

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 12 月 2 日 (02.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/104196 A1

- (51) 国際特許分類: **C12N 15/10, C12Q 1/68**
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/007162
- (22) 国際出願日: 2004 年 5 月 19 日 (19.05.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
PCT/JP03/06275 2003 年 5 月 20 日 (20.05.2003) JP
特願 2003-389821
2003 年 11 月 19 日 (19.11.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
アドジーン (ADGENE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒2300046
神奈川県横浜市鶴見区小野町 7 5 番地 1 リーディ
ングベンチャープラザ 5 0 3 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大島 譲二 (OS-
HIMA, Joji) [JP/JP]; 〒3600831 埼玉県熊谷市久保島
1 7 8 5 - 2 Saitama (JP). 根本 健 (NEMOTO, Ken)
[JP/JP]; 〒1570073 東京都世田谷区砧 1 - 8 - 1 1 -
7 0 6 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
3000847 茨城県土浦市卸町 1 - 1 - 1 関鉄つくばビ
ル 6 階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: BUFFER COMPOSITION

(54) 発明の名称: 緩衝剤組成物

(57) Abstract: A buffer composition which comprises at least one salt selected from the group consisting of sulfates, sulfites, phosphates, and carbonates and a modifier. The buffer enables primer annealing and complementary chain synthesis even under low-temperature conditions. Site-specific complementary chain synthesis based on a primer as short as, e.g., 10 mer is possible. The buffer is useful in the GP method.

(57) 要約: 硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、および炭酸塩からなる群から選択される少なくとも 1 種類の塩、および変性剤を組成に含む緩衝剤が提供された。本発明の緩衝剤は、低温条件下においてもプライマーのアニールと相補鎖合成を可能とする。本発明により、たとえば 10 mer のような短いプライマーを利用した、部位特異的な相補鎖合成が可能となる。本発明は、GP 法に有用である。



WO 2004/104196 A1

- 1 -

明細書

緩衝剤組成物

5 技術分野

本発明は、核酸の合成反応に有用な緩衝液組成物に関する。

背景技術

DNA 合成酵素や RNA 合成酵素を利用した、核酸の相補鎖合成反応は公知である。

- 10 相補鎖合成反応は、鋳型となる核酸にアニールしたプライマーの 3' 末端に、鋳型を構成する塩基と相補的な塩基を付加する反応である。反応の結果、鋳型と鋳型に相補的な塩基配列からなる 2 本鎖核酸が生成される。相補鎖合成反応は、遺伝子の単離や解析のための様々な操作に応用されている。

- 遺伝子の解析は、相補鎖合成反応の主要な用途の一つである。相補鎖合成反応
15 には、まずプライマーのアニールが必要である。言い換えれば、プライマーがアニールしなければ相補鎖合成反応は進行しない。この原理を利用して、相補鎖合成反応生成物を指標とする核酸の検出方法や同定方法が実用化されている（特公平 4-67957 号公報）。たとえば PCR 法に基づく遺伝子の検出方法は、感度と特異性に優れた遺伝子の検出方法として知られている。

- 20 PCR 法に基づく遺伝子の検出方法においては、検出対象の塩基配列に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドがプライマーとして利用される。以下、検出対象として想定された塩基配列を標的塩基配列と記載する。試料中に標的塩基配列を含む核酸が存在すれば、プライマーのアニールと相補鎖合成反応が進行する。しかし標的塩基配列を含む核酸が存在しなければ、アニールも相補鎖合成反
25 応も起こらない。したがって、PCR 反応産物が検出されたときには、標的塩基配列の存在を証明することができる。

- 2 -

PCR 法は、標的塩基配列が明らかな場合には、強力な解析ツールとなる。その反面、たとえば、比較すべき塩基配列が必ずしも明確でない場合には、適切なプライマーをデザインすることができない。更に PCR 法は、ある特定の塩基配列の存在を証明する場合には、優れた感度と特異性を発揮する。このことは、類似の

5 核酸を PCR 法によって識別するためには、両者の識別が可能な塩基配列を標的塩基配列として選択しなければならないことを意味する。そのため、未知の核酸や、きわめて類似性の高い核酸の間の相違を、PCR 法によって区別するには、それを可能とするプライマーのデザインが大きな課題となっていた。

PCR 法の課題を解決するために様々な方法が提案されている。本発明者らは、P

10 CR 法の課題を解決するための方法として、GP 法 (Geno-Patern technology) を開発した。GP 法は、類似性の高い核酸の間の相違を明瞭に識別することができる核酸の解析方法である。GP 法においては、被検核酸の複数の領域について、相補鎖が合成される。このとき、各相補鎖はできるだけ 1 本鎖として合成されるようにプライマーと相補鎖合成反応がデザインされる。その結果、1 つの反応系に相補鎖

15 を伴わない核酸が混在する状態が作り出される。

それぞれの核酸は、異なる領域に由来しているため、それぞれ異なる塩基配列を含んでいる。もしも部分的に相補的な塩基配列を含んでいるものがあれば、両者は互いにハイブリダイズする。しかし完全な相補鎖ではないため、ハイブリダイズは部分的な現象に過ぎない。同様に、一つの核酸の中でも、相補的な塩基配

20 列があれば、自身にハイブリダイズする場合もある。こうして、複雑に絡み合った核酸の集合体が構成される。GP 法における集合体を図 1 に模式的に示した。図 1 においては、「波形生成用プライマー」で示したプライマーによって、被検核酸の複数の領域を鋳型として相補鎖が合成されている。そしてこの合成産物が集合体を構成する。

25 GP 法は、こうして構成された核酸の集合体を解析の対象とする。すなわち、この集合体の融解曲線の比較によって、核酸が同定される。GP 法における核酸の集

- 3 -

合体は、様々な組み合わせの2本鎖核酸を含むため、融解曲線には複数の融解温度が記録される。相補鎖合成反応の条件が同一であれば、同じ被検核酸から得られる融解曲線のパターンは同一である。融解曲線のパターンは被検核酸にユニークなので、融解曲線の比較により核酸の同定が可能となる。

- 5 さて、GP法においては、被検核酸の複数の領域について、相補鎖合成が行われる。そのためには複数のプライマーが必要である。つまり、合成すべき領域に対してそれぞれ個別のプライマーをデザインすればよい。しかし、もしもより短い塩基配列のプライマーを利用することができれば、複数の領域の間でプライマーを共有できる可能性がある。たとえば7merのプライマーは、確率的には、16
10 384塩基(4⁷)に1回の割合でアニールすると期待できる。すなわち、たとえば7merの長さを有する1種類のプライマーの利用によって、(被検核酸の全長/16384)種類の合成産物を得ることができる。反応に必要なプライマーの種類が少ないことは、経済的なメリットである。また少ないプライマーで反応を構成すれば、各領域間のプライマーのアニーリングの条件を一定に保つことが容易
15 易なので、再現性の向上にも貢献するはずである。

しかし実際には、相補鎖合成反応において、短いプライマーを鋳型にアニールさせるためには様々な問題を伴う。まず、短いプライマーは融解温度(以下T_mと省略する)が低いため、低いアニーリング温度が必要である。T_m(°C)はWallaceの式 $2(A+T)+4(G+C)$ に基づいて導かれる(Thein and Wallace, The use of synthetic oligo-nucleotide as specific hybridization probes in the diagnosis
20 of genetic disorders. In human genetic diseases: A practical approach, ed. KE Davies, pp33-50. IRL Press, Oxford, UK)。

たとえば実施例に用いたプライマーBAUP65;5'-GGAAGGTGGGG-3'(配列番号: 6/11mer)のT_mは、38°Cである($2(2[a]+1[t])+4(0[c]+8[g])=38$)。PCR法な
25 どにおけるプライマーのアニーリング温度は、一般的にはプライマーのT_mより5°C程度低い温度に設定される。すなわちT_mが38°Cであれば、33°Cがアニー

- 4 -

リング温度となる。PCRなどの一般的な相補鎖合成反応は、通常60℃以上の温度がアニーリングに利用される。たとえば50℃以下といった低温条件下での相補鎖合成反応には、さまざまな障害が伴うことが知られている。

まずアニーリング温度の低下は、非特異的なアニーリングの増加の原因となる。

- 5 つまりアニーリング温度の低下に伴って、相補的な塩基配列のみならず、相補性の低い塩基配列に対してもアニーリングしてしまう現象が増えてくる。一方で、低温条件下では、プライマーの構造変化によってアニーリングが起こりにくくなることが知られている。たとえば、温度の低下によるプライマー間の非特異的な凝集、あるいはプライマーの物理的な自由度(flexibility)の低下などが、相補鎖
- 10 合成を妨げると考えられている。いずれにせよ、10塩基前後という短いプライマーを用いて相補鎖を合成することは、現状では困難である。そのため、通常、相補鎖合成のためのプライマーは、少なくとも20塩基前後の長さが必要とされている。

- 一方、複数の領域の相補鎖合成のために、ランダムプライマーが利用されている。
- 15 ランダムプライマーは、10mer前後の長さを有するオリゴヌクレオチドの集合体である。ランダムプライマーを構成するオリゴヌクレオチドは、任意の塩基配列からなっている。ランダムプライマーは、一般には、多型解析やプローブの合成などに利用されている。ランダムプライマーを使った相補鎖合成反応には、通常、特異性が要求されない。そのため低いストリンジェンシー条件の下で、相
- 20 補鎖合成が行われる。言い換えれば、非特異的なアニーリングを積極的に誘導するときに、ランダムプライマーが利用されている。

- GP法では、複数の領域が、特異的に再現性を維持して合成されることが望ましい。相補鎖が特異的に合成されなければ、融解曲線の再現性の維持が難しくなる可能性がある。したがって、ランダムプライマーの反応条件をGP法に応用することはできない。GP法のためには、低温条件下での特異的な相補鎖合成反応を可能
- 25 とする技術が必要である。

発明の開示

本発明は、低温条件における相補鎖合成反応に有用な緩衝剤組成物の提供を課題とする。

- 5 PCR 法などの相補鎖合成反応のために利用されている一般的な緩衝液の組成の例を以下に示す(Molecular Cloning 3rd ed. Vol.3 Appendix 1.9, Joseph Sambrook and David W. Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NewYork)。

10x Amplification Buffer

10 500mM KCl

100mM Tris-HCl (pH 8.3 at room temperature)

15mM MgCl₂

- ストリンジェンシーは、温度条件に加えて、塩濃度にも支配されている。更にもしも溶液中に変性剤などのハイブリダイズに影響する成分が共存するときには、
15 これらの成分によってもストリンジェンシーは変動する。したがって、温度を一定に維持しつつ、これらの成分の使用量を調節することによって、ある程度、ストリンジェンシーを調節することは可能である。

- たとえば、塩濃度の低下はストリンジェンシーを強める方向に作用する。つまり塩濃度が高い条件は、低い条件に比べてアニーリングが容易になる。この現象
20 を利用して、PCR 法などでは、しばしば Mg²⁺イオンの濃度を上げてストリンジェンシーを弱めることが試みられる。反応が十分に進まないときには、更にジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide;DMSO)、ポリエチレングリコール、あるいはグリセリンなどが反応増強のために添加される。しかし、これらの手法を組み合わせても、たとえば室温でのアニーリングは不可能である。

- 25 本発明者らは、低温条件下で特異性を維持しつつ、十分な相補鎖合成を可能とする緩衝剤を見出すために、様々な添加剤の組み合わせについて見当を重ねた。

- 6 -

その結果、一般的な相補鎖合成反応用の緩衝液を構成する 2 価あるいは 1 価の金属塩に加えて、特定の塩類を添加することで、前記課題を解決できることを見出した。更に、変性剤を添加することによって、十分な相補鎖合成反応効率を達成できることを確認して本発明を完成した。すなわち本発明は、以下の緩衝剤組成物ならびにその使用に関する。

〔1〕 下記の組成を含む、核酸合成用緩衝剤組成物。

- a) 核酸合成酵素による相補鎖合成反応に好適な pH を与える緩衝剤、
- b) 0.1 – 50 mM の Mg^{2+} 塩、および Mn^{2+} 塩のいずれか、または両方
- c) 1 – 200 mM の 1 価の金属塩
- 10 d) 0.005 – 0.5 M の、硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、および炭酸塩からなる群から選択される少なくとも 1 種類の塩、および
- e) 0.01 – 10 %w/v の変性剤

〔2〕 緩衝剤が、7.5 – 9 の pH を与える緩衝剤である〔1〕に記載の組成物。

〔3〕 Mg^{2+} 塩が、 $MgCl_2$ である〔1〕に記載の組成物。

- 15 〔4〕 1 価の金属塩が、KCl、および NaCl のいずれか、または両方である〔1〕に記載の組成物。

〔5〕 硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、および炭酸塩が、 Na_2SO_4 、 Na_2SO_3 、 NaH_2PO_4 、および $NaHCO_3$ からなる群から選択されるいずれかの塩である〔1〕に記載の組成物。

- 20 〔6〕 変性剤が、非イオン系界面活性剤、陰イオン系界面活性剤、および洗剤からなる群から選択される〔1〕に記載の組成物。

- 〔7〕 非イオン系界面活性剤が、グリセリンエステルのポリオキシエチレンエーテル、ソルビタンエステルのポリオキシエチレンエーテル、およびソルビトールエステルのポリオキシエチレンエーテルからなる群から選択される
- 25 いずれかの非イオン系界面活性剤である〔6〕に記載の組成物。

〔8〕 洗剤が、ドデシル硫酸塩、ラウロイルサルコシン塩、ラウリル酸塩、お

- 7 -

よびメルカプト酢酸塩からなる群から選択されるいずれかの化合物である
〔6〕に記載の組成物。

〔9〕合成すべき核酸が、鋳型となる核酸の複数の領域を鋳型とする相補鎖である
〔1〕に記載の組成物。

5 〔10〕下記の成分 d) および e) のいずれか、または両方の存在下で、低温でオリ
ゴヌクレオチドを相補鎖にアニーリングさせる方法。

d) 0.01 – 0.1 M の、硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、および炭酸塩
からなる群から選択される少なくとも 1 種類の塩

e) 0.01 – 10 %w/v の変性剤

10 〔11〕低温条件が、前記オリゴヌクレオチドの融解温度よりも 10 – 30 °C 低
い温度である〔10〕に記載の方法。

〔12〕オリゴヌクレオチドが、5 – 20 塩基の長さを有する〔10〕に記載の
方法。

15 〔13〕オリゴヌクレオチドが、7 – 15 塩基の長さを有する〔12〕に記載の
方法。

〔14〕オリゴヌクレオチドが、鋳型となる核酸の複数箇所にアニールするプラ
イマーである〔10〕に記載の方法。

〔15〕下記の成分 d) および e) のいずれか、または両方を有効成分として含有す
る、オリゴヌクレオチドのアニーリングの安定剤。

20 d) 0.01 – 0.1 M の、硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、および炭酸塩
からなる群から選択される少なくとも 1 種類の塩

e) 0.01 – 10 %w/v の変性剤

本発明は以下の組成を含む緩衝剤組成物に関する。

a) 核酸合成酵素による相補鎖合成反応に好適な pH を与える緩衝剤、

25 b) 0.1 – 50 mM の Mg^{2+} 塩、および Mn^{2+} 塩のいずれか、または両方

c) 1 – 200 mM の 1 価の金属塩

- 8 -

d) 0.005～0.5Mの、硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、および炭酸塩からなる群から選択される少なくとも1種類の塩、および

e) 0.01～10%w/vの変性剤

本発明において、オリゴヌクレオチドとは、複数のヌクレオチドが連結した分子を言う。一方核酸は、多数のヌクレオチドのポリマーを意味する。核酸には、DNAとRNAが含まれる。オリゴヌクレオチドも、DNA、RNA、あるいは両者のハイブリッド分子であることができる。オリゴヌクレオチドが相補的な塩基配列を有する核酸にハイブリダイズして相補鎖合成の基点を与えるとき、当該オリゴヌクレオチドを特にプライマーという。そしてプライマーが鋳型にハイブリダイズすることを、特にアニールと表現する。

本発明の緩衝剤組成物において、前記組成a)-c)は、公知の相補鎖合成反応用の反応液を構成する成分と同様の成分を利用することができる。たとえばa)核酸合成酵素による相補鎖合成反応に好適なpHを与える緩衝剤には、中性～弱アルカリのpHを与える緩衝剤を利用することができる。より具体的には、現在市販されている多くのDNAポリメラーゼの至適pHは、7.5～9、好ましくは8～8.5である。したがって、このpHを与える緩衝剤は本発明に有用である。本発明に有用な緩衝剤として、Tris-HClバッファーなどを例示することができる。Tris-HClバッファーを用いる場合には、たとえば1～50mM、通常5～20mM、好ましくは8～15mMの濃度とすることができる。緩衝剤組成物を構成する組成の濃度は、特に断りが無ければ、最終濃度を表す。

次に、組成b) 0.1～50mMの Mg^{2+} 塩、および Mn^{2+} 塩についても、公知の相補鎖合成反応用の反応液を構成する成分と同様の成分を利用することができる。これらの金属イオンは、DNAポリメラーゼの相補鎖合成活性の維持において、重要である。本発明の組成物における Mg^{2+} 塩、および Mn^{2+} 塩は、そのいずれか、または両方を組み合わせて利用することができる。 Mg^{2+} 塩、および Mn^{2+} 塩として、具体的には、 $MgCl_2$ 、あるいは $MnCl_2$ を用いることができる。これらの塩は、通常0.

1-50 mM、たとえば0.5-20 mM、好ましくは0.8-10 mMを添加することができる。Mg²⁺塩、およびMn²⁺塩として複数種の塩を組み合わせるときには、Mg²⁺塩、およびMn²⁺塩の合計濃度がこれらの濃度範囲となるように調節する。

またc) 1-200 mMの1価の金属塩は、一般にオリゴヌクレオチドのハイブリ
5 ダイズの調節のために添加されている。1価の金属塩には、たとえばKCl、およびNaClなどが利用されている。本発明の組成物における1価の金属塩は、単独でも複数種を組み合わせても良い。これらの塩は、通常1-200 mM、たとえば5-100 mM、好ましくは10-80 mMを添加することができる。1価の金属塩として複数の塩を組み合わせるときには、金属イオンの合計濃度がこれらの濃度範
10 囲となるように調節する。

b)の2価の金属イオンと、c)に示した1価の金属イオンは、いずれもその濃度の上昇とともに、ストリンジェンシーは低下する。したがって、これらの金属イオンの濃度は、目的とするアニーリングと相補鎖合成が可能な濃度に適宜調整することができる。濃度の調整に当たっては、オリゴヌクレオチドのT_mに加えて、
15 後に述べるd)およびe)の使用量などの条件も考慮される。

本発明の組成物において、次の組成d)およびe)は、本発明の課題である低温条件下でのプライマーのアニーリングのために必要な成分である。

d) 0.005~0.5 Mの、硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、および炭酸塩からなる群から選択される少なくとも1種類の塩、および
20 e) 0.01-10 %w/vの変性剤

本発明において、硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、および炭酸塩としては、たとえばNa₂SO₄、Na₂SO₃、NaH₂PO₄、およびNaHCO₃からなる群から選択されるいずれかの塩を用いることができる。これらの塩は、単独で、あるいは異なる塩を組み合わせることで本発明の緩衝剤組成物に利用することができる。これらの塩の濃度は、通
25 常0.005~0.5 M、たとえば0.01~0.1 M、より具体的には0.03~0.05 Mとすることができる。硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、および炭酸塩

- 10 -

として複数種の塩を組み合わせるときには、塩類の合計濃度がこれらの濃度範囲となるように調節する。

一方、本発明における変性剤とは、核酸の高次構造を解消する作用を有する化合物である。核酸は、たとえば、1本鎖のポリヌクレオチドであっても、高次構造を有する場合がある。特に温度が低い状態では、単純な鎖状構造ではなく、さまざまな高次構造を有していると考えられている。変性剤は、核酸の高次構造の解消によって、オリゴヌクレオチドのアニーリングを助ける作用を有していると考えられる。

本発明における変性剤として、非イオン系界面活性剤、陰イオン系界面活性剤、および洗浄剤を示すことができる。非イオン系界面活性剤は、エーテル型、エーテルエステル型、エステル型、および含窒素型に分類される。これらの非イオン型界面活性剤の中では、エーテルエステル型の非イオン系界面活性剤が好ましい。より具体的には、グリセリンエステルのポリオキシエチレンエーテル、ソルビタンエステルのポリオキシエチレンエーテル、およびソルビトールエステルのポリオキシエチレンエーテルをエーテルエステル型の非イオン系界面活性剤として示すことができる。エーテルエステル型の非イオン系界面活性剤には、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ヒマシ油、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸アルカノールアミド硫酸塩などが含まれる。本発明において、特に好ましいエーテルエステル型の非イオン系界面活性剤は、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルである。以下に本発明の組成物に利用することができる市販の非イオン系界面活性剤を例示する。

ポリオキシエチレンアルキルエーテル：

NIKKOL BL-9EX (Polyoxyethylene(9) Lauryl Ether)

25 Brj35 (Polyoxyethylene(23) Lauryl Ether)

ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル：

- 11 -

TRITON X-114 (Polyoxyethylene(8) Octylphenyl Ether)

TRITON X-100 (Polyoxyethylene(8) Octylphenyl Ether)

NP-40 (Polyoxyethylene(9) Octylphenyl Ether)

ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル：

5 TWEEN 20 (Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate)

TWEEN 80 (Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monooleate)

TWEEN 40 (Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monopalmitate)

TWEEN 60 (Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monostearate)

TWEEN 85 (Polyoxyethylene(20) Sorbitan Trioleate)

- 10 一方本発明に利用可能な陰イオン系界面活性剤としては、スルホン酸塩、カルボン酸塩、硫酸エステル塩、あるいはリン酸エステル塩などの界面活性剤を示すことができる。更に以下に示す洗浄剤も本発明の組成物に利用することができる。これらの洗浄剤は、ナトリウム塩以外の塩を利用することもできる。

ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecyl Sulfate; SDS)

- 15 ラウロイルサルコシンナトリウム (Sodium N-Lauroyl Sarcosinate)

ラウリル酸ナトリウム (Sodium Laurate)

メルカプト酢酸ナトリウム (Sodium Mercaptoacetate)

- 変性剤の反応液における濃度は、アニールさせるべきプライマーを構成する塩基配列や、相補鎖合成反応の温度に応じて、適宜調節することができる。一般的
- 20 には 0.01 %W/V ~ 10 %W/V、例えば 0.5 %W/V ~ 5 %W/V、より具体的には 1 %W/V ~ 3 %W/V となるように添加することができる。

本発明の緩衝剤組成物には、核酸の相補鎖合成に利用される付加的な成分を含むことができる。付加的な成分の例を以下に示す。

相補鎖合成のための基質

- 25 酵素の保護剤

核酸の相補鎖合成には、dXTP (dATP、dTTP、dCTP、および dGTP) が基質として

- 1 2 -

必要である。あるいは合成の目的に応じて、ヌクレオチド誘導体や標識されたヌクレオチドを利用することもできる。酵素の保護剤は、相補鎖合成を触媒する酵素の保護を目的として添加される化合物である。具体的には、ウシ血清アルブミンなどの不活性蛋白質、あるいは DMSO などの界面活性剤が、酵素の保護作用を有する。

また本発明の緩衝剤組成物には、相補鎖合成の成果物の解析に必要な物質を加えておくことができる。たとえば遺伝子の解析方法の一つである GP 法では、インターカレーターは反応産物の解析における重要な指示薬である。2 本鎖の核酸に結合してシグナルを生成する化合物を、インターカレーターという。インターカレーターとしては、エチジウムブロマイド（臭化エチジウム）、あるいは入手可能な商品としてサイバークリーン（Molecular Probe 社製）が知られている。

更に、本発明の緩衝剤組成物には、相補鎖合成のためのプライマーをあらかじめ添加しておくこともできる。本発明の緩衝剤組成物は、核酸の相補鎖合成に有用である。相補鎖合成のためのプライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に合わせて適宜デザインされる。予め鋳型とする核酸の塩基配列が明らかな場合には、本発明の緩衝剤組成物中に、相補鎖合成のためのプライマーを含有させた状態で流通させることができる。あるいは、ユーザーの指定する塩基配列のプライマーを合成し、本発明の緩衝剤組成物中に組み入れることもできる。

更に本発明の緩衝剤組成物には、相補鎖合成を触媒する核酸合成酵素をも添加することができる。基質、プライマー、および核酸合成酵素を含む緩衝剤組成物には、鋳型となる核酸を加えるだけで、相補鎖合成を開始することができる。あるいは、基質と核酸合成酵素を含む緩衝剤組成物においては、プライマーと鋳型となる核酸を加えることによって、目的とする相補鎖合成反応を開始することができる。これらの付加的な成分は、いずれも最終的な反応に必要な濃度を添加しておくことができる。

本発明の緩衝剤組成物は、任意の剤型で供給することができる。具体的には、

- 13 -

液状、粉末、あるいは錠剤とすることができる。液状製剤には、最終濃度に調整されたものと、濃縮されたものが含まれる。たとえば10倍濃度で各組成を含む液状の濃縮組成物は、使用時に10倍に希釈して利用される。あるいは、本発明の緩衝剤組成物に含まれる固体成分を混合して、粉末あるいは錠剤の形で供給することができる。ユーザーは、指定された容量の溶媒で粉末あるいは錠剤を溶解することによって、最終濃度に調整された緩衝剤組成物を得ることができる。緩衝剤として Tris-HCl を用いる場合には、溶解のための溶媒として Tris-HCl を指定することができる。

本発明の緩衝剤組成物は、プライマーのアニーリングをとまなう相補鎖合成反応のための反応液として利用することができる。本発明の緩衝剤組成物は、特に、構成塩基数の少ないオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる場合に有用である。通常、プライマーのアニーリングは、 T_m よりも 5°C 程度低い温度で行われる。しかし構成塩基数の少ないオリゴヌクレオチドは T_m が低い。低温では非特異的なアニーリングや、オリゴヌクレオチドの高次構造などが原因となって、相補鎖合成が進行しなくなる。あるいは相補鎖合成が可能な条件を与えたとしても、非特異的な合成産物が目立つため、目的とする合成産物を特異的に合成することが難しい。本発明の緩衝剤組成物を用いれば、これらの障害を解消することができる。

構成塩基数の少ないオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる相補鎖合成反応を必要とする核酸の解析方法として、GP 法を示すことができる。図1に示すように、GP 法は、被検核酸の複数の領域を鋳型として合成された相補鎖の集合体を解析対象とする。複数の領域を合成するための方法の一つに、構成塩基数の少ないプライマーを、複数の場所にアニールさせる方法がある。プライマーを構成する塩基数が少なければ、プライマーに相補的な塩基配列が被検核酸中に存在する可能性が高まる。その結果、単一のプライマーが複数の領域においてプライマーとして作用することができる。

- 14 -

GP 法の実施に当たっては、たとえば以下のような考え方に基づいて、相補鎖合成すべき複数の領域が選択される。

- 複数の領域は、比較すべき核酸の間で塩基配列の相違があることが期待できる領域を含むことが望ましい。比較の対象とする核酸が多種類である場合、各核酸の合成対象領域の塩基配列は、少なくともいずれかの領域で他の核酸との相違が含まれるようにデザインするのが好ましい。塩基配列の相違は、複数の領域の全てにおいて含まなくても良い。たとえば、3つの核酸 X、Y、および Z について a-c の3つの領域について合成するとする。各領域の塩基配列に相違が含まれることを'で示す。以下の例では、核酸 Y が他の核酸と異なる塩基配列からなる b' を、また核酸 Z が c' を有している。これらの領域を合成することにより、3者の識別が可能となる。

核酸 X: [a]-[b]-[c]

核酸 Y: [a]-[b']-[c]

核酸 Z: [a]-[b]-[c']

- GP 法に基づく核酸の同定方法において、前記複数の領域は、被検核酸からできるだけ多様な塩基配列情報を特異的に取り出すことが望まれる。つまり、被検核酸の間で、できるだけ塩基配列の相違している部分が多く合成される方が好ましい。したがって、たとえば前記核酸 X-Z の例においては、a-c のできるだけ多くの領域において、相互に塩基配列が異なっている方が、好ましい。
- たとえば微生物やウイルスのようなゲノムサイズが限られている生物種では、ゲノムの塩基配列情報が既に明らかにされているものも少なくない。これらの生物種については、予め、比較の対象となる生物種の間で、他の種との間で、塩基配列が相違する領域を選択することができる。また、ゲノムの塩基配列情報が不十分な場合であっても、既に明らかにされているゲノムや、遺伝子の情報に基づいて、塩基配列の相違する領域を選択することは可能である。

なお複数の領域は、再現性を有する方法で合成されることが好ましい。本発明

- 15 -

において、相補鎖合成の再現性とは、同じ領域が相補鎖合成の鋳型として利用されることを言う。相補鎖合成反応の原理によっては、合成産物の長さの均一性を保障できない場合があるかもしれない。本発明においては、鋳型として同じ領域が利用されていれば、合成産物の長さの変動は許容できる。本発明における再現性

5 性を有する相補鎖合成反応とは、あるプライマーが特異的に相補鎖合成を開始することであるということもできる。したがって本発明の相補鎖合成反応は、ランダムプライマーによる相補鎖合成反応とは区別される。

複数の核酸について複数の領域を合成する以上、各核酸が同じ条件で合成されるべきであることは言うまでも無い。したがってプライマーと DNA ポリメラーゼ

10 を用いた相補鎖合成反応によって複数領域を合成する場合には、プライマーのハイブリダイゼーションの特異性は維持されることが望まれる。

核酸の合成方法は、鋳型依存性の合成方法であれば、特に限定されない。被検核酸が 2 本鎖からなる場合には、前記複数の領域は、センス鎖、あるいはアンチセンス鎖を鋳型として合成することができる。複数の領域の全てが、センス鎖あ

15 るいはアンチセンス鎖を鋳型として合成されても良いし、両者を鋳型として合成することもできる。

続いて、GP 法のための伸長産物を得る方法について説明する。伸長産物を得るための代表的な方法として、DNA ポリメラーゼを利用した相補鎖合成反応を利用することができる。GP 法においては、被検核酸の複数の領域を合成するために、

20 被検核酸の複数の領域にアニールすることができるプライマーを利用する。GP 法において、被検核酸の複数の領域にアニールすることができるプライマーから、相補鎖合成反応によって合成された伸長生成物を伸長産物という。伸長産物は、被検核酸の複数の領域を鋳型として合成された、ポリヌクレオチドの集合体である。したがって伸長産物を構成する各ポリヌクレオチド鎖の塩基配列は相互に異

25 なる。ただし、相補鎖合成反応が繰り返されたときには、同じ塩基配列を含むポリヌクレオチド鎖が複数分子生成される。

- 16 -

また、異なる領域に同じ塩基配列を有する被検核酸を鋳型として場合には、同じ塩基配列を含む伸長産物が生成される可能性もある。しかし本発明においては、解離曲線の多用な波形パターンを得ることが望ましいため、伸長産物の塩基配列はできるだけ相違を含むようにデザインすることが望ましい。

- 5 被検核酸の複数の領域にアニールし、複数の領域の相補鎖合成を可能とするプライマーを、GP 法では波形生成用プライマーという。GP 法の波形生成用プライマーは、被検核酸の複数の領域の相補鎖合成に利用されるとともに、相補鎖合成の結果として、異なる塩基配列からなる伸長産物の混合物を与える。GP 法における異なる伸長産物の混合物とは、好ましくは解離曲線を解析したときに複数の T_m を
10 与えるポリヌクレオチドの混合物を言う。

- GP 法における波形生成用プライマーは、次のように定義することもできる。すなわち GP 法の波形生成用プライマーは、被検核酸上の複数箇所に出現する特定の塩基配列領域に相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであって、同一の条件下で被検核酸上の複数の領域において、鋳型依存性の DNA ポリメラーゼによ
15 る相補鎖合成を開始することができる。波形生成用プライマーの塩基配列の少なくとも一部は、前記特定の領域に対して相補的な塩基配列からなる。前記特定の領域に対して相補的な塩基配列は、オリゴヌクレオチドの任意の領域に配置することができる。すなわち、たとえばオリゴヌクレオチドの 3' 末端を含む領域、末端を含まない中間の領域、そして 5' 末端を含む領域に配置することができる。

- 20 被検核酸の複数の領域にアニールすることができるプライマーのデザイン方法として、たとえば次のような方法を示すことができる。以下のような考え方に基づいてプライマーをデザインすれば、単純に複数の領域の相補鎖合成に必要なプライマーを混合するよりも、プライマーを容易に合成することができる。

複数の領域にアニールする 1 種類のプライマー：

- 25 単一のプライマーであっても、適当な塩基配列を選択すれば、被検核酸の複数の部位にアニールすることができる。通常、配列特異的なアニーリングのために

- 17 -

は、20-50塩基のオリゴヌクレオチドがプライマーとして用いられる。このような長さのオリゴヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下では、複数の部位にアニールする可能性はきわめて低い。

ところが、より少ない塩基数のオリゴヌクレオチドを用いれば、複数の位置に
5 アニールする可能性が高まる。たとえば3-8塩基からなるオリゴヌクレオチドがアニールしうる領域は、計算上は、 $1/64(4^3) \sim 1/65536(4^8)$ の確率で存在することになる。つまり、短いプライマーは、単一で用いても複数領域の相補鎖合成を可能とする。

このような複数領域にアニール可能な1種類のプライマーの設計は、対象とするゲノムの塩基配列情報より、対象ゲノム中に出現頻度の高い3から10数塩基
10 よりなる短い塩基配列を検索し、出現頻度の高い順に上位候補とすることにより可能となる。出現頻度をカウントするゲノム領域は、すべての塩基配列情報を対象としてもよいし、特定の関心領域に対象を絞ってもよい。

複数の領域にアニールする2種類以上のプライマー：

15 鋳型となる核酸の塩基配列が明らかであれば、複数の領域を合成するために各々の箇所にアニールする複数のプライマーをデザインすることは容易である。
しかしGP法においては、より多くの領域について相補鎖合成が必要な場合もある。合成すべき領域の増加に伴って、必要なプライマーの数も増えてしまう。一方で、反応系に添加することができるオリゴヌクレオチドの量には上限がある。また多
20 様なオリゴヌクレオチドを合成するのは経済的にも不利である。そこで本発明者らは、多くの領域の相補鎖合成をできるだけ少ない種類のプライマーで合成する方法について、検討した。その結果、以下に示すようなプライマーのデザインが有効であることを見出した。

まず、できるだけプライマー間の塩基配列が共通となるように、合成すべき領域
25 域を選択する。たとえば以下の例においては、プライマーをアニールさせるための2つの領域が選択されている。これらの塩基配列は、2種類の抗酸菌A (*Mycoba*

- 18 -

cterium bovis)およびB (*Mycobacterium kansasii*)のゲノムから選択された。いずれも、ゲノム上の異なる位置にありながら、互いに塩基配列の類似性が高い(一致している塩基を大文字で示した)。

抗酸菌A : AGcTcGTAAa (配列番号 : 1)

5 抗酸菌A : AGtTcGTAAt (配列番号 : 2)

抗酸菌B : AGgTtGTAAa (配列番号 : 3)

抗酸菌B : AGtTcGTAAa (配列番号 : 4)

この例では、3、5、および10塩基目の塩基が相違し、それ以外の塩基は一致している。これらの相違している塩基を多義コード(ambiguity code)で表現すれば、agBtYgtaaW (配列番号 : 5)となる。本発明において、多義コードとは、ある位置に複数種の塩基を割り当てるための記号である。本発明において、多義コードで表現されたオリゴヌクレオチドは、当該多義コードの位置において、多義コードによって表される全ての塩基の組み合わせを含む混合物であることを意味している。ここで用いた多義コードはそれぞれ次の塩基に対応している。

15 B=c, g, t Y=c, t W=a, t

すなわち、共通性の高い塩基配列(agBtYgtaaW)の選択によって、この例では1菌種当たり2箇所の相補鎖合成を可能とできた。本発明において、多義コードで表現された塩基配列を有するプライマーを多義プライマーという。

通常、4つの領域の相補鎖合成のためには、各領域にアニールする4種類のプライマーが必要である。ところがここに示した例においては、1種類の多義プライマーによって4つの領域の相補鎖合成が可能となった。多義プライマーは、異なる塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの集合体である。しかし操作上は、単一のオリゴヌクレオチドと同様の操作によって合成され、相補鎖合成においても単一のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

25 更にこのような考え方に基づいて、ゲノム内の複数の特定の関心領域に対し、共通の1種類からなる多義プライマーの設計を行うことも可能である。上記の抗

- 19 -

酸菌 A, B における事例を例に採れば、A, B の種間差をもっとも顕著に示す塩基配列を選択することにより、菌種同定という目的を達成した。一方、この設計方法は更にまったく別の関心領域、例えば薬剤耐性に関わる情報を、同時に取得するための手段を提供する。すなわち、複数の関心領域に対し各々出現頻度の高い塩基配列候補を選択し、次にそれら上位候補間の塩基配列の中から更に共通性の高い塩基配列を選択することにより、複数のまったく独立した情報を同時に得ることが可能な、1 種類の多義プライマーの設計を可能とする。

さて、一般に、鋳型となる核酸の塩基配列の一部が不明なときに、しばしば縮重プライマー (degenerate primer) が利用される。縮重プライマーの塩基配列も本発明における多義プライマーと同じように表記される。しかし多義プライマーは異なる塩基配列を有する複数領域の合成を目的としている。他方、PCR クローニングなどに用いられる縮重プライマーは、通常、1 種類の鋳型に対して 1 種類の核酸の合成を目的としている。クローニング (すなわち遺伝子の単離) を目的とする場合には、多様な合成産物を生成するプライマーは望ましくない。このように多義プライマーと縮重プライマーとでは、そのデザインの目的がまったく異なっている。他方、縮重プライマーを GP 法における波形生成プライマーとして利用することは可能である。

以上の例では、被検核酸の塩基配列から、できるだけプライマーの種類を少なくすることが可能な領域を選び出した。言い換えれば、被検核酸に依存したデザイン方法である。したがって、被検核酸および比較対象となる核酸の塩基配列によっては、適用が難しい場合もあるかもしれない。これに対して、以下に述べる方法は、被検核酸および比較対象となる核酸の塩基配列の影響を受けず、比較的容易に複数のプライマーをデザインしうる方法である。

前記の多義プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に合わせて多義コードを配置した。これに対して、プライマーの 5' 側に多義コードを配置して、被検核酸の複数の領域にアニールすることができる波形生成用プライマー集合体を得るこ

- 20 -

ともできる。すなわち GP 法においては、下記の特異プライマーおよび多義プライマーを含む波形生成用プライマー集合体を利用することができる。

特異プライマー：鋳型核酸の標的領域に相補的な塩基配列を含む

多義プライマー：次の特異領域および多義領域を含む少なくとも 1 種類の多義プ

5 ライマー

特異領域：オリゴヌクレオチドの 3' 末端を含み、前記標的領域に対して相補的な塩基配列で構成される

多義領域：特異領域の 5' 側に配置され、前記標的領域に対して相補的な塩基配列を構成する塩基が当該塩基以外の塩基で置換された塩基配列を含む

- 10 GP 法における特異プライマーは、鋳型核酸の標的領域に相補的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドまたはその誘導体からなる。誘導体とは、付加的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、あるいは修飾されたオリゴヌクレオチドが含まれる。オリゴヌクレオチドは、蛍光物質、放射活性物質、あるいは結合性リガンドなどで修飾することができる。

- 15 GP 法における標的領域は、鋳型核酸に相補鎖合成のためのプライマーがアニールすべき領域を言う。つまり標的領域は、鋳型核酸の合成すべき領域の 3' 側に位置する領域である。鋳型核酸の合成すべき領域は、先に述べたように、GP 法による核酸の同定方法において、被検核酸に固有の波形パターンを生じることが期待できる領域として選択された領域であることが望ましい。このような領域は、
- 20 比較対象である核酸との、塩基配列の相違を含む領域を中心として、選択することができる。一方で、できるだけ少ない種類のプライマーで複数の領域を合成するためには、たとえば異なる位置に見出される相同性の高い塩基配列を標的領域として選択することができる。しかしながら、GP 法に基づく波形生成用プライマー集合体の利用によって、標的領域との相同性が低い領域に対してアニールする
- 25 ことが可能なプライマーを提供することもできる。その結果、単一の標的領域を選択した場合であっても、鋳型核酸の複数の領域の相補鎖合成が可能な波形生成

- 21 -

用プライマー集合体を得ることができる。

一方、以下に述べる多義プライマーにおいて、3'側の多義コードを含まない領域を特異領域、5'側の多義コードを配置した領域を多義領域という。特異領域は、特異プライマーの3'末端を含む領域を構成する塩基配列と同一の塩基配列で構成
5 される。すなわち、多義プライマーと特異プライマーの3'末端を含む塩基配列は共通である。特異領域を構成する塩基の数は制限されない。特異領域の長さは、多義領域の条件に応じて適宜設定することができる。たとえば、多義プライマー全体の長さの20～90%の範囲で、特異領域の長さを選択することができる。

多義領域を構成する多義コードは、たとえば4塩基多義(N)の連続とすることも
10 できるし、被検核酸の塩基配列に合わせて、抗酸菌の例で述べたように適宜必要な多義コードを配置することもできる。更に、以下に述べるように、プライマーの3'側から5'側にかけて多義領域のバリエーションを段階的に増やすこともできる。

このようにしてデザインされた多義プライマーは、被検核酸の多くの領域に対して、高い再現性でアニールし、複数領域の相補鎖合成産物を与える。多義領域
15 のバリエーションを段階的に変化させることにより、相補鎖合成において、反応特異性を左右する3'側の多義性を小さくする一方で、比較的特異性に対して影響を与えにくい5'側においてプライマーの塩基配列に多様性を与えることができる。このような構造的な特長により、多様な塩基配列に対して安定にアニールするこ
20 とができるプライマーの集合体とすることができる。

一方、プライマー集合体を構成する個々のオリゴヌクレオチドは、3'側の多様性が低くなるようにデザインされている。その結果、各オリゴヌクレオチドの塩基配列に対して相補的な塩基配列に選択的にアニールし相補鎖合成を開始する。
つまり、幅広い塩基配列について、それぞれ特異的に、かつ安定に相補鎖合成を
25 開始することができるのである。

多義領域における多義性を段階的に変化させた多義プライマーとして、次の構

- 2 2 -

造を示すことができる。すなわち、多義領域の塩基配列が次の3つの領域からなり、それぞれの領域を構成する置換塩基配列の全ての組み合わせを含む多義プライマーの集合体はGP法の波形形成用プライマー集合体として有用である。

(1)N領域：多義領域の5'末端を構成し、その塩基配列を構成する各塩基は前記
5 標的領域の塩基配列に相補的な塩基に代えて、アデニン、シトシン、グアニン、
およびチミンから選択される当該塩基以外の任意の3種類のすべての塩基で置換
された塩基である

(2)3多義領域：N領域の3'側に配置され、その塩基配列を構成する各塩基は前
記標的領域の塩基配列に相補的な塩基に代えて、アデニン、シトシン、グアニン、
10 およびチミンから選択される当該塩基以外の任意の2種類の塩基のすべてで置換
された塩基である

(3)2多義領域：3多義領域の3'側に配置され、その塩基配列を構成する各塩基
は前記標的領域の塩基配列に相補的な塩基に代えて、アデニン、シトシン、グア
ニン、およびチミンから選択される当該塩基以外の任意の1種類の塩基で置換さ
15 れた塩基である

図3に示す多義プライマー(NNVHDBSS)において、多義領域は、5'末端側から3'
側にかけて段階的に多義性が高まるようにデザインされている。すなわち、5'末
端側には、A(アデニン)、C(シトシン)、G(グアニン)、およびT(チミ
ン)の何れかを示すAmbiguity CodeであるNで構成されるN領域が存在する。N
20 領域は、標的領域に対して相補的な塩基をそれ以外の3種類のいずれかの塩基に
置換した領域と言うこともできる。

N領域に続いて、標的領域に対して相補的な塩基をそれ以外の2種類の塩基で
置換した3多義領域(3 ambiguity region; 3AR)が配置されている。更に3ARの
3'側に、標的領域に対して相補的な塩基をそれ以外の1種類の塩基で置換した2
25 多義領域(2 ambiguity region; 2AR)が配置されている。図3の例では、5'末端側
の2つのNがN領域を構成し、続くV、H、D、Bの4塩基分が3ARを構成する。

- 23 -

そして、3' 側の 2 つの S が 2AR を構成する。このような多義領域の構造により、3' 側から 5' 末端にかけて多義性を高めることができる。言い換えれば、このような構造によって、5' 側から 3' 末端にかけて特異性を高めることができる。GP 法に用いる多義コードと実際の塩基の対応は表 1 にまとめた。

5 GP 法の多義プライマーにおいて、N 領域の長さは 2 ～ 4 塩基が好ましい。N 領域の塩基数が 5 塩基以上になると、ダイマー、ループ等のプライマー相互干渉が出現しやすくなる可能性が高まる。また、3AR の配列は、DHVB、HDVB、VHDB、HVD B の順に安定性が高い。このように、3' 側における G 又は C の割合を高めた方が安定性が高くなる。

10 次に 2AR の配列も、標的領域の塩基配列を考慮して設計する必要がある。なお、N 領域、3AR、2AR の長さの比は、1 : 2 : 1 が好ましいがこれに限定されない。

プライマー集合体を構成する多義プライマーの多義領域の長さは、プライマーを構成する塩基数の 10 % ～ 80 % であることが好ましい。またプライマー集合体を構成する多義プライマーの特異領域および多義領域の長さの合計は、10 ～

15 30 塩基であることが好ましい。

多義プライマーを含む GP 法の波形生成用プライマー集合体は、前記標的領域として、少なくとも 1 つの領域を設定し、当該領域の塩基配列に基づいてデザインすることができる。標的領域を複数選択することもできる。この場合、特異プライマーの種類が増え、それに応じて多義プライマーの種類も増えることになる。

20 標的領域として複数の領域を選択した場合、波形生成用プライマー集合体は、同時にまたは個別に相補鎖合成に用いることができる。波形生成用プライマー集合体を用いることによって、波形の多様性を高めることができる。すなわち、GP 法の核酸の識別能力を高めることができる。

たとえば図 6 に示した 4 種類の波形生成用プライマー集合体 sPGBUP65、sPGBUP
25 UPR、sPGBUPFX、および sPGBUPRX は、それぞれ異なる標的領域についてデザインされている。仮に各波形生成用プライマー集合体によって各々 15 種の異なる波

- 24 -

形パターンが得られるとすると、理論上は、50,625種類（ $15 \times 15 \times 15 \times 15$ ）の波形パターンが得られることを意味する。このことは、15種類の波形パターンを生成することができる4とおりの波形生成用プライマー集合体の利用によって、GP法に基づく核酸の同定方法が、5万種類以上の核酸の識別できることを示している。

複数の領域に対してデザインされた複数種類の波形生成用プライマー集合体は、集合体同士の混合物として、あるいは集合体毎に独立して相補鎖合成に利用することができる。独立して相補鎖合成に用いることによって、波形パターンとプライマー集合体の関係を、明確に知ることができる。すなわち、ある領域Aに基づいてデザインされた波形生成用プライマー集合体Aと別の領域Bに基づいてデザインされた波形生成用プライマー集合体Bとは、混合しないで個別に相補鎖合成に用いるのが好ましい。

上記のような、複数の領域において相補鎖合成を開始することができるいずれかのプライマーを、相補鎖合成が可能な条件下で鋳型核酸とインキュベートすることにより、相補鎖合成が開始される。相補鎖合成が可能な条件とは、次の条件が満たされることを言う。

鋳型核酸に前記プライマーがアニールすることができる、

鋳型依存性のDNAポリメラーゼの触媒活性が維持される、および

相補鎖合成のための基質が供給される。

ここで、前記プライマーの構成塩基数が少ないために、低い T_m を採用せざるを得ない場合、本発明の緩衝剤組成物の利用が有効である。本発明の緩衝剤組成物において、特に低温でのアニーリングを可能とするために必要な成分は、以下の成分d)およびe)である。したがって本発明に基づいて、下記の成分d)およびe)のいずれか、または両方の存在下で、低温でオリゴヌクレオチドを相補鎖にハイブリダイズさせる方法が提供される。

d) 0.01-0.1Mの、硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、および炭酸塩からなる

- 25 -

群から選択される少なくとも1種類の塩

e) 0.01-10%w/vの変性剤

本発明の方法において、低温とは、たとえばハイブリダイズさせるべきオリゴヌクレオチドの T_m よりも 10°C 以上低い温度を言う。より具体的には、本発明の方法における低温には、アニールさせるべきオリゴヌクレオチドの T_m と比較して、たとえば $10\sim 30^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $15\sim 25^{\circ}\text{C}$ 、あるいは $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 低い温度が含まれる。オリゴヌクレオチドの T_m は、先に述べた Wallace の方法にしたがって計算することができる。

このような低い温度を必要とするオリゴヌクレオチドは、通常 $5\sim 20$ 塩基、たとえば $7\sim 15$ 塩基の長さを有する。したがって、このような長さを有するオリゴヌクレオチドは、本発明の方法を応用するオリゴヌクレオチドとして好ましい。本発明における T_m やオリゴヌクレオチドの長さは、鋳型にハイブリダイズする部分を構成する塩基配列の長さに基づいて算出するべきである。プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドには、しばしばアニールとは無関係な付加的な塩基配列が付加される。たとえば、プロモーター、あるいは制限酵素の認識配列などは、通常、プライマーのアニールとは無関係な塩基配列である。このようなアニールとは無関係な塩基配列については、 T_m やアニールする塩基の数には含まれない。

本発明の方法に用いる成分 d) および e) は、先に述べたような条件に基づいて利用することができる。また本発明の方法は、GP 法をはじめとする、短いプライマーを利用した相補鎖合成反応において有用である。更に本発明は、上記成分 d) および e) のいずれか、または両方を有効成分として含有するオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの安定剤を提供する。本発明の安定剤は、特に、構成塩基の少ないオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの安定化に有用である。

本発明の方法、あるいは安定化剤は、オリゴヌクレオチドのハイブリダイズを必要とする任意の方法に利用することができる。たとえば、先に述べたような短

- 26 -

いプライマーのアニールリングは、本発明の方法を応用することができる代表的な例である。その他、PCR 法などの公知の核酸合成反応において、短いプライマーを利用するときに、本発明の方法、あるいは安定化剤を利用することができる。あるいは、各種のハイブリダイゼーションアッセイにおいて、短いオリゴヌクレ
5 オチドをプローブとして利用するときにも、本発明の方法、あるいは安定化剤を応用することができる。

本発明の方法、あるいは安定剤を構成する d) 塩類、あるいは e) 変性剤は、単独で用いても良いし、複数の化合物を混合して利用することもできる。各化合物はいずれも異なる機序でプライマーのアニールの安定化、あるいは特異性の向上を
10 もたらしていると考えられる。したがって、界面活性剤、洗浄剤、および塩類の各成分を添加することによって、スタビライザーの作用は増強される。

あるいは本発明は、上記成分 d) 塩類および e) 変性剤の、低温条件下における短いプライマーを利用した相補鎖合成反応における使用に関する。本発明における低温条件とは、ハイブリダイズさせるべきオリゴヌクレオチドの T_m よりも 10°C
15 以上低い条件を言う。より具体的には、本発明の方法における低温には、アニールさせるべきオリゴヌクレオチドの T_m と比較して、たとえば $10\sim 30^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $15\sim 25^{\circ}\text{C}$ 、あるいは $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 低い温度が含まれる。また本発明における短いオリゴヌクレオチドは、通常 $5\sim 20$ 塩基、たとえば $7\sim 15$ 塩基の長さを有する。

20 以下実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

(参考例 1)

多義プライマーのデザイン

特異領域と多義領域とを有する多義プライマーを用い、GP 法における好適なプライマーのアニールリング条件を検討した。図 2 に多義プライマーの概念図を示した。図 2 の多義プライマーは、5' 末端側に多義領域を有することにより、特定塩
25 基配列のみならず、これに類似するような相似性のある配列にもアニールするこ

- 27 -

とができる。なお、実際にこのような構造の波形生成用プライマー集合体を用いる際には、目的に応じて、以下の（a）～（e）に示す条件を調整することが望ましい。

- （a）プライマー長
- 5 （b）特異領域の配列
- （c）多義領域の配列
- （d）プライマー量
- （e）アニーリング温度

そこで、以下では、この波形生成用プライマー集合体を構成する多義プライマーの構造及び反応条件の一例として、上述した（a）～（e）の項目を順に検討した。

（a）プライマー長の調整

先ず、プライマー全長が合成効率に与える影響を検討するため、特異領域と多義領域とが1：1であるプライマーについて、98℃／2秒、40℃／20秒、
15 72℃／20秒のプロトコルを50サイクル実施して相補鎖合成反応を行った。相補鎖合成によって得られた伸長産物について、解離曲線の波形を解析し、多義プライマーの構造が結果に与える影響を比較した。多義プライマーは、特異性と安定性の2つの指標に基づいて評価した。

ここで「特異性が高い」とは、標的領域として選択した部分以外の領域に対し
20 てアニールしにくいことを言う。本発明においては、多義プライマーの特異性が高いことは、伸長産物の多様性が低くなる原因となる。その結果、波形の多様性は失われる。つまり、特異性をある程度低下させた多義プライマーが、本発明における望ましい多義プライマーであると言える。

一方、安定性とは、多義プライマーを構成する各プライマーのアニールの再現
25 性を言う。多義プライマーが異なる塩基配列のオリゴヌクレオチドからなる集合体であることは既に述べた。しかし集合体を構成している個々のオリゴヌクレオ

- 28 -

チドは、それぞれの塩基配列に相補的な塩基配列に対してアニールするはずである。ところが、たとえば多義領域の長さが長すぎる場合には、結果的に目的とする塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドの量が少なくなる。つまり、十分な相補鎖合成が起きなくなる可能性が高まる。

- 5 この検討の結果、プライマー全長が 16 ～ 24mer の場合に、好ましいプライマーの特異性あるいは安定性が見られた。この条件で、伸長産物の波形の多様性が最大となった。

- 一方、プライマー全長が 24 ～ 30mer では、プライマーの特異性あるいは安定性が高くなる反面、得られる解離曲線の波形の多様性が低下した。特異性が高
10 まることにより、標的領域として選択した領域以外の領域の相補鎖合成反応が十分に進まなかったと考えられた。プライマー全長が 10 ～ 16mer では、波形の多様性は高まる。しかし一方で、特異性と安定性は低下した。プライマー全長が 9mer 以下では、合成反応が起こらなかった。これらの結果から、本発明の多義プライマーのプライマー長としては、10 ～ 30mer の範囲を使用することがで
15 き、中でも好ましい長さは 16 ～ 24mer であると結論した。

次に、プライマー全長に占める特異領域と多義領域の割合を検討した。この結果、プライマー全長に占める多義領域の割合が 0.33 ～ 0.55 の場合に、安定性と伸長産物の多様性が最大となった。塩基数に直すと、全長 24mer の多義プライマーでは、8 ～ 13mer の場合に望ましい結果が得られることになる。

- 20 一方プライマー全長に占める多義領域の割合が 0.55 ～ 0.88 の場合には、波形の多様性は高まるが安定性が低下した。このときの条件を塩基数で示せば、多義領域が 14 ～ 25mer、特異領域が 4 ～ 7mer となる。また、プライマー全長に占める多義領域の割合が 0.12 ～ 0.33 の場合には、波形の多様性が失われた。このときの条件を塩基数で示せば、多義領域が 4 ～ 7mer、特異領域が 14
25 ～ 25mer となる。

更に、プライマー全長に占める多義領域の割合が 0.89 以上では、いわゆる

- 29 -

ランダムプライマーとなり、正常な合成が起こらなかった。このときの条件を塩基数で示せば、例えば多義領域が 25mer 以上、かつ特異領域が 3mer 以下となる。また、プライマー全長に占める多義領域の割合が 0.11 以下では、通常の PCR プライマーと同じような合成反応が見られた。つまり、ほぼ 1 種類のみの相補鎖
5 合成産物が見られた。このときの条件を塩基数で示せば、例えば多義領域が 3mer 以下、かつ特異領域が 25mer 以上となる。

なお、以下ではプライマー全長に占める多義領域の割合を 0.33～0.55 とするものとして説明する。

(b) 特異領域の配列

10 特異領域は、被検核酸から選択された標的領域に相補的な塩基配列からなっている。特異領域の長さは、多義プライマーの全長が 16～24mer であるときに 8～13mer であることが好ましい。また、3' 末端を含む 5 塩基中における G (グアニン) 又は C (シトシン) が占める割合である GC% は、50% 以上であることが望ましい。さらに、3' 末端の安定性は、 $-5.5 \sim -9.5$ kcal/mol
15 以上が必要である。なお、3' 末端側の 3 塩基以外において 50% 以内のミスマッチがある場合にもアニール可能である。この際、ミスマッチ部分の安定性が -12.0 kcal/mol 以下であれば、合成効率の低下は無視し得る。

(c) 多義領域の配列

多義領域は、被検核酸から選択された標的領域以外の領域に対してもアニール
20 可能なプライマーを増やすために配置される領域である。多義領域は、前記標的領域に対して相補的な塩基を、それ以外の塩基に置換した塩基配列からなっている。置換する塩基の種類は 1～3 種類の任意の塩基である。本発明において、塩基の置換を表現するために、表 1 に示す多義コード (Ambiguity Code) を用いる。多義プライマーの構造は、例えば図 3 に示すような塩基配列によって示すことができる。図 3 に示した塩基配列を有する多義プライマーは、多義領域における多
25 義性が 5' ～ 3' 側にかけて段階的に低下する構造を有している。多義領域の長さ

- 30 -

は、プライマー全長が 16 ～ 24mer であるときに 8 ～ 13mer であることが好ましい。

表 1. Ambiguity Code

記号	塩基
M	A (アデニン) または C (シトシン)
R	A または G (グアニン)
W	A または T (チミン)
S	C または G
Y	C または T
K	G または T
V	A または C または G
H	A または C または T
D	A または G または T
B	C または G または T
N	A または C または G または T

5 (d) プライマー量

上述した多義領域を含む多義プライマーの集合体は、実際には異なる塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの集合体である。したがって、1つの 2 Ambiguity Code が含まれることは、実際には異なる塩基配列からなる 2 種類のオリゴヌクレオチドが含まれることを意味している。そのため、鋳型核酸とアニールする有効率は $1/2$ となる。

例えば、2 Ambiguity Code: S (C または G を示す) が含まれた S A T T という塩基配列は、実際には C A T T および G A T T の 2 種類の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを含むことを意味する。この場合、それぞれの有効プライマー量は $1/2$ となる。同様に、1つの 3 Ambiguity Code または 4 Ambiguity Code によって有効プライマー量はそれぞれ $1/3$ または $1/4$ となる。つまり、3 Ambiguity Code: B (C、G または T を示す) が含まれた B A T T という配列では、C A T T、G A T T 又は T A T T の 3 種類の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを含むことを意味

- 31 -

する。

したがって、実際にプライマー量を計算する際には、この有効プライマー量を考慮する必要がある。具体的には、最低プライマー量に有効プライマー量の逆数を乗算し、これを多義領域の塩基数とミスマッチ率である4とで除算する。図3の例では、2つの4 Ambiguity Code、4つの3 Ambiguity Code、そして2つの2 Ambiguity Codeを有するため、有効プライマー量は、 $1 / 5184 (= (1 / 4)^2 \times (1 / 3)^4 \times (1 / 2)^2)$ となる。また、多義領域の塩基数は8である。これにより、最低プライマー量を1 (pmol/50 μ L) としたとき、実際に加えるべきプライマー量は、 $1 \times 5184 \div 8 \div 4 = 162$ (pmol/50 μ L) 程度となる。なお、このプライマー量の算出方法は一例であり、この方法に限定されるものではない。

(e) アニーリング温度

アニーリング温度を検討するために、先ずプライマーの T_m 値を算出した。 T_m 値とは、互いに相補的な塩基配列を持つ核酸の50%が塩基対結合した状態となる温度をいう。具体的には、特異領域の T_m 値を $2(A+T)+4(G+C)$ 法で計算し、多義領域の平均 $2(A+T)+4(G+C)$ 法で計算した。そして、これらを総合してプライマー全長の T_m 値を計算した。

通常のPCR法におけるアニーリング温度は、 T_m 値マイナス5℃程度である。本発明におけるアニーリング温度は、波形パターンを多様化するために、 T_m 値マイナス20℃程度とすることが好ましい。低い温度を与えることで、短いプライマーもアニールしやすくなる。実験的には、40℃以下で解離曲線の波形多様性の向上が顕著となった。一方、15℃以下ではランダムプライミングのみとなり、殆ど合成反応を示さない。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明における相補鎖合成方法を模式的に説明する図である。図 1 (A) は、本発明によって被検核酸の複数の領域が合成される様子を示す。図 1 (B) は、複数の伸長産物が種々の相互干渉構造を形成する様子を示す。

5 図 2 は、本発明に用いる多義プライマーの構造を示す図である。

図 3 は、多義プライマーの多義領域の配列の一例を示す図である。

図 4 は、相補鎖合成におけるスタビライザーの添加が波形パターンに与える影響を示す。図 4 (A) がスタビライザー無し、図 4 (B) がスタビライザーを添加した場合の波形パターンである。図中、縦軸は蛍光強度微分値を、横軸は温度
10 (°C) を示す。

図 5 は、相補鎖合成におけるスタビライザーの添加が相補鎖合成に与える影響を示す写真である。図 5 (A) がスタビライザー無し、図 5 (B) がスタビライザーを添加した場合の、合成産物の電気泳動の結果を示す。(A) および (B) の左端のレーンが 200 bp ラダー、右側の 2 つのレーンがサンプル (デュプリケ
15 ート) の泳動結果である。

図 6 は、4 種類の波形生成用プライマー集合体 sPGBUP65、sPGBUPUPR、sPGBUPFX、および sPGBUPRX のデザインのために設定した「標的領域」の、被検核酸上における位置関係を模式的に示している。

20 発明を実施するための最良の形態

[実施例 1]

25°C の低温アニーリングにおける「スタビライザー」の効果

表 2 に示すアニーリングの安定剤 (以下「スタビライザー」を記載する) の効果について、実施例に基づいて本発明をさらに具体的に説明する。本発明は以下
25 の実施例に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において種々の変更が可能である。

- 33 -

(1) 方法

細菌 DNA の特定塩基配列を複数箇所で認識するプライマー、BAUP65（配列番号：6）を作成し、GP 法に基づいて核酸を同定した。相補鎖合成工程において、スタビライザーを加えた場合と加えない場合の波形パターンを比較して、スタビライザーの効果を確認した。

細菌 DNA は大腸菌 (*E. coli*) DNA を用いた。ISOGEN-LS（日本ジーン株式会社製）を用い、大腸菌約 10^6 個からマニュアルに従って DNA を抽出した。抽出 DNA は最終的に $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (H_2O) の濃度に調整した。「スタビライザー」の処方を表 2 に、相補鎖合成反応液の組成を表 3 および表 4 に示す。

10

表 2. 「スタビライザー」1 mL の処方

反応液処方	処分量
0.2 M Na_2SO_4	100 μL
1% SDS ^{*1}	50 μL
20% Brj35 ^{*2}	500 μL
滅菌蒸留水	350 μL
計	1000 μL

表 3. 「スタビライザー無し」の組成

反応液処方	処分量
検体 DNA 溶液 (DNA 1 μg 含有)	2 μL
10×PCR 緩衝液 (MgCl_2 無し)	5 μL
25mM MgCl_2	3 μL
SyGreen (サイバーグリーン) 溶液 ^{*3}	5 μL
dNTP (10mM each)	1 μL
BAUP65 プライマー (10 p モル/ μL)	18 μL
TaqDNA ポリメラーゼ (5 U/ μL) ^{*4}	0.5 μL
滅菌蒸留水	15.5 μL
計	50 μL

- 34 -

表4. 「スタビライザー有り」の組成

反応液処方	処方量
検体 DNA 溶液 (DNA 1 μ g 含有)	2 μ L
10 $\times$ PCR 緩衝液 (MgCl ₂ 無し)	5 μ L
25mM MgCl ₂	3 μ L
SyGreen (サイバークリーン) 溶液	5 μ L
dNTP (10mM each)	1 μ L
BAUP65 プライマー (10 p モル/ μ L)	18 μ L
TaqDNA ポリメラーゼ (5 U/ μ L)	0.5 μ L
滅菌蒸留水	5.5 μ L
「スタビライザー」	10 μ L
計	50 μ L

*1 SDS; Sodium Dodecyl Sulfate

*2 Brj35; Polyoxyethylene (23) Lauryl Ether

*3 SyGreen 溶液; 原液 1000 倍希釈

*4 Taq DNA polymerase; TAKARA Ex TaqTM R-PCR
BAUP65; 5'-GGAAGGTGGGG-3' (配列番号: 6)

5

「スタビライザー無し」および「スタビライザー有り」の組成を有する反応液について、各々 1 サンプル 50 μ L を加え相補鎖合成反応を行った。反応は、デュプリケートで実施し計 4 サンプルの波形を観察した。iCycler (Biorad 社製) を用いて 98 $^{\circ}$ C/2 秒、25 $^{\circ}$ C/40 秒、72 $^{\circ}$ C/10 秒のプロトコールを 50 サイクル実施して相補鎖を合成した。反応後、温度範囲 75 $^{\circ}$ C $\sim$ 95 $^{\circ}$ C、温度ステップ 0.1 $^{\circ}$ C の条件で各温度で 8 秒間観察することにより、合成産物の解離曲線の波形を描画した。

次に、核酸増幅反応終了後のサンプル 10 μ L に 2 μ L のローディングバッファーを添加し、1.2% アガロースゲルを使って、45 分間、50 V で電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色して合成産物を確認した。なお、分子サイズマーカーとして、200bp ladder marker を使用した。

(2) 結果

「スタビライザー」の効果をも、図 4 (A) 「スタビライザー無し」、図 4 (B) 「スタビライザー有り」の波形の差異として示す。ここで図 4 (A) では、

20

- 35 -

核酸の合成が不十分なため波形が不明瞭である。一方図 4 (B) では十分な核酸が合成されているため、大腸菌の DNA に特徴的な波形が正常に描画されている。

「スタビライザー」の効果は、電気泳動分析の結果によっても裏付けられた。すなわち、図 5 (A) 「スタビライザー無し」では合成産物のバンドが見られない。

- 5 一方図 5 (B) 「スタビライザー有り」では合成産物のバンドを確認することができた。

以上の結果から、「スタビライザー」の添加によって、25℃という低温条件下での相補鎖合成と波形の解析が可能となることが裏付けられた。スタビライザーは、たとえば次のような機序によって 25℃におけるプライマーの特異的なアニー

- 10 リングと相補鎖合成を成立させていると考えられた。

プライマーおよび DNA の直線化維持、あるいは高次構造形成抑制、
プライマー-鋳型 DNA 間の水素結合安定化。

したがって、低温条件下での相補鎖合成によって本発明を実施する場合には、「スタビライザー」の添加が有効であるといえる。

15

産業上の利用の可能性

- 本発明により、低温条件下でのプライマーの特異的なアニーリングを可能とする緩衝剤が提供された。本発明の緩衝剤を利用すれば、たとえば 10 塩基前後の短い塩基配列で構成されるプライマーを利用しても、塩基配列特異的な相補鎖合
- 20 成反応を期待できる。短いプライマーの利用により、被検核酸の複数の領域を少種類のプライマーで合成することが可能となる。本発明の緩衝剤は、GP 法のような、複数の領域の相補鎖合成を必要とする核酸解析方法に有用である。

- 本発明の緩衝剤は、短いプライマーを利用した相補鎖合成反応に利用することができる。短いプライマーのアニーリングには低い温度が要求される。本発明の
- 25 緩衝剤により、低温条件下でのアニーリングと相補鎖合成反応を効率的に行うことが可能となった。

- 36 -

- 短いプライマーは、少数のプライマーで複数の領域を特異的に合成するときに有利である。各領域にそれぞれ特異的なプライマーを混合して用いれば、複数領域を一つの反応系で合成することは可能である。しかし複数のプライマーを合成することはコストアップの原因である。また、構成塩基数の多い複数のプライマーは互いに異なる T_m を有する可能性がある。このような場合は、複数のプライマー間でストリンジェンシーを一致させることができなくなる。結果として、プライマー間で相補鎖合成反応の効率に差を生む恐れがある。GP 法のように、複数種の相補鎖合成産物の集合体を解析の対象とする解析方法においては、このような合成効率の差は小さいほうが望ましい。
- 5 GP 法以外の核酸解析方法においても、短いプライマーによってもたらされる効果が期待できる。たとえば PCR 法において、必ずしも十分な長さのプライマーをデザインできない場合がある。すなわち、合成対象の塩基配列情報が不十分な場合には、十分な長さのプライマーをデザインすることができない。あるいは、相補鎖合成反応以外の目的で組み込まれる塩基配列のために、プライマーにおける
- 10 相補鎖合成反応のための塩基数が制限される場合も考えられる。たとえば、プロモーターや制限酵素認識配列などを組み込んだプライマーがしばしば利用される。このような場合には、相補鎖合成反応のためのプライマーとして、少ない塩基が必要になる。本発明の緩衝剤を利用すれば、このようなプライマーであっても、PCR 法を効率的に実施することができる。
- 15 本発明の緩衝剤を利用して、短いプライマーで複数領域の相補鎖を合成すれば、プライマー間のストリンジェンシーを容易に一致させることができる。またプライマーが短いときには、複数の領域の間で、同じ塩基配列からなるプライマーを共有できる可能性も期待できる。このように、短いプライマーによる特異的な相補鎖合成を可能にした本発明の意義は大きい。

- 37 -

請求の範囲

1. 下記の組成を含む、核酸合成用緩衝剤組成物。
 - a) 核酸合成酵素による相補鎖合成反応に好適な pH を与える緩衝剤、
 - 5 b) 0.1 – 50 mM の Mg^{2+} 塩、および Mn^{2+} 塩のいずれか、または両方
 - c) 1 – 200 mM の 1 価の金属塩
 - d) 0.005 – 0.5 M の、硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、および炭酸塩からなる群から選択される少なくとも 1 種類の塩、および
 - e) 0.01 – 10 %w/v の変性剤
- 10 2. 緩衝剤が、7.5 – 9 の pH を与える緩衝剤である請求項 1 に記載の組成物。
3. Mg^{2+} 塩が、 $MgCl_2$ である請求項 1 に記載の組成物。
4. 1 価の金属塩が、KCl、および NaCl のいずれか、または両方である請求項 1 に記載の組成物。
5. 硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、および炭酸塩が、 Na_2SO_4 、 Na_2SO_3 、 NaH_2PO_4 、
- 15 および $NaHCO_3$ からなる群から選択される少なくとも 1 種類の塩である請求項 1 に記載の組成物。
6. 変性剤が、非イオン系界面活性剤、陰イオン系界面活性剤、および洗剤からなる群から選択される少なくとも 1 種類の変性剤である請求項 1 に記載の組成物。
- 20 7. 非イオン系界面活性剤が、グリセリンエステルのポリオキシエチレンエーテル、ソルビタンエステルのポリオキシエチレンエーテル、およびソルビトールエステルのポリオキシエチレンエーテルからなる群から選択される少なくとも 1 種類の非イオン系界面活性剤である請求項 6 に記載の組成物。
8. 洗剤が、ドデシル硫酸塩、ラウロイルサルコシン塩、ラウリル酸塩、お
- 25 よびメルカプト酢酸塩からなる群から選択される少なくとも 1 種類の化合物である請求項 6 に記載の組成物。

- 38 -

9. 合成すべき核酸が、鋳型となる核酸の複数の領域を鋳型とする相補鎖である請求項1に記載の組成物。
10. 下記の成分 d) および e) のいずれか、または両方の存在下で、低温でオリゴヌクレオチドを相補鎖にアニーリングさせる方法。
- 5 d) 0.01 - 0.1M の、硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、および炭酸塩からなる群から選択される少なくとも1種類の塩
- e) 0.01 - 10%w/v の変性剤
11. 低温条件が、前記オリゴヌクレオチドの融解温度よりも10 - 30℃低い温度である請求項10に記載の方法。
- 10 12. オリゴヌクレオチドが、5 - 20塩基の長さを有する請求項10に記載の方法。
13. オリゴヌクレオチドが、7 - 15塩基の長さを有する請求項12に記載の方法。
14. オリゴヌクレオチドが、鋳型となる核酸の複数箇所にアニールするプライマーである請求項10に記載の方法。
- 15 15. 下記の成分 d) および e) のいずれか、または両方を有効成分として含有する、オリゴヌクレオチドのアニーリングの安定剤。
- d) 0.01 - 0.1M の、硫酸塩、亜硫酸塩、リン酸塩、および炭酸塩からなる群から選択される少なくとも1種類の塩
- 20 e) 0.01 - 10%w/v の変性剤

図 1

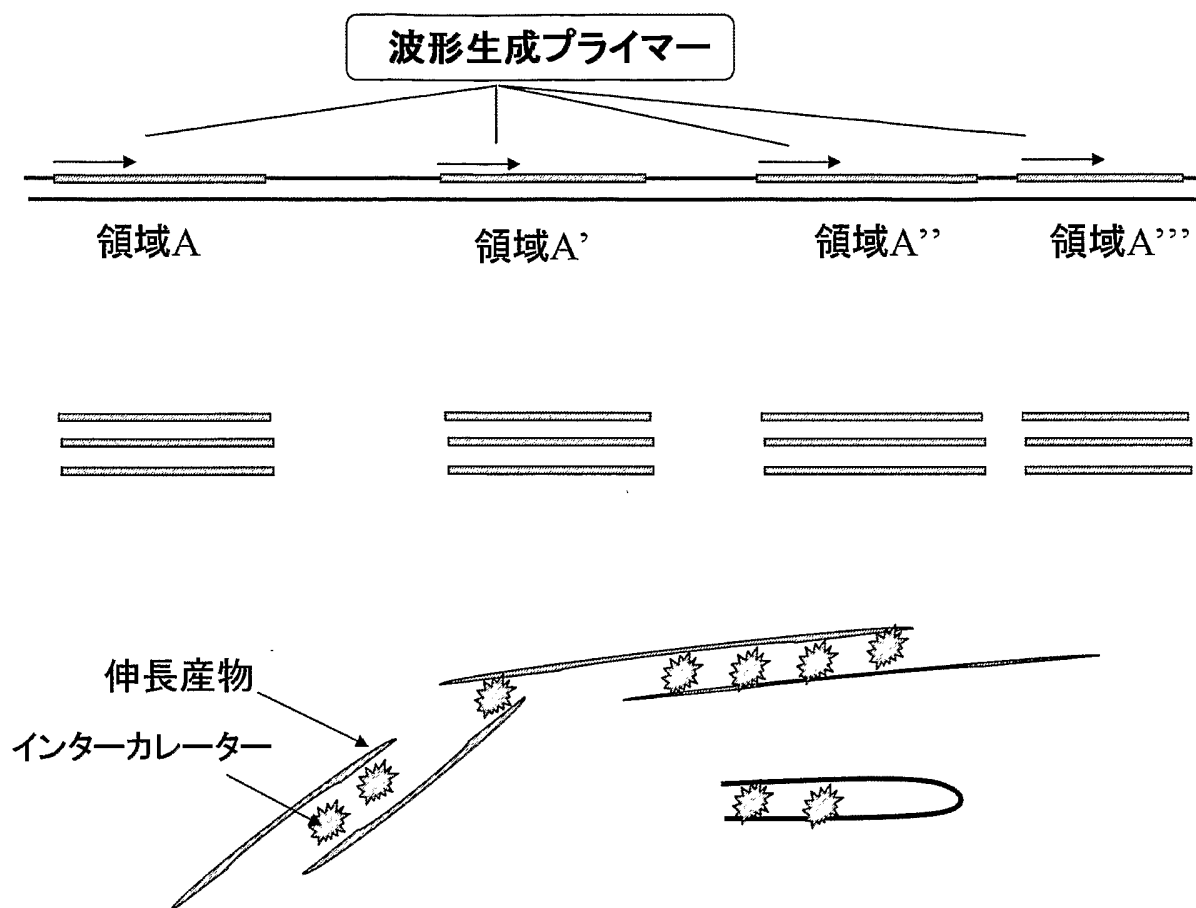


図 2

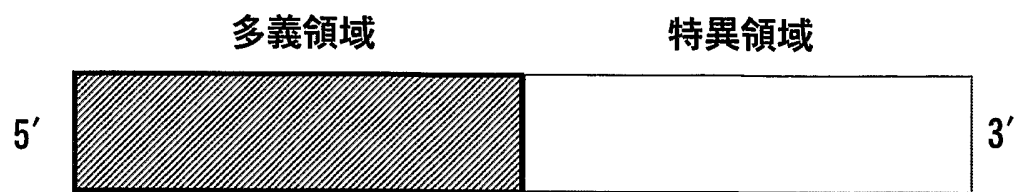


図 3

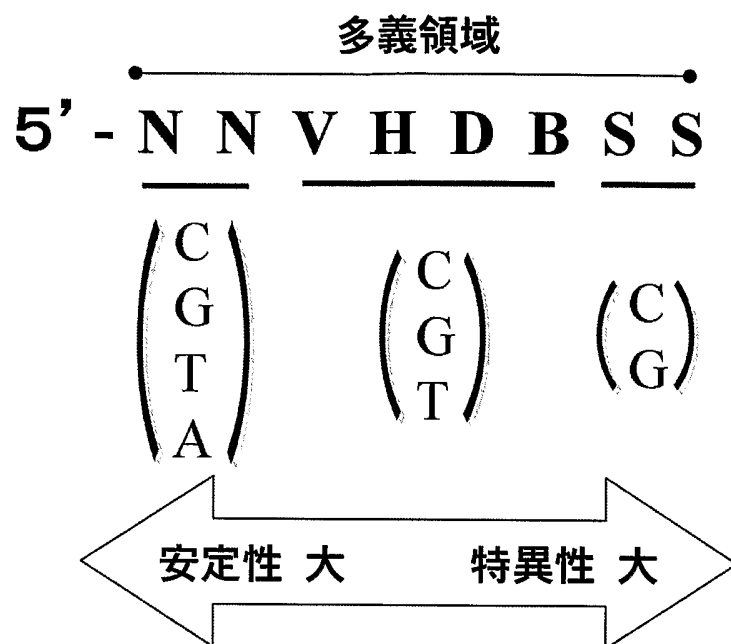
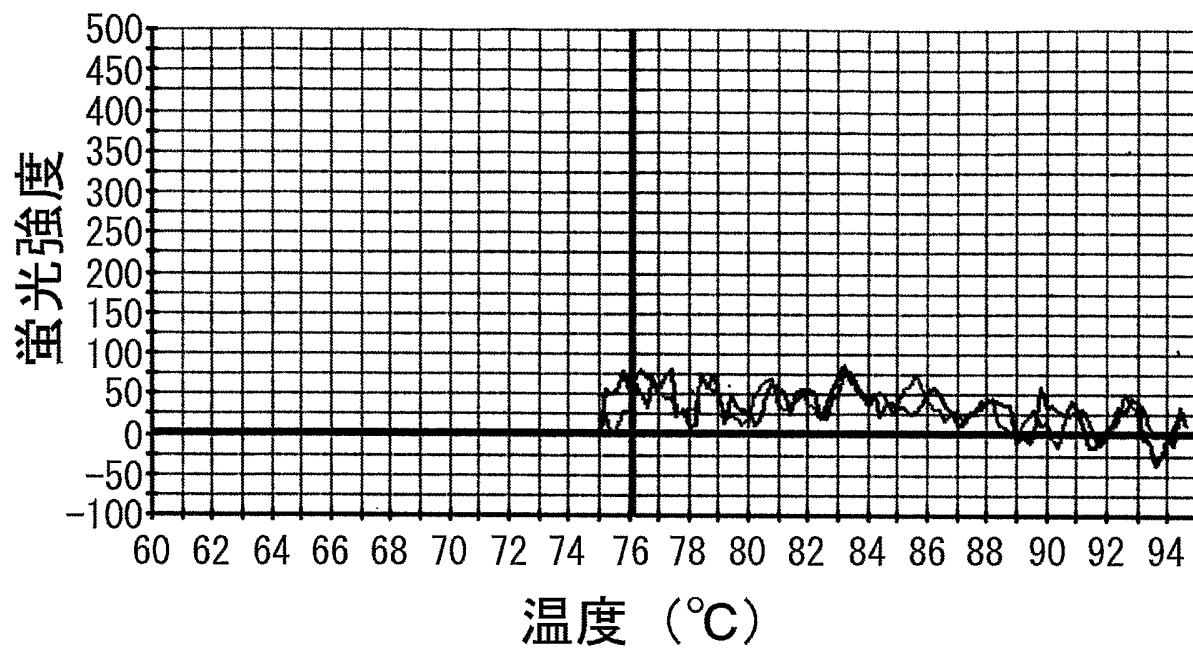


図 4

(A)



(B)

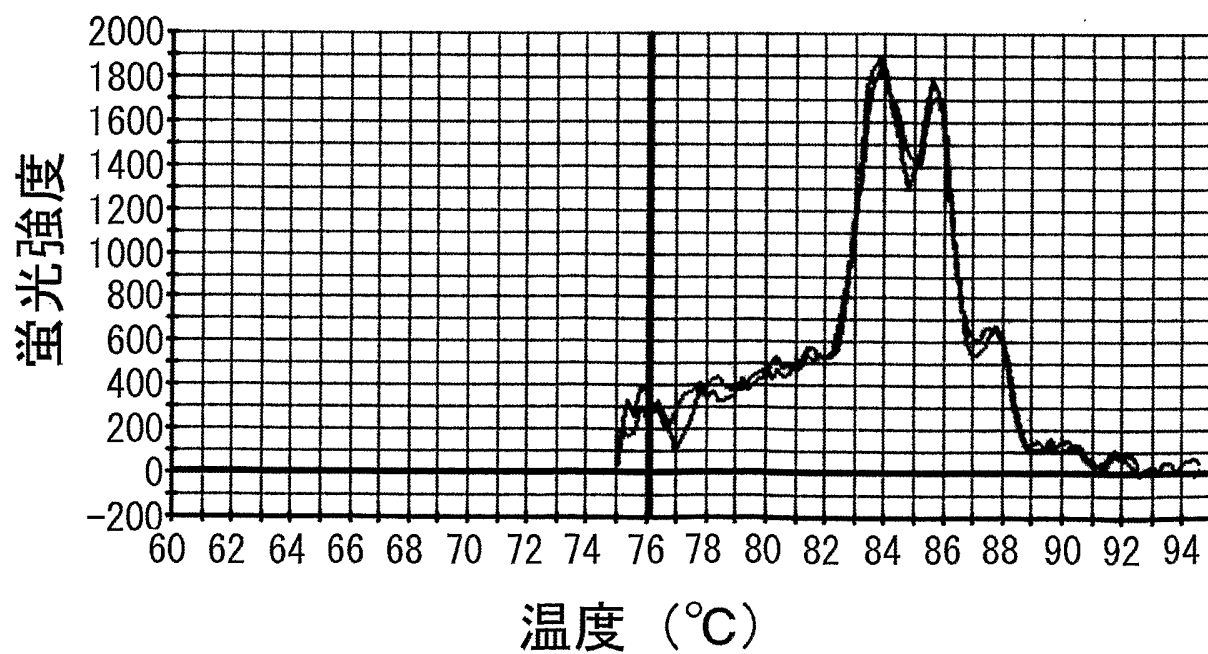
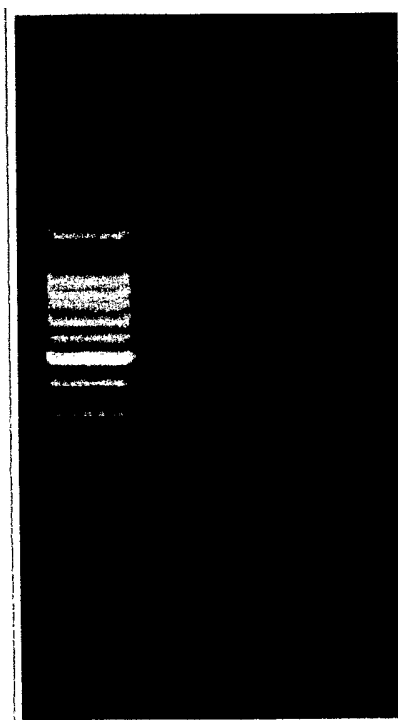


図 5

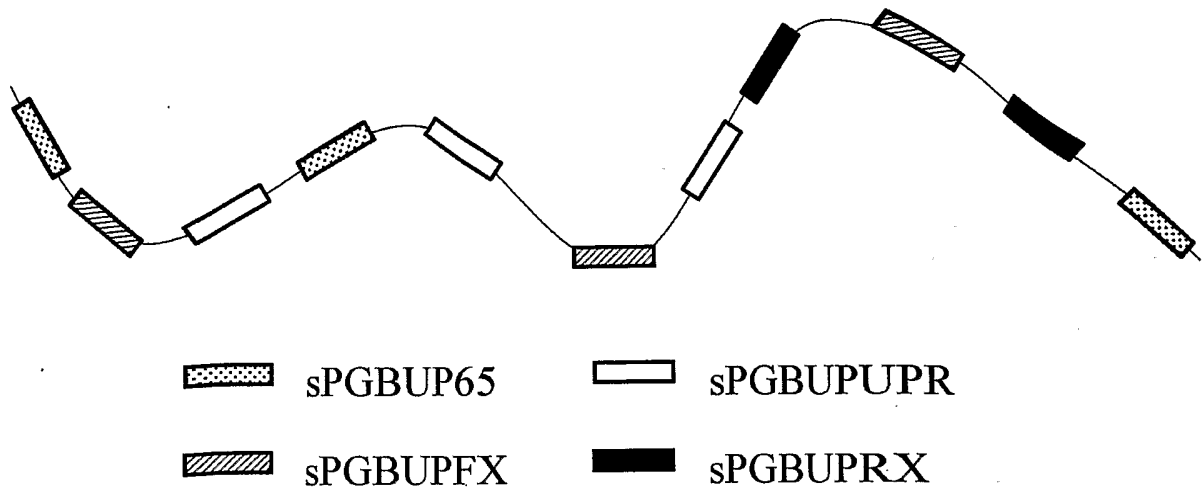
(A)



(B)



図 6



1 / 3

SEQUENCE LISTING

<110> ADGENE CO., LTD.

<120> Composition of buffering agent

<130> ADG-A0303P

<150> PCT/JP03/06275

<151> 2003-05-20

<150> JP 2003-389821

<151> 2003-11-19

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Mycobacterium bovis

<400> 1

agctcgtaaa

2 / 3

<210> 2

<211> 10

<212> DNA

<213> *Mycobacterium bovis*

<400> 2

agttcgtaat

10

<210> 3

<211> 10

<212> DNA

<213> *Mycobacterium kansasii*

<400> 3

aggttgtaaa

10

<210> 4

<211> 10

<212> DNA

<213> *Mycobacterium kansasii*

<400> 4

agttcgtaaa

10

3 / 3

<210> 5

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a sequence described by an ambiguity code

<400> 5

agbtygtaaw

10

<210> 6

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 6

ggaaggtggg g

11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007162

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/10, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/10, C12Q1/68

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-342287 A (Qiagen GmbH.), 12 December, 2000 (12.12.00), & EP 1050587 A2 & US 6300069 B1	1-15
Y	JP 10-080279 A (Shimadzu Corp.), 31 March, 1998 (31.03.98), (Family: none)	1-15
Y	JP 2001-299356 A (Shimadzu Corp.), 30 October, 2001 (30.10.01), & US 2002/0142402 A1	1-15
Y	JP 9-238687 A (Shimadzu Corp.), 16 September, 1997 (16.09.97), (Family: none)	1-15

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 August, 2004 (23.08.04)Date of mailing of the international search report
07 September, 2004 (07.09.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007162

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-352982 A (Shimadzu Corp.), 25 December, 2001 (25.12.01), & US 2002/0102660 A1	1-15
P,X	WO 03/097828 A1 (Kabushiki Kaisha Adojin), 27 November, 2003 (27.11.03), & JP 2004-041191 A & AU 2003234938 A1	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N 15/10, C12Q 1/68		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N 15/10, C12Q 1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2000-342287 A (キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング) 2000.12.12 & EP 1050587 A2 & US 6300069 B1	1-15
Y	JP 10-080279 A (株式会社島津製作所) 1998.03.31 (ファミリーなし)	1-15
Y	JP 2001-299356 A (株式会社島津製作所) 2001.10.30 & US 2002/0142402 A1	1-15
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 23.08.2004	国際調査報告の発送日 07.9.2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二	4 B 9 2 8 1
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 9-238687 A (株式会社島津製作所) 1997.09.16 (ファミリーなし)	1-15
Y	JP 2001-352982 A (株式会社島津製作所) 2001.12.25 & US 2002/0102660 A1	1-15
P, X	WO 03/097828 A1 (株式会社アドジーン) 2003.11.27 & JP 2004-041191 A & AU 2003234938 A1	1-15