(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5680080号
(P5680080)
(45)発行日　平成27年3月4日(2015.3.4)　(24)登録日　平成27年1月16日(2015.1.16)

(51)Int.Cl.　　F I
C12Q 1/68 (2006.01)　C12Q 1/68 ZNAA
C12N 15/09 (2006.01)　C12N 15/00 A

請求項の数 23　(全 23 頁)

(21)出願番号　特願2012-522041 (P2012-522041)
(86)(22)出願日　平成22年7月30日(2010.7.30)
(65)公表番号　特表2013-500707 (P2013-500707A)
(43)公表日　平成25年1月10日(2013.1.10)
(86)国際出願番号　PCT/EP2010/004914
(87)国際公開番号　WO2011/012330
(87)国際公開日　平成23年2月3日(2011.2.3)
審査請求日　平成24年2月1日(2012.2.1)
(31)優先権主張番号　09167013.3
(32)優先日　平成21年7月31日(2009.7.31)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)

前置審査

(73)特許権者　507214038
キアゲン　ゲーエムベーハー
ドイツ国　４０７２４　ヒルデン，　キアゲン　シュトラーセ　１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　ローフェルト，　ディルク
ドイツ国　４０５８９　デュッセルドルフ，　バーレンシュトラーセ　８
(72)発明者　コルフハーゲ，　クリスチャン
ドイツ国　４０７６４　ランゲンフェルト，　ゼップ－ヘルベルガー－シュトラーセ　６ツェー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アンカーオリゴヌクレオチドおよびアダプターオリゴヌクレオチドを用いる核酸の正規化した定量化方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
試料中の定量化される核酸の数量を、
（ｉ）前記試料中の核酸の総数量、または
（ｉｉ）ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＲＮＡまたはｍＲＮＡの総数量
に対して正規化するための方法であって、
（ａ）定量化される核酸を含有する試料を供給するステップと、
（ｂ）第１の核酸プローブの少なくとも末端領域が前記試料中の核酸の特異的な結合部位とハイブリダイズし、それによって二本鎖核酸が作出されることを可能にする条件下で、前記第１の核酸プローブを前記試料に加えるステップであって、前記第１の核酸プローブが、少なくとも１種のプライマー結合部位、プローブ結合部位、およびアンカーオリゴヌクレオチド結合部位を含むステップと、
（ｃ）アンカーオリゴヌクレオチドの５’配列が前記第１の核酸プローブとハイブリダイズしないように前記第１の核酸プローブの前記アンカーオリゴヌクレオチド結合部位とハイブリダイズすることを可能にする条件下で、前記アンカーオリゴヌクレオチドを加えるステップと、
（ｄ）前記核酸の３’末端で前記核酸を延長するステップであって、前記アンカーオリゴヌクレオチドが前記第１の核酸プローブとハイブリダイズし、前記アンカーオリゴヌクレオチドがさらなる延長のための鋳型として機能する領域に達するまで、前記第１の核酸プローブが鋳型として機能するステップと、

（ｅ）前記試料中の核酸の総量または前記試料中の前記特定のクラスの核酸の総量を、前記第１の核酸プローブおよびアンカーオリゴヌクレオチドから転写されたＤＮＡの領域と実質的に相補的な第２のプローブを使用して定量化するステップと、
（ｆ）前記定量化される核酸を、必要に応じて、その配列が前記定量化される核酸の限定された領域と実質的に同一な第３のプローブを使用して定量化するステップと、
（ｇ）前記定量化される核酸の数量と、前記試料中の核酸の総数量または前記試料中の前記特定のクラスの核酸の総数量との比を決定することによって、前記定量化される核酸の数量を正規化するステップと
を含む方法。
【請求項２】
前記定量化される核酸がＲＮＡであり、前記試料中の定量化される核酸の数量がＲＮＡまたはｍＲＮＡの総数量に対して正規化される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記定量化されるＲＮＡが、ｍＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｎＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、ｓｎｏＲＮＡ、ｓｃａＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｄｓＲＮＡ、リボザイム、リボスイッチおよびウイルスＲＮＡからなる群から選択されるＲＮＡである、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記定量化されるＲＮＡがｍＲＮＡであり、前記試料中の定量化されるＲＮＡの数量がｍＲＮＡの総数量に対して正規化される、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記特異的な結合部位がポリＡ配列またはポリＡ尾部である、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記定量化される核酸がＤＮＡであり、前記試料中の定量化されるＤＮＡの数量がＤＮＡまたはｃＤＮＡの総数量に対して正規化される、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記定量化されるＤＮＡが、ｃＤＮＡ、ｄｓＤＮＡ、ｓｓＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、コスミドＤＮＡ、染色体ＤＮＡ、ウイルスＤＮＡおよびｍｔＤＮＡからなる群から選択されるＤＮＡである、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記定量化されるＤＮＡがｃＤＮＡであり、前記試料中の定量化されるＤＮＡの数量がｃＤＮＡの総数量に対して正規化される、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記特異的な結合部位がｃＤＮＡに特異的であるか、またはポリＴ配列もしくはポリＴ尾部である、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記第１の核酸プローブがＤＮＡまたはＲＮＡである、請求項１から９までのいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
定量化が、定量的リアルタイムＰＣＲを含む、請求項１から１０までのいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記試料中のＲＮＡまたは特定のクラスのＲＮＡを逆転写することを可能にする条件下で、前記試料中のＲＮＡを逆転写酵素と接触させるステップをさらに含む、請求項２から５までのいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記第１の核酸プローブが、前記ポリＡ配列またはポリＡ尾部の５’末端に位置するかまたは前記ポリＡ配列またはポリＡ尾部の５’末端の近接部に位置するように前記特異的な結合部位とハイブリダイズする、請求項５または請求項１０から１２までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項１４】
定量化が、定量的リアルタイムＰＣＲを含む、請求項１から１３までのいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
ライゲーションステップと、前記ライゲーションステップの後に、前記試料中のＲＮＡまたは特定のクラスのＲＮＡを逆転写することを可能にする条件下で、前記試料中のＲＮＡを逆転写酵素と接触させるステップとをさらに含む、請求項２から５までのいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
前記定量化が、定量的リアルタイム逆転写ＰＣＲを含む、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
逆転写と定量化が同じ反応容器内で実施される、請求項１５または１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記第２の核酸プローブおよび第３の核酸プローブが、１種以上の蛍光色素で標識され、前記定量化ステップが、前記試料中の蛍光シグナルを検出することを含む、請求項１から１７までのいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
遺伝子発現レベルを正規化するための、請求項１から１８までのいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
さらに予め定量化された核酸を前記試料に加え、前記定量化ステップにおいて前記予め定量化された核酸の数量を決定する、請求項１から１９までのいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
請求項１から２０までのいずれか一項に記載の方法を実施するためのキットであって、
（ａ）前記試料中の核酸の限定された領域または特定のクラスの核酸と実質的に相補的なアダプターオリゴヌクレオチドであって、１種以上のプライマー結合部位および１つのプローブ結合部位を含むアダプターオリゴヌクレオチドと、
（ｂ）前記アダプターオリゴヌクレオチドの前記プローブ結合部位と実質的に相補的なアンカーオリゴヌクレオチドであって、前記アダプターオリゴヌクレオチドに対する結合配列の５’側にタグ配列を含むアンカーオリゴヌクレオチド
を含むキット。
【請求項２２】
特異的な核酸の数量を参照核酸の数量に対して正規化するための、請求項１から２０までのいずれか一項に記載の方法または請求項２１に記載のキットの使用。
【請求項２３】
遺伝子発現解析のための、請求項１から２０までのいずれか一項に記載の方法または請求項２１に記載のキットの使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、生物学および化学の分野内にある。特に、本発明は、分子生物学の分野内にある。より詳細には、本発明は、核酸の定量化およびリアルタイムＰＣＲの分野内にある。さらに、本発明は、核酸の正規化された定量化、および試料（例えば、核酸の混合物）中の核酸の数量（ｑｕａｎｔｉｔｙ）の正規化に関する。
【背景技術】
【０００２】
核酸の混合物中の特定の核酸を定量化（定量）することは、遺伝子発現解析、または核酸の混合物から特定の核酸を精製する間などの分子生物学におけるいくつもの適用におい

て重要である。定量化方法では、試料中の特定の核酸の濃度および／または相対的もしくは絶対的な量（ａｍｏｕｎｔ）を決定する。特に、遺伝子発現の解析に関して、例えば生物試料中のｍＲＮＡのレベルを測定するために、再現性があり、かつ相対的方法が望まれる。例えば、比較できる容積、核酸量、細胞材料などを有する生物試料を必ずしも得ることができるとは限らない。異なる試料は、例えば、異なる生物体もしくは個体からの異なる組織、または異なる化合物で処理された細胞培養試料に由来するＲＮＡまたはＤＮＡを含み得る。

【０００３】

さらに、検出の感度および選択性ならびに生物試料中の核酸の定量化が重要である。２つ以上の異なる（生物）試料において特定の核酸の数量を良好に比較するため、または試料中の２つ以上の異なる特定の核酸の数量を良好に比較するために、投入核酸に対するまたは特定のクラスの投入核酸に対する特定の核酸の数量について正規化を実施しなければならない。特定の核酸の数量は、例えば、これらの数量を、試料の内部標準と関連づける、または全体すなわち試料中の核酸の総量と、または試料中の特定のクラスの核酸の総量と関連づけることによって正規化することができる。

【０００４】

（生物）試料中の核酸の従来の定量化のために、定量的（リアルタイム）ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）が広く使用されている。ＲＮＡ、特にｍＲＮＡについて、定量的リアルタイム逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ｑＰＣＲ）がこの分野において使用される。定量的ＰＣＲ法から得られるデータを正規化するための異なる手法が使用されている。それらの中に、特定のｍＲＮＡの数量の、様々な参照遺伝子、例えば、ベータアクチン、グリセルアルデヒド３リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＰＲＴ）、または２８Ｓリボソーム ＲＮＡもしくは１８Ｓリボソーム ＲＮＡなどのハウスキーピング遺伝子またはメンテナンス遺伝子のうち１種以上のｍＲＮＡの数量に対する正規化がある。しかし、そのような正規子遺伝子（ｎｏｒｍａｌｉｚｅｒ ｇｅｎｅ）の発現レベルは、実験条件、試料の調製物および供給源（例えば、組織または細胞の型）に応じて変動することが示されており、したがってそれらは投入核酸を確実に表すわけではない。したがって、通常、調査中の試料間で変化しないものを同定するために、一連の様々なハウスキーピング遺伝子を、困難で誤りがちな手順で試験する必要がある。

【０００５】

他の手法は、例えば、ＤＮＡおよび／またはＲＮＡの総含有量または例えば、リボソーム ＲＮＡ（ｒＲＮＡ）の総含有量に対する正規化を利用する。生物細胞および生物試料中のリボソーム ＲＮＡの含有量も、種々の因子に応じて変動しやすく、同様にｒＲＮＡに対する正規化はあまり好ましくない。例えば、総核酸含有量、総ＲＮＡ含有量またはゲノムＤＮＡの総含有量に対する正規化を利用する方法も、例えば、これらの含有量または核酸試料の質の変動によって制限される。異質の分子または人工的な分子、例えば、試料（例えば、細胞抽出物または組織に由来する細胞抽出物または試料）に取り込まれたｉｎ ｖｉｔｒｏ転写物に対する正規化も、それらが細胞中の核酸（例えば、ゲノムＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ）含有量を表さないので、全ての場合で適切な手順であるわけではない。

【０００６】

さらに、正規化されたデータおよび実験手順の再現性を比較するために、適用された実験条件を完全に文書化することが必要である。これは、特に対象の核酸および正規化する核酸の数量を、別々に、または異なる方法を使用して決定する場合に当てはまる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

したがって、本発明の根底にある技術的な問題は、核酸の数量を正規化するための改良された方法、特に、あまり困難ではなく誤りがちでない方法を開発し、提供することであった。

【課題を解決するための手段】

【０００８】
本発明は、試料中または複数の試料中の（特定の）核酸（すなわち「標的核酸」）の数量を、試料（複数可）中の核酸の総数量；または試料（複数可）中の特定のクラスの核酸の総数量に対して正規化するための強力な改良された方法（複数可）を提供する。本発明は、試料中または複数の試料中の（特定の）核酸（すなわち「標的核酸」）の数量を、試料（複数可）中の核酸の総数量；または試料（複数可）中の特定のクラスの核酸の総数量に対して正規化するためのキットにも関する。
【０００９】
本発明に関しては、特定のクラスの核酸は、とりわけ、ＲＮＡ、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ（相補的ＤＮＡ）、ＬＮＡ（ロックド核酸）、ｍＲＮＡ（メッセンジャーＲＮＡ）、ｍｔＲＮＡ（ミトコンドリアの）、ｒＲＮＡ（リボソームＲＮＡ）、ｔＲＮＡ（転移ＲＮＡ）、ｎＲＮＡ（核ＲＮＡ）、ｓｉＲＮＡ（低分子干渉ＲＮＡ）、ｓｎＲＮＡ（低分子核ＲＮＡ）、ｓｎｏＲＮＡ（低分子核小体ＲＮＡ）、ｓｃａＲＮＡ（低分子カハール体特異的ＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ、ｄｓＲＮＡ（二本鎖ＲＮＡ）、リボザイム、リボスイッチ、ウイルスＲＮＡ、ｄｓＤＮＡ（二本鎖ＤＮＡ）、ｓｓＤＮＡ（一本鎖ＤＮＡ）、プラスミドＤＮＡ、コスミドＤＮＡ、染色体ＤＮＡ、ウイルスＤＮＡ、ｍｔＤＮＡ（ミトコンドリアＤＮＡ）、ｎＤＮＡ（核ＤＮＡ）、ｓｎＤＮＡ（低分子核ＤＮＡ）など、または試料中の大量の核酸と区別可能な任意の他のクラスまたはサブクラスの核酸であってよい。
【００１０】
本発明の手段および方法は、核酸プローブの使用を含む。本発明による核酸プローブは、特定の核酸配列と実質的に相補的なオリゴヌクレオチド、核酸またはその断片である。
【００１１】
一般に、本発明は、試料中の定量化される核酸の数量を、
（ｉ）試料中の核酸の総数量（ｔｏｔａｌ　ｑｕａｎｔｉｔｙ）、または
（ｉｉ）試料中の特定のクラスの核酸の総数量
に対して正規化するための方法であって、
（ａ）定量化される核酸を含有する試料を供給するステップと、
（ｂ）第１の核酸プローブの少なくとも末端領域が試料中の核酸の特異的な結合部位とハイブリダイズし、それによって二本鎖核酸が作出されることを可能にする条件下で、前記第１の核酸プローブを試料に加えるステップであって、前記第１の核酸プローブが、少なくとも１種のプライマー結合部位、プローブ結合部位、およびアンカーオリゴヌクレオチド結合部位を含むステップと、
ｃ）アンカーオリゴヌクレオチドの５’配列が第１の核酸プローブとハイブリダイズしないように第１の核酸プローブのアンカーオリゴヌクレオチド結合部位とハイブリダイズことを可能にする条件下で、アンカーオリゴヌクレオチドを加えるステップと、
ｄ）核酸の３’末端でその核酸を延長するステップであって、前記アンカーオリゴヌクレオチドが第１の核酸プローブとハイブリダイズし、そのアンカーオリゴヌクレオチドがさらなる延長のための鋳型として機能する領域に達するまで、前記第１の核酸プローブが鋳型として機能するステップと、
（ｅ）試料中の核酸の総量（ｔｏｔａｌ　ａｍｏｕｎｔ）または試料中の特定のクラスの核酸の総量を、前記第１の核酸プローブおよびアンカーオリゴヌクレオチドから転写されたＤＮＡの領域と実質的に相補的な第２のプローブを使用して定量化するステップと、
（ｆ）定量化される核酸を、必要に応じて、その配列が定量化される核酸の限定された領域（ｄｅｆｉｎｅｄ　ｒｅｇｉｏｎ）と実質的に同一な第３のプローブを使用して定量化するステップと、
（ｇ）定量化される核酸の数量と、試料中の核酸の総数量または試料中の特定のクラスの核酸の総数量との比を決定することによって、定量化される核酸の数量を正規化するステップと
を含む方法に関する。
【００１２】

本発明は、試料中の核酸の正規化された定量化のためのキットであって、試料中の核酸の限定された領域または特定のクラスの核酸と実質的に相補的な１種以上の第１の核酸プローブであって、１種以上のプライマー結合部位および１つのプローブ結合部位を含む第１の核酸プローブ；ならびに前記第１の核酸プローブの前記プローブ結合部位と実質的に相補的な第２の核酸プローブを含むキットにも関する。

本発明はまた、以下の項目を提供する。

（項目１）

試料中の定量化される核酸の数量を、

（ｉ）上記試料中の核酸の総数量、または

（ｉｉ）上記試料中の特定のクラスの核酸の総数量

に対して正規化するための方法であって、

（ａ）定量化される核酸を含有する試料を供給するステップと、

（ｂ）第１の核酸プローブの少なくとも末端領域が上記試料中の核酸の特異的な結合部位とハイブリダイズし、それによって二本鎖核酸が作出されることを可能にする条件下で、上記第１の核酸プローブを上記試料に加えるステップであって、上記第１の核酸プローブが、少なくとも１種のプライマー結合部位、プローブ結合部位、およびアンカーオリゴヌクレオチド結合部位を含むステップと、

（ｃ）アンカーオリゴヌクレオチドの５’配列が上記第１の核酸プローブとハイブリダイズしないように上記第１の核酸プローブの上記アンカーオリゴヌクレオチド結合部位とハイブリダイズすることを可能にする条件下で、上記アンカーオリゴヌクレオチドを加えるステップと、

（ｄ）上記核酸の３’末端で上記核酸を延長するステップであって、上記アンカーオリゴヌクレオチドが上記第１の核酸プローブとハイブリダイズし、上記アンカーオリゴヌクレオチドがさらなる延長のための鋳型として機能する領域に達するまで、上記第１の核酸プローブが鋳型として機能するステップと、

（ｅ）上記試料中の核酸の総量または上記試料中の上記特定のクラスの核酸の総量を、上記第１の核酸プローブおよびアンカーオリゴヌクレオチドから転写されたＤＮＡの領域と実質的に相補的な第２のプローブを使用して定量化するステップと、

（ｆ）上記定量化される核酸を、必要に応じて、その配列が上記定量化される核酸の限定された領域と実質的に同一な第３のプローブを使用して定量化するステップと、

（ｇ）上記定量化される核酸の数量と、上記試料中の核酸の総数量または上記試料中の上記特定のクラスの核酸の総数量との比を決定することによって、上記定量化される核酸の数量を正規化するステップと

を含む方法。

（項目２）

上記定量化される核酸がＲＮＡであり、上記特定のクラスの核酸がＲＮＡである、項目１に記載の方法。

（項目３）

上記定量化されるＲＮＡが、ｍＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｎＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、ｓｎｏＲＮＡ、ｓｃａＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｄｓＲＮＡ、リボザイム、リボスイッチおよびウイルスＲＮＡからなる群から選択されるＲＮＡであり、ＲＮＡの総数量が、ＲＮＡの総数量、ｍＲＮＡの総数量、ｒＲＮＡの総数量、ｔＲＮＡの総数量、ｎＲＮＡの総数量、ｓｉＲＮＡの総数量、ｓｎＲＮＡの総数量、ｓｎｏＲＮＡの総数量、ｓｃａＲＮＡの総数量、マイクロＲＮＡの総数量、ｄｓＲＮＡの総数量、リボザイムの総数量、リボスイッチの総数量、ウイルスＲＮＡの総数量からなる群から選択される、項目２に記載の方法。

（項目４）

上記定量化されるＲＮＡがｍＲＮＡであり、上記特定のクラスの核酸がｍＲＮＡである、項目３に記載の方法。

（項目５）

上記特異的な結合部位がポリＡ配列またはポリＡ尾部である、項目４に記載の方法。
（項目６）
上記定量化される核酸がＤＮＡであり、上記特定のクラスの核酸がＤＮＡである、項目１に記載の方法。
（項目７）
上記定量化されるＤＮＡが、ｃＤＮＡ、ｄｓＤＮＡ、ｓｓＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、コスミドＤＮＡ、染色体ＤＮＡ、ウイルスＤＮＡおよびｍｔＤＮＡからなる群から選択されるＤＮＡであり、ＤＮＡの総数量が、ＤＮＡの総数量、ｃＤＮＡの総数量、ｄｓＤＮＡの総数量、ｓｓＤＮＡの総数量、プラスミドＤＮＡの総数量、コスミドＤＮＡの総数量、染色体ＤＮＡの総数量、ウイルスＤＮＡの総数量およびｍｔＤＮＡの総数量からなる群から選択される、項目６に記載の方法。
（項目８）
上記定量化されるＤＮＡがｃＤＮＡであり、上記特定のクラスの核酸がｃＤＮＡである、項目７に記載の方法。
（項目９）
上記特異的な結合部位がｃＤＮＡに特異的であるか、またはポリＴ配列もしくはポリＴ尾部である、項目８に記載の方法。
（項目１０）
上記第１の核酸プローブがＤＮＡまたはＲＮＡである、項目１から９までのいずれか一項に記載の方法。
（項目１１）
定量化が、定量的リアルタイムＰＣＲを含む、項目１から１０までのいずれか一項に記載の方法。
（項目１２）
上記試料中のＲＮＡまたは特定のクラスのＲＮＡを逆転写することを可能にする条件下で、上記試料中のＲＮＡを逆転写酵素と接触させるステップをさらに含む、項目２から５までのいずれか一項に記載の方法。
（項目１３）
上記第１の核酸プローブが、上記ポリＡ配列またはポリＡ尾部の５’末端に位置するかまたは上記ポリＡ配列またはポリＡ尾部の５’末端の近接部に位置するように上記特異的な結合部位とハイブリダイズする、項目５または項目１０から１２までのいずれか一項に記載の方法。
（項目１４）
定量化が、定量的リアルタイムＰＣＲを含む、項目１から１３までのいずれか一項に記載の方法。
（項目１５）
ライゲーションステップの後で、上記試料中のＲＮＡまたは特定のクラスのＲＮＡを逆転写することを可能にする条件下で、上記試料中のＲＮＡを逆転写酵素と接触させるステップをさらに含む、項目２から５までのいずれか一項に記載の方法。
（項目１６）
上記定量化が、定量的リアルタイム逆転写ＰＣＲを含む、項目１５に記載の方法。
（項目１７）
逆転写と定量化が同じ反応容器内で実施される、項目１５または１６のいずれか一項に記載の方法。
（項目１８）
上記第２の核酸プローブおよび第３の核酸プローブが、１種以上の蛍光色素で標識され、上記定量化ステップが、上記試料中の蛍光シグナルを検出することを含む、項目１から１７までのいずれか一項に記載の方法。
（項目１９）
遺伝子発現レベルを正規化するための、項目１から１８までのいずれか一項に記載の方

法。
（項目２０）
さらに予め定量化された核酸を上記試料に加え、上記定量化ステップにおいて上記予め定量化された核酸の数量を決定する、項目１から１９までのいずれか一項に記載の方法。
（項目２１）
項目１から２０までのいずれか一項に記載の方法を実施するためのキットであって、（ａ）上記試料中の核酸の限定された領域または特定のクラスの核酸と実質的に相補的なアダプターオリゴヌクレオチドであって、１種以上のプライマー結合部位および１つのプローブ結合部位を含むアダプターオリゴヌクレオチドと、
（ｂ）上記アダプターオリゴヌクレオチドの上記プローブ結合部位と実質的に相補的なアンカーオリゴヌクレオチドであって、上記アダプターオリゴヌクレオチドに対する結合配列の５’側にタグ配列を含むアンカーオリゴヌクレオチド
を含むキット。
（項目２２）
特異的な核酸の数量を参照核酸の数量に対して正規化するための、項目１から２０までのいずれか一項に記載の方法または項目２１に記載のキットの使用。
（項目２３）
遺伝子発現解析のための、項目１から２０までのいずれか一項に記載の方法または項目２１に記載のキットの使用。

【図面の簡単な説明】
【００１３】
【図１】図１は、本発明の一実施形態を例示している。Ａ）第１のステップにおいて、アダプターオリゴヌクレオチドプローブ（第１の核酸プローブ）がｍＲＮＡのポリＡ尾部とハイブリダイズする。Ｂ）第２のステップにおいて、アンカーオリゴヌクレオチドがアダプターオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする。好ましい実施形態では、Ａ）とＢ）が同時に起こることに留意されたい。Ｃ）ｍＲＮＡが延長され、アダプターオリゴヌクレオチドおよびアンカーオリゴヌクレオチドがプライマーとして機能する。アダプターオリゴヌクレオチドは、以下の異なる配列エレメントを含む：Ｓｅｑ　Ｉ：ポリＡ尾部に結合するためのポリＴストレッチまたはポリＵストレッチを含む；Ｓｅｑ　ＩＩ：プライマー結合配列を含む；Ｓｅｑ　ＩＩＩ：プローブ結合配列を含む；Ｓｅｑ　ＩＶ：アンカーオリゴヌクレオチド結合配列を含む。
【図２】図２は、５’タグ配列（プライマー結合部位および／またはプローブ結合部位）およびアダプターオリゴヌクレオチドに対する３’プライマー（ｐｒｉｍｅ）結合部位を有するアンカーオリゴヌクレオチドの実施形態を例示している。
【発明を実施するための形態】
【００１４】
本発明は、試料中の定量化される核酸の数量を、
試料中の核酸の総数量、または
試料中の特定のクラスの核酸の総数量
に対して正規化するための方法であって、
定量化される核酸を含有する試料を供給するステップと、
第１の核酸プローブの少なくとも末端領域が試料中の核酸の特異的な結合部位とハイブリダイズし、それによって二本鎖核酸が作出されることを可能にする条件下で、前記第１の核酸プローブを試料に加えるステップであって、前記第１の核酸プローブが、少なくとも１種のプライマー結合部位、プローブ結合部位、およびアンカーオリゴヌクレオチド結合部位を含むステップと、
アンカーオリゴヌクレオチドの５’配列が第１の核酸プローブとハイブリダイズしないように第１の核酸プローブのアンカーオリゴヌクレオチド結合部位とハイブリダイズすることを可能にする条件下で、アンカーオリゴヌクレオチドを加えるステップと、

核酸の３’末端でその核酸を延長するステップであって、前記アンカーオリゴヌクレオチドが第１の核酸プローブとハイブリダイズし、そのアンカーオリゴヌクレオチドがさらなる延長のための鋳型として機能する領域に達するまで、前記第１の核酸プローブが鋳型として機能するステップと、
試料中の核酸の総量または試料中の特定のクラスの核酸の総量を、前記第１の核酸プローブおよびアンカーオリゴヌクレオチドから転写されたＤＮＡの領域と実質的に相補的な第２のプローブを使用して定量化するステップと、
定量化される核酸を、必要に応じて、その配列が定量化される核酸の限定された領域と実質的に同一な第３のプローブを使用して定量化するステップと、
定量化される核酸の数量と、試料中の核酸の総数量または試料中の特定のクラスの核酸の総数量との比を決定することによって、定量化される核酸の数量を正規化するステップとを含む方法を提供する。

【００１５】

「試料中の核酸の総数量」または「試料中の特定のクラスの核酸の総数量」は、定量化される核酸の数量を正規化するための参照数量（参照核酸）を指す。

【００１６】

本発明の特定の実施形態では、定量化される核酸はＲＮＡであり、特定のクラスの核酸はＲＮＡである。

【００１７】

試料は、定量化される核酸を含む核酸分子を少なくとも含有する。核酸は、細胞または生物体に埋め込むことができるが、無細胞系の中に存在してもよい。試料は、流体、溶解物、固体マトリックスまたは核酸分子を含む他の任意の試料であってよい。

【００１８】

本発明に関しては、核酸は、デオキシリボ核酸（ｄｅｓｏｘｙｒｉｂｏ　ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ）（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）またはペプチド核酸（ＰＮＡ）に関する。ＤＮＡおよびＲＮＡは、生物体において天然に存在するが、ＤＮＡおよびＲＮＡは生きている生物体の外側に存在してもよい、または生物体に追加されてもよい。核酸は、任意の起源、例えば、ウイルス起源、細菌起源、古細菌起源、真菌起源、リボソーム起源、真核生物起源または原核生物起源のものであってよい。これは、任意の生物学的試料および任意の生物体、組織、細胞または細胞下区画に由来する核酸であってよい。これは、例えば、植物、真菌、動物からの核酸、特にヒトの核酸であってよい。核酸は、定量化する前に、例えば、単離、精製または改変によって前処理することができる。人工的な核酸も定量化することができる。核酸の長さは変動してよい。核酸は、改変されてよく、例えば、１つ以上の改変された核酸塩基または改変された糖部分（例えば、メトキシ基を含む）を含んでよい。核酸の骨格は、ペプチド核酸（ＰＮＡ）にあるような１つ以上のペプチド結合を含んでよい。核酸は、非プリン類似体または非ピリミジン類似体またはヌクレオチド類似体などの塩基類似体を含んでよい。核酸は、タンパク質、ペプチドおよび／またはアミノ酸などの追加的な付着物も含んでよい。

【００１９】

「試料中の核酸の総数量」または「試料中の特定のクラスの核酸の総数量」は、ポリメラーゼによって延長することができる３’末端を有する核酸に関する。これらの核酸または核酸のクラスはＤＮＡまたはＲＮＡであることが好ましく、ｍＲＮＡまたはｃＤＮＡであることが最も好ましい。

【００２０】

定量化される核酸は、ＲＮＡまたはＤＮＡであることが好ましく、特定のｍＲＮＡまたはｃＤＮＡであることが最も好ましい。

【００２１】

本発明の特定の実施形態では、定量化されるＤＮＡは、ｃＤＮＡ、ｄｓＤＮＡ、ｓｓＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、コスミドＤＮＡ、染色体ＤＮＡ、ウイルスＤＮＡおよびｍｔＤＮＡからなる群から選択されるＤＮＡであり、ＤＮＡの総数量は、ＤＮＡの総数量、ｃＤ

ＮＡの総数量、ｄｓＤＮＡの総数量、ｓｓＤＮＡの総数量、プラスミドＤＮＡの総数量、コスミドＤＮＡの総数量、染色体ＤＮＡの総数量、ウイルスＤＮＡの総数量およびｍｔＤＮＡの総数量からなる群から選択される。

【００２２】

別の特定の実施形態では、定量化されるＲＮＡは、ｍＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｎＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｓｎＲＮＡ、ｓｎｏＲＮＡ、ｓｃａＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｄｓＲＮＡ、リボザイム、リボスイッチおよびウイルスＲＮＡからなる群から選択されるＲＮＡであり、ＲＮＡの総数量は、ＲＮＡの総数量、ｍＲＮＡの総数量、ｒＲＮＡの総数量、ｔＲＮＡの総数量、ｎＲＮＡの総数量、ｓｉＲＮＡの総数量、ｓｎＲＮＡの総数量、ｓｎｏＲＮＡの総数量、ｓｃａＲＮＡの総数量、マイクロＲＮＡの総数量、ｄｓＲＮＡの総数量、リボザイムの総数量、リボスイッチの総数量、ウイルスＲＮＡの総数量からなる群から選択される。

【００２３】

第１の核酸プローブ（「アダプター核酸」）は、本明細書では、核酸の（または核酸の特定のクラスの核酸の）特定の結合配列と実質的に相補的な末端配列を含む核酸プローブである。この相補的な配列は第１の核酸プローブの３’末端にあり、結合配列は核酸の３’末端にあることが好ましい。第１の核酸プローブは、アンカーオリゴヌクレオチドのための結合部位および必要に応じて別のプローブ結合部位またはプライマー結合部位を含む。

【００２４】

当業者は、延長反応の反応温度、使用する特定の酵素（複数可）（例えば、耐熱性ポリメラーゼ、逆転写酵素）およびそれぞれの結合パートナーの配列に応じて、どのようにプローブおよびプライマーの長さおよび配列を選択したらいいか分かっている。

【００２５】

アンカーオリゴヌクレオチド（「アンカープローブ」）は、第１の核酸のアンカーオリゴヌクレオチド結合部位に結合する（ハイブリダイズする）配列、すなわち結合部位の配列と実質的に相補的な配列を含む。さらに、アンカーオリゴヌクレオチドは、第２の核酸プローブのための結合配列と相補的な結合部位の５’側にタグ配列および必要に応じて別のプローブ結合部位および／またはプライマー結合部位を含む。タグ配列およびアダプターオリゴヌクレオチド結合配列は、定量化される核酸または参照核酸にはそれらが現れないように選択する。

【００２６】

第２の核酸プローブは、アンカーの５’配列が鋳型として機能して延長される配列と相補的な配列を含む、すなわちアンカーオリゴヌクレオチドおよび第２のオリゴヌクレオチドは、一続きの同一の配列を含む。

【００２７】

第３の核酸プローブは、定量化される核酸の配列と実質的に相補的な配列を含む。

【００２８】

本発明に関して、逆転写酵素活性を有する酵素は、ウイルス起源、細菌起源、古細菌起源および真核生物起源、特に耐熱性の生物体由来のものを含めた種々の起源の酵素であってよい。これは、イントロン、レトロトランスポゾンまたはレトロウイルス由来の酵素を含む。本発明に関して、逆転写酵素活性を有する酵素は、相補的なデオキシリボ核酸またはリボ核酸とハイブリダイズした、またはその逆のデオキシリボ核酸またはリボ核酸の３’末端に、前記デオキシリボ核酸またはリボ核酸と相補的な１種以上のデオキシリボヌクレオチドを、適切な反応条件、例えば、バッファーの条件で付加することができる酵素である。これは、内因性に逆転写酵素を有する酵素だけでなく、その遺伝子配列が進化もしくは変異してそのような機能を獲得した酵素、またはバッファーもしくは他の反応パラメータを調整することによってそのような機能を獲得する酵素も含む。

【００２９】

本発明に関しては、逆転写酵素活性を有する酵素は、ＨＩＶ逆転写酵素、Ｍ－ＭＬＶ逆

転写酵素、ＥＡＩＶ逆転写酵素、ＡＭＶ逆転写酵素、Ｔｈｅｒｍｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ ＤＮＡポリメラーゼＩ、Ｍ－ＭＬＶ ＲＮアーゼＨ、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ ＩＩ、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ ＩＩＩ、Ｍｏｎｓｔｅｒｓｃｒｉｐｔ（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ）、Ｏｍｎｉｓｃｒｉｐｔ、Ｓｅｎｓｉｓｃｒｉｐｔ Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ（Ｑｉａｇｅｎ）、ＴｈｅｒｍｏＳｃｒｉｐｔおよびＴｈｅｒｍｏ－Ｘ（どちらもＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含む群から選択されることが好ましい。酵素は、例えば、ＡｃｃｕＳｃｒｉｐｔ逆転写酵素（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）のように、上昇した忠実度を有してもよい。１種以上の適切な逆転写酵素活性を有する酵素を混合して、最適化された条件または新規の特徴を獲得することができることを、当業者は知っている。これは、とりわけ、例えば、中温性酵素と好熱性酵素の混合物、またはＲＮアーゼＨ活性を有する酵素とＲＮアーゼＨ陰性である酵素の混合物、または忠実度が上昇した酵素と好熱性酵素の混合物を含むことができる。　本発明の範囲内の逆転写酵素活性を有する好ましい酵素の一覧に基づいて、多数の他の組み合わせが可能である。

【００３０】

「プライマー」は、本明細書では、転写される核酸（「鋳型」）と相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドを指す。複製の間、ポリメラーゼによって、ヌクレオチドが、鋳型のそれぞれのヌクレオチドと相補的なプライマーの３’末端に付着する。

【００３１】

定量化されるＲＮＡがｍＲＮＡであり、特定のクラスの核酸がｍＲＮＡであることが好ましい。

【００３２】

本発明の好ましい実施形態では、特異的な結合部位はポリＡ配列またはポリＡ尾部である。

【００３３】

本発明の他の実施形態では、定量化される核酸はＤＮＡであり、特定のクラスの核酸はＤＮＡである。

【００３４】

定量化されるＤＮＡがｃＤＮＡであり、特定のクラスの核酸がｃＤＮＡであることが好ましい。

【００３５】

特に、特異的な結合部位は、ｍＲＮＡに特異的である、またはポリＡ配列もしくはポリＡ尾部である。ポリＡ尾部は、試料ＲＮＡ中に天然に存在するままであってよい。ポリＡ尾部を含有しないＲＮＡの場合は、適切なホモポリマーの尾部をＲＮＡの３’末端に付加するための実験手順を利用することができる。そのような尾部は、Ａ塩基、Ｃ塩基、Ｇ塩基、もしくはＵ塩基または適切な塩基類似体で構成されてよい。そのような尾部の付加は、化学的にまたは酵素的に実施することができる。酵素は、ポリＡポリメラーゼ、ターミナルトランスフェラーゼ、リガーゼ、または核酸の３’末端へのヌクレオチドの付加または連結を触媒する他の適切な酵素のクラスから選択することができる。

【００３６】

第１の核酸プローブは、ＤＮＡまたはＲＮＡであることが好ましい。

【００３７】

本発明の一部の実施形態では、定量化は、非等温増幅方法であるポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、特に、ＮＡＳＢＡ（核酸配列に基づく増幅）、ＴＭＡ（転写媒介性増幅）、３ＳＲ（自続配列増幅）、ＳＤＡ（鎖置換増幅）、ＨＤＡ（熱不安定性酵素または熱安定性酵素を用いたヘリカーゼ依存性増幅）、ＲＰＡ（リコンビナーゼポリメラーゼ増幅）、ＬＡＭＰ（ループ媒介性増幅）などの定量的リアルタイムＰＣＲまたは等温増幅方法など；またはＳＭＡＰ（ＳＭａｒｔ増幅プロセス）などの核酸増幅反応を含む。これらの技術では、当業者に周知の２～３種の異なる酵素、タンパク質、プライマーおよびアクセサリー分子を使用する。ポリメラーゼとしては、Ｔｈｅｒｍｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ（Ｔｔｈ）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｕｓ ａｑｕａｔｉｃｕｓ（Ｔａｑ）ＤＮ

Ａポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｏｔｏｇａ ｍａｒｉｔｉｍａ（Ｔｍａ）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ ｌｉｔｏｒａｌｉｓ（Ｔｌｉ）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆｕｒｉｏｓｕｓ（Ｐｆｕ）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ ｗｏｅｓｅｉ（Ｐｗｏ）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ ｋｏｄａｋａｒａｅｎｓｉｓ ＫＯＤ ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｕｓ ｆｉｌｉｆｏｒｍｉｓ（Ｔｆｉ）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ ｓｏｌｆａｔａｒｉｃｕｓ Ｄｐｏ４ ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｕｓ ｐａｃｉｆｉｃｕｓ（Ｔｐａｃ）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｕｓ ｅｇｇｅｒｔｓｏｎｉｉ（Ｔｅｇ）ＤＮＡポリメラーゼおよびＴｈｅｒｍｕｓ ｆｌａｖｕｓ（Ｔｆｌ）ＤＮＡポリメラーゼおよびファージ、例えば、Ｐｈｉ２９ファージ、Ｃｐ－１、ＰＲＤ－１、Ｐｈｉ １５、Ｐｈｉ ２１、ＰＺＥ、ＰＺＡ、Ｎｆ、Ｍ２Ｙ、Ｂ１０３、ＳＦ５、ＧＡ－１、Ｃｐ－５、Ｃｐ－７、ＰＲ４、ＰＲ５、ＰＲ７２２またはＬ １７などのＰｈｉ２９様ファージのポリメラーゼを含む群から選択されるポリメラーゼが挙げられる。ポリメラーゼとしては、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｔ４、Ｔ７などの他の生物体由来のポリメラーゼも挙げられる。他の追加的なタンパク質、例えばヘリカーゼ、一本鎖の結合性タンパク質または他のＤＮＡ－結合性タンパク質およびリコンビナーゼによって、方法を改善することができる。

【００３８】

本発明の好ましい実施形態では、前記第１の核酸プローブは、前記ポリＡ配列またはポリＡ尾部の５’末端に位置するかまたは前記ポリＡ配列またはポリＡ尾部の５’末端の近接部に位置するように、すなわち、５’末端から５ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、２０ヌクレオチドの範囲内で、前記特異的な結合部位とハイブリダイズする。好ましくは、前記第１の核酸プローブは、前記ポリＡ配列またはポリＡ尾部の５’末端に位置するように前記特異的な結合部位とハイブリダイズし、本明細書では、５’末端から０ヌクレオチド、１ヌクレオチド、２ヌクレオチド、３ヌクレオチド、５ヌクレオチド、１０ヌクレオチドの範囲内にあることを意味する。

【００３９】

定量化するステップは、一部の実施形態では、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、その後に検出測定を伴う標識化反応、および定量的リアルタイムＰＣＲからなる群から選択される方法を含んでよい。定量化は、定量的リアルタイムＰＣＲまたは定量的リアルタイム逆転写ＰＣＲを含むことが好ましい。本発明の好ましい実施形態では、定量化ステップ（複数可）は、（ｉ）ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ（すなわち逆転写酵素）を使用して、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）をＤＮＡ（例えば、ｃＤＮＡ）に逆転写すること、（ｉｉ）逆転写によって作製されたＤＮＡを、ＰＣＲを使用して増幅すること、および（ｉｉｉ）増幅産物をリアルタイムで検出し、定量化することを含む。

【００４０】

本発明の一部の実施形態は、ライゲーションステップの後で、試料中のＲＮＡまたは特定のクラスのＲＮＡを逆転写することを可能にする条件下で、試料中のＲＮＡを逆転写酵素と接触させるステップをさらに含む。

【００４１】

本発明の一部の実施形態では、逆転写するステップと定量化するステップを同じ反応容器内で実施する。

【００４２】

逆転写酵素は、定量化ステップの間に増幅のためにも使用するポリメラーゼであってよい。

【００４３】

選択的プライマーまたはランダムプライマーを、定量的リアルタイムＰＣＲにおいて使用して、第１の核酸プローブのｃＤＮＡを定量化することができる。リアルタイムＰＣＲにおいて選択的プライマーを使用することが好ましい。より好ましい実施形態では、第１の核酸プローブから生成したｃＤＮＡの増幅を可能にする選択的プライマー、必要に応じて追加的な核酸プローブを使用する。必要に応じて、１種以上の追加的な選択的プライマ

ーセットが反応物中に存在し、必要に応じて追加的な核酸プローブにより、定量化されるもう１つの標的核酸種を共増幅（多重増幅）することが可能になる。

【００４４】

本発明の一部の実施形態では、定量化される核酸の数量および核酸の総数量または特定のクラスの核酸の総数量を一度に決定する。

【００４５】

第２の核酸プローブおよび第３の核酸プローブは、１種以上の蛍光色素（複数可）で標識し、定量化するステップは、試料中の蛍光シグナルを検出することを含む。

【００４６】

第２の核酸プローブおよび第３の核酸プローブはハイブリダイゼーションプローブ、加水分解プローブおよびヘアピンプローブからなる群から選択される蛍光標識されたプローブであることが好ましい。

【００４７】

特に、蛍光標識されたプローブは、ＦＡＭ、ＶＩＣ、ＮＥＤ、フルオレセイン、ＦＩＴＣ、ＩＲＤ－７００／８００、ＣＹ３、ＣＹ５、ＣＹ３．５、ＣＹ５．５、ＨＥＸ、ＴＥＴ、ＴＡＭＲＡ、ＪＯＥ、ＲＯＸ、ＢＯＤＩＰＹ　ＴＭＲ、Ｏｒｅｇｏｎ　Ｇｒｅｅｎ、Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ　Ｇｒｅｅｎ、Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ　Ｒｅｄ、Ｔｅｘａｓ　Ｒｅｄ、Ｙａｋｉｍａ　Ｙｅｌｌｏｗ、Ａｌｅｘａ　ＦｌｕｏｒおよびＰＥＴからなる群から選択される色素で標識する。

【００４８】

特に、ハイブリダイゼーションプローブはＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒプローブ（Ｒｏｃｈｅ）である、または加水分解プローブはＴａｑＭａｎプローブ（Ｒｏｃｈｅ）である。他の実施形態では、ヘアピンプローブは、分子ビーコン、Ｓｃｏｒｐｉｏｎプライマー、Ｓｕｎｒｉｓｅプライマー、ＬＵＸプライマーおよびＡｍｐｌｉｆｌｕｏｒプライマーからなる群から選択される。

【００４９】

一部の実施形態では、本発明による手段および方法を、遺伝子発現レベルを正規化するために使用する。

【００５０】

本発明の一部の実施形態では、さらに、予め定量化された核酸を試料に加え、前記予め定量化された核酸の数量を、定量化するステップにおいて決定する。予め定量化された核酸はｍＲＮＡであることが好ましい。

【００５１】

定量化される２つ以上の核酸の数量は、同時に、すなわち一緒に正規化することが好ましい。

【００５２】

本発明は、上記の方法のいずれか１つの方法を実施するためのキットにも関し、キットは、（ａ）試料中の核酸の限定された領域または特定のクラスの核酸と実質的に相補的な１種以上の第１の核酸プローブであって、１種以上のプライマー結合部位および１つのプローブ結合部位を含む第１の核酸プローブと、（ｂ）前記第１の核酸プローブの前記プローブ結合部位と実質的に相補的なアダプターオリゴヌクレオチドとを含む。

【００５３】

したがって、本発明は、試料中の核酸の正規化された定量化のためのキットに関し、キットは、（ａ）試料中の核酸の限定された領域または特定のクラスの核酸と実質的に相補的な１種以上の第１の核酸プローブであって、１種以上のプライマー結合部位および１つのプローブ結合部位を含む第１の核酸プローブと、（ｂ）前記第１の核酸プローブの前記プローブ結合部位と実質的に相補的な第２の核酸プローブとを含む。

【００５４】

キットは、好ましくは、

－　試料中の核酸の限定された領域または特定のクラスの核酸と実質的に相補的なアダプ

ターオリゴヌクレオチドであって、１種以上のプライマー結合部位および１つのプローブ結合部位を含むアダプターオリゴヌクレオチドと、
－　前記アダプターオリゴヌクレオチドの前記プローブ結合部位と実質的に相補的なアンカーオリゴヌクレオチドであって、アダプターオリゴヌクレオチドに対する結合配列の５’であるタグ配列を含むアンカーオリゴヌクレオチドと
を含むことができる。
【００５５】
本発明の好ましい実施形態では、キットは、ポリメラーゼをさらに含む。キットは、ヌクレオチド混合物および反応バッファー（複数可）もさらに含んでよい。一部の実施形態では、キットは、逆転写酵素をさらに含む。
【００５６】
特定の実施形態では、キットは、１種以上の予め定量化された較正用核酸、前記較正用核酸を増幅するためのプライマーセットおよび前記予め定量化された核酸の配列と実質的に相補的な第１の核酸プローブをさらに含む。
【００５７】
キットは、
－　第１の核酸プローブ（アダプターオリゴヌクレオチド）
－　アンカーオリゴヌクレオチドのタグ配列および／または
－　アンカーオリゴヌクレオチドのタグ配列またはタグ配列の一部と実質的に相補的な配列
と実質的に相補的なプライマーをさらに含んでよい。
【００５８】
キットは、第２の核酸プローブおよび／または第３の核酸プローブもさらに含んでよく、第２の核酸プローブはアンカーオリゴヌクレオチドのタグ配列またはタグ配列の一部と実質的に相補的な配列と実質的に相補的であり、第３の核酸プローブは、定量化される核酸の配列と実質的に相補的である。
【００５９】
一部の実施形態では、１つ以上の構成成分を同じ反応容器内で予備混合する。
【００６０】
本明細書で上に示したように、遺伝子発現の解析に関して、試料中のｍＲＮＡの定量化は、定量的リアルタイム逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ｑＰＣＲ）を使用して実施することができる。ＲＴ－ｑＰＣＲ法では、３つのステップ：（ｉ）ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ（すなわち逆転写酵素）を使用して、ｍＲＮＡをｃＤＮＡに逆転写するステップ、（ｉｉ）ＰＣＲを使用してｃＤＮＡを増幅するステップ、および（ｉｉｉ）増幅産物をリアルタイムで検出し、定量化するステップの組み合わせを使用する。逆転写およびＰＣＲに基づく増幅のために、ｄＮＴＰ（「ヌクレオチド混合物」）が反応バッファー中に存在することが必要である。本発明によるヌクレオチド混合物は、ＰＣＲにおいて使用するために適したｄＮＴＰの混合物、すなわち、ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰおよびｄＴＴＰ／ｄＵＴＰの混合物である。本発明の特定の実施形態に関して、これらのｄＮＴＰの相対的な量は、鋳型核酸の特定のヌクレオチド含有量に応じて適合させることができる。ＲＴ－ｑＰＣＲのステップは、一段階のプロセス、または二段階のプロセスのいずれかで実施することができる。第１の場合では、逆転写およびＰＣＲに基づく増幅は、同じ反応容器内で、例えば、Ｔｈｅｒｍｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ（Ｔｔｈ）ポリメラーゼのような内因性逆転写機能性を有するＤＮＡポリメラーゼを利用することによって実施する。二段階の設定では、ＲＮＡを逆転写するステップとＤＮＡを増幅するステップを、別々に、例えば、異なる反応容器内で実施する。本発明による方法のステップは、例えば、マグネシウムイオンなどの塩を含む適切な反応バッファー中で行うことができる。すでに述べた通り、異なるステップは、同じバッファーおよび反応容器中で行ってよい、または、同じバッファーおよび反応容器中で行わなくてよい。ＲＴ－ｑＰＣＲと対照的に、ｑＰＣＲでは、逆転写は実施されず、したがって、これはＲＮＡではなくＤＮＡについての定量化方法であ

る。
【００６１】
ＲＴ－ｑＰＣＲにおける（ｍ）ＲＮＡの逆転写ならびにｑＰＣＲおよびＲＴ－ｑＰＣＲにおける（ｃ）ＤＮＡの増幅には、オリゴヌクレオチド（「プライマー」）によってプライミングすることが必要である。ＲＴ－ｑＰＣＲを用いてｍＲＮＡを定量化する場合では、ｍＲＮＡに特異的なオリゴヌクレオチド、例えば、ｍＲＮＡのポリＡ尾部とハイブリダイズするオリゴ－ｄＴプライマーを使用することができる。しかし、長さが異なるランダムプライマーも利用することができる。
【００６２】
さらに、標準の定量的リアルタイムＰＣＲプロトコールおよびキットを、本発明による手段および方法に適合させるまたは修正することができる。
【００６３】
上記の通り、リアルタイムＰＣＲ（本明細書では定量的ＰＣＲまたは定量的リアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲ）とも称される）は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して、核酸を同時に増幅し定量化するための方法である。定量的リアルタイム逆転写ＰＣＲ（ＲＴ－ｑＰＣＲ）は、ＲＮＡをＤＮＡに、例えば、ｍＲＮＡをｃＤＮＡに逆転写することをさらに含む定量的リアルタイムＰＣＲ法である。ｑＰＣＲ法およびＲＴ－ｑＰＣＲ法では、増幅された核酸は、それが蓄積するにつれて定量化される。一般には、二本鎖ＤＮＡに挿入する蛍光色素（例えば、臭化エチジウムもしくはＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎ Ｉ）または相補的な核酸とハイブリダイズしたときに（例えば、ＤＮＡの蓄積）蛍光を発する改変された核酸プローブ（「レポータープローブ」）を、ｑＰＣＲに基づく方法における定量化のために使用する。特に、蛍光発生プライマー、ハイブリダイゼーションプローブ（例えば、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒプローブ（Ｒｏｃｈｅ））、加水分解プローブ（例えば、ＴａｑＭａｎプローブ（Ｒｏｃｈｅ））、または分子ビーコン、Ｓｃｏｒｐｉｏｎプライマー（ＤｘＳ）、Ｓｕｎｒｉｓｅプライマー（Ｏｎｃｏｒ）、ＬＵＸプライマー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、Ａｍｐｌｉｆｌｕｏｒプライマー（Ｉｎｔｅｒｇｅｎ）などのヘアピンプローブなどを、レポータープローブとして使用することができる。本発明に従って、蛍光発生プライマーまたはプローブは、例えば蛍光色素が付着、例えば、共有結合的に付着したプライマーまたはプローブであってよい。そのような蛍光色素は、例えば、ＦＡＭ（５－カルボキシフルオレセインまたは６－カルボキシフルオレセイン）、ＶＩＣ、ＮＥＤ、フルオレセイン、ＦＩＴＣ、ＩＲＤ－７００／８００、ＣＹ３、ＣＹ５、ＣＹ３．５、ＣＹ５．５、ＨＥＸ、ＴＥＴ、ＴＡＭＲＡ、ＪＯＥ、ＲＯＸ、ＢＯＤＩＰＹ ＴＭＲ、Ｏｒｅｇｏｎ Ｇｒｅｅｎ、Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ Ｇｒｅｅｎ、Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ Ｒｅｄ、Ｔｅｘａｓ Ｒｅｄ、Ｙａｋｉｍａ Ｙｅｌｌｏｗ、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ、ＰＥＴなどであってよい。特定のレポータープローブは、蛍光クエンチャーをさらに含んでよい。
【００６４】
本発明の例示的だが非限定的な実施形態では、試料中の特定のｍＲＮＡを定量化し、その数量を、試料中の全部のｍＲＮＡの数量に対して正規化する。ｍＲＮＡの全数量を、アダプターオリゴヌクレオチド（本明細書では「第１の核酸プローブ」）、アンカーオリゴヌクレオチドおよび第２の核酸プローブを使用して定量化する。特定のｍＲＮＡの数量を、第３の核酸プローブを使用して定量化する。定量化は、この実施形態では、定量的逆転写リアルタイムＰＣＲを使用して実施し、ここで、第１の核酸プローブはｍＲＮＡのポリＡ尾部と相補的な配列を含む。第１の核酸プローブは、アンカーオリゴヌクレオチドプローブが結合するためのアダプターとして機能する。第１の核酸プローブは、アンカーオリゴヌクレオチドが第１の核酸プローブに結合する領域に達するまでｍＲＮＡを延長するための鋳型として機能し、そこからは核酸プローブの５’配列が鋳型として機能する。これにより、プライマー配列および／またはプローブ配列が導入された延長したｍＲＮＡが生じる。複製に際して、導入されたプライマー結合部位および／またはプローブ結合部位が、標識されたプライマーおよび／またはプローブを用いたリアルタイムＰＣＲを使用した

定量化に役立つ。定量化される特定のｍＲＮＡは、標識されたプローブおよび／またはプライマーを使用して定量化する。

【００６５】

本発明は、特定の核酸の数量を参照核酸の数量に対して正規化するための本発明の方法または本発明のキットの使用にも関する。

【００６６】

さらに、本発明は、遺伝子発現解析のための、本発明の方法または本発明のキットの使用にも関する。

【００６７】

本発明に関しては、ｍＲＮＡは、種々の種から天然に生じるようなポリアデニル化メッセンジャーＲＮＡであることが好ましい場合がある。ｍＲＮＡは、天然にポリＡ尾部を伴う、またはポリＡ尾部を伴わない任意のｍＲＮＡであってもよく、ポリヌクレオチド尾部は、適切な方法、例えば、酵素、好ましくはポリＡポリメラーゼによってｉｎ　ｖｉｔｒｏで付加される。

【００６８】

１－ｘは、天然に存在する、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏで付加されたポリヌクレオチド尾部の長さを記載する。適切な長さは、１～数千まで変動する。

【００６９】

Ａ［Ａ］ＡＡＡＡは、ポリヌクレオチド尾部を記載し、それは天然に存在するポリＡ尾部、または適切な方法によってｉｎ　ｖｉｔｒｏで付加されたポリヌクレオチド尾部であってよい。３’ＯＨは酵素的な伸長を可能にするために利用可能である。

【００７０】

アダプター核酸は、核酸のオリゴヌクレオチド、ＲＮＡまたはＤＮＡまたはそれらの類似形態である。アダプター核酸は、天然に存在するポリＡ尾部であり得るポリヌクレオチド尾部に所与の反応条件下でハイブリダイズするエレメントから構成される。ポリＡ尾部を担持するｍＲＮＡの場合、ハイブリダイズエレメントは、Ａと相補的な塩基、すなわちＵ塩基またはＴ塩基から構成されることが好ましい。好ましい実施形態では、ハイブリダイズエレメントの長さは、１～１５０ヌクレオチド、より好ましくは２～１００ヌクレオチド、最も好ましくは４～８０ヌクレオチドである。有用な長さは、利用可能な作製技術または合成技術によって制限され得る。

【００７１】

アダプター核酸は、アダプター配列を含む。アダプター配列は、検出方法において、この配列を鋳型として使用して生成したｃＤＮＡを特異的に検出することを可能にするために十分な長さを有するように選択されることが好ましい。１つの好ましい検出方法はＰＣＲである。この場合、アダプター配列は、少なくとも１種のＰＣＲプライマーに対して、および必要に応じて１種以上の配列特異的なプローブに対して十分な長さを有する。このアダプター核酸の３’ＯＨ基を遮断して伸長を妨げることができる、またはｃＤＮＡの合成を可能にするために、このアダプター核酸の３’ＯＨ基は遊離していてよい。３’ＯＨを遮断するための適切な方法は、当技術分野で公知の標準の方法である。適切な方法は、３’リン酸基、逆塩基、脂肪族リンカー、アミノ改変因子、または他のものであってよい。

【００７２】

酵素は、プライマーとしてポリヌクレオチド尾部を、および鋳型としてアダプター核酸を使用したｃＤＮＡの合成を可能にする少なくとも１つの酵素である。ポリＡ尾部またはアダプター核酸に使用される核酸の型に応じて、種々の酵素が可能である。これは、中温性の生物体または好熱性の生物体を起源としてよく、５℃～１００℃、好ましくは１０℃～８０℃、最も好ましくは１５℃～７５℃の温度範囲で活性をもたらす。

【００７３】

ｄＮＴＰは、ＤＮＡ合成に必要とされるデオキシヌクレオチド三リン酸である。混合物は、必要に応じて、改変されたヌクレオチドまたは標識されたヌクレオチドまたはヌクレ

オチド類似体を含有してよい。

【００７４】

本発明に関して、「バッファー」は、所与の反応温度および所与の１種以上の酵素でｃＤＮＡを合成するための反応条件をもたらす１種以上の緩衝物質、適切なｐＨ、カチオン、Mg^{++}のような補因子をもたらす適切な緩衝溶液である。

【実施例】

【００７５】

（実施例１）

アダプターオリゴヌクレオチドおよびアンカーオリゴヌクレオチドを使用したｃＤＮＡの生成および検出ならびにリアルタイムＰＣＲでのｃＤＮＡの検出。

【００７６】

本実験では、図１に示されている概念の実現性を実証するものとする。反応物は、表１に示されている通り構成され、表２に示されているプロトコールを用いて行う。反応容積は、検出されるべきＲＮＡの量に左右される（表１参照）。この目的のために、表３の試薬を使用した。ＲＮＡ試料は、標準の手順（Ｒｎｅａｓｙ　Ｋｉｔ、Ｑｉａｇｅｎ）を使用してＨｅｌａ細胞から単離した全ＲＮＡであった。バックグラウンドシグナルについての対照として、１μｇの全Ｈｅｌａ　ＲＮＡならびにアダプターおよびアンカー核酸を除く全ての構成成分を用いた陰性対照反応ｃＤＮＡ合成反応物。

【００７７】

【表１】

表1:アダプターオリゴヌクレオチドおよびアンカーオリゴヌクレオチドを使用してcDNAを合成するための構成

構成成分	最終濃度
RTバッファー、10x	1x
RNアーゼ阻害剤、40ユニット/μl	2ユニット/μl
DNAポリメリゼーションミックス 10mM dNTP	0.5mM
Omniscript逆転写酵素、4ユニット/μl	0.2ユニット/μl
アダプター核酸	0.2μM
アンカーオリゴ	1μM
RNアーゼを含まない水	可変
RNA試料の濃度	全RNA濃度: 0.2-2.0 ng/μl)
反応容積	500 μl

【００７８】

【表２】

表2:アダプターオリゴヌクレオチドおよびアンカーオリゴヌクレオチドを使用してcDNAを合成するためのプロトコール	
逆転写（RT）	37℃で45分間
RT不活性化	95℃で5分間
	4℃で維持

【００７９】
【表３】

表3:cDNAを合成するための試薬	
RTバッファー、10x	QIAGEN-Omniscript RT Kit、材料番号205111の構成成分
Omniscript逆転写酵素、4ユニット/μl	
RNアーゼを含まない水	
RNアーゼ阻害剤、40ユニット/μl	Promega材料番号N251B
10mM dNTP	Amersham材料番号27-2074-60
アンカーオリゴヌクレオチド	合成DNAオリゴヌクレオチド 5'-CACATCAGGATTCCTAGGACCAATATCACT CACC-3'P
アダプター核酸	合成RNAオリゴヌクレオチド: GGT GAG TGA TTG GAG GGT TGA GCA CAT CAG AGC CCT GCG ATG AGT CTG TCG TCG TCT CGT TCC AUU UUU UUU UUU UUU UU-3' NH2

逆転写した後、次いで、生成したｃＤＮＡを、リアルタイムＰＣＲにおいて観察されたＣｔ値とｃＤＮＡの合成において使用したＲＮＡの量の相関が観察され得るかどうかどうかを分析するために、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎに基づくリアルタイムＰＣＲにおいて鋳型として使用した。

【００８０】

この目的のために、ＲＴ酵素を不活性化した後（表２参照：９５℃で５分間）、ｃＤＮＡ合成反応物５μｌを、以下のリアルタイムＰＣＲにおいて各反応の鋳型として加えた。リアルタイムＰＣＲにおける検出を、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎの化学作用を用いて行った。表５に、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎリアルタイム ＰＣＲ反応のための構成を示す。ＰＣＲ反応物は、表４からの構成成分を用いて調製した。各条件について２連の反応を実施した。その後、表６に示されているサイクリングを実施した。リアルタイムＰＣＲは、Ａｐｐｌｉ

ｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ ７５００ Ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍで行った。その後にデータを適切なソフトウェア（ＳＤＳソフトウェア）を用いて解析した。結果を表７に示す。

【００８１】

これらの結果から、リアルタイムＰＣＲにおいて観察されたＣｔ値とｃＤＮＡ合成反応における投入ＲＮＡの量の相関を観察することができることが明らかになる。表７に示した通り、投入ＲＮＡの量とＣｔ値との間の、デルタＣｔと称されるＣｔの差異は、理論的なＣｔ差異とほぼ完全に適合する。１μｇと５００ｎｇとの間の２倍の差異に対して、１．０８のＣｔの差異が観察された。所与の条件における所与のＰＣＲアッセイの１００％に近いＰＣＲ効率（データは示さず）およびリアルタイムＰＣＲ計器の測定の不正確さを考慮に入れると、これらの値は、最適な理論的差異である１．０にほぼ正確に適合する。５００ｎｇと１００ｎｇとの間の５倍の差異については、２．３６のＣｔの差異が観察された。所与の１００％のＰＣＲ効率での５倍の差異についての理論的差異は２．３２である。したがって、本実施例において、投入ＲＮＡの量とＣｔ値との間に非常に良好な相関が観察され、これは、このシステムが試料中の全核酸、例えば、ＲＮＡを定量化する、および、これらの値を試料中の核酸、例えば、ＲＮＡの総量を正規化するために使用するのに適していることを実証している。

【００８２】

陰性対照反応物（１μｇの全Ｈｅｌａ ＲＮＡおよびアダプター核酸およびアンカー核酸を除く全ての構成成分を有するｃＤＮＡ合成反応物からの５μｌ）は、「未決定の」Ｃｔ値に示されるように、ＰＣＲにおいて、４５サイクル後に陰性のままであり、これは、反応の高い特異性を実証している。

【００８３】

総合すると、図１に示されている概念により、試料中の核酸、例えば、ＲＮＡを定量化し、その後に正規化することが可能になる。

【００８４】

【表４】

表4:SYBR Greenリアルタイム PCRの構成の構成成分および材料番号	
QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix、2x	QIAGEN-QuantiTect SYBR Green PCR Kit、 材料番号204143の構成成分
RNアーゼを含まない水	
HUM-Uni	AAC GAG ACG ACG ACA GAC
HBSR 1	CACATCAGGATTCCTAGGACC

【００８５】

【表５】

表5:SYBR Greenを用いたリアルタイムPCRの構成	
構成成分	最終濃度
QuantiTect SYBR Green PCR Mastermix、2x	1x
HUM-Uniプライマー	0.4μM
HBSR 1プライマー	0.4μM
RNアーゼを含まない水	1反応当たり20μlまで
（cDNA合成反応からの）鋳型	5μl/反応
最終の反応容積	25μl

【００８６】

【表６】

表6:SYBR Greenを用いたリアルタイムPCRのプロトコール		
PCRの最初の再活性化	95℃で15分間	
変性	95℃で15秒間	45x
アニーリング	55℃で30秒間	
伸長(データの取得)	70℃で30秒間	
解離段階が続く（融解曲線分析）		

【００８７】

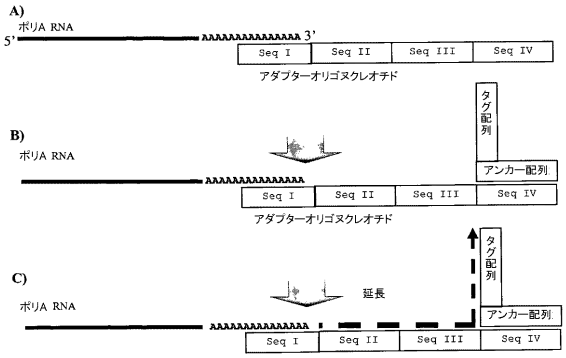
【表７】

表7: SYBR GreenリアルタイムPCRの結果

cDNAの合成に使用したRNAの量	リアルタイムPCRにおける鋳型	Ct	Ctの2連の平均値	デルタCt	理論的なデルタCt
1μg Hela RNA	5μl の cDNA 合成物	34.24 34.64	34.44		
500ng Hela RNA	5μl の cDNA 合成物	35.78 35.26	35.52	1.08	1.0
100ng Hela RNA	5μl の cDNA 合成物	37.71 38.05	37.88	2.36	2.32
陰性対照(アダプターとアンカー核酸なしの Hela RNA 1μg)	5μl の cDNA 合成物	未決定	–	–	–

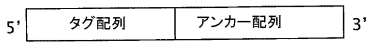
【図１】

Fig. 1



【図２】

Fig. 2



【配列表】

0005680080000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　エンゲル,　ホルガー
ドイツ国　４０７２４　ヒルデン,　ケーテーコルヴィッツーヴェグ　５

審査官　小暮　道明

(56)参考文献　米国特許出願公開第２００２／０１３２２４１（ＵＳ，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ１５／
Ｃ１２Ｑ１／
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＷＯＩＤＳ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）