

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6225123号
(P6225123)

(45) 発行日 平成29年11月1日(2017.11.1)

(24) 登録日 平成29年10月13日(2017.10.13)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 Q 1/44 (2006.01)	C 1 2 Q 1/44

請求項の数 8 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2014-557769 (P2014-557769)	(73) 特許権者	390041542
(86) (22) 出願日	平成25年2月14日 (2013.2.14)		ゼネラル・エレクトリック・カンパニー
(65) 公表番号	特表2015-507930 (P2015-507930A)		アメリカ合衆国、ニューヨーク州 1 2 3
(43) 公表日	平成27年3月16日 (2015.3.16)		4 5、スケネクタデイ、リバーロード、1
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/026136		番
(87) 国際公開番号	W02013/123187	(74) 代理人	100137545
(87) 国際公開日	平成25年8月22日 (2013.8.22)		弁理士 荒川 聡志
審査請求日	平成28年2月5日 (2016.2.5)	(74) 代理人	100105588
(31) 優先権主張番号	61/599,119		弁理士 小倉 博
(32) 優先日	平成24年2月15日 (2012.2.15)	(74) 代理人	100129779
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 黒川 俊久
(31) 優先権主張番号	13/446,474	(74) 代理人	100113974
(32) 優先日	平成24年4月13日 (2012.4.13)		弁理士 田中 拓人
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非特異的核酸増幅を低減するための方法及びキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸の増幅方法であって、

a) 核酸鋳型を用意するステップと、
b) DNAポリメラーゼと、デオキシリボヌクレオシド三リン酸と、3'末端及び5'末端を有するプライマーとを含む反応溶液に核酸鋳型を接触させるステップであって、プライマーが、2-アミノ-デオキシアデノシン(2-アミノ-dA)及び2-チオ-デオキシチミジン(2-チオ-dT)を含んでいて、(+N)(+N)(atN)(atN)(atN)*Nの一般構造(式中、ヘキサマーの5'末端は(+N)、3'末端は*Nであり、「N」はデオキシアデノシン(dA)、デオキシチミジン(dC)、デオキシグアノシン(dG)又はデオキシチミジン(dT)を表し、「+」はヌクレオチド塩基に先行するロックド核酸(LNA)塩基を示し、(atN)は2-アミノ-dA、dC、dG及び2-チオ-dTのランダム混合物を表し、「*」はホスホロチオエート結合を表す。)を有するヘキサマーである、ステップと、
c) 核酸鋳型を増幅するステップと
を含む方法。

【請求項 2】

核酸鋳型の増幅が等温条件下で行われる、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

核酸鋳型の増幅が高いストリンジェンシー条件下で行われる、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

DNAポリメラーゼがphi 29 DNAポリメラーゼである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

核酸鋳型の増幅がローリングサークル増幅法(RCA)又は多重置換増幅法(MDA)からなる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

当該方法により、痕跡量の核酸の増幅が可能である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

核酸を増幅するためのキットであって、

(a) DNAポリメラーゼと、

(b) デオキシリボヌクレオシド三リン酸と、

(c) 3'末端及び5'末端を有するプライマーであって、2-アミノ-デオキシアデノシン(2-アミノ-dA)及び2-チオ-デオキシチミジン(2-チオ-dT)を含んでいて、(+N)(+N)(atN)(atN)(atN)*Nの一般構造(式中、ヘキサマーの5'末端は(+N)、3'末端は*Nであり、「N」はデオキシアデノシン(dA)、デオキシチミジン(dC)、デオキシグアノシン(dG)又はデオキシチミジン(dT)を表し、「+」はヌクレオチド塩基に先行するロックド核酸(LNA)塩基を示し、(atN)は2-アミノ-dA、dC、dG及び2-チオ-dTのランダム混合物を表し、「*」はホスホロチオエート結合を表す。)を有するヘキサマーであるプライマーとを含むキット。

【請求項 8】

DNAポリメラーゼがphi 29 DNAポリメラーゼである、請求項 7 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、一般に、対象とする標的核酸の増幅のための方法及びキットに関する。本明細書に記載されている方法及び組成物は、新規なプライマーを使用することによって所望の標的核酸の増幅を促進することにより、望ましくない増幅産物(例えば、プライマー-ダイマー及びキメラ核酸)の生成を低減する。

【背景技術】

【0002】

現在、数個の分子の出発核酸鋳型からでも使用できる核酸の効率的な増幅のために種々の技術が利用可能である。その中には、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、自家持続配列複製法(3SR)、核酸配列ベース増幅法(NASBA)、ストランド置換増幅法(SDA)、多重置換増幅法(MDA)、及びローリングサークル増幅法(RCA)がある。これらの技術の多くが出発核酸鋳型の指数関数的増幅を必要とし、多数の増幅産物を迅速に生成することができる。標的核酸の増幅のためのキットは市販されている(例えば、GenomiPhi(商標)(General Electric, Inc.)及びRepliG(商標)(Qiagen, Inc.))が、これらの方法の改良は有利であろう。

【0003】

核酸増幅技術は、検体検出、感知、法医学及び診断用途、ゲノム配列決定、全ゲノム増幅、などに用いられる核酸に基づくアッセイで使用されることが多い。かかる用途では、高い特異性、感度、精度、及び頑強性(robustness)を有する増幅技術を要することが多い。しかしながら、核酸増幅のために現在利用可能なたいの技術は、不必要な増幅産物を生じる非特異的増幅反応により生成する高いバックグラウンド信号に悩まされる。これらの非特異的な増幅反応は、重大な核酸に基づくアッセイにおけるこれらの技術の多くの効果的な利用を妨げる。例えば、伝統的な増幅反応の使用は、偽陽性の結果を生ずることにより間違った診断に導き得る。かかる非特異的なバックグラウンド増幅反応は、増幅すべき標的核酸が痕跡量しか利用できない場合(例えば、単一のDNA分子からの全ゲノム

10

20

30

40

50

増幅)、より一層問題となる。

【0004】

非特異的なバックグラウンド増幅反応は、例えば、試料中の汚染性核酸配列の増幅、プライマー-ダイマーの形成、又はキメラ核酸の生成に起因し得る(例えば、所望の核酸産物の自己ハイブリダイゼーションの結果生ずる)。核酸増幅反応における非特異的増幅の頻繁な原因は様々な望ましくないプライマー相互作用の結果である。プライマーは、標的核酸内又は汚染性核酸内の、標的核酸の一部と幾らかの相同性を共有する核酸領域とハイブリダイズし得る。プライマーの3'末端が非標的領域と十分な相同性を有する場合、この領域が増幅され得る。

【0005】

非特異的増幅はまた、意図されない核酸の鋳型-非依存性プライマー-プライマー相互作用の結果としても起こり得る。プライマーは、ストランド内又はストランド間のプライマー-アニーリング(例えば、分子内又は分子間ハイブリダイゼーション)によりプライマー-ダイマー構造を形成し得、結果として不必要な核酸の増幅を起こし得る。結果として生じた偽のプライマー伸長産物はさらに増幅され得、時として優勢になったり、又は標的とする配列の所望の増幅を阻害したり、又は遮蔽したりし得る。また、増幅産物は自己ハイブリダイズすることがあり、増幅反応中核酸ポリメラーゼの作用により雑種産物又はキメラ産物が生成し得る。

【0006】

DNA合成をプライミングするために、現在のMDA処方方は配列5'-NNNNN*Nを有するランダムヘキサマーを利用することが多い。ここで、「N」はデオキシアデノシン(dA)、デオキシシチジン(dC)、デオキシグアノシン(dG)、又はデオキシチミジン(dT)を表し、「*」はホスホロチオエート結合を表す。

【0007】

分子内又は分子間のハイブリダイゼーションを介してクロスハイブリダイズすることができない拘束-ランダム化ヘキサマープライマー(例えば、R₆、ここでR=A/G)が核酸増幅中のプライマー-ダイマー構造の形成を抑制するために使用されている。しかしながら、これらの拘束-ランダム化プライマーは、核酸増幅反応において相当な偏り(bias)を付与する。また、かかるプライマーは配列-非特異的又は配列-非偏りの核酸増幅反応(例えば、全ゲノム又は未知の核酸配列の増幅)にとってあまり役に立たない。

【0008】

DNA合成をプライミングするために、MDA処方物は、配列5'-NNNNN*Nを有するランダムヘキサマーを利用することが多い。ここで、「N」はデオキシアデノシン(dA)、デオキシシチジン(dC)、デオキシグアノシン(dG)、又はデオキシチミジン(dT)を表し、「*」はホスホロチオエート結合を表す。競合する非標的核酸(すなわち、鋳型DNA)の増幅を最小化するための1つの解決策は、互いにアニールする能力を阻害するようにオリゴヌクレオチドプライマーを修飾することである。

【0009】

上に記載したランダムヘキサマープライマーを用いる核酸増幅に伴う問題を克服するための以前の研究は、米国特許第7993839号(2011年8月9日発行)に開示されている方法及びキットを含む。この特許に記載されている技術は、限定されることはないが、一般構造5'-+W+WN NN*S-3'のヘキサマーであるプライマーの使用を含む。ここで、「+」はロックド核酸塩基(すなわち、「LNA塩基」、例えば、+A=アデノシンLNA分子)の前にあり、「W」はdA及びdTのみの混合物を表し、「S」はdC及びdGのみの混合物を表す。記号「*」は2つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を表す。「W」塩基は「S」塩基と安定的に対合することができないので、オリゴヌクレオチドデュプレックスの形成が阻害され、その結果非鋳型核酸の増幅が減少する。これらの方法及びキットは「SD GenomiPhi」といわれることがある。

【0010】

微量の核酸試料を増幅する際のMDAの速度及び感度に対する1つの改良はオリゴヌク

10

20

30

40

50

レオチドプライマー中へのLNAの取り込みである。LNAは、塩基対合の速度、効率、及び安定性を増大することにより、修飾オリゴヌクレオチドの対象核酸内の標的配列に対するハイブリダイゼーションを促進するのに役立つ立体構造的に制限されたヌクレオチドアナログの1群である。オリゴヌクレオチドプライマー中に取り込まれる各LNAモノマーに対して、デュプレックス融解温度(T_m)は2 - 8 ずつ増大する。デュプレックスの T_m の増大により、より高い温度又はより低い塩濃度(例えば、未修飾プライマーを用いた従来の増幅反応で使用される75 mMのKClと対照的に15 mMのKCl)のようによりストリンジェントな条件でMDA反応を実施することが可能になる。MDAを用いる増幅の反応速度はランダムプライマー中へのLNAの組み込みによって劇的に増大するが、1つの欠点は、ヘキサマーが互いに対してもより効率的にアニールし、不必要な核酸(例えば、プライマー-ダイマー)が増幅するという点である。

10

【0011】

非標的核酸の望ましくない増幅に伴う問題は、核酸増幅法に使用される試薬及び試薬溶液から汚染性の核酸を除去するという観点からも取り組まれて来ている。核酸増幅に使用する核酸汚染物質を含まない試薬及び試薬溶液を生成するためのキット及び方法が米国特許出願公開第2009/0155859に開示されている。かかる方法は、汚染性の核酸を不活性にするためにポリメラーゼ溶液、ヌクレオチド溶液、及びプライマー溶液を処理することを含む。これらの方法はポリメラーゼ及び/又はエキソヌクレアーゼの校正活性を使用して試薬及び試薬溶液を浄化する。米国特許出願公開第2009/0155859号に記載されているこれらの方法は時として「Clean GenomiPhi」又は「Clean GPhi」といわれることがある。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】米国特許出願公開第2011/195457号

【発明の概要】

【0013】

これらの進歩にも関わらず、配列カバレッジ(sequence coverage)の点でより低い偏り(bias)を有し、かつより低いレベルの非特異的なバックグラウンド増幅を生成する、より効率的な核酸増幅方法を開発することに対するニーズが存続している。配列の偏りがなく、プライマー-プライマー相互作用を低下させると共にキメラ核酸(例えば、ヘキサマープライマーと標的核酸増幅産物のアニーリングから生じる不必要な核酸産物)の産生も最小にする核酸増幅のためのプライマーの開発が当技術分野で必要とされている。

30

【0014】

本出願は、標的核酸の増幅のための方法及び組成物を提供する。特定の作用機序に限定するつもりはないが、本明細書に開示されている方法は、他の核酸増幅方法及びキットで観察される不必要なプライマー-ダイマー及びキメラ産物の生成を最小にするか又は防止するように設計された修飾プライマーの使用によって、所望の標的核酸(例えば、「DNA鋳型」又は「核酸鋳型」)をより効率的に増幅すると考えられる。本明細書に記載されている方法は、偽の核酸増幅産物の生成を回避するために新規なプライマー設計法を利用する。例えば、1つの実施形態において、2-アミノ-デオキシアデノシン(2-アミノ-dA)及び2-チオ-デオキシチミジン(2-チオ-dT)を含むランダムヘキサマーを作成し、核酸増幅反応(例えば、MDA)に使用する。本明細書に記載されている方法及びキットは「AT GenomiPhi」ということができる。

40

【0015】

本発明の1つの局面において、これらの修飾されたヘキサマーは一般式： $+N+N(a_tN)(a_tN)(a_tN)*N$ で表される。ここで、「+」は上に記載したようにLNA塩基に先行し、 (a_tN) は2-アミノ-dA、dC、dG、及び2-チオ-dTのランダムな混合物を表す。本開示の別の局面で使用するヘキサマーは $(a_tN)(a_tN)(a_tN)(a_tN)(a_tN)*N$ を含む。ここで、記号はこれら2つのヘキサマー設

50

計間で一致する。以下でより詳細に記載するように、核酸増幅技術においてこれらのヘキサマーを使用すると、ランダムヘキサマーのもう1つ別のものとアニールする能力を阻害することにより、プライマーの融解する T_m を上昇させることにより、LNA及び2 - アミノ - dAのプライマーへの付加によってヘキサマーと標的核酸の結合効率を改良することにより、そしてランダムヘキサマーへの2 - チオ - dTの組み込みによって標的DNAとそれ自身のアニリングを防ぐことにより、従来の方法で観察されるプライマー - ダイマー形成及びキメラ核酸の生成に伴う問題が対処され、最小にされるか又は排除される。さらにまた、これらのプライマーの修飾はその標的核酸への結合強度を増大させ、よりストリンジентなハイブリダイゼーション緩衝液（これはプライマー - ダイマー及びキメラ核酸産物の生成の可能性をさらに最小にする）の利用が可能になる。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

化学的に修飾された多孔性の膜の上記及びその他の特徴、局面、及び利点は、添付の図面を参照して以下の詳細な説明を読むことでより良く理解されるであろう。全図面を通じて類似の符号は類似の部分を表す。

【図1】図1は、1) 2 - アミノ - デオキシアデノシン (2 - アミノ - dA) 及び2 - チオ - デオキシチミジン (2 - チオ - dT)、並びに2) 2 - アミノ - dA及び未修飾のTの塩基対合組合せを示す。2 - アミノ - dA / 2 - チオ - dT対合は非常に不安定であるが、2 - アミノ - dA / T対合は実際に標準のA / T対合よりも安定である。

【図2】図2は、標準のGenomiPhi (商標) 処方に対する改良点が、酵素クリーニング反応の付加、塩化カリウム濃度の調節、及びランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドの組成であったことを示す。この図中で使用している略号は、N = ランダム塩基、* = ホスホロチオエート結合、+ : LNA塩基の前に付いている、W = 塩基A又はTのみ、S = 塩基C又はGのみである。

20

【図3】図3Aは、標準のGenomiPhi (商標) キットを用いるか、又は「クリーン化(cleaned)」GenomiPhi、SD GenomiPhi、若しくはAT GenomiPhi 処方を利用して行った枯草菌(*Bacillus subtilis*)染色体DNA又は核酸なしの対照(NTC)の希釈系列の増幅反応の結果を示す。DNA増幅信号が各々の反応に対するバックグラウンドを超えて増大する閾値時間を、投入鑄型として反応に加えたDNAの量に対してプロットした。図3Bは、ヘキサマー配列NNNN*N*N及び75mMのKClを用いる標準のGenomiPhi (商標) キット、「クリーン化」GenomiPhi SD、又はGenomiPhi AT処方をを用いて上記のように行った*Bacillus subtilis*染色体DNAの増幅反応の結果を示す。鑄型なしの対照も実施した(NTC)。詳細は実施例1に記載する。

30

【図4】図4Aは、示された量の染色体DNAからの全*Bacillus subtilis*ゲノム増幅反応の結果を示す。鑄型なしの対照も実施した(NTC)。詳細は後記実施例3に示す。この図の凡例は以下の通り。1) 実線白い四角: NNNN*N*N (*はホスホロチオエート結合を示す)、2) 実線黒い三角: (atN)(atN)(atN)(atN)* (atN)*N (Aが2 - アミノ - Aに置換され、Tが2 - チオ - Tに置換されているランダム塩基の混合物)、3) 実線白い三角: +N+N+N+N+N*、4) 点線白い菱形: +N+N(atN)(atN)(atN)*N、5) 実線白丸: WVN+N+N*S、6) 実線黒丸: +W+WNNN*S。図4Bは、データを棒グラフ形式で要約している。

40

【図5】図5は、窓又は図2の増幅反応のゲノム及びGC含量の各100塩基対窓について決定されたカバレッジレベルを示す。カバレッジレベルを、そのGC含量を有する窓の部分カバレッジに対してプロットした。この例の詳細は後記実施例3に記載する。

【図6】図6Aは、改良されたAT GenomiPhi法を用いて行った大腸菌(*E. coli*)染色体DNAの増幅反応の結果を示す。鑄型なしの対照も実施した(NTC)。追加の詳細は実施例4に記載する。図6Bは、PCRにより行った分析を要約して示す。図6Cは、カバレッジレベルのヒストグラム、マップにされた読み取り値(reads mapped)パー

50

セント、及びゲノムカバレッジレベルを示す。実験の詳細は実施例 4 に示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

単一分子 DNA 増幅又は全ゲノム増幅を伴う核酸ベースのアッセイは、高い収率、高い忠実度を有し、かつ配列カバレッジの点で小さい偏りを有する極めて効率的な核酸増幅方法を必要とする。現在利用可能である種々の方法として、限定されることはないが、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、リガーゼ連鎖反応 (LCR)、自家持続配列複製法 (3SR)、核酸配列ベース増幅法 (NASBA)、ストランド置換増幅法 (SDA)、及びローリングサークル増幅法 (RCA) がある。ランダムプライマーを使用する多重置換増幅法 (MDA)、又はローリングサークル増幅法 (RCA) のような等温の核酸増幅反応は、かかる用途では、温度依存性の核酸増幅反応 (例えば、PCR) より適応可能である。しかしながら、これらの方法では、殊に標的核酸鋳型の濃度が低い (例えば、1 ng 未満) 場合、不必要な非特異的核酸増幅反応のために優勢なバックグラウンド信号が生じることが多い。

【0018】

本明細書に記載されている方法及びキットは、他の核酸増幅法で観察される非標的核酸 (例えば、プライマー-ダイマー、キメラ核酸産物、等) の非特異的増幅を低減するという追加の利点を伴って標的核酸を効率的に増幅することを意図している。特定の作用機序に限定する意図はないが、開示されている方法は、 T_m を増大する (例えば、2 - アミノ - dA 塩基をヘキサマー中に含ませる毎に T_m はおよそ 3 増大する) か又は望ましくないプライマー-ダイマーの形成を防止するヌクレオチドアナログ塩基の組み込みによってこれらの目標を達成する。幾つかの実施形態において、2 - アミノ - デオキシアデノシン (2 - アミノ - dA)、2 - チオ - デオキシチミジン (2 - チオ - dT)、又は対象とする他のヌクレオチドアナログを、標的核酸の増幅に使用されるランダムヘキサマー中に組み込む。図 1 に示されているように、ヌクレオチドアナログ塩基は立体障害のため互いに安定的に対合せず (例えば、2 - アミノ - dA は、未修飾の dA と dT で観察される 3 つの結合と対照的に、2 - チオ - dT とはたった 1 つの結合しか形成しない)、不必要な核酸デュプレックスの形成が大幅に低減することにより、非標的核酸増幅が全体的に阻害される。実際、これらのヌクレオチドアナログ塩基を含ませると、2 - アミノ - dA は未修飾のデオキシチミジン (dT) と 3 つの結合を形成し、同様に 2 - チオ - dT はその未修飾のパートナー (すなわち、デオキシアデノシン (dA)) と通常の安定な対合を形成するので、実際にプライマーが標的核酸にハイブリダイズする能力が改良される。

【0019】

1 以上の LNA ヌクレオチドと組み合わせたとき、本明細書に記載されている方法はさらにより頑強な (robust) 結果をもたらす。各々の LNA ヌクレオチドがオリゴヌクレオチドプライマー中に取り込まれると、 T_m が 2 - 8 ずつ増大する。修飾されたヌクレオチドアナログ塩基及び LNA ヌクレオチドの使用はまた、よりストリンジェントなハイブリダイゼーション緩衝液の使用を許容することにより、不必要な非標的核酸増幅の生産がさらに低下する。また、対象とされる特異的な標的核酸の増幅を促進するために、より高い温度及びより低い塩濃度も、核酸増幅反応で使用するすることができる。

【0020】

定義

本発明の主題をより明白かつ簡明に記載し指摘するために、以下の説明及び添付の特許請求の範囲で使用する特定の用語に対して以下の定義を提供する。本明細書を通じて、特定の用語の例示は非限定例として考えるべきである。

【0021】

単数形態の用語は特に断らない限り複数も含むものとする。本明細書及び特許請求の範囲を通じて使用する場合、概略を意味する用語は、その用語に関連する基本的な機能に変更を生じることなく変化が許される量的表現を修飾するために適用され得る。従って、「約」のような用語により修飾された値は明示される正確な値に限定されることはない。幾

10

20

30

40

50

つかの例において、概略の言語はその値を測定するための機器の精度に相当し得る。同様に、「含まない(free)」は、ある用語と組み合わせて使用され得、修飾された用語のものを実体のない数または痕跡量で含み得るが、それでもそれを含まないと考えられることを意味する。必要な場合、範囲が述べられるが、その範囲はその中に入る全ての部分範囲を含む。

【0022】

本明細書で使用する場合、用語「ヌクレオシド」は、核酸塩基（例えば、ヌクレオ塩基）が糖部分に結合しているグリコシルアミン化合物をいう。核酸塩基は天然のヌクレオ塩基でも修飾又は合成のヌクレオ塩基でもよい。核酸塩基には、限定されることはないが、プリン塩基（例えば、アデニン又はグアニン）、ピリミジン（例えば、シトシン、ウラシル、又はチミン）、又はデアザプリン塩基がある。核酸塩基はペントース（例えば、リボース又はデオキシリボース）糖部分の1'位、又は等価な位置に結合し得る。糖部分としては、限定されることはないが、天然の糖、代替糖（例えば、炭素環式又は非環式部分）、置換糖、又は修飾糖（例えば、LNAヌクレオチド内にあるような二環式フラノース単位）がある。ヌクレオシドは糖部分の2'-ヒドロキシル、2'-デオキシ、又は2',3'-ジデオキシ形態を含有し得る。

【0023】

本明細書で使用する用語「ヌクレオチド」又は「ヌクレオチド塩基」はヌクレオシドリン酸を指し、限定されることはないが、天然ヌクレオチド、合成ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、又は代理置換部分（例えば、イノシン）を包含する。ヌクレオシドリン酸はヌクレオシドーリン酸、ヌクレオシドリニン酸又はヌクレオシドリ三リン酸であり得る。ヌクレオシドリ三リン酸の糖部分はリボースのようなペントース糖（五炭糖）であり得、リン酸エステル化部位はヌクレオシドのペントース糖のC-5位に結合したヒドロキシル基に対応し得る。ヌクレオチドは、限定されることはないが、デオキシリボヌクレオチドリ三リン酸（dNTP）又はリボヌクレオチドリ三リン酸（NTP）であり得る。ヌクレオチドは表1に示されているようにアルファベット文字（文字記号）を用いて表し得る。例えば、Aはアデノシン（すなわち、ヌクレオ塩基アデニンを含有するヌクレオチド）を意味し、Cはシトシンを意味し、Gはグアニンを意味し、Tはチミジンを意味する。WはA又はT/Uのいずれかを意味し、SはG又はCのいずれかを意味する。Nはランダムヌクレオチドを表す（すなわち、NはA、C、G、又はT/Uのいずれかであり得る）。文字記号に先行するプラス（+）の記号は、その文字で示されるヌクレオチドがLNAヌクレオチドであることを示す。例えば、+AはアデノシンLNAヌクレオチドを表し、+Nはロックドランダムヌクレオチド（ランダムLNAヌクレオチド）を表す。文字記号に先行する星形（*）記号は、その文字により示されるヌクレオチドがホスホロチオエートで修飾されたヌクレオチドであることを示す。例えば、*Nはホスホロチオエートで修飾されたランダムヌクレオチドを表す。

【0024】

本明細書で使用する場合、用語「ヌクレオチドアナログ」とは、天然のヌクレオチドと構造的に類似の修飾された化合物をいう。ヌクレオチドアナログは、変更されたホスホロチオエート骨格、糖部分、ヌクレオ塩基、又はこれらの組合せを有し得る。一般に、変更されたヌクレオ塩基を有するヌクレオチドアナログは、就中、異なる塩基対合及び塩基スタッキング特性を授与する。変更されたリン酸-糖骨格（例えば、PNA、LNA、等）を有するヌクレオチドアナログは、就中、二次構造形成のような連鎖特性を改変することが多い。本出願では、時々、用語「ヌクレオチドアナログ」、「ヌクレオチドアナログ塩基」、「修飾されたヌクレオチド塩基」又は「修飾された塩基」を同義に使用することがある。

【0025】

非標的核酸の増幅を最小にするか又は防止するいかなるヌクレオチドアナログでも本発明の実施に使用することができる。上に記載したヌクレオチドアナログに加えて、所望の能力を有する種々のヌクレオチドアナログが当業者に周知である。例えば、米国特許第5

10

20

30

40

50

9 1 2 3 4 0 号、国際公開第 2 0 1 0 / 0 2 1 7 0 2 号、及び H o s h i k a ら (2 0 1 0) A n g e w . C h e m . I n t . E d . 4 9 : 5 5 5 4 - 5 5 5 7 (これらは全て援用によりその全体が本明細書の一部をなす)を参照されたい。かかるヌクレオチドアナログには、限定されることはないが「自己回避分子認識系(self-avoiding molecular recognition systems)」(S A M R S) が含まれる。H o s h i k a らにより記載されている S A M R S は T *、A *、G *、及び C * として 2 - チオチミン、2 - アミノプリン、ヒポキサンチン、及び N 4 - エチルシトシンに基づいている。これらが参照 DNA デュプレックスに個別に導入されると、対応する S A M R S : 標準の対は A : T 対と同じ程度にデュプレックスの安定性に寄与する。S A M R S : S A M R S 対は対応する S A M R S : 標準の対より参照デュプレックスの安定性に寄与する程度が少ない。H o s h i k a ら (2 0 1 0) A n g e w . C h e m . I n t . E d . 4 9 : 5 5 5 4 - 5 5 5 7。

10

【 0 0 2 6 】

【表 1】

表 1: 各種ヌクレオチドの略号表記

略号	ヌクレオチド
G	G
A	A
T	T
C	C
U	U
R	G 又は A
Y	T/U 又は C
M	A 又は C
K	G 又は T/U
S	G 又は C
W	A 又は T/U
H	A 又は C 又は T/U
B	G 又は T/U 又は C
V	G 又は C 又は A
D	G 又は A 又は T/U
N	G 又は A 又は T/U 又は C

20

本明細書で使用する場合、用語「LNA (ロックド核酸)ヌクレオチド」とは、ヌクレオチドの糖部分が、リボ核酸 (RNA) を模倣する糖立体構造にロックされた二環式のフラノース単位を含有するヌクレオチドアナログをいう。デオキシリボヌクレオチド (又はリボヌクレオチド) から LNA ヌクレオチドへの構造的変化は化学的観点から限定され、すなわち、2' 位と 4' 位の炭素原子間への付加的な結合の導入である (例えば、2' - C、4' - C - オキシメチレン結合、例えば、Singh, S. K. ら、Chem. Comm., 4, 455 - 456, 1998、又は Koshkin, A. A. ら、Tetrahedron, 54, 3607 - 3630, 1998 参照)。LNA ヌクレオチドのフラノース単位の 2' 位と 4' 位は、O - メチレン (例えば、オキシ - LNA : 2' - O, 4' - C - メチレン - D - リボフラノシルヌクレオチド)、S - メチレン (チオ - LNA)、又は NH - メチレン部分 (アミノ - LNA)、などにより結合され得る。かかる結合はフラノース環の立体構造的自由度を制限する。LNA オリゴヌクレオチドは相補的な一本鎖の RNA、及び相補的な一本鎖又は二本鎖の DNA に対して高まったハイブリダイゼーション親和力を示す。LNA オリゴヌクレオチドは A - 型の (RNA 様) デュプレックス立体構造を誘発し得る。

40

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用する場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、ヌクレオチド又はその誘導体のオリゴマーをいう。用語「核酸」は本明細書で使用する場合ヌクレオチド又はその誘

50

導体のポリマーをいう。「標的核酸」又は「核酸鋳型」は、増幅しようと意図し目的とする特定の配列を意味する。用語「配列」は本明細書で使用する場合オリゴヌクレオチド又は核酸のヌクレオチド配列をいう。本明細書を通じて、オリゴヌクレオチド／核酸が一連の文字の配列で表される場合はいつでも、ヌクレオチドは左から右へ5' 3'の順である。例えば、文字配列 $(W)_x(N)_y(S)_z$ で表されるオリゴヌクレオチドは、 $x = 2$ 、 $y = 3$ 、 $z = 1$ の場合、オリゴヌクレオチド配列WWNNNSを表す。ここで、Wは5'末端のヌクレオチドであり、Sは3'末端のヌクレオチドである。オリゴヌクレオチド／核酸はDNA、RNA、又はそれらのアナログ（例えば、ホスホロチオエートアナログ）であり得る。オリゴヌクレオチド又は核酸はまた、修飾された塩基、及び／又は骨格（例えば、修飾されたリン酸結合又は修飾された糖部分）も含み得る。安定性及び／又はその他の利点を核酸に授与する合成骨格の非限定例として、ホスホロチオエート結合、ペプチド核酸、ロックド核酸、キシロース核酸、又はこれらのアナログを挙げることができる。

10

【0028】

本明細書で使用する場合、用語「末端ヌクレオチド」とは、オリゴヌクレオチド配列の末端位置に位置するヌクレオチドをいう。3'末端位置に位置する末端ヌクレオチドは3'末端ヌクレオチドといい、5'末端位置に位置する末端ヌクレオチドは5'末端ヌクレオチドという。末端ヌクレオチドに隣接するヌクレオチドは、末端位置から二番目の位置に位置するヌクレオチドをいう。

【0029】

本明細書で使用する場合、用語「プライマー」又は「プライマー配列」とは、標的核酸配列（例えば、増幅されるべきDNA鋳型）にハイブリダイズして核酸合成反応をプライムする短い線状のオリゴヌクレオチドをいう。プライマーはRNAオリゴヌクレオチド、DNAオリゴヌクレオチド、又はキメラ配列であり得る。プライマーは天然、合成、又はヌクレオチドアナログ（例えば、 T_m を増大するもの）を含有し得る。プライマーの長さの上限と下限はいずれも経験的に決定される。プライマーの長さに対する下限は、核酸増幅反応条件下で標的核酸とハイブリダイゼーションしたときに安定なデュプレックスを形成するのに必要とされる最小の長さである。（通常3ヌクレオチド長未満の）極めて短いプライマーはかかるハイブリダイゼーション条件下で標的核酸と共に熱力学的に安定なデュプレックスを形成しない。上限は、標的核酸内の既定の核酸配列以外の領域においてデュプレックスを形成する可能性によって決定されることが多い。一般に、適切なプライマーの長さは約3ヌクレオチド長～約40ヌクレオチド長の範囲である。本明細書に記載されている標的核酸の増幅方法で使用される「オリゴヌクレオチドプライマー」は特定の組の実験条件に適当な長さのものである。プライマーの長さの決定は当業者の単に日常の能力の範囲内である。本出願に記載されている幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドプライマーはヘキサマーであり、より特定のには T_m を増大するか、及び／又はプライマー-ダイマーの形成を防止する少なくとも1つのヌクレオチドアナログを含むヘキサマーである。本開示のプライマーはさらにLNAヌクレオチド塩基を含み得る。

20

30

【0030】

本明細書で使用する場合、用語「ランダムプライマー」又は「完全ランダムプライマー」とは、いずれかの所与の位置が可能なヌクレオチド又はそれらのアナログのいずれかからなり得るようにしてオリゴヌクレオチド配列中の前記所与の位置のヌクレオチドをランダム化する（例えば、完全なランダム化）ことで生成されるプライマー配列の混合物をいう。従って、ランダムプライマーは、配列内のヌクレオチドのあらゆる可能な組合せからなるオリゴヌクレオチド配列のランダム混合物である。例えば、ヘキサマーのランダムプライマーは配列NNNNNNすなわち $(N)_6$ で表され得る。ヘキサマーのランダムDNAプライマーは4つのDNAヌクレオチドであるA、C、G及びTのあらゆる可能なヘキサマーの組合せからなり、 4^6 （4096）のユニークなヘキサマーDNAオリゴヌクレオチド配列を含むランダム混合物となる。ランダムプライマーは、標的核酸の配列が未知である場合核酸合成反応をプライムするのに効果的に使用できる。

40

50

【0031】

本明細書に記載されている「部分拘束プライマー」とは、オリゴヌクレオチド配列の幾つかのヌクレオチドを完全にランダム化する（すなわち、ヌクレオチドはA、T/U、C、G、又はそれらのアナログのいずれでもよい）一方で、幾つかの他のヌクレオチドの完全なランダム化を制限する（すなわち、ある位置におけるヌクレオチドのランダム化は、可能な組合せA、T/U、C、G、又はそれらのアナログより程度が低い）ことにより生成されるプライマー配列の混合物をいう。例えば、WNNNNNで表される部分拘束DNAヘキサマープライマーは、混合物中の全ての配列の5'末端ヌクレオチドがA又はTであるプライマー配列の混合物を表す。ここで、5'末端ヌクレオチドは、完全にランダムなDNAプライマー（NNNNNN）の最大4つの可能な組合せ（A、T、G又はC）とは対照的に、2つの可能な組合せ（A又はT）に拘束されている。部分拘束プライマーの適切なプライマー長さは約3ヌクレオチド長～約15ヌクレオチド長の範囲であり得る。

10

【0032】

本明細書に記載されている用語「末端ミスマッチプライマー-ダイマー構造を有する部分拘束プライマー」とは、部分拘束プライマー中の2つの個別のプライマー配列が、3以上のヌクレオチドの内部の相同性をもって互いに分子間でハイブリダイズして、陥凹末端をもたないプライマー-ダイマー構造、又は単一のヌクレオチド塩基3'陥凹末端を有するプライマー-ダイマー構造、又は2つのヌクレオチド塩基3'陥凹末端を有するプライマー-ダイマー構造を形成するとき、プライマー-ダイマー構造の両方の3'末端ヌクレオチドにヌクレオチドミスマッチ（すなわち、ヌクレオチドが塩基対合しない）が存在する、部分拘束プライマー配列をいう。例えば、WNNNSで表される部分拘束ペンタマープライマーは、分子間でハイブリダイズして陥凹末端をもたないプライマー-ダイマー構造を形成するとき両方の3'末端ヌクレオチドに末端ミスマッチをもたらす。プライマー-ダイマー構造には3つのヌクレオチドの内部相同性が存在する（すなわち、分子間ハイブリダイゼーションによって陥凹末端をもたないプライマー-ダイマー構造が形成されるときWNNNS内の3つのランダムヌクレオチドが互いに塩基対合し得る）。しかしながら、このプライマー例は、分子間でハイブリダイズして単一の-ヌクレオチド塩基3'陥凹末端を有するプライマー-ダイマー構造を形成するとき末端のミスマッチを提供しない。同様に、WWNNNSで表される部分拘束ヘキサマープライマーは、分子間でハイブリダイズして陥凹末端をもたないプライマー-ダイマー構造を形成するとき両方の3'末端ヌクレオチドに末端ミスマッチを提供する。また、このプライマー例は、分子間でハイブリダイズして単一の-ヌクレオチド塩基の3'陥凹末端を有するプライマー-ダイマー構造を形成するときでも両方の3'末端のヌクレオチドで末端のミスマッチを提供する。WWNNNSで表される部分拘束ヘプタマープライマーは、分子間でハイブリダイズして陥凹末端をもたないプライマー-ダイマー構造を形成するとき両方の3'末端ヌクレオチドで末端のミスマッチを提供する。さらに、このプライマー例は、分子間でハイブリダイズして、単一の-ヌクレオチド塩基3'陥凹末端を有するプライマー-ダイマー構造を形成するか、又は2つのヌクレオチド塩基3'陥凹末端を有するプライマー-ダイマー構造を形成するとき、両方の3'末端のヌクレオチドで末端のミスマッチを提供する。

20

30

【0033】

本明細書で使用する場合、用語「プラスミド」とは、染色体核酸とは別の染色体外核酸をいう。プラスミドDNAは細胞内で染色体核酸（染色体DNA）から独立して複製することが可能であり得る。プラスミドDNAは環状で二本鎖であることが多い。

40

【0034】

本明細書で使用する場合、用語「増幅」、「核酸増幅」、又は「増幅する」とは、核酸鋳型の複数のコピーの生成、又は核酸鋳型に対して相補的な複数の核酸配列コピーの生成をいう。これらの用語は本出願において互換的に使用され得る。

【0035】

本明細書で使用する場合、用語「標的核酸」とは、核酸増幅反応で増幅されるのが望まれる核酸をいう。例えば、標的核酸は核酸鋳型からなる。

50

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用する場合、用語「DNAポリメラーゼ」とは、核酸ストランドを鋳型として用いてDNAストランドを新たに(de novo)合成する酵素をいう。DNAポリメラーゼは、現存するDNA又はRNAをDNA合成のための鋳型として使用し、それが読み取る鋳型ストランドに沿ったデオキシリボヌクレオチドの重合を触媒する。新たに合成されるDNAストランドは鋳型ストランドに対して相補的である。DNAポリメラーゼは、新たに形成されるストランドの3'-ヒドロキシル末端のみに遊離のヌクレオチドを付加することができる、デオキシリボ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'-ヒドロキシル基へのヌクレオシドリン酸の転移によってオリゴヌクレオチドを合成する。この結果、新しいストランドが5'→3'方向に伸長する。DNAポリメラーゼは既存の3'-OH基にヌクレオチドを付加してDNA合成反応を開始させることができるのみであるので、このDNAポリメラーゼは最初のヌクレオチドを付加させることができるプライマーを必要とする。適切なプライマーはRNA又はDNAのオリゴヌクレオチドを含む。DNAポリメラーゼは天然のDNAポリメラーゼでもよいし、又は上記活性を有する天然の酵素の変異体でもよい。例えば、ストランド置換活性を有するDNAポリメラーゼ、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠くDNAポリメラーゼ、逆転写酵素活性を有するDNAポリメラーゼ、又はエンドヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼであり得る。

10

【 0 0 3 7 】

本明細書で使用する用語「校正DNAポリメラーゼ(proofreading DNA polymerase)」とは、DNA合成を行いながらエラーを修正することができるあらゆるDNAポリメラーゼをいう。校正DNAポリメラーゼはそのポリメラーゼ活性は別として3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を保持し、このエキソヌクレアーゼ活性は校正活性(proofreading activity)といわれる。かかるポリメラーゼの校正活性は新たに合成されるDNAの過ちを修正する。DNAの合成中、間違った塩基対合が認識されると、校正DNAポリメラーゼはDNAの1塩基対分だけその方向を逆転する。この酵素の3'→5'エキソヌクレアーゼ活性(校正活性)により、間違ったヌクレオチド塩基対が切除され得る。ヌクレオチド塩基の切除後、ポリメラーゼは正確なヌクレオチド塩基を再挿入し、DNA合成を続行する。遊離のdNTPがDNA合成に適した溶液又は反応混合物中に存在するとき、校正DNAポリメラーゼの主要な活性はDNAの合成である。しかし、dNTPがDNA合成反応に利用可能でないとき、校正DNAポリメラーゼの主要な活性はその3'→5'エキソヌクレアーゼ活性であり得る。幾つかの校正DNAポリメラーゼはそのポリメラーゼ活性と同様にその校正活性に対して二価陽イオンの存在を必要とし得る。校正ポリメラーゼの校正活性のスイッチを入れることができる適切な二価陽イオンとしては、限定されることはないが、マグネシウム又はマンガンがある。

20

30

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用する場合、「ストランド置換核酸ポリメラーゼ」とは、その核酸合成活性は別としてストランド置換活性を有する核酸ポリメラーゼをいう。すなわち、ストランド置換核酸ポリメラーゼは、核酸鋳型ストランドの配列に基づいて(すなわち、鋳型ストランドを読み取り)核酸合成を続行しつつ、鋳型ストランドにアニールされていた相補的ストランドを置換することができる。

40

【 0 0 3 9 】

本明細書で第1の核酸/オリゴヌクレオチド配列を第2の核酸/オリゴヌクレオチド配列に関して説明する際に使用する用語「相補的」とは、第1の核酸/オリゴヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドが、一定のハイブリダイゼーション条件下で、第2の核酸/オリゴヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする(例えば、デュプレックス構造を形成する)能力をいう。ハイブリダイゼーションは、ヌクレオチド(相補的ヌクレオチド)の塩基対合によって起こる。ヌクレオチドの塩基対合はWatson-Crick塩基対合、非Watson-Crick塩基対合、又は非天然/修飾ヌクレオチドにより形成される塩基対合を介して起こり得る。

50

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用する用語「高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件」又は「高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」とは、核酸増幅反応に一般に使用される条件によって提供されるストリンジェンシー（厳密さ）より高いストリンジェンシーを核酸ハイブリダイゼーション事象に付与する条件をいう。例えば、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、核酸増幅反応において、反応温度を上昇させるか又は塩濃度を低下させることによって達成することができる。短いプライマーを含有する核酸増幅反応は約 7.5 mM の塩濃度で行われることが多い。対照的に、約 1.5 mM の塩濃度で行われる核酸増幅反応は高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件を意味し得る。高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、インビトロ等温核酸増幅反応において、多くの場合に使用される約 30 °C より温度を高くすることによって提供され得る。例えば、等温核酸増幅反応は、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件を提供するために約 35 °C ~ 約 45 °C で行い得る。

10

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用する場合、用語「ローリングサークル増幅（RCA）」とは、ローリングサークルメカニズムによって環状の核酸鋳型（例えば、一本鎖 DNA 環）を増幅する核酸増幅反応をいう。ローリングサークル増幅反応はプライマーと環状の、多くは一本鎖の核酸鋳型とのハイブリダイゼーションによって開始され得る。その後、核酸ポリメラーゼが、環状の核酸鋳型の回りを連続的に前進して核酸鋳型の配列を何度も複製することにより（ローリングサークルメカニズム）、環状の核酸鋳型にハイブリダイズしたプライマーを伸長させる。このローリングサークル増幅は通例、環状の核酸鋳型配列のタンデム反復単位を含むコンカテマーを生成する。ローリングサークル増幅は、線形の増幅動力学を示す線形 RCA（LRCA）（例えば、単一の特異的なプライマーを用いる RCA）であってもよいし、又は指数関数的増幅動力学を示す指数関数的 RCA（ERC A）であってもよい。ローリングサークル増幅はまた、複数のプライマーを用いて実施して（多重プライムローリングサークル増幅法、すなわち MP RCA）超分岐コンカテマーをもたらすこともできる。例えば、二重プライム RCA において、1 つのプライマーは線形 RCA と同様に環状の核酸鋳型に対して相補的であり得、一方他の 1 つは RCA 産物のタンデム反復単位核酸配列に対して相補的であり得る。その結果、二重プライム RCA は、両方のプライマーが関与する多重ハイブリダイゼーション、プライマー伸長、及びストランド置換事象の分枝カスケードを特徴とする指数関数的（幾何学的）増幅動力学による連鎖反応として進行し得る。これにより、多くの場合、コンカテマー性の二本鎖核酸増幅産物の分離した組が生成する。ローリングサークル増幅法は Phi 29 DNA ポリメラーゼのような適切な核酸ポリメラーゼを用いて等温条件下においてインビトロで実施することができる。

20

30

【 0 0 4 2 】

本明細書で使用する場合、多重置換増幅（MDA）とは、増幅がプライマーを変性核酸にアニーリングした後ストランド置換核酸合成の工程を含む核酸増幅法をいう。核酸がストランド置換により合成され、次第に増大する数のプライミング事象が起こり、超分岐核酸構造のネットワークが生成する。MDA は、少量のゲノム DNA 試料から限定された配列の偏りを有する高分子量の DNA を生成するための全ゲノム増幅にとって極めて有用である。Phi 29 DNA ポリメラーゼ又は Bst DNA ポリメラーゼの大きい断片のようなストランド置換核酸ポリメラーゼを多重置換増幅法に使用し得る。MDA は等温反応条件下で行われることが多く、限定された配列の偏りを有する増幅を達成するためにランダムプライマーを反応に使用する。

40

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用する用語「反応混合物」とは、化学分析又は生物学的アッセイを実施するのに使用される試薬又は試薬溶液の組合せをいう。幾つかの実施形態において、反応混合物は核酸（DNA）合成 / 増幅反応を実施するのに必要な全ての成分を含む。

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用する場合、用語「試薬溶液」又は「DNA 合成反応を実施するのに適し

50

た溶液」又は「増幅溶液」とは、増幅反応又はDNA合成を実施するのに通例使用されるいずれか又は全ての溶液をいう。これには、限定されることはないが、等温DNA増幅方法で使用される溶液、PCR増幅反応で使用される溶液、などが含まれる。DNA合成反応に適した溶液は緩衝剤、塩、及び/又はヌクレオチドを含み得、さらにプライマー及び/又は増幅されるDNA鋳型を含み得る。

【0045】

幾つかの実施形態において、核酸増幅のためのキットが提供される。キットは、本明細書に記載されている核酸増幅方法を実施するのに必要とされる試薬と一緒に包装されて含有する。1つの実施形態において、キットは核酸ポリメラーゼ、ヌクレオチドアナログ（例えば、2-アミノ-dA及び2-チオ-dT）、及びLNA塩基を含む。核酸ポリメラーゼ及びその他の試薬は単一の容器内に包装されてもよいし、又は別々の容器に包装されてもよい。

10

【0046】

1つの実施形態において、キットは、一緒に包装されたPhi29DNAポリメラーゼ及び末端ミスマッチプライマー-ダイマー構造を有する部分拘束プライマーを含む。キット内の部分拘束プライマーはLNAヌクレオチドのようなヌクレオチドアナログを含み得る。幾つかの実施形態において、部分拘束プライマーはDNA-LNAキメラプライマーである。キット内の部分拘束プライマーはヌクレアーゼ耐性プライマー、例えばエキソヌクレアーゼ耐性プライマーであり得る。キット内のこれらのエキソヌクレアーゼ耐性プライマーはヌクレオチド間に1以上のホスホロチオエート結合を含有し得る。1つの実施形態において、キットは5'-+W+WNNN* S-3'及びPhi29DNAポリメラーゼを含み、ここで「+」は続いて記載されている塩基がロックド核酸塩基（すなわち、「LNA塩基」、例えば、+A=アデノシンLNA分子、他のヌクレオチドも同様）であることを表し、「W」はdAとdTのみの混合物を表し、「S」はdCとdGのみの混合物を表し、「*」は2つのヌクレオチド間のホスホロチオエート結合を表す。

20

【0047】

さらなる実施形態において、キットは本明細書に記載されているGenomiPhiAT法を実施するためのランダムヘキサマーを含む。具体的には、かかるキットは一般式： $+N+N(a\ t\ N)(a\ t\ N)(a\ t\ N)*N$ の修飾されたヘキサマーを含み、ここで「+」は上に記載したようにLNA塩基の前にあり、 $(a\ t\ N)$ は2-アミノ-dA、dC、dG、及び2-チオ-dTのランダム混合物を表す。或いは、これらのキットは式 $(a\ t\ N)(a\ t\ N)(a\ t\ N)(a\ t\ N)(a\ t\ N)*N$ で表されるヘキサマーを含み得る。

30

【0048】

キットはさらに核酸増幅反応を実施するのに必要とされる試薬又は試薬溶液を含み得、さらにキットに含まれる具体的な成分、又はそれらを核酸増幅反応で使用方法、又は両方を詳細に記載した取扱説明書を含み得る。

【実施例】

【0049】

以下に、限定ではなく、例示のために実施例を挙げる。

40

【0050】

実施例1

MDAの速さと感度の改良

ヘキサマー配列NNNN*N*N及び75mMのKClと共に標準のGenomiPhi（商標）キットを用いるか、又は「クリーン化」GenomiPhi（例えば、米国特許出願公開第2009/0155859号参照）、GenomiPhiSD（例えば、米国特許第7993839号参照）、又はGenomiPhiAT処方を利用して増幅反応を実施した。少量のSYBRグリーンIを増幅混合物に加え、Bacillus subtilis 染色体DNAの希釈系列を用いるTecanプレートリーダーで蛍光増大を経時的にモニターすることにより、リアルタイム増幅を実施した。鋳型なしの対照も分

50

析した (N T C)。

【 0 0 5 1 】

各反応についてバックグラウンドを超えて増大するDNA増幅信号の閾値時間を、投入鋳型として反応に加えたDNAの量に対してプロットした。LNA及びアミノ-A/チオ-Tと共にプライマーを含有する反応は増幅速度がおよそ10倍増大した。結果を図3A及び3Bにまとめて示す。

【 0 0 5 2 】

実施例 2

2 - アミノ - d A と 2 - チオ - d T を含有するオリゴヌクレオチドはMDAのカバレッジと全体の増幅偏りを改良する

指示された処方の標準GenomiPhi (商標) 反応又はMDA反応を100pgのB. subtilis投入DNAで実施した。反応における総増幅はおよそ20000倍であった。増幅されたDNAを処理してライブラリーとし、51ヌクレオチドの読み取り長さでIllumina GA全ゲノム配列決定にかけた。各試料について800 - 1000万の読み取り値をB. subtilis参照ゲノムに対してマッピングした。図4Aは、ゲノムの長さ全体にわたってカバレッジレベルをマップに表したヒストグラムである。相対標準偏差を式：カバレッジ標準偏差 / 平均カバレッジ * 100により計算した。カバレッジギャップの数及びそれらギャップの平均長さも示す。図4Bは、処方と比較する棒グラフである。

【 0 0 5 3 】

実施例 3

2 - アミノ - d A と 2 - チオ - d T を含有するオリゴヌクレオチドはMDA配列偏りを改良する

実施例3に記載した増幅反応について、ゲノムの各100塩基対ウィンドウに対してカバレッジレベルを決定した。ウィンドウのGC含量を、そのGC含量を有するウィンドウの部分カバレッジに対してプロットした。結果を図5に示す。これらの結果は、アミノ-A/チオ-T及びLNAヌクレオチドを増幅プライマーに含ませると、増大した代表的な増幅及び低下した増幅偏りの両方を提供することを示している。

【 0 0 5 4 】

実施例 4

GenomiPhi AT処方を用いた単一の細菌細胞の増幅

改良されたGenomiPhi AT処方を用いて増幅反応を実施した。少量のSYBRグリーンIを増幅混合物に加え、Tecanプレートリーダーで蛍光増大を経時的にモニターすることによりリアルタイム増幅を実施した。E. coli細胞を、10mM Tris、pH7.5、100mM NaCl、及び0.1mM EDTAを含有する緩衝液で希釈し、FM1-43FX染料 (Invitrogen) で染色し、384 - ウェルプレートのウェルにスポットし、倒立Fluorescent顕微鏡 (Nikon) を用いて細胞をカウントした。1µlの0.2M NaOH、0.015% Tween-20を添加することにより細胞を溶解し、室温で10分インキュベートし、0.5µlの0.4M HCl、0.6M Tris、pH7.5の添加により中和した。この混合物に増幅試薬を加え、反応を指示された時間30 でインキュベートした。鋳型なしの対照も分析した (N T C)。結果は図6Aにまとめて示す。

【 0 0 5 5 】

16Sレディーメードプライマー (NEB) 及びAmplitaq Gold試薬 (Invitrogen) を製造業者の指示に従って用いてPCRを実施した。DNAを1% アガロースゲル電気泳動により分析し、SYBRゴールド (Invitrogen) で染色し、Typhoon撮像素子 (GE Healthcare) でスキャンすることにより可視化した。図6B参照。

【 0 0 5 6 】

増幅されたDNAを処理し、上に記載したようにIllumina GA全ゲノム配列

10

20

30

40

50

決定にかけた。カバレッジレベルのヒストグラム、マップにされた読み取り値のパーセント、及びゲノムカバレッジレベルを図6Cにプロットして示す。

【0057】

本明細書中に述べた全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各々個々の刊行物、特許、又は特許出願が参照により具体的かつ個別に援用されていると示されているのと同程度に、援用によりその全体が本明細書の一部をなす。

【0058】

本明細書では本発明の幾つの特徴のみを例示し説明して来たが、当業者には多くの修正及び変更が明らかであろう。従って、添付の特許請求の範囲は、かかる修正及び変更の全てを本発明の真の思想範囲内に入るものとして包含するものであると了解されたい。

10

【図1】

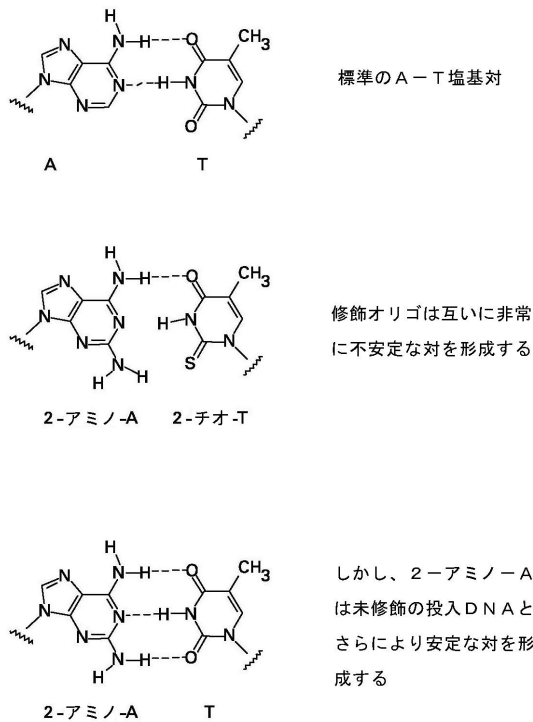


Fig. 1

【図2】

処方の説明			
酵素	ランダム ヘキサマー	反応における 最終塩濃度	反応
GenomiPhi	NNNN*N*N	75 mM	なし
クリーンGPhi	NNNN*N*N	75 mM	あり
SD GPhi	+W+NNNN*S	15 mM	あり
AT GPhi	+N+N(atN)(atN)(atN)*N	15 mM	あり

(a t N) はランダム塩基の混合物であり、
Aが2-アミノ-Aで置換され、
Tが2-チオ-Tで置換されている
(これらは互いに対合しない)

+はLNA塩基を示す
W = A 又は T
S = C 又は G

*はホスホロチオ
エート結合を示す

+N+N(atN)(atN)(atN)*N
LNA

Fig. 2

【図 3】

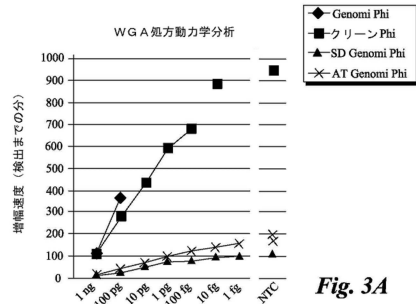


Fig. 3A

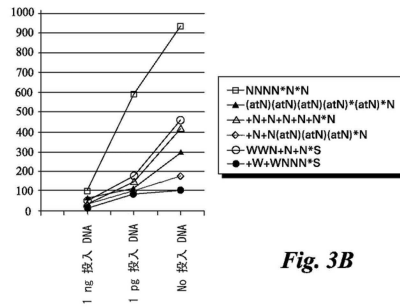


Fig. 3B

【図 4】

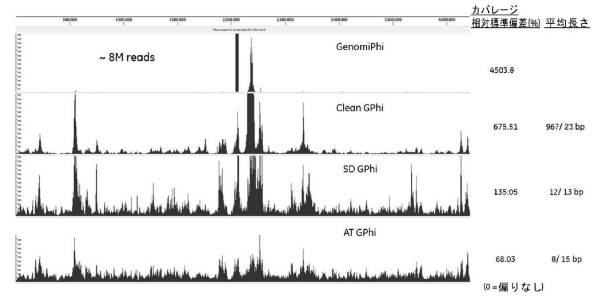


Fig. 4A

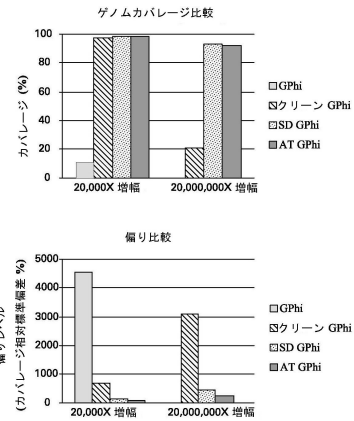


Fig. 4B

【図 5】

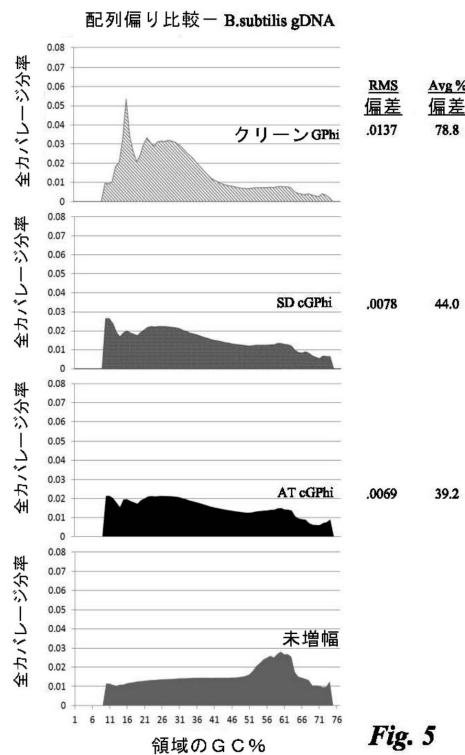


Fig. 5

【図 6】

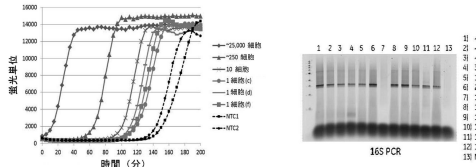


Fig. 6A

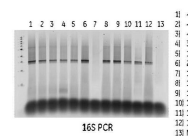


Fig. 6B

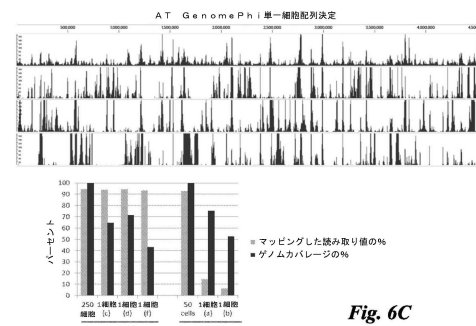


Fig. 6C

フロントページの続き

- (72)発明者 ネルソン, ジョン・リチャード
アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル
- (72)発明者 グロスマン, グレゴリー・アンドリュース
アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル
- (72)発明者 ドューシー, ロバート・スコット
アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル
- (72)発明者 シャー, ソナリ・ジャグディッシュ
アメリカ合衆国、コネチカット州・06001、エイヴオン、オーチャード・ストリート、400番
- (72)発明者 ヘラー, ライアン・チャールズ
アメリカ合衆国、ニューヨーク州・12309、ニスカユナ、ワン・リサーチ・サークル

審査官 安居 拓哉

- (56)参考文献 国際公開第2010/021702(WO, A1)
米国特許第07993839(US, B1)
米国特許出願公開第2004/0086880(US, A1)
国際公開第02/042490(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/09
C12Q 1/68
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)