世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7
C12N 15/10, C12Q 1/68

A1

(11) 国際公開番号 WO00/56877

(43) 国際公開日 2000年9月28日(28.09.00)

(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01534

(22) 国際出願日 2000年3月14日(14.03.00)

(30) 優先権データ
特願平11/76966 1999年3月19日(19.03.99) JP
特願平11/370035 1999年12月27日(27.12.99) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP]
〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
向井博之(MUKAI, Hiroyuki)[JP/JP]
〒524-0102 滋賀県守山市水保町字南川1461-82 Shiga, (JP)
山本純子(YAMAMOTO, Junko)[JP/JP]
〒524-0044 滋賀県守山市古高町332-2 Shiga, (JP)
武田 理(TAKEDA, Osamu)[JP/JP]
〒521-1124 滋賀県彦根市野良田町340-1-811 Shiga, (JP)
三宅一恵(MIYAKE, Kazue)[JP/JP]
〒611-0011 京都府宇治市五ケ庄三番割34-7 Kyoto, (JP)
上森隆司(UEMORI, Takashi)[JP/JP]
〒520-2141 滋賀県大津市大江3丁目1-16
シャルマンコーポ第2瀬田709号 Shiga, (JP)
佐藤好美(SATO, Yoshimi)[JP/JP]
〒520-3031 滋賀県栗太郡栗東町綣3丁目8番23-1010号 Shiga, (JP)
森山麻里子(MORIYAMA, Mariko)[JP/JP]
〒520-2133 滋賀県大津市野郷原1-4-3 シャロム瀬田西311号 Shiga, (JP)
椹木治久(SAWARAGI, Haruhisa)[JP/JP]
〒520-2133 滋賀県大津市野郷原1-14-3 瀬田寮301 Shiga, (JP)
萩屋道雄(HAGIYA, Michio)[JP/JP]
〒520-0226 滋賀県大津市陽明町3-4 Shiga, (JP)
浅田起代蔵(ASADA, Kiyozo)[JP/JP]
〒520-3333 滋賀県甲賀郡甲南町希望ケ丘3-20-9 Shiga, (JP)
加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)[JP/JP]
〒611-0028 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP)
(74) 代理人
青山葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.)
〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号
IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)

(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)

添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: METHOD FOR AMPLIFYING NUCLEIC ACID SEQUENCE

(54)発明の名称 核酸配列の増幅方法

(57) Abstract

A convenient and effective method for amplifying a nucleic acid sequence characterized by effecting a DNA synthesis reaction in the presence of chimeric oligonucleotide primers; a method for supplying a large amount of DNA amplification fragments; an effective method for amplifying a nucleic acid sequence by combining the above method with another nucleic acid sequence amplification method; a method for detecting a nucleic acid sequence for detecting or quantitating a microorganism such as a virus, a bacterium, a fungus or a yeast; and a method for detecting a DNA amplification fragment obtained by the above method *in situ*.

(57)要約

本発明により、キメラオリゴヌクレオチドプライマーの存在下にＤＮＡ合成反応を行うことを特徴とする簡便で、効率の良い核酸配列の増幅方法が提供される。また、本発明により、大量のＤＮＡ増幅断片を供給する方法が提供される。また、本発明の核酸配列の増幅方法と他の核酸増幅方法と組み合わせることにより、効率的な核酸配列の増幅方法が提供される。また、本発明によりウイルス、細菌、カビ、酵母などの微生物等の検出、定量のための核酸配列の検出方法が提供され、本発明の方法で得られたＤＮＡ増幅断片をリアルタイムで検出する方法が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AG アンティグア・バーブーダ
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボズニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルギナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴー
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CR コスタ・リカ
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
DM ドミニカ
DZ アルジェリア
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GR ギリシャ
GW ギニア・ビサオ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MA モロッコ
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシニ
MZ モザンビーク
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴー
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダッド・トバゴ
TZ タンザニア
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴェトナム
YU ユーゴースラヴィア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

明　細　書

核酸配列の増幅方法

技術分野

本発明は、遺伝子工学分野において有用なＤＮＡの合成方法に関し、鋳型となる核酸配列の増幅方法および該方法で増幅された核酸の検出方法に関する。

背景技術

遺伝子工学分野の研究においてＤＮＡの合成は種々の目的に使用される。このうちオリゴヌクレオチドのような短鎖のＤＮＡの合成を除けば、そのほとんどはＤＮＡポリメラーゼを利用した酵素的方法により実施されている。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応法（ＰＣＲ法）があるが、それは米国特許第４，６８３，１９５号、第４，６８３，２０２号および第４，８００，１５９号に詳細に記述されている。もう一つの例としては、トレンズ　イン　バイオテクノロジー（Trends in Biotechnology）第１０巻、１４６～１５２頁（１９９２）に記載の当該方法と逆転写酵素反応を組合わせた逆転写ＰＣＲ法（ＲＴ－ＰＣＲ法）が挙げられる。上記の方法の開発により、ＤＮＡから、若しくはＲＮＡから目的とする領域を増幅することが可能になった。

これらのＤＮＡ合成方法は、目的とするＤＮＡ領域を増幅させるために例えば、二本鎖鋳型ＤＮＡの一本鎖への解離（変性）、一本鎖鋳型ＤＮＡへのプライマーのアニーリング、プライマーからの相補鎖合成（伸長）の３つのステップからなる反応により、もしくは、”シャトルＰＣＲ”（『ＰＣＲ法最前線』、「蛋白質核酸　酵素」別冊、第４１巻、第５号、４２５頁～４２８頁（１９９６））と呼ばれる、前述の３ステップ反応のうちプライマーのアニーリングおよび伸長のステップを同一温度で行なう２ステップ反応により実施される。

さらに、別法としては、１９８９年６月１４日に公開された欧州特許出願第３２０，３０８号に記述されているリガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ；ligase chain reaction）法、あるいはＰＣＲ　プロトコールズ（PCR Protocols, Academic

Press. Inc., 1990) ２４５～２５２頁に記述されている転写増幅システム（ＴＡＳ；transcription-based amplification system）法が挙げられる。上記４法は、次の増幅サイクルのための一本鎖標的分子を再生するために、高温から低温の反応を何回も繰り返す必要がある。このように温度によって反応が制約されるため、反応系は不連続な相またはサイクルで行なう必要がある。

従って、上記の方法には広い温度範囲で、かつ、厳密な温度調整を経時的に行なうことのできる高価なサーマルサイクラーを使用することが必要となる。また、該反応は、２種類～３種類の温度条件で行なうため設定温度にするために要する時間が必要であり、そのロス時間はサイクル数に比例して増大していく。

そこで、上記問題点を解決すべく等温状態で実施可能な核酸増幅法が開発された。例えば、特公平７－１１４７１８号に記載の鎖置換型増幅（ＳＤＡ；strand displacement amplification）法、自立複製（３ＳＲ；self-sustained sequence replication）法、日本国特許番号第２６５０１５９号に記載の核酸配列増幅（ＮＡＳＢＡ；nucleic acid sequence based amplification）法、ＴＭＡ（transcription-mediated amplification）法、日本国特許番号第２７１０１５９号に記載のＱβレプリカーゼ法、さらに米国特許番号第５，８２４，５１７号、国際公開パンフレット第９９／０９２１１号、国際公開パンフレット第９５／２５１８０号あるいは、国際公開第９９／４９０８１号等に記載の種々の改良ＳＤＡ法が挙げられる。米国特許番号第５，９１６，７７７号には等温状態でのオリゴヌクレオチドの酵素的合成方法が記載されている。これらの等温核酸増幅法またはオリゴヌクレオチド合成法の反応においては、プライマーの伸長や、一本鎖伸長生成物（または元の標的配列）へのプライマーのアニーリングや、それに続くプライマーの伸長は、一定温度で保温された反応混合物中で同時に起こる。

これらの等温核酸増幅法のうち最終的にＤＮＡが増幅される系、例えば、ＳＤＡ法は、ＤＮＡポリメラーゼと制限エンドヌクレアーゼを介する二本鎖の置換による、試料中の標的核酸配列（およびその相補鎖）の増幅法であるが、該方法では、増幅に使用するプライマーは４種類必要であり、その内の２種類は、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含むように構築する必要がある。また、該方法では、ＤＮＡ合成のための基質として、修飾されたデオキシリボヌクレオチド３リ

ン酸、例えばα位のリン酸基の酸素原子が硫黄原子（S）に置換された（α－S）デオキシリボヌクレオチド３リン酸を大量に用いる必要があり、ルーチンワークで反応を行なう遺伝子検査等においては、そのランニングコストが深刻な問題となってくる。さらに該方法では、増幅されたＤＮＡ断片中に上記の修飾ヌクレオチド、たとえば（α－Ｓ）デオキシリボヌクレオチドが含まれるため、例えば、増幅後のＤＮＡ断片を制限酵素長多型（ＲＦＬＰ；restriction enzyme fragment length polymorphism）解析に供しようとする場合に、該断片が制限酵素で切断できないことがある。

また、米国特許番号第５，８２４，５１７号記載の改良ＳＤＡ法は、ＲＮＡとＤＮＡから構成され、少なくとも３’末端にＤＮＡが配置された構造を必須要件とするキメラプライマーを使用するＤＮＡ増幅方法である。また、国際公開パンフレット第９９／０９２１１号に記載の改良ＳＤＡ法は、５’突出末端を生じさせる制限酵素が必要である。また、国際公開パンフレット第９５／２５１８０号に記載の改良ＳＤＡ法は、少なくとも２組のプライマー対を必要とする。さらに、国際公開パンフレット第９９／４９０８１号に記載の改良ＳＤＡ法は、少なくとも２組のプライマーと少なくとも１種類の修飾デオキシリボヌクレオチド３リン酸を必要とする。一方、米国特許番号第５，９１６，７７７号は、オリゴヌクレオチドを合成するために、３’末端にリボヌクレオチドを有するプライマーを使用してＤＮＡを合成し、反応終了後にエンドヌクレアーゼによりプライマー伸長鎖中のプライマーと伸長鎖の間にニックをいれて分離させ、テンプレートを消化し、さらにプライマーを回収して再利用するというものである。該方法では、プライマーを再利用する際には反応系よりプライマーを単離したうえで鋳型を再度アニーリングさせる必要がある。

上記のように従来の等温核酸増幅法はまだまだ種々の問題をかかえており、低ランニングコストで、かつ結果的に得られたＤＮＡ断片をさらに遺伝子工学的な処理に使用することが可能な核酸配列の増幅方法が求められていた。

発明の目的

本発明の主な目的は、オリゴヌクレオチドプライマーの存在下にＤＮＡ合成反

応を行なうことを特徴とする簡便で、効率の良い核酸配列の増幅方法及びＤＮＡ増幅断片の大量供給のためのＤＮＡ増幅断片の大量製造方法を提供することにある。

発明の概要

本発明者らは鋭意研究の結果、リボヌクレオチドが３’末端又は３’末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマー、エンドリボヌクレアーゼ、およびＤＮＡポリメラーゼの存在下に目的とする領域のＤＮＡを増幅する方法を見出し、優れた遺伝子増幅反応系を構築し、本発明を完成するに至った。該方法は、等温条件下、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いる核酸配列の増幅（ＩＣＡＮ；Isothermally chimeric primer used amplification of nucleic acid）法である。

本発明の第１の発明は、核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸をこの核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して上記鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、この　　リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

本発明の第２の発明は、少なくとも２種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して上記鋳型に相補的なプライマ

一伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、このリボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｂ）工程に再度利用される工程；

（ｄ）（ｃ）工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも１種のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的なデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、当該リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｅ）（ｄ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｆ）（ｅ）工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｅ）工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

本発明の第１および第２の発明は、等温で行ってもよく、また鋳型となる核酸配列がＤＮＡ配列であってもよい。さらに、第１および第２の発明の（ａ）工程の前にＲＮＡを鋳型として、逆転写酵素による逆転写反応により一本鎖のｃＤＮＡを調製する工程を含んでもよく、該一本鎖のｃＤＮＡを鋳型となる核酸配列とすることもできる。また、本発明の第１および第２の発明において、鋳型となる

ＤＮＡは一本鎖、二本鎖のいずれもが好適に使用できる。二本鎖ＤＮＡが鋳型となる場合は、二本鎖ＤＮＡを一本鎖に変性する前処理工程の後に本発明の方法を行えばよい。

上記発明において、プライマーからの伸長は鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼにより行われることを特徴とする。即ち、本発明には大腸菌由来のＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウ断片、バチルス　ステアロサーモフィラス由来の５’→３’エキソヌクレアーゼ欠損ＢｓｔＤＮＡポリメラーゼ、およびバチルス　カルドテナックス由来の５’→３’エキソヌクレアーゼ欠損ＢｃａＤＮＡポリメラーゼからなる群から選択されるＤＮＡポリメラーゼが好適に使用できる。また、エンドヌクレアーゼは、エンドリボヌクレアーゼが好適に使用でき、特に限定するものではないが、例えばＲＮａｓｅＨが使用できる。

本発明の第３の発明は、核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド３リン酸、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ、少なくとも１種類のプライマー、およびこのプライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、リボヌクレオチドがエンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの３’末端又は３’末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドであり；および

（ｂ）反応産物を生成するのに充分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

上記第３の発明において、鋳型となる核酸配列としては、一本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡに変性された二本鎖ＤＮＡ、またはＲＮＡから逆転写反応によって得られたｃＤＮＡからなる群より選択される核酸配列が例示される。また、上記反応混合物中に２種以上のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有させてもよい。本発明に使用される鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼには、上記の第１、第２の発明に使用されるものが好適に使用できる。

本発明の第１～第３の発明に使用されるプライマーは、キメラオリゴヌクレオ

チドプライマーであり、例えば、プライマーの３’末端又は３’末端側に少なくとも１残基、好ましくは連続した２残基以上のリボヌクレオチドが結合した構造を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。

また、本発明の第１～第３の発明に使用される鋳型は、核酸増幅方法によってあらかじめ増幅された核酸であってもよい。該核酸増幅方法は、例えば、ＴＡＳ法、３ＳＲ法、ＮＡＳＢＡ法、ＴＭＡ法、Ｑβレプリカーゼ法、ＰＣＲ法、ＬＣＲ法、ＳＤＡ法が利用できるが、核酸を増幅するための方法であれば、特に限定はない。さらに、本発明の方法は、これらの核酸増幅方法と組み合わせて使用することができる。

また、上記核酸増幅反応においては、ランダムプライマーまたは縮重プライマーを使用することができ、特に限定はされないが例えば、少なくともその３’末端又は３’末端側にランダムな配列または縮重した配列を有するプライマーが好適に使用できる。

本発明の第４の発明は、上記の第１～第３の発明に使用できるキメラオリゴヌクレオチドプライマーに関する。このプライマーは、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドを含有し、プライマーの３’末端又は３’末端側にリボヌクレオチドが配置されていることを特徴とする。例えば、少なくとも１残基、好ましくは連続した２残基以上のリボヌクレオチドを含有し、その３’末端よりＤＮＡ鎖の伸長が可能なキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、リボヌクレアーゼ、例えばＲＮａｓｅＨの作用により上記リボヌクレオチド残基の３’末端側が切断されるよう設計されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーが挙げられる。

本発明の第５の発明は、上記第１～第３の発明に使用される鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼおよびそれらを含むキットに関する。

本発明の第６の発明は、標的核酸を検出するための方法であって、本発明の第１～３の発明の核酸配列の増幅方法により標的核酸を増幅した後、この核酸を検出する工程を包含することを特徴とする。検出方法には、消光状態になるような距離で配置された２種類以上の蛍光色素で標識されたリボヌクレオチド（ＲＮＡ）プローブによって標的核酸を検出する方法が包含される。

本発明の第７の発明は、本発明の第６の発明の標的核酸の検出方法に使用される鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼおよびそれらを含むキットに関する。

本発明の第８の発明は、核酸を所定の領域に整列させた核酸固定化物を作製するための方法に関し、本発明の第１～３の発明の核酸配列の増幅方法により増幅された核酸を担体上の所定の領域に整列させて固定化する工程を包含することを特徴とする。特に好適には、実質的にその相補鎖を含まない一本鎖の核酸を増幅し、所定の領域に整列させて固定化する方法が挙げられる。

本発明の第９の発明は、核酸を所定の領域に整列させた核酸固定化物に関し、本発明の第８の発明の方法によって作製されたものであることを特徴とする。特に好適な核酸固定化物としては、実質的にその相補鎖を含まない一本鎖の核酸を所定の領域に整列させて固定化させた核酸固定化物が挙げられる。

本発明の第１０の発明は、試料中の標的核酸を検出するための方法に関し、本発明の第９の発明の核酸を所定の領域に整列させた核酸固定化物を使用し、この核酸固定化物上の所定の領域に整列させて固定化された核酸にハイブリダイズした核酸を検出することを特徴とする。

本発明の第１１の発明は核酸を大量に製造する方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸をこの核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して上記鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸の製造方法に関する。

本発明の第１２の発明は、少なくとも２種類のプライマーを使用し、核酸を大量に製造する方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸をこの核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して上記鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｂ）工程に再度利用される工程；

（ｄ）（ｃ）工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも１種のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的なデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｅ）（ｄ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｆ）（ｅ）工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｅ）工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸の製造方法に関する。

本発明の第１３の発明は核酸を大量に製造する方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド３リン酸、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ、少なくとも１種類のプライマー、およびこのプライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドがエンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの３’末端又は３’末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドであり；および

（ｂ）反応産物を生成するのに充分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸の製造方法に関する。

本発明の第１４の発明は核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）増幅しようとする配列を含む核酸を核酸増幅反応によって増幅し、鋳型となる核酸を調製する工程；

（ｂ）（ａ）で得られた鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｃ）（ｂ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｄ）（ｃ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

本発明の第１５の発明は少なくとも２種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）増幅しようとする配列を含む核酸を核酸増幅反応によって増幅し、鋳型となる核酸を調製する工程；

（ｂ）（ａ）で得られた鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｃ）（ｂ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

（ｄ）（ｃ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｃ）工程に再度利用される工程；

（ｅ）（ｄ）工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として（ｂ）工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも１種のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該（ｂ）工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｆ）（ｅ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｇ）（ｆ）工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｆ）工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

本発明の第１６の発明は核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）増幅しようとする配列を含む核酸を核酸増幅反応によって増幅し、鋳型と

なる核酸を調製する工程；

（ｂ）（ａ）で得られた鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド３リン酸、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ、少なくとも１種類のプライマー、および該プライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドがエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；および

（ｃ）反応産物を生成するのに充分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

本発明の第１４～第１６の発明においては、増幅しようとする配列を含む核酸を先に核酸増幅反応によって増幅し、該増幅産物を本発明の第１～３の発明の方法の鋳型となる核酸として用いる。第１４～１６の発明に使用する該核酸増幅方法は、核酸を増幅するための方法であれば特に限定はなく、例えば、ＴＡＳ法、３ＳＲ法、ＮＡＳＢＡ法、ＴＭＡ法、Ｑβレプリカーゼ法、ＰＣＲ法、ＬＣＲ法、ＳＤＡ法が利用できる。

また、上記核酸増幅反応においては、ランダムプライマーまたは縮重プライマーを使用することができ、特に限定はされないが例えば、少なくともその３’末端又は３’末端側にランダムな配列または縮重した配列を有するプライマーが好適に使用できる。

本発明の第１７の発明は核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド

含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

本発明の第１８の発明は少なくとも２種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｂ）工程に再度利用される工程；

（ｄ）（ｃ）工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも１種のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該

（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｅ）（ｄ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｆ）（ｅ）工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳

型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｅ）工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

本発明の第１９の発明は核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド３リン酸、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ、少なくとも１種類のプライマー、および該プライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドが該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；および

（ｂ）反応産物を生成するのに充分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

本発明の第２０の発明は核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドが該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され、該リボヌクレオチド含有部位がエンドヌクレアーゼによって切断されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

本発明の第２１の発明は少なくとも２種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドが該プライマーの３'末端又は３’末端側に配置され、該リボヌクレオチド含有部位がエンドヌクレアーゼによって切断されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｂ）工程に再度利用される工程；

（ｄ）（ｃ）工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも１種のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドが該プライマーの３'末端又は３’末端側に配置され、該リボヌクレオチド含有部位がエンドヌクレアーゼによって切断されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；

（ｅ）（ｄ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｆ）（ｅ）工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｅ）工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

本発明の第２２の発明は核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド３リン酸、鎖置換活性を有す

るＤＮＡポリメラーゼ、少なくとも１種類のプライマー、および該プライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドが該プライマーの３'末端又は３'末端側に配置され、該リボヌクレオチド含有部位がエンドヌクレアーゼによって切断されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；および

（ｂ）反応産物を生成するのに充分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

本発明の第２３の発明は、核酸の塩基配列を決定するための方法であって、上記第１～第３の発明及び第１４～第２２の発明のいずれか１つの発明の方法の、核酸配列を増幅する工程を包含することを特徴とする核酸の塩基配列の決定方法に関する。

図面の簡単な説明

図１：本発明における１本鎖ＤＮＡに対する方法の一例を示すフローチャートである。図中、黒丸は遊離したＤＮＡ鎖が（６）の鋳型ＤＮＡであることを示す。

図２：本発明の方法により種々の反応時間で増幅された増幅ＤＮＡ断片の、アガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

発明の詳細な説明

本明細書においてデオキシリボヌクレオチド（本明細書中ではｄＮとも記載する）とは、糖部分がＤ－２－デオキシリボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、例えば、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、チミンを有するものが挙げられる。

本明細書においてリボヌクレオチド（本明細書中ではＮとも記載する）とは、糖部分がＤ－リボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルを有するものが挙げられる。さらに、当該

リボヌクレオチドには修飾リボヌクレオチドが包含され、例えばα位のリン酸基の酸素原子を硫黄原子に置き換えた修飾リボヌクレオチド［（α－Ｓ）リボヌクレオチド、（α－Ｓ）Ｎとも記載する］やこの他の誘導体等も含まれる。

本明細書においてキメラオリゴヌクレオチドプライマーとは、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するプライマーのことを言う。該プライマーは未修飾デオキシリボヌクレオチドおよび／または修飾デオキシリボヌクレオチドあるいは未修飾リボヌクレオチドおよび／または修飾リボヌクレオチドを含有していてもよい。

本発明に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、該プライマーの３’末端又は３’末端側にリボヌクレオチドを配置し、本発明の方法において核酸鎖が伸長でき、エンドヌクレアーゼで切断でき、鎖置換反応を行うことができるものであれば、いずれもが本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーに包含される。

本明細書において３’末端側とは、核酸、例えば、プライマーにおいて、その中央より３’末端にかけての部分を指す。同様に５’末端側とは、核酸においてその中央より５’末端にかけての部分を指す。

本明細書においてエンドヌクレアーゼとは、鋳型核酸にアニーリングした、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーよりＤＮＡの伸長を行って生成した二本鎖ＤＮＡに作用して、該プライマーのリボヌクレオチド部分を特異的に切断するものであればよい。

本明細書においてＤＮＡポリメラーゼとは、ＤＮＡ鎖を鋳型として新たなＤＮＡ鎖を合成する酵素のことを言う。特に限定はされないが、ポルＩ型ＤＮＡポリメラーゼ（大腸菌ＤＮＡポリメラーゼＩ、クレノウ断片、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼなど）、α型ＤＮＡポリメラーゼ（ピロコッカス・フリオサス由来ＤＮＡポリメラーゼ（ストラタジーン社製）、ＶＥＮＴ　ＤＮＡポリメラーゼ（ニューイングランドバイオラブス社製）、ＫＯＤ　ＤＮＡポリメラーゼ（東洋紡社製）、ＤＥＥＰ　ＶＥＮＴ　ＤＮＡポリメラーゼ（ニューイングランドバイオラブス社製）及び非α非ポルＩ型ＤＮＡポリメラーゼ（国際公開第９７／２４４４４号パンフレット記載のＤＮＡポリメラーゼ）等が挙げられる。また、鎖置換(Strand

displacement)活性を有するＤＮＡポリメラーゼとしては、バチルス・カルドテナックス（Bacillus caldotenax、以下、Ｂ．ｃａと称す）やバチルス・ステアロサーモフィラス（Bacillus stearothermophilus、以下Ｂ．ｓｔと称す）等の好熱性バチルス属細菌由来ＤＮＡポリメラーゼ及び該ＤＮＡポリメラーゼの５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体等が挙げられる。さらに、上記クレノウ断片のような鎖置換活性を有し、５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を有していないＤＮＡポリメラーゼも鎖置換型ＤＮＡポリメラーゼに含まれる。さらに、上記ＤＮＡポリメラーゼは、複数のＤＮＡポリメラーゼの混合物、特に限定はされないが上記鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ及び鎖置換活性を有さないＤＮＡポリメラーゼを組み合わせた混合物でもよい。

本明細書において「鎖置換活性」とは、鋳型となる核酸配列に従ってＤＮＡ複製を行う際、ＤＮＡ鎖を置き換えながら進行し、鋳型鎖にアニーリングしている相補鎖を遊離させる、即ち鎖置換（strand displacement）することができる活性のことをいう。また、本明細書においては、鎖置換により鋳型となる核酸配列から遊離したＤＮＡ鎖のことを「置換鎖」と称する。

以下、本発明を詳細に説明する。

（１）本発明に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマー

本発明の方法において使用されるプライマーは、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーである。該プライマーには未修飾リボヌクレオチドおよび／または修飾リボヌクレオチドを含有するオリゴリボヌクレオチドプライマーも含まれる。

本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型核酸の塩基配列の一部に実質的に相補的な塩基配列を有し、その３’末端よりＤＮＡ鎖の伸長が可能であり、さらに、ＤＮＡ合成反応中にエンドヌクレアーゼにより切断される部位をその３’末端又は３’末端側に有するものであれば良い。例えば、その３’末端又は３’末端側にリボヌクレオチドが配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用することができる。当該プライマーは通常、増幅しようとする領域の上流、すなわち鋳型核酸上の増幅しようとする領域に対応する塩基配列の３’側部分に相補的に設計される。なお、ここで「実質的に相

補的な塩基配列」とは、使用される反応条件において鋳型となるＤＮＡにアニーリング可能な塩基配列を意味する。このようなキメラオリゴヌクレオチドプライマーあるいはオリゴヌクレオチドプライマーの設計は当業者に公知であり、例えば、ラボマニュアルＰＣＲ（宝酒造社発行、第１３頁～第１６頁、１９９６年）を参考に設計することができる。また、市販のプライマー設計ソフト、例えば、ＯＬＩＧＯ^{TM} Ｐｒｉｍｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｓｏｆｔｗａｒｅ（宝酒造社製）を使用することができる。

本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは１以上の修飾リボヌクレオチドを含有するものであってもよい。即ち、本明細書においてリボヌクレオチドは、キメラオリゴヌクレオチドプライマーの３’末端又は３’末端側に配置され、エンドヌクレアーゼにより認識あるいは切断されるものであれば、未修飾リボヌクレオチドおよび／または修飾リボヌクレオチドのいずれであってもよく、そのような未修飾あるいは修飾リボヌクレオチドのいずれもが包含される。すなわち、本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーには、当該プライマーの機能を失わない範囲で未修飾リボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチドを使用することができ、さらにこれらを組合せて使用することができる。このような修飾リボヌクレオチドとしては、特に限定するものではないが、たとえば、リン酸基に結合する酸素原子が硫黄原子に置換された（α－Ｓ）リボヌクレオチドや、リボースの２位の水酸基がメトキシ基に置換されたリボヌクレオチドが挙げられる。このような修飾リボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、例えば、米国特許第５，００３，０９７号記載の硫化反応試薬（グレンリサーチ社製）を用いた方法で調製した（α－Ｓ）リボヌクレオチド３リン酸、あるいは２－ＯＭｅ－ＲＮＡ－ＣＥ　ホスホアミダイド試薬（グレンリサーチ社製）を用いて作製することができる。

また、エンドヌクレアーゼによる切断に耐性を付与するような性質の修飾リボヌクレオチドを含有し、本発明の増幅方法に使用できるキメラオリゴヌクレオチドプライマーを設計してもよく、この様なプライマーは、増幅反応工程におけるエンドヌクレアーゼの切断位置を制御し得る点において有用である。

本発明の方法で使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、増幅後のＤ

ＮＡ断片を一本鎖もしくは二本鎖のいずれの形態で得たいかによって１種類もしくは２種類を使い分けることができる。すなわち、一本鎖ＤＮＡが望まれる場合には１種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを、また、二本鎖が望まれる場合には２種類のプライマーが使用される。

本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは特に限定はないが約１２ヌクレオチドから約１００ヌクレオチドの長さのものが好ましい。さらに好ましくは、約１５ヌクレオチドから約４０ヌクレオチドの長さのプライマーである。その塩基配列は使用される反応条件において鋳型核酸にアニーリングするように、実質的に鋳型核酸に相補的な配列であることが好ましい。該プライマーには、後に示す段階で使用されるエンドヌクレアーゼにより認識される配列を３’末端又は３’末端側に含む。

本発明を何ら限定するものではないが、例えば、下記一般式で表す構造をもつオリゴヌクレオチドを本発明のＤＮＡ合成方法にプライマーとして使用することができる。

一般式：５’－ｄＮ$_a$－Ｎ$_b$－ｄＮ$_c$３’

（ａ：１１以上の整数、ｂ：０または１以上の整数、ｃ：０または１以上の整数、ただし、ｂ＝ｃ＝０の場合を除く、ｄＮ：デオキシリボヌクレオチド、Ｎ：未修飾リボヌクレオチド及び／又は修飾リボヌクレオチド）

例えば、上記一般式においてａ＝１１以上の任意の整数で、ｂ＝１、ｃ＝０のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、ｂ＝２、ｃ＝０のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、ｂ＝３～５、ｃ＝０のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、さらにｂ＝２、ｃ＝０～５のキメラオリゴヌクレオチドプライマー等がいずれも本発明に好適に使用できる。即ち、本発明の方法に用いるキメラオリゴヌクレオチドプライマーの３’末端又は３’末端側のリボヌクレオチドの長さは、好ましくは１ｍｅｒ～１５ｍｅｒ、さらに好ましくは、１ｍｅｒ～１０ｍｅｒ、特に好ましくは１ｍｅｒ～５ｍｅｒである。また、上記一般式中のｃの数は、特に限定はなく、本発明の方法に使用できる数を選択すればよいが、通常５以下が好適であり、４、３、２、１、の順に反応結果が良く、特にｃ＝０の場合が最も反応効率がよい。

本発明に使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、該プライマーよりＤＮＡポリメラーゼで伸長されたＤＮＡ鎖（プライマー伸長鎖）に含まれるリボヌクレオチド含有部位がエンドヌクレアーゼで切断されるような構造を有している。すなわち、上記のキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、エンドヌクレアーゼにより切断を受けるようにリボヌクレオチドがその３’末端又は３’末端側に配置されている。例えば、鋳型核酸にアニーリングした、上記の一般式で表されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーよりＤＮＡの伸長を行って生成した二本鎖ＤＮＡにＲＮａｓｅＨを作用させた場合には、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーのリボヌクレオチド部分が切断され、上記オリゴヌクレオチドプライマーと伸長により合成されたＤＮＡ鎖の間にニックの入った二本鎖ＤＮＡが生じる。さらに、該ニックの入った部位からＤＮＡポリメラーゼにより鎖置換反応がおこる。従って、プライマーの３’末端から核酸鎖を伸長させることができ、エンドヌクレアーゼにより切断されることができ、そしてＤＮＡポリメラーゼにより鎖置換反応ができるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは全て本発明の方法に使用することができる。

これらのキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、任意の核酸配列を持つように、例えばアプライド・バイオシステムズ社（ＡＢＩ社、Applied Biosystem Inc.）のＤＮＡシンセサイザー３９４型を用いて、ホスホアミダイト法により合成できる。また、別法としてリン酸トリエステル法、Ｈ－ホスホネート法、チオホスホネート法等があるが、いかなる方法で合成されたものであっても良い。

（２）本発明に使用されるエンドヌクレアーゼ

本発明に使用されるエンドヌクレアーゼとは、鋳型核酸にアニーリングした、上記（１）に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマーよりＤＮＡの伸長を行って生成した二本鎖ＤＮＡに作用して、鎖置換反応が起こるように伸長鎖を切断するものであればよい。即ち、上記の二本鎖ＤＮＡのうちのキメラオリゴヌクレオチドプライマー部分にニックを生成する酵素である。特に限定されるものではないが、例えば、本発明にはリボヌクレアーゼが使用でき、特にＤＮＡとＲＮＡとから形成された二本鎖核酸のＲＮＡ部分に作用するエンドリボヌクレアーゼＨ（ＲＮａｓｅＨ）が好適に使用できる。また、該リボヌクレアーゼには、上記作

用を有するものであれば、常温性から耐熱性のリボヌクレアーゼのいずれもが好適に本発明に使用できる。例えば、下記実施例に示すように、約５０℃～約７０℃での反応では大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）由来のＲＮａｓｅＨが本発明の方法に使用することができる。また、耐熱性リボヌクレアーゼである市販のＨｙｂｒｉｄａｓｅ™ Ｔｈｅｒｍｏｓｔａｂｌｅ ＲＮａｓｅＨ（エピセンターテクノロジーズ社製）等も好適に使用できる。さらに、該リボヌクレアーゼは、天然体および変異体のいずれでも良い。なお、本願明細書に記載されているＲＮａｓｅＨの酵素単位は、実施例中の参考例に示した酵素単位測定方法に基づいて表示された数値である。

また、本発明の方法に使用するエンドヌクレアーゼ、例えば、ＲＮａｓｅＨの切断反応の効率は上記プライマーの３’末端近傍の塩基配列に左右され、所望のＤＮＡの増幅効率に影響することが考えられるので、使用するＲＮａｓｅＨに最適なプライマーをデザインすることは当然のことである。

本明細書において使用されている「ニックを入れる」もしくは「ニッキング」という語は、二本鎖核酸の一方の鎖の内部を切断することを意味する。たとえば、ＲＮａｓｅＨはＤＮＡとリボヌクレオチドを含むＤＮＡとのハイブリッド二本鎖核酸に作用し、二本鎖のうちのリボヌクレオチドを含む鎖のリボヌクレオチド部分を選択的に切断することにより、当該ハイブリッド二本鎖核酸にニックを入れる。

（３）本発明に使用されるＤＮＡポリメラーゼ

本発明には、ＤＮＡの鎖置換（strand displacement）活性を有するＤＮＡポリメラーゼを使用することができる。また、実質的に５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を有しないものが特に好適に使用することができる。

本発明において、「鎖置換活性」とは、鋳型となる核酸配列に従ってＤＮＡ複製を行う際、ＤＮＡ鎖を置き換えながら進行し、鋳型鎖にアニーリングしている相補鎖を遊離させる、即ち鎖置換（strand displacement）することができる活性のことをいう。また、本明細書においては、鎖置換により鋳型となる核酸配列から遊離したＤＮＡ鎖のこと「置換鎖」と称する。

本発明に使用されるＤＮＡポリメラーゼは、上記の鎖置換活性を有するもので

あれば特に限定はなく、例えば、バチルス・カルドテナックス（Bacillus caldotenax、以下、Ｂ．ｃａと称す）やバチルス・ステアロサーモフィラス（Bacillus stearothermophilus、以下Ｂ．ｓｔと称す）等の好熱性バチルス属細菌由来ＤＮＡポリメラーゼの５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体や、大腸菌（以下、Ｅ．ｃｏｌｉと称す）由来のＤＮＡポリメラーゼＩのラージ フラグメント（クレノウ断片）等が挙げられる。また、本発明に使用できるＤＮＡポリメラーゼは、常温性から耐熱性のいずれのものも好適に使用できる。

Ｂ．ｃａは生育至適温度が約７０℃である好熱性細菌であり、この細菌由来のＢｃａ ＤＮＡポリメラーゼは、ＤＮＡ依存ＤＮＡポリメラーゼ活性、ＲＮＡ依存ＤＮＡポリメラーゼ活性（逆転写活性）、５’→３’エキソヌクレアーゼ活性、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性を持つことが知られている。

上記の酵素はその本来の起源より精製して取得されたもの、あるいは遺伝子工学的に生産された組み換え蛋白質の何れであっても良い。また、該酵素は、遺伝子工学的あるいはその他の手法によって置換、欠失、付加、挿入等の改変を加えたものであっても良く、このような酵素の例として、５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を欠損させたＢｃａ ＤＮＡポリメラーゼであるＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ（宝酒造社製）等が挙げられる。

（４）本発明に使用される反応バッファーの組成

本発明に使用される反応バッファーには、緩衝成分、マグネシウム塩、ｄＮＴＰを含有するものが使用される。緩衝成分は、特に限定はないが、例えば、トリシン、トリス－塩酸、リン酸塩（リン酸ナトリウム、リン酸カリウム等）が好適に使用できる。特にトリシン、あるいはリン酸塩を緩衝成分として含有するバッファーが本発明に好適である。該緩衝成分の最終濃度は５ｍＭ～１００ｍＭの範囲、特に好ましくは２０ｍＭ～５０ｍＭの範囲であり、またｐＨ６．０～９．５、特に好ましくはｐＨ７．０～９．２の範囲のものが使用される。例えば、２２ｍＭ～４６ｍＭのトリシンを含有するｐＨ７．５～９．２のバッファー、あるいは２５ｍＭ～５０ｍＭのリン酸カリウムを含有するｐＨ７．０～８．０のバッファーが好適に使用される。また、マグネシウム塩としては、特に限定はないが、例えば、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウムあるいは硫酸マグネシウムが好適に

使用でき、その濃度は、最終濃度で１mM～２０mM、特に好ましくは２mM～１０mMの範囲である。また、ＤＮＡ伸長反応の基質となるｄＮＴＰ混合物（ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰ）は、最終濃度で、それぞれ０．１mM～３．０mM、特に好ましくは０．２mM～１．２mMの範囲である。使用するプライマーの量は、反応液量５０μｌ当たり１ｐｍｏｌ～１０００ｐｍｏｌの範囲であり、特に１０ｐｍｏｌ～１００ｐｍｏｌの範囲が好ましい。さらに、反応液中には増幅反応の安定化等を目的とした添加物を共存させることができ、最終濃度０．１%以下のＢＳＡ、最終濃度１０%以下のジメチルスルホキシド、あるいは最終濃度４mM以下のプトレスシン２塩酸塩あるいは０．０１%以下のプロピレンジアミンを添加してもよい。この他、ＮＭＰ（１－メチル２ピロロリジノン）、グリセロール、ポリ（エチレングリコール）、ジメチルスルフォキシドおよび／またはホルムアミドを含んでもよく、これらの有機溶媒の添加により、オリゴヌクレオチドプライマーの非特異的なアニーリングが軽減されることが期待される。

エンドヌクレアーゼは、例えば、大腸菌由来のＲＮａｓｅＨならば、反応液量５０μｌ当たり３～２００Ｕの範囲が好ましく、特に１５Ｕ～６０Ｕの範囲が好適である。また、ＤＮＡポリメラーゼは、例えば、ＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼならば、反応液量５０μｌ当たり０．５Ｕ～１００Ｕの範囲、特に１Ｕ～２２Ｕの範囲が好ましい。特に、前者についてはその種類によって好適に使用できるユニット数が異なる場合が予想されるが、その際には増幅産物量が最大になるように該バッファーの組成および酵素の添加量を調整すればよい。いずれの場合においても、使用する酵素の種類にあわせて反応バッファーの組成等を至適化するのは当然のことである。

（５）本発明の核酸配列の増幅方法

本発明の方法は、上記（１）に示されたオリゴヌクレオチドプライマーを少なくとも１種類使用し、さらに上記（２）に示されたエンドヌクレアーゼおよび上記（３）に示されたＤＮＡポリメラーゼを組合わせて実施することができる。当該方法では、伸長反応の基質となるヌクレオチド３リン酸には、ＰＣＲ法等に使われるｄＮＴＰ、すなわちｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＴＴＰの混合物が

好適に使用できる。当該ｄＮＴＰは、使用されるＤＮＡポリメラーゼの基質となる限りにおいては、ｄＮＴＰのアナログ、たとえば７－デアザ－ｄＧＴＰ等を含んでいてもよい。また、当該方法では、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用するが、当該プライマーは、例えば、ＤＮＡ合成機等を用いて通常の合成方法と同様に調製することができる。さらに、本発明の方法においては、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーと通常のオリゴヌクレオチドプライマーを組み合わせて使用することもできる。

本発明の方法において鋳型となる核酸、すなわちＤＮＡまたはＲＮＡは、当該核酸を含む可能性のあるあらゆる試料から調製、あるいは単離したものでもよい。このような核酸を含む試料には特に限定はないが、例えば、全血、血清、バフィーコート、尿、糞便、脳脊髄液、精液、唾液、組織（例えば、癌組織、リンパ節等）、細胞培養物（例えば、哺乳動物細胞培養物及び細菌培養物等）のような生体由来試料、ウイロイド、ウイルス、細菌、カビ、酵母、植物及び動物のような核酸含有試料、ウイルス又は細菌のような微生物が混入もしくは感染している可能性のある試料（食品、生物学的製剤等）、あるいは土壌、排水のような生物を含有する可能性のある試料が挙げられる。また、前記試料等を公知の方法で処理することによって得られる核酸含有調製物であっても良い。該調製物としては、例えば細胞破砕物やそれを分画して得られる試料、該試料中の核酸、あるいは特定の核酸分子群、例えば、ｍＲＮＡを富化した試料等が本発明に使用できる。さらに上記試料中に含まれる核酸が公知方法で増幅されたＤＮＡあるいはＲＮＡ等の核酸等も好適に使用できる。

これら材料からの核酸含有調製物の調製には特に限定はなく、例えば、界面活性剤による溶解処理、超音波処理、ガラスビーズを用いた振盪撹拌、フレンチプレスの使用等により行うことができる。幾つかの例においては、さらに操作を加えて核酸を精製することが有利である（例えば、内在性ヌクレアーゼが存在するとき）。これらの例において、核酸の精製はフェノール抽出、クロマトグラフィー、イオン交換、ゲル電気泳動または密度勾配遠心分離等の公知方法により実施される。

ＲＮＡ由来の配列を有する核酸を増幅したい場合には、当該ＲＮＡを鋳型とし

た逆転写反応によって合成されたｃＤＮＡを鋳型として本発明の方法を実施すればよい。本発明の方法に適用することができるＲＮＡには、逆転写反応に使用されるプライマーが作製可能なものであれば特に制限はなく、試料中の全ＲＮＡの他、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｒＲＮＡ等のＲＮＡ分子群、あるいは特定のＲＮＡ分子種が挙げられる。

上記の逆転写反応に使用されるプライマーは、使用される反応条件において鋳型ＲＮＡにアニールするものであれば特に限定されるものではない。該プライマーは、特定の鋳型ＲＮＡに相補的な塩基配列を有するプライマー（特異的プライマー）の他、オリゴｄＴ（デオキシチミン）プライマーやランダムな配列を有するプライマー（ランダムプライマー）であっても良い。逆転写用プライマーの長さは、特異的なアニーリングを行う観点から、好ましくは６ヌクレオチド以上であり、更に好ましくは９ヌクレオチド以上であり、オリゴヌクレオチドの合成の観点から、好ましくは１００ヌクレオチド以下であり、更に好ましくは３０ヌクレオチド以下である。

さらに、逆転写用プライマーとして、逆転写後のｃＤＮＡを鋳型とした本発明の核酸配列増幅法を行う際に鎖置換反応のためのプライマーとして使用可能なキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用することができる。このようなプライマーは、上記（１）に記載された性質を有し、かつＲＮＡからの逆転写反応に使用できるものであれば特に限定はない。

上記の逆転写反応に使用される酵素としては、ＲＮＡを鋳型としたｃＤＮＡ合成活性を有するものであれば特に限定はなく、例えばトリ骨髄芽球症ウイルス由来逆転写酵素（ＡＭＶ　ＲＴａｓｅ）、モロニーネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素（ＭＭＬＶ　ＲＴａｓｅ）、ラウス関連ウイルス２逆転写酵素（ＲＡＶ－２　ＲＴａｓｅ）等、種々の起源の逆転写酵素が挙げられる。このほか、逆転写活性を併せ持つＤＮＡポリメラーゼを使用することもできる。また、本発明の目的のためには、高温で逆転写活性を有する酵素が好適であり、例えばサーマス属細菌由来ＤＮＡポリメラーゼ（ＴｔｈＤＮＡポリメラーゼ等）、好熱性バチルス属細菌由来ＤＮＡポリメラーゼ等を使用できる。特に限定はないが、例えば、好熱性バチルス属細菌由来ＤＮＡポリメラーゼが好ましく、Ｂ．ｓｔ由来ＤＮＡポ

リメラーゼ（Ｂｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ）、さらにＢ．ｃａ由来ＤＮＡポリメラーゼ（以下、Ｂｃａ　ＤＮＡポリメラーゼと記載する）が好ましい。例えば、Ｂｃａ　ＤＮＡポリメラーゼは、逆転写反応にマンガンイオンを必要とせず、また、高温条件下で鋳型ＲＮＡの二次構造形成を抑制しながらｃＤＮＡを合成することができる。上記の逆転写酵素活性を有する酵素も、当該活性を有している範囲において天然体、変異体のいずれもが使用できる。

本発明の方法による核酸の増幅においては、あらかじめ鋳型となる核酸を増幅しておくことにより、さらに効率よく目的の核酸を増幅できる場合がある。例えば、極めて少量のゲノムＤＮＡ等に存在する核酸配列を増幅する場合には、まず目的の核酸配列を含むＤＮＡ断片を適当な核酸増幅方法によって増幅し、次にこうして得られた増幅ＤＮＡ断片を鋳型とした本発明の核酸の増幅方法を実施することができる。１段階目の増幅工程は本発明の方法で実施されてもよく、また公知の核酸増幅方法、例えばＰＣＲ法で実施されてもよい。また、この工程に使用されるプライマーの５’側にある特定の塩基配列を付加しておくことができる。このようなプライマーで増幅された断片を鋳型として使用する場合には、当該プライマーに付加された特定の塩基配列を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用して本発明の核酸増幅方法を実施することができる。すなわち上記のような特定の塩基配列を５’側に付加されたプライマーを使用したＰＣＲを本発明の方法に組み合わせれば、ＰＣＲで増幅されたＤＮＡ断片を鋳型とした本発明の方法による核酸増幅工程は、増幅しようとする領域の塩基配列とは無関係に共通のキメラオリゴヌクレオチドプライマーで実施することが可能である。

通常、上記の１段階目の核酸増幅工程には、目的の核酸配列に応じて、当該配列を特異的に増幅するための特異的プライマー対を作製する必要があるが、非特異的に核酸断片を増幅するようなランダムプライマーや、あらかじめ作成された縮重プライマーのセットから選択されるプライマー対を利用することにより、目的の核酸配列に特異的プライマーを使用することなく鋳型となる核酸を増幅することができる。例えば、ヌクレイック　アシッズ　リサーチ（Nucleic Acids Research）第２４巻、１９号、３７７８～３７８３頁（１９９６）に記載のタグ配列を有するランダムプライマーを使用するＰＣＲ法、あるいはジェノミックス

(Genomics) 第１３巻、７１８～７２５頁（１９９２）に記載のタグ配列を有する縮重プライマー (Degenerate primer) を用いたＤＯＰ－ＰＣＲ (Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR) 法を利用することにより多種類の鋳型核酸を増幅するために必要なプライマー対の数を少なくすることができる。これらのプライマーはいずれもその３’末端にランダムな配列、縮重した配列を有している。さらに、タグ配列を有するプライマーで増幅された核酸を鋳型として本発明の核酸配列増幅方法を実施する場合には、上記のようにタグ配列と同じ塩基配列を有する１種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用することにより、同一のタグ配列を有するプライマーで増幅されたすべての核酸を鋳型として本発明の方法を実施することができる。すなわち、ランダムプライマーや縮重プライマーを用いた核酸増幅法と本発明の方法を組み合わせれば、数多くの種類の核酸配列を非常に安価に、かつ大量に供給することができる。

上記核酸増幅法に用いられるＤＮＡポリメラーゼとしては、ＤＮＡ鎖を鋳型として新たなＤＮＡ鎖を合成する酵素であれば特に限定はされないが、ポルＩ型ＤＮＡポリメラーゼ（大腸菌ＤＮＡポリメラーゼＩ、クレノウ断片、Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼなど）、α型ＤＮＡポリメラーゼ（ピロコッカス・フリオサス由来ＤＮＡポリメラーゼ、ＶＥＮＴ ＤＮＡポリメラーゼ、ＫＯＤ ＤＮＡポリメラーゼ、ＤＥＥＰ ＶＥＮＴ ＤＮＡポリメラーゼ）及び非α非ポルＩ型ＤＮＡポリメラーゼ（国際公開第９７／２４４４４号パンフレット記載のＤＮＡポリメラーゼ）等が挙げられる。また、少なくとも２種類のＤＮＡポリメラーゼを組み合わせた混合物、例えばタカラ Ｅｘ Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼ（宝酒造社製）あるいはＫＯＤ ｄａｓｈ ＤＮＡポリメラーゼ（東洋紡社製）等も好適に使用できる。また、Ｂ．ｃａ由来ＤＮＡポリメラーゼ、Ｂ．ｓｔ由来由来ＤＮＡポリメラーゼ及び該ＤＮＡポリメラーゼ及び該ＤＮＡポリメラーゼの５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体、９°Ｎ ＤＮＡポリメラーゼ、Ｐｆｕ(exo-) ＤＮＡポリメラーゼ（ストラタジーン社製）、Ｔｔｈ ＤＮＡポリメラーゼ（東洋紡社製）、Ｔｆｌ ＤＮＡポリメラーゼ（プロメガ社製）等のＤＮＡポリメラーゼも好適に使用できる。

また、ＰＣＲ増幅断片のような直鎖ＤＮＡ断片を本発明の核酸配列増幅方法の

鋳型とする場合、鋳型となる当該直鎖ＤＮＡ断片の３'末端から本発明の核酸増幅方法に用いるプライマーの５'末端のアニーリング位置との間にスペーサーと呼ばれる配列部分を設けると増幅効率が向上する場合がある。特に限定はないが、例えば、上記スペーサー部分の長さが１塩基～約７０塩基、さらに好ましくは、約５塩基～約６０塩基になるように本発明の核酸増幅方法用プライマーを設定するのが好ましい。なお、本発明の核酸配列増幅用プライマーの配列によっては、上記の好適なスペーサー部分の塩基数が異なる場合があるが、その場合最適なスペーサー部分を本明細書の実施例を参考に検討する事ができる。さらに、本発明の核酸増幅用プライマーのアニーリングする領域の３'側に上記のスペーサー部分が付加されるように、例えばＰＣＲによって本発明の核酸増幅方法の鋳型となる核酸を予め増幅したのち、この増幅断片を本発明の核酸増幅方法の鋳型として使用することができる。１つの態様としては、５'→３'方向に上記スペーサー領域、本発明の核酸増幅方法用プライマー領域及び他の核酸増幅用プライマー領域を有するプライマーを用いて、予め鋳型となる核酸を増幅したのち、この増幅断片を本発明の核酸増幅方法の鋳型として使用することができる。なお、前述の他の核酸増幅用プライマー領域は、例えば、ＰＣＲ法のような核酸増幅方法のためのプライマー領域であればよく特に限定はされない。あるいは、前述の他の核酸増幅用プライマー領域は、本発明の核酸増幅方法のための別のプライマー領域であってもよい。

上記方法により単離したゲノムＤＮＡやＰＣＲフラグメントのような二本鎖ＤＮＡ、および全ＲＮＡ若しくはｍＲＮＡから逆転写反応で調製されたｃＤＮＡのような一本鎖ＤＮＡのいずれもが本発明において鋳型ＤＮＡとして好適に使用できる。上記二本鎖ＤＮＡの場合は、一本鎖ＤＮＡに変性する工程（デネーチャー）を施したものが好適に使用できる。

また、鋳型がＰＣＲ増幅産物のような直鎖状２本鎖ＤＮＡにおいては、本発明の方法に用いるプライマーがアニーリングする位置を、該ＤＮＡの末端から約５０塩基程度内側に設定することにより、前述のデネーチャーの工程を行わなくても本発明の核酸配列の増幅方法を行うことができる場合がある。さらに、ＲＮＡ由来の配列を有する核酸の増幅を目的とする場合には、本発明のＤＮＡの合成方

法に逆転写酵素活性と鎖置換活性とを有するＤＮＡポリメラーゼを使用することにより、ＲＮＡを鋳型とした逆転写反応と、当該反応によって生成したｃＤＮＡを鋳型にしたＤＮＡ増幅反応とを１種類のＤＮＡポリメラーゼで行なうことができる。

上記鋳型の長さは、標的配列がその断片中に完全に含まれるか、または標的配列の十分な部分が少なくとも断片中に存在することにより、プライマー配列の十分な結合を提供するようなものがよい。

本発明の方法は、鋳型ＤＮＡが二本鎖ＤＮＡの場合、それらを変性して一本鎖にすることにより鋳型ＤＮＡ鎖へのプライマーの結合を可能にさせる。二本鎖ＤＮＡが変性する温度、例えば約９５℃で保持することは好ましい変性法である。他の方法はｐＨの上昇を含むが、オリゴヌクレオチドプライマーを標的物に結合させるためには、増幅反応時にｐＨを低下させる必要がある。上記のような二本鎖を一本鎖ＤＮＡに変性する工程、もしくは、鋳型がＲＮＡの場合、逆転写反応によりｃＤＮＡ（一本鎖ＤＮＡ）を調製する工程の後、等温条件下において、連続的に核酸配列が増幅される。

ここで、「連続的に」とは、反応温度、反応液組成の変更を伴わずに反応が進行していることを意味する。また、本明細書において「等温」とは、酵素および核酸鎖が上記各工程において機能する、実質的に一定の温度条件のことを意味する。

本発明の核酸増幅方法は、理論によって限定されないが、例えば、等温条件下、下記の工程が並行して連続し、繰返し起こると考えられる：

［１］鋳型となるＤＮＡを少なくとも１種のオリゴヌクレオチドプライマーとアニーリングさせる工程；

［２］プライマーの３’末端から鋳型ＤＮＡに相補的なＤＮＡの伸長反応を行なう工程；

［３］エンドヌクレアーゼで、［２］で伸長させたＤＮＡ鎖を切断する工程；

［４］［３］で切断された部位の３’末端からＤＮＡ伸長反応を行なうと同時に、［２］で伸長させたＤＮＡ鎖を分解することなく鋳型ＤＮＡから遊離させる工程；

［５］［４］の工程で得られた二本鎖ポリヌクレオチドを用いて［３］～［４］の工程を繰り返す工程。

上記の反応は、例えば、クレノウ断片のような常温性ＤＮＡポリメラーゼを使用することにより常温（例えば３７℃）でも実施できるが、耐熱性を有する酵素（エンドヌクレアーゼ、ＤＮＡポリメラーゼ）を使用して高温、例えば５０℃以上で、さらに例えば６０℃以上で実施することができる。この場合、プライマーの非特異的なアニーリングが抑制され、ＤＮＡ増幅の特異性が向上し、また鋳型ＤＮＡの二次構造が解消されることによりＤＮＡポリメラーゼの伸長性も向上する。さらに該方法においては、逆転写反応および核酸配列の増幅を連続して行なう態様も可能であり、上記反応に逆転写酵素を組み合わせて、あるいは逆転写活性を有するＤＮＡポリメラーゼを使用して、ＲＮＡ由来の配列を有するＤＮＡを増幅することができる。

本発明の第１の態様は、一本鎖のＤＮＡを鋳型として、少なくとも１種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行なう核酸配列の増幅方法である。

すなわち、核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸配列を該核酸の塩基配列の一部に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して上記鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法である。

本発明の第２の態様は、一本鎖のＤＮＡを鋳型として、少なくとも２種類の本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行なう核酸配列の増幅方法

である。

すなわち、少なくとも２種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列の一部に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して上記鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｂ）工程に再度利用される工程；

（ｄ）（ｃ）工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも１種のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列の一部に実質的に相補的なデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｅ）（ｄ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｆ）（ｅ）工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｅ）工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法である。

本発明の第３、第４の態様は、二本鎖のＤＮＡを変性して一本鎖ＤＮＡとする前処理の後に、当該一本鎖ＤＮＡを鋳型としてそれぞれ第１、もしくは第２の態様の核酸配列の増幅を行う方法である。

さらに、本発明の第５、第６の態様は、ＲＮＡを鋳型とした逆転写反応により一本鎖のｃＤＮＡを調製した後、当該ｃＤＮＡを鋳型としてそれぞれ第１、もしくは第２の態様の核酸配列の増幅を行う方法である。

本発明において、「再生されたプライマー伸長鎖」とは、鎖置換により新たに複製に用いられたオリゴヌクレオチドプライマーから伸長した、鋳型となる核酸配列に相補的なＤＮＡ鎖のことを言う。

本発明において、「再度利用され」とは、鋳型となる核酸配列と再生されたプライマー伸長鎖で構成された二本鎖ＤＮＡを再度鎖置換の工程に利用することを言う。

上記の本発明の態様のいずれにおいても、まず一本鎖の鋳型ＤＮＡに該ＤＮＡに相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせる。次にＤＮＡポリメラーゼの作用により、当該プライマーの３’末端より鋳型ＤＮＡの残りの配列に沿って鋳型ＤＮＡに相補的なＤＮＡ（プライマー伸長鎖）を伸長させて二本鎖ＤＮＡを合成する。エンドヌクレアーゼは当該二本鎖ＤＮＡに作用してキメラオリゴヌクレオチドプライマー中のリボヌクレオチド部分の３’末端側を切断するが、これ以外の部分は切断しない。即ち、エンドヌクレアーゼは上記の二本鎖ＤＮＡにニックを入れるニッキング酵素として作用する。また、該エンドヌクレアーゼは、キメラオリゴヌクレオチドプライマーと鋳型ＤＮＡの二本鎖ＤＮＡ構造を変化させるとも考えられるが、本願発明は理論によって限定はされない。さらに、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼがニックの入った二本鎖ＤＮＡのニックの３’末端からＤＮＡ鎖を再伸長して新たなプライマー伸長鎖を生成し、同時にニックの３’末端から下流のＤＮＡを遊離させる。こうして先に合成されたプライマー伸長鎖が新たなプライマー伸長鎖に置換される。

本発明の核酸配列増幅方法は、鋳型核酸に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーと、置換鎖に相補的なもう１種のキメラオリゴヌクレオチドプライマ

一の２種のプライマーを使用して実施することができる。この場合、一方のプライマーは鋳型となるＤＮＡ鎖に結合して鎖置換反応を起し、そして他方のプライマーは上記の鎖置換反応によって遊離した置換鎖に結合し、新たな鎖置換反応を開始する。この態様を使用すると、各反応産物が他のプライマーのための鋳型として機能できることは明らかである。このように鋳型量が増加することにより、非直線的に増幅産物が増加していく。

二本鎖ＤＮＡを鋳型に用いて本発明の核酸配列増幅方法を実施する場合には、二本鎖ＤＮＡを変性する前または後に、キメラオリゴヌクレオチドプライマー、４種のデオキシリボヌクレオチド３リン酸（ｄＮＴＰ）、ＤＮＡポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを反応液に添加する。熱処理により二本鎖ＤＮＡを変性し、かつ耐熱性の酵素を使用しない場合には、変性後に酵素を添加することが好ましい。

上記（２）に記述されたように、この方法において使用されるエンドヌクレアーゼは、プライマーのリボヌクレオチド部分において鎖を切断するように選択するべきである。特に好ましくはリボヌクレオチドの３’側である。さらにＤＮＡポリメラーゼは、ニックの入ったＤＮＡ鎖を合理的な速度で解離させるように選択されるべきである。

本発明に使用されるＤＮＡポリメラーゼは、ニックの入った部位から下流への伸長鎖合成に伴い、先に伸長されたＤＮＡ鎖の置換を行う必要がある。そして重要なことは置換鎖を分解する可能性のある５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を示さないことである。このようなＤＮＡポリメラーゼ、例えば大腸菌由来のＤＮＡポリメラーゼＩのエキソヌクレアーゼ欠損変異体であるクレノウ断片、Ｂｓｔ ＤＮＡポリメラーゼ由来の同様の断片（ニューイングランドバイオラブス社製）、Ｂ．ｃａ由来のＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ（宝酒造社製）が有用である。シークエネース１．０およびシークエネース２．０（米国バイオケミカル社）、ジーン（Gene）第９７巻、１３～１９頁（１９９１）記載のＴ５ＤＮＡポリメラーゼおよびφ２９ＤＮＡポリメラーゼも使用することができる。通常はエキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼであっても、その活性が適当な阻害剤の添加により阻害することが可能な場合は、本発明のＤＮＡ合成方法に使用で

きる。

本発明の核酸配列の増幅方法は、変温で行ってもよく、又は等温で行ってもよい。ここで変温とは、各工程の反応を妨げない範囲で各工程の反応温度を変化させることを意味する。すなわち、例えば、プライマーのアニーリング、相補鎖の合成反応、相補鎖のニッキング、そして置換反応のそれぞれに適した温度に変化させる場合のことをいう。

次に等温とは、各工程の反応温度を変化させず、各工程が実質的に一定の温度で行われることを意味する。いずれの場合においても、最適の反応条件となるように温度を設定するのは当然である。

本発明の核酸配列の増幅方法の１つの特徴としては、核酸の合成方法において温度を上げ下げする必要がないことにある。即ち、本発明は等温での核酸配列の合成方法を提供する。従来の多くの核酸増幅法は、温度を上下することにより合成鎖から標的物を解離する必要があり、例えばサーマルサイクラーのような特別な反応装置を必要とするが、本発明の方法においては一定温度を保持できる装置のみでも実施することができる。

このように、本発明の方法は、単一の温度で実施することができる。好ましくは、プライマーの非特異的なアニーリングが低減され、かつ鋳型となる核酸配列にプライマーが特異的にアニーリングするように反応温度、ストリンジェンシーのレベルを設定して実施される。特に限定するものではないが、上記のように耐熱性の酵素を用いて本発明の方法を高温条件下で行う事ができる。さらに、反応の効率を高く保つ観点から、本発明の方法は使用する酵素の活性が十分に保持される適当な温度で行うことが好ましい。従って、使用する酵素にもよるが、好ましい反応温度は、約２０℃～約８０℃であり、さらに好ましくは約３０℃～約７５℃であり、特に好ましくは、約５０℃～約７０℃である。特に高温条件下で反応を行う場合には、常温で反応を行う場合よりも鎖長の長いプライマーを使用することが好ましい。各反応温度に適したプライマーの配列及び長さの設定については、例えば、そのＴｍ値を参考にしてもよく、あるいは市販のプライマー設計ソフト、例えば、ＯＬＩＧＯ™ Ｐｒｉｍｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｓｏｆｔｗａｒｅ（宝酒造社製）を使用してもよい。例えば、本発明の方法において反応

温度を５５℃から６０℃あるいは６５℃に設定した場合、該方法に使用するプライマーの長さとしては、特に限定するものではないが、例えば１２ヌクレオチド～１００ヌクレオチドの長さ、好ましくは１４ヌクレオチド～５０ヌクレオチドの長さ、さらに好ましくは１５ヌクレオチド～４０ヌクレオチドの長さのプライマーが使用できる。このように反応温度を上げることの効果としては、鋳型ＤＮＡの二次構造を解消できることが挙げられ、ＧＣ含量の高い鋳型核酸を使用した場合にも所望の核酸が増幅される。また、長鎖長の領域を増幅する場合においても同様の効果がある。該効果は、約１００ｂｐ～約２０ｋｂｐの範囲で、さらに約２００ｂｐ～約４．３ｋｂｐの範囲で、特に約２５０ｂｐ～約１５００ｂｐの範囲で認められる。

また、本発明の方法において、逆転写酵素活性を持つＤＮＡポリメラーゼ、例えば、ＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼを使用した場合、ＲＮＡからｃＤＮＡを調製する工程（逆転写反応）を含むＲＮＡ由来の核酸配列の増幅を簡便に実施することができる。また、ＲＮＡからｃＤＮＡを調製する工程を独立させて行い、その生成物（ｃＤＮＡ）を本発明の方法に鋳型ＤＮＡとして使用することもできる。

いずれの場合においても、本発明の方法においては、適当な方法、例えば酵素を失活させたり反応温度を低下させて反応を停止させるか、または試薬のうちの一つが使い尽くされるかのいずれかまで繰り返される。

図１は、一本鎖ＤＮＡを鋳型にし、２種のプライマーを使用する場合の一態様を図示したものである。各工程を下記に示すが、各工程は並行、連続して行われる：

（１）鋳型となる一本鎖ＤＮＡとキメラオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせる工程；

（２）プライマーの３’末端からＤＮＡ伸長反応を行ない、プライマー伸長鎖ができる工程；

（３）プライマー中のリボヌクレオチドを含有する部位をエンドヌクレアーゼを用いて切断する工程；

（４）（３）の切断した部位よりＤＮＡポリメラーゼにより鎖置換する工程；

（５）（４）の工程で得られた鋳型および再生されたプライマー伸長鎖からなる二本鎖ＤＮＡが（３）の工程に再度利用され、また遊離した置換鎖が（６）の工程以降の反応に利用される工程；

（６）（５）の工程の遊離した置換鎖を鋳型として（１）と異なるオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせる工程；

（７）プライマーの３’末端からＤＮＡ伸長反応を行ない、プライマー伸長鎖ができる工程；

（８）プライマー中のリボヌクレオチドを含有する部位をエンドヌクレアーゼを用いて切断する工程；

（９）（８）の切断した部位よりＤＮＡポリメラーゼにより鎖置換する工程；

（１０）（９）の工程で得られた鋳型および再生されたプライマー伸長鎖が（８）の工程に再度利用される工程。

二本鎖ＤＮＡが鋳型の場合は、一本鎖ＤＮＡへの変性処理の後、それぞれのＤＮＡ鎖が上記工程（１）の鋳型になる。従って、得られる増幅産物の量は、一本鎖のＤＮＡを鋳型にする場合よりも多く、また増幅産物の検出においては、一本鎖ＤＮＡを鋳型にする場合よりも短時間で行なうことができる。

本発明の核酸配列の増幅方法は、核酸配列の増幅を利用した種々の実験操作、例えば核酸の検出、標識、塩基配列の決定に使用することができる。

また、本発明の核酸配列の増幅方法は、ｉｎ　ｓｉｔｕ核酸増幅方法、ＤＮＡチップのような固相担体上での核酸増幅方法あるいは多種類の領域を同時に増幅するマルチプレックス核酸増幅方法として使用することができる。

本発明の核酸配列の増幅方法の特徴の一つとして、一本鎖のＤＮＡを調製することが可能なことが挙げられる。この目的のためには、１種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する方法のみならず、２種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する方法を使用することもできる。例えば、２つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いる場合は、一方のオリゴヌクレオチドプライマー量を他方の量に対して過剰にして増幅反応を行なう、いわゆるアシンメトリック（非対称）－ＰＣＲ法において採用される方法と同様のプライマー比率によって行なうことができる。この結果、一方の鎖を置換した産物の量が、他方の鎖を置

換した産物の量に比べて過剰になる。

本発明の核酸配列の増幅方法によれば実質的にその相補鎖を含有しない一本鎖のＤＮＡを調製することができ、例えば、ＤＮＡチップのような核酸固定化物を作製するための一本鎖ＤＮＡ、標的核酸検出のための一本鎖ＤＮＡプローブ、または長鎖ＰＣＲ法のためのメガプライマーを容易にしかも短時間に作製することができる。また、本発明の方法を使用することにより、センス配列のみ、あるいはアンチセンス配列のみを選択して増幅させることが可能である。従って、本発明はセンス配列あるいはアンチセンス配列を有する核酸の製造方法としても有用である。

さらに、本発明の核酸配列の増幅方法には経時的な温度調節が可能な反応装置を使用する必要がないため、大容量の反応液を使用して増幅反応を実施することができる。したがって、例えば医薬用途等に使用される核酸の工業的大量製造が可能である。

本発明の核酸配列の増幅方法において使用するプライマーの利用効率は、ほぼ１００％であり、従来の方法、例えばＰＣＲ法の利用効率に比べて５倍～１０倍高くすることができる。

（６）本発明の核酸配列の増幅方法のためのキット

本発明は、前述の第１～第６の態様に記載の核酸配列の増幅方法に使用されるキットを提供する。１つの実施態様において、該キットは、パッケージされた形態において、鎖置換反応におけるＤＮＡポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼの使用のための指示書を含むことを特徴とする。さらに、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼならびに鎖置換反応用緩衝液を含むキットは本発明の方法に好適に使用される。あるいは、市販の鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼおよび／またはエンドヌクレアーゼを指示書に従って選択し、使用してもよい。さらに、ＲＮＡを鋳型とする場合の逆転写反応用試薬を含んでもよい。ＤＮＡポリメラーゼは、上記（３）記載の本発明に使用されるＤＮＡポリメラーゼから選択することができる。また、エンドヌクレアーゼは、上記（２）記載のエンドヌクレアーゼから選択することができる。さらに、該鎖置換反応用緩衝液は、上記（４）記載の反応バッファー組成を有するものが好適に使

用できる。

上記「指示書」とは、当該キットの使用方法、例えば鎖置換反応用試薬液の調製方法、推奨される反応条件等を記載した印刷物であり、パンフレットまたはリーフレット形式の取り扱い説明書のほか、キットに添付されたラベル、キットが納められたパッケージ等に記載されたものを含む。さらに、インターネットのような電子媒体を通し、開示、提供された情報も含まれる。

（7）本発明の核酸配列の検出方法および該方法のためのキット

本発明の核酸配列の増幅方法を使用することにより、試料中の標的核酸の検出を行うことができる。当該検出方法は、

（a）上記の本発明の核酸配列の増幅方法により、標的核酸を増幅する工程；および

（b）上記工程により増幅された標的核酸を検出する工程；

を包含する。

上記方法は試料中に存在する特定の遺伝子の検出・定量に利用することができる。すなわちＤＮＡまたはＲＮＡ等の核酸を含む可能性のあるあらゆる試料から特定の遺伝子を検出・定量することができる。前述の試料としては、特に限定はないが、例えば、全血、血清、バフィーコート、尿、糞便、脳脊髄液、精液、唾液、組織（例えば、癌組織、リンパ節等）、細胞培養物（例えば、哺乳動物細胞培養物及び細菌培養物等）のような生体由来試料、ウイロイド、ウイルス、細菌、カビ、酵母、植物及び動物のような核酸含有試料、ウイルス又は細菌のような微生物が混入もしくは感染している可能性のある試料（食品、生物学的製剤等）、あるいは土壌、排水のような生物を含有する可能性のある試料から特定の遺伝子を検出・定量することができる。さらに例えば、ウイロイド、ウイルス、カビ、細菌あるいはその他の微生物等由来の特定の遺伝子をターゲットとすることにより、該遺伝子の存在の有無によって、試料中のウイロイド、ウイルス、カビ、細菌あるいはその他の微生物の存在を検出・定量する方法等に利用することができる。さらに、生物の遺伝子型の判別や遺伝子の発現状態を調べるために本発明の方法を使用することもできる。上記検出法のための鋳型として使用される核酸は、ＲＮＡあるいはＤＮＡのいずれもが好適に使用できる。

上記（ｂ）工程には公知の核酸検出方法、例えば電気泳動により特定のサイズの反応産物を検出する方法や、プローブとのハイブリダイゼーションによる検出等を使用することができる。電気泳動による検出ではエチジウムブロマイド等の蛍光物質が使用されるが、プローブとのハイブリダイゼーションを組み合わせてもよい。また、プローブは放射性同位元素による標識の他、ビオチンや蛍光物質のような非放射性の標識を施したものが使用できる。この他、上記（ａ）工程において標識ヌクレオチドを使用することにより増幅産物の検出を容易とすることや、蛍光偏光法、蛍光エネルギー転移等を利用した検出を行うことも可能である。さらに、適切な検出系を構築することにより、標的核酸を自動的に検出することや、あるいは標的核酸の定量を行うことが可能である。

消光状態になるような距離で配置された２種類以上の蛍光物質で標識されたリボヌクレオチド（ＲＮＡ）プローブを本発明の検出方法に使用することができる。当該プローブは蛍光を発することはないが、これに相補的な標的核酸由来の増幅ＤＮＡにアニーリングした場合、ＲＮａｓｅＨは該プローブを分解する。この結果、プローブ上の蛍光物質間の距離が増大して蛍光が発せられるようになり、標的核酸の存在を知ることができる。ＲＮａｓｅＨを使用して本発明の核酸配列の増幅方法が実施された場合には、その反応液中にプローブを添加するだけで標的核酸を検出することができる。当該プローブの標識に使用される蛍光物質としては、例えば、６－ＦＡＭ（6-carboxyfluorescein）とＴＡＭＲＡ（N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine）との組み合わせが好適に使用できる。

本発明の核酸配列の増幅方法の等温下における増幅方法においては、サーマルサイクラーのような装置を必要としない。また本発明の増幅方法では、使用するプライマーを１種類もしくは２種類と従来法よりも少なくすることができる。ｄＮＴＰのような試薬もＰＣＲ等で用いられるものを流用できるため、ランニングコストを従来法よりも低くすることができる。そのため、ルーチンワークを行なっている遺伝子検査等の分野で好適に使用できる。さらに、本発明の方法はＰＣＲ法よりも短時間により多くの増幅産物を得られることから、簡便、迅速、高感度な遺伝子検出方法として利用することができる。

さらに、本発明においては、上記の標的核酸の検出方法に使用されるキットが

提供される。該キットは、上記の本発明の核酸配列の増幅方法のためのキットを使用することができる。さらに、標的核酸の増幅に使用するためのキメラオリゴヌクレオチドプライマー、増幅された標的核酸を検出するための試薬、例えばプローブ等を含むものであってもよい。

（8）本発明の核酸を所定の領域に整列させた核酸固定化物とその製造方法

ＤＮＡチップは、多数の異なる遺伝子あるいはＤＮＡの断片をスライドグラス等の固相担体上の所定の領域あるいは所定の位置に整列させて固定化した核酸固定化物であり、ＤＮＡマイクロアレイ（ＤＮＡアレイ）とも呼ばれる。ＤＮＡチップは、試料より調製した核酸試料、好ましくは標識された核酸試料と接触させてハイブリダイゼーションを行うことにより、核酸試料中に存在する、ＤＮＡチップ上の所定の領域に整列させて固定化されたＤＮＡと相補的な配列を有する核酸の存在を調べる目的で使用される。試料中の多数の核酸を一度の操作で検出、定量できることから、ＤＮＡチップは遺伝子の発現解析や変異あるいは多型解析を飛躍的に加速させる手段として非常に有用である。二本鎖核酸が所定の領域に整列させて固定化されたＤＮＡチップは適切な変性処理の後にハイブリダイゼーション工程に使用されるが、検出しようとする標的核酸に相補的な一本鎖ＤＮＡが所定の領域に整列させて固定化されたＤＮＡチップは、標的核酸の検出に特に好適である。

上記のように、本発明の方法により所望のＤＮＡを一本鎖の状態で増幅することができる。増幅物の精製方法に限定はないが、イソプロパノール沈殿による精製が好ましい。こうして得られたＤＮＡ、特に好ましくは実質的にその相補鎖を含有しない一本鎖のＤＮＡは、ＤＮＡチップ上に固定するＤＮＡ断片として好適に使用できる。即ち、本発明の方法は、ＤＮＡチップ作製において所定の領域に整列させて固定化するＤＮＡを調製する方法として好適に使用できる。こうして得られたＤＮＡを所定の領域に整列させて固定する担体は不溶性のものであれば特に限定はなく、ガラス、プラスチック等で作製された板状の担体の他、ニトロセルロースやナイロン製の膜状の担体が好適に使用される。また、その固定化にあたっては公知の核酸固定化方法が使用できる。上記のＤＮＡはそのまま担体に固定化を行う他、適当なリンカーを介して、または複数分子のＤＮＡをライゲー

ションさせたうえで固定化してもよい。

本発明の方法により増幅されたＤＮＡを所定の領域に整列させて固定化した核酸固定化物、例えばＤＮＡチップを試料より調製された標的核酸を含む可能性のある核酸試料と接触させ、ハイブリダイゼーションを実施することにより、当該核酸固定化物上の核酸とハイブリダイズした標的核酸を検出、定量することができる。特に、本発明の方法により増幅された一本鎖のＤＮＡを所定の領域に整列させて固定化したＤＮＡチップは、従来よりも簡便な操作で、かつ、高感度、高再現性での標的核酸の検出を可能とする。

（９）本発明の核酸の大量製造方法

上記のように、本発明の一態様により等温で実施可能な核酸配列の増幅方法が提供される。該方法は、増幅しようとする核酸の鋳型となる核酸の他、反応に必要な各種成分を混合して等温条件下で反応させることにより、所望の核酸を製造することができる。ＰＣＲ法では反応混合物の温度を経時的に変化させる必要があるため、反応のスケールは温度制御が可能な容量（通常、２００μｌ以下）に限られ、スケールアップは困難である。一方、当該方法にはこのような制約はなく、反応混合物の容量を増加させることにより大量の核酸を製造することが可能である。当該方法は１分子の鋳型から多数の相補鎖分子が合成され、さらにこれらの相補鎖分子を鋳型とした核酸の合成も可能であることから、鋳型ならびにプライマーを適切に設定することにより、所望の核酸を効率よく、大量に製造することができる。さらにまた、当該方法がＰＣＲ法のような特殊な装置、頻繁な温度変化を必要としないことは設備、エネルギーのコスト面からも有利であり、工業的な核酸の大量製造方法としても優れている。

また、本発明の方法は、上記のＤＮＡチップに固定化するためのＤＮＡ断片のような多種類、かつ大量のＤＮＡ断片を供給する方法として有用である。すなわち、１つの態様としては、単純な反応工程でＤＮＡ断片を大量に得ることができ、別の態様としては限られた種類のプライマーを使用して非常に多種類のＤＮＡ断片を得ることができる。後者は、本発明の方法の鋳型となる核酸を公知の核酸増幅方法、例えばＰＣＲ法等であらかじめ増幅する工程を組み合わせて実施することができる。例えば、ヌクレイック　アシッズ　リサーチ（Nucleic Acids

Research）第２４巻、１９号、３７７８～３７８３頁（１９９６）に記載のタグ配列を有するランダムプライマーを使用して核酸を増幅する方法あるいは、ジェノミックス（Genomics）第１３巻、７１８～７２５頁（１９９２）に記載の縮重プライマー（Degenerate primer）を用いたＤＯＰ－ＰＣＲ（Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR）法に基づき、限られた種類のプライマーを使用してあらゆる種類の鋳型核酸を増幅することができる。さらに、前述のランダムプライマーや縮重プライマーに付加されたタグ配列にあわせて本発明の核酸増幅法に使用されるプライマーを設計すれば、上記の工程で作成されたあらゆる鋳型核酸について１もしくは数種類のプライマーで本発明の核酸増幅反応を実施することができる。このように、適切な鋳型核酸の調製工程と本発明の方法を組み合わせれば、多種類のＤＮＡ断片を従来よりも安価で、大量に供給することができる。

核酸を含有する医薬としては、細胞内において有用なポリペプチドを発現させるための二本鎖ＤＮＡ、目的の遺伝子の発現を抑制するための一本鎖アンチセンスＤＮＡ等があり、これらは適切な手段、例えばリポソーム等の遺伝子導入用担体を使用して生体に投与される。本発明の核酸の製造方法は、上記のような医薬用途等の一本鎖、もしくは二本鎖の核酸を大量に製造するための方法として好適である。さらに、本発明の方法では、例えば生体内での分解を抑制するようなｄＮＴＰのアナログを含有する核酸を製造することも容易である。

本発明において増幅されたＤＮＡ断片は通常のヌクレオチドにより構成されるため、増幅されたＤＮＡはその内部の制限酵素部位を用いて適当なベクターにサブクローニングすることができる。さらにＲＦＬＰのような制限酵素を用いた処理をすることも問題なくでき、遺伝子検査の分野においても広く利用できる。また、本発明において増幅されたＤＮＡ断片は、通常のヌクレオチドにより構成されるため、増幅断片中にＲＮＡポリメラーゼのプロモーター配列を組込んでおけば、増幅断片を鋳型としてＲＮＡを合成し、例えば、合成されたＲＮＡをプローブとして使用可能である。当然ながら、通常のｄＮＴＰの代わりに蛍光標識されたｄＮＴＰを使用して本発明の核酸配列増幅方法を実施することにより、蛍光標識されたＤＮＡプローブを作製することができる。

本発明の方法において、最終的に増幅される断片は、その両端に増幅に使用す

るプライマーに相補的な塩基配列を有さないため、増幅産物の持ち込みによるコンタミネーションを軽減させることができる。従って、ルーチンワークで同じ領域を増幅する遺伝子検査等において有用である。

本発明の核酸配列の増幅方法の特徴を以下に列挙する。

1．少ない鋳型量より、大量の核酸を増幅することができる。２種のプライマーを使用した場合には増幅産物は２次関数的に増加する。

2．等温でも実施でき、その場合サーマルサイクラーのような装置を必要としない。このため、容易に反応容量をスケールアップすることができる。

3．通常、増幅反応は１または２種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーと２種の酵素（ＤＮＡポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼ）で実施される。

4．１分子のプライマーより多数のＤＮＡ鎖が合成されるため、プライマー量が増幅産物量を制限することがない。さらに、プライマー使用効率が約１００％とＰＣＲ法に比べて極めて高い。

5．一本鎖、二本鎖のＤＮＡを目的に応じ選択的に増幅することができる。

6．増幅反応に（α－Ｓ）ｄＮＴＰのようなｄＮＴＰアナログを必要としないため、試薬コストが安価である。また、ｄＮＴＰアナログを含有しない、天然型の核酸を取得することが可能である。

7．他の核酸増幅方法と組み合わせることにより、安価で大量のＤＮＡ増幅断片を供給することができる。

以上のように、本発明の方法は工業的スケールでの核酸製造に適した方法である。

実施例

本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

参考例

本発明の方法に使用されるＲＮａｓｅＨのユニット数は、以下の方法で測定した。

（１）使用する試薬液の調製

力価測定用反応液：最終濃度がそれぞれ４０mMトリス－塩酸（ｐＨ７．７、３７℃）、４mM塩化マグネシウム、１mM ＤＴＴ、０．００３%ＢＳＡ、４%グリセロール、２４μMポリ（ｄＴ）になるように滅菌水で調製した。

ポリ［８－^{3}Ｈ］アデニル酸溶液：３７０ｋＢｑのポリ［８－^{3}Ｈ］アデニル酸溶液を２００μｌの滅菌水に溶解した。

ポリアデニル酸溶液：ポリアデニル酸を３mMになるように滅菌超純水で希釈した。

酵素希釈液：最終濃度がそれぞれ２５mMトリス－塩酸（ｐＨ７．５、３７℃）、５mM ２－メルカプトエタノール、０．５mM ＥＤＴＡ（ｐＨ７．５、３７℃）、３０mM塩化ナトリウム、５０%グリセロールになるように滅菌水で調製した。

熱変性子牛胸腺ＤＮＡの調製：子牛胸腺ＤＮＡ２００ｍｇをＴＥバッファー１００ｍｌに懸濁し、膨潤させた。該溶液のＵＶ２６０ｎｍの吸光度を測定し、１ｍｇ／ｍｌの濃度に滅菌超純水で希釈した。次に、該溶液を１００℃で１０分間加熱後、氷浴中で急冷した。

（２）活性測定方法

上記（１）で調製した力価測定用反応液９８５μｌにポリ［８－^{3}Ｈ］アデニル酸溶液７μｌを加え３７℃で１０分間保持した。次にポリアデニル酸を最終濃度が２４μMになるように８μｌ加え、さらに３７℃で５分間保持した。このようにしてポリ［８－^{3}Ｈ］ｒＡ－ポリｄＴ反応液１０００μｌを調製した。次に、該反応液２００μｌを分取し、３０℃で５分間保持した後、任意の希釈系列で希釈した酵素液１μｌを加え、これらの反応液を経時的に５０μｌずつサンプリングして、後の測定に用いた。酵素添加からサンプリングまでの間の時間をＹ分とした。また、全ＣＰＭ用反応液５０μｌおよびブランク用反応液５０μｌは、酵素液の代わりに酵素希釈液を１μｌ加えて調製した。該サンプリング溶液に１００mMピロリン酸ナトリウム１００μｌ、熱変性子牛胸腺ＤＮＡ溶液５０μｌおよび１０%トリクロロ酢酸３００μｌ（全ＣＰＭ測定の場合は、超純水３００μｌ）を加え、０℃で５分間保持後、１００００ｒｐｍで１０分間遠心した。遠心後、得られた上清２５０μｌをバイアルに入れ、アクアゾルー２（ＮＥＮライフ

サイエンスプロダクツ社製)　１０ｍｌを加え、液体シンチレーションカウンターでＣＰＭを測定した。

（３）ユニット計算

各酵素のユニット（Unit）数は、以下の計算式で算出した。

Unit/ ml ={（測定したＣＰＭ－ブランクＣＰＭ）×１．２*×２０×１０００×希釈率}×２００（μｌ）／（全ＣＰＭ×Ｙ分×５０（μｌ）×９**）

１．２*：全ＣＰＭ中に含まれるポリ［８－^{3}Ｈ］ｒＡ－ポリｄＴの５０μｌ当たりのｎｍｏｌ数

９**：補正係数

実施例１

（１）鋳型ＤＮＡとプライマーの合成

本実施例に鋳型として使用した９９塩基の一本鎖ＤＮＡおよびプライマーは、ＤＮＡ合成機（アプライド・バイオシステム社製）を用いて合成した。配列表の配列番号１に上記の９９塩基の一本鎖ＤＮＡの塩基配列を示す。また、配列表の配列番号２および３に、それぞれ上流プライマーおよび下流プライマーの基本的な塩基配列を示す。本実施例に使用されたプライマーの詳細な構造を以下に示す：

プライマー対１：配列表の配列番号２および３に示される塩基配列を有し、その全体がすべてデオキシリボヌクレオチドで構築されたプライマーの組み合わせ；

プライマー対２：プライマー対１のプライマーの、それぞれの３’末端から２個のデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換され、かつ３’末端から２個めのリボヌクレオチドの５’側リン酸結合がホスホロチオエート結合に置換されたプライマーの組み合わせ；

プライマー対３：プライマー対１のプライマーの、それぞれの３’末端のデオキシリボヌクレオチドのみがリボヌクレオチドに置換され、かつ当該リボヌクレオチドの５’側リン酸結合がホスホロチオエート結合に置換されたプライマーの組み合わせ；

プライマー対４：プライマー対１のプライマーの、それぞれの３’末端から２個のデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換されたプライマーの組み合わせ；

プライマー対５：プライマー対１のプライマーのそれぞれの３’末端から３、４個めのデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換され、かつ３’末端から４個めのリボヌクレオチドの５’側リン酸結合がホスホロチオエート結合に置換されたプライマーの組み合わせ。

（２）増幅反応

５’→３’エキソヌクレアーゼ活性を欠損させたバチルス・カルドテナックス由来のＤＮＡポリメラーゼであるＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ（宝酒造社製）と、大腸菌由来のＲＮａｓｅＨであるｃｌｏｎｅｄリボヌクレアーゼＨ（宝酒造社製）を用いて、以下のモデル１～７の反応系について検討した。

反応液は、下記のように調製した。

３５mMトリス塩酸バッファー（ｐＨ７．５）、０．１ｍｇ／ｍｌ ＢＳＡ（牛血清アルブミン）、２．７％グリセロール、５％ジメチルスルオキシド、各１．４mM ｄＮＴＰ混合物、１０mM塩化マグネシウム、それぞれ２０ｐｍｏｌの（１）のプライマー対もしくはその一方のプライマー、ならびに０．６ｎｇの合成一本鎖鋳型ＤＮＡ、５ＵのＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ、６０ＵのｃｌｏｎｅｄリボヌクレアーゼＨ、反応液の最終容量５０μｌ。上記反応液を均一に混合し、５５℃、６０分間保温した後、９０℃、２分間加熱して酵素を失活させた。その後、各反応液の８μｌを３％ヌシーブ３：１アガロース（宝酒造社製）ゲルにて電気泳動を行なった。以下に各モデルに使用されたプライマーを示す：

モデル１～５：それぞれプライマー対１～プライマー対５を使用；

モデル６：プライマー対２のうちの下流プライマーのみを使用；

モデル７：プライマー対４を使用し、ＲＮａｓｅＨを添加しない。

その結果、モデル２～５の反応液を使用した場合、約４０ｂｐ(base pair)～約９０ｂｐの範囲で目的のサイズの増幅断片が確認された。これらの反応系でＤＮＡが増幅されることが明らかとなった。また、一方のプライマーのみを使用し

たモデル６においても、予想される約７０ｂ(base)の増幅断片（一本鎖ＤＮＡ断片）が確認できた。なお、モデル１および７の反応ではＤＮＡの増幅はまったく認められなかった。

（３）増幅産物の確認

上記（２）の、モデル４の反応によって得られた反応液をマイクロコン－１００（宝酒造社製）を用いてろ過した後、フィルターにトラップされた増幅ＤＮＡ断片を回収した。該ＤＮＡ断片の塩基配列をジデオキシ法により解析した。その結果、上記の反応によって増幅された断片が鋳型ＤＮＡと同じ塩基配列を持つＤＮＡである事が確認された。

（４）反応時間の検討

上記（２）のモデル２の反応液を調製し、これを種々の時間反応させた場合の増幅産物量の変化を調べた。当該反応液を、０、１５、３０、６０、９０、１２０分間、それぞれ５５℃で保温した後、９０℃、２分間の処理により酵素を失活させた。各反応液８μｌを３％ ヌシーブ３：１アガロースゲルを使用した電気泳動にて解析した。電気泳動の結果を図２に示す。図中１～６はそれぞれ０、１５、３０、６０、９０、１２０分間反応した反応液の泳動されたレーンを、また、Ｍは分子量マーカーとして、１００ｂｐ ＤＮＡ ｌａｄｄｅｒ ｍａｒｋｅｒ（宝酒造社製）が泳動されたレーンを示す。

図２に示されるように、反応時間が０分では増幅産物は確認できなかったが、反応時間が１５分、３０分、６０分と長くなるに従い、増幅産物量が増大していることが確認できた。しかし、６０分以上の反応では、電気泳動によって確認される増幅産物量はほぼ横ばいであり、使用された反応系での増幅は６０分程度でプラトーに達することが示された。

実施例２

（１）ＲＮＡの調製

本実施例に鋳型として使用するＲＮＡは、ヒト培養細胞ＨＴ２９（ＡＴＣＣ ＨＴＢ－３８）（大日本製薬社製）からトライゾール試薬（ライフテック社製）を用いて調製した。得られたトータルＲＮＡは、その濃度を１μｇ／μｌに調製

した。またＲＮＡの純度を分光学的に調べたところ、ＯＤ２６０／ＯＤ２８０＝１．８であった。

（２）増幅反応

逆転写活性およびＤＮＡポリメラーゼ活性を有するＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼとＲＮａｓｅＨエンドヌクレアーゼを用いて、ＲＮＡからのｃＤＮＡが増幅されるかを検討した。

反応液には１μｇ相当の上記トータルＲＮＡを加え、実施例２と同様の組成に調製した。ジーンバンク(GenBank)登録番号、Ｘ０１０６０のヒトトランスフェリンレセプターをコードする領域を増幅のターゲットとし、プライマーとして実施例１に記載のプライマー対２を用いた。

上記の反応液を５５℃、６０分間保温した後、９０℃、２分間加熱して酵素を失活させた。この反応液のうちの８μｌを３％ ヌシーブ３：１アガロースゲルにて電気泳動したところ、予想される５６ｂｐの増幅断片が確認できた。さらに、ターゲットとした塩基配列を有するプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションを行なった。その５’末端にビオチン標識を付した、配列表の配列番号４に示される塩基配列のＤＮＡプローブを使用してサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、このプローブは上記の増幅断片にハイブリダイズした。即ち、本発明の方法によりターゲットとした領域が正しく増幅されていることが確認された。

実施例３

（１）プライマーの合成

二本鎖ＤＮＡを鋳型とした場合の本発明の増幅方法について検討した。使用するプライマーは、ＤＮＡ合成機（アプライド・バイオシステム社製）を用いて合成した。配列表の配列番号５～１３にプライマーの基本的な塩基配列を示す。さらに、本実施例に使用されたプライマーの詳細な構造を以下に示す。プライマー対Ａ～Ｆまでは、ｐＵＣ１９ＤＮＡ（宝酒造社製）を鋳型とした。ｐＵＣ１９のヌクレオチド配列はデータベース、ジーンバンク(GenBank)登録番号、Ｌ０９１３７から入手可能である。プライマー対Ｇの場合は、実施例２で得られたヒト全

ＲＮＡより配列表の配列番号１４および１５記載のプライマーおよびＴａＫａＲａ ＲＮＡ ＰＣＲ Ｋｉｔ（ＡＭＶ）Ｖｅｒ．２．１（宝酒造社製）用いて、添付の標準プロトコールに従って調製した２本鎖ＤＮＡ増幅断片を鋳型とした。

プライマー対Ａ（増幅断片長約４５０ｂｐ）：配列表の配列番号５および６に示される塩基配列を有し、その３’末端２塩基がリボヌクレオチドに置き換わったプライマーの組み合わせ；

プライマー対Ｂ（増幅断片長約２５０ｂｐ）：配列表の配列番号５および７に示される塩基配列を有し、その３’末端２塩基がリボヌクレオチドに置き換わったプライマーの組み合わせ；

プライマー対Ｃ（増幅断片長約５２０ｂｐ）：配列表の配列番号５および８に示される塩基配列を有し、その３’末端２塩基がリボヌクレオチドに置き換わったプライマーの組み合わせ；

プライマー対Ｄ（増幅断片長約８９０ｂｐ）：配列表の配列番号５および９に示される塩基配列を有し、その３’末端２塩基がリボヌクレオチドに置き換わったプライマーの組み合わせ；

プライマー対Ｅ（増幅断片長約１３０ｂｐ）：配列表の配列番号１０および６に示される塩基配列を有し、その３’末端３塩基がリボヌクレオチドに置き換わったプライマーの組み合わせ；

プライマー対Ｆ（増幅断片長約２２０ｂｐ）：配列表の配列番号１１および６に示される塩基配列を有し、その３’末端３塩基がリボヌクレオチドに置き換わったプライマーの組み合わせ；

プライマー対Ｇ（増幅断片長約３２０ｂｐ）：配列表の配列番号１２および１３に示される塩基配列を有し、その３’末端３塩基がリボヌクレオチドに置き換わったプライマーの組み合わせ。

（２）増幅反応

反応液は、下記のように調製した。

３５ｍＭリン酸カリウムバッファー（ｐＨ７．５）、０．１ｍｇ／ｍｌ ＢＳＡ（牛血清アルブミン）、５％ジメチルスルオキシド、各１．４ｍＭ ｄＮＴＰ混合物、１０ｍＭ塩化マグネシウム、それぞれ６０ｐｍｏｌの（１）のプライマ

一対、ならびに１００ｎｇのｐＵＣ１９鋳型ＤＮＡ、５．５ＵのＢｃａＢＥＳＴＤＮＡポリメラーゼ、６０ＵのＲＮａｓｅＨ、反応液の最終容量５０μｌ。

反応条件は以下のとおりである。ＤＮＡポリメラーゼおよびＲＮａｓｅＨ無添加の反応液を９８℃、１分間熱変性処理後、５５℃に冷却し、ＤＮＡポリメラーゼおよびＲＮａｓｅＨを混合し、５５℃、６０分間保温した。反応終了後、９０℃、２分間加熱して酵素を失活させた。その後、各反応液の８μｌを３％ ヌシーブ３：１アガロースゲルにて電気泳動を行なった。

その結果、いずれのプライマー対においても目的の増幅断片が得られることが確認できた。即ち、本発明の増幅方法において、２本鎖ＤＮＡを鋳型として増幅反応を行うことができることを確認した。

（３）増幅産物の制限酵素消化

本発明の増幅方法を用いて得られた増幅断片の制限酵素消化について検討した。鋳型ＤＮＡとして、ｐＵＣ１９プラスミドＤＮＡを用いた。配列表の配列番号５～６に記載のｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ （２）ＮＮプライマーおよびｐＵＣ１９ ｌｏｗｅｒ ＮＮプライマーを使用した。なお、該プライマーは、いずれも３’末端の２塩基がリボヌクレオチドに置き換わったものを用いた。下記に反応液組成を示す。

反応液Ａ：３５ｍＭ リン酸カリウムバッファー（ｐＨ７．５）、１０ｍＭ塩化マグネシウム、１．４ｍＭ ｄＮＴＰ混合物、０．０１％ＢＳＡ、５％ＤＭＳＯ、２．７％グリセロール 、各１００ｐｍｏｌずつのｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ （２）ＮＮプライマーおよびｐＵＣ１９ ｌｏｗｅｒ ＮＮプライマー、５００ｎｇのｐＵＣ１９ ＤＮＡ、および滅菌蒸留水で反応液容量を４８μｌに調製した。

上記反応液を９８℃、１分間熱変性処理した後、５５℃に冷却した。次に、６０ＵのＥ．ｃｏｌｉ ＲＮａｓｅＨおよび５．５ＵのＢｃａＢＥＳＴを添加し、反応液量を５０μｌにした。該反応液を５５℃で１時間インキュベーションした。反応終了後、９０℃、２分間加熱処理して酵素を失活させた。その反応液を３％アガロースゲル電気泳動して、得られた増幅産物を精製した。回収された増幅産物は、１００μｌの滅菌蒸留水に再懸濁した。

上記ＤＮＡ溶液を使用して制限酵素消化を行った。制限酵素は、ＡｃｃＩＩ

（宝酒造社製）およびＢｃｎＩ（宝酒造社製）を使用した。以下に反応液組成を示す。

ＤＮＡ溶液３μｌ、１０×ＡｃｃＩＩ添付バッファーあるいは１０×Ｂｃｎ Ｉ添付バッファーを１μｌ、制限酵素ＡｃｃＩＩあるいはＢｃｎＩを１μｌ、さらに滅菌蒸留水で反応液容量を１０μｌに調製した。該反応液を３７℃、３０分間反応後、１０×ローディングバッファー（loading buffer）を１．５μｌ加え、そのうちの６μｌを３％ヌシーブアガロースゲルで電気泳動した。

その結果、ＡｃｃＩＩおよびＢｃｎＩのいずれの制限酵素においても目的とする制限酵素消化ＤＮＡ断片が得られた。

（４）突然変異検出

本発明の増幅方法を用いた突然変異検出について検討した。鋳型としてｐＵＣ１９を用いた。配列表の配列番号５～６にｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ（２） ＮＮプライマーおよびｐＵＣ１９ ｌｏｗｅｒ ＮＮプライマーの基本的な塩基配列を示した。上記プライマーは、いずれもその３’末端の２塩基がリボ核酸であるキメラオリゴヌクレオチドプライマーである。さらに、ｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ（２） ＮＮプライマーは、３’末端を鋳型と相補的なUおよびミスマッチのＡ、Ｃ、Ｇに置換した４種類（それぞれ、ｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ（２） ＮＮ－Ｕ、ｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ（２） ＮＮ－Ａ、ｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ（２） ＮＮ－ＣおよびｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ（２） ＮＮ－Ｇと称する）を作製した。これらのプライマーの組み合わせについて以下に示す。

プライマー対１： pUC19 upper(2) NN-UおよびpUC19 lower NN

プライマー対２： pUC19 upper(2) NN-AおよびpUC19 lower NN

プライマー対３： pUC19 upper(2) NN-CおよびpUC19 lower NN

プライマー対４： pUC19 upper(2) NN-GおよびpUC19 lower NN

反応液は、下記のように調製した。

３０mMリン酸カリウムバッファー（ｐＨ７．３）、０．０１％ＢＳＡ（牛血清アルブミン）、５％ＤＭＳＯ、各１mM ｄＮＴＰ混合物、８mM酢酸マグネシウム、それぞれ６０ｐｍｏｌの上記のプライマー対および５０ｎｇの鋳型ＤＮＡ、および滅菌蒸留水で反応液容量を４８μｌにした。

上記反応液を９８℃、１分間熱変性処理後、５５℃に冷却した。次に、５．５UのＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ、６０UのＥ．ｃｏｌｉ ＲＮａｓｅＨを添加し、５５℃、６０分間保持した。その後、９０℃、２分間加熱して酵素を失活させた。各反応液８μｌを使用し、４％ ヌシーブ３：１アガロース（宝酒造社製）ゲルにて電気泳動を行なった。その結果、ｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ（２） ＮＮの３’末端が相補的なプライマーの組み合わせのみ目的とする約４５０ｂｐの増幅断片が検出された。一方、 ｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ（２） ＮＮの３’末端がミスマッチのプライマーの組み合わせについてはいずれも増幅断片は、確認できなかった。

実施例４

（１）マイクロチューブでの反応

本発明の増幅方法について反応容量の検討を行った。増幅領域としては、ヒトトランスフェリンレセプターをコードする領域を選択した。配列表の配列番号１２および１３記載の配列を有するプライマーを使用した。なお、該プライマーは、３’末端の２塩基がリボ核酸に置き換わったものを使用した。鋳型となるＤＮＡは、あらかじめＲＴ－ＰＣＲ法により得た増幅断片約７５０ｂｐを使用した。反応容量は、５０μｌ、１００μｌ、３００μｌ、および５００μｌになるように調製した。下記に反応液組成を示す。

反応液Ａ：５×専用バッファー（１３５mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．５）、０．５ｍｇ／ｍｌ ＢＳＡ、２．５%DMSO）１０μｌ、１００mM酢酸マグネシウム ４μｌ、１０mM ｄＮＴＰ混合物 ５μｌ、１０μＭ ＡＴＰ １０μｌ、ＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ（２２Ｕ／μｌ）１μｌ、ＲＮａｓｅＨ（６０Ｕ／μｌ）１μｌ、および滅菌蒸留水で３９μｌに調製した。

反応液Ｂ：２０μＭヒトトランスフェリンレセプターＳプライマー（配列番号１２）および２０μＭヒトトランスフェリンレセプタープライマー（配列番号１３）をそれぞれ３μｌ、鋳型ＤＮＡ約１００ｎｇおよび滅菌蒸留水で１１μｌにした。容量が５０μｌ以上の場合は、上記組成に基づきスケールアップした。

増幅反応は、上記Ｂ液を９８℃、２分間処理した後、５５℃、３分間保持した。

次に、１５００μｌ容マイクロチューブ中で５５℃でプレインキュベーションしたＡ液に前述のＢ液を添加し、混和後、５５℃で１時間インキュベーションした。反応終了後、氷浴上に移し、反応液８μｌを３％アガロースゲル電気泳動した。

その結果、いずれの反応容量においても効率よく目的とする約３００ｂｐの増幅断片が検出できた。また、鋳型ＤＮＡがＰＣＲ増幅断片であっても問題なく目的とする増幅断片を得られることを確認した。

（２）シャーレでの反応

反応容量の増大に伴う反応液の温度不均一を防ぐために、シャーレを使用して検討を行った。増幅領域としては、ヒトトランスフェリンレセプターをコードする領域を選択した。配列表の配列番号１２および１３記載の配列を有するプライマーを使用した。なお、該プライマーは、3’末端の２塩基がリボ核酸に置き換わったものを使用した。鋳型となるＤＮＡは、あらかじめＲＴ－ＰＣＲ法により得た増幅断片約７５０ｂｐを使用した。反応容量は、１０ｍｌになるように調製した。下記に反応液組成を示す。

反応液Ａ：５×専用バッファー（１３５mMリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．５）、０．５ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ、２．５％　ＤＭＳＯ）２０００μｌ、１００mM 酢酸マグネシウム　８００μｌ、１０mM ｄＮＴＰ混合物　１０００μｌおよび滅菌蒸留水で９．１ｍｌに調製した。

反応液Ｂ：６０μM ヒトトランスフェリンレセプターＳプライマー（配列番号１２）および６０μM ヒトトランスフェリンレセプタープライマー（配列番号１３）をそれぞれ２００μｌ、鋳型ＤＮＡ　約１０μｇおよび滅菌蒸留水で５００μｌにした。

反応液Ｃ：ＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ（２２Ｕ／μｌ）　２００μｌ、ＲＮａｓｅＨ（６０Ｕ／μｌ）　２００μｌ。

増幅反応は、上記Ｂ液を９８℃、１分間処理した後、５５℃、３分間保持した。次に、直径６０ｍｍのプラスティックシャーレ中で５５℃でプレインキュベーションしたＡ液に前述のＢ液を添加し、さらにＣ液を添加し混和後、５５℃で１時間インキュベーションした。反応終了後、氷浴上に移し、反応液８μｌを３％アガロースゲル電気泳動した。

その結果、１０ｍｌの反応容量であっても目的とする約３００ｂｐの増幅断片が効率よく検出できた。また、鋳型ＤＮＡがＰＣＲ増幅断片であっても問題なく目的とする増幅断片を得られることを確認した。即ち、多量のＤＮＡ断片を必要とするＤＮＡチップ作製において、本発明の方法が従来のＰＣＲ法と比較しても好適に使用できることを確認した。

実施例５

（１）バッファーの種類とＲＮａｓｅＨ使用量の関係

バッファーの種類とＲＮａｓｅＨの使用量の関係について検討した。鋳型としてｐＵＣ１９ベクターに２４９ｂｐおよび９１１ｂｐのフラグメントをクローニングして得られたプラスミドＤＮＡ（ｐＵＣ１９－２４９およびｐＵＣ１９－９１１と称す）を、プライマーとして配列表の配列番号１６～１７記載の配列を有するＭＦ２Ｎ３（２４）プライマーおよびＭＲ１Ｎ３（２４）プライマーの３’末端３塩基をリボヌクレオチドにしたキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用した。該プライマーの組み合わせによりｐＵＣ１９－２４９では約４５０ｂｐの、ｐＵＣ１９－９１１では約１１００ｂｐの増幅断片が得られる。

検討するバッファーは、トリス塩酸バッファー、リン酸カリウムバッファー、トリシンバッファー系を選択した。また、ＲＮａｓｅＨは、無添加および最終濃度０．３Ｕ～１．２Ｕ／μｌで検討した。トリス塩酸バッファー系は、１０ｎｇのｐＵＣ１９－２４９あるいは２００ｎｇのｐＵＣ１９－９１１、各６０ｐｍｏｌのプライマーおよび１１Ｕ／５０μｌ　反応容量のＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ以外は、実施例１（２）と同様に調製した。リン酸カリウムバッファー系についても同様の組成とした。トリシンバッファー系については、最終濃度が３４ｍＭ　トリシンバッファー（ｐＨ８．７）、１０ｍＭ　塩化カリウム、１０ｍＭ　硫酸アンモニウム、０．０１％　ＢＳＡ、１％　ＤＭＳＯ、４ｍＭ　酢酸マグネシウム、０．５ｍＭ　ｄＮＴＰ混合物となるように調製した。上記バッファー系についてｐＵＣ１９－２４９プラスミド１０ｎｇ／５０μｌ　反応容量、ならびにｐＵＣ１９－９１１プラスミド２００ｎｇ／５０μｌ　反応容量、各６０ｐｍｏｌ／５０μｌ　反応容量のプライマー、各濃度となるＲＮａｓｅＨ、１

１U／５０μｌ　反応容量のＢｃａＢＥＳＴ　ＤＮＡポリメラーゼになるように調製した。

増幅反応は鋳型となるｐＵＣ１９－２４９あるいはｐＵＣ１９－９１１と各プライマーの混液を９８℃で１分間熱変性処理後、５５℃まで冷却した後に残りの反応組成混液を添加し、５５℃で６０分間反応させた。反応終了後、４℃に冷却し、１／１０量の０．５Ｍ　ＥＤＴＡを添加して反応を停止させた。その後、各反応液の３μｌを３％ヌシーブ３：１アガロース（宝酒造社製）ゲルにて電気泳動を行った。

その結果、ｐＵＣ１９－２４９を鋳型とした場合はトリス塩酸バッファー系、リン酸カリウムバッファー系、トリシンバッファー系の順に、ｐＵＣ１９－９１１を鋳型とした場合はトリス塩酸バッファー系、トリシンバッファー系、リン酸カリウムバッファー系の順に増幅効率の向上が認められた。さらに、ＲＮａｓｅＨについては、無添加では目的の増幅断片は得られなかったが、最終濃度０．３Ｕ～１．２Ｕ／μｌで用いた場合はいずれも目的の増幅断片が得られた。

（２）プライマー量の検討

使用するプライマー量が本発明の増幅方法に与える影響を検討した。反応液は、上記（１）記載の組成のうち、鋳型としてｐＵＣ１９－２４９を用いた系を使い、リン酸カリウムバッファー系は６０Ｕ／５０μｌ反応のＲＮａｓｅＨを、トリス塩酸バッファー系、トリシンバッファー系は３０Ｕ／５０μｌ反応のＲＮａｓｅＨを用いて行った。プライマーの濃度は１０ｐｍｏｌ～１００ｐｍｏｌ／５０μｌの範囲で検討した。反応条件および増幅確認は、上記（１）記載と同様にした。

その結果、どの反応バッファー系を用いた場合も、１０ｐｍｏｌ～１００ｐｍｏｌ／５０μｌの範囲で目的とする増幅断片が確認できた。

（３）反応バッファーのｐＨの影響

反応液のｐＨが本発明の増幅方法に与える影響について検討した。反応液は、上記（２）記載の組成と同様にした。ｐＨは、リン酸カリウムバッファー系は、ｐＨ７．０～８．０の範囲で、トリシンバッファー系は、ｐＨ７．５～９．２の範囲で、トリス塩酸バッファー系は、ｐＨ７．５～９．０の範囲で検討した。反応条件および増幅確認は、上記（１）記載と同様にした。

その結果、各々のバッファー系で用いたｐＨの範囲において、目的とする増幅断片が確認できた。

（４）添加剤の効果

上記（３）記載のリン酸バッファー系（ｐＨ７．５）の反応液組成で、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）の添加効果を検討した。また、ポリアミンの添加効果についても検討した。ＤＭＳＯの添加量は、無添加～１０％の範囲で検討した。一方、ポリアミンとしては、スペルミン４塩酸塩（シグマ社製）、スペルミジン３塩酸塩（シグマ社製）、アセチルプトレスシン（ナカライ社製）、プトレスシン２塩酸塩（ナカライ社製）、トリメチレンジアミン（ナカライ社製）、プロピレンジアミン（ナカライ社製）、ジアミノメタン２塩酸塩（ナカライ社製）を使用した。添加量は、プロピレンジアミンおよびトリメチレンジアミンは、無添加～２％の範囲で、それ以外のポリアミンは、無添加～５ｍＭの範囲で行った。反応条件および増幅確認は、上記（１）記載の方法と同様にした。

その結果、ＤＭＳＯは、無添加～５％、スペルミン４塩酸塩とスペルミジンは、無添加～２００μＭ、アセチルプトレスシンとプトレスシン２塩酸塩は、４０μＭ～４０ｍＭ、トリメチレンジアミンは、０．００２％～０．０２％、プロピレンジアミンは、０．０００１％～０．０１％、そしてジアミノメタン２塩酸塩は、０．１μＭ～１０μＭの範囲で、目的のＤＮＡ断片が効率よく増幅されることが確認できた。

（５）マグネシウム塩の種類の検討

本発明の増幅方法に対するマグネシウム塩の種類について検討した。鋳型としてｐＵＣ１９ＤＮＡを、プライマーとして配列表の配列番号１１および６記載の配列を有するｐＵＣ１９　ｕｐｐｅｒ　ＮＮ２４９プライマーおよびｐＵＣ１９　ｌｏｗｅｒ　ＮＮプライマーを使用した。該プライマー対で、約２２５ｂｐの増幅断片が得られる。マグネシウム塩は、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウムおよび硫酸マグネシウムを使用した。以下に反応液組成を示す。

３５ｍＭリン酸カリウムバッファー（ｐＨ７．３）、最終濃度８ｍＭの塩化マグネシウム、酢酸マグネシウムまたは硫酸マグネシウム、最終濃度１．０ｍＭｄＮＴＰ混合物、５０ｎｇ　ｐＵＣ１９ＤＮＡ、各６０ｐｍｏｌの上記プライマ

一対、６０Ｕ ＲＮａｓｅＨ、５．５Ｕ ＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ、および滅菌蒸留水で反応容量５０μｌ。反応条件および増幅確認は、上記（３）と同様にして行った。

その結果、いずれのマグネシウム塩においても目的の増幅断片が確認できた。

（６）マグネシウム濃度、およびｄＮＴＰ濃度の検討

本発明の増幅方法に対するマグネシウム濃度、およびｄＮＴＰ濃度について検討した。反応液組成は、２５ｎｇのｐＵＣ１９ ＤＮＡ、種々の濃度のマグネシウム、ｄＮＴＰ以外は上記（５）記載のものと同様にした。反応条件および増幅確認は上記（１）と同様にして行った。

最終濃度１ｍＭのｄＮＴＰで固定した反応系では、マグネシウム濃度が最終濃度６ｍＭ～１０ｍＭの範囲で目的の増幅断片が得られ、また、最終濃度８ｍＭのマグネシウムで固定した反応系ではｄＮＴＰ濃度が最終濃度０．６～１．２ｍＭの範囲で目的の増幅断片が得られた。さらに、最終濃度０．５ｍＭのｄＮＴＰで固定した反応系では、マグネシウム濃度が最終濃度２ｍＭ～６ｍＭの範囲で目的の増幅断片が得られ、最終濃度４ｍＭのマグネシウムで固定した反応系ではｄＮＴＰ濃度が最終濃度０．２～０．８ｍＭの範囲で目的の増幅断片が得られた。

（７）リン酸カリウムバッファー濃度、およびトリシンバッファー濃度変化と反応性の検討

本発明の増幅方法に対するリン酸カリウムバッファー濃度、およびトリシンバッファー濃度について検討した。反応液組成は、最終濃度２０～５０ｍＭリン酸カリウムバッファー、最終濃度２２～４６ｍＭトリシンバッファーとする以外は上記（１）記載のｐＵＣ１９－２４９を鋳型とした反応と同様にした。反応条件および増幅確認も上記（１）と同様にして行った。

その結果、リン酸カリウムバッファー、トリシンバッファーの濃度が、それぞれ最終濃度２０～５０ｍＭ、最終濃度２２～４６ｍＭの範囲で目的の増幅断片が得られた。

（８）ＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ濃度の検討

本発明の増幅方法に対するＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ濃度について検討した。反応液組成はリン酸カリウムバッファー、トリシンバッファー系を用

い、ＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼを１～２２Ｕ／５０μｌ反応容量の範囲で使用する以外は上記（１）記載のｐＵＣ１９－２４９を鋳型とした反応と同様にした。反応条件および増幅確認も上記（１）と同様にして行った。

その結果、ＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ量が１～２２Ｕ／５０μｌの範囲において目的の増幅断片が得られた。

実施例６

ＰＣＲ法との比較

本発明の増幅方法についてＰＣＲ法との比較を行った。鋳型は、ｐＵＣ１９プラスミドＤＮＡのマルチクローニングサイトに約１５０ｂｐおよび約２５０ｂｐのＤＮＡ断片を挿入したものを用いた。該鋳型は、以下のようにして調製した。

配列表の配列番号１０、１１および６記載の配列を有するｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ １５０プライマー、 ｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ ２４９プライマー、ｐＵＣ１９ ｌｏｗｅｒ ＮＮプライマー、を使用し、ｐＵＣ１９プラスミドＤＮＡ１００ｐｇを鋳型としてＰＣＲ反応を行った。 ｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ １５０プライマーおよびｐＵＣ１９ ｌｏｗｅｒ ＮＮプライマーの組み合わせでは約１５０ｂｐの増幅断片、 ｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ ２４９プライマーおよびｐＵＣ１９ ｌｏｗｅｒ ＮＮプライマーの組み合わせでは、約２５０ｂｐの増幅断片が得られた。該増幅断片は、マイクロコン－１００で精製後、ＤＮＡ ｂｌｕｎｔｉｎｇ ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いて平滑末端化し、ｐＵＣ１９プラスミドのＨｉｎｃＩＩサイトにサブクローニングした。上記増幅断片の挿入されたプラスミドを用いて、大腸菌ＪＭ１０９を形質転換した。該形質転換体を培養し、その菌体よりＱＩＡＧＥＮ ｐｌａｓｍｉｄ ｍｉｎｉ ｋｉｔ（キアゲン社製）を用いてＤＮＡ挿入プラスミドを精製した。このＤＮＡ挿入プラスミドを鋳型として使用した。

本実施例において使用するプライマーを配列表の配列番号１８～１９に示した。なお、本発明の増幅方法に用いるプライマーは、３’末端３塩基がリボヌクレオチドに置換したものを使用した。以下に反応液組成を示す。

２７ｍＭリン酸バッファー（ｐＨ７．３）、０．０１％ＢＳＡ（牛血清アルブミン）、５％ＤＭＳＯ 、各１ｍＭ ｄＮＴＰ混合物、８ｍＭ酢酸マグネシウム、そ

れぞれ６０ｐｍｏｌの上記のプライマー対および１ｎｇの鋳型ＤＮＡ、および滅菌蒸留水で反応液容量を４８μｌにした。

上記反応液を９８℃、１分間熱変性処理後、５５℃に冷却した。次に、５．５UのＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ、６０UのＥ．ｃｏｌｉ ＲＮａｓｅＨを添加し、５５℃、６０分間保持した。その後、９０℃、２分間加熱して酵素を失活させた。各反応液３μｌを４％ ヌシーブ３：１アガロース（宝酒造社製）ゲルにて電気泳動を行なった。

一方、対照としてＰＣＲ法での増幅を行った。反応は、ＰＣＲ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｋｉｔ（宝酒造社製）を使用し、配列表の配列番号１８～１９に示したリボヌクレオチドを含まないプライマーを各１０ｐｍｏｌずつ、１ｎｇの鋳型ＤＮＡ、および滅菌蒸留水で反応液容量を５０μｌにした。反応条件は、９４℃ ３０秒、５５℃ ３０秒、７２℃ ４０秒を１サイクルとして２５サイクル行った。反応終了後、各反応液３μｌを４％ ヌシーブ３：１アガロース（宝酒造社製）ゲルにて電気泳動を行なった。

その結果、挿入断片が、１５０ｂｐおよび２４９ｂｐのいずれのプラスミドを鋳型とした場合においてもＰＣＲ法より本発明の増幅方法の方が目的の増幅断片が多く確認できた。さらに増幅産物量を数値化するために、上記各反応液２０μｌをマイクロコン－１００にて精製し、その量をベックマンＤＵ－６４０分光光度計（ベックマン社製）にて定量した。すると本発明の増幅方法の方が挿入断片が１５０ｂｐのプラスミドを鋳型とした場合は約６０倍、挿入断片が２５０ｂｐの場合は約４０倍多く得られることが確認できた。このことから、多量のＤＮＡ断片を必要とするＤＮＡチップにおいて、本発明の方法が従来のＰＣＲ法と比較しても好適に使用できることを確認した。

実施例７

（１）ＲＮＡプローブの調製

本発明の増幅方法により得られた増幅断片の検出法について検討した。検出用プローブとして、リボヌクレオチドで構成され、該プローブの両端のリボヌクレオチドに異なる２つの蛍光物質の結合したものを調製した。検出用ＲＮＡプロー

ブは、ＤＮＡ合成機（アプライド・バイオシステム社製）を用いて合成した。その塩基配列を配列表の配列番号２０に示す。また、蛍光標識は、５’末端が、６－ＦＡＭ（グレーンリサーチ社製）、３’末端が、ＴＡＭＲＡ（グレーンリサーチ社製）を使用した。

（２）増幅反応および検出

鋳型として、０．１および１ｎｇのｐＵＣ１９ＤＮＡを使用した。プライマーは、配列表の配列番号１０および８に記載の配列を有するｐＵＣ１９ ｕｐｐｅｒ １５０プライマーおよびｐＵＣ１９ ｌｏｗｅｒ ５４２プライマーで、該プライマーの３’末端２塩基が、リボヌクレオチドに置き換わったものを使用した。

反応液組成を以下に示す。

２７ｍＭリン酸バッファー（ｐＨ７．３）、０．０１％ ＢＳＡ、５％ ＤＭＳＯ、各１ｍＭ ｄＮＴＰ混合物、８ｍＭ 酢酸マグネシウム、それぞれ６０ｐｍｏｌの上記のプライマー対および０．１または１ｎｇの鋳型ＤＮＡ、上記ＲＮＡプローブ０．１μｇおよび滅菌蒸留水で反応液容量を４８μｌにした。また対照として、鋳型ＤＮＡなしのものも調製した。

上記反応液を９８℃、１分間熱変性処理後、５５℃に冷却した。次に、２２ＵのＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼまたは滅菌水、および６０ＵのＥ．ｃｏｌｉ ＲＮａｓｅＨを添加し、５５℃、６０分間保持した。その後、１０％ ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム、ナカライ社製）を５μｌ添加し、酵素を失活させた。各反応液５０μｌを滅菌水で等量希釈し、マイクロプレートに移した。検出は、イメージアナライザーＦＭ ＢＩＯ ＩＩ Ｍｕｌｔｉ－Ｖｉｅｗ（宝酒造社製）を用いて励起波長５０５ｎｍで行った。

その結果、ＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ無添加では、どの鋳型量でも蛍光シグナルは検出されなかった。また、ＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ添加時においても鋳型ＤＮＡ量がなしの場合も蛍光シグナルは検出されなかった。一方、鋳型ＤＮＡが０．１ｎｇあるいは１ｎｇの場合、いずれも蛍光シグナルを検出することができた。また、同時に０．０００３％のエチジウムブロマイドを含む３％アガロース電気泳動においてもＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ存在下、鋳型ＤＮＡ量が０．１ｎｇおよび１ｎｇの場合のみ目的とする約１９０

ｂｐの増幅断片が確認できた。即ち、ＲＮＡプローブによる検出法と従来の電気泳動による検出法において同じ結果が得られた。このように、本発明の増幅方法で得られた増幅断片をＲＮＡプローブを用いて検出する方法を確立した。

実施例８

本発明の方法で一方のプライマーをデオキシヌクレオチドにした場合について検討した。プライマーは、配列表の配列番号１９記載の配列を有するＭＲ１Ｎ３（３０）と配列表の配列番号５８記載の配列を有するＭ４プライマー（宝酒造社製）を使用した。なお、ＭＲ１Ｎ３プライマーは、３’末端３塩基がリボヌクレオチドに置換したものを使用した。以下に反応液組成を示す。

２７ｍＭ リン酸バッファー（ｐＨ７．３）、０．０１％ ＢＳＡ（牛血清アルブミン）、５％ ＤＭＳＯ、各１ｍＭ ｄＮＴＰ混合物、８ｍＭ 酢酸マグネシウム、それぞれ３０ｐｍｏｌの上記のプライマー対および１ｎｇの鋳型ＤＮＡ、および滅菌蒸留水で反応液容量を２４μｌにした。

上記反応液を９８℃、２分間熱変性処理後、５５℃に冷却した。次に、１１ＵのＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ、３０ＵのＥ．ｃｏｌｉ ＲＮａｓｅＨを添加し、反応容量を２５μｌにした。該反応液を５５℃、６０分間保持した。その後、９０℃、２分間加熱して酵素を失活させた。各反応液５μｌを４％ ヌシーブ３：１アガロースゲルにて電気泳動を行なった。その結果、目的の増幅断片が確認できた。

実施例９

本発明の方法を用いて出血性大腸菌Ｏ－１５７検出を行った。

本実施例において使用するプライマーを配列表の配列番号２１～２４に示した。配列番号２１と２２の組み合わせは、Ｏ－１５７のベロ毒素１をコードする配列を、配列番号２３と２４の組み合わせは、ベロ毒素２をコードする配列を検出するように、臨床と微生物、第１８巻、第４号、５０７～５１３頁（１９９１）記載のプライマーを構築した。なお、本発明の増幅方法に用いるプライマーは、３’末端３塩基がリボヌクレオチドに置換したものを使用した。鋳型は、ＡＴＣ

C登録番号４３８９５の出血性大腸菌Ｏ－１５７を培養したものを集菌し、適当な細胞数に滅菌水で懸濁した後、９８℃で１０分間処理した熱抽出物を使用した。以下に反応液組成を示す。

２７mM リン酸バッファー（ｐＨ７．３）、０．０１％ ＢＳＡ（牛血清アルブミン）、５％ ＤＭＳＯ 、各１mM ｄＮＴＰ混合物、８mM 酢酸マグネシウム、それぞれ６０ｐｍｏｌの上記のプライマー対、10^4～10^6細胞数に相当する鋳型ＤＮＡ（熱抽出物）、および滅菌蒸留水で反応液容量を４８μｌにした。

上記反応液を９８℃、１分間熱変性処理後、５５℃に冷却した。次に、５．５ＵのＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ、６０ＵのＥ．ｃｏｌｉ ＲＮａｓｅＨを添加し、５５℃、６０分間保持した。その後、９０℃、２分間加熱して酵素を失活させた。各反応液３μｌを４％ ヌシーブ３：１アガロース（宝酒造社製）ゲルにて電気泳動を行なった。

その結果、いずれのプライマー対でも10^4細胞数相当のＤＮＡを鋳型として、Ｏ－１５７ベロ毒素１および２を検出することができ、本発明の方法が、病毒性細菌の検出方法として利用できることを確認した。

実施例１０

本発明の方法による長鎖ＤＮＡ断片の増幅について検討した。鋳型となる２本鎖ＤＮＡは、以下のようにして調製した。まず、胃正常部組織由来ｍＲＮＡから常法によりＵｎｉ－ＺＡＰ ＸＲベクター（ストラタジーン社製）を用いてライブラリーを構築した。次にそのライブラリーをスクリーニングして、インサート部が約２．１ｋｂｐおよび約４．３ｋｂｐのクローンを用いてインビトロエキシジョンして得られたｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＳＫ（－）ファージベクターを選択した。さらに、該プラスミドを鋳型として、配列表の配列番号２５～２６記載の配列を有するＭＣＲ－ＦプライマーおよびｍＣＲ－Ｒプライマー、ＰＣＲ Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（宝酒造社製）を用いて約２．２ｋｂｐおよび約４．４ｋｂｐの増幅断片を得た。このＰＣＲ断片を本発明の増幅方法の鋳型とした。使用するプライマーは、配列表の配列番号２７～２８に記載の配列を有するＭＦ２Ｎ３（２４）プライマーおよびＭＲ１Ｎ３（２４）プライマーを使用し、

該プライマーは3’末端の3塩基がリボヌクレオチドである。反応液組成を以下に示す。

28mM リン酸バッファー（pH7．5）、0．01% BSA（牛血清アルブミン）、1% DMSO、各0．5mM dNTP混合物、4mM 酢酸マグネシウム、各30pmolの上記のプライマー対、0．2mMプトレスシンおよび滅菌水を加え、24．25μlにした。該反応液を92℃で2分間処理して、55℃に冷却した後、30UのRNaseHおよび5．5UのBcaBEST DNAポリメラーゼを加え、反応容量を25μlにし、1時間保持した。反応終了後、4℃に冷却し、0．5M EDTA溶液を2．5μl加えて反応を停止させた。その後、該溶液5μlを1%アガロース電気泳動に供した。

その結果、本発明の方法で約2．2kbpあるいは約4．4kbpの増幅断片を得ることができ、本方法で長鎖DNA断片を増幅できることを確認した。

実施例11

本発明の増幅方法で増幅した約400bpのλDNA断片とPCRで増幅した300bpと1000bpのλDNA断片をスポットしたDNAマイクロアレイを作製した。λDNAのヌクレオチド配列はジーンバンク(GenBank)登録番号、V00636、J02459、M17233及びX00906のより入手可能である。本実施例において使用するプライマーを配列表の配列番号25～26および29～35に示した。なお、本発明の増幅方法の反応液は、下記のように調製した。

34mM トリシン塩酸バッファー（pH8．7）、10mM塩化カリウム、10mM硫酸アンモニュウム、0．01% BSA（牛血清アルブミン）、1% ジメチルスルオキシド、4mM酢酸マグネシウム、各0．5mM dNTP混合物、それぞれ500pmolのプライマー対、ならびに鋳型として100ngのPCR増幅産物、110UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、300UのclonedRNaseH、反応液の最終容量は500μl。上記反応液を均一に混合し、55℃で60分間保温した後、90℃で2分間加熱して酵素を失活させた。この溶液を以下の工程に使用した。また、スポットしたDNA断片は次の

通りである。

1．サンプル：λＤＮＡを鋳型にした、配列表の配列番号２９と３０に記載の配列を有するプライマーの組み合わせによるＰＣＲ増幅産物（３００ｂｐ）をｐＵＣ１９ベクターにサブクローニング後、配列表の配列番号２５と２６に記載の配列を有するプライマーでＰＣＲ増幅したものを鋳型にして、配列表の配列番号３１と３２に記載の配列を有するプライマーで、該フライマーの３’末端２塩基がリボヌクレオチドであるキメラオリゴヌクレオチドプライマーで本発明の増幅方法により増幅したもの（増幅サイズは約４００ｂｐ）。スポットする際のＤＮＡ溶液としては、反応液原液、炭酸バッファーでそれぞれ２倍、４倍、８倍、１６倍希釈したもの（希釈溶液の炭酸バッファー濃度はすべて５０ｍＭ）で計５種類。

2．サンプル：上記１で増幅したＤＮＡ断片をマイクロコン－１００（宝酒造社製）で処理して５０ｍＭ　炭酸バッファーで次の０．１２５μｇ／μｌ，０．２５μｇ／μｌ，０．５μｇ／μｌ，１．０μｇ／μｌ，２．０μｇ／μｌの各濃度に調整したもの、計５種類。

3．陽性コントロール：λＤＮＡを鋳型にした、配列表の配列番号２９と３０に記載の配列を有するプライマーの組み合わせによるＰＣＲ増幅産物（３００ｂｐ）をマイクロコン－１００で処理して５０ｍＭ　炭酸バッファーで次の０．１２５μｇ／μｌ，０．２５μｇ／μｌ，０．５μｇ／μｌ，１．０μｇ／μｌ，２．０μｇ／μｌの各濃度に調整したもの、計５種類。

4．陽性コントロール：λＤＮＡを鋳型にした、配列表の配列番号３３と３４に記載の配列を有するプライマーの組み合わせによるＰＣＲ増幅産物（１０００ｂｐ）をマイクロコン－１００で処理して５０ｍＭ　炭酸バッファーで次の０．１２５μｇ／μｌ，０．２５μｇ／μｌ，０．５μｇ／μｌ，１．０μｇ／μｌの各濃度に調整したもの、計４種類。

5．陰性コントロール：λＤＮＡを鋳型にした、配列表の配列番号３３と３５に記載の配列を有するプライマーの組み合わせによるＰＣＲ増幅産物（３００ｂｐ）をｐＵＣ１９ベクターにサブクローニング後、配列表の配列番号２５と２６に記載の配列を有するプライマーでＰＣＲ増幅したものを鋳型にして、配列表の

配列番号３１と３２に記載の配列を有するプライマーで本発明の増幅方法により増幅したもの（増幅サイズは約４００ｂｐ）。スポットする際のＤＮＡ溶液としては、反応液原液、炭酸バッファーでそれぞれ２倍、４倍、８倍、１６倍希釈したもの（希釈溶液の炭酸バッファー濃度はすべて５０mM）で計５種類。

６．陰性コントロール：上記５で得られたＤＮＡ断片をマイクロコン－１００で処理して５０mM　炭酸バッファーで次の０．１２５μｇ／μｌ，０．２５μｇ／μｌ，０．５μｇ／μｌ，１．０μｇ／μｌ，２．０μｇ／μｌの各濃度に調整したもの、計５種類。

調製した各ＤＮＡ溶液をＤＮＡチップ作製装置（Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｍｉｃｒｏ ｓｙｓｔｅｍｓ：ＧＭＳ社製）を用いてアミノ基導入スライドガラス（松浪硝子工業社製）にスポットし、ＵＶ照射により固定した。スライドを０．２％ＳＤＳ、次いで蒸留水で洗浄、乾燥してＤＮＡアレイとした。

また、配列表の配列番号２９と３０に記載の配列を有するプライマーの組み合わせによるＰＣＲ増幅産物（３００ｂｐ）をＬａｂｅｌ ＩＴ Ｃｙ５^{R} Ｌａｂｅｌｉｎｇ Ｋｉｔ（宝酒造社製）によりＣｙ５標識してプローブとした。次に、ＩｎｔｅｌｌｉＧｅｎｅ（宝酒造社製）の取扱説明書に記載のプレハイブリダイゼーション溶液およびハイブリダイゼーション溶液を用いてハイブリダイゼーションを行った。まず上記ＤＮＡアレイを室温にて２時間プレハイブリダイゼーション処理を行った後、変性したＣｙ５標識プローブを含むハイブリダイゼーション溶液をＤＮＡアレイに滴下し、カバーガラスをかけて周囲をフィルムで密封した。これを６５℃で１３時間保持した後、カバーガラスを除いて、６５℃で２×ＳＳＣ溶液で５分間、次に６５℃で０．２×ＳＳＣおよび０．１％ＳＤＳを含む溶液で５分間、最後に室温で０．２×ＳＳＣ溶液で５分間洗浄し、風乾した。これをマイクロアレイスキャナー（ＧＭＳ社）にかけて各スポットの蛍光シグナルを解析した。

この結果、ＰＣＲ法で増幅した断片（上記３、４の陽性コントロール）および、本発明の方法で増幅した断片（上記１、２のサンプル）をスポットした位置のいずれにおいても蛍光シグナルが確認できた。また、シグナルの強さはサンプル２＞陽性コントロール４＞サンプル１＞陽性コントロール３であった。一方、陰性

コントロールの５、６ではシグナルは全く認められなかった。このことから、本発明の方法で増幅したＤＮＡ断片は、未精製でもあるいは精製後でもＤＮＡチップを作製するための固定化用ＤＮＡ断片として好適に使用できることを確認した。

実施例１２

（ｉ）ＰＣＲ増幅断片を鋳型とする場合の本発明の方法に使用するプライマーデザインについて検討した。まず、配列表の配列番号３６～４１記載の配列を有するプライマーを常法により合成した。各プライマーの構造について以下に示す。

（ｉ）Ｒ１－Ｓ１プライマー：5'末端から７塩基のスペーサー配列、１７塩基のＭ１３ＲＶ配列（またはＲＶ配列）は、Ｍ１３ＲＶプライマー（宝酒造社製）のヌクレオチド配列をいう）及び２０塩基のλＤＮＡ特異的ＰＣＲ用センスプライマー配列；

（ｉｉ）Ｒ１－Ａ３プライマー：5'末端から７塩基のスペーサー配列、１７塩基のＭ１３ＲＶ配列及び２０塩基のλＤＮＡ特異的ＰＣＲ用アンチセンスプライマー配列；

（ｉｉｉ）Ｒ２－Ｓ１プライマー：5'末端から２５塩基のスペーサー配列、１７塩基のＭ１３ＲＶ配列及び２０塩基のλＤＮＡ特異的ＰＣＲ用センスプライマー配列；

（ｉｖ）Ｒ２－Ａ３プライマー：5'末端から２５塩基のスペーサー配列、１７塩基のＭ１３ＲＶ配列及び２０塩基のλＤＮＡ特異的ＰＣＲ用アンチセンスプライマー配列；

（ｖ）Ｒ３－Ｓ１プライマー：5'末端から５８塩基のスペーサー配列、１７塩基のＭ１３ＲＶ配列及び２０塩基のλＤＮＡ特異的ＰＣＲ用センスプライマー配列；

（ｖｉ）Ｒ３－Ａ３プライマー：5'末端から５８塩基のスペーサー配列、１７塩基のＭ１３ＲＶ配列及び２０塩基のλＤＮＡ特異的ＰＣＲ用アンチセンスプライマー配列。

なお、Ｍ１３ＲＶ　２０ｍｅｒは、１７塩基のＭ１３ＲＶ配列及び5'側に３塩基の計２０塩基の配列を有する。従って、Ｍ１３ＲＶ　２０ｍｅｒを用いて本

発明の方法を実施した場合、上記プライマーのスペーサー配列の長さは、それぞれ４塩基、２２塩基、５５塩基となる。さらに、対照として、上記プライマーのスペーサー配列のないプライマーも作成した。

上記プライマー対、例えば、Ｒ１－Ｓ１プライマー／Ｒ１－Ａ３プライマーを用いると３４８ｂｐの増幅断片が得られる。この増幅断片の両端７塩基がスペーサー部分であり、その内側にＲＶ配列、さらに内側にλＤＮＡの配列を含む。

同様に、Ｒ２－Ｓ１プライマー／Ｒ２－Ａ３プライマーを用いると増幅断片の両端２５塩基がスペーサー部分である３８４ｂｐの増幅断片が得られ、Ｒ３－Ｓ１プライマー／Ｒ３－Ａ３プライマーを用いると増幅断片の両端５８塩基がスペーサー部分である４５０ｂｐの増幅断片が得られる。一方、対照用プライマーを用いた増幅断片は、スペーサー部分を有さない。これらのＰＣＲ増幅断片を鋳型として以下の検討を行った。

本実施例においては、配列表の配列番号４２及び４３記載の配列を有するＭ１３ＲＶ－２Ｎ　１７ｍｅｒプライマー、Ｍ１３ＲＶ－２Ｎ　２０ｍｅｒプライマーの２種類を用いた。なお、該プライマーは、3'末端の２塩基がリボヌクレオチドに置き換わったものを用いた。反応は以下のように行った。即ち、前述のプライマー　２０μＭ、約２０ｎｇの上記鋳型及び０．０１％プロピレンジアミンの混合液５μｌを９８℃　２分間変性後、５５℃まで冷却した。その後、３４ｍＭ　トリシンバッファー（ｐＨ８．７）、１０ｍＭ　塩化カリウム、１０ｍＭ　硫酸アンモニウム、０．０１％　ＢＳＡ、１％　ＤＭＳＯ、４ｍＭ　酢酸マグネシウム、０．５ｍＭ　ｄＮＴＰ、１ＵのＢｃａＢＥＳＴ　ＤＮＡポリメラーゼ、１５ＵのＲＮａｓｅＨを添加し、最終反応容量を２５μｌにした。該反応液は、５５℃で１時間保持した。反応終了後、４℃に冷却し、０．５Ｍ　ＥＤＴＡ溶液２．５μｌを添加して反応を停止し、該反応液３μｌを３％　ヌシーブ　３：１　アガロース（宝酒造社製）ゲル電気泳動に供した。その結果、Ｍ１３ＲＶ－２Ｎ　１７ｍｅｒを用いた場合は、スペーサー配列が２５ｍｅｒ、７ｍｅｒ、５８ｍｅｒ、スペーサー配列なしの順に、Ｍ１３ＲＶ－２Ｎ　２０ｍｅｒを用いた場合は、スペーサー配列が２２ｍｅｒ、４ｍｅｒ、５５ｍｅｒ、スペーサー配列なしの順に増幅効率がよいことが確認できた。また、上記（ｉ）から（ｖｉ）のプライマ

ーのＭ１３ＲＶ配列をＭ１３Ｍ４配列に変更した場合でも、スペーサー配列と増幅効率の関係は同じ傾向を示した。即ち、ＰＣＲ増幅断片のような直鎖ＤＮＡ断片を鋳型とする場合、スペーサー配列（部分）ができるように本発明の方法に用いるプライマーをデザインすることが増幅効率向上につながることを確認した。

（２）反応温度を上げた場合の核酸配列増幅方法について、ＧＣ含量の高い鋳型の増幅について検討した。まず、ジーンバンク(GenBank)登録番号、ＡＡ７８９３２８のＣＤＣ２－ｒｅｌａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ｋｉｎａｓｅ ＰＩＳＳＬＲＥ遺伝子領域 ３０７ｂｐ（ＧＣ含量：６２．５％）について配列表の配列番号４４と４５に記載のＰＣＲ増幅用プライマーを、またジーンバンク(GenBank)登録番号、ＡＡ７０６０２２のＴｙｐｅ ＩＩ ｃｙｔｏｓｋｅｌｔａｌ １ ｋｅｒａｔｉｎ遺伝子領域 ２８４ｂｐ（ＧＣ含量：６１．３％）について配列表の配列番号４６と４７に記載のＰＣＲ増幅用プライマーをそれぞれ作製した。これらのプライマーを用いて、市販のＤＮＡ断片（リサーチジェネティック社製）を鋳型としてＰＣＲ増幅した。上記プライマー対を用いることにより、得られたＰＣＲ増幅断片は、両端にスペーサー配列及びＭ１３ＲＶ配列を有する。これを本発明の鋳型とした。

次に本実施例において使用するプライマーは、配列表の配列番号４２記載の配列を有するＭ１３ＲＶ－２Ｎ １７ｍｅｒプライマーまたは配列表の配列番号４３記載の配列を有するＭ１３ＲＶ－２Ｎ ２０ｍｅｒプライマーを用いた。なお、該プライマーは、いずれも3'末端の２塩基がリボヌクレオチドに置き換わったものを用いた。反応は以下のように行った。即ち前述のプライマー １００ｐｍｏｌ、２０ｎｇの鋳型及び０．０１％プロピレンジアミンの混合液１０μｌを９８℃ ２分間変性後、５５℃または、６０℃まで冷却した。その後、３４ｍＭ トリシンバッファー（ｐＨ８．７）、１０ｍＭ ＫＣｌ、１０ｍＭ 硫酸アンモニウム、０．０１％ ＢＳＡ、１％ ＤＭＳＯ、４ｍＭ 酢酸マグネシウム、０．５ｍＭ ｄＮＴＰ、１１ＵのＢｃａＢＥＳＴ ＤＮＡポリメラーゼ、３０ＵのＲＮａｓｅＨ を添加して、最終反応容量を５０μｌにした。該反応液を５５℃または６０℃で１時間保持した。反応終了後、４℃に冷却し、該反応液３μｌを３％アガロース電気泳動に供した。その結果を以下の表１に示す。

表１

反応温度	使用プライマー	遺伝子名及び増幅結果 CDC2-related	Type II cytoskeltal
55℃	M13RV-2N 17mer	＋＋	＋＋
	M13RV-2N 20mer	＋＋	＋＋
60℃	M13RV-2N 17mer	＋	＋
	M13RV-2N 20mer	＋＋＋＋	＋＋＋＋

＋～＋＋＋＋：増幅の程度を４段階で示す。

－　：増幅はみられない。

表１に示したように、反応温度を高くすること（５５℃から６０℃）、さらに６０℃で反応する場合、５５℃反応時の至適プライマーよりＴｍ値の高いプライマーを使用することにより、ＧＣ含量の高い鋳型の場合でも効率よく目的とする領域を増幅することができた。

（３）反応温度が高い場合の核酸配列の増幅方法について増幅断片長と増幅産物の関係を検討した。まず、ｌａｍｂｄａ　ＤＮＡ（宝酒造社製）の８００ｂｐ領域を増幅できる配列表の配列番号４８及び４９記載の配列を有するプライマーと４００ｂｐ領域を増幅できる配列表の配列番号５０及び５１記載の配列を有するプライマーを常法により合成した。このプライマー対を用いて、λＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行い増幅断片を得た。さらに、実施例５（１）に記載のｐＵＣ１９－９１１プラスミドを鋳型とし、配列表の配列番号１６～１７記載の配列を有するＭＦ２（２４）プライマー及びＭＲ１（２４）プライマー用いて増幅した約１．１ｋｂｐの増幅断片も調製した。上記プライマー対を用いることにより、得られたＰＣＲ増幅断片は、両端にスペーサー配列及びＭ１３ＲＶあるいはＭ４配列を有する。これを本発明の鋳型とした。

次に本実施例において使用するプライマーは、配列表の配列番号４２記載の配列を有するＭ１３ＲＶ－２Ｎ　１７ｍｅｒプライマーまたは配列表の配列番号４３記載の配列を有するＭ１３ＲＶ－２Ｎ　２０ｍｅｒプライマーを用いた。なお、該プライマーは、いずれも３'末端の２塩基がリボヌクレオチドに置き換わったものを用いた。さらに、約１ｋｂｐ領域の増幅に関しては、配列表の配列番号５

５記載の配列を有するＭ１３Ｍ４－３Ｎ　２０ｍｅｒプライマーと配列表の配列番号４３記載のＭ１３ＲＶ－３Ｎ　２０ｍｅｒプライマーの組み合わせ及び配列表の配列番号５６～５７記載の配列を有するＭ１３Ｍ４－３Ｎ　２４ｍｅｒプライマー及びＭ１３ＲＶ－３Ｎ　２４ｍｅｒプライマーの組み合わせで行った。なお、該プライマーは、いずれも3'末端の３塩基がリボヌクレオチドに置き換わったものを用いた。反応は以下のように行った。即ち、前述のプライマー　１００ｐｍｏｌ、約２０ｎｇの鋳型及び０．０１%プロピレンジアミンの混合液１０μｌを９８℃　２分間変性後、５５℃または６０℃まで冷却した。その後、３４ｍＭ　トリシンバッファー（ｐＨ８．７）、１０ｍＭ　塩化カリウム、１０ｍＭ硫酸アンモニウム、０．０１%　ＢＳＡ、１%　ＤＭＳＯ、４ｍＭ　酢酸マグネシウム、０．５ｍＭ　ｄＮＴＰ、１１ＵのＢｃａＢＥＳＴ　ＤＮＡポリメラーゼ、３０ＵのＲＮａｓｅＨを添加し、最終反応容量を５０μｌにした。該反応液を５５℃または６０℃で１時間保持した。反応終了後、４℃に冷却し、０．５Ｍ　ＥＤＴＡ溶液５μｌを添加して反応を停止し、該反応液３μｌを３%　ヌシーブ３：１アガロース（宝酒造社製）ゲル電気泳動に供した。その結果を表２及び表３に示す。

表２

		増幅鎖長及び結果	
反応温度	使用プライマー	400bp	800bp
55℃	M13RV-2N 17mer	＋＋	＋＋
	M13RV-2N 20mer	＋＋	＋＋
60℃	M13RV-2N 17mer	＋	＋
	M13RV-2N 20mer	＋＋＋＋	＋＋＋＋

＋～＋＋＋＋：増幅の程度を４段階で示す。

－　：増幅はみられない。

表２に示したように、増幅に使用するプライマーの長さを１７ｍｅｒから２０ｍｅｒにし、さらに反応温度を５５℃から６０℃に高くすることにより、４００ｂｐ及び８００ｂｐの増幅領域において増幅断片を効率よく得ることができた。

表３

反応温度	使用プライマー	増幅鎖長及び結果 1034bp
55℃	M13RV-3N 20mer & M13M4-3N 20mer	＋＋
	M13RV-3N 24mer & M13M4-3N 24mer	＋＋
65℃	M13RV-3N 20mer & M13M4-3N 20mer	＋
	M13RV-3N 24mer & M13M4-3N 24mer	＋＋＋＋

＋～＋＋＋＋：増幅の程度を４段階で示す。

－　：増幅はみられない。

さらに、表３に示したように増幅に使用するプライマーの長さを２０ｍｅｒから２４ｍｅｒにし、さらに反応温度を５５℃から６５℃に高くすることにより、約１ｋｂｐの増幅領域において増幅断片を効率よく得ることができた。また、実施例１０に示したような長鎖ＤＮＡ断片の増幅においても、使用するプライマーを長くし、反応温度を上げることにより上記と同様の結果が得られ、約２ｋｂｐ以上の増幅領域の場合でも増幅効率が向上することが確認できた。

実施例１３

（１）本発明の方法についてＢｃａＢＥＳＴ　ＤＮＡポリメラーゼ以外の耐熱性ＤＮＡポリメラーゼを使用した場合について検討した。耐熱性ＤＮＡポリメラーゼとしてＢｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ（ニューイングランドバイオラボ社製）を使用した。まず、配列表の配列番号５２及び５３記載の配列を有する5'ＩＤプライマー及び3'ＩＤプライマーを常法により合成した。このプライマー対を用いて、市販のｃｙｃｌｉｎ　Ａ遺伝子のＤＮＡ断片（リサーチジェネティック社製）を鋳型としてＰＣＲを行い、約３００ｂｐの増幅断片を得た。上記プライマー対を用いることにより、得られたＰＣＲ増幅断片は、両端にＭ１３ＲＶ配列を有する。これを本発明の鋳型とした。

次に本実施例において使用するプライマーは、配列表の配列番号４２記載の配列を有するＭ１３ＲＶ－２Ｎ　１７ｍｅｒプライマーを用いた。なお、該プライマーは、3'末端の２塩基がリボヌクレオチドに置き換わったものを用いた。反応は以下のように行った。即ち、前述のプライマー　２０μＭ、約２０ｎｇの上

記鋳型及び０．０１%プロピレンジアミンの混合液１０μｌを９８℃　２分間変性後、５５℃まで冷却した。その後、３４mM　トリシンバッファー（ｐＨ８．７）、１０mM　塩化カリウム、１０mM　硫酸アンモニウム、０．０１%　ＢＳＡ、１%　ＤＭＳＯ、４mM　酢酸マグネシウム、０．５mM　ｄＮＴＰ、４Ｕ、８Ｕ、１２Ｕ及び１６ＵのＢｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ、３０ＵのＲＮａｓｅＨを添加し、最終反応容量を５０μｌにした。また、対照として、１１ＵのＢｃａＢＥＳＴ　ＤＮＡポリメラーゼを使用する以外は上記反応液組成と同じものを調製した。該反応液は、５５℃で１時間保持した。反応終了後、４℃に冷却し、０．５Ｍ　ＥＤＴＡ溶液５μｌを添加して反応を停止し、該反応液３μｌを３%　ヌシーブ　３：１アガロース（宝酒造社製）ゲル電気泳動に供した。その結果、いずれのユニット数のＢｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼを使用した場合でも目的の増幅断片を得ることができた。従って、本発明の方法において、耐熱性ＤＮＡポリメラーゼが好適に使用できることを確認した。

（２）本発明の方法について常温性ＤＮＡポリメラーゼを使用した場合について検討した。常温性ＤＮＡポリメラーゼとして5'→3'エキソ活性（－）クレノウ断片（宝酒造社製）を使用した。本発明の方法に用いる鋳型ＤＮＡは、上記（１）で調製したものを使用した。

次に本実施例において使用するプライマーは、配列表の配列番号５４記載の配列を有するＭ１３ＲＶ－２Ｎ　１６ｍｅｒプライマーを用いた。なお、該プライマーは、3'末端の２塩基がリボヌクレオチドに置き換わったものを用いた。反応は以下のように行った。即ち、前述のプライマー　２０μＭ、約２０ｎｇの上記鋳型及び０．０１%プロピレンジアミンの混合液１０μｌを９８℃　２分間変性後、４０℃まで冷却した。その後、３４mM　トリシンバッファー（ｐＨ８．７）、１０mM　塩化カリウム、１０mM　硫酸アンモニウム、０．０１%　ＢＳＡ、１%　ＤＭＳＯ、４mM　酢酸マグネシウム、０．５mM　ｄＮＴＰ、０Ｕ、２Ｕ、４Ｕ、６Ｕ及び８Ｕのクレノウ断片、３０ＵのＲＮａｓｅＨを添加し、最終反応容量を５０μｌにした。該反応液は、４０℃で１時間保持した。反応終了後、４℃に冷却し、０．５Ｍ　ＥＤＴＡ溶液５μｌを添加して反応を停止し、該反応液３μｌを３%　ヌシーブ　３：１アガロース（宝酒造社製）ゲル電気泳

動に供した。その結果、クレノウ断片が存在しない場合を除いて、いずれのユニット数の場合でも目的の増幅断片を得ることができた。従って、本発明の方法において、常温性ＤＮＡポリメラーゼが好適に使用できることを確認した。

実施例１４

本発明の方法に用いるキメラオリゴヌクレオチドプライマーについて検討した。鋳型ＤＮＡ及びプライマー合成は、実施例１（１）記載の方法に従った。本実施例に使用されたプライマーの詳細な構造を以下に示す：

プライマー対１：配列表の配列番号２および３に示される塩基配列を有し、その全体がすべてデオキシリボヌクレオチドで構築されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対２：配列表の配列番号５９および６０に示される塩基配列を有し、それぞれの３’末端から６、７個めのデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対３：配列表の配列番号６１および６２に示される塩基配列を有し、それぞれの３’末端から５、６個めのデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対４：配列表の配列番号６３および６４に示される塩基配列を有し、それぞれの３’末端から４、５個めのデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対５：配列表の配列番号６５および６６に示される塩基配列を有し、それぞれの３’末端から３、４個めのデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対６：配列表の配列番号６７および６８に示される塩基配列を有し、それぞれの３’末端から２、３個めのデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対７：配列表の配列番号２および３に示される塩基配列を有し、それぞれの３’末端から１、２個めのデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対８：配列表の配列番号６７および６８に示される塩基配列を有し、

それぞれの３’末端から２、３個めのデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換され、かつ３’末端から３個めのリボヌクレオチドの５’側リン酸結合がホスホロチオエート結合に置換されたプライマーの組み合わせ。

増幅条件及び検出方法については、実施例１（２）及び（３）記載の方法に準じて行った。その結果、プライマー対２～８のいずれにおいても目的の長さの増幅断片を確認することができた。また、プライマー対２～７については、３’末端のデオキシリボヌクレオチドの数が減少するに従って増幅産物量が多くなり、特に３’末端にデオキシリボヌクレオチドがないプライマー対７において最も増幅産物量が多くなることを確認した。一方、プライマー対１については、増幅断片は確認できなかった。さらに、プライマー対６と８のいずれにおいても目的とする増幅断片が確認できたことから、プライマー中に存在するリボヌクレオチドが修飾リボヌクレオチドあるいは未修飾リボヌクレオチドのいずれであっても本発明の方法に好適に使用できることを確認した。

産業上の利用の可能性

本発明により、キメラオリゴヌクレオチドプライマーの存在下にＤＮＡ合成反応を行うことを特徴とする簡便で、効率の良い核酸配列の増幅方法が提供される。また、本発明により、大量のＤＮＡ増幅断片を供給する方法が提供される。また、本発明の核酸配列の増幅方法は、他の核酸増幅方法と組み合わせて使用することにより、効率的な核酸配列の増幅方法が提供される。また、本発明によりウイルス、細菌、カビ、酵母などの微生物等の検出、定量のための核酸配列の検出方法が提供され、本発明の方法で得られたＤＮＡ増幅断片をリアルタイムで検出する方法が提供される。さらに本発明により遺伝子の大規模シークエンシング方法が提供される。

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO:1: Synthetic DNA corresponding to a portion of human transferrin receptor-encoding sequence used as a template.

SEQ ID NO:2: Designed oligonucleotide primer to amplify a

portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:3: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:4: Designed oligonucleotide used as a probe for detecting an amplified portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:5: Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper(2)NN to amplify a portion of plasmid pUC19.

SEQ ID NO:6: Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 lower NN to amplify a portion of plasmid pUC19.

SEQ ID NO:7: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19.

SEQ ID NO:8: Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 lower 542 to amplify a portion of plasmid pUC19.

SEQ ID NO:9: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19.

SEQ ID NO:10: Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 150 to amplify a portion of plasmid pUC19.

SEQ ID NO:11: Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 249 to amplify a portion of plasmid pUC19.

SEQ ID NO:12: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:13: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:14: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:15: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:16: Designed oligonucleotide primer designated as

MF2N3(24) to amplify a portion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911.

SEQ ID NO:17: Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify a portion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911.

SEQ ID NO:18: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19.

SEQ ID NO:19: Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3 to amplify a portion of plasmid pUC19.

SEQ ID NO:20: Synthetic RNA used as a probe for detecting an amplified portion of plasmid pUC19.

SEQ ID NO:21: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157.

SEQ ID NO:22: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157.

SEQ ID NO:23: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157.

SEQ ID NO:24: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157.

SEQ ID NO:25: Designed oligonucleotide primer designated as MCR-F to amplify a long DNA fragment.

SEQ ID NO:26: Designed oligonucleotide primer designated as MCR-R to amplify a long DNA fragment.

SEQ ID NO:27: Designed oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify a long DNA fragment.

SEQ ID NO:28: Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify a long DNA fragment.

SEQ ID NO:29: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:30: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:31: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:32: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:33: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:34: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:35: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:36: Designed oligonucleotide primer designated as R1-S1 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:37: Designed oligonucleotide primer designated as R1-A3 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:38: Designed oligonucleotide primer designated as R2-S1 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:39: Designed oligonucleotide primer designated as R2-A3 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:40: Designed oligonucleotide primer designated as R3-S1 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:41: Designed oligonucleotide primer designated as R3-A3 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:42: Designed oligonucleotide primer designated as M13RV-2N 17mer.

SEQ ID NO:43: Designed oligonucleotide primer designated as

M13RV-2N 20mer.

SEQ ID NO:44: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of CDC2-related protein kinase PISSLRE gene.

SEQ ID NO:45: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of CDC2-related protein kinase PISSLRE gene.

SEQ ID NO:46: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of Type II cytoskeltal 11 keratin gene.

SEQ ID NO:47: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of Type II cytoskeltal 11 keratin gene.

SEQ ID NO:48: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:49: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:50: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:51: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA.

SEQ ID NO:52: Designed oligonucleotide primer designated as 5' ID to amplify a portion of cyclin A DNA.

SEQ ID NO:53: Designed oligonucleotide primer designated as 3' ID to amplify a portion of cyclin A DNA.

SEQ ID NO:54: Designed oligonucleotide primer designated as M13RV-2N 16mer.

SEQ ID NO:55: Designed oligonucleotide primer designated as M13M4-3N 16mer.

SEQ ID NO:56: Designed oligonucleotide primer designated as M13M4-3N 24mer.

SEQ ID NO:57: Designed oligonucleotide primer designated as M13RV-3N 24mer.

SEQ ID NO:58: Designed oligonucleotide primer designated as M13M4 17mer.

SEQ ID NO:59: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:60: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:61: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:62: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:63: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:64: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:65: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:66: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:67: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

SEQ ID NO:68: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence.

請 求 の 範 囲

1．核酸配列を増幅するための方法であって、

（a）鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの3’末端又は3’末端側に配置され；

（b）（a）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（c）（b）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

2．（b）工程と（c）工程が連続的に反復される請求項1記載の方法。

3．少なくとも2種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

（a）鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの3’末端又は3’末端側に配置され；

（b）（a）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

（c）（b）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマ

一伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｂ）工程に再度利用される工程；

（ｄ）（ｃ）工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも１種のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｅ）（ｄ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｆ）（ｅ）工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｅ）工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

４．各工程が等温で行われることを特徴とする請求項１～３のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

５．鎖置換活性を有する１種のＤＮＡポリメラーゼを使用して実施されることを特徴とする請求項１～４のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

６．ＤＮＡポリメラーゼとして、大腸菌由来のＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウ断片、バチルス　ステアロサーモフィラス由来の５’→３’エキソヌクレアーゼ欠損ＢｓｔＤＮＡポリメラーゼ、およびバチルス　カルドテナックス由来の５’→３’エキソヌクレアーゼ欠損ＢｃａＤＮＡポリメラーゼからなる群から選択されるＤＮＡポリメラーゼが使用される請求項１～５のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

７．エンドヌクレアーゼがエンドリボヌクレアーゼである請求項１～６のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

８．エンドリボヌクレアーゼがＲＮａｓｅＨである請求項７記載の核酸配列の

増幅方法。

９．キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、連続した２残基以上のリボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項１～８のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

１０．キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、１以上の修飾リボヌクレオチドを含有していることを特徴とする請求項１～９のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

１１．キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、リボヌクレオチドのα位のリン原子に結合している酸素原子を硫黄原子に置き換えた（α－Ｓ）リボヌクレオチドを含有していることを特徴とする請求項１０記載の核酸配列の増幅方法。

１２．トリシン、リン酸塩およびトリスから選択される緩衝成分を含有する緩衝液中で実施されることを特徴とする請求項１～１１のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

１３．核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド３リン酸、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ、少なくとも１種類のプライマー、および該プライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドがエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；および

（ｂ）反応産物を生成するのに充分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

１４．反応混合物を等温でインキュベートすることを特徴とする請求項１３記載の核酸配列の増幅方法。

１５．さらに鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相同な配列を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有する反応混合物を使用することを特徴とする請求項１３または１４に記載の核酸配列の増幅方法。

１６．ＤＮＡポリメラーゼが、大腸菌由来のＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウ断片、バチルス　ステアロサーモフィラス由来の５’→３’エキソヌクレアーゼ欠損Ｂｓｔ ＤＮＡポリメラーゼ、およびバチルス　カルドテナックス由来の５’→３’エキソヌクレアーゼ欠損Ｂｃａ ＤＮＡポリメラーゼからなる群から選択されるＤＮＡポリメラーゼである請求項１３～１５のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

１７．エンドヌクレアーゼがエンドリボヌクレアーゼである請求項１３～１６のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

１８．エンドリボヌクレアーゼがＲＮａｓｅＨである請求項１７記載の核酸配列の増幅方法。

１９．キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、連続した２残基以上のリボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項１３～１８のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

２０．キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、１以上の修飾リボヌクレオチドを含有していることを特徴とする請求項１３～１９のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

２１．キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、リボヌクレオチドのα位のリン原子に結合している酸素原子を硫黄原子に置き換えた（α－Ｓ）リボヌクレオチドを含有していることを特徴とする請求項２０記載の核酸配列の増幅方法。

２２．トリシン、リン酸塩およびトリスから選択される緩衝成分を含有する緩衝液中で実施されることを特徴とする請求項１３～２１のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

２３．鋳型となる核酸が一本鎖または二本鎖のＤＮＡである請求項１～２２のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

２４．鋳型となる二本鎖ＤＮＡを一本鎖ＤＮＡにする工程の後に実施されることを特徴とする請求項２３記載の核酸配列の増幅方法。

２５．鋳型となる核酸がＲＮＡから逆転写反応によって得られたｃＤＮＡである請求項２３または２４記載の核酸配列の増幅方法。

２６．ＲＮＡを鋳型とした逆転写反応によってｃＤＮＡを合成する工程の後に

実施されることを特徴とする請求項２５記載の核酸配列の増幅方法。

２７．逆転写反応用プライマーがオリゴｄＴプライマー、ランダムプライマーもしくは、特異的プライマーからなる群より選択されるプライマーである請求項２６記載の核酸の増幅方法。

２８．逆転写反応用プライマーがキメラオリゴヌクレオチドプライマーである請求項２６または２７記載の核酸配列の増幅方法。

２９．逆転写酵素として逆転写酵素活性を有するＤＮＡポリメラーゼを使用することを特徴とする請求項２６～２８いずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

３０．逆転写反応と鋳型に相補的な伸長鎖の合成とが、逆転写酵素活性と鎖置換活性とを有する１種のＤＮＡポリメラーゼにより実施されることを特徴とする請求項２６～２９のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

３１．ＤＮＡポリメラーゼが、バチルス　ステアロサーモフィラス由来の５’→３’エキソヌクレアーゼ欠損Ｂｓｔ ＤＮＡポリメラーゼ、もしくは、バチルスカルドテナックス由来の５’→３’エキソヌクレアーゼ欠損Ｂｃａ　ＤＮＡポリメラーゼであることを特徴とする請求項２８記載の核酸配列の増幅方法。

３２．逆転写反応の鋳型となるＲＮＡが核酸増幅反応で増幅されたＲＮＡである請求項２５～３１記載の核酸配列の増幅方法。

３３．ＲＮＡを鋳型とした核酸増幅反応による増幅ＲＮＡ断片を合成する工程の後に実施されることを特徴とする請求項３２記載の核酸配列の増幅方法。

３４．核酸増幅反応が、転写増幅システム（ＴＡＳ；transcription-based amplification system）法、自立複製（３ＳＲ；self-sustained sequence replication）法、ＮＡＳＢＡ（nucleic acid sequence-based amplification）法、ＴＭＡ（transcription-mediated amplification）法あるいはＱβレプリカーゼ法のいずれかより選択されることを特徴とする請求項３２～３３記載の核酸配列の増幅方法。

３５．鋳型となる核酸が核酸増幅反応によって得られたＤＮＡである請求項２３または２４記載の核酸配列の増幅方法。

３６．ＤＮＡを鋳型とした核酸増幅反応による増幅ＤＮＡ断片を合成する工程の後に実施されることを特徴とする請求項３５記載の核酸配列の増幅方法。

３７．核酸増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ；polymerase chain reaction）法、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ；ligase chain reaction）法、ＳＤＡ（strand displacement amplification）法のいずれかより選択されることを特徴とする請求項３６記載の核酸配列の増幅方法。

３８．核酸増幅反応がランダムプライマーまたは縮重プライマーを使用して行われることを特徴とする請求項３２～３７いずれか１項記載の核酸配列の増幅方法。

３９．ランダムプライマーまたは縮重プライマーが、少なくともその３’末端又は３’末端側にランダムな配列または縮重した配列を有するプライマーであることを特徴とする請求項３８記載の核酸配列の増幅方法。

４０．請求項１～３９いずれか１項記載の核酸配列の増幅方法に用いられるキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドを含有し、当該リボヌクレオチドが該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置された構造を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

４１．連続した２残基以上のリボヌクレオチドを含有する請求項４０記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

４２．１以上の修飾リボヌクレオチドを含有する請求項３８または４１記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

４３．修飾リボヌクレオチドとして、リボヌクレオチド３リン酸のα位のリン原子に結合している酸素原子を硫黄原子に置き換えた（α－Ｓ）リボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項４２記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

４４．請求項１～３９のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法に使用される鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ。

４５．請求項１～３９のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法に使用されるエンドヌクレアーゼ。

４６．請求項１～３９のいずれか１項記載の核酸配列の増幅方法に使用されるキットであって、パッケージされた形態において、鎖置換反応におけるＤＮＡポリメラーゼ及びエンドヌクレアーゼの使用を指示した指示書を含むことを特徴と

するキット。

４７．ＤＮＡポリメラーゼおよび／またはエンドヌクレアーゼを含有することを特徴とする請求項４６記載のキット。

４８．パッケージされた形態において：

（ａ）鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ；

（ｂ）エンドヌクレアーゼ；及び

（ｃ）鎖置換反応用緩衝液

を含むことを特徴とする請求項４７記載のキット。

４９．請求項４４記載の鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼおよび／または請求項４５記載のエンドヌクレアーゼを含む、請求項１～３９いずれか１項記載の核酸配列の増幅方法に使用されるキット。

５０．ＤＮＡポリメラーゼとして大腸菌由来のＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウ断片、バチルス　ステアロサーモフィラス由来の５’→３’エキソヌクレアーゼ欠損ＢｓｔＤＮＡポリメラーゼ、およびバチルス　カルドテナックス由来の５’→３’エキソヌクレアーゼ欠損ＢｃａＤＮＡポリメラーゼからなる群から選択されるＤＮＡポリメラーゼを含有する請求項４７～４９いずれか１項記載のキット。

５１．エンドヌクレアーゼとしてＲＮａｓｅＨを含有する請求項４７～４９いずれか１項記載のキット。

５２．試料中の標的核酸を検出するための方法であって、

（ａ）請求項１～３９記載の核酸配列の増幅方法により標的核酸を増幅する工程；および

（ｂ）（ａ）工程により増幅された標的核酸を検出する工程；

を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法。

５３．消光状態になるような距離で配置された２種類以上の蛍光物質で標識されたリボヌクレオチド（ＲＮＡ）プローブによって増幅された標的核酸を検出することを特徴とする請求項５２記載の核酸配列の検出方法。

５４．請求項５２または５３記載の核酸配列の検出方法に使用される鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ。

５５．請求項５２または５３記載の核酸配列の検出方法に使用されるエンドヌクレアーゼ。

５６．請求項５２または５３記載の核酸配列の検出方法に使用されるキットであって、パッケージされた形態において、鎖置換反応におけるＤＮＡポリメラーゼ及びエンドヌクレアーゼの使用を指示した指示書を含むことを特徴とするキット。

５７．ＤＮＡポリメラーゼおよび／またはエンドヌクレアーゼを含有することを特徴とする請求項５６記載のキット。

５８．パッケージされた形態において：

（ａ）鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ；

（ｂ）エンドヌクレアーゼ；及び

（ｃ）鎖置換反応用緩衝液

を含むことを特徴とする請求項５７記載のキット。

５９．請求項５４記載の鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼおよび／または請求項５５記載のエンドヌクレアーゼを含む、請求項５６～５８いずれか１項に記載のキット。

６０．ＤＮＡポリメラーゼとして大腸菌由来のＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウ断片、バチルス　ステアロサーモフィラス由来の５’→３’エキソヌクレアーゼ欠損Ｂｓｔ ＤＮＡポリメラーゼ、およびバチルス　カルドテナックス由来の５’→３’エキソヌクレアーゼ欠損Ｂｃａ ＤＮＡポリメラーゼからなる群から選択されるＤＮＡポリメラーゼを含有する請求項５７～５９いずれか１項記載のキット。

６１．エンドヌクレアーゼとしてＲＮａｓｅＨを含有する請求項５７～５９いずれか１項記載のキット。

６２．核酸を所定の領域に整列させた核酸固定化物を作製するための方法であって、

（ａ）請求項１～３９記載の核酸配列の増幅方法により固定化すべき核酸を増幅する工程；および、

（ｂ）（ａ）工程で増幅された核酸を担体上の所定の領域に整列させて固定化す

る工程；

を包含することを特徴とする核酸を所定の領域に整列させた核酸固定化物の作製方法。

６３．実質的にその相補鎖を含まない一本鎖の核酸を増幅し、担体上の所定の領域に整列させて固定化することを特徴とする請求項６２記載の核酸を所定の領域に整列させた核酸固定化物の作製方法。

６４．請求項６２または６３記載の核酸を所定の領域に整列させた核酸固定化物の作製方法により作製された核酸を所定の領域に整列させた核酸固定化物。

６５．一本鎖の核酸が所定の領域に整列させて固定化されていること特徴とする請求項６４記載の核酸を所定の領域に整列させた核酸固定化物。

６６．実質的にその相補鎖を含まない一本鎖の核酸が所定の領域に整列させて固定化されていること特徴とする請求項６５記載の核酸を所定の領域に整列させた核酸固定化物。

６７．試料中の標的核酸を検出するための方法であって、

（ａ）試料より標的核酸を含む可能性のある核酸試料を調製する工程；

（ｂ）該核酸試料を請求項６４～６６いずれか１項記載の核酸固定化物に接触させる工程；および、

（ｃ）核酸固定化物中の核酸とハイブリダイズした該核酸試料中の標的核酸を検出する工程；

を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法。

６８．核酸配列を大量に製造する方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸の製造方法。

６９．少なくとも２種類のプライマーを使用し、核酸を大量に製造するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｂ）工程に再度利用される工程；

（ｄ）（ｃ）工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも１種のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｅ）（ｄ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｆ）（ｅ）工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプラ

イマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｅ）工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸の製造方法。

７０．核酸を大量に製造するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド３リン酸、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ、少なくとも１種類のプライマー、および該プライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドがエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；および

（ｂ）反応産物を生成するのに充分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸の製造方法。

７１．核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）増幅しようとする配列を含む核酸を核酸増幅反応によって増幅し、鋳型となる核酸を調製する工程；

（ｂ）（ａ）で得られた鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｃ）（ｂ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｄ）（ｃ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

７２．少なくとも２種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）増幅しようとする配列を含む核酸を核酸増幅反応によって増幅し、鋳型となる核酸を調製する工程；

（ｂ）（ａ）で得られた鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｃ）（ｂ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

（ｄ）（ｃ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｃ）工程に再度利用される工程；

（ｅ）（ｄ）工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として（ｂ）工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも１種のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該

（ｂ）工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｆ）（ｅ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｇ）（ｆ）工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳

型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｆ）工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

７３．核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）増幅しようとする配列を含む核酸を核酸増幅反応によって増幅し、鋳型となる核酸を調製する工程；

（ｂ）（ａ）で得られた鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド３リン酸、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ、少なくとも１種類のプライマー、および該プライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドがエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；および

（ｃ）反応産物を生成するのに充分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

７４．鋳型となる核酸を調製するための核酸増幅反応が、ＴＡＳ法、３ＳＲ法、ＮＡＳＢＡ法、ＴＭＡ法、Ｑβレプリカーゼ法、ＰＣＲ法、ＬＣＲ法、ＳＤＡ法からなる群より選択されることを特徴とする請求項７１～７３記載の核酸配列の増幅方法。

７５．核酸増幅反応がランダムプライマーまたは縮重プライマーを使用して行われることを特徴とする請求項７４に記載の核酸配列の増幅方法。

７６．ランダムプライマーまたは縮重プライマーが、少なくともその３’末端又は３’末端側にランダムな配列または縮重した配列を有するプライマーであることを特徴とする請求項７５記載の核酸配列の増幅方法。

７７．核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー

伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

７８．少なくとも２種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｂ）工程に再度利用される工程；

（ｄ）（ｃ）工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも１種のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され；

（ｅ）（ｄ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｆ）（ｅ）工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｅ）工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

７９．核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド３リン酸、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ、少なくとも１種類のプライマー、および該プライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドが該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；および

（ｂ）反応産物を生成するのに充分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

８０．核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドが該プライマーの３’末端又は３’末端側に配置され、該リボヌクレオチド含有部位がエンドヌクレアーゼによって切断されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３’末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型

に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

８１．少なくとも２種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも１種類のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドが該プライマーの３'末端又は３'末端側に配置され、該リボヌクレオチド含有部位がエンドヌクレアーゼによって切断されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；

（ｂ）（ａ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

（ｃ）（ｂ）工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３'末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｂ）工程に再度利用される工程；

（ｄ）（ｃ）工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも１種のプライマーとＤＮＡポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程；ここで該（ａ）工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドが該プライマーの３'末端又は３'末端側に配置され、該リボヌクレオチド含有部位がエンドヌクレアーゼによって切断されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；

（ｅ）（ｄ）工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

（ｆ）（ｅ）工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の３'末端より、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライ

マー伸長鎖を含む二本鎖核酸が（ｅ）工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

８２．核酸配列を増幅するための方法であって、

（ａ）鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド３リン酸、鎖置換活性を有するＤＮＡポリメラーゼ、少なくとも１種類のプライマー、および該プライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程；ここで該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドが該プライマーの３'末端又は３’末端側に配置され、該リボヌクレオチド含有部位がエンドヌクレアーゼによって切断されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり；および

（ｂ）反応産物を生成するのに充分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

８３．核酸の塩基配列を決定するための方法であって、請求項１～３９および請求項７１～８２のいずれか１項記載の方法の、核酸配列を増幅する工程を包含することを特徴とする核酸の塩基配列の決定方法。

図1

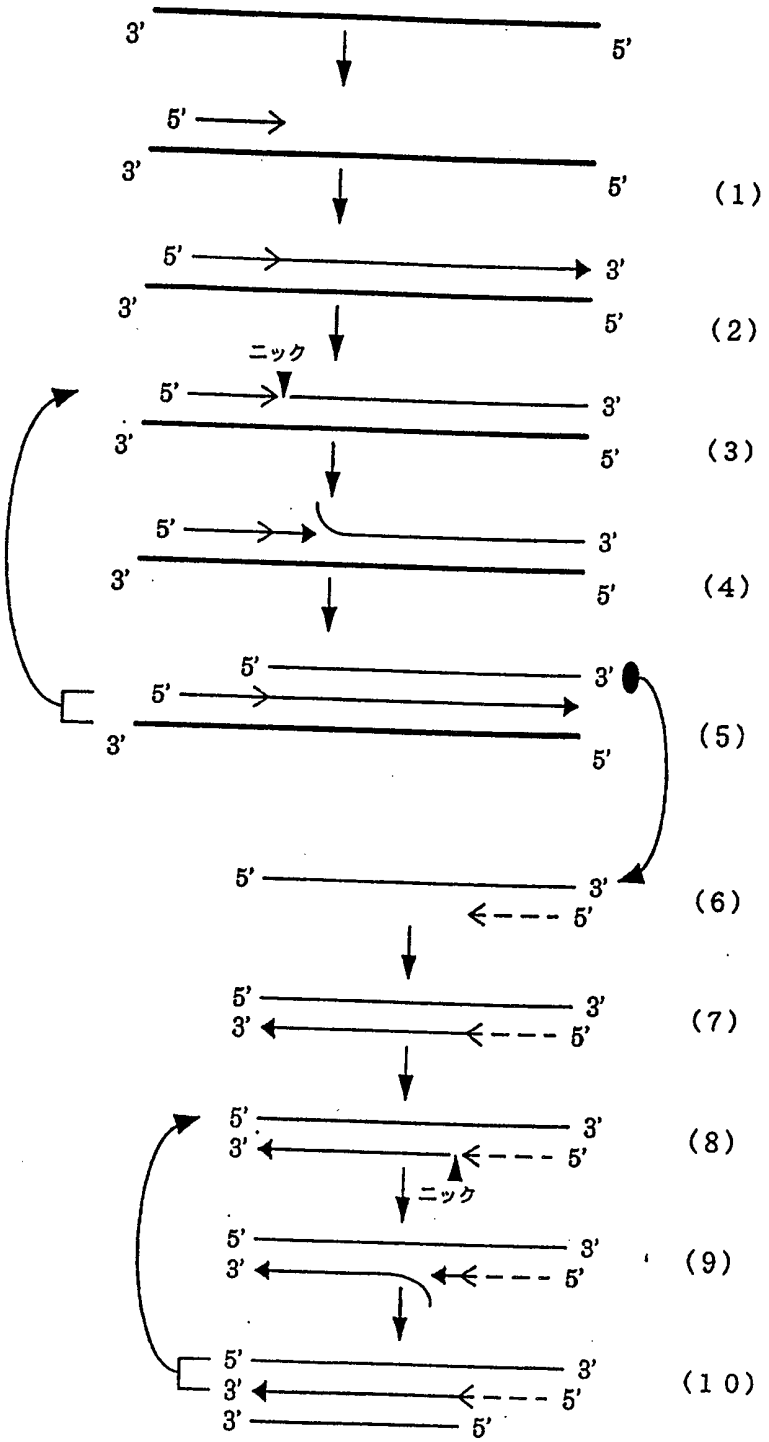
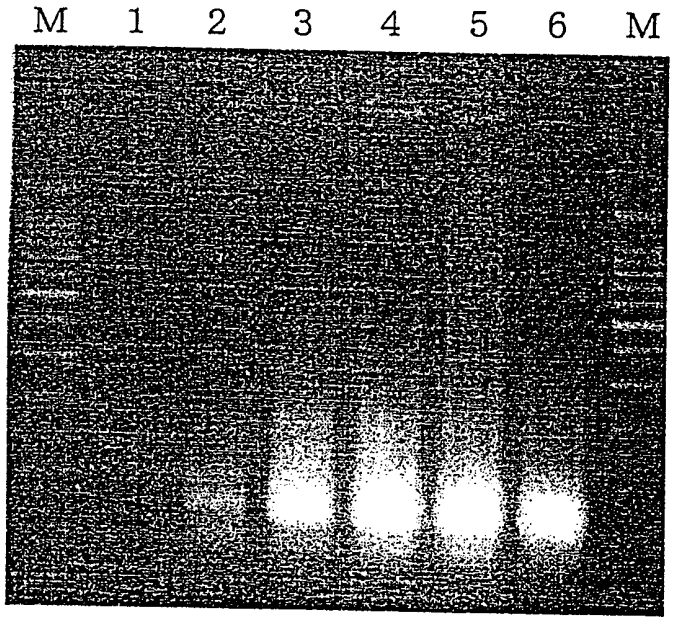


図2



SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> A method for amplification of nucleotide sequence

<130> 661724

<150> JP 11-076966

<151> 1999-03-19

<150> JP 11-370035

<151> 1999-12-27

<160> 68

<210> 1

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA corresponding to a portion of human transferrin receptor-encoding sequence used as a template

<400> 1

ggacagcaac tgggccagca aagttgagaa actcacttta gagaattctg ctttcccttt 60

ccttgcatat tctgagcagt ttctttctgt ttttgcgag 99

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 2

cagcaactgg gccagcaaag tt 22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 3

gcaaaaacag aaagaaactg ct 22

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide used as a probe for detecting an amplified portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 4

tgctttccct ttccttgcat attctg 26

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper(2)NN to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 5

attgcttaat cagtgaggca cctat 25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 lower NN to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 6

gataacactg cggccaactt acttc 25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 7

actggcgaac tacttactct agctt 25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 lower 542 to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 8

agtcaccagaa aagcatctta cggat 25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 9

gctcatgaga caataaccct gataa 25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 150 to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 10

ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatg 25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 249 to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 11

cgcctccatc cagtctatta attgt 25

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 12

ctgattgaga ggattcctga gt 22

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 13

tagggagaga ggaagtgata ct 22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 14

caacttcaag gtttctgcca gc 22

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 15

aatagtccaa gtagctagag c 21

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify a portion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911

<400> 16

gctgcaaggc gattaagttg ggta 24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify a portion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911

<400> 17

ctttatgctt ccggctcgta tgtt 24

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 18

ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta 30

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3 to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 19

tttacacttt atgcttccgg ctcgtatgtt 30

<210> 20

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic RNA used as a probe for detecting an amplified portion of plasmid pUC19

<400> 20

ugaucccccа uguugugcaa aaaagcgguu 30

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157

<400> 21

agttaatgtg gtggcgaa 18

<210> 22

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157

<400> 22

gactcttcca tctgcca 17

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157

<400> 23

ttcggtatcc tattcccg 18

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli O-157

<400> 24

tctctggtca ttgtatta 18

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MCR-F to amplify a long DNA fragment

<400> 25

ccattcaggc tgcgcaactg tt 22

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MCR-R to amplify a long DNA fragment

<400> 26

tggcacgaca ggtttcccga ct 22

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify a long DNA fragment

<400> 27

gctgcaaggc gattaagttg ggta 24

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify

a long DNA fragment

<400> 28

ctttatgctt ccggctcgta tgtt 24

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 29

aacaacaaga aactggtttc 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 30

gcaatgcatg acgactgggg 20

<210> 31

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 31

gttttcccag tcacgac 17

<210> 32

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 32

caggaaacag ctatgac 17

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 33

gtacggtcat catctgacac 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 34

gcaatcggca tgttaaacgc 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 35

cgccatcctg ggaagactcc 20

<210> 36

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as R1-S1 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 36

tttcacacag gaaacagcta tgacaacaac aagaaactgg tttc 44

<210> 37

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as R1-A3 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 37

tttcacacag gaaacagcta tgacgcaatg catgacgact gggg 44

<210> 38

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as R2-S1 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 38

attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg acaacaacaa gaaactggtt tc 62

<210> 39

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as R2-A3 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 39

attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg acgcaatgca tgacgactgg gg 62

<210> 40

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as R3-S1 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 40

cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca 60

ggaaacagct atgacaacaa caagaaactg gtttc 95

<210> 41

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as R3-A3 to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 41

cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca 60

ggaaacagct atgacgcaat gcatgacgac tgggg 95

<210> 42

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as M13RV-2N 17mer

<400> 42

caggaaacag ctatgac 17

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as M13RV-2N 20mer

<400> 43

acacaggaaa cagctatgac 20

<210> 44

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of CDC2-related protein kinase PISSLRE gene

<400> 44

gagttcgtgt ccgtacaact atttcacaca ggaaacagct atgacccaac aagagcctat 60

agcttcgctc 70

<210> 45

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of CDC2-related protein kinase PISSLRE gene

<400> 45

tcgaaatcag ccacagcgcc atttcacaca ggaaacagct atgacccgct gtctttgagt tgtggtg 67 60

<210> 46

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of Type II cytoskeltal 11 keratin gene

<400> 46

gagttcgtgt ccgtacaact atttcacaca ggaaacagct atgacgctat tctgacatca ctttccagac 70 60

<210> 47

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of Type II cytoskeltal 11 keratin gene

<400> 47

tcgaaatcag ccacagcgcc atttcacaca ggaaacagct atgacgaatt ccactggtgg cagtag 60 66

<210> 48

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 48

attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg acgtacggtc atcatctgac ac 60 62

<210> 49

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 49

attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg acatgcgccg cctgaaccac 60

ca 62

<210> 50

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 50

attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg acctgctctg ccgcttcacg 60

ca 62

<210> 51

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 51

attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg acgcaatcgg catgttaaac 60

gg 62

<210> 52

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as 5' ID to amplify a portion of cyclin A DNA

<400> 52

tcgaaatcag ccacagcgcc atttcacaca ggaaacagct atgacatgtt ttgggagaa 60

ttaagtctga 70

<210> 53

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as 3' ID to amplify a portion of cyclin A DNA

<400> 53

gagttcgtgc cgtacaacta tttcacacag gaaacagcta tgacttacag atttagtgtc 60

tctggtggg 69

<210> 54

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as M13RV-2N 16mer

<400> 54

aggaaacagc tatgac 16

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as M13M4-3N 16mer

<400> 55

agggttttcc cagtcacgac 20

<210> 56

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as M13M4-3N 24mer

<400> 56

cgccagggtt ttcccagtca cgac 24

<210> 57

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as M13RV-3N 24mer

<400> 57

tttcacacag gaaacagcta tgac 24

<210> 58

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as M13M4

<400> 58

gttttcccag tcacgac 17

<210> 59

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 59

cagcaactgg gccagcaaag ttgagaa 27

<210> 60

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 60

gcaaaaacag aaagaaactg ctcagaa 27

<210> 61

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 61

cagcaactgg gccagcaaag ttgaga 26

<210> 62

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 62

gcaaaaacag aaagaaactg ctcaga 26

<210> 63

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 63

cagcaactgg gccagcaaag ttgag 25

<210> 64

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 64

gcaaaaacag aaagaaactg ctcag 25

<210> 65

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 65

cagcaactgg gccagcaaag ttga 24

<210> 66

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 66

gcaaaaacag aaagaaactg ctca 24

<210> 67

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 67

cagcaactgg gccagcaaag ttg 23

<210> 68

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 68

gcaaaaacag aaagaaactg ctc 23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/01534

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/10, C12Q1/68

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)
Int.Cl[7] C12N15/10, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI(DIALOG),BIOSIS(DIALOG),JICST FILE(JOIS),DDBJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 99-9211, A (TEPNEL MEDICAL), 25 February, 1999 (25.02.99) & ZA, 9807257, A & AU, 9887403, A	1-83
A	US, 5824517, A (Bio Merieux), 20 October, 1998 (20.10.98) & WO, 97-4126, A1 & FR, 2737223, A1 & EP, 787209, A1	1-83
A	JP, 7-289298, A (BECTON DICKINSON AND COMPANY), 07 November, 1995 (07.11.95) & AU, 9514776, A & EP, 684315, A1 & BR, 9501581, A & CA, 2144495, A & SG, 28239, A1 & US, 5648211, A & US, 5744311, A	1-83

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09 June, 2000 (09.06.00)	20 June, 2000 (20.06.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ００／０１５３４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Ｉｎｔ．Ｃｌ⁷　Ｃ１２Ｎ１５／１０，Ｃ１２Ｑ１／６８

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Ｉｎｔ．Ｃｌ⁷　Ｃ１２Ｎ１５／１０，Ｃ１２Ｑ１／６８

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

ＷＰＩ（ＤＩＡＬＯＧ），ＢＩＯＳＩＳ（ＤＩＡＬＯＧ），ＪＩＣＳＴファイル（ＪＯＩＳ），ＤＤＢＪ

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	WO,99-9211,A (TEPNEL MEDICAL) 25.2月.1999 (25.02.99) & ZA,9807257,A & AU,9887403,A	1-83
A	US,5824517,A (Bio Merieux) 20.10月.1998 (20.10.98) & WO,97-4126,A1 & FR,2737223,A1 & EP,787209,A1	1-83
A	JP,7-289298,A (BECTON DICKINSON AND COMPANY) 7.11月.1995 (07.11.95) & AU,9514776,A & EP,684315,A1 & BR,9501581,A & CA,2144495,A & SG,28239,A1 & US,5648211,A & US,5744311,A	1-83

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ０９．０６．００	国際調査報告の発送日 20.06.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員） 引地　進　印　４Ｎ　９５４９ 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）