

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6433575号
(P6433575)

(45) 発行日 平成30年12月5日 (2018. 12. 5)

(24) 登録日 平成30年11月16日 (2018. 11. 16)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 Q	1/6869	(2018. 01)	C 1 2 Q	1/6869	Z N A Z
C 1 2 Q	1/6876	(2018. 01)	C 1 2 Q	1/6876	Z
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/09	Z

請求項の数 24 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2017-503523 (P2017-503523)	(73) 特許権者	510060453
(86) (22) 出願日	平成27年7月22日 (2015. 7. 22)		ベース4 イノベーション リミテッド
(65) 公表番号	特表2017-522031 (P2017-522031A)		イギリス国 ケンブリッジ シービー3
(43) 公表日	平成29年8月10日 (2017. 8. 10)		Oエフエー ジェジェイ トムソン アベ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2015/052119		ニュー プロアーズ ビルディング
(87) 国際公開番号	W02016/012789	(74) 代理人	100147485
(87) 国際公開日	平成28年1月28日 (2016. 1. 28)		弁理士 杉村 憲司
審査請求日	平成29年3月10日 (2017. 3. 10)	(74) 代理人	100181272
(31) 優先権主張番号	1412977.9		弁理士 神 絃一郎
(32) 優先日	平成26年7月22日 (2014. 7. 22)	(74) 代理人	100193437
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 高木 義和

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単一ヌクレオチド検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) 核酸の漸進的加ピロリン酸分解により単一ヌクレオシド三リン酸のストリームを生成するステップと；

(2) ポリメラーゼとリガーゼの存在下で、少なくとも1つの前記単一ヌクレオシド三リン酸を、(a) 検出不能状態にある特徴的な1つまたは複数のフルオロフォアで標識した、捕捉される前記単一ヌクレオシド三リン酸に対し相補的な単一ヌクレオチド捕捉領域を含み、前記捕捉領域には第2オリゴヌクレオチドおよび第3オリゴヌクレオチドに対し相補的な領域が隣接する、第1一本鎖オリゴヌクレオチドと、(b) 前記第1オリゴヌクレオチドの相補的領域にハイブリダイズすることが可能な、第2一本鎖オリゴヌクレオチドおよび第3一本鎖オリゴヌクレオチドとを含む対応プローブシステムと反応させることにより、少なくとも1つの実質的に二本鎖のオリゴヌクレオチド使用済みプローブを生成するステップと；

(3) 前記使用済みプローブを、二本鎖エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素で消化して、検出可能状態の1つまたは複数のフルオロフォアと、少なくとも部分的に前記第1オリゴヌクレオチドの配列相補体である一本鎖第4オリゴヌクレオチドとを生成するステップと；

(4) 前記第4オリゴヌクレオチドを別の第1オリゴヌクレオチドと反応させて、前記使用済みプローブに対応する、実質的に二本鎖のオリゴヌクレオチド生成物を生成するステップと；

(5) ステップ(3)とステップ(4)を周期的に繰り返すステップと;

(6) ステップ(3)の各反復において解放される前記特徴的な1つまたは複数のフルオロフォアを検出するステップとを含むことを特徴とする、核酸を配列決定する方法。

【請求項2】

前記第2オリゴヌクレオチドの5'末端と、前記第3オリゴヌクレオチドの3'末端がリンカー領域により連結されていることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記リンカー領域はオリゴヌクレオチド領域を含むことを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

生成された前記第4オリゴヌクレオチドは閉ループを含むことを特徴とする、請求項2または3に記載の方法。

【請求項5】

前記1つまたは複数のフルオロフォアは、前記第1オリゴヌクレオチドにおいてその5'末端と前記捕捉領域の間に位置することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記第2オリゴヌクレオチドは、(a)前記捕捉領域の3'側の隣接領域にハイブリダイズし、(b)前記側の領域よりも長いことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記第3オリゴヌクレオチドの3'末端はエキソヌクレアーゼ分解に対し抵抗性のある要素を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記第1オリゴヌクレオチドの3'末端と、前記第2オリゴヌクレオチドの対応領域の間に少なくとも1つのヌクレオチド塩基ミスマッチがあることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記フルオロフォアは、少なくとも1つのクエンチャの存在により前記第1オリゴヌクレオチドにおいて検出不能とされていることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記1つまたは複数のフルオロフォアを解放した後、前記第4オリゴヌクレオチドに付着した残留オリゴヌクレオチド断片をすべて取り除き、新しい第2オリゴヌクレオチドおよび第3オリゴヌクレオチドをアニールできるようにする、ステップ(3)の温度を循環させることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記プローブシステムは、異なる捕捉領域と特徴的な1つまたは複数のフルオロフォアとをそれぞれ備える複数の第1オリゴヌクレオチドタイプを含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

最大4つの異なるオリゴヌクレオチドプローブシステムの組を用い、各組の前記第1オリゴヌクレオチドは、天然に発生するDNAまたはRNAの特徴的なヌクレオチド塩基の1つに対し選択的な捕捉領域と、異なる1つまたは複数のフルオロフォアとを有することを特徴とする、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

ステップ(1)は各単一ヌクレオチド三リン酸を対応するマイクロ液滴中に含める工程をさらに含み、ステップ(2)~(6)は各マイクロ液滴において実行されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

ステップ(6)を各マイクロ液滴に適用することにより得られる結果は、前記核酸配列に特徴的なデータのストリームに組み込まれることを特徴とする、請求項13に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

(a) 検出不能状態にある1つまたは複数のフルオロフォアで標識した第1一本鎖オリゴヌクレオチドと、(b) 単一ヌクレオチド捕捉領域のいずれかの側に並置された、前記第1オリゴヌクレオチド上の相補的な3'側隣接領域および5'側隣接領域にそれぞれハイブリダイズすることが可能な、第2非標識一本鎖オリゴヌクレオチドおよび第3非標識一本鎖オリゴヌクレオチドとを含むことを特徴とする、多成分生物学的プローブシステム。

【請求項 16】

前記第2オリゴヌクレオチドの5'末端と、前記第3オリゴヌクレオチドの3'末端はリンカー領域により連結されていることを特徴とする、請求項15に記載の生物学的プローブシステム。

10

【請求項 17】

前記リンカー領域はオリゴヌクレオチド領域を含むことを特徴とする、請求項16に記載の生物学的プローブシステム。

【請求項 18】

前記フルオロフォアは、前記第1オリゴヌクレオチドの5'側隣接領域に位置することを特徴とする、請求項15～17のいずれか一項に記載の生物学的プローブシステム。

【請求項 19】

前記第1オリゴヌクレオチドはまた、1つまたは複数のクエンチャを含むことを特徴とする、請求項15～18のいずれか一項に記載の生物学的プローブシステム。

【請求項 20】

前記第2オリゴヌクレオチドは、前記第1オリゴヌクレオチドの3'側隣接領域より長いことを特徴とする、請求項15～19のいずれか一項に記載の生物学的プローブシステム。

20

【請求項 21】

前記第3オリゴヌクレオチドは、その3'末端においてエキソヌクレアーゼ分解に対し抵抗性のある要素を含むことを特徴とする、請求項15～20のいずれか一項に記載の生物学的プローブシステム。

【請求項 22】

前記第1オリゴヌクレオチドの3'末端のヌクレオチドは、前記第2オリゴヌクレオチドの対応するヌクレオチドとのミスマッチであることを特徴とする、請求項15～21のいずれか一項に記載の生物学的プローブシステム。

30

【請求項 23】

前記捕捉領域に特徴的な前記ヌクレオチド塩基が異なっている、1～4つの異なる第1オリゴヌクレオチドタイプと、使用される前記フルオロフォアとを含むことを特徴とする、請求項15～22のいずれか一項に記載の生物学的プローブシステム。

【請求項 24】

マイクロ液滴中に含まれていることを特徴とする、請求項15～23のいずれか一項に記載の生物学的プローブシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、DNAまたはRNAの配列決定で用いるのに得に適する、単一ヌクレオチドを検出し、特徴付ける方法に関する。

【背景技術】

【0002】

遺伝物質の次世代配列決定は、ますます高速化する配列決定装置の市場参入に伴って配列決定の単価が下落しているように、概して生物科学、特に医学において、すでに顕著な影響を与えている。

【0003】

当社の以前の出願である国際公開第2014/053853号、同2014/0538

50

54号、同第2014/167323号、同第2014/167324号、および同第2014/111723号において、当社は、それぞれ一つずつマイクロ液滴ストリーム中の対応する液滴に捕捉され得る単一ヌクレオチドの順序づけられたストリーム、好適には単一デオキシリボヌクレオシド三リン酸のストリームを生成するためのポリヌクレオチド分析物の漸進的消化を含む、新しい配列決定法を記載した。その後、各液滴を化学的および/または酵素学的に操作して、それがもともと含んでいた特定の単一ヌクレオチドを明らかにすることが可能である。一実施形態において、これらの化学的および/または酵素学的操作は、分析物を構成する単一ヌクレオチドタイプの1つを選択的に捕捉可能であるようにそれぞれ適合させた、1つまたは複数の二成分オリゴヌクレオチドプローブタイプの使用を含む方法を含む。典型的には、このようなプローブタイプのそれぞれにおいて、2つのオリゴヌクレオチド成分の1つは特徴的なフルオロフォアを含み、プローブが未使用の状態では、蛍光を発するというこれらのフルオロフォアの機能は近くにあるクエンチヤの存在によって、または自己消光によって消光したままである。使用時にプローブはその対応する単一ヌクレオチドを捕捉しているが、その場合は、それが次のエキソヌクレオリシス(exonucleolysis)の影響を受けやすくなることにより、フルオロフォアをクエンチヤから遊離させ、および/または、互いに自由に蛍光を発することができるようにする。この方法により、各液滴に存在する元の単一ヌクレオチドを分光学的方法により間接的に特定することが可能である。

10

【0004】

Fanらは、Nature Reviews Genetics 7(8) 632-644 (2006)において、遺伝子型決定、コピー数測定、ヘテロ接合度の消失の配列決定および検出、アレルト異的発現、ならびにメチル化のための、平行性の高いゲノムアッセイを可能にした方法およびプラットフォームの発展について一般的なレビューを提供する。このレビューの図2aは、分析物の一塩基多型(SNP)の部位の上流および下流にアニールすることにより、SNPの相補体であるヌクレオチドで後から埋めて解放後に増幅し得る完全な環状プローブを形成するためのギャップを残す、3'末端および5'末端を有する環状化可能プローブの使用を図式的に示す。しかしながら当社の方法と異なり、充填プロセス中に捕捉されるヌクレオチドは分析物自体から直接得られない。

20

【0005】

国際公開第03/080861号は、解放時にヌクレオチドに直接付着するヌクレオチド特異的反応ラベルの存在下で、核酸分析物を漸進的加ピロリン酸分解に供すプロセスを公開する。これは当社の用いる方法と全く異なるだけでなく、実際には、標識ヌクレオチドをその後調査する際に測定される蛍光シグナルが弱すぎて、関連する背景雑音を上回る、信頼性の高い特定ができない可能性があるだろう。

30

【0006】

最後に、国際公開第94/18218号は、分析物を漸進的エキソヌクレオリシスに供して単一ヌクレオチド三リン酸または単一ヌクレオチド二リン酸のストリームを生成し、これを次に蛍光増強マトリックスに組み入れてから検出するというDNA配列決定法を教示する。これは当社が記載するものと全く異なるアプローチであるだけでなく、またしても生成されるシグナルがすべて弱すぎて、信頼性をもって検出および特定することができない可能性が認められる。

40

【発明の概要】

【0007】

当社はついに、以前の特許出願で記載した方法の改善版を開発したが、これは、各単一ヌクレオチドに以前得たよりも自由な、多くのフルオロフォアを生じさせることにより、はるかに容易に背景雑音を上回る関連蛍光シグナルの検出を行うことができるという利点を有する。結果として、該方法を用いる任意の配列決定装置の感度は大きく改善され、大きい核酸分子(例えばヒトDNA断片)を正確に配列決定するのにかかる時間はかなり短縮され得る。さらに、検出に必要な計器はより単純になり、そのため製造がより安価になる。

50

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】反応混合物のdNTP成分の存在下および非存在下における、経時的な蛍光強度の増加をモニタリングした結果のグラフである。

【図2】マイクロ流体配列決定装置の概略断面図である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

したがって、本発明の第1態様により、(1)核酸の漸進的加ピロリン酸分解により単一ヌクレオシド三リン酸のストリームを生成するステップと；(2)ポリメラーゼとリガーゼの存在下で、少なくとも1つの前記単一ヌクレオシド三リン酸を、(a)検出不能状態にある特徴的な検出可能要素で標識した第1一本鎖オリゴヌクレオチドと、(b)前記第1オリゴヌクレオチドの相補的領域にハイブリダイズすることが可能な、第2一本鎖オリゴヌクレオチドおよび第3一本鎖オリゴヌクレオチドとを含む、対応するプローブシステムと反応させることにより、少なくとも1つの実質的に二本鎖のオリゴヌクレオチド使用済みプローブを生成するステップと；(3)前記使用済みプローブを、二本鎖エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素で消化して、検出可能状態の検出可能要素と、少なくとも部分的に前記第1オリゴヌクレオチドの配列相補体である一本鎖第4オリゴヌクレオチドとを生成するステップと；(4)前記第4オリゴヌクレオチドを別の第1オリゴヌクレオチドと反応させて、前記使用済みプローブに対応する、実質的に二本鎖のオリゴヌクレオチド生成物を生成するステップと；(5)ステップ(3)とステップ(4)を周期的に繰り返すステップと；(6)ステップ(3)の各反復において解放される前記特徴的な検出可能要素を検出するステップとを含むことを特徴とする、核酸を配列決定する方法を提供する。

【0010】

本発明の方法のステップ(1)は、加ピロリン酸分解により核酸分析物から単一ヌクレオシド三リン酸のストリームを生成する工程を含む。このステップで用いる分析物は、適切には二本鎖ポリヌクレオチドであり、その長さは原則的には無制限とすることができ、ヒトゲノム断片中に見られる最大数百万のヌクレオチド塩基を含む。しかしながら、典型的には、ポリヌクレオチドは少なくとも50、好適には少なくとも150のヌクレオチド対長であり、適切には、それは500より長く、1000より長く、多くの場合は数千ヌクレオチド対長であろう。分析物自体は、適切には、自然発生の(例えば、植物、動物、細菌、またはウイルスに由来する)RNAまたはDNAであるが、本方法は、合成的に生成したRNAもしくはDNAを、または、天然では通常発生しないヌクレオチド塩基、つまり、アデニン、チミン、グアニン、シトシンおよびウラシル以外のヌクレオチド塩基で全体的または部分的に構成される他の核酸を配列決定するためにも用いることが可能である。このようなヌクレオチド塩基の例としては、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、2-0-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノ-メチルウリジン、ジヒドロウリジン、2-0-メチルシュードウリジン、2-0-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンチルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルシュードウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルリノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、5-メトキシウリジン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5-オキシ酢酸、ウィプトキソシン、ウィプトシン、シュードウリジン、キューオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、2-0-メチル-5-メチルウリジン、および2-0-メチルウリジンが挙げられる。DNAの場合、生成される単一ヌクレオシド三リン酸はデオキシリボヌクレオシド三リン酸であるが、RNAの場合、それはリボヌクレオシド三リン酸である。

【0011】

本発明の一実施形態において、ステップ(1)は分析物を基板に付着させる第1サブステップを含む。典型的には、基板は、マイクロ流体表面、マイクロビーズ、または、例えばガラスもしくは非分解性ポリマーからなる透過膜を備える。好適には、基板はさらに、分析物を収容するよう適合した表面を備える。分析物をこうした表面に付着させることができる多くの方法があり、原則的にはそのいずれもこのサブステップで用いることが可能である。例えば、1つの方法は、ガラス表面をエポキシシラン、アミノヒドロカルビルシランまたはメルカプトシランなどの官能性シランでプライミングすることを含む。こうして生成した反応性部位は、次に、末端アミン、スクシニル基、またはチオール基を含むように改変した分析物の誘導体で処理することが可能である。

10

【0012】

ステップ(1)の一実施形態では、分析物を加ピロリン酸分解して、その順序が分析物の配列の順序に対応する単一ヌクレオシド三リン酸のストリームを生成する。加ピロリン酸分解は、ポリメラーゼを含む反応媒体の存在下で、20~90の範囲内の温度で実行することができる。好適にはこれは、単一デオキシヌクレオシド三リン酸が遊離する際に反応ゾーンから連続して離れるように、連続フローの条件下で実行する。最も好適には、酵素および他の典型的な添加物を含む水性緩衝媒体を、分析物が結合した表面に連続的に流すことにより加ピロリン酸分解を実行する。

【0013】

一実施形態では、用いられる酵素は、分析物の漸進的3'-5'加ピロリン酸分解を生じさせて、高い忠実度および適切な反応速度でヌクレオシド三リン酸のストリームを生成することが可能なものである。好適には、この分解速度は可能な限り早く、一実施形態では一秒あたり1~50ヌクレオシド三リン酸の範囲内である。ポリヌクレオチドの分解に適用されるような加ピロリン酸分解反応についてのさらなる情報は、例えばJ. Biol. Chem. 244 (1969) pp. 3019-3028を参照することが可能である。適切には、加ピロリン酸分解は、ピロリン酸アニオンおよびマグネシウムカチオンを、好適にはミリモル濃度でさらに含む媒体の存在下で実行される。

20

【0014】

本発明の方法のステップ(2)では、ストリーム中の少なくとも1つの単一ヌクレオシド三リン酸、好適には単一ヌクレオシド三リン酸のそれぞれを、ポリメラーゼとリガーゼの存在下でプローブシステムと反応させて、実質的に二本鎖の使用済みプローブを生成する。好適にはこのステップを実行する前に、単一ヌクレオシド三リン酸を含むステップ(1)の生成物をピロホスファターゼで処理して、残留ピロリン酸をすべて加水分解しリン酸アニオンにする。

30

【0015】

このステップで用いられるポリメラーゼは、適切には、反応条件下でエキソヌクレアーゼ活性もエンドヌクレアーゼ活性も本質的には示さないものから選択される。有利に用いることが可能なポリメラーゼの例としては、限定されるわけではないが、大腸菌(例えばクレノウ断片ポリメラーゼ)、テルムス・アクウアーティクス(Thermus aquaticus)(例えば、Taq Pol)、バチルス・ステアロテルモフィルス(Bacillus stearothermophilus)、バチルス・カルドベロックス(Bacillus caldovelox)、およびバチルス・カルドテナックス(Bacillus caldotenax)などの細菌から得られる原核生物pol 1型酵素または酵素誘導体が挙げられる。任意の適切なリガーゼを原則的にはこのステップで用いることが可能である。

40

【0016】

ステップ(2)で用いるプローブシステムは、3つの成分を含み、それは、(a)検出不能状態にある特徴的な検出可能要素で標識した第1一本鎖オリゴヌクレオチドと、(b)前記第1オリゴヌクレオチドの相補的領域にハイブリダイズすることが可能な、第2非標識一本鎖オリゴヌクレオチドおよび第3非標識一本鎖オリゴヌクレオチドである。一実施形態では、第2オリゴヌクレオチドおよび第3オリゴヌクレオチドは別個の実体である

50

一方、別の実施形態では、それらはリンカー領域により互いに連結している。この後者の場合、一実施形態では、リンカー領域は第2オリゴヌクレオチドと第3オリゴヌクレオチドの末端を、好適には、第2オリゴヌクレオチドの5'末端と第3オリゴヌクレオチドの3'末端を、連結する。リンカー領域は、原則的には任意の二価基とすることが可能であるが、都合のいいことには、別の一本鎖または二本鎖のオリゴヌクレオチド断片である。一実施形態において、リンカー領域は、第1オリゴヌクレオチドに実質的にハイブリダイズすることができない。

【0017】

第1オリゴヌクレオチド、第2オリゴヌクレオチド、および第3オリゴヌクレオチドは、ステップ(2)において、第2オリゴヌクレオチドおよび第3オリゴヌクレオチドがそれぞれ、検出されるヌクレオシド三リン酸が有する塩基に対し相補的なヌクレオチド塩基を有する単一ヌクレオチドを含む捕捉領域のいずれかの側に並置される、第1オリゴヌクレオチドの3'側隣接領域と5'側隣接領域にハイブリダイズすることが可能であるように選択される。これは三成分プローブシステムを、その特定のヌクレオシド三リン酸に対する選択性が高いものにする。したがって、例えば、分析物がDNAに由来し、第1オリゴヌクレオチド、第2オリゴヌクレオチド、および第3オリゴヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドである場合、捕捉領域は、それが含むヌクレオチドがチミン塩基を有する場合、デオキシアデノシン三リン酸に対し選択性が高いだろう。本発明の有用な一実施形態では、ステップ(2)を、複数のプローブシステムタイプ、例えば、それぞれが、求める種々の異なるヌクレオチド塩基およびそれに付着した異なる検出可能要素に特徴的な異なる捕捉領域を有する第1オリゴヌクレオチドを含む、1つ、2つ、3つ、または4つのプローブシステムタイプの存在下で実行することができる。

【0018】

典型的には、第1オリゴヌクレオチドは最大で150ヌクレオチド長、好適には20~100の間のヌクレオチドである。一実施形態では、第2オリゴヌクレオチドは、最大で10、好適には1~5のヌクレオチドの差で、第1オリゴヌクレオチドの相補的な3'側隣接領域よりも長い。別の実施形態では、この時点でヌクレオシド三リン酸がポリメラーゼにより捕捉されるのを防ぐため、第1オリゴヌクレオチドの3'末端と、第2オリゴヌクレオチドのそれに対向するヌクレオチドの間に単一ヌクレオチドミスマッチがある。さらに別の実施形態では、第3オリゴヌクレオチドの3'末端は、ステップ(3)で生成される第4オリゴヌクレオチド自体が実質的に消化されないことを確実にするために、エキソヌクレアーゼ分解に対し抵抗性のある要素を含む。これは、例えば、その特定の末端に、またはその近くに、1つまたは複数のホスホロチオエート連結、グアニン四重鎖(G-Quadruplex)、ホウ素化ヌクレオチド、inverted dtもしくはddt、C3スパーサ、またはホスフェート基を組み込むことにより達成することが可能である。

【0019】

第1オリゴヌクレオチドが独自のタイプの検出可能要素で多数標識されていることと、これらの検出可能要素が、プローブシステムが未使用状態にある場合は実質的に検出不能であるということが、第1オリゴヌクレオチドの特徴である。適切には、これらの検出可能要素は、光学事象が起きた後検出されるように適合させたものである。好適な一実施形態では、検出可能要素はフルオロフォアを含み、各未使用第1オリゴヌクレオチドは、前記フルオロフォアが検出されるように設計された波長において本質的に非蛍光性である。したがって、フルオロフォアは、電磁スペクトルの広範部分にわたって一般的な低レベルの背景蛍光を示し得るが、典型的には、蛍光の強度が最大である1つまたは少数の特異的波長または波長包絡線がある。フルオロフォアが特徴的に検出される1つまたは複数のこれらの最大では、蛍光は本質的には発生すべきではない。本発明の文脈では、「本質的に非蛍光性」という用語または同等の語は、関連する特徴的な波長または波長包絡線において第1オリゴヌクレオチドに付着した全フルオロフォアの蛍光の強度が、同等数の遊離フルオロフォアの蛍光の対応する強度の25%未満；好適には10%未満；より好適には1%未満；もっとも好適には0.1%未満であることを意味する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

原則的には、第1オリゴヌクレオチドの未使用状態においてフルオロフォアが本質的に非蛍光性であるようにするために、いかなる方法も用いることが可能である。1つのアプローチは、クエンチャを、それに近接して追加で付着させることである。別のアプローチは、多数のフルオロフォアを互いに近接して第1オリゴヌクレオチドに付着させる場合、前段落に記載した基準をクエンチャの必要なしに達成することができるほど十分に互いを消光する傾向があるという観察に基づくものである。本発明のこの文脈では、フルオロフォア間またはフルオロフォアとクエンチャとの間の「近接」を構成するものは、用いられる特定のフルオロフォアおよびクエンチャ、ならびに場合によっては第1オリゴヌクレオチドの構造的特徴に左右されよう。したがって、この用語は、種々の要素の任意の特定の構造的配置よりはむしろ求められる結果を参照して解釈されることを意図している。しかしながら、例を提供することのみを目的として、隣接するフルオロフォアまたは隣接するフルオロフォアおよびクエンチャが、特徴的なフェルスター距離に対応する距離（典型的には5 nm未満）だけ離れる場合、十分な消光が概して達成されることが指摘される。

10

【 0 0 2 1 】

適切には、第1オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの、好適には最大20個のフルオロフォアで標識する。最大の利点を得るため、第1オリゴヌクレオチドは、少なくとも2つの、好適には少なくとも3つのフルオロフォアで標識することが好ましい。従って、本明細書では、これらの最大および最小の任意の変更から構成される範囲を具体的に想定する。クエンチャを用いる場合、第1オリゴヌクレオチドは最大で20個、好適には最大で10個、最も好適には最大で5個のフルオロフォアで標識することが同様に好ましい。

20

【 0 0 2 2 】

フルオロフォアそのものに関し、それらは原則的には、限定されるわけではないが、キサンテン部分、例えばフルオレセイン、ローダミンおよびフルオレセインイソチオシアネート、ローダミンB等といったそれらの誘導體；クマリン部分（例えばヒドロキシ-、メチル-およびアミノクマリン）、ならびにCy2、Cy3、Cy5およびCy7などのシアニン部分を含む、当技術分野において従来用いられてきたもののいずれかから選択することが可能である。具体例としては、以下の通例用いられる染料：Alexa染料、シアニン染料、Atto Tec染料、およびローダミン染料に由来するフルオロフォアが挙げられる。例としてはまた、Atto 633 (ATTO-TEC GmbH)、テキサスレッド（商標）、Atto 740 (ATTO-TEC GmbH)、ローズベンガル、Alexa Fluor（商標）750 C₅-マレイミド (Invitrogen)、Alexa Fluor（商標）532 C₂-マレイミド (Invitrogen) ならびにローダミンレッドC₂-マレイミドおよびローダミングリーン、またQuasar 570などのホスホラミダイト染料が挙げられる。あるいは、量子ドットまたはLI-COR Biosciencesにより供給されるような近赤外染料を用いることが可能である。フルオロフォアは、典型的には、当技術分野において知られる化学的方法を用いて、ヌクレオチド塩基を介して第1オリゴヌクレオチドに付着させる。

30

【 0 0 2 3 】

適切なクエンチャには、フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) メカニズムにより機能するものが含まれる。上記フルオロフォアと関連して用いることが可能である、商業的に利用可能なクエンチャの例としては、限定されるわけではないが、DDQ-1、Dabcyl、Eclipse、Iowa Black FQ、Iowa Black RQ、IR Dye-QC1、BHQ-1、BHQ-2、BHQ-3、QSY-7、およびQSY-21が挙げられる。

40

【 0 0 2 4 】

一実施形態では、第2オリゴヌクレオチドおよび第3オリゴヌクレオチドは、検出可能要素で標識しない。

【 0 0 2 5 】

ステップ(2)は、適切には、20~80 の範囲の温度で、ストリーム中の各単一ヌ

50

クレオチド三リン酸を、上記の1つまたは複数のプローブシステムと接触させることにより実行される。

【0026】

本発明の方法のステップ(2)の生成物は、上記のように、実質的に二本鎖の使用済みプローブであり、その構成鎖はそれぞれ、第1オリゴヌクレオチド、および、5'-3'方向で読んだ場合、第2オリゴヌクレオチド、次に単一ヌクレオチド三リン酸に由来するヌクレオチド、最後に第3オリゴヌクレオチドを含む相補的第4オリゴヌクレオチドである。第2オリゴヌクレオチドおよび第3オリゴヌクレオチドがリンカー領域により互いに予め結合していた場合、第4オリゴヌクレオチドはエキソヌクレオリシスに対し抵抗性の高い閉ループ鎖を含むだろうことが容易に分かるだろう。

10

【0027】

ステップ(3)では、使用済みプローブを、30~100の範囲の温度で酵素を用いて処理する。このステップでは、検出可能要素を互いに分離し、それにより該要素を消光しないようにして検出可能にするプロセスにおいて、第1オリゴヌクレオチドに由来する使用済みプローブの鎖を消化してその構成ヌクレオチド(デオキシリボヌクレオシド-リン酸または場合によりリボヌクレオシド-リン酸)にする。従って、検出可能要素が、第1オリゴヌクレオチドにおいて消光して未検出状態にあるフルオロフォアである場合、ステップ(3)はフルオロフォアを互いに、および任意のクエンチャから遊離させ、それによりそれを蛍光させるだろう。消化プロセスが起きると、観察者はそのため、単一ヌクレオチドのカスケードが生成された際に蛍光シグナルの急速な成長を目にする。この蛍光の特徴はひいては、関連するプローブシステムにより元々捕捉されていた単一ヌクレオチド三リン酸の特性を間接的に反映する。

20

【0028】

ステップ(3)で用いることが可能な酵素としては、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を示すエキソヌクレアーゼまたはポリメラーゼが挙げられる。このクラスの酵素としては、Q5、Q5ホットスタート、Phusion、Phusion HS、Phusion II、Phusion II HS、Dnase I (RNaseフリー)、Exonuclease IまたはIII (例えばE. coli)、Exonuclease T、Exonuclease V (RecBCD)、Lambda Exonuclease、Micrococcal Nuclease、Mung Bean Nuclease、Nuclease BAL-31、RecJ_f、T5 Exonuclease、およびT7 Exonucleaseが挙げられる。

30

【0029】

一実施形態では、ステップ(3)の終わりで、第1オリゴヌクレオチドから残された残留オリゴヌクレオチド断片すべてを第4オリゴヌクレオチドから取り除き、新しい第2オリゴヌクレオチドおよび第3オリゴヌクレオチドをアニールできるようにするため、反応混合物を比較的高い温度と比較的低い温度の間で循環させる。

【0030】

ステップ(4)では、一本鎖形態でここでは存在する第4オリゴヌクレオチドを、別の第1オリゴヌクレオチド分子にハイブリダイズさせることにより、使用済みプローブに対応する、つまり、使用済みプローブと同一の化学的構造および物理的構造を有する新しい実質的に二本鎖のオリゴヌクレオチド生成物を生成する。この生成物はその後ステップ(3)の繰り返しにおいて消化することにより、検出可能状態にある検出可能要素をさらに解放し、第4オリゴヌクレオチドを再び再生する。その後、ステップ(5)に従い、ステップ(3)およびステップ(4)を周期的に継続して、原則的には、実質的に全ての第1オリゴヌクレオチドが消費されるまで、遊離した検出可能要素からのシグナル、例えば蛍光シグナルをさらに高める。結果として、観察者は、以前得られたよりもはるかに優れた蛍光シグナルの強化を見て取る。

40

【0031】

その後、ステップ(6)では、ステップ(3)のいくつかの反復において遊離した検出

50

可能要素を検出し、単一ヌクレオシド三リン酸に付着したヌクレオチド塩基の性質を求める。本発明の方法を、ステップ(1)で生成したストリーム中の全ての単一ヌクレオシド三リン酸について体系的に実行することにより、元の核酸分析物の配列に特徴的なデータを生成し、分析することが可能である。このステップを行う方法は当技術分野で周知であり、例えば、蛍光は、種々のフルオロフォアの特徴的な蛍光波長または波長包絡線に合わせた光検出器または同等の装置を用いて検出することができる。これは次に、既知のアルゴリズムを用いたコンピュータで処理および分析することが可能な、特徴的な電気シグナルを光検出器に生成させる。一実施形態では、ステップ(5)とステップ(6)の間で一定期間の経過を許容し、検出可能状態にある検出可能要素の数が最大となるようにする。

【0032】

特に好適な一実施形態では、本発明の方法を、少なくとも一部が単一ヌクレオシド三リン酸を含むマイクロ液滴のストリームにおいて、好適には順序づけられたストリームにおいて、全体的または部分的に実行する。このような方法は、例えば、ステップ(1)において生成したヌクレオシド三リン酸を、一つずつ、順序を保存するのに役立つ炭化水素油またはシリコン油などの非混和性担体溶媒中に維持した対応する水性マイクロ液滴ストリームに挿入することにより開始することができる。有利なことに、これは、例えば反応媒体を適切な寸法のマイクロ液滴ヘッドから溶媒の流動ストリームに出現させることで加ピロリン酸分解反応ゾーンのマイクロ液滴ダウストリームを直接生成することにより、達成することが可能である。あるいは、ステップ(1)による反応媒体の小アリコットを、溶媒に懸濁した既存の水性マイクロ液滴のストリームに、定期的および継続的に注入することが可能である。この後者のアプローチを採用した場合、各マイクロ液滴はすでに、ステップ(2)およびステップ(5)を行うために必要な酵素および任意の他の試薬(例えば緩衝液)とともに、プローブシステムの種々の成分を含み得る。さらに別のアプローチでは、前者の実施形態で作ったマイクロ液滴をこのような既存のマイクロ液滴ストリームと実質的に合体させて、同様の結果を得ることも可能である。これらのマイクロ液滴法では、ステップ(6)は好適には、各マイクロ液滴を調査して、遊離した検出可能要素と、ひいては元々含まれていたヌクレオシド三リン酸の性質とを特定する工程を含む。

【0033】

所与のマイクロ液滴が1超のヌクレオシド三リン酸を含むリスクを避けるため、各充填マイクロ液滴を1~20個、好適には2~10個の空のマイクロ液滴により離されるような割合で、各ヌクレオシド三リン酸をステップ(1)で解放することが好ましい。その後、溶媒中の充填マイクロ液滴および非充填マイクロ液滴のストリームを、液滴が離散状態に維持され、互いに合体する機会を持たないような割合および方法で、流路、好適にはマイクロ流体流路に沿って流す。好適には、用いるマイクロ流体は100ミクロン未満、好適には50ミクロン未満、より好適には20ミクロン未満、さらにより好適には15ミクロン未満の有限直径を有する。その全ての直径のうち最も好適なのは、2~20ミクロンの範囲内である。一実施形態では、全システムを通過するマイクロ液滴の流速は、1秒あたり50~3000マイクロ液滴、好適には100~2000マイクロ液滴の範囲内である。

【0034】

本発明の第2態様に従い、(a)検出不能状態にある1つまたは複数のフルオロフォアで標識した第1一本鎖オリゴヌクレオチドと、(b)単一ヌクレオチド捕捉領域のいずれかの側に並置される、第1オリゴヌクレオチド上の相補的な3'側隣接領域および5'側隣接領域にそれぞれハイブリダイズすることが可能な、第2非標識一本鎖オリゴヌクレオチドおよび第3非標識一本鎖オリゴヌクレオチドとを含み、前記第2オリゴヌクレオチドの長さは3'側隣接領域より少なくとも1ヌクレオチド分長いことを特徴とする、プローブシステムを提供する。

【0035】

本発明のこの態様の第1実施形態では、第2オリゴヌクレオチドと第3オリゴヌクレオチドはリンカー領域により、典型的には一本鎖または二本鎖のオリゴヌクレオチド領域に

10

20

30

40

50

より連結される。別の実施形態では、第1オリゴヌクレオチドの3'末端のヌクレオチドは、第2オリゴヌクレオチドの対応するヌクレオチドとのミスマッチである。さらに別の実施形態では、第3オリゴヌクレオチドは、その3'末端において、エキソヌクレアーゼ分解に対し抵抗性のある要素を含む。本発明の別の実施形態では、フルオロフォアは、クエンチャも含み得る第1オリゴヌクレオチドの5'隣接領域に位置する。

【0036】

上記の方法およびプローブシステムを用いて配列決定装置に利益をもたらすことが可能であり、このような装置は本発明の範囲内にあるとみなす。

【0037】

ここで、その種々の態様における本発明を、以下の例を参照に説明しよう。

10

【実施例】

【0038】

(実施例1)

プローブシステムの調製および使用

以下のヌクレオチド配列を有する一本鎖第1オリゴヌクレオチド1を調製した：

5' TCGTGCCTCATCGAACATGACGAGGXXQXXGGTTTTGTGGT3'

(ここで、A、C、G、およびTは、DNAの特徴的な関連ヌクレオチド塩基を有するヌクレオチドを表す；Xは、従来のアミン付着化学作用を用いてAtto 655染料で標識したデオキシチミジンヌクレオチド(T)を表し、Qは、BHQ-2クエンチャで標識したデオキシチミジンヌクレオチドを表す)。それはさらに、デオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)の混合物中のデオキシチミジン三リン酸ヌクレオチド(dTTP)を捕捉することにに対し選択的な捕捉領域(Aヌクレオチド)を含む)。

20

【0039】

(1)単一の塩基ミスマッチを有する、第1オリゴヌクレオチドの3'末端に対し相補的な配列を有する第2オリゴヌクレオチド領域と；(2)第1オリゴヌクレオチドの5'末端に対し相補的な配列を有する第3オリゴヌクレオチド領域と；(3)76塩基対一本鎖リンカー領域とを含む、別の一本鎖オリゴヌクレオチド2も調製した。それは以下のヌクレオチド配列を有した：

5' PCATGTTTCGATGAGGCACGATAGATGTACGCTTTGACATACGCTTTGACAATACTTGAGCAGTCGGCAGATATAGGATGTTGCAAGCTCCGTGAGTCCACAAACCAAAAACCTCG3'

30

(ここで、加えてPは5'ホスフェート基を表す)。

【0040】

プローブシステムを含む反応混合物を次に調製した。それは、以下の処方に由来するものに対応する構成物を有した：

56 μ Lの5x緩衝液pH7.5

28 μ Lのオリゴヌクレオチド1、100 nM

28 μ Lのオリゴヌクレオチド2、10 nM

2.8 μ LのdNTP混合物(dTTPを含む)、10 nM

0.4 UのPhusion IIホットスタートポリメラーゼ(エキソヌクレアーゼ)

1.6 UのBst Large Fragment polymerase

40

20 UのE. coliリガーゼ

4 Uの熱安定性無機ピロホスファターゼ

280 μ Lまでの水。

ここで、5x緩衝液は以下の混合物を含んだ：

200 μ LのTrizma(登録商標)塩酸塩、1 M、pH7.5

13.75 μ LのMgCl₂水溶液、1 M

2.5 μ Lのジチオトレイトール、1 M

50 μ LのTriton(登録商標)X-100界面活性剤(10%)

20 μ Lのニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、100 μ M

166.67 μ LのKCl

50

1 mLまでの水。

【0041】

d T T P の捕捉と、オリゴヌクレオチド 2 をオリゴヌクレオチド 1 にライゲーションすることによる閉ループ使用済みプローブの形成を、混合物を 37 で 50 分間、その後温度後 70 まで上げてさらに 50 分間インキュベーションすることにより実行した。反応混合物を次に 633 nm のヘリウムネオンレーザー線で照光し、結果として生じる A t t o 655 染料の特徴的な蛍光を、エキソヌクレオリシスおよび使用済みプローブの再生のサイクルを開始した際にカメラを用いて検出した。

【0042】

反応混合物の d N T P 成分の存在下および非存在下における、経時的な蛍光強度の増加をモニタリングし、その結果を図 1 にグラフを使って示した、これより、プローブシステムが d T T P を効率的に捕捉し、本発明のプロセスの周期性が蛍光シグナルの急速な増加を引き起こすことが見て取れる。それに反し、d N T P が存在しない比較実験では、オリゴヌクレオチド 1 の A t t o 655 染料は蛍光を著しく示すことはなかった。

【0043】

(実施例 2)

プローブシステムを用いた液滴マイクロ流体法

図 2 は、それぞれが単一ヌクレオチド塩基を含むマイクロ液滴を上記のタイプのプローブシステムを用いた反応に供する、マイクロ流体配列決定装置を図式的に示す。

【0044】

ヒト DNA に由来する 100 個のヌクレオチド塩基ポリヌクレオチド分析物を漸進的に加ピロリン酸分解することにより得られる単一ヌクレオチド三リン酸のストリームを含む水性媒体 1 を、P D M S ポリマーからなる直径 10 ミクロンのマイクロ流体チューブに流した。加ピロリン酸分解反応自体は、Taq Pol と、それぞれ 1 リットル当たり 2 ミリモル濃度のピロリン酸ナトリウムおよび塩化マグネシウムを含む溶液とを含む 72 の水性緩衝 (p H 7 . 5) 反応媒体を、分析物をスクシニル架橋により予め付着させたガラスマイクロビーズに通すことにより行われる。マイクロビーズのダウンストリームである 1 中の単一ヌクレオチドの順序は分析物の配列に対応する。1 が液滴ヘッド 2 から第 1 チャンバ 3 に現れ、ここで非混和性軽質シリコン油 4 の 1 つまたは複数のストリームと接触する。これらのストリームの速度は、乱流混合を回避し、各直径が約 8 ミクロンの、油中に懸濁させた水性球状液滴 5 を生成するように選択する。典型的には、割合は隣接する充填液滴の間に 10 個の空の液滴があるように調整される。5 のストリームを次に、同一直径の第 2 マイクロ流体チューブに沿って、5 ミクロンの水性球状液滴 7 も第 2 液滴ヘッド 8 により供給される第 2 チャンバ 6 に前進させる。液滴 5 および液滴 7 を順次合体させて、直径が約 9 ミクロンの肥大した水性液滴 9 を形成する。7 はそれぞれ、5 のそれぞれに存在する残留ピロリン酸アニオンをすべて破壊するピロホスファターゼを含む。

【0045】

9 のストリームを次に、マイクロ流体チューブを介して同じ割合で第 3 チャンバ 10 に前進させ、そこでこれらの液滴は、対応する液滴ヘッド 12 を通して同様に供給される 5 ミクロンの水性球状液滴 11 の第 3 ストリームと接触する。9 のそれぞれがチャンバ 6 とチャンバ 10 の間を移動するのにかかる時間は、約 2 分である。

【0046】

液滴 9 および液滴 11 を次に、10 において合体させて、液滴 13 (直径約 10 ミクロン) を生成する。11 のそれぞれは中温性リガーゼと、3' -5' 二本鎖エキソヌクレアーゼ活性を示す好熱性ポリメラーゼと、実施例 1 に記載したものと同様の、一本鎖オリゴヌクレオチドの 4 つの対を含むプローブシステムとを含む。各第 1 オリゴヌクレオチドは 40 ヌクレオチド長であり、DNA の特徴的な 4 つのヌクレオチド塩基タイプ (つまり、A、T、G、および C) に特徴的な異なる第 20 ヌクレオチド (5' 末端から測定) を有する。各第 1 オリゴヌクレオチドも互いに近い多数のフルオロフォアとクエンチャで標識し、その結果、それらが結合した状態では本質的には非蛍光性で、解放された際に、由来源

10

20

30

40

50

である第1オリゴヌクレオチドに特徴的な波長で蛍光を発するようにする。4つの異なる第2オリゴヌクレオチドはそれぞれ115ヌクレオチド塩基長であり、その2つの末端において第1オリゴヌクレオチドの第20塩基に隣接する領域に対し相補的な異なる終端配列を有し、共通の76塩基対リンカー領域を有する。

【0047】

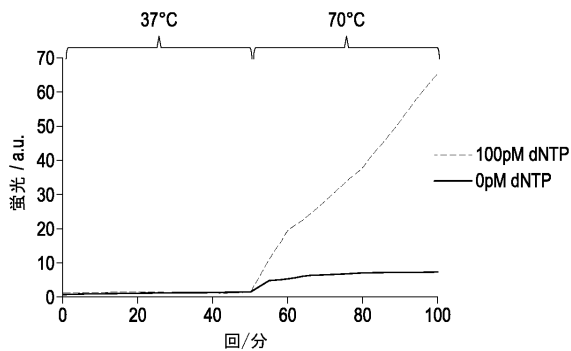
このように形成した合体マイクロ液滴13のストリームを次に、37で30分間、続いて70で30分間インキュベーションした。この時間の終わりに13を検出システム14に移す。

【0048】

検出システム(図示せず)は典型的に、各液滴をレーザーからの入射光で調査する検出窓を備える。この光の作用は次に、各液滴中の解放フルオロフォアを、もともと捕捉分子に組み込まれていた単一ヌクレオチド塩基に特徴的な方法で蛍光させる(または、液滴がもともと空だった場合は本質的に一切蛍光しない)。この蛍光の存在または非存在を次に、上記4つのフルオロフォアの4つの特徴的な波長で検出する。このように、液滴を順に調査して、元のポリヌクレオチド分析物中のヌクレオチド塩基の配列を実際に読み出すことが可能である。

10

【図1】



【図2】

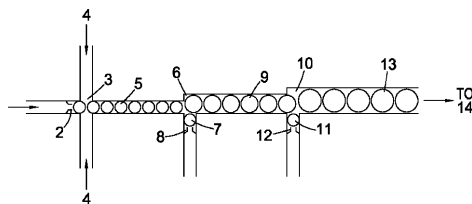


Fig. 2

【配列表】

0006433575000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 バーナビー バームフォース
イギリス国 ケンブリッジシャー ケンブリッジ シービー3 0エフエー ジェイジェイ トム
ソン アベニュー プロアーズ ビルディング ベース4 イノベーション リミテッド内
- (72)発明者 キャメロン アレクサンダー フレイリング
イギリス国 ケンブリッジシャー ケンブリッジ シービー3 0エフエー ジェイジェイ トム
ソン アヴェニュー プロアーズ ビルディング ベース4 イノベーション リミテッド内

審査官 吉田 知美

- (56)参考文献 国際公開第2014/053853(WO, A1)
国際公開第2014/053854(WO, A1)
国際公開第2014/167323(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68 - 1/6897

C12N 15/00 - 15/90

CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)