

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4989004号
(P4989004)

(45) 発行日 平成24年8月1日(2012.8.1)

(24) 登録日 平成24年5月11日(2012.5.11)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M
G O 1 N 33/566 (2006.01)	G O 1 N 33/566

請求項の数 58 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-561783 (P2001-561783)	(73) 特許権者	598004424
(86) (22) 出願日	平成13年2月22日 (2001.2.22)		シティ・オブ・ホープ
(65) 公表番号	特表2003-526344 (P2003-526344A)		City of Hope
(43) 公表日	平成15年9月9日 (2003.9.9)		アメリカ合衆国カリフォルニア州9101
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/005527		0-0269, デュアーテ, イースト・デ
(87) 国際公開番号	W02001/062975		ュアーテ・ロード 1500
(87) 国際公開日	平成13年8月30日 (2001.8.30)		1500 East, Duarte Ro
審査請求日	平成20年2月21日 (2008.2.21)		ad, Duarte, Californi
(31) 優先権主張番号	60/184, 315		a 91010-0269, United
(32) 優先日	平成12年2月23日 (2000.2.23)		States of America
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	60/187, 035		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成12年3月6日 (2000.3.6)	(74) 代理人	100089705
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 社本 一夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 加ピロリン酸分解活性化重合 (PAP) : アリール特異的増幅および核酸配列決定への適応

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸テンプレート鎖上で所望の核酸鎖を合成する加ピロリン酸分解活性化重合 (PAP) 方法であって、以下のステップ：

(a) 標的配列に相補的な配列を有し、加ピロリン酸分解により活性化可能であり、伸長可能ではない3'末端を有し、3'末端又はその近くにテンプレート鎖上の対応するヌクレオチドとミスマッチするヌクレオチドがないオリゴヌクレオチドP*を、テンプレート鎖を含有する反応混合物に対して添加すること、ここで、伸長可能ではない3'末端は、2', 3'-ジデオキシヌクレオチドであるか、または3'末端において3'-ヒドロキシル基を有さない化学的に修飾されたヌクレオチドである、

(b) オリゴヌクレオチドP*がアニールする場合に、伸長可能ではない3'末端がテンプレート鎖とハイブリダイズするように、前記オリゴヌクレオチドP*をテンプレート鎖とアニリングすること、

(c) 加ピロリン酸分解活性があり、ハイブリダイズした伸長可能ではない3'末端を除去してオリゴヌクレオチドP*を活性化する酵素であって耐熱性のTfi若しくはTaq、又は、Ampli TaqFS、ThermoSequenase及びTaqFS中のF667Y変異と同等の活性部位に変異を含むように改変されたDNAポリメラーゼからなる群から選択される遺伝子操作されたDNAポリメラーゼからなる群から選択されるもの、及びピロホスファターゼを用いて、結果として生じた二本鎖を加ピロリン酸分解すること、及び

(d) 4種のヌクレオシド三リン酸及び核酸ポリメラーゼの存在下で、テンプレート鎖上

の活性化されたオリゴヌクレオチドP^{*}を伸長させて重合し、所望の核酸鎖を合成すること、
を連続的に含む、前記方法。

【請求項2】

請求項1記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法であって、以下のステップ：

(e) テンプレート鎖からステップ(d)の所望の核酸鎖を分離すること；及び

(f) 所望の核酸鎖の増幅の所望のレベルが達成されるまでステップ(b)～(e)を繰り返すこと、
によって所望の核酸鎖を増幅することを含む、前記方法。

【請求項3】

請求項2記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法であって、増幅が指数関数的になるように、ステップ(b)で、ステップ(e)の分離された所望の核酸鎖産生物とアニールする第2のオリゴヌクレオチドの存在下で実行され、ここでステップ(d)が、所望の核酸鎖上で第2のオリゴヌクレオチドを伸長することにより重合して核酸テンプレート鎖のコピーを合成することを含み、ステップ(e)が、所望の核酸鎖から合成された核酸テンプレート鎖を分離することを含む、前記方法。

【請求項4】

ステップ(b)～(d)が、サーモサイクラー上で2又はそれ以上の温度ステージで連続的に行われる、請求項2又は3記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項5】

ステップ(b)～(d)が、サーモサイクラー上で1の温度ステージで行われる、請求項2又は3記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項6】

アリル特異的増幅に適用される請求項2～4の加ピロリン酸分解活性化重合方法であって、核酸テンプレート鎖が前記テンプレート鎖とは異なる第2のアリル核酸鎖との混合物中に存在し、ステップ(b)で、オリゴヌクレオチドP^{*}の伸長可能ではない3'末端がアリル鎖とはハイブリダイズしないように、活性化可能であるオリゴヌクレオチドP^{*}にはアリル鎖の対応するヌクレオチドをミスマッチする少なくとも1のヌクレオチドが3'末端又はその近くにあり；及び従って、ステップ(c)で、ピロリン酸及び加ピロリン酸分解活性がある酵素は活性化可能であるオリゴヌクレオチドP^{*}からハイブリダイズしなかった伸長可能ではない3'末端を実質的には除去せず；ステップ(d)で、オリゴヌクレオチドP^{*}はアリル鎖上の重合では実質的には伸長せず、それによってテンプレート鎖上で合成される所望の核酸鎖はアリル鎖上合成されるあらゆる核酸鎖よりも選択的に増幅される、前記方法。

【請求項7】

活性化可能であるオリゴヌクレオチドP^{*}及びテンプレート鎖の間のミスマッチが、伸長可能ではない3'末端又は伸長可能ではない3'末端から最初若しくは2番目のヌクレオチドで起こる、請求項6記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項8】

活性化可能であるオリゴヌクレオチドP^{*}及びテンプレート鎖の間のミスマッチが、伸長可能ではない3'末端で起こる、請求項6記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項9】

所望の核酸鎖、テンプレート鎖、及びアリル鎖がDNA鎖であり、活性化可能であるオリゴヌクレオチドP^{*}が2'-デオキシオリゴヌクレオチドであり、3'末端のデオキシヌクレオチドが伸長可能ではない末端であり、4種のヌクレオシド三リン酸が2'-デオキシヌクレオシド三リン酸であり、及び核酸ポリメラーゼがDNAポリメラーゼである、請求項6～8のいずれか1項記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項10】

所望の核酸鎖、テンプレート鎖、及びアリル鎖がDNA鎖であり、活性化可能であるオリゴヌクレオチドP^{*}及び第2のオリゴヌクレオチドの両方が2'-デオキシオリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドであり、3'末端のデオキシヌクレオチドが伸長可能ではない3'末端であり、4種のヌクレオシド三リン酸が2'-デオキシヌクレオシド三リン酸であり、核酸ポリメラーゼがDNAポリメラーゼである、請求項6~8のいずれか1項記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項 1 1】

オリゴヌクレオチドP^{*}はn>3の長さのヌクレオチドである3'特異的部分配列があり、そのテンプレート鎖に対する1つ又はそれ以上のミスマッチが3'特異的部分配列内に位置する場合はオリゴヌクレオチドP^{*}は実質的に増幅されないが、3'特異的部分配列内に完全にマッチするテンプレート鎖ではオリゴヌクレオチドP^{*}は実質的に増幅される、請求項1~10のいずれか1項記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項 1 2】

3'特異的部分配列におけるミスマッチが、オリゴヌクレオチドP^{*}の3'末端の16ヌクレオチド以内である、請求項11記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項 1 3】

PAPが、1のオリゴヌクレオチドP^{*}又は2のオリゴヌクレオチドで適用される、請求項11記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項 1 4】

異なる3'特異的部分配列を備えるオリゴヌクレオチドP^{*}のセットがPAPに適用される、2のDNA配列を比較するための又は遺伝子発現プロファイリングをモニターするための、請求項1~5のいずれか1項記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項 1 5】

各々のオリゴヌクレオチドP^{*}に3'特異的部分配列がある、請求項14記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項 1 6】

オリゴヌクレオチドP^{*}のセットが異なる3'特異的部分配列には不完全である、請求項14記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項 1 7】

オリゴヌクレオチドP^{*}のセットを用いた特異的PAP増幅のリストが記録されて、そして核酸のテンプレート鎖に相補的なDNA配列が3'特異的部分配列を整理することにより決定される、請求項14記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項 1 8】

PAPが、1のオリゴヌクレオチドP^{*}又は2のオリゴヌクレオチドを用いて適用される、請求項17記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項 1 9】

野生型アリルとの混合物中に存在する変異アリルの指数関数的増幅のための加ピロリン酸分解活性化重合方法であって、アリルごとの一本鎖DNAを作製すること、アリルごとに1の一本鎖DNAをテンプレート鎖とし、他方を相補鎖とすること、次に以下のステップ、

(a) 伸長可能ではない3'末端があり、3'末端又はその近くに変異アリルのテンプレート鎖上で2'-デオキシヌクレオチドとミスマッチする2'-デオキシヌクレオチドはないが、3'末端又はその近くに野生型アリルのテンプレート鎖上で対応する2'-デオキシヌクレオチドとミスマッチする少なくとも1の2'-デオキシヌクレオチドがある相補的な活性化可能である2'-デオキシオリゴヌクレオチドP^{*}と各アリルのテンプレート鎖が、2'-デオキシオリゴヌクレオチドP^{*}がアニーリングする場合、伸長可能ではない3'末端が変異体テンプレート鎖とはハイブリダイズするが、野生型テンプレート鎖とはハイブリダイズしないように、アニーリングすると同時に、活性化可能である2'-デオキシオリゴヌクレオチドP^{*}及び第2の2'-デオキシオリゴヌクレオチドが増幅すべき遺伝子の領域に隣接する、第2の相補的2'-デオキシオリゴヌクレオチドと各アリルの相補鎖がアニーリングすること、ここで、伸長可能ではない3'末端は、2',3'-ジデオキシヌクレオチドであるか、または3'末端において3'-ヒドロキシル基を有さない化学的に修飾されたヌクレオチドである；

(b) ハイブリダイズした伸長可能ではない3'末端を除去して2'-デオキシオリゴヌクレオチドP^{*}を活性化する加ピロリン酸分解活性がある酵素であって耐熱性のTfl若しくはTaq、

10

20

30

40

50

又は、AmpliTaqFS、ThermoSequenase及びTaqFS中のF667Y変異と同等の活性部位に変異を含むように改変されたDNAポリメラーゼからなる群から選択される遺伝子操作されたDNAポリメラーゼからなる群から選択されるもの、及びピロリン酸を用いて、変異体テンプレート鎖にアニールする活性化可能である2'-デオキシオリゴヌクレオチドP^{*}を加ピロリン酸分解すること、及び

(c) 4種のヌクレオシド三リン酸及びDNAポリメラーゼの存在下で変異体テンプレート鎖上で活性化されたオリゴヌクレオチドP^{*}を伸長すると同時に変異体及び野生型の相補鎖上で第2の2'-デオキシオリゴヌクレオチドを伸長することにより、重合すること、及び、

(d) ステップ(c)の伸長産物を分離すること；及び

10

(e) 変異アリルの指数関数的増幅が所望のレベルに達するまでステップ(a)～(d)を繰り返すこと、
を連続的に含む、前記方法。

【請求項20】

活性化可能である2'-デオキシオリゴヌクレオチドP^{*}及び野生型テンプレート鎖のミスマッチが、伸長可能ではない3'末端又は伸長可能ではない3'末端から最初若しくは2番目の2'-デオキシヌクレオチドで起こる、請求項19記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項21】

活性化可能である2'-デオキシオリゴヌクレオチドP^{*}及び野生型テンプレート鎖のミスマッチが、伸長可能ではない3'末端で起こる、請求項20の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

20

【請求項22】

活性化可能である2'-デオキシオリゴヌクレオチドP^{*}がアリルの相補鎖にアニールし、第2の2'-デオキシオリゴヌクレオチドがテンプレート鎖にアニールする、請求項19～21のいずれか1項記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項23】

(a) 相補的な配列を有し、活性化可能であり、伸長可能ではない3'末端があるがテンプレート鎖上で対応するヌクレオチドとミスマッチするヌクレオチドが3'末端又はその近くにないオリゴヌクレオチドP^{*}を、テンプレート核酸鎖を含有する反応混合物に対して添加すること、ここで、伸長可能ではない3'末端は、2',3'-ジデオキシヌクレオチドであるか、または3'末端において3'-ヒドロキシル基を有さない化学的に修飾されたヌクレオチドであり、

30

(b) 相補的な配列を有し、活性化可能であるオリゴヌクレオチドP^{*}をテンプレート核酸鎖に対してアニールし、それによりオリゴヌクレオチドP^{*}がアニールする場合に、3'末端のヌクレオチドがテンプレート鎖とハイブリダイズすること、

(c) ハイブリダイズした3'末端のヌクレオチドを除去することによりオリゴヌクレオチドP^{*}を活性化する加リン酸分解活性がある酵素であって耐熱性のTfl若しくはTaq、又は、AmpliTaqFS、ThermoSequenase及びTaqFS中のF667Y変異と同等の活性部位に変異を含むように改変されたDNAポリメラーゼからなる群から選択される遺伝子操作されたDNAポリメラーゼからなる群から選択されるもの、及びピロリン酸を用いて、結果として生じた二本鎖を加ピロリン酸分解すること、及び

40

(d) 伸長可能ではない3'-デオキシヌクレオシド三リン酸及び核酸ポリメラーゼの存在下で活性化されたオリゴヌクレオチドP^{*}をテンプレート鎖上で伸長すること、
を連続的に含む、加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項24】

ステップ(c)で、活性化されたオリゴヌクレオチドP^{*}が伸長可能ではない2',3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸及び4種の2'-デオキシ-ヌクレオシド三リン酸の混合物の存在下で伸長する、請求項23記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項25】

50

ステップ(c)で、活性化されたオリゴヌクレオチドP^{*}が伸長可能ではない3'-デオキシヌクレオシド三リン酸及び4種のヌクレオシド三リン酸の混合物の存在下で伸長する、請求項23記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項26】

加ピロリン酸分解活性化重合(PAP)により核酸配列中の未知の配列変異体を決定し又は核酸中の所定の配列を再度配列決定する方法であって、

(a) テンプレート鎖が伸長可能ではない3'末端と相補的な場合は、伸長可能ではない3'末端がテンプレート鎖とハイブリダイズし、セットの数が配列中のヌクレオチドの数に一致するように、ハイブリダイゼーション条件下で、前記テンプレート鎖とハイブリダイズするのに十分に相補的であるが、各セット内で異なる伸長可能ではない3'末端がある点で互いに異なる、4種の活性化可能であるオリゴヌクレオチドP^{*}の複数セットを核酸のテンプレート鎖と混合すること、ここで、伸長可能ではない3'末端は、2',3'-ジデオキシヌクレオチドであるか、または3'末端において3'-ヒドロキシル基を有さない化学的に修飾されたヌクレオチドである；

(b) テンプレート鎖にハイブリダイズする伸長可能ではない3'末端があるオリゴヌクレオチドP^{*}のみを加ピロリン酸分解で活性化する加リン酸分解活性がある酵素であって耐熱性のTfi若しくはTaq、又は、AmpliTaqFS、ThermoSequenase及びTaqFS中のF667Y変異と同等の活性部位に変異を含むように改変されたDNAポリメラーゼからなる群から選択される遺伝子操作されたDNAポリメラーゼからなる群から選択されるもの、及びピロリン酸を用いて、結果として生じた二本鎖を処理すること、

(c) 4種のヌクレオシド三リン酸及び1の核酸ポリメラーゼの存在下でテンプレート鎖上で活性化されたオリゴヌクレオチドP^{*}を伸長することにより重合すること、

(d) ステップ(c)で合成された核酸鎖をテンプレート鎖から分離すること、

(e) 増幅が所定のレベルに達するまでステップ(a)～(d)を繰り返すこと、及び

(f) 増幅をもたらしたオリゴヌクレオチドP^{*}の重複を解析することにより順に核酸鎖を整理すること、を含む、前記方法。

【請求項27】

ヌクレオチド三リン酸が単一ヌクレオチド伸長のためのDNAポリメラーゼの基質としての、ジデオキシヌクレオチド三リン酸である、請求項26記載の方法。

【請求項28】

3'末端ヌクレオチドが野生型の塩基又は3つの可能性のある単一塩基置換の1つと対応する1のオリゴヌクレオチドP^{*}がある、請求項26記載の方法。

【請求項29】

3'末端にddAMP、ddTMP、ddGMPあるいはddCMPのいずれかが野生型の塩基及び3つの可能性のある単一塩基置換と対応すること以外は同一な配列である4種のオリゴヌクレオチドP^{*}がある、請求項26記載の方法。

【請求項30】

4種のオリゴヌクレオチドP^{*}が単一スポット上で固定される、請求項29記載の方法。

【請求項31】

オリゴヌクレオチドP^{*}のセットを用いた特異的PAP増幅のリストを記録して、そして次に核酸のテンプレート鎖に相補的なDNA配列を、ワトソン-クリック対法則を用いて再構築する、請求項29記載の方法。

【請求項32】

PAPが1のオリゴヌクレオチドP^{*}又は2のオリゴヌクレオチドを用いて適用される、請求項29記載の方法。

【請求項33】

加ピロリン酸分解活性化重合(PAP)により核酸の配列をde novoに決定する方法であって、

(a) ヌクレオチドが全て同数のn個でありヌクレオチドがn個である全ての可能性のあ

10

20

30

40

50

る配列から集合的に構成され、全てが伸長可能ではない3'末端であり、それにより十分に相補的なオリゴヌクレオチドP*のいずれかがテンプレート鎖とハイブリダイズし、テンプレート鎖が3'末端の対応する位置で相補的である場合にのみ、伸長可能ではない3'末端がテンプレート鎖とハイブリダイズするような、複数の活性化可能であるオリゴヌクレオチドP*を核酸のテンプレート鎖とハイブリダイゼーション条件下で混合すること、ここで伸長可能ではない3'末端は、2',3'-ジデオキシヌクレオチドであるか、または3'末端において3'-ヒドロキシル基を有さない化学的に修飾されたヌクレオチドである、

(b) テンプレート鎖にハイブリダイズする伸長可能ではない3'末端があるハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドP*のみを活性化する加リン酸分解活性がある酵素であって耐熱性のTfl若しくはTaq、又は、AmpliTaqFS、ThermoSequenase及びTaqFS中のF667Y変異と同等の活性部位に変異を含むように改変されたDNAポリメラーゼからなる群から選択される遺伝子操作されたDNAポリメラーゼからなる群から選択されるもの、及びピロリン酸を用いて、ハイブリダイズした伸長可能ではない3'末端の加ピロリン酸分解により結果として生じた二本鎖を処理すること、

(c) 4種のヌクレオシド三リン酸及び1の核酸ポリメラーゼの存在下でテンプレート鎖上で活性化されたオリゴヌクレオチドP*を伸長することにより重合すること、

(d) ステップ(c)で合成された核酸鎖をテンプレート鎖から分離すること、

(e) 増幅が所望のレベルに達するまでステップ(a)~(d)を繰り返すこと、及び

(f) 増幅をもたらしたオリゴヌクレオチドP*の配列を決定し、次にこれらのオリゴヌクレオチドの重複を解析することにより順に核酸鎖を整理すること、を含む、前記方法。

【請求項34】

ヌクレオチド三リン酸が単一ヌクレオチド伸長のためのDNAポリメラーゼの基質としての、ジデオキシヌクレオチド三リン酸である、請求項33記載の方法。

【請求項35】

オリゴヌクレオチドP*の3'末端のジデオキシヌクレオチドが色素で標識された、請求項33記載の方法。

【請求項36】

異なる3'特異的部分配列があるオリゴヌクレオチドP*のセットがPAPに適用される、請求項33記載の方法。

【請求項37】

各オリゴヌクレオチドP*に3'特異的部分配列がある、請求項36記載の方法。

【請求項38】

オリゴヌクレオチドP*のセットが異なる3'特異的部分配列の完全なセット又は異なる3'特異的部分配列の不完全なセットである、請求項36記載の方法。

【請求項39】

オリゴヌクレオチドP*のセットを用いた特異的PAP増幅のリストを記録して、そしてワトソン-クリック対法則を用いて3'特異的部分配列を整えることにより核酸のテンプレート鎖と相補的なDNA配列を再構築する、請求項36記載の方法。

【請求項40】

PAPが1若しくは2のオリゴヌクレオチドP*又は2のオリゴヌクレオチドを用いて適用される、請求項36記載の方法。

【請求項41】

核酸テンプレート鎖上で所望の核酸鎖を合成する加ピロリン酸分解活性化重合(PAP)方法であって、以下のステップ、

(a) 伸長可能ではない3'末端があり、テンプレート鎖上の対応するヌクレオチドについて伸長可能ではない3'末端又は伸長可能ではない3'末端から最初若しくは2番目のヌクレオチドにミスマッチがある標的配列に相補的な配列を有し、加ピロリン酸分解により活性化可能であるオリゴヌクレオチドP*をテンプレート鎖とアニーリングすること、ここで、伸長可能ではない3'末端は、2',3'-ジデオキシヌクレオチドであるか、または3'末端

10

20

30

40

50

において3'-ヒドロキシル基を有さない化学的に修飾されたヌクレオチドである；

(b) 加リン酸分解活性があり、ハイブリダイズした伸長可能ではない3'末端ヌクレオチドを除去してオリゴヌクレオチドP^{*}を活性化する酵素であって耐熱性のTfl若しくはTaq、又は、AmpliTaqFS、ThermoSequenase及びTaqFS中のF667Y変異と同等の活性部位に変異を含むように改変されたDNAポリメラーゼからなる群から選択される遺伝子操作されたDNAポリメラーゼからなる群から選択されるもの、及びピロホスファターゼを用いて、結果として生じた二本鎖を加ピロリン酸分解すること、及び

(c) 4種のヌクレオシド三リン酸及び1の核酸ポリメラーゼの存在下で、テンプレート鎖上の活性化されたオリゴヌクレオチドP^{*}を伸長させることにより重合して、所望の核酸鎖を合成すること、

を連続的に含む、前記方法。

【請求項42】

請求項41記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法であって、以下のステップ、

(d) テンプレート鎖からステップ(c)の所望の核酸鎖を分離すること、及び

(e) 所望の核酸鎖の増幅が所望のレベルに達するまでステップ(a)～(d)を繰り返すこと、

によって所望の核酸鎖を増幅することを含む、前記方法。

【請求項43】

ステップ(a)で、ステップ(d)で分離された所望の核酸鎖産生物にアニールする第2のオリゴヌクレオチドの存在下で実行される請求項42記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法であって、ここで増幅が指数関数的であるように、ステップ(c)が、所望の核酸鎖上で第2のオリゴヌクレオチドを伸長することにより重合して、核酸テンプレート鎖のコピーを合成することを含み、ステップ(d)が、所望の核酸鎖から合成された核酸テンプレート鎖を分離することを含む、前記方法。

【請求項44】

活性化可能であるオリゴヌクレオチドP^{*}及びテンプレート鎖のミスマッチが、末端3'-デオキシヌクレオチドで起こる、請求項41～43のいずれか1項に記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項45】

ステップ(a)～(c)が、サーモサイクラー上で2又はそれ以上の温度ステージで連続的に行われる、請求項41～44のいずれか1項に記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項46】

活性化可能であるオリゴヌクレオチドP^{*}及びテンプレート鎖のミスマッチが、末端3'-デオキシヌクレオチドで起こる、請求項41～44のいずれか1項に記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項47】

ステップ(a)～(c)が、サーモサイクラー上で1の温度ステージで行われる、請求項41～44のいずれか1項に記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項48】

PAP効率が亢進されるか、又はPAP効率がオリゴヌクレオチドP^{*}の3'末端でいかなる種類の伸長可能ではない3'末端に対してもあまり差異がない、請求項1～47のいずれか1項記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項49】

DNAポリメラーゼがまた加ピロリン酸分解活性がある酵素である、請求項1～48のいずれか1項記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項50】

オリゴヌクレオチドP^{*}の伸長可能ではない3'末端で伸長可能ではない3'末端がジデオキシヌクレオチドか又はアシクロヌクレオチドである、請求項1～49のいずれか1項記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項51】

10

20

30

40

50

伸長可能ではない3'-デオキシヌクレオチド三リン酸が放射性あるいは蛍光標識で標識される、請求項1～50のいずれか1項記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項52】

ジデオキシヌクレオチド三リン酸が色素で標識されている、請求項1～50のいずれか1項記載の加ピロリン酸分解活性化重合方法。

【請求項53】

4種のヌクレオシド三リン酸及び1の核酸ポリメラーゼの存在下で核酸テンプレート上でオリゴヌクレオチドを伸長することにより核酸を増幅する第2の反応と、除去しなければテンプレート上でオリゴヌクレオチドの伸長を妨げるようなオリゴヌクレオチドの3'末端における伸長可能ではない3'-デオキシヌクレオチドを除去することによりオリゴヌクレオチドを活性化する第1の反応の、2の反応の連続的な結合を含むプロセスであって、(i)オリゴヌクレオチドの3'末端における伸長可能ではない3'-デオキシヌクレオチドが前オリゴヌクレオチドの3'末端が伸長可能ではない3'-デオキシヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチドの3'末端における伸長可能ではない3'-デオキシヌクレオチドが加ピロリン酸分解により除去されるか、又は、(ii)オリゴヌクレオチドの3'末端における伸長可能ではない3'-デオキシヌクレオチドが非メチル化標的鎖とハイブリダイズするオリゴヌクレオチド中のメチル化認識配列であり、オリゴヌクレオチドの3'末端における伸長可能ではない3'-デオキシヌクレオチドがメチル化依存性制限エンドヌクレアーゼ切断により除去される、前記プロセス。

【請求項54】

メチル化エンドヌクレアーゼ認識配列がG^mATCである、請求項53のプロセス。

【請求項55】

制限エンドヌクレアーゼがDpnIである、請求項54のプロセス。

【請求項56】

核酸を検出する方法であって、以下のステップ：

(a)核酸とオリゴヌクレオチドP^{*}とアニーリングすることであって、オリゴヌクレオチドP^{*}には伸長可能ではない3'末端があり、ここで、伸長可能ではない3'末端は、2',3'-ジデオキシヌクレオチドであるか、または3'末端における3'-ヒドロキシル基を有さない化学的に修飾されたヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチドP^{*}の伸長可能ではない3'末端は加ピロリン酸分解により除去される；

(b)オリゴヌクレオチドP^{*}の伸長可能ではない3'末端を、耐熱性のTfl若しくはTaq、又は、AmpliTaqFS、ThermoSequenase及びTaqFS中のF667Y変異と同等の活性部位に変異を含むように改変されたDNAポリメラーゼからなる群から選択される遺伝子操作されたDNAポリメラーゼからなる群から選択される酵素による加ピロリン酸分解により除去すること；及び

(c)除去されたオリゴヌクレオチドP^{*}の伸長可能ではない3'末端を検出すること；を含む、前記方法。

【請求項57】

オリゴヌクレオチドP^{*}の伸長可能ではない3'末端が標識され、オリゴヌクレオチドP^{*}から除去された伸長可能ではない3'末端の検出をオリゴヌクレオチドP^{*}の標識が減少したことを検出することにより行う、請求項56記載の方法。

【請求項58】

オリゴヌクレオチドP^{*}から除去された伸長可能ではない3'末端の検出を、

(a)ヌクレオチドを核酸ハイブリッドに組み込むことを触媒する酵素及び1又はそれ以上のヌクレオチドを用いてブロックされていないオリゴヌクレオチドを伸長すること；及び

(b)伸長したオリゴヌクレオチドを検出することにより核酸の存在を検出すること；により行う、請求項56記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

本発明は核酸の重合および増幅に関する。特に、核酸の増幅のための新規のおよび一般的な方法に関し、そこでは加ピロリン酸分解および重合は連続的に結合される。方法は、アリル特異的増幅に適應され、野生株アリル中で極度にまれなアリルを検出するための特異性を大いに増加することができる。我々は、加ピロリン酸活性化重合 (PAP) として方法に言及する。

【0002】

発明の背景を明らかにするため、あるいは実施に関するさらなる詳細を提供するために、ここで使用される刊行物およびその他の資料は参考文献により援用され、便宜上各々添付の参考文献のリストにまとめられる。

10

【0003】

10^6 - 10^9 の野生株アリルにおいて1つの変異を検出する方法は、微小残存病変 (緩解中のまれに残存する癌細胞、特にp53遺伝子あるいは以前に腫瘍内で同定されたその他の抑制遺伝子における変異) および変異負荷 (mutation load) の測定 (血液あるいは尿などの、正常な組織に存在する特異的な体細胞変異の頻度) を含む多くの応用にとって都合が良いであろう。高い変異負荷を有する個人は、ゲノムの完全さを維持するために必要な数百の遺伝子において、環境的な暴露あるいは内生的な欠損のいずれかに対する癌の危険度が増加しているかもしれない。高い変異負荷を有することが見出されるそれらの個人にとって、変異パターンを明らかにすることにより病因の糸口を得ることができる。

20

【0004】

特異的なアリルのPCR増幅 (PASA)、PNAクランピングブロッカーPCR、アリル特異的競合ブロッカーPCR、MAMA、およびRFLP/PCRを含む、細胞の10%未満に存在する変異 (すなわち、まれなアリル) を検出する複数の方法が開発された (1)。これらの方法は、i) まれなアリルを選択的に増幅する、ii) 豊富な野生型アリルを破壊する、あるいはiii) 野生型アリルからまれなアリルを空間的に分離する。RFLP/PCRは、 10^{-8} の最も高い特異性を有すると報告されたが (2)、しかし我々の場合、特異性は 10^{-3} から 10^{-4} であった (3)。選択的にまれなアリルを増幅する方法はPASAを含み、それは40分の1未満かあるいは等しい特異性を日常的に有する (4)。

【0005】

DNAポリメラーゼは、DNA増幅に重要であり、以下の反応のいくつかあるいは全てを触媒する：i) デオキシヌクレオチド三リン酸の重合；ii) ピロリン酸 (PPi) の存在におけるDNAの二本鎖の加ピロリン酸分解；iii) 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性およびiv) 5'-3'エキソヌクレアーゼ活性 (5, 6)。TaqおよびTfi DNAポリメラーゼについて、重合および5'-3'エキソヌクレアーゼ活性が報告された (7-9)。T7 SequenaseTM DNAポリメラーゼについて、加ピロリン酸分解によりサンガー配列決定反応において特異的ジデオキシヌクレオチド-終結セグメント (terminated segment) の減少を導くことができる (10, 11)。

30

【0006】

ジデオキシターミネーションおよび変性ゲル電気泳動を使用するサンガー配列決定 (27)、化学的開裂および変性ゲル電気泳動を使用するマクサム-ギルバー配列決定 (28)、DNAポリメラーゼ反応中に放出されるピロリン酸 (PPi) を検出するピロ-配列決定 (29)、およびオリゴヌクレオチドを使用するハイブリダイゼーションによる配列決定 (SBH) (30-35) などの、多くのDNA配列決定方法およびそれらの変法がある。

40

【0007】

ここでは、我々は加ピロリン酸分解活性化重合 (PAP)、つまりPASAの特異性を劇的に亢進する潜在能力を有するアプローチ、を記載する。我々はまた、PAPによるDNA配列決定の新規方法も記載する。

【0008】

発明の概略

本発明は、核酸テンプレート鎖上にて所望する核酸鎖を合成する加ピロリン酸分解活性化重合 (PAP) 方法である。この方法は、連続的に実行される以下のステップを含む。

50

【0009】

(a) テンプレート鎖に対する相補的な活性化可能オリゴヌクレオチドP^{*}のアニールリング。この活性化可能オリゴヌクレオチドは、その3'末端に非伸長可能(non-extendable)3'-デオキシヌクレオチドを有する。それは、その3'末端あるいはその近くにおいて、テンプレート鎖上で対応するヌクレオチドをミスマッチさせるヌクレオチドを持たない。従って、末端3'-デオキシヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドP^{*}がアニールされるとき、テンプレート鎖とハイブリダイズする。

【0010】

(b) ピロリン酸および加ピロリン酸分解活性を有する酵素を用いたアニールされた活性化可能オリゴヌクレオチドP^{*}の加ピロリン酸分解。これは、ハイブリダイズされた末端3'-デオキシヌクレオチドの除去によりオリゴヌクレオチドP^{*}を活性化する。

10

【0011】

(c) 4つのヌクレオシド三リン酸および核酸ポリメラーゼの存在下において、テンプレート鎖上での活性化オリゴヌクレオチドP^{*}の伸長による重合して、所望する核酸鎖を合成。

【0012】

PAP法は、以下の追加的なステップにより所望する核酸鎖を増幅するため利用できる。

(d) テンプレート鎖からのステップ(c)の所望する核酸鎖の分離。

【0013】

(e) 所望する核酸鎖の増幅の所望するレベルが達せられるまでのステップ(a)~(d)の繰り返し。

20

好ましい観点において、上記したようなPAP法はアリル特異的増幅に応用される。この応用において、核酸テンプレート鎖は1つのアリルのセンスあるいはアンチセンス鎖であり、2番目のアリルの対応(センスあるいはアンチセンス)核酸鎖(アリル鎖(allelic strand))との混合物中に存在する。活性化可能オリゴヌクレオチドP^{*}は、対立鎖(allelic strand)の対応ヌクレオチドとミスマッチする少なくとも1つのヌクレオチドを、その3'末端あるいはその近くに有する。ミスマッチのため、PAP法のステップ(a)において、オリゴヌクレオチドP^{*}の末端3'-デオキシヌクレオチドはアリル鎖に対してハイブリダイズしない。ステップ(b)において、加ピロリン酸分解は対立鎖にアニールされた活性化可能オリゴヌクレオチドP^{*}から非ハイブリダイズ末端3'-デオキシヌクレオチドを実質的には除去しない。ステップ(c)において、オリゴヌクレオチドP^{*}は対立鎖上において重合では実質的には伸長しない。結果として、テンプレート鎖上で合成される所望される核酸鎖は、アリル鎖上で合成されるあらゆる核酸鎖にわたり優先的に増幅される。

30

【0014】

PAP法を使用して、RNAあるいはDNAのいずれかを増幅できる。DNAを増幅するために使用するとき、活性化可能オリゴヌクレオチドP^{*}は2'-デオキシオリゴヌクレオチドであり、末端デオキシヌクレオチドは2', 3'-ジデオキシヌクレオチドであり、4つのオリゴヌクレオシド三リン酸は2'-デオキシヌクレオシド三リン酸であり、および核酸ポリメラーゼはDNAポリメラーゼである。ステップ(c)で使用するDNAポリメラーゼはまた、ステップ(b)で使用する加ピロリン酸分解活性を有する酵素でもありうる。加ピロリン酸分解活性を有する好ましいDNAポリメラーゼは、耐熱性Tfl、Taq、およびAmpliTaqFsおよびThermoSequenaseTMなどの遺伝子操作したDNAポリメラーゼである。これらの遺伝子操作したDNAポリメラーゼは、それらの活性部位に変異F667Yを有し、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性が除去されている。AmpliTaqFsおよびThermoSequenaseTMなどの遺伝子操作したDNAポリメラーゼの使用により、PAPの効率が大きく亢進する。

40

【0015】

PAP法による増幅は、線形的あるいは指数関数的となりうる。線形的増幅は、活性化可能オリゴヌクレオチドP^{*}が使用される唯一の相補的オリゴヌクレオチドであるときに得られる。指数関数的増幅は、所望する核酸鎖に対して相補的である第2オリゴヌクレオチドが存在するときに得られる。活性化可能オリゴヌクレオチドP^{*}および第2オリゴヌクレオチドは、増幅のために標的となる領域に隣接する。ステップ(a)において、第2オリゴヌ

50

レオチドは、ステップ(d)の分離された所望する核酸鎖産物にアニールする。ステップ(c)において、重合は所望する核酸鎖上で第2オリゴヌクレオチドを伸長して、核酸テンプレート鎖のコピーを合成する。ステップ(d)において、合成核酸テンプレート鎖は所望する核酸鎖から分離される。ステップ(a)から(d)は、所望するレベルの指数関数的増幅が達成されるまで繰り返される。

【0016】

PAP法では、もし活性化可能オリゴヌクレオチド P^* およびテンプレート鎖との間のミスマッチが P^* の3'末端にある P^* の3'特異的部分配列においてあるいは P^* の3'末端の16ヌクレオチド内で起こる場合は、そのミスマッチは結果として増幅を生じない。 P^* の3'特異的部分配列におけるそのようなミスマッチによるこの増幅の欠如により、1塩基置換分析を用いた40億の異なるおよび特異的なオリゴヌクレオチドが提供される。

10

【0017】

好ましい観点において、PAP法は1つあるいはそれ以上の野生型アリルを含有する混合物におけるまれな変異アリルの指数関数的な増幅のために使用される。アリルの鎖は分離されて、一本鎖DNAを提供して、そして以下のステップが連続的に実行される。

【0018】

(a) 各々のアリルのセンスあるいはアンチセンスに対して、3'末端での非伸長可能2',3'-デオキシヌクレオチドを有する相補的な活性化可能2'-デオキシオリゴヌクレオチド P^* のアニール。 P^* は、変異鎖上で対応する2'-デオキシヌクレオチドとミスマッチする2'-デオキシヌクレオチドをその3'末端あるいはその近くに有していないが、野生型鎖上で対応する2'-デオキシヌクレオチドとミスマッチする少なくとも1つの2'-オリゴヌクレオチドをその3'末端あるいはその近くに有する。従って、末端2',3'-デオキシヌクレオチドは変異鎖に対してハイブリダイズするが、オリゴヌクレオチド P^* がアニールされるとき野生型鎖に対してはハイブリダイズしない。同時に、各々のアリルのアンチパラレル鎖に相補的な第2の2'-デオキシオリゴヌクレオチドは、アンチパラレル鎖に対してアニールされる。活性化可能2'-デオキシオリゴヌクレオチド P^* および第2の2'-デオキシオリゴヌクレオチドは、増幅すべき遺伝子の領域に隣接する。

20

【0019】

(b) ピロリン酸および加ピロリン酸分解活性を有する酵素を用いた、変異鎖に対してアニールされる活性化可能2'-デオキシオリゴヌクレオチド P^* の加ピロリン酸分解。これは、ハイブリダイズした末端2',3'-デオキシヌクレオチドを除去することにより変異鎖に対してアニールされる2'-デオキシオリゴヌクレオチド P^* を活性化する。それは、変異鎖に対してアニールされる2'-デオキシオリゴヌクレオチド P^* を実質的には活性化しない。なぜなら非ハイブリダイズ末端2',3'-デオキシヌクレオチドが加ピロリン酸分解により実質的には除去されないためである。

30

【0020】

(c) 4つのヌクレオシド三リン酸およびDNAポリメラーゼの存在下における、変異鎖上での活性化オリゴヌクレオチド P^* の伸長による重合化、および同時期の、変異および野生型アンチパラレル鎖の両方における第2の2'-デオキシオリゴヌクレオチドの伸長。

【0021】

(d) ステップ(c)の伸長産物の分離。
(e) 変異アリルの指数関数的増幅の所望するレベルが達せられるまでのステップ(a)~(d)の繰り返し。

40

【0022】

活性化可能2'-デオキシオリゴヌクレオチド P^* はアリルのアンチセンス鎖に対してアニールされ、第2の2'-デオキシオリゴヌクレオチドはセンス鎖に対してアニールされ、あるいはその逆も同様である。

【0023】

PAPのステップ(a)から(c)は、サーモサイクラー上での2つあるいはそれ以上の温度ステージとして連続的に行われるか、あるいはそれらはサーモサイクラー上での1つの温度

50

ステージとして行われうる。

【0024】

ヌクレオシド三リン酸および2'-デオキシヌクレオシド三リン酸あるいはそれらの化学的修飾バージョンは、PAPによる複数-ヌクレオチド伸長のための基質として使用されうる、すなわち、1つのヌクレオチドが組み込まれるとき、伸長鎖はさらに伸長されうる。さらなる伸長のターミネーターである2', 3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸あるいはそれらの化学的修飾バージョンは、1ヌクレオチド伸長のために使用されうる。2', 3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸は、オリゴヌクレオチドP^{*}の3'末端ジデオキシヌクレオチドとの識別のために放射性あるいは蛍光色素により標識されうる。ヌクレオシド三リン酸あるいは2'-デオキシヌクレオチド三リン酸および2', 3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸の混合物もまた使用されうる。

10

【0025】

PAPは、DNA配列決定の新規方法において使用できる。PAPにおいて、DNAポリメラーゼによる加ピロリン酸分解および重合は、3'ジデオキシ末端オリゴヌクレオチドであるP^{*}により連続的に連結される。この原則はPAPの特異性、および次には3'特異的部分配列の塩基対の特異性に基づいている。3'特異的部分配列のこの特性は、未知の配列変化のスキャンニング、de novo DNA配列の決定、2つのDNA配列の比較、および大きいスケールでの遺伝子発現プロファイリングのモニターに応用することができる。P^{*}アレイはこれらの方法において可能である。すなわち、P^{*}の各々は、別々のドットあるいは2次元固体支持体において固定化することができ、従って、全てのPAP反応を同時にプロセスできる。

20

【0026】

このように1つの観点において、PAP法は以下のステップを連続的に実行することにより、核酸配列における未知の配列変化のスキャンニング、あるいは核酸において先に決定した配列の再配列決定のために使用される。

【0027】

(a) ハイブリダイゼーション条件下における、核酸のテンプレート鎖とそれとハイブリダイズするテンプレート鎖に十分に相補的である、4つの活性化可能オリゴヌクレオチドP^{*}の複数のセットとの混合。各々のセット内では、オリゴヌクレオチドP^{*}は異なる3'-末端非伸長可能ヌクレオチドを有する点で各々他のものと異なり、そのため、3'末端非伸長可能ヌクレオチドは、もしテンプレート鎖が3'末端非伸長可能ヌクレオチドに相補的であるなら、テンプレート鎖とハイブリダイズする。セットの数は、配列におけるヌクレオチドの数に一致する。

30

【0028】

(b) ピロリン酸、およびテンプレート鎖とハイブリダイズする3'末端非伸長可能ヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドP^{*}のみを加ピロリン酸分解により活性化するための加ピロリン酸分解活性を有する酵素を用いた、結果として生じた二本鎖の処理。

【0029】

(c) 4つのヌクレオシド三リン酸および核酸ポリメラーゼの存在下における、テンプレート鎖上での活性化オリゴヌクレオチドP^{*}の伸長による重合化。

(d) ステップ(c)において合成された核酸鎖のテンプレート鎖からの分離。

40

【0030】

(e) 増幅の所望するレベルが達せられるまでのステップ(a)~(d)の繰り返し、および

(f) 増幅を産生したオリゴヌクレオチドP^{*}の重複の解析による、核酸配列の順序に従った整理。

【0031】

第2の観点において、PAP法は以下のステップを連続的に行うことにより、核酸の配列のde novoを決定するために使用される。

(a) ハイブリダイゼーション条件下における、核酸のテンプレート鎖と複数の活性化可能オリゴヌクレオチドP^{*}との混合。オリゴヌクレオチドP^{*}の全ては、テンプレートとして

50

同数 n のヌクレオチドを有しており、集合的に n のヌクレオチドを有する全ての可能な配列からなる。オリゴヌクレオチド P^* の全ては、3'末端に非伸長可能ヌクレオチドを有する。十分に相補的なあらゆるオリゴヌクレオチド P^* は、テンプレート鎖とハイブリダイズするであろう。3'末端非伸長可能ヌクレオチドは、テンプレート鎖が3'末端に対応する位置で相補的である場合のみ、テンプレート鎖とハイブリダイズするであろう。

【0032】

(b) ピロリン酸、およびテンプレート鎖とハイブリダイズする3'末端非伸長可能ヌクレオチドを有するハイブリダイズされるオリゴヌクレオチド P^* のみを、それらのハイブリダイズされる3'末端非伸長可能ヌクレオチドの加ピロリン酸分解によって活性化するための加ピロリン酸分解活性を有する酵素を用いた、結果として生じた二本鎖の処理。

10

【0033】

(c) 4つのヌクレオシド三リン酸および核酸ポリメラーゼの存在下における、テンプレート鎖上での活性化オリゴヌクレオチド P^* の伸長による重合化。

(d) ステップ(c)において合成された核酸鎖のテンプレート鎖からの分離。

【0034】

(e) 増幅の所望するレベルが達せられるまでのステップ(a)～(d)の繰り返し、および

(f) 増幅を産生したオリゴヌクレオチド P^* の配列の決定、そしてこれらのオリゴヌクレオチドの重複の解析による、核酸配列の順序に従った整理。

20

【0035】

発明の詳細な説明

本発明は以下の実施例から理解することができ、それらはPAPを使用することにより、ヒト D_1 ドーパミン受容体遺伝子内の多型部位における既知の変異を同定できることを説明する。ジデオキシオリゴヌクレオチド配列、DNAポリメラーゼ、 PPi 濃度、アリル特異的テンプレート、pH、およびdNTP濃度の効果を調べた。実施例に報告される実験は、原理を証明するために行った。以下の実施例は、説明の目的で提供されるのであり、いかなる様式においても発明を限定する意図はない。当該技術分野における既知の標準的な技術、あるいはそこに具体的に記載される技術を利用した。

【0036】

【実施例】

30

実施例1

PCRによるテンプレートの調製

ヒト D_1 ドーパミン受容体遺伝子の640-bp領域を、2つのプライマー(T = 5' GAC CTG CAG CAA GGG AGT CAG AAG 3' (SEQ ID NO:1) およびU = 5' TCA TAC CGG AAA GGG CTG GAG AT A 3' (SEQ ID NO:2))を用いたPCRにより増幅した(図1A)。TU:UT二本鎖産生物はGenBank X55760におけるヌクレオチド33から672にわたり、G+C含量は55.3%である。共通のAからGへの多型はヌクレオチド229に配置しており、G/G、A/AおよびG/Aの3つの遺伝型を生じる(12)。PCR混合物は50 μ lの容量: 50 mM KCl、10 mM Tris/HCl、pH 8.3、1.5 mM $MgCl_2$ 、各々200 μ MのdNTP(Boehringer Mannheim)、各々0.1 μ Mのプライマー、2% DMSO、1 UのTaq DNAポリメラーゼ(Boehringer Mannheim)および250 ngのG/G同型接合体、A/A同型接合体あるいはG/A異型接合体由来のゲノムDNAを含有する。サイクリング条件は: 95 で15秒間の変性、55 で30秒間のアニーリング、および72 で1分間の伸長で、全35サイクル(Perkin Elmer GeneAmp PCR system 9600)を含んだ。PCR産生物は、Centricon[®] 100マイクロコンセンレーター(Amicon)上での3回の残留(retention)によって、プライマーおよびその他の小分子を除いて約10,000倍まで精製した。回収したPCR産生物の量は、260 nmでのUV吸光度により決定した。

40

【0037】

3'-ジデオキシヌクレオチドを加えることによる P^* の合成

デオキシヌクレオチドオリゴヌクレオチドは、Perseptive Biosystems 8909 Synthesizer (Framingham)により合成して、City of Hope DNA/RNA Chemistry Laboratoryで、オリ

50

ゴピュアカートリッジ (oligopure cartridge) (Hamilton) により精製した。3'末端ジデオキシヌクレオチドをターミナルトランスフェラーゼによって付加した。混合物は40 μ lの総量：200 mMカコジル酸カリウム、25 mM Tris/HCl (25 でpH 6.6)、2.5 mM CoCl_2 、0.25 mg/mlのBSA、4000 pMのオリゴヌクレオチド、2.5 mM 2'3'-ddNTP (3'-OH末端とddNTPとのモル比は1:25であった (Boehringer Mannheim))、125 Uのターミナルトランスフェラーゼ (Boehringer Mannheim) を含有した。反応は37 で1時間インキュベートして、そしてEDTAを5 mM最終濃度で加えて停止した。ブタノールによる脱塩の後、ジデオキシオリゴヌクレオチドはTBE緩衝液 (90 mM Tris/ホウ酸、1 mM EDTA、pH 8.3) 中で分離用 (preparative) の7 M尿素/20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した (25)。回収した P^* の量は、260 nmでのUV吸収度により決定した。

10

【0038】

少量の非末端化 (unterminated) オリゴヌクレオチドにより非特異的な加ピロリン酸分解が生じ得るため、各々のジデオキシオリゴヌクレオチドはT4ポリヌクレオチドキナーゼにより5'末端を ^{32}P -標識化して、7 M尿素/20%ポリアクリルアミドゲルを通して電気泳動した。 P^* 産生物のみ、ゲルを過剰暴露したときでさえも見ることもできた (データは示されていない)。 P^* の99.99%以上が3'末端にジデオキシオリゴヌクレオチドを含有することが推定された。

【0039】

加ピロリン酸分解活性化重合

TU:UT二本鎖テンプレート内の469-bp領域を、オリゴヌクレオチド P^* およびU、あるいは唯一 P^* のみを用いたPAPにより増幅した (表1および図1A)。PU:UP二本鎖産生物は、GenBank X55760におけるヌクレオチド204から672に対応しており、G+C含量は55.6%である。言及しない場合は、PAP反応混合物はTfI DNAポリメラーゼのために25 μ lの総量：75 mM KCl、20 mM Tris/HCl (pH 7.4)、1.5 mM MgCl_2 、各々40 μ lの4つのdNTP (dATP、dTTP、dGTP およびdCTP)、0.2 μ M P^* 、0.05 μ M MUオリゴヌクレオチド、300 μ M Na_4PPi (20 mMストック液はHClによりpH 8.0に調節した)、1 μ Ciの[^{-32}P]-dCTP (3000 Ci/nmole、Amersham)、1 UのTfI DNAポリメラーゼ (Promega) および2 ngのTU:UTを含有した。Taq DNAポリメラーゼのために、反応混合物は50 mM KCl、10 mM Tris/HCl (pH 7.4)、2.0 mM MgCl_2 および1 UのTaq DNAポリメラーゼ (Boehringer Mannheim) 以外は同様であった。PCRおよびその他の対照の混合物は、加えたプライマー以外は同様であった。サイクリング条件は：94 で15秒間、55 で1分間、および72 まで1分間のランピング (ramping) および72 で2分間、全15サイクルを含んだ。

20

30

【0040】

【表1】

PAPで使したオリゴヌクレオチド

テンプレート	<div style="text-align: center;"> G 5'...AATCTGACTGACCCCTATTCCCTGCTT GGAAC...3' (SEQ ID NO:3) A </div>							
名称	オリゴヌクレオチド配列5'-3' (SEQ ID NO:)					目 的		
D ₁	ACTGACCCCTATTCCCTGCTT ^b (4)					対照		
D ₁ G [*]	ACTGACCCCTATTCCCTGCTTG ^b (5)					3' ddGおよびGアリル特異性が共に存在		
D ₂ G [*]	ACTGACCCCTATTCCCTGCTTGG [*] (6)					ddGの5'側でGアリル特異性		
D ₃ G [*]	ACTGACCCCTATTCCCTGCTTGGG [*] (7)					ddGの5'側でGアリル特異性		
D ₄ G [*]	ACTGACCCCTATTCCCTGCTTGGGG [*] (8)					3' ddGはテンプレートとミスマッチする		
D ₅ G [*]	TCTGACTGACCCCTATTCCCTGCTTG [*] (9)					D ₁ G [*] 、5'伸長塩基を伴う		
D ₆ A [*]	TGACTGACCCCTATTCCCTGCTTA [*] (10)					3' ddAおよびAアリル特異性がともに存在		
U	TCATACCGGAAAGGGCTGGAGATA (11)					上流オリゴヌクレオチド		
名称	3'末端ヌクレオチド ^c		アリル-特異的ヌクレオチド ^d		サイズ(塩基)	T _m (°C) ^e	増幅 ^f	
	型	マッチ	型	3'末端から(bp)			Gアリル	Aアリル
D ₁	dT	Yes	-	+1	21	64	Yes	Yes
D ₁ G [*]	ddG	Yes	G	0	22	68	No	No
D ₂ G [*]	ddG	Yes	G	-1	23	72	No	No
D ₃ G [*]	ddG	Yes	G	-2	24	76	Yes	No
D ₄ G [*]	ddG	No	G	-3	25	80	No	No
D ₅ A [*]	ddG	Yes	G	0	26	80	Yes	No
D ₆ A [*]	ddA	Yes	A	0	24	72	No	No
U	dA	Yes	-	-	24	72	Yes	Yes

^a D₁G^{*}はD₁の3'末端へのGジデオキシヌクレオチドの追加により産生された、^{*} = 3'末端のジデオキシヌクレオチド。

^b Tは3'末端がTデオキシヌクレオチドであることを意味し、G^{*}は3'末端がGジデオキシヌクレオチドであることを意味する。太字大文字の“G”および“A”は、各々GおよびAアリルに対応するGおよびAの塩基である。5'末端の最初の塩基は、GenBank X55760におけるヌクレオチド208に一致する。

^c 3'末端塩基はデオキシヌクレオチドあるいはジデオキシヌクレオチドであり、テンプレートの相補的な鎖に対応する塩基とマッチ(Yes)あるいはミスマッチ(No)をつくる。

^d アリル-特異的ヌクレオチドはGあるいはAであり、3'末端に対するその距離は次のように割り当てる: 0 = 3'末端、+1 = 3'末端から1塩基下流、-1 = 3'末端から1塩基上流、-2 = 3'末端から2塩基上流、-3 = 3'末端から3塩基上流。

^e オリゴヌクレオチドについてのT_mは、1 M NaClにおける $4 \times (G+C) + 2 \times (T+A)$ であると推定した(26)。

^f Uおよび1つのP^{*}あるいは1つのP^{*}のみを用いた増幅。

【 0 0 4 1 】

反応は、標準的な2%アガロースゲルを通して電気泳動した。ゲルは、CCDカメラ (Bio-Rad Gel Doc 1000) によるUV写真撮影のためにエチジウムブロマイドで染色して、オートラジオグラフィーのために乾燥してKodak X-OMATTM ARフィルムにかけた。

【 0 0 4 2 】

制限消化

Acil (5'C CGC3'/3'GGC G5')、EaeI (5'Py GGCCPu3'/3'PuCCGG Py5') およびEco0109I (5'PuG GNCCPy3'/3'PyCCNG GPu5') の3つの制限エンドヌクレアーゼの各々は、PU:UP二本鎖内に制限部位をもつ。G/GアリルはD₅G^{*} およびUを用いてPAPにより増幅した; D₁ およびUを用いたPCR増幅を対照として使用した。40 μl のPAP反応物および2 μl のPCR反応物はCentricon^R 100マイクロコンセンレーターを用いて精製および濃縮し、産生物は制限エンドヌクレアーゼ: 1 X NE緩衝液3中の2.5 UのAcil; あるいは1 X NE緩衝液1中の3 UのEaeI; あるいはBSAを含むNE緩衝液4中の30 UのEco0109I (上の全ての酵素および緩衝液はNew England Biolabs由来) により消化した。10 μl の反応物は37 °Cで2時間インキュベートした。消化反応物は上記のように、標準的2%アガロースゲルを通して電気泳動した。

【 0 0 4 3 】

結果

PAPの原理

TfI およびTaq DNAポリメラーゼは、加ピロリン酸分解活性を含有することを示した (データは示していない)。TfI DNAポリメラーゼを利用して、D₁ドーパミン受容体遺伝子のヌクレオチド229にてGアリルを検出した (12) (図1A)。P^{*} は3'末端にてddGあるいはddAのどちらかを用いて合成された (表1参照)。3'末端ジデオキシヌクレオチドは重合による直接的な伸長を阻害するが、しかし、P^{*} がGアリルの相補鎖と特異的にハイブリダイズするときは、ピロリン酸 (PPi) の存在下で加ピロリン酸分解により除去することができる。分解されたオリゴヌクレオチドは、5'-3'方向における重合により伸長されうる (図1Bおよび1C)。

【 0 0 4 4 】

PASAに関連するPAPの特異性の亢進は、加ピロリン酸分解および重合を連続的に連結することにより提供される。著しい非特異的な増幅には、ミスマッチ加ピロリン酸分解およびDNAポリメラーゼによる間違った組み込み (misincorporation) が必要であり、非常にまれな事象である (図2)。

【 0 0 4 5 】

D₅G^{*} およびD₃G^{*} を用いた特異的増幅

PAPは2つのオリゴヌクレオチド (P^{*} およびU)、TfI DNAポリメラーゼおよびG/GおよびA/AアリルのDNAテンプレートを用いて行われた。複数のP^{*} をテストした (表1)。D₅G^{*} (アリル-特異的ヌクレオチドおよびジデオキシヌクレオチドは3'末端に共に存在 (co-localize) される) およびD₃G^{*} (アリル-特異的ヌクレオチドは3'末端からの2塩基である) は、PPiの存在下にてGアリルを特異的に増幅した (図3A)。PPiを加えない場合、D₅G^{*} を用いた特異的産生物は観察されず、添加されたPPiはPAPの必須成分であることが示された (図3B、レーン6および15)。D₃G^{*} を用いたわずかな産生物がレーン4に、およびD₄G^{*} を用いたわずかな産生物がレーン5に、観察された (図3B) (以下参照)。

【 0 0 4 6 】

pH、[PPi] および[dNTP] および酵素の効果

上のパラメーターの各々を調べた。PAPは、pHが7.4および7.7の間、[PPi]が200 μMおよび400 μMの間、[dNTP]が25 μMおよび50 μMの間で最も効果的であった (表2)。Taq DNAポリメラーゼは、TfIと置換しても同様の効果が得られる (表2)。

【 0 0 4 7 】

【 表 2 】

PAPに影響するパラメーター

パラメーター		PAP効率 ^b	
		D ₅ G [*] -U	D ₅ G [*] -U
pH ^a	8.1	-	-
	7.9	-	-
	7.7	++	+++
	7.5	++	+++
	7.4	++	+++
	7.15	+	+
PP _i ^a (μM)	1000	-	-
	800	-	+
	600	-	++
	400	++	+++
	200	++	+++
	0	-	+
全てのdNTPを変化 ^a (μM)	200	-	+
	100	-	+
	50	++	+++
	25	++	++++
dGTPを変化 ^{a, c}	100	+	++
	50	+	++
	25	+	++
dATPを変化 ^{a, c}	100	-	+
	50	-	+
	25	-	++
Taq DNA ポリメラーゼ	GアリルおよびPP _i	++	+++
	AアリルおよびPP _i	-	-
	Gアリルおよびなし	-	+

^a Tfi DNAポリメラーゼを使用して、表示した因子以外は材料と方法における条件下でG/Gアリルを増幅した。

^b PAP効率は：-、特異的産生物なし；+、非常に弱い特異的産生物；++、弱い特異的産生物；+++、中程度の特異的産生物；++++、強い特異的産生物；+++++、非常に強い特異的産生物、として表示する。

^c 表示した濃度は変化させたが、その他は200 μMに維持した。

【0048】

特異的産生物の同一性

特異的産生物の同一性を確認するため、制限エンドヌクレアーゼ消化を行った（図4）。AciI、EaeIおよびEco0109の3つの制限エンドヌクレアーゼの各々は、PU:UP二本鎖をとまなう制限部位を有する。期待される制限断片が見出された。同様な結果がD₅G^{*}およびUで観察された。

【0049】

D₅G^{*}およびUを用いたPAPの特異的産生物により、アガロースゲル上の2つの特異的バンド、すなわちPU:UPおよびUPが明らかになった；なぜなら、我々の増幅条件下では、UはD₅G^{*}よりも効率的であったためである。これを確認するために、G/Gアリルを先と同様にD₅G^{*}

10

20

30

40

50

およびUとともにTfI DNAポリメラーゼを使用するPAPにより増幅した。産生物を変性して、変性アクリルアミドゲルを通して電気泳動した。一本鎖型の1つの特異的バンドのみ観察され、特異的PAP産生物は二本鎖および一本鎖セグメントを含有することが示された。同様な結果が D_3G^* およびUで観察された。

【 0 0 5 0 】

線形PAP

PAPは、PPiの存在下にてG/GおよびA/Aアリル由来の1つの P^* のみを用いた線形増幅のために行った。PAPの特異的産生物は D_3G^* および D_5G^* で観察されたが、しかしその他の P^* では観察されなかった（図5、レーン4および6）。 P^* の効率は、オリゴヌクレオチドサイズ、3'-末端ジデオキシヌクレオチドおよびアリル-特異的ヌクレオチドの位置により影響された。

10

【 0 0 5 1 】

図1A-1C。PAPの概略図。図1A。二本鎖DNAテンプレートTU:UTは、2つのオリゴヌクレオチド P^* およびU、TfI DNAポリメラーゼ、dNTP、ピロリン酸および $[-^{32}P]$ -dCTPを用いて増幅される。 P^* = 加ピロリン酸分解活性化可能オリゴヌクレオチド。この実施例において、 P^* は D_5G^* であり、TU:UTはドーパミン D_1 受容体遺伝子の640-bpセグメントである。図1B。 D_5G^* は3'末端にGジデオキシヌクレオチドを有し、それはGアリルの相補鎖に特異的であるが、3'末端のAアリルとはミスマッチする（表1）。加ピロリン酸分解によりジデオキシGを除去した後、各々の増幅のための重合を行った。図1C。G/G、A/AおよびG/A遺伝子型由来のPAPのオートラジオグラム。Gアリルが存在するとき、469塩基の放射性に標識化された特異的産生物（二本鎖PU:UPおよび余剰アンチセンス鎖UP）を産生するが、なぜならTfIポリメラーゼによる低速の加ピロリン酸分解は、オリゴヌクレオチドUがオリゴヌクレオチド P^* よりも非常に高い効率を有することを意味するからである。より長時間の電気泳動は、UPからPU:UPを分離する。UTおよびUT:TUのその他の産生物が示される。TU:UTは、非放射性標識化TU起源テンプレートと共に余剰放射性標識UTをアニーリングすることで得られることは注目すべきである。PAPはまた、G/G、A/AおよびG/A遺伝子型から D_3G^* およびUを用いても行い、同様な結果が観察された。

20

【 0 0 5 2 】

図2A-2B。 D_5G^* を用いたPAPの特異性の亢進。PAPの特異性は、GおよびAアリルのテンプレートプール（template pool）の指数関数的な増幅のためにPASAの特異性と比較される。図2A。PASAの特異的な増幅は、プライマーがGアリルとマッチするときに、プライマー伸長の高い効率から得られる。非特異的増幅は、Aアリル由来のミスマッチ伸長から生じる。これが起きるとき、それはさらなる増幅のための効率的な基質となる。矢印の太さおよび位置は、各々のサイクルにおける増幅効率を示す。図2B。Gアリル由来のPAPの特異的増幅は、高い効率で起こる。非特異的増幅の2つの型はAアリルから生じる：（i）非特異的増幅は、A:Tホモ-二本鎖PU:UP産生物を生じるミスマッチ加ピロリン酸分解によって低い効率で起こりうるが、それは続く増幅にとって効率的なテンプレートではない；（ii）非特異的増幅は、ミスマッチ加ピロリン酸分解および間違った組み込みの両方によって非常に低い効率で起こり、G:Tヘテロ-二本鎖PU:UP産生物を産生しうるが、しかし一度それが起これば、それは続く増幅にとって効率的なテンプレートを提供する。非特異的増幅の同様な傾向が、 D_5G^* のみを用いたPAPによる線形増幅について示唆される。 D_3G^* などの P^* のアリル-特異的ヌクレオチドは3'末端の近くでありうるが、3'末端ではないことに注目すべきである。その場合には、PAPの非特異的増幅には、ミスマッチ加ピロリン酸分解およびミスマッチ伸長の両方が必要である。PAPの両方の変化がPASAよりも高い特異性を有するはずである一方で、最も高い特異性は、3'末端ジデオキシヌクレオチドがアリル-特異的ヌクレオチドでもあるときに予想される。

30

40

【 0 0 5 3 】

図3A-3B。 D_5G^* および D_3G^* を用いた特異的増幅。PAPは、指数関数的増幅のため2つのオリゴヌクレオチドを用いて、追加的PPiの存在下（図3A）あるいは非存在下（図3B）で行った。オリゴヌクレオチドは表1にリストされる。Uのみを用いた伸長対照は、TU:UTおよびU

50

Tの位置を同定する。D₁を用いた伸長対照は、PUの位置を同定する。D₁およびUのPCR対照は、PU:UPおよびPU:UTの位置を同定する。D₁を用いた伸長反応物およびPCR反応物の20%のみを、その他のレーンと比較してロードした。

【 0 0 5 4 】

図4. 制限エンドヌクレアーゼ消化。PAPの特異性を示すために、図3で示した実験由来の試料をAclI、EaeIおよびEco0109I制限エンドヌクレアーゼを用いて消化した。各々の酵素は、PU:UP内に制限部位を持つ。PAPはD₅G^{*}およびUを用いてG/Gアリルを増幅し、D₁およびUを用いたPCRの5%は対照として得た。AclIは、PU:UPから236 bpおよび233 bpの断片を、TU:UTから407 bpおよび233 bpの断片を産生する。EaeIは、PU:UPから289 bpおよび180 bpの断片を、TU:UTから460 bpおよび180 bpの断片を産生する。Eco0109Iは、PU:UPから348 bpおよび121 bpの断片を、TU:UTから107 bp、412 bpおよび121 bpの断片を産生する。矢印はPU:UPから期待される消化産生物を示す。

10

【 0 0 5 5 】

図5. 線形PAP。PAPは、追加的PPiの存在下で1つのP^{*}のみを用いて行った。D₁を用いた反応物の20%を、その他のレーンと比較してロードした(レーン1および10)。No = 追加的なオリゴヌクレオチドはない。

【 0 0 5 6 】

考察パートI

D₅G^{*}を用いたPAPの特異性の亢進

実施例Iは、加ピロリン酸分解の後に重合することを使用してPASAの特異性を増加させる証拠を提供する。顕著な非特異的増幅には、2つのタイプの誤りが連続的に連結することが必要である(図2)。3'末端でのミスマッチデオキシヌクレオチドを除去するミスマッチ加ピロリン酸分解の割合は、正確なdNMPに対する不正確なものの除去の割合で示され、T7 DNAポリメラーゼについては10⁻⁵以下であると報告された(6、13)。重合による置換的変異を生み出す間違っ組み込みの割合は、正確なdNMPに対する不正確なものの組み込みの割合で示され、T7 DNAポリメラーゼについては10⁻⁵およびE. coli DNAポリメラーゼIについては10⁻⁴であると報告された(6、13、14)。同様な結果は、Taq DNAポリメラーゼおよびT7 DNAポリメラーゼおよびE. coli DNAポリメラーゼIの3'-5'エキソヌクレアーゼ-欠損変異体について報告された(6、13、15)。(i) D₅G^{*}を用いたPAPにおける非特異的増幅による特異性は、もしddNMPのミスマッチ加ピロリン酸分解の割合がdNMPと同じである場合に、1サイクルあたり10⁻⁵であると見積もられる。(ii) 非特異的増幅による特異性は、もしミスマッチ加ピロリン酸分解および間違っ組み込みが連続的に連結される場合に、3.3 × 10⁻¹¹であると見積もられる。

20

30

【 0 0 5 7 】

PAPの必須成分

各々のP^{*}は、TflあるいはTaq DNAポリメラーゼを利用して、G/GおよびA/Aアリルを増幅することによりテストした。特異的増幅には、PPiおよびアリル-特異的テンプレートの存在が必要である。加えて、増幅効率は、オリゴヌクレオチドサイズ、3'末端ジデオキシヌクレオチド、P^{*}の3'末端に関連するアリル-特異的ヌクレオチドの位置に影響される。

【 0 0 5 8 】

D₁G^{*}およびD₂G^{*}が特異的シグナルを生成しなかった理由は明らかではないが、それはP^{*}およびテンプレートの間の二本鎖の限界安定性(threshold stability)に関連する。3'末端にAジデオキシヌクレオチドを含有するD₆A^{*}は、重合によるddNTPの様々な組み込み効率に関連する特異的シグナルを生成しなかった。E. coli DNAポリメラーゼI、Taq DNAポリメラーゼおよび Taq DNAポリメラーゼのクレノー断片は、ddGTPをその他のddNTPよりも効率よく組み込む(16、17、11)。ddNTPの組み込みの割合はもまた、テンプレート配列に依存して変化し、いくつかの塩基では他のものと比較して10倍高くなりうる(16)。もう一つの可能性は、D₆A^{*}はより低いT_mを有するサイズがより小さいことである。

40

【 0 0 5 9 】

追加的なPPiを用いないPAPにおいて、非常にかすかな擬似シグナルがD₃G^{*}およびD₄G^{*}で生

50

成された(図3B)。一つの可能性は、オリゴヌクレオチド二量体が“エンド-”PPiがUT生成のために副重合(by-polymerization)から放出された後の、より後のサイクルにて、P^{*}の非特異的過ピロリン酸分解を形成および誘引することができる、というものである。3'末端減少D₃G^{*}およびD₄G^{*}は、擬似シグナルとしてハイブリダイズおよび伸長されうる。オリゴヌクレオチド二量体は、D₃G^{*}およびD₄G^{*}で観察された。D₃G^{*}でのもう一つの可能性は、特異的加ピロリン酸分解は“エンド-”PPiが放出された後のより後のサイクルにて起こることができる、というものである。第三の可能性は、D₃G^{*}およびD₄G^{*}は3'末端でGジデオキシヌクレオチドにより完全には追加されなかった最小のD₃およびD₄によるコンタミネーションであった、というものである。

【0060】

その他の技術との比較

in vitroでの酵素的核酸増幅のための多くの方法が開発され、これを適用して、既知の配列変化を検出することができる。これらは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(18、19)、リガーゼ連鎖反応(LCR)(20、21)およびローリングサークル(rolling circle)増幅(RCA)(22、23)を含む。PAPは多くの方法において異なっている:i)加ピロリン酸分解および重合が各々の増幅のために連続的に連結する、ii)PAPのための少なくとも1つのジデオキシオリゴヌクレオチドがある。その他の化学的に修飾された3'末端での3'-水酸基を欠くヌクレオチドは、同様な機能を供給することができ、iii)一つの形式は線形増幅のためであり、その他は指数関数的増幅のためである、iv)PPiは増幅に必要である、v)顕著に非特異的な増幅には、ミスマッチ加ピロリン酸分解および間違っ組み込みの両方が必要である、vi)PAPは既知の点変異を検出でき、特異性を大きく増加させて、野生型アレルから非常にまれな変異アレルを検出できる。

【0061】

力学的な基礎は、2つあるいはそれ以上の反応が特異性の増加を伴って増幅のために連続的に結合することである。PAPの鍵となる成分は、加ピロリン酸分解活性化可能オリゴヌクレオチドである。これらの実験において阻害される3'末端はジデオキシヌクレオチドであるが、加ピロリン酸分解を受けやすい非伸長可能ヌクレオチドのいずれかは原則的に置換することができた。実際、ミスマッチに対してオリゴヌクレオチド5'を開裂するいずれかの酵素は、加ピロリン酸分解活性化と同様な機能を提供することができた。例えば、メチル化認識配列(G^mATCなど)を含む阻害されるオリゴヌクレオチドは、非メチル化認識配列を用いてその標的に対してアニールされ、そしてその後制限エンドヌクレアーゼ(DpnIなど)はメチル化部位をまさに開裂することで、伸長のためにオリゴヌクレオチドを活性化できる。もしミスマッチが開裂部位に対して5'に配置される場合は、顕著な非特異的増幅にはミスマッチ開裂および間違っ組み込みを連続的に連結することを必要とするが、それはまれな事象である。活性化可能オリゴヌクレオチドはまた、“ミニ配列決定(minisequencing)”プライマー伸長と組み合わせることができる。これは、特異性が問題となりうる²⁴チップ技術の影響を特に受けやすくなりうる、1塩基変化(single base change)の検出のためのさらなる特異的アッセイを提供しうる。PAPが線形形式(図5)にて起こることができることの説明は、このアプローチの実行可能性を支持する。

【0062】

ヌクレオシド三リン酸および2'-デオキシヌクレオチド三リン酸あるいはそれらの化学的修飾バージョンは、PAPによる複数-ヌクレオチド伸長のための基質として使用しうる、すなわち、1つのヌクレオチドが組み込まれるとき、伸長鎖はさらに伸長することができる。さらなる伸長にとってのターミネーターである2', 3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸あるいはそれらの化学的修飾バージョンは、1ヌクレオチド(single-nucleotide)伸長のために使用されうる。2', 3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸は、オリゴヌクレオチドP^{*}の3'末端ジデオキシヌクレオチドから識別するために、放射性あるいは蛍光色素で標識されうる。ヌクレオシド三リン酸あるいは2'-デオキシヌクレオチド三リン酸の混合物および2', 3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸もまた、使用されうる。

【0063】

考察パートII

PAPにおいて、特異的核酸配列はテンプレートとしてその配列を含有する核酸を使用することにより産生される。もし核酸が2つの鎖を含有するなら、それをテンプレートとして使用する前に、別々のステップとしてあるいは同時のどちらかで、核酸の鎖を分離する必要がある。鎖の分離はまた、生理学的、化学的あるいは酵素的な手段を含むその他の適した方法のいずれかにより達成することもできる。

【0064】

元の核酸あるいは核酸の混合物から1つ以上の特異的産生物を産生することを所望するとき、適した数の異なるオリゴヌクレオチドが利用される。例えば、2つの異なる特異的産生物を指数関数的に産生しなければならないとき、4つのオリゴヌクレオチドが利用される。2つのオリゴヌクレオチド ($P^* \geq 1$) は特異的核酸配列の1つに特異的であり、他の2つのオリゴヌクレオチド ($P^* \geq 1$) は第2の特異的核酸配列に特異的である。この様式において、各々の2つの異なる特異的配列は、現在のプロセスにより指数関数的に産生されることができる。

【0065】

DNAあるいはRNAは、一本鎖であってもあるいは二本鎖であってもよく、比較的純粋な種であってもあるいは核酸の混合物の成分であってもよく、および直線であってもあるいは環状であってもよい。1つあるいは複数の核酸は、例えば、プラスミド、クローンDNAあるいはRNA、あるいは細菌、酵母、ウイルス、および植物あるいは動物などの高等生物を含むあらゆる源からの天然DNAあるいはRNAからのあらゆる源から得られうる。DNAあるいはRNAは、Maniatisら (25) により記載されるような様々な技術により、血液、絨毛膜絨毛などの組織物質あるいは羊膜細胞から抽出されうる。

【0066】

P^* オリゴヌクレオチドは、増幅すべき各々の特異的配列の異なる鎖に対して“実質的に相補的”であるように選択される。従って、 P^* オリゴヌクレオチド配列は、テンプレートの正確な配列を反映する必要はない。例えば、非相補的ヌクレオチドセグメントは P^* オリゴヌクレオチドの5'-末端に接着することができ、 P^* オリゴヌクレオチド配列の残りは鎖に相補的である。あるいは、非相補的塩基あるいはより長い配列は、もし P^* オリゴヌクレオチド配列が増幅すべき鎖の配列に対する十分な相補性を有し、それによりハイブリダイズしてその他の P^* オリゴヌクレオチドの伸長産生物の合成のためのテンプレートを形成するのなら、 P^* オリゴヌクレオチド内に散在させることができる。請求項にて使用されるように、“相補的”という用語はここで議論されるように、“実質的に相補的”という意味であると理解されるべきである。

【0067】

あらゆる特異的核酸配列は、現在のプロセスにより産生することができる。配列の両方の末端における十分な数の塩基が十分詳細に知られており、そのため2つのオリゴヌクレオチドが配列に沿う相対的な位置で所望する配列の異なる鎖にハイブリダイズできることのみ必要である。配列の両末端での塩基についての知識が大きければ大きいほど、それだけ標的核酸配列にとってのオリゴヌクレオチドの特異性をより大きくすることができ、従って、プロセスの効率もそれだけ大きくすることができる。下で使用するように、オリゴヌクレオチドという言葉は、特に増幅すべきセグメントの末端配列に関する情報にいくつかあいまいなことがある場合、1つ以上のオリゴヌクレオチドのことを言うことがある。この集合からの1つのオリゴヌクレオチドは、増幅すべき所望する配列の末端と100%相同であるだろう。

【0068】

本発明は段階的様式にて行うことができ、そこでは、各々のステップの後に新たな試薬を加えるか、あるいは同時に、すなわち最初のステップで全ての試薬を加えるか、あるいは一部は段階的および一部は同時に試薬を加える、すなわち与えられた数のステップの後に新鮮な試薬を加える。同時的な方法は、酵素的手段が鎖の分離ステップのために使用されるときに利用されうる。同時的な手順において、反応混合物は鎖-分離酵素 (例えば、ヘ

10

20

30

40

50

リカーゼ)、ATPなどの鎖-分離酵素のための適したエネルギー源を含有しうる。さらなる物質は、必要なものとして加えられうる。

【0069】

核酸ポリメラーゼは、増幅を達成するために機能するであろういずれかの化合物あるいは系でありうる。この目的のために適した酵素は、例えば、TfI DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼI、E. coli DNAポリメラーゼIのクレノウ断片、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、その他の利用可能なDNAポリメラーゼ、逆転写酵素、およびその他の遺伝子操作バージョンを含む。DNAポリメラーゼが、もしddNTPを(dNTPに比べて)効率的におよび(4つのddNTP間で比較して)等しく組み込むなら、P^{*}活性化可能オリゴヌクレオチドにとって高いおよび等しい加ピロリン酸分解活性を有するであろうということは、逆および順反応の間の関係に基づいて予測される。全てのDNAポリメラーゼのうち、ThermoSequenase(2)などの遺伝子操作バージョンは、将来的に最も良いものでありうる。一般的に、合成は各々のオリゴヌクレオチドの3'末端で開始されて、テンプレート鎖に沿って5'方向に進行するであろう。しかし、5'末端で合成を開始してその他の方向に進行する誘導用薬剤もまた、上記のようにPAP法において使用することができる。

10

【0070】

実施例2

PCRによるテンプレートの調製

ヒトD₁ドーパミン受容体遺伝子の640-bp領域を、2つのプライマー(T = 5' GAC CTG CAG CAA GGG AGT CAG AAG 3' (SEQ ID NO:1) およびU = 5' TCA TAC CGG AAA GGG CTG GAG AT A 3' (SEQ ID NO:2))を用いてPCRにより増幅した。TU:UT二本鎖産生物はGenBank X55760中のヌクレオチド33から672におよび、産生物のG+C含量は55%である。共通のAからGの多型はヌクレオチド229に配置しており、G/G、A/AおよびG/Aの3つの遺伝子型を生じる¹¹。PCR容量は50 μl: 50 mM KCl、10 mM Tris/HCl、pH 8.3、1.5 mM MgCl₂、各々200 μMの4つのdNTP、各々0.1 μMのプライマー、2% DMSO、1 UのTaq DNAポリメラーゼ(Boehringer Mannheim) および250 ngのG/G同型接合体、A/A同型接合体あるいはG/A異型接合体由来のゲノムDNA、である。サイクリング条件は: 94 で15秒間の変性、55 で30秒間のアニーリング、および72 で1分間の伸長で、GeneAmp PCR system 9600(Perkin Elmer Applied Biosystems)を用いた全35サイクルを含んだ。PCR産生物は、Centricon^R 100マイクロコンセンレーター(Amicon)上での3回の残留(retention)によって、プライマーおよびその他の小分子を除いて約10,000倍まで精製した。回収したPCR産生物の量は、260 nmでのUV吸収度により決定した。

20

30

【0071】

3'-ジデオキシヌクレオチドを加えることによるP^{*}の合成

デオキシヌクレオチドオリゴヌクレオチドは、Perseptive Biosystems 8909 Synthesizer(Framingham)により合成して、City of Hope DNA/RNA Chemistry Laboratoryで、オリゴピュアーカートリッジ(oligopure cartridge)(Hamilton)により精製した。3'末端ジデオキシヌクレオチドをターミナルトランスフェラーゼによって付加した。混合物は30 μlの総量: 100 mMカコジル酸カリウム(pH 7.2)、2.0 mM CoCl₂、0.2 mMのDTT、2500 pMのオリゴヌクレオチド、2 mM 2', 3'-ddNTP(3'-OH末端とddNTPとのモル比は1:24であった)(Boehringer Mannheim)、100 Uのターミナルトランスフェラーゼ(GIBCO BRL)を含有した。反応は37 で4時間インキュベートして、そしてEDTAを5 mM最終濃度で加えて停止した。Centri-spinTMカラム(Princeton Separations)を使用した脱塩の後、P^{*}はTBE緩衝液(90 mM Tris/ホウ酸、1 mM EDTA、pH 8.3)中で分離用(preparative)の7 M尿素/20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した(25)。回収したP^{*}の量は、260 nmでのUV吸光度により決定した。

40

【0072】

少量の非末端化(unterminated)オリゴヌクレオチドにより加ピロリン酸分解の非特異性が生じ得るため、各々のP^{*}はT4ポリヌクレオチドキナーゼにより5'末端を³²P-標識化して

50

、その後7 M尿素/20%ポリアクリルアミドゲルを通して電気泳動した。ゲルを過剰暴露したときでさえも、P^{*}産生物のみを見ることができた（データは示されていない）。P^{*}の99.99%以上が3'末端にジデオキシオリゴヌクレオチドを含有することが評価された。P^{*}の純度は、pH 8.3にてPCR産生物あるいはPAP産生物が存在しないことにより支持された。

【0073】

加ピロリン酸分解活性化重合

TU:UT二本鎖テンプレート内の445から469 bpまでの領域を、オリゴヌクレオチドP^{*}およびU、あるいはP^{*}のみを用いたPAPにより増幅した。PU:UP二本鎖産生物は、GenBank X55760におけるヌクレオチド204-228から672に対応しており、そのG+C含量は56%である。PAP反応混合物は25 μ lの総量：50 mM KCl、10 mM Tris/HCl (pH 7.6)、1.5 mM MgCl₂、各々100 μ lの4つのdNTP (dATP、dTTP、dGTPおよびdCTP)、0.1 μ M P^{*}、0.1 μ M MUオリゴヌクレオチド (TCATACCGGA AAGGGCTGGA GATA (SEQ ID NO:2))、300 μ M Na₄PPi、2%のDMSO、1 μ Ciの[⁻³²P] dCTP (3000 Ci/nmole、Amersham)、1 UのAmpliTaQFS DNAポリメラーゼ (PE Applied Biosystems) あるいはおののおの0.5 UのAmpliTaQFSおよびTaq DNAポリメラーゼ、および10 ngのTU:UTを含有した。ThermoSequenase (Amersham Pharmacia) もまた、8 UのThermoSequenaseあるいは4 UのThermoSequenaseに0.5 U Taqおよび2.5 mM MgCl₂を加えること以外は同条件下でテストした。サイクリング条件は：94 で10秒間の変性、60 (ThermoSequenaseでは55) で1分間のアニーリング、および72 で2分間の伸長、全15サイクルを含んだ。

【0074】

産生物は、標準的な2%アガロースゲルを通して電気泳動した。ゲルは、CCDカメラ (Bio-Rad Gel Doc 1000) およびMulti-Analyst^RソフトウェアによるUV写真撮影のためにエチジウムブロマイドで染色して、オートラジオグラフィーのために乾燥してKodak X-OMATTM ARフィルムにかけた。PAP収量は、PCRバンドからバックグラウンドを引いた総ピクセル数としてImageQuantソフトウェア (Molecular Dynamics) を用いるPhosphorImagerを用いて定量されて、ランダムユニット (random unit) として表示された。

【0075】

結果および考察

PAP効率の亢進

実施例1において、3'末端にddGをともなうP^{*}のみを天然TfIあるいはTaq DNAポリメラーゼを使用して増幅した。AmpliTaQFSおよびThermoSequenase DNAポリメラーゼは、P^{*}の3'末端にていずれかの種類のジデオキシヌクレオチド (ddAMP、ddTMP、ddGMPあるいはddCMP) に対するかなり低い識別をともなう非常に高いPAP効率を達成することが見出された。例えば、P^{*}(212)18G⁰およびP^{*}(212)18A⁰は、ドーパミンD₁受容体遺伝子の18-merであるが3'末端にddGMPおよびddAMPを有するが(表3)、各々GおよびAアシルを特異的に増幅した。それらの収率は1.4であり(図6Bにおけるレーン9と11を比較)、そしてP^{*}(212)18G⁰はP^{*}(212)18A⁰よりサイクルあたり4%より効率的であると見積もられる。もう一つのP^{*}(228)26A⁻²⁴ = 5' TAGGAACCTTGGGGGTGTCAGAGCCC^{*} 3' (SEQ ID NO:12) は、3'末端にddCMPを有する26-merであり、3'末端でのddCMPがないプライマーと同程度の効率で増幅され、収量はTfIあるいはTaq を使用することによるものと比較すると1,000倍増加されると見積もられた。さらに、PAPはヒトゲノムDNAから直接的に由来するセグメントを増幅した。

【0076】

【表3】

P*長およびミスマッチにより影響されるPAP特異性

名称	配列 (SEQ ID NO:)	ミスマッチ塩基		T _m (°C) ^d	ノイズ割合 (%) ^e
		型	距離 ^c		
P*(204)26G ^{0a}	5'tctgactgACCCCTATTCCCTGCTTG* ^b (13)	G	0	80	0.0
P*(208)22G ⁰	5'actgACCCCTATTCCCTGCTTG* (14)	G	0	68	0.5
P*(210)20G ⁰	5'tgACCCCTATTCCCTGCTTG* (15)	G	0	62	0.1
P*(212)18G ⁰	5'ACCCCTATTCCCTGCTTG* (16)	G	0	56	0.3
P*(216)26G ⁻¹²	5'ctatccccTGCTTGGAACCTGAGGG* (17)	G	-12	80	107.1
P*(220)22G ⁻¹²	5'tcccTGCTTGGAACCTGAGGG* (18)	G	-12	70	95.5
P*(222)20G ⁻¹²	5'ccTGCTTGGAACCTGAGGG* (19)	G	-12	64	75.8
P*(224)18G ⁻¹²	5'TGCTTGGAACCTGAGGG* (20)	G	-12	56	7.0
P*(206)26A ⁻²	5'tgactgacCCCTATTCCCTGCTTAGG* (21)	A	-2	80	30.4
P*(210)22A ⁻²	5'tgacCCCTATTCCCTGCTTAGG* (22)	A	-2	68	3.3
P*(212)20A ⁻²	5'acCCCTATTCCCTGCTTAGG* (23)	A	-2	62	2.0
P*(214)18A ⁻²	5'CCCTATTCCCTGCTTAGG* (24)	A	-2	56	0.0
P*(206)26G ⁻⁹	5'tgactgacCCCTATTCGCTGCTTAGG* (25)	C-G	-9	80	95.0
P*(210)22G ⁻⁹	5'tgacCCCTATTCGCTGCTTAGG* (26)	C-G	-9	68	88.1
P*(212)20G ⁻⁹	5'acCCCTATTCGCTGCTTAGG* (27)	C-G	-9	62	49.5
P*(214)18G ⁻⁹	5'CCCTATTCGCTGCTTAGG* (28)	C-G	-9	56	4.7
P*(206)26T ⁻¹⁵	5'tgactgacCCCTATTCCCTGCTTAGG* (29)	C-T	-15	78	89.0
P*(210)22T ⁻¹⁵	5'tgacCCCTATTCCCTGCTTAGG* (30)	C-T	-15	66	47.8
P*(212)20T ⁻¹⁵	5'acCCCTATTCCCTGCTTAGG* (31)	C-T	-15	60	3.4
P*(214)18T ⁻¹⁵	5'CCCTATTCCCTGCTTAGG* (32)	C-T	-15	54	0.0

^a P*(204)26G⁰は3'末端でGジデオキシヌクレオチドを有するP*である。⁰はアリル-特異的塩基が3'末端にあることを意味する。5'末端の最初の塩基はGenBank X55760における塩基204に一致する。その長さは26塩基である。

^b 太字のGあるいはAはGあるいはAアリル特異的塩基であり、下線の塩基は設計されたミスマッチである。

^c 3'末端からアリル-特異的塩基までの距離：0 = 3'末端、-3 = 3'末端から3塩基。

^d オリゴヌクレオチドについてのT_mは、1 M NaClの条件の下で $4 \times (G+C) + 2 \times (T+A)$ であると推定された。各々のP*の長さは18塩基である。

^e PAP (%) のノイズ割合は、同じP*による非特異的アリル産生物の特異的アリル産生物に対する相対収量として、あるいは同じテンプレートを使用することによって示した変異させたP*のその天然型に対する相対収量として定義する。特異的シグナルは<10%ノイズ割合と表示される。

【 0 0 7 7 】

AmpliTaqFSは天然Taqと比較して2つの変異をもっている。5'ヌクラーゼドメインにある1つは5'-3'エクソヌクラーゼ活性を除去し、2番目の変異のF667Yは活性部位にある(38)。ThermoSequenaseは活性部位に同じ変異F667Yを有するが、5'-3'エクソヌクラーゼドメインは欠く(39、40)。それらは組み込みに関してdNTPおよびddNTPの間の識別はしない。ddNMPの加ピロリン酸分解は、逆反応であり、これらの酵素により非常に高くおよび低く認識されるはずである。使用するAmpliTaqFSあるいはThermoSequenase DNAポリメラーゼのいずれかを製剤化して、反応においてPPiの加水分解をすることができ、そのた

めPAP効率を減少させる耐熱性ピロホスファターゼ（製造者の教示）を含有するが、PAPは我々の条件下でまだ増幅される。AmpliTaQFSおよびThermoSequenase DNAポリメラーゼは、ピロホスファターゼが混入していないそれらの純粋な型のなかでよりよく働くであろう。

【0078】

P^{*}の3'特異的部分配列

異なる長さおよびミスマッチを有する様々なP^{*}をAmpliTaQFSを使用して調べた（表3）。PAP効率に対する長さおよびミスマッチの効果は、同じテンプレート由来の異なる長さの2つのP^{*}間の相対収量（％）として表示し（図7）、それは0.0％から201.5％の変化であり、各々長さで2から4少ない塩基を有していた。PAPの特異性もまた、P^{*}の長さおよびミスマッチに影響される（表3）。ノイズ割合（％）はマッチ産生物に対するミスマッチ産生物の相対収量として定義され、特異的シグナルは<10％ノイズ割合で区切られる。もしP^{*}のアリル-特異的塩基が3'末端にあった場合は、特異的アリルのみ増幅されて、特異性はP^{*}の長さには関係しなかった（図7A）。もしアリル-特異的塩基がP^{*}の3'末端になかった場合は、特異性はP^{*}の長さに関連した。18-mer P^{*}中の非3'末端ミスマッチは、3'末端から15塩基までであり、いずれも増幅を起こさなかったが（図7Bから7E）、26-mer P^{*}中の2つのそのようなミスマッチでさえ非特異的な増幅を引き起こした（データは示されない）。

【0079】

18-merはさらに、様々な位置でのアリル-特異的塩基におよぶ“積み重ねた（stacked）”P^{*}を使用して調べた（表4）。ノイズ割合（％）は0.0％から7.1％まで変化した。3'末端特異的部分配列の長さは ≥ 13 塩基であった。

【0080】

【表4】

10

20

様々に配置したP*を用いたPAPの特異性

名称	配列 (SEQ ID NO:)					
テンプレート	<div style="text-align: center;"> ^G 5' GACTGACCCCTATTCCCTGCTT-GGAACTTGAGGGGTGTC . . . 3' (33) ^A </div>					
P*(212) 18G ⁰	5'ACCCCTATTCCCTGCTTG* (16)					
P*(212)18A ⁰	5'ACCCCTATTCCCTGCTTA* (34)					
P*(214)18A ⁻²	5'CCCTATTCCCTGCTTAGG* (24)					
P*(218) 18G ⁻⁶	5'TTCCCTGCTTGGGAACT* (35)					
P*(221) 18G ⁻⁹	5'CCCTGCTTGGGAACTTGA* (36)					
P*(224) 18G ⁻¹²	5'TGCTTGGGAACTTGAGGG* (37)					
名称	3' 末端 ジデオキシ	アリル- 特異的塩基		T _m (°C) ^d	ノイズ割合 (%) ^a	
		型	距離		指数関数的 PAP	線形的 PAP
P*(212)18G ⁰	ddG	G	0	56	2.7	0.0
P*(212)18A ⁰	ddA	A	0	54	3.8	1.1
P*(214)18A ⁻²	ddG	A	-2	56	4.7	0.0
P*(218)18G ⁻⁶	ddT	G	-6	54	0.0	0.0
P*(221)18G ⁻⁹	ddA	G	-9	56	1.7	1.7
P*(224)18G ⁻¹²	ddG	G	-12	56	7.1	0.6

^a 2つのオリゴヌクレオチドを用いたPAP、あるいは1つのP*を用いた線形的PAPによるGおよびAテンプレートからの増幅。PAP (%) のノイズ割合は特異的アリル産生物に対する非特異的アリル産生物の相対収量である。

【 0 0 8 1 】

同様な結果は、異なる位置でGアリルをマッチおよびミスマッチするP*を使用することにより得られた (表5)。1つのミスマッチでのノイズ割合は0.8%から5.6%まで様々であった。3' 特異的部分配列の長さは ≥ 16 塩基であった。2つのミスマッチでのノイズ割合は0%であった (図9におけるレーン10~15とレーン2を比較)。

【 0 0 8 2 】

【 表 5 】

様々にミスマッチしたP*を用いたPAPの特異性

名称	配列 (SEQ ID NO:)	3' 末端 ジデオキシ	ミスマッチ ^a		T _m (°C)	ノイズ割合 (%) ^b	
			型	距離		指数関数的 PAP	線形的PAP
P*(212)18G ⁰	5'ACCCCTATTCCCTGCTTG* (16)	ddG			56	1.0	0.0
P*(212)18A ⁻³	5'ACCCCTATTCCCTGCTTG* (38)	ddG	C-A	-3	54	1.3	0.0
P*(212)18G ⁻⁶	5'ACCCCTATTCCCTGCTTG* (39)	ddG	C-G	-6	56	0.8	0.6
P*(212)18C ⁻⁹	5'ACCCCTATTCCCTGCTTG* (40)	ddG	T-C	-9	58	1.8	0.4
P*(212)18G ⁻¹²	5'ACCCCGATTCCCTGCTTG* (41)	ddG	T-G	-12	58	5.6	1.7
P*(212)18T ⁻¹⁵	5'ACTCCCTATTCCCTGCTTG* (42)	ddG	C-T	-15	54	3.3	1.2

^a Gアリルとのマッチあるいはミスマッチ。

^b ノイズ割合 (%) は、Gアリル-特異的テンプレートを用いたミスマッチP*およびP*(212)18G⁰の間の相対収量である。

【 0 0 8 3 】

線形的PAPは18 mer P*のみを使用して調べられ、より高い特異性がより低ノイズ割合で観察された (表4および5)。線形的PAPは異なる機構的な経路をとり、そこでは全ての非特異的産生物が開始テンプレートから生成され、3'末端ミスマッチP*をともなうミスマッチ加ピロリン酸分解、あるいは非3'末端ミスマッチP*をともなうミスマッチ加ピロリン酸分解およびミスマッチ伸長の両方を必要とする。

10

20

30

40

50

【0084】

PASAは3'末端にddNMPを加えない17-merプライマーを用いて行われた(表4および5参照)。ミスマッチ17-merプライマーは、ミスマッチが3'末端まで6塩基ほどの近さのとき、30%のノイズ割合を伴って非特異的産物を強力に増幅し、非常により短い3'特異的部分配列を示した。同様な結果は以前にその他でも報告された(41)。

【0085】

要約すると、 P^* (1-長) は2つの部分配列を有する: 3'特異的部分配列 ($n = 3'$ 特異的部分配列の塩基数 ≤ 1) は特異性を決定する、すなわち、この領域内でテンプレートのその相補鎖に対するいずれのミスマッチも増幅を生じない; および5'エンハンサー部分配列 ($m = 5'$ エンハンサー部分配列の塩基数 ≥ 0) は増幅効率を亢進する。PAP特異性は、3'特異的部分配列の塩基対の特異性、加ピロリン酸分解特異性および重合特異性により共決定 (co-determine) される。従って、3'特異的部分配列の塩基対特異性は、PAP特異性の最低必要なものである。

10

【0086】

P^* の3'特異的部分配列の長さは、配列の内容および P^* のサイズ、3'末端ジデオキシヌクレオチドの型、テンプレート配列、DNAポリメラーゼ、鉄のようなその他の成分、およびサイクリング条件により影響されうる。テンプレートが繰り返し配列 >1 あるいは同種ポリマー走行 >1 を含有するとき、 P^* は固定のための特異性を失う。

【0087】

未知の配列変化のためのスキャンニング

20

P^* の3'特異的部分配列の特性は、並列方法にて未知の配列変化のためのスキャンニングあるいは先に決定された配列の再配列決定に適応させることができる。先に決定された配列の相補鎖上の各々のヌクレオチドは、3'末端でddAMP、ddTMP、ddGMPあるいはddCMPのいずれかは野生型配列および3つの可能な一塩基置換に一致する以外は、同一の配列を有する、18-mer (図6) などの4つの下流 P^* により尋ねられる (query)。X塩基の相補鎖をスキャンニングする P^* の数は4およびXの複数であり、指数関数的あるいは線形的PAPのどちらかに適している。4つの下流 P^* は、3'末端でのddAMP、ddTMP、ddGMPおよびddCMPが4つの蛍光色素などによる識別のために異なって標識されるときに、単一ドット上で固定化させることさえ可能である。従って、増幅シグナルは、ddNMPが加ピロリン酸分解により P^* から除去されるときに、各々の色素の強度の減少により示すことができる。線形的PAPの1つの利点は、識別のために異なる色素で標識して、4つのddNTPを一塩基伸長のための基質として使用できることである。

30

【0088】

簡単には、もし野生型配列と一致する全ての P^* のみが特異的に増幅されると、野生型配列は重複を解析することにより順序に従って整理できる。3'末端に一塩基置換を有する P^* は、ヘミ-あるいはホモ-点変異の位置で増幅される。変異はまた、いくつかの連続的なヌクレオチドの領域にわたる非PAPシグナルの“ギャップ”もつくる。一塩基置換について、ギャップサイズ (塩基) $+1 = 3'$ 特異的部分配列の長さ。

【0089】

さらに、我々は上流 P^* の第2のセットを設計することによりセンス鎖をスキャンすることもできる。未知の一塩基置換は、異型接合体中でさえ P^* の2つのセットの結合により決定することができる。未知の小さい欠失および挿入は、検出して位置づけることができる。欠失あるいは挿入の具体的な型を同定するために、対応する P^* を加えることができる。変異位置の情報を提供することができるフィンガープリントにとって、各々2つの連続する P^* を積み重ねた領域<アレイ上の3'特異的部分配列、 n 倍まで P^* 数を減少させる、という簡単に積み重ねる方法がある。

40

【0090】

de novo DNA配列の決定

PAPによるde novo DNA配列決定の概念は、 P^* の可能な3'特異的部分配列の全てを利用して、de novo配列中の3'特異的部分配列の存在を同定する。 P^* の3'特異的部分配列の完全な

50

セットは 4^n である。各々の3'特異的部分配列は、 4^m の5'エンハンサー部分配列の完全なサブセットを有する。例えば、3'特異的部分配列としての16-merのおよび5'エンハンサー部分配列としての2-merの完全なセットは、(A、T、G、C)(A、T、G、C) $N_{16} = 4^{18}$ として示すことができる。

【0091】

簡単には、手順は全ての特異的PAP増幅のリストを最初に決定して、次にワトソン-クリック対法則を使用することにより、所定の長さを有する3'特異的部分配列を整えることによってこのリストから未知のDNA相補的配列を再構築する。

【0092】

組立プロセスは、所定の P^* の3'特異的部分配列が2回以上出会うところではどこでも中断される。最大の配列決定長に影響する因子の1つは、3'特異的部分配列の長さである。所定の長さを有する3'特異的部分配列の完全なセットによりあいまいでなく再構築されるランダム配列の長さは、完全なセットにおける3'特異的部分配列の数の約四乗根であり、いかなる所定の3'特異的部分配列も2回以上出合わないという $\geq 50\%$ 可能性を有する。65,538のうちの3'特異的部分配列の8 merは、200塩基までの範囲において有用でありうる。100万以上のうちのデカヌクレオチド(10ヌクレオチド)は、キロ塩基de novo配列まで解析しうる。3'特異的部分配列として16 merを含有する18 mer P^* は、完全セットが P^* の 4^{18} であり、最大77,332塩基を配列決定しうる。

【0093】

隣接する既知の配列があるとき、2つのオリゴヌクレオチドを用いたPAPのための反対のオリゴヌクレオチドを設計する。最大の配列決定長は主に対のオリゴヌクレオチドに限定されるが、 P^* の3'特異的部分配列の長さには限定されず、条件的 (conditional) de novo DNA配列決定と呼ばれる。

【0094】

PAPのためのその他の適応

2つのDNA配列を比較して、それらが同じあるいは異なるかどうかをみるフィンガープリント法について、3'特異的部分配列の不完全なセットを使用することにより P^* の数を減少させる簡単な方法がある。特定の順序でそれらを整理することにより、染色体での位置ならびに配列を同定することができる。ヒトゲノムにおける 3×10^9 bp DNAを考慮すると、2つのオリゴヌクレオチドを用いたPAPは1つの P^* のみを用いたPAPよりも好ましく、特異性を増加させる。

【0095】

6×10^4 から 10^5 までの転写が発現され、そして正確な配列の詳細が必要ではない、遺伝子発現プロファイリングをモニターするために、1つの P^* のみを用いたPAPを適応させることができ、遺伝子中の唯一のモチーフを同定する P^* のセットを22-merまでの全長で設計することができる。各々2つの P^* の間では、3'末端で少なくとも1つの配列差異あるいは非3'末端で ≥ 2 の配列差異がある。

【0096】

ハイブリダイゼーションによる配列の比較

オリゴヌクレオチドを使用することによるSBHにおいて、DNA配列は重複部分を通して積極的にハイブリダイズするプローブのハイブリダイゼーションおよび組立により決定される。固定化された試料上のオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションは、至適なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件では非常に特異的でありうるということが長い間知られており(42)、従って完全なハイブリッドと単一内在ミスマッチを含有するものとを識別することができる。アレイにおけるオリゴヌクレオチドは長さ11-20ヌクレオチドであり、中央に7-9塩基の特異的領域を有し、非特異的シグナルはミスマッチされたハイブリダイゼーションにより生成される。標準的なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件の下では、マッチおよびミスマッチの間の二本鎖の安定性もまた、末端のミスマッチおよび隣接する配列により影響される(32、33、43)。

【0097】

SHBはいくつかの方法において酵素を用いて修飾できる(26、44)。DNAポリメラーゼによるプライマー伸長は、塩基が相補鎖にマッチする場合のみ一度に1つずつ塩基を組み込む。リガーゼは同様な要求を有する：2つのオリゴヌクレオチドは、それら両方ともが結合部位でテンプレートに相補的であれば、酵素的に結合できる。

【0098】

図6A-6B。PAP効率の亢進。図6A。PAPは2つのオリゴヌクレオチド P^* およびUをもちいて二本鎖TU:UTテンプレートから増幅される。4つの P^* の各々は3'末端にddA、ddT、ddGおよびdCを有する。3'末端塩基はGあるいはAアリルの相補鎖に特異的であるか、あるいはマッチしないかのどちらかである。図6B。ヒトドーパミン受容体遺伝子のG/G、A/AおよびG/A遺伝子型由来のPAPのオートラジオグラム。461塩基の放射性標識特異的産生物(二本鎖PU:UPおよび過剰アンチセンス鎖UP)が産生される。その他の副産生物UTおよびUT:TUが示される。TU:UTは非放射性標識TUオリジナルテンプレートをともなう過剰放射性標識UTのアニーリングに由来することに注目せよ。

10

【0099】

図7A-7B。PAP効率に対する P^* 長およびミスマッチの効果。PAPは P^* およびUオリゴヌクレオチドを用いて増幅された(表3参照)。図7A-7の各々において、 P^* は試料3'末端を有するが、長さは様々である。図7A。レーン1-4では、 P^* はGアリルをマッチさせて増幅した。レーン5-8では、 P^* は3'末端でミスマッチしたがAアリルを増幅した。図7B。レーン9-12では、 P^* はGアリルをマッチさせて増幅した。レーン13-16では、 P^* は3'末端から-12塩基でミスマッチしたがAアリルを増幅した。図7C。レーン17-20では、 P^* はAアリルをマッチさせて増幅した。レーン21-24では、 P^* は3'末端から-2塩基でミスマッチしたがGアリルを増幅した。図7D。レーン25-28では、 P^* は3'末端から-9塩基でミスマッチしたがAアリルを増幅した。図7E。レーン29-32では、 P^* は3'末端から-15塩基でミスマッチしたがAアリルを増幅した。長さの効果は、先のレーン(L_{n-1})に対する1つのレーン(L_n)における収量割合として表示する。長さの効果はレーン5-8では示さなかったが、それはシグナルがバックグラウンドと同じかあるいは非常に近いためである。

20

【0100】

図8。様々に位置させた P^* を用いたPAPの特異性。PAPは P^* およびUオリゴヌクレオチドを用いて増幅された(表4参照)。 P^* はレーン2-7ではGアリルをマッチさせて増幅したが、レーン9-15ではAアリルをミスマッチさせて増幅した。レーン1および9は、 $D_1(212)17\text{ mer}$ およびUを用いたPCR対照であった。レーン8および16は、Uのみを用いた伸長対照であった。

30

【0101】

図9。様々にミスマッチさせた P^* を用いたPAPの特異性。PAPは P^* およびUオリゴヌクレオチドを用いて増幅された(表5参照)。レーン2-7では、 P^* はマッチあるいは1つのミスマッチをともなうGアリルを増幅した。レーン9-15では、 P^* は1つあるいは2つのミスマッチをともなうAアリルを増幅した。レーン1および9は、 $D_1(212)17\text{ mer}$ およびUを用いたPCR対照であった。レーン8および16は、Uのみを用いた伸長対照であった。

【0102】

実施例3

この実施例は、ゲノムDNAからの直接的なPAP増幅を説明する。この実施例で使用したオリゴヌクレオチドは以下に列挙する。レーン番号は図10におけるレーンのことである。

40

【0103】

0.1 μM 濃度における下流オリゴヌクレオチドは：

【0104】

【化1】

レーン1: D ₁ (204)25D	5' TCTGACTGACCCCTATTCCCTGCTT 3' (SEQ ID NO:43)
レーン2: P*(206)24A ⁰	5' TGACTGACCCCTATTCCCTGCTTA* 3' (A アリル特異的 ; SEQ ID NO:44)
レーン3: P*(204)26G ⁰	5' TCTGACTGACCCCTATTCCCTGCTTG* 3' (G アリル特異的 ; SEQ ID NO:45)
レーン4: P*(206)24G ⁻²	5' ACTGACCCCTATTCCCTGCTTGGG* 3' (G アリル特異的 ; SEQ ID NO:46)
レーン5: P*(228)26A ⁻²⁴	5' TAGGAACCTGGGGGGTGTTCAGAGCCC* 3' (A アリル特異的 ; SEQ ID NO:47)

10

0.1 μM濃度における対の上流オリゴヌクレオチドは：D₁(420)24U 5' ACGGCAGCACAGACCAGC GTGTTC 3' (SEQ ID NO:48)であり、それは各々の下流オリゴヌクレオチドと対になる。詳細は表3の脚注参照。

【 0 1 0 5 】

その他の成分は実施例2と同じであったが、以下のものは異なる：0.5 Uの各々のAmpliTaq FSおよびTaq DNAポリメラーゼ、および100 ngの異型接合G/A対立性ゲノムDNAは、30サイクルの使用による25 μl反応液毎で使用した。

【 0 1 0 6 】

20

PAP産生物のサイズは193 bpから218 bpの範囲である。1つの二本鎖および1つの一本鎖の産生物がゲル上で観察され、混入した耐熱性ピロホスファターゼにより加水分解されたPPiの消耗を示した。

【 0 1 0 7 】

参考文献のリスト

【 0 1 0 8 】

【表 6】

1. Parsons, B.L. and Heflich, R.H. *Mutat. Res.* **387**, 97-121 (1997).
2. Pourzand, C. and Cerutti, P. *Mutat. Res.* **288**, 113-121 (1993).
3. Knoll, A., Ketting, R.P. and Sommer, S.S. *Hum. Genet.* **98**, 539-545 (1996).
4. Sarkar, G., Cassady, J., Bottema, C.D.K. and Sommer, S.S. *Anal. Biochem.* **186**, 64-68 (1990).

30

5. Duetcher, M.P. & Kornberg, A., *J. Bio. Chem.* **244**, 3019-3028 (1969).
6. Kornberg, A. & Baker, T.A., *DNA Replication*, (eds Second Edition) 113-226 (W.H. Freeman and Company, New York 1992).
7. Chien, A., Edgar, D.B. & Trela, J.M., *J. Bacteriol.* **127**, 1550-1557 (1976).
8. Kaledin, A.S., Sliusarenko, A.G. & Gorodetskii, S.I., *Biokhimiia* **46**, 1576-1584 (1981).
9. Longley, M.J., Bennett, S.E. & Mosbaugh, D.W., *Nucleic Acids Res.* **18**, 7317-7322 (1990).
10. Tabor, S. & Richardson, D.C. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *J. Bio. Chem.* **265**, 8322-8328 (1990). 10
11. Vander Horn, P.B., Davis, M.C., Cunniff, J.J., Ruan, C., McArdle, B.F., Samols, S.B., Szasz, J., Hu, G., Hujer, K.M., Domke, S.T., Brummet, S.R., Moffett, R.B., Fuller, C.W. *BioTechniques* **22**, 758-762 (1997).
12. Liu, Q., Sobell, J.L. and Sommer, S.S., *Am. J. Med. Genet. (Neuropsych. Genet.)* **60**, 165-171 (1995).
13. Wong, I., Patel, S.S. & Johnson, K.A. *Biochemistry* **30**, 526-537 (1991).
14. Bebenek, K., Joyce, C.M., Fitzgerald, M.P. & Kunkel, T.A. *J. Bio. Chem.* **265**, 13878-13887 (1990).
15. Eckert, K.A. & Kunkel, T.A. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3739-3744 (1990). 20
16. Sanger, F., Nichlen S. & Coulson, A.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5463-5467 (1977).
17. Tabor, S. & Richardson, C.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6339-6343 (1995).
18. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. *Science* **230**, 1350-1354 (1985).
19. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erilich, H.A. *Science* **239**, 487-491 (1988).
20. Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J. and Hood, L. *Science* **241**, 1077-1080 (1988).
21. Barany, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 189-193 (1991).
22. Lizardi, P.M., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D.C. and Ward, D.C. *Nature Genetics* **19**, 225-232 (1998). 30
23. Banér, J., Nilsson, M., Mendel-Hartvig, M. & Landegren, U. *Nucleic Acids Res.* **26**, 5073-5078 (1998).
24. Syvanen, A.C. *Hum. Mutat.* **13**, 1-10 (1999).
25. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
26. Miyada, C.G. and Wallace, R.B. *Methods in Enzymology* **154**, 94-107 (1987).
27. Sanger, F., Nichlen, S. & Coulson, A.R. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **75**, 5463-5467 (1977). 40
28. Maxam, A.M. & Gilbert, W. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 560-564 (1977).
29. Ronaghi, M., Uhlen, M. & Nyren, P. *Science* **281**, 363, 365 (1998).

30. Lysov, I., Florent'ev, V.L., Khorlin, A.A., Khrapko, K.R. & Shik, V.V. *Dokl Akad Nauk SSSR* 303, 1508-1511 (1988).
31. Bains W. & Smith G.C. *JTheorBiol* 135, 303-307(1988).
32. Drmanac, R., Labat, I., Brukner, I. & Crkvenjakov, R. *Genomics* 4, 114-128 (1989).
33. Khrapko, K.R., Lysov, Y., Khorlyn, A.A., Shick, V.V., Florentiev, V.L. & Mirzabekov, A.D. *FEBS Lett* 256, 118-122 (1989).
34. Pevzner P.A. *J Biomol Struct Dyn* 7, 63-73 (1989).
35. Southern, E.M., Maskos, U. & Elder, J.K. *Genomics* 13, 1008-1017 (1992).
36. Liu, Q., Sobell, J.L. & Sommer, S.S. *Am J.Med.Genet.(Neuropsych.Genet.)* 60, 165-171 (1995).
37. Maniatis, T. Fritsch, E.F. & Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982).
38. Innis, M.A. & Gelfand, D.H. in *PCR APPLICATIONS Protocols for Functional Genomics* (eds Innis, M.A., Gelfand, D.H. & Sninsky, J.J.) 3-22 (Academic Press, 1999).
39. Tabor. S. & Richardson. C.C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6339-6343 (1995).
40. Van der Horn. P.B., Davis. M.C., Cunliffe. J.J., et al. *BioTechniques* 22, 758-762 (1997).
41. Sarkar, G., Cassady, J., Bottema, C.D.K. & Sommer, S.S. *Anal.Biochem.* 186, 64-68 (1990).
42. Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T. & Itakura, K. *Nucleic Acids Res* 6, 3543-3557 (1979).
43. Ginot, F. *HumMutat* 10, 1-10 (1997).
44. Southern, E.M. *Trends Genet* 12, 110-115 (1996).

10

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図1Aおよび1Bは、D₁ドーパミン受容体遺伝子のヌクレオチド229におけるGアリルを検出するためのPAPの使用を説明する概略図である。手順は以下の実施例1に詳細に記載する。

30

図1Cは、ヒトドーパミン受容体遺伝子のG/G、A/AおよびG/A遺伝子型由来のPAPのオートラジオグラムである。

【図 2】 図2A-2Bは、PASAに関連するPAPの特異性の亢進を説明するダイアグラムである。

【図 3】 図3Aおよび3Bは、以下の実施例1で得られた試料の電気泳動の結果を示すオートラジオグラムである。

【図 4】 図4は、以下の実施例1で得られた試料の電気泳動の結果を示すオートラジオグラムである。

【図 5】 図5は、以下の実施例1で得られた試料の電気泳動の結果を示すオートラジオグラムである。

40

【図 6】 図6Aは、PAP効率の亢進を説明する概略図である。

図6Bは、ヒトドーパミン受容体遺伝子のG/G、A/AおよびG/A遺伝子型由来のPAPのオートラジオグラムである。

【図 7】 図7A-7Bは、以下の実施例2で得られた試料の電気泳動の結果を示すオートラジオグラムである。

【図 8】 図8は、以下の実施例2で得られた試料の電気泳動の結果を示すオートラジオグラムである。

【図 9】 図9は、以下の実施例2で得られた試料の電気泳動の結果を示すオートラジオグラムである。

【図 10】 図10は、以下の実施例3で得られた試料の電気泳動の結果を示すオートラジオ

50

オグラムである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> City of Hope
Liu, Qiang
Sommer, Steve S.

<120> Pyrophosphorolysis Activated Polymerization (PAP): Application to
Allele-Specific Amplification and Nucleic Acid Sequence Determination

<130> 1954-328-II

<150> US 60/237,180

<151> 2000-10-03

10

<150> US 60/187,035

<151> 2000-03-06

<150> US 60/184,315

<151> 2000-02-23

<160> 47

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Amplification primer

20

<400> 1

gacctgcagc aagggagtca gaag

24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Amplification primer

<400> 2

tcataaccgga aagggctgga gata

24

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30

<400> 3

aatctgactg acccctattc cotgcttrgg aac

33

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Oligonucleotide

<400> 4

actgaccct attcctgct t

21

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Oligonucleotide

40

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> dideoxynucleotide

<400> 5
actgaccctt attccctgct tg                22

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> dideoxynucleotide
                                                    10

<400> 6
actgaccctt attccctgct tgg                23

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> dideoxynucleotide
                                                    20

<400> 7
actgaccctt attccctgct tggg               24

<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> dideoxynucleotide

<400> 8
actgaccctt attccctgct tgggg              25
                                                    30

<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> dideoxynucleotide

<400> 9
tctgactgac ccctattccc tgcttg            26

```

<210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Oligonucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> dideoxynucleotide

<400> 10
 tgactgaccc ctattccctg cttta

24

<210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Oligonucleotide

10

<400> 11
 tcataaccgga aagggctgga gata

24

<210> 12
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Oligonucleotide

<400> 12
 taggaacttg gggggtgtca gagccc

26

<210> 13
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Oligonucleotide

20

<400> 13
 tctgactgac ccctattccc tgcttg

26

<210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Oligonucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> dideoxynucleotide

30

<400> 14
 actgacccct attccctgct tg

22

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Oligonucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> dideoxynucleotide

<400> 15 tgacccctat tccctgcttg	20	
<210> 16 <211> 18 <212> DNA <213> Oligonucleotide		
<220> <221> misc feature <222> (18)..(18) <223> dideoxynucleotide		
<400> 16 accctattc cctgcttg	18	10
<210> 17 <211> 26 <212> DNA <213> Oligonucleotide		
<220> <221> misc feature <222> (26)..(26) <223> dideoxynucleotide		
<400> 17 ctattccctg cttgggaact tgaggg	26	
<210> 18 <211> 22 <212> DNA <213> Oligonucleotide		20
<220> <221> misc feature <222> (22)..(22) <223> dideoxynucleotide		
<400> 18 tccctgcttg ggaacttgag gg	22	
<210> 19 <211> 20 <212> DNA <213> Oligonucleotide		30
<220> <221> misc feature <222> (20)..(20) <223> dideoxynucleotide		
<400> 19 cctgcttggg aacttgaggg	20	
<210> 20 <211> 18 <212> DNA <213> Oligonucleotide		

<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(18)..(18)		
<223>	dideoxynucleotide		
<400>	20		
	tgcttgggaa cttgaggg	18	
<210>	21		
<211>	26		
<212>	DNA		
<213>	Oligonucleotide		
<220>			
<221>	misc_feature		10
<222>	(26)..(26)		
<223>	dideoxynucleotide		
<400>	21		
	tgactgaccc ctattccctg cttagg	26	
<210>	22		
<211>	22		
<212>	DNA		
<213>	Oligonucleotide		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(22)..(22)		
<223>	dideoxynucleotide		20
<400>	22		
	tgacccctat tccctgctta gg	22	
<210>	23		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Oligonucleotide		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(20)..(20)		
<223>	dideoxynucleotide		
<400>	23		
	accctattc cctgcttagg	20	30
<210>	24		
<211>	18		
<212>	DNA		
<213>	Oligonucleotide		
<220>			
<221>	misc_feature		
<222>	(18)..(18)		
<223>	dideoxynucleotide		
<400>	24		
	ccctattccc tgcttagg	18	

<210> 25		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Oligonucleotide		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (26)..(26)		
<223> dideoxynucleotide		
<400> 25		
tgactgaccc ctattcgctg cttagg	26	
<210> 26		
<211> 22		10
<212> DNA		
<213> Oligonucleotide		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (22)..(22)		
<223> dideoxynucleotide		
<400> 26		
tgacccctat tcgctgctta gg	22	
<210> 27		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Oligonucleotide		20
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (20)..(20)		
<223> dideoxynucleotide		
<400> 27		
acccctattc gctgcttagg	20	
<210> 28		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Oligonucleotide		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (18)..(18)		30
<223> dideoxynucleotide		
<400> 28		
ccctattcgc tgcttagg	18	
<210> 29		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Oligonucleotide		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (26)..(26)		

```

<223> dideoxynucleotide

<400> 29
tgactgaccc ttattccctg cttagg                26

<210> 30
<211> 22
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> dideoxynucleotide

<400> 30
tgacccttat tccctgctta gg                    22

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> dideoxynucleotide

<400> 31
acccttattc cctgcttagg                        20

<210> 32
<211> 18
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> dideoxynucleotide

<400> 32
ccttattccc tgcttagg                          18

<210> 33
<211> 40
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 33
gactgacccc tattccctgc ttrggaactt gaggggtgtc 40

<210> 34
<211> 18
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature

```

10

20

30


```

<222> (18)..(18)
<223> dideoxynucleotide

<400> 34
accctatttc cctgctta 18

<210> 35
<211> 17
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> dideoxynucleotide 10

<400> 35
ttccctgctt gggaact 17

<210> 36
<211> 18
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> dideoxynucleotide

<400> 36
ccctgcttgg gaacttga 18 20

<210> 37
<211> 18
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> dideoxynucleotide

<400> 37
tgcttgggaa cttgaggg 18

<210> 38
<211> 18
<212> DNA
<213> Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> dideoxynucleotide

<400> 38
accctatttc cctgattg 18

<210> 39

```

<211> 18
 <212> DNA
 <213> Oligonucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> dideoxynucleotide

<400> 39
 acccctattc cgtgcttg 18

<210> 40
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Oligonucleotide

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> dideoxynucleotide

<400> 40
 acccctatcc cctgcttg 18

<210> 41
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Oligonucleotide

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> dideoxynucleotide

<400> 41
 accccgattc cctgcttg 18

<210> 42
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Oligonucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> dideoxynucleotide

30

<400> 42
 actcctattc cctgcttg 18

<210> 43
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 43
 tctgactgac ccctattccc tgctt 25

<210> 44
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Oligonucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> dideoxynucleotide

<400> 44
 tgactgaccc ctattccctg ctta

24

<210> 45
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Oligonucleotide

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> dideoxynucleotide

<400> 45
 tctgactgac ccctattccc tgcttg

26

<210> 46
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Oligonucleotide

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> dideoxynucleotide

<400> 46
 actgaccctt attccctgct tggg

24

<210> 47
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Oligonucleotide

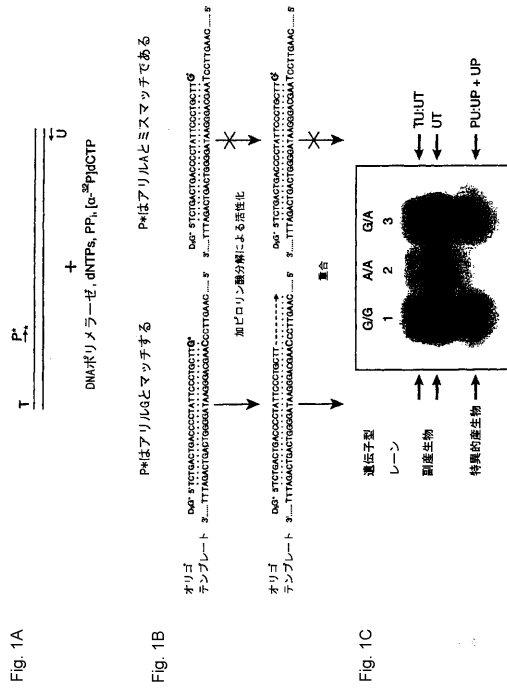
<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> dideoxynucleotide

30

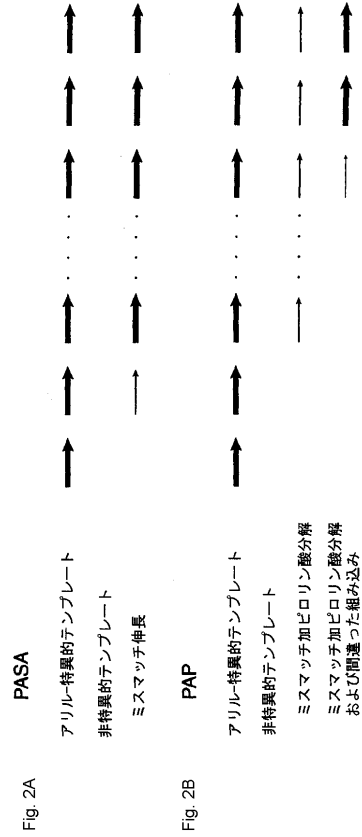
<400> 47
 taggaacttg gggggtgtoa gagccc

26

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】

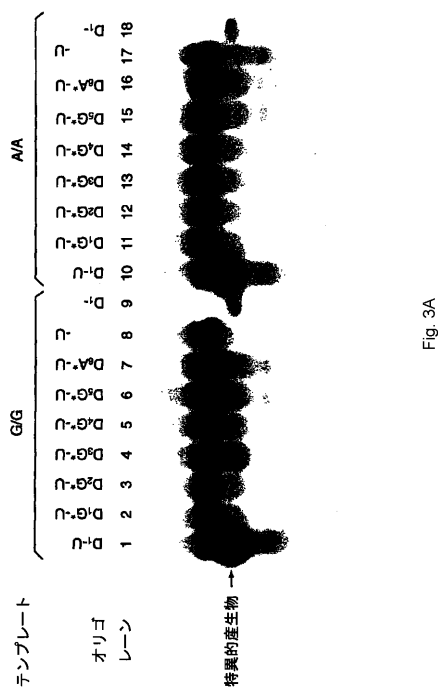
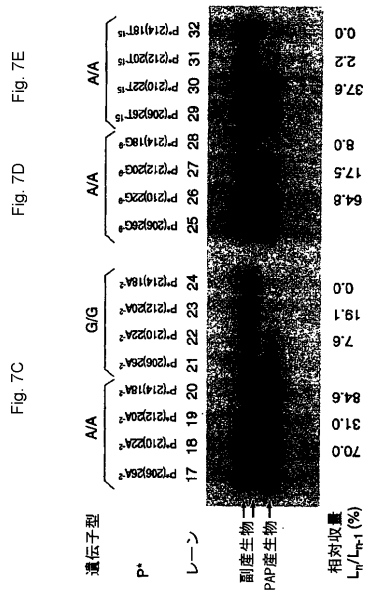
[illegible]

Fig. 3B

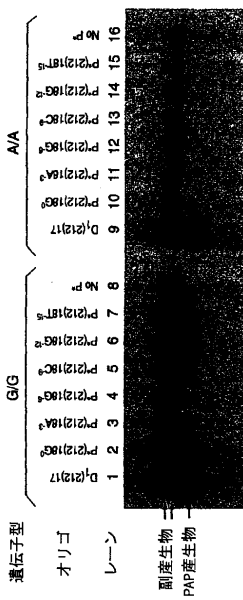
Fig. 7C

Fig. 7D

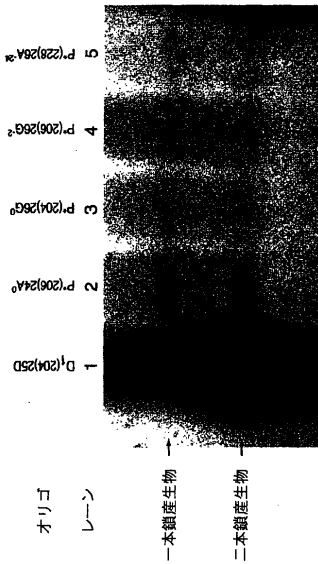
Fig. 7E



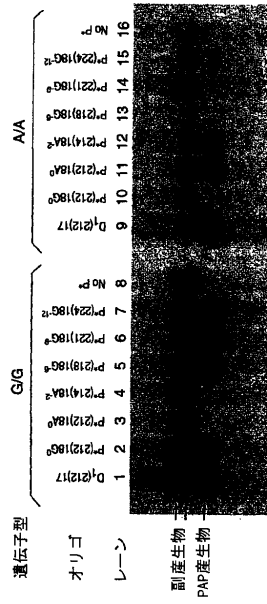
【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/58 (2006.01) G 0 1 N 33/58 A

(31)優先権主張番号 60/237,180

(32)優先日 平成12年10月3日(2000.10.3)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100076691

弁理士 増井 忠式

(74)代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74)代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 リュウ, チャン

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 1 7 8 4 , アップランド, ズィニア・ストリート 1 3 1 0

(72)発明者 サマー, スティーヴ・エス

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 1 0 1 0 , デュアーテ, スピックス・キャニオン・ロード 2
0 1

審査官 横田 倫子

(56)参考文献 特開平 1 1 - 0 8 9 5 8 8 (J P , A)

BioTechniques, 12[1] (1992) p.82-87

J Biol Chem., 265[14] (1990) p.8322-8.

J Biochem., 111[5] (1992) p.589-593

BioTechniques, 25[3] (1998) p.446-447,450-452,454,456,458,460,462

LIU QIANG , BIOTECHNIQUES , 2 0 0 0 年 1 1 月 , V29N5 , P1072-1083

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/68

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed