

(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2004-536617
(P2004-536617A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int.C1.⁷C12N 15/09
C12Q 1/68

F 1

C12N 15/00
C12Q 1/68A
ZNAA

テーマコード(参考)

4B024
4B063

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 79 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2003-517293 (P2003-517293) | (71) 出願人 | 504041697 バイオサイクリカ アクチボラゲット スウェーデン国、シグツナ、ストランドベ ーゲン 48 |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年7月12日 (2002.7.12) | (71) 出願人 | 504041686 ランデグレン ジーン テクノロジー ア クチボラゲット |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成16年2月2日 (2004.2.2) | (74) 代理人 | スウェーデン国、ウプサラ、ルドベック ラボラトリ一 |
| (86) 國際出願番号 | PCT/SE2002/001378 | (74) 代理人 | 100066692 弁理士 浅村 韶 |
| (87) 國際公開番号 | W02003/012119 | (74) 代理人 | 100072040 弁理士 浅村 肇 |
| (87) 國際公開日 | 平成15年2月13日 (2003.2.13) | (74) 代理人 | 100088926 弁理士 長沼 晉夫 |
| (31) 優先権主張番号 | 0118959.6 | | |
| (32) 優先日 | 平成13年8月3日 (2001.8.3) | | |
| (33) 優先権主張国 | 英國(GB) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】核酸増幅方法

(57) 【要約】

核酸増幅方法及びその方法の中で使用するためのプローブが記述されている。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

方法が下記段階：

- a) 単一または比 - 標識プローブを使用して均一ハイブリッド形成反応中の該增幅産物を直接検出する、そして該均一ハイブリッド形成検出が該增幅産物中に検出プローブが濃縮されることに基づき、及び / または改良分子ビーコン設計を使用することに基づいている；または

- b) 少なくとも下記の一つを含む別の信号発生反応を行う：

I) 該增幅産物とハイブリッド形成した場合に選択的に分解する分解可能な信号プローブを提供し、その分解されたプローブが該增幅産物から解離することにより別の信号プローブが産物とハイブリッド形成することができ、そのプローブのハイブリッド形成及び分解がプローブから放射される信号に変化を生じる。

I I) 増幅産物上の標的配列に互いに隣接してハイブリッド形成するように設計された連結可能な信号プローブを提供し、そのハイブリッド形成によりプローブは連結して標的配列から解離する連結産物を形成し、その連結産物の標的配列からの解離が別のプローブ対の標的配列へのハイブリッド形成を可能にし、その標的配列からの解離により連結産物が信号を放射する；または

- c) 該增幅産物をモノマー化し、該モノマー化增幅産物を環化し、該環化モノマーをローリング - サークル増幅反応で増幅し、そして任意にこの手順を繰り返す；そして増幅産物を検出または分析する。

を含む該環化DNAを増幅し、その産物が分析する配列のコンカテマーを含む増幅産物を提供することにより環化核酸を分析する方法。

【請求項 2】

分析する環化核酸がプローブ配列である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

分析する環化核酸がcDNA, ゲノムDNAまたはRNA配列を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

請求項 1 C に記載のモノマー化增幅産物がcDNA, ゲノムDNAまたはRNA配列を使用して環化したものである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

分析する環化DNAがプロキシミティー依存核酸相互作用により形成されている請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

增幅産物のモノマー化が制限酵素及び增幅産物に相補的なオリゴヌクレオチドを使用し、その制限酵素が增幅産物 / オリゴヌクレオチドハイブリッドを切断することにより行われる前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

增幅産物中に含まれるモノマーの数よりも過剰にオリゴヌクレオチドが加えられる請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

第一世代增幅産物がポリメラーゼ酵素を使用する第一世代增幅段階において生産され、そして続くポリメラーゼ酵素を不活化する段階を含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

モノマー化增幅産物が固体支持層に接着した局所RCAを開始するプライマーにハイブリッド形成そしてそこで環化する前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

環化增幅産物が固体支持層に接着した局所RCAを開始するプライマーにハイブリッド形成する前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

モノマー化増幅産物が固体支持層に接着したプライマーにハイブリッド形成し、そしてそこでモノマー化産物が検出される前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2】

プライマーが郵便番号またはタグ配列である請求項 9 - 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

下記段階：

- 増幅産物に相補的な配列を含む信号プローブを提供し；
- 信号プローブを増幅産物と反応させ；
- 第一世代増幅産物とハイブリッド形成した信号プローブを選択的に分解し、その分解プローブは第一世代増幅産物から解離し；

別の信号プローブが産物とハイブリッド形成し、そのプローブのハイブリッド形成及び分解がプローブから放射する信号の変化を生じる、

を含む増幅の程度を示すプローブを使用する前記請求項のいずれかに記載の核酸増幅方法。

【請求項 1 4】

プローブが増幅産物とハイブリッド形成したときに分解を受けやすくなる配列を含む請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

増幅産物に相補的であるプローブ、特にプローブの配列が、プローブが増幅産物とハイブリッド形成したときに R N A ニーゼ H のような適当な酵素による分解を受けやすい R N A 残渣配列を含む請求項 1 3 または 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

プローブが増幅産物に結合したときにエンドヌクレアーゼにより分解され、その増幅産物はエンドヌクレアーゼによる分解に抵抗するように修飾されている請求項 1 3 または 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

増幅産物がデオキシヌクレオチドをチオホスホデオキシヌクレオチドで置換することにより修飾されている請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

制限酵素認識部位が第一世代増幅産物とハイブリッド形成するプローブの配列中に含まれている請求項 1 3 、 1 4 、 1 6 または 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

プローブの選択的分解が二本鎖選択的オキソヌクレオチドによって行われる請求項 1 3 または 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 0】

プローブの選択的分解が R N A - ザイムまたは D N A - ザイムによって行われ、その R N A / D N A - ザイムが第一世代増幅産物中に含まれる請求項 1 3 または 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 1】

プローブが蛍光分子及び消去分子を含みそれらはヘアピンループ構造によって分離されており、非結合及び完全立体配座において消去分子は蛍光分子からの信号を消去し、そして結合または分解プローブは信号を放射する請求項 1 3 から 2 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 2】

プローブのヘアピンループのステム配列の少なくとも一つが増幅産物とハイブリッド形成するように設計されている請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

プローブが完全なときには F R E T による信号を発生し、プローブが分解したときには信号を抑制する一対の信号分子を含む請求項 1 3 から 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 4】

D N A ポリメラーゼの錆型 / 基質として働くないようにプローブが設計されている請求項

10

20

30

40

50

13から23のいずれかに記載の方法。

【請求項25】

増幅産物が一本鎖線状RCA産物である請求項13から24のいずれかに記載の方法。

【請求項26】

分解プローブの増幅産物からの解離が加熱サイクルによって行われる請求項13から25のいずれかに記載の方法。

【請求項27】

信号プローブが核酸増幅の間またはその後に加えられる請求項13から26のいずれかに記載の方法。

【請求項28】

信号プローブ対の一つはドナー分子を含みそして他の一つはアクセプター分子を含み、そして連結産物がヘアピン構造を形成し、その形成によりドナーとアクセプター分子の間のエネルギー転移により信号を発生することができるようプローブが設計されている請求項1に記載の方法。

【請求項29】

最初の段階として非環化プローブが除去されるかまたは不活化される前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項30】

非環化プローブがエキソヌクレアーゼを使用して除去される請求項29に記載の方法。

【請求項31】

非環化プローブに対する適当なリガンドを持つ固体支持層上における捕捉により非環化プローブを除去する請求項30に記載の方法。

【請求項32】

リガンドが非環化プローブに対する親和性を有する核酸配列である請求項31に記載の方法。

【請求項33】

非環化プローブが連結部分により分離された第一部分及び第二部分を含み、その第一及び第二部分は標的配列上の配列に相補的であり、そしてそのプローブはプローブの3'末端及びプローブの連結部分中の配列の間でヘアピンループを形成し、そのヘアピンループ構造のシステムは理想的にはループと標的配列の間のハイブリッド形成を抑制しないまたRCAによるプローブの複製も抑制しない熱安定性を有している請求項29に記載の方法。

【請求項34】

増幅反応の前にプローブの3'末端に相補的なオリゴヌクレオチドの過剰を加え、オリゴヌクレオチドは望ましくは5'配列延長を含み、そのために非環化プローブの3'末端が増幅過程の産物に対する相補性を失う請求項29に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

緒言

本発明は核酸の作製、増幅、検出及び定量に関するものである。特に、本発明は環状核酸の作製、増幅、検出及び定量に関するものである。

【背景技術】

【0002】

この20年の間に核酸の増幅は遺伝子異常、遺伝子変異の同定または感染性病原体の同定の一般的技術となった。

【0003】

核酸を増幅するための方法は多数存在する。それらは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、及びリガーゼ連鎖反応（LCR）、両者ともに加熱サイクルを必要とする、転写に基づく増幅系（TAS）、核酸配列に基づく増幅（NASBA）、ストランド置換増幅（SDA）、インベーダー検定、ローリングサークル増幅（RCA）、及びハイパー・プランチ

10

20

30

40

50

ド R C A (H R C A) などである。

【 0 0 0 4 】

以下の記述において、本発明はローリングサークル増幅法 (L i z a r d i et al . , 1 9 9 8) においてよく使用される参考文献 , U S P 5 8 5 4 0 3 3 , U S P 6 1 2 4 1 2 0 , U S P 6 1 4 3 4 9 5 , U S P 6 1 8 3 9 6 0 , 6 2 1 0 8 8 4 を引用して記述される。しかし、本発明は他の核酸増幅方法、特に他の環状増幅方法においても同等の有用性を見出しうるので、それに限定することは意図していない。本発明に関係する環状核酸は、環状化プローブ、環状化標的核酸、環状レポーター核酸、プラスミド、あるいは環状標的核酸でありうる。本発明は、例えば遺伝子分類、突然変異探索、配列分析、感染性病原体の同定、分子診断、遺伝子分析及び法医学、に使用することができるが、そのほかにタンパクの検出、タンパク - タンパク相互作用、及び生体分子の相互作用の分析にも使用することができる。

【 0 0 0 5 】

本発明は環化核酸を作製する新規方法、及び該環化核酸を増殖し、検出し、または分析することに関係している。分析の目的で環化核酸を作製する方法のいくつかは文献に既知である。南京錠プローブは標的核酸配列の認識の際に環化するオリゴヌクレオチドプローブである (N i l s s o n et al . , 1 9 9 4)。プロキシミティープローブリゲーションは、(L a n d e g r e n , P C T W O 9 9 / 4 9 0 7 9) に記述されているように、標的分子認識の結果として環状化プローブを作製する鑄型となりうる。

【 0 0 0 6 】

R C A は環化プローブの線状増幅を生じるので、感度が限定されている。典型的に R C A は 1 時間当たり各環化プローブの約 1 0 0 0 コピーを生産する。

【 0 0 0 7 】

この核酸増幅過程、特に R C A 過程の感度の改善が本発明の目的である。

【 0 0 0 8 】

(発明の開示)

発明の説明

例えば R C A プロセスのような増幅プロセスの感度を改善する一つの方法はこのプロセスの間に生じるシグナルを増加させることである。これは初代の R C A 産物を鑄型にした続く増幅過程を行うことにより達成することができる。そのような続く増幅過程の一つは、初代の R C A 産物をさらに続く増幅過程において増幅されるモノマーの新規作製に回すことによって行われる。したがって、最初の態様において、本発明は以下の段階を含む核酸産物増幅方法に関係している :

- 典型的に R C A により、初代増幅産物を提供する、この産物は増幅する配列のコンカテマーを含んでいる ;
- 増幅産物をモノマー化する ;
- このようにして形成したモノマーをさらに増幅して、第二代増幅産物を形成する。

【 0 0 0 9 】

続く環の増幅の後にモノマーは結合されて環を形成することが望ましいが、その場合に続く増幅は R C A が理想的である (図 1)。増幅される配列はプローブ配列またはプローブ配列の部分でありうるし、あるいは c D N A , ゲノム D N A または R N A 配列を含むことがありうる。

【 0 0 1 0 】

本発明の一態様において、初代増幅産物のモノマー化は制限酵素及び初代増幅産物に相補的なオリゴヌクレオチドを使用して行われ、制限酵素は初代増幅産物 / オリゴヌクレオチドのハイブリッドを切断する。

【 0 0 1 1 】

その他に、増幅される配列は、初代増幅産物のモノマー化をすることができる触媒活性配列を含むことができる (D a u b e n d i e k & K o o l , 1 9 9 7)。

【 0 0 1 2 】

10

20

30

40

50

典型的に、初代増幅産物は初代増幅段階において生産され、その段階はポリメラーゼ酵素を使用するが、その方法はポリメラーゼ酵素の不活化段階を含んでいる。重合は等温条件下で行うことが理想的である。

【0013】

初代増幅産物のモノマー化がオリゴヌクレオチド及び制限酵素を使用して行われる場合には、オリゴヌクレオチドは R C A 反応産物中に存在するモノマーの数よりも過剰に添加される。変性（及び酵素不活化）段階の後にモノマーとハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドの大部分は切断されないであろう。したがって、このハイブリッド形成反応の分子内優先性のために二量体あるいは多量体形成よりも環形成が（実用的濃度において）優先するので、非切断オリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成及びリガーゼ処理によりモノマーは優先的に環化するであろう。

【0014】

この新規に生じた環は次いで、例えば、リゲーションの鉄型となる同じオリゴヌクレオチドにより開始される後続 R C A 段階の鉄型となることができる。したがって、線状増幅と異なり、この方法では（ $X_1 \times X_2 \times \dots \times X_n$ ）倍の増幅を生じるであろう、そしてこの“ X ”は各 R C A において合成されるモノマーの数であり、“ n ”は R C A の消化及び環化の回数である。この方法は環状核酸の最初の複雑な組み合わせを維持するはずであるから、多数の異なる環状核酸の組み合わせを R C A により増幅する場合に本方法は特別な価値を有するはずである。これは環化反応の分子内優先性によるものであり、そして同時に増幅される他の分子に妨害されることなく、環化された核酸の増幅の各回は連続しておりそして生産的（一つの環 - 環の数千コピーを持つ一つの生成物）である故である。さらに、反応の各回は生成物抑制あるいはプライマー制限を受けることがなく、そして重合反応の間により多くのポリメラーゼを必要とすることもない。したがって、本方法は本質的に異なる増幅環の数には無関係であるはずである。この反応産物は一本鎖であり、これはハイブリッド形成プローブにより容易に検出することができる。R C A 反応の直線性は標的分子の定量的測定に確実な定量性を保障するはずである。

【0015】

モノマー化は反応に存在する種々のプローブの各々に存在する共通した配列を使用して行うことができる。第二世代の R C A において、切断 / 環化オリゴヌクレオチドを過剰に添加してあるためにすべてのモノマーは環化するので、生成物が二本鎖になるリスク（下記参照）は少ない。したがって、第二世代 R C A において配列は存在せず、そして第二世代 R C A 産物で合成を開始することができる。また、この多項増幅方法は完全に環状分子に特化しており、他の増幅方法に見られる偽の増幅生成物のリスクは少ない。

【0016】

分析する遺伝子発現が非常に複雑なパターンを示す場合には、例えば、マイクロアレイを使用してエンドポイント分析を行う必要がある。本発明を使用して、複合した方法において高度な分解能と正確度で遺伝子発現を監視することができる。それぞれ遺伝子産物またはフラグメントに特異的な、いわゆる南京錠プローブのいくつかは c D N A または R N A を鉄型としたリゲーションにより環化される。これらの南京錠プローブは、D N A マイクロアレイ上で R C A 産物を分析するためにタグ配列をコードすることができる。増幅のその他の方法は P C R を使用するものである。しかし、P C R は、数回の P C R サイクルの後に D N A 鎖の再アニーリングのためにそれ以上生成物を生じない定常状態に達する生成物阻害反応である。豊富にある転写物は複合増幅反応が終了する以前に増幅を止め、一方少ない転写物は増幅を続けるので、少ない転写物に対して豊富な転写物の定量性をゆがめるであろう。P C R を使用して定量的エンドポイント測定をする際の問題点はよく知られており、そのために P C R のリアルタイム分析技術が開発され、少ない数の転写物（~1 - 4 転写物）を同時に分析することができる（Heid et al., 1996）。

【0017】

本発明を使用して環化した南京錠プローブを増幅することにより、そのようなゆがみは生じない、なぜなら、反応は生成物阻害を受けずにむしろ基質、すなわちデオキシヌクレオ

10

20

30

40

50

チドミン酸によってのみ制限を受ける。これは一回の反応において非常に多数の転写物の定量を可能にする。

【0018】

環状配列の第一世代、第二世代そして多分それ以上の世代を複製する方法はプローブ及び標的核酸配列の両者に適用することができる。生成物は配列分析または、例えば以下に記述する方法のいずれかにより分析することができる。ゲノムまたはcDNA配列の増幅のための望ましい方式において、最初に標的DNAを、例えば制限酵素またはFLAPエンドヌクレアーゼを使用してフラグメントとし、次いで両端において増幅する標的DNAの末端と相補的な一本鎖配列からなる環化アダプターを使用して環化する。多数の異なるフラグメントを同一の反応において増幅する場合には、類似のサイズのフラグメントを増幅するのが有利であろう。例えばゲノムDNA検体中の類似サイズの配列をすべて制限フラグメントとして発生させる一つの制限酵素または制限酵素の組み合わせを発見することは不可能であろう。しかし、異なる制限酵素または制限酵素の組み合わせを使用して得られる多分10個の異なる制限消化産物の少なくとも一つの望むサイズの制限フラグメントに全ての配列が表示されることはありそうである。もっとも有利なのは、二本鎖となった標的に相補的でない部分が一本鎖部分の間に存在し、そしてそれが共通の制限オリゴヌクレオチド配列を含んでいる(図2)。共通の制限オリゴヌクレオチド配列を使用することにより、多数の異なる標的DNAフラグメントを異なる環化アダプターを使用して環化することができ、しかも次いで同じ共通制限オリゴヌクレオチド及び酵素を使用して増幅することができる。プローブ環化反応と同様に、この標的環化反応は、分子内環化反応が分子間結合反応に優先するので交差反応による産物を生じそうにない。したがって、PCRのような増幅方法と異なり、複数の異なる標的DNAフラグメントを平行して増幅することができる。多数の異なるフラグメントを同一反応で増幅する場合には、類似サイズのフラグメントを増幅することが有利である。例えばゲノムDNA検体中の類似サイズの配列をすべて制限フラグメントとして発生させる一つの制限酵素または制限酵素の組み合せを発見することは不可能であろう。しかし、異なる制限酵素または制限酵素の組み合わせを使用して得られる多分10個の異なる制限消化産物の少なくとも一つの望むサイズの制限フラグメントに全ての配列が表示されることはありそうである。もし1000種の異なるDNAが増幅されることになったとしたならば、制限酵素の10種の異なる組み合せを使用して消化したDNA検体を使用して多分10回の異なる反応により増幅することができるであろう。適当な制限消化産物及び対応する環化アダプターは利用可能な配列データベースから推定することができる。増幅したDNA配列は、限定はしないが、マイクロアレイハイブリッド形成、ミニ配列分析、または今日では複合的能力に限界があるPCRのためのハイスループットに限定されているマス-スペクトロメトリーを含む適当な方法により分析することができる。

【0019】

モノマー化増幅産物の環化と同じ機構を、プロキシミティー依存核酸相互作用に関係したオリゴヌクレオチドプローブの環状体の発生に使用することができる(Landegren, 1995及びLandegren & Fredriksson, 2000)。この検定において、標的分子、例えばタンパクへの二つ以上のプローブの結合は、増幅できそして検出できる結合タンパクの指標となる接着DNA鎖を連結反応によって連結することができる。望ましい態様において、過剰の制限オリゴヌクレオチドが、結合するオリゴヌクレオチドプローブの中にある制限酵素が認識する配列を含む二つの同じ配列にハイブリッド形成する。制限消化及び制限酵素の熱不活化の後、切断されたオリゴヌクレオチドは脱離し、優先的分子内ハイブリッド形成反応のために、完全な制限オリゴヌクレオチドがプローブオリゴヌクレオチドの結合及び消化の両端にハイブリッド形成できるようになる。DNAリガーゼの添加に際して、制限オリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチドの環化を誘導する連結錆型として働く(図3)。生成した環は次いで本発明にしたがって増幅される。プロキシミティー依存核酸連結反応の効果として環状DNAを形成する機構はPCT WO99/49079に記述されているものとは異なる。プロキシミティープローブは添

10

20

30

40

50

加したオリゴヌクレオチドの環化の鋳型となる、PCT WO 99/49079に記述されている方法に対して、本発明においては、プロキシミティープローブの一部が環化する。

【0020】

一つの望ましい方式において、環化増幅産物は、反応に存在する種々の生成物のそれぞれに特異的な、固相支持体に接着した種々のプライマーにハイブリッド形成する。種々のプライマーは可能な限り類似しないように設計されていることが望ましく、すなわち、それらはいわゆる郵便番号配列またはタグ配列を示し、そしてそれらはアレイに整列することができる。このプライマーは局所RCAを開始するために使用される。最初の環状核酸よりも環化増幅産物をハイブリッド形成することにより、ハイブリッド形成速度及び感度は数段階改善される。さらに、もし局所RCAをリアルタイムで監視するならば、経時的シグナル蓄積を非常に広い範囲にわたって検出することができ、特に発現分析に適している。もし検体の複雑さがコピー数及び/または異なる配列の数の差に関して非常に大きいならば、異なるタグ配列との交差ハイブリッド形成を完全に避けることは困難であろう。したがって、オリゴヌクレオチドハイブリッド形成により達成されるよりも、固相支持体に接着したタグ配列プライマーに増幅モノマーの環化の鋳型となるよう要求することにより、郵便番号認識の特異性を増加させることに価値がある。もし異なる標的の数が非常に多いならば、モノマー化操作を多数の異なるタグ配列のそれれにおいて特異的切断をすることができるように工夫しなければならない。この目的のために、環化しうる核酸の複雑な混合物中の全ての配列に、独特なタグ配列に隣接してタイプII制限酵素認識配列を取り付けることができる。タグ配列モチーフ内の特異的切断は、全てのRCA産物に共通の配列を有するオリゴヌクレオチド及び/または制限切断のための二本鎖基質を形成する短いランダムオリゴヌクレオチド、例えば、ヘキサマーの集団と認識配列を二本鎖にすることにより行われる(図4)。制限消化の後に、モノマーは次いで半分のタグ末端配列を含む南京錠プローブに変換される。さらに、この方法は近接して結合した結合試薬の対を同定するために結合した検出試薬の対と半分のタグを結合させることができる。連結しうる末端が独特の塩基対の半タグ配列を構成する近接連結プローブを使用することにより可能である。このようにして、平滑-または付着末端連結により端を結合することができる(図3)。

【0021】

反復RCAは既にWO 92/01813及びUS 5,714,320に提案されている。しかし、WO 92/01813において、予め作られた環を使用する続くRCA反応のための新規のプライマーを作るためにRCA産物はモノマーに切断されている。US 5,714,320においては、単離環状オリゴヌクレオチド鋳型を提供することにより規定した末端を有する選ばれたオリゴヌクレオチドを作るための調製法が記述されている。しかしこの方法は一般的に分析目的または稀な環状DNAの増幅には適していない、何故ならば典型的に0.1 μMから1 mMの単離環状鋳型を必要とするからである。US 5,714,320に記述されている方法において、プライマーは100未満の環状鋳型に対して1モル過剰に供給され、そしてデオキシヌクレオチド三磷酸は10⁷未満の環状鋳型に対して1モル過剰に供給される。分析に適用するには、標的分子の量が少ないので、これらのモル比は効果的な開始及び重合のそれぞれを行うには低すぎる。例えば、ゲノムDNA配列の分析を環化ゲノムDNAまたは環化オリゴヌクレオチドプローブの増幅により行うためには、最初の環化核酸の濃度が低いので、対応するモル比は最初の増幅段階において少なくともそれぞれ100及び10⁷、またはより望ましくはそれぞれ100000以上及び10¹⁰、理想的にはそれぞれ約10⁷及び10¹²である。日本特許出願JP 4-304900は環化プローブの検出のためにRCAを使用することを記述している。この出願には、RCA産物を続くプローブ連結及びRCAの標的として使用する反復RCAが記述されている。これに対して、本発明においては、モノマー化RCA産物は続く連結及びRCAにおいてプローブとして使用される。この方法の利点は既に検討した。

【0022】

10

20

30

40

50

本発明のその他の態様において、RCA産物の直線的シグナル発生増幅を加えることによりRCAから得られるシグナルを増加させる方法を発明した。これにより時間の二乗に比例して増加する環化プローブからのシグナルの増幅を生じる。

【0023】

最初の方法は、RCA産物に相補的プローブの選択的、ハイブリッド形成に依存した分解に基づいている。プローブは分解が検出できるように設計されていることが望ましい。

【0024】

したがって、そのほかの態様において、本発明は増幅の程度を示すプローブを使用する核酸増幅方法を含んでおり、この方法は以下の段階を含んでいる：

- 信号プローブを提供する、そのプローブは増幅産物に相補的な配列を含む；
- 信号プローブを増幅産物と反応させる；
- 初代増幅産物にハイブリッド形成した信号プローブは選択的に分解する、その分解プローブは初代増幅産物から解離し、さらに別の信号プローブが産物とハイブリッド形成できるようになり、プローブのハイブリッド形成及び分解はプローブから発信される検出信号の変化として現れる。

【0025】

望ましくは、プローブはヘアピン-ループプローブ、いわゆる分子ビーコン (Tyagi & Kramer, 1996) で構成され、これは検出しうる信号を選択的に発信する検出しうるマーカリガンドをその中に含んでいる。マーカーは核酸配列の部分とすることができます、またはヘアピン構造の中に含まれるリガンドとすることができます。望ましくは、リガンドは核酸の切断に際して核酸から放出される。

【0026】

プローブの一部が少なくとも部分的にRNAからなるRCA産物とハイブリッド形成する場合に、ハイブリッド形成の際に酵素RNアーゼHにより分解されるであろう (Duckett et al., e.g. U.S.P. 5,011,769, U.S.P. 5,660,988, U.S.P. 5,403,711 及び U.S.P. 6,121,001)。

【0027】

同じ効果はRCAに使用するデオキシヌクレオチドの一つ以上をチオリン酸デオキシヌクレオチドに置換することにより得られ、それによりRCA産物をエンドヌクレアーゼ加水分解から保護する。この場合には分子ビーコンは通常のデオキシヌクレオチドから作られるので、二本鎖特異的エンドヌクレアーゼによる分解を受けるであろう。特に、制限酵素認識部位をビーコンのループ配列の中に設計することができる。チオリン酸化鎖にハイブリッド形成したときに、チオリン酸化されていない鎖を特異的に切断する制限酵素がいくつか知られている。RNアーゼH分解プローブに類似して、標的分子が存在するときにのみ切断、したがってプローブからの信号発信を生じるであろう。特異的なエンドヌクレアーゼの代わりに、非特異的二本鎖特異的エンドヌクレアーゼを使用することができ、それによってプローブ中に特異的配列が必要でなくなる。

【0028】

検出可能な切断産物を作る関連方法はRCA産物に相補的なプローブ及びRCA-オリゴヌクレオチド複合体中の配列を認識する制限酵素を添加することである。RCA-オリゴヌクレオチド複合体の切断の後に、切断されたプローブはモノマー化RCA産物から解離するであろう。次いで完全なオリゴヌクレオチドは切り離されたモノマーの一端にハイブリッド形成することができる、その後そのモノマーの他の端は、相互作用の分子内優先性から、同じオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成することになろう。このようにして、制限酵素の新規基質が形成され、そして第二の信号発生切断が生じる。プローブの一端を蛍光分子で標識そして他端を消去分子で標識することにより、切断及び続く解離の際に信号が発生するであろう。

【0029】

プローブのハイブリッド形成依存分解は二本鎖特異的エキソヌクレアーゼによっても行うことができる ((Copley & Boot, 1992), U.S.P. 6,121,001)。この

場合に、RCA産物とハイブリッド形成するプローブはエキソヌクレアーゼの基質となるであろうが、しかしRCA産物は二本鎖末端を持たないために影響を受けない。分解に際して複合体の融解温度は低下するであろうそしてプローブは完全に分解していなくても解離しやすくなる。こうして配列は他のプローブとハイブリッド形成し、そして分解される。

【0030】

信号を増強するこの方法はリボ-またはいわゆるDNAザイム(R/D-ザイム)によっても行うことができる(例えば、(Herschlag & Cech, 1990) & (Carmi et al., 1998)。環化核酸の中にR/D-ザイムの相補配列を組み込むことにより、RCA産物は活性R/D-ザイムを含むであろう。次いでこれを反応混合物中に加えられたプローブを切断するために使用することができる。切断に際して切断されたプローブはRCA産物から解離し、そして他の切断されていないプローブにハイブリッド形成し切断される場を提供する。R/D-ザイムはプローブの切断をしなくとも、二つのオリゴヌクレオチドを連結する錆型となりうるし、下記のように信号を発生することができる(Cuenoud & Szostak, 1995)。

10

20

30

30

【0031】

RCA産物とハイブリッド形成したときに構造特異的酵素の基質に類似するようにプローブを設計することもできる。酵素は望ましくは、リゾルバーゼ、組換え酵素またはヌクレアーゼ、例えば、RuvABC、ホリディー連結リゾルバーゼ、F1ip組換え酵素、FENヌクレアーゼまたはある種のポリメラーゼを含む群から選択される。本発明の一態様では、下流オリゴヌクレオチドが突出した5開始端を持つように縦列にハイブリッド形成する二つのオリゴヌクレオチドを使用する。この構造は数種の異なる酵素、例えば、FENヌクレアーゼ、Taqポリメラーゼ、TthポリメラーゼまたはMjaヌクレアーゼにより切断することができる(Lyamichev et al., 1999)。下流オリゴヌクレオチドは、融解温度が等温RCA反応の温度に近くなるように設計される。

【0032】

したがって、プローブはヘアピンループ構造によって分離された蛍光分子および消去分子を含むことができ、その消去分子は、プローブが結合していないとき及び蛍光分子からの信号を消去分子が消去している完全な立体配座をとっているときには蛍光分子からの信号を消去し、そして結合または分解したプローブは信号を発する(図5)。そのほかには、プローブは信号分子の対を含むことができ、その分子はプローブが完全なときはFRETによる信号を発生するが、プローブが分解したときには信号の発生を抑制する。

【0033】

有利なのは、プローブとハイブリッド形成に依存した検出分子の蓄積の組み合わせにより反応を定温で、しかも低温において行うことができるることである。

【0034】

このように温度は60未満、そして望ましくは50未満でよい。これにより反応を高温に維持する必要性を除去することができるるのは有利である。

【0035】

分解するプローブの代わりに、RCA産物の存在を示すプローブを、組み立てることができる。もし二つのオリゴヌクレオチドプローブがRCA産物上に互いに隣接してハイブリッド形成するように構築するならば、その後それらをリガーゼにより連結することができる。もし二つのオリゴヌクレオチドを、連結して標的から解離する際に安定なステム-ループ構造を形成するように設計するならば、5開始位置にあるドナー分子を他のオリゴヌクレオチドの3開始位置にあるアクセプター分子に非常に近接しておくことが可能である。そして信号を蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)に基づいて発生させることができる。連結したプローブが等温で進行するRCA反応の温度に近い融解温度を持つように設計することにより、早い回転が可能になる。連結していないプローブは生成した連結プローブよりも大過剰に存在するであろう、そのために標的RCA産物とハイブリッド形成する速度が増加し、続いて連結、解離などが。こうして反応は等温で行うことが可能である。

40

50

【0036】

したがって、そのほかの態様において、増幅の程度を示すプローブを使用する核酸増幅の方法が提供されるが、この方法は一対の信号プローブを使用し、このプローブは増幅産物上の標的配列に互いに隣接してハイブリッド形成するように設計され、ハイブリッド形成したときにプローブは連結して連結産物を形成し、これは標的配列から解離し、標的配列から連結産物の解離により別の一対のプローブの標的配列へのハイブリッド形成が可能となり、そして標的配列から解離する際に連結産物が信号を発する。

【0037】

望ましくは、一対の信号プローブの一つはドナー分子を含み、そして他方はアクセプター分子を含み、そしてプローブは連結産物がヘアピン構造を形成し、その形成の際にドナーとアクセプターの分子間でエネルギー移転ができる信号を発するように設計されている。
10

【0038】

その他の態様において、本発明は改良分子ビーコン設計を使用するコンカテマー増幅産物の均一検出を含んでいる。本発明では通常の分子ビーコンは、ビーコン中のDNA残基の少なくとも一部がポリメラーゼの基質として受け入れられない核酸残基によって置換されていない限り、RCA産物が存在せずDNAポリメラーゼが存在するときに信号を発することを発見した、その理由は3'末端（通常は蛍光消去分子を担っている）がポリメラーゼの3'エキソヌクレアーゼ（ブルーフリーディング）作用により分解されているからである。非特異的信号の発生は、DNA残基の代わりに2' - O - メチル - RNA残基を含む分子ビーコンを使用することにより完全に避けることができる（図6）。さらに発明者らは、RCA産物とハイブリッド形成している通常の分子ビーコンは消去されていることを発見した、何故なら近くに存在するビーコンは容易に相互にステムを形成し（分子間ステム）、消去分子とレポーター蛍光分子を接近させ、ハイブリッド形成していないビーコンの密接（消去）立体配座に極めて類似する（図7）。RCA産物にハイブリッド形成する際に、付近に存在するビーコンとステム様構造を取れないようにステムの一部が産物にハイブリッド形成するように南京錠プローブ配列の中にビーコンのステム配列の一つを含ませることにより、これを避けることができる（図7）。このような改良を行うことによりRCAをリアルタイムに監視することができる（図8）。その他には、この配列がループを作ってしまうのを避けるために分子ビーコンの間にあるRCA産物にハイブリッド形成する第二のプローブを検出反応に加えることができ、これにより分子間のステム形成を抑制する。分子間消去の程度は、図8に使用した2' - O - Me - RNAビーコンの部分的消去に対してDNA分子ビーコン版（図9）の完全消去に示されるように異なる分子ビーコン配列により変動しうる。
20

【0039】

鎖状化配列にハイブリッド形成し、隣接する分子ビーコンの間に形成する分子間ヘアピン構造は、鎖状化配列の一つのモノマー内にハイブリッド形成する二つの分子ビーコン間のFRETを発生するためにも使用することができる。この二つの分子ビーコンは同じステム配列を備えていなければならないが、蛍光団のドナーとアクセプターの位置は二つの分子ビーコンのうち一つでは切り替えられていなければならない。そのような分子ビーコンは一つ置きにハイブリッド形成するであろう、そして隣接同士で分子間ヘアピン構造を形成するが、一つ置きの一つのビーコンの蛍光団は隣の分子ビーコンの蛍光団に極めて接近した位置にあり、二つの蛍光団の間の効果的なFRETが可能になる。このようにして、接近した分子ビーコンからの背景蛍光を減少させ、検出感度を増加させることができる。
40

【0040】

さらに他の態様において、本発明は、溶液中に遊離している非結合信号プローブの濃度に比較して、増幅産物にハイブリッド形成した信号プローブの濃度を増加させることによりコンカテマー増幅産物の均一な検出を含んでいる。長いコンカテマー増幅産物は溶液中に遊離するとコイルとなりそしてマイクロメーターサイズの球を形成する。DNAのボールの中に信号プローブが濃縮されるので、産物にハイブリッド形成した信号プローブからの強い信号と結合していないプローブからの比較的拡散した、弱い信号とのコントラストの
50

ために、個別の環化プローブからの一つの増幅産物を顕微鏡観察で簡単に検出することができる（図12）。遺伝子発現を分析する検体の場合には、RCA産物のボールの数は直接遺伝子発現に対応する。そのような均一な検出系は、各計数されたRCA産物は検出された一つの転写分子に対応するので、非常に簡便でありまた正確である。

【0041】

多項均一分析は一般的に分光学的に分解できる蛍光団の数により制限される。例えばPCR反応に数種の蛍光標識プローブを添加した場合に、反応中の異なる蛍光団の合計が分析されるので、重複スペクトルが大きな問題となる。しかし、本発明においては、個々のRCA産物ボールが分析され、スペクトル干渉がないので、非常に類似したスペクトルを持つ蛍光団も分別することができるため、蛍光標識プローブによる個別のRCA産物の分析は高度な多項性をもって行うことができる。

【0042】

遺伝子発現分析または多項的遺伝子分類のために、種々の増幅プローブ中に種々の郵便番号を含めることにより、種々の増幅産物に比標識郵便番号オリゴヌクレオチドをハイブリッド形成させることによる増幅産物の同定を可能にするので、均一検出を多項的にすることができる。比標識は既知技術であり、そして限られた数の原色から多数の混合色を創り出すのに使用されてきた（Dauwerve et al., 1992, 及びNederlof et al., 1992）。例えば、二つの原色色素A及びBを次のように混合する場合には：0% A及び100% B、20% A及び80% B, 40% A及び60%, 60% A及び40% B, 80% A及び20% B, そして100% A及び0% B。6種類の混合色が創り出される。もし3原色の色素が同様な比率段階で混合されると、36種の混合色を区別することができる。郵便番号オリゴヌクレオチドは異なる比率の蛍光色素の混合のいずれかにより容易に標識され、そして種々の郵便番号オリゴヌクレオチドとそれらの混合を結合するか、または異なる色素で標識した郵便番号オリゴヌクレオチドを望む比率で混合する。この標識方法における多項の程度は標識スキームに加える原色の数（n）に依存し、そして標識の精度は比段階数（x）を決定し、これは区別しうる混合色の数 $x^{(n-1)}$ を制限する。増幅産物は数千の反復単位で構成されうるので、比標識における精度は極めて高く、そしてわずかな交差ハイブリッド形成郵便番号オリゴヌクレオチドの影響は無視しうるであろう。多数の擬似色を創るために原色の二者択一（オール-オア-ノン）組み合わせを使用するコンビナトリアル標識方法に比較して比標識方法を使用する大きな利点は、色組み合わせに比較して色比を使用することにより多くの混合色を得ることができることである。

【0043】

本発明のある態様において、最初のRCAの以前に線状プローブを除去することは有利であろう、例えば、残留する非環化プローブはRCAにおいて非特異的信号を発生することが認められている。この問題を解決する試みがWO 00/36141に記述されており、その中で酵素またはいわゆる捕捉リガンドが残留する線状核酸プローブを除去するために使用されている。

【0044】

したがって、その他の態様において、本発明は環状プローブを使用する核酸増幅過程の間に（または後に）非環化プローブを除去または不活化する方法に関係している、その中において非環化プローブは連結部分に隔てられた第一及び第二部分を含んでおり、この第一及び第二部分は標的配列上の配列に相補的であり、そしてプローブはプローブの3'末端とプローブの連結部分にある配列との間にヘアピン構造を形成するように設計されており、そして理想的にはこのヘアピン構造のシステムは熱安定性を有して、ループと標的配列の間のハイブリッド形成を阻害しないし、RCAによるプローブの複製も阻害しない。

【0045】

このシステムは合成を開始するために十分安定であるので、非結合プローブを完全なヘアピンに変換し、RCA産物上における「第二鎖」の合成を開始することができない。

【0046】

10

20

30

40

50

さらに、ヘアピン形成プローブは、そのプローブ設計は通常に設計されたプローブよりもさらに特異的である点で有利である。通常のプローブ設計では、診断塩基はDNAリガーゼのミスマッチ識別能力の利点を十分に活かすためにプローブ配列の最後の3'位に位置していなければならない。本発明のヘアピンプローブにおいては、この診断塩基はヘアピン形成配列の一部であろう。この配列を、連結温度においてヘアピンと標的にハイブリッド形成する立体配座の間を行ったり来たりするように設計することができる。マッチした配列のプローブは、ミスマッチの配列のプローブよりも長時間標的ハイブリッド形成立体配座をとるであろう。このためにミスマッチプローブのミス連結よりもマッチしたプローブの連結が有利になるであろう。

【0047】

10

その他の態様において、本発明は環状プローブを使用する核酸増幅過程の間に（または後に）非環化プローブを除去または不活化する別の方法を提供する、その中において増幅反応の以前にプローブの3'末端に相補的なオリゴヌクレオチドを過剰に加えるが、このオリゴヌクレオチドは望ましくは5'配列延長を含み、それにより非環化プローブの3'末端は増幅過程の産物に対する相補性を失うであろう。

【0048】

プローブの3'末端に相補的なオリゴヌクレオチドの過剰を、他の試薬と同時にまたは反応を開始した直後に加えることもできるが、RCAを開始する以前に系に添加することが望ましい。

【0049】

20

本発明によれば、非連結プローブの3'末端はRCA産物に対する相補性を失っているであろう、そして第二鎖合成を開始することはできないであろう。このような3'除去化合物はRCAを開始するために使用することができる。

【0050】

30

その他に、非連結プローブの連結部分が複製される状況を避けるために、3'除去化合物はDNAポリメラーゼの3'エキソヌクレオチド分解活性により取り除くことができず、延長できない3'末端を取り付けることができる。これは特に、南京錠プローブの連結部分に対応するRCA産物を認識するオリゴヌクレオチドによりRCA産物を検出しようとする場合に重要である。この場合に一般的のプライマーはRCAを開始するための環化プローブに加えることができるであろう。3'除去化合物の限定された長さのために、プライマーを延長するポリメラーゼにより置換されるであろうから、RCAを阻害しないであろう

(Banér et al., 1998)。

【0051】

発明の詳細な説明

本発明の態様をこれから付属した図を参照して、例示に過ぎないが、詳細に記述する：

【0052】

図1は、本発明による数世代のローリングサークル複製(RCA)の一般的な方法を示したものである、1)南京錠プローブは特異的標的核酸鎖とハイブリッド形成する、2)南京錠プローブはDNAリガーゼを使用して環化する、3)環化プローブはRCAにおいて複製される、4)RCA産物のモノマーごとに一度存在する制限酵素認識配列に過剰のオリゴヌクレオチドがハイブリッド形成する、5)オリゴヌクレオチド/産物二本鎖を消化する制限酵素を使用してRCA産物をモノマー化する、6)制限酵素の不活化及びオリゴヌクレオチドフラグメントの変性を生じる加熱段階の後、大部分のモノマーはその両端で完全なオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成する、7)このモノマーはDNAリガーゼを使用して環化し、そして次いで生成した環は次のサイクルの3-7段階にしたがって処理される；

【0053】

50

図2は、本発明にしたがって配列を環化しそして増幅するための環化アダプターを使用するゲノム-またはcDNAの増幅を示したものである、1)制限酵素を使用してDNA検体をフラグメントにする、2)フラグメント化したDNAを変性する、3)環化アダプターが特異的標的フラグメントとハイブリッド形成する、4)DNAリガーゼを使用して標的フラグメントを環化する、5)環化した標的フラグメントをRCAで複製する、6)RCA産物のモノマーごとに一回アダプター配列中に存在する制限酵素認識配列に過剰の一般的アダプターオリゴヌクレオチドがハイブリッド形成する、7)オリゴヌクレオチド/産物二本鎖を消化する制限酵素を使用してRCA産物をモノマー化する、8)制限酵素の不活性化及びオリゴヌクレオチドフラグメントの変性を生じる加熱段階の後、大部分のモノマーはその両端で完全なオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成する、9)そのモノマーはDNAリガーゼを使用して環化し、そして次いで生成した環は次のサイクルの5-9段階にしたがって処理される；

【0054】

図3はプロキシミティー依存連結による本発明にしたがって増幅可能な環化DNAへの変換を示したものである、1)一対のプロキシミティープローブ、例えば、オリゴヌクレオチドを付けた抗体が標的タンパクと結合する、2)二つのオリゴヌクレオチドがプロキシミティー依存連結反応により結合する、例えば、近接して結合した一対の結合試薬を同定するための半タグ連結を可能にする平滑末端連結により、3)制限酵素認識配列を含みそして連結したオリゴヌクレオチド配列の両方に存在する同じ配列に過剰のオリゴヌクレオチドがハイブリッド形成する、5)オリゴヌクレオチド/産物二本鎖を消化する制限酵素を使用して連結産物を切断する、6)制限酵素の不活性化及びオリゴヌクレオチドフラグメントの変性を生じる加熱段階の後、大部分のモノマーはその両端で完全なオリゴヌクレオチドとハイブリッド形成する、7)そのモノマーはDNAリガーゼを使用して環化し、そして次いで生成した環は図1の3-7段階にしたがって処理される；

【0055】

図4は、RCA産物の複雑な集合がII型制限酵素を使用して郵便番号モチーフの中でモノマー化しうるのか、またモノマー化したRCA産物が特異性とダイナミックレンジを増加させるための郵便番号オリゴヌクレオチドマイクロアレイ上でハイブリッド形成しそして環化するのかを示したものである、1)郵便番号オリゴヌクレオチドを同定する配列を含むRCA産物の集合が、例えば、多項南京錠プローブ遺伝子分類または発現分析実験から、または多項プロキシミティー依存連結反応から発生した、2)II型制限酵素をランダムヘキサマー及びII型制限酵素認識配列を含む一般的オリゴヌクレオチドとともに加え、3)ヘキサマー及び制限オリゴヌクレオチドを任意に除去し、次いでモノマーは半郵便番号末端配列を持つ南京錠プローブに変換する、4)モノマーを郵便番号オリゴヌクレオチドマイクロアレイにハイブリッド形成する、5)DNAリガーゼを使用して郵便番号オリゴヌクレオチド上でモノマーを環化する、6)郵便番号オリゴヌクレオチドをプライマーとしてRCAにおいてモノマーを増幅する、そして重合は増加するダイナミックレンジ用の均一方式で任意に監視する；

【0056】

図5は、分子ビーコンが分解される本発明の増幅方法の図解である。

【0057】

図6は、分子ビーコンの全てのDNA残基を2'O-Me-RNA残基で置換することによる、DNAポリメラーゼの存在による非特異的蛍光の蓄積の除去を示すグラフであり、一つのDNA分子ビーコンはFAM蛍光(上段)で標識し、そして一つの2'O-Me-RNA分子ビーコンはHEX蛍光(下段)で標識されており、それらを29DNAポリメラーゼの存在下(四角)または非存在下(丸)に同じ試験管に加えた；

【0058】

図7は、従来の分子ビーコン設計を使用した場合のRCA産物にハイブリッド形成した分子ビーコンの分子間消去を図解したものである；

【0059】

10

20

30

40

50

図8は、RCA産物の制限切断により分子間ピーコン消去が示され、そして分子ピーコンの改良設計によりRCAのリアルタイムの監視が可能になることを示すグラフである；

【0060】

図9は、図8と同様に行われたRCA反応の温度による影響を示すグラフである。RCA及びポリメラーゼの熱不活化の後に蛍光はDNA分子ピーコンから得られる；

【0061】

図10は、例1に記載の第3世代RCAのリアルタイムモニタリングを示す；

【0062】

図11は、例2に従って得られる第2世代RCA産物に相補的なオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイの地区において記録された蛍光を示す；

10

【0063】

図12は、蛍光標識オリゴヌクレオチドの均一ハイブリッド形成により溶液中に検出された個別のRCA産物を示し、産物とハイブリッド形成した蛍光標識オリゴヌクレオチドからの強い信号と非結合オリゴヌクレオチドからの比較的拡散した、弱い信号とのコントラストを示している。

【0064】

例

例1（改良分子ピーコンを使用する第3世代RCAのリアルタイムモニタリング）

2nM南京錠プローブ（P-
20

CCTCCCATCATATTAAAGGCTTCTCTATGTTAAGTGACCTACGACCTCA
ATGCTGCTGCTGTACTACTCTTCCTAAGGCATTCTGCAAACAT

（P=5'リシン酸）を10mM TrisAc（pH7.5），10mM MgAc₂，50mM KAc，0.1% BSA，1mM ATP，200mM NaCl，及び20mU/μl T4 DNAリガーゼの中で、0，10，40または160zmolの標的オリゴヌクレオチド

（GCCTTAATATGGGAGGATGTTGCAGAATGCCTTAG）

30

の存在下に環化した。反応を15分間37℃でインキュベートし、次いで5分間65℃でリガーゼを不活化した。第一世代RCAは0.1μg/μl BSA，250μM dNTP，10mM DTT，1pmolプライマー

（CGTCGTAGGTCACTAACAT）

、及び1ng/μl 29 DNAポリメラーゼの中で45分間37℃で行った。重合成分を15μlの29 DNAポリメラーゼ緩衝液（10mM Tris-HCl（pH7.5），10mM MgCl₂，及び20mM (NH₄)₂SO₄）中で10μl連結反応に加えた。DNAポリメラーゼを10分間65℃で不活化した。5μl 0.1μg/μl BSA，3pmol RSAI
40

（GCTGCTGTACTACTCTCTT）

、及び29 DNAポリメラーゼ緩衝液中の10U RsaIを加えて第一世代RCA産物をモノマー化した。反応を60分37℃でインキュベートし、次いで10分間65℃で酵素を不活化した。5μl 0.1μg/μl BSA，1mM ATP，及び1U T4 DNAリガーゼを29ポリメラーゼ緩衝液中で加えてモノマー化RCA産物を環化した。15分間37℃でインキュベートして連結を行い、ついで5分間65℃で酵素を不活化した。第二世代RCAは15μl重合試薬を35μlの環化RCA産物に加えて、
50

第一世代 R C A と同じ条件を使用して行った。重合反応は 45 分間 37 で継続した。第二世代の R C A 産物の半分に、0.1 μ g / μ l B S A を含む 29 D N A ポリメラーゼ緩衝液 5 μ l 中で 6 pmol R S A I c o m p

(AAGAGAGTAGTACAGCAGC)

及び 10 U R s a I を加えてモノマー化した。反応を 60 分間 37 でインキュベートし、次いで 10 分間 65 で酵素を不活化した。モノマー化した第二世代の R C A 産物の環化は、モノマー化した第一世代の R C A 産物の環化と同じ方法を使用して行った。第三世代の R C A は、0.1 μ M 分子ビーコン

10

(HEX-ccuCAAUGCUGCUGCUGUACUACgagg-DABCYL)

の存在下 60 分間行った以外は第二世代 R C A と同様に行った。A B I 7700 を使用して反応をリアルタイムに追跡した。

【0065】

例 2. (第二世代 R C A 産物の D N A アレイ上で検出)

2 nM 南京錠プローブ (W D 1216 G) を種々の量の標的オリゴヌクレオチド (T 1216 G; 0, 25, 250, または 2500 z m o l) の存在下に上記のように環化した。第一世代 R C A は 1 pmol のプライマー W D P - F の存在下に上記と同様に 10 分間 37 で行った。15 μ l の 29 D N A ポリメラーゼ緩衝液中で 10 μ l 連結反応に重合成分を加えた。D N A ポリメラーゼを 10 分間 65 で不活化した。29 D N A ポリメラーゼ緩衝液中の 5 μ l 0.1 μ g / μ l B S A, 3 pmol C o m p W D P - F, 及び 5 U F n u 4 H 1 を加えることにより第一世代 R C A 産物をモノマー化した。反応を 60 分間 37 でインキュベートし、次いで 10 分間 65 で酵素を不活化した。5 μ l 0.1 μ g / μ l B S A, 1 mM A T P, 及び 1 U T 4 D N A リガーゼを 29 D N A ポリメラーゼ緩衝液中で加えてモノマー化 R C A 産物を環化した。15 分間 37 でインキュベートして連結を行い、ついで 5 分間 65 で酵素を不活化した。第二世代 R C A は 15 μ l 重合試薬を 35 μ l の環化 R C A 産物に加えて、第一世代 R C A と同じ条件を使用して行った。重合反応は 100 分間 37 で継続した。0.1 μ g / μ l B S A を含む 29 D N A ポリメラーゼ緩衝液 5 μ l 中で 4.5 pmol D - R C R c u t 及び 5 U F n u 4 H I を加えることにより第二世代の R C A 産物の半分をモノマー化した。反応を 60 分間 37 でインキュベートし、次いで 10 分間 65 で酵素を不活化した。30 μ l モノマー化第二世代 R C A 産物を、4⁺ S S C, 0.525 μ M C o m p W D C y 5, 10 μ M E D T A 中 45 で 2 時間 D N A マイクロアレイとハイブリッド形成させ、0.1 x S S C 中 45 で洗い、水ですすぎ、そして最後に乾燥した。C y 5 蛍光信号を蛍光レーザースキャナーで記録した。

20

30

40

【0066】

例 1 及び 2 に記述されているような数世代 R C A の一般的方法の図解は図 1 に示されている。例 1 及び 2 の結果はそれぞれ図 10 及び 11 に示されている。最初に環状核酸は R C A において複製される。次いで第一世代 R C A 産物は、例えば、R C A 産物と相補的なオリゴヌクレオチドにより二本鎖となった認識部位で産物を切断する制限酵素を使用することによりモノマー化される。例えば、制限酵素の熱不活化の間にまたはその後に、完全な制限オリゴヌクレオチドは消化されたものを置換するであろう。完全な制限オリゴヌクレオチドがモノマー化 R C A 産物の一端にハイブリッド形成したときに、二番目のハイブリッド形成反応の分子内優先のために、モノマーの他端は同じ制限オリゴヌクレオチドとハイブリッド形成するであろう。次いでモノマーは末端を、例えば、D N A リガーゼを使用して連結することにより環化することができる。この方法は同じ手順を 1 回以上反復することができる。

図 10 は、例 1 に記述されている第三世代の R C A のリアルタイムモニタリングを示している。A) 発生したときに R C A 産物にハイブリッド形成した分子ビーコンから放射され

50

た H E X 蛍光のリアルタイムの測定。B) グラフは最初のプローブ環化反応に加えられた標的オリゴヌクレオチドの量との関係を示している、4回繰り返し、そしてこの連結反応の第三世代リアルタイム R C A の最大勾配。エラーバーは標準偏差を示す。

図 11 は、例 2 に従って得られた第二世代 R C A 産物に相補的なオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイ地区で記録された蛍光を示す。

【 0 0 6 7 】

例 3

オリゴヌクレオチド：使用した南京錠プローブは p 9 0 :

P- CCTCCCATCATATTAAAGGCTTCTCTATGTTAAGTGACCTACGACGATG
CTGCTGCTGTACTACTCTTCCTAAGGCATTCTGCAAACAT

10

及び p 9 3 :

P- CCTCCCATCATATTAAAGGCTTCTCTATGTTAAGTGACCTACGACCTCA
ATGCTGCTGCTGTACTACTCTTCCTAAGGCATTCTGCAAACAT

20

(P = 5 ' リン酸) であった。南京錠プローブに対する連結錠型は t 4 0 :

GCCTTTAATATGGGAGGATGTTGCAGAATGCCTTAG

であった。DNA 分子ビーコンは F A M - c g c c t c A A T G C T G C T G C T A
C T A C g a g g c g - D A B C Y L (ステム部分は小文字) であり、そして 2 ' O - M
e - R N A 分子ビーコンは H E X - c c u c A A U G C U G C U G U A C U A C g
a g g - D A B C Y L であった。2 ' O - M e - R N A 塩基対の高いハイブリッド安定性
の故に 2 ' O - M e - R N A 分子ビーコンにおいてステムは 2 塩基対短い。制限消化に使
用したオリゴヌクレオチドは T s p 4 5 1 :

30

GGCTTTCTCTATGTTAAGTGACCTACGA

であった。

【 0 0 6 8 】

例 4

南京錠プローブの環化 : 1 0 m M T r i s - 酢酸 p H 7 . 5 , 1 0 m M 酢酸 M g ,
5 0 m M N a C l , 1 m M A T P , 1 μ g / μ l B S A , 及び 0 . 2 単位 / μ l
T 4 DNA リガーゼ (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) 中で
6 0 0 n M 連結錠型の存在下に 2 0 0 n M 南京錠プローブを 3 7 で 3 0 分間連結した
。

40

【 0 0 6 9 】

例 5

ローリングサークル増幅 : 重合反応を 5 0 m M T r i s - H C l (p H 7 . 5) , 1 0
m M M g C l 2 , 2 0 m M (N H 4) 2 S O 4 , 1 0 m M ジチオトレイトール及び 0 . 2 μ
g / μ l B S A , 0 . 2 5 m M d N T P , 及び 2 n g / μ l 2 9 D N A ポリメラ
ーゼ (D r . M . S a l a s から供与された) の中ににおいて 3 7 で行った。リアルタイ
ムモニタリングのために、1 0 0 n M 分子ビーコン及び 3 0 0 n M R O X 色素の存在下
に R C A を行った。蛍光の値は分子ビーコン (F A M または H E X) 及び R O X 対照色素
50

から放射される蛍光の比から得た。温度依存性は温度を1上昇させ30秒間保った後蛍光を測定して得た。

【0070】

例6

制限消化：20μlの10mM Bis Trisプロパン-HCl(pH7.0), 10mM MgCl₂, 1mMジチオトレイトル, 0.1μg/μl BSA, 1.5μM Tsp451, 及び0.1U/μl Tsp451(New England Biolabs)を40μl RCA産物に加え、そして65で4時間インキュベートした。

【0071】

図に戻って、図6で見るようにDNAポリメラーゼの存在下に生じる蛍光の非特異的蓄積は分子ビーコンのDNA残基を全て2'O-Me- RNA残基で置換することにより除去される。FAM蛍光で標識したDNA分子ビーコン(上段)及びHEX蛍光団で標識した2'O-Me- RNA分子ビーコン(下段)を29DNAポリメラーゼの存在下(四角)及び非存在下(丸)に同じ試験管に加えた。グラフの左側部分は試験管内のリアルタイムに観察した蛍光を示し、右側の部分は60分後に存在する成分の温度依存性を示す。

【0072】

図7からは、従来の分子ビーコン設計をしようした場合のRCA産物にハイブリッド形成した分子ビーコンの分子間消去を見ることができる(上段)。この構造は改良設計を使用することにより避けることができる(下段)。

【0073】

図8:図7に示された分子間ビーコン消去はRCA産物の制限切断によって示されており、そして分子ビーコンの改良設計によりRCAのリアルタイム監視が可能である。RCAをp90(四角)またはp93(丸)南京錠プローブのいずれかを含み、リガーゼがある場合(黒)またはリガーゼが無い場合(グレイ)の連結反応により行った。グラフの左側部分は異なる反応における2'O-Me- RNA分子ビーコンからの蛍光をリアルタイム測定したものを示す。右側部分は90分RCAの終了時に存在する成分の温度依存性を示す(塗りつぶした記号)。制限消化後の異なる反応成分の温度依存性を重ねてある(中抜き記号)。

【0074】

RCA、そしてポリメラーゼの熱不活化後にDNA分子ビーコンを加えて蛍光を測定した場合の、図8と同様に行ったRCA反応の温度依存性を図9に示す。

【0075】

例7

100ngのPstI切断ゲノムDNAを95で12分間変性し、そしてサーマルサイクラー中で12に急速に冷却した。予めアニルしたオリゴヌクレオチド

"CircEx15ATP7B"; TTG CTG GCT TTT GTC TCG TAT CGG
AGC GTA CCT AGA TAG CGT GCA GTC CTC TTT AAT TTG

及び" gDNA adapter 1。"

5'P-CGC TAT CTA GGT ACG CTC CGA TAC AT

を最終濃度2nMになるように変性切断ゲノムDNAに加えた。一つの反応にはリガーゼを加え、もう一つの反応にはリガーゼを加えなかった。連結を1時間室温で、次いで30分間37で進行させ、次いで65で20分間リガーゼを熱不活化した。連結反応の5μlを50mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM MgCl₂, 20mM (NH₄)₂SO₄, 0.2μg/μl BSA, 0.25mM dNTP, 及び10ng

10

20

30

40

50

29ポリメラーゼ中37で3時間ローリングサークル増幅にかけた。RCA産物の量を定量するために、リアルタイムPCR反応を容量25μl中1×PCR GOLD緩衝液(ABI), 1.6mM MgCl₂, 0.25mM dNTP, 200nM

Ex15ATP7B-Frw (AGA CCT TGG GAT ACT GCA CGG)

及び200nM

Ex15ATP7B-Rew (CAA TTC CAC AGC CTG GCA CT)

10

プライマー, 0.625U Taq GOLDポリメラーゼ(ABI), 300nM ROX色素及び0.15×SYBR Green(Molecular Probes)にRCA反応の2.5μlを加えて行った。プライマーはゲノムフラグメント及びRCA産物の両者をPCR増幅するように設計した。PCRプログラムは95で10分間、45サイクルの95 15分間及び60 60秒であった。PCR終了後、PCR増幅単位を解離曲線分析にかけた。Ct値として示された結果はカッコ内の標準偏差とともに表1に見ることができる。増幅単位の融解温度は82.6であり、これは増幅単位の推定Tm83によく近似した。29DNAポリメラーゼは一本鎖DNA(変性)に対して強いエキソヌクレアーゼ活性を示す;したがって4倍希釈を考慮した場合に、29DNAポリメラーゼ処理をしない検体に比較して非連結DNAは4分の1の少ない産物を示す。増幅されるDNAは545ntの長さであり、そして1500nt/minの速さであるから500倍の増幅が予想された。4倍希釈を考慮すると、非増幅検体に比較して120倍の結果になることが予想されるであろう。デルタCt値6.75は110倍の増幅に相当する。

20

表1

30

| サンプル | RCA前 | RCA後 |
|--------|----------------|----------------|
| リガーゼなし | 25,27 (±0,191) | 29,06 (±0,255) |
| リガーゼ | 25,98 (±0,057) | 19,23 (±0,212) |

【0076】

例8

環化南京錠プローブp93のRCA産物の2pM及び産物に相補的な標的プローブRC1R(5'-ローダミン-

CTCTATGTTAAGTGACCTACG)

40

)の5nMの1×PBS溶液を幅50マイクロメーター及びチャンネル間空間40マイクロメーターの二本の微量流体チャンネルに注入した。南京錠プローブの環化及びRCAは例4及び5に従って行った。RCAを1時間行ったので、RCA産物は環化プローブの平均1500コピーを含む。チャンネル中の結合及び非結合蛍光標識プローブからの蛍光を、40×ドライレンズを装着した表在蛍光顕微鏡を使用して画像化した。図12において、チャンネル中に数個の輝くDNAのボール、並びにやや弱く輝く焦点外の物体が非結合プローブの拡散した蛍光の背景上に認められる。

【0077】

本発明は、本発明の精神から離れることなく構造及び細部を変更することが可能であり、ここまでに記述した態様に限定されない。

50

文献

- Banér J., Nilsson M., Mendel-Hartvig M., and Landegren U. (1998). Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. *Nucleic Acids Res.* **22**: 5073-5078.
- Carmi N., Balkhi S. R., and Breaker R. R. (1998). Cleaving DNA with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2233-7.
- Copley C. G., and Boot C. (1992). Exonuclease cycling assay: an amplified assay for the detection of specific DNA sequences. *Biotechniques* **13**: 888-92. 10
- Cuenoud B., and Szostak J. W. (1995). A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature* **375**: 611-4.
- Daubendiek, S.L. and Kool, E.T. (1997) Generation of catalytic RNAs by rolling transcription of synthetic DNA nanocircles. *Nat Biotechnol.* **15**: 273-277. 20
- Dauwerse, J.G., Wiegant, J., Raap, A.K., Breuning, M.H. and van Ommen, G.-J.B. (1992) Multiple colors by fluorescence in situ hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular karyotype. *Hum Mol Genet*, **1**: 593-598.
- Herschlag D., and Cech T. R. (1990). DNA cleavage catalysed by the ribozyme from Tetrahymena. *Nature* **344**: 405-9.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., and Williams P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**: 986-994. 30
- Lizardi P. M., Huang X., Zhu Z., Bray-Ward P., Thomas D. C., and Ward D. C. (1998). Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nature Genet.* **19**: 225-232.
- Lyamichev V., Mast A. L., Hall J. G., Prudent J. R., Kaiser M. W., Takova T., Kwiatkowski R. W., Sander T. J., de Arruda M., Arco D. A., Neri B. P., and Brow M. A. D. (1999). Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat. Biotechnol.* **17**: 292-296. 40

- Nederlof, P.M., van, d.F.S., Vrolijk, J., Tanke, H.J. and Raap, A.K. (1992) *Fluorescence ratio measurements of double-labeled probes for multiple in situ hybridization by digital imaging microscopy. Cytometry*, **13**: 839-845.
- Nilsson, M., Malmgren, H., Samiotaki, M., Kwiatkowski, M., Chowdhary, B.P. and Landegren, U. (1994) *Padlock probes: Circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. Science*, **265**: 2085-2088.
- Tyagi S., and Kramer F. R. (1996). *Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nat. Biotechnol.* **14**: 303-308.

10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【0078】

【図1】本発明による数世代のローリングサークル複製（RCA）の一般的な方法を示したものである。

【図2】本発明にしたがって配列を環化そして増幅するための環化アダプターを使用するゲノム-またはcDNAの増幅を示したものである。

【図3】プロキシミティー依存連結による本発明にしたがって増幅可能な環化DNAへの変換を示したものである。

【図4】RCA産物の複雑な集合がII型制限酵素を使用して郵便番号モチーフの中でモノマー化しうるのか、またモノマー化したRCA産物が特異性とダイナミックレンジを増加させるための郵便番号オリゴヌクレオチドマイクロアレイ上でハイブリッド形成そして環化するのかを示したものである。

【図5】分子ビーコンが分解される本発明の増幅方法の図解である。

【図6】分子ビーコンの全てのDNA残基を2'O-Me- RNA残基で置換することによる、DNAポリメラーゼの存在による非特異的蛍光の蓄積の除去を示すグラフである。

【図7】従来の分子ビーコン設計を使用した場合のRCA産物にハイブリッド形成した分子ビーコンの分子間消去を図解したものである。

【図8】RCA産物の制限切断により分子間ビーコン消去が示され、そして分子ビーコンの改良設計によりRCAのリアルタイムの監視が可能になることを示すグラフである。

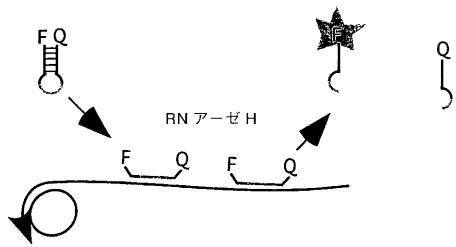
【図9】図8と同様に行われたRCA反応の温度による影響を示すグラフである。RCA及びポリメラーゼの熱不活化の後に蛍光はDNA分子ビーコンから得られる。

【図10】例1に記載の第3世代RCAのリアルタイムモニタリングを示す。

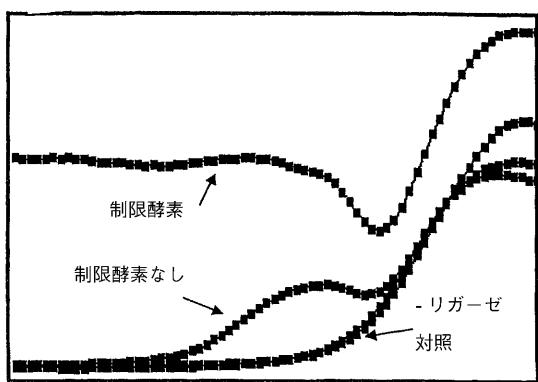
【図11】例2に従って得られる第2世代RCA産物に相補的なオリゴヌクレオチドを含むマイクロアレイの地区において記録された蛍光を示す。

【図12】蛍光標識オリゴヌクレオチドの均一ハイブリッド形成により溶液中に検出された個別のRCA産物を示し、産物とハイブリッド形成した蛍光標識オリゴヌクレオチドからの強い信号と非結合オリゴヌクレオチドからの比較的拡散した、弱い信号とのコントラストを示している。

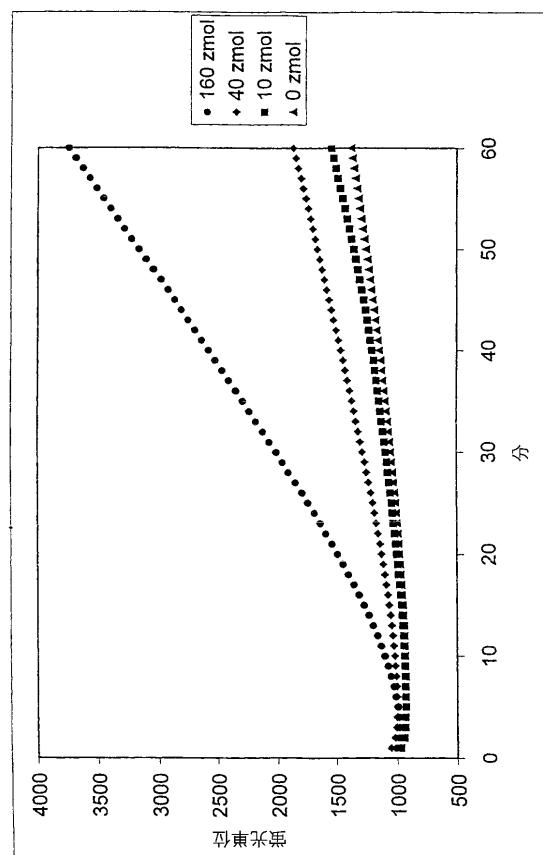
【図5】



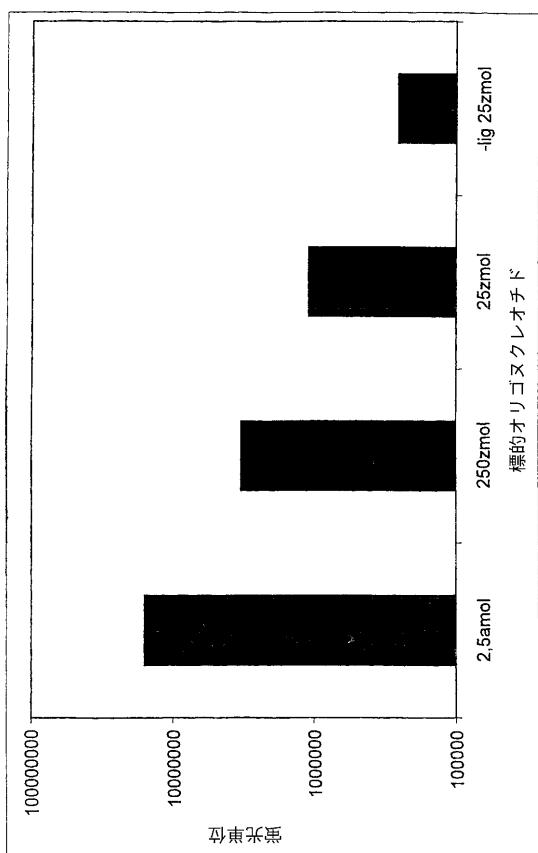
【図9】



【図10A】



【図11】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 February 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/012119 A2(51) International Patent Classification⁵: C12Q

(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CII, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DL, DK (utility model), DK, DM, DZ, IC, IE (utility model), IJ, IS, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PL, PT, RO, RU, SD, SL, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, IJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number: PCT/SE02/01378

(22) International Filing Date: 12 July 2002 (12.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0118959.6 3 August 2001 (03.08.2001) GB

(71) Applicants (for all designated States except US): **BIO-CYCLICA AB** [SE/SB]; Strandvägen 48, S-193 30 Sigtuna (SE); **LANDEGRENN Gene Technology AB** [SE/SE]; Rudbeck Laboratory, S-751 85 UPPSALA (SE).(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **LANDEGRENN, Ulf** [SE/SE]; Norra Parkvägen 29, S-756 45 Uppsala (SE); **GULLBERG, Mats** [SE/SE]; Olimmervägen 11B, S-752 41 Uppsala (SE); **NILSSON, Mats** [SE/SE]; Strandvägen 48, S-193 30 Sigtuna (SE).(74) Agents: **DR LUDWIG BRANN PATENTBYRÅ AB** et al.; Box 1344, S-751 43 Uppsala (SE).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, BG, CI, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BJ, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/012119 A2

(54) Title: NUCLEIC ACID AMPLIFICATION METHOD

(57) Abstract: A nucleic acid amplification method, and probes for use within the method are described.

WO 03/012119

PCT/SE02/01378

NUCLEIC ACID AMPLIFICATION METHOD**Introduction**

This invention relates to the generation, amplification, detection and quantification of nucleic acids. More particularly, the present invention relates to the generation, amplification, detection and quantification of circular nucleic acids.

Over the last 20 years nucleic acid amplification has become a common technique in the identification of genetic disorders, genetic variants or for the identification of infectious agents.

Many methods exist for the amplification of nucleic acids. These include the polymerase chain reaction (PCR), and the ligase chain reaction (LCR), both of which require thermal cycling, the transcription based amplification system (TAS), the nucleic acid sequence based amplification (NASBA), the strand displacement amplification (SDA), the invader assay, rolling circle amplification (RCA), and hyper-branched RCA (HRCA).

In the description that follows, the present invention will be described with reference to its preferred use in rolling circle amplification method (Lizardi *et al.*, 1998), USP5854033, USP6124120, USP6143495, USP6183960, 6210884. However, it is not intended to be limited thereto since the invention may find equal utility in other nucleic acid amplification methods, especially other circular amplification methods. The circular nucleic acids referred to in the invention can be circularised probes, circularised target nucleic acids, circular reporter nucleic acids, plasmids, or circular target nucleic acids. The present invention can be used for nucleic acid sequence analyses for e.g. genotyping, finding mutations, sequencing, identification of infectious agents, molecular diagnostics, genetic analyses and forensics, but also for detection of proteins, analysis of protein-protein interactions, and interactions of biomolecules.

The present invention relates to novel means of generating circularized nucleic acids, and to amplify, detect, or analyze the said circularized nucleic acids. Some means of generating circularized nucleic acids for analytical

purpose are known in the literature. Padlock probes are oligonucleotide probes that become circularized upon recognition of a target nucleic acid sequence (Nilsson et al., 1994). Proximity probe ligation can template generation of circularized probes as a consequence of target molecule recognition, as described in (Landegren, PCT WO99/49079).

RCA results in a linear amplification of circularized probes and is therefore of limited sensitivity. Typically an RCA produces about 1000 copies of each circularized probe molecule per hour.

It is an object of the present invention to improve the sensitivity of nucleic acid amplification processes, especially RCA processes.

Statements of Invention

One means of improving the sensitivity of an amplification process, such as for example a RCA process, is to increase the signal obtained during the process. This may be done by performing additional amplification procedures templated by the first generation RCA product. One such additional amplification procedure is obtained by turning the first generation RCA product into a new generation of monomers which themselves are amplified in a further amplification reaction. Accordingly, in a first aspect, the invention relates to a method of amplifying a nucleic acid product, comprising the steps of:

- providing a first generation amplification product, typically by RCA, which product comprises a concatemer of a sequence to be amplified;
- monomerising the amplification product; and
- carrying out a further amplification of the thus-formed monomers to form a second generation amplification product.

Preferably, the monomers are ligated to form circles followed by further amplification of the circles, in which case the further amplification is ideally RCA (Fig. 1). The sequence to be amplified may be a probe sequence, or part of probe sequence, or it may comprise cDNA, genomic DNA or RNA sequences.

In one embodiment of the invention, monomerization of the first generation amplification product is achieved using a restriction enzyme and an oligonucleotide complementary to the first generation amplification product, wherein the restriction enzyme cleaves any first generation amplification product/oligonucleotide hybrids. Typically, oligonucleotide is added in excess of the numbers of monomers contained in the first generation reaction product.

Alternatively, the sequence to be amplified may include a catalytically active sequence which enables monomerization of the first generation amplification product (Daubendiek & Kool, 1997).

Typically, the first generation amplification product is produced in a first generation amplification step, which step utilizes a polymerase enzyme, wherein the method includes a step of inactivating the polymerase enzyme. Ideally the polymerization is carried out under isothermal conditions.

When monomerization of the first generation amplification product is achieved using oligonucleotides and restriction enzymes, oligonucleotide is added in excess of the number of monomers present in the RCA reaction product. Most of the oligonucleotides that will hybridise to the monomers after a denaturation (and enzyme inactivation) step will be non-cleaved. Hence, because circularization is favored (at any practical concentrations) over di- or multi-merization due to the intra-molecular nature of this hybridization reaction, the monomers will preferentially become circularized upon hybridization to non-cleaved oligonucleotides and ligase treatment.

This new set of circles is now able to serve as templates for subsequent rounds of RCA, primed e.g. by the same oligonucleotide serving as template for ligation. Therefore, instead of a linear amplification, this procedure will generate a $(X_1 \times X_2 \times \dots \times X_n)$ -fold amplification, where "X" is the number of

monomers synthesized in each RCA, and "n" is the number of rounds of RCAs, digestions and circularizations. The procedure should be of particular value for applications where a large set of different circular nucleic acids is amplified by RCA, since the procedure should preserve the complexity of the initial set of circular nucleic acids. This is due to the intra-molecular nature of the circularization reactions, and because in each round of replication of the circularised nucleic acids is contiguous and processive (one circle-> one product carrying thousands of copies of the circle), without interference from any other simultaneously replicating molecule. Furthermore, each round of the reaction should not be product inhibited or primer limited, and does not recruit more polymerases during the polymerization reaction. Hence, the procedure should essentially be independent of the number of different amplified circles. The product of the reaction is single stranded, readily available for detection via hybridisation probes. The linear nature of RCA reactions should ensure faithful quantification quantitative determination of target molecules.

The monomerization can be effected using a general sequence that is present in each of the different probes present in a reaction. In the second generation of the RCA, the risk that the product will become double-stranded (see below) is minimal because all monomers will become circularised, due to the addition of excess cleavage/circularization oligonucleotides. Therefore, there should be no sequences present in the second-generation RCA, and able to prime synthesis on the second-generation RCA product. Also, this polynomial amplification method is completely specific to circularized molecules, reducing the risk for spurious amplification products seen in other amplification methods.

When analyzing gene expression patterns in a highly multiplexed fashion one needs to make an endpoint measurement on for example a microarray. Using the present invention, gene expression can be monitored with high resolution and precision in a multiplexed procedure. Several so called padlock probes, each specific for a gene product or fragment, are circularized by ligation templated by cDNA or RNA. These padlock probes can be encoded by a tag sequence in order to analyze the RCA products on a DNA

microarray. An alternative way of amplification is by using PCR. However, PCR is a product inhibited reaction which will reach a plateau-phase after a number of PCR cycles, where after no more products are formed due to reannealing of the DNA strands. This will skew the quantification of abundant transcripts compared to rare ones, since the abundant ones will stop amplifying towards the end of the multiplexed amplification reaction, while rare ones continue to be amplified. The problem of obtaining quantitative endpoint measurements using PCR is well known, and hence the technique of real-time analysis of PCR has been developed where a low number of transcripts (~1-4 transcripts) can be simultaneously analyzed (Heid et al., 1996).

By instead amplifying the circularized padlock probes using the present invention, no such skewing will occur since the reaction is not product inhibited but rather only limited by the substrates, i.e. the deoxynucleotide-triphosphates. This will enable the quantification of very high numbers of transcripts in one single reaction.

The method of replicating a first, second, and maybe more generations of circularized sequences is applicable both for probe and target nucleic acid sequences. The product can be analyzed by sequencing or by detection via e.g. any of the methods described below. In a preferred format for amplification of genomic or cDNA sequences, the target DNA is first fragmented using e.g. restriction enzymes or FLAP endonucleases, and then circularized using a circularization adapter consisting of single-stranded sequences at each end, complementary to the ends of the target DNA fragment to be amplified. It may be advantageous to amplify similar-sized fragments when many different fragments are amplified in the same reaction. It may not be possible to find one restriction enzyme or a combination of restriction enzymes that will generate restriction fragments of a similar size of all sequences in e.g. a genomic DNA sample. But it is very likely that all sequences will be represented on restriction fragments of the desired size in at least one of perhaps ten different restriction digestions using different restriction enzymes or combinations of restriction enzymes. Most advantageously, a double-stranded non-target complementary segment is

located in between the single-stranded segments, and that contains a general restriction oligonucleotide sequence (Fig. 2). By using the general restriction oligonucleotide sequence, many different target DNA fragments can be circularized using different circularization adaptors, but can then be amplified using the same general restriction oligonucleotides and enzymes. Similarly to probe circularization reactions, this target circularization reaction is unlikely to give rise to cross-reactive products since the intra-molecular circularization reaction is favored over inter-molecular ligation reactions. Therefore, a multiplicity of different target DNA fragments can be amplified in parallel, unlike amplification methods like PCR. It may be advantageous to amplify similar-sized fragments when many different fragments are amplified in the same reaction. It may not be possible to find one restriction enzyme or a combination of restriction enzymes that will generate restriction fragments of a similar size of all sequences in e.g. a genomic DNA sample. But it is very likely that all sequences will be represented on restriction fragments of the desired size in at least one of perhaps ten different restriction digest using different restriction enzymes or combinations of restriction enzymes. If 1000 different DNA sequences are to be amplified, then they can be amplified in perhaps ten different reactions using DNA samples digested with ten different combinations of restriction enzymes. The appropriate restriction digests and the corresponding circularization adaptors can be deduced from the available sequence databases. Amplified DNA sequences can be analyzed by suitable methods, including but not limited to, microarray hybridization, mini-sequencing, or mass-spectrometry, that today are limited in their through-put due to the limited multiplexing capacity of PCR.

The same mechanism of circularizing monomerized amplification products can be used to generate circularized representations of oligonucleotide probes that have been joined in a proximity-dependent nucleic acid interaction event (Landegren, 1995 and Landegren & Fredriksson, 2000). In this assay binding of two or more probes to a target molecule, e.g. a protein, allows attached DNA strands to be joined by ligation, serving as an amplifiable and detectable indicator of the bound protein. In a preferred

embodiment, an excess of restriction oligonucleotide is hybridized to two identical sequences, in two of the joined oligonucleotide probes, containing a restriction enzyme recognition sequence. After restriction digestion and heat-inactivation of the restriction enzyme, cleaved oligonucleotides are detached, allowing an intact restriction oligonucleotide to hybridize to both ends of the joined and digested probe oligonucleotides, due to the preferred intramolecular hybridization reaction. Upon addition of a DNA ligase, the restriction oligonucleotide acts as a ligation template, guiding the circularization of the oligonucleotide (Fig. 3). The circle that forms can now be amplified according to the present invention. The mechanism of forming circularized DNA as an effect of a proximity-dependent nucleic acid ligation reaction is distinct from the one described in PCT WO99/49079. In the present invention, parts of the proximity probes become circularized, in contrast to the method described in PCT WO99/49079 where proximity probes template circularization of added oligonucleotides.

In one preferred format, circularised amplification products are hybridised to different primers attached to a solid support, specific for each of the different products present in the reaction. The different primers are preferably designed to be as dissimilar as possible, i.e. they represent so-called zip-code- or tag-sequences, and they may be arranged in an array. The primers are used to initiate a localised RCA. By hybridizing the circularized amplification products rather than the initial circular set of nucleic acids, the hybridisation kinetics and sensitivity are improved by several orders of magnitude. Moreover, if a localised RCA is monitored in real-time, a signal accumulation over time could be detected over a very broad dynamic range, particularly suitable for expression analyses. If the complexity of the sample is very high with respect to differences in copy number and/or the number of different sequences, then cross hybridisation between different tag-sequences will be difficult to avoid completely. Therefore, it would be valuable to increase the specificity of zip code recognition, over that attained by oligonucleotide hybridization, by requiring that the solid support attached tag-sequence primers template circularization of the amplified monomers. If the number of

different targets is very high, a monomerization procedure must be devised that allows for specific cleavage in each of many different tag-sequences. For this purpose, every sequence in the complex mix of circularizable nucleic acids may be equipped with a type II restriction enzyme recognition sequence adjacent to the unique tag-sequence. Specific cleavage within the tag-sequence motif is obtained by rendering the recognition sequence double-stranded with an oligonucleotide having a sequence general for all RCA products and/or a pool of random short oligonucleotides, e.g. hexamers, which will form double-stranded substrates for restriction cleavage (Fig. 4). After restriction digest, the monomers have now in effect been converted to padlock probes containing half-tag end-sequences. Moreover, this strategy allows half-tags connected to pairs of detection reagents to be combined to identify the pairs of binding reagents that have been bound in proximity. This is possible by using proximity ligation probes where ligatable ends constitute unique base-paired half-tag sequences. In this manner ends may be joined by blunt- or sticky end ligation (Fig. 3).

Repeated RCAs has been proposed previously in WO 92/01813 and US5,714,320. However, in WO 92/01813 the RCA products are cleaved to monomers in order to create new primers for subsequent RCA reactions using preformed circles. In US5,714,320 a preparative method is described for producing selected oligonucleotides having well-defined ends by providing an isolated circular oligonucleotide template. The method is however not suited for analytical purposes or for amplification of rare circular DNA strands generally, since it typically requires 0.1 μ M to 1 mM isolated circular templates. In the method described in US5,714,320 the primers are provided in a molar excess over circular template of less than 100, and the deoxynucleotidetriphosphates in a molar excess over circular templates of less than 10^7 . For analytical applications these molar ratios are too low to allow efficient priming and polymerization, respectively, due to the low amount of target molecules. For analysis of, e.g. genomic DNA sequences by either amplification of circularized genomic DNA or circularized oligonucleotide probes, the corresponding molar ratios required in the first amplification step

are at least 100 and 10^7 , respectively, or more preferably greater than 100 000 and 10^{10} , respectively, or ideally about, 10^7 and 10^{12} , respectively, because of the low concentration of initial circularized nucleic acids. Japanese patent application JP 4-304900 describes the use of RCA for detecting circularised probes. In this application repeated RCAs are described using the RCA product as a target for subsequent probe ligations and RCAs. By contrast, in the present invention the monomerised RCA product is used as probe in subsequent ligations and RCAs. The advantages of this procedure have already been discussed.

In a further aspect of the invention, the present inventors have devised several approaches for increasing the signal obtained from an RCA by adding a linear signal-generating amplification of the RCA product. This results in an amplification of the signal from circularized probes that grows as a square function of time.

The first approach is based on selective, hybridisation-dependent, degradation of a probe complementary to the RCA product. It is desirable that the probe is designed in a manner such that its cleavage is detectable.

Accordingly, in a further aspect, the invention comprises a method of nucleic acid amplification that employs probes to indicate the extent of the amplification, which method comprises the steps of:

- providing a signaling probe, which probe includes a sequence which is complementary to an amplification product;
- reacting the signaling probe with the amplification product;
- selectively degrading signaling probes that have hybridized to the first generation amplification product, wherein degraded probes dissociate from the first generation amplification product allowing further signaling probes to hybridize with the product, wherein hybridization and degradation of the probes effects a change in detection signal emitted by the probe.

Preferably, the probe consists of a hairpin-loop probe, a so-called molecular beacon (Tyagi & Kramer, 1996) comprising a detectable marker ligand therein, which selectively emits a detectable signal. The marker may be part of the nucleic acid sequence or may be a ligand held within the hairpin formation. Preferably, the ligand is released from the nucleic acid on cleavage of the nucleic acid.

If the part of the probe hybridising to the RCA product at least partially consists of RNA it will, upon hybridisation, be degrade by the enzyme RNase H. (Duck et al, e.g. USP5011769, USP5660988, USP5403711 and USP6121001)

A similar effect can be obtained by substituting one or more of the deoxynucleotides, used in the RCA, for thiophosphorodeoxynucleotides, thereby protecting the RCA product from endonuclease hydrolysis. The molecular beacon would in this case be made of ordinary deoxynucleotides and would therefore be susceptible to degradation by a double strand specific endonuclease. Specifically, a restriction enzyme recognition site can be designed into the loop sequence of the beacon. There are several known restriction enzymes that specifically cleave the non-thiophosphorylated strand when this is hybridised to a thiophosphorylated strand. By analogy to the RNaseH degradable probe, this would only result in cleavage and thereby signal emission from of the probe in the presence of the target molecules. Instead of a specific endonuclease, any unspecific double strand specific endonuclease can be used, thereby avoiding the need for a specific sequence in the probe.

A related way of producing detectable cleavage products is to add a probe complementary to an RCA product and a restriction enzyme that recognise a sequence in the RCA-oligonucleotide duplex. After cleavage of the RCA-oligonucleotide duplex, the cleaved probe will dissociate from the monomerized RCA products. Then an intact oligonucleotide can hybridise to one end of the cleaved monomer, whereafter the other end of the monomer will most likely hybridise to the same oligonucleotide, due to the intra-molecular nature of the interaction. In this manner, a new substrate for the

restriction enzyme is formed, and a second signal-generating cleavage occurs. By labelling the probe with a fluorescent moiety at one end and a quencher molecule at the other end a signal will be generated upon cleavage and subsequent dissociation.

Hybridisation-dependent degradation of probes can also be performed with any double strand-specific exonuclease ((Copley & Boot, 1992), USP6121001). In this case a probe that hybridise to the RCA product will be a substrate for the exonuclease and thereby degraded while the RCA product are unaffected due to the lack of any double stranded ends. Upon degradation the melting temperature of the duplex will decrease and the probe is more likely to dissociate even if not fully degraded. Thereby the sequence is made accessible for another probe to hybridise and subsequently be degraded.

This approach for increasing the signal can also be performed with ribo- or so called DNA-zymes (R/D-zyme) (e.g. (Herschlag & Cech, 1990) & (Carmi *et al.*, 1998). By incorporating the complementary sequence of an R/D-zyme in the circularised nucleic acid the RCA product will contain the active R/D-zyme. This can then be used to cleave a probe that is added to the reaction mixture. Upon cleavage the cleaved probe will dissociated from the RCA product and leave place for another uncleaved probe to hybridise and be cleaved. The R/D-zyme does not need to cleave the probe but it can instead template ligation of two oligonucleotides together and generate a signal as described below (Cuenoud & Szostak, 1995).

Probes may also be designed so that upon hybridisation to the RCA product they assemble in such a way that they resemble the substrate for a structure specific enzyme. The enzyme is preferably selected from the group comprising resolvases, recombinases or nucleases, examples Ruv ABC, Holliday junction resolvases, Flp recombinases, FEN nuclease or certain polymerases. One aspect of the invention is to use two oligonucleotides hybridising in tandem in such a way that the downstream oligonucleotide has a protruding 5 prime end. This structure can be cleaved by several different enzymes e.g. FEN nucleases, *Taq* polymerase, *Tth* polymerase or *Mja* nuclease (Lyamichev *et al.*, 1999). The downstream oligonucleotide is

designed so that it has a melting temperature near the temperature of the isothermal RCA reaction.

Accordingly, the probes may comprise a fluorescent moiety and a quenching moiety which are separated by a hairpin-loop structure, wherein the quenching moiety quenches the signal from the fluorescent moiety when the probe is in an un-bound and intact conformation the quenching moiety quenches the signal from the fluorescent moiety, and wherein bound or degraded probe emits a signal (Fig. 5). Alternatively, the probe may include a pair of signalling moieties, which moieties produce a signal by FRET when the probe is intact, but where degradation of the probe inhibits signal production.

Advantageously, with the above combination of a probe with any of the hybridization-dependent accumulation of detectable moieties the reaction can continue isothermally, even at low temperature.

In this manner the temperature may be less than 60°C and preferably is less than 50°C. Advantageously, this may remove the need to maintain the reactions at an elevated temperature.

Instead of degrading probes it is possible to assemble probes to mark the presence of an RCA product. If two oligonucleotide probes are constructed in such a way that they hybridise adjacent to each other on the RCA product, then they can subsequently be joined by a ligase. If the two oligonucleotides are designed in such a way that upon ligation and dissociation from the target they form a stable stem-loop structure, a donor molecule at the 5 prime position can be placed in close proximity to a acceptor molecule at the 3 prime position in the other oligonucleotide. A signal can then be generated based upon fluorescence resonance energy transfer (FRET). By designing the probes so that the ligated probe will have a melting temperature near the temperature of the isothermally proceeding RCA reaction a fast turnover will be possible. The unligated probes will be present in large molar excess over the produced ligated probes, thereby increasing the rate at which they will hybridise to the target RCA product and subsequently be ligated, dissociate and so on. The reaction is thus possible to perform isothermally.

Accordingly, in a further aspect, there is provided a method of nucleic acid amplification which employs probes to indicate the extent of the amplification, which method employs a pair of signaling probes, which probes are designed such that they hybridize to a target sequence on an amplification product adjacent to each other, wherein upon hybridization the probes are ligated to form a ligated product which dissociates from the target sequence, wherein dissociation of the ligated product from the target sequence allows a further pair of probes to hybridize to the target sequence, and wherein upon dissociation from the target sequence the ligated product emits a signal.

Preferably, one of the pair of signaling probes comprises a donor moiety and another comprises an acceptor moiety, and wherein the probes are designed such that the ligated product forms a hairpin loop structure, which upon formation allows energy transfer between the donor and acceptor moieties to produce a signal.

In yet another aspect, the invention comprises homogenous detection of concatemer amplification products using a modified molecular beacon design. The present inventors have found that conventional molecular beacons generate signal in the absence of an RCA product but in the presence of DNA polymerase, unless at least parts of the DNA residues in the beacon are replaced by nucleic acid residues that are not accepted as substrates for the polymerase, since the 3' end (usually carrying the fluorescence quencher) is degraded by the 3' exonuclease activity of the polymerase. Generation of non-specific signal can be completely avoided by using molecular beacons comprising 2'-O-methyl-RNA residues instead of DNA residues (Fig. 6). The inventors further found that conventional molecular beacons that hybridise to an RCA product are quenched, because neighbouring beacons readily form stems with each other (inter-molecular stems), bringing the quencher and reporter fluorophores close together, much like the closed (quenched) conformation of non-hybridising beacons (Fig. 7). This can be avoided by including one of the stem sequences of the beacon in the padlock probe sequence so that, upon hybridisation to the RCA product, one part of the stem hybridises to the product so that it cannot form stem-like

structures with neighbouring beacons (Fig. 7). With these modifications the RCA can be monitored in real-time (Fig. 8). Alternatively, a second probe could be added to the detection reaction that hybridises to the RCA product in between the molecular beacons to avoid that this sequence loops out, thus hindering the inter-molecular stems to form. The magnitude of the inter-molecular quenching may vary between different molecular beacon sequences as exemplified by the complete quenching of the DNA molecular beacon version (Fig. 9) compared to the partial quenching of the 2'-O-Me-RNA beacon used in figure 8.

The inter-molecular hairpin structure that forms between adjacent molecular beacons, hybridising to a concatenate sequence, can also be used to generate FRET between two molecular beacons that hybridise within one monomer of the concatenate sequence. The two molecular beacons should be equipped with the same stem sequence, but the position of the donor and acceptor fluorophores should be switched in one of the two molecular beacons. Such molecular beacons will hybridise in an alternating fashion, forming inter-molecular hairpin structures between adjacent, but alternating molecular beacons, such that the fluorophore of one beacon is positioned in close proximity to the fluorophore of the neighbouring molecular beacon, enabling efficient FRET between the two fluorophores. In this way background fluorescence from closed molecular beacons can be diminished, increasing detection sensitivity.

In a yet further aspect, the invention comprises homogenous detection of concatemer amplification products by virtue of the increased concentration of signalling probes hybridized to the amplification product, compared to the concentration of non-bound signalling probes free in the surrounding solution. The homogenous detection is possible because the long concatemer amplification products are coiled when free in solution and form micrometer-sized balls. The enrichment of signalling probes in the balls of DNA allows convenient detection of single amplification products from individual circularized probes in microscopic analysis, due to the contrast between the condensed signal from the signalling probes hybridizing to the product and the

relatively diffuse, fainter signal from non-bound probes (Fig. 12). When for example analyzing gene expression, the number of RCA product balls will directly correspond to the gene expression level. Such a homogenous detection system is very convenient and accurate, since each counted RCA-product corresponds to one detected transcript molecule.

Multiplexed homogenous analyses are generally limited by the number of fluorophores which can be spectrally resolved. If several fluorescently labeled probes are added to for example a PCR reaction, overlapping spectra become a major problem, since the sum of the different fluorophores in the reaction is analyzed. However, in the present invention the analysis of individual RCA products by fluorescence labeled probes can be performed in high multiplex, because fluorophores with closely resembling spectra can be resolved since individual RCA product balls are analyzed, hence no spectral cross-talk.

The homogenous detection can be multiplexed for gene expression analysis or for multiplexed genotyping, by including different zip-code sequences in the different amplified probes, to allow identification of the amplification products by hybridizing ratio-labeled zip-code oligonucleotides to different amplification products. Ratio-labeling is well known in the art and has been used to create multiple color-blends from a limited number of primary colors (Dauwense et al., 1992, and Nederlof et al., 1992). For example, if two primary dyes A and B are mixed as follows: 0% A and 100% B, 20% A and 80% B, 40% A and 60%, 60% A and 40% B, 80% A and 20% B, and 100% A and 0% B, six different color-blends are created. If three primary dyes are mixed with a similar increment, 36 color-blends can be distinguished. The zip-code oligonucleotides are easily ratio-labeled by either mixing different proportions of fluorescent dye and conjugating these mixes with different zip-code oligonucleotides, or mixing zip-code oligonucleotides labeled with different dyes in the desired proportions. The degree of multiplicity in this labeling approach depends on the number of primary dyes added to the labeling scheme (n), and the precision of the labeling determining the number of ratio increments (x), which limits the number of color blends that can be

distinguished $x^{(n-1)}$. Since the amplification products can consist of thousands of repeated units, the precision in the ratio-labeling should be very high, and the contribution of any minor cross-hybridizing zip-code oligonucleotides would be negligible. The major advantages of using the ratio-labeling approach compared to the combinatorial labeling approach, which uses binary (all-or-none) combinations of primary dyes to create multiple pseudo-colors, is that many more color-blends can be obtained using color-ratios compared to color-combinations.

In some embodiments of the present invention it may be advantageous to eliminate any linear probes before the initial RCA, e.g., it has been noticed that remaining non-circularised probes produce a non-specific signal in RCAs. An attempt to overcome this problem is described in WO 00/36141 where enzymes or so-called capture ligands are used to remove any remaining linear nucleic acid probes.

Accordingly, in a further aspect, the present invention relates to a method of removing or rendering inert non-circularized probes during (or after) a nucleic acid amplification process which utilizes circular probes, in which the non-circularized probes comprise first and second segments separated by a linking segment, wherein the first and second segments are complementary to sequences on a target sequence, wherein the probe is designed to form a hairpin loop structure between the 3' end of the probe and a sequence in a linking segment of the probe, wherein a stem of the hairpin loop structure ideally has a thermal stability that neither inhibits formation of a hybrid between the loop and the target sequence nor inhibit replication of the probe by RCA.

The stem should be sufficiently stable to prime synthesis and thus convert non-ligated probes to full hairpins, unable to prime "second strand" synthesis on the RCA-product.

Additionally, the hairpin-forming probe has a further advantage in that such a probe design may be more specific than conventionally designed probes. In conventional probe design the diagnostic base should be positioned at the ultimate 3' position of the probe sequence to fully take

advantage of the mismatch discriminatory capacity of DNA ligases. In the hairpin probes of the present invention, this diagnostic base will thus be a part of the hairpin forming sequence. This sequence may be designed to flip back and forth between the hairpin and the target hybridising conformation at the ligation temperature. The matched sequence version of a probe will then spend more time in the target sequence hybridising conformation than the corresponding mismatched probe version. This will favour ligation of matched probes over misligation of mismatched probes.

In a further aspect, the invention provides a further method of removing or rendering inert non-circularized probes during (or after) a nucleic acid amplification process which utilizes circular probes, in which an excess of oligonucleotides that are complementary to a 3' end of the probes are added before the amplification reaction, which oligonucleotides preferably include a 5' sequence extension, whereby the 3' end of non-circularized probes will lose complementarity to a product of the amplification process

Preferably, the excess of oligonucleotides which are complementary to the 3' end of the probes are added to the system before the RCA is begun although they may be added simultaneously with the other reagents or immediately after the reaction is begun.

According to the invention, the 3' ends of non-ligated probes will lose their complementarity to the RCA product, and will not be able to prime a second strand synthesis. These 3' eliminators may be used to prime the RCA.

Alternatively, to avoid the situation where the linking segment of non-ligated probes becomes replicated, the 3' eliminators may be equipped with an unextendable 3' end that is also unremovable by 3' exonuclease activities of DNA polymerases. This may be particularly important if the RCA product is intended to be detected by oligonucleotides recognizing sequences in the RCA product that correspond to the linking segment of the padlock probes. In this case a general primer could be added to the circularised probes to initiate the RCA. Because of the limited length of the 3' eliminators, they will become displaced by the polymerase extending the primer and will thus not inhibit the RCA (Banér *et al.*, 1998).

Detailed Description of the Invention

Embodiments of the invention will now be described in more detail, by way of example only, with reference to the accompanying drawings of which:

Figure 1 illustrates the general procedure of several generation rolling circle replication (RCA) according to the invention, 1) a padlock probe is hybridized to a specific target nucleic acid strand, 2) the padlock probe is circularized using a DNA ligase, 3) the circularized probe is replicated in an RCA, 4) an excess of oligonucleotides are hybridized to a restriction enzyme recognition sequence present once per monomer of the RCA product, 5) the RCA product is monomerized using a restriction enzyme that digests the oligonucleotide/product duplexes, 6) after a heating step that inactivates the restriction enzyme and denature the oligonucleotide fragments, an absolute majority of the monomers will hybridize with both ends to intact oligonucleotides, 7) the monomers are circularized using a DNA ligase and the thus formed circles can now be treated according to steps 3-7 for additional cycles;

Figure 2 illustrates the amplification of genomic- or cDNA fragments using a circularization adaptor to circularize and amplify the sequences according to the invention, 1) a DNA sample is fragmented using e.g. a restriction enzyme, 2) the fragmented DNA is denatured, 3) a circularization adaptor is hybridized to a specific target fragment, 4) the target fragment is circularized using a DNA ligase, 5) the circularized target fragment is replicated in an RCA, 6) an excess of a general adaptor oligonucleotide is hybridized to a restriction enzyme recognition sequence present in the adaptor sequence once per monomer of the RCA product, 7) the RCA product is monomerized using a restriction enzyme that digests the oligonucleotide/product duplexes, 8) after a heating step that inactivates the restriction enzyme and denature the oligonucleotide fragments, an absolute majority of the monomers will hybridize with both ends to intact oligonucleotides, 9) the monomers are circularized using a DNA ligase and the thus formed circles can now be treated according to steps 5-9 for additional cycles;

Figure 3 illustrates the conversion of a proximity-dependent ligation event to circularized DNA that can be amplified according to the present invention, 1) a pair of proximity probes, e.g. antibodies equipped with oligonucleotides, binds to a target protein, 2) the two oligonucleotide are joined in a proximity-dependent ligation reaction, e.g. via blunt end ligation to allow half-tag ligation for the identification of pairs of binding reagents that have been bound in proximity, 3) an excess of oligonucleotides are hybridized to two identical sequences containing a restriction enzyme recognition sequence and present in both of the joined oligonucleotide sequences, 5) the joined product is cleaved using a restriction enzyme that digests the oligonucleotide/product duplexes, 6) after a heating step that inactivates the restriction enzyme and denature the oligonucleotide fragments, an absolute majority of the cleaved ligation products will hybridize with both ends to intact oligonucleotides, 7) the monomers are circularized using a DNA ligase and the thus formed circles can now be treated according to steps 3-7 in figure 1;

Figure 4 illustrates how a complex set of RCA products can be monomerized in the middle of a zip-code motif using a type IIs restriction enzyme and random hexamers, and how the monomerized RCA products then are hybridized and circularized on a zip-code oligonucleotide microarray for increased specificity and dynamic range, 1) a set of RCA products containing identifying zip-code oligonucleotide sequences has been generated from e.g. multiplexed padlock probe genotyping or expression analysis experiments, or a multiplexed proximity-dependent ligation event, 2) a type IIs restriction enzyme is added along with a set of random hexamers and a general oligonucleotide containing a type IIs restriction enzyme recognition sequence, 3) the hexamers and the restriction oligonucleotides are optionally removed and the monomers have now in effect been converted to padlock probes with half zip-code end-sequences, 4) the monomers are hybridized to zip-code oligonucleotide microarray, 5) the monomers are circularized on the zip-code oligonucleotides using a DNA ligase, 6) the monomers are amplified in a RCA using the zip-code oligonucleotides as

primers, and the polymerization may optionally be monitored in a homogenous format for increased dynamic range;

Figure 5 is a schematic representation of the amplification method of the invention whereby molecular beacons are degraded;

Figure 6 is a graph showing removal of non-specific accumulation of fluorescence in presence of DNA polymerase by replacing all DNA residues of the molecular beacon with 2'O-Me-RNA residues where one DNA molecular beacon is labeled with FAM fluorescence (upper panel) and one 2'O-Me-RNA molecular beacon is labelled with HEX fluorophore (lower panel) which was added to the same test tube in presence (squares) or in absence (circles) of ϕ 29 DNA polymerase;

Figure 7 is a schematic representation of inter-molecular quenching of molecular beacons hybridizing to an RCA product when using a traditional molecular beacon design;

Figure 8 is a graph showing the inter-molecular beacon quenching is demonstrated by restriction cleavage of the RCA product, and the modified design of the molecular beacon allows for real-time monitoring of RCA;

Figure 9 is a graph showing the temperature profile of RCA reactions performed as in figure 8. Fluorescence is obtained from the DNA molecular beacon added after RCA, and heat inactivation of the polymerase;

Figure 10 shows real time monitoring of third generation RCA according to example 1;

Figure 11 shows the fluorescence recorded at a microarray feature containing an oligonucleotide complementary to the second-generation RCA product obtained according to example 2; and

Figure 12 shows individual RCA products in solution detected by homogenous hybridization of fluorescence labeled oligonucleotides, demonstrating the contrast between the condensed signal from the fluorescence labeled oligonucleotides hybridizing to the product and the relatively diffuse, fainter signal from non-bound oligonucleotides.

EXAMPLESExample 1 (Real-Time Monitoring of a Third-Generation RCA Using Modified Molecular Beacons)

2 nM padlock probe (P-
CCTCCCCATATTAAAGGCTTCTCTATGTTAAGTGACCTACGACCTCA
ATGCTGCTGCTGACTACTCTCCCTAAGGCATTCTGCAAACAT (P= 5'
phosphate) was circularized in 10 mM TrisAc (pH 7.5), 10 mM MgAc₂, 50 mM
KAc, 0,1% BSA, 1mM ATP, 200mM NaCl, and 20 mU/μl T4 DNA ligase in
presence of 0, 10, 40, or 160 zmol of a target oligonucleotide
(GCCTTAATATGGGAGGATGTTGCAGAATGCCTTAG). The reactions
were incubated for 15 minutes at 37°C, and then the ligase was inactivated for
5 minutes at 65°C. The first-generation RCA was performed for 45 minutes at
37°C in 0,1 μg/μl BSA, 250μM dNTP, 10 mM DTT, 1 pmol primer
(CGTCGTAGGTCACTTAACAT), and 1ng/μl φ29 DNA polymerase. The
polymerization components were added to 10 μl ligation reactions in 15 μl of
φ29 DNA polymerase buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, and 20
mM (NH₄)₂SO₄. The DNA polymerase was inactivated for 10 min at 65°C.
The first-generation RCA product was monomerized by adding 5 μl 0,1 μg/μl
BSA, 3 pmol RSAI (GCTGCTGACTACTCTT), and 10 U RsaI in φ29 DNA
polymerase buffer. The reaction was incubated for 60 minutes at 37°C and
then the enzyme was inactivated for 10 minutes at 65°C. The monomerized
RCA product was circularized by adding 5 μl 0.1 μg/μl BSA, 1 mM ATP, and 1
U T4 DNA ligase in φ29 polymerase buffer. The ligation was incubated for 15
min at 37°C and then the enzyme was inactivated for 5 minutes at 65°C. The
second-generation RCA was performed using the same conditions as the
first-generation RCA by adding 15 μl polymerization reagents to 35 μl of the
circularized RCA product. The polymerization reaction continued for 45
minutes at 37°C. Half of the second-generation RCA product was
monomerized by adding 6 pmol RSAIcomp (AAGAGAGTAGTACAGCAGC)
and 10 U RsaI in 5 μl φ29 DNA polymerase buffer including 0.1 μg/μl BSA.

The reaction was incubated for 60 minutes at 37°C, and then the enzyme was inactivated for 10 minutes at 65°C. Circularization of the monomerized second-generation RCA product was performed using the same procedure as the circularization of the monomerized first-generation RCA product. The third-generation RCA was performed as the second-generation RCA but in presence of 0.1 μM molecular beacon (HEX-ccuCAAUGCUGCUGGUACUACgagg-DABCYL) and for 60 min. The reaction was followed in real-time using an ABI 7700.

Example 2. (Detection of a second-generation RCA product on a DNA microarray)

2 nM padlock probe (WD 1216G) was circularized as above in presence of various amounts of target oligonucleotides (T 1216G; 0, 25, 250, or 2500 zmol). The first-generation RCA was performed for 100 minutes at 37°C as above 1 pmol of the primer WDP-F. The polymerization components were added to 10 μl ligation reactions in 15 μl of φ29 DNA polymerase buffer. The DNA polymerase was inactivated for 10 min at 65°C. The first-generation RCA product was monomerized by adding 5 μl 0.1 μg/μl BSA, 3 pmol Comp WDP-F, and 5U *Fnu*4H 1 in φ29 DNA polymerase buffer. The reaction was incubated for 60 minutes at 37°C and then the enzyme was inactivated for 10 minutes at 65°C. The monomerized RCA product was circularized by adding 5 μl 0.1 μg/μl BSA, 1 mM ATP, and 1 U T4 DNA ligase in φ29 polymerase buffer. The ligation was incubated for 15 min at 37°C and then the enzyme was inactivated for 5 minutes at 65°C. The second-generation RCA was performed using the same conditions as the first-generation RCA by adding 15 μl polymerization reagents to 35 μl of the circularized RCA product. The polymerization reaction continued for 100 minutes at 37°C. Half of the second-generation RCA product was monomerized by adding 4.5 pmol D-RCRcut and 5 U *Fnu*4H 1 in 5 μl φ29 DNA polymerase buffer including 0.1 μg/μl BSA. The reaction was incubated for 60 minutes at 37°C, and then the enzyme was inactivated for 10 minutes at 65°C. 30μl monomerized second-generation

RCA product was hybridized to a DNA microarray in 4*SSC, 0,525 μ M Comp WD Cy5, 10 μ M EDTA at 45°C for 2h, washed in 0.1xSSC at 45°C, rinsed in water, and finally dried. The Cy5 fluorescence signal was recorded in a fluorescence laser scanner.

A schematic drawing of the general procedure of a several generation RCA, as described in examples 1 and 2 is illustrated in Figure 1. The results of examples 1 and 2 are shown in figures 10 and 11, respectively. First a circular nucleic acid is replicated in an RCA. Then the first-generation RCA product is monomerized, e.g. by using a restriction enzyme that will cleave the product at a recognition site, rendered double-stranded by an oligonucleotide complementary to the RCA product. Intact restriction oligonucleotides will displace the digested ones, e.g. during or after heat inactivation of the restriction enzyme. When an intact restriction hybridizes to one end of a monomerized RCA product, the other end of the monomer will hybridize to the same restriction oligonucleotide, because of the intra-molecular nature of the second hybridization reaction. The monomers can then be circularized by joining the ends, e.g. using a DNA ligase. The procedure can now be repeated for one or more rounds of the same procedure.

Figure 10 shows real-time monitoring of the third-generation RCA described in example 1. **A)** Real-time measurement of HEX fluorescence emitted from molecular beacons hybridizing to the RCA product as it is generated. **B)** A graph showing the relationship between the amounts of target oligonucleotide added in the first probe circularization reaction, performed in quadruplicate, and the maximum slope of the third-generation real-time RCA of these ligation reactions. The error-bars denote the standard deviation.

Figure 11 shows the fluorescence recorded at a microarray feature containing an oligonucleotide complementary to the second-generation RCA product obtained according to example 2.

Example 3

Oligonucleotides: The padlock probes used were p90: P-
CCTCCCCATCATTTAAAGGCTTCTATGTTAAGTGACCTACGACGATG

CTGCTGCTGACTACTCTTCTTAAGGCATTCTGCAACAT and p93: P-CCTCCCATCATTTAAAGGCTTCTATGTTAAGTGACCTACGACCTCAATGCTGCTGACTACTCTTCTTAAGGCATTCTGCAACAT (P= 5' phosphate). The ligation template for the padlock probes was t40: GCCTTAATATGGGAGGATGTTGCAGAATGCCTTAG. The DNA molecular beacon was FAM-cgcctcAATGCTGCTGACTACgaggcg-DABCYL (the stem part in lower case) and the 2' O-Me-RNA molecular beacon was HEX-ccucAAUGCUGCUGCUACUACgagg-DABCYL. The stem is two base pairs shorter in the 2'-O-Me-RNA beacon because of the higher hybrid stability of 2'-O-Me-RNA base pairs. The oligonucleotide used for restriction digestion was Tsp45I: GGCTTCTCTATGTTAAGTGACCTACGA.

Example 4

Padlock probe circularization: 200 nM padlock probes were ligated in 10 mM Tris-acetate pH 7.5, 10 mM MgAcetate, 50 mM NaCl, 1 mM ATP, 1 µg/µl BSA, and 0.2 units/µl T4 DNA ligase (Amersham Pharmacia Biotech) at 37°C for 30 minutes in presence of 600 nM ligation template.

Example 5

Rolling-circle amplification: Polymerization reactions were performed in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM dithiothreitol and 0.2 µg/µl BSA, 0.25 mM dNTP, and 2 ng/µl Φ29 DNA polymerase (kindly provided by Dr. M. Salas) at 37°C. For real-time monitoring the RCA was performed in presence of 100 nM molecular beacon and 300 nM ROX dye. Fluorescence values are given as a ratio between the fluorescence emitted by the molecular beacon (FAM or HEX) and the ROX reference dye. The temperature profiles were obtained by sampling fluorescence after temperature increments of 1°C held for 30 seconds.

Example 6

Restriction digestion: 20 µl of a 10 mM Bis Tris Propane-HCl (pH 7.0), 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.1 µg/µl BSA, 1.5 µM Tsp45I, and 0.1 U/µl

Tsp 45I (New England Biolabs) was added to 40 μ l RCA products and incubated at 65°C for four hours.

Turning to the drawings as can be seen in Figure 6, removal of non-specific accumulation of fluorescence in presence of DNA polymerase by replacing all DNA residues of the molecular beacon with 2' O-Me-RNA residues. One DNA molecular beacon labeled with FAM fluorescence (upper panel) and one 2' O-Me-RNA molecular beacon labeled with HEX fluorophore (lower panel) was added to the same test tube in presence (squares) or in absence (circles) of ϕ 29 DNA polymerase. The left portion of the graphs shows a real time monitoring of fluorescence in the test tube, and the right portion shows the temperature profile of the components present at the end of the 60 min incubation.

From Figure 7 it can be seen that inter-molecular quenching of molecular beacons hybridizing to an RCA product when using a traditional molecular beacon design (upper panel). The structure can be avoided by using a modified design (lower panel).

Figure 8: The inter-molecular beacon quenching shown in figure 7 is demonstrated by restriction cleavage of the RCA product, and the modified design of the molecular beacon allows for real-time monitoring of RCA. RCA was performed on ligation reactions subjected to ligase (black) or no ligase (grey) containing either the p90 (squares) or the p93 (circles) padlock probes. The left portion of the graph shows a real time monitoring of fluorescence from the 2' O-Me-RNA molecular beacon in the different reactions. The right portion shows the temperature profile of the components present at the end of the 90 min RCA (filled symbols). Superimposed are the temperature profiles of the different reaction components after a restriction digest (open symbols).

Temperature profile of RCA reactions performed as in figure 8 are shown in figure 9 where fluorescence is obtained from the DNA molecular beacon added after RCA, and heat inactivation of the polymerase.

Example 7

One hundred nanogram of *PstI*-cut genomic DNA was denatured at 95°C for 12 minutes and cooled rapidly in a thermal cycler to 12°C. Pre-annealed oligonucleotides "CircEx15ATP7B"; TTG CTG GCT TTT GTC TCG TAT CGG AGC GTA CCT AGA TAG CGT GCA GTC CTC TTT AAT TTG and "gDNAadapter1"; 5'P-CGC TAT CTA GGT ACG CTC CGA TAC AT were added to a final concentration of 2nM to the denatured cut genomic DNA. To one reaction ligase was added, and to another ligase was omitted. Ligation was allowed to proceed for 1h at room temperature followed by 30 minutes at 37°C before the ligase was heat inactivated at 65°C for 20 minutes. Five microliter of the ligase reaction were subjected to a rolling circle amplification reaction in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.2 µg/µl BSA, 0.25mM dNTP, and 10 ng Φ29 polymerase at 37°C for 3 hours. To quantify the amount of RCA product, a real-time PCR reaction was run on 2.5 µl of the RCA reactions in 1xPCR GOLD buffer (ABI), 1.6mM MgCl₂, 0.25 mM dNTP, 200 nM Ex15ATP7B-Fnw (AGA CCT TGG GAT ACT GCA CGG) and 200 nM Ex15ATP7B-Rew (CAA TTC CAC AGC CTG GCA CT) primers, 0.625 U Taq GOLD polymerase (ABI), 300 nM ROX dye and 0.15x SYBR Green (Molecular Probes) in a volume of 25 µl. The primers were designed to PCR amplify both the genomic fragment and the RCA product. The PCR program was 95°C for 10 minutes followed by 45 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 60 sec. The PCR amplicons were subjected to a dissociation-curve analysis after the completion of the PCR. The results presented as Ct-values are shown in table 1 with standard deviations in brackets. The melting temperature of all amplicons was 82.6°C which correlates well with the estimated Tm of 83°C for the amplicon. Φ29 DNA polymerase exhibits a strong exonucleolytic activity on single stranded DNA (denatured); therefore the non-ligated DNA shows 4-fold fewer products compared to the non-Φ29 DNA polymerase treated sample when taking the four-fold dilution into account. The DNA to be amplified is 545 nt long and with a processivity of 1500 nt/min, a 500-fold amplification should be expected. This would be expected to result in a 120-fold amplification compared to the unamplified

sample, when taking the four-fold dilution into account. The delta Ct-value of 6.75 corresponds to a 110-fold amplification.

Table1.

| SAMPLE | BEFORE RCA | AFTER RCA |
|-----------|-----------------------|-----------------------|
| NO LIGASE | 25,27 ($\pm 0,191$) | 29,06 ($\pm 0,255$) |
| LIGASE | 25,98 ($\pm 0,057$) | 19,23 ($\pm 0,212$) |

Example 8

A 1x PBS solution of 2 pM RCA product from circularized padlock probes p93, and 5 nM of the product complementary rhodamine labeled probe RC1R (5'-Rhodamine-CTCTATGTTAAGTGACCTACG) was injected into two microfluidic channels with a width of 50 micrometer and a inter-channel spacing of 40 micrometer. Circularization of the padlock probe and the RCA was performed according to examples 4 and 5. The RCA products consist of on average 1500 copies of the circularized probes, since the RCA was performed for 1 hour. The fluorescence from bound and non-bound fluorescence labeled probes in the channels was imaged using an epifluorescence microscope equipped with a 40x dry lens. In figure 12, several bright balls of DNA are seen in the channels, as well as many less bright out-of-focus objects, on a background of the diffuse fluorescence from non-bound probes.

The invention is not limited to the embodiments hereinbefore described which may be varied in both construction and detail without departing from the spirit of the invention.

References:

- Banér J., Nilsson M., Mendel-Hartvig M., and Landegren U. (1998). Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. *Nucleic Acids Res.* **22:** 5073-5078.
- Carmi N., Balkhi S. R., and Breaker R. R. (1998). Cleaving DNA with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 2233-7.
- Copley C. G., and Boot C. (1992). Exonuclease cycling assay: an amplified assay for the detection of specific DNA sequences. *Biotechniques* **13:** 888-92.
- Cuenoud B., and Szostak J. W. (1995). A DNA metalloenzyme with DNA ligase activity. *Nature* **375:** 611-4.
- Daubendiek, S.L. and Kool, E.T. (1997) Generation of catalytic RNAs by rolling transcription of synthetic DNA nanocircles. *Nat Biotechnol.* **15:** 273-277.
- Dauwense, J.G., Wiegant, J., Raap, A.K., Breuning, M.H. and van Ommen, G.-J.B. (1992) Multiple colors by fluorescence in situ hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular karyotype. *Hum Mol Genet.* **1:** 593-598.
- Herschlag D., and Cech T. R. (1990). DNA cleavage catalysed by the ribozyme from Tetrahymena. *Nature* **344:** 405-9.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., and Williams P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6:** 986-994.
- Lizardi P. M., Huang X., Zhu Z., Bray-Ward P., Thomas D. C., and Ward D. C. (1998). Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nature Genet.* **19:** 225-232.
- Lyamichev V., Mast A. L., Hall J. G., Prudent J. R., Kaiser M. W., Takova T., Kwiatkowski R. W., Sander T. J., de Arruda M., Arco D. A., Neri B. P., and Brow M. A. D. (1999). Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat. Biotechnol.* **17:** 292-296.

- Nederlof, P.M., van, d.F.S., Vrolijk, J., Tanke, H.J. and Raap, A.K. (1992)
Fluorescence ratio measurements of double-labeled probes for multiple
in situ hybridization by digital imaging microscopy. *Cytometry*, **13**: 839-
845.
- Nilsson, M., Malmgren, H., Samiotaki, M., Kwiatkowski, M., Chowdhary, B.P.
and Landegren, U. (1994) Padlock probes: Circularizing
oligonucleotides for localized DNA detection. *Science*, **265**: 2085-2088.
- Tyagi S., and Kramer F. R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce
upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* **14**: 303-308.

CLAIMS

1. A method of analyzing circularized nucleic acids, by providing an amplification product, amplifying the said circularized DNA, which product comprises a concatemer of a sequence to be analyzed; the method further comprising the steps of:
 - a) directly detecting the said amplification product in a homogenous hybridization reaction using singly- or ratio-labeled probes, wherein the said homogenous hybridization detection is based on an enrichment of the detection probes in the said amplification product, and/or by using a modified molecular beacon design; or
 - b) carrying out a further signal generating reaction, comprising at least one of the following:
 - I) providing a degradable signaling probe that is selectively degraded when it has hybridized to the said amplification product, wherein degraded probes dissociate from the said amplification product allowing further signaling probes to hybridize with the product, wherein hybridization and degradation of the probes effects a change in signal emitted by the probe.
 - II) providing a pair of ligatable signaling probes that are designed such that they hybridize adjacent to each other onto a target sequence on an amplification product, wherein upon hybridization the probes are ligated to form a ligated product which dissociates from the target sequence, wherein dissociation of the ligated product from the target sequence allows a further pair of probes hybridize to the target sequence, and wherein upon dissociation from the target sequence the ligated product emits a signal; or

- c) monomerizing the said amplification product, circularizing the said monomerized amplification products, amplifying the said circularized monomers in a rolling-circle amplification reaction, and optionally repeating this procedure; and detecting or analyzing the amplification product.
2. A method according to claim 1 in which the circularized nucleic acid to be analyzed is a probe sequence.
 3. A method according to claim 1 in which the circularized nucleic acid to be analyzed comprises cDNA, genomic DNA or RNA sequences.
 4. A method according to claim 1 in which the monomerized amplification product of 1C is circularized using cDNA, genomic DNA, or RNA sequences.
 5. A method according to claim 1 in which the circularized DNA to be analyzed has been formed through a proximity-dependent nucleic acid interaction event.
 6. A method as claimed in any preceding claim in which monomerization of the amplification product is achieved using a restriction enzyme and an oligonucleotide complementary to the amplification product, wherein the restriction enzyme cleaves any amplification product/oligo-nucleotide hybrids.
 7. A method as claimed in claim 6 in which oligonucleotide is added in excess over the number of monomers contained in the amplification product.

8. A method as claimed in any previous claim in which the first generation amplification product is produced in a first generation amplification step, which step utilizes a polymerase enzyme, wherein the method includes a subsequent step of inactivating the polymerase enzyme.
9. A method as claimed in any preceding claim in which monomerized amplification products are hybridized to and circularized on primers attached to a solid support, which primers initiate localized RCA.
10. A method as claimed in any preceding claim in which circularized amplification products are hybridized to primers attached to a solid support, which primers initiate localized RCA.
11. A method as claimed in any preceding claim in which monomerized amplification products are hybridized to primers attached to a solid support, and where the monomerized products are detected.
12. A method as claimed in claims 9-11 in which the primers are zip-code or tag sequences.
13. A method of nucleic acid amplification as claimed in any preceding claims which employs probes to indicate the extent of the amplification, which method comprises the steps of:
 - providing a signaling probe, which probe includes a sequence which is complementary to an amplification product;
 - reacting the signaling probe with the amplification product;
 - selectively degrading signaling probes that have hybridized to the first generation amplification product, wherein degraded probes dissociate from the first generation amplification product

WO 03/012119

33

PCT/SE02/01378

allowing further signaling probes to hybridize with the product, wherein hybridization and degradation of the probes effects a change in signal emitted by the probe.

14. A method as claimed in claim 13 in which the probe includes a sequence which is susceptible to degradation when the probe has hybridized to the amplification product.
15. A method as claimed in claims 13 or 14 in which the probe, and especially the sequence of the probe which is complementary to the amplification product, includes a sequence of RNA residues which is susceptible to degradation by a suitable enzyme such as RNaseH when the probe has hybridized to the amplification product.
16. A method as claimed in claims 13 or 14 in which the probe, when bound to the amplification product, is degraded by endonucleases, wherein the amplification product is modified to prevent degradation by the endonuclease.
17. A method as claimed in claim 16 in which the amplification product is modified by replacing deoxynucleotides with thiophosphorodeoxy-nucleotides.
18. A method as claimed in claims 13, 14, 16 or 17 in which a restriction enzyme recognition site is included in the sequence of the probe which hybridizes with the first generation amplification product.
19. A method as claimed in claims 13 or 14 in which selective degradation of the probe is achieved by means of a double strand specific exonuclease.

20. A method as claimed in claims 13 or 14 in which selective degradation of the probe is achieved using RNA-zymes or DNA-zymes, which RNA/DNA-zymes are contained in the first generation amplification product.
21. A method according to any of claims 13 to 20 in which the probes comprise a fluorescent moiety and a quenching moiety which are separated by a hairpin loop structure, wherein in an un-bound and intact conformation the quenching moiety quenches the signal from the fluorescent moiety, and wherein bound or degraded probe emits a signal.
22. A method according to claim 21 in which at least one of the stem sequences of the hairpin loop of the probe is designed to hybridize with the amplification product.
23. A method as claimed in any of claims 13 to 21 in which the probe includes a pair of signalling moieties, which moieties produce a signal by FRET when the probe is intact, wherein degradation of the probe inhibits signal production.
24. A method according to any of claims 13 to 23 in which the probes are designed such that they will not act as templates/substrates for DNA polymerase.
25. A method according to any of claims 13 to 24 in which the amplification product is a single stranded linear RCA product.
26. A method as claimed in any of claims 13 to 25 in which dissociation of the degraded probe from the amplification product is achieved by thermal cycling.

27. A method as claimed in any of claims 13 to 26 in which the signaling probe is added during or after nucleic acid amplification.
28. A method as claimed in claim 1 in which one of the pair of signaling probes comprises a donor moiety and another comprises an acceptor moiety, and wherein the probes are designed such that the ligated product forms a hairpin loop structure, which upon formation allows energy transfer between the donor and acceptor moieties to produce a signal.
29. A method according to any preceding claims in which, as an initial step, any non-circularized probes are removed, or rendered inert.
30. A method according to claim 29 in which non-circularized probes are removed using exonucleases.
31. A method according to claim 30 in which non-circularized probes are removed by capture on a solid support carrying an appropriate ligand for the non-circularized probes.
32. A method as claimed in claim 31 in which the ligand is a nucleic acid sequence which has sequence affinity for non-circularized probe.
33. A method as claimed in claim 29, wherein the non-circularized probes comprise first and second segments separated by a linking segment, wherein the first and second segments are complementary to sequences on a target sequence, wherein the probe is designed to form a hairpin loop structure between the 3' end of the probe and a sequence in a linking segment of the probe, wherein a stem of the hairpin loop structure ideally has a thermal stability that neither inhibits formation of a hybrid between the loop and the target sequence nor inhibit replication of the probe by RCA.

WO 03/012119

36

PCT/SE02/01378

34. A method as claimed in claim 29 in which an excess of oligonucleotides which are complementary to a 3' end of the probes are added before the amplification reaction, which oligonucleotides preferably include a 5' sequence extension, whereby the 3' end of non-circularized probes will lose complementarity to a product of the amplification process.

FIG. 1

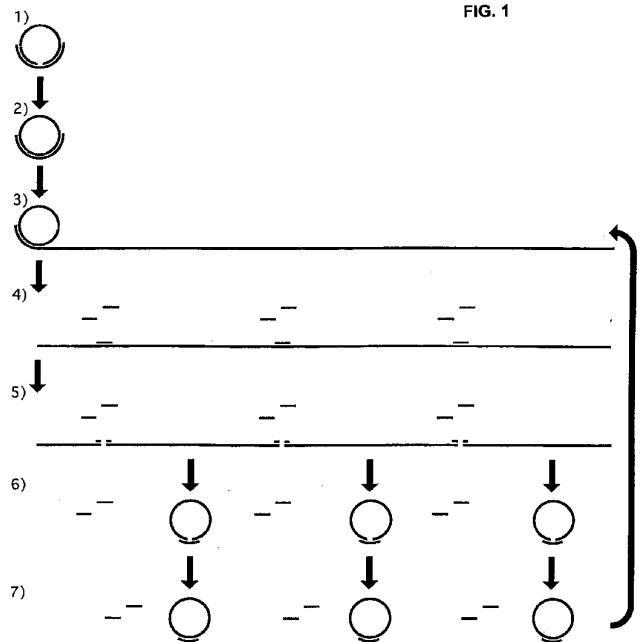


FIG. 2

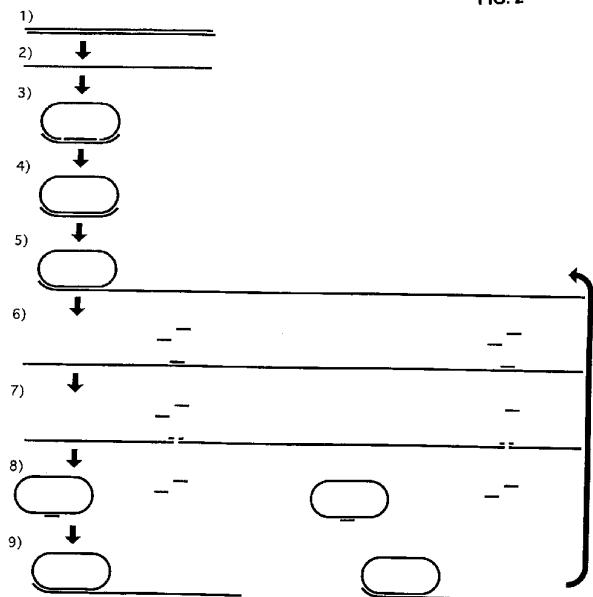


FIG. 3

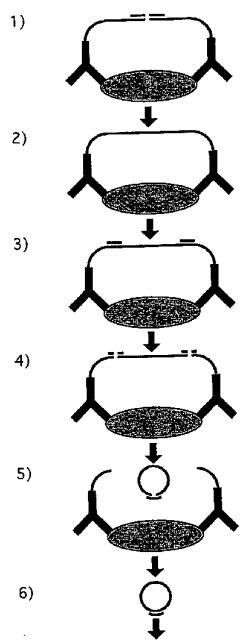


FIG. 4

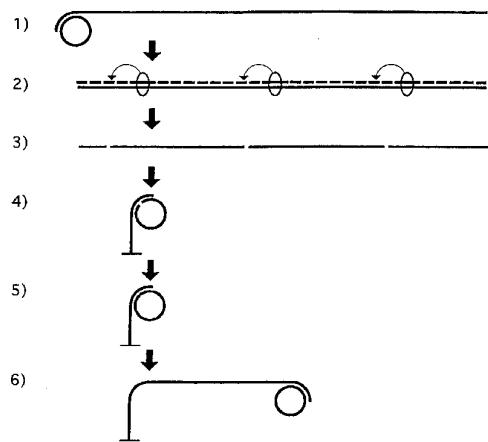
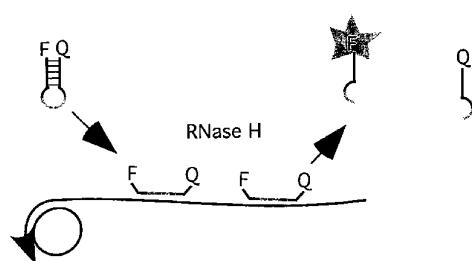


FIG. 5

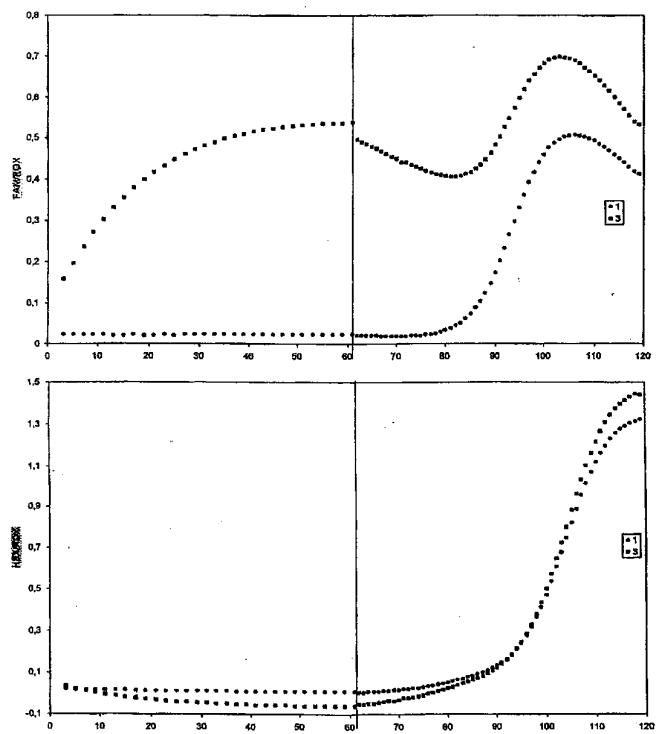


WO 03/012119

PCT/SE02/01378

6/13

FIG. 6

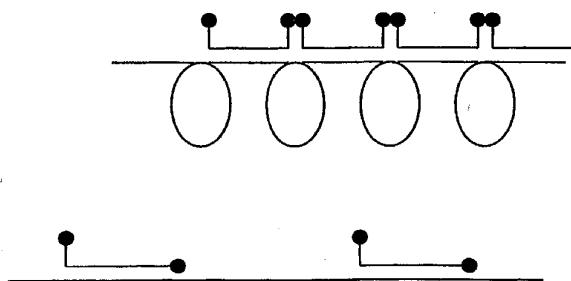


WO 03/012119

PCT/SE02/01378

7/13

FIG. 7

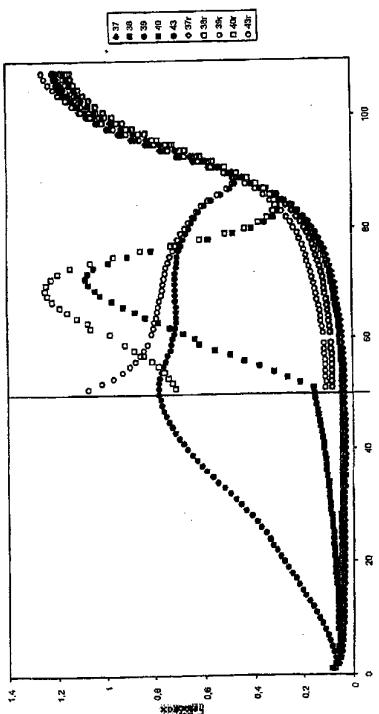


WO 03/012119

PCT/SE02/01378

8/13

FIG. 8

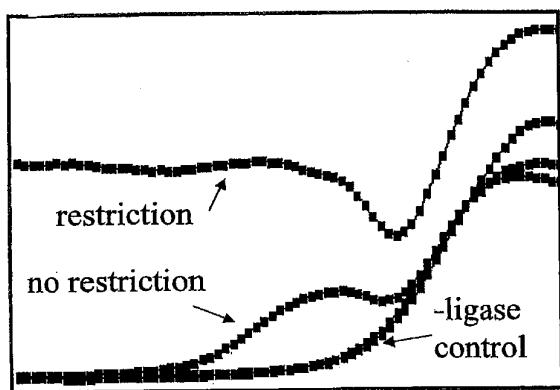


WO 03/012119

PCT/SE02/01378

9/13

FIG. 9

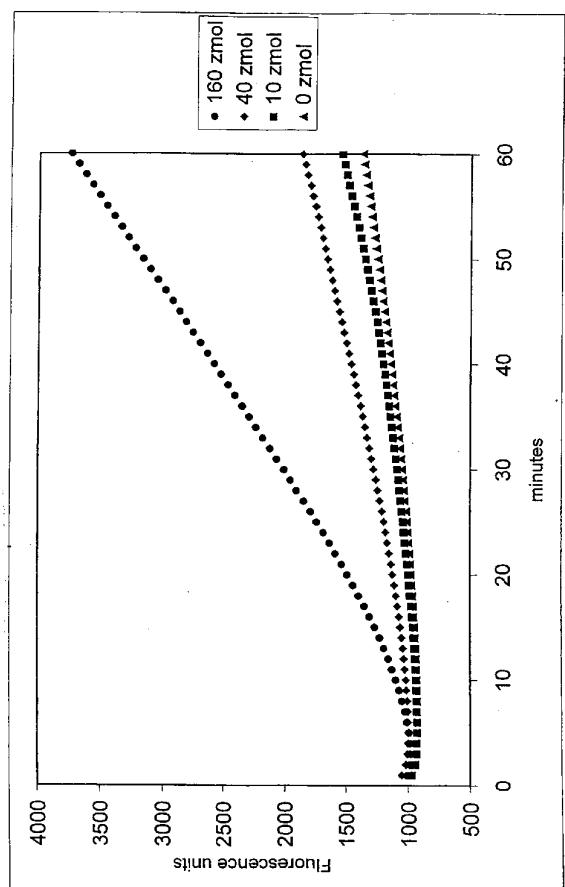


WO 03/012119

PCT/SE02/01378

10/13

FIG. 10A

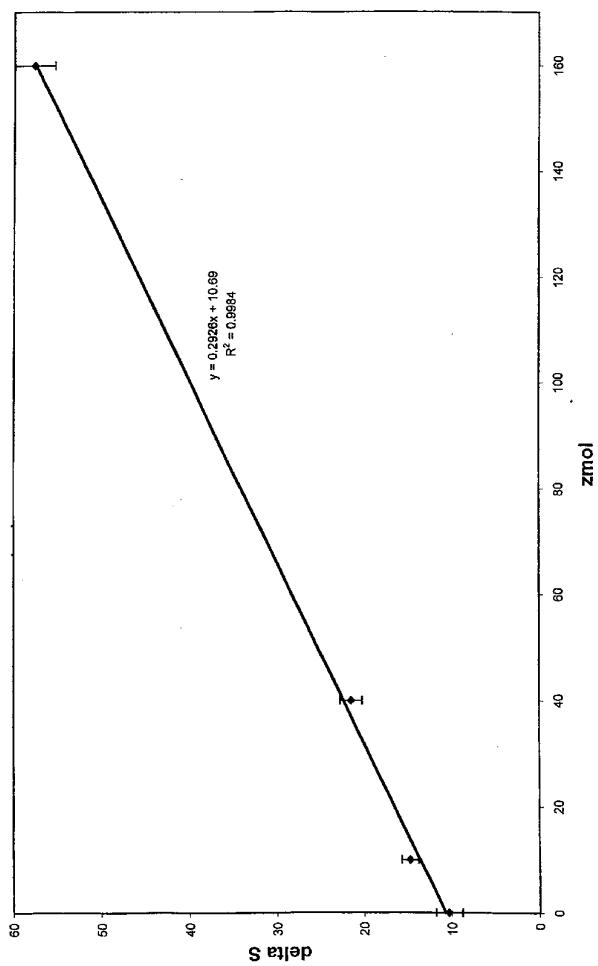


WO 03/012119

PCT/SE02/01378

11/13

FIG. 10B

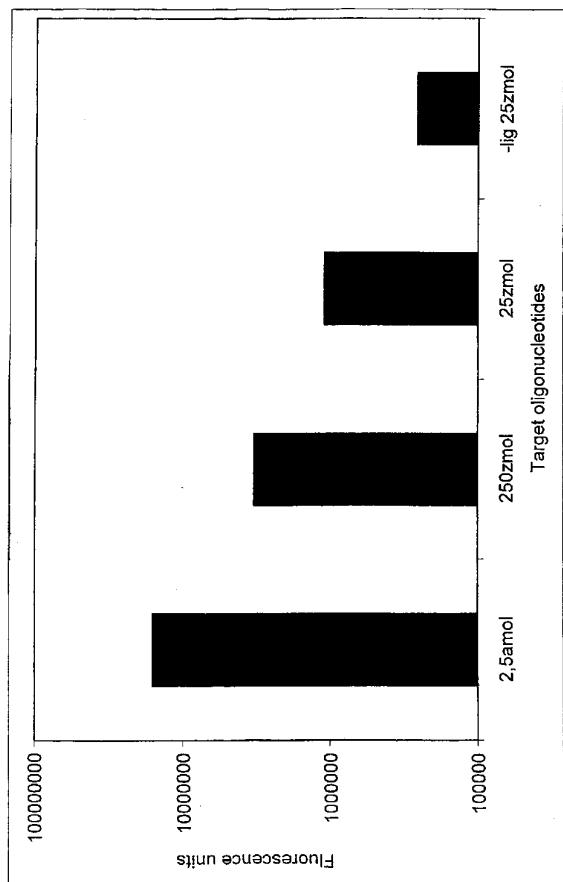


WO 03/012119

PCT/SE02/01378

12/13

FIG. 11

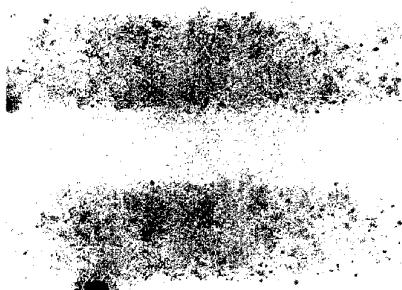


WO 03/012119

PCT/SE02/01378

13/13

FIG. 12



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 February 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/012119 A3(51) International Patent Classification⁵: C12Q 1/68

(81) Designated States (national): AI, AG, AI, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CII, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EL, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GL, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MR, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number: PCT/SE02/01378

(22) International Filing Date: 12 July 2002 (12.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0118959.6 3 August 2001 (03.08.2001) GB

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BI, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, BI, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicants (for all designated States except US): BIO-CYCLICA AB [SE/SE]; Strandvägen 48, S-193 30 Sigtuna (SE). LANDEGREN Gene Technology AB [SE/SE]; Radbeck Laboratory, S-751 85 UPPSALA (SE).

(85) Published:

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): LANDEGREN, Ulf [SU/SU]; Norra Parkvägen 29, S-756 45 Uppsala (SE). GULLBERG, Mats [SE/SE]; Glimmervägen 11B, S-752 41 Uppsala (SE). NILSSON, Mats [SE/SE]; Strandvägen 48, S-193 30 Sigtuna (SE).

(86) Date of publication of the international search report: 13 November 2003

(74) Agents: DR LUDWIG BRANN PATENTBYRÅ AB et al.; Box 1344, S-751 43 Uppsala (SE).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/012119 A3

(54) Title: NUCLEIC ACID AMPLIFICATION METHOD

(57) Abstract: A nucleic acid amplification method, and probes for use within the method are described.

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | |
|--|--|-----------------------------|
| International application No. PCT/SE 02/01378 | | |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| IPC7: C12Q 1/68 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) | | |
| IPC7: C12Q | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| SE, DK, FI, NO classes as above | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | Nature Genetics, Volume 19, 1998, Paul M. Lizardi et al: "Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification", pages 225- 231, figure 6 | 1-3, 5, 8, 10, 12, 28-34 |
| X | US 5854033 A (LIZARDI), 29 December 1998 (29.12.98), column 11, line 45 - line 64 | 1-3, 5, 8, 10, 12, 28-34 |
| X | WO 0188190 A2 (MOLECULAR STAGING, INC.), 22 November 2001 (22.11.01), claim 31 | 1-3, 5, 8, 10, 12, 28-34 |
| -- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| <p>* Special categories of cited documents</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" early application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"I" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other specific reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step, or which otherwise discloses an invention</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> | | |
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report | |
| 20 January 2003 | 22-01-2003 | |
| Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86 | Authorized officer Patrick Andersson/EP Telephone No. +46 8 782 25 00 | |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | | International application No. PCT/SE 02/01378 |
|---|--|--|
| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category ^a | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 0006778 A1 (THE PUBLIC HEALTH RESEARCH INSTITUTE OF THE CITY OF THE NEW YORK, INC.), 10 February 2000 (10.02.00), claims 19,23,33 -- | 1-3,5,8,10, 12,28-34 |
| A | US 6221603 B1 (MAHTANI), 24 April 2001 (24.04.01) -- | 1-3,5,8,10, 12,28-34 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE02/01378

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.:
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:
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

see next sheet

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.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE02/01378

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

1. Claim 1a completely and parts of claims 2-3, 5, 8, 10, 12 and 28-34, a method of analysing circularised nucleic acid by directly detecting concatemeric amplification product of said nucleic acid.
2. Claims 1b and 13-27 completely and parts of claims 2-3, 5, 8, 10, 12, and 28-34, a method of analysing circularised nucleic acid by carrying out a further signal generating reaction on a concatemeric amplification product of said nucleic acid. Said invention may at a further search be found to relate to two separate inventive concepts.
3. Claims 1c, 4, 6-7, 9, 11 completely and parts of claims 2-3, 5, 8, 10, 12, and 28-34, a method of analysing circularised nucleic acid by monomerising a concatemeric amplification product of said nucleic acid before analysing said product.

According to Article 34(3)(a-c) and Rule 13.2, an international application shall relate to one invention only or to a group of inventions linked by one or more of the same or corresponding "special technical features", i.e. features that define a contribution which each of the inventions makes over the prior art.

Direct detection of concatemeric amplification product of circularised nucleic acid is known in the art, see e.g. US5854033. Consequently, analysis of circularised nucleic acid by concatemeric amplification of said nucleic acid is known in the art, no other technical feature unifying the three invention have been found.

Invention 1 has been searched.

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | | | International application No. PCT/SE 02/01378 |
|---|---------------------|--|--|--|
| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date | |
| US 5854033 A 29/12/98 | | AT 199572 T AU 714486 B AU 1024097 A DE 69612013 D, T DK 862656 T EP 0862656 A, B SE 0862656 T3 JP 2002503948 T US 6143495 A US 6183960 B US 6210884 B US 6329150 B US 6344329 B WO 9719193 A | 15/03/01 06/01/00 11/06/97 02/08/01 09/04/01 09/09/98 05/02/02 07/11/00 06/02/01 03/04/01 11/12/01 05/02/02 29/05/97 | |
| WO 0188190 A2 22/11/01 | | AU 5332800 A US 6291187 B | 26/11/01 18/09/01 | |
| WO 0006778 A1 10/02/00 | | AU 5240299 A CA 2336489 A EP 1100971 A JP 2002521069 T US 6037130 A | 21/02/00 10/02/00 23/05/01 16/07/02 14/03/00 | |
| US 6221603 B1 24/04/01 | | AU 3476001 A EP 1252334 A WO 0157256 A | 14/08/01 30/10/02 09/08/01 | |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N0,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100102897

弁理士 池田 幸弘

(72)発明者 ランデグレン、ウルフ

スウェーデン国 ウブサラ、ノラ パークベーゲン 29

(72)発明者 グルベルグ、マティス

スウェーデン国 ウブサラ、グリムメルベーゲン 11ビー

(72)発明者 ニルソン、マティス

スウェーデン国 スイグトウナ、スュトランドベーゲン 48

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA11 HA08 HA12 HA19

4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR14 QR20 QR32 QR35

QR42 QR50 QR55 QR56 QR62 QR66 QR82 QS03 QS25 QS28

QS34 QS39 QX01