

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4393700号  
(P4393700)

(45) 発行日 平成22年1月6日(2010.1.6)

(24) 登録日 平成21年10月23日(2009.10.23)

(51) Int. Cl. F I  
**C 1 2 Q 1/68 (2006.01)** C 1 2 Q 1/68 A  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)** C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 15 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2000-531590 (P2000-531590)	(73) 特許権者	500370311
(86) (22) 出願日	平成11年2月8日(1999.2.8)		イエダ リサーチ アンド デベロップメント カンパニー リミテッド
(65) 公表番号	特表2002-503482 (P2002-503482A)		イスラエル国 76 100 レボト,
(43) 公表日	平成14年2月5日(2002.2.5)		ピー. オー. ボックス 95, ワイズマン
(86) 国際出願番号	PCT/IL1999/000080		インスティテュート オブ サイエンス
(87) 国際公開番号	W01999/041410	(74) 代理人	100066692
(87) 国際公開日	平成11年8月19日(1999.8.19)		弁理士 浅村 皓
審査請求日	平成17年12月22日(2005.12.22)	(74) 代理人	100072040
(31) 優先権主張番号	123256		弁理士 浅村 肇
(32) 優先日	平成10年2月10日(1998.2.10)	(74) 代理人	100088926
(33) 優先権主張国	イスラエル(IL)		弁理士 長沼 暉夫
		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA増幅法および配列決定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

循環プライマー伸長反応を実施するための方法であって、

( i )ヌクレオチドの標的配列を含む鋳型DNAを、該標的配列の3'末端のヌクレオチド配列に相補的な少なくとも1つのプライマーオリゴヌクレオチドと、該プライマーを該標的配列上のその相補的ヌクレオチド配列にアニーリングさせる条件下で、該鋳型DNAおよび/または該プライマーの融点を低下させるためにプロリン単独およびプロリンと2-メチル-4-カルボキシ-3,4,5,6-テトラヒドロピリミジン[THP(B)]との組み合わせから選択される浸透圧保護剤(osmoprotectant)の存在下で、接触させる工程；

( i i )ヌクレオチドの該標的配列への該プライマーのポリメラーゼ介在性伸長を、該ポリメラーゼを安定化するためにプロリン単独、プロリンとTHP(B)との組み合わせ、プロリンと2-メチル-4-カルボキシ-5-ヒドロキシ-3,4,5,6-テトラヒドロピリミジン[THP(A)]との組み合わせ、およびプロリンとTHP(B)とTHP(A)との組み合わせから選択される浸透圧保護剤の存在下で行う工程；および

( i i i )工程(i)および(ii)を、複数回繰り返す工程であって、各工程(i)の前に、該鋳型DNAをその鎖に分離し、かつ工程(ii)のポリメラーゼ伸長プライマーをそのヌクレオチドの相補的標的配列から分離するのに適切な温度で、DNA熱変性が行われ、該温度は、工程(ii)において使用されるポリメラーゼが安定な温度である、上記工程；

を含む、循環プライマー伸長反応を実施するための方法であり、

プロリン単独で使用する際には、プロリンは3.0 - 5.5 Mの量で存在し、そして、プロリンとT H P ( B )との組み合わせ、プロリンとT H P ( A )との組み合わせ、またはプロリンとT H P ( B )とT H P ( A )との組み合わせで使用するときには、プロリンは1 - 5 Mの量で存在し、T H P ( A )は0.5 - 3 Mの量で存在し、T H P ( B )は0.5 - 3.5 Mの量で存在し、プロリン単独での存在下では、循環プライマー伸長反応を実施するための非熱安定性ポリメラーゼを用い、プロリンにより、非熱安定性ポリメラーゼはそうでなければ熱不活性化に感受性となる高温での実施が可能となり、

こうして鋳型DNAのヌクレオチドの該標的配列へのプライマーの高収率で特異的な伸長を得る、上記方法。

10

【請求項2】

工程(i)において鋳型DNAの標的配列は、配列決定すべきヌクレオチドの配列であり、工程(ii)におけるプライマーのポリメラーゼ介在性伸長は、標的DNAのヌクレオチド配列の決定の前に、d A T P、d C T P、d G T Pおよびd T T Pの存在下で、かつ少量のd d A T P、d d C T P、d d G T Pまたはd d T T Pのいずれかの存在下で行われる、標的DNAのヌクレオチド配列を決定するための循環プライマー伸長反応を実施するための方法である請求項1に記載の方法。

【請求項3】

d G T Pは、7 - デアザ - d G T Pに置換された、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によりヌクレオチドの標的配列を増幅するための循環プライマー伸長反応を実施するための方法である請求項1に記載の方法であって、工程(i)において鋳型DNAの標的配列は、増幅すべきヌクレオチドの配列であり、そして鋳型DNAを、ヌクレオチドの該標的配列の3'末端のヌクレオチド配列およびその反対鎖に相補的な2つのオリゴヌクレオチドプライマーと接触させ；工程(ii)において工程(i)のアニーリングしたプライマーのポリメラーゼ介在性伸長が行われ；工程(i)~(ii)は、複数回繰り返され、最後の工程は工程(ii)であり、

こうしてヌクレオチドの標的配列の多数のコピーを作成する、上記方法。

20

【請求項5】

該鋳型DNAは、GC高含量DNAである、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項6】

工程(ii)におけるポリメラーゼは、熱安定性ポリメラーゼである、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

該熱安定性DNAポリメラーゼは、Taqポリメラーゼ、クレンタック(Klentaq)1 DNAポリメラーゼまたはPfuポリメラーゼである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

工程(ii)におけるポリメラーゼは、非熱安定性DNAポリメラーゼである、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項9】

該非熱安定性DNAポリメラーゼは、T7 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼIのクレノウ(Klenow)断片、逆転写酵素、Bca DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼおよびこれらのポリメラーゼの変異体から選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

請求項2または3に記載の方法により標的DNAのヌクレオチド配列を決定するためのキットであって、別々の容器に、(a) DNA配列決定に必要な試薬、および(b) プロリンを含んでなるキット。

【請求項11】

50

請求項 2 または 3 に記載の方法により標的 DNA のヌクレオチド配列を決定するためのキットであって、別々の容器に、( a ) DNA 配列決定に必要な試薬、および ( b ) T H P ( B ) または T H P ( B ) と T H P ( A ) との混合物を含んでなるキット。

【請求項 1 2】

請求項 4 に記載の方法によりヌクレオチドの標的配列を増幅するためのキットであって、別々の容器に、( a ) ポリメラーゼ連鎖反応に必要な試薬、および ( b ) プロリンを含んでなるキット。

【請求項 1 3】

請求項 4 に記載の方法によりヌクレオチドの標的配列を増幅するためのキットであって、別々の容器に、( a ) ポリメラーゼ連鎖反応に必要な試薬、および ( b ) T H P ( B ) または T H P ( B ) と T H P ( A ) との混合物を含んでなるキット。

10

【請求項 1 4】

浸透圧保護剤として、プロリン単独で用いる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

浸透圧保護剤として、プロリンと T H P ( A ) と T H P ( B ) との組み合わせ、プロリンと T H P ( A ) との組み合わせ、またはプロリンと T H P ( B ) との組み合わせを用いる、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、DNA 鋳型上で循環プライマー伸長を実施するための方法に関し、さらに詳細にはポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) 増幅およびヌクレオチド配列決定のようなプライマー伸長工程を含む方法であって、該 P C R および配列決定反応を、該反応の収率と特異性を改善するために、プロリン、2 - メチル - 4 - カルボキシ - 3 , 4 , 5 , 6 - テトラヒドロピリミジン (以降「T H P ( B )」)、2 - メチル - 4 - カルボキシ - 5 - ヒドロキシ - 3 , 4 , 5 , 6 - テトラヒドロピリミジン (以降「T H P ( A )」) およびこれらの混合物から選択される浸透圧保護剤の存在下で行うことを含んでなる方法に関する。本発明はさらに、P C R 増幅およびサイクルヌクレオチド配列決定において使用するための、プロリン、T H P ( B )、T H P ( A )、またはこれらの混合物を含んでなるキットに関する。

20

【0002】

(発明の背景)

DNA 鋳型上のプライマー伸長は、分子生物学における最も有用かつ強力な方法のいくつかに共通の工程である。これらの方法の一つであるポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) は、少量の原材料からマイクログラム量の DNA を産生するための迅速、安価かつ簡単な手段である。基本法に対して現在多くの変法が報告されており、ある範囲の学問分野に応用されている。

【0003】

医学において P C R は、遺伝病と癌の診断とスクリーニング、マイコバクテリウムと H I V の迅速な検出、白血病における小さな後遺症の検出、および H L A 型判定に、大きな影響を及ぼす。P C R 法はまた、法医学的病理および進化生物学において有用であり、ヒトゲノム計画において中心的役割を担い、そして分子生物学的プロセスでは日常的に使用されている (マクファーソン (McPherson) ら、1992)。

30

40

【0004】

しかし P C R 法の実際の使用は、しばしば困難や限界に直面する。元の 2 本鎖の原型 DNA をそして次に 2 本鎖 DNA 産物を、増幅のサイクルごとに 1 本鎖鋳型に変換する必要性は、通常 93 ~ 95 での DNA の熱変性により達成される。この DNA 変性は、その核酸塩基組成に大きく依存している。G C 高含量であると、融点の上昇と伸長したモチーフの安定な 2 次構造のため、DNA 増幅と配列決定が非常に困難である。G C 高含量の反復モチーフを含む領域の増幅による共通した結果は、所望の産物に対応しない追加の増幅産

50

物の存在である（バラダラジ（Varadaraj）とスキナー（Skinner）、1994）。さらに、不完全な変性では、DNA鎖が「スナップバック（snap back）」してしまい、これによって生成物の収率が低下する。変性工程が長時間および/または高温で行われると、酵素活性の不必要な消失やdNTPの分解を招く。

【0005】

PCRプロトコールにおいて普通に使用されるTaq DNAポリメラーゼは、典型的なDNA鎖の分離に必要な高温（94～95）への反復暴露によく耐え、このため、各サイクルにおいて酵素を加える必要がなくなるためPCR法が単純化される。しかしTaqポリメラーゼは、非熱安定性である、プルーフリーディングするエキソヌクレアーゼ活性を有する他のポリメラーゼ（例えば、クレノウおよびT7 DNAポリメラーゼ）に比較して、ミスマッチのプライマー/鋳型を伸長すると考えられる。

10

【0006】

プライマー伸長を利用する別の非常に有効な方法は、標的ヌクレオチド配列における核酸の順序を決定するために使用される、サイクル配列決定法である。この方法は、標的ヌクレオチド配列を配列決定しながら、プライマー伸長の反復サイクルを行う。

【0007】

PCR法に関して上述したものと同様の考察が、このサイクル配列決定法に適用される。配列決定反応でも同様に、鋳型DNAの完全な変性は、反応が成功するためには決定的に重要である。すなわち、反復モチーフ、GC高含量および硬質の2次構造を含むDNAの領域は、配列決定が困難である。さらに、ヌクレオチドの非常に長いストレッチ、または少量存在する標的ヌクレオチド配列の配列決定は、問題が多い。2本鎖DNAの完全な変性を達成し、かつTaqポリメラーゼまたは非熱安定性ポリメラーゼのいずれかを用いて低温で配列決定反応を実行できることは、収率と正確さの両方の面から有利である。

20

【0008】

PCRおよび配列決定反応の収率と特異性を改善するために、多くの緩衝化添加剤が利用された。DMSO（ポンプ（Pomp）とメドラノ（Medrano）、1991；フィリッキン（Filichkin）とゲルヴィン（Gelvin）、1992）、グリセロール（チェン（Cheng）ら、1994；米国特許第5,432,065号および5,545,539号）、ホルムアミド（コミー（Comey）ら、1991）およびベタイン（ドイツ特許DE4411594C1およびDE4411588C1；ミテルカ（Mytelka）ら、1996）のようなある種の共溶媒が、標準的PCRおよび/またはサイクル配列決定を促進することが証明された。DMSOは、鋳型DNAおよびオリゴヌクレオチドプライマーの融点（Tm）、および/または特定の「変性」での生成物鎖の分離の程度に影響を与え、さらにTaq DNAポリメラーゼの熱活性を改善することが示唆されている（ゲルフアンド（Gelfand）とホワイト（White）、1989）。グリセロールは、(i)95～97でのTaqポリメラーゼの熱安定性を二倍にし、そして(ii)DNA融点を有効に低下させる（グリセロール濃度が10%上昇するごとに2.5～3）ことにより、長い増幅に影響しうる（チェン（Cheng）ら、1994）；しかし、これらの緩衝化添加剤の使用は限定されており、例えば、20～40%の有効濃度でグリセロールを含む溶液は、粘性であり取り扱いが困難であり（米国特許第5,432,065号）、10%濃度のDMSOは、Taq DNAポリメラーゼ活性を53%阻害し、そしてT7 DNAポリメラーゼは、40%ホルムアミド中で完全に不活化される。

30

40

【0009】

エクトイン（ectoine）としても知られている化合物2-メチル-4-カルボキシ-3,4,5,6-テトラヒドロピリミジン[THP(B)]およびそのヒドロキシ誘導体の2-メチル-4-カルボキシ-5-ヒドロキシ-3,4,5,6-テトラヒドロピリミジン[THP(A)]は、数種のストレプトミセス属（Streptomyces）微生物における代謝物として、本発明の発明者らの実験室において以前同定された（インバー（Inbar）とラピドット（Lapidot）、1988a、1988bおよび1991；マリン（Malin）とラピドット（Lapidot）、1996）。エクトインはまた、種々の好塩菌および耐塩菌において

50

も見い出された(ガリンスキ(Galinski)ら、1985)。THP(B)とTHP(A)は、ストレプトミセス種の数種の微生物および大腸菌(E. coli)細胞の浸透圧保護および熱保護(thermoprotection)のような多くの有用な性質を有する(マリン(Malin)とラピドット(Lapidot)、1996)両性イオン性化合物である(インバー(Inbar)ら、1993;図1)。THP(B)とTHP(A)は、哺乳動物細胞にも動物にも毒性がない(ラピドット(Lapidot)ら、1995)。本出願人らのイスラエル特許第100810号、および対応する米国特許第5,789,414号およびヨーロッパ特許EP 0553884号は、THP(A)とTHP(B)が、非腫瘍組織におけるDNAと相互作用して、これらのDNAをDNA結合薬物による損傷から保護しており、このためこれらのTHPを、アドリアマイシンやアクチノマイシンDのようなDNA結合薬物の毒性効果を低下させるのに使用することができることを開示している。

10

#### 【0010】

プロリンは、塩分のストレスに対する応答として、植物、細菌、藻類および海洋無脊椎動物に蓄積する、もう1つの浸透圧保護剤である。プロリンは、DNAを不安定化し、二重らせんの安定性に及ぼす塩化ナトリウムおよびスペルミジンの作用を部分的に阻止し、そしてDNAの融点を濃度依存性に低下させることが証明された(ラジェンドラクマー(Rajendrakumar)ら、1997)。

#### 【0011】

上記参考文献のいずれも、PCR反応混合物への、およびヌクレオチド配列決定のための反応における添加剤としての、プロリン、THP(A)またはTHP(B)またはこれらの混合物の使用を記載または示唆していない。

20

#### 【0012】

(発明の要約)

本発明により、THP(B)は、2本鎖DNAの融点を低下させるのに有効であり、そしてプロリン、THP(B)およびTHP(A)は、高温でDNAポリメラーゼの熱安定性を増大させることができることが見い出され、このことは、これらが、プライマー伸長、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)増幅およびDNA配列決定におけるような、2本鎖DNAの融解および/またはポリメラーゼ介在性DNA合成を伴う操作において有用でありうることを示している。

#### 【0013】

すなわち1つの側面において本発明は、循環プライマー伸長反応を実施するための方法であって、

30

(i)ヌクレオチドの標的配列を含む鋳型DNAを、該標的配列の3'末端のヌクレオチド配列に相補的な少なくとも1つのプライマーオリゴヌクレオチドと、該プライマーを該標的配列上のその相補的ヌクレオチド配列にアニーリングさせる条件下で、該鋳型DNAおよび/または該プライマーの融点を低下させるためにプロリン、2-メチル-4-カルボキシ-3,4,5,6-テトラヒドロピリミジン[THP(B)]およびこれらの混合物から選択される浸透圧保護剤(osmoprotectant)の存在下で、接触させる工程;および(ii)ヌクレオチドの該標的配列への該プライマーのポリメラーゼ介在性伸長を、該ポリメラーゼを安定化するためにプロリン、THP(B)、2-メチル-4-カルボキシ-5

40

-ヒドロキシ-3,4,5,6-テトラヒドロピリミジン[THP(A)]およびこれらの混合物から選択される浸透圧保護剤の存在下で行い、こうして鋳型DNAのヌクレオチドの該標的配列へのプライマーの高収率で特異的な伸長を得る工程を含んでなる、上記方法を提供する。

#### 【0014】

工程(i)および(ii)は、複数回(例えば、10~90回、好ましくは15~35回)繰り返され、そして各工程(i)の前に、該鋳型DNAをその鎖に分離し、かつ工程(ii)のポリメラーゼ伸長プライマーをそのヌクレオチドの相補的標的配列から分離するのに適切な温度で、DNA熱変性が行われ、該温度は、工程(ii)において使用されるポリメラーゼが安定な温度である。

50

## 【 0 0 1 5 】

1つの実施態様において、本発明は、  
 工程 ( i ) において鋳型 DNA の標的配列は、配列決定すべきヌクレオチドの配列であり、  
 工程 ( ii ) におけるプライマーのポリメラーゼ介在性伸長は、標的 DNA のヌクレオチド配列の決定の前に、4つ全ての d N T P : d A T P、d C T P、d G T P および d T T P の存在下で、かつ少量の d d A T P、d d C T P、d d G T P または d d T T P のいずれかの存在下で行われる、標的 DNA のヌクレオチド配列を決定するための方法に関する。この d G T P は、E P 0 2 1 2 5 3 6 に記載される 7 - デアザ - d G T P に置換されてもよい。

## 【 0 0 1 6 】

本実施態様では、標的 DNA のヌクレオチド配列を決定するための方法は、  
 ( i ) 配列決定すべきヌクレオチドの標的配列を含む鋳型 DNA を、該鋳型 DNA をその鎖に分離するのに適切な温度で、プロリン、2 - メチル - 4 - カルボキシ - 3 , 4 , 5 , 6 - テトラヒドロピリミジン [ T H P ( B ) ] およびこれらの混合物から選択される浸透圧保護剤の存在下で加熱する工程；  
 ( ii ) 工程 ( i ) の該変性鋳型 DNA を、ヌクレオチドの該標的配列の 3 ' 末端のヌクレオチド配列に相補的なプライマーオリゴヌクレオチドと、該プライマーを標的配列上のその相補的ヌクレオチド配列にアニーリングさせる条件下で、プロリン、2 - メチル - 4 - カルボキシ - 3 , 4 , 5 , 6 - テトラヒドロピリミジン [ T H P ( B ) ] およびこれらの混合物から選択される浸透圧保護剤の存在下で、接触させる工程；  
 ( iii ) 工程 ( ii ) の該プライマーのポリメラーゼ介在性伸長を、4つのすべての天然の d N T P : d A T P、d C T P、d G T P ( または 7 - デアザ - d G T P ) および d T T P の存在下で、少量の d d A T P、d d C T P、d d G T P または d d T T P のいずれかの存在下で、かつプロリン、T H P ( B )、2 - メチル - 4 - カルボキシ - 5 - ヒドロキシ - 3 , 4 , 5 , 6 - テトラヒドロピリミジン [ T H P ( A ) ] およびこれらの混合物から選択される浸透圧保護剤の存在下で行う工程；  
 ( iv ) 工程 ( i ) ~ ( iii ) を複数回繰り返す工程；および  
 ( v ) 標的 DNA のヌクレオチド配列を決定する工程、  
 を含んでなる。

## 【 0 0 1 7 】

別の実施態様において、本発明は、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) によりヌクレオチドの標的配列を増幅するための方法であって、工程 ( i ) において鋳型 DNA の標的配列は、増幅すべきヌクレオチドの配列であり、そして鋳型 DNA は、ヌクレオチドの該標的配列の 3 ' 末端のヌクレオチド配列およびその反対鎖に相補的な2つのオリゴヌクレオチドプライマーと接触させ；工程 ( ii ) において工程 ( i ) のアニーリングしたプライマーのポリメラーゼ介在性伸長が行われ；工程 ( i ) ~ ( ii ) は、複数回繰り返され、最後の工程は工程 ( ii ) であり、こうしてヌクレオチドの標的配列の多数のコピーを作成する、上記方法を提供する。

## 【 0 0 1 8 】

本実施態様では、本発明は、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) によりヌクレオチドの標的配列を増幅するための方法であって、  
 ( i ) 増幅すべきヌクレオチドの標的配列を含む鋳型 DNA を、該鋳型 DNA をその鎖に分離するのに適切な温度で、プロリン、2 - メチル - 4 - カルボキシ - 3 , 4 , 5 , 6 - テトラヒドロピリミジン [ T H P ( B ) ] およびこれらの混合物から選択される浸透圧保護剤の存在下で加熱する工程；  
 ( ii ) 工程 ( i ) の鋳型 DNA を、ヌクレオチドの該標的配列の 3 ' 末端のヌクレオチド配列およびその反対鎖に相補的な2つのオリゴヌクレオチドプライマーと、プロリン、2 - メチル - 4 - カルボキシ - 3 , 4 , 5 , 6 - テトラヒドロピリミジン [ T H P ( B ) ] およびこれらの混合物から選択される浸透圧保護剤の存在下で、該オリゴヌクレオチドプライマーをヌクレオチドの該標的配列およびその反対鎖上のその相補的配列にアニーリン

10

20

30

40

50

グさせる条件下で、接触させる工程；

(iii) 工程(ii)のアニーリングしたプライマーのポリメラーゼ介在性伸長を、プロリン、THP(B)、2-メチル-4-カルボキシ-5-ヒドロキシ-3,4,5,6-テトラヒドロピリミジン[THP(A)]およびこれらの混合物から選択される浸透圧保護剤の存在下で行う工程；および

(iv) 工程(i)~(iii)を複数回繰り返す(最後の工程は工程(iii)である)、  
こうしてヌクレオチドの標的配列の多数のコピーを作成する工程、  
を含んでなる、上記方法に関する。

【0019】

本発明の方法は、GC高含量DNAを含む反応に特に有用であり、これによりGC高含量DNA分子の増幅および配列決定における困難さが、縮小または排除される。本方法は、工程(ii)または(iii)において熱安定性DNAポリメラーゼ(例えば、Taqポリメラーゼのクレンタック(Klentaq)1ポリメラーゼとPfuポリメラーゼ)、または非熱安定性DNAポリメラーゼ(例えば、T7 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼIのクレノウ断片、逆転写酵素、Bcaポリメラーゼ、Bstポリメラーゼおよびこれらのポリメラーゼの変異体)を含む反応にさらに有用である。

10

【0020】

別の側面において、本発明は、プロリン、THP(B)、THP(A)およびこれらの混合物から選択される浸透圧保護剤の、ヌクレオチド配列を決定するための反応における添加物、またはPCR反応混合物への添加物としての使用、並びに別々の容器に、(a) DNA配列決定に必要な試薬またはポリメラーゼ連鎖反応に必要な試薬、および(b)プロリン、THP(B)またはTHP(B)を含んでなるキットに関する。

20

【0021】

さらなる側面において、本発明は、2本鎖DNA(dsDNA)の融点を低下させるための方法であって、該dsDNAのインキュベーション混合物に有効量のTHP(B)を加えることを含んでなる方法に関する。

【0022】

さらなる側面において、本発明は、高温でDNAポリメラーゼの安定性を増大させるための方法であって、該ポリメラーゼのインキュベーション混合物に、プロリン、THP(B)、THP(A)およびこれらの混合物から選択される有効量の浸透圧保護剤を加えることを含んでなる方法に関する。

30

(発明の詳細な説明)

本明細書において使用される「プライマー伸長」という用語は、鋳型DNAに含まれるヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドの長さを増大させるプロセスを意味する。本プロセスは、オリゴヌクレオチドの3'末端に、相補的鋳型DNA鎖の対応する位置に存在するヌクレオチドにより指令される単一のヌクレオチドを反復して添加することからなる。「循環プライマー伸長」という用語は、プライマー伸長が周期的加熱と交互に行われ、それによって鋳型DNA鎖からの伸長したプライマーの分離が起こる、反復サイクルを伴う操作を意味する。

【0023】

2本鎖DNA(sdDNA)の「融点(Tm)」という用語は、50%のdsDNA試料が、その2つの相補的DNA鎖に分離される温度を意味する。

40

【0024】

「増幅」という用語は、ヌクレオチドの特定配列の反復複製により、ヌクレオチドの該特定配列の量が増加することを意味する。

【0025】

「配列決定」という用語は、標的ヌクレオチド配列中でヌクレオチドが出現する順序を決定する操作を意味する。

【0026】

「標的ヌクレオチド配列」という用語は、複製、増幅または配列決定することが意図され

50

るヌクレオチド配列を意味する。

【 0 0 2 7 】

「鑄型 DNA」という用語は、任意の起源またはヌクレオチド組成の DNA 分子またはその断片を意味し、これは上記と定義した標的ヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 2 8 】

本発明により、THP (B) もしくはプロリンまたはこれらの混合物は、dsDNA の融点を有意に低下させ、そして単独または組合せたプロリン、THP (B) または THP (A) は、高温でインキュベートされる DNA ポリメラーゼの安定性を増大させることができる。

【 0 0 2 9 】

本発明に使用するための THP (B) と THP (A) は、例えば、ストレプトミセス (*Streptomyces*) 種のアクチノマイシン D 産生微生物 (例えば、エス・パルブルス (*S. parvulus*)、エス・クリスマルス (*S. chromomalus*)、またはエス・アンティビオティクス (*S. antibioticus*)) のような、天然の供給源から単離することができ、そして IL 特許第 100810 号および対応する US 5,789,414 および EP 0553884 に記載したように精製された形で分離することができる。単独の THP (B) は、エクトチオロドスピラ (*Ectothiorhodospira*) 属の好塩菌や耐塩菌 (例えば、イー・ハロクロリス (*E. halochloris*)、イー・ハロフィラ (*E. halophila*) およびこれらの変異体) から、または高塩条件下で増殖させたハロモナス (*Halomonadaceae*) 科の従属栄養性好塩性真正細菌から単離および精製することができる。単独の THP (A) は、ストレプトミセス (*Streptomyces*) 種の土壌微生物 (例えば、エス・クラブリゲルス (*S. clavuligerus*)、エス・グリセウス (*S. griseus*) およびこれらの変異体) から、0.25 ~ 0.5 M NaCl のような低塩ストレス下で単離および精製することができる。THP (B) はまた、日本特許出願第 63-259827 号に記載したように合成により生成することができる。

【 0 0 3 0 】

L-プロリンは、市販されているか、または合成により高度に精製された形で生成および獲得することができる普通のアミノ酸である。

【 0 0 3 1 】

本発明により、THP (B) は、6 ~ 8 量体という長さのオリゴヌクレオチドの  $T_m$ 、およびゲノム DNA、cDNA または組換え DNA 分子のいずれかである dsDNA の  $T_m$  を、0.5 ~ 4 M の範囲の濃度で濃度依存性に低下させることが見いだされた。短いオリゴヌクレオチド (6 または 8 量体) の融点は、0.5 M および 1.0 M THP (B) の存在下で 3 ~ 6 低下した。

【 0 0 3 2 】

$T_m$  低下の程度は、特定のオリゴヌクレオチドまたは dsDNA の GC 含量に依存し、GC 高含量ではより著しい。例えば、THP (B) の存在下での、ウシ胸腺 DNA (GC 42%) およびマイクロコッカス・リソデイクチクス (*Micrococcus lysodeikticus*) DNA (GC 含量 72%) の  $T_m$  低下は、クロストリジウム・パーFRINGENS (*Clostridium perfringens*) DNA (GC 含量 26%) よりも有意に高かったが、一方合成オリゴヌクレオチドのポリ (dA - dT) の  $T_m$  では、4 M という高い濃度の THP (B) の存在下で何ら変化はなかった。4.0 M 濃度の THP (B) で、異なる GC 含量の DNA は、非常に狭い温度範囲 (40 ~ 43) で融解するが、THP (B) が存在しないときは融点は 39 ~ 75 の範囲である。THP (B) による DNA 分子のイソ安定化 (isostabilization) は、AT 高含量 DNA に比べて大きな GC 高含量の不安定化の結果として説明しうる。THP (B) は、DNA 融解への DNA 塩基対組成依存性を排除する。

【 0 0 3 3 】

DNA 融点を低下させることが知られている (ラジェンドラクマール (Rajendrakumar) ら、1997) プロリンは、本発明により、クレノウポリメラーゼの酵素活性をほんのわずかに低下させるのみであり、かつグリセロールよりも良好なクレノウポリメラーゼの安

10

20

30

40

50

定化剤であること（5 M L - プロリン中65 ではこの酵素の半減期は21分）が見い出された。これらの知見は、比較的GC高含量のゲノムDNA鋳型のためのPCRプロトコルの、設計の成功を可能にした。dGTPの代わりに7 - デアザ - dGTPを使用すると、変性温度の低下が予想されるため、本明細書に提示したプロトコル中のクレノウポリメラーゼの量（10～15単位）は、さらに減少させることができる。本明細書の結果は、クレノウポリメラーゼに安定性を与えるには3～5.5 Mの範囲のプロリン濃度で充分であることを明らかにしている。

#### 【0034】

プロリンは、本プロトコルにおいて単一の添加剤として、またはポリメラーゼが許容するグリセロール若しくは任意の他のDNA不安定化試薬（例えば、THP（B）またはTHP（A））と組合せて使用することができる。プロリン（5.0 Mまで）は、種々のDNAの融点（ $T_m$ ）を低下させ、そしてDNAの部分的「イソ安定化」（ $dT_m/dGC$ ファクターの明白な線形低下により示される、GC対とAT対の間の $T_m$ の差の低下）（メルキオル（Melchior）ら、1973；リーズ（Rees）ら、1993）をもたらすが、高濃度では、プロリンはGC対とAT対を対等に不安定化する。ベタン（betane）（リーズ（Rees）ら、1993）やTHP（B）（AT対とGC対の同等の安定性、 $dT_m/dGC = 0$ ）の場合のように、プロリンではDNAの完全な「イソ安定化」は得られなかった。試験した天然のDNAの $T_m$ 値（57～78）は、6.2 Mプロリンの存在下で28～32の狭い範囲に低下した。高濃度のプロリンによるDNAの部分的「イソ安定化」は、20～25塩基対プライマーを使用するとき、PCRの特異性を低下させることがある。

#### 【0035】

本明細書に記載のPCRプロトコルで使用される30～35塩基対長のプライマーは、高濃度のプロリンで低下したプライミングの特異性を改善し、増幅の良好な選択性を達成するのに有効であることが見い出された。

#### 【0036】

標準的PCRおよびDNA配列決定の他に、プロリンを用いるプロトコルは、以下の方法に対して興味深い：a）比較的少量の供給源DNAを利用する、隣接するヘキサマープライマーおよび特異的プライマー形成のための1本鎖DNA結合タンパク質（キーレクザワ（Kieleczawa）ら、1992）と組合せたクレノウポリメラーゼの使用；b）低い変性温度サイクルは、DNA配列決定またはPCRのための熱安定性の低い標識の使用を可能にするかも知れない。このアプローチは、PCRおよび他のDNA増幅法における他の熱不安定なポリメラーゼのために有用であろう。例えば、GC高含量DNAおよび安定な2次構造を有する領域を増幅することができるT7 DNAポリメラーゼおよびその修飾物は、長いCGGトリプレット反復配列の増幅のような、今日の実際的PCRおよびDNA配列決定法では未解決のケースへの解決策を提供することができるであろう。循環PCRへのT4ポリメラーゼの導入は、高い忠実度を必要とするケース（例えば、検出すべき多サイクルの増幅を必要とする、非常に低い頻度で存在する配列の増幅）には重要であろう。

#### 【0037】

本発明により、プロリン、THP（B）およびTHP（A）は、単独または組合せて、高温でインキュベートされた熱安定性および非熱安定性DNAポリメラーゼの両方を安定化することができること（安定化作用は、酵素が長時間、これらの最適活性の温度よりも高温でインキュベートされるときに、より明白である）が、さらに見い出された。95の典型的なDNA変性温度下で30～35分インキュベーション後、熱安定性Taqポリメラーゼは、わずか50%の活性であり、そして97で30分のインキュベーション後は、わずか10%の活性であるが、これに比較して1 M THP（B）の存在下では40%、そしてTHP（A）の存在下では55%といっそう高い。さらに劇的な作用は、長いインキュベーション時間（60分）で得られるが、ここで残存活性は、添加剤なしでは5%未満であり、そしてTHP（A）の存在下では55%である（10倍高い）。非熱安定性

10

20

30

40

50

ポリメラーゼは、熱不活化にさらに感受性であり、例えば、クレノウDNAポリメラーゼの半減期は、65 で約30～50秒であるのに、5Mプロリンの存在下では25分と約30～50倍長い。

【0038】

好ましい実施態様において、任意の鋳型DNAの循環プライマー伸長は、0.5～3.5M THP(B)の存在下で、場合により0.5～3.0M THP(A)または1～5Mプロリンと共に、60～80 で熱安定性Taqポリメラーゼにより、あるいは1～3M THP(B)の存在下で、場合により0.5～3.0M THP(A)または1～5Mプロリンと共に、30～65 で非熱安定性ポリメラーゼにより行われる。

【0039】

プロリンおよび/またはTHP(B)によりdsDNAのTmを低下させることと、プロリン、THP(B)および/またはTHP(A)によるDNAポリメラーゼの安定化は、DNA配列決定やPCR法のような、DNA融解とポリメラーゼ介在性DNA合成の工程を含んでなる循環プライマー伸長法にとって有益であり、これによって、低温でのdsDNA変性、すなわちdsDNAのその2つの相補鎖への分離の高収率と、DNAポリメラーゼの高性能がもたらされる。

【0040】

特定の循環プライマー伸長反応において使用される浸透圧保護剤の濃度は、具体的な鋳型DNA、プライマー、DNAポリメラーゼおよび利用される反応条件に依存する。平均的GC含量のDNAのTmを低下させるためには、低濃度のTHP(B)またはプロリン(典型的には約0.5～1.5M)が好ましく、一方GC高含量のDNAには、Tm(よって利用される変性温度)をさらに低下させるために、高濃度(典型的には1～3M)が好ましい。プライマー/鋳型DNAの顕著な解離を回避するために、DNAのTmを40～55 の範囲まで低下させるのに高濃度のTHP(B)(3～4M)およびプロリン(4～5M)が使用されるとき、少なくとも30ヌクレオチドのプライマーが使用される。これらの修飾は、アニーリングと反応の収率を改善する。

【0041】

DNA配列中の微妙な変化の検出や、小さな突然変異により引き起こされるいくつかの遺伝病や癌のPCRの型判定や診断プロセスにおけるようなDNA増幅の正確さが決定的に重要なケースでは、T7 DNAポリメラーゼまたはクレノウのような非熱安定性DNAポリメラーゼの使用は、これらのDNA複製における高い忠実度とブルーフリーディング能力のために重要である。

【0042】

低い温度でのプライマー伸長反応の実施もまた、化学ルミネセンス検出のような高感度測定法によるヌクレオチドの相補的標的配列の検出におけるプローブとして使用するために新たに合成したDNA鎖を標識するための、熱感受性蛍光性および他の不安定化合物の使用を可能にする。

【0043】

PCRで使用される反応条件は、鋳型DNAとプライマーの性質に応じて変化し、そして最適pHおよび塩とマグネシウムイオン濃度は、各特定の反応について通常経験的に決定される。典型的なPCR法は、各PCRサイクルにおいて(i)DNA変性；(ii)プライマーアニーリング；および(iii)プライマー伸長の3工程を達成するための適切な条件を提供するための温度サイクルを伴う。

【0044】

94～95 で0.5～2分間の標準的変性インキュベーション工程(i)は、平均的GC含量のDNA鎖を、元のDNAおよび新たに合成したDNAから分離するのに通常充分である。プライマーアニーリング工程(ii)は、プライマー-鋳型DNA2本鎖の融点よりも通常約5 低い温度で行われる。しかし目的産物の他に非特異的PCR産物が得られるならば、アニーリング温度を上昇させるべきである。鋳型鎖に相補的な新しいDNA鎖を合成するためその3'末端でアニーリングしたプライマーの伸長(工程(iii))は、

10

20

30

40

50

熱安定性酵素のTaqポリメラーゼにより70～75℃で通常行われるが、この温度は、酵素活性の最適温度範囲である(2～4Kb/分)。

【0045】

特に最初の増幅サイクルでのDNA鋳型の完全な変性は、PCR法において最も重要であり、そうでなければ、以後の反応工程の鋳型としての有用性が低下し、PCR産物の収率が低くなる。このことは、増幅したDNA2本鎖が、非常に高いGC含量を有しているため鎖の分離が困難であるとき、または最初の反応混合物中に標的ヌクレオチド配列が少量存在するときに特に当てはまる。すなわち、DNA鋳型のT<sub>m</sub>を有意に低下させる溶質を含むPCR緩衝液は、PCR法において非常に重要である。PCR法へのプロリン、THP(B)、THP(A)またはこれらの混合物の添加は、3つのレベルで有益である：(i)増幅DNA産物の収率の上昇；(ii)感度の上昇；および(iii)反応の特異性の上昇。オリゴヌクレオチドプライマーと鋳型DNAのT<sub>m</sub>を低下させるプロリンとTHP(B)の作用によって、反応の鋳型DNA、プライマーおよび酵素のさらに効率的な使用ができて、高収率のPCR増幅DNA産物が得られる。さらに、添加剤の存在下でのPCR測定法の感度の上昇によって、その非存在下では検出できない標的DNA配列の検出が可能になる。これは、非常に稀であるかまたは長い標的配列を増幅しようとする場合特に顕著である。さらに添加剤はまた、非特異的産物を有意に減少させるかまたは排除することにより、PCR増幅の質を改善する。プロリン、THP(B)および/またはTHP(A)の存在下でのPCRの正確さの改善によって、反応産物の質を損なうことなく、サイクルの数を増加させサイクルの時間を長くして、PCRプロトコールを実施することができる。

10

20

【0046】

別の実施態様において、本発明は、DNAポリメラーゼと有効量のプロリン、THP(B)および/またはTHP(A)の存在下で、DNA配列決定を可能にする条件下で、鋳型DNAを、標的DNA上の特異的配列と相同なプライマーに接触させることを含んでなるサイクルDNA配列決定のための方法を提供する。

【0047】

サンガー(Sanger)またはジデオキシ配列決定法として知られている一般に使用されるサイクルDNA配列決定プロトコールは、典型的には2本鎖鋳型DNAの単離、これの成分1本鎖への分離、標的DNA上のヌクレオチドの配列に相同な配列決定プライマーの添加、および標的DNAへの該プライマーの循環プライマー伸長の実施を含む。循環プライマー伸長は、4つの並行する反応において実施される(それぞれ、少量のジデオキシヌクレオチド三リン酸(ddATP、ddCTP、ddGTPまたはddTTPのいずれか)を、普通DNA合成に必要とされるモル過剰の4つのデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)(すなわち、dATP、dCTP、dGTPまたはdTTP)と共に含む)。伸長したDNA鎖の成長は、ddNTP分子がここに組み込まれると停止し、こうして種々の長さの一連の伸長産物を生成する。4つの伸長反応のこれらの伸長産物が、例えばポリアクリルアミドゲル上で一緒に分離されるとき、1つのパターンが得られる。標識プライマーまたは標識ddNTP(典型的には放射活性または蛍光)を使用することにより、例えば、オートラジオグラフィ、蛍光検出機などによってこのパターンを監視することができ、そしてDNA配列を決定することができる。

30

40

【0048】

サイクルDNA配列決定はまた、サイクルプライマー伸長を伴うため、配列決定の結果は、PCRに関して上述したものと同様な基準により影響される。鋳型DNAとプライマーの変性の程度、およびポリメラーゼの性能は、配列決定反応の感度と正確さに決定的に重要である。サイクルDNA配列決定法を実施するための正確な反応条件および添加される浸透圧保護剤の有効濃度は、鋳型DNA、プライマー、配列決定すべき標的DNA、および特定の反応に使用されるDNAポリメラーゼに応じて変化する。

【0049】

プロリン、THP(B)および/またはTHP(A)の存在下で行われる本発明のサイク

50

ル配列決定は、有益かつ感度の高い手段である。この浸透圧保護性添加剤によって、より長いストレッチのヌクレオチドの配列を単一反応において得ることができ、さらには例えば、法医学的病理および進化生物学において使用される血液または組織の限定された試料中に存在する少量のDNAを配列決定することができる。さらに、従来の反応混合物を使用して配列決定することが非常に困難なある種のGC高含量DNA、または複雑であるかまたは硬質の2次構造の他のDNAを、こうしてうまく配列決定することができる。添加剤の存在下では、プライマーアニーリングの特異性が増大し、かつ非特異的伸長産物がほぼ排除されるため、稀な突然変異の検出が可能になる。これは、遺伝子ヌクレオチド配列における小さな突然変異を特徴とする疾患の診断、またはハンチントン病のような、多くのヒトの障害を示す高いCGG反復の同定において、特に重要である（ハン(Han)ら、1994）。

10

## 【0050】

本発明の、PCRによりDNA増幅を実施するため、またはDNAサイクル配列決定のためのキットは、それぞれPCRまたはDNA配列決定のために必要な試薬（例えば、適切な緩衝液、dNTP、Taqまたは非熱安定性ポリメラーゼなど）と、別々の容器に、場合によりTHP(A)またはプロリンと共に、THP(B)を含む。

## 【0051】

(例)

材料と方法

(i)材料

20

例1~4のために、マリン(Malin)とラピドット(Lapidot)(1996)に従ってTHP(A)およびTHP(B)を調製し、使用前にその水溶液をケレックス(chellex)カラムに通して2価カチオンを除去した。使用前にベタイン(シグマ(Sigma))を水に溶解してケレックスカラムに通した。Taq DNAポリメラーゼ(組換え)およびDNAポリメラーゼIのクレノウ断片(10単位/ $\mu$ l)は、MBIファーマentas(MBI Fermentas)から購入し、ウシ胸腺DNA(DNA融解例において使用される)および活性化ウシ胸腺DNA(ポリメラーゼ活性測定法において使用される)、マイクロコッカス・リソデイクチクス(Micrococcus lysodeikticus)DNA、クロストリジウム・パーフリンジエンス(Clostridium perfringens)DNAおよびポリ(dA-dT)は、シグマ(Sigma)から購入した。オリゴヌクレオチド[d(ATGCAT)]<sub>2</sub>と[d(GCTTAA GC

30

1. 5'&gt; CGG GAT CCA TGG AAT ACG TAT ACG CTG C &lt;3'

2. 5'&gt; CGG AAT TCT TAG CCG AAG AGT TCG CCG A &lt;3'

## 【0052】

例5~9のために、L-プロリン99+%と99.5+%は、それぞれシグマ(Sigma)とフルカ(Fluka)から購入し、グリセロールはBDHから購入した。活性化ウシ胸腺DNAとウシ胸腺DNAは、シグマ(Sigma)から入手した。Taq DNAポリメラーゼ(組換え)およびDNAポリメラーゼIのクレノウ断片(10単位/ $\mu$ l)は、MBIファーマentas(MBI Fermentas)から購入し、クレンタック(Klentaq)1 DNAポリメラーゼは、ABペプチド(AB Peptides)から、そしてPfu DNAポリメラーゼ(クロン化)は、ストラタジーン(Stratagene)から購入した。ハロバクテリウム・マリスマルツイ(Halobacterium marismortui)ゲノムDNA鋳型は、シュラミス・ヴァインシュタイン博士(Dr. Shulamith Weinstein)(生物結晶化のキメルマン実験室(Kimmel Laboratory of Biocrystallization)、ヴァイツマン科学研究所(Weizmann Institute of Science))から寄贈された。

40

## 【0053】

2対のプライマーを例7~9において使用した：それぞれ22個の相補的ヌクレオチドを持ち、末端制限部位を持つ、2つの28量体プライマー3と4(プライマー3はBamH

50

I 制限部位を含み、プライマー 4 は E c o R I 制限部位を含む)、および全 30 個の相補的ヌクレオチドを持つ 2 つの 30 量体プライマー 5 と 6 :

- 3 . 5' > CGG GAT CCA TGG AAT ACG TAT ACG CTG C < 3'
- 4 . 5' > CGG AAT TCT TAG CCG AAG AGT TCG CCG A < 3'
- 5 . 5' > ATG GAA TAC GTA TAC GCT GCA CTC ATC CTG < 3'
- 6 . 5' > TTA GCC GAA GAG TTC GCC GAG GCC CTC ACC < 3'

#### 【 0 0 5 4 】

例 1 ~ 9 のための全てのオリゴヌクレオチドとプライマーは、ヴァイツマン科学研究所 (Weizmann Institute of Science) (レホヴォト、イスラエル) の化学サービスユニット (Chemical Service Unit) により調製され、これらの溶液濃度は、UV 吸光度により 260 nm で測定した。

#### 【 0 0 5 5 】

##### (ii) DNA 融解実験

DNA 融解試験は、5.0 mM  $K_2HPO_4$  と 0.1 mM  $Na_2EDTA$  を含む pH 7.5 の緩衝液 (1 ml) 中で行った。この緩衝液と THP (B) またはプロリン溶液は、DNA の添加の前に、0.22  $\mu$ m ミリポア (Millipore) 膜フィルターで濾過し、次に室温でヘリウムにより脱気した。DNA 試料は、 $OD_{260}$  0.2 に調整して、すでに報告された (リーズ (Rees) ら、1993) ように使用前に 37 °C で一晩インキュベートした。THP (B) またはプロリンを含む上記緩衝液および含まない緩衝液中の DNA は、1 cm 光路の、テフロン栓をした石英セル中で測定し、最初の測定温度で 5 分間インキュベートした。260 nm の吸光度の上昇は、温度プログラマーとコントローラーに取り付けたヒューレットパッカー (Hewlett Packard) 9450 A ダイオードアレイ分光光度計で監視した。試料セルと参照セルの両方とも一緒に 0.5 °C / 分の速度で加熱して、0.5 °C 上昇ごとに正味の吸光度を記録した。T<sub>m</sub> は、温度に対する吸光度のプロフィールの midpoint から線図によって求めた。

#### 【 0 0 5 6 】

##### (iii) 化学シフト変化の NMR 測定

ブルーカー (Bruker) AMX 400 NMR MHz 分光計で 400.13 MHz で <sup>1</sup>H NMR 測定を行った (アスペクト (Aspect) 300 コントロールが装備されている)。<sup>1</sup>H NMR 測定のために、1.0 mM DNA オリゴヌクレオチドを、50 mM NaCl と 0.1 mM EDTA を含む、0.5 ml の D<sub>2</sub>O 中のリン酸緩衝液 (pH 7.2) ([d(ATGCAT)]<sub>2</sub> では 20 mM、そして [d(GCTTAAGC)]<sub>2</sub> では 40 mM) に溶解した。この溶液を凍結乾燥し、次に 0.5 ml D<sub>2</sub>O (99.96%) に再溶解して、65 °C に加熱し、ゆっくり 5 °C に冷却し、次いで室温でアルゴンにより脱気した。

#### 【 0 0 5 7 】

##### (iv) クレノウ DNA ポリメラーゼ活性測定

本測定は、37 °C で、6.7 mM トリス - HCl (pH 7.4)、1.0 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、5.2 nM [<sup>32</sup>P] dATP、6.4  $\mu$ M dATP と 320  $\mu$ M のそれぞれ dCTP、dGTP、dTTP、0.6 mM 活性化ウシ胸腺 DNA、および THP では 6.7 mM MgCl<sub>2</sub> またはプロリンでは 6.7、10.0 および 15 mM MgCl<sub>2</sub> を含む、15  $\mu$ l の反応混合物中で行った。クレノウ断片 (0.1 単位) は、37 °C に予熱した反応混合物と共にマイクロチューブに加え、そして 37 °C で 7.5 分のインキュベーション後 (別の実験 (示していない) で求められた線形速度論の範囲内の時点)、反応マイクロチューブを氷上に静置し、12  $\mu$ l の 50 mM EDTA を添加して反応を停止させ、次にクロマトグラフィー紙 (ワットマン (Whatman) 3 番) のストリップに適用した。ストリップは冷 TCA 10% により 3 回洗浄し、乾燥して放射活性を計測した。

#### 【 0 0 5 8 】

(v) 高温での THP (A) または THP (B) とのインキュベーション後の Taq ポリメラーゼの残存活性の測定

Taqポリメラーゼ(0.5単位)を、10mMトリス-HCl(25 でpH8.8)、2.5ngハロバクテリウム・マリスモルツイ(Halobacterium marismortui)ゲノムDNA鋳型、各2mMのdNTP(dATP、dCTP、dGTPおよびdTTP)、各0.12nMの上記セクション(i)に記載した2つの28量体オリゴヌクレオチド1と2、50mM KCl、0.08%ノニデット(Nonidet)P40、および1.0mM MgCl<sub>2</sub>を含む、50μl緩衝液に加えた。THP(B)、THP(A)またはグリセロールは、3M原液から加えた(25 でpH8.8)。反応混合物をパラフィン油で覆い、95 または97 でインキュベートした。異なる時点でポリメラーゼ活性測定のために、アリコート(7.5μl)をとった。

【0059】

(vi) プロリンと65 でインキュベーション後のクレノウDNAの残存活性の測定  
クレノウDNAポリメラーゼ(0.5単位)を、67mMトリス-HCl(25 でpH7.4)、2.5ngハロバクテリウム・マリスモルツイ(Halobacterium marismortui)ゲノムDNA鋳型、各4μMのdNTP(dATP、dCTP、dGTPおよびdTTP)、各0.12nMの上記セクション(i)に記載した2つの28量体オリゴヌクレオチド3と4、6.7mM MgCl<sub>2</sub>を含む50μl緩衝液中で65 で、5.0Mグリセロールまたはプロリンの非存在下または存在下のいずれかでインキュベートした。トリス-HCl緩衝液、鋳型DNA、dNTP、プライマーおよびMgCl<sub>2</sub>をPCRマイクロチューブに加え、スピード真空により蒸発乾固して、それぞれの容量の水、プロリン(5.5M原液から)またはグリセロール(5.5M原液から)を加えた。マイクロチューブをボルテックス混合して、クレノウ酵素を試料に加えた。図11に記載の異なる時点でポリメラーゼ活性測定のために、アリコート(5μl)をとった。クレノウDNAポリメラーゼ活性測定は、上記セクション(iv)に記載されるように6.7mM濃度のMgCl<sub>2</sub>で実施した。各アリコート(5μl)に、他の全ての成分を含む20μlの原液を加えて、25μlの総容量およびアリコートの5倍希釈とした。すなわち、ポリメラーゼ測定法におけるプロリンおよびグリセロール濃度は、別の実験でクレノウポリメラーゼ活性について刺激性であることが証明されている(データは示していない)1.0Mであった。

【0060】

(vii) THP(B)を用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法  
PCRは、3ng鋳型DNA、各0.12nMの上記セクション(i)に記載した28量体オリゴヌクレオチドプライマー1と2、0.5単位Taq DNAポリメラーゼ、各200μMのdNTPを、10mMトリス-HCl(25 でpH8.8)、50mM KCl、0.08%ノニデット(Nonidet)P40を含むPCR緩衝液の中に含む25μlの反応混合物中で行った。THP(B)の非存在下および存在下で、それぞれ1.0mMおよび1.75mMのMgCl<sub>2</sub>濃度を使用して、3M原液から加えた(25 でpH8.8)。反応混合物をパラフィン油で覆い、それぞれの変性温度で3分間予熱し(94 で3分間予熱した、Td 95 で行われた反応の混合物を除く)、次に以下のとおり35回の熱サイクルに供した：(i)各実験に記載の89~95 で30秒間インキュベーション(変性工程)；(ii)55 で30秒間インキュベーション(アニーリング工程)；および(iii)72 で60秒間インキュベーション(プライマー伸長)。

【0061】

(viii) クレノウDNAポリメラーゼを使用するプロリンの存在下のPCR  
PCRは、100ngハロバクテリウム・マリスモルツイ(Halobacterium marismortui)ゲノムDNA鋳型、各0.12nMの上記セクション(i)に記載した30量体オリゴヌクレオチドプライマー5と6、10または15単位のクレノウDNAポリメラーゼ、各0.9mMのdNTPを、10mMトリス-HCl(25 でpH7.4)および15mM Mg(OAc)<sub>2</sub>を含むPCR緩衝液の中に含む25μlの反応混合物中で行った。トリス-HCl緩衝液、鋳型DNA、dNTP、プライマーおよびMg(OAc)<sub>2</sub>をPCRマイクロチューブに加え、スピード真空により蒸発乾固して、22μlのプロリン-グリセロール溶液(グリセロールの12.5%w/v水溶液中に5.5MのL-プロリン)に溶解した。

10

20

30

40

50

反応混合物を75℃で3分間予熱し、次に以下のとおり35回の熱サイクルに供した：(i)70℃で20秒間インキュベーション(変性工程)；(ii)37℃で4分間インキュベーション(プライマーアニーリングおよびプライマー伸長工程)。50%w/vグリセロールを含む、3μl容量まで希釈したクレノウDNAポリメラーゼ(10または15単位)は、37℃での最初のプライマーアニーリング工程中に加えた。

【0062】

(ix) Taq DNAポリメラーゼを使用するプロリンの存在下のPCR  
PCRは、3ngのハロバクテリウム・マリスモルツイ(Halobacterium marismortui)ゲノムDNA鋳型、各0.12nMの上記セクション(i)に記載した28量体オリゴヌクレオチドプライマー3と4、0.5単位のTaq DNAポリメラーゼ、各200μMのdNTPを、10mMトリス-HCl(25℃でpH8.8)、50mM KCl、0.08%ノニデット(Nonidet)P40を含むPCR緩衝液中に含む25μlの反応混合物中で行った。1.0M L-プロリンの非存在下および存在下で、それぞれ1.0mMおよび1.8mMのMgCl<sub>2</sub>濃度を使用した。L-プロリンは、25℃でpH8.8に調整した5.5M原液から加えた。反応混合物は、それぞれの変性温度で3分間予熱し(94℃で3分間予熱した、Td95℃で行われた反応を除く)、次に以下のとおり35回の熱サイクルに供した：(i)各実験に記載の91~95℃で30秒間インキュベーション(変性工程)；(ii)55℃で90秒間インキュベーション(プライマーアニーリング工程)；および(iii)72℃で60秒間インキュベーション(プライマー伸長)。

【0063】

(x) クレンタック(Klentaq)1とPfu(またはVent)DNAポリメラーゼの混合物を使用するプロリンの存在下のPCR  
PCRは、250ngのハロバクテリウム・マリスモルツイ(Halobacterium marismortui)ゲノムDNA鋳型、各0.12nMの上記セクション(i)に記載した30量体オリゴヌクレオチドプライマー5と6、報告されている(バーズ(Barnes)、1994)ように調製した0.3μlのクレンタック(Klentaq)1とPfu(またはVent)酵素混合物、各200μMのdNTPを、10mMトリス-HCl(25℃でpH8.3)および50mM KClを含むPCR緩衝液中に含む25μlの反応混合物中で行った。4.0M L-プロリンの非存在下および存在下で、それぞれ1.0mMおよび14.5mMのMg(OAc)<sub>2</sub>濃度を使用した。L-プロリンは、25℃でpH8.3に調整した5.5M原液から加えた。反応混合物は、それぞれの変性温度で1分間予熱し(94℃で1分間予熱した、Td95℃で行われた反応を除く)、次に以下のとおり35回の熱サイクルに供した：(i)各実験に記載の72~95℃で30秒間インキュベーション(変性工程)；(ii)各実験に記載の37~55℃で90秒間インキュベーション(プライマーアニーリング工程)；および(iii)各実験に記載の63~69℃で7分間インキュベーション(プライマー伸長)。

【0064】

例1：THP(B)の存在下のDNA融解

ウシ胸腺DNA(GC42%)の融解プロファイルに及ぼすTHP(B)の異なる濃度の作用を試験した。融解実験は、材料と方法、セクション(ii)に記載したように、0.8M、2M、3Mおよび4M THP(B)の非存在下または存在下で行った。

【0065】

図2に示すように、THP(B)の添加は、DNA融解温度を有意に低下させ、その転移プロファイルを鋭くした。水溶液中のDNA融解温度の62℃は、3または4M THP(B)の存在下では41℃まで低下した。

【0066】

DNA融解温度に及ぼすTHP(B)の効果は、マイクロコッカス・リソデイクチクス(Micrococcus lysodeikticus)およびクロストリジウム・パーフリンジェンス(Clostridium perfringens)DNA(それぞれGC72%および26%)、および合成ポリ(dA-dT)のような、異なる塩基組成の他のDNAでも検討した。図3に示すように、種々の

DNAの融点(T<sub>m</sub>)は、インキュベーション混合物中のTHP(B)濃度が上昇するにつれて低下した。この効果は、GC高含量DNAについて著しい。オリゴヌクレオチドのポリ(dA-dT)は、1~4M THP(B)の存在下で融点に何ら変化を示さなかったが、3~4M THP(B)は、DNAの熱融解の塩基対組成依存性を排除した。図3に示すように、4M THP(B)の存在下で、広範なGC含量の全てのDNAは、非常に狭い温度範囲(40~43)で融解し、一方THP(B)が存在しないとき、融点は39~75の範囲であった。THP(B)によるこのイソ安定化効果は、AT高含量DNAよりもGC高含量DNAを大きく不安定化する結果として説明することができよう。

【0067】

例2：THP(B)の存在下の短いオリゴヌクレオチド融解

10

短いオリゴヌクレオチド[d(ATGCAT)]<sub>2</sub>(図4A)および[d(GCTTAGC)]<sub>2</sub>(図4B)の熱転移を、0.5M(白丸)および1.0M(黒四角)THP(B)の存在下および非存在下(白四角)で試験した。[d(ATGCAT)]<sub>2</sub>のC4H5プロトンおよび[d(GCTTAGC)]<sub>2</sub>のG1H8プロトンのNMR化学シフト変化を、材料と方法、セクション(iii)に記載したように温度上昇の関数として測定した。これらの実験の結果は、図4A~Bに図示し、表1に要約する。

【0068】

【表1】

表1

20

オリゴヌクレオチド	T <sub>m</sub> (°C)			
	DNA	DNA-THP(B)		
		0.5M	1.0M	1.0M
[d(ATGCAT)] <sub>2</sub>	31.5	29.5	28.0	29.2
[d(GCTTAGC)] <sub>2</sub>	48.0	45.0	42.0	-

【0069】

表1に示すように、[d(ATGCAT)]<sub>2</sub>および[d(GCTTAGC)]<sub>2</sub>の融点は、0.5M THP(B)の存在下でそれぞれ2および3低下し、1.0M THP(B)の存在下でそれぞれ3.5および6低下した。データを、ベタインの存在下の[d(ATGCAT)]<sub>2</sub>の融点と比較した。ベタインによるT<sub>m</sub>の低下は、1.0M濃度でわずか2であり、THP(B)により引き起こされるものと同じT<sub>m</sub>の低下を起こすには2倍高濃度のベタインを要する。

30

【0070】

例3：高温でTaq DNAポリメラーゼ安定性に及ぼすTHP(B)およびTHP(A)の効果

異なる時間高温でインキュベートしたTaq DNAポリメラーゼの残存活性に及ぼすTHP(B)およびTHP(A)の効果を試験した。

【0071】

95で90分間のインキュベーション後、Taq DNAポリメラーゼはわずか30%の活性であった。この酵素は、THP(B)またはTHP(A)のいずれかの添加により顕著に安定化された。0.5M THP(B)または0.5M THP(A)の存在下で95でインキュベーション後、Taqポリメラーゼの半減期は、添加剤の存在しないときに観察された30~40分間の半減期(示していない)に比較して、それぞれ70分間と60~90分間であった。Taq DNAポリメラーゼを、THP(A)とTHP(B)との組合せの存在下で95でインキュベートすると、同等な保護効果が得られた(結果は示していない)。すなわち、反応混合物中に存在するTHP(B)および/またはTHP(A)は、酵素活性の消失を増大させることなく、PCRサイクルを増増することができる。

40

【0072】

50

図5では、1 Mグリセロール（白ひし形）に比較した、1 M THP（B）（黒四角）、1 M THP（A）（白四角）の存在下または非存在下（黒丸）の97 °CでのTaqポリメラーゼの熱不活化を測定する、同様な実験の結果が示される。高温の97 °Cでの酵素の熱不活化は、予想されるように、95 °Cでの不活化よりも迅速であった；添加剤なしでは97 °Cでの60分間のインキュベーション後、酵素活性のほぼ完全な消失（>95%）が観察された。しかしTHP（B）およびTHP（A）による保護効果も、より劇的であった；1 M THP（B）またはTHP（A）の存在下で、97 °Cで30分間のインキュベーション後の残存Taqポリメラーゼ活性は、それぞれ40%と50%であったのに比較して、添加剤の存在しないときには10%の残存活性であった。97 °Cで60分間のインキュベーションの結果として、添加剤が存在しないときには残存Taqポリメラーゼ活性は5%であったが、1 M THP（B）またはTHP（A）の存在下では、残存活性はそれぞれ20%と45%であった。図5に示す結果は、THP（A）が、Taq DNAポリメラーゼを安定化するのに、THP（B）またはグリセロールよりも有効であることを示している。

10

## 【0073】

例4：THP（B）の存在下のPCR

DNA融点と、高温でのTaq DNAポリメラーゼの活性と安定性に及ぼす、THP（B）の複合効果をPCR条件下で追跡した。

## 【0074】

材料と方法、セクション（vii）に記載したように、Taq DNAポリメラーゼにより、鑄型としてハロバクテリウム・マリスモルツイ（*Halobacterium marismortui*）の全ゲノムDNA（GC66.5%）とセクション（i）に記載した28量体プライマー1と2を使用して、PCR反応を行った。

20

## 【0075】

図6では、それぞれ0.5 M THP（B）の非存在下および存在下で、95 °Cおよび92 °Cで行われたPCRにより産生された増幅DNA配列が図示されており、THP（B）の存在により、DNA増幅の収率と特異性が改善されたことを示している。92 °Cで、増幅配列は、THP（B）の存在下でのみ産生され、存在しないときには産生されなかった。

## 【0076】

PCR緩衝液混合物中の1.0 M THP（B）の効果は、図7A～Cに示す。「対照」測定は、Td 95 °Cで1.0 M THP（B）の非存在下および存在下で、2つの濃度のTaq DNAポリメラーゼ（25 μlのPCR反応混合物中0.5および0.75単位）により行った。1.0 M THP（B）の存在は、Td 95 °CでのPCR特異的増幅を改善した（図7A）。しかし最も顕著な結果は、1.0 M THP（B）の存在下でDNAの変性温度が95 °Cから90 °Cに低下した（図7B）ときに得られた（25 μl反応混合物中の0.5または0.75単位のTaq DNAポリメラーゼのいずれかによる）。これらの条件下では、THP（B）の存在下でのみ特異的な増幅配列が生成され、この添加剤が存在しないときには増幅DNAの痕跡を検出することはできなかった。

30

## 【0077】

25 μl反応混合物中に0.5単位のTaq DNAポリメラーゼの存在下でTdがさらに89 °Cまで低下したとき、増幅DNA配列は、1.0 M THP（B）の存在下でも著しく低かったが、THP（B）が存在しないときには増幅DNAの痕跡を検出しなかった（図7C）。

40

## 【0078】

例5：プロリンの存在下のDNA融解

ウシ胸腺DNA（GC42%）の融解プロフィールに及ぼす異なる濃度のプロリンの効果を試験した。材料と方法、セクション（ii）に記載したように、2 M、3.5 M、5 Mおよび6.2 Mプロリンの非存在下または存在下で融解実験を行った。

## 【0079】

50

図 8 A に示すように、プロリンの添加は、DNA 融点を有意に低下させ、その転移プロフィールを鋭くした。水溶液中の DNA 融点の 62 °C は、6.2 M プロリンの存在下で 27 °C まで低下した。

【 0 0 8 0 】

DNA 融点に及ぼすプロリンの効果を、ミクロコッカス・リソデイクチクス (*Micrococcus lysodeikticus*) およびクロストリジウム・パーフリンジェンス (*Clostridium perfringens*) DNA (それぞれ GC 72% および 26%)、ウシ胸腺 DNA (GC 42%) および合成のポリ (dA - dT) のような、異なる塩基組成の異なる DNA について検討した。図 8 B に示すように、種々の DNA の融点 (Tm) は、インキュベーション混合物中に 6.2 M プロリン濃度の存在下で低下した。72% の GC 含量の DNA 融解の範囲は、42% および 26% の GC 含量のものよりも約 5 °C 高いが、ポリ (dA - dT) は約 15 °C 低く融解する。

10

【 0 0 8 1 】

4 つの DNA に及ぼす図 9 A に記載のプロリンの濃度上昇の効果は、この効果が GC 高含量 DNA について顕著であったことを明らかにしている。オリゴヌクレオチドのポリ (dA - dT) は、1 ~ 5 M プロリンの存在下で融点に何ら変化を示さなかったが、5 ~ 6.2 M プロリンの範囲で小さな効果があった。6.2 M のプロリンは、DNA 熱融解の塩基対組成依存性をほぼ排除した。図 9 A に示すように、6.2 M プロリンの存在下で、広範な GC 含量の全ての DNA は、非常に狭い温度範囲 (25 ~ 32 °C) で融解し、一方プロリンが存在しないときには、融点は 38 ~ 78 °C の範囲であった。

20

【 0 0 8 2 】

図 9 B は、プロリン濃度の関数として dTm / dGC の変化を示す。5 M までのプロリン濃度で線形相関を示す。

【 0 0 8 3 】

例 6 : プロリンの存在下のクレノウポリメラーゼ活性

クレノウ DNA ポリメラーゼ活性に及ぼす 5.0 M L - プロリンの効果を試験するために、異なる濃度の MgCl<sub>2</sub> : 6.7 mM、10.0 mM および 15.0 mM MgCl<sub>2</sub> の存在下で、材料と方法、セクション (iv) に記載したように実験を行った。

【 0 0 8 4 】

図 10 に示すように、L - プロリンは、クレノウ DNA ポリメラーゼ活性をほんのわずかに低下させた。この酵素の活性は、特に 10.0 (斜線の棒、中央) および 15.0 mM MgCl<sub>2</sub> (斜線の棒、右) で十分に高いまま維持された。

30

【 0 0 8 5 】

例 7 : 65 °C のクレノウ DNA ポリメラーゼの安定性に及ぼす 5.0 M プロリンの効果

5.0 M プロリン、5.0 M グリセロールの存在下、または添加剤なしで 65 °C でインキュベートしたクレノウ DNA ポリメラーゼの活性を、材料と方法、セクション (vi) に記載したように測定した。図 11 に示すように、65 °C のクレノウ DNA ポリメラーゼは、添加剤なし (黒丸) では 1 分未満、5.0 M グリセロールの存在下 (黒三角) では 3 分間、そして 5.0 M プロリンの存在下 (白ひし形) では 21 分間の半減期である。

40

【 0 0 8 6 】

例 8 : クレノウ DNA ポリメラーゼを使用するプロリンの存在下の PCR

高温でのクレノウ DNA ポリメラーゼ安定性、および DNA 変性温度工程に及ぼすプロリンの複合効果によって、この酵素の循環 PCR 条件の成功する設計が可能になった。材料と方法、セクション (viii) に記載したように、クレノウ DNA ポリメラーゼにより PCR を実施した。

【 0 0 8 7 】

ハロバクテリウム・マリスモルツイ (*Halobacterium marismortui*) ゲノム DNA (2546 ~ 2843 位) の 349 塩基対断片 (GC 66.5%) の PCR 増幅を、100 ng の DNA 鋳型、各 0.12 nM の上記セクション (i) に記載した 30 量体オリゴヌクレオチドプライマー 5 と 6、各 0.9 mM の dNTP、10 mM トリス - HCl (25 °C で pH 7

50

． 4 ) および 1.5 mM の酢酸マグネシウムを含む 2.5  $\mu$ l の反応混合物中で行った。トリス - HCl 緩衝液、鋳型 DNA、dNTP、プライマーおよび酢酸マグネシウムは、原液から PCR マイクロチューブに加え、スピード真空により蒸発乾固し、5.5 M の L - プロリンをグリセロールの 12.5 % w / v 水溶液中に含む 2.2  $\mu$ l のプロリン - グリセロール溶液に溶解した。クレノウポリメラーゼ (10 単位 /  $\mu$ l、保存緩衝液は、50 % w / v グリセロールを含む)、および PCR 混合物中の一定のグリセロール濃度を維持するために、グリセロール水溶液 (50 % w / v グリセロール) のアリコート、最初のプライマーアニーリング工程に加えられた。

【 0088 】

図 12 に示すように、レーン 1 および 2 には、1.0  $\mu$ l のクレノウポリメラーゼ (10 単位) と 2.0  $\mu$ l のグリセロール溶液を加え、そしてレーン 3 および 4 には、1.5  $\mu$ l のクレノウポリメラーゼ (15 単位) と 1.5  $\mu$ l のグリセロールを加えた。全ての PCR 混合物中の L - プロリンの最終濃度は、4.85 M であり、そしてグリセロールは 17 % w / v であった。全ての PCR 反応は、ノーマルブロック (ランプ速度は 1 / 秒) を装備した MJ リサーチ PTC - 100 装置で行った。反応混合物を 75 で 3 分間予熱し、次に以下のとおり 35 回の熱サイクルに供した: a) 70 で 20 秒間インキュベーション; b) 37 で 4 分間インキュベーション。反応産物は、2 % アガロースゲルで試験して、臭化エチジウムにより染色した。

10

【 0089 】

図 12 に示す結果は、3 ~ 5.5 M の範囲のプロリン濃度は、クレノウ DNA ポリメラーゼに安定性を与えるのに、そしてうまく PCR プロトコールを行うために、充分であることを明らかにした。

20

【 0090 】

例 9 : Taq DNA ポリメラーゼを使用するプロリンの存在下の PCR

図 13 は、Taq DNA ポリメラーゼを使用する、材料と方法、セクション (ix) に記載したように、1.0 M プロリンの非存在下および存在下で行った PCR を示す。反応混合物への 1.0 M プロリンの添加は、変性温度 95 での PCR 処理能力を害することはなく、低下した変性温度、すなわち 91 での PCR を成功させた。

【 0091 】

例 10 : クレンタック (Klentaq) 1 と Pfu DNA ポリメラーゼとの混合物を使用するプロリンの存在下の PCR

30

PCR は、材料と方法、セクション (x) に記載したように、クレンタック (Klentaq) 1 と Pfu DNA ポリメラーゼとの混合物を使用して、4.0 M プロリンの存在下で行った。反応混合物をそれぞれの変性温度 (77 と 75) で 1 分間予熱し、次に以下のとおり 35 回の熱サイクルに供した: (i) 77 または 75 で 30 秒間インキュベーション (変性工程); (ii) 44 で 90 秒間インキュベーション (プライマーアニーリング工程); および (iii) 65 で 7 分間インキュベーション (プライマー伸長)。

【 0092 】

図 14 に示すように、混合物中のプロリン濃度と最低変性温度との間に明らかな相関がある。すなわち、上述の条件について当てはまるが、4.0 M 濃度のプロリンは、77 の変性温度で PCR を成功させるには充分であったが、75 では充分でなかった。

40

参考文献

1. Barnes, W.M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from  $\lambda$  bacteriophage templates, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 2216-2220.
2. Cheng, S., C. Fockler, W.M. Barnes and R. Higuchi (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5695-5699.
3. Comey, C.T., J.M. Jung and B. Budowle (1991) *BioTechniques* 10, 60-61.
4. Filichkin, S.A. and S.B. Gelvin (1992) *BioTechniques* 12, 828-830.
5. Galinski, E.A., H.P. Pfeifer and H.G. Truper (1985) *Eur. J. Biochem.* 149, 135-139. 10
6. Gelfand, D.H. and White (1989) in *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification* (Erich, H.A., ed) pp. 17-22, Stockton Press, New York.
7. Han, J. et al. (1994) *Nucleic Acids Research* 22, 1735-1740.
8. Inbar, L. and A. Lapidot (1988a) *J. Bacteriol.* 170, 4055-4064.
9. Inbar, L. and A. Lapidot (1988b) *J. Biol. Chem* 263, 16014-16022.
10. Inbar, L., and A. Lapidot (1991) *J. Bacteriol.* 173, 7790-7801.
11. Inbar, L., F. Frolow and A. Lapidot (1993) *Eur. J. of Biochem.* 214, 897-906.
12. Kieleczawa, J., Dunn, J.J., and Studier, F.W. (1992) *Science* 258, 1787-1791. 20
13. Lapidot, A., Ben-Asher, E. and Eisenstein, M. (1995) *FEBS Letters* 367, 33-38.
14. Malin, G.M. and A. Lapidot (1996) *J. Bacteriol.* 178, 385-395.
15. Melchior, W.B., Von Hippel, P.H.Jr., and Von Hippel, P.H. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 298-302
16. Mcpherson, M.J., P. Quirke and G.R. Taylor (1992) in *PCR, A practical approach.* (Mcpherson, M.J., Quirke P. and Taylor, G.R., Editors), IRL Press, Oxford University Press.
17. Mytelka, D.S. and M.J. Chamberlain (1996) *Nucl. Acids Res.* 24, 2774-2781. 30
18. Pomp, D. and J.F. Medrano (1991) *BioTechniques* 10, 58-59.
19. Rajendrakumar, S.V., Suryanarayana, T., and Reddy, A.R. (1997) *FEBS Letters* 410, 201-205.
20. Rees, W.A., T.D. Yager, J. Korte and P.H. Von Hippel (1993) *Biochemistry* 32, 137-144.
21. Varadaraj, K. and D.M. Skinner (1994) *Gene* 140, 1-5.

【 0 0 9 3 】

40

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 図 1 は、T H P ( A ) ( 左 ) と T H P ( B ) ( 右 ) の構造式を示す。

【 図 2 】 図 2 は、表示量の T H P ( B ) : 0 . 8 M、2 M、3 M および 4 M の非存在下および存在下でのウシ胸腺 D N A の熱転移を示す。D N A 融解は、材料と方法、セクション ( ii ) に記載したように行った。

【 図 3 】 図 3 は、種々の塩基組成の D N A について、T H P ( B ) 濃度による融点 ( T m ) の変動を示す。材料と方法、セクション ( ii ) に記載したように、D N A 融解を行い、T m を測定した。( 黒三角 ) - ウシ胸腺 D N A ; ( 黒丸 ) - ミクロコッカス・リソデイクチクス ( *Micrococcus lysodeikticus* ) D N A ; ( 黒四角 ) - クロストリジウム・パーフリンジェンス ( *Clostridium perfringens* ) D N A ; ( 白三角 ) - ポリ ( d A - d T )

50

。【図4】 図4A～Bは、それぞれオリゴヌクレオチド $[d(ATGCAT)]_2$ および $[d(GCTTAAGC)]_2$ の熱転移を示す。 $[d(ATGCAT)]_2$ のC4H5プロトンおよび $[d(GCTTAAGC)]_2$ のG1H8プロトンの化学シフトは、THP(B)の非存在下(白四角)または0.5M(白丸)および1M(黒四角)存在下での温度上昇の関数として、材料と方法、セクション(iii)に記載したように測定した。

【図5】 図5は、1M THP(B)(黒四角)、1M THP(A)(白四角)または1Mグリセロール(白ひし形)のいずれかの存在下または非存在下(黒丸)での97のTaq DNAポリメラーゼの熱不活化の経時変化を示す。熱不活化は、材料と方法、セクション(vi)に記載したように測定したTaqポリメラーゼの残存活性から、異なる時点で測定した。

10

【図6】 図6は、1.7%アガロースゲル上で行ったPCR増幅DNA産物の臭化エチジウム染色を示す。PCRは、ハロバクテリウム・マリスマルツイ(*Halobacterium marismortui*)ゲノムDNA鋳型からの349塩基対断片(GC含量66.5%)の増幅に関して、2つの異なる変性温度(Td)(95(左)と92(右))で、記載の0.5M THP(B)の存在下および非存在下で、材料と方法、セクション(viii)に記載した手順により行った。各実験の2回または3回の反復が示される。

【図7】 図7A～Cは、1.7%アガロースゲル上で行ったPCR増幅DNA産物の臭化エチジウム染色を示す。PCRは、ハロバクテリウム・マリスマルツイ(*Halobacterium marismortui*)ゲノムDNA鋳型からの349塩基対断片(GC含量66.5%)の増幅に関して、3つの異なる変性温度(Td)(95(図7A)、90(図7B)および89(図7C))で、1.0M THP(B)の存在下および非存在下で、材料と方法、セクション(viii)に記載した手順により行った。各実験の2回または3回の反復が示される。

20

【図8】 図8A～8Bは、プロリンの存在下および非存在下でのウシ胸腺DNA(図8A)および他のDNA(図8B)の熱転移を示す。DNA融解は、材料と方法、セクション(ii)に記載したように行った。図8A:- (黒ひし形) - プロリン添加なし; (白四角) - 2.0M; (黒三角) - 3.5M; (黒四角) - 5.0M; (白三角) - 5.5M; (黒丸) - 6.2Mプロリン。図8B、6.2Mプロリンの存在下:(白三角) - ミクロコッカス・リソデイクチクス(*Micrococcus lysodeikticus*)DNA; (黒三角) - クロストリジウム・パーFRINGENS(*Clostridium perfringens*)DNA; (黒四角) - ウシ胸腺DNA; (黒丸) - ポリ(dA-dT)。

30

【図9】 図9Aは、種々の塩基組成のDNAに関して、プロリン濃度によるTmの変動を示す。DNA融解は、材料と方法、セクション(ii)に記載したように行った。(黒四角) - ウシ胸腺DNA; (白三角) - ミクロコッカス・リソデイクチクス(*Micrococcus lysodeikticus*)DNA; (黒三角) - クロストリジウム・パーFRINGENS(*Clostridium perfringens*)DNA; (黒丸) - ポリ(dA-dT)。図9Bは、プロリン濃度の関数としてのdTm/dGCの変化を示す。

【図10】 図10は、5.0Mプロリンの非存在下(黒色の棒)および存在下(斜線の棒)の37でのクレノウDNAポリメラーゼ活性を示す。クレノウDNAポリメラーゼの活性は、材料と方法、セクション(iv)に記載したように、6.7、10および15mM MgCl<sub>2</sub>で測定した。

40

【図11】 図11は、5Mプロリン(白ひし形)または5Mグリセロール(黒三角)のいずれかの存在下および非存在下(黒丸)の65でのクレノウDNAポリメラーゼの熱不活化の経時変化を示す。クレノウDNAポリメラーゼの残存活性は、材料と方法、セクション(vii)に記載したように異なる時点で測定した。

【図12】 図12は、2%アガロースゲル上で行ったPCR増幅DNA産物の臭化エチジウム染色を示す。PCRは、ハロバクテリウム・マリスマルツイ(*Halobacterium marismortui*)ゲノムDNAからの349塩基対断片(GC含量66.5%)の増幅に関して、DNAポリメラーゼIの10および15単位のクレノウ断片を使用して、材料と方法、

50

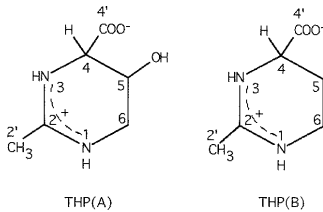
セクション (ix) に記載した手順により行った。

【図 1 3】 図 1 3 は、1.7% アガロースゲル上で行った PCR 増幅 DNA 産物の臭化エチジウム染色を示す。PCR は、Taq DNA ポリメラーゼにより触媒される、ハロバクテリウム・マリスモルツイ (*Halobacterium marismortui*) ゲノム DNA 鋳型からの 349 塩基対断片 (GC 含量 66.5%) の増幅に関して、2 つの異なる変性温度 (Td) (95 と 91) で、1.0 M プロリンの非存在下および存在下で、材料と方法、セクション (x) に記載した手順により行った。各実験の 3 回の反復が示される。

【図 1 4】 図 1 4 は、1.7% アガロースゲル上で行った PCR 増幅 DNA 産物の臭化エチジウム染色を示す。PCR は、KlenTaq1 DNA ポリメラーゼにより触媒される、ハロバクテリウム・マリスモルツイ (*Halobacterium marismortui*) ゲノム DNA 鋳型からの 349 塩基対断片 (GC 含量 66.5%) の増幅に関して、2 つの異なる変性温度 (Td) (77 と 75) で、4.0 M プロリンの存在下で、材料と方法、セクション (xi) に記載した手順により行った。各実験の 2 回の反復が示される。

10

【図 1】



【図 2】

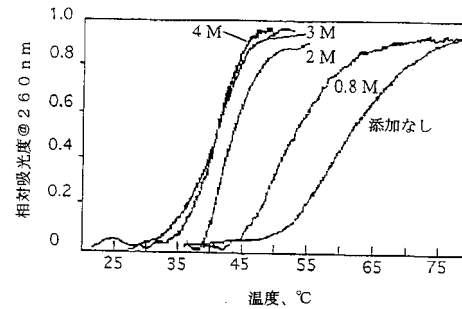
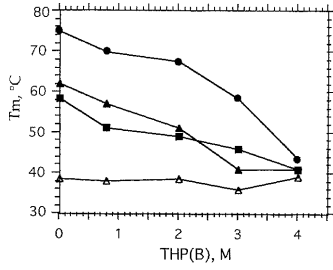


Fig. 1.

【 図 3 】



【 図 4 B 】

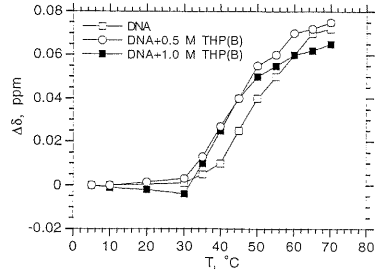


Fig. 4B

【 図 5 】

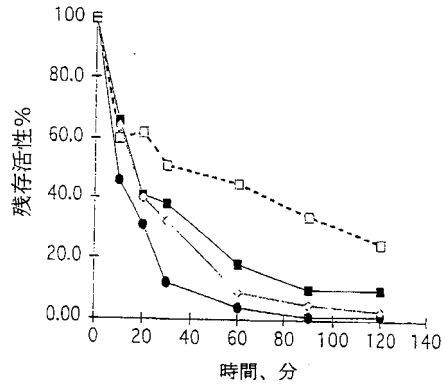


Fig. 3.

【 図 4 A 】

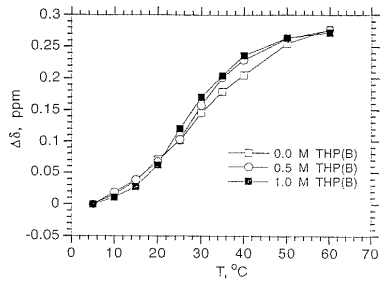
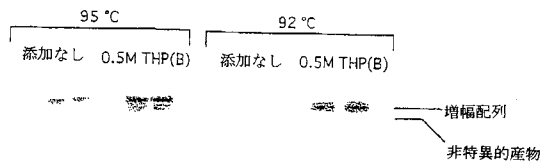
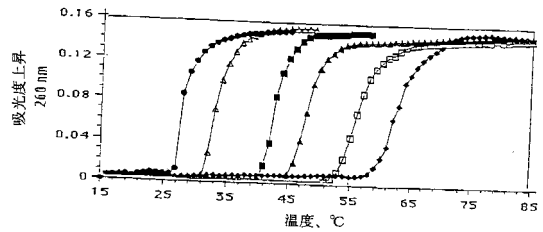


Fig. 4A

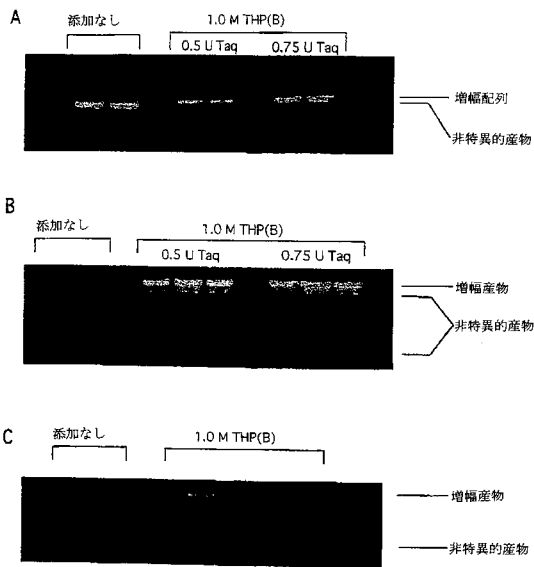
【 図 6 】



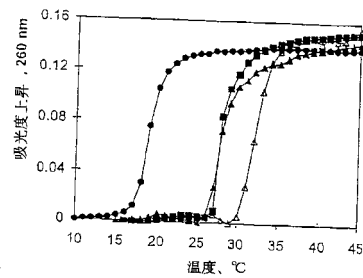
【 図 8 】



【 図 7 】

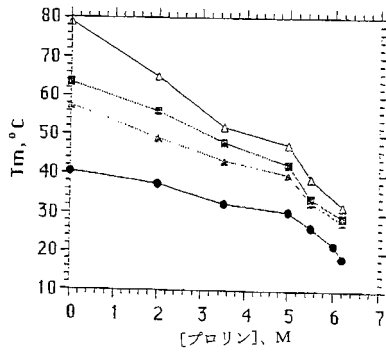


A

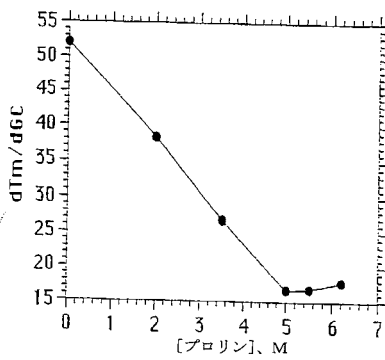


B

【 図 9 】

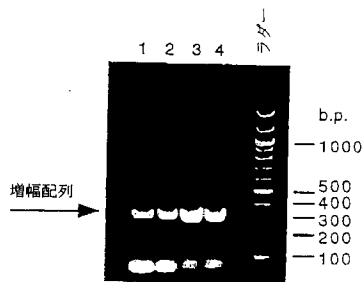


A

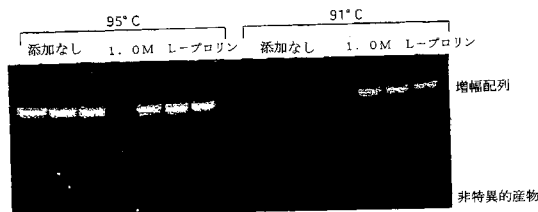


B

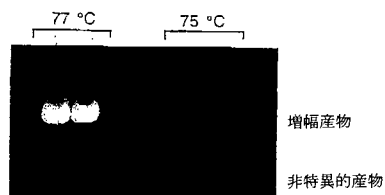
【 図 1 2 】



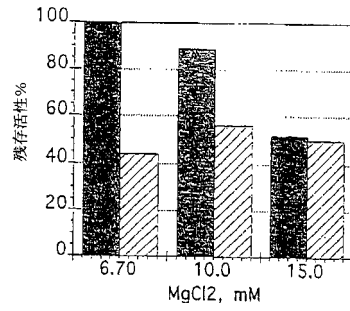
【 図 1 3 】



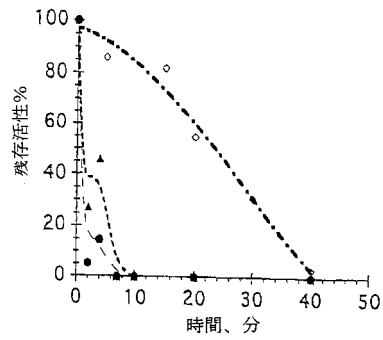
【 図 1 4 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



## フロントページの続き

- (72)発明者 ラピドット、アビバ  
イスラエル国 レホボト、 ケレン ケイメント ストリート 21
- (72)発明者 イアコバシビリ、ロバート  
イスラエル国 アシュドド、 ロシュ ピナ ストリート 14 / 46
- (72)発明者 マリン、ジェナディ  
イスラエル国 アシュドド、 ロシュ ピナ ストリート 12 / 46

審査官 高堀 栄二

- (56)参考文献 欧州特許出願公開第00821058 (EP, A1)  
特表平09-511133 (JP, A)  
特開平07-017864 (JP, A)  
Nucleic Acids Res., Vol.24, No.14(1996)p.2774-2781  
Nucleic Acids Res., Vol.25, No.19(1997)p.3957-3958  
Trends Biochem. Sci., Vol.22, No.6(1997)p.225-226  
Genome Res., Vol.6, No.7(1996)p.633-638  
FEBS Lett., Vol.410, No.2-3(1997)p.201-205  
Biochemistry, Vol.32, No.1(1993)p.137-144

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
BIOSIS/WPI(DIALOG)  
PubMed  
CA/REGISTRY(STN)