

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6054357号

(P6054357)

(45) 発行日 平成28年12月27日(2016.12.27)

(24) 登録日 平成28年12月9日(2016.12.9)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 22 (全 70 頁)

(21) 出願番号	特願2014-240265 (P2014-240265)	(73) 特許権者	507292955
(22) 出願日	平成26年11月27日(2014.11.27)		シージーン アイエヌシー
(62) 分割の表示	特願2013-515282 (P2013-515282) の分割		大韓民国 138-828 ソウル ソン パグ オグムーロ 91 タエウォン ビルディング 8階・9階
原出願日	平成24年1月11日(2012.1.11)	(74) 代理人	100107515
(65) 公開番号	特開2015-70848 (P2015-70848A)		弁理士 廣田 浩一
(43) 公開日	平成27年4月16日(2015.4.16)	(74) 代理人	100107733
審査請求日	平成26年12月10日(2014.12.10)		弁理士 流 良広
(31) 優先権主張番号	10-2011-0002840	(74) 代理人	100115347
(32) 優先日	平成23年1月11日(2011.1.11)		弁理士 松田 奈緒子
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		
(31) 優先権主張番号	10-2011-0023465		
(32) 優先日	平成23年3月16日(2011.3.16)		
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PTO切断及び伸長アッセイによるターゲット核酸配列の検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) ターゲット核酸配列を上流オリゴヌクレオチド及びPTO（プロービング及びタギングオリゴヌクレオチド、Probing and Tagging Oligonucleotide）とハイブリッド形成させる工程であって、前記上流オリゴヌクレオチドは、前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を含み、前記PTOは、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を含む3'-ターゲッティング部位及び(ii) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む5'-タギング部位を含み、前記3'-ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリッド形成され、前記5'-タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されず、前記上流オリゴヌクレオチドは、前記PTOの上流に位置する工程と、

(b) 前記PTOの切断のための条件下で、5'-ヌクレアーゼ活性を有する酵素に前記工程(a)の結果物を接触させる工程であって、前記上流オリゴヌクレオチド又はその伸長鎖は、前記5'-ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記PTOの切断を誘導して、このような前記切断は、前記PTOの5'-タギング部位又は5'-タギング部位の一部を含む断片を放出する工程と、

(c) 前記PTOから放出された前記断片とCTO（キャプチャリング及びテンプレートイングオリゴヌクレオチド、Capturing and Templating Oligonucleotide）をハイブリッド形成させる工程であって、前記CTOは、

10

20

3'→5'方向に(i)前記PTOの前記5'-ターギング部位又は前記5'-ターギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位及び(ii)前記PTOの前記5'-ターギング部位及び前記3'-ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレティング部位を含み、前記PTOから放出された前記断片は、前記CTOのキャプチャリング部位にハイブリッド形成される工程と、

(d)工程(c)の結果物及び鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用して伸長反応を行う工程であって、前記CTOの前記キャプチャリング部位にハイブリッド形成された前記断片は、伸長されて伸長二本鎖を形成し、前記伸長二本鎖のT_m値は、(i)前記断片の配列及び／又は長さ、(ii)前記CTOの配列及び／又は長さ、又は(iii)前記断片の前記配列及び／又は長さと前記CTOの前記配列及び／又は長さにより調節することができ、前記伸長二本鎖は、(i)前記断片及び／又はCTOに連結された少なくとも一つの標識、(ii)前記伸長反応の間に前記伸長二本鎖内に挿入された標識、(iii)前記断片及び／又は前記CTOに連結された少なくとも一つの標識と前記伸長反応の間に前記伸長二本鎖内に挿入された標識、又は(iv)インターカレーティング標識(Intercalating Label)によりターゲットシグナルを提供する工程と、

(e)前記伸長二本鎖がその二本鎖形態を維持する指定の温度で前記ターゲットシグナルを測定することにより、前記伸長二本鎖を検出する工程であって、これにより、前記伸長二本鎖の存在は、前記ターゲット核酸配列の存在を示し、前記伸長二本鎖は固相基質上に固定化されない工程と、

を含むことを特徴とする、液相におけるPTOCE(PTO切断及び伸長)アッセイによりDNA又は核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法。

【請求項2】

前記伸長二本鎖により提供される前記ターゲットシグナルは、工程(d)の伸長の間に提供され、非切断PTO及び前記CTO間のハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供しない請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記伸長二本鎖により提供される前記ターゲットシグナルは、工程(c)における前記断片及び前記CTOの前記ハイブリッド形成により提供され、工程(d)における前記伸長二本鎖の前記形成は、前記ターゲットシグナルを維持し、非切断PTO及び前記CTO間の前記ハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供し、前記指定温度は、前記ハイブリッド形成物を解離させて前記非ターゲットシグナルが除去される温度である請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記ターゲットシグナルは、前記断片及び／又は前記CTOに連結された少なくとも一つの標識により提供される請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記断片は、レポーター分子及びクエンチャー分子を含む相互作用的二重標識を有し、工程(c)における前記断片及び前記CTOのハイブリッド形成は、前記相互作用的二重標識からのシグナルの変化を誘導してターゲットシグナルを提供し、前記伸長二本鎖は、前記ターゲットシグナルを維持する請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記CTOは、レポーター分子及びクエンチャー分子を含む相互作用的二重標識を有し、工程(c)における前記断片及び前記CTOの前記ハイブリッド形成は、前記相互作用的二重標識からのシグナルの変化を誘導して前記ターゲットシグナルを提供し、前記伸長二本鎖は、前記ターゲットシグナルを維持する請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記CTOは、レポーター分子及びクエンチャー分子を含む相互作用的二重標識を有し、工程(d)における前記断片の前記伸長は、前記相互作用的二重標識からのシグナルの変化を誘導して前記ターゲットシグナルを提供する請求項4に記載の方法。

【請求項8】

前記断片は、レポーター分子及びクエンチャー分子を含む相互作用的二重標識の一つを有し、前記C T Oは、前記相互作用的二重標識の他の一つを有し、前記工程（c）における前記断片及び前記C T Oの前記ハイブリッド形成は、前記相互作用的二重標識からのシグナルの変化を誘導して前記ターゲットシグナルを提供し、前記伸長二本鎖は、前記ターゲットシグナルを維持する請求項4に記載の方法。

【請求項9】

前記断片又は前記C T Oは、単一標識を有し、工程（c）における前記断片及び前記C T Oの前記ハイブリッド形成は、前記単一標識からのシグナルの変化を誘導して前記ターゲットシグナルを提供し、前記伸長二本鎖は、前記ターゲットシグナルを維持する請求項4に記載の方法。

10

【請求項10】

前記C T Oは、単一標識を有し、工程（d）における前記断片の前記伸長は、前記単一標識からのシグナルの変化を誘導し、前記ターゲットシグナルを提供する請求項4に記載の方法。

【請求項11】

前記標識は、非切断P T O及び前記C T O間のハイブリッド形成物が形成される場合、前記ハイブリッド形成物が工程（d）において非ターゲットシグナルを提供しない範囲内に位置する請求項4に記載の方法。

【請求項12】

前記標識は、非切断P T O及び前記C T O間のハイブリッド形成物が形成される場合、前記ハイブリッド形成物が工程（d）において非ターゲットシグナルを提供する範囲内に位置し、前記伸長二本鎖のT_m値は、前記非切断P T O及び前記C T O間の前記ハイブリッド形成物のT_m値より高い請求項4に記載の方法。

20

【請求項13】

前記ターゲットシグナルは、前記伸長反応の間に前記伸長二本鎖内に挿入された単一標識により提供され、前記挿入された単一標識は、前記伸長反応の間に挿入されたヌクレオチドに連結されており、工程（d）における前記断片の前記伸長は、前記単一標識からのシグナルの変化を誘導し、前記工程（d）における前記ターゲットシグナルを提供する請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記伸長反応の間に挿入された前記ヌクレオチドは、第1非天然塩基（non-natural base）を有し、前記C T Oは、前記第1非天然塩基に対して特異的結合親和性のある第2非天然塩基を有するヌクレオチドを有する請求項13に記載の方法。

30

【請求項15】

前記ターゲットシグナルは、前記伸長反応の間に前記伸長二本鎖内に挿入された標識と前記断片及び／又は前記C T Oに連結された標識により提供され、前記挿入された標識は、前記伸長反応の間に挿入されたヌクレオチドに連結されており、前記二つの標識は、レポーター分子及びクエンチャー分子の相互作用的二重標識であり、工程（d）における前記断片の前記伸長は、前記相互作用的二重標識からのシグナルの変化を誘導し、前記ターゲットシグナルを提供する請求項1に記載の方法。

40

【請求項16】

前記伸長反応の間に挿入された前記ヌクレオチドは、第1非天然塩基（non-natural base）を有し、前記C T Oは、前記第1非天然塩基に対して特異的結合親和性のある第2非天然塩基を有するヌクレオチドを有する請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記上流オリゴヌクレオチドは、上流プライマー又は上流プローブである請求項1に記載の方法。

【請求項18】

前記方法は、工程（a）－（b）、（a）－（d）又は（a）－（e）を反復する工程と、その反復サイクルの間に変性過程とをさらに含む請求項1に記載の方法。

50

【請求項 19】

工程 (a) - (e) は、一つの反応容器又は個別反応容器で実施される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記方法は、少なくとも 2 種のターゲット核酸配列を検出するために行われ、前記上流オリゴヌクレオチドは、少なくとも 2 種のオリゴヌクレオチドを含み、前記 PTO は、少なくとも 2 種の PTO を含み、前記 CTO は、少なくとも 1 種の CTO を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

前記方法は、下流プライマーの存在下で行われる請求項 1 から 20 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

(a) ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を含む上流オリゴヌクレオチドと、

(b) PTO (プロービング及びタギングオリゴヌクレオチド、Probing and Tagging Oligonucleotide) であって、前記 PTO は、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を含む 3' - ターゲッティング部位及び (ii) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む 5' - タギング部位を含み、前記 3' - ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリッド形成され、前記 5' - タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されず、前記上流オリゴヌクレオチドは、前記 PTO の上流に位置し、前記上流オリゴヌクレオチド又はその伸長鎖は、5' ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記 PTO の切断を誘導し、このような前記切断は、前記 PTO の前記 5' - タギング部位又は前記 5' - タギング部位の一部を含む断片を放出する前記 PTO と、

(c) CTO (キャプチャリング及びテンプレートイングオリゴヌクレオチド、Capturing and Templating Oligonucleotide) であって、前記 CTO は、3' → 5' 方向に (i) 前記 PTO の 5' - タギング部位又は前記 5' - タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位及び (ii) 前記 PTO の 5' - タギング部位及び前記 3' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレートイング部位を含み、前記 PTO から放出された前記断片は、前記 CTO の前記キャプチャリング部位にハイブリッド形成され、そして、前記 CTO の前記キャプチャリング部位にハイブリッド形成された前記断片は、鋳型依存的核酸ポリメラーゼにより伸長されて伸長二本鎖を形成する前記 CTO と、
を含み、請求項 1 から 21 のいずれかに記載の方法に用いられることを特徴とする、PTOCE (PTO 切断及び伸長) アッセイにより DNA 又は核酸混合物からターゲット核酸配列を検出するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、PTOCE (PTO 切断及び伸長、PTO Cleavage and Extension) アッセイによるターゲット核酸配列の検出に関する。

【背景技術】

【0002】

DNA ハイブリッド形成 (hybridization) は、分子生物学の基本的な過程であり、イオン強度、塩基構成、核酸断片の長さ、ミスマッチング程度及び変性剤の存在により影響を受ける。DNA ハイブリッド形成ベースの技術は、特定核酸配列の決定に非常に有用な道具となり、臨床診断、遺伝子研究及び法医学的実験分析に明確に役に立つだろう。

【0003】

しかし、ハイブリッド形成にのみ依存する従来方法及び過程では、プローブと非ターゲ

10

20

30

40

50

ット配列間の非特異的なハイブリッド形成による擬陽性結果が発生する可能性が高い。したがって、従来の方法及び過程は、信頼度を改善しなければならない問題点が残っている。

【0004】

プローブハイブリッド形成過程の他にも、追加的に酵素的反応を利用した幾つかの接近法、例えば、TaqManTMプローブ方法が提示された。

【0005】

TaqManTMプローブ方法において、ターゲット核酸配列にハイブリッド形成された標識プローブは、上流プライマー依存のDNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性により切断され、ターゲット配列の存在を示すシグナルを発生させる（特許文献1〜3）。TaqManTMプローブ方法は、シグナル発生のための二つのアプローチを提示する：重合依存的切断（polymerization-dependent cleavage）及び重合非依存的切断（polymerization-independent cleavage）。重合依存的切断において、上流プライマーの伸長は、必ず核酸ポリメラーゼが標識プローブの5'-末端に接触する前に起こらなければならない。伸長反応が進行されつつ、ポリメラーゼは、標識プローブの5'-末端を徐々に切断する。重合非依存的切断において、上流プライマー及び標識プローブは、非常に近接してターゲット核酸にハイブリッド形成され、上流プライマーの3'-末端と核酸ポリメラーゼの結合は、前記核酸ポリメラーゼが標識プローブの5'-末端に接触するようにして、標識が放出される。また、TaqManTMプローブ方法は、その5'-末端部位にターゲット配列とハイブリッド形成されない5'-テイル領域を有する標識プローブが切断され、5'-テイル領域を含む断片が形成されることを開示している。

【0006】

ターゲット配列に非相補的な5'-テイル領域を有するプローブが5'ヌクレアーゼにより切断され、5'-テイル領域を含む断片が放出される幾つかの方法が報告された。

【0007】

例えば、特許文献4は、DNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性により切断される切断構造を開示している。鋳型に対して非相補的な5'部位及び鋳型に対して相補的な3'部位を含むオリゴヌクレオチドが鋳型にハイブリッド形成され、上流オリゴヌクレオチドは、非常に近接して鋳型にハイブリッド形成される切断構造が例示されている。切断構造は、5'ヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼ又は減少された合成活性を有する修飾DNAポリメラーゼにより切断され、鋳型に非相補的な5'部位が放出される。その後、放出された5'部位は、ヘアピン構造を有するオリゴヌクレオチドにハイブリッド形成されて切断構造を形成し、これにより漸進的な切断反応が誘導されてターゲット配列が検出される。

【0008】

特許文献5は、3'-末端がブロッキングされた上流オリゴヌクレオチドを有する切断構造が、5'ヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼ又はFENヌクレアーゼにより切断され、非相補的な5'フラップ（flap）部位が放出され、放出された5'フラップ部位は、サイズ分析又は相互作用的二重標識により検出される過程を開示している。米国特許第6,893,819号は、検出可能な放出されたフラップが核酸合成依存的な、フラップ媒介連続的増幅方法により生成されることを開示している。この方法において、一番目の切断構造から放出されたフラップは、核酸合成依存的な方式で二番目の切断構造を切断してフラップを放出させ、放出されたフラップを検出する。

【0009】

液相における蛍光標識プローブのハイブリッド形成により、一種類の蛍光標識を利用するとしても、メルティングカーブ分析により多数のターゲット核酸配列を同時的に検出することができる。しかし、相互作用的二重標識プローブの5'ヌクレアーゼ媒介切断によりターゲット配列を検出する従来の技術は、マルチプレックスターゲット検出において、互いに異なるターゲット配列に対して互いに異なる種類の蛍光標識を必要とし、このよ

うな蛍光標識の種類数の限界のため、検出されるターゲット配列の数は制限される。

【0010】

特許文献6は、ターゲット核酸配列に非相補的な5'部位を有するプローブの切断及びキャプチャープローブのハイブリッド形成を利用したターゲット検出方法を開示している。標識は、非相補的な5'部位に位置する。ターゲット配列にハイブリッド形成された標識プローブは、切断されて断片を放出して、以後断片は、キャプチャープローブとハイブリッド形成され、ターゲット配列の存在が検出される。この方法において、非切断された／完全な(uncleaved/intact)プローブは、キャプチャープローブとハイブリッド形成されないことが必須的である。このためには、短い長さを有するキャプチャープローブが固相基質上に固定化されなければならない。しかし、このような制限は、固相基質におけるハイブリッド形成の効率性を低めて、また反応条件の最適化も難しくする。

10

【0011】

したがって、より便利で、且つ信頼性及び再現性のある方式で、ハイブリッド形成だけでなく5'核酸分解反応(5'nucleolytic reaction)のような酵素的反応により、液相及び固相でターゲット配列、より好ましくは、複数のターゲット配列を検出するための新規な接近法に対する開発要求が高まっている。また、当業界で標識(特に、蛍光標識)種類の数に制限されない新規なターゲット検出方法が要求されている。

【0012】

20

本明細書全体にかけて多数の特許及び文献が参照され、その引用が表示されている。引用された特許及び文献の開示内容は、その全体が本明細書に参照として取り込まれ、本発明の属する技術分野の水準及び本発明の内容がより明確に説明される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】米国特許第5,210,015号明細書

【特許文献2】米国特許第5,538,848号明細書

【特許文献3】米国特許第6,326,145号明細書

【特許文献4】米国特許第5,691,142号明細書

30

【特許文献5】米国特許第7,381,532号明細書

【特許文献6】米国出願公開番号第2008-0241838号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明者らは、より改善された正確性及び便宜性を有し、特に、マルチプレックス方式においてターゲット配列を検出する新規なアプローチを開発するために鋭意研究した。その結果、本発明者らは、ターゲット配列を検出するための新規なプロトコルを立案して、このようなターゲット検出は、プローブハイブリッド形成、酵素的プローブ切断、伸長及び伸長二本鎖(Extended duplex)の検出により達成される。本発明のプロトコルは、固相反応だけではなく、液相反応にも好適に適用され、より改善された正確性及び便宜性を有して複数のターゲット配列が検出されるようにする。

40

【0015】

したがって、本発明の目的は、PTOC E (PTO切断及び伸長)アッセイを利用し、DNA又は核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法を提供することにある。

【0016】

本発明の他の目的は、PTOC E (PTO切断及び伸長)アッセイを利用し、DNA又は核酸混合物からターゲット核酸配列を検出するためのキットを提供することにある。

【0017】

本発明の他の目的及び利点は、発明の詳細な説明、請求の範囲及び図面により、さらに

50

明確にされる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】PTO切断及び伸長アッセイ (PTOCE assay) に利用されるPTO (Probing and Tagging Oligonucleotide) 及びCTO (Capturing and Templating Oligonucleotide) の図式的な構造を示す。好ましくは、PTO及びCTOの3'-末端は、ブロッキングされて伸長が防止される。

【図2】メルティング分析を含むPTOCEアッセイを図式的に示す。CTOは、そのテンプレティング部位にレポーター分子及びクエンチャー分子を有する。

10

【図3】メルティング分析を含むPTOCEアッセイを図式的に示す。CTOは、そのテンプレティング部位にレポーター分子を有する。前記レポーター分子は、一本鎖形態上に存在するかあるいは二本鎖形態上に存在するかによって異なるシグナル強度を示すことが要求される。

【図4】メルティング分析を含むPTOCEアッセイを図式的に示す。CTOは、そのテンプレティング部位にiso-dC残基及びレポーター分子を有する。クエンチャー-iso-dGTPは、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入 (incorporated) される。

【図5】メルティング分析を含むPTOCEアッセイを図式的に示す。PTOは、その5'-ターギング部位にレポーター分子を有し、CTOは、そのテンプレティング部位にiso-dC残基を有する。クエンチャー-iso-dGTPは、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入される。

20

【図6】メルティング分析を含むPTOCEアッセイを図式的に示す。PTOは、その5'-ターギング部位にレポーター分子及びクエンチャー分子を有する。

【図7】メルティング分析を含むPTOCEアッセイを図式的に示す。PTOは、その5'-ターギング部位にレポーター分子を有する。前記レポーター分子は、一本鎖形態上に存在するかあるいは二本鎖形態上に存在するかによって異なるシグナル強度を示すことが要求される。

【図8】メルティング分析を含むPTOCEアッセイを図式的に示す。PTOは、その5'-ターギング部位にクエンチャー分子を有して、CTOは、そのキャプチャリング部位にレポーター分子を有する。

30

【図9】指定温度における検出を含むPTOCEアッセイを図式的に示す。CTOは、そのテンプレティング部位にレポーター分子及びクエンチャー分子を有する。CTOは、その3'-末端を介して固相基質上に固定化される。

【図10】指定温度における検出を含むPTOCEアッセイを図式的に示す。レポーター標識dATPは、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入される。CTOは、その3'-末端を介して固相基質上に固定化される。

【図11】指定温度における検出を含むPTOCEアッセイを図式的に示す。CTOは、そのテンプレティング部位にiso-dC残基を有し、レポーター-iso-dGTPは、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入される。CTOは、その3'-末端を介して固相基質上に固定化される。

40

【図12】指定温度における検出を含むPTOCEアッセイを図式的に示す。PTOは、その5'-ターギング部位にレポーター分子を有する。CTOは、その5'-末端を介して固相基質上に固定化される。

【図13】インターカレーティング標識を利用する指定温度における検出を含むPTOCEアッセイを図式的に示す。CTOは、その5'-末端を介して固相基質上に固定化される。

【図14】メルティング分析を含むPTOCEアッセイによるNeisseria gonorrhoeae遺伝子の検出結果を示す。CTOは、そのテンプレティング部位にレポーター分子及びクエンチャー分子を有する。

50

【図15】メルティング分析を含むPTOCEアッセイによる*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子の検出結果を示す。PTOは、その5'-末端にクエンチャー分子を有し、CTOは、その3'-末端にレポーター分子を有する。

【図16】伸長二本鎖のTm値がCTO配列により調節されるという結果を示す。

【図17A】PCR増幅を利用したPTOCEアッセイによる*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子の検出結果を示す。CTOは、そのテンプレティング部位にレポーター分子及びクエンチャー分子を有する。図17Aは、リアルタイムPCR検出を含むPTOCEアッセイの結果を示す。

【図17B】PCR増幅を利用したPTOCEアッセイによる*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子の検出結果を示す。CTOは、そのテンプレティング部位にレポーター分子及びクエンチャー分子を有する。図17Bは、ポストPCRメルティング分析を含むPTOCEアッセイの結果を示す。

10

【図18A】PCR増幅を利用したPTOCEアッセイによる*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子の検出結果を示す。CTOは、その5'-末端にiso-dC残基及びレポーター分子を有する。クエンチャーiso-dGTPは、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入される。図18Aは、リアルタイムPCR検出を含むPTOCEアッセイの結果を示す。

【図18B】PCR増幅を利用したPTOCEアッセイによる*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子の検出結果を示す。CTOは、その5'-末端にiso-dC残基及びレポーター分子を有する。クエンチャーiso-dGTPは、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入される。図18Bは、ポストPCRメルティング分析を含むPTOCEアッセイの結果を示す。

20

【図19A】PCR増幅を利用したPTOCEアッセイによる*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子の検出結果を示す。PTOは、その5'-末端にクエンチャー分子を有して、CTOは、その3'-末端にレポーター分子を有する。図19Aは、リアルタイムPCR検出を含むPTOCEアッセイの結果を示す。

【図19B】PCR増幅を利用したPTOCEアッセイによる*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子の検出結果を示す。PTOは、その5'-末端にクエンチャー分子を有して、CTOは、その3'-末端にレポーター分子を有する。図19Bは、ポストPCRメルティング分析を含むPTOCEアッセイの結果を示す。

30

【図20】ポストPCRメルティング分析を含むPTOCEアッセイによる*Neisseria gonorrhoeae* (NG) 遺伝子及び*Staphylococcus aureus* (SA) 遺伝子の同時的検出結果を示す。CTOは、そのテンプレティング部位にレポーター分子及びクエンチャー分子を有する。

【図21A】マイクロアレイにおけるメルティング分析を含むPTOCEアッセイによる*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子の検出結果を示す。CTOは、その5'-末端を介して固定化される。PTOは、その5'-タギング部位にレポーター分子を有する。

【図21B】マイクロアレイにおけるメルティング分析を含むPTOCEアッセイによる*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子の検出結果を示す。CTOは、その5'-末端を介して固定化される。PTOは、その5'-タギング部位にレポーター分子を有する。

40

【図22A】マイクロアレイにおいて、指定温度におけるリアルタイム検出を含むPTOCEアッセイによる*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子の検出結果を示す。CTOは、その5'-末端を介して固定化される。PTOは、その5'-タギング部位にレポーター分子を有する。

【図22B】マイクロアレイにおいて、指定温度におけるリアルタイム検出を含むPTOCEアッセイによる*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子の検出結果を示す。CTOは、その5'-末端を介して固定化される。PTOは、その5'-タギング部位にレポーター分子を有する。

50

【図23A】マイクロアレイにおいて、指定温度におけるリアルタイム検出を含むPTOCEアッセイによる*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子の検出結果を示す。CTOは、その3'-末端を介して固定化され、そのテンプレティング部位にレポーター分子及びクエンチャー分子を有する。

【図23B】マイクロアレイにおいて、指定温度におけるリアルタイム検出を含むPTOCEアッセイによる*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子の検出結果を示す。CTOは、その3'-末端を介して固定化され、そのテンプレティング部位にレポーター分子及びクエンチャー分子を有する。

【図24】マイクロアレイにおいて、指定温度におけるエンドポイント検出を含むPTOCEアッセイによる単一又は複数のターゲット検出結果を示す。CTOは、その5'-末端を介して固定化される。PTOは、その5'-タギング部位にレポーター分子を有する。*Neisseria gonorrhoeae* (NG) 遺伝子及び*Staphylococcus aureus* (SA) 遺伝子は、ターゲット核酸配列として利用した。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明は、PTOCE (PTO切断及び伸長、PTO Cleavage and Extension) アッセイによりターゲット核酸配列を検出する新規な方法、及びPTOCE (PTO切断及び伸長) アッセイによりターゲット核酸配列を検出するためのキットを提供す。

【0020】

本発明は、ハイブリッド形成反応だけではなく、ターゲット核酸配列の存在依存的に生じる酵素的反応も含む。

【0021】

I. メルティング分析を含むPTOCEによるターゲット検出過程

本発明の一様態によると、本発明は、

(a) ターゲット核酸配列を上流オリゴヌクレオチド及びPTO (プロービング及びタギングオリゴヌクレオチド、Probing and Tagging Oligonucleotide) とハイブリッド形成させる工程であって、前記上流オリゴヌクレオチドは、前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を含み、前記PTOは、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を含む3'-ターゲッティング部位及び(ii) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む5'-タギング部位を含み、前記3'-ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリッド形成され、前記5'-タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されず、前記上流オリゴヌクレオチドは、前記PTOの上流に位置する工程と、

(b) 前記PTOの切断のための条件下で、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素に前記工程(a)の結果物を接触させる工程であって、前記上流オリゴヌクレオチド又はその伸長鎖は、前記5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記PTOの切断を誘導し、このような前記切断は、前記PTOの5'-タギング部位又は5'-タギング部位の一部を含む断片を放出する工程と、

(c) 前記PTOから放出された前記断片とCTO (キャプチャリング及びテンプレティングオリゴヌクレオチド、Capturing and Templating Oligonucleotide) をハイブリッド形成させる工程であって、前記CTOは、3'→5'方向に(i) 前記PTOの5'-タギング部位又は5'-タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位及び(ii) 前記PTOの5'-タギング部位及び3'-ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレティング部位を含み、前記PTOから放出された前記断片は、前記CTOのキャプチャリング部位にハイブリッド形成される工程と、

(d) 前記工程(c)の結果物及び鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用して伸長反応を行う工程であって、前記CTOのキャプチャリング部位にハイブリッド形成された前記断片

10

20

30

40

50

は、伸長されて伸長二本鎖を形成して、前記伸長二本鎖は、(i) 前記断片の配列及び／又は長さ、(ii) 前記CTOの配列及び／又は長さ又は(iii) 前記断片の配列及び／又は長さと同前記CTOの配列及び／又は長さにより調節可能なTm値を有する工程と、(e) 一定範囲の温度で前記伸長二本鎖をメルティング(melting)し、前記伸長二本鎖の存在を示すターゲットシグナルを提供する工程であって、前記ターゲットシグナルは、(i) 前記断片及び／又は前記CTOに連結された少なくとも一つの標識、(ii) 前記伸長反応の間に前記伸長二本鎖内に挿入された標識、(iii) 前記伸長反応の間に前記伸長二本鎖内に挿入された標識と前記断片及び／又は前記CTOに連結された標識又は(iv) インターカレーティング標識(Intercalating Label)により提供される工程と、

10

(f) 前記ターゲットシグナルを測定することにより、前記伸長二本鎖を検出する工程であって、前記伸長二本鎖の存在は、前記ターゲット核酸配列の存在を示す工程と、を含み、PTOCE(PTO切断及び伸長)アッセイによりDNA又は核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法を提供する。

【0022】

本発明者らは、より改善された正確性及び便宜性を有し、特に、マルチプレックス方式においてターゲット配列を検出する新規なアプローチを開発するために鋭意研究した。その結果、本発明者らは、ターゲット配列を検出するための新規なプロトコルを立案し、このようなターゲット検出は、プローブハイブリッド形成、酵素的プローブ切断、伸長及び伸長二本鎖(extended duplex)の検出により達成される。本発明のプロトコルは、固相反応だけではなく、液相反応にも好適に適用され、より改善された正確性及び便宜性を有して複数のターゲット配列が検出されるようにする。

20

【0023】

本発明は、下記の連続的なイベントを利用する；プローブハイブリッド形成；PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)の切断及び伸長；ターゲット依存的な伸長二本鎖の形成；及び伸長二本鎖の検出。したがって、本発明は、PTOCE(PTO Cleavage and Extension)アッセイと命名される。

【0024】

本発明において、伸長二本鎖は、メルティング分析又は指定温度における検出により伸長二本鎖の存在を示すシグナルを提供する標識を有することに特徴がある。また、伸長二本鎖は、調節可能なTm値を有する特徴を有し、これは、複数のターゲット検出又は非ターゲットシグナルとの区別において重要な役割をする。

30

【0025】

ターゲット核酸が存在する場合にのみ伸長二本鎖が生成されるため、伸長二本鎖の存在は、ターゲット核酸の存在を示す。

【0026】

以下、メルティング分析を含むPTOCEアッセイをさらに詳細に説明する。

【0027】

工程(a)：ターゲット核酸配列と上流オリゴヌクレオチド及びPTOのハイブリッド形成

40

本発明によると、まずターゲット核酸配列を上流オリゴヌクレオチド及びPTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)とハイブリッド形成させる。

【0028】

本明細書で使用される用語‘ターゲット核酸’、‘ターゲット核酸配列’又は‘ターゲット配列’は、検出しようとする核酸配列を意味し、ハイブリッド形成、アニーリング又は増幅条件下でプライマー又はプローブとアニーリング又はハイブリッド形成される。

【0029】

本明細書で使用される用語‘プローブ(probe)’は、ターゲット核酸配列に実質

50

的に相補的な部位又は部位を含む一本鎖核酸分子を意味する。

【0030】

本明細書で使用される用語‘プライマー’は、オリゴヌクレオチドを意味するもので、核酸鎖（鋳型）に相補的なプライマー伸長産物の合成が誘導される条件、即ち、ヌクレオチドとDNAポリメラーゼのような重合剤の存在、そして適した温度とpHの条件で合成の開始点として作用できる。

【0031】

好ましくは、プローブ及びプライマーは、一本鎖デオキシリボヌクレオチド分子である。好ましくは、プライマーは、オリゴデオキシリボヌクレオチドである。本発明で利用されるプローブ又はプライマーは、天然（*naturally occurring*）dNMP（即ち、dAMP、dGMP、dCMP及びdTMP）、変形ヌクレオチド又は非天然ヌクレオチドを含むことができる。また、プローブ又はプライマーは、リボヌクレオチドを含むことができる。

10

【0032】

プライマーは、重合剤の存在下で伸長産物の合成をプライミングさせることができるほど十分長くなければならない。プライマーの適した長さは、例えば、温度、応用分野及びプライマーのソース（*source*）を含む複数の要素によって決定される。本明細書で使用された用語‘アニーリング’又は‘プライミング’は、鋳型核酸にオリゴデオキシヌクレオチド又は核酸が並置（*apposition*）されることを意味し、前記並置は、ポリメラーゼがヌクレオチドを重合させて、鋳型核酸又はその一部分に相補的な核酸分子を形成するようにする。

20

【0033】

本明細書で使用された用語‘ハイブリッド形成（*hybridization*）’は、相補的な一本鎖核酸が二本鎖核酸を形成することを意味する。ハイブリッド形成は、二つの核酸鎖間の相補性が完全である場合（*Perfect match*）に起こるか、又は一部ミスマッチ（*mismatch*）塩基が存在しても起これる。ハイブリッド形成に必要な相補性の程度は、ハイブリッド形成条件によって変わり、特に温度によって調節され得る。

【0034】

上流オリゴヌクレオチド及びPTOとターゲット核酸配列のハイブリッド形成は、最適化過程により一般に決定される、適したハイブリッド形成条件下で行うことができる。温度、成分の濃度、ハイブリッド形成及び洗浄時間、バッファー成分及びこれらのpH及びイオン強度のような条件は、オリゴヌクレオチド（上流オリゴヌクレオチド及びPTO）の長さ、GC量及びターゲットヌクレオチド配列などの多様な因子によって様々である。例えば、相対的に短いオリゴヌクレオチドを利用する場合、低い厳格条件（*stringent condition*）を選択することが好ましい。ハイブリッド形成のための詳細な条件は、Joseph Sambrookら、*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)；及びM. L. M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N. Y. (1999)で確認できる。

30

40

【0035】

用語‘アニーリング’と‘ハイブリッド形成’に差はなく、本明細書で混用される。

【0036】

上流オリゴヌクレオチド及びPTOは、ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を含む。本明細書で使用される用語‘相補的’は、所定のアニーリング条件又は厳格条件（*stringent conditions*）下でプライマー又はプローブがターゲット核酸配列に選択的にハイブリッド形成するほど十分相補的なことを意味し、用語‘実質的に相補的（*substantially complementa*

50

ry) ' 及び ' 完全に相補的 (perfectly complementary) ' を包括する意味を有し、好ましくは、完全に相補的なことを意味する。

【0037】

P T O の 5 ' - タギング部位は、ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を有する。C T O (キャプチャリング及びテンプレティングオリゴヌクレオチド、Capturing and Templating Oligonucleotide) のテンプレティング部位は、P T O の 5 ' - タギング部位及び 3 ' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を有する。本明細書で使用する用語 ' 非相補的 ' は、所定のアニーリング条件又は厳格条件下でプライマー又はプローブがターゲット核酸配列に選択的にハイブリッド形成するほど十分非相補的なことを意味し、用語 ' 実質的に非相補的 (substantially non-complementary) ' 及び ' 完全に非相補的 (perfectly non-complementary) ' を包括する意味を有し、好ましくは、完全に非相補的なことを意味する。

10

【0038】

本明細書で使用する用語 ' P T O (プロービング及びタギングオリゴヌクレオチド、Probing and Tagging Oligonucleotide) ' は、(i) プローブとしての役割をする 3 ' - ターゲッティング部位及び (ii) ターゲット核酸配列とのハイブリッド形成後に切断されて P T O から放出され、ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を有する 5 ' - タギング部位を含むオリゴヌクレオチドを意味する。P T O の 5 ' - タギング部位及び 3 ' - ターゲッティング部位は、必ず 5 ' → 3 ' の順に位置する。図 1 で P T O を図式的に示す。

20

【0039】

好ましくは、3 ' - ターゲッティング部位がターゲット核酸配列にハイブリッド形成され、5 ' - タギング部位は、ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されない厳格条件下で工程 (a) のハイブリッド形成が実施される。

【0040】

P T O は、特定の長さである必要はない。例えば、P T O の長さは、15-150ヌクレオチド、15-100ヌクレオチド、15-80ヌクレオチド、15-60ヌクレオチド、15-40ヌクレオチド、20-150ヌクレオチド、20-100ヌクレオチド、20-80ヌクレオチド、20-60ヌクレオチド、20-50ヌクレオチド、30-150ヌクレオチド、30-100ヌクレオチド、30-80ヌクレオチド、30-60ヌクレオチド、30-50ヌクレオチド、35-100ヌクレオチド、35-80ヌクレオチド、35-60ヌクレオチドまた35-50ヌクレオチドの長さを有することができる。P T O の 3 ' - ターゲッティング部位がターゲット核酸配列に特異的にハイブリッド形成される限り、如何なる長さも有することができる。例えば、P T O の 3 ' - ターゲッティング部位は、10-100ヌクレオチド、10-80ヌクレオチド、10-50ヌクレオチド、10-40ヌクレオチド、10-30ヌクレオチド、15-100ヌクレオチド、15-80ヌクレオチド、15-50ヌクレオチド、15-40ヌクレオチド、15-30ヌクレオチド、20-100ヌクレオチド、20-80ヌクレオチド、20-50ヌクレオチド、20-40ヌクレオチド又は20-30ヌクレオチドの長さを有することができる。5 ' - 多銀部部位は、C T O のテンプレティング部位に特異的にハイブリッド形成された後に伸長される限り、如何なる長さも有することができる。例えば、P T O の 5 ' - タギング部位は、5-50ヌクレオチド、5-40ヌクレオチド、5-30ヌクレオチド、5-20ヌクレオチド、10-50ヌクレオチド、10-40ヌクレオチド、10-30ヌクレオチド、10-20ヌクレオチド、15-50ヌクレオチド、15-40ヌクレオチド、15-30ヌクレオチド又は15-20ヌクレオチドの長さを有することができる。

30

40

【0041】

P T O の 3 ' - 末端は、3 ' - O H ターミナル (terminal) を有することもできる。好ましくは、P T O の 3 ' - 末端は、' ブロッキング ' され、その伸長が防止され

50

る。

【0042】

ブロッキングは、従来の方法により達成できる。例えば、ブロッキングは、最後のヌクレオチドの3'ヒドロキシル基にビオチン、標識、ホスフェート基、アルキル基、非ヌクレオチドリナー、ホスホロチオエート又はアルカンージオール残基のような化学的部分(moiety)を追加して実施できる。択一的に、ブロッキングは、最後のヌクレオチドの3'ヒドロキシル基を除去するか、又はジデオキシヌクレオチドのように、3'ヒドロキシル基のないヌクレオチドを利用して実施できる。

【0043】

択一的に、PTOがヘアピン構造を有するようにデザインすることができる。

10

【0044】

PTOの5'ータギング部位及びターゲット核酸配列間の非ハイブリッド形成は、特定ハイブリッド形成条件下でそれらの間に安定した二本鎖が形成されない(non-formation)ことを意味する。本発明の好ましい具現例によると、ターゲット核酸配列とのハイブリッド形成に関与しないPTOの5'ータギング部位は、一本鎖を形成する。

【0045】

上流オリゴヌクレオチドは、PTOの上流に位置する。

【0046】

また、ターゲット核酸配列にハイブリッド形成された上流オリゴヌクレオチド又はその伸長鎖は、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素によるPTOの切断を誘導する。

20

【0047】

上流オリゴヌクレオチドによるPTO切断の誘導は、二つの方式で達成できる：(i)上流オリゴヌクレオチド伸長非依存的な切断誘導；及び(ii)上流オリゴヌクレオチド伸長依存的な切断誘導。

【0048】

上流オリゴヌクレオチドが5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記PTOの切断反応を誘導するに十分な程度にPTOに近接して位置する場合、上流オリゴヌクレオチドに結合した前記酵素は、伸長反応無しにPTOを切断する。その反面、上流オリゴヌクレオチドがPTOから離隔されている場合、ポリメラーゼ活性を有する酵素(例えば、鋳型依存的ポリメラーゼ)は、上流オリゴヌクレオチド(例えば、上流プライマー)の伸長を促進させて、伸長産物に結合された5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素はPTOを切断する。

30

【0049】

したがって、上流オリゴヌクレオチドは、二つの方式でPTOに対して相対的に位置することができる。上流オリゴヌクレオチドは、伸長非依存的な方式でPTOの切断を誘導するに十分なほどPTOに近接した位置に位置することができる。択一的に、上流オリゴヌクレオチドは、伸長-依存的な方式でPTO切断を誘導するに十分な程度にPTOから離隔された位置に位置することができる。

【0050】

本明細書において、地点(positions)又は位置(locations)を言及しながら使用される用語「近接(adjacent)」は、上流オリゴヌクレオチドがPTOの3'ータゲーティング部位のすぐ近くに位置して、ニック(nick)を形成することを意味する。また、前記用語は、上流オリゴヌクレオチドがPTOの3'ータゲーティング部位から1~30ヌクレオチド、1~20ヌクレオチド又は1~15ヌクレオチド離隔されて位置することを意味する。

40

【0051】

本明細書において、地点又は位置を言及しながら使用される用語「離隔(distant)」は、伸長反応が起こるに十分な程度のある位置又は場所を含む。

【0052】

本発明の好ましい具現例によると、上流オリゴヌクレオチドは、伸長依存的な方式でP

50

ＴＯの切断を誘導するに十分なほどＰＴＯから離隔されて位置することができる。

【００５３】

本発明の好ましい具現例によると、上流オリゴヌクレオチドは、上流プライマー又は上流プローブである。上流プライマーは、伸長非依存的な切断誘導又は伸長依存的な切断に適しており、上流プローブは、伸長非依存的な切断誘導に適している。

【００５４】

選択的に、上流オリゴヌクレオチドは、ＰＴＯの３'－ターゲッティング部位の５'－の一部と部分的に重なる配列（*partial-overlapped sequence*）を有することができる。好ましくは、重なる配列は、１～１０ヌクレオチド長さであり、より好ましくは、１～５ヌクレオチド、さらに好ましくは、１～３ヌクレオチドである。上流オリゴヌクレオチドがＰＴＯの３'－ターゲッティング部位の５'－の一部と部分的に重なる配列（*partial-overlapped sequence*）を有する場合、工程（b）の切断反応において、３'－ターゲッティング部位は、５'－ターゲッティング部位と共に部分的に切断される。また、重なる配列は、３'－ターゲッティング部位の所望の特定位置が切断されるようにする。

【００５５】

本発明の好ましい具現例によると、上流プライマーは、その伸長鎖を通じて、５'ヌクレアーゼ活性を有する酵素によるＰＴＯの切断を誘導する。

【００５６】

上流オリゴヌクレオチドがターゲット核酸配列にハイブリッド形成されたＰＴＯの切断を誘導してＰＴＯの５'－ターゲッティング部位又はＰＴＯの５'－ターゲッティング部位の一部を含む断片が放出される限り、上流オリゴヌクレオチドによる切断反応のための従来技術は、本発明に適用することができる。例えば、米国特許第５，２１０，０１５号、第５，４８７，９７２号、第５，６９１，１４２号、第５，９９４，０６９号、第７，３８１，５３２号及び米国出願公開番号第２００８－０２４１８３８号は、本発明に応用することができる。

【００５７】

本発明の好ましい具現例によると、前記方法は、下流プライマーの存在下で実施される。下流プライマーは、ＰＴＯにハイブリッド形成されるターゲット核酸配列を追加的に生成させて、ターゲット検出の感度を向上させる。

【００５８】

本発明の好ましい具現例によると、上流プライマー及び下流プライマーを利用する場合、プライマーの伸長のために追加的に鋳型依存的核酸ポリメラーゼを使用する。

【００５９】

本発明の好ましい具現例によると、上流オリゴヌクレオチド（上流プライマー又は上流プローブ）、下流プライマー及び／又はＰＴＯの５'－ターゲッティング部位は、本発明者により開発された二重プライミングオリゴヌクレオチド（ＤＰＯ）構造を有する。ＤＰＯ構造を有するオリゴヌクレオチドは、従来プライマー及びプローブに比べて非常に改善されたターゲット特異度を示す（参照：WO 2006/095981; Chun et al., *Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene*, *Nucleic Acid Research*, 35:6e40 (2007)）。

【００６０】

本発明の好ましい具現例によると、ＰＴＯの３'－ターゲッティング部位は、本発明者により開発された変形二重特異性オリゴヌクレオチド（ｍＤＳＯ）構造を有する。変形二重特異性オリゴヌクレオチド（ｍＤＳＯ）構造は、従来プローブに比べて非常に改善されたターゲット特異性を示す（参照：WO 2011/028041）。

【００６１】

工程（b）：P T Oから断片の放出

次いで、P T Oの切断のための条件下で工程（a）の結果物を、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素に接触させる。ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されたP T Oは、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素により切断され、P T Oの5'ータギング部位又は5'ータギング部位の一部を含む断片を放出する。

【0062】

本明細書で使用される用語「P T Oの切断のための条件」は、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素によりターゲット核酸配列にハイブリッド形成されたP T Oの切断が発生されるに十分な条件、例えば、温度、p H、イオン強度及びバッファ、オリゴヌクレオチドの長さ及び配列、そして酵素を意味する。例えば、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素としてTaq DNAポリメラーゼが利用される場合、P T Oの切断のための条件は、Tris-HClバッファ、KCl、MgCl₂及び温度を含む。

10

【0063】

P T Oがターゲット核酸配列にハイブリッド形成される場合、その3'ータゲッティング部位は、ハイブリッド形成に含まれるが、5'ータギング部位は、ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されず、一本鎖を形成する（参照：図2）。このように、一本鎖及び二本鎖構造を全部含むオリゴヌクレオチドは、当業界に知られた多様な技術により、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素を利用して切断できる。

【0064】

P T Oの切断位置は、上流オリゴヌクレオチド（上流プローブ又は上流プライマー）の種類、上流オリゴヌクレオチドのハイブリッド形成位置及び切断条件によって多様である（参照：米国特許第5, 210, 015号、第5, 487, 972号、第5, 691, 142号、第5, 994, 069号及び第7, 381, 532号又は米国出願公開番号第2008-0241838号）。

20

【0065】

P T Oの切断反応のために、多数の従来技術を利用することができ、5'ータギング部位又は5'ータギング部位の一部を含む断片を放出する。

【0066】

まとめてみると、工程（b）の切断反応において、三つの切断位置があり得る。第一の切断位置は、P T Oのハイブリッド形成部位（3'ータゲッティング部位）及び非ハイブリッド形成部位（5'ータギング部位）間のジャンクション位置（junction site）である。第二の切断位置は、P T Oの5'ータギング部位の3'末端から3'方向に一部ヌクレオチド離隔された位置である。第二の切断位置は、P T Oの3'ータゲッティング部位の5'末端の一部に位置できる。第三の切断位置は、P T Oの5'ータギング部位の3'末端から5'方向に一部ヌクレオチド離隔された位置である。

30

【0067】

本発明の好ましい具現例によると、上流プライマーが伸長されつつ、5'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存的ポリメラーゼによりP T Oの切断が始まる位置は、P T O及びターゲット核酸配列間の二本鎖が始まる地点又はその地点から1～3ヌクレオチド離隔された位置である。

40

【0068】

したがって、本明細書で5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素によるP T Oの切断を言及しながら使用される用語「P T Oの5'ータギング部位又は5'ータギング部位の一部を含む断片」は、（i）5'ータギング部位、（ii）5'ータギング部位及び3'ータゲッティング部位の5'末端の一部及び（iii）5'ータギング部位の一部を含む意味で使用される。また、本明細書で用語「P T Oの5'ータギング部位又は5'ータギング部位の一部を含む断片」は、「P T O断片」で表現される。

【0069】

本明細書において、P T Oの5'ータギング部位の一部、P T Oの3'ータゲッティ

50

ング部位の5'末端の一部及びCTOのキャプチャリング部位の5'末端の一部のように、PTO又はCTOを言及しながら使用される用語「一部(part)」は、1~40、1~30、1~20、1~15、1~10又は1~5ヌクレオチドで構成されたヌクレオチド配列を意味し、好ましくは、1、2、3又は4ヌクレオチドである。

【0070】

本明細書の好ましい具現例によると、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素は、5'ヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼ又はFENヌクレアーゼであり、より好ましくは、5'ヌクレアーゼ活性を有する熱安定性DNAポリメラーゼ又はFENヌクレアーゼである。

【0071】

本発明に適した5'ヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼは、多様なバクテリア種から得た熱安定性DNAポリメラーゼであり、これは、*Thermus aquaticus* (Taq)、*Thermus thermophilus* (Tth)、*Thermus filiformis*、*Thermis flavus*、*Thermococcus litoralis*、*Thermus antranikianii*、*Thermus caldophilus*、*Thermus chliarophilus*、*Thermus flavus*、*Thermus igniterrae*、*Thermus lacteus*、*Thermus oshimai*、*Thermus ruber*、*Thermus rubens*、*Thermus scotoductus*、*Thermus silvanus*、*Thermus species Z05*、*Thermus species sps 17*、*Thermus thermophilus*、*Thermotoga maritima*、*Thermotoga neapolitana*、*Thermosiphon africanus*、*Thermococcus litoralis*、*Thermococcus barossi*、*Thermococcus gorgonarius*、*Thermotoga maritima*、*Thermotoga neapolitana*、*Thermosiphon africanus*、*Pyrococcus woesei*、*Pyrococcus horikoshii*、*Pyrococcus abyssi*、*Pyrodictium occultum*、*Aquifex pyrophilus*及び*Aquifex aeolicus*を含む。最も好ましくは、熱安定性DNAポリメラーゼは、Taqポリメラーゼである。

【0072】

択一的に、本発明は、ポリメラーゼ活性をより少なく有するように変形された、5'ヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを使用することができる。

【0073】

使用されるFEN (flap endonuclease)ヌクレアーゼは、5'フラップ特異的ヌクレアーゼ (5' flap-specific nuclease) である。

【0074】

本発明に適しているFENヌクレアーゼは、多様なバクテリア種から得たFENヌクレアーゼを含み、これは、*Sulfolobus solfataricus*、*Pyrobaculum aerophilum*、*Thermococcus litoralis*、*Archaeoglobus veneficus*、*Archaeoglobus profundus*、*Acidianus brieryi*、*Acidianus ambivalens*、*Desulfurococcus amylolyticus*、*Desulfurococcus mobilis*、*Pyrodictium brockii*、*Thermococcus gorgonarius*、*Thermococcus zilligii*、*Methanopyrus kandleri*、*Methanococcus igneus*、*Pyrococcus horikoshii*、*Aeropyrum pernix*及び*Archaeoglobus veneficus*を含む。

【0075】

工程（a）において上流プライマーを利用する場合、P T Oの切断のための条件は、上流プライマーの伸長反応を含むことが好ましい。

【0076】

本発明の好ましい具現例によると、工程（a）において上流プライマーが使用され、前記上流プライマーの伸長のために鋳型依存的ポリメラーゼが使用され、前記鋳型依存的ポリメラーゼは、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素と同一な酵素である。

【0077】

選択的に、工程（a）において上流プライマーが使用され、前記上流プライマーの伸長のために鋳型依存的ポリメラーゼが使用され、前記鋳型依存的ポリメラーゼは、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素と異なる酵素である。

【0078】

工程（c）：P T Oから放出された断片とC T Oのハイブリッド形成

P T Oから放出された断片は、C T O（キャプチャリング及びテンプレティングオリゴヌクレオチド、Capturing and Templating Oligonucleotide）とハイブリッド形成される。

【0079】

C T Oは、3'→5'方向に（i）P T Oの5'-ターギング部位又は5'-ターギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位及び（ii）P T Oの5'-ターギング部位及び3'-ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレティング部位を含む。

【0080】

C T Oは、P T Oから放出された断片の伸長のための鋳型の役割をする。プライマーとしての役割をする前記断片は、C T Oにハイブリッド形成され、伸長されて二本鎖を形成する。

【0081】

テンプレティング部位がP T Oの5'-ターギング部位及び3'-ターゲッティング部位に非相補的な配列を有する限り、如何なる配列も含むことができる。また、テンプレート部位がP T Oから放出された断片の伸長のための鋳型の役割ができる限り、如何なる配列も含むことができる。

【0082】

上述のように、P T Oの5'-ターギング部位を有する断片が放出される場合、C T Oのキャプチャリング部位は、5'-ターギング部位に相補的なヌクレオチド配列を含むようにデザインすることが好ましい。5'-ターギング部位及び3'-ターゲッティング部位の5'-末端一部を有する断片が放出される場合、C T Oのキャプチャリング部位は、5'-ターギング部位及び3'-ターゲッティング部位の5'-末端一部に相補的なヌクレオチド配列を含むようにデザインすることが好ましい。P T Oの5'-ターギング部位の一部を有する断片が放出される場合、C T Oのキャプチャリング部位は、5'-ターギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むようにデザインすることが好ましい。

【0083】

さらに、P T Oの切断位置を予想することにより、C T Oのキャプチャリング部位をデザインすることができる。例えば、C T Oのキャプチャリング部位が5'-ターギング部位に相補的なヌクレオチド配列を含むようにデザインされる場合、5'-ターギング部位の一部を有する断片又は5'-ターギング部位を有する断片は、キャプチャリング部位とハイブリッド形成でき、以後伸長される。5'-ターギング部位及び3'-ターゲッティング部位の5'-末端一部を含む断片が放出される場合、前記断片は、5'-ターギング部位に相補的なヌクレオチド配列を含むようにデザインされたC T Oのキャプチャリング部位にハイブリッド形成でき、前記断片の3'-末端部位にミスマッチヌクレオチドが存在するにもかかわらず、成功的に伸長できる。これは、プライマーの3'-末端が一部ミスマッチヌクレオチド（例えば、1～3ミスマッチヌクレオチド）を含むにもかかわらず、プライマーが反応条件によって伸長できるからである。

10

20

30

40

50

【0084】

5'-ターギング部位及び3'-ターゲッティング部位の5'-末端一部を含む断片が放出される場合、CTOのキャプチャリング部位の5'-末端一部は、前記切断された3'-ターゲッティング部位の5'-末端一部に相補的なヌクレオチド配列を有するようにデザインすることにより、ミスマッチヌクレオチドに係わる問題を解決することができる（参照：図1）。

【0085】

好ましくは、切断された3'-ターゲッティング部位の5'-末端一部に相補的なCTOのキャプチャリング部位の5'-末端一部のヌクレオチド配列は、PTOの3'-ターゲッティング部位上の予想される切断位置によって選択できる。切断された3'-ターゲッティング部位の5'-末端一部に相補的なCTOのキャプチャリング部位の5'-末端一部のヌクレオチド配列は、1～10ヌクレオチドであることが好ましくは、より好ましくは、1～5ヌクレオチド、さらに好ましくは、1～3ヌクレオチドである。

10

【0086】

CTOの3'-末端は、断片とのハイブリッド形成に含まれない追加的なヌクレオチドを含むことができる。また、CTOが前記断片と安定してハイブリッド形成される限り、CTOのキャプチャリング部位は、前記断片の一部（例えば、その3'-末端部位を含む断片の一部）にのみ相補的なヌクレオチド配列を含むことができる。

【0087】

本明細書で使用される用語「5'-ターギング部位又は5'-ターギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位」は、上述のようにCTOのキャプチャリング部位の多様なデザイン及び構成を含んで説明される。

20

【0088】

CTOは、ヘアピン構造を有するようにデザインすることができる。

【0089】

CTOの長さは、多様である。例えば、CTOは、7-1, 000ヌクレオチド、7-500ヌクレオチド、7-300ヌクレオチド、7-100ヌクレオチド、7-80ヌクレオチド、7-60ヌクレオチド、7-40ヌクレオチド、15-1000ヌクレオチド、15-500ヌクレオチド、15-300ヌクレオチド、15-100ヌクレオチド、15-80ヌクレオチド、15-60ヌクレオチド、15-40ヌクレオチド、20-1000ヌクレオチド、20-500ヌクレオチド、20-300ヌクレオチド、20-100ヌクレオチド、20-80ヌクレオチド、20-60ヌクレオチド、20-40ヌクレオチド、30-1000ヌクレオチド、30-500ヌクレオチド、30-300ヌクレオチド、30-100ヌクレオチド、30-80ヌクレオチド、30-60ヌクレオチド又は30-40ヌクレオチドの長さである。CTOのキャプチャリング部位は、PTOから放出された断片に特異的にハイブリッド形成される限り、如何なる長さも有することができる。例えば、CTOのキャプチャリング部位は、5-100ヌクレオチド、5-60ヌクレオチド、5-40ヌクレオチド、5-30ヌクレオチド、5-20ヌクレオチド、10-100ヌクレオチド、10-60ヌクレオチド、10-40ヌクレオチド、10-30ヌクレオチド、10-20ヌクレオチド、15-100ヌクレオチド、15-60ヌクレオチド、15-40ヌクレオチド、15-30ヌクレオチド又は15-20ヌクレオチドの長さを有することができる。また、CTOのテンプレート部位は、PTOから放出された断片の伸長反応で鋳型の役割ができる限り、如何なる長さも有することができる。例えば、CTOのテンプレート部位は、2-900ヌクレオチド、2-400ヌクレオチド、2-300ヌクレオチド、2-100ヌクレオチド、2-80ヌクレオチド、2-60ヌクレオチド、2-40ヌクレオチド、2-20ヌクレオチド、5-900ヌクレオチド、5-400ヌクレオチド、5-300ヌクレオチド、5-100ヌクレオチド、5-80ヌクレオチド、5-60ヌクレオチド、5-40ヌクレオチド、5-30ヌクレオチド、10-900ヌクレオチド、10-400ヌクレオチド、10-300ヌクレオチド、15-900ヌクレオチド、15-100ヌクレオチド、15-80ヌ

30

40

50

クレオチド、15-60ヌクレオチド、15-40ヌクレオチド又は15-20ヌクレオチドの長さを有することができる。

【0090】

CTOの3'-末端は、3'-OHターミナルを有することができる。好ましくは、CTOの3'-末端は、その伸長が防止されるようにブロッキングされる。例えば、ブロッキングは、CTOの最後のヌクレオチドの3'-ヒドロキシル基にビオチン、標識、ホスフェート基、アルキル基、非ヌクレオチドリinker、ホスホロチオエート又はアルカンジオール残基のような化学的部分 (moiety) を追加して実施できる。択一的に、ブロッキングは、最後のヌクレオチドの3'-ヒドロキシル基を除去するか、又はジデオキシヌクレオチドのように、3'-ヒドロキシル基のないヌクレオチドを利用して実施できる。

10

【0091】

PTOから放出された断片は、CTOとハイブリッド形成され、断片の伸長に適した形態を提供する。また、非切断PTOがその5'-タギング部位を介してCTOのキャプチャリング部位とハイブリッド形成されとしても、PTOの3'-ターゲッティング部位は、CTOにハイブリッド形成されず、伸長二本鎖の形成が防止される。

【0092】

工程(c)におけるハイブリッド形成は、工程(a)におけるハイブリッド形成に対する説明を参照して詳細に説明できる。

【0093】

20

工程(d)：断片の伸長

鋳型-依存的核酸ポリメラーゼ及び工程(c)の結果物を利用して伸長反応を行う。CTOのキャプチャリング部位にハイブリッド形成された断片は、伸長され、伸長二本鎖を形成する。その反面、CTOのキャプチャリング部位にハイブリッド形成された非切断PTOは伸長されず、これにより、伸長二本鎖も形成されない。

【0094】

本明細書で使用される用語「伸長二本鎖」は、CTOのキャプチャリング部位にハイブリッド形成された断片が鋳型依存的核酸ポリメラーゼとCTOのテンプレティング部位を鋳型として利用して伸長される伸長反応により形成された二本鎖を意味する。

【0095】

30

伸長二本鎖は、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物 (hybrid) のT_m値と異なるT_m値を有する。

【0096】

好ましくは、伸長二本鎖は、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物のT_m値より高いT_m値を有する。

【0097】

伸長二本鎖のT_m値は、(i)断片の配列及び／又は長さ、(ii)CTOの配列及び／又は長さ、又は(iii)断片の配列及び／又は長さ、とCTOの配列及び／又は長さにより調節可能である。

【0098】

40

工程(e)において伸長二本鎖のメルティングにより伸長二本鎖の存在を示すターゲットシグナルが提供されるように伸長二本鎖の調節可能なT_m値を使用することは、本発明の顕著な特徴である。

【0099】

本明細書で使用される用語「T_m」は、二本鎖核酸分子の集団 (population) の半分が一本鎖分子に解離されるメルティング温度を意味する。T_m値は、ハイブリッド形成されるヌクレオチドの長さ及びG/C含量により決定される。T_m値は、Wallace rule (R. B. Wallaceら、Nucleic Acids Research, 6:3543-3547 (1979)) 及びnearest-neighbor方法 (Santa Lucia J. Jr. ら、Biochemistry, 35:

50

3555-3562 (1996)) ; Sugimoto N. ら、Nucleic Acids Res. , 24:4501-4505 (1996)) のような従来の方法により計算できる。

【0100】

本発明の好ましい具現例によると、 T_m 値は、実際使用する反応条件下での実際の T_m 値を意味する。

【0101】

工程(d)において利用される鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、如何なる核酸ポリメラーゼでも可能であり、例えば、*E. coli* DNAポリメラーゼIの‘Klenow’断片、熱安定性DNAポリメラーゼ及びバクテリオファージT7 DNAポリメラーゼである。好ましくは、ポリメラーゼは、多様なバクテリア種から得られる熱安定性DNAポリメラーゼであり、これは、*Thermus aquaticus* (Taq)、*Thermus thermophilus* (Tth)、*Thermus filiformis*、*Thermis flavus*、*Thermococcus litoralis*、*Thermus antranikianii*、*Thermus caldophilus*、*Thermus chliarophilus*、*Thermus flavus*、*Thermus igniterrae*、*Thermus lacteus*、*Thermus oshimai*、*Thermus ruber*、*Thermus rubens*、*Thermus scotoductus*、*Thermus silvanus*、*Thermus species Z05*、*Thermus species sps 17*、*Thermus thermophilus*、*Thermotoga maritima*、*Thermotoga neapolitana*、*Thermosiphon africanus*、*Thermococcus litoralis*、*Thermococcus barossi*、*Thermococcus gorgonarius*、*Thermotoga maritima*、*Thermotoga neapolitana*、*Thermosiphon africanus*、*Pyrococcus furiosus* (Pfu)、*Pyrococcus woesei*、*Pyrococcus horikoshii*、*Pyrococcus abyssi*、*Pyrodictum occultum*、*Aquifex pyrophilus*及び*Aquifex aeolicus*を含む。最も好ましくは、鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、Taqポリメラーゼである。

【0102】

本発明の好ましい具現例によると、工程(b)において利用される5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素は、工程(d)において利用される鋳型依存的核酸ポリメラーゼと同一である。より好ましくは、工程(b)において利用される5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素、上流プライマーの伸長のために利用される鋳型依存的核酸ポリメラーゼ及び工程(d)において利用される鋳型依存的核酸ポリメラーゼは、互いに同一である。

【0103】

伸長二本鎖は、(i) PTO断片及び／又はCTOに連結された少なくとも一つの標識、(ii) 伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された標識、(iii) 伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された標識及びPTO断片及び／又はCTOに連結された標識又は(iv) インターカレーティング標識 (Intercalating Label) に由来する標識を有する。

【0104】

ターゲット核酸配列が存在する場合、伸長二本鎖が形成されるため、伸長二本鎖の存在は、ターゲット核酸配列の存在を示すことができる。直接的な方式で伸長二本鎖の存在を検出するためには、検出可能なシグナルを提供する標識を有する伸長二本鎖が工程(d)において形成される。伸長二本鎖に利用される標識は、伸長二本鎖が二本鎖であるか一本鎖であるかによってシグナル変化を提供し、最終的に伸長二本鎖のメルティングにより伸長二本鎖の存在を示すターゲットシグナルを提供する。

【0105】

工程（e）：伸長二本鎖のメルティング

伸長反応に続けて、伸長二本鎖は、一定範囲の温度でメルティングされ、伸長二本鎖の存在を示すターゲットシグナルを提供する。

【0106】

ターゲットシグナルは、（i）前記断片及び／又は前記CTOに連結された少なくとも一つの標識、（ii）前記伸長反応の間に前記伸長二本鎖内に挿入された標識、（iii）前記伸長反応の間に前記伸長二本鎖内に挿入された標識及び前記断片及び／又は前記CTOに連結された標識又は（iv）インターカレーティング標識（Intercalating Label）により提供される。

【0107】

本明細書で使用される用語‘ターゲットシグナル’は、伸長二本鎖の存在を示すことのできるあらゆるシグナルを意味する。例えば、ターゲットシグナルは、標識からのシグナル（シグナル発生又は消滅）、標識からのシグナルの変化（シグナル増加又は減少）、メルティングカーブ、メルティングパターン及びメルティング温度（又はT_m値）を含む。

【0108】

本発明の好ましい具現例によると、ターゲットシグナルは、メルティング工程で伸長二本鎖の標識からのシグナルの変化である。シグナルの変化は、少なくとも二つの異なる温度でシグナルを測定することにより得ることができる。択一的に、ターゲットシグナルは、一定温度範囲で伸長二本鎖の標識からのシグナルを測定することにより得られるメルティングカーブ、メルティングパターン及びメルティング温度（又はT_m値）である。好ましくは、温度の範囲は、メルティングカーブ分析のための温度の範囲又は伸長二本鎖のT_m値の周囲温度である。

【0109】

伸長二本鎖は、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物より高いT_m値を有する。したがって、伸長二本鎖及びハイブリッド形成物は、互いに異なるメルティングパターンを示す。このような異なるメルティングパターンは、非ターゲットシグナルとターゲットシグナルとを区別できるようにする。異なるメルティングパターン又はメルティング温度は、適した標識システムと共にターゲットシグナルを発生させる。

【0110】

メルティングは、従来技術により実施でき、例えば、熱、アルカリ、ホルムアミド、ウレア及びグリコサル処理、酵素方法（例えば、ヘリカーゼ作用）、及び結合タンパク質を含むが、これらに限定されるものではない。例えば、メルティングは、80℃～105℃範囲の温度で熱処理して達成できる。上述の処理の一般的な方法は、Joseph Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)により提供される。

【0111】

本発明に使用される適した標識システムは、これらの種類、位置及びシグナルの発生方式の側面において多様である。

【0112】

本発明に有用な標識システムは、下記の通りに詳細に説明できる：

【0113】

（i）断片及び／又はCTOに連結された標識

本発明の好ましい具現例によると、前記シグナルは、断片及び／又はCTOに連結された少なくとも一つの標識により提供される。伸長二本鎖は、PTO断片及びCTO間に形成されるため、PTO断片又はCTOの標識は、伸長二本鎖に存在し、メルティング工程でターゲットシグナルを提供する。

【0114】

標識は、相互作用的二重標識及び単一標識を含む。

【0115】

(i-1) 相互作用的二重標識

相互作用の標識システムは、供与体分子及び受容体分子間にエネルギーが非放射能的 (non-radioactively) に伝達されるシグナル発生システムである。相互作用の標識システムの代表的例として、FRET (fluorescence resonance energy transfer) 標識システムは、蛍光レポーター分子 (供与体分子) 及びクエンチング分子 (受容体分子) を含む。FRETにおいてエネルギー供与体は、蛍光性であるが、エネルギー受容体は、蛍光性又は非蛍光性である。相互作用の標識システムの他の形態において、エネルギー供与体は、非蛍光性、例えば、発色団 (chromophore) であり、エネルギー受容体は、蛍光性である。相互作用の標識システムのまた他の形態において、エネルギー供与体は、発光性、例えば、生物発光性、化学発光性又は電気化学発光性であり、受容体は、蛍光性である。供与体分子及び受容体分子は、本発明においてそれぞれレポーター分子及びクエンチャー分子で説明できる。

10

【0116】

好ましくは、伸長二本鎖の存在 (即ち、ターゲット核酸配列の存在) を示すシグナルは、相互作用の標識システムにより発生され、最も好ましくは、FRET標識システム (即ち、相互作用的二重標識システム) である。

【0117】

具現例1 (鎖内相互作用的二重標識)

相互作用的二重標識システムの具現例1において、断片又はCTOは、レポーター分子及びクエンチャー分子を含む相互作用的二重標識を有し、前記工程(e)における伸長二本鎖のメルティングは、相互作用的二重標識からのシグナルの変化を誘導し、工程(e)においてターゲットシグナルを提供する。相互作用的二重標識システムの具現例1は、図2、6及び9で図式的に示す。具現例1は、鎖内相互作用的二重標識と命名される。

20

【0118】

図2における具現例1 (鎖内相互作用的二重標識)

例示された具現例は、図2を参考して説明される。CTOのテンプレートング部位は、レポーター分子及びクエンチャー分子を有する。ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されたPTOは、切断されて断片を放出して、前記断片は、CTOのキャプチャリング部位にハイブリッド形成されて伸長され、伸長二本鎖を形成する。

30

【0119】

工程(d)において伸長二本鎖が形成される場合、CTOのレポーター分子及びクエンチャー分子は、構造的に離隔され、クエンチャー分子がレポーター分子からのシグナルをアークエンチングして、工程(e)において伸長二本鎖がメルティングされる場合、レポーター分子及びクエンチャー分子は、構造的に互いに近接し、クエンチャー分子がレポーター分子からのシグナルをクエンチングして、これにより、ターゲットシグナルが提供され、工程(e)において伸長二本鎖の存在を示す。

【0120】

本明細書で使用される表現 ‘レポーター分子及びクエンチャー分子は、構造的に近接した’ は、断片又はCTOの形態的構造、例えば、ランダムコイル (coil) 及びヘアピン構造により、レポーター分子及びクエンチャー分子が3次元的に互いに隣接することになることを意味する。

40

【0121】

本明細書で使用される表現 ‘レポーター分子及びクエンチャー分子は、構造的に離隔されて’ は、二本鎖の形成による断片又はCTOの形態的構造の変化により、レポーター分子及びクエンチャー分子が3次元的に離隔されることを意味する。

【0122】

好ましくは、工程(e)において提供されるターゲットシグナルは、工程(e)において発生される蛍光シグナルの変化を測定して得られるメルティングカーブ、メルティングパターン又はTm値を含む。

50

【0123】

本発明の好ましい具現例によると、伸長二本鎖メルティングに依存的にレポーター分子からのシグナルがクエンチングされるか又はアଙ୍କエンチングされる限り、レポーター分子及びクエンチャー分子は、CTOの如何なる位置にも位置できる。

【0124】

本発明の好ましい具現例によると、レポーター分子及びクエンチャー分子は、両方ともCTOのテンプレティング部位又はキャプチャリング部位に連結される。

【0125】

本発明の好ましい具現例によると、レポーター分子及びクエンチャー分子は、CTOの5' - 末端及び3' - 末端に位置する。

10

【0126】

本発明の好ましい具現例によると、CTOのレポーター分子及びクエンチャー分子の一つは、その5' - 末端又はその5' - 末端から1～5ヌクレオチド離隔された位置にあり、他の一つは、CTOの立体構造 (conformation) によって、レポーター分子からのシグナルをクエンチング又はアଙ୍କエンチングする位置に位置する。

【0127】

本発明の好ましい具現例によると、CTOのレポーター分子及びクエンチャー分子の一つは、その3' - 末端又はその3' - 末端から1～5ヌクレオチド離隔された位置にあり、他の一つは、CTOの立体構造によって、レポーター分子からのシグナルをクエンチング又はアଙ୍କエンチングする位置に位置する。

20

【0128】

本発明の好ましい具現例によると、レポーター分子及びクエンチャー分子は、互いに最大80ヌクレオチド離隔された位置に位置し、より好ましくは、最大60ヌクレオチド、さらに好ましくは、最大30ヌクレオチド、最も好ましくは、最大25ヌクレオチドである。本発明の好ましい具現例によると、レポーター分子及びクエンチャー分子は、少なくとも4ヌクレオチド離隔された位置に位置し、より好ましくは、少なくとも6ヌクレオチド、さらに好ましくは、少なくとも10ヌクレオチド、最も好ましくは、少なくとも15ヌクレオチドである。

【0129】

本発明において、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物が形成できる。

30

【0130】

図2に示されたように、CTOのテンプレティング部位が相互作用的二重標識で標識される場合、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物の標識からのシグナルの変化は誘導されない。したがって、ハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供しない。

【0131】

CTOのキャプチャリング部位が相互作用的二重標識で標識される場合、メルティング工程で非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供する。このような場合、伸長二本鎖及びハイブリッド形成物のT_m値の差異により、伸長二本鎖のターゲットシグナルとハイブリッド形成物の非ターゲットシグナルとを区別することができる。

40

【0132】

図6における具現例1 (鎖内相互作用的二重標識)

例示された具現例は、図6を参考して説明される。PTOの5' - タギング部位は、レポーター分子及びクエンチャー分子を有する。ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されたPTOは、切断され、レポーター分子及びクエンチャー分子を有する5' - タギング部位を含む断片を放出する。前記断片は、CTOのキャプチャリング部位にハイブリッド形成される。

【0133】

工程(d)において伸長二本鎖が形成される場合、断片のレポーター分子及びクエンチ

50

ャー分子は、構造的に離隔され、クエンチャー分子がレポーター分子からのシグナルをア
ンクエンチングし、工程（e）において伸長二本鎖がメルティングされる場合、レポーター
分子及びクエンチャー分子は、構造的に互いに近接し、クエンチャー分子がレポーター
分子からのシグナルをクエンチングして、これにより、ターゲットシグナルが提供され、
工程（e）において伸長二本鎖の存在を示す。

【0134】

本発明の好ましい具現例によると、伸長二本鎖のメルティングによってレポーター分子
からのシグナルがクエンチングされるか又はアンクエンチングされる限り、レポーター分
子及びクエンチャー分子は、断片の如何なる位置にも位置できる。

【0135】

本発明の好ましい具現例によると、断片のレポーター分子及びクエンチャー分子の一つ
は、その5'-末端又はその5'-末端から1～5ヌクレオチド離隔された位置にあり、
他の一つは、断片の立体構造によって、レポーター分子からのシグナルをクエンチング又
はアンクエンチングする位置に位置する。

【0136】

本発明の好ましい具現例によると、レポーター分子及びクエンチャー分子は、互いに最
大50ヌクレオチド離隔された位置に位置し、より好ましくは、最大40ヌクレオチド、
さらに好ましくは、最大30ヌクレオチド、最も好ましくは、最大20ヌクレオチドであ
る。本発明の好ましい具現例によると、レポーター分子及びクエンチャー分子は、少なく
とも4ヌクレオチド離隔された位置に位置し、より好ましくは、少なくとも6ヌクレオチ
ド、さらに好ましくは、少なくとも10ヌクレオチド、最も好ましくは、少なくとも15
ヌクレオチドである。

【0137】

図6に示されたように、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物は、メルティ
ング工程で非ターゲットシグナルを提供する。このような場合、伸長二本鎖及びハイブリ
ッド形成物のT_m値の差異により、伸長二本鎖のターゲットシグナルとハイブリッド形成
物の非ターゲットシグナルとを区別することができる。

【0138】

具現例2（鎖内相互作用的二重標識）

相互作用的二重標識システムの具現例2において、断片は、レポーター分子及びクエン
チャー分子を含む相互作用的二重標識の一つを有し、CTOは、相互作用的二重標識の他
の一つを有し、前記工程（e）における伸長二本鎖のメルティングは、相互作用的二重標
識からのシグナルの変化を誘導し、工程（e）においてターゲットシグナルを提供する。

【0139】

例示された具現例は、図8を参考して説明される。

【0140】

工程（d）において伸長二本鎖が形成される場合、PTOに連結されたクエンチャー分
子により、CTOに連結されたレポーター分子からのシグナルがクエンチングされる。工
程（e）において伸長二本鎖がメルティングされる場合、レポーター分子及びクエンチャ
ー分子は、互いに離隔され、クエンチャー分子がレポーター分子からのシグナルをア
ンクエンチングして、これにより、ターゲットシグナルが提供され、工程（e）において伸
長二本鎖の存在を示す。

【0141】

好ましくは、工程（e）において提供されるターゲットシグナルは、相互作用的二重標
識からの蛍光シグナルの変化を測定して得られるメルティングカーブ、メルティングパタ
ーン又はT_m値を含む。

【0142】

伸長二本鎖のクエンチャー分子によりレポーター分子からのシグナルがクエンチングさ
れる限り、レポーター分子及びクエンチャー分子は、PTO断片及びCTOの如何なる位
置にも位置できる。

【0143】

本発明の好ましい具現例によると、PTOのレポーター分子又はクエンチャー分子は、5'-ターゲティング部位の5'-末端に位置する。

【0144】

本発明の好ましい具現例によると、CTOのレポーター分子又はクエンチャー分子は、その3'-末端に位置する。

【0145】

図8に示されたように、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物は、メルティング工程で非ターゲットシグナルを提供する。このような場合、伸長二本鎖及びハイブリッド形成物のT_m値の差異により、伸長二本鎖のターゲットシグナルとハイブリッド形成物の非ターゲットシグナルとを区別することができる。

10

【0146】

本発明に有用なレポーター分子及びクエンチャー分子は、当業界に知られた如何なるものでも利用できる。その例は、下記の通りである：Cy2TM (506)、YO-PROTM-1 (509)、YOYOTM-1 (509)、Calcein (517)、FITC (518)、FluorXTM (519)、AlexaTM (520)、Rhodamine 110 (520)、Oregon GreenTM 500 (522)、Oregon GreenTM 488 (524)、RiboGreenTM (525)、Rhodamine GreenTM (527)、Rhodamine 123 (529)、Magnesium GreenTM (531)、Calcium GreenTM (533)、TO-PROTM-1 (533)、TOTO1 (533)、JOE (548)、BODIPY530/550 (550)、Dil (565)、BODIPY TMR (568)、BODIPY558/568 (568)、BODIPY564/570 (570)、Cy3TM (570)、AlexaTM 546 (570)、TRITC (572)、Magnesium OrangeTM (575)、Phycocerythrin R & B (575)、Rhodamine Phalloidin (575)、Calcium OrangeTM (576)、Pyronin Y (580)、Rhodamine B (580)、TAMRA (582)、Rhodamine RedTM (590)、Cy3.5TM (596)、ROX (608)、Calcium CrimsonTM (615)、AlexaTM 594 (615)、Texas Red (615)、Nile Red (628)、YO-PROTM-3 (631)、YOYOTM-3 (631)、Rphycocyanin (642)、C-Phycocyanin (648)、TO-PROTM-3 (660)、TOTO3 (660)、DiD DilC (5) (665)、Cy5TM (670)、Thiadicarbocyanine (671)、Cy5.5 (694)、HEX (556)、TET (536)、Biosearch Blue (447)、CAL Fluor Gold 540 (544)、CAL Fluor Orange 560 (559)、CAL Fluor Red 590 (591)、CAL Fluor Red 610 (610)、CAL Fluor Red 635 (637)、FAM (520)、Fluorescein (520)、Fluorescein-C3 (520)、Pulsar 650 (566)、Quasar 570 (667)、Quasar 670 (705) 及び Quasar 705 (610)。括弧の数字は、ナノメートル単位で表示した最大発光波長である。好ましくは、レポーター分子及びクエンチャー分子は、JOE、FAM、TAMRA、ROX及びフルオレセインベースの標識を含む。

20

30

40

【0147】

適したレポーター-クエンチャー対は、たくさんの文献に開示されている：Pesceら、editors, Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, New York, 1971)；Whiteら、Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, New York, 1970)；Berlman, Han

50

book of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2nd Edition (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, Color AND Constitution of Organic Molecules (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, New York, 1949); Haugland, R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th Edition (Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996); 米国特許第3,996,345号及び第4,351,760号。

10

【0148】

本発明において、広範囲波長又は特定波長の蛍光をクエンチングできる非蛍光ブラッククエンチャー分子が利用できるということは、注目すべきことである。非蛍光ブラッククエンチャー分子の例は、BHQ及びDABCYLである。

【0149】

CTOに適用されるFRET標識において、レポーターは、FRETの供与体を含み、クエンチャーは、FRETのその他のパートナー（受容体）を含む。例えば、フルオレセイン色素（fluorescein dye）は、レポーターとして利用され、ロダミン色素（rhodamine dye）は、クエンチャーとして利用される。

20

【0150】

（i-2）単一標識

また、本発明は、ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを提供する単一標識システムを利用して好適に実施できる。

【0151】

本発明の好ましい具現例によると、断片又はCTOは、単一標識を有し、工程（e）における伸長二本鎖のメルティングは、単一標識からのシグナルの変化を誘導し、工程（e）においてターゲットシグナルを提供する。

30

【0152】

図3における具現例1（単一標識システム）

例示された具現例は、図3を参考して説明される。CTOのテンプレティング部位は、単一蛍光標識を有する。ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されたPTOは、切断されて断片を放出する。前記断片は、CTOのキャプチャリング部位にハイブリッド形成されて伸長され、伸長二本鎖を形成する。伸長二本鎖の形成により、単一蛍光標識から出る蛍光の強度は、増加するようになる。伸長二本鎖が工程（e）においてメルティングされる場合、単一蛍光標識から出る蛍光の強度は減少するようになり、これにより、ターゲットシグナルが提供され、工程（e）において伸長二本鎖の存在を示す。

40

【0153】

本発明の好ましい具現例によると、伸長二本鎖のメルティングによって、単一標識からのシグナルの水準に変化がある限り、単一標識は、CTOの如何なる位置にも位置できる。

【0154】

本発明の好ましい具現例によると、単一標識は、CTOのテンプレティング部位又はキャプチャリング部位に連結される。

【0155】

図3に示されたように、CTOのテンプレティング部位が単一標識で標識される場合、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物の標識からのシグナルの変化が誘導さ

50

れない。したがって、ハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供しない。

【0156】

C T Oのキャプチャリング部位が単一標識で標識される場合、メルティング工程で非切断P T O及びC T O間のハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供する。このような場合、伸長二本鎖及びハイブリッド形成物のT_m値の差異により、伸長二本鎖のターゲットシグナルとハイブリッド形成物の非ターゲットシグナルとを区別することができる。

【0157】

図7における具現例2（単一標識システム）

例示された具現例は、図7を参考して説明される。P T Oの5'ータギング部位は、単一蛍光標識を有する。ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されたP T Oは、切断され、単一蛍光標識のある5'ータギング部位を含む断片を放出する。ハイブリッド形成により、5'ータギング部位の単一蛍光標識から出る蛍光の強度は増加する。伸長二本鎖が工程（e）においてメルティングされる場合、単一蛍光標識から出るシグナル強度は減少するようになり、これにより、ターゲットシグナルが提供され、工程（e）において伸長二本鎖の存在を示す。

【0158】

本発明の好ましい具現例によると、伸長二本鎖のメルティングによって、単一標識からのシグナルの水準に変化がある限り、単一標識は、P T O断片の如何なる位置にも位置できる。

【0159】

図7に示されたように、非切断P T O及びC T O間のハイブリッド形成物は、メルティング工程で非ターゲットシグナルを提供する。このような場合、伸長二本鎖及びハイブリッド形成物のT_m値の差異により、伸長二本鎖のターゲットシグナルとハイブリッド形成物の非ターゲットシグナルとを区別する。

【0160】

本明細書で使用される単一標識は、二本鎖上に存在するかあるいは一本鎖上に存在するかによって、異なるシグナルを提供することができなければならない。単一標識は、蛍光標識、発光標識、化学発光標識、電気化学的標識及び金属標識を含む。好ましくは、単一標識は、蛍光標識を含む。

【0161】

本発明で使用される単一蛍光標識の種類及び好ましい結合位置は、米国特許第7, 537, 886号及び第7, 348, 141号に開示されており、その教示事項は、本明細書に参照として取り込まれる。好ましくは、単一蛍光標識は、J O E、F A M、T A M R A、R O X及びフルオレセインベースの標識を含む。標識されるヌクレオチドの残基は、5'末端又は3'末端より、オリゴヌクレオチド内の内部ヌクレオチド残基に位置することが好ましい。

【0162】

本発明において、有用な単一蛍光標識は、上述したレポーター及びクエンチャー分子に対する説明を参照して説明できる。

【0163】

特に、固相で本発明が単一標識を利用して実施される場合、一般的な蛍光標識を利用することができ、二本鎖上に存在するかあるいは一本鎖上に存在するかによって異なる強度を有する蛍光シグナルを提供することができるような特定な蛍光標識を必要としない。固相基質で提供されるターゲットシグナルは測定される。固定化されたC T Oを有する単一標識システムの具現例は、図12で図式的に示す。

【0164】

固相基質上に固定化されたC T Oを利用する場合、化学的標識（例えば、ビオチン）又は酵素的標識（例えば、アルカリホスファターゼ、ペロキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ）を利用することができる。

【0165】

‘断片及び／又はC T Oに連結された標識’を利用する標識システムにおいて、非切断P T O及びC T O間のハイブリッド形成物が形成される場合、標識は、前記ハイブリッド形成物が工程（e）において非ターゲットシグナルを提供しない範囲内に位置する。択一的に、非切断P T O及びC T O間のハイブリッド形成物が形成される場合、標識は、前記ハイブリッド形成物が工程（e）において非ターゲットシグナルを提供する範囲内に位置することができ、前記伸長二本鎖のT m値は、非切断P T O及びC T O間のハイブリッド形成物のT m値より高い。

【0166】

特に、非切断P T O及びC T O間のハイブリッド形成物が非ターゲットシグナルを提供しない範囲内に位置する場合、前記ハイブリッド形成物のT m値を含んでいる範囲は、ターゲット核酸配列の検出のための伸長二本鎖のT m値を選択することに利用できる。

10

【0167】

（i i）伸長二本鎖内に挿入された標識

本発明は、伸長二本鎖の存在を示すターゲットシグナルを提供するために、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された標識を利用することができる。

【0168】

例えばP T O断片又はC T Oが標識を有しなくても、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された標識を利用して、成功的に伸長二本鎖を標識させる。図10及び11は、単一標識ヌクレオチドが伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された具現例を図式的に示す（参照：図10及び11のC及びD）。また、本具現例は、メルティング分析を利用する他の具現例にも適用できる。

20

【0169】

本発明の好ましい具現例によると、ターゲットシグナルは、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された単一標識により提供され、前記挿入された単一標識は、伸長反応の間に挿入されたヌクレオチドに連結されており、工程（e）における前記伸長二本鎖のメルティングは、単一標識からのシグナルの変化を誘導し、工程（e）においてターゲットシグナルを提供する。

【0170】

例示された具現例は、図10を参考して説明される。ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されたP T Oは、切断されて断片を放出する。前記断片は、固相基質上に固定化されたC T Oのキャプチャリング部位にハイブリッド形成され、単一蛍光標識で標識されたヌクレオチドの存在下で伸長され、伸長二本鎖を形成する。伸長二本鎖からの蛍光シグナルは、C T Oが固定化された固相基質のスポット上で検出できる。伸長二本鎖がメルティングされる場合、蛍光標識を有する鎖が放出され、スポット上ではそれ以上蛍光シグナルが検出されない（図10では表れない）。したがって、シグナルの変化が伸長二本鎖のメルティングによりスポット上で提供され得る。即ち、ターゲットシグナルが提供され、工程（e）において伸長二本鎖の存在を示す。

30

【0171】

工程（e）において提供されるターゲットシグナルは、C T Oー固定化スポット上で蛍光強度の変化を測定して得られるメルティングカーブ、メルティングパターン又はT m値を含む。

40

【0172】

本発明の好ましい具現例によると、図11で図式的に示しているように、伸長反応の間に挿入されたヌクレオチドは、第1非天然塩基（non-natural base）を有し、C T Oは、前記第1非天然塩基に対して特異的結合親和性のある第2非天然塩基を有する。好ましくは、第2非天然塩基を有するヌクレオチドは、C T Oのテンプレートング部位の如何なる位置にも位置する。

【0173】

本明細書で使用される用語‘非天然塩基’は、水素結合塩基対を形成できるアデニン（

50

A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン(C)及びウラシル(U)のような天然塩基の誘導体を意味する。本明細書で使用される用語‘非天然塩基’は、母化合物(mother compound)として、天然塩基と異なる塩基対パターンを有する塩基を含み、例えば、米国特許第5,432,272号、第5,965,364号、第6,001,983号及び第6,037,120号に記載されている。非天然塩基間の塩基対は、天然塩基と同様に、二つ又は三つの水素結合を含む。また、非天然塩基間の塩基対は、特定の方式でも形成される。

【0174】

非天然塩基の特定の例は、下記の塩基の塩基対の組み合わせを含む：i s o - C / i s o - G、i s o - d C / i s o - d G、K / X、H / J及びM / N（参照：米国特許第7,422,850号）。

10

【0175】

例示された具現例は、図11を参考して説明される。第1非天然塩基（例えば、i s o - d G）に対して特異的結合親和性のある第2非天然塩基（例えば、i s o - d C）を有するヌクレオチドを含むC T Oに断片がハイブリッド形成される。単一蛍光標識で標識された第1非天然塩基を有するヌクレオチドの存在下で伸長が実施され、伸長二本鎖を形成する。伸長反応において、第1非天然塩基を有するヌクレオチドは、第2非天然塩基を有するヌクレオチドの向かい側の位置に挿入される。

【0176】

伸長二本鎖から出る蛍光シグナルは、固定化されたC T Oのある固相基質のスポット上で検出できる。伸長二本鎖がメルティングされる場合、蛍光標識を有する鎖が放出され、スポット上ではそれ以上蛍光シグナルが検出されない（図11では表れない）。したがって、シグナルの差異が伸長二本鎖のメルティングによりスポット上で提供され得る。即ち、ターゲットシグナルは、工程(e)において伸長二本鎖の存在を示す。

20

【0177】

伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された標識を利用する場合、ハイブリッド形成物は伸長されないため、標識は、非切断P T O及びC T O間のハイブリッド形成物内に含まれない。したがって、ハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供しない。

【0178】

使用される単一標識の種類及び特徴は、本明細書で詳述した‘断片及び／又はC T Oに連結された標識’を利用する標識システムに対する説明を参照して説明できる。

30

【0179】

(i i i) 伸長二本鎖内に挿入された標識と断片又はC T Oに連結された標識

図4及び図5で図式的に示すように、本発明は、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された標識と断片及び／又はC T Oに連結された標識の組み合わせを利用した標識システムを利用することができる。

【0180】

本発明の好ましい具現例によると、ターゲットシグナルは、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された標識と断片及び／又はC T Oに連結された標識により提供され、挿入された標識は、伸長反応の間に挿入されたヌクレオチドに連結されており、前記二つの標識は、レポーター分子及びクエンチャー分子の相互作用的二重標識であって、前記工程(e)における伸長二本鎖のメルティングは、相互作用的二重標識からのシグナルの変化を誘導し、工程(e)におけるターゲットシグナルを提供する。

40

【0181】

より好ましくは、伸長反応の間に挿入されたヌクレオチドは、第1非天然塩基を有し、C T Oは、第1非天然塩基に対して特異的結合親和性のある第2非天然塩基を有する。

【0182】

例示された具現例は、図4を参考して説明される。レポーター分子又はクエンチャー分子及び第1非天然塩基（例えば、i s o - d G）に対して特異的結合親和性のある第2非天然塩基（例えば、i s o - d C）を有するヌクレオチドを含むC T Oに断片がハイブリ

50

ッド形成される。レポーター分子又はクエンチャー分子で標識された第1非天然塩基を有するヌクレオチドの存在下で伸長が実施され、伸長二本鎖を形成され、レポーター分子からのシグナルがクエンチャー分子によりクエンチングされる。伸長反応において、第1非天然塩基を有するヌクレオチドは、第2非天然塩基を有するヌクレオチドの向かい側の位置に挿入される。

【0183】

工程(e)において伸長二本鎖がメルティングされる場合、レポーター分子及びクエンチャー分子は、互いに離隔され、クエンチャー分子がレポーター分子からのシグナルをアンクエンチングして、これにより、ターゲットシグナルが提供され、工程(e)において伸長二本鎖の存在を示す。

【0184】

好ましくは、工程(e)において提供されるターゲットシグナルは、相互作用的二重標識からのシグナルの変化を測定して得られるメルティングカーブ、メルティングパターン又はTm値を含む。

【0185】

C T O上における標識位置及び挿入される標識の挿入位置は、メルティング工程で前記二つの標識がシグナルの変化を誘導する相互作用的二重標識として作用する範囲内で決定される。

【0186】

より好ましくは、C T Oのテンプレートング部位は、レポーター分子又はクエンチャー分子及び第2非天然塩基を有するヌクレオチドを有する。工程(d)における伸長反応は、クエンチャー又はレポーター分子及びC T Oの第2非天然塩基に対して特異的結合親和性のある第1非天然塩基を有するヌクレオチドの存在下で行われる。工程(d)の伸長二本鎖の二つの非天然塩基は、塩基対を形成しながらクエンチャー分子によりレポーター分子からのシグナルをクエンチングし、シグナルの変化を誘導し、これによりターゲットシグナルが提供される。選択的に、断片は、レポーター分子又はクエンチャー分子を有し、C T Oのテンプレートング部位は、第2非天然塩基を有するヌクレオチドを有する。工程(d)における伸長反応は、クエンチャー又はレポーター分子及びC T Oの第2非天然塩基に対して特異的結合親和性のある第1非天然塩基を有するヌクレオチドの存在下で行われる。工程(d)の伸長二本鎖の二つの非天然塩基は、塩基対を形成しながら、クエンチングによってレポーター分子からのシグナルの変化を誘導し、これによりターゲットシグナルが提供される。

【0187】

また他の例示された具現例は、図5を参考して説明される。本具現例では、レポーター又はクエンチャー分子を含む断片が、第1非天然塩基(例えば、i s o - d G)に対して特異的結合親和性のある第2非天然塩基(例えば、i s o - d C)を有するヌクレオチドを含むC T Oにハイブリッド形成される。クエンチャー又はレポーター分子で標識された第1非天然塩基を有するヌクレオチドの存在下で伸長が実施され、伸長二本鎖が形成され、レポーター分子からのシグナルがクエンチャー分子によりクエンチングされる。伸長反応において、第1非天然塩基を有するヌクレオチドは、第2非天然塩基を有するヌクレオチドの向かい側の位置に挿入される。

【0188】

工程(d)において伸長二本鎖が形成される場合、レポーター分子及びクエンチャー分子は、構造的に互いに離隔され、クエンチャー分子がレポーター分子からのシグナルをアンクエンチングし、前記工程(e)において伸長二本鎖がメルティングされる場合、レポーター分子及びクエンチャー分子は、構造的に互いに近接し、クエンチャー分子がレポーター分子からのシグナルをクエンチングし、これにより、ターゲットシグナルが提供され、工程(e)において伸長二本鎖の存在を示す。

【0189】

好ましくは、工程(e)において提供されるターゲットシグナルは、相互作用的二重標

10

20

30

40

50

識からのシグナルの変化を測定して得られるメルティングカーブ、メルティングパターン又はT_m値を含む。

【0190】

P_{TO}の標識位置及び挿入される標識の挿入位置は、メルティング工程で二つの標識がシグナルの変化を誘導する相互作用的二重標識として作用する範囲内で決定される。

【0191】

伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された標識を利用する場合、ハイブリッド形成物は伸長されないため、標識は、非切断P_{TO}及びC_{TO}間のハイブリッド形成物内に含まれない。したがって、ハイブリッド形成物は、メルティング工程で非ターゲットシグナルを提供しない。

10

【0192】

(iv) インターカレーティング標識 (Intercalating label)

本発明は、伸長二本鎖の存在を示すターゲットシグナルを提供するインターカレーティング標識を使用することができる。試料内の二本鎖核酸分子がシグナルを発生させることができるため、固定化されたC_{TO}を利用する固相反応では、インターカレーティング標識がより有用である。

【0193】

本発明で有用なインターカレーティング標識の例は、SYBRTM Green I、PO-PROTM-1、BO-PROTM-1、SYTOTM 43、SYTOTM 44、SYTOTM 45、SYTOXTM Blue、POPOTM-1、POPOTM-3、BOBOTM-1、BOBOTM-3、LO-PROTM-1、JO-PROTM-1、YO-PROTM 1、TO-PROTM 1、SYTOTM 11、SYTOTM 13、SYTOTM 15、SYTOTM 16、SYTOTM 20、SYTOTM 23、TOTOTM-3、YOYOTM 3、GelStarTM及びthiazole orangeを含む。インターカレーティング染料が二本鎖核酸分子内に特異的に入り込んでシグナルを発生させる。

20

【0194】

伸長二本鎖の塩基対間にインターカレーティング染料が入り込む具現例を、図13で図式的に示す(図13のC及びD)。また、本具現例は、メルティング分析を利用する他の具現例にも適用できる。

30

【0195】

例示された具現例は、図13を参考して説明される。固相基質上に固定されたC_{TO}のキャプチャリング部位に断片がハイブリッド形成される。インターカレーティング染料(例えば、SYBRTM Green)の存在下で伸長を実施し、インターカレーティング染料を含む伸長二本鎖を生成する。固定化されたC_{TO}がある固相基質のスポット上の伸長二本鎖から出る蛍光シグナルは、インターカレーティング蛍光染料を利用して検出できる。伸長二本鎖がメルティングされる場合、インターカレーティング蛍光染料が放出され、スポット上でそれ以上蛍光シグナルが検出されない(図13では表れない)。したがって、ターゲットシグナルが提供され、工程(e)において伸長二本鎖の存在を示す。

【0196】

40

非切断P_{TO}及びC_{TO}間のハイブリッド形成物は、メルティング工程で非ターゲットシグナルを提供する。このような場合、伸長二本鎖及びハイブリッド形成物のT_m値の差異により、伸長二本鎖のターゲットシグナルとハイブリッド形成物の非ターゲットシグナルとを区別することができる(図13では表れない)。

【0197】

好ましくは、工程(e)において提供されるターゲットシグナルは、工程(e)において発生される蛍光シグナルの変化を測定して得られるメルティングカーブ、メルティングパターン又はT_m値を含む。

【0198】

工程(f)：ターゲットシグナルの検出

50

最終的に、伸長二本鎖は、工程（e）において提供されるターゲットシグナルを測定することにより検出され、これにより、伸長二本鎖の存在は、ターゲット核酸配列の存在を示す。

【0199】

ターゲットシグナルの種類によって多様な方法により検出を実施することができる。

【0200】

好ましい具現例によると、ターゲットシグナルの検出は、メルティング分析により実施される。

【0201】

本明細書で使用される用語‘メルティング分析’は、伸長二本鎖のメルティングによって、伸長二本鎖の存在を示すターゲットシグナルを得る方法を意味し、二つの異なる温度でシグナルを測定する方法、メルティングカーブ分析、メルティングパターン分析、及びメルティングピーク分析を含む。好ましくは、メルティング分析は、メルティングカーブ分析である。

【0202】

本明細書において好ましい具現例は、工程（e）のメルティング以後にハイブリッド形成を実施し、前記伸長二本鎖の存在を示すターゲットシグナルを提供する。このような場合、伸長二本鎖の存在は、ハイブリッド形成カーブ分析により検出される。

【0203】

メルティングカーブ又はハイブリッド形成カーブは、従来の技術、例えば、米国特許第6,174,670号及び第5,789,167号、Drobyshevら、Gene 188:45(1997)；Kochinsky and Mirzabekov Human Mutation 19:343(2002)；Livehitsら、J. Biomol. Structure Dynam. 11:783(1994)；及びHowellら、Nature Biotechnology 17:87(1999)で説明するように得ることができる。例えば、メルティングカーブ又はハイブリッド形成カーブは、ハイブリッド形成厳格度(stringency)のパラメーターに対するアウトプットシグナル(output signal)変化のグラフィックプロット(graphic plot)又はディスプレイ(display)で構成できる。アウトプットシグナルは、ハイブリッド形成パラメーター対して直接的プロットिंगをすることができる。典型的に、メルティングカーブ又はハイブリッド形成カーブは、例えば、Y軸には二本鎖構造の程度（即ち、ハイブリッド形成程度）を示す蛍光が、X軸にはハイブリッド形成パラメーターがプロットिंग(plotting)されたアウトプットシグナルを有する。

【0204】

PTO及びCTOは、天然(naturally occurring) dNMPsから構成できる。択一的に、PTO及びCTOは、変形ヌクレオチド又は非天然ヌクレオチド、例えば、PNA(Peptide Nucleic Acid、参照：PCT出願第WO92/20702号)及びLNA(Locked Nucleic Acid、参照：PCT出願第WO98/22489号、第WO98/39352号及び第WO99/14226号)を含むことができる。PTO及びCTOは、デオキシイノシン、イノシン、1-(2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-3-ニトロピロール及び5-ニトロインドールのようなユニバーサル塩基を含むことができる。用語‘ユニバーサル塩基’は、天然DNA/RNA塩基のそれぞれに対して、ほとんど区別無しに塩基対を形成することができるものを意味する。

【0205】

上述のように、PTOは、PTOの5'-タギング部位の3'-末端から3'-方向に離隔された一位置で切断できる。切断位置は、PTOの3'-ターゲッティング部位の5'-末端一部に位置できる。PTO断片がPTOの3'-ターゲッティング部位の5'-末端一部を含む場合、3'-ターゲッティング部位の5'-末端一部にハイブリッド形成

10

20

30

40

50

されるCTOの位置は、ユニバーサル塩基、縮重配列 (Degenerate sequence) 又はそれらの組み合わせを含むことができる。例えば、PTOがPTOの5' - タギング部位の3' - 末端から3' - 方向に一つのヌクレオチド離隔された一位置で切断される場合、前記ヌクレオチドとのハイブリッド形成のために、CTOのキャプチャリング部位の5' - 末端一部は、ユニバーサル塩基を含むことが有利である。PTOがPTOの5' - タギング部位の3' - 末端から3' - 方向に2個のヌクレオチド離隔された一位置で切断される場合には、CTOのキャプチャリング部位の5' - 末端は、縮重配列を含み、その3' - 方向に近接ヌクレオチドは、ユニバーサル塩基を含むことが有利である。このように、3' - ターゲッティング部位の5' - 末端一部の多様な位置でPTOの切断が起こる場合、CTOにユニバーサル塩基及び縮重配列を利用することが有用である。また、上流プライマー伸長依存的な切断誘導下で、同一な5' - タギング部位を有するPTOを複数のターゲット核酸配列のスクリーニングに利用する場合、3' - ターゲッティング部位の5' - 末端一部が相異なっているPTO断片を生成することができる。このような場合、ユニバーサル塩基及び縮重配列は、CTOに有用に使用される。CTOにユニバーサル塩基及び縮重配列を利用する戦略は、複数のターゲット核酸配列のスクリーニングのために、一種のCTO又は最小限の種類のCTOを使用するようにする。

10

【0206】

本発明の好ましい具現例によると、本発明の方法は、前記工程 (a) - (b)、(a) - (d) 又は (a) - (f) を反復する工程と、その反復サイクルの間に変性過程とを追加的に含み、好ましくは、下流プライマーを共に含む。このような反復は、ターゲット核酸配列及び／又はターゲットシグナルを増幅させる。

20

【0207】

本発明の好ましい具現例によると、工程 (a) - (f) は、一つの反応容器又は個別反応容器で実施される。例えば、工程 (a) - (b)、(c) - (d) 又は (e) - (f) を個別反応容器で実施することができる。

【0208】

本発明の好ましい具現例によると、工程 (a) - (b) 及び (c) - (f) は、反応条件 (特に、温度) によって、一つの反応容器でも同時的又は個別的に進行することができる。

【0209】

本発明では、検出及び／又は増幅しようとするターゲット核酸配列が、あらゆるDNA (gDNA及びcDNA) 及びRNA分子を含め、ある特定配列又は長さを有することを要求しない。

30

【0210】

mRNAを初期物質として利用する場合、アニーリング工程の実施以前に逆転写工程が必須的であり、その詳細な内容は、Joseph Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001); 及びNoonan, K. F. ら、Nucleic Acids Res. 16:10366 (1988) に開示されている。逆転写反応のためには、ランダムヘキサマー又はmRNAにハイブリッド形成されるオリゴヌクレオチドdTプライマーが利用できる。

40

【0211】

本発明で検出及び／又は増幅可能なターゲット核酸配列は、あらゆる天然 (Naturally occurring) の原核細胞核酸、真核細胞 (例えば、原生動物と寄生物、菌類、酵母、高等植物、下等動物、及び哺乳動物と人間を含む高等動物) 核酸、ウイルス (例えば、ヘルペスウイルス、HIV、インフルエンザウイルス、Epstein-Barrウイルス、肝炎ウイルス、ポリオウイルスなど) 核酸、又はウイロイド核酸を含む。

【0212】

50

また、本発明は、ヌクレオチド変異の検出に有用である。好ましくは、ターゲット核酸配列は、ヌクレオチド変異を含む。本明細書で使用される用語「ヌクレオチド変異 (nucleotide variation)」は、連続的DNA断片又は配列の類似したDNA断片において、特定位置のDNA配列における全ての単一又は複数のヌクレオチド置換、欠失又は挿入を意味する。このような連続的DNA断片は、一つの遺伝子又は一つの染色体のある他の部位を含む。このようなヌクレオチド変異は、突然変異 (mutant) 又は多形性対立遺伝子変異 (Polymorphic allele variations) でありえる。例えば、本発明で検出されるヌクレオチド変異は、SNP (Single Nucleotide Polymorphism)、突然変異、欠失、挿入、置換及び転座を含む。ヌクレオチド変異の例は、ヒトゲノムにある多様な変異 (例えば、MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase) 遺伝子の変異)、病原体の薬剤耐性に係わる変異及び癌発生関連変異を含む。

10

【0213】

ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異を検出する本発明において、使用されるプライマー又はプローブがターゲット核酸配列の前記ヌクレオチド変異に対して相補的な配列を有する場合、前記ヌクレオチド変異を含むターゲット核酸配列は、本明細書でマッチング鋳型 (matching template) と記載される。使用されるプライマー又はプローブがターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に対して非相補的な配列を有する場合、前記ヌクレオチド変異を含むターゲット核酸配列は、本明細書でミスマッチング鋳型 (mismatching template) と記載される。

20

【0214】

ヌクレオチド変異の検出のために、上流プライマーの3'末端は、ターゲット核酸配列におけるヌクレオチド変異位置の向かい側に位置するようにデザインすることができる。本発明の好ましい具現例によると、上流プライマーの3'末端は、ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に対して相補的な配列を有する。ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に対して相補的な配列を有する上流プライマーの3'末端は、マッチング鋳型にアニーリングされて伸長され、PTO切断を誘導する。結果物として、PTO断片は、CTOにハイブリッド形成されてターゲットシグナルを提供する。逆に、上流プライマーの3'末端がミスマッチング鋳型でヌクレオチド変異にミスマッチされる場合、上流プライマーがミスマッチング鋳型にハイブリッド形成されるとしても、伸長反応のためにプライマーの3'末端のアニーリングが必須的な条件下では伸長されず、これにより、ターゲットシグナルが発生しない。

30

【0215】

択一的に、ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に対して相補的な配列を有するPTOのハイブリッド形成に依存的なPTO切断を利用することができる。例えば、調節された条件下で、ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に対して相補的な配列を有するPTOは、マッチング鋳型にハイブリッド形成された後、切断される。結果物として、PTO断片は、CTOにハイブリッド形成されてターゲットシグナルを提供する。その反面、調節された条件下で、PTOは、ヌクレオチド変異位置に非相補的な配列を有するミスマッチング鋳型にハイブリッド形成されず、切断されない。このような場合、好ましくは、PTOのヌクレオチド変異に対する相補的な配列は、PTOの3'ターゲッティング部位の中間に位置する。

40

【0216】

択一的に、ヌクレオチド変異の検出のために、PTOの3'ターゲッティング部位の5'末端一部がターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に位置し、PTOの3'ターゲッティング部位の5'末端一部は、ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に対して相補的な配列を有することが好ましい。

【0217】

単一ヌクレオチド変異の検出のための具現例において、PTOの3'ターゲッティング部位の5'末端は、ターゲット核酸配列の単一ヌクレオチド変異に対して相補的な配

50

列を有する。上述のように、マッチング鋳型にハイブリッド形成されたP T Oの切断は、例えば、上流プライマー伸長依存的な切断誘導下で、P T Oの3' -ターゲッティング部位の5' -末端に対して3' -方向にすぐに近接（Immediately adjacent）した一位置で誘導できる。P T O断片の3' -末端は、単一ヌクレオチド変異に対して相補的なヌクレオチドを有する。P T O断片は、ヌクレオチド変異に対応する配列を含むキャプチャリング部位を有するC T Oにハイブリッド形成された後、伸長されて伸長二本鎖を形成し、ターゲットシグナルを提供する。同一なP T Oが、単一ヌクレオチド変異を除いてはマッチング鋳型に対して同一な配列を有するミスマッチング鋳型にハイブリッド形成される場合には、P T Oの3' -ターゲッティング部位の5' -末端から3' -方向に2個のヌクレオチドだけ離隔された位置でP T Oの切断が発生され得る。P T O断片の3' -末端は、単一ヌクレオチド変異に相補的なヌクレオチド以外に、追加的に切断されるヌクレオチドを有する。追加的に切断されるヌクレオチドにハイブリッド形成されるC T Oの位置が、前記追加的に切断されるヌクレオチドに対して非相補的な配列を有するようにデザインされた場合、P T O断片の3' -末端は、C T Oにハイブリッド形成されず、調節された条件でP T O断片が伸長されない。例え、P T O断片が伸長されて伸長二本鎖を形成しても、前記二本鎖は、P T O及びミスマッチング鋳型間のハイブリッド形成による二本鎖とは異なるT m値を有する。

10

【0218】

本発明の好ましい具現例によると、P T Oの3' -ターゲッティング部位の5' -末端一部にヌクレオチド変異に対して相補的な配列を有するP T Oの切断位置は、マッチング鋳型又はミスマッチング鋳型とのハイブリッド形成に依存的に変わり、これにより、前記二つのハイブリッド形成イベントから放出されるP T O断片は、異なる配列を有し、好ましくは、その3' -末端一部、より好ましくは、その3' -末端で異なる配列を有する。

20

【0219】

本発明の好ましい具現例によると、P T O断片の3' -末端一部の差異を考慮したC T Oのヌクレオチド配列の選択により、マッチング鋳型とミスマッチング鋳型とを区別することができる。

【0220】

本発明の好ましい具現例によると、本発明に利用されるターゲット核酸配列は、前増幅された核酸配列である。前増幅された核酸配列の利用は、本発明のターゲット検出の感度及び特異度を非常に高く増加させる。

30

【0221】

本発明の好ましい具現例によると、前記方法は、下流プライマーの存在下で実施される。

【0222】

少なくとも2種のターゲット核酸配列が同時に検出（マルチプレックス）されるという点で本発明の利点がさらに強調される。

【0223】

本発明の好ましい具現例によると、前記方法は、少なくとも2種（より好ましくは、少なくとも3種、さらに好ましくは、少なくとも5種）のターゲット核酸配列を検出するために実施される。

40

【0224】

本発明の好ましい具現例によると、前記方法は、少なくとも2種（より好ましくは、少なくとも3種、さらに好ましくは、少なくとも5種）のターゲット核酸配列を検出するために実施され、前記上流オリゴヌクレオチドは、少なくとも2種（より好ましくは、少なくとも3種、さらに好ましくは、少なくとも5種）のオリゴヌクレオチドを含み、P T Oは、少なくとも2種（より好ましくは、少なくとも3種、さらに好ましくは、少なくとも5種）のP T Oを含み、C T Oは、少なくとも1種（より好ましくは、少なくとも2種、さらに好ましくは、少なくとも3種、最も好ましくは、少なくとも5種）のC T Oを含み、前記少なくとも2種のターゲット核酸配列が存在する場合、前記方法は、少なくとも2

50

種のターゲット核酸配列に対応する少なくとも2種のターゲットシグナルを提供する。

【0225】

少なくとも2個のPTOの5'ータギング部位は、互いに同一な配列を有することができる。例えば、本発明がターゲット核酸配列のスクリーニングに実施される場合、PTOの5'ータギング部位は、同一な配列を有することができる。

【0226】

さらに、1種類のCTOを多数のターゲット核酸配列の検出に利用することができる。例えば、5'ータギング部位に同一な配列を有するPTOをターゲット核酸配列のスクリーニングに利用する場合、1種類のCTOを利用することができる。

【0227】

本発明の好ましい具現例によると、少なくとも2種のターゲット核酸配列に対応する伸長二本鎖は、互いに異なるTm値を有する。

【0228】

本発明の好ましい具現例によると、少なくとも2種のターゲット核酸配列に対応する少なくとも2種のターゲットシグナルは、互いに異なる種類の標識から提供される。

【0229】

本発明の好ましい具現例によると、少なくとも2種のターゲット核酸配列に対応する少なくとも2種のターゲットシグナルは、互いに同一な種類の標識から提供される。

【0230】

本発明の好ましい具現例によると、少なくとも2種のターゲット核酸配列に対応する少なくとも2種のターゲットシグナルは、互いに同一な種類の標識から提供され、少なくとも2種のターゲット核酸配列に対応する前記伸長二本鎖は、互いに異なるTm値を有する。

【0231】

本明細書で使用される用語「異なる種類の標識」は、検出可能なシグナルが異なる特徴を有する標識を意味する。例えば、蛍光レポーター標識としてのFAM及びTAMRA、異なる種類の標識として考えられるが、これは、これらの励起(excitation)及び放出波長が互いに相異なっているからである。

【0232】

メルティングカーブ分析により、少なくとも2種のターゲット核酸配列を同時に検出するために本発明を実施し、少なくとも2種のターゲット核酸配列に対応する伸長二本鎖が互いに異なるTm値を有する場合、1種類の標識(例えば、FAM)を利用するとしても、少なくとも2種のターゲット核酸配列を検出することができる。

【0233】

固相に固定化されたCTOを利用したターゲット検出

本発明の顕著な利点は、マイクロアレイのような固相でもターゲット核酸配列の検出が効果的であるということである。

【0234】

本発明の好ましい具現例によると、本発明は、固相で実施され、CTOは、その5'末端又は3'末端を介して固相基質上に固定化される。固相では、固相基質上で提供されるターゲットシグナルを測定する。

【0235】

固定化されたCTOを利用する場合、上述した標識システムを利用したメルティング分析は、本発明の固相反応に適用できる。

【0236】

本発明の好ましい具現例によると、ターゲットシグナルは、断片に連結された単一標識、又は前記伸長反応の間に前記伸長二本鎖内に挿入された単一標識により提供される。特に、固相で本発明が単一標識を利用して行われる場合、一般的な蛍光標識を利用することができ、二本鎖上に存在するかあるいは一本鎖上に存在するかによって異なる強度を有する蛍光シグナルを提供することができる特定の蛍光標識を必要としない。

10

20

30

40

50

【0237】

固相基質上に固定化されたCTOを利用する場合、化学的標識（例えば、ビオチン）又は酵素的標識（例えば、アルカリホスファターゼ、ペロキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ）を利用することができる。

【0238】

固相反応のために、CTOは、その5'-末端又は3'-末端（好ましくは、3'-末端）を介して固相基質の表面に直接的又は間接的に（好ましくは、間接的に）固定化される。また、CTOは、共有又は非共有結合方式で固相基質表面に固定化できる。固定化されたCTOが固相基質表面に間接的に固定化される場合、適したリンカーを利用する。本発明で有用なリンカーは、固相基質表面上のプロープ固定化に利用されるリンカーなら如何なるものでもよい。例えば、アミン基を有するアルキル又はアリール化合物、又はチオール基を有するアルキル又はアリール化合物がリンカーとしてCTO固定化に利用できる。また、ポリ（T）テイル又はポリ（A）テイルがリンカーとして使用できる。

10

【0239】

本発明の好ましい具現例によると、本発明で利用される固相基質は、マイクロアレイである。本発明の反応環境を提供するマイクロアレイは、当業界に知られた如何なるものでもよい。本発明の全ての過程、即ち、ターゲット核酸配列とのハイブリッド形成、切断、伸長、メルティング及び蛍光検出は、マイクロアレイ上で実施される。マイクロアレイ上に固定化されたCTOは、ハイブリッド形成アレイ要素（Hybridizable array element）として利用される。マイクロアレイを製作するための固相基質（Solid substrate）は、金属（例えば、金、金と銅の合金、アルミニウム）、金属オキシド、ガラス、セラミック、石英、シリコン、半導体、Si/SiO₂ウェハー、ゲルマニウム、ガリウムアルセニド、カーボン、炭素ナノチューブ、ポリマー（例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン及びポリアクリルアミド）、セファロース、アガロース及びコロイドを含むが、これらに限定されるものではない。本発明の複数の固定化されたCTOは、固相基質上の一つのアドレスابل（addressable）部位又は複数のアドレスابل部位に固定化され、固相基質は、2〜1,000,000個のアドレスابل部位を含むことができる。フォトリソグラフィ、インクジェット、機械的マイクロスポッティング及びその類似方法のような従来製作技術により、アレイ又は特定応用のためのアレイを生産するために、固定化されたCTOが組み立てられる。

20

30

【0240】

固相で実施する本発明は、固定化されたCTO上の標識は物理的に離隔されているため、一種類の標識を利用するとしても、多数のターゲット核酸配列を同時的に検出することができる。したがって、固相において、本発明により検出可能なターゲット核酸配列の数は制限されない。

【0241】

II. ターゲット核酸配列の増幅を利用した好ましい具現例

好ましくは、本発明は、ターゲット核酸配列を合成できる上流プライマー及び下流を含む一対のプライマーを利用し、ターゲット核酸配列の増幅を利用して同時的に実施される。

40

【0242】

本発明のまた他の様態によると、本発明は、

（a）ターゲット核酸配列を、上流プライマー及び下流プライマーを含む一対のプライマー及びPTO（プロービング及びタギングオリゴヌクレオチド、Probing and Tagging Oligonucleotide）とハイブリッド形成させる工程であって、前記上流プライマー及び前記下流プライマーのそれぞれは、前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を含み、前記PTOは、（i）前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を含む3'-ターゲッティング部位、及び（ii）前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含

50

む5' - タギング部位を含み、前記3' - ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリッド形成され、前記5' - タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されず、前記PTOは、前記上流プライマーと前記下流プライマーとの間に位置し、前記PTOは、その3' - 末端がブロックングされて伸長が防止される工程と、

(b) 前記プライマーの伸長及び前記PTOの切断のための条件下で、5' スクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼに工程(a)の結果物を接触させる工程であって、前記PTOが前記ターゲット核酸配列にハイブリッド形成される場合、前記上流プライマーは伸長され、前記伸長鎖は、前記5' スクレアーゼ活性を有する鋳型依存的核酸ポリメラーゼによる前記PTOの切断を誘導し、このような前記切断は、前記PTOの5' - タギング部位又は前記5' - タギング部位の一部を含む断片を放出する工程と、

(c) 前記PTOから放出された前記断片とCTO (キャプチャリング及びテンプレーティングオリゴヌクレオチド、Capturing and Templating Oligonucleotide) をハイブリッド形成させる工程であって、前記CTOは、3' → 5' 方向に (i) 前記PTOの前記5' - タギング部位又は前記5' - タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位及び (ii) 前記5' - タギング部位及び前記3' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレーティング部位を含み、前記PTOから放出された前記断片は、前記CTOの前記キャプチャリング部位にハイブリッド形成される工程と、

(d) 前記工程(c)の結果物及び鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用して伸長反応を行う工程であって、前記CTOの前記キャプチャリング部位にハイブリッド形成された前記断片は、伸長されて伸長二本鎖を形成し、前記伸長二本鎖は、(i) 前記断片の配列及び／又は長さ、(ii) 前記CTOの配列及び／又は長さ又は(iii) 前記断片の前記配列及び／又は長さ前記CTOの前記配列及び／又は長さにより調節可能なTm値を有する工程と、

(e) 一定範囲の温度で前記伸長二本鎖をメルティング(melting)し、前記伸長二本鎖の存在を示すターゲットシグナルを提供する工程であって、前記ターゲットシグナルは、(i) 前記断片及び／又は前記CTOに連結された少なくとも一つの標識、(ii) 前記伸長反応の間に前記伸長二本鎖内に挿入された標識、(iii) 前記伸長反応の間に前記伸長二本鎖内に挿入された標識と前記断片及び／又は前記CTOに連結された標識又は(iv) インターカレーティング標識(Intercalating Label)により提供される工程と、

(f) 前記ターゲットシグナルを測定することにより、前記伸長二本鎖を検出する工程であって、前記伸長二本鎖の存在は、前記ターゲット核酸配列の存在を示す工程と、を含む、PTOCE (PTO切断及び伸長) アッセイによりDNA又は核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法を提供する。

【0243】

本発明の好ましい具現例は、上述の本発明の工程を実施するため、その重複する内容は、本明細書の過度なる複雑性を避けるために、その記載を省く。

【0244】

本発明の好ましい具現例によると、前記方法は、前記工程(a) - (b)、(a) - (d) 又は(a) - (f)を反復する工程と、その反復サイクルの間に変性過程とをさらに含む。反応反復は、ターゲット核酸配列の増幅を伴う。好ましくは、前記増幅は、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号及び第4,800,159号に開示されたPCR (polymerase chain reaction) によって実施する。

【0245】

本発明の好ましい具現例によると、前記方法は、少なくとも2種のターゲット核酸配列を検出するために行われる。

【0246】

本発明の好ましい具現例によると、少なくとも2種のターゲット核酸配列に対応する少なくとも2種のターゲットシグナルは、同一な種類の標識から提供され、少なくとも2種のターゲット核酸配列に対応する前記伸長二本鎖は、互いに異なる T_m 値を有する。

【0247】

III. 指定温度における検出過程を含むPTOCによるターゲット検出方法

本発明は、伸長二本鎖の形成と関連して発生するターゲットシグナルを利用するために変形させることができる。

【0248】

本発明のまた他の様態によると、本発明は、

(a) ターゲット核酸配列を上流オリゴヌクレオチド及びPTO（プロービング及びタギングオリゴヌクレオチド、Probing and Tagging Oligonucleotide）とハイブリッド形成させる工程であって、前記上流オリゴヌクレオチドは、前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を含み、前記PTOは、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を含む3'-ターゲッティング部位及び(ii) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む5'-タギング部位を含み、前記3'-ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリッド形成され、前記5'-タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されず、前記上流オリゴヌクレオチドは、前記PTOの上流に位置する工程と、

(b) 前記PTOの切断のための条件下で、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素に前記工程(a)の結果物を接触させる工程であって、前記上流オリゴヌクレオチド又はその伸長鎖は、前記5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記PTOの切断を誘導して、このような前記切断は、前記PTOの5'-タギング部位又は5'-タギング部位の一部を含む断片を放出する工程と、

(c) 前記PTOから放出された前記断片とCTO（キャプチャリング及びテンプレティングオリゴヌクレオチド、Capturing and Templating Oligonucleotide）をハイブリッド形成させる工程であって、前記CTOは、3'→5'方向に(i) 前記PTOの前記5'-タギング部位又は前記5'-タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位及び(ii) 前記PTOの前記5'-タギング部位及び前記3'-ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレティング部位を含み、前記PTOから放出された前記断片は、前記CTOのキャプチャリング部位にハイブリッド形成される工程と、

(d) 工程(c)の結果物及び鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用して伸長反応を行う工程であって、前記CTOの前記キャプチャリング部位にハイブリッド形成された前記断片は、伸長されて伸長二本鎖を形成し、前記伸長二本鎖は、(i) 前記断片の配列及び／又は長さ、(ii) 前記CTOの配列及び／又は長さ又は(iii) 前記断片の前記配列及び／又は長さと同前記CTOの前記配列及び／又は長さにより調節可能な T_m 値を有し、前記伸長二本鎖は、(i) 前記断片及び／又はCTOに連結された少なくとも一つの標識、

(ii) 前記伸長反応の間に前記伸長二本鎖内に挿入された標識、(iii) 前記断片及び／又は前記CTOに連結された少なくとも一つの標識と前記伸長反応の間に前記伸長二本鎖内に挿入された標識又は(iv) インターカレーティング標識(Intercalating Label)によりターゲットシグナルを提供する工程と、

(e) 前記伸長二本鎖がその二本鎖形態を維持する指定の温度で前記ターゲットシグナルを測定することにより、前記伸長二本鎖を検出する工程であって、これにより、前記伸長二本鎖の存在は、前記ターゲット核酸配列の存在を示す工程と、

を含む、PTOC（PTO切断及び伸長）アッセイによりDNA又は核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法を提供する。

【0249】

本発明の好ましい具現例は、メルティング工程を除いては上述の本発明の工程を実施するため、その重複する内容は、本明細書の過度なる複雑性を避けるために、その記載を省

10

20

30

40

50

く。

【0250】

ターゲットシグナルは、伸長二本鎖のメルティングで提供されるシグナルの変化を測定して提供されるため、上述のメルティング分析を利用する本発明は、少なくとも二つの異なる温度で標識から出るシグナルの検出を必要とする。

【0251】

ありそうもないことに、本発明の本様態において、伸長二本鎖自体が、伸長二本鎖が形成された場合と形成されなかった場合とを区別可能なシグナルを提供して、前記シグナルは、伸長二本鎖が二本鎖形態を維持する指定温度で検出され、これにより、ターゲット核酸配列の存在が決定される。

10

【0252】

本発明は、ターゲット核酸配列の存在を検出するために、伸長二本鎖の形成に係わるターゲットシグナルを測定するものである。

【0253】

本発明において、伸長二本鎖は、標識を有し、これにより、伸長二本鎖は、ターゲットシグナルを提供する。

【0254】

好ましくは、ターゲットシグナルは、指定温度で伸長二本鎖の標識から出るシグナル（シグナル発生又はシグナル消滅）を含む。

【0255】

20

本発明の標識は、上述したメルティング分析を利用した方法と同一な方式で実施することができる。図2～13において、指定温度における検出を少し変形した本発明の一樣態を説明することができる。

【0256】

伸長二本鎖から出るターゲットシグナルを基本とした作動原理は、下記の通りである：(i) 断片の伸長は、標識からのシグナルの変化を誘導し、ターゲットシグナルを提供し、又は(ii) 断片及びCTOのハイブリッド形成は、標識からのシグナルの変化を誘導し、ターゲットシグナルを提供し、前記伸長二本鎖は、ターゲットシグナルを維持する。

【0257】

作動原理(i)の具現例は、図9を参照して説明できる。固定化されたCTOを利用する場合、本発明は、より効果的な方式で多数のターゲット核酸配列を検出する。固定化されたCTOのテンプレート部位は、レポーター分子及びクエンチャー分子を有する。レポーター分子及びクエンチャー分子は、立体構造的に互いに近接して、クエンチャー分子がレポーター分子からのシグナルをクエンチングする。断片がCTOのキャプチャリング部位にハイブリッド形成される場合、クエンチャー分子は、レポーター分子からのシグナルをクエンチングする。前記伸長二本鎖の形成により、レポーター分子及びクエンチャー分子は、立体構造的に互いに離隔するようになり、クエンチャー分子は、レポーター分子からのシグナルをアンクエンチングする。ターゲットシグナルは、伸長工程で提供される(図9のC及びD)。

30

【0258】

40

図9において、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物(hybrid)は、伸長二本鎖を形成しない。したがって、クエンチャー分子は、依然としてレポーター分子からのシグナルをクエンチングするようになる。ハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供しない。

【0259】

作動原理(ii)の具現例は、図6を参照して説明できる。図6は、メルティング分析を利用した方法だけではなく、本発明の様態も示す。PTOの5'-タギング部位は、レポーター分子及びクエンチャー分子を有する。レポーター分子及びクエンチャー分子は、構造的に互いに近接し、クエンチャー分子がレポーター分子からのシグナルをクエンチングする。ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されたPTOは切断され、レポーター分

50

子及びクエンチャー分子を有する5'ータギング部位を含む断片を放出して、前記断片は、C T Oのキャプチャリング部位にハイブリッド形成される。前記ハイブリッド形成により、レポーター分子及びクエンチャー分子は、構造的に互いに離隔するようになり、クエンチャー分子は、レポーター分子からのシグナルをアンクエンチングする。ターゲットシグナルは、断片ハイブリッド形成工程で提供され、伸長二本鎖は、ターゲットシグナルを維持する(図6のC及びD)。

【0260】

図6において、非切断P T O及びC T O間のハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供し(図6のC及びD)、非ターゲットシグナルを除去するために、ハイブリッド形成物を解離させることを必要とする。したがって、ターゲットシグナルを測定する温度は、ハイブリッド形成物が解離されるように決定される。本発明の好ましい具現例によると、前記温度は、ハイブリッド形成物のT_m値を考慮して追加的に決定される。

10

【0261】

本発明の好ましい具現例によると、ハイブリッド形成物が部分的に解離される温度で伸長二本鎖は検出され得る。

【0262】

指定温度は、ハイブリッド形成物のT_m値から10℃引いた温度より高く、好ましくは、ハイブリッド形成物のT_m値から5℃引いた温度より高く、より好ましくは、ハイブリッド形成物のT_m値より高い温度であり、さらに好ましくは、ハイブリッド形成物のT_m値に5℃足した温度より高い。

20

【0263】

本発明の好ましい具現例によると、伸長二本鎖により提供されるターゲットシグナルは、工程(d)の伸長の間に提供され、図2～4及び9～11に示されたように、前記非切断P T O及びC T O間のハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供しない。

【0264】

本発明の好ましい具現例によると、伸長二本鎖により提供されるターゲットシグナルは、工程(c)における断片及びC T Oのハイブリッド形成により提供され、工程(d)における前記伸長二本鎖の形成は、ターゲットシグナルを維持し、非切断P T O及びC T O間の前記ハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供し、図5～8及び12～13に示されたように、前記指定温度は、ハイブリッド形成物のT_m値より高い。

30

【0265】

非切断P T O及びC T O間のハイブリッド形成物が非ターゲットシグナルを提供する場合(図6のパネルD)、非ターゲットシグナルを除去するために、ハイブリッド形成物を解離させることを必要とする。したがって、ターゲットシグナルを測定する温度は、ハイブリッド形成物が解離されるように決定される。

【0266】

本発明に有用な標識システムは、以下のように説明できる。

【0267】

(i) 断片及び／又はC T Oに連結された標識

(i-1) 相互作用的二重標識

40

相互作用的二重標識システムの具現例において、C T Oは、レポーター分子及びクエンチャー分子を含む相互作用的二重標識を有し、工程(d)における前記断片の伸長は、相互作用的二重標識からのシグナルの変化を誘導し、ターゲットシグナルを提供する。相互作用的二重標識システムの具現例1は、図2で図式的に示す。ターゲットシグナルは、伸長同期化(extension-synchronized)シグナル発生により提供される。

【0268】

本発明の好ましい具現例によると、レポーター分子及びクエンチャー分子は、C T Oのテンプレティング部位に位置することができる。

【0269】

50

本発明の好ましい具現例によると、C T Oのレポーター分子及びクエンチャー分子の一つは、その5' -末端又はその5' -末端から1～5ヌクレオチド離隔された位置にあり、他の一つは、C T Oの形態によって、レポーター分子からのシグナルをクエンチング又はアノクエンチングする位置に位置する。

【0270】

相互作用的二重標識システムの具現例において、C T Oは、レポーター分子及びクエンチャー分子を含む相互作用的二重標識を有し、工程(c)における断片及びC T Oのハイブリッド形成は、相互作用的二重標識からのシグナルの変化を誘導してターゲットシグナルを提供し、前記伸長二本鎖は、ターゲットシグナルを維持する。

【0271】

本発明の好ましい具現例によると、レポーター分子及びクエンチャー分子は、C T Oのキャプチャリング部位に位置することができる。

【0272】

本発明の好ましい具現例によると、C T Oのレポーター分子及びクエンチャー分子の一つは、その3' -末端又はその3' -末端から1～5ヌクレオチド離隔された位置にあり、他の一つは、C T Oの形態によって、レポーター分子からのシグナルをクエンチング又はアノクエンチングする位置に位置する。

【0273】

本具現例において、非切断P T O及びC T O間のハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供し、前記ターゲットシグナルを測定する温度は、ハイブリッド形成物のT_m値を考慮して決定される。

【0274】

相互作用的二重標識システムの具現例において、断片は、レポーター分子及びクエンチャー分子を含む相互作用的二重標識を有して、工程(c)における前記断片及びC T Oのハイブリッド形成は、相互作用的二重標識からのシグナルの変化を誘導してターゲットシグナルを提供し、前記伸長二本鎖は、ターゲットシグナルを維持する。相互作用的二重標識システムの具現例1は、図6で図式的に示す。

【0275】

本発明の好ましい具現例によると、断片のレポーター分子及びクエンチャー分子の一つは、その5' -末端又はその5' -末端から1～5ヌクレオチド離隔された位置にあり、他の一つは、断片の形態によって、レポーター分子からのシグナルをクエンチングする位置に位置する。

【0276】

本具現例において、非切断P T O及びC T O間のハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供し、前記ターゲットシグナルを測定する温度は、ハイブリッド形成物のT_m値を考慮して決定される。

【0277】

相互作用的二重標識システムの具現例において、前記断片は、レポーター分子及びクエンチャー分子を含む相互作用的二重標識の一つを有し、C T Oは、前記相互作用的二重標識の他の一つを有し、工程(c)における前記断片及びC T Oのハイブリッド形成は、相互作用的二重標識からのシグナルの変化を誘導してターゲットシグナルを提供し、前記伸長二本鎖は、ターゲットシグナルを維持する。相互作用的二重標識システムの具現例は、図8で図式的に示す。

【0278】

レポーター分子からのシグナルがクエンチャー分子によりクエンチングされる限り、レポーター分子及びクエンチャー分子は、P T O断片及びC T Oの如何なる位置にも位置できる。

【0279】

本発明の好ましい具現例によると、好ましくは、P T Oのレポーター分子又はクエンチャー分子は、P T Oの5' -末端に位置する。

10

20

30

40

50

【0280】

本発明の好ましい具現例によると、好ましくは、CTOのレポーター分子又はクエンチャー分子は、CTOの5'末端に位置する。

【0281】

本具現例において、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供し、前記ターゲットシグナルを測定する温度は、ハイブリッド形成物のT_m値を考慮して決定される。

【0282】

(i-2) 単一標識

単一標識システムの具現例において、CTOは、単一標識を有して、工程(d)における断片の伸長は、単一標識からのシグナルの変化を誘導し、ターゲットシグナルを提供する。単一標識システムの具現例は、図3で図式的に示す。ターゲットシグナルは、伸長同期化(extension-synchronized)シグナル発生により提供される。

10

【0283】

本発明の好ましい具現例によると、CTOのテンプレティング部位は、単一標識で標識される。

【0284】

単一標識システムの具現例において、CTOは、単一標識を有し、工程(c)における断片及びCTOのハイブリッド形成は、相互作用的二重標識からのシグナルの変化を誘導してターゲットシグナルを提供し、前記伸長二本鎖は、ターゲットシグナルを維持する。

20

【0285】

本発明の好ましい具現例によると、CTOのキャプチャリング部位は、単一標識で標識される。

【0286】

本具現例において、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供し、前記ターゲットシグナルを測定する温度は、ハイブリッド形成物のT_m値を考慮して決定される。

【0287】

単一標識システムの具現例において、断片は、単一標識を有し、工程(c)における断片及びCTOのハイブリッド形成は、相互作用的二重標識からのシグナルの変化を誘導してターゲットシグナルを提供し、前記伸長二本鎖は、ターゲットシグナルを維持する。単一標識システムの具現例は、図12で図式的に示す。

30

【0288】

本具現例において、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供し、前記ターゲットシグナルを測定する温度は、ハイブリッド形成物のT_m値を考慮して決定される。

【0289】

本明細書で使用される単一標識は、二本鎖上に存在するかあるいは一本鎖上に存在するかによって異なるシグナルを提供することができなければならない。単一標識は、蛍光標識、発光標識、化学発光標識、電気化学的標識及び金属標識を含む。好ましくは、単一標識は、蛍光標識を含む。本発明で使用される単一蛍光標識の種類及び好ましい結合位置は、米国特許第7,537,886号及び第7,348,141号に開示されており、これは、本明細書に参照として取り込まれる。好ましくは、単一蛍光標識は、JOE、FAM、TAMRA、ROX及びフルオレセインベースの標識を含む。標識されるヌクレオチドの残基は、5'末端又は3'末端より、オリゴヌクレオチド内の内部ヌクレオチド残基に位置することが好ましい。

40

【0290】

本発明において、有用な単一蛍光標識は、上述したレポーター及びクエンチャー分子に対する説明を参照して説明できる。

50

【0291】

特に、固相で本発明が単一標識を利用して実施される場合、一般的な蛍光標識を利用することができ、二本鎖上に存在するかあるいは一本鎖上に存在するかによって異なる強度を有する蛍光シグナルを提供できる特定の蛍光標識を必要としない。

【0292】

固相基質上に固定化されたCTOを利用する場合、化学的標識（例えば、ビオチン）又は酵素的標識（例えば、アルカリホスファターゼ、ペロキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ）を利用することができる。

【0293】

本発明の好ましい具現例によると、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物が形成される場合、図2～3及び9で示すように、前記ハイブリッド形成物が工程（d）において非ターゲットシグナルを提供しない範囲内に断片及び／又はCTOに連結された標識が位置する。

10

【0294】

選択的に、図6～8及び12から分かるように、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物が形成される場合、前記ハイブリッド形成物が工程（d）において非ターゲットシグナルを提供する範囲内に標識が位置することができ、前記伸長二本鎖のT_m値は、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物より高い。

【0295】

（i i）伸長二本鎖内に挿入された標識

20

特に、本発明が固定化されたCTOを利用して固相で実施される場合、図10及び11で図式的に示すように、本標識システムは、ターゲットシグナルを提供するのにより有用である。

【0296】

本発明の好ましい具現例によると、ターゲットシグナルは、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された単一標識により提供され、挿入された単一標識は、伸長反応の間に挿入されたヌクレオチドに連結されており、工程（d）における断片の伸長は、単一標識からのシグナルの変化を誘導し、工程（d）におけるターゲットシグナルを提供する。

【0297】

本発明の好ましい具現例によると、図11で図式的に示すように、伸長反応の間に挿入されたヌクレオチドは、第1非天然塩基を有し、CTOは、第1非天然塩基に対して特異的結合親和性のある第2非天然塩基を有するヌクレオチドを有する。好ましくは、第2非天然塩基を有するヌクレオチドは、CTOのテンプレティング部位の如何なる位置にも位置できる。

30

【0298】

伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された標識を利用する場合、ハイブリッド形成物は伸長されないため、標識は非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物内に含まれない。したがって、ハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供しない。

【0299】

（i i i）伸長二本鎖内に挿入された標識と断片又はCTOに連結された標識

40

図4及び5で図式的に示すように、本発明は、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された標識と断片及び／又はCTOに連結された標識の組み合わせを利用した標識システムを利用することができる。

【0300】

本発明の好ましい具現例によると、ターゲットシグナルは、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された標識と断片及び／又はCTOに連結された標識により提供され、前記挿入された標識は、伸長反応の間に挿入されたヌクレオチドに連結されており、前記二つの標識は、レポーター分子及びクエンチャー分子の相互作用的二重標識であり、工程（d）における断片の伸長は、相互作用的二重標識からのシグナルの変化を誘導し、ターゲットシグナルを提供する。

50

【0301】

より好ましくは、伸長反応の間に挿入されたヌクレオチドは、第1非天然塩基を有し、CTOは、第1非天然塩基に対して特異的結合親和性のある第2非天然塩基を有するヌクレオチドを有する。

【0302】

好ましくは、工程(e)において提供されるターゲットシグナルは、工程(d)の相互作用的二重標識からのシグナルである。

【0303】

伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された標識を利用する場合、ハイブリッド形成物は伸長されないため、標識は非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物内に含まれない。したがって、ハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供しない。

10

【0304】

(iv) インターカレーティング標識 (Intercalating label)

本発明は、伸長二本鎖の存在を示すターゲットシグナルを提供するインターカレーティング標識を使用することができる。試料内二本鎖核酸分子がシグナルを発生させることができるため、固定化されたCTOを利用する固相反応では、インターカレーティング標識がより有用である。

【0305】

例示された具現例は、図13を参考して説明される。ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されたPTOは切断されて断片を放出する。前記断片は、CTOにハイブリッド形成される。インターカレーティング染料(例えば、SYBRTM Green)の存在下で伸長が実施され、インターカレーティング染料を含む伸長二本鎖が生成される。

20

【0306】

図13において、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供し(図13のC及びD)、非ターゲットシグナルを除去するために、ハイブリッド形成物を解離させることが必要である。したがって、ターゲットシグナルを測定する温度は、ハイブリッド形成物のT_m値を考慮して決定される。

【0307】

好ましくは、工程(e)において提供されるターゲットシグナルは、インターカレーティング染料から出るシグナルである。

30

【0308】

本発明の好ましい具現例によると、PTO及び/又はCTOは、その3'-末端がブロックされ、伸長が防止される。

【0309】

本発明の好ましい具現例によると、上流オリゴヌクレオチドは、上流プライマー又は上流プローブである。

【0310】

本発明の好ましい具現例によると、上流オリゴヌクレオチドは、5'-ヌクレアーゼ活性を有する前記酵素によるPTOの切断を誘導する程度にPTOに近接して位置する。

【0311】

本発明の好ましい具現例によると、上流プライマーは、その伸長鎖を通じて、5'-ヌクレアーゼ活性を有する酵素によるPTOの切断を誘導する。

40

【0312】

本発明の好ましい具現例によると、前記方法は、工程(a)-(b)、(a)-(d)又は(a)-(e)を反復する工程と、その反復サイクルの間に変性過程とをさらに含む。

【0313】

本発明の好ましい具現例によると、工程(a)-(b)又は(c)-(e)は、一つの反応容器又は個別反応容器で実施される。

【0314】

本発明の好ましい具現例によると、前記方法は、少なくとも2種のターゲット核酸配列

50

を検出するために行われ、前記上流オリゴヌクレオチドは、少なくとも2種のオリゴヌクレオチドを含み、P T Oは、少なくとも2種のP T Oを含み、C T Oは、少なくとも1種のC T Oを含み、前記少なくとも2種のターゲット核酸配列が存在する場合、前記方法は、少なくとも2種のターゲット核酸配列に対応する少なくとも2種のターゲットシグナルを提供する。

【0315】

本発明の好ましい具現例によると、上流オリゴヌクレオチドは、上流プライマーであり、前記上流プライマーの伸長のために、工程（b）では鋳型依存的核酸ポリメラーゼを利用する。

【0316】

本発明の好ましい具現例によると、C T Oは、その5' - 末端又は3' - 末端を介して固相基質上に固定化され、前記固相基質で提供されるターゲットシグナルを測定する。

【0317】

本発明の好ましい具現例によると、ターゲットシグナルは、断片に連結された単一標識、又は伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された単一標識により提供される。

【0318】

本発明の好ましい具現例によると、前記方法は、下流プライマーの存在下で行われる。

【0319】

工程（e）の検出は、リアルタイム方式、エンドーポイント方式又は指定時間間隔方式で実施することができる。本発明が工程（a）－（b）、（a）－（d）又は（a）－（e）を反復する工程を追加的に含む場合、指定温度における前記反復の各サイクルにおいて（即ち、リアルタイム方式）、指定温度における前記反復の終了時点で（即ち、エンドーポイント方式）又は指定温度における前記反復の間、指定時間間隔のそれぞれでシグナル検出が実施されることが好ましい。好ましくは、前記検出は、リアルタイム方式で前記反復の各サイクルで実施して、検出の正確性と定量化を改善することができる。

【0320】

I V. ターゲット検出のためのキット

本発明の他の様態によると、本発明は、

（a）ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を含む上流オリゴヌクレオチドと、

（b）P T O（プロービング及びタギングオリゴヌクレオチド、*Probing and Tagging Oligonucleotide*）であって、前記P T Oは、（i）前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリッド形成ヌクレオチド配列を含む3' - ターゲッティング部位及び（ii）前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む5' - タギング部位を含み、前記3' - ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリッド形成され、前記5' - タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されず、前記上流オリゴヌクレオチドは、前記P T Oの上流に位置し、前記上流オリゴヌクレオチド又はその伸長鎖は、5' ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記P T Oの切断を誘導し、このような前記切断は、前記P T Oの前記5' - タギング部位又は前記5' - タギング部位の一部を含む断片を放出する前記P T Oと、

（c）C T O（キャプチャリング及びテンプレティングオリゴヌクレオチド、*Capturing and Templating Oligonucleotide*）であって、前記C T Oは、3' → 5' 方向に（i）前記P T Oの5' - タギング部位又は前記5' - タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位及び（ii）前記P T Oの5' - タギング部位及び前記3' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレティング部位を含み、前記P T Oから放出された前記断片は、前記C T Oの前記キャプチャリング部位にハイブリッド形成され、そして、前記C T Oの前記キャプチャリング部位にハイブリッド形成された前記断片は、鋳型依存的核酸ポリメラーゼにより伸長されて伸長二本鎖を形成する前記C T Oと、

を含む、P T O C E（P T O切断及び伸長）アッセイによりDNA又は核酸混合物からタ

10

20

30

40

50

ターゲット核酸配列を検出するためのキットを提供する。

【0321】

本発明のキットは、上述の本発明の検出方法を実施できるように構成されたものであるため、その共通する内容は、本明細書の過度なる複雑性を避けるために、その記載を省く。

【0322】

本発明の好ましい具現例によると、前記キットは、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素をさらに含む。

【0323】

本発明の好ましい具現例によると、前記キットは、鋳型依存的核酸ポリメラーゼをさらに含む。

10

【0324】

本発明の好ましい具現例によると、前記PTO及び／又は前記CTOは、少なくとも一つの標識を有する。

【0325】

本発明の好ましい具現例によると、前記キットは、前記伸長反応の間に前記伸長二本鎖内に挿入される標識をさらに含む。

【0326】

本発明の好ましい具現例によると、前記キットは、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入される標識をさらに含み、前記PTO及び／又はCTOは、少なくとも一つの標識を有する。

20

【0327】

本発明の好ましい具現例によると、前記キットは、インターカレーティング標識をさらに含む。

【0328】

本発明の好ましい具現例によると、前記標識は、単一標識又は相互作用的二重標識である。

【0329】

本発明の好ましい具現例によると、前記キットは、少なくとも2種のターゲット核酸配列の検出に利用され、上流オリゴヌクレオチドは、少なくとも2種のオリゴヌクレオチドを含み、PTOは、少なくとも2種のPTOを含み、CTOは、少なくとも2種のCTOを含む。

30

【0330】

本発明の好ましい具現例によると、前記CTOは、その5'-末端又は3'-末端を介して固相基質上に固定化される。

【0331】

本発明の好ましい具現例によると、前記キットは、下流プライマーをさらに含む。

【0332】

本明細書で詳述した本発明のキットは、バッファー、DNAポリメラーゼ助因子及びデオキシリボヌクレオチド-5-トリホスフェートのようなターゲット増幅PCR反応（例えば、PCR反応）に必要な試薬を選択的に含むことができる。選択的に、本発明のキットは、多様なポリヌクレオチド分子、逆転写酵素、多様なバッファー及び試薬、及びDNAポリメラーゼ活性を抑制する抗体を含むことができる。また、キットは、陽性対照群及び陰性対照群反応を実施するに必須的な試薬を含むことができる。特定反応で使用される試薬の最適量は、本明細書の開示事項を習得した当業者により容易に決定できる。典型的に、本発明のキットは、上記言及された構成成分を含む別途の包装又は区分で製作される。

40

【0333】

本発明の特徴及び利点を要約すると、下記の通りである：

(a) 本発明は、ターゲット核酸配列にハイブリッド形成されたPTO（プロービング

50

及びタギングオリゴヌクレオチド、Probing and Tagging Oligonucleotide) が切断されて断片を放出し、前記断片は、CTO (キャプチャリング及びテンプレティングオリゴヌクレオチド、Capturing and Templating Oligonucleotide) にハイブリッド形成されて伸長二本鎖を形成するターゲット-依存的伸長二本鎖を提供する。伸長二本鎖は、ターゲット核酸配列の存在を示すシグナル (シグナル発生又は消滅) 又はシグナル変化 (シグナル増加又は減少) を提供する。

(b) 伸長二本鎖の存在は、メルティングカーブ及び指定温度における検出 (例えば、リアルタイム方式及びエンドポイント方式) のような多様な方法又は過程により決定される。

10

(c) 本発明は、一種類の標識 (例えば、FAM) のみを利用するとしても、メルティングカーブ分析により少なくとも2種のターゲット核酸配列を同時に検出する。その反面、液相で実施される従来マルチプレックスリアルタイム方式は、検出可能な蛍光標識の数に係わる限界により、深刻な問題が生じる。本発明は、このような短所を成功的に克服し、マルチプレックスリアルタイム検出の応用を広めた。

(d) 本発明は、多数の標識システムを利用して実施できる。例えば、PTO及び/又はCTOの如何なる位置にも連結される標識は、伸長二本鎖を示すターゲットシグナルを提供するに利用できる。また、伸長反応の間に伸長二本鎖内に挿入された標識を本発明に利用できる。それだけではなく、このような標識の組み合わせを利用することができる。本発明に適用可能な多目的の標識システムは、実験的条件又は目的によって適した標識システムを選択するようになる。

20

(e) 本発明は、(i) 前記断片の配列及び/又は長さ、(ii) 前記CTOの配列及び/又は長さ又は(iii) 前記断片の前記配列及び/又は長さとは前記CTOの前記配列及び/又は長さにより調節可能な指定Tm値を有するターゲット-依存的伸長二本鎖を提供する。

(f) 増幅産物を利用する従来のメルティングカーブ分析は、増幅産物の配列に依存し、これにより増幅産物の所望のTm値を得ることが非常に難しかった。その反面、本発明は、増幅産物の配列ではなく、伸長二本鎖の配列に依存し、伸長二本鎖の所望のTm値を選択することができる。したがって、本発明は、複数のターゲット配列を検出するに容易に適用することができる。

30

(g) 標識プローブ及びターゲット核酸配列間の直接的なハイブリッド形成を利用する従来メルティングカーブ分析は、プローブの非特異的ハイブリッド形成により、擬陽性シグナルが発生する可能性が高い。その反面、本発明は、PTOハイブリッド形成だけではなく、酵素的切断及び伸長を利用して、擬陽性シグナルの問題を完璧に克服した。

(h) 従来のメルティングカーブ分析のTm値は、ターゲット核酸配列の配列変異による影響を受ける。しかし、本発明の伸長二本鎖は、ターゲット核酸配列の配列変異に関係なく、一定なTm値を提供し、メルティングカーブ分析の卓越な正確性を保証する。

(i) PTOの5'-タギング部位の配列及びCTOの配列は、ターゲット核酸配列を考慮することなく選択することができるということは、注目すべきことである。これは、PTOの5'-タギング部位及びCTOに対する配列全体を事前デザイン可能にする。PTOの3'-ターゲッティング部位は、ターゲット核酸配列を考慮して製作しなければならないが、CTOは、ターゲット核酸配列の情報又はターゲット核酸配列に対する考慮無しに、既存の方式 (ready-made fashion) で製作することができる。このような特徴は、マルチプレックスターゲット検出、特に、固相基質上に固定化されたCTOを利用するマイクロアレイ上で格別な利点を提供する。

40

【0334】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明するが、これら実施例は、本発明をより具体的に説明するためのものであって、本発明の範囲がこれら実施例に限定されないことは、本発明の属する技術分野で通常の知識を有する者にとっては自明なことであろう。

【実施例】

50

【0335】

実施例1： PTOCE (Probing and Tagging Oligonucleotide Cleavage & Extension) アッセイの評価

伸長二本鎖がターゲット核酸配列の検出のためのターゲットシグナルを提供できるかを実験し、本発明の新規なアッセイであるPTOCE (PTO切断及び伸長) を評価した。

【0336】

この評価のために、メルティング分析により伸長二本鎖の存在を検出するPTOCEアッセイ (メルティング分析を含むPTOCEアッセイ) を行った。本発明者らは、上流プライマーの伸長、PTOの切断及びPTO断片の伸長のために、5'ヌクレアーゼ活性を有するTaq DNAポリメラーゼを利用した。

10

【0337】

アッセイを実施する間に形成された伸長二本鎖は、相互作用的二重標識を有するようにデザインした。伸長二本鎖の相互作用的二重標識は、(i) レポーター分子及びクエンチャー分子で標識されたCTO (二重標識CTO) 又は(ii) クエンチャー分子を有するPTO及びレポーター分子を有するCTO (クエンチャー標識PTO及びレポーター標識CTO) により提供した。PTO及びCTOの3'末端は、カーボンスペーサー (carbon spacer) でブロッキングした。Neisseria gonorrhoeae (NG) 遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドをターゲット鋳型として利用した。

【0338】

20

1-1. 二重標識CTOを利用したPTOCEアッセイ

PTOは、標識を有しない。CTOは、そのテンプレートイング (templating) 部位にクエンチャー分子 (BHQ-1) 及び蛍光レポーター分子 (FAM) を有する。本実施例で利用された合成鋳型、上流プライマー、PTO及びCTOの配列は、下記の通りである：

NG-T 5'-AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGGCATGATGCTTTTCTTTTGTTCCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATACCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

30

NG-PTO-1 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCCCTCATTTGGCGTGTTTTCG [C3 spacer] -3' (SEQ ID NO: 3)

NG-CTO-1 5'-[BHQ-1] CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCC [T (FAM)] CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT [C3 Spacer] -3' (SEQ ID NO: 4)

(下線を引いた文字は、PTOの5'-タギング (tagging) 部位を示す)

【0339】

NG遺伝子に対する合成鋳型 (SEQ ID NO: 1) 2 pmole、上流プライマー (SEQ ID NO: 2) 10 pmole、PTO (SEQ ID NO: 3) 5 pmole、CTO (SEQ ID NO: 4) 2 pmole、2.5 mM MgCl₂ 含有した2×マスターミックス10 µL、dNTPs 200 µM及びH-Taq DNAポリメラーゼ (Solgent、Korea) 1.6 unitを含有した20 µLの最終容量で反応を実施した；前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー (CFX96、Bio-Rad) に配置した；前記反応混合物を95℃で15分間変性し、95℃で30秒間、60℃で60秒間の過程を30回繰り返した。反応後、反応混合物を35℃に冷却し、35℃で30秒間維持させた後、35℃から90℃に徐々に加熱させることにより、メルティングカーブを得た。温度が上昇する間、蛍光を連続的に測定し、二本鎖DNAの解離をモニタリングした。メルティングピークは、メルティングカーブデータ由来である。

40

【0340】

50

図14から分かるように、鋳型がある場合、伸長二本鎖の予想 T_m 値に対応する 76.5°C でピークが検出された。鋳型がない場合は、ピークが検出されなかった。本標識方法において、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物(hybrid)は、如何なるシグナルも提供しないため、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物に対応するピークは検出されなかった。PTOが存在しないか、あるいはCTOが存在しない場合、如何なるピークも観察されなかった。

【0341】

1-2. クエンチャー標識PTO及びレポーター標識CTOを利用したPTOCEアッセイ

PTOは、その5'-末端をクエンチャー分子(BHQ-1)で標識した。CTOは、その3'-末端を蛍光レポーター分子(FAM)で標識した。

【0342】

本実施例で利用された合成鋳型、上流プライマー、PTO及びCTOの配列は、下記の通りである：

NG-T 5'-
 AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCGATGATGCTTTCT
 TTTTGTCTTGTCTCGGCAGAGCGAGTGATACCGATCCATT
 GAAAAA-3' (SEQ ID NO:1)
 NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID
 NO:2)
 NG-PTO-2 5'-[BHQ-1] ACGACGGCTTGGCTTTACTG
 CCCCTCATTTGGCGTGTTCG[C3 spacer]-3' (SEQ ID
 NO:5)
 NG-CTO-2 5'-CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAA
 AGCCAAGCCGTCGT[FAM]-3' (SEQ ID NO:6)

(下線を引いた文字は、PTOの5'-タギング(tagging)部位を示す)

【0343】

NG遺伝子に対する合成鋳型(SEQ ID NO:1) 2 pmole、上流プライマー(SEQ ID NO:2) 10 pmole、PTO(SEQ ID NO:5) 5 pmole、CTO(SEQ ID NO:6) 2 pmole、2.5 mM MgCl_2 含有した2×マスターミックス10 μL 、dNTPs 200 μM 及びH-Taq DNAポリメラーゼ(Solgent、Korea) 1.6 unitを含有した20 μL の最終容量で反応を実施した；前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー(CFX96、Bio-Rad)に配置した；前記反応混合物を 95°C で15分間変性し、 95°C で30秒、 60°C で60秒間及び 72°C で30秒間の過程を30回繰り返した。反応後、反応混合物を 35°C に冷却し、 35°C で30秒間維持させた後、 35°C から 90°C に徐々に加熱させることにより、メルティングカーブを得た。温度が上昇する間、蛍光を連続的に測定し、二本鎖DNAの解離をモニタリングした。メルティングピークは、メルティングカーブデータ由来である。

【0344】

図15から分かるように、鋳型がある場合、伸長二本鎖の予想 T_m 値に対応する 77°C でピークが検出された。本標識方法において、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供するため、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物の予想 T_m 値に対応する $64.0^\circ\text{C} \sim 64.5^\circ\text{C}$ でピークが表れた。PTOが存在しないか、あるいはCTOが存在しない場合、如何なるピークも観察されなかった

【0345】

これらの結果は、ターゲット依存的な伸長二本鎖が生成され、前記伸長二本鎖は、ターゲット核酸配列の存在を示すターゲットシグナルを提供するということを示す。

【0346】

実施例2：伸長二本鎖 T_m 値の調節

【 0 3 4 7 】

【 0 3 4 8 】

10

20

30

【 0 3 5 0 】

40

【 0 3 5 2 】

50

。

【0353】

実施例3：リアルタイム検出又はメルティング分析を含む、PTOC Eを利用したターゲット核酸配列の検出

本発明者らは、PTOC EアッセイがリアルタイムPCR方式(i)又はポスト-PCRメルティング分析方式(ii)でターゲット核酸配列を検出できるかを実験した：(i)PTOの切断及びPTO断片の伸長は、PCR過程によりターゲット核酸の増幅を伴い、伸長二本鎖の存在を、各サイクルの指定温度で検出した(指定温度におけるリアルタイム検出を含むPTOC Eアッセイ)；又は(ii)PTOの切断及びPTO断片の伸長は、PCR過程によりターゲット核酸の増幅を伴い、伸長二本鎖の存在を、ポスト-PCRメルティング分析により検出した(メルティング分析を含むPTOC Eアッセイ)。

10

【0354】

上流プライマーは、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素によるPTO切断と関与し、また、下流プライマーと共にPCR過程によるターゲット核酸配列増幅にも関与する。上流プライマーと下流プライマーの伸長、PTOの切断及びPTO断片の伸長に5'ヌクレアーゼ活性を有するTaq DNAポリメラーゼを利用した。

【0355】

伸長二本鎖は、相互作用的二重標識を有するようにデザインした。伸長二本鎖の相互作用的二重標識は、(i)レポーター分子及びクエンチャー分子で標識されたCTO、(ii)伸長反応の間に挿入されたクエンチャー-isodGTP及びレポーター分子とisodC残基を有するCTO又は(iii)クエンチャー分子を有するPTO及びレポーター分子を有するCTOにより提供された。PTO及びCTOの3'末端は、カーボンスペーサー(carbon spacer)でブロッキングした。

20

【0356】

Neisseria gonorrhoeae (NG)のゲノムDNAをターゲット核酸として利用した。

【0357】

3-1. 二重標識CTOを利用したPTOC Eアッセイ

PTOは、標識を有せず、CTOは、そのテンプレティング部位にクエンチャー分子(BHQ-1)及び蛍光レポーター分子(FAM)を有する。

30

【0358】

本実施例で利用された上流プライマー、下流プライマー、PTO及びCTOの配列は、下記の通りである：

NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTTCACGCT-3' (SEQ ID NO:10)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO:2)

NG-PTO-3 5'-ACGACGGCTTGGCCCCCTCATTTGGCGTGT TTCG [C3 spacer] -3' (SEQ ID NO:7)

NG-CTO-1 5'-[BHQ-1] CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCC [T (FAM)] CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT [C3 Spacer] -3' (SEQ ID NO:4)

40

(下線を引いた文字は、PTOの5'-タギング(tagging)部位を示す)

【0359】

3-1-1. 指定温度におけるリアルタイム検出を含むPTOC Eアッセイ

NGのゲノムDNA 100pg、下流プライマー(SEQ ID NO:10) 10pmole、上流プライマー(SEQ ID NO:2) 10pmole、PTO(SEQ ID NO:7) 5pmole、CTO(SEQ ID NO:4) 2pmole、2.5mM MgCl₂ 含有した2×マスターミックス10μL、dNTPs 200μM及びH-Taq DNAポリメラーゼ(Solgent、Korea) 1.6uni

50

tを含有した20 μLの最終容量で反応を実施した；前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー（CFX96、Bio-Rad）に配置した；前記反応混合物を95℃で15分間変性し、95℃で30秒間、60℃で60秒間、72℃で30秒間の過程を60回繰り返した。各サイクルの60℃でシグナルを検出した。伸長二本鎖が二本鎖形態を維持する範囲で検出温度を決定した。

【0360】

図17Aから分かるように、鋳型がある場合、ターゲットシグナル（Ct 31.36）が検出された。鋳型がない場合は、如何なるシグナルも検出されなかった。

【0361】

3-1-2. メルティング分析を含むPTOC Eアッセイ

実施例3-1-1の反応後、反応混合物を35℃に冷却し、35℃で30秒間維持させた後、35℃から90℃に徐々に加熱させることにより、メルティングカーブを得た。温度が上昇する間、蛍光を連続的に測定し、二本鎖DNAの解離をモニタリングした。メルティングピークは、メルティングカーブデータ由来である。

【0362】

図17Bから分かるように、鋳型がある場合、伸長二本鎖の予想Tm値に対応する76.0℃でピークが検出された。鋳型がない場合は、如何なるピークも検出されなかった。本標識方法において、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物は、如何なるシグナルも提供しないため、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物に対応するピークは検出されなかった。

【0363】

3-2. クエンチャー-i s o - d G T P及びi s o - d C残基を有するレポーター標識CTOを利用したPTOC Eアッセイ

PTOは、標識を有しない。CTOは、その5'-末端にレポーター分子（FAM）及びi s o - d C残基を有する。PTO断片の伸長反応の間、クエンチャー分子（d a b c y l）で標識されたi s o - d G T Pは、i s o - d C残基に対して相補的な位置に挿入される。

【0364】

本実施例で利用された上流プライマー、下流プライマー、PTO及びCTOの配列は、下記の通りである：

NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTTCACGCT-3' (SEQ ID NO:10)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO:2)

NG-PTO-1 5'-ACGACGGCTTGGCTGCCCCCTCATTTGGCGTGTTCG [C3 spacer] -3' (SEQ ID NO:3)

NG-CTO-5 5'-[FAM] [I s o - d C] CTCCTCCAGTAAAGC CAAGCCGTCGT [C3 spacer] -3' (SEQ ID NO:11)

（下線を引いた文字は、PTOの5'-タギング（t a g g i n g）部位を示す）

【0365】

3-2-1. 指定温度におけるリアルタイム検出を含むPTOC Eアッセイ

NGのゲノムDNA 100 pg、下流プライマー（SEQ ID NO:10）10 pmole、上流プライマー（SEQ ID NO:2）10 pmole、PTO（SEQ ID NO:3）5 pmole、CTO（SEQ ID NO:11）2 pmole及び2×プレクサー（登録商標）マスターミックス（Cat. No. A4100、Promega、USA）10 μLを含有した20 μLの最終容量で反応を実施した；前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー（CFX96、Bio-Rad）に配置した；前記反応混合物を95℃で15分間変性し、95℃で30秒間、60℃で60秒間、72℃で30秒間の過程を60回及び72℃で30秒間、55℃で3

10

20

30

40

50

0秒間の過程を5回繰り返した。各サイクルの60℃でシグナルを検出した。伸長二本鎖が二本鎖形態を維持する範囲で検出温度を決定した。

【0366】

プレクサー（登録商標）マスターミックス内の5'ヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを、上流プライマーと下流プライマーの伸長、PTOの切断及びPTO断片の伸長に利用した。

【0367】

図18Aから分かるように、鋳型がある場合、ターゲットシグナル（Ct 33.03）が検出された。鋳型がない場合は、如何なるシグナルも検出されなかった。

【0368】

3-2-2. メルティング分析を含むPTOCEアッセイ

実施例3-2-1の反応後、反応混合物を35℃に冷却し、35℃で30秒間維持させた後、35℃から90℃に徐々に加熱させることにより、メルティングカーブを得た。温度が上昇する間、蛍光を連続的に測定し、二本鎖DNAの解離をモニタリングした。メルティングピークは、メルティングカーブデータ由来である。

【0369】

図18Bから分かるように、鋳型がある場合、伸長二本鎖の予想Tm値に対応する70.0℃でピークが検出された。鋳型がない場合は、如何なるピークも検出されなかった。本標識方法において、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物は、如何なるシグナルも提供しないため、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物に対応するピークは検出されなかった。

【0370】

3-3. クエンチャー標識PTO及びレポーター標識CTOを利用したPTOCEアッセイ

PTOの5'-末端は、クエンチャー分子（BHQ-1）で標識した。CTOの3'-末端は、蛍光レポーター分子（FAM）で標識した。

【0371】

本実施例で利用された上流プライマー、下流プライマー、PTO及びCTOの配列は、下記の通りである：

NG-F 5'-TACGCCCTGCTACTTTTCACGCT-3' (SEQ ID NO:10) 30

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO:2)

NG-PTO-4 5'-[BHQ-1] ACGACGGCTTGCCCCCTCATTTG
GCGTGTTTCG [C3 spacer]-3' (SEQ ID NO:12)

NG-CTO-2 5'-CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCAGTAA
AGCCAAGCCGTCGT [FAM]-3' (SEQ ID NO:6)

（下線を引いた文字は、PTOの5'-タギング（tagging）部位を示す）

【0372】

3-3-1. 指定温度におけるリアルタイム検出を含むPTOCEアッセイ

NGゲノムDNA 100pg、下流プライマー（SEQ ID NO:10）10pmole、上流プライマー（SEQ ID NO:2）10pmole、PTO（SEQ ID NO:12）5pmole、CTO（SEQ ID NO:6）2pmole、2.5mM MgCl₂ 含有した2×マスターミックス10μL、dNTPs 200μM及びH-Taq DNAポリメラーゼ（Solgent、Korea）1.6unitを含有した20μLの最終容量で反応を実施した；前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー（CFX96、Bio-Rad）に配置した；前記反応混合物を95℃で15分間変性し、95℃で30秒間、60℃で60秒間、72℃で30秒間の過程を60回繰り返した。各サイクルの60℃でシグナルを検出した。伸長二本鎖が二本鎖形態を維持する範囲で検出温度を決定し、前記温度は、非切断PTO及びC 50

T O間のハイブリッド形成物のT_m値より高い。

【0373】

図19Aから分かるように、鋳型がある場合、ターゲットシグナル(C_t 29.79)が検出された。鋳型がない場合は、如何なるシグナルも検出されなかった。

【0374】

3-3-2. メルティング分析を含むPTOC Eアッセイ

実施例3-3-1の反応後、反応混合物を35℃に冷却し、35℃で30秒間維持させた後、35℃から90℃に徐々に加熱させることにより、メルティングカーブを得た。温度が上昇する間、蛍光を連続的に測定し、二本鎖DNAの解離をモニタリングした。メルティングピークは、メルティングカーブデータ由来である。

10

【0375】

図19Bから分かるように、鋳型がある場合、伸長二本鎖の予想T_m値に対応する76.5℃でピークが検出された。本標識方法において、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物は、非ターゲットシグナルを提供するため、鋳型がない場合、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物のT_m値に対応するピークが48.0℃で検出された。

【0376】

これらの結果は、リアルタイム検出又はメルティング分析を含むPTOC Eにより、ターゲット核酸配列を検出することができることを示す。

【0377】

20

実施例4：メルティング分析を含むPTOC Eアッセイによる複数のターゲット核酸配列の検出

また、本発明者らは、メルティング分析を含むPTOC Eアッセイが、同一種類のレポーター分子を利用して複数のターゲット核酸配列を検出できるか実験した。

【0378】

PTOの切断及びPTO断片の伸長は、PCR過程によりターゲット核酸の増幅を伴い、伸長二本鎖の存在を、ポスト-PCRメルティング分析(メルティング分析を含むPTOC Eアッセイ)により検出した。

【0379】

アッセイの間に形成された伸長二本鎖は、相互作用的二重標識を有するようにデザインした。伸長二本鎖の相互作用的二重標識は、そのテンプレティング部位のレポーター分子及びクエンチャー分子で標識されたCTOにより提供された。CTOは、同一な種類の蛍光レポーター分子(FAM)を有するが、異なるT_m値の伸長二本鎖が生成される。PTO及びCTOの3'末端は、カーボンスペースャーでブロッキングした。

30

【0380】

Neisseria gonorrhoeae (NG) 及び *Staphylococcus aureus* (SA) のゲノムDNAをターゲット核酸として利用した。

【0381】

本実施例で利用された上流プライマー、下流プライマー、PTO及びCTOの配列は、下記の通りである：

40

NG-F 5'-TACGCCTGCTACTTTTCACGCT-3' (SEQ ID NO:10)

NG-R 5'-CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO:2)

NG-PTO-3 5'-ACGACGGCTTGGCCCCCTCATTGGCGTGTTTCG [C3 spacer] -3' (SEQ ID NO:7)

NG-CTO-1 5'-[BHQ-1] CCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCC [T (FAM)] CCAGTAAAGCCAAGCCGTCGT [C3 Spacer] -3' (SEQ ID NO:4)

SA-F 5'-TGTTAGAAATTTGAACAAGGATTTAATC-3' (

50

SEQ ID NO: 13)

SA-R 5' - GATAAGTTTAAAGCTTGACCGTCTG - 3' (SEQ ID NO: 14)

SA-PTO-1 5' - AATCCGACCAACGCCAATTCGGTGGTCAATC
ATTCGGTTTACG [C3 spacer] - 3' (SEQ ID NO: 15)

SA-CTO-1 5' - [BHQ-1] TTTTTTTTTTTTTTTTGGCA [T (FAM)] AGCGTGGTCGGATT [C3 spacer] - 3' (SEQ ID NO: 16)

(下線を引いた文字は、PTOの5' - タギング (tagging) 部位を示す)

10

【0382】

NGのゲノムDNA 100 pg、SAのゲノムDNA 100 pg、各下流プライマー (SEQ ID NO: 10及び13) 10 pmole、上流プライマー (SEQ ID NO: 2及び14) 10 pmole、各PTO (SEQ ID NO: 7及び15)

5 pmole、各CTO (SEQ ID NO: 4及び16) 2 pmole、2.5 mM MgCl₂ 含有した2×マスターミックス10 µL、dNTPs 200 µM及びH-Taq DNAポリメラーゼ (Solgent、Korea) 1.6 unitを含有した20 µLの最終容量で反応を実施した；前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー (CFX96、Bio-Rad) に配置した；前記反応混合物を95℃で15分間変性し、95℃で30秒間、60℃で60秒間、72℃で30秒間の過程を60回繰り返した。反応後、反応混合物を35℃に冷却し、35℃で30秒間維持させた後、35℃から90℃に徐々に加熱させることにより、メルティングカーブを得た。温度が上昇する間、蛍光を連続的に測定し、二本鎖DNAの解離をモニタリングした。メルティングピークは、メルティングカーブデータ由来である。

20

【0383】

図20から分かるように、鋳型がある場合、複数のターゲットシグナル (NGのT_m: 75.5℃及びSAのT_m: 63.5℃) が検出された。鋳型がない場合は、如何なるシグナルも検出されなかった。

【0384】

これらの結果は、メルティング分析を含むPTOCEアッセイは、ターゲット核酸に対応する伸長二本鎖が異なるT_m値を有する条件で同一な種類のレポーター分子 (例えば、FAM) を利用することにより、複数のターゲット核酸を検出することができることを示す。

30

【0385】

実施例5：マイクロアレイにおけるメルティング分析を含むPTOCEアッセイの評価

本発明者らは、マイクロアレイにおけるメルティング分析を含むPTOCEアッセイを追加的に実験した。PTO切断を、個別容器で実施し、CTOが固定化されたマイクロアレイに前記反応結果物の一部分を移した。伸長反応以後、伸長二本鎖の存在をメルティング分析により検出した。

【0386】

5'ヌクレアーゼ活性を有するTaq DNAポリメラーゼを、上流プライマーの伸長、PTOの切断及びPTO断片の伸長に利用した。アッセイの間に形成された伸長二本鎖は、単一標識を有するようにデザインした。伸長二本鎖の単一標識は、その5' - 末端が蛍光レポーター分子であるQuasar 570で標識されたPTOにより提供された。PTO及びCTOの3' - 末端は、カーボンスペーサーでブロッキングした。CTOは、リンカーとしてポリ (T)₅を有し、その5' - 末端にあるアミノ基 (Amino C7) を利用してガラススライド表面に固定した。その5' - 末端に蛍光レポーター分子 (Quasar 570) を有するマーカープローブは、その3' - 末端にあるアミノ基を利用してガラススライド表面に固定した。

40

【0387】

50

本実施例で利用された合成鋳型、上流プライマー、PTO、CTO及びマーカの配列は、下記の通りである：

NG-T 5' - AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCGATGATGCTTTTCTTTTGTTCCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATACC
GATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO:1)

NG-R 5' - CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO:2)

NG-PTO-5 5' - [Quasar570] ACGACGGCTTGGCTTTA
CTGCCCTTCATTGGCGTGTTCG [C3 spacer] -3' (SEQ ID NO:17)

NG-CTO-S1 5' - [AminoC7] TTTTTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCAGTAAAGCCCAAGCCGTCGT [C3 Spacer] -3' (SEQ ID NO:18)

Marker 5' - [Quasar570] ATATATATAT [AminoC7] -3' (SEQ ID NO:19)

(下線を引いた文字は、PTOの5'-タギング (tagging) 部位を示す)

【0388】

NSB9 NHSスライド (NSBPOSTECH、Korea) をCTO及びマーカ (SEQ ID NO:18及び19) の製作に利用した。NSBスポットティングバッファ (NSB spotting buffer) で最終濃度10 µMになるように溶解させたCTO及びマーカをPersonal ArrayerTM 16 Microarray Spotter (Capital Bio、China) を利用し、NSB9 NHSスライド上にプリントした。CTO及びマーカを2×1フォーマット (duplicate spots) で並べてスポットティング (spotting) して、このように製作されたマイクロアレイを、約85%湿度に維持されるチャンバに一晩中インキュベートした。非特異的に結合されたCTO及びマーカを除去するために、前記スライドを2×SSPE (0.3M塩化ナトリウム、0.02Mリン酸水素ナトリウム及び2.0mM EDTA)、pH7.4及び7.0mM SDSを含有したバッファ溶液に37℃で30分間洗浄して、蒸留水で洗浄した。その後、スライド遠心分離機を利用して、前記DNA-機能化された (DNA-functionalized) スライドを乾燥し、使用前まで4℃暗室で保管した。

【0389】

NG遺伝子に対する合成鋳型 (SEQ ID NO:1) 2 pmole、上流プライマー (SEQ ID NO:2) 10 pmole、PTO (SEQ ID NO:17) 1 pmole及び2.5mM MgCl₂ 含有した2×マスターミックス25 µL、dNTPs 200 µM及びH-Taq DNAポリメラーゼ (Solgent、Korea) 4 unitを含有した50 µLの最終容量で切断反応を実施した；前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー (CFX96、Bio-Rad) に配置した；前記反応混合物を95℃で15分間変性し、95℃で30秒間、63℃で60秒間の過程を30回繰り返した。

【0390】

CTO (SEQ ID NO:18) が架橋結合 (cross-linked) されたNSBガラススライドの表面上に組み立てられたチャンバに前記結果物の混合物30 µLを適用した。スライドをin situブロック方式でサーマルサイクラー (Genepo B4I、China) に配置した。メルティング分析のために、6個の同一なスライドを製作した。伸長反応を55℃で20分間行った。その後、このように製作されたスライドを1分間室温でインキュベートした。最終的に、各スライドを44℃、52℃、60℃、68℃、76℃又は84℃で、蒸留水で1分間洗浄した。イメージ獲得は、共焦点レーザーキャナーAxon GenePix4100A (molecular Device、US) を利用し、5 µmピクセル解像度のスキニングで行った。蛍光強度は、

定量的なマイクロアレイ分析ソフトウェア、GenePix pro 6.0 ソフトウェア (molecular Device、US) を利用して分析した。蛍光強度は、周辺バックグラウンドを除去した後、スポット中央値 (spot-medians) で表現した。再現性を調べるために、各スポットは、2 個ずつスポッティングした。蛍光強度を、繰り返されたスポットの平均値で示した。

【0391】

図 21 A 及び 21 B から分かるように、異なる洗浄温度により製作されたスポットからの蛍光強度を測定することにより、メルティングカーブを得た。前記メルティングカーブデータから伸長二本鎖の存在を決定した。

【0392】

実施例 6：マイクロアレイにおけるリアルタイム検出を含む PTOCE アッセイの評価

本発明者らは、マイクロアレイで指定温度におけるリアルタイム検出を含む PTOCE アッセイを実験した。

【0393】

CTO が固定化されたマイクロアレイ上で PTO の切断及び PTO 断片の伸長を繰り返した。所定のサイクル毎に指定温度で伸長二本鎖の存在を検出した。

【0394】

5' スクレアーゼ活性を有する Taq DNA ポリメラーゼを、上流プライマーの伸長、PTO の切断及び PTO 断片の伸長に利用した。

【0395】

アッセイの間に形成された伸長二本鎖は、単一標識又は相互作用的二重標識を有するようにデザインした。伸長二本鎖の単一標識は、レポーター分子で標識された PTO (レポーター-標識 PTO) により提供された。伸長二本鎖の相互作用的二重標識は、レポーター分子及びクエンチャー分子で標識された CTO (二重標識 CTO) により提供された。PTO 及び CTO の 3' 末端は、カーボンスペーサーでブロッキングした。

【0396】

CTO は、リンカーとしてポリ (T) を有する。CTO は、その 5' -末端又は 3' -末端にあるアミノ基 (Amino C7) を利用してガラススライド表面に固定した。その 5' -末端に蛍光レポーター分子 (Quasar 570) を有するマーカープローブは、その 3' -末端にあるアミノ基を利用してガラススライド表面に固定した。ガラススライド上の蛍光強度は、指定温度で測定した。伸長二本鎖が二本鎖形態を維持する範囲で検出温度を決定した。Neisseria gonorrhoeae (NG) に対する合成オリゴヌクレオチドを鋳型として利用した。

【0397】

6-1. レポーター-標識 PTO を利用した PTOCE アッセイ

PTO は、その 5' -末端に蛍光レポーター分子として Quasar 570 を有する。CTO は、その 5' -末端を介して固定化させた。本標識方法では、伸長二本鎖が二本鎖形態を維持する範囲で検出温度を決定し、前記温度は、非切断 PTO 及び CTO 間のハイブリッド形成物の Tm 値より高い。

【0398】

本実施例で利用された合成鋳型、上流プライマー、PTO、CTO 及びマーカーの配列は、下記の通りである：

NG-T 5' -AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGCGATGATGCTTTCTTTTGTTCCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATACC
GATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5' -CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ ID NO: 2)

NG-PTO-5 5' -[Quasar 570] ACGACGGCTTGGCTTTA
CTGCCCTTCATTGGCGTGTTTCG [C3 spacer] -3' (SEQ ID NO: 17)

10

20

30

40

50

【 0 3 9 9 】

20

【 0 4 0 0 】

30

【 0 4 0 1 】

6-2. 二重標識CTOを利用したPTOCEアッセイ

CTOは、その3'-末端を介して固定化され、テンプレート部位にクエンチャー分子（BHQ-2）及び蛍光レポーター分子（Quasar 570）を有する。

【 0 4 0 2 】

40

50

C [T (Q u a s a r 5 7 0)] C C A G T A A A G C C A A G C C G T C G T T T T T
T T T T T T [A m i n o C 7] - 3' (SEQ ID NO: 21)

Marker 5' - [Q u a s a r 5 7 0] A T A T A T A T A T [A m i n o C 7]
- 3' (SEQ ID NO: 19)

(下線を引いた文字は、PTOの5'-タギング (tagging) 部位を示す)

【0403】

実施例5で利用されたものと同様なプロトコルでスライド製作を実施した。NG遺伝子に対する合成鋳型 (SEQ ID NO: 1) 2 pmole、上流プライマー (SEQ ID NO: 2) 10 pmole、PTO (SEQ ID NO: 20) 1 pmole 及び 2.5 mM MgCl₂ 含有した2×マスターミックス15 µL、dNTPs 200 µM及びH-Taq DNAポリメラーゼ (Solgent、Korea) 2.4 unitを含有した30 µLの最終容量でPTOCE反応を実施した；CTO (SEQ ID NO: 21) が架橋結合 (cross-linked) されたNSBガラススライドの表面上に組み立てられたチャンバに前記全体混合物を適用した。スライドをin situブロック方式でサーマルサイクラー (Gene pro B4I、China) に配置した。サイクリング分析のために、5個の同一なスライドを製作した。PTOCE反応を下記の通りに行った：95℃で15分間変性し、95℃で30秒間、60℃で60秒間及び50℃で60秒間の過程を0、5、10、20又は30サイクル実施した。各サイクル数による反応以後、イメージ獲得は、共焦点レーザースキャナーAxon GenePix 4100A (molecular Device、US) を利用し、5 µmピクセル解像度のスキャンングで行った。蛍光強度は、定量的なマイクロアレイ分析ソフトウェア、GenePix pro 6.0ソフトウェア (molecular Device、US) を利用して分析した。蛍光強度は、周辺バックグラウンドを除去した後、スポット中央値で表現した。再現性を調べるために、各スポットは、2個ずつスポッティングした。蛍光強度を、繰返されたスポットの平均値で示した。

【0404】

図23A及び23Bから分かるように、鋳型がある場合、ターゲット核酸配列に対する蛍光強度は、サイクル数によって増加した (0サイクル__RFU: 28, 078±460.3; 5サイクル__RFU: 35, 967±555.1; 10サイクル__RFU: 44, 674±186.0; 20サイクル__RFU: 65, 423±2.1; 及び30サイクル__RFU: 65, 426±2.8)。鋳型がない場合は、サイクル数による蛍光強度の変化がなかった。

【0405】

実施例7：マイクロアレイにおいて、指定温度におけるエンドーポイント検出を含むPTOCEアッセイを利用した複数のターゲット核酸配列の検出

本発明者らは、マイクロアレイにおいて、指定温度におけるエンドーポイント検出を含むPTOCEアッセイを利用し、複数のターゲット検出を追加的に実験した。

【0406】

PTO切断は、個別容器でPCR過程を利用して実施し、CTOの固定化されたマイクロアレイに前記結果物の適正量を移す。伸長反応以後、伸長二本鎖の存在を、指定温度におけるエンドーポイント検出により検出した。

【0407】

5'ヌクレアーゼ活性を有するTaq DNAポリメラーゼを、上流プライマーと下流プライマーの伸長、PTOの切断及びPTO断片の伸長に利用した。

【0408】

アッセイの間に形成された伸長二本鎖は、単一標識を有するようにデザインした。伸長二本鎖の単一標識は、5'-末端が蛍光レポーター分子であるQuasar 570で標識されたPTOにより提供された。PTO及びCTOの3'-末端は、カーボンスペーサーでブロックした。

【0409】

10

20

30

40

50

【 0 4 1 0 】

【 0 4 1 1 】

【 0 4 1 2 】

【 0 4 1 3 】

各 S A 及び／又は N G のゲノム D N A 1 0 0 p g、各下流プライマー（S E Q I D N O：1 0 及び／又は 1 3）1 0 p m o l e、各上流プライマー（S E Q I D N O：2 及び／又は 2 2）1 0 p m o l e、P T O（S E Q I D N O：1 7 及び／又は 2 3）1 p m o l e 及び 2. 5 m M M g C l₂ 含有した 2×マスターミックス 2 5 μ L、d N T P s 2 0 0 μ M 及び H-T a q D N A ポリメラーゼ（S o l g e n t、K o r e a）4 u n i t を含有した 5 0 μ L の最終容量で切断反応を実施した；前記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー（C F X 9 6、B i o-R a d）に配置した；前記反応混合物を 9 5℃で 1 5 分間変性し、9 5℃で 3 0 秒間、6 3℃で 6 0 秒間の過程を 6 0 回繰り返した。C T O（S E Q I D N O：1 8 及び 2 4）が架橋結合（c r o s s-l i n k e d）された N S B ガラススライドの表面上に組み立てられたチャンバに前記結果物の混合物 3 0 μ L を適用した。スライドを i n s i t u ブロック方式でサーマルサイクラー（G e n e p r o B 4 I、C h i n a）に配置した

。伸長反応を55℃で20分間行った。その後、このように製作されたスライドを64℃で蒸留水で1分間洗浄した。各洗浄以後、イメージ獲得は、共焦点レーザースキャナーAxon GenePix 4100A (molecular Device、US) を利用し、10μmピクセル解像度のスキャニングで行った。蛍光強度は、定量的なマイクロアレイ分析ソフトウェア、GenePix pro 6.0ソフトウェア (molecular Device、US) を利用して分析した。蛍光強度は、周辺バックグラウンドを除去した後、スポット中央値で表現した。再現性を調べるために、各スポットは、2個ずつスポットティングした。蛍光強度を、繰り返されたスポットの平均値で示した。

【0414】

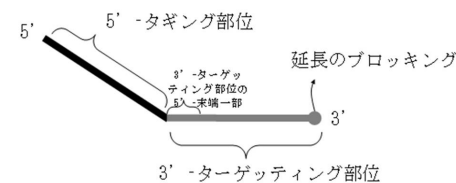
図24から分かるように、SA鋳型がある場合、SAに対するターゲットシグナル(RFU: 65, 192±198.7)が検出された。NG鋳型がある場合、NGに対するターゲットシグナル(RFU: 65, 332±1.4)が検出された。SA及びNGの鋳型が両方ともある場合、SAに対するターゲットシグナル(RFU: 65, 302±0.7)及びNG(RFU: 65, 302±0.7)に対するターゲットシグナルも全て検出された。

【0415】

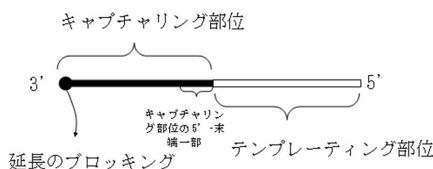
以上、本発明の望ましい具現例を詳細に記述したが、当業界の通常の知識を有する者にとっては、このような具体的な記述はただ望ましい具現例に過ぎなく、これに本発明の範囲が限定されないことは明らかである。従って、本発明の実質的な範囲は、添付の請求項とその等価物により定義されると言える。

【図1】

A. PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)

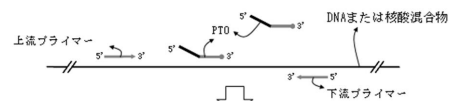


B. CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)

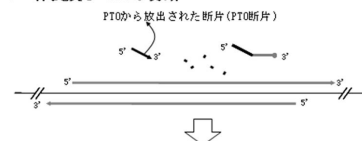


【図2】

A. ハイブリッド形成



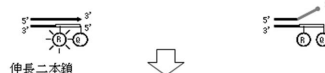
B. プライマー伸長及び PTOの切断



C. PTO断片とCTOのハイブリッド形成



D. PTO断片の伸長

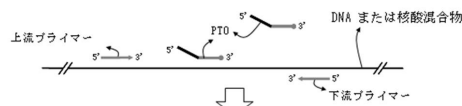


E. メルティング分析

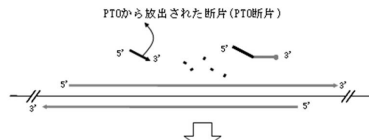


【図 3】

A. ハイブリッド形成



B. プライマー伸長及び PTOの切断



C. PTO断片とCTOのハイブリッド形成



D. PTO断片の伸長

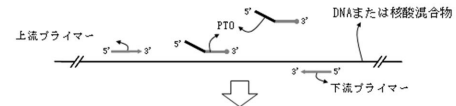


E. メルティング分析

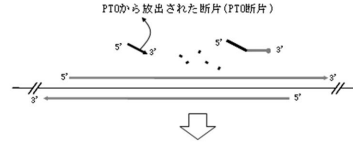


【図 4】

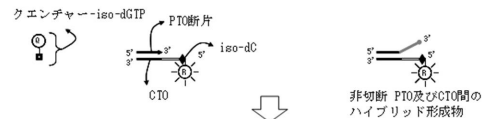
A. ハイブリッド形成



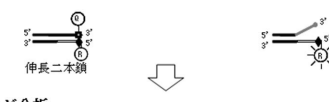
B. プライマー伸長及び PTOの切断



C. PTO断片とCTOのハイブリッド形成



D. PTO断片の伸長

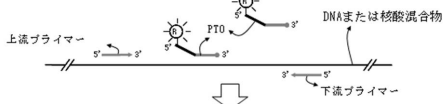


E. メルティング分析

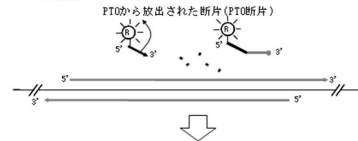


【図 5】

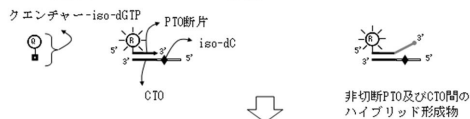
A. ハイブリッド形成



B. プライマー伸長及びPTOの切断



C. PTO断片とCTOのハイブリッド形成



D. PTO断片の伸長

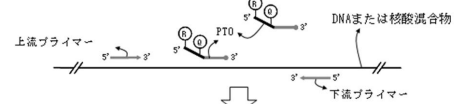


E. メルティング分析

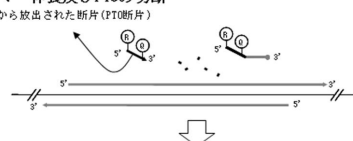


【図 6】

A. ハイブリッド形成



B. プライマー伸長及びPTOの切断



C. PTO断片とCTOのハイブリッド形成



D. PTO断片の伸長

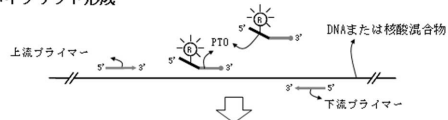


E. メルティング分析

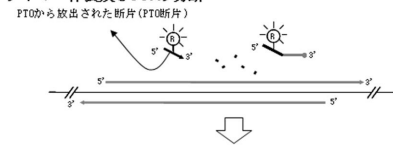


【図 7】

A. ハイブリッド形成



B. プライマー伸長及びPTOの切断



C. PTO断片とCTOのハイブリッド形成



D. PTO断片の伸長

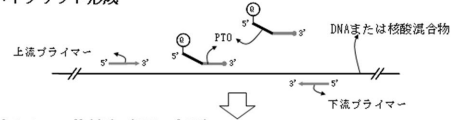


E. メルティング分析

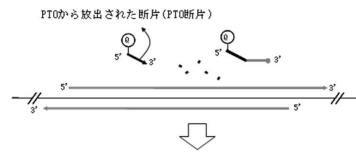


【図 8】

A. ハイブリッド形成



B. プライマー伸長及びPTOの切断



C. PTO断片とCTOのハイブリッド形成



D. PTO断片の伸長

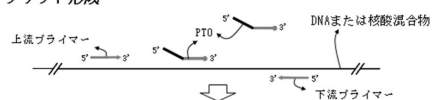


E. メルティング分析

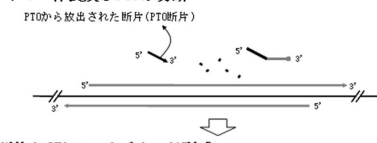


【図 9】

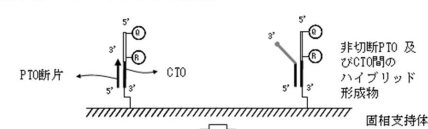
A. ハイブリッド形成



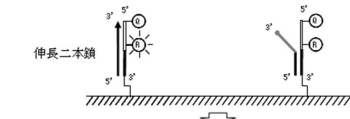
B. プライマー伸長及びPTOの切断



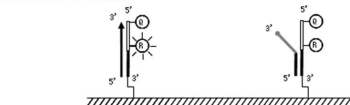
C. PTO断片とCTOのハイブリッド形成



D. PTO断片の伸長

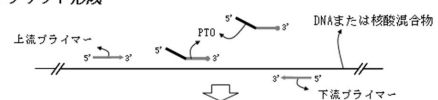


E. 指定温度における検出

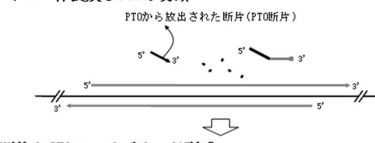


【図 10】

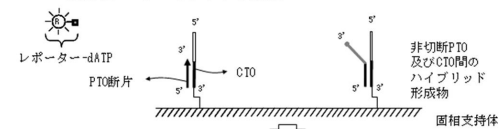
A. ハイブリッド形成



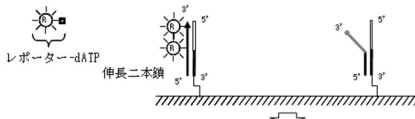
B. プライマー伸長及びPTOの切断



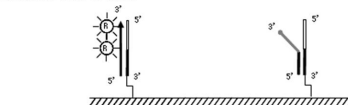
C. PTO断片とCTOのハイブリッド形成



D. PTO断片の伸長

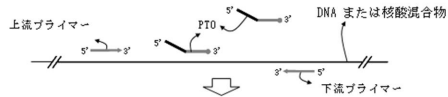


E. 指定温度における検出

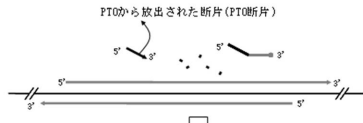


【図 1 1】

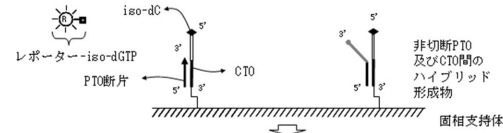
A. ハイブリッド形成



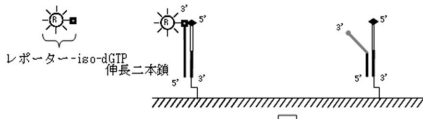
B. プライマー伸長及びPTOの切断



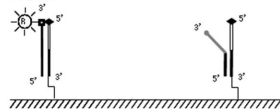
C. PTO断片とCTOのハイブリッド形成



D. PTO断片の伸長

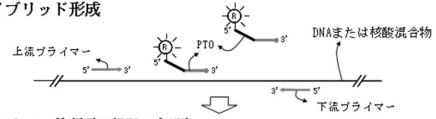


E. 指定温度における検出

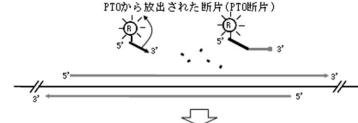


【図 1 2】

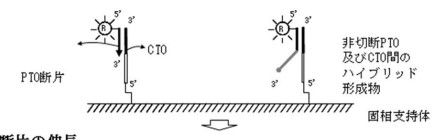
A. ハイブリッド形成



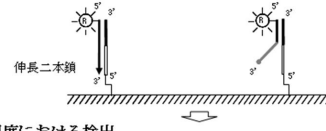
B. プライマー伸長及びPTOの切断



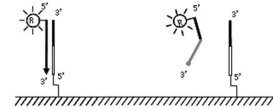
C. PTO断片とCTOのハイブリッド形成



D. PTO断片の伸長

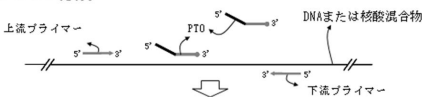


E. 指定温度における検出

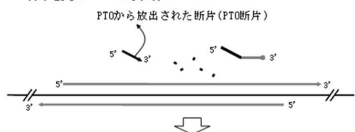


【図 1 3】

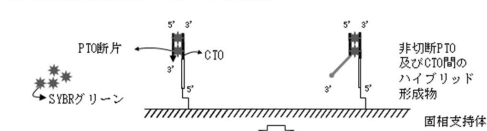
A. ハイブリッド形成



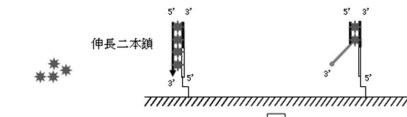
B. プライマー伸長及びPTOの切断



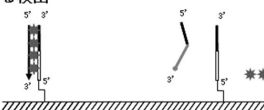
C. PTO断片とPTOのハイブリッド形成



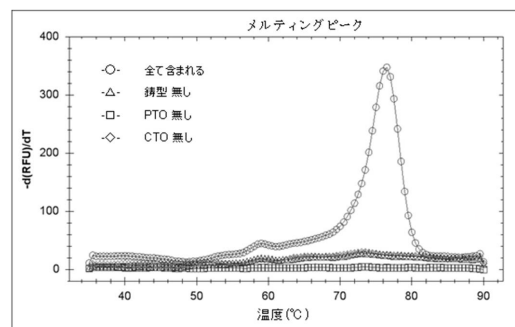
D. PTO断片の伸長



E. 指定温度における検出



【図 1 4】



錐型 ¹⁾	上流プライマー	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Tm (°C)	
				ターゲット ⁴⁾	非ターゲット ⁵⁾
+	+	+	+	76.5	-
-	+	+	+	-	-
+	+	+	+	-	-
+	+	+	-	-	-

¹⁾ 錐型は、*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子に刻する合成オリゴヌクレオチドである。

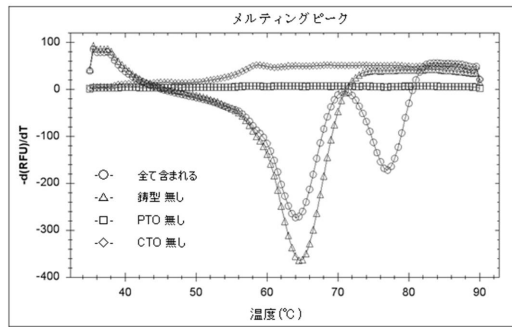
²⁾ PTOは、標識を有しない。

³⁾ CTOは、テンプレティング部位にクエンチャー分子及び蛍光レポーター分子を有する。

⁴⁾ ターゲットは、ターゲットシグナルを示し、これは、伸長二本鎖のTmである。

⁵⁾ 非ターゲットは、非ターゲットシグナルを示し、これは、非切断 PTO及びCTO間のハイブリッド形成物のTmである。

【図 15】



鋳型 ¹⁾	上流プライマー	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Tm (°C)	
				ターゲット ⁴⁾	非ターゲット ⁴⁾
+	+	+	+	77.0	64.0
-	+	+	+	-	64.5
+	+	-	+	-	-
+	+	+	-	-	-

¹⁾ 鋳型は、*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドである。

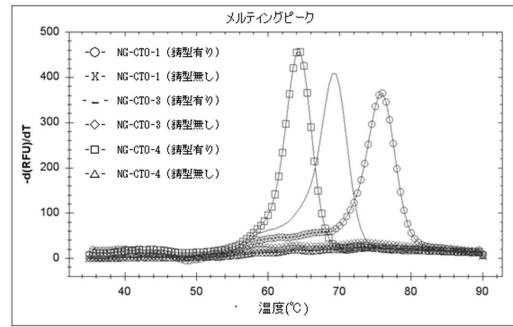
²⁾ PTOは、その5'-末端にクエンチャー 分子を有する。

³⁾ CTOは、その3'-末端に蛍光レポーター 分子を有する。

⁴⁾ ターゲットは、ターゲットシグナルを示し、これは、伸長二本鎖のTmである。

⁵⁾ 非-ターゲットは、非-ターゲットシグナルを示し、これは、非切断 PTO 及び CTO間のハイブリッド形成物のTmである。

【図 16】



鋳型 ¹⁾	上流プライマー	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Tm (°C) ⁴⁾
+	+	+	NG-CTO-1	76.0
-	+	+	NG-CTO-1	-
+	+	+	NG-CTO-3	69.0
-	+	+	NG-CTO-3	-
+	+	+	NG-CTO-4	64.5
-	+	+	NG-CTO-4	-

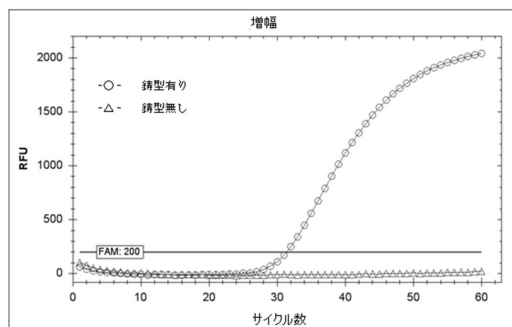
¹⁾ 鋳型は、*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドである。

²⁾ PTOは、標識を有しない。

³⁾ CTOは、テンプレティング部位にクエンチャー分子及び蛍光レポーター分子を有する。8個のCTOは、それらのテンプレティング部位にそれぞれ異なる配列を有する。

⁴⁾ Tmは、伸長二本鎖のメルティング温度を示す。

【図 17 A】



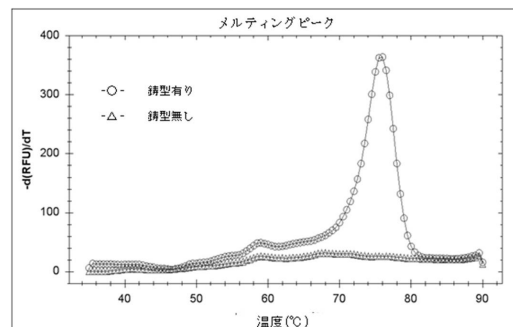
鋳型 ¹⁾	上流プライマー	下流プライマー	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Ct
+	+	+	+	+	31.98
-	+	+	+	+	-

¹⁾ 鋳型は、*Neisseria gonorrhoeae* のゲノムDNAである。

²⁾ PTOは、標識を有しない。

³⁾ CTOは、テンプレティング部位にクエンチャー分子及び蛍光レポーター 分子を有する。

【図 17 B】



鋳型 ¹⁾	上流プライマー	下流プライマー	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Tm (°C) ⁴⁾
+	+	+	+	+	76.0
-	+	+	+	+	-

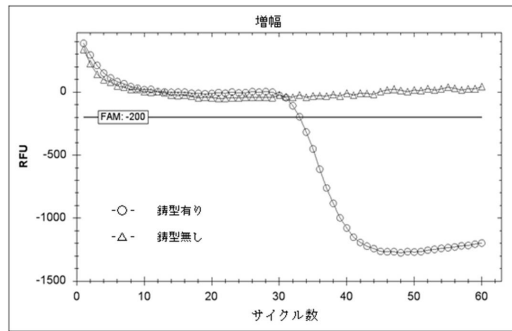
¹⁾ 鋳型は、*Neisseria gonorrhoeae* のゲノムDNAである。

²⁾ PTOは、標識を有しない。

³⁾ CTOは、テンプレティング部位にクエンチャー分子及び蛍光レポーター分子を有する。

⁴⁾ Tmは、伸長二本鎖のメルティング温度を示す。

【図 18 A】



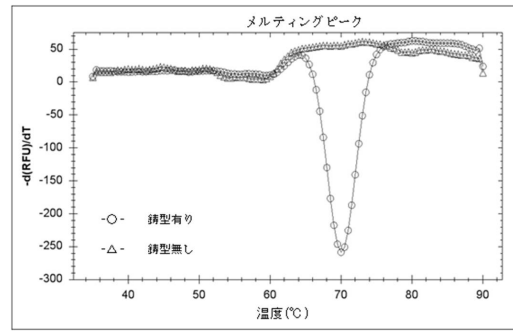
鑄型 ¹⁾	上流プライマー	下流プライマー	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Ct
+	+	+	+	+	33.08
-	+	+	+	+	-

¹⁾ 鑄型は、*Neisseria gonorrhoeae*のゲノムDNAである。

²⁾ PTOは、標識を有しない。

³⁾ CTOは、その5'-末端に蛍光レポーター分子で標識された非天然ヌクレオチド(iso-dC)を有する。

【図 18 B】



鑄型 ¹⁾	上流プライマー	下流プライマー	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Tm(°C) ⁴⁾
+	+	+	+	+	70.0
-	+	+	+	+	-

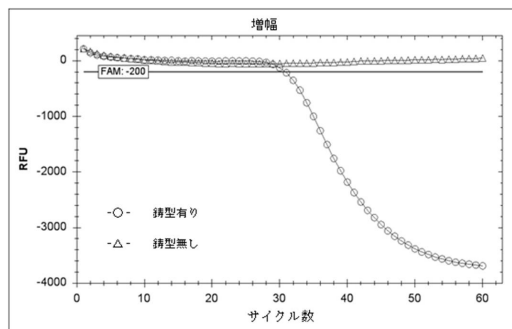
¹⁾ 鑄型は、*Neisseria gonorrhoeae*のゲノムDNAである。

²⁾ PTOは、標識を有しない。

³⁾ CTOは、その5'-末端に非天然ヌクレオチド(iso-dC)及び蛍光レポーター分子を有する。

⁴⁾ Tmは、伸長二本鎖のメルティング温度を示す。

【図 19 A】



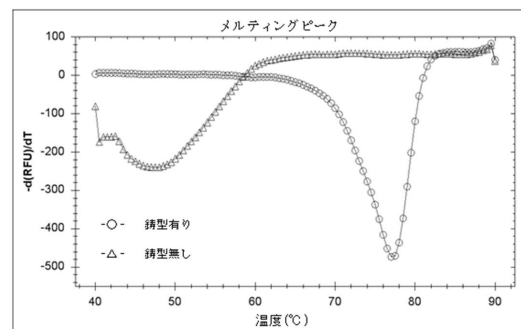
鑄型 ¹⁾	上流プライマー	下流プライマー	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Ct
+	+	+	+	+	28.78
-	+	+	+	+	-

¹⁾ 鑄型は、*Neisseria gonorrhoeae*のゲノムDNAである。

²⁾ PTOは、その5'-末端にクエンチャー分子を有する。

³⁾ CTOは、その3'-末端に蛍光レポーター分子を有する。

【図 19 B】



鑄型 ¹⁾	上流 プライマー	下流 プライマー	PTO ²⁾	CTO ³⁾	Tm (°C)	
					ター ゲット ⁴⁾	非- ター ゲット ⁵⁾
+	+	+	+	+	78.5	-
-	+	+	+	+	-	48.0

¹⁾ 鑄型は、*Neisseria gonorrhoeae*のゲノムDNAである。

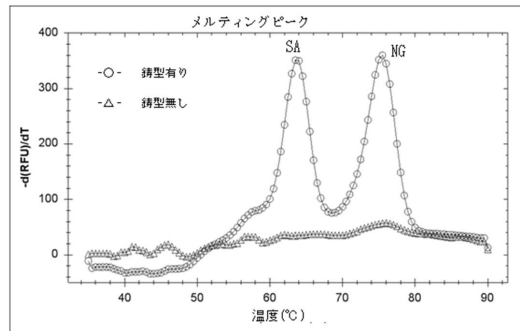
²⁾ PTOは、その5'-末端にクエンチャー分子を有する。

³⁾ CTOは、その3'-末端に蛍光レポーター分子を有する。

⁴⁾ ターゲットは、ターゲットシグナルを示し、これは、伸長二本鎖のTmである。

⁵⁾ 非-ターゲットは、非-ターゲットシグナルを示し、これは、非切断PTO及びCTO間のハイブリッド形成物のTmである。

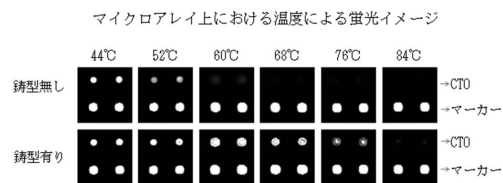
【図 20】



鑄型 ¹⁾	上流プライマー	下流プライマー	PTO ²⁾	CTO ³⁾	T _m (°C) ⁴⁾
NG及びSA	+	+	+	+	75.5 and 69.5
-	+	+	+	+	-

- ¹⁾ 鑄型は、*Neisseria gonorrhoeae* (NG)及び*Staphylococcus aureus* (SA)のゲノムDNAである。
²⁾ PTOは、標識を有しない。
³⁾ CTOは、テンプレティング部位にクエンチャー分子及び蛍光レポーター分子を有する。NG及びSAに対するCTOは、同一な種類の蛍光レポーター分子(FAM)を有する。
⁴⁾ T_mは、伸長二本鎖のメルティング温度を示す。

【図 21A】

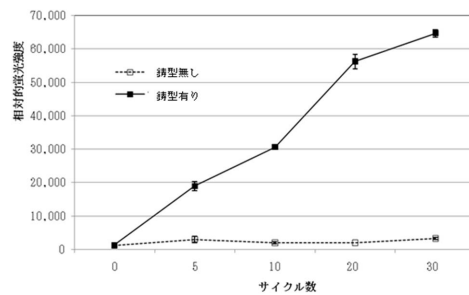


【図 22B】

マイクロアレイ上におけるサイクル数による蛍光強度の変化

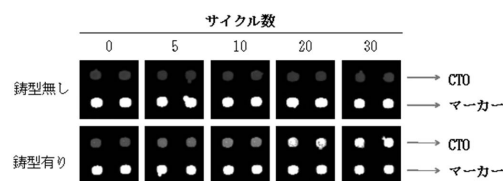
鑄型 ¹⁾	上流プライマー	PTO ²⁾	CTO ³⁾	相対的蛍光強度				
				サイクル数: 0	5	10	20	30
-	+	+	+	1,216 (± 96.3)	3,012 (± 929.1)	1,988 (± 276.5)	1,961 (± 25.5)	3,261 (± 278.3)
+	+	+	+	1,304 (± 0.7)	18,939 (± 1,342.1)	30,619 (± 295.0)	56,248 (± 2,306.3)	64,642 (± 1,110.2)

- ¹⁾ 鑄型は、*Neisseria gonorrhoeae*遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドである。
²⁾ PTOは、その5'-末端に蛍光レポーター分子を有する。
³⁾ CTOは、その3'-末端にあるアミノ基を利用し、固相基質の表面上に固定化される。



【図 23A】

マイクロアレイ上におけるサイクル数による蛍光イメージ

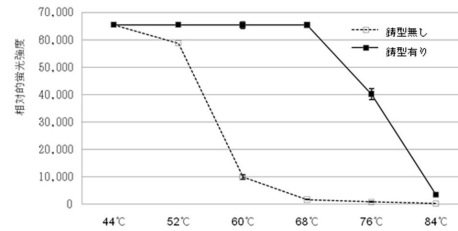


【図 21B】

マイクロアレイ上における温度による蛍光強度

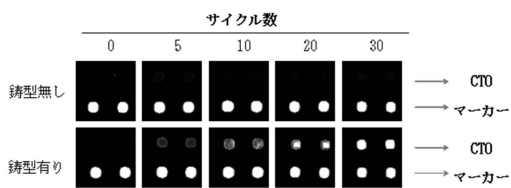
機型 ¹⁾	上流 プライマー	PTO ²⁾	CTO ³⁾	相対的蛍光強度					
				44℃	52℃	60℃	68℃	76℃	84℃
-	+	+	+	65,438 (± 1.4)	56,761 (± 2,243.3)	9,989 (± 473.1)	1,728 (± 186.1)	962 (± 184.6)	303 (± 92.7)
+	+	+	+	65,434 (± 3.5)	65,424 (± 11.3)	65,397 (± 9.8)	65,393 (± 12.7)	40,184 (± 3,237.9)	3,490 (± 246.8)

- ¹⁾ 鑄型は、*Neisseria gonorrhoeae*遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドである。
²⁾ PTOは、その5'-末端に蛍光レポーター分子を有する。
³⁾ CTOは、その3'-末端にあるアミノ基を利用し、固相基質の表面上に固定化される。



【図 22A】

マイクロアレイ上におけるサイクル数による蛍光イメージ

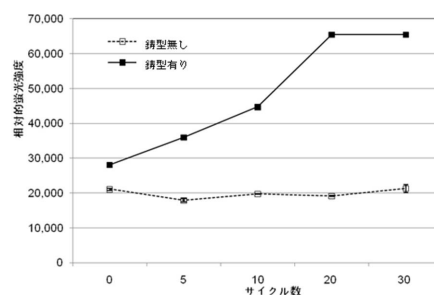


【図 23B】

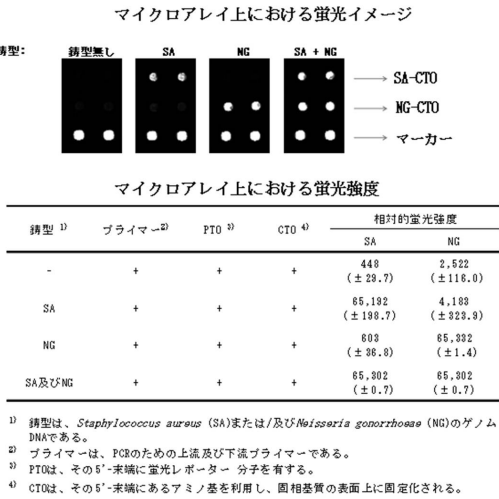
マイクロアレイ上におけるサイクル数による蛍光強度の変化

鑄型 ¹⁾	上流プライマー	PTO ²⁾	CTO ³⁾	相対的蛍光強度				
				サイクル数: 0	5	10	20	30
-	+	+	+	21,047 (± 334.5)	17,867 (± 478.7)	19,739 (± 92.0)	19,144 (± 176.8)	21,259 (± 1,130.7)
+	+	+	+	26,078 (± 460.3)	35,967 (± 555.1)	44,674 (± 166.0)	65,423 (± 2.1)	65,426 (± 2.8)

- ¹⁾ 鑄型は、*Neisseria gonorrhoeae*遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドである。
²⁾ PTOは、標識を有しない。
³⁾ CTOは、テンプレティング部位にクエンチャー分子及び蛍光レポーター分子を有する。CTOは、その3'-末端にあるアミノ基を利用し、固相基質の表面上に固定化される。



【図 2 4】



【配列表】

0006054357000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 PCT/KR2011/004452

(32)優先日 平成23年6月17日(2011.6.17)

(33)優先権主張国 韓国(KR)

(72)発明者 チュン・ジョン ユーン

大韓民国 ソウル 138-794 ソンパーク シンチョンードン 7-14 チャムシル ザ
シャープ スター パーク 101-3702

(72)発明者 リ・ヨン チョ

大韓民国 ソウル 138-240 ソンパーク シンチョンードン 17 パークリオ アパー
トメント 112-3501

審査官 坂崎 恵美子

(56)参考文献 特表2001-526526 (JP, A)

Nat Biotechnol., 1999年 3月, Vol.17, No.3, p.292-296

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

C12Q 1/68

C A p l u s / W P I D S / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)