(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2004-141105
(P2004-141105A)
(43)公開日　平成16年5月20日(2004.5.20)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12Q 1/68	C12Q	1/68	A	4B063

審査請求 未請求　請求項の数 24　ＯＬ　（全 27 頁）

(21)出願番号　特願2002-311596(P2002-311596)
(22)出願日　平成14年10月25日(2002.10.25)

(71)出願人　000003160
東洋紡績株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜２丁目２番８号
(72)発明者　北林　雅夫
福井県敦賀市東洋町１０番２４号　東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
(72)発明者　小松原　秀介
福井県敦賀市東洋町１０番２４号　東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
(72)発明者　西矢　芳昭
福井県敦賀市東洋町１０番２４号　東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
(72)発明者　岡　正則
福井県敦賀市東洋町１０番２４号　東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＤＮＡ合成反応を促進する方法、およびそのための組成物

(57)【要約】
【課題】本発明は、分子生物学の分野に属する。本発明は、鋳型核酸からＤＮＡの生成及び更なるＤＮＡ増幅を行う際に有用な新規組成物及び方法に関する。本発明は、具体的にはポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）等に有用な新規組成物及び方法に関する。本発明により、今まで不可能であった目的ＤＮＡに対してもＤＮＡ増幅が可能となった。
【解決手段】（１）鋳型となる核酸を基にＤＮＡを合成する酵素反応において、ＤＮＡ合成の促進に効果のある陰イオン物質、および、（２）グリシンを基本単位に持つ試薬あるいはＤＭＳＯの少なくとも１つ、を含有することを特徴とする反応液組成物。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（１）鋳型となる核酸を基にＤＮＡを合成する酵素反応において、ＤＮＡ合成の促進に効果のある陰イオン物質、および、（２）グリシンを基本単位に持つ試薬あるいはＤＭＳＯの少なくとも１つ、を含有することを特徴とする反応液組成物。
【請求項２】
グリシンを基本単位に持つ試薬が、トリメチルグリシン（ベタイン）であることを特徴とする請求項１の反応液組成物。
【請求項３】
ＤＮＡ合成の促進に効果のある陰イオン物質が、カルボキシル基を持つ物質である請求項１または２の反応液組成物。
【請求項４】
カルボキシル基を持つ物質が、ジカルボン酸塩である請求項３の反応液組成物。
【請求項５】
ジカルボン酸塩が、シュウ酸亜鉛、シュウ酸アンモニウム、シュウ酸カリウム、シュウ酸カルシウム、シュウ酸ジエチル、シュウ酸Ｎ，Ｎ’－ジスクシンイミジル、シュウ酸ジメチル、シュウ酸すず、シュウ酸セリウム、シュウ酸鉄、シュウ酸銅、シュウ酸ナトリウム、シュウ酸ニッケル、シュウ酸ビス、シュウ酸（２，４－ジニトロフェニル）、シュウ酸（２，４，６－トリクロロフェニル）、シュウ酸マンガン、シュウ酸メチル、シュウ酸ランタン、シュウ酸リチウム、または、マロン酸イソプロピリデン、マロン酸エチル、マロン酸ジエチル、マロン酸ジベンジル、マロン酸ジメチル、マロン酸タリウム、マロン酸二ナトリウム、または、マレイン酸一ナトリウム、マレイン酸ジエチル、マレイン酸クロルフェニラミン、マレイン酸ジ－ｎ－ブチル、マレイン酸モノ－ｎ－ブチルエステルからなる群より選択される、請求項４に記載の組成物。
【請求項６】
トリメチルグリシン（ベタイン）の濃度が０．５～１．５Ｍであり、および／または、ＤＭＳＯの濃度が２～５％である請求項２～５に記載の組成物。
【請求項７】
ＤＮＡポリメラーゼ活性を有する１つ以上の酵素をさらに含む、請求項１～６に記載の組成物。
【請求項８】
ＤＮＡポリメラーゼ活性を有する前記酵素が、ＤＮＡポリメラーゼおよび逆転写酵素からなる群より選択される、請求項７に記載の組成物。
【請求項９】
前記ＤＮＡポリメラーゼがＴａｑ，ＥＸ－Ｔａｑ，ＬＡ－Ｔａｑ，Ｅｘｐａｎｄシリーズ，Ｐｌｕｔｉｎｕｍシリーズ，Ｔｂｒ，Ｔｆｌ，Ｔｒｕ，Ｔｔｈ，Ｔ１ｉ，Ｔａｃ，Ｔｎｅ，Ｔｍａ，Ｔｉｈ、Ｔｆｉ，Ｐｆｕ，Ｐｆｕｔｕｂｏ，Ｐｙｒｏｂｅｓｔ，Ｐｗｏ，ＫＯＤ，Ｂｓｔ，Ｓａｃ，Ｓｓｏ，Ｐｏｃ，Ｐａｂ，Ｍｔｈ，Ｐｈｏ，ＥＳ４，ＶＥＮＴ，ＤＥＥＰＶＥＮＴ、ＫＯＤ、ならびにそれらの変異体、改変体および誘導体からなる群より選択される、請求項８に記載の組成物。
【請求項１０】
前記ＤＮＡポリメラーゼが、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を有する熱安定性ＤＮＡポリメラーゼである、請求項８に記載の組成物。
【請求項１１】
前記ＤＮＡポリメラーゼが、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である熱安定性ＤＮＡポリメラーゼである、請求項１０に記載の組成物。
【請求項１２】
前記逆転写酵素がＡＭＶ－ＲＴ，Ｍ－ＭＬＶ－ＲＴ，ＨＩＶ－ＲＴ，ＥＩＡＶ－ＲＴ，Ｒ

ＡＶ２－ＲＴ，Ｃ．ヒドロゲノホルマンス（Ｃ．ｈｙｄｒｏｇｅｎｏｆｏｒｍａｎｓ）ＤＮＡポリメラーゼ、スーパースクリプト（ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ）Ｉ、スーパースクリプト（ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ）ＩＩ、ならびにそれらの変異体、改変体および誘導体からなる群より選択される、請求項８に記載の組成物。

【請求項１３】

前記逆転写酵素のＲＮａｓｅＨ活性が実質的に減少している、請求項８または１２に記載の組成物。

【請求項１４】

ＤＮＡ合成の鋳型となる核酸、ＤＮＡ合成酵素、１種以上のオリゴヌクレオチドプライマー、１種以上のヌクレオチド又はそれらの誘導体、緩衝剤、塩から成る群の少なくとも１つを含有する請求項１～１３に記載の組成物。

【請求項１５】

前記ヌクレオチド又はそれらの誘導体が、デオキシホスホヌクレオチド又はその誘導体である請求項１４記載の組成物。

【請求項１６】

前記デオキシホスホヌクレオチド又はその誘導体が、ｄＡＴＰ，ｄＣＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＴＴＰ，ｄＩＴＰ，ｄＵＴＰ、α－チオ－ｄＮＴＰ類、ビオチンーｄＵＴＰ、フルオレセインーｄＵＴＰ、及びシゴキシゲニンーｄＵＴＰから成る群がら選択される請求項１５記載の組成物。

【請求項１７】

ＤＮＡを合成する方法であって、該方法は：　（ａ）核酸の鋳型を、請求項１～１６に記載の１つ以上の組成物と混合し、混合物を形成する工程；および　（ｂ）該鋳型の全体または一部に相補的な第１の核酸分子を作製するのに、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である条件下で、該混合物をインキュベートする工程、を包含する、方法。

【請求項１８】

前記第１の核酸分子の全体または部分に相補的な第２の核酸分子を作製するのに、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である条件下で、該第１の核酸分子をインキュベートする工程をさらに包含する、請求項１７に記載の方法。

【請求項１９】

請求項１７に記載の方法に従って作製される、核酸分子。

【請求項２０】

ＤＮＡ分子を増幅するための方法であって、該方法は、以下：（ａ）核酸の鋳型を、請求項１～１６に記載の１つ以上の組成物と混合し、混合物を形成する工程；および（ｂ）該鋳型の全体または一部に相補的な核酸分子を増幅するのに、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である条件下で、該混合物をインキュベートする工程、を包含する、方法。

【請求項２１】

ＤＮＡ分子を配列決定するための方法であって、該方法は、以下：（ａ）配列決定されるべき核酸分子を、１つ以上のプライマー、請求項１～１６に記載の１つ以上の組成物、１つ以上のヌクレオチド、および１つ以上の終結因子と混合し、混合物を形成する工程；（ｂ）配列決定されるべき該分子の全体または一部に相補的な分子の集団を合成するのに、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である条件下で、該混合物をインキュベートする工程；および（ｃ）該集団を分離して、配列決定されるべき該分子の全体または一部のヌクレオチド配列を決定する工程、を包含する、方法。

【請求項２２】

更にＨｏｔ　ｓｔａｒｔ　ＰＣＲを採用する、請求項１７、１８、２０、２１の方法。

【請求項２３】
ＤＮＡ分子を合成する際に使用するためのキットであって、該キットが、請求項１～１６のいずれかに記載の１つ以上の化合物または成分を含む、キット。
【請求項２４】
２以上のパーツからなるＤＮＡ分子を合成する際に使用するためのキットであって、請求項１～１６のいずれかに記載の１つ以上の化合物または成分が、前記キットのいずれかのパーツの構成成分として、いくつかのパーツに分散して、あるいは、１つのパートに集中して含まれることを特徴とする、キット。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、分子生物学の分野に属する。本発明は、鋳型核酸からＤＮＡの生成及び更なるＤＮＡ増幅を行う際に有用な新規組成物及び方法に関する。本発明は、具体的にはポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）に有用な新規組成物及び方法に関する。
【０００２】
【従来の技術】
ＰＣＲ（例えば、非特許文献４参照）に代表されるＤＮＡ増幅技術は、当分野においては周知の技術である。ＰＣＲ技術による核酸類の検出、分析、転写及び増幅等は、現代の分子生物学において最も重要な操作法の１つであり、とりわけ、遺伝子発現の研究、伝染性病原体（ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ　ａｇｅｎｔｓ）又は遺伝病の診断、ｃＤＮＡの生成及びレトロウイルス類の分析等への適用において重要である。
【０００３】
ＤＮＡ増幅の性能は使用するＤＮＡ合成酵素の性能に左右されるので、これまでに種々のＤＮＡ合成酵素が自然界より探索あるいは改良されてきた。例えば、ＰＣＲは当初、大腸菌などの常温菌由来の耐熱性が充分でないＤＮＡ合成酵素を用いて行われていた。ＰＣＲの反応は、熱循環（ｔｈｅｍｏｃｙｃｌｉｎｇ）（約２３℃～約１００℃の間、好ましくは約３７℃～約９５℃の間）を、多数回サイクリング（好ましくは約５～約９９の範囲、より好ましくは約２０サイクルより多く、最も好ましくは約２５～４０サイクル）することを必要とする、きわめて過酷な条件であるため、その成功率（実際に目的ＤＮＡが増幅する確率）は低いものであったが、現在では、好熱菌由来の耐熱性に優れたＤＮＡ合成酵素の利用が常識となっている。
【０００４】
ＤＮＡ合成酵素に要求される重要な性能の１つとして「合成速度」が挙げられる。ＤＮＡ合成速度を測定する方法は、当業者が知りうるものであれば特に限定されないが、典型的な方法の１つとして、Ｍ１３の１本鎖ＤＮＡ（１．６μｇ）とこれに相補的なプライマー（１６ｐｍｏｌｅ）　をアニーリングさせたものを基質として、各種ＤＮＡポリメラーゼ、ＫＯＤ、Ｐｆｕ、Ｄｅｅｐ　Ｖｅｎｔ、Ｔａｑなど（５Ｕ）をそれぞれの緩衝液にて反応させ、その反応時間と合成されるＤＮＡの大きさの関係から算出することができる。例えば、各ポリメラーゼのＤＮＡ合成速度は、ＫＯＤポリメラーゼ　１０５～１３０　塩基／秒、Ｐｆｕポリメラーゼ　２４．８　塩基／秒、Ｄｅｅｐ　Ｖｅｎｔポリメラーゼ　２３．３塩基／秒、Ｔａｑポリメラーゼ　６１．０　塩基／秒である（Ｔａｋａｇｉ，Ｍ．ｅｔａｌ．：Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　ｆｒｏｍ　Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．　ｓｔｒａｉｎ　ＫＯＤ１　ａｎｄｉｔｓ　ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ　ｔｏ　ＰＣＲ．　Ａｐｐｌ．　Ｅｎｖｉｒｏｎ．　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．　６３，　４５０４～４５４１０．（１９９７））。
【０００５】
ＤＮＡ合成酵素に要求される重要な性能の１つとして「正確性」が挙げられる。ＤＮＡポリメラーゼのＤＮＡ合成反応における正確性を測定する方法は、当業者が知りうるものであれば特に限定されないが、本発明ではプラスミドｐＭｏｌ　２１をＰＣＲ増幅したときの変異発生率により算出した。

【０００６】
ＤＮＡ合成時の正確性を評価する方法の一例として、ストレプトマイシン耐性に関与するリボゾーマルタンパク質Ｓ１２（ｒｐｓＬ）遺伝子を用いた方法が挙げられる。ストレプトマイシンは原核細胞のタンパク質合成を阻害する抗生物質であり、細菌の３０Ｓリボゾーマル ＲＮＡ（ｒＲＮＡ）に結合してタンパク質合成の開始複合体形成反応を阻害し、また遺伝子暗号の誤読を引き起こす。ストレプトマイシン耐性変異株ではリボゾームタンパク質Ｓ１２に変異が見られる。この変異はリボゾームの翻訳忠実度を上げるため、サプレッサーｔＲＮＡによる終始コドンの読み取りを抑制するなど多面的効果（ｐｌｅｉｏｔｒｏｐｉｃ ｅｆｆｅｃｔ）を示すことが知られている。したがって、ｒｐｓＬ遺伝子を鋳型としてＰＣＲにより増幅を行うと、ある確率で変異が導入され、それがアミノ酸レベルの変異であった場合、ｒｐｓＬタンパク質の構造が変化し、ストレプトマイシンが３０Ｓリボゾーマル ＲＮＡに作用できなくなるようなことが起こる。したがって、増幅したプラスミドＤＮＡによって大腸菌を形質転換した場合、変異が多く導入されるほどストレプトマイシン耐性菌の出現頻度が増すこととなる。

【０００７】
プラスミドｐＭｏｌ ２１（Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９９９）２８９，８３５－８５０に記載）は、ｒｐｓＬ遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子を含むプラスミドである。このプラスミドのアンピシリン耐性遺伝子上にＰＣＲ増幅用プライマーセット（片方をビオチン化、ＭｌｕＩ制限酵素サイトを導入）を設計し、プラスミドの全長を耐熱性ＤＮＡポリメラーゼにてＰＣＲ増幅した。得られたＰＣＲ産物をストレプトアビジンビーズを用いて精製し、制限酵素ＭｌｕＩを用いて切り出した後、ＤＮＡリガーゼを用いて結合して大腸菌を形質転換した。アンピシリンとアンピシリン及びストレプトマイシンを含有する２種類のプレートに接種して、それぞれのプレートに出現したコロニーの比を算出することによりＤＮＡ合成時の正確性を求めることができる。

【０００８】
先に示したＤＮＡ合成時の正確性を求める方法で、Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼのＰＣＲ産物の正確性を調べたところ、４％以上の変異挿入率であった。一方、単独で３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素では、０．０５～１％の変異挿入率であり、Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼなどの３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を持たない酵素に３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を混合して調製された混合型酵素では、２～４％の変異挿入率であった。ちなみに、ＫＯＤ ＤＮＡポリメラーゼの変異挿入率は０．１％以下であり、正確性の高いＰＣＲ産物を得るためには最も相応しい酵素である。

【０００９】
ＤＮＡ合成酵素に要求される重要な性能の１つとして、どの長さまでの目的ＤＮＡを増幅できるかを示す性能（以後「ｌｏｎｇ－ＰＣＲ性能」と呼ぶ。）が挙げられる。

【００１０】
ところで、一般に、耐熱性ＤＮＡ合成酵素の１種であるＤＮＡポリメラーゼは、Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｔｈ ＤＮＡポリメラーゼに代表されるＰｏｌＩ型酵素と、ＰｆｕＤＮＡポリメラーゼに代表されるα型酵素に大別される。一般的にＰｏｌＩ型酵素は、ＤＮＡ合成速度が速い反面、３’－５’エキソヌクレアーゼ活性が無いことから正確性に劣る。一方、α型酵素は、３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を持つことから正確性に優れるが、ＤＮＡ合成速度が遅い。このように、上記２タイプは「合成速度」「正確性」の面でそれぞれ優れた特性を持っているが、両方を兼ね備えてはいない。

【００１１】
上記両タイプの長所を合わせる目的で、２種類の耐熱性酵素を混合して利用する技術 （混合型酵素）が開示されている（例えば、非特許文献１参照。）。この酵素は、ＰｏｌＩ型酵素を主成分としてＤＮＡ合成は主にＰｏｌＩ型酵素が行い、誤った塩基の校正のみα型酵素が行うと言われている。

【００１２】

また、単独酵素（α型酵素）でありながら「合成速度」と「正確性」の両方を併せ持つ酵素である、ＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼが開示されている（例えば、特許文献１参照。）。

【００１３】

３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を測定する方法は、当業者が知りうるものであれば特に限定されないが、典型的な方法の１つとして、λＤＮＡのＨｉｎｄＩＩＩ　分解産物の３’端を　３Ｈでラベルしたものを基質として、各ポリメラーゼの至適条件で、　３Ｈの脱離する割合を調べることにより確認する。より具体的には、例えば、λＤＮＡ　ＨｉｎｄＩＩＩ分解物の［３Ｈ］ＴＴＰを取り込ませたＤＮＡ断片を基質として、ポリメラーゼに適した反応温度で、緩衝液　（２０ｍＭＴｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ６．５、１０ｍＭＫＣｌ、６ｍＭ（ＮＨ４）２　ＳＯ４　、２ｍＭ　ＭｇＣｌ２　、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、１０μｇ／ｍｌＢＳＡ）　中に放置し、遊離してくる［３Ｈ］ＴＴＰの割合を調べる。基質ＤＮＡは、まずλＤＮＡの　ＨｉｎｄＩＩＩ分解物（１０　μｇ）に、０．２ｍＭ　のｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＣＴＰおよび［３Ｈ］ＴＴＰを添加して、クレノー・ポリメラーゼで３’端部を伸長反応した後、フェノール抽出、エタノール沈殿してＤＮＡ断片を回収し、さらにスパンカラム（クローンテック社製）で遊離モノヌクレオチドを除去して調製する。

【００１４】

このほかにも、ＤＮＡ合成反応液組成の改良として様々な研究がなされたきた。緩衝剤には、例えば、トリス（ＴＲＩＳ）、トリシン（ＴＲＩＣＩＮＥ）、ビストリシン（ＢＩＳ－ＴＲＩＣＩＮＥ）、ヘペス（ＨＥＰＥＳ）、モプス（ＭＯＰＳ）、テス（ＴＥＳ）、タプス（ＴＡＰＳ）、ピペス（ＰＩＰＥＳ）、キャプス（ＣＡＰＳ）などが試された。塩では、例えば塩化カリウム、酢酸カリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マンガン、酢酸マンガン、硫酸マンガン・塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化リチウム、及び酢酸リチウムが試された。添加剤としては、例えばＤＭＳＯ、グリセロール、ホルムアミド、ベタイン、塩化テトラメチルアンモニウム、ＰＥＧ、ツイン（Ｔｗｅｅｎ）２０，ＮＰ４０、エクトイン（ｅｃｔｏｉｎｅ）、ポリオール類、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＳＳＢタンパク質、ファージＴ４遺伝子３２タンパク質、ＢＳＡが試みられた（例えば、特許文献２～６、非特許文献２および３参照。）。上記試薬は全てのＤＮＡ合成酵素に有効というものではなく、それぞれの酵素で向き不向きがあり、それぞれの酵素に合わせて独自の反応液組成が検討され各種酵素には最適な反応緩衝液が推奨されており、添付緩衝液よりも高性能化することは不可能と考えられていた。

【００１５】

また、我々は鋭意研究の結果、陰イオン物質もＰＣＲの成否を決めるために重要であることを見出し先に出願した。具体的には、ＰＣＲ反応系へジカルボン酸塩からなる２価のカルボキシルイオンを添加することによりＰＣＲの成功率が向上することを見出した。また、２価のカルボキシルイオンの中でも特にシュウ酸イオン，マロン酸イオン，マレイン酸イオンが効果的であることを発見した。

【特許文献１】

特許３１１２１４８号公報

【特許文献２】

特表平０９－５１１１３３号公報（請求項１など）

【特許文献３】

米国特許第５５４５５３９号明細書（クレーム１など）

【特許文献４】

国際公開第９６／１２０４１号パンフレット（クレーム１など）

【特許文献５】

米国特許第６１１４１５０号明細書（クレーム１など）

【特許文献６】

国際公開第９９／４６４００号パンフレット（クレーム１など）
【非特許文献１】
Ｂａｒｎｓ，Ｗ．Ｍ．著，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９１巻，１９９４年，ｐ．２２１６－２２２０
【非特許文献２】
Ｃｈｅｖｅｔ，Ｅ．著，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２３巻，１９９５年，ｐ．３３４３－３３４４
【非特許文献３】
Ｋｏｖａｒｏｖａ，Ｍ．著，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２８巻，２０００年 ｐ７０
【非特許文献４】
Ｎａｔｕｒｅ，３２４巻（６０９３），１９８６年，ｐ．１３－１９
【非特許文献５】
Ｋｕｎｋｅｌ著，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２６０巻，１９８５年，ｐ．５７８７－５７９６
【００１６】
【発明が解決しようとする課題】
ＤＮＡ増幅、殊にＰＣＲにおける「合成速度」「正確性」「ｌｏｎｇ－ＰＣＲ性能」などの要求性能は、近年のバイオテクノロジーの発展にともない、その要求レベルがますます高くなっている。特に、ヒトゲノムの全配列が解明されたことにより、研究の重点が、単に遺伝子を検出したり、違いを解析したりするだけでなく、遺伝子そのものあるいはその遺伝子がコードする蛋白質の機能を解析することに移行していることを考慮すると、ＤＮＡ増幅における正確性の重要度がより高くなっている。
したがって、これらを兼ね備えたＤＮＡ増幅方法を確立することが望まれているが、上記いずれの先行技術も、「合成速度」「正確性」「ｌｏｎｇ－ＰＣＲ性能」全ての性能が最高レベルであるとは言えない。
【００１７】
【課題を解決するための手段】
我々は鋭意研究の結果、ジカルボン酸塩からなる２価のカルボキシルイオンとグリシンを基本単位に持つ試薬あるいはＤＭＳＯの少なくともどちらか一方を組合わせることによりＤＮＡ増幅性能が更に向上することを見出した。また、２価のカルボキシルイオンの中でも特にシュウ酸イオンが効果的であり、グリシンを基本単位に持つ試薬の中でも特にトリメチルグリシンが効果的であることを発見した。また、シュウ酸イオンとＤＭＳＯの使用でも相乗効果があることを発見し、本発明を完成した。
相乗的な添加効果によるＤＮＡ増幅性能の向上とは、具体的にはＧＣ含量の高いＰＣＲターゲットにおける増幅成功や今まで不可能であった長鎖のターゲットでの増幅成功などが挙げられる。また、ＰＣＲ増幅量の向上も本特許の相乗効果の一つである。
【００１８】
すなわち、本発明は以下のような構成からなる。
項１．（１）鋳型となる核酸を基にＤＮＡを合成する酵素反応において、ＤＮＡ合成の促進に効果のある陰イオン物質、および、（２）グリシンを基本単位に持つ試薬あるいはＤＭＳＯの少なくとも１つ、を含有することを特徴とする反応液組成物。
項２．グリシンを基本単位に持つ試薬が、トリメチルグリシン（ベタイン）であることを特徴とする、項１の反応液組成物。
項３．ＤＮＡ合成の促進に効果のある陰イオン物質が、カルボキシル基を持つ物質である、項１または２の反応液組成物。
項４．カルボキシル基を持つ物質が、ジカルボン酸塩である、項３の反応液組成物。
項５．ジカルボン酸塩が、シュウ酸亜鉛、シュウ酸アンモニウム、シュウ酸カリウム、シュウ酸カルシウム、シュウ酸ジエチル、シュウ酸Ｎ，Ｎ’－ジスクシンイミジル、シュウ酸ジメチル、シュウ酸すず、シュウ酸セリウム、シュウ酸鉄、シュウ酸銅、シュウ酸ナト

リウム、シュウ酸ニッケル、シュウ酸ビス、シュウ酸（２，４－ジニトロフェニル）、シュウ酸（２，４，６－トリクロロフェニル）、シュウ酸マンガン、シュウ酸メチル、シュウ酸ランタン、シュウ酸リチウム、または、マロン酸イソプロピリデン、マロン酸エチル、マロン酸ジエチル、マロン酸ジベンジル、マロン酸ジメチル、マロン酸タリウム、マロン酸二ナトリウム、または、マレイン酸一ナトリウム、マレイン酸ジエチル、マレイン酸クロルフェニラミン、マレイン酸ジ－ｎ－ブチル、マレイン酸モノ－ｎ－ブチルエステルからなる群より選択される、項４に記載の組成物。

項６．トリメチルグリシン（ベタイン）の濃度が０．５～１．５Ｍであり、および／または、ＤＭＳＯの濃度が２～５％である項２～５に記載の組成物。

項７．　ＤＮＡポリメラーゼ活性を有する１つ以上の酵素をさらに含む、　項１～６に記載の組成物。

項８．　ＤＮＡポリメラーゼ活性を有する前記酵素が、ＤＮＡポリメラーゼおよび逆転写酵素からなる群より選択される、　項７に記載の組成物。

項９．　前記ＤＮＡポリメラーゼがＴａｑ，ＥＸ－Ｔａｑ，ＬＡ－Ｔａｑ，Ｅｘｐａｎｄシリーズ，Ｐｌｕｔｉｎｕｍシリーズ，Ｔｂｒ，Ｔｆｌ，Ｔｒｕ，Ｔｔｈ，Ｔ１ｉ，Ｔａｃ，Ｔｎｅ，Ｔｍａ，Ｔｉｈ、Ｔｆｉ，Ｐｆｕ，Ｐｆｕｔｕｂｏ，Ｐｙｒｏｂｅｓｔ，Ｐｗｏ，ＫＯＤ，Ｂｓｔ，Ｓａｃ，Ｓｓｏ，Ｐｏｃ，Ｐａｂ，Ｍｔｈ，Ｐｈｏ，ＥＳ４，ＶＥＮＴ，ＤＥＥＰＶＥＮＴ、ＫＯＤ、ならびにそれらの変異体、改変体および誘導体からなる群より選択される、　項８に記載の組成物。

項１０．　前記ＤＮＡポリメラーゼが、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を有する熱安定性ＤＮＡポリメラーゼである、　項８に記載の組成物。

項１１．　前記ＤＮＡポリメラーゼが、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である熱安定性ＤＮＡポリメラーゼである、　項１０に記載の組成物。

項１２．　前記逆転写酵素がＡＭＶ－ＲＴ，Ｍ－ＭＬＶ－ＲＴ，ＨＩＶ－ＲＴ，ＥＩＡＶ－ＲＴ，ＲＡＶ２－ＲＴ，Ｃ．ヒドロゲノホルマンス（Ｃ．ｈｙｄｒｏｇｅｎｏｆｏｒｍａｎｓ）ＤＮＡポリメラーゼ、スーパースクリプト（ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ）Ｉ、スーパースクリプト（ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ）ＩＩ、ならびにそれらの変異体、改変体および誘導体からなる群より選択される、　項８に記載の組成物。

項１３．　前記逆転写酵素のＲＮａｓｅＨ活性が実質的に減少している、　項８または１２に記載の組成物。

項１４．ＤＮＡ合成の鋳型となる核酸、ＤＮＡ合成酵素、１種以上のオリゴヌクレオチドプライマー、１種以上のヌクレオチド又はそれらの誘導体、緩衝剤、塩から成る群の少なくとも１つを含有する　項１～１３に記載の組成物。

項１５．前記ヌクレオチド又はそれらの誘導体が、デオキシホスホヌクレオチド又はその誘導体である　項１４記載の組成物。

項１６．前記デオキシホスホヌクレオチド又はその誘導体が、ｄＡＴＰ，ｄＣＴＰ，　ｄＧＴＰ，ｄＴＴＰ，ｄＩＴＰ，ｄＵＴＰ、α－チオ－ｄＮＴＰ類、ビオチン－ｄＵＴＰ、フルオレセイン－ｄＵＴＰ、及びシゴキシゲニン－ｄＵＴＰから成る群がら選択される　項１５記載の組成物。

項１７．ＤＮＡを合成する方法であって、該方法は：　（ａ）核酸の鋳型を、　項１～１６に記載の１つ以上の組成物と混合し、混合物を形成する工程；および（ｂ）該鋳型の全体または一部に相補的な第１の核酸分子を作製するのに、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である条件下で、該混合物をインキュベートする工程、を包含する、方法。

項１８．　前記第１の核酸分子の全体または部分に相補的な第２の核酸分子を作製するのに、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である条件下で、該第１の核酸分子をインキュベートする工程をさらに包含する、　項１７に記載の方法。

項１９．　項１７に記載の方法に従って作製される、核酸分子。
項２０．　ＤＮＡ分子を増幅するための方法であって、該方法は、以下：（ａ）核酸の鋳型を、　項１～１６に記載の１つ以上の組成物と混合し、混合物を形成する工程；および（ｂ）該鋳型の全体または一部に相補的な核酸分子を増幅するのに、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である条件下で、該混合物をインキュベートする工程、を包含する、方法。
項２１．　ＤＮＡ分子を配列決定するための方法であって、該方法は、以下：（ａ）配列決定されるべき核酸分子を、１つ以上のプライマー、　項１～１６に記載の１つ以上の組成物、１つ以上のヌクレオチド、および１つ以上の終結因子と混合し、混合物を形成する工程；（ｂ）配列決定されるべき該分子の全体または一部に相補的な分子の集団を合成するのに、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である条件下で、該混合物をインキュベートする工程；および（ｃ）該集団を分離して、配列決定されるべき該分子の全体または一部のヌクレオチド配列を決定する工程、を包含する、方法。
項２２．更にＨｏｔ　ｓｔａｒｔ　ＰＣＲを採用する、　項１７、１８、２０、２１の方法。
項２３．ＤＮＡ分子を合成する際に使用するためのキットであって、該キットが、　項１～１６のいずれかに記載の１つ以上の化合物または成分を含む、キット。
項２４．２以上のパーツからなるＤＮＡ分子を合成する際に使用するためのキットであって、　項１～１６のいずれかに記載の１つ以上の化合物または成分が、前記キットのいずれかのパーツの構成成分として、いくつかのパーツに分散して、あるいは、１つのパートに集中して含まれることを特徴とする、キット。
【００１９】
【発明の実施の形態】
以下、本発明のＤＮＡ合成反応を促進する添加剤の実施の形態を具体的に説明する。
本発明は、（１）鋳型となる核酸を基にＤＮＡを合成する酵素反応において、ＤＮＡ合成の促進に効果のある陰イオン物質、および、（２）グリシンを基本単位に持つ試薬あるいはＤＭＳＯの少なくとも１つ、を含有することを特徴とする反応液組成物である。
【００２０】
本発明において、「ＤＮＡ合成反応を促進する」とは、「合成速度」および／または「ｌｏｎｇ－ＰＣＲ性能」が向上することをいう。
【００２１】
本発明の反応液組成物に含まれる、ＤＮＡ合成の促進に効果のある陰イオン物質としては、特に制限がないが、例えばカルボキシル基を持つ物質等が挙げられる。好ましくは、ジカルボン酸塩が挙げられる。ジカルボン酸塩は、例えば無機塩の形で添加される。好ましくはシュウ酸イオン、マロン酸イオン、マレイン酸イオンの少なくとも１種類を含有する。さらに好ましくは、これらの無機塩は、アルカリ金属（好ましくはカリウム塩、あるいはナトリウム塩の形態）またはアルカリ土類金属またはアンモニウムとの塩の形態をとる。
【００２２】
具体的には、シュウ酸亜鉛、シュウ酸アンモニウム、シュウ酸カリウム、シュウ酸カルシウム、シュウ酸ジエチル、シュウ酸Ｎ，Ｎ’－ジスクシンイミジル、シュウ酸ジメチル、シュウ酸すず、シュウ酸セリウム、シュウ酸鉄、シュウ酸銅、シュウ酸ナトリウム、シュウ酸ニッケル、シュウ酸ビス、シュウ酸（２，４－ジニトロフェニル）、シュウ酸（２，４，６－トリクロロフェニル）、シュウ酸マンガン、シュウ酸メチル、シュウ酸ランタン、シュウ酸リチウム、または、マロン酸イソプロピリデン、マロン酸エチル、マロン酸ジエチル、マロン酸ジベンジル、マロン酸ジメチル、マロン酸タリウム、マロン酸二ナトリウム、または、マレイン酸一ナトリウム、マレイン酸ジエチル、マレイン酸クロルフェニラミン、マレイン酸ジ－ｎ－ブチル、マレイン酸モノ－ｎ－ブチルエステルなどが挙げら

れ、いずれも、市販品などを用いることができる。

【００２３】

上記陰イオン物質は、通常、０．１～２０ｍＭの濃度範囲で用いられる。好ましくは０．１～１０ｍＭ、さらに好ましくは１～１０ｍＭである。

【００２４】

本発明の反応液組成物に含まれる、グリシンを基本単位に持つ試薬としては、特に制限はないが、好ましくは、トリメチルグリシン（ベタイン）などが挙げられ、市販品などを用いることができる。トリメチルグリシン（ベタイン）の有効濃度は０．５～２Ｍであり、好ましくは０．５～１．５Ｍであり、さらに好ましくは１～１．５Ｍである。一方、ＤＭＳＯは、市販品などを用いることができる。ＤＭＳＯの有効濃度は０．１～１５％であり、好ましくは２～１０％であり、さらに好ましくは５～１０％である。

【００２５】

本発明の反応液組成物において、上記陰イオン物質と、グリシンを基本単位に持つ試薬あるいはＤＭＳＯの、両方を添加し最適な組合せとすることにより、さらに効果が増強することが期待できる。最適なシュウ酸イオン濃度ベタイン濃度の組合わせの決定には、標的ＤＮＡの種類及び増幅サイズ、ＰＣＲ　ｂｕｆｆｅｒ組成等を考慮しなければならない場合もありうる。

【００２６】

本発明の反応液組成物は、ＤＮＡを合成する酵素反応に用いることが出来る。本発明の反応液組成物に含まれるＤＮＡ合成酵素としては、特に制限がないが、例えばＤＮＡポリメラーゼや逆転写酵素が挙げられる。該ＤＮＡ合成酵素は耐熱性であることが好ましい。これらの酵素は市販品を用いることができる。また、本発明の反応液組成物は、種々の異なる性質をもつこれらのＤＮＡを合成する酵素を複数含むこともできる。

【００２７】

本発明の反応液組成物に含まれるＤＮＡポリメラーゼはα型ＤＮＡポリメラーゼ、ＰｏｌＩ型ＤＮＡポリメラーゼに大別される。一般的にＰｏｌＩ型酵素は、ＤＮＡ合成速度が速い反面、３’－５’エキソヌクレアーゼ活性が無いことから正確性に劣ると言われている。一方、α型酵素は、３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を持つことから正確性に優れるが、ＤＮＡ合成速度が遅いと言われている。α型ＤＮＡポリメラーゼとＰｏｌＩ型ＤＮＡポリメラーゼを混合して混合型酵素とすることもできる。

【００２８】

ＰｏｌＩ型酵素は、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｔｈ　ＤＮＡポリメラーゼに代表されるが、このほかに、ＥＸ－Ｔａｑ，ＬＡ－Ｔａｑ，Ｅｘｐａｎｄシリーズ，Ｐｌｕｔｉｎｕｍシリーズ，Ｔｂｒ，Ｔｆｌ，Ｔｒｕ，Ｔ１ｉ，Ｔａｃ，Ｔｎｅ，Ｔｍａ，Ｔｉｈ、Ｔｆｉ並びにそれらの突然変異体、変異体及び誘導体などが挙げられる。α型酵素は、Ｐｆｕに代表されるが、このほかに、Ｐｆｕｔｕｂｏ，Ｐｙｒｏｂｅｓｔ，Ｐｗｏ，ＫＯＤ，Ｂｓｔ，Ｓａｃ，Ｓｓｏ，Ｐｏｃ，Ｐａｂ，Ｍｔｈ，Ｐｈｏ，ＥＳ４，ＶＥＮＴ，ＤＥＥＰＶＥＮＴ、並びにそれらの突然変異体、変異体及び誘導体などが挙げられる。

【００２９】

本願で用いられるＤＮＡポリメラーゼは、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である熱安定性ＤＮＡポリメラーゼである。本願で用いられるＤＮＡポリメラーゼは、より好ましくは、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が１％以下である、および／または、２０ｋｂ以上の目的ＤＮＡを増幅することができる。

ＤＮＡポリメラーゼの選択は、「合成速度」「正確性」「ｌｏｎｇ－ＰＣＲ性能」「耐熱性」などの性能を勘案して適宜選択することが可能である。選択にあたっては、いくつかの酵素を組み合わせることもできる。

正確性の観点からは、正確性が主として酵素の特性である３’－５’エキソヌクレアーゼ活性の有無に依存することから、３’－５’エキソヌクレアーゼ活性をもつ酵素（例えばα型酵素）を選択することが好ましい。

なかでも、ＫＯＤは、正確性以外の性能に関しても優れており、特に好ましい。ＫＯＤは、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を有し、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が１％以下である熱安定性ＤＮＡポリメラーゼである。さらには、２０ｋｂ以上の目的ＤＮＡを増幅することができる。

【００３０】

本発明の反応液組成物には逆転写酵素を含んでも良い。逆転写酵素としては、ＡＭＶ－ＲＴ，Ｍ－ＭＬＶ－ＲＴ，ＨＩＶ－ＲＴ，ＥＩＡＶ－ＲＴ，ＲＡＶ２－ＲＴ，Ｃ．ヒドロゲノホルマンス（Ｃ．ｈｙｄｒｏｇｅｎｏｆｏｒｍａｎｓ）ＤＮＡポリメラーゼ、スーパースクリプト（ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ）Ｉ、スーパースクリプト（ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ）ＩＩ、並びにそれらの突然変異体、変異体及び誘導体から成る群から選択されるものが挙げられる。また、これら前記逆転写酵素のＲＮａｓｅＨ活性は、改変などにより実質的に減少していてもよい。

【００３１】

本発明の反応液組成物は、ＤＮＡ合成酵素に加えて、さらに、鋳型となる核酸、１種以上のオリゴヌクレオチドプライマー、１種以上のヌクレオチド又はそれらの誘導体、緩衝剤、塩、ＤＮＡ合成に有用な添加剤から成る群の少なくとも１つを含有することができる。

【００３２】

具体的には、本発明の反応液組成物は、ＤＮＡ合成酵素に加えて、さらに、標的核酸に相補的な塩基配列を有する正方向および逆方向プライマー、４種のｄＮＴＰ、２価陽イオン、緩衝液などを含むことができる。２価陽イオンとしては、マグネシウムイオンが挙げられる。その濃度は１～３ｍＭ程度であることが好ましい。また緩衝液としては、トリス緩衝液　（ｐＨ６．５　、７５℃）　、トリシン緩衝液　（ｐＨ６．５　、７５℃）　などが挙げられる。

具体的な組成の１つは、下記のとおりである。２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　（ｐＨ６．５　、７５℃）１０ｍＭ　ＫＣｌ６ｍＭ　（ＮＨ４）２　ＳＯ４１～３ｍＭ　Ｍｇ２　Ｃｌ２０．１％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００１０μｇ／ｍｌ　ＢＳＡ２０～２００μＭ　ｄＮＴＰｓ０．１ｐＭ～１μＭ　プライマー０．１～２５０ｎｇ　鋳型ＤＮＡ。

【００３３】

あるいは、本発明の反応液組成物は、ＤＮＡ合成酵素に加えて、さらに、標的核酸に相補的な塩基配列を有する正方向および逆方向プライマー、４種のｄＮＴＰ、２価陽イオン、緩衝液、核酸プローブ、発色試薬、発光試薬などを含んでもよい。

【００３４】

本発明の反応液組成物に含まれる１種以上のヌクレオチド又はその誘導体には、特に制限がないが、デオキシホスホヌクレオチド又はその誘導体が挙げられる。具体的な好ましい組成としては、ｄＡＴＰ，ｄＣＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＴＴＰ，ｄＩＴＰ，ｄＵＴＰ、α－チオ－ｄＮＴＰ類、ビオチンーｄＵＴＰ、フルオレセインーｄＵＴＰ、及びシゴキシゲニンーｄＵＴＰから成る群から選択される物質が例示される。

【００３５】

本発明の反応液組成物に含まれる塩は、特に制限がないが、塩化カリウム、酢酸カリウム、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マンガン、酢酸マンガン、硫酸マンガン、塩化ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化リチウム、及び酢酸リチウムから成る群から選択される物質が例示される。これらの塩は市販品を容易に入手することができる。

【００３６】

本発明の反応液組成物には、さらに、ＤＮＡ合成酵素の抗体を添加して常温下で酵素活性を完全に抑え、プライマーダイマーなどの副産物の産生を抑えたり、ｐｒｉｍｅｒの分解を保護することによりＰＣＲ成功率を高める方法（Ｈｏｔ　ｓｔａｒｔ　ＰＣＲ法）のためのホットスタート用抗体や、公知のエンハンサー、などを含むことができる。

【００３７】

本発明はまた、ＤＮＡを合成する方法であって、該方法は：　（ａ）核酸の鋳型を、（１）鋳型となる核酸を基にＤＮＡを合成する酵素反応において、ＤＮＡ合成の促進に効果のある陰イオン物質、および、（２）グリシンを基本単位に持つ試薬あるいはＤＭＳＯの少なくとも１つ、を含有することを特徴とする反応液組成物と混合し、混合物を形成する工程；および　（ｂ）該鋳型の全体または一部に相補的な第１の核酸分子を作製するのに、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である条件下で、該混合物をインキュベートする工程、を包含する、方法である。さらに本発明は、該方法に従って作製される核酸分子を含む。

【００３８】

上記方法の（ｂ）においては、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が１％以下である条件、および／または、２０ｋｂ以上の目的ＤＮＡを増幅することができる条件であることが好ましい。

【００３９】

本発明は、前記ＤＮＡを合成する方法においてさらに、前記第１の核酸分子の全体または部分に相補的な第２の核酸分子を作製するのに、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である条件下で、該第１の核酸分子をインキュベートする工程をさらに包含する、方法である。

【００４０】

上記方法の（ｂ）においては、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が１％以下である条件、および／または、２０ｋｂ以上の目的ＤＮＡを増幅することができる条件であることが好ましい。

【００４１】

さらに本発明は、ＤＮＡ分子を増幅するための方法であって、該方法は、以下：（ａ）核酸の鋳型を、ＤＮＡ合成の促進に効果のある陰イオン物質、および、（２）グリシンを基本単位に持つ試薬あるいはＤＭＳＯの少なくとも１つ、を含有することを特徴とする反応液組成物と混合し、混合物を形成する工程；および（ｂ）該鋳型の全体または一部に相補的な核酸分子を増幅するのに、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である条件下で、該混合物をインキュベートする工程、を包含する、方法である。

【００４２】

上記方法の（ｂ）においては、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が１％以下である条件、および／または、２０ｋｂ以上の目的ＤＮＡを増幅することができる条件であることが好ましい。

【００４３】

本発明の方法で用いられるＤＮＡを合成する酵素反応としては、ＤＮＡポリメラーゼによる反応あるいは逆転写酵素による反応が挙げられる。中でも、ＤＮＡポリメラーゼによる反応、とりわけＰＣＲに基づく遺伝子増幅方法において効果的である。さらには、前記ＰＣＲ増幅が、少なくとも２５回のＤＮＡ変性、アニーリング、ＤＮＡ重合過程を繰り返す方法においてより効果的である。

【００４４】

ＰＣＲ法に基づく遺伝子増幅方法は、標的核酸、４種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、一対のプライマー及びＤＮＡ合成酵素の存在下で、変性、アニーリング、伸長の３工程からなるサイクルを繰り返すことにより、上記一対のプライマーで挟まれる標的核酸の領域を指数関数的に増幅させる方法である（Ｎａｔｕｒｅ，　３２４　（６０９３），　１３－１９（１９８６））。すなわち、変性工程で試料の核酸を変性し、続くアニーリング工程において各プライマーと、それぞれに相補的な一本鎖標的核酸上の領域とをハイブリダイズさせ、続く伸長工程で、各プライマーを起点としてＤＮＡポリメラーゼの働きにより鋳型となる各一本鎖標的核酸に相補的なＤＮＡ鎖を伸長させ、二本鎖ＤＮＡとする。こ

の１サイクルにより、１本の二本鎖ＤＮＡが２本の二本鎖ＤＮＡに増幅される。従って、このサイクルをｎ回繰り返せば、理論上上記一対のプライマーで挟まれた試料ＤＮＡの領域は2^n倍に増幅される。

【００４５】

増幅のために好ましい反応条件は、熱循環（ｔｈｅｍｏｃｙｃｌｉｎｇ）、即ちＰＣＲサイクルの各々のステップを達成させるために、反応混合物の温度を変化させることである。熱循環は、約２３℃～約１００℃の間、好ましくは約３７℃～約９５℃の間の温度範囲で行う。核酸変性は、約９０℃～約１００℃の間、好ましくは約９４℃において通常行う。アニーリングは、約３７℃～約７５℃の間、好ましくは約６０℃において通常行う。ＤＮＡの伸長は、約５５℃～約８０℃の間、好ましくは約６８～７２℃において通常行う。サイクリング数は、所望のＤＮＡ生成物の量により大きく異なる。ＰＣＲサイクルの数は、好ましくは約５～約９９の範囲であり、より好ましくは約２０サイクルより多く、最も好ましくは約２５～４０サイクルである。

【００４６】

本発明では上記増幅反応により生成した増幅産物を例えば標識プローブを用いて標的核酸を検出することができる。標識プローブとしては、標識核酸に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであり、標識物質または標識結合物質を結合するものである。標識物質としては、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼなどの酵素、蛍光物質または放射性物質があり、標識結合物質としてはビオチン、ジゴキシゲニンなどが例示される。標識物質はビオチン、ジゴキシゲニンあるいはアビジンを経由して結合されていてもよい。これらの標識をプローブに導入する方法としては、オリゴヌクレオチドの合成時に、ｄＮＴＰの一成分として、これらの標識物質または標識結合物質を結合するｄＮＴＰを使用して合成する。

【００４７】

標識プローブと結合した核酸の検出には、従来公知の方法、例えばサザンハイブリダイゼーションやノーザンハイブリダイゼーション法などが挙げられる。これらの方法は１本鎖ＤＮＡやＲＮＡが互いに相補性をもっていると、ハイブリッドを形成することを利用して、未知の核酸断片群を例えばアガロース電気泳動法により、そのサイズを分離し、次いでゲル中の核酸断片を例えばアルカリ処理等により、１本鎖とした後、フィルターに転写し、固定し、さらに標識プローブとハイブリダイズさせるものである。標識の検出には、例えば標識物質として、アルカリホスファターゼを使用した場合、化学発光基質、例えば１，２－ジオキセタン化合物（ＰＰＤ）を反応させると、ハイブリッドを形成した核酸のみが発光する。これをＸ線フィルムに感光して標的核酸の大きさや電気泳動上での位置を確かめることができる。

【００４８】

本発明の別の実施態様は、ＤＮＡ分子を配列決定するための方法であって、該方法は、以下：（ａ）配列決定されるべき核酸分子を、１つ以上のプライマー、ＤＮＡ合成の促進に効果のある陰イオン物質、および、（２）グリシンを基本単位に持つ試薬あるいはＤＭＳＯの少なくとも１つ、を含有することを特徴とする反応液組成物、１つ以上のヌクレオチド、および１つ以上の終結因子と混合し、混合物を形成する工程；（ｂ）配列決定されるべき該分子の全体または一部に相補的な分子の集団を合成するのに、ＤＮＡ合成速度が少なくとも３０塩基／秒であり、かつ、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が４％以下である条件下で、該混合物をインキュベートする工程；および（ｃ）該集団を分離して、配列決定されるべき該分子の全体または一部のヌクレオチド配列を決定する工程、を包含する、方法である。

【００４９】

上記方法の（ｂ）においては、ｐＭｏｌ　２１を鋳型としたＰＣＲにおいて誤りが発生する確率が１％以下である条件、および／または、２０ｋｂ以上の目的ＤＮＡを増幅することができる条件であることが好ましい。

【００５０】

核酸を配列決定するための方法として、マキサム・ギルバート法（Ｍａｘａｍ，Ａ．Ｍ．ａｎｄ　Ｇｉｌｂｅｒｔ，Ｗ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７４：５６０－５６４，１９９７）、および、サンガー法（Ｓａｎｇｅｒ，Ｆ．　ａｎｄ　Ｃｏｕｌｓｏｎ，Ａ．Ｒ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．９４：４４４－４４８，１９７５）が広く知られている。マキサム・ギルバート法では、ＤＮＡは放射標識され、４つの試料に分割され、そしてＤＮＡ中の特定のヌクレオチド塩基を選択的に破壊しそして損傷部位で分子を切断する化学薬品で処理される。そして、得られるフラグメントをゲル電気泳動によって異なるバンドに分離しそしてゲルをＸ線フィルムに曝露することによって、元のＤＮＡ分子の配列をフィルムから読むことができる。一方サンガー法は、ＤＮＡポリメラーゼのＤＮＡ合成活性を使用し、これは、反応停止ジデオキシヌクレオシド三リン酸（Ｓａｎｇｅｒ，Ｆ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７４：５４６３－５４６７，１９７７）と短いプライマー（そのいずれかが検出可能に標識され得る）との混合物と合わせ、４つのジデオキシ塩基のうちの１つで特異的に停止した一連の新しく合成されたＤＮＡフラグメントを生じる。次いで、これらのフラグメントをゲル電気泳動によって解析し配列を決定する。４つの別々の反応を行うことによって（各ｄｄＮＴＰで１回）、かなりの複雑なＤＮＡ分子の配列は、迅速に決定され得る（Ｓａｎｇｅｒ，Ｆ．ら、Ｎａｔｕｒｅ　２６５：６７８－６９５，１９７７；Ｂａｒｎｅｓ，Ｗ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５２：５３８－５５６，１９８７）。

【００５１】

本発明は、ＤＮＡ分子を合成する際に使用するためのキットであって、該キットが、（１）ＤＮＡ合成の促進に効果のある陰イオン物質、および、（２）グリシンを基本単位に持つ試薬あるいはＤＭＳＯの少なくとも１つ、を含有する、キットである。

【００５２】

上記キットは、２以上のパーツからなることができ、上記化合物または成分は、該キットのいずれかのパーツの構成成分として、いくつかのパーツに分散して、あるいは、１つのパートに集中して含まれることができる。

【００５３】

本発明のキットには、ＤＮＡ合成酵素に加えて、さらに具体的に、上記の反応液組成物に含まれうる種々の成分を含むことができる。

【実施例】

以下実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例によりなんら限定されるものではない。

【００５４】

実施例１．

混合型酵素（ＥＸ－Ｔａｑ）におけるシュウ酸イオン、ベタインの相乗効果確認（図１）

通常、ＥＸ－Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ（宝酒造製）を用いたＰＣＲでは増幅ができないターゲットにて、シュウ酸イオンとベタインの相乗効果を確認した。ＰＣＲ　ｂｕｆｆｅｒはＥＸ－Ｔａｑ添付のものに最終濃度２ｍＭとなるようシュウ酸カリウムを添加して、０．２ｍＭ　ｄＮＴＰｓ、配列番号１、２記載のプライマー対０．３μＭ使用した。ＥＸ－Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ１．０Ｕを用い、鋳型にはヒト培養細胞Ｋ５６２由来のＧｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ２０ｎｇを使用し、ベタイン添加量の違いによるＰＣＲ結果に及ぼす影響について調べた。９４℃，２分の前反応の後、９４℃，１５秒－６０℃，３０秒－６８℃，８．５分を３５サイクル繰り返すスケジュールでＧｅｎｅＡｍｐ２４００（ＰＥアプライドバイオシステムズ社）にてＰＣＲを行った。結果を図１に示す。

【００５５】

ベタイン無添加の場合には僅かに目的ＤＮＡの増幅が確認できる程度であったが、０．５Ｍベタインを添加した時に増幅量の増大が認められた。以上の結果から、混合型酵素においてシュウ酸イオンとベタインの相乗効果が確認できた。

【００５６】

実施例２．

α型酵素（ｎａｔｉｖｅ　Ｐｆｕ）におけるシュウ酸イオン、ベタインの相乗効果確認（図２）

通常、ｎＰｆｕポリメラーゼを用いたＰＣＲでは増幅ができないターゲットにて、シュウ酸イオンとベタインの相乗効果を確認した。ＰＣＲ　ｂｕｆｆｅｒはｎＰｆｕ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ製）添付（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．７５），１０ｍＭ　ＫＣｌ，１０ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$，２ｍＭ　$MgSO_4$，０．１％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００，１００ｕｇ／ｍｌ　ＢＳＡ）のものに最終濃度２ｍＭとなるようシュウ酸カリウムを添加して、０．２ｍＭ　ｄＮＴＰｓ、配列番号５，６記載のプライマー対０．３μＭ使用した。ｎＰｆｕ　ＤＮＡポリメラーゼ２．５Ｕを用い、鋳型にはヒト培養細胞Ｋ５６２由来のＧｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ２０ｎｇを使用し、ベタイン添加量の違いによるＰＣＲ結果に及ぼす影響について調べた。９４℃，２分の前反応の後、９４℃，１５秒－６０℃，３０秒－６８℃，８分を３５サイクル繰り返すスケジュールでＧｅｎｅＡｍｐ２４００（ＰＥアプライドバイオシステムズ社）にてＰＣＲを行った。結果を図２に示す。

【００５７】

ベタイン無添加の場合にはスメアしか認められなかったが、０．５Ｍベタインを添加した時に目的ＤＮＡの増幅が確認できた。以上の結果から、α型酵素においてもシュウ酸イオンとベタインの相乗効果が確認できた。

【００５８】

実施例３．

Ｈｏｔ　ｓｔａｒｔ酵素（ＫＯＤ－ｐｌｕｓ）におけるシュウ酸イオン、ベタインの相乗効果確認（図３）

Ｈｏｔ　ｓｔａｒｔ酵素におけるシュウ酸イオン、ベタインの相乗効果を確認するため、ＫＯＤ（α型酵素）に２種類のＫＯＤ抗体が添加されたＨｏｔ　ｓｔａｒｔ酵素、ＫＯＤ－ｐｌｕｓ　ＤＮＡポリメラーゼを用いて、通常のＰＣＲでは増幅が困難であったターゲットにて検討した。ＰＣＲ　ｂｕｆｆｅｒはＫＯＤ－ｐｌｕｓ（東洋紡績製）添付のものに最終濃度２ｍＭとなるようシュウ酸カリウムを添加して、０．２ｍＭ　ｄＮＴＰｓ、配列番号１，２記載のプライマー対０．３μＭ使用した。ＫＯＤ－ｐｌｕｓ　ＤＮＡポリメラーゼ１．０Ｕを用い、鋳型にはヒト培養細胞Ｋ５６２由来のＧｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ２０ｎｇを使用し、ベタイン添加量の違いによるＰＣＲ結果に及ぼす影響について調べた。９４℃，２分の前反応の後、９４℃，１５秒－６０℃，３０秒－６８℃，８．５分を３５サイクル繰り返すスケジュールでＧｅｎｅＡｍｐ２４００（ＰＥアプライドバイオシステムズ社）にてＰＣＲを行った。結果を図３に示す。

【００５９】

ベタイン無添加の場合には僅かに目的ＤＮＡの増幅が確認できる程度であったが、０．５～１．５Ｍベタインを添加した時に増幅量の増大が認められた。１．５Ｍベタイン添加時に増幅量が最大となった。以上の結果から、Ｈｏｔ　ｓｔａｒｔ酵素においてシュウ酸イオンとベタインの相乗効果が確認できた。

【００６０】

実施例４．

Ｈｏｔ　ｓｔａｒｔ酵素（ＫＯＤ－ｐｌｕｓ）におけるシュウ酸イオン、ＤＭＳＯの相乗効果確認（図４）

Ｈｏｔ　ｓｔａｒｔ酵素におけるシュウ酸イオン、ＤＭＳＯの相乗効果確認のため、Ｈｏｔｓｔａｒｔ酵素、ＫＯＤ－ｐｌｕｓ　ＤＮＡポリメラーゼを用いて、通常のＰＣＲでは増幅が困難であったターゲットに対して検討を行った。ＰＣＲ　ｂｕｆｆｅｒはＫＯＤ－ｐｌｕｓ（東洋紡績製）添付のものに最終濃度２ｍＭとなるようシュウ酸カリウムを添加して、０．２ｍＭ　ｄＮＴＰｓ、配列番号５，６記載のプライマー対０．３μＭ使用した。鋳型にはヒト培養細胞Ｋ５６２由来のｔｏｔａｌ　ＲＮＡ５００ｎｇをサーモスクリプト（インビトロジェン製）にて逆転写反応して得られたｃＤＮＡ　０．５μＬを使用した。ＫＯＤ－ｐｌｕｓ　ＤＮＡポリメラーゼ１．０Ｕを用い、ＤＭＳＯ添加量の違いによる

ＰＣＲ結果に及ぼす影響について調べた。９４℃，２分の前反応の後、９４℃，１５秒－６０℃，３０秒－６８℃，９分を４０サイクル繰り返すスケジュールでＧｅｎｅＡｍｐ２４００（ＰＥアプライドバイオシステムズ社）にてＰＣＲを行った。結果を図４に示す。

【００６１】

ＤＭＳＯ無添加の場合には僅かに目的ＤＮＡの増幅が確認できる程度であったが、ＤＭＳＯの添加により増幅量の増大が認められ，５％ＤＭＳＯ添加時には十分な増幅が確認できた。以上の結果から、Ｈｏｔ　ｓｔａｒｔ酵素においてシュウ酸イオンとＤＭＳＯの相乗効果が確認できた。

【００６２】

実施例５．

α型酵素（ＫＯＤ）を用いたＰＣＲにおいてシュウ酸カリウムとベタインのｌｏｎｇ　ＰＣＲに対する相乗効果を確認（図５）

シュウ酸イオンとベタインのｌｏｎｇ　ＰＣＲに対する相乗効果を確認するため、ＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼを用いて、α型酵素単独では増幅が報告されていないヒトゲノム由来の２０ｋｂを越えるターゲットに対して検討を行った。ＰＣＲ　ｂｕｆｆｅｒはＫＯＤ－ｐｌｕｓ（東洋紡績製）添付のものに最終濃度２ｍＭとなるようシュウ酸カリウムを添加して、０．４ｍＭ　ｄＮＴＰｓ、配列番号７，８記載のプライマー対０．３μＭ使用した。ＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ２．０Ｕを用い、鋳型にはヒト培養細胞Ｋ５６２由来のＧｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ２００ｎｇを使用し、ベタイン添加量の違いによるＰＣＲ結果に及ぼす影響について調べた。９４℃，２分の前反応の後、９８℃，１０秒‐７４℃，１８分（５サイクル）－９８℃，１０秒‐７２℃，１８分（５サイクル）－９８℃，１０秒‐７０℃，１８分（５サイクル）－９８℃，１０秒‐６８℃，１８分（２５サイクル）のサイクル繰り返し、最後に６８℃，７分の追加反応を行うスケジュールでＧｅｎｅＡｍｐ２４００（ＰＥアプライドバイオシステムズ社）にてＰＣＲを行った。結果を図５に示す。

【００６３】

１．２Ｍ以下のベタイン濃度では目的ＤＮＡの増幅が認められないが、１．４Ｍ，　１．６Ｍ使用時に十分な増幅が確認できた。なお、ベタインの至適濃度は使用する酵素によって異なり、ベタイン使用量は上記濃度に限定されるものではない。

【００６４】

実施例６．

α型酵素（ＫＯＤ）を用いたＰＣＲにおいてベタインとシュウ酸カリウムのｌｏｎｇ　ＰＣＲに対する相乗効果を確認（図６）

シュウ酸イオンとベタインのｌｏｎｇ　ＰＣＲに対する相乗効果を確認するため、ＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼを用いて、α型酵素単独では増幅が報告されていないヒトゲノム由来の２０ｋｂを越えるターゲットに対して検討を行った。ＰＣＲ　ｂｕｆｆｅｒはＫＯＤ－ｐｌｕｓ（東洋紡績製）添付のものに最終濃度１．５Ｍとなるようベタインを添加して、０．４ｍＭ　ｄＮＴＰｓ、プライマー対０．３μＭ使用した。なお、ｔＰＡ２２ｋｂのＰＣＲには配列番号９，１０記載のプライマー対を、ｔＰＡ２４ｋｂのＰＣＲには配列番号９，１１記載のプライマー対を使用した。ＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ２．０Ｕを用い、鋳型にはヒト培養細胞Ｋ５６２由来のＧｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡ２００ｎｇを使用し、シュウ酸カリウム添加量の違いによるＰＣＲ結果に及ぼす影響について調べた。９４℃，２分の前反応の後、９８℃，１０秒‐７４℃，１８分（５サイクル）－９８℃，１０秒‐７２℃，１８分（５サイクル）－９８℃，１０秒‐７０℃，１８分（５サイクル）－９８℃，１０秒‐６８℃，１８分（２５サイクル）のサイクル繰り返し、最後に６８℃，７分の追加反応を行うスケジュールでＧｅｎｅＡｍｐ２４００（ＰＥアプライドバイオシステムズ社）にてＰＣＲを行った。結果を図６に示す。

【００６５】

ｔＰＡ２２ｋｂをターゲットとした場合、２ｍＭシュウ酸カリウム添加時のみターゲットの増幅が確認できた。また、ｔＰＡ２４ｋｂをターゲットとした場合、１．５ｍＭあるいは２．０ｍＭシュウ酸カリウム添加時において僅かながらターゲットの増幅が確認できた

。なお、シュウ酸カリウムの至適濃度は使用する酵素によって異なるため、シュウ酸カリウム使用量は上記濃度に限定されるものではない。

【００６６】

実施例７．

Ｌｏｎｇ ＰＣＲにおけるＨｏｔ ｓｔａｒｔ ＰＣＲの効果を確認（図７）

先のシュウ酸イオンとベタインが共存する反応条件において、抗体を使用したＨｏｔ ｓｔａｒｔ ＰＣＲの効果を確認するため、ＫＯＤ ＤＮＡポリメラーゼを用いたｌｏｎｇ ＰＣＲを検討した。ＰＣＲ ｂｕｆｆｅｒはＫＯＤ－ｐｌｕｓ（東洋紡績製）添付のものに最終濃度２ｍＭシュウ酸カリウムと１．５Ｍベタインを添加して、０．４ｍＭ ｄＮＴＰｓ、プライマー対０．３μＭ使用した。なお、ｔＰＡ１２ｋｂのＰＣＲには配列番号９，１２記載のプライマー対を、ｔＰＡ１５ｋｂのＰＣＲには配列番号９，１３記載のプライマー対を、ｔＰＡ１８ｋｂのＰＣＲには配列番号９，１４記載のプライマー対を、ｔＰＡ２２ｋｂのＰＣＲには配列番号９，１０記載のプライマー対を、ｔＰＡ２４ｋｂのＰＣＲには配列番号９，１１記載のプライマー対を、β－ｇｌｏｂｉｎ１７．５ｋｂのＰＣＲには配列番号１５，１６記載のプライマー対を使用した。ＫＯＤ ＤＮＡポリメラーゼ２．０Ｕを用い、鋳型にはヒト培養細胞Ｋ５６２由来のＧｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ２００ｎｇを使用し、抗体の有無にてＨｏｔ ｓｔａｒｔ ＰＣＲの効果を調べた。９４℃，２分の前反応の後、９８℃，１０秒‐７４℃，１８分（５サイクル）－９８℃，１０秒‐７２℃，１８分（５サイクル）－９８℃，１０秒‐７０℃，１８分（５サイクル）－９８℃，１０秒‐６８℃，１８分（２５サイクル）のサイクル繰り返し、最後に６８℃，７分の追加反応を行うスケジュールでＧｅｎｅＡｍｐ２４００（ＰＥアプライドバイオシステムズ社）にてＰＣＲを行った。結果を図７に示す。

【００６７】

６種類のターゲットにて評価したところ、抗体使用により総じてスメアリングの減少、増幅量の拡大が認められた。特に、ｔＰＡ２２ｋｂのターゲットにおいては、抗体を使用しない場合、ターゲットの増幅は認められなかったが、抗体使用により増幅が確認された。Ｈｏｔ ｓｔａｒｔ ＰＣＲがｌｏｎｇ ＰＣＲにも有効である事は予想されていたが、明確に示した例はなく、ヒトゲノム２０ｋｂ以上のターゲットでは初めての報告と思われる。

【００６８】

実施例８．

ＧＣ ｒｉｃｈ ｔａｒｇｅｔのＰＣＲに効果的な試薬のｌｏｎｇ ＰＣＲへの効果を確認（図８）

ベタインと同様にＧＣ含有量が高いターゲットに対して有効に働くと考えられている試薬“ＰＣＲｘ”（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社製）に対して、同様にｌｏｎｇ ＰＣＲに効果があるか調べた。ＰＣＲ ｂｕｆｆｅｒはＫＯＤ－ｐｌｕｓ（東洋紡績製）添付のものに最終濃度２ｍＭとなるようシュウ酸カリウムを添加して、０．４ｍＭ ｄＮＴＰｓ、プライマー対０．３μＭ使用した。なお、ｔＰＡ９ｋｂのＰＣＲには配列番号１７，１８記載のプライマー対を、ｔＰＡ１２ｋｂのＰＣＲには配列番号９，１０記載のプライマー対を使用した。ＫＯＤ ＤＮＡポリメラーゼ１．０Ｕを用い、鋳型にはヒト培養細胞Ｋ５６２由来のＧｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ２００ｎｇを使用し、ベタインとＰＣＲｘの添加効果を比較した。９４℃，２分の前反応の後、９８℃，１０秒‐７４℃，１２分（５サイクル）－９８℃，１０秒‐７２℃，１２分（５サイクル）－９８℃，１０秒‐７０℃，１２分（５サイクル）－９８℃，１０秒‐６８℃，１２分（２５サイクル）のサイクル繰り返し、最後に６８℃，７分の追加反応を行うスケジュールでＧｅｎｅＡｍｐ２４００（ＰＥアプライドバイオシステムズ社）にてＰＣＲを行った。結果を図８に示す。

【００６９】

ｔＰＡ９ｋｂ，１２ｋｂのいずれのターゲットでも、添加剤を加えない時には僅かしかターゲットの増幅が認められなかった。しかしながら、１Ｍあるいは１．５Ｍベタインを添加することにより両ターゲットにおいて十分な増幅が認められるようになった。一方、

ＰＣＲｘを使用説明書に従い、１ｘ濃度，　２ｘ濃度，　３ｘ濃度で使用した場合、全く増幅が認められなかった。以上の結果から、ＧＣ　ｒｉｃｈターゲットに対して有効である試薬が必ずしもｌｏｎｇ　ＰＣＲに有効であるとは言えず、ｌｏｎｇ　ＰＣＲに対する有効性はベタイン特有の性質であることが示唆された。なお、ベタインのｌｏｎｇ　ＰＣＲに対する効果はα型ＤＮＡポリメラーゼだけでなく、全ての耐熱性ＤＮＡポリメラーゼにおいて確認できている。

【００７０】

【発明の効果】

上述したように、本発明により、今まで不可能であった目的ＤＮＡに対してもＰＣＲが可能となり、ＰＣＲ成功率を高めることができた。また、２価のカルボン酸塩とベタイン、ＤＭＳＯの相乗効果は、複数のＤＮＡ合成酵素で確認でき、単純なＤＮＡ合成反応だけでなく、ＰＣＲ法においても有効であった。特に、今までｌｏｎｇ　ＰＣＲには不向きと考えられていたα型ＤＮＡポリメラーゼでもシュウ酸イオンとベタインの相乗効果により、ｌｏｎｇ　ＰＣＲが可能となり、更にＨｏｔ　ｓｔａｒｔ　ＰＣＲを採用することによりｌｏｎｇ　ＰＣＲに対する効果が安定することを見出した。

【００７１】

【配列表】

〈110〉 Toyo Boseki Kabushiki Kaisha

〈120〉 The synergistic effect of the additive agent which promotes DNA synthesis reaction

〈130〉 02-0844

〈141〉 2002-10-25

〈160〉 6

〈170〉 PatentIn version 2.1

〈210〉 1

〈211〉 22

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial sequence

〈220〉

〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.1,3

〈400〉 1

agtgcttcgt gcccgatgac 20

【００７２】

〈210〉 2
〈211〉 22
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No. 1,3
〈400〉 2
ccagtatcgg cagttgcgta gg 22

【００７３】
〈210〉 3
〈211〉 22
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.2
〈400〉 3
ggtgttccct tgatgtagca ca 22

【００７４】
〈210〉 4
〈211〉 26
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No. 2
〈400〉 4
acatgtattt gcatggaaaa caactc 26

【００７５】

〈210〉 5
〈211〉 25
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.4
〈400〉 5
tggaagtgtg gatattgtcc agtgc 25

【００７６】
〈210〉 6
〈211〉 27
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.4
〈400〉 6
cagggcggtt tgcttctcag caataga 27

【００７７】
〈210〉 7
〈211〉 33
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.4
〈400〉 7
agtgccctgt cctccagata ccactgagcc tct 33

【００７８】

BG21.5r
〈210〉 8
〈211〉 35
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.4
〈400〉 8
gcagcctaag ggtgggaaaa tagaccaata ggcag 35

【００７９】
〈210〉 9
〈211〉 34
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.4
〈400〉 9
ccttcactgt ctgcctaact ccttcgtgtg ttcc 34

【００８０】
〈210〉 10
〈211〉 31
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.4
〈400〉 10
gatgcgaaac tgaggctggc tgtactgtct c 31

【００８１】

〈210〉 11
〈211〉 31
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.4
〈400〉 11
tgtctccagc acacagcatg ttgtcggtga c 27

【００８２】
〈210〉 12
〈211〉 34
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.4
〈400〉 12
ccttctagag tcaactctag atgtggactt agag 34

【００８３】
〈210〉 13
〈211〉 34
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.4
〈400〉 13
actgtgcttc ctgacccatg gcagaagcgc cttc 34

【００８４】

〈210〉 14
〈211〉 34
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.4
〈400〉 14
gcaggggtgc tgcagaactc tgagctgtac ttcc 34

【００８５】
〈210〉 15
〈211〉 35
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.4
〈400〉 15
tgcacctgct ctgtgattat gactatccca cagtc 35

【００８６】
〈210〉 16
〈211〉 35
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.4
〈400〉 16
acatgattag caaaagggcc tagcttggac tcaga 35

【００８７】

〈210〉 17
〈211〉 34
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.4
〈400〉 17
ggaagtacag ctcagagttc tgcagcaccc ctgc 34

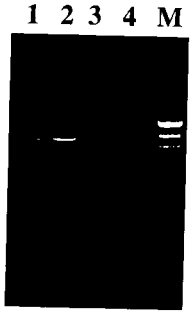
【００８８】
〈210〉 18
〈211〉 31
〈212〉 DNA
〈213〉 Artificial sequence
〈220〉
〈223〉 the sequence of designed polynucleotide for PCR primer, described in example No.4
〈400〉 18
caaagtcatg cggccatcgt tcagacacac c 31

【図面の簡単な説明】
【図１】混合型酵素（ＥＸ－Ｔａｑ）を用いたＰＣＲにおいてシュウ酸カリウムと他試薬の相乗効果を確認した電気泳動写真の代用図面である。
【図２】α型酵素（Ｐｆｕ）を用いたＰＣＲにおいてシュウ酸カリウムと他試薬の相乗効果を確認した電気泳動写真の代用図面である。
【図３】Ｈｏｔ ｓｔａｒｔ酵素（ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ）を用いたＰＣＲにおいてシュウ酸カリウムと他試薬の相乗効果を確認した電気泳動写真の代用図面１である。
【図４】Ｈｏｔ ｓｔａｒｔ酵素（ＫＯＤ－Ｐｌｕｓ）を用いたＰＣＲにおいてシュウ酸カリウムと他試薬の相乗効果を確認した電気泳動写真の代用図面２である。
【図５】α型酵素（ＫＯＤ）を用いたＰＣＲにおいてシュウ酸カリウムとベタインのｌｏｎｇ
ＰＣＲに対する相乗効果を確認した電気泳動写真の代用図面である。
【図６】α型酵素（ＫＯＤ）を用いたＰＣＲにおいてベタインとシュウ酸カリウムのｌｏｎｇ
ＰＣＲに対する相乗効果を確認した電気泳動写真の代用図面である。
【図７】Ｌｏｎｇ ＰＣＲにおけるＨｏｔ ｓｔａｒｔ ＰＣＲの効果を確認した電気泳動写真の代用図面である。
【図８】ＧＣ ｒｉｃｈ ｔａｒｇｅｔのＰＣＲに効果的な試薬のｌｏｎｇ ＰＣＲへの効果を確認した電気泳動写真の代用図面である。

【図１】

しゅう酸カリウムと他試薬の相乗効果確認
－混合型酵素－

EX-Taq 1.0U
EX-Taq添付buffer + 2mM しゅう酸K
human genomic DNA 20ng
Target: myosin heavy chain 8.4kb



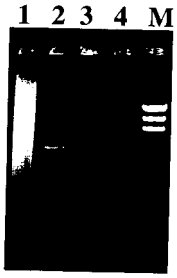
1:ﾍﾞﾀｲﾝ 0mM
2: 0.5mM
3: 1.0mM
4: 1.5mM

M: λ/*Hin*dIII digest

【図２】

しゅう酸カリウムと他試薬の相乗効果確認
－α型酵素－

Pfu 2.5U
Pfu添付buffer + 2mM しゅう酸K
human genomic DNA 20ng
Target: β-globin 3.6kb



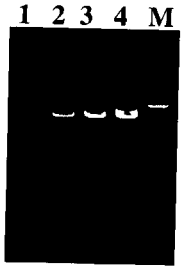
1:ﾍﾞﾀｲﾝ 0mM
2: 0.5mM
3: 1.0mM
4: 1.5mM

M: λ/*Hin*dIII digest

【図３】

しゅう酸カリウムと他試薬の相乗効果確認
－Hot start酵素1－

KOD-Plus 1.0U
KOD-Plus添付buffer + 2mM しゅう酸K
human genomic DNA 20ng
Target: myosin heavy chain 8.4kb



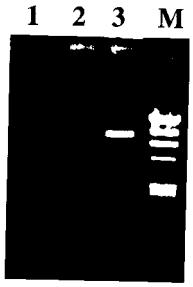
1:ﾍﾞﾀｲﾝ 0mM
2: 0.5mM
3: 1.0mM
4: 1.5mM

M: λ/*Hin*dIII digest

【図４】

しゅう酸カリウムと他試薬の相乗効果確認
－Hot start酵素2－

KOD-Plus 1.0U
KOD-Plus添付buffer + 2mM しゅう酸K
Target: insulin-like growth factor receptor Ⅱ 8.8kb



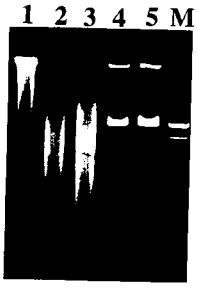
1:DMSO 0%
2: 2%
3: 5%

M: λ/*Hin*dIII digest

【図５】

シュウ酸カリウムとﾍﾞﾀｲﾝの相乗効果確認(Long PCR)

KOD 2.0U
KOD-Plus添付buffer + 2mM シュウ酸K
Target: β-globin 21.5kb



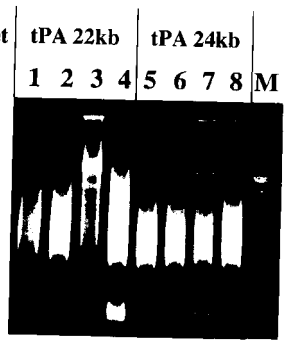
1:ﾍﾞﾀｲﾝ 0.8M
2: 1.0M
3: 1.2M
4: 1.4M
5: 1.6M

M: λ/*Hin*dIII digest

【図６】

ﾍﾞﾀｲﾝとシュウ酸カリウムの相乗効果確認(Long PCR)

KOD 2.0U
KOD-Plus添付buffer + 1.5M ﾍﾞﾀｲﾝ



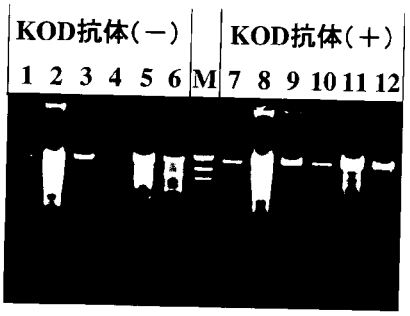
1,5 :シュウ酸K 1.0mM
2,6 : 1.5mM
3,7 : 2.0mM
4,8 : 2.5mM

M: λ/*Hin*dIII digest

【図７】

Long PCRにおけるHot start PCRの効果を確認

KOD 2.0U
KOD-Plus添付buffer + 2mM シュウ酸K + 1.5M ﾍﾞﾀｲﾝ



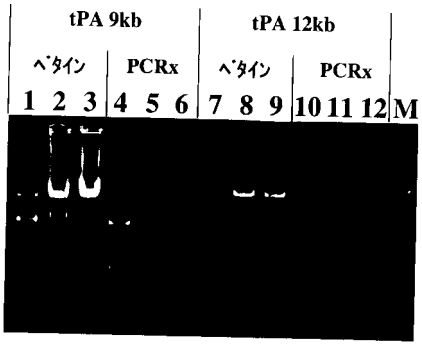
M: λ/*Hin*dIII digest

Target
1, 7 : tPA 12kb
2, 8 : 15kb
3, 9 : 18kb
4,10 : 22kb
5,11 : 24kb
6,12 : β-globin 17.5kb

【図８】

GC rich target用試薬のLong PCRへの添加効果確認

KOD 1.0U
KOD-Plus添付buffer + 2mM シュウ酸K



M: λ/*Hin*dIII digest

Target
1, 7 : ﾍﾞﾀｲﾝ 0
2, 8 : 1M
3, 9 : 1.5M
4,10 : PCRx x1
5,11 : x2
6,12 : x3

フロントページの続き

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA04 CA05 CA06 CA09 CA11 GA18 HA08 HA12
HA14 HA19
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QR07 QR08 QR32 QR41 QR42 QR49
QR62 QR66 QR82 QS12 QS25 QS34 QX02