

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-524902

(P2016-524902A)

(43) 公表日 平成28年8月22日 (2016. 8. 22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 O 1 A	
	G O 1 N 33/543 5 2 5 E	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 60 頁)		

(21) 出願番号 特願2016-525292 (P2016-525292)
 (86) (22) 出願日 平成26年7月14日 (2014. 7. 14)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年1月8日 (2016. 1. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2014/006296
 (87) 国際公開番号 W02015/008985
 (87) 国際公開日 平成27年1月22日 (2015. 1. 22)
 (31) 優先権主張番号 10-2013-0083072
 (32) 優先日 平成25年7月15日 (2013. 7. 15)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 507292955
 シーザーン アイエヌシー
 大韓民国 1 3 8 - 8 2 8 ソウル ソン
 パーグ オグムーロ 9 1 タエウォン
 ビルディング 8階・9階
 (74) 代理人 100107515
 弁理士 廣田 浩一
 (74) 代理人 100107733
 弁理士 流 良広
 (74) 代理人 100115347
 弁理士 松田 奈緒子
 (74) 代理人 100163038
 弁理士 山下 武志

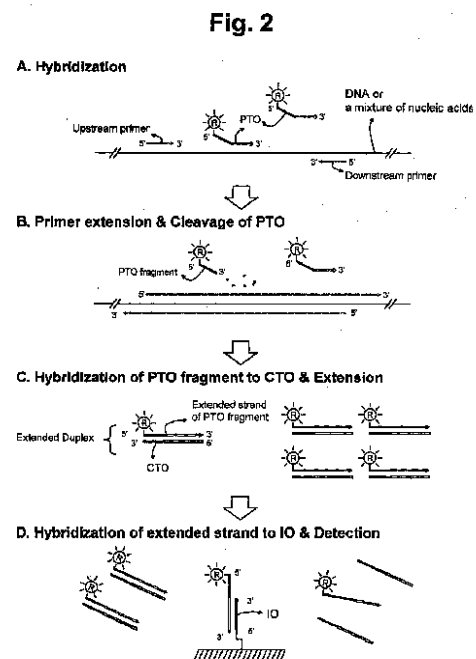
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PTOの切断及び延長-依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを用いたターゲット核酸配列の検出

(57) 【要約】

本発明は、PTOの切断及び延長-依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (PCE-IH) 分析によって固相でターゲット核酸配列を検出する技術に関するものである。本発明は、まずPTOをターゲット核酸配列とハイブリダイズさせ、人為的に選択した配列を有するCTOをテンプレートとして使うことによって、ターゲット-依存的な方式で延長鎖を形成させ、最後に、延長鎖を固相に固定されたIOとハイブリダイズさせる。すなわち、本発明は、PTOハイブリダイゼーション及び切断、CTOハイブリダイゼーション及び延長、及びIOハイブリダイゼーションを含む一連の反応を用いて、本発明の特異性を非常に向上させる。

【選択図】図2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

次の段階を含む P T O の切断及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (P C E - I H) 分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出する方法：

(a) 前記ターゲット核酸配列を、アップストリームオリゴヌクレオチド及びプロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド (P T O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含み；

前記 P T O は、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含む 3 ' - ターゲッティング部位、及び (i i) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む 5 ' - タギング部位を含み；

前記 3 ' - ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされ、前記 5 ' - タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされず；

前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、前記 P T O のアップストリームに位置し；

(b) 前記 P T O の切断のための条件下で、5 ' ヌクレアーゼ活性を有する酵素に前記段階 (a) の結果物を接触させる段階であって；

前記アップストリームオリゴヌクレオチドまたはその延長鎖は、前記 5 ' ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記 P T O の切断を誘導し、このような前記切断は、前記 P T O の 5 ' - タギング部位または 5 ' - タギング部位の一部を含む断片を放出し；

(c) 前記 P T O から放出された前記断片を、キャプチャリング・アンド・テンプレーティングオリゴヌクレオチド (C T O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記 C T O は、3 ' → 5 ' 方向に (i) 前記 P T O の 5 ' - タギング部位または 5 ' - タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位、及び (i i) 前記 P T O の 5 ' - タギング部位及び 3 ' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレーティング部位を含み；

前記 P T O から放出された前記断片は、前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされ；

(d) 前記段階 (c) の結果物及び鋳型 - 依存的核酸重合酵素を用いて延長反応を実施する段階であって；

前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされた前記断片は、延長されて前記 C T O のテンプレーティング部位に相補的な延長配列を含む延長鎖を生成し、延長二量体を形成し；

前記延長鎖は、標識を含み；

(e) 前記延長鎖を、固相基質上に固定された固定化オリゴヌクレオチド (I O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記 I O は、前記延長鎖に相補的な配列を含み；

前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリダイゼーションは、前記固相基質上に検出可能なシグナルを提供し；及び

(f) 前記延長鎖の存在を示す前記シグナルを検出する段階であって；

前記延長鎖の存在は、前記ターゲット核酸配列の存在を示す。

【請求項 2】

前記段階 (e) は、前記延長鎖が一本鎖状態で前記 I O とのハイブリダイゼーションに有利な条件下で実施され、これにより、前記延長鎖及び前記 C T O 間の前記延長二量体の形成による前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリダイゼーションの抑制が防止されることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 3】

前記条件は、前記段階 (e) で前記一本鎖状態の延長鎖の数を増加させることを特徴と

10

20

30

40

50

する請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記段階 (e) で前記一本鎖状態の延長鎖の数を増加させる前記条件は、前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリダイゼーション前に前記延長二量体を変性させることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記段階 (e) で前記一本鎖状態の延長鎖の数を増加させる前記条件は、前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリダイゼーション前に前記 C T O を除去することを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記段階 (e) で前記一本鎖形態の延長鎖の数を増加させる前記条件は、P T O の C T O に対する m o l 比が 1 超で前記 P T O 及び前記 C T O を使うことを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 P T O の C T O に対する m o l 比は、1 . 2 以上であることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記段階 (e) は、前記延長鎖と前記 I O とのハイブリダイゼーション競争力を、前記 C T O と前記延長鎖とのハイブリダイゼーション競争力よりも向上させる条件下で実施されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記延長鎖と前記 I O とのハイブリダイゼーション競争力を、前記 C T O と前記延長鎖とのハイブリダイゼーション競争力よりも向上させる前記条件は、前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリッドの T m 値及び前記 C T O 及び前記延長鎖間のハイブリッドの T m 値を調節することを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 I O は、(i) 前記延長配列の全部または一部、及び (i i) 前記延長鎖内の前記断片の一部に相補的な配列を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記延長鎖に含まれた前記標識は、(i) 前記 P T O から放出された前記断片に結合された単一標識、(i i) 前記延長反応の間に前記延長鎖に挿入される標識、または (i i i) 前記断片に結合された前記単一標識及び前記延長反応の間に前記延長鎖に挿入される前記標識の組合せであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記単一標識は、単一蛍光標識であることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記標識は、前記延長鎖に挿入される標識であり、

前記 C T O のテンプレティング部位は、第 1 非天然塩基を含むヌクレオチドを含み、

前記段階 (d) の前記延長反応は、標識及び前記第 1 非天然塩基に対して特異的結合親和性を有する第 2 非天然塩基を含むヌクレオチドの存在下で実施され、これにより、前記延長鎖に前記標識が挿入されることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記標識は、前記断片に結合された前記単一標識及び前記延長反応の間に前記延長鎖に挿入される前記標識の組合せであり、前記単一標識及び前記挿入された標識は、受容体及び供与体の対を含む相互作用的二重標識であることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

前記段階 (e) の前記ハイブリダイゼーションは、インターカレーティング染料の存在下で実施され、前記延長鎖に含まれた前記標識は、前記インターカレーティング染料からのシグナルを受ける受容体であり、前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリッドに挿入され

10

20

30

40

50

たインターカレーティング染料からのシグナルは、前記受容体に転移され、前記受容体は、検出可能なシグナルを提供することを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 PTO、前記 CTO 及び / または前記 IO は、その延長が防止されるように、その 3' 末端がブロッキングされることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、アップストリームプライマーまたはアップストリームプローブであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、前記 5' ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記 PTO の切断を誘導する程度に前記 PTO に近接して位置することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記アップストリームプライマーは、その延長鎖を通じて前記 5' ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記 PTO の前記切断を誘導することを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 CTO のキャプチャリング部位は、その 5' 末端の一部に前記 PTO の 3' - ターゲティング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記 PTO の 3' - ターゲティング部位の一部に相補的な前記ヌクレオチド配列は、1 ~ 10 ヌクレオチドの長さであることを特徴とする請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記シグナルを検出するための前記段階 (f) は、一定温度範囲で前記延長鎖及び前記 IO 間のハイブリッドをメルティングするか、または前記ハイブリッドをメルティングし、ハイブリダイズさせる過程で、前記固相基質上に提供されるシグナルを検出することで実施されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

前記方法は、反復サイクルの間に変性を含み、前記段階 (a) ~ (f) の全部または一部を繰り返す段階をさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 24】

前記段階 (a) ~ (f) は、1 つの反応容器または個別反応容器で実施されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

前記段階 (a) ~ (d) 及び (e) ~ (f) は、互いに異なる 2 つの反応容器で実施されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

前記方法は、少なくとも 2 種のターゲット核酸配列を検出するために実施され；

前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、少なくとも 2 種のオリゴヌクレオチドを含み、前記 PTO は、少なくとも 2 種の PTO を含み、前記 CTO は、少なくとも 2 種の CTO を含み、前記 IO は、少なくとも 2 種の IO を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 27】

前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、アップストリームプライマーであり、前記段階 (b) で 5' ヌクレアーゼ活性を有する前記酵素は、前記アップストリームプライマーの延長のための鋳型 - 依存的核酸重合酵素であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 5' ヌクレアーゼ活性を有する酵素は、5' ヌクレアーゼ活性を有する重合酵素ま

50

たは F E N ヌクレアーゼであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

前記ターゲット核酸配列は、ヌクレオチド変異を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

前記方法は、ダウンストリームプライマーの存在下で実施されることを特徴とする請求項 1 から 29 のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

次の段階を含む P T O の切断及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (P C E - I H) 分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出する方法；

(a) 前記ターゲット核酸配列を、アップストリームプライマー及びダウンストリームプライマーを含むプライマー対及びプロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド (P T O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記アップストリームプライマー及び前記ダウンストリームプライマーのそれぞれは、前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含み；

前記 P T O は、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含む 3' - ターゲッティング部位、及び (i i) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む 5' - タギング部位を含み；

前記 3' - ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされ、前記 5' - タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされず；

前記 P T O は、前記アップストリームプライマー及び前記ダウンストリームプライマーの間に位置し；

前記 P T O は、その延長が防止されるように、その 3' 末端がブロックングされており；

(b) 前記プライマーの延長及び前記 P T O の切断のための条件下で、5' ヌクレアーゼ活性を有する鋳型 - 依存的核酸重合酵素に前記段階 (a) の結果物を接触させる段階であって；

前記 P T O が、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされれば、前記アップストリームプライマーは延長され、前記延長鎖は、前記 5' ヌクレアーゼ活性を有する鋳型 - 依存的核酸重合酵素による前記 P T O の切断を誘導し、このような前記切断は、前記 P T O の 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部を含む断片を放出し；

(c) 前記 P T O から放出された前記断片を、キャプチャリング・アンド・テンプレティングオリゴヌクレオチド (C T O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記 C T O は、3' → 5' 方向に (i) 前記 P T O の 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位、及び (i i) 5' - タギング部位及び 3' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレティング部位を含み；

前記 P T O から放出された前記断片は、前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされ；

(d) 前記段階 (c) の結果物及び鋳型 - 依存的核酸重合酵素を用いて延長反応を実施する段階であって；

前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされた前記断片は、延長されて前記 C T O のテンプレティング部位に相補的な延長配列を含む延長鎖を生成し、延長二量体を形成し；

前記延長鎖は、標識を含み、

(e) 前記延長鎖を、固相基質上に固定された固定化オリゴヌクレオチド (I O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記 I O は、前記延長鎖に相補的な配列を含み；

前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリダイゼーションは、前記固相基質上に検出可能な

10

20

30

40

50

シグナルを提供し；及び

(f) 前記延長鎖の存在を示す前記シグナルを検出する段階であって；

前記延長鎖の存在は、前記ターゲット核酸配列の存在を示す。

【請求項 3 2】

次の段階を含む P T O の切断及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (P C E - I H) 分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出する方法；

(a) 前記ターゲット核酸配列を、プロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド (P T O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記 P T O は、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含む 3' - ターゲッティング部位、及び (i i) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む 5' - タギング部位を含み；

前記 3' - ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされ、前記 5' - タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされず；

(b) 前記 P T O の切断のための条件下で、5' ヌクレアーゼ活性を有する酵素に前記段階 (a) の結果物を接触させる段階であって；

前記 P T O は、前記 5' ヌクレアーゼ活性を有する酵素によって切断され、このような前記切断は、前記 P T O の 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部を含む断片を放出し；

(c) 前記 P T O から放出された前記断片を、キャプチャリング・アンド・テンプレーティングオリゴヌクレオチド (C T O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記 C T O は、3' → 5' 方向に (i) 前記 P T O の 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位、及び (i i) 前記 P T O の 5' - タギング部位及び 3' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレーティング部位を含み；

前記 P T O から放出された前記断片は、前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされ；

(d) 前記段階 (c) の結果物及び鋳型 - 依存的核酸重合酵素を用いて延長反応を実施する段階であって；

前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされた前記断片は、延長されて前記 C T O のテンプレーティング部位に相補的な延長配列を含む延長鎖を生成し、延長二量体を形成し；

前記延長鎖は、標識を含み、

(e) 前記延長鎖を、固相基質上に固定された固定化オリゴヌクレオチド (I O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記 I O は、前記延長鎖に相補的な配列を含み；

前記延長鎖と前記 I O との間のハイブリダイゼーションは、前記固相基質上に検出可能なシグナルを提供し；及び

(f) 前記延長鎖の存在を示す前記シグナルを検出する段階であって；

前記延長鎖の存在は、前記ターゲット核酸配列の存在を示す。

【請求項 3 3】

次を含む P T O の切断及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (P C E - I H) 分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出するためのキット；

(a) アップストリームオリゴヌクレオチド；

前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含み；

(b) プロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド (P T O) ；

前記 P T O は、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含む 3' - ターゲッティング部位、及び (i i) 前記ターゲット核酸配列に非

相補的なヌクレオチド配列を含む 5' - タギング部位を含み；

前記 3' - ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされ、

前記 5' - タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされず；

前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、前記 P T O のアップストリームに位置し；

前記アップストリームオリゴヌクレオチドまたはその延長鎖は、5' ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記 P T O の切断を誘導し、このような切断は、前記 P T O の 5' - タギング部位及び 5' - タギング部位の一部を含む断片を放出し；

(c) キャプチャリング・アンド・テンプレーティングオリゴヌクレオチド (C T O) ；

前記 C T O は、3' → 5' 方向に (i) 前記 P T O の 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位、及び (i i) 前記 P T O の 5' - タギング部位及び 3' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレーティング部位を含み；

前記 P T O から放出された前記断片は、前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされ；

前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされた前記断片は、延長されて前記 C T O のテンプレーティング部位に相補的な延長配列を含む延長鎖を生成し、延長二量体を形成し；

前記延長鎖は、標識を含み；及び

(d) 固定化オリゴヌクレオチド (I O) ；

前記 I O は、固相基質上に固定化されており；

前記 I O は、前記延長鎖に相補的な配列を含み；

前記延長鎖と前記 I O との間のハイブリダイゼーションは、前記固相基質上に検出可能なシグナルを提供する。

【請求項 3 4】

前記キットは、5' ヌクレアーゼ活性を有する酵素をさらに含むことを特徴とする請求項 3 3 に記載のキット。

【請求項 3 5】

P T O の C T O に対する m o l 比が 1 超で前記 P T O 及び C T O を含むことを特徴とする請求項 3 3 に記載のキット。

【請求項 3 6】

前記 I O は、(i) 前記延長配列の全部または一部、及び (i i) 前記延長鎖内の前記断片の一部に相補的な配列を含むことを特徴とする請求項 3 3 に記載のキット。

【請求項 3 7】

前記延長鎖に含まれた前記標識は、(i) 前記 P T O から放出された前記断片に結合された単一標識、(i i) 前記延長反応の間に前記延長鎖に挿入される標識、または (i i i) 前記断片に結合された前記単一標識及び前記延長反応の間に前記延長鎖に挿入される前記標識の組合せであることを特徴とする請求項 3 3 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2013 年 7 月 15 日付で大韓民国特許庁に出願された大韓民国特許出願番号第 2013 - 0083072 号に対して優先権を主張し、前記特許出願の開示事項は、本明細書に参照として挿入される。

【0002】

本発明は、P T O の切断及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (P T O C l e a v a g e a n d E x t e n s i o n - D e p e n d e n t I m m o b i l i z e d O l i g o n u c l e o t i d e H y b r i d i z a t i o n ; P C E - I H) 分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出する技

10

20

30

40

50

術に関する。

【背景技術】

【0003】

DNAハイブリダイゼーションは、分子生物学の基本的な過程である。しかし、ハイブリダイゼーションにのみ主に依存する従来方法及び過程では、プローブと非ターゲット配列との間の非特異的なハイブリダイゼーションによる擬陽性結果の発生可能性が高い。したがって、従来方法及び過程は、信頼度を改善しなければならない問題点が残っている。

【0004】

ハイブリダイゼーション過程以外にも、追加的に酵素反応を用いた幾つかの接近法、例えば、TaqManTMプローブ方法が提示された。

【0005】

TaqManTMプローブ方法で、ターゲット核酸配列にハイブリダイズされた標識プローブは、アップストリームプライマー依存的DNA重合酵素の5'ヌクレアーゼ活性によって切断されて、ターゲット配列の存在を示すシグナルを発生させる（米国特許第5,210,015号、第5,538,848号、及び第6,326,145号）。TaqManTMプローブ方法は、シグナル発生のための2つの接近法を提示する：重合依存的切断（polymerization-dependent cleavage）及び重合独立的切断（polymerization-independent cleavage）。重合依存的切断で、アップストリームプライマーの延長は、必ず核酸重合酵素が標識プローブの5'末端に接触する前に発生しなければならない。延長反応が進行しながら、重合酵素は、標識プローブの5'末端を次第に切断する。重合独立的切断で、アップストリームプライマー及び標識プローブは、非常に近接してターゲット核酸配列にハイブリダイズされ、アップストリームプライマーの3'末端と核酸重合酵素の結合は、前記核酸重合酵素を標識プローブの5'末端に接触させて、標識を放出する。また、TaqManTMプローブ方法は、その5'末端にターゲット配列とハイブリダイズされない5'末端領域を有する標識プローブが切断されて、5'末端領域を含む断片が形成されることを開示している。

【0006】

ターゲット配列に非相補的な5'末端領域を有するプローブが、5'ヌクレアーゼによって切断されて、5'末端領域を含む断片が放出される幾つかの方法が報告された。

【0007】

例えば、特許文献1は、DNA重合酵素の5'ヌクレアーゼ活性によって切断される切断構造を開示している。テンプレート（template）に非相補的な5'部位、及びテンプレートに相補的な3'部位を含むオリゴヌクレオチドがテンプレートにハイブリダイズされ、アップストリームオリゴヌクレオチドは、非常に近接してテンプレートにハイブリダイズされる切断構造が例示されている。前記切断構造は、5'ヌクレアーゼ活性を有するDNA重合酵素または減少した合成活性を有する変形DNA重合酵素によって切断されて、テンプレートに非相補的な5'部位が放出される。次いで、前記放出された5'部位は、ヘアピン構造を有するオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされて切断構造を形成し、これにより、漸進的な切断反応が誘導されてターゲット配列が検出される。

【0008】

特許文献2は、3'末端がブロックされたアップストリームオリゴヌクレオチドを有する切断構造が、5'ヌクレアーゼ活性を有するDNA重合酵素またはFENヌクレアーゼによって切断されて、非相補的な5'フラップ（flap）領域が放出され、前記放出された5'フラップ領域が、サイズ分析または相互作用的二重標識によって検出される過程を開示している。特許文献3は、検出可能な放出されたフラップが核酸合成依存的な、フラップ媒介連続的増幅方法によって生成されることを開示している。この方法では、第1切断構造から放出されたフラップが、核酸合成依存的な方式で第2切断構造を切断して第2切断構造からフラップを放出させ、前記放出されたフラップが検出される。

【 0 0 0 9 】

特許文献 4 は、核酸合成によって生成された放出されたフラップの形成、放出されたフラップの延長、フラップ延長の間にオリゴヌクレオチドの切断及びオリゴヌクレオチドの切断によって生成されたシグナル検出を含む方法を開示している。

【 0 0 1 0 】

液相での蛍光 - 標識プローブのハイブリダイゼーションによって、一種の蛍光標識を用いる場合にも、メルティングカーブ分析によって多数のターゲット核酸配列を同時に検出することができる。しかし、相互作用的二重標識プローブの 5'ヌクレアーゼ - 媒介切断によってターゲット配列を検出する従来技術は、マルチプレックスターゲット検出において、互いに異なるターゲット配列に対して、互いに異なる種類の蛍光標識を必要とし、このような蛍光標識種類の数の限界のために検出されるターゲット配列の数は制限される。

10

【 0 0 1 1 】

特許文献 5 は、ターゲット核酸配列に非相補的な 5'部位を有するプローブの切断及びキャプチャー (capture) プローブのハイブリダイゼーションを用いたターゲット検出方法を開示している。標識は、非相補的な 5'部位に位置する。ターゲット配列にハイブリダイズされた標識プローブは、切断されて断片を放出し、以後、前記断片は、キャプチャープローブにハイブリダイズされてターゲット配列の存在が検出される。この方法で、非切断された / 完全な (uncleaved / intact) プローブは、キャプチャープローブにハイブリダイズされないことが必須的である。そのためには、短い長さを有するキャプチャープローブが、固相基質上に固定されなければならない。しかし、このような制限は、固相基質でのハイブリダイゼーションの効率を低め、また反応条件の最適化も難しくする。

20

【 0 0 1 2 】

したがって、より便利かつ信頼性及び再現性のあるハイブリダイゼーション方式で、ハイブリダイゼーションだけではなく、5'核酸切断反応 (5' nucleolytic reaction) のような酵素反応によって、固相でターゲット配列、特に、複数のターゲット配列を向上させた正確性で検出するための新規な接近法に対する開発要求が台頭しつつある。

【 0 0 1 3 】

本明細書の全般に亘って多数の特許及び文献が参照され、その引用がカッコで囲まれている。本発明及び本発明が属する技術分野のレベルをより明確に説明するために、このような特許及び文献の公開は、その全体として本明細書に参照して含まれている。

30

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 4 】

【 特許文献 1 】 米国特許第 5, 6 9 1, 1 4 2 号

【 特許文献 2 】 米国特許第 7, 3 8 1, 5 3 2 号

【 特許文献 3 】 米国特許第 6, 8 9 3, 8 1 9 号

【 特許文献 4 】 米国特許第 7, 3 0 9, 5 7 3 号

【 特許文献 5 】 米国出願公開第 2 0 0 8 - 0 2 4 1 8 3 8 号

40

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 5 】

本発明者らは、より改善された正確性及び便宜性を有し、特に、マルチプレックス方式でターゲット配列を検出する新規な接近法を開発するために鋭意研究した。その結果、本発明者らは、ターゲット配列の検出のための新規なプロトコルを定立し、この新規なプロトコルによれば、ターゲット検出は、プローブハイブリダイゼーション、5'核酸切断反応及び延長を含む酵素反応及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによって達成される。本発明のプロトコルは、固相でより改善された正確性及び便宜性を有し、複数のターゲット配列を検出することができる。

50

【 0 0 1 6 】

したがって、本発明の目的は、P T Oの切断及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (P C E - I H) 分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出する方法を提供することである。

【 0 0 1 7 】

本発明の他の目的は、P C E - I H 分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出するためのキットを提供することである。

【 0 0 1 8 】

本発明の他の目的及び利点は、添付した特許請求の範囲及び図面と共に下記の詳細な説明によってより明確になる。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 9 】

本発明の一態様において、本発明は、次の段階を含み、P T Oの切断及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (P C E - I H) 分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出する方法を提供する：

(a) 前記ターゲット核酸配列を、アップストリームオリゴヌクレオチド (u p s t r e a m o l i g o n u c l e o t i d e) 及びプロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド (P r o b i n g a n d T a g g i n g O l i g o n u c l e o t i d e ; P T O) とハイブリダイズさせる段階であって；前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列 (h y b r i d i z i n g n u c l e o t i d e s e q u e n c e) を含み；前記P T Oは、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含む3' - ターゲッティング部位、及び(i i) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む5' - タギング部位を含み；前記3' - ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされ、前記5' - タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされず；前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、前記P T Oのアップストリームに位置し；

(b) 前記P T Oの切断のための条件下で、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素に前記段階(a)の結果物を接触させる段階であって；前記アップストリームオリゴヌクレオチドまたはその延長鎖は、前記5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記P T Oの切断を誘導し、このような前記切断は、前記P T Oの5' - タギング部位または5' - タギング部位の一部を含む断片を放出し；

(c) 前記P T Oから放出された前記断片を、キャプチャリング・アンド・テンプレーティングオリゴヌクレオチド (C a p t u r i n g a n d T e m p l a t i n g O l i g o n u c l e o t i d e ; C T O) とハイブリダイズさせる段階であって；前記C T Oは、3' → 5' 方向に(i) 前記P T Oの5' - タギング部位または5' - タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位、及び(i i) 前記P T Oの5' - タギング部位及び3' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレーティング部位を含み；前記P T Oから放出された前記断片は、前記C T Oのキャプチャリング部位にハイブリダイズされ；

(d) 前記段階(c)の結果物及び鋳型 - 依存的核酸重合酵素を用いて延長反応を実施する段階であって；前記C T Oのキャプチャリング部位にハイブリダイズされた前記断片は、延長されて前記C T Oのテンプレーティング部位に相補的な延長配列を含む延長鎖を生成し、延長二量体を形成し；前記延長鎖は、標識を含み；

(e) 前記延長鎖を、固相基質上に固定された固定化オリゴヌクレオチド (I m m o b i l i z e d O l i g o n u c l e o t i d e ; I O) とハイブリダイズさせる段階であって；前記I Oは、前記延長鎖に相補的な配列を含み；前記延長鎖及び前記I O間のハイブリダイゼーションは、前記固相基質上に検出可能なシグナルを提供し；及び(f) 前記延長鎖の存在を示す前記シグナルを検出する段階であって；前記延長鎖の存在は、前記ターゲット核酸配列の存在を示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

本発明者らは、より改善された正確性及び便宜性を有し、特に、マルチプレックス方式でターゲット配列を検出する新規な接近法を開発するために鋭意研究した。その結果、本発明者らは、ターゲット配列の検出のための新規なプロトコルを定立し、この新規なプロトコルによれば、ターゲット検出は、プローブハイブリダイゼーション、5' 核酸切断反応及び延長を含む酵素反応及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによって達成される。本発明のプロトコルは、固相でより改善された正確性及び便宜性を有し、複数のターゲット配列を検出することができる。

【 0 0 2 1 】

本発明は、プロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド (P T O) ハイブリダイゼーション ; P T O の切断及び延長 ; 及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを含む連続した段階を用いる。したがって、本発明は、P T O の切断及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (P C E - I H) 分析と名付けられる。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 2 】

本発明の特徴及び利点を要約すれば、次の通りである :

(a) 本発明は、まず P T O をターゲット核酸配列とハイブリダイズさせ、人為的に選択した配列を有する C T O をテンプレートとして使うことによって、ターゲット - 依存的な方式で延長鎖を形成させ、最後に、前記延長鎖を固相に固定された I O とハイブリダイズさせる。すなわち、本発明は、P T O ハイブリダイゼーション及び切断、C T O ハイブリダイゼーション及び延長、及び I O ハイブリダイゼーションを含む一連の反応を用いて、本発明の特異性を非常に向上させる。

(b) 固相は、制限された反応環境を提供することができるために、ターゲット核酸配列及び固相基質上に固定されたオリゴヌクレオチド間の直接的なハイブリダイゼーションは、効率的な反応結果が得られない。一方、本発明は、ターゲット核酸配列の関与なしに、延長鎖及び I O 間のハイブリダイゼーションを用いるので、一般的または典型的な反応条件下でより効率的に検出結果が得られる。このような利点は、より便利な方式で非常に多様な特性を有する臨床試料の複数のターゲット核酸検出のための反応条件を確立可能にし、擬陽性シグナルの発生を防止する。

(c) 固相に固定された I O は、標識を含まない。したがって、固相に固定された標識オリゴヌクレオチドを長期保管する場合に発生する標識分解 (d e g r a d a t i o n) の問題点がない。

(d) ターゲット核酸配列とプローブの直接的なハイブリダイゼーションを用いる従来の方法で、プローブは、相補的な配列と競争する方式でターゲット核酸配列に結合する。対照的に、本発明は、このような競争的なハイブリダイゼーションを避けることができる。本発明は、P T O 及び C T O の量を調節することによって、延長鎖のみが C T O をテンプレートとして用いて増幅され、これにより、延長鎖が C T O の妨害なしに効率的に I O とハイブリダイズされることができるために、より効率的なプローブハイブリダイゼーションが可能である。

さらに、ターゲット核酸配列の一鎖とプローブの直接的なハイブリダイゼーションを用いる従来の方法で、ターゲット核酸配列の反対側鎖の長さは、プローブの長さよりも相対的に長い。したがって、より長い長さのプローブ (すなわち、より高い T m 値のプローブ) を使って反対側鎖のハイブリダイゼーション競争力よりもプローブのハイブリダイゼーション競争力を向上させるのには限界がある。本発明で、延長鎖及び I O 間のハイブリダイゼーションを抑制する C T O の長さは、より短く調節される。したがって、I O の長さを調節 (すなわち、T m 値の調節) することによって、I O のハイブリダイゼーション競争力を C T O のハイブリダイゼーション競争力よりも向上させうる。

(e) 本発明は、固相でのシグナルをリアルタイム方式で検出し、かつ一定の温度範囲で提供されるシグナル (例えば、メルティングカーブ分析) の検出も可能である。

10

20

30

40

50

(f) 本発明は、固相に固定されたオリゴヌクレオチドを用いるので、一種の蛍光標識を使うとしても、複数のターゲット核酸配列を同時に検出することができる。

(g) PTOの5' - タギング部位の配列、CTOの配列及びIOの配列が、ターゲット核酸配列を考慮せずに選択可能であるということは注目すべき点である。これは、PTOの5' - タギング部位、CTO及びIOのための配列プール(pool)をあらかじめデザインすることを可能にする。PTOの3' - ターゲッティング部位は、必ずターゲット核酸配列を考慮して準備せねばならないが、CTO及びIOは、ターゲット核酸配列についての考慮や知識なしに既製作の方式で準備しうる。

【図面の簡単な説明】

【0023】

10

【図1A】PCE-IH分析で利用されるプロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド(PTO)、キャプチャリング・アンド・テンプレティングオリゴヌクレオチド(CTO)及び固定化オリゴヌクレオチド(IO)の図式的な構造を示す。特に、PTO、CTO及びIOの3'末端は、その延長が防止されるようにブロックされる。

【図1B】PCE-IH分析で利用されるプロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド(PTO)、キャプチャリング・アンド・テンプレティングオリゴヌクレオチド(CTO)及び固定化オリゴヌクレオチド(IO)の図式的な構造を示す。特に、PTO、CTO及びIOの3'末端は、その延長が防止されるようにブロックされる。

【図2】PTOから放出された断片に結合された単一標識を用いるPCE-IH分析の一具現例を図式的に示す。IOは、延長鎖の延長配列に相補的な配列を含む。

20

【図3】延長鎖に挿入される標識を用いるPCE-IH分析の一具現例を図式的に示す。

【図4】*Neisseria gonorrhoeae*のゲノムDNAの存在を分析するためにPTOの5'末端に結合された単一標識を用いるPCE-IH分析の結果を示す。ターゲット核酸配列が存在する場合、固相基質上で蛍光シグナルが検出された。

【図5A】延長鎖とIOのハイブリダイゼーションに対するCTOの影響に対する結果を示す。

【図5B】延長鎖とIOのハイブリダイゼーションに対するCTOの影響に対する結果を示す。

【図6A】PTO対CTOの多様なmol比を用いたPCE-IH分析の結果を示す。

【図6B】PTO対CTOの多様なmol比を用いたPCE-IH分析の結果を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明をより詳細に説明すれば、次の通りである：

段階(a)：アップストリームオリゴヌクレオチド及びPTOとターゲット核酸配列とのハイブリダイゼーション

本発明によれば、ターゲット核酸配列を、まずアップストリームオリゴヌクレオチド及びプロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド(PTO)とハイブリダイズさせる。

【0025】

40

本明細書で使われる用語“ターゲット核酸”、“ターゲット核酸配列”、または“ターゲット配列”は、検出しようとする核酸配列を意味し、これは、ハイブリダイゼーション、アニーリング、または増幅条件下で、プローブまたはプライマーとアニーリングまたはハイブリダイズされる。

【0026】

本明細書で使われる用語“プローブ(probe)”は、ターゲット核酸配列に実質的に相補的な部位または部位を含む一本鎖核酸分子を意味する。

【0027】

本明細書で使われる用語“プライマー(primer)”は、核酸鎖(テンプレート)に相補的なプライマー延長産物の合成が誘導される条件下で、すなわち、ヌクレオチドとDNA重合酵素のような重合剤の存在時に、そして、適した温度とpHとで合成の開始点

50

として作用するオリゴヌクレオチドを意味する。

【0028】

特定の具現例で、プローブ及びプライマーは、一本鎖デオキシリボヌクレオチド分子である。本発明で利用されるプローブまたはプライマーは、天然 (naturally occurring) dNMP (すなわち、dAMP、dGMP、dCMP、及び dTMP)、変形ヌクレオチドまたは非天然ヌクレオチドを含みうる。また、プローブまたはプライマーは、リボヌクレオチドを含みうる。

【0029】

プライマーは、重合剤の存在下で延長産物の合成をプライミングさせることができる程度に十分に長くなければならない。プライマーの正確な長さは、例えば、温度、応用分野及びプライマーのソース (source) を含んだ多くの因子によって決定される。本明細書で使われる用語 “アニーリング” または “プライミング” は、テンプレート核酸にオリゴデオキシヌクレオチドまたは核酸が並置 (apposition) されることを意味し、前記並置は、重合酵素がヌクレオチドを重合させて、鋳型核酸またはその一部に相補的な核酸分子を形成させる。

【0030】

本明細書で使われる用語 “ハイブリダイズ” は、相補的な一本鎖核酸が二本鎖核酸を形成することを意味する。ハイブリダイゼーションは、完全に一致するか、一部のミスマッチで実質的に一致する2つの核酸鎖間で起こりうる。ハイブリダイゼーションのための相補性は、ハイブリダイゼーション条件、特に、温度によって変わりうる。

【0031】

ターゲット核酸配列とアップストリームオリゴヌクレオチド及びPTOとのハイブリダイゼーションは、最適化手続きによって一般的に決定される適したハイブリダイゼーション条件下で実施される。温度、成分の濃度、ハイブリダイゼーション及び洗浄回数、バッファ成分、及びこれらのpH及びイオン強度のような条件は、オリゴヌクレオチド (アップストリームオリゴヌクレオチド及びPTO) の長さ、GC含量及びターゲットヌクレオチド配列を含んだ多様な因子によって変わりうる。例えば、相対的に短いオリゴヌクレオチドを用いる場合、低い厳格条件を選択することが望ましい。ハイブリダイゼーションのための詳細な条件は、文献 [Joseph Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); 及びM.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y. (1999)] で確認することができる。

【0032】

用語 “アニーリング” と “ハイブリダイズ” は、差がなく、本明細書で混用されて使われる。

【0033】

アップストリームオリゴヌクレオチド及びPTOは、ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を有する。本明細書で使われる用語 “相補的” は、所定のアニーリング条件または厳格条件下でプライマーまたはプローブがターゲット核酸配列に選択的にハイブリダイズされるほどに十分に相補的であることを意味し、用語 “実質的に相補的 (substantially complementary)” 及び “完全に相補的 (perfectly complementary)” であることをいずれも包括する意味を有し、例えば、完全に相補的であることを意味する。

【0034】

前記PTOの5' - タグging部位は、ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む。本明細書で使われる用語 “非相補的 (non-complementary)” は、所定のアニーリング条件または厳格条件下でプライマーまたはプローブがターゲット核酸配列に選択的にハイブリダイズされないほどに十分に非相補的であることを意味し

、用語“実質的に非相補的 (substantially non-complementary)”及び“完全に非相補的 (perfectly non-complementary)”であることをいずれも包括する意味を有し、例えば、完全に非相補的であることを意味する。

【0035】

例えば、PTOの5'-タギング部位と関連して使われる用語“非相補的”は、所定のアニーリング条件または厳格条件下で前記5'-タギング部位がターゲット核酸配列に選択的にハイブリダイズされないほどに十分に非相補的であることを意味し、用語“実質的に非相補的”及び“完全に非相補的”であることをいずれも包括する意味を有し、例えば、完全に非相補的であることを意味する。

10

【0036】

本明細書で使われる用語“プロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド (PTO)”は、(i)プローブの役割をする3'-ターゲッティング部位；及び(ii)ターゲット核酸配列とハイブリダイゼーションされた後、PTOから核酸切断 (nucleolytically) 方式で放出される、ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む5'-タギング部位を含むオリゴヌクレオチドを意味する。前記PTOで5'-タギング部位及び3'-ターゲッティング部位は、5'→3'順序で位置しなければならない。PTOは、図1に図式的に例示されている。

【0037】

一具現例で、前記段階(a)でハイブリダイゼーションは、前記3'-ターゲッティング部位が前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされ、前記5'-タギング部位が前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされない厳格条件下で実施される。

20

【0038】

前記PTOは、如何なる特定の長さを有することを要求しない。例えば、PTOの長さは、15~150ヌクレオチド、15~100ヌクレオチド、15~80ヌクレオチド、15~60ヌクレオチド、15~40ヌクレオチド、20~150ヌクレオチド、20~100ヌクレオチド、20~80ヌクレオチド、20~60ヌクレオチド、20~50ヌクレオチド、30~150ヌクレオチド、30~100ヌクレオチド、30~80ヌクレオチド、30~60ヌクレオチド、30~50ヌクレオチド、35~100ヌクレオチド、35~80ヌクレオチド、35~60ヌクレオチド、または35~50ヌクレオチドであり得る。前記PTOの3'-ターゲッティング部位は、それがターゲット核酸配列と特異的にハイブリダイズされる限り、如何なる長さも可能である。例えば、PTOの3'-ターゲッティング部位は、10~100ヌクレオチド、10~80ヌクレオチド、10~50ヌクレオチド、10~40ヌクレオチド、10~30ヌクレオチド、15~100ヌクレオチド、15~80ヌクレオチド、15~50ヌクレオチド、15~40ヌクレオチド、15~30ヌクレオチド、20~100ヌクレオチド、20~80ヌクレオチド、20~50ヌクレオチド、20~40ヌクレオチド、または20~30ヌクレオチドの長さを有する。前記5'-タギング部位は、それがCTOのキャプチャリング部位に特異的にハイブリダイズされて延長される限り、如何なる長さも可能である。例えば、前記PTOの5'-タギング部位は、5~50ヌクレオチド、5~40ヌクレオチド、5~30ヌクレオチド、5~20ヌクレオチド、10~50ヌクレオチド、10~40ヌクレオチド、10~30ヌクレオチド、10~20ヌクレオチド、15~50ヌクレオチド、15~40ヌクレオチド、15~30ヌクレオチド、または15~20ヌクレオチドの長さを有する。

30

40

【0039】

前記PTOの3'末端は、3'-OHターミナル (terminal) を有することもある。特定の具現例で、PTOの3'末端は、その延長が防止されるようにブロッキングされる。

【0040】

前記ブロッキングは、従来の方法によって達成されうる。例えば、ブロッキングは、最

50

後のヌクレオチドの3'-ヒドロキシル基に、ビオチン、標識、ホスフェート基、アルキル基、非ヌクレオチドリinker、ホスホロチオエート、またはアルカンジオールのような化学的モイエティ (m o i e t y) を付け加えて実施することができる。択一的に、ブロッキングは、最後のヌクレオチドの3'-ヒドロキシル基を除去するか、またはデオキシヌクレオチドのように3'-ヒドロキシル基のないヌクレオチドを用いて実施することができる。

【0041】

択一的に、前記PTOが、ヘアピン構造を有するようにデザインすることができる。

【0042】

前記PTOの5'-タギング部位及びターゲット核酸配列間の非ハイブリダイゼーションは、特定ハイブリダイゼーション条件下で前記PTOの5'-タギング部位及びターゲット核酸配列間に安定した二本鎖を形成しないことを意味する。本発明の一具現例によれば、前記ターゲット核酸配列とのハイブリダイゼーションに関与しない前記PTOの5'-タギング部位は、一本鎖を形成する。

10

【0043】

前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、前記PTOのアップストリームに位置する。

【0044】

また、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされたアップストリームオリゴヌクレオチドまたはその延長鎖は、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記PTOの切断を誘導する。

20

【0045】

前記アップストリームオリゴヌクレオチドによるPTOの切断の誘導は、2つの方式で達成されうる：(i) アップストリームオリゴヌクレオチド延長-独立的切断誘導；及び(ii) アップストリームオリゴヌクレオチド延長-依存的切断誘導。

【0046】

前記アップストリームオリゴヌクレオチドが、前記5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記PTOの切断の誘導に十分な程度に前記PTOに近接して位置する場合、前記アップストリームオリゴヌクレオチドに結合した前記酵素は、延長反応なしに前記PTOを切断する。一方、前記アップストリームオリゴヌクレオチドが、前記PTOと離隔して位置する場合、重合酵素活性を有する酵素（例えば、鋳型-依存的重合酵素）は、前記アップストリームオリゴヌクレオチド（例えば、アップストリームプライマー）の延長を促進させ、前記延長産物に結合された5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素は、PTOを切断する。

30

【0047】

したがって、前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、2つの方式で前記PTOに対して相対的に位置しうる。前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、延長-独立した方式で前記PTOの切断の誘導に十分な程度にPTOに近接して位置しうる。択一的に、前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、延長-依存的な方式で前記PTOの切断の誘導に十分な程度に前記PTOと離隔して位置しうる。

40

【0048】

本明細書で、地点 (p o s i t i o n s) または位置 (l o c a t i o n s) を言及しながら使われる用語“近接 (a d j a c e n t)”は、アップストリームオリゴヌクレオチドがPTOの3'-ターゲッティング部位に近接して位置して、ニック (n i c k) を形成することを意味する。また、前記用語は、アップストリームオリゴヌクレオチドがPTOの3'-ターゲッティング部位から1~30ヌクレオチド、1~20ヌクレオチド、または1~15ヌクレオチド離隔して位置することを意味する。

【0049】

本明細書で、地点または位置を言及しながら使われる用語“離隔 (d i s t a n t)”は、延長反応が起こるのに十分な程度の如何なる地点または位置を含む。

50

【 0 0 5 0 】

一具現例によれば、前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、延長 - 依存的な方式で P T O の切断の誘導に十分な程度に P T O と離隔して位置する。

【 0 0 5 1 】

一具現例によれば、前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、アップストリームプライマーまたはアップストリームプローブである。前記アップストリームプライマーは、延長 - 独立的切断誘導または延長 - 依存的切断に適し、前記アップストリームプローブは、延長 - 独立的切断誘導に適している。

【 0 0 5 2 】

択一的に、前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、P T O の 3' - ターゲッティング部位の 5' - 一部と部分的に重なる配列 (partial-overlapped sequence) を有しうる。特定の具現例で、前記重なる配列は、1 ~ 10 ヌクレオチド、1 ~ 5 ヌクレオチド、または 1 ~ 3 ヌクレオチドの長さである。前記アップストリームオリゴヌクレオチドが、P T O の 3' - ターゲッティング部位の 5' - 一部と部分的に重なる配列を有する場合、段階 (b) の切断反応で 3' - ターゲッティング部位は、5' - タギング部位と共に部分的に切断される。また、前記重なる配列は、3' - ターゲッティング部位の所望のサイト (site) を切断させる。

【 0 0 5 3 】

一具現例によれば、前記アップストリームプライマーは、その延長鎖を通じて 5' ヌクレアーゼ活性を有する酵素による P T O の切断を誘導する。

【 0 0 5 4 】

アップストリームオリゴヌクレオチドがターゲット核酸配列にハイブリダイズされた P T O の切断を誘導して、P T O の 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部を含む断片が放出される限り、アップストリームオリゴヌクレオチドによる切断反応に関する従来技術が、本発明に適用可能である。例えば、米国特許第 5, 210, 015 号、第 5, 487, 972 号、第 5, 691, 142 号、第 5, 994, 069 号、第 7, 381, 532 号、及び米国出願公開番号第 2008 - 0241838 号を、本発明に適用することができる。

【 0 0 5 5 】

一具現例によれば、本発明の方法は、ダウンストリームプライマーの存在下で実施される。前記ダウンストリームプライマーは、P T O にハイブリダイズされるターゲット核酸配列を追加的に生成させて、ターゲット検出の感度を向上させる。

【 0 0 5 6 】

一具現例によれば、前記アップストリームプライマー及び前記ダウンストリームプライマーを用いる場合、プライマーの延長のために、鋳型 - 依存的核酸重合酵素が追加的に使われる。

【 0 0 5 7 】

一具現例によれば、前記アップストリームオリゴヌクレオチド (アップストリームプライマーまたはアップストリームプローブ)、前記ダウンストリームプライマー及び前記 P T O の 5' - タギング部位は、本発明者によって開発された二重プライミングオリゴヌクレオチド (Dual Priming Oligonucleotide; DPO) 構造を有する。前記 DPO 構造を有するオリゴヌクレオチドは、従来のプライマー及びプローブに比べて、非常に改善されたターゲット特異性を示す (参照: WO 2006/095981; Chun ら、Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene, Nucleic Acid Research, 35: 6e40 (2007))。

【 0 0 5 8 】

一具現例によれば、前記 P T O の 3' - ターゲッティング部位は、本発明者によって開

10

20

30

40

50

発された変形二重特異性オリゴヌクレオチド(modified Dual Specificity Oligonucleotide; mDSO)構造を有する。前記変形二重特異性オリゴヌクレオチド(mDSO)構造は、従来のプローブに比べて、非常に改善されたターゲット特異性を示す(参照: WO 2011/028041)。

【0059】

段階(b): PTOの切断から断片の放出

引き続き、前記PTOの切断のための条件下で前記段階(a)の結果物を5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素に接触させる。前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされたPTOは、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素によって切断されて、前記PTOの5'-タギング部位または5'-タギング部位の一部を含む断片を放出する。

10

【0060】

本明細書で使われる用語“PTOの切断のための条件”は、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素によってターゲット核酸配列にハイブリダイズされたPTOが切断されるのに十分な条件、例えば、温度、pH、イオン強度、バッファ、オリゴヌクレオチドの長さ及び配列、そして、酵素を意味する。例えば、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素としてTaq DNA重合酵素が利用される場合、PTOの切断のための条件は、Tris-HClバッファ、KCl、MgCl₂、及び温度を含む。

【0061】

前記PTOが、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされる場合、その3'-ターゲッティング部位は、ハイブリダイゼーションに関与し、5'-タギング部位は、ターゲット核酸配列にハイブリダイゼーションされず、一本鎖を形成する(参照: 図2)。このように、一本鎖及び二本鎖構造いずれもを含むオリゴヌクレオチドは、当業者に知られた多様な技術によって5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素を用いて切断されうる。

20

【0062】

前記PTOの切断サイトは、アップストリームオリゴヌクレオチド(アップストリームプローブまたはアップストリームプライマー)の種類、アップストリームオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションサイト及び切断条件によって変わる(参照: 米国特許第5,210,015号、第5,487,972号、第5,691,142号、第5,994,069号、及び第7,381,532号、または米国出願公開番号第2008-0241838号)。

30

【0063】

前記PTOの切断反応のために、多数の従来技術が利用され、5'-タギング部位または5'-タギング部位の一部を含む断片を放出する。

【0064】

簡略に、段階(b)で、3種の切断サイトが存在することができる。最初の切断サイトは、PTOのハイブリダイゼーション部位(3'-ターゲッティング部位)及び非ハイブリダイゼーション部位(5'-タギング部位)間のジャンクション位置(junction site)である。二番目の切断サイトは、PTOの5'-タギング部位の3'末端から3'-方向に幾つかのヌクレオチドほど離隔して位置するサイトである。前記二番目の切断サイトは、PTOの3'-ターゲッティング部位の5'末端の一部に位置する。三番目の切断サイトは、PTOの5'-タギング部位の3'末端から5'-方向に幾つかのヌクレオチドほど離隔して位置するサイトである。

40

【0065】

一具現例によれば、アップストリームプライマーの延長時に、5'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型-依存的重合酵素によるPTOの切断のための初期サイト(initial site)は、PTO及びターゲット核酸配列間の二本鎖の開始点(starting point)またはその開始点から1~3ヌクレオチドほど離隔した位置である。

【0066】

このような観点で、本明細書で、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素によるPTOの切断と関連して使われる用語“PTOの5'-タギング部位または5'-タギング部位の一

50

部を含む断片”は、(i) 5' - タギング部位、(i i) 5' - タギング部位、及び 3' - ターゲッティング部位の 5' 末端の一部、及び (i i i) 5' - タギング部位の一部を含む意味として使われる。また、本明細書で、“ P T O の 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部を含む断片”は、“断片”または“ P T O 断片”と表現される。

【 0 0 6 7 】

一具現例によれば、前記 P T O は、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素による切断に対して耐性を有する 1 つのブロッカーを含むブロッカー部位を有し、前記ブロッカー部位は、初期切断サイト及び / または連続した切断の調節に利用される。一具現例によれば、前記 P T O は、ブロッカーとして 5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素による切断に対して耐性を有する少なくとも 1 つのヌクレオチドを含むブロッカー部位を有する。例えば、前記 P T O のハイブリダイゼーション部位 (3' - ターゲッティング部位) 及び非ハイブリダイゼーション部位 (5' - タギング部位) 間のジャンクション位置で切断を誘導するために、P T O の 3' - ターゲッティング部位の 5' 末端の一部は、ブロッカーでブロッキングされうる。前記ブロッカー部位に含まれるブロッカーの個数は、制限されず、1 ~ 10、2 ~ 10、3 ~ 8、または 3 ~ 6 ブロッカーを含む。P T O に存在するブロッカーは、連続または不連続方式で存在し、望ましくは、連続した方式である。ブロッカーとして 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性に対して耐性を有するバックボーンを含むヌクレオチドは、当業者に知られた如何なるものも含む。例えば、前記ヌクレオチドは、多様なホスホロチオエート結合、ホスホネート結合、ホスホロアミダート結合、及び 2' - カーパーハイドレート変形を含む。一具現例によれば、5' → 3' エキソヌクレアーゼに対して耐性を有するバックボーンを含むヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合、アルキルホスホトリエステル結合、アリールホスホトリエステル結合、アルキルホスホネート結合、アリールホスホネート結合、ハイドロゲンホスホネート結合、アルキルホスホロアミダート結合、アリールホスホロアミダート結合、ホスホロセネート結合、2' - O - アミノプロピル変形、2' - O - アルキル変形、2' - O - アリル変形、2' - O - ブチル変形、α - アノマーオリゴデオキシヌクレオチド、及び 1 - (4' - チオ - β - D - リボフラノシル) 変形を含む。

【 0 0 6 8 】

一具現例によれば、ブロッカーとしてヌクレオチドは、ロック核酸 (l o c k e d n u c l e i c a c i d ; L N A) を含む。

【 0 0 6 9 】

P T O の 5' - タギング部位の一部、P T O の 3' - ターゲッティング部位の 5' 末端の一部、及び C T O のキャプチャリング部位の 5' 末端の一部のように、P T O または C T O と関連して使われる用語“一部 (p a r t)”は、1 ~ 40、1 ~ 30、1 ~ 20、1 ~ 15、1 ~ 10、または 1 ~ 5 ヌクレオチド、望ましくは、1、2、3、または 4 ヌクレオチドで構成されたヌクレオチド配列を意味する。

【 0 0 7 0 】

一具現例によれば、前記 5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素は、5'ヌクレアーゼ活性を有する DNA 重合酵素または F E N ヌクレアーゼであり、望ましくは、5'ヌクレアーゼ活性を有する熱安定性 DNA 重合酵素または F E N ヌクレアーゼである。

【 0 0 7 1 】

本発明で、5'ヌクレアーゼ活性を有する適した DNA 重合酵素は、多様なバクテリア種から得た熱安定性 DNA 重合酵素であり、これは、*Thermus aquaticus* (T a q)、*Thermus thermophilus* (T t h)、*Thermus filiformis*、*Thermis flavus*、*Thermococcus litoralis*、*Thermus antranikianii*、*Thermus caldophilus*、*Thermus chliarophilus*、*Thermus flavus*、*Thermus igniterrae*、*Thermus lacteus*、*Thermus oshimai*、*Thermus ruber*、*Thermus rubens*、*Thermus scotoductus*、*Thermus sil*

10

20

30

40

50

vanus、Thermus species Z05、Thermus species sps 17、Thermus thermophilus、Thermotoga maritima、Thermotoga neapolitana、Thermosiphon africanus、Thermococcus litoralis、Thermococcus barossii、Thermococcus gorgonarius、Thermotoga maritima、Thermotoga neapolitana、Thermosiphon africanus、Pyrococcus woesei、Pyrococcus horikoshii、Pyrococcus abyssi、Pyrodictium occultum、Aquifex pyrophilus、及びAquifex aeolicusを含む。特定の具現例で、熱安定性DNA重合酵素は、Taq重合酵素である。

10

【0072】

択一的に、本発明は、減少した重合酵素活性を有するように変形された、5'ヌクレアーゼ活性を有するDNA重合酵素を使うことができる。

【0073】

一具現例によれば、使われるFEN (flap endonuclease)ヌクレアーゼは、5'フラップ-特異的ヌクレアーゼ (5' flap-specific nuclease)である。

【0074】

本発明で適したFENヌクレアーゼは、Sulfolobus solfataricus、Pyrobaculum aerophilum、Thermococcus litoralis、Archaeoglobus veneficus、Archaeoglobus profundus、Acidianus brieryi、Acidianus ambivalens、Desulfurococcus amylolyticus、Desulfurococcus mobilis、Pyrodictium brockii、Thermococcus gorgonarius、Thermococcus zilligii、Methanopyrus kandleri、Methanococcus igneus、Pyrococcus horikoshii、Aeropyrum pernix、及びArchaeoglobus veneficusを含む、多様なバクテリア種から得たFENヌクレアーゼを含む。

20

30

【0075】

前記段階(a)でアップストリームプライマーを用いる場合、PTOの切断のための条件は、アップストリームプライマーの延長反応を含みうる。

【0076】

一具現例によれば、前記段階(a)でアップストリームプライマーが使われ、前記アップストリームプライマーの延長のために、鋳型-依存的重合酵素が使われ、前記鋳型-依存的重合酵素は、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素と同一である。

【0077】

選択的に、前記段階(a)でアップストリームプライマーが使われ、前記アップストリームプライマーの延長のために、鋳型-依存的重合酵素が使われ、前記鋳型-依存的重合酵素は、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素と異なる。

40

【0078】

段階(c)：PTOから放出された断片とCTOとのハイブリダイゼーション

前記PTOから放出された断片は、キャプチャリング・アンド・テンプレートイングオリゴヌクレオチド(CTO)とハイブリダイズされる。

【0079】

前記CTOは、3'→5'方向に(i)PTOの5'-タギング部位または5'-タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位、及び(ii)PTOの5'-タギング部位及び3'-ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレートイング部位を含む。

50

【 0 0 8 0 】

前記 C T O は、 P T O から放出された断片の延長のためのテンプレートとして役割を果たす。プライマーとして作用する前記断片は、前記 C T O にハイブリダイズされ、延長されて延長二量体を形成する。

【 0 0 8 1 】

前記テンプレティング部位は、 P T O の 5' - タギング部位及び 3' - ターゲッティング部位に非相補的な限り、如何なる配列も含みうる。また、テンプレティング部位は、 P T O から放出された断片の延長のためのテンプレートとしての役割ができる限り、如何なる配列も含みうる。

【 0 0 8 2 】

前述したように、 P T O の 5' - タギング部位を有する断片が放出される場合、前記 C T O のキャプチャリング部位は、 5' - タギング部位に相補的なヌクレオチド配列を含むようにデザインされうる。 5' - タギング部位及び 3' - ターゲッティング部位の 5' 末端の一部を有する断片が放出される場合、前記 C T O のキャプチャリング部位は、 5' - タギング部位及び 3' - ターゲッティング部位の 5' 末端の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むようにデザインされうる。 P T O の 5' - タギング部位の一部を有する断片が放出される場合、前記 C T O のキャプチャリング部位は、 5' - タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むようにデザインされうる。

【 0 0 8 3 】

さらに、 P T O の切断サイトを予想することによって、 C T O のキャプチャリング部位をデザインすることができる。例えば、 C T O のキャプチャリング部位が 5' - タギング部位に相補的なヌクレオチド配列を含むようにデザインする場合、 5' - タギング部位の一部を有する断片、または 5' - タギング部位を有する断片は、キャプチャリング部位とハイブリダイズされて延長されうる。 5' - タギング部位及び 3' - ターゲッティング部位の 5' 末端の一部を含む断片が放出される場合、前記断片は、 5' - タギング部位に相補的なヌクレオチド配列を含むようにデザインされた C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされ、前記断片の 3' 末端部位にミスマッチヌクレオチドが存在するにも拘らず、成功的に延長されうる。これは、プライマーの 3' 末端が一部のミスマッチヌクレオチド（例えば、 1 ~ 3 ミスマッチヌクレオチド）を含むにも拘らず、プライマーが反応条件によって延長されるためである。

【 0 0 8 4 】

5' - タギング部位及び 3' - ターゲッティング部位の 5' 末端の一部を含む断片が放出される場合、 C T O のキャプチャリング部位の 5' 末端の一部（参照：図 1）は、前記切断された 3' - ターゲッティング部位の 5' 末端の一部に相補的なヌクレオチド配列を有するようにデザインされ、ミスマッチヌクレオチドと関連した問題を解決することができる（参照：図 1）。

【 0 0 8 5 】

一具現例で、前記切断された 3' - ターゲッティング部位の 5' 末端の一部に相補的な C T O のキャプチャリング部位の 5' 末端の一部のヌクレオチド配列は、 P T O の 3' - ターゲッティング部位上の予想される切断サイトによって選択されうる。前記切断された 3' - ターゲッティング部位の 5' 末端の一部に相補的な C T O のキャプチャリング部位の 5' 末端の一部のヌクレオチド配列は、 1 ~ 10 ヌクレオチド、 1 ~ 5 ヌクレオチド、または 1 ~ 3 ヌクレオチドの長さを有しうる。

【 0 0 8 6 】

前記 C T O の 3' 末端は、前記断片とのハイブリダイゼーションに関与しない追加的なヌクレオチドを含みうる。また、前記断片と安定してハイブリダイズされる限り、 C T O のキャプチャリング部位は、前記断片の一部（例えば、断片の 3' 末端部位を含む断片の一部）にのみ相補的なヌクレオチド配列を含みうる。

【 0 0 8 7 】

本明細書で使われる用語“ 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部に相補

10

20

30

40

50

的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位”は、前述したように、ＣＴＯのキャプチャリング部位の多様なデザイン及び組成を含むものと本願に記載される。

【００８８】

前記ＣＴＯは、ヘアピン構造を有するようにデザインされうる。

【００８９】

前記ＣＴＯの長さは、多様であり得る。例えば、前記ＣＴＯは、６～１０００ヌクレオチド、６～５００ヌクレオチド、６～３００ヌクレオチド、６～１００ヌクレオチド、６～８０ヌクレオチド、６～６０ヌクレオチド、６～４０ヌクレオチド、１５～１０００ヌクレオチド、１５～５００ヌクレオチド、１５～３００ヌクレオチド、１５～１００ヌクレオチド、１５～８０ヌクレオチド、１５～６０ヌクレオチド、１５～４０ヌクレオチド、２０～１０００ヌクレオチド、２０～５００ヌクレオチド、２０～３００ヌクレオチド、２０～１００ヌクレオチド、２０～８０ヌクレオチド、２０～６０ヌクレオチド、２０～４０ヌクレオチド、３０～１０００ヌクレオチド、３０～５００ヌクレオチド、３０～３００ヌクレオチド、３０～１００ヌクレオチド、３０～８０ヌクレオチド、３０～６０ヌクレオチド、または３０～４０ヌクレオチドの長さである。前記ＣＴＯのキャプチャリング部位は、ＰＴＯから放出された断片に特異的にハイブリダイズされる限り、如何なる長さも有しうる。例えば、前記ＣＴＯのキャプチャリング部位は、５～１００ヌクレオチド、５～６０ヌクレオチド、５～４０ヌクレオチド、５～３０ヌクレオチド、５～２０ヌクレオチド、１０～１００ヌクレオチド、１０～６０ヌクレオチド、１０～４０ヌクレオチド、１０～３０ヌクレオチド、１０～２０ヌクレオチド、１５～１００ヌクレオチド、１５～６０ヌクレオチド、１５～４０ヌクレオチド、１５～３０ヌクレオチド、または１５～２０ヌクレオチドの長さである。前記ＣＴＯのテンプレティング部位は、ＰＴＯから放出された断片の延長でテンプレートとしての役割ができる限り、如何なる長さも有しうる。例えば、前記ＣＴＯのテンプレティング部位は、１～９００ヌクレオチド、１～４００ヌクレオチド、１～３００ヌクレオチド、１～１００ヌクレオチド、１～８０ヌクレオチド、１～６０ヌクレオチド、１～４０ヌクレオチド、２～２０ヌクレオチド、２～９００ヌクレオチド、２～４００ヌクレオチド、２～３００ヌクレオチド、２～１００ヌクレオチド、２～８０ヌクレオチド、２～６０ヌクレオチド、２～４０ヌクレオチド、２～２０ヌクレオチド、５～９００ヌクレオチド、５～４００ヌクレオチド、５～３００ヌクレオチド、５～１００ヌクレオチド、５～８０ヌクレオチド、５～６０ヌクレオチド、５～４０ヌクレオチド、５～３０ヌクレオチド、１０～９００ヌクレオチド、１０～４００ヌクレオチド、１０～３００ヌクレオチド、１５～９００ヌクレオチド、１５～１００ヌクレオチド、１５～８０ヌクレオチド、１５～６０ヌクレオチド、１５～４０ヌクレオチド、または１５～２０ヌクレオチドの長さである。

【００９０】

前記ＣＴＯの３′末端は、３′-ＯＨターミナルを有しうる。具体的に、ＣＴＯの３′末端は、その延長が防止されるようにブロックされる。ＣＴＯの非延長ブロックは、従来の方法によって達成されうる。例えば、ブロックは、ＣＴＯの最後のヌクレオチドの３′-ヒドロキシル基に、ビオチン、標識、ホスフェート基、アルキル基、非ヌクレオチドリinker、ホスホロチオエート、またはアルカンジオールのような化学的モietiesを追加して実施することができる。択一的に、ブロックは、最後のヌクレオチドの３′-ヒドロキシル基を除去するか、またはデオキシヌクレオチドのように、３′-ヒドロキシル基のないヌクレオチドを用いて実施することができる。

【００９１】

前記ＰＴＯから放出された断片は、ＣＴＯとハイブリダイズされて、断片の延長に適した形態を提供する。また、非切断ＰＴＯが、その５′-タギング部位を通じてＣＴＯのキャプチャリング部位とハイブリダイズされとしても、ＰＴＯの３′-ターゲッティング部位は、ＣＴＯとハイブリダイズされず、延長二量体の形成が防止される。

【００９２】

前記段階（ｃ）でのハイブリダイゼーションは、前記段階（ａ）での説明を参照して詳

細に説明される。

【0093】

段階(d)：延長二量体を形成するための前記断片の延長

前記段階(c)の結果物及び鋳型-依存的核酸重合酵素を用いて延長反応を実施する。前記CTOのキャプチャリング部位にハイブリダイズされた前記断片は、延長されて前記CTOのテンプレティング部位に相補的な延長配列を含む延長鎖を形成し、これにより、延長二量体を形成する。一方、前記CTOのキャプチャリング部位にハイブリダイズされた非切断されたPTOは、延長されず、延長二量体も形成されない。

【0094】

前記延長鎖は、検出可能なシグナルを提供する標識を含む。

10

【0095】

本明細書で使われる用語“延長二量体(extended duplex)”は、CTOのキャプチャリング部位にハイブリダイズされた断片が鋳型-依存的核酸重合酵素とCTOのテンプレティング部位をテンプレートとして用いて延長される延長反応によって形成された二量体を意味する。

【0096】

本明細書で断片と共に使われる用語“延長鎖(extended strand)”は、断片及び断片の延長配列で構成された配列を意味する。本明細書で断片と共に使われる用語“延長配列(extended sequence)”は、延長鎖で断片を除いた新たに合成された配列を意味する。

20

【0097】

前記段階(d)で利用される鋳型-依存的核酸重合酵素は、如何なる核酸重合酵素、例えば、*E. coli* DNA重合酵素Iの“クレノウ(Klenow)”断片、熱安定性DNA重合酵素及びバクテリオファージT7DNA重合酵素を含みうる。具体的に、前記重合酵素は、*Thermus aquaticus* (Taq)、*Thermus thermophilus* (Tth)、*Thermus filiformis*、*Thermus flavus*、*Thermococcus litoralis*、*Thermus antranikianii*、*Thermus caldophilus*、*Thermus schliarophilus*、*Thermus flavus*、*Thermus igniterrae*、*Thermus lacteus*、*Thermus oshimai*、*Thermus ruber*、*Thermus rubens*、*Thermus cotoductus*、*Thermus silvanus*、*Thermus species Z05*、*Thermus species sps 17*、*Thermus thermophilus*、*Thermotoga maritima*、*Thermotoga neapolitana*、*Thermosiphon africanus*、*Thermococcus litoralis*、*Thermococcus barossi*、*Thermococcus gorgonarius*、*Thermotoga maritima*、*Thermotoga neapolitana*、*Thermosiphon africanus*、*Pyrococcus furiosus* (Pfu)、*Pyrococcus woesei*、*Pyrococcus horikoshii*、*Pyrococcus abyssi*、*Pyrodictum occultum*、*Aquifex pyrophilus*、及び*Aquifex aeolicus*を含む、多様なバクテリア種から得られる熱安定性DNA重合酵素である。より具体的には、前記鋳型-依存的核酸重合酵素は、Taq重合酵素である。

30

40

【0098】

一具現例によれば、前記段階(b)で使われる5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素は、段階(d)で使われる鋳型-依存的核酸重合酵素と同一である。具体的には、前記段階(b)で使われる5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素、アップストリームプライマーの延長のために使われる鋳型-依存的核酸重合酵素、及び段階(d)で使われる鋳型-依存的核酸重合酵素は、互いに同一である。

50

【 0 0 9 9 】

前記段階 (d) は、前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされた前記断片が延長されて、前記 C T O のテンプレティング部位に相補的な延長配列を含む延長鎖を生成し、延長二量体が形成される条件下で実施される。ターゲット核酸配列が存在しない場合、P T O は、切断されず、結局、延長二量体は形成されない。

【 0 1 0 0 】

前記延長鎖は、検出可能なシグナルを提供する標識を含む。

【 0 1 0 1 】

本発明に利用される標識は、当業者に公知の多様な標識を含む。

【 0 1 0 2 】

一具現例によれば、前記延長鎖に含まれた標識は、(i) P T O から放出された断片に結合された単一標識、(i i) 前記延長反応の間に前記延長鎖に挿入される標識、または (i i i) 前記断片に結合された単一標識及び前記延長反応の間に前記延長鎖に挿入される標識いずれもから由来の標識である。

【 0 1 0 3 】

本発明で使われた標識システムは、標識の種類及び標識されたオリゴヌクレオチドによって次のように分類されうる：

【 0 1 0 4 】

(i) P T O 断片に結合された単一標識

本発明は、単一標識を用いることによって、ターゲット核酸配列の存在を示す延長鎖の存在に対するシグナルを提供することができる (参照：図 2 及び図 3)。単一標識で標識された P T O 断片は、C T O にハイブリダイズされ、C T O 上で延長されて延長鎖を生成し、前記単一標識は、延長鎖に含まれる。引き続き、前記延長鎖が固相基質に固定された I O にハイブリダイズされて、固相基質上に検出可能なシグナルを提供した後、延長鎖の存在を示すシグナルが検出される。

【 0 1 0 5 】

前記単一標識は、蛍光標識、発光標識、化学発光標識、電気化学標識、及び金属標識を含む。

【 0 1 0 6 】

一具現例によれば、前記単一標識は、蛍光標識を含む。前記蛍光単一標識の種類は、下記に敘述した相互作用的二重標識についての説明を参照して説明することができる。

【 0 1 0 7 】

前記標識は、従来の方法によって P T O (例えば、P T O の 5 ' - タギング部位) に結合されうる。例えば、前記標識は、少なくとも 3 つの炭素原子を含むスペーサ (例えば、3 - カーボンスペーサ、6 - カーボンスペーサ、または 12 - カーボンスペーサ) を通じて P T O に結合されうる。一具現例によれば、P T O から放出された P T O 断片が単一標識を含ませる限り、前記 P T O 上の単一標識は、如何なるサイトにも位置しうる。一具現例によれば、前記 P T O 上の単一標識は、5 ' - タギング部位の如何なるサイトにも位置し、例えば、5 ' - タギング部位の 5 ' 末端に位置しうる。

【 0 1 0 8 】

(i i) 延長反応の間に延長鎖に挿入される標識

一具現例によれば、本発明で使われる標識は、延長鎖に挿入される標識であり、C T O のテンプレティング部位は、第 1 非天然塩基を含むヌクレオチドを含み、前記段階 (d) の延長反応は、標識及び前記第 1 非天然塩基に対して特異的結合親和性を有する第 2 非天然塩基を含むヌクレオチドの存在下で実施され、これにより、前記延長鎖に標識が挿入される。

【 0 1 0 9 】

本明細書で使われる用語 “ 非天然塩基 (non - natural base) ” は、アデニン (A)、グアニン (G)、チミン (T)、シトシン (C)、及びウラシル (U) のような天然塩基の誘導体を意味し、これらは、水素 - 結合塩基対を形成しうる。本明細書

10

20

30

40

50

で使われる用語“非天然塩基”は、母化合物 (mother compound) として天然塩基と異なる塩基対パターン (例えば、水素結合パターン) を有する塩基を含み、例えば、米国特許第 5,432,272 号、第 5,965,364 号、第 6,001,983 号、及び第 6,037,120 号に記載されている。非天然塩基間の塩基対は、天然塩基と類似に 2 または 3 つの水素結合を含む。また、非天然塩基間の塩基対は、特定の方式でも形成される。

【0110】

非天然塩基の特定の例は、塩基対の組合せで次のような塩基を含む: i s o - C / i s o - G、i s o - d C / i s o - d G、K / X、H / J、及び M / N (参照: 米国特許第 7,422,850 号)。

10

【0111】

前記延長鎖に挿入される標識は、望ましくは、ヌクレオチド、より望ましくは、ヌクレオチドトリホスフェートに結合される。前記標識は、望ましくは、塩基に結合される。

【0112】

例示された具現例を図 3 を参照して説明する。ターゲット核酸配列にハイブリダイズされた P T O から放出された断片は、i s o - d C を含む C T O とハイブリダイズされ、蛍光標識で標識された i s o - d G が延長反応の間に i s o - d C の反対側に挿入されて延長鎖に蛍光標識が導入される。引き続き、前記延長鎖が固相基質上に固定された I O にハイブリダイズされて、固相基質上に検出可能なシグナルを提供し、延長鎖の存在を示すシグナルが検出される。

20

【0113】

一具現例によれば、本発明で使われる標識は、延長鎖に挿入される標識であり、前記段階 (d) の延長反応は、単一標識を含むヌクレオチドの存在下で実施され、これにより、前記延長鎖に標識が挿入される。このような場合、単一標識を含むヌクレオチドの塩基の種類及び C T O のテンプレティング部位の配列に依存的な方式で複数個の同じ単一標識が延長鎖に挿入される。

【0114】

(i i i) P T O 断片の単一標識及び延長鎖に挿入される標識の組合せ

一具現例によれば、本発明で使われる標識は、断片に結合された単一標識及び延長反応の間に延長鎖に挿入される標識の組合せであり、前記単一標識及び前記挿入された標識は、受容体 (a c c e p t o r) 及び供与体 (d o n o r) の対を含む相互作用的二重標識である。

30

【0115】

例えば、蛍光単一標識 (供与体) で標識された 5' - タグging 部位を含む P T O は、ターゲット核酸配列にハイブリダイズされた後に切断される。蛍光単一標識 (供与体) を含む P T O 断片は、i s o - d C を含む C T O にハイブリダイズされ、受容体で標識された i s o - d G が延長反応の間に i s o - d C の反対側に挿入されて延長鎖に受容体が導入され、これにより、延長鎖上に相互作用的二重標識が形成される。引き続き、前記延長鎖は、固相基質上に固定された I O にハイブリダイズされ、供与体に対する励起光 (e x c i t a t i o n l i g h t) を用いて照射させて、供与体から受容体へのエネルギー転移を誘発し、これにより、受容体からのシグナル変化を誘導して、固相基質上に検出可能なシグナルを提供する。

40

【0116】

一具現例によれば、前記受容体及び供与体の対は、延長鎖が I O にハイブリダイズされる場合に、クエンチング (または、エネルギー転移) の誘導に適したサイトに位置する。

【0117】

当業者に公知されている受容体及び供与体分子が、本発明で有用である。

【0118】

適した蛍光分子及び受容体 - 供与体の対 (例えば、レポーター - クエンチャー対) は、次のように多様な文献に開示されている: P e s c e r a , e d i t o r s , F l u o r e

50

science Spectroscopy (Marcel Dekker, New York, 1971); White, Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, New York, 1970); Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2nd Edition (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, Color AND Constitution of Organic Molecules (Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, Fluorescence and Phosphorescence (Interscience Publishers, New York, 1949); Haugland, R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th Edition (Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996); 米国特許第3,996,345号、及び第4,351,760号。

【0119】

本発明で有用な供与体または受容体分子として蛍光標識は、当業者に知られた如何なる分子も含みうる。その例は、次の通りである：Cy2TM (506)、YO-PROTM - 1 (509)、YOYOTM - 1 (509)、Calcein (517)、FITC (518)、FluorXTM (519)、AlexaTM (520)、Rhodamine 110 (520)、Oregon GreenTM 500 (522)、Oregon GreenTM 488 (524)、RiboGreenTM (525)、Rhodamine GreenTM (527)、Rhodamine 123 (529)、Magnesium GreenTM (531)、Calcium GreenTM (533)、TO-PROTM - 1 (533)、TOTO1 (533)、JOE (548)、BODIPY530/550 (550)、Dil (565)、BODIPY TMR (568)、BODIPY558/568 (568)、BODIPY564/570 (570)、Cy3TM (570)、AlexaTM 546 (570)、TRITC (572)、Magnesium OrangeTM (575)、Phycocerythrin R&B (575)、Rhodamine Phalloidin (575)、Calcium OrangeTM (576)、Pyronin Y (580)、Rhodamine B (580)、TAMRA (582)、Rhodamine RedTM (590)、Cy3.5TM (596)、ROX (608)、Calcium CrimsonTM (615)、AlexaTM 594 (615)、Texas Red (615)、Nile Red (628)、YO-PROTM - 3 (631)、YOYOTM - 3 (631)、Rphycocyanin (642)、C-Phycocyanin (648)、TO-PROTM - 3 (660)、TOTO3 (660)、DiD DilC (5) (665)、Cy5TM (670)、Thiadicarbocyanine (671)、Cy5.5 (694)、HEX (556)、TET (536)、Biosearch Blue (447)、CAL Fluor Gold 540 (544)、CAL Fluor Orange 560 (559)、CAL Fluor Red 590 (591)、CAL Fluor Red 610 (610)、CAL Fluor Red 635 (637)、FAM (520)、Fluorescein (520)、Fluorescein - C3 (520)、Pulsar 650 (566)、Quasar 570 (667)、Quasar 670 (705)、及びQuasar 705 (610)。カッコの数字は、nm単位で表示した最大発光波長である。

【0120】

(i v) インターカレーティング染料

一具現例によれば、前記段階 (e) のハイブリダイゼーションは、インターカレーティング染料の存在下で実施し、延長鎖に含まれた標識は、前記インターカレーティング染料からのシグナルを受ける受容体であり、前記延長鎖及び I O 間のハイブリッドに挿入されたインターカレーティング染料からのシグナルは、前記受容体に転移され、前記受容体は、検出可能なシグナルを提供する。

【 0 1 2 1 】

本発明で有用なインターカレーティング染料の例は、SYBRTM Green I、PO-PROTM-1、BO-PROTM-1、SYTOTM 43、SYTOTM 44、SYTOTM 45、SYTOXTM Blue、POPOTM-1、POPOTM-3、BOBOTM-1、BOBOTM-3、LO-PROTM-1、JO-PROTM-1、YO-PROTM 1、TO-PROTM 1、SYTOTM 11、SYTOTM 13、SYTOTM 15、SYTOTM 16、SYTOTM 20、SYTOTM 23、TOTOTM-3、YOYOTM 3、GelStarTM、及びチアゾールオレンジ (thiazole orange) を含む。前記インターカレーティング染料は、二本鎖核酸分子内に特異的に挿入されてシグナルを発生させる。

【 0 1 2 2 】

例えば、蛍光標識 (受容体) で標識された 5' - タギング部位を含む PTO が、ターゲット核酸配列にハイブリダイズされた後に切断される。蛍光標識 (受容体) を含む PTO 断片は、CTO にハイブリダイズされ、延長されて延長鎖を形成する。引き続き、前記延長鎖は、供与体としてのインターカレーティング染料の存在下で固相基質上に固定された IO にハイブリダイズされて、前記ハイブリッド内にインターカレーティング染料が挿入される。供与体に対する励起光を用いて照射した後、供与体から受容体へのエネルギー転移が誘発され、これにより、受容体からのシグナル変化を誘導して、固体基質上に検出可能なシグナルを提供する。

【 0 1 2 3 】

択一的に、延長鎖に含まれる標識の使用なしに、段階 (e) のハイブリダイゼーションは、インターカレーティング染料の存在下で実施され、延長鎖及び IO 間のハイブリッドに挿入されたインターカレーティング染料からのシグナルを検出して、ターゲット核酸配列の存在を分析する。

【 0 1 2 4 】

段階 (e) : 延長鎖及び IO 間のハイブリダイゼーション

前記段階 (d) の延長鎖は、固相基質上に固定された固定化オリゴヌクレオチド (IO) にハイブリダイズされ、これにより、ターゲット配列の存在を示すシグナルが固相基質上に提供される。

【 0 1 2 5 】

前記 IO は、固相基質上に固定され、延長鎖に相補的な配列を含む。

【 0 1 2 6 】

一具現例によれば、前記 IO は、(i) 延長配列の全部または一部、及び (i i) 延長鎖内の断片の一部に相補的な配列を含む。

【 0 1 2 7 】

一具現例によれば、前記 IO が延長鎖内の断片とハイブリダイズ可能な配列を含む場合、前記段階 (e) は、前記 IO のハイブリダイズ可能な配列及び前記延長鎖内の断片間のハイブリダイゼーションのみでは安定したハイブリッドを形成しない条件下で実施される。前記条件を使うことは、標識を含む非切断された PTO 及び IO 間のハイブリダイゼーションの抑制に寄与し、これにより、非ターゲットシグナル (偽シグナル) の発生を抑制する。前記条件は、反応温度、反応混合物の塩濃度、及びバッファの pH を含む。

【 0 1 2 8 】

特定の具現例で、前記 IO の配列は、非切断された PTO とハイブリッドを形成しないように選択される。例えば、前記 IO 及び非切断された PTO の 5' - タギング部位間の

相補性は、90%未満、70%未満、50%未満、30%未満、または20%未満であり、これは、延長鎖/IOハイブリッドの形成のためのハイブリダイゼーション条件によって変わりうる。

【0129】

一具現例によれば、前記IOは、延長配列にのみ相補的な配列を含みうる。

【0130】

前記IOは、標識を含まない。

【0131】

前記IOの長さは、多様であり得る。例えば、前記IOは、5~100ヌクレオチド、5~80ヌクレオチド、5~60ヌクレオチド、5~40ヌクレオチド、5~20ヌクレオチド、5~10ヌクレオチド、10~100ヌクレオチド、10~80ヌクレオチド、10~60ヌクレオチド、10~40ヌクレオチド、10~30ヌクレオチド、10~20ヌクレオチド、15~100ヌクレオチド、15~80ヌクレオチド、15~60ヌクレオチド、15~40ヌクレオチド、15~30ヌクレオチド、15~20ヌクレオチド、20~100ヌクレオチド、20~80ヌクレオチド、20~60ヌクレオチド、20~40ヌクレオチド、または20~30ヌクレオチドの長さを有しうる。

【0132】

本発明の一具現例で、前記IOは、その延長が防止されるように、その3'末端がブロックされる。

【0133】

前記IOは、その5'末端または3'末端を通じて固相基質上に直接的または間接的に固定される。本発明の一具現例で、前記IOは、その5'末端または3'末端を通じて固相基質上に固定される。具体的に、前記IOは、その5'末端を通じて固相基質上に固定される。

【0134】

前記IOは、共有または非共有結合方式で固相基質の表面上に固定されうる。前記固定されたIOが固相基質表面に間接的に固定される場合、適したリンカーを用いる。本発明で有用なリンカーは、固相基質表面上のプロープ固定化に利用される如何なるリンカーも含みうる。例えば、アミン官能性(functionality)を有するアルキルまたはアリール化合物、またはチオール官能性を有するアルキルまたはアリール化合物が、IO固定化のためのリンカーとして利用されうる。また、poly(T)末端またはpoly(A)末端がリンカーとして使われる。リンカーとして使われるポリ(T)末端またはポリ(A)末端は、IOの配列と見なされない。

【0135】

一具現例によれば、本発明で利用される固相基質は、マイクロアレイである。本発明の反応環境を提供するマイクロアレイは、当業者に公知の如何なるものも含みうる。本発明のあらゆる過程、すなわち、ターゲット核酸配列とのハイブリダイゼーション、切断、延長、メルティング及び蛍光検出は、マイクロアレイ上で実施される。マイクロアレイ上に固定されたIOは、ハイブリダイゼーション可能アレイ要素(hybridizable array element)として役割を果たす。マイクロアレイを製作するための固相基質は、金属(例えば、金、金と銅との合金、アルミニウム)、金属オキシド、ガラス、セラミック、石英、シリコン、半導体、Si/SiO₂ウェーハ、ゲルマニウム、ガリウムアルセニド、カーボン、炭素ナノチューブ、ポリマー(例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、及びポリアクリルアミド)、セファロース、アガロース、及びコロイドを含むが、これらに限定されるものではない。前記固相基質は、ディップステック、プレート、粒子(例えば、ビーズ)、親和性カラム、及び膜(membrane)の形態であり得る。本発明の多数の固定されたIOは、固相基質上の1つのアドレスابل(addressable)領域または2つ以上のアドレスابل領域上に固定され、固相基質は、2~1,000,000個のアドレスابل領域を含みうる。フォトリソグラフィ、インクジェットティング、機械的マイクロスポッティング、及びその類似方法のよ

うな従来の製作技術によって、アレイまたは特定応用のためのアレイを生産するために、固定された I O が製作することができる。

【 0 1 3 6 】

固定された I O にハイブリダイズされた延長鎖上の標識が物理的に分離されているために、固相で実施する本発明は、一種の標識を利用するとしても、多数のターゲット核酸配列を同時に検出することができる。したがって、固相で、本発明によって検出されるターゲット核酸配列の数は制限されるものではない。

【 0 1 3 7 】

前記 C T O 及び前記 I O は、前記延長鎖とのハイブリダイゼーションで競争的なので、前記 C T O は、延長鎖及び I O 間のハイブリダイゼーションを抑制する可能性が高い。

10

【 0 1 3 8 】

例えば、延長鎖及び C T O 間の延長二量体の形成は、延長鎖及び I O 間のハイブリダイゼーションを妨害しうる。

【 0 1 3 9 】

一具現例によれば、前記段階 (e) は、延長鎖が一本鎖状態で前記 I O とのハイブリダイゼーションに有利な条件下で実施され、これにより、延長鎖及び C T O 間の延長二量体の形成による延長鎖及び I O 間のハイブリダイゼーションの抑制が防止される。

【 0 1 4 0 】

一具現例によれば、前記 C T O と I O とのハイブリダイゼーションよりも、前記延長鎖が一本鎖状態で I O とのハイブリダイゼーションに有利な条件は、前記段階 (e) で一本鎖状態の延長鎖の数を増加させる条件である。

20

【 0 1 4 1 】

一具現例によれば、前記段階 (e) で一本鎖状態の延長鎖の数を増加させる条件は、延長鎖及び I O 間のハイブリダイゼーション前に前記延長二量体を変性させることであり得る。前記変性は、一本鎖状態の延長鎖及び I O 間の接触機会を増加させ、これにより、延長鎖及び I O 間の増加した数のハイブリッドが生成される。特定の具現例で、本発明の方法は、延長鎖及び I O 間のハイブリダイゼーション前に延長二量体を変性させる段階をさらに含む。

【 0 1 4 2 】

一具現例によれば、前記段階 (e) で一本鎖状態の延長鎖の数を増加させる条件は、延長鎖及び I O 間のハイブリダイゼーション前に C T O を除去することであり得る。例えば、ビオチン化 C T O (b i o t i n y l a t e d C T O) は、ストレプトアビジン (s t r a p t a v i d i n) またはアビジン (a v i d i n) に対する特異的親和性を通じて除去される。一具現例で、本発明の方法は、延長鎖及び I O 間のハイブリダイゼーション前に C T O を除去する段階をさらに含む。

30

【 0 1 4 3 】

特定の具現例で、前記 C T O の除去は、延長鎖及び I O 間のハイブリダイゼーションのための容器とは異なる容器で実施される。

【 0 1 4 4 】

択一的に、前記段階 (e) で一本鎖状態の延長鎖の数を増加させる条件は、 P T O の C T O に対する m o l 比 (m o l e r a t i o) が 1 超 (具体的に、 1 . 2 以上、 1 . 3 以上、 1 . 5 以上、 1 . 8 以上、 2 以上、 3 以上、 4 以上、 5 以上、 7 以上、または 1 0 以上の m o l 比) で P T O 及び C T O を使うことである。 m o l 比を調節することによって、 C T O と延長二量体を形成せず、一本鎖状態で存在する延長鎖の数が増加する。

40

【 0 1 4 5 】

本発明者らは、本発明の方法の検出効率を向上させるために鋭意研究し、次のような結果を得た：本発明の方法の全体反応の間に C T O の量は一定に存在する一方、延長鎖は、ターゲット核酸配列の存在に依存的な方式で生成される。延長鎖の数が増加するにつれて、 C T O にハイブリダイゼーションされていない一本鎖状態の延長鎖の数は増加する。したがって、延長鎖及び I O 間のハイブリダイゼーションに対する C T O による抑制が最大

50

限排除され、延長鎖及びI O間のハイブリダイゼーションが十分に発生して、本発明の方法の検出効率を向上させる。P T Oの切断効率、P T O断片及びC T O間のハイブリダイゼーション効率及びP T O断片の延長効率などを考慮する時、P T Oの量は、C T Oよりも多く使うことが望ましい。このようなP T O対C T Oの量(すなわち、mol比)が調節される場合、本発明の方法は、反復サイクルの間に変性を含み、前記段階(a)~(f)の全部または一部を繰り返す段階をさらに含む。例えば、段階(a)~(d)の変性を含んで繰り返して実施する場合、C T Oの量は変わらず延長鎖のみが繰り返して生成される。このように、延長鎖がより効率的に生成され、一本鎖状態の延長鎖がさらに優勢になり、さらに、C T Oよりも延長鎖の数がさらに多くなる。一具現例で、変性を含む繰り返し段階は、少なくとも延長二量体を変性させる段階を含みうる。他の構成要素(例えば、アップストリームオリゴヌクレオチド、ダウンストリームプライマー、及び酵素)は、制限因子にならないように十分な量で使われる。

10

【0146】

文言“反復サイクルの間に変性を含んで”または“変性を含んで繰り返す”で、用語“変性”は、二本鎖核酸分子を一本鎖核酸分子に分離することを意味する。

【0147】

C T O及びI O間のハイブリダイゼーション競争と関連した問題点を克服するための他の接近法で、前記段階(e)及び/または段階(f)は、延長鎖とI Oとのハイブリダイゼーション競争力をC T Oと延長鎖とのハイブリダイゼーション競争力よりも向上させる条件下で実施される。

20

【0148】

前記延長鎖とI Oとのハイブリダイゼーション競争力をC T Oと延長鎖とのハイブリダイゼーション競争力よりも向上させる条件は、延長鎖及びI O間のハイブリッドのT_m値及びC T O及び延長鎖間のハイブリッドのT_m値を調節することである。例えば、段階(e)で形成された延長鎖及びI O間のハイブリッドのT_m値は、C T O及び延長鎖間のハイブリッドのT_m値よりも高いように(例えば、5 高い、10 高い、または20 高いように)調節される。段階(e)で形成された延長鎖及びI O間のハイブリッドのT_m値は、C T O及び延長鎖間のハイブリッドのT_m値とは最大限差が少ないT_m値を有するように調節される(例えば、40 低い、35 低い、30 低い、25 低い、20 低い、15 低い、10 低い、5 低いT_m値、または同じT_m値)。前記T_m値の調節は、C T OまたはI Oの配列または長さを調節するか、ヌクレオチド類似体(例えば、PNAまたはLNA)を使うことで実施される。

30

【0149】

前記C T O及びI Oの配列は、ターゲット核酸配列と無関係に選択され、これらのT_m値は、容易に調節することができる。

【0150】

本明細書で使われる用語“T_m”は、二本鎖核酸分子の集団(population)の半分が一本鎖分子に解離されるメルティング温度を意味する。T_m値は、ハイブリダイズされたヌクレオチドの長さ及びG/C含量によって決定される。T_m値は、Wallace rule(R. B. Wallaceら、Nucleic Acids Research, 6: 3543-3547(1979))及びnearest-neighbor方法(Santa Lucia J. Jr.ら、Biochemistry, 35: 3555-3562(1996)); Sugimoto N.ら、Nucleic Acids Res., 24: 4501-4505(1996))のような従来の方法によって計算することができる。

40

【0151】

前記I Oは、延長鎖内の断片にハイブリダイズ可能な配列を含むようにデザインされ、このような場合、I O及び延長鎖間のハイブリッドがI Oが延長配列にのみハイブリダイズ可能な配列を含むようにデザインされた場合と比較して、相対的に高いT_m値を有する。

50

【 0 1 5 2 】

前述した配列デザイン戦略は、延長鎖及び I O 間のハイブリダイゼーションのために延長鎖で延長配列のみを用いる場合に比べて、相対的に短い長さの C T O を利用可能にする。相対的に短い長さの C T O の利用は、より効率的な方式でハイブリッドの T m 値を調節する接近法を適用可能にする。特に、相対的に長い長さの C T O を用いる場合、C T O によって形成されたハイブリッドはさらに高い T m 値を有し、I O は、ハイブリダイゼーション競争力のために相対的に長い長さを有するか、さらに多いヌクレオチド類似体を含ませなければならない。

【 0 1 5 3 】

前述した配列デザイン戦略は、ハイブリッドの T m 値を調節する接近法でより便利な方式で T m 値を調節可能にする。

10

【 0 1 5 4 】

延長鎖及び C T O 間のハイブリッド形態は、固相基質上に集積された I O に接近することが容易ではない。したがって、一本鎖状態の延長鎖が有利に固相基質上に集積された I O と接触し、固相基質上の I O にハイブリダイズされる。特定の具現例で、一本鎖状態の延長鎖は、I O にハイブリダイズされ、一本鎖状態で存在する。

【 0 1 5 5 】

段階 (f) : シグナルの検出

最終的に、生成された検出可能なシグナルが、固相基質上から検出される。前記検出可能なシグナルは、延長鎖の存在を示し、前記延長鎖の存在は、ターゲット核酸配列の存在を示す。

20

【 0 1 5 6 】

一具現例によれば、延長鎖及び I O 間のハイブリッドを示すシグナルは、延長鎖及び I O がハイブリッドを形成する既定の温度で提供され、前記既定の温度から検出される。

【 0 1 5 7 】

一具現例によれば、前記シグナル検出は、反応の終了時点 (e n d - p o i n t) で提供されるシグナルを検出することで実施される。

【 0 1 5 8 】

一具現例によれば、前記シグナル検出は、反応の進行によるシグナルの変化をリアルタイムで検出するためにリアルタイム検出方式で実施される。

30

【 0 1 5 9 】

固相で共焦点検出機器を用いることによって、反応溶液に存在する標識からのシグナル影響なしに固相基質上に存在するシグナルのみが検出されうる。

【 0 1 6 0 】

一具現例によれば、本発明は、ターゲット核酸配列の定量のために使われる。

【 0 1 6 1 】

一具現例によれば、前記シグナルを検出するための段階 (f) は、一定温度範囲で延長鎖及び I O 間のハイブリッドをメルティングするか、または前記ハイブリッドをメルティングし、ハイブリダイズさせる過程で固相基質上に提供されるシグナルを検出することで実施される。このようなシグナル検出は、当業者に公知のメルティング分析によって実施される。

40

【 0 1 6 2 】

前記メルティング分析は、当業者に公知の多様な方法によって実施することができる。本明細書で使われる用語 “メルティング分析 (m e l t i n g a n a l y s i s) ” は、狭い意味のメルティング分析とハイブリダイゼーション分析とを包括する意味として使われる。メルティング分析は、2種の異なる温度でシグナルを測定する方法、メルティング (ハイブリダイゼーション) カーブ分析、メルティング (ハイブリダイゼーション) パターン分析、及びメルティング (ハイブリダイゼーション) ピーク分析を含む。

【 0 1 6 3 】

前記メルティングカーブまたはハイブリダイゼーションカーブは、例えば、米国特許第

50

6, 174, 670号及び第5, 789, 167号、Drobyshevら、Gene 188:45(1997); Kochinsky及びMirzabekov, Human Mutation 19:343(2002); Livehitsら、J. Biomol. Structure Dynam. 11:783(1994); 及びHowellら、Nature Biotechnology 17:87(1999)で説明するような従来の技術によって得られる。例えば、メルティングカーブまたはハイブリダイゼーションカーブは、ハイブリダイゼーション厳格度(stringency)のパラメータに対するアウトプットシグナル(output signal)変化のグラフィックプロット(graphic plot)またはディスプレイ(display)で構成することができる。アウトプットシグナルは、ハイブリダイゼーションパラメータに対して直接にプロットされる。典型的に、メルティングカーブまたはハイブリダイゼーションカーブは、Y軸には、二量体構造の程度(すなわち、ハイブリダイゼーション程度)を示すアウトプットシグナル、例えば、蛍光がプロットされる、X軸には、ハイブリダイゼーションパラメータがプロットされる。

10

【0164】

前記メルティング(ハイブリダイゼーション)カーブ分析及びメルティング(ハイブリダイゼーション)ピーク分析は、米国特許第8,039,21号の説明を参照してさらに詳しく説明される。

【0165】

特定の具現例で、メルティング分析は、ターゲット核酸配列の定量分析のために少なくとも2回以上実施される。前記メルティング分析から得られたメルティングピークの面積及び高さは、延長鎖の量に影響を受け、これは、ターゲット核酸配列の初期量についての情報を提供する。

20

【0166】

特定の具現例で、本発明は、(i)反復サイクルの間に変性を含み、(a)~(d)段階を繰り返して延長鎖の数を増加させる段階; (ii)IO及び延長鎖間のハイブリッドに対してメルティング分析を実施する段階; 及び(iii)前記段階(i)と(ii)とを少なくとも2回以上繰り返す段階を含む。データは、少なくとも2つの点を有する既定の繰り返し間隔(predetermined repetition interval)で得られ得る。引き続き、メルティングピーク面積または高さが、閾値(threshold)と交差するメルティング分析のサイクル数を測定して、ターゲット核酸配列の量を定量化する。択一的に、メルティング分析の結果(例えば、メルティング分析面積または高さ)をメルティング分析の各サイクル数(または、累積サイクル数)に対してプロットし、比較してターゲット核酸配列の量を定量化する。

30

【0167】

特定の具現例で、本発明の方法は、シグナルの検出前に固相基質を洗浄する段階をさらに含む。

【0168】

プライマー、PTO、CTO及びIOは、天然dNMPs及び/またはNMPsで構成することができる。択一的に、PTO、CTO及びIOは、変形ヌクレオチドまたは非天然ヌクレオチド、例えば、PNA(Peptide Nucleic Acid、PCT出願第WO 92/20702号参照)及びLNA(Locked Nucleic Acid、PCT出願第WO 98/22489号、第WO 98/39352号、及び第WO 99/14226号参照)を含みうる。PTO、CTO及びIOは、デオキシイノシン、イノシン、1-(2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-3-ニトロピロール及び5-ニトロインドールのようなユニバーサル塩基を含みうる。用語“ユニバーサル塩基(universal base)”は、それぞれの天然DNA/RNA塩基とほぼ区別なしに塩基対を形成できることを意味する。

40

【0169】

前述したように、PTOは、PTOの5'-タギング部位の3'末端から3'-方向に

50

離隔して位置するサイトで切断されうる。前記切断サイトは、PTOの3'-ターゲッティング部位の5'末端の一部に位置しうる。PTO断片が、PTOの3'-ターゲッティング部位の5'末端の一部を含む場合、前記3'-ターゲッティング部位の5'末端の一部にハイブリダイズされるCTOのサイトは、ユニバーサル塩基、縮退性配列 (degenerate sequence) またはそれらの組合せを含みうる。例えば、PTOが、PTOの5'-タギング部位の3'末端から3'-方向に1つのヌクレオチドほど離隔して位置するサイトで切断される場合、前記ヌクレオチドとのハイブリダイゼーションのために、CTOのキャプチャリング部位の5'末端の一部は、ユニバーサル塩基を含むことが有利である。もし、PTOが、PTOの5'-タギング部位の3'末端から3'-方向に2つのヌクレオチドほど離隔して位置するサイトで切断される場合、CTOのキャプチャリング部位の5'末端は、縮退性配列を含み、その3'-方向に隣接したヌクレオチドは、ユニバーサル塩基を含むことが有利である。このように、3'-ターゲッティング部位の5'末端の一部の多様なサイトでPTOの切断が起こる場合、CTOにユニバーサル塩基及び縮退性配列を用いることが有用である。また、アップストリームプライマー延長-依存的切断誘導下で、同一な5'-タギング部位を有するPTOを複数のターゲット核酸配列スクリーニングに用いる場合、3'-ターゲッティング部位の5'末端の一部が、異なるPTO断片が生成されうる。このような場合、ユニバーサル塩基及び縮退性配列は、CTOに有用に使われる。CTOにユニバーサル塩基及び縮退性配列を用いる戦略は、複数のターゲット核酸配列のスクリーニングのために、一タイプのCTOまたは最小限のタイプのCTOを使う。

10

20

【0170】

一具現例によれば、本発明の方法は、反復サイクルの間に変性を含み、前記段階(a)~(f)の全部または一部を繰り返す段階をさらに含む。このような繰り返しは、ターゲット核酸配列及び/またはターゲットシグナルを増幅可能にする。

【0171】

特定の具現例で、過量のPTOを使い、繰り返しサイクル数を調節して、過量の延長鎖を生成する。

【0172】

一具現例によれば、段階(a)~(f)は、1つの反応容器または個別反応容器で実施される。例えば、段階(a)~(b)、(c)~(d)及び(e)~(f)は、互いに異なる反応容器で実施される。

30

【0173】

特定の具現例で、段階(a)~(b)及び(c)~(f)は、1つの反応容器または個別反応容器で実施される。前記段階(a)~(b)及び(c)~(f)は、1つの反応容器でも互いに異なる方式で実施される。例えば、PTOの3'-ターゲッティング部位及びターゲット核酸配列間のハイブリダイゼーションが断片及びCTO間のハイブリダイゼーションまたは延長鎖及びIO間のハイブリダイゼーションよりもさらに厳格な条件下で起こりうる場合、段階(a)~(b)の繰り返しは、段階(c)~(f)過程の隋伴なしに進行し、段階(a)~(b)の完了後に段階(c)~(f)を進行できる。

40

【0174】

特定の具現例で、段階(a)~(d)及び(e)~(f)は、互いに異なる2つの反応容器で実施される。

【0175】

特定の具現例で、段階(a)~(b)は、反復サイクルの間に変性を含んで繰り返して実施される。

【0176】

一部段階の繰り返し、繰り返し内に変性の介入、一部段階の分離及び検出時点は、本発明の原理によって多様に変更されうるということは、当業者には明白である。

【0177】

特定の具現例で、反復サイクルの間に変性を含む繰り返し、アップストリームプライ

50

マーを含む段階 (a) の反応混合物を用いて実施される場合、前記方法は、ダウンストリームプライマーの存在下で、例えば、PCR方法によって実施される。

【0178】

特定の具現例で、反復サイクルの間に変性を含む繰り返し、アップストリームプローブを含む段階 (a) の反応混合物を用いて実施される場合、前記方法は、ダウンストリームプライマーの存在下で実施される。

【0179】

本明細書で使われる用語“核酸試料 (nucleic acid sample)”は、核酸分子を含む非生物学的試料 (例えば、食品、水、空気、土壌、及び廃水) または生物学的試料を意味する。生物学的試料は、動物、植物、ヒト、菌類、バクテリア及びウイルスから由来されうる。生物学的試料は、細胞、組織または生物学的源泉からの流体、血液、血しょう、血清、リンパ、牛乳、小便、糞便、眼球液、唾液、精液、脳抽出物、脊髄液、虫垂、脾臓及び扁桃組織抽出物であり得る。

10

【0180】

本発明は、検出及び/または増幅しようとするターゲット核酸配列が如何なる特定配列または長さを有することを要求せず、前記ターゲット核酸配列は、あらゆるDNA (gDNA及びcDNA) 及びRNA分子を含む。ターゲット核酸配列は、一本鎖または二本鎖であり得る。

【0181】

mRNAを出発物質として用いる場合、アニーリング段階の実施以前に逆転写段階が必須的であり、その詳細な内容は、文献 [Joseph Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); 及び Noonan, K.F. ら、Nucleic Acids Res. 16:10366 (1988)] に開示されている。逆転写反応のためには、ランダムヘキサマーまたはmRNAにハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドdTプライマーが利用される。

20

【0182】

ターゲット核酸配列は、あらゆる天然原核細胞核酸、真核細胞 (例えば、原生動物と寄生動物、菌類、酵母、高等植物、下等動物、及び哺乳動物とヒトを含む高等動物) 核酸、ウイルス (例えば、ヘルペスウイルス、HIV、インフルエンザウイルス、エプスタインバーウイルス、肝炎ウイルス、ポリオウイルスなど) 核酸、またはウィロイド核酸を含む。また、前記核酸分子は、組替えによって生産または生産される如何なる核酸分子、または化学的に合成または合成される如何なる核酸分子であり得る。したがって、前記核酸配列は、天然で発見されるか、または発見されないこともある。前記ターゲット核酸配列は、知られたまたは知られていない配列を含みうる。

30

【0183】

本発明は、またヌクレオチド変異の検出に有用である。特定の具現例で、ターゲット核酸配列は、ヌクレオチド変異を含む。本明細書で使われた用語“ヌクレオチド変異 (nucleotide variation)”は、連続的DNAセグメントのうち、特定位置のDNA配列での或る単一または複数のヌクレオチドの置換、欠失または挿入を意味する。このような連続的DNAセグメントは、1つの遺伝子または1つの染色体の或る他の部位を含む。このようなヌクレオチド変異は、突然変異 (mutant) または多型対立遺伝子変異 (polymorphic allele variations) であり得る。例えば、本発明から検出されるヌクレオチド変異は、単一ヌクレオチド多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP)、突然変異 (mutation)、欠失、挿入、置換、及び転座を含む。ヌクレオチド変異の例は、ヒトゲノム内の多様な変異 (例えば、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (methylenetetrahydrofolate reductase; MTHFR) 遺伝子の変異)、病原体の薬剤耐性と関連した変異及び腫瘍形成 - 誘発変異を含む。本明細書で使われる

40

50

用語“ヌクレオチド変異”は、核酸配列の特定位置でのあらゆる変異を含む。すなわち、用語“ヌクレオチド変異”は、核酸配列の特定位置での野生型及びそのあらゆる突然変異型を含む。

【0184】

ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異の検出のための本発明において、利用されるプライマーまたはプローブが、ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に相補的な配列を有する場合、前記ヌクレオチド変異を含むターゲット核酸配列は、本明細書でマッチングテンプレート (matching template) と表現される。利用されるプライマーまたはプローブが、ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に非相補的な配列を有する場合、前記ヌクレオチド変異を含むターゲット核酸配列は、本明細書でミスマッチングテンプレート (mismatching template) と表現される。

10

【0185】

ヌクレオチド変異の検出のために、アップストリームプライマーの3'末端は、ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異サイトの対向側にあるようにデザインされうる。一具現例によれば、アップストリームプライマーの3'末端は、ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に相補的な配列を有する。ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に相補的な配列を有するアップストリームプライマーの3'末端は、マッチングテンプレートにアニーリングされ、延長されてPTOの切断を誘導する。その結果、形成されたPTO断片は、CTOとハイブリダイズされて延長され、IOにハイブリダイズされてターゲットシグナルを提供する。逆に、アップストリームプライマーの3'末端が、ミスマッチングテンプレートのヌクレオチド変異にミスマッチされる場合、延長のために、プライマーの3'末端のアニーリングが必須的な条件下では、アップストリームプライマーがミスマッチングテンプレートとハイブリダイズされる場合にも、アップストリームプライマーは延長されず、これにより、ターゲットシグナルの発生が起こらない。

20

【0186】

択一的に、ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に相補的な配列を有するPTOのハイブリダイゼーションに依存的なPTOの切断を利用できる。例えば、調節された条件下で、ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に相補的な配列を有するPTOは、マッチングテンプレートにハイブリダイズされ、引き続き切断される。その結果、形成されたPTO断片は、CTOにハイブリダイズされて延長され、IOにハイブリダイズされてターゲットシグナルを提供する。一方、調節された条件下で、前記PTOは、ヌクレオチド変異位置に非相補的な配列を有するミスマッチングテンプレートには、ハイブリダイズされず、切断されない。特に、このような場合、PTOのヌクレオチド変異に相補的な配列は、PTOの3'-ターゲッティング部位の中間に位置する。

30

【0187】

一具現例によれば、人為的なミスマッチヌクレオチドの使用は、ヌクレオチド変異に対するPTOの区別可能性を向上させる。

【0188】

択一的に、本発明は、特定ヌクレオチド変異に対するPTOの選択性のために、3'-ターゲッティング部位の5'末端の一部に位置したヌクレオチド変異区別サイト (nucleotide variation discrimination site) を有するPTOを使う。ヌクレオチド変異の検出のために、PTOの3'-ターゲッティング部位の5'末端の一部は、ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に位置し、PTOの3'-ターゲッティング部位の5'末端の一部は、ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に相補的な配列を有する。

40

【0189】

PTOがヌクレオチド変異区別サイトに相補的なヌクレオチド変異を有するターゲット核酸配列 (すなわち、マッチテンプレート) にハイブリダイズされる場合、3'-ターゲッティング部位の5'末端の一部は、マッチテンプレートと二本鎖を形成するが、PTOがヌクレオチド変異区別サイトに非相補的なヌクレオチド変異を有するターゲット核酸配

50

列（すなわち、ミスマッチテンプレート）にハイブリダイズされる場合、3' - ターゲッティング部位の5' 末端の一部は、ミスマッチテンプレートと二本鎖を形成しない。

【0190】

本明細書で、PTOを言及しながら使われる用語“ヌクレオチド変異区別サイト”は、PTOの3' - ターゲッティング部位の5' 末端の一部上に存在する、ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に相補的な配列である。

【0191】

一具現例によれば、前記ヌクレオチド変異区別サイトは、PTOの3' - ターゲッティング部位の5' 末端から10ヌクレオチド、より望ましくは、8ヌクレオチド、さらに望ましくは、6ヌクレオチド、さらに望ましくは、4ヌクレオチド、3ヌクレオチド、2ヌクレオチド、または1ヌクレオチド以内に離隔して位置する。望ましくは、前記ヌクレオチド変異区別サイトは、PTOの3' - ターゲッティング部位の5' 末端に位置する。

10

【0192】

プローブのヌクレオチド変異区別サイトまたはターゲット配列上のヌクレオチド変異サイトで言及される用語“サイト”は、本明細書で単一ヌクレオチドだけではなく、多数のヌクレオチドも含む意味として使われる。

【0193】

関心のあるヌクレオチド変異でのこのような区別されるハイブリダイゼーションパターンは、PTOの初期切断サイトで差を提供し、これにより、2種のPTO断片が生成されて関心のあるヌクレオチド変異の存否によってシグナル差が発生するということは、注目すべきことである。

20

【0194】

前記関心のあるヌクレオチド変異の存在下で、第1断片は、PTO及びマッチングテンプレート間のハイブリッドの切断によって生成され、関心のあるヌクレオチド変異の非存在下で、第2断片は、PTO及びミスマッチングテンプレート間のハイブリッドの切断によって生成される。前記第2断片は、前記第2断片を前記第1断片と異ならせる追加的な3' 末端部位を含む。

【0195】

単一ヌクレオチド変異の検出のための一具現例で、前記PTOの3' - ターゲッティング部位の5' 末端は、前記ターゲット核酸配列の単一ヌクレオチド変異に相補的な配列を有する。前述したように、マッチングテンプレートとハイブリダイズされたPTOの切断は、例えば、アップストリームプライマー延長 - 依存的切断誘導下で、PTOの3' - ターゲッティング部位の5' 末端に3' - 方向に直ちに近接したサイトで誘導されうる。PTO断片の3' 末端は、単一ヌクレオチド変異に相補的なヌクレオチドを有する。PTO断片は、ヌクレオチド変異に該当する配列を含むキャプチャリング部位を有するCTOとハイブリダイズされた後、延長されて延長二量体を形成する。前記延長二量体は、IOにハイブリダイズされてターゲットシグナルを提供する。もし、同一なPTOが、単一ヌクレオチド変異を除いては、マッチングテンプレートと同一な配列を有するミスマッチングテンプレートにハイブリダイズされる場合、PTOの切断は、PTOの3' - ターゲッティング部位の5' 末端から3' - 方向に2つのヌクレオチドほど離隔したサイトで発生することがある。PTO断片の3' 末端は、単一ヌクレオチド変異に相補的なヌクレオチド以外に追加的に切断されたヌクレオチドを有する。追加的に切断されたヌクレオチドにハイブリダイズされるCTOのサイトが、前記追加的に切断されたヌクレオチドに非相補的な配列を有するようにデザインされた場合、PTO断片の3' 末端は、CTOにハイブリダイズされず、調節された条件下で、PTO断片は延長されない。

30

40

【0196】

一具現例によれば、前記3' - ターゲッティング部位の5' 末端の一部に存在する、ヌクレオチド変異に相補的な配列を有するPTOの切断サイトは、マッチングテンプレートまたはミスマッチングテンプレートとのハイブリダイゼーションによって異なり、これにより、前記何れか1つのハイブリダイゼーション反応から放出されるそれぞれのPTO断

50

片は、望ましくは、その 3' 末端の一部、より望ましくは、その 3' 末端で異なる配列を有する。

【0197】

一具現例によれば、PTO断片の 3' 末端の一部での差を考慮したCTOのヌクレオチド配列の選択は、マッピングテンプレートをミスマッピングテンプレートと区別可能にする。

【0198】

一具現例によれば、それぞれのPTO断片の生成は、CTOの延長反応によって区別して検出されうる。

【0199】

一具現例によれば、前記第2断片が、前記CTOのキャプチャリング部位にハイブリダイズされる時、前記第2断片が延長されることを防止するために、前記CTOが、前記第2断片の追加的な3'末端部位とハイブリダイズされないように選択された配列を前記CTOが有する。

【0200】

前述したように、前記第1断片の延長は、IOとのハイブリダイゼーションによって検出される。

【0201】

一具現例によれば、PTOの3'-ターゲッティング部位の5'末端の一部は、前記ヌクレオチド変異区別サイトから1~10ヌクレオチド(より望ましくは、1~5ヌクレオチド)以内に離隔して位置する非塩基対モイエティを含む。

【0202】

PTOが変異区別サイトに非相補的なヌクレオチド変異を有するターゲット核酸配列にハイブリダイズされる時、前記非塩基対モイエティは、3'-ターゲッティング部位の5'末端の一部がターゲット核酸配列と二本鎖を形成することを防止する。非塩基対モイエティ(例えば、人為的ミスマッチヌクレオチド)の使用は、ヌクレオチド変異に対するPTOの区別可能性を向上させる。

【0203】

一具現例によれば、PTOがヌクレオチド変異区別サイトに相補的なヌクレオチド変異を有するターゲット核酸配列とハイブリダイズされる時、前記非塩基対モイエティは、5'末端の一部及びターゲット核酸配列間の二本鎖の形成を抑制しない。

【0204】

一具現例によれば、非塩基対モイエティは、PTO及びマッピングテンプレートのハイブリッド上の初期切断サイトとPTO及びミスマッピングテンプレートのハイブリッド上の初期切断サイトとの距離を拡大させる。

【0205】

一具現例によれば、非塩基対モイエティ配列の導入は、初期切断サイト、特に、PTO及びミスマッピングテンプレート間のハイブリッド上の初期切断サイトを調節することができさせる。

【0206】

一具現例によれば、非塩基対モイエティは、ヌクレオチド変異区別サイトのダウンストリームに位置する。

【0207】

非塩基対モイエティは、ターゲット核酸配列間に塩基対を形成しない如何なるモイエティも含む。望ましくは、非塩基対モイエティは、(i)人為的なミスマッチ塩基、塩基対を形成することができない天然/非天然塩基、塩基対を形成することができないように変形された塩基、またはユニバーサル塩基を含むヌクレオチド、(ii)塩基対を形成することができないように変形された非塩基対ヌクレオチド、または(iii)非塩基対形成化合物(non-base pairing chemical compound)である。

10

20

30

40

50

【0208】

例えば、非塩基対モイエティは、アルキレン基、リボフラノシルナフタレン、デオキシリボフラノシルナフタレン、メタリン酸塩、ホスホロチオエート結合、アルキルホスホトリエステル結合、アリールホスホトリエステル結合、アルキルホスホネート結合、アリールホスホネート結合、ハイドロゲンホスホネート結合、アルキルホスホロアミダート結合、及びアリールホスホロアミダート結合を含む。従来のカーボンスペースも、非塩基対モイエティとして利用される。非塩基対モイエティとしてのユニバーサル塩基は、PTOの切断サイトの調節に有用である。

【0209】

デオキシイノシン、1-(2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル)-3-ニトロピロール及び5'-ニトロインドールのようなユニバーサル塩基を含む塩基対は、天然塩基間の結合力よりも低い結合力を有するので、ユニバーサル塩基は、特定ハイブリダイゼーション条件下で非塩基対モイエティとして利用されうる。

10

【0210】

5'末端の一部に導入された非塩基対モイエティは、望ましくは、1~10、より望ましくは、1~5、さらに望ましくは、1~2つのモイエティを有する。5'末端の一部内の多数の非塩基対モイエティは、連続または不連続方式で存在することができる。特定の具現例で、非塩基対モイエティは、2~5つの連続したモイエティを有する。

【0211】

特定の具現例で、非塩基対モイエティは、非塩基対形成化合物である。

20

【0212】

一具現例によれば、PTOのヌクレオチド変異区別サイト及び非塩基対モイエティは、3'-ターゲッティング部位の5'末端から10ヌクレオチド(より望ましくは、8ヌクレオチド、7ヌクレオチド、6ヌクレオチド、5ヌクレオチド、4ヌクレオチド、3ヌクレオチド、2ヌクレオチド、または1ヌクレオチド、さらに望ましくは、1ヌクレオチド)以内に離隔して位置する。

【0213】

5'末端にターゲット核酸配列に非相補的な末端及び5'末端部位にヌクレオチド変異区別サイトをいずれも含むプローブが、ヌクレオチド変異区別サイトのヌクレオチドに対するミスマッチテンプレートにハイブリダイズされる場合、前記5'末端部位は、一本鎖を形成し、残りの部位は、ターゲット核酸配列と二本鎖を形成しうる。プローブデザイン観点で、このようなプローブは、PTOと異なるが、前記プローブがミスマッチングテンプレートにハイブリダイゼーションされれば、PTO構造を有するプローブと見なされる。したがって、PTOを用いる本発明の分析方法によってシグナルが発生しうる。前記応用は、プローブのヌクレオチド変異区別サイトに非相補的なヌクレオチド変異を有するターゲット核酸配列の検出に有用である。

30

【0214】

増幅ブロッカー(amplification blocker)を用いた選択的増幅(preferential amplification)と共にPCE-IH分析は、効率的に少量のヌクレオチド変異を検出することができる。

40

【0215】

通常の臨床試料は、豊かな野生型対立遺伝子(wild-type allele)及び少量の突然変異対立遺伝子(mutant allele)を含む。増幅段階で、豊かな野生型対立遺伝子の増幅は、ほとんどの増幅試薬を消耗する可能性が高く、したがって、突然変異対立遺伝子は増幅されず、シグナル発生が防止される。このような問題を克服するために、野生型対立遺伝子の増幅は防止しながら、突然変異対立遺伝子を選択的に増幅するための方法が提示された。

【0216】

代表的に、増幅ブロッカーとしてPNAまたはLNAを含むオリゴヌクレオチドを用いる方法が報告された(US 2004/0014105, US 7,803,543, U

50

S 8, 206, 929, H. Orum., Nucleic Acids Research 21: 5332 - 5336 (1993) A. Senescauら、Journal of Clinical Microbiology, 3304 - 3308 (2005), Y. Nagaiら、Cancer Res 65: 7276 - 7282 (2005), Henrikら、Nucleic Acid Research 21: 5332 - 5336 (1993) 及び Luoら、Nucleic Acid Research Vol. 34, No. 2 e12 (2006))。前記方法は、“クランピング方法 (clamping method)” と呼ばれる。

【0217】

一般的に、クランピングのための増幅ブロッカーは、同一条件下で、ただ増幅ブロッカーに完全に相補的な配列を有するテンプレートにのみハイブリダイズされ、さらには、単一ミスマッチを有するテンプレートにもハイブリダイズされないようにデザインされる。プライマーアニーリングまたは鎖延長 (chain elongation) を抑制する増幅ブロッカーにハイブリダイズされたテンプレートは、増幅されず、増幅ブロッカーにハイブリダイズされていないテンプレートのみ増幅される。PNA 及び LNA のような核酸類似体は、単一塩基差のみでも相当な T_m 差を示すという点で、増幅ブロッカーとして有用である。

【0218】

使われる重合酵素がヌクレアーゼ活性を有する場合、増幅ブロッカーは、前記ヌクレアーゼ活性に対する耐性を有することが要求される。

【0219】

ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異領域に互いに異なる配列を有する2つの変異体 (variant) タイプが1つの試料に存在する場合、増幅ブロッカーは、関心のあるヌクレオチド変異を有するターゲット核酸配列は増幅させ、他のヌクレオチド変異を有するターゲット核酸配列は増幅させないことによって、より効率的な方式で関心のあるターゲットヌクレオチド変異を検出することができる。特に、増幅ブロッカーの使用は、豊かな野生型対立遺伝子及び少量の突然変異対立遺伝子を含む臨床試料から少量の突然変異対立遺伝子の検出に非常に有用である。

【0220】

増幅ブロッカーを使うとしても、野生型対立遺伝子の増幅が完全に防止されないこともある。しかし、ヌクレオチド変異に対する優れた区別可能性を有したPTOを用いるPCE-IH分析は、従来技術によってほぼ検出されない少量の突然変異対立遺伝子を検出可能にする。

【0221】

特定の具現例で、プライマーのダウンストリームに位置する増幅ブロッカーは、プライマーの延長をブロックする。

【0222】

特定の具現例で、前記増幅ブロッカーは、天然 (natural) ヌクレオシド/ヌクレオチド、ヌクレオシド/ヌクレオチド類似体、またはこれらの組合せで作られたオリゴヌクレオチドである。

【0223】

特定の具現例で、前記増幅ブロッカーは、5'ヌクレアーゼ活性に耐性があるバックボーンを有するヌクレオシド/ヌクレオチドを含む。5'ヌクレアーゼ活性に耐性があるバックボーンを有するヌクレオシド/ヌクレオチドは、当業者に知られている如何なるものも含む。例えば、前記ヌクレオシド/ヌクレオチドは、多様なホスホロチオエート結合、ホスホネート結合、ホスホロアミダート結合及び2'-カーボ-ハイドレート変形を含む。特定の具現例で、5'ヌクレアーゼに耐性があるバックボーンを有するヌクレオチドは、ホスホロチオエート結合、アルキルホスホトリエステル結合、アリールホスホトリエステル結合、アルキルホスホネート結合、アリールホスホネート結合、ハイドロゲンホスホネート結合、アルキルホスホロアミダート結合、アリールホスホロアミダート結合、ホス

10

20

30

40

50

ホロセレート結合、2'-O-アミノプロピル変形、2'-O-アルキル変形、2'-O-アリル変形、2'-O-ブチル変形、 α -アノマーオリゴデオキシヌクレオチド及び1-(4'-チオ- β -D-リボフラノシル)変形を含む。

【0224】

一具現例によれば、前記増幅ブロッカーは、ペプチド核酸(PNA)、ロック核酸(LNA)、モルホリノ(morpholino)、グリコール核酸(GNA)、トレオース核酸(TNA)、ブリッジ核酸(BNA)、N3'-P5'ホスホルアミダート(NP)オリゴマー、狭い溝結合物質(minor groove binder)が連結されたオリゴヌクレオチド(MGB-linked oligonucleotide)、ホスホロチオエート(PS)オリゴマー、C₁~C₄アルキルホスホネートオリゴマー、ホスホホルアミダート、 β -ホスホジエステルオリゴヌクレオチド、 α -ホスホジエステルオリゴヌクレオチド、またはこれらの組合せを含む。

10

【0225】

特定の具現例で、前記増幅ブロッカーは、5'ヌクレアーゼに耐性を有し、ハイブリダイゼーションでそのT_m値は、1つのミスマッチによっても大きく影響を受ける。前記言及された特性を有する代表的な例は、PNAまたはLNAを含む増幅ブロッカーである。

【0226】

前記増幅ブロッカーは、如何なる長さも有しうる。例えば、前記増幅ブロッカーは、5~100ヌクレオチド、5~80ヌクレオチド、5~50ヌクレオチド、5~40ヌクレオチド、5~30ヌクレオチド、10~100ヌクレオチド、10~80ヌクレオチド、10~50ヌクレオチド、10~40ヌクレオチド、10~30ヌクレオチド、15~100ヌクレオチド、15~80ヌクレオチド、15~50ヌクレオチド、15~40ヌクレオチド、15~30ヌクレオチド、20~100ヌクレオチド、20~80ヌクレオチド、20~50ヌクレオチド、20~40ヌクレオチド、または20~30ヌクレオチドの長さを有しうる。

20

【0227】

特定の具現例で、前記増幅ブロッカーは、その延長が防止されるように、その3'末端がブロッキング(blocking)される。

【0228】

ターゲット核酸配列上のヌクレオチド変異領域の対向側に位置する増幅ブロッカーのヌクレオチド変異区別サイト(すなわち、非ターゲットヌクレオチド変異に相補的な領域)は、前記増幅ブロッカーが非ターゲットヌクレオチド変異を有するターゲット核酸配列の増幅を抑制するが、ターゲットヌクレオチド変異を有するターゲット核酸配列の増幅を抑制しない限り、増幅ブロッカーの如何なるサイトにも位置しうる。

30

【0229】

特定の具現例で、増幅ブロッカーのヌクレオチド変異区別サイトは、その5'末端部位、中間部位、または3'末端部位に位置しうる。

【0230】

前記増幅ブロッカーは、増幅ブロッカーのアップストリームに位置するプライマーから200ヌクレオチド超過、100ヌクレオチド超過、50ヌクレオチド超過、30ヌクレオチド超過、20ヌクレオチド超過、10ヌクレオチド超過、5ヌクレオチド超過、2ヌクレオチド超過、または1ヌクレオチド超過で離隔しうる。前記増幅ブロッカーは、前記プライマーに直ちに隣接することができる。

40

【0231】

増幅ブロッカーと共にPCE-IH分析をヌクレオチド変異を検出するために用いる場合、PTO及び増幅ブロッカーは、ターゲット核酸配列の二本鎖のうち、同一鎖または互いに異なる鎖に位置するようにデザインされうる。同一鎖に位置するようにデザインされる場合、ターゲット核酸配列とのハイブリダイゼーションでPTO及び増幅ブロッカーは、相互間に影響を与え、反応条件または配列の調節が要求されている。

【0232】

50

一具現例によれば、本発明で利用されるターゲット核酸配列は、増幅プライマーによってのプレ増幅された (pre-amplified) 核酸配列である。

【0233】

本発明の利点は、少なくとも2種のターゲット核酸配列を同時に (マルチプレックス) 検出するという点でさらに注目されうる。

【0234】

一具現例によれば、前記方法は、少なくとも2種のターゲット核酸配列を検出するために実施され；前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、少なくとも2種のオリゴヌクレオチドを含み、前記PTOは、少なくとも2種のPTOを含み、前記CTOは、少なくとも2種のCTOを含み、前記IOは、少なくとも2種のIOを含む。

10

【0235】

一具現例によれば、本発明は、PTOに対する少なくとも2種のダウンストリームプライマーを用いて実施される。

【0236】

本発明によって検出されるターゲット核酸配列は、多様な核酸配列、例えば、ゲノム内の配列、人為的に分離されるか、断片化された配列、及び合成配列 (例えば、cDNA配列及びバーコード配列) を含む。例えば、ターゲット核酸配列は、Immuno-PCR (IPCR) のための核酸マーカー配列を含む。IPCRは、PCRと共に核酸マーカー配列及び抗体間のコンジュゲートを使い、これは、タンパク質を含んだ多種のターゲットの検出に幅広く適用される (Sanoら、Science 258 pp: 120-122 (1992)、米国特許第5,665,539号、Niemyerら、Trends in Biotechnology 23 pp: 208-216 (2005)、米国出願公開第2005/0239108号及びYeら、Journal of Environmental Science 22 pp: 796~800 (2010))。本発明のターゲット核酸分子は、IPCR方法で使われる核酸マーカーを含み、本発明は、IPCR方法で核酸マーカーの検出に適用可能である。

20

【0237】

ターゲット核酸配列の増幅を含む一具現例

本発明は、ターゲット核酸配列を合成することができるアップストリームプライマー及びダウンストリームプライマーで構成されたプライマー対を用いるターゲット核酸配列の増幅と共に同時に実施される。

30

【0238】

本発明の他の態様において、本発明は、次の段階を含むPTOの切断及び延長-依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (PCE-IH) 分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出する方法を提供する：

(a) 前記ターゲット核酸配列を、アップストリームプライマー及びダウンストリームプライマーを含むプライマー対及びプロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド (PTO) とハイブリダイズさせる段階であって；前記アップストリームプライマー及び前記ダウンストリームプライマーのそれぞれは、前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含み；前記PTOは、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含む3'-ターゲッティング部位、及び(ii) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む5'-タギング部位を含み；前記3'-ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされ、前記5'-タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされず；前記PTOは、前記アップストリームプライマー及び前記ダウンストリームプライマーの間に位置し；前記PTOは、その延長が防止されるように、その3'末端がブロッキングされており；

40

(b) 前記プライマーの延長及び前記PTOの切断のための条件下で、5'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型-依存的核酸重合酵素に前記段階(a)の結果物を接触させる段階であって；前記PTOが、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされれば、前記アップ

50

ストリームプライマーは延長され、前記延長鎖は、前記 5'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型 - 依存的核酸重合酵素による前記 P T O の切断を誘導し、このような前記切断は、前記 P T O の 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部を含む断片を放出し；

(c) 前記 P T O から放出された前記断片を、キャプチャリング・アンド・テンプレートのオリゴヌクレオチド (C T O) とハイブリダイズさせる段階であって；前記 C T O は、3' → 5' 方向に (i) 前記 P T O の 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位、及び (i i) 5' - タギング部位及び 3' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレートの部位を含み；前記 P T O から放出された前記断片は、前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされ；

10

(d) 前記段階 (c) の結果物及び鋳型 - 依存的核酸重合酵素を用いて延長反応を実施する段階であって；前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされた前記断片は、延長されて前記 C T O のテンプレートの部位に相補的な延長配列を含む延長鎖を生成し、延長二量体を形成し；前記延長鎖は、標識を含み、

(e) 前記延長鎖を、固相基質上に固定された固定化オリゴヌクレオチド (I O) とハイブリダイズさせる段階であって；前記 I O は、前記延長鎖に相補的な配列を含み；前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリダイゼーションは、前記固相基質上に検出可能なシグナルを提供し；及び (f) 前記延長鎖の存在を示す前記シグナルを検出する段階であって；前記延長鎖の存在は、前記ターゲット核酸配列の存在を示す。

20

【0239】

本発明の具現例は、前述した本発明の方法の段階に従うため、これらの間の共通した内容は、本明細書の複雑性をもたらす過度な重複を避けるために省略する。

【0240】

一具現例によれば、本発明は、反復サイクルの間に変性を含み、段階 (a) ~ (f) の全部または一部 (例えば、段階 (a) ~ (b)、(a) ~ (d)、または (a) ~ (e)) を少なくとも 2 回以上繰り返すことをさらに含む。前記反応の繰り返しは、少なくとも 5、10、20、または 30 回以上であり、最大 70、60、50、または 40 回以下である。

【0241】

アップストリームオリゴヌクレオチド - 独立的 5'ヌクレアーゼ活性に基づいた P C E - I H 分析

30

本発明の追加的な態様において、本発明は、次の段階を含む P T O の切断及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (P C E - I H) 分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出する方法を提供する：

(a) 前記ターゲット核酸配列を、プロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド (P T O) とハイブリダイズさせる段階であって；前記 P T O は、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含む 3' - ターゲッティング部位、及び (i i) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む 5' - タギング部位を含み；前記 3' - ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされ、前記 5' - タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされず；

40

(b) 前記 P T O の切断のための条件下で、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素に前記段階 (a) の結果物を接触させる段階であって；前記 P T O は、前記 5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素によって切断され、このような前記切断は、前記 P T O の 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部を含む断片を放出し；

(c) 前記 P T O から放出された前記断片を、キャプチャリング・アンド・テンプレートのオリゴヌクレオチド (C T O) とハイブリダイズさせる段階であって；前記 C T O は、3' → 5' 方向に (i) 前記 P T O の 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位、及び (i i) 前記 P T O の 5' - タギング部位及び 3' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配

50

列を含むテンプレティング部位を含み；前記 P T O から放出された前記断片は、前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされ；

(d) 前記段階 (c) の結果物及び鋳型 - 依存的核酸重合酵素を用いて延長反応を実施する段階であって；前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされた前記断片は、延長されて前記 C T O のテンプレティング部位に相補的な延長配列を含む延長鎖を生成し、延長二量体を形成し；前記延長鎖は、標識を含み、

(e) 前記延長鎖を、固相基質上に固定された固定化オリゴヌクレオチド (I O) とハイブリダイズさせる段階であって；前記 I O は、前記延長鎖に相補的な配列を含み；前記延長鎖と前記 I O との間のハイブリダイゼーションは、前記固相基質上に検出可能なシグナルを提供し；及び

(f) 前記延長鎖の存在を示す前記シグナルを検出する段階であって；前記延長鎖の存在は、前記ターゲット核酸配列の存在を示す。

【 0 2 4 2 】

アップストリームオリゴヌクレオチド - 独立的 5 ' ヌクレアーゼ活性を基にする本発明の方法は、アップストリームオリゴヌクレオチドを利用しないことを除いては、アップストリームオリゴヌクレオチドを用いる P C E - I H 分析による方法と同一なので、これらの間の共通した内容は、本明細書の複雑性をもたらす過度な重複を避けるために省略する。

【 0 2 4 3 】

面白くも、アップストリームオリゴヌクレオチド - 独立的 5 ' ヌクレアーゼ活性を基にする本発明の方法は、アップストリームオリゴヌクレオチドを使わずとも、P C E - I H 分析によってターゲットシグナルを実際に提供する。

【 0 2 4 4 】

本発明の方法のために、アップストリームオリゴヌクレオチド - 独立的 5 ' ヌクレアーゼ活性を有する従来の酵素が利用されうる。5 ' ヌクレアーゼ活性を有する鋳型 - 依存的重合酵素のうち、アップストリームオリゴヌクレオチド - 独立的 5 ' ヌクレアーゼ活性を有する幾つかの酵素があり、例えば、T a q D N A 重合酵素がある。

【 0 2 4 5 】

ターゲット核酸配列の増幅及び P T O の切断効率を考慮すれば、本発明の P C E - I H 分析は、望ましくは、アップストリームオリゴヌクレオチドを用いて実施される。

【 0 2 4 6 】

一具現例によれば、本発明は、反復サイクルの間に変性を含み、段階 (a) ~ (f) の全部または一部 (例えば、段階 (a) ~ (b)、(a) ~ (d)、または (a) ~ (e)) を少なくとも 2 回以上繰り返すことをさらに含む。前記反応の繰り返しは、少なくとも 5、10、20、または 30 回以上であり、最大 70、60、50、または 40 回以下である。

【 0 2 4 7 】

ターゲット検出用キット

本発明のさらに他の態様において、本発明は、次を含む P T O の切断及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (P C E - I H) 分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出するためのキットを提供する：

(a) アップストリームオリゴヌクレオチド；前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含み；

(b) プロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド (P T O)；前記 P T O は、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含む 3 ' - ターゲッティング部位、及び (i i) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む 5 ' - タギング部位を含み；前記 3 ' - ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされ、前記 5 ' - タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされず；前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、前記 P T O のアップストリームに位置し；前記アップストリームオリゴヌクレオチドまたはその

10

20

30

40

50

延長鎖は、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記PTOの切断を誘導し、このような切断は、前記PTOの5'-タギング部位及び5'-タギング部位の一部を含む断片を放出し；

(c)キャプチャリング・アンド・テンプレティングオリゴヌクレオチド(CTO)；前記CTOは、3'→5'方向に(i)前記PTOの5'-タギング部位または5'-タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位、及び(ii)前記PTOの5'-タギング部位及び3'-ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレティング部位を含み；前記PTOから放出された前記断片は、前記CTOのキャプチャリング部位にハイブリダイズされ；前記CTOのキャプチャリング部位にハイブリダイズされた前記断片は、延長されて前記CTOのテンプレティング部位に相補的な延長配列を含む延長鎖を生成し、延長二量体を形成し；前記延長鎖は、標識を含み；及び

(d)固定化オリゴヌクレオチド(IO)；前記IOは、固相基質上に固定化されており；前記IOは、前記延長鎖に相補的な配列を含み；前記延長鎖と前記IOとの間のハイブリダイゼーションは、前記固相基質上に検出可能なシグナルを提供する。

【0248】

本発明のキットは、前述した本発明の検出方法を実施するために製作されるので、これらの間の共通した内容は、本明細書の複雑性をもたらす過度な重複を避けるために省略する。

【0249】

特定の具現例で、前記キットは、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素をさらに含む。特定の具現例で、前記5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素は、5'ヌクレアーゼ活性を有する重合酵素またはFENヌクレアーゼである。

【0250】

一具現例によれば、PTO及びCTOは、PTOのCTOに対するmol比が1超(具体的に、1.2以上、1.3以上、1.5以上、1.8以上、2以上、3以上、4以上、5以上、7以上、または10以上のmol比)で含まれる。

【0251】

一具現例によれば、前記IOは、(i)延長配列の全部または一部、及び(ii)延長鎖内の断片の一部に相補的な配列を含む。

【0252】

一具現例で、前記延長鎖に含まれた標識は、(i)PTOから放出された前記断片に結合された単一標識、(ii)延長反応の間に延長鎖に挿入される標識、または(iii)前記断片に結合された単一標識及び前記延長反応の間に延長鎖に挿入される標識の組合せである。

【0253】

一具現例によれば、前記キットは、延長反応の間に延長鎖に挿入される標識をさらに含む。

【0254】

特定の具現例で、前記標識は、延長鎖に挿入される標識であり、前記CTOのテンプレティング部位は、第1非天然塩基を含むヌクレオチドを含み、前記段階(d)の前記延長反応は、標識及び前記第1非天然塩基に対して特異的結合親和性を有する第2非天然塩基を含むヌクレオチドの存在下で実施され、これにより、前記延長鎖に前記標識が挿入される。

【0255】

特定の具現例で、前記標識は、前記断片に結合された単一標識及び延長反応の間に延長鎖に挿入される標識の組合せであり、前記単一標識及び前記挿入された標識は、受容体及び供与体の対を含む相互作用的二重標識である。

【0256】

特定の具現例で、前記キットは、インターカラーティング染料をさらに含み、前記延長

10

20

30

40

50

鎖に含まれた標識は、前記インターカレーティング染料からのシグナルを受ける受容体である。

【0257】

一具現例によれば、PTO、CTO及び/またはIOは、その延長が防止されるように、その3'末端がブロックングされる。

【0258】

特定の具現例で、前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、アップストリームプライマーまたはアップストリームプローブである。

【0259】

一具現例によれば、前記CTOのキャプチャリング部位は、その5'末端の一部に前記PTOの3'-ターゲッティング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含む。一具現例によれば、前記PTOの3'-ターゲッティング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列は、1~10ヌクレオチドの長さである。

10

【0260】

一具現例によれば、前記キットは、少なくとも2種のターゲット核酸配列を検出するために使われ；前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、少なくとも2種のオリゴヌクレオチドを含み、前記PTOは、少なくとも2種のPTOを含み、前記CTOは、少なくとも2種のCTOを含み、前記IOは、少なくとも2種のIOを含む。

【0261】

一具現例によれば、前記ターゲット核酸配列は、ヌクレオチド変異を含む。

20

【0262】

一具現例によれば、前記キットは、ダウンストリームプライマーをさらに含む。

【0263】

実施例を通じて本発明をより詳しく説明する。これら実施例は、本発明をより具体的に説明するためのものであって、添付の請求項に提示された本発明の範囲が、これら実施例によって制限されるものではないということは、当業者にとって明白である。

【実施例】

【0264】

実施例1：PTOの切断及び延長依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション(PCI-EIH)分析の評価

30

本発明者らは、マイクロアレイ上で単一標識されたプロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド(PTO)、キャプチャリング・アンド・テンプレーティングオリゴヌクレオチド(CTO)及び固定化オリゴヌクレオチド(IO)を用いたPCI-EIH分析が、ターゲット核酸配列を検出できるか否かを実験した。

【0265】

アップストリームプライマーとダウンストリームプライマーとの延長、PTOの切断及びPTO断片の延長のために、5'ヌクレアーゼ活性を有するTaq DNA重合酵素を使った。*Neisseria gonorrhoeae*に対するゲノムDNAをターゲット核酸配列として使った。

【0266】

40

PTOは、その5'末端に蛍光レポーター分子(Quasar 570)を有する。PTO、CTO及びIOは、それらの3'末端がカーボンスペースでブロックングされている。IOは、リンカーアーム(linker arm)としてpoly(T)₁₀を有し、これをその5'末端のアミノ基(Amino C6)を用いてガラススライドの表面上に固定した。蛍光レポーター分子(Quasar 570)を有するマーカープローブをその3'末端のアミノ基(Amino C7)を用いてガラススライドの表面上に固定した。

【0267】

本実施例で、もし、NGが存在する場合、NGに特異的にハイブリダイズされたPTOは切断され、蛍光レポーターが標識されたPTO断片が生成される。前記PTO断片は、CTOのキャプチャリング部位にアニーリングされ、前記CTOのテンプレーティング部

50

位上で延長されて、その5'末端に蛍光レポーター分子を有する延長鎖を形成する。前記延長鎖は、IOにハイブリダイズすることができる。前記PTOの切断及びPTO断片の延長、IOに前記延長鎖のハイブリダイゼーションをマイクロアレイ上で同時に行った。前記反応後、延長鎖・IO二量体の存在または非存在を分析した。

【0268】

本実施例で使ったアップストリームプライマー、ダウンストリームプライマー、PTO、CTO、IO、及びマーカの配列は、次の通りである：

NG-F 5' - TACGCCCTGCTACTTTTCACGCTIIIIIGTAAT
CAGATG - 3' (配列番号：1)

NG-R 5' - CAATGGATCGGTATCACTCGCIIIIICGAGC
AAGAAC - 3' (配列番号：2)

PTO 5' - [Quasar570] ACGACGGCTTG GCTGCCCCCTC
ATTGGCGTGTTTTCG[C3 spaser] - 3' (配列番号：3)

CTO 5' - CATATCGTCCAGGGTATCCAGCGCTCAGCCAA
GCCGTCGT[C3 spaser] - 3' (配列番号：4)

IO 5' - [Amino C6]TTTTTTTTTTTCATATCGTCCAGG
GTATCCAGCGC[C3 spaser] - 3' (配列番号：5)

Marker 5' - [Quasar570]ATATATATAT[Amino C
7] - 3' (配列番号：6)

(I：デオキシイノシン)

(下線を引いた文字は、PTO・NVの5'・タギング部位を示す)

【0269】

NSB9 NHSスライド(NSBPOSTECH, Korea)をIO及びマーカ
(SEQ ID NOs: 5及び6)の製作に用いた。NSBスポットティングバッファ
(NSB spotting buffer)に最終濃度50 µMになるように溶解させ
たIO及びマーカをPersonal ArrayerTM 16 Microarray
Spotter(CapitalBio, China)を用いてNSB9 NHSスラ
イド上にプリンティングした。前記IO及びマーカを3×1フォーマット(triplicate spots)で平行にスポットティング(spotting)し、このように
して製作されたマイクロアレイを約85%湿度で保持されるチャンバに一晩インキュベ
ーティングした。そして、前記スライドを2×SSPE(0.3M塩化ナトリウム、0.0
2Mリン酸水素二ナトリウム及び2.0mM EDTA)、pH7.4及び7.0mM
SDSを含有したバッファ溶液で37℃で30分間洗浄して、非特異的に結合されたIO
及びマーカを除去し、蒸留水で洗浄した。次いで、スライド遠心分離機を用いて前記D
NA・機能化された(DNA-functionalized)スライドを乾燥させ、使用
前まで4℃暗室で保管した。

【0270】

NG遺伝子のゲノムDNA100 pg、アップストリームプライマー(配列番号：1)
10 pmole、ダウンストリームプライマー(配列番号：2)10 pmole、PTO
(配列番号：3)5 pmole、CTO(配列番号：4)0.5 pmole、及び2×
マスターミックス(2.5mM MgCl₂、200 µM dNTPs、及び2.4 un
itのH-Taq DNA重合酵素)(Solgent, Korea)15 µlを含有し
た30 µlの最終体積でPCE-IH反応を実施し、IO(配列番号：5)が交差結合(cross-linked)されたNSBガラススライドの表面上に組み立てられたチャ
ンバに前記全体混合物を適用した。前記スライドを熱循環器(GenePro B4I,
China)内のインサイチュ(in situ)ブロック上に位置させた。PCE-I
H反応を次のように実施した：95℃で15分変性させ、95℃で30秒、60℃で60
秒、72℃で30秒の反応過程を40サイクル繰り返し後、55℃で30分ハイブリダイ
ゼーションさせた。

【0271】

10

20

30

40

50

前記反応以後、前記スライドを1分間蒸留水で洗浄した。イメージを共焦点レーザスキャナーAxon GenePix 4300A (Molecular Device, USA)を用いて5- μ mピクセル解像度でスキャンして獲得した。蛍光強度を定量的なマイクロアレイ分析ソフトウェアであるGenePix pro 7.0ソフトウェア(Molecular Device, USA)を用いて分析した。蛍光強度を周辺バックグラウンドを除去した後、スポット-中央値で表現した。再現性を試験するために、スポットを3つずつスポッティングした。蛍光強度は、3つのスポットの平均値で表わした。

【0272】

図4に示されたように、蛍光強度は、ターゲットがない場合と比較して、ターゲットが存在する場合、確実に増加した。このような結果は、マイクロアレイ上で単一-標識PTO、CTO及びIOを用いるPCE-IH分析が、ターゲット核酸配列を検出することができることを示す。

10

【0273】

実施例2：延長鎖とIOのハイブリダイゼーションに及ぼすCTOの影響評価

延長鎖がターゲット核酸配列の存在下で生成される場合、延長鎖及びIO間のハイブリッドの形成は、CTOと延長鎖のハイブリダイゼーションによって抑制されうる。本発明者らは、多様な濃度のCTO及び延長鎖を模倣した合成延長鎖(Syn-ES)を用いて延長鎖及びIO間のハイブリッドの形成に及ぼすCTOの影響を調査した。Syn-ESは、その5'末端に蛍光レポーター分子(Quasar 570)を有する。

20

【0274】

実施例1で使われた同一なTaq DNA重合酵素、CTO、IO及びマーカ―を本実施例で使った。

【0275】

本実施例で、Syn-ESの配列は、次の通りである：

Syn-ES 5'-[Quasar 570]ACGACGGCTTG GCTGAGCGCTGGATACCCCTGGACGATATG-3' (配列番号：7)

【0276】

スライド製作は、実施例1で使われた同一なプロトコルで行った。

【0277】

CTO (配列番号：4) 2、1、0.5、または0 pmole、Syn-ES (配列番号：7) 1 pmole、及び2X マスターミックス(2.5 mM MgCl₂、200 μ M dNTPs、及び2.4 unitのH-Taq DNA重合酵素)(Solgent, Korea) 15 μ lを含有した30 μ lの最終体積で反応を実施し、IO (配列番号：5) が交差結合されたNSBガラススライドの表面上に組み立てられたチャンバに前記全体混合物を適用した。前記スライドを熱循環器(Gene pro B4I, China)内のインサイチュブロック上に位置させた。ハイブリダイゼーション反応を55で30分間実施した。

30

【0278】

前記反応以後、前記スライドを1分間蒸留水で洗浄した。イメージを共焦点レーザスキャナーAxon GenePix 4300A (Molecular Device, USA)を用いて5- μ mピクセル解像度でスキャンして獲得した。蛍光強度を定量的なマイクロアレイ分析ソフトウェアであるGenePix pro 7.0ソフトウェア(Molecular Device, USA)を用いて分析した。蛍光強度を周辺バックグラウンドを除去した後、スポット-中央値で表現した。再現性を試験するために、スポットを3つずつスポッティングした。蛍光強度は、3つのスポットの平均値で表わした。

40

【0279】

図5A及び図5Bで示すように、CTOの濃度が増加するにつれて、蛍光強度は確実に減少した。

【0280】

実施例3：多様な比率のPTO対CTOを用いたPCE-IH分析の評価

50

実施例 2 で示すように、延長鎖及び C T O 間のハイブリッドの形成は、延長鎖及び I O のハイブリダイゼーションを抑制する。延長鎖がターゲット核酸配列の存在下で生成される場合、一本鎖状態の延長鎖の数の増加は、延長鎖及び I O のハイブリダイゼーションを向上させる。

【 0 2 8 1 】

一本鎖状態の延長鎖の数を調節する 1 つの方法は、P T O 対 C T O の比率を変化させることである。ターゲットの存在下で、C T O よりもさらに高い濃度の P T O を使うことは、一本鎖状態の延長鎖の生成を増加させて蛍光強度を向上させる。本発明者らは、多様な濃度の C T O を用いることによって、多様な P T O 対 C T O の比率が蛍光強度に如何に影響を及ぼすかについて調査した。

10

【 0 2 8 2 】

実施例 1 で使われた同一な T a q DNA 重合酵素、アップストリームプライマー、ダウンストリームプライマー、P T O、C T O、I O 及びマーカーを本実施例で使った。

【 0 2 8 3 】

スライド製作は、実施例 1 で使われた同一なプロトコルで行った。

【 0 2 8 4 】

N G 遺伝子のゲノム DNA 1 0 0 p g、アップストリームプライマー（配列番号：1）1 0 p m o l e、ダウンストリームプライマー（配列番号：2）1 0 p m o l e、P T O（配列番号：3）5 p m o l e、C T O（配列番号：4）3、1、または 0 . 5 p m o l e 及び 2 X マスターミックス（2 . 5 m M M g C l ₂、2 0 0 μ M d N T P s、及び 2 . 4 u n i t の H - T a q DNA 重合酵素）（S o l g e n t , K o r e a）1 5 μ l を含有した 3 0 μ l の最終体積で P C E - I H 反応を実施し、I O（配列番号：5）が交差結合された N S B ガラススライドの表面上に組み立てられたチャンバに前記全体混合物を適用した。スライドをインサイチュブロック方式で熱循環器（G e n e p r o B 4 I , C h i n a）に位置させた。P C E - I H 反応を次のように実施した：9 5 で 1 5 分変性させ、9 5 で 3 0 秒、6 0 で 6 0 秒、7 2 で 3 0 秒の反応過程を 4 0 サイクル繰り返し後、5 5 で 3 0 分ハイブリダイゼーションさせた。

20

【 0 2 8 5 】

前記反応以後、前記スライドを 1 分間蒸留水で洗浄した。イメージを共焦点レーザスキャナー A x o n G e n e P i x 4 3 0 0 A（M o l e c u l a r D e v i c e , U S A）を用いて 5 - μ m ピクセル解像度にスキャンして獲得した。蛍光強度を定量的なマイクロアレイ分析ソフトウェアである G e n e P i x p r o 7 . 0 ソフトウェア（M o l e c u l a r D e v i c e , U S A）を用いて分析した。蛍光強度を周辺バックグラウンドを除去した後、スポット - 中央値で表現した。再現性を試験するために、スポットを 3 つずつスポッティングした。蛍光強度は、3 つのスポットの平均値で表わした。

30

【 0 2 8 6 】

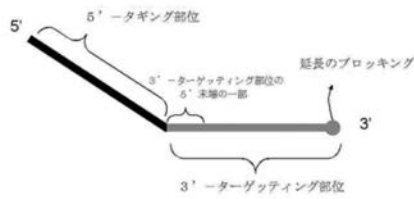
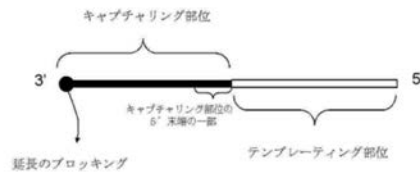
図 6 A 及び図 6 B に示されたように、C T O の濃度が減少するにつれて、ターゲットの存在下で蛍光強度は確実に増加した。

【 0 2 8 7 】

本発明の望ましい具現例を詳しく記述したところ、本発明の原理による変形及び修正が可能であるということは、当業者に明白であり、本発明の範囲は、添付の請求項とその均等物とによって定義される。

40

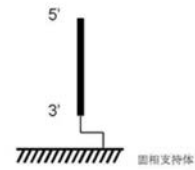
【図 1 A】

A. プロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド
(Probing and Tagging Oligonucleotide: PTO)B. キャプチャリング・アンド・テンプレティングオリゴヌクレオチド
(Capturing and Templating Oligonucleotide: CTO)

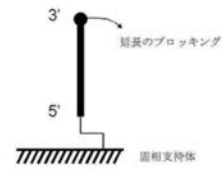
【図 1 B】

C. 固相支持体上の固定化オリゴヌクレオチド (Immobilized Oligonucleotide: IO)

3' 末端を通じる IO の固定化

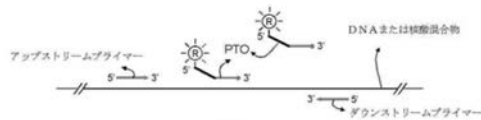


5' 末端を通じる IO の固定化

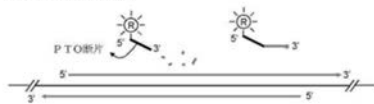


【図 2】

A. ハイブリダイゼーション



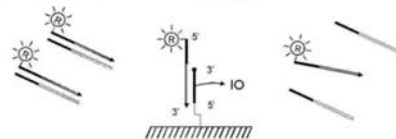
B. プライマー延長 & PTO の切断



C. PTO断片のCTOとのハイブリダイゼーション及び延長

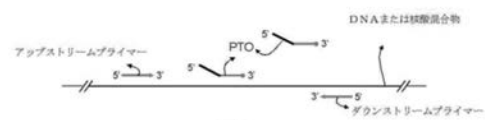


D. 延長鎖の IO とのハイブリダイゼーション 及び検出



【図 3】

A. ハイブリダイゼーション



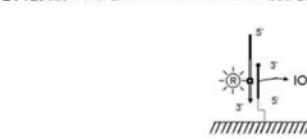
B. プライマー延長 & PTO の切断



C. PTO断片のCTOとのハイブリダイゼーション 及び延長

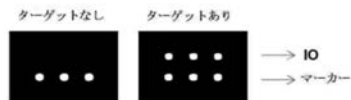


D. 延長鎖の IO とのハイブリダイゼーション 及び検出



【 図 4 】

A. 蛍光イメージ



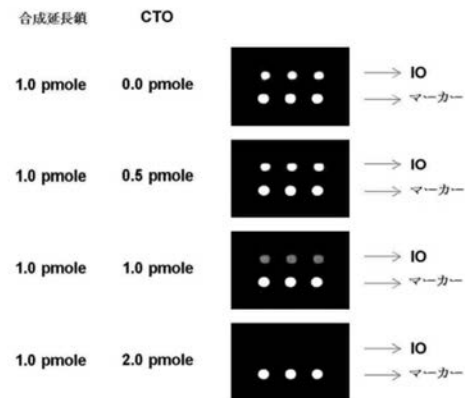
B. 蛍光強度

ターゲット ¹⁾	プライマー ²⁾	PTO ³⁾	CTO ⁴⁾	RFU ⁵⁾
-	+	+	+	13 (±14.2)
+	+	+	+	65,444 (±14.0)

- 1) ターゲットは、*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子のゲノムDNAである。
 2) プライマーは、PCRのためのアップストリームプライマー及びダウンストリームプライマーである。
 3) PTO (プロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド) は、その5' 末端に蛍光分子を有し、その3' 末端は、カーボンスペースでブロックされている。
 4) CTO (キャプチャリング・アンド・ランプレーティングオリゴヌクレオチド) は、その3' 末端がカーボンスペースでブロックされている。
 5) RFUは、相対的な蛍光単位を示す。

【 図 5 A 】

A. 蛍光イメージ



【 図 5 B 】

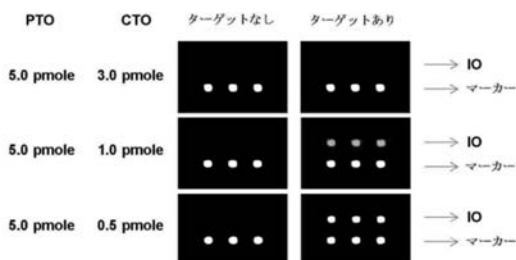
B. 蛍光強度の変化

Syn-ES ¹⁾	CTO ²⁾	RFU ³⁾
1.0 pmole	0.0 pmole	65,462 (±1.2)
1.0 pmole	0.5 pmole	65,448 (±1.0)
1.0 pmole	1.0 pmole	43,484 (±416.5)
1.0 pmole	2.0 pmole	142 (±7.8)

- 1) Syn-ES (合成延長鎖, Synthetic Extended strand) は、その5' 末端に蛍光分子を有する。
 2) CTO (キャプチャリング・アンド・ランプレーティングオリゴヌクレオチド) は、その3' 末端がカーボンスペースでブロックされている。
 3) RFUは、相対的な蛍光単位を示す。

【 図 6 A 】

A. 蛍光イメージ



【 図 6 B 】

B. 蛍光強度の変化

ターゲット ¹⁾	PTO ²⁾	CTO ³⁾	RFU ⁴⁾
-	5.0 pmole	3.0 pmole	-5 (±4.4)
-	5.0 pmole	1.0 pmole	1 (±1.0)
-	5.0 pmole	0.5 pmole	13 (±14.2)
+	5.0 pmole	3.0 pmole	264 (±7.4)
+	5.0 pmole	1.0 pmole	59,598 (±736.4)
+	5.0 pmole	0.5 pmole	65,444 (±14.0)

- 1) ターゲットは、*Neisseria gonorrhoeae* 遺伝子のゲノムDNAである。
 2) PTO (プロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド) は、その5' 末端に蛍光分子を有し、その3' 末端は、カーボンスペースでブロックされている。
 3) CTO (キャプチャリング・アンド・ランプレーティングオリゴヌクレオチド) は、その3' 末端がカーボンスペースでブロックされている。
 4) RFUは、相対的な蛍光単位を示す。

【配列表】

2016524902000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年1月8日(2016.1.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

次の段階を含むP T Oの切断及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション(P C E - I H)分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出する方法；

(a) 前記ターゲット核酸配列を、アップストリームオリゴヌクレオチド及びプロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド(P T O)とハイブリダイズさせる段階であって；

前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含み；

前記P T Oは、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含む3' - ターゲッティング部位、及び(ii) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む5' - タギング部位を含み；

前記3' - ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされ、前記5' - タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされず；

前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、前記P T Oのアップストリームに位置し；

(b) 前記P T Oの切断のための条件下で、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素に前記段階(a)の結果物を接触させる段階であって；

前記アップストリームオリゴヌクレオチドまたはその延長鎖は、前記5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記P T Oの切断を誘導し、このような前記切断は、前記P T Oの5' - タギング部位または5' - タギング部位の一部を含む断片を放出し；

(c) 前記P T Oから放出された前記断片を、キャプチャリング・アンド・テンプレティングオリゴヌクレオチド(C T O)とハイブリダイズさせる段階であって；

前記C T Oは、3' → 5'方向に(i) 前記P T Oの5' - タギング部位または5' - タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位、及び(ii) 前記P T Oの5' - タギング部位及び3' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレティング部位を含み；

前記P T Oから放出された前記断片は、前記C T Oのキャプチャリング部位にハイブリダイズされ；

(d) 前記段階(c)の結果物及び鋳型 - 依存的核酸重合酵素を用いて延長反応を実施する段階であって；

前記C T Oのキャプチャリング部位にハイブリダイズされた前記断片は、延長されて前記C T Oのテンプレティング部位に相補的な延長配列を含む延長鎖を生成し、延長二量体を形成し；

前記延長鎖は、標識を含み；

(e) 前記延長鎖を、固相基質上に固定された固定化オリゴヌクレオチド(I O)とハイブリダイズさせる段階であって；

前記I Oは、前記延長鎖に相補的な配列を含み；

前記延長鎖及び前記I O間のハイブリダイゼーションは、前記固相基質上に検出可能なシグナルを提供し；及び

(f) 前記延長鎖の存在を示す前記シグナルを検出する段階であって ;
前記延長鎖の存在は、前記ターゲット核酸配列の存在を示す。

【請求項 2】

前記段階 (e) は、前記延長鎖が一本鎖状態で前記 I O とのハイブリダイゼーションに有利な条件下で実施され、これにより、前記延長鎖及び前記 C T O 間の前記延長二量体の形成による前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリダイゼーションの抑制が防止されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記条件は、前記段階 (e) で前記一本鎖状態の延長鎖の数を増加させることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記段階 (e) で前記一本鎖状態の延長鎖の数を増加させる前記条件は、前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリダイゼーション前に前記延長二量体を変性させることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記段階 (e) で前記一本鎖状態の延長鎖の数を増加させる前記条件は、前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリダイゼーション前に前記 C T O を除去することを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記段階 (e) で前記一本鎖形態の延長鎖の数を増加させる前記条件は、P T O の C T O に対する m o l 比が 1 超で前記 P T O 及び前記 C T O を使うことを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 P T O の C T O に対する m o l 比は、1 . 2 以上であることを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記段階 (e) は、前記延長鎖と前記 I O とのハイブリダイゼーション競争力を、前記 C T O と前記延長鎖とのハイブリダイゼーション競争力よりも向上させる条件下で実施されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記延長鎖と前記 I O とのハイブリダイゼーション競争力を、前記 C T O と前記延長鎖とのハイブリダイゼーション競争力よりも向上させる前記条件は、前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリッドの T m 値及び前記 C T O 及び前記延長鎖間のハイブリッドの T m 値を調節することを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 I O は、(i) 前記延長配列の全部または一部、及び (i i) 前記延長鎖内の前記断片の一部に相補的な配列を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記延長鎖に含まれた前記標識は、(i) 前記 P T O から放出された前記断片に結合された単一標識、(i i) 前記延長反応の間に前記延長鎖に挿入される標識、または (i i i) 前記断片に結合された前記単一標識及び前記延長反応の間に前記延長鎖に挿入される前記標識の組合せであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記標識は、前記延長鎖に挿入される標識であり、
前記 C T O のテンプレティング部位は、第 1 非天然塩基を含むヌクレオチドを含み、
前記段階 (d) の前記延長反応は、標識及び前記第 1 非天然塩基に対して特異的結合親和性を有する第 2 非天然塩基を含むヌクレオチドの存在下で実施され、これにより、前記延長鎖に前記標識が挿入されることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記標識は、前記断片に結合された前記単一標識及び前記延長反応の間に前記延長鎖に

挿入される前記標識の組合せであり、前記単一標識及び前記挿入された標識は、受容体及び供与体の対を含む相互作用的二重標識であることを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記段階 (e) の前記ハイブリダイゼーションは、インターカレーティング染料の存在下で実施され、前記延長鎖に含まれた前記標識は、前記インターカレーティング染料からのシグナルを受ける受容体であり、前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリッドに挿入されたインターカレーティング染料からのシグナルは、前記受容体に転移され、前記受容体は、検出可能なシグナルを提供することを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 P T O、前記 C T O 及び / または前記 I O は、その延長が防止されるように、その 3 ' 末端がブロッキングされることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記シグナルを検出するための前記段階 (f) は、一定温度範囲で前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリッドをメルティングするか、または前記ハイブリッドをメルティングし、ハイブリダイズさせる過程で、前記固相基質上に提供されるシグナルを検出することで実施されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記方法は、反復サイクルの間に変性を含み、前記段階 (a) ~ (f) の全部または一部を繰り返す段階をさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記段階 (a) ~ (f) は、1 つの反応容器または個別反応容器で実施されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記方法は、少なくとも 2 種のターゲット核酸配列を検出するために実施され；

前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、少なくとも 2 種のオリゴヌクレオチドを含み、前記 P T O は、少なくとも 2 種の P T O を含み、前記 C T O は、少なくとも 2 種の C T O を含み、前記 I O は、少なくとも 2 種の I O を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記ターゲット核酸配列は、ヌクレオチド変異を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記方法は、ダウンストリームプライマーの存在下で実施されることを特徴とする請求項 1 から 2 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 2】

次の段階を含む P T O の切断及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (P C E - I H) 分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出する方法；

(a) 前記ターゲット核酸配列を、アップストリームプライマー及びダウンストリームプライマーを含むプライマー対及びプロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド (P T O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記アップストリームプライマー及び前記ダウンストリームプライマーのそれぞれは、前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含み；

前記 P T O は、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含む 3 ' - ターゲッティング部位、及び (i i) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む 5 ' - タギング部位を含み；

前記 3 ' - ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされ、前記 5 ' - タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされず；

前記 P T O は、前記アップストリームプライマー及び前記ダウンストリームプライマー

の間に位置し；

前記 P T O は、その延長が防止されるように、その 3' 末端がブロッキングされており；

(b) 前記プライマーの延長及び前記 P T O の切断のための条件下で、5'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型 - 依存的核酸重合酵素に前記段階 (a) の結果物を接触させる段階であって；

前記 P T O が、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされれば、前記アップストリームプライマーは延長され、前記延長鎖は、前記 5'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型 - 依存的核酸重合酵素による前記 P T O の切断を誘導し、このような前記切断は、前記 P T O の 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部を含む断片を放出し；

(c) 前記 P T O から放出された前記断片を、キャプチャリング・アンド・テンプレーティングオリゴヌクレオチド (C T O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記 C T O は、3' → 5' 方向に (i) 前記 P T O の 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位、及び (i i) 5' - タギング部位及び 3' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレーティング部位を含み；

前記 P T O から放出された前記断片は、前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされ；

(d) 前記段階 (c) の結果物及び鋳型 - 依存的核酸重合酵素を用いて延長反応を実施する段階であって；

前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされた前記断片は、延長されて前記 C T O のテンプレーティング部位に相補的な延長配列を含む延長鎖を生成し、延長二量体を形成し；

前記延長鎖は、標識を含み、

(e) 前記延長鎖を、固相基質上に固定された固定化オリゴヌクレオチド (I O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記 I O は、前記延長鎖に相補的な配列を含み；

前記延長鎖及び前記 I O 間のハイブリダイゼーションは、前記固相基質上に検出可能なシグナルを提供し；及び

(f) 前記延長鎖の存在を示す前記シグナルを検出する段階であって；

前記延長鎖の存在は、前記ターゲット核酸配列の存在を示す。

【請求項 23】

次の段階を含む P T O の切断及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (P C E - I H) 分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出する方法；

(a) 前記ターゲット核酸配列を、フローピング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド (P T O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記 P T O は、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含む 3' - ターゲッティング部位、及び (i i) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む 5' - タギング部位を含み；

前記 3' - ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされ、前記 5' - タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされず；

(b) 前記 P T O の切断のための条件下で、5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素に前記段階 (a) の結果物を接触させる段階であって；

前記 P T O は、前記 5'ヌクレアーゼ活性を有する酵素によって切断され、このような前記切断は、前記 P T O の 5' - タギング部位または 5' - タギング部位の一部を含む断片を放出し；

(c) 前記 P T O から放出された前記断片を、キャプチャリング・アンド・テンプレーティングオリゴヌクレオチド (C T O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記 C T O は、3' → 5' 方向に (i) 前記 P T O の 5' - タギング部位または 5' -

タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位、及び (i i) 前記 P T O の 5 ' - タギング部位及び 3 ' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレティング部位を含み；

前記 P T O から放出された前記断片は、前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされ；

(d) 前記段階 (c) の結果物及び鋳型 - 依存的核酸重合酵素を用いて延長反応を実施する段階であって；

前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされた前記断片は、延長されて前記 C T O のテンプレティング部位に相補的な延長配列を含む延長鎖を生成し、延長二量体を形成し；

前記延長鎖は、標識を含み、

(e) 前記延長鎖を、固相基質上に固定された固定化オリゴヌクレオチド (I O) とハイブリダイズさせる段階であって；

前記 I O は、前記延長鎖に相補的な配列を含み；

前記延長鎖と前記 I O との間のハイブリダイゼーションは、前記固相基質上に検出可能なシグナルを提供し；及び

(f) 前記延長鎖の存在を示す前記シグナルを検出する段階であって；

前記延長鎖の存在は、前記ターゲット核酸配列の存在を示す。

【請求項 2 4】

次を含む P T O の切断及び延長 - 依存的固定化オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション (P C E - I H) 分析によって固相で核酸試料内のターゲット核酸配列を検出するためのキット；

(a) アップストリームオリゴヌクレオチド；

前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含み；

(b) プロービング・アンド・タギングオリゴヌクレオチド (P T O) ；

前記 P T O は、(i) 前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイジングヌクレオチド配列を含む 3 ' - ターゲッティング部位、及び (i i) 前記ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を含む 5 ' - タギング部位を含み；

前記 3 ' - ターゲッティング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされ、前記 5 ' - タギング部位は、前記ターゲット核酸配列にハイブリダイズされず；

前記アップストリームオリゴヌクレオチドは、前記 P T O のアップストリームに位置し；

前記アップストリームオリゴヌクレオチドまたはその延長鎖は、5 ' ヌクレアーゼ活性を有する酵素による前記 P T O の切断を誘導し、このような切断は、前記 P T O の 5 ' - タギング部位及び 5 ' - タギング部位の一部を含む断片を放出し；

(c) キャプチャリング・アンド・テンプレティングオリゴヌクレオチド (C T O) ；

前記 C T O は、3 ' → 5 ' 方向に (i) 前記 P T O の 5 ' - タギング部位または 5 ' - タギング部位の一部に相補的なヌクレオチド配列を含むキャプチャリング部位、及び (i i) 前記 P T O の 5 ' - タギング部位及び 3 ' - ターゲッティング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含むテンプレティング部位を含み；

前記 P T O から放出された前記断片は、前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされ；

前記 C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイズされた前記断片は、延長されて前記 C T O のテンプレティング部位に相補的な延長配列を含む延長鎖を生成し、延長二量体を形成し；

前記延長鎖は、標識を含み；及び

(d) 固定化オリゴヌクレオチド (I O) ；

前記 I O は、固相基質上に固定化されており；

前記 I O は、前記延長鎖に相補的な配列を含み；

前記延長鎖と前記 I O との間のハイブリダイゼーションは、前記固相基質上に検出可能なシグナルを提供する。

【請求項 25】

P T O の C T O に対する m o l 比が 1 超で前記 P T O 及び C T O を含むことを特徴とする請求項 24 に記載のキット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2014/006296
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12Q 1/68(2006.01)i, G06F 19/10(2011.01)i, C12N 15/11(2006.01)i		
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) C12Q 1/68; C07H 21/04; C12Q 1/48; C12N 15/10; G06F 19/10; C12N 15/11		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: detecting target nucleic acid, solid phase, PTO cleavage and extension dependent immobilized oligonucleotide hybridization assay		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012-150835 A2 (SEEGENE, INC.) 08 November 2012 See abstract and claim 1.	1-37
A	WO 2012-096523 A2 (SEEGENE, INC.) 19 July 2012 See abstract and claim 1.	1-37
A	US 2006-0040282 A1 (MONFORTE et al.) 23 February 2006 See abstract and claims 1-19.	1-37
A	US 2004-0023271 A1 (KURN et al.) 05 February 2004 See abstract and claims 1-25.	1-37
A	US 5691142 A (DAHLBERG et al.) 25 November 1997 See abstract and claims 1-8.	1-37
☐ 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 22 October 2014 (22.10.2014)		Date of mailing of the international search report 23 October 2014 (23.10.2014)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer LIM, Hea Joon Telephone No. +82-42-481-8395 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/006296

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012-150835 A2	08/11/2012	AU 2012-251222 A1 CA 2834030 A1 CN 103620056 A EP 2705163 A2 IL 229132 D0 KR 10-2013-0137703 A US 2014-0073534 A1 WO 2012-150749 A1 WO 2012-150835 A3	14/11/2013 08/11/2012 05/03/2014 12/03/2014 31/12/2013 17/12/2013 13/03/2014 08/11/2012 21/03/2013
WO 2012-096523 A2	19/07/2012	AU 2012-205956 A1 CA 2802494 A1 CN 102959092 A CN 103866037 A EP 2572004 A2 EP 2572004 A4 EP 2708608 A1 JP 2013-538041 A KR 10-2012-0081482 A KR 10-2012-0105811 A KR 10-2013-0006477 A MX 2013001510 A NO 20121065 A SG 190758 A1 US 2013-0109588 A1 WO 2012-096430 A1 WO 2012-096523 A3	31/01/2013 19/07/2012 06/03/2013 18/06/2014 27/03/2013 29/05/2013 19/03/2014 10/10/2013 19/07/2012 26/09/2012 16/01/2013 27/02/2013 18/12/2012 30/08/2013 02/05/2013 19/07/2012 06/12/2012
US 2006-0040282 A1	23/02/2006	AU 5635296 A AU 695705 B2 CA 2220418 A1 CA 2220418 C CN 1191575 A0 DE 69605669 D1 DE 69605669 T2 EP 0828855 A1 EP 0828855 B1 JP 11-505127 A JP 3437184 B2 KR 10-1999-0021950 A US 5700642 A US 5830655 A US 6949633 B1 WO 96-37630 A1	11/12/1996 20/08/1998 28/11/1996 03/06/2003 26/08/1998 20/01/2000 27/07/2000 18/03/1998 15/12/1999 18/05/1999 18/08/2003 25/03/1999 23/12/1997 03/11/1998 27/09/2005 28/11/1996
US 2004-0023271 A1	05/02/2004	AU 2003-222178 A1 CA 2480525 A1 EP 1490514 A2 EP 1490514 A4	13/10/2003 09/10/2003 29/12/2004 17/12/2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/006296

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5691142 A	25/11/1997	JP 2005-521409 A	21/07/2005
		WO 03-083435 A2	09/10/2003
		WO 03-083435 A3	26/02/2004
US 5691142 A	25/11/1997	AU 1999-44446 A1	14/10/1999
		CA 2163015 A1	22/12/1994
		CA 2163015 C	20/11/2001
		CA 2203627 A1	23/05/1996
		CA 2203627 C	06/06/2000
		CA 2320666 A1	22/12/1994
		CA 2320666 C	05/06/2007
		EP 0601834 A1	15/06/1994
		EP 0601834 B1	02/08/2000
		EP 0711361 A1	27/06/2001
		EP 0788557 A1	06/08/2003
		EP 1505160 A2	09/02/2005
		EP 1505160 A3	04/05/2005
		EP 1505160 B1	19/09/2007
		JP 06-303975 A	01/11/1994
		JP 08-511684 A	10/12/1996
		JP 10-509322 A	14/09/1998
		JP 2006-296425 A	02/11/2006
		JP 2008-054686 A	13/03/2008
		JP 2009-232854 A	15/10/2009
		JP 3518884 B2	12/04/2004
		JP 4016050 B2	05/12/2007
		JP 4451476 B2	14/04/2010
		US 2003-0054338 A1	20/03/2003
		US 2003-0108873 A1	12/06/2003
		US 2005-0158716 A1	21/07/2005
		US 2006-0035256 A1	16/02/2006
		US 2006-0035257 A1	16/02/2006
		US 2006-0040299 A1	23/02/2006
		US 2006-0068383 A1	30/03/2006
		US 2006-0183109 A1	17/08/2006
		US 5422253 A	06/06/1995
		US 5541311 A	30/07/1996
		US 5614402 A	25/03/1997
		US 5719028 A	17/02/1998
		US 5795763 A	18/08/1998
		US 5837450 A	17/11/1998
		US 5843654 A	01/12/1998
		US 5871911 A	16/02/1999
		US 5888780 A	30/03/1999
		US 6372424 B1	16/04/2002
		US 6673616 B1	06/01/2004
		US 7067643 B2	27/06/2006
		US 7087381 B2	08/08/2006
		US 7273696 B2	25/09/2007
		US 7601496 B2	13/10/2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/KR2014/006296

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 7691573 B2	06/04/2010
		US 7785852 B2	31/08/2010
		US 8026050 B1	27/09/2011
		WO 94-29482 A1	22/12/1994
		WO 96-15267 A1	23/05/1996

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 チュン・ジョン ユーン

大韓民国 135-957 ソウル カンナム - グ ヨンドン - デロ 142ギル 21 チョンドム マークヒルズ 1チャ ルーム 1901

(72)発明者 リ・ヨン チョ

大韓民国 138-930 ソウル ソンパ - グ オリンピック - ロ 435 パーク リオ アパート 115-1301

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ03 QQ42 QQ52 QR08 QR56 QR62 QS34
QX02