

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-506417

(P2008-506417A)

(43) 公表日 平成20年3月6日 (2008. 3. 6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 5 0
C 1 2 N 9/12 (2006.01)	C 1 2 N 9/12	4 B 0 6 3

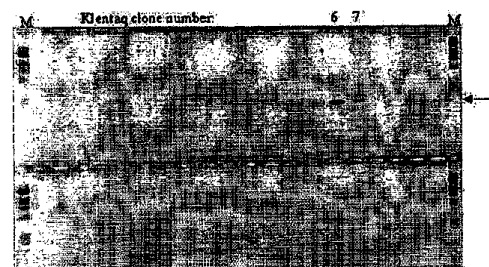
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2007-527461 (P2007-527461) (86) (22) 出願日 平成17年5月20日 (2005. 5. 20) (85) 翻訳文提出日 平成19年1月19日 (2007. 1. 19) (86) 国際出願番号 PCT/US2005/017669 (87) 国際公開番号 W02005/113829 (87) 国際公開日 平成17年12月1日 (2005. 12. 1) (31) 優先権主張番号 10/850, 816 (32) 優先日 平成16年5月20日 (2004. 5. 20) (33) 優先権主張国 米国 (US) (31) 優先権主張番号 11/005, 559 (32) 優先日 平成16年12月6日 (2004. 12. 6) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 506387867 ミルコ・ビー・ケルメクキエフ M i l k o B. K E R M E K C H I E V アメリカ合衆国63139ミズーリ州セン ト・ルイス、ウエスト・パーク・アベニュー 6665番 (71) 出願人 506387270 ウェイン・エム・バーンズ W a y n e M. B A R N E S アメリカ合衆国63130ミズーリ州ユニ バーシティ・シティ、プリンストン・アベ ニュー11番 (74) 代理人 100081422 弁理士 田中 光雄 最終頁に続く
---	--

(54) 【発明の名称】 PCR反応における全血の使用

(57) 【要約】

血液 - 耐性ポリメラーゼを用いてPCRアッセイ混合物中でDNA増幅を行うことを含む、全血の体積から核酸標的のDNA増幅を得る方法。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血液 - 耐性ポリメラーゼを含むPCRアッセイ混合物中でDNA増幅を行うことを含む、一定の体積を有する全血から核酸標的のDNA増幅を得る方法。

【請求項 2】

血液 - 耐性ポリメラーゼが、KT-6 (配列番号：4)、KT-7 (配列番号：6)、KT-10 (配列番号：20)、KT-12 (配列番号：24)、FL-10 (配列番号：28) および FL-12 (配列番号：30) よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーを含む請求項1記載の方法。

【請求項 3】

一定の体積を有する全血をPCRアッセイ混合物の約3%を超えて含む請求項1記載の方法。

10

【請求項 4】

一定の体積を有する全血をPCRアッセイ混合物の約5%ないし約20%の範囲で含む請求項1記載の方法。

【請求項 5】

さらに、さらなるDNAポリメラーゼ酵素を含む請求項1記載の方法。

【請求項 6】

さらなるDNAポリメラーゼ酵素が3'-エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを含む請求項5記載の方法。

【請求項 7】

さらなるDNAポリメラーゼ酵素が、Vent DNAポリメラーゼ、Deep Vent DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼおよびPwu DNAポリメラーゼよりなる群から選択される少なくとも1のメンバーを含む請求項6記載の方法。

20

【請求項 8】

KT-1 (配列番号：2) を含むPCRアッセイ混合物中でDNA増幅を行うことを含む、一定の体積を有する全血から核酸標的のDNA増幅を得る方法。

【請求項 9】

一定の体積を有する全血を反応物の最終体積の約3%を超えて含む請求項8記載の方法。

【請求項 10】

一定の体積を有する全血を反応物の最終体積の約5%ないし約20%の範囲で含む請求項8記載の方法。

30

【請求項 11】

Z-TAQ (商標) を用いるPCRアッセイ混合物中でDNA増幅を行うことを含む、一定の体積を有する全血から核酸標的のDNA増幅を得る方法。

【請求項 12】

サーマルサイクリングの前に反応容器中で全血試料がDNA増幅カクテルと混合することを回避することによって、DNA増幅カクテルを用いて全血試料から核酸標的のDNA増幅を得る方法であって、

DNA増幅カクテルを反応容器に添加し、ここにDNA増幅カクテルは少なくとも1のDNAポリメラーゼを含み；

全血試料を反応容器に添加し、ここに全血試料は、反応容器へのDNA増幅カクテルおよび全血試料の添加の順序にかかわらず、DNA増幅カクテルの下方に層をなし；ついで

サーマルサイクリング・プログラムを行って核酸標的のDNA増幅を行うことを含む該方法。

40

【請求項 13】

少なくとも1のDNAポリメラーゼが、KT-6 (配列番号：4)、KT-7 (配列番号：6)、KT-10 (配列番号：20)、KT-12 (配列番号：24)、FL-10 (配列番号：28) および FL-12 (配列番号：30) よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーを含む血液 - 耐性ポリメラーゼを含む請求項12記載の方法。

【請求項 14】

血液 - 耐性ポリメラーゼがKT-6 (配列番号：4) を含む請求項12記載の方法。

50

【請求項 15】

血液 - 耐性ポリメラーゼがKT-7 (配列番号: 6) を含む請求項12記載の方法。

【請求項 16】

血液 - 耐性ポリメラーゼがKT-10 (配列番号: 20) を含む請求項12記載の方法。

【請求項 17】

血液 - 耐性ポリメラーゼがKT-12 (配列番号: 24) を含む請求項12記載の方法。

【請求項 18】

血液 - 耐性ポリメラーゼがFL-10 (配列番号: 28) を含む請求項12記載の方法。

【請求項 19】

血液 - 耐性ポリメラーゼがFL-12 (配列番号: 30) を含む請求項12記載の方法。

10

【請求項 20】

一定の体積を有する全血を反応物の最終体積の約3%を超えて含む請求項12の方法。

【請求項 21】

一定の体積を有する全血を反応物の最終体積の約5%ないし約20%の範囲で含む請求項12記載の方法。

【請求項 22】

核酸標的のDNA増幅のためのhot startを得る方法であって:

少なくとも第1の体積を有する成分および第2の体積を有する成分を含む反応カクテルの調製を含み、

ここに第2の体積を有する成分は第1の体積を有する成分よりもより重く、

20

ここに第1の体積を有する成分は、DNA増幅活性に必要な必須の構成成分を欠いているDNAポリメラーゼカクテルを含み、

ここに第2の体積を有する成分はDNA増幅活性に必要な必須の構成成分を含み、

ここに第2の体積を有する成分は、DNA増幅反応が開始される前に、過度に混合することなく第1の体積を有する成分の下方に下敷きされる該方法。

【請求項 23】

さらに、第2の体積を有する成分がマグネシウム塩およびデオキシヌクレオチド三リン酸を含む溶液を含む請求項22記載の方法。

【請求項 24】

さらに、第2の体積を有する成分が標的テンプレート核酸を含む請求項22記載の方法。

30

【請求項 25】

さらに、第2の体積を有する成分がスクロースまたはソルビトールを含む請求項22記載の方法。

【請求項 26】

さらに、第2の体積を有する成分がベタインを含む請求項22記載の方法。

【請求項 27】

さらに、第2の体積を有する成分が稠密な組成物を含む請求項22記載の方法。

【請求項 28】

さらに、第2の体積を有する成分が全血またはそのサブ画分を含む請求項22記載の方法。

40

【請求項 29】

さらに、第2の体積を有する成分が第1のDNAポリメラーゼ酵素を含む請求項22記載の方法。

【請求項 30】

第1のDNAポリメラーゼ酵素が、KT-1 (配列番号: 2)、KT-6 (配列番号: 4)、KT-7 (配列番号: 6)、KT-10 (配列番号: 20)、KT-11 (配列番号: 22)、KT-12 (配列番号: 24)、FL-10 (配列番号: 28) およびFL-12 (配列番号: 30) よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーを含む請求項29記載の方法。

【請求項 31】

第1のDNAポリメラーゼ酵素がZ-TAQ (商標) を含む請求項29記載の方法。

50

【請求項 3 2】

さらに、第2の体積を有する成分が第2のDNAポリメラーゼ酵素を含む請求項29の方法。

【請求項 3 3】

第2のDNAポリメラーゼ酵素が、3'-エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを含む請求項32記載の方法。

【請求項 3 4】

第2のDNAポリメラーゼ酵素が、Vent DNAポリメラーゼ、Deep Vent DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼおよびPwu DNAポリメラーゼよりなる群から選択される少なくとも1のメンバーを含む請求項33記載の方法。

【請求項 3 5】

KT-6 (配列番号：4)、KT-7 (配列番号：6)、KT-10 (配列番号：20)、KT-12 (配列番号：24)、FL-10 (配列番号：28) およびFL-12 (配列番号：30) よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、血液 - 耐性ポリメラーゼを含む該ポリペプチド。

【請求項 3 6】

KT-7 (配列番号：6)、KT-11 (配列番号：22)、KT-12 (配列番号：24) およびFL-12 (配列番号：30) よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、より迅速に伸長するポリメラーゼを含む該ポリペプチド。

【請求項 3 7】

KT-6 (配列番号：4)、KT-7 (配列番号：6)、KT-10 (配列番号：20)、KT-11 (配列番号：22)、KT-12 (配列番号：24)、FL-10 (配列番号：28) およびFL-12 (配列番号：30) よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーを含む単離されたポリペプチド。

【請求項 3 8】

少なくとも2のアミノ酸残基置換を有するKT-1 (配列番号：2) を含む単離されたポリペプチドであって、少なくとも2のアミノ酸残基置換のうちの1が、単離されたポリペプチドが血液 - 耐性ポリメラーゼ、より迅速に伸長するポリメラーゼ、または血液 - 耐性でより迅速に伸長するポリメラーゼをコードするように、アミノ酸残基ポジション430を含む該ポリペプチド。

【請求項 3 9】

少なくとも3のアミノ酸残基置換を有するTaq DNAポリメラーゼ (配列番号：26) を含む単離されたポリペプチドであって、少なくとも3のアミノ酸残基置換のうちの1が、単離されたポリペプチドが血液 - 耐性ポリメラーゼ、より迅速に伸長するポリメラーゼ、または血液 - 耐性でより迅速に伸長するポリメラーゼをコードするように、アミノ酸残基ポジション708を含む該ポリペプチド。

【請求項 4 0】

KT-1 (配列番号：1)、KT-6 (配列番号：3)、KT-7 (配列番号：5)、KT-10 (配列番号：19)、KT-12 (配列番号：23)、Taq DNAポリメラーゼ (配列番号：25)、FL-10 (配列番号：27) およびFL-12 (配列番号：29) よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーと少なくとも80%のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸であって、血液 - 耐性ポリメラーゼをコードする該核酸。

【請求項 4 1】

KT-1 (配列番号：1)、KT-7 (配列番号：5)、KT-11 (配列番号：21)、KT-12 (配列番号：23)、Taq DNAポリメラーゼ (配列番号：25) およびFL-12 (配列番号：29) よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーと少なくとも80%のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸であって、より迅速に伸長するポリメラーゼをコードする該核酸。

【請求項 4 2】

KT-6 (配列番号：3)、KT-7 (配列番号：5)、KT-10 (配列番号：19)、KT-11 (配列番号：21)、KT-12 (配列番号：23)、FL-10 (配列番号：27) およびFL-12 (配列番号：29)

10

20

30

40

50

よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーを含む単離された核酸。

【請求項43】

少なくとも2のコドン置換を有するKT-1（配列番号：1）を含む単離された核酸であって、少なくとも2のコドン置換のうちの1が、単離された核酸が血液 - 耐性ポリメラーゼ、より迅速に伸長するポリメラーゼ、または血液 - 耐性でより迅速に伸長するポリメラーゼをコードするように、コドンポジション430を含む該核酸。

【請求項44】

少なくとも3のコドン置換を有するTaq DNAポリメラーゼ（配列番号：25）を含む単離された核酸であって、少なくとも3のコドン置換のうちの1が、単離された核酸が血液 - 耐性ポリメラーゼ、より迅速に伸長するポリメラーゼ、または血液 - 耐性でより迅速に伸長するポリメラーゼをコードするように、コドンポジション708を含む該核酸。

10

【請求項45】

より迅速に伸長するDNAポリメラーゼを含むPCRアッセイ混合物中で核酸標的の迅速なDNA増幅を得る方法。

【請求項46】

より迅速に伸長するDNAポリメラーゼが、KT-7（配列番号：6）、KT-11（配列番号：22）、KT-12（配列番号：24）およびFL-12（配列番号：30）よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーを含む請求項45記載の方法。

【請求項47】

全血の試料に対してPCRアッセイを行うためのキットであって、血液 - 耐性ポリメラーゼを含む該キット。

20

【請求項48】

血液 - 耐性ポリメラーゼが、KT-6（配列番号：4）、KT-7（配列番号：6）、KT-10（配列番号：20）、KT-12（配列番号：24）、FL-10（配列番号：28）およびFL-12（配列番号：30）よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーを含む請求項47記載のキット。

【請求項49】

全血の試料に対してPCRアッセイを行うためのキットであって、KT-1（配列番号：2）を含む該キット。

【請求項50】

全血の試料に対してPCRアッセイを行うためのキットであって、Z-TAQ（商標）を含む該キット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液 - 耐性ポリメラーゼを含むPCRアッセイ混合物中でDNA増幅を行うことを含む、一定の体積を有する全血から核酸標的のDNA増幅を得る方法である。

【背景技術】

【0002】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、複合的な混合物からの特定の核酸の選抜および検出を許容する感受性のDNA増幅手順である。その最も基本の形態において、PCRは、標的核酸（DNA）を含む試料、標的にハイブリダイズする一組のDNAプライマー、および標的の相補鎖のプライマーに基づいて合成ができるDNAポリメラーゼを使って利用される。核酸増幅プロセスの間に、標的：プライマー：ポリメラーゼ混合物を、標的DNA鎖の分離を促進する異なる温度にての加熱の連続的なラウンド（～90-99 で実行する）、プライマー：標的DNA鎖アニリング（～40-70 で実行する）、ならびに新しい補完的な標的鎖をつくるDNAポリメラーゼによって媒介されるプライマー伸長（～50-72 で実行する）に付す。反応を～25-45ラウンドのサイクリングに付して望ましいDNA増幅産物を得るためには、PCRは、通常、熱誘導性のタンパク質変性に起因する不活性化を被ることなく、標的鎖分離に関連する非常に高温に耐え得る温度安定性DNAポリメラーゼを用いて行う。1980年代半ばのその導入の時から、PCRは試料中の少量の核酸を検出し、複合的なDNAゲノムおよび試料

40

50

から特定の遺伝子を得るための事実上の標準になっている。

【0003】

PCRに基づく診断および法医学技術に関する重大な問題は、PCRに干渉する抑制物質によって生じる偽陰性反応または低感度である。特に臨床的に重要なのは、血液試料のPCR分析であり、それは遺伝病、ウイルスおよび微生物感染症の診断、血液タイピング、および安全な血液バンクのためのヒトの健康に関連する試験の最も大きな画分を表す。いろいろな研究は、PCRに対する血液の抑制効果が主に熱安定性DNAポリメラーゼの直接的不活性および/または標的DNAおよびプライマーの捕捉または分解と関係していることを示している。血液中のプロテアーゼ活性もPCR効率の低下に貢献することが報告されている(1-5、7、10、12)。

10

【0004】

熱安定性DNAポリメラーゼの血液 - 耐性特徴は、酵素の入手源によって異なる(6)。サーマス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) DNAポリメラーゼ (Taq) およびAmpliTaq Gold (登録商標) のような広く使われている熱安定性ポリメラーゼは、0.004-0.2%のヒト全血の存在で完全に阻害される (vol/vol ; 3、4、6)。Taqに対する血液の抑制効果を減少するために、種々の剤が試験されている。ベタイン、牛血清アルブミン、T4 32遺伝子 (gp32) の一本鎖DNA結合タンパク質、またはプロテアーゼインヒビターのカクテルの添加が、血液阻害を部分的に助けることができ、および、Taqが2%までの血液 (vol/vol) で働くことを許容することが見出された。しかし、この効果は試料特異的である可能性がある (3、8、9、11)。

20

【0005】

免疫グロブリンG、ヘモグロビン、ラクトフェリンおよび過剰な白血球DNAのようなヒト血液中のPCRのいくつかの主なインヒビターが特徴付けられている(4、7、10)。IgG、ヘモグロビンおよびラクトフェリンは、サイズ排除およびアニオン交換クロマトグラフィーを用いて、各々、血漿、赤血球および白血球から精製された(4、7)。ヘムはその触媒ドメインに結合することによってTaqポリメラーゼを不活性化することが報告された(10)が、他の阻害成分の作用のメカニズムはさらにほとんど理解されていない。IgGの抑制効果は、PCRを添加する前にこの血漿画分を95℃に加熱した場合、または、過剰な非 - 標的DNAをPCR混合物に添加すると低下することができる。しかし、95℃にて標的DNAおよびIgGを加熱することは、増幅を遮断することが判明した。IgGによる抑制は、標的DNAにおける一本鎖DNA画分との相互作用に起因することかもしれない。抑制効果は、増幅の前に血漿をDNAアガロースビーズで処理することによっても、取り除くことができた。

30

【0006】

他の複雑にしている要因はEDTAとヘパリンを含む。それらはDNA増幅を阻害し得る抗凝固剤としても使われる。ヘパリナーゼの添加は、ヘパリンによって媒介される阻害を打ち消すことが示されている(13、14)。したがって、試料調製の種々の研究室手順が、血液の阻害効果を低下するために開発されている。PCRに好適なDNA精製方法は、透析、DNA - アガロースビーズまたはChelex 100樹脂での処理、複数回のDNA洗浄、または赤血球の溶解を引き起こす緩衝液での希釈、白血球を回収する遠心分離、NaOHでの洗浄および牛血清アルブミンの添加の組合せのようなさらなる工程を含み得る(2、3、15-19)。

40

【0007】

血液試料のこれらの処理前の工程は、通常、時間がかかり、労働集約型であり、試料特異的である可能性もある。DNA単離のためのチオシアン酸グアニジウム法は、臨床試料中のマイコバクテリウム・チューベルクローシス (*Mycobacterium tuberculosis*) の信頼し得る検出には好適でない。フェノール-クロロホルム抽出が続くプロテアーゼK処理を用いるDNA精製の代替方法は、抑制を軽減するために利用されなければならない(20)。ミリポアフィルターを用いた透析が続くQIAampキットを用いた分離は、B型肝炎ウイルス検出のヘム阻害を除くために必要である(21)。加えて、幾つかの上記の工程は標的DNA損失の危険性をともなっており、自動化には好適でない。さらに、QIAampまたはGeneReleaserのような血液試料からDNA精製のために特に処方化された市販のキットでさえ、必ずしも満足

50

のゆくものではない。その理由はTaqインヒビターの不完全な除去に起因し、それは偽陰性結果を生じるかもしれない。例えば、かかる血液キットを使用する場合、B型肝炎ウイルスについて試験したヒト血液試料の14%が偽陰性結果を与えた。

【0008】

全血を含む試料について増幅反応の特異性を達成する目的は、PCRの間に起こる2のタイプの不要なDNA合成反応によってさらに複雑化される。両方のタイプの副反応が望ましい標的としばしば競合し、不純な産物または増幅の失敗につながる可能性がある。これは、特に、PCR条件を、望ましい増幅産物の十分な収率を達成するために増幅サイクルのより大きな回数を含むように修正した、低いコピー数の核酸テンプレート標的を含んでいるPCRアッセイについて問題である。

10

【0009】

不要なDNA合成の最初のタイプは、テンプレート中のより特異性の低い配列の上での開始である。これは、DNA調製物がその単離の間に融解条件に付される、テンプレートが一本鎖核酸で汚染される場合や、または、テンプレートが一本鎖である場合にのみ問題である。

【0010】

不要なDNA合成の第2のタイプは、少なくともさらなるヌクレオチドの付加によってその3'末端を修飾した結果でもって、それ自体および/または互いにテンプレートとして作用するプライマーである。これらのかく修飾したプライマーは、核酸標的にアニーリングし得る；しかし、それらは、プライマーの3'末端と望ましい標的との間の伸長のサイトにミスマッチなヌクレオチドが存在することに起因して、相補鎖合成のプライマーとして作用しない。この問題は、その名称は正確な記述ではないが、「プライマー・ダイマー」といわれる場合がある。この問題は、注意深いプライマー設計によって低下または回避することができる場合があり、それは多重PCRに関するより一層の問題である。複数のプライマー対の中の偶然のホモロジーのより高い機会が存在するからである。

20

【0011】

「hot start PCR」として知られている手順は、両方のタイプの不要なDNA合成副反応の発生を回避する。この方法によれば、酵素DNAポリメラーゼ、またはマグネシウム(II)カチオンおよび/またはdNTPのようなその活性に必須の緩衝液成分が、PCR反応物が少なくとも正常なプライマー・アニーリング(または、好ましくはDNA伸長)温度(55 - 75、至適68)に加熱するまでに、他のPCRアッセイ混合成分から差し控える。この温度では、プライマーはおそらくはそれら自体とまたは不必要な鋳型配列と安定な二本鎖を形成することができない。選択温度が達成された後、省略した成分を反応に添加して機能的な増幅混合物を再構成する。

30

【0012】

典型的なhot start PCR手順は労働集約型であるだけでなく、それらは互いに、およびサーマルサイクラー機器中で以前に増幅した分子での汚染に対してPCR反応物を曝露する。

【0013】

高温開始を実行するより標準的な方法は、2の部分が高温、通常65 - 85 で合するまでDNAポリメラーゼがDNAに作用することができないように、2の部分でPCR反応物を処方化することからなる。例えば、すべてのマグネシウムを含有する初期溶液をワックスビーズ中にカプセル化するか、またはワックスの層下にシールした反応チューブに導入する。ついで、Mgを含まない残りの反応物を、適当な場合は油の上塗りとともに添加する。反応物を最初のサイクルのために加熱する間に、ワックスは融解して表面に浮き、マグネシウムを一定の体積を有する反応物と混合させる。DNAポリメラーゼ活性は、したがって、非特異性または不要なプライマーの相互作用を許容しない温度で、DNAポリメラーゼ活性が復元される。ワックス法の大きな欠点は、PCRサイクリングが完了した後に出現し、産物を分析のために取り出さなければならない。その際、ワックスはピペット先端に栓をする傾向があり、大いに反応分析の時間と労力を増す。

40

50

【 0 0 1 4 】

近年では、全く高温でないが、抗 - Taq抗体を用いる高温開始方法が記載されており、特許権を得て、市販されている（33-35）。抗体はTaqポリメラーゼの酵素活性をおおいに中和し、プライマーの前にいつでも加えることができ、またはストック酵素の保管の間に便利に存在させることができる。抗体は高温不安定であり、したがってTaqポリメラーゼは最初の高温工程の後に活性を再開させることができる。この方法のためにここまで開発された抗体は、10倍モル過剰で使用しなければならず、高価である。さらにまた、抗体はKlentaqLAポリメラーゼ混合物を用いて行ういくつかのlong PCRアッセイを阻害する。

【 0 0 1 5 】

Taqポリメラーゼの化学的に不活性化した形態が最近導入されており、AmpliTaq Gold（登録商標）と呼ばれている。不活性化の性質は所有権であるが、不活性化はポリメラーゼを95℃に加熱することによって可逆的である。この方法は他の方法よりもさらに簡便であるが、それは少なくとも1の現行の不利がある：再活性化の時間は、95℃にて約10分である。この手順はlong PCR適用に和合しない。その処理が数kbより長い核酸標的を過度にデプリナート（depurinate）するからである。

10

【 0 0 1 6 】

したがって、PCRを使用する全血試料の分析は、現在のPCR技術の前記の欠点を克服する新しい試薬と方法の発見によって恩恵を被る。本明細書中に開示する発明は、これらの欠点の多くを問題にし、解決する。

【 0 0 1 7 】

発明の概要

最初の態様において、本発明は、血液 - 耐性ポリメラーゼを含むPCRアッセイ混合物中でDNA増幅を行うことを含む、一定の体積を有する全血から核酸標的のDNA増幅を得る方法である。

20

【 0 0 1 8 】

第2の態様において、本発明は、KT-1（配列番号：2）またはZ-TAQ（商標）を含むPCRアッセイ混合物中でDNA増幅を行うことを含む、一定の体積を有する全血から核酸標的のDNA増幅を得る方法である。

【 0 0 1 9 】

第3の態様において、本発明は、サーマルサイクリングの前に反応容器中でDNA増幅カクテルと全血試料とが混合することを避けることによって、DNA増幅カクテルを用いて全血試料から核酸標的のDNA増幅を得る方法であり、以下の工程を含む：

30

DNA増幅カクテルを反応容器に添加し、ここにDNA増幅カクテルは少なくとも1のDNAポリメラーゼを含み；

全血試料を反応容器に添加し、ここに全血試料は、反応容器へのDNA増幅カクテルおよび全血試料の添加の順序にかかわらず、DNA増幅カクテルの下方に層を形成し；ついでサーマルサイクリング・プログラムを行って核酸標的のDNA増幅を行う。

【 0 0 2 0 】

第4の態様において、本発明は、反応カクテルの調製物を含む核酸標的のDNA増幅の高温開始を得るための方法であり、少なくとも第1の体積を有する成分および第2の体積を有する成分を含む。第2の体積を有する成分は第1の体積を有する成分よりもより重い。第1の体積を有する成分は、DNA増幅活性に必要な必須の構成成分を欠いているDNAポリメラーゼカクテルを含む。第2の体積を有する成分は、DNA増幅活性に必要な必須の構成成分を含んでいる。第2の体積を有する成分は、DNA増幅反応が開始する前に過度な混合がない場合は第1の体積を有する成分の下方に積層されている。

40

【 0 0 2 1 】

第5の態様において、本発明は、KT-6（配列番号：4）、KT-7（配列番号：6）、KT-10（配列番号：20）、KT-12（配列番号：24）、FL-10（配列番号：28）およびFL-12（配列番号：30）よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであり、当該単離された

50

ポリペプチドは血液 - 耐性ポリメラーゼを含む。

【 0 0 2 2 】

第6の態様において、本発明は、KT-7（配列番号：6）、KT-11（配列番号：22）、KT-12（配列番号：24）およびFL-12（配列番号：30）よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーと少なくとも80%のアミノ酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離されたポリペプチドであり、当該単離されたポリペプチドはより迅速な伸長ポリメラーゼを含む。

【 0 0 2 3 】

第7の態様において、本発明は、KT-6（配列番号：4）、KT-7（配列番号：6）、KT-10（配列番号：20）、KT-11（配列番号：22）、KT-12（配列番号：24）、FL-10（配列番号：28）およびFL-12（配列番号：30）よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーを含む単離されたポリペプチドである。

第8の態様において、本発明は、少なくとも2のアミノ酸残基置換を有するKT-1（配列番号：2）を含む単離されたポリペプチドであり、ここに少なくとも2のアミノ酸残基置換のうちの1は、単離されたポリペプチドが血液 - 耐性ポリメラーゼ、より迅速な伸長ポリメラーゼまたは血液 - 耐性でより迅速な伸長ポリメラーゼをコードするように、アミノ酸残基ポジション430を含む。

【 0 0 2 4 】

第9の態様において、本発明は、少なくとも3のアミノ酸残基置換を有するTaq DNAポリメラーゼ（配列番号：26）を含む単離されたポリペプチドであり、ここに少なくとも3のアミノ酸残基置換のうちの1は、単離されたポリペプチドが血液 - 耐性ポリメラーゼ、より迅速な伸長ポリメラーゼまたは血液 - 耐性でより迅速な伸長ポリメラーゼをコードするように、アミノ酸残基ポジション708を含む。

【 0 0 2 5 】

第10の態様において、本発明は、KT-1（配列番号：1）、KT-6（配列番号：3）、KT-7（配列番号：5）、KT-10（配列番号：19）、KT-12（配列番号：23）、Taq DNAポリメラーゼ（配列番号：25）、FL-10（配列番号：27）およびFL-12（配列番号：29）よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーと少なくとも80%のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸であり、ここに単離された核酸は血液 - 耐性ポリメラーゼをコードする。

【 0 0 2 6 】

第11の態様において、本発明は、KT-1（配列番号：1）、KT-7（配列番号：5）、KT-11（配列番号：21）、KT-12（配列番号：23）、Taq DNAポリメラーゼ（配列番号：25）およびFL-12（配列番号：29）よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーと少なくとも80%のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸であり、ここに単離された核酸はより迅速な伸長ポリメラーゼをコードする。

【 0 0 2 7 】

第12の態様において、本発明は、KT-6（配列番号：3）、KT-7（配列番号：5）、KT-10（配列番号：19）、KT-11（配列番号：21）、KT-12（配列番号：23）、FL-10（配列番号：27）およびFL-12（配列番号：29）よりなる群から選択される少なくとも1のメンバーを含む単離された核酸である。

【 0 0 2 8 】

第13の態様において、本発明は、少なくとも2のコドン置換を有するKT-1（配列番号：1）を含む単離された核酸であり、ここに少なくとも2のコドン置換のうちの1は、単離された核酸が血液 - 耐性ポリメラーゼ、より迅速な伸長ポリメラーゼ、または血液 - 耐性でより迅速な伸長ポリメラーゼをコードするように、コドンポジション430を含む。

【 0 0 2 9 】

第14の態様において、本発明は、少なくとも3のコドン置換を有するTaq DNAポリメラーゼ（配列番号：25）を含む単離された核酸であり、ここに少なくとも3のコドン置換のうちの1は、単離された核酸が血液 - 耐性ポリメラーゼ、より迅速な伸長ポリメラーゼ、ま

10

20

30

40

50

たは血液 - 耐性でより迅速な伸長ポリメラーゼをコードするように、アミノ酸残基ポジション708を含む。

【0030】

第15の態様において、本発明は、より迅速な伸長DNAポリメラーゼを含むPCRアッセイ混合物中において核酸標的の迅速なDNA増幅を得る方法である。

【0031】

第16の態様において、本発明は、全血試料に対してPCRアッセイを行うためのキットであり、ここにキットは血液 - 耐性ポリメラーゼを含む。

【0032】

第17の態様において、本発明は、全血試料に対してPCRアッセイを行うためのキットであり、ここにキットはKT-1（配列番号：2）またはZ-TAQ（商標）を含む。

10

【0033】

定義

「アンプリコン」なる用語は、PCRアッセイのDNA増幅の標的である核酸をいう。

「増幅活性」なるフレーズは、本明細書に開示するPCR条件下で核酸標的のコピーを増幅して、当該技術分野でよく知られているインターカレーション色素（例えば、エチジウムブロマイド）染色法によって識別可能である多数の増幅DNA産物を得るためのDNAポリメラーゼの機能的能力をいう。本明細書で用いる「均一PCRアッセイ溶液（homogeneous PCR assay solution）」なるフレーズは、不連続相の不存在に関して均一である溶液をいう。均一PCRアッセイ溶液は、ボルテックスミキサーまたは匹敵する混合装置を用いて反応容器の内容物を混合することによって典型的に調製するものである。heavy hot start PCRアッセイの内容においては、PCRアッセイ溶液はサーマルサイクリング・プログラムを開始する前は2の相からなる；すなわち、heavy hot start PCRアッセイのPCRアッセイ溶液はサーマルサイクリング・プログラムを開始する前に予め混合されず、均一PCRアッセイ溶液と考えない。

20

【0034】

本明細書で用いる「血液 - 耐性ポリメラーゼ」なるフレーズは、Klentaq-278 DNAポリメラーゼまたは完全長Taq DNAポリメラーゼのいずれかの変異体形態をいい、ここに変異体酵素は低温感受性であり、約3%（vol/vol）ないし約25%（vol/vol）まで範囲で全血を含んでいる均一PCRアッセイ溶液中で増幅活性を示す。「低温感受性」によって、変異体酵素は、DNA伸長反応が行われる正常な温度（ $\sim 72^\circ\text{C}$ ）に対して低い温度では、野生型Taq DNAポリメラーゼよりも低い増幅活性を示す。かかる変異体酵素は、hot start PCR条件下でDNA増幅活性を示す。Klentaq-278 DNAポリメラーゼの変異体形態には、Klentaq-278 DNAポリメラーゼの同一のアミノ酸配列（配列番号：2）をコードしないポリペプチドが含まれる。かかる変異体形態の例には、Klentaq-278 DNAポリメラーゼのアミノ酸配列に対して、少なくとも1のアミノ酸の欠失、さらなるアミノ酸の挿入、または少なくとも1のアミノ酸の置換が含まれる。完全長Taq DNAポリメラーゼの変異体形態には、完全長Taq DNAポリメラーゼの同一アミノ酸配列（GenBank受入れ番号J04639；配列番号：25）をコードしないポリペプチドが含まれる。かかる変異体形態の例には、完全長Taq DNAポリメラーゼのアミノ酸配列（配列番号：25）に対して、少なくとも1のアミノ酸の欠失、さらなるアミノ酸の挿入、または少なくとも1のアミノ酸の置換が含まれる。

30

40

【0035】

本明細書で用いる「より迅速に伸長するポリメラーゼ」なるフレーズは、2kbまで完了するのに約12秒ないし約50秒の範囲の伸長時間で行うPCRアッセイにおいて増幅活性を示すTaq DNAポリメラーゼの誘導体をいう。

【0036】

本明細書で用いる「生理学的に和合性の緩衝液」なるフレーズは、酵素活動の機能と和合性であって、細胞および生物学的巨大分子がそれらの生理学的および生化学的機能を保持することを可能にするいずれの溶液をもいう。典型的には、生理的に和合性の和合性の緩衝液には、緩衝剤（例えばTRIS、MES、 PO_4 、HEPES、その他）、キレート試薬（例えばE

50

DTA、EGTAなど）、塩（例えば、NaCl、KCl、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、NaOAc、KOAc、 $Mg(OAc)_2$ 他）、および所望により安定化剤（例えば、スクロース、グリセリン、Tween20他）が含まれるであろう。

【0037】

この説明を通していうポリメラーゼは、以下の構造および特性を有する：(1)Taqは、サーマス・アクアティカス（*Thermus aquaticus*）からの野生型、完全長DNAポリメラーゼ（GenBank受け入れ番号J04639）をいい、AmpliTaq Gold（登録商標）のようなその化学的に修飾した変形にも使用される；(2)Klentaq-235は、Taqの最初の235のアミノ酸のN - 末端欠失をいう。Klentaq-235は、DeltaTaq、Taq、KlentaqおよびKlentaq5という商品名でも知られている；(3)Klentaq-278はTaqの最初の278のアミノ酸のN - 末端欠失をいい（Klentaq-278は、「Klentaq1」または「KT-1」または野生型Klentaq1とも称される）をいい、米国特許第5,436,149号の特許請求の範囲1-5項に記載されている；(4)Klentaq6（KT-6と略される）は、2のアミノ酸変化を有するKlentaq-278をいい；(5)Klentaq7（KT-7と略される）は、3のアミノ酸変化を有するKlentaq-278をいう；(6)Klentaq10（KT-10と略される）は、3のアミノ酸変化を有するKlentaq-278をいう；Klentaq11（KT-11と略される）は、4のアミノ酸変化を有するKlentaq-278をいう；Klentaq12（KT-12と略される）は、4のアミノ酸変化を有するKlentaq-278をいう；FL-10は、3のアミノ酸変化を有する完全長Taqポリペプチドをいう；および、FL-12は、4のアミノ酸変化を有する完全長Taqポリペプチドをいう。関連するTaqポリメラーゼ変異体のこれらのコドン変化は、表I中で省略形に要約する。

10

20

【0038】

【表 1】

表I. Taq DNAポリメラーゼ変異体におけるコドン変化

配列 番号: ¹	名称	DNA変化 ² <野生型>nuc<変異体>	コドン変化	アミノ酸 変化 ²	表現型 ³
3 4	KT-6	A2119C; (1285) A2123T; (1289)	ATTからCTT; GAGからGTG	I707L; (429) E708V (430)	CS BR
5 6	KT-7	G1876A; (1042) A2119C; (1285) G2122T/A2123G (1288) (1289)	GAGからAAG; ATTからCTT; GAGからTGG	E626K; (348) I707L; (429) E708W (430)	CS CS BR*, FAST*
19 20	KT-10	G1876A; (1042) A2119C; (1285) G2122A (1288)	GAGからAAG; ATTからCTT; GAGからAAG	E626K; (348) I707L; (429) E708K (430)	CS CS BR
21 22	KT-11	G1876A; (1042) G1945A; (1111) A2119C; (1285) G2122A/A2123C (1288) (1289)	GAGからAAG; GTCからATC; ATTからCTT; GAGからTCG	E626K; (348) V649I; (371) I707L; (429) E708S (430)	CS FAST CS FAST
23 24	KT-12	T1826C; (992) G1876A; (1042) A2119C; (1285) G2122T/A2123T (1288) (1289)	CTGからCCG; GAGからAAG; ATTからCTT; GAGからTTG	L609P; (331) E626K; (348) I707L; (429) E708L (430)	BR*, FAST* CS CS BR*, FAST*
27 28	FL-10	G1876A; A2119C; G2122A	GAGからAAG; ATTからCTT; GAGからAAG	E626K; I707L; E708K	CS CS BR
29 30	FL-12	T1826C; G1876A; A2119C; G2122T/A2123T	CTGからCCG; GAGからAAG; ATTからCTT; GAGからTTG	L609P; E626K; I707L; E708L	BR*, FAST* CS CS BR*, FAST*

10

20

30

40

¹ 奇数および偶数の配列番号は、各々、配列表に図示する核酸およびポリペプチド配列をいう。² 左側の上段（コドン）の野生型（「WT」）、右側の変異体（「MUT」）塩基、核酸

およびポリペプチドをコードする完全長Taq DNAポリメラーゼ（本明細書中、各々、配列番号：25および26、GenBank受け入れ番号J04639に開示）に対する数字である変化の数字ポジション（「nuc」）；括弧内の数字は対応するKlentaq-278配列ポジションをいう（配列番号：1および2、各々、米国特許第5,436,149号に開示）

³この突然変異がその親に加えられた場合に付与される表現型；CS、低温感受性；BR（血液-耐性）；FAST、迅速なDNA伸長。

*KT-7、KT-12およびその対応するFL-バージョンの場合においては、BRおよびFASTの両方の表現型が存在し、これらの変化の可能な二重の効果が予想される。各突然変異を個々に試験すれば、表現型間の連鎖が明らかになるであろう。

【0039】

接尾辞「LA」は「LongおよびAccurate」を意味し、米国特許5,436,149の特許請求の範囲1-16項およびBarnes（1994）の後、熱安定性DNAポリメラーゼの混合物をいう。主要成分は、通常TaqまたはKlentaq1である。微量成分は、通常、Pfuポリメラーゼ、Pwuポリメラーゼ、VentポリメラーゼまたはDeep Ventポリメラーゼのような古細菌DNAポリメラーゼである。

【0040】

KlentaqLAは、市販の酵素Klentaq1：Deep Ventの体積での47:1の混合物である。テキストに注記されているように、この混合物は24:1まで修飾し得る。商業的に分配したKlentaq1は商業的に分配したDeep Ventよりも約15-20倍より濃縮されているため（正確な比）、単位またはタンパク質によっては、ほぼ15-20倍より高い、すなわち705:1または360:1である。

【0041】

TaqLAはTaq：Deep Ventの47：1の混合物、またはTaq：Pfuの16：1の混合物、または「TaqPlus」として商業的に知られているTaq：Pfuの非特定の混合物である。

【0042】

制御配列は、特定の宿主生物で作動可能に結合したコード配列の発現を可能にするDNA配列である。原核生物制御配列は、プロモーター、オペレーター配列、およびリボソーム結合部位を含む。真核生物細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用する。

【0043】

「反応容器」なるフレーズは、生物学的、生化学的、または化学的を行うために使用し得るいずれの容器もいう。PCRアッセイの内容においては、反応容器は、典型的なDNA増幅反応の間に行われる温度に耐え得るいずれの好適な容器である。好ましくは、PCRに使用する反応容器は、閉じ部と嵌合するチューブであり、ここにチューブおよび閉じ部は両方ともポリプロピレンまたは当該技術分野で通常使用される同様の物質のようなポリマー材料でできている。

【0044】

「単離された核酸分子」なるフレーズは、天然で見出される集合物から精製され、少なくとも1の汚染核酸分子から分離される。

【0045】

「単離されたポリペプチド分子」なるフレーズは、天然で見出される集合物から精製され、少なくとも1の汚染ポリペプチド分子から分離される。

【0046】

「精製されたポリペプチド」なるフレーズは、クーマシーブルーまたは銀染色を用いて非還元または還元条件下でSDS-PAGEによって80%を超える均質性まで精製されたポリペプチド分子をいう。単離されたポリペプチドは、遺伝子工学的に作製した細胞において異的に発現され、またはイン・ビトロ(in vitro)で発現されるものを含む。通常、単離されたポリペプチドは、少なくとも1の精製工程によって調製する。

【0047】

図面の簡単な説明

10

20

30

40

50

図1は、阻害量の血液の存在下で行うKlentaqポリメラーゼの異なる形態を用いたPCRアッセイの結果を図示する（Klentaqの40の変異体および野生型形態）。クローンKT-6およびKT-7は、10%のヒト全血の存在下で添加したプラスミドテンプレートから1.65kbp標的DNAを増幅することができた；

【 0 0 4 8 】

図2Aは、増加する量のヒト全血（レーン1：0%；レーン2：5%；レーン3：10%；レーン4：15%）の存在下でKlentaqの2の変異体形態（KT-6およびKT-7）を用いて全血からの直接的な0.32kbp内在性標的DNAのPCR増幅の結果を図示する；

【 0 0 4 9 】

図2Bは、図面の上方に示すように、Klentaqの2の変異体形態（KT-10およびKT-12）を含む均一PCRアッセイ溶液中の全血（vol/vol）の示したパーセンテージの存在下で0.32kbp内在性ヒト・ジストロフィン（Dystrophin）遺伝子断片の増幅に向けられたPCRアッセイの結果を図示する；

【 0 0 5 0 】

図2Cは、図面の上方に示すように、Klentaqの2の変異体形態（KT-10およびKT-12）を含む均一PCRアッセイ溶液中の全血（vol/vol）の示したパーセンテージの存在下で1.1kbp内在性CCR5遺伝子断片の増幅に向けられたPCRアッセイの結果を図示する；

【 0 0 5 1 】

図3Aは、血液 - 不活性な商業的なTaq酵素（JumpStart（商標）Taq（Sigma）、AmpliTaq Gold（登録商標）（Applied Biosystems）およびEx Taq（商標）（Takara））と比較した完全長Taq DNAポリメラーゼ（FL-10）の血液 - 耐性突然変異体形態を用いた均一PCRアッセイ溶液中の示した量の全血（vol/vol）の存在下で内在性ヒト・ジストロフィン遺伝子の0.32kbp断片、内在性ヒトCCR5遺伝子の1.1kbpおよび2.5kbp断片、またはヒト組織プラスミノゲン活性化因子（TPA）遺伝子断片の増幅に向けられたPCRアッセイの結果を図示する（「0」で示すレーンは血液不存在下で行ったPCRアッセイ、「0+」で示すレーンは10ngのヒトDNAの存在下で行ったPCRアッセイを示す）；

【 0 0 5 2 】

図3Bは、FL-12およびZ-TAQ（商標）（Takara）Taq DNAポリメラーゼを使用して、示したパーセンテージ（vol/vol）（図の下方に示すように）の全血を含有する均一PCRアッセイ溶液の反応における1.1kbp内在性CCR5ヒト遺伝子断片（矢印で示す）のDNA増幅の結果を図示する；

【 0 0 5 3 】

図4Aは、Klentaq1ポリメラーゼ（レーン1）、2の変異体Klentaqポリメラーゼ（KT-6（レーン2）およびKT-7（レーン3））およびもう1の市販のTaqポリメラーゼ（レーン4）を含有する反応物についての伸長時間の関数としての1.65kbp標的DNAのPCR増幅の結果を図示する。伸長時間はパネルの下方に示す；

【 0 0 5 4 】

図4Bは、変異体Klentaqポリメラーゼ（KT-7）および最高の先行技術伸長速度を有するDNAポリメラーゼ（Z-TAQ（商標））を含有する反応物についての在外性テンプレート濃度および伸長時間の関数としての1.65kb標的DNAのPCR増幅の結果を図示する。添加した核酸標的量は以下の通り：0.5ng（レーン1）；0.25ng（レーン2）；0.125ng（レーン3）；および0.06ng（レーン4）。増幅時間は以下の通り：60秒（上方パネル）；15秒（中央パネル）；および12秒（下方パネル）；

【 0 0 5 5 】

図4Cは、30秒に短縮した増幅工程を有するPCRサイクルを用いて行った変異体Klentaq DNAポリメラーゼKT-7（レーン1）、KT-11（レーン2）またはKT-12（レーン3）、野生型Klentaq DNAポリメラーゼ（レーン4）、変異完全長Taq DNAポリメラーゼFL-12（レーン5）、またはZ-TAQ（商標）（Takara；レーン6）のいずれかを用いた1.65kbp標的DNA（矢印で示す）のPCR増幅の結果を図示する；

【 0 0 5 6 】

10

20

30

40

50

図5Aは、全血存在下、サーマルサイクリング・プログラムを開始する前に反応試料の異なる前処理条件下で、KT-1（配列番号：2）、KT-6（配列番号：4）およびKT-7（配列番号：6）を用いて行ったheavy hot start PCRアッセイの結果を図示する。アスタリスクは、ボルテックス攪拌によって重いおよび軽い一定の体積を有する成分層、すなわち均一PCRアッセイ溶液を含み、本明細書に記載するheavy hot start法に付していない反応物、が前混合された反応容器を示す。レーン1-13、15および17はヒトCCR5遺伝子からの1.1kbp標的の増幅に向けられたPCRアッセイであり、一方レーン14、16と18はヒトCCR5遺伝子からの2.5kbp標的の増幅に向けられたPCRアッセイである；

【0057】

図5Bは、サーマルサイクリング反応を開始する前に混合されていない図5Aの反応混合物9-14からのPCRアッセイチューブの例を図示する（非-heavy hot start反応；反応番号11および12）；

【0058】

図6は、全血中に存在する細胞のヒトCCR5遺伝子からの0.5kbp標的のheavy hot start PCR増幅の結果を図示する。反応は、全血不存在下（「0」によって示す）または血液不存在下および10ngのヒトDNAの存在下（「0+」によって示す）、各レーン下方に示すパーセンテージで下層中の全血の存在下で行った（vol/vol；両方の層の総体積に調整）；

【0059】

図7は、Deep Ventポリメラーゼ不存在下（レーン1-3および7-9）またはDeep Ventポリメラーゼ存在下（レーン4-6と10-12）、KT-1（配列番号：2）、KT-6（配列番号：4）またはKT-7（配列番号：7）のいずれかを用いた、2ngのゲノムDNA由来（「DNA」とする）または3%の全血（vol/vol）由来（「血液」とする）のヒトCCR5遺伝子からの2.5kbp標的の増幅に向けられたPCRアッセイの結果を図示し、ここにDeep Ventポリメラーゼに対するKT酵素の比は約1に対して360である。

【0060】

詳細な説明

本発明は、特定のN末端欠失を運ぶTaqポリメラーゼが全血に通常になく耐性であり、それが、ヒト血液からの核酸標的の分析PCRアッセイにおける使用に理想的に好適になるという発見を利用する。さらに、血液インヒビターに対してなおより高い耐性を有する完全長Taq DNAポリメラーゼの突然変異体（または複数の突然変異体）を開発し、それらは、少なくとも約20-25%の血液または血液画分の等価物の存在下で完全に機能的のままである。血寛耐性のこのレベルは、既存の熱安定性DNAポリメラーゼのレベルを上回る（そして、物理学的な凝集に起因してPCRで実際的または簡便に取扱い得る血液の量を上回りさえする）。さらに、血液インヒビターに対する高い耐性を示す突然変異体は、より迅速な伸長速度を有するものと同定された。これらの新規な酵素の使用は、かかるテストをより敏感で無駄がなくするだけでなく、臨床および法医学試験の実行を単純化および加速することが期待される。最後に、本発明は、全血からの試料とこれらのポリメラーゼを用いる、DNA増幅特異性を高める方法を提供する。これらのTaqポリメラーゼ変異体およびそれらの使用の方法を、以下に記載する。

【0061】

血液阻害に対して非常に耐性であるKlentaq変異体の同定

Klentaq1ポリメラーゼ（配列番号：1（核酸）および配列番号：2（ポリペプチド））は、完全長（832のアミノ酸）酵素から278のアミノ酸のN末端欠失を運ぶ、Taqポリメラーゼの改善された、より強いバージョンである。Klentaq1は、Taqよりもより高い忠実度およびより大きな熱安定性を示す。ポリメラーゼを血液産物の存在下で行うPCRアッセイにおいて使用する場合、Klentaq1はTaqよりもより小さい程度で阻害される。例えば、精製されたKlentaq1酵素は、反応混合物中の約5%の全血（vol/vol）の存在下で核酸標的を容易に増幅する。これは予期せぬ結果である。完全長Taq酵素が反応混合物中の約0.004%ないし約0.2%の全血の濃度範囲（vol/vol）で完全に阻害されるからである。Taq（それはKlentaq1を生成する）のN末端欠失と酵素の血液耐性特徴との間に相関が存在することは報

告されていない。

【0062】

いくつかの変異体Klentaqクローンを、全血に耐えるその能力についてPCRアッセイによって分析した。約40の突然変異を誘発し、なおPCR機能的であるKlentaqクローンを構築し、約10%ヒト全血 (vol/vol) を含有するPCRアッセイ混合物中で試験した。これらの40のクローンは低温感受性であり、またはその酵素産物が低温感受性表現型を示すクローンの突然変異体である。さらなる変異体クローンの低温感受性は、いまだ測定されていない。意外なことに、この小さな収集物の2の変異体、KT-6 (配列番号: 3 (核酸); 配列番号: 4 (ポリペプチド)) およびKT-7 (配列番号: 5 (核酸); 配列番号: 6 (ポリペプチド)) は、これらの条件下において残りのクローンおよび野生型Klentaq1タンパク質を明らかに上回った (図1)。

10

【0063】

これらの結果は、増加する量の全血の存在下でPCRアッセイを行うことによって確認した。図2Aに示すように、クローンKT-6およびKT-7は、全血の存在下で機能的に活性のまま、いずれのDNA精製工程なしに、約15%のヒト全血 (vol/vol) を含有する反応物に存在する血液細胞から内在性遺伝子標的を直接的に増幅することができた。PCRアッセイにおけるわずか1%ほどの全血 (vol/vol) の存在でも、Taq (Roche) に対して阻害的であった (実施例4を参照されたい)。Klentaq-278の2のさらなる変異形態、クローンKT-10 (配列番号: 19 (核酸) および配列番号: 20 (ポリペプチド)) およびKT-12 (配列番号: 23 (核酸) および配列番号: 24 (ポリペプチド)) も、全血試料から内在性遺伝子標的を増幅する能力を示した (図2Bおよび2C)。

20

【0064】

前述の結果は、全血をスクリーニングアッセイに直接的に用いて、血液により耐性であるKlentaq-278の変異体を同定することができることを明らかにしている。本発明は、反応混合物中に約5%の全血ないし約25%の全血を含有するPCRアッセイにおいて活性を示すKlentaq-278 DNAポリメラーゼの変異体形態を部分的に描く。より好ましくは、本発明は、反応混合物中に6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%および19% (vol/vol) の全血を包含する、反応混合物中に約5%の全血から約20% (vol/vol) の全血を含有するPCRアッセイにおいて増幅活性を示すKlentaq DNAポリメラーゼの変異体形態を描く。

30

【0065】

血液阻害に非常に耐性である完全長Taq突然変異体の誘導

Klentaq-278の変異体形態はKlentaq-278よりも全血PCRアッセイにおいてより強いポリメラーゼであったため、本発明者らは、この切頭Taqポリペプチドの構造内さらなるアミノ酸変化が、完全長Taq酵素に取り込まれた場合に、同様の血液 - 耐性活性を付与し得るかもしれないと考えた。この仮説を検証するために、関連するコドン置換を含むKT-10遺伝子の領域 (配列番号: 19) を、標準的な組換えDNA法を用いて野生型完全長Taq (配列番号: 25 (核酸) および配列番号: 26 (ポリペプチド)) の背景に再導入し、これをFL-10 (配列番号: 27 (核酸) および配列番号: 28 (ポリペプチド)) と命名した。得られたポリペプチドを、変化する量の全血 (0%、10%または20% (vol/vol)) を含有する均一PCRアッセイ溶液中で、他の市販のTaqポリメラーゼとともに試験した。図3Aに示すように、FL-10は、JumpStart (商標) Taq、AmpliTaq Gold (登録商標) またはEx Taq (商標) と比較して、顕著に強い、血液 - 耐性の、DNA増幅活性を示している。

40

【0066】

FL-10について見出したのと同様に、高い血液 - 耐性のDNA増幅活性を示す完全長Taq DNAポリメラーゼのもう1の変異体形態を同定した。この変異体は、標準的な組換えDNA法を用いて、KT-12ポリメラーゼ (配列番号: 23) に血液 - 耐性のDNA増幅活性を付与する、関連したコドン置換を含むKT-12の領域 (配列番号: 23) を、野生型完全長Taq (配列番号: 25) の背景にクローニングして関連する変異体Taqポリメラーゼを得ることによって誘導し、FL-12 (配列番号: 29 (核酸) および配列番号: 30 (ポリペプチド)) と命名した。

50

この完全長Taqポリメラーゼ変異体は、KT-12ポリメラーゼ変異体（配列番号：24）について観察された活性を映す血液 - 耐性DNA増幅活性を示した（図3B）。これらの知見は、血液 - 耐性DNA増幅活性をコードするいずれのKlentaq - 278変異体の領域が、野生型遺伝子背景の文脈に再導入された場合に、完全長Taq DNAポリメラーゼに同様の特性を付与することの事実を提供している。

【 0 0 6 7 】

FL-10およびFL-12 Taqポリメラーゼの両方が高い血液 - 耐性DNA増幅活性を示したが、FL-12 Taqポリメラーゼのみがより迅速な伸長活性および高い血液 - 耐性活性を示した。これらの2の特性は別々の特質であるので、本発明者らはより迅速な伸長活性が高い血液 - 耐性活性と相関するか否かを試験した。本明細書に記載するように、Z-TAQ（Takara）はTaq DNAポリメラーゼと比較して5倍より速い伸長速度を示す完全長Taq DNAポリメラーゼの所有権形態である。酵素の製造業者がZ-TAQ（商標）を所有権製品と考えているという事実のために、その強化された伸長活性に寄与するZ-TAQ（商標）の変化の性質は当該技術分野において知られていない。この実験のために、FL-12 TaqおよびZ-TAQ（商標）を、それらのそれぞれの血液 - 耐性DNA増幅活性について評価した。図3Bに示すように、かなりの量の全血（20%（vol/vol））を含有する反応物においては、FL-12酵素がZ-TAQ（商標）よりもより強かったが、FL-12およびZ-TAQ（商標）は両方とも、均一PCRアッセイ溶液中で血液 - 耐性DNA増幅活性を示した。

【 0 0 6 8 】

前記のFL変異体（すなわち、FL-10およびFL-12）をZ-TAQ（商標）から区別する1の機能的特徴は、FL変異体が低温感受性の表現型を示すのに対し、Z-TAQ（商標）は示さないことである。前記のFL変異体をZ-TAQ（商標）から区別するさらに1の機能的な特質は、FL変異体が高温開始条件下でDNA増幅を行うことができるのに対し、Z-TAQ（商標）ポリメラーゼはその能力を欠いていることである。したがって、全血PCRにおいてZ-TAQ（商標）にその異常に高い活性を与えるいかなる化学的または遺伝的特質であっても、FL変異体を血液 - 耐性にするのは同一の修飾ではない。この開示の目的のために、血液 - 耐性DNAポリメラーゼは3の特質を有すると定義される：(1)野生型Taq DNAポリメラーゼと比較して、PCRアッセイにおいて低温感受性の表現型を示す；(2)hot start PCR条件下でDNA増幅活性を示す；および、(3)約3%ないし約25%（vol/vol）の範囲の全血を含むPCRアッセイにおいてDNA増幅活性を示す。

【 0 0 6 9 】

前述の結果は、全血をスクリーニングアッセイに直接用いて血液に対してさらにより抵抗性であるKlentaq-278の変異体を同定することができること、およびこの方法が血液 - 耐性DNA増幅活性を示す完全長Taqの変異体を同定することまで容易に拡張し得ることを明らかにしている。本発明は、一部、反応混合物中に約5%の全血から約25%の全血を含有するPCRアッセイにおいて活性を示す完全長Taq DNAポリメラーゼの変異体形態を描く。より好ましくは、発明は、反応混合物中に6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%および19%の全血（vol/vol）を含む、反応混合物中に約5%の全血ないし約20%の全血（vol/vol）を含有するPCRアッセイにおいて増幅活性を示す完全長Taq DNAポリメラーゼの変異体形態を描く。

【 0 0 7 0 】

血液 - 耐性Taq DNAポリメラーゼを同定するための現在好ましい手順は、変異体の収集時に2のスクリーニング作業を行うことである：(1)修飾したPCRアッセイにおいて低温感受性の表現型を示す変異体を同定すること；に続いて、(2)全血PCRアッセイにおいて、DNA増幅活性について低温感受性のTaq DNAポリメラーゼ変異体のサブセットを特徴づけること。なおより好ましくは、所定の活性を有するDNAポリメラーゼ変異体を得るためにコンパートメント化した自律複製（compartmentalized self-replication）と呼ばれる選択手順（25、26）の採用を用いて血液 - 耐性ポリメラーゼを最初に同定することができる。予言例で説明するように、Taq DNAポリメラーゼ変異体は、最初にその血液 - 耐性活性について選択し、それにつづいて、二次的にその低温感受性表現型（例えば、hot start PCR

条件下のDNA増幅活性)を特徴付けするスクリーニング手順を行う。血液 - 耐性であって低温感受性の表現型を示す全ての変異体は、本明細書に定義する血液 - 耐性ポリメラーゼのグループのメンバーを含む。

【0071】

より迅速なDNA伸長速度を有するKlentaqおよびTaq変異体の同定

野生型Klentaq-278ポリメラーゼについて判明しているよりも迅速なDNA伸長速度を示す「急速」熱安定性DNAポリメラーゼ変異体が、発見されている。PCRの間にDNA拡大時間を低下することによってある種のPCR条件が決定し、そこでは、サイクルにおける伸長工程が野生型Klentaq-278の酵素による首尾よい増幅を制限するようになる。標的としてKlentaq-278遺伝子(1.65kb長)を使用する場合、必要な最小限の増幅時間は約1分であった。例えば、Klentaq-278ポリメラーゼは、50秒の増幅時間を用いる条件下で行うPCRアッセイにおいては増幅活性を所有していなかった。同様の結果がTaq酵素を用いて得られた。

【0072】

約40の機能的変異体Klentaqクローンを、伸長速度の関数として評価した。30秒の増幅時間を最初にPCRアッセイで用い、これは野生型KlentaqおよびAmpliTaq Gold(登録商標)について効果的でないことが判明した条件を反映している。興味深いことに、変異体KT-6(配列番号:4)およびKT-7(配列番号:6)は、このより短い増幅時間でもって標的を効率的に増幅することができた(図4)。2の変異体酵素のこの特徴はさらなる試験において確認され、そこでは、それらのうちの1(クローンKT-7(配列番号:6))が20秒の増幅時間で増幅産物を得た(図4A)。この酵素の特徴をさらに特徴付けて、15および12秒の増幅時間でさえ良好な増幅産物を得た(図4B)。顕著なことに、選択された変異体は、これらの低い増幅時間において、Z-TAQ(商標)(Takara)を完全に上回った(図4B、中央および下方のパネル)。同様の結果は、Klentaq-278、クローンKT-11(配列番号:21(核酸)および配列番号:22(ポリペプチド))の2のさらなる変異体形態およびクローンKT-12(配列番号:23(核酸)および配列番号:24(ポリペプチド))を用いて得られた(図4C)。このことは注目すべきである。Z-TAQ(商標)、所有権Taq酵素は市販されている最も迅速なDNA伸長PCR酵素のうちの1であるからである。

【0073】

Klentaq-278の変異体形態のいくつかはKlentaq-278について観察されるよりもより迅速に伸長するポリメラーゼであったため、本発明者らは、この切頭ポリペプチドの構造内のさらなるアミノ酸変化が完全長Taq酵素に取り込まれた場合に同様のより迅速な伸長活性を付与し得るかもしれないと考えた。この仮説を試験するために、関連するコドン置換を含むKT-12遺伝子(配列番号:23)の領域を、標準的な組換えDNA法を用いて野生型完全長Taq(配列番号:25(核酸)および配列番号:26(ポリペプチド))の背景に再導入して変異体Taq遺伝子を得、得られた変異体Taq遺伝子をFL-12(配列番号:29(核酸)および配列番号:30(ポリペプチド))と命名した。得られたポリペプチドを発現させ、増幅時間が30秒に減少されたPCR条件を用いる均一PCRアッセイ溶液中で他の市販のTaqポリメラーゼと結合して試験した。図4Cに示されるように、FL-12は、Z-TAQ(商標)と比較して、顕著に強く、より迅速に伸長するDNA増幅活性を示した。

【0074】

これらの結果は、Klentaq DNAポリメラーゼおよび完全長Taq DNAポリメラーゼの伸長速度が突然変異導入によって改善し得ることを証明している。本発明は、一部、Klentaqの変異体形態およびそれぞれの酵素が首尾よい増幅活性を表示できなかった条件下でのPCRアッセイにおいて増大した伸長速度を示すKlentaqおよび完全長Taq DNAポリメラーゼの変異体形態を描く。好ましくは、本発明は、伸長工程が野生型Klentaq-278ポリメラーゼとの反応について時間を制約している条件下で、PCRアッセイにおける増幅活性を示す、Klentaq-278および完全長Taq DNAポリメラーゼの変異体形態を描く。なおより好ましくは、本発明は、本明細書に開示したおよび15秒、18秒、20秒、22秒、24秒、25秒、26秒、28秒、30秒、32秒、34秒、36秒、38秒、40秒、42秒、44秒、45秒、46秒および48秒を包含する約12秒ないし約50秒の範囲の伸長時間を有するPCR条件下で増幅活性を示すKlentaq-278お

よび完全長Taq DNAポリメラーゼの変異体形態を描く。

【 0 0 7 5 】

heavy hot start PCR手順および全血PCRへの適用

本明細書に記載する新たなプロトコルは、ワックスまたは抗体を使用せず、サーマルサイクリング・プログラムが開始されると操作を必要としない。このプロトコルは、PCRアッセイのセットアップの時点で2の水層を使用する。最終的な体積の約1/10ないし約1/4を表す下層は、反応に必要であるdNTPおよびマグネシウム(II)を含む。上層は、ポリメラーゼ酵素、プライマー、および核酸標的を含む。両方の層とも、増幅に必要な濃度他の緩衝成分の等しい濃度を含む。下層は、約10-20% (wt/vol) のスクロース、ソルビトールまたはDMSO (または、約10-20までPCRと和合性である同様の試薬の好適な組合せ) のようなそれを重くする構成成分も含む。

10

【 0 0 7 6 】

所望により、下層により大きな密度を付与する他の成分を、前記した項目に代えて用いるまたはそれを補充してもよい。例えば、Baskaranおよび共同研究者は、1.4Mのベタイン、5%のDMSOが高GC含量を有する核酸標的を含むPCRに良好であることを証明した(36)。これらの結果は、2.8Mのベタイン、10%のDMSOを含むことがMgCl₂およびdNTPを含有する下層のheavy start成分として適することを示唆している。所望によりおよび日常的に、0.05%のクレゾールレッドの形態の色も、重い下層に含まれる。

【 0 0 7 7 】

全血を含む反応において、より大きな密度を下層に付与する成分の添加および着色剤は必要でない。全血が密度を前記の重い層成分の密度に近い密度を下層に付与するため、および、血液のヘモグロビンが色を提供するため、これらの特徴は余分である。全血を含有する反応物においては、テンプレートは重い層に含まれ、反応物の他の全ての成分は上層に存在する。重い層中の全血の使用に適当な体積の範囲は、1%~25%を含む。

20

【 0 0 7 8 】

酵素またはプライマーのような血液の幾つかの反対作用成分がPCR反応の種々の成分を攻撃する。それでも、反対作用の成分は高温不安定であるかもしれない。このように、比混合下層として注意深く血液を添加することは、推定される感受性PCR反応成分との重要な接触なしに、それを添加することを許容する。90-95 °Cの通常のPCRサーマルサイクリング温度まで加熱すると、変性し、適所 (in place) に凝集するようである血液成分の多くはサイクリング後は茶色に見え、加熱によって不活性化される前にPCR成分と混合しなかったか、またはPCR反応成分とはっきりと混合することはなかったかのいずれかであった。それにもかかわらず、ゲノムDNAテンプレート、およびおそらくウイルスおよび他の微生物ゲノムのような他の標的テンプレートは、対流混合によって増幅反応に適時に利用できるようになる。

30

【 0 0 7 9 】

反応機構の間に熱不安定なインヒビターを分離するこの原理は、血液を含まない、複合的または環境試料の他の状況に適用し得る。

【 0 0 8 0 】

DNAポリメラーゼカクテルおよび全血試料のPCR反応容器への添加の順序は、heavy hot start PCR手順への重大な態様ではない。むしろ、heavy hot start PCR反応の機構への重要な態様は、サーマルサイクリングを開始する前に可能な限り個々の層の小さな混合を避けるように、DNAポリメラーゼカクテルおよび下層の、重い溶液 (例えば、全血試料) をPCR反応容器へ注意深く添加することである。かくして、下層の、重い溶液をPCR反応容器に最初に添加し、つづいて上敷き層としてのDNAポリメラーゼカクテルを注意深く添加することができる。しかし、より好ましくは、DNAポリメラーゼカクテルをPCR反応容器に最初に添加し、つづいて下敷き層としての下層の、重い溶液をPCR反応容器に注意深く添加する。

40

【 0 0 8 1 】

好ましい形態において、層の混合は、サーマルサイクラーが反応物を加温および冷却し

50

てPCRプロセスを開始した後に、拡散および/または対流によって起こる。ボルテックス攪拌処理によって実験的に予め混合した全血を含有する層化した反応チューブは、反応成分の耐性に依存して、PCR増幅活性を支持することが不定にできず、最も感受性の成分はDNAポリメラーゼ酵素であることが発見された(図5A)。図5Bは、反応の前には分離した層を含み、反応の間に層を混合することを含むPCRアッセイチューブの例を図示する。

【0082】

分離した層の成分の組合せは種々の順列で処方化し得ることは、当業者によく理解される。本発明において合致させなければならない基準は、ポリメラーゼを、増幅反応に必須の少なくとも1の成分(例えば、プライマー、および/またはテンプレート、および/または Mg^{2+})から分離しなければならないこと、下層が溶液により大きな密度を付与する成分を含むこと、および、2の層の混合がPCRアッセイ条件の再構成を生じて増幅活性を許容することのみである。

10

【0083】

スクロース、ソルビトールまたはDMSOのような重い試薬を含むことは、核酸標的の融解温度をわずかに低下させるので、PCRサイクルの変性工程はこの効果を補うために約1-2低下させなければならないかもしれない。

【0084】

Taq DNAポリメラーゼの変異体形態は、配列表に図示する核酸(配列番号:25)によってコードされる野生型ポリペプチド(配列番号:26)と比較して少なくとも1のアミノ酸変化を含む完全長Taq DNAポリメラーゼを含む。。かかるTaq DNAポリメラーゼの変異体形態の例は、FL-10(配列番号:28)およびFL-12(配列番号:30)を含む。本発明で使用するTaq DNAポリメラーゼのさらなる変異体形態は、配列表に図示する配列を有する核酸(配列番号:1)またはそのアミノ酸をコードする他のコドンによってコードされるアミノ酸配列(配列番号:2)、またはそのアミノ末端に数個の余分のコドンを有するアミノ酸を含む。また、本発明は、完全長TaqまたはKlentaq-278をコードする変異体または変異型遺伝子も使用し、それらの塩基はいずれも表1-6および8-19に示す対応する塩基から、完全長TaqおよびKlentaq-278の活性および生理学的機能を維持するタンパク質をいまだコードしつつ、またはN-末端におけるKlentaq-278のわずかにより長いかより短いバージョンをいまだコードしつつ、変化してもよい変異体または変異型遺伝子も使用する。さらに、補完的な核酸断片を含む、配列がちょうど記載したものに対して相補的である核酸が含まれる。さらに、構造が化学的修飾を含む核酸または核酸断片、またはそれらの相補体も含まれる。かかる修飾には、非限定的な例によって、修飾塩基、および糖リン酸エステル鎖が修飾または誘導化された核酸が含まれる。変異体または変異型核酸、およびそれらの成分においては、20%以上まではそのように変化していてもよい。

20

30

【0085】

また、本発明は、配列番号:1-6および19-24に対して、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98および99%の配列同一性を含む、配列番号:1-6および19-30に対して80-100%の配列同一性を有するポリペプチドおよびヌクレオチド、ならびにこれらのポリペプチドのいずれかをコードするヌクレオチドおよびこれらのヌクレオチドのいずれかの相補体の使用も含む。Klentaq1(配列番号:1)の場合においては、本発明はKlentaq1(配列番号:2)のオープンリーディングフレーム中に少なくとも1のコドン変化を含む変異体形態を含む。Taq DNAポリメラーゼ(配列番号:25)の場合においては、本発明はTaq DNAポリメラーゼ(配列番号:26)のオープンリーディングフレーム中に少なくとも1のコドン変化を含む変異体形態を含む。

40

【0086】

パーセンテージ配列同一性

本明細書中で同定したKlentaq-278コード核酸配列に関する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を一行に並べ、ギャップを導入し、必要な場合は最高のパーセント配列同一性を達成した後に、関心のあるKlentaq-278配列中のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセンテージと定義する。%核酸配列同一性を決定するための

50

アライメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign (DNASTAR) ソフトウェアのような公的に利用できるコンピュータソフトウェアを使用して、当業者の範囲内にある種々の方法で達成し得る。当業者は、比較する配列の完全長にわたる最大のアライメントを達成するために必要ないずれかのアルゴリズムを含む、アライメントを測定する適当なパラメータを決定することができる。同一の方法および原理は、2の配列を整列した場合に候補核酸配列中のTaq DNAポリメラーゼをコードする核酸配列に関する「パーセント (%) 核酸配列同一性」を確認するために当てはめる。

【0087】

ヌクレオチド配列を整列する場合、所定の核酸配列Dへの、との、または、に対する所定の核酸配列Cのパーセント (%) 核酸配列同一性 (別法として、それは、所与の核酸配列Cが、所与の核酸配列Dへの、との、またはに対するある種の%核酸配列同一性を有するまたは含むことと表すことができる) は、以下のように計算することができる；

10

$$\% \text{核酸配列同一性} = W/Z \cdot 100$$

[式中、

Wは、CおよびDの配列アライメントプログラムまたはアルゴリズムのアライメントによって同一マッチとスコアされたヌクレオチドの数であり、

ZはDのヌクレオチドの総数である]

【0088】

核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さと等しくない場合、DへのCの%核酸配列同一性はCへのDの%核酸配列同一性と等しくならないであろう。

20

【0089】

「パーセント (%) アミノ酸配列同一性」は、2の配列を整列した場合、候補配列中の開示されたKlentaq-278 DNAポリメラーゼポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一であるアミノ酸残基のパーセンテージと定義する。%アミノ酸同一性を決定するためには、配列は整列し、必要な場合は、ギャップを導入して最大%配列同一性を達成し；同類置換は配列同一性の部分として考慮しない。パーセント同一性を決定するアミノ酸配列アライメント手順は、当業者によく知られている。BLAST、BLAST2、ALIGN2またはMegalign (DNASTAR) ソフトウェアのようなしばしば公的に利用できるコンピュータソフトウェアを用いて、ペプチド配列を一行に整列する。当業者は、比較する配列の完全長にわたる最大のアライメントを達成するために必要ないずれのアルゴリズムを含む、アライメントを測定するための適当なパラメータを決定することができる。同一の方法および原理は、2の配列を整列した場合に候補配列中のTaq DNAポリメラーゼをコードするポリペプチド配列に関する「パーセント (%) アミノ酸配列同一性」を確認するために当てはめる。

30

【0090】

アミノ酸配列を整列する場合、所定のアミノ酸配列Bへの、との、または、に対する所定のアミノ酸配列Aのパーセント (%) アミノ酸配列同一性 (別法として、それは、所与のアミノ酸配列Aが、所与のアミノ酸配列Bへの、との、またはに対するある種の%アミノ酸配列同一性を有するまたは含むことと表すことができる) は、以下のように計算することができる；

40

$$\% \text{アミノ酸配列同一性} = X/Y \cdot 100$$

[式中、

Xは、AおよびBの配列アライメントプログラムまたはアルゴリズムのアライメントによって同一マッチとスコアされたアミノ酸残基の数であり、

YはBのアミノ酸残基の総数である]

【0091】

アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと等しくない場合、BへのAの%アミノ酸配列同一性はAへのBの%アミノ酸配列同一性と等しくならないであろう。

【0092】

50

本発明で使用する核酸分子、例えば配列番号：1、3、5、19、21、23、25、27または29またはこの前記のヌクレオチド配列の相補体は、標準的な分子生物学技術および提供された配列情報を用いて単離し得る。ハイブリダイゼーション・プローブとして配列番号：1、3、5、19、21、23、25、27または29の核酸配列の全体または一部を用いれば、標準的なハイブリダイゼーションおよびクロニング技術（29、30）を使用してKlentaq-278またはTaq遺伝子分子を単離することができる。

【0093】

PCR増幅技術を用いて、テンプレートおよび適当なオリゴヌクレオチドプライマーとしてサーマス・アクアティカス（*Thermus aquaticus*）ゲノムDNAを用いて、Klentaq-278またはTaqをコードするDNAを増幅することができる。さらにまた、Klentaq-278またはTaq遺

10

【0094】

Klentaq-278は米国特許第5,436,149号（31）の主題であり、それは出典明示して本明細書の一部とみなす。

【0095】

Klentaq-235は米国特許第5,616,494号（32）の主題であり、それは出典明示して本明細書の一部とみなす。

【0096】

医療応用

20

本発明の応用は、遺伝的な障害（例えばガン、血疾患、糖尿病、その他）および血液/骨の微生物因子（例えばウイルス、バクテリア、菌類、その他）によって引き起こされる疾患の存在および状態；多形性を用いる組織タイピング、および法医学的研究、のための全血試料の診断評価を含む。当業者であれば、これらの対象に指向された全血試料に対するPCRの応用を進歩させることに向けられた、本発明の血液 - 耐性ポリメラーゼおよび高伸長ポリメラーゼの有用性を認識するであろう。

【0097】

キット

また、本発明は、臨床的設定で、または、本発明の血液 - 耐性ポリメラーゼおよび高伸長ポリメラーゼを用いる全血試料の迅速なPCR用の単純化された一組のセットを許容する分野において利用し得るキットも予期する。キットは、典型的には、好適なオリゴヌクレオチドプライマー、PCR反応緩衝液成分、対照溶液、および好適なDNAポリメラーゼ、ならびにキットを使用するための指示書を含む。好ましいDNAポリメラーゼは、本明細書で定義した開示した血液 - 耐性ポリメラーゼ（例えば、血液 - 耐性であって低温感受性表現型を示すKT変異体）ならびにZ-TAQ（商標）酵素およびKT-1酵素（それぞれは各々、穏やかな血液 - 抵抗を示したが、低温感受性でない）を含む。

30

【0098】

実施例

実施例 1 血液 - 耐性変異体酵素活性についての突然変異導入したKlentaqクローンのスクリーニング

40

新しい変異体を機能的に特徴付けるためには、発現系から高度に精製された酵素を生成させることが望ましい。PEI処理、BioRex-70クロマトグラフィーおよびヘパリン-アガロース・クロマトグラフィーを含む手順は、クーマシー染色タンパク質ゲル（23）中の単一のバンドによって判定される均一性まで精製された、DNAを含まず、ヌクレアーゼを含まないKlentaq酵素を与えた。同精製手順は、低温感受性のKlentaq変異体の精製についても非常に良好に作動した（23）。この手順は、特定のクロマトグラフィー樹脂上の变化したアフィニティーおよび溶出プロファイルのような通常でない特徴を示す変異体ポリメラーゼの精製に適応するために容易に適合可能である。精製スキームにおける各工程の効率は、標準DNA取り込みアッセイによって簡単にモニターした。

【0099】

50

得られた変異体酵素の増幅活性は、種々の遺伝子標的のPCR増幅において広範囲に評価した。新しい酵素は、SYBRグリーン蛍光検出を用いて従来のPCRおよびリアル・タイムPCRの両方で評価した。これらの試験は、少なくとも約20%のヒト全血（非処置、EDTA処理またはヘパリン凝血防止処理）、血中IgGヘモグロビン画分等価物を含んでいた。所望により、全血に向けてポリメラーゼ変異体が示す異なる感度を、約5%の全血（vol/vol）から約25%の全血（vol/vol）までアッセイ混合物に添加する全血の増分量を増加させつつ増幅活性滴定実験を行うことによって評価した。

【0100】

図1は、Klentaq遺伝子が標的核酸を表した10%の全血（vol/vol）を含有する均一PCRアッセイ溶液を用いたPCRによって40のKT変異体を収集したスクリーニングの結果を図示する。PCRアッセイで使用したプライマーはKT1（配列番号：11）およびRevTaqH（配列番号：12）を含み、1.65kbpの標的断片の特定の増幅を生じた。

【0101】

図2Aは、反応物中に異なる量の全血（vol/vol）を含有する均一PCRアッセイ溶液を用いた典型的なPCRアッセイの結果を図示し、ここでは血液からの内在性ヒト遺伝子が標的核酸を表す。PCRアッセイにおいて使用するプライマーはDMDex21f（配列番号：13）およびDMDex21r（配列番号：14）を含み、それは内在性ヒトデュシェンヌ型筋ジストロフィー遺伝子（ジストロフィン）の0.32kbp標的断片の特定の増幅を生じた。

【0102】

Klentaq変異体酵素の血液 - 耐性特徴を確かめるために、多数の外在性および内在性試験遺伝子標的を使用した。2-3ngのプラスミドpWB254 DNAまたはヒトDNAを在外性標的として用いて、Klentaq遺伝子自体（1.65kb断片、プライマーKT1（配列番号：11）およびRevTaqH（配列番号：12））を用いて得た）またはヒトTPA遺伝子の4.3kb断片（プライマーTPAフォワード（配列番号：17）およびTPAリバース（配列番号：18）を用いて得た）を、それぞれ増幅した。内在性標的（血球に存在するDNAから）は、ヒト・ジストロフィン遺伝子の0.32kbのアンプリコン（プライマーDMDex21f（配列番号：13）およびDMDex21r（配列番号：14）およびヒトCCR5遺伝子の1.1kbまたは2.5kbのアンプリコン（プライマー対ccr5+1kb（配列番号：9）/CCR5-KOZ（配列番号：7）およびCCR5-2kb（配列番号：8）/ccr5deltaRT（配列番号：10）をそれぞれ用いて得た）。ヒト全血またはEDTA処理（4.8mMのEDTA）したヒト血液を、PCR（均一PCR構成）の前にPCRカクテルに0% - 20%の濃度で添加した。図2Bおよび2Cに図示するように、KT-10とKT-12変異体は少なくとも20%の全血中で簡単に標的を増幅した。野生型Taq酵素は、匹敵する条件下で増幅できなかった。内在性血遺伝子を検出する場合の変異体で得た増幅シグナルは遺伝子 - 用量 - 応答性であった。

【0103】

実施例2 完全長Taq DNAポリメラーゼ変異体は血液 - 耐性活性を示す

重要なことに、Klentaqの血液 - 耐性表現型に寄与するアミノ酸変化は、これらのアミノ酸変化を完全長遺伝子に取り込んだ場合、完全長Taq血液 - 耐性とするのにも十分であった。例えば、KT-10およびKT-12変異体のアミノ酸変化を完全長Taq遺伝子に取り込んで、類似するTaq変異体FL-10およびFL-12を創製した。図3A（FL-10について）および図3B（FL-12について）に示すように、両方の完全長Taq変異体は非常に高い耐性を血液阻害に示し、20%の血液を含有する均一PCR溶液中で内在性ヒト・ジストロフィンおよびCCR5遺伝子を首尾よく増幅した。これらの変異体の観察された高い血液耐性は、野生型Taqがわずかに0.1-0.5%の全血を含有する均一PCRアッセイ溶液中で典型的には不活性化されるという事実を考慮すると、Taq酵素の性質の劇的な変化を反映している。AmpliTaq Gold（登録商標）、JumpStart（商標）TaqおよびEx Taq（商標）を含む種々の商業的なTaq酵素は、試験した最も低い血液濃度でさえ内在性血液遺伝子を検出することができなかった。1の驚くべき例外は酵素Z-TAQ（商標）であった。それは5%および10%の血液で顕著な血抵抗性を示した；しかし、プライマー-ccr5+1kb（配列番号：9）およびCCR5-KOZ（配列番号：7）を用いた内在性CCR5遺伝子の1.1kbp断片を増幅するために20%の血液を含有する均一PCRアッセイ溶液中で使用した場合、FL-12ポリメラーゼ変異体はZ-TAQ（商標）を上回った（図3B）。

製造業者 (Takara) がその組成を所有権の秘密として維持しているので、その血液 - 耐性特性に寄与するZ-TAQ (商標) 酵素の分子変化はわかっていない。

【 0 1 0 4 】

実施例3 より迅速なDNA伸長速度を有する突然変異導入Klentaq変異体

ここでのスクリーニング要因は、単純に、野生型または先行技術酵素が作用を中止する時点を越えるPCRサイクルのDNA増幅工程を短縮することである。野生型Klentaqがそれ自体の遺伝子を増幅した場合、増幅効率は60秒の増幅工程においてかなり低かった (図4A、1分のレーン1)。別々の増幅時間を用いたさらなる試験は、Klentaqポリメラーゼが約50秒以下の拡張時間を用いる条件下で行ったPCRアッセイにおいて増幅活性を示さないことを示した (例えば、図4A、30秒および20秒のレーン1を参照されたい)。他方、変異体KlentaqクローンKT-7は、わずか約12秒の増幅工程を有する条件下のPCRアッセイにおいて同じ標的で増幅活性を示した (図4B、下部パネル)。迅速伸長変異体の評価のために、2kbのアンプリコン当たり20秒を上回らないPCRサイクルの増幅時間を使用した。KT変異体、KT-7 (配列番号: 6)、KT-11 (配列番号: 21) およびKT-12 (配列番号: 24) はKT-1 (配列番号: 2) より著しく迅速な伸長ポリメラーゼであったが、完全長Taq変異体、FL-12 (配列番号: 30) はZ-TAQ (商標) と比較して増大した伸長活性を示した (図4C)。これらの実験のために、KT1 (配列番号: 11) およびRevTaqH (配列番号: 12) を含む均一PCRアッセイ溶液を用いてPCRアッセイを行い、それはKlentaq1遺伝子から1.65kbp標的断片の特異的な増幅を生じた。

【 0 1 0 5 】

実施例4 重い液体成分の下敷きによって達成されるhot startは特定の増幅産物の収量を向上し得る - 「heavy hot start」増幅

この増幅手順により、PCRアッセイから向上した特異性および信頼性を得ることができる。ストラテジーは、以下に記載するように、全血を含むPCRアッセイにも敏感に反応する。2の好ましい形態において、反応混合物中に存在する Mg^{2+} およびdNTPの量において主に異なる2のheavy hot start混合物を開示する。Klentaq1およびKlentaqLAについての至適 Mg^{2+} およびdNTP濃度は、TaqおよびTaqLAについてよりも高いからである。これらのheavy hot start混合物は、4 にて少なくとも1ヶ月間保存することができる。

【 0 1 0 6 】

10 × TCAは、500mMのトリス-HCl、pH 9.2、160mMの硫酸アンモニウムである。トリス-HClストック溶液のpHをpH 9.2に調節した場合、アリコットのpHはを室温、水中の50mMの緩衝液濃度で測定した。1Mの $MgCl_2$ ストック溶液の濃度は、屈折計を用いて溶液の屈折率を測定し、例えばChemical Rubber CompanyによるTHE HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICSのような技術便覧中の屈折率 - 濃度データに参照することによって確認した。

【 0 1 0 7 】

KlentaqLAの重い混合物レシピは、dNTPの合計濃度よりも大きい、2.5mMの最終マグネシウム(II)陽イオン濃度を与えた。この重い混合物レシピは、以下の成分からなる: 100 μlの10 × TCA; 10mMのdATP、10mMのdGTP、10mMのdCTPおよび10mMのdTTPからなる100 μlのdNTP混合物; 140 μlの100mM $MgCl_2$ 、67 μlの0.75mM クレゾールレッド、4.25mMのトリスベース、400 μlの50%スクロースまたはソルビトール; および、1mlとするための193 μlの水。

【 0 1 0 8 】

TaqまたはTaqLAの重い混合物レシピは、dNTPの合計濃度よりも大きい、0.75mMの最終マグネシウム(II)陽イオン濃度を与えた。この重い混合物レシピは、以下の成分からなる: 100 μlの10 × TCA; 94 μlの100mM $MgCl_2$ 、16 μlの100mM dATP; 16 μlの100mM dGTP; 16 μlの100mM dCTP; 16 μlの100mM dTTP; 67 μlの0.75mM クレゾールレッド、4.25mM トリスベース、400 μlの50%スクロースまたはソルビトール; および、1mlとするための275 μlの水。

【 0 1 0 9 】

典型的な反応混合物は、以下の成分を集合した: 3.75 μlの10 × TCA; 1.0ngの標的DNA; 1.0 μl (各々) の10 μM プライマー; 0.25-0.50 μlの酵素; 最終体積37.5 μlとするための30.25 μlの水。この初期混合物は表層を表した。表層をPCRアッセイチューブに添加し、つ

づいて油（望ましいまたは必要な場合）を添加した。PCRチューブを簡単な遠心工程に付して、水および油層を分離した。最後に、13.0 μ lの重い混合物を、「混合することなく」PCRチューブ内容物の下層として添加した。チューブを閉じ、過度に振盪させずに、サーマルサイクラーに注意深く運び、その中に設置した。サーマルサイクラーは、最初の熱変性ステップの前に60 から68 まで5分の加熱工程で開始するように設定した。その後のチューブの視覚検査により、この時間の間は2の層がすでに混合していることが確認された。

【0110】

全血を重い層に含むheavy hot start PCRアッセイについては、以下の実験を行った。100 μ lの反応物を、最後に添加した全血と合した。表層は80 μ lの混合物からなり、ここに各混合物はKlentaq1 (Klentaq-278)、Klentaq5 (Klentaq-235)、Klentaq6、Klentaq7、さらなる変異体およびTaqよりなる群から選択される0.25 μ lのポリメラーゼを含んでいた。血液を添加する前に、重い血液下敷きの体積は0.5 μ lないし20 μ lの範囲であったが、最終体積時に100 μ lとなるように水を添加した。80 μ lの表層の下、チューブの底部に血液を注意深く添加した。例えば、0.5 μ lの血液を含むPCRアッセイにおいては、血液をチューブの底部に下敷きとして添加する前に、19.5 μ lの水を上層に添加した。PCRアッセイを行う前に層は手動で混合しなかった。プライマーは、100 μ lの反応物当たり各々20ピコモルで存在した。緩衝液はKLA pH 9とし、dNTPの濃度は各々100 μ Mとし、1.3Mのベタインを存在させた（すべて、濃度は100 μ l中の最終濃度）。10ナノグラムのヒトDNA (Novagen から)を、2の血液を含まない反応物 (Klentaq-235およびTaqによって触媒したもの)（「0+」と示すレーンによって示す）に含めて、ポリメラーゼ活性の陽性対照を得た。サーマルサイクリング・プログラムは、60 にて3分間の前加熱、（93 にて71秒、60 にて60秒、および68 にて5分）の35サイクルとした。

【0111】

図5Aは、サーマルサイクリング・プログラムを開始するに先立ち、反応試料の前処理の異なる条件下、全血存在下で、KT-1（配列番号：2）、KT-6（配列番号：4）およびKT-7（配列番号：6）を用いて行ったheavy hot start PCRアッセイ（100 μ lの反応物体積）の結果を図示する。アスタリスクは、重いおよび軽い一定の体積を有する成分層をボルテックス攪拌によって前混合した反応物、すなわち均一PCRアッセイ溶液を含み、本明細書に記載したheavy hot start手順に付さなかった反応物、の容器を示す。レーン1-13、15および17は、ccr5+1kb（配列番号：9）およびCCR5-KOZ（配列番号：7）を用いたヒトCCR5遺伝子からの1.1kbp標的の増幅に向けられたPCRアッセイである。レーン14、16および18は、CCR5-2kb（配列番号：8）およびccr5deltaRT（配列番号：10）を用いたヒトCCR5遺伝子からの2.5kbp標的の増幅に向けられたPCRアッセイである。

【0112】

図6は、この種の実験のさらなる結果を図示する。増幅活性は、血液中のヒト細胞に対して内在性のCCR5遺伝子からの0.5kbp DNA産物の特異的増幅によって現れた（全血を含まない10ngの外來性ヒトDNAテンプレートの存在を示す「0+」によって示されるレーンを除いて）。KT-1（配列番号：2）、KT-6（配列番号：4）およびKT-7（配列番号：6）は約1%の全血（vol/vol）から約20%の全血（vol/vol）を含有する反応物中でDNA増幅活性を示したが、Klentaq5およびTaqはわずか約1%の全血（vol/vol）を含有する反応物において増幅活性を示さなかった。この増幅産物を生成するために使用したプライマーは、CCR5-D5（配列番号：15）およびCCR5-D3（配列番号：16）であった。

【0113】

実施例5 3'-エキソヌクレアーゼ活性を有する第2の熱安定性DNAポリメラーゼと共にでKT変異体ポリメラーゼを使用する全血PCRアッセイ

この実施例は、LA PCRが、標的テンプレートの供給源として全血を用いて働くことを示す。LA PCR（米国特許第5,436,149号、Claim 6-16）はDNAポリメラーゼの混合物の使用を含み、この実施例は、混合物の微量成分、熱安定性であって3'-エキソヌクレアーゼ活性を示す始原細菌DNAポリメラーゼが、驚くべきことには、全血を用いて活性であることも

説明する。

マスターPCRカクテルは以下のように合した：

200 μ l の 10 \times KLA pH 9

20 μ l の 10/40 (10mM の各 dNTP および 40mM の $MgCl_2$ の混合物)

520 μ l の 5M ベタイン

40 μ l の プライマー-CCR5-2kb (配列番号：8)

40 μ l の プライマー-ccr5deltaRT (配列番号：10)

20 \times 97 μ l の 反応混合物 アリコットを作製するための 1120 μ l の水

1940 μ l の 合計カクテル体積

【0114】

PCRカクテルが標的核酸テンプレートおよびDNAポリメラーゼをこの段階で欠いている点に注意する価値がある。

【0115】

酵素希釈液は、以下のようにマスター混合物の一部とそれを混合することによって氷上で調製した：マスター混合物の6のアリコット (各75 μ l) を取り出し、酵素KT-1 (配列番号：2)、KT-6 (配列番号：4) またはKT-7 (配列番号：6) のアリコット (0.75 μ l、各々約30のU/ μ l、および、2U/ μ l で市販されている始原細菌酵素Deep Ventの1:24希釈体積と予め混合した同じ3の酵素のアリコットに添加した。これらの後者の酵素混合物は、約1:360のDeep Vent酵素に対するKT酵素の比を有していた。

【0116】

マスター混合物のアリコット (72 μ l) を反応チューブに分配し、ついで適当な酵素希釈混合物のアリコット (25 μ l) を反応チューブに分配して、97 μ l の合計体積を得た。

【0117】

4 の温度および3ng/ μ l の濃度で保存した純粋なヒトDNA (Novagen) を標準TEN緩衝液 (10mMのトリスpH7.9、10mMのNaCl、0.1mMのEDTA) で3倍希釈して1ng/ μ l とし、ついでこの溶液のアリコット (3 μ l) を前記した97 μ l の混合物にピペットで移して最終PCRアッセイマスター混合物を得た。

【0118】

典型的には-80 にて、4.5mMのEDTAを含む0.5mlのアリコット中に保存する全血は、室温にて約15ないし30分間解凍し、さらなるPCR反応チューブ中の前記した97 μ l の混合物の下層に3 μ l をピペットで加えて混合するのを回避する前に、穏やかに逆転することによって混合した。ピペッターを3.2 μ l に設定し、空気の泡がPCRアッセイ溶液に注射され、それによってチューブの底部の重い層がかき乱されることを回避するように、最後の少量の血液体積 (~0.2 μ l) を排出しないように注意した。

【0119】

PCR増幅のサーマルサイクリングは、前記したのと同様のプログラム (93 にて2分、その後 (93 にて71秒、60 にて1分、68 にて10分) の33サイクル) を用いて行った。PCRアッセイが完了した後、反応物のアリコット (18 μ l) を4.4 μ l の青色色素混合物と混合し、1.4%のアガロースゲル上の電気泳動によって分析した。

【0120】

図7は、Deep Ventポリメラーゼの量が存在して主要なDNAポリメラーゼKlentaq1 (配列番号：2)、Klentaq6 (配列番号：4) またはKlentaq7 (配列番号：6) (これらはすべてこれらの条件下で等しく良好に行う) を補わなければ予想されるサイズ (2.5kbp) のPCR産物がほとんどまたは全く得られないことを説明している。

【0121】

予言例 コンパートメント化自律複製を用いた血液 - 耐性Klentaq DNAポリメラーゼ変異体の選択

酵素 (25、26) の指向した発展のための最近記載された非常に有効なコンパートメント化自律複製 (CSR) ストラテジーを、血液 - 耐性Klentaq変異体の選択に適用し得る。Klentaqの血液 - 耐性変異体の存在は、10%の血液、野生型Klentaqに対しては阻害的である濃度

10

20

30

40

50

、の存在下でKlentaq遺伝子の検出し得る自己複製の徴候として、ライブラリー中で明らかにしなければならない。血液 - 耐性Klentaqクローンは単離することができ、Klentaq変異体タンパク質は実施例1に記載した手順に従って調製した。ついで、個々のKlentaqポリメラーゼ変異体をスクリーニング手順に付して、各々が低温感受性表現型を示すか否かを確認した。血液 - 耐性であって低温感受性表現型を示すそれらのKlentaq変異体は、本明細書に定義する血液 - 耐性DNAポリメラーゼの群に適合することが予想される。前記した選抜 / スクリーニング手順は、本明細書に定義する血液 - 耐性DNAポリメラーゼである完全長Taq DNAポリメラーゼ変異体を同定することにも敏感に反応しなければならない。

【 0 1 2 2 】

配列情報

10

本願明細書に記載する種々のDNAポリメラーゼおよびオリゴヌクレオチドプライマーの核酸およびポリペプチドは、配列表に示す配列を含む。表IIは、本願明細書に記載する種々の例で使用した具体的なオリゴヌクレオチドプライマーの核酸配列を掲載する。

【 0 1 2 3 】

【表 2】

配列番号:	名称	プライマー配列 (5' ? 3')
7	CCR5-K0Z	TGGAACAAGATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCA 1 10 20 30
8	CCR5-2kb	AGAAGAGCTGAGACATCCGTTCCCTACAAGAA 1 10 20 30
9	ccr5+1kb	AGGCTGTGTATGAAAATAAGCCATGTGCACAA 1 10 20 30
10	ccr5deltaRT	GCAGCGGCAGGACCAGCCCCAAGATGACTATCT 1 10 20 30
11	KT1	GAGCCATGGTCCTCCACGAGTTCGGCCTTCTGG 1 10 20 30
12	RevTaqH	CGGTCCGAAAGCTTCTATCACTCCTGGCGG 1 10 20 30
13	DMDex21f	GGCTGTGATAGAGGCTGTCTATA 1 10 20
14	DMDex21r	CTGGCCTGCACATCAGAAAAGACT 1 10 20
15	CCR5-D5	AGGTACCTGGCTGTCGTCATGCTGTGTTT 1 10 20 30
16	CCR5-D3	GATGATGGGGTTGATGCAGCAGTGCATCAT 1 10 20 30
17	TPA forward	GGAAGTACAGCTCAGAGTTCTGCAGCACCCCTGC 1 10 20 30
18	TPA reverse	GATGCGAACTGAGGCTGGCTGTACTGTCTC 1 10 20 30

10

20

30

40

【 0 1 2 4 】

参考文献

1. Lantz P-G, Al-Soud WA, Knutsson R, Hahn-Haegerdal B, Radstrom P. 2000. Biotechnical use of the polymerase chain reaction for microbial analysis of biological samples, p. 87-130. In M. R. El-Gewely (ed.), Biotechnology Annual Review, vol. 5. (Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands).
2. Altwegg M, Verhoef J. 1995. Amplification methods in diagnostic microbiology. J. Microbiol. Methods 23:3-138.
3. Al-Soud WA, Radstrom P. 2000. Effect of amplification facilitators on diagnosis

50

- stic PCR in the presence of blood, feces and meat. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4463-70.
4. Al-Soud AW, Joensson LJ, Radstrom P. 2000. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38:345-50.
 5. de Franchis R, Cross NCP, Foulkes NS, Cox TM. 1988. A potent inhibitor of Taq polymerase copurifies with human genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 16:10355.
 6. Al-Soud AW, Radstrom P. 1998. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3748-53.
 7. Al-Soud WA, Radstrom P. 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* 39:485-93.
 8. Frackman S, Kobs G, Simpson D, Storts D. 1998. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. *Promega Notes* 65:27.
 9. Topal MD, Sinha NK. 1983. Products of bacteriophage T4 genes 32 and 45 improve the accuracy of DNA replication in vitro. *J. Biol. Chem.* 258:12274-79.
 10. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. 1994. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from blood stains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J. Forensic Sci.* 39:362-72.
 11. Kreader CA. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1102-06.
 12. Morata P, Queipo-Ortuno I, Colmenero J. 1998. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2443-46.
 13. Rossen L, Noskov P, Holmstrom K, Rasmussen OF. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solution. *Int. J. Food Microbiol.* 17:37-45.
 14. Izraeli S, Pflleiderer C, Lion T. 1991. Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. *Nucleic Acids Res.* 19:6051.
 15. Wilson IG. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3741-51.
 16. Al-Soud AW, Lantz P-G, Baeckman A, Olcen P, Radstrom P. 1998. A sample preparation method which facilitates detection of bacteria in blood cultures by the polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Methods* 32:217-224.
 17. Klein A, Barsuk R, Dagan S, Nusbaum O, Shouval D, Galun E.. 1997. Comparison of methods for extraction of nucleic acid from hemolytic serum for PCR amplification of hepatitis B virus DNA sequences. *J. Clin. Microbiol.* 35:1897-99.
 18. Cattaneo A, Graig OE, James NT, Bolton H. 1997. Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. *J. Forensic Sci.* 42:1126-35.
 19. Bourke MT, Scherczinger CA, Ladd C, Lee HC. 1999. NaOH treatment to neutralize inhibitors of Taq polymerase. *J. Forensic Sci.* 44:1046-50.
 20. Kox LF, Rhienthong D, Miranda AM, Udomsantisuk N, Ellis K, van Leeuwen J, van Heusden S, Kuijper S, Kolk AH. 1994. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 32:672-80.
 21. Kramvis A, Bukovzer S, Kew MC. 1996. Comparison of hepatitis B virus DNA extractions from serum by the QIAamp blood kit, Genereleaser, and the phenol-chloroform method. *J. Clin. Microbiol.* 34:2731-33.

22. Barnes WM. 1992. The fidelity of taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene* 112:29-35.
23. Kermekchiev MB, Tzekov A, Barnes WM. 2003. Cold-sensitive mutants of Taq DN A polymerase provide a hot start PCR. *Nucleic Acids Res.* 31:6139-47.
24. Tabor S, Richardson CC. 1995. A single residue in DNA polymerases of the E. coli DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and d ideoxyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92:6339-43.
25. Tawfik DS, Griffiths AD. 1998. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nature Biotech.* 16:652-56.
26. Ghadessy FJ, Ong JL, Holliger P. 2001. Direct evolution of polymerase functi on by compartmentalized self-replication. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 98:4552-5 7. 10
27. Barnes WM. 1994. PCR amplification of up to 35 kb DNA with high fidelity an d high yield from bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91:2216 -20.
28. Barnes WM. 1994. Tips and tricks for long and accurate PCR. *TIBS* 19:342-46.
29. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD et al. 1987. *Current Protocols In Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
30. Sambrook J. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harb or Laboratory, Cold Spring Harbor. 20
31. Barnes WM. July 25, 1995. 米国特許第5,436,149号, Thermostable DNA polymera se with enhanced thermostability and enhanced length and efficiency of primer ex tension.
32. Barnes WM. April 1, 1997. 米国特許第5,616,494号, *Thermus aquaticus* DNA poly merase lacking the n-terminal 235 amino acids of taq DNA polymerase.
33. Scalice ER, Sharkey DJ, Daiss JL. 1994. Monoclonal antibodies prepared aga inst the DNA polymerase from サーマス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) are p otent inhibitors of enzyme activity. *J. Immunol. Methods* 172:147-63.
34. Sharkey DJ, Scalice ER, Christy KG Jr, Atwood SM, Daiss JL. 1994. Antibodi es as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chai n reaction. *Biotechnology* 12:506-9. 30
35. Kellogg DE, Rybalkin I, Chen S, Mukhamedova N, Vlasik T, Siebert PD, Chench ik A. 1994. TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing mo noclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques* 16:1134-7.
36. Baskaran N, Kandpal RP, Bhargava AK, Glynn MW, Bale A, Weissman SM. 1996. Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC con tent. *Genome Res.* 6:633-8.

【図面の簡単な説明】

【 0 1 2 5 】

【図 1】図1は、阻害量の血液の存在下で行うKlentaqポリメラーゼの異なる形態を用いた PCRアッセイの結果を図示する（Klentaqの40の変異体および野生型形態）。クローンKT-6 およびKT-7は、10%のヒト全血の存在下で添加したプラスミドテンプレートから1.65kbp標 的DNAを増幅することができた； 40

【図 2 A】図2Aは、増加する量のヒト全血（レーン1：0%；レーン2：5%；レーン3：10%；レ ーン4：15%）の存在下でKlentaqの2の変異体形態（KT-6およびKT-7）を用いて全血からの 直接的な0.32kbp内在性標的DNAのPCR増幅の結果を図示する；

【図 2 B】図2Bは、図面の上方に示すように、Klentaqの2の変異体形態（KT-10およびKT- 12）を含む均一PCRアッセイ溶液中の全血（vol/vol）の示したパーセンテージの存在下で 0.32kbp内在性ヒト・ジストロフィン（Dystrophin）遺伝子断片の増幅に向けられたPCRア ッセイの結果を図示する； 50

【図 2 C】図2Cは、図面の上方に示すように、Klentaqの2の変異体形態（KT-10およびKT-12）を含む均一PCRアッセイ溶液中の全血（vol/vol）の示したパーセンテージの存在下で1.1kbp内在性CCR5遺伝子断片の増幅に向けられたPCRアッセイの結果を図示する；

【図 3 A】図3Aは、血液 - 不活性な商業的なTaq酵素（JumpStart（商標）Taq（Sigma）、AmpliTaq Gold（登録商標）（Applied Biosystems）およびEx Taq（商標）（Takara））と比較した完全長Taq DNAポリメラーゼ（FL-10）の血液 - 耐性突然変異体形態を用いた均一PCRアッセイ溶液中の示した量の全血（vol/vol）の存在下で内在性ヒト・ジストロフィン遺伝子の0.32kbp断片、内在性ヒトCCR5遺伝子の1.1kbpおよび2.5kbp断片、またはヒト組織プラスミノゲン活性化因子（TPA）遺伝子断片の増幅に向けられたPCRアッセイの結果を図示する（「0」で示すレーンは血液不存在下で行ったPCRアッセイ、「0+」で示すレーンは10ngのヒトDNAの存在下で行ったPCRアッセイを示す）；

【図 3 B】図3Bは、FL-12およびZ-TAQ（商標）（Takara）Taq DNAポリメラーゼを使用して、示したパーセンテージ（vol/vol）（図の下方に示すように）の全血を含有する均一PCRアッセイ溶液の反応における1.1kbp内在性CCR5ヒト遺伝子断片（矢印で示す）のDNA増幅の結果を図示する；

【図 4 A】図4Aは、Klentaq1ポリメラーゼ（レーン1）、2の変異体Klentaqポリメラーゼ（KT-6（レーン2）およびKT-7（レーン3））およびもう1の市販のTaqポリメラーゼ（レーン4）を含有する反応物についての伸長時間の関数としての1.65kbp標的DNAのPCR増幅の結果を図示する。伸長時間はパネルの下方に示す；

【図 4 B】図4Bは、変異体Klentaqポリメラーゼ（KT-7）および最高の先行技術伸長速度を有するDNAポリメラーゼ（Z-TAQ（商標））を含有する反応物についての在外性テンプレート濃度および伸長時間の関数としての1.65kb標的DNAのPCR増幅の結果を図示する。添加した核酸標的量は以下の通り：0.5ng（レーン1）；0.25ng（レーン2）；0.125ng（レーン3）；および0.06ng（レーン4）。増幅時間は以下の通り：60秒（上方パネル）；15秒（中央パネル）；および12秒（下方パネル）；

【図 4 C】図4Cは、30秒に短縮した増幅工程を有するPCRサイクルを用いて行った変異体Klentaq DNAポリメラーゼKT-7（レーン1）、KT-11（レーン2）またはKT-12（レーン3）、野生型Klentaq DNAポリメラーゼ（レーン4）、変異完全長Taq DNAポリメラーゼFL-12（レーン5）、またはZ-TAQ（商標）（Takara；レーン6）のいずれかを用いた1.65kbp標的DNA（矢印で示す）のPCR増幅の結果を図示する；

【図 5 A】図5Aは、全血存在下、サーマルサイクリング・プログラムを開始する前に反応試料の異なる前処理条件下で、KT-1（配列番号：2）、KT-6（配列番号：4）およびKT-7（配列番号：6）を用いて行ったheavy hot start PCRアッセイの結果を図示する。アスタリスクは、ボルテックス攪拌によって重いおよび軽い一定の体積を有する成分層、すなわち均一PCRアッセイ溶液を含み、本明細書に記載するheavy hot start法に付していない反応物、が前混合された反応容器を示す。レーン1-13、15および17はヒトCCR5遺伝子からの1.1kbp標的の増幅に向けられたPCRアッセイであり、一方レーン14、16と18はヒトCCR5遺伝子からの2.5kbp標的の増幅に向けられたPCRアッセイである；

【図 5 B】図5Bは、サーマルサイクリング反応を開始する前に混合されていない図5Aの反応混合物9-14からのPCRアッセイチューブの例を図示する（非-heavy hot start反応；反応番号11および12）；

【図 6】図6は、全血中に存在する細胞のヒトCCR5遺伝子からの0.5kbp標的のheavy hot start PCR増幅の結果を図示する。反応は、全血不存在下（「0」によって示す）または血液不存在下および10ngのヒトDNAの存在下（「0+」によって示す）、各レーン下方に示すパーセンテージで下層中の全血の存在下で行った（vol/vol；両方の層の総体積に調整）；

【図 7】図7は、Deep Ventポリメラーゼ不存在下（レーン1-3および7-9）またはDeep Ventポリメラーゼ存在下（レーン4-6と10-12）、KT-1（配列番号：2）、KT-6（配列番号：4）またはKT-7（配列番号：7）のいずれかを用いた、2ngのゲノムDNA由来（「DNA」とする）または3%の全血（vol/vol）由来（「血液」とする）のヒトCCR5遺伝子からの2.5kbp標的の増幅に向けられたPCRアッセイの結果を図示し、ここにDeep Ventポリメラーゼに対す

10

20

30

40

50

るKT酵素の比は約1に対して360である。

【図 1】

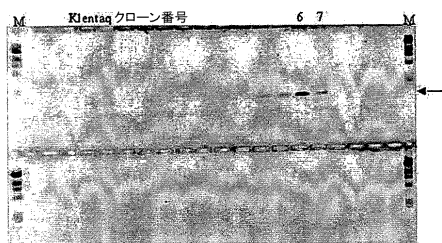


Fig. 1

【図 2 B】

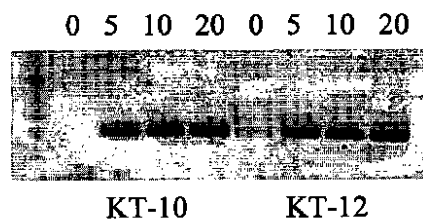


Fig. 2B

【図 2 A】

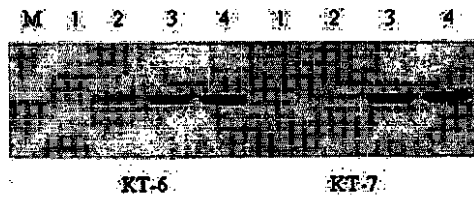


Fig. 2A

【図 2 C】

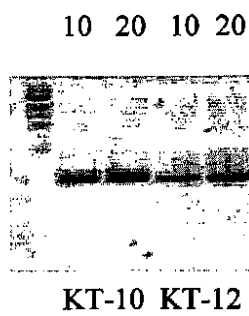


Fig. 2C

【図 3 A】

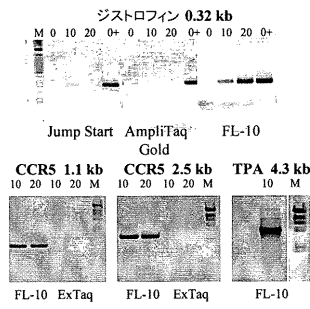


Fig. 3A

【図 3 B】

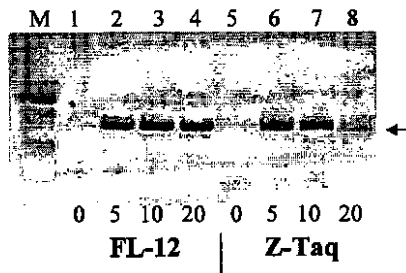


Fig. 3B

【図 4 C】

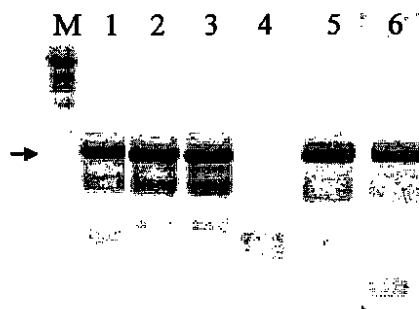


Fig. 4C

【図 5 A】

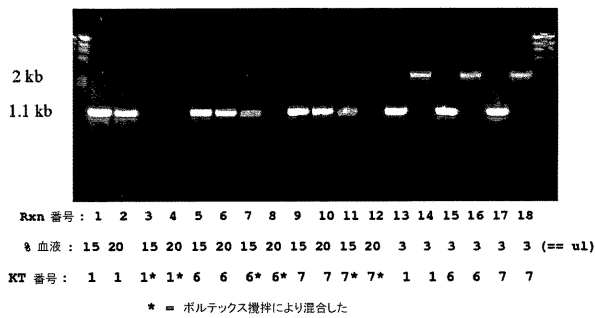


Fig. 5A

【図 4 A】

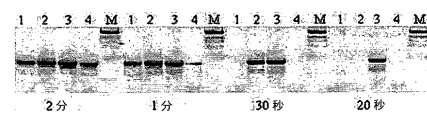


Fig. 4A

【図 4 B】

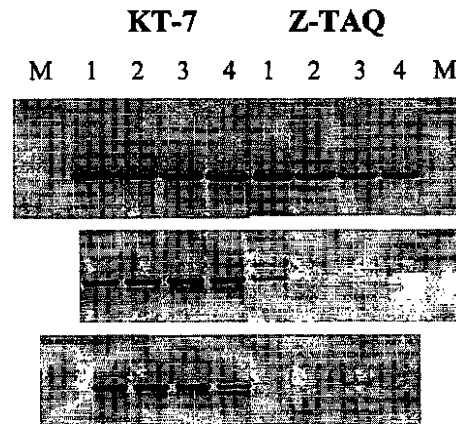


Fig. 4B

【図 5 B】

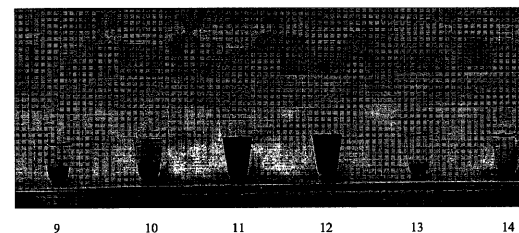


Fig. 5B

【図 6】

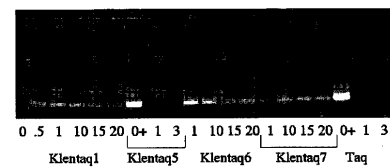


Fig. 6

【図 7】

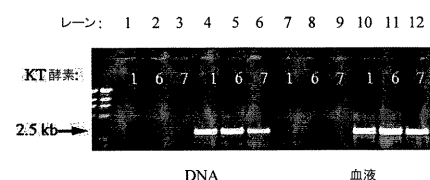


Fig. 7

【手続補正書】

【提出日】平成19年6月27日(2007.6.27)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2008506417000001.app

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100106231

弁理士 矢野 正樹

(72)発明者 ミルコ・ビー・ケルメクキエフ

アメリカ合衆国 6 3 1 3 9 ミズーリ州セント・ルイス、ウエスト・パーク・アベニュー 6 6 6 5 番

(72)発明者 ウェイン・エム・バーンズ

アメリカ合衆国 6 3 1 3 0 ミズーリ州ユニバーシティ・シティ、プリンストン・アベニュー 1 1 番

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA10 CA02 CA09 HA14

4B050 CC04 DD02 LL03

4B063 QA01 QQ42 QR62 QS16 QS25 QS34 QX02