

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4718756号
(P4718756)

(45) 発行日 平成23年7月6日(2011.7.6)

(24) 登録日 平成23年4月8日(2011.4.8)

| (51) Int. Cl. | | F I | |
|---------------|-----------------|---------|---------------|
| C 1 2 N | 15/09 (2006.01) | C 1 2 N | 15/00 Z N A A |
| C 1 2 Q | 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q | 1/68 A |
| G O 1 N | 33/53 (2006.01) | G O 1 N | 33/53 M |

請求項の数 67 (全 32 頁)

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2002-506247 (P2002-506247) | (73) 特許権者 | 599072611 キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシ ユレンクテル ハフツング ドイツ連邦国、ヒルデン 40724、キ アゲン シュトラーセ 1 |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年6月27日(2001.6.27) | (74) 代理人 | 110000109 特許業務法人特許事務所サイクス |
| (65) 公表番号 | 特表2004-512823 (P2004-512823A) | (72) 発明者 | ラスケン, ロジャー, エス. アメリカ合衆国, 06437 コネティカ ット, ギルフォード, ステート ストリ ート 87 |
| (43) 公表日 | 平成16年4月30日(2004.4.30) | (72) 発明者 | ディーン, フランク, ビー. アメリカ合衆国, 06437 コネティカ ット, ギルフォード, パール ストリ ート 21 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2001/020217 | | |
| (87) 国際公開番号 | W02002/000934 | | |
| (87) 国際公開日 | 平成14年1月3日(2002.1.3) | | |
| 審査請求日 | 平成20年4月10日(2008.4.10) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 09/605,192 | | |
| (32) 優先日 | 平成12年6月28日(2000.6.28) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸配列の多重プライミング増幅プロセス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 個またはそれ以上の増幅標的サークル (A T C s) が、1 個以上の多重一本鎖非環状オリゴヌクレオチドプライマー (P 1) と結合し、またここでその条件が多重タンデム配列 DNA (T S - DNA) 産物を形成するために、P 1 プライマーの伸長により、前記増幅標的サークルの複製を促進するという条件下で、前記多重一本鎖非環状オリゴヌクレオチドプライマー (P 1)、1 個またはそれ以上の増幅標的サークル (A T C s)、DNA ポリメラーゼおよび多重デオキシヌクレオシド三リン酸 (d N T P) を含む混合物を形成することを含み、核酸配列を選択的に増幅するプロセスであって、前記増幅標的サークルは培養物から直接誘導され、かつ前記増幅標的サークルは培養物に存在するゲノム DNA よりも優先的に増幅されることを特徴とするプロセス。

【請求項 2】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここに前記多重プライマーが、A T C の部分に相補である特異的な配列を持つことを特徴とするプロセス。

【請求項 3】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記多重プライマーが、ランダムプライマーであることを特徴とするプロセス。

【請求項 4】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記多重プライマーが、ランダムプライマーと特異的プライマーの混合物より成ることを特徴とするプロセス。

10

20

【請求項 5】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記多重プライマーが、長さで 5 乃至 50 ヌクレオチドの範囲内にあることを特徴とするプロセス。

【請求項 6】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記多重プライマーが、長さで 5 乃至 35 ヌクレオチドの範囲内にあることを特徴とするプロセス。

【請求項 7】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記多重プライマーが、長さで 5 乃至 10 ヌクレオチドであることを特徴とするプロセス。

【請求項 8】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記多重プライマーが、ヘキサマー（六量体）であることを特徴とするプロセス。

10

【請求項 9】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記多重プライマーが、オクタマー（八量体）であることを特徴とするプロセス。

【請求項 10】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記多重プライマーが、ATC に相補でない前記プライマーの 5' 末端で 1 個の領域を含むことを特徴とするプロセス。

【請求項 11】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記 ATC が、一本鎖 DNA サークルであることを特徴とするプロセス。

20

【請求項 12】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記 ATC が、少なくとも 1 個のニックを持つ複式 DNA サークルであることを特徴とするプロセス。

【請求項 13】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記 ATC が、ニックを持たない複式 DNA サークルであることを特徴とするプロセス。

【請求項 14】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記 ATC が、一本鎖 RNA サークルであることを特徴とするプロセス。

30

【請求項 15】

請求項 12 または請求項 13 記載のプロセスであって、更に複式 DNA サークルの 2 個の鎖を分離する変性段階を含むことを特徴とするプロセス。

【請求項 16】

請求項 15 記載のプロセスであって、ここで増幅標的サークルが、細菌コロニー、バクテリアオフィージ、ウイルスブランク、酵母コロニー、バキュロウイルスブランク、および遷移形質移入真核細胞より成るグループから選択される部材から直接誘導されることを特徴とするプロセス。

【請求項 17】

請求項 16 記載のプロセスであって、ここで前記部材が、溶菌されていることを特徴とするプロセス。

40

【請求項 18】

請求項 17 記載のプロセスであって、ここで溶菌が、熱、酵素、および有機溶媒より成るグループから選択される作用薬での処置により実現されることを特徴とするプロセス。

【請求項 19】

請求項 18 記載のプロセスであって、ここで前記酵素が、リゾチーム、ヘリカーゼ、グルシラーゼ、およびザイモリアーゼより成るグループから選択されることを特徴とするプロセス。

【請求項 20】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記 ATC が、サイズで約 10,000 ヌクレ

50

オチド以下であることを特徴とするプロセス。

【請求項 2 1】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記 A T C が、サイズで約 1 0 , 0 0 0 ヌクレオチド以上であることを特徴とするプロセス。

【請求項 2 2】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記 A T C が、サイズで約 1 , 0 0 0 ヌクレオチド以下であることを特徴とするプロセス。

【請求項 2 3】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記 A T C が、サイズで約 1 0 0 ヌクレオチド以下であることを特徴とするプロセス。

10

【請求項 2 4】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで増幅標的のサークルが、一本鎖バクテリオファージ D N A、二本鎖 D N A プラスミドまたは他のベクター、あるいはこのようなベクターから誘導されたクローンを含むことを特徴とするプロセス。

【請求項 2 5】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで増幅される増幅標的のサークルが、未知の配列組成物のものであることを特徴とするプロセス。

【請求項 2 6】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記 d N T P が、d T T P , d C T P , d A T P , d G T P , d U T P、前記のものとは異なる自然発生 d N T P、d N T P の類似体、および普遍塩基を持つ d N T P より成るグループから選択された部材であることを特徴とするプロセス。

20

【請求項 2 7】

請求項 2 6 記載のプロセスであって、ここで少なくとも 1 個の前記 d N T P が、放射能標識されることを特徴とするプロセス。

【請求項 2 8】

請求項 2 6 記載のプロセスであって、ここで少なくとも 1 個のヌクレオチドが、そこへの取り込みに続き、T S - D N A にヌクレアーゼ活性に対する耐性を与えることを特徴とするプロセス。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 記載のプロセスであって、ここで少なくとも 1 個の前記ヌクレオチドが、ホスホロチオエートヌクレオチドであることを特徴とするプロセス。

30

【請求項 3 0】

請求項 2 8 記載のプロセスであって、ここで前記ヌクレアーゼ活性が、エンドヌクレアーゼによるものであることを特徴とするプロセス。

【請求項 3 1】

請求項 2 8 記載のプロセスであって、ここで前記ヌクレアーゼ活性が、エキソヌクレアーゼによるものであることを特徴とするプロセス。

【請求項 3 2】

請求項 2 8 記載のプロセスであって、ここで前記ヌクレアーゼ活性が、3 - 5 エキソヌクレアーゼ活性を持つポリメラーゼによるものであることを特徴とするプロセス。

40

【請求項 3 3】

請求項 3 1 記載のプロセスであって、ここで前記エキソヌクレアーゼ活性が、追加されたエキソヌクレアーゼ酵素によるものであることを特徴とするプロセス。

【請求項 3 4】

請求項 2 8 記載のプロセスであって、ここで前記ヌクレアーゼ活性が、汚染ヌクレアーゼによるものであることを特徴とするプロセス。

【請求項 3 5】

請求項 2 8 記載のプロセスであって、ここで少なくとも 1 個の前記ヌクレオチドが、修飾ヌクレオチドであることを特徴とするプロセス。

50

【請求項 3 6】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで少なくとも 1 個の P 1 プライマーが固体支持材に付着されることを特徴とするプロセス。

【請求項 3 7】

請求項 3 6 記載のプロセスであって、ここで前記固体支持材がガラスまたはプラスチックで作られることを特徴とするプロセス。

【請求項 3 8】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記多重プライマーがエキソヌクレアーゼ活性に対して耐性を持つことを特徴とするプロセス。

【請求項 3 9】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記多重プライマーがエキソヌクレアーゼ活性に耐性であり、前記標的 DNA が高分子量線状 DNA であることを特徴とするプロセス。

【請求項 4 0】

請求項 3 8 記載のプロセスであって、ここで前記エキソヌクレアーゼ活性が、酵素により起こることを特徴とするプロセス。

【請求項 4 1】

請求項 3 8 記載のプロセスであって、ここで前記エキソヌクレアーゼ活性が 3' - 5' - エキソヌクレアーゼにより起こることを特徴とするプロセス。

【請求項 4 2】

請求項 3 8 記載のプロセスであって、ここで前記エキソヌクレアーゼ活性が、3' - 5' - エキソヌクレアーゼ活性を持つ DNA ポリメラーゼにより起こることを特徴とするプロセス。

【請求項 4 3】

請求項 3 8 記載のプロセスであって、ここで前記エキソヌクレアーゼ活性が汚染ヌクレアーゼにより起こることを特徴とするプロセス。

【請求項 4 4】

請求項 3 8 記載のプロセスであって、ここで前記各多重プライマーが、前記プライマーをエキソヌクレアーゼ活性に耐性にする少なくとも 1 個のヌクレオチドを含むことを特徴とするプロセス。

【請求項 4 5】

請求項 4 4 記載のプロセスであって、ここで前記少なくとも 1 個のヌクレオチドが、修飾ヌクレオチドであることを特徴とするプロセス。

【請求項 4 6】

請求項 4 5 記載のプロセスであって、ここで前記修飾ヌクレオチドが、3' 末端ヌクレオチドであることを特徴とするプロセス。

【請求項 4 7】

請求項 4 6 記載のプロセスであって、ここで前記修飾ヌクレオチドが、ホスホロチオエートヌクレオチドであることを特徴とするプロセス。

【請求項 4 8】

請求項 4 4 記載のプロセスであって、ここで前記各多重プライマーが、前記プライマーをエキソヌクレアーゼ活性に耐性にする少なくとも 2 個のヌクレオチドを含むことを特徴とするプロセス。

【請求項 4 9】

請求項 3 5 記載のプロセスであって、ここで前記少なくとも 1 個のヌクレオチドが、3' 末端位置以外に位置することを特徴とするプロセス。

【請求項 5 0】

請求項 4 9 記載のプロセスであって、ここで前記プライマーの前記 3' 末端ヌクレオチドが、3' - 5' - エキソヌクレアーゼ活性により除去できることを特徴とするプロセス。

【請求項 5 1】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで前記 DNA ポリメラーゼが、バクテリオファー

10

20

30

40

50

ジ 29 DNAポリメラーゼ、Tts DNAポリメラーゼ、ファージ M2 DNAポリメラーゼ、ファージ PRD1 DNAポリメラーゼ、VENT™ DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼIのクレノウ断片、T5 DNAポリメラーゼ、PRD1 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼホロ酵素、T7生ポリメラーゼおよびBstポリメラーゼより成るグループから選択される部材であることを特徴とするプロセス。

【請求項52】

請求項1記載のプロセスであって、ここで前記DNAポリメラーゼが、バクテリオファージジ29 DNAポリメラーゼであることを特徴とするプロセス。

【請求項53】

請求項1記載のプロセスであって、ここで前記DNAポリメラーゼが、バクテリオファージジ29 DNAポリメラーゼであり、また前記多重プライマーがエキソヌクレアーゼ活性に耐性であることを特徴とするプロセス。

10

【請求項54】

請求項1記載のプロセスであって、ここで前記DNAポリメラーゼが、バクテリオファージジ29 DNAポリメラーゼであり、ここで前記多重プライマーがエキソヌクレアーゼ活性に耐性であり、また前記標的DNAが高分子線状DNAであることを特徴とするプロセス。

【請求項55】

請求項1記載のプロセスであって、ここで前記DNAポリメラーゼが、3', 5'-エキソヌクレアーゼ活性を示さないことを特徴とするプロセス。

20

【請求項56】

請求項55記載のプロセスであって、ここで前記DNAポリメラーゼが、Taq、Tfl、およびTthポリメラーゼなどの3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を欠くDNAポリメラーゼ、真核DNAポリメラーゼアルファ、および29 DNAポリメラーゼのエキソ(-)バージョンなどの3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を排除するように修飾されたDNAポリメラーゼ、クレノウ断片、VentおよびPfu DNAポリメラーゼより成るグループから選択されることを特徴とするプロセス。

【請求項57】

請求項1記載のプロセスであって、ここで前記DNAポリメラーゼが逆転写酵素であることを特徴とするプロセス。

30

【請求項58】

請求項1記載のプロセスであって、ここで前記ATCがRNAであり、また前記DNAポリメラーゼが逆転写酵素であることを特徴とするプロセス。

【請求項59】

請求項1記載のプロセスであって、ここで線状DNA標的が前記ATCの代りに使用されることを特徴とするプロセス。

【請求項60】

請求項34乃至49いずれかに記載のプロセスであって、ここで線状DNA標的が、前記ATCの代りに使用されることを特徴とするプロセス。

【請求項61】

請求項53記載のプロセスであって、ここで前記DNAポリメラーゼが、29 DNAポリメラーゼであることを特徴とするプロセス。

40

【請求項62】

(a) 増幅標的サークル(ATC)が多重一本鎖非環状オリゴヌクレオチドプライマー(P1)の1個と結合してプライマーATCサンプル混合物を産生する条件の下で、多重一本鎖非環状オリゴヌクレオチドプライマー(P1)と1個またはそれ以上の増幅標的サークル(ATC)を混合し、

(b) P1プライマーの伸長により、前記増幅標的サークルの複製を促進して多重一次タンデム配列DNA(TS-DNA)産物を形成する条件の下で、DNAポリメラーゼと多重デオキシヌクレオシド三リン酸を加える、

50

ことを含む、核酸配列を選択的に増幅するプロセスであって、前記増幅標的サークルは培養物から直接誘導され、かつ前記増幅標的サークルは培養物に存在するゲノムDNAよりも優先的に増幅されることを特徴とするプロセス。

【請求項 6 3】

請求項 1 記載のプロセスであって、ここで少なくとも 1 個のデオキシリボヌクレオシド三リン酸が、容易に検出可能な成分を含むことを特徴とするプロセス。

【請求項 6 4】

請求項 6 3 記載のプロセスであって、ここで検出可能な成分が、蛍光標識であることを特徴とするプロセス。

【請求項 6 5】

ヌクレアーゼ耐性ランダムプライマー、DNA ポリメラーゼおよび 1 個またはそれ以上のデオキシリボヌクレオシド三リン酸を含む、DNA 配列を増幅するためのキットであって、請求項 1 から 6 4 のいずれか 1 項に記載のプロセスに用いるためのキット。

10

【請求項 6 6】

請求項 6 5 記載のキットであって、ここで前記 DNA ポリメラーゼが、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を持つことを特徴とするキット。

【請求項 6 7】

請求項 6 5 記載のキットであって、ここで前記 DNA ポリメラーゼが 2' 9' DNA ポリメラーゼであることを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】

20

【0001】

【発明の属する技術分野】

本出願は、2000年6月28日に受理された合衆国暫定特許出願番号第09/605,192号の優先権を主張し、その開示は全体としてここに組み込まれている。

【0002】

本発明は、従来のローリングサークル法を上回る量の有利性を持つ増幅産物の改良された収量の向上を提供するように、ローリングサークル増幅で多重複製フォークを確立するためのプロセスに関する。

【0003】

【発明の背景】

30

標的DNA分子を増幅する手段は、このような増幅DNAが、続くDNA配列決定、クローニング、マッピング、遺伝子型化、プローブの生成、および診断による同定を含む方法にしばしば利用されることが多いために価値がある。

【0004】

これまでの所、核酸の増幅を可能にするいくつかの有用な方法が開発されてきた。その大部分は選択されたDNA標的およびまたはプローブの増幅の周辺で設計されたものであり、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、自給配列複製(3SR)、核酸配列ベースの増幅(NASBA)、鎖置換増幅(SDA)、およびQレプリカーゼでの増幅などが含まれている(バーケンマイヤーおよびマシャヴァール, ウイルス学方法ジャーナル, 35巻: 117-126ページ(1991年); ランディグレン, トレンズ・ジェネティクス, 9巻: 199-202ページ(1993年))。

40

【0005】

加えて、M13などのバクテリオファージからのプラスミドまたはDNAなどの環状DNA分子を増幅するいくつかの方法が使用されてきた。その一つは、大腸菌の適切な宿主菌株でのこれら分子の増殖であり、それに続く十分立証されたプロトコルによるDNAの分解であった。(サムブルック, J., フリッツ, E. F., マニエイタス, T., 分子クローニング, ラボラトリーマニュアル, 1989年, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス, コールド・スプリング・ハーバー ニューヨーク)。またPCRは、M13などのバクテリオファージからのプラスミドおよびDNAなどのようなDNA標的において、決まった配列を増幅するためにしばしば使用された方法であった。(PC

50

Rプロトコルズ, 1990年, M. A. イニス, D. H. ゲルファンド, J. J. スニンスキー編, アカデミック・プレス, サンディエゴ)。これらの方法のいくつかは、労力を要し、費用が高く、時間がかかり、効率が悪く、また感受性を欠いていることで難点がある。

【0006】

これらの方法を改良したのものとして、線型ローリングサークル増幅(LRCA)は、環状標的DNA分子にアニーリングされたプライマーを使用し、DNAポリメラーゼが付加される。増幅標的サークル(ATC)は新しいDNAが作られる鋳型を形成し、それによりサークルに相補の反復配列の連続配列としてプライマー配列を伸長するが、時間当たり約数千コピー(複製)を生成するにすぎない。LRCAに対する改良は、増幅の新しいセンターを提供するために複製相補配列に対してアニーリングする付加プライマーと共に指数RCA(ERCA)を使用することであり、これにより指数反応速度と増加増幅を提供する。指数ローリングサークル増幅(ERCA)は鎖置換反応のカスケードを採用し、HRCAとしても引用される(ライザーディ, P. M. 他, ネイチャー・ジェネティクス, (1998年)19巻, 225-231ページ)しかしERCAは、プライマーP1の特異的DNA配列を知る必要があるために、また環状DNA標的分子が一本鎖DNAサークルになる必要性のために、環状DNA標的分子にアニーリングされた単なる単一プライマーP1の使用に限定される。

10

【0007】

本発明の方法(ここで多重プライムドロリングサークル増幅、すなわちMPRCAとして引用されるもの)は、個別標的サークルの増幅のために多重プライマーを使用することにより、線状ローリングサークル増幅の感受性に改良を与える方法を採用して前記のこのような不利益を避ける。本発明は各環状標的DNA分子から、多重タンデム配列DNA(TS-DNA)複製を生成するという利点を持つ。加えてMPRCAは、ある実施例において、環状標的DNA分子の配列が未知であり、一方環状標的DNA分子は一本鎖(ssDNA)または二本鎖(dsDNAまたは複式DNA)であってもよいという利点を持つ。本発明のある実施例のも一つの利点は、一本鎖または二本鎖環状標的DNA分子の増幅が、等温線上およびまたは大気温度で行われるということである。また他の利点は、ローリングサークルの増幅の新しい適用で高度に有用である低コスト、標的サークルの低い濃度での感受性、柔軟性、とりわけ検出試薬の使用の際の柔軟性、および低い汚染へのリスクなどの利点を持つ。

20

30

【0008】

本発明のある実施例では、反応で存在するエキソヌクレアーゼ活性による分解に耐性である多重プライマーを用いて、増幅産物DNAの収量を改良するための手順が採用されている。これはエキソヌクレアーゼ活性を含み、また長い培養期間にわたり行われる反応にプライマーが持続できるようにする利点を持つ。このプライマーの持続性は、新しいプライミング事象が反応の全培養時間に起こることを可能にし、それはERCAの特質の一つであり、また増幅DNAの収量の増加をもたらすという利点を有する。

【0009】

本発明の方法は、初めて「試験管内クローニング」すなわちサークルで囲まれる既知または未知の標的DNAの本体内にクローニングする必要なしで行うことを初めて可能にする。[標的DNAの周辺を含み、それに連結されて標的DNAに付着する]パドロックプローブを、ギャップ充填法により標的配列をサークル内に複製するために使用することができる(ライザーディ, P. M. 他, ネイチャー・ジェネティクス, 19巻, 225-231ページ(1998年))。選択肢として、標的配列は他の多くの一般に使用される方法で、環状ssDNAまたはdsDNA内に複製または挿入することができる。RCA増幅は、生体でクローニングによるDNAの増幅収量を生成する必要性を克服する。

40

【0010】

予見される一つの応用は、ゲノムまたは他の複合体DNAから既知の配列を標的として捕捉することである。第2の応用は、全ゲノム増幅法で生成されるサークルのRCAであ

50

る。全ゲノム増幅は、ゲノムcDNAまたは他の複合体DNAのサブユニットのランダムプライミングまたは特異的プライミングされた生成を伴う。従来の技術に基づく方法は、全ゲノム増幅の産物を環状化するのに使用できる。パドロックも環状標的を生成することができた。これらのサークルは、次いで本発明の標的増幅の基質を構成する。全ゲノム増幅の環状産物を生成する手段には拘らず、本発明のランダムプライミングRCAは、配列が何かを知る必要なくて線状DNAの背景にわたりサークルの選択的増幅を可能にするであろう。同様に、環状DNAは、多重プライマーRCAに特異的なプライマー配列の使用を可能にするであろう。

【0011】

本発明の方法は、合成と産出の割合の増加を可能にするLRCAに勝る改良法である。これは、DNAポリメラーゼ伸長のための多重プライマー部位から生じる。ランダムプライマーRCAもまた、二本鎖産物を生成するという利点を持つ。これは環状鋳型の複製により生成される線状ssDNA産物が、それ自身DNA合成のランダムプライミングにより、複式形態に転換されるであろうということのためである。二本鎖DNA産物は、いずれかの鎖の配列決定を可能にすることで有利であり、および制限エンドヌクレアーゼ消化とクローニング、標識化、および検出に使用される他の方法を可能とするということでも同じく有利である。

【0012】

鎖置換DNA合成がランダムプライミングRCAの間に生じ指数増幅となり得ることも期待される。これは従来のERCAを上まわる改良であり、またHRCAと名付けられ(ライザーディ他(1998年))、サークル内に封入された非常に大きな標的を指数的に増幅する能力を持つことになる。細菌人工染色体(BACs)を含む大型環状DNAの増幅は、本発明で実行に移されるように減少されている。実際に従来のERCAは、長さ200ヌクレオチド以下の小さいサークルの使用に限定されていた。

【0013】

縮重プライマー(チェン, V. G. およびネルソン, S. F., 全米科学アカデミー紀要, 93巻, 14676-14679ページ(1996年))、およびゲノムDNAなどの標的の複合混合物のサブセットが増幅するランダムプライマー(ザング, L. 他, 全米科学アカデミー紀要, 89巻, 5847-5851ページ(1992年))を用いる全ゲノム増幅に関する方法が開示された。複雑性の減少がこれらの方法の目的の一つである。本発明の方法の更なる利点は、RCA反応として、それがDNA標的の「サブセットティング」(部分集合)、すなわちDNA標的の複雑性を減少させる必要なしに環状DNA標的分子を選択的に増幅することである。

【0014】

【発明の説明】

本発明は、特異的プライマーまたはランダムプライマーを使用する環状DNA標的の増幅を高めるプロセスに関する。それは単一プライミング鋳型環状DNA分子で線状ローリングサークル増幅の感受性を改良する。一つの特異的实施例において、本発明のこの見地は、RCAからの増幅産物の収量を増加するために、環状標的DNA分子にアニーリングされた(特異的またはランダム、エキソヌクレアーゼ-感受性、またはエキソヌクレアーゼ耐性の)多重プライマーを採用する。多重プライマーはサークルの多重位置にアニーリングし、ポリメラーゼによる伸長した産物はそれぞれの位置から開始される。このように、多重伸長は、単一増幅標的サークルから同時に達成される。

【0015】

前記の方法の別の実施例では、多重プライマーの使用は、いくつか異なる方法で行われる。それはサークル上の異なる配列にアニーリングする2個またはそれ以上の特異的なプライマーの使用により、またはサークル上の2個またはそれ以上の別の位置で反復される配列に1個の与えられたプライマーアニーリングを持つことにより、あるいはサークル上の多くの位置でアニーリングできるランダムプライマーもしくは縮重プライマーを使用することにより達成される。縮重物は、1個またはそれ以上のヌクレオチドの位置が1個以上

10

20

30

40

50

の塩基、すなわち決められた長さのオリゴヌクレオチドの混合物により占められ、混合物の個々の部材の1個またはそれ以上の位置がその位置での一つの可能性以上の間から無作為に選択される塩基により占められていることを引用する。このようなオリゴヌクレオチドの集まりは、標準オリゴヌクレオチド合成器具およびソフトウェアを用いて容易に合成される。ランダムは、それぞれのヌクレオチドの位置が、完全なセットの可能性の間から無作為に選択されるが、一般には4個のヌクレオチド、すなわちdAMP、dCMP、dGMP、またはdTMPに一般に限定されることを意味する。

【0016】

ある実施例では、プライマーが酵素分解に耐性のプライマーを作るのに役立つ修飾ヌクレオチドのすべての型を含むヌクレオチドを含有する。酵素の分解は、DNAポリメラーゼと会合する3 - 5 エキソヌクレアーゼ活性などのような特異的なエキソヌクレアーゼにより、または非特異的な汚染エキソヌクレアーゼにより起こることがある。

10

【0017】**【発明の更なる説明】**

本発明は、DNA合成を大きく増幅し、そこに含まれる特異的な核酸配列の検出のために大幅に増加した信号増幅を提供する手段として、環状DNA鋳型を用いる核酸配列増幅における多重プライマーの使用に関し、ここで特異的な核酸配列は、例えば標的DNAに含まれ、そこでこのような標的は一本鎖または二本鎖環状DNAの形態にあり、あるいはこのような環状DNAの部分である、従来の方がしばしばかなり複雑な標的を採用している一方、本発明は、単純プラスミド標的などのような比較的単純な標的を利用する。本発明で有用な標的DNAは、更に高分子量線状DNAをも含む。

20

【0018】

加えて他の方法は、増幅材料のより複雑でないセットのものを生成するために、事実上複合体の標的DNA分子（例えば、そのサンプル内での存在が検出され、またはその配列が続く方法あるいは手順での使用などのために増幅され、もしくはそのサンプル内での存在が、その配列が増幅される1個またはそれ以上の他の核酸の同定を決定するDNAまたはRNAのいずれかを含む核酸など）のランダムサブセットを増幅するように試みられてきたのに対して、本発明は、複雑性または他のサブセットを減少させるための努力なしでの単一標的の増幅に関する。従ってそれは、例えばコロニーまたはブランクから抽出されるDNAにおいて、線状DNA分子全体で環状標的の望ましい増幅という利点を取る。

30

【0019】

一つの見地において、本発明は核酸配列を選択的に増幅する一つのプロセスに関し、増幅標的サークル(ATCs)が1個以上の多重一本鎖非環状オリゴヌクレオチドプライマー(P1)と結合し、またはその条件が多重タンデム配列DNA(TS-DNA)産物を形成するためにP1プライマーの伸長により前記増幅標的サークルの複製を促進する条件下で、P1、1個またはそれ以上の前記増幅標的サークル(ATCs)、DNAポリメラーゼおよび多重デオキシヌクレオチド三リン酸より成る混合物を含むことより成る。

【0020】

かくして、一つの実施例では、キットの形態などのようなあらかじめ混合されたものを提供することができ、これは1個以上のポリメラーゼをさえ含むポリメラーゼ、ヘキサマーなどの保護オリゴヌクレオチドプライマー、必要とされるヌクレオチド三リン酸、適当な緩衝液、ピロホスファターゼ、および他の潜在的に望ましい成分を、各成分毎に別の小びんで、または異なる組合せで一緒に混合して、1個、2個、3個またはもっと別の小びんの全体を形成し、また例えば増幅プロセスで使用するための意図された標的核酸を懸濁するブランクまたは緩衝液小びんなどを含む。本発明の一つの実施例は、DNA配列を増幅するためのキットより成り、ヌクレアーゼ耐性ランダムプライマー、DNAポリメラーゼおよび1個またはそれ以上のデオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTPs)を含み、このdNTPsは蛍光成分または放射能標識などで標識される。別の実施例では、前記DNAポリメラーゼは3 - 5 エキソヌクレアーゼ活性を持つ。望ましい実施例では、前記DNAポリメラーゼは29 DNAポリメラーゼである。このようなキットは、更に

40

50

本発明のプロセスを実行するために、文書で、またはコンピュータディスクットあるいはCDROMでの一連の使用説明書を含んでいる。

【0021】

このような実施例の特異的な応用として、一つのプロセスが提供され、これによりサークルの形態にあるDNAなどのような核酸のサンプルがTE緩衝液などのような緩衝液に懸濁され、次いで加熱、冷却され、次いで前に列挙された成分と連続して接触され、または順次調節された温度、pHその他の条件で、例えばそのような組合せで30を維持して前記前もって混合されたものにこのような成分を加えることで接触される。

【0022】

加えて、本発明に基づき開示されたプロセスを実施する際に使用される条件は、いずれか
10
与えられた適用の間に変化する。かくして限定されない実施例により、ポリメラーゼまたは複数のポリメラーゼの基質として作用するプライマー-A TC複合体の変性を起こすことなく、増幅を促進する異なる条件の下でハイブリッド形成を促進し、DNAポリメラーゼとヌクレオシド三リン酸が加えられる条件の下でプライマーとATCsが加えられる。

【0023】

も一つの実施例では、本発明は核酸配列を選択的に増幅する一つのプロセスに関し、それは

(a) 多重一本鎖非環状オリゴヌクレオチドプライマーと、1個またはそれ以上の増幅標
20
的サークル(ATC)とを、前記ATCが1個以上の前記多重P1プライマーとハイブリッドを形成し、プライマー-A TCサンプル混合物を産生する条件下で混合し、

(b) DNAポリメラーゼと多重デオキシヌクレオシド三リン酸を、P1プライマーの伸
長により前記増幅標的サークルの複製を促進し、多重一次タンデム配列DNA(TS-DNA)を形成する条件下で加える、

ことより成る。

【0024】

本発明の手順を実施する際に、成分を加えることのできる数多くの順序があり、前記追加
の配列は限定することを意図するものではなくて、通常の技術を有するものが、議論の提
示される特定の前後関係において、興味がありまたは価値があると認識するであろうすべ
ての追加の組合せを含むように読み取られるべきであることは理解されねばならない。例
えば、すべての成分は、ワンステッププロトコルで同時に加えることができ、あるいはD
30
NAポリメラーゼは、DNA標的への追加の前に、エキソヌクレアーゼ耐性プライマーと
混合することもできる。

【0025】

要約すると、前記方法のステップは、ここで列挙されたいずれの順序でも実施することが
できるが、望ましければ、有利であれば、または別途便利であるならば、本発明の目的と
利点が達成される限りにおいて、どのような適切な順序でも実施されるであろう。かくし
て例えば、前に列挙したプロセスは、既に前記DNAポリメラーゼを含有する培地で、前
記プライマーとATCsを混合することで実行され得るものである。

【0026】

一つの実施例では、本発明は、ATCが少なくとも3、4、5、更に10個またはそれ以上
40
のプライマーオリゴヌクレオチドと結合し、またはハイブリッド形成し、前記各プライ
マーが適切な条件下で別のタンデム配列DNA分子を産生するような、ここで記載される
プロセスに関する。もち論、タンデム配列DNAs(TS-DNAs)の配列が、鋳型とし
て働くATCsの配列に相補であるために、もしATCsすべてがプライマーの配列に
拘らず同じ配列を持つならば、TS-DNA産物はすべて同じ配列を持つであろう。

【0027】

各増幅標的サークル(ATC)に対して多重(ここでは3個)プライマーを用いて、本発
明の一つのサンプル実施例が図1で示される。増幅標的サークルの別のセグメントに相補
の領域を持つ(それぞれ長さで約20-50塩基でAで示されている)オリゴヌクレオチ
ドプライマーは、(Bで示される)増幅標的サークルに特異的にハイブリッド形成する。
50

CはBのハイブリッド形成された構造にdNTPs、DNAポリメラーゼ、その他を追加した結果を示し、これにより、各プライマーの3'末端は伸長される。各産物の伸長が続く、DNAポリメラーゼは、隣接する酵素により合成されたDNAを置換する。オリゴヌクレオチドプライマーは、前記プライマーの5'末端でヌクレオチドの領域または配列を任意に含有し、もしヌクレオチドの非相補領域または配列が、鎖置換DNA合成を実行するためのDNAポリメラーゼが能力を増大するのに有用であると見做されるならば、このヌクレオチドの領域または配列は、ATCに対して非相補である。ここで示される特異的実施例では、1個のATCは、同じ増幅標的サークル鋳型で3ラウンドの線状複製を達成するために、3個のプライマーと3個の酵素分子と相互作用する。

【0028】

別の実施例では、本発明の方法で使用されるオリゴヌクレオチド(P1)プライマーは、特異的またはランダムいずれかであり、後者がとりわけ有用である。ここで使用されるように、「特異的」という用語は、ワトソン-クリックの語義で、増幅標的サークル(ATC)に存在する配列に相補であり、またオリゴヌクレオチドプライマー内の前記相補配列が前記プライマーの3'末端を含む場合には、とりわけATCに対するプライマーのハイブリッド形成を促進するのに役立つヌクレオチド配列を持ち、または持つように操作されるプライマーを引用する。このような特異的な配列は、その5'末端に、ATC鋳型のいずれの部分にも相補でない配列を含み、ATC鋳型の非相補部分は、増幅のラウンドを続けている間に、TS-DNAの置換を促進するのに役立つ。このような特異的プライマーが利用される場合には、一定のATCと結合するプライマーの数は、一般に前記ATC

【0029】

望ましい実施例では、増幅に使用されるプライマーは、ランダム配列を持つであろう。ここで使用されるように、「ランダム」という用語は、前記オリゴヌクレオチドプライマー(P1)が、増幅の鋳型として働く増幅標的サークル(ATC)のヌクレオチド配列に無関係のヌクレオチド配列を持つことを意味する。このようなランダム関係の結果は、前記ランダムプライマーがハイブリッド化するATCの位置が、同じようにランダムであるであろうということである。加えてプライマーがランダム配列を持つために、与えられたプライマーが、ATCに不完全にハイブリッド化したATCの対応するヌクレオチドに相補的でない1個またはそれ以上のヌクレオチドを持つ場合には、実例が起こるであろう。このような発生が、本発明の広がりからこのようなプライマーの使用を除去するのに決して役立たないことは認識されるべきである。例えば、このような発生は、ATCにDNA合成を開始する際に、ランダムプライマーの効率を減少させることはありそうもないことである。

【0030】

本発明のプロセスに有用なオリゴヌクレオチドプライマーは、いずれか望ましい長さのものにすることができる。例えばこのようなプライマーは、望ましくは少なくとも2個のヌクレオチドから、約30乃至50ヌクレオチドの長さのものであり、もっとも望ましくは約5乃至約10ヌクレオチドの長さのものであり、ヘキサマー(六量体)およびオクタマー(八量体)のものが特に望ましい実施例である。ここで使用されるこのような多重プライマーは、特異的のみ、またはランダムのみ、もしくはその両方の混合物であり、ランダムプライマーが形態と使用の面でとりわけ有用であり、また便利である。

【0031】

図1で示された実施例は特異的プライマー(ここでは数字で3であるがいずれの数でも十分である)の使用を示すけれども、前記プライマーは容易にランダムにすることができ、より高次の数にすることができる。かくしてATCと結合される各プライマーは、それがATCの周りでDNAポリメラーゼにより伸長されるにつれて複製フォークを産生する。ATCが大きければ、それだけ形成されると期待される増幅フォークが形成される。本発明に従って、一般にはATC鋳型の約10毎乃至約1000ヌクレオチド毎に増幅フォークが存在し、約50乃至約100毎での増幅フォークも確かに一般的であり、本発明の範

10

20

30

40

50

囲では約10ヌクレオチド毎前後でも意外なことではない。

【0032】

本発明のオリゴヌクレオチドは、ATCの部分に相補であるセグメントを持ち、また図1で示される限定されない実施例は、このような3個のプライマーの使用を単に示すに過ぎず、それらすべては同じ長さのように見える。しかし既に述べたように、本発明は与えられたATCに結合するこのようなプライマーの数、あるいはこのようなプライマーの長さ、またはその配列を限定するものではなく、容易に異なる長さのものをまたは図で示されるようにすべて同じ長さのものを同じ実験で使用することができる。

【0033】

本発明のプロセスで有用である増幅標的サークル(ATCs)は、一般に40乃至10,000ヌクレオチドの間で含むDNAまたはRNAハイブリッド分子を含む一本鎖または二本鎖の環状DNAまたはRNA分子である。しかしATCのサイズに上限はないであろうことが予期される。ATCが複式サークルである場合には、このような数は、個々のヌクレオチド残基よりも、むしろ塩基対として引用されることを意図している。ここで開示されたプロセスで有用であるATCは、異なる目的のために、とりわけそれらを有用なものにする機能的に異なる部分またはセグメントを持つこともできる。少なくとも2個のこのような部分は、1個またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーに相補であり、また存在する場合には、プライマー相補部分または部位として引用される。本発明で有用である増幅標的サークルは、細菌コロニー、バクテリオファージ、ウイルスブランク、酵母コロニー、バキュロウイルスコロニー、同じく遷移性形質移入真核細胞から直接誘導されるものを含む。このような源は、ATCsを獲得する前に溶解されることもあり、またそうでないこともある。このような源が溶解された場合には、このような溶解は、溶解剤が熱、酵素を含む数多くの手段で達成され、その酵素は必ずしもそれに限定されないが、リゾチーム、ヘリカーゼ、グルシラーゼ、およびザイモリアーゼを含み、あるいは溶解剤は有機溶媒であってもよい。

【0034】

本発明の増幅標的サークル(ATCs)は、ここで開示された方法により増幅される標的配列を含み、またここでの開示に従って、P1とATCの指名はRCAの最初のラウンドを引用することを意味し、更にP1プライマーのための適切な配列の使用により、P2プライマーと指名されたオリゴヌクレオチドプライマーの次の混合物の追加により、DNA増幅のこのような追加のラウンドの使用にた易く伸長でき、ここでP2プライマーはP1プライマーと殆んど同じ性質を持つが、タンデム配列DNA産物(それ自身出発ATCに相補であるもの)の1個またはそれ以上に相補であるものである。もち論増幅のこのような更なるラウンドは、本発明のプロセスを用いるのに利用できる単なる一つの選択肢ではあるが、このような追加のラウンドの設計と実行は、分子生物学の技術を持つ人の通常の知識内に十分あり、ここではこれ以上記載することはしない。

【0035】

MPRCAでは、増幅は各プライマーで起こり、これにより各プライマーで複製される一次ATC(またはATC)に相補であるセグメントのタンデム反復(すなわちTS-DNA)のコンカテマーを形成する。かくしてランダムプライマーが使用される場合には、多くのこのようなTS-DNAsが、対応するATC配列の増幅が大幅に増加するように、各プライマーから1個形成され、何故なら産物のヌクレオチド配列、または構造は、鋳型として使用されるATCの配列のみに依存し、オリゴヌクレオチドプライマーがランダムまたは特異的もしくはその両方の混合物であろうとも、オリゴヌクレオチドプライマーの配列には依存しない。

【0036】

これまでの技術はランダム配列を利用してきたが(例えばライザーディ他、合衆国特許第5,854,033号参照のこと)、これらは全ゲノムまたは線状配列の増幅に使用され、本発明の一本鎖または複式サークルの増幅に使用されたものではなかった。

【0037】

10

20

30

40

50

本発明は、現存する方法を上まわる改良（チェン，V．g．及びネルソン，S．F．，全米科学アカデミー紀要93巻，14676 - 14679ページ（1996年））およびこの反応の望ましい酵素として 29 DNAのここで提案された使用で、線状DNA標的の増幅にランダムまたは多重プライマーを使用するランダムプライマー（ザン，L．他，全米化学アカデミー紀要，89巻，5847 - 5851ページ（1992年））、およびエキソヌクレアーゼ耐性プライマー（下記参照）を提供する。従って本発明は、29 DNAポリメラーゼの特徴の利点を得る高分子量線状DNA標的の増幅のための方法、および 29 DNAポリメラーゼと会合する3 - 5 エンドヌクレアーゼ活性と両立するエキソヌクレアーゼ耐性ポリマーを含み、ここで前記線状DNA標的はATCに代って使用される。

10

【0038】

前に記載したように、本発明に従って開示された増幅のための鑄型として利用される増幅標的サークルは、一本鎖DNAサークルまたは複式（二本鎖）DNAサークルである。前記ATCsが複式である場合には、前記複式の少なくとも一本鎖がニックを含有することが望ましい。このようなニックは一般に複式サークルで存在するが、それらは更にそこに存在していなくても、従来の技術で公知の酵素法などによりこのようなサークルに導入される。選択肢としては、複式サークルの一つの鎖でのニックの存在は、望ましくもなくまた必要でもない。複式DNAサークルの2個の鎖は、MPRCAに必要な多重プライマーのハイブリッド形成を可能にする当業者に公知の手順により、ニックの不在下で変性され十分に巻きがとれるであろう。

20

【0039】

複式サークルが採用される場合には、増幅は一般に鑄型として両方の鎖から起こるのである。両鎖の同時の増幅は望ましくまた望ましくないこともある。複式サークルが更に前記サークルのDNAを配列決定するように設計された反応で使用されるものとする、両鎖の増幅は望ましい特徴のものとなり、そのため複式サークルは（必要な場合ニックの形成の場合を除き）更なる処置なしで直接使用することができる。しかし他の用途として、両鎖の同時の増幅が望ましい特徴ではない場合には、それは本発明のプロセスによる増幅に役立ち、鎖を変性し分離するため、あるいは選択肢として、複式環状鑄型の2個の鎖の1個のみに相補である配列を含む多重特異的プライマーを採用するために、当業者の技術の範囲内に十分にある。もち論他の有用な戦略も直ちに当業者に起こるのである。ここで更に詳細に記載する必要はない。

30

【0040】

増幅サークルのサイズで、構造が一本鎖か複式であるか、また使用されるDNAポリメラーゼに依存して、MPRCAは（採用される特定のプライマーおよび標的配列のためにしばしば臨時に決定される）サークル数、DNAポリメラーゼ、dNTPsおよびMg²⁺を最適化できるきわめて高い度合の増幅（および感受性）を達成する。

【0041】

ある状況では、起こり得る増幅の範囲、およびまたは形成されるTS-DNAの量を計量的に決定し、あるいはある状況においては、出発混合物のATCsが、構造的におよびまたはサイズの上からも均一でない場合に形成される増幅標的サークルの相対量を弁別する様式で測定できることが望ましい。このような場合には、本発明は、その計量測定がよりた易く行えるように、特殊なデオキシリボヌクレオシド三リン酸（dNTPs）が使用される場合などのようなかなり多数の標準検出計画で十分に機能する。もっとも一般的な例は、このようなヌクレオチド基質が放射能標識されるか、あるいは蛍光標識その他などの標識の他の型のものでそこに付着される場合である。改めてこのような状況で使用され得る方法は多くあり、それに伴う技術は標準のものであり、当業者にとっては公知である。かくしてこのような検出標識は、直接または間接的に、増幅核酸と関連であるいずれかの分子を含み、直接または間接的に、測定可能でまた検出可能な信号を生じるものである。核酸内にとり込まれ、あるいは核酸プローブと結合する多くのこのような標識は、当業者に公知である。その一般的な例としては、放射性同位元素、蛍光分子、燐光分子、酵素

40

50

、抗体、およびリガンドが含まれる。

【0042】

蛍光標識の例は、Cy Dyes、例えばCy 2, Cy 3, Cy 3.5, Cy 5、およびCy 5.5を含み、エイマシャム・ファルマシア・バイオテックから利用できる（合衆国特許番号第5,268,486号）。適切な蛍光標識の更なる例はフルオレセイン, 5,6-カルボキシメチルフルオレセイン, テキサスレッド, ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール-4-イル(NBD), クマリン, ダンシルクロリド、およびローダミンを含む。望ましい蛍光標識はフルオレセイン(5-カルボキシフルオレセイン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)およびローダミン(5,6-テトラメチルローダミン)である。これらのものは、モレキュラー・プローブス, ユージーン, オレゴンおよび-リサーチ・オーガニクス, クリーブランド, オハイオを含む各種の商業源から得ることができる。

10

【0043】

標識ヌクレオチドは、検出標識の望ましい形態であり、何故なら、それらは合成期間中にRCAの産物に直接取り込むことができるからである。増幅標識に取り込むことのできる検出標識の例は、ヌクレオチド類似体、例えばBrdUrd(ホイおよびシムケ, 突然変異研究, 290巻: 217-230ページ(1993年)), BrUTP(ワンジック他, 細胞生物学ジャーナル, 122巻: 283-293ページ(1993年))およびピオチン修飾ヌクレオチド(ランガー他, 全米科学アカデミー紀要, 78巻: 6633ページ(1981年))またはジゴキシゲニンなどの適切なハプテンで修飾されたヌクレオチド(カークホフ, 分析生化学, 205巻: 359-364ページ(1992年))を含む。適切な蛍光標識ヌクレオチドは、フルオレセイン-イソシアネート-dUTP, シアニン-3-dUTPおよびシアニン-5-dUTPである(ユ-他, 核酸研究22巻: 3226-3232ページ(1994年))である。DNAの望ましいヌクレオチド類似体検出標識は、BrdUrd(BUDR三リン酸, シグマ)であり、また望ましいヌクレオチド類似体検出標識は、ピオチン-16-ウリジン-5-三リン酸(ピオチン-16-dUTP ベーリンガー・マンハイム)である。放射能標識は、ここで開示された増幅方法にとりわけ有用である。かくして、このようなdNTPsは、ここで記載された蛍光標識などのような容易に検出可能な成分を取り込むことも可能である。

20

【0044】

本発明は、各種の方法で信号増幅を達成する手段を提供する。この場合の目標は、標的の検出と特徴付けを可能にする信号を増幅することである。DNAが、標識プローブのアニーリングにより、または標識ヌクレオチドの取り込みにより、あるいは合成後のDNA産物の標識化により、例えば検出可能分子の共有結合修飾またはインターカレーションにより検出される場合を含み、またそれに限定されない方法において、本発明は、DNA産物を増幅し、またそれにより信号強度を増幅する方法を提供する。

30

【0045】

本発明の方法は、多重プライミング事象が増幅の標的である環状DNA分子に誘導される故で、大幅に増加した増幅を提供する。かくして、増幅の速度と範囲は、DNAサークルを複製する単一DNAポリメラーゼにより達成されたものに限定されない。その代わりに多重DNAポリメラーゼは、各鋳型サークルを同時に複製するために誘導され、そのそれぞれはプライマーの一つから開始する。これは本発明のユニークな長を提供する特性である。

40

【0046】

本発明の方法の一つの実施例では、完全にランダムなプライマーが増幅プロセス、特に望ましいプロセスに使用され、何故なら鋳型を提供するATCの配列が公知ではないからである。かくしていずれかの一本鎖または複式DNAサークルが、ここで開示された方法に基づいて、広範囲の精製ありまたはなしで容易に使用することができる。かくしてランダムプライマーを使用する主要な利点は、既知または未知の配列の環状DNA標的が、線状および環状DNA分子の両方の混合物を含むDNA分子の複合混合物の間から、優先して

50

また選択的に増幅されるということである。

【0047】

特異的な実施例が実施例1で記載されており、ここでサークルの周りの9個の異なる部位でアニーリングされた9個の異なるオリゴヌクレオチドプライマーを持つバクテリオファージ、M13 DNAは、6個またはそれより少ないプライマーを持つM13 DNAよりもより大きな増幅を提供する。更に6個の異なるプライマーを持つM13 DNAは、3個またはそれより少ないプライマーを持つM13 DNAよりも大きな増幅を提供する。最後に、3個のプライマーを持つM13 DNAは、T度1個のプライマーを持つM13よりも大きな増幅を提供する。

【0048】

も一つ特異的な実施例が実施例2で記載されており、ここでサークルの周りでアニーリングされたランダムオリゴヌクレオチドプライマーを持つM13 DNAは、T度1個のプライマーを持つM13で見られるものよりもより大きな増幅を提供する。

【0049】

も一つの特異的な実施例が実施例3で記載されており、ここで未精製コロニー抽出物は、環状プラスミドDNA標的の源であり、また未精製プラーク抽出物は、環状バクテリオファージM13 DNA標的の源である。これらの環状標的は、本発明の方法を用いて存在する細菌DNAよりも優先的に増幅される。

【0050】

も一つの特異的な実施例が実施例5に記載されており、ここでサークルの周りでアニーリングされた、エキソヌクレアーゼ耐性ランダムプライマーを持つM13 DNAは、エキソヌクレアーゼ感受性ランダムプライマーを持つM13で見られるものよりもより大きい増幅を提供する。これは、実施例4で提示された結果と一致しており、ここでは、そのような特別なエキソヌクレアーゼ耐性ヌクレオチドを欠いているランダムプライマーが、しばしば容易に分解し、特にエキソヌクレアーゼ活性を持つ酵素が、高水準で存在する場合には、とりわけ容易に分解する。

【0051】

も一つの特異的な実施例が実施例6で記載されており、ここでM13 DNAの0.01 ngの投入から増幅された鋳型DNAを用いるDNA配列が、非増幅DNA鋳型200 ngから達成された信号に類似した信号強度に帰着したことが示される。

【0052】

も一つの特異的な実施例が実施例7に記載されており、ここで未精製コロニー抽出物は、環状BAC DNA標的の源であり、またこれらBAC標的は、本発明の方法を用いて存在する細菌DNA以上に優先的に増幅されることが示される。

【0053】

も一つの特異的な実施例が実施例8に記載されており、ここで未修飾ランダムヘキサマーに代えてエキソヌクレアーゼ耐性ランダムヘキサマーを使用するヒトゲノムDNAが、少なくとも200倍の収量を改善できることが示される。

【0054】

ここで開示された方法に有用なエキソヌクレアーゼ耐性プライマーは、それらをエキソヌクレアーゼ消化に対して耐性にする修飾ヌクレオチドを含むことができる。例えばプライマーは、プライマーの3'末端でヌクレオチドの間で1, 2, 3または4個のホスホチオエート結合を含むこともある。

【0055】

かくしてある実施例においては、本発明は、以下のプロセスに関し、すなわちプライマーは、一般には酵素により、とりわけエキソヌクレアーゼにより、とりわけもっとも3' - 5' - エキソヌクレアーゼ活性により、プライマーを分解に対して耐性にする少なくとも1個のヌクレオチドを含むことを特徴とするプロセスに関する。このような実施例においては、少なくとも1個のヌクレオチドは、ホスホチオエートヌクレオチドであり、またはある修飾されたヌクレオチドである。このようなヌクレオチドは、一般に3'末端ヌク

10

20

30

40

50

レオチドであるが、本発明のプロセスは、更にそのようなヌクレオチドが3'末端位置以外に位置し、また前記ポリマーの3'末端ヌクレオチドが、3'-5'-エキソヌクレアーゼ活性により除去できる実施例に関する。

【0056】

A T C 鑄型を固体支持材に付着させる手段を提供することも、本発明の範囲内で有利である。これを達成するためには、増幅される固体支持材に単一オリゴヌクレオチドプライマーを付着させることだけでよい。かくして、本発明のプロセスを実施するに際して、一定のA T Cは多重プライマーに付着されるであろうけれども、その一つのみがある種の固体支持材にそれ自身をつなぎ留めることが必要とされる。このような拘束プライマーは二極性であり、従って2個の3'末端を持ち、これによりこのような末端が支持材にプライマーを付着させ、一方他の端部はサークルに付着できプライマーに増幅を提供するという点でしばしばこれは有利である。A T Cに付着される他の多重プライマーが、それ自身をいずれかの型の支持材に付着することが必要とされるものは何も存在しない。二極性拘束プライマーは、ここで開示されるプロセスに対して、障害なく特異的でありまたはランダムであり得る。このような二極性プライマーの例、およびその調製と用途については、文献で明らかである[例えば前掲ライザーディ他(1998年)の開示を参照されたい]。

10

【0057】

加えて、本発明のA T Cは、オリゴヌクレオチドプライマーがとりわけ便利で回りくどくないものではあるけれども、何らかの便利な手段によってある種の固体支持材に直接付着されるような形態で利用することができる。

20

【0058】

このような支持材へのA T Cまたはオリゴヌクレオチドプライマーの付着は、前記ポリマーまたはA T Cを固体支持材に付着させるのに役立つ、例えば生物系または他のもののある種のポリマーなどのある分子種の手段を通じて行うことができる。このような本発明の方法に有用な固体基質は、オリゴヌクレオチドと連結することのできるいずれかの固形物質を含むことができる。これはアクリルアミド、セルロース、ニトロセルロース、ガラス、ポリスチレン、酢酸ビニルポリエチレン、ポリプロピレン、ポリメタアクリレート、ポリエチレン、ポリエチレンオキシド、ガラス、ポリケイ酸塩、ポリカーボネート、テフロン(R)、フルオロカーボン、ナイロン、シリコンラバー、ポリ無水物、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリオルソエステル、フマル酸ポリプロピル、コラーゲン、ポリグリコサミド、グリカン、およびポリアミノ酸などの物質を含む固体基質は、薄層フィルムまたは薄膜、ビート、ボトル、皿、線維、織布、形成ポリマー、粒子および微粒子を含むいずれかの有用な形態を持つことができる。固体基質のための望ましい形態はガラススライドまたはマイクロフィルターである(例えば標準の96ウエル皿がそれである)。望ましい実施例は支持材としてガラスまたはプラスチックを利用する。更なる調製については、合衆国特許番号第5,854,033号を参照されたい。

30

【0059】

オリゴヌクレオチドを固体基質に固定する方法は十分確立されている。アドレスプローブと検出プローブを含むオリゴヌクレオチドは、確立されたカップリング法を用いて基質に結合できる。例えば適切な付着法は、ピース他、全米科学アカデミー紀要、91巻(11号):5022-5026ページ(1994年)に記載されている。オリゴヌクレオチドを固体基質に付着させる望ましい方法は、グオ他、核酸研究、22巻:5456-5465ページ(1994年)に記載されている。

40

【0060】

本発明に有用なオリゴヌクレオチドとA T C sは、確立されたオリゴヌクレオチド合成法を用いて合成することができる。オリゴヌクレオチドを合成する方法は、従来技術で公知である。このような方法は、標準の酵素消化法からヌクレオチド断片分離法にまでわたることができる(例えば、サムブルック他、分子クローニング:ラボラトリーマニュアル、第二版、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク(1989年)、ウー他、遺伝子バイオテクノロジーの方法(CRCプレス、ニューヨーク、ニューヨーク、1997

50

年), および組換え遺伝子発現プロトコル, 分子生物学, 第62巻所収(トゥアン, 編, フーマナプレス, トトワ, ニュージャージー, 1997年), これらの開示はここで引用例としてとり込まれている)。他に純粋に合成法としては、例えばミリゲンまたはベックマンシステム1プラスDNA合成機を利用するシアノエチルホスホルアミダイト法によるものもある(例えばミリゲン-バイオサーチ, パーリントン, マサチューセッツのモデル8700自動合成機またはAB1モデル380B)。オリゴヌクレオチドを作るのに有用な合成法は、更に生田他, アニュアル・レビュー・オブ・バイオケミストリー, 53巻: 323-356ページ(1984年)(ホスホトリエステルとホスファイト-トリエステル法), およびナラン他, 酵素学の方法, 65巻: 610-620ページ(1980年), (ホスホトリエステル法)により記載されている。タンパク質核酸分子は、ニールセン他, バイオコンジュゲートケミカルズ, 5巻: 3-7ページ(1994年)に記載されたものなどの既知の方法を用いて作ることができる。

10

【0061】

化学的硫化により、エキソヌクレアーゼ耐性ホスホロチオエートジエステルを含むプライマーを合成する方法は、十分に確立されている。ランダムプライマーの固定相合成は、3末端で1個またはいくつかの特異的に配置されたインターヌクレオチドホスホロチオエートジエステルを採用する。ホスホロチオエートトリエステルは、五価リンを生成するために、3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン1, 1ジオキサイド^{1, 2}、またはボーケージ試薬とのホスホロアミダイト化学反応の間に得られた中間ホスファイトトリエステルの酸化で導入することができ、ここでホスホロチオエートトリエステルはチオンとして存在する。このように形成されたチオンは、インターヌクレオチドホスホジエステルを生成するのに必要な続く酸化段階で安定している(マイヤー, R. P., イーガン, W., リーガン, J. B., ボーケージ, S. L., アメリカ化学学会ジャーナル, 112巻: 1253ページ, (1990年), およびマイヤー, R. P., フィリップス, L. R., イーガン, W., リーガン, J. B., ボーケージ, S. L., 有機化学ジャーナル, 55巻: 4693ページ(1999年))。

20

【0062】

ここで記載された多くのオリゴヌクレオチドは、それらの間でハイブリッドが形成できるように、他のオリゴヌクレオチドまたは核酸のある部分に相補であるように設計される。これらのハイブリッドの安定性は、レスニックおよびフライヤー, バイオケミストリー, 34巻: 10807-10815ページ(1995年), マグロー他, バイオテクニク, 8巻: 674-678ページ(1999年), およびライクリック他, 核酸研究: 6409-6412ページ(1990年)などに記載されたもののような既知の方法を使用して計算することができる。

30

【0063】

RCAのローリングサークル複製段階で有用なDNAポリメラーゼは、プライムド一本鎖サークル(または複式基質の各鎖)のローリングサークル複製を実行しなければならない。このようなポリメラーゼは、ここでローリングサークルDNAポリメラーゼとして引用されている。ローリングサークル複製に関しては、DNAポリメラーゼが鋳型鎖に相補である鎖を置換できることが望ましく、この置換は鎖置換と名付けられ、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠いている。鎖置換は、ATCの多重タンデム複製の合成をもたらすのに必要である。5' 3'のエキソヌクレアーゼ活性は、もしそれが存在するならば、合成鎖の破壊を来たすことになるであろう。開示された方法で使用されるDNAポリメラーゼが、高度に処理加工性であることも望ましい。開示された方法での使用にDNAポリメラーゼの適合性は、ローリングサークルに複製を実行するその能力を評価することにより、容易に決定することができる。望ましいローリングサークルDNAポリメラーゼは、バクテリオファージ-29 DNAポリメラーゼ(合衆国特許番号5,198,543号、5,001,050号, ブランコ他)、ファージM2 DNAポリメラーゼ(松本他, 遺伝子84巻: 247ページ, (1989年)、ファージ-PRD1 DNAポリメラーゼ(ジャン他, 全米科学アカデミー紀要, 84巻: 8287ページ(1987年))およ

40

50

び、ズーおよび伊藤，バイオケミカル・バイオフィジカル・アクタ，1219巻：267 - 276ページ（1994年）、VENT・RTM・DNAポリメラーゼ（コン他，生物学化学ジャーナル，268巻：1965 - 1975ページ（1993年））、DNAポリメラーゼIのクレウノ断片（ジェイコブセン他，生化学ヨーロッパ・ジャーナル45巻：623 - 627ページ（1974年））、T5 DNAポリメラーゼ（チャタージー他，遺伝子97巻：13 - 19ページ（1991年））、およびT4 DNAポリメラーゼホロ酵素（カブドおよびベンコビッチ，カレント・バイオロジー：5巻149 - 157ページ（1995年））。 - 29 DNAポリメラーゼがもっとも望ましい。同じく望ましいポリメラーゼは、T7生のポリメラーゼ、パシラス = ステアロテルモフィルス（Bst）DNAポリメラーゼ、テルモアネロバクター = テルモヒドロスルフリカス（Tts）DNAポリメラーゼ（合衆国特許番号第5,744,312号）、およびテルムス・アクアティカス，テルムス・フラブスまたはテルムス・テルモフィルスのDNAポリメラーゼを含む。同じように望ましいのは、29, Cp - 1, PRD1, 15, 21, PZE, PZA, Nf, M2Y, B103, SF5, GA - 1, Cp - 5, Cp - 7, PR4, PR5, PR722およびL17のファージのDNAポリメラーゼから選択される29型DNAポリメラーゼである。特異的な実施例において、DNAポリメラーゼはバクテリオファージ29 DNAポリメラーゼであり、ここで多重プライマーはエキソヌクレアーゼ活性に耐性であり、標的DNAは高分子量線状DNAである。

10

【0064】

RCA期間中の鎖置換は、とりわけ複式ATCsが鋳型として利用された場合には、例えばヘリカーゼなどのような鎖置換因子の使用を通じて促進することができる。たとえDNAポリメラーゼがこのような因子の不在下でローリングサークル複製を実行しないとしても、鎖置換因子の存在下でローリングサークル複製を実行できるDNAポリメラーゼはいずれも本発明のプロセスでの使用に適している。RCAで有用な鎖置換因子はBMRF1ポリメラーゼアクセサリサブユニット（鶴見他，ウイルス学ジャーナル，67巻（12号）7648 - 7653ページ（1993年））、アデノウイルスDNA結合タンパク質（ツァイデルヘルト，およびファン・デル・フリート，ウイルス学ジャーナル，68巻（2号）：1158 - 1164ページ（1994年参照）。ヘルペス単純性ウイルスタンパク質ICP8（ベーマーおよびレーマン，ウイルス学ジャーナル，67巻（2号）：711 - 715ページ（1993年）；スケライター，およびレーマン，全米科学アカデミー紀要，91巻（22号），10665 - 10669ページ（1994年））、一本鎖DNA結合タンパク質（SSB；リグラールおよびロマーノ，J. Biol. Chem, 270巻：8910 - 8919（1995年）および子牛胸腺ヘリカーゼ（シーゲル他，J. Biol. Chem, 267巻：13629 - 13635ページ（1992年））を含む。

20

30

【0065】

ローリングサークル複製を実行するためのポリメラーゼの能力は、ファイアーおよびスー，全米科学アカデミー紀要，92巻：4641 - 4645ページ（1995年）、およびライザーディ（合衆国特許番号5,854,033号、例えば実施例1など）に記載されたものなどのような、ポリメラーゼをローリングサークル複製で使用するにより決定することができる。

40

【0066】

別の特異的な実施例において、標的DNAは、例えば一本鎖バクテリオファージDNAまたは二本鎖DNAプラスミドまたはベクターであり、それはDNA配列決定、クローニング、またはマッピング、およびまたは検出の目的で増幅される。以下の実施例は、特異的なプロトコルを提供するが、条件は増幅されるDNAサークルの同定に依存して変化することができる。

【0067】

かくして本発明の手順を実行するにあたり、特定の緩衝液、培地、試薬、細胞、培養条件、pHおよびその他への言及は、それを限定することを意図するものではなく、議論が提

50

示される特殊な前後関係で、通常の知識を有する者が関心があるまたは価値があるものとして認識するすべての関連する物質を含むように読み取られるべきであることは理解されねばならない。例えば、この一つの緩衝液または培養培地をも一つのものに置換して、しかも同一ではないにしても類似の結果を達成することはしばしば可能である。従来技術に習熟した者は、無駄な実験を行うことなく、ここで開示された方法と手順を使用して、その目的に最適に役立つようにそのような置換を行うことができるようなシステムと方法論についての十分な知識を有するであろう。

【0068】

本発明は、これから以下の限定されない実施例にしてより更に詳細に記載されるであろう。これらの実施例の開示を適用するに際して、本発明に基づき開示される方法の他の異なる実施例も、関連する技術に習熟した者に間違いなくそれら自身を提示するものとなるであろうことは十分に留意しておかなければならない。

10

【0069】

【発明を実施するための最良の形態】

(実施例1)

多重特異的プライマーを使用するローリングサークル増幅における収量向上

【0070】

RCAにおける増幅DNAの収量は、多重プライマーが基質DNAにアニーリングされる時に増幅することがここで示される。RCAでは、増幅DNAの収量は、環状DNA鑄型に確立された複製フォークの数により限定されることもある。一本鎖環状DNAへの多重複製フォークの確立は、増幅が起こる点の数を比例的に増加させる。環状鑄型DNAにアニーリングされた多重プライマーの使用は、DNAポリメラーゼによる多重複製フォークの確立に帰着する。この実施例は、多重プライマーが基質DNAにアニーリングされる時に、DNA合成が増加することを実証する。

20

【0071】

プライムドM13 DNAは以下の通り調製された。M13一本鎖ウイルス(+)鎖DNAの周りの異なる部位にアニーリングする9個のオリゴヌクレオチドが得られた。アニーリング反応は、M13 DNAとオリゴヌクレオチドのいずれか一つ、オリゴヌクレオチドの3個、オリゴヌクレオチドの6個、またはすべて9個のオリゴヌクレオチドのいずれかを含んでいた。アニーリングは、20 mMのトリス-HCl, pH 7.5, 40 mMのNaCl, 6.5 µgのM13ウイルス(+)鎖DNA (M13サークルの2.75 pmoleと等価)を含む反応液(100 µl)で50 pmoleの各オリゴヌクレオチドが加えられて行われた。これらの条件下で、オリゴヌクレオチドの各プライマーに対する比率は、18:1であった。反応は1分間95°Cに加熱され、30分にわたり室温までゆっくり冷却された。9個のオリゴヌクレオチドの構造は以下の通りであった。

30

【0072】

プライマー1

5' TCT GTT TAT AGG GCC TCT TCG CTA TTA CGC CAG 3'

(配列識別番号1)

プライマー2

5' TTT TTT TTT TTT TTT CAG GGT GGT TTT TCT TTT CAC CAG CGA GAC GGG CAA CAG CTG ATT GCC CTT CAC CGC CTG 3'

(配列識別番号2)

プライマー3

5' TTT TTT TTT TTT TTT ACC ACA CCC GCC GCG CTT AAT GCG CCG CTA CAG GGC GCG TAC TAT GGT TGC TTT GAC GAG 3'

(配列識別番号3)

プライマー4

5' TTT TTT TTT TTC CTC AAG AGA AGG ATT AGG ATT AGC GGG G 3'

(配列識別番号4)

40

50

プライマー 5

5' TTT TTT TTT TAC AAA AGG GCG ACA TTC AAC CGA TTG AGG G 3'

(配列識別番号 5)

プライマー 6

5' TTT TTT TTT TCC TGA ACA AAG TCA GAG GGT AAT TGA GCG C 3'

(配列識別番号 6)

プライマー 7

5' TTT TTT TTT TAC AAC ATG TTC AGC TAA TGC AGA ACG CGC C 3'

(配列識別番号 7)

プライマー 8

5' TTT TTT TTT TCA TCG GGA GAA ACA ATA ACG GAT TCG CCT G 3'

(配列識別番号 8)

プライマー 9

5' TTT TTT TTT TAT GCG CGA ACT GAT AGC CCT AAA ACA TCG C 3'

(配列識別番号 9)

一本鎖環状 DNA にアニーリングされた多重プライマーの使用により、DNA 合成の収量増加を説明するために、4 個の RCA 反応が行われた。反応液 (50 μ l) は 20 mM のトリス-HCl, pH 7.5, 7 mM の MgCl₂, および 30 mM の NaCl, 200 μ M のデオキシリボヌクレオシド三リン酸, γ -[³²P]dCTP、特異的活性 40 cpm/pmol 全 dNTP, 12 ng のプライムド M13 ウイルス (+) 鎖 DNA および 26 ユニットの T7 シークエナーゼを含有していた。

【0073】

反応は 37 °C で 2 時間培養された。アリコートは 30 分, 60 分, 90 分, および 120 分でとられ、放射性デオキシリボヌクレオチドの取り込みにより DNA 合成を計量するために、DE81 フィルター上にスポットされた。投入 M13 DNA のフォールド増幅は、投入 M13 DNA に存在するデオキシリボヌクレオチドの pmol で、とり込まれたデオキシリボヌクレオチドの pmol を割ることにより決定された。その結果は図 2 で示されている。

【0074】

そこで見ることができるよう、著しくより多い DNA 合成が、より多くのプライマーをそれにアニーリングした M13 鋳型で現れる。

【0075】

(実施例 2)

ランダムヘキサマープライマーを使用するローリングサークル増幅における収量向上

【0076】

多重ランダムヘキサマープライマーが基質 DNA にアニーリングされる時に、RCA 内の増幅 DNA の収量を向上されることも実証された。

【0077】

プライムド M13 DNA は以下の通り調製された。単一プライムド M13 は、前記の通り調製された。ランダムヘキサマープライムド DNA は、M13 DNA とランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドを含有していた。アニーリングは、20 mM のトリス-HCl, pH 7.5, 20 mM の KCl, 0.1 mM の EDTA, 6 ng の M13 ウイルス (+) 鎖 DNA (M13 サークルの 2.5 fmole s に相当)、および 6000 pmole s のランダムヘキサマープライマーを含有する反応液 (60 μ l) で実施された。これらの条件下で、プライマー:サークル比は 2.4×10^6 :1 であった。反応は 1 分 95 まで加熱され、30 分にわたり室温までゆっくりと冷却された。

【0078】

一本鎖環状 DNA にアニーリングされたランダムヘキサマープライマーを使用して DNA 合成の収量増加を説明するために、2 個の RCA 反応が行われた。反応液 (20 μ l) は 50 mM のトリス-HCl, pH 7.5, 10 mM の MgCl₂, 20 mM の硫酸アンモ

10

20

30

40

50

ニウム，および200 μg/mlのウシ血清アルブミン，1 mMのデオキシリボヌクレオシド三リン酸， $-\text{[}^{32}\text{P]dCTP}$ ，特異的活性24 cpm/pmol全dNTP，および0.32ユニットの29 DNAポリメラーゼを含有していた。第1反応液は、実施例1で記載の通り調製された1 ngの単一プライムドM13を含有し、一方第2反応液は、前に記載の通り調製された1 ngのランダムヘキサマープライムドM13を含んでいた。

【0079】

反応液は24時間37℃で培養された。アリコートが2時間，6時間および24時間で採取され、放射性デオキシリボヌクレオチドのとり込みが確認された。投入M13 DNAのフォールド増幅が、とり込まれたデオキシリボヌクレオチドのpmolを投入M13 DNAに存在するデオキシリボヌクレオチドのpmolで割ることで確認された。その結果は図3で示される。

10

【0080】

ここで見られるように、単一プライマーを持つM13（単一プライムドM13曲線の参照のこと）と比較して、M13鑄型にアニーリングされた多重ランダムプライマーを持つM13鑄型（ヘキサマープライムドM13曲線を参照）で著しく多いDNA合成が生じる。M13 DNAの370倍増幅がこれらの条件下で達成され、これは少量のDNA鑄型の増幅にとっては重要な有用性を持つ。

【0081】

（実施例3）

ランダムヘキサマープライマーを使用する細菌コロニーとプラークからのプラスミドとバクテリオファージDNAのローリングサークル増幅

20

【0082】

多重ランダムヘキサマープライマーでプライミングされた環状プラスミドとバクテリオファージDNAが、細菌コロニーまたはプラークからのRCAを用いて採取された未精製物質から特異的に増幅されることも実証された。

【0083】

DNAサンプルは以下の通り調製された。長さ1 cmのポリエチレン管材料（イントラメディック，PE20，1.09 mm外径）の部分の一端が、大腸菌の菌叢において、プラスミドpUC19またはバクテリオファージM13のプラークで形質転換された大腸菌のコロニーに穿刺された。対照反応物としては、管材料は、平板内には穿刺されないか、またはプラスミドで形質転換されたプラークも細菌も含まない細菌菌叢の領域に穿刺された。管材料は次いで、20 μlの緩衝液（20 mMのトリス-HCl，pH 7.5，40 mMのNaCl，1 mMのEDTAを含む）を含有するサーモサイクラー管（200 μl）に配置された。ランダムヘキサマープライマー（1000 pmol）が各管に加えられ、反応液は95℃で3分加熱され、その後30分にわたり室温までゆっくりと冷却された。

30

【0084】

RCAを行うために、反応液は最終量40 μlで、最終濃度50 nMのトリス-HCl，pH 7.5，10 mMのMgCl₂，20 mMの硫酸アンテニウム，5%のグリセロール，200 g/mlのウシ血清アルブミン，1 mMのデオキシリボヌクレオシド三リン酸， $-\text{[}^{32}\text{P]dCTP}$ ，特異活性67 cpm/pmol全dNTP，0.04ユニットの酵母菌ピロホスファターゼ，および0.6ユニットの29 DNAポリメラーゼを含んでいた。

40

【0085】

反応液は8時間37℃で培養された。8時間後にアリコートが採取され、放射性デオキシリボヌクレオチドのとり込みが確認された。DNA合成量は二つの方法で確認された。まずとり込まれたデオキシリボヌクレオチドの量が合成されたDNAのナノグラム数を計算するのに使用された。第2に、放射能標識反応産物が、制限エンドヌクレアーゼEcoRIで消化され、産物はアガロースゲル（1.0%，TBE）を通して電気泳動により分析された。M13（7.2キロベース）とpUC19（2.7キロベース）の増幅の線状産物は

50

計量され、既知の量の線状放射能標識 M 1 3 DNA と比較された。増幅 DNA の量の 2 個の測定値は一致した結果をもたらした。この結果は表 1 で示される。

【 0 0 8 6 】

表 1 は、多重ランダムヘキサマープライマーでプライミングされたプラスミドとバクテリオファージ DNA が、細菌コロニーまたはプラークから採取された未精製物質から増幅された後の DNA の収量 (n g で表示) を示す。ここで見られるように、DNA の著しい収量向上が、プラスミドまたはバクテリオファージ DNA を含まないサンプルと比較して、コロニー (p U C 1 9 プラスミド DNA) またはプラーク (バクテリオファージ M 1 3 DNA) から達成される。

【 0 0 8 7 】

【表 1】

プラークおよびコロニーからの RCA 収率の定量

| # | 反応液 | n g (ヌクレオチドからのもの) |
|---|----------|-------------------|
| 1 | DNA なし | 0.4 |
| 2 | コロニー # 1 | 25 |
| 3 | コロニー # 2 | 16 |
| 4 | プラーク # 1 | 29 |
| 5 | プラーク # 2 | 25 |
| 6 | 大腸菌細胞のみ | 2 |

【 0 0 8 8 】

このような方法は、ゲノム、cDNA または他の複合 DNA s の配列決定に採用されるこれまでの方法よりも際立った利点を提供する。

【 0 0 8 9 】

1 . 反応が遅く、高価で、労働集約的なプラスミドまたはファージのミニプレップの必要性の回避。プラスミドとファージの成長は、細菌宿主により寛容化されない「有害な」配列を予防することにより制限される。この方法はこれらそのそれぞれを潜在的に未然に予防し、成長とミニプレップに要する時間を約 2 4 時間短縮するであろう。

【 0 0 9 0 】

2 . 両鎖の配列決定を可能にする産物の提供 (ファージ鎖からの配列決定のみを可能にする M 1 3 ファージミニプレップとの比較におけるもの) 。

【 0 0 9 1 】

3 . 高処理量毛管配列機 (例えばエイマシャム・ファーマシア・バイオテック、アプライド・バイオシステムズ、およびベックマン・インストゥルメンツで製造されたもの) により採用された動電学的注入に対する排除に理想的に適した分子サイズによる産物の提供。これとは逆に、ファージまたはプラスミドミニプレップは、正確な量で提供されないと毛管の遮断を起こし得る産物を産出する。

【 0 0 9 2 】

4 . サンプル (プラークまたはコロニー) 間で「標準化」される DNA 収量の提供。すなわち、産物量は投入鑄型量に拘らず不変に留まるよう構成することができる。この特徴は、鑄型の追加の超過が品質を低下させ、配列の長さを読み取ることが必要とされる毛管配列で特に有利な特徴である。

【 0 0 9 3 】

5 . 本方法は、ゲノム配列決定のためのベクター選択の際に、より大きな柔軟性を可能にする。サブクロニングは減少または排除される。現在 B A C s は、非常に限定された組成物の M 1 3 ファージまたはプラスミドにサブクロン化される。部分または全体としての合成サブクロニングベクターは、ゲノム範囲を最大にし、配列決定反応数を最小にするように設計できるように製作可能である。

【 0 0 9 4 】

(実施例4)

29 DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性によるプライマーの分解

【0095】

ランダムヘキサマープライマーは、RCAで用いられる条件下で、29 DNAポリメラーゼの存在下で分解した。

【0096】

プライムドM13 DNAは以下の通り調製された。ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドは、 1.3×10^7 cpm/pmolの特異活性まで ^{32}P ATPで5'末端標識された。アニリング反応液(60 μl)は20 mMのトリス-HCl, pH 7.5, 40 mMのNaCl, 1 mMのEDTA, 6 ngのM13ウイルス(+)鎖DNA(M13サークルの2.5 fmolに等価物)、および6000 pmolの標識ランダムヘキサマープライマーを含有していた。これらの条件下で、プライマー:サークルの比率は 2.4×10^6 :1であった。反応液は95℃まで1分加熱され、30分にわたり室温までゆっくりと冷却された。

【0097】

RCA条件下で29 DNAポリメラーゼによるプライマー分解を評価するために、反応液は、50 mMのトリス-HCl, pH 7.5, 10 mMのMgCl₂, 20 mMの硫酸アンモニウム, 5%のグリセロール, 200 g/mlのウシ血清アルブミン, 1 mMのデオキシリボヌクレオシド三リン酸, 0.02ユニットの酵母菌ピロホスファターゼ, および0.1ユニット, 1.0ユニットおよび10ユニットの29 DNAポリメラーゼの最終濃度を含む最終量にもたらされた。

【0098】

反応液は24時間37℃で培養された。アリコート(3 μl)が0時間, 0.25時間, 2時間, 6時間, および23時間で採取され、反応産物は25%ポリアクリルアミド配列決定ゲルを通じて電気泳動で分析された。結果は図4で示される。

【0099】

ランダムプライマーは、29 DNAポリメラーゼの10ユニットの存在下で15分で完全に分解した。プライマーは、29 DNAポリメラーゼの0.1ユニットおよび1.0ユニットの存在下ではより長時間持続した。

【0100】

かくして、このような分解を防止する方法の利用は有利である。そのような一つの方法は、次の実施例に記載される。

【0101】

(実施例5)

M13 RFI DNAの29増幅でのエキソヌクレアーゼ耐性ランダムプライマーの作用

【0102】

多重エキソヌクレアーゼ耐性ランダムヘキサマープライマーでプライミングされた環状二本鎖バクテリオファージDNAは、エキソヌクレアーゼに感受性のプライマーでプライミングされたDNAよりも、より大きい範囲で増幅される。

【0103】

エキソヌクレアーゼ耐性ランダムヘキサマープライマーは、Nがランダムヌクレオチドを表し、下線部が5'-チオリン酸塩結合を持つヌクレオチド: 5' NNNNNNT3'を含む。

【0104】

この7マー(ヘプタマー)オリゴヌクレオチドにおいて、3' T残基はエキソヌクレアーゼ感受性であり、また2個の最後から2番目の3' ランダムヌクレオチドは、3' -> 5' エキソヌクレアーゼ活性に耐性である。3' -> 5' エキソヌクレアーゼの存在下では、3' T残基は除去され、エキソヌクレアーゼ耐性ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドを産出する。

10

20

30

40

50

【0105】

プライムドM13 DNAは下記の通り調製された。アニーリング反応液は、20 mMのトリス-HCl, pH7.5, 40 mMのNaCl, 1 mMのEDTA, 6 ngのM13 RFI DNA (M13サークルの2.5 fmolの等価物)、および6000 pmolのエキソヌクレアーゼ耐性ランダムヘキサマープライマーを含有した。これらの条件下でプライマー：サークルの比率は 2.4×10^6 : 1であった。反応液は95で1分加熱され、30分にわたり室温までゆっくりと冷却された。

【0106】

RCAを実行するために、反応液は、50 mMのトリス-HCl, pH7.5, 10 mMのMgCl₂, 20 mMの硫酸アンモニウム, 5%のグリセロール, 200 g/mlのウシ血清アルブミン, 1 mMのデオキシリボヌクレオシド三リン酸, $[\text{ }^3\text{ }^2\text{ P}] \text{ dCTP}$, 特異的活性67 cpm/pmol全dNTP, 0.02ユニットの酵母菌ピロホスファターゼ, および0.3ユニットのポリメラーゼの最終濃度を含有する20 µlの最終量にもたらされた。

10

【0107】

反応液は34で培養され、13時間後にアリコートが採取され、放射性デオキシリボヌクレオチドのとり込みが確認された。投入M13 DNAのフォールド増幅は、とり込まれたデオキシリボヌクレオチドのpmolを投入M13 DNAに存在するデオキシリボヌクレオチドのpmolで割ることで確認された。その結果は図5で示される。

【0108】

ここで見られるようにエキソヌクレアーゼ耐性(エキソ^R)プライマーが使用される時に、投入DNAの著しいフォールド増幅が起こり、加えて29 DNAポリメラーゼの増量が反応液に加えられるにつれて、フォールド増幅の収量の増加が見られる(1000 pmolエキソ^Rヘキサマー曲線および100 pmolエキソ^Rヘキサマー曲線を参照)。これとは逆に、エキソヌクレアーゼ感受性(エキソ^S)プライマーを使用するフォールド増幅は、エキソ^Rプライマーで見られるものよりもずっと少ない。加えて、エキソ^Sプライマーを使用する最適増幅は、29 DNAポリメラーゼの0.3ユニットを使用するものに見られ、一方酵素水準の高いものは増幅の収量が少なかった(1000 pmolエキソ^Sプライマー曲線を参照)。追加プライマーが不在の場合には、増幅は見られなかった(プライマー無しの曲線参照)。エキソヌクレアーゼ耐性ランダムプライマーは、高濃度の29 DNAポリメラーゼを用いて、9000以上のフォールド増幅の達成を可能にし、それは非常に低い水準のDNA鋳型の増幅には大きな効用を持つ。

20

30

【0109】

(実施例6)

エキソヌクレアーゼ耐性ランダムヘキサマープライマーを使用するローリングサークル増幅で増幅される鋳型DNAを使用するDNA配列決定

【0110】

多重エキソヌクレアーゼ耐性ランダムヘキサマープライマーを使用して増幅された環状一本鎖バクテリオファージM13 DNAは、DNA配列決定のための鋳型として有用であることが確認された。

40

【0111】

一本鎖M13 mp18 DNA (1 ng)が、62 pmolのランダムヘキサマー, 2.5ユニットの29 DNAポリメラーゼ, 0.007ユニットの酵母菌無機ピロホスファターゼと組み合わせて、25 mMトリス-HCl, pH8.0, 10 mMのMgCl₂, 75 mMのKClおよび0.5 mMのdNTPを含む緩衝液で、5マイクロリットル反応液で増幅された。反応液は、30で12時間培養され、M13 DNAの増幅を可能にした。1ユニットのウシ腸アルカリ性ホスファターゼが加えられ、混合物は37で30分培養され、次いで95で3分培養された。この反応液に495マイクロリットルの水が加えられ、0.01 ngの投入M13 mp18 DNAから増幅されたDNAの量を含む5マイクロリットルの希釈サンプルが、5 pmolの~40ユニバーサルプ

50

ライマーと8マイクロリットルのDYE n a m i c (ダイエナミック) ET ターミナープレミックス(エイマシャム・ファーマシア・バイオテック)を含む20マイクロリットルの配列決定反応液に移された。この反応液は95 で20秒、および60 で60秒、25回繰返して循環され、沈殿され、産物の1/2がABI 373配列決定ゲル装置に適用された。生成する電気泳動図は表6で示される。得られた配列は平均信号強度119で400ヌクレオチド以上にわたり正確であった。

【0112】

比較の目的で、200 ngの純粋な非増幅一本鎖M13mp18 DNAが、増幅DNAで記載されたのと全く同じにDNA配列決定の鋳型として使用された。生成する電気泳動図は図7で示される。得られた配列は、425の平均信号強度を持つ400ヌクレオチド以上で正確であり、0.01 ngの投入DNAから増幅されたDNA鋳型から得られたものの約3.6倍であった。

10

【0113】

ここで見られるように、0.01 ngの投入M13 DNAから増幅された鋳型DNAを用いる配列決定は、非増幅DNA鋳型の20,000倍大きな量から達成された信号よりも僅か約4倍少ないだけであった。かくして記載された方法を使用するDNA鋳型増幅は、少量のDNA鋳型の配列決定も可能にする大きな有用性を有している。

【0114】

(実施例7)

エキソヌクラーゼ耐性ランダムヘキサマープライマーを使用する細菌コロニーからの細菌人工染色体DNAのローリングサークル増幅

20

【0115】

多重エキソヌクラーゼ耐性ランダムヘキサマープライマーでプライミングされた細菌人工染色体(BAC)DNAが、RCAを用いる細菌コロニーから採取された未精製物質から特異的に増幅されることが確認された。

【0116】

DNAサンプルは以下の通り調製された。BAC含有細菌菌株(リサーチ・ジェネティクス)が筋状に配列され、単一コロニーとして成長した。一片のポリエチレン管部材(イントラメディック, PE20, 1.09 mm外径)がコロニーに穿刺され、管部材は20 µlの緩衝液(20 mMのトリス-HCl, pH 7.5, 40 mMのNaCl, 1 mMのEDTA)を含むサーモサイクラーに配置された。エキソヌクラーゼ耐性ランダムヘキサマープライマー(オリゴヌクレオチドの3'末端に最近接して位置する2個のチオリン酸塩結合を含むように修飾されたランダムヘキサマー, 1000 pmol)が各管部材に加えられ、反応液は95 で3分加熱され、8時間にわたりゆっくりと室温まで冷却された。RCAを行うために反応液は、50 mMのトリス-HCl, pH 7.5, 10 mMのMgCl₂, 20 mMの硫酸アンモニウム, 5%のグリセロール, 200 g/mlのウシ血清アルブミン, 0.5 mMのデオキシリボヌクレオシド三リン酸, 0.04ユニットの酵母菌ピロホスファターゼ, および0.6ユニットの29 DNAポリメラーゼの最終濃度を含む40 µlの最終量にもたらされた。

30

【0117】

反応液は8時間37 で培養された。反応が終結した後、アリコートが採取され、DNA合成は(臭化エチジウム染色アガロースゲルから)測光法で確認された。増幅DNAは、制限エンドヌクラーゼ分析およびDNA配列決定の両方で確認された通り、BAC DNAであると確認された。増幅BAC DNAの収量は、単一細菌コロニーから3 µgであった。かくして、エンドヌクラーゼ耐性ランダムヘキサマープライマーを用いるRCAは、細菌コロニーから直接BAC DNAを増幅することで、大きな有用性を持つ。

40

【0118】

(実施例8)

エキソヌクラーゼ耐性ランダムヘキサマープライマーを使用するヒトゲノムDNAの増幅

50

【0119】

ヒトゲノムDNAの増幅が、エキソヌクレアーゼ感受性プライマーでプライミングされたヒトゲノムDNAに比べてエキソヌクレアーゼ耐性ランダムヘキサマープライマーを使用してからかなりの範囲まで生じることが確認された。

【0120】

ヒトゲノムDNA（プロメガ）は以下の通り増幅された。DNA（20 ng）は、25 mMのトリス-HCl, pH 8.0, 10 mMのMgCl₂, 50 mMのKClよりなる緩衝液で700 pmolのエキソヌクレアーゼ感受性ランダムヘキサマー、またはエキソヌクレアーゼ耐性ランダムヘキサマー（すなわち、オリゴヌクレオチドの3'末端に最近接する2個のチオリン酸塩結合を含むように修飾されたランダムヘキサマー）のいずれかで混合され、95 °Cで3分培養され、4 °Cまで冷却された。これらの混合物は、次いで、25 mMトリス-HCl, pH 8.0, 10 mMのMgCl₂, 50 mMのKClおよび0.5 mMのdNTPの全量50マイクロリットルより成る緩衝液で、64ユニットの29 DNAポリメラーゼと0.04ユニットの酵母菌無機ピロホスファターゼで組合わされた。反応液はDNAの増幅が可能になるように、30 °Cで16時間培養された。一度増幅されるとDNA産物は（臭化エチジウム染色アガロースゲルから）測光法で計量された。ランダムヘキサマープライマーを用いてプライミングされたDNAサンプルは2倍増幅され、一方ヌクレアーゼ耐性ヘキサマーを用いてプライミングされたDNAサンプルは400倍増幅された。かくして未修飾ランダムヘキサマーに代ってエキソヌクレアーゼ耐性ランダムヘキサマーの使用は、少なくとも200倍収量を改善することができ、ヒトゲノムDNAなどのような高分子量DNA調製物の有効な増幅に大きな有用性をもつことになる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明に基づく一般的な実施例を示す図。増幅標的のサークルに相補である領域を持つオリゴヌクレオチドプライマー（Aで示されるもの）は、増幅標的のサークルに特異的にハイブリッド形成する（Bで示される）。CはBのハイブリッド形成された構造へのdNTPs, DNAポリメラーゼなどの追加の結果を示し、これにより各プライマーの3'末端は伸長される。各産物の伸長は、DNAポリメラーゼが隣接する酵素により合成されたDNAを置換することで継続する。この場合、1個の標的のサークルは、同じ増幅標的のサークル鑄型で線状複製3ラウンドを達成するために、3個のプライマーと3個の酵素に相互作用する。より多くのプライマーを使用することもできる。多重特異的プライマーを使用することもできるし、あるいはプライマーは標的のサークルにランダムな位置でハイブリッド形成するランダム配列のものであることも可能である。

【図2】 M13と各種の数のアニーリングされたプライマーを使用する増幅反応である（出発鑄型のpmol当りで形成されたpmol/投入またはピコモル数での）フォールド増幅を示すグラフ。M13 DNA基質にアニーリングされたプライマー数は、各曲線の最終データ点のグラフの左隣りに注で示される。単一プライマーを使用するプロットは線状RCA（LRCA）反応である。

【図3】 M13と多重ランダムプライマー、または単一プライマーを使用したローリングサークル増幅期間でのフォールド増幅（pmol/投入：産物にとり込まれたデオキシヌクレオチドのpmolesで測定されたDNA合成量として定義されたもの）対経過時間（時間）の関係を示すグラフ。M13基質にアニーリングされたランダムヘキサマープライマーまたは単一プライマーの存在は、各曲線の最終データ点のグラフの右隣りに注で示される。

【図4】 プライマー、ここではランダムヘキサマー（未反応残存プライマー%）対経過時間（時間）の29 DNAポリメラーゼの量は、各曲線の最終データ点のグラフの右隣りに注で示される。

【図5】 M13とエキソヌクレアーゼ耐性（エキソ^R）ランダムプライマーまたはエキソヌクレアーゼ感受性（エキソ^S）ランダムプライマーを用いるローリングサークル増幅期間中のフォールド増幅（産物/投入のpmol表示）対反応液に加えられた29 D

10

20

30

40

50

NAポリメラーゼの量(ユニット表示)の関係を示すグラフ。M13基質にアニーリングされたエキソ^Rまたはエキソ^Sランダムヘキサマープライマーの存在、またはプライマーの存在なしは、各曲線の最終データ点の右隣りに注で示される。

【図6】 鋳型としてのM13 DNAの0.01ngからのMPRCAにより増幅されたDNAを使用するDNA配列決定反応を実行する結果を表示するDNA配列決定反応を示す電気泳動図。

【図7】 鋳型としてのM13 DNAの200ngを使用するDNA配列決定反応を実行する結果を表示するDNA配列決定反応を示す電気泳動図。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Lasken, Roger S.
Dean, Frank B.
Nelson, John

<120> Multiply-primed Amplification of Nucleic Acid Sequences

<130> 469290-62

<140>
<141>

<150> US/09/605,192
<151> 2000-06-28

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide primer that anneals to M13 (+)-strand DNA.

<400> 1
tctgtttata gggcctcttc gctattacgc cag 33

<210> 2
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide primer that anneals to M13 (+)-strand DNA.

<400> 2
tttttttttt tttttcaggg tggtttttct tttcaccagc gagacgggca acagctgatt 60
gccttcacc gcctg 75

<210> 3
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide primer that anneals to M13 (+)-strand DNA.

<400> 3
tttttttttt tttttaccac acccgccgcg cttaatgcgc cgctacaggg cgcgtactat 60

10

20

30

40

ggttgctttg acgag

75

<210> 4
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide primer that anneals to M13 (+)-strand DNA.

<400> 4
 tttttttttt tcctcaagag aaggattagg attagcgggg

40

10

<210> 5
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide primer that anneals to M13 (+)-strand DNA.

<400> 5
 tttttttttt acaaaagggc gacattcaac cgattgaggg

40

<210> 6
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide primer that anneals to M13 (+)-strand DNA.

<400> 6
 tttttttttt cctgaacaaa gtcagagggt aattgagcgc

40

<210> 7
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide primer that anneals to M13 (+)-strand DNA.

<400> 7
 tttttttttt acaacatggt cagctaagtc agaacgcgcc

40

<210> 8
 <211> 40
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide primer that anneals to M13 (+)-strand DNA.

<400> 8

tttttttttt catcgggaga aacaataacy gattcgctg

40

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide primer that anneals to M13 (+)-strand DNA.

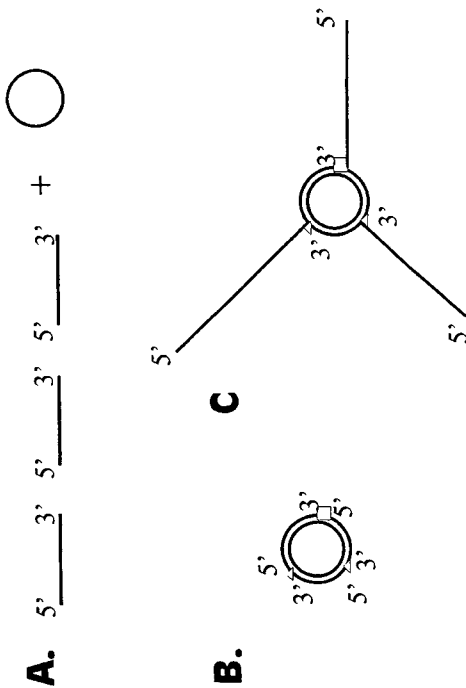
<400> 9

tttttttttt atgcgcgaac tgatagccct aaaacatcgc

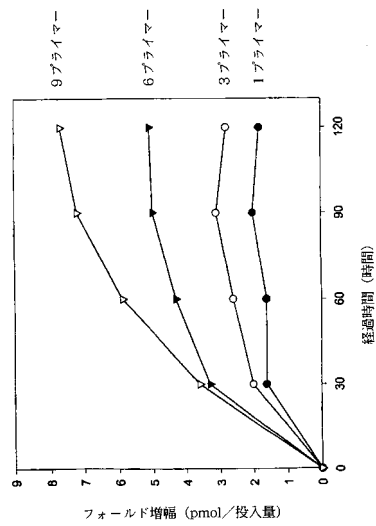
40

10

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(72)発明者 ネルソン, ジョン

アメリカ合衆国, 0 8 8 5 3 ニュージャージー, ネシャニック ステーション, マーシャル
ロード 1 6

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 1 8 2 4 1 (WO , A 1)

国際公開第 9 7 / 0 1 9 1 9 3 (WO , A 1)

Genome Res., Vol. 11, No. 6 (2001. Jun.) p. 1095-1099

Nat. Genet., Vol. 19, No. 3 (1998) p. 225-232

J. Am. Chem. Soc., Vol. 118, No. 7 (1996) p. 1587-1594

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

CA/BIOSIS/WPIDS(STN)

PubMed