

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4632788号
(P4632788)

(45) 発行日 平成23年2月16日 (2011. 2. 16)

(24) 登録日 平成22年11月26日 (2010. 11. 26)

(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 1/533 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/533
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 47 (全 41 頁)

(21) 出願番号	特願2004-537832 (P2004-537832)	(73) 特許権者	501425360
(86) (22) 出願日	平成15年9月19日 (2003. 9. 19)		ニュー・イングランド・バイオラプス・インコーポレイティッド
(65) 公表番号	特表2006-500028 (P2006-500028A)		New England Biolabs, Inc.
(43) 公表日	平成18年1月5日 (2006. 1. 5)		アメリカ合衆国 01938-2723
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/029020		マサチューセッツ州 イプスウィッチ カントリー・ロード 240
(87) 国際公開番号	W02004/027025	(74) 代理人	100089118
(87) 国際公開日	平成16年4月1日 (2004. 4. 1)		弁理士 酒井 宏明
審査請求日	平成18年5月10日 (2006. 5. 10)	(72) 発明者	コン, ヒュイミン
(31) 優先権主張番号	60/412, 298		アメリカ合衆国, 01984 マサチューセッツ州, ウェンハム, コンラド サークル 5
(32) 優先日	平成14年9月20日 (2002. 9. 20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/446, 662		
(32) 優先日	平成15年2月11日 (2003. 2. 11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸のヘリカーゼ依存性増幅

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヘリカーゼ依存的反応において、標的の核酸を指数的かつ選択的に増幅するための方法であって、

(a) 増幅すべき標的の核酸の少なくとも一部の一本鎖鋳型を提供する工程と、

(b) 工程 (a) の鋳型に対して、1 以上の対のオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせる工程と、

(c) 二本鎖を形成する DNA ポリメラーゼによって、鋳型に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーの伸長産物を合成する工程と、

(d) 二本鎖を巻き戻すために、工程 (c) の二本鎖をヘリカーゼ調製物と接触させる工程であって、該ヘリカーゼ調製物は、ヘリカーゼおよび一本鎖結合タンパク質 (SSB) を含み、但し、該ヘリカーゼが熱安定的である場合、SSBは随意である、工程と、

(e) 工程 (b) ~ (d) を反復して、該ヘリカーゼ依存的反応において、標的の核酸を指数的かつ選択的に増幅する工程であって、その結果、増幅が、ゲル電気泳動により決定される場合、該ヘリカーゼの非存在下で生じない、工程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

増幅は等温的であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 (a) の核酸は、一本鎖核酸であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

20

【請求項 4】

一本鎖核酸は一本鎖 DNA であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

一本鎖核酸は一本鎖 RNA であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

標的の核酸は二本鎖核酸であり、該二本鎖核酸は工程 (a) に先だって、熱によってまたは酵素的に変性されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

標的の核酸は、50 bp ~ 100 kb の範囲の大きさを有することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 8】

オリゴヌクレオチドプライマーは、1つのプライマーが5'末端にハイブリダイズし、1つのプライマーが該核酸の3'末端にハイブリダイズし、標的の核酸を選択的に増幅させる一対のオリゴヌクレオチドプライマーであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

オリゴヌクレオチドプライマーは、オリゴヌクレオチドプライマーが増幅中のハイブリダイゼーションの反応温度よりも10℃ ~ 30℃高い融点を持つような、長さおよび GC 含量を有することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

20

DNA ポリメラーゼは、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I の Klenow 断片、T7 DNA ポリメラーゼ (Sequenase (登録商標))、および Bst ポリメラーゼラージフラグメント (large fragment) から選択されることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

DNA ポリメラーゼは、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠如していることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

DNA ポリメラーゼは、鎖置換活性を有することを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

30

【請求項 13】

ヘリカーゼ調製物は、1つのヘリカーゼを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

ヘリカーゼ調製物は、複数のヘリカーゼを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

ヘリカーゼ調製物は、3' → 5' ヘリカーゼを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

40

ヘリカーゼ調製物は、5' → 3' ヘリカーゼを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

ヘリカーゼ調製物は、スーパーファミリー 1 ヘリカーゼを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

ヘリカーゼ調製物は、スーパーファミリー 4 ヘリカーゼを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

ヘリカーゼ調製物は、スーパーファミリー 2 ヘリカーゼ、スーパーファミリー 3 ヘリカ

50

ーゼ、およびA A A⁺ヘリカーゼから選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項20】

ヘリカーゼ調製物は、6量体ヘリカーゼを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項21】

ヘリカーゼ調製物は、1量体または2量体ヘリカーゼを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項22】

ヘリカーゼ調製物は、U v r Dヘリカーゼを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

10

【請求項23】

U v r Dヘリカーゼは、熱安定性ヘリカーゼを含むことを特徴とする請求項22に記載の方法。

【請求項24】

ヘリカーゼ調製物は、大腸菌U v r Dヘリカーゼ、T t e -U v r Dヘリカーゼ、T 7 G p 4ヘリカーゼ、R e c B C Dヘリカーゼ、D n a Bヘリカーゼ、M C Mヘリカーゼ、R e pヘリカーゼ、R e c Qヘリカーゼ、P c r Aヘリカーゼ、S V 4 0 ラージT抗原ヘリカーゼ、ヘルペスウィルスヘリカーゼ、酵母S g s 1ヘリカーゼ、D E A H _ A T P 依存性ヘリカーゼおよびパピローマウィルスヘリカーゼE 1タンパク質からなる群より選択される1つ以上のヘリカーゼを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

20

【請求項25】

U v r Dヘリカーゼは、大腸菌U v r Dヘリカーゼであることを特徴とする請求項22に記載の方法。

【請求項26】

熱安定性ヘリカーゼはT t e -U v r Dヘリカーゼであることを特徴とする請求項23に記載の方法。

【請求項27】

ヘリカーゼ調製物は、R e c B C Dヘリカーゼを含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

30

【請求項28】

ヘリカーゼ調製物は、T 7 遺伝子4ヘリカーゼおよび大腸菌U v r Dヘリカーゼを含むことを特徴とする請求項14に記載の方法。

【請求項29】

ヘリカーゼ調製物中のエネルギー源が、アデノシン三リン酸(A T P)、デオキシチミジン三リン酸(d T T P)またはデオキシアデノシン三リン酸(d A T P)から選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項30】

A T P、d A T Pまたはd T T Pは、0.1 ~ 5 0 m Mの範囲の濃度であることを特徴とする請求項29に記載の方法。

40

【請求項31】

熱安定性ヘリカーゼ調製物は、一本鎖結合タンパク質を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項32】

一本鎖結合タンパク質(S S B)は、T 4 遺伝子3 2 S S B、大腸菌S S B、T 7 遺伝子2.5 S S B、ファージφ 2 9 S S Bおよびそれらの誘導体より選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項33】

ヘリカーゼ調製物は、アクセサリタンパク質を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

50

【請求項 34】

U v r Dヘリカーゼのためにアクセサリタンパク質は、M u t Lであることを特徴とする請求項 33に記載の方法。

【請求項 35】

ヘリカーゼ調製物は、大腸菌U v r Dヘリカーゼと、A T Pと、大腸菌M u t Lタンパク質と、T 4 G p 3 2とを含むことを特徴とする請求項 1に記載の方法。

【請求項 36】

ヘリカーゼ調製物は、大腸菌R e c B C Dと、A T Pと、T 4 G p 3 2 S S Bとを含むことを特徴とする請求項 1に記載の方法。

【請求項 37】

ヘリカーゼ調製物は、T 7 G p 4 Bヘリカーゼと、d T T Pと、T 7 G p 2 . 5 S S Bとを含むことを特徴とする請求項 1に記載の方法。

【請求項 38】

ヘリカーゼ調製物は、熱安定性T t e - U v r Dヘリカーゼ、d A T PまたはA T Pを含むことを特徴とする請求項 1に記載の方法。

【請求項 39】

ヘリカーゼ調製物は、熱安定性T t e - U v r Dヘリカーゼ、d A T PまたはA T P、およびT 4 G p 3 2 S S Bを含むことを特徴とする請求項 1に記載の方法。

【請求項 40】

工程 (b) ~ (e) は、20 °C ~ 75 °Cの範囲の1つの温度において実施することを特徴とする請求項 1に記載の方法。

【請求項 41】

工程 (b) ~ (e) は、37 °Cで実施することを特徴とする請求項 1に記載の方法。

【請求項 42】

工程 (b) ~ (e) は、60 °Cで実施することを特徴とする請求項 23に記載の方法。

【請求項 43】

標的の核酸は生物試料中の病原体から得られ、工程 (e) は、標的の核酸を増幅して病原体を検出する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 1に記載の方法。

【請求項 44】

標的DNAは、染色体DNAであり、工程 (e) は、染色体DNA内の配列の変化を検出する工程をさらに含むことを特徴とする請求項 1に記載の方法。

【請求項 45】

配列の変化は、一塩基変異多型であることを特徴とする請求項 44に記載の方法。

【請求項 46】

請求項 1に記載の方法を実施するための、ヘリカーゼ調製物とDNAポリメラーゼとを含む、核酸増幅キット。

【請求項 47】

ヘリカーゼ調製物が、請求項 1に記載の増幅を行うために、U v r Dヘリカーゼと、一本鎖結合タンパク質と、アデノシン三リン酸とを含むことを特徴とする、請求項 46に記載の核酸増幅キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の実施形態は、ヘリカーゼを用いた標的の核酸の指数的かつ選択的増幅の方法、および試料中の核酸を検出するための該方法の用途に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸の増幅は、研究、法科学、医学および農業において広く用いられている。最もよく知られた増幅方法のひとつに、標的の増幅方法であるポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) がある (例えば、米国特許第 4, 683, 195号明細書、第 4, 683, 202号明細書

10

20

30

40

50

および第4, 800, 159号明細書を参照のこと)。PCR反応は典型的には、標的配列の5'および3'端部にハイブリダイズさせる2種のオリゴヌクレオチドプライマーと、各デオキシヌクレオチド三リン酸(dNTPs)を加えることにより、アニールしたプライマーを伸長して、二本鎖産物を産生することのできるDNAポリメラーゼを用いる。反応混合物の温度を昇降することにより、DNA産物の2本の鎖が分離し、次の回のアニーリングおよび伸長のための鋳型として機能できるようになり、このプロセスが繰り返される。

【0003】

PCRは研究者によって広く用いられているが、2本のDNA鎖を分離するために、サーモサイクリングが必要である。この10年の間に、いくつかの等温標的増幅方法が開発されてきた。その一つとして、鎖置換増幅(Strand Displacement Amplification: SDA)が知られている。SDAは、エンドヌクレアーゼが標的DNAの非修飾鎖にニックを入れることができること、および、エキソヌクレアーゼ欠損DNAポリメラーゼによる、ニックにおいて3'末端を伸長し、下流DNA鎖を置換する作用を組み合わせたものである。置換された鎖は、アンチセンス反応のための鋳型として、また逆も同様に機能し、標的DNAが指数的に増幅されることになる(例えば、米国特許第5, 455, 166号明細書および第5, 470, 723号明細書を参照のこと)。当初に設計されたSDAにおいては、所定の3'および5'末端を有する増幅可能な標的断片を作成するために、最初にDNAを制限酵素で開裂させていたが、制限酵素切断部位の要件が標的DNA配列の選択に限界を与えていた(例えば、Walkerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89: 392~396(1992)を参照のこと)。この不便さは、増幅すべき領域の両側に位置する(flan k)バンパープライマーを利用することによって回避されてきた(前掲のWalkerら(1992))。SDA技術は、主として、クラミジアや淋病などの感染性疾患の臨床診断に用いられてきた。SDAの最も魅力ある特徴の1つは、操作を単一温度で行うことから、高価なサーモサイクリング装置が必要なくなることである。しかしながら、SDAは、長い標的配列の増幅には効率が悪い。

【0004】

2つめの等温増幅系である転写媒介増幅(Transcription-Mediated Amplification: TMA)は、RNAポリメラーゼの持つ、プライマー領域中に作られたプロモータからのRNAの生成能と、逆転写酵素のもつRNA鋳型からのDNAの生成能とを利用している。このRNA増幅技術は、第3の酵素活性、RNase Hを導入して、熱変性工程なしにcDNAからRNAを除去することにより、さらに改良されている。このようにサーモサイクリング工程を無くして、自己持続配列複製(3SR)と呼ばれる等温増幅方法が生み出された(例えば、Guatelliら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87: 1874~1878(1990)を参照のこと)。しかしながら、TMAおよび3SRのための出発物質は、RNA分子に限定されている。

【0005】

3つめの等温標的増幅方法であるローリングサークル増幅(Rolling Circle Amplification: RCA)は、in vivoローリングサークルDNA複製から改変したin vitro DNA増幅において用いるための、複数コピーの配列を生産する(例えば、FireとXu、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、92: 4641~4645(1995); Luiら、J. Am. Chem. Soc. 118: 1587~1594(1996); Lizardiら、Nature Genetics、19: 225~232(1998)、米国特許第5, 714, 320号明細書および第6, 235, 502号明細書を参照のこと)。この反応においては、DNAポリメラーゼは環状鋳型上でプライマーを伸長し、タンデムに結合した鋳型の相補配列のコピーを生産する(例えば、KornbergとBaker、DNA replication、W. H. Freeman and Company、New York(第2版

10

20

30

40

50

(1992))を参照のこと)。最近になって、RCAは、複数置換増幅(Multiple Displacement Amplification:MDA)と呼ばれる技術にさらに改良されており、このMDAでは、全ゲノム増幅において非常に均一な発現を与える(例えば、Deanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、99:5261~5266(2002)を参照のこと)。

【0006】

さらなる核酸増幅方法としては、プローブ増幅技術であるリガーゼ連鎖反応(LCR)(例えば、Barany、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:189~193(1991)および米国特許第5,494,810号明細書を参照のこと)や、シグナル増幅技術であるブランチドDNA(bDNA)技術(Hornら、Nucleic Acids Res.、25:4842~4849(1997))が挙げられる。

10

【0007】

上記の増幅方法はいずれもそれぞれの限界を有している。例えば、PCRとLCRは、関連する機器を備えたサーモサイクラーを必要とする。PCRを除く他のどの標的増幅方法も、遺伝子のクローニングおよび毒性因子や抗生物質耐性遺伝子の分析に有用な十分な長さを有するDNA標的を増幅することができない。PCRは10~20kbまでの標的を増幅することができるが、変異率が高いためにPCR増幅産物の使用に限界を与えるかもしれない(Clineら、Nucleic Acids Res.、24:3546~3551(1996))。したがって、問題を最小限に抑えるために、長い標的のための忠実度(fidelity)の高い増幅方法が必要とされている。さらに、すべての既存の増幅方法は、DNAポリメラーゼのための事前に準備された鋳型(primed template)を与えるために、事前の熱変性およびアニーリング工程を必要とする。このために、増幅工程に余計な時間がかかる。

20

【0008】

核酸増幅技術の潜在的用途は高まり続けている。例えば、核酸アレイは多数の増幅反応を利用する場合が多い。環境汚染場所の検出では、核酸増幅手順を含む診断試験に対する感度と分析能力が要求される。したがって、増幅手法を改良することが望ましい。

【発明の開示】

【課題を解決しようとする手段】

【0009】

30

本発明の一実施形態において、標的の核酸を指数的かつ選択的に増幅するための方法が提供され、該方法は、増幅すべき標的の核酸の一本鎖鋳型を提供する工程と、前記鋳型にハイブリダイズさせるためのオリゴヌクレオチドプライマーを添加する工程と、二本鎖を形成するDNAポリメラーゼによって、鋳型に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーの伸長産物を合成する工程と、二本鎖を巻き戻すために前記二本鎖をヘリカーゼ調製物と接触させる工程と、上記工程を反復して標的の核酸を指数的かつ選択的に増幅する工程とを含む。

【0010】

本発明のさらなる実施形態において、増幅は等温で行ってもよいし、20℃~75℃の範囲、好ましくは室温において行ってもよい。

40

本発明のさらなる実施形態において、標的の核酸は、一本鎖核酸、より詳細には一本鎖DNAまたは一本鎖RNA、または二本鎖核酸、より詳細には二本鎖DNAのいずれであってもよい。核酸が二本鎖である場合には、熱または酵素によって変性させて、DNAポリメラーゼ依存性増幅のための一本鎖鋳型を作成してもよい。さらに、標的の核酸は、約50bp~100kbの範囲の大きさを有していてもよい。

【0011】

本発明のさらなる実施形態において、増幅方法において用いるオリゴヌクレオチドプライマーは、一対のオリゴヌクレオチドプライマーであり、一方のプライマーは、選択的に増幅すべき標的の核酸の5'末端にハイブリダイズし、もう一方のプライマーは該核酸の3'末端にハイブリダイズする。多重化の状況下にあっては、同一の反応混合物中で複

50

数のプライマー対を用いて、複数の標的の核酸を増幅するようにしてもよい。さらに、オリゴヌクレオチドプライマーは、オリゴヌクレオチドプライマーの融点が、増幅の間のハイブリダイゼーションの反応温度よりも10℃～30℃高くなるような、長さおよびGC含量を有しているとよい。

【0012】

本発明のさらなる実施形態において、DNAポリメラーゼは、大腸菌DNAポリメラーゼIのKlenow断片、T7 DNAポリメラーゼ (Sequenase)、およびBstポリメラーゼラージフラグメント (large fragment) から選択される。DNAポリメラーゼは、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失し、鎖置換活性を有していることが好ましい。

10

【0013】

本発明のさらなる実施形態において、ヘリカーゼ調製物は、1つのヘリカーゼを含むものであってもよいし、複数のヘリカーゼを含むものであってもよい。調製物中の1つまたは複数のヘリカーゼは、3'→5'ヘリカーゼのクラスまたは5'→3'ヘリカーゼのクラスから選択することができる。より詳細には、ヘリカーゼ調製物は、スーパーファミリー1～4からのヘリカーゼ、またはAAA⁺ヘリカーゼを含むものであってもよい。ヘリカーゼは、ヘリカーゼ6量体ヘリカーゼまたは単量体または2量体ヘリカーゼのいずれであってもよい。より詳細には、ヘリカーゼは、UvrDヘリカーゼまたはそのホモログ、例えば、熱安定性ヘリカーゼまたはそのホモログであってよい。

【0014】

20

本発明のさらなる実施形態において、ヘリカーゼ調製物は、大腸菌UvrDヘリカーゼ、Tte-UvrDヘリカーゼ、T7 Gp4ヘリカーゼ、RecBCDヘリカーゼ、DnaBヘリカーゼ、MCMヘリカーゼ、Repヘリカーゼ、RecQヘリカーゼ、PcrAヘリカーゼ、SV40ラージT抗原ヘリカーゼ、ヘルペスウィルスヘリカーゼ、酵母Sgs1ヘリカーゼ、DEAH__ATP依存性ヘリカーゼおよびパピローマウィルスヘリカーゼE1タンパク質およびそのホモログからなる群より選択される1つ以上のヘリカーゼを含んでいてもよい。

【0015】

さらに、ヘリカーゼ調製物は、ヌクレオチド三リン酸 (NTP) またはデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP)、例えば、アデノシン三リン酸 (ATP)、デオキシチミン三リン酸 (dTTP) またはデオキシアデノシン三リン酸 (dATP) を含んでいてもよい。エネルギー源のための適切な濃度は、約0.1～50mMの範囲である。

30

【0016】

本発明のさらなる実施形態において、ヘリカーゼ調製物は、一本鎖結合タンパク質、例えば、T4遺伝子32SSB、大腸菌SSB、T7遺伝子2.5SSB、ファージφ29SSBおよびそれらの誘導体、およびアクセサリタンパク質、例えばMutLを含んでいてもよい。

【0017】

本発明の実施形態は、ヘリカーゼ依存性増幅によって生物試料中の病原体を検出することを含み、この際の標的の核酸は該病原体由来の核酸である。あるいは、標的の核酸が染色体DNAの断片である場合には、染色体DNA内の配列変化を判定することもできる。この手法は、異なる起源からの標的の核酸における一塩基変異多型を検出するために用いることができる。

40

【0018】

本発明の一実施形態において、ヘリカーゼ調製物と、ヌクレオチド三リン酸またはデオキシヌクレオチド三リン酸と、DNAポリメラーゼと、ヘリカーゼ依存性増幅を行うための説明書とを含むキットが提供される。このキットは、例えば、現場において、標準的な機器を備えた実験室内の場所において、または試料の高出力スクリーニングのために用いられる。

【0019】

50

本発明の一実施形態において、ヘリカーゼ調製物中で用いるヘリカーゼが、標的の核酸を指数的かつ選択的に増幅させるのに適しているかどうかを判定する方法が提供され、該方法は、ヘリカーゼと、NTPまたはdNTPと、トリス酢酸またはトリスHClを含み、約pH6.0～9.0の範囲のpHを与え、0～200mMの濃度範囲のNaClまたはKClの濃縮物を含む緩衝液と、任意で一本鎖結合タンパク質および／またはアクセサリタンパク質とを含むヘリカーゼ調製物を調製する工程と；様々な濃度またはコピー数の標的の核酸と、オリゴヌクレオチドプライマーと、4種のdNTPと、DNAポリメラーゼとを、ヘリカーゼ調製物に添加する工程と；混合物を約20℃～75℃の温度でインキュベートする工程と；増幅されたDNAを分析して、選択的および指数的増幅が起こったかどうかを判定する工程とを含む。

10

【0020】

反応混合物の組成、反応の条件、および反応物の濃度は、ヘリカーゼ依存性増幅のための最適な条件を同定するために、本明細書中で提供する一定の範囲内で変えることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

ここで「ヘリカーゼ依存性増幅」(HDA)と呼ぶ新しい増幅方法について記載する。ヘリカーゼ依存性増幅(HDA)は、DNAヘリカーゼの巻き戻し活性に基づいている。この新しい方法では、DNA二本鎖の2本の鎖を分離して標的の核酸の*in vitro*増幅を行うための一本鎖鋳型を作成するために、熱ではなくヘリカーゼを使用する。配列特異的プライマーは鋳型にハイブリダイズし、DNAポリメラーゼによって伸長されて、標的配列を増幅する。一定温度において指数的増幅が達成できるようにこのプロセスを繰り返す(図1)。

20

【0022】

この増幅系の特性は、従来技術に記載の増幅方法よりも改善されている。この改善には、例えば、高い忠実度で、等温的に核酸の長い標的配列を増幅できることが含まれる。

【0023】

HDAは、1つ以上のヘリカーゼに依存して、DNA二本鎖の2本の鎖を分離(融解または巻き戻し)する。HDAはさらに、DNAまたはRNAポリメラーゼを利用して、一本鎖ヌクレオチドの配列にハイブリダイズしたプライマーを伸長し、相補的プライマー伸長産物を生成する。単一の温度において指数的増幅が達成されるように、このプロセスそのものを繰り返す。従来技術の増幅方法と比較しての本実施形態のいくつかの利点として、DNAおよびRNAの長い(約200ヌクレオチドより長い、より特定すると約500ヌクレオチドを越える、より特定すると約1000ヌクレオチドを越える、より特定すると約2000ヌクレオチドを越える、より特定すると約50,000ヌクレオチドにのぼる、より特定すると約100,000ヌクレオチド)標的配列を等温的に増幅できること、および、最初から最後まで一定の温度で標的配列を増幅できることが挙げられる。

30

【0024】

(定義)

便宜上、本明細書、実施例および添付の請求項において用いる用語についてここにまとめる。

40

【0025】

「核酸」とは、二本鎖または一本鎖DNA、RNA分子またはDNA/RNAハイブリッドのことをいう。二本鎖核酸分子である分子は、ニックが入ったもの、無傷(*intact*)のものいずれであってもよい。二本鎖または一本鎖核酸分子は線形または環状のいずれであってもよい。二本鎖は、平滑末端を持つものであってもよいし、一本鎖尾部を有していてもよい。一本鎖分子は、ヘアピンまたはループおよびステムの形状の二次構造を有していてもよい。核酸は、環境、食物、農業、発酵、例えば血液のような生体液、ミルク、脳脊髄液、痰、唾液、大便、肺吸引液、粘膜組織または組織試料を採取した綿棒、または細胞などを含む様々な供給源から単離したものであってもよい。核酸試料は、細胞ま

50

たはウィルスから得たものであってよく、染色体DNA、プラスミドDNAを含む染色体外DNA、組み換えDNA、DNA断片、メッセンジャーRNA、トランスファーRNA、リボソームRNA、二本鎖RNA、または細胞またはウィルス内に見られる他のRNAのいずれかを含む。核酸は、単離したもの、クローニングしたもの、または*in vitro*化学合成により合成したもののいずれであってもよい。上述の核酸のいずれも、核酸内の個々のヌクレオチドを化学的に変えるように、修飾されてもよい（例えば、メチル化によって）。修飾は、自然に起こるものであっても、*in vitro*合成によって起こるものであってもよい。「二本鎖」という用語は、全体または一部が二本鎖であるような核酸分子のことをいう。

【0026】

10

「標的の核酸」とは、選択的に増幅すべき核酸の全体または一部のことをいい、その範囲は3'および5'端部によって規定される。標的の核酸は、増幅しようとする断片または配列と呼ぶ場合もある。増幅すべき標的の核酸の大きさは、例えば、約100~5000bpの範囲を含む、約50bpから約100kbの範囲であってもよい。標的の核酸は、より長い二本鎖または一本鎖核酸内に含まれていてもよい。あるいは、標的の核酸は、全長二本鎖または一本鎖核酸であってもよい。

【0027】

「融解させる (*melting*)」、「巻き戻す (*unwinding*)」または「変性させる (*denaturing*)」という用語は、核酸二本鎖の2本の相補鎖の全部または一部を分離することをいう。

20

【0028】

「ハイブリダイゼーション」とは、プライマーが、鋳型鎖の一方上にある該プライマーの相補的配列に特異的に結合するものの鋳型内の他の領域には結合しない条件において、オリゴヌクレオチドプライマーが、一本鎖核酸鋳型の一領域に結合することをいう。ハイブリダイゼーションの特異性は、オリゴヌクレオチドプライマーの長さ、ハイブリダイゼーション反応が行われる温度、イオン強度、およびpHの影響を受ける。

【0029】

「プライマー」とは、標的の核酸上の一本鎖領域に結合することができ、標的の核酸のポリメラーゼ依存性複製を容易にする一本鎖核酸のことをいう。

【0030】

30

「アクセサリタンパク質」とは、ヘリカーゼ活性を刺激することのできる任意のタンパク質のことをいう。例えば、大腸菌MutLタンパク質は、UvrDヘリカーゼ融解活性を強化するためのアクセサリタンパク質である (Yamaguchiら、J. Biol. Chem. 273: 9197~9201 (1998); Mechanicら、J. Biol. Chem. 275: 38337~38346 (2000))。本方法の実施形態において、選択されたヘリカーゼとともにアクセサリタンパク質を使用することが望ましい。代替の実施形態において、核酸の巻き戻しは、アクセサリタンパク質の非存在下でヘリカーゼによって行ってもよい。

【0031】

40

「補因子」とは、ヘリカーゼ巻き戻し活性に必要とされる小分子物質のことをいう。ヘリカーゼ補因子としては、ヌクレオチド三リン酸 (NTP) およびデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) およびマグネシウム (または他の二価カチオン) が挙げられる。例えば、ATP (アデノシン三リン酸) を、UvrDヘリカーゼのための補因子として、0.1~100mMの範囲、好ましくは1~10mMの範囲の濃度 (例えば3mM) で使用してもよい。同様に、dTTP (デオキシチミジン三リン酸) を、T7 Gp4Bヘリカーゼのための補因子として、1~10mM (例えば3mM) の範囲の濃度で使用してもよい。

【0032】

本明細書において「ヘリカーゼ」とは、二本鎖核酸を酵素的に巻き戻すことのできる任意の酵素のことをいう。たとえば、ヘリカーゼは、あらゆる有機体において、複製、組み

50

換え、修復、転写、翻訳およびRNAスプライシングなどの核酸が関与するすべてのプロセスにおいて見られる酵素である（KornbergとBaker、DNA Replication、W. H. Freeman and Company（第2版（1992））、特に第11章）。DNAまたはRNAに沿って5'から3'の方向または逆に3'から5'の方向に移動する任意のヘリカーゼを、本発明の実施形態において用いることができる。これには、原核生物、ウィルス、古細菌、および真核生物または天然の酵素の組換え型から得られるヘリカーゼ、ならびに特定の活性を有するアナログまたは誘導体が含まれる。KornbergとBakerによる書籍（DNA Replication、W. H. Freeman and Company（第2版（1992））の第11章に記載されている天然のDNAヘリカーゼの例としては、大腸菌ヘリカーゼI、II、IIIおよびIV、Rep、DnaB、PriA、PcrA、T4 Gp41ヘリカーゼ、T4 Ddaヘリカーゼ、T7 Gp4ヘリカーゼ、SV40ラージT抗原、酵母RADが挙げられる。HDAにおいて有用であるかもしれないさらなるヘリカーゼとしては、RecQヘリカーゼ（HarmonとKowalczykowski、J. Biol. Chem. 276:232~243（2001））、T. tengcongensis（本発明の実施例XIIに記載）およびT. thermophilus（CollinsとMcCarthy、Extremophiles. 7:35~41.（2003））由来の熱安定性UvrDヘリカーゼ、T. aquaticus由来の熱安定性DnaBヘリカーゼ（KaplanとSteitz、J. Biol. Chem. 274:6889~6897（1999））、および、古細菌および真核生物由来のMCMヘリカーゼ（Graingeら、Nucleic Acids Res. 31:4888~4898（2003））が挙げられる。

【0033】

本実施形態において用いるヘリカーゼの例は、以下のウェブアドレス（<http://blocks.fhcrc.org>（キーワード「helicase」によってブロックを入手）で見つけることもできる。このサイトでは、49のヘルペスヘリカーゼ、224のDnaBヘリカーゼ、250のUvrDヘリカーゼおよびUvrD/Repヘリカーゼ、276のDEAH_ATP依存性ヘリカーゼ、147のパピロマウィルスヘリカーゼE1タンパク質、608のウィルスヘリカーゼ1ウィルス（スーパーファミリー1）RNAヘリカーゼ、および556のDEAD_ATP依存性ヘリカーゼのリストがある。一般に5'から3'の方向に複製を行うヘリカーゼとしては、例えば、T7 Gp4ヘリカーゼ、DnaBヘリカーゼおよびRhoヘリカーゼが挙げられ、3'から5'の方向に複製を行うヘリカーゼとしては、例えば、UvrDヘリカーゼ、PcrA、Rep、HCVのNS3RNAヘリカーゼが挙げられる。

【0034】

本発明の好ましい実施形態において、ヘリカーゼは「ヘリカーゼ調製物」中で提供される。ヘリカーゼ調製物とは、DNAポリメラーゼ、核酸鋳型、4種のデオキシヌクレオチド三リン酸、およびプライマーと組み合わせられた場合に、in vitroにおいて等温的、指数的かつ特異的な核酸増幅を達成することのできる、物質の混合物のことをいう。

【0035】

より詳細には、ヘリカーゼ調製物は、ヘリカーゼと、ヌクレオチド三リン酸（NTP）またはデオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）などのエネルギー源と、一本鎖DNA結合タンパク質（SSB）とを含む。1つ以上の追加の物質をヘリカーゼ調製物中に含めてもよいが、該物質は、1つ以上の追加のヘリカーゼ、アクセサリタンパク質、小分子、化学物質およびバッファのなかから選ばれる。

熱安定性ヘリカーゼをヘリカーゼ調製物中で利用する場合、一本鎖結合タンパク質を共存されるかどうかは随意である。

【0036】

「HDA系」という用語は、本明細書中においては、本明細書に記載のヘリカーゼ依存

性増幅によって核酸を増幅する機能を遂行するために相互作用する一群の要素を記述するために用いてきた。HDA系は、ヘリカーゼ調製物と、ポリメラーゼと、随意でトポイソメラーゼを含んでいる。

【0037】

例えば、UvrD HDA系は、UvrDヘリカーゼ調製物（例えば、大腸菌UvrDヘリカーゼ調製物またはTte-UvrDヘリカーゼ調製物）と、エキソ⁻Klenow断片、DNAポリメラーゼラージフラグメント、エキソ⁺Klenow断片、またはT7 SequenaseなどのDNAポリメラーゼとを混ぜ合わせるにより構成してもよい。

【0038】

別の例として、T7ヘリカーゼ調製物（T7 Gp4Bヘリカーゼ、T7 Gp2.5SSB、およびdTTP）とT7 Sequenaseとを含むT7 HDA系が挙げられる。

【0039】

別の例として、RecBCD調製物（T4 Gp32を有するRecBCDヘリカーゼ）とT7 Sequenaseとを含むRecBCD HDA系が挙げられる。

【0040】

選択されるどのHDA系も、混合物中の要素の置換、加減によって最適化することができ、このことについては詳細に後述する。

【0041】

「HDA」とは、プライマーハイブリダイゼーションとそれに続くプライマー伸長のための鑄型を作成するための二本鎖核酸巻き戻しに、ヘリカーゼ調製物を用いる、in vitro核酸増幅方法であるヘリカーゼ依存性増幅のことをいう。このプロセスは2種のオリゴヌクレオチドプライマーを利用し、そのそれぞれは、標的配列を含んだセンス鎖または逆相補標的配列を含むアンチセンス鎖の3'末端にハイブリダイズする。HDA反応は、ヘリカーゼ依存性核酸増幅のための一般的な方法である。

【0042】

「等温増幅」とは単一の温度で起こる増幅のことをいう。これには、増幅手順と同じ温度または高い温度で行ってもよいような増幅開始時の単一の短い時間（15分未満）は含まれない。

【0043】

（ヘリカーゼの作用機構）

ヘリカーゼは、ヌクレオチド三リン酸（例えばATP）加水分解のエネルギーを利用して、二本鎖DNAおよびRNA内の鎖同士を保持している水素結合を破壊する（KornbergとBaker、DNA Replication、W. H. Freeman and Company（第2版、（1992））、特に第11章）。ヘリカーゼは、DNA複製、DNA修復および組み換え、転写、およびRNAプロセッシングなどの細胞内での核酸代謝のあらゆる面に関与している。あらゆる生物において発見されている多数のヘリカーゼが、この広い利用性を反映しているのかもしれない。

【0044】

（ヘリカーゼの分類）

ヘリカーゼは、いくつかの異なる特性に基づいて分類されてきた。例えば、異なるヘリカーゼの特徴は、単量体または多量体構造を有するヘリカーゼを含めた、それらのオリゴマー構造である。例えば、ヘリカーゼのあるファミリーは6量体構造を有する一方で、別のファミリーは単量体または2量体ヘリカーゼで構成される。

【0045】

ヘリカーゼの別の特徴は、保存性のモチーフの出現である。すべてのヘリカーゼは、ATP結合およびMg²⁺結合を伴う古典的なWalker AおよびBモチーフを有している（CaruthersとMcKay、Curr. Opin. Struct. Biol. 12:123~133（2002）、SoultanasとWigley、Trends

10

20

30

40

50

Biochem. Sci. 26:47~54 (2001)に概説)。ヘリカーゼは、ヘリカーゼシグネチャーモチーフの数およびモチーフに対するコンセンサス配列の違いによって、いくつかのスーパーファミリーに分類されてきた(GorbalenyaとKoonin, Curr. Opin. Struct. Biol. 3:419~429 (1993))。スーパーファミリー1および2は、7つの特徴的ヘリカーゼシグネチャーモチーフを有し、これには、古細菌、真正細菌、真核生物およびウィルスに由来するヘリカーゼが含まれ、ヘリカーゼは、二本鎖DNAまたはRNAを3'→5'方向または5'→3'方向のいずれかに巻き戻す。スーパーファミリー1ヘリカーゼとしては、例えば、大腸菌UvrDヘリカーゼ、T. tengcongensis UvrDヘリカーゼ、およびRecBCDのBサブユニットが挙げられる。スーパーファミリー3は、3つのモチーフを有し、スーパーファミリー4は5つのモチーフを有する。スーパーファミリー4ヘリカーゼとしては、例えば、T7 Gp4ヘリカーゼおよびDnaBヘリカーゼが挙げられる。標準的なヘリカーゼとは異なる新しいファミリーは、AAA⁺ファミリー(様々な細胞活動に関連するATPaseの拡張ファミリー)である。

10

【0046】

第3のタイプの分類は、ヘリカーゼの巻き戻し方向、すなわち、ヘリカーゼが核酸二本鎖を、ヘリカーゼが結合して移動する方の鎖を基準として5'→3'方向(T7 Gp4ヘリカーゼなど)または3'→5'方向(UvrDヘリカーゼなど)のいずれに巻き戻すかに関係する。

【0047】

20

分類の第4のタイプは、ヘリカーゼが平滑末端を有した核酸二本鎖またはフォークまたは一本鎖尾部を有する二本鎖のいずれを好んで巻き戻しを行うかに関係する。平滑末端を有する核酸二本鎖は、ヘリカーゼ依存性増幅の第1のサイクルには必要でないかもしれないが、後続の増幅サイクルにおいては望ましい。これは増幅反応の進行に伴って、平滑末端を有する標的断片が優占種となるためである(図3)。これらの平滑末端を有する標的の核酸は、後続の増幅回に対する鋳型基質を構成する(図3)。

【0048】

本明細書に記載のHDAを達成するために、上記のいずれによって分類されたヘリカーゼも、核酸増幅には適している。実際に、実施例II~IX、X、XIおよびXIIでは、本方法に従って使用しうる多様なヘリカーゼの試料によって、ヘリカーゼ依存性増幅が達成されることを実証している。

30

【0049】

実施例Iは、UvrDヘリカーゼ調製物について述べている。UvrDヘリカーゼは、3'→5'極性の巻き戻しを行わせる一本鎖DNA依存性ATPアーゼ活性を有し(Matson, J. Biol. Chem. 261:10169~10175 (1986))、DNA修復と組み換えの両方に関与する。In vivoにおいて、UvrDは、第2のタンパク質であるMutLと相互作用する。MutLはミスマッチ修復経路の主たる調整役であり、UvrDによって触媒される巻き戻し反応を劇的に刺激する(例えば、Yamaguchiら, J. Biol. Chem. 273, 9197~9201 (1998); Mechanicら, J. Biol. Chem. 275, 38337~38346 (2000)を参照のこと)。実施例XIIおよびXIIIからは、アクセサリタンパク質は、UvrDなどのいくつかのヘリカーゼに対しては好ましく使用しうるが、最適化されたヘリカーゼ調製物において常に必要なわけではないことがわかる。HDAにおける個々のヘリカーゼに対するアクセサリタンパク質の要件は、実施例IIからVに記載のようなアッセイなどを用いることにより、またHDA産物をゲル電気泳動によって解析することにより、容易に決定することができる。

40

【0050】

大腸菌UvrDヘリカーゼは、スーパーファミリー1ヘリカーゼである。大腸菌UvrDヘリカーゼは、ニックの入った環状DNA分子のみならず、平滑末端DNA二本鎖も巻き戻すことができる(RunyonとLohman, J. Biol. Chem. 264:

50

17502～17512(1989))。UvrDの濃度が低い場合には、最適な巻き戻しには3'側一本鎖DNA尾部が必要であるが、濃度が高ければ、巻き戻しはニックまたは平滑末端において開始することができる(Runyonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87:6383～6387(1990))。

【0051】

HDAの別の例において、T7遺伝子4タンパク質をヘリカーゼ調製物中で用いて、標的の核酸を増幅させる。T7遺伝子4タンパク質は、プライマーゼ活性と3'→5'ヘリカーゼ活性の両方を含む6量体の複製ヘリカーゼである(LechnerとRichardson、J. Biol. Chem. 258:11185～11196(1983))。遺伝子4タンパク質のアミノ末端切断型である、T7遺伝子4Bタンパク質(T7 Gp 4Bヘリカーゼ)は、DNAヘリカーゼ活性しか含まない。T7 Gp 4Bヘリカーゼのクローニングと精製については、BernsteinとRichardson(J. Biol. Chem. 263:14891～14899(1988))によって記載されている。T7遺伝子2.5タンパク質は、一本鎖DNA結合タンパク質であり、T7 DNAポリメラーゼ活性を刺激する(Kimら、J. Biol. Chem. 267:15032～15040(1992))。T7 Gp 2.5SSBの調製については、以前に記載されている(Kimら、J. Biol. Chem. 267:15022～15031(1992))。

【0052】

HDAの別の実施形態において、ヘリカーゼ調製物中で大腸菌RecBCDタンパク質を使用する。大腸菌RecBCDは、1つのスーパーファミリー1ヘリカーゼ(RecB)と1つの5'→3'ヘリカーゼ(RecD)とを含むタンパク質複合体であり、標的断片を増幅するために用いられる。大腸菌RecBCDヘリカーゼは、3量体の多官能性酵素であり、ATP依存性ヘリカーゼであるとともにDNAヌクレアーゼでもある(RomanとKowalczykowski、Biochemistry. 28:2863～2873(1989))。RecBサブユニットは、3'→5'DNAヘリカーゼ活性に加えて、エキソヌクレアーゼ活性も有している。エキソヌクレアーゼ活性は、二本鎖DNAを分解することなく巻き戻すことのできるエキソヌクレアーゼ欠失RecB^{D1067A}CDをもたらす、部位特異的変異法によって除去することができる(Wangら、J. Biol. Chem. 275、507～513(2000))。RecDタンパク質もまた、5'→3'極性を有するDNAヘリカーゼである(TaylorとSmith、Nature 423、889～893(2003))。RecBおよびRecDヘリカーゼは、いずれも二極性転座モデルを介して無傷のRecBCDにおいて活性を有する。この2つのDNAヘリカーゼは相補的であり、逆平行DNA二本鎖の各鎖上で、相反する極性でもって同じ向きに移動する。この二極性モーター機構が、その指数的に高い速度(500～1000bp/秒)とプロセッシビティ(processivity)(1回の結合あたり>30kb)を説明する助けとなる。Dillinghamら、Nature 423、893～897(2003))。

【0053】

HDAの別の例において、ヘリカーゼ調製物において、6量体複製ヘリカーゼであるT7 Gp 4ヘリカーゼを使用して、1kbよりも長い標的断片を増幅させる。T7 Gp 4ヘリカーゼは、スーパーファミリー4に属し、このファミリーのメンバーには、DnaBやT4 Gp 41などのいくつかの6量体ヘリカーゼが含まれ、これらのヘリカーゼは、迅速な巻き戻し速度と、高度なプロセッシビティを有する。これらのヘリカーゼは、巻き戻しのために二本鎖領域の端部にある一本鎖尾部を認識する。例えば、DNAポリメラーゼの存在下において、大腸菌DnaBヘリカーゼはDNAを750bp/秒の速度で50kbを越えるプロセッシビティで巻き戻し、T7 Gp 4ヘリカーゼはDNAを300bp/秒の速度で高いプロセッシビティで巻き戻す(前掲のKornbergとBaker(1992))。SV40ラージT抗原は、DNAを、75～100bp/秒の速度にて、高いプロセッシビティで巻き戻す(前掲のKornbergとBaker(1992

10

20

30

40

50

); Liら、Nature. 423: 512~518 (2003))。

【0054】

理論に結び付けることは望まないが、T7 Gp4などのいくつかのヘリカーゼは、一本鎖尾部を有する二本鎖DNAを好むものの、それらは、平滑末端を有する二本鎖DNA分子に対しても低い巻き戻し活性を有しているかもしれない。一本鎖尾部は、二本鎖DNA分子の「末端ブリージング (terminal breathing)」を介して二本鎖DNAの端部に維持的に存在することもできる (Roychoudhuryら、Nucleic acid Res. 6: 1323~3123 (1979))。これらの一過性の一本鎖尾部はT7ヘリカーゼによって捕捉されることができ、その後、該ヘリカーゼは巻き戻しプロセスを続ける。

10

【0055】

標的の核酸の起源に関係なく、二本鎖分子を巻き戻すことにより反応温度の変化無しに、ポリメラーゼ依存性増幅のための一本鎖分子を生産するために、核酸の増幅のあいだの熱変性工程の代わりにヘリカーゼ調製物を用いてもよい。したがって、Taqポリメラーゼを用いる標準的なPCR増幅において必要とされるサーモサイクリングを回避することができる。

【0056】

一般に、プライマーと鋳型の間の認識特異性と、それに続くアニーリングを可能にするのに適した変性温度は、例えば20℃~75℃などの温度範囲とすることができる。好ましい変性温度は、融解プロセスのためにどのヘリカーゼを選択したかに応じて選択するとよい。選択したヘリカーゼの存在下での核酸の増幅に対する最適温度を決定するための試験は、反応混合物の温度を変化させて、ゲル電気泳動を用いて増幅産物を比較することにより、常套的な実験によって決定することができる。

20

【0057】

核酸二本鎖の変性は、たとえば45℃~75℃の範囲よりも高い温度を含むインキュベーション条件下で、熱安定性ヘリカーゼ調製物を用いることにより加速することができる (実施例XII)。熱安定性ヘリカーゼ調製物および熱安定性ポリメラーゼを用いて高温でHDAを行うことにより、プライマー結合の特異性を高めることができ、これにより、増幅の特異性を改善することができる。

【0058】

ある状況において、増幅反応において複数の異なるヘリカーゼ酵素を用いることが望ましいかもしれない。複数のヘリカーゼを使用することで、異なるヘリカーゼが様々な機能を調整して二本鎖核酸の巻き戻しの効率を高めているような一定の状況下において、HDAにおける標的増幅の収率および長さを高めることができるかもしれない。たとえば、低プロセッシビリティしか持たないものの、平滑末端を有するDNAを融解することのできるヘリカーゼを、高いプロセッシビリティを持つものの、巻き戻し開始のために二本鎖領域にある一本鎖尾部を認識する第2のヘリカーゼと組み合わせてもよい (実施例X)。この例において、第1のヘリカーゼが最初に長い核酸二本鎖の平滑末端を分離して5'および3'の一本鎖尾部とした後、その限られたプロセッシビリティのためにその基質から解離する。この部分的に巻き戻された基質は次に第2のヘリカーゼによって認識され、該第2のヘリカーゼは優れたプロセッシビリティで巻き戻しプロセスを続ける。このようにして、核酸二本鎖内の長い標的を、複数のヘリカーゼを含むヘリカーゼ調製物を使用することにより巻き戻して、続いてHDA反応において増幅させることができる。

30

40

【0059】

(プライマー)

一般に、HDAにおいて使用するのに適したプライマー対は、例えば、10ヌクレオチドよりも長く50ヌクレオチド未満の長さを有する短い合成オリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドプライマー設計には、文字列に基づく (string-based) アライメントスコア、融点、プライマーの長さ、およびGC含量などの様々なパラメータが関与する (Kampkeら、Bioinformatics 17: 214~225 (2

50

003))。プライマーを設計する際の重要な因子の1つは、増幅すべき核酸分子に特異的な標的断片内の配列を選択することである。他の重要な因子は、HDA反応のためにプライマーの融点を決定することである。プライマーの融点は、そのオリゴヌクレオチドの長さやGC含量によって決まる。好ましくは、プライマーの融点は、ハイブリダイゼーションと増幅を行う温度よりも約10～30℃高ければよい。例えば、大腸菌UvrDヘリカーゼ調製物を用いる場合でハイブリダイゼーションと増幅の温度を37℃に設定するならば、この反応のために設計するプライマー対の融点は、約47℃～67℃の範囲とする。ハイブリダイゼーションと増幅の温度が60℃であるならば、この反応のために設計するプライマー対の融点は、約65℃～90℃の範囲とする。HDA反応のための最良のプライマーを選択するために、様々な融点をもつプライマーの組を平行アッセイにおいて調べることができる。プライマー設計に関するさらなる情報は、Kampkeら、Bioinformatics 17:214～225 (2003)に記載されている。

10

【0060】

各プライマーは標的の核酸の各端部にハイブリダイズし、標的ヌクレオチド配列を鋳型として用いてポリメラーゼにより3'から5'の方向に伸長しうる(図3)。ハイブリダイゼーションの条件は、“Molecular Cloning and Laboratory Manual”第2版、Sambrook、RichとManiatis、Cold Spring Harbor出版(2003)に記載されるような標準的なものである。特異的な増幅を達成するために、相同または完全に一致するプライマーが好ましい。しかしながら、プライマーは、5'末端に標的ヌクレオチド配列とは相補的でない配列を含んでいてもよい。あるいは、プライマーは、標的の核酸と正確には相補的でないようなヌクレオチドまたは配列を含んでいてもよい。所定の温度においてプライマーと鋳型間結合によって特異的なハイブリダイゼーションを達成できるのであれば、HDAにおいて使用するプライマーは、類似プライマーであってもよいし、あるいは非特異的またはユニバーサルプライマーであってもよい。

20

【0061】

プライマーは、デオキシリボヌクレオチド塩基A、T、GまたはCおよび/または1つ以上のリボヌクレオチド塩基、A、C、U、Gおよび/または1つ以上の修飾ヌクレオチド(デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド)のいずれを含んでいてもよい。上記修飾は、プライマーの核酸へのハイブリダイゼーション、またはプライマーの伸長、または二本鎖分子の変性を阻害しないものとする。プライマーは、その性能を高めるために、あるいは増幅産物のキャラクタリゼーションを容易にするために、ホスホロチオエートまたはメチルホスホロチオエートなどの物質群によって、あるいは非ヌクレオチドリナーに修飾してもよい。

30

【0062】

増幅産物を検出するために、プライマーに対して、蛍光または化学発光標識、およびビオチン標識などの修飾を行ってもよい(例えば、カルボキシフルオレセインのアミン反応性フルオレセインエステルなどの蛍光タグ: Glen Research、バージニア州スターリング)。他の標識方法としては、放射性同位体元素、発色団と、ビオチンなどのリガンド、または直接は検出できないものの、標識されたその特異的な結合相手であるアビジンなどとの反応によって容易に検出可能なハプテン、および抗体などが挙げられる。

40

【0063】

本明細書に記載するプライマーは、当該技術分野における周知の方法によって調製することができる(例えば、米国特許第6,214,587号明細書を参照のこと)。

【0064】

実施形態において、一方が標的配列の5'端部にハイブリダイズし、他方が標的配列の3'端部にハイブリダイズする2つの配列特異的なプライマーの対(図3)をHDAにおいて用い、標的配列の指数的増幅を達成する。この手法は、Leeら(J. Mol. Biol. 316:19～34 (2002))の方法とは容易に区別できる。多重反応における異なる検出タグを同時に用いて、複数の標的を増幅するために、1つのHDA反応におい

50

て複数のプライマー対を用いることができる。多重化は、SNP分析および病原体の検出において一般的に用いられている（Jessingら、J. Clin. Microbiol. 41: 4095～4100（2003））。

【0065】

（ポリメラーゼ）

ポリメラーゼは、プロセッシビティおよび鎖置換活性に基づいてHDA用を選択する。融解、およびプライマーとのハイブリダイゼーションに続き、核酸を重合工程に供する。増幅すべき核酸がDNAである場合には、DNAポリメラーゼを選択する。最初の標的がRNAである場合には、まず初めに逆転写酵素を用いてRNA標的をcDNA分子に複写し、このcDNAをさらに、選択したDNAポリメラーゼによるHDAにおいて増幅する（実施例VII）。DNAポリメラーゼは、4種のdNTPの存在下において、標的の核酸上で作用して、核酸鋳型にハイブリダイズしたプライマーを伸長して、核酸鋳型上のヌクレオチド配列に相補的なプライマー伸長産物を作成する（図1および図3）。

10

【0066】

DNAポリメラーゼは、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失するポリメラーゼ、およびこれに加えて随意で3'→5'エキソヌクレアーゼ活性も欠失していてもよいポリメラーゼから成る群より選択される。

【0067】

適切なDNAポリメラーゼとしては、例えば、大腸菌DNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠失Klenow断片（New England Biolabs Inc.（マサチューセッツ州ベバリー））、エキソヌクレアーゼ欠失T7 DNAポリメラーゼ（Sequenase；USB（オハイオ州クリーブランド））、大腸菌DNAポリメラーゼIのKlenow断片（New England Biolabs Inc.（マサチューセッツ州ベバリー））、Bst DNAポリメラーゼのラージフラグメント（New England Biolabs Inc.（マサチューセッツ州ベバリー））、KlenTaq DNAポリメラーゼ（AB Peptides、（ミズーリー州セントルイス））、T5 DNAポリメラーゼ（米国特許第5,716,819号明細書）、およびPol III DNAポリメラーゼ（米国特許第6,555,349号明細書）が挙げられる。ヘリカーゼ依存性増幅には、大腸菌DNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠失Klenow断片、Bst DNAポリメラーゼラージフラグメント、およびSequenaseなどの鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼが好ましい。T7ポリメラーゼは、Taqポリメラーゼよりもエラー率が 3.5×10^{-5} と有意に小さい高忠実度ポリメラーゼである（KeohavongとThilly、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86、9253～9257（1989））。T7ポリメラーゼは、熱安定性ではないが、それ故に、サーモサイクリングを必要とする増幅系において使用するのに最適ではない。等温的に実施できるHDAにおいて、T7 Sequenaseは、DNA増幅のための好ましいポリメラーゼの1つである。

20

30

【0068】

（一本鎖DNA結合タンパク質）

ヘリカーゼは、一本鎖結合タンパク質（SSB）の存在下で活性の向上を示す。こうした状況において、SSBの選択は一般に特異的タンパク質には限られない。一本鎖結合タンパク質としては、例えば、T4遺伝子32タンパク質、大腸菌SSB、T7 Gp2.5 SSB、ファージφ29 SSB（前掲のKornbergとBaker（1992））および上述の切断型が挙げられる。

40

【0069】

（他の化学物質）

塩およびpHに加えて、他の化学物質、例えば、尿素やジメチルスルホキシド（DMSO）などの変性剤をHDA反応に加えて、二本鎖DNAを部分的に変性または不安定化するようにしてもよい。HDA反応は、SSBタンパク質の存在下または非存在下にて、変性剤の濃度を変えて比較することができる。このようにして、HDA効率を高めるか、お

50

よび／または一本鎖 (ss) DNA 安定化において SSB の代わりとなる化学化合物を同定することができる。核酸やタンパク質などの生体マクロ分子の殆どが、生物細胞内では *in vitro* 実験条件よりもはるかに高い濃度で機能および／またはそれらの天然の構造を形成するように設計される。ポリエチレングリコール (PEG) は、水を排除し、溶質ポリカチオンと静電的相互作用を作り出すことにより、人工的な分子の込み合った状態を作り出すために用いられてきた (Miyoshi ら、*Biochemistry* 41:15017-15024 (2002))。PEG (7.5%) を DNA ライゲーション反応に加えると、反応時間は 5 分間に短縮される (Quick Ligation Kit、New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー))。また PEG は、反応の効率を高めるためにヘリカーゼ巻き戻しアッセイにも加えられてきた (Dong ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、93:14456-14461 (1996))。HDA への PEG または他の分子込み合い剤は、HDA 反応における酵素および核酸の有効濃度を高めることにより、反応時間および反応に必要なタンパク質の濃度を低減するかもしれない。

【0070】

(補因子)

ATP または TTP は、高いプロセッシビティをもつ (*highly processive*) ヘリカーゼのための、広く好まれているエネルギー源である。平均的な 1 つの ATP 分子は、1~4 塩基対を巻き戻すために DNA ヘリカーゼによって消費される (前掲の Kornberg と Baker (1992))。本発明の一実施形態において、UvrD に基づく HDA 系は、3 mM の最適初期 ATP 濃度を有していた。より長い標的を増幅するためには、短い標的の場合よりもより多くの ATP が消費されるかもしれない。こうした状況において、ヘリカーゼとともに用いるための、ピルビン酸キナーゼに基づく ATP 再生産系を含めることが好ましいかもしれない (Harmon と Kowalczykowski、*Journal of Biochemical Chemistry*、276:232-243 (2001))。

【0071】

(トポイソメラーゼ)

トポイソメラーゼは、長い HDA 反応において、HDA が長い標的アンプリコンを増幅する能力を高めるために用いることができる。非常に長い線形 DNA 二本鎖をヘリカーゼによって分離する場合には、トポイソメラーゼの巡回 (弛緩) 機能がよじれを除去し、巻きすぎ (*overwinding*) を防ぐ (前掲の Kornberg と Baker (1992))。例えば、大腸菌トポイソメラーゼ I (Fermentas、ビルニウス、リトアニア) を用いて、一方の DNA 鎖にニックを入れることにより、負の超らせん状 DNA を弛緩させることができる。これに対し、大腸菌 DNA ジャイレース (トポイソメラーゼ II) は、DNA 中に一時的な二本鎖破断をもたらし、DNA 鎖同士が互いに通り越すようにする (前掲の Kornberg と Baker (1992))。

【0072】

(増幅核酸の検出)

増幅された核酸産物は、臭化エチジウム染色、および、放射性標識、蛍光標識および酵素からなる群より選択される標識によって、増幅された核酸を検出することを含む、様々な方法で検出することができる。例えば、HDA 増幅産物は、ヘアピン構造内の 3' 末端の近くに蛍光団を有するように設計されたオリゴヌクレオチドである蛍光標識 LUX (登録商標) プライマー (Invitrogen Corporation、Carlsbad、CA) で検出することができる。この構成は、別個の消光部分を必要とせずに、それ自体で本質的に蛍光消光能を与える。プライマーが二本鎖増幅産物に組み込まれると、蛍光団は脱消光されて、蛍光シグナルが著しく増大する。実施例 XIV は、蛍光標識せられたプライマーを用いた標的配列のリアルタイム検出と、HDA 方法を実証するものである。

【0073】

(HDA において使用可能なヘリカーゼの同定)

ヘリカーゼを標的の核酸を増幅するためにHDAにおいて使用できるかどうかを調べるために、HDA反応を以下のように構成することができる。

【0074】

(a) 短い二本鎖オリゴヌクレオチド(100ヌクレオチド未満)を増幅の基質として使用することができる。このオリゴヌクレオチドの5'および3'末端にハイブリダイズできるプライマーを準備する。前記二本鎖オリゴヌクレオチドを変性させ、標準的なトリス酢酸バッファ(10mM、pH7.5)またはThermoPol(New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー))バッファに溶解したプライマーと可変量のdNTPまたはNTPとの第1の混合物中で一本鎖を形成させる。混合物は95℃で10分間加熱し、53℃で1分間加熱する。

10

【0075】

(b) 第2の混合物を調製するが、この第2の混合物は、pH6.0～pH9.0の間で変えられるpHを有するHDAバッファ中に、試験対象濃度のヘリカーゼを含んでいる。標準バッファは、それぞれ約0～200mMの範囲の濃度の、一定濃度のNaClおよびKClを含んでいてもよい。ヘリカーゼの濃度を変えてもよい。T4 Gp32などの一本鎖結合タンパク質を、DNAポリメラーゼおよび4種のdNTPsとともに、増幅すべき核酸およびプライマーも含む増幅反応系中で用いる標準量で加える。

【0076】

(c) 混合物を合わせて、37℃(またはある温度で)で2時間インキュベートした後、3%GPG LMPアガロースゲル上で分析する。

20

【0077】

上述の異なる条件下で反復反応を行うことにより、個々のヘリカーゼについて、HDAのための最適な条件を求めることができる。

【0078】

次に、ヘリカーゼが、プラスミドやより長いDNA分子、および大腸菌UvrDヘリカーゼに対する実施例で説明するようなゲノムDNA内の短い配列を増幅できるかどうかを調べてもよい。

【0079】

ここで、ヘリカーゼ依存性増幅が、多種多様な用途に使用される改良された核酸増幅方法であることを実証する。これらには、逆転写に続く増幅、およびリアルタイムHDAを用いた定量的増幅が含まれる。以下の実施例では、HDAが、広範な大きさの核酸を増幅するためのいかに高感度で効率的な方法であるかを説明する。HDA反応の感度の一つの尺度は、核酸配列を10倍から10億倍の範囲で増幅できることである。

30

【0080】

表1は、限定することなくいくつかの標本値を含んでいる。

【0081】

【表1】

(表1) 増幅率

基質	開始時の量	終了時の量	増幅倍率
オリゴ	5 ng	500 ng	100
プラスミド	2700bpの25 ng	100bpの500 ng	5000
ゲノムDNA	3Mbの100 ng	100bpの300 ng	1×10^5
ゲノムDNA	3Mbの0.1 ng	100bpの300 ng	1×10^9

40

【0082】

50

(増幅条件—温度)

鎖置換増幅などの他の等温的核酸増幅方法でも、サーモサイクリングを用いない定温度での標的増幅を行うことができるものの、これらの方法には一本鎖鋳型を生成するための初期変性工程を必要とする。本方法の実施形態の利点は、ヘリカーゼによる巻き戻しと増幅の両方を、実施例 I X において実証するように一貫して単一の温度において効率的に行うことができることにある。あるいは、ヘリカーゼによる標的の核酸の初期巻き戻しを助けるために温度を上げ、その後増幅を単一の温度で進行させる。

【0083】

我々は、RNA の逆転写産物の増幅のための PCR の代わりに、HDA を使用できることも示した (実施例 V I I)。さらに、HDA は、遺伝子発現研究や環境分析において有用であることが分かっている定量的増幅に対しても有用であると予想される。したがって、標的の核酸の量を決定することが望ましい場合には、HDA をリアルタイムエンドポイントアッセイにおいて使用することができる。したがって、HDA は、遺伝子発現研究において、細胞内のメッセンジャー RNA の相対量を決定するために用いてもよい。例えば、国際公開第 01/25473 号パンフレットに記載の校正された (calibrated) 遺伝子発現プロファイルを、定量的ヘリカーゼ依存性増幅または Q-HDA を用いて作成することができる。

10

【0084】

リアルタイム HDA は、海水中の大腸菌などの汚染試料中の生物の量を決定するための高感度の技術として使用してもよい。HDA 反応において蛍光などの高感度マーカーを用いるリアルタイム検出は実施例 X I V で実証する。

20

【0085】

HDA は、野外作業および／または実験室での診断において使用するための小型装置に関連して開発してもよい。例えば、HDA は、マイクロ流体環境において実施してもよい。マイクロ流体技術 (チップ上の実験室) は、通常はナノリットルスケールの小型環境において生化学分析を行うことによりコストと時間を削減するための重要な戦略として急速に普及してきている。マイクロ流体技術は、核酸増幅および検出方法と組み合わせた場合に、病原体検出における野外持ち出し可能な装置として使用できる大きな可能性を有している。HDA は、初期変性を行わずに等温条件において核酸を増幅できるという能力を持つことから、マイクロ流体装置における核酸増幅プロセスのための優れた候補となっている。同様に、HDA は、キット、あるいは、国際公開第 02/02740 号パンフレットに開示されている分類の反応プロファイルを作成するための実験室増幅手順において、あるいは疾病を監視するために (米国公報 No. 2001018182) 用いてもよい。

30

【0086】

実施例 I I から X I V では、HDA が、異なる起源に由来する、異なる配列を有する標的の核酸を増幅するのに有用であることを説明する。実施例 I V では、HDA を用いた DNA プラスミドに由来する様々な長さの標的配列の増幅について説明する。実施例 X では、T7 Gp4B に基づく HDA 系によって、より長い標的配列 (>2 kb) を増幅できることを実証する。実施例 X は、核酸を増幅するためのヘリカーゼ依存性増幅を用いた方法が、異なるヘリカーゼ調製物、例えば T7 Gp4B ヘリカーゼを含むヘリカーゼ調製物、または T7 Gp4B ヘリカーゼや UvrD ヘリカーゼなどの 1 つ以上のヘリカーゼを含むヘリカーゼ調製物を用いても実施できることをさらに実証するものである。

40

【0087】

HDA を用いてわずか 10 コピーの細菌ゲノム DNA でもうまく増幅できることを実施例 V I I I において実証するが、これは、例えば *Chlamydia trachomatis* や *Neisseria gonorrhoeae* などの病原性細菌を原因とする感染性疾患の分子診断用途に対する HDA の使用を立証するものである。ヒトゲノム DNA 試料から標的配列を増幅できることを実証するが (実施例 V I)、これは、一塩基変異多型を含む特定の疾病に対応する遺伝的対立遺伝子の同定における、また犯罪現場や考古学的な遺跡に残された少量の核酸を解析することによる法科学的用途における、HDA の使

50

用を立証するものである。

【0088】

以下の実施例は、本発明の理解を助けるために提供するものであって、本発明を限定するものではない。

【0089】

上記および下記に挙げた参考文献は参照により本願に組み込む。

【実施例】

【0090】

(実施例 I)

UvrDヘリカーゼとそのアクセサリタンパク質MutLのクローニングと精製

1. UvrDヘリカーゼとMutLタンパク質をコードする遺伝子のクローニング

大腸菌ヘリカーゼIIまたはUvrDヘリカーゼ (Swissprotアクセス番号: P03018)、およびそのアクセサリタンパク質である大腸菌MutLタンパク質 (Swissprotアクセス番号: P23367) をコードする遺伝子を、Impact (登録商標) 系を用いてクローニングした。このImpact系は、S. cerevisiae VMAインテインとキチン結合ドメインからなる2官能性タグのC末端翻訳融合体をもたらす (New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー))。タンパク質精製系では、標的タンパク質を親和性タグ (キチン結合ドメイン) から分離するために、タンパク質スプライシング要素 (インテインと呼ばれる) のD TT誘導性自己開裂活性を利用する。大腸菌K12ゲノムDNAから、プライマー5A (5' GGTGGTACCATGGACGTTTCTTACCTGCTC3' (配列番号: 1)) およびプライマー3A (5' GGTGGTGGCTCTTCCGCACACCGACTCCAGCCGGGC3' (配列番号: 2)) を用いてuvrD遺伝子を増幅するために、Vent (登録商標) DNAポリメラーゼを用いた。mutL遺伝子は、プライマー5B (5' GGTGGTCAATATGCCAATTCAGGTCTTACCG3' (配列番号: 3)) およびプライマー3B (5' GGTGGTTGCTCTTCCGCACCTCATCTTTTCAGGGCTTTTATC3' (配列番号: 4)) を用いて、大腸菌K12ゲノムDNAから増幅させた。大腸菌K-12はNew England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー) から得た。ゲノムDNAは、QiagenゲノムDNAキット (Qiagen、ヒルデン、ドイツ) を用いて単離した。プライマーには、mutL遺伝子をpTYB1 (New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー)) のNdeIおよびSapI部位に、またuvrD遺伝子をpTYB3 (New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー)) のNcoIおよびSapI部位にクローニングできるようにする制限酵素部位を含めた。ライゲーション産物をER2502細胞に形質転換した。陽性の形質転換体を、100 μg/mLのアンプシリンを含むLB平板上で選択的に培養した後、コロニーPCRおよびインサートの配列決定によりスクリーニングした。配列決定結果を分析した後、妥当な構築物を大腸菌ER2566細胞に形質転換した。pTYB1-MutLまたはpTYB3-UvrDを含んだER2566細胞を、100 μg/mLのアンプシリンを加えたLB培地中、37°Cで培養した。OD₅₅₀が~0.5に達したところで、0.5 mM イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) によってタンパク質発現を誘導した。15°Cで一晩インキュベートした後、遠心分離により細胞を回収した。

【0091】

2. UvrDおよびMutL精製

インテインタグのキチン結合ドメイン (CBD) によって、融合タンパク質をキチンビーズカラム (New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー)) 上でアフィニティ精製することができるようになる。すべての手順は4°Cで行った。6リットルの培地に含まれるUvrD発現細胞を210 mLの超音波処理用バッファ (20 mM トリス pH 7.8、0.1 mM EDTA、50 mM NaCl、20 μ

10

20

30

40

50

M PMSF、5%グリセロール)に再懸濁し、超音波破碎した。透明になった抽出物を、500mLのバッファA(20mMトリス-HCl(pH8)、1mM EDTA)と500mM NaClで平衡化した45mLキチンビーズカラムにロードした。カラムを500mLのバッファA+1M NaClと、500mLのバッファA+500mM NaClで洗浄した。自己開裂の誘導は、カラムに、カラムの3倍体積(135mL)の開裂バッファ(バッファA+500mM NaCl+50mMジチオトレイトール(DTT))を流すことにより行った。開裂反応は、開裂バッファ中、4℃で64時間行った。タンパク質を67mLのバッファB(20mMトリス-HCl(pH8)、1mM EDTA、1mM DTT)+50mM NaClで溶出した。陽性の画分をプールし、予めバッファB+50mM NaClで平衡化しておいた1mLのMonoQカラム(Pharmacia(ニュージャージー州ピスカタウェイ))にロードした。素通り画分と溶出画分をSDS-PAGEで分析した。陽性画分におけるヘリカーゼ活性については、ヘリカーゼが、30ヌクレオチド(nt)のオリゴヌクレオチドを相補的非標識70ntオリゴヌクレオチドにアニーリングすることによって調製した部分的二重鎖から、蛍光標識オリゴヌクレオチド(30nt)を置換する能力を測定することにより、さらに調べた。置換された30nt標識オリゴヌクレオチドは、別の非標識30nt相補的オリゴヌクレオチドによって捕捉された。オリゴヌクレオチドは、20%非変性ポリアクリルアミドゲル中での電気泳動により分離し、置換されたオリゴヌクレオチドはUV光によって可視化した。UvrDタンパク質およびヘリカーゼ活性は、素通りおよび洗浄画分中で見られた。これらの画分を混合し、1mLヘパリンTSKカラム(Pharmacia(ニュージャージー州ピスカタウェイ))上にロードした。この場合も、UvrDはカラムに結合しなかった。1mLのヒドロキシアパタイトカラム(TosoHaas(ペンシルヴェニア州フィラデルフィア))がUvrDを保持したが、これは直線勾配(50mM~1M NaCl)における340mM NaCl付近で溶出した。精製画分をプールし、保存バッファ(20mMトリス-HCl(pH8.2)、200mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、15mM 2-メルカプトエタノール、50%グリコール)に対して一晩透析した。最終濃度は、Bradfordタンパク質アッセイ(Bradford, Anal. Biochem. 72:248~254(1976))およびSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いて決定した。

【0092】

MutLもUvrDと同様に精製した。6リットルのER2566/pTYB1-MutLの培養液を使用した。すべての手順は4℃で行った。キチンビーズカラム精製の条件は、カラム体積を14mLとした以外はUvrDの場合と同様にした。カラムを125mLのバッファA+1M NaCl、および125mLのバッファA+500mM NaClで洗浄した。自己開裂の誘導は、カラムを45mLの開裂バッファ(バッファA+500mM NaCl+50mM DTT)で洗浄することにより誘導した。開裂反応は、開裂バッファ中、4℃で40時間行った。タンパク質を36mLのバッファB+50mM NaClで溶出した。陽性の画分をプールし、1mL MonoQカラムにロードした。MutLは、カラムの素通り画分中に見られた。したがって、素通りおよび洗浄画分をプールし、バッファB+40mM NaClに対して透析して、最終NaCl濃度を50mMとした。試料を1mLのヘパリンTSKカラムにロードした。MutLが保持され、565mM NaClにおいて溶出した。しかしながら、SDS-PAGE上では他のタンパク質バンドも検出することができ、エキソヌクレアーゼアッセイにおいては、目的の画分中にエキソヌクレアーゼ活性が存在することが分かった。これらの画分をプールし、バッファB+50mM NaClに対して透析した。2回目の1mL MonoQカラムを用いて、混入タンパク質からMutLを分離した。MutLは、220mM NaClにおいて溶出した。精製画分をプールし、CentriplusYM10(Millipore、(マサチューセッツ州ベッドフォード))によって濃縮してから、保存バッファ(25mMトリス-HCl(pH7.5)、200mM NaCl、1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM EDTA、50%グリセロール)に対して一晩透析した。最

終濃度は、Bradfordタンパク質アッセイおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を用いて決定した。

【0093】

3. 他のクローニングおよび精製系

Impact (登録商標)に加えて、ヘリカーゼおよびそれらのアクセサリタンパク質は、いくつかの代替の方法、例えば直接クローニング(付加的タグなしに遺伝子をベクターに直接クローニングする)、His-Tag (登録商標) (Novagen, Inc. (ウィスコンシン州マジソン)) およびpMAL (登録商標) タンパク質融合体と精製系(New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー))を用いて精製してもよい。大腸菌UvrDヘリカーゼを、プラスミドpET15b (Novagen Inc. (ウィスコンシン州マジソン)) およびpMAL-c2X (New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー))中にクローニングした。Hisタグ融合体であるUvrD-Hisを、His. Bind (登録商標) カラムおよび製造業者(Novagen Inc. (ウィスコンシン州マジソン))によって提供されるプロトコルを用いて精製した。UvrD-Hisタンパク質は、ヒドロキシアパタイトカラムによってさらに精製した。MBP-UvrD融合タンパク質は、アミロースカラムおよび製造業者(New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー))によって提供されるプロトコルを用いて精製した。UvrD-Hisタンパク質およびMBP-UvrD融合タンパク質のいずれも、機能的巻き戻し活性を示し、ヘリカーゼ依存性増幅反応において使用しうることがわかった。

【0094】

(実施例II)

核酸二本鎖標的の増幅方法

ヘリカーゼ依存性増幅のモデル系として、合成DNA二本鎖をHDA反応における鋳型として用いた。この実施例では、UvrD HDA系を用いた上記DNA二本鎖の増幅について説明する。鋳型変性の方法、プライマーアニーリングおよび伸長について以下に示す。

【0095】

35 μ Lの反応成分Aは、10 μ Lの5 $\times$ HDAバッファA (175mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM DTT)と、上部オリゴデオキシヌクレオチド(2 μ M; 5' TGGCTGGTCACCAGAGGGTGGCGCGGACCGAGTGCCTCGGCGGGCTGCGGAGAGGGGTAGAGCAGGCAGC3' (配列番号: 5)) および下部オリゴデオキシヌクレオチド(2 μ M; 5' GCTGCCCTGCTCTACCCCTCTCCGCGAGCCGCCGAGCGCACTCGGTCCGCGCCACCCCTCTGGTGACCAAGCCA3' (配列番号: 6))から得た0.5 μ Lの70bp DNA鋳型と、1 μ Lの5' プライマー(10 μ M; 5' CATGTTAGGTCTCTATGATCGAGTCTGGCTGGTCAACCAGAGGG3' (配列番号: 7))と、1 μ Lの3' プライマー(10 μ M; 5' TCCCTTAGAGGTCACATTGGATCGAGTCGCTGCCCTGCTCTACCCC3' 配列番号: 8))と、10 μ Lの4種のdNTP (各2mM)と、1.5 μ LのATP (100mM)と、11 μ LのdH₂Oとを混合することにより作成した。反応成分Aを95 $^{\circ}$ Cで2分間加熱して鋳型を変性させ、53 $^{\circ}$ Cで3分間および37 $^{\circ}$ Cで2分間加熱してプライマーをアニーリングさせた後、0.5 μ LのMutLタンパク質(800ng/ μ L)を加えた。15 μ Lの反応成分Bは、10 μ Lの5 $\times$ HDAバッファB (5mM トリス-HCl (pH7.9)、25mM NaCl、55mM MgCl₂、0.5mg/mL BSA、0.5mM DTT)、0.5 μ Lの大腸菌DNAポリメラーゼIのexo⁻Klenow断片(5ユニット/ μ L)、0.5 μ LのUvrDヘリカーゼ(200ng/ μ L)、0.9 μ LのT4遺伝子32タンパク質(Gp32; 5 μ g/ μ L)、および3.1 μ LのdH₂Oを混合することにより調製し、これをMutLに続いて成分Aに加えた。exo⁻Kl

enow断片は市販されており（New England Biolabs Inc.（マサチューセッツ州ベバリー））、T4遺伝子32タンパク質もまた市販されている（Roche Applied Science,（インディアナ州インディアナポリス））。反応は37℃で30分間続け、12.5μLの停止バッファ（1%SDS、0.05M EDTA、30%グリセロール、0.2%ブロモフェノールブルー）を加えることにより停止した。反応産物は、トリスホウ酸EDTA（TBE）バッファおよび臭化エチジウム中、3%ゲノム処理グレード（GPG）低融点（LMP）アガロースゲル（American Bioanalytical（マサチューセッツ州ナティック））上で分析した（図2-2）。約120bpのDNA断片が観察され（図2-2）、これは予想される123bpの産物に一致した（図2-1）。

10

【0096】

（実施例III）

HDAによるプラスミドDNAからの特定配列の増幅

DNA鋳型から特定の標的配列を増幅するためにHDAを用いることができるかどうかを調べるために、2つのpUC19/M13ユニバーサルプライマーであるプライマー1224およびプライマー1233を用いて、2647bpのDNAプラスミドであるpAH1（図15（配列番号：9））から110bpの配列をUvrD-HDA系を用いて増幅した。プライマー1224およびプライマー1233は、市販されており、それらの配列は会社（New England Biolabs Inc.（マサチューセッツ州ベバリー））で入手可能である。増幅スキームを図3にまとめる。

20

【0097】

次の2つの酢酸ベースのバッファを予め調製しておいた。10×HDAバッファAは、350mMトリス酢酸（pH7.5）と100mM DTTとを含み、10×HDAバッファBは、10mMトリス酢酸（pH7.5）と、1mg/mL BSAと、90mM酢酸マグネシウムとを含む。HDA反応成分Aは、以下のものを組み合わせることにより構成した。

- 5μL 10×HDAバッファA
- 1.5μLの23nM AhdI開裂pAH1プラスミド
- 1μLの10μMプライマー1224
- 1μLの10μMプライマー1233
- 2μLの各dNTP（10mM）
- 1.5μLのATP（100mM）
- 8μLのdH₂O

30

【0098】

反応成分Aを95℃で2分間加熱して鋳型を変性させ、69℃で3分間加熱することによりプライマーをアニールさせ、37℃で2分間加熱してから成分Bを加えた。

【0099】

以下のものを混合することにより、15μLの反応成分を調製した。

- 5μL 10×HDAバッファB
- 1μL exo⁻Klenow断片（5ユニット/μL）
- 0.5μL UvrDヘリカーゼ（200ng/μL）
- 1μL MutLタンパク質（400ng/μL）
- 0.9μL T4 Gp32（5μg/μL）
- 21.6μL dH₂O

40

【0100】

次に成分Bを成分Aに加えた。反応は37℃でさらに1時間続け、12.5μLの停止バッファ（1%SDS、0.05M EDTA、30%グリセロール、0.2%ブロモフェノールブルー）を加えることにより停止した。反応産物は、臭化エチジウムを含む2%GPG-LMPゲル上で分析した（図4）。

【0101】

50

110bp増幅産物が2%アガロースゲル上で観察された。この産物の大きさは、予想される標的配列の長さとも一致していた(図4、レーン1)。UvrDヘリカーゼの非存在下では、増幅は全く観察されなかったことから、増幅にはヘリカーゼが必要とされることが確認された。さらに、これらの結果からは、UvrDは、MutLおよびT4 Gp32SSBの存在下での標的DNAの増幅において実質的により高い効率を示すことが分かった。

【0102】

(実施例IV)

DNAプラスミドからの様々な標的配列の増幅方法

UvrDに基づくHDA系が様々な標的配列を増幅できるかどうかを調べるために、プライマー1224とプライマー1233の間に様々な配列および大きさのインサートを含んだpAHI誘導プラスミドを用いて、いくつかの平行反応を行った。

10

【0103】

50μLのHDA反応は、後述するような2つの反応成分AおよびBを用い、それらを順に混ぜ合わせるにより構成した。以下の2種の酢酸ベースのバッファを予め作成しておいた。10×HDAバッファAは、350mMトリス酢酸(pH7.5)と100mM DTTとを含み、10×HDAバッファBは、10mMトリス酢酸と(pH7.5)、1mg/mL BSAと、100mM酢酸マグネシウムとを含む。

【0104】

以下のものを組み合わせることにより、35μLの成分Aを作成した。

20

- 5μL 10×HDAバッファA
- 1μL pAHI1プラスミドまたはpAHI1誘導体(50ng/μL)
- 1μLの10μMプライマー1224
- 1μLの10μMプライマー1233
- 10μL 各dNTP(2mM)
- 1.5μL ATP(100mM)
- 15.5μL dH₂O

【0105】

以下のものを組み合わせることにより、15μLの成分Bを調製した。

30

- 5μL 10×HDAバッファB
- 1μL exo⁻Klenow断片(5ユニット/μL)
- 0.5μL UvrDヘリカーゼ(200ng/μL)
- 0.5μL MutL(800ng/μL)
- 0.9μL T4 Gp32(5μg/μL)
- 7.1μL dH₂O

【0106】

成分Aを95℃で2分間加熱して鋳型を変性させることにより、HDA反応を開始した。次に、成分Aを69℃で3分間インキュベートして、プライマーをアニールさせ、37℃で2分間インキュベートして反応物を冷却した。15μLの作りたての成分Bを、変性、アニーリングおよび冷却工程を行った後の35μLの成分Aに添加した。反応を37℃でさらに1時間続け、12.5μLの停止バッファ(1%SDS、0.05M EDTA、30%グリセロール、0.2%プロモフェノールブルー)を加えることにより停止した。反応産物は、TBEバッファおよび臭化エチジウム中において3%GPG LMPゲル上で分析した(図4)。すべての増幅産物が予想される標的の大きさに一致していた(図4、レーン1~5)。さらに、UvrDに基づくHDA系は、650bpまでの標的DNAをHDA反応において増幅することができた(図4、レーン5)。

40

【0107】

(実施例V)

HDAによる細菌ゲノムDNAからの特定配列の増幅

HDAは、ウィルスゲノムDNAまたはRNA、細菌ゲノムDNAまたはヒトゲノムD

50

NAなどのさらに複雑な核酸試料から、特定の標的配列を増幅するためにも用いることができる。本例においては、口腔病原体である *Treponema denticola* ATCC No. 35405 の細菌ゲノムから、大腸菌 *UvrD* に基づく HDA 系を用いて、特定の標的配列を増幅および検出する方法を開示する。制限エンドヌクレアーゼ遺伝子 *earI*R を標的遺伝子（図 16（配列番号：10））として選択し、*earI*R の配列にハイブリダイズするように 1 つの 5' プライマーと 2 つの 3' プライマーを設計した。反応バッファおよびプロトコールは、ゲノム DNA 増幅用に改変した。10×HDA バッファ A は、350 mM トリス-酢酸（pH 7.5）および 100 mM DTT を含む。10×HDA バッファ B は、10 mM トリス-酢酸（pH 7.5）と、1 mg/mL BSA と、100 mM 酢酸マグネシウムとを含む。

10

【0108】

以下のものを組み合わせることにより、20 μL の成分 A を構成した。

5 μL 10×HDA バッファ A
 2 μL の *Treponema denticola* ゲノム DNA（50 ng/μL）
 2 μL の 10 μM プライマー 58861（5' CCAAATGATGCTTATGTTGCTT3'（配列番号：11））
 2 μL の 10 μM プライマー 58862（5' CATAGCCTCTCTTGGA TCT3'（配列番号：12））または 2 μL の 10 μM プライマー 58863（5' TCCACATCTTTTCACATTTCCAT3'（配列番号：13））
 2 μL 各 dNTP（10 mM）
 7 μL dH₂O

20

【0109】

以下のものを混合することにより 30 μL の反応成分 B を調製した。

5 μL 10×HDA バッファ B
 4 μL 100 mM ATP
 0.5 μL *UvrD* ヘリカーゼ（200 ng/μL）
 0.5 μL *MutL*（800 ng/μL）
 0.9 μL T4 Gp32（5 μg/μL）
 1 μL *exo⁻Klenow* 断片（5 ユニット/μL）
 18.1 μL dH₂O

30

【0110】

反応成分 A を 95℃ で 10 分間、53℃ で 1 分間、および 37℃ で 2 分間加熱した。作りたての成分 B を、37℃ まで冷却した後の成分 A に加えた。反応を 37℃ でさらに 2 時間続け、12.5 μL の停止バッファを加えることにより停止した。反応産物は、3% GPG LMP アガロースゲル上で分析した（図 5-1）。標的 DNA の予想される大きさはプライマー 58861 とプライマー 58862 の間の 97 bp であり（図 5-1、レーン 1）、プライマー 58861 とプライマー 58863 の間の予想される長さは 129 bp（図 5-1、レーン 2）である。アガロースゲル上には 2 つの産物が観察され、いずれも標的 DNA の予想される大きさに一致していた。増幅産物の配列決定を行い、配列決定の結果から、いずれも標的 DNA の配列に一致することを確認した。

40

【0111】

UvrD ヘリカーゼ調製物が様々な DNA ポリメラーゼと協働するかどうかを調べるために、*T. denticola* ゲノムに由来する 129 bp の標的配列を増幅するための HDA 反応を、*UvrD* ヘリカーゼ調製物および T7 Sequenase（USB、（オハイオ州クリーブランド））を用いて行った。

【0112】

反応成分 A（20 μL）は、以下のものを混合することにより調製した。

5 μL 10×HDA バッファ A
 2 μL の *Treponema denticola* ゲノム DNA（50 ng/μL）
 2 μL の 10 μM プライマー 58861（5' CCAAATGATGCTTATGTT

50

T G C T T 3' (配列番号: 11))

2 μ L の 10 μ M プライマー 58863 (5' T C C A C A T C T T T C A C A T T
T C C A T 3' (配列番号: 13))

2 μ L 各 d N T P (10 mM)

7 μ L d H₂O

【0113】

以下のものを混合することにより 30 μ L の反応成分 B を調製した。

5 μ L 10 $\times$ HDA バッファ B

4 μ L 100 mM A T P

0.5 μ L U v r D ヘリカーゼ (200 ng/ μ L)

0.5 μ L M u t L (800 ng/ μ L)

0.9 μ L T4 G p 3 2 (5 μ g/ μ L)

1 μ L T7 S e q u e n a s e (1.5 ユニット/ μ L、または 3.5 ユニット/ μ L)

18.1 μ L d H₂O

【0114】

HDA 反応は上述と同様に行った。反応産物は、3% G P G L M P アガロースゲル上で分析した (図 5-2)。アガロースゲル上に 130 bp 付近の増幅産物が観察されたが、これは 129 bp の標的配列の予想される大きさに一致していた (図 5-2、レーン 1 および 2)。

【0115】

(実施例 VI)

HDA による、ヒトゲノム DNA 試料からの標的配列の増幅

本例においては、ヒトゲノム DNA 試料から、大腸菌 U v r D に基づく HDA 系を用いて標的配列を増幅する方法を開示する。乳癌細胞系列から調製したヒトゲノム DNA 調製物を A T C C N o. 45537 より購入した。ヒト DNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子 (d n m t 1) に特異的な 2 種のプライマーを合成した。50、75、100 ng/ μ L の異なる濃度のゲノム DNA を用いた反応において、異なる開始量のヒトゲノム DNA について調べた。

【0116】

以下のものを組み合わせることにより、20 μ L の成分 A を構成した。

5 μ L 10 $\times$ HDA バッファ A

2 μ L のヒトゲノム DNA (50~100 ng/ μ L)

2 μ L の 10 μ M プライマー d n m t 5 (5' G G A A G C T G C T A A G G A C T
A G T T 3' (配列番号: 14))

2 μ L の 10 μ M プライマー d n m t 3 (5' C C A T G T A C C A C A C A T G T
G A A C 3' (配列番号: 15))

2 μ L 各 d N T P (10 mM)

7 μ L d H₂O

【0117】

以下のものを混合することにより 30 μ L の反応成分 B を調製した。

5 μ L 10 $\times$ HDA バッファ B

3 μ L 100 mM A T P

1 μ L e x o - K l e n o w 断片 (5 ユニット/ μ L)

0.5 μ L U v r D ヘリカーゼ (200 ng/ μ L)

0.5 μ L M u t L (800 ng/ μ L)

0.9 μ L T4 G p 3 2 (5 μ g/ μ L)

19.1 μ L d H₂O

【0118】

反応成分 A を 95 $^{\circ}$ C で 10 分間、53 $^{\circ}$ C で 1 分間、および 37 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱した。3

10

20

30

40

50

7℃まで冷却した後の成分Aに、成分Bを加えた。反応を37℃でさらに2時間続け、12.5μLの停止バッファを加えることにより停止した。反応産物は、3%GPG LMPアガロースゲル上で分析した(図6)。臭化エチジウム染色により124bp付近にバンドを検出することができたが、その大きさは最初のdnmt1遺伝子内の標的の長さと一致していた。

【0119】

(実施例VII) HDAによるRNA試料からの標的配列の増幅

本実施例においては、RNA試料から標的配列を増幅するための方法について開示する。ラット全RNAを核酸基質として使用し、最初にNew England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー)製のThe ProtoScriptキットを用いて一本鎖cDNA産物に変換した。

10

【0120】

反応系は以下のものを組み合わせて構成し、70℃で5分間インキュベートした後、氷上に保持した。

2μL ラット全RNA (0.5μg/μL)

2μL プライマーdT₂₃VN (50μM、New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー))

4μL dNTP (2.5mM)

8μL H₂O

【0121】

20

その後、以下の試薬を反応チューブに加えた。

2μL 10×RTバッファ (New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー))

1μL RNase阻害剤 (10U/μL)

1μL M-MuLV逆転写酵素 (25U/μL)

【0122】

RT反応系は、42℃で1時間インキュベートした後、95℃で5分間インキュベートした。2μLの一本鎖cDNA産物をHDAにおける成分Aに加え、HDAは、以下のものを組み合わせることにより開始した。

5μL 10×HDAバッファA

30

2μLの第1鎖cDNA産物

1μLの10μMプライマーsfo (5' ACCGCATCGAATGCATGTGGATCTCACCACTGCTTAGC3' (配列番号:16))

1μLの10μMプライマーsre (5' CGATTCCGCTCCAGACTTGGATCTGATGGCATGGACTGTGGT3' (配列番号:17))

2μLの各dNTP (10mM)

9μLのdH₂O

【0123】

以下のものを混合することにより、30μLの反応成分Bを調製した。

5μL 10×HDAバッファB

40

2μL 100mM ATP

1μL exo⁻Klenow断片 (5ユニット/μL)

0.5μL UvrDヘリカーゼ (200ng/μL)

0.5μL MutL (800ng/μL)

0.9μL T4 Gp32 (5μg/μL)

20.1μL dH₂O

【0124】

反応成分Aを95℃で2分間、53℃で1分間、および37℃で2分間加熱した。作りたての成分B、37℃に冷却した後の成分Aに加えた。反応を37℃でさらに2時間続け、12.5μLの停止バッファを加えることにより停止した。反応産物は、3%GPG

50

LMPゲル上で分析した(図7)。アガロースゲル中には、予想される大きさである136bpに合う130bp付近にバンドが見られた。増幅産物をアガロースゲルから精製し、配列決定した。増幅産物の配列は、最初の標的であるラットグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)遺伝子の配列と合致したことから、増幅は配列特異的であることが確認された。

【0125】

(実施例VII)

HDAは、細菌ゲノムDNAのわずか10コピーからでさえ標的配列を増幅および検出することができる。

【0126】

HDAの増幅力を調べるために、様々な量の*Treponema denticola*ゲノムDNAを用いてHDA反応を行った。各反応は、ゲノムDNAの量を除いては実施例Vに記載されているように行った。第1のチューブは、*Treponema denticola*ゲノムの約 10^7 コピーに相当する100ngの*Treponema denticola*ゲノムDNAを含み、*Treponema denticola*ゲノムのコピー数が10に達するまで10倍の系列希釈を行った。

【0127】

実施例Vにおけるプライマー58861およびプライマー58862を用いて、UvrDに基づくHDA反応を行った。反応産物は3%GPG LMPアガロースゲル上で分析した(図8)。一般に、97bpHDA産物の強度は、初期コピー数が減少する関数として減少する(図8)。標的を付加せずに行った反応では、おそらくは試薬の汚染に起因すると考えられるわずかなバンドが図8に見られた。RNAインテイン試薬に、10分子のスケールの標的DNA汚染物を含まないようにすることは非常に困難である。しかしながら、強度は初期標的が10コピーの場合であってもバックグラウンドよりは有意に高く、HDAが1コピーの標的配列を増幅できることが示唆された。10コピーの初期標的を用いた場合、約10ngの産物がHDAにより生成されたが、これは 10^{10} 分子の97bp断片に相当する。したがって、本願に開示のHDA法は10億倍を超える増幅を行うことができる。

【0128】

(実施例IX)

熱変性を行わないHDAによる細菌ゲノムDNAからの標的配列の増幅

等温的標的増幅方法の大半は、配列特異的プライマーが標的配列にアニールできるようにするために熱変性工程から始める。熱変性工程を回避することにより、増幅手順が簡単になる。したがって、UvrDに基づくHDA反応は、最初の熱変性/アニーリング工程を行わずに37℃で行った。HDA反応成分Aは、以下の試薬を1つのチューブ内に組み合わせることにより構成した。

- 5 μ L 10×HDAバッファA
- 2 μ Lの*Treponema denticola*ゲノムDNA (50ng/ μ L)
- 2 μ Lの10 μ Mプライマー58861 (5' CCAAATGATGCTTATGTTGCTT3' (配列番号:11))
- 2 μ Lの10 μ Mプライマー58862 (5' CATAAAGCCTCTCTTGGA TCTT3' (配列番号:12))
- 2 μ L 各dNTP (10mM)
- 5 μ L 10×HDAバッファB
- 3 μ L 100mM ATP
- 0.9 μ L exo-Klenow断片 (5ユニット/ μ L)
- 0.5 μ L UvrDヘリカーゼ (200ng/ μ L)
- 0.5 μ L MutL (800ng/ μ L)
- 0.9 μ L T4 Gp32 (5 μ g/ μ L)
- 26.2 μ L dH₂O

【0129】

次に、50 μ Lの反応系を37℃で2時間インキュベートした。12.5 μ Lの停止バッファを加えることにより反応を停止した。増幅産物は、3% GPG LMPアガロースゲル上で分析した(図9)。増幅産物の大きさは、予想された標的DNAの大きさ(97 bp)と一致していた。

【0130】

(実施例X)

複製ヘリカーゼ(T7遺伝子4ヘリカーゼ)を用いたHDAによる長い標的配列の増幅方法

T7 Gp4Bなどの6量体複製ヘリカーゼを、さらに長い標的配列の増幅に用いることができるかを調べるために、また、異なるHDA系をHDA反応を行うために使用できるかどうかを調べるために、T7 Gp4Bヘリカーゼ調製物をT7 Sequenase(USB, (オハイオ州クリーブランド))とともに用いて、2.3 kbの標的配列を増幅した。この標的配列は、プラスミドpCR2.1(Invitrogen Corporation)中にクローニングされた大腸菌Rep遺伝子(GenBank Accession No. U00096)であり、得られた組み換えプラスミドはPCR-Repと呼ぶ。挿入部位の両脇に位置するプライマー1224とプライマー1233を用いて、2.3 kbの標的を増幅した。後述のように、2つの反応成分AおよびBを用い、これらを順に混合することにより、50 μ LのHDA反応系を構成した。2種類の酢酸をベースとする反応バッファをあらかじめ作成した。10×HDAバッファAは、350 mM トリス-酢酸(pH 7.5)および100 mM DTTを含み、10×HDAバッファBは、10 mM トリス-酢酸(pH 7.5)、1 mg/mL BSA、および100 mM 酢酸マグネシウムを含む。3本の平行チューブを、各チューブ内に以下の成分を混合することにより、それぞれ20 μ Lの反応成分Aを含むように構成した。

5 μ L 10×HDAバッファA

1 μ LのプラスミドpCR-Rep (50 ng/ μ L)

1 μ Lの10 μ Mプライマー1224

1 μ Lの10 μ Mプライマー1233

3 μ L 各dNTP (10 mM)

9 μ L dH₂O

【0131】

3本の平行チューブを、各チューブ内に以下の成分を混合することにより、それぞれ30 μ Lの反応成分Bを含むように構成した。

5 μ L 10×HDAバッファB

9.3 μ L ヘリカーゼ調製物(*)

1 μ L T7 Sequenase (1 U/ μ L, USB Corporation)

14.7 μ L dH₂O

【0132】

*3種の異なるヘリカーゼ調製物をHDA反応において用いた。最初のものは、4.5 μ LのT7 Gp4Bヘリカーゼ(70 ng/ μ L)と、1.3 μ LのT7 Gp2.5 SSB(5 μ g/ μ L)と、1.5 μ Lの100 mM dTTPと、2 μ LのH₂O(図10、レーン1)とを含むT7ヘリカーゼ調製物とした。第2のヘリカーゼ調製物は、複数の2つのヘリカーゼを含むものとし、4.5 μ LのT7 Gp4Bヘリカーゼ(70 ng/ μ L)と、0.5 μ Lの大腸菌UvrDヘリカーゼ(200 ng/ μ L)と、0.5 μ LのMutL(800 ng/ μ L)と、1.3 μ LのT7 Gp2.5 SSB(5 μ g/ μ L)と、1.5 μ Lの100 mM dTTPと、1 μ Lの100 mM ATP(図10、レーン2)とを含むものとした。第3のものは、1.3 μ LのT7 Gp2.5 SSB(5 μ g/ μ L)と、1.5 μ Lの100 mM dTTPと、6.5 μ LのH₂Oとを含む負のコントロールとした(図10、レーン3)。

【0133】

HDA反応は、それぞれ等量の20 μ Lの成分Aを含む3本のチューブを、95℃で2分間加熱して鋳型を変性させ、37℃で1分間加熱プライマーをハイブリダイズさせることによって開始した。それぞれ異なるヘリカーゼ調製物を含む3つの作りたての成分B混合物を、各成分A混合物に加えた。37℃において反応をさらに2時間続け、12.5 μ Lの停止バッファ（1% SDS、0.05M EDTA、30%グリセロール、0.2% ブロモフェノールブルー）を加えることにより停止した。増幅産物は、TBEバッファおよび臭化エチジウム中において1%アガロースゲル上で可視化した（図10）。T7 Gp4Bヘリカーゼ調製物の存在下では、2.3 kb付近の増幅産物が観察されたが、これは、予想された標的の大きさに一致していた（図10、レーン1）。T7 Gp4Bヘリカーゼと大腸菌UvrDヘリカーゼとからなるヘリカーゼ調製物においては、類似の2.3 kb産物が観察された（図10、レーン2）。さらに、ヘリカーゼ調製物中にヘリカーゼを全く含まない負のコントロールにおいては増幅産物は観察されなかった（図10、レーン3）。その後、レーン1およびレーン2からの増幅産物の配列決定を行い、配列決定結果からは、産物がRep遺伝子に由来するものであることが確認された。

10

【0134】

(実施例XI)

RecBCDを用いたHDAによるDNA断片の増幅方法

ヌクレアーゼ欠失変異体RecB^{D1067A}CD（Wangら、J. Biol. Chem. 275:507~513（2000））を、HDA反応において使用し、400bp DNA断片を増幅した。この平滑末端を持つ二本鎖DNA鋳型は、プライマー1224とプライマー1233の間に400bpのインサートを含むpUC19誘導体を用いたPCR反応によって作成した（New England Biolabs, Inc.（マサチューセッツ州ベバリー））。RecB^{D1067A}CDタンパク質のクローニングと精製については以前に記載されている（Wangら、J. Biol. Chem. 275:507~513（2000））。1本のチューブ中で以下の試料を組み合わせることにより、50 μ Lの反応液を構成した。

20

【0135】

5 μ L 10×HDAバッファ（360mM トリス酢酸（pH7.5）、250mMのKOAC、100mM DTT、1mg/mL BSA、および50mM酢酸マグネシウム）

30

1 μ Lの400bp鋳型（2ng/ μ L）1.5 μ Lの10 μ Mプライマー12241.5 μ Lの10 μ Mプライマー12332 μ L 各dNTP（10mM）2 μ L 100mM ATP1 μ L Sequenase Version 2.0（1.3ユニット/ μ L）0.5 μ L RecB^{D1067A}CDヘリカーゼ（130ng/ μ L）1.3 μ L T4 Gp32（3.8 μ g/ μ L）26.2 μ L dH₂O

【0136】

40

50 μ Lの反応液を37℃で1時間インキュベートした。12.5 μ Lの停止バッファを加えることにより反応を停止した。増幅産物は、1%アガロースゲル上で分析した（図11、レーン2）。増幅産物の大きさは、予想された標的DNAの大きさ（400bp）と一致していた。RecB^{D1067A}CDヘリカーゼなしのコントロールの反応では生成物は得られなかった（図11、レーン3）。

【0137】

(実施例XII)

特定配列の熱安定性ヘリカーゼ依存性増幅方法

熱安定性ヘリカーゼと熱安定性ポリメラーゼを用いて高温でHDAを行うことにより、プライマー結合の特異性が高まり、増幅の特異性が向上するかもしれない。本実施例にお

50

いては、口腔病原体である *Treponema denticola* ATCC No. 35405 の細菌性ゲノムから、Tte-UvrD に基づく熱安定性ヘリカーゼ依存性増幅または t-HDA 系を用いて、特定の標的配列を増幅し検出する方法を開示する。

【0138】

1. 熱安定性ヘリカーゼの入手

熱安定性 UvrD 様ヘリカーゼである Tte-UvrD は、完全に配列が決定されている熱安定細菌 *Thermoanaerobacter tengcongensis* (Baor, Genome Res. 12:689~700 (2000)) からクローニングおよび精製した。Tte-UvrD ヘリカーゼをコードする *T. tengcongensis* の UvrD 遺伝子のヌクレオチド配列は、*T. tengcongensis* ゲノムの 605, 527 と 607, 668 の間に位置し、配列は GenBank (アクセス番号: NC 003869; Baor, Genome Res. 12:689~700 (2000)) において参照することができる。PCR により、*T. tengcongensis* ゲノム DNA (100 ng) + プライマー TUF (5' - ATACATATGATTGGAGTGAAAAAGATGAA - 3' (配列番号: 18)) およびプライマー TUR (5' - AAATAAGCTCTTCAGCAAGAAATTGCCCTTAATAGGAG - 3' (配列番号: 19)) を用いて、Tte-UvrD 遺伝子を増幅した。プライマーには、Tte-UvrD 遺伝子を、pTYB1 (New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー)) の NdeI および SapI 部位にクローニングできるようにする制限酵素部位を含めた。PCR 産物を NdeI および SapI で消化し、消化した pTYB1 にライゲーションした。ライゲーション産物を ER2502 細胞に形質転換した。陽性の形質転換体を 100 µg/mL のアンピシリンを含む LB 平板上での選択培養によりスクリーニングし、インサートのコロニー PCR と配列決定を行った。配列決定結果の解析後、妥当な構築物を大腸菌 ER2566 細胞中に形質転換した。pTYB1-Tte-UvrD を含む ER2566 細胞を、100 µg/mL のアンピシリンを加えた LB 培地中、37℃ で培養した。OD₅₅₀ が ~0.65 に達したところで、0.4 mM IPTG によってタンパク質発現を誘導した。15℃ で一晚インキュベートした後、細胞を遠心分離により回収した。

【0139】

インテインタグのキチン結合ドメイン (CBD) により、キチンビーズカラム上での融合タンパク質のアフィニティ精製が可能になる (New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー))。Tte-UvrD ヘリカーゼは最初にキチンカラムおよび実施例 I に詳細に記載したプロトコルを用いて精製した (UvrD および MutL 精製)。次に、Tte-UvrD は、1 mL ヘパリン TSK カラム (Pharmacia (ニュージャージー州ピスカタウェイ)) によってさらに精製した。Tte-UvrD を含む画分を SDS-PAGE により分析した。精製画分をプールし、保存バッファ (20 mM トリス-HCl (pH 8.2)、200 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、15 mM 2-メルカプトエタノール、50% グリセロール) に対して一晚透析した。最終濃度は、Bradford タンパク質アッセイ (Bradford Anal. Biochem. 72:248~254 (1976)) および SDS-PAGE を用いて決定した。

【0140】

2. 熱安定性ヘリカーゼ依存性増幅 (t-HDA)

精製した熱安定性 Tte-UvrD ヘリカーゼを、熱安定性 Bst DNA ポリメラーゼ ラージフラグメント (New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー)) とともに用いて、ゲノム DNA から高温で選択的に標的配列を増幅した。制限エンドヌクレアーゼ遺伝子 earIR を標的遺伝子として選択した (図 16 (配列番号: 10))。標的断片の末端ごとに 1 種類ずつ、高温にて標的配列にハイブリダイズできるように高い融点 (~75℃) を有する 2 種類のプライマーを設計した。反応バッファとプロトコルは、ゲノム DNA 増幅用に改変した。反応バッファは以下のとおり

である。10×ThermoPol 反応バッファ (New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー)) : 200mM トリス-HCl (pH 8.8)、100mM KCl、100mM (NH₄)₂SO₄、20mM MgSO₄、1% Triton X-100。

【0141】

以下のものを組み合わせることにより、35 μL の成分 A を作成した。

3.5 μL 10×ThermoPol バッファ

2 μL の 0.83 pM *Treponema denticola* ゲノム DNA

1 μL の 10 μM プライマー p5-76 (5' GGCCAGTTTGAATAAGAC
AATGAATTATT-3' (配列番号: 20))

1 μL の 10 μM プライマー p3-76 (5'-ATTTTGAACACAAGAA
TGGAAATGTGAAAG-3' (配列番号: 21))

2 μL 各 dNTP (10mM)

1.5 μL dATP (100mM)

24 μL の dH₂O

【0142】

以下のものを混合することにより、15 μL の反応成分 B を調製した。

1.5 μL 10×ThermoPol バッファ

2.6 μL Bst DNA ポリメラーゼ、ラージフラグメント (8 ユニット/μL)

1 μL UvrD-tte ヘリカーゼ (100 ng/μL)

0.9 μL T4 Gp32 (5 μg/μL)

9 μL dH₂O

【0143】

HDA 反応は、成分 A を 95℃ で 2 分間加熱して鋳型を変性させることにより開始した。次に成分 A を 60℃ まで冷却し、60℃ で 3 分間維持してプライマーをアニールさせた。15 μL の作りたての成分 B を、変性とアニーリング工程を終えた後の 35 μL の成分 A に加えた。反応を 60℃ でさらに 1 時間行い、12.5 μL の停止バッファ (1% SDS、0.05M EDTA、30% グリセロール、0.2% プロモフェノールブルー) を添加することにより停止した。増幅産物は、TBE バッファおよび臭化エチジウム中、2% GPG LMP アガロースゲル上で可視化した。増幅された DNA の大きさは、予想される標的大きさ 82 bp に一致する (図 12)。

【0144】

(実施例 XIIII)

t-HDA による *Neisseria gonorrhoeae* からの特定配列の増幅および検出方法

本実施例においては、異なる細菌ゲノム *Neisseria gonorrhoeae* からの特定の標的配列の増幅および検出方法を開示する。*N. gonorrhoeae* は、最も一般的な性感染症の一つである淋病の原因となるヒトの病原体である。*N. gonorrhoeae* ゲノム DNA は、American Type Culture Collection (ATCC No. 700825、(バージニア州マナサス)) より購入した。標的配列 (CATATGTAAACAGCAGGTCAGGCCATATCCAA
TATTCCACAAAATGCCAGTAATAATGAATTACTGAAAAATC
AGCGATAAAACACGCCGTATGTTG (配列番号: 22)) の各末端に対して 1 つずつの 2 種類のプライマーを、~78℃ の融点を有するように合成した。反応バッファおよびプロトコールは、ゲノム DNA 増幅用に改変した。反応バッファは、10×ThermoPol 反応バッファ (New England Biolabs Inc. (マサチューセッツ州ベバリー)) である。

【0145】

以下のものを組み合わせることにより、35 μL の成分 A を作成した。

3.5 μL 10×ThermoPol バッファ

2 μ L N. gonorrhoeae ゲノム DNA (50 ng/ μ L)
 1 μ L の 10 μ M プライマー H153 (5' - CATATGTAACAGCAGGTC
 AGGCCATAT - 3' (配列番号: 23)
 1 μ L の 10 μ M プライマー H154 (5' - CAACATACGGCGTGTTTT
 ATCGCTGAT - 3' (配列番号: 24)
 2 μ L 各 dNTPs (10 mM)
 1. 5 μ L dATP (100 mM)
 24 μ L dH₂O

【0146】

以下のものを混合することにより、15 μ L の反応成分 B を調製した。

1. 5 μ L 10 $\times$ ThermoPol バッファ
2. 6 μ L Bst DNA ポリメラーゼ、ラージフラグメント (8 ユニット/ μ L)
- 1 μ L UvrD-tte ヘリカーゼ (100 ng/ μ L)
- 0.9 μ L T4 Gp32 (5 μ g/ μ L)
- 9 μ L dH₂O

【0147】

HDA 反応は、成分 A を 95 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱して鋳型を変性させることによって開始した。次に成分 A を 60 $^{\circ}$ C に冷却し、60 $^{\circ}$ C において 3 分間維持してプライマーをアニールさせた。15 μ L の作りたての成分 B を、変性とアニーリング工程を行った後の 35 μ L の成分 A に加えた。反応は 60 $^{\circ}$ C でさらに 1 時間続け、12.5 μ L の停止バッファ (1% SDS、0.05 M EDTA、30% グリセロール、0.2% ブロモフェノールブルー) を添加することにより停止させた。増幅産物は、TBE バッファおよび臭化エチジウム中、2% GPG LMP アガロースゲル上で可視化した。Tte-UvrD ヘリカーゼ、Gp32 SSB、および Bst DNA ポリメラーゼのラージフラグメントの存在下において、ゲル上の 95 bp 付近に優勢なバンドが観察され、これは予想される標的の大きさに一致していた (図 13、レーン 1)。Gp32 SSB を平行反応において除去したところ、95 bp の産物が観察され (図 13、レーン 2)、この HDA 系に対しては一本鎖 DNA 結合タンパク質が必要でないことが示唆された。Tte-UvrD ヘリカーゼを反応系に含めない場合、増幅は全く観察されず (図 13、レーン 3)、このことから本反応がヘリカーゼ依存性増幅であることがさらに確認された。本実施例は、HDA が、DNA ヘリカーゼ活性と DNA ポリメラーゼ活性の最低限の 2 つの酵素活性しか必要としないことを実証するものである。

【0148】

(実施例 XIV)

試料中の病原体細菌の標的配列のリアルタイム検出

HDA は、他の技術と組み合わせて、一塩基変異多型 (SNP) の決定などのゲノムの類別や、感染性物質の同定などのためにも用いることもできる。例えば、HDA は、蛍光標識した LUX (商標) プライマー (Invitrogen Corporation、カリフォルニア州カールスバッド) や、リアルタイム蛍光検出系 (iCycler、Bio-Rad Laboratories Inc. カリフォルニア州ヘラクレス) などの他の核酸検出方法と組み合わせて、リアルタイムで標的配列を増幅および検出するために用いることもできる。本実施例では、細菌病原体 *Treponema denticola* (ATCC No. 35405) における、HDA 法および UvrD HDA 系を用いた、標的配列 (図 16 (配列番号: 10) のリアルタイム増幅および検出を開示する。蛍光標識したプライマー、プライマー 175-LUX (5' c a c a t t t T G A A A C A C A A G A A T G G A A A T G T G 3' (配列番号: 25)) は、標的配列 (図 16 (配列番号: 10)) に基づいて特注し、Invitrogen Corporation より入手した。反応バッファは予め調製しておいた。10 $\times$ HDA バッファ A は 350 mM トリス-酢酸 (pH 7.5) と 100 mM DTT を含む。10 $\times$ HDA バッファ B は、10 mM トリス-酢酸 (pH 7.5) と、1 mg/mL BSA と、100 mM 酢酸マグネ

10

20

30

40

50

シウムとを含む。

【0149】

リアルタイムHDA反応の再現性を調べるために、2つの平行反応を行った（図14、線1と線2）。各反応は、次のように構成した。

【0150】

以下のものを組み合わせることにより、20 μ Lの成分Aを作成した。

5 μ L 10 $\times$ HDAバッファA

1 μ Lの*Treponema dentico*laゲノムDNA（30 ng/ μ L）

2 μ Lの10 μ Mプライマー175-LUX（5' c a c a t t t T G A A A C A C A A G A A T G G A A A T G T G 3'（配列番号：25））

2 μ Lの10 μ Mプライマー175-Rev（5' G G C C A G T T T G A A T A A G A C A A T G 3'（配列番号：26））

2 μ Lの10 mM各dNTP

8 μ L dH₂O

【0151】

以下のものを混合することにより、30 μ Lの反応成分Bを調製した。

5 μ L 10 $\times$ HDAバッファB

1. 5 μ L 100 mM ATP

1 μ L exo⁻Klenow断片（5ユニット/ μ L）

0. 5 μ L UvrDヘリカーゼ（200 ng/ μ L）

0. 8 μ L MutL（800 ng/ μ L）

1. 2 μ L T4 Gp32（5 μ g/ μ L）

20 μ L dH₂O

【0152】

反応成分Aを95℃で2分間、その後37℃で1分間インキュベートした。作りたての成分Bを、37℃に冷却後の成分Aに加えた。反応は、iCycler（Bio-Rad）中、37℃で行った。増幅産物は、リアルタイムPCR機器であるiCycler（Bio-Rad）を用いて5分間隔で蛍光シグナル（FAMに対して490 nM）を測定することにより、リアルタイムで検出した。反応1および2からのシグナルは、40分後に増加し始め、50分前後にT_t（閾値の時間）と交差した（図14、線1と線2）。これらの2つの反応に対するT_t値は約50分であった。さらに、反応1および反応2から得られた曲線は非常に類似していることから、リアルタイムHDA反応の再現性は良好であることが示唆された。負のコントロールにおいて、蛍光シグナルはT_t線より下に止まっていた（図14、線3）。

【図面の簡単な説明】

【0153】

【図1】ヘリカーゼ置換増幅の模式図であり、（1）一本鎖DNAへのプライマーのアニーリングを示しており、（2）プライマーを伸長中のDNAポリメラーゼであり、1つの二本鎖から2つの二本鎖に増幅されており、（3）プロセスを繰り返して指数的な増幅を行っている様子を示している。

【図2-1】増幅産物を生産するための、プライマーを用いたオリゴヌクレオチドのHDA（ヘリカーゼ依存性増幅）の模式図。

【図2-2】図2-1によるHDA反応であり、HDA産物を3% LMPアガロースゲル（レーン1）上で解析し、レーン2はサイズマーカー（M）として用いたpBR322/MspIラダーを含んでいる。

【図3】標的配列を含む大きなDNA分子からの、HDAによる標的配列の選択的増幅の模式図であり、（4）は二本鎖DNA分離／プライマーアニーリングであり、（5）はポリメラーゼによるプライマー伸長であり、（6）はヘリカーゼによる巻き戻しとそれに続くプライマーアニーリングであり、（7）はDNAポリメラーゼによるプライマー伸長であり、および（8）は巻き戻し、アニーリングおよび伸長を示す。

【図4】DNAプラスミドからの様々な大きさの標的配列の増幅。HDA反応は、大腸菌UvrDヘリカーゼ、大腸菌MutL、T4 Gp32およびATPを含むUvrDヘリカーゼ調製物に加えて、ポリメラーゼ、2種のプライマー（1224および1233）、およびプラスミドpAH1に組み込んだ異なる長さの標的DNAを用いて行った。増幅産物は、3%LMPアガロースゲル上でのゲル電気泳動によって分析した。レーン1：110bp；レーン2：200bp；レーン3：300bp；レーン4：400bp；レーン5：650bpの長さの標的DNA。M：100bp DNAラダーサイズマーカー。

【図5-1】2つの異なるポリメラーゼを用いた細菌ゲノムDNAからの標的配列の増幅。

【図5-2】2つの異なるポリメラーゼを用いた細菌ゲノムDNAからの標的配列の増幅。標的の核酸は、T. denticolaゲノムDNAから、大腸菌UvrDヘリカーゼ、大腸菌MutL、T4 Gp32およびATPを含むUvrDヘリカーゼ調製物に加えて、2つの異なるポリメラーゼを用いて増幅した。増幅産物は、3%LMPアガロースゲル上でのゲル電気泳動によって分析した。図5-1は、DNAポリメラーゼIのexo⁻Klenow断片を用いたHDAであり、レーン1：プライマー58861およびプライマー58862を用いたHDAの産物。レーン2：プライマー58861およびプライマー58863を用いたHDAの産物。図5-2は、T7 Sequenaseとプライマー58861および58863を用いたHDA。レーン1：1.5ユニットのT7 Sequenase；レーン2：3.5ユニットのT7 Sequenase；および、レーンMはサイズマーカーとして使用した100bp DNAのラダーを示す。

【図6】ヒトゲノムDNAからの標的配列の増幅。HDA反応は、大腸菌UvrDヘリカーゼ、MutL、T4 Gp32、およびATPを含むUvrDヘリカーゼ調製物に加えて、ポリメラーゼ、2種のプライマー、およびヒトゲノムDNAを用いて行った。HDA産物は、3%LMPアガロースゲル上でのゲル電気泳動によって分析した。M：サイズマーカーとして使用した100bp DNAのラダー。初期量100ngのヒトゲノムDNAから得られたHDA産物（レーン1）、初期量150ngのヒトゲノムDNAから得られたHDA産物（レーン2）、初期量200ngのヒトゲノムDNAから得られたHDA産物（レーン3）。

【図7】cDNA合成と組み合わせた標的配列の増幅（RT増幅）。HDA反応をcDNA合成と組み合わせた。第1の鎖cDNA（RNA/DNAハイブリッド）を、大腸菌UvrDヘリカーゼ、MutL、T4 Gp32、およびATPを含むヘリカーゼ調製物に加えて、DNAポリメラーゼ、およびラットGAPDH遺伝子に特異的な2種のプライマーを用いたHDAによってさらに増幅した。増幅産物である、2μLの第1のcDNA鎖（レーン1）、4μLの第1のcDNA鎖（レーン2）を、3%LMPアガロースゲル上でのゲル電気泳動によって解析した。M：φX174 DNA-HaeIII DNAラダー。

【図8】細菌ゲノムDNAからの様々なコピー数の標的配列の増幅の感度。HDA反応は、大腸菌UvrDヘリカーゼ、MutL、T4 Gp32、およびATPを含むヘリカーゼ調製物に加えて、DNAポリメラーゼ、2種のプライマー（プライマー58861およびプライマー58862）、および様々な量のTreponema denticolaゲノムDNAを用いて行った。増幅産物は、3%LMPアガロースゲル上でのゲル電気泳動により解析した。各HDA反応中に最初に存在していた単一のTreponema denticola染色体のコピー数を、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10および0というように大きい方から順に各レーンの上に示している。

【図9】事前変性を行わない細菌ゲノムDNAからの標的配列の増幅。HDA反応は、大腸菌UvrDヘリカーゼ、MutL、T4 Gp32、およびATPを含むヘリカーゼ調製物に加えて、DNAポリメラーゼ、2種のプライマー（プライマー58861およびプライマー58862）、およびTreponema denticolaゲノムDNAを用いて行った。HDA産物は、3%LMPアガロースゲル上でのゲル電気泳動により解析した。M：サイズマーカーとして用いたφX174 DNA-HaeIII DNAのラ

10

20

30

40

50

ダー。

【図10】1つのヘリカーゼ（T7 Gp4Bヘリカーゼ）または2つのヘリカーゼ（UvrDヘリカーゼおよびT7 Gp4Bヘリカーゼ）を用いた2.3Kb標的DNAの増幅。HDA反応は、2種のプライマー（1224および1233）と、プラスミドpCR-Repとを用いて、T7 Gp4BヘリカーゼおよびT7 Gp2.5SSBを含むT7 Gp4Bヘリカーゼ調製物の存在下（レーン1）；T7 Gp4BヘリカーゼおよびUvrDヘリカーゼの両方を含むヘリカーゼ調製物の存在下（レーン2）；負のコントロールとしてヘリカーゼの非存在下（レーン3）で行った。M：サイズマーカーとして用いた2-log DNAラダーである。HDAの産物は、1%ゲル電気泳動によって示されている。

10

【図11】RecBCDヘリカーゼを用いた400bp標的DNAの増幅。HDA反応は、RecB^{D1067A}CDヘリカーゼ、T4 Gp32およびATPを含むRecBCDヘリカーゼ調製物に加えて、ポリメラーゼ（T7 Sequenase）、2種のプライマー（1224および1233）、および標的DNAを用いて行った。HDA産物の1%アガロースゲル上でのゲル電気泳動を示したが、レーン2はRecB^{D1067A}CDヘリカーゼとT7 Sequenaseの両方を含むヘリカーゼ調製物からの増幅産物を示し、レーン3は、ヘリカーゼを使わない負のコントロールである。マーカー：サイズマーカーとして用いた2-log DNAのラダー（NEB）。

【図12】熱安定性HDAによる細菌ゲノムDNAからの標的配列の増幅。HDA反応は、熱安定性Tte-UvrDヘリカーゼ、T4 Gp32、およびdATPを含むヘリカーゼ調製物に加えて、熱安定性Bst DNAポリメラーゼ、2種のプライマー、およびT. denticolaゲノムDNAを用いて行った。増幅産物は、2%LMPアガロースゲル上でのゲル電気泳動によって解析した。M：サイズマーカーとして用いた100bp DNAのラダー（NEB）。レーン1：82bp産物。

20

【図13】いくつかまたは全てのアクセサリタンパク質の非存在下での、熱安定性ヘリカーゼによる、Neisseria gonorrhoeaeのゲノムDNAからの標的配列の増幅。HDA反応は、様々なヘリカーゼ調製物に加えて、熱安定性Bst DNAポリメラーゼ、2種のプライマー、およびNeisseria gonorrhoeaeゲノムDNAを用いて行った。1つ目のヘリカーゼ調製物は、熱安定性Tte-UvrDヘリカーゼ、T4 Gp32、およびdATP（レーン1）を含むものとする。2つめのヘリカーゼ調製物は、熱安定性Tte-UvrDヘリカーゼとdATP（レーン2）を含むものとする。コントロール反応においては、T4 Gp32およびATPを調製物中に共存させる（レーン3）。M：サイズマーカーとして使用した100bp DNAのラダー（NEB）。

30

【図14】口腔病原体、T. denticolaのHDA法によるリアルタイム検出。HDA反応は、大腸菌UvrDヘリカーゼ、MutL、T4 Gp32、およびATPを含むUvrDヘリカーゼ調製物に加えて、DNAポリメラーゼ、T. denticolaゲノムDNA、蛍光標識LUXプライマー（Invitrogen）、およびリバースプライマーを用いて行った。増幅産物は、リアルタイムPCR機器iCycler（Bio-Rad）を用いてFAM蛍光シグナルを測定することによってリアルタイムで検出した。1および2：ゲノムDNA、プライマー、およびUvrD HDA系の存在下でHDAを行った2つの同一の反応。3：ゲノムDNAを存在させないこと以外は1および2と同様に行ったHDA（負のコントロール）。

40

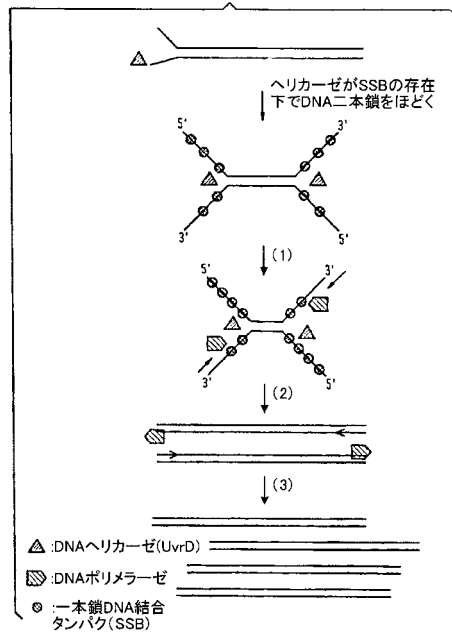
【図15-1】プラスミドpAHIの配列（配列番号：9）。

【図15-2】プラスミドpAHIの配列（配列番号：9）。

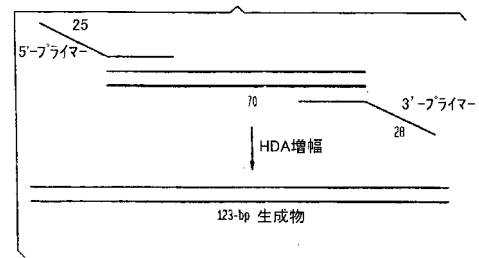
【図15-3】プラスミドpAHIの配列（配列番号：9）。

【図16】earRI遺伝子T. denticolaの配列（配列番号：10）。

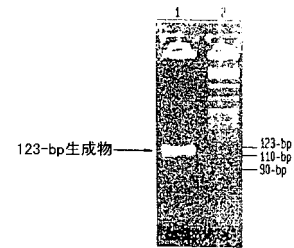
【図 1】



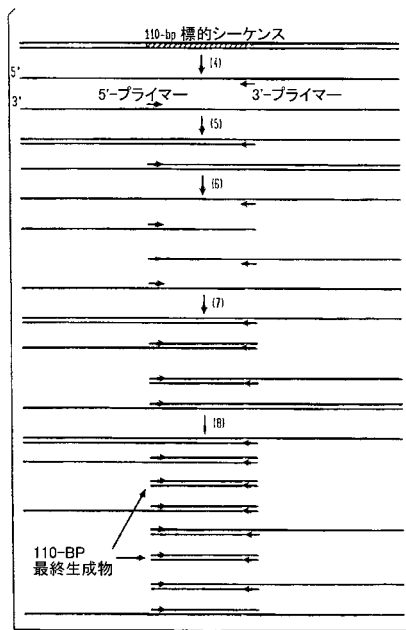
【図 2 - 1】



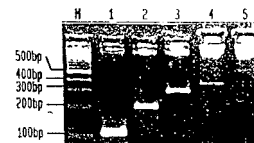
【図 2 - 2】



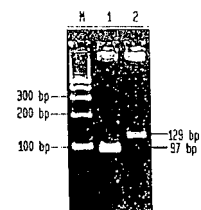
【図 3】



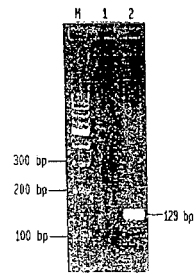
【図 4】



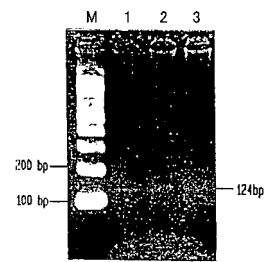
【図 5 - 1】



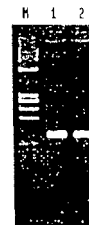
【図 5 - 2】



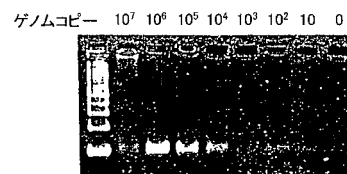
【図 6】



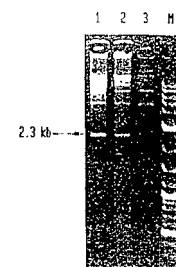
【図 7】



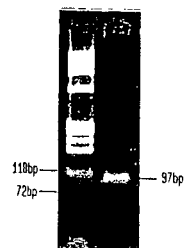
【図 8】



【図 10】



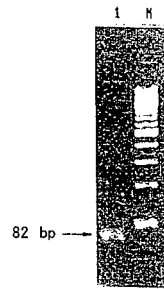
【図 9】



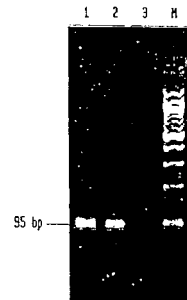
【図 11】



【図 1 2】



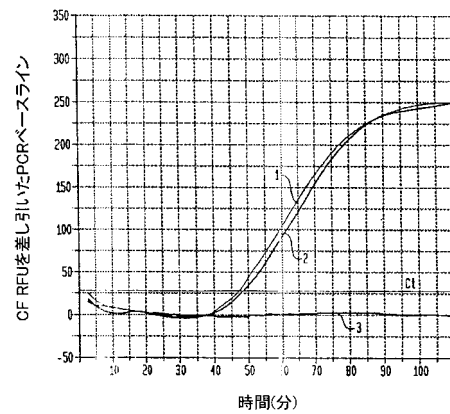
【図 1 3】



【図 15-1】

[illegible]

【図 14】



【図 15-2】

[illegible]

【図 15-3】

CATGACATTAACTATAAAATAGCGTATCAGAGGCC
TTTCGTC

【図 16】

```
ATGAGTAGCGGTGAGTAAAAATCAACAAATATTTCTA  
GAATGAGGAATTAAACCAATGATGCTTATGTTGCTTAT  
GTATGTGTACAATGTAAACAAATGATATGATAAATATGG  
ACAAAAATTTATGATGCAAGGAGCTTTATGAACACAA  
GATGGAAATGTGAAGATGTGGATTTTACATAGTAAGA  
ATAATTCATGTGCTTTATTCAACTGGCCAGAGAAAGTAA  
AGGAAGGCTTCTATTCCTGTACAAAGATTTGGCAAGCTTT  
TTTAGAGTATATACAGCAATAAAGAGCATATGGAAA  
CAATGTAAATGTTGTGGAAATATTAACCATTTCCGCAAT  
TACGAGGCATATGTTTTGGCCCTCTGAAGAGCAATG  
GATGTAGAGCTGTAAAGGAGTGAATGTCATTTTAA  
ATCCAGAGAGACAGAGATCAATTAGAGAGTCAATGT  
TAGAGAGCTGTGCGGATTTGTTGTAAGAAAGCAAT  
AAATCTAAGATGATGGATTTATTAAGATTTATTTAAACG  
TTTGGTTCAAGTGTCTTAAAGCAAGAAATATCTAAATA  
TTGATGATAGAAATCTTGGCTATAGATCATATTTACCA  
TCAAAATCTTTATCTCTGTACAAAGAAATGCTGCCT  
ATTATCTGTAGAGCTAATTCGAATAAAGAGATGCTGG  
CCTCAGAAATTTATACAAATATGAATTAATAGAACTTGC  
TACAAATACAGAGCTGATTTACAATTTATCAAAATAGAA  
CAGCTATATAGAGTCAATCTTACTGATGAGGATATAAT  
CGAGCTATGAGATTAATTTGCTGTGCTGGAATTCAAA  
CCTTGAGAGCGAGTACGTGAATTAAGAAATCATATA  
GACTATCAATTAAGGATAAATATCGAAAGCAGACACA  
ATTTACTTGGTTATCTTAA
```

【配列表】

0004632788000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ヴィンセント, ミリアム
スイス国, 8046 チューリッヒ, シャウエンベルグストラッセ 11
(72)発明者 シュー, ヤン
アメリカ合衆国, 01982 マサチューセッツ州, ハミルトン, タリー ホ ドライヴ 24

審査官 小暮 道明

- (56)参考文献 特表平09-510351 (JP, A)
特開平10-004985 (JP, A)
国際公開第99/037820 (WO, A1)
国際公開第00/041524 (WO, A1)
J.Biol.Chem., 273[15](1998) p.9197-9201

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