

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-239790

(P2011-239790A)

(43) 公開日 平成23年12月1日(2011.12.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68</b> (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
<b>G O 1 N 37/00</b> (2006.01)	G O 1 N 37/00 1 O 2	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 93 頁)

(21) 出願番号	特願2011-192129 (P2011-192129)	(71) 出願人	500358711
(22) 出願日	平成23年9月2日 (2011.9.2)		イルミナ インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2006-517406 (P2006-517406) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1-1 9 7 5 サンディエゴ タウン センター ドライブ 9 8 8 5
原出願日	平成16年6月17日 (2004.6.17)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	10/600,634		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成15年6月20日 (2003.6.20)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	10/681,800	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成15年10月8日 (2003.10.8)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ケビン ガンダーソン
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 2 4, エンシニタス, ジュニパー ヒ ル ドライブ 1 5 4 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 全ゲノム増幅および遺伝型決定のための方法および組成物

## (57) 【要約】

【課題】全ゲノム増幅および遺伝型決定のための方法および組成物を提供すること。

【解決手段】ゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する方法であって、(a)該型決定可能な遺伝子座を含むゲノム断片の増幅された表示的集団を提供し、ここで、該集団は高複雑性表示を含み；(b)該ゲノム断片を、プローブ-断片ハイブリッドが形成される条件下で、該型決定可能な遺伝子座に対応する配列を有する複数の異なる核酸プローブと接触させ；次いで、(c)該プローブ-断片ハイブリッドの型決定可能な遺伝子座を直接的に検出することを含む、方法。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

明細書に記載の発明。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(発明の分野)

本発明は、一般に、遺伝子解析、さらに詳しくは、全ゲノムの増幅およびゲノムにまたがる複数の遺伝子マーカーに基づく遺伝子型分類に関する。

## 【背景技術】

10

## 【0002】

(発明の背景)

いずれかの一人の個人のDNAの大部分、約99.9パーセントは、いずれかの他の個人のDNAと正確に同一である。ゲノム配列における概略0.1%の差は、目の色および血液型等の人々の間での非常に多様な差を説明する。また、遺伝的変異は、個人が特定の病気になりつつあるリスクがあるか否か、または個人が特定の薬物に対して好都合なまたは有害な応答を有するようか否かにおいて役割を演じる。個人における単一遺伝子の差は嚢胞性線維症および鎌状細胞病等の種々の病気に罹患する上昇したリスクと関連付けられてきた。多数の遺伝子および環境内のより複雑な相互関係は、糖尿病、癌、発作、アルツハイマー病、パーキンソン病、鬱病、アルコール症、心臓病、関節炎および喘息等の一部の一般的な病気に対するリスク等の多くの特性の原因となる。

20

## 【0003】

遺伝子ベースの診断テストは、嚢胞性線維症等の、単一遺伝子によって引き起こされる一部の浸透性の高い病気のために利用できる。そのようなテストは、各遺伝子における特定の突然変異または多型に関してプローブすることによって行うことができる。従って、特定の病気に罹るリスクは徴候が現われる充分前に判断することができ、所望であれば、予防的手段を取ることができる。しかしながら、糖尿病、心臓病、癌、および精神的障害等の多くの一般的な病気を含めた病気の大部分は複数遺伝子ならびに環境条件によって影響されると信じられている。かくして、遺伝学に基づくそのような病気の診断は、質問すべき遺伝子の数が増大するにつれ極めて複雑である。

30

## 【0004】

最近、種々の遺伝子型分類上の努力を介して、非常に多数の多型DNAマーカーが同定されており、その多くは、既知の病気を獲得するリスク等の特定の特性を発生する確率と関連すると信じられている。利用可能な例示的多型DNAマーカーは、ヒトゲノムDNAにおいてキロベース当たり1を超える平均頻度で起こる単一ヌクレオチド多型(SNP)を含む。これらのSNPの多くは、治療的に関連する遺伝子的変異型であり/または病気に対する遺伝子的素因に関与するようである。しかしながら、SNPおよび他のマーカーのゲノム幅質問についての現在の方法は不十分であり、それにより、優良な診断マーカーの組の同定を非現実的としている。

## 【0005】

40

DNA試料全般に亘って多数のSNPマーカーを同時に遺伝子型分類する能力は、遺伝子連鎖および関連研究で益々重要になりつつある。全ゲノム関連研究に対する主な制限は、高度に多重化したSNP遺伝子タイプ分けを行うための技術の欠如である。主な民族全般に亘ってのヒトゲノムの完全なハプロタイプマップの創製は、(約200,000~300,000 SNPと見積もられる)全ゲノム関連研究のためのSNP含有量を提供するであろう。しかしながら、現在利用できる遺伝子型分類方法は面倒であって、ハプロタイプマップを作るのに必要な多数のSNPをスコア取りするには不十分である。

## 【0006】

したがって、全ゲノムスケールで多数の遺伝子座を同時に質問する方法が当該分野で求められている。そのような利点はゲノム発見プロセスおよび病気の遺伝子的解析、ならび

50

に個人の遺伝子的解析に影響するであろう。本発明は、この要望を満足させ、同様に他の利点も提供するのである。本発明は、ゲノム研究において新しい時代を可能とする大規模多重化反応を行うための方法を記載し、証明する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

1つの態様において、本発明は、与えられたゲノム内に含まれる1つまたは複数の型決定可能な遺伝子座を検出する方法をその主旨とし、ここに、上記方法はそのような型決定可能な遺伝子座を有するゲノム断片の上記増幅された表示的集団を提供し、上記ゲノム断片を、プローブ-断片ハイブリッドが形成される条件下で、型決定可能な遺伝子座に対応する配列を有する複数の核酸プローブと接触させ；次いで、プローブ-断片ハイブリッドの型決定可能な遺伝子座を検出する工程を含む。特別な実施形態において、これらの核酸プローブは長さが多くとも125ヌクレオチドである。しかしながら、種々の長さまたは配列のいずれかを有するプローブは、以下により詳細に記載するように用いることができる。

10

【0008】

別の態様において、本発明は、型決定可能な遺伝子座を検出する方法をその主旨とし、上記方法は、そのような型決定可能な遺伝子座を有するゲノム断片の増幅された表示的集団を提供し、上記ゲノム断片を、プローブ-断片ハイブリッドが形成される条件下で、上記型決定可能な遺伝子座に対応する配列を有する複数の核酸プローブと接触させ；次いで、上記プローブ-断片ハイブリッドの型決定可能な遺伝子座を直接的に検出する工程を含む。

20

【0009】

さらに別の態様において、本発明は、型決定可能な遺伝子座を有するゲノム断片の増幅された表示的集団を提供し；上記ゲノム断片を、固定化されたプローブ-断片ハイブリッドが形成される条件下で、型決定可能な遺伝子座に対応する配列を有する複数の固定化された核酸プローブと接触させ；固定化されたプローブ-断片ハイブリッドを修飾し；次いで、修飾されたプローブまたは断片を検出し、それにより、ゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する工程を含む、ゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する方法をその主旨とする。

30

【0010】

また、本発明は、(a)複数のゲノム断片を提供し、ここに、上記複数のゲノム断片は少なくとも1ギガ塩基の複雑性を有する少なくとも100 $\mu$ g/ $\mu$ lのDNAを有し；(b)上記複数のゲノム断片を複数の異なる固定化された核酸プローブと接触させ、ここに、上記異なる核酸プローブの少なくとも500はゲノム断片とハイブリダイズして、プローブ-断片ハイブリッドを形成し；次いで、(c)上記プローブ-断片ハイブリッド型決定可能な遺伝子座を検出する工程を含む方法を提供する。

【0011】

また、本発明の方法は、(a)複数のゲノム断片を提供し、ここに、上記複数のゲノム断片は少なくとも1ギガ塩基の複雑性を有する少なくとも1 $\mu$ g/ $\mu$ lのDNAの濃度を有し；(b)上記複数のゲノム断片を複数の異なる固定化された核酸プローブと接触させ、ここに、上記異なる核酸プローブの少なくとも500はゲノム断片とハイブリダイズして、プローブ-断片ハイブリッドを形成し；次いで、(c)上記プローブ-断片ハイブリッドの型決定可能な遺伝子座を検出する工程を含むこともできる。

40

【0012】

さらに別の態様において、本発明は、単離された二本鎖ゲノムDNAを提供し、上記二本鎖ゲノムDNAをニックング剤と接触させることによってニックドDNAを生じさせ、このニックドDNAをストランド置き換えポリメラーゼおよび複数のプライマーと接触させ、ゲノムDNAを増幅する工程を含むゲノムDNAを増幅する方法をその主旨とする。

50

## 【 0 0 1 3 】

本発明は、さらに、ゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する方法を提供する。上記方法は、(a)複数の増幅されたgDNA断片をインビトロ転写し、それにより、ゲノムRNA(gRNA)断片が得られ；(b)上記gRNA断片を、型決定可能な遺伝子座に対応する配列を有する複数の核酸プローブとハイブリダイズさせ；次いで、(c)上記プローブにハイブリダイズするgRNA断片の型決定可能な遺伝子座を検出する工程を含む。

## 【 0 0 1 4 】

本発明は、さらに、ゲノム断片の複雑性が低下した、遺伝子座 - 特異的な増幅された表示的集団の生成方法を提供する。上記方法は(a)天然ゲノムを複数のランダムプライマーで複製し、それにより、ゲノム断片の増幅された表示的集団を生じさせ；(b)上記ゲノム断片の増幅された表示的集団のサブグループを複数の異なる遺伝子座 - 特異的プライマーで置き換え、それにより、ゲノム断片の遺伝子座特異的な増幅された表示的集団を生じさせ；次いで、(c)上記サブグループを単離し、それにより、ゲノム断片の複雑性が低下した遺伝子座 - 特異的な増幅された表示的集団を生じさせる工程を含む。

## 【 0 0 1 5 】

本発明は、プライマー伸長アッセイにおいてプローブの異所性伸長を阻害する方法も提供する。上記方法は(a)プローブ - 標的ハイブリッドが形成される条件下で、複数のプローブ核酸を複数の標的核酸と接触させ；(b)プローブ - 異所性伸長インヒビターハイブリッドが形成される条件下で、上記複数のプローブ核酸を異所性伸長インヒビターと接触させ；次いで、(c)プローブ - 異所性伸長インヒビターハイブリッドにおけるプローブと比較してプローブ - 標的ハイブリッドにおけるプローブを選択的に修飾する工程を含む。

## 【 0 0 1 6 】

さらに、(a)固定化されたプローブ - 断片がハイブリッド形成される条件下で、複数のゲノム断片を複数の異なる固定化核酸プローブと接触させ；(b)ゲノム断片にハイブリダイズさせつつ固定化されたプローブを修飾し、それにより、修飾された固定化プローブを形成し；(c)上記プローブ - 断片ハイブリッドから上記ゲノム断片を除去し；次いで、(d)ゲノム断片を除去した後に修飾された固定化プローブを検出し、それにより、ゲノム断片の型決定可能な遺伝子座を検出する工程を含む方法が提供される。

## 【 0 0 1 7 】

また、本発明は、(a)天然ゲノムを表示的に増幅し、ここに、型決定可能な遺伝子座を有する上記ゲノム断片の増幅された表示的集団が等温条件下で生成され；(b)プローブ - 断片ハイブリッドが形成される条件下で、上記ゲノム断片を型決定可能な遺伝子座に対応する配列を有する複数の核酸プローブと接触させ；次いで、(c)プローブ - 断片ハイブリッドの型決定可能な遺伝子座を検出する工程を含む方法も提供する。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

( 項目 1 )

ゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する方法であって、

( a ) 該型決定可能な遺伝子座を含むゲノム断片の増幅された表示的集団を提供し、ここで、該集団は高複雑性表示を含み；

( b ) 該ゲノム断片を、プローブ - 断片ハイブリッドが形成される条件下で、該型決定可能な遺伝子座に対応する配列を有する複数の異なる核酸プローブと接触させ；次いで、

( c ) 該プローブ - 断片ハイブリッドの型決定可能な遺伝子座を直接的に検出することを含む、方法。

( 項目 2 )

( a ) ゲノム断片の増幅された表示的集団を、固定化されたプローブ - 断片ハイブリッドが形成される条件下で、複数の異なる固定化された核酸プローブと接触させ；

( b ) 該ゲノム断片にハイブリダイズされた状態で該固定化されたプローブを修飾し、それにより、修飾された固定化プローブを形成し；

( c ) 該プローブ - 断片ハイブリッドから該ゲノム断片を除去し；次いで、

( d ) 該ゲノム断片を除去した後に、該修飾された固定化プローブを検出し、それにより、該ゲノム断片の型決定可能な遺伝子座を検出することを含む、方法。

( 項目 3 )

( a ) ゲノム断片の増幅された表示的集団を、固定化されたプローブ - 断片ハイブリッドが形成される条件下で、複数の異なる固定化された核酸プローブと接触させ；

( b ) 該プローブへの検出部分の付加によって該固定化されたプローブ - 断片ハイブリッドを修飾し、それにより、親和性リガンド - 標識プローブを形成し；

( c ) 該親和性リガンド - 標識プローブを結合部分および増幅試薬と接触させ、

ここで、該結合部分は該リガンドに結合することができる 1 つ以上の部位を有し、ここで、該増幅試薬は該結合部分に対して親和性を有し、

それにより、該親和性リガンド - 標識プローブ、該結合部分および該増幅試薬の間にマルチマー複合体が形成され；次いで、

( d ) 該マルチマー複合体を検出し、それにより、該ゲノム断片の型決定可能な遺伝子座を検出することを含む、方法。

( 項目 4 )

前記複数の異なる核酸プローブが、表面に結合した該プローブのアレイを含む、項目 1、2 または 3 に記載の方法。

( 項目 5 )

前記異なる核酸プローブが粒子に結合されている、項目 1、2 または 3 に記載の方法。

( 項目 6 )

前記粒子の各々が単一の型の核酸プローブに結合されている、項目 5 に記載の方法。

( 項目 7 )

前記粒子が基材に結合されている、項目 5 の記載の方法。

( 項目 8 )

前記プローブが長さが多くとも 1 2 5 ヌクレオチドである、項目 1、2 または 3 に記載の方法。

( 項目 9 )

天然ゲノムを表示的に増幅し、それにより、該ゲノム断片の増幅された表示的集団を提供することをさらに含む、項目 1、2 または 3 に記載の方法。

( 項目 1 0 )

単一工程反応で前記天然ゲノムを表示的に増幅することを含む、項目 9 に記載の方法。

( 項目 1 1 )

等温条件下で前記天然ゲノムを表示的に増幅することを含む、項目 9 に記載の方法。

( 項目 1 2 )

前記表示的に増幅することが、リンカーアダプター - P C R を含む、項目 9 に記載の方法。

( 項目 1 3 )

前記表示的に増幅することが、ランダムプライマー増幅を含む、項目 9 に記載の方法。

( 項目 1 4 )

低反応促進性を有するポリメラーゼを用いて増幅することを含む、項目 1 3 に記載の方法。

( 項目 1 5 )

前記低反応促進性が重合事象当たり 1 0 0 塩基未満である項目 1 4 に記載の方法。

( 項目 1 6 )

前記表示的に増幅することが、前記ゲノム D N A をエンドヌクレアーゼで処理することを含む、項目 9 に記載の方法。

( 項目 1 7 )

前記表示的に増幅することが、前記ゲノム断片をエンドヌクレアーゼで処理することを含む、項目 9 に記載の方法。

( 項目 1 8 )

10

20

30

40

50

前記天然ゲノムの多くとも  $1 \times 10^6$  コピーを、前記表示的に増幅することのためのテンプレートとして用いる、項目 9 に記載の方法。

(項目 19)

前記天然ゲノムがヒトゲノムである、項目 9 に記載の方法。

(項目 20)

前記ゲノム断片の増幅された表示的集団が、前記天然ゲノムの少なくとも 5 % と同一である配列を含む、項目 9 に記載の方法。

(項目 21)

前記ゲノム断片の増幅された表示的集団が少なくとも  $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$  の DNA 濃度を含む、項目 1、2 または 3 に記載の方法。

(項目 22)

前記ゲノム断片の増幅された表示的集団が少なくとも 1 ギガ塩基の複雑性を含む、項目 1、2 または 3 に記載の方法。

(項目 23)

前記ゲノム断片の表示的集団が少なくとも  $100 \mu\text{g}$  の DNA を含む、項目 1、2 または 3 に記載の方法。

(項目 24)

少なくとも 100,000 の前記異なる核酸プローブが、ゲノム断片とハイブリダイズしてプローブ-断片ハイブリッドを形成する、項目 1、2 または 3 に記載の方法。

(項目 25)

前記検出が、前記ゲノム断片にハイブリダイズされた状態で前記プローブを修飾することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 26)

前記核酸プローブが固定化されている、項目 25 に記載の方法。

(項目 27)

さらに、前記検出に先立って前記修飾された固定化プローブを変性条件に曝露し、それにより、前記ゲノム断片を除去することを含む、項目 2 または 26 に記載の方法。

(項目 28)

前記修飾が、前記プローブへ検出部分を付加し、それにより、親和性リガンド-標識プローブを形成する工程を含む、項目 2 または 25 に記載の方法。

(項目 29)

前記親和性リガンド-標識プローブを受容体および増幅試薬と接触させることをさらに含む、

ここで、該受容体は該リガンドに結合することができる 1 つ以上の部位を有し、ここに、前記増幅試薬は該受容体に対する親和性を有し、

それにより、該親和性リガンド-標識プローブ、該受容体および該増幅試薬の間にマルチマー複合体が形成される、項目 28 に記載の方法。

(項目 30)

前記検出が、前記マルチマー複合体を検出することを含む、項目 29 に記載の方法。

(項目 31)

前記修飾が、ポリメラーゼによるヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログの付加を含む、項目 2、3 または 25 に記載の方法。

(項目 32)

前記修飾が、前記固定化された核酸プローブへのプローブの連結を含む、項目 2、3 または 25 に記載の方法。

(項目 33)

前記修飾が、前記固定化された核酸プローブの切断を含む、項目 2、3 または 25 に記載の方法。

(項目 34)

前記プローブを、一本鎖核酸結合蛋白質と接触させることをさらに含む、項目 2、3 ま

10

20

30

40

50

たは 25 に記載の方法。

(項目 35)

前記プローブ - 断片ハイブリッドがキャピラリーギャップフローセル中で形成される、  
項目 1、2 または 3 に記載の方法。

(項目 36)

少なくとも 100 の型決定可能な遺伝子座が同時に検出される、項目 1、2 または 3 に  
記載の方法。

(項目 37)

検出された該型決定可能な遺伝子座を同定するレポートを作成することをさらに含む、  
項目 1 に記載の方法。

(項目 38)

項目 37 に記載の方法によって作成されたレポート。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図 1】図 1 は、本発明の全ゲノム遺伝子型分類 (WGG) 方法のダイアグラムを示す。

【図 2】図 2 には、対立遺伝子特異的プライマー伸長 (ASPE) または単一塩基伸長 (SBE) を用いる型決定可能な遺伝子座の検出で有用な例示的プローブを示す。

【図 3】図 3 は、パネル A において、種々の条件下で行った全ゲノム増幅反応からの増幅  
生成物を負荷したアガロースゲルおよび、パネル B において、反応で計算された収率の表  
を示す。

【図 4】図 4 は、Bead Array<sup>TM</sup> (パネル A) アッセイした酵母ゲノム DNA お  
よび 4 つの異なる四連アレイ (R5C1、R5C2、R6C1、R6C2) (パネル B)  
からアッセイした 192 のうちの 18 の遺伝子座についてのパーフェクトマッチ (PM)  
およびミスマッチ (MM) 強度のサブセットからのアレイシグナルのイメージを示す。P  
M プローブは 4 つの強度値の第一の組であり、MM プローブは下側軸上の各プローブタイ  
プ標識によって示される 4 つの強度値の第二の組である。

【図 5】図 5 は、Bead Array<sup>TM</sup> に直接ハイブリダイズしたヒト gDNA に関し  
て行ったアレイ - ベースの SBE 遺伝子型分類を示す。

【図 6】図 6 は、Bead Array<sup>TM</sup> に直接ハイブリダイズしたヒト gDNA に関し  
て行ったアレイ - ベースの ASPE 遺伝子型分類を示す。パネル A は 77 のプローブ対を  
横切る生の強度値を示し、パネル B は 77 の遺伝子座に関してプロットした区別比率 (P  
M / PM + MM) を示す。

【図 7】図 7 は、Golden Gate<sup>TM</sup> アッセイを用いる、ランダムプライマー増幅  
(RPA) ゲノム DNA と比較した未増幅ゲノム DNA の遺伝子型分類スコアを示す (R  
PA 反応における DNA 入力量は各棒線の下方に示され、ヘキサヌクレオチド (6 - 量  
体) またはドデカンヌクレオチド (12 - 量体) の使用が特定されている以外は、RPA  
反応はランダムな 9 - 量体オリゴヌクレオチドを使用した)。

【図 8】図 8 は、増幅または検出用の標的核酸としてのゲノム RNA を創製するための例  
示的方法のダイアグラムを示す。

【図 9】図 9 は、ゲノム断片の複雑性が低下した遺伝子座 - 特異的な表示的集団を創製す  
るための例示的方法のダイアグラムを示す。

【図 10】図 10 は、例示的シグナル増幅のスキームを示す。

【図 11】図 11 は、パネル A において、ゲノム DNA 断片とハイブリダイズし、ASPE  
で検出された Bead Array<sup>TM</sup> のイメージをおよび、パネル B において、少なく  
とも 1 つの遺伝子座における 2 つのホモ接合型 (B / B および A / A) クラスタおよび  
1 つのヘテロ接合型 (A / B) クラスタが区別される GenTrain プロットを示す  
。

【図 12】図 12 は、パネル A において、遺伝子型分類上の精度に関する統計表；パネル  
B および C において、2 つの試料についての GenCall プロット (0.45 における  
線は呼ぶべきデータをフィルターするのに用いる下方閾値を示す) および、パネル D およ

10

20

30

40

50

びEにおいて、2つの遺伝子座についてのGenTrainプロット(矢印は、それがGenCallプロットにおいて0.45の閾値未満に下降するにつれ、呼ばれなかった質問可能データ点を示す)を示す。

【図13】図13は、異所性伸長(パネルA)および一本鎖プローブをSSBに結合させることによって阻害を含めた異所性伸長を阻害するための方法(パネルB);相補的配列を有する核酸でプローブの3'末端をブロックすること(パネルC)および伸長不可能ヘアピンの形成(パネルD)を示すダイアグラムを示す。

【図14】図14は、一本鎖結合蛋白質(SSB)の存在下および不存在下におけるBead Array<sup>TM</sup>比較アッセイシグナルでのクレノウ-起点ASPE反応についてのバラツキプロットを示す。パネルAにおけるバラツキプロットは増幅されたゲノムDNAの不存在下における異所性シグナル強度に対するSSBの効果を示し、他方、パネルBにおけるバラツキプロットは増幅されたゲノムDNAの存在下におけるシグナル強度に対するSSBの効果を示す。パネルCおよびDは、ゲノム断片が上記増幅された断片が増幅された集団の不存在下におけるBead Array<sup>TM</sup>についてのクレノウ(パネルCまたはクレンタック(Klentack)パネルD)ASPE反応ランについての(増大する強度の順で分類した)遺伝子座についての強度のプロットを示す(ntc-標的対照は「異所性」伸長の尺度を供しない)。

【図15A】図15は、ランダムプライマー増幅(増幅)および/または未増幅ゲノムDNA(未増幅)によって生じたゲノム断片の集団のASPE検出に続くプローブについての強度値を比較するバラツキプロットを示す。

【図15B】図15は、ランダムプライマー増幅(増幅)および/または未増幅ゲノムDNA(未増幅)によって生じたゲノム断片の集団のASPE検出に続くプローブについての強度値を比較するバラツキプロットを示す。

【図15C】図15は、ランダムプライマー増幅(増幅)および/または未増幅ゲノムDNA(未増幅)によって生じたゲノム断片の集団のASPE検出に続くプローブについての強度値を比較するバラツキプロットを示す。

【図16】図16は、増幅DNA入力に対する未増幅DNA入力(増幅:未増幅の比率)についてのシグナル強度の特定の比率を有するプローブの数(カウント)の分布を示す。

【図17】図17は、Golden Gate<sup>TM</sup>アッセイを用いるゲノム断片の表示的に増幅された集団から検出された4つの遺伝子座(1824、2704、3633および6126)についての例示的ゲノプロットを示す。ゲノム断片の表示的に増幅された集団は、脚注に示された3つの異なる量にてゲノムDNA試料から個別に生じさせた。対照データ点は、Golden Gate<sup>TM</sup>アッセイを用いて同一条件下で検出された未増幅ゲノムDNAに関して得られた。GenTrainアルゴリズムによって同定された対照データ点についてのクラスターを丸印で表し、各クラスターにおけるデータ点の数はX-軸下方に示す。2704遺伝子座については、空のクラスターはABおよびBBクラスターの位置に基づくAAゲノタイプについての予測されたクラスター位置を示す。

【図18】図18は、(A)異なる量の入力ゲノムDNA(input)から生じたRPA反応混合物のハイブリダイゼーションおよびASPE検出に続く各アレイ(LOD)についての全てのプローブで検出された平均強度をプロットする棒グラフおよび(B)種々の量の入力ゲノムDNA(input)から生じたRPA混合物をプローブするのに用いた場合における、アレイの全てのプローブ(比率)についての比率(PMシグナル強度/(PMシグナル強度+MMシグナル強度))をプロットする棒グラフを示す。

【図19-1】図19は、95のCEPHヒト試料から生じ、遺伝子座の1500HapMapQC組に特異的なプローブを有するアレイについてのプローブの対立遺伝子特異的プライマー伸長によって検出されたランダムプライマー増幅ヒトゲノム断片についての860の遺伝子座(パネルA)および954の遺伝子座(パネルB)についての代表的なゲノプロットを示す。パネルCは、遺伝子型クラスター分離スコアに従う遺伝子座の分布を示す。

【図19-2】図19は、95のCEPHヒト試料から生じ、遺伝子座の1500Hap

10

20

30

40

50



Map QC組に特異的なプローブを有するアレイについてのプローブの対立遺伝子特異的プライマー伸長によって検出されたランダムプライマー増幅ヒトゲノム断片についての860の遺伝子座(パネルA)および954の遺伝子座(パネルB)についての代表的なゲノプロットを示す。パネルCは、遺伝子型クラスター分離スコアに従う遺伝子座の分布を示す。

【図20】図20は、対立遺伝子特異的プライマー伸長検出および0.1N NaOHでの処理またはそれなしでの処理に続くパーフェクトマッチ(PM)およびミスマッチ(MM)プローブについてのシグナル強度を示す。

【図21】図21は、(A)各々、完全に脱リン酸化または3'脱リン酸化生成物いずれかを生じさせるためのピサルファイト-生成DNA断片のアルカリ性ホスファターゼおよびT4 DNAキナーゼでの処理；(B)連結されたDNAを生じさせるための3'脱リン酸化DNAのT4 RNAリガーゼでの処理、続いて、ストランド-置き換え全ゲノムランダムプライマー増幅反応における増幅；(C)ユニバーサルテイル配列を上記断片に付加するための、ピサルファイト-生成DNA断片のターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ(TdT)およびT4 RNAリガーゼでの処理、続くPCR増幅；(D)5'および3'ユニバーサルテイル配列テイルをピサルファイト生成物に付加するための、ピサルファイト-生成DNA断片のT4 RNAリガーゼでの処理、続くPCR増幅を示す。

【発明を実施するための形態】

【0019】

(定義)

本明細書中で用いるように、用語「ゲノム」とは真核生物細胞の核内で見出される染色体DNAの全相補体を意味することを意図する。上記用語は原核生物、ウイルス、ミトコンドリアまたは葉緑体の全ゲノム相補体、または真核生物種のハプロイド核ゲノム相補体をいうのにも用いることができる。

【0020】

本明細書中で用いるように、用語「ゲノムDNA」または「gDNA」とは、真核生物細胞の核、または原核生物、ウイルス、ミトコンドリアまたは葉緑体、天然で生じ、かつ天然でRNAに転写される配列、ならびに当該細胞によって天然ではRNAに転写されない配列を含有する1つ以上の染色体ポリマーデオキシリボヌクレオチド分子を意味することを意図する。真核生物細胞のgDNAは少なくとも1つの動原体、2つのテロメア、1つの複製起点および、例えば、イントロンまたは転写プロモータを含めた真核生物細胞によってRNAに転写されない1つの配列を含有する。原核生物細胞のgDNAは、少なくとも1つの複製起点、および、例えば、転写プロモータを含めた原核生物細胞によってRNAに転写されない1つの配列を含有する。真核生物ゲノムDNAは、例えば、真核生物ゲノムDNA中のイントロンの存在、および他のもののgDNA中のイントロンの不存在に従って、原核生物、ウイルスまたはオルガネラゲノムDNAから区別することができる。

【0021】

本明細書中で用いるように、用語「検出」とは、特異的ヌクレオチド配列を有する核酸等の特定の分子の存在を測定するいずれの方法をも意味することを意図する。核酸を検出するのに用いる技術は、例えば、検出すべき配列へのハイブリダイゼーションを含む。しかしながら、本発明の特別な実施形態は、検出すべき配列の直接的なハイブリダイゼーションを必要とせず、むしろ、ハイブリダイゼーションは検出すべき配列の近くで、または、検出すべき配列に隣接して起こり得る。用語「近く」の使用は、検出すべき配列から約150塩基以内を含むことを意味する。他の場合も、核酸に沿って約150塩基以内である。従って、近い核酸に沿っての他の距離は、例えば、検出すべき配列から、約100、50、40、30、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1塩基を含む。ハイブリダイゼーションは、例えば、約250塩基、500塩基、1キロベース以上の距離を含む、かつ検出すべき標

10

20

30

40

50

的核酸またはゲノム断片の長さを含めた検出すべき遺伝子座または配列より長い距離を有する配列において起こり得る。

#### 【0022】

検出で有用な試薬の例は、限定されるものではないが、放射性標識プローブ、フルオロフォア - 標識プローブ、量子ドット - 標識プローブ、クロモフォア - 標識、酵素 - 標識プローブ、親和性リガンド - 標識プローブ、電磁スピン標識プローブ、重原子標識プローブ、ナノ粒子光散乱標識または他のナノ粒子もしくは球状シェルで標識されたプローブおよび当業者に既知のいずれかの他のシグナル発生標識で標識されたプローブを含む。本発明での検出で有用な標識部分の非限定的例は、限定されるものではないが、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシラーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼ等の適切な酵素；ストレプトアビジン/ビオチン、アビジン/ビオチン、または例えば、ウサギ Ig G および抗ウサギ Ig G を含めた抗原/抗体複合体等の複合体を形成することができる結合対のメンバー；ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、緑色蛍光蛋白質、エリスロシン、クマリン、メチルクマリン、ピレン、マラカイトグリーン、スチルベン、ルシフェールイエロー、カスケードブルー<sup>TM</sup>、テキサスレッド、ジクロロトリアジミルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、フィコエリスリン、ユーロピウムおよびテルビウムを含むもの等の蛍光タンパク質複合体、Cy 3、Cy 5、分子ビーコンおよびその蛍光誘導体等のフルオロフォア、ならびに、例えば、Principles of Fluorescence Spectroscopy、Joseph R. Lakowicz (編集者)、Plenum Pub Corp, 第2版(1999年7月)およびRichard P. HoaglandによるMolecular Probes Handbookの第6版に記載されている当該分野で既知の他のもの；ルミノール等のルミネセント材料；金または銀粒子または量子ドット等の光散乱またはプラズモン共鳴材料を含み；あるいは放射性材料は<sup>14</sup>C、<sup>123</sup>I、<sup>124</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、Tc 99m、<sup>35</sup>Sまたは<sup>3</sup>Hを含む。

10

20

#### 【0023】

本明細書中で用いるように、用語「型決定可能な遺伝子座」とは核酸中の配列特異的な位置を意味することを意図する。上記用語は、単離された核酸分子に存在すると予測される所定のまたは予測された核酸配列を含むことができる。用語型決定可能な遺伝子座は単一ヌクレオチド多型(SNP)突然変異、可変数のタンデムリピート(VNTR)および単一タンデムリピート(STR)、他の多型、挿入、欠失、スプライス変異型またはいずれかの他の公知の遺伝子マーカーを含むことを意図する。公知のSNPおよび他の遺伝子変異を供する例示的源は、限定されるものではないが、NCBIによって管理されたdbSNP、およびncbi.nlm.nih.gov/snp/における利用可能なオンライン、およびFredman et al. Nucleic Acids Research、30:387-91、(2002)に記載されたHCVBASEデータベース、およびhgvdbase.cgb.ki.se/における利用可能なオンラインを含む。

30

#### 【0024】

本明細書中で用いるように、用語「表示的に増幅する」とは核酸コピーを生じさせるための核酸テンプレートの複製を意味することを意図し、ここで、コピー中の全ての他の配列に対するコピー中の各配列の割合は核酸テンプレート中の割合と実質的に同一である。上記用語に含まれる核酸テンプレートは染色体等の単一分子、またはゲノムまたはゲノムの一部分を形成する染色体のコレクション等の複数の分子であり得る。同様に、核酸コピーは単一の分子または複数の分子であり得る。核酸はDNAまたはRNAまたはその模倣体または誘導体であり得る。コピー核酸は、テンプレートDNAよりも小さな複数の断片であり得る。従って、上記用語は、集団中の全ての他のゲノム断片に対するゲノム断片に由来する各々の割合がゲノム中の他のゲノム断片配列に対するその配列の割合と実質的に同一であるように、ゲノム、またはその部分を複製することを含むことができる。複製すべきDNAは組織または血液試料から、法医学試料から、ホルマリン - 固定細胞から、ま

40

50

たは他の源から単離することができる。本発明で用いるゲノムDNAは無傷、ほぼ無傷、または断片化であり得る。テンプレートまたはそのコピー等の核酸分子は、限定されるものではないが多くとも約1mb、0.5mb、0.1mb、50kb、10kb、5kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb、0.25、0.1、0.05または0.02kbを含めた種々のサイズのいずれかであり得る。

#### 【0025】

従って、用語「増幅された表示」とは、コピー中の全ての他の配列に対するコピー中の各配列の割合が核酸テンプレート中の割合と実質的に同一である核酸コピーを意味することを意図する。ゲノム断片の集団に言及するのに用いる場合、例えば、上記用語は、集団中の全ての他のゲノム断片に対する各ゲノム断片の割合がゲノム中の他のゲノム断片配列に対するその配列に対する割合に実質的に同一であるゲノム断片の集団を意味することを意図する。増幅された表示およびテンプレートゲノムDNA中の配列の割合の間の実質的同様性は、上記表示中の遺伝子座の少なくとも60%が5倍過剰表示または過少表示以下であることを意味する。そのような表示において、遺伝子座の少なくとも70%、80%、90%、95%または99%は、例えば、5、4、3または2倍以下に過剰表示または過少表示され得る。上記用語に含まれる核酸はDNA、RNAまたはそのアナログであり得る。増幅された表示的集団における各核酸配列のコピーの数は、例えば、テンプレートよりも少なくとも2、5、10、25、50、100、1000、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ または $1 \times 10^{10}$ 倍以上であり得る。

#### 【0026】

ゲノムの一部と同一である配列を含むゲノム断片の例示的集団が、例えば、高複雑性表示または低複雑性表示を含む。本明細書中で用いるように、用語「高複雑性表示」とは、そのテンプレートの配列の少なくとも約50%を有する核酸コピーを意味することを意図する。かくして、ゲノムDNAの高複雑性表示は、限定されるものではないが、テンプレートゲノム配列の少なくとも約60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%を含むことができる。本明細書中で用いるように、用語「低複雑性表示」とは、そのテンプレートの配列の多くとも約49%を有する核酸コピーを意味することを意図する。かくして、ゲノムDNAの低複雑性表示は、限定されるものではないが、下の配列の多くとも約49%、40%、30%、20%、10%、5%または1%を含むことができる。特別な実施形態において、本発明のゲノム断片の集団はゲノム配列の少なくとも約5%、10%、20%、30%または40%を表す複雑性を有することができる。

#### 【0027】

本明細書中で用いるように、用語「直接的に検出する」とは、核酸に言及するのに用いる場合に、試料中の核酸のレベルに基づいて試料中の核酸の特性を認識または識別することを意味することを意図する。上記用語は、例えば、試料中の核酸を増幅することなく試料中の核酸の特性を認識または識別すること、または増幅なしでの検出を含むことができる。認識または識別することができる例示的特性は、限定されるものではないが、ヌクレオチド配列、配列中の特定の部位における多型または突然変異等の特定のヌクレオチドの存在等を含む。直接的検出方法の1つの非限定的例は、核酸に対して標識されたプローブをハイブリダイズさせ、次いで、ハイブリダイズした標識の存在に基づいて核酸の存在を測定することによる核酸の検出である。直接的検出法の他の例は本明細書中に記載され、例えば、単一塩基伸長(SBE)および対立遺伝子特異的プライマー伸長(ASPE)を含む。当業者であれば、検出に従い、未増幅ゲノムDNA断片の試料等の未増幅核酸の試料を増幅することができることを理解するであろう。

#### 【0028】

特別な実施形態において、直接的検出は、型決定可能な遺伝子座およびその相補的配列の間の二本鎖核酸複合体の創製、および型決定可能な遺伝子座のさらに別のコピーを創製することなく複合体を認識することを含むことができる。一部の実施形態において、型決定可能な遺伝子座の直接的検出は、単一ハイブリダイゼーション複合体の形成、それにより、型決定可能な遺伝子座を有する特定の核酸分子に対する反復されたハイブリダイゼー

ションを排除する意味を含むことができる。

【0029】

型決定可能な遺伝子座または型決定可能な遺伝子座に遺伝的に連結した配列等の検出可能位置を検出する方法は、例えば、質問位置へのオリゴヌクレチドによるハイブリダイゼーション、または質問位置近くの、またはそれに隣接するオリゴヌクレオチドによるハイブリダイゼーション、続く、質問位置全般に亘ってのハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの伸長を含むことができる。

【0030】

本発明で有用であって、本明細書中に記載された、限定されるものではないが、SBEおよびASPEを含めた一部の直接的な検出方法は、ゲノム断片を捕獲すると共に、断片上の特定のSNP遺伝子座の存在を示すシグナルを生成するプローブを使用する。特に、本発明の方法は、ゲノム断片等の捕獲されたオリゴヌクレオチドのSNPまたは他の特徴の検出が外因的に付加された問合せオリゴヌクレオチドを必要としない条件下で行うことができる。しかしながら、所望であれば、外因的に付加された問合せオリゴヌクレオチドを用いることができる。オリゴ連結アッセイ(OLA)、伸長連結(Golden Gate<sup>TM</sup>)、ローリングサークル-ベースの検出方法、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)ハイブリダイゼーションその他のような外因的に付加された問合せオリゴヌクレオチドを使用する例示的方法は以下に記載する。

【0031】

本明細書中で用いるように、用語「増幅する」とは、一本鎖核酸に言及するのに用いる場合、上記一本鎖核酸の1つ以上のコピー、またはその一部分を生じさせることを意味することを意図する。

【0032】

本明細書中で用いるように、用語「ゲノム断片」とは、染色体の一部と実質的に同一である配列を有する単離された核酸分子を意味することを意図する。染色体は、複製された遺伝子の大半または全てを含有するウイルス、原核生物、または真核生物核の線状または時々環状DNA-含有体であると理解される。ゲノム断片の集団は、実質的に全ゲノムまたはその一部分と同一の配列を含むことができる。ゲノム断片は、例えば、染色体の少なくとも約25、50、70、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000以上のヌクレオチドと実質的に同一である配列を有することができる。ゲノム断片はDNA、RNA、またはそのアナログであり得る。チミンの代わりにウラシルの存在によって異なるRNA配列およびDNA染色体配列は配列が実質的に同一であることは当業者によって理解されるであろう。

【0033】

本明細書中で用いるように、用語「天然」とは、ゲノムに言及するのに用いる場合、細胞または他の宿主からの単離によって生じることを意味することを意図する。上記用語は、インビトロ合成、複製または増幅によって生じたゲノムを排除する意図である。

【0034】

本明細書中で用いるように、用語「に対応する」とは、型決定可能な遺伝子座に言及するのに用いる場合、型決定可能な遺伝子座の配列、またはその診断的部分と同一、またはそれに相補的なヌクレオチド配列を有することを意味することを意図する。例示的診断部分は、例えば、注目する型決定可能な遺伝子座に隣接する、またはそれに近い核酸配列を含む。

【0035】

本明細書中で用いるように、用語「多重」とは、1つ以上の試料について複数のアッセイを同時に行うことを意味することを意図する。多重化は、さらに、複数の個別の試料の各々において複数のアッセイを同時に行うことを含む。例えば、分析すべき反応混合物の数は、マルチ-ウェルプレート中のウェルの数に基づくことができ、各ウェルで行ったアッセイの数は各ウェルの内容物に接触するプローブの数に基づくことができる。かくして、当業者によって理解されるように、各マイクロタイターウェルは個々のアレイを含む必

10

20

30

40

50

要はないが、96ウェル、384ウェルまたは1536ウェルマイクロタイタープレートは96、384および1536の個々のアレイを含む複合アレイを利用するであろう。マイクロタイタープレートのサイズおよび個々のアレイのサイズに依存して、非常に多くの数のアレイを同時に実行することができる；例えば、2,000の個々のアレイおよび96ウェルマイクロタイタープレートを用い、192,000の実験を一度に行うことができ；384マイクロタイタープレートにおける同一アレイは同時に768,000の実験を生じ、1536マイクロタイタープレートは3,072,000実験を与える。多重化はマイクロタイタープレートに対して例示してきたが、例えば、米国特許第2002/0102578 A1に記載されたものを含めた多重化で他のフォーマットを用いることができるのが理解されよう。

10

#### 【0036】

本明細書中で用いるように、用語「ポリメラーゼ」とは、テンプレートストランドとして核酸を用いて核酸分子の相補的レプリカを生じる酵素を意味することを意図する。DNAポリメラーゼはテンプレートストランドに結合し、次いで、テンプレートストランドを下方に動かし、ヌクレオチドを核酸の成長する鎖の3'末端の遊離ヒドロキシル基に加える。DNAポリメラーゼはDNAまたはRNAテンプレートから相補的DNA分子を合成し、RNAポリメラーゼはDNAテンプレートからRNA分子を合成する（転写）。DNAポリメラーゼは、一般には、プライマーと呼ばれる短い予め存在するRNAまたはDNAストランドを用いて、鎖成長を開始する。一部のDNAポリメラーゼは一本鎖テンプレートを複製できるに過ぎないが、他方、他のDNAポリメラーゼは、それらが塩基を鎖に加えている部位の上流のストランドを置き換える。本明細書中で用いるように、用語「ストランド置き換え」とは、ポリメラーゼに言及するのに用いる場合、ポリメラーゼによって読まれるテンプレートストランドから相補的ストランドを除去する活性を有することを意味することを意図する。ストランド置き換え活性を有する例示的ポリメラーゼは、限定されるものではないが、Bst (Bacillus stearothermophilus) ポリメラーゼ、exo<sup>-</sup>クレノウポリメラーゼまたは配列決定グレードのT7 exo<sup>-</sup>ポリメラーゼの大きな断片を含む。

20

#### 【0037】

さらに、一部のDNAポリメラーゼはそれらの前面にあるストランドを分解し、それを背後の成長する鎖で効果的に置き換える。これは、エキソヌクレアーゼ活性として既知である。商業的にまたは研究室で用いられる一部のDNAポリメラーゼは、エキソヌクレアーゼ活性を低下または排除するために、突然変異その他によって修飾されている。さらなる突然変異または修飾は、しばしば行われて、基質として非天然ヌクレオチドを用いるDNAポリメラーゼの能力を改善する。

30

#### 【0038】

本明細書中で用いるように、用語「反応促進性」とは、複製すべきテンプレート核酸から脱着させたポリメラーゼに先立ってポリメラーゼによって合成される核酸に付加された、平均の、塩基の数をいう。低反応促進性のポリメラーゼは、平均して、高反応促進性のポリメラーゼと比較してより短い核酸鎖を合成する。低反応促進性のポリメラーゼは、平均して、複製すべきテンプレート核酸から脱着するに先立って長さが約100塩基未満である核酸を合成するであろう。複製すべきテンプレート核酸からの脱着に先立って低反応促進性ポリメラーゼによって合成された核酸についてのさらに別の例示的平均長さは、限定されるものではないが、約80、50、25、10または5塩基未満を含む。

40

#### 【0039】

本明細書中で用いるように、用語「ニックド」とは、二本鎖核酸に言及するのに用いる場合、第一のストランド中の隣接配列に連結し、かつ第一ストランド中の隣接配列の双方にハイブリダイズした相補的第二ストランドを有する骨格の少なくとも1つの共有結合を欠くことを意味することを意図する。

#### 【0040】

本明細書中で用いるように、用語「ニックング剤」とは、最初の核酸ストランド中の隣

50

接配列を結合する共有結合を切断し、それにより、隣接配列が同一相補的ストランドにハイブリダイズした生成物を生じる物理的、化学的または生化学的存在を意味することを意図する。例示的なニッキング剤は、限定されるものではないが、バクテリオファージ f 1 の N , B s t N B I、M u t H または遺伝子 I I 蛋白質等の特異的配列を認識する一本鎖ニッキング制限エンドヌクレアーゼ；D N A s e I；フリーラジカル等の化学試薬；または超音波を含む。

#### 【0041】

本明細書中で用いるように、用語「単離された」とは、生物学的物質に言及するのに用いる場合、その天然環境中の物質と関連した、またはそれと共に生じる分子の少なくとも一部から除去されたことを意味することを意図する。従って、用語「単離する」とは、生物学的物質に言及するのに用いる場合、その天然環境から物質を取り出すこと、またはその天然環境中の核酸または物質と関連した、またはそれと共に生じる分子の少なくとも一部を取り出すことを意味することを意図する。単離することができる例示的物質は、限定されるものではないが、核酸、蛋白質、染色体、細胞組織等を含む。核酸等の単離された生物学的物質は他の生物学的物質を実質的に含まないようにすることができる。例えば、単離された核酸はそれと天然で関連した非ヌクレオチド物質を少なくとも約 90%、95%、99%または100%含まないようにすることができる。単離された核酸は、例えば、その配列が、配列がそこから取られた細胞におけるよりも注目する溶液中に存在する全核酸の有意により高い分率まで増加するように、他の核酸を実質的に含まないようにすることができる。例えば、単離された核酸は、そこからそれが取られた細胞におけるレベルに対してインピットにて他の核酸よりも2、5、10、50、100または1000倍以上高いレベルで存在させることができる。これは、存在する他のDNAまたはRNAの量の優先的低下によって、または特異的DNAまたはRNA配列の量の優先的増加によって、または2つの組合せによって引き起こすことができる。

#### 【0042】

本明細書中で用いるように、用語「複雑性」とは、核酸配列に言及するのに用いる場合、ゲノムにおけるユニークな配列の全長を意味することを意図する。ゲノムの複雑性は、ゲノム（すなわち、ハプロイド配列）の単一コピーの長さと同等、またはそれ未満とすることができる。ゲノム複雑性の見積もりは、反復した配列の存在に関してもし調整されれば、全長未満とすることができる。そのような見積もりで用いられる反復配列の長さは、特別な分析に適合するように調整することができる。例えば、複雑性は、ハプロイドゲノム配列におけるユニークな配列単語の数+配列単語の長さの合計であり得る。配列単語は、少なくとも10のヌクレオチドの規定された長さの連続的配列である。反復された配列の数、かくして、ゲノムにおけるユニークな配列の長さは配列単語の長さに依存するであろう。より具体的には、配列単語の長さは、例えば、15、20、25、30、50、100以上のヌクレオチドまで増加されるので、複雑性の見積もりは、一般には、ハプロイドゲノムの長さの上限に近づくまで増加するであろう。

#### 【0043】

（発明の詳細な説明）

本発明の1つの目的は、DNA試料中の複数の遺伝子座に同時に質問する感度がよくかつ正確な方法を提供することにある。特に、本発明の方法を用いて、個体のゲノムDNAまたはcDNAの試料中での複数の単一ヌクレオチド多型の直接的検出によって個体の遺伝子型を決定することができる。本発明の利点は、少量のゲノムDNAを個体から得、それを増幅して、上記ゲノム断片の増幅された表示的集団が得られ、これを本発明の方法で質問することができることである。かくして、上記方法は、バイオプシーまたは保管された試料等の比較的小さな組織試料から得られたゲノムDNAを遺伝子型分類するのに特に有用である。一般に、上記方法は、比較的少数のテンプレートゲノムコピーを増幅するのに用いられるであろう。特別な実施形態において、ゲノムDNA試料は、単一細胞から得、次いで、遺伝子型分類することができる。

#### 【0044】

本発明の方法における遺伝子座の直接的検出法のさらに別の利点は、標的ゲノムDNA断片が、一旦それが適切なプローブによって捕獲されれば増幅する必要がないことである。かくして、上記方法は、捕獲に続く検出のための高級で高価な手段の必要性を低下させるまたは軽減するという利点を提供することができる。もし十分なDNAが存在すると、型決定可能な遺伝子座の検出は、単一塩基伸長(SBE)または対立遺伝子特異的プライマー伸長(ASPE)等の捕獲された標的の増幅を必要としない技術によって行うことができる。直接的検出の他の方法は連結、伸長-連結、インベータアッセイ、標識された相補的配列とのハイブリダイゼーション等を含む。そのような直接的検出技術は、例えば、後記する捕獲されたプローブ-標的複合体に対して直接的に行うことができる。標的増幅-ベースの検出方法は本発明の方法では要求されないが、上記方法は所望であれば用いることができるインベータ、PCR-ベースの、またはオリゴヌクレオチド連結アッセイ-ベースの(OLA-ベースの)技術等の種々の増幅ベースの検出方法と適合する。

10

20

30

40

50

#### 【0045】

本発明は、ゲノム中の型決定可能な遺伝子座の検出等の遺伝子評価に先立ってゲノムDNAを増幅するのに用いることができる全ゲノム増幅の方法を提供する。本発明の全ゲノム増幅方法を用いて、与えられた配列のいずれの場合においても質または表示を危うくすること無くゲノムDNAの量を増加させることができる。かくして、上記方法を用いて、配列独立的に比較的少量のゲノムDNAを増幅して、遺伝子型分類できるゲノムDNAのレベルを提供することができる。驚くべきことに、複雑なゲノムは、低反応促進性ポリメラーゼで増幅して、ゲノムに代表的であり、高い複雑性を有し、典型的な核酸アレイに対するハイブリダイゼーションについての好都合なサイズを有する断片を含有するゲノム断片の集団を得ることができる。

#### 【0046】

後にさらに詳しく記載するように、ゲノム断片の複雑な表示的集団は、複数のプローブ、および注目する遺伝子座を有し、具体的には、断片の集団に存在する実質的に多量の他のゲノム配列の存在にも拘らず検出された比較的小さな割合のこれらの断片と共にインキュベートすることができる。さらに、もしプローブハイブリダイゼーションをゲノム断片集団を多量かつ高濃度で行う場合でさえ、特異的検出はそのような複雑な表示で起こり得る。かくして、本発明の利点は、高複雑性ゲノムDNAバックグラウンドの存在下で全ゲノム遺伝子分けを行うことができることである。

#### 【0047】

さらに、本明細書中に開示された方法におけるゲノムDNAの増幅はポリメラーゼ鎖反応を必要としない。具体的には、増幅は、配列が等温条件下で数倍増幅されるように行うことができる。かくして、温度上昇の工程を用いて、例えば、ゲノムDNAテンプレートを最初に変性することができるが、温度サイクリングは用いる必要がない。従って、通常ハイブリッドを変性するのに用いられる温度の反復した上昇およびハイブリダイゼーション温度への反復した復帰を用いる必要がない。

#### 【0048】

アレイでの型決定可能な遺伝子座の捕獲および分離の後、個々の型決定可能な遺伝子座は、ASPEまたはSBE等のその後の続く検出アッセイを介してインポシタス(所定の場所で)スコア取りすることができる。かくして、低反応促進性ポリメラーゼでの全ゲノム増幅によって得られたゲノム断片の集団は、プローブのアレイによって捕獲することができ、ゲノムの遺伝子型は、後に記載し、実施例で証明するように、個々に各プローブで検出された型決定可能な遺伝子座に基づいて決定することができる。インポシタス(inpositus)遺伝子型分類の手法は、それが所望であればアッセイの広い多重化を可能とする点で顕著な利点を有する。

#### 【0049】

cDNA試料等の、全ゲノムまたは完全なDNA試料中での型決定可能な遺伝子座の検出のための高密度DNAアレイ技術の使用は、本発明の増幅方法によって容易ならしめることができる。なぜならば、上記方法は型決定可能な遺伝子座、または型決定可能な遺伝

子座に相補的な配列の多数のコピーを、テンプレート試料におけるその表示に対する相対的割合のスケールまで生じさせることができるからである。比較的均一な表示を維持することは多くの適用で有利である。なぜならば、もし特異的遺伝子マーカーを含むゲノムの一部の領域が高い信頼性をもって複製されなければ、それらは平均的増幅に関して調整されたアッセイで検出されないからである。

#### 【0050】

本発明は、所望により同時にまたは順次に所望の数の型決定可能な遺伝子を検出するようなスケールとすることができる。上記方法を用いて、同時に、少なくとも10の型決定可能な遺伝子座、少なくとも100、1000、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ の型決定可能な遺伝子座以上を検出することができる。同様に、これらの数の型決定可能な遺伝子座は、所望であれば順次のフォーマットで測定することができる。かくして、本発明を用いて、所望であれば、ゲノム-幅スケールにて個体を遺伝子型分類することができる。

10

#### 【0051】

本発明の全ゲノム増幅方法および本発明の全ゲノム遺伝子型分類方法は、単独で、あるいは組み合わせて、例えば、単一細胞精子ハプロタイプ分析、高スループット様式での多数の個体の遺伝子型分類、または新規なハプロタイプの同定を含めた多数の適用で有用である。さらに、本発明は、多くの現行のアレイアッセイで必要なDNAまたはRNA試料の量を低下させる。なおさらに、本発明で利用できる改善されたアレイ感度は低下した試料の要件、改善されたLODスコアリング能力、およびより広いダイナミックレンジに導くことができる。

20

#### 【0052】

本発明を用いて、上記でリストしたものの等の特性の診断である新規のマーカーまたはハプロタイプを同定することができる。そのような研究は、共有された特性または特性の組を有する個体の群についての遺伝子型を、病気または応答のない同様な人々のグループにおけるよりも、特定の病気、または薬物、ワクチン、病原体または環境因子に対する応答等の共有された特性を持つ人々のグループに対し遺伝子構成要素がより高い頻度で寄与しているという例外に基づいて、特性を欠く対照グループと比較することによって行うことができる。従って、本発明の方法を用いて、人々の2つのグループにおいて異なるハプロタイプ分布を有する染色体領域、病気または応答を持つそれら、およびそれがないものを見出すことができる。次いで、各領域をより詳細に調べて、領域中のいずれの遺伝子におけるいずれの変異型が病気または応答に寄与し、より効果的な介入に導くかを発見することができる。これは、いずれの薬物またはワクチンが薬物代謝に影響する遺伝子についての特定の遺伝子型を持つ個体で効果的であるかを予測するためのテストの開発も可能とする。かくして、本発明を用いて、いずれの遺伝子マーカーが個体のゲノムで見出されるかの同定に基づいて個体の遺伝子型を決定することができる。個体の遺伝子型の知識を用いて、環境因子に対する応答、感染に対する感受性、特定の薬物またはワクチンの有効性、または薬物またはワクチンに対する有害または応答に対するリスクに対する種々の特性を測定することができる。

30

#### 【0053】

本発明は、ここでは、全ゲノムに対する型決定可能な遺伝子座の増幅および/または検出に関して例示する。当業者であれば、上記方法を、例えば、染色体または染色体のサブセット等のゲノムの一部；宿主ならびに1つ以上の寄生体からのゲノムDNAを有するバイオプシー試料、または特定の環境からの複数生物を有する生態学的試料；またはcDNAまたは増幅されたcDNAの表示さえが複数の異なるゲノムを有する試料を含めた他の複雑な核酸試料で用いることができることをここでの教示から理解するであろう。従って、上記方法を用いて、ゲノムの一部、または混合されたゲノム試料で見出される型決定可能な遺伝子座を特徴付けることができる。本発明は、与えられたゲノム内に含まれる1つまたは数個の型決定可能な遺伝子座を検出する方法を提供する。上記方法は、(a)そのような型決定可能な遺伝子座を有するゲノム断片の増幅された表示的集団を提供し；(b)

40

50



）上記ゲノム断片を、プローブ - 断片ハイブリッドが形成される条件下で、型決定可能な遺伝子座に対応する配列を有する複数の核酸プローブと接触させ；次いで、（c）プローブ - 断片ハイブリッドの型決定可能な遺伝子座を検出する工程を含む。特別な実施形態において、これらの核酸プローブは長さが多くとも125ヌクレオチドである。図1は、ゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する例示的方法の一般的概要を示す。図1に示すように、ゲノム断片の集団をゲノムから得、変性し、各々がゲノムの特定の型決定可能な遺伝子座に相補的な配列を有する核酸プローブのアレイと接触させることができる。プローブに表されたタイパフル遺伝子座を有するゲノム断片は、注目する遺伝子座を欠く他の断片はバルク溶液中に残りつつ、アレイ上の区別される位置においてプローブ - 断片ハイブリッドとして捕獲される。プローブ - 断片ハイブリッドは、（図1においてはシグナル部分という）検出部分のプローブへの酵素 - 介在付加によって検出することができる。図1の例示的实施形態において、ポリメラーゼはビオチン標識ヌクレオチドをプローブ - 断片ハイブリッド中のプローブに選択的に付加させる。次いで、例えば、ビオチニル化プローブが選択的に結合される条件下で蛍光標識アビジンをアレイに接触させ、次いで、蛍光を発するアレイ中の位置を検出することによってビオチニル化プローブを検出することができる。各位置におけるプローブについての既知の配列に基づき、特定の型決定可能な遺伝子座の存在を測定することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0054】

本発明の方法を用いて、ゲノムDNA（gDNA）を増幅し、またはいずれかの生物からのゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出することができる。上記方法は、典型的には、真核生物単細胞および多細胞生物で見出されるもの等の大きなゲノムの増幅および分析に理想的には適合する。本発明の方法で用いることができる例示的真核生物gDNAは、限定されるものではないが、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、有蹄動物、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、ネコ、イヌ、霊長類、ヒトまたはヒト以外の霊長類等の哺乳動物；*Arabidopsis thaliana*、トウモロコシ（*Zea mays*）、ソルガム、オート麦（*Oryza sativa*）、麦、コメ、カノーラ、または大豆等の植物；*Chlamydomonas reinhardtii*等の藻類；*Caenorhabditis elegans*等の線虫；*Drosophila melanogaster*、蚊、ハエ、ミツバチまたはクモ等の昆虫；ゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）等の魚類；は虫類；カエルまたは*Xenopus laevis*等の両生類；*Dictyostelium discoideum*；*pneumocystis carinii*、*Takifugu rubripes*、酵母、*Saccharomyces cerevisiae*または*Schizosaccharomyces pombe*等の真菌；または*plasmodium falciparum*からのものを含む。また、本発明の方法を用いて、細菌、*Escherichia coli*、*Staphylococci*または*Mycoplasma pneumoniae*等の原核生物；古細菌；C型肝炎ウイルスまたはヒト免疫不全ウイルス等のウイルス；またはピロイドからのもの等のより小さなゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出することもできる。

#### 【0055】

本発明で用いるゲノムDNAは1つ以上の染色体を有することができる。例えば、1つの染色体を含む原核生物ゲノムDNAを用いることができる。別法として、複数の染色体を含む真核生物ゲノムDNAを本発明の方法で用いることができる。かくして、上記方法を用いて、例えば、2以上、4以上、6以上、8以上、10以上、15以上、20以上、23以上、25以上、30以上、または35以上の染色体と等しい $n$ を有するゲノムDNAの型決定可能な遺伝子座を増幅し、または検出することができ、ここに、 $n$ はハプロイド染色体の数であって、ジプロイド染色体のカウントは $2n$ である。また、本発明の方法で用いるゲノムDNAのサイズは、染色体相補体の塩基対の数またはヌクレオチドの長さに従って測定することができる。本発明で有用なゲノムのいくつかについての例示的サイズの見積もりは約3.1 Gbp（ヒト）、2.7 Gbp（マウス）、2.8 Gbp（ラット）、1.7 Gbp（ゼブラフィッシュ）、165 Mbp（ミバエ）、13.5 Mbp（

S. erevisia e)、390 Mbp (フグ)、278 Mbp (蚊)または103 Mbp (C. elegans)である。当業者であれば、例えば、より小さなまたはより大きなゲノムを含めた上記例示のもの以外のサイズを有するゲノムを本発明の方法で用いることができるのを理解するであろう。

【0056】

ゲノムDNAは1つ以上の細胞、体液または組織から単離することができる。公知の方法を用いて血液、汗、涙、リンパ液、尿、唾液、精液、脳脊髄液、糞またはヒツジ膜液等の体液を得ることができる。同様に、既知のバイオプシー方法を用いて頬綿棒、マウスウオッシュ、外科的除去バイオプシー吸入等のような細胞または組織を得ることができる。また、ゲノムDNAは、一次培養、増殖した細胞系、固定された保管試料、法医学試料または考古学的試料中の1つ以上の細胞または組織から得ることもできる。

10

【0057】

それからgDNAが本発明の方法で得ることができる例示的細胞型は、限定されるものではないがBリンパ球、Tリンパ球、白血球、赤血球、マクロファージまたは好中球等の血液細胞；骨格細胞、平滑筋細胞または心筋細胞等の筋肉細胞；精子または卵子等の生殖細胞；上皮細胞；脂肪細胞、線維芽細胞または骨芽細胞等の結合組織細胞；ニューロン；星状神経膠細胞；間質細胞；腎臓細胞；脾臓細胞；肝臓細胞；またはケラチノサイトを含む。それからgDNAが得られる細胞は、例えば、造血幹細胞または赤血球細胞、Bリンパ球、Tリンパ球、ナチュラルキラー細胞、好虫球、塩基球、好酸球、単またはマクロファージ血小板等の造血幹細胞から生起する細胞を含めた特定の発生レベルであり得る。他の細胞は骨髄間質細胞（腸間幹細胞）または骨細胞（オステオサイト）、軟骨細胞（コンドロサイト）、脂肪細胞（アジブサイト）等のそれから発生する細胞、または腱で見出されるもの等の結合組織細胞の他の種類；神経幹細胞または、例えば、神経細胞（ニューロン）、星状神経膠細胞または稀突起神経膠細胞を含めたそれが生起させる細胞；上皮幹細胞または吸収細胞；ゴブレ細胞、パネス細胞、腸内分泌細胞等の上皮幹細胞から生起する細胞；皮膚幹細胞；表皮幹細胞；または小胞幹細胞を含む。一般に、限定されるものではないが、胚性幹細胞、成人幹細胞、多能性幹細胞を含めたいずれのタイプの幹細胞も用いることができる。

20

【0058】

それからgDNA試料が本発明で用いるのに得られる細胞は正常細胞、または特定の疾患または症状の1つ以上の徴候を呈する細胞であり得る。かくして、本発明の方法で用いるgDNAを癌細胞、新形成細胞、壊死細胞等から得ることができる。当業者であれば、S A ambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001)またはAusuben et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1998)に記載されたもの等の当該分野で既知の方法を用いて細胞、流体または組織からgDNAを単離するための方法を知っているか、またはそれを容易に決定することができる。

30

【0059】

本発明の方法は、さらに、特定のタイプの細胞または組織を単離する工程を含むことができる。集団中の他の細胞から特定の細胞を単離するために本発明の方法で用いることができる例示的方法は、限定されるものではないが、例えば、Shapiro, Practical Flow Citemetry, 第三版 Wiley-Liss (1995)に記載された蛍光活性化細胞分類(FACS)；密度勾配遠心、顕微鏡の援助を借りたミクロ操作方法を用いる手動分離を含む。本発明で有用な例示的細胞分離デバイスは、限定されるものではないが、Beckman JE-6遠心浄化システム、Beukman Coulter EPICS ALTRAコンピュータ-制御フローサイトメーター-セルソーター、Cytomation, Inc.からのモジュラーフローサイトメーター、コールターカウンタオーおよびチャネライザーシステム、密度勾配装置、細胞遠心、

40

50

Beckman J - 6 遠心機、EPICS Vデュアルレーザーセルソーター、またはEPICS PROFILEフローサイトメーターを含む。細胞の組織または集団を、外科的技法によって取り出すこともできる。例えば、腫瘍または腫瘍からの細胞を外科的方法によって組織から取り出すことができ、あるいは逆に、非癌性細胞を腫瘍の近隣から取り出すことができる。後にさらに詳細に記載するもの等の方法を用い、本発明を用いて、例えば、同一個体から、または異なる個体から単離した癌性および非癌性細胞を含めた異なる細胞に関して型決定可能な遺伝子座を比較することができる。

#### 【0060】

DNAを含有する細胞を溶解させることによって、本発明の方法で用いるためにgDNAを調製することができる。典型的には、実質的に細胞のgDNAの完全性を保持する条件下で細胞を溶解させる。特に、アルカリ性pHへの細胞の曝露を用いて、比較的少ない損傷をgDNAに引き起こしつつ、本発明の方法で細胞を溶解させることができる。例えば、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム等を含めた種々の塩基性化合物のいずれかを溶解で用いることができる。加えて、比較的損傷していないgDNAは、細胞壁を分解する酵素によって溶解された細胞から得ることができる。天然でまたは酵素除去により細胞壁を欠く細胞は浸透圧応力への曝露によって溶解させることもできる。細胞を溶解するのに用いることができる他の条件は洗剤への曝露、機械的破壊、音波処理加熱、フレンチプレスデバイスにおけるような圧力差、またはDounceホモゲナイゼーションを含む。例えば、ヌクレアーゼ阻害剤、キレート化剤、塩緩衝液等を含めたgDNAを安定化させる剤を細胞溶解物または単離されたgDNA試料に含ませることができる。細胞を溶解させてgDNAを得るための方法は、例えば、Sambrook et al., 前掲(2001)またはAusubel et al., 前掲(1998)に記載されている当該分野で既知の条件下で行うことができる。

#### 【0061】

本発明の特別な実施形態において、gDNAを含有する粗製細胞溶解物を、gDNAのさらに別の単離なくして、直接的に増幅または検出することができる。別法として、gDNAは、増幅または検出に先立って他の細胞構成要素からさらに単離することができる。従って、本発明の検出または増幅方法は、精製されたまたは部分的に精製されたgDNAで行うことができる。ゲノムDNAは、例えば、液相抽出、沈殿、固相抽出、クロマトグラフィー等を含めた公知の方法を含めた単離することができる。その方法は、しばしばミニプレブといわれ、例えば、Sambrook et al., 前掲(2001)またはAusubel et al., 前掲(1998)に記載されており、あるいは例えば、Qiagen (Vanencia, CA)またはPromega (Madison, WI)を含めた種々の市販元から入手できる。

#### 【0062】

ゲノム断片の増幅された表示的集団は、ゲノムDNA (gDNA) テンプレートを複製して、各コピーされた配列の相対的割合が元のgDNAにおけるその割合と実質的に同一である1つ以上のコピーを生じる条件下で天然ゲノムを増幅することによって供することができる。かくして、本発明の方法は、天然ゲノムを表示的に増幅する工程を含むことができる。配列独立的にゲノムDNAを複製する種々の方法のいずれかを本発明で用いることができる。

#### 【0063】

本発明の方法を用いて、少数のゲノムコピーからゲノム断片が上記増幅された断片が増幅された表示的集団を生じさせることができる。従って、例えば、低い豊富さ、バイオプシー拘束または高いコストのため比較的少数の細胞を有する同一組織試料または他の試料をゲノム - 幅スケールで遺伝子型分類または評価することができる。本発明の方法を用いて、例えば、単一細胞から得られた単一天然ゲノムコピーからの上記ゲノム断片の増幅された表示的集団を生じさせることができる。本発明の他の例示的实施形態において、天然ゲノム断片の増幅された表示的集団を、限定されるものではないが、約1,000コピー(ヒトゲノムについては、ほぼ3ナノグラムのDNA)以下、10,000コピー以下、

$1 \times 10^5$  コピー (ヒトゲノムについてはほぼ 300 ナノグラムの DNA) 以下、 $5 \times 10^5$  コピー以下、 $1 \times 10^6$  コピー以下、 $1 \times 10^8$  コピー以下、 $1 \times 10^{10}$  コピー以下、または  $1 \times 10^{12}$  コピー以下を含めた非常に多数の天然ゲノムコピーから生じさせることができる。

#### 【0064】

本発明で表示的に増幅される DNA 試料は上記したもの、またはミトコンドリア DNA 等の他の DNA テンプレート、またはゲノム DNA の一部のサブセット等のゲノムであり得る。ゲノム DNA のサブセットの 1 つの非限定的例は、1 つの特別な染色体または特定の染色体の 1 つの領域である。一般に、本発明で用いる増幅方法は、テンプレート核酸にハイブリダイズして、ハイブリダイゼーション複合体を形成する少なくとも 1 つのプライマー核酸、ヌクレオチド三リン酸 (NTP)、および NTP をプライマーの 3' ヒドロキシルと反応させ、それによりテンプレートの少なくとも一部を複製することによってプライマーを修飾するポリメラーゼを用いて行うことができる。例えば、PCR ベースの方法は、一般には、DNA テンプレート、2 つのプライマー、dNTP および DNA ポリメラーゼを利用する。かくして、本発明の典型的な全ゲノム増幅方法においては、ゲノム DNA 試料は、上記したもの等の増幅構成要素を含む反応混合物と共にインキュベートし、上記ゲノム断片の増幅された表示的集団が形成される。

#### 【0065】

本発明の方法で用いるプライマーは、それが、配列特異性を持つテンプレート核酸にハイブリダイズする能力を有し、かつテンプレートの複製に参画することができる限り、種々の組成物またはサイズのいずれかを有することができる。例えば、プライマーは、天然構造またはそのアナログを有する核酸であり得る。天然構造を持つ核酸は、一般には、ホスホジエステル結合を含有する骨格を有し、例えば、デオキシリボ核酸またはリボ核酸であり得る。アナログの構造は、限定されるものではないが、ホスホルアミダイト (例えば、Beaucage et al., Tetrahedron 49 (10): 1925 (1993) およびその中の文献; Letsinger, J. Org. Chem. 35: 3800 (1970); Sprinzl et al., Eur. J. Biochem. 81: 579 (1977); Letsinger et al., Nucl. Acids Res. 14: 3487 (1986); Sawai et al., Chem. Lett. 805 (1984); Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110: 4470 (1988); および Pauwels et al., Chimica Scripta 26: 141 (1986) 参照)、ホスホロチオエート (例えば、Mag et al., Nucleic Acids Res. 19: 1437 (1991); および米国特許第 5,644,048 号参照)、ホスホロジチオエート (例えば、Briu et al., J. Am. Chem. Soc. 111: 2321 (1989) 参照)、O-メチルホスホロアミダイト結合 (例えば、Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press 参照)、およびペプチド核酸骨格および結合 (例えば、Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114: 1895 (1992); Meier et al., Chem. Int. Ed. Engl. 31: 1008 (1992); Nielsen, Nature, 365: 566 (1993); Carlsson et al., Nature 380: 207 (1996 参照) を含めた別の骨格を有することができる。他のアナログ構造は陽性骨格 (例えば、Denpcy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097 (1995) 参照); 非イオン性骨格 (例えば、米国特許第 5,386,023 号、第 5,637,684 号、第 5,602,240 号、第 5,216,141 号および第 4,469,863 号; Kiedrowski et al., Angew. Chem. Intl. Ed. English 30: 423 (1991); Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc. 110: 4470 (1988); Letsinger et al., Nucleoside & Nucleotide 1

10

20

30

40

50

3:1597(1994); Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, 「Carbohydrate Modifications in Antisense Research」, Y. S. Sanghui and P. Dan Cook 編; Mesmaeker et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Left. 4:395(1994); Jeffs et al., J. Biomolecular NMR 34:17(1994); Tetrahedron Lett. 37:743(1996) 参照) および、例えば、米国特許第5,235,033号および第5,034,506号、および Chapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, 「Carbohydrate Modifications in Antisense Research」, Y. S. Sanghui and P. Dan Cook 編に記載されたものを含めた非リボース骨格を持つものを含む。1つ以上の炭素環糖を含有するアナログ構造も上記方法で有用であり、例えば、Jenkins et al., Chem. Soc. Rev. (1995) pp 169-176に記載されている。本発明で有用な一部の他のアナログ構造は Rawls, C & E News Jun. 2, 1997 page 35 に記載されている。

10

#### 【0066】

本発明で有用なアナログ構造を持つ核酸のさらに別の例はペプチド核酸(PNA)である。PNAの骨格は、天然に生じる核酸の高度に荷電されたホスホジエステル骨格とは対照的に、中性条件下で実質的に非イオン性である。これは、2つの非限定的利点を供する。まず、PNA骨格は改善されたハイブリダイゼーションキネティクスを呈する。第二に、PNAは、ミスマッチ vs パーフェクトマッチした塩基対のための融解温度(T<sub>m</sub>)のより大きな変化を有する。DNAおよびRNAは、典型的には、内部ミスマッチに関してT<sub>m</sub>の2~4で降下を呈する。非イオン性PNA骨格では、上記降下は7~9により近い。これは、良好な配列区別を提供することができる。同様に、それらの非イオン性性質のための、これらの骨格に付着した塩基のハイブリダイゼーションは塩濃度に対して比較的非感受性である。

20

#### 【0067】

本発明で有用な核酸は骨格に非天然の糖部分を含むことができる。例示的な糖は、限定されるものではないが、ハロゲン、アルキル、置換されたアルキル、アルカリール、アラキル、O-アルカリールまたはO-アラキル、SH、SCH<sub>3</sub>、OCN、Cl、Br、CN、CF<sub>3</sub>、OCF<sub>3</sub>、SOCH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、ONO<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリール、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換されたシリル等の付加などの2'修飾を含む。同様な修飾を糖上の他の位置、特に、3'末端ヌクレオチドの糖の3'位置、または2'-5'連結オリゴヌクレオチドおよび5'末端ヌクレオチドの5'位置で行うこともできる。

30

#### 【0068】

本発明で用いる核酸は天然または非天然塩基を含むこともできる。この点について、天然デオキシリボ核酸はアデニン、チミン、シトシンまたはグアニンよりなる群から選択される1つ以上の塩基を有することができる、リボ核酸はウラシル、アデニン、シトシンまたはグアニンよりなる群から選択される1つ以上の塩基を有することができる。天然骨格またはアナログ骨格を有するかを問わず、核酸に含めることができる例示的非天然塩基は、限定されるものではないが、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシン、イソグアニン、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシン、2-アミノアデニン、6-メチルアデニン、6-メチルグアニン、2-プロピルグアニン、2-プロピルアデニン、2-チオウラシル、2-チオチミン、2-チオシトシン、15-ハロウラシル、15-ハロシトシン、5-プロピニルウラシル、5-プロピニルシトシン、6-アゾウラシル、6-アゾシトシン、6-アゾチミン、5-ウラシル、4-チオウラシル、8-ハロアデニンまたはグアニン、8-アミノアデニンまたはグアニン、8-チオールアデニンまたはグアニン、8-チオアルキルアデニンまたはグアニン、8-ヒドロキシアデニンまたはグ

40

50

アニン、5 - ハロ置換ウラシルまたはシトシン、7 - メチルグアニン、7 - メチルアデニン、8 - アザグアニン、8 - アザアデニン、7 - デアザグアニン、7 - デアザアデニン、3 - デアザグアニン、3 - デアザアデニン等を含む。特別な実施形態は核酸においてイソシトシンおよびイソグアニンを利用して、一般的には、米国特許第 5, 681, 702 号に記載されたように非特異的ハイブリダイゼーションを低下させることができる。

【0069】

本発明の核酸で用いる非天然塩基は不偏的な塩基対合活性を有することができ、ここに、それはいずれかの他の天然に生じる塩基とで塩基対合することができる。普遍的な塩基対合活性を有する例示的塩基は 3 - ニトロピロールおよび 5 - ニトロインドールを含む。用いることができる他の塩基は、その塩基がシトシン、アデニンまたはウラシルと対合するイノシン等の天然に生じる塩基のサブセットにて塩基対合活性を有するものを含む。

10

【0070】

修飾されたまたはアナログ構造を有する核酸は本発明で用いて、例えば、標識の付加を容易としまたは増幅条件または本発明に従って用いられる他の条件下で分子の安定性または半減期を増加させることができる。当業者に理解されるように、例えば、天然またはアナログ構造を持つ分子を含めた混合物として、上記核酸の 1 つ以上を本発明で用いることができる。加えて、本発明で用いられる核酸プライマーは、以下に記載するもの等の本発明で用いる特定の増幅技術に関して望まれる構造を有することができる。

【0071】

特別な実施形態において、本発明で有用な核酸は検出部分を含むことができる。検出部分を用いて、例えば、後に記載するもの等の方法を用い、上記ゲノム断片の増幅された表示的集団の 1 つ以上のメンバーを検出することができる。検出部分は、例えば、一次標識との直接的または間接的相互作用を介して、間接的に検出することができる直接的に検出可能なまたは二次的標識である一次標識であり得る。例示的一次標識は、限定されるものではないが、天然に生じる少量の放射性または安定同位元素等の同位体標識；クロモフォア；ルミノフォア；フルオロフォア；比色剤；磁気物質；金属等の電子 - 豊富材料；Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>等のエレクトロケミルミネセント標識；または核磁気、常磁性、電気、質量に対する電荷、または熱的特徴に基づいて検出することができる部分を含む。本発明で有用なフルオロフォアは、例えば、ユーロピウムおよびテルビウムのそれを含めた蛍光ランタノイド錯体、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチル - クマリン、ピレン、マラカイトグリーン、Cy3、Cy5、スチルレン、ルシフェールイエロー、カスケードブルー<sup>TM</sup>、テキサスレッド、アレクサ色素、フィコエリスリン、ボジビ、およびHaugland, Molecular Probs Handbook, (Eugene, OR) 第六版；Synthegenカタログ(Houston, TX.), Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 第二版, Plenum Press New York (1999)、またはWO 98/59066に記載されたもの等の当該分野で既知の他のものを含む。標識はホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリ性ホスファターゼ、あるいは磁気粒子または光学的にコードされたナノ粒子等の酵素を含むこともできる。

20

30

40

【0072】

例示的二次標識は結合部分である。結合部分を核酸に付着させて、受容体に対する特異的親和性を介する核酸の検出または単離を行うことができる。2つの結合パートナーの間の特異的親和性は、系における他の構成要素または汚染物に対するパートナーの結合と比較したさらに別のパートナーに対する1つのパートナーの優先的結合を意味する。特異的に結合した結合パートナーは、典型的には、非特異的結合を除去するための洗浄工程を含めた、本明細書中に記載した検出または分離条件下で結合したままである。用いる特定の結合条件に依存して、対の解離定数は、例えば、約 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-1}$ 、または $10^{-12}$  M<sup>-1</sup>未満であり得る。

50

## 【 0 0 7 3 】

本発明で用いることができる結合部分および受容体の例示的対は、限定されるものではないが、抗原および免疫グロブリンまたはF A b等のその活性断片；免疫グロブリンおよび免疫グロブリン（または各々、活性断片）；アビジンおよびビオチン、またはイミノ・ビオチン等のアビジンに対する特異性を有するそのアナログ；ストレプトアビジンおよびビオチン、またはイミノ・ビオチン等のストレプトアビジンに対する特異性を有するそのアナログ；炭水化物およびレクチン；および他の公知の蛋白質およびそれらのリガンドを含む。上記した対におけるいずれかのパートナーは核酸に結合させ、各パートナーへの結合に基づいて検出または単離することができるのが理解されよう。さらに、核酸に結合させることができる一部の部分は本発明の方法で一次および二次双方の標識として機能することができるのが理解されよう。例えば、ストレプトアビジン・フィコエリスリンはフィコエリスリン部分からの蛍光による一次標識として検出することができるか、あるいはそれは、シグナル増幅方法に関して後にさらに詳細に記載するように、抗ストレプトアビジン抗体に対するその親和性により二次標識として検出することができる。

10

## 【 0 0 7 4 】

特別な実施形態において、二次標識は化学的に修飾することができる部分であり得る。この実施形態において、反応性官能基を有する標識は核酸に取り込むことができる。官能基は、引き続いて、一次標識と共有結合反応させることができる。適切な官能基は、限定されるものではないが、アミノ基、カルボキシ基、マレイミド基、オキシ基およびチオール基を含む。結合部分は、g D N Aの増幅で用いられるプライマーに付着させる場合に特に有用であり得る。そのようなプライマーで生じたゲノム断片が上記増幅された表示的な集団を上記結合部分を介してアレイに付着させることができる。さらに、結合部分が、増幅された断片を増幅反応の他の構成要素から分離し、上記ゲノム断片の増幅された表示的な集団を濃縮し、あるいはアレイ上の捕獲プローブに結合した場合、ゲノム断片の増幅された表示的な集団の1つ以上のメンバーを検出するのに有用であり得る。付着した結合部分を有する核酸分子のための例示的分離および検出方法を以下にさらに詳しく記載する。

20

## 【 0 0 7 5 】

結合部分、検出部分またはいずれかの他の有用な部分を、当該分野で既知の方法を用い、増幅されたゲノム断片等の核酸に付着させることができる。例えば、核酸を増幅するのに用いられるプライマーは核酸またはそのアナログにおける塩基、リボース、リン酸、または類似の構造に付着した部分を含むことができる。特別な実施形態において、例えば、増幅または検出工程の間に、成長するヌクレオチドストランドに付加される修飾されたヌクレオチドを用いて部分を一体化させることができる。ヌクレオチドは、例えば、塩基またはリボース、または核酸アナログにおける類似の構造において修飾することができる。かくして、本発明の方法は、上記した1つ以上の修飾を有する上記ゲノム断片の増幅された表示的な集団を生じさせるためにゲノム断片を標識する工程を含むことができる。本発明の方法でg D N Aを増幅するのに用いることができる核酸プライマーは、十分な安定性および特異性をもってテンプレートg D N Aを結合させて、ポリメラーゼ複製活性の起点とすることができるいずれかの長さである相補的配列を含むことができる。相補的配列は増幅で用いられるプライマーの全てまたは一部を含むことができる。本発明の方法において増幅で用いられるプライマーの相補的配列の長さは、一般には、g D N Aテンプレート上の起点部位の間の距離に逆比例する。かくして、増幅は、例えば、長さが多くとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500ヌクレオチドを含む比較的短い相補的配列を有するプライマーで行うことができる。

30

40

## 【 0 0 7 6 】

当業者であれば、ハイブリダイゼーションの特異性は、一般には、核酸プライマーの長さが増大するにつれ増大することを理解するであろう。かくして、より長い核酸プライマーを用いて、例えば、所望であれば、複製の特異性または再現性を増加させることができ

50

る。従って、本発明の方法で用いる核酸は少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500以上のヌクレオチド長であり得る。当業者であれば、本発明で用いる核酸プローブは上記した例示的長さのいずれを用いることもできることを理解するであろう。

#### 【0077】

本発明で用いることができる全ゲノム増幅に対する2つの一般的アプローチは、ユニバーサルPCRによって増幅可能なゲノム表示のランダム起点増幅または創製の一部の形態の使用を含む。ランダム起点増幅についての例示的技術は、限定されるものではないが、PEP-PCRまたはDOP-PCR等のPCRに基づくもの、またはランダム-プライマーの増幅等のストランド-置き換え増幅に基づくものを含む。ユニバーサルPCRによって増幅可能なゲノム表示を創製する例示的方法は、例えば、Lucito et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 4487-4492 (1998)に記載されている。ゲノム表示の1つの実行は、gDNAの制限消化を介して短いゲノムインサート(例えば、30~2000塩基)を作り出し、アダプター連結によってユニバーサルPCRテイルを加えることである。典型的には、gDNAの増幅または検出は、gDNAテンプレートの異なる部分にハイブリダイズする核酸の集団で行われる。本発明で用いる核酸の集団は、配列のランダムまたはセミ-ランダム相補体を有するメンバーを含むことができる。かくして、核酸の集団は固定された配列長さを持つメンバーを有することができ、そこでは、配列に沿った1つ以上の位置が集団内でランダム化されている。その例として、12量体プライマーの集団は、4つの天然DNAヌクレオチドのうちのいずれかが組み込まれ、それにより、4つの異なるプライマーメンバーを有する集団が生じる1つの特別な位置、例えば、位置5を除いて同一である配列を有することができる。特別な実施形態において、配列に沿った複数位置は組合せによりランダム化することができる。例えば、核酸プライマーはランダム化された2、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100以上の位置を有することができる。例えば、4つの可能な天然DNAヌクレオチドにて各位置がランダム化された12量体プライマーは $4^{12} = 1.7 \times 10^7$ メンバーまでを含むであろう。

#### 【0078】

特別な実施形態において、本発明で用いる核酸の集団は、合理的アルゴリズムまたはプロセスに基づいて設計された配列を持つメンバーを含むことができる。同様に、核酸の集団は、各々が、合理的アルゴリズムまたはプロセスに基づいて設計されたそれらの配列の少なくとも一部を有するメンバーを含むことができる。合理的設計アルゴリズムまたはプロセスを用いて、区別される配列を有する核酸生成物の合成を指令し、または優先的に特定の配列を含むよう偏った核酸混合物の合成を指令することができる。

#### 【0079】

合理的設計方法を用い、集団における核酸についての配列を、例えば増幅すべき、または検出すべきgDNA中の既知の配列に基づいて選択することができる。上記配列は、集団が、所望の範囲を持つgDNAにハイブリダイズする配列を優先的に含むように選択することができる。例えば、プライマーの集団は、コーディング領域または非コーディング領域のような特定の染色体またはgDNAの一部にハイブリダイズするメンバーを優先的に含むよう設計することができる。また、核酸の集団の他の特性を選択して、相互から所望の平均の最小または最大長さにおけるgDNA配列に沿った位置で優先的なハイブリダイゼーションを達成するように選択することもできる。例えば、プライマーの長さは、gDNA配列に沿って相互から少なくとも約64、256、1000、4000、16000以上の塩基ごとにおいてハイブリダイズし、起点となるよう選択することができる。

#### 【0080】

また、本発明で有用な核酸は、例えば、Aluリピートを含めた既知のリピートまたは反復的エレメント等の、増幅または検出すべきgDNA中の特定の配列にハイブリダイズする配列を優先的に省略または低下させるよう設計することもできる。従って、任意の -



プライマー増幅で用いられるもの等の単一プローブまたはプライマーは、特定の配列を含み、またはそれを排除するよう設計することができる。同様に、ランダムプライマー増幅で用いるプライマーの集団等の、プローブまたはプライマーの集団は、A L uリビート等の特定の配列を優先的に排除し、または含むように合成することができる。また、ランダムプライマーの集団は、A および T ヌクレオチドと比較して、より高い含有量の G および / または C ヌクレオチドを優先的に含むように合成することもできる。得られたランダムプライマー集団は G C が豊富であって、従って、非コーディング g D N A 領域よりも高い G C 含有量を典型的には有するヒトゲノムの遺伝子コーディング領域等のゲノムの高 G C 領域にハイブリダイズするより高い確率を有する。逆に、A T が豊富なプライマーは、ヒトゲノムの非コーディング領域等の A T が豊富な領域を優先的に増幅し、またはそれにア

ニールするように合成することができる。核酸の設計に影響されるために用いることができる他のパラメーターは、そこでプライマーダイマーの形成の傾向があるまたは、ヘアピン形成、または所望の最大、最小または平均 T m を有する配列の優先的選択の傾向がある、例えば、プライマー自身を相補的にする配列の優先的除去を含む。プローブを設計するために本発明で用いることができる例示的方法およびアルゴリズムは、U S 2 0 0 3 / 0 0 9 6 9 8 6 A 1 に記載されているものを含む。

10

20

30

40

50

#### 【0081】

ランダムプライマーの集団中のプライマーは、ユニバーサルテイルのような同一配列の領域を有することができる。ユニバーサルテイルは、その後の増幅工程のためのユニバーサルプライミング部位、または増幅された配列を単離し、または検出するのに有用な特定の結合剤にアニールする部位を含むことができる。ユニバーサルテイルを持つランダムプライマーの集団を作成し、それを用いる方法は、例えば、Singer et al., Nuc l . A c i d . R e s . 2 5 : 7 8 1 - 7 8 6 ( 1 9 9 7 ) または Grothues et al., Nuc l . A c i d s R e s . 2 1 : 1 3 2 1 - 2 ( 1 9 9 3 ) に記載されている。

#### 【0082】

当業者であれば、プローブ等の本発明で用いる種々の核酸のいずれも1つ以上の特性を有することができるか、あるいはプライマーとの関係で供された例を含めて上記したように、それを作り出すことができる。

#### 【0083】

ゲノムを増幅するための本発明の方法は、ゲノム D N A を表示的に増幅するための条件下で、g D N A をポリメラーゼと接触させる工程を含むことができる。本発明の方法における増幅で用いられるポリメラーゼのタイプおよび条件は、所望の長さを有するゲノム断片を得るように選択することができる。特別な実施形態において、例えば、低反応促進性のポリメラーゼで g D N A を増幅されることによって、あるいはエンドヌクレアーゼまたは化学剤等の核酸切断剤で g D N A テンプレートまたはその増幅生成物を断片化することによって、比較的小さな断片を本発明の方法で得ることができる。例えば、本発明の方法を用いて、限定されるものではないが、長さが多くとも約 1 0 k b、5 k b、4 k b、3 k b、2 k b、1 k b、0 . 8 k b、0 . 6 k b、0 . 5 k b、0 . 4 k b、0 . 2 k b、または 0 . 1 k b である上記ゲノム断片の増幅された表示的集団を得ることができる。

#### 【0084】

別の実施形態において、本発明の方法を用いて、g D N A を増幅し、比較的大きなゲノム D N A 断片を形成することができる。そのような実施形態によると、本発明の方法を用いて、長さが少なくとも約 1 0 k b、1 5 k b、2 0 k b、2 5 k b、3 0 k b 以上である上記ゲノム断片の増幅された表示的集団を得ることができる。

#### 【0085】

比較的に小さなサイズを有するゲノム断片を含めた増幅された表示的集団は、例えば、低反応促進性のポリメラーゼで g D N A を増幅することによって得ることができる。本発明の方法で用いる低反応促進性ポリメラーゼは、重合事象当たり 1 0 0 塩基未満を合成することができる。所望であれば、増幅の条件下にて、重合事象当たり 5 0、4 0、3 0、

20、10または5未満の塩基を合成するポリメラーゼを用いることによって、より短い断片を得ることができる。増幅のために低反応促進性ポリメラーゼを用いる非限定的利点は、比較的小さな断片が得られ、それにより、核酸アレイへの効果的なハイブリダイゼーションが可能となることである。低反応促進性ポリメラーゼは、断片化されたゲノム試料を増幅するのに特に有用であり得る。後に記載するように、個々の分析の特に有用な方法は、例えば、プローブのアレイ中の区別される位置における断片の捕獲を含むことができる。

#### 【0086】

特別な実施形態において、変性されたまたは一本鎖のゲノムDNAテンプレートは、本発明の方法において低反応促進性ポリメラーゼを用いて増幅することができる。gDNAテンプレートは、例えば、熱、ヘリカーゼ等の酵素、塩または洗剤等の化学剤、pHなどによって変性することができる。低反応促進性が可能であって、本発明でgDNAを増幅するのに有用な例示的ポリメラーゼは、限定されるものではないがTaqポリメラーゼT4ポリメラーゼ、(ベクターサブユニットを欠く)「モノマー」E.coli Pol III、またはE.coli DNA Pol Iまたはクレノウポリメラーゼとして既知のその5'ヌクレアーゼ結合断片を含む。

#### 【0087】

本発明は、さらに、gDNAテンプレートが変性されない条件下で増幅が起こる実施形態を提供する。例示的な条件は、単離されたゲノムDNAが実質的に二本鎖でとどまる温度である。DNAの高温変性が必要とされない条件は、典型的には、等温条件という。ゲノムDNAは、ストランド置き換え活性を有するポリメラーゼを用いて本発明における等温条件下で増幅することができる。特別な実施形態において、低反応促進性およびストランド置き換え活性双方を有するポリメラーゼを用いて、上記ゲノム断片の増幅された表示的集団を得ることができる。低反応促進性およびストランド置き換えが可能な例示的ポリメラーゼは、限定されるものではないが、E.coli Pol I、exo<sup>-</sup>クリノウポリメラーゼまたは配列決定グレードのT7 exo<sup>-</sup>ポリメラーゼを含む。

#### 【0088】

一般に、例えば、反応促進性およびストランド置き換え活性を含めたポリメラーゼ活性は、pH、温度イオン強度、および緩衝液の組成のような因子によって影響され得る。当業者であれば、例えば、Eun, Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology, Academic Press, San Diego (1996)に記載されたポリメラーゼの活性に関して何が既知であるかを考慮して、いずれのタイプのポリメラーゼおよび条件を用いて所望の長さを有する断片を得ることができるかを知っており、あるいはゲル電気泳動または質量分析等の公知のアッセイを用いる全体的テストによって適切なポリメラーゼおよび条件を決定して、増幅された断片の長さを測定することができる。

#### 【0089】

E.coli Pol Iまたはそのクレノウ断片を、例えば、約5および37の間の温度でインキュベートした低塩(I=0.085)反応において、小さなゲノムDNA断片を生じさせるためのゲノムの等温増幅で用いることができる。クレノウ断片でgDNAを増幅するのに用いることができる例示的な緩衝液およびpH条件は、例えば、37にて16時間インキュベートした50mMトリスHCl(pH7.5)、5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM NaCl、50μg/mlウシ血清アルブミン(BSA)、0.2mMの各dNTP、2μg(マイクログラム)ランダムプライマー(n=6)、10ng gDNAテンプレートおよび5ユニットのクレノウexo<sup>-</sup>を含む。1つ以上の反応成分を省略し、または置換する場合同様な反応条件を実行することができる。例えば、緩衝液を50mMリン酸塩(pH7.4)で置き換えることができるか、あるいは約7.0~7.8の範囲の他のpH値を用いることができる。増幅すべきgDNAテンプレートは、限定されるものではないが、本明細書中において先に記載したものを含めた種々の量のいずれかで供することができる。別の実施形態において、増幅の条件は、例えば、10ngのゲ

10

20

30

40

50

ノムDNAテンプレート、2 mMのdNTP、10 mMのMgCl<sub>2</sub>、0.5 U/μl (マイクロリットル)のポリメラーゼ、50 μM (マイクロモラー)のランダムプライマー (n = 6)、および37 °Cにおける16時間の等温のインキュベーションを含む。

#### 【0090】

特別な実施形態において、増幅反応は、例えば、最初のアニーリング工程、続く伸長工程を含めた二つの工程で行うことができる。例えば、95 °Cでの短時間のインキュベーションによって30 μlの10 mMトリス-HCl (pH 7.5)中で、10 ngのgDNAを100 μMのランダムプライマー (n = 6)でアニーリングすることができる。反応を室温まで冷却し、等用量の20 mMのトリス-HCl (pH 7.5)、20 mMのMgCl<sub>2</sub>、15 mMのジチオスレイトール、4 mMのdNTPおよび1 U/μlのクレノウex o - を添加し、37 °Cにて16時間インキュベートすることによってアニーリング工程を行うことができる。クレノウ-ベースの増幅を例示したが当業者であれば後に記載するもの等の他のポリメラーゼで行う増幅反応のために、別のアニーリングおよび伸長工程を用いることができるのを理解するであろう。

#### 【0091】

特別な実施形態において、異なる長さ (n) のランダムアニーリング領域を有するプライマーをクレノウ-ベースの増幅方法で置き換えることができる。例えば、上記例示の条件におけるn = 6ランダムプライマーを、限定されるものではないがn = 7, 8, 9, 10, 11つまたは12ヌクレオチドを含めた他のランダム配列長さを有するプライマーで置き換えることができる。再度、クレノウ-ベースの増幅に関して例示したが、当業者であれば、後に記載するもの等の他のポリメラーゼで行う増幅反応のために異なるランダム配列長さ (n) を有するランダムプライマーを用いることができるのを理解するであろう。

#### 【0092】

T4 DNAポリメラーゼは、例えば、50 mMのHEPES pH 7.5、50 mMのトリス-HCl pH 8.6、または50 mMのグリシネートpH 9.7中での一本鎖または変性gDNAの増幅で用いることができる。また、典型的な反応混合物は、37 °Cにて少なくとも一時間インキュベートする50 mMのKCl、5 mMのMgCl<sub>2</sub>、5 mMのジチオスレイトール (DTT)、40 μg/mlのgDNA、0.2 mMの各dNTP、50 μg/mlのBSA、100 μMのランダムプライマー (n = 6) および10ユニットのT4ポリメラーゼを含むことができる。温度をサイクルさせて、複数ラウンドの増幅用の複製ストランドを置き換えることができる。

#### 【0093】

T7ポリメラーゼは、典型的には、高度に反応促進性であり、テンプレートDNAからの解離前の数千のヌクレオチドの重合を可能とする。T7ポリメラーゼは高度に反応促進性である典型的な反応条件が40 mMのトリス-HCl pH 7.5、15 mMのMgCl<sub>2</sub>、25 mMのNaCl、5 mMのDTT、0.25 mMの各dNTP、50 μg/mlの一本鎖gDNA、100 μMのランダムプライマー (n = 6) および0.5 ~ 1ユニットのT7ポリメラーゼである。しかしながら、37 °C未満の温度では、T7ポリメラーゼの反応促進性は大いに低下する。T7ポリメラーゼの反応促進性は、高いイオン強度、例えば、100 mMのNaClを超えてはやはり低下し得る。形態IIのT7ポリメラーゼは、典型的には、二本鎖DNAを増幅することができる。しかしながら、形態IのT7ポリメラーゼおよび修飾されたT7ポリメラーゼ (28アミノ酸領域Lys 118 ~ Arg 145を欠くSEQUENASE<sup>TM</sup>バージョン2.0) はストランド置き換え複製を触媒することができる。従って、小さなゲノム断片は、上記したもののような修飾されたT7ポリメラーゼまたは修飾された条件を用いる本発明の方法で増幅することができる。特別な実施形態において、増大したストランド置き換えのために、E. coli一本鎖結合蛋白質 (SSB) の存在下でSEQUENASE<sup>TM</sup>を用いることができる。また、SSBを用いて、所望であれば、SEQUENASE<sup>TM</sup>の反応促進性を増加させることもできる。

10

20

30

40

50

## 【0094】

Taqポリメラーゼは、10倍モル過剰のテンプレートおよびランダムプライマー（ $n = 6$ ）と反応させる場合、70 程度の温度で高度に反応促進性である。これらの条件下で行う増幅反応は、さらに、約20mMのトリス HCl、約7のpH、約1~2mMのMgCl<sub>2</sub>、および0.2mMの各dNTP等の緩衝液を含むことができる。加えて、グリセロール、ゼラチン、BSAまたは非イオン性洗剤等の安定化剤を加えることができる。Taqポリメラーゼは70 未満の温度にて低い反応促進性を有する。したがって、gDNAの小さな断片は、本発明の方法において、あるいはTaqが低い反応促進性を有するさらに別の条件において、低温でTaqポリメラーゼを用いて得ることができる。さらに別の実施形態において、TaqポリメラーゼのN-末端289アミノ酸残基を欠き、75 10にて低い反応促進性を有するStoffel断片を用いて、本発明の方法において、比較的小さなgDNA断片を生じさせることができる。Taqを用いて、本発明の方法において、一本鎖または変性DNAテンプレートを増幅することができる。温度をサイクルさせて、複数ラウンドの増幅のために、複製ストランドを置き換えることができる。

## 【0095】

当業者であれば、上記した種々のポリメラーゼでの増幅のための条件は例示であることを理解するであろう。かくして、実質的に活性を変化させない些細な変化を行うことができる。さらに、条件を実質的に変化させて、所望の増幅活性を達成し、または本発明の特別な適用に適合させることができる。

## 【0096】

本発明は、上記したポリメラーゼの変異型がポリメラーゼ活性を保持する限り、それらで行うこともできる。例示的な変異型は、限定されるものではないが、減少したエキソヌクレアーゼ活性、増加した忠実度、増大した安定性、またはヌクレオシドアナログに対する増大した親和性を有するものを含む。例示的な変異型ならびに本発明の方法でいうような他のポリメラーゼは、限定されるものではないがバクテリオファージphi29 DNAポリメラーゼ（米国特許第5,198,543号および第5,001,050号）、exo(-)Bca DNAポリメラーゼ（Walker and Linn, Clinical Chemistry 42:1604-1608 (1996)）、ファージM2 DNAポリメラーゼ（Matsumono et al., Gene 84:247 (1989)）、ファージphiPRD1 DNAポリメラーゼ（Jung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8287 (1987)）、exo(-)VENT<sup>TM</sup> DNAポリメラーゼ（Knog et al., J Biol. Chem. 268:1965-1975 (1993)）、T5 DNAポリメラーゼ（Chatterjee et al., Gene 97:13-19 (1991)）、およびPRD1 DNAポリメラーゼ（Zhu et al., Biochim. Biophys. Acta. 1219:267-276 (1994)）を含む。

## 【0097】

本発明の方法で有用なさらなるポリメラーゼ変異型は、その野生型未修飾バージョンと比較すると、核酸の3'末端へ非テンプレート指向性ヌクレオチドを加える低下したまたは排除された能力を有する修飾されたポリメラーゼである。例示的な変異型は、全てのタイプのヌクレオチドまたはピリミジンヌクレオチド、プリンヌクレオチド、A、C、T、UまたはG等の1つ以上のタイプのヌクレオチドを加えることに向けられたポリメラーゼの活性に影響するものを含む。修飾は、ポリメラーゼ中のアミノ基の化学的修飾、またはアミノ酸の欠失、付加または置換等の配列突然変異を含むことができる。核酸の3'末端に非テンプレート指向性ヌクレオチドを加える低下したまたは排除された能力を有する修飾されたポリメラーゼの例は、例えば、米国特許第6,306,588号、またはYang et al., Nucleic Acids Res. 30:4314-4320 (2002)に記載されている。特別な実施形態において、そのようなポリメラーゼ変異型は、本明細書中に記載されたSBEまたはASPE検出方法で用いることができる。

## 【0098】

本発明の特別な実施形態において、ストランド置き換えポリメラーゼによって増幅すべき二本鎖を持つDNAをニッキング剤と反応させて、ゲノムDNAテンプレートの共有結合構造において単一のストランド破壊を生じさせることができる。gDNAテンプレート中への単一のストランド破壊の導入は、例えば、等温増幅において増幅効率または再現性を増加させるのに用いることができる。ニッキングは、例えば、ランダムプライマー増幅反応、または任意の起点増幅反応で用いることができる。一本鎖破壊を増幅反応に導入する非限定的利点は、それを熱変性の代わりに用いることができることである。熱変性は、例えば、Lage et al., Gene Res. 13:294-307 (2003)に記載されているように、ある種のランダム-起点増幅反応に対して有害である。この点に関して、gDNAテンプレートをニックする位置は、ポリメラーゼ活性のためのプライミング部位を提供することができる。かくして、gDNAをニッキング剤と接触させると、gDNAテンプレート中のプライミング部位の数を増加させることができ、それにより、増幅の効率を改善することができる。ニックの数またはニックの位置、あるいは双方は所望のニッキング活性レベルに好都合な特定の条件の使用あるいは配列特異的であるニッキング剤の使用によって影響され得る。かくして、ニッキング剤の使用は増幅の再現性を改善することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0099】

従って、本発明は、さらに、(a)単離された二本鎖ゲノムDNAを提供し；(b)上記二本鎖ゲノムDNAをニッキング剤と接触させ、それによりニックされた二本鎖ゲノムDNAを生じさせ；次いで、(c)上記ニックされた二本鎖ゲノムDNAをストランド置き換えポリメラーゼおよび複数のプライマーと接触させ、ここに、ゲノムDNAは増幅される工程を含む、ゲノムDNAを増幅する方法を提供する。上記したように、上記複数のプライマーは、例えば、ランダムプライマー増幅反応においてランダムプライマーの集団とすることができる。

#### 【0100】

本発明の方法で用いるニッキング剤は、第一の核酸ストランド中の隣接配列を連結する共有結合を切断し、隣接配列が同一相補ストランドにハイブリダイズした生成物を生じるいずれの物理的、化学的または生化学的存在でもあり得る。例示的ニッキング剤の例は、限定されるものではないが、DNAse I, N. Bst NBI, MuttH、またはバクテリオファージφ1の遺伝子II蛋白質等の一本鎖-ニッキング酵素；フリーラジカル等の化学試薬；または超音波を含む。

#### 【0101】

ニッキング剤は、上記剤を溶液中でgDNAと一緒に混合することによって二本鎖gDNAと接触させることができる。当業者であれば、例えば、Promega Corp. (Madison, Wisconsin)、またはRoche applied Sciences (Indianapolis, IN)等の種々の商業的供給業者から入手できるニッキング剤の活性に関して当該分野で既知であるものに基づいて、gDNAをニッキングするための適切な条件を知っているか、あるいはそれを決定することができる。化学的または生物学的ニッキング剤は、DNAとは異なる源からの由来するゲノムDNAに対して内因性であるものであり得る。別法として、その天然環境においてゲノムDNAと共に通常は見出されるニッキング剤を、本発明の方法でgDNAと接触させることができる。そのような内因性ニッキング剤を活性化させてそのニッキング活性を増加させることができるか、あるいはそれをゲノムDNAから単離し、引き続いて例えば、gDNAでのその天然環境と比較してより高い濃度にて、gDNAと混合することができる。ニッキング剤は、gDNAに対して内因性であろうが外因性であろうが、本発明の方法においてgDNAと接触させるに先立って単離することができる。

#### 【0102】

当業者であれば、上記ゲノム断片の増幅された表示的集団は新たに単離された試料、あるいは試料の完全性を保持するための適切な条件下で貯蔵されていたものから供することができる。かくして、本発明の方法で提供された試料は、当該剤がハイブリダイゼーショ

ンおよび検出工程、および本明細書中に記載された種々の実施形態で用いる他の工程に干渉しない限り断片を安定化剤を含むことができる。上記方法に干渉する安定化剤を試料に含める場合に断片は、公知の精製および分離方法を用いて剤から分離することができる。当業者であれば、例えば、Sambrook et al., 前掲(2001)およびAusubel et al., 前掲(1998)に記載された核酸を貯蔵するための当該分野で既知の条件に基づき、ゲノム断片の表示的集団を貯蔵するための適切な条件を知っているか、またはそれを容易に決定することができる。特別な実施形態において、gDNAは、加熱変性gDNAテンプレートでのランダムまたは変性オリゴヌクレオチド起点ポリメラーゼを利用する方法によって増幅することができる。例示的方法はプライマー伸長プレ増幅(PEP)として既知である。この技術は、ゲノムを通じてのコピーを開始させるためにTaq DNAポリメラーゼと組み合わせてランダム15-量体を用いる。この技術を用いて、例えば、Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5847-51(1992); Snabes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:6181-85(1995); またはBarrett et al., Nucleic Acids Res., 23:3488-92(1995)に記載された条件を用いて単一細胞と同程度に少ないものからゲノムDNAを増幅することができる。

10

#### 【0103】

本発明で有用なさらに別のgDNA増幅方法は、例えば、Grothues et al. Nucleic Acids Res. 21(5):1321-2(1993)に記載されたように、一定5'領域、続いて、ランダム3'領域を有する2-ドメインプライマーの集団を用いるタグ化PCRである。第一ラウンドの増幅を行って、ランダムに合成された3'領域からの個々のハイブリダイゼーションに基づいて、熱変性DNAについての開始の多重度を可能とする。3'領域の性質のため、開始の部位はゲノム全体を通じてランダムであろう。しかる後、未結合プライマーを除去することができ、一定5'領域に相補的なプライマーを用いて更なる複製が起こることができる。

20

#### 【0104】

本発明の方法でgDNAを増幅するのに用いることができる更なるアプローチは、例えば、Cheung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:14676-79(1996)または米国特許第5,043,272号によって記載された条件下での変性オリゴヌクレオチド起点ポリメラーゼ鎖反応(DOP-PCR)である。少量のgDNA、例えば、15pgのヒトgDNAを、本発明の方法で好都合には検出されるレベルまで増幅されることができる。Cheung et al.の方法で用いる反応条件は、ヒトゲノムの殆ど完全な範囲を有する上記ゲノム断片の増幅された表示的集団の生成に関して選択することができる。LL-DOP-PCR(Long Products from Low DNA quantities(低DNA量からの長い生成物)-DOP-PCR)として既知のプロトコルにおける、Kittler et al.によって記載されたもの等の、DOP-PCRのさらに別の修飾されたバージョンを用いて、本発明に従ってgDNAを増幅することができる(Kittler et al., Anal. Biochem. 300:237-44(2002))。

30

40

#### 【0105】

プライマー-伸長プレ増幅ポリメラーゼ鎖反応(PEP-PCR)を本発明の方法で用いてgDNAを増幅することもできる。PEP-PCRを用いるgDNAの増幅のための有用な条件は、例えば、Casas et al., Biotechniques 20:219-25(1996)に記載されたものを含む。

#### 【0106】

本発明の方法におけるgDNAの増幅を、変性されているgDNAテンプレートで行うこともできる。従って、本発明は、等温条件下でgDNAテンプレートから上記ゲノム断片の増幅された表示的集団の生成する工程を含むことができる。本発明の方法で用いることができる例示的等温増幅方法は、限定されるものではないが、Dean et al.,

50

, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:5261-66 (2002) に記載されているもの等の条件下での多重置き換え増幅(MDA)、または米国特許第6,214,587号に記載された等温ストランド置き換え核酸増幅を含む。本発明で用いることができる他の非PCR-ベースの方法は、例えば、Walker et al., Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press, Inc., 1995; 米国特許第5,455,166号および第5,130,238号、およびWalker et al., Nucl. Acids Res. 20:1691-96 (1992)に記載されているストランド置き換え増幅(SDA)、またはLage et al., Genome Research 13:294-307 (2003)に記載されている過剰分岐ストランド置き換え増幅を含む。等温増幅方法は、ゲノムDNAのランダムプライマー増幅では、ストランド-置き換え29ポリメラーゼまたはBst DNAポリメラーゼ大断片、5'->3'exo<sup>-</sup>で用いることができる。これらのポリメラーゼの使用は、それらの高い反応促進性およびストランド置き換え活性を利用する。高い反応促進性は、ポリメラーゼが長さが10~20kbである断片を生じさせるようにする。上記したように、小さな断片はクレノウポリメラーゼ等の低い反応促進性およびストランド-置き換え活性を有するポリメラーゼを用いて等温条件下で生成することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0107】

本発明の特別な実施形態において、ゲノムDNA、または増幅されたgDNA断片の集団は、インビトロにてゲノムRNA(gRNA)断片に転写することができる。本発明の方法におけるgRNAの生成はDNAアレイベースのプライマー伸長アッセイ等のプライマー伸長アッセイにおける型決定可能な遺伝子座の検出のための一部の非限定的利点を供する。アレイ-ベースのプライマー伸長は、典型的には標的DNAの固定化されたプローブDNAへのハイブリダイゼーション、その後のDNAポリメラーゼでのプローブ-標的ハイブリッドの修飾または伸長の工程を含む。これらのアッセイは、しばしば、アレイ表面のそれらの物理的均一性、およびこれらのプローブ-プローブハイブリッドのその後の異所性伸長のため、プローブ-プローブハイブリッドの望ましくない形成から生起するアーチファクトによって危うくなり得る。gDNAがgRNAに変換される本発明の実施形態において、そのようなアーチファクトは回避することができる。なぜならば、それらはDNA-DNAハイブリッドであって、逆転写酵素はRNAテンプレートをも有するハイブリッドに対して選択的であるので、DNAポリメラーゼはプローブ-プローブハイブリッドを効果的に修飾または伸長しない逆転写酵素(RT)で置き換えられるからである。さらに、標的プローブハイブリッドの検出のためのgRNAおよび逆転写酵素の使用は、直接的ハイブリダイゼーションアレイベースのプライマー伸長アッセイにおいて異所性伸長を最小化する。アレイベースのプライマー伸長反応においてプローブ間およびプローブ内自己伸長(異所性伸長)は共に高いバックグラウンドに導きかねない。異所性伸長によるアーチファクトをRTおよびgRNAの使用は妨げる。なぜならば、RTはRNA標的にハイブリダイズしたDNAプローブを容易に伸長できないが、それはDNA-DNA複合体を効果的には伸長しないからである。

#### 【0108】

したがって、本発明はゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する方法を提供する。上記方法は(a)増幅されたgDNA断片の集団をインビトロ転写し、それにより、ゲノムRNA(gRNA)断片が得られ;(b)gRNA断片を、型決定可能な遺伝子座に対応する配列を有する複数の核酸プローブとハイブリダイズさせ;次いで、(c)プローブにハイブリダイズするgRNA断片の型決定可能な遺伝子座を検出する工程を含む。

#### 【0109】

gDNAを増幅してgRNAを断片を生じさせる方法の模式的例を図8に示す。パネル8Aに示すように、gDNAをDNAポリメラーゼおよびランダムDNAプライマーの集団で増幅して、インビトロ転写工程に先立ってゲノム断片の表示的集団を生じさせることができる。示した例において、gDNAは、9つのヌクレオチドのランダム領域およびユ

ニバーサルプライミング配列 (U1) および T7 プロモーター配列 (T7) を有する固定化された領域を含むプライマーの集団を用いてランダム - 起点標識 (RPL) する。図 8 に示された例では、ランダム配列は 9 ヌクレオチド長である。しかしながら、種々のランダム配列長さのいずれかを用いて、例えば、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15 以上のヌクレオチド長のランダム配列を含めた本発明の特定の適用に適合されることができる。さらに、本発明の方法で用いるプライマーのランダム配列は、所望であれば、固定されたヌクレオチドを有する散在位置または 2 つ以上のヌクレオチドの固定された配列を有する領域を含むことができる。

#### 【0110】

パネル B に示すように、T7 プロモーター標識ゲノム断片の表示的な集団は、T7 RNA ポリメラーゼおよび相補的な T7 プライマー (cT7) を用いて gRNA にインビトロ転写することができる。gDNA の gRNA 断片への転写は、T3 または SP6 等の他のプロモーター、および後にさらに詳細に記載するそれらの各ポリメラーゼで行うこともできる。

#### 【0111】

インビトロ転写によって生じたゲノム断片の gRNA - ベースの表示的な集団は、本明細書中に記載された種々の方法のうちのいずれかで操作し、検出することができる。例えば、図 8 B に例示した方法によって生じた gRNA - ベースのゲノム断片は U1 標識テイルを有するであろう。これらのテイルを用いて、例えば、固相に付着した相補的捕獲配列を用い、gDNA、および他の増幅反応成分から gRNA 断片を単離することができる。ゲノム RNA 断片は逆転写酵素を用いて検出することができるか、あるいは DNA にコピーすることができる。ゲノム断片の gRNA - ベースの表示的集団は後に記載するもの等の方法を用いて直接的に検出することができるか、あるいは別法として、検出に先立って DNA にコピーすることができる。図 8 C の例示的増幅工程に示されるように、gRNA 断片の集団は、第 2 のユニバーサル配列 (U2) を所望により有する遺伝子座 - 特異的プライマー、および逆転写酵素を用いて複製することができる。この工程に続いて、U1 および U2 プライマーと共にユニバーサル PCR を用いて増幅することができる。かくして、gRNA 断片を複製して、ゲノム断片の遺伝子座 - 特異的な増幅された表示的集団を生じさせることができる。さらに詳細に後に記載するように、遺伝子座 - 特異的プライマーでの gRNA の逆転写酵素 - 指向性複製は複雑性の低下をもたらすことができ、所望により、U2 ユニバーサルプライミング部位を加えることができる。U2 配列が存在する実施形態においては、遺伝子座特異的プライマーでの複製によって生じたゲノム断片の集団は、各々、集団を検出したまたは増幅するのに有用なフランキング U1 および U2 配列を有する。かくして、十分に伸長された生成物は、U1 および U2 プライマー部位を起点とするユニバーサル PCR 反応で増幅することができる。

#### 【0112】

さらに、図 8 D に示されたように「プライマー - ダイマー」とは検出工程で伸長させることができない。なぜならば、逆転写酵素は DNA テンプレートを非常に効果的には伸長できないからである。対照的に、DNA ポリメラーゼは L1 - L2 プライマーダイマーを伸長することができ、これは、潜在的に検出アーチファクトに導く。かくして、ゲノム断片の gRNA - ベースの表示的集団の使用は、一部の多重検出方法においてアーチファクトを回避する非限定的利点を供することができる。かくして、gRNA の使用は、多数の型決定可能な遺伝子座の多重化検出についての増大した有効性の利点を供することができる。

#### 【0113】

gDNA をゲノム断片の gRNA - ベースの表示的集団に転写しまたは gRNA を逆転写する本発明の方法で用いる核酸プライマーは、他のポリメラーゼおよびテンプレートで用いるプライマーに関して本明細書中に記載した長さ、組成、または他の特性を有することができる。当業者であれば、本明細書中に記載されたガイダンスおよび教示、および先に記載され、かつ例えば Eun et al., 前掲 (1996) に記載された逆転写酵

10

20

30

40

50



素またはRNAポリメラーゼに関して既知であるものに基づき、本発明のインビトロ転写または逆転写酵素工程で用いられる核酸プライマーの適切な特性を知っているか、あるいはそれを決定することができる。

#### 【0114】

さらに、図8の実施形態に関して上記で例示したプライマー集団は単一のU1配列および単一のU2配列を有するが、本発明で有用なプライマーの集団は1を超える一定の配列領域を含むことができるのは理解されるであろう。かくして、各々が異なる一定の配列領域を有する複数のランダムプライマーサブグループは、本発明の方法においてハイブリダイゼーションまたは増幅で用いたより大きな集団に存在させることができる。DNAテンプレートから相補的RNAを合成することができるいずれのRNAポリメラーゼも本発明の方法で用いることができる。本発明で有用な例示的RNAポリメラーゼはT7 RNAポリメラーゼである。T7 RNAポリメラーゼでのインビトロ転写についての本発明の方法で用いることができる条件は、限定されるものではないが、50マイクロリットル中の40 mM トリス-HCl pH 8.0 (37)、6 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM の DTT、1 mM の スペリミジン、50 μg / ml の BSA、40 μg / ml の ファージプロモーターを含む gDNA 断片、0.5 ~ 8.5 mM の NTP、および 200 ~ 300 ユニットの T7 RNAポリメラーゼを含む。本発明の方法で用いることができるさらに別のRNAポリメラーゼはSP6 RNAポリメラーゼである。用いられる例示的条件は、限定されるものではないが、50マイクロリットル中の40 mM トリス-HCl pH 8.0 (25)、6 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM の DTT、2 mM の スペルミジン、50 μg / ml の BSA、50 μg / ml の SP6 プロモーターを含む gDNA 断片、0.5 mM の NTP、および 10 ユニットの SP6 RNAポリメラーゼを含む。

#### 【0115】

また、T3 RNAポリメラーゼは、例えば、50マイクロリットル中の50 mM トリス-HCl pH 7.8 (37)、25 mM の NaCl、8 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM の DTT、2 mM の スペルミジン、50 μg / ml の BSA、50 μg / ml の T3 プロモーターを含む gDNA 断片、0.5 mM の NTP、および T3 RNAポリメラーゼを含めた条件下での、インビトロ転写についての本発明の方法で用いることができる。

#### 【0116】

RNAテンプレートからの相補的DNAの合成を触媒する逆転写酵素(RT)は本発明の方法で用いることができる。本発明の方法で用いることができる例示的RTは、限定されるものではないが、鳥類筋芽細胞腫ウイルス(AMV)RT、モロニーネズミ白血病ウイルス(MoLV)RT、HIV-1 RTまたはラウス肉腫ウイルス(RSV)RT等のレトロウイルスからのものを含む。一般には、本発明の方法で用いる逆転写反応はRNAテンプレート、1つ以上のdNTP、および3' OH基を持つ核酸プライマーを含む。所望であれば、RNAse阻害剤を加えて、転写された生成物の分解を阻害することができる。特定の反応条件を用いて、特定のRTまたは本発明の特定の適応に適合させることができる。

#### 【0117】

AMV RTでの修飾または伸長の有用な条件は、例えば、50マイクロリットル中の50 mM トリス-HCl (42におけるpH 8.3)、150 mM の NaCl (または100 mM の KCl)、6 ~ 10 mM の MgCl<sub>2</sub>、1 mM の DTT、50 μg / ml の BSA、50 ユニットの RNasin、0.5 mM の スペルミジン HCl、4 mM の NA-PBi、0.2 mM の 各 dNTP、1 ~ 5 μg の gRNA、0.5 ~ 2.5 μg の プライマーおよび 10 ユニットの AMV RTを含む。しかしながら、そうでなければ同様な条件で25においてpH 8.1にて反応を行うことも可能である。AMV RT活性に関して、特に、DNA-依存性DNA合成を阻害するのに用いることができる他の条件は、例えば、Lokhava et al., FEBS Lett. 274: 156-158 (1990) または Lokhava et al., Mol. Biol. (USSR) 24: 396-407 (1990) に記載されている。

## 【0118】

M o L V R Tを用いる実施形態において、修飾または伸長のための例示的条件は、限定されるものではないが、50マイクロリットル中の50mMトリス-HCl (25におけるpH8.1)、75mMのKCl、3mMのMgCl<sub>2</sub>、10mMのDTT、100μg/mlのBSA、20ユニットのRNasin、50μg/mlのアクチノマイシンD、0.5mMの各dNTP、5~10μgのgRNA、0.5~4μgのプライマーおよび200ユニットのM o L V R Tを含む。

## 【0119】

本発明の方法で用いるRTは、例えば、B型肝炎ウイルスまたはカウリモウイルス等のDNAウイルス、Myxococcus xanthusまたはE. coliの一部の株のような細菌、Tyレトロトランスポゾンを持つもののような酵母、真菌、ショウジョウバエのcopia様エレメントを持つもののような無脊椎動物、または植物を含めた非レトロウイルス源からのものでもあり得る。さらに、所望であれば、逆転写はE. coli DNA Pol I等のRT活性を有するDNAポリメラーゼを用いて本発明の方法で行うことができる。しかしながら、上記した理由で、例えば、DNA-依存性DNA合成が可能でないRTを用い、またはDNA-依存性DNA合成を阻害するpH、イオン強度またはMg<sup>2+</sup>濃度等の条件を用い、DNAテンプレートに向けての活性が阻害され、または実質的に存在しない条件下で逆転写を行うのが望ましいであろう。さらに、所望であれば、アクチノマイシンDまたはピロフォスフェート(Na-PPi)のようなDNA-依存性DNA合成の阻害剤を加えることができる。

## 【0120】

RT活性が可能な例示的DNAポリメラーゼは、Mn<sup>2+</sup>の存在下で用いる場合にはTth polである。Tth pol RTでのgRNAの逆転写についての例示的条件は、限定されるものではないが、20分間の70における50mMトリス-HCl (pH8.8)、16mMのNH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>、1mMのMnCl<sub>2</sub>、200μMのdNTP、0.25u/μlのTth pol、100fmol/μlのRNAテンプレートを含む。

## 【0121】

本発明の方法におけるgDNAの増幅は、所望の複雑性を有する上記ゲノム断片の増幅された表示的集団が生じるように行うことができる。例えば、所望の複雑性を有する上記ゲノム断片の増幅された表示的集団は、増幅反応の間におこるプライミングまたは断片化事象の頻度または多様性を特定することによって生じさせることができる。従って、本発明を用いて、断片の集団の所望の使用に応じて、高いまたは低い複雑性を有する上記ゲノム断片の増幅された表示的集団を生じさせることができる。上記した、および後に実施例に記載する増幅条件のいくつかは高い複雑性表示を提供する。本発明の方法は複雑性を低下させる工程を含むことができ、あるいは所望であれば、低い複雑性表示を生じる増幅方法で行うことができる。

## 【0122】

低い複雑性の表示を生じさせるための例示的方法は、例えば、Lucitto et al., Genome Res. 10:1726-36 (2000)に記載された、制限エンドヌクレアーゼでのDNAの初期ランダム消化、アダプターオリゴヌクレオチドでの消化された断片の連結、および熱変性アダプター誘導体断片のPCR増幅を必要とするリン化アダプター-PCRである。上記方法におけるgDNA消化の条件の変更を用いて、生じる上記ゲノム断片の増幅された表示的集団の複雑性に影響させることができる。特に、低い複雑性の表示は、例えば、6塩基またはより長い認識モチーフを有する頻繁な切断のエンドヌクレアーゼを用いて得ることができる。従って、頻繁なカッターを用いて、高い複雑性の表示を得ることができる。例えば、4つのヌクレオチド部位GATCを認識し、かくして、gDNAを比較的頻繁に制限するDpn IIは、ゲノムの約70%を含有するヒトゲノム断片の表示的な集団を表示させることができる。対照的に、比較的頻繁ではないカッターを用いて、低い複雑性の表示を生じさせることができる。例えば、6つのヌクレオチド部位AGATCTを認識し、かくして、gDNAを比較的頻繁ではなく制

限する B g l i i を用いて、ゲノムのほぼ 2 . 5 % を含むに過ぎないヒトゲノム断片の表示的な集団を表示させることができる。さらに、g D N A は、増幅で用いるポリメラーゼの反応促進性よりも小さな平均長さまで断片化し、それにより、生じる上記ゲノム断片の増幅された表示的集団の複雑性を低下させることができる。

#### 【 0 1 2 3 】

低い複雑性の表示を生じさせるための更なる方法は、係留したリン化アダプター P C R についての 2 つ以上のアダプターの使用である。特別は実施形態において、複雑性の低下は、少なくとも 2 つの制限酵素を用いて g D N A 試料を断片化し；アダプターを得られた断片に連結し；次いで、一方の末端については 1 つの制限酵素によって、他方の末端については異なる制限酵素によって切断された断片を選択的に増幅することによって達成することができる。もし 1 つの酵素が 6 - カッターであって、他方が 4 - カッターであれば、上記表示は、4 - カッター消化（約 2 5 6 塩基毎）の頻度によって決定された平均サイズを持つ 6 - カッター部位のあたりに係留されるであろう。得られた試料の複雑性は、特定の頻度で切断される酵素を選択することによって調節することができる。また、選択的増幅は、1 つのアダプターが 5 ' 突出を有するように、第 2 のアダプターが 3 ' 突出を有するように設計することによって達成することができ、ここに、上記突出は断片を複製するのに用いられる増幅プライマーについてのアニーリング部位を有する。複雑性低下のための複数アダプターの使用のための例示的条件は U S 2 0 0 3 / 0 0 9 6 2 3 5 A 1 に記載されている。

10

#### 【 0 1 2 4 】

また、複雑性低下は遺伝子座 - 特異的に行うこともできる。従って、本発明は、さらに、ゲノム断片の複雑性が低下した遺伝子座 - 特異的な増幅された表示的集団を生じさせる方法を提供する。上記方法は、( a ) 天然のゲノムを複数のランダムプライマーで複製し、それにより上記ゲノム断片の増幅された表示的集団を生じさせ；( b ) 上記ゲノム断片の増幅された表示的集団のサブグループを複数の異なる遺伝子座 - 特異的プライマーで複製し、それにより、ゲノム断片の遺伝子座 - 特異的な増幅された集団を生じさせ；次いで、( c ) 上記サブグループを単離し、それにより、ゲノム断片の複雑性が低下した遺伝子座 - 特異的な増幅された表示的集団を生じさせる工程を含む。

20

#### 【 0 1 2 5 】

複雑性低下のために用いることができる例示的方法是、図 8 に示し、かつ上記した g R N A 断片を生じさせる増幅である。ゲノム断片の複雑性が低下した遺伝子座 - 特異的な増幅された表示的集団を生じさせる方法のダイアグラム例は図 9 に示す。図 9 A に示すように、g D N A 試料は、各々が、g D N A にアニーリングするためのランダム 3 ' 配列および 5 ' ユニバーサルプライミングテール（U 1 配列）を有する核酸プライマーの集団を使用するランダム - 起点標識（R P L）技術によって増幅することができる。かくして、ランダム - 起点標識反応は、ユニバーサルプライミング部位が近接する上記ゲノム断片の増幅された表示的集団を生じさせることができる。図 9 に示す例において、ランダム配列は 9 つのヌクレオチドを有する。しかしながら、種々のランダム配列の長さまたは組成のいずれかを用いて、例えば、本明細書中で先に記載したものを含めた本発明の特定の適用に適合させることができる。一般に、ランダムプライマーの集団のランダムアニーリング部分の長さが低下するにつれ、ゲノム上の潜在的アニーリング部位の数は増加し、それにより、増幅された表示の複雑性を増加させる。

30

40

#### 【 0 1 2 6 】

図 9 B に示すように、上記ゲノム断片の増幅された表示的集団は、例えば、固相ビーズ上への固定化によってゲノム D N A から単離することができる。図 9 A の例では、増幅された断片の固定化は、N<sub>9</sub> - U 1 プライマーに結合したビオチンによって容易とすることができる。ビオチニル化増幅生成物は、アビジンまたはストレプトアビジンで誘導体化された固相によって捕獲し、所望であれば、引き続いて、g D N A テンプレートから単離することができる。ランダムプライマー増幅のためにプライマーで用いることができる他の例示的捕獲部位およびそれらの固定化された受容体は上記した。かくして、g D N A を増

50

幅する方法は、さらに、上記ゲノム断片の増幅された表示的集団を捕獲または単離する工程を含むことができる。上記ゲノム断片の増幅された表示的集団を捕獲または単離するのに用いることができる例示的基質は、例えば、核酸ハイブリッドからの単一の標準核酸の分離に関して後に記載するものを含む。

【0127】

当業者であれば、増幅されたゲノム断片は、上記で例示した固相基質を用いて本発明の方法において他の反応成分から分離することができる。同様に、増幅されたゲノム断片はそれらのサイズ等の断片の他の特性に基づいて分離することができる。かくして、濾過、またはサイズ排除クロマトグラフィー等のクロマトグラフィー方法を用いて、アニールされないプローブ等の他の反応成分からゲノム断片を分離することができる。

10

【0128】

本発明の方法は、上記ゲノム断片の増幅された表示的集団のサブグループを、各々が、3' 遺伝子座特異的配列領域および5' 一定配列領域を有する複数の異なる遺伝子座 - 特異的プライマーで複製する工程を含むことができる。図9Bの例に続き、固定化されたランダムプライマー増幅生成物は、L1、L2またはL3および5' 第二ユニバーサルテイル(U2)として確認される異なる遺伝子座 - 特異的3' 配列を有する異なるプライマーの集団とハイブリダイズさせることができる。この時点において、所望であれば、洗浄工程を含ませて、誤ってアニールされた過剰のプライマーを除去することができる。洗浄のための条件は、特異的ハイブリッドを維持しつつ非特異的に結合した核酸を除去するいずれのものも含むことができる。次いで、プライマー伸長を用いて、遺伝子座 - 特異的プライマーに相補的な配列を有する上記ゲノム断片の増幅された表示的集団のサブグループを複製することができる。このサブグループは、元のgDNA、およびN9 - U1プライマーで生じたゲノム断片が上記増幅された集団と比較してより低い複雑性を有するであろう。さらに、複雑性低下は、第二の増幅工程において遺伝子座 - 特異的プライマーでの選択により遺伝子特異的であろう。異なる遺伝子座 - 特異的プライマーの数および遺伝子座 - 特異的配列の長さを変化させて、本発明の方法で得られた表示の複雑性を増加または減少させることができる。

20

【0129】

図9Bに示された例における捕獲された断片の全長に沿ったU2含有プライマーの伸長は、第一の一定領域(U1)および第二の一定領域(U2)で標識されたゲノム断片の遺伝子座 - 特異的な増幅された表示的集団を生じるであろう。かくして、十分に伸長された生成物は、U1およびU2プライマー部位を起点とするユニバーサルPCR反応で増幅することができる。従って、本発明の方法は、フランキング第一および第二一定領域に対して、相補的プライマーでゲノム断片の複雑性が低下した遺伝子座特異的な増幅された表示的集団を複製する工程を含むことができる。さらに、断片の検出は、例えば、修飾されたOLAプローブの検出に関して後に記載される技術を用いてU1およびU2双方の配列の存在に基づいて行うことができる。

30

【0130】

また、複雑性低下は、ゲノム断片の集団から特定の配列を除去することによって行うこともできる。1つの実施形態において、ゲノム断片の試料における高コピー数のまたは豊富な配列を、検出または捕獲プローブにハイブリダイズすることを阻害することができる。例えば、Cot分析を用いることができ、そこでは、単一コピーの種をプローブへのハイブリダイゼーションが可能な一本鎖状態に残しつつ、豊富な種を動的に再度アニールするよう駆動する。かくして、特別な実施形態において、プローブのアレイへの試料の曝露に先立ち、ゲノム断片の試料を、特定の反復された配列、または試料から滴下測定が望まれる他の配列に対して相補的なcotオリゴヌクレオチドで予め処理することができる。さらに別の例において、ゲノム断片の試料は、過剰表現された配列の実質的な一部分に対して十分である短い時間の間で室温まで冷却して、再度アニールさせることができるが、低コピー数で存在する配列の実質的再アニーリングには不十分である。得られた試料は、プローブのアレイとのその後の相互作用のために利用可能な低下した量の反復された配列

40

50

を有するであろう。

【0131】

例えば、Cot分析またはゲノム断片再アニーリングにおいて二本鎖種を形成する望ましくない断片は、一本鎖および二本鎖核酸の異なる特性に基づいて一本鎖種から分離することができる。特別な実施形態において、二本鎖DNAを優先的に切断する酵素を用いることができる。例えば、DNAse Iは既知の条件下で一本鎖DNAよりも100～500倍速く二本鎖DNAを切断することができる。従って、望ましくない断片は、Cotオリゴヌクレオチドでの処理によって、または断片再アニーリング、および望ましくない断片が優先的に二本鎖種を形成し、切断される条件下でのDNAse Iでの処理によって除去することができる。さらに、一本鎖種と比較して優先的に二本鎖種を修飾し、それを切断またはそれに結合する他の酵素を用いて、配列特異的制限エンドヌクレアーゼまたはKamchatka二重鎖 - 特異的エンドヌクレアーゼ等の本発明の方法における種を分離することができる。

10

【0132】

また、任意プライマー(arbitrary-primer)PCRを用いて、本発明の方法においてゲノムDNAを増幅することもできる。任意-プライマーPCRは、プライマーが任意にgDNA中の種々の位置にアニールするように、非ストリンジェントな条件下でgDNA試料をプライマーで複製することによって行うことができる。その後のPCR工程をより高いストリンジェンシーにおいて行って、先の工程における任意のプライミングにより生じた断片を増幅することができる。任意-プライマーの長さ、配列または双方は、gDNAに沿った特定の間隔でのプライミングの確率に従って選択することができる。この点に関して、他の増幅条件の変化はないと仮定し、プライマーの長さが増加するにつれ、任意に起点となる位置の間の平均間隔は増大する。同様に、反復された配列に相補的な、またはそれに同様な配列を有するプライマーがよりしばしば起点となり、増幅すべきゲノム中の反復した配列と同様な配列を欠くプライマーよりも増幅された断片間のより短い間隔を生じる。任意-プライマー増幅は、例えば、Bassam et al., *Australas Biotechnol.* 4:232-6 (1994)に記載されたものと同様な条件下で行うことができる。本発明に従い、増幅は、任意のプライマー、低ストリンジェンシーアニーリング条件、およびストランド-置き換えポリメラーゼを用いて等温条件下で行うことができる。

20

30

【0133】

本発明においてゲノムを増幅するのに用いることができるさらに別の方法はAlu間PCRである。この方法においては、プライマーは、ゲノムを通じて反復されるAlu配列にアニールするように設計される。これらのプライマーでのPCR増幅は、Alu反復によって近接して挟まれる断片を生じる。当業者であれば、同様の方法を、転写調節領域、スプライス部位等のような注目するゲノム中の他の反復した配列にアニールするプライマーで行うことができる。さらに、反復した配列に対するプライマーをここに記載したものの等の等温増幅方法で用いることができる。

【0134】

プライマーの特定の組での増幅に由来する表示の複雑性および程度は、異なるプライマーハイブリダイゼーション条件を用いて調整することができる。限定されるものではないが、Sambrook et al., 前掲(2001)またはAusubel et al., 前掲(1998)に記載されたものを含めた高、中程度または低ストリンジェンシー条件等の種々のハイブリダイゼーション条件を本発明で用いることができる。ストリンジェントな条件は特異的配列-依存性ハイブリダイゼーションに好都合である。一般に、より長い配列および上昇した温度は特異的な配列-依存性ハイブリダイゼーションに好都合である。核酸のハイブリダイゼーションに対する有用なガイドは、Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Hybridization with Nucleic Acid Probes*, "Overview of Principles of hy

40

50

bridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)に見出される。

【0135】

本発明で用いる増幅および検出工程は、一般に、相補的配列存在下でハイブリダイゼーション複合体の形成を選択的に可能とするストリンジェンシー条件下で行われる。ストリンジェンシーは、限定されるものではないが、温度、ホルムアミド濃度、塩濃度、カオトロピック塩濃度、pH、有機溶媒の濃度等を含めた熱力学的変数である工程パラメータを変化させることによって制御することができる。また、これらのパラメータを用いて、一般には、米国特許第5,681,697号に概説されているように、非特異的結合を制御することもできる。かくして、所望であれば、非特異的結合を低下させる比較的高いストリンジェンシー条件下で、ある工程を行うことができる。

10

【0136】

一般に、高ストリンジェンシー条件は、特定のイオン強度およびpHにおけるアニーリング配列のための熱融解温度( $T_m$ )よりも低い約5~10である温度を含む。高ストリンジェンシー条件は、第一の核酸が、その長さに沿って少なくとも約90%の相補的塩基対を有し、例えば、少なくとも約95%、98%、99%または100%相補的である相補的核酸に結合させるものを含む。ストリンジェントな条件は、さらに、例えば、塩濃度が約1.0M未満のナトリウム塩(または他の塩)、典型的にはpH7.0~8.3において約0.01~1.0M濃度であって、温度は短いアニーリング配列(例えば、10~50ヌクレオチド)については少なくとも約30であり、より長いアニーリング配列(例えば、50ヌクレオチドを超える)では少なくとも約60であるものを含む。また、高ストリンジェンシー条件は、例えば、42における50%ホルムアミド、5xデンハルトの溶液、5xSSPE、0.2%SDS中でのハイブリダイゼーション、続く65における0.1xSSPE、および0.1%SDSでの洗浄と同等な条件を含むことができる。核酸ハイブリッドは、さらに、1つ以上の架橋剤での共有結合修飾によって安定化させることができる。

20

【0137】

中程度にストリンジェントな条件は、第一の核酸が、上記第一の核酸に対してその長さに沿って少なくとも約60%相補的塩基対を有する相補的核酸に結合させるものを含む。用いる中程度のストリンジェンシーの特定の条件に応じて、ハイブリッドは、ハイブリダイズした領域の長さに沿って塩基対の少なくとも約75%、85%または90%についての相補性を有する配列の間で形成できる。中程度にストリンジェントな条件は、例えば、42における50%ホルムアミド、5xデンハルトの溶液、5xSSPE、0.2%SDSにおけるハイブリダイゼーション、続く65における0.2xSSPE、0.2%SDSにおける洗浄と同等な条件を含む

30

【0138】

低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、例えば、42における10%ホルムアミド、5xデンハルトの溶液、6xSSPE、0.2%SDS中のハイブリダイゼーション、続く、50における1xSSPE、0.2%SDSにおける洗浄と同等な条件を含む。デンハルトの溶液およびSSPEは、他の適切なハイブリダイゼーション溶液のように当業者において十分に既知のものである(例えば、Sambrook et al., 前掲(2001)またはAusubel et al., 前掲(1998)参照。

40

【0139】

ハイブリッドが、例えば、ポリメラーゼによって修飾される本発明の実施形態において、条件は、さらに、特定の修飾反応に適合するように選択されることができる。例えば、修飾が特性または増幅を含む場合、特定のポリメラーゼに関して上記したもの等の条件を用いることができる。ポリメラーゼ等の修飾剤を、例えば、修飾反応の核酸成分の付加に先立って、その間、またはその後を含めた、増幅または検出工程の間のいずれかの時点で加えることができるのは理解されるであろう。

【0140】

50

本発明の方法を用いて、単一反応工程において、または単一反応容器中で天然ゲノムを増幅させ、高い複雑性を有する上記ゲノム断片の増幅された表示的集団を生じさせることができる。単一の工程または反応容器を用いる能力が、複数の工程または反応容器を必要とする方法と比べて、増大する増幅効率の非限定的利点を提供する。さらに、特別な実施形態において、ゲノム断片の高い複雑性の増幅された表示的集団は、複数の増幅反応からの生成物のプーリングを必要としない条件下で得ることができる。かくして、上記ゲノム断片の増幅された表示的集団における断片は、本発明の種々の実施形態において順次よりはむしろ平行して得ることができる。しかしながら、異なる反応が個別の容器中で順次に行われる、または複数反応の生成物がプールされて、例えば、特定の適用に適合される実施形態において上記方法を用いることが可能である。

10

#### 【0141】

天然ゲノムまたはその断片等の核酸を増幅するために本発明で用いることができる例示的方法のさらに別の記載は米国特許第6,355,431号に見出すことができ、これは、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)増幅、ランダム起点、PCR、任意起点PCR、ストランド置き換え増幅、核酸配列ベースの増幅および転写介在増幅を含む。

#### 【0142】

ゲノムまたはゲノム断片の集団の複製に続き、所望の修飾を含む核酸は未反応プライマーまたはテンプレート等の未修飾核酸から分離することができる。例えば、未伸長または未反応プライマーを除去するのは望ましくあり得る。なぜならば、未伸長プライマーは、本発明で用いられる種々の検出方法において伸長されたまたは標識されたプライマーと競合でき、それにより、シグナルを減少させるからである。従って、多数の技術を用いて、未伸長プライマーの除去を容易とすることができる。以下の議論は明瞭性のために増幅反応に指向されるが、これらの技術を用いて、修飾されたおよび未修飾核酸を検出工程で分離することもできるのが理解されるであろう。

20

#### 【0143】

核酸の分離は、例えば、本明細書中で先に記載された一次または二次標識の1つ以上を含めた標識の選択的一体化によって介在することができる。二次標識が取り込まれた核酸は、例えば、標識に対して特異性を有する受容体への結合に基づいて標識を欠くものから分離することができる。受容体は、例えば、図9に例示した実施形態に関して上記した固相基質に付着させることができる。一次標識を用いて、蛍光活性化セルソーティング等のソーティング技術において核酸を分離することができる。同様に、一体化された二次標識を有する核酸は、核酸-受容体複合体に対して一次標識を供する受容体の検出に基づいてソーティング方法において標識を欠くものから分離することができる。分離は、G-50樹脂等の標準サイズ排除樹脂、AmiconまたはCentriconカラムでの限外濾過、またはエタノール-様沈殿方法を用いて達成することもできる。

30

#### 【0144】

核酸は、標識されたプライマー、標識されたヌクレオチド前駆体または双方を介して、増幅または修飾反応の間に導入された部分によって本発明の方法において好都合には標識することができる。特別な実施形態において、核酸を複製するのに用いる1つ以上のNTPは、標識を欠く未修飾プライマーから修飾されたプライマーを分離するのに用いることができる二次的検出可能な標識を含むことができる。二次的標識は、SBE、OLAまたは侵襲的切断等の標識されたおよび未標識のプロブの分離のための工程を含む検出技術で特別な用途を見出す。特に有用な標識は、限定されるものではないが、結合パートナー対；化学的修飾可能な部分；またはヌクレアーゼ阻害剤のうちの1つを含む。

40

#### 【0145】

その例として、二次的標識は、固体支持体に付着した免疫グロブリン、またはその機能的断片に対する親和性を有するハプテンまたは抗原であり得る。免疫グロブリンに結合した標識された核酸は、固体支持体および可溶性画分の物理的分離によって未標識核酸から分離することができる。加えて、例えば、ストレプトアビジン、ビオチン模倣体または双方を利用するものを含めたアビジン/ビオチンシステムを用いて、未標識であるものから

50

修飾された核酸を分離することができる。典型的には、2つの結合パートナーのうちのより小さいものを核酸に付着させる。しかしながら、より大きなパートナーの付着を用いることもできる。例えば、アビジンの核酸への付加はそのサイズを増加させ、その物理的特性を変化させ、これは分離のために利用することができる。従って、ストレプトアビジン標識核酸は、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、濾過または分別沈殿等の技術を用いて混合物中の未標識核酸から分離することができる。

#### 【0146】

固体支持体への結合パートナーの付着を含めた実施形態において、固体支持体は、例えば、検出アッセイに関して本明細書中に記載したものから選択することができる。特に有用な基質は、例えば、磁性ビーズを含み、これは容易に核酸試料に導入し、容易に磁石で除去することができる。他の公知のアフィニティークロマトグラフィー基質を同様に用いることができる。既知の方法を用いて、結合パートナーを固体支持体に結合させることができる。

10

#### 【0147】

典型的には、ゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する方法は、例えば、上記した方法によって得られた上記ゲノム断片の増幅された表示的集団で行われる。別法として、型決定可能な遺伝子座は、増幅方法以外の方法によってゲノムから誘導されたゲノム断片の表示的集団に関して決定することができる。1つの実施形態において、ゲノム断片の表示的集団は、天然ゲノムを断片化することによって得ることができる。ゲノムを断片化するのに用いることができる例示的方法は後に記載する。当業者であれば、断片化方法を本明細書中に記載した増幅方法に対する代替法として、あるいは所望であれば増幅技術と組み合わせて用いることができる。

20

#### 【0148】

単離された天然ゲノムは、DNA中に二本鎖破壊を作り出すいずれかの物理的、化学的または生化学的実態によって断片化することができる。特別な実施形態において、天然ゲノムはエンドヌクレアーゼで消化することができる。本発明の方法で有用なエンドヌクレアーゼは、特異的認識配列において切断するもの、またはDNase I等のDNAを非特異的に切断するものを含む。エンドヌクレアーゼは当該分野で入手可能であるが、例えば、とりわけ、New England BioLab (Beverly, Mass.) またはLife Technologies Inc. (Rockville, Md.) 等の商業的源から得ることができる。特異的エンドヌクレアーゼを用いて、酵素を曝露してランダム配列をそれによって切断する頻度に従って特定の平均サイズのポリヌクレオチド断片を作り出すことができる。例えば、6つのヌクレオチド認識配列を有するエンドヌクレアーゼは、平均して、4096塩基対長である断片を生じると予測される。平均断片長は、ランダム配列としてDNAを処理し、次いで、関係 $4^n = s$  (式中、 $n$ はエンドヌクレアーゼによって認識された塩基の数であって、 $s$ は生じた断片の平均サイズである)に従ってランダム配列中の認識部位の頻度を見積もることによって見積もることができる。また、後に記載するようにインキュベーション条件を修飾して、エンドヌクレアーゼの酵素効率を変化させ、それにより、生じた断片の平均サイズを変化させることができる。6塩基対認識部位を有するエンドヌクレアーゼの例を用い、酵素効率の減少は、平均して4096よりも長い塩基対長である断片を生じさせることができる。

30

40

#### 【0149】

また、非特異的エンドヌクレアーゼを用いて、所望の平均サイズのゲノム断片を生じさせることができるエンドヌクレアーゼ反応は二分子であるので、断片化の速度は、エンドヌクレアーゼDNAまたは双方の濃度のような条件を変化させることによって操作することができる。具体的には、エンドヌクレアーゼ、DNAまたは双方いずれかの濃度の低下を用いて、反応速度を低下させる、これは、増加した平均断片サイズをもたらす。エンドヌクレアーゼ、DNA認識配列または双方いずれかの濃度を増加させると、特定の酵素に対する最大速度( $V_{max}$ )に近づく増大した効率を可能とし、これは、低下した平均断片サイズに導かれる。また、条件の同様な変化を部位特異的エンドヌクレアーゼに適用す

50



ることにもできる。なぜならば、DNAとのそれらの反応もまた二分子だからである。例えば、温度、塩濃度および反応の時間を含めた他の反応条件もまた切断の速度に影響し得る。エンドヌクレアーゼ反応速度を変化させて測定された平均サイズのポリヌクレオチド断片を生じさせるための方法は、例えば、Sambrook et al., 前掲(2001)またはAusubel et al., 前掲(1998)に記載されている。

#### 【0150】

ゲノム断片を生じさせるのに用いることができる他の方法は、例えば、フリーラジカルメカニズム、UV光、機械的破壊等によって結合を切断するもの等のDNAのホスホジエステル骨格を破壊する化学的剤での処理を含む。これらのおよび上記した方法を用いて、天然ゲノムからゲノム断片を生じさせ、さらにゲノム断片を切断し、または本発明で用いる他の核酸を切断することができる。ゲノム断片を生じさせるのに用いることができるさらなる例示的機械的破壊方法は、超音波および剪断を含む。

10

#### 【0151】

ランダムプライマー全ゲノム増幅は、典型的には、無傷のゲノムDNAを断片化されたテンプレートと比較してテンプレートとして用いる場合、典型的には、より高い増幅収率および増大した表示を生じさせる。断片化されたゲノムDNAの増幅が望まれる本発明の適用において、断片を一緒に連結して、連結したDNAを生じさせることも可能である。次いで、連結されたDNAを、本明細書中にて先に記載した全ゲノム増幅方法で用いることができる。ゲノム断片連結反応で用いることができる例示的条件は、例えば、WO 03/033724 A1に記載されている。

20

#### 【0152】

標的核酸試料の断片化が望まれない実施形態においては、断片は本発明の方法で用いるために修飾することができる。例えば、ゲノムDNAを修飾して、増幅を容易とすることができる。増幅を容易とすることができる例示的修飾は、例えば、ランダムプライマー増幅によって効果的に増幅することができる伸長されたテンプレートを形成するためのゲノム断片の連結である。連結は、例えば、McCoy et al., Biochem. 19:635-642(1980)に記載されたもの等の当該分野で既知の条件下で、ゲノム断片の集団をT4 RNAリガーゼで処理することによって行うことができる。また、連結はAPエンドヌクレアーゼポリメラーゼおよびリガーゼの混合物を用いて行うこともできる。損傷したDNAは、Sigma-Aldrichから入手可能なRestorase<sup>TM</sup>ポリメラーゼ混合物(R1028)等の適切な酵素を用いて修復することができる。用いることができるさらに別の修飾は、ユニバーサルテイルのゲノム断片への付加である。ユニバーサルテイルと一体化させる例示的方法は、限定されるものではないが、dGTP等のモノヌクレオチドでの3'末端にテイルするターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼでの断片の処理を含む。従って、ポリGテイルをユニバーサルテイルとしてゲノム断片に付加することができる。ポリC、T、U、Aまたは他のヌクレオチドテイルと同様に添加することができる。また、ユニバーサルテイルは、ユニバーサルテイル配列をゲノム断片の一方または双方の端部に付加される条件下で、ゲノム断片をT4 RNAリガーゼおよびランダム4-量体二重鎖アダプターおよびユニバーサルテイル配列を有するオリゴヌクレオチドで処理することによって付加することもできる。

30

40

#### 【0153】

実施例Xは、メチル化されたDNAの亜硫酸水素塩処理によって生じた断片を増幅する方法を記載する。当業者であれば、実施例Xに記載された増幅方法は、種々のメカニズムのうちのいずれかによって生じた種々の組成のうちのいずれかの核酸断片試料で用いることができるのを理解するであろう。本発明で有用なDNA断片のさらに別の例は、限定されるものではないが、例えば、貯蔵されたホルマリン-固定された、ホルムアルデヒド-固定された、パラフィンに包埋された、ポリマーに包埋された、エタノール包埋された、またはその何らかの組合せ処理されたもの等の保管された組織または細胞からのcDNAまたは分解されたゲノムのDNAを含む。また、断片化されたDNAは法医学試料、考古学試料、古生物学試料、ミイラ化した試料、石化した試料、および細胞または組織の死滅

50

およびそのゲノムDNAの分析の間の長い時間のため崩壊が生じた他の試料から得られたものであり得る。ゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する方法は、ゲノム断片を、プローブ-断片ハイブリッドが形成される条件下で型決定可能な遺伝子座に対応する配列を有する複数の核酸プローブと接触させる工程を含むことができる。本発明の方法で用いるプローブは、それが配列特異性を持って標的核酸に結合する能力を有する限り、種々の組成またはサイズのいずれをも有し得る。典型的には、上記方法で用いるプローブは、例えば、天然構造またはそのアナログを有するものを含めた核酸である。本発明の方法で用いることができる例示的核酸プローブは、限定されるものではないが、本発明で有用なプライマーおよび他の核酸に関して上記したものを含む。さらに、例えば、ペプチド、蛋白質または他のポリマー化合物を含めた他の配列特異的プローブを本発明の方法で用いることもできる。

10

#### 【0154】

本発明のプローブは、型決定可能な遺伝子座、またはゲノム断片の表示的集団中の型決定可能な遺伝子座の存在を示す他の検出位置に相補的であり得る。かくして、ゲノム断片の型決定可能な遺伝子座を検出する工程は、例えば、遺伝子座それ自体の検出、または遺伝子的に連結した、または関連したさらに別の配列の検出を含むことができる。この相補性は完全である必要はない。例えば、ミスマッチが、用いるべき条件下で検出のための十分に安定なハイブリダイゼーション複合体の形成を妨げない限り、ハイブリダイズした核酸複合体内のいずれかの数の塩基対ミスマッチがあり得る。

20

#### 【0155】

さらに、本発明の方法で用いる核酸プローブは、ゲノム断片の特定の集団に存在する標的配列または他の配列に相補的でない配列領域を含むことができる。これらの非標的相補的配列領域は、例えば、プローブを基質に付着させ、プライマーまたは他の所望の配列のような他の核酸用の部位をアニーリングするためのリンカー配列を含むことができる。核酸プローブの標的-相補性配列領域は、例えば、長さが少なくとも10ヌクレオチドである長さを有することができる。また、限定されるものではないが、長さが少なくとも約15、20、25、35、50、70、100、500、1000または5000ヌクレオチド以上であるものを含めた、より長い標的-相補性領域も有用であり得る。上記したように、本発明の特定の実施形態は、天然ゲノムを増幅して、比較的小さなゲノム断片の表示的集団を生じさせる能力を提供する。小さなゲノム断片上のゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する非限定的利点は、比較的近い遺伝子座が個々の検出のために分離できることである。従って、小さな標的配列の検出等の特別な実施形態において、核酸プローブの標的-相補性領域は長さが多くとも約100、90、80、70、60、50、40、35、30、25、20または10ヌクレオチドであり得る。

30

#### 【0156】

本発明で有用な例示的標的-相補性配列は種々の検出技術の関係で後に記載する。当業者であれば、プローブは例示した特定の検出技術で用いるのに限定されず、むしろ、本発明の特定の適用で望まれる種々の異なる検出技術のいずれでも用いることができる。

#### 【0157】

本発明の方法で用いるプローブは、さらに、例えば、特定の検出方法を指示するための修飾を有することができる。例えば、特定のプローブの増幅または修飾が望まれない実施形態において、プローブは、修飾に対して抵抗性である構造を有することができる。特別な例として、プローブは3'OH基を欠き得、または3'キャップ部分を有することができる。それにより、ポリメラーゼでの修飾に対して不活性である。特別な実施形態において、プローブは、限定されるものではないが、上記した一次または二次核酸標識の1つ以上を含めた検出可能な標識を含むことができる。別法として、検出は、標識が必要ないよう

40

にプローブ、断片またはハイブリッドの固有の特徴に基づくことができる。検出することができる固有の特徴の例は、限定されるものではないが、質量、電導度、エネルギー吸収、蛍光などを含む。

#### 【0158】

50

種々の条件のいずれかを用いて、プローブを、限定されるものではないが、標的に対するプライマーアニーリングに関して上記したものを含めたゲノム断片をハイブリダイズさせることができる。特別な実施形態において、ハイブリダイゼーション条件は、プローブ、ゲノム断片または双方の修飾または特性を支持することができる。しかしながら、プローブが適用される検出方法に依存して、ハイブリダイゼーション条件はプローブ-断片ハイブリッドの修飾を支持する必要はない。従って、特定の断片の存在は、ゲノム断片、プローブまたは双方の検出可能な特性に基づいて測定することができる。さらなる例示的ハイブリダイゼーション条件は、特定の検出方法に関して後に記載する。

#### 【0159】

本発明の方法においてプローブと接触させる複数のゲノム断片は、ゲノム配列の全てまたは一部を表すことができる。従って、上記複数のゲノム断片の複雑性は、それが増幅され、またはそうでなければ生じるゲノムのサイズと同等であり得る。例えば、プローブと接触させる複数のヒトゲノム断片は、全長ゲノムと概略同等な約3.1ギガ塩基の複雑性を有することができる。また、より低い複雑性の表示を用いることができる。再度、ヒトゲノムを非限定的例として用いて、プローブと接触させる複数のゲノム断片は少なくとも約2ギガ塩基の複雑性を有することができ、これはヒトゲノムの約60%の表示であり、あるいは少なくとも約1ギガ塩基の複雑性を有することができ、これは、ヒトゲノムの少なくとも約30%の表示である。本発明の方法においてプローブと接触させた複数のプローブの複雑性は、例えば、少なくとも約0.1ギガ塩基、0.2ギガ塩基、0.5ギガ塩基、0.8ギガ塩基、1ギガ塩基、1.5ギガ塩基、2ギガ塩基、2.5ギガ塩基、3ギガ塩基、3.5ギガ塩基、4ギガ塩基、4.5ギガ塩基、5ギガ塩基以上であり得る。

#### 【0160】

より高い複雑性の複数のゲノム断片を本発明の方法で用いるので、典型的には、より大きな量のDNAを用いるのが望ましい。従って、本明細書中に開示した方法においてプローブと接触させる複数のゲノム断片におけるDNAの量は少なくとも約1 $\mu$ g、10 $\mu$ g、50 $\mu$ g、100 $\mu$ g、150 $\mu$ g、200 $\mu$ g、300 $\mu$ g、400 $\mu$ g、500 $\mu$ g、1000 $\mu$ g以上(ここでは $\mu$ gはマイクログラムをいう)であり得る。複数のゲノム断片は、プローブおよび断片の間の配列特異的ハイブリダイゼーションの所望のレベル、または検出された遺伝子座の量等の所望の結果を与えるいずれかの濃度にて流体中に存在させることができる。例えば、本発明の方法においてプローブと接触させる複数のゲノム断片の濃度は少なくとも約0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l、0.2 $\mu$ g/ $\mu$ l、0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l、0.8 $\mu$ g/ $\mu$ l、1 $\mu$ g/ $\mu$ l、1.5 $\mu$ g/ $\mu$ l、2 $\mu$ g/ $\mu$ l、5 $\mu$ g/ $\mu$ l、10 $\mu$ g/ $\mu$ lであり得る(ここでは $\mu$ lはマイクロリットルをいう)。

#### 【0161】

複数のゲノム断片と接触させるプローブの数は当該方法の所望の適用に基づいて選択することができる。用いることができる例示的プローブ集団およびアレイは当該分野で既知でありおよび/または本明細書中に記載されたものを含むことができる。ゲノム断片とで配列特異的ハイブリッドを形成する異なるプローブの数は、例えば、少なくとも約100、500、1000、5000、 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 以上であり得、これは、当該分野で既知のおよび/または本明細書中に記載された集団またはアレイにおける多数のプローブを含む。

#### 【0162】

ハイブリダイゼーション後、所望であれば、ハイブリダイズしなかった核酸はハイブリッドから分離することができる。一本鎖の核酸およびハイブリッド核酸は、例えば、サイズ、質量、エネルギー吸収、蛍光、電導度、電荷、または特定の基質に対する親和性を含めた2つの種に関して異なる特性に基づいて分離することができる。2つの種では異なる特性に基づいて一本鎖の核酸およびハイブリッド核酸を分離するのに用いることができる例示的方法は、限定されるものではないが、サイズ排除クロマトグラフィー、特定のサイズカットオフを有する膜を通じての濾過、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、毛細管電気泳動、蛍光活性化セルソーティング(FACS)などを含む。

## 【0163】

特別な実施形態において、ハイブリッド核酸からのプローブ、標的または双方のような一本鎖核酸の分離は、プローブまたは標的の基質への付着によって促進することができる。固相基質を用いる核酸の分離を含む例示的方法は図9に示され、後に記載する。基質結合核酸で形成されたハイブリッドは、反応混合物からの基質の物理的分離によってハイブリダイズしていない核酸から分離することができる。そのような分離で用いることができる例示的基質は、限定されるものではないが、磁性ビーズ、Sephadex<sup>TM</sup>、制御されたポアのガラス、アガロースなどのような粒子；またはガラス表面、プラスチック、セラミックなどのような表面を含む。核酸は、当該分野で既知の方法を用い、核酸二次的標識に関連して上記されたもの等の公知のリンカーおよびリガンドを介して基質に付着させることができる。基質は、例えば、磁気引力、重力沈積、遠心沈積、濾過、FACS、電氣的引力などを含めた種々の方法のいずれかによって溶液から物理的に分離することができる。分離は、例えば、手またはロボットデバイスを用いて基質の手動での移動によって行うこともできる。

10

## 【0164】

本発明の方法は、さらに、プローブ-ゲノム断片ハイブリッドの型決定可能な遺伝子座を検出する工程を含むことができる。本発明の特定の適用に応じて、プローブ-ゲノム断片ハイブリッドは、直接的検出技術、あるいは別法として増幅-ベースの技術を用いて検出することができる。直接的検出技術は、プローブ-断片ハイブリッドにおける核酸のレベルが検出されたシグナルを供するものを含む。例えば、特定のアレイ位置で形成されたハイブリッドの場合には、捕獲されたハイブリッドまたはその構成要素核酸から生起する位置からのシグナルは、ハイブリッドまたはその構成要素核酸を増幅すること無く検出することができる。別法として、検出は、検出される核酸のレベルを増大させるための、プローブまたはゲノム断片または双方の増幅を含むことができる。種々の例示的検出技術の関係で後に記載するように、プローブ核酸、ゲノム断片または双方を標識することができる。さらに、プローブ-断片ハイブリッドにおける核酸は、そのような標識の検出に基づいて、ハイブリッド形成および型決定可能な遺伝子座の検出に先立って、その間に、またはその後に標識することができる。

20

## 【0165】

従って、ゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する方法は、(a)そのような型決定可能な遺伝子座を有するゲノム断片の増幅された表示的集団を提供し、(b)上記ゲノム断片を、プローブ-断片ハイブリッドが形成される条件下で、型決定可能な遺伝子座に対応する配列を有する複数の核酸プローブと接触させ；次いで、(c)上記プローブ-断片ハイブリッドの型決定可能な遺伝子座を直接的に検出する工程を含むことができる。

30

## 【0166】

一般に、直接的か、または増幅技術に基づくかを問わず、検出は、核酸またはそれらの関連した標識に固有の特性を検知する方法によって達成することができる。有用な特性は、例えば、遺伝子座を欠くものから型決定可能な遺伝子座を有する核酸を区別するのに用いることができるものを含む。そのような検出された特性を用いて、異なる核酸を単独で、または検出アレイの区別される位置への付着等の他の方法と組み合わせて区別することができる。検出がそれに基づくことができる例示的特性は、限定されるものではないが、質量、電導度、エネルギー吸収、蛍光などを含む。

40

## 【0167】

蛍光の検出は、核酸またはその標識に励起波長の放射線を照射し、当該分野で既知であり、かつ例えば、Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 第2版, Plenum Press New York (1999)に記載された方法によってそこでのフルオロフォアから発せられた放射線を検出することによって行うことができる。フルオロフォアは、例えば、発光波長、励起波長、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)強度、消光、異方性または寿命を含めた種々の蛍光現象のうちのいずれかに基づいて検出することができる。FRETを用いて、励

50

起されたドナーからアクセプターへのエネルギーの移動による、ドナーフルオロフォアに結合した第一のポリヌクレオチド、およびアクセプターフルオロフォアに結合した第二のポリヌクレオチドの間のハイブリダイゼーションを測定することができる。かくして、ハイブリダイゼーションは、ドナー発光の低下、およびハイブリッドについてのアクセプター発光の出現によって引き起こされた波長のシフトとして検出することができる。加えて、光脱色後の蛍光回復 (F R A P) を用いて、蛍光標識標的ポリヌクレオチドの結合による先に光脱色したアレイ位置で起こる蛍光の増加に従ってハイブリダイゼーションを同定することができる。

#### 【 0 1 6 8 】

型決定可能な遺伝子座を有する核酸を検知しまたは同定するのに用いることができる他の検出技術は、例えば、その質量に基づいて核酸を検知するのに用いることができる質量分析；表面固定化相補的配列への結合に基づいて核酸を検知するのに用いることができる表面プラズモン共鳴；それが吸収するエネルギーの波長に基づいて核酸を検知するのに用いることができる吸収分光分析；相補的配列への結合によりその環境の温度変化に基づいて核酸を検知するのに用いることができる熱量測定；その電気的特性またはその環境の電気的特性の変化に基づいて核酸を検知するのに用いることができる電気的コンダクタンスまたはインピーダンス、磁性核の存在に基づいて核酸を検知するのに用いることができる磁気共鳴、または他の公知の分析的分光測定またはクロマトグラフィー技術を含む。

#### 【 0 1 6 9 】

特別な実施形態において、プローブ - 断片ハイブリッドの型決定可能な遺伝子座は、ハイブリッド種のその後の修飾無くして、ハイブリッド中のプローブ、断片または双方の存在に基づいて検出することができる。例えば、特定の型決定可能な遺伝子座を有するブレ - 標識された断片は、遺伝子座の核酸相補体が存在する特定のアレイ位置での標識の存在に基づいて同定することができる。

#### 【 0 1 7 0 】

本発明は、さらに、( a ) 型決定可能な遺伝子座を有する上記ゲノム断片の増幅された表示的集団を提供し；( b ) ゲノム断片を、固定化されたプローブ - 断片ハイブリッドが形成される条件下で、型決定可能な遺伝子座に対応する配列を有する複数の固定化された核酸プローブと接触させ；( c ) 上記固定化されたプローブ - 断片ハイブリッドを修飾し；次いで、( d ) 修飾されているプローブまたは断片を検出し、それにより、ゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する工程を含むゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する方法を提供する。

#### 【 0 1 7 1 】

特別な実施形態において、整列させた核酸プローブは、検出のためにゲノム断片にハイブリダイズする間に修飾することができる。そのような実施形態は、例えば、米国特許第 6 , 3 5 5 , 4 3 1 号 B 1、米国特許出願第 1 0 / 1 7 7 , 7 2 7 号および / または後に記載される A S P E、S B E、オリゴヌクレオチド連結増幅 ( O L A )、伸長連結 ( G o l d e n G a t e <sup>T M</sup> )、インベータ技術、プローブ切断またはパイロシーケンシングを利用するものを含む。かくして、本発明は、固定化されたプローブがプローブによって捕獲されたゲノム断片の代わりに修飾される態様で行うことができる。別法として、検出は、プローブにハイブリダイズした間でのゲノム断片の修飾を含むことができる。例示的な修飾は、ポリメラーゼ等の酵素によって触媒されるものを含む。有用な修飾は 1 つ以上のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログの 1 つ以上の、テンプレートにハイブリダイズしたプライマーへの一体化であり得、そこでは、プライマーはプローブ - ゲノム - 断片ハイブリッドにおけるプローブまたはゲノム断片いずれかであり得る。そのような修飾はプライムドテンプレートの全てまたは一部の複製を含むことができる。テンプレートプローブまたはゲノム断片の一部のみの複製に導く修飾は、テンプレートの増幅無くしての検出であると理解される。というのは、テンプレートはその全長に沿って複製されるのではないからである。

#### 【 0 1 7 2 】

伸長アッセイは型決定可能な遺伝子座の検出で有用である。伸長アッセイは、一般には、第二の核酸にハイブリダイズした場合に、第一の核酸の3'末端を修飾することによって行われる。第二の核酸は、例えば、第一の核酸のポリメラーゼ-ベースの伸長の間に起こって、1つ以上のヌクレオチドを取り込む塩基対合相互作用によって、修飾のタイプを指令するテンプレートとして働くことができる。ポリメラーゼ伸長アッセイは、例えば、ポリメラーゼの相対的高忠実度、およびその実行の相対的容易性のため、特に有用である。伸長アッセイを行って、例えば、アレイ等の基材に結合した場合に、遊離3'末端を有する核酸プローブを修飾することができる。用いることができる例示的アプローチは、例えば、対立遺伝子特異的プライマー伸長 (ASPE)、単一塩基伸長 (SBE)、またはパイロシーケンシングを含む。

10

#### 【0173】

特別な実施形態において、単一塩基伸長 (SBE) を型決定可能な遺伝子座の検出で用いることができる。SBEの例示的ダイアグラム表示を図2に示す。簡単に述べれば、SBEは、検出部位に近接する、または隣接する位置における標的ゲノム断片にハイブリダイズする伸長プローブを利用し、検出位置は特定の型決定可能な遺伝子座を示す。ポリメラーゼを用いて、本明細書中で先に記載したもの等の検出標識で標識されたヌクレオチドアナログでプローブの3'末端を伸長させることができる。酵素の忠実度に基づき、もしそれが標的ゲノム断片中の検出位置に相補的であれば、ヌクレオチドは伸長プローブに取り込まれるだけである。所望であれば、上記ヌクレオチドは、さらなる伸長が起こり得ず、かくして、単一ヌクレオチドのみが付加されるように誘導体化することができる。伸長されたプローブにおける標識されたヌクレオチドの存在は、例えば、アレイ中の特定の位置で検出することができ、付加されたヌクレオチドを同定して、型決定可能な遺伝子座の同一性配列を決定することができる。SBEは、米国特許出願第09/425,633号に記載されたもの等の公知の条件下で行うことができる。標識されたヌクレオチドは、上記した、またはSyvanen et al., Genomics 8:684-692 (1990); Syvanen et al., Human Mutation 3:172-179 (1994); 米国特許第5,846,710号および第5,888,819号; Pastinen et al., Genomics Res. 7(6):606-614 (1997) 等のどこかに記載されたもの等の方法を用いて検出することができる。

20

30

#### 【0174】

SBE検出で有用なヌクレオチドアナログはジデオキシヌクレオシド三リン酸 (デオキシヌクレオチドまたはddNTP、すなわち、ddATP、ddTTP、ddCTPおよびddGTPとも呼ばれる)、または鎖停止するように誘導体化された他のヌクレオチドアナログも含むことができる。標識された鎖停止ヌクレオチドの使用は、例えば、検出位置を超えての伸長による偽陽性を防ぐように、存在するdNTPの1を超えるタイプを有する反応で有用である。例示的アナログはジデオキシ-三リン酸ヌクレオチド (ddNTP) またはアシクロターミネーター (Perkin Elmer, Foster City, CA) である。一般に、ddATP、ddCTP、ddGTPおよびddTTPを含むヌクレオチドの組を用いることができ、その少なくとも1つは標識を含む。特定の適用で望まれれば、全ての4つが標識されたヌクレオチドの組を用いることができる。標識は全て同一であるか、あるいは別法として、異なるヌクレオチドタイプは異なる標識を有することができる。当業者によって理解されるように、ポリメラーゼ酵素が、型決定可能な遺伝子座を示す質問位置において注目する特定のヌクレオチドを取り込む限り、いずれかの数のまたはそのアナログをプライマーに加えることができる。

40

#### 【0175】

SBE検出方法で用いるヌクレオチドは、さらに、例えば、一次または二次検出可能標識のいずれかであり得る検出可能標識を含むことができる。本明細書中において先に記載された種々の核酸標識のいずれかをSBE検出方法で用いることができる。また、二次標識の使用は、特別な実施形態において未伸長プローブの除去を促進することができる。

50

## 【0176】

SBE用の溶液はDNAポリメラーゼ等の伸長酵素を含むこともできる。適切なDNAポリメラーゼは、限定されるものではないが、DNAポリメラーゼI、SEQUENASE<sup>TM</sup> 1.0およびSEQUENASE<sup>TM</sup> 2.0 (U.S. Biochemical)、T5 DNAポリメラーゼ、Phi29 DNAポリメラーゼ、Thermosequenase<sup>TM</sup> (Tabor-Richardson突然変異を持つTaq)、および当該分野で既知の、または本明細書中に記載されたその他のクレノウ断片を含む。もしヌクレオチドが、伸長プライマーと隣接する標的配列の検出位置の塩基に相補的であれば、伸長酵素はそれを伸長プライマーに加えるであろう。かくして、伸長プライマーは修飾され、すなわち、伸長されて、修飾されたプライマーを形成する。

10

## 【0177】

反応における未伸長プライマーの量が得られた伸長された - 標識プライマーを大幅に超え、かつ過剰の未伸長プライマーが標識プライマーの検出に競合する実施形態において、未伸長プライマーを除去することができる。例えば、未伸長プライマーは、少量のDNA標的で行われるSBE反応から除去することができる。未伸長プライマーを除去するための有用な方法は本明細書中に記載する。さらに、一本鎖プローブはプローブのアレイから優先的に除去でき、エキソヌクレアーゼ処理等の後にさらに詳しく記載する方法を用いて二本鎖プローブ - 標的ハイブリッドを残す。そのような方法は、例えば、非テンプレート指向性プローブ標識から生起するバックグラウンドを除去することによって、増大したアッセイ感度および選択的検出を供することができる。

20

## 【0178】

当業者に理解されるように、SBE反応の配置は一部の形態のうちのいずれかを取ることができる。特別な実施形態において、反応は溶液で行うことができ、次いで、塩基 - 特異的検出可能標識を持つ新たに合成されたストランドを検出することができる。例えば、それらは直接的にハイブリダイズさせて、伸長プライマーに相補的なプローブを捕獲することができ、次いで、標識の存在を検出することができる。そのような配置は、例えば、ゲノム断片を捕獲プローブとして整列させた場合に有用である。別法として、SBE反応は表面で起こり得る。例えば、ゲノム断片は、断片の第一の標的ドメインにハイブリダイズする第一の捕獲プローブを用いて捕獲することができ、反応は、プローブが図2Aに示されたように修飾されるように進行することができる。

30

## 【0179】

検出位置における塩基の測定は、一部の方法のいずれかで進行させることができる。特別な実施形態において、混合した反応を2、3または4の異なるヌクレオチドで行うことができ、各々は異なる標識を備えたものである。この実施形態において、プローブ上の標識を取り込まれなかった標識から区別して、いずれのヌクレオチドがプローブを取り込んだかを決定することができる。別法として、区別される反応は、各々、異なる標識ヌクレオチドで行うことができる。これは、単一基材結合プローブおよび順次の反応を用いることによって、あるいは複数基材 - 結合プローブに同一反応を曝露することによって行うことができ、後者の場合は図2Aに示される。例えば、dATPをプローブ - 断片ハイブリッドに加えることができ、シグナルの生成を評価することができ；dATPを除去し、dTTPを加えることができるなどである。別法として、4つのアレイを用いることができ；第一のものをdATPと反応させ、第二のものをdTTPと反応させるなどであり、シグナルの存在または不存在を各アレイで評価する。

40

## 【0180】

別法として、放射分析を行うことができ；例えば、2つの基材（例えば、2つのアレイ）上の2つの標識「A」および「B」を検出することができる。この実施形態において、プライマー伸長反応の2つの組を行い、各々は2つのアレイ上にあり、各反応は4つの鎖停止NTPの完全な組を含む。第一の反応は2つの「A」標識ヌクレオチドおよび2つの「B」標識ヌクレオチドを含む（例えば、AおよびCは「A」標識でき、GおよびTは「B」標識できる）。第二の反応は2つの標識を含むが、スイッチされ；例えば、Aおよび

50

Gは「A」標識され、TおよびCは「B」標識される。この反応組成は、二対立遺伝子マーカが放射線スコア取りできるようにし；すなわち、単一基材上の2つの異なる「色」チャンネルにおける2つの標識の強度を、2つのハイブリダイズしたアレイの組からのデータを用いて比較する。例えば、もしマーカがA/Gであれば、第一のアレイ上の第一の反応を用いて、放射遺伝子型分類スコアを計算し；もしマーカがA/Cであれば、第二のアレイ上の第二の反応を計算で用い；もしマーカがG/Tであれば、第二のアレイを用いる、などである。この概念は全ての可能な二対立遺伝子マーカ組合せに適用することができる。このように、単一繊維放射スコアを用いる遺伝子型のスコア取りは、2つの異なるアレイの間の絶対的または正規化された強度の比較を用いて遺伝子型をスコア取りするよりも頑強な遺伝子型分類を可能とすることができる。

10

#### 【0181】

図2に例示されたSBE反応は、4つの個別の反応が単一標識を用いて4つの個別のアレイで行われる実施形態を示す。さらなる実施形態は、4よりも少ないプローブ集団またはアレイと組み合わせた1を超えるタイプの標識の使用を含むことができる。例えば、SBEは、単一の反応および単一のプローブ集団を用いて2色モードで行うことができる。このモードにおいては、全ての4つの鎖停止ヌクレオチドは、第一のタイプの標識を担うヌクレオチドの2つ、および第二のタイプの標識を担う他の2つにて存在させることができる。第一の標識はAおよびCで用いることができ、他方、第二の標識はGおよびT（またはGおよびU）で用いられる。この例示的標識スキームは天然で生じるヒトSNPのほぼ80%の検出を可能とする。というのは、最も豊富なヒトSNPはA/GおよびC/T多型だからである。当業者であれば、所望であれば、他の標識スキームを用いて、例えば、特定の生物における多型の豊富さを確認し、または特定の適用で検出すべき多型の所望のタイプを確認することができるのを理解するであろう。複数の標識タイプでのSBEの使用は、遺伝子型分類データを得るのに必要なアレイおよび反応の数を低下させる非限定的利点を提供することができる。

20

#### 【0182】

単一塩基配列決定(SBE)は、1つ以上の非鎖停止ヌクレオチドを伸長反応に含める以外は、SBEに関して上記したように行うことができる伸長アッセイである。かくして、本発明によると、1つ以上の非鎖停止ヌクレオチドを、例えば、上記したものを含めたSBE反応に含めることができる。

30

#### 【0183】

SBSの例示的实施形態は、2つの個別のプローブ集団について2つの個別の反応を行うことである。2つの個別の反応は、有利には、単一標識を用いて行われ；しかしながら、所望であれば、1を超えるタイプの標識を用いることができる。第一の反応は、伸長可能であって、ゲノムDNA中の4つの天然に生じるヌクレオチドのうちの2つにハイブリダイズできる2つの異なる標識されたヌクレオチドを含むことができる。第二の反応は2つの異なるヌクレオチドを含むことができ、上記ヌクレオチドは標識され、かつゲノムDNA中の他の2つの天然に生じるヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。2つの反応の各々は他の反応に見出されるヌクレオチドを欠乏させることができるか、あるいは他の反応で見出されるヌクレオチドの鎖停止アナログを含めることができる。その例として、第一の反応(ホットAC反応)はdATP-ビオチンおよびdCTP-ビオチンを含むことができる。この第一の反応はGTP、UTPおよびTTPを欠くことができる。別法として、第一の反応はジデオキシGTPおよびジデオキシUTP(またはジデオキシGTPおよびジデオキシTTP)を含むことができる。上記例を継続し、第二の反応(ホットGU反応)はdGTP-ビオチンおよびdUTP-ビオチン(またはdGTP-ビオチンおよびdTTP-ビオチン)を含むことができる。この第二の反応はCTPまたはATPを欠くことができる。別法として、第二の反応はジデオキシCTPおよびジデオキシATPを含むことができる。この例示的標識スキームは天然に生じるヒトSNPのほぼ80%の検出を可能とする。というのは、豊富なヒトSNPの大半はA/GおよびC/T多型だからである。

40

50



## 【0184】

A S P E は、それらの 3' 末端においてヌクレオチド組成が異なる伸長プローブを利用する伸長アッセイである。A S P E の例示的ダイアグラム表示を図 2 B に示す。簡単に述べれば、A S P E は、標的ゲノム断片を、検出位置に対して相補的な 3' 配列部分、および検出位置に隣接する配列に対して相補的である 5' 部分を有する伸長プローブにハイブリダイズさせることによって行うことができる。例えば、ポリメラーゼによる標識されたヌクレオチドの付加による、プローブの 3' 部分のテンプレート指向性修飾により標識された伸長生成物が得られるが、テンプレートが標的配列を含む場合のみである。次いで、そのような標識されたプライマー - 伸長生成物の存在は、例えば、アレイ中のその位置に基づいて検出して、特定の型決定可能な遺伝子座の存在を示すことができる。

10

## 【0185】

特別な実施形態において、A S P E は、検出位置に相補的な 3' 末端を有するプローブのみがポリメラーゼによって修飾されるように、それらが異なる 3' 末端を除いて標的ゲノム断片中の同一検出位置に隣接してアニールされるように、同様な 5' 末端を有する複数伸長プローブで行うことができる。図 2 B に示すように、特定の検出位置に相補的な 3' 末端塩基を有するプローブを、上記位置についてのパーフェクトマッチ (P M) プローブといい、他方、3' 末端ミスマッチ塩基を有し、A S P E 反応で伸長できないプローブは、上記位置に関してミスマッチ (M M) プローブである。P M プローブにおける標識されたヌクレオチドの存在を検出することができ、プローブの 3' 配列を決定して、特定の型決定可能な遺伝子座を同定することができる。A S P E 反応は、例えば、区別されるアレイ位置における 1、2 または 3 の異なる M M プローブを含むことができ、上記数はアッセイすべき特定の遺伝子座で起こる多様性に依存して選択される。例えば、2 つのプローブを用いて、特定の遺伝子座についての 2 つの対立遺伝子のいずれが試料に存在するかを決定することができ、他方、3 つの異なるプローブを用いて、3 - 対立遺伝子の座の対立遺伝子を区別することができる。

20

## 【0186】

特別な実施形態において、A S P E 反応は、鎖停止するように誘導体化されたヌクレオチドアナログを含むことができる。かくして、プローブ - 断片ハイブリッドにおける P M プローブは、さらなる伸長無くして単一ヌクレオチドアナログを取り込むように修飾することができる。例示的な鎖停止ヌクレオチドアナログは、限定されるものではないが、S B E 反応に関して上記したものを含む。さらに、それらが鎖停止するものであるか否かを問わず、A S P E 反応で用いる 1 つ以上のヌクレオチドは、本明細書中において先に記載したもの等の検出標識を含むことができる。例えば、A S P E 反応は、実施例 I I I に例示された単一ピオチン標識 d N T P を含むことができる。所望であれば、A S P E 反応における 1 を超えるヌクレオチドを標識することができる。例えば、実施例 I I に記載したもの等の反応条件を修飾して、ピオチニル化 d C T P ならびにピオチニル化 d G T P およびピオチニル化 d T T P を含むようにすることができる。A S P E 反応は全ての 4 つのヌクレオチド A、C、T および G の存在下で、あるいは、例えば、実質的な量の A、C、T または G の 1 つ以上を欠くサブセットを含めたこれらのヌクレオチドのサブセットの存在下で行うことができる。

30

40

## 【0187】

パイロシーケンシングは、1 つ以上のヌクレオチドを検出位置に加えるのに用いることができる伸長アッセイである；型決定可能な遺伝子座の同定が、ヌクレオチドに付着した標識上よりはむしろ、伸長されたプローブへの d N T P の付加の間に生じた、反応生成物のピロホスフェート (P P i) の検出に基づく以外は S B E と同様である。P P i の 1 つの分子が、伸長プライマーに加えられた d N T P 当たりに生じる。すなわち、ヌクレオチドの各々との順次の反応を実行し、反応生成物をモニタリングすることによって、付加された塩基の同一性を判断することができる。パイロシーケンシングは、U S 2 0 0 2 / 0 0 0 1 8 0 1 に記載されたもの等の条件を用いて本発明で用いることができる。

## 【0188】

50

特別な実施形態において、固定化されたプローブ - 断片ハイブリッドの修飾は、1つ以上のミスマッチした塩基対を有するハイブリッドの切断または分解を含むことができる。本明細書中に記載した他の修飾に関しては、パーフェクトマッチしたハイブリッドと比較して1つ以上のミスマッチを有するハイブリッドの選択的修飾をもたらす条件を使用することができる。例えば、A S P E - ベースの検出方法においては、ミスマッチプローブ - 断片ハイブリッドは、パーフェクトマッチプローブ - 断片ハイブリッドと比較して選択的に切断または分解することができる。例えば、ハイブリッドを、塩基対ミスマッチを認識し、結合切断によるなどしてミスマッチしたハイブリッドを修飾することができる剤と接触させることができる。例示的剤は、DNAグリコシラーゼ、Cel I、T4エンドヌクレアーゼV II、T7エンドヌクレアーゼI、マングリーエンドヌクレアーゼまたは Mut - y、またはBradley et al., Nuc l . A c i d s R e s . 3 2 : 2 6 3 2 - 2 6 4 1 ( 2 0 0 4 ) に記載されたもの等の他のもののごときミスマッチした塩基対を有するハイブリッドを認識し、それを切断する酵素を含む。ミスマッチしたハイブリッドから生じた切断生成物は、例えば、洗浄によって除去することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0189】

従って、本発明の方法は、ミスマッチプローブ - 断片ハイブリッドの切断と共にA S P Eを用いて固定化されたプローブ - 断片ハイブリッドを修飾することを含むことができる。組み合わせる双方の修飾工程を用いる利点は、工程の1つのみの使用と比較して特異性を増大させることができることである。例えば、A S P E検出を用いる場合、特異性の第一のレベルは、伸長ポリメラーゼによるマッチおよびミスマッチプライマーの区別により得られる。望ましくないミスマッチプライマー伸長が起こる場合、ミスマッチしたハイブリッドの切断はミスマッチプローブによる人工的シグナルを妨げるよう働くことができ、それにより、アッセイの特異性および感度を増加させる。同様に、特異性および感度は、連結ベースのアッセイ等の本明細書中に記載された他の検出方法で形成されたミスマッチハイブリッドにより生起する人工的シグナルを除去することによって増加させることができる。ミスマッチハイブリッドは、本明細書中に開示された方法に従って液相または固相固定化ハイブリッドから除去することができる。

#### 【0190】

特別な実施形態において、A S P E反応は、パーフェクトマッチプローブ - 断片ハイブリッドの伸長が完了するように駆動され、実質的な量のミスマッチプローブ - 断片ハイブリッドもまた伸長される条件下で行うことができる。例えば、AおよびB対立遺伝子を有する遺伝子座の場合には、パーフェクトマッチプローブは、A A個体を持つ完全なハイブリッドを形成するホモ接合性対立遺伝子Aに対して設計することができ、ミスマッチプローブはB B個体を持つ完全なハイブリッドを形成するホモ接合性対立遺伝子Bに対して設計することができる。従って、パーフェクトマッチおよびミスマッチプローブの役割は、観察下での試料に応じて留保することができる。ミスマッチ伸長の生成物は、伸長した生成物において1つのミスマッチ塩基対を有し、パーフェクトマッチはミスマッチを含まないであろう。ミスマッチプローブによって生じたシグナルの特異的除去は、パーフェクトマッチ伸長からのシグナルを無傷としつつ、パーフェクトマッチおよびミスマッチの間のより大きな区別を作り出す第二の区別工程を付け加えることができ、パーフェクトマッチプローブのポリメラーゼ - ベースの修飾のみに基づく検出と比較して、より特異的な遺伝子型分類アッセイを創製する。

#### 【0191】

所望ならば、プローブ - 断片ハイブリッドの一部ではない固定化されたプローブはプローブ - 断片ハイブリッドと比較して選択的に修飾することができる。ハイブリダイズしなかったプローブの選択的修飾を用いて、例えば、ポリメラーゼ伸長アッセイの間にテンプレート独立的に標識されたプローブを除去することによってアッセイの特異性および感度を増加させることができる。特に有用な選択的修飾は、ハイブリダイゼーション条件下での標的との接触に続いて、集団またはプローブのアレイに存在する一本鎖プローブの分解または切断である。一本鎖核酸を分解する例示的な酵素は、限定されるものではないが、

エキソヌクレアーゼ 1 つまたはラムダエキソヌクレアーゼを含む。

【0192】

その 3' 末端における反応性ヒドロキシルを持つプローブ、およびポリメラーゼ伸長を利用する実施形態において、有用なエキソヌクレアーゼは、3' ~ 5' 方向に一本鎖 DNA を優先的に消化するものである。かくして、特定のアッセイ条件下で形成される二本鎖プローブ - 標的ハイブリッドは、プローブのポリメラーゼ伸長用のテンプレートとして働く標的の 3' 突出の場合のように、分解から優先的に保護される。しかしながら、アッセイ条件下で標的にハイブリダイズしない一本鎖プローブは優先的に分解される。さらに、そのようなエンドヌクレアーゼ処理は、断片または核酸が、標的核酸の非プローブ相互作用部分との相互作用のためアレイにより保持される場合に、ゲノム断片または他の核酸の一本鎖領域を優先的に分解することができる。かくして、エキソヌクレアーゼ処理は、プローブに結合した 2 つ以上の核酸のブリッジ形成ネットワークのため生起し得るアーチファクトを妨げることができる。エキソヌクレアーゼでの消化は、典型的には、プローブ伸長工程の後に行われる。

【0193】

一部の実施形態において、型決定可能な遺伝子座の検出は、プローブ - 断片ハイブリッドの形成に続くゲノム - 断片標的の増幅を含むことができ、それは、標的分子の数の有意な増加をもたらす。標的増幅 - ベースの検出技術は、例えば、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR)、ストランド置き換え増幅 (SDA)、または核酸配列ベースの増幅 (NASBA) を含むことができる。別法として、標的を増幅するよりはむしろ、代替技術はテンプレートとしての標的を用いて、ハイブリダイズしたプローブを複製し、少数の標的分子が多数のシグナリングプローブをもたらし、次いで、これは検出することができる。プローブ増幅 - ベースの戦略は、例えば、リガーゼ鎖反応 (LCR)、サイクリングプローブ技術 (CPT)、インベダー (Invader) TM 技術等の侵襲性切断技術、Q - Beta レプリカーゼ (Q<sub>β</sub>R) 技術またはサンドイッチアッセイを含む。そのような技術は、例えば、米国特許出願第 60 / 161, 148 号、第 09 / 553, 993 号および第 090 / 556, 463 号；および米国特許第 6, 355, 431 号 B1 に記載され、あるいは後に記載される条件下で行うことができる。これらの技術は、整列された核酸プローブにハイブリダイズする標的核酸として用いられるゲノム断片との関係で後に例示する。そのような実施形態においては、ゲノム断片はプローブとして整列させ、合成核酸標的にハイブリダイズさせることができるのは理解されよう。

【0194】

オリゴヌクレオチド連結増幅 (OLA) での消化は、テンプレートとしてゲノム - 断片標的配列を用いて、2 つのより小さなプローブを単一の長いプローブにテンプレート - 依存的に連結することを含む。特別な実施形態において、一本鎖標的配列は第一の標的ドメインおよび第二の標的ドメインを含み、それらは隣接し、かつ連続したものである。第一の OLA プローブおよび第二の OLA プローブは、各標的ドメインの相補的配列にハイブリダイズさせることができる。次いで、2 つの OLA プローブを相互に共有結合させて、修飾されたプローブを形成する。プローブが相互に直接的に隣接してハイブリダイズする実施形態において、共有結合はリガーゼを介して起こることができる。1 つの実施形態において、連結プローブの一方はアレイまたは粒子等の表面に付着させることができる。さらに別の実施形態において、双方の連結プローブをアレイまたは粒子等の表面に結合させることができる。

【0195】

別法として、伸長連結 (Goldengate<sup>TM</sup>) アッセイを用いることができ、ここでは、ハイブリダイズしたプローブは連続するものではなく、1 つ以上のヌクレオチドが、付加されたヌクレオチドを介してプローブを接合する 1 つ以上の剤と共に加えられる。例示的剤は、例えば、ポリメラーゼおよびリガーゼを含む。所望であれば、修飾されたプローブおよび標的の間のハイブリッドを変性することができ、連結されたプローブのプールの創製に導く増幅に関して上記プロセスを反復することができる。上記したように、

これらの伸長 - 連結プローブはアレイまたは粒子等の表面に付着させることができるが、その必要はない。本発明で有用な伸長連結アッセイのためのさらに別の条件は、例えば、米国特許第 6,355,431 号 B1 および米国出願第 10/177,727 号に記載されている。

#### 【0196】

OLA は、二本鎖ゲノム断片標的を用いる場合には、連結鎖反応 (LCR) といわれる。LCR においては、標的配列を変性し、プローブの 2 つの組を加える：1 つの組は標的の 1 つのストランドに関して上記で概説した通りであり、別の組 (すなわち、第三および第四プライマープローブの核酸) は標的の他のストランドについて上記で解説した通りである。第一および第二のプローブが標的にハイブリダイズし、伸長されたプローブを形成するように修飾される条件を用いることができる。標的 - 修飾プローブハイブリッドの変性に続き、第二の標的配列に加えて、第三および第四のプローブの付着のために、修飾されたプローブをテンプレートとして用いることができる。同様に、連結した第三および第四のプローブは、第一の標的ストランドに加えて、第一および第二のプローブの付着用のテンプレートとして働くことができる。このようにして、丁度直線状よりはむしろ指数関数的な増幅が、変性および連結のプロセスを反復した場合に起こり得る。

10

#### 【0197】

修飾された OLA プローブ生成物は種々の方法のいずれかで検出することができる。特別な実施形態において、テンプレート - 指向性プローブ修飾反応は、溶液中で行うことができ、修飾されたプローブはアレイ中の捕獲プローブにハイブリダイズする。捕獲プローブは、一般には、修飾された OLA プローブの少なくとも一部に対して相補的である。例示的な実施形態において、第一の OLA プローブは検出可能な標識を含むことができ、第二の OLA プローブは捕獲プローブに対して実質的に相補的であり得る。この実施形態の非限定的利点は、アッセイで修飾されなかった標識プローブの存在によるアーチファクトが最小化されることである。何故ならば、未修飾プローブは、捕獲プローブによってハイブリダイズされる相補的配列を含まないからである。また、OLA 検出技術は、反応混合物を、例えば、米国特許第 6,355,431 号 B1 に記載された捕獲プローブと接触させるに先立ち、反応混合物から未修飾標的プローブを除去する工程を含むこともできる。

20

#### 【0198】

別法として、ゲノム断片標識は固相表面に固定化することができ、ハイブリダイズした OLA プローブを修飾する反応は固相表面で行うことができる。未修飾プローブは適切なストリンジェンシー下での洗浄によって除去することができる。次いで、修飾されたプローブを、0.1N NaOH 等の変性条件を用いてゲノム断片標的から溶出させることができ、本明細書中に記載したように検出することができる。ゲノム断片が、OLA 技術において標的配列として用いる場合に検出できる他の条件は、例えば、米国特許第 6,355,431 号 B1、第 5,185,243 号、第 5,679,524 号および第 5,573,907 号；EP 0 320 308 B1；EP 0 336 731 B1；EP 0 439 182 B1；WO 90/01069；WO 89/12696；WO 97/31256；および WO 89/09835 および米国出願第 60/078,102 号および第 60/073,011 号に記載されたものを含む。

30

40

#### 【0199】

型決定可能な遺伝子座は、ローリングサークル増幅 (RCA) を用いて本発明の方法で検出することができる。第一の実施形態において、単一プローブを、上記プローブが標的にハイブリダイズしている間に環状化されるように、ゲノム断片標的にハイブリダイズさせることができる。上記プローブの各末端は標的核酸上に隣接してハイブリダイズし、ポリメラーゼの付加の結果、環状プローブが伸長される。しかしながら、プローブは末端を有しないので、ポリメラーゼはプローブを反復して伸長し続ける。この結果、環状プローブが増幅される。RCA に続き、増幅された環状プローブを検出することができる。これは、種々の方法で達成することができ；例えば、プライマーを標識することができ、あるいはポリメラーゼを標識されたヌクレオチドに組み込み、標識された生成物を検出アレイ

50

において捕獲プローブによって検出することができる。ローリング - サークル増幅は、一般には、Baner et al. (1998) Nuc. Acids Res. 26: 5073 - 5078; Barany, F. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189 - 193; および Lizardi et al. (1998) Nat. Genet. 19: 225 - 232 に記載されたもの等の条件下で行うことができる。

#### 【0200】

さらに、本発明で用いるローリングサークルプローブは、標的にアニールしない場合にそれらを複製できなくする構造的特徴を有することができる。例えば、標的にアニールする末端の一方または双方は、ヘアピン構造等の分子内ステム構造を形成する配列を有することができる。ステム構造は、正当な標的配列にハイブリダイズする場合にオープンサークルプローブが環状化されるようにするが、環状化されないオープンサークルプローブの不活化をもたらす配列で作成することができる。この不活化は、検出アッセイにおいて修飾されたプローブの合成の起点となり、またはローリングサークル増幅のためのテンプレートとして働くオープンサークル能力を低下させ、または排除する。分子内ステム構造を形成することができる例示的プローブ、および本発明で用いることができるそれらの使用方法は米国特許第 6 5 7 3 0 5 1 号に記載されている。

#### 【0201】

さらに別の実施形態において、検出は O L A、続く R C A を含むことができる。この実施形態において、固定化されたプライマーをゲノム断片標的と接触させることができる。相補的配列は相互にハイブリダイズし、その結果、固定化されていない二重鎖がもたらされる。また、第二のプライマーを標的核酸と接触させることができる。第二のプライマーは第一のプライマーに隣接した標的核酸とハイブリダイズする。O L A 反応を行って、第一および第二のプライマーを、例えば、上記した修飾されたプライマー生成物として付着させることができる。次いで、ゲノム断片を除去し、固定化された修飾プライマー生成物を、未修飾固定化プライマーではなく修飾されたプライマー生成物に相補的な R C A プローブとハイブリダイズさせることができる。次いで、R C A 反応を行うことができる。

#### 【0202】

特別な実施形態において、パドロックプローブを O L A のため、および R C A 用の環状テンプレートとして用いることができる。パドロックプローブの各末端は、ゲノム断片標的に相補的な配列を含むことができる。より具体的には、パドロックプローブの第一の末端は第一の標的ドメインに対して実質的に相補性とすることができ、R C A プローブの第二の末端は、第一のドメインに隣接した第二の標的ドメインに対して実質的に相補的とすることができる。ゲノム断片標的へのパドロックプローブのハイブリダイゼーションの結果、ハイブリダイゼーション複合体が形成される。単一オリゴヌクレオチドの区別される末端の連結の結果、R C A テンプレート複合体として作用する環状プローブを含有する修飾されたハイブリダイゼーション複合体が形成される。R C A テンプレート複合体へのポリメラーゼの付加は、増幅された生成物の核酸の形成を可能とすることができる。R C A に続いて、増幅された生成物の核酸を、例えば、アレイに対するハイブリダイゼーションによって直接的にまたは間接的に検出することができ、関連した標識を検出することができる。

#### 【0203】

本発明で用いるパドロックプローブは、さらに、アダプター配列、コンカテマーを切断するための制限部位、標識配列、または、例えば、米国特許第 6, 3 5 5, 4 3 1 号 B 1 に記載された R C A 反応の起点となるプライミング部位を含むことができる。この同一特許は、本発明の方法においてゲノム断片標的の型決定可能な遺伝子座を検出するのに用いることができるパドロックプローブ方法も記載する。

#### 【0204】

本発明の方法において型決定可能な遺伝子座を検出するのに用いることができる L C R の変形は、米国特許第 5, 6 1 6, 4 6 4 号および第 5, 7 6 7, 2 5 9 号に記載された

10

20

30

40

50

もの等の条件下での化学的連結を利用する。この実施形態においては、酵素修飾と同様に、プローブの対を利用することができ、そこでは、第一のプローブは標的ゲノム断片の第一のドメインに対して実質的に相補的であって、第二のプローブは標的の隣接する第二のドメインに対して実質的に相補的である。各プローブは、標的配列を結合するよりはむしろプローブの間に非共有結合ステム構造の1つの半分を形成する「側鎖」として働く部分を含むことができる。特別な実施形態は、側鎖として実質的に相補的な核酸を利用する。かくして、プローブの標的配列へのハイブリダイゼーションに対して、プローブの側鎖は空間的に近接させる。側鎖の少なくとも1つは、一般的には、活性化に際して、隣接プローブとで化学的架橋または化学的連結をもたらす、側鎖に共有結合した活性化可能架橋剤を含むことができる。活性化可能基は、側鎖の架橋を可能とするいずれの部位も含むことができ、それは、光活性化可能基等の化学的に、光学的（フォトミック）にまたは熱的に活性化された基を含む。一部の実施形態において、側鎖の1つ上の単一の活性化可能基は、他の側鎖上の官能基への相互作用を介する架橋をもたらすのに十分であり；別の実施形態において、活性化可能基は各側鎖に含めることができる。プローブの一方または双方は標識することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0205】

一旦ハイブリダイゼーション複合体が形成されれば、プローブが相互に共有結合されるように、架橋剤は活性化されており、反応はハイブリダイゼーション複合体の解離を可能とする条件に付すことができ、かくして、標的を遊離させて、次の連結または架橋のためのテンプレートとして働かすことができる。このようにして、シグナル増幅が起こることができ、架橋した生成物は、例えば、アレイへのハイブリダイゼーションによって直接的にまたは間接的に検出することができ、解離した標識は検出することができる。

#### 【0206】

特別な実施形態において、増幅 - ベースの検出は、侵襲的切断技術を用いて達成することができる。そのようなアプローチを用い、ゲノム断片標的を2つの区別されるプローブにハイブリダイズさせることができる。2つのプローブは、ゲノム断片標的の第一の部分に対して実質的に相補的であるインベータプローブ、および検出位置を有する配列に対して実質的に相補的な3'末端、および一本鎖テイルを形成することができる5'非相補的末端を有するシグナルプローブである。上記テイルは検出配列を含むことができ、典型的には、少なくとも1つの検出可能標識も含む。しかしながら、シグナルプローブ中の検出配列は捕獲プローブ用の標的配列として機能することができるので、標識プローブを利用するサンドイッチ配置を本明細書中に記載したように用いることができ、シグナルプローブは検出可能な標識を含む必要がない。

#### 【0207】

上記インベータ、およびゲノム断片標的上のさらに別の近くの、またはそれに隣接するシグナルプローブのハイブリダイゼーションは、プローブ - 断片ハイブリッドの検出で有用な一部の構造のうちのいずれかを形成することができる。例えば、フォーク型の切断構造を形成することができ、それにより、検出配列をシグナルプローブから切断するヌクレアーゼに対する基質を供することができる。切断の部位は、インベータプローブの3'末端およびシグナルプローブの下流フォークの間の距離または重複によって制御することができる。従って、誤整列した場合、あるいはゲノム断片標的に付着しなかった場合、いずれのオリゴヌクレオチドも切断されない。

#### 【0208】

特別な実施形態において、フォーク型切断構造を認識し、テイルの放出を触媒する熱安定性ヌクレアーゼを用いることができ、それにより、切断反応の熱サイクリンを行うことが可能となり、所望であれば、増幅する。用いることができる例示的ヌクレアーゼは、限定されるものではないが、*Thermusaquaticus*、*Thermusflavus*、または*Thermusthermophilus*に由来するもの；米国特許第5,719,028号および第5,843,669号に記載されたもの、または例えば、米国特許第5,843,669号およびLyamichev et al., *Natur*

e Biotechnology 17:292-297 (1999) に記載された Flap エンドヌクレアーゼ (FEN) を含む。

【0209】

所望であれば、切断されたシグナルプローブの 3' 部分を、例えば、ビーズ結合ストレプトアビジン等の固相捕獲タグへ結合させることによって、または捕獲タグを通じて架橋させて凝集体を生じさせることによって、抽出することができる。シグナルプローブの 5' 検出配列は、アレイ上のプローブへのハイブリダイゼーション等の後に記載する方法を用いて検出することができる。侵襲的切断技術は、さらに、例えば、米国特許第 6,355,431 号; 第 5,846,717 号; 第 5,614,402 号; 第 5,719,028 号; 第 5,541,311 号; または第 5,843,669 号に記載された条件および検出方法を用いて本発明で用いることができる。

10

【0210】

型決定可能な遺伝子座を検出するのに用いることができるさらなる増幅 - ベースの検出技術はサイクリングプローブ技術 (CPT) である。CPT プローブは分裂可能な結合によって分離された 2 つのプローブ配列を含むことができる。上記 CPT プローブはゲノム断片標的配列に対して実質的に相補的であって、かくして、それにハイブリダイズして、プローブ - 断片ハイブリッドを形成する。上記 CPT プローブは本発明の方法においてゲノム断片標的にハイブリダイズさせることができる。典型的には、一次プローブが結合し、一次プローブのより短い切断された一部分が解離するように、温度およびプローブ配列を選択する。特定の適用に依存して、CPT は溶液で行うことができるか、あるいは標的または分裂可能プローブを固体支持体に結合させることができる。上記方法で形成されたプローブ - 断片ハイブリッドは、標的配列を切断すること無く、分裂可能結合を選択的に切断させ、それにより、2 つのプローブ配列を分離する切断条件に付すことができる。2 つのプローブ配列は、次いで、標的から解離させることができる。特別な実施形態において、過剰のプローブを用いることができ、有効な量の切断されたプローブが増幅されるように、反応をいずれかの回数反復させる。

20

【0211】

プローブがハイブリダイゼーション複合体である場合、すなわち、二本鎖複合体が形成される場合、選択的に切断できる CPT プローブ内のいずれかの結合を分裂可能結合として用いることができる。例えば、DNA:RNA ハイブリッドにおける場合、リボヌクレアーゼ等の種々の二本鎖ヌクレアーゼによって切断することができる RNA を含めた種々の分裂可能結合のいずれかを本発明で用いることができる。そのようなヌクレアーゼは、そのようなハイブリッドまたは一本鎖 DNA における DNA よりはむしろ、RNA:DNA ハイブリダイゼーション複合体から RNA ヌクレオシドを選択的にニックし、またはそれを切り出す。本発明で用いることができる分裂可能結合および切断剤のさらに別の例は、米国特許第 6,355,431 号 B1 およびそこに引用された文献に記載されている。

30

【0212】

CPT 切断反応の完了に際して、切断されたプローブの検出に先立って、切断しなかった分裂可能プローブを除去し、または中和して、所望であれば、偽陽性シグナルを回避することができる。これは、例えば、CPT 反応に続いて、溶液に放出された切断プローブを支持体上に残る切断されていないプローブから物理的に分離することができるような切断に先立ち、例えば、支持体へのプローブの結合を含めた種々の方法のうちのいずれかで行うことができる。切断されなかった、および切断されたプローブは、例えば、米国特許第 6,355,431 号に記載された方法を用い、長さの差、特定の結合標識または配列の捕獲に基づいて分離することもできる。

40

【0213】

CPT 反応によって生じた切断プローブは、アレイへのハイブリダイゼーション等の方法、または本明細書中に記載された他の方法を用いて検出することができる。例えば、切断されたプローブは、直接的にまたは間接的に捕獲プローブに結合することができ、関連した標識を検出することができる。CPT 技術は、例えば、米国特許第 5,011,76

50

9号；第5，403，711号；第5，660，988号；および第4，876，187号、およびPCT公開出願WO 95/05484；WO 95/1416、およびWO 95/00667、および米国出願第09/014，304号に記載された条件下で行うことができる。

#### 【0214】

特別な実施形態において、分裂可能結合を含有するプローブでのCPTを用いて、米国特許第5，660，988号およびWO 95/14106に一般的に記載されているように、ミスマッチを検出することができる。そのような実施形態において、分裂可能結合の配列は、検出すべき特定の配列、すなわち、推定ミスマッチの領域に対応するより長い配列内の位置に位置させることができる。ミスマッチ検出の一部の実施形態において、放出された断片の創製速度は、上記方法が実質的には是/非結果を供するようなものであり、それにより、実質的にいずれの放出された断片の検出も所望の型決定可能な遺伝子座の存在を示す。別法として、あるいは加えて、最終量の切断された断片を定量して、型決定可能な遺伝子座の存在または不存在を示すことができる。

#### 【0215】

プローブ-断片ハイブリッドの型決定可能な遺伝子座は、サンドイッチアッセイを用いて本発明の方法で検出することもできる。サンドイッチアッセイは増幅-ベースの技術であって、そこでは、典型的には標識された多数のプローブが単一のゲノム断片標的に結合される。例示的な実施形態において、ゲノム断片標的は相補的捕獲プローブを介して固体基材に結合することができる。典型的には、ユニークな捕獲プローブを、検出すべき各パイパブル遺伝子座配列に対して存在させる。ビーズアレイの場合には、各ビーズはユニークな捕獲プローブの1つを有することができる。所望であれば、捕獲エクステンダープローブを用いることができ、これはユニバーサル表面が、複数標的配列を検出するのに用いることができる単一タイプの捕獲プローブを有するようにすることができる。捕獲エクステンダープローブは捕獲プローブの全てまたは一部にハイブリダイズする第一の部分、および検出すべき標的配列の第一の部分にハイブリダイズする第二の部分を含む。従って、慣用化された多様性プローブを生じさせることができ、これは、当業者に理解されるように、単純化することができ、本発明の多くの適用においてコストを低下させることができる。特別な実施形態において、2つの捕獲エクステンダープローブを用いることができる。これは、例えば、検出すべき標的配列が大きい場合、または大きなアンプリファイアープローブ（特に、分岐したまたはデンドリマーアンプリファイアープローブ）を用いる場合に、アッセイ複合体を安定化する非限定的利点を供することができる。

#### 【0216】

一旦、捕獲プローブを介して、ビーズ等の固体基材にゲノム断片標的が結合してしまったならば、アンプリファイアープローブを断片にハイブリダイズさせて、プローブ-断片ハイブリッドを形成することができる。本発明の方法で用いることができる例示的アンプリファイアープローブ、およびサンドイッチアッセイでそれを用いるための条件は米国特許第6，355，431号に記載されている。簡単に述べれば、アンプリファイアープローブは、少なくとも1つのプローブ配列、および少なくとも1つの増幅配列を有する核酸である。アンプリファイアープローブの第一のプローブ配列を直接的にまたは間接的に用いて、ゲノム断片標的配列にハイブリダイズさせることができる。アンプリファイアープローブの増幅配列は、直接的または間接的に用いて、標識プローブの第一の部分に結合する種々の配列のいずれかであり得る。典型的には、アンプリファイアープローブは複数の増幅配列を含むであろう。増幅配列は、例えば、相互への、または介入配列もしくは化学的部分への直接的共有結合を含めた種々の方法で相互に連結させることができる。

#### 【0217】

検出可能な標識を含む標識プローブはゲノム断片にハイブリダイズさせることができ、それにより、プローブ-断片ハイブリッドを形成させ、標識を検出して、型決定可能な遺伝子座の存在を決定することができる。アンプリファイアープローブの増幅配列を直接的または間接的に用いて、標識プローブを結合させて、検出を可能とすることができる。増



幅生成物の直接的検出、および標識プローブを利用する間接的検出（すなわち、サンドイッチアッセイ）を含めた本発明の増幅反応の検出は、標識を有するアッセイ複合体を検出することによって行うことができる。サンドイッチアッセイを用いるための例示的方法、および本発明で用いることができる関連した核酸は、さらに、米国特許出願第 60 / 073, 011 号、および米国特許第 6, 355, 431 号；第 5, 681, 702 号；第 5, 597, 909 号；第 5, 545, 730 号；第 5, 594, 117 号；第 5, 591, 584 号；第 5, 571, 670 号；第 5, 580, 731 号；第 5, 571, 670 号；第 5, 591, 584 号；第 5, 624, 802 号；第 5, 635, 352 号；第 5, 594, 118 号；第 5, 359, 100 号；第 5, 124, 246 号および第 5, 681, 697 号に記載されている。

10

#### 【0218】

本発明の方法の特別な適用に応じて、上記した検出技術を用いて、一次ゲノム断片標的を検出することができるか、または上記ゲノム断片の増幅された表示的集団中の標的を検出することができる。

#### 【0219】

特別な実施形態において、検出に先立って反応混合物から伸長しなかったまたは反応しなかった核酸を除去するのが望ましくあり得る。というのは、伸長しなかった、または反応しなかったプライマーは、時々、修飾されたプローブと検出中に競合し、それにより、シグナルを低下させるからである。修飾されたプローブに対する未修飾プローブの濃度は、しばしば、例えば、大過剰のプローブを用いる実施形態においては比較的高くなり得る。従って、多数の異なる技術を用いて、伸長しなかったプライマーの除去を促進することができる。伸長しなかったプライマーを除去するのに用いることができる例示的方法は、例えば、米国特許第 6, 355, 431 号に記載されたものを含む。

20

#### 【0220】

上記したように、本発明を用いて、1つ以上の型決定可能な遺伝子座を検出することができる。特に、本発明は複数の型決定可能な遺伝子座の検出によく適合する。何故ならば、上記方法は個々の遺伝子座が大きくかつ複雑な複数のもの内で検出できるようにするからである。個々の型決定可能な遺伝子座は、遺伝子座の個々のゲノム断片への分離、プローブ-断片ハイブリッドの形成、および物理的に分離されたプローブ-断片ハイブリッドの検出に基づいて本発明で区別することができる。プローブ-断片ハイブリッドの物理的分離は、ハイブリッドまたはそれらの構成要素を1つ以上の基材に結合させることによって本発明で達成することができる。特別な実施形態において、プローブ-断片ハイブリッドは、アレイ等の基材の表面のハイブリッドの物理的位置に基づいて、複数のものにおける他のプローブおよび断片から区別することができる。プローブ-断片ハイブリッドを粒子に結合させることもできる。粒子は、それらの位置に基づいて直接的に検出され、ビーズアレイ等の表面の粒子、またはフローサイトメーターでの流体流れ等の流体試料中での区別される検出に従って、他のプローブおよび断片から区別することができる。個々の型決定可能な遺伝子座の検出用のプローブ-断片ハイブリッドを区別する為の例示的フォーマットは、後にさらに詳しく記載する。

30

#### 【0221】

ゲノム断片の増幅された表示的集団における型決定可能な遺伝子座の検出は、アレイを使用することができる。比較的多数の遺伝子座を検出すべき実施形態においては、アレイは、好ましくは、高密度アレイである。本発明で用いることができる例示的マイクロアレイは、限定されるものではないが、Butte, Nature Reviews Drug Discov. 1: 951-60 (2002) または米国特許第 5, 429, 807 号；第 5, 436, 327 号；第 5, 561, 071 号；第 5, 583, 211 号；第 5, 658, 734 号；第 5, 837, 858 号；第 5, 874, 219 号；第 5, 919, 523 号；第 6, 136, 269 号；第 6, 287, 768 号；第 6, 287, 776 号；第 6, 288, 220 号；第 6, 297, 006 号；第 6, 291, 193 号；第 6, 346, 413 号；第 6, 416, 949 号；第 6, 482, 591 号；第 6, 514,

40

50

751号および第6,610,482号;およびWO 93/17126、WO/11995;WO 95/35505;EB 742 287;および欧州特許EP 799897に記載されたものを含む。本発明で有用なアレイフォーマットのさらに別の例示は米国特許第6,355,431号B1、US 2002/0102578およびPCT公開番号WO 00/63437に記載されている。マイクロ流体デバイスを用いて流体試料中のビーズを区別するために本発明で用いることができる例示的フォーマットは、例えば、米国特許第6,524,793号に記載されている。ビーズを区別するための商業的に入手可能な流体フォーマットは、例えば、LuminoxからのxMAP<sup>TM</sup>技術、またはLynx TherapeuticsからのMPSS<sup>TM</sup>方法で用いられるものを含む。種々の技術およびテクノロジーを、基材または支持体上、またはその中の生物学的物質のアレイを合成して、マイクロアレイを形成するのに用いることができる。例えば、Affymetrix(登録商標) GeneChip(登録商標)アレイは、VLSIPST<sup>TM</sup>(Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis(非常に大規模な固定化されたポリマー合成))技術と時々呼ばれる技術に従って合成することができる。VLSIPST<sup>TM</sup>および他のマイクロアレイ、および(蛋白質を含めた)ポリマーアレイ製造方法および技術の一部の態様は米国特許第09/536,841号、国際公開番号WO 00/58516;米国特許第5,143,854号、第5,242,974号、第5,252,743号、第5,324,633号、第5,445,934号、第5,744,305号、第5,384,261号、第5,405,783号、第5,424,186号、第5,451,683号、第5,482,867号、第5,491,074号、第5,527,681号、第5,550,215号、第5,571,639号、第5,578,832号、第5,593,839号、第5,599,695号、第5,624,711号、第5,631,734号、第5,795,716号、第5,831,070号、第5,837,832号、第5,856,101号、第5,858,659号、第5,936,324号、第5,968,740号、第5,974,164号、第5,981,185号、第5,981,956号、第6,025,601号、第6,033,860号、第6,040,193号、第6,090,555号、第6,136,269号、第6,269,846号、第6,022,963号、第6,083,697号、第6,291,183号、第6,309,831号および第6,428,752号;およびPCT出願番号PCT/US99/00730(国際公開番号WO 99/36760)およびPCT/US01/04285に記載されている。

#### 【0222】

VLSIPST<sup>TM</sup>を用い、5-インチ平方水晶ウエハーのヒドロキシル化表面をシランと反応させることによって、GeneChipアレイを製造することができる。次いで、リンカーをシラン分子に付着させることができる。これらのシラン分子の間の距離はプローブの充填密度を決定し、アレイを、ただ1.28平方センチメートル内で500,000を超えるプローブの位置あるいは特徴において保持することを可能とする。数百万の同一DNA分子は、個々の特徴の寸法に対応する18~20平方ミクロンのウインドウを運ぶマスクをコートされたウエハー上に置かれる写真印刷プロセスを用いて、各特徴において合成することができる。紫外光を合成の最初の工程でマスク上に照らすと、曝露されたリンカーは脱保護され、ヌクレオチドカップリングで利用できる。一旦所望の特徴が活性化されれば、除去可能な保護基を持つ単一タイプのデオキシヌクレオチドを含有する溶液をウエハーの表面にフラッシュすることができる。ヌクレオチドは活性化されたリンカーに結合し、合成プロセスを開始させる。キャッピング工程を用いて、未反応のリンカー(またはその後の工程におけるポリヌクレオチド)を切形することができる。次の合成工程において、さらに別のマスクをウエハー上において、次のラウンドの脱保護およびカップリングを可能とすることができる。プローブがそれらの全長(通常は25ヌクレオチドに到達するまで、上記プロセスを反復する。しかしながら、本明細書中の他の箇所に記載したもの等の他の長さを有するプローブを各特徴において結合させることもできる。一旦合成が完了すれば、ウエハーを脱保護し、ダイシングし、得られた個々のアレイをフローセ

ルカートリッジでパッキングすることができる。

【0223】

また、スポットしたアレイを本発明の方法で用いることもできる。例示的なスポットしたアレイはAmer sham Biosciencesから入手可能なCode Link<sup>TM</sup>アレイである。Code Link<sup>TM</sup>活性化スライドを、アミン-反応性基を含有する鎖の親水性ポリマーでコートする。このポリマーをそれ自体に、およびスライドの表面に共有結合により架橋させる。プローブの結合は、オリゴヌクレオチドプローブのアミン-修飾された5'末端およびポリマーに存在するアミン反応性基の間の共有結合相互作用を通じて達成することができる。プローブは、スポットティングペンを用いて区別される位置に結合させることができる。有用なペンは、個々にバネを装備したステンレス鋼キャピラリーペンである。ペンの負荷用量は約200 nL未満とすることができ、送達用量は約0.1 nL以下である。そのようなペンを用いて、例えば、約140~160 μmのスポット直径を有する特徴を作り出すことができる。好ましい実施形態において、各スポットした特長における核酸プローブは30ヌクレオチドの長さとするすることができる。しかしながら、本明細書中の他の箇所に記載したもの等の他の長さを有するプローブを各スポットに結合させることもできる。

10

【0224】

また、本発明で有用なアレイは、Agilent Technologiesから入手可能なSurePrint<sup>TM</sup>技術等のインクジェット印刷方法を用いて製造することができる。そのような方法を用いて、インサイチュにてオリゴヌクレオチドプローブを合成し、または基材表面と反応性である部分を有するプレ-合成プローブを結合させることもできる。印刷されたマイクロアレイは、標準的なスライド寸法(約1インチ×3インチ)を有する表面上に22,575の特徴を含有することができる。典型的には、印刷されたプローブは長さが25または60ヌクレオチドである。しかしながら、本明細書中の他の箇所に記載されたもの等の他の長さを有するプローブを各位置で印刷することもできる。

20

【0225】

本明細書中に記載した実施形態のいくつかについては、核酸プローブは、それらが酵素または他の剤による修飾に関して遊離3'末端を有するように、基材に結合させることができる。当業者であれば、3'から5'の方向の核酸の合成に関して上記で例示した方法を修飾して、遊離3'末端を有する核酸を生じさせることができる。例えば、固体支持体への5'結合を有する、5'から3'の方向に核酸を合成するための当該分野で既知の合成方法はインクジェット印刷、または写真印刷方法で用いることができる。さらに、基材結合核酸のインサイチュ逆転は、3'基材-結合核酸がその5'末端で基材に結合するようになり、その3'末端で脱着するように行うことができる。インサイチュ逆転は、Kwiatkowski et al., Nuc l . A c i d s R e s . 27: 4710-4714 (1999)に記載されたもののように、当該分野で既知の方法に従って行うことができる。

30

【0226】

例示的な高密度アレイはアレイのアレイ、または複数試料の処理を可能とするように配置された複数の個々のアレイを有する複合アレイである。そのようなアレイは型決定可能な遺伝子座の多重検出を可能とする。例えば、多重検出フォーマットで本発明で用いることができる例示的複合アレイは、米国特許第6,429,027号およびUS 2002/0102578に記載されている。特別な実施形態において、各個々のアレイはマイクロタイタープレートの各ウェル内に存在させることができる。かくして、マイクロタイタープレートのサイズ、および個々のアレイのサイズに応じて、非常に多数のアレイを同時に実行することができ;例えば、2,000の個々のアレイ、および96ウェルマイクロタイタープレートを用いて、192,000のアッセイを平行して行うことができ;384マイクロタイタープレートの各ウェルにおける同一数のアレイは768,000の同時アッセイが行え、1536マイクロタイタープレートでは、3,072,000アッセイを生じる。

40

50

## 【0227】

特定の実施形態において、ゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出するのに有用な核酸は、整列させた、またはそうでなければ空間的に区別される粒子に結合させることができる。例示的な粒子はマイクロスフィアまたはビーズを含む。しかしながら、本発明で用いる粒子は球形である必要はない。むしろ、限定されるものではないが、ディスク、プレート、チップ、スライバーまたは不規則な形状を含めた他の形状を有する粒子を用いることができる。加えて、本発明で用いる粒子は多孔性とすることができ、かくして、結合、またはプローブ-断片ハイブリッドのアレイで利用可能な表面積を増加させる。粒子サイズは、例えば、約100nmビーズ等のナノメートルから、約1mmビーズ等のミリメートルまでの範囲とすることができ、多くとも約0.2ミクロン、0.5ミクロン、5ミクロンまたは200ミクロン等の中間サイズの粒子は有用である。ビーズの組成は、例えば、本発明の適用または合成の方法に応じて変化させることができる。適切なビーズの組成は、限定されるものではないが、プラスチック、セラミック、ガラス、ポリスチレン、メチルスチレン、アクリルポリマー、常磁性材料、トリアゾル、炭素グラファイト、二酸化チタン、ラテックス、またはSephacrose<sup>TM</sup>等の架橋したデキストラン、セルロース、ナイロン、架橋したミセルまたはTenslon<sup>TM</sup>等の、ペプチド、核酸および有機部分合成で用いられるものを含む。有用な粒子は、例えば、Bangs Laboratories, Sishers IndからのMicrosphere Detection Guideに記載されている。

10

## 【0228】

20

本発明におけるアレイ-ベースの検出の一部の実施形態は、ビーズまたはマイクロスフィアに関して後に例示される。当業者であれば、上記したもののような他の形状およびサイズの粒子を、これらの実施形態に関して例示したビーズまたはマイクロスフィアの代わりに用いることができるのを理解するであろう。

## 【0229】

ゲノム断片の集団における型決定可能な遺伝子座の検出で用いる各粒子は関連した捕獲プローブを含むことができる。しかしながら、所望であれば、1つ以上の粒子を、捕獲プローブを含有子内粒子のアレイまたは集団に含めることができる。捕獲プローブは、型決定可能な遺伝子座等の標的配列を有する核酸に直接的にまたは間接的に結合するいずれかの分子または材料であり得る。捕獲プローブは、例えば、相補的核酸、または配列特異的に核酸に結合するさらに別の分子にハイブリダイズする配列を有する核酸であり得る。

30

## 【0230】

特別な実施形態において、各ビーズまたは他のアレイ位置は、単一タイプの捕獲プローブを有することができる。しかしながら、所望であれば、複数のプローブを各ビーズに結合させることができる。例えば、ビーズまたは他のアレイ位置は、同一ゲノム断片の異なる一部分にアニールする1つ以上のプローブを有することができる。上記プローブは隣接する位置、または捕獲された標的核酸上で相互から分離された位置にアニールすることができる。この複数プローブ捕獲実施形態の使用は、唯一のプローブの使用と比較して、検出の特異性を増加させることができる。かくして、より小さなプローブが望まれる場合、多数プローブ戦略を使用して、より長いプローブを利用する実施形態と匹敵する特異性を供することができる。同様に、特定の捕獲プローブを含有する1を超えるマイクロスフィアのサブグループを用いて、本発明におけるゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出することができる。かくして、特定のプローブのためのマイクロスフィアのサブグループの使用によって、冗長性をアッセイシステムに形成することができる。

40

## 【0231】

一部の実施形態において、核酸またはペプチド等のポリマープローブは、ビーズまたはスライド表面等のアレイで用いる固体支持体上への直接的なモノマーユニットの順次の付加によって合成することができる。ペプチド、有機部分および核酸の固相合成のための方法等の、固体支持体上での種々の異なる化学化合物の合成について当該分野で既知の方法を本発明で用いることができる。別法として、まずプローブを合成し、次いで、固体支持

50

体に共有結合させることができる。プローブは固体支持体上の官能基に結合させることができる。官能性化固体支持体は当該分野で既知の方法により生じさせることができ、所望であれば、使用者によって、所望の官能性の結合を容易とする表面化学を有するビーズおよび他の支持体のための一部の商業的供給業者のいずれかから入手することができる。本発明で有用な例示的表面化学は、限定されるものではないが、脂肪族および芳香族アミン等のアミノ基、カルボン酸、アルデヒド、アミド、クロロメチル基、ヒドラジド、ヒドロキシル基、スルホネートまたはスルフェートを含む。所望であれば、プローブは化学的リンカーを介して固体支持体に結合させることができる。そのようなリンカーは、例えば、安定な結合、可逆的結合、十分な柔軟性を提供して、検出すべき型決定可能な遺伝子座を有するゲノム断片との望まれる相互作用を可能とし、または望ましくない結合反応を回避する特徴を有することができる。ポリマープローブを固体支持体に結合させるために本発明で用いることができるさらなる例示的方法は、Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(11): 5022-5026 (1994); Khrapko et al., Mol. Biol. (Mosk) (USSR) 25: 718-730 (1991); Stimpson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6379-6383 (1995) またはGuo et al., Nucleic Acids Res. 22: 5456-5465 (1994)に記載されている。

10

#### 【0232】

一般に、アレイのアレイは一部の方法のうちいずれかで配置することができる。特別な実施形態において、後により十分記載するように、1構成要素システムを用いることができる。すなわち、マイクロタイタープレート等の複数のアッセイ位置を有する第一の基材は、各アッセイ位置が個々のアレイを含むように配置させることができる。かくして、アッセイ位置およびアレイ位置は同一とすることができる。例えば、マイクロタイタープレートのプラスチック材料は、アッセイウェルの各々の底部に複数のビーズアレイを含むように形成することができる。次いで、本発明の捕獲プローブを含有するビーズを、後により十分に記載するように、各アッセイ位置におけるビーズウェルに負荷することができる。

20

#### 【0233】

別法として、2構成要素システムを用いることができる。この実施形態においては、個々のアレイを第二の基材上に形成することができ、第二の基材は、次いで、第一のマイクロタイタープレート基材にフィッティングさせ、または浸漬させることができる。特別な実施形態は、捕獲プローブを含有するビーズを繊維光学束の末端に負荷するように、一般には、各個々の繊維の1つの表面にエッチングされたビーズウェルを備えた個々のアレイとしての繊維光学束を利用する。上記複合アレイは、かくして、マイクロタイタープレートのウェル内にフィットするよう配置された多数の個々のアレイを含むことができる。

30

#### 【0234】

したがって、本発明は、複数のアレイ位置を有する表面を持つ少なくとも第一の基材を有する複合アレイを提供する。アレイ様式で複数の候補剤を有する種々のアレイのいずれも本発明で用いることができる。本発明で用いられるアレイのサイズは、プローブ組成およびアレイの所望の使用に応じて変化させることができる。何百万に対する約2つの異なるプローブを含有するアレイを作成することができ、非常に大きな繊維光学アレイが可能である。一般には、アレイは、平方cm当たり2から10億以上と多くのアレイ位置を有することができる。アレイの位置は、例えば、それに対してプローブまたは同様なプローブの集団を結合させる表面の領域、または粒子とすることができる。粒子の場合には、そのアレイ位置は、フローサイトメーターを通る流れ等の流体試料中の1つ以上の他の参照粒子の位置と比較して、それに対してそれが結合または関連する基材上の固定された座標、または相対的座標であり得る。例えば、約10,000,000アレイ位置/cm<sup>2</sup> ~ 約2,000,000,000アレイ位置/cm<sup>2</sup>、あるいは約100,000,000アレイ位置/cm<sup>2</sup> ~ 約1,000,000,000アレイ位置/cm<sup>2</sup>を有するものを

40

50

含めた、非常に高密度のアレイは本発明で有用である。例えば、約 100,000 アレイ位置 /  $\text{cm}^2$  ~ 10,000,000 アレイ位置 /  $\text{cm}^2$ 、または約 1,000,000 アレイ位置 /  $\text{cm}^2$  ~ 約 5,000,000 アレイ位置 /  $\text{cm}^2$  の範囲のものを含めた高密度アレイを用いることもできる。本発明で有用な中密度アレイは約 10,000 アレイ位置 /  $\text{cm}^2$  ~ 約 100,000 アレイ位置 /  $\text{cm}^2$ 、または約 20,000 アレイ位置 /  $\text{cm}^2$  ~ 約 50,000 アレイ位置 /  $\text{cm}^2$  の範囲とすることができる。低密度アレイは、一般には、10,000 粒子 /  $\text{cm}^2$  未満であり、約 1,000 アレイ位置 /  $\text{cm}^2$  ~ 約 5,000 アレイ位置 /  $\text{cm}^2$  は特別な実施形態で有用である。1,000 未満のアレイ位置 /  $\text{cm}^2$ 、約 10 アレイ位置 /  $\text{cm}^2$  ~ 約 1000 アレイ位置 /  $\text{cm}^2$ 、または約 100 アレイ位置 /  $\text{cm}^2$  ~ 約 500 アレイ位置 /  $\text{cm}^2$  を有する非常に低密度なアレイも一部の適用で有用である。本発明の方法は、例えば、1つまたは少数の遺伝子座を検出するべき実施形態においてアレイ様式で実行する必要はない。所望であれば、例えば、異なるまたは同一の組成を有する基材を含めた多数の基材を有するアレイを用いることができる。かくして、例えば、大きなアレイは複数のより小さな基材を含むことができる。

#### 【0235】

一部の適用では、個々のアレイの数は使用するマイクロタイタープレートのサイズによって設定され；かくして、96 ウェル、384 ウェルおよび 1536 ウェルのマイクロタイタープレートは、96、384 および 1536 の個々のアレイを含む複合アレイを利用する。当業者によって理解されるように、各マイクロタイターウェルは個々のアレイを含む必要はない。複合アレイは、同一、同様または異なる個々のアレイを含むことができることに注意すべきである。例えば、96 の同様なアレイを有する複合アレイを、96 の異なる試料に関して同一の 2,000 の型決定可能な遺伝子座の存在または不存在を決定するのが望ましい適用で用いることができる。別法として、各々が 2,000 の異なるプローブを備えた 96 の異なるアレイを有する複合アレイを、単一試料に関して 192,000 の型決定可能な遺伝子座の存在または不存在を決定するのが望ましい適用で用いることができる。マイクロタイターフォーマットのアレイの列、行または他の部分が同一である別の組み合わせを、例えば、冗長性が望まれる場合に用いることができる。当業者によって理解されるように、システムを配置させるのに種々の方法がある。加えて、アレイのランダムな性質は、ビーズの同一集団を 2 つの異なる表面に加えることができ、その結果、実質的に同様であるが、恐らくは同一ではないアレイが得られることを意味することができる。

#### 【0236】

本発明のアレイで用いられる基材は、区別される個々の部位を含むように修飾することができ、かつ少なくとも 1 つの検出方法に使用できるいずれかの材料で作成することができる。粒子のアレイを用いる実施形態においては、1 つ以上のタイプの粒子と結合または関連できる材料を用いることができる。有用な基材は、限定されるものではないが、ガラス；修飾されたガラス；官能性化ガラス；アクリル、ポリスチレンおよびスチレンおよび他の材料のコポリマー、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタン、テフロン（登録商標）等のようなプラスチック；および多糖；ナイロン；ニトロセルロース；樹脂；シリカ；ケイ素または修飾されたケイ素等のシリカ - ベーベースの材料；炭素；金属；無機ガラス；光ファイバー束、または種々の他のポリマーのいずれかを含む。有用な基材は、例えば、所望の検出波長のエネルギーに対して不透明であり、および / または所望の検出波長においてそれ自己認識可能に蛍光を発しないことによって、光学検出を可能とするものを含む。

#### 【0237】

一般に、本発明のアレイで用いる基材は平坦なまたは平面状の表面を有する。しかしながら、基材の他の配置も同様に用いることができる。例えば、三次元配置は、ビーズアレイ等のアレイを、アレイ位置への試料アクセス、および検出用の共焦点顕微鏡の使用を可能とする、プラスチックのブロックコポリマー等の多孔性材料に埋め込むことによって用いることができる。同様に、アレイの位置はフロー - スルー試料分析のためにチューブの

10

20

30

40

50

内側表面に置くことができる。本発明で有用な例示的基材は、限定されるものではないが、光ファイバー束、ガラス等の平坦で平面状の基材、ポリスチレンまたは他のプラスチックおよびアクリルを含む。

【0238】

基材の表面は、相互に物理的に分離された複数の個々のアレイ位置を含むことができる。例えば、物理的分離は、マイクロタイタープレートにおけるように、アレイウェルの存在によることができる。物理的にアレイ位置を分離するのに用いることができる他のバリアーは、例えば、水性溶媒の誘導を妨げる疎水性領域、または無極性または疎水性溶媒の流動を妨げる親水性領域を含む。

【0239】

相互から物理的に分離されたアレイ位置はアッセイ位置を形成する。アッセイ位置は、プローブのアレイを含むことができ、流体がプローブに接触するように、流体を保持するための容器を供することができる。例えば、ゲノム断片を含有する流体を、本明細書中に記載された、または当該分野で公知のハイブリダイゼーション条件下でプローブと接触させることができる。同様に、洗浄流体、または他の試薬または本明細書中に記載した分析物を含有する流体を、アレイ位置に配置した場合にプローブのアレイと接触させることができる。アレイ位置は、所望であれば、包むことができる。例示的な包みは、限定されるものではないが、カセット、包んだウェル、またはバスケットもしくは膜双方によって包まれたスライド表面を含む。本発明で有用なさらなる例示的包みは、WO 02/00336、米国特許出願公開02/0102578、または異なるタイプのアレイに関して本明細書中で先に引用した刊行物に記載されている。

【0240】

また、アッセイ位置は、フローセルの内部とすることができる。プローブのアレイはフローセルの内部表面に配置することができ、流体はセルに流入することによって導入される。本発明で有用なフローセルはキャピラリーギャップフローセルであり得る。キャピラリーギャップフローセルは、流体を毛細管作用によってセルに保持することができ、引き続いて、第二の流体により開口に作用する正圧によって置き換えることができる。正圧は、例えば、重力流動によって供することができる。本発明で有用な例示的キャピラリーフローセルは、Bead Chipアレイ(Illumina, Inc., San Diego, CA)およびCover plate(ThermoShandon, Inc., Pittsburgh, PH)等のスライドベースのアレイの表面の間に形成されたものである。さらに別の有用なキャピラリーギャップフローセルは、Tecan(Maennedorf, Switzerland)から入手可能なシステムを通じるGenePaint<sup>TM</sup>流動で用いるものである。したがって、本発明は、キャピラリーギャップフローセルにおいて、基材結合プローブ等の核酸の酵素的修飾の方法を提供する。当業者であれば、キャピラリーフローセルは、当該分野で既知の種々のアレイで形成して、同様な流体流動能力を達成することができることを理解するであろう。

【0241】

上記部位は、規則的な設計または配置等のパターンとすることができるか、あるいは上記部位はパターン化しないものとすることができる。部位の規則的パターンの非限定的利点は、上記部位が好都合には、X-Y座標平面にアドレスさせることである。この意味におけるパターンは、ビーズの高密度を基材上で可能とするもの等の反復ユニットセルを含む。

【0242】

特別な実施形態において、アレイ基材は、一般には、米国特許出願第08/944,850号、米国特許第6,200,737号; WO9840726およびWO9850782に記載されているように、光ファイバー束またはアレイであり得る。また、本発明で有用なのは、共軸配置され、それらの長さに沿って接合される区別される個々の繊維光学ストランドを有する予め形成された単位繊維光学アレイである。他の繊維光学フォーマットと比較した予め形成された単位繊維光学アレイの区別される特徴は、上記繊維が個々には

物理的に操作できないことであり；すなわち、1つのストランドは、一般には、さらに別の繊維ストランドからその長さに沿っていずれかの点で物理的に分離できない。

【0243】

本発明のアレイの部位は区別される部位である必要はない。例えば、いずれかの位置における粒子の結合を可能とする、例えば、接着剤または化学的官能性の均一な表面を用いることが可能である。すなわち、アレイ基材の表面は、それらの部位が他の部位と連続しているか連続していないかに拘らず、個々の部位におけるマイクロスフィアの結合または解剖を可能とするように修飾することができる。かくして、基材の表面を修飾して単一のビーズのみが上記部位に関連するように区別される部位を形成することができるか、あるいは別法として、ビーズが種々の数にてランダムに集団形成する部位をおえるように上記表面を修飾することができる。

10

【0244】

特別な実施形態において、基材の表面は、基材の表面にウェルまたは窪みを含むように修飾することができる。これは、限定されるものではないが、写真印刷、スタンピング技術、成型技術またはマイクロエッチング技術を含めた種々の技術を用いて成すことができる。当業者に理解されているように、用いる技術は基材の組成および形状に依存するであろう。複合アレイのための基材がマイクロタイタープレートである場合、成型技術を利用して、アレイウェルのそこにビーズウェルを形成することができる。

【0245】

特別な実施形態においては、物理的な変化を基材の表面でなして、アレイ位置を生じさせることができる。例えば、基材が繊維光学束である場合、基材の表面は、一般には、米国特許第6,023,540号および第6,327,410号に記載されているように、繊維束の末端とすることができる。この実施形態において、ウェルは、一部の個々の繊維を有する繊維光学束の末端側または遠位端部に作成することができる。この実施形態においては、個々の繊維のコアは、小さなウェルまたは窪みが繊維の1つの端部に形成されるように、クラッドに関してエッチングすることができる。ウェルの深さは、異なるエッチング条件を用いて変化させて、特定のサイズまたは形状の粒子を収容することができる。この実施形態においては、一般には、ウェルは、加えて、粒子の共有結合のために官能性化することができるが、マイクロスフィアはウェルに非共有結合的に関連される。後にさらに詳細に記載するように、架橋剤を用いることができるか、あるいは粒子上にフィルムまたは膜等の物理的バリアーを用いることができる。

20

30

【0246】

特別な実施形態において、基材の表面は、プローブまたはプローブが付着した粒子を共有結合により、または共有結合にはよらずに付着させるのに有用な化学的に修飾された部位を含むように修飾することができる。この意味における化学的に修飾された部位は、限定されるものではないが、例えば、アミノ基、カルボキシ基、オキシ基またはチオール基を含めた化学的官能基のパターンの付加を含む。そのような基を用いて、対応する反応性官能基を含有するプローブまたは粒子を共有結合させることができる。他の有用な表面修飾は、例えば、粒子を結合させるのに用いることができる接着剤のパターンの付加；プローブまたは粒子の静電的付着のための荷電基のパターンの付加；適切な条件下での同様に疎水性または親水性のプローブまたは粒子の付加の結果、ヒドロ親和性を基礎とした部位への関連がもたらされるように、上記部位を異なって疎水性または親水性とすることができる。化学官能基のパターンの付加を含む。

40

【0247】

一旦マイクロスフィアが生成したならば、それらは基材に加えてアレイを形成することができる。アレイは、例えば、ビーズの溶液またはスラリーを、ビーズ用の結合部位を含む基材に加えることによって作成することができる。ビーズ用のキャリアー溶液はpH緩衝液、水性溶媒、有機溶媒、または混合物であり得る。基材へのビーズスラリーの曝露に続き、溶媒を蒸発させ、過剰のビーズを除去することができる。非共有結合方法を用い、ビーズをアレイ基材に関連させる実施形態においては、ビーズは、基材を粒子の溶液に

50



曝露し、次いで、例えば、混合物を攪拌または振動させることによってエネルギーを適用することによって基材に負荷することができる。しかしながら、所望であれば、静的負荷を用いることもできる。本発明で用いることができるビーズおよび他の粒子をアレイ基材に負荷するための方法は、例えば、米国特許第 6,355,431 号に記載されている。ビーズ負荷は、プローブの修飾に先立って、本明細書中に記載した検出方法で行うことができる。別法として、ビーズ負荷は、本発明の方法でゲノム断片のハイブリダイズさせるビーズ固定化プローブの修飾後に行うことができる。

#### 【0248】

一部の実施形態においては、例えば、化学的結合を行う場合、プローブ、またはプローブが関連した粒子を非ランダムまたは秩序立ったプロセスで基材に結合させることができる。例えば、光活性化可能結合リンカーまたは光活性化可能接着剤またはマスクを用い、活性化されたアレイ基材に曝露された場合にプローブまたは粒子の規定された集団が規定された位置におかれるように、アレイ基材上の選択された部位を、結合のために順次に活性化することができる。

#### 【0249】

別法として、プローブまたはプローブが関連した粒子は基材上にランダムに沈積させることができ、アレイにおけるそれらの位置は解読工程によって決定することができる。これはアレイの使用前、使用中または使用後に行って、本明細書中に記載されたもの等の方法を用いて型決定可能な遺伝子座を検出することができる。プローブの設置がランダムである実施形態においては、暗号化または解読システムを用いて、アレイ中の各位置におけるプローブを突き止め、および / または同定することができる。これは、例えば、米国特許第 6,355,431 号に記載されているように、種々の方法のうちのいずれかで行うことができる。

#### 【0250】

粒子が用いられる実施形態において、ユニークな光学シグニチャーを粒子に一体化させることができ、これを用いて、化学的官能性または粒子と関連した核酸を同定することができる。例示的光学シグニチャーは、限定されるものではないが、ビーズに捕獲されまたは付着された色素、通常はクロモフォアまたはフルオロフォアを含む。異なるタイプの色素、異なるタイプの色素の混合物、または異なる濃度の色素、またはこれらの差の組合せを本発明における光学的シグニチャーとして用いることができる。本発明で用いることができる検出可能なシグニチャーを有する粒子および他の支持体のさらに別の例は Cunniff et al., Nature Materials 1:39-41 (2002); 米国特許第 6,023,540 号または第 6,327,410 号; または WO 98/040726 に記載されている。この実施形態に従うと、核酸の合成はアレイ上のそれらの設置から分離することができる。かくして、捕獲プローブをビーズ上で合成することができ、次いで、ビーズをパターン化された表面にランダムに分布させることができる。ビーズはまず光学的シグニチャーで暗号化されるので、これは、アレイを後に解読することができることを意味する。かくして、アレイが作成された後、アレイ上の個々のアレイ位置の位置とそのプローブ同一性との相関を行うことができる。これは、アレイ位置をアレイ上にランダムに分布させることができることを意味し、これは、一般には、米国特許出願第 98/05025 号、第 99/14387 号、第 08/818,199 号または第 09/151,877 号に概説されたインサイチュまたは合成スポッティング技術いずれかと比較して、本発明の多くの適用において迅速かつ安価なプロセスである。しかしながら、所望であれば、インサイチュ合成またはスポッティング技術によって作成されるアレイを本発明で用いることができる。

#### 【0251】

アレイの全ての部位がプローブまたは粒子を含む必要は無いことに注意すべきである。かくして、アレイは、空である基材上の 1 つ以上のアレイ位置を有することができる。一部の実施形態において、アレイ基材は、1 を超えるビーズまたはプローブを含有する 1 つ以上の部位を含むことができる。

## 【0252】

当業者によって理解されるように、ランダムアレイは必ずしも解読される必要はない。この実施形態において、ビーズまたはプローブはアレイ基材に結合させることができ、検出アッセイを行うことができる。特定の型決定可能な遺伝子座を持つプローブ-断片ハイブリッドの存在に対する陽性シグナルを有するアレイ位置をマークし、またはそうでなければ、それを同定して、他のアレイ位置からそれらを区別し、または分離することができる。例えば、ビーズが蛍光色素で標識された適用では、陽性または陰性ビーズについてのアレイ位置は光脱色によってマークすることができる。さらなる例示的マークは、限定されるものではないが、適切な波長の光での照射に際して、標識または基材でプローブまたは粒子を誘導体化することができる光活性化または光架橋性基によって蛍光形態に変換される非蛍光前駆体を含む。

10

## 【0253】

特別な実施形態において、冗長性の一部のレベルを本発明で用いるアレイに内蔵することができる。アレイへの内蔵冗長性は、データについての信頼性および感度の実質的上昇の定量的な見積もりをなす能力を含めた、一部の非限定的利点を与えることができる。当業者によって理解されるように、アレイに内蔵することができる少なくとも2つのタイプの冗長性があり；異なる化学的官能性を有する以外は、多数の同一プローブの使用または同一標的に向けられた多数のプローブの使用。例えば、核酸の検出では、センサーの冗長性は、プローブ等の同一の結合リガンドを有するビーズ等の複数のセンサーエレメントを利用する。標的冗長性は同一標的に対する異なるプローブを備えたセンサーエレメントを利用し：1つのプローブは標的の最初の25塩基に及ぶことができ、第二のプローブは標的の第二の25塩基に及ぶことができる。これらのタイプの冗長性のいずれかまたは双方をアレイに内蔵することによって、種々の統計学的数学解析を大きなデータ組の分析で行うことができる。本発明で用いることができる冗長なセンサーエレメントおよび標的エレメントで解読するための他の方法は、例えば、米国特許第6,355,431号に記載されている。

20

## 【0254】

プローブ-断片ハイブリッドの型決定可能な遺伝子座は、本明細書中において先に記載された方法を用いてアレイ上で検出することができる。特別な実施形態において、プローブ冗長性を用いることができる。この実施形態において、同一の配列を有する複数のプローブをアレイに存在させる。かくして、各々が同一のプローブを備えた複数のビーズを有する複数のサブグループをアレイで存在させることができる。与えられたアレイに対して一部の同一のプローブを用いることによって、各アレイ位置からの光学シグナルを組み合わせ、統計学的方法を用いて分析することができる。かくして、冗長性は、所望な場合、データの信頼性を有意に増大させることができる。

30

## 【0255】

当業者によって理解されるように、サブグループ中の同一のプローブの数は特定のアレイの適用および使用で変化するであろう。一般に、例えば、約5、10、20、50または100の同一のプローブまたは粒子を含めた、2~1000のいずれかの同一のアレイ位置を用いることができる。

40

## 【0256】

一旦得られたならば、複数のアレイ位置からのプローブ-断片ハイブリッドを示すシグナルを、ベースライン調整、平均化、標準偏差解析、分布およびクラスター解析、信頼区間解析、平均テスト等を含めた種々の方法で操作し、分析することができる。データ操作のさらに別の記載は後に記載し、多くの場合、ビーズアレイで検出されたプローブ-断片ハイブリッドに関して例示される。当業者であれば、同様な操作を、例えば、他のアレイ位置が後の例におけるビーズと同様に処理されるものを含めた、プローブ-断片ハイブリッドの他の集団で行うことができる。

## 【0257】

所望により、アレイまたはプローブ-断片ハイブリッドの他の混合物から検出された複

50

数のシグナルをベースライン調整することができる。例示的手法において、光学シグナルを調整して、全てのデータ点から整数 1 . 0 を差し引くことによって、0 . 0 の値において開始することができる。これを投与することは、一緒に合計されたランダムな応答シグナルノイズをキャンセルする場合においてさえ、ベースライン - ループデータが 0 のままとする。試料が流体である場合、しかしながら、流体パルス - ループの一時的領域は、試料パルスに先立って、陽性、陰性または中性いずれかの、応答の特徴的变化を頻繁に呈し、しばしば、CCDカメラにおける電荷形成による最初の数個のデータ点におけるドリフトに関連するノイズを克服するためにベースライン調整を必要とする。もしドリフトが存在しなければ、典型的には、各ピーズについての最初のデータ点からのベースラインを、同一ピーズタイプについての全ての応答データから差し引くことができる。もしドリフトが観察されれば、各ピーズについての最初の 10 のデータ点からの平均ベースラインを、同一のピーズタイプに関して、全ての応答データから差し引くことができる。このベースライン調整を適用することによって、複数のアレイ位置の応答と一緒に加えると、それらは、ベースラインがゼロに止まりつつ増幅させることができる。全てのアレイ位置は試料に対して同時に応答するので（例えば、試料パルス）、それらは全て正確に同一時点におけるパルスを見ているのであり、それらの応答を重ね合わせるために必要な登録または調整はない。加えて、用いるシステムの要件および出力に応じて、当該分野で既知の他のタイプのベースライン調整を行うことができる。

10

#### 【0258】

種々の可能な統計学的解析のいずれかを行って、既知の統計学的パラメータを生じさせることができる。冗長性に基づく分析は既知のものであり、一般には、Freund and Walpole, Mathematical Statistics, Prentice Hall Inc., New Jersey (1980) 等のテキストに記載されている。

20

#### 【0259】

所望であれば、シグナルの合計は特定の時点において全ての強度の値を加えることによって行うことができる。特別な実施形態において、シグナルは一部の時点において合計することができる。これにより、全てのピーズ応答の合計よりなる一時的応答を生じさせる。これらの値はベースライン - 調整することができるか、または生である。シグナル合計は、リアルタイムにて、またはデータ獲得後データ換算および分析の間に行うことができる。1つの実施形態において、シグナル合計は、光学応答データが収集された後に、市販のスプレッドシートプログラム (Excel, Microsoft, Redmond, Wash.) で行うことができる。本発明で用いることができるさらなる例示的シグナル合計方法は米国特許第 6,355,431 号に記載されている。

30

#### 【0260】

特別な実施形態において、統計学的分析を行って、限定されるものではないが、分布またはクラスター分析を含めた技術を用いることによって、特定のデータ点がサブグループ内に統計学的有効性を有するか否かを見積もることができる。これを行って、そうでなければ結果を非対称としかねず、いずれかの特定の実験のシグナル - 対 - ノイズ比率を増加させかねない孤立値を統計学的に捨てることができる。データ点が統計学的有効性を有するか否かを判断するための有用な方法は、例えば、米国特許第 6,355,431 号に記載されており、限定されるものではないが、信頼区間、平均テスト、または分布解析の使用を含む。

40

#### 【0261】

特別な実施形態は、シグナル型決定可能な遺伝子座に向けられるが、それらの現実の配列は異なる複数の核酸プローブを利用する。例えば、単一標的ゲノム断片は、各々が異なるプローブを有する 2 つ以上のアレイ位置を有することができる。これは、非特異的結合相互作用は特定の配列で起こる適用においてあるレベルの信頼性を付け加えることができる。従って、冗長な核酸プローブは、重複し、隣接し、または空間的に分離された配列を有することができる。

50

## 【0262】

本発明の方法は、さらに、核酸プローブのアレイをシャペロンプローブと接触させる工程を含むことができる。シャペロンプローブは、ゲノム断片を検出または捕獲するのに用いられるプローブについてのハイブリダイゼーション部位に対して近位にある部位における標的ゲノム断片にハイブリダイズする核酸である。シャペロンプローブは、捕獲工程または検出工程の前または間に加えて、ゲノム断片に対する捕獲プローブまたは検出プローブのハイブリダイゼーションに好都合とすることができる。シャペロンプローブは、適切なテンプレートストランドが、検出または捕獲プローブにアニーリングするのに利用できるように、ゲノム断片の相補的ストランドの関連を妨げることによって検出または捕獲プローブのハイブリダイゼーションに好都合とすることができる。

10

## 【0263】

シャペロンプローブは、例えば、本発明で有用な他の核酸に関して本明細書中で先に記載されたものを含めた種々の長さまたは組成のいずれかを有することができる。シャペロンプローブは、さらに別のプローブについてのアニーリング部位に直ぐに隣接した、または他のプローブについてのアニーリング部位から分離された部位における標的配列にハイブリダイズすることができる。プローブの間のギャップは長さが1以上、2以上、3以上、5以上、10以上のヌクレオチドまたはそれよりも長くすることができる。シャペロンプローブは、例えば、標的ゲノム断片のモル当たりシャペロンプローブの約100モル、10モル、5モル、2モル、1モル、0.5モルまたは0.1モルの比率を含めた、さらに別のプローブのアニーリングに有効に好都合であることが判明するいずれかの化学量論的濃度にて供することができる。

20

## 【0264】

本発明の方法は、さらに、核酸に結合した検出可能な標識の数が増大するシグナル増幅の工程を含むことができる。1つの実施形態において、シグナル増幅工程は、特定の受容体に対する親和性を有するリガンドで標識された核酸を供することを含むことができる。リガンドに結合することができる1つ以上の部位を有する最初の受容体を、上記受容体およびリガンド-標識核酸の間で複合体が形成される条件下で標識された核酸と接触させることができる。さらに、受容体を、受容体に対する親和性を有する増幅試薬と接触させることができる。増幅試薬、例えば、リガンド、リガンドの模倣体、または第一の受容体に対する親和性を有する第二の受容体であり得る。増幅試薬は、今度は、リガンド受容体および増幅試薬の間でマルチマー複合体が形成できるように、リガンドで標識することができる。次いで、例えば、受容体または増幅試薬上の検出可能な標識の存在を検出することによって、マルチマー複合体の存在を検出することができる。シグナル増幅工程に含まれる成分は、検出可能な複合体が形成される限り、いずれの順序で加えることもできる。さらに、本明細書中で先に記載したもの等の他の結合部分および結合パートナー対をシグナル増幅で用いることができる。

30

## 【0265】

図10の例示的シグナル増幅スキームに示すように、シグナル増幅は、ストレプトアビジンフィコエリスリン(SAPE)によって標識された核酸およびビオチニル化抗SAPE抗体を用いて行うことができる。1つの実施形態において、3工程プロトコルを使用することができ、そこでは、ビオチンを取り込むように修飾されている整列させたプローブをまずストレプトアビジン-フィコエリスリン(SAPE)と共にインキュベートし、続いて、ビオチニル化抗ストレプトアビジン抗体と共にインキュベートし、最後に、再度SAPEと共にインキュベートする。このプロセスはカスケード増幅サンドイッチを作り出す。というのは、ストレプトアビジンは複数の抗体結合部位を有し、抗体は複数のビオチンを有するからである。当業者であれば、本明細書中の教示から、アビジン、アビジンの修飾されたバージョン、または抗体等の他の受容体を増幅複合体で用いることができ、Cy3、Cy5または本明細書中で先に記載されたもの等の異なる標識を用いることができることを理解するであろう。本発明で用いることができるさらなる例示的シグナル増幅技術および成分は、例えば、米国特許第6,203,989号B1に記載されている

40

50

。

## 【0266】

本発明の方法は、さらに、プローブの修飾に続き、および修飾されたプローブの検出に先立ち、プローブ-断片ハイブリッドからゲノム断片を除去する工程を含むことができる。低塩、ホルムアミド等の有機溶媒、熱、または他の編成剤への曝露等の塩基-対合相互作用を破壊するための当該分野で公知の方法を用いて断片-プローブハイブリッドを変性することによってゲノム断片を取り出すことができる。上記方法で有用なハイブリッド核酸を変性するための例示的方法はSambrook et al., 前掲(2001)またはAusubel et al., 前掲(1998)に記載されている。ゲノム断片は変性に先立って洗浄することができる。別法として、ゲノム断片は検出の間に変性条件下で存在させることができる。

10

## 【0267】

本発明の方法は、さらに、検出される少なくとも1つの型決定可能な遺伝子座を同定するレポートを生じさせる工程を含むことができる。検出された型決定可能な遺伝子座は、例えば、配列、染色体上の位置によって、または遺伝子座の認識される名称によって直接的に同定することができる。別法として、上記レポートは、引き続いて分析して、1つ以上の検出された遺伝子座を同定することができるフォーマットにて、本発明の方法から得られたデータを含むことができる。

## 【0268】

かくして、本発明は、さらに、本発明の方法によって得られた少なくとも1つの結果のレポートを提供する。本発明のレポートは、例えば、電子伝達、コンピューターリーダーメモリ、コンピュータグラフィックユーザーインターフェースへの出力、コンパクトディスク磁気ディスクまたはペーパーを含めた種々の認識可能なフォーマットのいずれかとすることができる。ヒト、機械または双方の間の通信に適した他のフォーマットを本発明のレポートで用いることができる。

20

## 【0269】

本発明は、さらに、ゲノム断片の固相固定化された表示的集団を含めたアレイを提供する。ゲノム断片の表示的集団は、本明細書中にて先に記載されたもの等の方法を用いて生じさせ、固定化することができる。例えば、ビオチンまたは反応性架橋剤等の二次標識を有するプライマーを用いてゲノムを増幅し、引き続いてアビジン、または架橋基と反応性の化学部位等の固相受容体との相互作用を介して固定化することができる。ゲノム断片の固相固定化された表示的集団は、高い、低い、または中程度の複雑性等の本明細書中にて先に記載した特徴の1つ以上を有することができる。

30

## 【0270】

ゲノム断片の固相固定化された表示的集団は、本発明の方法を用いて直接的に質問することができる。一般には、検出アッセイおよび方法は、固定化されたプローブおよび可溶性ゲノム断片標的に関して上記にて例示されている。当業者であれば、ゲノム断片の表示的集団が固定化された実施形態において、しかしながら、上記方法は、上記例におけるプローブおよび上記例における標的として処理されたプローブを置き換えるゲノム断片で同様に行うことができるのを理解するであろう。

40

## 【0271】

固相ゲノムDNA標的の使用は、例えば、伸長または連結技術において、プライマーのその後の酵素修飾の前にいずれかの貧弱にハイブリダイズされた、または過剰の検出プローブが洗浄除去することによって、高度なアッセイ多重化の利点を供することができる。プライマー-ダイマー形成によって悪影響される適用は、検出に先立ってプライマーダイマーを除去することによって改善することができる。また、固相標的DNAフォーマットは速いハイブリダイゼーションキネティックスを可能とすることができる。というのは、プライマーは、例えば、約100 pMよりも大きな比較的高い濃度にてハイブリダイズすることができるからである。

## 【0272】

50

ゲノムDNAを増幅するための本明細書中に記載された方法は、比較的少量のゲノムDNAが大量に増幅されるのを可能とする。大量のゲノムDNAの固相への固定化は、その後の増幅の必要性なくして、例えば、プライマー伸長または連結 - ベースのアッセイにおいて型決定可能な遺伝子座が直接的に問い合わせることができるようにする。増幅の排除は、プレ - 増幅 - ベースの検出を用いる場合にしばしば利用可能なものよりも頑強かつ定量的遺伝子型分類に導くことができる。

#### 【0273】

固相ゲノムDNA標的を用いるさらに別の利点は、それを再度用いることができることである。かくして、固定化されたゲノム標的は、異なる組の核酸プローブで反復して用いることができる保管試料であり得る。さらに、一部の適用において、固定化されたgDNAを用いることによってキャリアオーバー汚染を低下させることができる。というのは、増幅は、SNP特異的検出反応前に起こるからである。本発明の方法を行うための上記した肯定は、説明のために特定の順序で記載したことは理解されるであろう。当業者であれば、上記工程は、所望の結果が達成される限り、種々の順番のうちいずれかで行うことができるのを理解するであろう。例えば、上記した反応の成分は同時に、または順次に、記載した結果の1つ以上を生じるにおいて効果的である順番で加えることができる。加えて、本明細書中に記載された反応は、例えば、塩、緩衝液、中性蛋白質、アルブミン、洗剤等を含めた種々の他の試薬を含めることができる。そのような試薬を加えて、最適なハイブリダイゼーションおよび検出を容易とし、非特異的な、またはバックグラウンド相互作用を低下させ、または使用する他の試薬を安定化することができる。また、試料調製方法および標的の純度に応じて、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗微生物剤等の本発明の方法の効率をそうでなければ改善する試薬を用いることができる。当業者であれば、そのような結果を達成するための適切な試薬を知っており、またはそれを決定することができる。

#### 【0274】

また、ゲノムDNAの型決定可能な遺伝子座の検出に関して本明細書中に例示した方法のいくつかを、遺伝子発現分析に適用することができる。特に、プライマー伸長方法を用いるプローブ核酸のオン - アレイ標識のための方法をRNAまたはcDNAの検出で用いることができる。プローブ - cDNAハイブリッドは、本明細書中に先に記載したポリメラーゼ - ベースのプライマー伸長方法によって検出することができる。別法として、アレイ - ハイブリダイズdmRNAでは、逆転写酵素 - ベースのプライマー伸長を使用することができる。遺伝子発現分析のためのオン - アレイ標識の一部の非限定的利点がある。標識コストは劇的に減少させることができる。というのは、使用する標識されたヌクレオチドの量は、捕獲された標的を標識するための方法と比較して実質的に少ないからである。第二に、交差 - ハイブリダイゼーションは劇的に低下させることができる。というのは、標的はハイブリダイズしなければならないと共に、プライマー伸長反応において標識取り込みのためのその3'末端における完全な相補性を含まなければならないからである。同様に、ハイブリダイズしたcDNAまたはmRNAの検出のために、OLAまたはGoldenGate<sup>TM</sup>アッセイを用いることができる。後者の2つの方法は、典型的には、問い合わせられた各遺伝子座についての外因性核酸の付加を必要とする。しかしながら、そのような方法は、プライマー伸長の使用が許容できないレベルの異所性伸長に導く適用においては有利であり得る。

#### 【0275】

また、プライマー伸長での上記したオン - アレイ標識を用いて、標的cDNAまたはmRNAのスプライス接合と合致するように3'プローブ末端を設計することによって別のスプライス部位をモニターすることもできる。上記末端は、特定の遺伝子についての全ての関連する可能なアクセプタースプライス部位をユニークに同定するように配置することができる。例えば、最初の45の塩基を完全にドナーエクソン内に存在するように選択することができ、最後の5つの3' - 塩基は、最初の45の塩基に隣接してスプライスされるようになる可能なスプライスアクセプターエクソンの組内に存在させることができる。

## 【0276】

型決定可能な遺伝子座を同定するための本明細書中に先に記載された方法における gDNA の代わりに cDNA または mRNA の標的を用いることができる。例えば、cDNA または mRNA の標的は、遺伝子型分類アッセイで用いることができる。遺伝子型分類 cDNA または mRNA は、対立遺伝子特異的発現の差が、例えば、「定量的遺伝子型分類」、または二対立遺伝子 SNP マーカーにおける 1 つの対立遺伝子 v s 他の対立遺伝子の割合の測定を介してモニターできるようにする。対立遺伝子発現の差は、例えば、転写速度、転写体プロセッシングまたは転写体安定性の差から由来することができる。そのような効果は、調節領域、プロモータ、スプライス部位またはスプライス部位モディファイヤー領域または他のそのような領域における多型（または突然変異）に由来することができる。加えて、メチル化等のクロマチンにおけるエピゲノミック変化もまた対立遺伝子発現の差に寄与することもできる。かくして、上記方法を用いて、発現された生成物においてそのような多型または突然変異を検出することができる。

10

## 【0277】

「正規化された」表示は、cDNA 表示上にユニバーサル PCR テールを置くことに基づいたもの等のいくつかの方法のいずれかによって cDNA または mRNA 標的から作り出すことができる（例えば bRADY, Yeast, 17:211-7 (2000) 参照）。上記正規化プロセスを用いて、集団中の各型決定可能な遺伝子座が比較的同一のコピー数で存在する cDNA 表示を作り出すことができる。これは、cDNA 試料の定量的遺伝子型分類プロセスを助けることができる。というのは、アレイベースのプライマー伸長アッセイからのシグナル強度は、正規化プロセスなくしてよりも均一だからである。

20

## 【0278】

さらなる実施形態において、本発明の方法を用いて、mRNA または cDNA 試料を特徴付けることができる。mRNA または cDNA 試料を本発明の方法における標的試料として用いることができ、型決定可能な遺伝子座の表示的組を検出することができる。型決定可能な遺伝子座の表示的組は、mRNA または cDNA 試料の診断または特徴となるように選択することができる。例えば、特定の型決定可能な遺伝子座のレベルを試料において検出し、これらの遺伝子座についての参照レベルと比較することができ、上記参照レベルは、試料は所望の遺伝子をカバーする発現された配列を含む程度を示す。かくして、上記方法を用いて、mRNA または cDNA 試料の量または特定の適用についてのその適切性を決定することができる。

30

## 【0279】

ビーズ等の典型的なアレイ位置は、比較的密にパッキングされたプローブ核酸の大きな集団を含むことができる。多くの条件下での標的核酸のハイブリダイゼーションに続き、検出アッセイにおけるプローブの一部のみが相補的標的で占められるであろう。そのような条件下では、密にパッキングされたプローブは、異所性プライマー伸長に感受性であるプローブ間構造を形成する可能性がある。さらに、図 13A に示すように、自己相補性配列を有するプローブもまた、異所性プライマー伸長に感受性である構造を検出することができる。異所性伸長は、伸長反応の間における、プローブ間またはプローブ内ハイブリッドにおける一方または双方のプローブの修飾をいう。異所性伸長は、アレイに対するハイブリダイズされた標的の存在にかかわらず起こり得る。

40

## 【0280】

従って、本発明は、プライマー伸長アッセイにおいてプローブの異所性伸長を阻害する方法を提供する。上記方法は、(a) 複数のプローブ核酸を、プローブ-標的ハイブリッドが形成される条件下で複数の標的核酸と接触させ；(b) 上記複数のプローブ核酸を、プローブ-異所性伸長阻害剤ハイブリッドが形成される条件下で異所性伸長阻害剤と接触させ；次いで、(c) プローブ-異所性伸長阻害剤ハイブリッドにおけるプローブと比較して、プローブ-標的ハイブリッドにおけるプローブを選択的に修飾する工程を含む。

## 【0281】

本発明で有用な異所性伸長阻害剤は、一本鎖核酸プローブに結合することができ、それ

50

により、プローブの第二のプローブへのハイブリダイゼーションを妨げるいずれの剤でもあり得る。例示的剤は、限定されるものではないが、一本鎖核酸結合蛋白質 (SSB)、核酸アナログを含めた上記したもの等の核酸、小分子を含む。そのような剤は、ヌクレオチド配列にかかわらず、二本鎖核酸よりも一本鎖核酸に対して優先的に結合する一般的特性を有する。本発明で用いることができる例示的一本鎖核酸結合蛋白質は、限定されるものではないが、Eco SSB、T4 gp32、T7 SSB、L4 SSB、Ad SSB、UP1等、および例えば、Chase et al., Ann. Rev. Biochem., 55:103-36 (1986); Coleman et al., CRC Critical Reviews in Biochemistry, 7(3):247-289 (1980) および米国特許第5,773,257号に記載された他のものを含む。上記したプライマー伸長アッセイのいずれかにおける異所性伸長は、本発明の方法を用いて阻害することができる。プライマー伸長アッセイにおけるプローブの異所性の伸長を阻害するための方法の例示的实施形態は図13に示し、後にさらに詳細に記載する。

10

20

30

40

50

#### 【0282】

図13Bに示すように、異所性伸長は、SSB、T4遺伝子32等々の一本鎖核酸に選択的に結合する蛋白質または他の剤と共にプローブの集団をインキュベートすることによって最小化することができる。上記剤または蛋白質は、それが、標的核酸にハイブリダイズせず、それにより、それらの自己-アニーリングおよびその後の伸長を妨げる一本鎖プローブをコート条件下で加えることができる。一本鎖プローブに結合する蛋白質等の剤は、プライマー伸長反応に先立って、またはその間に、例えば、アニーリング工程に先立って、またはその間に、プローブの集団に加えることができる。

#### 【0283】

また、1つ以上のブロッキングオリゴヌクレオチド(オリゴ)を用いて異所性発現を低下させることもできる。図13Cに示すように、プローブの3'末端に相補的なブロッキングオリゴを、それが、標的核酸にハイブリダイズしていないプローブにハイブリダイズする条件下で加えることができる。一部のプローブが存在する適用においては、プローブの3'末端にアニールするように設計された複数のブロッキングオリゴヌクレオチドに加えることができる。プライマー伸長反応に先立って、またはその間に、例えば、アニーリング工程に先立って、またはその間に、1つ以上のブロッキングオリゴをプローブの集団に加えることができる。

#### 【0284】

図13Dに示すように、プローブは、プライマー伸長アッセイにおいてプライマー伸長工程で用いられる条件下で伸長できないヘアピン構造を形成することができる相補的配列な部分で設計することができる。図13Dに示す例においては、プローブの3'末端はプローブの5'末端にアニールし、5'末端は読むことができるテンプレートに隣接しないので、ヘアピンは異所的に伸長できない。プローブは、ヘアピンが、伸長できない3'突出とで形成されるように、プローブの第二の配列領域に相補的なプローブの3'末端に隣接する第一の配列領域を有するように設計することができる。ヘアピン構造は、さらに、それが、プライマー伸長反応のアニーリング工程の条件下で標的核酸へのアニーリングを阻害しないように設計される。例えば、プローブの2つの領域は、標的ハイブリダイゼーションの間に用いられる温度では実質的にアニールしないが、一旦温度が伸長のために低下すれば、アニールしてヘアピンを形成するようになる相補的配列を有することができる。

#### 【0285】

異所性伸長を低下させる方法は整列させたプローブに関して上記では例示したが、当業者であれば、上記方法は、液相反応または流体相において空間的に分離されたビーズ等の他のフォーマットでの伸長反応に同様に適用できることを理解するであろう。

#### 【0286】

一部の伸長アッセイ条件下では、ポリメラーゼは、ハイブリダイズしたテンプレート核酸が存在しなければ、一本鎖プローブの3'末端の端部にて過剰のヌクレオチドを配置す



ることができる。そのような活性は一部の条件下で二本鎖核酸の平滑端部の 3' 末端で起こることも既知であり、これは、末端エクステンダーゼ活性といわれる（例えば、Hu et al., DNA and Cell Biology, 12: 763-770 (1993) 参照）。従って、本発明で用いる伸長反応は、末端エクステンダーゼ活性を阻害する条件下で行うことができる。例えば、用いるべき伸長反応条件下で十分に低いレベルの末端エクステンダーゼを有するポリメラーゼを選択することができるか、あるいは特定のポリメラーゼのエクステンダーゼ活性によって優先的に一体化されるヌクレオチドを伸長反応から排除することができるか、あるいはハイブリダイズしていないプローブをブロックするか、または伸長反応から除去することができる。

#### 【0287】

核酸標的の直接的ハイブリダイゼーション検出は、一部のアッセイ条件下での交差 - ハイブリダイゼーション反応のためアッセイ特異性の減少を被りかねない。核酸標的のアレイ - ベースの酵素的検出は特異性を増加させるための強力なアプローチを提供する。先に議論した遺伝子型分類の分野に加えて、本発明は、DNA コピー数、微生物剤、遺伝子発現等の検出において特異性を増加させるのに適用することができる。これは、核酸試料の複雑性がヒトゲノム複雑性のレベルまで増加するので、特に重要となる。例えば、標識されたゲノム DNA が DNA アレイにハイブリダイズする DNA コピー数実験は、しばしば、特異性の問題によって危うくなる。プライマー伸長または本明細書中で記載した他のもの等のアレイ - ベースの酵素的工程と組み合わせて直接的ハイブリダイゼーションを使用することによって、特異性は劇的に改善することができる。これは、酵素的検出工程による標識は完全な 3' 相補性により起こるので、交差 - ハイブリダイジング標的は検出されないからである。

#### 【0288】

本発明のさらに別の実施形態によると、本明細書中で先に記載した方法の 1 つ以上を行うための診断システムが提供される。本発明の診断システムは、所望ならば、適切なパッケージング材料を含むキットの形態で提供することができる。1 つの実施形態において、例えば、診断システムは、例えば、アレイフォーマットでの複数の核酸プローブ、およびアレイのプローブにハイブリダイズした gDNA 断片または他の標的核酸を検出するのに有用な 1 つ以上の試薬を含むことができる。従って、特定の方法に関して本明細書中にて先に記載したもの等の本発明の方法で有用な試薬または成分のいずれの組合せも、本発明によって提供されるキットに含めることができる。例えば、キットは、アレイに結合し、かつプライマー伸長検出反応で有用な他の試薬と共に遊離 3' 末端を有する 1 つ以上核酸プローブを含むことができる。

#### 【0289】

本明細書中で用いるように、フレーズ「パッケージング材料」とは、核酸プローブまたはプライマー等の、キットの内容物を収容するのに用いられる 1 つ以上の物理的構造をいう。パッケージング材料をよく既知の方法によって構築して、好ましくは、滅菌された汚染のない環境を提供することができる。ここに使用されるパッケージング材料は、例えば、核酸 - ベースの診断システムで慣用的に利用されるものを含むことができる。例示的パッケージング材料は、限定されるものではないが、単離された核酸、オリゴヌクレオチド、またはプライマー等の本発明の方法で有用な成分を固定された制限内に保持することができるガラス、プラスチック、紙、ホイル等を含む。

#### 【0290】

パッケージング材料は、本発明の核酸を特定の方法で用いることができることを示す標識を含むことができる。例えば、標識は、上記キットが型決定可能な遺伝子座の特定の組を検出するのに有用であり、それにより、個々の遺伝子型を決定することを示すことができる。さらに別の例において、標識は、上記キットが特定のゲノム DNA 試料を増幅するのに有用であることを示すことができる。

#### 【0291】

パッケージされた試薬または成分を用いるための指令書も、典型的には、本発明のキッ

10

20

30

40

50

トに含まれる。「用いるための指令書」とは、典型的には、試薬または成分の濃度、または混合すべきキット成分および試料の相対的量、試薬 / 試料混合のための維持時間、温度、緩衝液条件等のような、少なくとも 1 つのアッセイ方法パラメータを記載する有形の表現を含む。

#### 【0292】

本発明の方法は、試薬、成分、または本明細書中に開示した工程の 1 つ以上についての望ましいまたは望ましくない結果を判断するための対照を含むことができる。対照についての結果と、調べるべき試料についての結果と比較を本発明の方法で行うことができ、それにより、結果を有効なものとし、結果の反復するまたは影響する解釈を担う工程を同定することができる。もし 1 つ以上の対照についての結果が結果の所望の範囲の外側にあれば、本発明の方法は、調べるべき試料で得られた値または他のデータ点を修飾する工程を含むことができる。本発明の方法は、後に記載する対照の 1 つ以上についての結果および、もし結果が所望の範囲の外側であれば、上記方法の 1 つ以上の工程を反復することを含むことができる。かくして、対照からのシグナルおよび条件の修飾の検出は、条件の所望の組が得られるまで反復して行うことができる。

10

#### 【0293】

増幅対照は、表示的にゲノムを増幅しおよび / またはゲノム断片を生じさせる工程を含めた方法等の本発明の方法で用いることができる。例示的増幅対照は固有のゲノムスパイクである。例えば、少量の微生物ゲノム DNA を、ヒトゲノムのランダムプライマー増幅のための反応にスパイクすることができる。加えられた微生物ゲノム DNA の量は、典型的には、他の DNA 試料からの可能な汚染と競合するのに十分であるが、ヒトゲノム DNA 試料の増幅と実質的に競合するには不十分なものである。例えば、ヒト遺伝子座ではなく微生物遺伝子座に選択的にハイブリダイズするプローブのサブセットを用いるヒトゲノムと比較して微生物ゲノムに対してユニークである遺伝子座の検出を用いて、失敗した増幅が、誤った RPA 反応成分または貧弱な質のヒトゲノム DNA によるものか否かを判断することができる。さらに詳しくは、RPA 反応から得られた微生物遺伝子座の検出可能なレベルは、ヒトゲノム DNA が貧弱な量であって、RPA 反応成分が機能的であることを示し、対照においては、微生物遺伝子座の検出可能なレベルの不存在は反応成分の失敗を示す。

20

#### 【0294】

ゲノム断片を核酸プローブと接触させる工程を含む方法等の本発明の方法で、ハイブリダイゼーション対照を用いることができる。典型的には、ハイブリダイゼーション対照は、プローブハイブリダイゼーション工程の間に標的核酸と共にインキュベートされる合成核酸である。有用なハイブリダイゼーション対照の例は、ストリンジェンシー対照標的の配列に対する一連のミスマッチを形成する配列を有するストリンジェンシー対照プローブの組である。プローブのシリーズは、ストリンジェンシー対照標的の配列にパーフェクトマッチする配列を有する第一のプローブ、ストリンジェンシー対照標的の配列とのミスマッチを有する第二のプローブ、第二のプローブおよび第二のミスマッチと同一のミスマッチを有する第三のプローブ、第三のプローブおよび第三のミスマッチと同一の 2 つのミスマッチを有する第四のプローブを含むことができる。このシリーズにおいてプローブ当たり 2 つ以上のミスマッチを有することが可能である。シリーズにおけるミスマッチが、1 つ以上のマッチするヌクレオチドが配列に介在するように、相互に隣接し、または相互から間隔を設けることができる。シリーズにおけるミスマッチは、プローブの全てがストリンジェンシー対照標的とパーフェクトマッチする 3' 末端を有するようにプローブの 5' 末端近くに位置することができる。

30

40

#### 【0295】

ストリンジェンシー対照標的にハイブリダイズするストリンジェンシー対照プローブの数および / または同一性は、ハイブリダイゼーションの条件のストリンジェンシーと相関させることができる。最高のストリンジェンシーレベルにおいては、上記シリーズにおける第一のストリンジェンシー対照プローブ（パーフェクトマッチ対照プローブ）のみが標

50

的対照プローブにハイブリダイズする。より低いストリンジェンシーの条件の結果、ストリンジェンシー対照標的にハイブリダイズするシリーズ中のより多いストリンジェンシー対照プローブをもたらす。かくして、ストリンジェンシー対照プローブを用いて、ゲノム断片およびプローブについてのハイブリダイゼーションのための所望のストリンジェンシーを供する条件を同定することができる。

#### 【0296】

用いることができるさらなる対照は濃度対照である。濃度対照プローブの配列とパーフェクトマッチする配列を有する濃度対照標的を用いることができる。濃度対照標的は対照プローブに対して異なる濃度で供することができる。アッセイ条件の特定の組についての検出のより低い制限は、検出された標的の最低濃度を測定することによって定量することができる。所望であれば、濃度対照標的は、例えば、標的配列の3'末端において対照プローブに対して1つ以上のミスマッチを有することができる。従って、ストリンジェンシーまたは特異性評価も濃度プローブで行うことができる。

10

#### 【0297】

プローブ修飾対照は、ゲノム断片にハイブリダイズさせつつプローブを修飾する工程を含む方法等の本発明の方法で用いることができる。プローブ修飾対照の例は、本発明の方法においてポリメラーゼによってプローブ伸長の例を示す伸長対照である。例示的伸長対照は、ヘアピンプローブまたはマッチおよびミスマッチヘアピンプローブの組である。上記組は4ヌクレオチドに関して生起するマッチおよびミスマッチの16の可能な組合せのうち2つ以上を含むことができる(例えば、GCマッチおよびGA、GTおよびGGの少なくとも1つ)。ヘアピンプローブは、典型的には、それらの5'末端において基材に結合し、それらが許容されるストリンジェンシー条件下でそれらの3'末端においてヘアピン構造を形成できるように回文配列を有する。マッチプローブは3'塩基対マッチで終了するヘアピンを有し、他方、ミスマッチプローブは3'ミスマッチで終了する。マッチヘアピンプローブの修飾は、伸長アッセイ成分が使用される条件下で機能的であることを示す。ヘアピン対照プローブの利点は、上記表示が標的核酸の存在から独立していることである。かくして、失敗した伸長反応では、マッチヘアピン対照についての結果を用いて、問題が標的核酸試料または他の伸長反応試薬から生じたかを決定することができる。ミスマッチヘアピンプローブの修飾をモニターして、伸長反応試薬がテンプレート独立的にプローブを修飾するかを決定することができる。ヘアピン対照プローブを伸長反応に関して上記にて例示してきたが、当業者であれば、それらが連結反応等の他のテンプレート-依存性修飾反応で用いることができるのを理解するであろう。

20

30

#### 【0298】

さらに別の有用なプローブ修飾対照は、伸長効率対照である。伸長効率対照は、プローブの3'末端が、各々、4ヌクレオチド配列のA、C、TまたはGヌクレオチドに相補するように、伸長効率対照標的の重複する配列に相補的な伸長効率対照プローブの組を含むことができる。かくして、4つのそのような伸長効率対照プローブと伸長効率対照標的との配列の整列は、1つのヌクレオチドだけそれらの3'末端における配列オフセットのスタガードセットとして出現する。伸長効率対照は、選択された伸長反応条件が、用いるヌクレオチドの全てを一体化させることに関してバランスしているか否か、または1つ以上のヌクレオチドが選択的に一体化されるかを決定するのに有用であり得る。

40

#### 【0299】

本発明の方法は、さらに、非多型対照の評価を含むことができる。非多型対照は、ゲノムにおける非多型配列についてのパーフェクトマッチおよびミスマッチプローブの組である。パーフェクトマッチおよびミスマッチプローブは、それらの3'末端が、各々、ゲノム配列領域に対して相補的であるか、または相補的でないかを除いて、ゲノムの同一領域に対して相補的である。例えば、ストリンジェンシーをモニターするための異なるGC含有量を有する、および/または、マッチおよびミスマッチの全ての可能な組合せの1つ以上を有する1つ以上の組を用いることができる。多型プローブは、複数個体でのクラスタリングデータと比較した場合、単一または混合した個体試料を用いるアッセイ最適化を容

50

易とすることができる。

#### 【0300】

ストリップ対照は、複数のプローブからゲノム断片を除去する工程を含む方法等の本発明の方法で用いることができる。例えば、一旦、ハイブリッドを処理して、ゲノム断片を除去したならば、標識された標的の存在または不存在を検出し、各々、満足されないまたは満足される断片除去と関連させることができるように、複数のプローブとのハイブリダイゼーションに先立って、標識されたストリップ対照標的をゲノム断片試料にスパイクすることができる。特別な実施形態において、標識は、相補的プローブにハイブリダイズさせつつ、ストリップ対照標的に一体化させることができる。例えば、ストリップ対照標的の3'末端は、標的がテンプレート依存的に修飾できるようにプローブにハイブリダイズさせることができる。典型的には、ストリップ対照標的およびその相補的プローブは、プローブが標的と同一の工程で修飾されないように設計される。例えば、プローブは、修飾に使用できない3'ヌクレオチドアナログを有することができ、および/またはプローブの3'末端は標的とでミスマッチを形成することができる。さらに、ストリップ対照標的と相補的なプローブは、本発明の方法で検出されるべきゲノム断片のいずれかと相補的でない配列を有するように設計することができる。

10

#### 【0301】

検出対照は、プローブ-断片ハイブリッドの型決定可能な遺伝子座を検出する工程を含む方法等の本発明の方法で用いることができる。例えば、既知の量の関連した標識を有する標識対照プローブの組を用いることができる。標識対照プローブは滴定曲線として分析して、ゲノム断片の型決定可能な遺伝子座を検出するのに用いられる標識についての感度または検出の範囲を決定することができる。標識対照プローブは、ゲノム断片の検出で用いるプローブと同一のタイプの分子である必要はない。従って、標識対照プローブは、アレイ表現の特定の位置に直接的にまたは間接的に結合させた標識であり得る。オン-アレイピオチン-ベースの検出の場合には、標識対照プローブは、既知の量の共有結合したピオチンを有するアレイ位置であり得る。

20

#### 【0302】

本発明を固定化されたプローブのアレイに関して本明細書中で例示したが、当業者であれば、他の検出フォーマットを同様に使用することができるのを理解するであろう。例えば、本明細書中に記載した方法は、固相よりはむしろ液相で行うことができる。従って、液相プローブは、上記した方法における固定化されたプローブを置き換えることができる。検出標識または検出部分に関して上記したもの等の特性に従って、液相プローブを検出することができる。例えば、プローブは同定可能な電荷、質量、質量に対する電荷の比率、または他の区別する特性を有することができる。そのような区別する特性は、例えば、毛細管電気泳動、アクリルアミドゲル、アガロースゲル等のクロマトグラフィーシステムにおいて、あるいは質量分光分析のような分光分析システムで検出することができる。かくして、本発明は、さらに、(a)型決定可能な遺伝子座を有するゲノム断片の増幅された表示的集団を提供し；(b)上記ゲノム断片を、プローブ-断片ハイブリッドが形成される条件下で、型決定可能な遺伝子座に対応する配列を有する複数の核酸プローブと接触させ；(c)プローブ-断片ハイブリッドを修飾し；次いで、(d)修飾されたプローブまたは断片を検出し、それにより、ゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する工程を含むゲノムの型決定可能な遺伝子座を検出する方法を提供する。

30

40

#### 【実施例】

#### 【0303】

(実施例I)

(ランダム-起点増幅(RPA)を用いる全ゲノム増幅)

本実施例は、酵母ゲノムからの上記ゲノム断片の増幅された表示的集団の生成を示す。

#### 【0304】

Qiagen Genomic DNA抽出キットを用いて*S. Cerevisiae*株S228Cからの酵母ゲノムDNAを調製し、10 ngのゲノムDNAをクレノウポリ

50

メラーゼで増幅した。

#### 【0305】

一部のパラメーターを見積もって、クレノウ (exon) ランダム - 起点増幅反応の収率に対するそれらの効果を決定した。増幅反応は、1つのパラメーターを系統的に修飾した以外は、同様な条件下で行った。図3は、異なる濃度のデオキシヌクレオチド三リン酸で行った増幅反応を比較する結果を示す。

#### 【0306】

各反応に続き、増幅されたDNAをMontage限外濾過プレート (Millipore) で精製し、アガロースゲルに入れて、図3Aに示したようにUV<sub>260</sub>の表示によってDNAを定量した。増幅収率は、各レーンにおける株の密度に基づいて測定し、結果を図3(B)中の表に示す。図3Bの最後の2つの欄に示したように、10ngの酵母ゲノムテンプレートを増幅して、約600~8000倍の増幅を表す約6~80マイクログラムの範囲の量まで増幅した。テスト条件下での平均断片サイズは約200~300bpであった。

10

#### 【0307】

結果は、増幅収率がプライマーまたはデオキシヌクレオチド三リン酸のより高い濃度において増加したことを示した。かくして、反応パラメーターを系統的に修飾し、評価して、所望の増幅収率を測定することができる。

#### 【0308】

(実施例II)

20

(BeadArrays<sup>TM</sup>にハイブリダイズした酵母全ゲノム試料についての酵母遺伝子座の検出)

本実施例は、BeadArrays<sup>TM</sup>にハイブリダイズし、および対立遺伝子特異的プライマー伸長(ASPE)でプローブした酵母全ゲノム試料についての酵母遺伝子座の再現性がある検出を示す。

#### 【0309】

600ナノグラムのランダムプライマー増幅(RPA)酵母gDNAを遺伝子座 - 特異的BeadArrays<sup>TM</sup>(Illumina)にハイブリダイズさせた。上記BeadArrays<sup>TM</sup>は、S.cerevisiaeゲノム全体を通じて分布した異なる遺伝子 - ベースの遺伝子座を質問する96のオリゴヌクレオチドプローブ対(PMおよびMM、長さは50塩基)よりなるものであった。増幅された酵母ゲノムDNAを、以下の条件下でBeadArrays<sup>TM</sup>にハイブリダイズさせた: 標準1xハイブリダイゼーション緩衝液(1M NaCl、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)、0.1%Tween20、20%ホルムアミド)中の48における一晚のハイブリダイゼーション。ハイブリダイゼーションの後、アレイを48にて1xハイブリダイゼーション緩衝液で5分間洗浄し、続いて、室温にて0.1xハイブリダイゼーション緩衝液中で5分間洗浄した。最後に、アレイをASPE反応緩衝液で5分間洗浄して、伸長工程前にアレイをブロックし、平衡化させた。ASPE反応緩衝液(10xGG伸長緩衝液(Illumina, Inc., San Diego, CA)、0.1%Tween-20、100μg/mlのBSA、および1mMのジチオスレイトール、10%スクロース、500mMベタイン)。

30

40

#### 【0310】

ASPE反応は以下のようにアレイ上で直接的に行った。BeadArraysは、3μM dNTP(1.5μM dCTP)、1.5μMビオチン-11-dCTP、~0.4μl KlenTaq(DNA Polymerase Technology, Inc. St. Louis, MO, 63104)を補足した上記記載されたASPE反応緩衝液を含有する50μlのASPE反応ミックスに浸漬した。BeadArrays<sup>TM</sup>を室温にてASPE反応中で15分間インキュベートした。BeadArrays<sup>TM</sup>を新鮮な0.2N NaOA中で2分間洗浄し、次いで、1xハイブリダイゼーション緩衝液中で30秒間の洗浄を2度行った。取り込まれたビオチン標識を、ストレプトアビジン

50

- フィコエリスリンおよびビオチニル化抗ストレプトアビジン染色を使用するサンドイッチアッセイによって検出した。これは以下のように行った: Bead Arrays<sup>TM</sup>をエオシンブロック (Pierce, Rockford, IL) 中で室温にて30分間ブロックした。これに続いて、1×ハイブリダイゼーション緩衝液中で素早く洗浄し(1分)、しかる後、ストレプトアビジン-フィコエリスリン (SAPE) 溶液 (1×ハイブリダイゼーション緩衝液, 0.1% Tween 20, 1mg/ml BSA, 3μg/ml ストレプトアビジン-フィコエリスリン (Molecular Probes, Eugene, OR)) で室温にて5分間染色した。染色の後、Bead Arrays<sup>TM</sup>を1×Hyb. 緩衝液で素早く洗浄し、しかる後、6mg/mlのヤギ血清、カゼインおよび0.1% Tween 20を補足した1×TBS中の10μg/ml ビオチニル化抗ストレプトアビジン抗体 (Vector Labs, Burlingame, CA) で対比染色した。この工程に続いて、1×Hyb. 緩衝液中で素早く洗浄し、次いで、記載したSAPE溶液で第二の染色を行った。染色の後、1×Hyb. 緩衝液中の最終洗浄を行った。

10

20

30

40

50

#### 【0311】

図4の左側パネルは、増幅された全酵母ゲノム試料のハイブリダイゼーションおよびASPE検出に続くアレイのイメージを示す。図4の右側パネルにおけるチャートはパーフェクトマッチ (PM) およびミスマッチ (MM) 強度 (96のうち48の遺伝子座) のサブセットを呈する。88%を超える遺伝子座は5よりも大きなPM/MM比率を有し、これは、別の遺伝子型から遺伝子座の大半を区別する能力を示す。

#### 【0312】

酵母よりも高い複雑性のゲノムにおける型決定可能な遺伝子座を識別する能力は、より複雑な生物のゲノムバックグラウンドに酵母ゲノムDNAをスパイクすることによって評価した。600ナノグラムの酵母ゲノムDNA (12Mb複雑性) を150μgのヒトゲノムDNA (3000Mb複雑性) にスパイクして、ヒトと同等な複雑性を有するゲノムにおける単一コピー遺伝子座の存在を模倣した。アレイへのこのスパイクされた試料のハイブリダイゼーションは、酵母DNAが単独でハイブリダイズした非常に少ない差を示し、これは、複雑なゲノムバックグラウンド中の正しい標的配列を特異的に補足するアレイの能力を示す。

#### 【0313】

これらの結果は、全ゲノム試料のアレイへのハイブリダイゼーションに続く酵母ゲノムの一部の型決定可能な遺伝子座の検出を示す。これらの結果は、さらに、全ゲノム試料中の複数の型決定可能な遺伝子座を検出するのに増幅が必要でないことを示す。さらに、結果は再現性があり、上記方法が頑強であることを示す。

#### 【0314】

##### (実施例III)

(Bead Arrays<sup>TM</sup>に直接的にハイブリダイズしたヒトgDNAの全ゲノム遺伝子型分類 (WGG))

本実施例は、ゲノム断片の表示的集団のアレイへのハイブリダイゼーション、およびハイブリダイズしたゲノム断片の一部の型決定可能な遺伝子座の直接的検出を示す。本実施例は、さらに、2つの異なるプライマー伸長アッセイのいずれかをを用いるアレイ上での型決定可能な遺伝子座の検出を示す。

#### 【0315】

##### (SBE-ベースの検出)

ヒト胎盤ゲノムDNA試料はCoriell Inst. Camden, NJから入手した。ヒト胎盤gDNA試料 (150μg) を、各々が24の異なる非多型プローブ (50-量体) の同一の組を含有する4つの個別の束を有するBead Arrays<sup>TM</sup> (Illumina) にハイブリダイズさせた。上記Bead Arrays<sup>TM</sup>は、ヒトゲノム全体を通じてランダムに分布したヒト非多型遺伝子座に対する96のプローブよりなるものであった。プローブは50塩基の長さであり、約50%のGC含有量であり、隣接A

(16プローブ)、C(16プローブ)、G(16プローブ)またはT(16プローブ)塩基を再度配列決定するように設計された。DNA試料(150 $\mu$ gのヒト胎盤DNA)を、15 $\mu$ lの容量中の標準1 $\times$ ハイブリダイゼーション緩衝液(1M NaCl、100mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)、0.1%Tween20、20%ホルムアミド)中で48 にて一晩ハイブリダイズさせた。

#### 【0316】

4つの個別のSBE反応を、1つは各個別の束に対するものであるアレイで以下のように直接的に行った。「A」反応はビオチン-標識ddATPおよび未標識ddCTP、ddGTP、およびddTTPを含むものであった。他の3つのSBE反応は、標識されたおよび標識されていない表示は適切に調整した以外は同様であった。SBE反応条件は以下の通りであった：BeadArrays<sup>TM</sup>を50 にてSBE反応ミックスに1分間浸漬させた。4つの異なるSBE反応ミックス、A、C、GまたはT再配列決定ミックスを提供した。例えば、50 $\mu$ lのA-SBE再配列決定ミックスは、1 $\mu$ Mのビオチン-11-ddATP(Perkin Elmer)、1 $\mu$ MのddCTP、1 $\mu$ MのddGTP、および1 $\mu$ MのddUTP、1 $\times$ Thermosequencase緩衝液、0.3UのThermosequencase、10 $\mu$ g/mlのBSA、1mMのDTT、および0.1%Tween20を含有するものであった。他の3つのSBEミックスは、含まれる適切な標識された塩基が同様であり、他の塩基は未標識であった。

#### 【0317】

SBE反応の結果を図5に示す。図5において、96のプローブの組を、ビオチン-標識ddATP反応のためのCA1~CA24、ビオチン-標識ddCTP反応のためのCC1~CC24、ビオチン-標識ddGTP反応のためのCG1~CG24、およびビオチン-標識ddTTP反応のためのCT1~CT24と命名された4つの異なる反応に対応する4つの群に分ける。図5に示すように、プローブの大半は優れたシグナル識別を示した。

#### 【0318】

##### (ASPE-ベースの検出)

同様に調製したヒト胎盤gDNA試料(150 $\mu$ g)を、非多型遺伝子座を問い合わせる77の機能的パーフェクトマッチ(PM)およびミスマッチ(MM)プローブ対を含有するBeadArrays<sup>TM</sup>にハイブリダイズさせた。ASPEプローブはヒトゲノム内の非多型部位に対して設計した。プローブは長さが50塩基であって、約50%GC含有量であった。パーフェクトマッチ(PM)プローブは完全にゲノム配列にマッチし、他方、ミスマッチ(MM)プローブは3'塩基におけるゲノム配列に対する単一塩基ミスマッチを含んだ。ミスマッチタイプはモデリングA/GおよびC/T多型に向けて偏っていた。ハイブリダイゼーションおよび反応条件は実施例IIで先に記載した。

#### 【0319】

対立遺伝子特異的プライマー伸長反応(ASPE)はアレイ表面で直接的に行い、取り込まれたビオチン標識はストレプトアビジン-フィコエリスリン染色で検出した。ASPE反応は以下のように行った。BeadArrays<sup>TM</sup>を1 $\times$ ハイブリダイゼーション緩衝液中で2回洗浄し、次いで、室温にて(酵素およびヌクレオチドを含まない)ASPE反応緩衝液で洗浄した。BeadArrays<sup>TM</sup>を50 $\mu$ lのASPE反応ミックスに室温にて15分間浸漬することによって、ASPE反応を行った。ASPEミックスは以下の成分を含有した：3 $\mu$ MのdATP、1.5 $\mu$ MのdCTP、1.5 $\mu$ Mのビオチン-11-ddCTP、3 $\mu$ MのdGTP、3 $\mu$ MのdUTP、1 $\times$ GoldenGate<sup>TM</sup>伸長緩衝液(Illumina)、10%スクロース、500mMベタイン、1mMのDTT、100 $\mu$ g/mlのBSA、0.1%Tween20および0.4 $\mu$ lのKlentag(DNA Polymerase Inc., St. Louis, MO)。図6Aは、77のプローブ対を横切る生の強度値を示す。PMプローブ(視覚)は、プローブの大部分全般に亘ってのMMプローブよりも極めて高い強度を呈し、これは、効果的に問い合わせられた塩基が区別されることを可能とする。図6は、77の遺伝子座について

の識別比率 ( $PM / PM + MM$ ) のプロットを示す。これらの結果は、遺伝子座の約 2 / 3 が比率  $> 0.8$  を有することを示した。

【0320】

本実施例の結果は、ゲノム断片の表示的集団のアレイへのハイブリダイゼーション、およびハイブリダイズしたゲノム断片の一部の型決定可能な遺伝子座の直接的検出が、遺伝子型分類適用のための十分な遺伝子座識別を供することを示す。

【0321】

(実施例IV)

(増幅されたゲノムDNA断片の遺伝子型分類)

本実施例は、ゲノム断片が上記増幅された集団の遺伝子型分類を示す。

10

【0322】

ヒト胎盤ゲノムDNA試料はCoriell Inst. Camden, NJから入手した。上記ゲノムを増幅し、テンプレートゲノムの量を変化させ、ランダムプライマーの長さを図7に示すように変化させた以外は、実施例Iに記載された条件下でランダムプライマー増幅を用いてピオチン標識した。全ての反応についての増幅出力は、40  $\mu$ l 反応当たり約40  $\mu$ gの増幅されたゲノム断片において比較的一定であった。

【0323】

ゲノム断片が上記増幅された集団は以下のように遺伝子型分類した。上記遺伝子型分類は、IllumiCode<sup>TM</sup>アレイ上の所有GoldenGate<sup>TM</sup>アッセイを用いるIlluminaのSNP遺伝子型分類サービスによって行った。GenTrainスコアは、どのようにしてよくSNP遺伝子座の遺伝子方強度が試料集団全般に亘ってクラスターを形成するかについての計量である。未増幅対照に対するGenTrainスコアの比較は、遺伝子座の増幅および偏りの見積もりを供する。

20

【0324】

未増幅DNAについての遺伝子型分類の質を、図7に示されたゲノム断片が上記増幅された集団と比較した。増幅反応で用いたゲノムテンプレートの量を各棒線の下方に示す。増幅された試料のうち、最良のGenTrainスコアは、1000ngのテンプレートゲノムを用いる増幅反応で得られた(40x増幅)。1000ngのテンプレートゲノムを用いる増幅反応についてのGenTrainスコアは、未増幅ゲノムDNAで得られたのと同様であり、これは、増幅された生成物がゲノムを表すことを示す。許容されるGenTrainスコアは、100ng程度の少ないテンプレートゲノムを用いて増幅反応で得られた(400x増幅)。

30

【0325】

これらの結果は、本発明に従って得られたゲノム断片が増幅された集団が遺伝子型分類アッセイにおいてゲノム配列を表すことを示す。

【0326】

(実施例V)

(増幅されたゲノムDNA断片の全ゲノム遺伝子型分類(WGG))

本実施例は、DNAアレイへの直接的ハイブリダイゼーションおよびアレイ-ベースのプライマー伸長SNPスコアリングによるゲノム断片が増幅された集団の全ゲノム遺伝子型分類を示す。

40

【0327】

3x32 DNA試料の組(各々1  $\mu$ g)は、ランダムプライマー増幅によって増幅して、150  $\mu$ gのゲノムDNA断片を有する個別の標的試料を生じた。断片が上記増幅された集団は、192遺伝子座をカバーする50-量体ASPE捕獲プローブを有するBeadArrays<sup>TM</sup>にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションの後、ASPE反応は実施例IIIに記載したように行った。イメージを収集し、所有GenTrainソフトウェア(Illumina)を用いて遺伝子型クラスターを分析した。ASPEで検出されたBeadArrays<sup>TM</sup>の例示的イメージを図11Aに示す。

【0328】

50



図 1 1 B は、1つの遺伝子座についてのシート  $v$  s 強度の GenTrain プロットを示す。強度は、特定のピーズについて検出された合計蛍光強度である。シートは、遺伝子座の1つの対立遺伝子についての蛍光強度  $v$  s 遺伝子座の第二の対立遺伝子についての蛍光強度のバラツキプロットに対するピーズの蛍光強度の位置に対応する。特に、バラツキプロットに対するピーズの蛍光強度の位置は特定の  $x$  ,  $y$  座標に対応し、シートは  $x$  軸および原点からその  $x$  ,  $y$  座標へ引いた線の間の角度である。図 1 1 B に示すように、2つのホモ接合性 (  $B / B$  および  $A / A$  ) クラスターおよび1つのヘテロ接合性 (  $A / B$  ) クラスターは明瞭に区別された。

#### 【 0 3 2 9 】

遺伝子座の約 5 2 % はよく分解されたクラスターを与え、これは「成功した」と呼び、引き続いて、全ての試料全般に亘って遺伝子型に関して分析した。参照遺伝子型が既知の  $3 \times 16$  試料全般に亘っての遺伝子型要求 ( 1 0 1 / 1 9 2 遺伝子座 ) の分析は、1 0 0 % の要求率を持つ 9 9 . 9 5 % の一致 ( 4 0 9 0 / 4 0 9 2 ) を示した ( 表 1 2 、パネル A ) 。異なる遺伝子座におけるスコアを示す GenCall プロットは2つの異なる試料について図 1 2 B および C に示す。個々の遺伝子型要求についての GenCall スコアは 0 および 1 の間の値であり、これは、その要求における信頼性を示す。より高いスコアは、上記要求におけるより高い信頼性を示す。

10

#### 【 0 3 3 0 】

2つの異なる遺伝子座についての例示的 GenTrain プロットを図 1 2 C および 1 2 D に示す。このデータは、試料の大部分に関して、3つのクラスターがホモ接合性 (  $B / B$  および  $A / A$  ) および (  $A / B$  ) 遺伝子型に対応して明瞭に区別されることを示す。2つの灰色の点は「標的対照無し」Bead Arrays <sup>T M</sup> からのものである。

20

#### 【 0 3 3 1 】

図 1 2 D および E におけるバラツキプロットの調査は、プロット中の矢印によって示される、4 0 9 2 の要求のうち2つの質問可能な要求のみを示した。上記要求は、図 1 2 B および C 中の水平線によって示されるように、GenCall スコアに関して 0 . 4 5 の閾値を適用することによって濾過した。

#### 【 0 3 3 2 】

( 実施例 V I )

( 異所性シグナルの阻害 )

30

本実施例は、アレイ - ベースのプライマー伸長反応における異所性発現を阻害するための一本鎖核酸結合蛋白質 ( S S B ) の使用を示す。

#### 【 0 3 3 3 】

E . coli S S B および T 4 Gene 3 2 等の一本鎖結合蛋白質を、クレノウおよび K l e n t a q アレイ - ベースの A S P E 反応双方における異所性伸長を抑制するそれらの能力に関してテストした。使用した条件は以下の通りであった：アレイ - ベースのクレノウ A S P E 反応は 8 0 m M のトリス - 酢酸 ( p H 6 . 4 ) 、 0 . 4 m M の E D T A 、 1 . 4 m M の酢酸マグネシウム、 0 . 5 m M の D T T 、 1 0 0  $\mu$  g / m l の B S A 、 0 . 1 % T w e e n - 2 0 、 0 . 2 U /  $\mu$  l のクレノウエキソポリメラーゼ、および 0 . 5 u M の d N T P を含有し、d C T P 、 d G T P 、 および d U T P について「冷」ヌクレオチドに対するピオチン - 1 1 標識ヌクレオチドは 1 : 1 の比率であった。S S B での実験において、濃度は 0 . 2  $\mu$  g / 2 0  $\mu$  l r x n であった。アレイ - ベースの K l e n t a q 条件は実施例 I I I に記載する。

40

#### 【 0 3 3 4 】

図 1 4 A は、S S B の存在下における、および標的核酸試料 ( N T C = 標的対照無し ) の不存在下における、Bead Arrays <sup>T M</sup> に対するクレノウポリメラーゼでの A S P E 反応の実行についてのバラツキプロットを示す。図 1 4 C によって示されるように、異所性シグナルは、S S B の不存在下と比較して S S B の存在下で大いに低下した。同様の結果が、K l e n t a q ポリメラーゼでの A S P E 反応で得られた。図 1 4 C および D に示されたプロットは、増大する強度に従った  $X$  - 軸に沿ったバラツキプロットからのシ

50

グナルを分類することによって得られた。図 1 4 B に示すように、対立遺伝子特異的伸長は、ゲノム断片の増幅した集団を含有する標的試料の存在下で行った A S P E 反応についての検出可能なレベルで起こった。

#### 【0335】

これらの結果は、プライマー伸長アッセイに S S B を含めると、対立遺伝子特異的伸長を維持または改善しつつ異所性伸長を抑制することを示す。さらなる実験は、アレイ - ベースの A S P E 反応に S S B を含めると、対立遺伝子識別を改善することを示した。

#### 【0336】

(実施例 V I I )

(ランダムプライマー増幅によって生じたゲノム断片集団の評価)

10

本実施例は、ランダムプライマー増幅 ( R P A ) によって生じたヒトゲノム断片集団が、対立遺伝子偏りをほとんど有しないそれらのゲノムテンプレートの代表であり、再現性よく生じさせることができることを示す。

#### 【0337】

R P A 反応を用いて、実施例 V に記載された方法を用いてヒトゲノム D N A からゲノム集団の増幅された集団を生じさせた。増幅反応は、プローブアレイと共に反応混合物をインキュベートするに先立って、反応成分または生成物の単離の必要性無くして単一チューブフォーマットで行った。後に記載する修飾を例外として、反応混合物は実施例 V に記載したように B e a d A r r a y s <sup>T M</sup> と共にインキュベートし、検出は実施例 I I I に記載したように A S P E を用いて行った。

20

#### 【0338】

図 1 5 に示された結果は、増幅プロセスで達成された表示を示す。1 0 0 μ l 中の 1 0 0 n g のヒトゲノム D N A ( C o r i e l l C e l l R e p o s i t o r i e s , C a m d e n , N J ) で行った二連 R P A 反応は、1 ~ 2 μ g の D N A / μ l を有するゲノム断片の集団を生じた。二連未増幅ゲノム試料は、D N A s e I で約 2 0 0 ~ 3 0 0 塩基の平均サイズに断片化されたヒト胎盤 D N A ( S i g m a - A l d r i c h , P a r t N o . D 3 2 8 7 ) よりなるものであった。

#### 【0339】

増幅した、および未増幅試料を、ゲノムの非多型領域に対して設計されたプローブでアレイにハイブリダイズさせた。それ自体、全てのプローブはゲノムに対してパーフェクトマッチであり、遺伝子型分類アッセイにおいて伸長すべきである。2 つの異なる試料へのハイブリダイゼーションに続いて個々のプローブで得られた強度値を図 1 5 のバラツキプロットでプロットする。図 1 5 A に示したように、高度な相関が二連未増幅試料の間で起こった。同様に、かつ図 1 5 に示すように、強力な相関が二連増幅試料の間で観察され、これは、増幅方法が高度に再現性のある結果を与えることを示す。図 1 5 C の増幅された v s 未増幅バラツキプロットは、二連で観察されたものと比較したより散漫なクラスターを示し、これは、一部の遺伝子座が過剰表現され、他方、他のものは増幅された試料において過少表現された。

30

#### 【0340】

それにもかかわらず、結果は良好な表示を示した。増幅された D N A 入力に対する未増幅についてのシグナル強度の特定の比率 ( 増幅 : 未増幅の比率 ) を有するプローブの数 ( カウント ) を図 1 6 A にプロットする。データは、検出された遺伝子座の 9 0 . 1 % が、未増幅ゲノム D N A について測定された強度と比較して 0 . 5 - ~ 2 - 倍過剰ではなかった増幅集団における強度偏差を有することを示した。かくして、増幅された集団における検出された遺伝子座の 9 0 . 1 % が、未増幅ゲノムにおけるそれらの相対的量と比較して、0 . 5 倍以上の不足する、かつ 2 倍以下の過剰にて表された。さらに、増幅された集団における検出された遺伝子座の 9 7 . 4 % は、未増幅ゲノムにおけるそれらの相対的量と比較して、0 . 3 倍以上不足、かつ 3 倍以下の過剰にて表された。

40

#### 【0341】

ゲノム断片の表示的に増幅された集団を、G o l d e n G a t e <sup>T M</sup> アッセイ ( I l l

50

umina, Inc. San Diego, CA) においてみ増幅対照 DNA 試料と比較した。4つの遺伝子座 (1824、2706、3633 および 6126) についての例示的データは、図17の (GenTrainプロットとも呼ばれる) ゲノプロット (Genoplot) に示す。上記ゲノプロットは標準遺伝子型分類バラツキプロットの極座標再プロットである。標準遺伝子型分類バラツキプロットは、(第一の対立遺伝子と相関する) 第一のチャンネルで検出された強度  $v_s$  (第二の対立遺伝子と相関する) 第二の色チャンネルで検出された強度の軸を有し、および各チャンネルにおけるその強度に従った各遺伝子座についてのバラツキ点をプロットする。ゲノプロットは原点からバラツキ点 (R) まで描いた線の距離、および上記線および x 軸の間の角度 (シータ) に従った各バラツキ点の再プロットである。図17に示すように、10 ng、100 ng または 1  $\mu$  g ゲノム入力から生じた RPA 混合物から生じたデータについてのバラツキ点の結果、未増幅ゲノム DNA からの対照クラスター (丸印) と比較して良好なクラスターをもたらし、これは、非常に少ない対立遺伝子偏りを示す。

10

#### 【0342】

遺伝子型分類アッセイにおける検出の限界 (LOD) は、ゲノム DNA の増大する量が RPA 反応に輸入されるにつれ増加することを示した。別の RPA 反応は種々の量の入力ゲノム DNA で行った (二連)。上記入力量は 1 フェムトグラム ~ 100 ナノグラムの範囲であり、これは、図18Aの x - 軸上にプロットされた量を示す。図18Aは、ハイブリダイゼーション後に各アレイ (LOD) 上の全てのプローブで検出された平均強度、および入力ゲノム DNA の異なる量 (入力) から生じた RPA 反応混合物の ASPE 検出を示す棒グラフである。図18Aに示すように、10 pg (ヒトゲノムのほぼ3コピー) 以上の入力ゲノム DNA の量の結果、入力ゲノム DNA を用いなかった (0 g) 対照 RPA 反応と比較して実質的に増大した LOD 値をもたらした。少なくとも 100 pg (30 ゲノムコピー)、1 ng (300 ゲノムコピー)、10 ng (3,000 ゲノムコピー) または 100 ng (30,000 ゲノムコピー) の入力ヒトゲノム DNA を図18Aに示すように RPA 反応で用いた場合、LOD はバックグラウンドを超えて実質的に増大した。

20

#### 【0343】

表示は、増大する量のゲノム DNA を RPA 反応に輸入するにつれて改善されることが示された。図18Bに示された棒グラフは、変化させる量の入力ゲノム DNA (入力) から生じた RPA 混合物をプローブするのに用いる場合のアレイの全てのプローブについての  $PM / (PM + MM)$  (比率) をプロットする。10 pg (ヒトゲノムのほぼ3コピー) 以上の入力ゲノム DNA の量の結果、入力ゲノム DNA (0 g) を用いない、または低レベルのゲノム DNA (フェムトグラム量) を用いる対照 RPA 反応と比較した場合に、表示の実質的改善をもたらした。表示は、少なくとも 100 pg (30 ゲノムコピー)、1 ng (300 ゲノムコピー)、10 ng (3,000 ゲノムコピー) または 100 ng (30,000 ゲノムコピー) の入力ヒトゲノム DNA を RPA 反応で用いた場合にさらに実質的に改善された。

30

#### 【0344】

これらの結果は、RPA を用いて、数ピコグラムと低いゲノム DNA テンプレートの量から数百マイクログラムのゲノム断片が上記増幅された集団を生じさせることができることを示す。RPA によって生じたゲノム断片が上記増幅された集団は良好な表示を有し、再現性よく作成でき、かつ対立遺伝子の大半が偏りを有しない。かくして、RPA によって生じた DNA は全ゲノム遺伝子型分類で十分な量および質のものである。

40

#### 【0345】

(実施例 VII I)

(全ゲノム遺伝子型分類アッセイの性能)

本実施例は、DNA アレイへの直接的ハイブリダイゼーションおよびアレイ - ベースのプライマー伸長によるゲノム断片が増幅された集団のゲノム遺伝子型分類が、ヒト対象に関して正確な高い質の SNP スコアリング結果を生じることを示す。

#### 【0346】

50

ゲノムDNA (100 ng) は、国際HapMapプロジェクト (試料の情報については、International HapMap Consortium, Nature 426: 789-796 (2003) 参照) の質の対照で用いた組でのCentre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) における95の試料から得られた。RPA反応は実施例Vに記載されたように行い、100 µl中に188 µgのDNAを含有する反応混合物がもたらされた。未希釈反応混合物を、実施例Vに記載された方法、続いて、実施例IIIに記載されたASPEを用い、遺伝子座の1500 HapMap QC組 (遺伝子座の情報については、International HapMap Consortium, Nature 426: 789-796 (2003)) に特異的な50-量体プローブを有するBead Arrays<sup>TM</sup>と共にインキュベートした。次いで、Gunderson et al., Genome Res. 14: 870-877 (2004) に記載されているように電荷結合デバイスリーダーでアレイをイメージした。SNP遺伝子型はGenCallソフトウェア (Illumina Inc., San Diego, CA) を用いて読んだ。

10

#### 【0347】

図19Aおよび19Bは、各々、860および954遺伝子座に関して (GenTrainプロットとも呼ばれる) 代表的ゲノプロットを示す。良好なクラスター分離が860および954遺伝子座で得られ、各々、7.5および4.4の遺伝子クラスタースコア (GCS) を生じた ( $GCS = \min [ (Abs (A_B - A_A) / (A_B + A_A)) , (Abs (A_B - B_B) / (A_B + B_B)) ]$ )、ここに、 $A_B$  はABクラスターについての平均であり (は図11に関連して上記した)、および $A_B$  は $A_B$  についての標準偏差である)。図19Cは、遺伝子型クラスター分離スコアに従う遺伝子座の分布を示す。75%を超える遺伝子座は3.0以上のGCSを有し (暗色の棒線)、従って、遺伝子型分類で許容できると考えた。

20

#### 【0348】

CEPH試料における遺伝子座のHapMap QC組の質問についての遺伝子型分類に関する統計のまとめを表1に示す。アッセイ変換率は、従たる対立遺伝子を首尾よく検出した遺伝子座の数をカウントすることによって評価した。非多型遺伝子座および高コピー数遺伝子座は、現実のSNPアッセイを開発するに関してアッセイの失敗としてカウントされた。技術的には、非多型遺伝子座の多くは成功したアッセイであったが、それらはカウントしなかった。何故ならば、それらは従たる対立遺伝子を呈しなかったからである。同一ゲノムDNA試料を用いてGolden Gate Assay (Illumina, Inc. San Diego, CA) からの結果と比較したアッセイ変換率は95%であった。要求率は99.5%において極めて高く、再現性は99.99%よりも大であった。

30

#### 【0349】

一致は、上記したようにして得られた遺伝子型分類結果およびGolden Gate Assay (Illumina, Inc. San Diego, CA) を用いて同一の試料および遺伝子座に関して得られた遺伝子型分類結果の間で決定した。一致は99.9%よりも大きかった。

40

#### 【0350】

【表 1】

表 1

パラメーター	値	パーセント
アッセイ変換	819/864	95%
要求率	68807/68970	99.5%
再現性	8189/8190	99.99%
一致	137,456/137,614	99.9%

10

これらの結果は、全ゲノム遺伝子型分類アッセイが、国際 H a p M a p プロジェクトにおいてゲノムの大きな部分を遺伝子型分類するのに現在用いられている G o l d e n G a t e アッセイと同様に、高い質の遺伝子型分類データを提供することを示す。

## 【0351】

(実施例 I X)

(検出に先立ってハイブリダイズした標的を除去するためのストリッピングアレイ)

本実施例は、標的 - 依存性ポリメラーゼ伸長によるプローブの修飾後に 0 . 1 N N a O H でのストリッピングによるアレイからのハイブリダイズした標的の除去を示す。

## 【0352】

ゲノム DNA は、C o r i e l l C e l l R e p o s i t o r i e s ( C a m d e n , N J ) から入手した。R P A 反応は実施例 V I I に記載したように行った。得られた反応混合物を B e a d A r r a y s <sup>T M</sup> にハイブリダイズさせ、実施例 I I I に記載したように A S P E 反応を行った。A S P E 反応の後であって、蛍光シグナルの検出に先立って、アレイを水 (+ N a O H ) 中の 0 . 1 N N a O H またはホルムアミド (- N a O H ) を欠く 1 × ハイブリダイゼーション緩衝液で処理した。アレイを実施例 V I I I に記載したように検出した。

20

## 【0353】

図 20 に示すように、N a O H でのアレイの伸長後ストリッピングはミスマッチプローブからバックグラウンドシグナルを低下させ、ミスマッチおよびパーフェクトマッチプローブからのシグナルの間のより大きな比率の差をもたらした。

30

## 【0354】

これらの結果は、プローブ修飾後のアレイをストリッピングすることは、必要ではないが、アッセイ特異性を大いに改善するのに用いることができることを示す。

## 【0355】

(実施例 X)

(亜硫酸水素塩処理 DNA の全ゲノム増幅)

本実施例は、亜硫酸水素塩処理 DNA を全ゲノム増幅する方法を記載する。典型的には、DNA の亜硫酸水素塩処理は実質的な脱プリン化および DNA の同時断片化を生じる。この断片化された生成物は、ランダムプライマー全ゲノム増幅アプローチにおいて、ストランド - 置き換えポリメラーゼを用いて低い収率にて典型的には増幅される。増幅収率を改善するための 2 つのアプローチは本明細書中に記載する。最初のアプローチは、断片化された試料の連結、およびストランド - 置き換えランダムプライマー増幅のためのテンプレートとしてのより長い連結された生成物の使用である。第二のアプローチは、ユニバーサルプライミング部位の断片の末端への結合による断片化標的からの表示を作り出す。

40

## 【0356】

ゲノム DNA の亜硫酸水素塩処理は、典型的には、シトシンがウラシルに変換されるが、5 - メチルシトシンは非反応性のままでの反応に基づいてメチル化を検出するのに用いられる (例えば、F e i l e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s , 2 2 ; 6 9 5 - 6 9 6 ( 1 9 9 4 ) ; F r o m m e r e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 8 9 ; 1 8 2 7 - 1 8 3 1 ( 1 9 9 2 ) 参照)。DNA と亜

50

硫酸水素塩とのさらに別の反応は脱プリン化および同時断片化である。亜硫酸水素塩処理によって生じたDNA断片は、3'末端にリン酸基を含む。このリン酸基は、一部の生物学的酵素を用いる単一ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドと3'末端との反応を効果的にブロックする。

#### 【0357】

(亜硫酸水素塩処理ゲノムDNAの連結)

亜硫酸水素塩処理ゲノムDNAの3'リン酸基は、供給業者によって推奨される標準的条件を用いる、アルカリ性ホスファターゼでの処理、またはT4 DNAキナーゼの3'ホスファターゼ活性によって除去される。T4 DNAキナーゼは(ATPの存在下で)3'リン酸を除去しつつ5'リン酸を無傷に維持し、その結果、5'リン酸および3'ヒドロキシルを有する生成物が得られる(図21A参照)。対照的に、アルカリ性ホスファターゼは5'および3'の双方のリン酸を除去し、その結果、3'および5'の両ヒドロキシルを有する生成物が得られる(図21A参照)。

10

#### 【0358】

T4 DNAキナーゼによる3'リン酸の除去の後、次いで、上記生成物をT4 RNAリガーゼと共にインキュベートして、McCoy et al., 前掲(1980)に記載された条件を用いてコンカテマーを作る。種々のサイズを有する得られた線状および環状コンカテマーは、例えば、実施例Vにてここに記載したようにランダムプライマー増幅によって増幅される。次いで、この増幅された生成物を、例えば、実施例VIIにてここに記載したように遺伝子型分類で用い、これは、ゲノムの広いメチル化プロファイリングを行うための手段を提供する。

20

#### 【0359】

(亜硫酸水素塩処理ゲノムDNAのテイリング)

亜硫酸水素塩処理断片の3'リン酸は上記したようにして3'ヒドロキシルに変換される。3つの異なる方法の1つを用い、ユニバーサルテイルを生成物に加える。

#### 【0360】

第一の方法は、ポリグアニレートテイルを3'末端に加えるためのターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ(TdT)およびdGTPでのDNA断片の処理である(図21C参照)。供給業者によって推奨される標準条件を用いて、DNAリガーゼ、および3'ランダム4-量体二重鎖アダプターおよび5'ユニバーサルプライミング部位配列を有するオリゴヌクレオチドとの断片インキュベーションの5'末端にユニバーサルテイルを加える(図21C)。得られた断片を、上記断片の5'ユニバーサルプライミング部位テイルに相補するユニバーサルプライマー(図21CにおけるプライマーA)および断片の3'ポリグアニレートテイルに相補するポリシチジレートプライマー(図21CにおけるプライマーB)を用いるポリメラーゼ鎖反応によって増幅させる。

30

#### 【0361】

第二の方法において、供給業者によって推奨される標準条件を用い、ユニバーサルプライミング部位を有するオリゴヌクレオチドのT4 RNAリガーゼ-介在連結によって5'テイルを加える。図21Dに示すように、反応は2工程で行う。第一の工程において、5'リン酸を有するが、3'ヒドロキシルを欠くユニバーサルプライミング部位オリゴヌクレオチドを、3'テイルが断片に加わるように上記断片と反応させる。第二の工程において、3'ヒドロキシルを有するが5'リン酸を欠くユニバーサルプライミング部位オリゴヌクレオチドを、5'テイルが断片に加わるように上記断片と反応させる。2工程でのブロックされたオリゴヌクレオチドの使用は、ユニバーサルプライミング部位オリゴヌクレオチドの自己-連結により望ましくない副反応を低下させる。断片の5'ユニバーサルプライミング部位テイルに相補するユニバーサルプライマー(図21DにおけるプライマーA)および断片の3'ユニバーサルプライミング部位を相補するユニバーサルプライマー(図21DにおけるプライマーB)を用い、得られた断片をポリメラーゼ鎖反応によって増幅する。次いで、この増幅された生成物を、例えば、実施例VIIにてここに記載した遺伝子型分類で用い、これは、ゲノムの広いメチル化プロファイリングを行うための手

40

50

段を提供する。

### 【0362】

第三の方法は、供給業者によって推奨される標準条件を用い、T4 RNAポリメラーゼを用いて、3'および5'両末端へのユニバーサルプライミング部位を有するオリゴヌクレオチドの直接的連結を使用する。次いで、相補的ユニバーサルプライマーを用いて、ポリメラーゼ鎖反応による断片を増幅する。次いで、増幅された生成物を、例えば、実施例VIIにてここに記載したように遺伝子型分類で用い、これは、ゲノムの広いメチル化プロファイリングを行うための手段を提供する。

### 【0363】

本出願を通じて、種々の刊行物、特許および特許出願に言及した。これらの刊行物の特許および特許出願の開示を、本出願においてここに引用してその全体を一体化させて、本発明が属する技術分野をより十分に記載する。

### 【0364】

用語「含む」とは、ここでは、引用されたエレメントのみならず、いずれかのさらに別のエレメントをさらに含むオープン・エンデッドであることをここでは意図する。

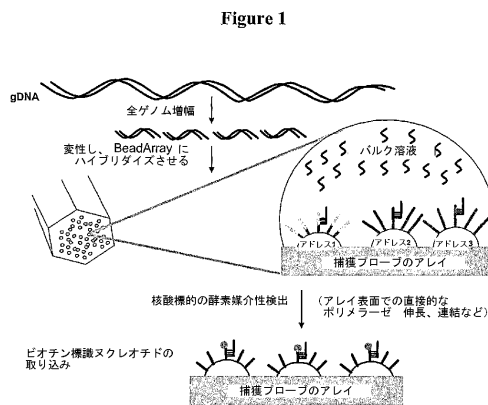
### 【0365】

本発明の種々の実施形態をここに広くかつ上位概念的に記載してきた。上位概念開示に入るより狭いスピーシズおよびサブ上位概念的グループ分けの各々はこれらの発明の一部を形成する。これは本発明の各々の上位概念的記載内に、除去すべき物質が実施形態に引用されることにかかわらず、またはそうか否かにかかわらず、上位概念からいずれかの主題を取り出すことを可能とする但書または否定的限定を含む。

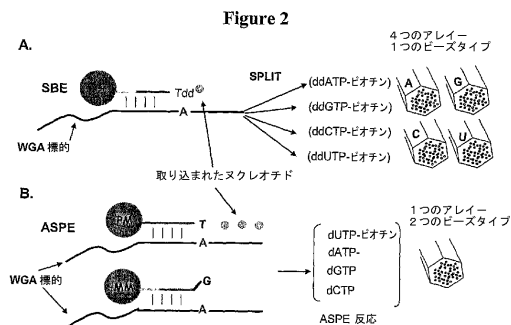
### 【0366】

本発明を上記に掲げた実施例を参照して記載してきたが、本発明を逸脱することなく種々の修飾を行うことができることは理解されるべきである。従って、本発明は特許請求の範囲によってのみ制限される。

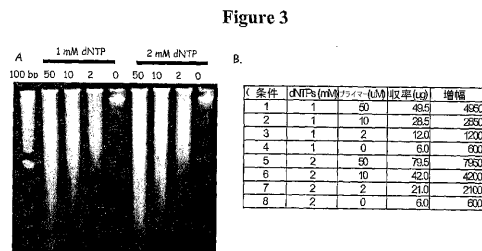
### 【図1】



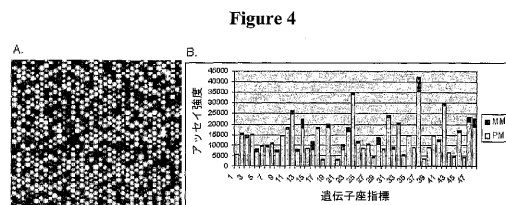
### 【図2】



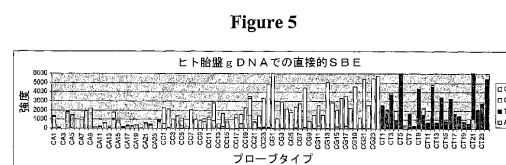
### 【図3】



### 【図4】

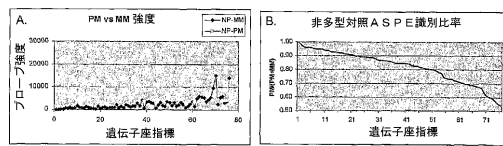


### 【図5】



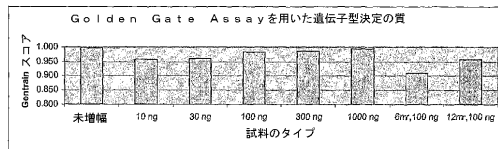
【図 6】

Figure 6



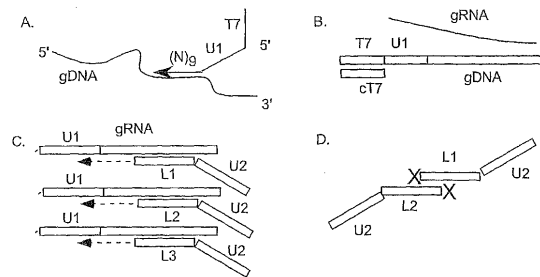
【図 7】

Figure 7



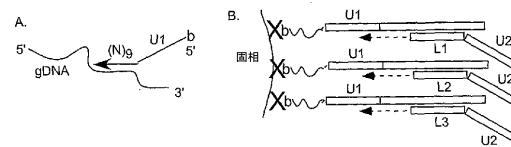
【図 8】

Figure 8



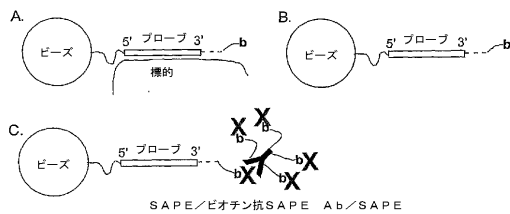
【図 9】

Figure 9



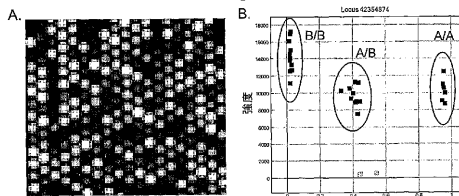
【図 10】

Figure 10



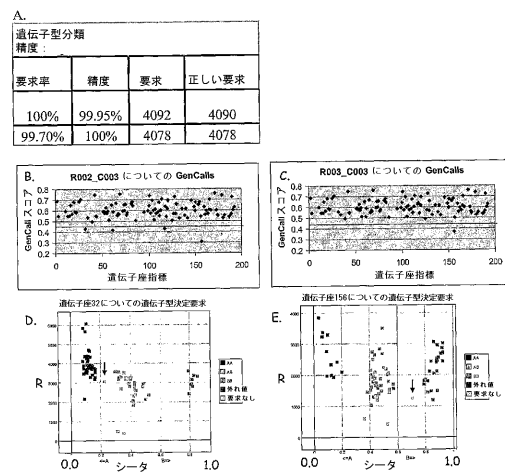
【図 11】

Figure 11



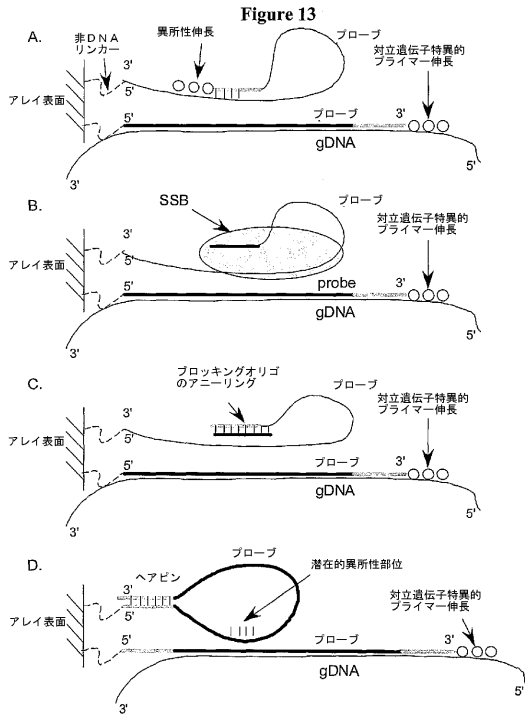
【図 12】

Figure 12

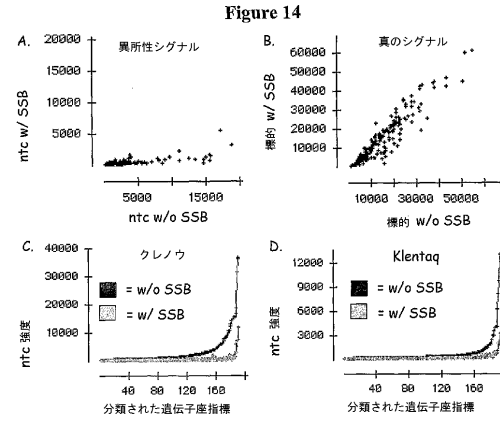




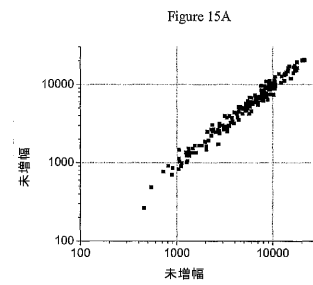
【図 13】



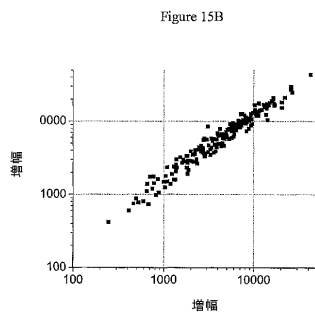
【図 14】



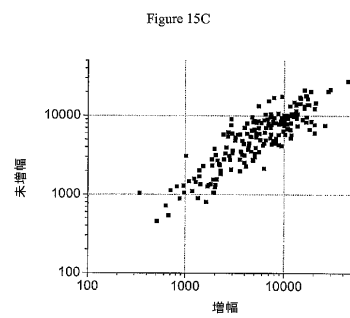
【図 15 A】



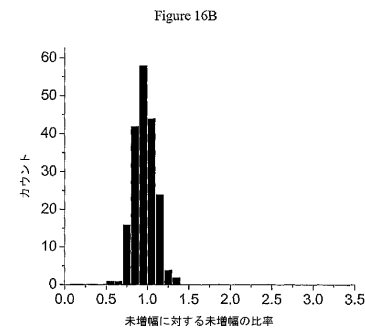
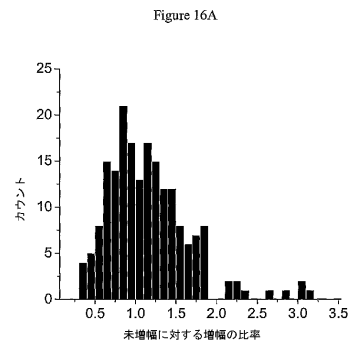
【図 15 B】



【図 15 C】

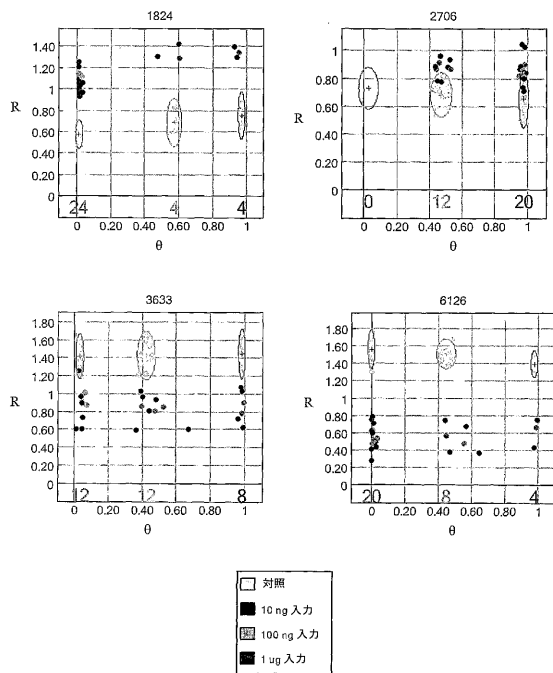


【図 16】



【 図 1 7 】

Figure 17



【 図 1 8 】

Figure 18A

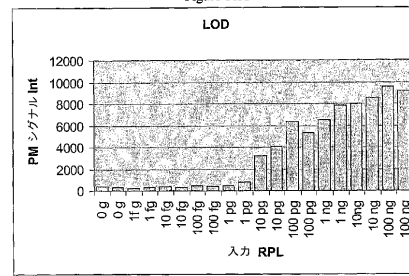
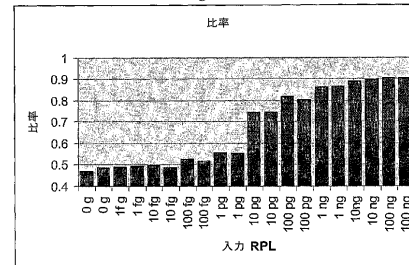
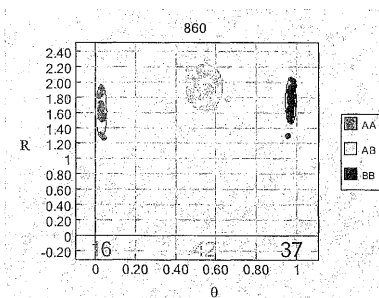


Figure 18B



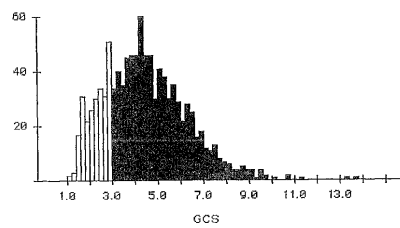
【 図 1 9 - 1 】

Figure 19A



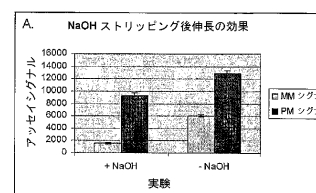
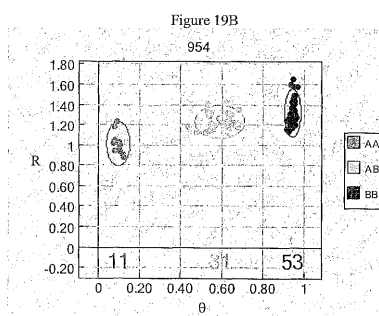
【 図 1 9 - 2 】

Figure 19C



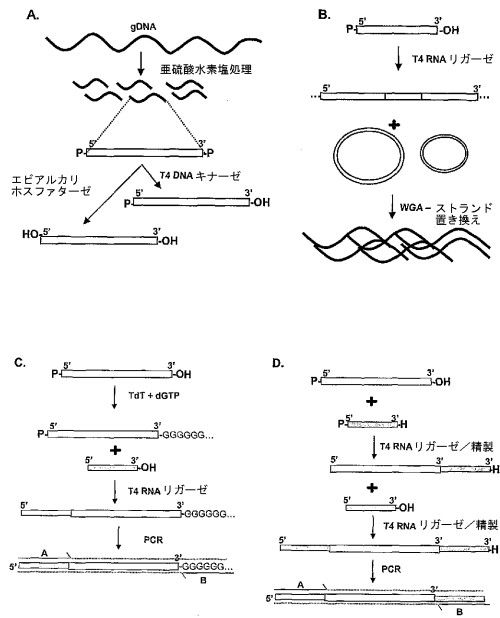
【 図 2 0 】

Figure 20



## 【図 21】

Figure 21



---

フロントページの続き

(72)発明者 フランク スティーマーズ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 2 , サン ディエゴ, ノーベル ドライブ 3 8  
3 3 , アpartment ナンバー 3 1 1 6

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 CA11 HA14

4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR32 QR56 QS25 QS34 QX02

【外国語明細書】  
20112397900000001.pdf