、該第1の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第3の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第1の領域および該第3の領域がヌクレオチドアナログを含み、該第1の領域が第1のクエンチャーを含み、該第2の領域が第2のクエンチャーを含み、該ヌクレオチド配列が少なくとも1つの二本鎖セグメントを形成し、該酵素および酵素インヒビターが会合して複合体を形成し、該少なくとも2つのクエンチャーが該酵素インヒビターのヌクレオチド配列の二本鎖セグメントに会合した該核酸色素の蛍光を阻害する、工程と、

30

該反応組成物を第2の温度に加熱して該複合体を解離する工程と、

該反応組成物中の標的核酸を増幅して複数のアンプリコンを生成する工程と、

該反応組成物中の複数のアンプリコンに会合した該核酸色素の蛍光を検出する工程と、を含む、方法。

【請求項11】

標的核酸を増幅するための方法であって、

40

酵素、酵素インヒビター、標的核酸、および核酸色素を含む反応組成物を第1の温度で形成する工程であって、該酵素は、リガーゼ、ヘリカーゼ、RNAポリメラーゼ、および切断酵素からなる群より選択され、該酵素インヒビターは、リガーゼインヒビター、ヘリカーゼインヒビター、RNAポリメラーゼインヒビター、および切断酵素インヒビターからなる群より選択され、該酵素インヒビターがヌクレオチド配列および少なくとも2つのクエンチャーを含み、該ヌクレオチド配列が第1の領域、第2の領域、第3の領域、および、任意選択的に第4の領域を含み、該第1の領域が該第3の領域に相補的であり、該第1の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第3の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第1の領域および該第3の領域がヌクレオチドアナログを含み、該第1の領域が第1のクエンチャーを含み、該第2の領域が第2のクエンチャーを含み、該ヌクレオチド配

50

列が少なくとも1つの二本鎖セグメントを形成することができ、該酵素および該酵素インヒビターが会合して酵素－酵素インヒビター複合体を形成し、該少なくとも2つのクエンチャーが該ヌクレオチド配列の二本鎖セグメントに関連した蛍光を阻害する、工程と、
該反応組成物を第2の温度に加熱して該複合体を解離する工程と、
該反応組成物中の標的核酸を増幅して複数のアンプリコンを生成する工程と、
を含む、方法。

【請求項12】

ヌクレオチド配列および少なくとも2つのクエンチャーを含む酵素インヒビターを含むキットであって、該酵素インヒビターは、リガーゼインヒビター、ヘリカーゼインヒビター、RNAポリメラーゼインヒビター、および切断酵素インヒビターからなる群より選択され、該ヌクレオチド配列が第1の領域、第2の領域、第3の領域、および、任意選択的に第4の領域を含み、該第1の領域が該第3の領域に相補的であり、該第1の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第3の領域がヌクレオチドアナログを含むか、該第1の領域および該第3の領域がヌクレオチドアナログを含み、該第1の領域が第1のクエンチャーを含み、該第2の領域が第2のクエンチャーを含む、キット。

10

【請求項13】

前記ヌクレオチドアナログの少なくとも1つがジデオキシヌクレオチドである、請求項1または8に記載の複合体。

【請求項14】

前記ジデオキシヌクレオチドがddCである、請求項13に記載の複合体。

20

【請求項15】

前記少なくとも2つのクエンチャーが同一である、請求項1または8に記載の複合体。

【請求項16】

前記第1のクエンチャーおよび／または前記第2のクエンチャーがDABCYLである、請求項1または8に記載の複合体。

【請求項17】

前記DNAポリメラーゼインヒビターが5'オーバーハングを含む、請求項1に記載の複合体。

【請求項18】

前記DNAポリメラーゼインヒビターがステムーループ高次構造を形成する、請求項1に記載の複合体。

30

【請求項19】

前記ヌクレオチドアナログの少なくとも1つがジデオキシヌクレオチドである、請求項3に記載のDNAポリメラーゼインヒビター。

【請求項20】

前記ジデオキシヌクレオチドがddCである、請求項19に記載のDNAポリメラーゼインヒビター。

【請求項21】

前記少なくとも2つのクエンチャーが同一である、請求項3に記載のDNAポリメラーゼインヒビター。

40

【請求項22】

前記第1のクエンチャーおよび／または前記第2のクエンチャーがDABCYLである、請求項3に記載のDNAポリメラーゼインヒビター。

【請求項23】

前記DNAポリメラーゼインヒビターが5'オーバーハングを含む、請求項3に記載のDNAポリメラーゼインヒビター。

【請求項24】

前記DNAポリメラーゼインヒビターがステムーループ高次構造を形成する、請求項3に記載のDNAポリメラーゼインヒビター。

【請求項25】

50

前記ヌクレオチドアナログの少なくとも1つがジデオキシヌクレオチドである、請求項5、6、10および11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

前記ジデオキシヌクレオチドがddCである、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記少なくとも2つのクエンチャが同一である、請求項5、6、10および11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】

前記第1のクエンチャおよび／または前記第2のクエンチャがD A B C Y Lである、請求項5、6、10および11のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項29】

前記DNAポリメラーゼインヒビターが5'オーバーハングを含む、請求項5または6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

前記DNAポリメラーゼインヒビターがステムループ高次構造を形成する、請求項5または6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】

前記ヌクレオチドアナログの少なくとも1つがジデオキシヌクレオチドである、請求項7または12に記載のキット。

【請求項32】

前記ジデオキシヌクレオチドがddCである、請求項31に記載のキット。

20

【請求項33】

前記少なくとも2つのクエンチャが同一である、請求項7または12に記載のキット。

【請求項34】

前記第1のクエンチャおよび／または前記第2のクエンチャがD A B C Y Lである、請求項7または12に記載のキット。

【請求項35】

前記DNAポリメラーゼインヒビターが5'オーバーハングを含む、請求項7に記載のキット。

【請求項36】

前記DNAポリメラーゼインヒビターがステムループ高次構造を形成する、請求項7に記載のキット。

30

【請求項37】

前記ヌクレオチドアナログの少なくとも1つがジデオキシヌクレオチドである、請求項9に記載の酵素インヒビター。

【請求項38】

前記ジデオキシヌクレオチドがddCである、請求項37に記載の酵素インヒビター。

【請求項39】

前記少なくとも2つのクエンチャが同一である、請求項9に記載の酵素インヒビター。

【請求項40】

前記第1のクエンチャおよび／または前記第2のクエンチャがD A B C Y Lである、請求項9に記載の酵素インヒビター。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(分野)

本教示は、一般に、非特異的蛍光および望ましくない増幅産物を減少させながら核酸を増幅するための組成物、方法、およびキットに関する。

【背景技術】

【0002】

50

(導入)

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) および関連技術は種々の適用に非常に有用である一方で、深刻な問題として望ましくない副反応に起因する非標的核酸の増幅が生じ得る。かかる副反応は、非標的核酸の誤プライミングおよび／またはプライマーオリゴマー化 (時折、プライマー二量体形成と呼ばれる)、およびその後のこれらのプライミング人工物の増幅の結果として起こり得る。これは、特に、有意なバックグラウンド核酸を有する一方で、標的核酸のコピー数が少ない核酸混合物を使用して PCR を行う適用で当てはまる (例えば、非特許文献 1 を参照のこと)。非特異的に増幅した産物の生成は、少なくともその一部が、非特異的にアニーリングしたプライマーを伸長する周囲温度での DNA ポリメラーゼ活性に起因していた (例えば、非特許文献 1、非特許文献 2 を参照のこと)。したがって、周囲温度での DNA ポリメラーゼ活性の阻害は、二次アンプリコンの生成の調節で有益である。

10

【0003】

望ましくない二次増幅産物の形成を減少させるとされるいくつかの技術が記載されている。一定の「マニュアルホットスタート (manual hot start)」技術によれば、DNA ポリメラーゼ活性に極めて重要な成分 (例えば、2 価イオンおよび／または DNA ポリメラーゼ自体) を、混合物の温度が非特異的プライマーアニーリングを防止するのに十分に高くなるまで、反応混合物に添加しない (例えば、非特許文献 1 ; および非特許文献 3 を参照のこと)。労働集約性の低い技術は、少なくとも 1 つの増幅反応成分の物理的分離または可逆的不活化を使用する。例えば、マグネシウムおよび DNA ポリメラーゼを、ワックスビーズ中で配列決定する。このワックスビーズは反応温度の上昇につれて融解し、それによって高温でのみ配列決定した成分が放出される。他の技術によれば、DNA ポリメラーゼは、例えば、DNA ポリメラーゼの可逆的化学修飾または抗体の結合によって可逆的に不活化されるか修飾される (例えば、Birchらの特許文献 1 を参照のこと)。高い反応温度では、化学修飾が逆行するか、抗体分子が変性し、機能的 DNA ポリメラーゼが放出される。しかし、これらの技術のいくつかは、いくつかの DNA ポリメラーゼ活性がより低い反応温度で検出可能であるという点で漏出性があるようであるか、DNA ポリメラーゼを完全に活性化させるために高温で反応混合物を長期間曝露する必要がある。

20

【0004】

現在使用されている一定の核酸増幅技術は、核酸色素 (例えば、SYBR (登録商標) Green I (Molecular Probes, Eugene, OR) が含まれるが、これに限定されない) を含む増幅産物の検出および／または定量工程 (一定の実時間および／または終点検出技術が含まれる) を含む (例えば、非特許文献 4 を参照のこと)。典型的には、核酸色素は、増幅産物の二本鎖セグメントおよび／またはプライマーテンプレート二重鎖と会合し、特定の核酸色素に特徴的な波長の検出可能な蛍光シグナルを放射する。一定の増幅方法は、核酸産物を含む複数の増幅産物を評価するための検出工程 (例えば、融解曲線分析としても公知の PCR 後解離曲線分析が含まれるが、これらに限定されない) を含む。アンプリコンの融解曲線は特にその長さおよび配列に依存するので、アンプリコンを、一般に、その融解曲線によって識別することができる (例えば、非特許文献 5 を参照のこと)。解離曲線または融解曲線を、反応温度がアンプリコンの融点を通過する時の核酸色素の蛍光のモニタリングによって一定の増幅反応中に得ることができる。二本鎖アンプリコンの解離は、核酸色素に特徴的な放射波長の蛍光の突然の減少として認められる。一定の解離曲線分析技術によれば、融解曲線が単一の貫した融点を示し、時折、蛍光強度の負の微分値対温度 ($-dF/dt$ 対 T) のプロットのピークとしてグラフで示される場合、増幅産物を「純粋」と分類する。例えば、単回 (singleplex) シングルプレックス増幅由来のかかる解離曲線中の複数のピークの外観は、典型的には、望ましくない副反応産物の存在を示す。かかる核酸色素ベースの増幅産物の検出技術を使用する場合、しばしば、以下であることが望ましい: 1) 望ましくない副反応産物の形成を少なくとも減少させ、好ましくは排除すること、2) 他の核酸の二本鎖セグメ

30

40

50

ント（すなわち、非増幅産物）の変性に起因する蛍光ピークを少なくとも減少させ、好ましくは排除すること。

【0005】

一定の他の増幅技術でも、特に、プライマー、ライゲーションプローブ、切断プローブ、プロモータープライマーなどの非特異的アニーリング、および最適以下の温度でのその後の酵素活性によって望ましくない増幅産物を生じ得る。例えば、反応成分がしばしば室温で組み合わされるか、反応組成物が所望の反応温度に加熱される。これらの技術の少なくともいくつかは、バックグラウンド蛍光の減少から恩恵を受け得る。

【特許文献1】米国特許第5, 677, 152号明細書

【非特許文献1】Chouら、Nucl. Acids Res. (1992) 20:1717-1723 10

【非特許文献2】Liら、Proc. Natl. Acad. Sci. (1990) 87:4580

【非特許文献3】D'Aquilaら、Nucl. Acids Res. (1991) 19:3749

【非特許文献4】Ririeら、Analyt. Biochem. (1997) 245:154-60

【非特許文献5】Zhangら、Hepatology (2002) 36:723-28

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

20

【0006】

(要旨)

本教示は、非特異的蛍光および望ましくない増幅産物（時折、当該分野で二次アンプリコンまたは偽副産物と呼ばれる）を減少させながら標的核酸を増幅するための組成物、方法、およびキットに関する。

【0007】

ヌクレオチド配列およびクエンチャーを含む酵素インヒビターを開示する。開示のインヒビターを、酵素の少なくとも1つの酵素活性を阻害するようにデザインする。一部の実施形態では、酵素インヒビターのヌクレオチド配列は、アプタマーを含む。いくつかの実施形態では、酵素インヒビターは、少なくとも1つの二本鎖セグメントを形成することができるアプタマーを含む（例えば、Yakimovichら、Biochem. (Moscow) 68(2):228-35(2003); Nickensら、RNA 9:1029-33(2003); Nishikawaら、Oligonucleotides 14:114-29(2004); および Umeharaら、J. Biochem. 137:339-74(2005)を参照のこと）。いくつかの実施形態では、酵素インヒビターは、複数の異なるクエンチャーを含む。一部の実施形態では、酵素インヒビターは、第1の温度での少なくとも1つの二本鎖セグメントを含む高次構造を想定することができるが、第2の温度に加熱した場合、一本鎖または実質的に一本鎖である。一部の実施形態によれば、少なくとも1つの二本鎖セグメントを含む酵素インヒビターは、少なくとも1つのDNAポリメラーゼ（逆転写酵素が含まれるが、これに限定されない）、RNAポリメラーゼ、切断酵素（構造特異的ヌクレアーゼが含まれるが、これに限定されない）、ヘリカーゼ、およびリガーゼと複合体を形成することができる。一部の実施形態では、酵素インヒビターが遮断基（blocking group）、ヌクレオチドアナログ、非切断性ヌクレオチド間結合、またはこれらの組み合わせを含むので、酵素インヒビターは対応する酵素の無効な基質である。

30

40

【0008】

ヌクレオチド配列およびクエンチャーを含むDNAポリメラーゼインヒビターを開示する。いくつかのDNAポリメラーゼインヒビターは、同一のクエンチャーまたは異なるクエンチャーであり得る2つまたはそれを超えるクエンチャーを含む。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターは副溝結合剤（minor groove bind

50

er) をさらに含み、いくつかの実施形態では、クエンチャーを含む。いくつかの実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターのヌクレオチド配列の3'末端は、DNAポリメラーゼによって伸長できず、これは、典型的には、遮断基または非伸長ヌクレオチドの存在に起因する。いくつかの実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターのヌクレオチド配列は、少なくとも1つの二本鎖セグメントを形成することができるアダプターを含む(例えば、Yakimovichら、Biochem. (Moscow) 68(2): 228-35 (2003)を参照のこと)。

【0009】

酵素および酵素インヒビターを含む複合体を提供する。一定の複合体は、DNAポリメラーゼおよびDNAポリメラーゼインヒビター、リガーゼおよびリガーゼインヒビター、RNAポリメラーゼおよびRNAポリメラーゼインヒビター、切断酵素および切断酵素インヒビター、またはヘリカーゼおよびヘリカーゼインヒビターを含む。一定の複合体は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、アクセサリタンパク質(例えば、一本鎖結合タンパク質(SSB)または増殖性細胞核抗原(PCNA))が含まれるが、これらに限定されない)、またはこれらの組み合わせをさらに含む。典型的には、酵素-酵素インヒビター複合体は第1の温度で形成することができ、複合体中のインヒビターと会合する間に、酵素の少なくとも1つの酵素活性が阻害される。複合体が第2の温度に加熱される場合、複合体は解離し、酵素を放出する。

【0010】

一部の実施形態では、酵素-酵素インヒビター複合体は、DNAポリメラーゼおよびDNAポリメラーゼインヒビターを含む。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼ-DNAポリメラーゼインヒビター複合体は、ヌクレオチド三リン酸(NTTP)および/またはヌクレオチドアナログをさらに含む。一定の複合体は、DNAポリメラーゼ、および、任意選択的に、DNAポリメラーゼ、および、任意選択的に、NTTPおよび/またはヌクレオチドアナログに会合したステムループ高次構造でDNAポリメラーゼインヒビターを含む。一定の複合体の実施形態は、アニーリングして少なくとも1つの二本鎖セグメント、および、任意選択的に、NTTPおよび/またはヌクレオチドアナログを含む二重鎖を形成する少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むDNAポリメラーゼインヒビターに会合したDNAポリメラーゼを含む。典型的には、本教示のDNAポリメラーゼインヒビター、および、任意選択的に、NTTPおよび/またはヌクレオチドアナログと複合体化する場合に、DNAポリメラーゼのDNA合成活性は阻害される。

【0011】

本教示の酵素インヒビターを含む非特異的蛍光を減少する方法を開示する。一定の方法によれば、酵素を、酵素-酵素インヒビター複合体の形成に適切な条件下で酵素インヒビターと接触させる。酵素の少なくとも1つの酵素活性が粗害される一方で、酵素は複合体で存在する。酵素-酵素インヒビター複合体を適切な第2の温度に加熱する場合、複合体は解離し、酵素を遊離する。

【0012】

いくつかの非特異的蛍光の減少方法は、本教示のDNAポリメラーゼインヒビターを含む。一定のかかる方法によれば、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチド配列およびクエンチャーを含むDNAポリメラーゼインヒビター、NTTPおよび/またはヌクレオチドアナログ、標的核酸、プライマー、および核酸色素を含む反応組成物を、第1の温度で形成する。一部の実施形態では、プライマーはプライマー対を含む。第1の温度で、DNAポリメラーゼインヒビターは、少なくとも1つの二本鎖セグメントを含み、DNAポリメラーゼと複合体を形成することができる。DNAポリメラーゼインヒビターのクエンチャーは、DNAポリメラーゼインヒビターの二本鎖セグメントと会合した核酸色素の少なくともいくつかの蛍光シグナルを吸収することができる。反応組成物を、典型的には、DNAポリメラーゼインヒビターの融点付近、融点、または融点以上である第2の温度に加熱し、それにより、少なくともいくつかのDNAポリメラーゼインヒビター-DNAポリメラーゼ複合体が解離する。反応組成物を、少なくとも1サイクルの増幅に供し、複数のアンプリ

コンを生成する。二本鎖アンプリコンを、アンプリコンに会合した核酸色素の蛍光によって「実時間」または増幅反応が完了した後のいずれかで検出することができる一方で、DNAポリメラーゼインヒビターの二本鎖セグメントに会合した核酸色素の蛍光は、クエンチャーによって少なくとも減少する。

【0013】

本教示の酵素インヒビターを使用した標的核酸の増幅方法を開示する。一定のかかる方法によれば、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチド配列およびクエンチャーを含むDNAポリメラーゼインヒビター、NTP、標的核酸、プライマー、および核酸色素を含む反応組成物を、第1の温度で形成する。一部の実施形態では、プライマーはプライマー対を含む。第1の温度で、DNAポリメラーゼインヒビターは、少なくとも1つの二本鎖セグメントを含み、DNAポリメラーゼと複合体を形成することができる。DNAポリメラーゼインヒビターのクエンチャーは、DNAポリメラーゼインヒビターの二本鎖セグメントと会合した核酸色素によって少なくともいくつかの蛍光シグナルを吸収することができる。反応組成物を、典型的には、DNAポリメラーゼインヒビターの融点付近、融点、または融点以上である第2の温度に加熱し、それにより、少なくともいくつかのDNAポリメラーゼインヒビター-DNAポリメラーゼ複合体が解離する。反応組成物を、少なくとも1サイクルの増幅に供し、複数のアンプリコンを生成する。一部の実施形態では、アンプリコンの生成量は、反応組成物中のDNAポリメラーゼインヒビターの存在によって増加する。

10

【0014】

一定の方法によれば、反応組成物は、標的核酸、酵素、酵素インヒビター、核酸色素、ならびにNTP、ヌクレオチドアナログ、プライマー、ライゲーションプロブ対、切断プロブ対、プロモータープライマー、補因子（例えば、NAD⁺を含む物質が含まれるが、これに限定されない）、およびアクセサリタンパク質（PCNAおよび／またはSSBが含まれるが、これらに限定されない）のうちの少なくとも1つを含む。

20

【0015】

一定の方法によれば、リガーゼを適切な条件下でリガーゼインヒビターに接触させ、リガーゼ-リガーゼインヒビター複合体を形成する。一定の方法によれば、切断酵素を、適切な条件下で切断酵素インヒビターと接触させ、切断酵素-切断酵素インヒビター複合体を形成する。一定の方法によれば、ヘリカーゼを適切な条件下でヘリカーゼインヒビターと接触させ、ヘリカーゼ-ヘリカーゼインヒビター複合体を形成する。いくつかの方法によれば、RNAポリメラーゼを適切な条件下でRNAポリメラーゼインヒビターと接触させ、RNAポリメラーゼ-RNAポリメラーゼインヒビター複合体を形成する。

30

【0016】

一定の本方法を実施するためのキットも開示する。いくつかの実施形態では、キットは、ヌクレオチド配列およびクエンチャーを含む酵素インヒビターを含む。一部の実施形態では、キットは、2つまたはそれを超える酵素インヒビターを含む。いくつかの実施形態では、酵素インヒビターは、RNAポリメラーゼ、ヘリカーゼ、切断酵素、またはリガーゼと複合体を形成することができる。一定のキット実施形態は、切断プロブ組、ライゲーションプロブ組、プライマー、プロモータープライマー、またはこれらの組み合わせをさらに含む。

40

【0017】

一定のキット実施形態は、ヌクレオチド配列およびクエンチャーを含む少なくとも1つのDNAポリメラーゼインヒビターを含む。いくつかの実施形態では、キットは、2つまたはそれを超えるDNAポリメラーゼインヒビターを含む。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターは、副溝結合剤を含む。一定のキット実施形態は、プライマー、プライマー対、核酸色素、DNAポリメラーゼ、およびレポータープロブの少なくとも1つをさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、DNA依存DNAポリメラーゼおよび逆転写酵素を含む。

【0018】

50

本教示のこれらおよび他の特徴を、本明細書中に記載する。

【0019】

当業者は、下記の図面が例示のみを目的とすると理解するであろう。これらの図面は、決して本教示の範囲を制限することを意図しない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

(例示的实施形態の説明)

上記の一般的説明および以下の詳細な説明の両方が例示および説明のみを目的とし、本教示の範囲を制限することを意図しないと理解すべきである。本明細書中で使用される、用語「a」または「an」は、別な様に明確に示されない限り、少なくとも1つを意味する。本明細書中では、別なふうに明確に示されない限り、単数形を使用する場合、複数形が含まれる。例えば(制限されない)、「標的核酸」は、1つを超える標的核酸(例えば、特定の標的核酸種の1つまたは複数のコピーおよび標的核酸の2つまたはそれを超える異なる種)が存在することができることを意味する。また、「comprise」、「comprises」、「comprising」、「contain」、「contains」、「containing」、「include」、「includes」、および「including」は、制限することを意図しない。用語「および/または」は、この用語の前後の用語が一緒でも個別でもよいことを意味する。例示を目的として、「Xおよび/またはY」は、「X」もしくは「Y」または「XおよびY」を意味し得る。

【0021】

本明細書中で使用される節の見出しは、まとめることのみを目的とし、記載の対象を制限すると決して解釈すべきではない。本明細書中に引用して全ての文献(特許、特許出願、論文、書籍、および専門書が含まれるが、これらに限定されない)は、任意の目的のためにその全体が参照として明確に援用される。任意の援用された文献が本明細書中に定義の任意の用語と矛盾する事象では、本明細書に従う。本教示は種々の実施形態と併せて記載されているが、本教示はかかる実施形態に制限されることを意図しない。一方、当業者に認識されるように、本教示は、種々の変更形態、修正形態、および等価物を含む。

【0022】

2004年1月11日出願で、発明の名称が「Competitive Kinetic Nucleic Acid DNA polymerase Inhibitors」であるJohn W. Brandisの米国特許出願番号10/762,222号は、任意の目的のためにその全体が明確に参照として援用される。

【0023】

定義

用語「~の少なくともいくつかを吸収する」は、核酸色素から放射された蛍光シグナルに関して使用される場合、酵素インヒビターの1つまたは複数のクエンチャーの存在によって検出可能な蛍光の減少をいう。酵素インヒビターの二本鎖セグメントに会合した核酸色素によって放射された少なくともいくつかの蛍光を吸収は、酵素インヒビターがクエンチャーを含まないこと以外は同一の成分を含む反応組成物中の検出可能な蛍光と比較して、核酸色素に特徴的な放射波長の検出可能な蛍光が測定可能に減少することを意味する。いくつかの実施形態では、検出可能な蛍光の測定可能な減少は、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、または99%を超える蛍光の相対的減少を意味する。少なくとも1つのクエンチャーが蛍光クエンチャーを含む一部の実施形態では、核酸色素に特徴的な波長の検出可能な蛍光が測定可能に減少し、酵素インヒビターの少なくとも1つの蛍光クエンチャーの特徴的な放射波長の検出可能な蛍光が測定可能に増加し得る。

【0024】

本明細書中で使用される、用語「アンプリコン」および「増幅産物」は、一般に、増幅反応産物をいう。アンプリコンは、二本鎖または一本鎖であり得、二本鎖増幅産物の変性によって得られた分離成分の鎖が含まれ得る。いくつかの実施形態では、アンプリコンは

、ライゲーション産物（例えば、ライゲーションしたプローブが含まれるが、これに限定されない）、ライゲーション産物の少なくとも一部の相補物、またはその両方を含む。一部の実施形態では、1増幅サイクルのアンプリコンを、その後の増幅サイクルにおけるテンプレートとしての役割を果たし得る。

【0025】

用語「アニーリング」および「ハイブリッド形成」（基語の変化形である「ハイブリッド形成する」および「アニーリングする」が含まれるが、これらに限定されない）を交換可能に使用し、これらの用語は、二本鎖、三本鎖、または他の高次構造が形成されるある核酸の別の核酸とのヌクレオチド塩基対合相互作用を意味する。本教示のいくつかの実施形態では、アニーリングまたはハイブリッド形成は、ヘアピン構造またはステムループ構造を形成するための同一酵素インヒビターの少なくとも2つの領域中の少なくともいくつかのヌクレオチド間の相互作用をいい、時折、自己アニーリングと呼ばれる。一次相互作用は、典型的には、ヌクレオチド塩基特異的である（例えば、ワトソン-クリック水素結合およびフグスティーヌ水素結合によるA:T、A:U、およびG:C）。一部の実施形態では、塩基スタッキングおよび疎水性相互作用は、二重鎖の安定性にも寄与し得る。プライマーおよびプローブが相補配列にアニーリングする条件は当該分野で周知であり、例えば、Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, Hames and Higgins, eds., IRL Press, Washington, D. C. (1985) および Wetmur and Davidson, Mol. Biol. 31:349, 1968 に記載されている。一般に、かかるアニーリングが起こるかどうかは、特に、一定の酵素インヒビターの対応する第1および第3の領域および／または第4および第5の領域の相補部分、プライマーならびに標的隣接配列および／またはアンプリコン中のその対応する結合部位の相補部分、切断プローブまたはライゲーションプローブおよび標的核酸またはアンプリコンの対応する結合部分の相補部分、または対応する相補部分もしくはレポータープローブおよびその結合部位の長さ、pH、温度、1価および2価の陽イオンの存在、ハイブリッド形成領域中のGおよびCヌクレオチドの比率、培地の粘度、ならびに変性剤の存在に影響を受ける。かかる変動因子は、ハイブリッド形成に必要な時間に影響を与える。一定の酵素インヒビターの実施形態では、インヒビター、プローブ、および／またはプライマー中の一定のヌクレオチドアナログまたは副溝結合剤の存在もハイブリッド形成条件に影響を与える。したがって、好ましいアニーリング条件は、特定の適用に依存するであろう。しかし、当業者は、かかる条件を過度に実験することなく日常的に決定することができる。好ましくは、アニーリング条件プライマーおよび／またはプローブが対応する標的隣接配列またはアンプリコン中の相補配列と選択的にハイブリッド形成するが、第2の反応温度での反応組成物中の異なる標的核酸または非標的配列にいかなる有意な程度でもハイブリッド形成しないように選択する。

【0026】

用語「選択的にハイブリッド形成する」およびその変形形態は、適切なストリンジェンシー条件下で、所与の配列（例えば、プライマーが含まれるが、これに限定されない）がヌクレオチドの相補鎖を含む第2の配列（例えば、アンプリコンの標的隣接配列またはプライマー結合部位が含まれるが、これらに限定されない）とアニーリングするが、望ましくない配列（非標的核酸、プローブ、または他のプライマーなど）とアニーリングしないことを意味する。典型的には、反応温度が特定の二本鎖配列の融点にむかって上昇するにつれて、選択的ハイブリッド形成の相対量は一般に増加し、誤プライミングは一般に減少する。本明細書では、一方の配列が他方の配列にハイブリッド形成するか選択的にハイブリッド形成するという記述は、両配列の全体が相互にハイブリッド形成するか選択的にハイブリッド形成するという状況および配列の一方または両方の一部のみが他の配列の全体または他の配列の一部にハイブリッド形成するか選択的にハイブリッド形成するという状況を含む。

【0027】

本明細書中で使用される、用語「ストリンジェンシー」を、ハイブリッド形成中に存在する温度および溶媒の組成ならびに2つの相補ヌクレオチド配列から構成されるハイブリッドが形成されるその後の処理工程を定義するために使用する。ストリンジェンシーはまた、相同性、必要条件、および2つのヌクレオチド配列間に形成されたハイブリッドの安定性を定義する。ストリンジェンシー条件が高くなるにつれて、選択的ハイブリッド形成が好まれ、非特異的交差ハイブリッド形成が避けられる。ストリンジェンシー条件の増加は、典型的には、誤プライミング（ライゲーションプローブおよび／または切断プローブの誤アニーリングが含まれるが、これらに限定されない）が起こる可能性がより高いより低いストリンジェンシー条件と比較してより高いインキュベーション温度、より低い塩濃度、および／またはより高いpHに相当する。当業者は、プライマーまたはプライマー対、ライゲーションプローブ対、および／または切断プローブ対が対応する標的隣接配列および／またはアンプリコンに選択的にハイブリッド形成することができる適切なストリンジェンシー条件を、周知の技術を使用して、過度の実験を行うことなく日常的に決定することができることと理解している（例えば、PCR: The Basics from background to bench, McPherson and Moller, Bios Scientific Publishers (2000; 以下“McPherson”)を参照のこと）。

10

【0028】

本明細書では、一方の核酸配列が他方のヌクレオチド配列と同一であるか実質的に同一であるという記述は、両ヌクレオチド配列が他方の配列と同一であるか実質的に同一であるという状況および一方の配列の一部のみが他方の配列全体の一部と同一であるか実質的に同一であるという状況を含む。同様に、一方の核酸配列が他方のヌクレオチド配列と相補的であるか実質的に相補的であるという記述は、両ヌクレオチド配列が相互に相補的であるか実質的に相補的であるという状況および一方の配列の一部のみが他方の配列全体の一部と相補的であるか実質的に相補的であるという状況を含む。

20

【0029】

本明細書中で使用される、用語「アダプター」は、1) 典型的には、in vitro 選択プロセス（例えば、指数関数的富化によるリガンドの体系的評価（systematic evolution of ligands by exponential enrichment）（SELEX）プロセスまたはその変形形態が含まれるが、これらに限定されない）を使用して最初に同定され、2) 非常に特異的な高次構造依存様式で結合パートナー（例えば、酵素が含まれるが、これに限定されない）を認識して結合するDNAまたはRNAオリゴヌクレオチドをいう。

30

【0030】

本明細書中で使用される、用語「またはこれらの組み合わせ」は、この用語に先行する列举事項の全ての置換物および組み合わせをいう。例えば、「A、B、C、またはこれらの組み合わせ」は、A、B、C、AB、AC、BC、またはABCのうちの少なくとも1つを含むことを意図し、特定の文脈で順序が重要である場合、BA、CA、CB、ACB、CBA、BCA、BAC、またはCABも含むことを意図する。この例の連続物で明らかに含まれるのは、1つまたは複数の用語の連続物（BB、AAA、AAB、BBC、AAABCC、CBBAAA、およびCABABBなど）を含む組み合わせである。当業者は、文脈から明らかでない限り、典型的には、任意の組み合わせ中のこの用語の数に制限はないと理解するであろう。

40

【0031】

本明細書中で使用される、用語「相補的な」および「相補性」を、塩基対合規則によって関連する少なくとも2つの核酸に関して使用する。例えば（制限されない）、配列「A-C-T」は、配列「T-G-A」に相補的である。塩基対合規則にしたがってヌクレオチドのいくつかのみが適合する場合、相補性は部分的であり得る。そうでなければ、核酸間には完全または全体的に相補的であり得る。核酸鎖間の相補度は、核酸鎖間のハイブリッド形成の有効性および強度に対して有意な影響を及ぼす。相補性は、安定な二重鎖の形成

50

に完全に必要ではない（すなわち、安定な二重鎖はミスマッチした塩基対または非適合塩基を含み得る）。当業者は、多数の変動因子（核酸の長さ、核酸の塩基組成および配列、イオン強度、ならびにミスマッチした塩基対の発生率が含まれるが、これらに限定されない）を考慮して、二重鎖安定性を経験的に決定することができる。核酸二重鎖の安定性を、典型的には、その融点によって測定する。

【0032】

本明細書中で使用される、用語「複合体」および「酵素インヒビター-酵素複合体」は、本教示の酵素インヒビターと対応する酵素との間の会合をいう。いくつかの実施形態では、酵素インヒビター-酵素複合体は、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、リガーゼ、切断酵素、またはヘリカーゼを含む。用語「阻害する（inhibit）」、「阻害する（inhibits）」、およびその変形形態は、酵素に関して使用する場合、相対語であり、同一の増幅条件であるが酵素インヒビターの非存在下の酵素活性と比較した酵素活性の測定可能な減少をいう。一部の実施形態では、酵素インヒビターと複合体化した場合、酵素インヒビターの存在下および非存在下における並行した増幅反応で生成された所望のアンプリコンの量によって決定した場合、酵素の酵素活性は、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または99%を超えて減少する。一部の実施形態では、複合体がアクセサリタンパク質、NTP、ヌクレオチドアナログ、NAD+を含む物質、またはこれらの組み合わせをさらに含む場合、至適に阻害される。

10

【0033】

本明細書中で使用される、用語「対応する」は、この用語が関連するエレメント間の少なくとも1つの特異的關係をいう。例（制限されない）は以下である：特定のプライマー対の少なくとも1つの順方向プライマーが同一のプライマー対の少なくとも1つの逆方向プライマーに対応すること、少なくとも1つのプライマーが対応する標的核酸の隣接領域および／または少なくとも1つの対応するアンプリコンのプライマー結合部分とアニーリングするようにデザインすること、ライゲーションプローブ組の第1のプローブがライゲーション部位の上流、典型的にはこの部位に隣接した標的核酸および／またはアンプリコンにアニーリングすること、対応する第2のライゲーションプローブがライゲーション部位の下流、典型的にはこの部位に隣接した標的核酸および／またはアンプリコンにアニーリングすること、一定の酵素インヒビターの実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドは、対応する第2のオリゴヌクレオチドとアニーリングして、少なくとも1つの二本鎖セグメントを含む二重鎖を形成することなど。

20

30

【0034】

本明細書中で使用される、用語「変性する（denaturing）」および「変性（denaturation）」は、二本鎖ポリヌクレオチド（少なくとも1つの標的核酸を含むgDNAフラグメント、二本鎖アンプリコン、または少なくとも1つの二本鎖セグメントを含むポリヌクレオチド（例えば、酵素インヒビターが含まれるが、これに限定されない）が含まれるが、これらに限定されない）を、必要に応じて、第1の温度で二本鎖ポリヌクレオチドまたは一本鎖もしくは実質的に一本鎖のポリヌクレオチドに変換する任意のプロセスをいう。酵素インヒビターの二本鎖ポリヌクレオチドまたは二本鎖セグメントには、酵素インヒビターの二本鎖核酸または二本鎖セグメントを一本鎖または実質的に一本鎖にする種々の熱技術および化学的技術（例えば、二本鎖ポリヌクレオチドまたは2つのオリゴヌクレオチドを含む二重鎖からの2つの各一本鎖成分の放出が含まれるが、これらに限定されない）が含まれるが、これらに限定されない。当業者は、使用される変性技術は、一般に、変性技術が増幅反応のその後のアニーリングもしくは酵素的工程、または、一定の方法では、蛍光シグナルの検出を実質的に妨害しない場合、制限されない。

40

【0035】

本明細書中で使用される、用語「二本鎖」は、その長さの少なくとも一部に沿ってハイブリッド形成した1つまたは2つの核酸鎖をいう。従って、一定の文脈では、「二本鎖」は、オリゴヌクレオチドの第1の領域の少なくとも1つのセグメントが同一のオリゴヌ

50

レオチドの第3の領域の少なくとも1つのセグメントにハイブリッド形成するか、オリゴヌクレオチドの第4の領域の少なくとも1つのセグメントがそのオリゴヌクレオチドの第6の領域の少なくとも1つのセグメントにハイブリッド形成するか、またはその両方によって1つまたは複数の二本鎖セグメントおよび1つまたは複数の一本鎖部分を形成するように折り畳むことができる1つのオリゴヌクレオチドの一部をいうことができる。したがって、1つのヌクレオチド鎖は、二本鎖および一本鎖のセグメントを有するヘアピンまたはステムループ高次構造を形成することができる（例えば、図1を参照のこと）。同様に、2つの相補オリゴヌクレオチドが相互にハイブリッド形成して、二本鎖を形成することができる（例えば、図2を参照のこと）。したがって、「二本鎖」は、核酸が完全に二本鎖でなければならないことを意味しない。むしろ、二本酸核酸は、1つまたは複数の一本鎖セグメントおよび1つまたは複数の二本酸セグメントを有し得る。

10

【0036】

用語「第1の温度」は、酵素-酵素インヒビター複合体を形成することができる温度（しばしば、温度範囲）をいう。用語「第2の温度」は、酵素-酵素インヒビター複合体が解離するかこれを形成しない温度（しばしば、温度範囲）をいう。当業者が認識するように、第2の温度は、典型的には、酵素インヒビターが少なくとも1つの二本鎖セグメントを含む高次構造を担うために、酵素インヒビターのT_m未満である。例示的な第1の温度は、周囲温度、すなわち「室温」であり得る。

【0037】

本明細書中で使用される、用語「T_m」を、融点に関して使用する。融点は、二本鎖核酸分子集団が半分に解離して一本鎖になる温度である。

20

【0038】

「マイクロ流体デバイス」は、少なくとも1つのマイクロチャネル（一般に、内部の寸法が1mm以下である）を含む反応容器である。マイクロ流体デバイスは、典型的には、非常に小さな反応体積（しばしば、およそ1または数マイクロリットル（ μL ）、ナノリットル、またはピコリットル）を使用する。当業者は、マイクロ流体デバイスのサイズ、形状、および組成が本教示を制限しないと認識している。むしろ、開示の方法の1つまたは複数の工程の実施において、任意の適切なマイクロ流体デバイスを使用することができる。例示的マイクロ流体デバイスおよびその使用の説明は、特に、Fiorini and Chiu, *BioTechniques* 38:429-46 (2005); Kelly and Woolley, *Analyt. Chem.* 77(5):96A-102A (2005); Cheuk-Wai Kanら, *Electrophoresis* 25:3564-88 (2004); および Yeunら, *Genome Res.* 11:405-12 (2001)に見出すことができる。

30

【0039】

本明細書中で使用される、用語「副溝結合剤」は、時折、配列特異的様式で二本鎖DNAの副溝に適合する小分子をいう。一般に、副溝結合剤は、三日月のような形状を取り、それにより、二重らせんの副溝にぴったり適合し、しばしば水を置換する長くて平坦な分子である。副溝結合剤分子は、典型的には、自由にねじれる結合によって連結されたいくつかの芳香環（フラン環、ベンゼン環、またはピロール環が含まれるが、これらに限定されない）を含む。

40

【0040】

本明細書中で使用される、用語「誤プライミング（mis-priming）」または「誤プライミングされた（mis-primed）」は、非標的核酸へのプライマーまたはプローブのハイブリッド形成をいう。当該分野で公知のように、プライマー（ランダムプライマーを除く）を、一般に、標的核酸に隣接する選択された配列またはアンプリコンのプライマー結合部位にハイブリッド形成し、その部位でDNA合成またはプライマー伸長が指示されるようにデザインする。しばしば低いまたは低下したストリンジェンシー条件下でプライマーまたはプローブが非標的核酸にハイブリッド形成し、次いで、その非標的部位からのプライマー伸長のための開始点としての機能を果たし、一定の所望の二次増

50

幅産物が合成される場合に誤プライミングが起こり得る。ライゲーションプローブ対および切断プローブ対はまた、しばしば低いまたは低下したストリンジェンシー条件下で非標的核酸に誤アニーリングし得、それにより、望ましくない増幅産物も形成され得る。

【0041】

本明細書中で使用される、用語「非伸長ヌクレオチド」は、ポリメラーゼによって他のヌクレオチドを実質的に付加することができないヌクレオチドをいう。いくつかの実施形態では、非伸長ヌクレオチドは、別のヌクレオチドとのホスホジエステル結合の形成のための至適な官能基を持たないヌクレオチドアナログである。一部の実施形態では、非伸長ヌクレオチドは、本質的にプライマー伸長できない鎖終結ヌクレオチド（例えば、ジデオキシヌクレオチド（ddNs）（ddA、ddC、ddG、ddl、ddT、およびddUなど）である。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは、非伸長ヌクレオチドに他のヌクレオチドを結合することができるが、低速である。

10

【0042】

用語「非特異的」または「バックグラウンド」は、蛍光に関して使用する場合、所望のアンプリコン以外の二本鎖核酸に会合した核酸色素分子から放射された検出可能なシグナルをいう。所望のアンプリコンは、標的核酸の増幅産物を含み、いくつかの実施形態では、これらには、特に、標準化および／または定量的ために本教示の一定の反応組成物に含まれ得る内部標準またはコントロール配列が含まれる。したがって、偽二次アンプリコンとの核酸色素分子の会合、しばしば、誤プライミング、誤ライゲーション、および／またはプライマー二量体形成の結果に起因する蛍光シグナルは、非特異的蛍光の1つの原因である。当業者は、本教示の酵素インヒビターが、核酸色素分子が会合することができる第1の温度で少なくとも1つの二本鎖セグメントを含む場合、インヒビターのクエンチャー部分が会合した核酸色素（バックグラウンドの第2の供給源）由来のいくつかの検出可能な蛍光シグナルを吸収し得るので、反応組成物の非特異的蛍光が減少すると認識している。

20

【0043】

時折、窒素塩基または窒素複素環塩基と呼ばれる、用語「ヌクレオチド塩基」は、ヌクレオチド成分としての機能を果たし得る置換または非置換芳香環をいう。一部の実施形態では、芳香環は窒素原子を含む。一部の実施形態では、ヌクレオチド塩基は、相補ヌクレオチド塩基とワトソン-クリック水素結合またはフーグスティーン水素結合を形成することができる。例示的ヌクレオチド塩基およびそのアナログには、天然に存在するヌクレオチド塩基であるアデニン、グアニン、シトシン、5-メチルシトシン、ウラシル、およびチミン、ならびに天然に存在するヌクレオチド塩基のアナログ（7-デアザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザー8-アザグアニン、7-デアザー8-アザアデニン、N6-Δ2-イソペンテニルアデニン（6iA）、N6-Δ2-イソペンテニル-2-メチルチオアデニン（2ms6iA）、N2-ジメチルグアニン（dmG）、7-メチルグアニン（7mG）、イノシン、ネブラリン、2-アミノプリン、2-アミノ-6-クロロプリン、2,6-ジアミノプリン、ヒポキサンチン、プソイドウリジン、プソイドシトシン、プソイドイソシトシン、5-プロピニルシトシン、イソシトシン、イソグアニン、2-チオピリミジン、6-チオグアニン、4-チオチミン、4-チオウラシル、O⁶-メチルグアニン、N⁶-メチルアデニン、O⁴-メチルチミン、5,6-ジヒドロチミン、5,6-ジヒドロウラシル、ピラゾロ[3,4-D]ピリミジン（例えば、米国特許第6,143,877号および同第6,127,121号、ならびにPCT公開出願WO 01/38584号を参照のこと）、エテノアデニン、インドール（ニトロインドールおよび4-メチルインドールなど）、およびピロール（ニトロピロールなどが含まれる）が含まれる。ヌクレオチド塩基の非限定的な例を、例えば、Fasman, Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, pp. 385-394, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1989)、およびその参考文献に見出すことができる。

30

40

【0044】

50

本明細書中で使用される、用語「ヌクレオチド」は、ヌクレオシドのリン酸エステル（例えば、三リン酸エステル）をいい、最も一般的なエステル化部位はペントースのC-5部位に結合した水酸基である。用語「ヌクレオチド」はまた、一般に、文脈から明らかでない限り、ヌクレオシドおよびヌクレオチドの両方を含む化合物組をいうために使用される。本明細書中で使用される、用語「ヌクレオシド」は、糖（リボース、アラビノース、キシロース、ピラノース、およびこれらの糖アナログなど）のC-1'炭素に結合したヌクレオチド塩基を含む化合物をいう。糖は、置換されていても置換されていても良い。置換リボース糖には、1つまたは複数の炭素原子（例えば、2'-炭素原子）が1つまたは複数の同一または異なる-R基、-OR基、-NR₂アジド基、シアニド基、またはハロゲン基（式中、各Rは、独立して、H、C₁~C₆アルキル、C₂~C₇アシル、またはC₅~C₁₄アリールである）に置換されたリボースが含まれるが、これらに限定されない。例示的リボースには、2'-(C₁~C₆)アルコキシリボース、2'-(C₅~C₁₄)アリールオキシリボース、2', 3'-ジデヒドロリボース、2'-デオキシ-3'-ハロリボース、2'-デオキシ-3'-フルオロリボース、2'-デオキシ-3'-クロロリボース、2'-デオキシ-3'-アミノリボース、2'-デオキシ-3'-(C₁~C₆)アルキルリボース、2'-デオキシ-3'-(C₁~C₆)アルコキシリボース、および2'-デオキシ-3'-(C₅~C₁₄)アリールオキシリボース、リボース、2'-デオキシリボース、2', 3'-ジデオキシリボース、2'-ハロリボース、2'-フルオロリボース、2'-クロロリボース、および2'-アルキルリボース（例えば、2'-O-メチル）、4'-α-アノマーヌクレオチド、1'-α-アノマーヌクレオチド、2'-4'-および3'-4'-結合および他の「ロックド(locked)」または「LNA」、二環式糖修飾物が含まれるが、これらに限定されない（例えば、PCT公開出願番号WO98/22489号、WO98/39352号、およびWO99/14226号；Braasch and Corey, Chem. Biol. 8:1-7, 2001；ならびに米国特許第6,268,490号を参照のこと）。「LNA」または「ロックド核酸」は、リボース環が、例えば、2'-酸素と3'-もしくは4'-炭素または3'-4' LNAとの間（限定されない）のメチレン結合によって固定されるように高次構造が固定されたヌクレオチドアナログである（例えば、Imanishi and Obikaの米国特許第6,268,490号；およびWengel and Nielsenの米国特許第6,670,461号を参照のこと）。結合によって強いられた高次構造の制限により、しばしば、相補配列に対する結合親和性が増加し、かかる二重鎖の熱安定性が増加する。ポリヌクレオチド内の例示的LNA糖アナログには、以下の構造：

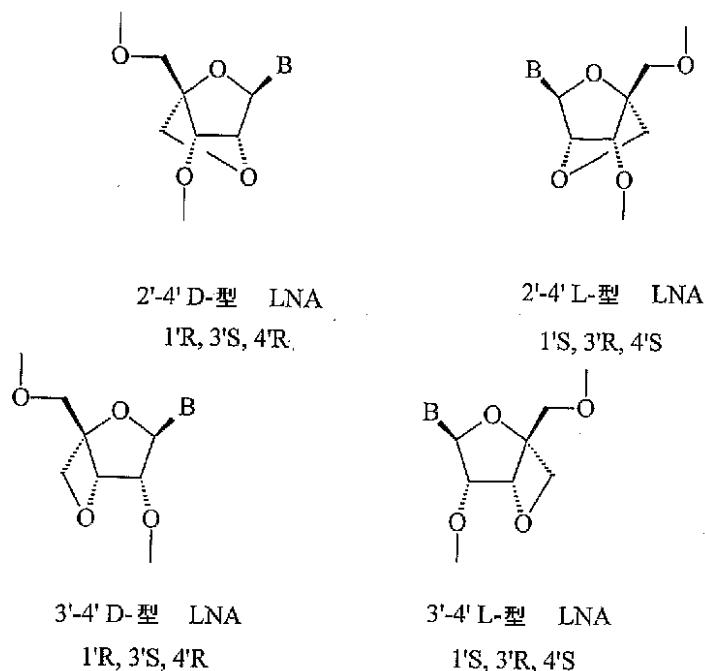
【0045】

10

20

30

【化 1】



10

(式中、Bは任意のヌクレオチド塩基である)が含まれる。

20

【0046】

リボースの2'位または3'位を、水素、ヒドロキシ、メトキシ、エトキシ、アリルオキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、メトキシエチル、アルコキシ、フェノキシ、アジド、シアノ、アミド、イミド、アミノ、アルキルアミノ、フルオロ、クロロ、およびブロモを含むように修飾することができる。ヌクレオチドには、天然のD型光学異性体形態およびL型光学異性体形態が含まれる(例えば、Garbesiら、Nuc l. Acids Res. 21:4159-65(1993); Fujimoriら、J. Amer. Chem. Soc. 112:7436-38(1990); Urataら、Nuc l. Acids Symposium Ser. No. 29:69-70(1993)を参照のこと)。ヌクレオチド塩基がプリン(例えば、AまたはG)である場合、ヌクレオチド塩基のN⁹位にリボース糖が結合する。ヌクレオチド塩基がピリミジン(例えば、C、T、またはU)である場合、ウラシルヌクレオチド塩基のC5位にペントース糖が結合する。プソイドウリジン以外のヌクレオチド塩基のN¹位にペントース糖が結合する(例えば、Kornberg and Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (1992), Freeman, San Francisco, CAを参照のこと)。

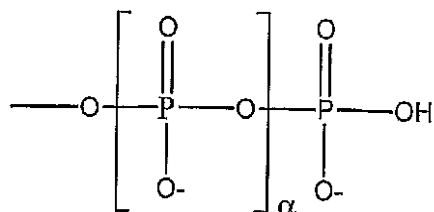
30

【0047】

ヌクレオチドの1つまたは複数のペントース炭素を、式：

【0048】

【化 2】



40

(式中、αは0~4の整数である)を有するリン酸エステルに置換することができる。一部の実施形態では、αは2であり、リン酸エステルはペントースの3'-または5'-炭素に結合する。一部の実施形態では、ヌクレオチドは、ヌクレオチド塩基がプリン、7-デアザプリン、ピリミジン、またはこれらのアナログであるヌクレオチドである。用語「

50

ヌクレオチド5'-三リン酸」は、5'位に三リン酸エステル基を有するヌクレオチドをいい、時折、リボース糖の構造的特徴を特に指摘するために、「rNTP」または「dNTP」および「ddNTP」、一般に「NTP」と示す。三リン酸エステル基には、種々の酸素の硫黄置換物（例えば、 α -チオヌクレオチド5'-三リン酸）が含まれ得る。ヌクレオチド化学の概説は、特に、Miller, Bioconjugate Chem. 1:187-91 (1990); Shabarova, Z. and Bogdanov, A. Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, VCH, New York (1994); および Nucleic Acid Chemistry and Biology, 2d ed., Blackburn and Gait, eds., Oxford University Press (1996; 以後“Blackburn and Gait”) 中に見出すことができる。

【0049】

用語「ヌクレオチドアナログ」は、一般的に本明細書中におよび他の場所に記載のように修飾ヌクレオチド塩基部分、修飾ペントース部分、および／または修飾リン酸部分を有し、ポリヌクレオチドの場合、修飾ヌクレオチド間結合を有する合成アナログをいう（例えば、Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York, 1980; Englisch, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30:613-29, 1991; Agarwal, Protocols for Polynucleotides and Analogs, Humana Press, 1994; および S. Verma and F. Eckstein, Ann. Rev. Biochem. 67:99-134, 1998）。一般に、修飾リン酸部分は、リン原子が+5酸化状態であり、1つまたは複数の酸素原子が非酸素部分（例えば、硫黄が含まれるが、これに限定されない）に置換されたリン酸のアナログを含む。リン酸アナログのいくつかの非限定的な例には、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホロセレンオアート（phosphoroselenoate）、ホスホロジセレンオアート（phosphorodiselenoate）、ホスホロアニロチオアート（phosphoroanilothioate）、ホスホロアニリダート（phosphoranilidate）、ホスホロアミダート（phosphoramidate）、ボロノホスフェート（boronophosphates）（かかる対イオンが存在する場合、関連対イオン（例えば、 H^+ 、 NH_4^+ 、 Na^+ が含まれる）が含まれる。修飾ヌクレオチド塩基部分の非限定的な例には、5-メチルシトシン（5mC）；C-5-プロピニルアナログ（C-5プロピニル-CおよびC-5プロピニル-Uが含まれるが、これらに限定されない）、2, 6-ジアミノプリン（2-アミノ アデニンまたは2-アミノ-dAとしても公知）、ヒポキサンチン、プソイドウリジン、2-チオピリミジン、イソシトシン（イソC）、5-メチルイソC、およびイソグアニン（イソG；例えば、米国特許第5, 432, 272号を参照のこと）が含まれる。修飾ペントース部分の非限定的な例には、LNAアナログ（Bz-A-LNA、5-Me-Bz-C-LNA、dmf-G-LNA、およびT-LNAが含まれるが、これらに限定されない）（例えば、The Glen Report, 16(2):5(2003); Koshkinら, Tetrahedron 54:3607-30(1998)を参照のこと）、ならびに2'位または3'位が、水素、ヒドロキシ、アルコキシ（例えば、メトキシ、エトキシ、アリルオキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、およびフェノキシ）、アジド、アミノ、アルキルアミノ、フルオロ、クロロ、またはブromoである2'または3'修飾物が含まれる。修飾ヌクレオチド間結合には、リン酸アナログ、アキラルおよび非荷電サブユニット間結合（例えば、Sterchak, E. P. ら, Organic Chem. 52:4202(1987)）、およびアキラルサブユニット間結合を有する非荷電モルホリノベースのポリマー（例えば、米国特許第5, 034, 506号を参照のこと）が含まれる。ヌクレオチド間結合アナログのいくつかの非限定的な例には、モルホリデート、アセタール、およびポリアミド結合複素環が含まれる。ペプチド核（「PNA」と総称される）（偽相補

10

20

30

40

50

プチド核酸が含まれるが、これらに限定されない)として公知のヌクレオチドアナログの1つのクラスでは、従来の糖およびヌクレオチド間結合が、2-アミノエチルグリシンアミド骨格ポリマーに置換されている(例えば、Nielsenら、Science, 254:1497-1500(1991); Egholmら、J. Am. Chem. Soc., 114:1895-1897(1992); Demidovら、Proc. Natl. Acad. Sci. 99:5953-58(2002); Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications, Nielsen, ed., Horizon Bioscience(2004)を参照のこと)。酵素的組み込みまたは化学合成で用いる広範なヌクレオチドアナログは、他の供給元(Glen Research, Sterling, MD; Link Technologies, Lanarkshire, Scotland, UK; および TriLink BioTechnologies, San Diego, CA)から、酸リン酸塩、ホスホルアミダート、またはCPG誘導体として利用可能である。オリゴヌクレオチド合成および一定のヌクレオチドアナログの説明は、特に、S. Verma and F. Eckstein, Ann. Rev. Biochem. 67:99-134(1999); Goodchild, Bioconj. Chem. 1:165-87(1990); Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Beaucageら、eds., John Wiley & Sons, New York, New York(2005年8月の最新版が含まれる(以後“Beaucageら”); および Blackburn and Gaitに見出すことができる。

10

20

【0050】

本明細書中で使用される、用語「プライマー結合部位」は、ポリヌクレオチド配列(典型的には、プライマーが当該分野で公知の任意の適切なプライマー伸長反応(例えば、PCRが含まれるが、これに限定されない)のためにアニーリングすることができるテンプレートとして直接またはその相補物によって機能することができる標的核酸および/またはアンプリコン)の領域をいう。2つのプライマー結合部位が1つのポリヌクレオチド上に存在し、2つのプライマー結合部位の方向が一般に異なることが当業者に認識されるであろう。例えば、プライマー対の一方のプライマーが第1のプライマー結合部位に相補的であり、これとハイブリッド形成することができる一方で、プライマー対の対応するプライマーを、第2のプライマー結合部位の相補物にハイブリッド形成するようにデザインする。つまり、いくつかの実施形態では、第1のプライマー結合部位はセンス方向であり得、第2のプライマー結合部位はアンチセンス方向であり得る。アンプリコンのプライマー結合部位は、標的隣接配列またはその相補物と同一の配列またはその少なくともいくつかの配列を含み得るが、含む必要はない。

30

【0051】

当業者は、標的核酸および/または増幅産物が一定の増幅手段によって増幅された場合、相補アンプリコンまたはアンプリコンの相補鎖中にプライマー結合部位の相補物が合成されると理解している。したがって、プライマー結合部位の相補物は、本明細書中で使用される、用語「プライマー結合部位」の意図する意味の範囲内に明確に含まれると理解すべきである。

40

【0052】

本明細書中で使用される、用語「プローブ結合部位」は、ポリヌクレオチド配列(典型的には、プローブがアニーリングすることができるテンプレートとして直接またはその相補物によって機能することができる標的核酸および/またはアンプリコン)の領域をいう。当業者は、ライゲーションプローブ対のプローブ結合部位が上流のプローブ結合部位および下流のプローブ結合部位を含み、これらの2つの部位が典型的には相互に隣接していると認識するであろう。一部の実施形態では、上流のライゲーションプローブ結合部位および下流のプローブ結合部位は相互に隣接せず、増幅工程はギャップ充填反応を含み得る。当業者は、切断プローブ対のプローブ結合部位が上流のプローブ結合部位を含み、これは、下流の切断プローブ結合部位の少なくとも一部に隣接するが、これと重複する必要は

50

ないかもしれないということも認識するであろう。

【0053】

当業者は、標的核酸および／または増幅産物が一定の増幅手段によって増幅された場合、相補アンプリコンまたはアンプリコンの相補鎖中にプローブ結合部位の相補物が合成されると理解している。したがって、プローブ結合部位の相補物は、本明細書中で使用される、用語「プローブ結合部位」の意図する意味の範囲内に明確に含まれると理解すべきである。

【0054】

本明細書中で使用される、用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、および「核酸」を、交換可能に使用し、これらは、ヌクレオチド単量体の一本鎖および二本鎖ポリマー（ヌクレオチド間ホスホジエステル結合および関連対イオン（例えば、 H^+ 、 NH_4^+ 、トリアルキルアンモニウム、 Mg^{2+} 、および Na^+ など）によって結合した2'-デオキシリボヌクレオチド（DNA）およびリボヌクレオチド（RNA）またはヌクレオチド間アナログなどが含まれるが、これらに限定されない）をいう。ポリヌクレオチドは、完全なデオキシリボヌクレオチド、完全なリボヌクレオチド、またはそのキメラ混合物から構成され得、ヌクレオチドアナログが含まれ得る。ヌクレオチド単量体単位は、本明細書中に記載の任意のヌクレオチド（ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログが含まれるが、これらに限定されない）を含み得る。ポリヌクレオチドは、典型的には、数個の単量体単位（例えば、これらが当該分野で時折オリゴヌクレオチドと呼ばれる場合、5〜40個）から数千個の単量体ヌクレオチド単位までのサイズ範囲である。他で示さない限り、ポリヌクレオチド配列を示す時は常に、ヌクレオチドは、左から右に5'→3'の順序であり、他で示さない限り、「A」はデオキシアデノシンを示し、「C」はデオキシシトシンを示し、「G」はデオキシグアノシンを示し、「T」はチミジンを示し、「U」はデオキシウリジンを示すと理解されるであろう。

【0055】

本明細書中で使用される、用語「クエンチャー」は、少なくともいくつかの強度の蛍光放射を吸収する部分をいう。クエンチャーを、蛍光クエンチャーおよびダーククエンチャー（dark quenchers）（時折、非蛍光クエンチャーとも呼ばれる）として分類することができる。蛍光クエンチャーは、第1の波長の蛍光源（例えば、核酸の二本鎖セグメントに会合した核酸色素が含まれるが、これに限定されない）から放射された蛍光シグナルを吸収することができる部分（典型的には、フルオロフォア）であり、十分な蛍光エネルギーの吸収後、蛍光クエンチャーは、クエンチャーに特徴的な第2の波長の蛍光を放射することができる（「蛍光共鳴エネルギー移動」またはFRETと呼ばれる過程）。例えば（限定されない）、TAMRA蛍光クエンチャーに会合したFAMフルオロフォアは、492 nm（FAMの励起ピーク）で発光し、580 nm（TAMRAの放射ピーク）で蛍光を放射する。蛍光源と適切に対合したダーククエンチャーは、供給源からの蛍光エネルギーを吸収するが、それ自体は蛍光を発しない。むしろ、ダーククエンチャーは、吸収したエネルギーを典型的には熱として放散する。一部の実施形態では、ダーククエンチャーは、蛍光源（本教示の酵素インヒビターの二本鎖セグメントに会合した核酸色素など）からのエネルギー移動受容体として作用するがそれぞれの検出可能な蛍光シグナルを放射しない発色団を含む。ダーククエンチャーまたは非蛍光クエンチャーの非限定的な例には、DABCYL（4-（4'-ジメチルアミノフェニルアゾ）スルホン酸）、Black Holeクエンチャーシリーズのクエンチャー（例えば、BHQ-1、BHQ-2、およびBHQ-3が含まれるが、これらに限定されない）、Iowa Black、QSYシリーズのクエンチャー（例えば、QSY-7が含まれるが、これに限定されない）、Absolute Quencher、Eclipse非蛍光クエンチャー、ナノ結晶（例えば、量子ドット）、金属（金ナノ粒子）などが含まれる。

【0056】

本明細書中で使用される、用語「反応容器」は、一般に、本教示にしたがって反応させることができる任意のコンテナ、チャンバー、デバイス、またはアセンブリをいう。いく

10

20

30

40

50

つかの実施形態では、反応容器は、微小管（例えば、Micro Amp（登録商標）Optical tube（Applied Biosystems）などの0.2mLまたは0.5mLの反応管）、微量遠心管、または分子生物学実験で一般的な他のコンテナであり得る。いくつかの実施形態では、反応容器は、マルチウェルプレートのウェル、スライドガラス上のスポット、マイクロ流体デバイスのチャンネルまたはチャンバー（Applied Biosystems TaqMan Low Density Arrayが含まれるが、これらに限定されない）を含む。例えば（制限されない）、複数の反応容器は、同一の支持体上に存在し得る。いくつかの実施形態では、例えば、Caliper and Fluidigmから利用可能なラボオンチップ（lab-on-a-chip）様デバイスは、開示の方法における反応容器としての機能を果たし得る。種々の反応容器が市販されているか、本教示の状況で使用するためにデザインすることができると認識されるであろう。

10

【0057】

用語「レポーター基」は、本明細書中にて広義で使用され、任意の識別可能なタグ、標識、または部分をいう。

【0058】

用語「小RNA分子」は、本明細書中にて広義で使用され、非コードであり、典型的には、150ヌクレオチド以下、100ヌクレオチド以下、75ヌクレオチド以下、30ヌクレオチド以下、19ヌクレオチドと27ヌクレオチドとの間、および21ヌクレオチドと23ヌクレオチドとの間の長さを有するリボヌクレオチドを含む任意の核酸配列をいう。小RNA分子は、一本鎖、二本鎖であり得るか、少なくとも1つの一本鎖領域および少なくとも1つの二本鎖領域（ステムループ領域またはヘアピン領域が含まれるが、これらに限定されない）を含み得る。小RNA分子の非限定的な例には、非翻訳機能的RNA、非コードRNA（ncRNA）、小さな非メッセンジャーRNA（snmRNA）、小さな干渉RNA（siRNA）、tRNA、小さな非コードRNA（tnRNA）、小さな調整RNA（small modulatory RNA）（smRNA）、snoRNA、stRNA、snRNA、マイクロRNA（miRNA）（一次miRNA（pri-miRNA）および前駆体miRNA（pre-miRNA）などのmiRNA前駆体が含まれるが、これらに限定されない）、および小さな干渉RNA（siRNA）が含まれる（例えば、Eddy, Nature Reviews Genetics 2:919-29（2001）；Storz, Science 296:1260-63（2002）；Buckingham, Horizon Symposia: Understanding the RNAissance:1-3（2003））。一部の実施形態では、標的核酸は、小RNA分子を含む。リボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドアナログを含む本教示の酵素インヒビターは、本明細書中で使用される、用語「小RNA分子」の意図する範囲から明確に除外される。

20

30

【0059】

用語「熱安定性」は、酵素に関して使用する場合、酵素が高温（例えば、約55℃またはそれ以上が含まれるが、これらに限定されない）で機能的であるか活性である（すなわち、触媒として機能することができる）ことを示す。本教示での使用に適切であり得る熱安定性酵素は、種々の業者（Applied Biosystems（Foster City, CA）、Promega（Madison, WI）、Stratagene（La Jolla, CA）、およびNew England BioLabs（Beverly, MA）が含まれるが、これらに限定されない）から市販されている。当業者は、熱安定性酵素を、種々の好熱性生物および／または超好熱性酵素生物（例えば、真正細菌種および古細菌種（かかる生物に感染する一定のウイルスが含まれるが、これらに限定されない）が含まれるが、これらに限定されない）から単離することができ、かかる熱安定性酵素は開示の複合体、方法、およびキットでの使用に適切であり得ると理解するであろう。

40

【0060】

用語「普遍的塩基（universal base）」または「普遍的ヌクレオチド（

50

universal nucleotide)」を、本明細書中で一般に交換可能に使用し、これは、ポリヌクレオチド（酵素インヒビターが含まれるが、これに限定されない）中の1種を超える天然に存在するヌクレオチドを構成し得るヌクレオチドアナログをいう。普遍的塩基は、典型的には、窒素原子を含んでいても含んでいなくても良い芳香環部分を含み、一般に、二重鎖を安定化させるために芳香環スタッキングを使用する。一部の実施形態では、普遍的塩基は、ペントース糖のC-1'炭素に共有結合して普遍的ヌクレオチドを形成することができる。一部の実施形態では、普遍的塩基は、別のヌクレオチド塩基と特異的に水素結合しない。一部の実施形態では、普遍的塩基は、疎水性スタッキングによって同一の核酸鎖上の隣接ヌクレオチド塩基と相互作用することができる。普遍的ヌクレオチドおよび普遍的塩基の非限定的な例には、デオキシ-7-アザインドール三リン酸 (d7AITP)、デオキシイソカルボスチリル三リン酸 (dICSTP)、デオキシプロピニルイソカルボスチリル三リン酸 (dPICSTP)、デオキシメチル-7-アザインドール三リン酸 (dM7AITP)、デオキシImPy三リン酸 (dImPyTP)、デオキシPP三リン酸 (dPPTP)、デオキシプロピニル-7-アザインドール三リン酸 (dP7AITP)、3-メチルイソカルボスチリル (MICS)、5-メチルイソカルビル (5MICS)、イミダゾール-4-カルボキシアミド、3-ニトロピロール、5-ニトロインドール、ヒポキサンチン、イノシン、デオキシイノシン、5-フルオロデオキシウリジン、4-ニトロベンズイミジゾール、および一定のPNA-塩基（一定の偽相補PNA (pcPNA) 塩基が含まれるが、これらに限定されない）が含まれる。普遍的塩基の説明は、特に、Loakes, Nucl. Acids Res. 29:2437-47 (2001); Bergerら, Nucl. Acids Res. 28:2911-14 (2000); Loakesら, J. Mol. Biol. 270:426-35 (1997); Verma and Eckstein, Ann. Rev. Biochem. 67:99-134 (1998); 公開PCT出願番号US02/33619号、およびPatron and Pervinの米国特許第6,433,134号に見出すことができる。

【0061】

2つの異なるオリゴヌクレオチドが同一の線状相補核酸の異なる領域にアニーリングし、一方のオリゴヌクレオチドの3'末端が他方のオリゴヌクレオチドの5'末端に面するか対峙する場合、前者を「上流」オリゴヌクレオチドとすることができ、後者を「下流」オリゴヌクレオチドとすることができる。

【0062】

一定の例示的成分

用語「切断酵素」は、適切な条件下で核酸切断構造（時折、重複フラップ構造または侵襲性切断反応基質と呼ばれる）と組み合わせられた場合に下流切断プローブの非アニーリングフラップ部分を切断してライゲーションニックを含む構造を生成する任意のポリペプチドをいう。切断酵素の制限されない例には、構造特異的ヌクレアーゼ（例えば、細菌およびバクテリオファージ由来の一定のDNAポリメラーゼ（その単離5'エクソヌクレアーゼドメインが含まれる）、Cleavase（登録商標）酵素（Third Wave Technologies, Inc., Madison, WI）、真核生物フラップエンドヌクレアーゼ、および古細菌フラップエンドヌクレアーゼが含まれるが、これらに限定されない（例えば、Lyamichevら, Science 260:778-83 (1993); Liら, J. Biol. Chem. 270:22109-12 (1995); Wuら, Nucl. Acids Res. 24:2036-43 (1996); Hosfieldら, J. Biol. Chem. 273:27154-61 (1998); Kaiserら, J. Biol. Chem. 274:21387-94 (1999); Allawiら, J. Mol. Biol. 328:537-54 (2003); および米国特許第5,614,402号および同第6,706,471号を参照のこと）。

【0063】

核酸切断構造は、典型的には、テンプレート鎖にハイブリッド形成して「フラップ」を

形成する2つの重複プローブを含む切断プローブ対にハイブリッド結合したテンプレート鎖（一般に、標的核酸、一本鎖アンプリコン、または二本鎖アンプリコンの個別の鎖）を含む。第1または上流の切断プローブは、テンプレート鎖の第1の部分に相補的であり、第2または下流の切断プローブのテンプレート相補配列の5'末端に重複する配列を含み、第2または下流の切断プローブは、（1）テンプレート鎖の第1の部分に隣接するテンプレート鎖の第2の部分に相補的な配列、および（2）テンプレート鎖に相補的であっても相補的でなくても良いが、テンプレート鎖にハイブリッド形成した場合、上流の切断プローブの3'末端に置換される少なくとも1つのヌクレオチドを含む5'領域を含む（例えば、Lyamichevら、Nat. Biotechnol. 17:292-96（1999）（特に、図1）；Nevilleら、BioTechniques 32:S34-43（2002）（特に、図2A）；Allawiら、J. Mol. Biol. 328:537-54（2003）（特に、図2）；およびBrownらの米国特許第6,706,471号（例えば、図32および65）を参照のこと。本教示の一定の切断酵素インヒビターを、核酸切断構造に類似するかこれを模倣する第1の温度で高次構造を想定するようにデザインする。一定の開示の切断酵素インヒビターは、第1の温度で核酸切断構造を形成することができるが、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは、切断酵素によって切断することができないかゆっくりと切断され得る少なくとも1つのヌクレオチドアナログおよび／または少なくとも1つのヌクレオチド間結合（「非切断性ヌクレオチド間結合」）を含む。非切断性ヌクレオチド間結合の非限定的な例には、ホスホロチオアート（ホスホロジチオアートが含まれるが、これらに限定されない）、メチルホスホナート、ホスホルアミダート、およびボラノホスフェート（boranophosphate）が含まれる。

【0064】

「リガーゼ」は、適切な条件下で隣接してハイブリッド形成されるプローブの3'-OHと5'-リン酸との間（ライゲーションプローブ組の第1のライゲーションプローブと第2のライゲーションプローブとの間または切断酵素によって切断された第1の切断プローブと第2の切断プローブのハイブリッド形成フラグメントとの間が含まれるが、これらに限定されない）のホスホジエステル結合形成を触媒するポリペプチドである。温度感受性リガーゼには、バクテリオファージT4リガーゼおよび大腸菌リガーゼが含まれるが、これらに限定されない。温度感受性リガーゼの非限定的な例には、Afuリガーゼ、Taqリガーゼ、Tfiリガーゼ、Mthリガーゼ、Tthリガーゼ、Tth HB8リガーゼ、Tscリガーゼ、サーマス属AK16Dリガーゼ、Apeリガーゼ、Lig_{Tk}リガーゼ、Aaeリガーゼ、Rmリガーゼ、およびPfuリガーゼが含まれる（例えば、Housbyら、Nucl. Acids Res. 28:e10, 2000；Tongら、Nucl. Acids Res. 28:1447-54, 2000；Nakataniら、Eur. J. Biochem. 269:650-56, 2002；およびSriskanndaら、Nucl. Acids Res. 11:2221-28, 2000を参照のこと）。当業者は、多くの中温性、熱安定性、および／または超好熱性のリガーゼ（DNAリガーゼおよびRNAリガーゼが含まれる）を、中温性、好熱性、または超好熱性の生物（例えば、一定の真正細菌種および古細菌種ならびにかかる中温性、好熱性、または超好熱性の生物に感染するウイルス）から得ることができ、かかるリガーゼは、開示の複合体、方法、およびキットで適切であり得ると認識するであろう。

【0065】

本明細書中で使用される、用語「核酸色素」は、二本鎖ポリヌクレオチドに特異的であるか、一本鎖ポリヌクレオチドよりも二本鎖ポリヌクレオチドに会合する場合に少なくとも実質的により高く蛍光が増加する蛍光分子をいう。典型的には、核酸色素分子は、二本鎖セグメントの塩基対間の介入、二本鎖セグメントの主溝または副溝中の結合、またはその両方によってポリヌクレオチドの二本鎖セグメントに会合する。核酸色素の非限定的な例には、臭化エチジウム、DAPI、Hoechst誘導体（Hoechst 33258およびHoechst 33342が含まれるが、これらに限定されない）、ランタノ

イドキレートを含む介入物（例えば、2つの蛍光テトラデンタート（tetradentate） β -ケトン- Eu^{3+} キレートを含むナルサレンジイミド（naltthalene diimide）誘導体（NDI-（BHHC T- Eu^{3+} ）₂が含まれるが、これらに限定されない）（例えば、Nojimaら、Nucl. Acids Res. Supplement No. 1, 105-06（2001）を参照のこと）、臭化エチウム、および一定の非対称性シアニン色素（SYBR Green（登録商標）、PicoGreen（登録商標）、およびBOXTOなど）が含まれる。

【0066】

一定の開示の酵素インヒビターの核酸配列は、アプタマーを含む。アプタマーは、高度に特異的な高次構造依存様式（典型的には、非常に高い親和性）で、標的分子に結合するが、当業者は、必要に応じて、より低い結合親和性を有するアプタマーを選択することができる。アプタマーは、非常に小さな構造の相違（メチル基またはヒドロキシル基の有無など）に基づいて標的を区別することが示されており、一定のアプタマーは、D鏡像異性体とL鏡像異性体を識別することができる。小分子標的（薬物、金属イオン、および有機色素、ペプチド、ビオチン、およびタンパク質（ストレプトアビジン、VEGF、ウイルスタンパク質、および種々の酵素（DNA依存性DNAポリメラーゼ、RNA依存性DNAポリメラーゼ、RNA依存性RNAポリメラーゼ、ヘリカーゼ、およびプロテアーゼが含まれるが、これらに限定されない）が含まれる）に結合するアプタマーが得られている（例えば、Lin and Jayasena, J. Mol. Biol. 271:100-11（1997）；Thomasら、J. Biol. Chem. 272:27980-86（1997）；Kulbachinskiyら、Eur. J. Biochem. 271:4921-31（2004）；Hannoushら、Chembiochem. 5:527-33（2004）；Bellecaveら、Oligonucleotides 13:455-63（2003）；およびNishikawaraら、Nucl. Acids Res. 31:1935-43（2003）を参照のこと）。アプタマーは、ビオチン化、フルオレセイン標識後、およびガラス表面およびミクロスフェアに結合した場合に機能的活性を保持することが示されている。

【0067】

アプタマー（スペイゲルマー（speigelmers）が含まれる）を、*in vitro*選択プロセス（例えば、指数関数的増幅によるリガンドの体系的評価（SELEX）として公知のプロセスが含まれるが、これに限定されない）によって同定する。SELEXプロセスでは、オリゴヌクレオチドの非常に大きな組み合わせライブラリー（例えば、 $10^{14} \sim 10^{15}$ 個の個別の配列、しばしば、60～100ヌクレオチド長の大きさ）を、*in vitro*選択および増幅の反復プロセスによって日常的にスクリーニングする。ほとんどの標的は、8～15サイクル以内で親和性富化され、このプロセスは、より速いアプタマー単離のために自動化されている。当業者は、アプタマーを過度に実験を行うことなく従来の手順後に得ることができると理解するであろう。アプタマーおよびその選択についての説明は、特に、L. Gold, J. Biol. Chem., 270（23）:13581-84（1995）；L. Goldら、Ann. Rev. Biochem. 64:763-97（1995）；Wilson and Szostak, Ann. Rev. Biochem. 68:611-47（1999）；Coxら、Nucl. Acids Res. 30:e108（2002）；Hermann and Patel, Science 287:820-25（2000）；Vuyisich and Beal, Chem. & Biol. 9:907-13（2002）；S. Jayasena, Clin. Chem., 45:1628-50（1999）；Cox and Ellington, Bioorg. Med. Chem. 9:2525-31（2001）；Eulbergら、Nucl. Acids Res. 33:e5（2005）；およびJayasena and Goldの米国特許第6,183,967号中に見出すことができる。

【0068】

用語「DNAポリメラーゼ」は、本明細書中にて広義で使用され、テンプレート依存様式でのデオキシリボヌクレオチドおよび／または一定のヌクレオチドアナログの付加によるハイブリッド形成したプライマーの5'－3'伸長を触媒することができる任意のポリペプチドをいう。例えば（限定されない）、プライマー伸長反応中に核酸テンプレートにアニーリングするプライマーの3'末端へのデオキシリボヌクレオチドの連続的付加。DNAポリメラーゼの非限定的な例には、RNA依存性DNAポリメラーゼ（逆転写酵素が含まれるが、これに限定されない）およびDNA依存性DNAポリメラーゼが含まれる。一定のDNAポリメラーゼ（例えば、一定の真正細菌A型DNAポリメラーゼおよびTaq DNAポリメラーゼが含まれるが、これらに限定されない）が構造特異的ヌクレアーゼ活性をさらに含むことができ、増幅反応が、切断酵素がDNAポリメラーゼを含む増幅反応が侵襲性切断反応（例えば、FEN－LCRまたはPCR－FEN（例えば、Biらの米国特許第6,511,810号；およびNevilleら、BioTechniques 32:34－43（2002））を含む場合に、侵襲切断においてかかるポリメラーゼを本明細書中で切断酵素といい、対応する酵素活性が構造特異的オリゴヌクレオチド切断を含むと認識すべきである。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼは、重合活性および構造特異的切断活性の両方をもたらす。用語「RNAポリメラーゼ」は、DNA依存性RNAポリメラーゼおよびRNA依存性DNAポリメラーゼ（しばしば、RNAレプリカーゼという）をいい、テンプレート依存様式でのリボヌクレオチドの5'－3'付加を触媒することができる任意のポリペプチドが含まれる。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼは、プロモーター配列に結合し、転写を触媒する。RNAポリメラーゼの非限定的な例には、バクテリオファージT3、T7、SP6、φ2、MS2、およびQβ由来のRNAポリメラーゼが含まれる。

【0069】

用語「プライマー」は、適切なストリンジェンシー条件下で標的核酸の隣接配列または増幅産物の対応するプライマー結合部位に選択的にハイブリッド形成するようにデザインされ、3'末端由来の対応するポリヌクレオチドテンプレートに相補的なヌクレオチド配列の合成開始点としての機能を果たす、典型的には約12～35ヌクレオチド長の「標的」結合部分を含むポリヌクレオチド（一般に、オリゴヌクレオチド）をいう。

【0070】

用語「順方向」および「逆方向」は、プライマー対のプライマーに関して使用される場合、ポリヌクレオチド配列上のプライマーの相対的方向を示す。例として（制限されない）、左から右の方向に水平に置いた一本鎖ポリヌクレオチドにおいて、左側を5'末端とする。「逆方向」プライマーを、右から左に5'→3'方向で例示的ポリヌクレオチドの「3'」末端またはその付近で下流プライマー結合部位にアニーリングするようにデザインする。対応する「順方向」プライマーを、左から右に5'→3'の「順」方向でポリヌクレオチドの「5'」末端またはその付近で上流プライマー結合部位の相補物にアニーリングするようにデザインする。したがって、逆方向プライマーは、ヌクレオチドの逆方向または下流プライマー結合部位に相補的な配列を含み、順方向プライマーは、順方向または上流プライマー結合部位と同一または実質的に同一の配列を含む。本パラグラフ中で使用される、用語「3'末端」および「5'末端」は例示のみを目的とし、必ずしも文字通りにポリヌクレオチドの各末端をいうわけではないと理解すべきである。むしろ、この例示的プライマー対の逆方向プライマーが、対応する順方向プライマーの「標的」結合部分と同一または実質的に同一の配列を含む順方向プライマー結合部位の下流である逆方向プライマー結合部位にアニーリングするという点のみが制限される。当業者に認識されるように、これらの用語は、制限を意図しないが、むしろ、所与の実施形態において例示的方向を提供することを意図する。

【0071】

本教示の「プライマー対」は、順方向プライマーおよび対応する逆方向プライマーを含む。順方向プライマーは、第1または上流の標的隣接配列のヌクレオチド配列と同一また

は実質的に同一であり、特に、逆方向増幅産物中に存在する上流標的隣接配列の相補物に選択的にハイブリッド形成するようにデザインされた配列を含む第1の標的特異的部分を含む。プライマー対の逆方向プライマーは、特に、順方向増幅産物中に存在する第2または下流の標的領域隣接配列に相補的または実質的に相補的であり、これに選択的にハイブリッド形成するようにデザインされた配列を含む第2の標的特異的部分を含む。一部の実施形態では、プライマー対の順方向プライマー、逆方向プライマー、または順方向プライマーおよび逆方向プライマーは、レポータープローブ結合部位、普遍的プライマー結合部位、および／またはレポーター基（例えば、蛍光レポーター基が含まれるが、これに限定されない）をさらに含む。いくつかの実施形態では、配列決定プライマーは、蛍光レポーター基を含む。一部の実施形態では、プライマー対の順方向プライマーおよび対応する逆方向プライマーは、温度ベースの非対称PCRが可能なように異なる融点を有する。

10

【0072】

普遍的プライマーまたはプライマー組を、本教示の一部の実施形態にしたがって使用することができる。一部の実施形態では、普遍的プライマーまたはプライマー組は、2つまたはそれを超える異なる標的核酸種および／または2つまたはそれを超える異なる所望のアンプリコン種にハイブリッド形成し、それにより、これらを増幅するために使用することができる。

【0073】

用語「プローブ」は、配列特異的様式で特定の核酸配列（例えば、標的核酸または増幅産物が含まれるが、これらに限定されない）上の相補プローブ結合部位にハイブリッド形成するようにデザインされた部分を含むポリヌクレオチドをいう。一部の実施形態では、ライゲーションプローブ組の対応するプローブを共にライゲーションして、ライゲーションしたプローブを形成する。いくつかの実施形態では、切断プローブ組の対応するプローブがテンプレート鎖にアニーリングして、核酸切断構造を形成し、これを適切な条件下で適切な切断酵素によって切断して、テンプレート鎖、上流切断プローブ、および第2の切断プローブのハイブリッド形成したフラグメントを含むハイブリッド形成構造を形成することができる。一部の実施形態では、アニーリングした上流切断プローブおよび下流切断プローブのハイブリッド形成したフラグメントを共にライゲーションして、ライゲーションされたプローブを形成する。一部の実施形態では、プローブは、レポーター基（例えば、レポータープローブが含まれるが、これに限定されない）を含む。いくつかの実施形態では、プローブは、プライマー結合部位を含む。

20

30

【0074】

本教示のプローブおよびプライマーの配列特異的部分は、標的核酸および所望のアンプリコン中の相補配列への特異的アニーリングを可能にするのに十分な長さである。プライマーおよびプローブデザインの詳細な説明を、特に、Dieffenbach and Dveksler, PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1995; 以後「PCR Primer」)、R. Rapley, The Nucleic Acid Protocols Handbook (2000), Humana Press, Totowa, New Jersey (以後「Rapley」)、Schena; and Kwokら、Nuc l. Acid Res. 18:999-1005 (1990)に見出すことができる。プライマーおよびプローブデザインのソフトウェアプログラムも市販されており、Primer Express, Applied Biosystems, Foster City, CA、Primer Premier and Beacon Designer software, PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA、Primer Designer 4, Sci-Ed Software, Durham, NC、Primer Detective, Clontech, Palo Alto, CA、Lasergene, DNASTAR, Inc., Madison, WI、Oligo software, National Biosciences, Inc., Plymouth, MN、iOligo, Caesar Soft

40

50

ware, Portsmouth, NH、およびワールドワイドウェブ上の `realtimeprimerdatabase.ht.st` または `medgen31.urgent.be/primerdatabase/index` の RT Primer DB (Pat tynら、Nucl. Acid Res. 31:122-23 (2003) も参照のこと) が含まれるが、これらに限定されない。

【0075】

当業者は、開示のプロープおよびプライマー、標的核酸、所望のアンプリコン、またはこれらの組み合わせの相補物を本教示の一部の実施形態で使うことができることを認識するであろう。例えば、制限されないが、ゲノムDNAサンプルは、標的核酸配列およびその相補物の両方を含み得る。したがって、一部の実施形態では、ゲノムサンプルが変性される場合、標的核酸およびその相補物の両方は、一本鎖配列としてサンプル中に存在する。一部の実施形態では、プライマー、ライゲーションプロープ対、切断プロープ対、またはこれらの組み合わせを、適切な配列（標的核酸、標的核酸の相補物、アンプリコン、および／またはアンプリコンの相補物が含まれるが、これらに限定されない）に選択的にハイブリッド形成するようにデザインすることができる。

【0076】

用語「レポータープロープ」は、標的核酸および／またはアンプリコンにアニーリングするヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログの配列をいい、放射波長の強度の変化（これに限定されない）が検出された場合、これを使用して、終点またはリアルタイム検出技術（例えば、Q-PCR技術が含まれるが、これに限定されない）において対応する標的核酸を同定および／または定量する。ほとんどのレポータープロープを、その作用様式に基づいて分類することができ、これらのプロープには、例えば、以下が含まれるが、これらに限定されない：ヌクレアーゼプロープ（TaqMan（登録商標）プロープが含まれるが、これに限定されない（例えば、Livak, Genetic Analysis: Biomolecular Engineering 14:143-149 (1999); Yeungら、BioTechniques 36:266-75 (2004) を参照のこと）、伸長プロープ（スコルピオンプライマー（scorpion primer）、Lux（商標）プライマー、およびAmplifluorsなど）、ハイブリッド形成プロープ（分子ビーコン、Eclipseプロープ、ライトアッププロープ、単一標識されたレポータープロープ対、およびハイブリッド形成プロープ対など）、またはこれらの組み合わせ。一部の実施形態では、レポータープロープは、PNA、LNA、普遍的塩基、またはこれらの組み合わせを含み、ステムループおよびステムレスレポータープロープ立体配置が含まれ得る。一定のレポータープロープは単一標識される一方で、他のレポータープロープは二重標識される。隣接してハイブリッド形成されるプロープの間にFRETを含む二重プロープ系は、用語「レポータープロープ」の意図する範囲内に含まれる（例えば、Zhangら、Hepatology 36:723-28 (2003) を参照のこと）。

【0077】

当該分野で時折非対称（asymmetric）シアニン色素または非対称（asymmetrical）シアニン色素と記載される、「非対称（unsymmetrical）シアニン色素」は、一般式 $R_2N[CH=CH]_nCH=NR_2$ （式中、 n は少数であり、 R 基は、典型的には、少なくとも1つのベンザゾールおよび少なくとも1つのキノリン基または少なくとも1つのピリジン基を含む）の色素分子をいう。非対称性シアニン色素の非限定的な例には、 $[2-N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N-プロピルアミノ]-4-[2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン]-1-フェニル-キノリニウム]$ （SYBR（登録商標）Green）、 $[2-N-ビス-(3-ジメチルアミノプロピル)-アミノ]-アミノ]-4-[2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン]-1-フェニル-キノリニウム]$ （PicoGreen（登録商標））、 $4-[(3-メチル-6-(ベンゾチアゾール-2-イル)-2,3-ジヒドロ-(ベンゾ-1,3-チ$

アゾール) - 2 - メチリデン)] - 1 - メチル - ピリジニウム ヨー ジド (B E B O)、B O X T O、および B E T O が含まれる。非対称性シアニン色素の説明を、特に、K a r l s s o n ら、N u c l . A c i d s R e s . 3 1 : 6 2 2 7 - 3 4 (2 0 0 3) ; Z i p p e r ら、N u c l . A c i d s R e s . 3 2 : e 1 0 3 (2 0 0 4) ; B e n g t s s o n ら、N u c l . A c i d s R e s . 3 1 : e 4 5 (2 0 0 3) ; および G o r a n s s o n ら、A s y m e t t r i c c y a n i n e d y e s , D N A - T e c h n o l o g y 2 0 0 5 , C h a l m e r s U n i v e r s i t y T e c h n o l o g y (2 0 0 5 ; 以下のワールドワイドウェブ上で利用可能 : m o l b i o t e c h . C h a l m e r s . s e / r e s e a r c h / m k / A s y m e t r i c % c y a n i n e % d y e s . d o c) に見出すことができる。

10

【0078】

用語「標的核酸」または「標的」は、本技術の組成物、方法、およびキットを使用して特異的に増幅および／または検出される核酸配列をいう（二次増幅産物と対照的に、典型的には、後プライミングによる偽副反応の結果である）。一部の実施形態では、標的核酸は、プライマー伸長反応においてテンプレートとしての機能を果たす。いくつかの実施形態では、標的核酸は、ライゲーションテンプレートとしての機能を果たす。いくつかの実施形態では、標的核酸は、核酸切断構造においてテンプレート鎖としての機能を果たす。一部の実施形態では、標的核酸は、DNAを含み、ゲノムDNA (gDNA) またはミトコンドリアDNA (mtDNA) 中に存在する。一部の実施形態では、標的核酸は、RNA (例えば、リボゾームRNA (rRNA)、メッセンジャーRNA (mRNA)、運搬RNA (tRNA)、またはRNA分子 (miRNA前駆体 (primiRNA、premiRNA、またはprimiRNAおよびpremiRNAが含まれるが、これらに限定されない) など) が含まれるが、これらに限定されない) を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸は、小RNA分子 (miRNA、siRNA、stRNA、snoRNA、または他のncRNAが含まれるが、これらに限定されない) を含む。標的核酸は、核酸分子全体を構成する必要はない。例えば (限定されない)、巨大な核酸 (例えば、gDNAフラグメント) は、複数の異なる標的核酸分子を含み得る。典型的には、標的核酸は、少なくとも1つの定義した末端を有する。多くの核酸増幅反応では、標的は、定義の末端を含む。

20

【0079】

一部の実施形態では、標的核酸は、2つの隣接配列 (標的核酸のいずれかの側面であるが、必ずしも直接隣接する必要はない場所に存在する第1の標的隣接配列および第2の標的隣接配列) の間に存在する。いくつかの実施形態では、gDNAフラグメントなどのポリヌクレオチドは、複数の異なる標的核酸を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸は、1つまたは複数の異なる標的核酸に連続しているか隣接している。いくつかの実施形態では、所与の標的核酸は、その5'末端上の一方の標的核酸、その3'末端上の他方の標的核酸、またはその両方が重複し得る。他の実施形態では、例えば (制限されない)、標的が小RNA分子を含む場合、標的は隣接領域を含まなくてよく、プライマーを、小さなRNA標的の一部 (典型的には、標的核酸の末端) にアニーリングするようにデザインする (例えば、Chenらの米国特許出願番号10/947,460号を参照のこと)。

30

40

【0080】

一定の例示的成分の技術

本教示によれば、標的核酸を、任意の生きている生物または生きていた生物 (原核生物、古細菌、または真核生物 (例えば、昆虫 (ショウジョウバエが含まれるが、これに限定されない)、寄生虫 (線虫が含まれるが、これに限定されない)、植物 (シロイヌナズナが含まれるが、これに限定されない)、動物 (ヒト、マウス、家畜、または非ヒト霊長類が含まれるが、これらに限定されない)、原核細胞、および真核生物から得た細胞、組織、および器官 (例えば、臨床生検材料、口腔スワブ、培養細胞、および血球が含まれるが、これらに限定されない) これらに限定されない) が含まれる) から得ることができる。ウイルス核酸も本教示の範囲内に含まれる。一部の実施形態では、標的核酸は、二本鎖形

50

態または一本鎖形態で存在し得る。当業者は、gDNAには全長材料だけでなく、多数の手段（例えば、酵素消化、超音波処理、および剪断力などが含まれるが、これらに限定されない）によって生成されたフラグメントも含まれ、すべてのかかる材料は、全長またはフラグメントにかかわらず、本教示の増幅反応のためのテンプレートとしての機能を果たしうるgDNAの形態を表すものと認識する。

【0081】

標的核酸は、合成または天然に存在する標的核酸のいずれかであり得る。一定の標的核酸（必要に応じて、隣接配列が含まれる）を、当該分野で周知のオリゴヌクレオチド合成方法を使用して合成することができる。かかる技術の詳細な説明を、特に、Bea u c a g eおよびBlackburn and Gaitに見出すことができる。標的核酸および他のオリゴヌクレオチド（一定の酵素インヒビター、プローブ、およびプライマーが含まれるが、これらに限定されない）の合成に有用な自動化DNA合成機は、多数の業者から市販されており、例えば、Applied Biosystems DNA合成機モデル381A、391、392、および394（Applied Biosystems, Foster City, CA）が含まれる。標的核酸（必要に応じて、隣接領域が含まれる）および他のオリゴヌクレオチドを、当該分野で周知のin vivo法および／またはin vitro法を使用して合成的に生成することもできる。かかる技術の説明を、特に、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1989)（以後「Sambrookら」）およびAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.（2005年9月26日までの増補が含まれる）（以後「Ausubelら」）に見出すことができる。

【0082】

本教示の方法で使用される標的核酸（含まれるが限定されない）を、当該分野で公知の任意の適切なサンプル調製技術を使用して生体物質からgDNAを得ることができる。市販の核酸抽出装置およびシステムには、特に、ABI PRISM（登録商標）6100 Nucleic Acid PrepStationおよびABI PRISM（登録商標）6700 Nucleic Acid Automated Work Stationが含まれる。核酸サンプル調製試薬およびキットも市販されており、NucPrep（商標）Chemistry、BloodPrep（商標）Chemistry、ABI PRISM（登録商標）TransPrep System、およびPrepMan（商標）Ultra Sample Preparation Reagent（全てApplied Biosystems）、ならびにmiRvana RNA単離キット（Ambion, Austin, TX）が含まれるが、これらに限定されない。精製核酸または部分精製核酸（gDNA、総RNA、および組織特異的核酸調製物が含まれるが、これらに限定されない）は、多数の業者（Coriell Cell Repositories, Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ、Serologicals Corp., Norcross, GA; Stratagene, La Jolla CA、Ambion, Austin, TX、およびAmerican Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA）から市販されている。

【0083】

用語「増幅（amplifying）」および「増幅（amplification）」は、本明細書中にて広義で使用され、標的核酸、アンプリコン、標的核酸の少なくとも一部、またはアンプリコンの少なくとも一部がテンプレート依存様式（線形または指数関数的な広範な核酸配列増幅技術が含まれる）で再生またはコピーされる当該分野で公知の任意の技術をいう。いくつかの増幅技術は等温的に行われ、いくつかの増幅技術は温度サイクリングを使用して行われ、いくつかの増幅技術はサーモサイクリングを含む少なくとも1つの等温増幅工程および少なくとも1つの増幅工程を含む。増幅技術のいくつかの非

限定的な例には、プライマー伸長（PCR、RT-PCR、非同期PCR（A-PCR）、非対称PCR、定量的またはQ-PCRが含まれるが、これらに限定されない）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、リガーゼ検出反応（LDR）（それぞれのギャップ充填バージョンおよびギャップオリゴヌクレオチドバージョンが含まれるが、これらに限定されない）（例えば、Cao, Chapter 1.3 in DNA Amplification: Current Techniques and Applications, Demidov and Broude, eds., Horizon Bioscience (2004; 以後「Demidov and Broude」); Abravayaら、Nuccl. Acids Res. 23:675-82 (1995); Lizardiら、Nat. Genetics 19:225-32 (1998); およびSegevの米国特許第6,004,826号を参照のこと）、ローリングサークル増幅（RCA）（時折、ローリングサークル複製（RCR）と呼ばれる）、鎖置換増幅（SDA）、および多置換増幅（MDA）、核酸鎖ベースの増幅（NASBA）（時折、転写媒介増幅（TMA）または自律維持複製（3SR）と呼ばれる）、SPIA（商標）およびRiboSPIA（商標）増幅（例えば、Kurnの米国特許第6,251,639号および米国特許公報番号US2003/0017591 A1号を参照のこと）、ヘリカーゼ依存増幅（HDA; 例えば、Vincentら、EMBO Reports 5:795-800 (2004)を参照のこと）（その多重バージョンおよび／または組み合わせ（例えば、OLA/PCR、PCR/LDR、PCR/LCR（組み合わせ鎖反応（CCR）としても公知）が含まれる）が含まれる。一定の増幅技術の説明を、特に、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Sambrook and Russell, eds., Cold Spring Harbor Press, 3d ed. (2001; 以後「Sambrook and Russell」); Sambrookら; Ausubelら; PCR Primer; McPherson; Rapley; Lizardiら、Nat. Genetics 19:225-32 (1998); Wiedmannら、51-64, in PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994); Cao, Trends in Biotechnol. 22:38-44 (2004); およびWenz and Schrothの米国特許公報番号US2003/0190646 A1号に見出すことができる。

【0084】

一部の実施形態では、増幅技術は、少なくとも1つの増幅サイクル（例えば（制限されない）、二本鎖核酸を変性させて成分鎖を分離する工程、プライマーをアンプリコン（または、必要に応じて、いずれかの相補物）の標的隣接配列またはプライマー結合部位にハイブリッド形成させる工程、およびDNAポリメラーゼを使用したテンプレート依存様式でヌクレオチド鎖を合成する工程）を含む。一部の実施形態では、増幅工程は、二本鎖核酸を変性させて成分鎖を分離する工程、第1のライゲーションプローブおよび対応する第2のライゲーションプローブを、（1）標的核酸または標的核酸の対応する第2のライゲーションプローブまたは（2）アンプリコンにハイブリッド形成する工程、およびリガーゼで隣接してハイブリッド形成したプローブをライゲーションして、ライゲーションしたプローブ（例示的アンプリコン）を形成する工程を含む。一部の実施形態では、増幅サイクルは、二本鎖核酸を変性させて成分鎖を分離する工程、上流切断プローブおよび対応する下流切断プローブを（1）標的核酸または標的核酸の相補物または（2）アンプリコンにハイブリッド形成して、核酸切断構造を形成する工程、切断構造を切断してフラップを放出させ、下流切断プローブのハイブリッド形成したフラグメントに隣接してアニーリングした上流切断プローブを含むハイブリッド形成構造を形成する工程、および、任意選択的に、隣接してハイブリッド形成したプローブをリガーゼでライゲーションしてライゲーションしたプローブを形成する工程を含む。サイクルを反復しても反復しなくても良い。一部の実施形態では、増幅サイクルは、複数の増幅サイクル（例えば、20増幅サイクル、25増幅サイクル、30増幅サイクル、35増幅サイクル、40増幅サイクル、45増

幅サイクル、または45を超える増幅サイクルが含まれるが、これらに限定されない)を含む。

【0085】

いくつかの実施形態では、増幅は、装置(例えば、Gene Amp(登録商標)PCR System 9700、9600、2700、または2400サーモサイクラー(全て、Applied Biosystems)が含まれるが、これらに限定されない)を使用したサーモサイクリングを含む。一部の実施形態では、一本鎖アンプリコンを、増幅反応(例えば、非対称PCRまたはA-PCRが含まれるが、これらに限定されない)で生成する。

【0086】

核酸を含む反応組成物でのサーマルサイクリング反応および検出を行い、特定の波長の光ビームを放射し、二本鎖核酸に会合した核酸色素分子から放射された蛍光シグナルの強度を読み取り、各サイクル後の蛍光強度を表示することができるデバイスが開発されている。サーマルサイクラー、光ビーム放射体、および蛍光シグナル検出器を含むデバイスは、例えば、米国特許第5,928,907号、同第6,015,674号、および同第6,174,670号に記載されており、ABI Prism(登録商標)7700配列検出システム(Applied Biosystems, Foster City, California)およびABI Gene Amp(登録商標)5700配列決定システム(Applied Biosystems, Foster City, California)が含まれる。

【0087】

一部の実施形態では、これらの機能を個別のデバイスによって行うことができる。例えば(制限されない)、増幅のためにQ-βレプリカーゼ反応を使用する場合、この反応は、サーマルサイクラー中ではなく、特定の波長を放射する光ビーム、蛍光シグナルの検出、ならびにモニターまたは他の読み取りデバイスでの増幅産物両の計算および表示を含み得る装置内で行うことができる。

【0088】

一部の実施形態では、サーマルサイクリングと蛍光検出デバイスとの組み合わせを、サンプル中の標的核酸配列の正確な定量のために使用することができる。一部の実施形態では、蛍光シグナルを、1つまたは複数のサーマルサイクル中および/または後に検出および表示することができ、それにより、反応が「リアルタイム」で起こるにつれて、増幅産物がモニタリングされる。一部の実施形態では、増幅産物量および増幅サイクル数を使用して、増幅前にどの程度の標的核酸配列がサンプル中に存在したかを計算することができる。

【0089】

いくつかの実施形態では、1つの核酸について1つのライゲーションプローブを準備し、標的を線形に増幅する(例えば、LDRが含まれるが、これに限定されない)。一部の実施形態では、1つの標的核酸について2つのライゲーションプローブ組を準備し、標的を指数関数的に増幅する(例えば、LCRが含まれるが、これに限定されない)。いくつかの実施形態では、第1の切断プローブおよび対応する第2の切断プローブが標的核酸にアニーリングして重複配列またはフラップ配列を含む核酸切断構造を形成し、これが切断酵素のための適切な基質を形成する。一部の実施形態では、切断後、第1の切断プローブおよび第2の切断プローブのハイブリッド形成したフラグメントをライゲーションして、ライゲーションしたプローブを形成することができる。いくつかの実施形態では、ライゲーションプローブは、プライマー結合部位を含み、プライマー伸長反応(例えば、PCRが含まれるが、これに限定されない)のためのテンプレートとして機能を果たし得る。

【0090】

本教示のプライマー伸長は、DNAポリメラーゼを使用した5'→3'方向でテンプレートにアニーリングされるプライマーの伸長を含む増幅プロセスである。一部の実施形態によれば、適切な緩衝液、塩、pH、温度、および適切なNTP(ヌクレオチドアナログ

10

20

30

40

50

を含み得るが、必要ない)を使用して、DNAポリメラーゼは、アニーリングしたプライマーの3'末端から開始されるテンプレート鎖に相補的なヌクレオチドを組み込んで、相補鎖を生成する。一部の実施形態では、プライマー伸長のために使用されるDNAポリメラーゼは、5'-エクソヌクレアーゼ活性、3'-エクソヌクレアーゼ活性、またはその両方を欠くか実質的に欠く。いくつかの実施形態では、プライマー伸長は逆転写を含み、DNAポリメラーゼは、一定の条件下で逆転写酵素活性を含む逆転写酵素またはDNA依存性DNAポリメラーゼ(例えば、高度好熱菌(Tth)DNAポリメラーゼ、組換えTth DNAポリメラーゼ(rTth pol)、GeneAmp AccuRT RNA PCR酵素、サーマスZ05属(TZ05)DNAポリメラーゼが含まれるが、これらに限定されない)を含む(例えば、Smithら、in PCR Primer, at pages 211-219を参照のこと)。一部の実施形態では、プライマー伸長は、逆転写酵素およびDNA依存性DNAポリメラーゼを含む。一定のかかる実施形態では、反応組成物は、1つのDNAポリメラーゼインヒビターまたは少なくとも2つの異なるDNAポリメラーゼインヒビター(例えば、逆転写酵素と複合体を形成することができるDNAポリメラーゼおよびDNA依存性DNAポリメラーゼと複合体を形成することができる第2のDNAポリメラーゼインヒビターが含まれるが、これらに限定されない)を含み得る。一定のプライマー伸長反応の説明を、特に、Sambrookら、Sambrook and Russell、Ausubelら、およびChenらの米国特許公報番号10/947,460号に見出すことができる。

【0091】

本教示のいくつかの実施形態では、増幅は、2工程反応(限定されたサイクル数(例えば、2、3、4、または5回の増幅サイクルが含まれるが、これらに限定されない)の増幅が起こる増幅前工程、およびその後の得られたアンプリコンを一般に希釈し、希釈アンプリコンの一部をさらなる増幅サイクルに供するその後の増幅工程が含まれるが、これらに限定されない)を含む(例えば、Marmaro and Gordesの米国特許第6,605,451号およびAndersen and Ruffの米国特許公報番号US2004/0175733号を参照のこと)。いくつかの実施形態では、増幅前工程、その後の増幅工程、またはその両方は、DNAポリメラーゼインヒビターを含む。

【0092】

一部の実施形態では、増幅反応は、多重増幅を含む。この多重増幅は、複数の異なる標的核酸および/または複数の異なる増幅産物種を、複数の異なるプライマー組、複数の異なるライゲーションプローブ組、複数の異なる切断プローブ組、またはこれらの組み合わせを使用して同時に増幅する(例えば、Henegariuら、BioTechniques 23:504-11, 1997; Belgraderら、Development of a Multiplex Ligation Detection Reaction DNA Typing Assay, Sixth International Symposium on Human Identification (1995); およびRapley(特に、79章)を参照のこと)。開示の方法の一部の実施形態は、並行して行われる多重増幅反応および単回(singleplex)増幅反応(複数の単回または少数回(lowerplex)の反応(例えば、二重、三重、四重、五重、または六重の反応が含まれるが、これらに限定されない)が含まれる)を含む。

【0093】

一部の実施形態では、増幅反応は、非対称PCRを含む。一部の実施形態によれば、非対称PCRは、(i)プライマー対の対応するプライマーと比較してあるプライマーが過剰な(例えば、5倍、10倍、または20倍過剰が含まれるが、これらに限定されない)少なくとも1つのプライマー対、(ii)たった1つの順方向プライマーまたはたった1つの逆方向プライマーを含む少なくとも1つのプライマー対、(iii)所与の増幅条件中に1つの鎖および無効の対応するプライマーが増幅されるプライマーを含む少なくとも1つのプライマー対、または(iv)上記の(i)および(iii)の両方の記載を満たす少なくとも1つのプライマー対を含む反応組成物を含む。したがって、標的核酸および

10

20

30

40

50

／またはアンプリコンが増幅される場合、（その相補物と比較して）その後の増幅産物の一方の鎖が過剰に生成される。非対称PCRの説明を、特に、McPherson（特に、第5章）およびRapley（特に、第64章）に見出すことができる。

【0094】

一部の実施形態では、一方のプライマーのT_mが他方のプライマーのT_mより高い少なくとも1つのプライマー対を使用することができる（時折、A-PCRと呼ばれる）（例えば、Chenらの米国特許公報番号US 2003/0207266 A1号を参照のこと）。一部の実施形態では、順方向プライマーのT_mは、対応する逆方向プライマーのT_mと少なくとも4～15℃異なる。一部の実施形態では、順方向プライマーのT_mは、対応する逆方向プライマーのT_mと少なくとも8～15℃異なる。一部の実施形態では、順方向プライマーのT_mは、対応する逆方向プライマーのT_mと少なくとも10～15℃異なる。一部の実施形態では、順方向プライマーのT_mは、対応する逆方向プライマーのT_mと少なくとも10～12℃異なる。一部の実施形態では、少なくとも1つのプライマー対で、順方向プライマーのT_mは、対応する逆方向プライマーのT_mと少なくとも約4℃、少なくとも約8℃、少なくとも約10℃、または少なくとも約12℃異なる。

10

【0095】

A-PCRの一部の実施形態では、プライマー対中のプライマーのT_mの相違に加えて、プライマー対中の一方のプライマーが他方のプライマーと比較して過剰でもある。一部の実施形態では、プライマー対中の一方のプライマーが他方のプライマーと比較して5倍～20倍過剰に存在する。A-PCRの一部の実施形態では、プライマー濃度は、少なくとも50 nMである。

20

【0096】

一定のA-PCRの実施形態によれば、二本鎖アンプリコンまたは標的核酸の両方プライマーがアニーリングし、両方の鎖が増幅されるような第1の増幅サイクル中で従来のPCRを使用することができる。しかし、たった1つの鎖が増幅されるようにより低いT_mのプライマーを無効にすることができる。したがって、より低いT_mのプライマーを無効にするその後のA-PCRサイクルにより、非対称に増幅される。したがって、標的核酸または増幅産物が増幅される場合、（その相補物と比較して）その後の増幅産物の一方の鎖が過剰に生成される。

【0097】

一定のA-PCRの実施形態によれば、従来のPCRサイクリングの第1段階の間のサイクル数の変化によって、増幅レベルを調節することができる。かかる実施形態では、最初の従来のサイクル数の変化により、二本鎖増幅産物の量を変化させることができ、これを、より低いT_mのプライマーが無効なより高い温度のその後のPCRのサイクルに供する。

30

【0098】

増幅産物の一定の至適化方法は、当業者に公知である。例えば、アニーリング、重合、および変性の時間および温度の変化、ならびに反応組成物中の緩衝液、塩、および他の試薬の変化によってPCRを至適化することができることが公知である。使用されるプローブおよび／またはプライマーのデザインも、至適化に影響を及ぼし得る。例えば、プローブおよび／またはプライマーの長さならびにG-C:A-T比は、アニーリング効率を変化させ、それにより、増幅反応を変化させることができる。増幅至適化の説明を、特に、James G. Wetmur, "Nucleic Acid Hybrids, Formation and Structure," in Molecular Biology and Biotechnology, pp. 605-8, (Robert A. Meyers ed., 1995); McPherson（特に第4章）; Rapley; およびProtocols & Applications Guide, rev. 9/04, Promegaに見出すことができる。

40

【0099】

一定の反応組成物は、dUTPおよびウラシル-N-グリコシラーゼ（UNG；例えば

50

、AmpErase（登録商標）、Applied Biosystems）またはウラシル-DNAグリコシラーゼ（UDG；New England BioLabs, Beverly, MA）をさらに含む。増幅反応におけるdUTPおよびUNGの使用の考察を、例えば、Kwokら、Nature, 339:237-238, 1989；McPherson；Longoら、Gene, 93:125-128, 1990；およびGelbandらの米国特許第5,418,149号に見出すことができる。

【0100】

一定の方法の実施形態では、増幅は、ヘリカーゼ（大腸菌UvrDヘリカーゼ、DnaBヘリカーゼ、またはバクテリオファージT7遺伝子4タンパク質が含まれるが、これらに限定されない）、DNAポリメラーゼ（DNAポリメラーゼIIIまたはDNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントが含まれるが、これらに限定されない）、ヘリカーゼアクセサリタンパク質（MutLタンパク質が含まれるが、これに限定されない）、一本鎖結合タンパク質（SSB）（大腸菌SSB、T7遺伝子2.5 SSB、T4遺伝子32タンパク質、および／またはRB49遺伝子32タンパク質が含まれるが、これらに限定されない）、またはこれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、ヌクレオチド配列およびクエンチャーを含む酵素インヒビターを、第1の温度で複合体中にて酵素インヒビターおよびヘリカーゼが相互に会合するが、第2の温度では会合せず、この温度で酵素インヒビターおよびヘリカーゼが解離する場合、ヘリカーゼの酵素活性を阻害するようにデザインする。一部の実施形態では、ヘリカーゼインヒビターのヌクレオチド配列はアプタマーを含む。いくつかの実施形態では、ヘリカーゼインヒビターのヌクレオチド配列は、第1の温度で二本鎖セグメントを形成することができるが、典型的には、第2の温度で形成できない。

【0101】

いくつかの実施形態では、増幅は、リガーゼ媒介増幅技術（例えば、LDR、LCR、FEN-LCR、ライゲーション媒介増幅技術のギャップオリゴヌクレオチドおよびギャップ充填バージョン、リガーゼ媒介増幅のパッドロック（padlock）バージョン、ならびにPCRおよび／または他の増幅アプローチと併せたライゲーションアプローチ（その多重バージョンが含まれる）を含む（例えば、Demidov and Broude（特に、第1.3章）；Lizardiら、Nat. Genetics 19:225-32（1998）；Biらの米国特許第6,511,810号；およびWenz and Schrothの米国特許公報番号US 2003/0190646A1号を参照のこと）。リガーゼ媒介増幅を含む一定の方法によれば、ヌクレオチド配列およびクエンチャーを含むリガーゼインヒビターは、第1の温度で会合して、リガーゼ-リガーゼインヒビター複合体を形成する。リガーゼインヒビターと会合した場合、リガーゼの酵素活性は阻害されてリガーゼインヒビターの非存在下で起こり得る誤ライゲーションの少なくともいくつかは減少し、それより、一定の二次アンプリコンが減少し、バックグラウンド蛍光が減少する。リガーゼ-リガーゼインヒビター複合体を含む反応組成物を第2の温度に加熱した場合、リガーゼインヒビターがリガーゼから解離し、隣接してハイブリッド形成したプローブを効率的にライゲーションすることができる。一部の実施形態では、5'末端下流ライゲーションプローブおよび対応する上流ライゲーションプローブの3'末端は、これらが標的核酸またはその相補物にハイブリッド形成する場合に直接隣接せず、ギャップ充填工程を使用して、下流プローブの5'末端と並列して上流プローブの3'末端に伸長する。他の実施形態では、「ギャップオリゴヌクレオチド」がライゲーションプローブの対峙する末端の間のギャップ中でハイブリッド形成できるように、下流プローブの5'末端と上流プローブの3'末端との間にギャップが存在する。一定のかかる実施形態では、5'末端下流プローブをギャップオリゴヌクレオチドの3'末端にライゲーションすることができ、上流プローブの3'末端をギャップオリゴヌクレオチド5'末端にライゲーションすることができる。

【0102】

一部の実施形態では、リガーゼインヒビターのヌクレオチド配列は、アプタマーを含む

。いくつかの実施形態では、リガーゼインヒビターのヌクレオチド配列は、第1の温度で二本鎖セグメントを形成することができるが、典型的には、第2の温度では形成できない。

【0103】

一定のギャップ充填LCRまたはギャップ充填LDR増幅技術によれば、DNAポリメラーゼおよびDNAポリメラーゼインヒビターを含む複合体を第1の温度で形成し、DNAポリメラーゼ活性を阻害することができる。一部の実施形態では、リガーゼおよびリガーゼインヒビターは第1の温度で複合体を形成し、誤アニーリングされたライゲーションプローブのライゲーション（時折、誤ライゲーションと呼ばれる）を阻害する。

【0104】

当業者は、開示の酵素インヒビター、複合体、方法、およびキットを、プライマーおよび／またはプローブが誤アニーリングし、その後に望ましくない二次アンプリコンが形成され得る酵素媒介増幅を行う種々の異なる状況で適用できると認識する。バックグラウンド蛍光を少なくとも減少させるためのクエンチャーを含む酵素インヒビターの使用から利益を得ることができる任意の酵素媒介増幅技術は、本教示の意図する範囲内に含まれる。

【0105】

増幅されたか配列決定された標的核酸を、当該分野で公知の任意の技術（消光可能な放射（蛍光、化学発光、生物発光、およびリン光など（例えば、レーザー誘導蛍光および電気化学発光が含まれるが、これらに限定されない）が含まれるが、これらに限定されない）の直接または間接的な測定、定量、および／または観察を含む）によって検出することができる。開示の方法のいくつかの実施形態によれば、検出は、任意のリアルタイム検出技術または終点検出技術を含み得る。適切な検出技術のいくつかの非限定的な例には、核酸色素、いくつかの実施形態では、少なくとも1つのレポータープローブを含む融解曲線技術、Q-PCR、または他のリアルタイム技術、および電気泳動技術（ゲル電気泳動が含まれるが、これに限定されない）が含まれる。当業者は、広範な検出可能な放射を集合的に対象とし、適切な吸収スペクトルを有するクエンチャーの放射源との対合によって放射源らの少なくともいくつかの放射を減少させることができる種々のクエンチャー部分が利用可能である。

【0106】

いくつかの実施形態では、本教示の方法は、Q-PCRを含む。リアルタイムPCRとしても公知の用語「定量PCR」または「Q-PCR」は、PCR増幅産物を特異的、非特異的、またはその両方で定量するための種々の方法をいう（例えば、Raeymakers, Mol. Biotechnol. 15:115-22 (2000); Joyce, Quantitative RT-PCR, in Methods in Mol Biol., vol. 193, O'Connell, ed., Humana Press; Piersonら、Nucl. Acids Res. 31(14):e73 (2003)）。かかる方法を、速度ベースの系（典型的に、一般に増幅因子（閾値サイクル（threshold cycle）（ C_t ））などを決定または比較する）または同時増幅法（一般に、標的および標準的テンプレートの同時増幅から生成された産物の量を比較する）として分類する。Q-PCR技術は、一般に、レポータープローブ、核酸色素、または両方を含む。例えば（制限されない）、TaqMan（登録商標）プローブ（Applied Biosystems）、i-プローブ、分子ビーコン、Eclipseプローブ、スコピオンプライマー、Lux（商標）プライマー、FRETプライマー、臭化エチジウム、および非対称性シアニン色素（例えば、SYBR（登録商標）Green I（Molecular Probes）、YO-PRO-1、Hoechst 33258、BOXTO（TATAA Biocenter, Goteborg, Sweden）、およびPicoGreen（登録商標）（Molecular Probes）が含まれるが、これらに限定されない）。

【0107】

いくつかの実施形態では、本教示の方法を、配列決定反応前または同時に行う。用語「配列決定」は、本明細書中にて広義で使用され、ポリヌクレオチドの少なくとも一部における少なくともいくつかの連続ヌクレオチド（例えば、標的核酸またはアンプリコンが含まれるが、これらに限定されない）の順序が同定される当該分野で公知の任意の技術を行う。配列決定技術のいくつかの非限定的な例には、Sangerのジデオキシターミネーター法およびMaxam and Gilbertの化学的切断法（これらの方法の変形形態が含まれる）、ハイブリッド形成による配列決定、合成による配列決定、および制限マッピングが含まれる。いくつかの配列決定法は、電気泳動（キャピラリー電気泳動およびゲル電気泳動が含まれる）、ハイブリッド形成（マイクロアレイハイブリッド形成が含まれる）による配列決定、質量分析、および単一分子の検出を含む。いくつかの実施形態では、配列決定法は、直接配列決定、二重鎖配列決定、サイクル配列決定、単一塩基伸長配列決定（SBE）、固相配列決定、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、配列決定法は、装置（例えば、ABI PRISM（登録商標）377 DNAシーケンサー、ABI PRISM（登録商標）310、3100、3100-Avant、3730、または3730xI遺伝子分析器、ABI PRISM（登録商標）3700 DNA分析器（全てApplied Biosystems）、または質量分析計が含まれるが、これらに限定されない）を使用した配列決定産物の検出を含む。いくつかの実施形態では、配列決定法は、dNTP（dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP、dITP、またはこれらの組み合わせが含まれる）（dNTPのジデオキシリボヌクレオチドアナログが含まれる）の増幅産物への組み込みを含む。

【0108】

当業者は、典型的には、使用される配列決定法が本発明の方法を制限しないと認識するであろう。むしろ、典型的には、対応するアンプリコンまたは標的核酸の少なくとも一部の少なくともいくつかの連続するヌクレオチドの順序が得られる任意の配列決定技術を、本方法と共に使用することができる。いくつかの実施形態では、配列決定工程前に、酵素分解（エクソヌクレアーゼIおよびエキソアルカリホスファターゼ消化（例えば、ExoSAP-IT（登録商標）試薬（USB Corp., Cleveland, OH）が含まれるが、これに限定されない）が含まれるが、これらに限定されない）によって非組み込みプライマーおよび／またはdNTPを除去する。いくつかの実施形態では、非組み込みプライマー（dNTPsおよび／またはddNTP）を、ゲルまたはカラムでの精製、沈殿、濾過、ビーズ、磁選、またはハイブリッド形成ビーズの取り出しによって除去する（例えば、ABI PRISM（登録商標）Duplex（商標）384 Well F/R Sequence Capture Kit, Applied Biosystems P/N 4308082を参照のこと）。一部の実施形態では、増幅産物またはかかる反応組成物の少なくとも一部を含む反応組成物を、精製工程を介入することなく配列決定反応に供する（例えば、Baskinらの米国特許公報番号US 2002/0137047 A1号を参照のこと）。配列決定技術の説明を、特に、McPherson（特に、第5章）；Sambrook and Russell；Ausubelら；Siu zdak, The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology, MCC Press, 2003（特に、第7章）；およびRapley（特に、パートVI）に見出すことができる。

【0109】

いくつかの実施形態では、開示の方法およびキットは、マイクロ流体デバイス、「ラボオンチップ」、またはマイクロトータル分析システム（micrototal analytical system）（ μ TAS）を含む。いくつかの実施形態では、マイクロ流体デバイスを使用して、サンプル調製を行う。いくつかの実施形態では、マイクロ流体デバイスを使用して、増幅反応を行う。いくつかの実施形態では、マイクロ流体デバイスを使用して、配列決定またはリアルタイムPCR反応を行う。いくつかの実施形態では、マイクロ流体デバイスを使用して、増幅産物の少なくとも一部のヌクレオチド配列を得る。例示的マイクロ流体デバイスの説明を、特に、公開PCT出願番号WO/018534

1号およびWO 04/011666号; Kartalov and Quake, Nucleic Acids Res. 32:2873-79, 2004; および Fiorini and Chiu, BioTechniques 38:429-46, 2005に見出すことができる。

【0110】

一定の例示的实施形態

本教示は、典型的には、少なくとも1つの酵素ならびに少なくとも1つのヌクレオチド配列および少なくとも1つのクエンチャーを含む少なくとも1つの酵素インヒビターを含む反応組成物中の標的核酸の増幅およびバックグラウンド蛍光の減少のための組成物、方法、およびキットを提供する。

10

【0111】

本発明の酵素インヒビターは、ヌクレオチド配列およびクエンチャーを含む。かかる酵素インヒビターのヌクレオチド配列を、特に、非標的配列の誤プライミング事象、ライゲーションプローブおよび／または切断プローブの誤アニーリング、およびプライマー二量体形成、第1の温度で酵素活性を阻害するが第2の温度で阻害しないことによる望ましくない増幅産物の形成を減少させるようにデザインする。二次アンプリコン形成の減少により、反応組成物中の非特異的蛍光の少なくとも1つの成分が減少する。開示の酵素インヒビターも、適切な条件下で自己消光するようにデザインする。開示のインヒビターのクエンチャー部分を、酵素インヒビターが溶液中で遊離しているか酵素と複合体化する場合に、第1の温度範囲での酵素インヒビターの二本鎖セグメントへの核酸色素分子の会合によって生成される蛍光シグナルの少なくともいくつかは吸収されるようにデザインする。したがって、酵素インヒビターのクエンチャーにより、バックグラウンド蛍光のこの第2の供給源の少なくともいくつかは阻害され、さらに、反応組成物中の非特異的蛍光を減少する。

20

【0112】

一定の例示的酵素インヒビター

本教示によれば、ヌクレオチド配列およびクエンチャーを含む酵素インヒビターを、酵素の少なくとも1つの酵素活性を阻害するようにデザインする一方で、酵素インヒビター-酵素複合体中で酵素インヒビターを酵素に会合する。少なくとも1つの二本鎖セグメントを含む構造を形成することができるようには酵素インヒビターのヌクレオチド配列をデザインし、酵素インヒビターの二本鎖セグメントに会合した場合に核酸色素から放射される蛍光のすくなくともいくつかを吸収することができるようにはクエンチャーを選択する。酵素-酵素インヒビター複合体は、第1の温度（例えば、室温（典型的には、約22℃～28℃）および望ましいテンプレート伸長温度を超えるか、この温度か、これをわずかに超える温度が含まれるが、これらに限定されない）で形成し、そして／または会合を維持することができる。酵素-酵素インヒビター複合体を含む反応組成物を第2の温度に加熱した場合、複合体が解離するにつれて酵素が放出される。開示のRNAポリメラーゼインヒビターを、インヒビターおよびRNAポリメラーゼが複合体中で会合された場合にRNAポリメラーゼの重合活性を阻害するようにデザインする。開示のリガーゼインヒビターを、リガーゼインヒビターおよびリガーゼが複合体中で会合した場合にテンプレート上の2つの隣接してハイブリッド形成したヌクレオチド鎖の間のホスホジエステル形成を阻害するようにデザインする。開示のヘリカーゼインヒビターを、複合体中でヘリカーゼインヒビターおよびヘリカーゼが会合した場合に二本鎖核酸のほぐれを触媒するヘリカーゼの能力を阻害するようにデザインする。一定の開示の切断酵素インヒビターを、複合体中で切断酵素インヒビターおよび切断酵素が会合した場合に切断酵素の5'-ヌクレアーゼ活性を阻害するようにデザインする。一部の実施形態では、リガーゼインヒビター、RNAポリメラーゼインヒビター、ヘリカーゼインヒビター、および／または切断酵素インヒビターのヌクレオチド配列は、アダプターを含む。本教示の酵素インヒビターの阻害活性は、典型的には、正確なインヒビター配列に有意に依存しない。むしろ、酵素インヒビターの全構造およびその融点が、酵素インヒビターが対応する酵素の意図する酵素活性を阻害す

30

40

50

るかどうかの主な決定因子である。一部の実施形態では、酵素インヒビターを、対応する酵素の基質を模倣し、それにより、酵素がインヒビターに結合して酵素活性が阻害された複合体を形成する第1の温度での高次構造を想定するようにデザインする。第2の温度では、ほはや基質を模倣せず、複合体から酵素が放出されるように、酵素インヒビターの高次構造を変化させることができる。したがって、開示のインヒビターは、典型的には、阻害効果がある場合、インヒビターが実質的に一本鎖であり、そして／または酵素と複合体を形成しない場合、阻害効果が有意に低い。いくつかの実施形態では、酵素インヒビターのヌクレオチド配列は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、非ヌクレオチドリinker、またはこれらの組み合わせを含む。

【0113】

開示のリガーゼインヒビターは、標的核酸または所望のアンプリコン上の対応する配列へのライゲーションプローブまたは切断プローブのアニーリング（例えば、ライゲーションしたプローブ）を有意に妨害しない。開示のヘリカーゼインヒビターは、対応する標的隣接配列またはアンプリコンへのプライマーのハイブリッド形成を有意に妨害しない。開示の切断酵素インヒビターは、標的核酸もしくは所望のアンプリコン上の対応する配列への切断プローブまたはライゲーションプローブのアニーリングまたは対応する標的隣接配列および／またはアンプリコンとのプライマーのハイブリッド形成を有意に妨害しない。

【0114】

開示のDNAポリメラーゼインヒビターを、第1の温度（例えば、プライマーのおよそ T_m または T_m 未満の温度）にてDNAポリメラーゼインヒビター-DNAポリメラーゼ複合体中でインヒビターがDNAポリメラーゼ、任意選択的に、NTPおよび／またはヌクレオチドアナログと会合した場合にDNAポリメラーゼの重合活性を阻害するようにデザインする。本教示のDNAポリメラーゼインヒビターの阻害能力は、一般に、正確なインヒビター配列に有意に依存しない。むしろ、DNAポリメラーゼインヒビターの全構造およびその融点が、DNAポリメラーゼインヒビターがDNAポリメラーゼの酵素活性（すなわち、重合）を阻害するかどうかの主な決定因子である。典型的には、開示のDNAポリメラーゼインヒビターは、これらが二本鎖セグメントを含み、且つ、複合体中でDNAポリメラーゼ、任意選択的に、NTPおよび／またはヌクレオチドアナログと会合した場合にDNAポリメラーゼの重合活性を阻害する。しかし、開示のDNAポリメラーゼインヒビターは、阻害効果がある場合、インヒビターが一本鎖であり、且つDNAポリメラーゼと複合体を形成しない場合、阻害効果が有意に低い。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターの T_m を、選択した重合反応またはプライマー伸長反応で使用されるアニーリングされたプライマーのプライマー伸長のために使用される温度とおおよそ同一であるかより低いように選択するが、常にそう言うわけではない。いくつかの実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターの融点は、プライマー伸長温度よりもいくらか高い（例えば、DNAポリメラーゼインヒビターを低濃度で使用する反応組成物が含まれるが、これに限定されない）。

【0115】

典型的には、本教示のDNAポリメラーゼインヒビターは、第1の温度またはそれ未満で少なくとも1つの二本鎖セグメントを含むが、第2の温度またはそれを超える温度で一本鎖または実質的に一本鎖である。したがって、第1の温度では、複合体中のDNAポリメラーゼの酵素活性が阻害され、第2の温度ではDNAポリメラーゼが活性を示して増幅反応が起こり得る。

【0116】

例示的な第1の温度には、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、約22℃～約40℃、約25℃～約35℃、および約22℃～約28℃が含まれ、特定の第1の温度範囲の全ての介入温度が明確に含まれる。例示的な第2の温度には、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃、50℃、51℃、52℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃

10

20

30

40

50

、71℃、72℃、73℃、約48℃～約73℃、約53℃～約67℃、約63℃～約67℃、および約64℃～約66℃が含まれ、特定の第2の温度範囲の全ての介入温度が明確に含まれる。当業者は、所与の増幅反応のための適切な第1および第2の温度は、少なくとも一部が、酵素、酵素インヒビターのT_m、ならびに／またはプライマーおよび／もしくはプローブのT_mに依存するが、適切な温度を、当該分野で公知の方法を使用して、過度に実験することとなる日常的に決定することができ、本教示によってその情報が与えられることを理解するであろう。

【0117】

一部の実施形態では、本教示のDNAポリメラーゼインヒビターのヌクレオチド配列は、1つのオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、かかるDNAポリメラーゼインヒビターは、第1の領域、第2の領域、第3の領域、および、任意選択的に第4の領域を含み、第1の領域が第3の領域に相補的である。適切な条件下（第1の温度が含まれる）では、DNAポリメラーゼインヒビターがステムループまたはヘアピン高次構造を想定するように、DNAポリメラーゼインヒビターの第1の領域および第3の領域がアニーリングして少なくとも1つの二本鎖セグメントを形成することができる。一部の実施形態では、第1の領域中のヌクレオチドのたった1つのサブセットが第3の領域中の対応するサブセットに相補的である。いくつかの実施形態では、開示のDNAポリメラーゼインヒビターは、ヌクレオチドアナログを含み、このアナログは、DNAポリメラーゼインヒビターのT_mに影響を及ぼしても及ぼさなくても良い。

【0118】

1つのオリゴヌクレオチドを含むいくつかの例示的なDNAポリメラーゼインヒビターを、図1に概略的に示す。図1Aに示す例示的DNAポリメラーゼは、図1を通して黒のストライプで示す第1の領域（1）、図1を通して波線で示す第2の領域（2）、第3の領域（3）、および任意選択的な第4の領域（[4]、本実施形態で任意選択的であることを示すために角括弧で示す）を含む。この例示的インヒビターの3'末端は、ジデオキシシトシン（ddCと示す）を含む末端ヌクレオチドによって伸長できない。第1の領域（1）は、クエンチャー（5）をさらに含む。インヒビターがループを形成する第2の領域（2）および5'一本鎖オーバーハングとしての第4の領域（4）とステムループ高次構造で存在するように、例示的インヒビターを、第3の領域（3）にアニーリングして二本鎖セグメントを形成する第1の領域（1）と共に示す。一部の実施形態では、特に、インヒビターを一定の逆転写酵素と複合体化するようにデザインする場合、かかるDNAポリメラーゼインヒビターの第4の領域の一本鎖オーバーハングは、少なくともいくつかのリボヌクレオチドを含む。図1Bに示す例示的DNAポリメラーゼインヒビターは、第1の領域（1）、第2の領域（2）、および第3の領域（3）を含むが、第4の領域を含まない。第1の領域（1）および第3の領域（3）はアニーリングしてステムを形成し、第2の領域（2）はループ構造を形成し、クエンチャー（5）をさらに含む。図1Cに示す例示的DNAポリメラーゼインヒビターは、Q1として示す第1のクエンチャー（6）を含む第1の領域（1）、Q2として第2のクエンチャー（7）を含む第2の領域（2）、第3の領域（3）、および任意選択的な第4の領域（[4]）を含む。図1Dに示す例示的DNAポリメラーゼインヒビターは、第1の領域（1）、第2の領域（2）、第3の領域（3）、および5'末端にQとして示すクエンチャー（5）を含む任意選択的な第4の領域（[4]）を含む。

【0119】

一定のDNAポリメラーゼインヒビターの実施形態では、ヌクレオチド配列は、第1の領域、第2の領域、第3の領域、第4の領域、第5の領域、および第6の領域を含み、第1の領域は第3の領域に相補的であり、第1の温度で第1の領域および第3の領域が少なくとも1つの二本鎖セグメントを形成することができ、第4の領域は第6の領域に相補的であり、第1の温度で第4の領域および第6の領域は少なくとも1つの二本鎖セグメントを形成することができ、第6の領域の3'末端と第1の領域の5'末端との間に少なくとも1つの一本鎖領域が存在し、第6の領域の3'末端は伸長できないヌクレオチドを含む

。

【0120】

他のDNAポリメラーゼインヒビターの実施形態では、ヌクレオチド配列は、少なくとも2つの異なるオリゴヌクレオチド（例えば、第1のオリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない）を含む。DNAポリメラーゼインヒビターが2つのオリゴヌクレオチドを含む一部の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドは第1の領域を含み、第2のオリゴヌクレオチドは第3の領域、および、任意選択的な第4の領域を含み、第1のオリゴヌクレオチドの第1の領域は第2のオリゴヌクレオチドの第3の領域に相補的である。一部の実施形態では、第1の領域中のたった1つのサブセットが第3の領域の対応するセグメントに相補的である。適切な条件下（第1の温度が含まれる）では、第1のオリゴヌクレオチドの第1の領域および第2のオリゴヌクレオチドの第3の領域がアニーリングして、少なくとも1つの二本鎖セグメントを含む二重鎖を形成することができる。本教示のDNAポリメラーゼインヒビターが第2の温度（例えば、第2の温度範囲が含まれるが、これに限定されない）に加熱される場合、このインヒビターは、一本鎖または実質的に一本鎖の高次構造を想定するが、ステムループまたは二重鎖高次構造を想定しない。

10

【0121】

2つまたはそれを超えるオリゴヌクレオチドを含むいくつかの例示的酵素インヒビターを、図2に概略的に示す。図2Aに示す例示的DNAポリメラーゼインヒビターは、第3の領域（3）を含む第2のオリゴヌクレオチドにアニーリングする、図2を通して黒のストライプで示す第1の領域（1）および図2を通して黒で影をつけた第4の領域（4）を含む。この例示的DNAポリメラーゼインヒビターの第1のオリゴヌクレオチドは、Qとして示すクエンチャーをさらに含む。図2Bに示す例示的DNAポリメラーゼインヒビターは、第3の領域（3）および第4の領域（4）を含む第2のオリゴヌクレオチドにアニーリングする、第1の領域（1）を含む第1のオリゴヌクレオチドを含む。この例示的DNAポリメラーゼインヒビターでは、クエンチャー（Q）は第4の領域（4）に結合している。図2Cに示す例示的DNAポリメラーゼインヒビターは、第1のクエンチャー（Q1として示す）を含む第1の領域を含む第1のオリゴヌクレオチドならびに第3の領域（3）および第2のクエンチャー（Q2として示す）を含む第4の領域（4）を含む第2のオリゴヌクレオチドを含む。図2Dに示す例示的DNAポリメラーゼインヒビターは、第3の領域（3）を含む第2のオリゴヌクレオチドにアニーリングする、第1の領域（1）を含む第1のオリゴヌクレオチドを含み、第2のオリゴヌクレオチドはクエンチャー（Qとして示す）を含む。図2Eに示す例示的DNAポリメラーゼインヒビターは、第1の領域（1）を含み、第3の領域（3）を含む第2のオリゴヌクレオチドにアニーリングする第1のオリゴヌクレオチドを含み、第1のオリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチドの両方がクエンチャーを含む（Q1およびQ2として示す）。

20

30

【0122】

一部の実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターのヌクレオチド配列は、アプタマーに結合した場合にDNAポリメラーゼに結合してその酵素活性を阻害するアプタマーを含む。いくつかの実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターは、少なくとも1つの二本鎖セグメントを含むアプタマーを含む。アプタマーが溶液中で遊離しているか複合体中でDNAポリメラーゼに結合している場合、クエンチャーは、アプタマーに会合した核酸色素分子によって生成された少なくともいくつかの蛍光シグナルを吸収する。

40

【0123】

開示のDNAポリメラーゼインヒビターは、対応する標的隣接配列および／またはアンプリコンとのプライマーハイブリッド形成を有意に妨害しない。DNAポリメラーゼインヒビターの二本鎖セグメントに会合した核酸色素分子の蛍光強度の減少および二次アンプリコン形成の減少に加えて、本教示のいくつかのDNAポリメラーゼインヒビターは、DNAポリメラーゼインヒビターを含まない並行増幅反応と比較して所望のアンプリコンの収率を増加させる。

50

【0124】

いくつかの実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターの3'末端は、典型的には、非伸長ヌクレオチド（遮断基を含む末端ヌクレオチドが含まれるが、これに限定されない）の存在により、DNAポリメラーゼによって伸長できない。遮断基は、DNAポリメラーゼによるヌクレオチド付加を防止または最小にするためにヌクレオチドまたは核酸に付加することができる化学的部分である。末端3'-OHへの遮断基の付加により、ヌクレオチドは、もはやDNAポリメラーゼによって触媒されるホスホジエステル結合の形成に関与できない。遮断基のいくつかの非限定的な例には、アルキル基、非ヌクレオチドリinker、ホスホチオアート、アルカンージオール残基、PNA、LNA、3'-ヒドロキシル基の代わりに3'アミノ基を含むヌクレオチドアナログ、5'リン酸基の代わりに5'ヒドロキシル基を含むヌクレオチドアナログ、および3'OH基を欠くヌクレオチドアナログが含まれる。アルキル遮断基は、直鎖、分岐鎖、環式、またはこれらの組み合わせであり得る飽和炭化水素である。非伸長ヌクレオチドのいくつかの非限定的な例は、水素またはフッ素との置換またはエステル、アミド、スルフェート、またはグリコシドの形成などによって修飾された3'-ヒドロキシル基を有するヌクレオチドが含まれる。これらのヌクレオチドは、一般に、鎖が伸長できない。使用することができる非伸長ヌクレオチドの他の例には、修飾リボース部分を有するヌクレオチドが含まれる。一部の実施形態では、リボヌクレオチドにおけるオリゴヌクレオチドの終結によって一定のDNAポリメラーゼによって伸長することができないので、リボヌクレオチドは、非伸長ヌクレオチドとしての機能を果たし得る。リボースを、3'-デオキシ誘導体（3'-ヒドロキシが水素以外の官能基（例えば、アジド基など）に置換される誘導体が含まれる）を含むように修飾することができる。一部の実施形態では、非伸長ヌクレオチドは、ジデオキシヌクレオチド（ddN）（例えば、ジデオキシアデノシン（ddA）、ジデオキシシトシン（ddC）、ジデオキシグアノシン（ddG）、ジデオキシチミジン（ddT）、またはジデオキシウリジン（ddU）を含む。

10

20

【0125】

いくつかの実施形態では、酵素インヒビターは、2つのクエンチャー、3つのクエンチャー、または3つを超えるクエンチャーを含む。一定のインヒビターの実施形態では、第1の領域はクエンチャーを含み、そして／または第3の領域は第3のクエンチャーを含む。一部の実施形態では、第2の領域はクエンチャーを含む。いくつかの実施形態では、第4の領域はクエンチャーを含む。一部の実施形態では、第5の領域はクエンチャーを含む。一部の実施形態では、第6の領域はクエンチャーを含む。いくつかの実施形態では、酵素インヒビターは、ヌクレオチド配列の3'末端、ヌクレオチド配列の5'末端、および／または内部にクエンチャーを含む。いくつかの実施形態では、酵素インヒビターは、第2の領域を含み、いくつかの実施形態では、ステムループ高次構造のループを形成する第5の領域を含む。一部の実施形態では、ループはクエンチャーを含む。

30

【0126】

開示のリガーゼインヒビターは、対応する標的核酸および／またはアンプリコンとのライゲーションプローブアニーリング、および、一部の実施形態では、切断プローブアニーリングおよび／またはプライマーアニーリングを有意に妨害しない。開示の切断酵素インヒビターは、対応する標的核酸またはアンプリコンとの切断プローブアニーリング、および、一部の実施形態では、ライゲーションプローブアニーリングおよび／またはプライマーアニーリングを有意に妨害しない。開示のヘリカーゼインヒビターは、対応する標的核酸またはアンプリコンとのプライマーアニーリング、および、一部の実施形態では、切断プローブアニーリングおよび／またはライゲーションプローブアニーリングを有意に妨害しない。酵素インヒビターの二本鎖セグメントに会合した核酸色素分子の蛍光強度の減少および二次アンプリコン形成の減少に加えて、本教示のいくつかの酵素インヒビターは、酵素インヒビターを含まない並行増幅反応と比較して所望のアンプリコンの収率を増加させる。

40

【0127】

50

一部の実施形態では、酵素インヒビターの二本鎖セグメントは、内部塩基対のミスマッチを含む。一部の実施形態では、酵素インヒビターは、ループ構造、典型的には、二本鎖セグメントおよび一本鎖ループを含むステムループ構造を含む。一部の実施形態では、酵素インヒビターは、2つのループ構造を含む。いくつかの実施形態では、酵素インヒビターの第2の領域および／または第5の領域は、インヒビターの相補配列が相互にアニーリングする場合に第1の温度でループ構造（例えば、第3の領域にアニーリングした第1の領域および／または第6の領域にアニーリングした第4の領域が含まれるが、これらに限定されない）を形成することができる。一部の実施形態では、ヌクレオチド配列の第2の領域、第5の領域、または第2の領域および第5の領域は、2～12個のヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログ、および、いくつかの実施形態では、2～6個のヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含む。いくつかの実施形態では、第2および／または第5の領域は、非ヌクレオチドリinkerを含む。一部の実施形態では、酵素インヒビターの第2の領域、第5の領域、または第2および第5の領域は、配列（T）_n（式中、nは1と8との間のTヌクレオチドの任意の数である）（例えば、TT、TTT、TTTT、またはTTTTT）からなるか、本質的になるか、含む。他の実施形態では、第2の領域および／または第5の領域は、ヌクレオチドA、C、および／またはG（これらのいずれかのヌクレオチドアナログが含まれるが、これらに限定されない）からなるか、本質的になるか、含む。いくつかの実施形態では、第2の領域および／または第5の領域は、（1）少なくとも1つのヌクレオチドアナログ（例えば、PNAおよび／またはLNAが含まれるが、これらに限定されない）、および／または（2）非ヌクレオチドリinker（例えば、炭化水素基（-CH₂-）を含む非ヌクレオチド（アルカン、アルケン、またはアルキレン部分、およびエチレングリコール（ポリエチレングリコール（PEG））が含まれるが、これに限定されない）を含むリンカーが含まれるが、これらに限定されない）を含む。典型的には、リンカー基は疎水性ではない。一部の実施形態では、リンカーは親水性であるか、リンカーの少なくとも一部が親水性を示す。当業者は、リンカーが酵素-酵素インヒビター相互作用を妨害せず、第1の温度でリンカーが酵素インヒビター自体をアニーリングするのに十分に柔軟である場合、開示の酵素インヒビター中のリンカーの組成は一般に制限されないと認識する。

【0128】

いくつかの実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターは、ヌクレオチド配列の3'末端、5'末端、または3'末端と5'末端の両方に副溝結合剤を含む。いくつかの実施形態では、副溝結合剤は、内在している。一部の実施形態では、副溝結合剤は、クエンチャー（例えば、MGB-NFQ（Applied Biosystems））が含まれるが、これに限定されない）をさらに含む。副溝結合剤の非限定的な例には、抗生物質（ネトロプシン、ジスタマイシン、ベレニル、ペンタミジン、および他の芳香族ジアミジンなど）、Hoechst 33258、SN 6999、アウレオル酸抗腫瘍薬（クロモイシンおよびミトラマイシンなど）、CC-1065、ジヒドロシクロピロロインドールトリペプチド（DPI₃）、1,2-ジヒドロ（3H）-ピロロ[3,2-e]インドール-7-カルボキシレート（CDPI₃）、ならびに関連する化合物およびアナログが含まれる。副溝結合剤の説明を、特に、Nucleic Acids in Chemistry and Biology, 2d ed., Blackburn and Git（特に、第8.3項）；Kumarら、Nucleic Acids Res. 26:831-838, 1998；Kutyavinら、Nucleic Acids Res. 28:655-661, 2000；Turner and Denny, Curr. Drug Targets 1:1-14, 2000；Kutyavinら、Nucleic Acids Res. 25:3718-25, 1997；Lukhtanovら、Bioconjug. Chem. 7:564-7, 1996；Lukhtanovら、Bioconjug. Chem. 6:418-26, 1995；米国特許第6,426,408号；およびPCT公開出願番号WO03/078450号に見出すことができる。当業者は、副溝結合剤が、典型的には、結合するオリゴヌクレオチドのT_mを増加させ、それにより、より高い温度

10

20

30

40

50

でかかるオリゴヌクレオチドを効率的にハイブリッド形成することが可能であると理解している。副溝結合剤は、特に、Applied Biosystems (Foster City, CA) および Epoch Biosciences (Bothell, WA) から市販されている。

【0129】

いくつかの実施形態では、酵素インヒビターのヌクレオチド配列は、普遍的塩基を含む。いくつかの実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターは、普遍的塩基を含む第4の領域または第6の領域を含む。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼの第3の領域に直接隣接する第4の領域のヌクレオチドは、普遍的塩基を含む。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターの第6の領域と第1の領域との間の一本鎖領域に直接隣接する第6の領域のヌクレオチドは、普遍的塩基を含む。いくつかの実施形態では、普遍的塩基は、DNAポリメラーゼインヒビター-DNAポリメラーゼ複合体中のNTPと相互作用する。

10

【0130】

当業者は、酵素インヒビターの T_m を、過度の実験を行うことなく、周知の方法および本教示によって教授された方法を使用して経験的に決定することができるか、アルゴリズムを使用して T_m を評価することができる。評価した T_m の計算のためのいくつかの式およびコンピュータアルゴリズム（従来のヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログを含むキメラオリゴマーが含まれる）は、当該分野で周知である。オリゴヌクレオチドの1つのかかる予想式 ($T_m = (4 \times G + C \text{ の数}) + (2 \times A \text{ および } T \text{ の数})$) によれば、特定のオリゴヌクレオチド（酵素インヒビター、プローブ、またはプライマーなど）の T_m を、過度の実験を行うことなく、公知の方法を使用して日常的に決定することもできる。 T_m /融点およびその計算の説明を、特に、Rapley; Nielsen, Exiqon Technical Note LNA 02/07. 2002, Exiqon A/S; McPherson; Finnら、Nucl. Acids Res. 17:3357-63, 1996に見出すことができる。

20

【0131】

本教示の酵素インヒビターの融点を、種々の方法で調整することができる。例えば、当業者は、第1および第3の領域、および、一部の実施形態では、第4および第6の領域の相補配列の長さおよび／または組成を、酵素インヒビターの融点を増加または減少するように変化させることができ、第4および第6の領域の相補配列の長さおよび／または組成を、酵素インヒビターの T_m を増加または減少させるために変化させることができると理解している。したがって、一般に、より多数のハイブリッド形成塩基対を有する二本鎖セグメントは、通常、より少数のハイブリッド形成塩基対を有する二本鎖セグメントよりも高い温度で融解する。しかし、長い二本鎖セグメントが望ましい場合、当業者は、塩基対ミスマッチ（例えば、G:T塩基対が含まれるが、これに限定されない）を導入して、融点を調整することができる。一部の実施形態では、酵素インヒビターの二本鎖セグメントは、1つのミスマッチした塩基対、2つのミスマッチした塩基対、3つのミスマッチした塩基対、4つのミスマッチした塩基対、または4つを超えるミスマッチした塩基対を含み、2つまたはそれを超えるミスマッチした塩基対が連続し得るが、その必要はない。

30

40

【0132】

したがって、開示の酵素インヒビターの二本鎖セグメントは、100%相補的である必要はない。その代わり、二本鎖セグメントは、多数または一定の比率のミスマッチまたはゆらぎ塩基対を有し得る。例えば、二本鎖セグメントは、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約11%、約12%、約13%、約14%、約15%、約16%、約17%、約18%、約19%、または20%の塩基対ミスマッチを有し得る。一部の実施形態では、酵素インヒビターの融点を、脱塩基ヌクレオチドアナログ（例えば、糖または糖アナログおよびリン酸またはリン酸アナログを含むアナログが含まれるが、これらに限定されない）を含む二本鎖セグメントのデザインによって調整するが、特に、二本鎖領域中の塩基対を排除するヌクレオチド塩基またはヌクレオチ

50

ド塩基アナログでは調整されない。

【0133】

第2の領域および／または第5の領域を含む酵素インヒビターの融点を、ループ中のヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログ数の増加または減少によって調整することもできる。1つのオリゴヌクレオチドを含む酵素インヒビターの融点を、第1の温度での少なくとも1つの二本鎖セグメントを含み得る領域と第1の温度で二本鎖セグメントを含まない領域との間の接合部での1つまたは複数の「GCクランプ」の有無によって調整することもできる。例えば（限定されない）、ループ構造の塩基（一部の実施形態では、第2の領域に隣接する第1の領域のヌクレオチドであって、第2の領域に隣接する第3の領域のヌクレオチドにアニーリングするヌクレオチド（例えば、図1Aを参照のこと）および／または、いくつかの実施形態では、第5の領域に隣接する第4の領域のヌクレオチドであって、第5の領域に隣接する第6の領域のヌクレオチドにアニーリングするヌクレオチド（例えば、図1Eを参照のこと）が含まれるが、これらに限定されない）。同様に、特に、必要に応じて、GCクランプが酵素インヒビターの第1および第3の領域（ループの塩基が含まれるが、これに限定されない）の相補セグメントの一方または両方の末端、一部の実施形態では、酵素インヒビターの第4および第6の領域の相補セグメントの一方または両方の末端に存在する場合、2つまたはそれを超えるオリゴヌクレオチドを含む酵素インヒビターの T_m を、GCクランプの有無によって調整することができる。酵素インヒビターの融点を、ヌクレオチド配列の第1および／または第3の領域、一部の実施形態では、ヌクレオチド配列の第4および／または第6の領域（例えば、デアザーdAが含まれるが、これに限定されない）中のヌクレオチドアナログによって調整することもできる。 T_m を増加させるヌクレオチドアナログのいくつかの非限定的な例には、C-5プロピニル-dCまたはdCと置換した5-メチル-2'-デオキシシチジン、dAと置換した2,6-ジアミノプリン2'-デオキシリボシド（2-アミノ-dA）、ならびにdTと置換したC-5プロピニル-dUが含まれ、これらは、置換当たり相対融点をそれぞれ約2.8°C、1.3°C、3.0°C、および1.7°C増加させる。

【0134】

二本鎖セグメントの長さを考慮する場合、酵素インヒビターの融点を考慮すべきである。例えば（制限されない）、DNAポリメラーゼインヒビターの T_m が高すぎる場合、DNAポリメラーゼインヒビターはプライマー伸長のための増幅で使用する温度を超える温度で変性し、それにより、所望の重合反応が阻害され、所望のアンプリコンの収量が減少し得る。 T_m が非常に低い場合、DNAポリメラーゼインヒビターは融解し、プライマーが非標的核酸にハイブリッド形成して伸長する温度で不活化するようになり得る。DNAポリメラーゼがかかる非標的核酸を増幅することができる場合、多くの望ましくない産物が最終増幅産物の混合物（プライマー-二量体）中に存在するであろう。一部の実施形態では、酵素インヒビターは、必要に応じて、増幅反応の選択された伸長、ライゲーション、および／または切断反応温度に近いが、有意に高くない融点を有する。いくつかの実施形態では、特に、酵素インヒビターを低濃度で使用する場合、必要に応じて、プライマー伸長温度、ライゲーション温度、または切断反応温度を超える融点を有する酵素インヒビターを使用することができる。典型的には、当業者は、例えば、核酸重合条件下で使用される条件下での酵素インヒビターの融点を決定することができる。

【0135】

例示的DNAポリメラーゼインヒビターは、以下：

【0136】

【化3】

5'-[TCTGG]GATA(デアザdA)TT(デアザdA)TGGTA(デアザdA)ATATGT(DABCYL-T)TTC(デアザdA)TATTTATT(デアザdA)TA(デアザdA)TTATC(MGB-NFQ)-3' (配列番号),

(式中、第4の領域を角括弧で示し、第3の領域を下線で示し、第2の領域を太字で示し

、第1の領域を斜体で示し、第2の領域は第1のクエンチャーを含み（この例では、D A B C Y Lとして示す）、第1の領域は、第2のクエンチャーを含む副溝結合剤を含む（この例では、M G B - N F Qとして示す））を含むか、これからなるか、本質的になる。第1の領域は、2つの領域間の2つの内部G : T塩基対ミスマッチによってこの領域に実質的に相補的であるが、DNAポリメラーゼインヒビターは依然として第1の温度で自己アニーリングする。例示的DNAポリメラーゼインヒビターのいくつかの実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターの3'末端上の末端Cヌクレオチドは、ヌクレオチドアナログであるジデオキシシトシン (d d C) を含む。いくつかの実施形態では、第2の領域は、T T、T T T、またはT T T T Tを含むか、これからなるか、本質的になる。他の実施形態では、第2の領域は、非ヌクレオチドリinkerを含む。いくつかの実施形態では、第2の領域は、クエンチャーを含まない。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターの5'末端は、クエンチャーをさらに含む。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターのGヌクレオチドの少なくとも1つは、ヌクレオチドアナログであるデアザー d Gを含む。いくつかの実施形態では、第1のクエンチャーは、T A M R A（商標）（カルボキシテトラメチルローダミン）、Black Hole Quencher色素（例えば、BHQ-1、BHQ-2、またはBHQ-3（Biosearch Technologies, Inc.））が含まれるが、これらに限定されない）、OREGON GREEN（登録商標）色素（Molecular Probes）、ROX（商標）（カルボキシ-X-ローダミン）、D A B S Y L（4-ジメチルアミノアゾベンゼン-4'-スルホニルクロリド）、またはT E T（テトラクロロフルオレセイン）（D A B C Y L部分の代わりまたはこれに加えて）を含む。いくつかの実施形態では、第2のクエンチャーは、D A B S Y L、D A B C Y L、T A M R A、Black Hole Quencher、ROX、OREGON GREEN、またはT E T（M G B - N F Qの代わりまたはこれに加えて）を含む。選択したクエンチャーが核酸色素に特徴的である波長の蛍光を吸収することができ、インヒビター中のクエンチャーおよび／またはクエンチャーの位置は、インヒビターが自己アニーリングし、そして／または酵素と複合体を形成する能力が実質的に低下しない場合、クエンチャーの選択は、典型的には、本教示を制限しない。

【0137】

別の例示的DNAポリメラーゼインヒビターは、以下：

【0138】

【化4】

5'-(TET)-[TTCTGG]GATAATTATGGTAAATATAITTTATATATTTATTATAATTATddC-3' (配列番号),

（式中、第4の領域を角括弧で示し、第3の領域を下線で示し、第2の領域を太字で示し、第1の領域を斜体で示し、第4の領域はクエンチャーを含む（この例では、T E Tとして示す））を含むか、これからなるか、本質的になる。第1の領域は、第3の領域に相補的である。DNAポリメラーゼインヒビターの第1の3'末端上の末端Cヌクレオチドは、ヌクレオチドアナログであるジデオキシシトシン (d d C) を含む、d d Cがこの例示的DNAポリメラーゼインヒビターを非伸長性にする。いくつかの実施形態では、第2の領域は、T T、T T T T、またはT T T T Tを含むか、これからなるか、本質的になる。いくつかの実施形態では、第2の領域は、非ヌクレオチドリinkerを含む。一部の実施形態では、第2の領域は、クエンチャーを含まない。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターの5'末端は、クエンチャーをさらに含む。一部の実施形態では、Gヌクレオチドの少なくとも1つはヌクレオチドアナログであるデアザー d Gを含む、少なくとも1つのAヌクレオチドはヌクレオチドアナログデアザー d Aを含むか、Gヌクレオチドの少なくとも1つはデアザー d Gを含む、少なくとも1つのAヌクレオチドはデアザー d Aを含む。いくつかの実施形態では、クエンチャーは、T A M R A、Black Hole Quencher色素、ROX、OREGON GREEN、D A B C Y Lまたは

D A B S Y L (T E T 部分) (T E T 部分の代わりまたはこれに加えて) を含む。

【0139】

当業者は、典型的には、開示の酵素インヒビターの長さおよびヌクレオチドおよび／またはヌクレオチドアナログ組成を、インヒビター（特に、二本鎖セグメント）の安定性を最適にし、複合体中で会合した場合に対応する酵素の酵素活性を阻害する能力を増加させるように変化させることができると認識するであろう。当業者はまた、開示の酵素インヒビターが、典型的には、第1の温度での酵素－酵素インヒビター複合体の解離速度（時折、「脱離速度（off-rate）」と呼ばれる）が低い場合に二次増幅産物の形成の阻害でより有効であると認識するであろう。しかし、一定の適用では、より高い濃度の酵素インヒビターの使用によって「より速い」脱離速度を補うことができるかもしれない。当業者は、特定の適用のための酵素インヒビターの適切な濃度を経験的に決定することができるとう理解するであろう。

10

【0140】

本教示の酵素インヒビターは、検出が融解曲線分析（時折、解離曲線分析と呼ばれる）を含む場合に特に有用である。融解曲線または解離曲線を作成するために、反応組成物を、典型的には、段階的様式または漸増的様式で加熱し、反応混合物の蛍光を適切な間隔で検出する。最初に、反応組成物中の非特異的蛍光は、酵素インヒビター中のクエンチャー部分によって最初の加熱プロセス中に減少し、それにより、第1の温度範囲での酵素インヒビターの二本鎖セグメントに会合した核酸色素分子から放射される蛍光が減少する。温度が第2の温度に上昇するにつれて、酵素インヒビターの二本鎖セグメントは融解し始め、酵素インヒビターの二本鎖セグメントに会合した核酸色素分子が放出される。解離曲線中のピーク（蛍光の第1の微分対温度としてプロット）は、酵素インヒビターの解離によって1つまたは複数のアンプリコンの評価を複雑にし得るようであると予想されるであろう。酵素インヒビター中のクエンチャーの存在により、インヒビターの融解に関連する解離ピークが減少するか検出されず、これは、クエンチャーが会合した色素分子から放射された蛍光の少なくともいくつかを吸収し、それにより、酵素インヒビターの解離ピークが少なくとも減少するからである（図3～6を参照のこと）。

20

【0141】

一般に、本教示のDNAポリメラーゼインヒビターを、DNAポリメラーゼを使用する任意の増幅方法で使うことができる。例えば、開示のDNAポリメラーゼインヒビターを、1つまたは複数の以下の方法で使うことができる：DNA配列決定、DNA増幅、RNA増幅、逆転写、DNA合成、および／またはプライマー伸長。開示のDNAポリメラーゼインヒビターを、プライマー伸長（PCRおよび／または逆転写）による標的核酸の増幅のための反応組成物中で使うことができる。本教示のDNAポリメラーゼインヒビターを、一定の配列決定技術で使うこともできる。開示のDNAポリメラーゼインヒビターを、終結ヌクレオチドを使用した一塩基プライマー伸長による一塩基多型（SNP）の試験で使うことができる。その変形形態を含む任意のかかる手順（例えば、ポリヌクレオチドまたはプライマーの標識、およびミニシーケンシングなどが含まれるが、これらに限定されない）は、本明細書中に開示のDNAポリメラーゼインヒビターと使うことが意図される。

30

40

【0142】

いくつかの実施形態では、リガーゼインヒビターは、第1の温度で、リガーゼによってライゲーションすることができるニックを含む基質であるライゲーション基質模倣物としての機能を果たし得るオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、リガーゼインヒビターは、2つの隣接してハイブリッド形成した核酸末端を含むが、少なくとも1つの末端の少なくとも1つの末端ヌクレオチドはインヒビターの「テンプレート」鎖にハイブリッド形成せず、2つの末端は共にライゲーションすることができない。一部の実施形態では、リガーゼインヒビターは、2つの隣接するハイブリッド形成した核酸末端を含むが、少なくとも1つの末端は、リガーゼによってライゲーションされない末端ヌクレオチドを含む。例えば、3'末端ヌクレオチドは3'-ヒドロキシル基を含まないか、5'末

50

端ヌクレオチドは5'リン酸基を含まないか、その両方である。リガーゼによって閉じることができないニックを含む例示的リガーゼインヒビターの実施形態を、図1Eに示す。この例示的リガーゼインヒビターは、第1の領域(1)、第2の領域(2)、第3の領域(3)、第4の領域(4)、第5の領域(8)、および第6の領域(9)を含む。ループ構造として示される第2の領域(2)は、第1のクエンチャー(6)および第5の領域(8)をさらに含み(ループ構造として示される)、第2のクエンチャー(7)をさらに含む。第1の領域(1)は第3の領域(3)にアニーリングして第1の二本鎖セグメントを形成し、第4の領域(4)は第6の領域(9)にアニーリングして第2の二本鎖セグメントを形成する(例えば、第1の温度でも起こり得る)。第6の領域(9)の3'末端は、非ライゲーション末端(10)(例えば、3'-OH基を欠く末端ヌクレオチド(Xとして示す)が含まれるが、これに限定されない)を含む。一部の実施形態では、かかる例示的なリガーゼインヒビターの第6の領域の3'末端および/または第1の領域の5'末端は、「テンプレート鎖」(この例示では、それぞれ、第4の領域(4)および/または第3の領域(3))にアニーリングされない。一部の実施形態では、リガーゼインヒビターの上流末端(図1Eに示す例示的リガーゼインヒビター中で9として示す)は、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、15ヌクレオチド、16ヌクレオチド、17ヌクレオチド、18ヌクレオチド、19ヌクレオチド、20ヌクレオチド、または20を超えるヌクレオチドを含む。リガーゼインヒビターの「上流鎖」の長さを、典型的には、所望のリガーゼのフットプリントと少なくとも同一の長さであるようにデザインし、この長さはより長くても良いと認識すべきである。

【0143】

一部の実施形態では、リガーゼインヒビターは、テンプレート鎖に隣接してハイブリッド形成することができる2つのオリゴヌクレオチドを含むが、ニックの対峙した末端は共にライゲーションに適切であり、例えば(制限されない)、上流鎖の3'末端は3'-OH基を含まないか、下流鎖の5'末端は5'リン酸基を含まないか、その両方である。

【0144】

いくつかのリガーゼインヒビターの実施形態は、少なくとも3つのオリゴヌクレオチド(第1のオリゴヌクレオチド、第2のオリゴヌクレオチド、および第3のオリゴヌクレオチド)を含み、ここで、第1のオリゴヌクレオチドは第1の領域を含み、第2のオリゴヌクレオチドは第3の領域および第4の領域を含み、第3のオリゴヌクレオチドは第6の領域を含み、ここで、第1の領域は第3の領域に相補的であり、第4の領域は第6の領域に相補的である。

【0145】

一定のリガーゼインヒビターは、2つのオリゴヌクレオチド(第1のオリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチド)を含み、ここで、第1のオリゴヌクレオチドは第1の領域、第2の領域、第3の領域、および第4の領域を含み、第2のオリゴヌクレオチドは第6の領域を含み、ここで、第1の領域は第3の領域に相補的であり、第4の領域は第6の領域に相補的である。適切な条件下(第1の温度を含む)では、第1の領域および第3の領域がアニーリングして少なくとも1つの二本鎖セグメントを形成することができ、第4の領域および第6の領域がアニーリングして少なくとも1つの二本鎖セグメントを形成することができる。他のリガーゼインヒビターの実施形態は、2つを超えるオリゴヌクレオチドを含み、これらが適切な条件下(第1の温度を含む)でアニーリングして、リガーゼによって閉じることができない2つの隣接してハイブリッド形成したオリゴヌクレオチド末端の間にニックまたはギャップを含むハイブリッド形成構造を形成することができる。一定のリガーゼインヒビターの実施形態では、上流オリゴヌクレオチドの3'末端、下流オリゴヌクレオチドの5'末端、またはその両方またはこれら付近の少なくとも1つのヌクレオチドは、第1および第2のオリゴヌクレオチドが隣接してアニーリングする第3のオリゴヌクレオチドの対応するヌクレオチドに相補的でない。したがって、少なくとも1つの逆末端は、テンプレートに十分にアニーリングされず、リガーゼは相互にライゲ

ーションすることができない。

【0146】

一部の実施形態では、切断酵素インヒビターは、切断酵素によって切断できないかゆっくり切断される少なくとも1つのヌクレオチド間結合を含むフラップ配列を含む。かかるインヒビターの例示的实施形態を、図1Fに概略的に示す。例示的インヒビターは、第1の領域(1)、第2の領域(2)、第1のクエンチャー(6)を含む第3の領域(3)、第4の領域(4)、第5の領域(8)、および第6の領域(9)(この例示的インヒビターでは、第2のクエンチャー(7)を含む)を含む。第1の領域(1)および第3の領域(3)がアニーリングして第1の二本鎖セグメントを形成し、第4の領域(4)および第6の領域(9)がアニーリングして第2の二本鎖セグメントを形成し、第2の領域(2)および第5の領域(8)を、それぞれループ構造として示す。第1の領域(1)から上流は、フラップ配列(11)であり、これは、この例示的実施形態では、切断酵素(12)によって切断できない複数のヌクレオチド間結合を含む。この高次構造では、例示的酵素インヒビターは、切断構造模倣物を含み、これは、切断酵素の無効な基質としての機能を果たす核酸切断構造に類似する二次構造である。一部の実施形態では、例えば(制限されない)、切断酵素が重合活性を有するDNAポリメラーゼを含む場合および/または反応組成物が切断酵素およびDNAポリメラーゼを含む場合、切断酵素インヒビターの3'末端は、非伸長ヌクレオチド(ddNが含まれるが、これに限定されない)を含む。

10

【0147】

一部の実施形態では、酵素インヒビターのヌクレオチド配列は、少なくとも1つの二本鎖セグメントを含み、アプタマーに結合した場合に酵素に結合してその酵素活性を阻害するアプタマーを含む。アプタマーが第2の温度未満の溶液中で遊離しているか複合体中で酵素に結合している場合、クエンチャーは、アプタマーに会合した核酸色素分子によって生成された少なくともいくつかの蛍光シグナルを吸収する。

20

【0148】

一定の例示的複合体

本教示の複合体は、少なくとも1つの酵素活性が阻害されるように酵素に会合した酵素インヒビターを含む。一部の実施形態では、複合体は、増幅酵素(例えば、増幅反応に含まれる任意の酵素)に会合した酵素インヒビターを含む。いくつかの実施形態では、複合体は、RNAポリメラーゼインヒビターに会合したRNAポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、複合体は、リガーゼに会合したリガーゼインヒビターを含む。いくつかの実施形態では、複合体は、ヘリカーゼに会合したヘリカーゼインヒビターを含む。一部の実施形態では、複合体は、切断酵素インヒビターに会合した切断酵素を含む。いくつかの複合体は、さらなる成分(例えば、デオキシリボヌクレオチド(dNTP)、リボヌクレオチド(rNTP)、ヌクレオチドアナログ、ヘリカーゼアクセサリタンパク質、SSB、または酵素補因子(ATPおよびニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)ならびに一定の酵素-酵素インヒビター複合体の形成および/または安定化に関与し得るその非切断アナログが含まれるが、これに限定されない))、またはこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない)含む。

30

【0149】

一部の実施形態では、酵素-酵素インヒビター複合体は、DNAポリメラーゼインヒビターに会合したDNAポリメラーゼを含む。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターおよびDNAポリメラーゼを含む複合体は、DNAポリメラーゼインヒビター-DNAポリメラーゼ複合体に関与し得るNTPおよび/またはヌクレオチドアナログを含む。本教示によれば、DNAポリメラーゼがDNAポリメラーゼインヒビター、および、任意選択的に、NTPおよび/またはヌクレオチドアナログと複合体化する(すなわち、複合体中で会合する)場合、プライマーまたは隣接するポリヌクレオチド鎖の3'末端へのヌクレオチドの付加を触媒する能力に関するDNAポリメラーゼの酵素活性が阻害される。典型的には、開示のDNAポリメラーゼインヒビターを、第1の温度で少なくとも1つの二本鎖セグメントおよびDNAポリメラーゼとの複合体を形成するようにデザイン

40

50

する。複合体を第2の温度に加熱する場合、DNAポリメラーゼインヒビターの二本鎖セグメントが変性し、複合体が解離する。複合体から放出される場合、DNAポリメラーゼの合成活性が修復され、適切な条件下で、一定の核酸配列を増幅することができる。

【0150】

一部の実施形態によれば、複合体は、DNAポリメラーゼの酵素活性が阻害されるようにDNAポリメラーゼに会合したDNAポリメラーゼインヒビターを含む。いくつかの実施形態では、複合体は、DNAポリメラーゼに会合した一本鎖または二本鎖のステムループ高次構造のDNAポリメラーゼインヒビターを含む。いくつかの実施形態では、複合体は、アニーリングして少なくとも1つの二本鎖セグメントを形成する少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むDNAポリメラーゼインヒビターに会合したDNAポリメラーゼを含む。

10

【0151】

典型的には、DNAポリメラーゼインヒビターの第1および第3の領域が第1の温度でアニーリングして二本鎖セグメントを形成し、必要に応じて、DNAポリメラーゼインヒビターはステムループ高次構造または二重鎖高次構造を想定する。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターの第4および第6の領域が第1の温度でアニーリングして二本鎖セグメントを形成し、必要に応じて、DNAポリメラーゼインヒビターは、ステムループ高次構造、二本鎖ステムループ高次構造、または二本鎖高次構造を想定する。ステムループ高次構造または二重鎖高次構造中のDNAポリメラーゼインヒビターをDNAポリメラーゼと組み合わせる場合、DNAポリメラーゼインヒビターおよびDNAポリメラーゼが会合して複合体を形成し、ここで、DNAポリメラーゼ活性が阻害される。反応温度が上昇するにつれて、DNAポリメラーゼインヒビターの二本鎖セグメントは第2の温度または第2の温度付近で変性し、複合体が解離し、DNAポリメラーゼの阻害が放出される。

20

【0152】

本教示のDNAポリメラーゼには、典型的には、DNA依存性DNAポリメラーゼおよびRNA依存性DNAポリメラーゼ（逆転写酵素が含まれる）が含まれるが、これらに限定されない。一定の逆転写酵素は、一定の反応条件下（AMV逆転写酵素およびMMLV逆転写酵素が含まれる）でDNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する。DNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する、かかる逆転写酵素は、開示の方法との使用に適切であり得、これは明確に本教示の意図の範囲内である。DNAポリメラーゼの説明を、特に、Lehninger Principles of Biochemistry, 3d ed., Nelson and Cox, Worth Publishing, New York, NY, 2000（特に、第26章および第29章）；Twyman, Advanced Molecular Biology: A Concise Reference, Bios Scientific Publishers, New York, NY, 1999；Ausubelら；Lin and Jaysena, J. Mol. Biol. 271:100-111, 1997；Pavlovら, Trends in Biotechnol. 22:253-60, 2004；およびEnzymatic Resource Guide: DNA polymerases, 1998, Promega, Madison, WIに見出すことができる。

30

40

【0153】

二次アンプリコンの合成、より一般には、DNAポリメラーゼによる全核酸合成に関するDNAポリメラーゼ活性の阻害が認められる。一般に、当業者は、偽副産物の合成を最小にしながら所望のアンプリコンの合成を至適化するように選択することができる。したがって、所望のアンプリコンを生成する場合、開示のDNAポリメラーゼインヒビターは、選択されたDNAポリメラーゼインヒビターの非存在下で合成した二次アンプリコンの量と比較した場合、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、また

50

は99%を超える二次アンプリコンの合成を阻害することができる。

【0154】

望ましくない副産物（誤ライゲーション産物が含まれるが、これに限定されない）の合成、より一般には、反応組成物（例えば、LCR、LDR、LDR-PCR、PCR-LDR、またはFEN-LCRで生じる反応組成物が含まれるが、これらに限定されない）中の全核酸アンプリコン増幅に関するリガーゼ活性の阻害が認められる。一般に、当業者は、偽副産物の合成を最小にしながら所望のアンプリコンの合成を至適化するように選択することができる。したがって、所望のアンプリコンを生成する場合、開示のリガーゼインヒビターは、選択されたりガーゼインヒビターの非存在下で合成した二次アンプリコンの量と比較した場合、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または99%を超える望ましくない副産物の合成を阻害することができる。

10

【0155】

望ましくない副産物の合成、より一般には、反応組成物（例えば、FEN-LCRで生じる反応組成物が含まれるが、これらに限定されない）中の全核酸アンプリコン増幅に関する切断酵素活性の阻害が認められる。一般に、当業者は、偽副産物の合成を最小にしながら所望のアンプリコンの合成を至適化するように選択することができる。したがって、所望のアンプリコンを生成する場合、開示の切断酵素インヒビターは、選択された切断酵素インヒビターの非存在下で合成した二次アンプリコンの量と比較した場合、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または99%を超える望ましくない副産物の合成を阻害することができる。

20

【0156】

二次アンプリコンの合成、より一般には、反応組成物（例えば、HDAで生じる反応組成物が含まれるが、これに限定されない）中の全核酸アンプリコン増幅に関するヘリカーゼ活性の阻害が認められる。一般に、当業者は、偽副産物の合成を最小にしながら所望の標的核酸の合成を至適化するように選択することができる。したがって、所望のアンプリコンを生成する場合、開示のヘリカーゼインヒビターは、選択されたヘリカーゼインヒビターの非存在下で合成した二次アンプリコンの量と比較した場合、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または99%を超える二次アンプリコンの合成を阻害することができる。

30

【0157】

開示の酵素インヒビターを、酵素と種々の比率または濃度で混合して複合体を形成することができる。いくつかの実施形態では、酵素インヒビターは、酵素よりも高いモル濃度で存在する。他の実施形態では、酵素インヒビターは、酵素のモル濃度とほぼ同一またはそれ未満で存在する。当業者は、各酵素分子が酵素インヒビターと会合して複合体を形成することができるように、確実に十分な酵素インヒビターを存在させるために、1:1（インヒビター：酵素）を超える酵素インヒビター：酵素モル比で使用するように選択することができる。一般に、高度に有効な酵素インヒビターを、有効性がより低い酵素インヒビターより低い濃度で使用するすることができる。したがって、酵素インヒビターを、種々の濃度で反応組成物に準備することができる。かかる濃度は、例えば、約1 nM～約10 mM、約5 nM～約1 mM、約10 nM～約100 μM、または当業者によって選択された他の都合の良い濃度に変化させることができる。

40

【0158】

増幅反応条件が第1の温度での少なくとも1つの工程を含む場合、本明細書中に開示の酵素インヒビターを、増幅反応前または増幅反応中のいずれかで酵素と組み合わせて複合

50

体を形成することができる。一部の実施形態では、酵素および酵素インヒビターを、反応組成物が形成される前に第1の温度で組み合わせる。かかるプレインキュベーション工程により、酵素インヒビター-酵素複合体の形成を容易にし、望ましくない副産物（誤プライミングされたアンプリコン、誤ライゲーションされたプローブ、およびオリゴマー化したプライマーなど）の合成の減少または排除を補助することができる。

【0159】

一定の例示的方法

開示の酵素インヒビターは、本教示の方法で少なくとも2つの機能を果たす。第1に、開示の酵素インヒビターは、第1の温度で対応する酵素の酵素活性を阻害し、特に、誤アニリングによる二次アンプリコンの形成または標的核酸以外の配列に対するプライマーおよび／またはプローブ、ならびにプライマー二量体形成を減少させる。当業者は、二次増幅産物形成の減少により、本教示の酵素インヒビターが反応組成物の非特異的蛍光を減少させることができると認識するであろう。第2に、少なくとも1つのクエンチャー部分が酵素インヒビターの二本鎖セグメントに会合した核酸色素分子によって放射された少なくともいくつかの蛍光を吸収することができるので、開示の酵素インヒビターはまた、酵素インヒビターの自己消光能力によって反応組成物中の非特異的蛍光を減少させることができる。一部の実施形態では、酵素インヒビターはまた、開示の方法におけるアンプリコンの生成を減少させる。

【0160】

標的核酸の増幅方法を提供する。一定の方法の実施形態によれば、第1の温度で反応組成物を形成し、ここで、反応組成物は、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチド配列およびクエンチャーを含むDNAポリメラーゼインヒビター、ヌクレオシド三リン酸（NTP）（典型的には、デオキシリボヌクレオチド三リン酸（dNTPs）の混合物）、標的核酸、プライマー、および核酸色素を含む。一部の実施形態では、反応組成物は、ヌクレオチドアナログをさらに含む。いくつかの実施形態では、DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼインヒビター、および、任意選択的に、NTPおよび／またはヌクレオチドアナログを、反応組成物の形成前に合わせる。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼおよびDNAポリメラーゼインヒビターを、反応組成物の形成前に第1の温度でプレインキュベーションする。第1の温度で、DNAポリメラーゼインヒビターのヌクレオチド配列は、少なくとも1つの二本鎖セグメントを含み、DNAポリメラーゼおよびDNAポリメラーゼインヒビターを会合して複合体を形成する。同一のDNAポリメラーゼインヒビターのヌクレオチド配列を含むがクエンチャーを欠く並行反応組成物中で検出されたシグナルと比較して、クエンチャーは、ヌクレオチド配列の二本鎖セグメントに会合した核酸色素分子によって放射された少なくともいくつかの蛍光シグナルを吸収する。次いで、反応組成物を、DNAポリメラーゼインヒビターの融点付近、融点、またはそれを超える第2の温度に加熱して二本鎖セグメントを変性させ、複合体を解離する。複合体からのDNAポリメラーゼインヒビターの放出により、DNAポリメラーゼの酵素活性はもはや阻害されない。反応組成物を少なくとも1つの増幅サイクルに供して複数のアンプリコンを生成する。

【0161】

反応組成物中の非特異的蛍光を減少させる方法を提供する。一定のかかる方法によれば、反応組成物を、第1の温度で形成し、ここで、反応組成物は、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチド配列およびクエンチャーを含むDNAポリメラーゼインヒビター、NTP（典型的にはdNTPの混合物）、標的核酸、プライマー、および核酸色素を含む。一部の実施形態では、反応組成物は、ヌクレオチドアナログをさらに含む。いくつかの実施形態では、DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼインヒビター、および、任意選択的に、NTPおよび／またはヌクレオチドアナログを、反応組成物の形成前に合わせる。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼおよびDNAポリメラーゼインヒビターを、反応組成物の形成前に第1の温度でプレインキュベーションして複合体を形成する。同一のDNAポリメラーゼインヒビターのヌクレオチド配列を含むがクエンチャーを欠く並行反応組成物中で検出されたシグナルと比較して、クエンチャーは、ヌクレオチド配列の二本鎖セグメ

ントに会合した核酸色素分子によって放射された少なくともいくつかの蛍光シグナルを吸収する。次いで、反応組成物を、DNAポリメラーゼインヒビターの融点付近、融点、またはそれを超える第2の温度に加熱して二本鎖セグメントを変性させ、複合体を解離する。複合体からのDNAポリメラーゼインヒビターの放出により、DNAポリメラーゼの重合活性はもはや阻害されない。反応組成物を少なくとも1つの増幅サイクルに供して複数のアンプリコンを生成する。適切な検出条件下で、反応組成物中の複数のアンプリコンに会合した核酸色素の蛍光を検出することができる一方で、DNAポリメラーゼインヒビターのヌクレオチド配列の二本鎖セグメントに会合した核酸色素の蛍光は、クエンチャーによって少なくとも減少する。

【0162】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの増幅サイクルは、複数の増幅サイクル（例えば、少なくとも10サイクル、少なくとも15、サイクル、少なくとも20サイクル、少なくとも25サイクル、少なくとも30サイクル、少なくとも35サイクル、少なくとも40サイクル、40サイクルを超える増幅が含まれるが、これらに限定されない）を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1増幅サイクルへの反応組成物の適用は、PCR（PCRの変形形態（例えば、RT-PCR、非対称PCR、または定量もしくはリアルタイムPCRが含まれるが、これらに限定されない）が含まれる）を含む（例えば、Rapley（特に、パートVII）；Protocols & Applications Guide, rev. 9/04, Promega; McPhersonを参照のこと）。

【0163】

開示の方法の一部の実施形態は、複数の増幅工程（複数の並行単回または少数回の増幅反応（例えば、二重、三重、四重、五重、または六重の増幅反応）が含まれるが、これらに限定されない）、複数の検出工程（少数回の検出工程の複数の並行単回検出工程が含まれるが、これらに限定されない）（例えば、同一の反応組成物中の2つ、3つ、4、つ、5つ、または6つの異なるアンプリコンを検出する）、または多重増幅反応および多重検出手順の両方を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸は、複数の異なる標的核酸を含み、プライマーは複数の異なるプライマーまたは複数の異なるプライマー対を含み、複数のアンプリコンは複数の異なるアンプリコンを含み、検出は複数の異なるアンプリコンに会合した核酸色素の蛍光の検出を含む。

【0164】

開示のDNAポリメラーゼインヒビターを使用して得た酵素阻害度を変化させることができ、使用した方法、DNAポリメラーゼ、選択したDNAポリメラーゼインヒビターの構造および融点、ならびに他の要因（プライマー伸長温度など）に依存し得る。当業者は、これらの各変動因子を、非標的核酸の産生を最小にしながらか所望の産物を至適に産生するための本明細書中の教示および／または利用可能な手順を使用して至適化することができる。同様に、非特異的蛍光の減少レベルは、特に、ヌクレオチド配列中の特定のクエンチャー、DNAポリメラーゼインヒビターあたりに使用されるクエンチャーの数、使用される核酸色素、反応条件、および二次増幅産物量の減少に及ぼすDNAポリメラーゼインヒビターの有効性に依拠して変化し得る。当業者は、特定のDNAポリメラーゼインヒビター中の特定のクエンチャーの数および配置、特定のDNAポリメラーゼインヒビターとの特定のDNAポリメラーゼの対合、および特定の核酸色素との特定のクエンチャーの対合を、当該分野で公知の日常的方法を使用して、特定の反応組成物中の非特異的蛍光の減少を至適化するための過度の実験および増幅技術を行うことなく、経験的に評価することができることと認識するであろう。

【0165】

一定の方法の実施形態によれば、リガーゼは、標的核酸およびライゲーションプローブ対を含む反応組成物中で、第1の温度にてリガーゼインヒビターと複合体を形成する。一部の実施形態では、リガーゼおよびリガーゼインヒビターを組み合わせ、反応組成物の形成前にプレインキュベーションする。最初の第2の温度では、リガーゼーリガーゼインヒ

ビター複合体は解離し、リガーゼを放出する。ライゲーションプローブ対の上流および下流のライゲーションプローブは、標的核酸と選択的にハイブリッド形成し、リガーゼはライゲーションしたプローブの形成を触媒する。いくつかのかかる実施形態は、変性する工程、上流および下流のライゲーションプローブをアニーリングする工程、およびプローブをライゲーションしてライゲーションされたプローブを生成する工程を含む、複数の増幅サイクルを含む。一部の実施形態では、反応組成物は、ライゲーションしたプローブの相補物の少なくとも一部に特異的にハイブリッド形成するようにデザインされたライゲーションプローブ対を含む。いくつかの実施形態では、ライゲーションプローブはプライマー結合部位を含み、反応組成物はプライマーおよびDNAポリメラーゼ-DNAポリメラーゼ複合体を含む。

10

【0166】

一定の開示の方法によれば、第1の温度で、切断酵素は切断酵素インヒビターと複合体を形成し、リガーゼはリガーゼインヒビターと複合体を形成する。一部の実施形態では、最初の第2の温度で、切断酵素-切断酵素インヒビター複合体は解離する。次いで、放出された切断酵素は、(1) 標的核酸または一本鎖アンプリコン、(2) 上流切断プローブ、および(3) 少なくとも1つのヌクレオチドによって上流切断プローブの3'末端が重複する5'オーバーハングまたはフラップ配列を含む対応する下流切断プローブを含むフラップ部分を一定の重複フラップ構造から切断することができる。切断酵素によってフラップを切断する場合、ハイブリッド形成構造は、テンプレート鎖、上流切断プローブ、および下流切断プローブのハイブリッド形成したフラグメントを含み、上流切断プローブの3'末端と下流切断プローブのハイブリッド形成されたフラグメント5'末端の間にライゲーション可能なニックを有する。いくつかの実施形態では、2番目の第2の温度で、リガーゼ-リガーゼインヒビター複合体が解離し、放出されたリガーゼはハイブリッド形成構造中のニックをライゲーションして、ライゲーションされたプローブおよびテンプレート鎖を含む二重鎖が生成される。一部の実施形態では、ライゲーションされたプローブは、少なくとも1つのプライマー結合部位を含む。当業者は、最初の第2の温度および2番目の第2の温度はほぼ同一の温度であり得るか、異なる温度であり得ると認識するであろう。

20

【0167】

いくつかの方法の実施形態は、第1の温度でDNAポリメラーゼ-DNAポリメラーゼインヒビター複合体をさらに含む。適切な3番目の第2の温度で、DNAポリメラーゼ-DNAポリメラーゼインヒビター複合体が解離する。適切な条件下で、プライマーはライゲーションされたプローブのプライマー結合部分に特異的にハイブリッド形成し、プライマー伸長が起こり得る。当業者は、反応組成物中で異なる酵素インヒビターを使用する場合、最初の第2の温度、2番目の第2の温度、および3番目の第2の温度のうちの少なくとも2つがほぼ同一の温度であり得るか、全てが異なる温度であり得ると認識するであろう。

30

【0168】

開示の複合体、方法、およびキットで使用するための例示的切断酵素には、以下が含まれるが、これらに限定されない：大腸菌DNAポリメラーゼI、サーマス・アクアチクス (*Thermus aquaticus*) DNAポリメラーゼI、高度好熱菌DNAポリメラーゼI、哺乳動物FEN-1、アーケオグロブス・フルギダス FEN-1、メタノコッカス・ヤナシイ (*Methanococcus jannaschii*) FEN-1、パイロコッカス・フリオサス FEN-1、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) FEN-1、高度好熱菌FEN-1、Cleavase (登録商標) 酵素 (Third Wave, Inc., Madison, WI)、出芽酵母 RTH1、出芽酵母 RAD27、分裂酵母 rad2、バクテリオファージ T5 5'-3' エクソヌクレアーゼ、パイロコッカス・ホリコシイ (*Pyrococcus horikoshii*) FEN-1、ヒトエクソヌクレアーゼ1、仔牛胸腺5'-3' エクソヌクレアーゼ (細菌、真核生物、およ

40

50

び古細菌のそのホモログが含まれる) (構造特異的酵素のクラス I I ファミリーのメンバーなど)。切断酵素の説明を、特に、Lyamichevら、Science 260: 778-83 (1993); Eisら、Nat. Biotechnol. 19: 673-76 (2001); Shenら、Trends in Bio. Sci. 23: 171-73 (1998); Kaiserら、J. Biol. Chem. 274: 21387-94 (1999); Maら、J. Biol. Chem. 275: 24693-700 (2000); Allawiら、J. Mol. Biol. 328: 537-54 (2003); Sharmaら、J. Biol. Chem. 278: 23487-96 (2003); および Fengら、Nat. Struct. Mol. Biol. 11: 450-56 (2004) に見出すことができる。

10

【0169】

一定の開示の方法によれば、DNAポリメラーゼを、DNAポリメラーゼインヒビター、および、任意選択的に、NTPおよび/またはヌクレオチドアナログと組み合わせて複合体を形成する。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼは、逆転写酵素、DNA依存性DNAポリメラーゼ(熱安定性DNAポリメラーゼ)、または逆転写酵素およびDNA依存性DNAポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、DNAポリメラーゼインヒビターは、(1)適切な第1の温度で逆転写酵素と複合体を形成することができる第1のDNAポリメラーゼインヒビター、(2)適切な第1の温度でDNA依存性DNAポリメラーゼと複合体を形成することができる第2のDNAポリメラーゼインヒビター、(3)適切な第1の温度で逆転写酵素と複合体を形成することができる第1のDNAポリメラーゼインヒビターおよび適切な第1の温度でDNA依存性DNAポリメラーゼと複合体を形成することができる第2のDNAポリメラーゼインヒビターを含み、ここで、第1のDNAポリメラーゼインヒビターおよび第2のDNAポリメラーゼインヒビターは、同一のヌクレオチド配列または異なるヌクレオチド配列を含み、第1のDNAポリメラーゼインヒビターに適切な第1の温度および第2のDNAポリメラーゼインヒビターに適切な第1の温度は、同一の温度または異なる温度である。

20

【0170】

一定の開示の方法によれば、増幅は、2つの異なる反応組成物、第1の反応組成物および第2の反応組成物(それぞれ、DNAポリメラーゼおよびDNAポリメラーゼインヒビターを含む)を含む二相PCR反応を含む。一定のかかる実施形態では、第1の反応組成物は、第1のDNAポリメラーゼ、第1のDNAポリメラーゼインヒビター、NTP(典型的には、NTPの混合物)、プライマー(典型的には、複数の異なるプライマー対)を含む。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼインヒビター、および、任意選択的に、NTPおよび/またはヌクレオチドアナログを、第1の反応組成物の形成前に合わせる。第1の反応組成物を、制限されたサイクル数の増幅(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15サイクルの増幅が含まれるが、これらに限定されない)に供する。制限された第1段階の増幅後に第1の反応組成物を希釈し、希釈された第1の反応組成物の一部を、第2のDNAポリメラーゼ、第2のDNAポリメラーゼインヒビター、NTP(典型的には、NTPの混合物)、およびプライマー(典型的には、プライマー対)と合わせる。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼインヒビター、および、任意選択的に、NTPおよび/またはヌクレオチドアナログを、第2の反応組成物の形成前に合わせる。各サイクル数を本明細書中で明確に列挙しているかのように、第2の反応組成物を、複数回のサイクルの増幅(例えば、10~45サイクルの増幅または20~40サイクルの増幅(列挙した範囲内の任意の増幅サイクル数))に供する。いくつかの実施形態では、希釈された第1の反応組成物中に第1のDNAポリメラーゼが十分に残存し、第2のDNAポリメラーゼは必要ない。いくつかの実施形態では、希釈された第1の反応組成物中に第1のDNAポリメラーゼインヒビターが十分に残存し、第2のDNAポリメラーゼインヒビターは必要ない。一部の実施形態では、第1のDNAポリメラーゼおよび第2のDNAポリメラーゼは同一のポリメラーゼまたは異なるポリメラーゼであり、このポリメラーゼには、逆転

30

40

50

写酵素およびDNA依存性DNAポリメラーゼが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、第1のDNAポリメラーゼインヒビターおよび第2のDNAポリメラーゼインヒビターは、同一のインヒビターまたは異なるインヒビターである。かかる実施形態を制限しない例示として、逆転写酵素、第1のDNAポリメラーゼインヒビター、および、任意選択的に、NTPおよび／またはヌクレオチドアナログを含む第1の反応ならびに熱安定性DNA依存性DNAポリメラーゼ、第2のDNAポリメラーゼインヒビター、および、任意選択的に、NTPおよび／またはヌクレオチドアナログを含む第2の反応組成物を含む例示的RT-PCRを考慮する。第1のDNAポリメラーゼインヒビターを、逆転写酵素の至適温度未満の温度（すなわち、例示的な第1段階の第1の温度）で逆転写酵素活性を阻害するが、至適逆転写酵素温度またはこの温度を超える温度（すなわち、例示的な第1段階の第2の温度）で阻害しないようにデザインすることができる。第2のDNAポリメラーゼインヒビターを、第2段階の第1の温度未満の温度で熱安定性DNAポリメラーゼの酵素活性を阻害するようにデザインすることができる。例えば（制限されない）、少なくとも1つのPCRプライマーのT_mより約5℃～約10℃または約4℃～約6℃低い温度（すなわち、例示的な第2段階の第1の温度）で阻害するが、PCRプライマーのT_mを超える温度（すなわち、例示的な第1段階の第2の温度）で阻害しない。

10

【0171】

本教示の方法を、典型的には、任意の標的核酸と共に使用することができる。開示の方法は、大量の所望のアンプリコンの産生だけでなく、存在することは知られているが、完全に配列決定や精製が行われていない核酸の産生または配列決定にも有用である。配列決定プライマーとしての機能を果たし得る少なくとも1つのプライマーを調製することができるように、標的（すなわち、標的隣接配列）の1つまたは2つの末端の十分な数の塩基の同一性を知ることのみが必要である。許容可能な第2の標的隣接配列の配列決定および同定後、第2のプライマーを作製することができ、隣接配列間に存在する標的核酸を指数関数的に増幅することができ、いくつかの実施形態では、定量することができる。他の実施形態では、十分な配列が得られた場合、適切なライゲーションプローブ組および／または適切な切断プローブ組を合成することができる。

20

【0172】

開示の方法の一部の実施形態では、検出は、内部標準またはコントロール配列を評価する工程を含み、これには、所望のアンプリコンの量を検量線または内部サイズ標準と比較する工程を含み得る。いくつかの実施形態では、レーン毎、キャピラリー毎、および／またはアッセイ毎のばらつきを明らかにするために、コントロール配列、パッシブリファレンス色素、またはその両方を反応組成物中に含める。

30

【0173】

本方法の一部の実施形態は、複数の増幅反応、いくつかの実施形態では、複数の検出を、典型的には、並行して行うマルチウェル反応容器（マルチウェルプレートが含まれるが、これらに限定されない）または多室マイクロ流体デバイスをさらに含む。一部の実施形態では、アンプリコンを生成するための1つまたは複数の多重反応を、同一の反応容器（マルチウェルプレート（96ウェルプレート、384ウェルプレート、および1536ウェルプレートなど）、マイクロ流体デバイス（例えば、TaqMan（登録商標）低密度アレイ（Applied Biosystems）が含まれるが、これに限定されない）が含まれるが、これらに限定されない）で行う。いくつかの実施形態では、大量の並行増幅工程は、マルチウェル反応容器（複数の反応ウェルを含むプレート（例えば、24ウェルプレート、96ウェルプレート、384ウェルプレート、または1536ウェルプレートが含まれるが、これらに限定されない）が含まれる）または多室マイクロ流体デバイス（例えば、TaqMan低密度アレイが含まれるが、これらに限定されない）を含み、ここで、各室またはウェルは、必要に応じて、適切なプライマー、プライマー組、および／またはレポータープローブを含む。典型的には、かかる増幅工程を、一連の単回、二重、三重、四重、五重、または六重の反応で行うが、より高い並行増幅レベルも本教示の意図

40

50

する範囲に含まれる。

【0174】

一部の実施形態では、反応組成物は、パッシブリファレンス色素をさらに含む。パッシブリファレンス色素は、内部コントロールが蛍光における非PCR関連変動（例えば、ウェル毎、チューブ毎、プレート毎、およびアッセイ毎の変動が含まれるが、これらに限定されない）を標準化する場合に反応組成物中に含まれる。一連の増幅反応中にその蛍光が変化しないので、パッシブリファレンスによって標準化のベースラインが得られる。典型的には、パッシブリファレンスは、増幅反応を妨害しない。パッシブリファレンス色素の使用およびパッシブリファレンスに基づいた標準化計算（例えば、 R_n および ΔR_n が含まれるが、これらに限定されない）は、当該分野で周知である（例えば、Killigoreら、J. Clin. Micro., 38:2516-19, 2000; TaqMan（登録商標）PCR Reagent Kit With AmpliTaq Gold（登録商標）DNA polymerase Protocol, Applied Biosystems P/N 402823 Rev. D 2003; Brilliant（登録商標）SYBR（登録商標）Green QRT-PCR Master Mix Kit, 1-step Instruction Manual, Rev. # 75003a, Stratagene, 2005; および Essential of Real Time PCR, Applied Biosystemsを参照のこと）。いくつかの実施形態では、パッシブリファレンス色素は、ROX（商標）またはTAMRA（商標）を含む。

10

20

【0175】

一定の例示的キット

本発明の技術により、一定の開示の方法の実施を抄らせるためにデザインしたキットも提供する。キットは、方法の実施に必要な2つまたはそれを超える要素の組み立てによって一定の開示の方法の能力を高めるのに役立ち得る。一部の実施形態では、キットは、最終使用者が測定する必要性を最小にするために、予め測定した単位量で成分を含む。いくつかの実施形態では、キットは、1つまたは複数の開示の方法を実施するための説明書を含む。好ましくは、キットの成分を、相互に同時に操作するように至適化する。

【0176】

一定の開示のキットは、ヌクレオチド配列およびクエンチャーを含む酵素インヒビターを含む。一部の実施形態では、キットは、少なくとも1つの以下を含む：リガーゼインヒビター、ヘリカーゼインヒビター、RNAポリメラーゼインヒビター、切断酵素インヒビター、および／またはDNAポリメラーゼインヒビター。本教示の一定のキットは、少なくとも1つの以下をさらに含む：リガーゼ、ヘリカーゼ、RNAポリメラーゼ、および切断酵素。一定のキットは、酵素インヒビターを含み、少なくとも1つの以下をさらに含む：プライマー（ランダムプライマー、オリゴdTを含むプライマー、またはプライマー対が含まれるが、これらに限定されない）、ライゲーションプローブ対、切断プローブ組、リガーゼ補因子（ATPまたはNADが含まれるが、これらに限定されない）、SSB、および／またはヘリカーゼアクセサリタンパク質。いくつかの実施形態では、キットは、プライマー、DNAポリメラーゼ、リガーゼ、またはこれらの組み合わせを含む。一部の

30

40

【0177】

一定のキットの実施形態は、ヌクレオチド配列およびクエンチャーを含むDNAポリメラーゼインヒビターを含む。一部の実施形態では、キットは、以下を含む：DNAポリメラーゼ、調節配列（例えば、ハウスキーピング遺伝子および／または同時増幅配列（例えば、Siebert and Larrick, BioTechniques 14:244-49 (1993); Joyce, Quantitative RT-PCR, 83-92, in Methods in Mol Biol., vol. 193, O'Connell, ed., Humana Press; Raeymaekers, Mol. Biotechnol. 115-22 (2000)を参照のこと）、または分子サイズまた

50

は分子量標準を含むポリヌクレオチドラダーなどの内部標準配列が含まれるが、これらに限定されない)、プライマーおよび/またはプライマー対、レポータープローブ、核酸色素、パッシブリファレンス色素、またはこれらの組み合わせ。一部の実施形態では、キットは複数の異なるプライマー対を含む。いくつかの実施形態では、キットは、順方向プライマー、逆方向プライマー、または順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含み、レポーター基をさらに含む。いくつかのかかる実施形態では、プライマー対の順方向プライマーのレポーター基は、プライマー対の逆方向プライマーのレポーター基と異なる。

【0178】

当業者は、多数の異なる種のレポーター基を、個別または1つまたは複数の異なるレポーター基と組み合わせて本教示で 사용할 ことができる と認識するであろう。一部の実施形態では、レポーター基は、蛍光、化学発光、生物発光、リン光、または電気化学発光のシグナルを放射する。レポーター基のいくつかの非限定的な例には、フルオロフォア、放射性同位体、色原体、酵素、抗原（エピトープタグが含まれるが、これに限定されない）、半導体ナノ結晶（量子ドット）、重金属、色素、リン光基、化学発光基、電気化学的検出部分、結合タンパク質、リン光体、希土類キレート、遷移金属キレート、近赤外色素、電気化学発光標識、および質量分析計に適合するレポーター基（質量タグ、電荷タグ、および同位体など）が含まれる（例えば、Haff and Smirnov, Nucl. Acids Res. 25:3749-50, 1997; Xuら, Anal. Chem. 69:3595-3602, 1997; Sauerら, Nucl. Acids Res. 31:e63, 2003を参照のこと）。核酸へのレポーター基の結合のための詳細なプロトコルを、特に、Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego, 1996; Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Beaucageら, eds., John Wiley & Sons, New York, NY (2000) (2005年8月の増補版を含む); およびHaugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 10th ed., Molecular Probes-Invitrogen, 2005に見出すことができる。

【0179】

一部の実施形態では、キットは、2つまたはそれを超える異なる酵素インヒビター（例えば、リガーゼインヒビターおよび切断酵素インヒビター、切断酵素インヒビター、リガーゼインヒビター、およびDNAポリメラーゼインヒビター、またはヘリカーゼインヒビターおよびDNAポリメラーゼインヒビターが含まれるが、これらに限定されない）を含む。いくつかの実施形態では、キットは、2つまたはそれを超える異なるDNAポリメラーゼインヒビターを含む。一部の実施形態では、キットは、2つの異なる酵素（DNA依存性DNAポリメラーゼおよびRNA依存性RNAポリメラーゼ（逆転写酵素など）、リガーゼおよび切断酵素、RNAポリメラーゼおよびDNAポリメラーゼ（例えば、逆転写酵素が含まれるが、これに限定されない）、ならびにヘリカーゼおよびDNAポリメラーゼを含む。一部の実施形態では、キットは、熱安定性DNAポリメラーゼを含む。

【0180】

上記の本教示を、実施例を参照してより深く理解することができる。以下の実施例は、例示のみを目的とし、決して本明細書中の教示の範囲を制限すると解釈すべきではない。

【実施例】

【0181】

実施例1：一定の例示的酵素インヒビターのクエンチャー部分が例示的酵素インヒビターの二本鎖セグメントに会合した核酸色素分子から放射された少なくともいくつかの蛍光を吸収する効果を評価するために、表1（以下）に示すように、5つの例示的DNAポリメラーゼインヒビターを合成した。クエンチャー部分の同一性、位置、および数を、変化させた。

【0182】

【表 1】

表 1.

名称	配列 (5' ~ 3' 方向で示す)
"DNA ポリメラーゼ インヒビター" A	TCTGGGATAATTATGGTAAATATATGTTTTCATATATTTATTATAAATTAT ^{dd} C (配列番号:)
DNA ポリメラーゼ インヒビター B	(Dabcyl)TCTGGGATAATTATGGTAAATATATGTTTTCATATATTTATTATAAATTAT ^{dd} C (配列番号:)
DNA ポリメラーゼ インヒビター C	(ROX)TCTGGGATAATTATGGTAAATATATGTTTTCATATATTTATTATAAATTAT ^{dd} C (配列番号:)
DNA ポリメラーゼ インヒビター D	TCTGGGATAATTATGGTAAATATATGTTTTCATATATTTATTATAAATTATC(MGB-NFQ) (配列番号:)
DNA ポリメラーゼ インヒビター E	TCTGGGATA(デアザA)TT(デアザA)TGGTA(デアザA)ATATGT(Dabcyl- T)TTC(デアザA)TATTTATTATAAATTATC(MGB-NFQ) (配列番号:)

一連の並行組成物（それぞれ、1×SYBR Green I 核酸色素 (Molecular Probes) を含む 1×反応緩衝液 (50mM Tris 緩衝液 (pH9))、5mM MgCl₂、250μM dATP、dCTP、および dGTP、500μM dUTP、60nM ROX パッシブリファレンス色素、および必要に応じて 5nM、10nM、25nM、50nM、75nM、または 100nM の濃度の表 1 に示す例示的 DNA ポリメラーゼインヒビターを含む) を、室温で形成した。表 1 に示すように、「DNA ポリメラーゼインヒビター」A、DNA ポリメラーゼインヒビター B、DNA ポリメラーゼインヒビター C、および DNA ポリメラーゼインヒビター D は、DNA ポリメラーゼインヒビター D の 3' 末端のヌクレオチドが C である一方で、「DNA ポリメラーゼインヒビター」A、DNA ポリメラーゼインヒビター B、および DNA ポリメラーゼインヒビター C の 3' 末端のヌクレオチドが全てジデオキシシトシン (ddC) を含むことを除き、同一のヌクレオチド配列を有する。「DNA ポリメラーゼインヒビター」A はクエンチャー部分を欠き（したがって、A は、本教示の真の DNA ポリメラーゼインヒビターではなく、引用符：「DNA ポリメラーゼインヒビター」の使用によって示す）、DNA ポリメラーゼインヒビター B はその 5' 末端に DABCYL クエンチャー部分を含み、DNA ポリメラーゼインヒビター C はその 5' 末端に ROX クエンチャー部分を含み、DNA ポリメラーゼインヒビター D はその 3' 末端に非蛍光クエンチャーを含む副溝結合剤を含む (MGB-NFQ)。DNA ポリメラーゼインヒビター E は、その第 1 および第 3 の領域に 4 つのデアザー-dA ヌクレオチドアナログ (デアザ A として示す) および 2 つの G : T 塩基対ミスマッチを含むヌクレオチド配列を含む。DNA ポリメラーゼインヒビター E もまた、2 つのクエンチャー部分 (第 2 の領域ループ中に DABCYL 部分および 3' 末端に MGB-NFQ) を含む。

【0183】

ABI PRISM (登録商標) 7900HT リアルタイム配列検出システム装置 (Applied Biosystems) を使用して、30℃~95℃の温度範囲で各組成物についての解離曲線を作成した。蛍光の微分値対温度を、関連解離曲線ソフトウェアを使用して計算した。図 3 に示すように、このヌクレオチド配列の T_m (約 56℃) で 100nM の「DNA ポリメラーゼインヒビター」A (100nM A として示す) を含む組成物から得た解離ピークは、100nM、75nM、または 50nM の DNA ポリメラー

ゼインヒビターBを含む組成物（それぞれ、100 nM B、75 nM B、および50 nM Bとして示す）から得た解離ピークよりもはるかに高かった。図3に証明するように、恐らくDNAポリメラーゼインヒビターBの二本鎖セグメントに会合した核酸色素分子から放射された蛍光シグナルに起因するバックグラウンド蛍光は、「DNAポリメラーゼインヒビター」Aと比較して減少する。

【0184】

100 nMの「DNAポリメラーゼインヒビター」A、100 nMのDNAポリメラーゼインヒビターC、75 nMのDNAポリメラーゼインヒビターC、および50 nMのDNAポリメラーゼインヒビターCを含む組成物から得た解離曲線を図4に示す。図4で認められるように、100 nMの「DNAポリメラーゼインヒビター」Aを使用して得た解離ピークは、100 nM、75 nM、または50 nMのDNAポリメラーゼインヒビターCに関連する解離ピークより実質的に高い。

10

【0185】

50 nMの「DNAポリメラーゼインヒビター」Aを含む組成物および50 nMのDNAポリメラーゼインヒビターDを含む組成物から得た解離曲線を、図5に示す。50 nMの「DNAポリメラーゼインヒビター」Aを含む組成物から得た解離ピーク（図5でAとして示す）は、50 nMのDNAポリメラーゼインヒビターDを含む組成物から得た解離ピーク（Dとして示す）よりも実質的に高い。

【0186】

図6は、100 nM、75 nM、50 nM、25 nM、10 nM、または5 nMの「DNAポリメラーゼインヒビター」A（それぞれ、100 nM/Std、75 nM/Std、50 nM/Std、25 nM/Std、10 nM/Std、および5 nM/Stdとして示す）および100 nM、75 nM、50 nM、25 nM、10 nM、または5 nMのDNAポリメラーゼインヒビターEを含む組成物から得た解離曲線を示す。図6に示すように、「DNAポリメラーゼインヒビター」Aを含む各組成物から得た解離ピークは、検出可能により高く、DNAポリメラーゼインヒビターEを含む組成物から得た解離ピークよりも概して実質的に高く、Eは本質的に「ベースライン」にまぎれ、容易に区別できない。

20

【0187】

これらの例示的DNAポリメラーゼインヒビターが種々のDNAポリメラーゼインヒビターデザインの非限定的な例（例えば、副溝結合剤を有するか有さないヌクレオチド配列の異形ならびに異なるクエンチャー部分（インヒビターあたり異なるクエンチャー数、インヒビター内の異なるクエンチャーの位置（例えば、3'末端、5'末端、および内部）、および異なる特異的クエンチャー（DABCYL、ROX、およびNFQ）が含まれるが、これらに限定されない）が含まれるが、これらに限定されない）を意図すると認識すべきである。当業者は、種々のDNAポリメラーゼインヒビターデザインが可能であり、特定のDNAポリメラーゼおよび所与の反応条件組と共に使用するために、適切なDNAポリメラーゼインヒビターを、本教示によって知らされた種々のデザインの日常的評価によって得ることができると理解するであろう。

30

【0188】

実施例2：gDNAのプラスミノゲン活性化因子ウロキナーゼ（PAU）遺伝子中の例示的標的核酸のPCR増幅中の二次アンプリコンの阻害

40

gDNA中の標的核酸の増幅におけるDNAポリメラーゼインヒビターEの阻害能力を評価するために、PCR反応を行った。6つの並行した20 µLの反応組成物を室温で形成した。各反応組成物は、40 ng ヒトgDNA（Coriell）、2.25 µMの順方向プライマー：

【0189】

【化5】

5'-TGTAACGACGGCCAGTTCTCATATTCTCTCATCCTCCTGTCCC-3' (配列番号)

50

および 2.25 μ M の逆方向プライマー：

【0190】

【化6】

5'-CAGGAAACAGCTATGACCAAGCGGCTTTAGGCCACCT-3' (配列番号)

を含む PAU 標的核酸特異的プライマー対、最終濃度が 5、10、25、50、75、または 100 nM のいずれかの DNA ポリメラーゼインヒビター E を、1×PCR 緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 9)、250 μ M dATP、dCTP、および dGTP、500 μ M dUTP、5 mM MgCl₂、0.6 U AmpliTaq DNA ポリメラーゼ (Applied Biosystems)、60 nM ROX パッシブ
リファレンス色素、8% グリセロール、0.01% Tween-20、0.01% NaN₃、1×SYBR Green I 核酸色素) に含む。gDNA が存在せず、且つ DNA
ポリメラーゼインヒビター E の最終濃度が 50 nM であることを除いて他の 6 つと同一の
処方物を含む第 7 の並行反応組成物中にテンプレートコントロールは含まれなかった。

【0191】

反応組成物を、室温で約 15 分間インキュベートし、次いで、ABI PRISM (登録商標) 7900 HT リアルタイム配列検出システム装置 (Applied Biosystems) にてサーマルサイクリングを行った。以下のサイクルを使用した：95℃で
2 分間、96℃で 5 秒間を 40 サイクル、および 60℃で 2 分間。各サーモサイクリング
を行った反応組成物中で生成された増幅産物を評価するために、15 μ L の各反応組成物
を、未変性 4% アガロースエーゲル (Invitrogen, Carlsbad, CA) の個別のレーンにロードし、これらと共に、2 つのレーンに、500 塩基対、400 塩基
対、300 塩基対、200 塩基対、および 100 塩基対のマーカー (Low Range
DNA Marker, Invitrogen) を含む分子サイズラダーをロードした。
反応組成物を、以下のようにゲルのレーンにロードした：レーン B、5 nM インヒビター E；レーン C、10 nM インヒビター E；レーン D、25 nM インヒビター E；レーン
E、50 nM インヒビター E；レーン F、75 nM インヒビター E；レーン G、100 nM インヒビター E；レーン H、50 nM インヒビター E、テンプレートなしのコントロール。
サンプルを 15 分間電気泳動し、臭化エチジウムによって視覚化した。図 7 に示すように、
所望のアンプリコン (11) の量は、約 75 nM の濃度 (レーン 7) まで DNA ポリメラーゼインヒビターの濃度が増加するにつれて増加した。対照的に、二次アンプリコン
バンドの強度は、DNA ポリメラーゼインヒビター濃度が増加するにつれて減少した。

【0192】

実施例 3：cDNA 中のヒトシトクロム P450 の例示的標的核酸の PCR 増幅中の二次アンプリコンの阻害

7 つの並行した 20 μ L の反応組成物を室温で形成した。各反応組成物は、10 ng 普遍的基準ヒト cDNA (Stratagene)、200 nM の順方向プライマー：

【0193】

【化7】

5'-TGGGAGTCCTGGAAGCAGC-3' (配列番号)

および 200 nM の逆方向プライマー：

【0194】

【化8】

5'-TGGCTTCTGGTCAACAAGTGC-3' (配列番号)

を含む P450 標的核酸特異的プライマー対、最終濃度が 0、5、10、25、50、75、または 100 nM のいずれかの DNA ポリメラーゼインヒビター E を、1×PCR 緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 9)、250 μ M dATP、dCTP、および dGTP、500 μ M dUTP、5 mM MgCl₂、1.5 U AmpliTaq

DNAポリメラーゼ、60 nM ROXパッシブリファレンス色素、8%グリセロール、0.01% Tween-20、0.01% NaN₃、1×SYBR Green I 核酸色素)に含む。cDNAが存在せず、且つDNAポリメラーゼインヒビターEの最終濃度が50 nMであることを除いて他の7つと同一の処方物を含む第8の並行反応組成物中でテンプレートコントロールは含まれなかった。実施例2に記載のように、反応組成物を、室温で約15分間インキュベートし、次いで、ABI PRISM (登録商標) 7900 HTリアルタイム配列検出システム装置にてサーマルサイクリングを行い、増幅産物を未変性アガロースゲルで分析した。反応組成物を、以下のようにゲルのレーンにロードした：レーンB、0 nMインヒビターE；レーンC、5 nMインヒビターE；レーンD、10 nMインヒビターE；レーンE、25 nMインヒビターE；レーンF、50 nMインヒビターE；レーンG、75 nMインヒビターE；レーンH、100 nMインヒビターE、およびレーンI、50 nMインヒビターE、テンプレートなしのコントロール。

【0195】

図8に示すゲルから認められるように、所望のアンプリコン(21)の量は、約75 nMの濃度までDNAポリメラーゼインヒビターの濃度が増加するにつれて増加した。DNAポリメラーゼインヒビターEを含まない反応組成物中に所望のアンプリコンはほとんどまたは全く認められなかった(レーンA)。二次アンプリコンバンドの強度は、DNAポリメラーゼインヒビター濃度が増加するにつれて減少した。

【0196】

実施例4：プライマー二量体を含む二次増幅産物の阻害

有効な遺伝子発現アッセイ(インターロイキン1, β (IL1β; アッセイID Hs00174097_m1)、TRAFファミリーメンバー関連NFKBアクチベーター(TANK; アッセイID Hs00370305_m1)、脂肪酸合成酵素(FASN; アッセイID Hs00188012_m1)、溶質キャリアファミリー2, メンバー1(SLC2A1; アッセイID Hs00197884_m1)、およびホスホリパーゼD1(ホスファチジルコリン特異的)(PLD1; アッセイID Hs00160118_m1)のためのアッセイが含まれる)のための5つの市販のプライマー対および対応するTaqManレポータープローブを得た(Applied Biosystems)。

【0197】

プライマー二量体アンプリコンの形成に及ぼす例示的酵素インヒビターの影響を評価するために、標的核酸を欠く5つの対応する反応組成物組を並行して調製した。各20 μLの反応組成物対は、1倍濃度の適切なプライマー対および対応するTaqMan(登録商標)プローブ、250 μM dATP、dCTP、およびdGTP、500 μM dUTP、5 mM MgCl₂、2 U AmpliTaq DNAポリメラーゼ、60 nM ROXパッシブリファレンス、8%グリセロール、0.01% Tween-20; 0.01% NaN₃、1×SYBR Green (登録商標) Iを含む50 mM (pH9) Tris-HCl緩衝液、および50 nMポリメラーゼインヒビターEまたはインヒビターなしのいずれかを含んでいた。5つの並行反応組成物組を、室温で30分間インキュベートし、次いで、ABI PRISM (登録商標) 7900 HTリアルタイム配列検出システム装置に移した。反応組成物を95℃に2分間加熱し、次いで、96℃で5秒間を含む40サイクルの増幅および60℃で2分間に供した。15 μLのサーモサイクリングした反応組成物を、以下のように4%アガロースE-ゲル(Invitrogen)の各レーンにロードした：IL1βアッセイ、レーンB(インヒビターなし)およびC(50 nMポリメラーゼインヒビターE)；TANKアッセイ、レーンD(インヒビターなし)およびE(50 nMポリメラーゼインヒビターE)；FASNアッセイ、レーンF(インヒビターなし)およびG(50 nMポリメラーゼインヒビターE)；SLC2A1アッセイ、レーン(インヒビターなし)HおよびI(50 nMポリメラーゼインヒビターE)；およびPLD1アッセイ、レーンJ(インヒビターなし)およびK(50 nMポリメラーゼインヒビターE)。1200、800、400、200、および100塩基対のためのマーカを含む分子量標準を、レーンAおよびLに加えた。ゲルを15分間電気泳動し、核酸色素で

ある臭化エチジウムでの染色によって視覚化した（図9に示す）。インヒビターを欠く対応する反応組成物と比較した場合（例えば、レーンB（IL1 β アッセイ、インヒビターなし）およびC（IL1 β アッセイ、50 nMポリメラーゼインヒビターE）またはD（TANKアッセイ、インヒビターなし）およびE（TANLアッセイ、50 nMポリメラーゼインヒビターE）と比較した）、インヒビターを含む反応組成物中の望ましくないプライマー二量体産物の量は少なくとも減少した。

【0198】

実施例5：酵素インヒビターに会合した非特異的蛍光の減少

PCR増幅および融点曲線分析を使用した例示的ポリメラーゼインヒビターの例示的クエンチャー部分の影響を評価するために、2つの反応組成物を調製した。各20 μ Lの反応組成物は、1倍濃度のTANKアッセイ（実施例4に記載の）由来のプライマーおよびレポータープローブ、10 ng 普遍的基準ヒトcDNA（Stratagene）；250 μ M dATP、dCTP、およびdGTP、500 μ M dUTP、5 mM MgCl₂、2 U AmpliTaq DNAポリメラーゼ、60 nM ROXパッシブリファレンス、8%グリセロール、0.01% Tween-20；0.01% NaN₃、1 $\times$ SYBR Green Iを含む50 mM（pH 9）Tris-HCl緩衝液、および50 nM「ポリメラーゼインヒビターA」または50 nMポリメラーゼインヒビターEのいずれかを含んでいた。実施例4に記載のように、反応組成物を室温で約15分間インキュベートし、次いで、ABI PRISM（登録商標）7900 HTリアルタイム配列検出システム装置に移し、サーモサイクリングを行った。図10に示すように、デフォルト条件に設定した機器関連ソフトウェアを使用して、2つのサーモサイクリングした反応組成物の解離曲線を作成した。サーモサイクリングした反応組成物が「ポリメラーゼインヒビターA」を含んでいた場合、2つの解離ピーク（ピークA（「ポリメラーゼインヒビターA」）およびピークB（TANKアンプリコン）が含まれる）が認められた。対照的に、ポリメラーゼインヒビターBを含むサーモサイクリングした反応組成物を用いて得た解離曲線は、TANKアンプリコンのピーク（下のパネル中のCとして示す）を含んでいたが、ポリメラーゼインヒビターEの解離曲線は容易に区別できなかった。

【0199】

本教示の酵素インヒビター、酵素-酵素インヒビター複合体、方法、およびキットを、本明細書中に広範且つ一般的に記載した。一般的開示の範囲内に含まれるそれぞれのより狭い種および下位概念の分類も本教示の一部を形成する。これには、類概念由来の任意の主題を排除する但し書きまたは消極的な限定と共に本教示の一般的説明が含まれ、使用した材料を本明細書中に具体的に引用するかどうかと無関係である。

【0200】

上記実施例は、例示を目的とし、本明細書中の教示の範囲を制限することを意図しない。

【0201】

開示の教示は種々の酵素インヒビター、酵素-酵素インヒビター複合体、方法、およびキットを参照して記載されているが、本明細書中の教示を逸脱することなく、種々の変更形態および修正形態を実施することができると認識されるであろう。上記実施例を、本教示をより良好に例示するために提供し、上記実施例は、本明細書中の教示の範囲を制限することを意図しない。以下の特許請求の範囲を鑑みて、本教示の一定の態様をさらに理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0202】

【図1】1つのオリゴヌクレオチドを含む一定の例示的酵素インヒビターの例示的实施形態を概略的に示す。

【図2】複数のオリゴヌクレオチドを含む一定の例示的酵素インヒビターの例示的实施形態を概略的に示す。

【図3】一定の例示的DNAポリメラーゼインヒビターを使用して得た、蛍光の負の微分

10

20

30

40

50

値 ($-dF/dt$) 対温度 ($^{\circ}\text{C}$) としてプロットした解離曲線を示す。

【図4】一定の例示的DNAポリメラーゼインヒビターを使用して得た、蛍光の負の微分値対温度 ($^{\circ}\text{C}$) としてプロットした解離曲線を示す。

【図5】一定の例示的DNAポリメラーゼインヒビターを使用して得た、蛍光の負の微分値対温度 ($^{\circ}\text{C}$) としてプロットした解離曲線を示す。

【図6】一定の例示的DNAポリメラーゼインヒビターを使用して得た、蛍光の負の微分値対温度 ($^{\circ}\text{C}$) としてプロットした解離曲線を示す。

【図7】アガロースゲルの写真を示す。実施例2に記載のように、種々の濃度の例示的酵素インヒビター中で生成されたアンプリコンを含む一連のサーモサイクリングした反応組成物のアリコート、未変性アガロースゲルの個別のレーンで電気泳動し、臭化エチジウムで視覚化した。レーンAおよびJ：1200塩基対、800塩基対、400塩基対、200塩基対、および100塩基対、のサイズ標準を含むサイズラダー、レーンB～G：5、10、25、50、75、または100nMのポリメラーゼインヒビターEをそれぞれ含むサーモサイクリングした反応組成物のアリコート、レーンH：50nMのDNAポリメラーゼインヒビターEを含むテンプレートなしのコントロール反応組成物、レーンI：ブランク。

10

【図8】アガロースゲルの写真を示す。実施例3に記載のように、種々の濃度の例示的DNAポリメラーゼインヒビター中で生成されたアンプリコンを含む一連のサーモサイクリングした反応組成物のアリコート、未変性アガロースゲルの個別のレーンで電気泳動し、臭化エチジウムで視覚化した。レーンAおよびJ：1200塩基対、800塩基対、400塩基対、200塩基対、および100塩基対のサイズ標準を含むサイズラダー、レーンB～H：0、5、10、25、50、75、または100nMのポリメラーゼインヒビターEをそれぞれ含むサーモサイクリングした反応組成物のアリコート、レーンI：50nMのDNAポリメラーゼインヒビターEを含むテンプレートなしのコントロール反応組成物。

20

【図9】実施例4に記載のように、例示的DNAポリメラーゼインヒビターの存在によって二次アンプリコンが減少することを示す、未変性アガロースゲルの写真を示す。

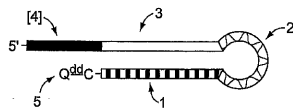
【図10A】実施例5に示すように、本教示の例示的方法にしたがって生成した例示的解離曲線を示す。

【図10B】実施例5に示すように、本教示の例示的方法にしたがって生成した例示的解離曲線を示す。

30

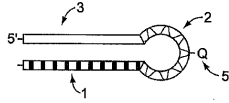
【図 1 A】

FIG. 1A



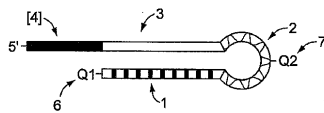
【図 1 B】

FIG. 1B



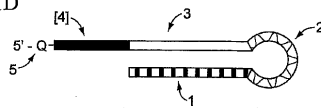
【図 1 C】

FIG. 1C



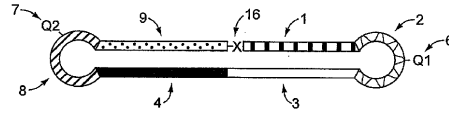
【図 1 D】

FIG. 1D



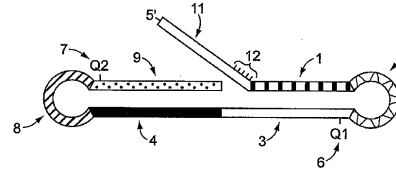
【図 1 E】

FIG. 1E



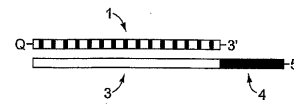
【図 1 F】

FIG. 1F



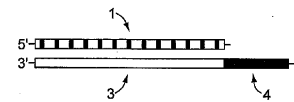
【図 2 A】

FIG. 2A



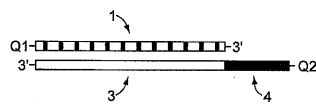
【図 2 B】

FIG. 2B



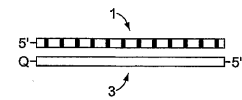
【図 2 C】

FIG. 2C



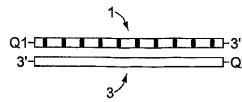
【図 2 D】

FIG. 2D



【図 2 E】

FIG. 2E



【図 3】

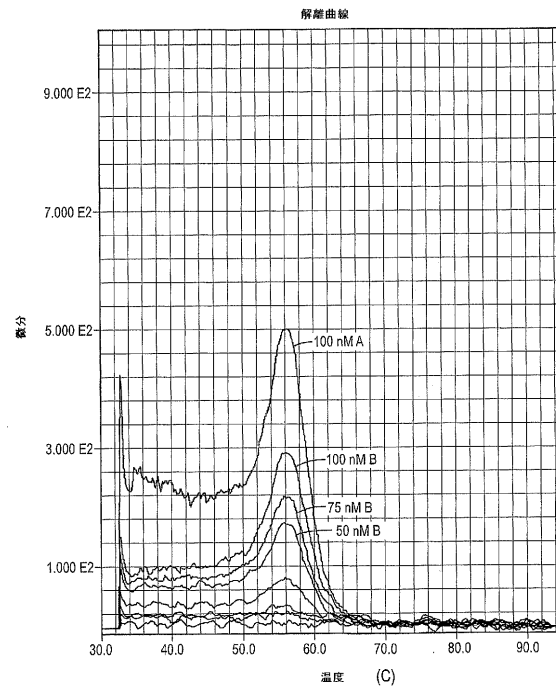


FIG. 3

【図 4】

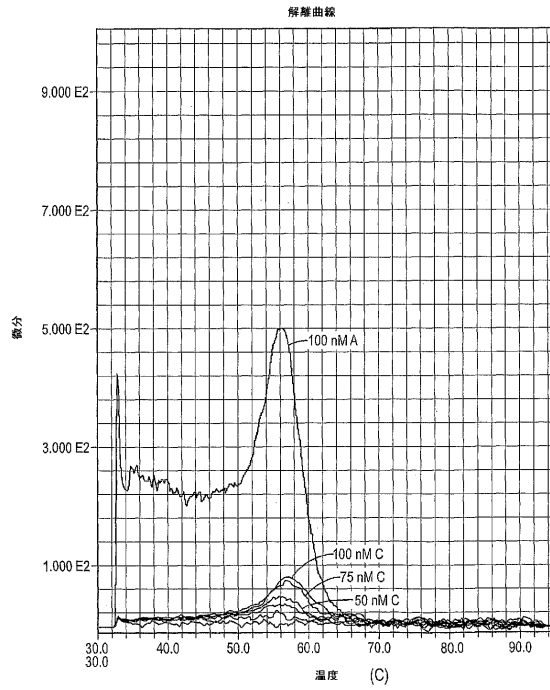


FIG. 4

【図 5】

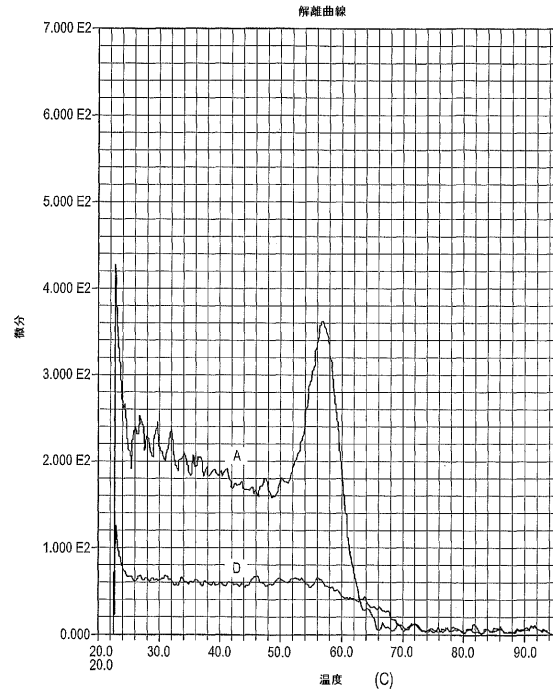


FIG. 5

【図 6】

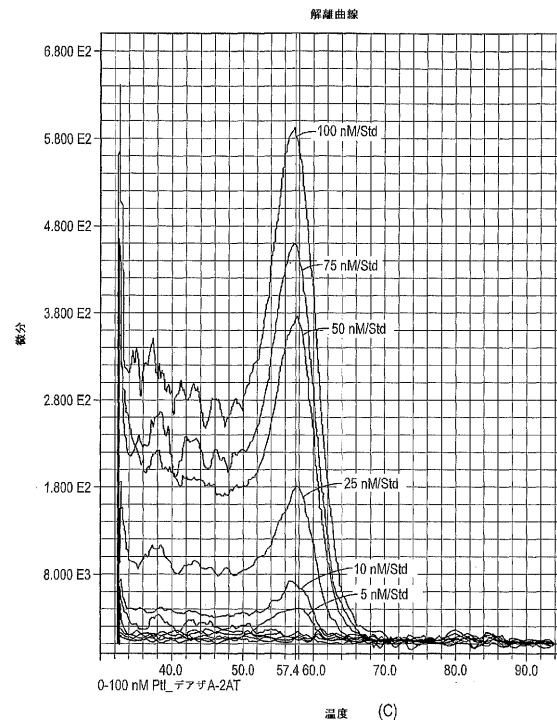


FIG. 6

【図 7】

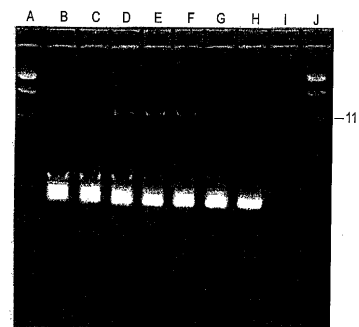


FIG. 7

【図 8】

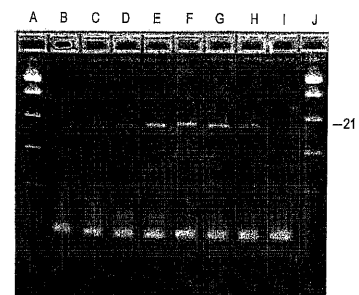


FIG. 8

【図 9】

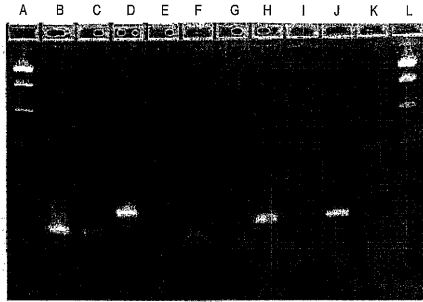


FIG. 9

【図 10 A】

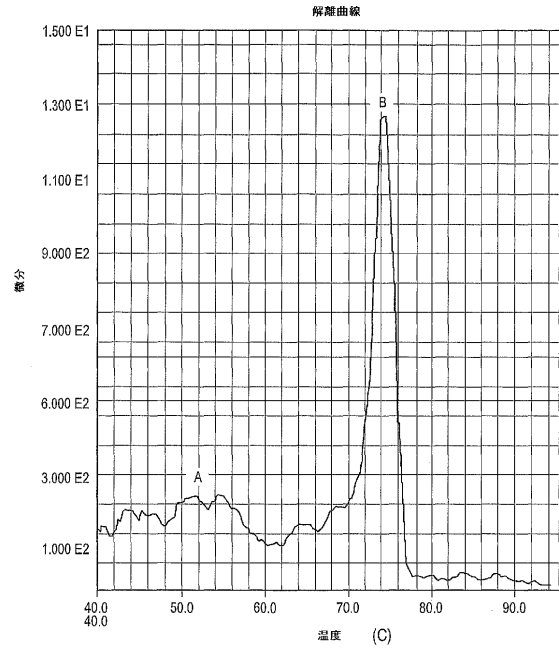


FIG. 10A

【図 10 B】

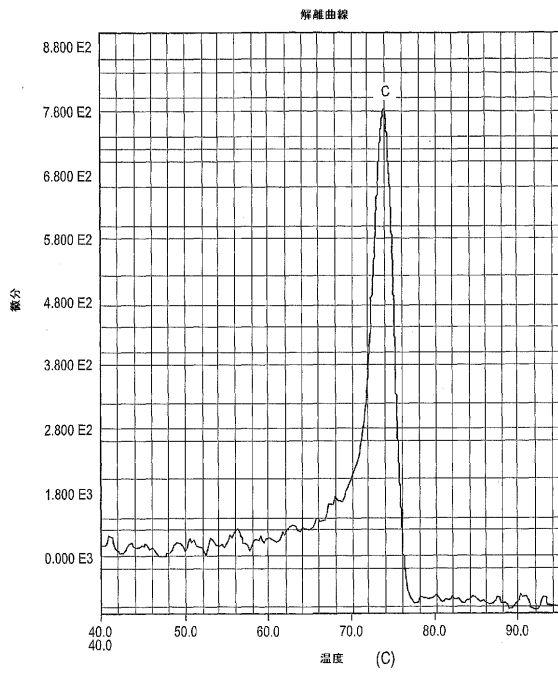


FIG. 10B

【配列表】

0005438320000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ドン, シュリアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 95132, サン ノゼ, ミラ ビスタ サークル 33
50
- (72)発明者 スティーブンス, ジュンコ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025, メンロ パーク, ウィンザー ウェイ 11
57
- (72)発明者 リー, ダニー エイチ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94587, ユニオン シティ, パームデール ストリー
ト 4336

審査官 小暮 道明

- (56)参考文献 国際公開第2004/090153 (WO, A1)
特表2003-504018 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N15/
C12Q1/
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)