

(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2010-512754

(P2010-512754A)

(43) 公表日 平成22年4月30日 (2010.4.30)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁)

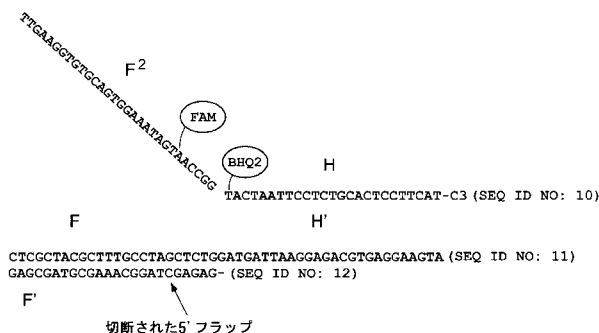
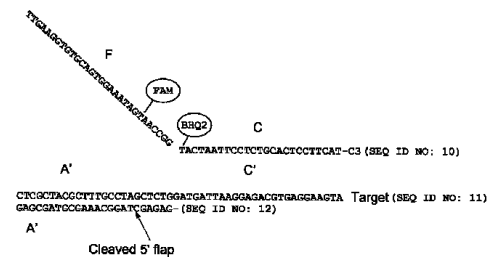
(21) 出願番号 特願2009-541628 (P2009-541628) (86) (22) 出願日 平成19年12月15日 (2007.12.15) (85) 翻訳文提出日 平成21年8月13日 (2009.8.13) (86) 国際出願番号 PCT/US2007/087685 (87) 国際公開番号 W02008/076948 (87) 国際公開日 平成20年6月26日 (2008.6.26) (31) 優先権主張番号 11/639, 781 (32) 優先日 平成18年12月15日 (2006.12.15) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 509291312 ホロジック インコーポレイティッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 マ ルボロ キャンパス ドライブ 250 (74) 代理人 100102978 弁理士 清水 初志 (74) 代理人 100102118 弁理士 春名 雅夫 (74) 代理人 100160923 弁理士 山口 裕孝 (74) 代理人 100119507 弁理士 刑部 俊 (74) 代理人 100142929 弁理士 井上 隆一
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 切断反応による核酸の検出のための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、標的核酸配列を含む試料を上流および下流オリゴヌクレオチドとともにインキュベートすることにより、切断構造を形成する段階、ならびにシグナルを生成するために切断構造をヌクレアーゼで切断する段階を含む、試料中の標的核酸配列の存在を示すシグナルを生成するための、方法、組成物およびキットを提供する。検出可能なシグナルの存在は、標的核酸配列および非侵入性の切断構造の存在を示す。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 以下を提供する段階：

3' から 5' 方向の順に第一の領域および第二の領域を含む、標的核酸、

3' から 5' 方向の順に第一の領域および第二の領域を含む、鋳型核酸、

該標的核酸の該第一の領域に少なくとも部分的に相補的である、第一のオリゴヌクレオチド、

3' 領域が、該標的核酸の該第二の領域に相補的であり、かつ

5' 領域が、該標的核酸に相補的ではないが、該鋳型核酸の該第一の領域に少なくとも部分的に相補的である、

5' 領域および 3' 領域を含む第二のオリゴヌクレオチド、

3' 領域が、該鋳型核酸の該第二の領域に少なくとも部分的に相補的であり、かつ

5' 領域が、該鋳型核酸に相補的ではない、

5' 領域および 3' 領域を含む第三のオリゴヌクレオチド、

切断因子、および

重合因子；

(b) 該標的核酸、該鋳型核酸、該第一のオリゴヌクレオチド、該第二のオリゴヌクレオチド、該第三のオリゴヌクレオチド、該切断因子および該重合因子を、以下を可能とする反応条件の下で混合する段階：

第二のオリゴヌクレオチドの 5' 領域が第一の切断構造の第一のフラップを形成する、該標的核酸と該第一のオリゴヌクレオチドおよび該第二のオリゴヌクレオチドのそれぞれとの間の二本鎖の形成、

第一のフラップの遊離を可能とする、該切断因子による第一のフラップの切断、

第三のオリゴヌクレオチドの 5' 領域が第二の切断構造の第二のフラップを形成する、遊離された第一のフラップと、該鋳型核酸と、該第三のオリゴヌクレオチドとによる第二の二本鎖の形成、および

該切断因子による第二のフラップの切断；ならびに

(c) 第一の二本鎖が形成されると、該第一のオリゴヌクレオチドおよび該第二のオリゴヌクレオチドが少なくともニックによって分離される場合のみ、シグナルが生成される、第二のフラップの切断から生成した該シグナルを検出する段階を含む、標的核酸を検出する方法。

【請求項 2】

第一のオリゴヌクレオチドが、標的ヌクレオチド酸に非相補的な単一の 3' ヌクレオチドを有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

第二および第三のオリゴヌクレオチドが、切断抵抗性のオリゴヌクレオチドである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

遊離されたフラップが、鋳型核酸に非相補的な単一の 3' ヌクレオチドを有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

第一のオリゴヌクレオチドが、標的ヌクレオチド酸に非相補的な二つまたはそれ以上の 3' ヌクレオチドを有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

第一のオリゴヌクレオチドおよび/または遊離されたフラップが 3' ブロックを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

遊離されたフラップが、鋳型核酸に非相補的な二つまたはそれ以上の 3' ヌクレオチドを有する、請求項 1 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

第一の二本鎖が形成された場合に、第一および第二のオリゴヌクレオチドがニックによって分離される、請求項1記載の方法。

【請求項 9】

第一の二本鎖が形成された場合に、第一および第二のオリゴヌクレオチドが1ヌクレオチドギャップによって分離される、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

第一の二本鎖が形成された場合に、第一および第二のオリゴヌクレオチドが2ヌクレオチドギャップによって分離される、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

第一の二本鎖が形成された場合に、第一および第二のオリゴヌクレオチドが3ヌクレオチドギャップによって分離される、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

第二の二本鎖が形成された場合に、遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドがニックによって分離される、請求項1記載の方法。

【請求項 13】

第二の二本鎖が形成された場合に、遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドが1ヌクレオチドギャップによって分離される、請求項1記載の方法。

【請求項 14】

第二の二本鎖が形成された場合に、遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドが2ヌクレオチドギャップによって分離される、請求項1記載の方法。

【請求項 15】

第二の二本鎖が形成された場合に、遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドが3ヌクレオチドギャップによって分離される、請求項1記載の方法。

【請求項 16】

フォワードプライマーをさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 17】

フォワードプライマーが標的核酸の第一の領域に相補的である、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

リバースプライマーをさらに含む、請求項16記載の方法。

【請求項 19】

重合因子が5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠く、請求項1記載の方法。

【請求項 20】

重合因子が熱安定性である、請求項1記載の方法。

【請求項 21】

単一の酵素が重合因子および切断因子を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 22】

酵素が、大腸菌(*E. coli*) DNAポリメラーゼI、T7 DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、またはTaq DNAポリメラーゼである、請求項22記載の方法。

【請求項 23】

第一の酵素が重合因子を含み、かつ
第二の酵素が切断因子を含む、
請求項1記載の方法。

【請求項 24】

切断因子が5'ヌクレアーゼである、請求項1記載の方法。

【請求項 25】

切断因子がFEN-1ヌクレアーゼである、請求項1記載の方法。

【請求項 26】

5'ヌクレアーゼが熱安定性である、請求項24記載の方法。

【請求項 27】

10

20

30

40

50

第一および第二の酵素が単一の配合物中で提供される、請求項23記載の方法。

【請求項 28】

第一の酵素がPfu DNAポリメラーゼであり、かつ

第二の酵素がFEN-1ヌクレアーゼである、

請求項23記載の方法。

【請求項 29】

反応条件が核酸重合反応条件である、請求項1記載の方法。

【請求項 30】

核酸重合反応条件がポリメラーゼ連鎖反応条件である、請求項29記載の方法。

【請求項 31】

第三のオリゴヌクレオチドが相互作用性標識の対を含む、請求項1記載の方法。

10

【請求項 32】

相互作用性標識の対の第一のメンバーが、第三のオリゴヌクレオチドの5'フラップに機能的に結合される、請求項1記載の方法。

【請求項 33】

相互作用性標識の対の第二のメンバーが、第三のオリゴヌクレオチドの+1位に機能的に結合される、請求項32記載の方法。

【請求項 34】

相互作用性標識の対の第二のメンバーが、第三のオリゴヌクレオチドの+2位に機能的に結合される、請求項32記載の方法。

20

【請求項 35】

相互作用性標識の対が、フルオロフォアおよびクエンチャーを含む、請求項31記載の方法。

【請求項 36】

クエンチャーが、第三のオリゴヌクレオチドの+1位に機能的に結合され、かつ

フルオロフォアが、第三のオリゴヌクレオチドの5'フラップに機能的に結合される、

請求項35記載の方法。

【請求項 37】

シグナルの検出が、

第三のオリゴヌクレオチドが切断されると、相互作用性標識の対の第一のメンバーと第二のメンバーとの間の蛍光の変化を検出する段階を含む、請求項35記載の方法。

30

【請求項 38】

第二のオリゴヌクレオチドおよび第三のオリゴヌクレオチドの3'ヌクレオチドがブロックされる、請求項1記載の方法。

【請求項 39】

(a) 以下を提供する段階：

3'から5'方向の順に第一の領域および第二の領域を含む、標的核酸、

3'から5'方向の順に第一の領域および第二の領域を含む、鋳型核酸、

該標的核酸の該第一の領域に少なくとも部分的に相補的である、第一のオリゴヌクレオチド、

40

3'領域が、該標的核酸の該第二の領域に相補的であり、かつ

5'領域が、該標的核酸に相補的ではないが、該鋳型核酸の該第一の領域に少なくとも部分的に相補的である、

5'領域および3'領域を含む第二のオリゴヌクレオチド、

3'領域が、該鋳型核酸の該第二の領域に少なくとも部分的に相補的であり、か

つ

5'領域が、該鋳型核酸に相補的ではない、

5'領域および3'領域を含む第三のオリゴヌクレオチド、

切断因子、および

50

重合因子；

(b) 該標的核酸、該第一のオリゴヌクレオチド、該第二のオリゴヌクレオチド、該切断因子および該重合因子を、以下を可能とする反応条件の下で混合することにより、反応混合物を形成させる段階；

第二のオリゴヌクレオチドの5'領域が第一の切断構造の第一のフラップを形成する、該標的核酸と該第一のオリゴヌクレオチドおよび該第二のオリゴヌクレオチドのそれぞれとの間の二本鎖の形成、および

第一のフラップの遊離を可能とする、該切断因子による第一のフラップの切断；

(c) 反応混合物中の、遊離された第一のフラップ、該第三のオリゴヌクレオチド、および該鋳型核酸を、以下を可能とする反応条件の下で混合する段階；

第三のオリゴヌクレオチドの5'領域が第二の切断構造の第二のフラップを形成する、遊離された第一のフラップと、該鋳型核酸と、該第三のオリゴヌクレオチドとによる第二の二本鎖の形成、および

該切断因子による第二のフラップの切断；ならびに

(d) 該第一の二本鎖が形成されると、該第一のオリゴヌクレオチドおよび該第二のオリゴヌクレオチドが少なくともニックによって分離される場合のみ、シグナルが生成される、第二のフラップの切断から生成した該シグナルを検出する段階を含む、標的核酸を検出する方法。

【請求項 40】

以下を含む、組成物；

(i) 標的核酸の第一の領域に少なくとも部分的に相補的である、第一のオリゴヌクレオチド；

(ii) 3'領域が、標的核酸の第二の領域に少なくとも部分的に相補的であり、かつ

5'領域が、標的核酸に非相補的であるが、鋳型核酸の第一の領域に少なくとも部分的に相補的である、

5'領域および3'領域を含む第二のオリゴヌクレオチド；ならびに

(iii) 3'領域が、鋳型核酸の第二の領域に少なくとも部分的に相補的であり、かつ

5'領域が、鋳型核酸に非相補的であり、かつ

相互作用性標識の対の第一のメンバーが、5'領域に機能的に結合され、かつ

相互作用性標識の対の第二のメンバーが、3'領域に機能的に結合される、

5'領域および3'領域を含む第三のオリゴヌクレオチド。

【請求項 41】

第一の領域および第二の領域を3'から5'方向の順に含む鋳型核酸をさらに含む、請求項40記載の組成物。

【請求項 42】

相互作用性標識の対の第二のメンバーが、第三のオリゴヌクレオチドの+1位に機能的に結合される、請求項40記載の方法。

【請求項 43】

切断因子をさらに含む、請求項40記載の組成物。

【請求項 44】

重合因子をさらに含む、請求項40記載の組成物。

【請求項 45】

請求項40記載の組成物、およびその包装材料を含むキット。

【請求項 46】

切断因子をさらに含む、請求項45記載のキット。

【請求項 47】

重合因子をさらに含む、請求項45記載のキット。

【請求項 48】

(a) 以下を提供する段階；

3'から5'方向の順に第一の領域および第二の領域を含む、標的核酸、

10

20

30

40

50

該標的核酸の該第一の領域に少なくとも部分的に相補的である、第一のオリゴヌクレオチド、

3'領域が、該標的核酸の該第二の領域に相補的であり、かつ

5'領域が、該標的核酸に相補的ではない、

5'領域および3'領域を含む第二のオリゴヌクレオチド、

切断因子、および

重合因子；

(b) 該標的核酸、該第一のオリゴヌクレオチド、該第二のオリゴヌクレオチド、該切断因子および該重合因子を、以下を可能とする反応条件の下で混合する段階；

第二のオリゴヌクレオチドの5'領域が切断構造の第一のフラップを形成する、該標的核酸と該第一のオリゴヌクレオチドおよび該第二のオリゴヌクレオチドのそれぞれとの間の二本鎖の形成、

該切断因子による第一のフラップの切断；ならびに

(c) 第一の二本鎖が形成されると、該第一のオリゴヌクレオチドおよび該第二のオリゴヌクレオチドの相補的部分が少なくともニックによって分離される場合のみ、シグナルが生成される、第一のフラップの切断から生成した該シグナルを検出する段階を含む、標的核酸を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2000年11月21日付で出願された米国特許出願第09/717,602号の分割出願である2004年11月15日付で出願された米国特許出願第10/981,942号の一部継続出願である2005年8月5日付で出願された米国特許出願第11/198,762号に対する優先権を米国特許法第120条の下で主張する一部継続出願である。本出願は同様に、2006年3月17日付で出願された米国特許仮出願第60/783,633号および2005年4月24日に提出された米国特許仮出願第60/794,628号の恩典を主張する。上記の出願の教示全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

DNA複製、組換えおよび修復の忠実度は、ゲノム安定性を維持するのに不可欠であり、これらの過程は全て、全生物に存在する5'3'エキソヌクレアーゼ酵素に依っている。DNA修復の場合、これらの酵素は、損傷を受けた断片の切除および組換えミスマッチの補正に必要である。複製の場合、これらのヌクレアーゼは、ラギング鎖DNA合成の間の岡崎断片の効率的なプロセッシングに重要である。大腸菌(*Escherichia coli*)では、この後者の活性は、DNAポリメラーゼI (Pol I)によって供与される。Pol I 5'→3'エキソヌクレアーゼドメインの中に不活性化突然変異を有する大腸菌(*E. coli*)株は、岡崎断片をプロセッシングできないために生存できない。しかしながら、真性生物のDNAポリメラーゼは、内在性の5'→3'エキソヌクレアーゼドメインを欠き、この重要な活性は多機能性の、構造特異的メタロヌクレアーゼFEN-1 (5'エキソヌクレアーゼ-1またはフラップエンドヌクレアーゼ-1)によって供与され、これは5' DNAフラップに対するエンドヌクレアーゼとしても機能する(Hosfield et al., 1998a, *Cell*, 95:135 (非特許文献1)に概説されている)。

【0003】

米国特許第5,843,669号(特許文献1)、同第5,719,028号(特許文献2)、同第5,837,450号(特許文献3)、同第5,846,717号(特許文献4)および同第5,888,780号(特許文献5)では、5'標識した標的DNAを、サーマス・アクアティカス(*Thermus aquaticus*)から単離されたDNAポリメラーゼ(Taqポリメラーゼ)および所望の切断点で配列とハイブリダイズできる部分的に相補的なオリゴヌクレオチドとともにインキュベートすることにより、標的DNA分子を切断する方法を開示している。部分的に相補的なオリゴヌクレオチドは、所望の

10

20

30

40

50

切断部位の逆側に3'伸長部分を持った二本鎖を含む基質構造の形成を通じてTaqポリメラーゼを標的DNAへ誘導し、このオリゴヌクレオチドの非相補的な領域が3'アームとなり、この基質分子の非アニール5'領域が5'アームとなる。部分的に相補的なオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイズされなかった場合にまたは所望の切断点で標的配列とハイブリダイズされた場合に、短いヘアピンを形成できる3'ヌクレオチド伸長部分を含む。Taqポリメラーゼによる切断後に標識断片の放出が検出される。

【0004】

米国特許第5,843,669号(特許文献1)、同第5,719,028号(特許文献2)、同第5,837,450号(特許文献3)、同第5,846,717号(特許文献4)および同第5,888,780号(特許文献5)では、検出可能な合成活性、および野生型の熱安定性ヌクレアーゼ活性をほとんど持たない、または全く持たない変異体の、熱安定性DNAポリメラーゼの作出を開示している。この変異体ポリメラーゼは、5'から3'方向の合成活性を欠くため有用であるといわれている。すなわち、合成活性は、検出アッセイ法でのDNA切断段階との組み合わせにおいて望ましくない副反応である。

【0005】

米国特許第5,843,669号(特許文献1)、同第5,719,028号(特許文献2)、同第5,837,450号(特許文献3)、同第5,846,717号(特許文献4)および同第5,888,780号(特許文献5)では、野生型Taqポリメラーゼまたは合成活性を欠く変異体Taqポリメラーゼが、ヘアピン構造の3'アームに結合するプライマーの存在下、熱変性、引き続き冷却によって形成された5'末端標識ヘアピン構造を切断することによって標識断片を放出できることを開示している。さらに、米国特許第5,843,669号(特許文献1)、同第5,719,028号(特許文献2)、同第5,837,450号(特許文献3)、同第5,846,717号(特許文献4)および同第5,888,780号(特許文献5)では、合成活性を欠く変異体Taqポリメラーゼが同様に、ヘアピン構造の3'アームに結合するプライマーの非存在下においてこのヘアピン構造を切断できることを教示している。

【0006】

米国特許第5,843,669号(特許文献1)、同第5,719,028号(特許文献2)、同第5,837,450号(特許文献3)、同第5,846,717号(特許文献4)および同第5,888,780号(特許文献5)では、合成活性を欠く変異体Taqポリメラーゼによるヘアピン構造の3'アームに結合するプライマーの存在下でのこのヘアピン構造の切断が、単一種の標識切断産物をもたらすのに対し、野生型Taqポリメラーゼは、野生型Taq酵素の合成活性のレベルが高いため、複数の切断産物を生成し、dNTPの存在下においてヘアピン構造を二本鎖形態へ変換することも開示している。

【0007】

米国特許第5,843,669号(特許文献1)、同第5,719,028号(特許文献2)、同第5,837,450号(特許文献3)、同第5,846,717号(特許文献4)および同第5,888,780号(特許文献5)では同様に、5'末端標識された標的核酸および相補的なオリゴヌクレオチドを含み、この相補的なオリゴヌクレオチドは、この標的核酸の5'および3'領域がオリゴヌクレオチドにアニールされず一本鎖のままであるように標的核酸の一部とハイブリダイズする、直鎖状の核酸基質を切断することによって、合成活性の低減を示す変異体Taqポリメラーゼは単一の標識断片を放出できるが、野生型Taqポリメラーゼではできないことを開示している。

【0008】

米国特許第5,846,717号(特許文献4)、同第6,090,543号(特許文献6)、同第6,001,567号(特許文献7)、同第6,090,606号(特許文献8)、同第5,985,557号(特許文献9)および同第5,994,069号(特許文献10)は、標的配列上に核酸切断構造を形成する方法および部位特異的に核酸切断構造を切断する方法に関する。これらの特許は同様に、標的依存的な切断構造を切断するために種々の酵素の5'ヌクレアーゼ活性を使用し、それによって特異的な核酸配列またはその変種の存在を示すことに関する。

【0009】

10

20

30

40

50

米国特許第5,843,669号(特許文献1)では、低減した合成活性を示す変異体Taqポリメラーゼの存在または非存在下において、熱安定性FEN-1ヌクレアーゼを用い切断断片長多型分析によって多型を検出する方法を開示している。この方法によれば、二本鎖C型肝炎ウイルス(HCV) DNA断片は、PCR反応のなかで5'末端標識プライマー(TMR蛍光色素で標識された)を用いることによって標識される。TMR標識されたPCR産物は、95℃に加熱することによって変性され、55℃に冷却されて、切断構造を生ずる。米国特許第5,843,669号(特許文献1)では、切断構造が二次構造を含んだ一本鎖核酸基質の領域を含むことを開示している。切断はCleavaseBNヌクレアーゼ、古細菌メタノコッカス・ヤナシイ(*Methanococcus jannaschii*)に由来するFEN-1ヌクレアーゼまたは両酵素の存在下において行われる。標識された反応産物はゲル電気泳動の後、蛍光画像化によって可視化される。米国特許第5,843,669号(特許文献1)では、CleavaseBNヌクレアーゼおよびメタノコッカス・ヤナシイFEN-1ヌクレアーゼが、互いに容易に区別される切断パターンを生じること、および両酵素を含んだ反応から得られる切断パターンが、各個別の酵素を用いた切断によって生じるパターンの要素を含むが、単に各個別の酵素によって生じる切断パターンの複合体であるわけではないことを開示している。このことは、一つの酵素によって切断されない(およびその酵素のパターンにおいてバンドとして見える)断片のなかには、同じ反応混合物中のもう一つの酵素によって切断されうるものもあることを示す。

10

20

30

40

50

【0010】

Lyamichevらは、標的DNAの領域に部分的に相補的な重複するオリゴヌクレオチドプローブの対が5'フラップ領域を形成するように標的DNAと混合され、かつ熱安定性FEN-1ヌクレアーゼによる標識された下流プローブの切断が標識された切断産物を生成する、DNAの検出方法を開示している。Lyamichevらは同様に、切断シグナルを増幅させ、アトモルより下のレベルでの標的DNAの定量的検出を可能にさせるため、温度サイクリングなしに単一の標的配列について下流オリゴヌクレオチドプローブの複数コピーを切断できる反応条件を開示している(Lyamichev et al., 1999, *Nat. Biotechnol.*, 17:292(非特許文献2))。

【0011】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術は、米国特許第4,683,202号(特許文献11)、同第4,683,195号(特許文献12)および同第4,800,159号(特許文献13)に開示されている。その最も簡単な形態において、PCRは、逆鎖とハイブリダイズしかつ標的DNA中の関心領域に隣接する2本のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた、特異的DNA配列の酵素合成のためのインビトロ法である。鋳型の変性、プライマーのアニールングおよびDNAポリメラーゼによるアニールしたプライマーの伸長を伴う反復的な一連の反応段階は、末端がプライマーの5'末端によって定義される特異的断片の指数関数的蓄積をもたらす。PCRは、 10^9 倍で特異的DNA配列の選択的濃縮をもたらすことができると報告されている。PCR法はSaiki et al., 1985, *Science*, 230:1350(非特許文献3)にも記述されている。

【0012】

米国特許第5,210,015号(特許文献14)および同第5,487,972号(特許文献15)では、増幅される核酸、5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を有するTaqポリメラーゼ、ならびに増幅された領域に相補的な領域およびさらなる非相補的な5'尾部領域を含む5'、3'または5'および3'末端標識プローブの存在下においてPCR反応の増幅段階の間にシグナルを生成する段階を含む、標識プローブを放出するためのPCRに基づくアッセイ法を開示している。米国特許第5,210,015号(特許文献14)および同第5,487,972号(特許文献15)では、Taqポリメラーゼが、例えばdNTPの非存在下において、重合非依存的に上流プローブにより標識プローブの近くに位置付けられる場合、このPCRに基づくアッセイ法はハイブリダイズしたプローブの5'標識末端を解放できることをさらに開示している。

【0013】

米国特許第5,843,669号(特許文献1)、同第5,719,028号(特許文献2)、同第5,837,450号(特許文献3)、同第5,846,717号(特許文献4)および同第5,888,780号(特許文献5)では同様に、二次構造の天然領域で標識核酸基質を切断する方法を開示している。この方

法によれば、ビオチン標識DNA基質をPCRによって調製し、野生型TaqポリメラーゼまたはCleavaseBN（低減した合成活性および野生型の5'から3'方向のヌクレアーゼ活性を有する変異体Taqポリメラーゼ）と混合し、5秒間95℃でインキュベートして基質を変性し、その後65℃に素早く冷却して相補的な塩基間で鎖内水素結合の形成を可能にすることによりDNAがその特有の二次構造を取ることを可能にする。反応混合物を65℃でインキュベートして切断が起こるようにし、ビオチン化された切断産物を検出する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】米国特許第5,843,669号

10

【特許文献2】米国特許第5,719,028号

【特許文献3】米国特許第5,837,450号

【特許文献4】米国特許第5,846,717号

【特許文献5】米国特許第5,888,780号

【特許文献6】米国特許第6,090,543号

【特許文献7】米国特許第6,001,567号

【特許文献8】米国特許第6,090,606号

【特許文献9】米国特許第5,985,557号

【特許文献10】米国特許第5,994,069号

20

【特許文献11】米国特許第4,683,202号

【特許文献12】米国特許第4,683,195号

【特許文献13】米国特許第4,800,159号

【特許文献14】米国特許第5,210,015号

【特許文献15】米国特許第5,487,972号

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Hosfield et al., 1998a, Cell, 95:135

【非特許文献2】Lyamichev et al., 1999, Nat. Biotechnol., 17:292

【非特許文献3】Saiki et al., 1985, Science, 230:1350

【発明の概要】

30

【0016】

本発明は、標的核酸配列を含む試料を上流および下流オリゴヌクレオチドとともにインキュベートすることにより、切断構造を形成する段階、ならびにシグナルを生成するために切断構造をヌクレアーゼで切断する段階を含む、試料中の標的核酸配列の存在を示すシグナルを生成するための、方法、組成物およびキットを提供する。検出可能なシグナルの存在は、標的核酸配列および非侵入性の切断構造の存在を示す。下流オリゴヌクレオチド上の相互作用性標識の対（例えば、フルオロフォアおよびクエンチャー）の選択的配置は侵入性の切断反応と非侵入性の切断反応を識別するように選択される。非侵入性の切断事象だけが検出可能である。

【0017】

40

本方法は単一または逐次の切断反応として行われてもよい。単一の切断反応において、標的核酸の存在を示す検出可能なシグナルは、切断反応が非侵入性である場合に生成するだけである。逐次の切断反応において、第一の切断反応からの遊離フラップが第二の切断反応での上流オリゴヌクレオチドとして働く。逐次の切断反応において、検出可能なシグナルは、第一の切断反応も第二の切断反応とともに非侵入性である場合に生成するだけである。侵入性の構造が形成される事象では、シグナルが生成しない。切断構造は、上流オリゴヌクレオチドが下流オリゴヌクレオチドと標的/鋳型核酸の同じ領域に相補的である場合に侵入性である。

【0018】

一つの局面において、本発明は、逐次検出反応において標的核酸を検出する方法を提供

50

する。この局面において、検出可能なシグナルは、第一の切断反応も第二の切断反応もともに非侵入性である場合に生成するだけである。侵入性の切断構造が形成される事象では、シグナルが生成しないまたは検出されない。この方法は、標的核酸(図1; A'C')、鋳型核酸(図1; H'F')、第一のオリゴヌクレオチド(図1; A-1)、第二のオリゴヌクレオチド(図1; FC)、第三のオリゴヌクレオチド(図1; F2H)、切断因子および重合活性を有する作用因子を提供する段階を含む。標的および鋳型核酸は3'から5'方向の順に、第一の領域(A'またはF')、および第二の領域(C'またはH')を有する。第一のオリゴヌクレオチドは、標的核酸の第一の領域に少なくとも部分的に相補的である。第二のオリゴヌクレオチドの3'領域は標的核酸の第二の領域に少なくとも部分的に相補的であり、標的核酸に非相補的であるが、しかし鋳型核酸の第一の領域に少なくとも部分的に相補的である5'領域を有する。第三のオリゴヌクレオチドの3'領域は鋳型核酸の第二の領域に相補的であり、鋳型核酸に非相補的である5'領域を有する。第三のオリゴヌクレオチドは、第三のオリゴヌクレオチドの非侵入性の切断(例えば、第三のオリゴヌクレオチドの屈曲部での切断)によって引き離される場合にシグナルを生成する相互作用性標識の対に機能的に結合される。侵入性の切断構造が形成される事象では、第三のオリゴヌクレオチドが両標識の下流で切断されるのでシグナルが生成しない(例えば、遊離フラップが侵入性の切断反応において切断される場合)。

10

【0019】

第一および第二の二本鎖ならびに第一および第二の切断構造の形成を可能とする反応条件の下で試薬を混合する。反応条件は、標的核酸と第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドのそれぞれとの間での第一の二本鎖の形成を可能とする(図1)。いくつかの態様において、第一のオリゴヌクレオチドの3'ヌクレオチドは標的に非相補的である。第一および第二のオリゴヌクレオチドは、少なくともニックが第一のオリゴヌクレオチドの3'末端および第二のオリゴヌクレオチドの相補的部分を分離するように標的にアニールする。第二のオリゴヌクレオチドは、標的にアニールされる場合に5'側の非相補的な第一のフラップを形成する。この非相補的なフラップは、しかしながら、鋳型核酸の部分に相補的な部分を有する。いくつかの態様において、遊離フラップの3'末端ヌクレオチドは鋳型に非相補的である。第二のオリゴヌクレオチドは検出可能に標識されない。

20

【0020】

第一の切断構造は第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドの5'側の非相補的部分(第一のフラップ)によって、これらのオリゴヌクレオチドが標的にアニールされる場合に形成される。第一および第二のオリゴヌクレオチドは、少なくともニックが第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドの標的相補的部分を分離するように標的にアニールする。切断構造は第二のオリゴヌクレオチドの屈曲部で切断され、それによって第一のフラップの遊離を可能とすることができる(図1)。

30

【0021】

第二の二本鎖は、第二のオリゴヌクレオチドの遊離された第一のフラップ、鋳型核酸、および第三のオリゴヌクレオチドで形成される(図1)。第三のオリゴヌクレオチドは、鋳型核酸にアニールされる場合に5'側の非相補的な第二のフラップを有する。遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドは、少なくともニックが遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドの鋳型相補的部分を分離するように鋳型にアニールする(図1)。

40

【0022】

第二の切断構造は、遊離フラップおよび第三のオリゴヌクレオチドの5'側の非相補的部分(第二のフラップ)によって、これらのオリゴヌクレオチドが標的にアニールされる場合に形成される。切断構造はヌクレアーゼにより第三のオリゴヌクレオチドの屈曲部の位置でまたは上流で切断され、それによって第三のオリゴヌクレオチド上の相互作用性標識の対の分離によりシグナルを生成する(図1)。侵入性の切断反応が第一または第二のいずれかの切断反応において起きる事象(例えば、重複する相補的ヌクレオチドによって生成する切断)では、相互作用性標識の対は分離せず、シグナルは生成しない。

50

【0023】

第三のオリゴヌクレオチド上の相互作用性標識の対(例えば、フルオロフォアおよびクエンチャー)の配置は、侵入性の切断反応と非侵入性の切断反応を識別するように選択することができる。第一または第二のいずれかの切断反応が侵入性である事象では、相互作用性標識の対は分離されず、検出可能なシグナルは生成しない。したがって、本発明の一つの態様では、第三のオリゴヌクレオチドの相補的領域の+1位のクエンチャー(例えば、BHQ)および屈曲部の上流のフルオロフォア(例えば、FAM)の配置を企図する。別の態様において、クエンチャーおよびフルオロフォアの位置は逆にされる。このように、フルオロフォアおよびクエンチャーは、非侵入性の切断構造が第一の切断反応でも第二の切断反応でもともに形成される場合に検出可能なシグナルを生成するように分離されるだけである。

10

【0024】

第一の切断反応が侵入性である事象では、第二のオリゴヌクレオチドは屈曲部の下流、両相互作用性標識の下流で切断される。それゆえ、標識は分離せず、シグナルは生成しない。

【0025】

いくつかの態様において、反応は二つの異なる混合段階において行われる。例えば、第一の反応混合物は、第一の二本鎖が形成することおよび第一の切断反応が起こることを可能にする条件の下で、標的核酸、第一のオリゴヌクレオチド、第二のオリゴヌクレオチド、切断因子および重合因子を混合することによって調製される。次に第二の反応混合物は、第二の二本鎖の形成および第二の切断反応が起こることを可能にする反応条件の下で、第三のオリゴヌクレオチドおよび鋳型核酸を第一の反応混合物に添加することによって調製される。

20

【0026】

重合活性および切断手段/因子は単一の酵素に存在してよい。両活性を供与するそのような酵素は、大腸菌DNAポリメラーゼI、T7 DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼまたはTaq DNAポリメラーゼを含む。代替の態様において、重合活性および切断手段はそれぞれ、別個の酵素、例えばPfu DNAポリメラーゼおよびFEN-1ヌクレアーゼによって供与される。ポリメラーゼ活性は、DNAポリメラーゼおよび/または熱安定性でありうるポリメラーゼによって供与される。ポリメラーゼは5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠いてよい。切断手段は5'ヌクレアーゼ活性を含むことができる。そのような5'ヌクレアーゼ活性はFEN-1ヌクレアーゼに存在する。FEN-1ヌクレアーゼはフラップ特異的なヌクレアーゼであってよい。一つの態様において、FEN-1ヌクレアーゼは熱安定性である。

30

【0027】

本発明の最後の三つの局面のいずれかのさらに別の態様において、一連の反応条件は核酸重合反応条件である。さらなる態様において、核酸重合反応条件はポリメラーゼ連鎖反応条件である。

【0028】

本発明のいくつかの態様において、第二および/または第三のオリゴヌクレオチドの5'部分は、第二のオリゴヌクレオチドの3'部分に少なくとも部分的に相補的である。さらなる態様において、第二および/または第三のオリゴヌクレオチドの3'部分および5'部分は、第二のオリゴヌクレオチドが標的核酸にハイブリダイズされない場合にステム構造を形成する。第二および/または第三のオリゴヌクレオチドは、第二のオリゴヌクレオチドの5'部分と3'部分の間にリンカー配列を含んでよい。リンカー部分は、標的核酸に相補的でなくてよいが、鋳型核酸の第一の部分に相補的でありうる。第一、第二もしくは第三のオリゴヌクレオチドまたは鋳型核酸のいずれかの3'末端はブロックされてもよい。

40

【0029】

本発明のさらに別の局面において、本発明は、標的核酸、鋳型核酸、第一のオリゴヌクレオチド、第二のオリゴヌクレオチドおよび第三のオリゴヌクレオチドを含む組成物に向けられる。標的および鋳型核酸は3'から5'方向の順に、第一の領域および第二の領域を有する。いくつかの態様において、鋳型および/または標的は第一の領域と第二の領域との

50

間に伸長領域をさらに含む。第一のオリゴヌクレオチドは、標的核酸の第一の領域に少なくとも部分的に相補的であり、標的に非相補的な3'末端ヌクレオチドを有する。第二のオリゴヌクレオチドの3'領域は、標的核酸の第二の領域に少なくとも部分的に相補的であり、その5'領域は、標的核酸に相補的ではないが、鋳型核酸の第一の領域に少なくとも部分的に相補的である。第三のオリゴヌクレオチドの3'領域は、鋳型核酸の第二の領域に少なくとも部分的に相補的であるのに対し、その5'領域は鋳型核酸に相補的ではない。第三のオリゴヌクレオチドは5'領域および3'領域を有し、この3'領域は鋳型の第二の領域に少なくとも部分的に相補的であり、この5'領域は鋳型に非相補的である。相互作用性標識の対の第一のメンバーは5'領域に機能的に結合され、相互作用性標識の対の第二のメンバーは第三のオリゴヌクレオチドの3'領域に機能的に結合される。さらに別の局面において、相互作用性標識の対の第二のメンバーは、第三のオリゴヌクレオチドの+1位に機能的に結合される。さらに別の態様において、本組成物はプライマーの対を含む。

10

【0030】

別の局面において、本発明は、標的核酸を単一の切断反応で検出する方法を提供する。この局面において、検出可能なシグナルは両切断反応が非侵入性である場合に生成するだけである。侵入性の切断構造が形成される事象では、シグナルが生成しない。この方法は標的核酸(図1; A'C')、第一のオリゴヌクレオチド(図1; A-1)、第二のオリゴヌクレオチド(図1; FC但し相互作用性標識の対を有する)、切断因子および任意で、重合活性を有する作用因子を提供する段階を含む。標的核酸は3'から5'方向の順に、第一の領域(A')および第二の領域(C')を有する。第一のオリゴヌクレオチドは標的核酸の第一の領域に少なくとも部分的に相補的である。第二のオリゴヌクレオチドの3'領域は標的核酸の第二の領域に少なくとも部分的に相補的であり、標的核酸に非相補的である5'領域を有する。第二のオリゴヌクレオチドは、第二のオリゴヌクレオチドの切断(例えば、第二のオリゴヌクレオチドの屈曲部での切断)によって引き離される場合にシグナルを生成するが、(例えば、第一のオリゴヌクレオチドが第二のオリゴヌクレオチドの相補的部分に重なることで)第二のオリゴヌクレオチドが両標識の下流で切断される場合にはシグナルを生成しない、相互作用性標識の対に機能的に結合される。

20

【0031】

第一の二本鎖および第一の切断構造の形成を可能とする反応条件の下で、試薬を混合する。反応条件は、標的核酸と第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドのそれぞれとの間での第一の二本鎖の形成を可能とする(図1)。いくつかの態様において、第一のオリゴヌクレオチドの3'ヌクレオチドは標的に非相補的である。第一および第二のオリゴヌクレオチドは、少なくともニックが第一のオリゴヌクレオチドの標的相補的な部分および第二のオリゴヌクレオチドの相補的部分を分離するように標的にアニールする。第二のオリゴヌクレオチドは、標的にアニールされる場合に5'側の非相補的なフラップを形成する。

30

【0032】

第一の切断構造は、第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドの5'側の非相補的部分(第一のフラップ)によって、これらのオリゴヌクレオチドが標的にアニールされる場合に形成される。第一および第二のオリゴヌクレオチドは、少なくともニックが第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドの標的相補的な部分を分離するように、標的にアニールする。切断構造は、ヌクレアーゼにより第二のオリゴヌクレオチドの屈曲部の位置でまたは上流で切断され、それによって第二のオリゴヌクレオチド上の相互作用性標識の対の分離によりシグナルを生成する。侵入性の切断反応が起きる事象(例えば、重複する相補的ヌクレオチドによって生成する切断)では、相互作用性標識の対は分離せず、シグナルは生成しない。

40

【0033】

さらに別の局面において、本発明は、第一のオリゴヌクレオチド、第二のオリゴヌクレオチドおよび第三のオリゴヌクレオチドを有する組成物に向けられる。第一のオリゴヌクレオチドは、標的核酸の第一の領域に少なくとも部分的に相補的であり、標的に非相補的

50

な3'末端ヌクレオチドを有する。第二のオリゴヌクレオチドは5'領域および3'領域を有し、この3'領域は標的の第二の領域に少なくとも部分的に相補的であり、この5'領域は、標的に非相補的であるが、鋳型核酸の第一の領域に少なくとも部分的に相補的である。第三のオリゴヌクレオチドは5'領域および3'領域を有し、この3'領域は鋳型の第二の領域に少なくとも部分的に相補的であり、この5'領域は鋳型に非相補的である。相互作用性標識の対の第一のメンバーは5'領域に機能的に結合され、相互作用性標識の対の第二のメンバーは3'領域に機能的に結合される。さらに別の局面において、相互作用性標識の対の第二のメンバーは、第三のオリゴヌクレオチドの+1位に機能的に結合される。さらに別の態様において、本組成物はプライマーの対を含む。

【0034】

10

さらに別の局面において、本発明は、第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドを有する組成物に向けられる。第一のオリゴヌクレオチドは、標的核酸の第一の領域に少なくとも部分的に相補的であり、標的に非相補的な3'末端ヌクレオチドを有する。第二のオリゴヌクレオチドは5'領域および3'領域を有し、この3'領域は標的の第二の領域に少なくとも部分的に相補的であり、この5'領域は標的に非相補的である。相互作用性標識の対の第一のメンバーは5'領域に機能的に結合され、相互作用性標識の対の第二のメンバーは第二のオリゴヌクレオチドの3'領域に機能的に結合される。さらに別の局面において、相互作用性標識の対の第二のメンバーは、第三のオリゴヌクレオチドの+1位に機能的に結合される。さらに別の態様において、本組成物はプライマーの対を含む。

【0035】

20

一つの態様において、本組成物は、切断手段をさらに含む。さらなる態様において、本組成物は同様に、ポリメラーゼを含む。ポリメラーゼおよび切断手段は、単一の酵素に存在してよい。両活性を供与するそのような酵素は、大腸菌DNAポリメラーゼI、T7 DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼまたはTaq DNAポリメラーゼを含む。代替の態様において、重合活性および切断手段はそれぞれ、別個の酵素、例えばPfu DNAポリメラーゼおよびFEN-1ヌクレアーゼによって供与される。ポリメラーゼ活性は、DNAポリメラーゼおよび/または熱安定性でありうるポリメラーゼによって供与される。ポリメラーゼは、5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠いてよい。切断手段は、5'ヌクレアーゼ活性を含むことができる。そのような5'ヌクレアーゼ活性は、FEN-1ヌクレアーゼに存在する。FEN-1ヌクレアーゼは、フラップ特異的なヌクレアーゼであってよい。切断手段はFEN-1ヌクレアーゼであってよく、ポリメラーゼはPfu DNAポリメラーゼであってよい。

30

【0036】

本組成物の別の態様において、第一、第二もしくは第三のオリゴヌクレオチドまたは鋳型核酸の3'末端はブロックされる。3'のブロッキングによって、ポリメラーゼによるオリゴヌクレオチドの3'末端の伸長が阻止されるであろう。

【0037】

ブロックは、標的核酸に非相補的である塩基、または核酸合成もしくは伸長を可能とする条件の下でヌクレオチド三リン酸の付加を阻害する修飾を含んでよい。好ましくは、ブロックされた3'末端は以下を含む。

- a) ジデオキシヌクレオチド;
- b) 3'ヒドロキシルがリン酸基と置き換えられているヌクレオチド; または
- c) 3'炭素にもしくは3'酸素に付着されたレポーター成分を有するヌクレオチド。

40

【0038】

さらに別の態様において、第二のオリゴヌクレオチドの5'部分は、第二のオリゴヌクレオチドの3'部分に少なくとも部分的に相補的である。さらに別の態様において、第三のオリゴヌクレオチドの5'部分は、第三のオリゴヌクレオチドの3'部分に少なくとも部分的に相補的である。さらなる態様において、第二および/または第三のオリゴヌクレオチドの3'部分および5'部分は、第二および/または第三のオリゴヌクレオチドが標的または鋳型核酸にハイブリダイズされない場合に、ステム構造を形成する。第二および/または第三のオリゴヌクレオチドは、第二のオリゴヌクレオチドの5'部分と3'部分の間にリンカー配列

50

を含んでよい。いくつかの態様において、リンカー配列は、標的核酸に相補的ではないが、鋳型核酸の第一の部分に相補的である。

【0039】

キットは、上記の組成物のいずれか一つ、およびその包装材料を含みうる。

【0040】

本発明のさらなる特徴および利点は、以下の態様およびその図面の説明において、ならびに特許請求の範囲からさらに十分に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】 FENヌクレアーゼ切断構造を示す。

10

【図2A】 二本鎖DNA 対 一本鎖DNAの吸光度の相違を示すグラフである。

【図2B】 DNA融解曲線を示すグラフである。

【図2C】 DNAの相対吸光度に及ぼす温度の影響を示すグラフである。

【図2D】 DNAの相対吸光度に及ぼす温度の影響を示すグラフである。

【図2E】 相互作用性標識の対で標識されたDNAの蛍光に及ぼす温度の影響を示すグラフである。

【図2F】 相互作用性標識の対で標識されたDNAの蛍光に及ぼす温度の影響を示すグラフである。

【図2G】 相互作用性標識の対で標識されたDNAの蛍光に及ぼす標的核酸の影響を示すグラフである。

20

【図3】 CBPタグを付けたPFU FEN-1タンパク質を示すSypro Orange染色ポリアクリルアミドゲルである。

【図4】 FEN-1ヌクレアーゼアッセイ法のオートラジオグラフである。

【図5】 キープローブを表したものである。

【図6】 Fen活性を検出するために使用できる3つの鋳型(1、2、3)を示す。

【図7】 図1に示したオリゴヌクレオチドを用いたリアルタイム蛍光検出アッセイ法を図示するグラフである。

【図8】 3'末端の非相補的なヌクレオチドをそれぞれが有する第一のオリゴヌクレオチドおよび遊離フラップを用いた、標的核酸を検出するための本発明の別の態様を示す。

【図9】 実施例5に記述したリアルタイム蛍光検出アッセイ法のグラフである。

30

【図10】 実施例6に記述したリアルタイム蛍光検出アッセイ法を図示するグラフである。

【図11】 単一の切断反応での本発明の別の態様を示す。

【発明を実施するための形態】

【0042】

説明

本発明は、標的核酸、ならびに上流および下流オリゴヌクレオチドを含む切断構造を形成かつ切断することによって、標的核酸が検出される方法を提供する。この方法は、2つまたはそれ以上の切断反応により逐次的に行うことができる。逐次切断反応において、標的核酸、第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドを含む第一の切断構造が形成される。第一の切断構造は、第一および第二のオリゴヌクレオチドが標的核酸とハイブリダイズする場合に、形成される。第二のオリゴヌクレオチドの5'フラップが、切断され遊離される。遊離されたフラップは、第二の切断構造において上流オリゴヌクレオチドとして働く。第二の切断構造は、標的核酸、第二のオリゴヌクレオチドの遊離フラップおよび第三のオリゴヌクレオチドを含む。第二の切断構造は、遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドが鋳型核酸とハイブリダイズする場合に、形成される。第一の切断事象も第二の切断事象もともに非侵入性である場合には、第三のオリゴヌクレオチドは相互作用性標識の対の間で切断される。相互作用性標識の対の間での切断によって検出可能なシグナルが生成する。標的核酸の存在および/または量は、生成したシグナルを検出することによって判定される。第一または第二の切断事象が侵入性である事象では、

40

50

シグナルが生成しない。

【 0 0 4 3 】

本明細書において用いられる、「標的核酸」とは、第一のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的な第一の領域および第二のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的な第二の領域を3'から5'方向の順に含む、ポリヌクレオチドをいう。いくつかの態様において、標的は、伸長領域を標的の第一領域と第二領域の間に含んでよい。標的核酸は、一本鎖または二本鎖DNAまたはRNAを含んでよい。

【 0 0 4 4 】

本明細書において用いられる、標的核酸をいう場合の「第一の領域」とは、第一のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを可能とするのに十分な長さのヌクレオチドを意味し、この「第一の領域」は、本明細書において定義される、第一のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的である。「第一の領域」は、長さが約6ヌクレオチドから約1000ヌクレオチドの範囲内にあり、好ましくは約8から30ヌクレオチドの範囲、最適には、10から25ヌクレオチドの範囲である。

10

【 0 0 4 5 】

本明細書において用いられる、本明細書中下記の、鑄型核酸をいう場合の「第一の領域」とは、第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップのハイブリダイゼーションを可能とするのに十分な長さのヌクレオチドを意味し、この「第一の領域」は、本明細書において定義される、第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップの少なくとも一部分に相補的である。「第一の領域」は、長さが約6ヌクレオチドから約1000ヌクレオチドの範囲内にあり、好ましくは約8から30ヌクレオチドの範囲、最適には、10から25ヌクレオチドの範囲である。

20

【 0 0 4 6 】

本明細書において用いられる、「伸長領域」とは、核酸重合活性を介してオリゴヌクレオチドの伸長を可能とするのに十分な長さのヌクレオチド(例えば、フォワードプライマーまたは第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップ)をいう。「伸長領域」は、標的および鑄型核酸のいくつかの態様において存在する。「伸長領域」は、存在する場合、標的または鑄型核酸の第一領域と第二領域の間にある。「伸長領域」は、長さが約1ヌクレオチドから約1000ヌクレオチドであり、約1~100ヌクレオチドの範囲が好ましく、3から50の範囲がより好ましく、最適には、長さが3~10ヌクレオチドの範囲である。

30

【 0 0 4 7 】

本明細書において用いられる、標的核酸をいう場合の「第二の領域」とは、第二のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを可能とするのに十分な長さのヌクレオチドを意味し、この「第二の領域」は、本明細書において定義される、第二のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的である。「第二の領域」は、長さが約6ヌクレオチドから約1000ヌクレオチドの範囲内にあり、好ましくは約8から30ヌクレオチドの範囲、最適には、10から25ヌクレオチドの範囲である。

【 0 0 4 8 】

本明細書において用いられる、本明細書中下記の、鑄型核酸をいう場合の「第二の領域」とは、第三のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを可能とするのに十分な長さのヌクレオチドを意味し、この「第二の領域」は、本明細書において定義される、第三のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的である。「第二の領域」は、長さが約6ヌクレオチドから約1000ヌクレオチドの範囲内にあり、好ましくは約8から30ヌクレオチドの範囲、最適には、10から25ヌクレオチドの範囲である。

40

【 0 0 4 9 】

本明細書において用いられる、第一、第二、第三または第四のオリゴヌクレオチドをいう場合の「~の少なくとも一部分」とは、第一、第二、第三または第四のオリゴヌクレオチドの100%未満(例えば、99%、90%、75%、50%、25%など)を意味する。

【 0 0 5 0 】

本明細書において用いられる、「鑄型核酸」とは、第二のオリゴヌクレオチドの遊離フ

50

ラップの少なくとも一部分に相補的な第一の領域および第三のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に相補的な第二の領域を3'から5'方向の順に含むポリヌクレオチドをいう。鋳型核酸は「伸長領域」を鋳型の第一領域と第二領域の間に含んでもよい。鋳型核酸は一本鎖もしくは二本鎖DNAもしくはRNAまたはその化学修飾もしくは非天然変種を含んでもよい。

【0051】

本明細書において用いられる、「オリゴヌクレオチド」とは、標的核酸配列および/または鋳型核酸配列に相補的な領域を含む核酸をいう。

【0052】

本明細書において用いられる、「オリゴヌクレオチド」という用語は同様に、検出されるプライマー、プローブ、上流オリゴヌクレオチド(例えば、第一のオリゴヌクレオチドおよび第一の遊離されたフラップ)、下流オリゴヌクレオチド(例えば、第二のオリゴヌクレオチドおよび第三のオリゴヌクレオチド)ならびにオリゴマー断片をいい、ポリデオキシリボヌクレオチド(2-デオキシ-D-リボースを含有する)に対する、ポリリボヌクレオチド(D-リボースを含有する)に対する、およびプリンもしくはピリミジン塩基のN-グリコシドまたは修飾プリンもしくはピリミジン塩基(脱塩基部位を含む)であるその他任意のタイプのポリヌクレオチドに対する総称であるものとする。「オリゴヌクレオチド」という用語は、二本鎖および一本鎖DNA、ならびに二本鎖および一本鎖RNAを含む。「オリゴヌクレオチド」という用語は、ゲノムDNAもしくはRNA、cDNA、半合成由来、または合成由来のポリヌクレオチドを表し、これは、それが合成由来であるまたは操作されているという理由で、(1)自然界において結び付いているポリヌクレオチドの全部または一部と結び付いておらず、および/または(2)自然界において結合しているもの以外のポリヌクレオチドに結合している。オリゴヌクレオチドが、伸長領域に相補的なその3'末端からヌクレオチドを重合する重合活性のためのプライマーとして用いられる場合、オリゴヌクレオチドをプライマーということもできる。本発明による「オリゴヌクレオチド」は同様に、ペプチド核酸(PNA)または核酸およびペプチド核酸のハイブリッドをいう。

【0053】

本発明において有用なオリゴヌクレオチドは、一般的に長さが約8ヌクレオチドから約200ヌクレオチドの範囲内にある。

【0054】

本発明による「第一のオリゴヌクレオチド」は、長さが好ましくは6から100ヌクレオチド、より好ましくは8から30ヌクレオチドおよび最も好ましくは20ヌクレオチドである。「第一の」オリゴヌクレオチドは、標的核酸に少なくとも部分的に相補的である。第一のオリゴヌクレオチドは、標的核酸に非相補的である3'末端を持ちうる。

【0055】

本発明による「第二のオリゴヌクレオチド」は、長さが好ましくは20~120ヌクレオチド、より好ましくは25~45ヌクレオチドおよび最も好ましくは35ヌクレオチドである。「第二のオリゴヌクレオチド」は3'および5'領域を含む。「第二のオリゴヌクレオチド」の3'領域は、標的核酸に少なくとも部分的に相補的であり、好ましくは8~80ヌクレオチドおよび最も好ましくは10~20ヌクレオチドである。「第二のオリゴヌクレオチド」の5'領域は、二本鎖構造が事前形成されたフラップを含む態様の場合には、長さが好ましくは0から80ヌクレオチドおよび最も好ましくは10から20ヌクレオチドである。本発明の別の態様において、本発明による第二のオリゴヌクレオチドの5'領域は、標的核酸に相補的ではない。

【0056】

本発明による「第三のオリゴヌクレオチド」は、長さが好ましくは20~120ヌクレオチド、より好ましくは25~45ヌクレオチドおよび最も好ましくは35ヌクレオチドである。「第三のオリゴヌクレオチド」は3'および5'領域を含む。本発明による第三のオリゴヌクレオチドは、鋳型核酸の領域に少なくとも部分的に相補的でありかつ好ましくは8から80ヌクレオチドおよび最も好ましくは10~20ヌクレオチドである、3'領域を含む。「第三のオ

リゴヌクレオチド」の5'領域は、二本鎖構造が事前形成されたフラップを含む態様の場合には長さが好ましくは0から80ヌクレオチド、最も好ましくは10から20ヌクレオチドである。本発明の別の態様において、本発明による「第三のオリゴヌクレオチド」の5'領域は、鋳型核酸に相補的ではない。

【0057】

一つの態様において、本発明は切断抵抗性のオリゴヌクレオチドを用いる。好ましい態様において、第二および/または第三のオリゴヌクレオチドは切断抵抗性のプローブである。

【0058】

本明細書において用いられる、本発明による「切断抵抗性のプローブ」または「切断抵抗性のオリゴヌクレオチド」とは、非重複性(非侵入性)の切断構造が形成されると切断因子による切断を受けやすい、しかし重複性(侵入性)の切断構造が形成されると切断因子によって切断できない、切断構造を形成するプローブである。この切断抵抗性は、重複構造の標的とされるプローブの一部分を切断抵抗性にする一つまたは複数の修飾を含むことによって達成される。したがって、切断抵抗性のプローブは、本発明の切断因子による切断に抵抗性である少なくとも一部分を有する。

【0059】

一つの態様において、切断抵抗性のプローブは、プローブを本発明の切断因子による切断に抵抗性にする+1および/または+2位の下流に一つまたは複数の修飾を含む。これらの修飾は、重複性(侵入性)の切断構造による切断の標的とされる領域においてプローブを切断抵抗性にする。しかしながら、切断抵抗性のプローブは、非重複性(非侵入性)の切断構造による切断の標的とされる領域において切断を受けやすい。適当な修飾は、核酸のリン酸エステルをチオリン酸エステルとおよび/または2'-ヒドロキシルを2'-O-メトキシと交換することを含むが、これらに限定されることはない。他の適当な修飾は2'-デオキシ-2'-フルオロ-β-D-アラビノ核酸(2'-F-ANA)ヌクレオチド、ロック核酸(LNA)およびENA: 2'-O, 4'-C-エチレン-架橋核酸を含む。2006年11月30日付で出願された米国特許出願第11/607,341号は、本発明において適当である切断抵抗性のオリゴヌクレオチドを作出および使用する方法について記述しており、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0060】

5'フラップを有する下流プローブをいう場合、標的とハイブリダイズする下流プローブのヌクレオチドは、ヌクレオチド+1~+Xであると定義され、+1位は、下流プローブのハイブリダイズ領域の5'末端のヌクレオチドと定義され、領域+2は、+1位のすぐ下流にあるヌクレオチドと定義される、などである。5'フラップのヌクレオチドは、ヌクレオチド-1~-Xであると定義される。-1位は、フラップ領域の3'末端のヌクレオチドと定義される。

【0061】

本明細書において用いられる、本発明による「フォワードプライマー」とは、長さが好ましくは6から100ヌクレオチド、より好ましくは8から30ヌクレオチドおよび最も好ましくは20ヌクレオチドである。「フォワードプライマー」は、標的核酸または鋳型核酸を鋳型として用いる核酸合成用のプライマーとしてのその使用を可能とするのに十分なその3'末端の長さで、標的核酸および/または鋳型核酸に少なくとも部分的に相補的である。

【0062】

本明細書において用いられる、本発明による「上流オリゴヌクレオチド」とは、標的または鋳型核酸にアニールされた場合に下流オリゴヌクレオチドの上流にある任意のオリゴヌクレオチドである。例えば、「上流オリゴヌクレオチド」は、「第一のオリゴヌクレオチド」または「遊離されたフラップ」でありうる。

【0063】

本明細書において用いられる、本発明による「下流オリゴヌクレオチド」とは、標的または鋳型核酸にアニールされた場合に上流オリゴヌクレオチドの下流にある任意のオリゴヌクレオチドである。例えば、「下流オリゴヌクレオチド」は本発明の「第二の」または「第三の」オリゴヌクレオチドでありうる。

10

20

30

40

50

【0064】

本明細書において用いられる、「完全に相補的」とは、オリゴヌクレオチドの100%のヌクレオチドが、標的または鋳型核酸の対応する相補的なヌクレオチドに水素結合できることを意味する。

【0065】

本明細書において用いられる、オリゴヌクレオチドをいう場合の「少なくとも部分的に相補的」とは、オリゴヌクレオチドの100%未満(例えば、99%、90%、75%、50%、25%など)のヌクレオチドが、標準的なストリンジェント条件の下で標的または鋳型核酸のヌクレオチドとハイブリダイズ(すなわち水素結合を形成)できることを意味する。オリゴヌクレオチドが「部分的に相補的」である場合、相補的なヌクレオチドの領域は連続したヌクレオチドであってもなくてもよい。

10

【0066】

核酸合成のプライマーとしては機能せず、むしろ5'領域でフラップを供与する、本明細書において定義される、「第二のオリゴヌクレオチド」の場合、「部分的な相補性」とは、標準的なストリンジェント条件の下で標的核酸との水素結合を可能とするのに十分な相補性の領域に先立つ、標的核酸に対して非相補性のヌクレオチドの領域をいい、この第二のオリゴヌクレオチドは本発明による二本鎖および/または切断構造を形成することができる。一つの態様において、十分な相補性の領域は10またはそれ以上の連続したヌクレオチド(例えば、20、30、40、50、100など)であってよい。別の態様において、十分な相補性の領域は、標的核酸とのハイブリッドの形成を可能とするのに、標的核酸と相補的である十分な数の非連続ヌクレオチドを含む。「第二のオリゴヌクレオチド」の3'末端は、標的核酸に相補的でありうるが、相補的である必要はない。3'末端が標的核酸に相補的ではない場合(例えば、3'末端が標識されるおよび/またはハイブリダイズされたもしくはハイブリダイズされていないオリゴヌクレオチドの検出の機能を果たすような場合には)、非相補性の領域は連続してもしなくてもよい。一つの態様において、非相補性の領域は、連続する1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3、4、5ヌクレオチドなど、または10またはそれ以上の長さによって連続するヌクレオチド(20、30、40、50など)であってよい。別の態様において、非相補性の領域は、標的核酸と非相補的な十分な数の非連続ヌクレオチドを含む。

20

【0067】

本発明による「第一のフラップ」、「第二のフラップ」または「第一の遊離されたフラップ」、「第二の遊離されたフラップ」は、長さが好ましくは6から80ヌクレオチドおよび最も好ましくは10~25ヌクレオチドである。

30

【0068】

本明細書において定義される、「遊離されたフラップ」の場合、第二の切断反応のための上流オリゴヌクレオチドとして働くことができる。遊離されたフラップは、鋳型核酸の第一の領域とハイブリダイズしうるが、フラップの3'末端は鋳型と相補的であってもなくてもよい。一つの態様において、フラップの3'末端は、連続したヌクレオチド上の長さ10またはそれ以上のヌクレオチド(20、30、40、50など)にわたって鋳型と相補的である。別の態様において、フラップの3'末端は、鋳型核酸に相補的な十分な数の非連続ヌクレオチドを含む鋳型核酸と相補性の領域を含む。相補性の領域は、ハイブリッドの形成を可能とするのに十分な数の連続したヌクレオチドを含まなければならない。いくつかの態様において、遊離されたフラップは、鋳型核酸に非相補的な一つまたは複数の3'末端ヌクレオチドを有する。

40

【0069】

5'領域でフラップを供与する、本明細書において定義される、「第三のオリゴヌクレオチド」の場合、「部分的な相補性」とは、標準的なストリンジェント条件の下で鋳型核酸との水素結合を可能とするのに十分な相補性の領域に先立つ、鋳型核酸に対して非相補性の少なくとも10個の連続したヌクレオチド(20、30、40、50ヌクレオチドなど)の領域をいう。この十分な相補性の領域は10またはそれ以上の連続したヌクレオチド(例えば、20、3

50

0、40、50、100など)であってよい。「第三のオリゴヌクレオチド」の3'末端は、鋳型核酸に相補的でありうるが、相補的である必要はない。3'末端が鋳型核酸に相補的ではない場合(例えば、3'末端が標識されるおよび/またはハイブリダイズされたもしくはハイブリダイズされていないオリゴヌクレオチドの検出の機能を果たすような場合には)、第三のオリゴヌクレオチドと鋳型核酸との相補性が乱されない限り、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3、4、5ヌクレオチドなど、または10またはそれ以上の連続したヌクレオチド(20、30、40、50など)の長さにならって非相補的であってよい。

【0070】

本明細書において定義される、「第三のオリゴヌクレオチド」とは、切断構造から切断および遊離されうる5'フラップを供与しうる。鋳型との相補性の領域は、鋳型核酸とのハイブリットの形成を可能とするのに十分な数の連続したヌクレオチドを含まなければならない。

10

【0071】

本明細書において用いられる、「混合する」とは任意の順序で組み合わせることを意味する。

【0072】

本明細書において用いられる、「二本鎖の形成を可能とする条件」とは、本発明の二本鎖の形成に可能および好ましくは最適な緩衝液(すなわち指定の塩および有機溶媒濃度の緩衝液)、温度、インキュベーション時間および二本鎖の構成要素(例えば、標的核酸、第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチド)の濃度をいう。例えば、本発明の一つの態様において、「二本鎖の形成を可能とする条件」の下で、標的核酸、第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドは、第二のオリゴヌクレオチドの5'領域がフラップとなるようにハイブリダイズするであろう。

20

【0073】

本明細書において用いられる、「二本鎖」とは、標的または鋳型核酸、上流オリゴヌクレオチドまたは上流プライマーおよび下流の少なくとも3'領域を含む複合体をいう。標的または鋳型核酸ならびに上流オリゴヌクレオチドまたは上流プライマーおよび、下流オリゴヌクレオチドの少なくとも3'領域のそれぞれの相補的なヌクレオチド塩基は、水素結合の形成によってハイブリダイズされる。

【0074】

本明細書において用いられる、「第一の二本鎖」とは、標的、第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドの少なくとも3'領域を含む複合体をいい、この標的または鋳型核酸ならびに第一のオリゴヌクレオチドおよび、第二のオリゴヌクレオチドの少なくとも3'領域のそれぞれの相補的なヌクレオチド塩基は、水素結合の形成によってハイブリダイズされる。いくつかの態様において、第二のオリゴヌクレオチドの5'領域および標的核酸の伸長領域は、相補的ではなく、したがって二本鎖内にハイブリッドを形成しない。したがって伸長領域は一本鎖であってよい。

30

【0075】

本明細書において用いられる、「第一の二本鎖」とは同様に、標的核酸、上流プライマーおよび下流オリゴヌクレオチドの少なくとも3'領域を含む複合体をいい、この鋳型核酸ならびに上流プライマーおよび下流オリゴヌクレオチドの少なくとも3'領域のそれぞれの相補的なヌクレオチド塩基は、水素結合の形成によってハイブリダイズされ、この下流オリゴヌクレオチドの5'領域はフラップとなる。

40

【0076】

本明細書において用いられる、「第二の二本鎖」とは、鋳型核酸、第二のオリゴヌクレオチドの開放されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドの少なくとも3'領域を含む複合体をいい、この鋳型核酸ならびに第二のオリゴヌクレオチドの開放されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドの少なくとも3'領域のそれぞれの相補的なヌクレオチド塩基は、鋳型核酸との水素結合の形成によってハイブリダイズされる。

【0077】

50

分枝DNAまたはDNA/RNAハイブリッドの「フラップ」または「アーム」とは、分枝DNAまたはハイブリッドDNA/RNAと水素結合しないが、分枝DNAまたはDNA/RNAハイブリッドの水素結合部材とリン酸結合する5'ポリヌクレオチドをいう。したがって、フラップは、構造の二本鎖部分の垂下する(つまり、分枝である)核酸鎖である。本発明による切断構造の「フラップ」は、好ましくは約1~80ヌクレオチド、より好ましくは約5~25ヌクレオチドおよび最も好ましくは約10~20ヌクレオチドであり、分枝構造の「屈曲部」に位置付けされたリン酸に配置される位置でまたはフラップ鎖の屈曲部より近位および/もしくは遠位に配置される1から10のリン酸のいずれかの位置で好ましくは切断される。切断の位置は、下流オリゴヌクレオチドに対する上流オリゴヌクレオチドの配置に依存する。

【0078】

10

本明細書において用いられる、「屈曲部」とは、5'フラップの第一の一本鎖ヌクレオチドと第一の二本鎖(例えば、標的または鋳型核酸にハイブリタイズされた)ヌクレオチドの間のリン酸結合をいう。本発明による「フラップ」は、検出可能な標識で標識することができる。本発明による「フラップ」または「アーム」は、本明細書において定義される「切断構造」の一部であり、遊離されて「遊離されたアーム」または「遊離されたアーム」を形成する場合に切断手段によって切断される。

【0079】

核酸に関して「一本鎖」という用語は、その他任意の核酸に水素結合されえない一本のポリヌクレオチド鎖をいい、または、これは(二次もしくは三次構造を形成するように)それ自体に内部的にもしくは別の核酸分子に水素結合されうる。

20

【0080】

核酸に関して「一本鎖の」という用語は、別の核酸に水素結合されない、かつ好ましくは内部相補性を全くまたはほとんど含有しない(10%未満、例えば9%、5%、4%など)ポリヌクレオチド鎖をいう。

【0081】

本明細書において用いられる、「伸長」とは、従来のDNA重合反応における第一のオリゴヌクレオチドまたは第二のオリゴヌクレオチドの遊離された一本鎖アームの3'末端へのヌクレオシド三リン酸の付加をいう。したがって、第一のオリゴヌクレオチドの3'末端および第二のオリゴヌクレオチドの遊離された一本鎖アームの3'末端は、ブロックされず、本明細書においてプライマーともいわれる。

30

【0082】

一般的に、鋳型、第一、第二および第三のオリゴヌクレオチドの3'末端は、伸長産物の作出を抑制するために「ブロック」されるであろう。「ブロッキング」は非相補的な塩基を使用することによって、またはビオチンもしくはリン酸基などの化学成分を最後のヌクレオチドの3'ヒドロキシルに付加することによって達成することができる。ブロッキングは、3'-OHを除去することによってもしくはジデオキシヌクレオチドなどの3'-OHを欠くヌクレオチドを使用することによって、または当業者に公知の他の方法によって達成することもできる。

【0083】

本明細書において用いられる、「核酸重合活性」とは、ヌクレオシド三リン酸の重合を触媒する酵素をいう。一般的に、酵素は、標的配列にアニールされたプライマーの3'末端で重合を開始し、核酸に沿って5'方向に進行し、5'から3'方向のヌクレアーゼ活性を保持する場合に、介在するアニールされたプローブを加水分解して、標識されたプローブ断片と標識されていないプローブ断片とをともに、合成が終了するまで放出する。公知のDNAポリメラーゼは、例えば、大腸菌DNAポリメラーゼI、T7 DNAポリメラーゼ、サーマス・サーモフィルス(*Thermus thermophilus*) (Tth) DNAポリメラーゼ、パチルス・ステアロサーモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*) DNAポリメラーゼ、サーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*) DNAポリメラーゼ、サーマス・アクアティカス(Taq) DNAポリメラーゼおよびパイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*) (Pfu) DNAポリメラーゼを含む。核酸鋳型がRNAである場合に、「核酸重合活性」とは、逆転写酵素など

40

50

の、RNA依存重合活性をいう。

【0084】

本明細書において用いられる、「5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性」または「5'→3'エキソヌクレアーゼ活性」とは、従来いくつかのDNAポリメラーゼと関連付けられている鑄型特異的な核酸ポリメラーゼの活性、例えば5'→3'エキソヌクレアーゼ活性をいい、それによってモノヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは連続的にポリヌクレオチドの5'末端から除去され(すなわち大腸菌DNAポリメラーゼIはこの活性を持つが、Klenow (Klenow et al., 1970, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 65:168)断片はそれを持たない(Klenow et al., 1971, Eur. J. Biochem., 22:371))、あるいはポリヌクレオチドが5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性に本質的に含まれるエンドヌクレアーゼ活性により5'末端から除去される。

10

【0085】

本明細書において用いられる、「5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠く」または「5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠く」という語句は、野生型酵素の活性の10%、5%、1%、0.5%または0.1%未満を有することを意味する。「5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠く」または「5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠く」という語句は、検出不能な5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を有すること、または野生型酵素の5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性の約1%、0.5%もしくは0.1%未満を有することを意味する。5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性は、適切な緩衝液(例えば、10 mM トリス-HCl (pH 8.0)、10 mM MgCl₂および50 μg/ml ウシ血清アルブミン)の存在下においてニックの入った基質を30分間60 で切断する段階、10 mM EDTAおよび1 mg/ml プロモフェノールブルーを含有する95%ホルムアミドの添加により切断反応を終了させる段階、ならびにニック入りのまたはニックなしの産物を検出する段階を含む、エキソヌクレアーゼアッセイ法によって測定することができる。

20

【0086】

二つの重合段階を含む本発明の方法によれば、重合段階のそれぞれは、同じ核酸重合活性によってまたは異なる核酸重合活性によって行うことができる。

【0087】

本明細書において用いられる、「重合」、「重合活性」または「ポリメラーゼ活性」とは、ヌクレオシド三リン酸をオリゴヌクレオチドの3'末端に付加することをいい、このオリゴヌクレオチドの3'末端はブロックされない。

30

【0088】

本明細書において用いられる、「ヌクレオシド」とは、糖(例えばDNA中の2-デオキシリボースまたはRNA中のリボース)に結合した任意のプリンもしくはピリミジン塩基、または修飾プリンもしくはピリミジン塩基をいう。

【0089】

本明細書において用いられる、「ヌクレオチド」とは、糖に結合した任意のプリンもしくはピリミジン塩基、または修飾プリンもしくはピリミジン塩基をいい、この糖がリン酸基に結合される。

【0090】

本明細書において用いられる、「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」とは、特異的なポリヌクレオチド鑄型配列を増幅するためのインビトロ法をいう。PCR反応は、反復的な一連の温度サイクルを含み、一般的に50~100 μlの量で行われる。反応混合物は、dNTP (4つのデオキシリボヌクレオチドdATP、dCTP、dGTPおよびdTTPのそれぞれ)、プライマー、緩衝液、DNAポリメラーゼ、ならびにポリヌクレオチド鑄型を含む。一つのPCR反応は、ポリヌクレオチド分子の変性および合成の5から100の「サイクル」からなりうる。PCR過程は、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号に記述されており、それらの開示は参照により本明細書に組み入れられる。

40

【0091】

本明細書において用いられる、「ポリメラーゼ連鎖反応条件」または「PCR条件」とは

50

、PCRの実行が可能なおよび好ましくは最適な緩衝液、一連の温度インキュベーション段階および時間をいう。一連の温度インキュベーション段階および時間は、好ましくは本発明の核酸の変性、アニーリングおよび伸長を可能にする。PCR反応条件は、当技術分野において公知であり、本明細書において記述される。

【0092】

「核酸増幅反応」は、特定核酸配列の数の増加を意味し、非限定的に、ポリメラーゼ連鎖反応またはリガーゼ連鎖反応のインビトロ法によって達成されうる。

【0093】

本明細書において用いられる、「核酸増幅反応条件」とは、核酸増幅の実行が可能なおよび好ましくは最適な緩衝液、一連の温度インキュベーション段階および時間をいう。増幅は、特定核酸配列の数の増加を意味し、非限定的に、ポリメラーゼ連鎖反応またはリガーゼ連鎖反応のインビトロ法によって達成されうる。そのような反応条件は、当技術分野において公知であり、本明細書において記述される。核酸反応条件はPCR条件を包含する。

10

【0094】

「核酸増幅反応混合物」とは、緩衝液、dNTP、水、標的核酸およびポリメラーゼのような、核酸増幅に必要な成分を含む混合物をいう。核酸増幅のための方法に依って、必要な成分は異なりうる。例えば、リガーゼ連鎖反応では、あるポリメラーゼ連鎖反応では必要とされない可能性のあるリガーゼの存在を必要とする。

【0095】

本明細書において用いられる、「切断構造」とは、フラップを有する少なくとも二本鎖の核酸を含むポリヌクレオチド構造をいう。本発明による「切断構造」は、標的核酸配列または鋳型核酸配列を含むことができ、また、標的配列に少なくとも部分的に相補的でありかつ完全に相補的でありうる上流オリゴヌクレオチド(例えば、図1のA-1)、および標的配列に相補的でありかつフラップを含みうる下流オリゴヌクレオチド(例えば図1中のFCまたはF2H)を含む。一つの態様において、「第一の切断構造」は、少なくともギャップが第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドの相補的部分を分離するように標的にアニールする第一のオリゴヌクレオチドによって形成される。別の態様において、「第一の切断構造」は、第二のオリゴヌクレオチドの水素結合により(すなわち、二本鎖およびフラップの連結部で)形成される二本鎖への上流オリゴヌクレオチド(プライマー)の3'末端からの重合によって形成される。別の態様において、「第二の切断構造」は、少なくともニックが遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドの相補的部分を分離するように鋳型核酸にアニールする第一の遊離されたフラップによって形成される。別の態様において、「第二の切断構造」は、第三の下流オリゴヌクレオチドおよび鋳型核酸の水素結合により(すなわち、二本鎖およびフラップの連結部で)形成される二本鎖への上流オリゴヌクレオチドの3'末端(すなわち、第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたアーム)からの重合によって形成される。好ましくは、上流オリゴヌクレオチドの3'末端はブロックされ、末端のブロッキングは上流オリゴヌクレオチドの3'末端の伸長を阻止する。

20

30

【0096】

本明細書において用いられる、代替的な用語「に隣接する」を使用することもできる。

40

【0097】

新たに合成された核酸の重合が伸長領域を通じて完全に継続するそれらの反応において、上記の距離は当然ながらヌクレオチドなしである。

【0098】

したがって、本発明による「切断構造」は、鋳型核酸とハイブリダイズされる第二のオリゴヌクレオチド、および下流オリゴヌクレオチドの5'部分であるフラップを含む第三のオリゴヌクレオチドであってよい。

【0099】

本明細書において用いられる「切断構造」とは5'フラップを含み、例えば、3'フラップのみを含有する二本鎖核酸などの5'フラップを含まない構造は包含しない。本明細書にお

50

いて用いられる、「切断構造」とはリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含み、したがってRNAまたはDNAでありうる。

【0100】

本明細書において用いられる「切断手段」とは、作用因子、好ましくは本発明による切断構造に特異的である、つまり、本発明による切断構造を切断する酵素をいう。

【0101】

「切断手段」または「切断因子」という用語は、5'エンドヌクレアーゼ活性を持つ酵素、例えばDNAポリメラーゼ、例えば大腸菌由来のDNAポリメラーゼI、ならびにサーマス・アクアティカス(Taq)、サーマス・サーモフィルス(Tth)およびサーマス・フラバス(Thermus flavus) (Tfl)由来のDNAポリメラーゼを含む。「切断手段」という用語は、0~2ヌクレオチド、2~20ヌクレオチド、20~50ヌクレオチドまたは50を超えるヌクレオチドの伸長領域一本鎖ギャップ(つまり、上流プライマーおよび/または下流プローブとハイブリダイズされない伸長領域の部分)を含む本発明による切断構造を切断する、作用因子を含む。「切断手段」という用語は同様に、FENヌクレアーゼを具現する。「FENヌクレアーゼ」という用語は、5'エキソヌクレアーゼおよび/またはエンドヌクレアーゼ活性を持つ酵素のことである。「FENヌクレアーゼ」という用語は同様に、5'フラップに特異的なヌクレアーゼを具現する。「切断手段」という用語は、0~2ヌクレオチド、2~20ヌクレオチド、20~50ヌクレオチドまたは50を超えるヌクレオチドの伸長領域一本鎖ギャップ(つまり、上流プライマーおよび/または下流プローブとハイブリダイズされない伸長領域の部分)を含む本発明による切断構造を切断する、FENヌクレアーゼを含む。

10

20

【0102】

本発明による「切断手段」または「切断因子」は、アーケオグロブス・フルギダス(Archaeoglobus fulgidus)、メタノコッカス・ヤナシイ、パイロコッカス・フリオサス、ヒト、マウスまたはアフリカツメガエルに由来するFENヌクレアーゼ酵素を含むが、これに限定されることはない。本発明によるヌクレアーゼは同様に、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) RAD27およびシゾサッカロマイセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe) RAD2、5'から3'方向のエキソヌクレアーゼドメインに関連する(例えば、大腸菌、サーマス・アクアティカス(Taq)、サーマス・フラバス(Tfl)、バチルス・カルドテナクス(Bacillus caldotenax) (Bca)、肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)) Pol DNAポリメラーゼならびにT5 5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ、T7遺伝子6エキソヌクレアーゼおよびT3遺伝子6エキソヌクレアーゼを含むがこれらに限定されない、FENのファージ機能相同体を含む。好ましくは、Taq、TflおよびBca FENヌクレアーゼの5'から3'方向のエキソヌクレアーゼドメインのみが使用される。本発明による「切断手段」は同様に、RNAが鋳型または標的核酸であるRNA/DNA複合体を含んだ本発明による切断構造を切断する作用因子、好ましくは酵素を含む。「切断手段」という用語は、RNase Hを含まない。

30

【0103】

「切断手段」は同様に、上流オリゴヌクレオチド(例えば、A-2、図1)および一つまたは複数の下流オリゴヌクレオチド(例えば、FC、図1)を含む切断構造を切断できる酵素を含み、重合は、上流オリゴヌクレオチドの伸長された3'末端が下流オリゴヌクレオチドの相補的部分(例えばC、図1)に隣接するが、重複しないように上流オリゴヌクレオチドの3'末端から行われた。

40

【0104】

「切断手段」は同様に、少なくともニックがオリゴヌクレオチドの相補的部分を分離するように、標的または鋳型核酸にアニールされる上流オリゴヌクレオチド(例えばA-1、図1)および下流オリゴヌクレオチド(例えばFC、図1)を含む切断構造を切断できる酵素を含む。

【0105】

本明細書において用いられる、「隣接する」とは、20未満のヌクレオチド、例えば15ヌクレオチド、10ヌクレオチド、5ヌクレオチドまたは0ヌクレオチドにより分離されている

50

ことをいう。

【0106】

「切断手段」または「切断因子」は同様に、上流オリゴヌクレオチド(例えばA-2、図1)および一つまたは複数の下流オリゴヌクレオチド(例えばFC、図1)を含む切断構造を切断できる酵素を含み、重合は、上流オリゴヌクレオチドの伸長された3'末端が、下流オリゴヌクレオチドの相補的部分(例えばC、図1)から50未満のヌクレオチドであるが、下流オリゴヌクレオチドに重複しないように、上流オリゴヌクレオチドの3'末端から行われた。本発明のこの態様によれば、伸長領域にわたり、下流オリゴヌクレオチドのフラップの連結部に十分に近い上流オリゴヌクレオチドの3'末端の間の距離は、本発明による切断構造を形成するように、上流オリゴヌクレオチドの3'末端から十分な量の重合が行われることを可能とする長さのものである。

10

【0107】

二つの切断段階を含む本発明の方法によれば、切断段階のそれぞれは同じ切断手段によって、または異なる切断手段によって行うことができる。

【0108】

本発明による「切断手段」は、ポリメラーゼ活性もヌクレアーゼ活性もともに持つ単一の酵素またはヌクレアーゼ活性を持つが、ポリメラーゼ活性を欠く酵素でありうる。

【0109】

本明細書において用いられる、「可能とする」とは、二本鎖形成に必要な全ての成分(例えば、第一および第二のオリゴヌクレオチドならびに標的核酸、または第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップ、鋳型核酸および第三のオリゴヌクレオチド)が存在する場合に、本明細書において定義される二本鎖または第二の二本鎖が形成されるように反応が進行するのを可能にすることを意味する。「可能とする」とは同様に、任意の必要な成分(例えば、第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップ)を鋳型および第三のオリゴヌクレオチドを含む混合物に添加すること、ならびに本明細書において定義される、「第二の二本鎖」が形成されるように反応が進行するのを可能にすることを意味する。「可能とする」とは同様に、任意の必要な成分(例えば、第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップ)を鋳型、第三のオリゴヌクレオチドおよび第四のオリゴヌクレオチドを含む混合物に添加すること、ならびに本明細書において定義される、「第二の二本鎖」が形成されるように反応が進行するのを可能にすることを意味する。「可能とする」とは同様に、任意の必要な成分(例えば、鋳型および第三のオリゴヌクレオチド)を第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップに添加すること、ならびに本明細書において定義される、二本鎖または第二の二本鎖が形成されるように反応が進行するのを可能にすることを意味する。

20

30

【0110】

本明細書において用いられる、「標的核酸配列を検出する」または「標的核酸配列を測定する」とは、試料中の特定の標的核酸配列の存在を決定すること、または試料中の標的核酸配列の存在の指標として試料中の特定の標的核酸配列の量を決定することをいう。測定または検出できる標的核酸配列の量は、好ましくは約1分子~ 10^{20} 分子、より好ましくは約100分子~ 10^{17} 分子および最も好ましくは約1000分子~ 10^{14} 分子である。本発明の一つの態様によれば、検出される核酸は、本明細書において定義される、標識された下流オリゴヌクレオチド(例えば、図1中のF2H)に由来する。本発明によれば、相互作用性標識の対の第一のメンバーは下流オリゴヌクレオチドの5'フラップに付着され、相互作用性標識の対の第二のメンバーは下流オリゴヌクレオチドの3'領域に付着される。

40

【0111】

本発明によるオリゴヌクレオチド(例えば、第一、第二、第三のオリゴヌクレオチド)は、標識を5'末端、3'末端に付着することによって、またはオリゴヌクレオチドを内部で標識化することによって標識されうる。

【0112】

別の態様において、プローブ(下流オリゴヌクレオチド)はFRET対で標識される。この相

50

相互作用性の標識対のメンバーは、プローブ(例えば、下流オリゴヌクレオチド)が切断されないかまたは侵入性の切断反応によって切断される場合に相互作用する。非侵入性の切断反応によるプローブの切断により、検出可能なシグナル(例えば蛍光)が生成する。相互作用性標識の対は、相互作用性標識の対が相互作用し、プローブが非侵入性の切断反応によって切断される場合には検出可能なシグナルを生成するが、オリゴヌクレオチドが侵入性の切断反応によって切断される場合には検出可能なシグナルを生成しない限り、プローブに沿ってどこにでも配置されてよい。

【0113】

一つの態様において、第二または第三のオリゴヌクレオチドは、相互作用性標識の対を含む。さらなる態様において、相互作用性標識の対の第一のメンバーは、前記第二または第三のオリゴヌクレオチドの5'フラップに機能的に結合される。さらなる態様において、相互作用性標識の対の第二のメンバーは、第二または第三のオリゴヌクレオチドの+1位に機能的に結合される。あるいは、相互作用性標識の対の第二のメンバーは、第二または第三のオリゴヌクレオチドの+2位、+3位、+4位または+5位に機能的に結合される。相互作用性標識の対はフルオロフォアおよびクエンチャーであってよい。

10

【0114】

本明細書において用いられる、「第三のオリゴヌクレオチドの切断によって生成したシグナルの検出」とは、試料中の切断された第三の標識オリゴヌクレオチドの存在を決定すること、または切断された第三の標識オリゴヌクレオチドの量を決定することをいう。当技術分野において周知のおよび本明細書において記述の方法を、第三の標識オリゴヌクレオチドの切断を検出または測定するために使用することができる。切断された第三の標識オリゴヌクレオチドの存在または量は、蛍光の変化を検出することによって決定されてよい。例えば、第三のオリゴヌクレオチドが切断される場合および第三のオリゴヌクレオチド上に存在する相互作用性標識の対が分離される場合。本明細書において記述する検出方法は、切断された第三のオリゴヌクレオチドを検出するために機能し、反応において生成した、切断された第三のオリゴヌクレオチドの割合が小さくてもまたは大きくても切断された第三のオリゴヌクレオチドの任意の量が検出される。第三のオリゴヌクレオチドの切断を検出または測定する方法は、切断された第三のオリゴヌクレオチド上に存在する標識成分の測定または検出に適切であろう。

20

【0115】

本明細書において用いられる、「標識されたフラップ」とは、切断されたモノヌクレオチドまたは本発明による標識された切断構造に由来する小さなオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチドをいい、この切断されたオリゴヌクレオチドは、好ましくは約6~80ヌクレオチド、およびより好ましくは10~25ヌクレオチドであり、ヌクレアーゼによって切断構造から切断し、当技術分野において周知のおよび本明細書において記述の方法により検出することができる。

30

【0116】

一つの態様において、第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドは標的核酸の非重複領域とハイブリダイズし、第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドは鋳型核酸の非重複領域とハイブリダイズする。

40

【0117】

本明細書において用いられる、切断構造は、上流オリゴヌクレオチド(例えば、プライマー)の一つまたは複数のヌクレオチドが下流オリゴヌクレオチド(例えば、プローブ)と同じ標的領域に相補的である場合、「重複性」または「侵入性」ということができる。この態様において、二つのオリゴヌクレオチドが、同じ標的領域との結合のために競合するであろう。

【0118】

本明細書において用いられる、「非重複(性)」または「非侵入(性)」とは、二つのオリゴヌクレオチドが標的(または鋳型)核酸とハイブリダイズされる場合に、二つのオリゴヌクレオチドが標的(または鋳型)核酸とのハイブリダイゼーションに関してお互いに競合し

50

ないことを意味する。したがって、標的(または鋳型)核酸の二つの各ハイブリダイゼーション領域が一つまたは複数のヌクレオチドに共通して関与することはない。

【0119】

本明細書において用いられる、「ギャップ」とは、上流オリゴヌクレオチドの3'末端の相補的ヌクレオチドと下流オリゴヌクレオチドの最も5'側の相補的ヌクレオチドとの間の少なくとも一つのヌクレオチドの標的または鋳型部分を意味する。

【0120】

本明細書において用いられる、「ニック」とは、上流オリゴヌクレオチドの3'末端の相補的ヌクレオチドと下流オリゴヌクレオチドの最も5'側の相補的ヌクレオチドとの間にある、それらの相補的ヌクレオチドが直接的に隣接している場合の、標的または鋳型部分を意味する。ニックは、オリゴヌクレオチドが重複せず、かつ直接的に隣接しているそれらの間でギャップに満たない、例えば、0ヌクレオチドを有する場合に存在する。

10

【0121】

鎖置換活性を示し、本発明によって有用な核酸ポリメラーゼは、「温度活性化」鎖置換活性を有する古細菌(エキソプラスおよびエキソマイナス版のVent、Deep Vent、Pfu、JDF-3、KOD (LTIの商品名Pfx)、Pwo、9 degrees North、サーモコッカス・アグレガンス(The rmococcus aggregans)、サーモコッカス・ゴルゴナリウス(Thermococcus gorgonarius) DNAポリメラーゼ、ならびに鎖置換活性を有する真正細菌DNAポリメラーゼ(エキソマイナス Bst、エキソマイナスBca、Genta、Klenow断片、エキソマイナスKlenow断片、エキソマイナスT7 DNAポリメラーゼ(Sequenase))を含むが、これらに限定されることはない。

20

【0122】

一つの態様において、切断手段は、切断構造からのフラップの切断が切断部位での二本鎖DNAの形成に依る5'ヌクレアーゼ活性を含む。

【0123】

別の態様において、単一の酵素は重合活性および切断手段を含む。

【0124】

別の態様において、重合活性および切断手段を含む単一の酵素は、大腸菌DNAポリメラーゼI、T7 DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼまたはTaq DNAポリメラーゼからなる群より選択される。

【0125】

さらに別の態様において、第一の酵素は重合活性を含み、第二の酵素は切断手段を含む。

30

【0126】

別の態様において、切断手段はFEN-1ヌクレアーゼを含む。

【0127】

別の態様において、本方法は等温的に実行される。

【0128】

本明細書において用いられる、「等温的に」とは、本発明による切断手段および重合手段の活性を支持する、および好ましくはその活性に最適である、温度をいう。

【0129】

さらに別の態様において、本方法は、一連の反応条件の下で実行される。

40

【0130】

本明細書において用いられる、「一連の反応条件」とは、本発明による二本鎖形成、および切断の段階に最適である二つまたはそれ以上の温度インキュベーションをいう。例えば、一連の反応条件は、PCR反応および核酸反応条件を含む。

【0131】

本発明の実践では、特に規定がない限り、当技術分野の技術の範囲内である分子生物学、微生物学および組換えDNA技術の在来技術を用いる。そのような技術は文献のなかで十分に説明されている。例えば、Sambrook, FritschおよびManiatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition ; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait

50

, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. HarnesおよびS.J. Higgins, eds., 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal, 1984); および一連のMethods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Short Protocols In Molecular Biology, (Ausubel et al., ed., 1995)を参照されたい。本明細書において、前記および下記の、全ての特許、特許出願、および刊行物は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0132】

本発明の方法は、等温的に行われてもよく、または温度サイクリング、例えば、PCR、核酸増幅の条件の下で行われてもよい。

【0133】

本発明は、標的核酸配列を上流および下流オリゴヌクレオチドとともにインキュベートすることにより標識された切断構造を形成する段階、ならびに切断構造をヌクレアーゼで切断する段階を含む、試料中の標的核酸配列の存在を示すシグナルを生成する方法を提供する。本発明は同様に、逐次切断反応において試料中の標的核酸配列の存在を示すシグナルを生成する方法を提供する。本発明の方法は、以下におよび実施例に記述のPCRに基づくアッセイ法において使用することができる。

【0134】

上流オリゴヌクレオチド(例えばA-1、図1)、5'非相補的フラップを有する標識された下流オリゴヌクレオチドプローブ(例えばFC、図1)および標的核酸配列(例えばA'C'、図1)を含む標識された切断構造は、「切断構造」と題した項に記述されているように形成される。下流オリゴヌクレオチドは、非侵入性の切断構造だけが検出可能であるように、位置付けられた相互作用性成分の対で標識される。

【0135】

手短に言えば、切断構造は、標的核酸配列、上流オリゴヌクレオチド(例えばA-1、図1)、標識された下流プローブ(例えばFC、図1(図1には非標識で示されている))、標的核酸配列に特異的な増幅プライマー(A-2およびR、図1、任意)、核酸ポリメラーゼ(任意)、FENヌクレアーゼおよび適切な緩衝液(例えば1×Pfu緩衝液; Stratagene、または15 mMのTris-HCL (pH 8)、50 mM KCL、5.5 mM MgCl₂、8%グリセロール、1% DMSOを含むプローブ用緩衝液)の存在下、以下の温度サイクリングパラメータ: 2分間95 および15秒間95 (変性段階)、60秒間60 (アニーリング/伸長段階) の40サイクルによるPCR反応において形成され切断される。フォワードおよびリバースプライマーが伸長されて標的を増幅しうる。上流オリゴヌクレオチドおよび標識された下流オリゴヌクレオチドは、切断構造を形成するように標的にアニールする。結果として生じる標識された構造は、本発明によるFENヌクレアーゼで切断される。下流オリゴヌクレオチドは、屈曲部の位置でまたは上流で切断され、相互作用性標識の対の分離を引き起こす。これによって検出可能な切断事象が生じるであろう。切断構造が侵入性である事象(例えば、標的と相補的な下流オリゴヌクレオチドの領域へのフォワードプライマーの伸長)においては、下流オリゴヌクレオチドは+1位の下流で切断される。したがって、侵入性の切断反応と非侵入性の切断反応を区別するよう適切に間隔を置いた相互作用性標識の対(例えば、5'フラップ上のFAMおよび+1位のBHQ)は、両標識の下流で切断され、検出可能な標識は生成されないであろう。

【0136】

図1は、PCR条件下の逐次的切断反応を用いた本発明の一つの態様を図示する。第一の切断反応も第二の切断反応とともに、標的(鋳型)核酸、上流オリゴヌクレオチド(第一の切断反応の第一のオリゴヌクレオチドまたは第二の切断反応の遊離されたフラップ)および下流オリゴヌクレオチド(第一の切断反応の第二のオリゴヌクレオチドまたは第二の切断反応の第三のオリゴヌクレオチド)を含む。

【0137】

この態様において、逐次的な検出反応は、標的核酸の存在を示す検出可能なシグナルを生成する。検出可能なシグナルは、第一の切断反応も第二の切断反応とともに非侵入性である場合に生成するだけである。切断反応が侵入性である事象においては、シグナルが生成しない。切断構造は、(1) 上流および下流オリゴヌクレオチドの両方の相補的部分が隣

10

20

30

40

50

接し(それらの間に非相補的な標的/鋳型ヌクレオチドがない)および(2) 上流オリゴヌクレオチドが下流オリゴヌクレオチドの相補的部分に重複する3'領域を有する場合に、侵入性である。これらの二つの要件のどちらも満たされない場合には、反応は非侵入性である。したがって、上流オリゴヌクレオチドが下流オリゴヌクレオチドの相補的部分に重複する場合。

【0138】

第一の切断反応(図1A)は、標的核酸(A'C')、第一のオリゴヌクレオチド(A-1)、第二のオリゴヌクレオチド(FC)、リバースプライマー(R)、フォワードプライマー(A-2)、ポリメラーゼおよび切断因子を含む。第二の切断反応(図1B)では、鋳型核酸(F'H')、第一の切断反応において生成した遊離フラップ(F)、第三のオリゴヌクレオチド(F2H)および切断因子を用いる。

10

【0139】

標的および鋳型核酸は、3'から5'方向の順に、第一の領域(A'またはF')、および第二の領域(C'またはH')を有する。

【0140】

第一のオリゴヌクレオチド(A-1)は、標的の第一の領域(A')に相補的であり、標的に非相補的な3'末端ヌクレオチドを有する。第二のオリゴヌクレオチド(FC)は、標的に非相補的な5'フラップ(F)および標的の第二の領域(C')に相補的な3'領域を有する。しかしながら、5'フラップ(F)は鋳型核酸の第一の領域(F')に相補的であり、フラップの3'末端に、鋳型核酸に非相補的な一つのヌクレオチドを含む。この3'の非相補的なヌクレオチドは、ポリメラーゼによるオリゴヌクレオチドの伸長を阻害するブロックとして働く。

20

【0141】

第三のオリゴヌクレオチド(F2H)は、鋳型に非相補的な5'フラップ(F2)および鋳型の第二の領域(H')に相補的な3'領域を有する。蝶番部または屈曲部の領域は、第三のオリゴヌクレオチドの相補的領域および非相補的領域が交わる場所である。第三のオリゴヌクレオチドは、相互作用性標識の対に機能的に結合される。これらの標識は、第三のオリゴヌクレオチドが切断される(例えば、第三のオリゴヌクレオチドの屈曲部での切断)と引き離される場合にシグナルを生成するものの、第三のオリゴヌクレオチドが標識の下流で切断される場合にはシグナルを生成しない。いくつかの態様において、検出可能な標識はFAMおよびBHQである。一つの態様において、FAMは第三のオリゴヌクレオチドの5'フラップに機能的に結合され、BHQは第三のオリゴヌクレオチドの相補的部分の最初のヌクレオチド(+1)に機能的に結合される。

30

【0142】

第一の反応は、二組の上流オリゴヌクレオチド、第一のオリゴヌクレオチドおよびプライマーの混合物を含む。この態様において、プライマーも第一のオリゴヌクレオチドとともに標的中の同一の全体的領域に相補的であり、その結果、一方のアニールリングがもう一方のアニールリングを妨げる。第一のオリゴヌクレオチドは非侵入性の切断構造を形成するのに対し、プライマーは標的を増幅する役割を果たす。プライマーが侵入性の切断構造を形成する事象において、第二のオリゴヌクレオチドは、任意の検出可能なシグナルが第二の切断反応において生成するのを阻止するように屈曲部の下流で切断される。

40

【0143】

第一のオリゴヌクレオチドを用いる反応において、一つの非相補的鋳型核酸が、上流オリゴヌクレオチドの相補的部分と下流オリゴヌクレオチドの相補的部分とを分離する。3'の非相補的なヌクレオチドは第一のオリゴヌクレオチドの伸長を阻害し、FENを導いて第二のオリゴヌクレオチドを屈曲部で切断する。この切断によって、鋳型核酸の第一の領域に相補的である、かつ鋳型に非相補的な3'ヌクレオチドを含む遊離されたフラップが生成する。

【0144】

リバースプライマーは、標的の相補鎖にアニールし、ポリメラーゼによって伸長される。

50

【0145】

第一の切断反応の間の第二のオリゴヌクレオチドの切断によって、第二の切断反応に不可欠な遊離されたフラップが生成する。遊離されたフラップは鋳型の第一の領域にアニールし、第三のオリゴヌクレオチドが鋳型の第二の領域にアニールする。

【0146】

遊離されたフラップは、鋳型にアニールされる場合に、一つまたは二つの非相補的鋳型ヌクレオチドが、遊離されたフラップの相補的部分および第三のオリゴヌクレオチドを分離するように標的にアニールする。遊離されたフラップは3'の非相補的ヌクレオチドを有し、これがポリメラーゼによるその伸長を阻害し、第二の非侵入性の切断構造の形成に有利に働く。第三のオリゴヌクレオチドは、屈曲部でFENにより切断され、フルオレッサおよびクエンチャーを分離して検出可能なシグナルを生成する。

10

【0147】

逐次的切断反応において、第一のオリゴヌクレオチドは、一つの3'末端非相補的ヌクレオチドを有することが好ましい。さらなる態様において、標的にアニールされた場合に、第一のオリゴヌクレオチドの相補的部分および第二のオリゴヌクレオチドの相補的部分が、一つの非相補的標的核酸により分離される。遊離されたフラップは同様に、一つの3'末端非相補的ヌクレオチドを有することが好ましいであろう。さらに、遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドの相補的部分は、好ましくは二つの非相補的鋳型核酸により分離されるであろう。

【0148】

20

本発明の方法を非PCRに基づく用途で使用して、標的核酸配列を検出することもできる。いくつかの態様において、固体支持体に固定化することができる。核酸配列を固体支持体に固定化する方法は、当技術分野において公知であり、Ausubel FM et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc.に、ならびに製造業者、例えば、膜の場合Pall Corporation, SchleicherおよびSchuell、磁気ビーズの場合DynaL、培養プレートの場合Costar, Nalgenuncおよび本発明により有用な他の支持体の場合CPG, Incのプロトコルに記述されている。本発明により有用な固体支持体は、シリカに基づくマトリックス、膜に基づくマトリックスならびに、以下に限定されないが、スチレン、ラテックスまたはシリカに基づくマトリックスおよび他の重合体を含む表面を含んだビーズを含むが、これらに限定されることはない。磁気ビーズも本発明により有用である。固体支持体は、上記の製造業者およびその他公知の製造業者から入手することができる。

30

【0149】

本発明は同様に、溶液中の標的核酸配列を検出するための非PCRに基づくアッセイ法を提供する。本発明の方法は、細胞、組織、単細胞生物、細菌またはウイルスから単離され精製されたRNAおよびDNAを含むがこれらに限定されない、溶液中の天然の標的核酸配列を検出するために、使用することができる。本発明の方法は同様に、RNAまたはDNAオリゴヌクレオチド、およびペプチド核酸(PNA)を含むがこれらに限定されない、溶液中の合成標的を検出するために、使用することができる。非PCRアッセイ法は、等温増幅を伴う検出アッセイ法を含むがこれに限定されることはなく、そのアッセイ法では3'-5'合成活性により合成される核酸の量が直線的にまたは指数関数的に増加し、FENヌクレアーゼが下流プロンプを切断するために使用される。

40

【0150】

I. 核酸

A. 本発明において有用な核酸配列

本発明は、オリゴヌクレオチド、プライマーおよびプローブを用いて標的核酸配列を検出または測定する方法を提供する。本明細書において用いられる、「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、検出されるプライマー、プローブ(上流および下流オリゴヌクレオチド)およびオリゴマー断片をいい、ポリデオキシリボヌクレオチド(2-デオキシ-D-リボースを含有する)に対する、ポリリボヌクレオチド(D-リボースを含有する)に対する、およびプリンもしくはピリミジン塩基のN-グリコシド、あ

50

るいは修飾プリンもしくはピリミジン塩基(脱塩基部位を含む)またはタンパク質核酸(PNA)などの類似体であるその他任意のタイプのポリヌクレオチドに対する総称であるものとする。「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語の間で長さの違いは意図されておらず、これらの用語は同じ意味で使用されよう。これらの用語は分子の一次構造のみをいう。したがって、これらの用語は、二本鎖および一本鎖DNA、ならびに二本鎖および一本鎖RNAを含む。

【0151】

本明細書において用いられる核酸配列の相補体とは、一方の配列の5'末端がもう一方の3'末端と対合するように核酸配列と整列された場合、「逆平行の関係」にあるオリゴヌクレオチドをいう。

10

【0152】

オリゴヌクレオチドは、必ずしも既存または天然の配列から物理的に派生するというわけではなく、化学合成、DNA複製、逆転写またはその組み合わせを含むいかなる方法で作出されてもよい。「オリゴヌクレオチド」または「核酸」という用語は、ゲノムDNAもしくはRNA、cDNA、半合成由来、または合成由来のポリヌクレオチドを表し、これは、それが合成由来であるまたは操作されているという理由で、(1)自然界において結び付いているポリヌクレオチドの全部または一部と結び付いておらず、および/または(2)自然界において結合しているもの以外のポリヌクレオチドに結合している。

【0153】

モノヌクレオチドは、一つのモノヌクレオチドペントース環の5'リン酸がその隣の3'酸素にリン酸ジエステル結合を介して一方向に付着されるように反応してオリゴヌクレオチドを作出するので、オリゴヌクレオチドの「末端」は、その5'リン酸がモノヌクレオチドペントース環の3'酸素に結合されていない場合には「5'末端」といわれ、その3'酸素が次のモノヌクレオチドペントース環の5'リン酸に結合されていない場合には「3'末端」といわれる。本明細書において用いられる、より大きなオリゴヌクレオチドのなかで内部にある核酸配列は、分子の5'末端または3'末端の近くに位置するかどうかによって5'領域または3'領域といわれる場合もある。

20

【0154】

二つの異なる非重複性のオリゴヌクレオチドが、同じ直鎖状の相補的核酸配列の異なる領域にアニールし、かつ、一方のオリゴヌクレオチドの3'末端がもう一方の5'末端の方向を指す場合、前者を「上流」オリゴヌクレオチド、後者を「下流」オリゴヌクレオチドと呼ぶことができる。

30

【0155】

天然の核酸には通常見られないある塩基は、本発明の核酸に含まれてよく、例えば、イノシンおよび7-デアザグアニンを含む。相補性は完全である必要はなく、安定な二本鎖がミスマッチ塩基対または不適合塩基を含むことがある。核酸技術における当業者は、例えば、オリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドの塩基組成および配列、イオン強度、ならびにミスマッチ塩基対の発生率を含むいくつかの変数を考慮し、二本鎖の安定性を実験的に測定することができる。

【0156】

核酸二本鎖の安定性は、融解温度、または「 T_m 」により測定される。特定条件下での特定の核酸二本鎖の T_m は、塩基対の半分が解離した温度である。

40

【0157】

B. 本発明により有用なオリゴヌクレオチド

本発明は、標的核酸を検出または測定するのに、標的核酸配列を増幅するのに、および本発明による切断構造を形成するのに有用なオリゴヌクレオチドプライマー、オリゴヌクレオチドプローブ(上流および下流オリゴヌクレオチド)、および鋳型核酸を提供する。

【0158】

本明細書において用いられる、「増幅する」とは、等温法によりまたはポリメラーゼ連鎖反応を含む温度サイクリングを必要とする方法により、核酸配列のさらなるコピーを作

50

出することをいう。

【0159】

1. プライマー

本発明は、重合によって伸長されるフォワードおよびリバースプライマーを提供する。

【0160】

「プライマー」という用語は、複数のプライマーをいってもよく、精製された制限消化物のように、天然に存在しようとも、または合成により作出されようとも、核酸鎖に相補的であるプライマー伸長産物の合成が触媒される条件に置かれた場合に相補鎖に沿って合成の開始点として働くことができる、オリゴヌクレオチドをいう。プライマー伸長産物の合成に適した条件は、適当な緩衝液(「緩衝液」は、補因子であるまたはpH、イオン強度などに影響を与える置換基を含む)中での、および適当な温度での、異なる四種類のデオキシリボヌクレオシド三リン酸およびDNAポリメラーゼまたは逆転写酵素などの重合誘発因子の存在を含む。プライマーは、増幅の最大効率のために一本鎖であることが好ましい。

10

【0161】

本発明により有用なオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型核酸配列とハイブリダイズ可能でありかつ第二の核酸鎖の酵素合成を準備する(prime)、一本鎖DNAまたはRNA分子である。プライマーは、核酸分子のプールの中に存在する標的分子の一部に相補的である。本発明によるオリゴヌクレオチドプライマーは、化学的にまたは酵素的にかのいずれかの合成方法により調製され则认为られる。あるいは、そのような分子またはその断片は、天然に存在しており、その天然源から単離され、または商業的供給業者から購入される。

20

【0162】

本発明により有用なプライマーは同様に、融解温度推定法によって特定の融解温度(T_m)を有するように設計される。Oligo(商標)を含む市販プログラム、Primer DesignならびにPrimer3およびOligo Calculatorを含むインターネット上で利用可能なプログラムを用いて、本発明により有用な核酸配列の T_m を算出することができる。例えばOligo Calculatorにより算出された、本発明により有用な増幅プライマーの T_m は、好ましくは約15~80、およびより好ましくは約50~60であることが好ましい。オリゴヌクレオチドプライマーは、これらの考慮を念頭に置いて設計され、以下の方法によって合成されうる。

30

【0163】

a. オリゴヌクレオチドプライマーの設計戦略

本発明による特定のオリゴヌクレオチドプライマーの設計は、標的配列を認識できるが、予測される二次構造が最小限である配列を選択することを伴う。さらに、オリゴヌクレオチドの T_m は、オリゴヌクレオチドの長さおよびGC含量の分析によって最適化される。さらに、ゲノムDNAの増幅に有用なPCRプライマーを設計する場合、選択されたプライマー配列は、GenBankデータベース(または他の利用可能なデータベース)中の配列と著しい適合を示さない。

【0164】

プライマーの設計は、上記のいくつかのパラメータの評価およびプライマー配列の最適化を支援するために開発された、容易に利用可能なコンピュータプログラムの使用により容易になる。そのようなプログラムの例は、DNASar(商標)ソフトウェアパッケージの「PrimerSelect」(DNASar, Inc.; Madison, WI)、OLIGO 4.0 (National Biosciences, Inc.)、PRIMER, Oligonucleotide Selection Program、PGENおよびAMPLIFY(Ausubel et al., 1995, Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition, John Wiley & Sonsに記述されている)である。一つの態様において、プライマーを他のプライマーの標的として働く配列を用いて設計し、さらなる増幅の標的として働く既知の配列を末端に持ったPCR産物を(例えば、PCR産物を配列決定するために)作出する。多くの異なる標的核酸配列が、共通の「尾部配列」を共有する特異的プライマーを用いて増幅される場合に、これらの異なる遺伝子由来のPCR生成物を、その後、単一のプライマーセットを用いて配列決定する

40

50

ことができる。あるいは、増幅された配列の、その後のクローニングを容易にするために、制限酵素部位の配列をプライマーの5'末端に付加してプライマーを設計する。したがって、プライマーの全てのヌクレオチドは、制限酵素部位を形成するのに必要な少数のヌクレオチドを除き、標的核酸配列、または標的核酸配列に隣接する配列に由来する。そのような酵素および部位は、当技術分野において周知である。標的核酸配列のゲノム配列および標的核酸配列のオープンリーディングフレームの配列が公知である場合に、特定のプライマーの設計は、十分に当技術分野の技術の範囲内である。

【0165】

b. 合成

プライマーそれ自体も、当技術分野において同様に周知である技術を用いて合成される。特異的配列のオリゴヌクレオチドを調製する方法は、当技術分野において公知であり、例えば、適切な配列のクローニングおよび制限消化分析ならびに直接的な化学合成を含む。オリゴヌクレオチドは、設計されると、例えば、Narang et al., 1979, Methods in Enzymology, 68:90により記述されているホスホトリエステル法、Brown et al., 1979, Methods in Enzymology, 68:109により開示されているホスホジエステル法、Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Letters, 22:1859に開示されているジエチルホスホロアミデート法、および米国特許第4,458,066号に開示されている固体支持体法を含む適当な化学合成法により、または商業的な自動オリゴヌクレオチド合成機(これは市販されている)もしくはVLSIPS(商標)技術を用いた他の化学的方法により調製される。

【0166】

c. プローブ

本発明は、本明細書において定義される切断構造または標識された切断構造を形成するのに有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供する。本発明による標識された切断構造を調製する方法は、「切断構造」と題した項に示されている。本発明は、本発明による第一もしくは第二の二本鎖、または本発明による第一もしくは第二の切断構造の一つまたは複数の成分である第一、第二、および第三のオリゴヌクレオチド(全て本明細書において定義される)を提供する。本明細書において用いられる、「プローブ」とは、本発明による第一、第二または第三のオリゴヌクレオチドのいずれか一つをいう。

【0167】

本発明による「第一のオリゴヌクレオチド」は、長さが好ましくは10~120ヌクレオチド、より好ましくは15~40ヌクレオチドおよび最も好ましくは20~30ヌクレオチドである。「第一のオリゴヌクレオチド」は、標的核酸の第一の領域に少なくとも部分的に相補的である。一つの態様において、第一のオリゴヌクレオチドは、標的に非相補的である一つの3'末端ヌクレオチドを有する。別の態様において、第一のオリゴヌクレオチドは、標的に非相補的である二つまたはそれ以上の3'末端ヌクレオチドを有する。

【0168】

本発明による「第二のオリゴヌクレオチド」は、長さが好ましくは20~120ヌクレオチド、より好ましくは25~45ヌクレオチドおよび最も好ましくは25~35ヌクレオチドである。「第二のオリゴヌクレオチド」は3'および5'領域を含む。「第二のオリゴヌクレオチド」の3'領域は、標的核酸に少なくとも部分的に相補的である。「第二のオリゴヌクレオチド」の5'領域は、長さが好ましくは8から80ヌクレオチドおよび最も好ましくは10から20ヌクレオチドである。本発明の一つの態様において、「第二のオリゴヌクレオチド」の5'領域は、鋳型核酸の領域に少なくとも部分的に相補的である。本発明の別の態様において、本発明による第二のオリゴヌクレオチドの5'領域は、標的核酸に相補的ではない。

【0169】

本発明による「第三のオリゴヌクレオチド」は、長さが好ましくは20~120ヌクレオチド、より好ましくは25~45ヌクレオチドおよび最も好ましくは25~35ヌクレオチドである。「第三のオリゴヌクレオチド」は3'および5'領域を含む。本発明による第三のオリゴヌクレオチドは、鋳型核酸の領域に少なくとも部分的に相補的でありかつ好ましくは8から80ヌクレオチドおよび最も好ましくは10~20ヌクレオチドである3'領域を含む。「第三の

オリゴヌクレオチド」の5'領域は、長さが好ましくは8から80ヌクレオチドおよび最も好ましくは10から20ヌクレオチドである。本発明の一つの態様において、本発明による「第三のオリゴヌクレオチド」の5'領域は、鋳型核酸に相補的ではない。

【0170】

一般的に、プローブの3'末端はプライマー伸長産物へのプローブの取り込みを防ぐために「ブロックされる」であろう。

【0171】

1. 標識

本発明によるプローブは、(例えば、放射性同位体、蛍光標識、クエンチャーまたは「切断構造」と題した項に列挙されている標識のいずれかの付着により)標識されうる。標識されたオリゴヌクレオチドプローブは、当技術分野において周知のおよび本明細書において記述の方法によって調製される(Sambrook et al., 前記; Ausubel et al., 前記を参照のこと)。

【0172】

2. 二次構造を含むプローブ

本発明の一つの態様による「プローブ」は、標的または鋳型核酸配列に相補的な領域(例えば、標的または鋳型核酸結合配列)を含む一本鎖核酸であってよい。本発明のこの態様による「プローブ」は、標的または鋳型核酸配列とのプローブの結合によって変化する二次構造を有し、結合成分をさらに含むことができる。本発明のこの態様による「プローブ」は標的または鋳型核酸配列に結合して、切断手段により切断されうる切断構造を形成し、ここで切断は切断温度で行われ、かつここで標的または鋳型核酸配列に結合されない場合にプローブの二次構造は、好ましくは切断温度でまたは切断温度未満で安定である。本発明によるプローブは、標的または鋳型核酸との結合の前に、本明細書において定義される「切断手段」により切断されて、シグナルを生成することはできない。本発明の一つの態様において、プローブは、標的または鋳型核酸配列に結合できないかまたは相補的ではない領域を含むことができる。本発明の別の態様において、プローブは、標的または鋳型核酸に結合される場合に二次構造を持たない。

【0173】

本明細書において用いられる、「二次構造」とは、三次元立体構造(例えばヘアピン、ステムループ構造(図5)、内部ループ、パルジループ、分枝構造もしくは偽結び目構造、多重ステムループ構造、クローバー型構造または任意の三次元構造)をいう。本明細書において用いられる、「二次構造」とは、三次、四次などの構造を含む。そのような三次元構造を含むプローブは、標的または鋳型核酸配列に結合して、切断手段により切断温度で切断されうる切断構造を形成する。標的または鋳型核酸配列に結合されない場合にプローブの三次元構造は、好ましくは切断温度でまたは切断温度未満で安定である。本明細書において用いられる「二次構造」とは、第一の一本鎖塩基配列(本明細書において「相補的核酸配列」といわれる)と、続いて同じ分子中の、またはプローブを含む第二の分子中の第二の相補的配列とを含む配列が折り重なって逆平行の二本鎖構造を生じることを意味し、この一本鎖配列およびその相補的配列(つまり、相補的核酸配列)は水素結合の形成によってアニールする。本発明において用いられる、オリゴヌクレオチドプローブは、キープローブ(図5)を含むが、これに限定されない、二次構造を含んだオリゴヌクレオチドを含む。

【0174】

本明細書において用いられる、第一および第二の「相補的」核酸配列は、相互に相補的であり、相補的塩基間の水素結合の形成によってアニールすることができる。

【0175】

本発明のこの態様による「プローブ」は、単分子でありうる。本明細書において用いられる、「単分子」プローブは、標的または鋳型核酸配列に結合して、切断手段により切断されうる切断構造を形成する単一の分子を含み、ここで切断は切断温度で行われ、かつここで標的または鋳型核酸配列に結合されない場合に「単分子」プローブの二次構造は、好

ましくは切断温度でまたは切断温度未満で安定である。本発明により有用な単分子プローブは、キープローブを含むが、これに限定されることはない。

【0176】

本明細書において用いられる、「分子」とはポリヌクレオチドをいう。

【0177】

本発明のこの態様による「プローブ」またはプローブを含む「分子」は、長さが5~10,000ヌクレオチドであり、理想的には長さが17~40ヌクレオチドであるが、異なる長さのプローブまたはプローブを含む分子が有用である。

【0178】

本発明のこの態様による「プローブ」は、約5から約10,000ヌクレオチド、および好ましくは10から約140ヌクレオチドである標的または鋳型核酸結合配列を有する。本発明の一つの態様において、本発明による「プローブ」は、3~250ヌクレオチド長、好ましくは4~50ヌクレオチド長、およびより好ましくは17~40ヌクレオチド長である少なくとも第一および第二の相補的核酸配列または領域を含む。第一および第二の相補的核酸配列は、同じ長さを有しても有していなくてもよい。本発明は、第一または第二の相補的核酸配列が標的または鋳型核酸に相補的である、プローブを提供する。別の態様において、第一および/または第二の相補的核酸配列は、標的または鋳型核酸結合部位の上流(5')に位置している。あるいは、第一および/または第二の相補的核酸配列は、標的または鋳型核酸結合部位の下流(3')に位置していてもよい。実際の長さは、標的または鋳型核酸に結合されたプローブを含む切断構造の切断が行われる温度で、プローブが標的または鋳型核酸に結合されていない場合にプローブの二次構造が安定であるように、標的または鋳型核酸結合配列に対して選択されるであろう。標的または鋳型核酸結合配列は、サイズが500ヌクレオチドまで増えるにつれて、相補的核酸配列の長さは15~125ヌクレオチドまで増えうる。100ヌクレオチドより大きい標的または鋳型核酸結合配列の場合、相補的核酸配列の長さがさらに増えることはない。また、プローブが対立遺伝子識別プローブである場合に、相補的核酸配列の長さは、以下に論じられるように、さらに制限される。

【0179】

本明細書において用いられる、「標的核酸結合配列」とは、標的核酸に特異的に結合するプローブの領域をいう。

【0180】

本明細書において用いられる、「鋳型核酸結合配列」とは、鋳型核酸に特異的に結合するプローブの領域をいう。

【0181】

本発明によるプローブは、本明細書において定義される二次構造(ステムループ、ヘアピン、内部ループ、バルジループ、分枝構造および偽結び目構造を含む)もしくは複数の二次構造、または本明細書において定義されるいずれかの三次元構造を形成することができる。

【0182】

例えば、本発明の一つの態様によれば、プローブは、ヘアピンまたはステムループなどの二次構造を有するオリゴヌクレオチドであってよく、分子ビーコン、安全ピン、スコープオン(scorpion)、サンライズ(sunrise)/アンプリフロール(amplifluor)プローブ、およびキープローブを含むが、これらに限定されることはない。

【0183】

分子ビーコンプローブは、ビーコンプローブが標的核酸配列とハイブリダイズされない場合に検出可能なシグナルの生成を抑えるよう効果的に位置付けられた相互作用性のシグナル生成標識成分の対(例えば、フルオロフォアおよびクエンチャー)を保有する、ヘアピンまたはステムループ構造を含む。ループは、標的核酸に相補的な領域を含む。ループの横には、核酸標的配列に相補的なプローブの領域が標的核酸に結合されない場合に相補的核酸配列によって相互に可逆的に作用する5'および3'領域(「アーム」)が、配置されている。あるいは、ループの横には、核酸標的配列に相補的なプローブの領域が標的核酸に結

合されない場合に親和性対のメンバーの付着により相互に可逆的に作用して、二次構造を形成する5'および3'領域(「アーム」)が、配置されている。本明細書において用いられる、「アーム」とは、a) 核酸標的配列に相補的なプローブの領域が標的核酸に結合されない場合に相補的核酸配列によって相互に可逆的に作用する分子ビーコンプローブの領域、またはb) 核酸標的配列に相補的なプローブの領域が標的核酸に結合されない場合に親和性対のメンバーの付着により相互に可逆的に作用して、二次構造を形成するプローブの領域をいう。分子ビーコンプローブが標的とハイブリダイズされない場合、アームは相互にハイブリダイズしてステムハイブリッドを形成し、これは「ステム二本鎖」といわれることもある。これは閉じられた立体構造である。分子ビーコンプローブがその標的とハイブリダイズすると、プローブの「アーム」は引き離される。これは開かれた立体構造である。開かれた立体構造において、アームは同様に、標的とハイブリダイズすることができる。そのようなプローブは溶液中で遊離していてもよく、またはそれらは固体表面に係留されていてもよい。アームがハイブリダイズされる(例えば、ステムを形成する)と、クエンチャーはフルオロフォアに非常に近接し、その蛍光を効果的に消光または抑制し、プローブを暗くする。そのようなプローブは米国特許第5,925,517号および米国特許第6,037,130号に記述されている。

10

【0184】

本明細書において用いられる、分子ビーコンプローブは、本明細書において記述される「対立遺伝子識別」プローブであってもよい。

20

【0185】

本発明において有用なさらなるオリゴヌクレオチドプローブは、キープローブである。キープローブは、全体が参照により本明細書に組み入れられる、2006年2月9日付で出願された米国特許出願第11/351,129号に記述されている。キープローブは、ステムおよび、任意でループ部分を含むヘアピン構造を形成するため、任意でリンカーオリゴヌクレオチド配列によって相補的配列に結び付けられた標的結合オリゴヌクレオチドから形成されうる(図5参照)。ループ部分は、任意のリンカー配列、または単に第一および第二配列の末端を結び付ける共有結合を含有する。ループ構造を形成するリンカー配列は、標的配列とハイブリダイズしてもしなくてもよい。ステム部分は、任意で第一および第二配列の間に一つまたは複数のミスマッチを含有してもよく、ミスマッチの数を用いてプローブの融解温度を調整することができる。ステム部分は、修飾ヌクレオチド、例えば副溝結合物質またはLNAを含有してもよく、これは標的配列に対するプローブの親和性を変えることができ、融解温度を調整するために用いることもできる。キープローブは、プローブが標的配列とハイブリダイズする場合に検知可能なシグナル、例えば、フルオロフォアの蛍光発光の増大が生じるように、プローブの末端にまたは末端の近くに付着された相互作用性の標識対、例えば、フルオロフォア/クエンチャー対を含有してもよい。

30

【0186】

本発明において有用なキープローブの場合、標的に相補的であるプローブ配列の長さ、核酸標的配列に相補的な領域が標的核酸に結合されない場合に相補的核酸配列によって相互に可逆的に作用するプローブ(例えば、ステムハイブリッド)の領域の長さおよびこの二つの関係は、プローブが用いられるアッセイ条件にしたがって設計される。特定のアッセイ条件に対する標的相補的な配列およびステムハイブリッド配列の長さは、当技術分野において公知である事柄にしたがって推定することができる。核酸標的配列に相補的な領域が標的核酸に結合されない場合に相補的核酸配列によって相互に可逆的に作用するプローブの領域は、それぞれ6から100ヌクレオチド、好ましくは8から50ヌクレオチドおよび最も好ましくは8から25ヌクレオチドの範囲内である。標的に相補的であるプローブ配列の長さは、好ましくは17~40ヌクレオチド長、より好ましくは17~30ヌクレオチド長および最も好ましくは17~25ヌクレオチド長である。相補的核酸配列によって相互に可逆的に作用するプローブの領域間の相互作用の安定性は、適切な機能性を達成するように日常の実験によって決定される。相補的核酸配列によって相互に可逆的に作用するプローブの領域間の相互作用の安定性は、長さに加え、G-C含量を変化させかつ不安定化ミスマッチを挿

40

50

入ることによって、調整することができる。相補的核酸配列によって相互に可逆的に作用するプローブの領域の一つは、標的に部分的にまたは完全に相補的であるように設計することができる。

【0187】

広範囲のフルオロフォアを本発明によるプローブに使用することができる。使用可能なフルオロフォアは、クマリン、フルオレセイン、テトラクロロフルオレセイン、ヘキサクロロフルオレセイン、ルシファーイエロー、ローダミン、BODIPY、テトラメチルローダミン、Cy3、Cy5、Cy7、エオシン、テキサスレッドおよびROXを含む。例えば、Lee et al. (1997), Nucleic Acids Research 25:2816により記述されているフルオレセイン-ローダミン二量体のようなフルオロフォアの組み合わせも適当である。フルオロフォアは、可視スペクトルで、または紫外領域もしくは赤外領域でなどの可視スペクトル外で、吸収および放射するように選択することができる。

10

【0188】

当技術分野において記述されている適当なクエンチャーは、特に、DABCYLおよびその変種、例えばDABSYL、DABMIおよびメチルレッドなどを含む。フルオロフォアは、ある他のフルオロフォアに接している場合に蛍光を消光する傾向があるので、クエンチャーとして使用することもできる。好ましいクエンチャーはDABCYLもしくはマラカイトグリーンなどのクロモフォア、またはプローブが開かれた立体構造にある場合に検出域の蛍光を発しないフルオロフォアである。

20

【0189】

一つの態様において、下流プローブは相互作用性標識の対を含む。さらなる態様において、相互作用性標識の対の第一のメンバーは、前記下流オリゴヌクレオチドの5'フラップに機能的に結合される。さらなる態様において、相互作用性標識の対の第二のメンバーは、下流オリゴヌクレオチドの+1位に機能的に結合される。さらに別の態様において、相互作用性標識の対の第二のメンバーは、前記下流オリゴヌクレオチドの+2位に機能的に結合される。さらなる態様において、相互作用性標識の対は、フルオロフォアおよびクエンチャーを含む。

【0190】

一般的にプローブの3'末端は、活性なポリメラーゼが反応に用いられる場合には、プライマー伸長産物へのプローブの取り込みを防ぐために「ブロックされる」であろう。「ブロッキング」は、非相補的な塩基を使用することによって、またはビオチンもしくはリン酸基などの化学成分を最後のヌクレオチドの3'ヒドロキシルに付加することによって達成可能であり、選択した成分に依って標識に付着された核酸のその後の検出または捕捉のための標識としても作用することにより、二重の目的を果たすこともある。ブロッキングは、3'-OHを除去することによって、またはジデオキシヌクレオチドなどの3'-OHを欠くヌクレオチドを使用することによって達成することもできる。

30

【0191】

プローブという用語は、対立遺伝子識別プローブを包含する。本明細書において用いられる、「対立遺伝子識別」プローブは、完全に相補的な標的核酸配列と選択的にハイブリダイズし、少なくとも一つのヌクレオチドだけ異なる配列を識別する。標的核酸配列と比べて、少なくとも一つのヌクレオチドだけ異なる核酸配列は、以後「標的様核酸配列」というが、したがって本発明による対立遺伝子識別プローブの標的核酸配列ではない。

40

【0192】

対立遺伝子識別プローブは特定の温度で、または当技術分野において周知の方法による実験的最適化により決定された温度の範囲内で、標的核酸相補的な配列と比べて1つまたは複数のヌクレオチドミスマッチを含有する標的様核酸配列と十分にはハイブリダイズせず、したがって標的様核酸配列のみの存在下で、および対立遺伝子識別プローブと標的核酸配列とのハイブリダイゼーションを支持する条件下で、標的様核酸配列との結合によって二次構造の変化を起こさない。

【0193】

50

一つの態様において、本発明による「対立遺伝子識別プローブ」とは、標的核酸配列と少なくとも一つのヌクレオチドだけ異なる標的様核酸配列とハイブリダイズするプローブをいい、この変種ヌクレオチドは対立遺伝子識別部位に位置していない。本発明のこの態様によれば、「対立遺伝子識別プローブ」は、特定の温度で、または当技術分野において周知の方法による実験的最適化により決定された温度の範囲内で、対立遺伝子識別部位中の少なくとも一つのヌクレオチドだけ同様に異なる標的様核酸配列に結合することができない。単一のヌクレオチドの相違は、標的または標的様核酸配列に結合されるプローブの割合に影響を及ぼすだけである。例えば、本発明は、過剰なプローブの存在下において、100%もの標的または鋳型がプローブ-標的またはプローブ-鋳型複合体にある(例えばプローブにより結合されている)完全に適合したプローブを提供する。本発明は同様に、少なく

10

【0194】

本明細書において用いられる、「対立遺伝子識別部位」とは、標的核酸配列を含む可能な全ての対立遺伝子中の対応領域とは異なる(すなわち少なくとも一つのヌクレオチドだけ異なる)標的核酸配列の領域をいう。

【0195】

本発明により有用な対立遺伝子識別プローブは同様に、標的配列と比べて、標的様配列にあまり効果的に結合しないプローブを含む。標的配列または標的様配列とのプローブの結合の有効性は、標的様配列または標的配列の存在下において、プローブの二次構造の T_m より(少なくとも5 および好ましくは10 またはそれ以上)低い温度で行われるFRETアッセイ法で測定される。標的様配列の存在下または非存在下における蛍光のレベルの変化と比べて、標的配列の存在下または非存在下における蛍光のレベルの変化は、標的または標的様配列とのプローブの結合の有効性の効果的手段となる。

20

【0196】

本発明による方法において、標的配列と比べて標的様配列にあまり効果的に結合しないプローブは、本明細書において記述のFRETアッセイ法において蛍光を測定することにより判定された場合、標的核酸配列と比べて標的様配列とのハイブリダイゼーションにより、二次構造のいっそう小さな(例えば、標的核酸配列との結合による蛍光変化値の好ましくは25~50%、より好ましくは50~75%および最も好ましくは75~90%)変化を起こすであろう。本発明による方法において、標的配列と比べて標的様配列にあまり効果的に結合しないプローブは、試料中の標的様核酸配列の存在を示すシグナルを生成するであろう。しかしながら、上記のいっそう小さな変化のように、シグナルの強度も、標的配列の存在下において生成したシグナルの強度とは変わる(例えば、標的核酸配列との結合による蛍光変化値よりも好ましくは25~50%、より好ましくは50~75%および最も好ましくは75~90%少ないまたは多い)であろう。

30

【0197】

「標的核酸配列の存在を示すシグナル」または「標的様核酸配列」とは、標的核酸配列または標的様核酸配列の1分子から 10^{20} 分子、より好ましくは約100分子から 10^{17} 分子および最も好ましくは約1000分子から 10^{14} 分子から生成したシグナルに等しいシグナルをいう。

40

【0198】

D. 標的核酸

本発明は、第一のオリゴヌクレオチドに少なくとも部分的に相補的である第一の領域、伸長領域および第二のオリゴヌクレオチドに少なくとも部分的に相補的である第二の領域を3'から5'方向の順に含むポリヌクレオチドである、「標的核酸」を提供する。標的核酸は、一本鎖または二本鎖DNAまたはRNAを含んでよい。

【0199】

50

本発明は同様に、第一のオリゴヌクレオチドに少なくとも部分的に相補的である第一の領域および第二のオリゴヌクレオチドに少なくとも部分的に相補的である第二の領域を3'から5'方向の順に含むポリヌクレオチドである、「標的核酸」を提供する。

【0200】

本発明による標的核酸は、本明細書において定義される第一のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを可能とするのに十分な長さのヌクレオチドである「第一の領域」を含み、この「第一の領域」は第一のオリゴヌクレオチドに少なくとも部分的に相補的である。「第一の領域」は、長さが約6ヌクレオチドから約1000ヌクレオチドの範囲内にあり、好ましくは約8~30ヌクレオチドの範囲、および最適には、10~25ヌクレオチドの範囲である。

10

【0201】

いくつかの態様において、本発明による標的核酸は同様に、核酸重合活性を介してオリゴヌクレオチド(例えば、第一のオリゴヌクレオチド)の伸長を可能とするのに十分な長さのヌクレオチドである「伸長領域」を含む。「伸長領域」は、長さが約1ヌクレオチドから約1000ヌクレオチドの範囲内にあり、好ましくは約3~100ヌクレオチドの範囲、および最適には、長さが3~30ヌクレオチドの範囲である。

【0202】

標的核酸の第二の領域は、プローブ(例えば、本明細書において定義される、第二のオリゴヌクレオチド)に少なくとも部分的に相補的である長さのヌクレオチドである。「第二の領域」は、長さが約6ヌクレオチドから約1000ヌクレオチドの範囲内にあり、好ましくは約8~30ヌクレオチドの範囲、および最適には、10~25ヌクレオチドの範囲である。

20

【0203】

E. 鋳型核酸

本発明は同様に、本明細書において定義される第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップに少なくとも部分的に相補的である第一の領域、伸長領域およびプローブ(例えば、本明細書において定義される第三のオリゴヌクレオチド)に少なくとも部分的に相補的である第二の領域を3'から5'方向の順に含むポリヌクレオチドである、「鋳型核酸」を提供する。

【0204】

本発明は同様に、第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップに少なくとも部分的に相補的である第一の領域およびプローブ(例えば、本明細書において定義される第三のオリゴヌクレオチド)に少なくとも部分的に相補的である第二の領域を3'から5'方向の順に含むポリヌクレオチドである、「鋳型核酸」を提供する。鋳型核酸は一本鎖または二本鎖DNAまたはRNAを含んでよい。

30

【0205】

本発明による鋳型核酸は、本明細書において定義される第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップのハイブリダイゼーションを可能とするのに十分な長さのヌクレオチドである「第一の領域」を含み、この「第一の領域」は、第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップに少なくとも部分的に相補的である。「第一の領域」は、長さが約6ヌクレオチドから約1000ヌクレオチドの範囲内にあり、好ましくは約8~30ヌクレオチドの範囲、および最適には、10~25ヌクレオチドの範囲である。

40

【0206】

いくつかの態様において、本発明による鋳型核酸は同様に、核酸重合活性を介してオリゴヌクレオチド(例えば、本明細書において定義される第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップ)の伸長を可能とするのに十分な長さのヌクレオチドである「伸長領域」を含む。「伸長領域」は、長さが約1ヌクレオチドから約1000ヌクレオチドの範囲内にあり、好ましくは約3~100ヌクレオチドの範囲、および最適には、長さが3~30ヌクレオチドの範囲である。

【0207】

鋳型核酸の第二の領域は、プローブ(例えば、本明細書において定義される第三のオリ

50

ゴヌクレオチド)に少なくとも部分的に相補的である長さのヌクレオチドである。「第二の領域」は、長さが約6ヌクレオチドから約1000ヌクレオチドの範囲内にあり、好ましくは約8~30ヌクレオチドの範囲、および最適には、10~25ヌクレオチドの範囲である。

【0208】

F. ハイブリダイゼーション

本発明によるプライマーおよびプローブ(例えば、第一、第二および第三のオリゴヌクレオチドまたはフォワードおよびリバースプライマー)を標識することができ、標識された切断構造を調製するために使用することができる。オリゴヌクレオチドの以下の組み合わせ: 第二のオリゴヌクレオチドおよび第一のオリゴヌクレオチドまたはフォワードプライマーおよび第二のオリゴヌクレオチド を標的核酸配列内の配列にアニールさせることができる。オリゴヌクレオチドの以下の組み合わせ: 第三のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップ を鋳型核酸内の配列にアニールさせることができる。

10

【0209】

一つの態様において、ハイブリダイズされた第一のオリゴヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドは切断構造を形成し、この切断構造は本発明による切断因子により切断されて、第二のオリゴヌクレオチドのフラップを遊離する。別の態様において、ハイブリダイズされた第二のオリゴヌクレオチドの遊離フラップおよび第三のオリゴヌクレオチドは切断構造を形成し、この切断構造は本発明による切断手段により切断されて、第三のオリゴヌクレオチドのフラップを遊離する。第一および第二の切断反応は非侵入性でありうる。非侵入性の切断反応において、切断は第三のオリゴヌクレオチドの屈曲部の位置でまたは上流で起こる。相互作用性標識の対は、非侵入性の切断(屈曲部の位置でのまたは上流での切断)が標識を引き離して検出可能なシグナルを生成するように第三のオリゴヌクレオチドに結合される。

20

【0210】

一つの態様において、ハイブリダイズされたフォワードプライマーは重合により伸長されて切断構造を形成し、この切断構造は本発明による切断因子により切断されて、第二のオリゴヌクレオチドのフラップを遊離する。別の態様において、ハイブリダイズされた第二のオリゴヌクレオチドの遊離フラップおよび第三のオリゴヌクレオチドは切断構造を形成し、この切断構造は本発明による切断手段により切断されて、第三のオリゴヌクレオチドのフラップを遊離する。第一または第二の切断反応が侵入性である事象において、切断は第三のオリゴヌクレオチドの屈曲部の下流で起こるであろう。屈曲部下流の切断では、相互作用性標識の対の両メンバーを含有する第三のオリゴヌクレオチドのフラップの遊離が起こる。それゆえ検出可能なシグナルは生成しない。

30

【0211】

典型的には、二つの核酸配列が実質的に相補的(一続きの少なくとも14から25ヌクレオチドにわたって少なくとも約65%相補的、好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約90%相補的)である場合に選択的なハイブリダイゼーションが起こる。参照により本明細書に組み入れられるKanehisa, M., 1984, Nucleic Acids Res. 12:203を参照されたい。結果として、本明細書において定義される、オリゴヌクレオチドの結合部位におけるある程度のミスマッチが許容されるものと予想される。そのようなミスマッチはモノ-、ジ-またはトリ-ヌクレオチドのような、小さなものでありうる。あるいは、ミスマッチの領域は、連続した一連の四つまたはそれ以上のヌクレオチドの中にミスマッチが存在する領域と定義される、ループを包含してもよい。

40

【0212】

多くの要因が、オリゴヌクレオチドと第二の核酸分子とのハイブリダイゼーションの効率性および選択性に影響を及ぼす。オリゴヌクレオチドの長さ、ヌクレオチドの配列および/または組成、ハイブリダイゼーションの温度、緩衝液の組成ならびにオリゴヌクレオチドがハイブリダイズするのに必要とされる領域における立体障害の可能性を含むこれらの要因は、本発明によるオリゴヌクレオチドを設計する際に考慮されよう。

50

【0213】

オリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチドが標的配列にアニールする効率および精度との間には正の相関性がある。具体的には、より長い配列は、より短い配列が持つよりも高い融解温度(T_M)を持ち、所与の標的配列内で繰り返される可能性が低く、それにより無差別のハイブリダイゼーションを最小限にする。高いG-C含量を有するまたはパリンδροーム配列を含むオリゴヌクレオチド配列は、二分子ハイブリダイゼーションの動態よりも、単分子ハイブリダイゼーションの動態が溶液中では一般的に有利なので、その意図した標的部位と同様に、自己ハイブリダイズする傾向がある。しかしながら、各G-Cの対は、AおよびTの塩基対が標的配列に結合する際に見られる二本の水素結合ではなく、三本の水素結合によって結合し、それゆえいっそう強固な結合を形成するので、十分な数のG-Cヌクレオチドの対合を含有するオリゴヌクレオチドを設計することも重要である。ハイブリダイゼーションの温度は、プライミング反応液またはハイブリダイゼーション混合液の中に含まれる有機溶媒、例えばホルムアミドの濃度と同様に、オリゴヌクレオチドアニリングの効率に逆比例して変化するのに対し、塩濃度の増大は結合を促進する。ストリンジェントなアニリング条件の下で、より長いハイブリダイゼーションプローブまたは合成プライマーは、より短いものよりも効率的にハイブリダイズし、これはより寛容な条件下でも十分である。本明細書において用いられる、「標準的なストリンジェント条件」という用語は、配列間に少なくとも95%の同一性および好ましくは少なくとも97%の同一性がある場合にのみハイブリダイゼーションが起きることを意味する。配列は、終夜42度の配列のインキュベーションの後、ストリンジェントな洗浄(65で $0.2 \times \text{SSC}$)によるストリンジェントな条件の下でハイブリダイズする。例えば、対立遺伝子識別プローブが、例えば少なくとも一つのヌクレオチドだけ、異なる配列を識別するために使用されるある態様では、特異的なハイブリダイゼーションのためにいっそう高いハイブリダイゼーション温度を必要とすることもある。いくつかの要因がハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を及ぼすので、パラメータの組み合わせは、単一の要因の絶対尺度よりも重要である。

【0214】

G. 核酸の生成

本発明は、標的核酸配列の増幅のためにおよび切断構造の形成のために、検出およびまたは測定される核酸を提供する。

【0215】

本発明は、RNA、cDNA、ゲノムDNA、合形成態、および混合重合体を含む、核酸を用いる。本発明は、核酸のセンス鎖もアンチセンス鎖もともに含む。本発明によれば、核酸は化学的にもしくは生化学的に修飾されてもよく、または非天然のもしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含んでもよい。そのような修飾は、例えば、標識、メチル化、一つまたは複数の天然ヌクレオチドの類似体による置換、非荷電結合(例えば、メチルホスホネート、ホスホロジチオエートなど)のようなヌクレオチド間の修飾、ペンダント成分(例えば、ポリペプチド)、挿入剤(例えばアクリジン、ソラレンなど)、キレート剤、アルキル化剤、および修飾結合(例えば α アノマー核酸など)を含む。同様に含まれるのは、ポリヌクレオチドを、水素結合および他の化学的相互作用を介して指定の配列に結合するその能力において模倣する合成分子である。そのような分子は、当技術分野において公知であり、例えば、ペプチド結合が分子主鎖中のリン酸塩結合と置き換わるものを含む。

【0216】

1. DNAを含む核酸

a. クローニング

DNAを含む核酸は、当業者に周知のクローニング法により、cDNAまたはゲノムライブラリーから単離することができる(Ausubel et al., 前記)。手短に言えば、特定の核酸配列を含むDNAクローンの単離は組換えDNAまたはcDNAライブラリーのスクリーニング、および所望の配列を含むクローンの同定を伴う。クローニングは、以下の段階を含むであろう。特定のライブラリーのクローンをプレートに広げ、スクリーニングに適した基材に移し、

変性し、特定の核酸の存在について探索する。ハイブリダイゼーション条件の説明、および標識プローブを作出する方法は、以下に含まれている。

【0217】

所望のクローンは、核酸プローブとのハイブリダイゼーションによって、または抗体により検出できるタンパク質の発現によって同定されることが好ましい。あるいは、所望のクローンは、以下に記述の方法による特定のプライマーセットにより規定される配列のポリメラーゼ連鎖増幅によって同定される。

【0218】

適切なライブラリーの選択は、所望の配列の豊富な供給源である組織または細胞株を同定することを伴う。さらに、関心対象の核酸が調節配列またはイントロン配列を含む場合には、ゲノムライブラリーをスクリーニングする(Ausubel et al., 前記)。

【0219】

b. ゲノムDNA

本発明の核酸配列は、ゲノムDNAから増幅されうる。ゲノムDNAは、以下の方法によって組織または細胞から単離される。

【0220】

特定組織からの遺伝子の変種形態の検出を容易にするため、周囲の正常組織を含まないように組織を単離する。ゲノムDNAを哺乳類の組織から単離するために、組織を細分化し、液体窒素中で凍結する。凍結組織を、予冷した乳鉢および乳棒を用いて微粉に粉碎し、消化用緩衝液(100 mM NaCl、10 mM Tris-HCl、pH 8.0、25 mM EDTA、pH 8.0、0.5% (w/v) SDS、0.1 mg/ml プロテイナーゼK)に組織100 mgあたり消化用緩衝液1.2 mlで懸濁する。ゲノムDNAを哺乳類の組織培養細胞から単離するため、細胞を5分間500 × gの遠心分離によってペレットとし、氷冷PBS 1~10 mlに再懸濁し、5分間500 × gで再びペレットとし、1容量の消化用緩衝液に再懸濁する。

【0221】

消化用緩衝液中の試料を50 ℃で12~18時間(振盪しながら)インキュベートし、次いで等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールで抽出する。遠心分離段階(1700 × gで10分)の後に相分離が起こらない場合には、もう一容量の消化用緩衝液(プロテイナーゼK不含)を加え、遠心分離段階を繰り返す。二つの相の界面に白色粘調物質が認められる場合には、有機抽出段階を繰り返す。抽出後、上部の水層を新たな試験管に移し、これに1/2容量の7.5 M酢酸アンモニウムおよび2容量の100%エタノールを加える。核酸を1700 × gで2分間の遠心分離によってペレットとし、70%エタノールで洗浄し、風乾し、TE緩衝液(10 mM Tris-HCl、pH 8.0、1 mM EDTA、pH 8.0)に1 mg/mlで再懸濁する。0.1% SDSおよび1 μg/mlのDNase不含RNaseの存在下において37 ℃で1時間試料をインキュベートすることにより、かつ抽出およびエタノール沈殿段階を繰り返すことにより、残存するRNAを除去する。この方法によるゲノムDNAの収率は、およそ2 mg DNA/1g細胞または組織であるものと予想される(Ausubel et al., 前記)。この方法によって単離されたゲノムDNAは、本発明により、PCR分析に使用することができる。

【0222】

c. (cDNAまたはゲノムDNAの)制限消化

特定の標的核酸配列を含有する所望のcDNAまたはゲノムクローンの同定の後、本発明の核酸を制限酵素での消化によってこれらのクローンから単離することができる。

【0223】

制限酵素消化の技術は、当業者に周知である(Ausubel et al., 前記)。制限酵素消化に有用な試薬は、Stratageneを含む商業的供給元、および他の供給源から容易に入手することができる。

【0224】

d. PCR

本発明の核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によりゲノムDNAまたは他の天然の供給源から増幅することができる。PCR法は当業者に周知である。

10

20

30

40

50

【0225】

PCRにより、関心対象の標的配列を増幅するために、熱安定なDNA依存性DNAポリメラーゼが触媒する複数サイクルのDNA複製を用いることによって特定のDNA配列を素早く増幅する方法が提供される。PCRでは増幅される標的核酸配列の存在、増幅される配列に隣接する二つの一本鎖オリゴヌクレオチドプライマー、DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸、緩衝液および塩を必要とする。

【0226】

PCRは、参照により本明細書に組み入れられるMullis and Faloona, 1987, *Methods Enzymol.*, 155:335に記述されているように行われる。

【0227】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術は、米国特許第4,683,202号、同第4,683,195号および同第4,800,159号に開示されている。その最も簡単な形態において、PCRは、逆鎖とハイブリダイズしかつ標的DNA中の関心領域に隣接する2本のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた、特異的DNA配列の酵素合成のためのインビトロ法である。鋳型の変性、プライマーのアニーリングおよびDNAポリメラーゼによるアニールしたプライマーの伸長を伴う反復的な一連の反応段階は、末端がプライマーの5'末端によって定義される特異的断片の指数関数的蓄積をもたらす。PCRは、 10^9 倍で特異的DNA配列の選択的濃縮をもたらすことができると報告されている。PCR法はSaiki et al., 1985, *Science* 230:1350にも記述されている。

【0228】

PCRは、鋳型DNA (少なくとも1 fg; より有効的には1~1000 ng)および少なくとも25 pmolのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行われる。典型的な反応混合物は、以下を含む: DNA 2 μ l、25 pmolのオリゴヌクレオチドプライマー、適当な緩衝液2.5 μ l、1.25 μ M dNTP 0.4 μ l、2.5単位のTaq DNAポリメラーゼ(Stratagene)および全体積25 μ lまでの脱イオン水。ミネラルオイルを重層し、プログラム可能なサーマルサイクラーを用いてPCRを行う。

【0229】

PCRサイクルの各段階の長さおよび温度、ならびにサイクル数は、実際にはストリンジエンシー要件によって調整される。アニーリングの温度およびタイミングは、プライマーが鋳型にアニールするものと予想される効率、および許容されるミスマッチの程度の間によって決定される。プライマーアニーリング条件のストリンジエンシーを最適化する能力は、十分に当業者の知識の範囲内である。30 ~ 72 のアニーリング温度が用いられる。鋳型分子の最初の変性が、通常は4分間92 ~ 99で行われ、その後に変性(15秒~1分間94~99)、アニーリング(上記のように決定された温度; 1~2分)、および伸長(1分間72)からなるサイクルが20~40回行われる。最後の伸長段階は、一般的に72で4分間行われ、それに引き続き4で無期限(0~24時間)の段階を行うことができる。

【0230】

標準的なPCR技術で一般的に用いられる検出法では、ハイブリダイゼーションアッセイ法において増幅DNAとともに標識プローブを用いる。ハイブリダイゼーションの検出を可能にするため、プローブが、例えば、 32 P、ビオチン、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)などで標識されることが好ましい。

【0231】

他の検出手段は、断片長多型(PCR FLP)の使用、対立遺伝子特異的なオリゴヌクレオチド(ASO)プローブとのハイブリダイゼーション(Saiki et al., 1986, *Nature* 324:163)、または(クローニングされたDNAではなく増幅DNAを用いる)ジデオキシ法による直接配列決定を含む。標準的なPCR技術は、二つのプライマーの間に位置するDNA配列を複製することによって(本質的に)機能し、反応の主要産物として、各鎖の5'末端のプライマーで終結する別個の長さのDNA配列をもたらす。したがって、プライマー間の挿入および欠失は、異なる長さの産物の配列をもたらす、その産物をPCR-FLPにおいてサイズで分類することにより、それを検出することができる。ASOハイブリダイゼーションの例においては、増幅

されたDNAを(例えばUV照射によって)ナイロンフィルタに一連の「ドットプロット」として固定し、その後、HRPにより標識されたオリゴヌクレオチドプローブとストリンジェントな条件の下でハイブリダイズさせる。洗浄した後に、テトラメチルベンジジン(TMB)および過酸化水素を加え、HRPは過酸化水素を酸化し、これが今度はTMBを青色の沈殿物に酸化し、ハイブリダイズされたプローブを示す。

【0232】

2. RNAを含む核酸

本発明は同様に、RNAを含む核酸を提供する。

【0233】

RNAを含む核酸は、当技術分野において周知の方法(Ausubel et al., 前記)によって精製することができる。全RNAは、当技術分野において周知の方法(Ausubel et al., 前記)および以下に記述する方法によって細胞および組織から単離することができる。

【0234】

RNAは、以下の方法によって哺乳類の組織から精製される。関心対象の組織を取り出した後、2 gの組織片に細断し、液体窒素中で急速凍結してRNAの分解を阻止する。適当な体積のグアニジン溶液(例えば組織2 gあたりグアニジン溶液20 ml)の添加と同時に、組織試料を組織破砕機中、10秒のバースト2回または3回で粉砕する。組織グアニジン溶液(1 L)を調製するため、イソチオシアン酸グアニジウム590.8 gをDEPC-処理H₂Oおよそ400 mlに溶解する。2 M Tris-HCl、pH 7.5 25 ml (終濃度0.05 M)およびNa₂EDTA 20 ml (終濃度0.01 M)を加え、この溶液を終夜攪拌し、体積を950 mlに調整し、2-ME 50 mlを加える。

【0235】

ホモジナイズされた組織試料を12 にて12,000 × gで10分間の遠心分離に供する。得られた上清を0.1容量の20%サルコシルの存在下において65 度で2分間インキュベートし、5.7 M CsCl溶液(0.1 g CsCl/ml) 9 mlの上に重層し、22 度で終夜113,000 × gの遠心分離により分離する。上清を注意しながら取り除いた後に、試験管を逆さまにして水気を切る。(RNAペレットを含有する)試験管の底を50 mlのプラスチック製試験管に入れ、組織再懸濁用緩衝液(5 mM EDTA、0.5% (v/v)サルコシル、5% (v/v) 2-ME) 3 mlの存在下4 度で終夜(またはそれ以上)インキュベートしてRNAペレットを完全に再懸濁させる。得られたRNA溶液を、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール25:24:1、引き続きクロロホルム/イソアミルアルコール24:1で連続的に抽出し、3 M酢酸ナトリウム、pH 5.2および2.5容量の100%エタノールの添加によって沈澱し、DEPC水に再懸濁する(Chirgwin et al., 1979, Biochemistry, 18:5294)。

【0236】

あるいは、RNAを以下の一段階プロトコルによって哺乳類の組織から単離する。関心対象の組織をガラステフロン製ホモジナイザー中、組織100 mgあたり変性溶液(4 Mチオ硫酸グアニジウム、25 mMクエン酸ナトリウム、pH 7.0、0.1 M 2-ME、0.5% (w/v) N-ラウリルサルコシン) 1 mlでのホモジナイゼーションによって調製する。ホモジネートを5 mlのポリプロピレン製試験管に移した後に、2 M酢酸ナトリウム、pH 4 0.1 ml、水飽和フェノール1 ml、および49:1のクロロホルム/イソアミルアルコール0.2 mlを連続的に加える。試料を各成分の添加後に混合し、全ての成分を添加した後に0~4 度で15分間インキュベートする。試料を10,000 × g、4 度で20分間の遠心分離によって分離し、100%イソプロパノール1 mlの添加によって沈澱し、-20 度で30分間インキュベートし、10,000 × g、4 度で10分間の遠心分離によってペレットとする。得られたRNAペレットを変性溶液0.3 mlに溶解し、微量遠心管に移し、-20 度で30分間100%イソプロパノール0.3 mlの添加によって沈澱し、4 度にて10,000 × gで10分間遠心分離する。RNAペレットを70%エタノール中で洗浄し、乾燥し、DEPC処理水またはDEPC処理0.5% SDS 100~200 μlに再懸濁する(Chomczynski and Sacchi, 1987, Anal. Biochem., 162:156)。

【0237】

RNAを含む核酸は、インビトロ転写法によって産生することができる。

【0238】

10

20

30

40

50

インビトロ転写の技術は、当業者に周知である。手短に言えば、関心対象の遺伝子を、SP6、T3またはT7プロモーターを含有するベクターに挿入する。コード配列の下流に位置する単一の部位でベクターを消化する適切な制限酵素により、ベクターを直線化する。フェノール/クロロホルム抽出の後、DNAをエタノール沈殿し、70%エタノール中で洗浄し、乾燥し、滅菌水に再懸濁する。直線化されたDNAを転写用緩衝液(200 mM Tris-HCl, pH 8.0、40 mM MgCl₂、10 mMスベルミジン、250 NaCl [T7もしくはT3]または200 mM Tris-HCl, pH 7.5、30 mM MgCl₂、10 mMスベルミジン[SP6])、ジチオスレイトール、RNase阻害剤、四種類のリボヌクレオシド三リン酸のそれぞれ、およびSP6、T7またはT3 RNAポリメラーゼとともに37℃で30分間インキュベートすることにより、インビトロ転写反応を行う。RNAを含む放射性標識リボヌクレオチドを調製するため、未標識のUTPを除外し、³⁵S-UTPを反応混合液に含める。次いでDNA鋳型をDNaseIとのインキュベーションによって除去する。エタノール沈殿の後、放射性標識RNAのアリコートシンチレーションカウンタでカウントしてcpm/μlを決定する(Ausubel et al., 前記)。

10

【0239】

あるいは、RNAを含む核酸を、固相ホスホルアミドのような化学合成技術によって調製する(上記)。

【0240】

3. オリゴヌクレオチドを含む核酸

オリゴヌクレオチドを含む核酸は、市販されているオリゴヌクレオチド合成機を用いることによって作出することができる(上記)。

20

【0241】

固体支持体に結合され、結合成分またはタグに結合しうるような、ある化学成分および/または捕捉成分を用いてオリゴヌクレオチドを合成できることは当業者に周知である。適当な補足要素は、核酸結合タンパク質もしくはヌクレオチド配列、ビオチン、ハプテン、タンパク質、または化学的に反応性の成分を含むが、これらに限定されることはない。このようなオリゴヌクレオチドを最初に溶液中で用い、その後で固体支持体に捕捉しても、または最初に固体支持体に付着してから検出反応で用いてもよい。後者の例は、上流プローブ分子の5'末端が蛍光クエンチャーを含むように、上流プローブ分子を固体支持体に結合することである。同じ上流プローブ分子はまた、FENヌクレアーゼによる切断がクエンチャーをフルオロフォアから物理的に引き離すような位置にフルオロフォアを含む。例えば、標的核酸が固相上流プローブオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることができ、液相上流プライマーがまた、標的分子とハイブリダイズすることができる場合には、FEN切断反応が固体支持体上で起こり、5'クエンチャー成分を複合体から遊離する。これによって固体支持体に結合されたフルオロフォアが検出可能になり、したがって、適当に標識されたまたは識別された固体支持体上での切断事象の存在が明らかになるであろう。異なる上流プローブ分子は、アレイ上の異なる位置に結合されうる。アレイ上の位置は、プローブ分子を識別し、プローブ分子がハイブリダイズできる鋳型の存在を示しうる。

30

【0242】

II. 二本鎖

本発明は、本発明による切断構造を調製するのに使用される二本鎖を提供する。

40

【0243】

本発明による二本鎖は、任意の順序で、二本鎖の成分のハイブリダイゼーションおよび二本鎖の形成を可能とする条件の下で、二本鎖の成分を混合することによって形成される。一つの態様において、二本鎖は、最初に標的核酸または鋳型核酸を下流オリゴヌクレオチドとハイブリダイズし、次いで上流オリゴヌクレオチドを加えることによって形成される。別の態様において、二本鎖は、標的核酸および/または鋳型核酸を下流オリゴヌクレオチドおよび上流オリゴヌクレオチドと同時にハイブリダイズすることによって形成される。一つの態様において、二本鎖は、温度サイクリング反応のアニーリング段階の間に形成される。標的または鋳型核酸と一つまたは複数のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションは、適当な条件の下で行われる。適当な条件は、例えば、二次構造を含むプロ

50

ープの変性、ならびに標的または鋳型核酸およびプローブの相補的塩基間の水素結合の形成を可能とする温度を含む。ある態様において、ジメチルスルホキシド(DMSO)またはグリセロールなどの変性剤の適当な量が、ハイブリダイゼーション混合物に加えられる。変性剤の適当な量は、本発明による、第一または第二の二本鎖のハイブリダイゼーションおよび形成、ならびに以下に記述される、重合および/または切断の段階を可能とするのに十分である。本発明により有用な変性剤の濃度は、二本鎖の成分の塩基対組成に依って異なるであろう。本発明により有用な変性剤の濃度は、相補的核酸のハイブリダイゼーション、プライマー(例えばフォワードおよびリバースプライマー)の重合ならびに切断構造の切断を可能とするのに十分であるように、当技術分野において公知のおよび本明細書において記述の方法によって実験的に決定されるであろう。一つの態様において、変性剤は、およそ0.1~1 kbの範囲の核酸の場合、0~6%、および好ましくは1.5~2%前後の濃度で使用されるDMSOである。2%を超えるDMSOの濃度は、10 kbを超える核酸に使用されうる。あるいは、グリセロールを0~10%、および好ましくは5~8%の濃度で変性剤として使用することもできる。その両方の、それともその他の変性剤を、当技術分野において公知の方法によって実験的に決定される濃度で組み合わせて使用してもよい。

10

【0244】

二本鎖の成分の「ハイブリダイゼーションを可能とする条件」を決定する方法は、当技術分野において公知であり、核酸のハイブリダイゼーションに影響を与えるパラメータは「核酸」と題した項に詳細に論じられている。

20

【0245】

A. 第一の二本鎖

一つの態様において、本発明は、標的核酸(例えば、A'C'、図1)、標的に非相補的な3'末端ヌクレオチドを有する上流オリゴヌクレオチド(第一のオリゴヌクレオチド)(例えば、図1のA-1)および下流オリゴヌクレオチド(例えば、第二のオリゴヌクレオチド、例えば、FC、図1)を含む第一の二本鎖を提供する。下流オリゴヌクレオチド(例えば、第二のオリゴヌクレオチド)は、標的核酸に非相補的な5'領域および標的に相補的な3'領域を有する。この態様によれば、第一のオリゴヌクレオチドの最も3'側の相補的ヌクレオチドおよび第二のオリゴヌクレオチドの最も5'側の相補的ヌクレオチドは、標的にアニールされる場合に少なくともニックによって分離される。第一の二本鎖は第一の切断構造を形成する。

30

【0246】

別の態様において、本発明は、標的核酸(例えば、A'C'、図1)、標的の第一の領域に相補的なフォワードプライマー(例えば、図1のA-2)および下流オリゴヌクレオチド(例えば、第二のオリゴヌクレオチド、例えば、FC、図1)を含む第一の二本鎖を提供する。下流オリゴヌクレオチド(例えば、第二のオリゴヌクレオチド)は、標的核酸に非相補的な5'領域および標的の第二の領域に相補的な3'領域を有する。第一の二本鎖は第一の切断構造を形成する。

【0247】

一つの態様において、二本鎖は、最初に標的核酸を第二のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせ、その後第一のオリゴヌクレオチドを添加することにより形成される。

40

【0248】

別の態様において、二本鎖は、標的核酸を上流および下流オリゴヌクレオチドと同時にハイブリダイズさせることにより形成される。

【0249】

一つの態様において、第一および第二のオリゴヌクレオチドは、標的にアニールされる場合にニックによって分離される。

【0250】

別の態様において、第一および第二のオリゴヌクレオチドは、標的にアニールされる場合に1ヌクレオチドギャップによって分離される。

【0251】

50

別の態様において、第一および第二のオリゴヌクレオチドは、標的にアニールされる場合に2ヌクレオチドギャップによって分離される。

【0252】

さらにさらなる態様において、第一および第二のオリゴヌクレオチドは、標的にアニールされる場合に3ヌクレオチドギャップによって分離される。

【0253】

B. 第二の二本鎖

本発明は、鋳型核酸(例えば、F'H'、図1)、上流オリゴヌクレオチド(例えば、第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップ、例えば、F、図1)および下流オリゴヌクレオチド(例えば、第三のオリゴヌクレオチド、例えば、F2H、図1)を含む第二の二本鎖を提供する。第三のオリゴヌクレオチドは、鋳型核酸に非相補的な5'領域および鋳型の第二の領域に相補的な3'領域を有する。この態様によれば、上流オリゴヌクレオチド(例えば、第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップ)および下流オリゴヌクレオチド(例えば、第三のオリゴヌクレオチド)は、遊離されたフラップの最も3'側の相補的ヌクレオチドおよび第三のオリゴヌクレオチドの最も5'側の相補的ヌクレオチドが標的にアニールされる場合に少なくともニックによって分離されるように、鋳型とハイブリダイズする。

【0254】

一つの態様において、遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドは、鋳型核酸にアニールされる場合にニックによって分離される。

【0255】

別の態様において、遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドは、鋳型核酸にアニールされる場合に1ヌクレオチドギャップによって分離される。

【0256】

さらなる態様において、遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドは、標的にアニールされる場合に2ヌクレオチドギャップによって分離される。

【0257】

さらにさらなる態様において、遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドは、標的にアニールされる場合に3ヌクレオチドギャップによって分離される。

【0258】

III. 核酸重合活性

本発明は、等温反応において有用な核酸重合活性(核酸ポリメラーゼを含む)を提供する。本発明による等温反応において有用な核酸重合活性は、以下に記載の核酸ポリメラーゼのいずれかを含むが、それらに限定されることはない。

【0259】

本発明による核酸ポリメラーゼは、熱安定性であることができる。本明細書において用いられる、「熱安定性」とは、例えば、同様の活性を有する熱不安定型の酵素と比べて、熱に対し好ましくは約90~100 およびより好ましくは約70~98 もの高い温度で安定かつ活性な酵素をいう。例えば、熱安定性核酸ポリメラーゼまたはP.フリオサス(*P. furiosus*)、M.ヤナシイ(*M. jannaschii*)、A.フルギダス(*A. fulgidus*)もしくはP.ホリコシイ(*P. horikoshii*)などの好熱性生物に由来するFENヌクレアーゼは、大腸菌由来の核酸ポリメラーゼまたは哺乳類のFEN酵素と比べて高温でいっそう安定かつ活性である。サーマス・アクアティカス(*Taq*)から単離された典型的な熱安定性核酸ポリメラーゼは、米国特許第4,889,818号に記載されており、従来のPCRにおいてそれを使用する方法は、Saiki et al., 1988, *Science* 239:487に記載されている。P.フリオサス(*Pfu*)から単離された別の典型的な熱安定性核酸ポリメラーゼは、Lundberg et al., 1991, *Gene*, 108:1-6に記載されている。さらなる典型的な温度安定性ポリメラーゼは、例えば、好熱性細菌サーマス・フラバス、サーマス・ルバー(*Thermus ruber*)、サーマス・サーモフィルス、バチルス・ステアロサーモフィルス(記載された他のものより若干低い温度最適条件を有する)、サーマス・ラクテウス(*Thermus lacteus*)、サーマス・ルベンス(*Thermus rubens*)、サーモトガ・マリティマ(*Thermotoga maritima*)から、または好熱性古細菌サーモコッカス・リトラリ

スおよびメタノサーマス・フェルビドゥス(*Methanothermus fervidus*)から抽出されるポリメラーゼを含む。

【0260】

温度安定性ポリメラーゼおよびFENヌクレアーゼは、PCRサイクルの間の高温(約95)への曝露によって二本鎖核酸が変性される温度サイクリング過程において好ましい。

【0261】

本発明により有用な公知のDNAポリメラーゼは、例えば、大腸菌DNAポリメラーゼI、サーマス・サーモフィルス(Tth) DNAポリメラーゼ、パチルス・ステアロサーモフィルスDNAポリメラーゼ、サーモコッカス・リトラリスDNAポリメラーゼ、サーマス・アクアティカス(Taq) DNAポリメラーゼおよびパイロコッカス・フリオサス(Pfu) DNAポリメラーゼを含む。

10

【0262】

本発明により有用な5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠く核酸ポリメラーゼは、KlenowおよびKlenowエキソ-、ならびにT7 DNAポリメラーゼ(Sequenase)を含むが、これらに限定されることはない。

【0263】

本発明により有用な5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠く熱安定性核酸ポリメラーゼは、Pfu、エキソ-Pfu (3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠くPfuの突然変異型)、Taqのストフェル(Stoffel)断片、N-切断型Bst、N-切断型Bca、Genta、Jd F3エキソ-、Vent、Ventエキソ- (3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠くVentの突然変異型)、Deep Vent、Deep Ventエキソ- (3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠くDeep Ventの突然変異型)、U1Tma、およびThermoSequenaseを含むが、これらに限定されることはない。

20

【0264】

本発明のある態様において有用な核酸ポリメラーゼは、3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠き、エキソ-Pfu DNAポリメラーゼ(3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠くPfu DNAポリメラーゼの突然変異型、Cline et al., 1996, Nucleic Acids Research, 24:3546; 米国特許第5,556,772号; Stratagene, La Jolla, Calif. から市販されている、カタログ番号600163)、エキソ-Tma DNAポリメラーゼ(3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠くTma DNAポリメラーゼの突然変異型)、エキソ-Tli DNAポリメラーゼ(3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠くTli DNAポリメラーゼの突然変異型、New England Biolabs、(カタログ番号257))、エキソ-大腸菌DNAポリメラーゼ(3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠く大腸菌DNAポリメラーゼの突然変異型)、大腸菌DNAポリメラーゼIのエキソ-Klenow断片(Stratagene、カタログ番号600069)、エキソ-T7 DNAポリメラーゼ(3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠くT7 DNAポリメラーゼの突然変異型)、エキソ-KOD DNAポリメラーゼ(3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠くKOD DNAポリメラーゼの突然変異型)、エキソ-JDF-3 DNAポリメラーゼ(3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠くJDF-3 DNAポリメラーゼの突然変異型)、エキソ-PGB-D DNAポリメラーゼ(3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠くPGB-D DNAポリメラーゼの突然変異型) New England Bio 40
labs、カタログ番号259、Tth DNA ポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ(例えば、カタログ番号600131、600132、600139、Stratagene); U1Tma (N-切断型)サーモトガ・マルティマ(*Thermatoga martima*) DNAポリメラーゼ; DNAポリメラーゼIのKlenow断片、9 ° Nm DNAポリメラーゼ(New England Biolabs, Beverly, MAの製造中止品)、「3'-5'方向のエキソ低減」変異体(Southworth et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci 93:5281)およびSequenase (USB, Cleveland, OH)を含むが、これらに限定されることはない。上記の酵素のいずれのポリメラーゼ活性も、当技術分野において周知の手段によって定義することができる。本発明による、DNAポリメラーゼ活性の一単位は、最適温度において30分で多量体型への総dNTP 10ナノモルの取り込みを触媒する酵素の量と定義される。

30

40

【0265】

50

本発明により有用な核酸ポリメラーゼは、天然のポリメラーゼも、5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠くポリメラーゼ変異体もともに含む。本発明により有用な核酸ポリメラーゼは、さまざまな熱安定度を保有することができる。

【0266】

重合因子はポリメラーゼである。一つの態様において、重合因子は、5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠く。別の態様において、重合因子は熱安定性である。さらに別の態様において、シグナル酵素が重合活性および切断活性を含有する。両活性を有する酵素は、大腸菌DNAポリメラーゼI、T7 DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、またはTaq DNAポリメラーゼを含む。代替の態様において、切断活性および重合活性は別々の酵素によって供与される。別々の酵素は単一の配合物中で供給されうる。

10

【0267】

本発明により有用なさまざまな熱安定度を持った、5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠くさらなる核酸ポリメラーゼを以下に記載する。

【0268】

A. バクテリオファージDNAポリメラーゼ(37℃アッセイ法に有用):

バクテリオファージDNAポリメラーゼは、5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠いている。というのは、この活性が別々のポリペプチドによってコードされるからである。適当なDNAポリメラーゼの例はT4、T7、およびφ29 DNAポリメラーゼである。市販の酵素はT4 (多くの供給元、例えば、Epicentreから入手可能)およびT7 (多くの供給元、例えば、非修飾DNAポリメラーゼの場合Epicentreおよび3'から5'方向のエキソ T7「Sequenase」DNAポリメラーゼの場合USBから入手可能)である。

20

【0269】

B. 古細菌DNAポリメラーゼ:

古細菌において同定されたDNAポリメラーゼには二つの異なるクラスがある。

1. ファミリーB/pol αタイプ(パイロコッカス・フリオサス由来のPfuの相同体) および

2. pol IIタイプ(P.フリオサスDP1/DP2 2-サブユニットポリメラーゼの相同体)

両クラスのDNAポリメラーゼは、関連する5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を天然には欠いていること、および3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ(校正)活性を保有することが明らかにされている。適当なDNAポリメラーゼ(pol αまたはpol II)を、所望のアッセイ温度と同様である至適増殖温度を有する古細菌から得ることができる。適当な古細菌の例としては以下が挙げられるが、これらに限定されることはない。

30

1. 熱不安定性(37℃アッセイ法に有用)- 例えば、メタノコッカス・ボルタエ(Methanococcus voltae)。

2. 熱安定性(非PCRアッセイ法に有用)- 例えば、スルホロブス・ソルファタリカス(Sulfolobus solfataricus)、スルホロブス・アシドカルダリウム(Sulfolobus acidocaldarius)、メタノコッカス・ヤナシイ、サーモプラズマ・アシドフィラム(Thermoplasma acidophilum)。適当な古細菌は、80~85℃以下の最大増殖温度または70~80℃以下の至適増殖温度を示すと推定される。

3. 熱安定性(PCRアッセイ法に有用)- 例えば、パイロコッカス・種(フリオサス、GB-D種、KOD1株種、ウーゼイ(woesii)、アビシイ(abysii)、ホリコシイ(horikoshii))、サーモコッカス種(リトラリス、9°North-7種、JDF-3種、ゴルゴナリウス)、パイロディクテウム・オカルタム(Pyrodicticum occultum)、およびアーケオグロブス・フルギダス(Aeropyrum pernix)。適当な古細菌は、80~85℃以上の最大増殖温度または70~80℃以上の至適増殖温度を示すものと推定される。KOD (Toyobo)、Pfx (Life Technologies, Inc.)、Vent (New England BioLabs)、Deep Vent (New England BioLabs)およびPwo (Boehringer-Mannheim)を含む、古細菌pol α DNAポリメラーゼ群の適切なPCR酵素は、市販されている。

40

【0270】

上記のものに関連するさらなる古細菌は、以下の参考文献に記載されている: 古細菌:

50

A Laboratory Manual (Robb, F.T. and Place, A.R., eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1995および好熱性細菌(Kristjansson, J.K., ed.) CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1992。

【0271】

C. 真正細菌DNAポリメラーゼ:

3つのクラスの真正細菌DNAポリメラーゼ、pol I、IIおよびIIIがある。pol I DNAポリメラーゼファミリーの酵素は5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を保有し、あるメンバーは3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性も示す。pol II DNAポリメラーゼは、もとも5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠いているが、それでも3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性を示す。pol III DNAポリメラーゼは、細胞の主要な複製型DNAポリメラーゼに相当し、複数のサブユニットで構成される。pol III触媒サブユニットは、5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠くが、一部の例では3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性は同じポリペプチドに位置する。

10

【0272】

真正細菌pol IIおよびpol III DNAポリメラーゼの商業的供給源はない。

【0273】

さまざまな市販のPol I DNAポリメラーゼがあり、その中には5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を低減または消失するために改変されているものもある。pol I DNAポリメラーゼの5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を除去するために使用される方法は、以下を含む。

20

-突然変異誘発(Xu et al., 1997, J. Mol. Biol., 268:284およびKim et al., 1997, Mol. Cells, 7:468に記述されている通り)。

-タンパク質分解消化によるN-切断(Klenow et al., 1971, Eur. J. Biochem., 22:371に記述されている通り)、または

-クローニングおよびC末端断片として発現することによるN-切断(Lawyer et al., 1993, PCR Methods Appl., 2:275に記述されている通り)。

【0274】

古細菌の供給源に関しては、アッセイ温度の要件によって、本発明により有用なDNAポリメラーゼの供給源としてどの真正細菌(例えば、中温菌、好熱性細菌、超好熱性細菌)を使用すべきかが決まる。

30

【0275】

1. 中温性/熱不安定性(37℃アッセイ法に有用)

i. 天然には5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠くDNAポリメラーゼ:

大腸菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenza*)、マイコバクテリウム(*Mycobacterium*)種(結核菌(*tuberculosis*)、ハンセン菌(*leprae*))などの、中温性真正細菌由来のpol IIまたはpol III触媒サブユニット

ii. 5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠くDNAポリメラーゼ変異体:

N-切断または突然変異誘発のためのpol I DNAポリメラーゼは、上記の中温性真正細菌から単離することができる(Ci)。市販の真正細菌DNAポリメラーゼpol I断片は、Klenow断片である(N-切断型大腸菌pol I; Stratagene)。

40

【0276】

2. 熱安定性(非PCRアッセイ法に有用)

i. 天然には5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠くDNAポリメラーゼ:

バチルス種(例えば、ステアロサーモフィルス、カルドテナクス、カルドベロックス(*Caldococcus*))などの、好熱性真正細菌由来のpol IIまたはpol III触媒サブユニット

ii. 5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠くDNAポリメラーゼ変異体:

N-切断または突然変異誘発に適したpol I DNAポリメラーゼは、上記のバチルス種などの好熱性真正細菌から単離することができる。B. ステアロサーモフィルスDNAポリメラーゼpol Iの熱安定性N-切断型断片は、市販されており、商品名Bst DNAポリメラーゼI大断片(Bio-RadおよびIsotherm DNAポリメラーゼ(Epicentre))で販売されている。バチルス・

50

カルドテナクス pol I の C-末端断片は、Panvera から入手可能である (商品名 Ladderman で販売されている)。

【 0 2 7 7 】

3. 熱安定性 (PCR アッセイ法に有用)

i. 天然には 5' から 3' 方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠く DNA ポリメラーゼ:

サーマス種 (アクアティカス、サーモフィルス、フラバス、ルバー、カルドフィルス (*Caldophilus*), フィリホルミス (*filiformis*), プロキアナス (*brokianus*)) 由来のまたはサーモトガ・マリティマ由来の pol II または pol III 触媒サブユニット。サーマス・サーモフィルスおよびサーマス・アクアティカス由来の触媒 pol III サブユニットは、Yi-Ping et al., 1999, J. Mol. Evol., 48:756 および McHenry et al., 1997, J. Mol. Biol., 272:178 に記述されている。 10

ii. 5' から 3' 方向のエキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠く DNA ポリメラーゼ変異体:

N-切断または突然変異誘発に適した pol I DNA ポリメラーゼは、サーマス種およびサーモトガ・マリティマを含むさまざまな好熱性真正細菌から単離することができる (上記参照)。サーマス・アクアティカス DNA ポリメラーゼ pol I (Taq) の熱安定性断片は、市販されており、商品名 KlenTaq1 (Ab Peptides)、Stoffel 断片 (Perkin-Elmer)、および Thermo Sequenase (Amersham) で販売されている。C-末端断片に加えて、TaqFS (Hoffman-LaRoche) などの、5' から 3' 方向のエキソヌクレアーゼ⁻ Taq 変異体も市販されている。Taq の 5'-3' エキソヌクレアーゼ⁻ 版に加えて、サーモトガ・マリティマ DNA ポリメラーゼ I の N-切断型版も市販されている (商品名 U1Tma, Perkin-Elmer)。 20

【 0 2 7 8 】

上記のものに関連するさらなる真正細菌は、Thermophilic Bacteria (Kristjansson, J. K., ed.) CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1992 に記述されている。

【 0 2 7 9 】

D. 真核生物の 5' から 3' 方向のエキソヌクレアーゼ⁻ DNA ポリメラーゼ (37℃ アッセイ法に有用)

DNA pol α (複製/修復)、δ (複製)、ε (複製)、β (修復) および γ (ミトコンドリア複製) を含む、真核生物において同定されているいくつかの DNA ポリメラーゼがある。真核生物の DNA ポリメラーゼは、5' から 3' 方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠いている。というのは、この活性が別々のポリペプチド (例えば、哺乳類 FEN-1 または酵母 RAD2) によってコードされるからである。適当な熱不安定性 DNA ポリメラーゼは、さまざまな真核生物 (酵母、哺乳類細胞、昆虫細胞、ショウジョウバエ (*Drosophila*)) を含むが、これらに限定されない) および真核生物ウイルス (例えば、EBV、アデノウイルス) から単離することができる。 30

【 0 2 8 0 】

5' から 3' 方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠くことに加えて、3'-5' エキソヌクレアーゼ (校正) 活性を欠く DNA ポリメラーゼ変異体は、FEN に基づく検出戦略において性能の向上を示すことが可能である。例えば、固有の 3' から 5' 方向のエキソヌクレアーゼ活性を低減または消失することは、標識プローブの非特異的なエキソヌクレアーゼ分解を減少させることによってバックグラウンドシグナルを低下させうる。三つの 3' から 5' 方向のエキソヌクレアーゼモチーフが同定されており、これらの領域における変異は、Klenow、φ29、T4、T7、および Vent DNA ポリメラーゼ、酵母 Pol α、Pol β、および Pol γ、ならびに枯草菌 (*Bacillus subtilis*) Pol III において 3' から 5' 方向のエキソヌクレアーゼ活性を消失することが明らかにされている (Derbeyshire et al., 1995, Methods. Enzymol. 262:363 に概説されている)。3' から 5' 方向のエキソヌクレアーゼ活性の低減または消失している、さらなる DNA ポリメラーゼ変異体を調製する方法は、当技術分野において周知である。 40

【 0 2 8 1 】

5' から 3' 方向のエキソヌクレアーゼ活性も 3' から 5' 方向のエキソヌクレアーゼ活性もともに欠く市販の酵素は、Sequenase (エキソ⁻ T7; USB)、Pfu エキソ⁻ (Stratagene)、エキソ⁻ Vent (New England BioLabs)、エキソ⁻ Deep Vent (New England BioLabs)、エキソ⁻ Klenow 断片 (Stratagene)、Bst (Bio-Rad)、Isotherm (Epicentre)、Ladderman (Panvera) 50

)、KlenTaq1 (Ab Peptides)、Stoffel断片(Perkin-Elmer)、ThermoSequenase (USB)、およびTaqFS (Hoffman-LaRoche)を含む。

【0282】

鎖置換活性を有する核酸ポリメラーゼも本発明により有用である。

【0283】

Pfu以外のポリメラーゼが使用される場合には、緩衝液および伸長温度は、本発明により有用な特定のポリメラーゼによる最適活性を可能とするように選択される。本発明によるポリメラーゼに有用な緩衝液および伸長温度は、当技術分野において公知であり、供給元の仕様書から決定することもできる。

【0284】

本発明により有用なさらなるヌクレアーゼは、5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠くが、3'から5'方向のDNA合成活性を保有し、以下の突然変異を含むTaqポリメラーゼの突然変異型：D144Sが5'から3'方向のエキソヌクレアーゼ活性を除去する、かつF667YがddNTPの取り組みを改善する、D144S/F667Y Taqを含む。

【0285】

Pol Iポリメラーゼのエキソ-変異体は、Xu et al., 1997, J. Mol. Biol., 268:284の方法によって調製することができる。

【0286】

IV. 切断構造

本発明は、ヌクレアーゼ(例えば、FENヌクレアーゼ)によって切断されうる切断構造を提供し、それゆえ切断構造を調製する方法を教示する。

【0287】

A. 切断構造の調製

1. 本発明の一つの態様において、第一の切断構造は、標的核酸(A'C'、図1)、下流プローブ(例えば、第二のオリゴヌクレオチド、例えば、FC、図1)、および上流オリゴヌクレオチド(例えば、第一のオリゴヌクレオチド、例えば、A-1、図2)を、適当な緩衝液(例えば、Stratageneから入手可能な1×Pfu緩衝液(カタログ番号600153)または15 mMのTris-HCL (pH 8)、50 mM KCL、5.5 mM MgCl₂、8%グリセロール、1% DMSOを含むプローブ用緩衝液)とともに、標的核酸配列をオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせて本発明による二本鎖を形成させることを可能にする条件(例えば、10秒~5分間95℃、その後におよそ50~60℃に冷却)の下でインキュベートすることによって形成される。プローブの5'領域は、標的に非相補的であり、標的にアニールされる場合に5'フラップを形成する。上流オリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドは標的に非相補的である。切断構造は、上流オリゴヌクレオチドの相補的部分および下流オリゴヌクレオチドの相補的部分が、少なくともニックによって分離されるように標的にアニールする場合に形成される。構造の形成および切断に最適な温度は、特定のオリゴヌクレオチドおよびポリメラーゼに依って変わるであろう。反応は、フォワードおよびリバースプライマーを含むことができ、PCR反応条件の下で行うことができる。例えば、本発明の切断構造は、以下の反応条件：(1) 95℃で2分を1サイクル、(2) 1秒間95℃、(3) 18秒間60℃の下で形成することができる。段階(2)および(3)は、繰り返してもよい。

【0288】

2. 本発明の別の態様において、第二の切断構造は、鋳型核酸(F'H'、図1)、下流プローブ(例えば、第三のオリゴヌクレオチド、例えば、F2H、図1)、および上流オリゴヌクレオチド(例えば、第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップ、例えば、F、図1)を、適当な緩衝液(Stratageneから入手可能な1×Pfu緩衝液(カタログ番号600153)または15 mMのTris-HCL (pH 8)、50 mM KCL、5.5 mM MgCl₂、8%グリセロール、1% DMSOを含むプローブ用緩衝液)とともに、鋳型核酸配列をオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせて本発明による第二の二本鎖を形成させることを可能にする条件(例えば10秒~5分間95℃、その後におよそ50~60℃に冷却)の下でインキュベートすることによって形成される。プローブの5'領域は鋳型に非相補的であり、このオリゴヌクレオチドの3'領域が鋳型にアニールさ

10

20

30

40

50

れる場合に5'フラップを形成する。上流オリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドは鋳型に非相補的である。切断構造は、上流オリゴヌクレオチドの鋳型相補的な部分および下流オリゴヌクレオチドの相補的部分が、少なくともニックによって分離されるように鋳型にアニールする場合に形成される。構造の形成および切断に最適な温度は、特定のオリゴヌクレオチドおよびポリメラーゼに依って変わるであろう。反応は、フォワードおよびリバースプライマーを含むことができ、PCR反応条件の下で行うことができる。例えば、本発明の切断構造は、以下の反応条件：95 で2分を1サイクル、(2) 1秒間95 、(3) 18秒間60 の下で形成することができる。段階(2)および(3)は、繰り返してもよい。

【0289】

上記の第1部～第2部のいずれか一つに記述の切断構造は、以下のように調製することもできる。切断構造の成分を、ハイブリダイゼーション、ならびにその後の切断の段階およびいくつかの態様では重合の段階に最適な温度(例えば50 、69 または72)でハイブリダイズする。切断構造の成分を、本明細書において定義される、第一の二本鎖、または第二の二本鎖のハイブリダイゼーションおよび形成を可能とするのに十分な時間ハイブリダイズする。

10

【0290】

本発明のある態様において、第一または第二の二本鎖は、本発明による、第一または第二の二本鎖のハイブリダイゼーションおよび形成と、以下に記述される、その後の切断の段階およびいくつかの態様では重合の段階とを可能とするのに十分な濃度の変性剤(例えば、DMSOまたはグリセロール)の存在下において第一または第二の二本鎖の成分をインキュベートすることによって形成される。本発明により有用な変性剤の濃度は、二本鎖の成分の塩基対組成に依って変わるであろう。本発明により有用な変性剤の濃度は、本発明による、相補的核酸のハイブリダイゼーション、切断構造の切断およびいくつかの態様ではプライマー(例えば、フォワードプライマー)の重合を可能とするのに十分であるように、当技術分野において公知のおよび本明細書において記述の方法によって実験的に決定されるであろう。一つの態様において、変性剤は、およそ0.1～1 kbの範囲の核酸の場合、0～6%、および好ましくは1.5～2%前後の濃度で使用されるDMSOである。2%を超えるDMSOの濃度は10 kbを超える核酸に使用されうる。あるいは、グリセロールを0～10%、および好ましくは5～8%の濃度で変性剤として使用することもできる。その両方の、それともその他の変性剤を、当技術分野において公知の方法によって実験的に決定される濃度で組み合わせて使用してもよい。

20

30

【0291】

本発明による等温反応の場合、本明細書において定義される、第一の二本鎖の形成の後に行われる反応の段階の全てが、同じ温度で実施される。

【0292】

プローブと標的核酸配列との結合によって変化する二次構造を持つプローブを、本発明による切断構造を調製するために使用することができる。

【0293】

B. 標識された切断構造を調製する方法

本発明は、標識された切断構造を提供する。標識された切断構造は、上記の「切断構造」と題した項のA1～A2項に記述されるように形成され、ここでは非侵入性の切断構造の切断によって検出可能なシグナルが生成するように、下流オリゴヌクレオチドの一方または両方が(例えば、第二または第三のオリゴヌクレオチドの5'フラップ上の相互作用性成分の対の第一のメンバーおよび3'領域上の相互作用性成分の対の第二のメンバーで)標識される。核酸プローブまたはオリゴヌクレオチドを標識する方法は、当技術分野において周知である(Sambrook et al., 前記; Ausubel et al., 前記を参照のこと)。

40

【0294】

オリゴヌクレオチドプローブは、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、酵素的または化学的手段によって検出可能な成分を組み入れることによって、下記のように、標識することができる。標識をオリゴヌクレオチドプローブに連結または結合する方法は、

50

当然ながら、使用される標識のタイプおよびプローブ上の標識の位置に依る。いくつかの態様において、第三のオリゴヌクレオチドは相互作用性成分の対で標識される。相互作用性成分の対の第一のメンバーは、5'フラップに機能的に結合され、相互作用性成分の対の第二のメンバーは、プローブの+1ヌクレオチドに機能的に結合される。

【0295】

本発明で用いるのに適しうる種々の標識、およびそれらを下流オリゴヌクレオチドに含めるための方法は、当技術分野において公知であり、互いに相互作用してシグナルを強め、変え、または弱めうる酵素(例えば、アルカリホスファターゼおよび西洋ワサビペルオキシダーゼ)かつ酵素基質、放射性原子、蛍光色素、クロモフォア、化学発光標識、Origen(商標)(Igen)などの電気化学発光標識を含むが、これらに限定されることはない。当然ながら、サーマルサイクラー機器を用いて行われるPCRに基づいたアッセイ法において標識分子が使用される場合には、標識はこの自動化過程において必要とされる温度サイクリングをしのぐことができなければならない。

【0296】

1. フルオロフォア

本発明の標識プローブを構築する際に標識として用いられるフルオロフォアは、ローダミンおよび誘導体(テキサスレッドなどの)、フルオレセインおよび誘導体(5-プロモメチルフルオレセインなどの)、ルシファーイエロー、IAEDANS、7-Me₂N-クマリン-4-酢酸、7-OH-4-CH₃-クマリン-3-酢酸、7-NH₂-4-CH₃-クマリン-3-酢酸(AMCA)、モノプロモビマン、カスケードブルーなどのピレントリスルホン酸、ならびにモノプロモリメチル-アンモニオビマンを含む。一般に、単一比色計(monochromometer)よりむしろフィルタ付き蛍光光度計の使用を可能にするため、および検出の効率を高めるため、幅の広いストークスシフトを有するフルオロフォアが好ましい。

【0297】

フルオロフォアで標識されたプローブは、本発明による標識プローブを含む切断構造のヌクレアーゼ(例えばFEN-ヌクレアーゼ)媒介性の切断において容易に使用することができる。標識がプローブの5'末端にある場合に、ヌクレアーゼ(例えばFEN-ヌクレアーゼ)によって生成した標識断片は、当技術分野において周知の手順によって完全な状態の(intact)、ハイブリダイズされたプローブから分離される。本発明の別の態様において、加水分解された標識プローブの検出は、例えば、蛍光偏光、つまり分子回転に基づいて大分子と小分子を区別する技術を用いて達成することができる。大分子(すなわち、完全な状態の標識プローブ)は、小分子よりもはるかに遅く溶液中で回転する。関心対象の分子上の適切な部位(例えば、標識プローブの5'末端)への蛍光成分の連結によって、この蛍光成分を分子回転に基づき測定(および区別)し、したがって完全な状態のプローブと消化されたプローブを区別することができる。

【0298】

2. FRET

本明細書において用いられる、「相互作用性の標識対」という語句および「相互作用性標識の対」という語句ならびに「第一および第二の成分」という語句は物理的に、光学的に、または別の方法で検出可能なシグナルによって近接性の検出を可能とするように相互作用する分子の対をいう。「相互作用性標識の対」の例としては、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)(Stryer, L. Ann. Rev. Biochem. 47, 819-846, 1978)、シンチレーション近接アッセイ法(SPA)(Hart and Greenwald, Molecular Immunology 16:265-267, 1979; 米国特許第4,658,649号)、発光共鳴エネルギー転移(LRET)(Mathis, G. Clin. Chem. 41, 1391-1397, 1995)、直接消光(Tyagi et al., Nature Biotechnology 16, 49-53, 1998)、化学発光エネルギー転移(CRET)(Campbell, A. K., and Patel, A. Biochem. J. 216, 185-194, 1983)、生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)(Xu, Y., Piston D. W., Johnson, Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 151-156, 1999)、またはエキシマー形成(Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Press, New York, 1999)で用いるのに適した標識が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0299】

第一および第二の成分は、本発明のオリゴヌクレオチドに「機能的に結合」される。これは、各成分がその機能に合った任意の方法で、すなわち、プローブの切断によって検出可能なシグナルをもたらすことに合った任意の方法で、その各配列に結合されることを意味する。例えば、成分の対は、本発明のオリゴヌクレオチドに共有結合によりまたは非共有結合により付着されうる。非共有結合的な付着の例は、このどれを用いても第一または第二の成分を本発明のオリゴヌクレオチドに機能的に結合できるが、ハイブリダイゼーションを介した付着、水素結合、イオン結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス相互作用、およびタンパク質-核酸相互作用を含む。好ましいのは、オリゴヌクレオチドの5'末端および3'末端の位置でまたはその近くで共有結合により付着される成分である。

10

【0300】

本明細書において用いられる、「蛍光」または「蛍光基」または「フルオロフォア」への言及は、それぞれ、発光および発光基を含む。

【0301】

本明細書において用いられる、「蛍光の増加」とは、フルオロフォアによって放出される検出可能な蛍光の増加をいう。蛍光の増加は、例えば、フルオロフォアとクエンチャーとの間の距離が、例えば消光が低減されるような、切断手段による切断反応に起因して、増加される場合に起こりうる。フルオロフォアによって放出される蛍光が少なくとも2倍、例えば2倍、2.5倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、10倍またはそれ以上だけ増加される場合に「蛍光の増加」が認められる。

20

【0302】

a. FRET適合性フルオロフォア

本発明に有用な相互作用性標識の対は、FRET適合性色素の対、またはクエンチャー-色素対を含むことができる。一つの態様において、対はフルオロフォア-クエンチャー対を含む。

【0303】

本発明のオリゴヌクレオチドは、蛍光による標的核酸の検出/測定を可能とする。完全な状態のオリゴヌクレオチドにおいてフルオロフォアにより放出される蛍光は実質的に消光されるのに対し、切断されたまたはいくつかの態様では標的にハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドにおいて蛍光は消光されず、プローブ切断またはいくつかの態様では標的ハイブリダイゼーションによって全体的な蛍光の増加を結果的にもたらしように、本発明のオリゴヌクレオチドをフルオロフォアおよびクエンチャーで標識することができる。さらに、増幅反応産物のリアルタイム検出の間の蛍光シグナルの生成によって、試料中の標的配列の初期数の正確な定量が可能になる。

30

【0304】

5-FAM (5-カルボキシフルオレセインとも呼ばれ; スピロ(イソベンゾフラン-1(3H), 9'-(9H)キサンテン)-5-カルボン酸, 3',6'-ジヒドロキシ-3-オキソ-6-カルボキシフルオレセインとも呼ばれる); 5-ヘキサクロロ-フルオレセイン([4,7,2',4',5',7'-ヘキサクロロ-(3',6'-ジピバロイル-フルオレセイニル)-6-カルボン酸]); 6-ヘキサクロロ-フルオレセイン([4,7,2',4',5',7'-ヘキサクロロ-(3',6'-ジピバロイルフルオレセイニル)-5-カルボン酸]); 5-テトラクロロ-フルオレセイン([4,7,2',7'-テトラ-クロロ-(3',6'-ジピバロイルフルオレセイニル)-5-カルボン酸]); 6-テトラクロロ-フルオレセイン([4,7,2',7'-テトラクロロ-(3',6'-ジピバロイルフルオレセイニル)-6-カルボン酸]); 5-TAMRA (5-カルボキシテトラメチルローダミン; キサンチリウム, 9-(2,4-ジカルボキシフェニル)-3,6-ビス(ジメチル-アミノ); 6-TAMRA (6-カルボキシテトラメチルローダミン; キサンチリウム, 9-(2,5-ジカルボキシフェニル)-3,6-ビス(ジメチルアミノ); EDANS (5-((2-アミノエチル)アミノ)ナフタレン-1-スルホン酸); 1,5-IAEDANS (5-(((2-ヨードアセチル)アミノ)エチル)アミノ)ナフタレン-1-スルホン酸); DABCYL (4-((4-(ジメチルアミノ)フェニル)アゾ)安息香酸) Cy5 (インドジカルボシアニン-5) Cy3 (インド-ジカルボシアニン-3); およびBODIPY FL (2,6-ジブromo-4,4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-

40

50

インダセン-3-プロピオン酸)、Quasar-670 (Bioreseach Technologies)、CalOrange (Bio research Technologies)、Rox、ならびにそれらの適当な誘導体を含むが、これらに限定されない、多種多様のフルオロフォアを使用することができる。

【0305】

b. FRET適合性クエンチャー

本明細書において用いられる「クエンチャー」という用語は、蛍光供与体からの放出を供与体に付着または近接する場合に低減できる、クロモフォア分子または化合物の部分をいう。消光は、蛍光共鳴エネルギー転移、光誘起電子移動、項間交差の常磁性増強、Dexter交換カップリング、および暗錯体の形成などの励起カップリングを含む、いくつかの機構のいずれかによって起こりうる。クエンチャーの非存在下での蛍光と比べて少なくとも10%、例えば、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.9%またはそれ以上だけフルオロフォアにより放出される蛍光が低減される場合に、蛍光は「消光」される。

【0306】

クエンチャーは、アッセイ法において使用されている励起フルオロフォアからの少なくとも一つの蛍光放出を消光できる任意の材料でありうる。以下の参考文献: Clegg (1993, Proc. Natl. Acad. Sci., 90:2994-2998); Wu et al. (1994, Anal. Biochem., 218:1-13); Pesce et al., editors, Fluorescence Spectroscopy (1971, Marcel Dekker, New York); White et al., Fluorescence Analysis: A Practical Approach (1970, Marcel Dekker, New York) などによって例示されるように、特定のプローブに適したレポーター-クエンチャーの対を選択するのに使用できる多くの実用的指針が文献に掲載されている。文献、例えば、Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2nd Edition (1971, Academic Press, New York); Griffiths, Colour and Constitution of Organic Molecules (1976, Academic Press, New York); Bishop, editor, Indicators (1972, Pergamon Press, Oxford); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1992 Molecular Probes, Eugene) Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (1949, Interscience Publishers, New York)の中には、レポーター-クエンチャーの対を選択するための蛍光分子およびクロモジェニック分子の包括的リストならびにその関連する光学的特性を与える参考文献もあり、これらの全てが参照により本明細書に組み入れられる。さらに、以下の参考文献によって例示されるように、オリゴヌクレオチドに付加できる共通の反応基による共有結合のためにレポーターおよびクエンチャー分子を誘導体化するための広範な指針が文献に掲載されており、例えば、Haugland (上記に引用); Ullman et al., 米国特許第3,996,345号; Khanna et al., 米国特許第4,351,760号を参照されたく、これらの全てが参照により本明細書に組み入れられる。

【0307】

いくつかの市販のクエンチャーは、当技術分野において公知であり、DABCYL、BHQ-1、BHQ-2およびBHQ-3を含むが、これらに限定されることはない。BHQ (「Black Hole Quenchers」)クエンチャーは、ハイブリダイゼーション事象が起こるまで蛍光を阻止する新しいクラスの暗クエンチャーである。さらに、これらの新しいクエンチャーは固有の蛍光を持たず、他のクエンチャーで見られるバックグラウンドの問題を事実上解消する。BHQクエンチャーは、ほぼ全てのレポーター色素を消光するのに使用することができ、例えば、Biosearch Technologies, Inc (Novato, CA)から市販されている。

【0308】

c. フルオロフォアおよびクエンチャーの付着

本発明の一つの態様において、相互作用性標識の対の一つのメンバーは、下流オリゴヌクレオチド(例えば、第二または第三のオリゴヌクレオチド)の5'領域に付着され、相互作用性標識の対の第二のメンバーは、下流オリゴヌクレオチド(例えば、第二または第三のオリゴヌクレオチド)の3'領域に付着される。本発明の一つの態様において、フルオロフォアまたはクエンチャーは、本発明のオリゴヌクレオチドの3'ヌクレオチドに付着される。本発明の別の態様において、フルオロフォアまたはクエンチャーは、5'ヌクレオチドに

付着される。さらに別の態様において、フルオロフォアまたはクエンチャーは、本発明のオリゴヌクレオチドに内部的に付着される。いくつかの態様において、フルオロフォアまたはクエンチャーのいずれかは、プローブの5'ヌクレオチドに付着され、前記フルオロフォアまたはクエンチャーのもう一方は、プローブの3'ヌクレオチドに付着される。付着は直接的結合によって、またあるいは、例えば、長さが約1から約5原子のスペーサ分子を用いて行われてもよい。

【0309】

フルオロフォアまたはクエンチャーの内部付着の場合には、連結は、当技術分野において公知の手段のいずれかを用いて行うことができる。オリゴヌクレオチドとの多くの色素の付着に適した連結法は、多くの参考文献、例えば、Marshall, *Histochemical J.*, 7: 299-303 (1975); Menchen et al., 米国特許第5,188,934号; Menchen et al., 欧州特許出願第87310256.0号; および Bergot et al., 国際出願PCT/US90/05565に記述されている。全てが参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0310】

フルオロフォア/クエンチャーの対の各メンバーは、オリゴヌクレオチド内のどこにでも、好ましくは、オリゴヌクレオチドが切断されないまたは鋳型核酸にハイブリダイズされる場合に十分な量の消光が起こるように対のもう一方から少し離れて、付着されうる。

【0311】

一つの態様において、オリゴヌクレオチドプローブの(例えば、プローブの二次構造の変化による)アンフォールディングまたは加水分解の間の標識の分離を可能とするようにオリゴヌクレオチド上の標識の適切な間隔の維持を十分に考慮して単一のオリゴヌクレオチドプローブ上に二つの相互作用性標識(例えば、FRETまたは非FRETの対)を使用してもよい。

20

【0312】

別の態様において、非侵入性の切断事象の間の標識の分離を可能とするようにしかし侵入性の切断事象の場合には標識の分離を可能としないように、オリゴヌクレオチド上の標識の適切な間隔の維持を十分に考慮して、単一のオリゴヌクレオチドプローブ(例えば、第三のオリゴヌクレオチド)上に二つの相互作用性標識(例えば、FRETまたは非FRETの対)を使用してもよい。

【0313】

ある態様において、遊離された標識の蛍光を次いで、標的に依然として結合されている標識と比較する。約20ヌクレオチドだけ分離されているフルオロフォアおよびクエンチャーでプローブが合成される場合には、ヌクレアーゼ(例えばFEN-ヌクレアーゼ)で生成した断片およびヌクレアーゼ(例えばFEN-ヌクレアーゼ)の存在下での切断後に標的に依然として結合されているプローブを分離する必要はない。あるいは、標的核酸配列にハイブリダイズされない場合、プローブが蛍光を発しないように、クエンチャーは位置付けられる。色素から放出される光がクエンチャーにより消光されるので、そのような二重標識プローブは、完全な状態の場合または標的核酸配列にハイブリダイズされない場合(または二分子もしくは多分子プローブの場合には、プローブが解離されない場合)に蛍光を発しないであろう。したがって、完全な状態のプローブによって放出されるいずれの蛍光も、バックグラウンドの蛍光であると見なされる。一つの態様において、標識プローブが非侵入性の切断反応においてFENヌクレアーゼにより切断される場合、色素およびクエンチャーは分離され、遊離された断片は蛍光を発するであろう。あるいは、標識プローブが標的核酸にハイブリダイズされる場合、色素とクエンチャーとの距離は増加し、蛍光のレベルが増大する。プローブが二分子または多分子プローブである態様において、プローブを含む分子の解離は、蛍光の増大をもたらす。蛍光の量は、試料に存在する核酸標的配列の量に比例する。

30

40

【0314】

本発明において複数のオリゴヌクレオチドを用いて、他の恩恵を得ることもできる。例えば、所望されるだけの数のプローブを反応混合物の中に単に入れることによって、試料

50

中の任意の数の病原体を検査することができる。このプローブはそれぞれが異なる標識を含んで、検出を容易にすることができる。例えば、異なる第一のオリゴヌクレオチド、第二のオリゴヌクレオチド、鋳型核酸および第三のオリゴヌクレオチドの複数のセットを、反応混合物に加えることができる。第二のオリゴヌクレオチドのそれぞれは、異なる病原体由来の核酸配列の領域に相補的であろう。病原体が反応混合物に存在する場合に、対応する第二のオリゴヌクレオチドは病原体の核酸配列とハイブリダイズするであろう。第二のオリゴヌクレオチドは切断されよう。切断されたフラップは次いで、このフラップに特異的な鋳型核酸とハイブリダイズするであろう。このフラップ、鋳型および第三のオリゴヌクレオチドは第二の切断構造を形成するはずであり、これが切断される。第三のオリゴヌクレオチドの切断によって、特定の病原体を示すシグナルが得られよう。関心対象の各病原体に対し複数の異なるシグナル、例えば、蛍光シグナルが生成されう。そのような反応はMx3005PリアルタイムPCRシステム(Stratagene, California)において行うことができる。

10

20

30

40

50

【0315】

重要な恩恵を得るためにオリゴヌクレオチド配列を選択することができるとはいえ、プローブ標識の選択によって重要な利点を実現することもできる。標識は、さまざまな技術によって直接的にまたは間接的にオリゴヌクレオチドに付着されてもよい。使用される標識の正確なタイプに依って、標識は、プローブの5'もしくは3'末端に位置付けられても、プローブの内部に位置付けられても、またはさまざまなサイズおよび組成のスペーサーアームに付着されてシグナル相互作用を促進してもよい。市販のホスホルアミド試薬を用い、5'または3'末端のいずれかに適切に保護されたホスホルアミドを介して官能基(例えば、チオールまたは第一級アミン)を含有するオリゴマーを作出することができ、それらを、例えばPCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds. Academic Press, Ind., 1990に記述されているプロトコルを用いて標識することができる。

【0316】

一つまたは複数のスルフヒドリル、アミノまたはヒドロキシル成分をオリゴヌクレオチドプローブ配列に、通常その5'末端において導入するためのオリゴヌクレオチド官能化試薬を導入する方法が、米国特許第4,914,210号に記述されている。ポリヌクレオチドキナーゼおよび γ - ^{32}P -ATPまたは γ - ^{33}P -ATPを用いることにより放射性同位体として5'リン酸基を導入し、レポーター基を供与することができる。合成の間に導入された、アミノチミジン残基、または6-アミノヘキシル残基をビオチンのN-ヒドロキシスクシンイミドエステルと反応させることによって5'末端にビオチンを付加することができる。3'末端の標識ではポリヌクレオチド末端転移酵素を用いて、例えば、コルジセピン ^{35}S -dATP、およびビオチン化dUTPなどの、所望の成分を付加することができる。

【0317】

オリゴヌクレオチド誘導体も利用可能な標識である。例えば、エテノ-dAおよびエテノ-Aは、核酸プローブに組み入れることができる公知の蛍光アデニンヌクレオチドである。同様に、エテノ-dCまたは2-アミノプリンデオキシリボシドは、プローブ合成に使用できる別の類似体である。そのようなヌクレオチド誘導体を含有するプローブは、フラップ特異的なヌクレアーゼ活性によってはるかに強力な蛍光モノヌクレオチドを遊離するように加水分解されう。

【0318】

標的核酸配列とのプローブの結合によって変化する二次構造を有する標識されたプローブ(例えば、キープローブ)を用いて、本発明による標識された切断構造を調製する。本発明による標識されたプローブは、本明細書において定義される二次構造(ステムループ、ヘアピン、内部ループ、バルジループ、分枝構造および偽結び目構造を含む)もしくは複数の二次構造、クローバー型構造または任意の三次元構造を有することができる。本発明による標識された切断構造の形成に有用な標識されたプローブは、共有結合性または非共有結合性のサブユニット(例えば、本明細書において定義される二分子または多分子プローブ)を含むこともできる。

【0319】

フルオロフォア/クエンチャー対の位置決め

上記のように、一つの態様において、本発明は、フルオロフォア/クエンチャー対で二重標識されたプローブの使用を企図する。標識されたプローブがFENヌクレアーゼ(または本明細書において記述の他のヌクレアーゼ)によって切断される場合、フルオロフォアおよびクエンチャーは引き離されることができ、残りの断片が蛍光を発するであろう。プローブ上のフルオロフォアおよびクエンチャーの配置は、プローブの非重複性(侵入性)の切断と重複性(非侵入性)の切断を識別するように特異的に選択できるものと考えられる。レポーター分子の位置決めは、フルオロフォア/クエンチャー対との関連で記述されるが、その特定のレポーター系に限定されないことを当業者は理解するであろう。レポーター分子の配置は、特異的部位でのプローブの切断が色素シグナルの消光をもたらさう、例えば、介入性の色素などの他のレポーター系に適用されてもよい。分子の相互作用がプローブの非相補的部分の切断によって妨害されう、相互作用性のレポーター分子を含む任意のレポーター系において配置スキームが用いられてもよい。そのようなレポーター系は、当技術分野において公知であり、本明細書において記述されている。

10

20

30

【0320】

Pfu FENは、標的/鋳型核酸とハイブリダイズされる上流オリゴヌクレオチド(例えば、第二のオリゴヌクレオチドの遊離されたフラップ)の3'末端に対して単一の位置で主に、下流プローブ(例えば、第三のオリゴヌクレオチド)のフラップを切断する。標的とハイブリダイズする下流プローブのヌクレオチドは、ヌクレオチド+1~+Xであると定義され、+1位は、下流プローブのハイブリダイズ領域の5'末端のヌクレオチドと定義され、領域の+2位は、+1位のすぐ下流にあるヌクレオチドと定義される、など。上流オリゴヌクレオチドが下流オリゴヌクレオチドのハイブリダイズ領域と重複するのではなく、二つのオリゴヌクレオチドの相補的部分の間に(例えば、一つの3'末端非相補的ヌクレオチドを有する上流オリゴヌクレオチドおよび5'非相補的フラップを有する下流オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって作出される)一つのヌクレオチドギャップしか存在しないように下流オリゴヌクレオチドに隣接する場合、FENは下流オリゴヌクレオチドの+1位の上流を切断する。上流オリゴヌクレオチドが、プローブのハイブリダイズ領域の5'末端と重複する一つの3'塩基(標的に相補的か非相補的かのいずれかの)を有し、かつその3'塩基の位置で標的とハイブリダイズする場合に、プローブの切断は下流オリゴヌクレオチドの+1位の下流で起こる。

40

50

【0321】

したがって、クエンチャーなどの、相互作用性標識の対の一方のメンバーがプローブのハイブリダイズ領域の塩基の+1に付着され、フルオロフォアが5'フラップ中の塩基に付着される場合には、+1位の下流での切断によってクエンチャーおよびレポーター基は同じ核酸分子に依然として付着されたままである。しかしながら、切断がプローブの+1位の上流で起きた場合には、塩基の+1上に位置するクエンチャーは、フラップ上に位置するレポーターから引き離されるようになるであろう。したがって+1位の上流での切断がある場合には上流オリゴヌクレオチドは、下流プローブのハイブリダイズ領域との重複を持ちえないということにもなる。すなわち、上流オリゴヌクレオチドが、標的に相補的でもあり、下流プローブの相補的部分と重複性でもある3'部分を有する重複性の構造(例えば、侵入性の切断構造)は、+1位または+2位の下流での切断を引き起こすであろう。それゆえ、+1位上に位置するクエンチャーおよび5'フラップ中に位置するレポーター基の物理的分離は起きないであろう。重複性(侵入性の切断)構造による切断事象は検出されないのに対し、非重複性(非侵入性)の切断構造(例えば、隣接した上流および下流オリゴヌクレオチド)による切断事象は検出可能とされよう。このように、下流プローブのハイブリダイズ/相補的部分の+1位に(BHQなどの)クエンチャー分子を配置することで、侵入性の切断と非侵入性の切断との識別が可能とされる。

【0322】

したがって、本発明の一つの態様では、下流プライマーの相補的領域の+1位のクエンチ

50

ャー(例えば、BHQ)および屈曲部の上流のフルオロフォア(例えば、FAM)の配置を企図する。フルオロフォア/クエンチャー対の位置決めは、クエンチャーが5'フラップ上にあり、フルオロフォアが下流プローブの相補的領域の+1位に位置するように、逆さまにできるとも考えられる。

【0323】

したがって、本発明は、屈曲部の上流にフルオロフォア基(以下に限定されないが、FAM基などの)とシグナルを、非侵入性の切断構造からのみ生成し、侵入性の切断構造からは生成しないように+1位上にクエンチャーとを有する下流プローブの使用を企図する。

【0324】

いくつかの態様において、相互作用性の標識対の選択的配置を有するプローブは、切断抵抗性のプローブである。この態様において、非重複性の切断構造が生じる場合のみプローブが切断されうる。同様に、検出可能なシグナルは、非重複性の切断構造の形成および切断によってのみ生成するであろう。

【0325】

それゆえ、上流オリゴヌクレオチドが下流オリゴヌクレオチドと重複する相補性を持たないという条件で、切断は+1位でまたは+1位の上流で起こるであろう。上流オリゴヌクレオチドがその3'末端に、下流オリゴヌクレオチドのハイブリダイズ領域と重複する一つまたは複数の塩基を含有する場合には(例えば、侵入性の切断構造)、切断は+1および相互作用性標識の対の両メンバーの下流で起こるであろう。

【0326】

C. 切断構造の切断およびシグナルの生成

本発明による切断構造は、本明細書において記述される方法によって切断することができる。

【0327】

D. 遊離された標識断片の検出

標識断片の検出または検証は、当技術分野において周知のさまざまな方法によって達成することができ、標識された切断構造を含む標識成分の特徴に依ることができる。

【0328】

V. 切断手段

本発明により有用なヌクレアーゼは、5'エンドヌクレアーゼ活性を保有する任意の酵素、例えばDNAポリメラーゼ、例えば大腸菌由来のDNAポリメラーゼI、ならびにサーマス・アクアティカス(Taq)、サーマス・サーモフィルス(Tth)およびサーマス・フラバス(Tfl)由来のDNAポリメラーゼを含む。本発明により有用なヌクレアーゼは同様に、サーマス種に由来する酵素(Taq、Tfl、Tth、Tca (カルドフィルス (caldophilus)、Tbr (プロキアナス (brockianus))、パチルス種に由来する酵素(Bst、Bca、マゼンタ(N-切断型版ではなく完全長のポリメラーゼ))、サーモトガ種に由来する酵素(Tma (マリティマ、Tne (ネオポリタナ (neopolitana))および大腸菌DNAポリメラーゼIを含む、真正細菌のDNAポリメラーゼIを含むがこれに限定されない、5' - 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。ヌクレアーゼという用語はFENヌクレアーゼも包含する。

【0329】

FEN-1は、およそ40 kDaの二価金属イオン依存性エキソおよびエンドヌクレアーゼであり、5'-一本鎖フラップ鎖の骨格を特異的に認識し、このアームを追跡して捕らえ、二本鎖DNAの二本の鎖がフラップに隣接する連結部にある切断部位に位置する。エンドおよびエキソヌクレアーゼ活性のどちらも、フラップまたはニックの最も5'位の塩基にほとんど感受性を示さない。FEN-1エンドおよびエキソヌクレアーゼ基質結合および切断は、上流オリゴヌクレオチド(フラップ隣接鎖またはプライマー)によって刺激される。これは大腸菌 pol I の場合でもある。この酵素のエンドヌクレアーゼ活性は、5'フラップ長とは無関係であり、1ヌクレオチドほどの小さな5'フラップを切断する。エンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼ活性は、基質の化学的性質に感受性ではなく、DNAもRNAもともに切断する。

10

20

30

40

50

【0330】

エンドヌクレアーゼ活性およびエキソヌクレアーゼ活性のどちらも、生理学的範囲の塩濃度によって阻害される。エキソヌクレアーゼ活性は、0 mM NaClと比べて50 mM NaClで50倍阻害される。エンドヌクレアーゼ活性は、50 mM NaClで7倍だけ阻害される(Lieber 1997, 前記に概説されている)。

【0331】

5'-OH末端は、5'フラップ基質上に付着しているFEN-1にとって良好な基質であるが、ほかの二本鎖DNA構造におけるニックの一部である場合には極めて不良な基質として働く。末端リン酸による静電反発力は、偽フラップ構造への基質のブリージング(breathing)に有利に働く可能性が高く、基質の活性型をFEN-1に供与する。そのような説明から、フラップの5' ssDNA末端またはニックの偽フラップ構造にFEN-1を付着させる単一の活性部位および単一の機構が示唆されうる。ニックでの至適活性には非常に低い Mg^{2+} および一価塩濃度が必要であるが、これは塩基対合を不安定化し、フラップへのニックのブリージングに有利に働く可能性があるという所見は、このモデルと一致している。比較的高い Mg^{2+} および一価塩濃度は、ブリージングに不利に働き、フラップへ変換するためにブリージングを必要とするニック構造またはギャップ構造の切断を阻害しうる。安定なフラップ構造の切断は、中程度の Mg^{2+} レベルで最適であり、 Mg^{2+} 濃度の増加とともに減少することはない。これは、フラップ基質がその構造を得るのに塩基対を融解しなくてもよいからであり、ゆえに、フラップ基質は Mg^{2+} に全く感受性がない。エンドヌクレアーゼ活性は一価塩とともに減少するが、その低下はエキソヌクレアーゼ活性で見られる場合ほど著しくはない。さらに、一つのヌクレオチドフラップが効率的な基質であることも以前に示されている。これらの所見は全て、FEN-1がエキソヌクレアーゼとして機能しているものと解釈された場合に、分解産物のサイズは長さが一ヌクレオチドから数ヌクレオチドまでさまざまであるという事実と一致している。さまざまな長さのフラップへのニックのブリージングは、G/C含量に応じて、局所的配列とともに変化するものと予想される。要約すれば、一過性フラップを形成するためのニックのブリージングは、FEN-1のエキソヌクレアーゼ活性がエンドヌクレアーゼ活性と同じであることを意味する(Lieber, 1997, 前記に概説されている)。

【0332】

FEN-1のエンドヌクレアーゼおよびエキソヌクレアーゼ活性は、付属タンパク質を必要とせずにDNAもRNAもともに切断する。しかしながら、複製フォークでは、FEN-1はDNAヘリカーゼおよび増殖性細胞核抗原(PCNA)、つまりDNAポリメラーゼ δ および ϵ のプロセッシビティー(processivity)因子を含む、他のタンパク質と相互作用する。PCNAはFEN-1エンドおよびエキソヌクレアーゼ活性を著しく刺激する。

【0333】

FEN-1酵素は、T5 5'エキソヌクレアーゼおよびT4 RNase Hなどのいくつかの比較的小さなバクテリオファージ5'→3'エキソヌクレアーゼに機能的に関連しているほかに、酸化的塩基損傷の転写共役修復においても作用する、XPGなどの比較的大きな真核生物ヌクレオチド除去修復酵素にも機能的に関連している。大腸菌およびサーマス・アクアティカスなどの真正細菌において、岡崎プロセシングはPol II 5'→3'エキソヌクレアーゼドメインによりもたらされる。これらの細菌酵素およびファージ酵素は、N (N末端)領域およびI (中間)領域と称される、限定的配列相同性を有する二つの領域をFEN-1と共有しており、その残基類似性は7個の保存酸性残基の周りに集中している。T4 RNase HおよびT5エキソヌクレアーゼの結晶構造ならびに突然変異誘発データに基づき、これらの残基が、DNA加水分解に影響を及ぼすのに必要とされる二つの Mg^{2+} イオンに結合することが提唱されているが、各酵素で微妙に異なる、各金属が触媒サイクルにおいて果たす役割は十分に理解されていない(Hosfield et al., 1998b, 前記に概説されている)。

【0334】

本発明において有用なFEN-1酵素をコードするFEN-1遺伝子は、マウスfen-1、ヒトfen-1、ラットfen-1、アフリカツメガエルfen-1、ならびに4つの古細菌アーケオグロブス・フ

ルギダス、メタノコッカス・ヤナシイ、パイロコッカス・フリオサスおよびパイロコッカス・ホリコシイに由来する fen-1 遺伝子を含む。FEN-1 酵素をコードする cDNA クローンは、ヒト (GenBank アクセッション番号 NM_004111 および L37374)、マウス (GenBank アクセッション番号 L26320)、ラット (GenBank アクセッション番号 AA819793)、アフリカツメガエル (GenBank アクセッション番号 U68141 および U64563)、ならびに P. フリオサス (GenBank アクセッション番号 AF013497) から単離されている。P. ホリコシイ・フラップエンドヌクレアーゼの完全なヌクレオチド配列も決定されている (GenBank アクセッション番号 AB005215)。FEN-1 ファミリーは同様に、サッカロマイセス・セレピシエ RAD27 遺伝子 (GenBank アクセッション番号 Z28113 Y13137) および サッカロマイセス・ポンベ RAD2 遺伝子 (GenBank アクセッション番号 X77041) を含む。メタノバクテリウム・サームオートトロフィキュラム (*Methanobacterium thermautotrophicum*) の古細菌ゲノムも配列決定されている。FEN-1 と原核生物およびウイルス 5' → 3' エキソヌクレアーゼとの間の配列類似性は低い、真核生物界のなかで FEN-1 はアミノ酸レベルで高度に保存されており、ヒトおよび S. セレピシエのタンパク質は 60% 同一および 78% 類似である。3 つの古細菌 FEN-1 タンパク質も真核生物 FEN-1 酵素と高度に相同性である (Matsui et al., 1999, *J. Biol. Chem.*, 274:18297, Hosfield et al., 1998b, *J. Biol. Chem.*, 273:27154 および Lieber, 1997, *BioEssays*, 19:233 に概説されている)。

10

【0335】

ヒトと他の FEN-1 ファミリーのメンバーとの間の二つの保存ヌクレアーゼドメイン (N 末端ドメインまたは Nドメイン および 中間体ドメイン または Iドメイン) における配列類似性は、92% (マウス)、79% (S. セレピシエ)、77% (S. ポンベ)、72% (A. フルギダス)、76% (M. ヤナシイ)、および 74% (P. フリオサス) である。

20

【0336】

FEN-1 は、5' 一本鎖フラップ鎖の骨格を特異的に認識し、このフラップアームを下って、二重鎖 DNA の二本の鎖とフラップとの間の連結部に位置する切断部位に移動する。フラップの上流の鎖 (フラップ隣接鎖またはプライマー鎖と呼ばれることもある) が除去される場合には、得られる構造は偽 Y と称される。この構造は、FEN-1 により、20 倍から 100 倍低い効率であるが切断される。FEN-1 は 3' 一本鎖フラップを切断しない。しかしながら、エキソヌクレアーゼとして作用する FEN-1 は、ギャップまたはニックを含有する dsDNA 基質を加水分解する (Hosfield et al., 1998a, 前記、Hosfield et al., 1999b, 前記 および Lieber 1997, 前記に概説されている)。エキソヌクレアーゼ性に (exonucleotically)、FEN-1 は、ニックで作用し、かつ、低い効率で、dsDNA 上のギャップまたは陥凹 5' 末端で作用する。ギャップ構造で、FEN-1 の結合および切断の効率は、ギャップサイズがおよそ 5 ヌクレオチドまで大きくなるにつれて低下し、次いで dsDNA 内の陥凹 5' 末端での活性に相当する切断のレベルで安定する。平滑末端 dsDNA、陥凹 3' 末端 および ssDNA は切断されない (Lieber 1997, 前記に概説されている)。

30

【0337】

本発明により有用な FEN ヌクレアーゼは、ヒト (GenBank アクセッション番号 NM_004111 および L37374)、マウス (GenBank アクセッション番号 L26320)、ラット (GenBank アクセッション番号 AA819793)、酵母 (GenBank アクセッション番号 Z28113 Y13137 および GenBank アクセッション番号 X77041) ならびに アフリカツメガエル (GenBank アクセッション番号 U68141 および U64563) を含むさまざまな生物から単離されている。そのような酵素は、当技術分野において周知の従来技術を用いてクローニングおよび過剰発現することができる。

40

【0338】

本発明による FEN ヌクレアーゼは、好ましくは熱安定性である。熱安定性 FEN ヌクレアーゼは、4 つの古細菌を含むさまざまな熱安定性生物から単離され特徴付けられている。P. フリオサスのフラップエンドヌクレアーゼに対する cDNA 配列 (GenBank アクセッション番号 AF013497) および アミノ酸配列 (Hosfield et al., 1998a, 前記 および Hosfield et al., 1998b) が決定されている。P. ホリコシイのフラップエンドヌクレアーゼに対する完全なヌクレオチド配列 (GenBank アクセッション番号 AB005215) および アミノ酸配列 (Matsui et al.

50

., 前記)も決定されている。M.ヤナシイのフラップエンドヌクレアーゼに対するアミノ酸配列(Hosfield et al., 1998bおよびMatsui et al., 1999 前記)ならびにA.フルギダスのフラップエンドヌクレアーゼに対するアミノ酸配列(Hosfield et al., 1998b)も決定されている。

【0339】

熱安定性FEN1酵素は、当技術分野において周知のかつHosfield et al., 1998a, 前記、Hosfield et al., 1998b、Kaiser et al., 1999、J. Biol. Chem., 274:21387およびMatsui et al., 前記)ならびに本明細書において「Pfu FEN-1のクローニング」と題した実施例5に記述の技術を用いてクローニングおよび過剰発現することができる。

【0340】

FEN1酵素のエンドヌクレアーゼ活性は、以下の方法を含むさまざまな方法によって測定することができる。

【0341】

A. FEN1エンドヌクレアーゼ活性アッセイ法

1. 鋳型(例えば、図6に示されるように)を用いて、本発明によるFEN1ヌクレアーゼの活性を評価する。

【0342】

鋳型1は、以下の配列:

5'AAAATAAATAAAAAAAATACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCG 3'

を有する5' ³³P標識オリゴヌクレオチド(ヘルテスト(Heltest)4)である。ヘルテスト4の下線部は、M13mp18+に相補的な領域を表す。切断産物は、配列

AAAATAAATAAAAAAAAT

を有する18ヌクレオチドの断片である。

【0343】

ヘルテスト4は、M13に結合して、相補的な二本鎖ドメインおよび非相補的な5'突出部を作出する。この二本鎖は、ヘリカーゼアッセイ法にも使用される鋳型2(図6)を形成する。鋳型3(図6)は、M13に結合し、ヘルテスト4に直接隣接しているさらなるプライマー(FENAS)を有する。FENASの配列は、

5' CCATTCGCCATTCAGGCTGCGCA 3'

である。鋳型3の存在下で、FEN1は、ヘルテスト4の遊離5'末端と結合し、接合部に移動し、18ヌクレオチドの断片を作出するためにヘルテスト4を切断する。鋳型1および2は対照として機能するが、鋳型2は鋳型としても機能しうる。

【0344】

鋳型は、下記のように調製される。

	鋳型 1	鋳型 2	鋳型 3
ヘルテスト4	14 μ l	14 μ l	14 μ l
M13	**	14 μ l	14 μ l
FENAS	**	**	14 μ l
H ₂ O	28 μ l	14 μ l	**
10x Pfu 緩衝液	4.6 μ l	4.6 μ l	4.6 μ l

【0345】

10x Pfu緩衝液は、Stratagene (Stratageneカタログ番号600153)から入手可能である。本発明の方法によれば、10x Pfu緩衝液は、反応が1x緩衝液の存在下で行われるように希釈される。

【0346】

M13は、M13mp18+鎖であり、かつ200 ng/μLの濃度であり、³³P標識ヘルテスト4は約0.7 ng/μlの濃度であり、ならびにFENASは4.3 ng/μlの濃度である。これらの濃度に基づき、ヘルテスト4およびM13はほぼ等モル量(5×10^{-14})であり、FENASはおよそ10倍モル過剰(6×10^{-13})で存在する。

【0347】

鋳型混合物を、95℃で5分間加熱し、45分間室温に冷却し、4℃で一晩保存する。

【0348】

FEN-1または対照としてH₂O 2 μlを、以下のように3つの鋳型と混合する。

鋳型 3 μl

10×クローニング用Pfu緩衝液 0.7 μl

100 mM MgCl₂ 0.56 μl

酵素またはH₂O 2.00 μl

H₂O 0.74 μl

全体積 7.00 μl

【0349】

反応を、50℃で30分間進行させ、各試料へのホルムアミド「シーケンシング停止」溶液2 μlの添加によって停止する。試料を、95℃で5分間加熱し、6%アクリルアミド、7 M尿素CastAway (Stratagene)ゲルにローディングする。

【0350】

あるいは、1時間のインキュベーション時間を用いて、以下の緩衝液の中でFEN活性を分析してもよい。

10×FEN緩衝液

500 mM Tris-HCl pH 8.0

100 mM MgCl₂

【0351】

以下の反応混合物を、FEN 2 μlまたは対照としてH₂O 2 μlと混合する。

鋳型 3 μl

10×FEN緩衝液 0.7 μl

酵素またはH₂O 2.00 μl

H₂O 1.3 μl

全体積 7.00 μl

【0352】

試料を、Robocycler 96ホットトップサーマルサイクラーにおいて50℃で1時間インキュベートする。シーケンシング停止(Sequencing Stop)色素溶液2 μlの添加後、試料を99℃で5分間加熱する。手で流し込んだ11インチ長の20%アクリルアミド/ビスアクリルアミド、7 M尿素ゲルに試料をローディングする。プロモフェノールブルーが総距離のおよそ2/3に移動するまで、ゲルを20ワットで泳動する。ゲルを、ガラス板から除去し、固定液(15%メタノール、5%酢酸)に10分間、次いで水に10分間浸漬する。ゲルを、Whatmann 3mm紙に置き、プラスチックラップで覆い、加熱真空ゲル乾燥機中で2時間乾燥する。ゲルをX線フィルムに一晩曝露する。

【0353】

2. FENエンドヌクレアーゼ活性は、Kaiser et al., 前記の方法によって測定することもできる。手短に言えば、10 mM MOPS, pH 7.5、0.05% Tween 20、0.05% Nonidet P-40、10 μg/ml tRNA、ならびにTaqPolおよびTthPolの場合には200 mM KClまたはその他全ての酵素の場合には50 mM KClを含有する体積10 μlにおいて、反応を行う。反応条件は分析される切断構造に依って異なってもよい。基質(2 μM)および各種量の酵素を、表示(上記)の反応緩衝液と混合し、Chill-out (MJ Research)液体ワックスで重層する。基質を、90℃で20秒間加熱変性し、50℃に冷却し、次いでMgCl₂またはMnCl₂の添加によって反応を開始し、50℃で特定の時間インキュベートする。10 mM EDTAおよび0.02%メチルバイオレット(Sigma)を含有する95%ホルムアミド1011の添加によって、反応を停止する。試料を、1

10

20

30

40

50

分間90 に加熱した直後に、7 M尿素を含む20%変性アクリルアミドゲル(19:1架橋)上で、および45 mM Trisホウ酸, pH 8.3、1.4 mM EDTAの緩衝液中で電気泳動を行う。特に指定のない限り、1レーンにつき各停止反応物1 μ lをローディングする。505 nmのフィルタを用いFMBIO-100蛍光ゲルスキャナ(Hitachi)にてゲルをスキャンする。FMBIO分析ソフトウェア(バージョン6.0, Hitachi)を用いて、非切断基質および切断基質に対応するバンドの強度から切断産物の画分を決定する。測定値を最初の切断速度に確実に近づけるために、切断産物の画分は20%を超えるべきではない。切断速度は、酵素濃度および反応時間(分単位)で割った切断産物の濃度と定義される。各酵素に対し、3つのデータポイントを用いて速度および実験誤差を決定する。

【0354】

3. FENエンドヌクレアーゼ活性は、Hosfield et al., 1998a, 前記の方法によって測定することもできる。手短に言えば、終体積13 μ lの中で、各種量のFENおよび1.54 pmolの標識された切断基質を種々の温度にて30分間インキュベートした後に、等量の停止溶液(10 mM EDTA、95%脱イオンホルムアミドならびに0.008%プロモフェノールブルーおよびキシレンシアノール)で反応を停止する。試料を変性15%ポリアクリルアミドゲルによって電気泳動し、IPLabGelシステム(Stratagene)によりMacBAS画像解析ソフトウェアを実行して出発材料および産物の相対量を定量化する。ほとんどの反応は標準的なアッセイ用緩衝液(10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM $MgCl_2$ および50 μ g/mlのウシ血清アルブミン)の中で行われるが、一連の実験において標準的な緩衝液を変化させることにより、種々の二価金属およびpHレベルの影響を調べる。二価金属の場合、 $MgCl_2$ を除き、種々の金属イオンを終濃度10 mMで使用する。pHの影響を調べるために、さまざまな量のTris-HCl、グリシン、および酢酸ナトリウムを含有する緩衝液を、終濃度10 mMで用いて25 で広範囲のpHレベルを得る。

【0355】

4. FENエンドヌクレアーゼ活性は、Matusi et al., 1999, 前記の方法によって測定することもできる。手短に言えば、50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1.5 mM $MgCl_2$ 、0.5 mM β -メルカプトエタノール、100 μ g/mlのウシ血清アルブミンおよび0.6 pmolの標識された切断構造を含有する反応混合物15 μ lにおいて酵素反応を行う。60 で30分間のインキュベーションの後、10 mM EDTAおよび1 mg/mlのプロモフェノールブルーを含有する95%ホルムアミド15 μ lを加えることによって反応を終結する。試料を、95 で10分間加熱し、7 M尿素および10 $\times$ TBE (89 mM Tris-HCl、89 mMホウ酸、2 mM EDTA (pH 8.0))を含有する15%ポリアクリルアミドゲル(35 cm $\times$ 42.5 cm)にローディングし、次に2000 Vで2時間電気泳動する。反応産物を、可視化し、PhosphorImager (Bio-Rad)を用いて定量化する。サイズマーカーであるオリゴヌクレオチドは、[γ - ^{32}P]ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼで5'末端標識する。

【0356】

至適pHを決定するため、以下の緩衝液のうちの一つの50 mM緩衝液の中に1.5 mM $MgCl_2$ 、0.5 mM β -メルカプトエタノール、100 μ g/mlのウシ血清アルブミンおよび0.6 pmolの5'末端標識切断構造を含有するアッセイ混合物(15 μ l)において60 で30分間反応を行う。3つの異なる50 mM緩衝液を用いて、以下のように広範なpH範囲を得る：酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0~5.5)、リン酸緩衝液(pH 5.5~8.0)およびホウ酸緩衝液(pH 8.0~9.4)。

【0357】

B. FENエキソヌクレアーゼ活性アッセイ法

本発明によるFENヌクレアーゼのエキソヌクレアーゼ活性は、Matsui et al., 1999, 前記に記述のおよび上記に要約のFEN-1エンドヌクレアーゼ活性を測定する方法によって測定することができる。

【0358】

あるいは、FEN酵素のエキソヌクレアーゼ活性は、Hosfield et al., 1998b, 前記に記述の方法によって分析することができる。手短に言えば、エンドヌクレアーゼアッセイ法(上記)について記述したのと同じ条件の下でニックの入ったFEN基質を用い、エキソヌ

10

20

30

40

50

クレアーゼ活性をアッセイする。

【0359】

エキソヌクレアーゼ実験でもエンドヌクレアーゼ実験でもともにDNA切断の正確な位置は、Klenow断片の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を用いた5' ³²P標識鋳型鎖の部分的消化によって得ることができる。

【0360】

本発明による切断構造は、「切断構造」と題した項に記述されている。

【0361】

VI. プローブの二次構造の安定性の決定

A. 融解温度アッセイ法

10

融解温度アッセイ法では、二本鎖および一本鎖DNAの異なる吸収特性、すなわち、二本鎖DNA（相補的な配列(塩基対)が水素結合によって結び付いた逆平行の二本鎖構造を生成するように折り重なった核酸配列のその部分である二本鎖DNA)は、分光光度測定により測定した場合、260 nmの波長では一本鎖DNAよりも光吸収が少ないことを利用する。

【0362】

DNAの変性は、狭い温度範囲にわたって起こり、DNAの物理的特性の多くの顕著な変化を引き起こす。特に有用な変化は光学密度に起こる。ヌクレオチドの複素環は、紫外線領域において強力に光を吸収する(各塩基に特有の、260 nmに近い最大値を有する)。しかしながら、DNAの吸着は、同じ組成の遊離ヌクレオチドの混合物によって示されるよりもおよそ40%低い。この効果は濃色効果と呼ばれ、二重らせんの平行アレイにおける重なりによって可能になる、塩基の電子系間での相互作用に起因する。二本鎖状態からのいかなる逸脱もこの効果の減少によって直ちに反映される(すなわち遊離塩基に特有の値に関する光学密度の増加によって(図2a)。それゆえ、二本鎖DNAの変性の後にはこの濃色効果が続きう(図2bおよび図2c)。

20

【0363】

DNA鎖が分離する温度範囲の中間点は、 T_m で表示される融解温度と呼ばれる。吸光度の変化によって決定される融解曲線の例を図2cに示す。常に同じ形だが、温度目盛(すなわち、その T_m)での絶対位置を成す曲線は、DNAの塩基組成および変性のために用いた条件の両方によって影響を受ける。

【0364】

30

DNA分子の融解温度は、その塩基組成に著しく依存する。GC塩基対が豊富なDNA分子は、多量のAT塩基対を有するものよりも高い T_m を有する(図2b)。多くの種由来のDNAの T_m は、GC含量とともに直線的に変化し、GC対の割合が20%から78%に増加するにつれて、77 から100 に上昇する。すなわち、塩基組成への T_m の依存性は直線的に、G-C含量が1パーセント増加するごとに約0.4 上昇している。GC塩基は2水素結合によってではなく3水素結合によって結合しているので、GC塩基対はAT対よりも安定である。さらに、隣接するGC塩基対は、隣接するAT塩基対よりも強力に相互に作用する。ゆえに、DNAのATが豊富な領域は最初に融解する。

【0365】

40

溶液のイオン強度は、 T_m に多大な影響を与える。一価陽イオン濃度が10倍増加するごとに、 T_m は16.6 上昇する。最も一般に使用される条件は、0.18 Mの一価Na⁺濃度、および90 前後の T_m を提供する、0.12 Mのリン酸緩衝液でDNAの操作を実行することである。

【0366】

T_m は、水素結合を不安定にさせるホルムアミドなどの試薬の存在下で反応を実行することによって大きく異なることができる。これにより、 T_m を、高温への曝露に起因しうる損傷(鎖分解などの)をDNAが受けないという利点のある40 ほどに低下させることができる。(Stryer, *Biochemistry*, 1998, 3rd Edition, W.H. Freeman and Co., pp.81-82およびLewin, *Genes II*, 1985, John Wiley & Sons, p.63-64)。

【0367】

本発明によるプローブの二次構造の安定性は、以下の融解温度アッセイ法において決定

50

される。

【0368】

吸光度を温度に対してプロットする、プローブの標準曲線(例えば、図2c)は、プローブの変性および再アニーリングを可能にする緩衝液中およそ0.2 $\mu\text{g/ml}$ ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ のプローブを含んだ試料を、プローブの変性および再アニーリングを可能とするのに十分な時間および種々の温度でインキュベートすることにより、ならびに温度下限がプローブの T_m または予測 T_m の少なくとも50 を下回り、かつ温度上限がプローブの T_m または予測 T_m の少なくとも50 を上回る温度範囲にわたり分光光度計において、(使用される分光光度計に適した光路長、例えば、1-cmを有する)石英キュベット中で試料の吸光度を測定することにより作成される。プローブの T_m は、当技術分野において周知の方法により塩基対組成に基づいて予想される(Sambrook, 前記; Ausubel, 前記参照)。標準曲線は、特定のヌクレアーゼを切断反応に用いることが可能なおよび選択的に最適な緩衝液を含む、さまざまな緩衝液(例えば、1×TNE緩衝液(10×-0.1 M Tris塩基、10 mM EDTA、2.0 M NaCl, pH 7.4)、本明細書において記述されるFENヌクレアーゼ緩衝液、本明細書において記述される1×クローニング用Pfu緩衝液、本明細書において記述される1×センチネル分子(Sentinel Molecular)ピーコン緩衝液)を用いて、作成され比較される。温度が上昇するにつれて緩衝液のpHをモニターし、必要に応じて調整する。

10

【0369】

本アッセイ法は、単一光線の紫外・可視域(UV-VIS)分光光度計において行う。本アッセイ法は、試料溶液を保持するキュベットを、ブランクを含有する参照キュベット(適合キュベット)と自動的に比較することによって測定を簡素化するために、二光線分光光度計において行われることが好ましい。ブランクは、等量の試料用緩衝液である。

20

【0370】

分光光度計の温度は、試料の吸光度が特定の温度で測定されるように制御することができる。本発明により有用な分光光度計は、MicroTm Analysis Accessory (Beckman Coulter, Inc., Columbia, MD)と組み合わせたBeckman Coulter DU (登録商標) 600/7000分光光度計を含むが、これに限定されることはない。

【0371】

特定の温度でのならびにヌクレアーゼをプローブの切断反応に用いることが可能なおよび選択的に最適な緩衝液中でのプローブの二次構造の安定性は、上記のように、特定の温度でのプローブの吸光度を測定することにより、および試験温度で使用されるのと同じ緩衝液か、上記のように比較可能な標準曲線を作成することで公知の緩衝液かのどちらかを用いて作成される標準曲線から決定した場合に、吸光度の値が、 T_m での吸光度に満たないかどうかを決定することにより決定される。プローブの二次構造は融解温度アッセイ法において、切断反応温度のまたはその温度未満の温度で(すなわち、切断が行われる温度で)、切断反応温度のまたはその温度未満の温度での吸光度レベルが、プローブの T_m に等しい温度での吸光度レベルに満たない(すなわち、少なくとも5%、好ましくは20%および最も好ましくは25%またはそれ以上満たない)なら「安定」である(図2cおよび図2d参照)。

30

【0372】

B. FRET

FRETアッセイ法は、二つの目的で本発明において有用である。一つ目は、プローブの二次構造が本明細書において定義されるように「安定」であるかどうかを決定することである。二つ目は、プローブと標的核酸との結合によってプローブの二次構造が「変化」を起こしたかどうか、またはプローブが切断手段によって切断されたかどうかを決定することである。

40

【0373】

「FRET」は、励起が供与体分子から受容体分子に転移される、二つの色素分子の電子的励起状態間の距離依存的な相互作用である。FRETは、相互作用している共鳴エネルギー受容体、つまり別のフルオロフォア、クロモフォアまたはクエンチャーのいずれかから蛍光供与体基を引き離す距離の変化によって引き起こされる。供与体および受容体成分の組み

50

合わせは「FRET対」として公知である。効率的なFRET相互作用には、色素対の吸収および発光スペクトルが高い重複度を有することが必要である。

【0374】

ほとんどの態様において、受容体の増感蛍光の出現により、および/または供与体蛍光の消光によりFRETを検出できる場合には、FRETの供与体および受容体色素が異なる。供与体および受容体が同じである場合、FRETは、得られた蛍光偏光解消によって検出される。FRETは分子間分離の逆6乗に依存する(Stryer et al., 1978, Ann. Rev. Biochem., 47:819; Selvin, 1995, Methods Enzymol., 246:300)。

【0375】

本明細書において用いられる、「供与体」という用語は、第一の波長で吸収し、かつ比較的長い第二の波長で発光するフルオロフォアをいう。「受容体」という用語は、供与体の発光スペクトルと重複しかつ供与体基の近く(通常1~100 nm)にある場合に、供与体から放出されたエネルギーの一部分または大部分を吸収できる、吸収スペクトルを有するフルオロフォア、クロモフォアまたはクエンチャーをいう。受容体がFRETを示しうるフルオロフォアである場合には、それはさらに長い第三の波長で再発光し、受容体がクロモフォアまたはクエンチャーである場合には、それは光子を発することなく供与体から吸収されたエネルギーを放出する。受容体の吸収スペクトルは、二つの基が近接している場合に供与体の発光スペクトルと重なるが、溶液中で遊離状態にあるそれら分子のスペクトルの場合にこの必要はない。したがって、受容体は、本明細書において定義されるように、標的核酸とのプローブの結合によって変化するプローブの二次構造の存在により、本発明によるプローブ上で供与体のすぐ近くに配置される場合にFRETまたは消光のどちらかを示すフルオロフォア、クロモフォアまたはクエンチャーを含む。受容体はa) T_mに等しい温度でもしくはT_mを超える(例えば、T_mを5 超える、例えば、T_mを6 、10 、25 、50 もしくはそれ以上超える)温度で、またはb) 標的核酸の存在下で、FRETまたは消光を示すフルオロフォア、クロモフォアまたはクエンチャーを含まない。

【0376】

本明細書において「蛍光」または「蛍光基」または「フルオロフォア」への言及は、それぞれ、発光、発光基および適当なクロモフォアを含む。適当な発光プローブは、ランタンキレートとして導入されるテルビウムおよびユーロピウムの発光イオンを含むが、これらに限定されることはない(HeydukおよびHeyduk, 1997)。ランタニドイオンは同様に、蛍光基へのエネルギー転移にふさわしい供与体である(Selvin 1995)。ランタニドイオンを含有する発光基は、「オープンケージ」キレート剤ホスホルアミドを用いて核酸に組み入れることができる。

【0377】

本明細書において用いられる、「消光」という用語は、供与体によって示される蛍光の強度の低下に関連する、供与体から受容体へのエネルギー転移をいう。

【0378】

供与体および受容体基は、適当な蛍光基、クロモフォアおよびクエンチング基から独立して選択されてもよい。本発明により有用な供与体および受容体は、5-FAM (5-カルボキシフルオレセインとも呼ばれる; スピロ(イソベンゾフラン-1(3H), 9'-(9H)キサンテン)-5-カルボン酸, 3',6'-ジヒドロキシ-3-オキソ-6-カルボキシフルオレセインとも呼ばれる); 5-ヘキサクロロ-フルオレセイン([4,7,2',4',5',7'-ヘキサクロロ-(3',6'-ジピバロイル-フルオレセイニル)-6-カルボン酸]); 6-ヘキサクロロ-フルオレセイン([4,7,2',4',5',7'-ヘキサクロロ-(3',6'-ジピバロイルフルオレセイニル)-5-カルボン酸]); 5-テトラクロロ-フルオレセイン([4,7,2',7'-テトラ-クロロ-(3',6'-ジピバロイルフルオレセイニル)-5-カルボン酸]); 6-テトラクロロ-フルオレセイン([4,7,2',7'-テトラクロロ-(3',6'-ジピバロイルフルオレセイニル)-6-カルボン酸]); 5-TAMRA (5-カルボキシテトラメチルローダミン; キサンチリウム, 9-(2,4-ジカルボキシフェニル)-3,6-ビス(ジメチル-アミノ); 6-TAMRA (6-カルボキシテトラメチルローダミン; キサンチリウム, 9-(2,5-ジカルボキシフェニル)-3,6-ビス(ジメチルアミノ); EDANS (5-((2-アミノエチル)アミノ)ナフ

タレン-1-スルホン酸); 1,5-IAEDANS (5-(((2-ヨードアセチル)アミノ)エチル)アミノ)ナフタレン-1-スルホン酸); DABCYL (4-((4-(ジメチルアミノ)フェニル)アゾ)安息香酸) Cy5 (インドジカルボシアニン-5) Cy3 (インド-ジカルボシアニン-3); およびBODIPY FL (2,6-ジブプロモ-4,4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン-3-プロピオン酸)、ならびにそれらの適当な誘導体を含むが、これらに限定されることはない。

【0379】

本発明のある態様において、プローブを二つのクロモフォアで標識してもよく、かつ標識対の吸収スペクトルの変化を、蛍光の変化を測定することの代わりに検出シグナルとして使用する。

10

【0380】

本発明の方法において、プローブの蛍光強度は、当技術分野において公知の方法によって、蛍光分光光度計またはマイクロタイタープレートリーダーを用いて一つまたは複数の波長で測定される。

【0381】

C. 蛍光消光アッセイ法

蛍光消光アッセイ法は、二つの目的で本発明において有用である。一つ目は、プローブの二次構造が本明細書において定義されるように「安定」であるかどうかを決定することである。二つ目は、プローブと標的核酸との結合によってプローブの二次構造が「変化」を起こしたかどうかを決定することである。

20

【0382】

本発明によるプローブは、対の一方のメンバーがフルオロフォアであり、対のもう一方のメンバーがクエンチャーである相互作用性標識の対(例えば、FRET対または非FRET対)で標識される。例えば、本発明によるプローブをフルオロフォアおよびクエンチャーで標識し、標的核酸の非存在下において、例えば、温度下限がプローブの T_m または予測 T_m の少なくとも50 を下回り、かつ温度上限がプローブの T_m または予測 T_m の少なくとも50 を上回る温度範囲にわたり、蛍光を測定する。

【0383】

D. 安定性

本発明によるプローブの二次構造の「安定性」は、以下のように決定される。プローブは、当技術分野において周知の方法により(例えば、Glazer and Mathies, 1997, Curr. Opin. Biotechnol., 8:94; Ju et al., 1995, Analytical Biochemistry, 231:131に記述されているように)、本明細書において記述される相互作用性標識の対(FRET対または非FRET対のどちらか)で標識される。標的核酸とのプローブの結合の後にプローブの二次構造が変化する場合に標識が引き離されるように、プローブ上の相互作用性標識の対を位置付けることができる。

30

【0384】

蛍光を温度に対してプロットする、プローブの標準曲線(例えば図2e)は、1×融解用緩衝液(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM $MgCl_2$)中またあるいは、5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA、または他の適切な緩衝液中、通常125 nMのプローブを含む試料を、プローブの変性および再アニリングを可能とするのに十分な時間インキュベートすることにより(通常、標準曲線は1分につき1 の変化を起こす蛍光光度計または分光計を用いて作成される)、ならびに温度下限がプローブの T_m または予測 T_m の少なくとも50 を下回り、かつ温度上限がプローブの T_m または予測 T_m の少なくとも50 を上回る温度範囲にわたり蛍光光度計または走査型蛍光分光光度計において蛍光を測定することにより作成される。プローブの T_m は、当技術分野において周知の方法により塩基対組成に基づいて予想される(Sambrook, 前記; Ausubel, 前記参照)。

40

【0385】

標準曲線は、特定のヌクレアーゼを切断反応に用いることが可能なおよび選択的に最適な緩衝液を含む、さまざまな緩衝液(例えば、1×TNE緩衝液(10×-0.1 M Tris塩基、10 mM

50

EDTA、2.0 M NaCl, pH 7.4)、本明細書において記述されるFENヌクレアーゼ緩衝液、本明細書において記述される1×クローニング用Pfu緩衝液)を用いて、作成され比較される。緩衝液のpHを、温度が上昇する間モニターし、必要に応じて調整する。

【0386】

蛍光光度計または分光光度計の温度は、試料の蛍光が特定の温度で測定されるように制御することができる。蛍光は、例えば、温度調節可能な水浴(例えば、Fisher Scientificから入手可能な)と組み合わせてPerkin-Elmer LS50B発光分光計により測定することができる。

【0387】

特定の温度でのプローブの二次構造の安定性は、上記のように、特定の温度でのプローブの蛍光を測定することにより、および標準曲線から決定した場合に、蛍光の値が T_m での蛍光に満たないかどうかを決定することにより決定される。プローブの二次構造は、切断反応温度の温度または切断反応温度未満の温度での蛍光レベルが、プローブの T_m に等しい温度での蛍光レベルより(すなわち、プローブの T_m に等しい温度での蛍光レベルより少なくとも5%、好ましくは20%および最も好ましくは25%多くまたはそのレベル未満で)変化している場合には、FRETアッセイ法において、切断反応温度の温度または切断反応温度未満の温度で(すなわち、切断が行われる温度で)「安定」である。プローブの二次構造は、切断反応温度のまたはその温度未満の温度での蛍光レベルが、プローブの T_m に等しい温度での蛍光レベルより(すなわち、少なくとも5%、好ましくは20%および最も好ましくは25%多くまたはそのレベル未満で)変化している場合には、蛍光消光アッセイ法において、切断反応温度のまたはその温度未満の温度で(すなわち、切断が行われる温度で)「安定」である。

10

20

【0388】

あるいは、プローブの二次構造の安定性を、参照により本明細書に組み入れられるGelfandら(1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:6113)の方法を改変することによって決定し、上記の温度範囲にわたって、相互作用性標識の対で標識されたプローブの蛍光を決定する。

【0389】

VII. 二次構造の検出

本発明による二次構造は、上記のように、FRETアッセイ法において相互作用性標識の対を含むプローブに対し蛍光対温度の標準曲線を作成することによって検出することができる(図2e参照)。温度の変化と相関する蛍光の変化を示す(図2e参照)(例えば、FRET反応の温度が増すにつれて蛍光が増大する)プローブは、二次構造を形成することができる。

30

【0390】

VIII. 二次構造の変化の測定

本発明による二次構造の「変化」は、FRETまたは蛍光消光アッセイ法において、100 nMから10 μ Mの標的核酸配列の存在下または非存在下(通常、標的核酸配列はプローブ濃度に対して2~4モル過剰にあり、すなわち、250~500 nMの標的核酸配列が使用される)、上記のように、プローブの T_m を下回る特定の温度(例えば、切断温度)で相互作用性標識の対を含むプローブを分析することによって検出することができる。

40

【0391】

あるいは、プローブの二次構造の変化を、参照により本明細書に組み入れられるGelfandら(1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:6113)の方法を改変することによって決定し、上記のように標的核酸の存在下または非存在下において、相互作用性標識の対で標識されたプローブの蛍光を決定する。

【0392】

本発明によるプローブが標的核酸に結合し、非侵入性の切断反応によって切断される場合に起こる二次構造の「変化」は、プローブの T_m 未満の温度での標的核酸とのプローブの結合および切断後の蛍光レベルが、標的核酸配列の非存在下において認められる蛍光レベルを超える(例えば、少なくとも5%、好ましくは5~20%および最も好ましくは25%またはそ

50

れ以上超える)ような、蛍光の増大として測定される(図2g参照)。

【0393】

IX. 試料

本発明は、本明細書において定義されるように、試料中の標的核酸配列を検出または測定する方法を提供する。本明細書において用いられる、「試料」とは、関心対象の核酸(標的核酸配列)を含有するかもしれないもしくは含有すると推定される任意の物質、またはそれ自体が標的核酸配列であり、関心対象の標的核酸配列を含有するかもしれないもしくは含有すると推定されるものをいう。したがって「試料」という用語は、例えば、血漿、血清、髄液、リンパ液、滑液、尿、涙液、便、皮膚の外分泌物、呼吸器官、腸管および尿生殖路、唾液、血液細胞、腫瘍、臓器、組織、インビトロ細胞培養成分の試料、自然分離株(飲料水、海水、固形物などの)、微生物標本、ならびに核酸トレーサー分子で「印がつけられている」対象物または標本を含むがこれらに限定されない、標的核酸配列(ゲノムDNA、cDNAもしくはRNA)、細胞、生物、組織、体液または物質の試料を含む。

【0394】

実施例

本発明を、以下の材料および方法が用いられる以下の非限定的な実施例によって例証する。以下に引用される文献参照のそれぞれの開示全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0395】

実施例1

Pfu FEN-1のクローニング

本発明により有用な熱安定性FENヌクレアーゼ酵素は、以下の方法により調製することができる。

【0396】

熱安定性FENヌクレアーゼ遺伝子は、当技術分野において周知のPCRクローニングの方法により、P. フリオサス(ATCC番号43587)に由来するゲノムDNAから単離することができる。クローニングされたPfuFEN-1は、当技術分野において周知のおよび以下に記述の方法により細菌細胞中で過剰発現させることができる。

【0397】

以下のpCAL-n-EKクローニングオリゴヌクレオチドを重合し精製した。

a.

5'GACGACGACAAGATGGGTGTCCCAATTGGTGAGATTATACCAAGAAAAG 3'

および

b.

**5'GGAACAAGACCCGTTTATCTCTTGAACCAACTTTCAAGGGTTGATTGTTTT
CCACT 3'**

。

【0398】

StratageneからAffinity(登録商標) Protein Expression and Purification Systemを入手し、製造元のプロトコルにしたがって使用した。

【0399】

増幅

pCAL-n-EKベクターの一本鎖尾部に相補的な12および13ヌクレオチドの配列を5'末端に含み、それゆえに方向性のクローニングを可能にする遺伝子特異的プライマー(オリゴヌクレオチドaおよびb、上記)を用いたPCR増幅によって、挿入DNAを調製した。FEN-1配列を以下:

10 × cPfu緩衝液(Stratagene) 50 μl

PfuゲノムDNA (およそ100 ng/μl) 7.5 μl

PfuTurbo (2.5 u/ μ l) (Stratagene, カタログ番号600250) 7.5 μ l
 混合プライマー対(各100 ng/ μ l)(オリゴヌクレオチドaおよびb、上記) 15 μ l
 100 mM dNTP 4 μ l
 H₂O 416 μ l
 総量 500 μ l

を含有する増幅反応液(5つの独立の100 μl反応液)を調製することにより、およびStrata gene Robocycler 96ホットトップ式サーマルサイクラーを用い以下の条件:

ウィンドウ 1 95°C 1 分 1 サイクル

ウィンドウ 2 95°C 1 分

50°C 1 分 30 サイクル

72°C 3 分

10

の下で増幅を実行することにより、P. フリオサスに由来するゲノムDNAから増幅した。

【 0 4 0 0 】

5回の反応の各々からのPCR産物を、1つの試験管の中で合わせ、StrataPrep PCRを用いて精製し、1 mM Tris-HCl pH 8.6 50 μ l中に溶出した。FEN-1 PCR産物をゲル上で分析し、およそ1000 bpであると判定した。

【 0 4 0 1 】

fen-1遺伝子を含むPCR産物を、ライゲーション非依存性クローニング末端(LIC)を作出することにより、fen-1遺伝子を含むPCR産物をpCALnEK LICベクター(Stratagene)にアニールすることにより、および以下の方法によって細胞をアニーリング混合物で形質転換することにより、pCALnEK LICベクター(Stratagene)にクローニングした。手短に言えば、PCR増幅の後、PCR産物を精製し、dATPの存在下においてPfu DNAポリメラーゼで処理する(Affinity(登録商標) Protein Expression and Purification System, Stratagene, カタログ番号204301に含まれる使用説明書にしたがう)。dTTP、dGTPおよびdCTPの非存在下、Pfu DNAポリメラーゼの3'から5'方向のエキソヌクレアーゼ活性は、PCR産物の各3'末端で少なくとも12および13ヌクレオチドを除去する。この活性は、最初のアデニンと遭遇するまで続き、pCAL-n-EKベクターの一本鎖尾部に相補的な、5'伸長された一本鎖尾部を有するDNA断片をもたらす。

【 0 4 0 2 】

LIC末端の作出

以下の混合物を調製することによって、LIC末端を作出した。

精製PCR産物(およそ0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 45 μl

10 mM dATP 2.5 μ l

10 × cPfu 緩衝液 5 μl

cPfu (2.5 u/ μ l) 1 μ l

H₂O 0.5 μl

【 0 4 0 3 】

cPfuおよびcPfu緩衝液はStratageneから入手することができる(cPfuおよびcPfu緩衝液, Stratageneカタログ番号600153)。

【 0 4 0 4 】

試料を72℃で20分間インキュベートし、産物を室温に冷却した。各試料に調製済みのpC ALnEK LICベクター(この調製済みのベクターはAffinity LIC Cloning and Protein Purification Kit (214405)でStratageneから市販されている) 40 ngを加えた。ベクターおよび挿入DNAを合わせ、室温でアニールさせ、高コンピテント細菌宿主細胞に形質転換した(Wyborski et al., 1997, Strategies, 10:1)。

【 0 4 0 5 】

FEN産生用の細胞の調製

LB-AMP 2リットルをFEN-1クローン(クローン3)の終夜培養物20 mlとともにインキュベ

20

30

40

50

ートした。およそ11時間増殖を進行させ、その時点で細胞は $OD_{600} = 0.974$ に達した。細胞を1 mM IPTGで一晩(約12時間)誘導した。細胞を遠心分離によって収集し、得られた細胞ペーストを-20℃で保存した。

【0406】

タグを付けたFEN-1の精製

細胞をカルシウム結合用緩衝液20 mlに再懸濁した。

CaCl₂結合用緩衝液

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

150 mM NaCl

1.0 mM MgOAc

2 mM CaCl₂

【0407】

マイクロチップを用いBranson Sonicatorで試料を超音波処理した。出力設定は5で、デューティサイクルは90%であった。試料を三回超音波処理し、その合間は氷上に静置させた。超音波処理物を $26,890 \times g$ で遠心分離した。清澄になった上清を、50 mlのコニカル試験管の中で、洗浄された(CaCl₂結合用緩衝液中で)カルモジュリンアガロース(CAMアガロース) 1 mlと混合し、低温室(4℃)の中でゆっくりと回転するホイールに載せ5時間インキュベートした。簡単な遠心分離(卓上遠心分離機中5000 rpm)によってCAMアガロースを収集した。

【0408】

上清の除去後、CAMアガロースをCaCl₂結合用緩衝液50 mlで洗浄し、使い捨てドリップカラムに移した。元の容器およびピペットを十分にすすいで、残存するアガロースを除去した。カラムをCaCl₂結合用緩衝液およそ200 mlですすいだ。

【0409】

50 mM NaCl溶出用緩衝液(50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EGTA) 10 mlで溶出を行った。画分0.5 mlを収集した。1 M NaCl溶出用緩衝液で第二の溶出段階を行い、画分0.5 mlを収集した。

【0410】

精製されたタグ付FEN-1の評価

1 M NaCl中で溶出されたCBPタグ付Pfu FEN-1を含有する画分を、SDS中で煮沸し、シプロオレンジ(Sypro Orange)で染色する4~20%ゲル上でのSDS-PAGEによって分析した(図3)。

【0411】

未切断FEN-1のタンパク質濃度がおよそ150 ng/マイクロリットルであると決定された(以下)。

【0412】

精製FEN-1のエンテロキナーゼプロテアーゼ(EK)切断

画分3~9を50 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH 8.0および2 mM CaCl₂中で4℃にて一晩透析した。

【0413】

不透明で、非常に微細な沈殿物が、透析されたFEN-1に現れた。試料を1/20希釈した場合、沈殿物は除かれた。試料を1/3希釈した場合、不溶性材料は依然として検出可能であった。1/3希釈した材料を37℃で2分間加熱し、0.1%の終濃度までTween 20と混合した。Tween 20の添加によって、溶液の中に「ひも状物」およびさらに粗大な固形物が、ほぼすぐに生成し、溶液を1 M NaClに調整した後でさえ、それを食い止めることができなかった。

【0414】

基質として1/20希釈した試料を用い、かつ透析袋を1×EK緩衝液ですすぐことによって調製された希釈試料を用い、EK切断を行った。室温で一晩(約16時間)のEK (1 u/μl) 1 μlの添加によってEK切断を行った。

【0415】

10

20

30

40

50

CAMアガロース100 μ lと合わせたSTIアガロース100 μ lを1×STI緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 0.1% Tween 20) 10 mlで二回すすいだ。NaClを二つのEK試料に加えて終濃度を200 mM NaClとした。二つの試料を合わせ、すすいだアガロースに加えた。試料を、4 で3時間、ホイール上でゆっくりと回転させ、卓上遠心分離機中での簡単な遠心分離によって分離した(上記のように)。上清を除去し、樹脂を1×STI 500 μ lで二回すすいだ。二回のすすぎ液を合わせ、元の上清とは別個に保存した。試料を4～20%ゲル上でのSDS-PAGEによって分析した。

【0416】

消化産物の濃度は、濃度およそ50 ng/mlのPfu標準物質との比較によって決定した場合に、およそ23 ng/ μ lであった。

10

【0417】

実施例2

FENヌクレアーゼ活性

実施例1に記述されるように調製されたFENヌクレアーゼのエンドヌクレアーゼ活性およびFENヌクレアーゼの切断構造要件は、「FENヌクレアーゼ」と題した項にまたは以下に記述される方法によって決定することができる。

【0418】

手短に言えば、三つの鋳型(図6)を用いて、本発明によるFENヌクレアーゼの活性を評価する。鋳型1は以下の配列:

5'AAAATAAATAAAAAAAAAATACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCG3'

20

を有する5' ^{33}P 標識オリゴヌクレオチド(ヘルテスト4)である。

【0419】

ヘルテスト4の下線部は、M13mp18+に相補的な領域を表す。切断産物は配列

AAAATAAATAAAAAAAAAAT

を有する18ヌクレオチド断片である。ヘルテスト4は、M13に結合して相補的な二本鎖ドメインおよび非相補的な5'突出部を生じる。この二本鎖は、鋳型2(図6)を形成する。鋳型3(図6)は、ヘルテスト4に直接隣接する、M13に結合されたさらなるプライマー(FENAS)を有する。FENASの配列は

5' CCATTCGCCATTCAGGCTGCGCA 3'

30

である。鋳型3の存在下において、FENヌクレアーゼは、ヘルテスト4の遊離5'末端に結合し、連結部に移動し、18ヌクレオチド断片を生成するためにヘルテスト4を切断。得られた切断産物を6%アクリルアミド、7 M尿素の配列決定用ゲル上で分離する。

【0420】

鋳型を以下のように調製する。

	鋳型 1	鋳型 2	鋳型 3
ヘルテスト4	14 μ l	14 μ l	14 μ l
M13	**	14 μ l	14 μ l
FENAS	**	**	14 μ l
H ₂ O	28 μ l	14 μ l	**
10x Pfu 緩衝液	4.6 μ l	4.6 μ l	4.6 μ l

40

【0421】

Pfu緩衝液は、Stratagene (カタログ番号600153)から入手することができる。

【0422】

鋳型混合物を、95 で5分間加熱し、45分間室温に冷却し、4 で一晩保存する。

【0423】

50

酵素試料は、次の通りである。

- A. H₂O (対照)
- B. 無希釈非切断FEN-1 (およそ445 ng/μl) 2 μl
- C. 1/10希釈の非切断FEN-1 (およそ44.5 ng/μl) 2 μl
- D. エンテロキナーゼプロテアーゼ(EK)切断FEN-1 (およそ23 ng/μl) 2 μl

【0424】

四つの反応混合物を次の通りに三つの鑄型と混合する。

鑄型1、鑄型2または鑄型3 3 μl
 10×クローニング用Pfu緩衝液0.7 μl
 100 mM MgCl₂ 0.6 μl
 FEN-1またはH₂O 2.00 μl
 H₂O 0.7 μl
 総体積7.00 μl

10

【0425】

反応を、50℃で30分間進行させ、各試料へのホルムアミド「シーケンシング停止」溶液2 μlの添加によって停止する。試料を、95℃で5分間加熱し、6%アクリルアミド、7 M尿素CastAwayゲル(Stratagene)にローディングする。

【0426】

あるいは、1時間のインキュベーション時間を用いて、以下の緩衝液の中でFENヌクレアーゼ活性を分析してもよい。

20

10×FENヌクレアーゼ緩衝液

500 mM Tris-HCl pH 8.0
 100 mM MgCl₂

【0427】

反応混合物は、次の通りである。

鑄型1、鑄型2または鑄型3 3 μl
 10×FENヌクレアーゼ緩衝液 0.7 μl
 FEN-1またはH₂O (A~D、上記) 2.00 μl
 H₂O 1.3 μl
 総量 7.00 μl

30

【0428】

試料を、Robocycler 96ホットトップサーマルサイクラーにおいて50℃で1時間インキュベートする。シーケンシング停止(95%ホルムアミド、20 mM EDTA、0.05%プロモフェノールブルー、0.05%キシレンシアノール、Stratageneから入手可能)色素溶液2 μlの添加後、試料を99℃で5分間加熱する。手で流し込んだ11インチ長の20%アクリルアミド/ビスアクリルアミド、7 M尿素ゲルに試料をローディングする。プロモフェノールブルーが総距離のおよそ2/3に移動するまで、ゲルを20ワットで泳動する。ゲルをガラス板から除去し、固定液(15%メタノール、5%酢酸)に10分間、次いで水に10分間浸漬する。ゲルをWhatman n 3mm紙に置き、プラスチックラップで覆い、加熱真空ゲル乾燥機(およそ80℃)中で2時間乾燥する。ゲルをX線フィルムに一晩曝露する。

40

【0429】

鑄型1、2および3 (上記のように調製した)を

- A. H₂O
- B. CBPタグ付Pfu FEN-1 2 μl
- C. (1:10)希釈したCBPタグ付Pfu FEN-1 2 μl
- D. EK切断Pfu FEN-1 2 μl

の添加によって切断する、FEN-1ヌクレアーゼアッセイ法のオートラジオグラフを図4に示す。

【0430】

レーンは、次の通りである。レーン1A、1B、1Cおよび1Dは、それぞれ、H₂O、無希釈CBP

50

タグ付Pfu FEN-1、1:10希釈のCBPタグ付Pfu FEN-1およびEK切断Pfu FEN-1で切断された鑄型1を表す。レーン2A、2B、2Cおよび2Dは、それぞれ、H₂O、無希釈CBPタグ付Pfu FEN-1、1:10希釈のCBPタグ付Pfu FEN-1およびEK切断Pfu FEN-1で切断された鑄型2を表す。レーン3A、3B、3Cおよび3Dは、それぞれ、H₂O、無希釈CBPタグ付Pfu FEN-1、1:10希釈のCBPタグ付Pfu FEN-1およびEK切断Pfu FEN-1で切断された鑄型3を表す。

【0431】

タグ付Pfu FEN-1は、N末端のCBP親和性精製タグを含有する。タグ付型のFEN-1とタグなし型のFEN-1との間の活性のいかなる差異も、タグ付対タグなしFEN-1の量が等価ではないため、タンパク質濃度(酵素試料の濃度は上記に示されている)の差異によるものである。タグ付Pfu FEN-1もタグなしPfu FEN-1もともに切断活性を示す。

10

【0432】

図4は、FEN-1の非存在下での切断のバックグラウンドレベルを示す(レーン1A、2Aおよび3A)。さらに、この図は、タグ付Pfu FEN-1が鑄型1と比べてより多くの鑄型2を切断することを示す。特に、最大量の鑄型2は、無希釈のタグ付Pfu FEN-1の存在下において切断される(レーン2B)。鑄型3の分析から、最大量の鑄型3は無希釈のタグ付Pfu FEN-1によって切断され、最小量の鑄型3は希釈タグ付FEN-1によって切断されることが明らかである。標識プローブは、40~43ヌクレオチドのバンドとして移動する。FEN-1は、鑄型2と比べて鑄型3(上流プライマーを含む)を選択的に切断する。切断産物のバンドは、16~20ヌクレオチドで移動する主要なバンドである。標識切断産物の不均一性は、使用の前にゲル精製されなかった標識基質の不均一性の結果である。

20

【0433】

実施例3

非侵入性の切断反応の切断によって検出可能なシグナルを生ずるだけの本発明のオリゴヌクレオチドを用いたリアルタイムQPCR検出

標的核酸配列を以下の方法によって検出および/または測定した。

【0434】

図1に示されるオリゴヌクレオチドを含有する反応物を調製した。オリゴヌクレオチドには、3'の非相補的ヌクレオチドを有する第一のオリゴヌクレオチド(A-1、図1A)、上流プライマー(A-2、図1A)、第二のオリゴヌクレオチド(F-C、図1A)、標的核酸(A'C'、図1A)、鑄型核酸(F'H'、図1B)、および第三のオリゴヌクレオチド(F2H、図1B)が含まれた。第二のオリゴヌクレオチドおよび第三のオリゴヌクレオチドの3'末端をブロックした。第一および第二のオリゴヌクレオチドは、標的とハイブリダイズされる場合に、第一のオリゴヌクレオチドの相補的部分および第二のオリゴヌクレオチドの相補的部分が、標的にアニールされる際に1ヌクレオチドギャップによって分離されるように、設計された(図1A)。同様に、遊離されたフラップおよび第三のオリゴヌクレオチドも、鑄型にアニールされる場合にそれらの鑄型相補的部分がギャップ(2ヌクレオチドギャップ; 図1B)を形成するように設計された。さらに、非侵入性の切断反応に有利に働き、プライマー伸長には有利に働かないように、第一のオリゴヌクレオチドおよび遊離されたフラップは、3'末端の非相補的なヌクレオチドをそれぞれが有するように設計された。

30

【0435】

第三のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドが屈曲部で切断される場合に検出可能なシグナルを生ずる相互作用性標識の対に結合された。これは、第一の切断反応が非侵入性である場合のみ起こりうる。これは、FAMを第三のオリゴヌクレオチドの5'フラップ上におよびBHQ2を第三のオリゴヌクレオチドの+1ヌクレオチド上に位置付けることによって達成された。すなわち、第一の切断反応が非侵入性であった場合には、2ヌクレオチドギャップによって第三のオリゴヌクレオチドの相補的部分から3'末端の相補的ヌクレオチドが分離されるように、遊離されたフラップは鑄型核酸とハイブリダイズしうる。これは、屈曲部での第三のオリゴヌクレオチドの切断をもたらし、それゆえ標識が分離するのを可能にしうる。しかしながら、第一の切断反応が侵入性であった場合には、遊離されたフラップの3'末端に一つまたは複数のさらなるヌクレオチドが含まれるように、遊離された

40

50

フラップは鋳型核酸とハイブリダイズしうる。これは、相互作用性標識の対の下流を切断する第二の切断反応を引き起こし、標識は分離せず、シグナルを生成しないであろう。

【0436】

反応条件は、次の通りであった。

第一の系の成分：

- 10 ~ 1×10^6 コピーの標的
- 300 nMのA-2オリゴヌクレオチド
- 500 nmのA-1オリゴヌクレオチド
- 200 nmのリバースプライマー
- 200 nmの第二のオリゴヌクレオチド

10

第二の系の成分：

- 600 nmの鋳型核酸(図1参照)
- 200 nmの第三のオリゴヌクレオチド(図1参照)
- 1×プローブ用緩衝液(15 mMのTris-HCL (pH8), 50 mM KCL, 5.5 mM $MgCl_2$, 8%グリセロール, 1% DMSO) + (NTPs)
- 1.25 U Pfu V93R エキソ(-)ポリメラーゼ、
- FEN-1エンドヌクレアーゼ 200 ng

【0437】

反応混合物をサーマルサイクラーの中に置き、以下の条件の下で繰り返した。

- (1) 95 で2分を1サイクル
- (2) 95 、10秒間
- (3) 60 、30秒間

20

段階(1)および(2)を50サイクル繰り返した。

【0438】

各サイクルの60 の段階の終わりに蛍光データを収集した。この結果を図7に図示する。この結果から、本方法は、試料中の標的核酸の量を検出および決定するのに有効であることが示唆される。

【0439】

実施例4

非侵入性の切断反応の切断によって検出可能なシグナルを生ずるだけの単一の切断反応を用いたリアルタイムQPCR検出

30

当業者は、上記の反応は非逐次反応において実施できることを理解するであろう。反応が非逐次的に実施される場合には、その系には以下を含めることができる。

系の成分：

- 10 ~ 1×10^6 コピーの標的
- 300 nMのA-2オリゴヌクレオチド
- 500 nmのA-1オリゴヌクレオチド
- 200 nmのリバースプライマー
- 200 nmの(標識された)第二のオリゴヌクレオチド
- 1×プローブ用緩衝液(15 mMのTris-HCL (pH8), 50 mM KCL, 5.5 mM $MgCl_2$, 8%グリセロール, 1% DMSO) (+NTPs)
- 1.25 U Pfu V93R エキソ(-)ポリメラーゼ、
- FEN-1エンドヌクレアーゼ 200 ng

40

次いで反応混合物をサーマルサイクラーの中に置き、以下の条件の下で繰り返す。

- (1) 95 で2分を1サイクル
- (2) 95 、10秒間
- (3) 60 、30秒間

段階(1)および(2)を50サイクル繰り返す。

各サイクルの60 の段階の終わりに蛍光データを収集することができる。

【0440】

50

この反応においては、第二のオリゴヌクレオチドを、逐次切断反応の第三のオリゴヌクレオチドで先に記述したように相互作用性標識の対で標識する。

【0441】

実施例5

プライマー/上流(第一の)オリゴヌクレオチド比の最適化

プライマーと上流オリゴヌクレオチドとの最適比を決定するために、標的核酸配列を以下の方法によって検出および/または測定した。

【0442】

図8に示されるオリゴヌクレオチドを含有する反応物を調製した。オリゴヌクレオチドには、第一のオリゴヌクレオチド(A-1、図8A)、上流プライマー(A-2、図8A)、リバースプライマー(R; 図8A)、第二のオリゴヌクレオチド(F-C、図8A)、標的核酸(A'C'、図8A)、鋳型核酸(F'H'、図8B)、および第三のオリゴヌクレオチド(F2H、図8B)が含まれた。第二のオリゴヌクレオチドおよび第三のオリゴヌクレオチドの3'末端をブロックした。第三のオリゴヌクレオチドには、例えば、第三のオリゴヌクレオチドの屈曲部の切断によって標識が引き離される場合に検出可能なシグナルを生成する相互作用性標識の対が含まれた。FAMは第三のオリゴヌクレオチドの5'フラップに結合されたのに対し、BHQ2は第三のオリゴヌクレオチドの+1ヌクレオチドに結合された。

【0443】

標的の濃度およびプライマーと上流オリゴヌクレオチドとの比は、反応混合物においてさまざまであった。反応条件は、次の通りであった。

第一の系の成分:

2.5 ~ 2.5 × 10⁵ コピーの標的

400 nmの種々のプライマー混合物:

フォワードプライマー(A-2):上流オリゴヌクレオチド(0:100)

フォワードプライマー(A-2):上流オリゴヌクレオチド(10:90)

フォワードプライマー(A-2):上流オリゴヌクレオチド(25:75)

200 nmのリバースプライマー

200 nmの下流オリゴヌクレオチド

第二の系の成分:

50 nmの鋳型核酸

200 nmの第三のオリゴヌクレオチド

1 × プローブ用緩衝液(15 mMのTris-HCL (pH8), 50 mM KCL, 5.5 mM MgCl₂, 8%グリセロール, 1% DMSO) (+dNTP)

1.25 U Pfu V93R エキソ(-)ポリメラーゼ、

FEN-1エンドヌクレアーゼ100 ng

【0444】

反応混合物をサーマルサイクラーの中に置き、以下の条件の下で繰り返した。

(1) 95 °Cで2分を1サイクル

(2) 95 °C、1秒間

(3) 60 °C、18秒間

段階(1)および(2)を55サイクル繰り返した。

【0445】

各サイクルの60 °Cの段階の終わりに蛍光データを収集した。この結果を図9に図示する。この結果から、最適なプライマー:上流オリゴヌクレオチドの比は10:90であることが示唆された。

【0446】

実施例6

標的上の上流オリゴヌクレオチドおよび下流プローブの配置の最適化

第三のオリゴヌクレオチドの切断によって生成するシグナルを最適化するために、標的上の下流(第三の)オリゴヌクレオチドに対する上流オリゴヌクレオチドの配置を変化させ

て、反応を行った。第三のオリゴヌクレオチドは、FAM標識が下流オリゴヌクレオチドの-3位に結合され、BHQ2が+1に結合された。(図8B参照)

【0447】

図8Bに示したオリゴヌクレオチドを本実施例において使用した。オリゴヌクレオチドには、上流オリゴヌクレオチド(F、図8)、鋳型核酸(F'H'、図8)、および第三のオリゴヌクレオチド(プローブ)が含まれた(FH、図8)。上流オリゴヌクレオチドの長さは、変えられ、以下のオリゴを含められた；図8bに示した上流オリゴヌクレオチド、さらに1つの3'ヌクレオチドを有する上流オリゴヌクレオチド、さらに2つの3'ヌクレオチドを有する上流オリゴヌクレオチド、またはさらに3つの3'ヌクレオチド(2 ntの重複)を有する上流オリゴヌクレオチド。反応条件は、次の通りであった。

10

200 nmの鋳型核酸

200 nmの第三のオリゴヌクレオチド

200 nmの上流オリゴヌクレオチド(さらに0~3つの3'ヌクレオチドを有する)

1× プローブ用緩衝液(15 mMのTris-HCL (pH8), 50 mM KCL, 5.5 mM MgCl₂, 8%グリセロール, 1% DMSO) (+dNTP)

+/- 1.25 U Pfu V93Rエキソ(-)ポリメラーゼ、

FEN-1エンドヌクレアーゼ100 ng

【0448】

反応混合物をサーマルサイクラーの中に置き、以下の条件の下で繰り返した。

(1) 95 で2分を1サイクル

(2) 95 、1秒間

(3) 60 、18秒間

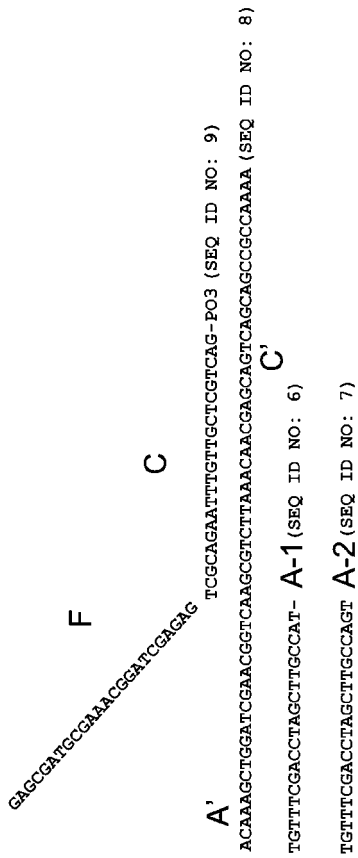
段階(1)および(2)を40サイクル繰り返した。

20

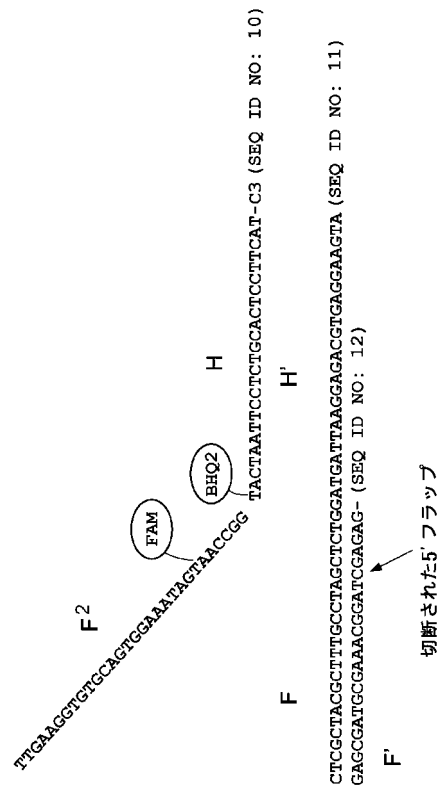
【0449】

各サイクルの60 の段階の終わりに蛍光データを収集した。この結果を図10に図示する。上流オリゴヌクレオチドの相補的部分が2ヌクレオチドギャップだけ下流オリゴヌクレオチドの相補的部分から引き離された場合に、および上流オリゴヌクレオチドが3'末端の一つの非相補的ヌクレオチドを持った場合に、最適なシグナルを生成した。

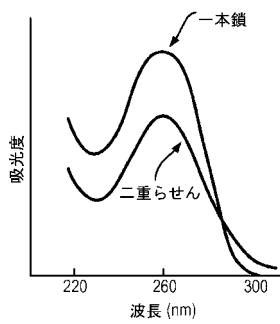
【図 1 A】



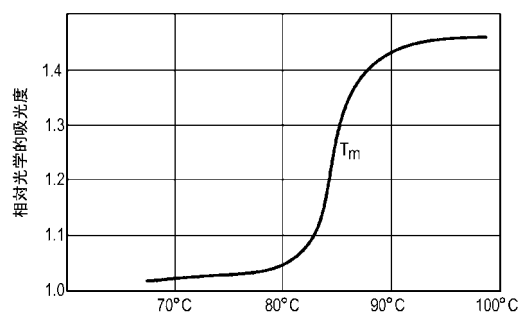
【図 1 B】



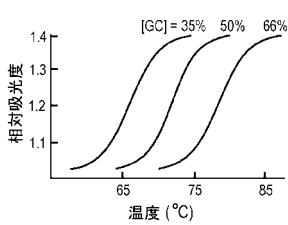
【図 2 A】



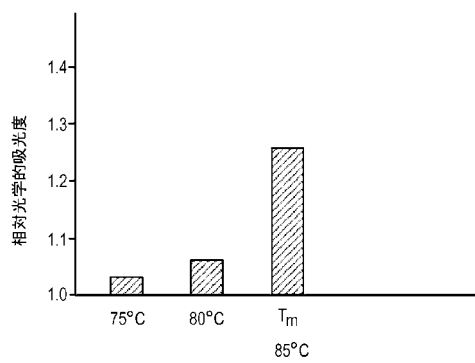
【図 2 C】



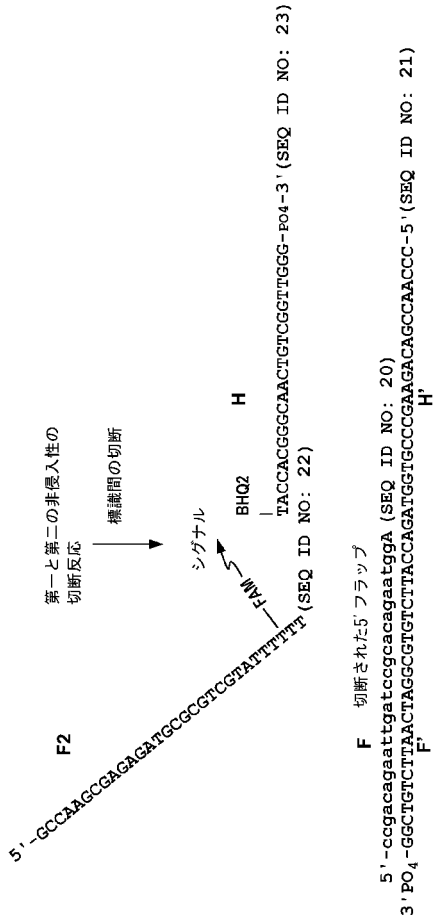
【図 2 B】



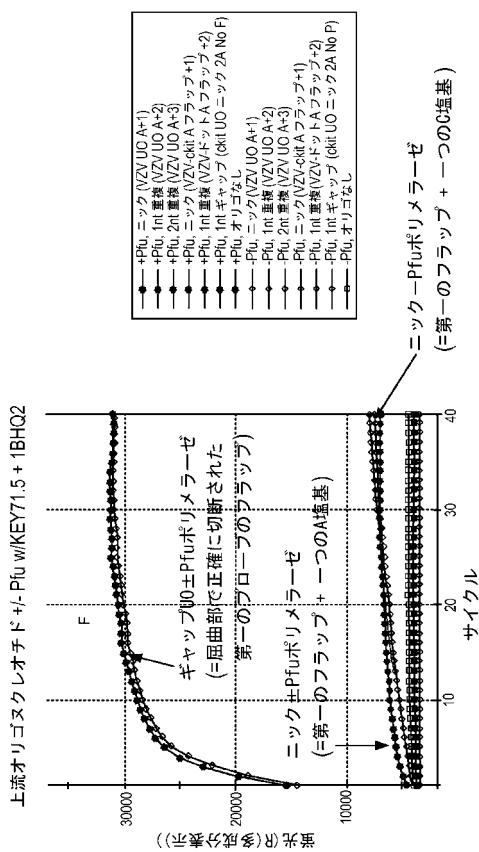
【図 2 D】



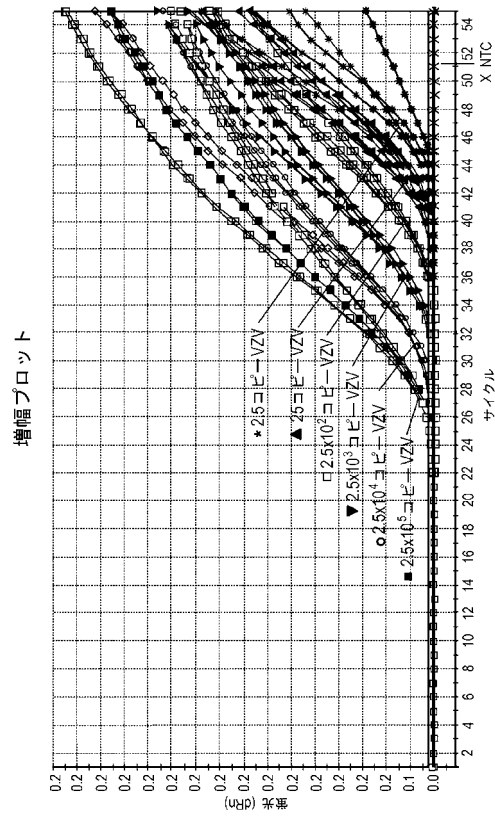
【図 8 C】



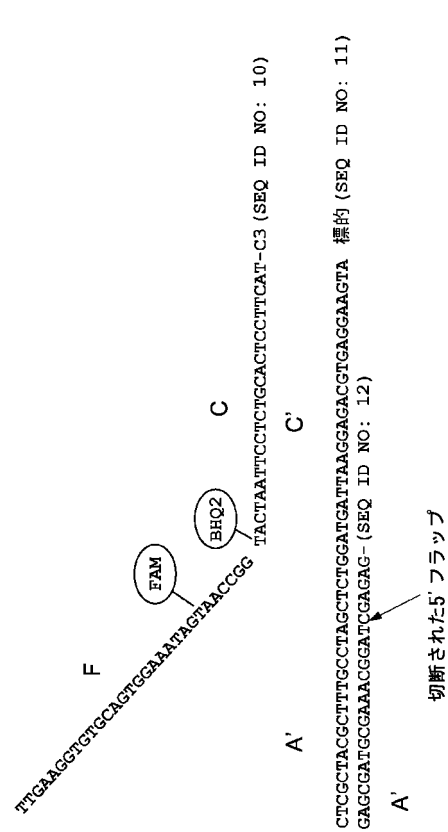
【図 10】



【図 9】



【図 11】



【配列表】

2010512754000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2007/087685
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12Q 1/68(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 8 C12N 9/22, C12Q 1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) NCBI PubMed, eKIPASS "nucleic acid, detection, flap, invasive cleavage, etc."		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6759226 B1 (Third Wave Technologies, Inc., US) 06 July 2004 - see the whole document, especially Figures 1-4, 10; Claims.	1-21, 23-31, 35-48
A	US 6458535 B1 (Third Wave Technologies, Inc., US) 01 October 2002 - see the whole document, especially, Figures 5, 15E, 18A, 37; Claims.	1-21, 23-31, 35-48
A	US 2006/0110748 A1 (Stratagene California, US) 25 May 2006 - see the whole document, especially Figure 1; Claims.	1-21, 23-31, 35-48
A	Jeff G. Hall, et al., 'Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction', In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 18 July 2000, Vol.97(15), pp.8272-8277 - see the whole document, especially Figure 1.	1-21, 23-31, 35-48
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 MAY 2008 (23.05.2008)		Date of mailing of the international search report 23 MAY 2008 (23.05.2008)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer SHIN, Kyeong A Telephone No. 82-42-481-5589 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2007/087685

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 22, 32-34
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
 - 1) Claim 22 is unclear since it refers to itself. 2) Claim 32 quotes claim 1, describing a first member of the pair of interactive labels. But, claim 1 does not mention a first member of the pair of interactive labels.
 - 3) Claims 33 and 34 are not clear and concise because these claims quote indefinite claim 32.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2007/087685

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6759226 B1	06.07.2004	AU 200163449 A1	03.12.2001
		AU 200163449 A5	03.12.2001
		CA 2410072 AA	29.11.2001
		EP 01294863 A2	26.03.2003
		JP 16521606	22.07.2004
		US 2003104378 A1	05.06.2003
		US 2003134349 A1	17.07.2003
		US 2003186238 A1	02.10.2003
		US 2004018489 A1	29.01.2004
		US 6635463 BB	21.10.2003
		US 6759226 B1	06.07.2004
		US 7045289 BB	16.05.2006
		US 7122364 BA	17.10.2006
		US 7150982 BB	19.12.2006
		WO 0190337 A2	29.11.2001
		WO 200190337 A3	23.01.2003
US 6458535 B1	01.10.2002	AU 199868690 B2	20.10.1998
		AU 6869098 A1	20.10.1998
		AU 738849 B2	27.09.2001
		CA 2284552 AA	01.10.1998
		EP 00994964 A1	26.04.2000
		EP 00994964 B1	21.06.2006
		JP 13518805	16.10.2001
		JP 17224249	25.08.2005
		US 2002187486 AA	12.12.2002
		US 2003104378 A1	05.06.2003
		US 2003104378 AA	05.06.2003
		US 2003186238 A1	02.10.2003
		US 2004018489 A1	29.01.2004
		US 2006183207 A1	17.08.2006
		US 5994069 A	30.11.1999
		US 6458535 BA	01.10.2002
		US 6872816 B1	29.03.2005
		US 6913881 B1	05.07.2005
		US 7045289 BB	16.05.2006
		US 7150982 BB	19.12.2006
		WO 9842873 A1	01.10.1998
US 20060110748 A1	25.05.2006	US 7309573 BB	18.12.2007
		WO 2007019492 A2	15.02.2007
		WO 2007019492 A3	22.11.2007
		WO 2007019492 C2	21.06.2007

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,LV,MC,MT,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,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

１．テフロン

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ソルゲ ジョセフ エー．

アメリカ合衆国 ワイオミング州 ウィルソン ウェスト パイン メドウ ロード 5320
ピー．オー．ボックス 1576

(72)発明者 ハッペ スコット

アメリカ合衆国 テキサス州 オースチン テトベリー レーン 1105

(72)発明者 ファーミン アンドリュウ

アメリカ合衆国 ワイオミング州 ジャクソン ピー．オー．ボックス 12192

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA11 HA08 HA14

4B063 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR14 QR32 QR56 QR62 QS25 QS34

QX02