

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6096672号  
(P6096672)

(45) 発行日 平成29年3月15日 (2017. 3. 15)

(24) 登録日 平成29年2月24日 (2017. 2. 24)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C 1 2 Q</b> 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A
<b>C 1 2 M</b> 1/00 (2006. 01)	C 1 2 M 1/00 A
<b>C 1 2 M</b> 1/34 (2006. 01)	C 1 2 M 1/34 B
<b>C 1 2 N</b> 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 18 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2013-543299 (P2013-543299)	(73) 特許権者	513143401 ヌビオ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O 2 1 3 9, ケンブリッジ, スイート 1 4 2 0 1, 1 ケンドール スクエア ビル ディング 1 4 0 0
(86) (22) 出願日	平成23年12月7日 (2011. 12. 7)	(74) 代理人	100114775 弁理士 高岡 亮一
(65) 公表番号	特表2014-500729 (P2014-500729A)	(74) 代理人	100121511 弁理士 小田 直
(43) 公表日	平成26年1月16日 (2014. 1. 16)	(72) 発明者	ラズ, タル アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O 2 1 3 9, ケンブリッジ, スイート 3 8 O, 6 4 シドニー ストリート, ヌビオ インコーポレイテッド内 最終頁に続く
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/063654		
(87) 国際公開番号	W02012/078710		
(87) 国際公開日	平成24年6月14日 (2012. 6. 14)		
審査請求日	平成26年12月3日 (2014. 12. 3)		
(31) 優先権主張番号	61/420, 747		
(32) 優先日	平成22年12月7日 (2010. 12. 7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 検出体、プローブ、および阻害剤を用いた核酸標的検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的核酸を検出するための方法であって、

a) 標的核酸に検出体を組み込むことであって、前記検出体はフルオロフォア又は消光剤に共役されたオリゴヌクレオチドであり、前記組み込みは、

(1) ライゲーション、又は、

(2) (i) 3' 末端に標的的特異的配列、(ii) 5' 末端に阻害剤と相補的な普遍的核酸配列、及び (iii) フルオロフォア又は消光剤を含むプライマーを用いた PCR、によって行われ、

b) 反応物に前記標的核酸にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを添加することと、

c) 前記反応物に阻害剤を添加することであって、前記阻害剤は、前記組み込まれた検出体とハイブリダイズするものであり、前記阻害剤は、前記検出体がフルオロフォアに共役されている場合は、消光剤に共役されたオリゴヌクレオチドであり、前記検出体が消光剤に共役されている場合は、フルオロフォアに共役されたオリゴヌクレオチドであり、

d) 前記オリゴヌクレオチドプローブが前記標的核酸にハイブリダイズした場合は、前記阻害剤を置換するポリメラーゼによる鎖置換反応を行うことと、

e) 前記検出体と阻害剤がハイブリダイズするとフルオロフォアの信号が消光剤によって消光されることにより、前記標的核酸の存在の指標として前記オリゴヌクレオチ

10

20

ドプローブの前記阻害剤との干渉を検出し、それにより標的核酸を検出することと、を含む、方法。

【請求項 2】

前記標的核酸が一本鎖核酸である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記標的核酸内の単一ヌクレオチドが検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記標的核酸内のヌクレオチドの短配列が検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記標的核酸全体が検出される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記標的核酸内の変異が検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記標的核酸内の突然変異が検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記標的核酸内の多型が検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出体がフルオロフォアに共役される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記阻害剤が消光剤に共役される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 11】

前記検出体が消光剤に共役される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記阻害剤がフルオロフォアに共役される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記検出体がエピトープに共役される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記阻害剤がエピトープに共役される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

1 つを超える標的核酸が検出される、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 16】

前記方法が乳剤内で行われる、請求項 1 ～ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記乳剤がマイクロ流体デバイス内にある、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の方法を実施するための、前記検出体、前記オリゴヌクレオチドプローブ、及び前記阻害剤を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

関連出願および参照による組み込み

本出願は、2010年12月7日に提出された米国仮出願第61/420,747号の優先権を主張する。

【0002】

前記出願、ならびにそこに引用されたまたはそれらの審査手続き時に引用された全ての文献(「出願引用文献(outlined documents)」)、および出願引用文献において引用もしくは参照された全ての文献、ならびに本明細書において引用もしくは参照された全ての文献(「本明細書引用文献(herein cited documents)」)、ならびに本明細書引用文献において引用もしくは参照された全ての文献は、本明細書において言及された任意の製品に関するあらゆる製造業者の指示書、

50

説明書、製品仕様書、および製品添付シートまたは本明細書に参照により組み込まれた任意の文献と一緒に、参照により本明細書に組み込まれ、かつ本発明の実践において使用することができる。より具体的には、それぞれの個々の文献があたかも参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示された様に、全ての参照文献は同程度に参照により組み込まれる。

#### 【0003】

本発明は、バイオテクノロジーの技術分野におけるものである。より具体的には、本発明は、分子生物学の技術分野におけるものである。

#### 【0004】

連邦政府の補助金に関する説明

10

本発明は、一部、国立衛生研究所補助金番号 1 R 4 3 H G 0 0 5 1 4 4 - 0 1 により支援された。連邦政府は、本発明に対してある権利を有し得る。

#### 【背景技術】

#### 【0005】

分子生物学内のほとんどのプロセスでは、特定の事象の発生を検出する能力を考慮に入れる反応を有することが重要である。例えば、伸長プライマー上への1つ、または多くのヌクレオチドの組み込み等の事象が、単一ヌクレオチド多型の存在を示し得る。1つ以上のヌクレオチドの組み込み等の事象の発生時に、検出のための機構は、反応物に組み込まれ得るか、あるいは、後続反応において、事象の発生を信号で伝える手段を提供するために使用され得る。

20

#### 【0006】

単一ジ-デオキシヌクレオチドを組み込む、検出のための染料を含有（または検出のための手段として質量を使用）し得る単一塩基鎖伸長は、核酸の照合および検出の両方の機構を含む反応の一例である。単一ヌクレオチド伸長を検出するための最も簡単な方法の1つは、蛍光発光による、例えば、蛍光標識されたヌクレオチドまたは FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）信号を用いることによるものである。しかしながら、単一塩基鎖伸長は、蛍光標識されたヌクレオチドおよび/またはプローブの使用を必要とするため、費用がかかる。さらに、このプローブおよびヌクレオチドの両方の濃度は、作業を行う反応に対して高くなくてはならず、これは高いバックグラウンド信号をもたらす。それ故に、複数の厳密な洗浄ステップは、非ハイブリダイズまたは非結合材料を除去するために使用しなければならず、ほとんどの適用、特に小型反応槽を用いるときには実用的ではない。

30

#### 【0007】

蛍光ベースの検出の別の用途は、蛍光標識された分子（フルオロフォア）および消光剤の利用である。上記のように、複数の分子と共に作業を行うとき、蛍光分子の濃度は、信号において問題がある場合がある。

#### 【0008】

この問題に対する1つの解決法は、二本鎖の蛍光消光剤プローブの使用である。そのようなアッセイは、しばしば、プローブの長さ、標的DNAの長さ、または酵素反応等の特定のパラメータに対して最適化される。ほとんどのフルオロフォア-消光剤対アッセイは、厳格な温度制御下で短DNA鎖またはアンプリコン（< 200 bp）に対してのみ有効である（例えば、Holland et al., "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase", PNAS (1991) vol. 88, pp. 7276-7280、Piatek, et al., "Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*", Nat Biotechnol (1998) vol. 16, no. 4, pp. 359-363、Udvardi, et al., "Eleven golden rules of quantitative RT-

40

50

PCR”, The Plant Cell (2008) vol. 20, pp. 1736 - 1737、Vet al., “Design and Optimization of Molecular Beacon Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays”, In: P. Herdewijn, ed. 2004. Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications (Methods in Molecular Biology, vol. 288). New Jersey: Humana Press Inc., pp. 273 - 290、“Top Ten Pitfalls in Quantitative Real-time PCR Primer/Probe Design and Use”, Applied Biosystems TechNotes (2011) vol. 13, no. 4 ([www.ambion.com/techlib/tn/134/13.html](http://www.ambion.com/techlib/tn/134/13.html))、“PCR Primer Design Guidelines”, PREMIER Biosoft (2011) ([www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/PCR\\_Primer\\_Design.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html))。

10

#### 【0009】

したがって、以下の発明によって提供される、様々な核酸プローブの長さ、標的核酸の長さ、温度条件、またはDNAポリメラーゼを用いて特定の核酸配列の存在または不在を検出するための信頼性のあり、効率がよく、費用効率が高い方法が必要である。

#### 【0010】

20

本出願におけるいずれの文献の引用または特定も、このような文献が本発明の先行技術として利用可能であることを承認するものとして解釈されるべきではない。

#### 【発明の概要】

#### 【0011】

本発明は、一般に、特定の核酸配列の存在または不在を検出するための方法に関する。本発明による一方法は、標的核酸に検出体を組み込むことと、反応物にオリゴヌクレオチドプローブ、ポリメラーゼ酵素、および阻害剤を添加することと、特定の標的核酸配列の存在の指標としてオリゴヌクレオチドプローブの阻害剤との干渉を検出することと、に関する。干渉の欠如は、特定の標的核酸配列の不在の指標である。

#### 【0012】

30

本発明はまた、乳剤内の核酸試料中の標的核酸配列を検出するための方法に関する。本方法は、標的核酸に検出体を組み込むことと、反応物にオリゴヌクレオチドプローブ、ポリメラーゼ酵素、および阻害剤を添加することと、特定の標的核酸配列の存在の指標としてオリゴヌクレオチドプローブの阻害剤との干渉を検出することと、に関し、この反応は、乳剤内で行われる。干渉の欠如は、特定の標的核酸配列の不在の指標である。

#### 【0013】

本発明はまた、マイクロ流体デバイス内の核酸試料中の標的核酸を検出するための方法に関する。本方法は、標的核酸に検出体を組み込むことと、反応物にオリゴヌクレオチドプローブ、ポリメラーゼ酵素、および阻害剤を添加することと、特定の標的核酸配列の存在の指標としてオリゴヌクレオチドプローブの阻害剤との干渉を検出することと、に関し、この反応は、マイクロ流体デバイスで行われる。干渉の欠如は、特定の標的核酸配列の不在の指標である。

40

#### 【0014】

本発明はまた、核酸試料中の標的核酸配列を検出するための方法のための試薬を含むキットに関する。このキットは、特定の標的核酸配列の存在の指標としてオリゴヌクレオチドプローブの阻害剤との干渉を検出するための試薬と一緒に、標的核酸への組み込みのための検出体、反応物へのオリゴヌクレオチドプローブ、ポリメラーゼ酵素、および阻害剤を含んでよい。このキットは、本発明の方法を実施するための試薬をさらに含んでよい。

#### 【0015】

したがって、従来知られている任意の製品、その製品の作製プロセス、またはその製品

50

の使用方法も本発明内に包含しないことが本発明の目的であり、したがって、本出願者は、従来知られている任意の製品、プロセス、または方法の権利を留保し、本明細書によって、これらの権利の放棄を開示するものである。本発明が米国特許商標局（USPTO）（35 合衆国法典 U.S.C. § 112、第 1 段落）またはヨーロッパ特許庁（EPO）（EPC 83 条）の明細書および実施可能要件を満たさない、本発明の範囲内で任意の製品、またはその製品の作製プロセス、またはその製品の使用方法を包含することを意図せず、したがって、本出願者は、前述の任意の製品、その製品の作製プロセス、またはその製品の使用方法の権利を留保し、本明細書によって、これらの権利の放棄を開示するものであることをさらに留意されたい。

【0016】

10

本開示ならびに特に特許請求の範囲および/または段落において、「含む (comprises)」、「含んだ (comprised)」、「含んでいる (comprising)」等の用語は、米国特許法による意味を有することができ、例えば、「含む (includes)」、「含んだ (included)」、「含んでいる (including)」等を意味することができ、「本質的に～からなる (consisting essentially of)」および「本質的に～からなる (consists essentially of)」等の用語は、米国特許法に帰する意味を有することができ、例えば、明確に言及されていない要素が許容されるが、従来技術中に見られるかまたは本発明の基本的もしくは新規な特徴に影響を及ぼす要素は排除されることに留意されたい。

【0017】

20

これらおよび他の実施形態は、以下の発明を実施するための形態に開示されるか、またはそれから明白であり、それによって包含される。

【図面の簡単な説明】

【0018】

以下の発明を実施するための形態は、例証のために示されるが、単に記載される特定の実施形態に本発明を限定することを意図せず、添付の図面と共に最良に理解され得る。

【0019】

【図 1】標的核酸を検出するために使用される反応を示す概略図であり、この検出体をフルオロフォアに共役し、阻害剤を消光剤に共役する。図 1 A は、DNA 重合のためのプライマーとして機能する標的核酸に適合するオリゴヌクレオチドプローブを示す。得られた二本鎖 DNA は、検出体上の阻害剤に対する結合部位を遮断し、蛍光信号をもたらす。図 1 B は、標的核酸に適合しないオリゴヌクレオチドプローブを示す。したがって、阻害剤は、検出体と結合し、蛍光信号を消光する。F は、蛍光標識（即ち、検出体 - フルオロフォア共役体）であり、Q は消光剤（即ち、阻害剤 - 消光剤共役体）である。

30

【図 2】標的核酸を検出するために使用される反応を示す概略図であり、この検出体を消光剤に共役し、阻害剤をフルオロフォアに共役する。

【図 3】検出体上のフルオロフォアおよび阻害剤上の消光剤の様々な位置を示す概略図である。

【図 4】検出体上の消光剤および阻害剤上のフルオロフォアの様々な位置を示す概略図である。

40

【図 5】検出体上の第 1 のフルオロフォアおよび阻害剤上の第 2 のフルオロフォアの様々な位置を示す概略図である。

【図 6】阻害剤をピオチンに共役し、西洋ワサビペルオキシダーゼ化学発光アッセイが読み出し機構として使用される例を示す概略図である。

【図 7】検出体がフルオロフォアを備え得、阻害剤をピオチンに共役する（「阻害剤 - ピオチン共役体」）例を示す概略図である。

【図 8】ヌクレオチドが実施例 1 で使用されるオリゴヌクレオチドプローブに適合するおよび不適合する位置の実例を示す。

【図 9】実施例 1 の 7 つの反応物に対してマイクロプレートリーダーを用いて、適合プローブまたは 6 つの不適合プローブのうちの 1 つのいずれかを含む試料について測定された

50

蛍光発光を示す。

【図10】実施例2に記載される、T N N T 2 遺伝子の2つの異なる対立遺伝子間で区別するためにプローブを用いてヘテロ接合体患者およびホモ接合体患者からの試料において測定された蛍光発光を示す。

【図11】実施例3の標的核酸を分析するために使用されるそれぞれのプローブ適合タイプおよびプローブ不適合タイプに対する平均蛍光発光および標準偏差を示す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明は、一般に、本明細書中では「標的核酸」と称される、特定の核酸配列の存在または不在を検出するための方法に関する。標的核酸は、ヒトまたは動物から得られた後、クエリーされる核酸試料であり、これには、ゲノムDNA、PCRアンプリコン、cDNA等が含まれるが、これらに限定されない。標的核酸は、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。一例では、一本鎖標的核酸はDNAである。一実施形態では、二本鎖標的核酸は、まず、一本鎖標的核酸に変換される。なお別の実施形態では、PCRは、検出前に標的核酸上で実施される。本実施形態の一態様では、PCR産物は、続いて、一本鎖形態に変換される。二本鎖核酸を一本鎖核酸に変換するための方法は、当該技術分野で公知であり、例えば、Mitsis et al., "Characterization of the interaction of lambda exonuclease with the ends of DNA", Nucleic Acids Res (1999) vol. 27, no. 15, pp. 3057-3063、Sanchez, et al., "Linear-After-The-Exponential (LATE) - PCR: An advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis", PNAS (2004) vol. 101, no. 7, pp. 1933-1938、Chen, et al., "Asynchronous PCR", In: D. Park, ed. 2011. PCR Protocols (Methods in Molecular Biology, vol. 687). New Jersey: Humana Press Inc., pp. 231-243に記載されている。

【0021】

本発明の方法は、標的核酸内の核酸配列の存在または不在を検出するために使用される。一実施形態では、標的核酸配列内の単一ヌクレオチドが検出される。本実施形態の一態様では、特定の遺伝子座が、特定の核酸配列変異の存在または不在を検出するためにクエリーされ得る。「変異」は、関連したポリヌクレオチドの間でのヌクレオチド配列の差異である。差異は、関連したポリヌクレオチドの配列と比較して、1つのポリヌクレオチドの配列からの1つ以上のヌクレオチドの欠失、1つ以上のヌクレオチドの付加、または別のヌクレオチドに代わる1つのヌクレオチドの置換であり得る。「突然変異」、「多型」、および「変異」という用語は、本明細書では交換可能に使用される。本明細書で使用する、単数形「変異」という用語は、複数の変異、即ち、同じポリヌクレオチド中の2つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、および/または置換を含むと解釈されるものとする。「点突然変異」とは、別のヌクレオチドに代わる1つのヌクレオチドの単一置換を指す。

【0022】

例えば、特定の遺伝子座は、単一ヌクレオチド多型の存在または不在を検出するためにクエリーされ得る。「単一ヌクレオチド多型」または「SNP」とは、単一ヌクレオチドの差異により別のポリヌクレオチドとは異なるポリヌクレオチドのヌクレオチド配列の変異を指す。SNPには、例えば、ポリヌクレオチドの全配列中で、1つのAを1つのC、G、もしくはTに置換、1つのCを1つのG、T、もしくはCに置換することが含まれるが、これらに限定されない。さらに、特定の核酸配列中で、1つを超えるSNPを有することが可能である。例えば、核酸配列中で、1つの位置で、Gは、Aで置換することができ、別の位置では、CはT等で置換することができる。

## 【0023】

別例では、特定の遺伝子座は、単一ヌクレオチド突然変異の存在または不在を検出するためにクエリーされ得る。別の実施形態では、複数のヌクレオチド標的（例えば、2つ以上のヌクレオチド）が、同じ反応内で検出される。本実施形態の一態様では、標的核酸配列内の短核酸配列が検出される。一例では、核酸プローブは、約6～8ヌクレオチド長と同じくらい短い。本実施形態の別の態様では、短い核酸プローブの完全相補体は、標的核酸の全配列を決定するために連続して使用することができる。例えば、短い核酸プローブの完全相補体は、一連の全ての4096の可能な六量体であり得る。したがって、標的核酸は、特定の標的長さの制限のない、本発明の方法を用いて検出され得る。

## 【0024】

本発明の方法は、標的核酸に組み込まれる検出体の使用をさらに含み得る。検出体は、この反応の阻害剤のための結合部位として機能する標的核酸に組み込まれるオリゴヌクレオチドである。一実施形態では、検出体は、アダプターライゲーションによって標的核酸に組み込まれる。本実施形態の一例では、アダプターは、互いに類似している2つのオリゴヌクレオチドである。本例では、アダプターは、標的核酸に検出体を付着する。別の実施形態では、検出体は、PCRプライマーを用いて核酸試料に組み込まれる。本実施形態の一例では、PCRプライマーには、標的特異的配列（プライマーの3'末端上）、下流ステップにおいて阻害剤をハイブリダイズするように設計される普遍的核酸配列（プライマーの5'末端上）、および検出体が含まれる。任意の実施形態では、検出体は、標的核酸配列に組み込まれ、標的核酸配列の5'に配向される。

## 【0025】

一実施形態では、検出体が、フルオロフォアに共役される。フルオロフォアは、特定の波長の光からのエネルギーを吸収し、次いで、特定のフルオロフォアに対して別の特定の波長特性の蛍光発光としてこのエネルギーを発する能力を有する分子である。この様式では、フルオロフォアは、標的核酸の存在または不在を示す最終アッセイ読み出しを促進する。特定のフルオロフォアの使用は、本発明では重要ではない。フルオロフォアは、当該技術分野で公知であり、例えば、Marras, "Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes", In: V. Didenko, ed. 2006. Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Designs and Protocols (Methods in Molecular Biology, vol. 335). New Jersey: Humana Press Inc., pp. 3-16によって記載されている。本発明で 사용할ことができるフルオロフォアの例としては、Marras 2006によって記載されるものおよび本明細書で以下にさらに記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。検出体に関連するフルオロフォアの特定の位置は、本発明では重要ではない。フルオロフォアは、検出体の5'末端、3'末端、またはその内部のいずれかの場所を含む、検出体に沿っていかなる場所に付着させてもよい。

## 【0026】

本発明の方法は、阻害剤の使用をさらに含んでよい。この阻害剤は、検出体に類似しているオリゴヌクレオチドであり、検出体とハイブリダイズする。阻害剤は、オリゴヌクレオチドプローブが標的核酸に適合する場合のみ、信号が検出可能であるように機能する。検出体への阻害剤のハイブリダイゼーションは、標準反応緩衝液、例えば、DNAポリメラーゼ反応緩衝液中で生じ、それによって、検出体および阻害剤は、適切な温度で、緩衝液中で混合される。一例では、反応物は、30秒間95℃まで加熱され、次いで、阻害剤のアニール温度を下回る5℃まで冷却され得る。

## 【0027】

一実施形態では、阻害剤が、消光剤に共役される。消光剤は、第1のフルオロフォアから第2のフルオロフォアまたは非蛍光発光分子にエネルギーを移動させることによって蛍

10

20

30

40

50

光発光の強度を減少させる、即ち、消光させるように機能する分子である。特定の消光剤の使用は、本発明では重要ではない。消光剤は、当該技術分野で公知であり、例えば、Marras 2006によって記載されている。本発明で使用する事ができる消光剤の例としては、Marras 2006によって記載されるものおよび本明細書で以下にさらに記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。阻害剤に関連する消光剤の特定の位置は、本発明では重要ではない。消光剤は、阻害剤の5'末端、3'末端、または阻害剤の内部のいずれかの場所を含む、阻害剤に沿っていかなる場所に付着させてもよい。

#### 【0028】

代替的な実施形態では、検出体が、消光剤に共役される。特定の消光剤の使用は、本発明では重要ではない。本発明で使用する事ができる消光剤の例としては、Marras 2006によって記載されるものおよび本明細書で以下にさらに記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。検出体に関連する消光剤の特定の位置は、本発明では重要ではない。消光剤は、検出体の5'末端、3'末端、検出体の内部のいずれかの場所を含む、検出体に沿っていかなる場所に付着させてもよい。

#### 【0029】

代替的な実施形態では、阻害剤が、フルオロフォアに共役される。特定のフルオロフォアの使用は、本発明では重要ではない。本発明で使用する事ができるフルオロフォアの例としては、Marras 2006によって記載されるものおよび本明細書で以下にさらに記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。阻害剤に関連するフルオロフォアの位置は、本発明では重要ではない。フルオロフォアは、阻害剤の5'末端、3'末端、または阻害剤の内部のいずれかの場所を含む、阻害剤に沿っていかなる場所に付着させてもよい。

#### 【0030】

本発明の方法の別の実施形態では、阻害剤が、ビオチンに共役される（「阻害剤 - ビオチン共役体」）。阻害剤 - ビオチン共役体は、様々な製造供給元（例えば、Integrated DNA Technologies, Inc., Eurofins MWG Operon, Eurogentec, Trilink BioTechnologies, Inc.）から商業的に得ることができる。市販の精製キットの例には、Agencourt（登録商標）- AMPure（登録商標）XP（Beckman Coulter, Inc.）およびQIAquick 96 PCR精製キット（Qiagen）が含まれる。阻害剤に関連するビオチンの特定の位置は、本発明では重要ではない。ビオチンは、阻害剤の5'末端、3'末端、または阻害剤の内部のいずれかの場所を含む、阻害剤に沿っていかなる場所に付着させてもよい。

#### 【0031】

本発明の方法の別の実施形態では、検出体または阻害剤がそれぞれ、反応物からの検出体または阻害剤の単離を促進する分子に共役される。この単離を促進する分子は、例えば、エピトープであり得、これは抗体と反応させることが可能なもの全てである。このエピトープは、例えば、抗原、ペプチド、またはタンパク質であり得る。一例では、このエピトープはビオチンである。

#### 【0032】

本発明の方法の別の実施形態では、検出体または阻害剤がそれぞれ、反応物内の検出体または阻害剤の検出を促進する分子に共役される。この検出を促進する分子は、例えば、エピトープであり得る。このエピトープは、例えば、抗原、ペプチド、またはタンパク質であり得る。一例では、このエピトープはビオチンである。別例では、エピトープは、化学発光アッセイを用いて、例えば、HRP酵素に共役させた第2の抗体を用いることによって検出することができるペプチドである。

#### 【0033】

検出体または阻害剤をビオチンに共役させた上記の実施形態では、この共役は、ビオチン共役プライマー（Integrated DNA Technologies, Inc

10

20

30

40

50



、Operon, EurogentecおよびTrilink Biotechnologies, Inc. から市販)を用いる検出体または阻害剤のPCR増幅によって達成することができる。HRP酵素に共役させた抗体を用いてエピトープが検出される上記の実施形態では、共役キットは、Solulinkから商業的に入手してもよいし、または抗体-HRP酵素共役体は、製造供給元、例えばEurogentec)から直接注文してもよい。

#### 【0034】

本発明の方法の一実施形態では、検出体がフルオロフォアに共役されるとき、阻害剤が消光剤に共役される。本発明の方法の別の実施形態では、検出体が消光剤に共役されるとき、阻害剤がフルオロフォアに共役される。検出体と阻害剤または阻害剤と検出体との間のエネルギー移動効率はそれぞれ、選択されたフルオロフォア-消光剤対に特異的であり、したがって、Marras 2006および本明細書で以下に記載されている公知の製造供給元によって提供される文献の製品によって記載されるように、最適化されるべきである。

#### 【0035】

本発明の方法の別の実施形態では、検出体が第1のフルオロフォアに共役され、阻害剤が第2のフルオロフォアに共役され、したがって、第1のフルオロフォアからの放射は、エネルギー移動によって第2のフルオロフォアを励起し、移動エネルギーが、第2のフルオロフォアの蛍光発光特性として放射される。この消光現象は、当該技術分野で公知であり、例えば、Marras 2006によって記載されている。フルオロフォア-フルオロフォア対はまた、当該技術分野で公知であり、例えば、Marras 2006によって記載されている。本発明で 사용할 ことができるフルオロフォア-フルオロフォア対の例としては、Marras 2006によって記載されるものおよび本明細書で以下にさらに記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。検出体に関連する第1のフルオロフォアの特定の位置および阻害剤に関連する第2のフルオロフォアの特定の位置は、本発明では重要ではない。第1のフルオロフォアは、検出体の5'末端、3'末端、または検出体の内部のいずれかの場所を含む、検出体に沿っていかなる場所に付着させてもよい。第2のフルオロフォアは、阻害剤の5'末端、3'末端、または阻害剤に沿って内部のいずれかの場所を含む、阻害剤のいかなる場所に付着させてもよい。検出体と阻害剤との間のエネルギー移動効率は、選択されたフルオロフォア-フルオロフォア対に特異的であり、したがって、最適化されるべきである。

#### 【0036】

フルオロフォアおよび消光剤のフルオロフォア-消光剤対または第1のフルオロフォアおよび第2のフルオロフォアのフルオロフォア-フルオロフォア対(単独かつ集合的に「FRET対(複数可)」と称する)は、その距離(「FRET距離」)が特定のFRET対の効率の良いエネルギー移動距離を超えて減少しない限り、互いに関連していかなる場所でも設置され得る。FRET距離の重要性は、当該技術分野で公知であり、例えば、Marras 2006によって記載されている。検出体と阻害剤との間のエネルギー移動効率は、選択されたFRET対に特異的であり、したがって、最適化されるべきである。

#### 【0037】

図3で示されるように、互いのFRET距離内である限り、フルオロフォアは、検出体上のいかなる場所でも設置することができ、消光剤は、阻害剤上のいかなる場所でも設置することができる。あるいは、図4で示されるように、互いのFRET距離内である限り、消光剤は、検出体上のいかなる場所でも設置することができ、フルオロフォアは、阻害剤上のいかなる場所でも設置することができる。したがって、このフルオロフォアおよび消光剤は、反応を生じさせる互いに許容されるFRET距離内でなければならない。このFRET距離は、選択されたフルオロフォア-消光剤対に対して特定され、それぞれのフルオロフォアおよび消光剤は、隣接ヌクレオチド上、10個の別個のヌクレオチド、または数百個の別個のヌクレオチドであり得、これは選択された特定のFRET対によって異なる。

## 【0038】

一例では、フルオロフォアは、検出体の5'末端上にあり、消光剤は、阻害剤の3'末端上にある。別例では、消光剤は、検出体の5'末端上にあり、フルオロフォアは、阻害剤の3'末端上にある。

## 【0039】

図5で示されるように、互いのFRET距離内である限り、第1のフルオロフォアは、検出体上のいかなる場所でも設置することができ、第2のフルオロフォアは、阻害剤上のいかなる場所でも設置することができる。したがって、第1のフルオロフォアおよび第2のフルオロフォアは、反応を生じさせる互いに許容される距離内でなければならない。このFRET距離は、フルオロフォア-フルオロフォア対に対して特定され、それぞれのフルオロフォアは、隣接ヌクレオチド上、10個の別個のヌクレオチド、または数百個の別個のヌクレオチドであり得、これは選択された特定のFRET対によって異なる。

10

## 【0040】

一例では、検出体が、その5'末端上のFAMフルオロフォアに共役され、阻害剤が、FAMフルオロフォアから約15nt離れて位置付けられたTAMRAフルオロフォアに共役される。

## 【0041】

特定のフルオロフォア-消光剤対またはフルオロフォア-フルオロフォア対の選択は重要ではない。本発明に使用することができるフルオロフォアの種類の例としては、隣接プローブ(例えば、Sigma-Aldrich(登録商標)から入手可能なLightCycler(登録商標)ハイブリダイゼーションプローブ)、5'-ヌクレアーゼプローブ(またはPREMIER Biosoftから入手可能なTaqMan(登録商標)プローブ)、副溝結合(Applied Biosystems(登録商標)から入手可能なTaqman(登録商標)MGBプローブ)プローブ、分子指標プローブ、Scorpions(登録商標)プライマー(PREMIER BiosoftおよびBiosearch Technologiesから入手可能)、ならびに鎖置換プローブ(または陰陽プローブ)が挙げられるが、これらに限定されない。

20

## 【0042】

本発明に使用され得る特定のフルオロフォアの例としては、フルオレセインおよびその誘導体(例えば、フルオレセインイソチアネート(FITC)、カルボキシフルオレセイン(FAM)、テトラクロロフルオレセイン(TET)、2',7'-ジフルオロフルオレセイン(Oregon Green(登録商標)488)、Oregon Green(登録商標)514カルボン酸、およびクロロおよびメトキシ置換によるフルオレセイン(JOEおよび6-JOE));ローダミン誘導体(例えば、テトラメチルローダミン(TAMRA)、テトラメチルローダミンイソチアネート(TRITC)、テトラメチルローダミン(TMR)、カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、Texas Red(スルホニルクロリドおよびスルホローダミンの異性体混合物;Invitrogen(商標))およびTexas Red-X(フルオロフォアとその反応基との間でさらに7個の原子のアミノヘキサノイルスパーサー('X'))を含む、Texas Redスクシンイミジルエステル;Invitrogen(商標))、およびローダミンX);シアニン(Cy)染料(例えば、Cy3、Cy5、およびCy5.5)およびシアニン誘導体(例えば、インドカルボシアニン(Quasar(登録商標)570、Quasar(登録商標)670、およびQuasar(登録商標)705)、Oregon Green(登録商標)イソチアネート、およびエオシンイソチアネート(EITC));N-ヒドロキシスクシンイミジル1-ピレンブチレート(PYB);N-ヒドロキシスクシンイミジル1-ピレンスルホネート(PYS);(5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン(EDANS);CAL Fluor(登録商標)Gold 540、CAL Fluor(登録商標)Orange 560、Fluor(登録商標)Red 590、CAL Fluor(登録商標)Red 610、およびCAL Fluor(登録商標)Red 635(Biosearch Technologies, Inc.から入

30

40

50

手可能な特許フルオロフォア) ; V I C (登録商標) ; H E X (登録商標) ( 6 - 異性体ホスホラミジド) ; ならびにN E D (登録商標) が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 4 3 】

本発明に使用され得る特定の消光剤の例としては、B l a c k H o l e Q u e n c h e r (登録商標) 染料 ( B H Q (登録商標) - 1、B H Q (登録商標) - 2、B H Q (登録商標) - 3 ) ; p - (ジメチルアミノフェニルアゾ) 安息香酸 ( D A B C Y L ) ; D e e p D a r k Q u e n c h e r D D Q - I ( E u r o g e n t e c ) ; エオシン ( 2 ' , 4 ' , 5 ' , 7 ' - テトラプロモフルオレセイン ) ; E c l i p s e (登録商標) D a r k Q u e n c h e r ( E u r o g e n t e c ) ; I o w a B l a c k (登録商標) Q u e n c h e r s、例えばI o w a B l a c k (登録商標) F Q およびI o w a B l a c k (登録商標) R Q ( I n t e g r a t e d D N A T e c h n o l o g i e s , I n c . ) ; Q S Y - 7、Q S Y - 9、およびQ S Y - 2 1 ( M o l e c u l a r P r o b e s (登録商標) ) が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【 0 0 4 4 】

本発明に使用され得る特定のフルオロフォア - 消光剤対の例としては、フルオレセイン / D A B C Y L、E D A N S / D A B C Y L、C A L F l u o r (登録商標) G o l d 5 4 0 / B H Q (登録商標) - 1、C y 3 / B H Q - 1、F A M / B H Q (登録商標) - 1、T E T / B H Q (登録商標) - 1、J O E / B H Q (登録商標) - 1、H E X / B H Q (登録商標) - 1、O r e g o n G r e e n (登録商標) / B H Q - 1、C y 3 / B H Q (登録商標) - 2、C y 5 / B H Q - 2、R O X / B H Q (登録商標) - 2、T A M R A / B H Q - 2、C y 5 / B H Q (登録商標) - 3、およびC y 5 . 5 / B H Q (登録商標) - 3 が挙げられるが、これらに限定されない。

20

#### 【 0 0 4 5 】

本発明に使用され得る特定のフルオロフォア - フルオロフォア対の例としては、F A M / T A M R A、F I T C / T A M R A、F I T C / ロードミンX、P Y S / F I T C、F I T C / E I T C、F I T C / P Y B、F I T C / T e x a s R e d、およびF I T C / T R I T C が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 4 6 】

本発明の方法は、標的核酸中の配列 (「クエリー配列」) に対する適合を探すクエリー分子として機能するオリゴヌクレオチドプローブの使用をさらに含んでよい。オリゴヌクレオチドプローブが標的核酸に適合する場合、それにハイブリダイズし、核酸ポリメラーゼ鎖伸長のためのプライマーとしての機能を果たす。伸長が進行すると、検出体から阻害剤を移動させる。オリゴヌクレオチドプローブが標的核酸に適合しない場合、標的核酸にハイブリダイズせず、鎖伸長は生じず、阻害剤が検出体に付着したままである。

30

#### 【 0 0 4 7 】

本発明の方法は、ポリメラーゼ酵素の使用をさらに含んでよい。これは、鎖置換能力を有する任意の酵素であり得る。市販のポリメラーゼ酵素の例としては、K l e n o w 断片 ( N e w E n g l a n d B i o l a b s (登録商標) I n c . )、T a q D N A ポリメラーゼ ( Q I A G E N )、9 ° N (商標) D N A ポリメラーゼ ( N e w E n g l a n d B i o l a b s (登録商標) I n c . )、D e e p V e n t (商標) D N A ポリメラーゼ ( N e w E n g l a n d B i o l a b s (登録商標) I n c . )、M a n t a D N A ポリメラーゼ ( E n z y m a t i c s (登録商標) )、B s t D N A ポリメラーゼ ( N e w E n g l a n d B i o l a b s (登録商標) I n c . )、およびp h i 2 9 D N A ポリメラーゼ ( N e w E n g l a n d B i o l a b s (登録商標) I n c . ) が挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【 0 0 4 8 】

本発明の方法の一実施形態では、検出体が、フルオロフォアに共役され、阻害剤が、消光剤に共役される。この例では、検出体は、標的核酸に組み込まれ、続いて、オリゴヌクレオチドプローブ、ポリメラーゼ、および阻害剤を反応物に添加する。フルオロフォアは

50

、阻害剤が検出体と結合し、消光剤によって蛍光信号を消光するまで蛍光発光を放射する。オリゴヌクレオチドプローブが標的核酸中での適合を見出す場合（図1Aで示される）、ポリメラーゼは、阻害剤に達し、検出体から阻害剤を移動させるまでプローブを伸長する。結果として、消光剤は、もはやフルオロフォアによって放射された蛍光発光を消光せず、比較的強い蛍光信号が放射される。オリゴヌクレオチドプローブが標的核酸中での適合を見出さない場合（図1Bで示される）、阻害剤は、定位置にとどまり、消光剤は、フルオロフォアによって放射された蛍光発光を消光し続け、連続した比較的低い蛍光信号を得る。

#### 【0049】

本発明の方法の別の実施形態では、検出体が、消光剤に共役され、阻害剤が、フルオロフォアに共役される。この例では、検出体は、標的核酸に組み込まれ、続いて、オリゴヌクレオチドプローブ、ポリメラーゼ、および阻害剤を反応物に添加する。阻害剤は検出体と結合し、フルオロフォアによって放射された蛍光発光は、検出体の消光剤によって消光される。オリゴヌクレオチドプローブが標的核酸中での適合を見出す場合、ポリメラーゼは、阻害剤に達し、検出体から阻害剤を移動させるまでプローブを伸長する（図2Aで示される）。結果として、消光剤は、もはやフルオロフォアによって放射された蛍光発光を消光せず、比較的強い蛍光信号が放射される。オリゴヌクレオチドプローブが標的核酸中の適合を見出さない場合（図2Bで示される）、阻害剤は、定位置にとどまり、消光剤は、フルオロフォアによって放射された蛍光発光を消光し続け、連続した比較的低い蛍光信号を得る。

#### 【0050】

本実施形態の別の態様では、検出体が、第1のフルオロフォアに共役され、阻害剤が、第2のフルオロフォアに共役される。この例では、検出体は、標的核酸に組み込まれ、続いて、反応物にオリゴヌクレオチドプローブ、ポリメラーゼ、および阻害剤を添加する。阻害剤は検出体と結合し、第1のフルオロフォアによって放射された蛍光発光として放射されたエネルギーは、第2のフルオロフォアに移動され、第2のフルオロフォアの蛍光発光特性として放射される。オリゴヌクレオチドプローブが標的核酸中での適合を見出す場合、ポリメラーゼは、阻害剤に達し、検出体から阻害剤を移動させるまでプローブを伸長する。結果として、第2のフルオロフォアは、もはや第1のフルオロフォアから移動したエネルギーを有さず、したがって、もはや蛍光発光を放射しない。したがって、放射された蛍光発光は、もはや第2のフルオロフォアの特性を示さず、再び、第1のフルオロフォアの特性を示す。オリゴヌクレオチドプローブが標的核酸中での適合を見出さない場合、阻害剤は、定位置にとどまり、放射された蛍光発光は、第2のフルオロフォアの特性を示し続ける。

#### 【0051】

本発明の方法の別の実施形態では、図7で示されるように、検出体をフルオロフォアに共役し、阻害剤をビオチンに共役する（「阻害剤-ビオチン共役体」）。この例では、検出体は、標的核酸に組み込まれ、続いて、反応物にオリゴヌクレオチドプローブ、ポリメラーゼ、および阻害剤-ビオチン共役体を添加する。オリゴヌクレオチドプローブが標的核酸中での適合を見出す場合、ポリメラーゼは、阻害剤-ビオチン共役体に達し、検出体から阻害剤-ビオチン共役体を移動させるまでプローブを伸長する。オリゴヌクレオチドプローブが標的核酸中での適合を見出さない場合、阻害剤-ビオチン共役体は、定位置にとどまる。反応が完了した後、阻害剤-ビオチン共役体は、ストレプトアビジン基質、例えばストレプトアビジンビーズ（例えば、Invitrogen、Solulink、Thermo Scientific等の様々な製造供給元から容易に入手可能）を用いて反応物から抽出することができ、これは阻害剤-ビオチン共役体のビオチンと結合する。プローブ不適合の場合、阻害剤-ビオチン共役体は、プローブによって検出体から移動されず、ストレプトアビジンビーズは、反応物から検出体-阻害剤-ビオチン共役体対を抽出する。プローブ適合の場合、阻害剤-ビオチン共役体は、プローブによって移動され、ストレプトアビジンビーズは、非結合阻害剤-ビオチン共役体を抽出する。抽出された試

料から放射された蛍光信号は、検出体 - 阻害剤 - ビオチン共役体対の存在を示し、したがって、プローブ不適合、即ち、標的核酸配列の不在を示す。抽出された試料から放射された比較的低い蛍光信号は、検出体の不在を示し、したがって、プローブ適合、即ち、標的核酸配列の存在を示す。

#### 【0052】

本発明の方法の別の実施形態では、阻害剤は、エピトープ、例えば抗原、ペプチド、またはタンパク質に共役され得る（「阻害剤 - エピトープ共役体」）。この例では、検出体は、前述のように標的核酸に組み込まれ、続いて、反応物にオリゴヌクレオチドプローブ、ポリメラーゼ、および阻害剤 - エピトープ共役体を添加する。オリゴヌクレオチドプローブが標的核酸中での適合を見出す場合、ポリメラーゼは、阻害剤 - エピトープ共役体に達し、検出体から阻害剤 - エピトープ共役体を移動させるまでプローブを伸長する。オリゴヌクレオチドプローブが標的核酸中での適合を見出さない場合、阻害剤 - エピトープ共役体は、検出体上の定位置にとどまる。反応が完了した後、標的核酸は、反応物から任意の非適合プローブおよび任意の非結合阻害剤 - エピトープ共役体を除去するために精製することができる。精製後、標的核酸は、エピトープに対して特異的な抗体と反応させる。抗体が、検出システム、例えば、蛍光標識されたタンパク質に共役されるか、または西洋ワサビペルオキシダーゼ（「HRP」）アッセイ（HRP化学発光アッセイは、例えば、Sigma-Aldrich, Invitrogen（商標）、Thermo Scientific, Bio-Rad Laboratories, Inc., Cell Signaling Technology, Inc., Invitrogen（商標）、およびBiological Industries等の様々な製造供給元から市販されている）を用いて検出される。エピトープ信号の検出は、検出体に結合された阻害剤 - エピトープ共役体の存在を示し、したがって、プローブ不適合、即ち、標的核酸配列を示す。比較的低いエピトープ信号は、阻害剤 - エピトープ共役体が検出体に結合されないことを示し、したがって、プローブ適合、即ち、標的核酸配列の存在を示す。

#### 【0053】

図6は、阻害剤をエピトープに共役し、阻害剤 - エピトープ共役体がエピトープとしてビオチンを含み得る一例を示す。この例では、上述のように反応を進行させ、精製後、標的核酸は、アッセイ中に残留するビオチンの量を定量化することによって、標的核酸に結合された阻害剤の存在について試験される。例えば、残留するビオチンは、前述のように、化学発光アッセイにおいて、抗ビオチンのHRP結合抗体を用いることによって検出され得る。

#### 【0054】

次いで、特定の標的核酸配列と関連する、本明細書では「データ」と称される本発明の検出方法の結果は、アクセス可能なデータベース中に保存されてもよく、標的核酸配列と関連する特定のヒトもしくは動物からの他のデータ、または他のヒトもしくは動物からのデータと関連しても、関連しなくてもよい。得られたデータは、他のデータベースと統合されるもしくは関連する、および/または交差適合することができるデータベース中に保存してもよい。

#### 【0055】

本発明の方法およびキットは、ネットワークインターフェースとさらに関連させてもよい。「ネットワークインターフェース」という用語は、データにアクセスする、データを預ける、データを合わせる、データを分析する、データを検索する、データを送信する、またはデータを保存することができる任意の人物またはコンピュータシステムを含むように本明細書に定義される。この用語は、データを分析する人物、分析に使用される電子機器およびソフトウェアシステム、データ分析を保存するデータベース、およびデータを保存することができる任意の記憶媒体であるように広範囲に定義される。ネットワークインターフェースの限定されない例としては、人、自動化実験装置、コンピュータおよびコンピュータネットワーク、ならびにディスク、ハードドライブ、またはメモリチップ等であるが、これらに限定されないデータ記憶装置が挙げられる。

## 【0056】

本発明の方法およびキットは、乳剤内の核酸試料中の標的核酸配列を検出するためにさらに提供され得る。本明細書で使用される「乳剤」は、少なくとも2つの非混和性、または部分的に非混和性の液体の安定した混合物である。一般に、非混和性液体は、2つの異なる相に分離される傾向がある。したがって、界面活性剤は、少なくとも2つの非混和性、または部分的に非混和性の液体間の表面張力を低下させることによって乳剤を安定させる、および/あるいはインターフェースを安定させるために添加してもよい。例えば、本発明の方法およびキットに従って乳剤は、フッ化炭素油、シリコン油、または炭化水素油等の非混和性油中の複数の水性液滴を含み得、この液滴粒度は、直径約0.5～5000ミクロンに及ぶ。本明細書で使用される「液滴」は、例えば、円筒状、球状、および楕円、ならびに扁平、延伸、または不規則な形状等であるが、これらに限定されない、あらゆる形状を有する連続相内の単離された水性または脂溶性相を意味する。

10

## 【0057】

本発明およびその利点は詳細に記載されているが、添付の特許請求の範囲に定義されるように、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更、置換、および変形が行われ得ることが理解されよう。

## 【0058】

本発明は、例証目的のためにのみ提示されるもので、多少なりとも本発明を限定することは意図されない、以下の実施例においてさらに説明されよう。

## 実施例

20

## 実施例 1

## 【0059】

本実施例では、FAMフルオロフォアで共役され、標的核酸に組み込まれる検出体が、Iowa Black FQ消光剤(Integrated DNA Technologies, Inc.)、Manta DNAポリメラーゼ(Enzymatics (登録商標))、dNTP、適切な緩衝液(Enzymatics (登録商標))からのDNAポリメラーゼと共に供給される)、ならびに図8に示される、8ヌクレオチド長プローブに沿って標的核酸への完全適合または6つの異なる位置のうちの1つの位置で単一の位置不適合のいずれかを有する短いオリゴヌクレオチドプローブと共役される阻害剤の存在下で、34で10分間、アッセイが行われた。

30

## 【0060】

蛍光発光が、7つの反応物に対してマイクロプレートリーダーを用いて測定された。図9に示されるように、適合プローブを含む試料中の蛍光発光は、不適合プローブを含む試料中のものよりも2～5倍高かった。

## 実施例 2

## 【0061】

本実施例では、一連のオリゴヌクレオチドプローブが患者試料中の2つの異なる対立遺伝子間で区別するために使用された、アッセイが行われた。TNNT2遺伝子は、まず、A/G SNPに対してヘテロ接合体であった1人の患者およびホモ接合体(G)であった別の患者からのゲノムDNAを用いて、PCR増幅した(エクソン4～5、477bp)。PCRプライマー(前向き)のうちの1つが、FAMフルオロフォア(Integrated DNA Technologies, Inc.)で標識された。PCR試料を、一本鎖DNAに変換し、Iowa Black (登録商標) FQ消光剤(Integrated DNA Technologies, Inc.)、Manta DNAポリメラーゼ(Enzymatics (登録商標))、dNTP、適切な緩衝液(Enzymatics (登録商標))からの酵素と共に供給される)、ならびにSNP対立遺伝子(対立遺伝子1)に適合、「WT」対立遺伝子(対立遺伝子2)に適合した、あるいは標的(即ち、六量体プローブのライブラリーからランダムに選択された)に適合しなかった短いプローブに共役させた阻害剤と混合した。それぞれの試料の蛍光発光は、34で30分間インキュベーションした後、測定された。図10で示されるように、比較的高い蛍光発光

40

50

が、ヘテロ接合体患者については対立遺伝子 1 および 2 の両方に適合するプローブで見られるが、ホモ接合体患者については対立遺伝子 2 のみで見られ、比較的に低い蛍光発光はまた、全ての不適合プローブに見られる。

### 実施例 3

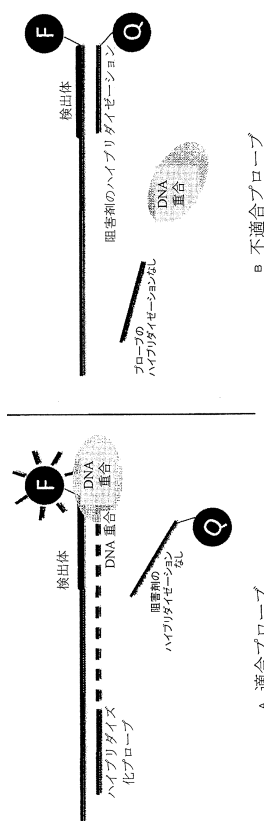
#### 【0062】

本実施例では、FAMフルオロフォア (Integrated DNA Technologies, Inc.) に共役させた検出体を含む 191 bp の一本鎖 DNA アンプリコンを、34 で 30 分間インキュベートし、次いで、Iowa Black (登録商標) FQ 消光剤 (Integrated DNA Technologies, Inc.)、Manta DNA ポリメラーゼ (Enzymatics (登録商標))、dNTP、適切な緩衝液 (Enzymatics (登録商標) からの酵素と共に供給される)、ならびに標的 (18 個のプローブ) を完全に適合するか、または不適合 (6 個のプローブ) のいずれかであった 24 個の短いプローブ (6 ~ 8 ヌクレオチド長) に共役させた阻害剤と混合した。24 個の混合物のそれぞれが、ピコリットルサイズの液滴に乳化され、その後、蛍光発光は、乳化された数千の滴において検出された (1700 滴が、平均してそれぞれのプローブにおいて測定された)。それぞれのプローブタイプの平均蛍光発光および標準偏差を図 11 に示す。不適合プローブ (陰性) は全て、低い蛍光発光を有し、全ての適合プローブ (陽性) は、高い蛍光発光を有する (棒 = 標準偏差)。

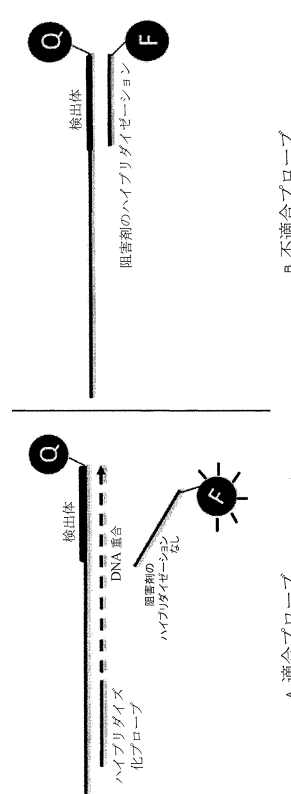
#### 【0063】

したがって、本発明の好ましい実施形態を詳細に説明してきたが、上記の段落によって定義される本発明が、本発明の精神または範囲から逸脱することなく、それらの多くの明らかな変形が可能である場合に、上の説明に記載される特定の詳細を限定するものではないことが理解されよう。

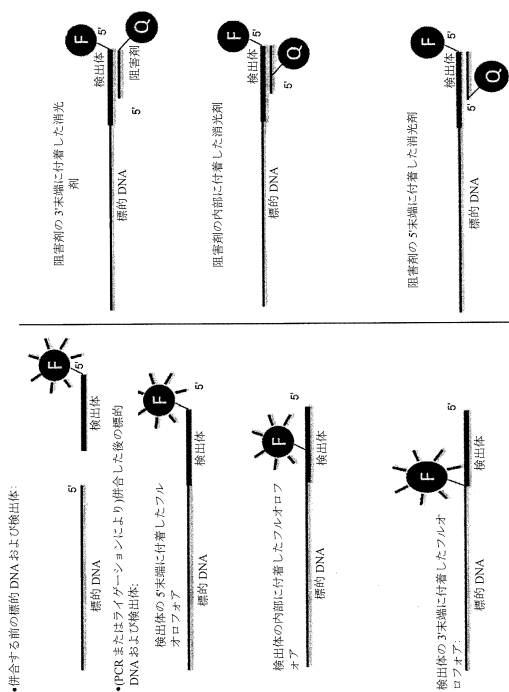
【図 1】



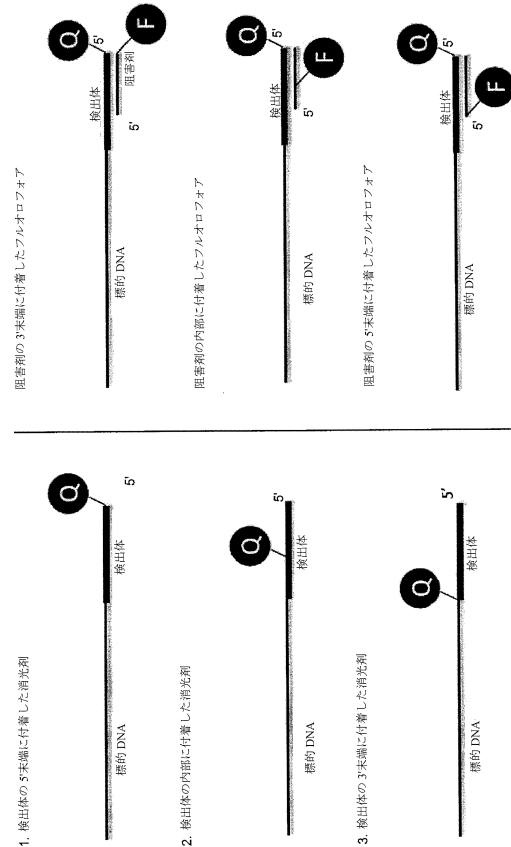
【図 2】



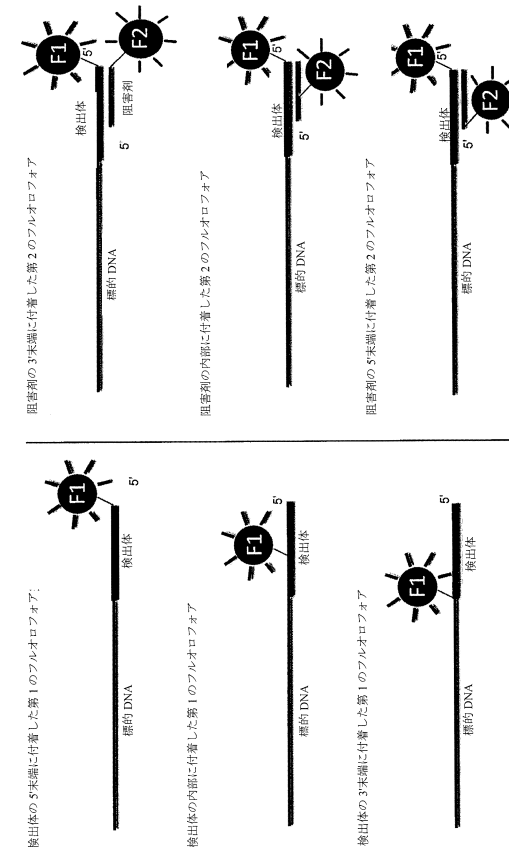
【 図 3 】



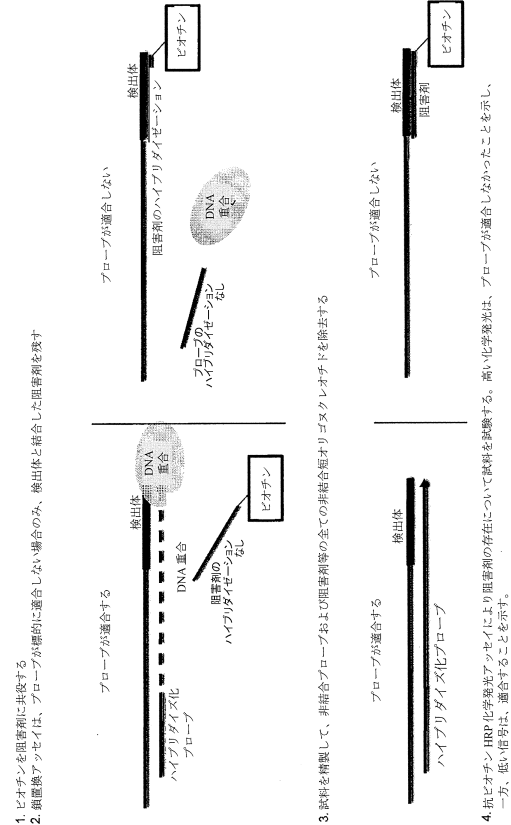
【 図 4 】



【 図 5 】

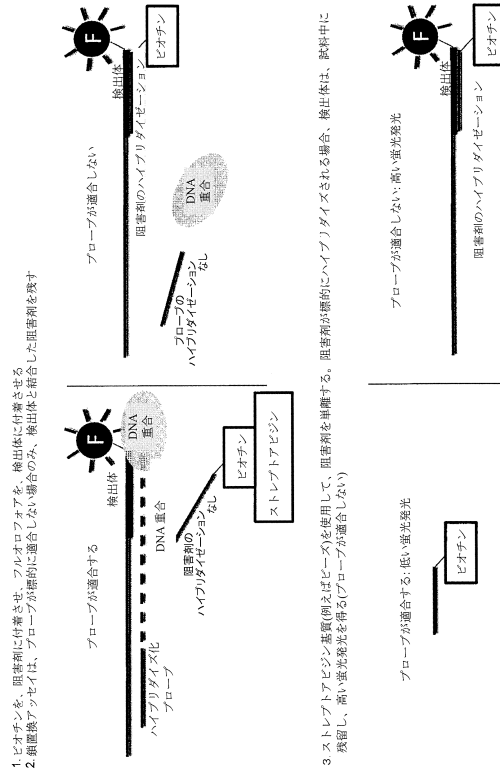


【 図 6 】





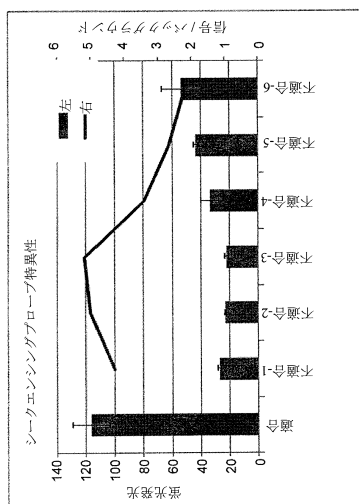
【 図 7 】



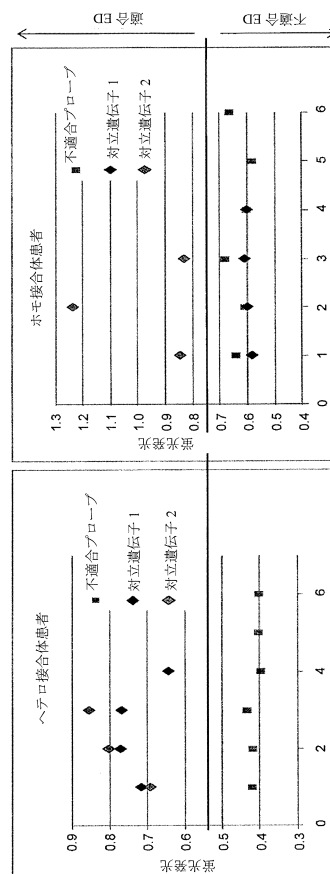
【 図 8 】

適合	CGCATATG
不適合 1	CGCATATC
不適合 2	CGCATAGG
不適合 3	CGCATCTG
不適合 4	CGCAGATG
不適合 5	CGCTATG
不適合 6	CGGATATG

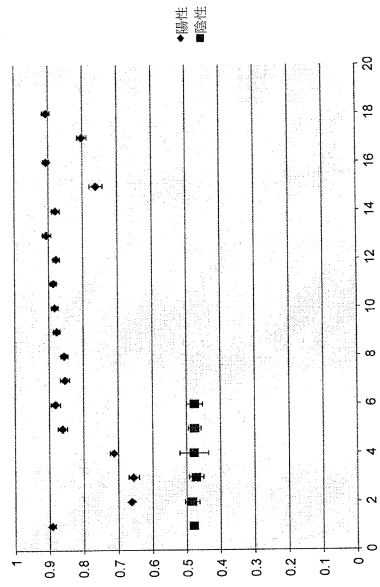
【圖 9】



【 図 1 0 】



【図 11】



---

フロントページの続き

(72)発明者 メアリー，パスカリーヌ  
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 02139，ケンブリッジ，スイート 380，64 シ  
ドニー ストリート，ヌビオ インコーポレイテッド内

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0129792 (US, A1)  
特開2010-246492 (JP, A)  
国際公開第2008/021446 (WO, A2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12Q 1/68  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)  
DWPI(Thomson Innovation)