

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5757885号
(P5757885)

(45) 発行日 平成27年8月5日(2015.8.5)

(24) 登録日 平成27年6月12日(2015.6.12)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 Q 1/68 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00
C 12 Q 1/68 Z N A A

請求項の数 13 (全 90 頁)

(21) 出願番号 特願2011-554206 (P2011-554206)
 (86) (22) 出願日 平成22年3月11日 (2010.3.11)
 (65) 公表番号 特表2012-520080 (P2012-520080A)
 (43) 公表日 平成24年9月6日 (2012.9.6)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2010/027011
 (87) 國際公開番号 WO2010/105074
 (87) 國際公開日 平成22年9月16日 (2010.9.16)
 審査請求日 平成25年3月11日 (2013.3.11)
 (31) 優先権主張番号 61/202,565
 (32) 優先日 平成21年3月12日 (2009.3.12)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 501442345
 ブランディーズ・ユニバーシティ
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州O 2 4
 5 4 - 9 1 1 O, ウォルサム, サウス・ス
 トリークト 4 1 5
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁
 (72) 発明者 ワン, ローレンス, ジェイ.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 4 6 6, オーバンデール, ダッフィール
 ド ロード 2 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PCR用の試薬および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

プライマー依存DNA增幅反応用の反応混合物であって、少なくとも1つのプライマーペア、DNAポリメラーゼ、dNTP、少なくとも1つの標的配列、および少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤を含み、前記少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤は、6～50のヌクレオチド長の長さのハイブリッドを有し、32で少なくとも50%が二本鎖であり、その鎖のそれぞれに末端領域を有し、かつそれぞれ異なる末端領域に共有結合的に結合される、1～4つの修飾基を含み、前記修飾基は、ダブシリル(Dabcy1)、ジゴキシゲニン、クマリン、およびQSY21から選択される、添加剤であり、前記少なくとも1つの添加剤は、前記少なくとも1つの標的配列のためのプライマーまたはプローブではなく、前記少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤は、ミスプライミングの抑制、完全に相補的でない陥凹3'末端配列を有するハイブリッドに対するポリメラーゼ選択性の増加、AT豊富の陥凹3'末端配列を有するハイブリッドに対するポリメラーゼ選択性の増加、反復反応間のばらつきの減少、ポリメラーゼ5'エキソヌクレアーゼ活性の阻害、およびポリメラーゼ活性の阻害の機能のうちの少なくとも1つについて効果的である、前記DNAポリメラーゼの濃度に対する濃度で含まれる、反応混合物。

【請求項2】

前記少なくとも1つの修飾基は、2～4つの修飾基である、請求項1に記載の増幅反応混合物。

【請求項 3】

前記修飾基は、前記少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤の末端ヌクレオチドに共有結合的に連結される、請求項1または2に記載の増幅反応混合物。

【請求項 4】

前記修飾基は、ダブシリル(D a b c y 1)である、請求項1～3のいずれかに記載の増幅反応混合物。

【請求項 5】

前記少なくとも1つの添加剤は、2つの添加剤の混合物である、請求項2に記載の増幅反応混合物。

【請求項 6】

前記混合物は、3本の鎖から成る、請求項5に記載の増幅反応混合物。 10

【請求項 7】

前記少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤は、天然のヌクレオチドから成る、請求項1～6のいずれかに記載の増幅反応混合物。

【請求項 8】

前記少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤は、DNAである、請求項1～6のいずれかに記載の増幅反応混合物。

【請求項 9】

前記少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤の前記濃度は、1000nM以下である、請求項1～8のいずれかに記載の増幅反応混合物。 20

【請求項 10】

逆転写酵素をさらに含む、請求項1～8のいずれかに記載の増幅反応混合物。

【請求項 11】

前記少なくとも1つの二本鎖添加剤は、1～4つの一本鎖オーバーハングを含む、請求項1に記載の増幅反応混合物。

【請求項 12】

前記少なくとも1つの二本鎖添加剤は、ハイブリッド形成されない時、ステムループ構造を形成する少なくとも1本の鎖を含む、請求項1～11に記載の増幅反応混合物。

【請求項 13】

少なくとも1つのDNA標的配列を増幅するための方法であって、プライマーアニーリング温度およびプライマー伸長温度を有するプライマー依存DNA増幅反応に、請求項1～12のいずれか1項に記載の増幅反応混合物を供すること、を含む、方法。 30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

関連特許出願の相互参照

本出願は、Zhangへの、2009年3月12日に出願された米国仮特許出願第61/202,565号の利益を主張するものとし、参照によりその全体が本明細書に援用される。

技術分野

リアルタイムおよびエンドポイントの両方の、均質ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)単一および多重増幅アッセイを含む、核酸増幅反応およびアッセイを提供する。 40

【背景技術】**【0002】**

核酸標的配列の増幅および検出のために、DNAプライマーおよびDNAポリメラーゼを使用する増幅および増幅アッセイは、周知である。指標関数的増幅の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、鎖置換増幅(SDA)、核酸配列ベースの増幅(NASBA)、転写媒介増幅(TMA)、およびローリングサークル型増幅(RCA)を含む。PCR等の特定のこれらのプライマー依存増幅法は、熱サイクルを含み、一方、NASBA等の他の増幅は、等温である。多くのDNAポリメラーゼの中で通常使用されるものは、好熱

菌DNAポリメラーゼ(Taqポリメラーゼ)および逆転写酵素である。直鎖DNAオリゴヌクレオチド増幅プライマーの設計は、一般的に、その目的のために設計されたコンピュータプログラムの補助により達成される。入手可能なプログラムの中で利用することができるものは、PRIIDE(Haas et al., Nucl. Acids Res. 26:3006-3012 1998)、OLIGO(Rychlik et al., Nucl. Acids Res 17(21):8543-51 1989)、OSP(Hilber et al., OSP:a computer program for choosing PCR and DNA sequencing primers. PCR Methods Appl. 1(2):124-128 1991)、Prim o(Li et al., Genomics 40(3):476-85 1997)、およびPrimer Master(Proutski et al., Comput Appl. Biosci 12(3):253-5 1996)である。
10

【0003】

PCRを利用する核酸増幅は、周知であり、PCR増幅を含むアッセイも同様である。米国特許第4,683,202号、第4,683,195号および第4,965,188号、ならびに一般的に、PCR PROTOCOLS, a guide to Methods and Applications, Innis et al. eds., Academic Press(San Diego, CA(USA)1990)を参照のこと。未結合検出素子試薬またはプローブを除去するための洗浄を必要とせず、したがって、増幅反応槽の開口なしに実施することができる均質PCRアッセイも、周知である。均質PCRアッセイは、増幅された産物が、増幅反応の終了時に検出されるエンドポイントアッセイと、反応が進行するにつれ、増幅された産物が、幾つかの、または全ての熱サイクル中に検出されるリアルタイムアッセイとの両方を含む。米国特許第5,994,056号、第5,487,972号、第5,925,517号、および第6,150,097号を参照のこと。
20

【0004】

PCR増幅反応は、上に参照する他の増幅法と同様に、一般的に、対称であるように設計される、つまり、「一致する」順方向プライマーおよび逆プライマーを利用することにより、二本鎖アンプリコンを作製する、つまり、これらは、可能な限り近い融解温度を有し、等モル濃度で反応物に添加される。PCR反応で、直接一本鎖DNAを作製するための限られた用途を見出す技法は、「非対称PCR」である。Gyllensten and Erlich, "Generation of Single-Stranded DNA by the Polymerase Chain Reaction and Its Application to Direct Sequencing of the HLA-DQA Locus," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:7652-7656(1988)、および米国特許第5,066,584号。非対称PCRは、プライマーの1つが、限定量、典型的には、他方のプライマーの濃度の1~20パーセントで添加されるという点で、対称PCRと異なる。
30

【0005】

最近開発された非対称PCR増幅法は、「指数後直線的(Linear-After-The-Exponential)」PCR、または略して「LATE-PCR」として知られる。Sanchez et al.(2004)PNAS 101:1933-1938, Pierce et al.(2005)PNAS 102:8609-8614、および参照によりその全体が本明細書に援用される、公開された国際特許出願第WO 03/054233号(2003年7月3日)を参照のこと。LATE-PCRは、 $T_m^{[0]}$ と称される、増幅の開始時の、実際の濃度調節されたPCRプライマーの融解温度を考慮する。 $T_m^{[0]}$ は、非天然ヌクレオチドが使用される時に必要である際に、経験的に決定されるか、または計算することができる。種々の蛍光プローブが、LATE-PCRで使用することができ、特に、標的に結合しない時に接近し、よって一端にフルオロフォア、そしてもう一端にクエンチャーを相互に近くに持ってくることができるステムループ
40

構造を形成することができる一本鎖である分子指標；一端にフルオロフォア、そしてもう一端にクエンチャーを有する直鎖一本鎖プローブ；標的配列上で隣接的にハイブリッド形成する2つの標識された一本鎖プローブであり、FRETによる、それらの標識にプローブ間でのエネルギーの通過を可能にするFRETプローブ対；DNA色素とFRETする、フルオロフォア標識された直鎖状プローブ；およびフルオロフォアが、標的に結合する鎖上にあり、クエンチャーが、標的の不在下で対応するTmのプローブに結合する相補鎖上にある、直鎖二本鎖プローブを含む。

【0006】

望ましくない対称PCR增幅の特色は、増幅の対数期後、リアルタイムでの反復増幅を監視することにより得られる蛍光曲線が、分散し、異なるレベルで平坦域に達することである。ばらつきは、反復が、同じ反応効率を有さず、検出精度を低下させることを示す。これは、一般的に、PCRアッセイにおいて問題であるが、エンドポイントアッセイの場合において、特に望ましくない。反復間でのばらつきは、かなり減少するが、両方とも、対数期および線形位相を有する、LATE-PCRアッセイおよび非対称PCRアッセイにおいて、それでも存在する。線形位相でのばらつきは、ある程度、制限プライマーがなくなった時の指数関数的増幅の終了時の平坦域のばらつきを反映する。

【0007】

PCR増幅を含む、プライマー依存増幅反応での別の重大な问题是、ミスプライミングであり、我々は、それが幾つかの個別のタイプにより表されると考える：タイプ1は、増幅の開始前の反応混合物の調製中に生じるミスプライミング、タイプ2は、温度（PCR増幅において、任意の熱サイクルでの温度を意味する）が、何らかの理由で、プライマーの融解温度未満に低下した場合、増幅中に生じるミスプライミング、およびタイプ3は、高濃度のアンプリコンが作製された後に継続される、PCR増幅を含む、増幅の後期に生じるミスプライミングである。タイプ3のミスプライミングが、LATE-PCRおよび非対称反応で生じる時、一本鎖アンプリコンの3'端は、別のss-DNA分子上でプライミングされ、これによってss-DNAをds-DNAに変換する。反応中のミスプライミングも、反復実感反応間でのばらつきをもたらす。ミスプライミングは、プライマー-ダイマー形成を含み、これは、増幅のあらゆる段階中に生じ得る。

【0008】

タイプ1のミスプライミングに対処するために、幾つかのアプローチが使用されている。アプローチの1つは、95等の高温に加熱されるまで不活性であるように、ポリメラーゼを化学的に修飾することである。米国特許第5,677,152号および第5,773,258号を参照のこと。別のアプローチは、抗体をポリメラーゼに結合して、反応が95等の高温に加熱されて、抗体を不可逆的に変性させるまで、ポリメラーゼを阻害することである。米国特許第5,338,671号を参照のこと。化学的に修飾され、抗体結合されたDNAポリメラーゼは、通常、「温態始動」DNAポリメラーゼと称される。さらに別の「温態始動」アプローチは、反応混合物にアプタマーを含むことである。Dough and Jayasena(1996), J. Mol. Biol. 264:268-278、および米国特許第6,020,130号を参照のこと。アプタマーは、ポリメラーゼに結合し、低温で陥凹3'端を伸長するその能力を阻害する、長さが約30のヌクレオチドである、一本鎖オリゴヌクレオチドである。アプタマーは、PCRサイクルにおいて典型的な高温である95で、不可逆的に変性されない。Appendorf-5Prime, Inc.は、温度依存様式でTaqポリメラーゼに結合し、約50より低い温度で、二本鎖DNAへのその結合を阻害すると言われる特許リガンドを市販する。これらの多くの試みにも関わらず、ミスプライミングは、なお、PCR増幅で問題となっている。

【0009】

PCR増幅を含む、プライマー依存増幅反応中の別のタイプのミスプライミングは、プライマー-ダイマー形成およびプライマー-ダイマー増幅として知られる。この現象によると、1つのプライマーは、他のプライマーまたはそれ自体の別のコピーとハイブリッド

10

20

30

40

50

形成し、その後、3'端の伸長を受けて、小さい二本鎖アンプリコンを生成し、これは、次いで、さらに増幅するか、または多量体化し、さらに増幅することができる。プライマー-ダイマー形成は、標的の不在下で生じる。

【0010】

PCR増幅を含む、増幅反応の定量分析は、リアルタイム検出法により可能になった。PCR増幅において、蛍光シグナルが、反応の閾値サイクル、または C_T 以上で可視になるPCRサイクルは、開始標的濃度を示す。エンドポイント分析は、反応が指数関数的増幅を出ると、反復間である程度分散するため、せいぜい半定量的である。二本鎖アンプリコンの電気泳動分析は、半定量的であり、蛍光的に標識されたプライマーを利用してよい。対立遺伝子識別プローブまたはミスマッチ寛容性プローブのいずれかの蛍光的に標識されたプローブを利用するエンドポイント分析も、せいぜい半定量的である。ばらつきを低減し、一本鎖産物を產生することにより、LATE-PCRは、エンドポイント分析において、顕著な改善を提供するが、反復間のばらつきは、多くの場合、完全に排除されず、所望より定量的および多重検出の精度が低く、問題を残す。10

【0011】

単一反応におけるプライマーの複数対の使用は、幾何学的に、多数の意図しないプライマーおよび標的配列、または存在するかもしれない他のDNA鎖の相互作用の可能性を増大させるため、多重PCRアッセイの設計および構築は、多くの場合、ミスプライミングの問題に遭遇する。実際、対称多重PCRアッセイにおいて、同じ融解温度を有するように、全てのプライマー対を設計すること、また、非対称またはLATE-PCR多重PCRアッセイにおいて、単一の融解温度を有するように制限プライマーの全てを、および单一融解温度を有するように過剰プライマーの全てを設計することは、非常に困難である。したがって、多重PCRアッセイにおいて、1つ以上の熱サイクルに使用される特定のアニーリング温度が、プライマーの全ての対に最適である可能性は高くないということになる。PCRサイクルのプライマーアニーリングステップが、最低 T_m プライマーのハイブリッド形成を可能にするように設定される場合、反応は、より高い T_m ではプライマーの厳密性を低下させ、これは、ミスプライミングが生じる確率を増加させる。その上、LATE-PCRアッセイにおいて、使用される制限プライマー（単一または多重に関わらず）は、典型的に、過剰プライマーの融解温度よりも5°C以上高い融解温度を有し、ここでも、単一プライマーのアニーリング温度を両方のプライマーの融解温度に一致させることは不可能となる。20

【0012】

PCR増幅を含む、プライマー依存増幅におけるDNAポリメラーゼの1つの性質は、選択性の公称量、具体的には、プライマーに完全に相補的である標的配列と、プライマーの3'末端ヌクレオチドでのミスマッチを除き、完全に相補的である配列とを識別する公称能力である。変異を受ける標的ヌクレオチドに相補的であるそれらの3'末端ヌクレオチドを有するプライマーを設計することにより、單一ヌクレオチド変異またはSNPを検出するために、この公称選択性を利用することが試されている。増幅不応性変異システム(ARMS)として知られる増幅アッセイ法は、これを行うための試みである(Newton et al., Nucl. Acids Res. 17, 2503-2516 (1989)、Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2757-2760 (1989))。ARMSアッセイは、ミスプライミングおよびプライマー-ダイマー形成により、偽陽性シグナルを生成する傾向がある。特定のミスプライミング事象は、3'ミスマッチのヌクレオチドが存在するという、不適切にハイブリッド形成されるプライマーを含む場合がある。プライマー-ダイマー形成も、ミスマッチの3'ヌクレオチドを含む場合がある。LATE-PCR増幅の最後の段階において、反応混合物中の別の一本鎖上の一本鎖アンプリコンのミスプライミングも、ミスマッチの3'ヌクレオチドを含む場合がある。したがって、3'末端ミスマッチに対するポリメラーゼの識別の強化は、その他の作用の中でも、ミスプライミングを低減させることができる。増幅プライマー自体をより選択性的にすることにより、前述の公称選択性以上に増幅中の選択性4050

を改善するための試みがなされている。例えば、*Tyagi*らは、プライマーの3'端に相補的な配列をプライマーの5'端に付加して、ループとステムの3'部分が標的鎖に相補的であるステムループ構造を形成した(米国特許第6,277,607号)。このアプローチは、上述の、多重アッセイのプライマーを設計する困難さを低減しないようである。プライマーをより選択的にすることは、言うまでもなく、DNAポリメラーゼの選択性を改善しない。

【0013】

選択性を改善するための、プライマー修飾の代替案は、DNAポリメラーゼ自体に影響を与えることである。米国特許出願第U.S.11/242,506号は、PCR增幅反応における産物特異性をある程度改善し、ミスプライミングの作用を大きく低下させる、または幾つかの場合において、事実上それを排除する試薬添加剤のクラスを記載している。このクラスの試薬は、温度がステムの融解温度以下に低下する時、ステムおよびループを有するヘアピン構造の中に折り畳むことができる、單一オリゴヌクレオチド分子から成る。二本鎖ステムは閉鎖されるが、3'端および5'端のヌクレオチドは、ほどかれる傾向がある。したがって、これらの添加試薬は、端を閉鎖したままとするように、それらの3'端および5'端の両方で、化学的に修飾される。本方式での端閉鎖は、ステムの融解温度を効果的に上昇させる。閉鎖構造において、これらの試薬添加剤は、選択性を改善するよう、DNAポリメラーゼと相互作用する。閉鎖構造において、これらは、DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性も阻害する。これらの添加剤は、全種類のPCRにおいて、既存の「温態始動」方法より優れており、多数のサイクル(典型的に60サイクル以上)を有する反応の早期およびLATE-PCR反応中の両方で、プライマー-ダイマーおよびミスプライミングされたアンプリコンを含む、望まない産物の蓄積を防ぐために使用することができるが、これらは、それらが單一オリゴヌクレオチドから成ることに由来するそれらの制限がある。具体的には、ステムの長さは、約12ヌクレオチド以上であってはならない、なぜなら、それ以上であり、かつその端で化学的に修飾もされる場合、融解温度が非常に高くなり、PCRが伸長温度に加熱される時、容易に開放しないためである。低濃度で添加される時でさえ、長いステムおよび高Tmを有するヘアピン分子は、反応を阻害する傾向がある。これらの添加剤に由来するさらに別の問題は、これらが、直線的に対称ではないことである、すなわち、閉鎖ヘアピンの一端が開放であり、一方、もう一端がループである。米国特許出願第U.S.11/242,506号に記載されるように、3~22のヌクレオチドから成るループを有する分子は、ループが三炭素または六炭素リンカーの使用により形成される分子より、容易に増幅を阻害する傾向がある。構造的に端から端まで対称である試薬を有することが望ましいであろう。

【0014】

Kainz et al. (2000) Biotechniques 28: 278-282は、長さが16~21のヌクレオチドを有するDNA断片、二本鎖DNAオリゴヌクレオチドが、対称PCR反応の最適なアニーリング温度で、またはそのちょうど下で生じるミスプライミングを阻害し、それにより非特異的産物の増幅を阻止できることを報告した。DNAオリゴマーは、PCRサイクルの融解ステップ中に、可逆的に変性される。全ての場合において、*Kainz*らが利用したアッセイは、温度が、95°での第1の融解事象後、最適なアニーリング温度に低下する時に起こるミスプライミングの存在、およびその阻害を明らかにした。これは、*Kainz*らが認めるように、タイプ1のミスプライミングに対処せず、これらのデータは、タイプ1のミスプライミングが生じる時(つまり、反応のアニーリング温度より5°を超えて低い融解温度で)にのみ二本鎖である二本鎖断片が、ミスプライミングを阻止できないことを明らかにする。*Kainz*らから、上に説明するように、プライマーの全ての対において、アニーリング温度を同時に最適化することができないため、これらの方法が、多重反応において、さらに不確かである可能性があるだろうと推測する。*Kainz*らは、彼らの特定の実験では観察しなかったが、二本鎖DNAオリゴヌクレオチドが、反応で、1つ以上のプライマーのハイブリッド形成の標的になる場合、ミスプライミングを引き起こす場合があることも認めた。

10

20

30

40

50

【発明の概要】**【0015】**

一実施形態は、プライマー依存DNA増幅反応、好ましくは、PCR増幅反応の反応混合物であり、少なくとも1つのDNA標的配列を増幅するためのDNAポリメラーゼによるプライマー伸長を含み、該反応混合物は、少なくとも1つのプライマー対、熱的に安定したDNAポリメラーゼ、およびdNTPを含み、改善点は、その鎖のそれぞれに末端領域を有し、6～50のヌクレオチド長の長さのハイブリッドを有し、32で少なくとも50%が二本鎖であり、かつそれぞれ異なる末端領域、好ましくは、末端ヌクレオチドに共有結合的に結合される、1～4つの修飾基、好ましくは、2つ、3つ、または4つの修飾基を含み、該修飾基は、非平面の巨大部分を有さない多環式部分である、少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤を、増幅の開始前の反応混合物に含めることを含み、該少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤は、ミスプライミングの抑制、完全に相補的でない陥凹3'末端配列を有するハイブリッドに対するポリメラーゼ選択性の増加、AT豊富の陥凹3'末端配列を有するハイブリッドに対するポリメラーゼ選択性の増加、反復反応間のばらつきの減少、ポリメラーゼ5'エキソヌクレアーゼ活性の阻害、およびポリメラーゼ活性の阻害の機能のうちの少なくとも1つについて効果的である濃度で含まれるが、ただし、添加剤が、任意の標的配列のプライマーまたは検出プローブである場合、少なくとも3つの修飾基を含むものとする。

【0016】

別の実施形態は、2つのこののような二本鎖添加剤の混合物を含む、前の段落に記載するような反応混合物である。

【0017】

別の実施形態は、添加剤が、該少なくとも1つの標的配列のためのプライマーまたはプローブである第1の鎖と、第1の鎖に部分的に相補的である逆相補体鎖とを含み、添加剤が、記載される修飾基のうちの3つを含む、上に記載するような反応混合物である。

【0018】

別の実施形態は、上に記載される反応混合物を使用する、DNA(cDNAを含む)標的のプライマー依存増幅、好ましくは、PCR増幅であり、必要に応じて、RNAを逆転写して、増幅されるDNA標的配列を得る。

【0019】

別の実施形態は、リアルタイムアッセイおよびエンドポイントアッセイの両方の均質検出アッセイであり、これは、増幅産物のこのようなプライマー依存増幅に加え蛍光検出を含む。

【0020】

別の実施形態は、上述のように、少なくとも1つのDNA標的配列、dNTP、熱的に安定したDNAポリメラーゼ、および少なくとも1つの修飾された二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤のためのプライマーを含む試薬キットである。

【0021】

別の実施形態は、均質に増幅反応産物を検出するための、少なくとも1つの蛍光検出試薬も含むそのような試薬キットである。

【0022】

別の実施形態は、これらの鎖のそれぞれに末端領域を有し、6～50のヌクレオチド長の長さのハイブリッドを有し、好ましくは40であるが、少なくとも32で少なくとも50%が二本鎖であり、かつそれぞれ異なる末端領域に、好ましくは、末端ヌクレオチドに共有結合的に結合される、2～4つの修飾基を含み、該修飾基は、非平面の巨大部分を有さない多環式部分であり、該修飾されたオリゴヌクレオチドは、DNAポリメラーゼの5'エキソヌクレアーゼドメインに結合することができる、修飾された二本鎖オリゴヌクレオチドである。

【0023】

10

20

30

40

50

別の実施形態は、少なくとも 1 つの D N A 標的配列を増幅するための D N A ポリメラーゼによるプライマー伸長を含む、プライマー依存 D N A 増幅反応混合物であり、該反応混合物は、少なくとも 1 つのプライマー対、D N A ポリメラーゼ、および d N T P を含み、改善点は、6 ~ 5 0 のヌクレオチド長の長さのハイブリッドを有し、3 2 で少なくとも 5 0 % が二本鎖であり、その鎖のそれぞれに末端領域を有し、かつそれぞれ異なる末端領域に共有結合的に結合される、1 ~ 4 つの修飾基を含み、該修飾基は、非平面の巨大部分を有さない多環式部分である、少なくとも 1 つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤を、増幅の開始前の反応混合物に含めることを含み、該少なくとも 1 つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤は、ミスプライミングの抑制、完全に相補的でない陥凹 3' 末端配列を有するハイブリッドに対するポリメラーゼ選択性の増加、A T 豊富の陥凹 3' 末端配列を有するハイブリッドに対するポリメラーゼ選択性の増加、反復反応間のばらつきの減少、ポリメラーゼ 5' エキソヌクレアーゼ活性の阻害、およびポリメラーゼ活性の阻害の機能のうちの少なくとも 1 つについて効果的である、該 D N A ポリメラーゼの濃度に対する濃度で含まれるが、ただし、添加剤が、任意の標的配列のプライマーまたは検出プローブである場合、少なくとも 3 つの修飾基を含むものとする。
10

【 0 0 2 4 】

別の実施形態は、増幅中にリアルタイムで、もしくは増幅後のエンドポイントのいずれかでの、反応の一本鎖産物、反応の二本鎖産物、または両方の、増幅および蛍光検出を含む増幅アッセイであり、反応の二本鎖産物は、蛍光 D N A 色素によって検出される、反応の一本鎖産物は、少なくとも 1 つの蛍光的に標識されたハイブリッド形成プローブによって検出される、または両方である。
20

【 0 0 2 5 】

別の実施形態は、その鎖のそれぞれに末端領域を有し、6 ~ 5 0 のヌクレオチド長の長さのハイブリッドを有し、3 2 で少なくとも 5 0 % が二本鎖であり、かつそれぞれ異なる末端領域に共有結合的に結合される、2 ~ 4 つの修飾基を含み、該修飾基は、非平面の巨大部分を有さない多環式部分であり、該修飾されたオリゴヌクレオチドは、D N A ポリメラーゼの 5' エキソヌクレアーゼドメインを阻害することができる、修飾された二本鎖オリゴヌクレオチドである。修飾された二本鎖オリゴヌクレオチドは、1 ~ 4 つの一本鎖オーバーハングを有してもよく、二本鎖オリゴヌクレオチド構造でハイブリッド形成されない時、ステムループ(ヘアピン)構造を形成する 1 または 2 つのいずれかの一本鎖を含んでもよく、この場合、ステムは、6 もしくはそれより少ない塩基対長である。
30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 6 】

【図 1】3 0 0 n M の濃度の添加剤 1 6 m e r A を利用する、実施例 1 に記載される L A T E - P C R 増幅の反復の融解曲線を表す。

【 0 0 2 7 】

【図 2】3 0 0 n M の濃度の添加剤 1 6 m e r B を利用する、実施例 1 に記載される L A T E - P C R 増幅の反復の融解曲線を表す。

【 0 0 2 8 】

【図 3】6 0 0 n M の濃度の添加剤 E P 0 4 9 を利用する、実施例 1 に記載される L A T E - P C R 増幅の反復の融解曲線を表す。
40

【 0 0 2 9 】

【図 4】1 0 0 n M の濃度の添加剤 E P 0 2 7 を利用する、実施例 1 に記載される L A T E - P C R 増幅の反復の融解曲線を表す。

【 0 0 3 0 】

【図 5】1 0 0 、 3 0 0 、 6 0 0 、および 1 0 0 0 n M の濃度の添加剤 E P 0 2 7 を利用する、実施例 1 に記載される L A T E - P C R 増幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての S Y B R G r e e n 蛍光のグラフである。

【 0 0 3 1 】

【図6】100nMの濃度の添加剤22merAおよび100nMの濃度の添加剤EP003を利用する、実施例2に記載されるLATE-PCR增幅の反復の融解曲線を表す。

【0032】

【図7A】600nMの全濃度および25/600/575nMの鎖濃度の三本鎖添加剤混合物EP043を利用する、実施例4に記載されるLATE-PCR增幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、SYBR Green蛍光のグラフである。

【0033】

【図7B】600nMの全濃度および50/600/550nMの鎖濃度の三本鎖添加剤混合物EP043を利用する、実施例4に記載されるLATE-PCR增幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、SYBR Green蛍光のグラフである。10

【0034】

【図7C】600nMの全濃度および75/600/525nMの鎖濃度の三本鎖添加剤混合物EP043を利用する、実施例4に記載されるLATE-PCR增幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、SYBR Green蛍光のグラフである。

【0035】

【図7D】600nMの全濃度および100/600/500nMの鎖濃度の三本鎖添加剤混合物EP043を利用する、実施例4に記載されるLATE-PCR增幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、SYBR Green蛍光のグラフである。

【0036】

【図8A】600nMの全濃度および25/600/575nMの鎖濃度の三本鎖添加剤混合物EP045を利用する、実施例4に記載されるLATE-PCR增幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、SYBR Green蛍光のグラフである。20

【0037】

【図8B】600nMの全濃度および50/600/550nMの鎖濃度の三本鎖添加剤混合物EP045を利用する、実施例4に記載されるLATE-PCR增幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、SYBR Green蛍光のグラフである。

【0038】

【図8C】600nMの全濃度および75/600/525nMの鎖濃度の三本鎖添加剤混合物EP045を利用する、実施例4に記載されるLATE-PCR增幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、SYBR Green蛍光のグラフである。30

【0039】

【図8D】600nMの全濃度および100/600/500nMの鎖濃度の三本鎖添加剤混合物EP046を利用する、実施例4に記載されるLATE-PCR增幅の反復に対する増幅サイクル数の関数としての、SYBR Green蛍光のグラフである。

【0040】

【図9A】添加剤なし、および65°のアニーリング温度を利用する、実施例5に記載されるLATE-PCR二重增幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、2つのプローブからの蛍光のグラフである。

【0041】

【図9B】400nMの濃度の添加剤EP020および65°のアニーリング温度を利用する、実施例5に記載されるLATE-PCR二重增幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、2つのプローブからの蛍光のグラフである。40

【0042】

【図9C】400nMの濃度の添加剤EP020および60.7°のアニーリング温度を利用する、実施例5に記載されるLATE-PCR二重增幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、2つのプローブからの蛍光のグラフである。

【0043】

【図9D】300nMの濃度の添加剤EP013および66°のアニーリング温度を利用する、実施例5に記載されるLATE-PCR二重增幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、2つのプローブからの蛍光のグラフである。50

【0044】

【図9E】300nMの濃度の添加剤EP013および64.2のアニーリング温度を利用する、実施例5に記載されるLATE-PCR二重増幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、2つのプローブからの蛍光のグラフである。

【0045】

【図9F】300nMの濃度の添加剤EP013および60.7のアニーリング温度を利用する、実施例5に記載されるLATE-PCR二重増幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、2つのプローブからの蛍光のグラフである。

【0046】

【図10】幾つかの添加剤のいずれかを利用した、または添加剤なしの、実施例6に記載されるプライマー依存プローブ切断アッセイに対する、温度周期的変動サイクルの数の関数としてのプローブ蛍光のグラフである。 10

【0047】

【図11A】添加剤なしの実施例7に記載されるLATE-PCR増幅の反復から得られたプローブ-アンプリコンハイブリッド、およびプローブ単独の融解曲線を表す。

【0048】

【図11B】600nM濃度の添加剤EP013を用いた実施例7に記載されるLATE-PCR増幅の反復から得られたプローブ-アンプリコンハイブリッド、およびプローブ単独の融解曲線を表す。 20

【0049】

【図12】添加剤なし、300nMの濃度の添加剤EP011、および600nMの濃度の添加剤EP011を用いた1000コピーのミトコンドリアゲノムDNA（標的配列）から開始する、実施例8に記載される12の多重LATE-PCR増幅の産物を示す、電気泳動ゲルである。 20

【0050】

【図13】添加剤なしのTaq DNAポリメラーゼ、添加剤なしのTaq DNAポリメラーゼおよび抗体、600nMの濃度の添加剤EP046を用いたTaq DNAポリメラーゼ、ならびに600nMの濃度の添加剤EP046を用いたTaq DNAポリメラーゼおよび抗体を利用する、実施例9に記載されるLATE-PCR増幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、SYBR Green蛍光のグラフである。 30

【0051】

【図14A】1000、100、および10コピーの標的から開始する、600nMの濃度の添加剤EP010を利用する実施例10に記載される低温度検出ステップを用いた、LATE-PCR増幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としてのプローブからの蛍光のグラフである。

【0052】

【図14B】1000、100、および10コピーの標的から開始する、600nMの濃度の添加剤EP010を利用する、実施例10に記載されるLATE-PCR冷却停止増幅の40サイクル後のプローブ-アンプリコンハイブリッドの融解曲線を表す。 40

【0053】

【図14C】1000、100、および10コピーの標的から開始する、600nMの濃度の添加剤EP010を利用する、実施例10に記載されるLATE-PCR冷却停止増幅の70サイクル後のプローブ-アンプリコンハイブリッドの融解曲線を表す。

【0054】

【図15A】尾状でないプライマーおよび尾状のプライマーを用いた、600nMの全濃度および50/600/550nMの鎖濃度の添加剤混合物EP043を利用する、実施例13に記載されるLATE-PCR増幅の反復に対する、増幅サイクル数の関数としての、SYBR Green蛍光のグラフである。

【図15B】添加剤EP043を用いた6つの増幅産物の融解曲線を示し、下方矢印は、適切な二本鎖DNA産物の融解温度86を示す。丸153は、図15Aの産物進化（平 50

らな平坦域)のない適切なピークを示した、尾状でないプライマーを用いた1つの反復を特定し、丸154は、同じく図15Aの産物進化(平らな平坦域)を示さなかった尾状のプライマーを用いた2つの反復を特定する。

【0055】

【図16A】5'-ダブシリ化プライマーを利用するが、逆相補体配列用いない、実施例14に記載されるLATE-PCR增幅の反復の融解曲線を表す。

【0056】

【図16B】5'-ダブシリ化プライマーに加え、100nMの濃度の逆相補体配列を利用する、実施例14に記載されるLATE-PCR增幅の反復の融解曲線を表す。

【0057】

【図16C】5'-ダブシリ化プライマーに加え、200nMの濃度の逆相補体配列を利用する、実施例14に記載されるLATE-PCR增幅の反復の融解曲線を表す。

10

【0058】

【図16D】5'-ダブシリ化プライマーに加え、300nMの濃度の逆相補体配列を利用する、実施例14に記載されるLATE-PCR增幅の反復の融解曲線を表す。

【0059】

【図17A】2000nMの濃度の添加剤EP020を利用する、実施例15に記載されるRNA標的用の逆転写を用いた、LATE-PCR增幅の反復に対する、サイクル数の関数としてのプローブ蛍光のグラフである。

【0060】

【図17B】200nMの濃度の添加剤EP010を利用する、実施例15に記載されるRNA標的用の逆転写を用いた、LATE-PCR增幅の反復に対する、サイクル数の関数としてのプローブ蛍光のグラフである。

20

【0061】

【図17C】400nMの濃度の添加剤EP003を利用する、実施例15に記載されるRNA標的用の逆転写を用いた、LATE-PCR增幅の反復に対する、サイクル数の関数としてのプローブ蛍光のグラフである。

【0062】

【図17D】400nMの濃度の添加剤EP010と1000nMの濃度の添加剤EP020との混合物を利用する、実施例15に記載されるRNA標的用の逆転写を用いた、LATE-PCR增幅の反復に対する、サイクル数の関数としてのプローブ蛍光のグラフである。

30

【0063】

【図17E】400nMの濃度の添加剤EP003と1000nMの濃度の添加剤EP020との混合物を利用する、実施例15に記載されるRNA標的用の逆転写を用いた、LATE-PCR增幅の反復に対する、サイクル数の関数としてのプローブ蛍光のグラフである。

【0064】

【図17F】添加剤を利用しない、実施例15に記載されるRNA標的用の逆転写を用いた、LATE-PCR增幅の反復に対する、サイクル数の関数としてのプローブ蛍光のグラフである。

40

【図18A】2つの直鎖状(ランダムコイル)オリゴヌクレオチドから形成され、一本鎖オーバーハンギングを有する、本発明に従う修飾された二本鎖添加剤の概略図である。

【図18B】図18Aの通りであるが、1つの直鎖状オリゴヌクレオチドおよび1つのヘアピン形成オリゴヌクレオチドから形成される、修飾された二本鎖添加剤の概略図である。

【図18C】図18Aの通りであるが、2つのヘアピン形成オリゴヌクレオチドから形成される、修飾された二本鎖添加剤の概略図である。

【図19A】実施例16に記載する通り、添加剤SL04を有する、または添加剤なしのTaqポリメラーゼに加えて抗体を用いた、LATE-PCR增幅の産物の融解曲線を表

50

す。

【図19B】実施例16に記載する通り、添加剤SL07を有する、または添加剤なしのTaqポリメラーゼに加えて抗体を用いた、LATE-PCR增幅の産物の融解曲線を表す。

【図19C】実施例16に記載する通り、添加剤SL08を有する、または添加剤なしのTaqポリメラーゼに加えて抗体を用いた、LATE-PCR增幅の産物の融解曲線を表す。

【図19D】実施例16に記載する通り、添加剤SL09を有する、または添加剤なしのTaqポリメラーゼに加えて抗体を用いた、LATE-PCR增幅の産物の融解曲線を表す。

【図20】異なる濃度の添加剤SL06を利用する、実施例18に記載されるプライマー依存プローブ切断アッセイの温度周期的変動に対する、サイクルの数の関数としてのプローブ蛍光のグラフである。

【図21】制限プライマーと、そのプライマーが完全に相補的である標的との間に、3'末端ミスマッチを作製する、プロッカーオリゴヌクレオチドの作用を示す図式的描写である。

【図22A】実施例19に記載される、プロッカーなしの増幅の希釈系列の標的の開始濃度（コピー数）に対する閾値サイクル（ C_T ）のグラフである。

【図22B】実施例19に記載される、プロッカーを用いた増幅の希釈系列における、標的の開始濃度（コピー数）に対する閾値サイクル（ C_T ）のグラフである。

【図23A】実施例20に記載される増幅における抗体の効果を示す、増幅サイクル数に対するSYBR Green蛍光のグラフである。

【図23B】実施例20に記載する増幅における添加物EP010の効果を示す、増幅サイクル数に対するSYBR Green蛍光のグラフである。

【図23C】DNAポリメラーゼのみで作製された実施例20に記載される産物と、抗体がアッセイの第1のインキュベーションステップ後に添加されて作製された産物の融解曲線である。

【図23D】抗体がアッセイの第1のインキュベーションステップ前に添加されて作製された、実施例20に記載される産物の融解曲線である。

【図23E】添加剤EP010がアッセイの第1のインキュベーションステップの前と後に添加されて作製された、実施例20に記載される産物の融解曲線である。

【発明を実施するための形態】

【0065】

二本鎖添加剤、プライマー、およびプローブの融解温度（ T_m ）について言及する。定義によると、 T_m は、二本鎖オリゴヌクレオチドの50%が二本鎖であり、50%が一本鎖である温度を意味する。添加剤については、 T_m は、いかなる置換基修飾因子の効果をも考慮せずに、計算された二本鎖オリゴヌクレオチドの T_m を意味する。本明細書に説明される二本鎖添加剤の T_m は、Markham and Zuker (2005) DINAMELT web server for nucleic acid melting prediction, Nucleic Acids Res. 33:W577-W581、およびMarkham and Zuker (2008) UNAFOLD: software for nucleic acid folding and hybridization. In Keith, J.M., ed., BIOINFORMATICS, vol. II, Structure, Functions and Applications, No. 453 in Methods in Molecular Biology, Ch. 1, pages 33-31 (Humana Press, Totowa, New Jersey. ISBN 978-1-60327-428-9)に従い計算された。参照ウェブサーバーを利用するにあたり、以下の入力がなされた：実施例に報告されるように、 μM での各鎖の濃度；塩濃度70mM；およびマグネシウム濃度3mM。増幅の開始時における、LATE-PCR增幅反応のプローブおよびプライマーの T_m は、

10

20

30

40

50

$T_m[0]$ と称される。 $T_m[0]$ は、構造プローブが使用される時に必要であるように、経験的に決定されるか、または塩濃度調節を使用する「最近接」法に従い計算することができ (Santa Lucia, J. (1998) PNAS (USA) 95: 1460 - 1465、およびAllawi, H.T. and Santa Lucia, J. (1997) Biochem. 36: 10581 - 10594)、参照によりその全体が本明細書に援用される。我々の研究において、他の濃度を使用することができるが、我々は、0.07Mの一価塩濃度を使用する。

【0066】

末端領域オリゴヌクレオチド鎖上に位置する修飾基について言及する。「末端領域」とは、末端5'もしくは3'ヌクレオチド、または5'もしくは3'端から、5つ以下、3つ以下、または2つ以下のヌクレオチドの内部ヌクレオチドに結合されることを意味する。幾つかの実施形態において、末端修飾因子は、5'または3'末端ヌクレオチドに結合される。

【0067】

選択性について言及する。「選択性」とは、一般的に、特定の条件が満たされる時に、陥凹3'端を伸長するためのDNAポリメラーゼの優先度を意味する。一般的に言うと、標的配列に結合される陥凹3'端は、熱力学的に不安定である、つまり、これらは、それらは、ハイブリッド形成される鎖に結合し、それから部分的にほどかれることが交互に発生する。これらの端は、標的への結合が、より多くの水素結合の形成により支持される時に安定であり、それらがより少ない水素結合を形成する時に不安定であるといえる。この見解によると、それらの標的に完全に相補的である陥凹3'端は、それらの標的に完全に相補的でない陥凹3'端より安定している。同様に、GC豊富の陥凹3'端は、一般的に、AT豊富の陥凹3'端より安定している。なぜならGCジヌクレオチド対は、3つの水素結合を形成し、一方、ATジヌクレオチド対は、2つの水素結合を形成するからである。

【0068】

この見解に従い、選択性の1タイプは、陥凹3'端の3'端領域、具体的には末端3'ヌクレオチドを含む3'端領域が、完全に相補的である時、つまり、ミスマッチがなくハイブリッド形成される時の、ハイブリッドの陥凹3'端を伸長するためのDNAポリメラーゼの優先度である。別の言い方をすれば、このタイプの選択性は、その標的に完全に一致しない3'端プライミング配列に対する選択性である。3'端領域ミスマッチに対する選択性は、例えば、3'末端ヌクレオチドでミスマッチを有するプライマー-標的ハイブリッドよりプライマーの3'端で完全に相補的であるプライマー-標的ハイブリッドのポリメラーゼの優先度を示す、プライマー-標的ハイブリッドに適用される。3'末端領域ミスマッチに対する選択性は、より一般的には、1つのアンブリコン鎖が、別のアンブリコン鎖とハイブリッド形成する時(つまり、その上でプライミングされる)に生じる場合がある等の、増幅反応混合物中の任意の2つのDNA鎖により形成される、陥凹の、伸長可能な3'端を有するハイブリッドにも適用される。

【0069】

選択性の第2のタイプは、AT豊富ではなく、GC豊富である3'末端領域を有するプライマー(またはプライミング鎖)のDNAポリメラーゼの優先度であり、別の言い方をすれば、末端領域がAT豊富であるプライマーまたは他のプライミング鎖に対する選択性である。

【0070】

いずれのタイプの選択性においても、選択性の測定値は、好ましくないハイブリッド、例えば、プライマーおよびミスマッチ標的により形成されたハイブリッドの増幅からのシグナルの閾値サイクル(C_T)と、好適なハイブリッド、例えば、プライマーおよび一致する標的により形成されたハイブリッドの増幅からのシグナルの C_T との間の差(ΔC_T)である。添加剤の使用による選択性の改善は、いかなる添加剤をも使用しない C_T を、添加剤を用いて得られる C_T から差し引くことにより得られる、純 C_T 差である。

10

20

30

40

50

【0071】

ミスプライミングを低減する、DNAポリメラーゼ活性を阻害する、いずれかのタイプのDNAポリメラーゼ選択性を増加させる、DNAポリメラーゼエキソヌクレアーゼ活性を阻害する、もしくは反復反応間のばらつきを減少させる添加剤、またはプライマー依存DNA增幅反応における前述の任意の組み合わせ、ならびにPCR增幅反応およびPCR增幅アッセイを含む、このような反応を利用する核酸検出アッセイを含むことができる。

【0072】

DNA增幅緩衝剤に可溶性であり、修飾基、または略して修飾因子と称される、1~4つ、または2~4つの共有結合的に結合される部分を含む化学試薬は、ミスプライミングを抑制し、プライマーと完全に相補的な標的配列との間のハイブリッドのポリメラーゼ選択性を強化する。共有結合的に結合される修飾基は、多環式（芳香族を含むが、これに限定されない）部分であり、巨大である場合、平面であり、ミスプライミングを抑制し、プライマーと完全に相補的な標的配列との間のハイブリッドのポリメラーゼ選択性を強化するように、エキソヌクレアーゼドメインを有するDNAポリメラーゼ（活性または不活性）に結合するように構成することができる。

10

【0073】

幾つかの実施形態において、クエンチャーであるダブシルは、これらの試薬の修飾基として使用することができる。

【0074】

これらの多環式部分は、これらを二本鎖オリゴヌクレオチドに結合することにより可溶化することができる。上述の1~4つの多環式部分を有する特定の二本鎖オリゴヌクレオチドは、ミスプライミングを低減する、DNAポリメラーゼ活性を阻害する、DNAポリメラーゼ選択性を増加させる、DNAポリメラーゼエキソヌクレアーゼ活性を阻害する、反復間のばらつきを減少させる、またはプライマー依存DNA增幅反応における前述の任意の組み合わせ、ならびにPCR增幅反応およびPCR增幅アッセイを含む、このような反応を利用する核酸検出アッセイのための添加剤として有用であり得る。修飾された二本鎖オリゴヌクレオチドは、天然のヌクレオチドを含んでもよい、つまり、これらは、DNA、RNA、またはDNAとRNAの混合物を含んでもよい。修飾された二本鎖オリゴヌクレオチドは、非天然のヌクレオチド、例えば、LNAおよび2'-O-メチルリボヌクレオチドも含んでもよい。増幅反応は、非対称PCR増幅反応、好ましくは、LATE-PCR反応を含む、対称または非対称であってもよい。

20

【0075】

添加剤は、相補的核酸鎖の長さが6~50、好ましくは、12~30、より好ましくは、16~26のヌクレオチドである、修飾された直鎖状二本鎖DNAオリゴヌクレオチドであり得る。修飾された二本鎖オリゴヌクレオチドは、平滑末端であるか、または1端または両端上に、1~8つのヌクレオチド、好ましくは、1~5つのヌクレオチドの短いオーバーハングを含んでもよい。図18A~18Cは、添加剤の二本鎖領域の1端または両端の鎖に非相補的末端領域を有する、幾つかの異なる実施形態を示す。図示説明の目的のために、全ての構成は、特定の配置を有する3つの修飾基Mを用いて示されるが、これらのような実施形態が、示される配置、または3つの修飾因子群の含有に制限されることを理解するであろう。図18Aは、二本鎖添加剤183を形成するようにハイブリッド形成される、2つの部分的に相補的なランダムコイルオリゴヌクレオチド181、182を示し、これは、二本鎖領域184および一本鎖オーバーハング185、186を含む。ハイブリッド184の融解温度Tmは、その長さおよびGC含量を変更することにより調節することができる。図18Bは、同様に、二本鎖添加剤189を形成するようにハイブリッド形成される、2つの部分的に相補的なオリゴヌクレオチド187、188を示し、これは、二本鎖領域190および一本鎖オーバーハング191、192を含む。オーバーハング191、192は、低温度でも相互とハイブリッド形成しない配列を含んでもよい。代替的に、オーバーハングは、低温度（相補性およびGC含量の程度により決定される、二本鎖領域184のTmより低いTm）でのみ、相互とハイブリッド形成する配列を含ん

30

40

50

でもよい。図18Bに示される実施形態は、1つのオリゴヌクレオチド、すなわち、オリゴヌクレオチド187が、オリゴヌクレオチド188とハイブリッド形成しない時、長さが最大6つのヌクレオチドの二本鎖システム193を含むヘアピン構造の形態をとるという点で、図18Aに示す実施形態と異なる。図18Cは、同様に、二本鎖添加剤196を形成するようにハイブリッド形成される、2つの部分的に相補的なオリゴヌクレオチド194、195を示し、これは、二本鎖領域197および一本鎖オーバーハング198～201を含む。図18Cに示される実施形態において、オリゴヌクレオチド194および195の両方は、相互とハイブリッド形成しない時、それぞれ、システム202および203を含むヘアピン構造の形態をとる。実施例16および17は、図18Cに示される構造を利用する。いずれか、または両方の鎖が、ヘアピンまたはシステムループの構造を形成する添加剤において、各システムのTmは、使用中のヘアピン形成を確実にするように、二本鎖領域のTmより高いが、反応の温度が使用中に低下する時、適切な時間期間、添加剤の二本鎖の立体構造を妨げるほど高くない。いずれのオリゴヌクレオチド鎖も、増幅プライマーまたはプローブとして作用しない、幾つかの実施形態において、両方の3'端は遮断され、DNAポリメラーゼによる伸長を妨げる。遮断は、修飾基を鎖の3'末端ヌクレオチドに共有結合的に連結することにより達成されるか、または例えば、3'末端リン酸基を含むことによって伸長を遮断してもよい。添加剤は、32で少なくとも50%が二本鎖である、二本鎖オリゴヌクレオチドを含むことができ、この温度は、増幅反応混合物の組み立て中に遭遇する可能性がある温度と同じ高さである。10

【0076】

1～4つの修飾基、好ましくは、2つ、3つ、または4つの基が、直鎖二本鎖オリゴヌクレオチドに含まれる。修飾因子は、それらの末端領域の添加剤の鎖に、つまり、末端ヌクレオチド、または末端ヌクレオチドから5つ以下、好ましくは、2つ以下のヌクレオチドであるヌクレオチドで、共有結合的に結合される。幾つかの実施形態は、二本鎖オリゴヌクレオチドの末端ヌクレオチドに結合される修飾因子を利用する。修飾因子は、オリゴヌクレオチド鎖に共有結合的に連結することができる。修飾基の共有結合連結は、例えば、フルオロフォアおよびクエンチャーの組み込みの分野において周知である。20

【0077】

修飾基は、多芳香族を含むが、これに限定されない多環式、および巨大である場合、全平面様態を有する部分であり得る。例としては、植物ステロイドであるジゴキシゲニン、二環式芳香族であるクマリン、平面ではないクエンチャーとして使用される小型多芳香族化合物であるQS Y-21が挙げられる。フルボ酸およびフミン酸が、含まれると考えられる。幾つかの実施形態において、修飾基は、よく知られたクエンチャーであるダブシリであり、これは、多芳香族で、巨大であり、平面状である。したがって、修飾基は、非平面の巨大部分を有さない多環式部分であり、好ましくは、多芳香族であり得る。30

【0078】

添加剤は、1つ、2つ、3つ、および4つの修飾基の種々の可能な構造を有する、直鎖二本鎖DNAオリゴヌクレオチドを含むことができる。1つの末端修飾基で可能な構造が4つある：修飾因子は、いずれかの鎖の3'または5'末端ヌクレオチドに結合することができる。2つの末端修飾基で、可能な構造は6つあり、3つの末端修飾基で、可能な構造は4つあり、4つの修飾基では、可能な構造は1つしかない。末端領域の内部ヌクレオチドへの修飾因子の結合は、さらなる可能な構造を作製する。鎖がプライマーではなく、修飾基が鎖の3'末端ヌクレオチドに結合しない全ての場合において、そのヌクレオチドは、それ以外は、リン酸基によって等で遮断される（実施例の配列で、「p」として認識される）。

【0079】

特定の実施形態において、1つの鎖がプライマーとして機能し、その3'末端は遮断されない。特定の他の実施形態において、1つの鎖が検出プローブとして機能し、この場合、その3'端は、例えば、末端修飾基、末端フルオロフォア、または末端リン酸基によって遮断することができる。プライマーの実施形態において、一本鎖増幅プライマーは、ブ4050

ライマーと二本鎖ハイブリッドを形成するように、プライマーに相補的である一本鎖オリゴヌクレオチドを含むことによって、添加剤に変換することができ、我々は、これを逆相補体配列と呼ぶ。ハイブリッドは、二本鎖である時、添加剤として機能することができる。ハイブリッドは、ダブル基等の、3つの修飾因子を含むことができる。プライマー鎖に対する逆相補体配列のTmは、その増幅標的配列に対するプライマー鎖のTmより5~30、好ましくは、15~25低いように設計することができる。Tmの差を達成するために、1つ以上のヌクレオチドでプライマー鎖を短くするか、もしくはミスマッチにするか、またはその両方を行うことにより、プライマー鎖に部分的な相補性を逆相補体配列に付与することができる。プローブの実施形態において、標識された一本鎖ハイブリッド形成プローブは、プライマーの変換と同様に、添加剤に変換され、同様に、プローブ-標的ハイブリッドのTmより低いTmを有することができる。好適なプローブ実施形態は、フルオロフォアおよびクエンチャーを有するプローブ鎖と、2つの末端クエンチャーを有する逆相補体配列とを含む。

【0080】

少なくとも1つのDNAまたはcDNA標的を増幅するためのプライマー依存増幅反応混合物を含むことができる。反応混合物は、前述の添加剤の少なくとも1つならびに標的核酸およびプライマーと、DNAポリメラーゼと、dNTPと、一般的に増幅緩衝剤とを含む増幅試薬を含む。増幅混合物が、二本鎖増幅産物、一本鎖増幅産物、もしくは両方の増幅および均質検出の両方を含む増幅アッセイ用である場合、反応混合物は、産物検出、好ましくは、蛍光検出用の少なくとも1つの試薬を含むことができる。二本鎖増幅産物を検出するための好適な試薬は、SYBR Green等のDNA色素である。一本鎖産物を検出するための好適な試薬は、一本鎖産物とのハイブリッド形成が、検出可能な蛍光シグナルの変化を生じるか、または増幅中の一本鎖産物とのハイブリッド形成が、検出可能な蛍光シグナルの変更をもたらす、蛍光的に標識された検出プローブである。多くの均質検出試薬が、当該分野において知られており、任意の適切な検出試薬、または複数の検出試薬を使用することができる。他の試薬も使用することができる。含まれる標的核酸がRNA標的配列である場合、反応混合物は、逆転写酵素を含むであろう。

【0081】

反応混合物は、複数の増幅およびアッセイ用の複数の標的のために、複数のプライマーペアを含むことができる。実施例5は、各増幅された産物のために、2つのプライマーペアと、蛍光プローブとを含む、2つの標的配列のための二重LATE-PCRアッセイ用の反応混合物を説明する。実施例8は、12の異なる標的のために12のプライマーペアを含む、高度に多重な増幅である12の多重用の反応混合物を説明する。添加剤が、プライマー鎖の1つを含む場合、反応混合物は、適切な逆相補体配列をさらに含むことができる。反応混合物は、PCR反応混合物であり得、幾つかの実施形態において、LATE-反応混合物であり得る。反応混合物は、2つの添加剤の組み合わせ、または混合物を含んでもよい。このような混合物は、4本の鎖、または2つの添加剤が共通の鎖を共有する場合、3本の鎖を含んでもよい。反応混合物は、最大2000nM、好ましくは、最大1000nM、より好ましくは、最大600nMの全濃度で、少なくとも1つの修飾された、二本鎖添加剤を含むことができる。反応混合物が添加剤の混合物を含む場合、添加剤の全濃度は、記載の通りのままである。

【0082】

上述の反応混合物を利用する、1つ以上のDNAまたはcDNA標的配列のプライマー依存増幅、および増幅産物の均質検出を伴う1つ以上のDNAまたはcDNA標的配列のプライマー依存増幅(つまり、均質検出を用いた増幅アッセイ)のための方法を提供する。増幅法および増幅アッセイ法は、等温増幅反応または熱サイクル増幅反応を含んでもよい。一実施形態において、増幅法は、PCR、幾つかの実施形態において、LATE-PCRであり得る。特定の増幅または増幅アッセイに使用されるように選択される添加剤または添加剤の組み合わせ、およびその、またはそれらの量は、所望の効果、および増幅中に利用される温度に依存する。等温増幅は、反応混合物調製温度のみ、典型的には、室温

10

20

30

40

50

、続いて、単一反応温度、例えば、37°での等温增幅反応を含み得る。PCRおよび他の熱サイクル増幅法は、反応混合物調製温度、続いて、プライマーアニーリング温度(アニーリング温度)、プライマー伸長温度(伸長温度)、および鎖変性温度(融解温度)を含む、多数の熱サイクルを含む。アニーリング温度と伸長温度は、同じであってもよいが、アニーリング温度が伸長温度より摂氏5~20度()低いのが、より一般的である。LA TE - PCR アッセイは、幾つかの、または全ての熱サイクルに低温度検出ステップをさらに含んでもよく、その間、低温度プローブがそれらの標的配列と結合できるよう、反応混合物の温度をアニーリング温度以下に低下させる。低温度(アニーリング温度以下)を含み得る、ある操作を実施するための中間点で、增幅反応を中断してもよく、その後で、增幅反応を再開することができる。增幅は、ミスプライミングを低減する他の方針を利用してもよい。例えば、使用されるDNAポリメラーゼは、温態始動ポリメラーゼであってもよい。さらに、使用されるプライマーは、必要な場合、伸長を添加することを含む、AT 豊富な5'端を有するように設計することができる。加えて、または代替的に、プライマーの3'端は、増幅および増幅アッセイにおいて、ポリメラーゼ阻害を変更するように、GC 豊富またはAT 豊富のいずれかであるように設計することができる。増幅反応の産物は、ジデオキシ配列決定を含むが、これに限定されない配列決定に適している。

【0083】

増幅アッセイは、DNA 標的配列の増幅中、例えば、PCR 増幅反応の幾つかの、または全てのサイクル中の複数の時で、一本鎖産物、二本鎖産物、またはその両方のリアルタイム均質検出を含んでもよい。上に述べた通り、蛍光検出を使用することができる。代替的に、増幅アッセイは、増幅反応の完了後、エンドポイントでの均質検出を含んでもよい。検出は、増幅産物の融解、および温度の関数としての蛍光変化の検出を含み得る。検出は、定性的、または定量的であってもよい。RNA である標的において、アッセイは、逆転写を含むことができる。

【0084】

増幅および増幅アッセイを実施するための試薬キットを提供する。そのようなキットは、上述の、少なくとも1つの標的配列、dNTP、DNAポリメラーゼ、および少なくとも1つの修飾された二本鎖添加剤のためのプライマーを含む、反応混合物を調製するために必要な試薬を含むことができる。増幅アッセイ用のキットは、DNA蛍光色素または蛍光的に標識されたハイブリッド形成プローブ等の、少なくとも1つの検出試薬も含むことができる。増幅キットおよび増幅アッセイキットは、試料調製用の試薬、例えば、細胞溶解試薬、核酸単離用の試薬、および逆転写酵素も含んでもよい。増幅アッセイキットは、それらの増幅用の制御標的配列およびプライマーを含んでもよい。

【0085】

添加剤または添加剤の混合物の選択においては、DNAポリメラーゼ阻害、3'末端プライマーミスマッチに対する選択性、AT 豊富プライマーの3'末端領域に対する選択性、ポリメラーゼエキソヌクレアーゼ活性の阻害、ミスプライミング抑制、および反復間のばらつきの低減のそれらの性質を考慮することができる。添加剤の効果は、次いで、添加剤の固有特性、その濃度、その融解温度、およびその濃度に依存する。例えば、固有のポリメラーゼ阻害は、添加剤に含まれる修飾因子の数により増加する傾向があり、添加剤による効果的な阻害は、その濃度により増加する。3'末端プライマーミスマッチに対する選択性は、その活性を有する、または少なくともエキソヌクレアーゼ部位を有するDNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性の遮断と相關することが分かった。これは、添加剤により、酵素のエキソヌクレアーゼ部位を遮断することによる可能性がある。

【0086】

添加剤は、ミスプライミングの抑制、完全に相補的でない陥凹3'末端配列を有するハイブリッドに対するポリメラーゼ選択性の増加、AT 豊富の陥凹3'末端配列を有するハイブリッドに対するポリメラーゼ選択性の増加、反復反応間のばらつきの減少、ポリメラーゼ5'エキソヌクレアーゼ活性の阻害、およびポリメラーゼ活性の阻害の機能の1つ以上に有効である濃度で、増幅反応混合物に添加することができる。添加剤は、DNAポリ

10

20

30

40

50

メラーゼと相互作用するため、必要とされる濃度は、増幅反応混合物に含まれるDNAポリメラーゼの濃度によって変動する。前述の機能の1つ以上に有効であるように、必要とされる添加剤の濃度の決定ならびに最適な濃度の決定は、以下の実施形態で例証される、添加剤が意図される増幅反応または増幅アッセイで、幾つかの濃度を試すことにより日常的に決定することができる。例えば、実施例3は、好適な添加剤の選択を補助するように種々の濃度で添加剤の効果を決定するために、有効濃度を確定するために、および特定のLATE-PCRアッセイの特定の目的のために、最適な濃度を決定するために、幾つかの濃度で、幾つかの添加剤の実験的試みを報告する。増幅反応および増幅アッセイに最も一般的に使用されるポリメラーゼであるTaq DNAポリメラーゼにおいて、典型的なポリメラーゼ濃度は、25マイクロリットル(μl 0 r u1)の反応混合物で、1.25ユニットであり得る。幾つかの実施形態においては、多くて2000ナノモル(nM)の添加剤が必要とされ、幾つかの実施形態においては、1000nM以下が必要とされ、幾つかの実施形態においては、600nM以下が必要とされる。Taq DNAポリメラーゼより高い濃度で反応混合物に含まれ得るTfi DNAポリメラーゼにおいて、同じ濃度の添加剤が、一般的に有効である。

【0087】

添加剤が「温態始動」試薬として機能するためには、等温增幅の反応温度以下、かつPCR等の熱サイクル反応のアニーリング温度以下の温度で使用されるポリメラーゼ、例えば、Taq DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性をほぼ、または完全に阻害する添加剤が好ましい。本目的において、添加剤は、ポリメラーゼ活性に高い阻害作用と、少なくとも32であり、等温反応温度もしくはPCRと等しい、またはそれ以下、好ましくは、それより1~15低い、より好ましくは、それより1~5低く、かつポリメラーゼ活性を完全に、または少なくとも実質的に阻害するのに十分に高い濃度である融解温度(Tm)とを有することができる。添加剤は、それらのTm以上の温度で融解されて離れることによって不可逆的に変性されないため、添加剤は、温度が添加剤にとって二本鎖になるのに十分に低くなるたびに、PCR熱サイクルの等温反応中、例えば、LATE-PCRアッセイで時折使用される、低温度検出ステップ中に機能する。

【0088】

添加剤は、等温增幅の反応温度で、またはPCR増幅のアニーリング温度以上の温度で、特に、伸長温度で、ミスプライミングを低減し、ポリメラーゼ選択性を増加するようにも機能することができる。本目的において、添加剤は、ポリメラーゼ活性に低から中程度の阻害作用と、等温反応温度またはPCR伸長温度より2より低くなることはなく、好ましくは、少なくともそれと等しい、より好ましくは、それ以上であり、かつ反応の効率を過度に阻害することなく、所望の作用を達成するのにちょうど必要な高さの濃度である融解温度とを有することができる。ここでも、添加剤は、PCRサイクルの鎖融解ステップ中に不可逆的に変性されないため、添加剤は、鎖融解温度において、アニーリング温度またはそれ以下に低くなると、各PCRサイクル中、ポリメラーゼ選択性を増加するよう機能することができる。

【0089】

添加剤は、単独で、または組み合わせて使用することができる。2つの修飾された二本鎖オリゴヌクレオチドの混合物は、4本の鎖、または2つの添加剤が共通の鎖を共有する場合、3本の鎖を含んでもよい。三本鎖混合物は、1本少ない鎖を反応混合物の中に挿入するが、これは、添加剤が、増幅反応混合物において、任意の標的配列のためのプライマーまたはプローブのいずれでもない実施形態において、有利であり得る。組み合わせでの添加剤の使用は、設計に柔軟性を付与する。例えば、タイプIのミスプライミングを抑制するために、その固有の性質であるTmおよび温度により、増幅反応のプライマーアニーリング温度以下でポリメラーゼ活性を非常に阻害するが、重合反応を阻害しないように増幅中は一本鎖である、第1の添加剤を含んでもよい。このような添加剤との組み合わせにおいて、増幅中のタイプIIのミスプライミング、および適用可能な場合、タイプIIIのミスプライミングを抑制するために、プライマーアニーリング中は二本鎖であるが、ブ

10

20

30

40

50

ライマー伸長中はポリメラーゼ活性を最小に阻害する添加剤を含んでもよい。

【0090】

P C R 反応等の、等温 D N A 増幅反応または熱サイクル D N A 增幅反応のいずれかで使用される D N A ポリメラーゼ酵素と直接相互作用する、オリゴヌクレオチド試薬を提供する。オリゴヌクレオチド試薬は、それらが二本鎖である全てのステップ中の増幅反応で作動することができる。これらは、ミスプライミングの抑制とポリメラーゼ選択性の増加の両方の作用を有することができ、これは、これらがハイブリッド形成される鎖に不完全に相補的である陥凹 3' 端と比較して、これらがハイブリッド形成される鎖に完全に相補的である陥凹 3' 端を伸長するための、D N A ポリメラーゼの優先度を含む。ミスプライミングは、異なるタイプにより、考慮することができる。タイプ I は、反応混合物の温度がプライマーアニーリング温度以下である時に必ず生じるミスプライミングである。増幅の開始前の反応混合物の調製中に生じる。温度がプライマーアニーリング温度以下に低下する場合、増幅中にも生じる場合がある。タイプ II は、反応混合物の温度がプライマーアニーリング温度、またはそれ以上であるが、存在するプライマーの融解温度以下である時に必ず、増幅中に生じるミスプライミングである。タイプ III は、高濃度の増幅産物（アンプリコン）が作製された後に継続する増幅中に生じるミスプライミングである。さらに別のミスプライミングの徴候は、プライマー - ダイマー形成であり、そこでは 1 つのプライマーが別のプライマー、またはそれ自体とハイブリッド形成し、次いで伸長を受け、短い二本鎖アンプリコンを生成し、これは、次いで、さらに増幅するか、または多量体化さえし、さらに増幅し得る。増幅反応を段階に分割し、ミスプライミングの可能性を考慮することが有用である。ミスプライミングは、増幅産物を作製するため、増幅反応の初期に生じるミスプライミングは、ほぼ標的分子であるかのように増幅されるであろう。以下の概要は、P C R 反応についてであるが、当業者は、その用途を他の増幅反応に認めるであろう。P C R の本概要は、単に図示の目的のためであり、使用することができる増幅反応の種類を制限するものではない。
10

【0091】

予備段階：試薬を調製し、25 またはそれ以下（例えば、氷上）で混合する。プライマーの濃度は、予備段階で最高であるが、これは、典型的に数分間持続する。通常、標的の数は、予備段階中は低いが、または非常に低く、これらの標的の幾つか、または全ては、どのように試料が調製されたか、そして c D N A であるかないかにより、一本鎖であり得る。実際、逆転写酵素等の酵素を使用する c D N A の合成は、c D N A 合成に使用される反応混合物が、プライマーおよび D N A ポリメラーゼも含む時、予備段階の一部もある、なぜなら、反応混合物のこれらの構成要素は、c D N A 合成に必要とされる条件下、典型的には、40 ~ 60 の範囲の温度で 5 ~ 30 分で、ミスプライミングするからである。予備段階は、反応混合物中の全ての二本鎖 D N A を変性するために、高温、例えば、95 に加熱することにより終了する。D N A ポリメラーゼが不活性形態、例えば、抗体結合 D N A ポリメラーゼの形態で添加された場合、本加熱ステップは、ポリメラーゼを活性化し、これは、「温態始動」として知られるプロセスである。
30

【0092】

タイプ I ミスプライミングは、予備段階中に生じる。D N A ポリメラーゼが温態始動酵素でない場合、および他のポリメラーゼ活性の阻害剤が反応混合物に含まれない場合、タイプ I のミスプライミングの可能性が増加する。また、ポリメラーゼの温態始動の修飾、またはポリメラーゼ活性を遮断するために使用される追加の阻害剤が、そうすることに完全に失敗した場合、タイプ I のミスプライミングが生じる。プライマー - ダイマー形成およびタイプ I のミスプライミングの両方は、温度が低いため、予備段階内で発生しやすい条件である。予備段階のミスプライミングの産物が増幅される。
40

【0093】

初期段階：反応の本段階は、典型的に、P C R 増幅のうちの 10 ~ 15 热サイクルである。3 ステップ P C R の各サイクルの热プロファイルは、鎖 - 融解温度、プライマーアニーリング温度、およびプライマー伸長温度を含む。2 ステップ P C R において、プライマ
50

—アニーリングおよびプライマー伸長が、同じ温度で実施される。熱サイクルの各ステップに割り当てられる時間量は、典型的には、数秒間である。第1および第2の熱サイクル中、プライマーは、完全長標的内のそれらの標的配列と最初にアニーリングし、完全に相補的な標的配列の時のみに選択的に伸長するように意図される。プライマーは、標的の両方の鎖とアニーリングし、それらに伸長し、全てが完全に行われると、定義された長さの2つの相補的鎖を生成し、次いで、指数関数的に増幅する。相互とハイブリッド形成する産物鎖の傾向は、それらの濃度が低いため、低い。

【0094】

タイプIIのミスプライミングは、プライマーが、それらが完全に相補的でない対立遺伝子標的に伸長する場合、初期段階中に生じ得る。プライマーが、アニーリング温度より数度、またはそれ以上のT_mを有することは、まれではなく、これはタイプIIのミスプライミングを招く。短いアニーリング時間および高いアニーリング温度（プライマーのT_mに対して）は、長いアニーリング時間および低いアニーリング温度より厳密であり、したがって、タイプIIのミスプライミングを低減し、ポリメラーゼ選択性を増加させる。タイプIIのミスプライミングの産物は、増幅の残余中に増幅され得る。高温への最初の加熱は、温態始動抗体または酵素アルキル化を不可逆的に不活性化するため、温態始動ポリメラーゼ修飾は、ここでは適用されない。ここに記載するものを含む、熱的に安定した阻害剤は、それらが高温により不可逆的に変性されないため、第1および後続のアニーリングステップ中は機能的である。

【0095】

中期段階：PCR反応の本段階は、典型的に、10～25の熱サイクルから成り、融解、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長を含む。熱サイクルの各ステップに割り当てられる時間量は、典型的に、数秒間である。プライマーは、標的の両鎖とアニーリングし、それらに伸長し、最適な条件下で、プライマー対により決定される、定義された長さの2つの相補的な鎖を生成し、次いで、それらを指数関数的に増幅する。

【0096】

リアルタイム対称PCRアッセイの場合において、中間段階は、典型的に、反応のアニーリングステップまたは伸長ステップのいずれか中に、産物検出を含む。LATE-PCR反応の場合において、中間段階は、アニーリング温度より低い温度で産物検出を含んでもよく、伸長ステップ後に生じる。ハイブリッド形成プローブを使用する蛍光シグナルは、典型的に、対称およびLATE-PCRの両方の対数期の終わりで検出可能となる。

【0097】

対称PCRの中期段階の終わり頃、指数関数的に蓄積する産物鎖の濃度は、プライマー-アニーリングステップ中、産物鎖のハイブリッド形成に十分に高くなる。ポリメラーゼが反応の二本鎖産物に結合すると考えられるため、指数関数的増幅は低下し、平坦になる。LATE-PCRの場合において、制限プライマーはなくなり、産物鎖の濃度が反応を遅くするのに十分に高くなる前に、反応の対数期を終了する。

【0098】

低温度検出ステップを含むLATE-PCR増幅において、タイプIおよびタイプIIのミスプライミングが、ちょうど初期段階のように、中間段階で生じ得る。これは、リアルタイムLATE-PCRの低温検出ステップ中は、特に危険である。タイプIIIのミスプライミングも、産物鎖の濃度が上昇すると、中間段階中に生じ得る。前段階、初期段階、または中間段階に関わらず、任意のタイプのミスプライミングは、反復反応間のばらつきを生じ、これは、指数関数的増幅が低下すると、特に明白である。

【0099】

後期段階：増幅の後期段階は、対称PCRが平坦域に達し、本段階で終了するため、一般的に、LATE-PCRでのみ見られる。LATE-PCR増幅の本段階は、典型的に、融解、プライマーアニーリング（過剰プライマーのみ）、およびプライマー伸長（過剰プライマーのみ）のステップを含む、10～25の熱サイクルから成る。熱サイクルの各ステップに割り当てられる時間量は、典型的に数秒間である。各過剰プライマーは、その

10

20

30

40

50

対応する制限プライマー（その制限プライマー鎖）の伸長により作製された伸長産物とアニーリングされ、それに伸長し、全てが完全に行われる場合、過剰プライマー鎖を効率的に生成し、これは、過剰プライマー自体を上回り始めるまで、直鎖状に蓄積される。したがって、L A T E - P C R 反応は低下するが、対称 P C R 反応のように平坦にならない。

【 0 1 0 0 】

リアルタイム L A T E - P C R アッセイの場合において、本段階は、プライマーアニーリング温度で、またはアニーリング温度より低い温度で産物検出を含んでもよく、伸長段階後に生じる。ハイブリッド形成プローブを使用する蛍光シグナルは、典型的に、本段階中に、ほぼ線形動態で増加する。

【 0 1 0 1 】

過剰プライマー鎖の 3' 端は、過剰プライマー鎖の別の分子に沿ってどこででもミスプライミングし得るため、タイプ I I I のミスプライミングは、多数の線形サイクル後の後期段階中に生じ得る。したがって、1) 一本鎖産物の濃度が増加する、2) 多重反応において異なる一本鎖産物の数が増加する、3) 反応温度が低下する、4) 過剰プライマー鎖の 3' 端またはその 3' 端付近の塩基が、G C 豊富であり、より容易にハイブリッド形成（ミスプライミング）すると、タイプ I I I のミスプライミングの確率が増加する。タイプ I I I のミスプライミングは、一本鎖 D N A を二本鎖 D N A に変換し戻すことにより生じ、これは、（産物は、不完全または異常であるが）「産物進化」と称される。産物進化は、二本鎖産物を検出する色素を使用する蛍光の突然の遅延増加（平坦域後のスロープの増加）、または一本鎖 D N A を検出するプローブからの蛍光の突然の減少のように明白である。したがって、タイプ I I I のミスプライミングは、エラーがアニーリング温度以上で生じ得るという点で、タイプ I I のミスプライミングと類似するが、タイプ I I I のミスプライミングは、エラーがアニーリング温度より低い温度で生じ得るという点で、タイプ I のミスプライミングとも類似する。タイプ I I のミスプライミングは、確かに、本段階中に生じ得、また低温度ステップが含まれる場合、タイプ I のミスプライミングも生じ得る。

【 0 1 0 2 】

最終段階：L A T E - P C R における最終段階は、二本鎖産物が、もはや溶解して離れないため、さらなる增幅に関与しない。最終段階は、ある操作が実行される、增幅後段階である。最も一般的には、プローブ標的ハイブリッド形成を可能にするために、温度をアニーリング温度以下に低下させ（シグナル生成 = アニーリングシグナル）、その後、プローブ - 標的複合体を融解して離すために、時間をかけて温度を上昇させる（シグナルの損失 = 融解）。我々は、これを「プローブアニーリング - 融解分析（P r o b e A n n e a l - M e l t A n a l y s i s ）」と称する。最終段階でのプローブアニーリング - 融解分析は、L A T E - P C R 増幅中、リアルタイム分析を用いて、または用いずに実行することができる。10 ~ 15 サイクルの最終段階後の典型的なプローブアニーリング - 融解分析は、反応の開始時に存在する標的コピーの数についての定量的な情報を生成する。

【 0 1 0 3 】

典型的に、ミスプライミングは、最終段階中に生じないが、生じた場合、ミスプライミングの産物を可視状態にさせるために必要とされる追加增幅は続いて行われない。そして、実施例 10 に示されるように、最終段階中にプローブアニーリング - 融解分析を実行し、その後、プローブアニーリング - 融解分析を繰り返すことができる最終段階に到達するまで、追加サイクルの増幅を再開するための「冷却停止」プロトコルを使用することが可能である。実施例 10 に示されるように、タイプ I I I のミスプライミングの頻度は、各熱サイクルにおける検出ステップの省略により低減されるため、プローブアニーリング融解分析前にリアルタイム分析が使用されない時、反復間のばらつきは少ない。

【 0 1 0 4 】

何らかの理論に拘束されることを意図するものではないが、我々は、本明細書に記載されるように、修飾された二本鎖オリゴヌクレオチドが、D N A ポリメラーゼと直接相互作

10

20

30

40

50

用し、全タイプのミスプライミング、つまり、タイプI、タイプII、タイプIII、およびプライマー-ダイマーを抑制するという論理を立てる。我々は、添加剤は、二本鎖の時、DNAポリメラーゼの5'エキソヌクレアーゼドメインに優先的に結合するが、5'エキソヌクレアーゼドメインを飽和する以上の十分な濃度で添加される場合、DNAポリメラーゼのポリメラーゼドメインにも結合すると確信している。実験的に、25 μL反応容量での1.25ユニットのTaq DNAポリメラーゼ当たり300~600nM濃度の添加剤は、5'ヌクレアーゼドメインおよびポリメラーゼドメインの両方を飽和するのに十分であり得る。

【0105】

何らかの理論に拘束されることを意図するものではないが、我々は、プライマーアニーリング温度より低い温度で、両方のドメインを飽和することにより、本明細書に記載されるように、添加剤は、修飾基による質量作用および結合の組み合わせによってポリメラーゼを効果的に中断することにより、タイプIのミスプライミングを妨げるという理論を立てる。プライマーアニーリング温度より高い温度で、添加剤は、5'エキソヌクレアーゼドメインおよびポリメラーゼドメインの両方を飽和しない濃度で使用することができる。これらの温度で、添加剤は、適切にハイブリッド形成されたプライマーの伸長を実行するために、ポリメラーゼドメインの大部分を解放した状態で残す一方で、5'エキソヌクレアーゼドメインに優先的に結合し、かつその活性を選択的に阻害する。5'エキソヌクレアーゼドメインに選択的に結合することにより、添加剤は、アロステリック効果によるポリメラーゼドメインの選択性を増加させる。

10

【0106】

何らかの理論に拘束されることを意図するものではないが、我々は、修飾基、例えば、ダブシリル基が、特定の目的のために、1つ以上の添加剤の選択に使用することができる方式で、添加剤の機能に貢献するという理論を立てる。1つの3'末端修飾基でさえ、添加剤自体によって生じる可能性があるミスプライミングを抑制することができる。しかしながら、3'末端修飾基は、二本鎖オリゴヌクレオチド上に1つまたは2つに関わらず、プライマーの3'末端でのミスマッチに対して、ポリメラーゼの選択性を増加するように機能しない。一方、5'末端修飾基、特に、2つの5'修飾基は、そのポリメラーゼの選択性を有意に強化することができる。二本鎖オリゴヌクレオチドの1端の両方の鎖上に修飾因子を含むことは（つまり、5'修飾因子1つと、3'修飾因子1つ）、二本鎖オリゴヌクレオチドが平滑末端でない場合でも、その選択性を有意に強化することができる。二本鎖オリゴヌクレオチドの両端上に2つの修飾因子を有することは、選択性の強化において、単に1端上に2つの修飾因子を有するより良好であり得るが、4つの修飾基を有する二本鎖オリゴヌクレオチドは、1つ、2つ、または3つの修飾基を有する二本鎖オリゴヌクレオチドより、重合反応の効率を低下させる傾向がある。我々は、この原因是、4つの修飾基を有する添加剤が、より少ない修飾基を有する添加剤より、ポリメラーゼドメインをより効率的に結合するという理論を立てる。

20

30

タイプIミスプライミングの抑制

【0107】

添加剤は、鎖の末端で、またはその付近で、つまり、鎖の末端領域で、1つ、2つ、3つ、または4つの修飾基、例えば、ダブシリル修飾基の付加により修飾される二本鎖オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態においては、2~4つのこのような基が存在し、幾つかの実施形態においては、基は、末端ヌクレオチドに共有結合的に結合される。実施例において、本明細書に記載されるような添加剤は、単一添加剤または混合物に関わらず、比較目的で記載される他の添加剤とそれらを区別するために、接頭辞「EP」により表示される。実施例1は、添加剤が、さらなるミスプライミングを生じずに、タイプIのミスプライミングを抑制することを例証する。本実施例において、不適切な産物（融解分析によって決定される、プライマー対により定義される以外の産物）を產生したLATE-PCR增幅が、使用された。誤った産物の产生は、タイプIのミスプライミングを示す。同じ長さ（16ヌクレオチド）を有するが、異なる配列の未修飾の二本鎖オリゴヌクレオ

40

50

チドを含む、2つの異なる添加剤が、本增幅の対照添加剤として試された。少なくとも300nMの濃度で添加された1つである16mer Aは、適切な産物を產生する反応をもたらした(図1)。もう一方の16mer B(図2)は、600nMまたは1000nMの濃度で添加された時でさえ、適切な産物の產生をもたらさず、実際、ミスプライミングを生じた。この不一致は、二本鎖オリゴヌクレオチドは、ミスプライミングを抑制することができるか、またはミスプライミングを生じることができるという、Kainzらの教示に一致する。ミスプライミングを生じたオリゴヌクレオチドの修正版である添加剤16mer Bで、アッセイを繰り返し、修正版は、1つまたは2つのいずれかの末端ダブシル修飾因子を含む。600nM濃度での單一ダブシル修飾因子、添加剤EP048(図3)または添加剤EO049を含むと、16mer B(図2)と比較して、未修飾オリゴマーによって生じたミスプライミングを含むミスプライミングを抑制した。2つのダブシル修飾因子、添加剤EP027を含むと、300nM濃度でのみミスプライミングを抑制し、僅か100nM濃度で添加された時に、かなり改善された(図4)。異なる濃度の添加剤EP027を含む反応の動態分析によって示されるように(図5)、300nM濃度の添加剤EP027は、反復間のばらつきを排除し、300nMが、本アッセイにおいて最適な濃度であると判断された。

【0108】

12~30のヌクレオチドの長さを有する、幾つかの他の未修飾二本鎖オリゴヌクレオチドを用いて、実施例1のアッセイを繰り返した。実施例1に報告される結果は、未修飾オリゴヌクレオチドが、タイプIのミスプライミングの抑制または原因に関して不一致であることを立証した。実施例1に報告されるように、8~22クレオチドの範囲の長さを有し、ダブシルである2つの修飾因子、ジゴキシゲニンである2つの修飾因子、ダブシルである4つの修飾因子、またはジゴキシゲニンである4つの修飾因子を有する、多数の二本鎖オリゴヌクレオチドを用いたアッセイも繰り返した。結果は、本明細書に記載されるように、添加剤がタイプIのミスプライミングを抑制したことを立証した。これらの結果は、添加剤におけるTmの影響も例証する。(本用途において、添加剤のTmは、上に定義するように、その未修飾の二本鎖配列の計算されたTmを意味する。修飾因子は、読取機を考慮に入れることができるが、実際のTmを僅かに、おそらく、1~2増加させる傾向がある。)タイプIのミスプライミングを抑制するために、添加剤は、二本鎖の最大、または最大付近のプライマーアニーリング温度およびプライマーTmに留まることが好みしい。実施例1において、最初の10サイクルのプライマーアニーリング温度は、55であった。実施例1において、37~63の範囲のTmを有する添加剤を用いた、600nM濃度での全ての場合で良好な結果が得られたが、最低Tmを有する添加剤である添加剤EP021のみが、300nMでも良好な結果が得られなかった。100nMおよび50nMの濃度で最も良く機能した添加剤は、少なくとも60のTmであった。PCR增幅反応におけるタイプIのミスプライミングの抑制において、添加剤は、少なくとも32、より典型的には、少なくとも50、より好ましくは、少なくとも60のTmを有することができる。

【0109】

本明細書に記載される添加剤が、タイプIのミスプライミングを抑制する一貫性のさらなるチェックとして、我々は、異なるプライマーを使用して、異なる標的配列についてLATE-PCRアッセイを実施した。本アッセイにおいて、実施例2に報告されるように、我々は、実施例1の最初の部分で良く機能した、未修飾の二本鎖オリゴヌクレオチドであるオリゴヌクレオチド22mer Aと、12の添加剤を比較した。添加剤は全て、22ヌクレオチドの長さ、幾つかの異なる配列、および2つ、3つ、または4つの末端ダブシル修飾因子である幾つかの異なる構造を有した。全てが、300nM濃度でのミスプライミング抑制において、添加剤22mer Aと少なくとも同じくらい良好であり、ほぼ半分が、僅か100nMの低濃度でそうであった。図6は、添加剤EP003および添加剤22mer Aの融解曲線であり、100nM濃度でミスプライミングを抑制したのは、本添加剤のみであったことを示す。

【0110】

実施例9は、第1の熱サイクル前のDNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性を測定するための、定量的LATE-PCRアッセイを示す。これと同じアッセイは、添加剤のDNAポリメラーゼ阻害能力を定量化し、比較するために使用することができ、これは、広範な濃度、温度、およびインキュベーション時間に渡ってアッセイすることができる。初期の反応混合物は、長さが27の塩基対であり、60の計算されたTmを有するハイブリッドを形成するように、それらの3'端で相互とアニーリングすることができる、高濃度の2つのオリゴヌクレオチド（それぞれ、62および75塩基対）を含む。これらは、それらの5'端でプライミング部位も有する。增幅プライマーは、初期の反応混合物に含まれない。反応の熱プロファイルは、10分間、50での等温浸漬で始まる。本ステップ中、重複するオリゴヌクレオチドは、それら自身をプライミングすることができる、つまり、ハイブリッド形成され、活性DNAポリメラーゼにより伸長される。これが生じる限り、プライマー用の二本鎖標的のコピーが作製され、これは、熱サイクル前に反応混合物に添加される。50での長期インキュベーション中のポリメラーゼ活性の活性の阻害は、本ステップ中に形成された標的のコピーの数を減少させるであろう。

【0111】

50での長期インキュベーションの後、高Tmプライマーを添加し、標的が作製されたものは何でも増幅するために、2段階のLATE-PCR増幅を実施する。さらなる二本鎖標的が生成されないように、増幅に使用するプライマーアニーリング温度（72）は、重複するヌクレオチドのTmをはるかに上回る。本アッセイにおいて、検出可能なレベルの産物を生成するために必要なサイクルの数（過剰プライマー鎖に対するSYBR Greenまたはプローブのいずれかで観察された）は、いくつの完全長鎖が、部分的に相補オリゴマーの初期の等温インキュベーション中に生成されたかに依存する。これは、同時に、あらゆる潜在的な酵素阻害剤の存在／不在によって、等温インキュベーション中にDNAポリメラーゼがどれだけ活性であるかに依存し、既知の組成物および濃度のこのような阻害剤が、反応混合物に添加された。

【0112】

我々は、本定量的アッセイにおいて、添加剤を試験し、これは、50のインキュベーション温度での、またはそれ以下のTmを有する添加剤（EP020、Tm50；EP022、Tm45）、および実質的にインキュベーション温度以上のTmを有する添加剤（EP046、Tm67）を含む。低Tmを有する添加剤は、50のインキュベーション中、少なくとも実質的に一本鎖を有し、一方、高Tm添加剤EP046は、二本鎖を有したであろう。低Tm添加剤の反応混合物への組み込みは、CTの遅延をもたらさないが、600nMの濃度でのEP046の組み込みは、ポリメラーゼが、Taqまたは抗体付加Taqであるかに関わらず、CTを遅延した。添加剤EP046の動態曲線を図13に示す。図13は、任意のDNAポリメラーゼ阻害剤の不在において、重複するオリゴヌクレオチドの3'端が、相互とハイブリッド形成し、伸長したことを明らかにする。温態始動のポリメラーゼを有する抗体の添加は、約1000倍、タイプIのミスプライミングを部分的に阻害したが、600nMのEP046のさらなる添加は、さらに10倍、タイプIのミスプライミングを阻害した。

実施例16は、長さが6ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングおよび22の塩基対の二本鎖領域を有する添加剤を用いた、同様の試験を報告する。添加剤は、全て、同じ鎖配列を含むが、修飾因子の数と配置が異なり、これは、実施例において、ダブシル基であった。両方の個々の鎖は、図18Cに図示するヘアピン形成であった。試験の方法は、1分間（実施例9の10分間ではなく）、50での等温浸漬、その後、氷上のインキュベーション、次いで、LATE-PCR増幅を含んだ。融解曲線分析は、2つの修飾因子（図19A）および3つの修飾因子（図19B、19C）を有する添加剤が、不適切な産物の生成を低減し、4つの修飾因子（図19D）を有する添加剤が、その生成を完全に抑制したことを示した。

実施例20は、前段階中にタイプIのミスプライミングをより厳密に単離する、実施例

10

20

30

40

50

9に従う試験を報告する。PCRアニーリング／伸長温度で一本鎖になる添加剤を使用することにより、可能なタイプIIミスプライミングが排除される。実施例20に報告された結果に基づき、我々は、a)温態始動抗体が、DNA合成を完全に抑制せず、抗体の存在下で生成された大半の産物は、タイプIのミスプライミングに起因する、b)氷上でインキュベーション中に合成された産物は、大部分は、タイプIのミスプライミングに起因する、c)添加剤EP010は、氷上の産物伸長の特異性を増加するように機能し、氷上で生成された大半の産物は、タイプIのミスプライミングに起因するため、EP010は、氷上での大半のプライマー伸長事象を阻害すると結論づける。添加剤EP010を含む増幅された産物の融解曲線(図23E)は、プライマーアニーリングおよび伸長が増幅中に実行された温度である72度で、二本鎖形態がもはや存在せず、実施例20で観察されたEP010の作用は、完全に、増幅の開始前の、50度および氷上でインキュベーション中のEP010の活性によるものであることを示す。実施例9に使用された添加剤の同様の分析は、これらが、EP010より高い融解ピーク(図示せず)を有し、したがって、実施例9における添加剤の作用は、増幅前のステップだけでなく、増幅中のステップにもよるものもあることを明らかにした。

PCR反応におけるタイプIIミスプライミングの抑制およびポリメラーゼ選択性の増加

【0113】

添加剤は、タイプIIのミスプライミングを抑制し、プライマーのハイブリッド形成された3'末端ヌクレオチドのDNAポリメラーゼの選択性を増加することができる。LATE-PCRアッセイにおける増幅中の制限プライマーの3'末端ヌクレオチドでのミスマッチに対する選択性を決定するために、我々は、両方のプライマー(一致する標的)に完全に相補的である標的を増幅し、また、我々は、過剰プライマーに完全に相補的であるが、制限プライマーの3'末端ヌクレオチドにミスマッチを1つ含む標的を個別に増幅する。代替的に、以下に記載するように、または実施例19で例証するように、3'末端ミスマッチは、プロッカーオリゴヌクレオチドの使用により作製することができる。我々は、DNA色素により二本鎖産物を検出する。「選択性」は、ミスマッチ標的の増幅からのシグナルのCTと、一致した標的の増幅からのシグナルのCTとの間の差(CT)である。添加剤を含まない試料で実施される時、このアッセイは、プライマー/ミスマッチ標的に対するプライマー/一致する標的についてのポリメラーゼの塩基選択性、ならびにプライマー/一致する標的の増幅の塩基効率を例証することができる。Taq DNAポリメラーゼにおいて、CTは、2増幅サイクル未満であり得る。添加剤によりもたらされる選択性の改善は、増幅反応混合物中の添加剤の含有に起因するCTにおける増加である。

【0114】

我々は、本選択性アッセイで、未修飾の二本鎖オリゴヌクレオチドおよび多数の添加剤を試験した。3回行われたアッセイの結果を実施例3に報告する。報告されたCT差(CT)は、3つの反復の平均に基づく選択性の改善である。アッセイのプライマーアニーリング温度より僅かに上のTmを有するにも関わらず、未修飾二本鎖オリゴヌクレオチド22merAは、最大300nMの濃度の2CTユニット未満で、Taq DNAポリメラーゼ自体の塩基選択性を改善した。我々は、2つ、3つ、または4つのダブル修飾因子の種々の構造の、同じ22ヌクレオチドの長さを有する多くの添加剤を試験した。実施例3に報告されるように、2つ、3つ、または4つのダブル修飾因子の多くの構造は、実質的に、ポリメラーゼの選択性を改善し、これにより、タイプIIのミスプライミングのその傾向を低減した。実施例3にさらに報告されるように、我々は、添加剤の修飾基としては有用ではないが、添加剤およびフルオロセイン(FAM)に有用な、3つの他の修飾因子も試験した。少なくとも幾つかの二本鎖オリゴヌクレオチドにおいて、修飾因子のジゴキシゲニン、クマリン、およびクエンチャーチーQSY21のそれぞれは、添加剤22merAと比較して、また、4つのFAM修飾因子を有する22ヌクレオチド長オリゴヌクレオチドと比較して、選択性を有意に改善した。

10

20

30

40

50

実施例 17 に報告されるように、我々は、22 の塩基対の二本鎖領域および長さが 6 ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有する、種々の量の 3 つの添加剤を用いて、増幅を同様に試験した。添加剤の配列を実施例 16 に示す。図 18 C に示すように、添加剤は、ヘアピン形成である 2 本の鎖を含んだ。修飾因子として 2 つ、および 3 つのダブシル基を有するこのような添加剤は、3 C_T ユニットを超える選択性 (C_T) において、中程度の改善を示した。選択性における最大の増加は、修飾因子として 4 つのダブシル基を有する、つまり、6 C_T ユニットを超える添加剤で達成された。

【 0 1 1 5 】

添加剤は、従来の対称 P C R 増幅において、タイプ I I のミスプライミングを抑制し、ポリメラーゼ選択性を増加させることもできる。実施例 11 は、1 つが両方のプライマーに完全に相補的であり、1 つが、1 つのプライマーに完全に相補的であるが、他のプライマーの 3' 末端ヌクレオチドの反対にミスマッチを含む、2 つの標的配列用の対称 P C R アッセイを報告する。アッセイは、反応混合物中に添加剤を用いずに、および反応混合物中に 2 つの添加剤の組み合わせを用いて行われた。E P 0 4 3 と命名されるその組み合わせは、300 nM の混合濃度で、ダブシル修飾因子を有する 2 つの二本鎖オリゴヌクレオチドを含んだ。実施例 11 のアッセイにおいて、プラチナ T a q D N A ポリメラーゼ、温態始動 D N A ポリメラーゼ、および高度識別対立遺伝子特異的プライマー対の組み合わせは、ミスマッチ標的と比較して、7.84 C_T 値で、一致する標的を優先的に増幅した。この検出特異性は、両方の D N A 標的の理論上の混合母集団における過剰の 229 のミスマッチ標的（すなわち、0.43% の意図する標的）中、1 つの一致する標的の検出に相当するであろう。相対的に、添加剤 E P 0 4 3 の同じ対称 P C R アッセイへの添加は、さらに 4.75 C_T 値から 12.59 C_T 値で、一致する標的を選んで特異性を増加させ、これは、検出特異性において、26.7 倍の増加に相当する、過剰の 6,615 のミスマッチ標的（すなわち、0.02%）中、1 つの一致する標的の検出に相当するであろう。

【 0 1 1 6 】

実施例 5 に報告される実験において、我々は、添加剤なし、低 T_m 添加剤 E P 0 2 0 (T_m 51)、および高 T_m 添加剤 E P 0 1 3 (T_m 62) を用いて、一連の L A T E - P C R 増幅を実施した。実験は、高度な厳密条件下（高アニーリング温度）、中程度の厳密な条件下、およびむしろ厳密でない条件下（プライマーの T_m と比較して低アニーリング温度）での、増幅反応を試験するために、異なるプライマーアニーリング温度の使用を含んだ。ミスプライミングの問題点は、典型的に、厳密性が低減されると悪化する。アッセイは、2 つの標的配列のため、二重アッセイであり、それぞれ、その独自のプライマー対およびその独自の検出プローブを有した。

【 0 1 1 7 】

プローブは、アンプリコンを修正するために、ハイブリッド形成時に蛍光を発する分子指標プローブであった。最初の 50 サイクルに対するプローブ蛍光の動態曲線を図 9 A ~ 9 F に報告する。

【 0 1 1 8 】

図 9 A は、本増幅反応において、プラチナ T a q D N A ポリメラーゼ、温態始動ポリメラーゼが、厳密な条件下（全てのサイクルにおいて、65 のアニーリング温度）でさえ、タイプ I およびタイプ I I のミスプライミングを抑制することができなかったことを示す。逆に、両方の添加剤は、使用された濃度でそうすることができた（図 9 B および 9 D）。最初の 20 サイクル中の低い厳密性（アニーリング温度 60.7）で、アニーリング温度で二本鎖ではない低 T_m 添加剤 E P 0 2 0 は、増幅中、タイプ I I のミスプライミングを抑制しなかったが（図 9 C）、高い T_m 添加剤 E P 0 1 3 は抑制した（図 9 F）。これは、特定の温度で生じるミスプライミングの種類を抑制するために、添加剤は、その温度で二本鎖でなければならないことを示す。図 9 D ~ 9 F の比較は、添加剤 E P 0 1 3 で、反復間の最少ばらつきが、最初の 20 サイクルに最も厳密なアニーリング条件 (6

10

20

30

40

50

6.5)を使用することにより達成され、ばらつきは、中程度の厳密性(64.2)より、最も厳密でない条件(60.7)で少なかったことを示す。後者の結果は、添加剤の機能的濃度である二本鎖の濃度が、低アニーリング温度で高かったという事実により説明され、添加剤濃度とプライマーアニーリング温度との間の相互関連を例示する。添加剤E P 0 1 3で、1つの標的配列が、反応において、他の産物配列より非常に効率悪く増幅したことが、図9D~9Fから認められるであろう。我々は、本相違が、効率が悪い増幅において、50nMから100nMに制限プライマー濃度を増加させることにより、非常に減少し得ることを認めた。

タイプIIIミスプライミングの抑制

【0119】

10

添加剤は、タイプIIIのミスプライミングを抑制することができる。実施例13は、タイプIIIのミスプライミングが生じ、別のアンプリコン鎖によって、1つのアンプリコン鎖のプライミングから得られる長い二本鎖産物を生成するのに十分に長い、65サイクルまでL A T E - P C R反応が実行された実験を報告する。我々は、添加剤なしの増幅、58のプライマーアニーリング温度に非常に近いTmを有する添加剤を用いた増幅(添加剤E P 0 4 7、Tm59.1)、および我々が添加剤E P 0 4 7の僅か約10分の1の少量をアニーリング温度以上の温度で二本鎖である添加剤と交換した添加剤の混合物を用いて試験した。本実施例において、我々は、実質的にアニーリング温度以上のTm(67.4)を有する高Tm添加剤を使用した。添加剤なしの3つの反復増幅の融解曲線は、増幅の65サイクル後、検出された産物が、意図する産物より高いTmを有したことを見出し、産物進化が生じたことを示す。動態曲線は、平坦位相の間、SYBRシグナルの上昇が生じたことを示し、同じく、産物進化が生じたことを示す。制限プライマーの5'端が、1対のA-ヌクレオチドの付加により修飾された時、結果は同じであった：融解曲線は、所望のアンプリコンより高いTmを有する産物を示した。非修飾の制限プライマーを用いた600nM濃度のE P 0 4 7を含むことは、少しの補助となつた：産物進化を数サイクル遅延し、3つの反復の2つにおいて、幾つかの検出された産物は、適切なTmであった。600nMのE P 0 4 7を含み、かつ修飾された制限プライマーを使用すると、産物進化を有意に低減し、3つの反復の1つで完全にそれを妨げた。未修飾の制限プライマーとともに使用される時に、600nMの全濃度で添加剤混合物E P 0 4 3を含むことにより、産物進化を有意に低減し、3つの反復の1つで完全にそれを妨げた。600nMのE P 0 4 3を含み、かつ修飾された制限プライマーを使用すると、産物進化を有意に低減し、3つの反復の2つで完全にそれを妨げた。したがって、プライマーアニーリング温度以上のTmを有するように設計される低濃度の添加剤は、タイプIIIのミスプライミングを抑制することができる。さらに、アンプリコン鎖の3'端が、必要に応じ、制限プライマーの5'端の修飾により達成することができる、ATヌクレオチド豊富にされる場合、効果を強化することができる。

20

【0120】

30

実施例15は、重度のタイプIIIミスプライミングを示したR N A標的配列用の、添加剤なし対照増幅アッセイを含む。二本鎖オリゴヌクレオチドおよび二本鎖オリゴヌクレオチドの4本鎖混合物の両方の添加剤を含むと、対照に認められるタイプIIIのミスプライミングを抑制することができることも示す。実施例15は、添加剤、反応混合物、および方法が、R N A標的をc D N A標的に変換するために使用される逆転写酵素を阻害しないことを例証する。

40

多重化

【0121】

50

添加剤は、多くのプライマー対を有する多くの標的配列について高度な多重反応を可能にすることができます。実施例8は、12の多重反応、つまり、単一反応混合物で12のプライマー対を使用する、12の標的配列の多重増幅を報告する。増幅反応は、65サイクルのL A T E - P C R増幅であった。標的配列は、ヒトミトコンドリアゲノムD N Aとして含まれ、これは、1000、100、および10の開始コピー数の反応混合物に含まれ

た。添加剤なしの対照増幅に加え、300nMおよび600nMの濃度で、添加剤E P 0 1 1を反応混合物に含んだ。増幅後、12の意図する産物が作製されたかどうかを確かめるために、反応混合物に、電気泳動分離を行った。加えて、アンプリコンを評価するために、ジデオキシ配列決定を実施した。図12の電気泳動ゲルの写真は、添加剤なしの、1000コピーで開始する増幅が、意図する一連の12の産物の產生に失敗したが、300nMおよび600nM濃度の添加剤E P 0 1 1付加の1000コピーで開始する増幅は、12の産物を產生した。ゲルは、本反応において、軽量の産物のバンドにより証明されるように、300nM濃度のE P 0 1 1が、ミスプライミングを完全に抑制しなかったことを明らかにした。添加剤E P 0 1 1が600nM濃度で反応混合物に含まれる時、ミスプライミング産物は、ゲルに見られなかった。この最後の産物に対するさらなる分析として、配列決定を行った。配列決定の結果は、十分な量の12のアンプリコンのそれぞれが生成され、単純化されたD i l u t e ' N ' G oプロトコルによるジデオキシ配列決定を可能にしたことを示した。標的の開始数が100および10コピーに低減された時の場合には、それは認められなかった。1000コピーのミトコンドリアDNAの結果は、ミスプライミングが、増幅前と増幅中の両方で、うまく抑制されたことを示す。

添加剤混合物

【0122】

添加剤の混合物である添加剤混合物E P 0 4 3を、実施例13と関連して上で論じた。混合物を使用する理由は、例えば、実施例1を参照することにより理解することができる。結果は、タイプIのミスプライミングの抑制が、典型的に、中高度の濃度の添加剤を必要とすることを示す。しかしながら、図5の動態曲線は、有意にプライマーアニーリング温度以上のTmを有する添加物の濃度を上げると、重合反応の効率が低下する傾向にあることを示す。さらに実施例13は、タイプI I Iのミスプライミングを抑制するために、高Tm添加剤が必要であり得ることを示す。添加剤の混合物は、増幅の効率の低下を最小にしながら、両方のタイプのミスプライミングを抑制するように設計することができる。一実施形態において、アニーリング温度に近いTmを有する高濃度(300nMから100nM)の添加剤と、アニーリング温度より高い温度で二本鎖である低濃度(25nMから300nM)の添加剤、具体的には、アニーリング温度より数度高い(または2つが反応で使用される場合、より高いアニーリング温度)Tmを有する添加物とを含む混合物の使用は、両方のタイプのミスプライミングを抑制するために使用することができる。添加剤の混合物は、4つの異なる鎖、つまり、共通の鎖を共有しない2つの二本鎖添加剤を含んでもよい。代替的に、添加剤の混合物は、3本の鎖、つまり、共通の鎖を共有する2つの二本鎖添加剤を含んでもよい。後者のアプローチは、増幅混合物に含まれる異なる鎖の数を低減する。

【0123】

我々は、実施例3に記載されるポリメラーゼ選択性アッセイで、未修飾の二本鎖オリゴヌクレオチドの混合物と添加剤の混合物の両方の、添加剤の混合物を試験した。実験結果を実施例4に報告する。試験された混合物は、全て、2つの添加剤が共通の鎖を共有する、3本鎖混合物であった。混合物は、全て、本実験では62であったプライマーアニーリング温度より数度上の、67.4のTmを有する高Tm添加剤と、57.4~59.1の範囲、つまり、アニーリング温度より僅かに下のTmを有する低Tm添加剤とを含んだ。混合物のうちの2つである添加剤041および添加剤042は、未修飾の二本鎖オリゴヌクレオチドを含んだ。未修飾のオリゴヌクレオチドを有する両方の混合物は、高いTmハイブリッドについては75nM、そして低いTmハイブリッドについては325nMの濃度で添加された時、相対的に僅かに2増幅サイクル未満のみ、ポリメラーゼの選択性を改善した。我々は、4つの添加剤の混合物も試験した。2つ(E P 0 4 1、E P 0 4 2)において、両方の二本鎖オリゴヌクレオチドは、3つのダブシリ修飾因子を含み、1つ(E P 0 4 3)において、高Tmオリゴヌクレオチドは、3つのダブシリを含み、一方、低Tmオリゴヌクレオチドは、4つのダブシリを含み、1つ(E P 0 4 5)において、両方のオリゴヌクレオチドは、4つのダブシリを含んだ。4つの全ての混合物は、添加剤

10

20

30

40

50

041および042より選択性を改善した。図7A～7Dおよび8A～8Dは、それぞれ、同じ600nMの全濃度であるが、高Tmハイブリッドの量が25nMから100nMまで変動する、混合物EP043およびEP045の動態曲線である。これらの曲線は、添加剤によりもたらされた阻害、および反復間のばらつきも明らかにする。CT結果および動態曲線を統合すると、各混合物において、混合物中での高Tmハイブリッドの最適量が存在する場合があることを示す。混合物EP043において、(a)高Tm構成要素の最低濃度(25nM)でさえ、ポリメラーゼ選択性を増加させる、(b)ポリメラーゼ選択性は、最大100nMまで高Tm構成要素の比率を増加することによっては、さらに増加されない。および(c)どの調合物も、その一致する標的に対するプライマーの増幅の効率を有意に阻害しない。混合物EP045において、(a)高Tm構成要素の最低濃度(25nM)でさえ、EP043より大幅にポリメラーゼ選択性を増加させる、(b)ポリメラーゼ選択性は、高Tm構成要素の濃度比率に比例して増加する、(c)全ての調合物は、その一致する標的に対するプライマーの増幅の効率を阻害する、および(d)阻害の程度は、高Tm構成要素の比率とともに増加する。これらの調合物は、反復間のばらつきが少なかったため、我々は、混合物EP043の最適な調合は、75/600/525nMであると判断し、また、我々は、混合物EP045の最適な調合は、50/600/550nMであると判断した。

我々は、実施例19において、3'末端ミスマッチがプロッカーオリゴヌクレオチドの使用により作製されるアッセイで、添加剤混合物EP043も試験した。そのアッセイのスキームを、図21Aおよび図21Bに一般的に図示する。図21A、21Bは、2つの二本鎖標的231、232を表すが、これらは、矢印233の制限プライマーの結合部位から僅かに下流の1つの塩基対(過剰プライマー鎖のGまたはAのいずれか)が異なる。過剰プライマーの結合部位、矢印234も、2つの標的に保存される。オリゴヌクレオチドプロッカー235は、標的231に相補的であり、それに結合し(図21A)、これは、選択される「ミスマッチ」標的である。プロッカー235は、対立遺伝子識別であり、標的232に対してミスマッチであり(図21B)、それに結合しない。したがって、プライマー233は、標的232に完全に結合し、伸長されるが、プライマー233の3'末端は、標的231に結合することができず、伸長を妨げる。図21Aにおいて、点線242は、プライマー233が伸長した時に作製されるであろう制限プライマー鎖である。図21Bにおいて、点線243は、プライマー233の伸長により作製された制限プライマー鎖である。プロッカー235は、末端フルオロフォア236および末端クエンチャー237で示されるが、プロッcker235は、増幅中、DNAポリメラーゼにより伸長可能にならないように、遮断された3'末端ヌクレオチドを有することが唯一必要とされる。図21A、21Bに示される特定の実施形態において、標的231、232は、プロッcker235から下流であり、また過剰プライマー234から下流の別の塩基対(図21Aの過剰プライマー鎖のG、または図21Bの過剰プライマー鎖プライマー鎖244のCのいずれか)が異なるように示される。フルオロフォア239およびクエンチャー240で標識される、配列特異的プローブ238は、標的231の増幅の産物(「ミスマッチ」標的)と結合するが、標的232の増幅、およびハイブリッド形成時のシグナルの産物に結合しない。プローブ238は、ポリメラーゼ選択性を強化するために使用されないという意味では、随意である。例えば、増幅産物の融解分析用に使用することができる。実施例19は、誘発されたタイプIIのミスプライミングの場合において、添加剤が増幅の効率を低下させる時、増幅は熱サイクル依存様式で遅延され、添加物の存在による選択性の強化の規模も、熱サイクル依存である時、熱サイクル依存において修正される必要がある選択性の見かけ強化は、効率が低下することを示す。添加剤の存在/不在を付加したプロッckerの存在下で、一連の標的希釈反応を使用するその修正を行う方法を、実施例19に例証する。

【0124】

我々は、十分な量の12の全ての産物が配列決定のために生成され得るかどうかを見る

10

20

30

40

50

ために、上述の実施例 8 の 12 多重の添加剤混合物 E P 0 4 3 を利用した。これらの実験において、我々は、A T 豊富な尾を追加することにより制限プライマーを修飾し、また、我々は、65 サイクルから 80 ~ 90 サイクルに、増幅反応を延長した。これらの修飾で、添加剤混合物 E P 0 4 3 が、50 / 600 / 550 nM の鎖濃度で含まれ、ゲノムミトコンドリア DNA の開始量が、100 コピーまたは 10 コピーのみであった時、12 全ての意図される産物は、配列決定に必要な量でうまく作製された。伸長した長さの増幅が、タイプ I II のミスプライミングの抑制のための厳密な試験で存在したという事実にも関わらず、これらの結果は、ミスプライミングが、増幅前と増幅中にうまく防止されたことを示す。

【0125】

10

実施例 12において、我々は、制限プライマーの 3' 端で異なる L A T E - P C R 増幅反応で、600 nM の全濃度で混合物 E P 0 4 3 を試験した。反応の 1 つは、G C 豊富な 3' 端 (G G C) を有する制限プライマーを含んだ。他の反応は、A T 豊富な 3' 端 (A A G) を有する制限プライマーを含んだ。添加剤なしの対照と比較して、G C 豊富な 3' 端を有するプライマーを用いた増幅での添加剤 E P 0 1 3 (3 つのダブシル修飾因子、T m 60) の含有は、相対的に、重合の効率をほとんど低下させなかった (4 サイクルの C T 遅延)。しかしながら、添加剤なしの対照と比較して、A T 豊富な 3' 端を有するプライマーを用いた、同じ濃度での同じ添加剤の含有は、効率を有意に大きく低下させた (11 サイクルの C T 遅延)。70 サイクル続けられた両方の反応において、添加剤 E P 0 1 3 は、添加剤なしの対照と比較して、4 つの反復間のばらつきを有意に減少させた。

20

冷却停止プロトコルおよび全タイプのミスプライミング

【0126】

タイプ I II のミスプライミングの可能性は、リアルタイム検出の P C R サイクルに低温度検出ステップを含むことにより強化される。タイプ I II のミスプライミングは、L A T E - P C R 増幅を長くし、一本鎖産物を生成することにより強化される。我々は、リアルタイムの低温度検出の代わりとして、低温度ステップを含んでもよい操作を実施するために、増幅反応が 1 つ、または幾つかの中間点で中断される、我々が「冷却停止」と呼ぶプロトコルを試験した。実施例 10 は、操作が融解分析である、「冷却停止」プロトコルを図示する。実施例 10 の増幅は、蛍光検出のためにハイブリッド形成プローブを使用する、70 サイクルの 2 段階 L A T E - P C R 増幅である。600 nM 濃度で、添加剤 E P 0 1 0 を試験した。比較目的のため、増幅はリアルタイム検出で実施された。リアルタイム検出において、増幅サイクルの各アニーリング / 伸長ステップ後に、低温度検出ステップ (60) を追加した。熱サイクルの関数としてのプローブ蛍光を図 14 A に示すが、これは、1000、100、および 10 コピーの標的配列で開始する増幅の反復間の適度のばらつきを示す。図 14 A は、サイクル 70 で集束し始める初期標的の 3 つの量の曲線も示す。リアルタイム低温度検出を含むと、タイプ I II のミスプライミングの確率が上昇した。我々は、3 つ全ての開始コピー数について、リアルタイム低温度検出を用いないが、45 で始まる融解を実施するために、40 サイクル後の中断を伴う増幅を繰り返した。その後、我々は、70 サイクル後、終結まで増幅を再開し、そこでは第 2 の融解が実施された。第 1 融解の融解曲線を図 14 B に示す。3 つの異なる開始量の標的の反復は、明らかに識別可能であり、ほとんどばらつきを示さない。第 2 融解の融解曲線を 14 C に示す。サイクル 70 までに、初期標的量の 3 つのレベルの曲線が集束し、ばらつきは、ほとんど検出されない。

30

【0127】

40

図 14 B および 14 C に示される結果を説明するために、以下を記載する。ミスプライミングが低温度の中断により起こる場合、一本鎖 DNA は、二本鎖 DNA に変換され、一本鎖産物の量は、サイクル 40 から 70 の間で減少する。これは、起こらなかった。ミスプライミングが 40 サイクル後の中断中に生じる場合、反復間のばらつきは、サイクル 40 から 70 の間で増加する。これは、起こらなかった。ミスプライミングが中断中に生じる場合、異なる量の初期標的から生成される一本鎖産物の量は、70 サイクル後に等しく

50

ならないであろう。これは、起こらなかった。図14A、図14B、および図14Cの比較は、添加剤EP046が、本「冷却停止」増幅で、全てのタイプのミスプライミングを完全に抑制したことを示す。1回の中断を伴う「冷却停止」プロトコルは、サイクル40前とサイクル41後のあらゆる低温度ステップを排除する。これは、サイクル41以外の全てのサイクル中のタイプIIおよびタイプIIIのミスプライミングの確率を低下させる。第1融解は、プライマーアニーリング温度以下の温度での長い時間を含み(本実施例において、約15分)、したがって、他のサイクルで低温度ステップを排除する代わりに、融解中のミスプライミングの可能性(ミスプライミングされた3'端の伸長を1つ含むであろう)を増加させる。この交換は、反復間のばらつきの低減を補助してもよい。「冷却停止」プロトコルは、ミスプライミングのそれらの作用について、添加物の組成物および濃度をスクリーニングするために使用することができるよう理解されるであろう。

10

DNAポリメラーゼの5'エキソヌクレアーゼ活性の阻害

【0128】

添加剤は、例えば、Taq DNAポリメラーゼおよびTfi (+) DNAポリメラーゼ等の、その活性を保有するDNAポリメラーゼの5'エキソヌクレアーゼ活性を阻害するのに効果的であり得る。(本効果は、5'エキソヌクレアーゼドメインを保有しないクレノー断片、およびそれに不活性を付与するように修飾される5'エキソヌクレアーゼドメインを含むTfi (-) DNAポリメラーゼ等の、その活性を有さないDNAポリメラーゼには適用されない。)我々は、DNAポリメラーゼの5'エキソヌクレアーゼ活性に対する添加剤の阻害作用を測定するためのプライマーに依存しない依存手段として、実施例6に報告されるアッセイを開発した。そのアッセイにおいて、フルオロフォアとクエンチャード二重標識された伸長不可能なプローブは、プライマーを反応混合物に含まずに標的とハイブリッド形成される。次いで、反応混合物は、プローブ蛍光がリアルタイムで検出される間、温度が45から60の間で、45回繰り返される、熱の周期的変動を受ける。プローブ切断は、ポリメラーゼの5'エキソヌクレアーゼ活性を示す蛍光の増加をもたらす。300nMの濃度で、幾つかの添加剤を本アッセイで試験し、プローブを含むが、標的を含まない対照アッセイと比較した。対照アッセイにおいて、ハイブリッドが形成されず、プローブは切断されなかった。プローブおよび標的を含むが、添加剤を含まないアッセイにおいて、蛍光の大幅な増加が生じた。プローブ、標的、および添加剤を含むアッセイにおいて蛍光の増加は、標的を有するが、添加剤を用いないアッセイと比較して、著しく減少し、5'ヌクレアーゼ活性の顕著な阻害を示す。それぞれ3つおよび4つの共有結合的に連結されたダブシル基を有する添加剤EP004およびEP001は、プローブのプライマー依存5'エキソヌクレアーゼ切断を完全に阻害した。その5'ヌクレオチドのそれぞれに、共有結合的に連結されたダブシル基を有する添加剤EP008は、本アッセイにおいて、プライマー依存5'エキソヌクレアーゼ活性も完全に阻害した。それと比較して、3'ヌクレオチドのそれぞれに共有結合的に連結されたダブシル基を有する添加剤EP009は、本アッセイにおいて、プライマー依存5'エキソヌクレアーゼ活性を部分的にしか阻害しなかった。結果は、二本鎖オリゴヌクレオチド上のダブシル修飾因子基が、位置依存様式で5'エキソヌクレアーゼ活性の阻害を強化することができることを示す。添加剤の両方の5'端上にダブシル基が好ましく、3つおよび4つのダブシル基が2つのダブシル基より好ましい。さらなる実験は、Tfi (+) DNAポリメラーゼについて一貫性のある結果を示した。

20

実施例18に報告するように、我々は、22の塩基対の一本鎖領域および長さが6ヌクレオチドの一本鎖オーバーハングを有する、種々の量の3つの添加剤を用いて、実施例6の温度周期的変動アッセイを実施した。添加剤の配列を実施例16に示す。図18Cに示すように、添加剤は、ヘアピン形成である2本の鎖を含んだ。このような添加剤は、修飾因子として、2つ、3つ、または4つのダブシル基を含んだ。図20に示すように、2つのダブシル修飾因子を有する添加剤は、濃度依存様式で、Taq DNAポリメラーゼのプライマー依存5'エキソヌクレアーゼ活性を阻害し、200nMおよび400nMの濃度では、活性を大きく阻害し、600nMの濃度では、ほぼ完全に活性を阻害した。3つ

30

40

50

および4つの修飾因子を有する試験された添加剤も、濃度依存様式で、ポリメラーゼのプライマー依存5'エキソヌクレアーゼ活性を阻害したが、図20に示される結果より幾分小幅であった。

【0129】

PCR增幅中の5'ヌクレアーゼ活性の阻害を測定するために、我々は、実施例5に記載されるLATE-PCR增幅から得られたプローブおよびアンプリコンを、ハイブリッド形成条件に供した後、融解分析を行った。プローブ単独の反応混合物も、融解分析を受けた。実験を実施例7に報告し、融解曲線を図11Aおよび11Bに示す。図11Aのプローブ単独と添加剤なしの増幅からの蛍光の比較は、幾つかのプローブ分子が切断されたことを示す：増幅反応からの蛍光は、融解が完了した後のプローブ蛍光のレベルまで低下しなかった。図11Bは、増幅反応混合物が600nMの濃度で添加剤EP013を含む時、ポリメラーゼ（この場合、Taq DNAポリメラーゼ）の5'ヌクレアーゼ活性によるプローブ切断が阻害されたことを示す：増幅反応からの蛍光は、融解が完了した後のプローブ蛍光のレベルに低下した。
10

PCRプライマーとしての添加剤

【0130】

実施例14は、CRプライマーの形態で添加剤を例証する。LATE-PCR增幅の典型的な過剰プライマーを、タイプIのミスプライミングを抑制する添加剤に変換するためには、以下の2つのことが行われた：最初に、修飾基、この場合、ダブシル基をプライマーの5'末端に添加した；第2に、過剰プライマーに部分的に相補的であり、5'末端ダブシル基と3'末端ダブシル基の両方を有した逆相補体鎖が、100、200、または300nMの濃度で、反応混合物に含まれた。幾つかのミスマッチを逆相補体鎖に導入することによって、過剰プライマーと標的配列により形成されたハイブリッドのTmと比較して、過剰プライマーおよび逆相補体鎖により形成されたハイブリッドのTmを低くした（代替的に、逆相補体鎖の長さを縮小することができる）。過剰プライマーおよび逆相補体鎖により形成されたハイブリッドは、3つの修飾基を含んだ。二本鎖増幅産物の融解分析は、200nMまたは300nMの濃度で反応混合物中に逆相補体配列を含むと、少量から全く他の産物を有さない、予想されたアンプリコンをもたらしたことを示した。逆に、反応混合物に逆相補体配列を用いない増幅は、意図されたアンプリコンと低Tm産物の混合物をもたらし、融解曲線は、反復間でばらつきを示した。
20
30

【0131】

前述の実施例は、それに合うように、添加剤、反応混合物、および方法の特定の好適な実施形態を図示することを意図し、包括的または限定的であるものと解釈されるべきでない。多くの変形が可能であり、当業者には明らかであろう。例えば、PCR以外の増幅法が利用されてもよく、添加剤は、二本鎖DNA分子以外の修飾された型の分子であってもよい。他の変形は、当業者に明らかであろう。

実施例

実施例1 タイプIミスプライミングの抑制

【0132】

二本鎖および一本鎖アンプリコンを生成するために、一対のプライマーと单一標的を使用して、LATE-PCRアッセイを実施した。増幅の終わりに、融解分析により二本鎖産物を特徴付けた。二本鎖オリゴヌクレオチド以外の反応構成要素および反応条件は、以下の通りである。
40

制限プライマー 5' CCTGGATTATGCCCTGGCACCAT (配列番号1)

過剰プライマー 5' CCTTGATGACGCTTCTGTATCTA (配列番号2)

標的 5' CCTGGATTATGCCCTGGCACCATTAAGAAAAATATC
ATCTTTGGT

GTTCCTATGATGAATATAGATACAGAACGCGTCATCA
AAG (配列番号3)

【0133】

1 X PCR緩衝剤 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3 mM MgCl₂、250 nM dNTP、50 nMの制限プライマー、1000 nMの過剰プライマー、0.24 X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA)、約1000ゲノムのヒトゲノムDNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を有する1.25ユニットのTaq DNAポリメラーゼ (Invitrogen, Carlsbad, CA) から成る25 μl容量で、LATE-PCR増幅を実施した。添加剤なしの反応に加えて、50、100、300、600、および1000 nMの濃度の添加剤を利用して、各添加剤について、3重の、増幅反応を行った。

【0134】

これらの反応の熱プロファイル条件は、以下の通りである：10サイクルにおいては、95 / 10 s - 55 / 30 s - 70 / 30 s、その後、40サイクルにおいては、95 / 10秒 - 50 / 30秒 - 70 / 30秒、その後、97まで30秒間隔で1ずつ上昇しながら、55で融解開始。

【0135】

二本鎖DNA産物のSYBR Green蛍光 (-dF/dT, SYBR) の第1導関数を使用して、融解曲線分析により、50サイクルの終わりに反応を分析した。加えて、特定の反応について、二本鎖産物の産生動態（熱サイクルの関数としてSYBR強度読み取り）を分析した。

【0136】

A. 16mers

【0137】

16ヌクレオチド長である以下の添加剤のそれぞれが、開始反応混合物（末端プロッカ-C₃は、三炭素リンカー鎖である）に含まれた。

16mer A. 5' C A C G A C C T C G C C G A C C (C₃)
(C₃) G T G C T G G A G C G G C T G G 5' (配列番号4)

16mer B. 5' C A C G A C C T C G C T G A C C (C₃)
(C₃) G T G C T G G A G C G A C T G G 5' (配列番号5)

E P 0 4 8 : 上部鎖の3'端に1つのダブルシルを有する16mer B (配列番号6)

E P 0 4 9 : 底部鎖の3'端に1つのダブルシルを有する16mer B (配列番号7)

E P 0 2 7 : 各鎖の3'端に1つずつ、2つのダブルシルを有する16mer B (配列番号8)

【0138】

添加剤なしで、増幅は、「適切な」産物以外、つまり、プライマーにより定義される二本鎖産物（アンプリコン）以外の産物を生成した。意図される産物が下方矢印で特定される、300 nM濃度の添加剤16mer Aを含む3つの反復増幅反応の融解曲線を図1に示す。丸11は、3つの反復の曲線である。（1）適切な産物は、不適切な産物を全体的に除いて作製された、および（2）3つの反復は非常に一致（重複曲線）していたため、この増幅は、非常に良好であると判断された。同様の結果が、高濃度の16mer Aで得られた。低濃度（50 nM、100 nM）で、大量の不適切な産物が確認され、3つの反復は一致しなかった。

【0139】

300 nM濃度の添加剤16mer Bの融解曲線を図2に示す。丸21は、3つの反復の曲線である。大量の不適切な産物が確認され、3つの反復が一致していなかったため、この増幅は、非常に不適切であると判断された。利用された濃度のいずれにおいても、増幅は、不適切な産物を全体的に除いて適切な産物を生成しないことが確認され、いずれにおいても、反復は、高度に一致しなかった。不適切な産物は、添加剤なしで得られた不適切な産物とは非常に異なり、これは、添加剤16mer Bがミスプライミングを引き起こ

10

20

30

40

50

すことを示した。

【0140】

意図される産物が下方矢印で特定される、 600 nM 濃度の添加剤 E P O 4 9 の融解曲線を図3に示す。丸31は、3つの反復の曲線である。(1)適切な産物は、不適切な産物を全体的に除いて作製された、および(2)3つの反復は非常に一致(重複曲線)していたため、この增幅は、非常に良好であると判断された。同様の結果が、高濃度で得られたが、低濃度は、反復間で一致しなく、不適切な産物をもたらした。添加剤 E P O 4 8 は、 100 および 600 nM の濃度で、より一致した産生を示し、両方の鎖がミスプライミングする可能性があることを示した。

【0141】

10

意図される産物が下方矢印で特定される、 100 nM 濃度の添加剤 E P O 2 7 の融解曲線を図4に示す。丸41は、3つの反復の曲線である。(1)適切な産物は、不適切な産物を全体的に除いて作製された、および(2)3つの反復は、曲線間ににおいて多少のばらつきを伴うが、適度に一致(重複曲線)していたため、この增幅は、非常に良好ではなく、良好であると判断された。3つの反復は非常に一致していたため、本添加剤の高濃度で、結果は、非常に良好であると判断された。しかしながら、 50 nM で、著しく不適切な産物が作製され、反復は、一致しなかった。

【0142】

E P O 2 7 を用いた増幅の動態分析を図5に示す。丸51は、 100 nM の濃度での3つの反復であり、丸52は、 300 nM の濃度での3つの反復であり、丸53は、 600 nM の濃度での3つの反復であり、丸54は、 1000 nM の濃度での3つの反復である。 100 nM 濃度で、平坦域に3つの反復間でばらつきがある。 300 nM を含む3つの反応は、 600 または 1000 nM を含む反応より、完全に重複した動態を有し、高効率であった。したがって、 300 nM のE P O 2 7 は、本アッセイにおいて、最適な量であった。

20

B. 他の添加剤

【0143】

30

追加の修飾因子を用いない二本鎖オリゴヌクレオチドから成り、12、18、20、22、および24の長さのヌクレオチドの幾つかの添加剤を、 50 、 100 、 300 、 600 、および 1000 nM の濃度で、本実施例のアッセイで試験した。A部に説明される16mersに関して、結果は、一致しなかった。例えば、試験された3つの異なる12mersのうち、1つは、全濃度で適切な産物を産生せず、1つは、 1000 nM 濃度でのみ、適切な産物を生成し、1つは、 600 nM 以上の濃度で適切な産物を産生した。試験された8つ長いオリゴヌクレオチドのうち、半分は、 600 および 1000 nM の最高濃度でさえ大量の不適切な産物を産生した。3つのみが、 300 nM 濃度で全体的に不適切な産物を除いて適切な産物を生成し、低濃度では、いずれもそうではなかった。我々は、添加剤 22mer A が本アッセイで最良であると判断した(末端プロッカー p は、リン酸である)。

40

22mer A . 5' G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A p
p C C T C G T T T T A T C G T T A C T C C A T 5' (配列番号
9)

【0144】

2つまたは4つのいずれかの末端修飾因子を含み、8、11、および22の長さのヌクレオチドである二本鎖オリゴヌクレオチドから成る幾つかの添加剤も試験した。修飾因子は、ダブシリル、またはジゴキシゲニン(DIG)のいずれかであった：

添加剤 E P O 1 0 . 5' ダブシリル G G T C A G A T G A A A A T G A T A C G T G ダブ

50

シル

ダブシル C C A G T C T A C T T T T A C T A T G C A C ダブ
シル 5 '

(配列番号 10)

添加剤 E P 0 1 8 . 5 ' G G T C A G A T G A A A A T G A T A C G T G ダブシル
ダブシル C C A G T C T A C T T T T A C T A T G C A C 5 '

(配列番号 11)

添加剤 E P 0 2 0 . 5 ' ダブシル G A A A T A A A A T A A A A A T A A A A T A ダブ
シル

ダブシル C T T T A T T T T A T T T T A T T T T A T ダブシル 10
5 '

(配列番号 12)

添加剤 E P 0 2 1 . 5 ' ダブシル C A G C C G G C ダブシル
ダブシル G T C G G C C G ダブシル 5 ' (配列番号 13)

添加剤 E P 0 2 2 . 5 ' ダブシル C C G C C G G C ダブシル
ダブシル G G C G G C C G ダブシル 5 ' (配列番号 14)

添加剤 E P 0 2 3 . 5 ' ダブシル G C G T A C G C A G G ダブシル
ダブシル C G C A T G C G T C C ダブシル 5 ' (配列番号 15)

添加剤 E P 0 2 4 . 5 ' ダブシル G C G T A C G A A G G ダブシル
ダブシル C G C A T G C T T C C ダブシル 5 ' (配列番号 16) 20

添加剤 E P 0 2 6 . 5 ' D I G G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A D
I G

D I G C C T C G T T T T A T C G T T A C T C C A T D I G
5 '

(配列番号 17)

添加剤 E P 0 2 8 . 5 ' ダブシル T G A G A G A T G A A A A T G A T C G A G T ダブ
シル

ダブシル A C T C T C T A C T T T T A C T A G C T C A ダブシル
5 '

(配列番号 18)

添加剤 E P 0 2 9 . 5 ' G G T C A G A T G A A A A T G A T A C G T G D I G
D I G C C A G T C T A C T T T T A C T A T G C A C 5 '

(配列番号 19)

【0145】

本群の添加剤の全ては、600nMと等しい、またはそれ未満の濃度で、全体的に他の産物を除いて適切な産物を生成した。1つ(E P 0 2 1)を除く全てが、300nMかまたはそれ未満の濃度でそうであった。添加剤 E P 0 2 8 は、100nMの濃度でそうであり、添加剤 E P 0 1 0 は、50nMの濃度でそうであった。

実施例2. タイプIミスプライミングの抑制

【0146】

異なるプライマーを有する異なる標的用に、実施例1で最良の未修飾添加剤であると判断された、未修飾の二本鎖オリゴヌクレオチド22merA、および幾つかのダブシル修飾オリゴヌクレオチドを本アッセイに使用した。100および300nMの濃度で、増幅の開始前に、各添加剤をLATE-PCR増幅反応混合物に個別に添加した。二本鎖DNA産物のSYBR Green蛍光(-dF/dT, Sybr)の第1導関数を使用して、融解分析により、反応を50サイクルの終わりに分析した。加えて、特定の反応について、二本鎖産物の産生動態(熱サイクルの関数としてSybr強度読み取り)を分析した。二本鎖オリゴヌクレオチド以外の反応構成要素および反応条件は、以下の通りである。

制限プライマー 5' A A A T T G C G T C A T T G T T T C A C A G G G C C A
 (配列番号 20)

過剰プライマー 5' A A T C T G G G T G G T G G T C A T A C (配列番号 21)

標的 5' A A T C T G G G T G G T G G T C A T A C A G G T C A T C A C T G T A A
 A A T T C T T T G A
 A C T T T T C T G T A T A T A T C T T G A A A A T T T T G G A A A A A
 A A T G T T G G
 A A A A C T T A A A A G G C T G T T G C T T G C T C A T A T T G G C G G
 T A C A T A T 10
 A C A A A A G T G G A A A G G A T G A G A T T G A T T G G C A T G G C C C
 T G T G A A
 A C A A T G A C G C A A T T T (配列番号 22)

【0147】

1 X Invitrogen 緩衝剤 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3 mM MgCl₂、250 nM dNTP、50 nMの制限プライマー、1000 nMの過剰プライマー、0.24 X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA)、約1000ゲノムのヒトゲノムDNAを有する1.25ユニットのTaq DNAポリメラーゼ (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) から成る25 μl容量で、LA TE-PCR増幅を実施した。これらの反応の熱プロファイル条件は、以下の通りである：30分間、25 °C、その後、50サイクルにおいては、95 / 10 s - 62 / 20 s - 70 / 20 s、その後、42サイクルにおいては、1ずつ上昇しながら55 / 30 sで融解開始。（20 sに見られる略語「s」は、「秒」である。）全ての反応は、二本鎖DNA産物のSYBR Green蛍光の第1導関数を使用して、50サイクルの終わりで分析された。 20

【0148】

以下の添加剤を試験した。

添加剤 22mer A . 5' G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A p
 p C C T C G T T T T A T C G T T A C T C C A T 5' 30
 (配列番号 9)

添加剤 E P 0 0 1 . 5' ダブシル G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A ダブシル
 ブシル
 ダブシル C C T C G T T T T A T C G T T A C T C C A T ダブシル 5' 30
 (配列番号 23)

添加剤 E P 0 0 2 . 5' ダブシル G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A ダブシル
 ブシル
 ダブシル p C C T C G T T T T A T C G T T A C T C C A T ダブシル 5' 40
 (配列番号 24)

添加剤 E P 0 0 3 . 5' G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A ダブシル
 ダブシル C C T C G T T T T A T C G T T A C T C C A T ダブシル 5' 80
 (配列番号 25)

添加剤 E P 0 0 4 . 5' ダブシル G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A p
 ダブシル C C T C G T T T T A T C G T T A C T C C A T ダブシル 5' 90
 (配列番号 26)

10

20

30

40

50

添加剤 E P 0 0 5 . 5' ダブシル G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A ダブ
シル

添加剤 C C T C G T T T A T C G T T A C T C C A T 5' ,
(配列番号 27)

添加剤 E P 0 0 6 . 5' ダブシル G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A p
添加剤 C C T C G T T T A T C G T T A C T C C A T 5' ,

(配列番号 28)

添加剤 E P 0 0 7 . 5' G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A ダブシル
p C C T C G T T T A T C G T T A C T C C A T ダブシル 5' ,
(配列番号 29)

10

添加剤 E P 0 0 8 . 5' ダブシル G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A p
p C C T C G T T T A T C G T T A C T C C A T ダブシル 5' ,
(配列番号 30)

添加剤 E P 0 0 9 . 5' G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A ダブシル
添加剤 C C T C G T T T A T C G T T A C T C C A T 5' ,
(配列番号 31)

添加剤 E P 0 2 0 . 5' ダブシル G A A A T A A A A T A A A A A T A A A A T A ダブ
シル

ダブシル C T T T A T T T T A T T T T A T T T A T ダブシル
5' ,
(配列番号 12)

20

添加剤 E P 0 5 2 . 5' ダブシル G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A ダブ
シル

p C C T C G T T T A T C G T T A C T C C A T 5' ,
(配列番号 32)

添加剤 E P 0 5 3 . 5' G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A p
ダブシル C C T C G T T T A T C G T T A C T C C A T ダブシル
5' ,
(配列番号 33)

30

【 0 1 4 9 】

(1) 適切な産物は、全体的に不適切な産物を除いて作製された、および(2) 3つの反復試験は非常に一致(重複曲線)していたため、300 nM濃度の二本鎖オリゴヌクレオチド22mer Aは、非常に良好であると判断された。しかしながら、反復の1つが、全体的に不適切な産物を排除しなかったため、100 nM濃度の22mer Aの場合においてはそうではなかった。ダブシル含有添加剤の全ては、300 nMでも非常に良好であると判断された。これらのうちの5つ(E P 0 0 1 、 E P 0 0 2 、 E P 0 0 3 、 E P 0 0 4 、および E P 0 0 5)も、100 nM濃度で非常に良好であると判断された。図6は、100 nMの添加剤 E P 0 0 3 および添加剤 22mer A を用いた3つの反復反応についての融解曲線を示す。丸61は、添加剤 22mer A の3つの反復の曲線である。丸62は、添加剤 E P 0 0 3 の3つの反復の曲線である。

40

実施例3 . タイプIIのミスプライミングおよびポリメラーゼ選択性

【 0 1 5 0 】

我々は、両方のプライマー(一致する標的)に相補的であった標的を増幅し、また、我々が、過剰プライマーに相補的であったが、制限プライマーの3'末端ヌクレオチドにミスマッチを1つ含む標的を個別に増幅した、LATE - PCR アッセイを我々は実施した。我々は、DNA色素、この場合、SYBR Greenで、リアルタイムで、つまり、PCRサイクル毎のプライマーアニーリング部分中に、二本鎖産物を検出した。任意の濃度の添加剤の存在下での3'末端ミスマッチに対する選択性は、ミスマッチ標的の増幅か

50

らのシグナルの閾値サイクル (C_T) と、一致する標的の増幅からのシグナルの C_T との間の差 (ΔC_T) である。増幅反応を3重で行った。 C_T 差は、3つの反復の平均を使用して計算される。DNAポリメラーゼの選択性を改善するための添加剤の効果は、添加剤を用いた C_T 差から添加剤なしの C_T 差を引いたものである。本実施例および後続の実施例の「選択性」の表題下で、我々は、 C_T ユニット、つまり、 ΔC_T として、添加剤の使用に起因する C_T 差の改善を報告する。

【0151】

プライマーおよび一本鎖標的の配列は、以下の通りである。

制限プライマー	5' CGTAAGATTACAATGGCAGGCTCCAGT	10
	(配列番号 34)	
過剰プライマー	5' GCCCAAGTTTATCGTTCTCTCA	
	(配列番号 35)	
一致する標的 (A) .	5' CGTAAGATTACAATGGCAGGCTCCAG <u>A</u>	
	AGGTTCTAA	
	GTGCCATGATACAAAGCTTCCCAATTACTA	
	AGTATG C	
	TGAGAA GAACGATAAAACTTGGG (配列番号 36)	
ミスマッチ標的 (T) .	5' CGTAAGATTACAATGGCAGGCTCCAG <u>T</u>	20
	AGGTTCTA AGTGCCATGATACAAAGCTTCCCAATTACTAA	
	GTATGCTG	
	AGAAGAACGATAAAACTTGGGCAA (配列番号 37)	

【0152】

下線付きおよび太字ヌクレオチドは、過剰プライマー鎖の相補体が、制限プライマーの3'末端ヌクレオチドに一致またはミスマッチのいずれかであるヌクレオチドである。

【0153】

1 X Invitrogen PCR 緩衝剤 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3 mM MgCl ₂ 、250 nM dNTP、50 nM の制限プライマー、1000 nM の過剰プライマー、0.24 X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA)、約1000 の一本鎖標的 A (一致) または (ミスマッチ) を有する 1.25 ユニットのプラチナ Taq DNA ポリメラーゼ (Invitrogen, Carlsbad, CA) から成る 25 μl 容量で、3重で、LATE-PCR 増幅を実施した。これらの反応の熱プロファイル条件は、3分間、95°、その後、60° サイクルにおいては、95° / 5 s - 62° / 20 s - 72° / 30 s であった。両方の標的の開始コピー数が同じであること、この場合、両方の標的の C_T が同じであることを確実にするために、2つの標的を含む本アッセイおよび他のアッセイにおいて、我々は、両方の標的に完全に相補的である過剰プライマー、および同様に、両方の標的に完全に相補的である対照制限プライマーを使用して、対照増幅を行った。(対照増幅が、開始コピー数が同じでないことを認めた場合、2つの選択肢がある：再調合するか、または本明細書に報告される全ての実施例の場合のように、 C_T 差が僅かの場合、差に合わせて観察された C_T 値を修正する。)	30
	40

【0154】

Tm が報告される場合には、それは、修飾因子を有さない二本鎖添加剤の計算された融解温度である。本明細書に示される二本鎖添加剤の Tm は、Markham and Zuker (2005) DINAMELT web server for nucleic acid melting prediction, Nucleic Acids Res. 33: W577-W581、および Markham and Zuker (20	50
---	----

08) UNAFOLD: software for nucleic acid folding and hybridization. In Keith, J.M., ed., BIOINFORMATICS, vol. II, Structure, Functions and Applications, No. 453 in Methods in Molecular Biology, Ch. 1, pages 3-31 (Human Press, Totowa, New Jersey. ISBN 978-1-60327-428-9に従い計算された。

A. 添加剤なし

【0155】

本アッセイは、添加剤なしで行われた。SYBR Greenシグナルは、リアルタイム、つまり、全PCRサイクルのプライマーアニーリング部分中に検出された。増幅サイクル数の関数としての蛍光強度読み取りは、酵素が、一致する標的について適度に固有の選択性を有することを示す。添加剤が本アッセイで試験された時、添加剤なしの対照も含まれ、添加剤なし対照の一致する標的配列とミスマッチの標的配列との間の C_T 差は、添加剤の一致する標的配列とミスマッチの標的配列との間の C_T 差から差し引かれ、存在する選択性改善数 (ΔC_T) に達する。

10

B. 修飾因子を有さない二本鎖添加剤

【0156】

20

各鎖の3'末端がリン酸(p)で覆われ、DNAポリメラーゼによる伸長を防止する、「22merA」と命名される以下の22ヌクレオチド長の二本鎖オリゴヌクレオチドは、3つの異なる濃度で、添加剤として利用された。

22mer A. 5' G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A p
p C C T C G T T T T A T C G T T A C T C C A T 5'
(配列番号9)

【0157】

選択性の結果(ミスマッチの標的の C_T から一致する標的の C_T を引く)を表1に示す。

30

【表1】

添加剤	長さ(NTの)	Tm、°C	濃度、nM	選択性、 ΔC_T
22merA	22	63.1	100	0.1
			200	1.2
			300	1.8

C. 2つのダブシリ修飾因子を有する二本鎖添加剤

40

【0158】

実施例1に記載される二本鎖オリゴヌクレオチド16merB(配列番号5)は、上部鎖の5'端にダブシリ、および底部鎖の3'端にダブシリを配置することにより(添加剤EP050、配列番号38)、ならびに上部鎖の3'端にダブシリ、および底部鎖の5'端にダブシリを配置することにより(添加剤EP051、配列番号39)、2つのダブシリで修飾された。上のB部に記載される二本鎖オリゴヌクレオチド22merA(配列番号9)は、上部鎖の5'端上にダブシリおよび底部鎖の3'端上にダブシリを配置することにより、(添加剤EP006、配列番号28)、上部鎖の3'端上にダブシリおよび底部鎖の5'端上にダブシリを配置することにより(添加剤EP007、配列番号29)、各鎖の5'端上にダブシリを配置することにより(添加剤EP008、配列番号30)、

50

各鎖の3'端上にダブシルを配置することにより(添加剤EP009、配列番号31)、上部鎖の各端上にダブシルを配置することにより(添加剤EP052、配列番号32)、ならびに底部鎖の各端上にダブシルを配置することにより(添加剤EP053、配列番号33)修飾された。これらの添加剤の配列を以下に示し、選択性の結果を表2に示す。

添加剤EP050.	5'ダブシルCAGGACCTGGCTGACC(C ₃) ダブシルGTGCTGGAGCGACTGG5'(配列番号38)	
添加剤EP051.	5'CACGACCTCGCTGACCダブシル pGTGCTGGAGCGACTGGダブシル5'(配列番号39)	10
添加剤EP006.	5'ダブシルGGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp ダブシルCCTCGTTTATCGTTACTCCAT5'(配列番号28)	
添加剤EP007.	5'GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAダブシル pCCTCGTTTATCGTTACTCCATダブシル5'(配列番号29)	
添加剤EP008.	5'ダブシルGGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp pCCTCGTTTATCGTTACTCCATダブシル5'(配列番号30)	20
添加剤EP009.	5'GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAダブシル ダブシルCCTCGTTTATCGTTACTCCAT5'(配列番号31)	
添加剤EP052.	5'ダブシルGGAGCAAAATAGCAATGAGGTAダブシル pCCTCGTTTATCGTTACTCCAT5'(配列番号32)	
添加剤EP053.	5'GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAp ダブシルCCTCGTTTATCGTTACTCCATダブシル5'(配列番号33)	30

【表2】

添加剤	長さ(NTの)	Tm、°C	濃度、nM	選択性、△C _T
EP050	16	62.8	200	1.6
			300	2.9
			400	5.5
EP051	16	62.8	200	1.1
			300	2.7
			400	1.8
EP006	22	63.1	100	3.5
			300	8.3
			600	12.0
EP007	22	63.1	100	3.5
			300	7.3
			600	11.5
EP008	22	63.1	100	1.7
			300	5.8
			600	9.7

【0159】

上のB部に記載される二本鎖オリゴヌクレオチド22mer A(配列番号9)は、上部鎖の各端上および底部鎖の5'端上にダブシルを配置することにより(添加剤EP002、配列番号24)、上部鎖の3'端上および底部鎖の各端上にダブシルを配置することにより(添加剤EP003、配列番号25)、上部鎖の5'端上および底部の各端上にダブシルを配置することにより(添加剤EP004、配列番号26)、ならびに上部鎖の各端上および底部鎖の3'端上にダブシルを配置することにより(添加剤EP005、配列番号27)修飾された。添加剤の配列を以下に示し、結果を表3に示す。

添加剤EP002 . 5'ダブシルGGAGCAAAATAGCAATGAGGTAダブシル 10
 p C C T C G T T T A T C G T T A C T C C A T ダブシル5'
 (配列番号24)

添加剤EP003 . 5'GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAダブシル
 ダブシルC C T C G T T T A T C G T T A C T C C A T ダブシル
 5' (配列番号25)

添加剤EP004 . 5'ダブシルGGAGCAAAATAGCAATGAGGTA p
 ダブシルC C T C G T T T A T C G T T A C T C C A T ダブシル
 5' (配列番号26)

添加剤EP005 . 5'ダブシルGGAGCAAAATAGCAATGAGGTAダブシル
 ダブシルC C T C G T T T A T C G T T A C T C C A T 5' (配
 列番号27)

【表3】

添加剤	長さ(NTの)	Tm、°C	濃度、nM	選択性、△CT
EP002	22	63.1	100	4.2
			200	7.1
			300	9.2
EP003	22	63.1	100	2.1
			200	5.6
			300	8.2
EP004	22	63.1	100	5.0
			200	6.6
			300	11.9
EP005	22	63.1	100	5.9
			200	9.3
			300	7.8

10

20

30

40

E. 4つのダブシル修飾因子を有する添加剤

【0160】

幾つかの二本鎖オリゴヌクレオチドを4つの末端ダブシル修飾因子で修飾した。

添加剤EP022 . 5'ダブシルC G C C G C G C ダブシル
 ダブシルG C G G C G C G ダブシル5' (配列番号14)

添加剤EP020 . 5'ダブシルG A A A T A A A A T A A A A A T A ダブシル
 ダブシルC T T T A T T T T A T T T T A T T T T A T ダブシル

50

5'

(配列番号12)

添加剤EP001. 5'ダブシルGGAGCAAAATAGCAATGAGGTAダブ
シル

ダブシルCCTCGTTTATCGTTACTCCATダブシル

5'

(配列番号23)

添加剤EP028. 5'ダブシルTGAAGAGATGAAAATCATCGAGTダブシ
ル

ダブシルACTCTCACTTTACTAGCTCAダブシル 10

5'

(配列番号18)

【0161】

結果を表4に示す。

【表4】

添加剤	長さ(NTの)	Tm、°C	濃度、nM	選択性、△CT
EP0022	8	42.8	600	1.2
EP0020	22	47.7	600	0.9
EP001	22	63.1	100	7.1
			200	9.5
EP028	22	60.6	300	10.0

F. 異なる修飾因子を有する添加剤

【0162】

幾つかの二本鎖オリゴヌクレオチドをダブシル以外の修飾因子で修飾した。ジゴキシゲニン(DIG)、クマリン(CMN)、QSY21(QSY)の3つの修飾因子は、添加剤で有用であり、フルオロセイン(FAM)はそうでないことが示された。オリゴヌクレオチドの配列は、以下の通りであった。 20

添加剤EP026. 5'DIG GGAGCAAAATAGCAATGAGGTA DIG

DIG CCTCGTTTATCGTTACTCCAT DIG

5'

(配列番号17)

添加剤EP029. 5'GGTCAGATGAAAATGATACG TG DIG
DIG CCAGTC TACTTTACTATGCAC 5'
(配列番号40)添加剤EP031. 5'CMN GGTCAGATGAAAATGATACG TG C 40
MN

CMN CCAGTC TACTTTACTATGCAC CMN

5'

(配列番号41)

添加剤EP033. 5'QSY GGTCAGATGAAAATGATACG TG Q
SY

QSY CCAGTC TACTTTACTATGCAC QSY

5'

(配列番号42)

添加剤F032. 5'FAM GGTCAGATGAAAATGATACG TG F

20

30

50

40

A M

F A M C C A G T C T A C T T T T A C T A T G C A C F A M
 5 ,
 (配列番号 4 3)

【 0 1 6 3 】

結果を表 5 に示す。

【表 5 】

添加剤	長さ(NT の)	Tm、°C	濃度、nM	選択性、 ΔC_T
EP026	22	63.1	300	3.8
EP029	22	63.1	300	0.9
EP031	22	63.1	200	3.2
EP033	22	63.1	200	3.4
F032	22	63.1	200	0.9

実施例 4 . 添加剤混合物を用いたタイプ II のミスプライミングおよびポリメラーゼ選択性

【 0 1 6 4 】

2つの添加剤の組み合わせは、4本鎖、つまり、2つの異なる二本鎖オリゴヌクレオチドの混合物として、反応混合物に添加することができる。代替的に、2つの添加剤は、共通の鎖を共有することができ、したがって、3本鎖として反応混合物に添加することができる。本実施例は、修飾因子を有さない対照混合物を含む、3本鎖型の混合物を使用して、実施例 3 に報告されるアッセイで得られた結果を報告する。共通の鎖を共有する2つの添加剤において、我々は、共通の鎖を中心、中央鎖とのハイブリッドが高融解温度を有する鎖を上部に、そして中央鎖とのハイブリッドが低融解温度を有する鎖を底部に書く。我々は、上部 / 中央 / 底部のように、鎖濃度を nM で書く。我々は、上方 / 下方のように、2つのハイブリッドの Tm () を書く。底部鎖を短くするか、またはミスマッチを底部鎖（ミスマッチのヌクレオチドは下線付きである）に導入するかのいずれかにより、融解温度を調節した。試験された添加剤は、

添加剤 0 4 1 . p C C T C G T C T G A T C G T G A C T C C A T 5 ,
 5 ' G G A G C A G A C T A G C A C T G A G G T A p
 p T C T G A T C G T G A C T C C A T 5 '
 (配列番号 4 4)

添加剤 E P 0 4 1 . ダブシル C C T C G T C T G A T C G T G A C T C C A T ダブシル
 5 ,
 5 ' G G A G C A G A C T A G C A C T G A G G T A ダブシル
 ダブシル T C T G A T C G T G A C T C C A T ダブシル 5 '
 (配列番号 4 5)

添加剤 0 4 2 . p C C T C G T C T G A T C G T G A C T C C A T 5 ,
 5 ' G G A G C A G A C T A G C A C T G A G G T A p
 p C C T G G T C T G A T T G T G A C T C C A T 5 '
 (配列番号 4 6)

添加剤 E P 0 4 2 . ダブシル C C T C G T C T G A T C G T G A C T C C A T ダブシル
 5 ,
 5 ' G G A G C A G A C T A G C A C T G A G G T A ダブシル
 ダブシル C C T G G T C T G A T T G T G A C T C C A T ダブシル
 5 ,
 (配列番号 4 7)

10

20

30

40

50

添加剤 EP043 . 5' G G A G C A G A C T A G C A C T G A G G T A ダブシル
 ダブシル C C T C G T C T G A T C G T G A C T C C A T ダブシル
 5' ,
 5' ダブシル A G A C T A G C A C T G A G G T A ダブシル
 (配列番号 48)

添加剤 EP045 . 5' ダブシル G G A G C A G A C T A G C A C T G A G G T A ダブ
 シル
 ダブシル C C T C G T C T G A T C G T G A C T C C A T ダブシル
 5' ,
 5' ダブシル A G A C T A G C A C T G A G G T A ダブシル
 (配列番号 49) 10

【0165】

上方の 2 本の鎖と下方の 2 本の鎖の未修飾のハイブリッドの鎖濃度および T_m とともに、結果を表 6 に示す。添加剤なし対照 (rC_T) に対する選択性の改善の数を、実施例 3 に記載されるように計算した。

【表 6】

添加剤	<u>T_m(上方/下方、(°C))</u>	濃度、nM	選択性、 ΔC_I
041	67.4/59.0	上部 75	1.7
		中央 400	
		底部 325	
EP041	67.4/59.0	上部 75	4.8
		中央 400	
		底部 325	
042	67.4/57.4	上部 75	1.9

		中央 400	
		底部 325	
EP042	67.4/57.4	上部 75	6.8
		中央 400	
		底部 325	
EP043	67.4/59.1	上部 25	2.4
		中央 600	
		底部 575	
		上部 50	2.9
		中央 600	
		底部 550	
		上部 75	2.2
		中央 600	
		底部 525	
		上部 100	3.3
		中央 600	
		底部 500	
EP045	67.4/59.1	上部 25	5.0
		中央 600	
		底部 575	
		上部 50	6.9
		中央 600	
		底部 550	
		上部 75	7.7
		中央 600	
		底部 525	
		上部 100	10.8
		中央 600	
		底部 500	

【 0 1 6 6 】

添加剤 E P 0 4 3 および E P 0 4 5 を用いた增幅反応の動態分析を、それぞれ、図 7 A ~ 7 D および図 8 A ~ 8 D に示す。これらの図は、異なる濃度の添加剤の L A T E - P C R サイクル数の関数としての、 S Y B R G r e e n 色素からの蛍光強度読み取りを表す。図 7 A は、 2 5 / 6 0 0 / 5 7 5 n M の鎖濃度（上方 / 中央 / 下方鎖）を有する添加剤 E P 0 4 3 の結果を表す。図 7 A において、丸 7 1 は、一致する標的についての 3 つの反復であり、丸 7 2 は、ミスマッチ標的についての 3 つの反復である。図 7 B は、 5 0 / 6 0 0 / 5 5 0 n M の鎖濃度（上方 / 中央 / 下方鎖）を有する添加剤 E P 0 4 3 の結果を表す。

10

20

30

40

50

す。図7Bにおいて、丸73は、一致する標的についての3つの反復であり、丸74は、ミスマッチ標的についての3つの反復である。図7Cは、75 / 600 / 525 nMの鎖濃度（上方／中央／下方鎖）を有する添加剤EP043の結果を表す。図7Cにおいて、丸75は、一致する標的についての3つの反復であり、丸76は、ミスマッチ標的についての3つの反復である。図7Dは、100 / 600 / 500 nMの鎖濃度（上方／中央／下方鎖）を有する添加剤EP043の結果を表す。図7Dにおいて、丸77は、一致する標的についての3つの反復であり、丸78は、ミスマッチ標的についての3つの反復である。

【0167】

図8Aは、25 / 600 / 575 nMの鎖濃度（上方／中央／下方鎖）を有する添加剤EP045の結果を表す。図8Aにおいて、丸81は、一致する標的についての3つの反復であり、丸82は、ミスマッチ標的についての3つの反復である。図8Bは、50 / 600 / 550 nMの鎖濃度（上方／中央／下方鎖）を有する添加剤EP045の結果を表す。図8Bにおいて、丸83は、一致する標的についての3つの反復であり、丸84は、ミスマッチ標的についての3つの反復である。図8Cは、75 / 600 / 525 nMの鎖濃度（上方／中央／下方鎖）を有する添加剤EP045の結果を表す。図8Cにおいて、丸85は、一致する標的についての3つの反復であり、丸86は、ミスマッチ標的についての3つの反復である。図8Dは、100 / 600 / 500 nMの鎖濃度（上方／中央／下方鎖）を有する添加剤EP045の結果を表す。図8Dにおいて、丸87は、一致する標的についての3つの反復であり、丸88は、ミスマッチ標的についての3つの反復である。

10

20

実施例5.二重反応におけるタイプIおよびタイプIIIのミスプライミングの抑制

【0168】

二重LATE-PCR反応を、2つのDNA標的、各標的にプライマー対、および各標的に分子指標ハイブリッド形成プローブを用いて、3重に、行われた。各反応混合物は、以下のプライマーおよびプローブを含んだ。

第1の標的配列用

過剰プライマー 5' T G T C A T C T T C T G T C C C T T C C C A G A A A
(配列番号50)

30

制限プライマー 5' A C T G T C C C A G A A T G C A A G A A G C C C A G A C G
(配列番号51)

第1のアンブリコン用プローブ 5' BHQ - 1 C C G T A G C T G C C C T G G ' Ca
1 Red 610

(配列番号52)

20

第2の標的配列用

過剰プライマー 5' G C A C A G T T A C A G T A T T C C A G C A G A C T C A
(配列番号53)

40

制限プライマー 5' T C A G T G G T G G C A G T G G T A G T G G T G G C
(配列番号54)

第2のアンブリコン用プローブ 5' BHQ - 2 T C A G T G G T G G C A G T G G T
AGA Quasar 670
(配列番号55)

【0169】

LATE-PCR反応混合物は、25 μlの容量で、1X プラチナTaq緩衝剤(Invitrogen, Carlsbad, CA)、3 mM MgCl₂、0.25 nM dNTP、各50 nMの制限プライマー、各1000 nMの過剰プライマー、および各50

50

0 nMの検出プローブ、1.25ユニットのプラチナTaqポリメラーゼ(Invitrogen, Carlsbad, CA)、ならびにヒトDNAの1000ゲノムに相等するものを含んだ。異なる反応混合物は、添加剤なし、400nM濃度の添加剤EP020、または300nM濃度の添加剤EP013を含んだ。

【0170】

LATE-PCR增幅反応熱プロファイル条件は、95 / 10 s、以下に指定される温度でアニーリングを10 s間、および72 / 10 sの20サイクル、その後、95 / 10 s、65 / 10 s、72 / 10 s、および54 / 20 sで蛍光シグナル検出の50サイクルであった。增幅は、異なるアニーリング温度が同じ機器で行える、多重增幅温度プロファイルを可能にする温度勾配機能を使用して、Bio-Rad IQ-5多色リアルタイムPCR検出システム(Bio-Rad, Hercules, CA)で実施された。
10

添加剤EP020. 5'ダブシルG A A A T A A A A T A A A A A T A A A A T Aダブシル

5' ダブシルC T T T A T T T T A T T T T A T T T T A Tダブシル
5'

(配列番号12)

添加剤EP013. 5'ダブシルG G T C A G A T G A A A A T G A T A C G T G p
ダブシルC C A G T C T A C T T T T A C T A T G C A Cダブシル
5'

(配列番号56)

【0171】

6つのアッセイを行った。これらは、以下の添加剤および初期のアニーリング温度(最初の20サイクル)であった。

反応1：添加剤なし、アニーリング温度：6.5

反応2：添加剤EP020、アニーリング温度：6.5

反応3：添加剤EP020、アニーリング温度：6.0.7
30

反応4：添加剤EP013、アニーリング温度：6.6.5

反応5：添加剤EP013、アニーリング温度：6.4.2

反応6：添加剤EP013、アニーリング温度：6.0.7

【0172】

図9は、LATE-PCR熱サイクル数の関数としてプローブからの蛍光読み取りを表す。図9Aは、反応1からの読み取りを示し、丸911は、第1標的の増幅の4つの反復における第1プローブからの読み取りであり、丸912は、第2標的の増幅の4つの反復における第2プローブからの読み取りである。図9Bは、反応2からの読み取りを示し、丸913は、第1標的の増幅の4つの反復における第1プローブからの読み取りであり、丸914は、第2標的の増幅の4つの反復における第2プローブからの読み取りである。図9Cは、反応3からの読み取りを示し、丸915は、第1標的の増幅の4つの反復における第1プローブからの読み取りであり、丸916は、第2標的の増幅の4つの反復における第2プローブからの読み取りである。図9Dは、反応4からの読み取りを示し、丸917は、第1標的の増幅の4つの反復における第1プローブからの読み取りであり、丸918は、第2標的の増幅の4つの反復における第2プローブからの読み取りである。図9Eは、反応5からの読み取りを示し、丸919は、第1標的の増幅の4つの反復における第1プローブからの読み取りであり、丸920は、第2標的の増幅の4つの反復における第2プローブからの読み取りである。図9Fは、反応6からの読み取りを示し、丸921は、第1標的の増幅の4つの反復における第1プローブからの読み取りであり、丸922
40
50

は、第2標的の増幅の4つの反復における第2プローブからの読み取りである。

実施例 6 . 5 ' エキソヌクレアーゼ活性の阻害を評価するためのプライマーに依存しない温度変動アッセイ

【0173】

TaqおよびTfi(+)を含む多くのDNAポリメラーゼは、その標的鎖とハイブリッド形成する、オリゴヌクレオチドプローブの5'端上の蛍光的に標識されたヌクレオチドを切断する能力を有する。この5'エキソヌクレアーゼ切断は、上流プライマーの伸長の不在下の、等温条件下でも生じる。したがって、標準5'ヌクレアーゼ増幅反応で起こるプライマー依存切断とは対照的に、プライマーに依存しない切断である。プライマーに依存しない依存5'エキソヌクレアーゼ切断の比率は、プローブ/標的ハイブリッドのTm以上および以下の限定的な温度範囲を超えて、反応混合物の温度を変動することにより増加することができる。10

【0174】

周期的変動反応は、1X PCR緩衝剤(Invitrogen, Carlsbad, CA)、3 mM MgCl₂、200 nM dNTP、1.25ユニットのTaq DNAポリメラーゼ(Invitrogen, Carlsbad, CA)、5'FAMおよび3'Black Hole Quencher 1(BHQ1)を有する200 nMのプローブ、ならびに100 nMの相補的41ヌクレオチド標的から成る25 μl容量で実施された。本反応混合物は、任意の添加剤を用いて、および用いずに、ならびに300 nMの濃度の、以下に特定されるそれぞれの添加剤を用いて使用された。反応混合物中に唯一のオリゴヌクレオチドとしてのプローブを用いて、対照反応を行った。添加剤は、ステムループ構造を形成する(ステムを形成する相補的ヌクレオチドは、下線付きである)一本鎖添加剤であるPS060、ならびに二本鎖添加剤を含んだ。反応混合物は、以下の熱プロファイルを使用して変動させた：45サイクルにおいては、45 / 20 s、60 / 10 s、その後、30サイクルにおいては、1ずつ上昇しながら、45 / 30秒で融解開始。熱プロファイルの45 / 10 s区域中、FAM蛍光を取得した。プローブ、標的、および添加剤の配列は。20

プローブ 5' FAM CCCATGATACAAAGCTTCC BHQ1 (配列番号57)30

標的 5' ACTTAGTAATTGGGAAGCTTGTATCATGGCACT
TAGAACCT(配列番号58)

添加剤 E P 0 0 1 . 5' ダブシルGGAGCAAAATAGCAATGAGGTAダブ
シル5'

ダブシルCCTCGTTTATCGTTACTCCATダブシル
(配列番号23)40

添加剤 E P 0 0 4 . 5' ダブシルGGAGCAAAATAGCAATGAGGTA p
ダブシルCCTCGTTTATCGTTACTCCATダブシル
5'(配列番号26)

添加剤 E P 0 0 8 . 5' ダブシルGGAGCAAAATAGCAATGAGGTA p
p CCTCGTTTATCGTTACTCCATダブシル5'(配列番号30)

添加剤 E P 0 0 9 . 5' GGAGCAAAATAGCAATGAGGTAダブシル
ダブシルCCTCGTTTATCGTTACTCCAT5'(配列番号31)

50

50

50

50

50

添加剤 P S 0 6 0 . 5 ' C G C G G C G T C A G G C A T A T A G G A T A C C G G G
A C A G A C
G C C G C G (配列番号 5 9)

である。

【 0 1 7 5 】

エキソヌクレアーゼ切断活性は、プローブからプローブのフルオロフォアを単離し、これによって、蛍光 (F A M) の増加をもたらす。結果を図 1 0 に報告する。図 1 0 において、プローブのみの反応の曲線 1 0 1 は、標的の不在下において、プローブは切斷されないことを示す。プローブおよび標的を含むが、添加剤を含まない反応の曲線 1 0 2 は、最も高いプローブ切断を示す。P S 0 6 0 の曲線 1 0 3 は、添加剤の曲線、つまり、E P 0 1 0 9 の曲線 1 0 4 ; E P 0 0 4 および E P 0 0 8 において同じ曲線である曲線 1 0 5 ; および E P 0 0 1 の曲線 1 0 6 より高いプローブ切断を示す。
10

実施例 7 . P C R 中の 5 ' エキソヌクレアーゼ活性の阻害

【 0 1 7 6 】

実施例 5 に記載されるように、L A T E - P C R 増幅後、第 1 標的用の検出プローブは、1 分間、5 0 °で、その相補的増幅産物とハイブリッド形成された。プローブ - 標的ハイブリッドは、次いで、プローブがアンブリコンから融解されると、5 0 °から 8 0 °の間で、それぞれ 3 0 秒の 1 °間隔でプローブ蛍光強度を監視することにより、融解曲線分析を受けた。プローブのみを含む、テンプレートなし対照も、融解レジメンを受けた (フルオロフォアからの蛍光強度は温度依存性であるため、蛍光は、プローブ切断の不在下で、温度とともに僅かに増加する)。2 つの試料は、融解を受けた：1 つは添加剤を含まず、もう 1 つは、6 0 0 n M 濃度の添加剤 E P 0 1 3 (配列番号 4 7) を含んだ。
20

【 0 1 7 7 】

結果を図 1 1 A および 1 1 B に示す。図 1 1 A において、曲線 1 1 1 は、プローブ単独についてであり、曲線 1 1 2 は、添加剤を含まない反応の増幅産物についてである。図 1 1 B において、曲線 1 1 3 は、プローブ単独についてであり、曲線 1 1 4 は、添加剤 E P 0 1 3 を含む増幅産物についてである。プライマー依存 T a q DNA ポリメラーゼ 5 ' エキソヌクレアーゼ活性の阻害は、融解が完了した時に、プローブのみを含む対照試料の蛍光シグナルと一致する増幅標的を溶融したプローブからの蛍光シグナルにより明白となつた。
30

実施例 8 . 大規模な多重反応

【 0 1 7 8 】

それぞれがヒトミトコンドリアゲノムの遺伝子内の異なる配列用である 1 2 のプライマー組を、1 2 の異なる標的配列の多重増幅のために、単一の多重増幅混合物の中に混合した。2 5 μl の反応混合物は、添加剤なし、3 0 0 n M 濃度の添加剤 E P 0 1 1 、または 6 0 0 n M 濃度の添加剤 E P 0 1 1 のいずれかとともに、1 × P C R 緩衝剤、4 0 0 n M d N T P 、3 mM M g C l₂ 、0 . 2 4 × S Y B R Green 、5 0 n M の制限プライマー、1 0 0 0 n M の過剰プライマー、および 3 . 7 5 ユニットの T f i (-) D N A ポリメラーゼを含んだ。
40

【 0 1 7 9 】

反応混合物は、以下の L A T E - P C R 熱サイクルプロトコルを受けた：3 分間、9 5 °、その後、9 5 ° / 5 s 、5 8 ° / 2 0 s 、および 6 8 ° / 2 m の 6 5 サイクル、その後、9 5 °まで 3 0 s 間隔で 1 °ずつ上昇しながら 4 5 °で融解開始。二本鎖 D N A 産物の S Y B R Green 蛍光 (- d F / d T , S Y B R) の第 1 導関数を使用して、融解曲線分析により、6 5 サイクルの終わりで反応を分析した。加えて、反応について、二本鎖産物の产生動態 (熱サイクルの関数として S Y B R Green 強度読み取り) を分析した。

【 0 1 8 0 】

添加剤 E P 0 1 1 の配列、12の標的の配列、およびそれぞれを増幅するために使用されたプライマーは、以下の通りである。

添加剤 E P 0 1 1 . 5 ' ダブシル G G T C A G A T G A A A A T G A T A C G T G ダブシル

p C C A G T C T A C T T T T A C T A T G C A C ダブシル 5 '
(配列番号 60)

標的 H V 1 . 5 ' G C C C G G A G C G A G G A G A G T A G C A C T C T T G T G C G
G G A T A T T G A 10

T T T C A C G G A G G A T G G T G G T C A A G G G A C C C C T A
T C T G A G G G G

G G T C A T C C A T G G G G A C G A G A A G G G A T T T G A C T
G T A A T G T G C

T A T G T A C G G T A A A T G G C T T T A T G T A C T A T G T A
C T G T T A A G G G

T G G G T A G G T T T G T T G G T A T C C T A G T G G G T G A G
G G G T G G C T T

T G G A G T T G C A G T T G A T G T G T G A T A G T T G A G G G
T T G A T T G C T 20

G T A C T T G C T T G T A A G C A T G G G G A G G G G G T T T
G A T G T G G A T

T G G G T T T T A T G T A C T A C A G G T G G T C A A G T A T
T T A T G G T A C

C G T A C A A T A T T C A T G G T G G C T G G C A G T A A T G T
A C G A A A T A

C A T A G C G G T T G T T G A T G G G T G A G T C A A T A C T T
G G G T G G T A C

C C A A A T C T G C T T C C C A T G A A A G A A C A G A G A A
T A G T T T A A 30

A T T A G A A T C T T A G C T T T G G G T G C T A A T G G T G G
A G T T A A A G A C T

T T T T C T C T G A T T T G T C C T T G G A A A A A G G T T T
C A T C T C C G G T

T T A C A A G A C T G G T G (配列番号 61)

制限プライマー 5 ' G C C C G G A G C G A G G A G A G T A G C A C T C T T G
(配列番号 62)

過剰プライマー 5 ' C A C C A G T C T T G T A A A C C G G A G A T G A A
(配列番号 63) 40

標的 H V 2 . 5 ' A C A G G T C T A T C A C C C T A T T A A C C A C T C A C G G
G A G C T C T C C

A T G C A T T T G G T A T T T C G T C T G G G G G G T A T G C A
C G C G A T A G C

A T T G C G A G A C G C T G G A G G C C G G A G C A C C C T A T G T
C G C A G T A T

C T G T C T T T G A T T C C T G C C T C A T C C T A T T A T T A
T C G C A C C T A

C G T T C A A T A T T A C A G G C G A A C A T A C T T A C T A A A
G T G T G T T A 50

ATT AATTAATGCTTGTAGGACATAATAATAACA
ATTGAAT

GTCTGCACAGCCACTTTCCACACAGACATCATA
ACAAAAA

ATTTCCACCAAACCCCCCTCCCCCGCTTCTGG
CCACAGCA

CTTAAACACATCTCTGCCAAACCCCCAAAAACAA
AGAACCC

TAACACCCAGCCTAACCAAGATTCAAATTATC
TTTGGCG 10

GTATGCACTTTAACAGTCACCCCCCAACTAAC
ACATTATT

TTCCCCCTCCCACCTCCCATACTACTAATCTCATC
AATACAAAC

CCCCGCCATCCTACCCAGCACACACACACACC
TG

(配列番号 64)

制限プライマー 5' AGCGGTGTGTGTGCTGGTAGGAT
(配列番号 65)

過剰プライマー 5' ACAGGTCTATCACCCATTAAACCACTCA 20
(配列番号 66)

標的 CO1 - 1 . 5' AGGTTGCGGTCTGTTAGTAGTATAGTGAT
GCCAGCAGCT

AGGACTGGGAGAGATAAGGAGAAGTAGGACTG
CTGTGATT

AGGACGGATCAGACGAAGAGGGGGCGTTGGT
ATTGGGTTA

TGGCAGGGGTTTATATTGATAATTGTTGT
GATGAAATTG 30

ATGGCCCCCTAACAGATAGAGGAGACACCTGCTA
GGTGTAAAGG

AGAAGATGGTTAGGTCTACGGAGGCTCCAGG
GTGGGAGT

AGTTCCCTGCTAACGGAGGGTAGACTGTTCA
ACCTGTTCCCT

GCTCCGGCCTCCACTATAGCAGATGCGAGCA
GGAGTAGG

AGAGAGGGAGGTAAGAGTCAGAAGCTTATGT
TGTTTATGC 40

GGGGAAACGCCATATCGGGGGCACCGATTAT
TAGGGGAAC

TAGTCAGTTGCCAAAGCCTCCGATTATGATG
GGTATTACT

ATGAAGAAGATTATTACAAATGCATGGCTG
TGACGATAA

CGTTGTAGATGTGGTCGTTACCTAGAAGGTT
GCCCTGGCTGG 50

CCCAGCTCGGCTCGAATAAGGAGGCTTAGAG
CTGTGCCATA

G G A C T C C A G C T C A T G C G C C G A A T A A T A G G T A
 T A G T G T T C C A
 A T G T C T T T G T G G T T T G T A G A G A A T A G T C A A C
 G G T

(配列番号 67)

制限プライマー 5' A G G T T G C G G T C T G T T A G T A G T A G T G A T G
 C C A G C A (配列番号 68)

過剰プライマー 5' A C C G T T G A C T A T T C T C T A C A A A C C A C A
 (配列番号 69)

標的 C O 1 - 2 . 5' A T G G A G G G T T C T T C T A C T A T T A G G A C T T T
 T C G C T T C G A A G

C G A A G G C T T C T C A A A T C A T G A A A A T T A T T A A
 T A T T A C T G C T

G T T A G A G A A A T G A A T G A G C C T A C A G A T G A T A
 G G A T G T T T C

A T G T G G T G T A T G C A T C G G G G T A G T C C G A G T A
 A C G T C G G G G

C A T T C C G G A T A G G C C G A G A A A G T G T T G T G G G
 A A G A A A G T T

A G A T T T A C G C C G A T G A A T A T G A T A G T G A A A T
 G G A T T T T G G C

G T A G G T T T G G T C T A G G G T G T A G C C T G A G A A T
 A G G G G A A A T C

A G T G A A T G A A G C C T C C T A T G A T G G C A A A T A C
 A G C T C C T A T

T G A T A G G A C A T A G T G G A A G T G G G C T A C A A C G
 T A G T A C G T G

T C G T G T A G T A C G A T G T C T A G T G A T G A G T T T G
 C T A A T A C A A T

G C C A G T C A G G C C A C C T A C G G T G A A A A G A A A G
 A T G A A T C C

T A G G G C T C A G A G C A C T G C A G C A G A T C A T T C
 A T A T T G C T T C

C G T G G A G T G T G G C G A G T C A G C T A A A T A C T T T
 G A C G C C G G T

G G G G A T A G C G A T G A T T A T G G T A G C G G A G G T G
 A A A T A T G C T

C G T G T G T C T A C G T C T A T T C C T A C T G T A A A T A
 T A T G G T G T G C

T C A C A C G A T A A A C C C T A G G A A G C C A A T T G A T
 A T C A T A G C T

C A G A C C A T A C C T A T G T A T C C A A A T G G T T C T T
 T T T T T C C G G A

G T A G T A A G T T A C A A T A T G G G A G A T T A T T C C G
 A A G C C T G G

T A G G A T (配列番号 70)

制限プライマー 5' A T G G A G G G T T C T T C T A C T A T T A G G A C T T T
 T C G C T

(配列番号 71)

10

20

30

40

50

過剰プライマー 5' ATCCTACCAAGGCTTCGGAATAATCTC
(配列番号72)

標的CO₂. 5' AGGGTAAATACGGGCCCTATTCAAAGAT
TTTAGGGG
AATTAATTCTAGGACGATGGGCATGAAACTG
TGGTTTGCTC
CACAGATTTCAGAGCATTGACCGTAGTATAAC
CCCCGGTCG
TGTAGCGGTGAAAGTGGTTGGTTAGACGT 10
CCGGGAATTG
CATCTGTTTTAACGCCATAATGTTGGGACAGC
TCATGAGTGC
AGACGTCCTGTGATGTAATTATTATAACGAAT
GGGGGCTTCA
ATCGGGAGTACTACTCGATTGTCAACGTC
GGAGTCGCA
GGTCGCCCTGGTCTAGGAATAATGGGGAAAG
TATGTAGGA
GTTGAAGATTAGTCCGCCGTAGTCGGTGTAC 20
TCGTAGGTT
AGTACCATGGTGGCCAATTGATTGATGGT
AAGGGAGGG
ATCGTTGACCTCGTCTGTTATGTAAGGATG
CGTAGGGAT
GGGAGGGCGATGAGGACTAGGATGATGGCGG
GCAGGATA
GTTCAGACGGTTCTATTCCCTGAGCGTCTG
AGATGTTAGTA
TTAGTTAGTTGGTGTGAGTGTAGGAAAA 30
GGGCATACA
GGACTAGGAAGCAGATAAGGA(配列番号73)
制限プライマー 5' AGGGTAAATACGGGCCCTATTCAAAGAT
TTTAGGGG
(配列番号74)
過剰プライマー 5' TCCCTTATCTGCTTCCCTAGTCCTGTATGC
(配列番号75)

標的12srRNA. 5' CCTCTAAATCACCAACGATCAAAAGGAA
CAAGCATCAA
GCACGCCAGCAATGCAGCTCAAAACGCTTA 40
GCCCTAGCCA
CACCCCCACGGGAAACAGCAGTGAATTAAAC
CTTTAGCAATA
AACGAAAGTTAACCTAAGCTATACTAAC
CCAGGGTT
GGTCAATTCTGTCGCCAGCCACCGCGGTCA
CACGATTAA
ACCCAAAGTCATAAGAAGGCCGGCGTAAAGA
GTGTTTAGAT
CACCCCCCTCCCCAATAAGCTAAAACCTCA 50

CCTGAGTTGT
 ACGAAAGTGG
 AGACCCAAAC
 CTAAACCTCAA
 ACAC TAC GAG
 GTGCTTCATA
 ATA AAC CCCC
 ATACCGCCATC
 TAAGCGCAAG
 TAGCCCCATGAG
 CCAGAAAACT
 AAGGTGGATT
 TTGAACAGGG
 CCTCCTCAAG
 CCTACGCATT
 AAGTGT
 制限プライマー-5' TCCAGTACACTTACCATGTTACGACTTGTCT
 CCTCTA (配列番号77)
 過剰プライマー-5' CCTCTAAATCACCCACGATCAAAAGGAAC
 (配列番号78)

標的Cyt b - 1. 5' TGTGAGGGTGGGACTGTC TACTGAGTAG
 CCTCCTCAGAT
 GATGGCGGATA
 ATGATATTTGG
 GTTGCCTATAG
 AGGTTCTGA
 CCCGATGTTG
 ACTGGAA (配列番号76)

40

TCATTGA ACTAGGTCTGTC CCAATGTATGG
 GTAAGTTGTAATTACTGTGGCCCTCAGA
 CCTCACGGGAGGGACATAGCCTATGAAGGCT
 TTGCAAGCAGGAGGATAATGCCGATGTTTC
 GTAGAGAAATGATCCGTAATATAGGCCCTCG
 AGGAAGAGGGCAGATAAAGAATATTGAGGGCG

50

```
CCATGGCG  
TGAAGGTAGCGGATGATTCAGCCATAATT  
ACGTCTCGAG  
TGATGTGGCGATTGATGAAAAAGGCGGTTG  
AGGCGTCTGG  
TGAGTAGTGCATGGCTAGGAATAGTCCTGT  
GGTGATTTGG  
AGGATCAGGCAGGGCGCCAAGGGAGTGAGCCG  
AAGTTTC
```

10

ATCATGCGGA (配列番号 79)
 制限プライマー 5' TGTGAGGGTGGGACTGTC TAC TGAGTAGCC
 (配列番号 80)
 過剰プライマー 5' TCCGCATGATGAAACTTCGGCTC (配列番号 81)
)

標的 Cyt b - 2 . 5' ACTCCACCTCCTATTCTTGCACGAAACG
 GGATCAAAACAA
 CCCCCTAGGAATCACCTCCCATTCCGATAA
 AATCACCTTCC
 ACCCTTACTACACAATCAAAGACGCCCTCG
 GCTTACTTCTCT 20
 TCCTTCTCTCCTTAATGACATTAACACTAT
 TCTCACCAAGAC
 CTCCTAGGGGACCCAGACAATTATAACCTA
 GCCAACCCCT
 TAAACACCCCTCCCCACATCAAGCCCGAAT
 GATATTCTCT
 ATT CGCCTACACAATTCTCCGATCCGTCCC
 TAACAAACTAG 30
 GAGGGGTCCCTTGCCCTATTACTATCCATCC
 TCATCCTAGCA
 ATAATCCCCATCCTCCATATATCCAAACAA
 CAAAGCATAAT
 ATTTCGCCCACTAAGCCAATCAGCTTTATTG
 ACTCCTAGCCG
 CAGACCTCCTCATTCATAACCTGAAATCG (配列)

番号 8 2)
制限プライマー 5' C G A T T C A G G T T A G A A T G A G G A G G T C T G C G G
C T A G (配列番号 8 3)
過剰プライマー 5' A C T C C A C C T C C T A T T C T T G C A C G A (配列番号 8
4) 40

標的 N D 1 . 5 ' C A T A A G A A C A G G G A G G T T A G A A G T A G G G T C
T G G T G A C A A
A A T A T G T T G T G T A G A G T T C A G G G G A G A G T G C G T
C A T A T G T
T G T T C C T A G G A A G A T T G T A G T G G T G A G G G T G T T
T A T T A T A A
T A A T G T T T G T G T A T T C G G C T A T G A A G A A T A G G G
C G A A G G G

G C C T G C G G C G T A T T C G A T G T T G A A G C C T G A G A C
 T A G T T C G G

A C T C C C C T T C G G C A A G G T C G A A G G G G T T C G G T
 T G G T C T C

T G C T A G T G T G G A G A T A A A T C A T A T T A T G G C C A A
 G G G T C A T

G A T G G C A G G A G T A A T C A G A G G T G T T C T T G T G T T
 G T G A T A A

G G G T G G A G A G G T T A A A G G A G C C A C T T A T T A G T A
 A T G T T G A

T A G T A G A A T G A T G G C T A G G G T G A C T T C A T A T G A
 G A T T G T T T

G G G C T A C T G C T C G C A G T G C G C C G A T C A G G G C G T
 A G T T T G A G

T T T G A T G C T C A C C C T G A T C A G A G G A T T G A G T A A
 A C G G C T A

G G C T A G A G G T G G C T A G A A T A A A T A G G A G G C C T A
 G G T T G A

G G T T G A C C A G G G G T T G G G T A T G G G G A G G G G G G
 T T C A T A

G T A G A A G A G C G A T G G T G A G A G C T A A G G T C G G G G
 C G G T G A

T G T A G A G G G T G A T G G T A G A T G T G G C G G G T T T A
 G G G G (配列番号 8 5)

制限プライマー 5' C A T A A G A A C A G G G A G G T T A G A A G T A G G G T C
 T T G G T (配列番号 8 6)

過剰プライマー 5' C C C C T A A A A C C C G C C A C A T (配列番号 8 7)

標的 N D 2 . 5' A G T G T G A T T G A G G T G G A G T A G A T T A G G C G T A
 G G T A G A A

G T A G A G G T T A A G G A G G G T G A T G G T G G C T A T G A T
 G G T G G G G

A T G A T G A G G C T A T T G T T T T T G T G A A T T C T T C G
 A T A A T G G C

C C A T T T G G G C A A A A A G C C G G T T A G C G G G G G C A G
 G C C T C C

T A G G G A G A G G A G G G T G G A T G G A A T T A A G G G T G T
 T A G T C A T

G T T A G C T T G T T C A G G T G C G A G A T A G T A G T A G G
 G T C G T G G T

G C T G G A G T T T A A G T T G A G T A G T A G G A A T G C G G T
 A G T A G T T

A G G A T A A T A T A A A T A G T T A A A T T A A G A A T G G T T
 A T G T T A G

G G T T G T A C G G T A G A A C T G C T A T T A T T C A T C C T A
 T G T G G G T A

A T T G A G G G A G T A T G C T A A G A T T T G C G T A G C T G G
 G T T T G G T T

T A A T C C A C C T C A A C T G C C T G C T A T G A T G G A T A A
 G A T T G A G

10

20

30

40

50

A G A G T G A G G A G A A G G C T T A C G T T T A G T G A G G G A
 G A G A T T T
 G G T A T A T G A T T G A G A T G G G G G C T A G T T T T G T C
 A T G T G A G
 A A G A A G C A G G C C G G A T G T C A G A G G G G T G C C T T G
 G G T A A C C
 T C T G G G A C T C A G A A G T G A A A G G G G G C T A T T C C T
 A G T T T T A T
 T G C T A T A G C T A T T A T G A T T A T T A A T G A T G A G T A
 T T G A T T G G 10
 T A G T A T T G G T T A T G G T T C A T T G T C C G G A G A G T A
 T A T T G T T G
 A A G A G G A T A G C T A T T A G A A G G A T T A T G G A T G C G
 G T T G C T T
 G C G T G A G G A A A T A C T T G A T G G C A G C T T C T G T G G
 A A C G A G G G
 T T T A T T T T T G G T T A G A A C T G G A A T A A A A G C T
 A G C A T G T T T
 A T T T C T A G G C C T A C T C A G G T A A A A A A T C A G T G C
 G A G C T T A 20
 G C G C T G T G A T G A G T G T G C C T G C A (配列番号 88)
 制限プライマー 5' A G T G T G A T T G A G G T G G A G T A G A T T A G G C G T
 A G G T
 A G A A G T (配列番号 89)
 過剰プライマー 5' T G C A G G C A C A C T C A T C A C A G C G C T A A G C T
 (配列番号 90)

 標的 N D 4 - 1 . 5' A A C A C A A C C A C C C A C A G G C C T A A T T A T T A G
 C A T C A T C C C T C
 T A C T A T T T T T A A C C A A A T C A A C A A C A A C C T 30
 A T T T A G C T G T T
 C C C C A A C C T T T C C T C C G A C C C C C T A A C A A C
 C C C C C T C C T A
 A T A C T A A C T A C C T G A C T C C T A C C C C T C A C A A
 T C A T G G C A A G
 C C A A C G G C C A C T T A T C C A G T G A A C C A C T A T C A
 C G A A A A A A A
 C T C T A C C T C T C T A T A C T A A T C T C C C T A C A A A
 T C T C C T T A A T T 40
 A T A A C A T T C A C A G G C C A C A G A A C T A A T C A T A T
 T T T A T A T C T T
 C T T C G A A A C C A C A C T T A T C C C C A C C T T G G C T
 A T C A T C A C C C
 G A T G A G G C A A C C A G G C C A G A A C G C C T G A A C G C
 A G G C A C A T A
 C T T C C T A T T C T A C A C C C T A G T A G G C T C C C T T
 C C C C T A C T C A T
 C G C A C T A A T T T A C A C T C A C A A C A C C C T A G G C
 T C A C T A A A C A
 T T C T A C T A C T C A C T C A C T G C C C A A G A A C T 50

A T C A A

A C T C C T G A G C (配列番号91)

制限プライマー 5' G C T C A G G A G T T G A T A G T T C T T G G G C A G T G
A G A G

(配列番号92)

過剰プライマー 5' A A C A C A A C C A C C C A C A G C C T A A T T A T T A G
(配列番号93)標的N D 4 - 2 . 5' G T G G T G G G T G A G T G A G C C C C A T T G T G T T G
T G G T A A A T A T 10G T A G A G G G A G T A T A G G G C T G T G A C T A G T A T G
T T G A G T C C TG T A A G T A G G A G A G T G A T A T T T G A T C A G G A G A
A C G T G G T T AC T A G C A C A G A G A G T T C T C C C A G T A G G T T A A T
A G T G G G G G GT A A G G C G A G G T T A G C G A G G C T T G C T A G A A G T
C A T C A A A A AG C T A T T A G T G G G A G T A G A G T T T G A A G T C C T T
G A G A G A G G A 20T T A T G A T G C G A C T G T G A G T G C G T T C G T A G T T
T G A G T T T G C TA G G C A G A A T A G T A A T G A G G A T G T A A G C C C G T
G G G C G A T T AT G A G A A T G A C T G C G C C G G T G A A G C T T C A G G G
G G T T T G G A TG A G A A T G G C T G T T A C T A C G A G G G C T A T G T G G
C T G A T T G A A 30G A G T A T G C A A T G A G C G A T T T A G G T C T G T T T
G T C G T A G G C AG A T G G A G C T T G T T A T A A T T A T G C C T C A T A G G
G A T A G T A C A

A G G A A G G G G T A G (配列番号94)

制限プライマー 5' G T G G T G G G T G A G T G A G C C C C A T T G T G T
(配列番号95)過剰プライマー 5' C T A C C C C T T C C T T G T A C T A T C C C T A T G A G
(配列番号96)

【0181】

その後、1 u l の負荷色素と混合した1 μ l のP C R 産物で充填した5 %ポリアクリルアミドゲルを使用して、増幅した産物を分析した。4 で、30 ボルトで、8 時間、ゲルを走行させた。S Y B R G o l d を使用して、10 分間、ゲルを発達させた。ゲルの写真を図12に示す。最初の列は、添加剤なしの反応である。2番目の列は、300 n M濃度の添加剤E P 0 1 1を用いた反応である。3番目の列は、600 n M濃度の添加剤E P 0 1 1を用いた反応である。図12から分かるように、添加剤なしの反応は、予測される12の産物一式を生成しない。列2から、300 n Mの添加剤E P 0 1 1が、大半のミスプライミングを抑制したことが分かる（軽量産物の1バンドが、底部に認められる）。列3から、600 n M濃度の添加剤E P 0 1 1が、全てのミスプライミングを抑制したことが分かる。

【0182】

600 nMの添加剤E P 0 1 1を含む反応物は、Dilute-‘N’-Go法として知られる配列決定試料調製を受けた。Rice, J. E. et al. (2007), Monoplex/Multiplex Linear-After-The-Exponential PCR Assay Combined with PrimeSafe and Dilute-‘N’-Go Sequencing, Nature Protocols 2: 2429-2438を参照のこと。調製された試料は、12のアリコートに分割され、各アリコートは、配列決定プライマーとして12の制限プライマーの1つを利用して、ジデオキシ配列決定を受けた。配列決定の結果は、増幅反応が、各アンプリコンに十分な一本鎖DNAを生成し、Dilute ‘N’ Goジデオキシ配列決定プロトコルを介して、単一反応から12の異なる制限プライマー鎖のそれぞれの配列決定を可能にしたことを例証した。
10

【0183】

上記の結果は、各反応に1000コピーのミトコンドリアゲノムDNAを使用して得られた。本実験のさらなる試料（結果は示さず）は、各反応が、100または10コピーのミトコンドリアゲノムDNAしか含まない時、全12の産物の完全な増幅が得られなかつたことを例証した。これは、タイプ1およびタイプ3のミスプライミングが、標的の数の減少とともに増加するという事実と一致する。

【0184】

しかし、100および10コピーのミトコンドリアゲノムDNAは、以下の調節を行つた後、上記の多重反応でうまく増幅され得る：1) 50 / 600 / 550 nMでの鎖の組み合わせでE P 0 4 3を使用する；2) 80 - 90に増幅サイクル数を増加する；および3) 実施例14に従い、少なくとも2つのミスマッチのAまたはTをそれらの5'端へ追加することにより（下線付きによって示される）、以下の標的の制限プライマーを変更する。
20

標的H V 1用：

制限プライマー 5' T A A A G C C C G G A G C G A G G A G A G T A G C A C T C T
T G
(配列番号97)

標的H V 2用：

制限プライマー 5' A A A G C G G T G T G T G T G C T G G G T A G G A T
(配列番号98)

標的C O 1 - 1用：

制限プライマー 5' A A A G G T T G C G G T C T G T T A G T A G T A G T G A
T G C C A G C A (配列番号99)

標的C O 1 - 2用：

制限プライマー 5' A A A T G G A G G G T T C T T C T A C T A T T A G G A C T T
T T C G C T (配列番号100)

標的C O 2用：

制限プライマー 5' T A A G G G T A A A T A C G G G C C T A T T T C A A A G A
T T T T T
A G G G G A (配列番号101)

標的12srRNA用：

制限プライマー 5' A A T C C A G T A C A C T T A C C A T G T T A C G A C T T G
T C T C C T C T A (配列番号102)

標的Cytb-1用：

制限プライマー 5' A A T G T G A G G G T G G G A C T G T C T A C T G A G T A G
C C
(配列番号103)

標的Cytb-2用：

10

20

30

40

50

制限プライマー 5' AACGATTCAGGTTAGAATGAGGAGGTCTGC
GGCTAG (配列番号 104)

標的 ND 1 用 :

限定 : 5' AACATAAGAACAGGGAGGTTAGAAAGTAGGGTCTTG
GT

(配列番号 105)

標的 ND 2 用 :

制限プライマー 5' AAAGTGTGATTGAGGTGGAGTAGATTAGGC
GT

AGGTAGAAGT (配列番号 106)

10

標的 ND 4 - 1 用 :

制限プライマー 5' AAGCTCAGGAGTTTGATAGTTCTTGGGCAG
TGAGAG (配列番号 107)

標的 ND 4 - 2 用 :

制限プライマー 5' TAGTGGTGGTGAGTAGGCCCATTTGTGT
(配列番号 108)

実施例 9 . タイプ 1 のミスプライミング抑制の直接的な定量的測定

【0185】

本実施例に報告されるアッセイは、タイプ I のミスプライミングならびにタイプ I のミスプライミングの抑制における添加剤および温態始動試薬の効果を測定するために開発された。本アッセイにおいて、アニーリングおよび伸長できる 2 つの重複するオリゴヌクレオチドが、長期間 (10 分)、L A T E - P C R アニーリング温度以下の温度 (50) で、最初にインキュベーションされる。伸長が生じる場合、一対の L A T E - P C R プライマーに対するプライミング部位が作製される、つまり、伸長した重複するヌクレオチドは、プライミング部位を含むが、オリゴヌクレオチド自体は、プライミング部位の相補体のみを含む。反応混合物は、その後、プライマー対を使用して、L A T E - P C R 増幅を受けた。これらの条件下において、検出可能なレベルの産物を生成するために必要なサイクルの数 (過剰プライマー鎖に対する S Y B R Green またはプローブのいずれかで観察された) は、いくつの伸長した (または完全長) 鎌が、部分的に相補的なオリゴマーの初期の等温インキュベーション中に生成されたかに依存するであろう。これは、次いで、等温インキュベーション中に D N A ポリメラーゼがどれだけ活性であるかに依存するだろう。阻害剤を用いた反応の閾値サイクル (C_T) を阻害剤なしの反応と比較することにより、初期の、等温伸長の抑制における阻害剤の効果の定量的測定値を得、これは、本アッセイにおいて、ミスプライミングの事象であると考えられる。最低の C_T 値は、初期に存在する全てのオリゴマーが、初回の増幅前に完全に伸長される時に観察される。C_T 値が高くなるほど、D N A ポリメラーゼの阻害が大きくなることが観察される。反応のそれぞれの組み合わせが混合された後と、50 °C での等温インキュベーション前、全ての反応は、それぞれ、約 100,000 コピーで添加された、重複オリゴヌクレオチド 1 および 2 を有した。

20

【0186】

以下のオリゴヌクレオチドを使用した。重複するオリゴヌクレオチドについて、プライミング部位に相補的な配列は、下線付きであり、重複する配列は、イタリック体である。

30

重複するオリゴヌクレオチド 1 :

5' TTGCACGAGAGCCAGCTCGTCAGGTAGTCACCCAGT
A C A G T C C G C T

T G T G T C A A G A C A G C A C G (配列番号 109)

重複するオリゴヌクレオチド 2

5' CAGCAGCAGACAGTGCACTCGTCAC T C A C T A A C C G
C T A T T C G A G T T

40

50

C G C G T G C T G T C T T G A C A C A A G C G G A C T G T (配列番号 110)
 制限プライマー : 5' T T G C A C G A G A G C C A G C T C G T C A G G T A G T C A
 C C A G T (配列番号 111)
 過剰プライマー : 5' C A G C A G C A G A C A G T G C A C T C G T C A C (配列番号 112)
 添加剤 E P 0 4 6 . 5' ダブシル G G A G C A G A C T A G C A C T G A G G T A ダブ
 シル
 ダブシル C C T C G T C T G A T C G T G A C T C C A T ダブシル 10
 5' (配列番号 113)
 添加剤 E P 0 2 0 . 5' ダブシル G A A A T A A A A T A A A A A T A A A A T A ダブ
 シル
 ダブシル C T T T A T T T T A T T T T A T T T T A T ダブシル
 5' (配列番号 12)
 添加剤 E P 0 2 2 . 5' ダブシル C C G C C G G C ダブシル
 ダブシル G G C G G C C G ダブシル 5' (配列番号 14) 20

【0187】

各反応は、25 μlの反応で、3重で、実施された。各反応混合物は、1X PCR 緩衝剤 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3 mM MgCl₂、250 nM dNTP、0.24 X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA)、および1.25ユニットのTaq DNAポリメラーゼ (Invitrogen, Carlsbad, CA)を含んだ。1つの反応混合物はTaq DNAポリメラーゼのみを含んだ。第2の反応混合物は、Taq DNAポリメラーゼおよび600 nM濃度の添加剤E P 0 4 6を含んだ。第3の反応混合物は、抗体を有する「温態始動」Taq DNAポリメラーゼ (Invitrogen, Carlsbad, CA)を含んだ。第4の反応混合物は、抗体および600 nM濃度の添加剤E P 0 4 6を有するTaq DNAポリメラーゼを含んだ。反応成分のそれぞれの組み合わせが混合された後と、50での等温インキュベーション前、全ての反応は、それぞれ、約100,000コピーで添加された、重複するオリゴヌクレオチド1および2を有した。

【0188】

これらの反応の熱プロファイル条件は、以下の通りである：10分間、50°、その後、プライマーを添加するのに十分長い間、氷上でインキュベーション、その後、98°に急速加熱、その後、98° / 10 s および 72° / 40 s で 60 サイクル。重複するオリゴヌクレオチドによって形成されたハイブリッドの融解温度は、約 60°、つまり、初期の10分のインキュベーションの温度よりはるかに上であった。2ステップPCRプロトコルのアニーリング／伸長温度は、制限プライマーおよび過剰プライマーの濃度調節融解温度より低く、これは、それぞれ、75.1 および 73.6°であり、実施例1に示される方法に従い計算された。試料のそれぞれは、リアルタイムで、SYBR Green 蛍光により分析され、操作の終わりに、反応が、增幅反応の二本鎖産物について予測される88°の単一産物ピークを生成したことを確認するために、それぞれ、融解曲線分析を受けた(図示せず)。

【0189】

増幅サイクルの関数としてのSYBR Green 蛍光を図13に示すが、ここで、丸131は、Taq DNAポリメラーゼのみを有する試料からの反復を特定し、丸132は、Taq DNAポリメラーゼおよび添加剤E P 0 4 6を有する試料からの反復を特定 50

し、丸133は、抗体付加Taq DNAポリメラーゼを有する試料からの反復を特定し、丸134は、抗体付加Taq DNAポリメラーゼおよび添加剤EP046を有する試料からの反復を特定する。

実施例10. ミスプライミングおよび「冷却停止」検出

【0190】

ある低温操作を実施するために、PCR增幅を中断することが可能であるかを決定する。することについてのミスプライミングの作用を決定する必要がある。我々は、その目的のために、本実施例に報告されるアッセイを開発した。アッセイは、LATE-PCR增幅アッセイであり、我々は、以下の標的鎖、プライマー、およびハイブリッド形成プローブ（一端をフルオロフォアQuasar 670（Biosearch Technologies, Novato, CA）で、もう一端をクエンチャーヒューリック（Biosearch Technologies, Novato, CA）で標識した）を利用した。
10

制限プライマー 5' C T C C A G C C C G G C A C G C T C A C G T G A C A G A C C
G

（配列番号114）

過剰プライマー 5' C C G G T G G T C G C C G C G A T C A A G G A G
（配列番号115）

プローブ 5' Quasar 670 G C G G G T T G T T C T G G T C C A T G A B
H Q 2 （配列番号116）
20

標的 5' C C G G T G G T C G C C G C G A T C A A G G A G T T C T T C G G C A C
C A G C C A

G C T G A G C C A A T T C A T G G A C C A G A A C A A C C C G C T G T C G
G G G

T T G A C C C A C A A G C G C C G A C T G T C G G C G C T G G G G C C C G
G C G

G T C T G T C A C G T G A G C G T G C C G G G C T G G A G (配列番号117)
）
30

【0191】

反応混合物は、1XPCR緩衝剤（Invitrogen, Carlsbad, CA）、2 mM MgCl₂、200 nM dNTP、50 nMの制限プライマー、1000 nMの過剰プライマー、200 nMのプローブ、1.25ユニットのTaq DNAポリメラーゼ（Invitrogen, Carlsbad, CA）、および試験される添加剤、この場合、600 nMの添加剤EP010を含んだ。加えて、各反応は、1000万コピーのヒトゲノムDNA（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を含んだ。試験された添加剤の配列は、

添加剤EP010. 5' ダブシルGGTCAGATGAAAAATGATACGTGダブシル
40

ダブシルCCAGTCCTACTTTACTATGCACダブシル
5'
（配列番号10）であった。

【0192】

中断されないプロトコルが、感度が高く、堅固であることを確立するために、反応混合物に含まれる試験添加剤を用いるが、いかなる熱サイクルのプロトコルの中止なしに、3つの対照アッセイを最初に実施した。増幅反応混合物に1000、100、および10コピーの標的鎖を用いて、対照アッセイを開始した。熱サイクルレジメンは、3分間、98℃、その後、60℃で蛍光読み取りを行う、98℃ / 10 s 75 / 40 s、60℃ / 30 s
50

0 s の 70 サイクルであった。図 14 A は、 P C R サイクル数の関数としてのプローブからの蛍光読み取りを表し、丸 14 1 は、 1000 コピーの標的を有する試料の 4 つの反復増幅からの読み取りであり、丸 14 2 (点線) は、 100 コピーの標的を有する試料の反復からの読み取りであり、丸 14 3 は、 10 コピーの標的を有する試料の反復からである。

【 0193 】

個別の反応混合物は、中断された熱サイクルプロトコルを受けた。熱プロファイルは、 98 °で 1 分間、その後、 98 ° / 10 s 、 75 ° / 40 s の 40 サイクル、その後、 40 ステップにおいて、融解が 45 °で開始し、 30 秒毎に 1 °のステップで増加し (各ステップにおいてデータ取得) 、その後、融解が繰り返される終結で、さらに 98 ° / 10 s 、 75 ° / 40 s の 30 サイクルであった。

【 0194 】

2 つの融解からの結果を図 14 B および図 14 C に示す。これらの図は、各温度での蛍光値が、プローブが一本鎖に結合しない温度である 75 °での蛍光値で割られることにより基準化される、融解曲線を表す。基準化された融解は、増幅の終結後 (図 14 C) 、 40 増幅サイクル後 (図 14 B) および 70 サイクル後に決定された。図 14 B において、丸 14 4 は、 1000 コピーの標的についての反復であり、丸 14 5 は、 100 コピーの標的を有する試料の反復であり、丸 14 6 は、 10 コピーの標的を有する試料の反復である。同様に、図 14 C において、丸 14 7 (黒い実線) は、 1000 コピーの標的を有する試料の 3 つの反復増幅であり、丸 14 8 (点線) は、 100 コピーの標的を有する試料の反復であり、丸 14 9 (灰色の実線) は、 10 コピーの標的を有する試料の反復である。

実施例 11 . 対称 P C R 反応におけるタイプ II のミスマッチング

【 0195 】

従来の対称 P C R 、対立遺伝子識別プライマーの特異性に対する添加剤の作用を例証するために、以下のアッセイを実施した。1 つのプライマーが、これらの D N A が D N A を標的とするもの (「一致する標的」と称する) に対して特異的である (対立遺伝子特異的プライマー) プライマー対を使用して、添加剤 E P 043 (配列番号 45) の存在下、または不在下の対称 P C R 条件下で、並行して、単一ヌクレオチド位置で異なる等濃度の 2 つの D N A 標的配列を増幅した。文献 (Newton et al . , Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) . 1989 , Nucleic Acids Res . 17 : 2503 - 2516) に提案されるように、一致する標的の優先的増幅のための一対の対称 P C R プライマーは、プライマーの 1 つの 3 ' 端が、意図される D N A 標的に固有のヌクレオチドに相補的であり、最後から 2 番目の 3 ' 端位置が、意図される、および意図されない D N A 標的の両方に不一致であるように構築された。したがって、意図される標的に特異的なプライマーは、意図される D N A 標的にその 3 ' 端で 1 回のみ不一致であるが、ミスマッチ標的にその 3 ' 端で 2 回不一致である。本プライマー設計は、一致する標的の優先的増幅をもたらす。本実験前に、標的ゲノム濃度の差におけるデータを基準化するために、一致する、およびミスマッチの標的を含むゲノム D N A 試料を、両方の標的に完全に相補的であるプライマーを用いて定量化した。この場合、ミスマッチの標的の C T は、一致する標的の C T より 1 . 52 低く、したがって、対立遺伝子特異的プライマーを使用するアッセイにおいて、ミスマッチの標的の C T のあらゆる記載される遅延は、標的濃度差を説明するために、観察された rC T に 1 . 52 を足すことにより修正されなければならなかった。

【 0196 】

優先的増幅の標的およびプライマーの配列、ならびに添加剤の配列は、

対立遺伝子特異的プライマー 5 ' T A T C G T C A A G G C A C T C T T G C C T A C

10

20

30

40

50

G C C T T (配列番号 118)
 共通プライマー 5' G T A C T G G T G G A G T A T T G A T A G T G T A T T A A
 C C (配列番号 119)
 一致する標的 5' G T A C T G G T G G A G T A T T G A T A G T G T A T T A A C
 C T T A T G T G T
 G A C A T G T T C T A A T A T A G T C A C A T T T C A T T A T T
 T T T A T T A T A
 A G G C C T G C T G A A A A T G A C T G A A T A T A A A C T T G T
 G G T A G T T 10
 G G A G C T G A T G G C G T A G G C A A G A G T G C C T T G A C G
 A T A
 (配列番号 120)
 ミスマッチ標的 5' G T A C T G G T G G A G T A T T G A T A G T G T A T T A A
 C C T T A T G T
 G T G A C A T G T T C T A A T A T A G T C A C A T T T C A T T
 A T T T T T
 A T T A A G G C C T G C T G A A A A T G A C T G A A T A T A
 A A C T T
 G T G G T A G T T G G A G C T G G T G G C G T A G G C A A G A G
 T G C 20
 C T T G A C G A T A (配列番号 121)
 添加剤 E P 0 4 3 . 5' G G A G C A G A C T A G C A C T G A G G T A ダブシル
 ダブシル C C T C G T C T G A T C G T G A C T C C A T ダブシル
 5'
 5' ダブシル A G A C T A G C A C T G A G G T A ダブシル
 (配列番号 48)

であった。

【0197】

対称 P C R 増幅を、 1 X プラチナ T a q 緩衝剤 (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) 、 3 m M M g C l ₂ 、 0 . 2 m M d N T P 、 1 u M のプライマー対、 0 . 2 4 X S Y B R G r e e n (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) 、 1 ユニットのプラチナ T a q D N A ポリメラーゼ (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) 、 および 2 5 μ l の最終反応容量で、一致する、またはミスマッチの標的配列のいずれかを含む 1 0 0 0 ゲノム等量のヒト D N A で実施した。反応混合物は、添加剤なしか、または 1 0 0 n M 濃度の上部鎖、 3 0 0 n M 濃度の中央鎖、および 2 0 0 n M 濃度の底部鎖を有する 3 0 0 n M の全濃度の添加剤 E P 0 4 3 を含むかのいずれかであった。

【0198】

増幅条件は、 5 分間、 9 4 / 、その後、 7 2 ステップでのデータ取得を伴う 9 4 / 1 分 (m) 、 6 4 / 1 分、 7 2 / 1 分の 6 0 サイクル、および 7 2 / 1 0 m の最終伸長ステップであった。増幅は、 B i o - R a d I Q - 5 多色リアルタイム P C R 検出システム (B i o - R a d , H e r c u l e s , C A) で実施された。

【0199】

S Y B R g r e e n リアルタイム蛍光シグナルから、添加剤を含まないアッセイにおいて、ミスマッチの標的からのシグナルは、一致する標的からのシグナルと比較して遅かったと判断され、 7 . 8 4 の修正された r C _T をもたらした。同様に、 3 0 0 n M 濃度の全濃度の添加剤 E P 0 4 3 を含むアッセイにおいて、ミスマッチの標的からのシグナルは、一致する標的からのシグナルと比較してさらに遅く、 1 2 . 5 9 の修正された r C _T をもたらした。したがって、 E P 0 4 3 の存在による増加したポリメラーゼ特異性は、 4 . 7 5 サイクルであった。

実施例 12 . T a q D N A ポリメラーゼ活性の阻害および制限プライマー 3' 端の A T 含量

【 0 2 0 0 】

その 3' 端で制限プライマー G C 豊富、およびその 3' 端で制限プライマー A T 豊富を利用する L A T E - P C R アッセイを、本明細書に記載される添加剤の存在により生じる遅延について比較した。4つの增幅反応を実施した：1つは、G C 豊富 3' 端を有するプライマーを使用するが添加剤なし、第 2 は、同じプライマーと添加剤 E P 0 1 3 とを使用し、第 3 は、A T 豊富 3' 端を有するプライマーを使用するが添加剤なし、第 4 は、同じプライマーと添加剤 E P 0 1 3 とを使用する。

10

【 0 2 0 1 】

各 25 μl 増幅反応混合物は、1 X プラチナ T a q 緩衝剤 (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) 、3 mM MgCl₂ 、250 nM d NTP 、1.25 ユニットのプラチナ T a q ポリメラーゼ (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) 、1000 ゲノム等量のヒト D N A 、1000 nM 濃度の過剰プライマー、50 nM 濃度の制限プライマー、および 500 nM 濃度の検出プローブを含んだ。添加剤 E P 0 1 3 (配列番号 47) を含んだ 2 つのアッセイにおいては、600 nM 濃度で反応混合物に含まれた。

【 0 2 0 2 】

熱サイクルレジメンは、20 サイクルについては、10 秒間 95 、10 秒間 66.5 、および 10 秒間 72 、その後、10 秒間 95 、10 秒間 65 、10 秒間 72 、および 54 で 20 秒間の蛍光シグナル検出の 50 サイクルであった。その標的に結合された時の各プローブからの蛍光検出は、P C R サイクルのアニーリング段階中に測定された。

20

【 0 2 0 3 】

G C 豊富 3' 端を有する限定プライマーを用いたアッセイで利用された標的、プライマー、およびプローブの配列は、

過剰プライマー 5' G C A C A G T T A C A G T A T T C C A G C A G A C T C A
(配列番号 122)

制限プライマー 5' T C A G T G G T G G C A G T G G T A G T G G T G G C
(配列番号 123)

30

G C 豊富プライマーの標的 5' G C A C A G T T A C A G T A T T C C A G C A G A C
T C A A A T

A C A A G A A C C T A C T G C T A A T G C C A C C A C
T A C

C A C T G C C A C C A C T G A (配列番号 124)

検出プローブ 5' B H Q - 2 T C A G T G G T G G C A G T G G T A G A Qu a s a
r 670

(配列番号 125)

であった。

40

【 0 2 0 4 】

A T 豊富 3' 端を有する限定プライマーを用いたアッセイで利用された標的、プライマー、およびプローブの配列は、

過剰プライマー 5' C T T T G G C A C C A G A G G T G A G C
(配列番号 126)

制限プライマー 5' G G T G C G T G G G T C C C A G T C T G C A G T T A A G
(配列番号 127)

A T 豊富プライマーの標的 5' G G T G C G T G G G T C C C A G T C T G C A G T T
A A G G G

50

G G C A G G A G T G G C G C T G C T C A C C T C T G G
T G C C A A A G (配列番号 128)

検出プローブ 5' BHQ - 2 G C A G G A G T G G C G C T Quasar 670
(配列番号 129)

であった。

【0205】

添加剤 E P 0 1 3 の配列は、以下の通りであった。

添加剤 E P 0 1 3 . 5' ダブシル G G T C A G A T G A A A A T G A T A C G T G p 10
ダブシル C C A G T C T A C T T T A C T A T G C A C ダブシル
5'
(配列番号 56)

【0206】

G C 豊富 3' 端を有する制限プライマーを使用するアッセイにおいて、添加剤 E P 0 1 3 の 600 nM 濃度の反応混合物への添加は、添加剤なしの増幅と比較して、閾値サイクル (C_T) に 4 サイクルの遅延をもたらした。A T 豊富 3' 端を有する制限プライマーを使用するアッセイにおいて、添加剤 E P 0 1 3 の 600 nM 濃度の反応混合物への添加は、11 サイクルの C_T 遅延をもたらした。

20

実施例 13 . プライマーの 5' 端の修飾およびタイプ III のミスプライミング

【0207】

我々は、さらなるヌクレオチドを使用し、PCR 増幅プライマーの 1 つの 5' 端上に非相補的な尾を形成した。本実施例において、我々は、LATE-PCR 増幅を使用し、我々は、制限プライマーを修飾した。我々は、修飾されたプライマーと未修飾のプライマーを比較し、完全結合 3' 端と部分的結合 3' 端とを区別した。ヒトミトコンドリアシトクローム b 遺伝子（下線付き塩基として表示される）を増幅するために使用される制限プライマーの 5' 端に、2 つのアデニンを添加した。我々は、2 つの添加剤を試験し（添加剤 E P 0 4 7、標的、プライマー）、添加剤の配列は、以下の通りである。

30

標的 Cytb - 1 . 5' T G T G A G G G T G G G A C T G T C T A C T G A G T A G
C C T C C T C A G A T
T C A T T G A A C T A G G T C T G T C C C A A T G T A T G G
G A T G G C G G A T A
G T A A G T T T G T A A T T A C T G T G G C C C C T C A G A
A T G A T A T T T G G
C C T C A C G G G A G G A C A T A G C C T A T G A A G G C T
G T T G C T A T A G
T T G C A A G C A G G A G G A T A A T G C C G A T G T T T C
A G G T T T C T G A 40
G T A G A G A A A T G A T C C G T A A T A T A G G C C T C G
C C C G A T G T G T
A G G A A G A G G C A G A T A A A G A A T A T T G A G G C G
C C A T T G G C G
T G A A G G T A G C G G A T G A T T C A G C C A T A A T T T
A C G T C T C G A G
T G A T G T G G G C G A T T G A T G A A A A G G C G G T T G
A G G C G T C T G G
T G A G T A G T G C A T G G C T A G G A A T A G T C C T G T
G G T G A T T T G G 50

A G G A T C A G G C A G G C G C C A A G G A G T G A G C C G
A A G T T T C

制限プライマー 5' T G T G A G G G T G G G A C T G T C T A C T G A G T A G C C
(配列番号 80)

過剰プライマー 5' T C C G C A T G A T G A A A C T T C G G C T C (配列番号 81)
)

修飾された制限プライマー 5' A A T G T G A G G G T G G G A C T G T C T A C T G
A G T A G C C
(配列番号 130) 10

添加剤 E P 0 4 7 ダブシル C C T C G T C T G A T C G T G A C T C C A T ダブシル 5'
,

5' ダブシル A G A C T A G C A C T G A G G T A
(配列番号 131)

添加剤 E P 0 4 3 . 5' G G A G C A G A C T A G C A C T G A G G T A ダブシル
ダブシル C C T C G T C T G A T C G T G A C T C C A T ダブシル
5'

5' ダブシル A G A C T A G C A C T G A G G T A ダブシル
(配列番号 48) 20

【0208】

添加剤 E P 0 4 7 は、22ヌクレオチド長の鎖と、17ヌクレオチド長である二本鎖領域を形成する17ヌクレオチド長の鎖とを含み、4つの末端ダブシル修飾因子を有する。添加剤 E P 0 4 7 の Tm は、59.1 である。添加剤 E P 0 4 3 は、添加剤の混合物である。構成要素の1つとして添加剤 I E P 0 4 7 (2つの底部鎖を含む) を含み、これは、550nM の濃度で本試験に含まれる。混合物 E P 0 4 3 も、上部2つ鎖として示される別の二本鎖オリゴヌクレオチドを含む。この2番目のオリゴマーは、22ヌクレオチド長である2つの相補的鎖を含み、3つの末端ダブシル修飾因子を有する。それは、67.4 の Tm を有し、50nM の濃度で本試験に含まれた。混合物中の2つの添加剤は、共通の鎖を共有するため、鎖濃度は、上部 / 中央 / 底部鎖において、50 / 600 / 550 30 であった。

【0209】

L A T E - P C R 反応混合物は、25μl の容量で、1×P C R 緩衝剤、250nM d N T P、3mM M g C l₂、0.24× S Y B R G r e e n、50nM の制限プライマー、1000nM の過剰プライマー、1000コピーのヒトミトコンドリアD N A 、および抗体結合の5' エキソヌクレアーゼ(-)ポリメラーゼ(I n v i t r o g e n , C a r l s b a d C A) である2.5ユニットのT F i (-) D N A ポリメラーゼを含んだ。反応混合物中に以下の添加剤および制限プライマーを用いて、6つのアッセイを実施した。 40

- (1) 添加剤なし、尾状でない制限プライマー (配列番号 80)
- (2) 添加剤なし、尾状制限プライマー (配列番号 133)
- (3) 600nM 濃度の添加剤 E P 0 4 7 、尾状でない制限プライマー
- (4) 600nM 濃度の添加剤 E P 0 4 7 、尾状プライマー
- (5) 50 / 600 / 550 の鎖濃度の3本鎖添加剤混合物 E P 0 4 3 、尾状でないプライマー
- (6) 50 / 600 / 550 の鎖濃度の3本鎖添加剤混合物 E P 0 4 3 、尾状のプライマ

【0210】

6つの反応混合物を以下の条件で増幅した：3分間、95℃、その後、95℃/5s、58℃/20s、および68℃/2mの65サイクル。次いで、45℃から開始し、95℃まで、30秒間隔で1ずつ上昇させながら、産物の融解分析を実施した。PCR増幅ならびに融解分析をSYBR Greenを使用して監視した。

【0211】

添加剤なしの反応において、産物進化は、どの制限プライマーを使用しても、所望の産物のTmより高いTmを有する増幅をもたらした。反応混合物に添加剤EP047を含むと、数増幅サイクルで、検出可能な産物進化の開始を遅延し、増幅産物の一部に適切な産物を生じた。添加剤EP047に関して、より適切な産物は、尾状でないプライマーを使用して作製されるより、尾状のプライマーを使用して作製された。添加剤EP047は、
59.1のその未修飾鎖に基づく計算されたTmを有する。¹⁰ 反応混合物に添加剤EP043を含むと、検出可能な産物進化の開始も遅延し、最も適切な産物の生成をもたらした。添加剤EP043では、より適切な産物は、尾状でないプライマーを使用して作製されるより、尾状のプライマーを使用して作製された。添加剤EP043は、67.4および59.1の未修飾鎖に基づく計算されたTmを有する混合物である。

【0212】

添加剤EP043、尾状制限プライマー、および尾状でない制限プライマーを用いた、6つの反復のリアルタイム動態曲線を15Aに示す。図15Aにおいて、丸151（灰色の線）は、尾状でないプライマーを用いた3つの反復の曲線を特定し、丸152（黒色の線）は、尾状のプライマーを用いた反復の曲線を特定する。²⁰ 添加剤EP043を用いた6つの増幅産物の融解曲線を図15Bに示し、下方矢印は、適切な二本鎖DNA産物の融解温度86℃を示す。図15Bにおいて、丸153は、図15Aの産物進化（平らな平坦域）のない適切なピークを示した、尾状でないプライマーを用いた1つの反復を特定し、丸154は、同じく、図15Aの産物進化（平らな平坦域）を示さなかった尾状のプライマーを用いた2つの反復を特定した。

実施例14：ミスプライミングを抑制するためのプライマーとしての添加剤

【0213】

添加剤であるプライマーは、1本の鎖が伸長可能な3'端を有する増幅プライマーである、二本鎖オリゴヌクレオチドである。その5'端は、変更置換基を有する。我々が逆相補体配列として称するもう一方の鎖は、2つを有し、その3'端は、伸長不可能である。³⁰ 本実施例の増幅アッセイは、制限プライマーが非常に低濃度で反応混合物に含まれるLAT-E-PCRアッセイであるため、過剰プライマーのみが添加剤として使用される。遊離型3'端を有する鎖は、その標的鎖とハイブリッド形成し、そこに伸長する時に、増幅プライマーとして作用し、その修飾された相補的鎖とハイブリッド形成される時、ミスプライミングの阻害剤として作用する。本実施例において、プライマー-逆相補体配列添加剤は、3つの末端ダブシル修飾因子を有する。プライマー鎖は、修飾基、ここでは、ダブシル基のその5'末端ヌクレオチドへの共有結合により修飾される。逆相補体配列は、修飾基、ここでは、ダブシル基のその5'端および3'端のそれぞれへの共有結合により修飾される。プライマー鎖に対する逆相補体配列のTmは、その増幅標的配列に対するプライマー鎖のTmより5~30℃、好ましくは、15~25℃低いように設計される。Tmの差を達成するために、1つ以上のヌクレオチドでプライマー鎖を短くするか、またはミスマッチにするかにより、プライマー鎖に部分的な相補性を逆相補体配列に付与することができる。本実施例において、幾つかのミスマッチのヌクレオチドが含まれた。1対以上のプライマーを有する多重反応において、少なくとも1つのプライマーは、その対応する部分的に相補的逆相補体配列を有する添加剤に変換される。単一および多重反応の両方において、該少なくとも1つのオリゴヌクレオチドの濃度は、反復反応間でばらつきが少ない、ミスプライミングの抑制を達成するように、経験的に滴定され、最適化される。典型的に、該最適濃度は、ミスプライミングを抑制するために同反応に添加されるプライマーではない、二本鎖添加剤のそれに近い。当業者に理解されるように、添加剤-プライマーを
⁴⁰
⁵⁰

利用する反応は、プライマーではない添加剤でさらに補てんすることができるが、ただし、後者は、前者とクロスハイブリッド形成しないものとする。

【0214】

L A T E - P C R 反応は、以下の配列を使用して、3重で、実施された。

制限プライマー 5' T C C A G T A C A C T T A C C A T G T T A C G A C T T G T C
T C C T C T A

(配列番号 132)

過剰プライマー 5' ダブシル A G T T C A C C C T C T A A A T C A C C A C G A T
(配列番号 133) 10

逆相補体配列

5' ダブシル A T C G T T G T G G T A T A G A G G G T G A A C T -
ダブシル

(配列番号 134)

標的 5' A G T T C A C C C T C T A A A T C A C C A C G A T C A A A A G G A A C A
A G C

A T C A A G C A C G C A G C A A T G C A G C T C A A A A C G C T T A G C C T
A G C C A

C A C C C C C A C G G G A A A C A G C A G T G A T T A A C C T T A G C A A
T A A A C 20

G A A A G T T T A A C T A A G C T A T A C T A A C C C C A G G G T T G G T C
A A T T T C G

T G C C A G C C A C C G C G G T C A C A C G A T T A A C C C A A G T C A A T
A G A A G C

C G G C G T A A A G A G T G T T T A G A T C A C C C C T C C C C A A T A
A A G C T A

A A A C T C A C C T G A G T T G T A A A A A C T C C A G T T G A C A C A A
A A T A G A

C T A C G A A A G T G G C T T T A A C A T A T C T G A A C A C A C A A T A G
C T A A G A 30

C C C A A A C T G G G A T T A G A T A C C C C A C T A T G C T T A G C C C T
A A A C C T

C A A C A G T T A A A T C A A C A A A A C T G C T C G C C A G A A C A C T A
C G A G C

C A C A G C T T A A A A C T C A A A G G A C C T G G C G G T G C T T C A T A
T C C C T C

T A G A G G G A G C C T G T T C T G T A A T C G A T A A A C C C C G A T C A A
C C T C A C

C A C C T C T T G C T C A G C C T A T A T A C C G C C A T C T T C A G C A A
A C C C T G A 40

T G A A G G G T A C A A A G T A A G C G C A A G T A C C C A C G T A A A G A
C G T T A G

G T C A A G G T G T A G C C C A T G A G G T G G C A A G A A A T G G G C T A
C A T T T T C

T A C C C C A G A A A A C T A C G A T A G C C C T T A T G A A A C T T A A G
G G T C G A

A G G T G G A T T T A G C A G T A A A C T A A G A G T A G A G T G C T T A G
T T G A A C

A G G G C C C T G A A G C G C G T A C A C A C C G C C C G T C A C C C T C C
T C A A G T 50

A T A C T T C A A A G G A C A T T T A A C T A A A A C C C C T A C G C A T T
T A T A T A
G A G G A G A C A A G T C G T A A C A T G G T A A G T G T A C T G G
(配列番号 135)

【0215】

1 X プラチナ T f i (-) 緩衝剤 (Invitrogen, Carlsbad, CA)
、 3 mM MgCl₂、 250 nM dNTP、 50 nM の制限プライマー、 1000 nM の過剰プライマー、 0.24 X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA) 10
、ヒトゲノムDNAから約 1000 ゲノムを有する 2.5 ユニットのプラチナ T f i (-) DNA ポリメラーゼ (Invitrogen, Carlsbad, CA) から成る 25 μl 容量で、 L A T E - P C R 増幅を実施した。添加剤を作製した逆相補体の濃度は、 100 、 200 、および 300 nM であった。この場合において、我々は、ミスマッチを逆相補体鎖に導入することによって（ミスマッチのヌクレオチドは下線付きである）、プライマー - 標的ハイブリッドと比較して、プライマー - 逆相補体ハイブリッドの T m を低くした。

【0216】

これらの反応の熱プロファイル条件は、以下の通りである： 3 分間、 95 °C 、その後、 60 サイクルについては、 95 °C / 5 s - 58 °C / 20 s - 68 °C / 2 m 、その後、 51 サイクルについては、 1 °C ずつ上昇させながら、 45 °C / 45 s で融解開始。全ての反応は、熱サイクルの伸長段階 (68 °C) 中に、リアルタイムで分析された。 60 サイクルの終わりで、二本鎖DNA産物の SYBR Green 蛍光の第 1 導関数を使用して（融解曲線分析）、増幅産物を分析した。 20

【0217】

融解曲線を図 16 A ~ 16 D に示す。図 16 A は、逆相補体配列を有さない、 3 つの反復の融解曲線である。曲線 16 1 は、相補オリゴヌクレオチドの不在下において、 3 つの反復の 1 つのみが、 86 °C の融解温度を有する予測された産物を生成した（矢印）ことを示す。図 16 B は、 100 nM 濃度の逆相補体配列を含んだ 3 つの反復の融解曲線である。曲線 16 2 は、 3 つの反応の 2 つが予測された産物を生成したことを示す。図 16 C および 16 D は、それぞれ、 200 nM および 300 nM の濃度の逆相補体配列を用いた反復の融解曲線である。曲線 16 3 および 16 4 は、各一連の反応での 3 つの反復の全てが、適切な産物を生成したことを示す (86 °C の融解ピークの存在により判断された) 。 30

実施例 15 : RNA 標的でのミスプライミング

【0218】

本実施例は、開始標的配列がDNAではなくRNAである一連のL A T E - P C R アッセイを説明する、したがって、初期の反応混合物は逆転写酵素を含み、プロトコルは、cDNAの増幅前に、RNAをcDNAに変換するための初期のインキュベーションを含んだ。本シリーズで利用されたRNAは、エンテロウイルスRNAからの5'未翻訳領域(UTR)の一部を含む、エンテロウイルス補強されたRNA(EV, Asuragen, Austin, TX, USAのカタログ#42050)内の配列であった。試料は、EVおよび口蹄疫ウイルス(FMDV)の両方のプライマー対を含んだが、FMDV標的は本実施例において含まれなかった。増幅反応は、フルオロフォア(Cal Red 610)およびクエンチャー(Black Hole Quencher No.2)を有する分子指標プローブの使用により、リアルタイムで追跡された。全反応の全セットは、3重で行われ、産物は、エンドポイントで、融解曲線分析を介して分析された。 40

【0219】

混合物を含む幾つかの添加剤を、添加剤なし対照と比較した。EVプライマー、EVプローブ、および添加剤の配列は、以下の通りである。

E V 制限プライマー 5' G A C T T G C G C G T T A C G A C A G G C C A A T C
(配列番号 136)

E V 過剰プライマー 5' T G A A T G C G G C T A A T C C C A A C (配列番号 137)
)

E V プローブ 5' C a l R e d 610 - A A C C A C C T G C C C C T T -
B H Q 2
(配列番号 138)

添加剤 E P 0 2 0 . 5' ダブシル G A A A T A A A A T A A A A A T A A A A T A ダブ
シル
ダブシル C T T T A T T T T A T T T T A T T T T A T ダブシル 10
5'
(配列番号 12)

添加剤 E P 0 1 0 . 5' ダブシル G G T C A G A T G A A A A T G A T A C G T G ダブ
シル
ダブシル C C A G T C T A C T T T T A C T A T G C A C ダブシル
5'
(配列番号 10)

添加剤 E P 0 0 3 . 5' G G A G C A A A A T A G C A A T G A G G T A ダブシル
ダブシル C C T C G T T T A T C G T T A C T C C A T ダブシル
5'
(配列番号 25) 20

【0220】

E V 補強された R N A を 1 0 m M の T R I S 、 pH 8.3 で、 μ 1 当り約 25,000 粒子に希釈し、 75 °C で 3 分間加熱し、 外殻タンパク質を変性し、 R N A を解放した。 R N A (試料当り 2 μ l)を、 濃縮プライマー (試料当り 3 μ l)を含む溶液と混合し、 5 分間、 室温でインキュベーションした後、 濃縮試薬混合物を添加し、 試料当り 25 μ l の最終容量の以下の濃縮物を得た： 3 m M の塩化マグネシウム、 それぞれ 400 n M のデオキシヌクレオチド、 それぞれ 500 n M のプローブ、 それぞれ 50 n M の制限プライマー、 それぞれ 500 n M の過剰プライマー、 1 X T f i (e x o -) 反応緩衝剤、 試料当り 2 ユニットの T f i (e x o -) ポリメラーゼ (Invitrogen , Cat. No. 60684-050)、 および試料当り 100 ユニットの SuperScript III 逆転写酵素 (Invitrogen , Cat. No. 18080-044)。 E V R N A は、 試料当り約 50,000 コピーであった。 添加剤は、 以下の濃度で含まれた。

反応 A - 2000 n M の添加剤 E P 0 2 0

反応 B - 200 n M の添加剤 E P 0 1 0

反応 C - 400 n M の添加剤 E P 0 0 3

反応 D - 400 n M の添加剤 E P 0 1 0 および 1000 n M の添加剤 E P 0 2 0

反応 E - 400 n M の添加剤 E P 0 0 3 および 1000 n M の添加剤 E P 0 2 0

反応 F - 添加剤なしの対照 40

【0221】

試料を Stratagene MX 3005 P 熱サイクルに設置し、 6 分間 50 °C 、 1 分間 95 °C 、 その後、 95 °C / 10 s 、 64 °C / 10 s 、 および 68 °C / 20 s の 25 サイクル、 その後、 50 °C でプローブの蛍光検出を伴う 95 °C / 10 s 、 64 °C / 10 s 、 68 °C / 20 s 、 および 50 °C / 30 s の 35 サイクルでインキュベーションした。

【0222】

図 17 A ~ 17 F は、 サイクル 26 ~ 60 の低温 (50 °C) 検出ステップ中の、 プローブ蛍光のリアルタイム結果を示す。 図 17 A において、 丸 17 1 は、 反応 A の 3 つの反復の曲線である。 図 17 B において、 丸 17 2 は、 反応 B の 3 つの反復の曲線である。 図 1 50

7 Cにおいて、丸173は、反応Cの3つの反復の曲線である。図17Dにおいて、丸174は、反応Dの3つの反復の曲線である。図17Eにおいて、丸175は、反応Eの3つの反復の曲線である。図17Fにおいて、丸176は、反応Fの3つの反復の曲線である。

【0223】

丸176の曲線は、添加剤なし対照が、タイプI IIのミスプライミング（幾つかの産物進化）を示したことを示すが、これは、後期增幅サイクル（おおよそサイクル42～60）における一本鎖産物の減少により示される。非常に高濃度で、低Tm添加剤（Tm47.7、これは、アニーリング温度より約16低く、低温検出温度より2.3低かった）を含んだ反応Aにおける丸171の曲線は、タイプIのミスプライミングの抑制を示したが、60サイクルまで反復間で高いばらつきを伴なって、タイプI IIのミスプライミングを一部抑制したのみであった。非常に低い濃度で、幾分高いTm（Tm60、これは、アニーリング温度より4低く、低温検出温度以上であった）を有する添加剤を含んだ反応Bにおける丸172の曲線は、タイプIのミスプライミングを完全に抑制し、タイプI IIのミスプライミングは部分的に抑制したのみだが（3つの反復のうち2つは、サイクル60までにプローブシグナルにおいて、いくらかの減少を示した）、それにもかかわらず、サイクル60ではばらつきが著しく減少した。添加剤を含んだ反応C、D、およびEの全ては、サイクル60までの間中、プローブシグナルにおいて、減少を示さなかった。丸174の曲線は、高シグナルでタイプI IIのミスプライミングの抑制を示し、反応の効率において、最小限の低下を示すため、反応Dは、本一連の反応とて最適であると判断された。
10
20

実施例16. オーバーハングを有する添加剤によるタイプIのミスプライミング抑制の直接的な定量的測定

ここで報告されるアッセイは、以下を除き、実施例9に記載される通りに実施された：（a）Taqポリメラーゼ抗体は、50のインキュベーションステップ中、全ての試料に存在した、（b）50でのインキュベーションステップは、1分間であった。

各添加剤は、ダブルシル部分の添加により修飾される1つ、2つ、3つ、または4端を伴う、図18Cに示されるオリゴマー194、195の構造を有する、同じ2つのヘアピン形成34ヌクレオチド長一本鎖オリゴマーから成了た。3'端がクエンチャーによって遮断されなかつた全てのオリゴは、伸長を妨げるために、リン酸（P）または三炭素修飾因子（C₃）のいずれかにより遮断された。各一本鎖オリゴマーの5'端および3'端上の6つのヌクレオチドは、これらの端が相互とハイブリッド形成した時、これらが6塩基対システムおよび22ヌクレオチドループ構造を形成するように、相補的であった。図18Cを参照すると、該添加剤の2つの22ヌクレオチドループは、相互とハイブリッド形成する時、4つの非相補的一本鎖6塩基対長の端198、199、200、201を伴う、22塩基対長二本鎖部分197を有する添加剤196を形成するように、相補的であった。一本鎖オリゴマーの配列は、ランダムに指定されなかつたが、設計における固有の相補性のため、慎重な考察が必要とされた。本考察は、ループが結合される温度で、オリゴマーに他の構造を形成させないこと、特に、アーム配列が相互に解放されたままの状態を防ぐこと、ならびにいずれかのオリゴヌクレオチドの相補的ループ配列のどれにも結合しないことである。これらの添加剤配列は、温度範囲を超えて事前設計された立体構造に留まる能力を有する。
30
40

構成要素オリゴヌクレオチド鎖の1つまたは両方が、システムループ構造を形成する能力を有する添加剤の場合において（図18B、18Cを参照）、該システムの融解温度（Tm）は、添加剤の二本鎖の融解温度より高いが、反応の温度を低下する時に、適切な時間期間、添加剤の二本鎖立体構造の形成を妨げる程高くないことが望ましい。この場合、添加剤の二本鎖部分の計算されたTmは、59であり、システムヌクレオチドの計算されたTmは、65であった。これらの計算は、50での70mM Na⁺、3mM Mg²⁺の試薬濃度に基づく。二本鎖部分については、ウェブサイト（http://dina

`melt.bioinfo.rpi.edu/twostate.php`を使用し、システムについては、ウェブサイト(`http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/dna-form1.cgi`)を使用した。実践において、実際のTmは、相互作用するダブシルの数に依存し、約4まで、計算されたTmから上昇させることができる。

以下の添加剤を使用し、相補的である配列は下線付きである。

添加剤 S L 0 2 .

5' G C G C C T C A C G T A T C A T T T C A T C T G A C C A G G C G C 10
 (P)
 3' ダブシル G C C T C C G T G C A T A G T A A A A G T A G A C T G G G G
 A G G C
 (配列番号 1 3 9)

添加剤 S L 0 3 .

5' G C G C C T C A C G T A T C A T T T C A T C T G A C C A G G C G C
 (P)
 3' (P) G C C T C C G T G C A T A G T A A A A G T A G A C T G G G G A 20
 G G C ダブシル
 (配列番号 1 4 0)

添加剤 S L 0 4 .

5' ダブシル G C G C C T C A C G T A T C A T T T C A T C T G A C C A G
 G C G C (P)
 3' (P) G C C T C C G T G C A T A G T A A A A G T A G A C T G G G G A
 G G C ダブシル
 (配列番号 1 4 1)

添加剤 S L 0 5 .

5' G C G C C T C A C G T A T C A T T T C A T C T G A C C A G G C G C 30
 ダブシル
 3' ダブシル G C C T C C G T G C A T A G T A A A A G T A G A C T G G G G
 A G G C
 (配列番号 1 4 2)

添加剤 S L 0 6 .

5' ダブシル G C G C C T C A C G T A T C A T T T C A T C T G A C C A G
 G C G C (P)
 3' ダブシル G C C T C C G T G C A T A G T A A A A G T A G A C T G G G G 40
 A G G C
 (配列番号 1 4 3)

添加剤 S L 0 7 .

5' ダブシル G C G C C T C A C G T A T C A T T T C A T C T G A C C A G
 G C G C ダブシル
 3' ダブシル G C C T C C G T G C A T A G T A A A A G T A G A C T G G G G A
 G G C
 (配列番号 1 4 4)

添加剤 S L 0 8 .

5' ダブシリル G C G C C T C A C G T A T C A T T T C A T C T G A C C A G
G C G C (C₃)
3' ダブシリル G C C T C C G T G C A T A G T A A A A G T A G A C T G G G G
A G G C ダブシリル
(配列番号 1 4 5)

添加剤 S L 0 9 .

5' ダブシリル G C G C C T C A C G T A T C A T T T C A T C T G A C C A G
G C G C ダブシリル
3' ダブシリル G C C T C C G T G C A T A G T A A A A G T A G A C T G G G G
A G G C ダブシリル
(配列番号 1 4 6)

各反応を、3重で、25 μl 容量で実施した。最終反応混合物は、1X PCR 緩衝剤 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3 mM MgCl₂、25 nM dNTP、0.24 X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA)、1.25 ユニットのTaq DNAポリメラーゼおよびTaq DNAポリメラーゼ抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA) の両方を含んだ。個別の反応混合物は、300 nM の各添加剤を含んだ、および添加剤を含まなかった。反応成分のそれぞれの組み合わせが混合された後と、50 °C での等温インキュベーション前に、全ての反応は、それぞれ、約 100,000 コピーで添加された、重複するオリゴヌクレオチド 1 および 2 (実施例 9) を有した。

これらの反応の熱プロファイル条件は、以下の通りである：1分間、50 °C 、その後、氷上でのインキュベーション後、50 nM の制限プライマーおよび1 μM の過剰プライマーの最終濃度のために、全反応混合物にプライマーを添加。この後、3分間、95 °C に急速加熱した後、98 °C / 10 s および 72 °C / 40 s で 50 サイクルが続いた。試料のそれぞれは、リアルタイムで、SYBR Green 蛍光により分析され、操作の終わりに、反応が、增幅反応の二本鎖産物について予測される 88 °C の単一産物ピークを生成したことを見たために、それぞれ、融解曲線分析を受けた。

添加剤 S L 0 4 、S L 0 7 、S L 0 8 、および S L 0 9 の融解曲線分析を図 19 A ~ 19 D に示す。各図の丸 210 で特定される線は、抗体付加 Taq DNA ポリメラーゼを用いた試料からの反復である。丸 211 、212 、213 、および 214 により特定される線は、それぞれ、添加剤 S L 0 4 、S L 0 7 、S L 0 8 、および S L 0 9 を用いた反復である。

結果 (図 19 A を参照) は、2つのピーク、低融解ピーク (すなわち、不適切な産物、85 °C) 、および高ピーク (88 °C) で適切な産物が存在するため、抗体 (丸 210) が、ミスプライミングを低減しなかったことを裏付ける。添加剤 S L 0 4 、S L 0 5 、S L 0 7 、および S L 0 8 の結果は、各添加剤が、不適切な産物量を大幅に低減したが、完全にそれを抑制しなかったことを示す。図 19 D は、4つのダブシリルを有する添加剤 S L 0 9 が、不適切な産物の産生を完全に抑制することができたことを示す。

実施例 17 . オーバーハンプ有する添加剤を用いたタイプ II のミスプライミングおよびポリメラーゼ選択性

我々は、200 nM 、400 nM 、および 600 nM 濃度の添加剤 S L 0 6 、S L 0 7 、および S L 0 9 (実施例 16) を使用して、実施例 3 に記載される LATE - PCR アッセイを実施した。これらの添加剤は、それぞれ、2つ、3つ、または4つのダブシリル修飾因子を含む。

LATE - PCR 増幅は、1X Invitrogen PCR 緩衝剤 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 、3 mM MgCl₂ 、250 nM dNTP 、5

10

20

30

40

50

0 nMの制限プライマー、1000 nMの過剰プライマー、0.24 X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA)、約1000の一本鎖標的A（一致）またはT（ミスマッチ）を有する1.25ユニットのプラチナTaq DNAポリメラーゼ（Invitrogen, Carlsbad, CA）から成る25 μl容量で、3重で、LATE-PCR增幅を実施した。これらの反応の熱プロファイル条件は、3分間、95℃、その後、60サイクルにおいては、95℃ / 5s - 62℃ / 20s - 72℃ / 30sであった。

両方の標的の開始コピー数が同じであること、この場合、両方の標的のC_Tが同じであることを確実にするために、2つの標的を含む本アッセイおよび他のアッセイにおいて、両方の標的に完全に相補的である過剰プライマー、および同様に、両方の標的に完全に相補的である対照制限プライマーを使用して、対照增幅を行った。（対照增幅が、開始コピー数が同じでないことを認めた場合、2つの選択肢がある：再調合するか、または本明細書に報告される全ての実施例の場合のように、C_T差が僅かの場合、差に合わせて観察されたC_T値を修正する。）

選択性の結果（rC_Tは、ミスマッチの標的のC_Tから一致する標的のC_Tを引いたものに等しい）を表7に示す。

【表7】

添加剤	濃度、nM	選択性、△C _T
SL06 (ダブシル2つ)	200	1.3
	400	0.8
	600	3.2
SL07 (ダブシル3つ)	200	0.8
	400	2.4
	600	2.6
SL09 (ダブシル4つ)	200	2.8
	400	4.2
	600	6.8

10

20

30

40

50

実施例18. オーバーハングを有する添加剤によるプライマー依存5'エキソヌクレアーゼ活性の阻害

図18Cに示されるタイプの一本鎖オーバーハングを有する添加剤を使用して、DNA Taqポリメラーゼのプライマー依存5'エキソヌクレアーゼ活性の阻害の有効性を決定するために、我々は、実施例6に記載されるLATE-PCRアッセイを実施した。

周期変動反応は、1X PCR緩衝剤（Invitrogen, Carlsbad, CA）、3 mM MgCl₂、200 nM dNTP、1.25ユニットのTaq DNAポリメラーゼ（Invitrogen, Carlsbad, CA）、200 nMのプローブ（実施例6）、および100 nMの標的（実施例6）から成る25 μl容量で実施された。本反応混合物は、どの添加剤も用いずに、および200 nM、400 nM、および600 nMの濃度の各添加剤を用いて使用された。反応混合物中に唯一のオリゴヌクレオチドとしてのプローブを用いて、対照反応を行った。添加剤（実施例16を参照）は、2つのダブシルを有するSL06、3つのダブシルを有するSL07、および4つのダブシルを有するSL09を含んだ。反応混合物は、以下の熱プロファイルを使用して変動させた：45サイクルで、95℃ / 20s、60℃ / 10s、その後、25サイクルで、1℃ずつ上昇しながら、45℃ / 30秒で融解開始。サイクル中、熱プロファイルの60℃ / 1

0 s 区間中で、F A M 蛍光を取得した。

エキソスクレアーゼ切断活性は、プローブからプローブのフルオロフォアを単離し、これによって、蛍光(F A M)の増加をもたらす。添加剤S L 0 6の結果を図20に報告するが、ここで、丸220は、プローブのみの対照を特定し、丸221は、プローブおよび標的を用いるが、添加剤なしの試料を特定し、丸222は、プローブ、標的、および200 n M濃度の添加剤S L 0 6を用いた試料を特定し、丸223は、プローブ、標的、および400 n M濃度の添加剤S L 0 6を用いた試料を特定し、丸224は、プローブ、標的、600 n M濃度の添加剤S L 0 6を用いた試料を特定する。

実施例19.3'末端ミスマッチを作製するためのプロッカーの使用

10

上の実施例4は、制限プライマーの3'末端ヌクレオチドで单一塩基対ミスマッチを含むミスマッチの標的と反対に、制限プライマーに完全に相補的である標的配列のL A T E - P C R增幅における、タイプIIのミスプライミングおよびポリメラーゼ選択性に対する添加剤混合物の効果を例証する。本実施例は、ミスマッチのヌクレオチドまたは複数のヌクレオチドが、制限プライマー結合部位から下流である時、制限プライマーの3'末端がミスマッチの標的、つまり、選択される標的と考えられる標的とハイブリッド形成することを妨げるために、「プロッカー」と称されるオリゴヌクレオチドの使用を例証する。アッセイの種類における標的、プライマー、およびプロッカーを、概略的に、図21A、21Bに示す。

二本鎖第1標的の鎖に完全に相補的であり、同じく、二本鎖第2標的の鎖に完全に相補的である制限プライマーおよび過剰プライマーを使用して、L A T E - P C R增幅を実施した。第2標的が第1標的に対して選択的に増幅されることが望ましかった。第2標的は、第1標的と異なる2つの塩基対を含んだ。第1塩基対の相違は、制限プライマー結合部位の下流であり、3'末端ミスマッチを作製するために利用されたプロッカーオリゴヌクレオチドの結合部位に含まれた。第2塩基対の相違は、制限プライマー結合部位およびプロッカー結合部位の両方の下流、ならびに過剰プライマー結合部位の下流であり、プローピングのために使用された。図21Aに示されるように、プロッカー結合部位は、制限プライマーの3'端の制限プライマー結合部位と重複した。

標的間の第1塩基対の相違のため、第2標的(図21B)ではなく、制限プライマーがハイブリッド形成する(図21Aを参照)第1標的の鎖と優先的にハイブリッド形成するように、L A T E - P C Rアッセイに使用されたプロッカーは、対立遺伝子特異的であった。プロッカーの5'端および制限プライマーの3'端は、両方とも第1標的鎖上の同じ塩基に相補的であったが、該鎖に対するプロッカーの融解温度T m(B)は、反応温度が増幅中に低下すると最初に結合するように高く、プライマーの3'末端が第1標的とハイブリッド形成するのを防ぎ、完全に相補的なプライマーと3'末端ミスマッチを形成する。プロッカーの3'端は、それ自体、増幅中の伸長を妨げるために遮断された。この場合、プロッカーは、その5'端上のフルオロフォア(Cal Orange 560)およびその3'端上のダブルクエンチャーで二重標識された。

両方のL A T E - P C Rアッセイは、該第2標的T m(P2)から生成される過剰プライマー鎖とハイブリッド形成される時より高い融解温度T m(P1)で、該第1標的から生成される過剰プライマー鎖(このような鎖が生成される限り)とハイブリッド形成する対立遺伝子特異的プローブも含んだ。この場合、プローブは、Black Hole Quencher 2(BHQ2)を有するその5'端上、およびフルオロフォア(Quasar 670)を有するその3'端上に標識された分子指標プローブであった。

制限プライマー、対立遺伝子特異的プロッカー、および対立遺伝子特異的プローブの該第1および第2の標的の両方への結合を、概略的に、図21Aおよび21Bに図示する。制限プライマーの結合および伸長を効率的に遮断するために、プロッカーは、プライマーの3'端で少なくとも1つのヌクレオチド分重複しなければならない。プロッカーの5'端は、プロッカーが制限プライマーより高い温度で結合する限り、標的に完全に一致する必要はない。

20

30

40

50

反応構成要素および反応条件は、以下の通りである。

制限プライマー：5' G C A C T C T T G C C T A C G C C (配列番号 147)

過剰プライマー：5' C T G G T G G A G T A T T G A T A G T G (配列番号 148)

対立遺伝子特異的プロッカー：5' C a l O r g 5 6 0 - G C C T A C G C C A C C A G C T C C - ダブシリ

(配列番号 149)

分子指標プローブ：5' B H Q 2 - C A A G A A C A T G T C A C A C A T A A T G - Q u a s a r 6 7 0

(配列番号 150)

該第 1 標的の過剰プライマー鎖：

5' C T G G T G G A G T A T T G A T A G T G T A T T A A C C T T A T G T G T G A C A T

G T T C T A A T A T A G T C A C A T T T C A T T A T T T T A T T A T
A A G G C C T G C T G A A A A T G A C T G A A T A T A A A C T T G T G G T A G T
T G G A G C T G G T G G C G T A G G C A A G A G T G C (配列番号 151)

第 2 標的の過剰プライマー鎖（プロッカー結合部位での変化である、第 1 塩基対の変化は、下線付きである；プローブ結合部位での変化である、第 2 塩基対の変化は、太字である）：

5' C T G G T G G A G T A T T G A T A G T G T A T T A A C C T T A T G T G T C A C A T

G T T C T A A T A T A G T C A C A T T T C A T T A T T T T A T T A T
A A G G C C T G C T G A A A A T G A C T G A A T A T A A A C T T G T G G T A G T
T G G A G C T G A T G G C G T A G G C A A G A G T G C (配列番号 152)

— L A T E - P C R 増幅は、1 X P C R 緩衝剤 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、3 mM MgCl₂、200 nM dNTP、50 nM の制限プライマー、1000 nM の過剰プライマー、0.24 X SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA)、200 nM のプローブ、段階希釈により得られる 10⁰ ~ 10⁶ の範囲の開始コピー数をもたらす異なる濃度のプラスミドDNA (Epoch Biolabs, Inc, Sugar Land, TX) を有する 2 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼ (Invitrogen, Carlsbad, CA) から成る 25 μl 容量で実施された。増幅反応は、500 nM のプロッcker の存在下、または不在下で、添加剤なし、または鎖濃度（上部 / 中央 / 底部）が 33.3 nM、200 nM および 166.7 nM である添加剤 E P 0 4 3 (実施例 4) のいずれかを用いて、各条件について 2 回実施された。

これらの反応の熱プロファイル条件は、以下の通りである：3 分間、95°、その後、95° / 10 s、70° / 30 s、62° / 10 s、72° / 20 s の 70 サイクル、その後、90°まで 30 s 間隔で 1°ずつ上昇しながら、30°で融解開始。SYBR Green シグナルは、全 PCR サイクルのプライマー伸長部分中、リアルタイムで検出され、C_T 値が決定された。アッセイは、2重で行われたため、標的の各濃度での 2 つの C_T 値を平均化した。図 22 A は、E P 0 4 3 添加剤を用いた、または用いない両方の、プロッcker なしで実施されたアッセイの標的濃度の関数としての C_T 値を表す。図 22 B は、添加剤を用いた、または用いない両方の、プロッcker を用いて実施されたアッセイの標的濃度の関数としての C_T 値を表す。

図 22 A を参照すると、塗りつぶされた矩形は、開始標的（コピー数）の種々の濃度の第 1 標的（プロッcker の操作を通して識別される）を用いた、プロッcker なし、および添加剤なしの試料の C_T 値であり、C_T 値は、線 250 で結ばれ、塗りつぶされた三角形は、第 2 標的（プロッcker と一致しないため、優先的に増幅される）を用いた、プロッcker なし、および添加剤なしの試料の C_T 値であり、C_T 値は、線 251 で結ばれる。同様に、図 22 A において、塗りつぶされていない矩形は、第 1 標的および添加剤を用いるが、

10

20

30

40

50

プロッカーなしの試料の C_T 値であり、 C_T 値は、線 252 で結ばれ、塗りつぶされていない三角形は、第 1 標的および添加剤を用いるが、プロッカーなしの試料の C_T 値であり、 C_T 値は、線 253 で結ばれる。

図 22B を参照すると、塗りつぶされた矩形は、第 1 標的およびプロッカーを用いるが、添加剤なしの試料の C_T 値であり、 C_T 値は、線 254 で結ばれ（低コピー数に外挿される）、塗りつぶされていない矩形は、第 2 標的およびプロッカーを用いるが、添加剤なしの試料の C_T 値であり、 C_T 値は、線 255 で結ばれる（低コピー数に外挿される）。また図 22Bにおいて、塗りつぶされた丸は、第 1 標的、プロッカーおよび添加剤を用いた試料の C_T 値であり、 C_T 値は、線 256 で結ばれ（外挿される）、塗りつぶされていない丸は、第 2 標的、プロッcker および添加剤を用いた試料の C_T 値であり、 C_T 値は、線 257 で結ばれる（外挿される）。

添加剤、この場合、添加剤 E P 043 の不在下で作製された 3' 末端ミスマッチに対する選択性は、第 1 濃度での該第 1 標的の増幅からのシグナルの閾値サイクル (C_T) と、該第 1 濃度での該第 2 標的の増幅からの信号の C_T との間の差であり、(C_{T_B}) と表記される。添加剤 E P 043 による選択性は、二倍の C_T 差であり、(C_T) と明示され、 $C_{T_A} - C_{T_B}$ として計算され、 C_{T_A} は、添加剤およびプロッcker の両方の存在下の第 2 の濃度での該第 1 標的と該第 2 標的の C_T 値間の差として測定され、該第 2 標的の C_T 値は、該第 1 濃度のプロッcker のみを含む反応、および該第 2 濃度でのプロッcker および添加剤の両方を含む反応において、同じである。

図 22A は、我々が予測したように、制限プライマーといずれかの標的との間の 3' 末端ミスマッチの欠損により、プロッcker なしで、いずれの標的についての選択性は存在しないことを示す。線 250 および 251 の両方が、約 3.5 のスロープを有するため、データは、添加剤 E P 043 なしで、アッセイは効率的であることを示す。しかしながら、添加剤 E P 043 を用いた、線 252 および 253 のスロープは、両方とも約 3.9 であり、したがって、E P 043 が、両方の標的において PCR 増幅を低減したことを例証する。

選択性に対する添加剤の効果について、図 22B を参照する。対立遺伝子特異的プロッcker を用いるが、添加剤なしで、制限プライマーのミスマッチの 3' 端は、該第 1 標的に対して作製され、これは、該第 1 標的の C_T と、該第 2 標的の C_T との間の C_T として示す第 1 の選択性をもたらす。線 254、255 で示されるように、本 C_T は、標的の濃度の関数である。プロッcker および添加剤 E P 043 の両方を用いると、添加剤による別の選択性が存在する。E P 043 による PCR 増幅反応の阻害のため、E P 043 の存在下での第 1 標的と第 2 標的との間の C_T 差は、実際には 2 つの要因を含む：1) E P 043 による選択性と相まつた、対立遺伝子特異性プロッcker による選択性、および 2) PCR の E P 043 阻害による効率の漸進的低下。

これらの 2 つの要因の寄与を区別し、定量化するために、我々は、図 22B の情報を用いて、以下を行った。特定の標的濃度（コピー数）で、第 2 標的、プロッcker、および添加剤を用いた試料の C_T は、線 257 上に点 A の値を有し、第 1 標的、プロッcker、および添加剤を用いた試料の C_T は、線 256 上に点 D の値を有する。これらの C_T 値は、それぞれ、35 および 62 であり、試料に 27 の C_{T_A} が生じる。しかしながら、点 A の C_T 値は、線 255 上の点 B の C_T 値である（同じ標的、つまり、添加剤 E P 043 なしの第 2 標的）。点 B での第 2 標的の濃度は、その増幅の阻害のため、E P 043 の存在下において有効な標的濃度である。点 B の濃度で、 C_{T_B} は、17 の区域 BC である。添加剤 E P 043 なしで、該第 1 標的と該第 2 標的との間の本選択性は、対立遺伝子特異的プロッcker による。 C_{T_A} から添加剤 E P 043 の阻害作用を除去するために、該標的の第 1 濃度での C_{T_B} 、17 は、該標的の第 2 濃度での C_{T_A} 、27 から差し引かれる。これは、10 の C_T を生じる。10 の C_T は、点 A の標的濃度での誘発されたタイプ II のミスプライミングの存在下における、添加剤 E P 043 の選択性作用である。図 22B から分かるように、線 254、255、256、257 が相互に平行ではないため、添加剤 E P 043 の選択性作用の規模は、標的濃度に依存する。標的濃度が低く

10

20

30

40

50

なるほど、添加剤の選択性作用は大きくなる。より多くの熱サイクルが産物を検出するために必要とされるため、これは、この例である。

実施例 20 . 増幅前の氷上でタイプミスプライミングの抑制

ここで報告されるアッセイは、以下を除いて、実施例 9 に記載される通りに実施された：(a) 50 でのインキュベーションステップは、1 分間であった、(b) 増幅サイクルの数は、50 に削減された、(c) 実施例 10 に記載される E P O 1 0 が、添加剤として使用された、(d) 添加剤の濃度は、300 nM であった。

これらの増幅反応で生成された二本鎖産物の S Y B R G r e e n 蛍光を図 23 A に示すが、丸 260 は、Taq DNA ポリメラーゼのみを用いた試料からの反復を特定し、丸 261 は、Taq DNA ポリメラーゼおよび等温伸長ステップ直後に添加された抗体を用いた試料からの反復を特定し、丸 262 は、等温伸長ステップ中に存在する、抗体付加 Taq DNA ポリメラーゼを用いた試料からの反復を特定する。
10

図 23 A は、重複するオリゴヌクレオチドの伸長に対する抗体の作用を示す。いずれの抗体も用いない反復試料（丸 260）は、22 の C_T 値を有し、したがって、重複するテンプレートの伸長は、効率的であった。逆に、重複するテンプレートの伸長は、添加剤が 50 のインキュベーションステップ前に添加される時、広範囲に渡って阻害される（丸 262）。抗体の添加が、50 のインキュベーションの終わりまで遅延される時（丸 261）、C_T は、添加剤なしの例より高い（丸 260）。これは、可能な重複するテンプレートの大半であるが、全てではない 50 での 1 分のインキュベーション中に伸長されたとことを意味する。さながら重複するテンプレートは、氷上で後続のインキュベーション中に伸長される。
20

図 23 B は、重複するオリゴヌクレオチドの伸長に対する添加剤 E P O 1 0 の作用を示す。E P O 1 0 を用いた反復（丸 263）は、50 でのインキュベーション前、または 50 でのインキュベーション後のいずれかで、添加剤 E P O 1 0 を与えられた。E P O 1 0 がインキュベーションステップの前または後に添加される時、結果（丸 263 として組み合わされる）は、増幅において相違を示さない。これは、E P O 1 0 が、50 ステップのインキュベーション中、重合を阻害しないことを例証する。しかしながら、C_T 値は、50 ステップの終わりで抗体を与えられた C_T 反復より僅かに高い（丸 261）。これは、氷上で重複するオリゴヌクレオチドの伸長の阻害において、添加剤 E P O 1 0 の添加が、抗体より僅かに有効であることを例証する。
30

図 23 C は、Taq DNA ポリメラーゼのみを用いた反復（丸 264）、ならびに Taq DNA ポリメラーゼおよび伸長ステップ直後に添加された抗体を用いた反復（丸 265）で生成された二本鎖産物の S Y B R G r e e n 融解曲線を示す。図 23 D は、伸長ステップ中に、抗体付加 Taq DNA ポリメラーゼを用いた反復で生成された二本鎖産物の S Y B R G r e e n 融解曲線を示す（丸 266）。図 23 E は、50 でのインキュベーション前（丸 267）、または 50 でのインキュベーション後（丸 268、1 つは失ったため、2 つの反復のみ）のいずれかで添加剤を与えられた反復で生成された二本鎖産物の S Y B R G r e e n 融解曲線（丸 267）を示す。

図 23 C は、完全な添加剤の排除（丸 264）または 50 でのテンプレートのインキュベーション中の抗体の除外（丸 265）が、88 で融解する、比較的純粋な産物の伸長および後続の増幅をもたらすことを例証する。図 23 D は、逆に、50 でのインキュベーション中に抗体を含むと（丸 266）、88 および 85 でピークを有する産物の混合物をもたらすことを例証する。図 23 E は、50 ステップの前または後のいずれかで E P O 1 0 添加剤を添加すると、88 で、鋭い融解ピークを有する純粋な二本鎖産物の増幅を生じることを例証する。図 23 E の融解曲線も、67 ~ 71 で、小さい広範なピークの存在を示す。このピークは、E P O 1 0 の二本鎖形態の融解による。二本鎖形態は、伸長がこれらの反応の増幅段階中、および実施例 9 で実施される温度である 72 で、もはや存在しないことを示す。逆に、実施例 9 で使用された添加剤は、E P O 1 0 より高い融解ピーク（図示せず）を有することが認められた。
40
50

【0224】

上述の特定の実施形態は、包括的ではなく、特許請求の範囲を制限するものと解釈されるべきではない。これらの実施形態の種々の修正は、本明細書に記載される概念から逸脱することなく行うことができる。このような修正は、本特許請求の範囲内に含まれるものとする。

— 本発明は、以下の態様を含み得る。

[1] 少なくとも1つのDNA標的配列を増幅するためのDNAポリメラーゼによるプライマー伸長を含む、プライマー依存DNA増幅反応用の反応混合物において、前記反応混合物は、少なくとも1つのプライマー対、DNAポリメラーゼ、およびdNTPを含み、改善点は、6～50のヌクレオチド長の長さのハイブリッドを有し、32で少なくとも50%が二本鎖であり、その鎖のそれぞれに末端領域を有し、かつそれぞれ異なる末端領域に共有結合的に結合される、1～4つの修飾基を含み、前記修飾基は、非平面の巨大部分を有さない多環式部分である、少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤を、増幅の開始前の前記反応混合物に含めることを含み、前記少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤は、ミスプライミングの抑制、完全に相補的でない陥凹3'末端配列を有するハイブリッドに対するポリメラーゼ選択性の増加、AT豊富の陥凹3'末端配列を有するハイブリッドに対するポリメラーゼ選択性の増加、反復反応間のばらつきの減少、ポリメラーゼ5'エキソヌクレアーゼ活性の阻害、およびポリメラーゼ活性の阻害の機能のうちの少なくとも1つについて効果的である、前記DNAポリメラーゼの濃度に対する濃度で含まれるが、ただし、前記添加剤が、任意の標的配列のプライマーまたは検出プローブである場合、少なくとも3つの修飾基を含むものとする、反応混合物。
10

[2] 前記少なくとも1つの修飾基は、2～4つの修飾基である、上記[1]に記載の増幅反応混合物。

[3] 前記2～4つの修飾基は、3つの修飾基である、上記[2]に記載の増幅反応混合物。

[4] 前記添加剤は、前記少なくとも1つの標的配列のためのプライマーまたはプローブである第1の鎖と、前記第1の鎖に部分的に相補的である逆相補体鎖と、を含む、上記[3]に記載の増幅反応混合物。
20

[5] 前記2～4つの修飾基は、4つの修飾基である、上記[2]に記載の増幅反応混合物。
30

[6] 前記修飾基は、前記少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤の末端又クレオチドに共有結合的に連結される、上記[1]～[5]のいずれかに記載の増幅反応混合物。

[7] 前記修飾基は、ダブシル(Dabcy1)である、上記[1]～[6]のいずれかに記載の増幅反応混合物。

[8] 前記少なくとも1つの添加剤は、2つの添加剤の混合物である、上記[2]に記載の増幅反応混合物。

[9] 前記混合物は、3本の鎖から成る、上記[8]に記載の増幅反応混合物。

[10] 前記少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤は、天然のヌクレオチドから成る、上記[1]～[9]のいずれかに記載の増幅反応混合物。
40

[11] 前記少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤は、DNAである、上記[1]～[9]のいずれかに記載の増幅反応混合物。

[12] 前記少なくとも1つの添加剤は、前記少なくとも1つの標的配列のためのプライマーまたはプローブではない、上記[1]～[3]および[5]～[11]のいずれかに記載の増幅反応混合物。

[13] 前記少なくとも1つの二本鎖オリゴヌクレオチド添加剤の前記濃度は、100nM以下である、上記[1]～[12]のいずれかに記載の増幅反応混合物。

[14] 逆転写酵素をさらに含む、上記[1]～[13]のいずれかに記載の増幅反応混合物。
50

[15] 前記少なくとも 1 つの二本鎖添加剤は、1 ~ 4 つの一本鎖オーバーハングを含む、上記 [1] に記載の増幅反応混合物。

[16] 前記少なくとも 1 つの二本鎖添加剤は、ハイブリッド形成されない時、ステムループ構造を形成する少なくとも 1 本の鎖を含む、上記 [15] に記載の増幅反応混合物。

[17] 少なくとも 1 つの DNA 標的配列を増幅するための方法であって、前記少なくとも 1 つの DNA 標的配列を上記 [1] に記載の増幅反応混合物と接触させることと、プライマーアニーリング温度およびプライマー伸長温度を有するプライマー依存 DNA 増幅反応に、前記反応混合物を供することと、を含む、方法。

[18] 前記少なくとも 1 つの DNA 標的配列を前記反応混合物と接触させることは、一本鎖形態の前記少なくとも 1 つの DNA 標的配列を前記反応混合物に添加することから成る、上記 [17] に記載の方法。 10

[19] 前記少なくとも 1 つの DNA 標的配列を得るために、逆転写 RNA を含む、上記 [17] に記載の方法。

[20] 前記少なくとも 1 つの修飾因子は、2 ~ 4 つの修飾因子である、上記 [17] に記載の方法。

[21] 前記二本鎖オリゴヌクレオチドは、前記プライマーアニーリング温度から、前記プライマーアニーリング温度より多くても 5 低い温度までの範囲にある融解温度 (T_m) を有する、上記 [20] に記載の方法。

[22] 前記二本鎖オリゴヌクレオチドは、前記アニーリング温度より高い融解温度 (T_m) を有する、上記 [20] に記載の方法。 20

[23] 前記添加剤は、3 つの修飾基を有し、前記少なくとも 1 つの標的配列のためのプライマーまたはプローブである第 1 の鎖と、前記第 1 の鎖に部分的に相補的である逆相補体鎖とを含む、上記 [17] に記載の方法。

[24] 前記少なくとも 1 つの添加剤は、2 つの添加剤の混合物である、上記 [20] に記載の方法。

[25] 前記混合物は、前記プライマーアニーリング温度から、前記プライマーアニーリング温度より多くても 5 低い温度までの範囲にある T_m を有する、二本鎖オリゴヌクレオチドを有する第 1 の添加剤と、前記プライマーアニーリング温度より高い T_m を有する、二本鎖オリゴヌクレオチドを有する第 2 の添加剤と、を含む、上記 [22] に記載の方法。 30

[26] 各添加剤は、3 ~ 4 つの修飾基を含む、上記 [25] に記載の方法。

[27] 前記プライマー依存増幅反応は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 增幅反応である、上記 [17] ~ [26] のいずれかに記載の方法。

[28] 前記プライマー依存増幅は、LATE - PCR 增幅反応である、上記 [17] ~ [26] のいずれかに記載の方法。

[29] 前記少なくとも 1 つの DNA 標的配列は、RNA 標的配列から逆転写される、上記 [17] ~ [28] のいずれかに記載の方法。

[30] 上記 [17] ~ [29] のいずれかに記載の増幅と、増幅中にリアルタイムで、もしくは増幅後のエンドポイントのいずれかでの、前記反応の一本鎖産物、前記反応の二本鎖産物、または両方の蛍光検出とを含む増幅アッセイであって、前記反応の二本鎖産物は、蛍光 DNA 色素によって検出されるか、前記反応の一本鎖産物は、少なくとも 1 つの蛍光的に標識されたハイブリッド形成プローブによって検出されるか、または両方である、増幅アッセイ。 40

[31] 少なくとも 1 つの DNA 標的配列を増幅する試薬のキットであって、上記 [1] ~ [16] のいずれかに記載の反応混合物のための前記試薬を含む、キット。

[32] 逆転写酵素をさらに含む、上記 [31] に記載のキット。

[33] DNA 色素をさらに含む、上記 [31] または上記 [32] に記載のキット。

[34] 前記少なくとも 1 つの標的配列のための蛍光的に標識された検出プローブをさらに含む、上記 [31] ~ [33] のいずれかに記載のキット。

[35] 鎮のそれぞれに末端領域を有し、6～50のヌクレオチド長の長さのハイブリッドを有し、32で少なくとも50%が二本鎖であり、かつそれ異なる末端領域に共有結合的に結合される、2～4つの修飾基を含む、修飾された二本鎖オリゴヌクレオチドであって、前記修飾基は、非平面の巨大部分を有さない多環式部分であり、前記修飾されたオリゴヌクレオチドは、DNAポリメラーゼの5'エキソヌクレアーゼドメインを阻害することができる、修飾された二本鎖オリゴヌクレオチド。

[36] 前記二本鎖オリゴヌクレオチドは、DNAである、上記[35]に記載の修飾されたオリゴヌクレオチド。

[37] 前記修飾基は、末端ヌクレオチドに結合される、上記[35]または上記[36]に記載の修飾されたオリゴヌクレオチド。

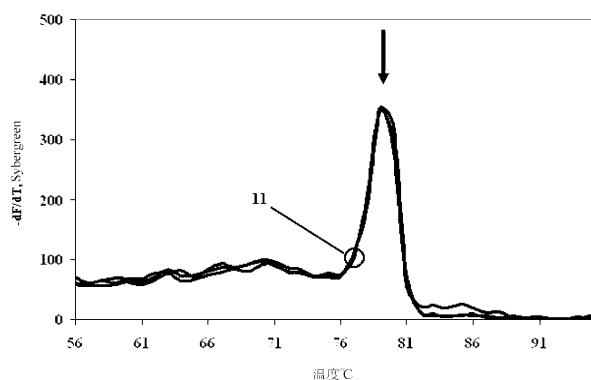
10

[38] 上記[35]～[37]のいずれかに記載の2つの修飾された二本鎖オリゴヌクレオチドの混合物。

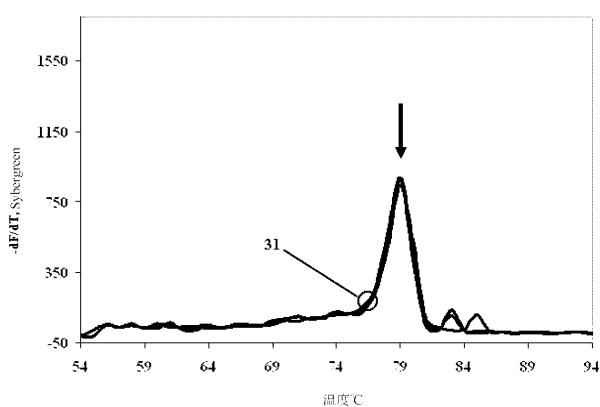
[39] 前記2つの二本鎖オリゴヌクレオチドは、3本の鎖を含む、上記[38]に記載の混合物。

[40] 前記DNAポリメラーゼは、熱安定性である、上記[1]に記載の増幅反応混合物。

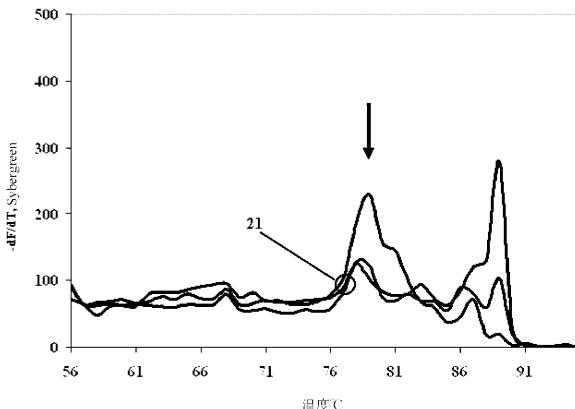
【図1】



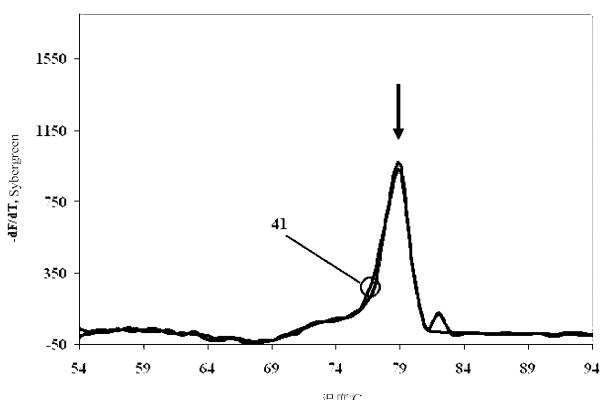
【図3】



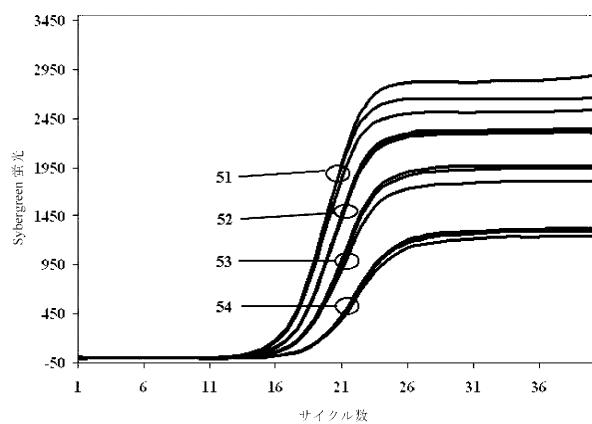
【図2】



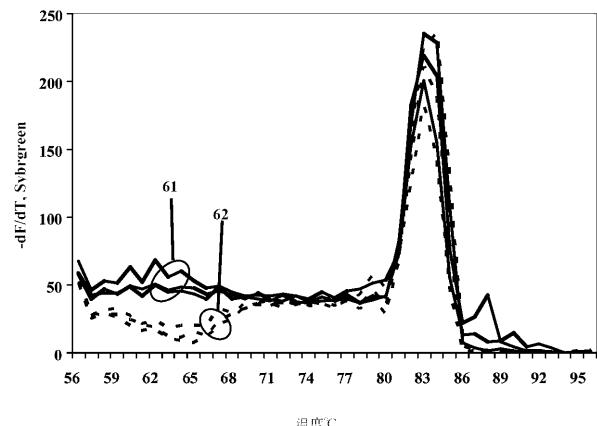
【図4】



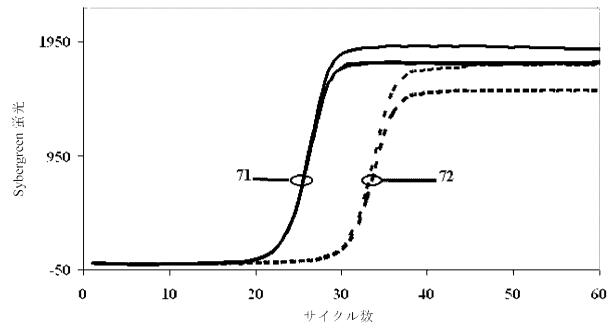
【図5】



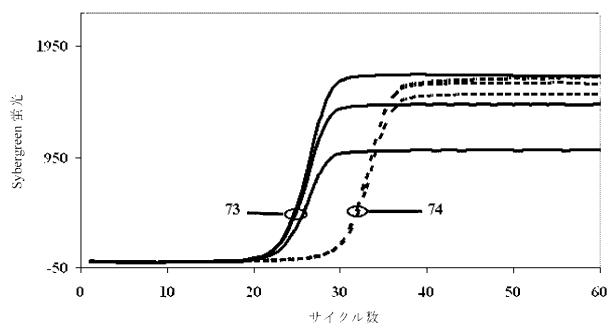
【図6】



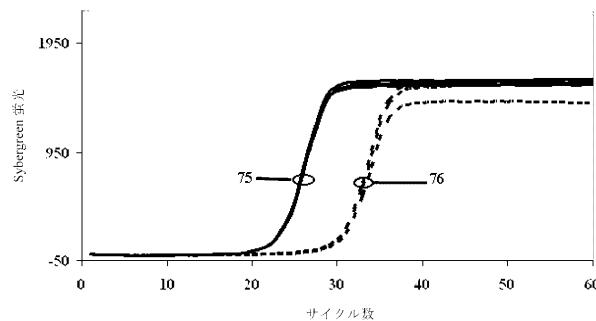
【図7 A】



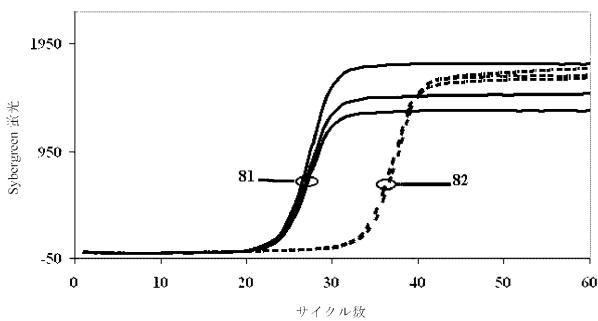
【図7 B】



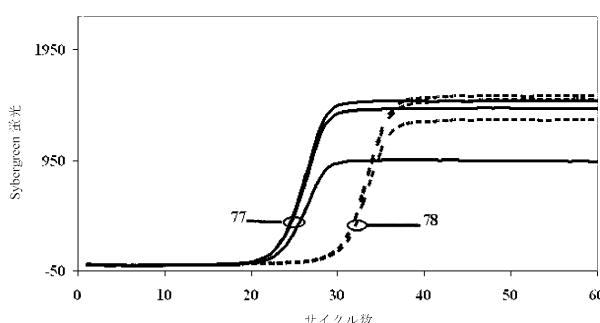
【図7 C】



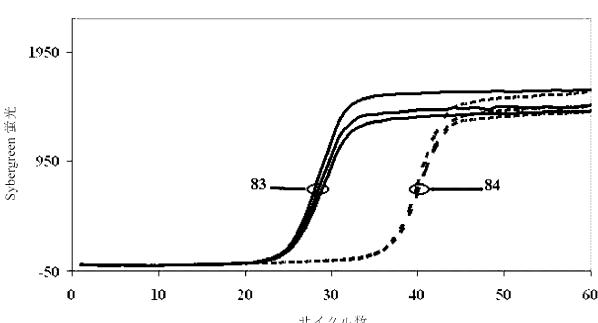
【図8 A】



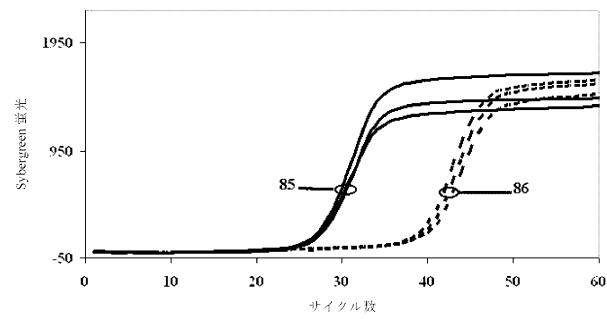
【図7 D】



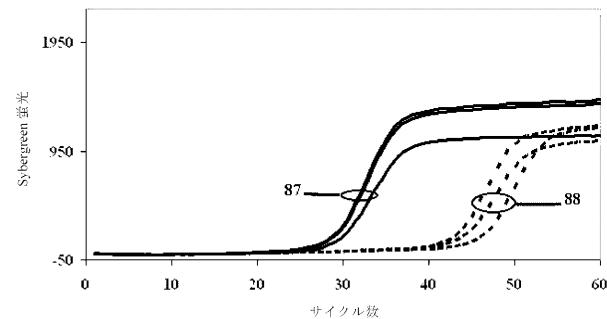
【図8 B】



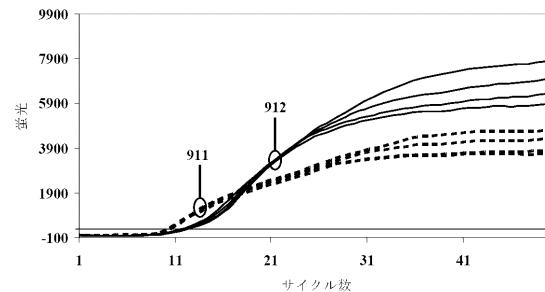
【図 8 C】



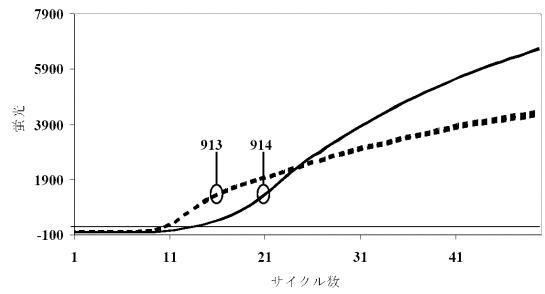
【図 8 D】



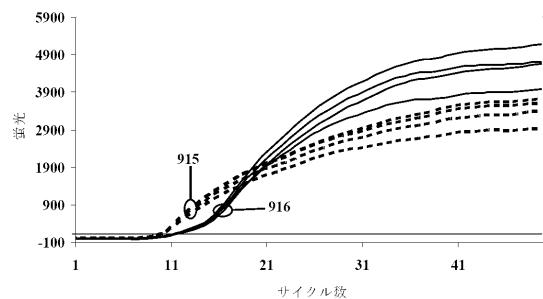
【図 9 A】



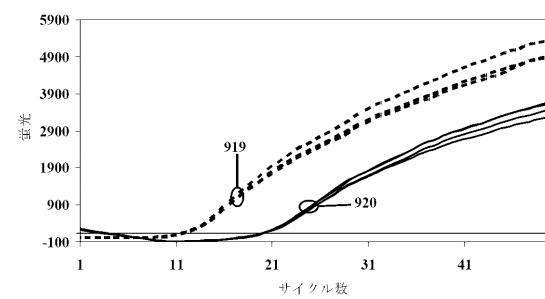
【図 9 B】



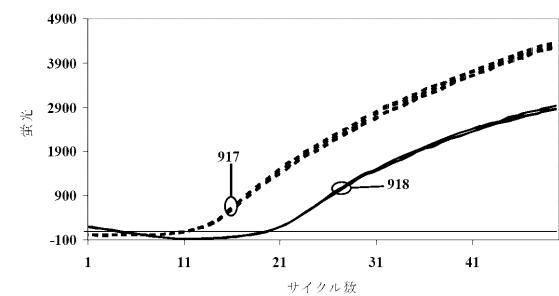
【図 9 C】



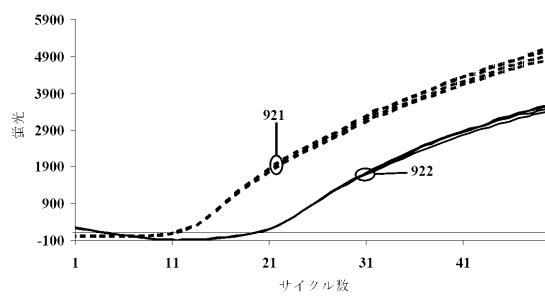
【図 9 E】



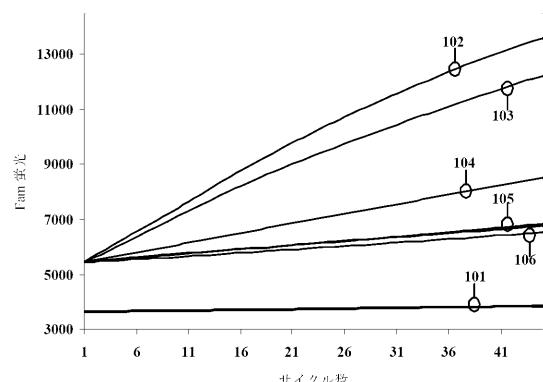
【図 9 D】



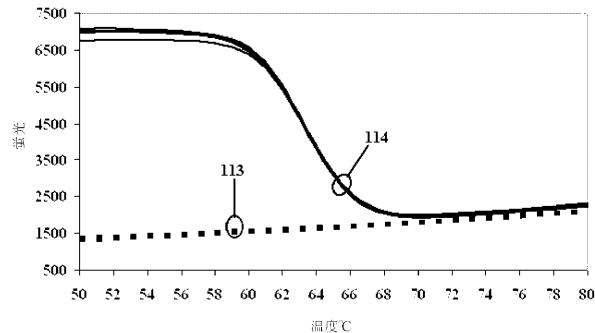
【図 9 F】



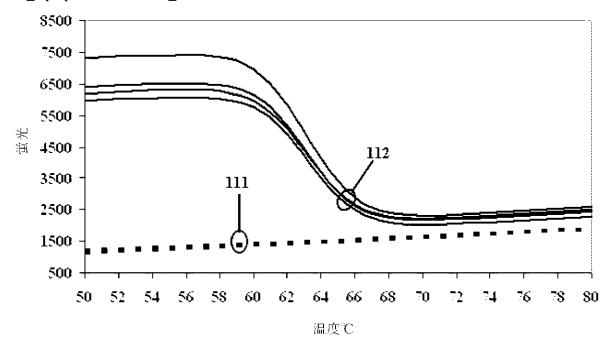
【図10】



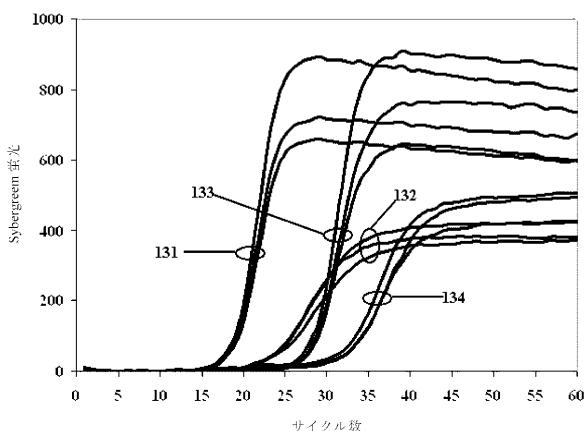
【図11B】



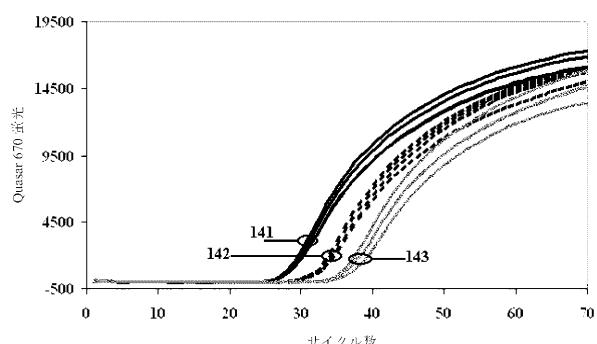
【図11A】



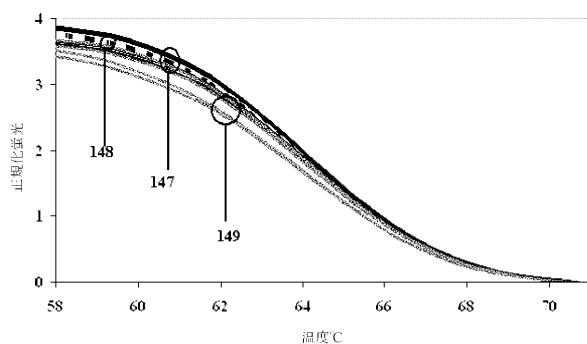
【図13】



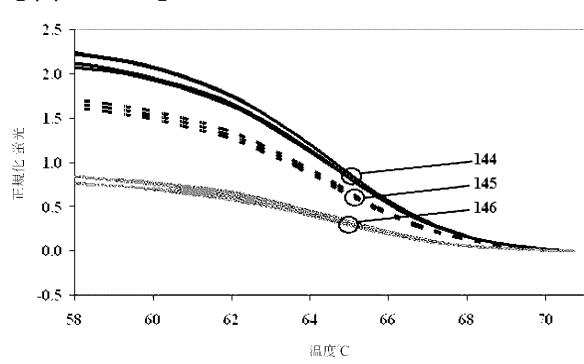
【図14A】



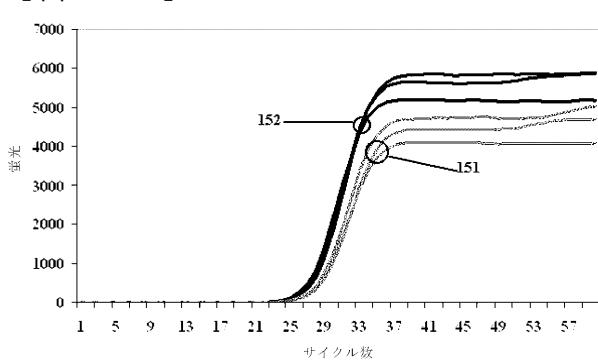
【図14C】



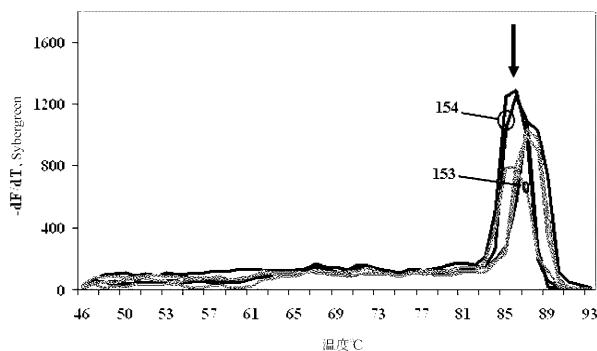
【図14B】



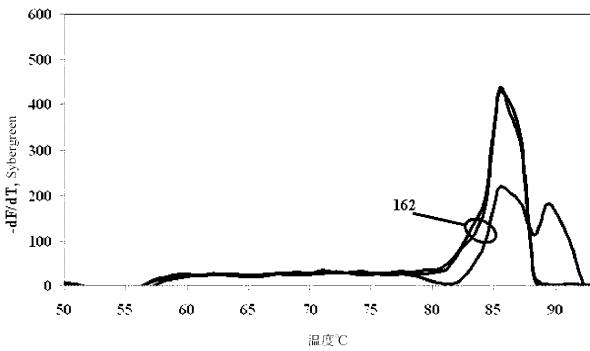
【図15A】



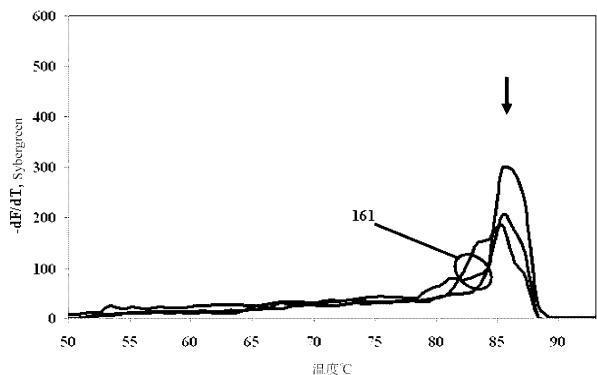
【図 15 B】



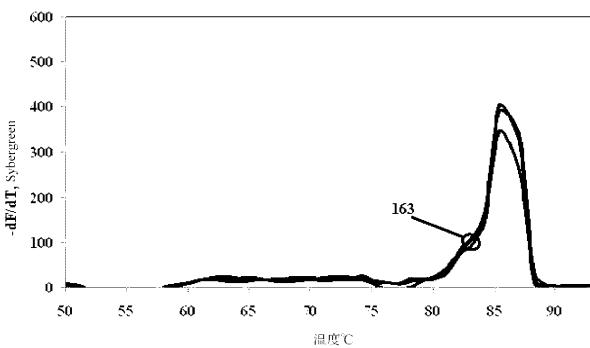
【図 16 B】



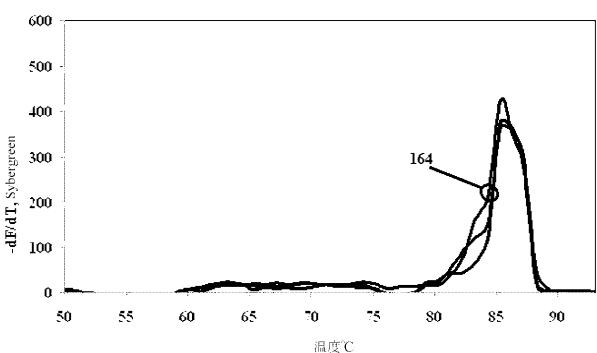
【図 16 A】



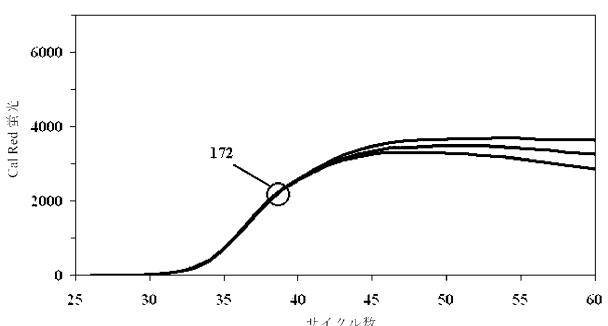
【図 16 C】



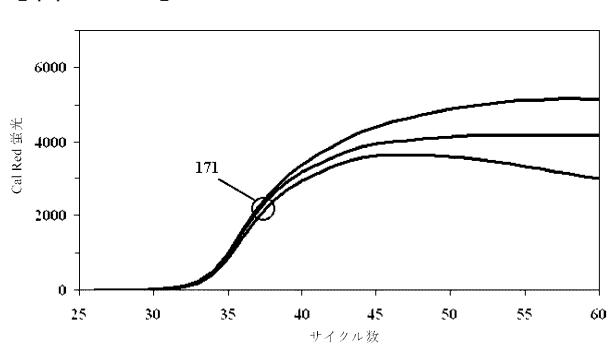
【図 16 D】



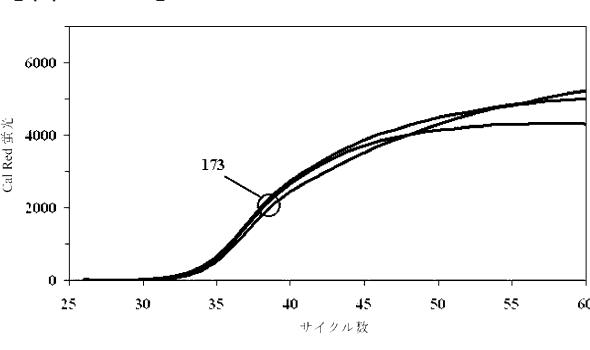
【図 17 B】



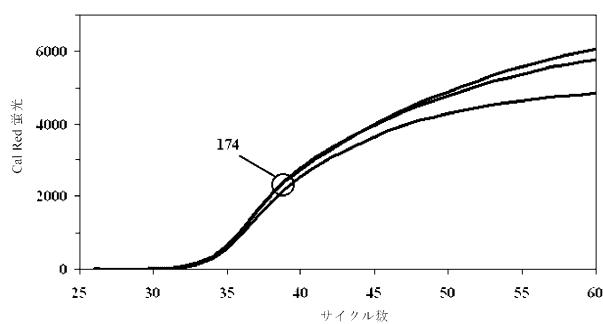
【図 17 A】



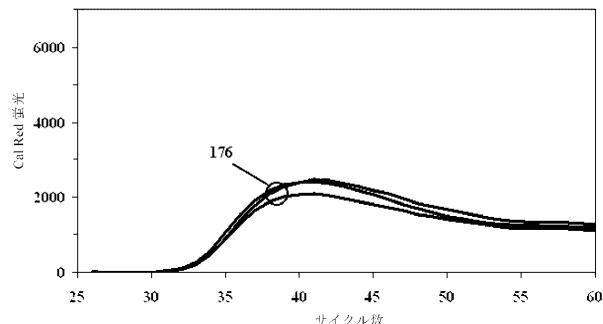
【図 17 C】



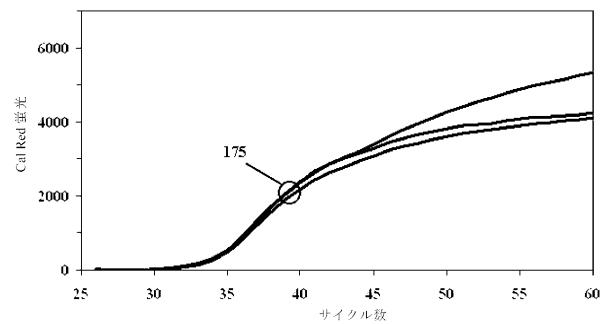
【図 17 D】



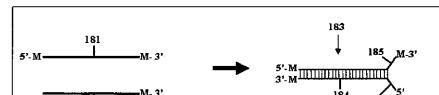
【図 17 F】



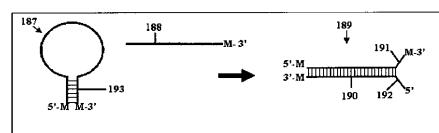
【図 17 E】



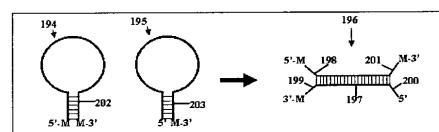
【図 18 A】



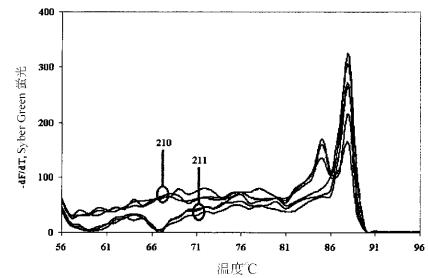
【図 18 B】



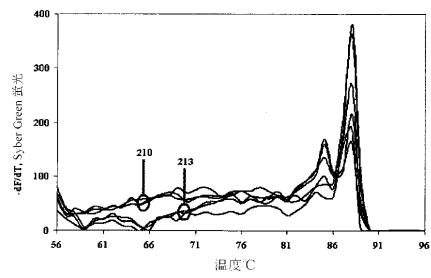
【図 18 C】



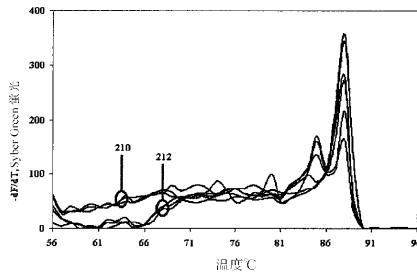
【図 19 A】



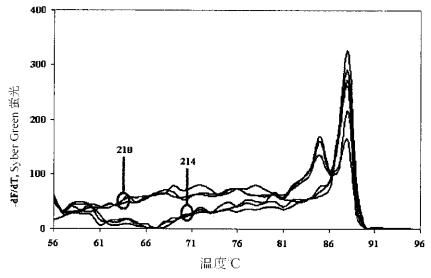
【図 19 C】



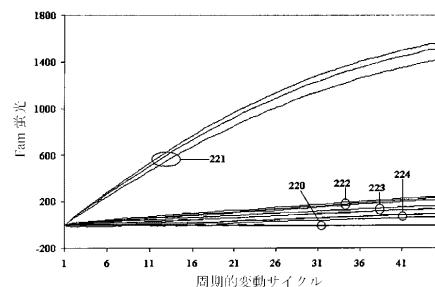
【図 19 B】



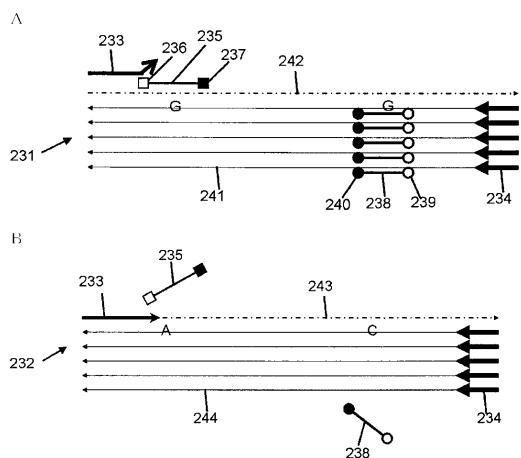
【図 19 D】



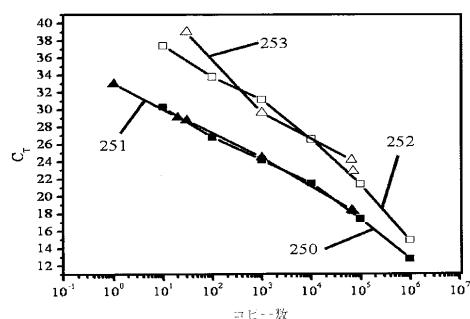
【図20】



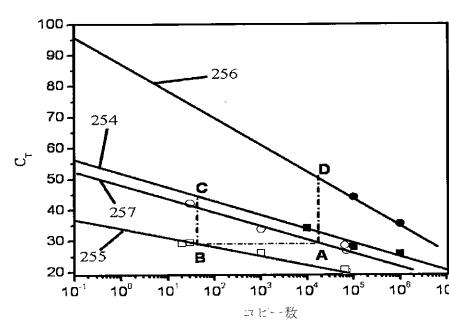
【図21】



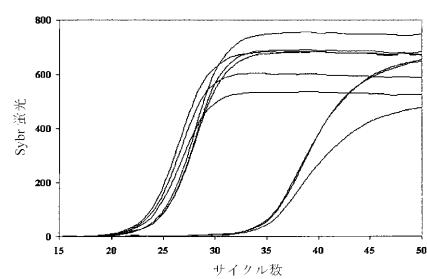
【図22A】



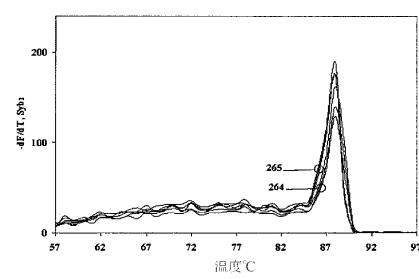
【図22B】



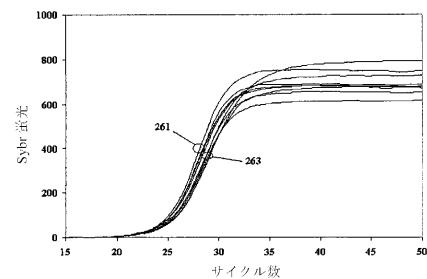
【図23A】



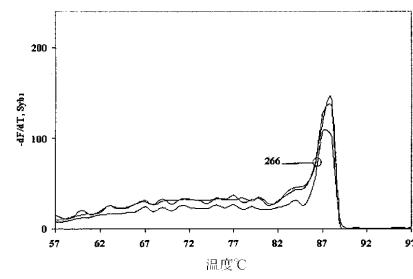
【図23C】



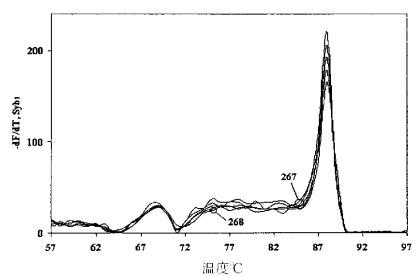
【図23B】



【図23D】

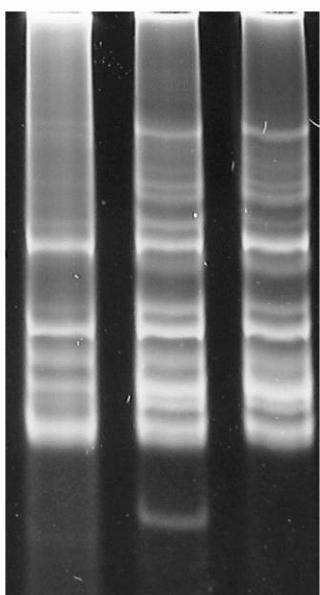


【図23E】



【図12】

列番号 1 2 3



【配列表】

0005757885000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ライス , ジョン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02169 , クインシー , コモン ストリート 268

(72)発明者 ライス , ニコラス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02169 , クインシー , コモン ストリート 268

(72)発明者 ジア , ヤンウェイ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02543 , ウォルサム , アパートメント 4 , プロスペクト ストリート 17

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 國際公開第2008/044129 (WO , A1)

特表2008-516612 (JP , A)

特表2008-516613 (JP , A)

Arch. Virol. , 2007年 , Vol.152 , pp.431-440

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12Q 1/00 - 3/00

C12N 15/00 - 15/90

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)

Caplus / MEDLINE / BIOSIS (STN)