

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4104657号
(P4104657)

(45) 発行日 平成20年6月18日(2008.6.18)

(24) 登録日 平成20年4月4日(2008.4.4)

(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 57 (全 35 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平9-527451 (86) (22) 出願日 平成9年1月30日(1997.1.30) (65) 公表番号 特表平11-513888 (43) 公表日 平成11年11月30日(1999.11.30) (86) 国際出願番号 PCT/IB1997/000226 (87) 国際公開番号 W01997/028279 (87) 国際公開日 平成9年8月7日(1997.8.7) 審査請求日 平成16年1月27日(2004.1.27) (31) 優先権主張番号 60/010,948 (32) 優先日 平成8年2月1日(1996.2.1) (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 アベンティス・ファーマシューティカルズ ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国08807-0800 ニ ュージャージー州ブリッジウォーター、サ マーセット・コーポレイト・ブルバード 300番 (74) 代理人 弁理士 青山 稜 (74) 代理人 弁理士 中嶋 正二 (72) 発明者 ラインカーズ,アレキサンダー・ジェイ アメリカ合衆国98012ワシントン州ボ ゼル、サウス・イースト、トゥーハンドレ ッドセブンス・ストリート2308番 最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 ポリヌクレオチド増幅の陽性コントロール

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的ポリヌクレオチドの標的配列の多数のコピーを形成させる方法であって、オリゴヌクレオチドプライマーの伸長生成物を少なくとも該標的配列に沿って、または該標的配列の代わりにオリゴヌクレオチドプライマーが伸長した産物に沿って形成させる工程を含み、該伸長生成物が、該標的配列のコピーである方法において、該オリゴヌクレオチドプライマーが、該オリゴヌクレオチドプライマーの3'-末端の1-10ヌクレオチド以外でハイブリダイズする第2ポリヌクレオチドの存在下、該1-10ヌクレオチドが3'-5'エクソヌクレアーゼにより分解された後にのみ、該第2ポリヌクレオチドに沿って伸長する条件で、該伸長生成物を形成させることを含んでなる、改良法。

【請求項2】

標的ポリヌクレオチドの標的配列の増幅法であって、該標的ポリヌクレオチドを含有する疑いのある試料を、標的配列が存在すればそれを増幅する試薬類と合わせ、該組み合わせ物を該標的配列が存在すればそれを増幅する条件下におくことを含み、該試薬類がオリゴヌクレオチドプライマーおよびポリメラーゼを含む方法において、(a)該組み合わせ物中に、該オリゴヌクレオチドプライマーが該オリゴヌクレオチドプライマーの3'-末端の1-10ヌクレオチド以外でハイブリダイズするコントロールポリヌクレオチド、および該ポリメラーゼが3'-5'エクソヌクレアーゼを含まないときは3'-5'エクソヌクレアーゼを含ませ、ここで該オリゴヌクレオチドプライマーは該標的配列に沿って伸長し、該1-10ヌクレオチドが3'-5'エクソヌクレアーゼ活性を有する該ポリメラー

ぜにより分解された後にのみ、該コントロールポリヌクレオチドに沿って伸長して該コントロールポリヌクレオチドのコピーを生成するものであり、そして (b) 該コントロールポリヌクレオチドの該コピーの存在を検出し、その存在が該標的配列を増幅する該試薬および条件が適切に機能していることを示すものであることを含んでなる、改良法。

【請求項 3】

該オリゴヌクレオチドプライマーが、それがハイブリダイズする該標的配列の部分に対して十分に相補的であり、かつそれがその 3' - 末端の該 1 - 10 ヌクレオチド以外でハイブリダイズする該コントロールポリヌクレオチドの部分に対して相補的である、請求の範囲第 2 項に記載の方法。

【請求項 4】

修飾したオリゴヌクレオチドプライマーが、該組み合わせ物中に含まれており、そこで、該修飾オリゴヌクレオチドプライマーは、該オリゴヌクレオチドプライマーと同一であるが、該 3' - 5' エクソヌクレアーゼによる該 1 - 10 ヌクレオチドの分解を防ぐ化学修飾をその 3' - 末端に含有する、請求の範囲第 2 項に記載の方法。

【請求項 5】

該化学修飾が、ホスホロチオエート類、ホスホン酸エチル類、カルボキサミド類、ホスホンアミド類、カルバメート類、アセタール類、およびケタール類からなる群から選択される、請求の範囲第 4 項に記載の方法。

【請求項 6】

該化学修飾がホスホロチオエートである、請求の範囲第 4 項に記載の方法。

【請求項 7】

該オリゴヌクレオチドプライマーが該コントロールポリヌクレオチドに該オリゴヌクレオチドプライマーの 3' - 末端の 3 - 5 ヌクレオチド以外でハイブリダイズする、請求の範囲第 2 項に記載の方法。

【請求項 8】

増幅した標的配列の存在を検出し、それが該標的ポリヌクレオチドの存在と相関している、請求の範囲第 2 項に記載の方法。

【請求項 9】

一本鎖標的ポリヌクレオチドの標的配列 (標的配列) の多数のコピーを形成させる方法であって、

(a) 第 1 オリゴヌクレオチドプライマー (第 1 プライマー) を該標的配列の 3' - 末端にハイブリダイズさせ、

(b) 該第 1 プライマーを、ポリメラーゼの存在下、少なくとも該標的配列に沿って伸長させ、該第 1 プライマーは第 2 オリゴヌクレオチドプライマーの伸長産物 (伸長第 2 プライマー) にハイブリダイズし、および、それに沿って伸長する能力があり、ここで、該伸長第 2 プライマーは、該標的配列に相補的であるポリヌクレオチド (相補的ポリヌクレオチド) にハイブリダイズし、そして、それに沿って伸長する能力のある第 2 プライマーの伸長の結果生じるものであり、

(c) 該標的配列から該第 1 プライマーの伸長産物 (伸長第 1 プライマー) を解離させ、

(d) 該第 2 プライマーを該伸長第 1 プライマーの 3' - 末端にハイブリダイズさせ、

(e) 該第 2 プライマーを該伸長第 1 プライマーに沿って伸長させ、

(f) 該伸長第 2 プライマーを該伸長第 1 プライマーから解離させ、

(g) 該第 1 プライマーを該伸長第 2 プライマーの 3' - 末端にハイブリダイズさせ、そして、

(h) 工程 (e) ~ (g) を繰り返す、

ことを含んでなる方法において、(i) 上記工程 (a) ~ (g) に従う同一反応混合物内に、該第 1 または第 2 プライマーが、該第 1 または該第 2 プライマーの 3' - 末端の 1 - 10 ヌクレオチド以外でハイブリダイズするコントロールポリヌクレオチドを陽性内部コントロールとして含み、そして該ポリメラーゼが 3' - 5' エクソヌクレアーゼを含まな

10

20

30

40

50

いは、3' - 5' エクソヌクレアーゼを含ませ、ここで、該第1または該第2プライマーは、該1 - 10ヌクレオチドが3' - 5' エクソヌクレアーゼ活性を有する該ポリメラーゼにより分解された後にのみ、該コントロールポリヌクレオチドに沿って伸長して該コントロールポリヌクレオチドのコピーを生成するものであり、そして(ii)該コントロールポリヌクレオチドの該コピーを検出することを含んでなる、改良法。

【請求項10】

該第1プライマーが、それがハイブリダイズする該標的配列の部分に対して十分に相補的であり、かつそれがその3' - 末端で該1 - 10ヌクレオチド以外でハイブリダイズする該コントロールポリヌクレオチドの部分に対して相補的である、請求の範囲第9項に記載の方法。

10

【請求項11】

修飾したオリゴヌクレオチドプライマーが、該組み合わせ物中に含まれており、そこで、該修飾オリゴヌクレオチドプライマーは、該3' - 5' エクソヌクレアーゼによる該1 - 10ヌクレオチドの分解を防ぐ化学修飾がその3' - 末端にある以外は該第1または該第2プライマーと同一である、請求の範囲第9項に記載の方法。

【請求項12】

該化学修飾が、ホスホロチオエート類、ホスホン酸エチル類、カルボキサミド類、スルホンアミド類、カルバメート類、アセタール類、およびケタール類からなる群から選択される、請求の範囲第11項に記載の方法。

【請求項13】

該化学修飾がホスホロチオエートである、請求の範囲第11項に記載の方法。

20

【請求項14】

該第1または該第2プライマーが該コントロールポリヌクレオチドに該第1または該第2プライマーの3' - 末端の3 - 5ヌクレオチド以外でハイブリダイズする、請求の範囲第9項に記載の方法。

【請求項15】

該伸長第1プライマーおよび/または該伸長第2プライマーの存在を検出し、それが該標的ポリヌクレオチドの存在と相関している、請求の範囲第9項に記載の方法。

【請求項16】

該コントロールポリヌクレオチドが長さ50ないし5000ヌクレオチドである、請求の範囲第9項に記載の方法。

30

【請求項17】

該コントロールポリヌクレオチドが反応混合物中、1pMから100pMの濃度で存在する、請求の範囲第9項に記載の方法。

【請求項18】

工程(e) ~ (g)の繰り返しは、温度サイクリングを繰り返すことにより達成される、請求の範囲第9項に記載の方法。

【請求項19】

温度サイクリングが少なくとも3回繰り返される、請求の範囲第18項に記載の方法。

【請求項20】

該標的ポリヌクレオチドがDNAである、請求の範囲第9項に記載の方法。

40

【請求項21】

該伸長がヌクレオシドトリホスフェートの存在下で実施される、請求の範囲第9項に記載の方法。

【請求項22】

該コントロールポリヌクレオチドが標的配列にはない少なくとも15ヌクレオチド配列を含有する、請求の範囲第9項に記載の方法。

【請求項23】

該第1および該第2プライマーが異なっており、該コントロールポリヌクレオチドがその5' - 末端に該第2プライマーの5' - 末端の配列と同一である配列を含有する、請求の

50

範囲第 9 項に記載の方法。

【請求項 24】

該第 1 および該第 2 プライマーが異なり、該伸長第 1 プライマーが該第 2 プライマーの鑄型であり、該伸長第 2 プライマーが該第 1 プライマーの鑄型である、請求の範囲第 9 項に記載の方法。

【請求項 25】

少なくとも 1 種の二本鎖ポリヌクレオチド (ポリヌクレオチド) の多数のコピーを形成させる方法であって、該ポリヌクレオチドが一本鎖標的ポリヌクレオチド配列 (標的配列) およびその相補的配列 (相補的配列) を含み、陽性内部コントロールを有し、該方法が、

(a) 1 またはそれ以上の該二本鎖ポリヌクレオチドを含有する疑いのある試料を、下記 (i) ~ (i i i) : (i) 該標的配列および該相補的配列にプライマーをハイブリダイズさせ、そしてそれに沿って該プライマーを伸長させる条件下で該試料中に存在する疑いのある各標的配列の一部およびその相補的配列にハイブリダイズする能力のあるオリゴヌクレオチドプライマー (但し、該プライマーは、一方のプライマーから形成された伸長生成物とその相補物から解離したときに、もう一方のプライマーの伸長生成物形成のための鑄型として働くことができるように選択されるものである)、(i i) 該プライマーの 1 つが該プライマーの該 1 つの 3' - 末端の 1 - 10 ヌクレオチド以外でハイブリダイズする鑄型としてのコントロールポリヌクレオチド、および (i i i) 3' - 5' エクソヌクレアーゼ (ここで、該プライマーはそれぞれ該標的配列および該相補的配列に沿って伸長し、該プライマーの該 1 つが、該 1 - 10 ヌクレオチドが該 3' - 5' エクソヌクレアーゼにより分解された後にのみ、該コントロールポリヌクレオチドに沿って伸長する)、で処理し、

(b) プライマー伸長生成物をそのそれぞれの鑄型から解離させて、一本鎖分子を生成させ、そして、

(c) 工程 (b) において生成した一本鎖分子を工程 (a) のプライマーで、工程 (b) で生成した一本鎖を鑄型として用いてプライマー伸長生成物が形成されるような条件下で処理し、その結果、標的配列および相補的配列が存在するならば、それらの増幅を生成させ、該条件により該コントロールポリヌクレオチドに沿って該プライマーの該 1 つを伸長させて該陽性内部コントロールを提供できる、

ことを含んでなる、方法。

【請求項 26】

該各プライマーの該一方が、それがハイブリダイズする該標的配列の部分に対して十分に相補的であり、かつそれがその 3' - 末端で該 1 - 10 ヌクレオチド以外でハイブリダイズする該コントロールポリヌクレオチドの部分に対して相補的である、請求の範囲第 25 項に記載の方法。

【請求項 27】

修飾したオリゴヌクレオチドプライマーが、該組み合わせ物中に含まれており、そこで、該修飾オリゴヌクレオチドプライマーは、該 3' - 5' エクソヌクレアーゼによる該 1 - 10 ヌクレオチドの分解を防ぐ化学修飾がその 3' - 末端にある以外は該プライマーの該 1 つと同一である、請求の範囲第 25 項に記載の方法。

【請求項 28】

該化学修飾が、ホスホロチオエート類、ホスホン酸エチル類、カルボキサミド類、スルホンアミド類、カルバメート類、アセタール類、およびケタール類からなる群から選択される、請求の範囲第 27 項に記載の方法。

【請求項 29】

該化学修飾がホスホロチオエートである、請求の範囲第 27 項に記載の方法。

【請求項 30】

該プライマーの該 1 つが該コントロールポリヌクレオチドにその 3' - 末端の 3 - 5 ヌクレオチド以外でハイブリダイズする、請求の範囲第 25 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

プライマー伸長生成物の存在を検出し、それが該標的ポリヌクレオチドの存在と相関している、請求の範囲第 2 5 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

該コントロールポリヌクレオチドが長さ 5 0 ないし 5 0 0 0 ヌクレオチドである、請求の範囲第 2 5 項に記載の方法。

【請求項 3 3】

該コントロールポリヌクレオチドが反応混合物中、1 pM から 1 0 0 pM の濃度で存在する、請求の範囲第 2 5 項に記載の方法。

【請求項 3 4】

工程 (a) ~ (c) の繰り返しは、温度サイクリングを繰り返すことにより達成される、請求の範囲第 2 5 項に記載の方法。

【請求項 3 5】

温度サイクリングが少なくとも 3 回繰り返される、請求の範囲第 3 4 項に記載の方法。

【請求項 3 6】

該標的ポリヌクレオチドが DNA である、請求の範囲第 2 5 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

該伸長がヌクレオシドトリホスフェートの存在下で実施される、請求の範囲第 2 5 項に記載の方法。

【請求項 3 8】

工程 (c) の生成物に、該配列にハイブリダイズする能力のある増幅中の各配列に対する標識オリゴヌクレオチドプローブを加え、該ハイブリダイゼーションが起こったかどうかを測定することを含む、請求の範囲第 2 5 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

標的ポリヌクレオチドの標的配列の多数のコピーを作製する方法であって、

(a) (1) 該標的配列であり、かつ各末端で少なくとも部分的に相補的な第 1 および第 2 フランキング配列にフランクされている配列を有する一本鎖ポリヌクレオチド、(2) その少なくとも 1 0 塩基部分がその 3 ' - 末端で、該一本鎖ポリヌクレオチドの 3 ' - 末端である該第 1 および該第 2 フランキング配列のメンバーにハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドプライマー、(3) ヌクレオシドトリホスフェート、(4) 該オリゴヌクレオチドプライマーが該オリゴヌクレオチドプライマーの 3 ' - 末端の 1 - 1 0 ヌクレオチド以外でハイブリダイズする鑄型としてのコントロールポリヌクレオチド、および(5) 3 ' - 5 ' エクソヌクレアーゼ(但し、該プライマーは、該標的配列に沿って伸長し、該プライマーは、該 1 - 1 0 ヌクレオチドが 3 ' - 5 ' エクソヌクレアーゼにより分解された後にのみ該コントロールポリヌクレオチドに沿って伸長する)の組み合わせ物を供給し、

(b) 該組み合わせ物を、全体的または部分的に、連続してかまたは同時にかのいずれかで、(1) 該一本鎖ポリヌクレオチドを任意の相補的配列から解離させ、(2) 該オリゴヌクレオチドプライマーを該一本鎖ポリヌクレオチドの 3 ' - 末端でフランキング配列と、および該コントロールポリヌクレオチドとハイブリダイズさせ、(3) 該オリゴヌクレオチドプライマーを該一本鎖ポリヌクレオチドに沿って伸長させて、第 1 伸長オリゴヌクレオチドプライマーを提供し、該コントロールポリヌクレオチドにハイブリダイズした該オリゴヌクレオチドプライマーを分解させ該分解したオリゴヌクレオチドを該コントロールポリヌクレオチドに沿って伸長させ、(4) 該第 1 伸長プライマーおよび該一本鎖ポリヌクレオチドを解離させ、そして該コントロールポリヌクレオチドおよび該伸長分解プライマーを解離させ、(5) 該第 1 伸長オリゴヌクレオチドプライマーを該オリゴヌクレオチドプライマーとハイブリダイズさせ、該オリゴヌクレオチドプライマーおよび該コントロールポリヌクレオチドをハイブリダイズさせ、(6) 該オリゴヌクレオチドプライマーを該第 1 伸長オリゴヌクレオチドプライマーに沿って伸長させて、第 2 伸長ポリヌクレオチドプライマーを提供し、該コントロールポリヌクレオチドにハイブリダイズした該オリ

10

20

30

40

50

ゴヌクレオチドプライマーを分解させ、該オリゴヌクレオチドプライマーを該コントロールヌクレオチドに沿って伸長させて伸長分解プライマーを提供し、(7)該第2伸長オリゴヌクレオチドプライマーを該第1伸長オリゴヌクレオチドプライマーから、および該伸長分解プライマーを該コントロールポリヌクレオチドから解離させ、そして(8)上記工程(5)~(7)を繰り返す条件下でインキュベートし、

(c)該伸長分解プライマーの存在、その存在は、標的ポリヌクレオチドの該標的配列の多数のコピーを作製するための該試薬および条件が適切に機能していることを示すものである、を検出する、
ことを含んでなる、方法。

【請求項40】

該オリゴヌクレオチドプライマーが、それがハイブリダイズする該標的配列の部分に対して十分に相補的であり、かつそれがその3'-末端の該1-10ヌクレオチド以外でハイブリダイズする該コントロールポリヌクレオチドの部分に対して相補的である、請求の範囲第39項に記載の方法。

【請求項41】

修飾したオリゴヌクレオチドプライマーが、該組み合わせ物中に含まれており、そこで、該修飾オリゴヌクレオチドプライマーは、該3'-5'エクソヌクレアーゼによる該1-10ヌクレオチドの分解を防ぐ化学修飾がその3'-末端にある以外は該オリゴヌクレオチドプライマーと同一である、請求の範囲第39項に記載の方法。

【請求項42】

該化学修飾が、ホスホロチオエート類、ホスホン酸エチル類、カルボキサミド類、スルホンアミド類、カルバメート類、アセタール類、およびケタール類からなる群から選択される、請求の範囲第41項に記載の方法。

【請求項43】

該化学修飾がホスホロチオエートである、請求の範囲第41項に記載の方法。

【請求項44】

該オリゴヌクレオチドプライマーが該コントロールポリヌクレオチドにその3'-末端の3-5ヌクレオチド以外でハイブリダイズする、請求の範囲第39項に記載の方法。

【請求項45】

伸長オリゴヌクレオチドプライマーの存在を検出し、それが該標的ポリヌクレオチドの存在と相関している、請求の範囲第39項に記載の方法。

【請求項46】

該コントロールポリヌクレオチドが長さ50ないし5000ヌクレオチドである、請求の範囲第39項に記載の方法。

【請求項47】

該コントロールポリヌクレオチドが反応混合物中、1pMから100pMの濃度で存在する、請求の範囲第39項に記載の方法。

【請求項48】

工程(5)~(7)の繰り返しは、温度サイクリングを繰り返すことにより達成される、請求の範囲第39項に記載の方法。

【請求項49】

温度サイクリングが少なくとも3回繰り返される、請求の範囲第48項に記載の方法。

【請求項50】

該標的ポリヌクレオチドがDNAである、請求の範囲第39項に記載の方法。

【請求項51】

工程(c)の生成物に、該配列にハイブリダイズする能力のある標識オリゴヌクレオチドプローブを加え、該ハイブリダイゼーションが起こったかどうかを測定することを含む、請求の範囲第39項に記載の方法。

【請求項52】

該オリゴヌクレオチドプライマーをリポーター基で標識する、請求の範囲第39項に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 5 3】

パッケージした組み合わせ物中に：

- (a) オリゴヌクレオチドプライマー、
 - (b) 該オリゴヌクレオチドプライマーが該オリゴヌクレオチドプライマーの 3' - 末端の 1 - 10 ヌクレオチド以外でハイブリダイズする配列を有するコントロールポリヌクレオチド、
 - (c) 3' - 5' エクソヌクレアーゼによる、該 1 - 10 ヌクレオチドの分解を防ぐ化学修飾がその 3' - 末端にある以外は該オリゴヌクレオチドプライマーと同一である修飾オリゴヌクレオチドプライマー、
 - (d) ヌクレオシドトリホスフェート、および、
 - (e) 3' - 5' エクソヌクレアーゼ、
- を含んでなるキット。

10

【請求項 5 4】

該オリゴヌクレオチドプライマーが、それがその 3' - 末端で該 1 - 10 ヌクレオチド以外でハイブリダイズする該コントロールポリヌクレオチドの部分に対して相補的である、請求の範囲第 5 3 項に記載のキット。

【請求項 5 5】

該化学修飾が、ホスホロチオエート類、ホスホン酸エチル類、カルボキサミド類、スルホンアミド類、カルバメート類、アセタール類、およびケタール類からなる群から選択される、請求の範囲第 5 3 項に記載のキット。

20

【請求項 5 6】

該化学修飾がホスホロチオエートである、請求の範囲第 5 3 項に記載のキット。

【請求項 5 7】

該オリゴヌクレオチドプライマーが該コントロールポリヌクレオチドにその 3' - 末端の 3 - 5 ヌクレオチド以外でハイブリダイズする、請求の範囲第 5 3 項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

1. 発明の分野

顕著な罹病率および死亡率は、感染病に関連する。疾病をよりよく監視および処置するためのより迅速かつ正確な診断法が要求されている。DNA プロブ、核酸ハイブリダイゼーションおよびインビトロ増幅技術を用いる分子学的方法は、患者の診断に使用される従来法に利点を与える有望な方法である。

30

核酸ハイブリダイゼーションは、核酸の同一性を調査し、その存在を確認するのに使用されてきた。ハイブリダイゼーションは、相補的塩基対形成に基づくものである。違いに相補的な一本鎖核酸と一緒にインキュベートすると、相補的塩基配列対は、二本鎖ハイブリッド分子を形成する。一本鎖デオキシリボ核酸 (ssDNA) またはリボ核酸 (RNA) が相補的核酸配列と水素結合構造を形成する能力は、分子生物学研究における分析ツールとして使用されてきた。高比活性の放射性ヌクレオシドトリホスフェートを有効利用し、T4 ポリヌクレオチドキナーゼにより DNA を ³²P 標識することにより、様々な生物学的対象の核酸配列が同定、単離および特性化されてきた。核酸ハイブリダイゼーションは、特定の核酸配列に関係する疾病状態の診断において多大な可能性を有する。これらの特定核酸配列は、挿入、欠失、点突然変異による、または細菌、糸状菌カビ、真菌、およびウイルスの感染による外来 DNA または RNA の獲得による、DNA の遺伝子変化または環境変化から生じる場合もある。核酸ハイブリダイゼーションは、今までのところ、主に、大学および企業の分子生物学研究所で採用されている。患者体液に存在する疾病関連 DNA または RNA の濃度が多くの場合非常に低く、また十分な感度の核酸ハイブリダイゼーション分析法が利用できないため、核酸ハイブリダイゼーションを臨床医療において診断ツールとして応用するには限界がある。

40

特定の核酸配列を検出する方法の 1 つは、一般に、ニトロセルロース紙、セルロース紙、

50

ジアゾ化紙、またはナイロン膜などの固体支持体への標的核酸の固定化である。標的核酸を支持体に固定化した後、支持体を適切に標識したプローブ核酸に約48時間接触させる。その時間経過後、固体支持体を温度制御下で数回洗浄して、ハイブリダイズしなかったプローブを除去する。次いで、この支持体を乾燥し、ハイブリダイズした物質をオートラジオグラフィーにより、または分光測定法により検出する。

非常に低い濃度を検出しなければならない場合、上記の方法は、反応が遅くかつ多くの手間がかかり、また、放射性標識よりも検出されにくい同位元素標識は適切でないことが多い。

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法として知られている特定のDNAセグメントの酵素的増幅法が報告されている。このインビトロ増幅法は、変性、オリゴヌクレオチドプライマー-アニーリング、および好熱性ポリメラーゼによるプライマー伸長というサイクルの繰り返しに基づくものであり、プライマーによりフランクされた領域のコピーを指数的に増大する。DNAの相対する鎖にアニールするPCRプライマーを、一方のプライマーのポリメラーゼ触媒伸長生成物がもう一方の鋳型鎖として働き得るように配置し、その長さが各オリゴヌクレオチドプライマーの5'末端間の距離として定義される別個のフラグメントの蓄積を導く。

その他の核酸配列増幅法もまた、報告されている。この方法は、シングルプライマー増幅と称する。この方法は、標的配列が相対的に短い相補的配列によりフランクされているステム-ループ構造または逆方向反復構造を有する標的配列の増幅を提供するものである。検出すべきポリヌクレオチド分析物の存在にかかるとともに、標的配列を作製する様々な方法もまた、報告されている。

上記方法は、非常に少量で存在する標的DNA分子を、高感度で検出する極めて有力な技術である。元の標的DNA分子の数と特異的に増幅した生成物の数との相関関係は、多くの変数によって影響を受ける。緩衝液または温度条件の僅かな変化が反応毎の(reaction-to-reaction)増幅効率に非常に大きな影響を与えることもある。更に、DNA標的の臨床試料が酵素的増幅を抑制し得る阻害因子を含有することもある。

核酸の標的配列を臨床診断使用のために増幅する場合、確実に各増幅反応により増幅した生成物を獲得できるようにする必要がある。特に、市販診断用製品では、不適切なアッセイ法または汚染試薬または不活性試薬に起因する誤診を避けるための確認方法が必要である。各試薬および検出方法が適切に作用していることを示す内部陽性コントロールの開発が重要である。かかるコントロールがない場合、標的核酸の存在を示すはずのアッセイの失敗は、標的の不在に起因することもあり、またはアッセイの実施に使用される1またはそれ以上の試薬またはある器具の不足によって引き起こされることもある。

増幅反応を定性化または定量化する様々な手法が開発されており、これらの手法は、2つの主たるカテゴリー、即ち、相同コントロール(homologous controls)と異種コントロール(heterologous controls)に分けることができる。かかるコントロールは、mRNAの増幅に応用されており、またDNA分析物に適用されている。相同コントロールは、標的配列を含有しないコントロールポリヌクレオチドを有する。かかる手法の1つは、“内生標準”アッセイとして知られており、試験したすべての試料において比較的一定レベルで発現される内生ポリヌクレオチドを標準として利用するものである。次いで、試験配列のレベルを標準と比較する。異種コントロールは、通常、HLA-DQおよびベータ-グロブリン遺伝子またはmRNAなどのヒトDNAの増幅領域である。異種コントロールは、すべての非標的的特異的試薬および操作の適切さを保証するが、標的的特異的試薬に関わる問題については感度が低い。

相同コントロールは、目指す標的と同じ配列の一部を含有するコントロールポリヌクレオチドを利用するが、サイズの相異により、または制限部位などの特定の配列の存在または不存在により標的と識別できる。相同コントロールは、外生核酸フラグメントを含有する、即ち、それらは、天然には試料中に存在せず、また、標的を増幅するのに使用したのと同じプライマーを用いてそれらを増幅できるように構築されている。この手法では、配列中にほんの僅かな変化を持つが、容易に標的配列と識別できるように合成標準を設計する

10

20

30

40

50

。アッセイする試料および合成標準を同一の反応容器内で増幅するので、増幅に影響を与え得るあらゆる変数は標的およびコントロールの双方に等しく影響すべきである。

一般に、上記の方法では、コントロールの増幅と存在するならば標的の増幅との間に競合が起こり、例えば、プライマー結合に対する競合、およびデオキシヌクレオシドトリホスフェートおよびポリメラーゼなどのその他の試薬に対する競合などである。この競合は、普通、限られた量のポリメラーゼしか利用できないことから起こる。結果として、これらの1つが高濃度で存在すれば、他のものの増幅はブロックされてしまい、そうして、コントロールまたは標的のいずれかの検出を妨害する可能性がある。従って、例えば、PCRにおいて類似サイズの2種のDNAの同時増幅を達成するためには、普通、ほぼ等しい濃度の2種のDNA標的配列を用いて増幅を開始する必要がある。

10

2. 関連技術の記載

米国特許第5,219,727号(Wang等)は、ポリメラーゼ連鎖反応により、試料中の標的核酸セグメントの量を測定する方法を記述している。この方法は、標的核酸セグメントと内部標準核酸セグメントとの同時増幅に関連するものである。各セグメントから増幅したDNAの量を測定し、標準曲線と比較して増幅前に試料中に存在した標的核酸セグメントの量を測定する。この方法は、生物学的試料中の特定のmRNA種の量を測定する具体的な応用性を有する。この開発についてもWang等によりProc.Nat.Acad.Sci.USA(1989)86:9717-9721に記述されている。

定量PCR法は、Eeles等により“Polymerase Chain Reaction(PCR):The Technique and Its Applications”(1993)6章、55-61頁、R.G.Landes Companyに開示されている。

20

核酸増幅における偽陰性の消去法は、ヨーロッパ特許出願WO94/04706(Kievits等)に記述されている。増幅前に内部コントロールを試料に加える。コントロールは分析物核酸と同一の増幅試薬で増幅させることができる、分析物核酸と識別可能な核酸、好ましくは、それを分析物核酸と区別するために突然変異させた、分析物核酸に対応する核酸配列を有する。

Celi等は、Nucleic Acids Research(1993)21(4):1047に競合的PCR用の迅速かつ多用途の内部標準合成法を記載している。

Gilliland等は、Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1990)87:2725-2729に、サイトカインmRNAとDNAの分析；競合的ポリメラーゼ連鎖反応による検出および定量を記述している。

定量的PCRにおいて内部標準として使用するためのPCR模擬体：競合的DNAフラグメントは、Siebert等、Biotechniques(1993)14(2):244-249に開示されている。

30

Piatak等は、Biotechniques(1993)14(1):70-80にHIV DNAおよびRNA種を正確に定量するための定量競合的ポリメラーゼ連鎖反応を記載している。

ウイルス学における定量PCRおよびRT-PCRは、Clementi等によりPCR methods and Applications(1993)2:191-196に開示されている。

内部標準を用いる競合的ポリメラーゼ連鎖反応：ウイルスDNAの定量への応用は、Telenti等、Journal of Virological Methods(1992)39:259-268に記述されている。

Eckstein等、TIBS(1989)14:97-100は、分子生物学におけるホスホロチオエート類を報告している。

Ott等、Biochemistry(1987)26:8237-8241は、DNAポリメラーゼIによる分解に対するオリゴヌクレオチドプライマーの保護を開示している。

40

核酸配列の増幅法、検出法および/またはクローニング法は、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号、第4,800,159号、第4,965,188号および第5,008,182号に開示されている。

ポリメラーゼ連鎖反応による配列重合は、Saiki等、(1986)Science,230:1350-1354に記載されている。熱安定性DNAポリメラーゼを用いるDNAのプライマー指向性酵素的増幅は、Saiki等、Science(1988)239:487に記載されている。

1989年1月19日および1989年8月29日にそれぞれ出願された米国特許出願第07/299,282号および第07/399,795号は、シングルポリヌクレオチドプライマー(ASPP)を用いる核酸増幅を記載している。1990年7月19日に発明された米国特許出願第07/555,323号は、シングルプライマー増幅に使用するためのポリヌクレオチドの製法を開示している。米国特許

50

出願第07/555,968号は、分子内塩基対構造を含有する分子の製法を記載している。シングルプライマー増幅に使用するためのポリヌクレオチドの製法は、1991年10月11日に出願された米国特許出願第07/776,538号に記載されている。これらの5つの出願の開示内容は、“関連技術の記載”と題する章に挙げた文献と共に出典明示により本明細書の一部としている。

プライマーとしてランダム配列のオリゴヌクレオチドを用いる核酸配列の増幅は、米国特許第5,043,272号に記載されている。自身にまたは他の核酸に繰り返しハイブリダイズして増幅物を形成する能力のある一本鎖自己ハイブリダイジング核酸プローブは、1986年7月22日に出願された米国特許出願第888,058号に記載されている。

発明の概要

最も広義の態様において、本発明は、増幅過程における相対的な検出能に関して2またはそれ以上の別個のポリヌクレオチドの増幅の比較を可能とする。本発明によれば、一方の増幅を進行させながら他方の増幅を制限することにより、一方のポリヌクレオチドの増幅をもう一方のポリヌクレオチドの増幅に相関して制御できる。このことは、両方のポリヌクレオチドを増幅させるため、単一のプライマーを用いることにより達成され、このプライマーは、一方のポリヌクレオチドに対するその結合部位に3'-ミスマッチを有する。この3'-ミスマッチは、他方のポリヌクレオチドに相関する一方のポリヌクレオチドの増幅調節を可能にするものである。かかる調節の量およびタイミングは、ミスマッチプライミング部位を持たないポリヌクレオチドの濃度を直接反映する。従って、本発明方法は、定性的または定量的な測定または制御を提供するものである。

本発明の一実施態様は、標的ポリヌクレオチドの標的配列の多数のコピーを形成させる方法に関する。この方法は、オリゴヌクレオチドプライマーの伸長生成物を、少なくとも標的配列に沿って、または伸長したオリゴヌクレオチドプライマーに沿って形成させる工程を含む。この伸長生成物は、標的配列のコピーである。本発明の改良法は、オリゴヌクレオチドプライマーがかかるプライマーの3'-末端以外でハイブリダイズする第2のポリヌクレオチドの存在下で伸長生成物を形成させることを含む。この方法の条件下、オリゴヌクレオチドプライマーは、標的配列に沿うオリゴヌクレオチドプライマーの伸長に関して、制御された方法で第2のポリヌクレオチドに沿って伸長する。反応混合物は、第2のポリヌクレオチドのコピーである伸長生成物について試験する。その存在は標的配列増幅の条件および試薬が適切に機能していることを示す。標的配列のコピーである伸長生成物の存在についても試験する。その存在は標的配列の存在を示し、その量は、かかる第2のポリヌクレオチドの量の適切な制御のもと、標的配列の量を示す。

本発明のその他の態様は、標的ポリヌクレオチドの標的配列の増幅法の改良に関する。その方法は、標的ポリヌクレオチドを含有する疑いのある試料を、標的配列が存在した場合にそれを増幅する試薬類と合わせ、その組み合わせ物を標的配列が存在した場合にそれを増幅する条件下におくことを含む。この試薬類は、オリゴヌクレオチドプライマーおよびポリメラーゼを含む。本発明の改良法は、その組み合わせ物中に、オリゴヌクレオチドプライマーがそのオリゴヌクレオチドプライマーの3'-末端の1-10ヌクレオチド以外でハイブリダイズするコントロールポリヌクレオチドを含む。また、ポリメラーゼが増幅反応条件下で3'ないし5'エクソヌクレアーゼ活性を持たない場合、その組み合わせ物中に、3'ないし5'エクソヌクレアーゼを含ませる。このオリゴヌクレオチドプライマーは、標的配列に沿って伸長する。オリゴヌクレオチドプライマーのその他の分子は、1-10ヌクレオチドが3'ないし5'エクソヌクレアーゼ活性により分解された後にのみ、コントロールポリヌクレオチドに沿って伸長する。反応混合物はコントロールポリヌクレオチドのコピーについて試験する。その存在は、標的配列を増幅する試薬および条件が機能的であることを示す。所望により、修飾したオリゴヌクレオチドプライマーが上記組み合わせ物中に含まれる。この修飾プライマーは、反応条件下、上記の1-10ヌクレオチドの3'ないし5'エクソヌクレアーゼ活性による分解を防ぐ化学修飾がその3'-末端にある以外はオリゴヌクレオチドプライマーと実質的に同一である。

本発明のその他の実施態様は、一本鎖標的ポリヌクレオチドの標的配列(“標的配列”)

10

20

30

40

50

の多くのコピーを形成する方法の改良法である。その方法では、第1のポリヌクレオチドプライマー（“第1プライマー”）を標的配列の3'-末端にハイブリダイズさせる。第1プライマーは、ポリメラーゼの存在下で少なくとも標的配列に沿って伸長し、（1）その伸長第1プライマーまたは（2）伸長第2ポリヌクレオチドプライマー（“第2プライマー”）にハイブリダイズし、そして、それに沿って伸長する能力がある。この伸長第2プライマーは、標的配列に相補的なポリヌクレオチド（相補的ポリヌクレオチド）にハイブリダイズし、そしてそれに沿って伸長する能力のある第2プライマーの伸長の結果得られる。伸長第1プライマーを標的配列から解離させる。第1または第2プライマーを伸長第1プライマーの3'-末端にハイブリダイズさせる。第1または第2プライマーを伸長第1プライマーに沿って伸長させる。伸長第1プライマーまたは伸長第2プライマーを伸長第1プライマーから解離させる。第1プライマーを伸長第1または第2プライマーの3'-末端にハイブリダイズさせる。次いで、後の3工程を繰り返す。本発明の改良法は、上記工程にかけた同一反応混合物中に、ポリヌクレオチドプライマーがそのプライマーの3'-末端の1-10ヌクレオチド以外でハイブリダイズするコントロールポリヌクレオチドを含むことからなる。また、ポリメラーゼが3'ないし5'エクソヌクレアーゼを含まない場合、その組み合わせ物中に3'ないし5'エクソヌクレアーゼが含まれる。オリゴヌクレオチドプライマーは、標的配列に沿って伸長し、第2プライマーは、相補的ポリヌクレオチドに沿って伸長する。更に、第1または第2プライマーは、1-10ヌクレオチドがポリメラーゼの3'ないし5'エクソヌクレアーゼ活性によって分解された後のみ、コントロールポリヌクレオチドに沿って伸長する。所望により、修飾オリゴヌクレオチドプライマーが上記組み合わせ物中に含まれる。修飾プライマーは、この反応条件下、上記の1-10ヌクレオチドの分解を防ぐ化学修飾がその3'-末端にある以外はオリゴヌクレオチドプライマーと実質的に同一である。

本発明のその他の実施態様は、少なくとも1種の二本鎖ポリヌクレオチド（“ポリヌクレオチド”）の多数のコピーを形成する方法を指向し、この場合、ポリヌクレオチドは、一本鎖標的ポリヌクレオチド配列（“標的配列”）およびその相補的配列を含む。この方法は、陽性内部コントロールを有する。この方法では、1またはそれ以上の二本鎖ポリヌクレオチドを含有する疑いのある試料を、試料中に存在する疑いのある各標的配列の一部およびその相補的配列にハイブリダイズする能力のあるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、その標的配列および相補的配列にプライマーをハイブリダイズさせ、そしてそれに沿ってプライマーを伸長させる条件下で、処理する。プライマーは、一方のプライマーから形成された伸長生成物とその相補物から解離したときに、もう一方のプライマーの伸長生成物形成のための鑄型として働くことができるようなものを選択する。また、上記中に、3'ないし5'エクソヌクレアーゼおよびコントロールポリヌクレオチドを、少なくとも1つのプライマーがそのプライマーの3'-末端の1-10ヌクレオチド以外でハイブリダイズする鑄型として、含む。各プライマーは、それぞれ、標的配列および相補的配列に沿って伸長し、プライマーの1つは、1-10ヌクレオチドが3'ないし5'エクソヌクレアーゼにより分解された後のみ、コントロールポリヌクレオチドに沿って伸長する。所望により、修飾オリゴヌクレオチドプライマーが上記組み合わせ物中に含まれる。修飾プライマーは、その反応条件下、上記の1-10ヌクレオチドの分解を防ぐ化学修飾がその3'-末端にある以外はオリゴヌクレオチドプライマーと実質的に同一である。プライマー伸長生成物をそのそれぞれの鑄型から解離させて、一本鎖分子を生成させ、これを、生成した一本鎖を鑄型として用いてプライマー伸長生成物を形成するような条件下、上記プライマーで処理し、その結果、標的配列および相補的配列が存在するならば、それらを増幅させる。この条件は、コントロールポリヌクレオチドに沿ってプライマーを伸長させ、陽性内部コントロールを提供するものである。

本発明のその他の実施態様は、標的ポリヌクレオチドの標的配列の多数のコピーを作製する方法である。（1）標的配列であり、かつ各末端で少なくとも部分的に相補的な第1および第2フランキング配列によりフラックされている配列を有する一本鎖ポリヌクレオチド、（2）その少なくとも10塩基部分がその3'-末端で、一本鎖ポリヌクレオチドの

10

20

30

40

50

3' - 末端である第1および第2フランキング配列のメンバーにハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドプライマー、(3)ヌクレオシドトリホスフェート、(4)少なくとも1つのプライマーがそのプライマーの3' - 末端の1 - 10ヌクレオチド以外でハイブリダイズする鑄型としてのコントロールポリヌクレオチドおよび3'ないし5'エクソヌクレアーゼ、を含む組み合わせ物を提供する。所望により、修飾オリゴヌクレオチドプライマーが上記組み合わせ物中に含まれる。修飾プライマーは、この反応条件下、上記の1 - 10ヌクレオチドの分解を防ぐ化学修飾がその3' - 末端にある以外はオリゴヌクレオチドプライマーと実質的に同一である。

組み合わせ物を、全体的にまたは部分的に連続してかまたは同時にかのいずれかで、(1)一本鎖ポリヌクレオチドを任意の相補的配列から解離し、(2)オリゴヌクレオチドプライマーを一本鎖ポリヌクレオチドの3' - 末端でフランキング配列と、およびコントロールポリヌクレオチドとハイブリダイズさせ、(3)そのオリゴヌクレオチドプライマーを一本鎖ポリヌクレオチドに沿って伸長させて、第1伸長ポリヌクレオチドプライマーを提供し、コントロールポリヌクレオチドにハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプライマーを分解し、分解したオリゴヌクレオチドをコントロールポリヌクレオチドに沿って伸長させ、(4)第1伸長プライマーおよび一本鎖ポリヌクレオチドを解離し、そしてコントロールポリヌクレオチドおよび伸長分解プライマーを解離し、(5)第1伸長オリゴヌクレオチドプライマーをオリゴヌクレオチドプライマーとハイブリダイズさせ、そのオリゴヌクレオチドプライマーをコントロールポリヌクレオチドとハイブリダイズさせ、(6)オリゴヌクレオチドプライマーを第1伸長オリゴヌクレオチドプライマーに沿って伸長させ、第2伸長ポリヌクレオチドプライマーを提供し、コントロールポリヌクレオチドにハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプライマーを分解し、オリゴヌクレオチドプライマーをコントロールポリヌクレオチドに沿って伸長させて伸長分解プライマーを提供し、(7)第2伸長ポリヌクレオチドプライマーを第1伸長ポリヌクレオチドプライマーおよびコントロールポリヌクレオチドの伸長分解プライマーから解離し、(8)上記工程(5)~(7)を繰り返す、条件下でインキュベートする。反応混合物を伸長分解プライマーの存在について試験する。その存在は、標的ポリヌクレオチドの標的配列の多数のコピーを作製するための試薬および条件が機能的であることを示す。

本発明のその他の実施態様は、パッケージした組み合わせ物中に、(a)オリゴヌクレオチドプライマー、(b)オリゴヌクレオチドプライマーがそのオリゴヌクレオチドプライマーの3' - 末端の1 - 10ヌクレオチド以外でハイブリダイズする配列を有するコントロールポリヌクレオチド、(c)3'ないし5'エクソヌクレアーゼによる、1 - 10ヌクレオチドの分解を防ぐ化学修飾がその3' - 末端にある以外はオリゴヌクレオチドプライマーと実質的に同一である修飾オリゴヌクレオチドプライマー、(d)ヌクレオシドトリホスフェート、および(e)3'ないし5'エクソヌクレアーゼ、を含んでなるキットである。

【図面の簡単な説明】

図1および1Aは、本発明のある実施態様を示す略図である。

図2は、本発明の別の実施態様を示す略図である。

図3は、本発明の別の実施態様を示す略図である。

具体的な実施態様の説明

上記の通り、本発明は、その最も広義の態様において、増幅過程にその相対的な検出能に関して2またはそれ以上の別個のポリヌクレオチドの増幅の比較を可能にするものである。両方のポリヌクレオチドを増幅させるため、単一のプライマー、但し、その結合部位に一方のポリヌクレオチドに対する3' - ミスマッチを有するプライマーを用いることにより、一方のポリヌクレオチドの増幅をもう一方のポリヌクレオチドの増幅に相関して制御する。かかる調節の量およびタイミングは、ミスマッチプライミング部位を持たないポリヌクレオチドの濃度を直接反映する。従って、本発明は、試料中のポリヌクレオチドの定量測定または内部定量コントロールとしての使用に有用である。例えば、標的ポリヌクレオチドの増幅の最中にコントロールポリヌクレオチドを本発明に従い増幅した場合、コ

ントロールポリヌクレオチドの増幅量は、標的ポリヌクレオチドの量を直接反映する。コントロールポリヌクレオチドは、試料または反応媒質に添加されるもの、または既に標的ポリヌクレオチド配列含有試料中に存在するものであることができる。

本発明は、標的ポリヌクレオチドのプライミング部位の1つおよびコントロールポリヌクレオチドのプライミング部位の少なくとも1つにハイブリダイズする能力のあるプライマーを用いることによりコントロールされる陽性コントロールポリヌクレオチド鑄型の増幅を可能にするものである。しかしながら、本発明は、標的ポリヌクレオチドの増幅に対してコントロールポリヌクレオチドの増幅を制御できる。これは、プライミング部位を持つコントロールポリヌクレオチドを、プライマーが塩基対形成においてコントロールポリヌクレオチドに対する3'ミスマッチを有するが、標的ポリヌクレオチドに対するミスマッチは持たないように設計することにより達成される。3'ないし5'エクソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼの存在下では、このミスマッチ配列が分解し、その際にコントロールポリヌクレオチドの増幅が起こる。この方法では、コントロールポリヌクレオチドの増幅は、標的ポリヌクレオチドの増幅と直接的に競合しないようにコントロールされる。このコントロールポリヌクレオチドは標的ポリヌクレオチドの増幅を抑制する程多くの増幅試薬は消費できないようになっている。好ましくは、コントロールポリヌクレオチドの増幅の抑制は、上記オリゴヌクレオチドプライマーに加えて、上記オリゴヌクレオチドプライマーと実質的に同一であるが、コントロールポリヌクレオチドにハイブリダイズするときに修飾プライマーの分解を妨げる化学修飾がその一部にある、修飾オリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより制御される。従って、コントロールポリヌクレオチドの増幅を支持するプライマーの量は調節できる。オリゴヌクレオチドプライマーと修飾オリゴヌクレオチドプライマーの比率を制御することにより、制御オリゴヌクレオチドに沿ったオリゴヌクレオチドプライマーの鎖伸長レベルを制御できる。本発明の方法は、コントロールが標的増幅と競合する能力を低減することにより、相同コントロールおよび異種コントロール両方の性能を改善するものである。

一態様において、本発明は、標的ポリヌクレオチドの標的配列の多数のコピーを形成する方法に関する。この方法は、オリゴヌクレオチドプライマーの伸長生成物を少なくとも標的配列に沿って、または伸長オリゴヌクレオチドプライマーに沿って形成する工程を含む。この伸長生成物は、標的配列のコピーである。本発明の改良法は、オリゴヌクレオチドプライマーがそのプライマーの3'-末端以外でハイブリダイズするコントロールポリヌクレオチドの存在下で、伸長生成物を形成することを含む。この方法の条件下で、オリゴヌクレオチドプライマーは、標的配列に沿ったかかるプライマーの伸長を制御された方法でコントロールポリヌクレオチドに沿って伸長する。このようにして、コントロールポリヌクレオチドに対応する伸長プライマーの存在が増幅試薬類および増幅条件が機能的であることを示すことから、陽性コントロールが提供される。

更に、本発明の具体的な実施態様の説明に進む前に、多数の用語を定義したい。

ポリヌクレオチド分析物 - - ポリマーヌクレオチドである測定すべき化合物または組成物であって、無傷の自然状態では、約20ないし500,000またはそれ以上のヌクレオチドを有することができ、単離した状態では、約30ないし50,000またはそれ以上のヌクレオチドを有することができ、通常は、約100ないし20,000ヌクレオチド、より頻繁に見られるのは500ないし10,000ヌクレオチドである。従って、自然状態から分析物を単離することにより、しばしば断片化が起こるのは明らかである。ポリヌクレオチド分析物は、任意の供給源由来の核酸を精製化または未精製化形態で含んでおり、t-RNA、m-RNA、r-RNA、ミトコンドリアDNAおよびRNA、葉緑体DNAおよびRNA、DNA-RNAハイブリッド類、またはそれらの混合物、遺伝子、染色体、プラスミド、微生物、例えば、細菌類、酵母類、ウイルス類、ウイロイド類、糸状菌、真菌、植物、動物、ヒト、などの生物学的材料のゲノム、およびそれらの断片などを含むDNA(dsDNAおよびssDNA)およびRNAを包含している。ポリヌクレオチド分析物は、生物学的試料などの複合混合物の少量画分のみであってもよい。分析物は、当業者にはよく知られた方法により様々な生物学的材料から得ることが出来る。かかる生物学的

10

20

30

40

50

材料のいくつかの例は、限定ではなく説明を目的として、下記表に開示している。

表

対象となる微生物は：

<u>コリネバクテリア属</u>		
コリネバクテリウム・ジフテリア		
<u>肺炎球菌属</u>		
ディプロコッカス・ニューモニアエ		10
<u>連鎖球菌属</u>		
ストレプトコッカス・ピロゲンス		
ストレプトコッカス・サリバルス		
<u>スタフィロコッカス属</u>		
スタフィロコッカス・アウレウス		
スタフィロコッカス・アルブス		20
<u>ナイセリア属</u>		
ナイセリア・メニンジティディス		
ナイセリア・ゴノレア		
<u>エンテロバクテリア属</u>		
エシェリヒア・コリ		
アエロバクター・アエロゲネス	コリ型細菌	
クレブシエラ・ニューモニアエ		30
サルモネラ・ティホサ		
サルモネラ・コレラエスイス	サルモネラ類	
サルモネラ・チフィムリウム		
シゲラ・ディセンテリア		
シゲラ・シミツイ		
シゲラ・アラビノタルダ		40
	シゲラ類	
シゲラ・フレクスネリ		
シゲラ・ボイディイ		
シゲラ・ソネ		
<u>他の腸内細菌</u>		
プロテウス・ブルガリス		50

プロテウス・ミラビリス	プロテウス種	
プロテウス・モルガニ		
シュードモナス・アエルギノサ		
アルカリゲネス・ファエカリス		
ビブリオ・コレラエ		
<u>ヘモフィルスーボルデテラ群</u>	リゾープス・オリザエ	10
ヘモフィルス・インフルエンザ、 H. ダクリイ	リゾープス・アリヅア	藻菌類
ヘモフィルス・ヘモフィルス	リゾープス・ニグリカンス	
ヘモフィルス・エジプチクス	スポロトリカム・シェンキ	
ヘモフィルス・パラインフルエンザ	フロンセカエ・ペドロソイ	
ボルデテラ・ペルツシス	フォンセカエ・コンパクト	20
<u>パスツレラ属</u>	フォンセカエ・デルマチディス	
パスツレラ・ペスティス	クラドスポリウム・カリオニ	
パスツレラ・ツラレウシス	フィアロホラ・ベルコーサ	
<u>ブルセラ属</u>	アスペルギルス・ニドゥランス	
ブルセラ・メリテンシス	マドゥレラ・ミセトミ	30
ブルセラ・アボルタス	マドゥレラ・グリセア	
ブルセラ・スイス	アレシェリア・ボイディイ	
<u>好気性胞子形成細菌</u>	フィアロホラ・ジャンセルメイ	
バシラス・アンストラシス	ミクロスポラム・ジブセウム	
バシラス・ズブチルス	トリコフィトン・メンタグロフィテス	40
バシラス・メガテリウム	ケラチノマイセス・アジェロイ	
バシラス・セレウス	ミクロスポラム・カニス	
<u>嫌気性胞子形成細菌</u>	トリコフィトン・ルブルム	
クロストリジウム・ボツリナム	ミクロスポラム・アドゥイニ	
クロストリジウム・テタニ	<u>ウイルス類</u>	

クロストリジウム・ペルフリンゲンス	ウデノウイルス類	
クロストリジウム・ノヴィイ	<u>ヘルペス・ウイルス類</u>	
クロストリジウム・セプティカム	単純ヘルペス・シンプレックス	
クロストリジウム・ヒストリチカム	水痘（水ぼうそう）	
クロストリジウム・テルチウム	帯状ヘルペス（帯状疱疹）	
クロストリジウム・ビフェルメントス	Bウイルス	10
クロストリジウム・スポロゲネス	サイトメガウイルス	
<u>ミコバクテリア</u>	<u>ポックスウイルス類</u>	
ミコバクテリウム・ツベルクロシス・ホニス	痘瘡（天然痘）	
ミコバクテリウム・ボビス	完全痘瘡	
ミコバクテリウム・アビウム	ポックスウイルス・ボビス	
ミコバクテリウム・レプラ	パラワクシニア	20
ミコバクテリウム・パラツベルクロシス	モルスカム・コンタジオスム	
<u>放線菌属（真菌様菌）</u>	<u>ピコルナウイルス類</u>	
アクチノマイセス・イスラエリ	ポリオウイルス	
アクチノマイセス・ボビス	コクサッキーウイルス	
アクチノマイセス・ネスルンディ	ECHOウイルス	
ノカルジア・アステロイデス	ライノウイルス	30
ノカルジア・ブラシリエンシス	<u>ミクソウイルス類</u>	
<u>スピロヘータ属</u>	インフルエンザ（A、BおよびC型）	
トレポネマ・パリダム	パラインフルエンザ（1－4型）	
トレポネマ・ペルテヌ	おたふくかぜウイルス	
トレポネマ・カラテウム	ニューキャッスル病ウイルス	40
ボレリア・レクレンティス	麻疹ウイルス	
レプトスピラ・イクテロヘモラジアエ	牛疫ウイルス	
レプトスピラ・カニコラ	イヌジステンパーウイルス	
スピリルム・ミナス	呼吸性シンチウムウイルス	
ストレプトバチルス・モニリホルミス	風疹ウイルス	

<u>トリパノソーマ属</u>		
<u>マイコプラズマ属</u>		
マイコプラズマ・ニューモニア		
<u>他の病原体</u>		
リステリア・モノサイトゲネス	東部ウマ脳脊髄炎症ウイルス	
エリシペロスリクス・ルシオパチア	西部ウマ脳脊髄炎症ウイルス	
ストレプトバチルス・モニリホルミス	シンドビスウイルス	10
ドンパニア・グラヌロマティス	チクングニヤウイルス	
バルトネラ・バシリホルミス	セムリキフォレストウイルス	
<u>リケッチア属 (細菌様寄生虫)</u>	マヨラウイルス	
リケッチア・プロワゼキ	セントルイス脳炎ウイルス	
リケッチア・モオセリ	カリフォルニア脳炎ウイルス	
リケッチア・リケッチア	コロラドマダニ熱ウイルス	20
リケッチア・コノリ	黄熱病ウイルス	
リケッチア・アウストラリス	デング熱ウイルス	
リケッチア・シビリカス	<u>レオウイルス属</u>	
リケッチア・アカリ	レオウイルス1-3型	
リケッチア・ツツガムシ	<u>レトロウイルス類</u>	
リケッチア・ブルネッティ	ヒト免疫不全ウイルスIおよびII型(HIV)	30
リケッチア・クインタナ	ヒトT細胞向性ウイルスIおよびII型(HTLV)	
<u>クラミジア属 (未分類寄生虫細菌</u>	<u>肝炎類</u>	
ノウイルス性)	A型肝炎ウイルス	
クラミジア剤 (名称不祥)	B型肝炎ウイルス	
<u>真菌</u>	C型肝炎ウイルス	40
クリプトコックス・ネオファルマンズ	腫瘍ウイルス類	
ブラストマイセス・デルマティディス	ローシャー白血病ウイルス	
ヒストプラズマ・カプスラタム	グロスウイルス	
コクシジオイデス・イミティス	マロニー白血病ウイルス	
	ヒト乳頭腫ウイルス	

パラコキシジオイデス・ブラジリエンス

カンジダ・アルビカンス

アスペルギルス・フミガツス

ムコール・コリムビフェル

(アブシディア・コリムビフェラ)

を包含する。

病的細胞貧血のヘモグロビン遺伝子、嚢胞性繊維症遺伝子、腫瘍形成遺伝子、cDNAなどのような遺伝子類も含まれる。

10

適当なポリヌクレオチド分析物は、分析物を切断処理して、例えば、制限エンドヌクレアーゼまたは他の部位特異的の化学切断法により、剪断または処理することにより、標的ポリヌクレオチド配列を含有するフラグメントを得ることが出来る。しかしながら、本発明の利点は、ポリヌクレオチド分析物を更に切断することなく、その単離した状態で使用出来るという点である。

本発明の目的のために、ポリヌクレオチド分析物またはポリヌクレオチド分析物から得られた切断フラグメントは、通常少なくとも部分的に変性しているか、または一本鎖になっており、もしくは、変性または一本鎖になるように処理される。かかる処理は、当業者にはよく知られており、例えば、加熱またはアルカリ処理である。例えば、二本鎖DNAは、90 - 100 で約1ないし10分間加熱して変性物質を生成することができる。

20

核酸またはポリヌクレオチドの増幅 - - 普通は、媒質中に存在する核酸またはポリヌクレオチド分析物である、核酸またはポリヌクレオチド分子の1またはそれ以上のコピーの形成を起こす(指数増幅)か、または核酸またはポリヌクレオチド分子の相補物の1またはそれ以上のコピーの形成を起こす(線形増幅)方法。

核酸またはポリヌクレオチドの指数増幅 - - 核酸またはポリヌクレオチド分子、普通は、媒質中に存在する核酸またはポリヌクレオチド分析物の1またはそれ以上のコピーの形成を起こす方法。このようなDNAの特定の二本鎖配列を酵素的増幅する方法の1つは、上記の通り、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)として知られている。このインビトロ増幅法は、変性、オリゴヌクレオチドプライマーアニーリング、および好熱性鋳型依存性ポリヌクレオチドポリメラーゼによるプライマー伸長、即ち、かかるプライマーの“鎖伸長”、というサイクルの繰り返しに基づき、プライマーによりフランクされたポリヌクレオチド分析物の所望の配列のコピー、即ち“上記プライマーの鎖伸長生成物”、の指数増加をもたらす。DNAの相対する各鎖にアニールする2つの異なるPCRプライマーを、一方のプライマーのポリメラーゼ触媒伸長生成物がもう一方に対する鋳型鎖として働き得るように配置し、その長さがオリゴヌクレオチドプライマーの5'末端間の距離で定義される別個の二本鎖フラグメントの蓄積をもたらす。

30

その他の増幅法は上述したものであり、シングルポリヌクレオチドプライマーを用いる一本鎖ポリヌクレオチドの増幅に関連する。増幅対象の一本鎖ポリヌクレオチドは、互いに相補的であり、かつそのため、互いにハイブリダイズしてステム-ループ構造を形成する能力のある隣接していない2つの配列を含有する。この一本鎖ポリヌクレオチドは、既にポリヌクレオチド分析物の部分であってもよく、また、ポリヌクレオチドが存在する成果として作製されることもある。

40

核酸増幅の成果を達成するその他の方法は、リガーゼ連鎖反応(LCR)として知られている。この方法は、リガーゼ酵素を用いて、予め形成しておいた核酸プローブを結合させるものである。プローブは、核酸分析物が存在するならばそれとハイブリダイズするが、リガーゼは、プローブを互いに連結させるために使用され、そうして、次のサイクルにおいて特定の核酸配列を反復する働きができる2つの鋳型を生じる。

核酸増幅を達成するその他の方法は、核酸配列をベースとした増幅(the nucleic acid sequence based amplification)(NASBA)である。この方法は、インビトロで、特

50

定の核酸の連続的で、均質な、かつ等温の増幅を誘導するプロモーター指向性酵素的方法である。

その他に核酸の特定の基を増幅する方法は、Q - ベータ - レプリカーゼ法であり、これは、Q - ベータ - レプリカーゼがそのRNA基質を指数的に増幅する能力に依存するものである。

核酸またはポリヌクレオチドの線形増幅 - - 核酸またはポリヌクレオチド分子、普通は、媒質中に存在する核酸またはポリヌクレオチド分析物、の相補物のみの1またはそれ以上のコピーの形成を起こす方法。従って、線形増幅と指数増幅との相異点の1つは、後者がポリヌクレオチドのコピーを生成するのに対し、前者がポリヌクレオチドの相補鎖のみを生成するという点である。線形増幅では、形成された相補物の数は、コピー数が指数関数である指数増幅とは反対に、一定の倍数である。

標的ポリヌクレオチドの標的配列 - - 同定すべきヌクレオチドの配列であって、普通は、ポリヌクレオチド分析物の部分(標的ポリヌクレオチド)または全体中に存在しており、その同一性は、標的ポリヌクレオチド内に含有される標的配列の増幅を実施するのに必要な様々なプライマーおよび他の分子を調製するのに十分な程度知られている。一般に、プライマー伸長増幅において、プライマーは、標的ポリヌクレオチド内の少なくとも標的配列にハイブリダイズし、かつそれに沿って伸長(鎖伸長)するので、標的配列は鋳型として働く。伸長したプライマーは、“鎖伸長生成物”である。標的配列は、普通、2つの指定配列の間にあるが、必ずしもそうである必要はない。一般に、プライマーおよび他のプローブポリデオキシヌクレオチドは、その指定配列と、またはかかる標的ポリヌクレオチドの少なくとも一部、普通、その3' - 末端の少なくとも10ヌクレオチドセグメント、好ましくは少なくとも15ヌクレオチドセグメント、頻繁にあるものでは20ないし50ヌクレオチドセグメント、とハイブリダイズする。この標的配列は、普通、約30ないし5,000、またはそれ以上のヌクレオチド、好ましくは50ないし1,000ヌクレオチドを含有する。標的ポリヌクレオチドは、多くの場合、ポリヌクレオチド分析物の一部である。標的ポリヌクレオチドは、一般に、より大きい分子の断片であるか、または、実質的にその分子全体であってもよい。試料中の標的ポリヌクレオチド配列の存在が、試料中のポリヌクレオチド分析物の存在を示す特異的インジケータであることを保証するために、標的ポリヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの最小数を選択する。非常に大まかには、標的ポリヌクレオチド配列の長さは、通常約 $1.6 \log L$ ヌクレオチドより大きく、ここで、Lは、試料の生物源のゲノムにおける塩基対の数である。標的ポリヌクレオチド配列におけるヌクレオチドの最大数は、通常、ポリヌクレオチド分析物の長さ、およびそれが剪断または単離中の他の過程およびアッセイ用試料を調製するのに必要となる何等かの操作により破壊される傾向、および配列の検出および/または増幅効率により支配される。

オリゴヌクレオチド - - ポリヌクレオチド、普通は、一本鎖ポリヌクレオチドであり、普通は、合成ポリヌクレオチドであるが、天然発生ポリヌクレオチドであってもよい。オリゴヌクレオチドは、普通、長さにして、少なくとも5ヌクレオチド、好ましくは10ないし50ヌクレオチド、より好ましくは15ないし25ヌクレオチドの配列からなる。

オリゴヌクレオチドの調製については、様々な十分に知られた技術を採用できる。かかる配列は、生合成により、または化学合成により得ることができる。短い配列(約100ヌクレオチドまで)の場合、生合成よりも化学合成がより経済的であることが多い。より長い配列では、分子生物学で使用される標準複製法を使用でき、例えば、J. Messing, *Methods Enzymol* (1983) 101:20-78に記載のように、一本鎖DNA用のM13の使用などである。

標準クローニング技術のほかに、ポリメラーゼ触媒反応などのインビトロ酵素的方法も使用できる。RNAを調製する場合、T7 RNAポリヌクレオチドおよび適切なDNA鋳型を使用できる。DNAの場合、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)およびシングルプライマー増幅が便利である。

その他の化学的なポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド合成法には、ホスホトリエ

10

20

30

40

50

ステルおよびホスホジエステル法 (Narang等、Meth.Enzymol (1979)68:90) および支持体上での合成 (Beaucage等、Tetrahedron(1981)Letters 22:1859-1862)、並びに、ホスホルアミデート技術、Caruthers,M.H.,等、“Methods in Enzymology”,Vol.154,pp.287-314(1988)、および“Synthesis and Applications of DNA and RNA”,S.A.Narang編,Academic Press,New York,1987および本明細書に含まれる文献に記載の他の方法がある。

相補的の第1および第2フランキング配列を有する一本鎖ポリヌクレオチド - - 通常、互いに隣接しておらず、かつ相補的である少なくとも2つのセグメントまたはフランキング配列から成るデオキシヌクレオチド配列。これらの配列は、お互いにハイブリダイズして、ステム-ループ構造を形成できる。その相補的配列に結合したとき、リプレッサー、制限酵素および同等物などのレセプターに対する特異的結合部位である1またはそれ以上の配列を含有していることもある。第1および第2のセグメントまたはフランキング配列は、それぞれ一本鎖ポリヌクレオチド配列の3'-末端および5'-末端にあり、それぞれ、少なくとも10、好ましくは少なくとも15のデオキシヌクレオチドおよび/またはそれらの誘導体を含んでなる。各フランキング配列間にある一本鎖ポリヌクレオチド配列の部分は、標的配列を含んでなる。一本鎖ポリヌクレオチド配列が相補鎖とハイブリダイズするとき、各末端は逆方向リピート対のメンバーを有すると思われる。

オリゴヌクレオチドの末端 (End) - - 本明細書に使用した場合、この文言は、オリゴヌクレオチドの3'-または5'-向かい側のいずれかにあるヌクレオチド類を表し、そのターミナルヌクレオチドを含む。

オリゴヌクレオチドの終端 (Terminus) - - 本明細書に使用した場合、この文言は、オリゴヌクレオチドの3'-または5'-末端のいずれかにあるターミナルヌクレオチドを表す。

オリゴヌクレオチドプライマー - - 普通、例えば、核酸の増幅などにおけるポリヌクレオチド鑄型での鎖伸長に使用されるオリゴヌクレオチド。オリゴヌクレオチドプライマーは、普通、その3'-末端に標的ポリヌクレオチドの指定配列とハイブリダイズする能力のある配列を含有する、一本鎖の合成デオキシヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドプライマー、特にその3'-末端は、通常、指定配列に対し、少なくとも50%、好ましくは70%、より好ましくは90%、最も好ましくは100%の相補性を有する。標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドプライマーのハイブリダイズ可能配列のヌクレオチド数は、オリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズするのに使用した条件が、過剰の非制御非特異的ハイブリダイゼーションを防ぐ程度にストリンジェンシーであるべきである。オリゴヌクレオチドプライマーのヌクレオチド数は、普通、少なくとも標的ポリヌクレオチドの指定配列と同程度、即ち、少なくとも10ヌクレオチド、好ましくは少なくとも15ヌクレオチド、一般には、約10から200、好ましくは20ないし50ヌクレオチドである。

コントロールポリヌクレオチド - - オリゴヌクレオチドプライマーの一部とハイブリダイズ可能な配列を有するポリヌクレオチド。従って、かかる配列は、鎖伸長の開始に関わる領域、即ち、プライミング部位にある。好ましくは、コントロールポリヌクレオチドは相同である。コントロールポリヌクレオチドは、普通、長さにして少なくとも50ヌクレオチド、好ましくは100ないし500ヌクレオチド、より好ましくは100ないし500ヌクレオチドの配列からなる。結合がコントロールポリヌクレオチドプライミング部位内で起こるとき、結合の効果は、標的ポリヌクレオチドに沿う鎖伸長に使用されるオリゴヌクレオチドプライマーが、コントロールポリヌクレオチドに対する3'ミスマッチ部分または非ハイブリダイズ部分を有する程度のものである。言い換えれば、オリゴヌクレオチドプライマーの3'-末端の一部は、コントロールポリヌクレオチドにハイブリダイズしない。そのため、かかるオリゴヌクレオチドプライマーの鎖伸長によるコントロールポリヌクレオチドの増幅は、かかるオリゴヌクレオチドプライマーの鎖伸長による標的ポリヌクレオチドの増幅に比べて低い。普通、ミスマッチは、その3'-末端に、コントロールポリヌクレオチドとハイブリダイズしない部分を有するオリゴヌクレオチドプライマーから得られる。この部分は、コントロールポリヌクレオチドのプライミング部位に関し

10

20

30

40

50

て約1ないし10ヌクレオチド、好ましくは3ないし5ヌクレオチドである。従って、オリゴヌクレオチドプライマーの非ハイブリダイズ部分は自身が伸長するための鋳型を持たないことから、オリゴヌクレオチドプライマーの3'-末端の非ハイブリダイズ部分のコントロールポリヌクレオチドに沿った伸長は起こらない。

修飾オリゴヌクレオチドプライマー - その3'-末端に化学修飾がある以外は、標的ポリヌクレオチドの増幅に使用されるオリゴヌクレオチドプライマーと実質的に同一のオリゴヌクレオチドプライマー。この修飾は、3'ないし5'エクソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼにより、コントロールポリヌクレオチドにハイブリダイズしないオリゴヌクレオチドプライマーの1ないし10ヌクレオチドが分解されるのを妨げるものである。従って、化学修飾は、かかる1ないし10ヌクレオチド内、普通はその位置またはその近く、または修飾オリゴヌクレオチドの3'-終端(terminus)の1ないし5ヌクレオチド内にある。

10

本発明の目的を達成するあらゆる化学修飾が利用できる。かかる修飾には、例示であって限定ではないが、ホスホロチオエート類、ホスホン酸エチル類、カルボキサミド類、スルホンアミド類、カルバメート類、アセタール類、およびケタール類がある。更に、その他の修飾も本発明の開示から当業者に示唆されるであろう。

本発明の目的に特に好ましいのは、ホスホロチオエート修飾である。本発明によれば、修飾オリゴヌクレオチドプライマーは、その3'-末端に、普通は、3'-終端の1ないし5ヌクレオチド内に、好ましくは3'-終端に、少なくとも1つのホスフェートの酸素が硫黄に置換されているヌクレオチドモノホスフェートを持つ。好ましくは、1ないし5のホスフェートの酸素を、より好ましくは1ないし2のホスフェートの酸素を硫黄で置換する。硫黄は、しばしば単独でリン(ホスホロチオエート基)に結合するが、リボースの炭素原子または標識の炭素原子とも結合できる。従って、かかる修飾オリゴヌクレオチドプライマーは、少なくとも1つの、好ましくは1ないし5の、より好ましくは1ないし2のリン-硫黄結合を含有する。これらの硫黄含有修飾オリゴヌクレオチドプライマーは、下記の既知技術に従って調製できる。

20

少なくとも1つのモノホスフェートを含有する修飾オリゴヌクレオチドプライマーは、オリゴヌクレオチドが、例えば、Chemical and Engineering News(1994)17(No.16):21-22に記載のものである、ヌクレオチドモノホスフェートを含んでなる。

ヌクレオシドトリホスフェート - - 5'-トリホスフェート置換基を有するヌクレオシド。ヌクレオシドは、普通、デオキシリボースまたはリボースである五炭糖の1'-炭素に共有結合しているプリンまたはピリミジン類のいずれかの窒素塩基の五炭糖誘導体である。プリン塩基は、アデニン(A)、グアニン(G)、イノシンおよびそれらの誘導体および類似体を含む。ピリミジン塩基は、シトシン(C)、チミン(T)、ウラシル(U)およびそれらの誘導体および類似体を含む。ヌクレオシドトリホスフェートには、dATP、dCTP、dGTP、およびdTTPなどのデオキシリボヌクレオシドトリホスフェートおよびrATP、rCTP、rGTPおよびrUTPなどのリボヌクレオシドトリホスフェートがある。“ヌクレオシドトリホスフェート類”の用語は、その誘導体および類似体も含み、非誘導化ヌクレオシドトリホスフェートと同様の方法で、認識および重合化されるような誘導体によって例示される。かかる誘導体または類似体の例は、例示であって限定ではないが、リポーター基で修飾、ビオチニル化、アミン修飾、放射性標識、アルキル化等されるものであって、ホスホロチオエート、ホスファイト、環状原子修飾誘導体類、および同等物などを含む。リポーター基は、フルオレセインなどの蛍光基、ルミノールなどの化学発光基、遅延蛍光などにより検出可能なN-(ヒドロキシエチル)エチレンジアミントリ酢酸などのテルビウムキレーターなどであり得る。“ヌクレオシドトリホスフェート”の用語は、その誘導体および類似体を含む。

30

40

ヌクレオチド - - 核酸ポリマー、即ちDNAおよびRNAのモノマー単位である塩基-糖-ホスフェート化合物。

修飾ヌクレオチド - - 増幅反応中に修飾ヌクレオシドトリホスフェートを組み込むことにより得られ、そうして核酸ポリマーの部分となる核酸ポリマーの単位である。

50

ヌクレオシド - - 塩基 - 糖化合物またはホスフェート部分のないヌクレオチド。

ヌクレオチドポリメラーゼ - - DNA 鋳型と相補的に伸長が起こるようにDNA 鋳型に沿ったオリゴヌクレオチドの伸長を形成する触媒、通常は酵素。ヌクレオチドポリメラーゼは、鋳型依存性ポリヌクレオチドポリメラーゼであって、オリゴヌクレオチドの3'末端の伸長のための基礎単位 (building blocks) としてヌクレオシドトリホスフェートを利用し、オリゴヌクレオチドがハイブリダイズして二本鎖を形成するポリヌクレオチドの一本鎖部分と相補的な配列を提供するものである。通常は、触媒は、DNAポリメラーゼなどの酵素である。

3'ないし5'エクソヌクレアーゼ - - 本発明の目的には、ここに意図した反応条件下で、オリゴヌクレオチドプライマーの一部がコントロールポリヌクレオチドにハイブリダイズするとき、オリゴヌクレオチドプライマー3'-末端からのハイブリダイズしなかったヌクレオチドの選択的切断を触媒する配列依存性酵素として働き、またヌクレオチドポリメラーゼとしても働くことができる、3'ないし5'エクソヌクレアーゼであるか、または3'ないし5'エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素とみなす(後者の場合は、3'ないし5'エクソヌクレアーゼを含むポリメラーゼとみなすことができる)。この酵素は、オリゴヌクレオチドプライマーのハイブリダイズしなかったヌクレオチドを、コントロールポリヌクレオチドにハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプライマーの部分の3'-末端でハイブリダイズしなかったヌクレオチドがない位置まで選択的に切断するが、ハイブリダイズした部分またはコントロールポリヌクレオチドは切断しない。本発明に有用な3'ないし5'-ヌクレアーゼは、本発明方法で使用した条件で安定でなければならず、普通、熱安定性のヌクレオチドポリメラーゼである。このような酵素は、ポリメラーゼを化学的、または遺伝子操作によって修飾し、熱安定性および/または活性増大を与えることができる、細胞、細菌、例えば、E.コリ、植物、動物、ウイルス、好熱性細菌、などの生物源に由来する酵素である。このような酵素には、カリフォルニア州、ラホーヤのStratagene社のPfu DNAポリメラーゼ(天然物または組換え物)、カリフォルニア州、フォスター・シティーのPerkin Elmer社のUltma DNAポリメラーゼ、ウィスコンシン州、マジソンのEpicentre Technologies社のr Bst DNAポリメラーゼ、マサチューセッツ州、ピバリーのNew England Biolabs社のVENT DNAポリメラーゼおよびウィスコンシン州、マジソンのPromega Corp.社のTi DNAポリメラーゼ、およびインディアナポリス州、インディアナポリスのBoehringer Mannheim社のPwo DNAポリメラーゼ等がある。

全体的にまたは部分的に連続して - - 本発明で利用した試料および様々な薬剤を一緒(同時に)でなく合わせる場合、1つまたはそれ以上を残りの薬剤の1つまたはそれ以上と合わせて、サブコンビネーションを形成することが出来る。その後、各サブコンビネーションを本方法の1またはそれ以上の工程にかけることが出来る。そうして、それぞれのサブコンビネーションを、所望の結果の1またはそれ以上を達成する条件下でインキュベート出来る。

ハイブリダイゼーション(ハイブリダイズする)および結合 - - 本明細書には、ヌクレオチド配列の前後にこの用語が互換的に用いられている。2つのヌクレオチド配列が互いにハイブリダイズする能力は、2つのヌクレオチド配列の相補性の程度に基づいており、次にこれは適合した相補的ヌクレオチド対の断片に基づいている。与えられた配列中に別の配列と相補的なヌクレオチドがより多くなると、ハイブリダイゼーションに対する条件は、ますますストリンジェントであることが出来、2つの配列の結合は、ますます特異的になるであろう。高いストリンジェンシーは、温度を上げること、共溶媒の比率を増やすこと、塩濃度を下げることなどにより、達成される。

相同または実質的に同一 - - 一般に、同一であるか、または同じポリヌクレオチド配列とそれぞれハイブリダイズできる2つのポリヌクレオチド配列は、相同である。2つの配列は、各配列が、チミン(T)とウラシル(U)を同じとみなした上で同じまたは類似の塩基配列を少なくとも90%、好ましくは100%有する場合、相同または実質的に同一である。従って、リボヌクレオチドA、U、CおよびGは、それぞれ、デオキシヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド d A、d T、d C および d G に対する類似体と見なす。相同配列は、両方 DNA であるか、または一方が DNA で他が RNA であることが出来る。

相補的 - - 2つの配列は、1つの配列が、逆平行センスで、即ち、各配列の3'末端がもう一方の配列の5'末端に結合し、そして、一方の配列のA、T(U)、GおよびCそれぞれがもう一方の配列のT(U)、A、CおよびGとそれぞれ整列する状態で、もう一方の配列と結合出来るとき、相補である。

隣接しない - - ポリヌクレオチドの2つのセグメント間の、または2つの配列、S1およびS2間の標的ポリヌクレオチド配列に存在する少なくとも1、通常は少なくとも10のヌクレオチドがある、隣接しない配列。

隣接する - - ポリヌクレオチドの2つのセグメント間、または2つの配列間にヌクレオチドがない場合、隣接すると見なされる配列。

配列のコピー - - 一本鎖ポリヌクレオチドの配列に相補的である配列とは区別されるような、一本鎖ポリヌクレオチド配列の直接同一のコピーである配列。

プライマー伸長手段 - - 少なくともプライマーの3'末端または両方にハイブリダイズできる、ヌクレオチドポリマーゼまたはその3'末端以外に配列を有する一本鎖鋳型ポリヌクレオチド。プライマー伸長手段は、また、酵素または他の物質に対する基質として作用できるヌクレオシドトリホスフェート類またはその類似体および、酵素活性に必要な条件、例えば、二価金属イオン(通常はマグネシウム)、pH、イオン強度、有機溶媒(ホルムアミド)等、を含んでいる。

特異的結合対のメンバー(“sbpメンバー”) - - 2種の異なる分子のうち、表面上または空洞内に、一方の分子の特定の空間的かつ極性組織に特異的に結合する領域を有し、それ故に、それと相補であると定義されるもう一方の分子。特異的結合対のメンバーは、リガンドとレセプター(抗リガンド)のように表される。これらは、抗原-抗体などの免疫学的対のメンバーであり得るか、または、オペレーター-レセプター、ヌクレアーゼ-ヌクレオチド、ビオチン-アビジン、ホルモン-ホルモンレセプター、核酸二本鎖分子、IgG-プロテインA、DNA-DNA、DNA-RNAなどであり得る。

リガンド - - それに対するレセプターが天然に存在するか、または製造できる、いくつかの化合物。

レセプター(“抗リガンド”) - - 分子の特定の空間的かつ極性の構造、例えば、エpitepまたは決定基部位、を認識できるいくつかの化合物または組成物。例となるレセプターは、天然に生成するレセプター、例えば、チロキシン結合グロブリン、抗体類、酵素類、Fabフラグメント類、レクチン類、核酸類、リプレッサー類、防御酵素類(Protection enzyme)、プロテインA、補体成分C1q、DNA結合タンパク質またはリガンド類等を含む。

小さい有機分子 - - 分子量1500以下、好ましくは100ないし1000、より好ましくは300ないし600の化合物であって、例えば、ビオチン、フルオレセイン、ロダミンおよび他の染料、テトラサイクリンおよび他のタンパク質結合分子、およびハプテン等である。小さい有機分子は、標識または支持体へのヌクレオチド配列の結合法を提供できる。

支持体または表面 - - 多孔性または非多孔性の水不溶性物質。支持体は、親水性であるか、または親水性となし得るものであり、無機粉末、例えば、シリカ、硫酸マグネシウムおよびアルミナ；天然ポリマー物質、特にセルロース性物質およびセルロースから誘導される物質、例えば、濾紙、クロマトグラフィー用紙等の繊維含有紙など；合成の、または修飾した天然生成ポリマー、例えば、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリ(塩化ビニル)、ポリアクリルアミド、架橋化デキストラン、アガロース、ポリアクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ(4-メチルブテン)、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ(エチレンテレフタレート)、ナイロン、ポリ(ビニルブチレート)等；それ単独で、または他の物質と共に使用されるいずれかのもの；バイオガラス、セラミック類、金属類および同種物のように利用可能なガラスを含む。天然または合成のアセンブリー、例えば、リポソーム類、リン脂質小胞類、および細胞類もまた採用出来る。

10

20

30

40

50

支持体または表面へのsbpメンバーの結合は、通常、文献により入手出来るよく知られた技術により達成され得る。例えば、“インモビライズド・エンザイムス”、イチロー・チバタ、ハルステッド・プレス、ニューヨーク(1978年)およびクアトレカサス、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、245巻、3059頁(1970年)参照。その表面は、多くの形、例えば、ストリップ状、ロッド状、ビーズおよび同種物を含む粒子状のうちのいずれか1つを有している。

標識またはリポーター基もしくはリポーター分子 - - シグナル生成系の1メンバー。通常は、標識またはリポーター基もしくは分子は、ポリヌクレオチドプローブまたはポリヌクレオチドプライマーにコンジュゲートまたは結合させるものであって、直接的または特異的結合反応によって検出される能力があり、検出可能なシグナルを生成できる。標識類は、増幅またはライゲーション用の鋳型を提供し、リプレッサータンパク質；ハプテン類；抗体類；アビジンなどのレセプター類；ビオチンおよび同種物などのリガンドとして作用できる。好ましくは、オリゴヌクレオチドプライマーは標識を持つか、または標識を持つ能力がある。一般に、検出可能なあらゆる標識が使用できる。標識類は、同位元素性または非同位元素性、通常は、非同位元素性であって、触媒、例えば、酵素、触媒をコードするポリヌクレオチド、プロモーター、染料、蛍光分子、化学発光体、補酵素、酵素基質、放射活性基、小さい有機分子、増幅可能なポリヌクレオチド配列、粒子、例えば、ラテックスまたは炭素粒子、金属ゾル、クリスタライト、リポソーム、細胞等であり得る。さらに染料、触媒または他の検出可能基および同種物で標識されてもまたはされなくても良い。標識は、シグナル生成系の1メンバーであって、単独か、またはシグナル生成系の他の

10

20

メンバーと一緒にかのいずれかで、検出可能なシグナルを産生できる。該標識は、ヌクレオチド配列に直接結合できるか、またはヌクレオチド配列に結合するsbpメンバーに相補なsbpメンバーに結合させることにより、それらに結合できるようになる。シグナル生成系 - - シグナル生成系は、1またはそれ以上の成分を有することができ、少なくとも1つの成分は、標識またはリポーター基である。シグナル生成系は、試料中の標的ポリヌクレオチド配列またはポリヌクレオチド分析物の存在または量に関連するシグナルを産生するものである。シグナル生成系は、測定可能なシグナルを生成するために必要な全ての試薬を包含している。標識をヌクレオチド配列にコンジュゲートさせない場合、その標識は、通常、ヌクレオチド配列に、またはその部分に結合するsbpメンバーの1つに相補なsbpメンバーに結合させる。シグナル生成系の他の成分は、展開溶液中に含まれていることもあり、かつ、基質類、エンハンサー類、活性化剤類、化学発光化合物類、コファクター類、阻害剤類、スカベンジャー類、金属イオン類、シグナル産生物質の結合に必要な特異的結合物質、および同種物を含むことが出来る。シグナル生成系の他の成分は、補酵素類、酵素生成物と反応する基質類、他の酵素類および触媒類および同種物であり得る。シグナル生成系は、外部操作、電磁放射の使用、望ましくは、目視検査により検出可能なシグナルを提供するものである。シグナル生成系は、1990年7月19日に出願された米国特許出願第07/555,323号に記載されており、これと同等の開示内容が本明細書に参照として組み込まれている。

30

30

補助物質 - - 様々な補助物質を本発明の方法および本発明に従い実施するアッセイでは頻繁に採用するであろう。例えば、緩衝液は、通常、アッセイ媒質の安定剤およびアッセイ成分と同じく、アッセイ媒質中に存在するであろう。しばしば、これらの添加物に加えて、アルブミンなどのタンパク質類、ホルムアミドなどの有機溶媒類、第4級アンモニウム塩類、硫酸デキストランなどのポリカチオン類、界面活性剤類、特に、非イオン性界面活性剤類、結合エンハンサー類、例えば、ポリアルキレングリコール類または同種物が含まれ得る。

40

上記のように、本発明の一つの態様は、陽性コントロールを提供することにより核酸増幅反応における改良法を提供する。従って、本発明はこのような増幅反応における偽陰性を回避する。この方法は、一般に、少なくとも標的配列に沿ったまたは伸長オリゴヌクレオチドプライマーに沿ったオリゴヌクレオチドプライマーの伸長生産物を形成する工程を含む。伸長生産物は標的配列のコピーである。本発明の改良は、オリゴヌクレオチドプライ

50

マーが、プライマーの3' - 末端の1 - 10ヌクレオチド以外でハイブリダイズする、コントロールポリヌクレオチド存在下での伸長生産物の形成を含む。この方法条件下で、オリゴヌクレオチドプライマーは、標的配列に沿ったオリゴヌクレオチドプライマーの伸長に関連した制御法で、コントロールポリヌクレオチドに沿って伸長する。所望により、修飾オリゴヌクレオチドプライマーを上記組み合わせに含んでもよい。修飾プライマーは、この反応条件下で、上記の1 - 10ヌクレオチドの分解を防ぐ化学的修飾が3' - 末端にある以外、オリゴヌクレオチドプライマーと実質的に同一である。この試みにおいて、コントロールオリゴヌクレオチドに沿ったオリゴヌクレオチドプライマーの鎖伸長のレベルは、オリゴヌクレオチドプライマーおよび修飾オリゴヌクレオチドプライマーの比率を制御することにより制御できる。

10

本発明の一つの態様を図1に記載する。この態様では、PCRによる増幅を選択したが、例示であって限定ではない。二本鎖であり、PCRにより増幅すべき標的配列を有する核酸または標的ポリヌクレオチド(TPN)を含む疑いのある試料を、二つの異なるポリヌクレオチドプライマー(PP1およびPP2)、3'ないし5'エキソヌクレアーゼ活性を有するヌクレオチドポリメラーゼ(NP-EXO)、ヌクレオチドトリホスフェート(NTP)およびコントロールポリヌクレオチド(CPN)と合わせる。CPNは、その3' - 末端に、PP1の3' - 末端の1 - 10ヌクレオチドの部分(P1)以外、PP1とハイブリダイズできるCPNS配列を有する。

条件は、反応混合物の温度サイクリングを達成するように選択する。このような条件下で、PP1は、TPNが存在する時TPNのプライマー結合部位PBS1と、およびCPNのCPNSとハイブリダイズし、プライマーPP2は、TPNのプライマー結合部位PBS2とハイブリダイズする。それぞれのTPNの鎖に沿ったPP1およびPP2の伸長は、それぞれ、伸長PP1(EPP1)および伸長PP2(EPP2)を作り、それらはTPNのそれぞれの鎖の各相補物である。分子EPP1およびEPP2は、それぞれ、プライマーPP2およびPP1のプライマーの鋳型として働く。従って、続く温度サイクリングは標的配列の増幅をもたらす。

20

加えて、PP1は、P1部分を除き、結合部位CPNSでCPNにハイブリダイズする。従って、CPNにハイブリダイズしたPP1は、CPNにハイブリダイズしないP1部分を、PP1の3' - 末端に有する。従って、PP1の3' - 末端は、PP1の3' - 末端が完全にCPNとハイブリダイズするために、P1がNP-EXOのエキソヌクレアーゼ活性によりフラグメントP1Fに分解されるまで、CPNに沿った鎖伸長をすることができない。従って、温度サイクリングの間、分解PP(PP1マイナスP1(またはDPP1))分子のCPNに沿った伸長は、PP1からP1への分解のための遅延により、TPNに沿ったPP1の伸長に関連して制御される。コントロールの増幅は、標的配列の増幅よりも遅い。従って、コントロールの存在は、標的ポリヌクレオチドの増幅が抑制されるほど多くの試薬の消費をもたらさない。この方法において、有効な陽性コントロールが達成される。

30

コントロールポリヌクレオチドは、PP1が結合する部位以外の標的ポリヌクレオチド配列に無関係なオリゴヌクレオチドであってよい。一方、コントロールポリヌクレオチドは、プライマーPP1の3' - 末端が結合しないコントロールポリヌクレオチドの部分以外の標的ポリヌクレオチド配列の鎖の一つに対応することができる。コントロールポリヌクレオチドは二本鎖であってよい。この状況において、コントロールポリヌクレオチドと標的ポリヌクレオチド配列の間に対応がある時、第2のプライマー、例えば、上記PP2がまたPP1が結合する鎖以外の鎖に結合し、それに沿って伸長する(図1A参照)。

40

PP2と、それが結合するコントロールポリヌクレオチドの鎖の間の3' - 末端ミスマッチは、このような鎖に沿ったPP2伸長の制御および所望の陽性コントロールの促進をもたらす。

上記のように、CPNは、下記のようなコントロールポリヌクレオチドとして機能する。PP1は、TPNが試料に存在する時、TPNおよびCPNの両方とハイブリダイズする。しかしながら、PP1のCPNに沿った伸長は、PP1がCPNに沿って伸長し得る前

50

に起こるべき P 1 部分の分解のため、その T P N に沿った伸長に関して制御される。T P N に沿った P P 1 の伸長は、その伸長が C P N に沿っている場合、P P 1 の前分解に依存しない。C P N のコピーであり、相補物である伸長生産物を得るための、P P 1 と C P N のハイブリダイゼーションおよびそれに沿った伸長によりもたらされるコピーおよび C P N 相補物の数は、T P N が試料に存在する時は減少する。T P N が試料に存在しない時、P P 1 の伸長は、C P N に沿って起こり、T P N に沿った P P 1 の伸長を含む競合反応がないため、より多くの C P N のコピーおよび相補物が形成される。

C P N に沿った P P 1 の伸長を制御できる他の方法は、P P 1 および / または C P N もしくは P P 1 および P P 2 の濃度を調節することによる。

本発明の他の態様は、図 2 に記載する。この態様において、上記で定義の修飾オリゴヌクレオチドプライマーである付加的プライマー M P P 1 を使用する。上記のように、M P P 1 は P P 1 に対応するが、P P 1 を C P N とハイブリダイズした時、P 1 を分解不可能にするか、また分解に対して耐性にする修飾を P 1 内に含む。二本鎖の、P C R により増幅すべき標的配列 (T P N S) を有する核酸または標的ポリヌクレオチド (T P N) を含有する疑いのある試料を、3 つのポリヌクレオチドプライマー (P P 1 、 M P P 1 および P P 2) 、好ましくは 3 ' ないし 5 ' エキソヌクレアーゼ活性を有するヌクレオチドポリメラーゼ (N P - E X O) 、ヌクレオシドトリホスフェート (N T P) およびコントロールポリヌクレオチド (C P N) と合わせる。C P N は、その 3 ' - 末端に、P P 1 および M P P 1 の 3 ' - 末端の 1 - 10 ヌクレオチドの部分 (P 1) 以外で P P 1 および M P P 1 とハイブリダイズできる C P N S 配列を有する。

条件は、反応混合物の温度サイクリングを達成するように選択する。このような条件下で、P P 1 および M P P 1 は、T P N が存在する時、T P N のプライマー結合部位 P B S 1 と、および C P N の C P N S とハイブリダイズし、プライマー P P 2 は、T P N のプライマー結合部位 P B S 2 とハイブリダイズする。それぞれの T P N の鎖に沿った P P 1 、M P P 1 および P P 2 の伸長は、それぞれ、伸長 P P 1 および M P P 1 (それぞれ E P P 1 および E M P P 1) および伸長 P P 2 (E P P 2) を作り、それらは T P N のそれぞれの鎖の各相補物である (E P P 1 および E M P P 1) 。従って、続く温度サイクリングは標的配列の増幅をもたらす。一方の分子 E P P 1 および E M P P 1 、および他方の E P P 2 は、それぞれ、一方のプライマー P P 2 および他方の P P 1 および M P P 1 のプライマーの鑄型として働く。

加えて、P P 1 は、P 1 部分を除き、結合部位 C P N S で C P N にハイブリダイズする。従って、C P N にハイブリダイズした P P 1 は、C P N にハイブリダイズしない P 1 部分を、P P 1 の 3 ' - 末端に有する。従って、P P 1 の 3 ' 末端は、P 1 が、P P 1 の 3 ' 末端が完全に C P N とハイブリダイズするために、N P - E X O のエキソヌクレアーゼ活性によりフラグメント P 1 F に分解されるまで、C P N に沿った鎖伸長をすることができない。従って、温度サイクリングの間、分解 P P (P P 1 マイナス P 1 (または D P P 1)) 分子の C P N に沿った伸長は、P P 1 から P 1 への分解のための遅延により、T P N に沿った P P 1 の伸長に関連して制御される。コントロールの増幅は、標的配列の増幅と比較して遅い。従って、コントロールの存在は、標的ポリヌクレオチド配列の増幅が抑制されるほど多くの試薬の消費をもたらさない。この方法において、有効なプラスへの制御が達成される。

加えて、上記のように、P P 1 および M P P 1 は、P 1 部分以外、C P N に、結合部位 C P N S でハイブリダイズする。従って、C P N にハイブリダイズした P P 1 および M P P 1 は、C P N にハイブリダイズしない P 1 部分を、それぞれ P P 1 および M P P 1 の 3 ' 末端に有する。従って、P P 1 の 3 ' - 末端は、P P 1 の 3 ' - 末端が完全に C P N とハイブリダイズするために、P 1 が酵素のエキソヌクレアーゼ活性によりフラグメント P 1 F に分解されるまで、C P N に沿った鎖伸長をすることができない。更に、M P P 1 は修飾 M を有するため、修飾が起こるまでの間のみ分解される。通常、修飾は、M P P 1 が C P N S にハイブリダイズする点から 1 から 10 ヌクレオチド、好ましくは 1 から 4 ヌクレオチド以内である。従って、M P P 1 がまだ C P N とハイブリダイズしない部分 P 2 を含

10

20

30

40

50

むため、M P P 1 は C P N に沿った鎖伸長ができない。従って、温度サイクリングの間、P P 1 マイナス P 1 の分子の C P N に沿った伸長は、P P 1 から P 1 への分解のための遅延により、および、M P P 1 の C P N への競合ハイブリダイゼーションにより、T P N に沿った P P 1 の伸長に関連して制御される。コントロールポリヌクレオチドの増幅は、標的配列の増幅よりも遅い。従って、コントロールポリヌクレオチドの存在は、標的ポリヌクレオチド配列の増幅が抑制されるほど多くの試薬の消費をもたらさない。この方法において、有効な陽性コントロールが達成される。

上記態様において、コントロールポリヌクレオチドの増幅を支持するプライマーの量を、非修飾プライマー P P 1 の量により調節できる。これにより、得られる増幅コントロールポリヌクレオチドの量が制御できる、比較的感度のよい方法を可能にする。一般に、修飾プライマー対非修飾プライマーの比率は 5 : 1 から 1 : 1、好ましくは、約 2 . 5 : 1 である。P P 1 および M P P 1 の両方が、標的ポリヌクレオチド配列 T P N に結合し、それに沿って伸長するため、標的感度の減少は、修飾オリゴヌクレオチドプライマーの増幅反応への取り込みに反映されない。

本発明の他の態様を図 3 に示す。この態様において、単一プライマー増幅による増幅を選択するが、例示であって限定ではない。標的ポリヌクレオチド T P N ' は、逆方向リピートを有する一本鎖ポリヌクレオチドであり、即ち、T P N ' の配列 P B N S 1 ' が T P N ' の配列 S 2 と相補的である。T P N ' を含有する疑いのある試料を、単一オリゴヌクレオチドプライマー P P 1 '、好ましくは 3 ' ないし 5 ' エキソヌクレアーゼ活性を有するヌクレオチドポリメラーゼ N P - E X O、ヌクレオチドトリホスフェート (N T P) およびコントロールポリヌクレオチド (C P N ') と合わせる。C P N ' は、その 3 ' - 末端に、P P 1 ' の 3 ' - 末端の 1 - 10 ヌクレオチドの部分 (P 1 ') 以外で P P 1 ' とハイブリダイズできる C P N S ' 配列を有する。

条件は、反応混合物の温度サイクリングを達成するように選択する。このような条件下で、P P 1 ' は、T P N ' が存在する時 T P N ' のプライマー結合部位 P B S 1 ' と、および C P N ' の C P N S ' とハイブリダイズする。T P N ' の鎖に沿った P P 1 ' の伸長は、伸長 P P 1 ' (E P P 1 ') を作り、それは T P N ' の相補物である。S 2 が P B N S ' の相補物であるため、E P P 1 ' は、S 2 と P P 1 ' の相補物であり、T P N ' および E P P 1 ' の両方と結合でき、それに沿って伸長できる配列 C S 2 を含む。従って、続く温度サイクリングは、標的配列の増幅をもたらす。分子 E P P 1 ' は、プライマー P P 1 ' の鋳型として働く。

加えて、P P 1 ' は、P 1 ' 部分を除き、結合部位 C P N S ' で C P N ' にハイブリダイズする。従って、C P N ' にハイブリダイズした P P 1 ' は、C P N ' にハイブリダイズしない P 1 ' 部分を、P P 1 ' の 3 ' 末端に有する。従って、P P 1 ' の 3 ' - 末端は、P 1 ' が、P P 1 ' の 3 ' - 末端が完全に C P N ' とハイブリダイズするために、N P - E X O のエキソヌクレアーゼ活性によりフラグメント P 1 F ' に分解されるまで、C P N ' に沿った鎖伸長をすることができない。従って、温度サイクリングの間、P P 1 ' マイナス P 1 ' (D P P 1 ') 分子の C P N ' に沿った伸長は、P P 1 ' から P 1 ' への分解のための遅延により、T P N ' に沿った P P 1 ' の伸長に関連して制御される。コントロールの増幅は、標的配列の増幅よりも遅い。従って、コントロールの存在は、標的ポリヌクレオチド配列の増幅が抑制されるほど多くの試薬の消費をもたらさない。この方法において、有効な陽性コントロールが達成される。上記の態様はまた上記のように修飾オリゴヌクレオチドプライマーでも使用できることは明らかである。

本方法は、標的ポリヌクレオチドが DNA または RNA である時、使用される。本発明の態様において、例えば、オリゴヌクレオチドプライマーのような 1 個またはそれ以上の試薬を標識 (レポーター分子) で標識する。レポーター分子は、例えば、検出可能な基またはビオチンのようなバインダーまたは標的配列とハイブリダイズする配列以外のヌクレオチド配列であり得る。伸長プライマーは、プローブに共有的に結合するレポーター分子により検出できる。プローブは、プライマーが結合する配列以外の標的ヌクレオチド配列の部分と相同または相補的なヌクレオチド配列を有する。

10

20

30

40

50

本発明の他の態様は、ポリヌクレオチド分析物を含有する疑いのある試料中のポリヌクレオチド分析物の存在の検出法に関する。試料を含む媒質を上記のように処置して、ポリヌクレオチド分析物が存在するならば、そのポリヌクレオチド分析物から標的ポリヌクレオチドを製造するか、またはポリヌクレオチド分析物それ自体が標的ポリヌクレオチドである。次いで、媒質を増幅を行うための試薬と合わせるが、これは選択した特定の増幅プロトコールによる。次いで、標的ポリヌクレオチドを、本発明に従った上記方法に付し、標的ポリヌクレオチド配列の多数のコピーを製造し、次いでそれを検出する。試験は、その存在がポリヌクレオチド分析物の存在を示すものである伸長プライマーの存在に関して行う。増幅は、ポリヌクレオチド分析物を正確に検出するのに十分な数の伸長プライマーの分子が得られるまで行う。選択した増幅プロトコールによるが、サイクルの数は、少なくとも3、好ましくは少なくとも10である；通常、サイクルの数が30より少ないのが好ましい。ポリヌクレオチド分析物がRNAである場合、ヌクレオチドポリメラーゼは逆転写酵素を含む。

10

増幅を含む本発明に従った方法の実施では、水性媒質を使用する。他の極性共溶媒、通常、アルコール、エーテル等を含む、1-6、通常1-4の炭素原子の酸素化有機溶媒も使用し得る。通常、これらの共溶媒は、使用する場合、約70重量%以下、より普通には、約30重量%以下で存在する。

媒質のpHは、通常、約4.5から9.5、より普通には、約5.5-8.5の範囲、および好ましくは約6-8の範囲である。pHおよび温度は、場合により、同時または連続した、内部ハイブリダイズ配列の分解、プライマーおよび他のプローブと標的ポリヌクレオチド配列のハイブリダイゼーション、ポリデオキシヌクレオチドプライマーと標的ポリヌクレオチド配列のハイブリダイゼーション、プライマーの伸長および伸長プライマーの分解をもたらすように選択し、変える。ある場合、上記工程を連続してまたは同時に行うことが望ましいか否かによって、速度、効果およびこれらの工程の特異性を最適化することで妥協される。種々の緩衝液を、所望のpHを達成するためおよびpHを測定中維持するために使用し得る。緩衝液を例示すれば、ホウ酸、リン酸、炭酸、トリス、バルビタール等がある。用いる特定の緩衝液は本発明で重要ではないが、個々の方法において、一つの緩衝液が他のものより好ましいことがある。

20

中位の温度が発明を行うために使用される。通常、方法の実施において、媒質は2から3種の温度の間を循環する。この方法のための温度は、通常、約10から105、より普通には約40から99、好ましくは50から98である。正確な温度は、塩濃度、pH、使用する溶媒、標的ポリヌクレオチド配列の長さおよび組成およびプライマーによって変化し得る。約30から65の相対的に低い温度が伸長工程で使用できるが、変性およびハイブリダイゼーションは、約50から105の温度で行い得る。

30

本発明を単一プライマー増幅またはPCRに使用する場合、この方法は、伸長プライマーまたはそれに相補的な配列のコピーの所望の数を達成するのに十分な時間行う。この場合、これは、例えば、ポリヌクレオチド分析物のアッセイなどの、増幅を行う目的に依存する。一般に、この方法を行う時間は、1サイクル当たり約1から10分であり、1から200以上程の、通常5から80の、頻繁には10-60のサイクル数を使用できる。簡便さのために、サイクルの時間および数を減らすことが通常望ましい。一般に、所定度合いの増幅のための時間は、例えば、ポリヌクレオチドポリメラーゼを飽和させるのに十分なヌクレオチドトリホスフェートの濃度の選択ならびにポリヌクレオチドポリメラーゼおよびポリヌクレオチドプライマーの濃度の増加により短くできる。一般に、この方法を行うための時間は、約5から200分である。簡便さのために、通常時間を短くすることが望ましい。

40

3'ないし5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素の濃度は、コントロールポリペプチドに沿ったプライマーの伸長の遅延を必要なレベルで実行するのに充分であり、通常、100マイクロリットル反応量当たり約0.1から10単位であり、好ましくは、100マイクロリットル量反応量当たり1から5単位である。このような酵素がまたポリメラーゼとして機能する場合、このポリメラーゼの濃度は、鎖伸長を達成するのに充分なように選

50

扱する。ポリメラーゼの濃度は、通常、経験的に決定する。好ましくは、濃度をさらに増加しても増幅のための時間を5倍まで、好ましくは2倍まで減少しないような十分な濃度を使用する。主要な制限因子となるのは、通常、試薬の値段である。

コピーする標的ポリヌクレオチドの量は、試料中1または2分子程の低量であってもよいが、一般に、試料中に約 10^2 から 10^{10} 、より普通には約 10^3 から 10^8 分子、好ましくは少なくとも試料中に 10^{-21} Mおよび 10^{-10} から 10^{-19} M、より普通には 10^{-14} から 10^{-19} Mで変化し得る。

コントロールポリヌクレオチドの量は、通常、標的ポリヌクレオチドより低く、一般に、約10倍から10000倍、標的ポリヌクレオチドより低い。エキソヌクレアーゼ耐性3'-末端を有するポリヌクレオチドプライマーの場合、コントロールポリヌクレオチドは標的ポリヌクレオチドより過剰であり得るが、一般に、標的ポリヌクレオチドの量または濃度に関して10000倍以上過剰ではない。

オリゴヌクレオチドプライマーの量は、少なくとも所望のコピーの数と同程度であり、通常、試料が1-1,000mLである場合、試料当たり 1×10^{-10} から 1×10^{-6} モルである。通常、プライマーは少なくとも約0.1 μ M、好ましくは0.5 μ Mおよびより好ましくは約1 μ M存在する。好ましくは、オリゴヌクレオチドプライマーは、実質的に、好ましくは少なくとも 1×10^{14} 倍、標的ポリヌクレオチド配列の濃度より過剰である。媒質中のデオキシヌクレオシドトリホスフェートの濃度は広範囲で変化できる；好ましくは、これらの試薬は過剰量で存在する。デオキシヌクレオシドトリホスフェートは通常 10^{-6} から 10^{-2} M、好ましくは 10^{-5} から 10^{-3} Mで存在する。

組み合わせ物を形成するための種々の試薬を合わせる順序は変えてもよい。一般に、標的ポリヌクレオチド配列は、このような配列を含む試料またはこのような配列を得るために処理したポリヌクレオチド分析物から得る。一般に、標的ポリヌクレオチド配列は、デオキシヌクレオシドトリホスフェートと鑄型依存ポリデオキシヌクレオチドポリメラーゼの予備調製組み合わせ物と組み合わせる。オリゴヌクレオチドプライマーは、調製した組み合わせ物に含まれ得るかまたは続いて添加し得る。しかしながら、上記全てを同時添加してもよく、また他にステップ-ワイズ添加または連続添加を用いてもよい。

試薬の濃度および添加順序および方法の条件は、一般に、伸長プライマーのコピーの数およびこのようなコピーが形成される速度を最大にしたいという願望および複製の忠誠度に依存する。一般に、伸長プライマーのコピーの数を、少なくとも 10^2 の率まで、好ましくは 10^4 の率まで、より好ましくは 10^6 またはそれ以上の率まで増加させることが望ましい。

ポリヌクレオチド分析物検出への使用に関する本発明の実施において、媒質、pH、温度および時間に関する考えは上記の通りであり得る。

種々の試薬の濃度が、一般に、対象となるポリヌクレオチド分析物の濃度範囲により決定されるのに対し、多くの試薬の最終濃度は通常、アッセイ感度を最適化するために対象となる範囲にわたり経験的に決定される。アッセイにおける他の試薬の濃度は、一般に、上記と同じ概念に従って決定する。主要な考慮点は、十分な数の伸長プライマーのコピーが、ポリヌクレオチド分析物配列に関連して製造され、そうしてこのようなコピーが容易に検出され、かつポリヌクレオチド分析物の正確な測定を提供することである。

伸長プライマーのコピーは種々の方法で検出できる。例えば、本発明において、オリゴヌクレオチドプライマーの分子は、リガンド、小有機分子、ポリヌクレオチド配列、タンパク質、支持体、オペレーター-リプレッサー・ペアのメンバー、挿入色素等のリポーター分子で標識できる。核酸配列を特異的に検出する標準法が使用できる。

核酸を検出する一つの方法は、核酸プローブの使用である。プローブを使用する一つの方法は、1985年、9月6日に出願された米国特許出願第773,386号に記載されており、その記載を本明細書に参考として包含させる。

他のアッセイ形式および検出形式は、それぞれ1989年1月19日および1989年8月29日に出願された米国特許出願第07/229,282号および07/399,795号、1990年7月19日に出願された米国特許出願第07/555,323号、米国特許出願第07/555,968号および1991年10月11日に出願さ

10

20

30

40

50

れた米国特許出願第07/776,538号に記載され、これらは本明細書に参考として包含させる。

特定の標識またはリポーター分子およびそれらの検出の例は、1990年7月19日出願の米国特許出願第07/555,323号に見ることができ、その関連する記載を本明細書に参考として包含させる。

シグナルの検出は、用いるシグナル生成系の性質に依存する。標識またはリポーター基が酵素である場合、シグナル生成系の更なるメンバーは酵素的基質等を含む。酵素反応の生産物は好ましくは発光生産物または、分光光学的に検出できる蛍光または非蛍光色素、もしくは他のスペクトル的または電気的方法で検出できる生産物である。標識が蛍光分子である場合、媒質を照射し、蛍光を測定できる。標識が放射性基である場合、媒質をカウントし、放射能カウントを測定できる。

10

本発明の他の態様は、標的ポリヌクレオチドを含有する疑いのある試料中の標的ポリヌクレオチドの定量測定に関する。PCR増幅を例えば増幅過程で行う場合、増幅DNA種またはアンプリコンの初期の測定は、しばしば試料に存在する標的DNAの量に直接関連し得る。この技術は、未知標的濃度を含む同じ反応混合物に既知の濃度のコントロールDNAを添加することにより、より信頼できるようになる。これら二つのアンプリコンの初期の測定は比較でき、未知の標的の濃度の決定に使用できる。添加コントロールDNAは、従って、未知標的の内部濃度対照として働く。

上記方法は、DNAの対照濃度が未知標的の濃度より100から1000倍多いかまたは少なくなることができないことで制限される。反応容器中の二つのDNA濃度がこの範囲外である場合、最大濃度DNAが、低い濃度のDNAが増幅できる前に増幅する。この場合、より低い濃度のDNAは検出されず、二つのDNA、即ち、コントロールおよび標的の比較は達成できない。標的DNAの濃度が、ある施用の場合、1000倍以上で変化するため、実際の結果では、未知標的濃度をコントロールDNAの濃度の100 - 1000倍にすることを確実にするために、別の反応容器で、種々のコントロールDNA濃度で行うことが必要である。

20

本発明により、コントロールポリヌクレオチドは、この用語を本発明で使用する限り、増幅反応混合物に、参考ポリヌクレオチドとして、コントロールポリヌクレオチドが常に検出可能なレベルに増幅されるが、標的増幅のシグナルを弱めるかまたは除去する程は増幅しない濃度で、挿入する。従って、単一反応容器で標的ポリヌクレオチドの濃度を信頼できる同定をする濃度範囲は広がる。

30

簡便のために、本発明で用いる予定した量の試薬を、パッケージした組み合わせ物のキットで提供できる。キットは、パッケージにした組み合わせ物中に、(a)オリゴヌクレオチドプライマー、(b)オリゴヌクレオチドプライマーの3' - 末端の1 - 10ヌクレオチド以外、オリゴヌクレオチドプライマーがハイブリダイズする配列を有するコントロールポリヌクレオチド、(c)1から10ヌクレオチドの3'ないし5'エキソヌクレアーゼによる分解を防ぐ化学的修飾がその3' - 末端にある以外はオリゴヌクレオチドプライマーと実質的に同一の修飾オリゴヌクレオチドプライマー、(d)ヌクレオシドトリホスフェートおよび(e)エキソヌクレアーゼ活性を有しても有しなくてもよいヌクレオチドポリメラーゼを含むことができる。ヌクレオチドポリメラーゼが3'ないし5'エキソヌクレアーゼ活性を有しない事例の場合、キットは3'ないし5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を更に含む。

40

標的ポリヌクレオチド配列を増幅するためのキットは、上記の材料を含み、PCRを行うためのものは、加えて、プライマーが、他のものの伸長の鋳型として働く標的配列に沿ったものの伸長生産物に関するものである限り、第2のポリヌクレオチドプライマーを含む。

試料中のポリヌクレオチド分析物のアッセイにおいて、本発明法で使用できるキットは、上記の他の試薬と組み合わせたパッケージに、ポリヌクレオチド分析物から標的ポリヌクレオチド配列を形成する試薬を含むことができる。更に、オリゴヌクレオチドプライマーは、標識し得るか、または配列標識を付与するまたは支持体に結合する基と共に提供され

50

得る。キットは、更に、増幅標的ポリヌクレオチド配列に結合できる標識ポリヌクレオチドプローブを含むことができる。キットは更にシグナル生成系およびまた種々の緩衝媒質（この内の幾つかは、1個またはそれ以上の上記試薬を含み得る）を含むことができる。キット中の種々の試薬の相対的量は、本方法に際して起こる必要のある反応を実質的に最適化し、更に、アッセイ感度を実質的に最適化する試薬の濃度を提供するように、広範囲で変化する。適当な条件下で、キット中の1種またはそれ以上の試薬は、通常凍結乾燥された、賦形剤を含む乾燥粉末として提供され、溶解して、本発明の方法またはアッセイを行うための適当な濃度を有する試薬溶液を提供する。各試薬は別の容器にパッケージしてもよく、またはある試薬を交差反応性および貯蔵寿命が許容される一つの容器に組み合わせてもよい。キットは、更に、上記の本発明の方法に関する取り扱い書を含むことができる。

10

実施例

本発明を、更に、以下の説明的実施例により説明する。特記しない限り、温度は摂氏（ $^{\circ}\text{C}$ ）で、部およびパーセントは重量で記載する。

以下の用語を定める：

H P L C - 高速液体クロマトグラフィー

D T T - ジチオトレイトール

min - 分

sec - 秒

hr - 時間

20

下記実施例で使用するオリゴヌクレオチドは、Biosearch 8750 DNA合成装置で、標準ホスホロアミダイト法で合成した。水酸化アンモニウムで脱保護後、オリゴヌクレオチドをH P L Cで精製した。

実施例 1

この実施例において、二つのオリゴヌクレオチド + 3' - 末端に3'ホスホロチオエート付加を有する一つのオリゴヌクレオチドを、P R C増幅のために使用した。ホスホロチオエート付加は、オリゴヌクレオチド配列中の“*”で示す。

プライマーA - 5'CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGC3' (配列番号1)

プライマーB - 5'CGACTCACTATAGGGCGAATTGG*G*C3' (配列番号2)

30

プライマーC - 5'CATTAGGCACCCCAGGCTTTACAC3' (配列番号3)

標的ポリヌクレオチドは、Promega Company, Madison, WIのpGem5であった。コントロールポリヌクレオチドはまたPromega CompanyのpGem3であった。pGem3は、pGem5より57ヌクレオチド小さい多重クロニング部位(MCS)を有する。プライマーをこれらのプラスミドのMCSに対して設計した。プライマーAは、プラスミド配列がpGem3と異なるpGem5のMCSの上流領域に設計した。プライマーAはpGem5と完全に相補的であり、また3' - 末端の最後の4つのヌクレオチド以外、pGem3と相補的である。下流プライマーであるプライマーCはpGem3および5の両方に相補的であり、全てのP R C増幅において下流プライマーとして働く。プライマーAおよびプライマーCから製造される増幅生産物は、pGem3では212ヌクレオチドおよびpGem5では269ヌクレオチドであり、アガロースゲル電気泳動により容易に区別された。

40

P R Cは、3' - エキソヌクレアーゼ活性(Stratagene, La Jolla, CA)を有する熱安定クローンPfu DNAポリメラーゼで行った。P R C混合物の最終組成は、10mM Tris-HCl (pH 8.8)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.1%トリトンX-100、7.5mM DTT、各ヌクレオチドトリホスフェート0.2mMおよびクローンPfu DNAポリメラーゼ5単位であった。最終プライマー濃度は1.0μMであった。pGem3およびpGem5を脱イオン蒸留水で使用前に希釈し、1μg/μlの濃度にした。適当なDNA試料を個々の試料に最後に加えた。全ての力価測定反応は共通のマスター混合物で行った。サイクルパラメータは、最初の5分の95での変性、続く60で1分の

50

45 サイクル、72 で1分の伸長および94 で30秒の変性であった。100 μLの全PCR反応量をEricomp水 - 冷却サーモサイクラー (Ericomp, Inc. San Diego, CA) で使用した。二つのプラスミド、pGem3 およびpGem5 を、増幅コントロールのレベルおよび二つの鋳型の間の競合を測定する試みにおいて、10²および10⁶標的分子/増幅反応で、増幅反応で力価測定した。

増幅の後、反応を、2.0%の濃度でBethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD) の超純粋寒天から製造したアガロースゲルで分析した。エチジウムブロミドを、紫外線光下で可視化するために、0.5 mg/mlの濃度で加えた。6x 充填色素 (水中の0.25%プロモフェノールブルー、0.25%キシレンシアノールおよび15%フィコール) と合わせた各反応の3分の1を、各アガロースゲルのレーンに充填し、UV放射で可視化した。

10

結果:

標的ポリヌクレオチドが同じか多い濃度である増幅反応において、標的ポリヌクレオチド pGem5 の増幅は、コントロールポリヌクレオチド pGem3 よりも高いレベルで起こった。表1はコントロールおよび標的ポリヌクレオチドの種々の濃度での異なる増幅頻度を比較する。データは、プライマーAのエキソヌクレアーゼ分解が、通常、同様の濃度の標的ポリヌクレオチドよりも低い程度で増幅されるコントロールポリヌクレオチドに反映されることを示した (表1参照)。コントロールポリヌクレオチドの濃度が標的ポリヌクレオチドより高い場合、3' ないし5' エキソヌクレアーゼ分解による遅延を克服し、コントロールポリヌクレオチドは標的ポリヌクレオチドと同程度がより多いレベルで増幅された。この特定の実施例において、標的ポリヌクレオチドの増幅の促進されたレベルは、コントロールポリヌクレオチド増加の濃度に関連して減少した。

20

表1
プライマーAおよびCによる増幅反応

標的のコピーの数

コントロール 鋳型の コピーの 数	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
10 ⁶	$\frac{++}{+}$	$\frac{++}{+}$	$\frac{-}{++}$	$\frac{-}{++}$	$\frac{-}{+++}$
10 ⁵	$\frac{+++}{+}$	$\frac{++}{+}$	$\frac{+}{++}$	$\frac{(+) }{++}$	$\frac{-}{++}$

標的
コントロール

30

10 ⁴	$\frac{++}{-}$	$\frac{++}{-}$	$\frac{++}{-}$	$\frac{+}{+}$	$\frac{+}{+}$
10 ³	$\frac{+++}{-}$	$\frac{+++}{-}$	$\frac{++}{-}$	$\frac{+}{+}$	$\frac{+}{+}$
10 ²	$\frac{+++}{-}$	$\frac{+++}{-}$	$\frac{+++}{-}$	$\frac{++}{++}$	$\frac{+++}{++}$

40

プライマーA エキソヌクレアーゼ分解の調節は、標的ポリヌクレオチドおよびコントロールポリヌクレオチドの両方の増幅中の、コントロールポリヌクレオチドの増幅の割合を制

50

御する手段であった。

標的ポリヌクレオチドおよびコントロールポリヌクレオチドの両方の、低いおよび高い標的ポリヌクレオチド濃度での増幅は、ホスホロチオエート置換プライマーBの取り込みに関してより成功した(表2)。増幅反応は、ホスホロチオエート化プライマー(プライマーB)対非ホスホロチオエート化プライマー(プライマーA)の2.5:1(表2)の比率で行った。標的ポリヌクレオチドおよびコントロールポリヌクレオチドの両方の増幅は、広範囲の濃度の標的ポリヌクレオチド(100-1,000,000標的ポリヌクレオチド分子)にわたり、コントロールポリヌクレオチドの10⁵から10⁶コピーで観察された。

表2
プライマーA、BおよびCによる増幅反応

標的のコピーの数

コントロール 鋳型の コピーの 数	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
10 ⁶	$\frac{+++}{+}$	$\frac{++}{+}$	$\frac{++}{++}$	$\frac{+}{++}$	$\frac{+}{++}$
10 ⁵	$\frac{+++}{+}$	$\frac{+++}{+}$	$\frac{++}{+}$	$\frac{+}{+}$	$\frac{(+)}{++}$
10 ⁴	$\frac{+++}{-}$	$\frac{+++}{+}$	$\frac{++}{+}$	$\frac{++}{+}$	$\frac{++}{++}$
10 ³	$\frac{+++}{-}$	$\frac{+++}{-}$	$\frac{+++}{-}$	$\frac{++}{+}$	$\frac{+}{+}$
10 ²	$\frac{+++}{-}$	$\frac{+++}{-}$	$\frac{+++}{-}$	$\frac{++}{-}$	$\frac{++}{-}$

標的
コントロール

プライマーAを使用しない(プライマーBおよびCのみ)同じ混合物の増幅は、コントロールポリヌクレオチドの検出可能な量の増幅なしに標的アンプリコンのみ製造した。3'ないし5'エキソヌクレアーゼ活性を欠くPfuポリメラーゼを、全3つのプライマーの存在下に増幅の触媒として使用した場合、また標的ポリヌクレオチドのみが増幅された。上記は本発明に含まれる機構に関するある理論を含む。これらの理論は、本発明が記載の結果を達成することは証明されているので、本発明を限定するものとみなされるべきではない。

上記および実施例は、その好ましい態様を含み、本発明を十分に開示するものである。記載した方法の修飾は、分子生物学などの分野の通常の技術者に明らかであり、関連科学は、以下の請求の範囲の範囲内であるとみなされる。

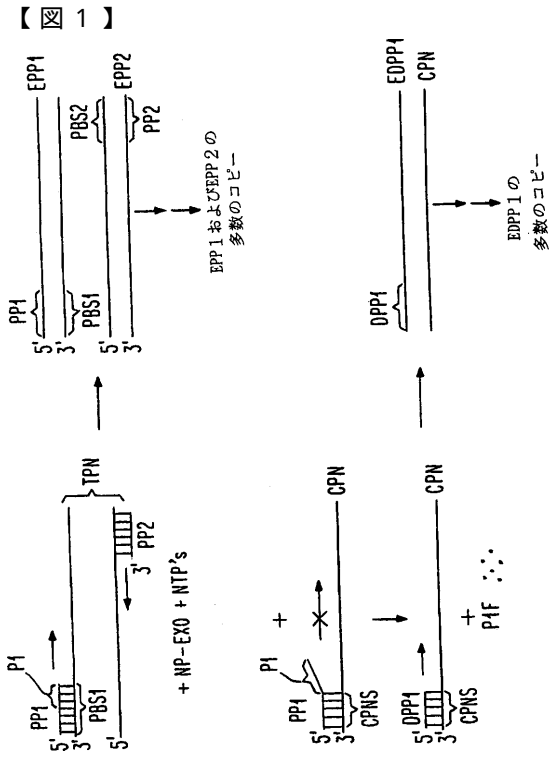


Fig. 1

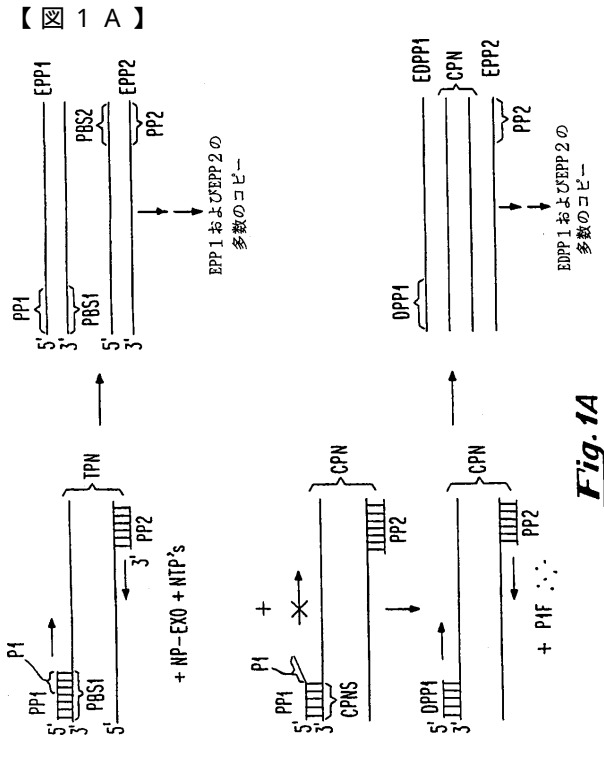


Fig. 1A

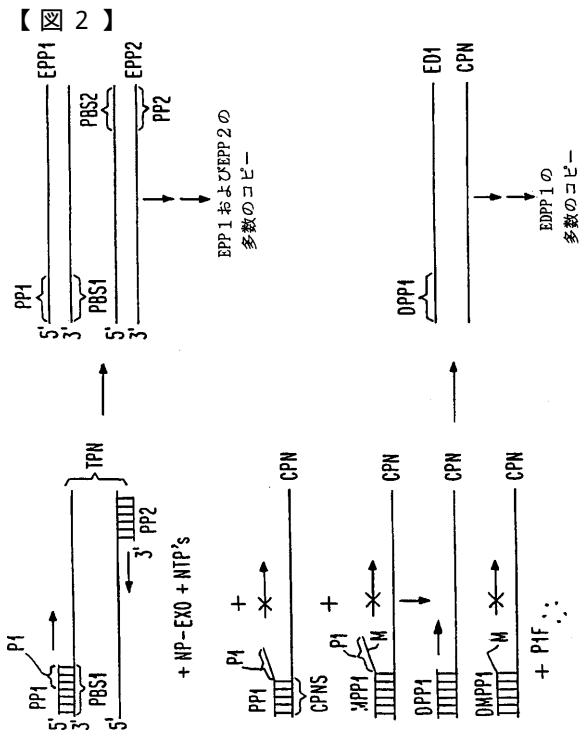


Fig. 2

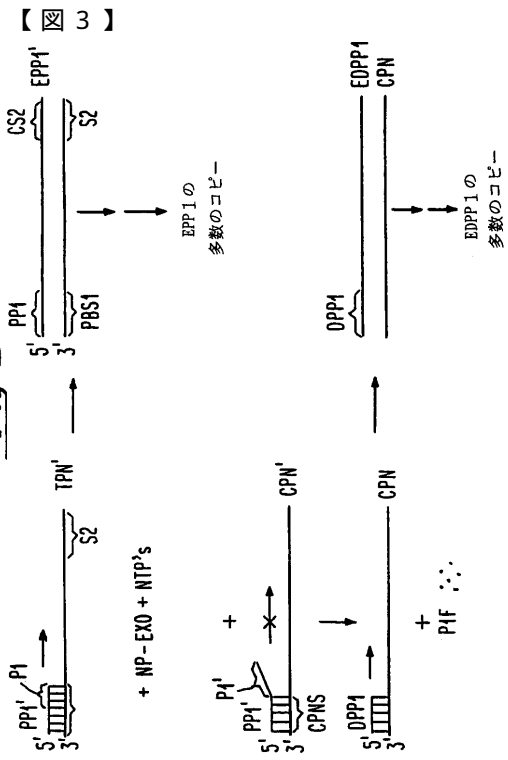


Fig. 3

フロントページの続き

審査官 引地 進

(56)参考文献 国際公開第93/22456(WO, A1)

特開平2-31699(JP, A)

Gene, 1992年, Vol.122, No.2, pp.313-320

PNAS, 1989年, Vol.86, No.24, pp.9717-9721

Nucleic Acids Research, 1992年, Vol.20, No.14, pp.3551-3554

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/09

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed

Science Direct

JSTPlus(JDream2)