

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4360904号
(P4360904)

(45) 発行日 平成21年11月11日(2009.11.11)

(24) 登録日 平成21年8月21日(2009.8.21)

(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 1/42 (2006.01)	C 1 2 Q 1/42
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 6 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2003-525595 (P2003-525595)	(73) 特許権者	598041463
(86) (22) 出願日	平成14年8月29日 (2002.8.29)		ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス
(65) 公表番号	特表2005-501551 (P2005-501551A)		・コーポレーション
(43) 公表日	平成17年1月20日 (2005.1.20)		アメリカ合衆国ニュージャージー州088
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/027564		55-1327, ピスカタウェイ, センテ
(87) 国際公開番号	W02003/020891		ニアル・アベニュー 800, ビー・オー
(87) 国際公開日	平成15年3月13日 (2003.3.13)		・ボックス 1327
審査請求日	平成17年8月24日 (2005.8.24)		800 Centennial Aven
(31) 優先権主張番号	60/315,798		ue, P. O. Box 1327, Pi
(32) 優先日	平成13年8月29日 (2001.8.29)		scataway, New Jersey
(33) 優先権主張国	米国 (US)		08855-1327, United
(31) 優先権主張番号	10/113,025		States of America
(32) 優先日	平成14年4月1日 (2002.4.1)	(74) 代理人	100137545
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 荒川 聡志
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単一ヌクレオチドの増幅およびポリメラーゼによる検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸試料を検出する方法であって、当該方法が、

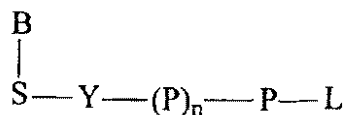
(a) 鋳型と、非加水分解性プライマーと、1種以上の末端ホスフェート標識ヌクレオチドと、DNAポリメラーゼと、ホスファターゼと、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素であってDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼ及びそれらの組合せから選択し得る酵素との反応を含むDNAポリメラーゼ反応であって標識ポリホスフェートを生じるDNAポリメラーゼ反応を実施し、

(b) 上記標識ポリホスフェートをホスファターゼと反応させて、検出可能な種を生じさせ、

(c) 上記検出可能な種を検出する

ことを含み、上記末端ホスフェート標識ヌクレオチドが次の式 I のものである、方法。

【化 1】



式中、P＝ホスフェート（PO₃）及びその誘導体であり、nは3以上であってポリホスフェート鎖中に4つ以上のホスフェート基を含んでおり、Yは酸素又は硫黄原子であり、

Bは窒素含有複素環式塩基であり、Sは非環式部分、炭素環式部分又は糖部分であり、Lは、天然又は修飾ヌクレオチドの末端ホスフェートにリン酸エステル、チオエステル又はホスホラミデート結合を形成するのに適当なヒドロキシル基、スルフヒドリル基又はアミノ基を含む酵素で活性化可能な標識であり、P-Lは、ホスフェートが除去されたときに、独立して検出可能になるリン酸化標識である。

【請求項2】

前記糖部分が2',3'-ジデオキシリボシルである、請求項1記載の方法。

【請求項3】

核酸試料を特徴づける方法であって、当該方法が、

(a) 鋳型と、非加水分解性プライマーと、1種以上の末端ホスフェート標識ヌクレオチドと、DNAポリメラーゼと、ホスファターゼと、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素であってDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼ及びそれらの組合せから選択し得る酵素との反応を含むDNAポリメラーゼ反応であって標識ポリホスフェートを生じるDNAポリメラーゼ反応を実施し、

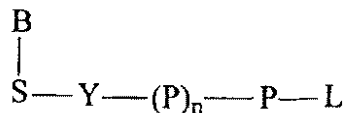
(b) 上記標識ポリホスフェートをホスファターゼと反応させて、上記試料に特徴的な検出可能な種を生じさせ、

(c) 上記検出可能な種を検出し、

(d) 上記検出に基づいて上記核酸を特徴づける

ことを含み、上記末端ホスフェート標識ヌクレオチドが次の式Iのものである、方法。

【化2】



式中、P=ホスフェート(PO_3)及びその誘導体であり、nは3以上であってポリホスフェート鎖中に4つ以上のホスフェート基を含んでおり、Yは酸素又は硫黄原子であり、Bは窒素含有複素環式塩基であり、Sは非環式部分、炭素環式部分又は糖部分であり、Lは、天然又は修飾ヌクレオチドの末端ホスフェートにリン酸エステル、チオエステル又はホスホラミデート結合を形成するのに適当なヒドロキシル基、スルフヒドリル基又はアミノ基を含む酵素で活性化可能な標識であり、P-Lは、ホスフェートが除去されたときに、独立して検出可能になるリン酸化標識である。

【請求項4】

工程(a)が、別個の標識を有する2種以上の末端ホスフェート標識ヌクレオチドの存在下で前記ポリメラーゼ反応を実施することをさらに含む、請求項3記載の方法。

【請求項5】

前記糖部分が2',3'-ジデオキシリボシルである、請求項3記載の方法。

【請求項6】

請求項3記載の方法において、工程(b)で独特なシグナルプロファイルを有する検出可能な種を生じさせ、工程(d)で前記検出可能な種の存在又は不存在及び上記独特なシグナルプロファイルに基づいて前記核酸における突然変異を特徴づけ、もって標的核酸配列中の特異的ヌクレオチド塩基の突然変異を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願)

本出願は、2001年8月29日に出願した、米国仮出願第60/315,798号の表題35§119(e)の下で優先権の恩典を主張する。

【0002】

(技術分野)

10

20

30

40

50

本発明は、DNAポリメラーゼのための基質として非一加水分解可能なプライマーおよび末端－ホスフェート標識ヌクレオチドの使用に基づいて、試料中でポリヌクレオチドを検出して特徴づける方法に一般的に関する。本発明はさらに、標的ポリヌクレオチドにおける特異的なヌクレオチド塩基の突然変異を検出する方法に関する。使用される標識は、酵素で活性化可能であって、化学発光の、蛍光性の、電気化学的および発色性の部分ならびに質量タグを含む。

【0003】

(背景技術)

高度の特異性および感度を持って試料中で特異的な核酸もしくはアナライトを検出する方法は公知である。核酸配列間の相補性に基づいている分析手法は、遺伝子の特性の直接分析を可能とする。これは、遺伝子の障害もしくは正常細胞のがん性変化を確認する非常に有用な手段を提供する。

10

【0004】

しかしながら、試料中での微量の標的ヌクレオチドの検出および特徴づけは困難である。それ故に、遺伝子の直接検出方法は一般的に、特異的な標的配列もしくはアナライトの存在に基づいて核酸配列を先ず増幅することを必要とする。増幅に引き続いて、増幅された配列が検出されて、定量化される。核酸のための従来の検出システムには、蛍光性の標識の検出、蛍光性の酵素－結合検出システム、抗体－仲介標識検出および放射性標識の検出が含まれる。

20

【0005】

核酸配列を増幅する方法として、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)方法が公知である。現在、PCRは、核酸のインビトロ増幅のための最も従来の手段である。しかしながら、PCRは、厳密な温度制御の必要性、対数的増幅による不適切な定量化、微量の汚染DNAの同時の増幅によりもたらされる誤った結果の危険を含む、特定の不利点を有する。

【0006】

配列の検出および特徴づけを伴う増幅方法に加えて、増幅された分解生成物を検出するシグナル増幅方法がある、即ち、反応の生成物もしくは副産物が標的核酸からのシグナルとして増幅される。

【0007】

例えば、 λ -エキソヌクレアーゼを利用して、二本鎖DNAを特異的に開裂するところのサイクリングアッセイが開発されている(C.G. Copley et al., Bio Techniques, Vol. 13, No. 6, pp 882-892, 1992)。この方法は、オリゴヌクレオチドプローブをそれに相補的な核酸配列でハイブリダイズすることを伴い、 λ -エキソヌクレアーゼが形成した二本鎖DNAに作用して、ハイブリダイズされたプローブを分解させる。プローブは、次いで分解されるところのもう一つのプローブに置き換えられる。この方式で、サイクリング反応が繰り返される。この方法では、標的DNA配列の存在は、分解されたプローブの検出により見積もられる。この方法の不利点は、 λ -エキソヌクレアーゼが、基質としてその5'-末端でリン酸化されるプローブを必要とすることである。プローブの既知方法による化学合成に引き続いて、5'-末端をリン酸化する必要があるが、全ての5'-末端が完全にリン酸化されることを確認することはしばしば困難である。この方法のさらに別な問題は、サイクリング反応の低い代謝回転数、即ち、ハイブリダイゼーションがプライマーおよび標的ヌクレオチドの間に起こる回数、である。ハイブリダイゼーション工程が繰り返して起こらねばならないので、代謝回転数は低い。

30

40

【0008】

エキソヌクレアーゼによるさらに別なサイクリングアッセイがEP 500224/A1に開示されている。この方法では、標的DNAに相補的なDNA鎖の合成は、もう一つのプライマーが前にハイブリダイズされた分解したプライマーの代わりに標的配列とハイブリダイズするように、プライマーから同時に同一のプライマーの5'→3'エキソヌクレアーゼによる他の側からの分解と共に進行する。それ故に、単一のサイクル反応において、DNAポリメラーゼによる相補的な鎖の合成ならびに合成された鎖の分解の両方が繰り返して起こる

50

。この方法の不利点は、低い代謝回転数であり、ハイブリダイゼーション工程は、そこで繰り返して起こらねばならない、律速段階である。

【0009】

特異的配列を含むポリヌクレオチドの検出のためのさらなるサイクリングアッセイは、米国特許第5,849,487号に開示されている。この方法は、シグナル増幅および分解生成物の検出に頼る。この方法は、核酸ポリメラーゼ、3'→5'エキソヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ抵抗性プライマー、限定濃度でDNAであり得る標的核酸、および少なくとも一つのデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)を用いて、標的核酸配列を検出することを含む。この方法はさらに、ヌクレアーゼ抵抗性プライマーの3'-末端に隣接して位置するヌクレオチド種である相補的鎖を合成し、それに引き続いてプライマーの末端に結合したヌクレオチド種の分解および得られたピロリン酸もしくはデオキシヌクレオシド一リン酸の検出を行うことを含み、ヌクレオチド種の合成および分解は一つもしくはそれ以上の回数で繰り返される。現在広く使用されるこの方法ならびに他の検出方法の不利点は、最終の標識生成物もしくは副産物から標識出発原料を分離する必要がある。そのような分離は一般的に、検出のためにゲル電気泳動もしくは標的核酸配列の膜の上への固定化を必要とする。例えば、米国特許第5,849,487号には、ヌクレアーゼ反応により形成したデオキシヌクレオシド一リン酸が、クロマトグラフィーで分離されて、光学的に測定された。これに代えて、DNAポリメラーゼによる相補性塩基の組み込みで形成されるピロリン酸をアデノシン-5'-ホスホ硫酸およびアデノシン三リン酸スルフラゼと反応させ、アデノシン三リン酸を形成させて、次いでそれをルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いて検出させ得る；これは、さらに別な試薬およびインキュベーション工程を必要とする不利点を提示する。

【0010】

さらに、米国特許第5,849,487号は、ヌクレアーゼ消化の後に残るヌクレオチド種の存在もしくは不存在のみを用いて、標的中の特異的ヌクレオチド塩基の突然変異を検出する。即ち、単にもしも特異的塩基が検出されるべき突然変異であるか、もしくはそうでない、ときのみ、ヌクレオチドは、プライマーの3'-末端の上に結合するであろう。この特許は、存在する実際の突然変異を最初の分析により同定する方法を開示していない。

【0011】

DNAおよびRNAポリメラーゼは、トリホスフェート部分のガンマ位置におけるかもしくは代わりに修飾を持つヌクレオシドを認識して、利用することができることが知られている。種々のポリメラーゼがガンマー修飾ヌクレオチド三リン酸(NTPの)を認識して、利用する能力は、ガンマホスフェートに付加した部分に依存して変わるように見えることがさらに公知である。

【0012】

ガンマーホスフェートで修飾したヌクレオチドの存在下でRNAポリメラーゼからRNA合成をモニターするための比色アッセイは報告されている(Vassiliou W, Epp JB, Wang BB, Del Vecchio AM, Widlanski T, Kao CC., 「ポリメラーゼ無差別性の利用：簡単な比色性RNAポリメラーゼアッセイ」、Virology. 2000 Sep 1;274(2):429-37を参照)。この報告においては、RNAポリメラーゼ反応は、ガンマーホスフェートにおいてジニトロフェニル基で修飾した、ガンマー修飾のアルカリ性ホスファターゼ耐性のヌクレオチド三リン酸の存在下で実施された。RNAポリメラーゼ反応が、単なるヌクレオチド三リン酸およびホモポリマー性鋳型としてこのガンマー修飾のNTPの存在下で実施されたときには、RNAポリメラーゼが修飾NTPを認識して、利用することができることが見出された。さらに、ポリメラーゼ反応が、発色性p-ニトロフェニレートへのホスホリル転移のピロリン酸p-ニトロフェニルのアルド-生成物を消化した、アルカリ性ホスファターゼの存在下で実施されたときには、吸光度の増加が報告された。この検出方法の不利点は、アルカリ性ホスファターゼの存在下で実施される、リアルタイムの比色アッセイは、ホモポリマー性鋳型でもって単に働くことである。

【0013】

それ故に、核酸を検出して特徴づけする方法を提供することは恩恵をもたらして、その方法は、エキソヌクレアーゼによるサイクリングアッセイにおいてDNAポリメラーゼのための基質として末端ホスフェート標識ヌクレオチドの利用を含むであろう。もしそのような方法が、標識生成物もしくは副産物から標識出発原料を分離する必要を除外するところの標的核酸から増幅された検出種の生産のためにヌクレオチドの末端ホスフェートにおいて酵素で活性化可能な標的を使用するであろうならば、さらに恩恵をもたらすであろう。さらに、もしそのような核酸を検出して特徴づけする方法が、日常的な実験室計器を用いてヘテロポリマー性標的核酸のリアルタイムのモニタリングを可能とするであろうことは高度に望ましいであろう。

10

【0014】

(発明の概要)

本発明の態様は、ポリヌクレオチドを検出する方法を提供することであって、その中では、DNAに作用する3'→5'DNAエキソヌクレアーゼが、標的ヌクレオチドからのシグナルが増幅されて、標識出発原料から標識生成物を分離する必要無しに検出され得るように、DNA反応ポリメラーゼおよびホスファターゼと一緒に用いられる。

【0015】

本発明は、核酸試料を検出する方法を提供する。一つの方法は、(a) DNAポリメラーゼ反応を実施し、反応が、鋳型、非一加水分解可能なプライマー、少なくとも一つの末端ホスフェート標識ヌクレオチド、DNAポリメラーゼならびに、酵素がDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼおよびそれらの組合せから選択され得る、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素の反応を含み、その反応は標識ポリホスフェートの生産をもたらす；(b)標識ポリホスフェートがホスファターゼと反応して、検出可能な種を生産することを可能とすること；ならびに(c)検出可能な種を検出すること：の工程を含む。

20

【0016】

さらに、核酸試料を検出する方法であって、(a) DNAポリメラーゼ反応を実施し、反応が、鋳型、非一加水分解可能なプライマー、ポリホスフェート鎖中に四つもしくはそれ以上のホスフェート基を有する少なくとも一つの末端ホスフェート標識ヌクレオチド、DNAポリメラーゼならびに、酵素がDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼおよびそれらの組合せから選択され得る、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素の反応を含み、その反応は標識ポリホスフェートの生産をもたらす；ならびに(b)標識ポリホスフェートを検出すること：の工程を含む、方法が提供される。

30

【0017】

本発明のもう一つの態様は、核酸試料を検出する方法であって、(a) DNAポリメラーゼ反応を実施し、反応が、鋳型、非一加水分解可能なプライマー、ポリホスフェート鎖中に四つもしくはそれ以上のホスフェート基を有する少なくとも一つの末端ホスフェート標識ヌクレオチド、DNAポリメラーゼならびに、酵素がDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼおよびそれらの組合せから選択され得る、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素の反応を含み、その反応は標識ポリホスフェートの生産をもたらす；(b)標識ポリホスフェートがホスファターゼと反応して、検出可能な種を生産することを可能とすること；ならびに(c)検出可能な種を検出すること：の工程を含む、方法に関する。

40

【0018】

本発明はさらに、核酸試料を特徴づけする方法を提供する。例えば、本発明は、(a) DNAポリメラーゼ反応を実施し、反応が、鋳型、非一加水分解可能なプライマー、少なくとも一つの末端ホスフェート標識ヌクレオチド、DNAポリメラーゼならびに、酵素がDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼおよびそれらの組合せから選択され得る、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素の反応を含み、その反応は標識ポリホスフェートの生産をもたらす；(b)標識ポリホスフェートがホスファターゼと反応して、検出可能な種を生産することを可能とすること；(c)検出可能な種を検出すること；ならびに(d)検出に基づいて核酸を特徴づけすること：の工程を含む、方法を提供する。

50

【0019】

本発明によりさらに包含されるものは、核酸試料を特徴づける方法であって、(a) DNAポリメラーゼ反応を実施し、反応が、鋳型、非一加水分解可能なプライマー、ポリホスフェート鎖中に四つもしくはそれ以上のホスフェート基を有する少なくとも一つの末端ホスフェートー標識ヌクレオチド、DNAポリメラーゼならびに、酵素がDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼおよびそれらの組合せから選択され得る、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素の反応を含み、その反応は標識ポリホスフェートの生産をもたらす；(b)標識ポリホスフェートを検出すること；ならびに(c)検出に基づいて核酸試料を特徴づけること：の工程を含む、方法である。

【0020】

また、核酸試料を特徴づける方法であって、(a) DNAポリメラーゼ反応を実施し、反応が、鋳型、非一加水分解可能なプライマー、ポリホスフェート鎖中に四つもしくはそれ以上のホスフェート基を有する少なくとも一つの末端ホスフェートー標識ヌクレオチド、DNAポリメラーゼならびに、酵素がDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼおよびそれらの組合せから選択され得る、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素の反応を含み、その反応は標識ポリホスフェートの生産をもたらす；(b)標識ポリホスフェートがホスファターゼと反応して、試料に特徴的なシグナルプロファイルを有する検出可能な種を生産することを可能とすること；(c)検出可能な種を検出すること；ならびに(d)シグナルプロファイルに基づいて核酸試料を特徴づけること：の工程を含む、方法が提供される。

【0021】

さらに、本発明は、標的核酸鎖中の特異的ヌクレオチド塩基の突然変異を検出する方法を提供する。一つの発明的方法は、(a) DNAポリメラーゼ反応を実施し、反応が、鋳型、非一加水分解可能なプライマー、少なくとも一つの末端ホスフェートー標識ヌクレオチド、DNAポリメラーゼならびに、酵素がDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼおよびそれらの組合せから選択され得る、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素の反応を含み、その反応は標識ポリホスフェートの生産をもたらす；(b)標識ポリホスフェートがホスファターゼと反応して、独特なシグナルプロファイルを有する検出可能な種を生産することを可能とすること；(c)検出可能な種を検出すること；ならびに(d)検出可能な種の存在もしくは不存在およびその独特なシグナルプロファイルに基づいて核酸配列における突然変異を特徴づけること：の工程を含む。

【0022】

これに加えて、標的核酸鎖中の特異的ヌクレオチド塩基の突然変異を検出する方法であって、以下の工程：(a) DNAポリメラーゼ反応を実施し、反応が、鋳型、非一加水分解可能なプライマー、ポリホスフェート鎖中に四つもしくはそれ以上のホスフェート基を有する少なくとも一つの末端ホスフェートー標識ヌクレオチド、DNAポリメラーゼならびに、酵素がDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼおよびそれらの組合せから選択され得る、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素の反応を含み、その反応は、もし末端ホスフェートー標識ヌクレオチドが特異的塩基に相補的であるならば、標識ポリホスフェートの生産をもたらす；(b)標識ポリホスフェートを検出すること；ならびに(c)標識ポリホスフェートの存在もしくは不存在に基づいて核酸配列における突然変異を特徴づけること、を含む、方法が提供される。

【0023】

本発明によりさらに包含されるものは、標的核酸鎖中の特異的ヌクレオチド塩基の突然変異を検出する方法であって、(a) DNAポリメラーゼ反応を実施し、反応が、鋳型、非一加水分解可能なプライマー、ポリホスフェート鎖中に四つもしくはそれ以上のホスフェート基を有する少なくとも一つの末端ホスフェートー標識ヌクレオチド、DNAポリメラーゼならびに、酵素がDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼおよびそれらの組合せから選択され得る、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素の反応を含み、その反応は、もし末端ホスフェートー標識ヌクレオチドが特異的塩基に相補的であるならば、標

識ポリホスフェートの生産をもたらす；(b)標識ポリホスフェートがホスファターゼと反応して、独特なシグナルプロファイルを有する検出可能な種を生産することを可能とすること；(c)検出可能な種を検出すること；ならびに(d)検出可能な種の存在もしくは不存在におよびその独特なシグナルプロファイルに基づいて核酸配列における突然変異を特徴づけること：の工程を含む、方法である。

【0024】

ポリヌクレオチドを検出するキットが本発明によりさらに提供されて、一つのキットは、(a)少なくとも一つの末端－ホスフェート－標識ヌクレオチド；(b)DNAポリメラーゼ；(c)ホスファターゼ；および(d)DNAを3'→5'方向で分解するのに十分な酵素活性を持つヌクレアーゼを含む。

10

【0025】

(a)少なくとも一つの末端－ホスフェート－標識ヌクレオシド；(b)ホスファターゼ；および(c)DNAを3'→5'方向で分解するのに十分な酵素活性を持つDNAポリメラーゼ：を含むところのポリヌクレオチドを検出するさらなるキットが提供される。

【0026】

本発明のさらなる態様は、標的核酸鎖中の特異的ヌクレオチド塩基の突然変異を検出するためのキットを提供することであって、一つのキットは(a)少なくとも一つの末端－ホスフェート－標識ヌクレオチド；(b)DNAポリメラーゼ；(c)ホスファターゼ；および(d)DNAを3'→5'方向で分解するのに十分な酵素活性を持つヌクレアーゼ：を含む。

【0027】

20

最後に、(a)少なくとも一つの末端－ホスフェート－標識ヌクレオチド；(b)ホスファターゼ；および(c)DNAを3'→5'方向で分解するのに十分な酵素活性を持つDNAポリメラーゼ：を含むところの標的核酸鎖中の特異的ヌクレオチド塩基の突然変異を検出するためのキットが本明細書で提供される。

【0028】

(本発明の説明)

本明細書中で定義される際には、用語“ヌクレオシド”とは、炭素環式のもしくは非環式のリンカーのような、糖または糖代用品に結合したプリン、デアザプリン、ピリミジンまたは修飾塩基を、1'位置または同等な位置に含む化合物であって、2'-デオキシおよび2'-ヒドロキシル、2',3'-ジデオキシ形ならびに他の置換を含む。

30

【0029】

本明細書中で使用される際には、用語“ヌクレオチド”とは、エステル化部位がペントース糖のC-5位置に付加したヒドロキシル基に典型的には対応する、ヌクレオシドのリン酸エステルを指す。

【0030】

用語“オリゴヌクレオチド”には、デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド等を含む、ヌクレオチドの線状オリゴマーもしくはそれらの誘導体が含まれる。本明細書を通じて、オリゴヌクレオチドが文字の配列により表されるときは何時でも、ヌクレオチドは、左から右に5'→3'の順序にあって、そこでは、別に指示が無い限り、Aはデオキシアデノシンを意味し、Cはデオキシシチジンを意味し、Gはデオキシグアノシンを意味し、そしてTはチミジンを意味する。

40

【0031】

用語“プライマー”とは、独特な核酸配列に特異的な方式でアニールして、その独特な配列の増幅を可能とするところの線状オリゴヌクレオチドを指す。

【0032】

語句“標的核酸配列”等とは、その配列の個性、またはヌクレオシドの順番もしくは位置が本発明の一つもしくはそれ以上の方法により決定される、核酸を指す。

【0033】

本発明は、便利なアッセイが、標的ポリヌクレオチド中の特異的塩基に相補的な末端－ホスフェート－標識ヌクレオチドの非一加水分解可能なプライマーの上への添加に引き続

50

いてそのヌクレアーゼ分解をモニターするために用いられる、試料中でポリヌクレオチドを検出して特徴づけする方法に関する。DNAポリメラーゼは、デオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)から成長するオリゴヌクレオチド鎖の3'ヒドロキシルへのヌクレオシドリン酸の転移を介してオリゴヌクレオチドを合成する。

【0034】

この反応を駆動する力は、酸無水物結合の開裂および無機のピロホスフェートの付随する形成である。本発明は、ヌクレオチドの末端ホスフェートの構造的修飾はポリメラーゼ反応において機能するその能力を破棄しないという発見を利用する。オリゴヌクレオチドの合成反応は、ヌクレオチドの α -および β -ホスホリル基においてのみ直接な変化を伴い、末端ホスフェート位置における修飾を持つヌクレオチドを核酸ポリメラーゼ反応のための基質として貴重であるようにさせる。

10

【0035】

本発明により提供される方法は、末端ホスフェートに付加した電気化学的標識、質量タグ、または発色性の、化学発光のもしくは蛍光性の色素標識を持つデオキシヌクレオシドポリリン酸またはジデオキシヌクレオシドポリリン酸類似体のような、ヌクレオシドポリリン酸類似体を利用する。核酸ポリメラーゼがこの類似体を基質として用いるときには、酵素で活性化可能な標識は、ホスホリル転移の無機のポリホスフェート副産物上に存在する。ホスファターゼによるホスホリル転移のポリホスフェート生成物の開裂は、その上に付加した標識中で検出可能な変化をもたらす。例えば、もしも3-シアノウンベリフェロン色素が、ヒドロキシル基を介してヌクレオチドの末端ホスフェート位置に付加されるならば、色素は、408nmにおいて励起されたときには、蛍光を放たないで、それはアルカリ性ホスファターゼに対する基質でない。一旦このヌクレオシドがDNAの中に組み込まれると、放出色素の無機ポリホスフェート(これもまた、408nmにおいて励起されたときには、蛍光を放たない)がアルカリ性ホスファターゼに対する基質である。一旦脱リン酸化されると、色素は、408nmにおいて励起されたときには、蛍光性にかつそれ故に検出可能になる。ポリホスフェート生成物の特異的分析を、出発原料から反応生成物を分離する必要無しで、ポリメラーゼおよびエキソヌクレアーゼ反応液のような、同一の反応溶液中で行うことができる。これは、蛍光計もしくは分光光度計のような日常的な計測器を用いて、ポリメラーゼ反応の間に形成される核酸の検出および、任意に、定量化を可能とする。

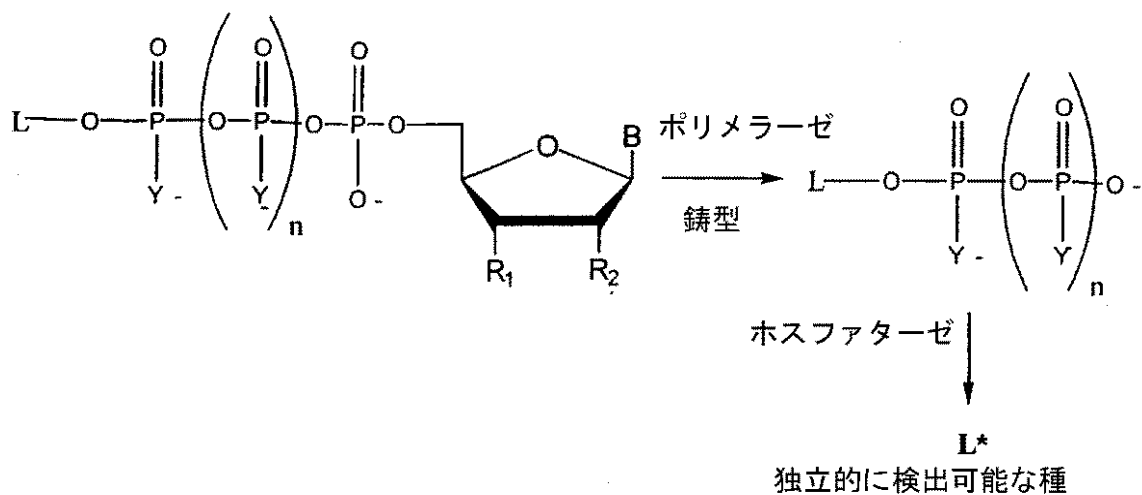
20

30

【0036】

RNAおよびDNAポリメラーゼは、修飾した末端ホスホリル基を持つヌクレオチドを認識することができる一方で、本発明者等はこの出発原料はホスファターゼのための基質ではないことを決定していることが注目される。下の反応式は、本発明の方法において最も関連する分子；即ち、末端ホスフェート標識ヌクレオチド、標識ポリホスフェート副産物および酵素で活性化された標識、を示す。

【化 1】



10

【0037】

上の反応式において、 n は1もしくはそれより大であり、 R_1 および R_2 は独立してH、SH、SR、F、Br、Cl、I、 N_3 、 NH_2 、NHR、ORもしくはOHであり；Bは天然もしくは修飾ヌクレオシド塩基であり；XはO、SもしくはNHであり；YはO、Sもしくは BH_3 であり；そしてLは、発色性の、蛍光原のもしくは化学発光の分子、質量タグまたは電気化学的に検出可能な部分であり得るところのホスファターゼで活性化可能な標識である。質量タグは、質量の相違により他の反応生成物から容易に識別可能であるところの質量スペクトル法に適当な小分子量部分である。電気化学的タグは、容易に酸化可能なもしくは還元可能な種である。 n が2もしくはそれより大であるときには、ヌクレオチドは、 n が1であるときよりポリメラーゼに対して顕著にさらに良い基質であることが発見されている。それ故に、本発明の好ましい実施態様において、 n は2、3もしくは4である。本発明のさらに望ましい実施態様において、XおよびYはOであり； R_1 および R_2 は独立してHもしくはOHであり；Bはヌクレオチド塩基であり；そしてLは、発色性の、蛍光原のもしくは化学発光の分子である。

20

30

【0038】

本明細書中で提供される核酸配列を検出する方法の一つの実施態様において、工程は、反応が、鋳型、非一加水分解可能なプライマー、少なくとも一つの末端ホスフェート標識ヌクレオチド、DNAポリメラーゼならびに、酵素がDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼおよびそれらの組合せから選択され得る、 $3' \rightarrow 5'$ エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素の反応を含み、その反応は、末端ホスフェート標識ヌクレオチドが鋳型に相補的であるという条件で、標識ポリホスフェートの生産をもたらす、DNAポリメラーゼ反応を実施すること；標識ポリホスフェートが、アルカリ性ホスファターゼのような、ホスファターゼと反応して、検出可能な種を生産することを可能とすること；ならびに検出可能な種を検出することを含む。

40

【0039】

本発明により提供される核酸試料を特徴づける方法において、標的核酸は、検出可能な種の存在もしくは不存在を決定することにより特徴づけされ得る。さらに、検出可能な種は、それに関連した特徴的な染色プロファイルもしくはシグナルプロファイルを有し得て、このプロファイルは試料に特徴的である。これは、検出可能な種の独特なプロファイルに基づく核酸標的の特徴づけを可能とする。

【0040】

標的核酸の一つの特別な特徴づけは、標的核酸配列中の特異的ヌクレオチド塩基の突然変異の検出を含み得る。本明細書中で提供される突然変異を検出する方法は、(a)反応が、鋳型、非一加水分解可能なプライマー、少なくとも一つの末端ホスフェート標識ヌ

50

レオチド、DNAポリメラーゼならびに、酵素がDNAポリメラーゼ、エキソヌクレアーゼおよびそれらの組合せから選択され得る、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素の反応を含み、その反応は標識ポリホスフェートの生産をもたらす、DNAポリメラーゼ反応を実施すること；(b)標識ポリホスフェートがホスファターゼと反応して、独特なシグナルプロファイルを有する検出可能な種を生産することを可能とすること；(c)検出可能な種を検出すること；ならびに(d)検出可能な種の存在もしくは不存在におよびその独特なシグナルプロファイルに基づいて核酸配列における突然変異を特徴づけること；の工程を含む。

【0041】

図1は、上で説明した方法のそれぞれについて使用された一般的反応式をしめす。この反応式において、nは1もしくはそれより大であり、R₁およびR₂は独立してH、OH、SH、SR、F、Br、Cl、I、N₃、NH₂もしくはORであり；Gはグアニンまたは天然もしくは修飾ヌクレオシド塩基の代表であり；Cはシトシンもしくは加えたヌクレオチドに相補的な塩基の代表であり；YはO、SもしくはBH₃であり；そしてLは、ホスフェートが除去されるときに、好ましくは独立して検出可能になる、発色性の、蛍光原の、化学発光のもしくは電気化学的な標識または質量タグである。図1に示すように、標的ポリヌクレオチドは、少なくとも部分的に標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を有するヌクレアーゼ耐性で、非一加水分解可能なポリヌクレオチドプライマーとハイブリダイズする。DNAポリメラーゼ反応は、形成されたハイブリッドおよび少なくとも一つの末端ホスフェート標識ヌクレオチドの存在下で、末端ホスフェート標識ヌクレオシドから誘導されたヌクレオシドーリン酸が、もしそれが標的ポリヌクレオチドに相補的であるならば、ヌクレアーゼ耐性プライマーの3'-末端に結合するようにする条件下で、実施される。これは、独立して検出可能であり得ない標識生成物の付随的形成により達成される。ヌクレオチド種の組み込みの間に付随的に形成した標識ポリホスフェートは、ホスファターゼと反応して、標的ポリヌクレオチドからシグナルとして役立つところの独立して検出可能な種を生産することが許容される。プライマーの3'-末端に相補的ヌクレオチド種の添加は、DNAポリメラーゼ自身に関連し得る3'→5'エキソヌクレアーゼの反応によるその分解により引き続けられる。本質的にヌクレオチド種である相補的鎖の合成および分解は、一つもしくはそれ以上の回数で繰り返されて、サイクリングアッセイを成し遂げる。

【0042】

上で説明した方法において、ポリメラーゼ反応はさらに、標識ポリホスフェート生成物を検出可能な標識へ転化するところのアルカリ性ホスファターゼのような、ホスファターゼの存在下で実施され得る。それ自体で、検出可能な種の形成の連続的な、リアルタイムのモニタリングを可能とする便利なアッセイが、核酸を検出して、特徴づけるために確立される。これは、その中で単一の管の中で実施できる均一系アッセイフォーマットを表す。

【0043】

ポリホスフェート鎖中に四つもしくはそれ以上のホスフェートを有する末端ホスフェート標識ヌクレオチドを含む実施態様において、ホスホリル転移の標識ポリホスフェート副産物は、ホスファターゼ処置の使用無しに検出され得ることは本発明の意図の内にあることが注目される。例えば、天然もしくは修飾ヌクレオシド塩基、特にグアニン、は蛍光マーカーの失活を引き起こすことができることは公知である。それ故に、末端ホスフェート標識ヌクレオチドにおいては、標識は、塩基により部分的に失活させられ得る。ヌクレオシドーリン酸の組み込みで、標識ポリホスフェート副産物は、その強化された蛍光により検出され得る。これに代えて、標識ポリホスフェート生成物を、蛍光、色、化学発光もしくは電気化学的検出による同定の前にクロマトグラフ的分離方法により物理的に分離することが可能である。加えて、質量スペクトル法を用いて、質量の相違により生成物を検出できるかもしれない。

【0044】

検出可能の種を、標的核酸配列の量に実質的に比例する量で生産し得て、それ自体で、標的核酸の量に対するシグナルである。本明細書中で説明された方法はさらに、反応の間に生産された検出可能の種の量に基づいて標的核酸配列を定量化する工程を含み得る。標的核酸配列を定量化する工程は、検出可能の種により作製されたスペクトルと既知の標的量との比較により行うように望まれる。

【0045】

本発明においては、一旦ハイブリダイズされると、オリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型ヌクレオチド配列に比して少なくとも同一なモル量で定量的に反応が進行することを可能とするように、繰り返して機能することができる。本発明の方法で有用なオリゴヌクレオチドプライマーの量は、好都合なハイブリダイゼーションを達成するのに十分なものであるべきである。一般に、高感度アッセイは、検出の意図する範囲に比して少なくとも同一なモル量で、望ましくは5倍過剰にあるプライマーの存在により達成されることができる。

10

【0046】

本発明により提供される方法はさらに、DNAポリメラーゼ反応において一つもしくはそれ以上のさらに別な検出試薬を含む工程を含み得る。さらに別な検出試薬は、検出可能な種から検出的に異なる場所の応答の能力があり得る。例えば、さらに別な検出試薬は抗体であり得る。

【0047】

本発明の標的核酸には、限定するものではないが、染色体DNA、RNA、mRNA、ウィルスもしくはmRNA-誘導化cDNA、または天然のオリゴヌクレオチドが含まれる。

20

【0048】

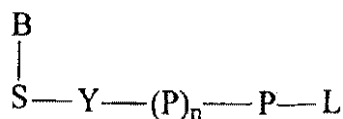
本発明の方法は一般的に、興味のある領域中における標的核酸配列の知識を必要とする。例えば、興味のある領域は、点突然変異を含むと疑われるその領域であり得る。既知の標的配列以外の核酸配列からの汚染の最小化は、本発明における増幅のために望ましい。

【0049】

本発明の方法およびキットにおいて有用な末端-ホスフェート-標識ヌクレオチドは、式I：

【化2】

30



[式中、P=ホスフェート(PO_3)およびその誘導体、nは2もしくはそれより大であり；Yは酸素もしくは硫黄原子であり；Bは窒素含有の複素環式塩基であり；Sは非環式部分、炭素環式部分もしくは糖部分であり；Lは、天然または修飾ヌクレオチドの末端ホスフェートにおいてリン酸エステル、チオエステルもしくはホスホラミデート結合を形成するのに適当なヒドロキシル基、スルフヒドリル基またはアミノ基を含む酵素で活性化可能な標識であり；P-Lは、ホスフェートが除去されるときに、好ましくは独立して検出可能になるところのリン酸化標識である]

40

により表され得る。

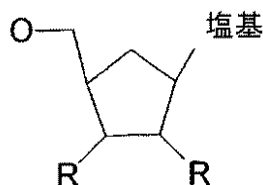
【0050】

本発明の方法の目的には、有用な炭素環式部分は、Ferraro, M. and Gotor, V. in Chem Rev. 2000, volume 100, 4319-48、により記載されている。適当な糖部分は、Joeng, L. S. et al., in J Med. Chem. 1993, vol. 356, 2627-38; by Kim H.O. et al., in J Med. Chem. 1993, vol. 36, 30-7; and by Eschenmosser A., in Science 1999, vol. 284, 2118-2124、により記載されている。さらに、有用な非環式部分は、Martinez, C.I., et al., in Nucleic Acids Research 1999, vol. 27, 1271-1274; by Martinez, C.I., et al.

50

l., in Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 1997, vol. 7, 3013-3016; および Trainer, G.L. への米国特許第 5,558,91 号、により記載されている。これらの部分の構造は下に示されるが、そこでは、全ての部分について、R は H、OH、NHR、低級アルキルおよびアリールであり得て；糖部分について、X および Y は独立して O、S もしくは NH であり；そして非環式部分について、X = O、S、NH、NR である。

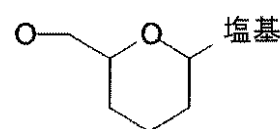
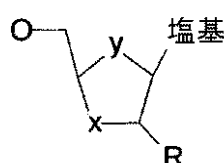
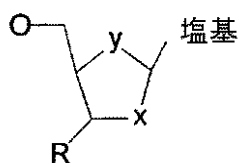
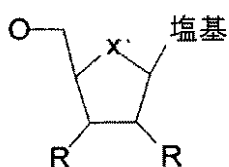
【化 3】



10

炭素環式部分

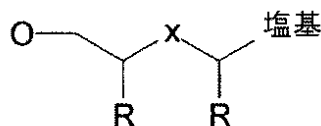
【化 4】



20

糖部分

【化 5】



非環式部分

【0051】

特定の実施態様において、糖部分は、以下：リボシル、2'-デオキシリボシル、3'-デオキシリボシル、2',3'-ジデオキシリボシル、2',3'-ジデヒドロジデオキシリボシル、2'-アルコキシリボシル、2'-アジドリボシル、2'-アミノリボシル、2'-フルオロリボシル、2'-メルカプトリボシル、2'-アルキルチオリボシル、炭素環式、非環式および他の修飾糖、から選択され得る。

30

【0052】

さらに、上の式 I において、塩基には、ウラシル、チミン、シトシン、5-メチルシトシン、グアニン、7-デアザグアニン、ヒポキサンチン、7-デアザヒポキサンチン、アデニン、7-デアザアデニン、2,6-ジアミノプリンもしくはそれらの類似体が含まれる。

【0053】

ヌクレオチドの末端-ホスフェート位置に付加した酵素で活性化可能な標識は、1,2-ジオキセタン化学発光化合物、蛍光原色素、発色性色素、質量タグ、電気化学的タグおよびそれらの組むあわせから選択され得る。これは、検出可能な種を、色、蛍光放射、化学発光もしくはそれらの組み合わせのいずれか一つの存在により、検出可能にさせる。

40

【0054】

酵素で活性化可能な標識はまた、検出可能なシグナルの生産をもたらすところのさらに別な化学もしくは酵素反応のための基質となる、化学部分であり得る。

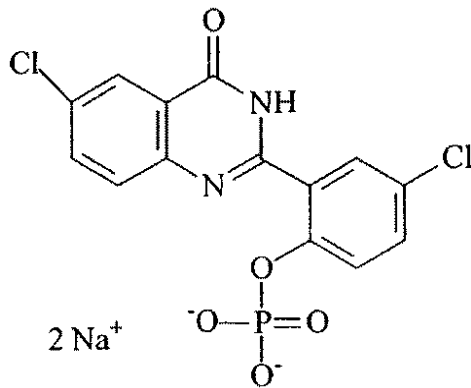
【0055】

上の式 I に示されたリン酸化標識が蛍光原部分であるところでは、それは、以下の例(それらのリン酸エステルとして示される)の一つから望ましくは選択される：ELF97

50

の商品名(Molecular Probes, Inc.)で発売される、2-(5'-クロロ-2'-ホスホリルオキシフェニル)-6-クロロ-4-(3H)-キナゾリノン、二リン酸フルオレセイン、フルオレセイン 3'-(6')-O-アルキル-6'-(3')-リン酸、9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン-7-イル)リン酸、リン酸4-メチルウンベリフェリル、リン酸レゾルフィン、リン酸4-トリフルオロメチルウンベリフェリル、リン酸ウンベリフェリル、リン酸3-シアノウンベリフェリル、リン酸9,9-ジメチルアクリジン-2-オン-7-イルおよびリン酸6,8-ジフルオロ-4-メチルウンベリフェリルである。これらの色素の構造は以下に示される：

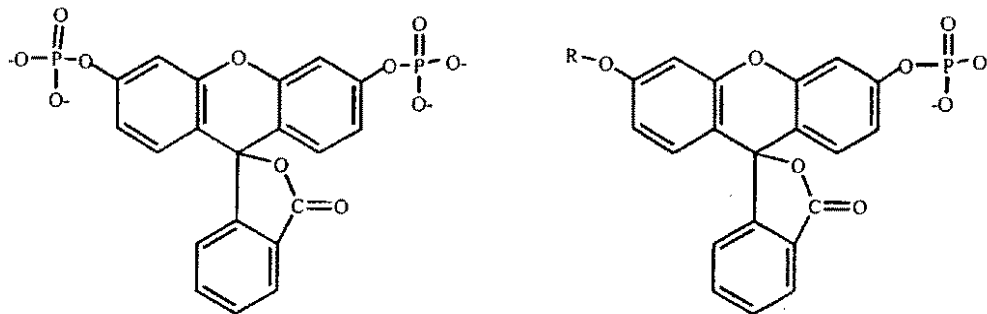
【化6】



10

2-(5'-クロロ-2'-ホスホリルオキシフェニル)-6-クロロ-4-(3H)-キナゾリノン

【化7】

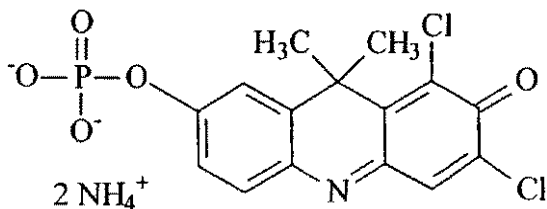


20

30

二リン酸フルオレセイン フルオレセイン 3'-(6')-O-アルキル-6'-(3')-リン酸

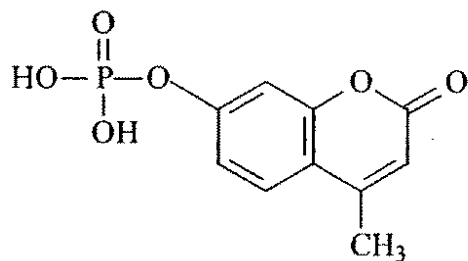
【化8】



40

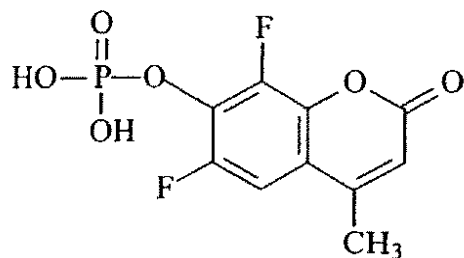
9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン-7-イル)リン酸(ジアンモニウム塩)

【化 9】



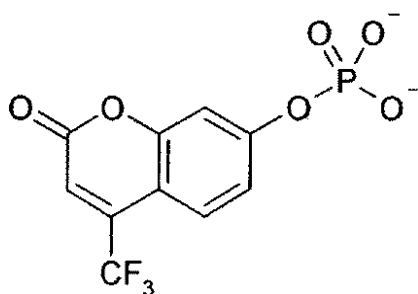
リン酸 4-メチルウンベリフェリル
【化 10】

10



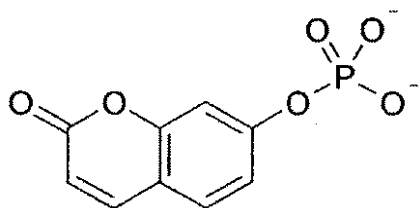
リン酸 6,8-ジフルオロ-4-メチルウンベリフェリル
【化 11】

20



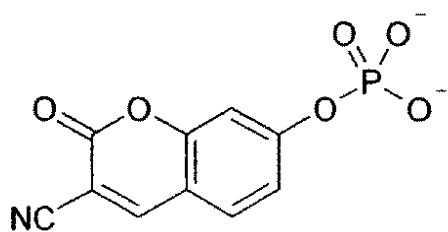
リン酸 4-トリフルオロメチルウンベリフェリル
【化 12】

30



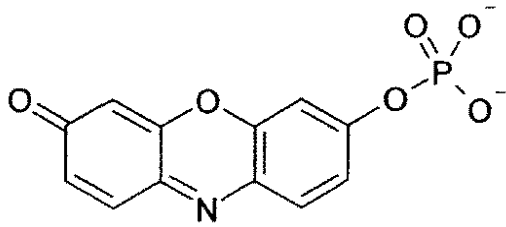
リン酸ウンベリフェリル
【化 13】

40



リン酸 3-シアノウンベリフェリル

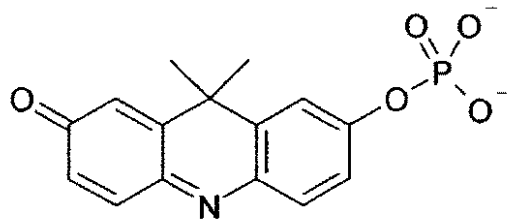
【化 1 4】



リン酸レゾルフィン

【化 1 5】

10



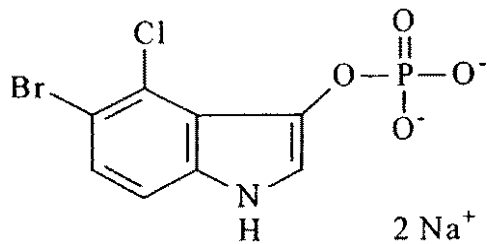
リン酸 9,9-ジメチルアクリジン-2-オン-7-イル

【0056】

20

上の式 I に示されたリン酸化標識が発色性部分であるところでは、それは、以下の部分 (リン酸エステルとして示される) から選択される: リン酸 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル、リン酸 3-インドリル、リン酸 p-ニトロフェニルおよびそれらの誘導体。これらの発色性色素の構造は、以下に示される。

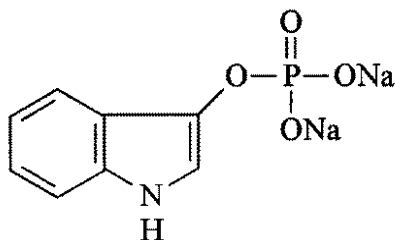
【化 1 6】



30

リン酸 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル (二ナトリウム塩)

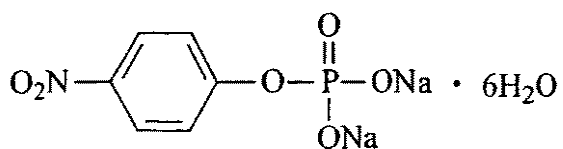
【化 1 7】



40

リン酸 3-インドリル (二ナトリウム塩)

【化 1 8】



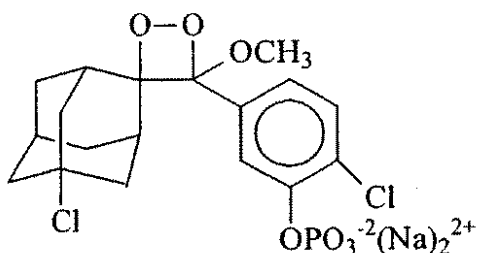
リン酸 p-ニトロフェニル

50

【0057】

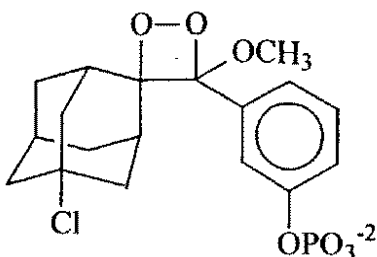
末端ホスフェート位置における部分はさらに、アルカリ性ホスファターゼ活性化1,2-ジオキセタン化合物であることが望まれる、化学発光化合物であり得る。1,2-ジオキセタン化合物のリン酸エステルには、限定するものではないが、CDP-Starの商品名(Tropix, Inc., Bedford, MA)で発売される、リン酸2-クロロ-5-(4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5-クロロ)トリシクロ[3,3,1-1^{3,7}]-デカン]-1-イル)-1-フェニル二ナトリウム、CSPDの商品名(Tropix)で発売される、クロロアダマント-2'-イリデンメトキシフェノキシリン酸化ジオキセタン、AMPDの商品名(Tropix)で発売される、3-(2'-スピロアダマント)-4-メトキシ-4-(3''-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタンが含まれる。これらの市販のジオキセタン化合物の構造は、米国特許第5,582,980号、第5,112,960号および第4,978,614号に、それぞれ、開示されていて、以下に示される。

【化19】



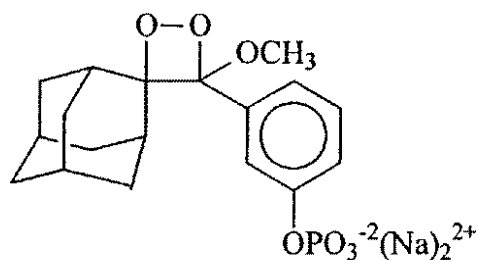
リン酸2-クロロ-5-(4-メトキシスピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-(5-クロロ)トリシクロ[3,3,1-1^{3,7}]-デカン]-1-イル)-1-フェニル二ナトリウム

【化20】



クロロアダマント-2'-イリデンメトキシフェノキシリン酸化ジオキセタン

【化21】



3-(2'-スピロアダマント)-4-メトキシ-4-(3''-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン

【0058】

本発明の方法において、非-加水分解可能なプライマーは、システム中に存在する3'→5'エキソヌクレアーゼによるその分解を防止するために、ヌクレアーゼに耐性でなければならない。上で説明したように、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性は、DNAポリメ

ラーゼ自身に関連し得る。本発明に使用のための適当なDNAポリメラーゼには、限定するものではないが、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、Phi 29 DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼI、T4 DNAポリメラーゼ、Thermo Sequenase (Amersham Biosciences Corporation)、Amplitaq FS (Applied Biosystems)、逆転写酵素およびT7 DNAポリメラーゼが含まれる。

【0059】

ヌクレアーゼに耐性なオリゴヌクレオチドプライマーを合成する方法は、特に限定するものではなくて、当分野で公知の任意の適当な方法が使用され得る。例えば、本発明により提供される方法の一つの実施態様において、非一加水分解可能なプライマーは、3'-最リン酸ジエステル結合末端においてホスホロチオエート化される。プライマーの標識部位の中にホスホロチオエート結合を導入することによりヌクレアーゼに耐性を有するオリゴヌクレオチドプライマーを化学的に合成する方法は周知である。一つの方法において、プライマーは、ヨウ素水による普通の酸化工程が、ホスホロチオエート結合が普通のリン酸ジエステル結合の代わりに導入され得るように、ホスホロチオエート化に適当な試薬による酸化処置で取り替えられる、修飾ホスホラミダイト方法を用いて化学的に合成され得る。ホスホロチオエート化用の一つの適当な試薬は、Beaucageの試薬(3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン1,1-ジオキシド)である。この方法は、3'-最リン酸ジエステル結合においてを含んで、任意の選ばれた部位においてプライマーの中にホスホロチオエート結合を導入するために使用されることができる。

【0060】

分析時間の前にホスホロチオエート結合を持つオリゴヌクレオチドプライマーを作成する代替りの手段は、 α -位置の酸素原子が硫黄により置換されている、ヌクレオチド類似体のDNAポリメラーゼの組み込みを介するものである。そのような置換化合物は、 α -S-デオキシヌクレオチド三リン酸と言われる。DNAポリメラーゼは、デオキシヌクレオチド三リン酸の代わりに硫黄-置換類似体を組み込んで、ヌクレアーゼ耐性を含有するホスホロチオエート化されたオリゴヌクレオチドプライマーを与えることができる。

【0061】

何れにせよ、オリゴヌクレオチドプライマーの3'-末端の近辺においてリン酸ジエステル結合の代替りのホスホロチオエート結合の存在は、3'-末端側から切断するエキソヌクレアーゼに対する抵抗をプライマーの部分上に付与する。オリゴヌクレオチドプライマーは、単一のホスホロチオエート結合の導入により十分に非一加水分解可能である。

【0062】

緩衝液、pHおよび温度のような反応条件は、十分なハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ、ヌクレアーゼならびにホスファターゼの活性を獲得するように選択されるべきである。ハイブリダイゼーションに適当な温度は、オリゴヌクレオチドプライマーおよび標的配列の間の相同性に依存するが、約20℃～約60℃の範囲にあると期待される。pH値はトリス-HCl緩衝液のような適当な緩衝液中で約7～約9の範囲にあるのが望ましい。

【0063】

下に実施例で示すように、標的核酸試料を、プライマーを含有しかつマグネシウムを含有する緩衝溶液中で約5分間、>90℃において加熱することにより先ず変性し、続けて適当な温度において十分な時間、通常約10分、の間ハイブリダイゼーションを行わねばならない。ハイブリダイゼーション工程は、対応する基質の存在下において、適当なDNAポリメラーゼと関連し得るところのDNAポリメラーゼである、3'→5'エキソヌクレアーゼ、およびホスファターゼとの20～70℃における酵素処置により直ちに引き継がれ得る。

【0064】

本発明は、ハイブリダイゼーション工程に引き続いて、少なくとも一つの末端-ホスファターゼ-標識デオキシヌクレオチドポリリン酸、DNAポリメラーゼ、ヌクレアーゼ(ポリメラーゼと関連し得るところの)およびホスファターゼを、プライマーの3'-末端の次

に位置してかつ標的核酸に相補的なヌクレオチドが組み込まれるように、システムに加えて、引き続きその分解ならびに標的核酸からのシグナルとして働くところの検出可能の種の検出、一回もしくはそれ以上繰り返される相補的な鎖の合成と分解を行って、シグナルの増幅のためのサイクリングアッセイを成し遂げることを特徴とする。

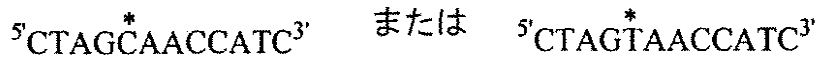
【0065】

単一の末端－ホスフェート－標識ヌクレオチドが存在する、そして、別に、全ての四つのタイプの末端－ホスフェート－標識ヌクレオチドが存在する、本発明の実施態様を例示することは有益であろう。

【0066】

プローブは、試験されている特定の塩基にすぐ隣接した塩基に反対の3'-末端を持つ標的核酸にハイブリダイズされるようになる。我々は、例を介して、その上に星印を持つ塩基が点突然変異を表すところの標的配列を考えることができる。

【化22】

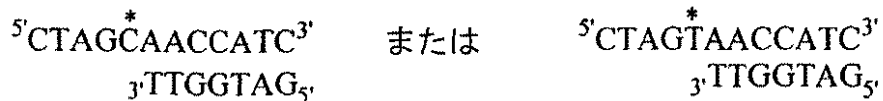


プライマーは以下の配列を有する：



ハイブリッドは以下のように形成され得る。

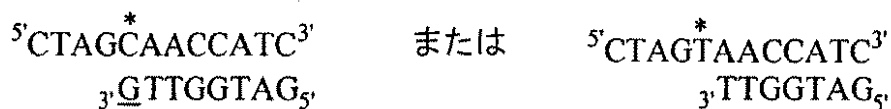
【化23】



【0067】

一つのフォーマットにおいて、末端－ホスフェート－標識ジデオキシグアノシンポリリン酸が、本発明の方法のDNAポリメラーゼ反応に、いかなる他のヌクレオチド無しに用いられ、そして一つのケースにおいて、しかし、組み込まれたヌクレオチドが下線で示される、下記の他のものではなく、組み込まれるであろう。

【化24】



【0068】

それ故に、C点突然変異は、アルカリ性－ホスファターゼ－耐性グアノシンヌクレオチド類似体の組み込みの間に付随して形成されるところの標識ポリホスフェート副産物のホスファターゼ消化にしたがって形成される検出可能の種の存在により分析の間に確認され得る。標的配列中のT点突然変異を確認するためには、末端－ホスフェート－標識アデニンを検出可能の種の生産についての別な分析の間に加え得る。上で説明したように、数回繰り返される相補的な鎖の合成および分解は、シグナルの増幅を成し遂げる。

【0069】

代わりのフォーマットは、それにより任意の点突然変異が単一の分析の間に確認され得る手段を提供する。このフォーマットにおいては、全ての四つのタイプの末端－ホスフェート－標識ヌクレオチドが存在して(例えば、アデノシンポリリン酸、グアノシンポリリン酸、チミジンポリリン酸およびシチジンポリリン酸)、それぞれが独特な色素もしくは標識に結合し、そしてそれぞれが末端－ホスフェート－標識ジデオキシヌクレオチド三リン酸のような非－拡張可能なヌクレオチドである。一つの態様において、末端－ホスフェート－標識ヌクレオチドは、標的の特定の塩基の反対に組み込まれる。しかしながら、非

10

20

30

40

50

一拡張可能なヌクレオチドを使用する代案として、拡張の長さが使用されるヌクレオチドを持つポリメラーゼより多いエキソヌクレアーゼの存在により限定されるという条件で、非一末端にあるヌクレオチドがまた使用されるかもしれない。本発明の方法と通して使用される末端一ホスフェート標識ヌクレオチドはホスファターゼに耐性であることはさらなる態様である；すなわち、生成物として放出される標識ポリホスフェートのみが、ホスファターゼに対する基質として働いて、検出可能な種を生成する。全ての四つのタイプの末端一ホスフェート標識ヌクレオチドを用いるアッセイフォーマットにおいては、非一加水分解可能なプライマーの3'-末端に隣接するヌクレオチドの個性は、独特な色、蛍光放射、化学発光もしくは検出可能な種から得られる他のシグナルから演繹され得る。

【0070】

10

増幅反応がポリメラーゼおよび一本鎖ヌクレアーゼ(ポリメラーゼもしくは別の酵素の生来の性質であるかもしれないところの)を用いて実施されるかもしれないことは、本発明の意図内に十分にある。反応は熱的にサイクルされて、低温の間にポリメラーゼによるプライマーの拡張および高温の間にヌクレアーゼによる添加塩基の除去をさせる。これは、使用者が増幅の量を、それは実施される熱サイクルの数に依存するであろうので、制御することをさせるであろう。

【0071】

(実施例)

実施例 1

δ -9H(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン-7-イル)-ジデオキシチミジン-5'-四リン酸(ddTTP-DDAO)の作成

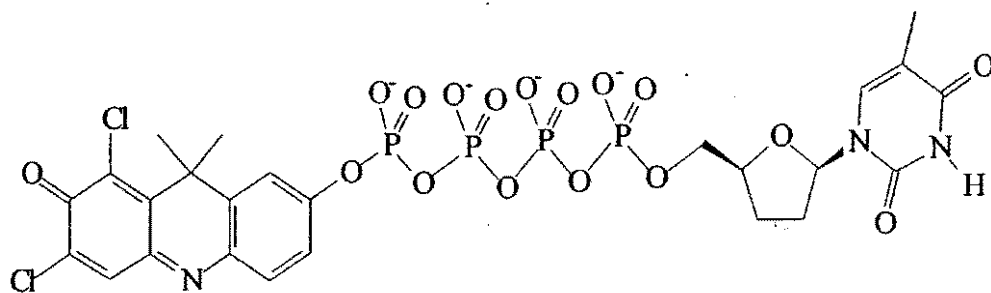
20

ddTTP(80mM溶液100 μ l)を無水のジメチルホルムアミド(DMF、2 $\times$ 1ml)と共に共蒸発した。これに、ジシクロヘキシルカルボジイミド(8.3mg、5当量)を加えて、混合液を再び無水のDMF(1ml)と共に共蒸発した。残渣を無水のDMF(1ml)中に取り、反応液を終夜室温で攪拌した。HPLCはほとんど環化したトリホスフェート(約82%)を示した。反応混合液を濃縮して、残渣を無水のジエチルエーテルで3回洗浄した。それを無水のDMF中に再溶解して、ロータリーエバポレーター上で濃縮乾固した。残渣を無水のDMF200 μ l中のDDAO-リン酸、アンモニウム塩(5mg、1.5当量)と共に取って、週末にかけて40 $^{\circ}$ Cで攪拌した。HPLCは、11.96分に望ましいUV特色を持つ新しい生成物の形成を示した。(HPLC方法：15分間で0.1M酢酸トリエチルアンモニウム(pH7)中の0~30%アセトニトリル、5分間で30~50%アセトニトリル、NovapakC18 3.9 $\times$ 150mmカラム、1ml/分)。LCMS(ES-)はまた、M-1ピークとして主要質量ピーク834を示した。反応混合液を濃縮して、DeltapakC18 19 $\times$ 300mmカラム上で0.1M TEAB(pH6.7)およびアセトニトリルを用いて精製した。生成物を持つフラクションを上で説明したのと同じの方法を用いるHPLCにより再精製した。純粋な生成物を持つフラクションを濃縮して、MeOH(2回)および水(1回)と共に共蒸発した。残渣を水(1.2ml)中に溶解すると、1.23mMの溶液を与えた。HPLC純度：254nmにおいて>97.5%、455nmにおいて>96%；UV λ_A =267nmおよび455nm；MS：M-1=834.04(計算値833.95)。

30

40

【化 2 5】



ddT4P-DDAO

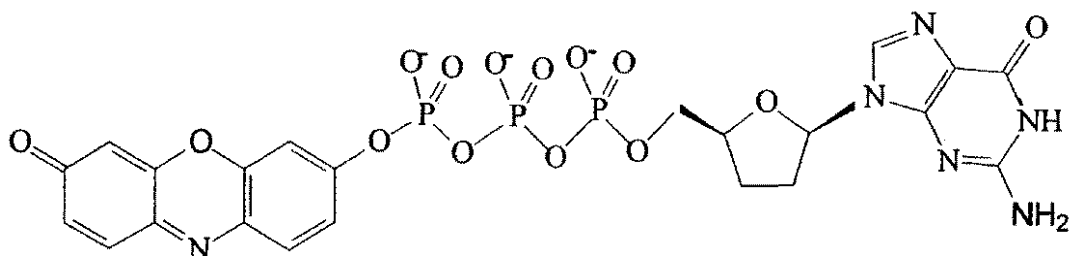
【0072】

実施例 2

γ -(7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オン) ddGTP (γ -レゾルフィン-ddGTP) の作成

ddGTP (86.7 mM 溶液 125 μ l、10.8 μ mol) を無水の DMF (3 $\times$ 0.25 ml) と共に共蒸発した。これに、DCC (5 当量) を加えて、混合液を再び無水の DMF (0.25 ml) と共に共蒸発した。残渣を無水の DMF (1 ml) 中に取り、反応液を室温で週末にかけて攪拌した。レゾルフィン (20 当量) を無水の DMF (2 $\times$ 1 ml) と共に共蒸発して、上の環化工程からの ddGTP トリメタリン酸に引き続いてトリエチルアミン 20 当量を加えた。2 週間後に、反応混合液をロータリーエバポレーター上で濃縮し、そして残渣を水 (3 $\times$ 1 ml) で抽出して、ろ過した。ろ液を、Xterra RP C18 (19 $\times$ 100 mm) カラム上で、0.1 M 重炭酸トリエチルアンモニウム (pH 6.7) 中の 0 ~ 30 % アセトニトリルを 5 カラム容積でおよび 30 ~ 50 % アセトニトリルを 1 カラム容積で用いて精製した。純粋なフラクションをロータリーエバポレーター上で濃縮して、メタノール (2 $\times$ 5 ml) と共に共蒸発した。残渣を水 (1.5 ml) 中に溶解すると、0.5 mM の溶液を与えた。HPLC 純度：260 nm において > 98 %、470 nm において > 97.5 %；UV/VIS = 251 および 472 nm；MS：M-1 = 685.10 (計算値 685.03)。

【化 2 6】



【0073】

実施例 3

末端-ホスフェート上に蛍光原色素で標識したヌクレオチドの組み込みにより生成したシグナルを増幅するためにエキソヌクラーゼ III の使用

25 mM トリス HCl、pH 8.0、5 mM $MgCl_2$ 、0.5 mM $MnSO_4$ 、40 ピコモルの ddT4P-DDAO (DDAO- δ -2', 3'-ジデオキシチミジン-5'-四リン酸)、5 ピコモルのプライマー (5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGT* A3' (配列番号 1) [式中、* はホスホロチオエート結合である] および 10 ピコモルの鋳型 (5' GTCGTTATACAACGTCGTGACTGGGAAAA*d dC3' (配列番号 2) [式中、* はホスホロチオエート結合であり、d dC は末端ジデオキシヌク

レオチドを示す])を含有する反応液50 μ lを、4分間75℃で加熱することによりアニールして、21℃に冷却した。今や図2を参照して、この反応液に以下を加えた：エビアルカリ性ホスファターゼ0.15単位およびエキソヌクレアーゼIII(四角)0.5単位もしくはエビアルカリ性ホスファターゼ0.15単位、エキソヌクレアーゼIII0.5単位ならびにThermo Sequenase(円)16単位である。第三の反応混合液に、エビアルカリ性ホスファターゼ0.15単位およびThermo Sequenase16単位を加えて、次いで10分後に(三角)を加えた。612nmにおける励起および670nmにおける放射により時間ドライブモードで運転される、LS-55ルミネセンス分光計(Perkin Elmer)の中の石英蛍光超微小キュベット中で、反応液を室温でインキュベートした。放射は任意の単位で表示される。

10

【0074】

図2に示されるように、ポリメラーゼの無い反応混合液からは蛍光放射は何も得られなかった。さらに、図2に示されるように、シグナルの増幅は、反応混合液中にエキソヌクレアーゼIIIおよびポリメラーゼの両方が存在するときのみ得られた。

【0075】

実施例4

末端-ホスフェート上に配列特異性を持つ蛍光原色素で標識したヌクレオチドの配列特異的組み込みにより生成したシグナルを増幅するためにエキソヌクレアーゼIIIの使用

図3Aを参照して、アッセイを実施して、鋳型中のデオキシチジン(C)の存在を決定した。図3Aに示されたそれぞれの結果について、25mMトリスHCl、pH8.0、5mM MgCl₂、0.5mM MnSO₄、40ピコモルのddG3P-レゾルフィン(レゾルフィン- δ -2',3'-ジデオキシグアノシン-5'-三リン酸)、5ピコモルのプライマー(5'GTTTTTCCAGTCACGACGTTGT*A3'(配列番号1)[式中、*はホスホロチオエート結合である]および10ピコモルの鋳型(5'GTCGTTATACAAACGTCGTGACTGGGAAAAA*ddC3'(配列番号3)[式中、*はホスホロチオエート結合であり、ddCは末端ジデオキシヌクレオチドを示す])を含有する反応液50 μ lを、4分間75℃で加熱することによりアニールして、21℃に冷却した。かくして、図3Aについて、プライマー/鋳型の組合せは：

20

5' GTTTTTCCAGTCACGACGTTGT A (配列番号1)

30

ddCAAAAGGGTCAGTGCTGCAACATCTTGCTG (配列番号3)
であった。

【0076】

これに、エビアルカリ性ホスファターゼ0.15単位およびThermo SequenaseDNAポリメラーゼ16単位を加えて、エキソヌクレアーゼIIIを指示のようにを加えた。反応液を21℃で40分間インキュベートした。インキュベーション後に、25 μ lを96穴のプレートに取り去り、そして530nmの励起および590nmの放射フィルターを持つTecan ULTRAプレートリーダー中で、蛍光を測定した。蛍光放射は任意の単位で表示される。

【0077】

40

今や図3Bを参照して、アッセイを実施して、鋳型中のデオキシチミジン(T)の存在を決定した。図3Bに示されたそれぞれの結果について、25mMトリスHCl、pH8.0、5mM MgCl₂、0.5mM MnSO₄、40ピコモルのddT4P-DDAO(DDAO- δ -2',3'-ジデオキシチミジン-5'-四リン酸)、5ピコモルのプライマー(5'GTTTTTCCAGTCACGACGTTGT*A3'(配列番号1)[式中、*はホスホロチオエート結合である])および10ピコモルの鋳型(5'GTCGTTATACAAACGTCGTGACTGGGAAAAA*ddC3'(配列番号3)[式中、*はホスホロチオエート結合であり、ddCは末端ジデオキシヌクレオチドを示す])を含有する反応液50 μ lを、4分間75℃で加熱することによりアニールして、21℃に冷却した。かくして、プライマー/鋳型の組合せは：

50

5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA (配列番号 1)

ddCAAAAGGGTCAGTGCTGCAACATCTTGCTG (配列番号 2)
であった。

【0078】

これに、エピアルカリ性ホスファターゼ 0.15 単位および Thermo Sequenase DNA ポリメラーゼ 16 単位を加えて、エキソヌクレアーゼ III を指示のようにを加えた。反応液を 21℃ で 40 分間インキュベートした。インキュベーション後に、25 μl を 96 穴のプレートに取り去り、そして 612 nm の励起および 670 nm の放射フィルタを持つ Tecan ULTRA プレートリーダー中で、蛍光を測定した。蛍光放射は任意の単位で表示される。

10

【0079】

図 3A に示すように、末端-ホスフェート-標識ジデオキシグアノシン三リン酸色素を含有する反応液については、プライマー-鋳型組合せについて蛍光放射を検出したが、ここでは鋳型中の次のヌクレオチドは dC であった。図 3B を参照して、末端-ホスフェート-標識ジデオキシチミジン四リン酸を含有する反応液については、プライマー-鋳型組合せについて蛍光放射を検出したが、ここでは鋳型中の次のヌクレオチドは dA であった。エピアルカリ性ホスファターゼによるホスホリル転移のピロホスフェート生成物の開裂は、核酸の検出、シグナルの増幅を成し遂げるために数回繰り返される相補的な標識ヌクレオチド合成および分解を可能とするレゾルフィンもしくは DDAO 標識中の検出可能な変化に至る。

20

【0080】

本明細書に本発明の特別な、望ましい態様を説明しているので、本発明の意図する範囲から逸脱すること無しにここを通して修飾を成し得ることは、認識されるべきである。本発明の真の範囲は、本明細書に添付される特許請求の範囲に示される。

【図面の簡単な説明】

【0081】

【図 1】図 1 は、標的ポリヌクレオチドに配列で相補的である末端-ホスフェート-標識ヌクレオチドがヌクレアーゼ-抵抗性プライマーの 3' 末端に結合されて、引き続きその分解により、ヌクレオチド組み込みの標識ポリホスフェート副産物がアルカリ性ホスファターゼと反応して、検出可能な種を生産するところのサイクリングアッセイを成し遂げる、本発明の方法の態様を示す。

30

【図 2】図 2 は、蛍光原色素で末端ホスフェート上に標識したヌクレオチドの組み込みにより作成されたシグナルを増幅するために 5'→3' エキソヌクレアーゼの使用により得られた蛍光放射対時間のグラフである。

【図 3】図 3 (A および B) は、蛍光原色素で末端ホスフェート上に標識したヌクレオチドの配列特異的組み込みにより作成されたシグナルを増幅するために 5'→3' エキソヌクレアーゼの使用により得られた蛍光放射のバーグラフを示す。

【図 1】

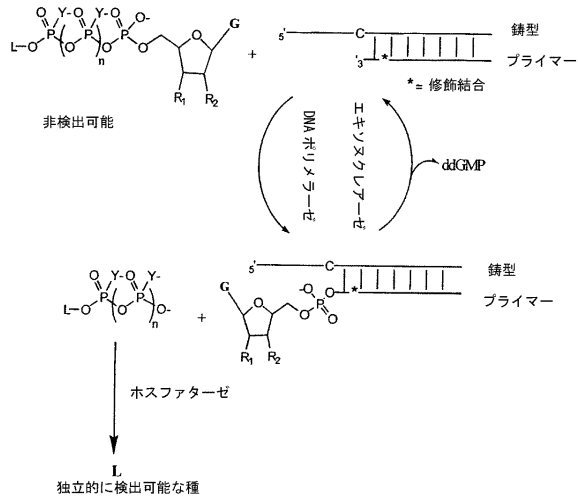


Figure 1

【図 2】

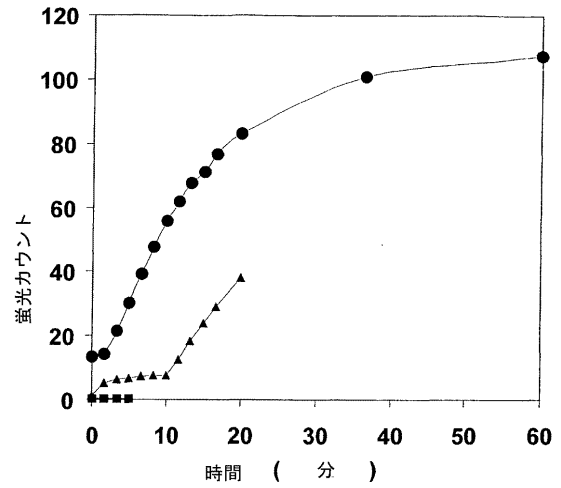


Figure 2

【図 3】

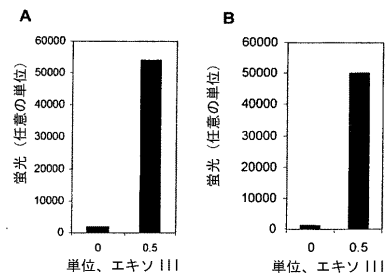


Figure 3

【配列表】

0004360904000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100105588

弁理士 小倉 博

(74)代理人 100129779

弁理士 黒川 俊久

(72)発明者 ジョン・ネルソン

アメリカ合衆国 0 8 8 4 4 ニュージャージー州ヒルズバーロウ、マーシャル・ロード 1 6 番

(72)発明者 カール・フラー

アメリカ合衆国 0 7 9 2 2 ニュージャージー州パークレー・ハイツ、ロビンズ・アベニュー 3 3 番

(72)発明者 アヌップ・ソード

アメリカ合衆国 0 8 8 2 2 ニュージャージー州フレミントン、ハニーマン・ドライブ 3 7 番

(72)発明者 シブ・クマー

アメリカ合衆国 0 8 5 0 2 ニュージャージー州ベル・ミード、ミューアヘッド・コート 2 1 番

審査官 富永 みどり

(56)参考文献 特開平 0 7 - 2 3 1 7 9 9 (J P, A)

国際公開第 0 1 / 0 4 8 2 3 5 (W O, A 1)

国際公開第 0 0 / 0 1 1 2 2 0 (W O, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/09

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

BIOSIS/WPI(DIALOG)