

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6096885号  
(P6096885)

(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  
**C 1 2 Q 1/68 (2006.01)** C 1 2 Q 1/68 Z N A A  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)** C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 20 (全 54 頁)

(21) 出願番号	特願2015-506891 (P2015-506891)	(73) 特許権者	507292955
(86) (22) 出願日	平成25年4月16日(2013.4.16)		シージーン アイエヌシー
(65) 公表番号	特表2015-514415 (P2015-514415A)		大韓民国 138-828 ソウル ソン
(43) 公表日	平成27年5月21日(2015.5.21)		パード オグムーロ 91 タエウォン
(86) 国際出願番号	PCT/KR2013/003196		ビルディング 8階・9階
(87) 国際公開番号	W02013/157821	(74) 代理人	100107515
(87) 国際公開日	平成25年10月24日(2013.10.24)		弁理士 廣田 浩一
審査請求日	平成26年11月7日(2014.11.7)	(74) 代理人	100107733
(31) 優先権主張番号	10-2012-0040864		弁理士 流 良広
(32) 優先日	平成24年4月19日(2012.4.19)	(74) 代理人	100115347
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		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】 P T O切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断を用いたターゲット核酸配列の検出 {Detection of Target Nucleic Acid Sequence by P

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

次のステップを含む P T O切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断 ( P T O Cleavage and Extension - Dependent Signaling Oligonucleotide Cleavage : P C E - S C ) アッセイによって液相で D N A又は核酸混合物から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上流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 ) とハイブリダイゼーションさせるステップであって ; 前記上流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ゼーション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ゼーション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ゼーションされ、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ゼーションされず ; 前記上流オリゴヌクレオチドは前記 P T Oより上流に位置し ;

( 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持つ酵素に前記ステップ ( a ) の結果物を接触させるステップであって、前記上流オリゴヌクレオチド又は

その伸長鎖は5'ヌクレアーゼ活性を持つ前記酵素による前記PTOの切断を誘導して、前記PTOの5'タギング部位又は5'タギング部位の一部を含む断片を放出し；

(c) 前記PTOから放出された前記断片と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)とをハイブリダイゼーションさせるステップであって、前記CTOは3'5'の順序で、(i)前記PTOの5'タギング部位又は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'ターゲット部位それぞれ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から放出された断片は、前記CTOのキャプチャリング部位とハイブリダイゼーションされ；

10

(d) 鋳型依存的な核酸ポリメラーゼ及び前記ステップ(c)の結果物を用いて伸長反応を行うステップであって、前記CTOのキャプチャリング部位にハイブリダイゼーションされた前記断片は伸長され、前記CTOのテンプレティング部位と相補的な伸長配列を含む伸長鎖が生成されて伸長二重体を形成し、

(e) 前記伸長鎖とシグナリングオリゴヌクレオチド(Signaling Oligonucleotide: SO)とをハイブリダイゼーションして伸長鎖/SOハイブリッドを形成させるステップであって、前記SOは、前記伸長鎖に相補的なハイブリダイゼーションヌクレオチド配列及び少なくとも1つの標識を含み；前記SOは、前記伸長配列にハイブリダイゼーション可能な配列を含み；

(f) 核酸分解酵素(nucleolytic enzyme)を用いて前記伸長鎖/SOハイブリッドの前記SOを切断して、前記SOの切断された断片を生成させるステップ；及び

20

(g) 前記ステップ(f)で前記切断反応の発生を検出するステップであって；前記検出は、液相で前記SOに連結された標識から提供されるシグナルを測定して行い、前記CTO及び前記SOは固相基質上に固定化されておらず、前記伸長鎖/SOハイブリッドの前記SOに対する切断反応の発生は、前記ターゲット核酸配列の存在を示す。

#### 【請求項2】

前記核酸分解酵素は5'ヌクレアーゼであり、前記ステップ(e)で前記伸長鎖/SOハイブリッドの形成は5'ヌクレアーゼに対する切断位置を生成し、前記伸長鎖/SOハイブリッドの前記SOは、5'ヌクレアーゼによって5'3'の方向に切断されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

30

#### 【請求項3】

前記核酸分解酵素は5'ヌクレアーゼであり、前記ステップ(f)は、前記SOの上流に位置した上流オリゴヌクレオチドの存在下で行われ、前記伸長鎖/SOハイブリッドの前記SOは、前記上流オリゴヌクレオチド又はこれの伸長鎖に依存的な前記5'ヌクレアーゼの核酸分解活性によって切断されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

#### 【請求項4】

前記核酸分解酵素はリボヌクレアーゼであり、前記SOはRNA配列を含み、前記ステップ(e)で前記伸長鎖/SOハイブリッドの形成はDNA-RNAハイブリッド二重体を生成し、前記伸長鎖/SOハイブリッドの前記SOは、前記リボヌクレアーゼによって切断されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

40

#### 【請求項5】

前記核酸分解酵素は制限酵素であり、前記SOは前記制限酵素によって認識される配列を含み、前記ステップ(e)で前記伸長鎖/SOハイブリッドの形成は前記制限酵素に対する切断位置を生成し、前記伸長鎖/SOハイブリッドの前記SOは、前記制限酵素によって切断されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

#### 【請求項6】

前記ステップ(e)で前記伸長鎖/SOハイブリッドの形成は、DNA二重体、RNA二重体又はDNA-RNAハイブリッド二重体を切断することができる核酸分解酵素に対する切断位置を生成することを特徴とする請求項1に記載の方法。

50

## 【請求項 7】

前記ステップ ( f ) で前記核酸分解酵素は 5'ヌクレアーゼであり、前記 5'ヌクレアーゼは、5'ヌクレアーゼ活性を持つ鋳型依存的な DNA ポリメラーゼ又は FEN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 8】

前記 SO は、レポーター分子及びクエンチャー分子を含む相互作用的な二重標識を持ち、前記核酸分解酵素に対する前記切断位置は、前記 SO に連結された前記レポーター分子と前記クエンチャー分子との間に位置し、前記伸長鎖 / SO ハイブリッドの前記 SO の切断は、前記レポーター分子と前記クエンチャー分子とを互いに分離させ、前記伸長鎖 / SO ハイブリッドの前記 SO に対する切断反応の発生は、前記標識からのシグナルを測定することで検出することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 9】

前記 SO は単一標識を持ち、前記伸長鎖 / SO ハイブリッドの前記 SO 切断は単一標識を持つ断片を生成し、前記伸長鎖 / SO ハイブリッドの前記 SO 切断の発生は、前記単一標識された断片の放出を検出することで検出することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記 SO は、その 5' 方向に前記伸長鎖に非相補的な配列を含む 5' タギング部位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】

前記伸長鎖 / SO ハイブリッドの前記 SO 切断は、前記 SO の 5' タギング部位又は 5' タギング部位の一部を含む断片を放出し、前記 SO から放出された前記断片は、前記 CTO とのハイブリダイゼーション及び伸長が可能であることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

20

## 【請求項 12】

前記 PTO、CTO 及び / 又は SO は、伸長されないようにその 3' 末端がブロックされていることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記方法は、前記ステップ ( a ) ~ ( g ) の全体又は一部を変性を含んで繰り返すことをさらに行うことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 14】

前記ステップ ( a ) ~ ( g ) は 1 つの反応容器で行うか又は前記ステップ ( a ) ~ ( g ) のうち一部は別途の反応容器で行うことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 15】

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行われ；前記上流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 SO は少なくとも 2 種の SO を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 16】

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。

40

## 【請求項 17】

前記方法は、下流プライマーの存在下で行うことを特徴とする請求項 1 から 16 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 18】

次のステップを含む PTO 切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断 ( PTO Cleavage and Extension - Dependent Signaling Oligonucleotide Cleavage: PCE - SC ) アッセイによって液相で DNA 又は核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法

:

50

(a) 前記ターゲット核酸配列を上流プライマー及び下流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(Probing and Tagging Oligonucleotide: PTO)とハイブリダイゼーションさせるステップであって;前記上流プライマー及び下流プライマーはそれぞれ前記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイゼーション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ゼーション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ゼーションされ、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ゼーションされず;前記PTOは前記上流プライマーと前記下流プライマーとの間に位置し;前記PTOは伸長されないようにその3'末端がブロックされており;

10

(b) 前記PTOの切断のための条件下で5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素に前記ステップ(a)の結果物を接触させるステップであって、前記上流プライマー又はその伸長鎖は5'ヌクレアーゼ活性を持つ前記酵素による前記PTOの切断を誘導して、前記PTOの5'タギング部位又は5'タギング部位の一部を含む断片を放出し;

(c) 前記PTOから放出された前記断片と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)とをハイブリダイゼーションさせるステップであって、前記CTOは3' 5'の順序で、(i)前記PTOの5'タギング部位又は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から放出された断片は、前記CTOのキャプチャリング部位とハイブリダイゼーションされ;

20

(d) 鑄型依存的な核酸ポリメラーゼ及び前記ステップ(c)の結果物を用いて伸長反応を行うステップであって、前記CTOのキャプチャリング部位にハイブリダイゼーションされた前記断片は伸長され、前記CTOのテンプレティング部位に相補的な伸長配列を含む伸長鎖を生成して伸長二重体を形成し;

(e) 前記伸長鎖とシグナリングオリゴヌクレオチド(Signaling Oligonucleotide: SO)とをハイブリダイゼーションして伸長鎖/SOハイブリッドを形成させるステップであって、前記SOは、前記伸長鎖に相補的な配列及び少なくとも1つの標識を含み;前記SOは、前記伸長配列にハイブリダイゼーション可能な配列を含み;

30

(f) 核酸分解酵素(nucleolytic enzyme)を用いて伸長鎖/SOハイブリッドの前記SOを切断して、前記SOの切断された断片を生成させるステップ;及び

(g) 前記ステップ(f)で切断反応の発生を検出するステップであって;前記検出は、液相で前記SOに連結された標識から提供されるシグナルを測定して行い、前記CTO及び前記SOは固相基質上に固定化されておらず;前記伸長鎖/SOハイブリッドの前記SOに対する切断反応の発生は、前記ターゲット核酸配列の存在を示す。

40

#### 【請求項19】

前記方法は、前記ステップ(a)~(g)の全体又は一部を変性を含んで繰り返すことをさらに行うことを特徴とする請求項18に記載の方法。

#### 【請求項20】

請求項1から19のいずれかに記載の方法の実施における使用のためのキットであって、次を含むPTO切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断(PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Cleavage: PCE-SC)アッセイによってDNA又は核酸混合物からターゲット核酸配列を検出するためのキット;

(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

50

Tagging Oligonucleotide: PTO); 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ゼーション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PTOの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ゼーションされ、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ゼーションされず;

(b) 上流オリゴヌクレオチド(upstream oligonucleotide); 前記上流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ゼーションヌクレオチド配列を含み; 前記上流オリゴヌクレオチドは前記PTOより上流に位置し、前記上流オリゴヌクレオチド又はその伸長鎖は5' ヌクレアーゼ活性を持つ酵素による前記PTOの切断を誘導して、前記PTOの5' タギング部位又は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(Capturing and Templating Oligonucleotide: CTO); 前記CTOは3' 5' の順序で、(i) 前記PTOの5' タギング部位又は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とハイブリダイゼーションされて伸長され、前記CTOのテンプレティング部位と相補的な伸長配列を含む伸長鎖を生成して伸長二重体を形成し; 前記CTOは固相基質上に固定化されておらず;

(d) 少なくとも1つの標識を持つシグナリングオリゴヌクレオチド(Signaling Oligonucleotide: SO); 前記SOは前記伸長鎖に相補的な配列を含み; 前記SOは前記伸長鎖とハイブリダイゼーションして伸長鎖/SOハイブリッドを生成し; 前記SOは、前記伸長配列にハイブリダイゼーション可能な配列を含み; 前記SOは固相基質上に固定化されておらず; 及び

(e) 核酸分解酵素(nucleolytic enzyme); 前記核酸分解酵素は前記伸長鎖/SOハイブリッドの前記SOを切断する。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本特許出願は、2012年4月19日に大韓民国特許庁に提出された大韓民国特許出願第10-2012-0040864号に対して優先権を主張し、上記特許出願の開示事項は本明細書に参照として組み込まれる。

本発明は、PTO切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断(Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Cleavage: PCE-SC)アッセイによるターゲット核酸配列の検出に関するものである。

【背景技術】

【0002】

DNAハイブリダイゼーション(hybridization)は分子生物学の基本的な過程であり、イオン強度、塩基構成、核酸断片の長さ、ミスマッチの程度及び変性剤の存在によって影響される。

【0003】

DNAハイブリダイゼーション基盤技術は特定の核酸配列の決定に非常に有用な道具になるはずであり、臨床診断、遺伝子研究及び法医学的な実験分析に明らかに役立つだろう。しかしながら、ハイブリダイゼーションのみ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非特異的なハイブリダイゼーションによる偽陽性結果が発生する可能性が高い。よって、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。

10

20

30

40

50

## 【0004】

プローブハイブリダイゼーション過程の以外にも追加で酵素的反応を用いたいくつかの接近法、例えば、TaqMan<sup>TM</sup>プローブ法が提示された。

## 【0005】

TaqMan<sup>TM</sup>プローブ法において、ターゲット核酸配列にハイブリダイゼーションされた標識プローブは上流プライマー依存的なDNAポリメラーゼの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(特許文献1~3)。TaqMan<sup>TM</sup>プローブ法はシグナル発生のための2つの接近法を提示する: 重合依存的な切断(polymerization-dependent cleavage)及び重合独立な切断(polymerization-independent cleavage)。重合依存的な切断において、上流プライマーの伸長は必ず核酸ポリメラーゼが標識プローブの5'末端に接触する前に発生しなければならない。伸長反応が進行されながら、ポリメラーゼは標識プローブの5'末端を次第に切断する、重合独立な切断において、上流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ゼーションされ、上流プライマーの3'末端と核酸ポリメラーゼとの結合は上記核酸ポリメラーゼが標識プローブの5'末端に接触するようにして標識が放出される。また、TaqMan<sup>TM</sup>プローブ法は、その5'末端部位にターゲット配列とハイブリダイゼーションされない5'テール区域を持つ標識プローブが切断されて、5'テール区域を含む断片が形成されることを開示している。

10

## 【0006】

ターゲット配列に非相補的な5'テール区域を持つプローブが5'ヌクレアーゼによって切断されて、5'テール区域を含む断片が放出されるいくつかの方法が報告された。

20

## 【0007】

例えば、特許文献4は、DNAポリメラーゼの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。鋳型に対して非相補的な5'部位及び鋳型に対して相補的な3'部位を含むオリゴヌクレオチドが鋳型にハイブリダイゼーションされ、上流オリゴヌクレオチドは非常に近接して鋳型にハイブリダイゼーションされる切断構造が例示されている。切断構造は5'ヌクレアーゼ活性を持つDNAポリメラーゼ又は減少された合成活性を持つ変形DNAポリメラーゼによって切断されて、鋳型に非相補的な5'部位が放出される。その後、放出された5'部位はヘアピン構造を持つオリゴヌクレオチドにハイブリダイゼーションされて切断構造を形成し、これによって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。

30

## 【0008】

特許文献5は、3'末端がブロックされた上流オリゴヌクレオチドを持つ切断構造が、5'ヌクレアーゼ活性を持つDNAポリメラーゼ又は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)部位が放出され、放出された5'フラップ部位は大きさの分析又は相互作用的な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6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な増幅方法によって生成されることを開示している。この方法において、一番目の切断構造から放出されたフラップは、核酸合成依存的な方式で二番目の切断構造を切断して二番目の切断構造からフラップを放出させ、放出されたフラップを検出する。特許文献7は、核酸合成によって生成された放出されたフラップの生成、放出されたフラップの伸長、フラップ伸長中にオリゴヌクレオチドの切断及びオリゴヌクレオチド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。

40

## 【0009】

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、一種類の蛍光標識を用いても融解曲線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。しかしながら、相互作用的な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の技術は、マルチプレックスターゲット検出で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

50

の数の限界のため、検出されるターゲット配列の数は制限される。

【0010】

特許文献8は、ターゲット核酸配列に非相補的な5'部位を持つ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ゼーションされた標識プローブは切断されて断片を放出し、その後、断片はキャプチャープローブにハイブリダイゼーションされてターゲット配列の存在が検出される。この方法において、非切断された/無傷な(uncleaved/intact)プローブはキャプチャープローブにハイブリダイゼーションされないことが必須である。このためには、短い長さを持つキャプチャープローブが固相基質上に固定化されなければならない。しかしながら、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性を低くし、また反応条件の最適化も難しくする。

10

【0011】

したがって、より便利で、信頼性及び再現性のある方式で、ハイブリダイゼーションだけでなく、5'核酸分解反応(5'nucleolytic reaction)のような酵素的反応によって液相及び固相でターゲット配列、より好ましくは複数のターゲット配列を検出するための新規な接近法に対する開発要求が浮上している。さらに、当業界で標識(特に、蛍光標識)の種類の数に制限されない新規なターゲット検出方法が要求されている。

【0012】

本明細書の全体にかけて多数の引用文献及び特許文献が参照され、その引用が表示されている。このような文献及び特許の開示内容はその全体が本明細書に参照により組み込まれ、本発明の属する技術分野の水準及び本発明の内容がより明確に説明される。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】米国特許第5,210,015号

【特許文献2】米国特許第5,538,848号

【特許文献3】米国特許第6,326,145号

【特許文献4】米国特許第5,691,142号

【特許文献5】米国特許第7,381,532号

【特許文献6】米国特許第6,893,819号

【特許文献7】米国特許第7,309,573号

【特許文献8】米国出願公開番号第2008-0241838号

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明者らは、より改善し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べく鋭意研究努力した。その結果、本発明者らは、ターゲット配列を検出する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のハイブリダイゼーションだけでなく、5'核酸分解反応(5'nucleolytic reaction)及び伸長のような酵素的な反応と伸長依存的なハイブリダイゼーション及び切断反応を用いて達成され、ターゲット特異性、過程の便宜性及びマルチプレックス検出可能性を改善させる。

40

【0015】

したがって、本発明の目的は、PTO切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断(PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Cleavage: PCE-SC)アッセイによるDNA又は核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法を提供することにある。

50

## 【0016】

本発明の他の目的は、P T O切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断 ( 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 S i g n a l i n g O l i g o n u c l e o t i d e C l e a v a g e : P C E - S C ) アッセイによるDNA又は核酸混合物から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にある。

## 【0017】

本発明の他の目的及び利点は、下記の実施例、請求の範囲及び図面によってより明らかにされる。

## 【課題を解決するための手段】

10

## 【0018】

本発明は、P T O切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断 ( 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 S i g n a l i n g O l i g o n u c l e o t i d e C l e a v a g e : P C E - S C ) アッセイによるターゲット核酸配列を検出する新規な方法に関するものである。

## 【0019】

本発明のP C E - S Cアッセイは、次においてより詳しく説明されることができる：

## I . P C E - S Cアッセイによるターゲット核酸配列の検出

本発明の一態によれば、本発明は、次のステップを含むP T O切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断 ( 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 S i g n a l i n g O l i g o n u c l e o t i d e C l e a v a g e : P C E - S C ) アッセイによるDNA又は核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法を提供する：

20

( a ) 上記ターゲット核酸配列を上流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 ) とハイブリダイゼーションさせるステップであって；上記上流オリゴヌクレオチドは、上記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイゼーションヌクレオチド配列を含み；上記P T Oは、( i ) 上記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイゼーション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 ) 上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；上記3' ターゲッティング部位は上記ターゲット核酸配列にハイブリダイゼーションされ、上記5' タギング部位は上記ターゲット核酸配列にハイブリダイゼーションされず；上記上流オリゴヌクレオチドは上記P T Oより上流に位置し；

30

( b ) 上記P T Oの切断のための条件下で5' ヌクレアーゼ活性を持つ酵素に上記ステップ( a )の結果物を接触させるステップであって；上記上流オリゴヌクレオチド又はその伸長鎖は5' ヌクレアーゼ活性を持つ上記酵素による上記P T Oの切断を誘導して、上記5' タギング部位又は5' タギング部位の一部を含む断片を放出し；

( c ) 上記P T Oから放出された上記断片と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 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 ) とをハイブリダイゼーションさせるステップであって；上記C T Oは3' 5' の順序で、( i ) 上記P T Oの5' タギング部位又は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 ) 上記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；上記P T Oから放出された断片は、上記C T Oのキャプチャリング部位とハイブリダイゼーションされ；

40

( d ) 鋳型依存的な核酸ポリメラーゼ及び上記ステップ( c )の結果物を用いて伸長反応を行うステップであって、上記C T Oのキャプチャリング部位にハイブリダイゼーションされた上記断片は伸長され、上記C T Oのテンプレティング部位と相補的な伸長配列を含む伸長鎖が生成されて伸長二重体を形成し；

50

(e) 上記伸長鎖とシグナリングオリゴヌクレオチド (Signaling Oligonucleotide: SO) とをハイブリダイゼーションさせて伸長鎖 / SO ハイブリッドを生成させるステップであって; 上記 SO は、上記伸長鎖に相補的なハイブリダイゼーションヌクレオチド配列及び少なくとも 1 つの標識を含み;

(f) 核酸分解酵素 (nucleolytic enzyme) を用いて上記伸長鎖 / SO ハイブリッドの上記 SO を切断して、上記 SO の切断された断片を生成させるステップ; 及び

(g) 上記ステップ (f) で上記切断反応の発生を検出するステップであって; 上記検出は、上記 SO に連結された標識から提供されるシグナルを測定して行い、上記伸長鎖 / SO ハイブリッドの上記 SO に対する切断反応の発生は、上記ターゲット核酸配列の存在を示す。

10

#### 【0020】

本発明者らは、より改善し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べく鋭意研究努力した。その結果、本発明者らは、ターゲット配列を検出する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のハイブリダイゼーションだけでなく、5' 核酸分解反応 (5' nucleolytic reaction) 及び伸長のような酵素的な反応及び伸長依存的なハイブリダイゼーション及び切断反応を用いて達成され、ターゲット特異性、過程の便宜性及びマルチプレックス検出可能性を改善させる。

#### 【発明の効果】

20

#### 【0021】

本発明の特徴及び利点を要約すれば、次のとおりである:

(a) 本発明は、ターゲット核酸配列とハイブリダイゼーションしてターゲットシグナルを提供するプローブを使用しない。本発明は、ターゲット核酸配列の存在に依存的な鑄型として任意的な配列を持つ上記 CTO 上に伸長鎖が生成される方式で行われ、結局、プローブとして上記 SO が上記伸長鎖とハイブリダイゼーションされ切断されてシグナルを提供する。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伸長、及び SO ハイブリダイゼーション及び切断を含む一連の反応を用い、これによって本発明の特異性が高く向上する。

(b) SO の配列は、ターゲット核酸配列を考慮することなく選択されることができ、よって、関心のある核酸分解酵素に対する切断位置を生成することができる。それによって、本発明は、5' ヌクレアーゼ、RNase 及び制限酵素のような核酸分解酵素によるプローブ切断を用いる従来のターゲット検出技術を採択して、ターゲット核酸配列を検出することができる。

30

(c) SO の配列はターゲット核酸配列に関らず選択されるため、シグナル生成に関する条件は、ターゲット核酸配列を考慮することなく便利に調節されることができる。このような特徴は多重ターゲット検出で著しい長所を提供し、これはマルチプレックスに対する反応条件がこれ以上困難な問題にならずに偽陽性シグナルの発生を防ぐためである。

(d) 本発明は、伸長鎖 / SO ハイブリッドの切断によって提供されるシグナルを測定するため、上記伸長鎖と SO とのハイブリダイゼーション維持のための条件下でシグナルを測定する必要がない。標識された断片を生成することで、いずれの温度条件でも上記断片の標識から発生したシグナルを検出することができる。それによって、本発明は、多様な検出条件下で行われることができる (例えば、広範囲な温度)。

40

(e) ターゲット核酸配列と直接ハイブリダイゼーションするプローブを用いる従来の技術で、プローブは相補的な配列と競争的な方式でターゲット核酸配列に結合する。これに対し、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。本発明においては、テンプレートである CTO を用いて伸長鎖のみを増幅させることができるので、より一層効率的なプローブハイブリダイゼーションが可能であり、結局、効果的にターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを得ることができる。

(f) PTO の 5' タギング部位、CTO 及び SO の配列はターゲット核酸配列を考

50

慮することなく選択されることができる。これはPTOの5'タグging部位、CTO及びSOに対する配列プールを予めデザインできるようにする。PTOの3'ターゲットing部位はターゲット核酸配列を考慮して製造すべきであるが、CTO及びSOの場合は、ターゲット核酸配列の情報又は考慮なしで既存の方式(ready-made)で製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】PTO切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断(PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Cleavage: PCE-SC)アッセイで用いられるPTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)、CTO(Captureing and Templating Oligonucleotide)及びSO(Signaling Oligonucleotide)の図式的な構造を示す。PTO、CTO及びSOの3'末端は伸長されることを防止するためにブロッキングされることができる。

10

【図2】PCE-SCアッセイの一実現例を図式的に示す。SOはレポーター分子及びクエンチャー分子を含み、5'ヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼ又は切断酵素によって切断される。

【図3】SOに対する上流オリゴヌクレオチドとして上流プローブを使用するPCE-SCアッセイの他の一実現例を図式的に示す。SOはレポーター分子及びクエンチャー分子を含み、上流プローブ依存的な5'ヌクレアーゼ活性によって切断される。

20

【図4】SOに対する上流オリゴヌクレオチドとして上流プライマーを使用するPCE-SCアッセイのまた他の一実現例を図式的に示す。SOはレポーター分子及びクエンチャー分子を含み、上流プライマー依存的な5'ヌクレアーゼ活性によって切断される。

【図5】SOに対する上流オリゴヌクレオチドとして上流プライマーを使用するPCE-SCアッセイのまた他の一実現例を図式的に示す。レポーター分子及びクエンチャー分子で標識されたSOは、伸長鎖に非相補的な配列を含む5'タグging部位を含む。

【図6】固相でのPCE-SCアッセイの追加の実現例を図式的に示す。単一標識で標識されたSOはその3'末端を通じて固相基質上に固定化される。SOは5'ヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼ又は切断酵素によって切断される。

30

【図7】POに対する上流プライマーを使用するPCE-SCアッセイを通じてNeisseria gonorrhoeae遺伝子を検出した結果である。SOはレポーター分子及びクエンチャー分子を含み、5'ヌクレアーゼによって切断される。

【図8】POに対する上流プライマー及びSOに対する上流オリゴヌクレオチドを使用するPCE-SCアッセイを通じてNeisseria gonorrhoeae遺伝子を検出した結果である。SOはレポーター分子及びクエンチャー分子を含む。

【図9】PTOに対する上流プライマーを使用せずにPCE-SCアッセイを通じてNeisseria gonorrhoeae遺伝子を検出した結果である。SOに対する上流オリゴヌクレオチドが使用される。SOはレポーター分子及びクエンチャー分子を含む。

40

【図10】PTOに対する上流及び下流プライマー対を使用するPCE-SCアッセイを通じてNeisseria gonorrhoeae遺伝子を検出した結果である。SOに対する上流オリゴヌクレオチドが使用される。SOはレポーター分子及びクエンチャー分子を含む。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明は、PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)の切断と伸長及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断反応を含むプローブハイブリダイゼーションによって発生する連続的なイベントを用い、よって、本発明は、「PTO切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断(PT

50

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 S i g n a l i n g O l i g o n u c l e o t i d e C l e a v a g e : P C E - S C ) ア ッ セ イ」と命名される。

【0024】

本発明のPCE - SCアッセイをそれぞれのステップ別に詳細に説明すれば、次のとおりである：

【0025】

ステップ ( a ) : ターゲット核酸配列と上流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PTOとのハイブリダイゼーション

本発明によれば、まず、ターゲット核酸配列を上流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PTO ( 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 ) とハイブリダイゼーションさせる。

10

【0026】

本明細書において使用される用語「ターゲット核酸」、「ターゲット核酸配列」又は「ターゲット配列」とは、検出しようとする核酸配列を意味し、ハイブリダイゼーション、アニーリング又は増幅条件下でプライマー又はプローブとアニーリング又はハイブリダイゼーションされる。

【0027】

本明細書において使用される用語「プローブ ( p r o b e ) 」は、ターゲット核酸配列に実質的に相補的な部位又は部位等を含む一本鎖の核酸分子である。

20

【0028】

本明細書において使用される用語「プライマー ( p r i m e r ) 」とは、オリゴヌクレオチドを意味するものであって、核酸鎖 ( 鋳型 ) に相補的なプライマー伸長産物の合成が誘導される条件、すなわち、ヌクレオチドとDNAポリメラーゼのような重合剤の存在、そして好適な温度とpHの条件で合成の開始点として作用することができる。

【0029】

特定の実現例において、プローブ及びプライマーは、一本鎖のデオキシリボヌクレオチド分子である。本発明において用いられるプローブ又はプライマーは、天然 ( n a t u r a l l y o c c u r r i n g ) d N M P ( すなわち、d A M P、d G M P、d C M P 及び d T M P )、修飾ヌクレオチド又は非天然ヌクレオチドを含むことができる。また、プローブ又はプライマーは、リボヌクレオチドも含むことができる。

30

【0030】

プライマーは重合剤の存在下で伸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長くなければならない。プライマーの好適な長さは、例えば、温度、応用分野及びプライマーのソース ( s o u r c e ) を含んだ複数の要素によって決定される。本明細書において使用される用語「アニーリング」又は「プライミング」とは、鋳型核酸にオリゴデオキシヌクレオチド又は核酸が並置 ( a p p o s i t i o n ) されることを意味し、上記並置は、ポリメラーゼがヌクレオチドを重合させて鋳型核酸又はその一部分に相補的な核酸分子を形成させる。

【0031】

本明細書において使用される用語「ハイブリダイゼーション ( h y b r i d i z i n g ) 」とは、相補的な一本鎖の核酸が二本鎖の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、2本の核酸鎖間の相補性が完全な場合 ( p e r f e c t m a t c h ) に起こるか、又は一部のミスマッチ ( m i s m a t c h ) 塩基が存在しても起こることができる。ハイブリダイゼーションに必要な相補性の程度は、ハイブリダイゼーションの条件によって変わることができ、特に温度によって調節されることができる。

40

【0032】

上流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は、最適化の手順によって通常決定される好適なハイブリダイゼーション条件下で行われることができる。温度、成分の濃度、ハイブリダイゼーション及び洗浄回数、緩衝液の成

50

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（上流オリゴヌクレオチド及びPTO）の長さ及びGC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得る。例えば、相対的に短いオリゴヌクレオチドを用いる場合、低い厳しい条件（stringent condition）を選択することが好ましい。ハイブリダイゼーションのための詳細な条件は、Joseph Sambrookなど、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)から確認

10

## 【0033】

用語「アニーリング」と「ハイブリダイゼーション」とは違いがなく、本明細書において混用される。

## 【0034】

上流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ゼーションヌクレオチド配列を含む。本明細書において使用される用語「相補的」とは、所定のアニーリング又は厳しい条件の下でプライマー又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ゼーションする程度に十分に相補的であることを意味し、「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。

20

## 【0035】

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。CTO（Capturing and Templating Oligonucleotide）のテンプレティング部位はPTOの5'タグging部位及び3'ターゲットング部位に非相補的なヌクレオチド配列を含む。本明細書において使用される用語「非相補的」とは、所定のアニーリング条件又は厳しい条件の下でプライマー又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ゼーションされない程度に十分に非相補的であることを意味し、「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。

30

## 【0036】

例えば、PTOの5'タグging部位を言及しながら使用される用語「非相補的」とは、所定のアニーリング条件又は厳しい条件の下で上記5'タグging部位がターゲット核酸配列に選択的にハイブリダイゼーションされない程度に十分に非相補的であることを意味し、「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。

40

## 【0037】

本明細書において使用される用語「プロービングアンドタグgingオリゴヌクレオチド（Probing and Tagging Oligonucleotide: PTO）」とは、(i)プローブとしての役割をする3'ターゲットング部位；及び(ii)ターゲット核酸配列とのハイブリダイゼーション後に切断されてPTOから放出され、ターゲット核酸配列に非相補的なヌクレオチド配列を持つ5'タグging部位を含むオリゴヌクレオチドを意味する。上記PTOの5'タグging部位及び3'ターゲットング部位は、必ず5' 3'の順序で位置する。図1にPTOを図示的に示す。

## 【0038】

50

ー実現例において、3'ターゲッティ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、5'タグging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ない厳しい条件の下でステップ(a)のハイブリダイゼーションが行われる。

【0039】

P T Oは特定の長さを要求しない。例えば、P T O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、又は35~50ヌクレオチドの長さを持つことができる。P T Oの3'ターゲッティング部位はターゲット核酸配列に特異的にハイブリダイゼーションされる限り、いずれの長さであってもよい。例えば、P T O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ヌクレオチド又は20~30ヌクレオチドの長さを持つことができる。5'タグging部位は、C T Oのテンプレティング部位に特異的にハイブリダイゼーションされた後に伸長される限り、いずれの長さであってもよい。例えば、P T Oの5'タグging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ヌクレオチド又は15~20ヌクレオチドの長さを持つことができる。

【0040】

P T Oの3'末端は3'-OHターミナル(terminal)を持つこともできる。特定の実現例において、P T Oの3'末端は「ブロッキング」されてその伸長が防止される。

【0041】

ブロッキングは、従来の方法によって達成されることができる。例えば、ブロッキングは、最後のヌクレオチドの3'-ヒドロキシル基にビオチン、標識、リン酸基、アルキル基、非ヌクレオチドリinker、ホスホロチオエート又はアルカンジオール残基のような化学的部分(moiety)を追加して行うことができる。または、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又はジ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行うことができる。

【0042】

または、P T Oはヘアピン構造を持つようにデザインされることができる。

【0043】

上記P T Oの5'タグging部位とターゲット核酸配列との非ハイブリダイゼーションとは、特定のハイブリダイゼーション条件下でそれら間で安定した二本鎖が形成されないことを意味する。本発明の一実現例によれば、ターゲット核酸配列とのハイブリダイゼーションに参与しない上記P T Oの5'タグging部位は一本鎖を形成する。

【0044】

上流オリゴヌクレオチドは、P T Oの上流に位置する。

【0045】

また、ターゲット核酸配列にハイブリダイゼーションされた上流オリゴヌクレオチド又はその伸長鎖は、5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素によるP T Oの切断を誘導する。

【0046】

上流オリゴヌクレオチドによるP T O切断の誘導は、2つの方式で達成されることができる：(i)上流オリゴヌクレオチド伸長独立的な切断の誘導；及び(ii)上流オリゴ

10

20

30

40

50

ヌクレオチド伸長依存的な切断の誘導。

【0047】

上流オリゴヌクレオチドが5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素によって上記PTOの切断を誘導するのに十分な程度にPTOに近接して位置する場合、上流オリゴヌクレオチドに結合した上記酵素は伸長反応がなくてもPTOを切断する。一方、上流オリゴヌクレオチドがPTOから離隔している場合、ポリメラーゼ活性を持つ酵素（例えば、鋳型依存的なポリメラーゼ）は、上流オリゴヌクレオチド（例えば、上流プライマー）の伸長を促進させ、伸長産物に結合された5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素はPTOを切断する。

【0048】

したがって、上流オリゴヌクレオチドは2つの方式でPTOに対して相対的に位置することができる。上流オリゴヌクレオチドは、伸長独立的な方式でPTOの切断を誘導するのに十分な程度にPTOに近接した位置に位置することができる。または、上流オリゴヌクレオチドは、伸長依存的な方式でPTOの切断を誘導するのに十分な程度にPTOから離隔した位置に位置することができる。

10

【0049】

本明細書において地点（positions）又は位置（locations）を言及しながら使用される用語「近接（adjacent）」とは、上流オリゴヌクレオチドがPTOの3'ターゲッティング部位のすぐ近くに位置して切れ目（nick）を形成することを意味する。また、上記用語は、上流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ヌクレオチド又は1~15ヌクレオチド

20

離隔して位置することを意味する。

【0050】

本明細書において地点又は位置を言及しながら使用される用語「離隔（distant）」とは、伸長反応が起こるのに十分な程度のある位置又は場所を含む。

【0051】

本発明の一実現例によれば、上流オリゴヌクレオチドは、伸長依存的な方式でPTOの切断を誘導するのに十分な程度にPTOから離隔して位置することができる。

【0052】

本発明の一実現例によれば、上流オリゴヌクレオチドは、上流プライマー又は上流プローブである。上流プライマーは伸長独立的な切断の誘導又は伸長依存的な切断に適しており、上流プローブは伸長独立的な切断の誘導に適している。

30

【0053】

または、上流オリゴヌクレオチドは、PTOの3'ターゲッティング部位の5'の一部と部分的に重なる配列（partial-overlapped sequence）を持つことができる。特定の実現例において、重なる配列は1~10ヌクレオチド、1~5ヌクレオチド、又は1~3ヌクレオチドの長さである。上流オリゴヌクレオチドがPTOの3'ターゲッティング部位の5'の一部と部分的に重なる配列（partial-overlapped sequence）を持つ場合、ステップ（b）の切断反応で3'ターゲッティング部位は5'ターゲッティング部位とともに部分的に切断される。また、重なる配列は3'ターゲッティング部位のうち所望の特定位置が切断されるようにする。

40

【0054】

本発明の一実現例によれば、上流プライマーはその伸長鎖を通じて5'ヌクレアーゼ活性を持つ上記酵素による上記PTOの切断を誘導する。

【0055】

上流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ゼーションされたPTOの切断を誘導して、PTOの5'ターゲッティング部位又はPTOの5'ターゲッティング部位の一部を含む断片が放出される限り、上流オリゴヌクレオチドによる切断反応に係る従来技術は、本発明に適用されることができる。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号は本発明に応用することがで

50

きる。

【0056】

本発明の一実現例によれば、上記方法は、下流プライマーの存在下で行う。下流プライマーは、PTOにハイブリダイゼーションされるターゲット核酸配列を追加で生成させ、ターゲット検出の感度を向上する。

【0057】

本発明の一実現例によれば、上流プライマー及び下流プライマーを使用する場合、上記プライマーの伸長のために鋳型依存的な核酸ポリメラーゼをさらに使用する。

【0058】

本発明の一実現例によれば、上流オリゴヌクレオチド（上流プライマー又は上流プローブ）、下流プライマー及び/又はPTO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（DPO）構造を有する。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かなり改善したターゲット特異性を示す（参照 WO 2006/095981; Chunなど, Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene, Nucleic Acid Research, 35:6e40(2007)）。

10

【0059】

本発明の好ましい一実現例によれば、PTOの3'ターゲッティング部位は、本発明者によって開発された変形二重特異性オリゴヌクレオチド（mDSO）構造を有する。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かなり改善したターゲット特異性を示す（参照 WO 2011/028041）。

20

【0060】

ステップ（b）：PTO切断からの断片の放出

次に、PTOの切断のための条件下で5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素に上記ステップ（a）の結果物を接触させる。上記ターゲット核酸配列にハイブリダイゼーションされた上記PTOは、5'ヌクレアーゼ活性を持つ上記酵素によって切断されて、上記PTOの5'タギング部位又は5'タギング部位の一部を含む断片を放出する。

【0061】

本明細書において使用される用語「PTOの切断のための条件」とは、5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素によってターゲット核酸配列にハイブリダイゼーションされたPTOの切断が発生するのに十分な条件、例えば、温度、pH、イオン強度、緩衝液、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持つ酵素としてTaq DNAポリメラーゼが用いられる場合、PTOの切断のための条件はTris-HCl緩衝液、KCl、MgCl<sub>2</sub>及び温度を含む。

30

【0062】

PTOがターゲット核酸配列とハイブリダイゼーションされる場合、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参与するが、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に一本鎖を形成する（参照：図2）。このように、一本鎖及び二本鎖の構造をいずれも含むオリゴヌクレオチドは、当業界に知られている多様な技術によって5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素を用いて切断されることができる。

40

【0063】

PTOの切断位置は、上流オリゴヌクレオチド（上流プローブ又は上流プライマー）の種類、上流オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション位置及び切断条件によって多様になる（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号又は米国出願公開番号第2008-0241838号）。

【0064】

50

本発明は、PTOの切断反応のために多数の従来技術を用いることができ、5'タギング部位又は5'タギング部位の一部を含む断片を放出する。

【0065】

総合すれば、ステップ(b)の切断反応で三つの切断位置があり得る。第一の切断位置は、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)と非ハイブリダイゼーション部位(5'タギング部位)との結合位置(junction site)である。第二の切断位置は、PTOの5'タギング部位の3'末端から3'の方向に一部ヌクレオチド離隔した位置である。第二の切断位置は、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ことができる。第三の切断位置は、PTOの5'タギング部位の3'末端から5'の方向に一部ヌクレオチド離隔した位置である。

10

【0066】

本発明の一実現例によれば、上流プライマーが伸長されながら5'ヌクレアーゼ活性を持つ鋳型依存的なポリメラーゼによってPTOの切断が開始される位置は、PTO及びターゲット核酸配列間の二本鎖が開始される地点又はその開始地点から1~3ヌクレオチド離隔した位置である。

【0067】

したがって、本明細書において5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素によるPTOの切断を言及しながら使用される用語「PTOの5'タギング部位又は5'タギング部位の一部を含む断片」は、(i)5'タギング部位、(ii)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(iii)5'タギング部位の一部を含む意味で使用される。また、本明細書において用語「PTOの5'タギング部位又は5'タギング部位の一部を含む断片」は、「PTO断片」と表現される。

20

【0068】

一実現例によれば、PTOは5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素による切断に対して耐性を持つ1つのブロッカーを含むブロッカー部位を持ち、上記ブロッカー部位は初期切断位置及び/又は連続的な切断を調節するのに用いられる。

【0069】

一実現例によれば、PTOはブロッカー(blocker)として5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素による切断に対して耐性を持つ少なくとも1個のヌクレオチドを含むブロッカー部位を持つ。

30

【0070】

例えば、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)と非ハイブリダイゼーション部位(5'タギング部位)との結合位置(junction site)で切断を誘導するために、PTO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ることができる。

【0071】

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又は3~6のブロッカーを含む。ブローブに存在するブロッカーは連続的又は不連続的な方式で存在することができ、好ましくは連続的な方式である。ブロッカーとしてのヌクレオチド、すなわち5' 3'エキソヌクレアーゼ活性に対して耐性を持つ骨格を含むヌクレオチドは、当業界に知られているいずれのものも含む。例えば、上記ヌクレオチドは、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'-炭水化物修飾を含む。本発明の一実現例によれば、5' 3'エキソヌクレアーゼに対して耐性を持つ骨格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、ヒ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、ホスホロセレート結合、2'-O-アミノプロピル修飾、2'-O-アルキル修飾、2'-O-アリル修飾、2'-O-ブチル修飾、-アノメリックオリゴデオキシヌクレオチド及び1-(4'-チオ-D-リボフラノシル)修飾である。

40

50

## 【0072】

－実現例によれば、ブロッカーとしてヌクレオチドはLNA (locked nucleic acid) を含む。

## 【0073】

本明細書においてPTOの5'タグging部位の一部、PTOの3'ターゲッティング部位の5'末端の一部及びCTOのキャプチャリング部位の5'末端の一部のように、PTO又はCTOを言及しながら使用される用語「一部(part)」とは、1~40、1~30、1~20、1~15、1~10又は1~5ヌクレオチドで構成されたヌクレオチド配列を意味し、好ましくは1、2、3又は4ヌクレオチドである。

## 【0074】

－実現例によれば、5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素は5'ヌクレアーゼ活性を持つDNAポリメラーゼ又はFENヌクレアーゼであり、好ましくは5'ヌクレアーゼ活性を持つ熱安定性DNAポリメラーゼ又はFENヌクレアーゼである。

## 【0075】

本発明に好適な5'ヌクレアーゼ活性を持つDNAポリメラーゼは、多様なバクテリア種から得た熱安定性DNAポリメラーゼであり、これは*Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *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 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 woesei*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrodictium occultum*, *Aquifex pyrophilus*及び*Aquifex aeolicus*を含む。特定の実現例において、熱安定性DNAポリメラーゼはTaqポリメラーゼである。

## 【0076】

または、本発明は、ポリメラーゼ活性が減少するように変形された、5'ヌクレアーゼ活性を持つDNAポリメラーゼを使用することができる。

## 【0077】

使用されるFEN (flap endonuclease)ヌクレアーゼは、5'フラップ特異的なヌクレアーゼ (5' flap-specific nuclease) である。

## 【0078】

本発明に好適なFENヌクレアーゼは多様なバクテリア種から得たFENヌクレアーゼを含み、これは*Sulfolobus solfataricus*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Thermococcus litoralis*, *Archaeoglobus veneficus*, *Archaeoglobus profundus*, *Acidianus brierlyi*, *Acidianus ambivalens*, *Desulfurococcus amylolyticus*, *Desulfurococcus mobilis*, *Pyrodictium*

10

20

30

40

50

brockii, Thermococcus gorgonarius, Thermococcus zilligii, Methanopyrus kandleri, Methanococcus igneus, Pyrococcus horikoshii, Aeropyrum pernix 及び Archaeoglobus veneficus を含む。

【0079】

ステップ(a)で上流プライマーを用いる場合、PTOの切断のための条件は上流プライマーの伸長反応を含むことができる。

【0080】

一実現例によれば、ステップ(a)で上流プライマーを用い、上記上流プライマーの伸長のために鑄型依存的なポリメラーゼを用い、上記鑄型依存的なポリメラーゼは5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素と同一の酵素である。

10

【0081】

または、ステップ(a)で上流プライマーを用い、上記上流プライマーの伸長のために鑄型依存的なポリメラーゼを用い、上記鑄型依存的なポリメラーゼは5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素と異なる酵素である。

【0082】

ステップ(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

PTOから放出された断片は、CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)とハイブリダイゼーションされる。

20

【0083】

CTOは3' 5'の方向に、(i)PTOの5'タグging部位又は5'タグging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'タグging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む。

【0084】

CTOは、PTOから放出された断片の伸長のための鑄型の役割をする。プライマーとしての役割をする上記断片はCTOにハイブリダイゼーションされ、伸長されて二重体を形成する。

【0085】

30

テンプレティング部位がPTOの5'タグging部位及び3'ターゲッティング部位に非相補的な配列を持つ限り、いずれの配列でも含むことができる。また、テンプレティング部位がPTOから放出された断片の伸長のための鑄型の役割ができる限り、いずれの配列でも含むことができる。

【0086】

上述したように、PTOの5'タグging部位を持つ断片が放出される場合、CTOのキャプチャリング部位は5'タグging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ることができる。5'タグging部位及び3'ターゲッティング部位の5'末端の一部を持つ断片が放出される場合、CTOのキャプチャリング部位は5'タグging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ることができる。PTOの5'タグging部位の一部を持つ断片が放出される場合、CTOのキャプチャリング部位は5'タグging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ることができる。

40

【0087】

一方、PTOの切断位置を予想することでCTO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、CTOのキャプチャリング部位が5'タグging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'タグging部位の一部を持つ断片又は5'タグging部位を持つ断片はキャプチャリング部位とハイブリダイゼーションされることができ、その後、伸長される。5'タグging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、上記断片は5'タグging部位に相補的なヌク

50

レオチド配列を含むようにデザインされたCTOのキャプチャリング部位にハイブリダイゼーションされることができ、上記断片の3'末端部位にミスマッチヌクレオチドが存在するにもかかわらず、成功的に伸長されることができる。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)を含むにもかかわらず、プライマーが反応条件によって伸長されることができるからだ。

**【0088】**

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、CTOのキャプチャリング部位の5'末端の一部は上記切断された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持つようにデザインすることで、ミスマッチヌクレオチドに係る問題を解決することができる。

10

**【0089】**

一実現例において、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CTO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、PTOの3'ターゲッティング部位上の予想される切断位置によって選択されることができる。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CTO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ヌクレオチド又は1~3ヌクレオチドの長さを持つことができる。

**【0090】**

CTOの3'末端は断片とのハイブリダイゼーションに含まれない追加のヌクレオチドを含むことができる。また、CTOが上記断片と安定してハイブリダイゼーションされる限り、CTOのキャプチャリング部位は上記断片の一部(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むことができる。

20

**【0091】**

本明細書において使用される用語「5'タギング部位又は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」は、上述したようにCTOのキャプチャリング部位の多様なデザイン及び構成を含んで説明する。

**【0092】**

CTOは、ヘアピン構造を持つようにデザインされることができる。

**【0093】**

CTOの長さは多様であってもよい。例えば、CTOは、7~1000ヌクレオチド、7~500ヌクレオチド、7~300ヌクレオチド、7~100ヌクレオチド、7~80ヌクレオチド、7~60ヌクレオチド、7~40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ヌクレオチド又は30~40ヌクレオチドの長さである。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ゼーションされる限り、いずれの長さであってもよい。例えば、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ヌクレオチド又は15~20ヌクレオチドの長さを持つことができる。また、CTOのテンプレティング部位は、PTOから放出された断片の伸長反応で鑄型の役割ができる限り、いずれの長さであってもよい。例えば、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、1~20ヌクレオチド、2~900

30

40

50

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ヌクレオチド又は15～20ヌクレオチドの長さを持つことができる。

【0094】

CTOの3'末端は3'-OHターミナルを持つことができる。特定の実現例において、CTOの3'末端はそれの伸長が防止されるようにブロッキングされる。CTOの非伸長ブロッキングは、従来の方法によって達成されることができる。例えば、ブロッキングは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、リン酸基、アルキル基、非ヌクレオチドリinker、ホスホロチオエート又はアルカンジオール残基のような化学的部分(moiety)を追加して行うことができる。または、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又はジ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行うことができる。

10

【0095】

PTOから放出された断片はCTOとハイブリダイゼーションされ、断片の伸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ゼーションされても、PTOの3'ターゲット部位はCTOにハイブリダイゼーションされず、伸長二重体の形成が防止される。

20

【0096】

ステップ(c)でのハイブリダイゼーションは、ステップ(a)でのハイブリダイゼーションに関する説明を参照して詳細に説明されることができる。

【0097】

ステップ(d)：断片の伸長

鋳型依存的な核酸ポリメラーゼ及びステップ(c)の結果物を用いて伸長反応を行う。CTOのキャプチャリング部位にハイブリダイゼーションされた断片は伸長され、CTOのテンプレティング部位に相補的な伸長配列を含む伸長鎖を形成し、これによって伸長二重体が形成される。一方、CTOのキャプチャリング部位にハイブリダイゼーションされた非切断PTOは伸長されず、これによって伸長二重体も形成されない。

30

【0098】

本明細書において使用される用語「伸長二重体」とは、CTOのキャプチャリング部位にハイブリダイゼーションされた断片が鋳型依存的な核酸ポリメラーゼとCTOのテンプレティング部位を鋳型として用いて伸長される伸長反応によって形成された二重体を意味する。

【0099】

本明細書において用語断片を言及しながら使用される用語「伸長鎖(extended strand)」とは、断片とこれの伸長配列を含む配列を意味する。

40

【0100】

本明細書において用語断片を言及しながら使用される用語「伸長配列(extended sequence)」とは、伸長鎖で断片を除いた新しく伸長された配列のみを意味する。

【0101】

ステップ(d)で用いられる鋳型依存的な核酸ポリメラーゼはいずれの核酸ポリメラーゼも含まれ、たとえば、E. coli DNAポリメラーゼIの「クレノウ」断片、熱安定性DNAポリメラーゼ及びバクテリオファージT7 DNAポリメラーゼを含む。好ましくは、ポリメラーゼは多様なバクテリア種から得ることができる熱安定性DNAポリメラーゼであり、これはThermus aquaticus(Taq), Therm

50

us thermophilus (Tth), Thermus filiformis, Thermus flavus, Thermococcus litoralis, Thermus antranikianii, Thermus caldophilus, Thermus chliarophilus, Thermus flavus, Thermus igniterrae, Thermus lacteus, Thermus oshimai, Thermus ruber, Thermus rubens, Thermus scotoductus, Thermus silvanus, Thermus species Z05, Thermus species sps 17, Thermus thermophilus, Thermotoga maritima, Thermotoga neapolitana  
 及び Thermosiphon africanus, Thermococcus litoralis, Thermococcus barossi, Thermococcus gorgonarius, Thermotoga maritima, Thermotoga neapolitana, Thermosiphon africanus, Pyrococcus furiosus (Pfu), Pyrococcus woesei, Pyrococcus horikoshii, Pyrococcus abyssi, Pyrodictium occultum, Aquifex pyrophilus and Aquifex aeolicusを含む。特に、鋳型依存的な核酸ポリメラーゼはTaqポリメラーゼである。

10

## 【0102】

20

本発明の一実施例によれば、ステップ(b)で用いられる5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素と、ステップ(d)の鋳型依存的な核酸ポリメラーゼとは同一の酵素である。より好ましくは、ステップ(b)で用いられる5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素、上流プライマーを伸長するための鋳型依存的な核酸ポリメラーゼ及びステップ(d)の鋳型依存的な核酸ポリメラーゼは同一の酵素である。

## 【0103】

ステップ(e)：伸長鎖とSOとのハイブリダイゼーション

上記伸長反応に続き、上記伸長鎖とSO(Signaling Oligonucleotide)とをハイブリダイゼーションさせて伸長鎖/SOハイブリッドを生成させる。

30

## 【0104】

上記伸長鎖とハイブリダイゼーションされる上記SOは、上記伸長鎖に相補的なハイブリダイゼーションヌクレオチド配列及び少なくとも1つの標識を含む。

## 【0105】

本明細書において用語SOを言及しながら使用される用語「伸長鎖に相補的なハイブリダイゼーションヌクレオチド配列」とは、特定の厳しい条件の下で上記伸長鎖と二本鎖を形成して伸長鎖とともにハイブリッドを形成することができる配列を意味する。

## 【0106】

一実施例によれば、上記SOは、その全体又は一部の配列に上記伸長配列にハイブリダイゼーション可能な配列を含むことができる。

40

## 【0107】

本明細書において用語SOを言及しながら使用される用語「伸長配列にハイブリダイゼーション可能な配列」とは、SO配列のうち上記伸長配列と二本鎖を形成するのに関与する特定の配列を意味する。

## 【0108】

例えば、上記SOは、その配列全体的に上記伸長配列にハイブリダイゼーション可能な配列を含むことができる。または、上記ステップ(e)で上記SOが上記伸長鎖と二本鎖を形成することができる限り、上記SOの一部は上記伸長配列に相補的な配列を含むことができ(すなわち、上記部位は上記伸長配列にハイブリダイゼーション可能な配列である)、他の部位は上記PTO断片に相補的な配列を含むことができる。

50

## 【 0 1 0 9 】

特に、上記S Oは、その配列全体的に上記伸長配列にハイブリダイゼーション可能な配列を含むことができる。

## 【 0 1 1 0 】

上記伸長鎖で上記P T O断片に該当する部位にのみ相補的な配列を含むS Oが使用される場合、核酸分解酵素に対する切断位置はそのハイブリダイゼーションによって提供され、非切断P T Oの5' タグging部位とS Oとのハイブリッドは切断されて非ターゲットシグナルを生成することができる。しかし、上記S Oが上記伸長反応で新しく合成された上記伸長配列にハイブリダイゼーション可能な配列を含むようにデザインされる場合、非ターゲットシグナルを排除させることができる。例えば、核酸分解酵素に対する切断位置は、上記S Oの少なくとも一位置が上記S O / 伸長鎖ハイブリッドで新しく合成された上記伸長配列にハイブリダイゼーションされるときにのみ提供されるようにデザインされることができる。上記の場合において、上記S Oが非切断P T Oにハイブリダイゼーションされる場合、核酸分解酵素に対する切断位置は提供されないこともある。

10

## 【 0 1 1 1 】

特定の実現例において、上記S Oの配列は非切断P T Oとハイブリッドを形成しないように選択される。例えば、上記S Oと非切断P T Oの上記5' タグging部位との間の相補性は、90%、70%、50%、30%又は20%以下であってもよく、上記伸長鎖 / S Oハイブリッドの形成に対するハイブリダイゼーション条件に依存的に変わることができる。

20

## 【 0 1 1 2 】

S Oの長さはいずれの長さであってもよい。例えば、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ヌクレオチド又は20 ~ 30ヌクレオチドの長さを持つことができる。

## 【 0 1 1 3 】

S Oはヘアピン構造を持つことができる。特定の実現例において、S Oは伸長されないようにその3' 末端がブロックされている。または、ブロックされていない3' - O H基を持つS Oは伸長されることができる。

30

## 【 0 1 1 4 】

本発明の一実現例において、上記S Oはその5' 方向に上記伸長鎖に非相補的な配列を持つ5' タグging部位を含む5' 末端がタグgingされたS O (5' - t a g g e d S O) である。上記伸長鎖に非相補的な配列を持つ上記部位 (5' タグging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ヌクレオチド又は15 ~ 20ヌクレオチドの長さを持つことができる。

40

## 【 0 1 1 5 】

特定の実現例において、上記ステップ ( e ) のハイブリダイゼーションは、上記S Oの上流に位置した上流オリゴヌクレオチドの存在下で行われる。上記上流オリゴヌクレオチドは上記伸長鎖に相補的な配列を含み、上記S Oの上流で上記伸長鎖とハイブリダイゼーションされる。他の一実現例において、上記上流オリゴヌクレオチドは、上流プライマー又は上流プローブである。

## 【 0 1 1 6 】

上記伸長鎖と上記S Oとのハイブリダイゼーションは5' ヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼ又は制限酵素のような核酸分解酵素に対する切断位置を生成させる。上記S O上で上

50

記切断位置は、上記伸長鎖 / S Oハイブリッドが形成されるときにのみ生成される。

【 0 1 1 7 】

一実現例において、上記ステップ ( e ) で上記伸長鎖 / S Oハイブリッドの形成は、5'ヌクレアーゼに対する切断位置を生成させる。上記S O上で上記切断位置は上記伸長鎖 / S Oハイブリッドが形成されるときにのみ生成され、上記伸長鎖 / S OハイブリッドのS Oは、5'ヌクレアーゼによって5' 3'方向に切断される。

【 0 1 1 8 】

一実現例において、上記S OはRNA配列を含み、上記ステップ ( e ) で上記伸長鎖 / S Oハイブリッドの形成は、DNA - RNAハイブリダイゼーション二重体及びリボヌクレアーゼに対する切断位置を生成させる。

10

【 0 1 1 9 】

一実現例において、上記S Oは上記切断酵素によって認識される配列を含み、上記ステップ ( e ) で上記伸長鎖 / S Oハイブリッドの形成は、上記制限酵素に対する切断位置を生成させる。

【 0 1 2 0 】

特定の実現例において、上記ステップ ( e ) で上記伸長鎖 / S Oハイブリッドの形成は、DNA二重体、RNA二重体又はDNA - RNAハイブリダイゼーション二重体を切断することができる核酸分解酵素に対する切断位置を生成させる。

【 0 1 2 1 】

上記P T O断片の上記伸長鎖及び / 又は上記S Oは、核酸分解酵素に対する切断位置が所望の類型で導入されるようにデザインされることができる。

20

【 0 1 2 2 】

DNA二重体上で作用する核酸分解酵素 (例えば、5'ヌクレアーゼ及び制限酵素) に対する切断位置を生成させる場合、それぞれDNA分子で構成された上記P T O断片の伸長鎖及び上記S Oが使用される。DNA分子で構成された上記P T O断片の伸長鎖は、DNA分子で構成された上記S Oとハイブリダイゼーションされて、DNA二重体上で作用する核酸分解酵素 (例えば、5'ヌクレアーゼ及び制限酵素) に対する切断位置を生成する。

【 0 1 2 3 】

本発明において制限酵素を使用する場合、上記P T O断片の伸長鎖及び上記S Oは、上記制限酵素によって認識される配列を含む。上記制限酵素に対する切断位置を持つ上記伸長鎖 / S Oハイブリッドは上記制限酵素によって切断されて、切断された断片を生成し、これはターゲット核酸配列の存在を示す。

30

【 0 1 2 4 】

DNA - RNAハイブリダイゼーション二重体上で作用する核酸分解酵素 (例えば、RNase H) に対する切断位置を生成させる場合、特にDNA分子で構成された上記P T O断片の伸長鎖及びRNA分子で構成された上記S Oが使用される。一実現例において、上記S Oは1 ~ 10リボヌクレオチドを含む。

【 0 1 2 5 】

DNA分子で構成された上記P T O断片の伸長鎖は、RNA分子で構成された上記S Oとハイブリダイゼーションされて、DNA - RNAハイブリダイゼーション二重体上で作用する核酸分解酵素 (例えば、RNase H) に対する切断位置を生成する。

40

【 0 1 2 6 】

一実現例において、本発明の方法は、上記ステップ ( d ) と ( e ) との間に変性ステップをさらに含む。

【 0 1 2 7 】

上記伸長鎖と上記C T Oとの伸長二重体の生成は、上記S Oと上記伸長鎖との低いハイブリダイゼーション効率の原因になることができる。本発明において上記伸長鎖量の増加は、上記伸長鎖と上記S Oとのハイブリダイゼーションだけでなく、連続的な切断反応の発生可能性を増加させることができる。

50

## 【0128】

一実現例によれば、上記PTOの量は上記CTOの量より多く（例えば、1.0以上のCTOに対するPTOのモル比）、上記ステップ(a)～(f)は繰り返しサイクルの間に変性過程を含んで繰り返される。このような場合、上記伸長鎖の数は増加するのに対し、上記CTOの数は一定である。よって、上記CTOとハイブリダイゼーションされない自由伸長鎖は、上記伸長鎖と上記CTOとで伸長二重体を形成するようにする条件の下でも存在することができる。上記SOは、上記CTOに妨げられず上記自由伸長鎖と効果的にハイブリダイゼーションされることができる。

## 【0129】

上記SOは、上記伸長鎖/SOハイブリッドの切断反応の発生（すなわち、ターゲット核酸配列の存在）を示すシグナルを提供することができる少なくとも1つの標識で標識される。

10

## 【0130】

ステップ(f)：伸長鎖/SOハイブリッドの切断

上記伸長鎖/SOハイブリッドのSOは核酸分解酵素を使用して切断されて、上記SOの切断された断片を生成する。本明細書において上記ステップ(b)の切断反応は第1の切断反応と呼び、上記ステップ(f)の切断反応は第2の切断反応と呼ぶ。

## 【0131】

上記ステップ(e)のハイブリダイゼーションによって生成された上記伸長鎖/SOハイブリッドに核酸分解酵素に対する作用位置が生成されるため、上記第2の切断反応が起こることができる。

20

## 【0132】

本発明の一実現例において、上記伸長鎖/SOハイブリッドのSOの切断された断片は一本鎖又は二本鎖であってもよく、上記切断は少なくとも2個の断片を生成することができる。例えば、制限酵素による上記伸長鎖/SOハイブリッドのSOの切断は二本鎖状態の2つの切断された断片を生成し、上記二本鎖の断片は反応条件によって一本鎖の形態に解離されることができる。5'ヌクレアーゼを用いた切断反応で一本鎖の断片が生成されることができる。

## 【0133】

上記第2の切断反応に使用される核酸分解酵素は、当業界に知られているいずれの酵素も含まれることができる。

30

## 【0134】

特定の実現例において、上記第2の切断反応に使用される核酸分解酵素は5'ヌクレアーゼ、制限酵素及びリボヌクレアーゼを含み、特に、熱安定性5'ヌクレアーゼ、制限酵素及びリボヌクレアーゼを含む。

## 【0135】

他の実現例において、上記第2の切断反応に使用される核酸分解酵素は、二重体分子上で特異的に作用する核酸分解酵素を含む。

## 【0136】

特定の実現例において、上記核酸分解酵素は5'ヌクレアーゼであり、上記ステップ(e)で上記伸長鎖/SOハイブリッドの形成は上記5'ヌクレアーゼに対する切断位置を生成し、それによって上記伸長鎖/SOハイブリッドのSOは5' 3'の方向に5'ヌクレアーゼによって切断される。特に、上記5'ヌクレアーゼは、鋳型依存的なDNAポリメラーゼ又は5'ヌクレアーゼ活性を持つFENヌクレアーゼである。

40

## 【0137】

核酸分解酵素のうち、上記5'ヌクレアーゼは5' 3'方向にDNA二重体を切断する。特定の実現例において、上記5'ヌクレアーゼは5' 3'エキソヌクレアーゼ活性、5' 3'エンドヌクレアーゼ活性又は両方の活性を持つ。図2及び図5に示すように、上記ターゲット核酸配列とハイブリダイゼーションされたPTOの切断によって生成されたPTO断片は上記CTOとハイブリダイゼーションされ、その後伸長されて伸長鎖

50

を生成し、上記S Oは上記伸長鎖とハイブリダイゼーションされて上記伸長鎖/S Oハイブリッドを生成する。上記伸長鎖/S OハイブリッドのS Oの5'末端部位は5'ヌクレアーゼによって切断されて、ターゲット核酸配列の存在を示す切断された断片を生成する。

【0138】

5'ヌクレアーゼ活性を持つ鋳型依存的なDNAポリメラーゼは5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を持ち、一部のポリメラーゼでは5' 3'エンドヌクレアーゼ活性も持つ。

【0139】

5'ヌクレアーゼ活性を持つ鋳型依存的なDNAポリメラーゼは、上記ステップ(b)で上流オリゴヌクレオチド依存的な切断反応を誘導することができる(参照:USP 5,210,015)。また、5'ヌクレアーゼ活性を持つ鋳型依存的なDNAポリメラーゼは、上流オリゴヌクレオチド独立的な切断反応を誘導することができる(参照:Lawyerなど、Genome Res. 1993, 2:275-287 and WO 2008/011004)。

10

【0140】

本発明の一実現例において、上記5'ヌクレアーゼは5'ヌクレアーゼ活性を持つ鋳型依存的なDNAポリメラーゼであり、特に熱安定性DNAポリメラーゼである。上記熱安定性DNAポリメラーゼは、上記ステップ(b)での説明を参照して詳しく説明されることができる。好ましくは、上記伸長鎖/S OハイブリッドのS O切断のための5'ヌクレアーゼはTaqポリメラーゼである。

20

【0141】

本発明の一実現例において、上記ステップ(b)の5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素及び上記ステップ(f)の核酸分解酵素は、5'ヌクレアーゼ活性を持つ鋳型依存的なDNAポリメラーゼである。

【0142】

特定の実現例において、上記5'ヌクレアーゼ活性を持つ鋳型依存的なDNAポリメラーゼは、上記ステップ(b)の上流オリゴヌクレオチド独立的な切断反応だけでなく、上記ステップ(e)の上記伸長鎖/S Oハイブリッドを切断する上流オリゴヌクレオチド独立的な切断反応を誘導することができる。

30

【0143】

一実現例によれば、上流オリゴヌクレオチド独立的な5'ヌクレアーゼ活性を持つ鋳型依存的なDNAポリメラーゼによる上記伸長鎖/S Oハイブリッドの切断は、上記伸長鎖/S Oハイブリッドに存在する標識の位置又は標識の連結種類によって影響されることができる。特に、標識が上記伸長鎖/S OハイブリッドのS Oの5'末端に連結された場合、上記標識が特にカーボンスペースャーを通じて上記S Oの5'末端のリン酸基に連結されると、5'ヌクレアーゼ活性を持つ上記鋳型依存的なDNAポリメラーゼによる上記伸長鎖/S Oハイブリッドの切断はより効果的になることができる。上記標識が上記S Oの5'末端塩基に連結されるか、上記カーボンスペースャーが使用されない場合、上記伸長鎖/S Oハイブリッドの切断は発生しないこともある。

40

【0144】

核酸分解酵素のうち上記切断酵素は、上記ステップ(e)で上記伸長鎖/S Oハイブリッドの形成によって生成される制限酵素に対する切断位置を切断する。上記ターゲット核酸配列とハイブリダイゼーションされたPTO切断によって生成された上記PTO断片は、上記CTO(上記制限酵素によって認識される配列を含む)とハイブリダイゼーションされた後、伸長されて上記PTO断片の伸長配列に上記制限酵素の認識配列が導入され、上記制限酵素によって認識される配列を含む上記S Oは上記PTO断片の伸長鎖とハイブリダイゼーションされて、上記制限酵素に対する切断位置を生成する。上記制限酵素は、上記伸長鎖/S Oハイブリッドをエンドヌクレアーゼ的(endonucleolytically)に切断して、上記ターゲット核酸配列の存在を示す上記切断された断片を生

50

成する。

【0145】

一実現例によれば、上記制限酵素は、二重体の特定配列を特異的に認識して切断する制限酵素であり、特に熱安定性制限酵素である。当業界に公知されている多様な制限酵素が使用されることができる。

【0146】

一実現例によれば、上記核酸分解酵素はリボヌクレアーゼであり、上記SOはRNA配列を含み、上記ステップ(e)で上記伸長鎖/SOハイブリッドの形成は、DNA-RNA二重体を形成させて上記リボヌクレアーゼに対する切断位置を生成する。上記リボヌクレアーゼに対する上記切断位置は、上記ステップ(f)でリボヌクレアーゼによって切断されて上記ターゲット核酸配列の存在を示す切断された断片を形成する。

10

【0147】

一実現例によれば、本発明で使用されるリボヌクレアーゼは、RNase H又はExo IIIである。

【0148】

RNase Hは、DNA-RNAハイブリダイゼーション二重体のRNA部位を切断することができるエンドリボヌクレアーゼの1つである。RNase Hが使用される場合、上記SOはRNA分子を含むことができる。上記ターゲット核酸配列とハイブリダイゼーションされるPTOの切断によって生成された上記PTO断片は、上記CTOのキャプチャリング部位とハイブリダイゼーションされた後に伸長され、上記SOは上記PTO断片の伸長鎖とハイブリダイゼーションされる。上記伸長鎖/SOハイブリッドのSOで上記RNA分子はエンドヌクレアーゼ的に切断されて、上記ターゲット核酸配列の存在を示す切断された断片を形成する。

20

【0149】

Exo IIIはRNase活性を持つものと報告されている(Mol CDなど, Nature 374(6520):381386(1995))。Exo IIIが使用される場合、上記ターゲット核酸配列の存在を示す切断された断片は、RNase Hと同じ方式で形成される。

【0150】

上記SOがRNA分子を含む場合、上記SOはRNA分子を全体又は部分的に含む。

30

【0151】

上記ステップ(f)は、上記SOに対する上流オリゴヌクレオチドの存在又は不在下で行われることができる。このような場合、上記SOに対する上流オリゴヌクレオチドは、上流プライマー又は上流プローブである。

【0152】

特定の実現例において、上記ステップ(f)は、上記SOに対する上流オリゴヌクレオチドの存在下で行われる。

【0153】

本発明の一実現例において、上記核酸分解酵素は5'ヌクレアーゼであり、上記ステップ(f)は上記SOの上流に位置する上流オリゴヌクレオチドの存在下で行われ、上記伸長鎖/SOハイブリッドのSOは、上記上流オリゴヌクレオチド又はその伸長鎖に依存的な5'ヌクレアーゼの核酸分解活性によって切断される。

40

【0154】

特定の実現例において、上記核酸分解酵素は熱安定性核酸分解酵素である。

【0155】

図2及び図6は、上記SOに対する上流オリゴヌクレオチドの不在下で行われる本発明の特定の実現例を図式的に示し、図3~5は、上記SOに対する上流オリゴヌクレオチドの存在下で行われる本発明の特定の実現例を示す。

【0156】

一実現例によれば、上記鋳型依存的なDNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性によ

50

る上記伸長鎖 / S O ハイブリッドの上流オリゴヌクレオチド独立的な切断は、上記鋳型依存的な D N A ポリメラーゼの 5 ' ヌクレアーゼ活性による上流オリゴヌクレオチド依存的な切断より低い切断効率を持つことができる。

【 0 1 5 7 】

上記 S O に対する上流オリゴヌクレオチドの細部内容は、ステップ ( a ) で上記 P T O に対する上流オリゴヌクレオチドの内容を参照して記述されることができる。

【 0 1 5 8 】

一実現例において、リボヌクレアーゼ又は制限酵素が核酸分解酵素として使用される場合、上記 S O に対する上流オリゴヌクレオチド (特に、上流プライマー) が使用されることができる。このような場合、5 ' ヌクレアーゼ活性を持たない D N A ポリメラーゼは、単に上記上流プライマーの伸長のために使用されることができる。

10

【 0 1 5 9 】

本発明の一実現例において、上記 S O は、5 ' 方向に上記伸長鎖に非相補的な配列を含む 5 ' タギング部位を含む。このような場合、上記 S O は 5 ' 3 ' の方向に、( i ) 上記伸長鎖に非相補的な配列を含む 5 ' タギング部位、及び ( i i ) 上記伸長鎖に非相補的な配列を含む 3 ' ハイブリダイゼーション部位を含む。

【 0 1 6 0 】

上記 S O の 5 ' タギング部位が上記 C T O (例えば、C T O のキャプチャリング部位) に相補的なヌクレオチド配列を含む場合、5 ' ヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼ又は制限酵素による上記伸長鎖 / S O ハイブリッドの S O 切断は、上記 S O の 5 ' タギング部位又は 5 ' タギング部位の一部を含む断片を放出し、上記 S O から放出された上記断片は、上記 C T O とハイブリダイゼーションされて伸長されることができる。よって、伸長鎖は追加で生成される。

20

【 0 1 6 1 】

本発明の一実現例において、核酸分解酵素 (特に、制限酵素) による上記伸長鎖の生成及び切断は別途の容器で行われる。

【 0 1 6 2 】

ステップ ( g ) : ターゲット核酸配列の存在を示す伸長鎖 / S O ハイブリッドの切断の検出

上記伸長鎖 / S O ハイブリッドの切断反応に続き、上記ターゲット核酸配列の存在を分析するために上記伸長鎖 / S O ハイブリッドの切断反応の発生を検出する。

30

【 0 1 6 3 】

一実現例によれば、上記伸長鎖 / S O ハイブリッドの切断反応発生の検出は、上記 S O に連結された標識から提供されるシグナルを測定することで行う。

【 0 1 6 4 】

本発明で採択されたシグナリングシステムは、上記伸長鎖 / S O ハイブリッドの切断とシグナル生成とを直接関連付けたことに特徴がある。一実現例によれば、本発明で使用されたシグナリングシステムは、上記伸長鎖 / S O ハイブリッドの切断時にシグナルを変化させる。ターゲット核酸配列が存在し、P T O が切断される場合にのみ上記伸長鎖 / S O ハイブリッドの切断が発生するため、本発明は、上記ターゲット核酸配列の存在を示すシグナルを提供する。要求に応じて、本発明はリアルタイム方式で行うことができる。

40

【 0 1 6 5 】

シグナル発生と上記伸長鎖 / S O ハイブリッドの切断とを直接関連付けるために、本発明は、上記 S O に連結された少なくとも 1 つの標識を用いてシグナルを提供する。

【 0 1 6 6 】

特定の実現例において、本発明で使用する上記標識システムは相互作用的な二重標識又は単一標識である。

【 0 1 6 7 】

( i ) 相互作用的な二重標識

相互作用的な標識システムは、ドナー分子及びアクセプター分子間でエネルギーが非放

50

射性 (non-radioactively) で伝達されるシグナル発生システムである。相互作用的な標識システムの代表的な例として、FRET (fluorescence resonance energy transfer) 標識システムは、蛍光レポーター分子 (ドナー分子) 及びクエンチャー分子 (アクセプター分子) を含む。FRET で、エネルギー供与体は蛍光性であるが、エネルギー受容体は蛍光性又は非蛍光性であってもよい。相互作用的な標識システムの他の形態において、エネルギー供与体は非蛍光性、例えば発色団 (chromophore) であり、エネルギー受容体は蛍光性である。相互作用的な標識システムのまた他の形態において、エネルギー供与体は発光性 (luminescent)、例えば、生物発光性、化学発光性又は電気化学発光性であり、受容体は蛍光性である。ドナー分子及びアクセプター分子は、本発明においてそれぞれレポーター分子及びクエンチャー分子と説明されることができる。

10

## 【0168】

本発明の一実現例によれば、伸長鎖 / SO ハイブリッドの切断発生 (すなわち、ターゲット核酸配列の存在) を示すシグナルは相互作用的な標識システムによって発生され、特に FRET 標識システム (すなわち、相互作用的な二重標識システム) によって発生される。

## 【0169】

一実現例によれば、上記 SO はレポーター分子及びクエンチャー分子を含む相互作用的な二重標識を持ち、上記核酸分解酵素に対する切断位置は上記 SO に連結された上記レポーター分子と上記クエンチャー分子との間に位置し、上記伸長鎖 / SO ハイブリッドの上記 SO の切断は、上記レポーター分子と上記クエンチャー分子とを互いに分離させ、上記伸長鎖 / SO ハイブリッドの SO に対する切断反応の発生は、上記標識からのシグナルを測定することで検出する。

20

## 【0170】

特定の実現例において、上記伸長鎖 / SO ハイブリッドの生成の前に上記クエンチャー分子は上記レポーター分子からシグナルをクエンチングできる位置に位置する。

## 【0171】

本発明において上記相互作用的な標識システムは、液相及び固相で用いられる。

## 【0172】

上記相互作用的な標識システムが用いられる場合、上記ステップ (e) で生成される切断位置は、5'ヌクレアーゼ、制限酵素又はリボヌクレアーゼに対する切断位置である。

30

## 【0173】

本発明において相互作用的な二重標識の原理は、図2ないし5に図式的に示す。ターゲット核酸配列とハイブリダイゼーションされた PTO から PTO 断片が放出された後、CTO のキャプチャリング部位にハイブリダイゼーションされ伸長されて、CTO のテンプレティング部位に相補的な伸長配列を含む伸長鎖を形成する。上記 SO は上記伸長鎖とハイブリダイゼーションされ、核酸分解酵素によって切断される。このとき、上記 SO に連結されたレポーター分子とクエンチャー分子とは互いに分離され、クエンチャー分子によるクエンチングが防止されてシグナル変化 (例えば、レポーター分子からシグナル増加) が誘導され、最終的に検出可能なシグナルを提供する。

40

## 【0174】

上記 SO 上で二重標識は、上記伸長鎖と SO とのハイブリダイゼーション時に、クエンチングしない (unquenching) 位置に位置されることができる。連続的な切断反応によって上記 SO 上で上記レポーターとクエンチャーとを互いに分離することは、クエンチングを完全に軽減させることができる。その後、上記標識された断片からシグナルを測定して上記切断反応の発生を検出する。

## 【0175】

上記ターゲット核酸配列の不在時に、上記 PTO は切断されず、上記切断されていない PTO は伸長されないが、上記 CTO のキャプチャリング部位とハイブリダイゼーションされる。このような場合、上記非ハイブリダイゼーション SO に連結された上記レポーター

50

一分子とクエンチャー分子とは互いに隣接して、上記クエンチャー分子が上記レポーター分子からのシグナルをクエンチングできるようにする。

【0176】

上記ターゲット核酸配列は、上述した原理によって検出されることができる。

【0177】

上記伸長鎖/SOハイブリッドの形成の前に、上記クエンチャー分子は上記レポーター分子からシグナルをクエンチングできる位置に位置する。特定の実現例において、上記レポーター分子とクエンチャー分子とは、上記SOの長さによって互いに隣接して位置するか、ランダムコイル及びヘアピン構造のようなSOの形態的構造の形成によって互いに隣接して位置する。

10

【0178】

上記核酸分解酵素(例えば、5'ヌクレアーゼ)は、上記伸長鎖/SOハイブリッドのSOの5'末端部位を切断して上記レポーター分子を放出することができ、それによって上記レポーター分子からシグナル変化を誘導する。上記伸長鎖/SOハイブリッドの切断発生は、上記ターゲット核酸配列の存在決定のための蛍光シグナルを測定することで検出することができる。

【0179】

上記クエンチャー分子が蛍光である場合、上記伸長鎖/SOハイブリッドの切断発生は、上記蛍光クエンチャーからシグナルを測定することで検出することができる。

【0180】

20

一実現例によれば、上記レポーター分子及びクエンチャー分子のうち少なくとも1つは上記SOの5'末端に連結されている。特定の実現例において、上記レポーター分子及びクエンチャー分子のうち1つは上記SOの5'末端に連結されており、他の1つは3'末端に連結されている。

【0181】

一実現例によれば、上記SO上で上記レポーター分子及びクエンチャー分子のうち1つはその5'末端又はその5'末端から1~10ヌクレオチド離隔して位置し、他の1つは上記伸長鎖とSOとのハイブリダイゼーションの前には上記レポーター分子からシグナルをクエンチングするように位置する。

【0182】

30

一実現例によれば、上記SO上で上記レポーター分子及びクエンチャー分子のうち1つはその3'末端又はその3'末端から1~10ヌクレオチド離隔して位置し、他の1つは上記伸長鎖とSOとのハイブリダイゼーションの前には上記レポーター分子からシグナルをクエンチングするように位置する。

【0183】

例えば、上記SO上で上記レポーター分子はその5'末端又はその5'末端から1~5ヌクレオチド離隔して位置することができ、上記クエンチャー分子は上記レポーター分子から5~80ヌクレオチド離隔して位置することができる。

【0184】

一実現例によれば、上記相互作用的な二重標識は上記伸長鎖/SOハイブリッドの形成に先立ってクエンチング現象を維持するのに十分な位置に位置し、上記伸長鎖/SOハイブリッドの切断によってクエンチングしないことを誘導する。

40

【0185】

上記伸長鎖/SOハイブリッドの切断中にリアルタイムシグナル生成を考慮するとき、上記レポーター分子とクエンチャー分子とは互いに80ヌクレオチド以内、60ヌクレオチド以内、30ヌクレオチド以内、25ヌクレオチド以内、20ヌクレオチド以内、15ヌクレオチド以内又は10ヌクレオチド以内で離隔して位置することができる。一実現例によれば、上記レポーター分子とクエンチャー分子とは少なくとも3ヌクレオチド、少なくとも4ヌクレオチド、少なくとも5ヌクレオチド、少なくとも6ヌクレオチド、少なくとも10ヌクレオチド又は少なくとも15ヌクレオチド離隔する。

50

## 【0186】

また、標識（例えば、レポーター分子）を持つ切断された断片が生成されるため、上記伸長鎖／SOハイブリッドの切断発生はより柔軟か便利な条件（例えば、高い厳しい条件又は固相基質上で洗浄後の条件）下で上記切断された断片に連結された標識からシグナルを直接検出することで分析することができる。

## 【0187】

一実現例によれば、上記固定化されたSOに連結された相互作用的な二重標識のうち1つは、上記伸長鎖／SOハイブリッドの切断後に固相基質上に残る。

## 【0188】

一実現例によれば、固相基質上に固定化された上記SOが相互作用的な二重標識を持ち、5'ヌクレアーゼが核酸分解酵素として使用される場合、上記ハイブリッドからSO断片を解離する適当な条件を付与するか上記SOの内部ヌクレオチドに5'ヌクレアーゼ活性に対して耐性（例えば、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性又はその塩基上に標識を持つヌクレオチドに対して耐性を持つ骨格を含むヌクレオチド）を付与することで、上記伸長鎖／SOハイブリッドの切断後に上記相互作用的な二重標識のうち1つは固相基質上に確実に残っていることができる。

## 【0189】

一実現例によれば、5'ヌクレアーゼ活性に対する耐性は5' 3'エキソヌクレアーゼ活性に対して耐性を持つ骨格を含むヌクレオチドによって付与され、上記ヌクレオチドは、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' - 炭水化物修飾を含み、特に、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、アリアルホスホトリエステル結合、アルキルホスホネート結合、アリア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、アリアルホスホロアミダート結合、ホスホロセレナート結合、2' - O - アミノプロピル修飾、2' - O - アルキル修飾、2' - O - アリル修飾、2' - O - プチル修飾、 - アノメリックオリゴデオキシヌクレオチド及び1 - (4' - チオ - - D - リボフラノシル)修飾を含む。

## 【0190】

上記SOが上記伸長鎖に非相補的な5'タグging部位を含む場合、レポーター又はクエンチャー分子は、上記切断位置を考慮して上記5'タグging部位に位置することができる。

## 【0191】

本発明において有用なレポーター分子及びクエンチャー分子は、当業界に知られているいずれの分子でも含むことができる。その例は次のとおりである： Cy2<sup>TM</sup> (506), YO-PRO<sup>TM</sup>-1 (509), YOYO<sup>TM</sup>-1 (509), Calcein (517), FITC (518), FluorX<sup>TM</sup> (519), Alexa<sup>TM</sup> (520), Rhodamine 110 (520), Oregon Green<sup>TM</sup> 500 (522), Oregon Green<sup>TM</sup> 488 (524), RiboGreen<sup>TM</sup> (525), Rhodamine Green<sup>TM</sup> (527), Rhodamine 123 (529), Magnesium Green<sup>TM</sup> (531), Calcium Green<sup>TM</sup> (533), TO-PRO<sup>TM</sup>-1 (533), TOTO1 (533), JOE (548), BODIPY 530/550 (550), Dil (565), BODIPY TMR (568), BODIPY 558/568 (568), BODIPY 564/570 (570), Cy3<sup>TM</sup> (570), Alexa<sup>TM</sup> 546 (570), TRITC (572), Magnesium Orange<sup>TM</sup> (575), Phycocerythrin R&B (575), Rhodamine Phalloidin (575), Calcium Orange<sup>TM</sup> (576), Pyronin Y (580), Rhodamine B (580), TAMRA (582), Rhodamine Red<sup>TM</sup> (590), Cy3.

10

20

30

40

50

5<sup>TM</sup> (596), ROX (608), Calcium Crimson<sup>TM</sup> (615), Alexa<sup>TM</sup> 594 (615), Texas Red (615), Nile Red (628), YO-PRO<sup>TM</sup>-3 (631), YOYO<sup>TM</sup>-3 (631), Rphycocyanin (642), C-Phycocyanin (648), TO-PRO<sup>TM</sup>-3 (660), TOTO3 (660), DiD DilC(5) (665), Cy5<sup>TM</sup> (670), Thiadicarboxyanine (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)。カッコの数字はナノメートル単位で表示した発光最大波長である。好ましくは、レポーター分子及びクエンチャー分子は、JOE、FAM、TAMRA、ROX及びフルオレセイン基盤標識を含む。

10

#### 【0192】

好適なレポーター-クエンチャー対は多くの文献に開示されている：Pesce など, editors, Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, New York, 1971); White など, Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, New York, 1970); Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2<sup>nd</sup> 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, 6<sup>th</sup> Edition (Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996); 米国特許第3,996,345号及び第4,351,760号。

20

30

#### 【0193】

本発明において、広範囲な波長又は特定波長の蛍光をクエンチングできる非蛍光ブラッククエンチャー分子(又はダーククエンチャー分子)が用いられることができるということは注目に値する。非蛍光ブラッククエンチャー分子の例は、BHQ及びDABCYLである。

40

#### 【0194】

SOに適用されるFRET標識で、レポーターはFRETのドナーを含み、クエンチャーはFRETの残りのパートナー(アクセプター)を含む。例えば、フルオレセイン色素(fluorescein dye)はレポーターとして用いられ、ローダミン色素(rhodamine dye)はクエンチャーとして用いられる。

#### 【0195】

上記標識は、従来の方をを通じてSOに連結されることができる。例えば、炭素原子を

50

含むスパーサー（例えば、3 - カーボンスパーサー、6 - カーボンスパーサー又は12 - カーボンスパーサー）を通じてSOに連結される。

【0196】

(ii) 単一標識

また、本発明は、ターゲット核酸配列の存在を示す伸長鎖/SOハイブリッドの発生に対するシグナルを提供する単一標識システムを用いて優秀に行われる。

【0197】

上記単一標識は、蛍光標識、発光標識、化学発光標識、電気化学的標識及び金属標識を含むが、これに限定されるものではない。特に、上記単一標識は蛍光標識を含む。

【0198】

単一標識がオリゴヌクレオチドに連結されているかそれともオリゴヌクレオチドから放出されるかに依存的に、又は単一標識が無傷 (intact) のオリゴヌクレオチドに連結されているかそれとも上記オリゴヌクレオチドの断片に連結されているかに依存的に、異なるシグナルを示す単一標識が存在する。このような単一標識が使用される場合、本発明は液相でも伸長鎖/SOハイブリッドの切断と同時に発生するシグナリングシステムを提供することができる。例えば、蛍光テルビウムキレートは、それがオリゴヌクレオチドに連結されているかそれともオリゴヌクレオチドから放出されるかに依存的に異なるシグナルを提供する (Nurmiなど, Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28 No. 8 e28)。他の例としては、上記単一標識が平面偏光による励起を通じて分極化された蛍光を放出する色素である場合、上記単一標識を含む切断された断片はFP (fluorescence polarization) 法を通じて検出することができる。放出された蛍光の分極化程度は、標識に連結された分子の運動によって影響される。通常、運動が速ければ分極化程度は低くなる (Latifなど, Genome Research, 11: 436 - 440, 2001)。

【0199】

特定の実現例において、上記伸長鎖/SOハイブリッドの切断に依存的に異なるシグナルを発生させることができる単一標識は、蛍光テルビウムキレート又は分極化された蛍光を放出する色素である。

【0200】

上記SOの切断で生成された断片が単一標識を含むようにシグナリングシステムがデザインされた場合、上記伸長鎖/SOハイブリッドの切断発生は上記標識された断片を用いることで効果的に検出することができる。特定の実現例において、上記伸長鎖/SOハイブリッドの切断発生は電気泳動上で標識された断片を検出することで便利に分析することができる。

【0201】

本発明の一実現例において、上記SOは単一標識を持ち、上記伸長鎖/SOハイブリッドのSO切断は単一標識を持つ断片を生成し、上記伸長鎖/SOハイブリッドのSO切断の発生は、上記単一標識された断片の放出を検出することで検出する。このような場合、上記SOの切断に先立って上記単一標識から発生したシグナルは、上記SOの切断後に上記単一標識から発生したシグナルと異なり、上記シグナルの差は上記伸長鎖/SOハイブリッドのSO切断の発生を検出できるようにする。

【0202】

一実現例によれば、上記単一標識は上記SOの5'末端又は3'末端に連結される。

【0203】

本発明において単一標識を使用する場合、本発明は固定化されたSOを使用して固相で効果的に行われる。一実現例によれば、上記SOはその5'末端又は3'末端を通じて固相基質上に固定化される。

【0204】

一実現例によれば、上記SOはその5'末端又は3'末端を通じて固相基質の表面上に固定化され、上記SOは単一標識を持ち、上記伸長鎖/SOハイブリッドのSO切断は

10

20

30

40

50

単一標識を持つ断片を生成させ、上記断片は固相基質上で放出され、それによってシグナル変化が上記固相基質上で発生して上記伸長鎖 / SOハイブリッドのSO切断の発生を検出する。

【0205】

上記SOがその3'末端を通じて上記固相基質上に固定化される場合、上記単一標識は上記SOの5'末端に連結され、上記ステップ(e)で生成される上記切断位置は、5'-ヌクレアーゼ、制限酵素又はリボヌクレアーゼに対する切断位置である。

【0206】

図6に示すように、上記PTO断片の伸長鎖はその3'末端を通じて固相基質上に固定化されたSOとハイブリダイゼーションされて、5'ヌクレアーゼに対する切断位置を生成させる。上記5'ヌクレアーゼは上記切断位置を攻撃することで上記伸長鎖 / SOハイブリッドを切断し、上記SOの5'末端から蛍光レポーター分子を放出させる。ターゲット核酸配列が存在する場合、固定化されたSOを含むスポットは蛍光の減少又は消滅を示すのが観察される。ターゲット核酸配列がない場合、固定化されたSOを含むスポットで蛍光の減少又は消滅は観察されない。

【0207】

特に、本発明が単一標識を使用して固相で行われる場合、一般的な蛍光標識を使用することができ、オリゴヌクレオチドに連結されているかそれともオリゴヌクレオチドから放出されるかに依存的に、又は無傷のオリゴヌクレオチドに連結されるかそれとも上記オリゴヌクレオチドの断片に連結されるかに依存的に、異なる強度を持つ蛍光シグナルを提供することができる特定の蛍光標識を必要としない。固相で上記伸長鎖 / SOハイブリッド切断の発生に依存的に差を示すシグナルは、固相で単一標識の残留を検出することで分析することができる。このような点で、本発明で単一標識の活用性(workability)は固相で目立つ。

【0208】

上述したように、シグナルの存在有無又はシグナル変化(シグナル強度の増加又は減少)は、上記第2の切断反応と同時発生的な方式で上記単一標識によって提供されてターゲット核酸配列の存在を検出する。

【0209】

本発明において有用な単一蛍光標識の例は、上述したようにレポーター及びクエンチャー分子に関する説明を参照して説明することができる。

【0210】

上記単一標識は、従来の方法によって上記SOに連結されることができる。例えば、上記単一標識は炭素原子を含むスペーサー(例えば、3-カーボンスペーサー、6-カーボンスペーサー又は12-カーボンスペーサー)を通じてSOに連結される。

【0211】

特定の実現例において、上記SOの単一標識は5'末端又は5'末端から1~5ヌクレオチド離隔して位置する。または、上記単一標識は、上記SOの3'末端又は3'末端から1~5ヌクレオチド離隔して位置する。

【0212】

上記プライマー、PTO、CTO及びSOは天然(naturally occurring) dNMPsから構成されることができる。または、上記プライマー、PTO、CTO及びSOは、修飾ヌクレオチド又は非天然ヌクレオチド、例えば、PNA(Peptidic Nucleic Acid, 参照PCT出願第WO 92/20702号)及びLNA(Locked Nucleic Acid, 参照PCT出願第WO 98/22489号、第WO 98/39352号及び第WO 99/14226号)を含むことができる。上記PTO及びCTOは、デオキシイノシン、イノシン、1-(2'-デオキシ-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ことができる。用語「ユニバーサル塩基」とは、天然DNA/RNA塩基それぞれに対してほとんど区別なく塩基対を形成できることを意味する。

## 【0213】

上述したように、PTOは、PTOの5'タギング部位の3'末端から3'方向に離隔した一位置で切断されることができる。上記切断位置は、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ことができる。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、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ゼーションされるCTOの位置は、ユニバーサル塩基、縮重配列 (degenerate sequence) 又はそれらの組合わせを含むことができる。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つのヌクレオチドだけ離隔した一位置で切断されると、上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。仮に、PTOがPTOの5'タギング部位の3'末端から3'方向に2つのヌクレオチドだけ離隔した一位置で切断されると、CTOのキャプチャリング部位の5'末端は縮重配列を含み、その3'方向に接したヌクレオチドはユニバーサル塩基を含むのが有利である。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位置でPTOの切断が起こる場合、CTOにユニバーサル塩基及び縮重配列を用いるのが有用である。また、上流プライマー伸長依存的な切断誘導下で、同一の5'タギング部位を持つ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'末端の一部が互いに異なるPTO断片を生成することができる。このような場合、ユニバーサル塩基及び縮重配列はCTOに有用に使用される。CTOにユニバーサル塩基及び縮重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1つのタイプのCTO又は最小限のタイプのCTOを使用させる。

10

20

## 【0214】

一実現例によれば、本発明は繰り返しサイクル (repeating cycle) の間に変性過程を含んでステップ (a) ~ (g) の全部又は一部を繰り返し行うことをさらに含む。このような繰り返しによって、ターゲット核酸配列及び/又はターゲットシグナルを増幅させることができる。上記変性は、熱、アルカリ、ホルムアミド、ウレア及びグリオキサール処理、酵素的な方法 (例、ヘリカーゼ作用) 及び結合タンパク質を含む公知の技術を通じて行うことができるが、これに限定されるものではない。例えば、変性は80~105の温度範囲で熱処理して達成されることができる。このような処理を達成するための一般的な方法は、Joseph Sambrookなど、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) に開示されている。

30

## 【0215】

一実現例によれば、上記ステップ (a) ~ (b)、(a) ~ (d)、(a) ~ (e)、(a) ~ (f) 又は (a) ~ (g) は変性過程を含んで繰り返されるることができる。

## 【0216】

上記ステップ (a) ~ (f) の繰り返しは、上記SOの断片生成に関する一例であることは当業者に明確である。例えば、本発明は、ステップ (a) ~ (b) を繰り返してステップ (c) ~ (f) を行って上記SOの断片を生成した後、上記SO断片の検出を行うことができる。

40

## 【0217】

本発明の一実現例によれば、上記ステップ (a) ~ (g) は1つの反応容器で行われるか上記ステップ (a) ~ (g) の一部は別途の反応容器で行われる。例えば、上記ステップ (a) ~ (b)、(c) ~ (d) 又は (e) ~ (f) は1つの反応容器又は別途の反応容器で行われることができる。例えば、PTOの3'ターゲッティング部位とターゲット核酸配列とのハイブリダイゼーションが、PTO断片とCTOとのハイブリダイゼーションよりもっと厳しい条件の下で行われるようにPTO及びCTOの配列及び反応条件が決定される場合、上記ステップ (a) ~ (b) は上記ステップ (c) ~ (g) を行うことなく繰り返されるることができる。上記ステップ (a) ~ (b) の繰り返し後、ステップ (c

50

) ~ (g) を行うことができる。

【0218】

一実現例によれば、上記ステップ(a) ~ (b)は、変性過程を含んで繰り返されること  
ことができる。

【0219】

特定ステップの繰り返し、繰り返し過程で変性の介在、特定ステップ(等)の分離実施  
及び検出時点が、幅広く変化されることができるということは当業者に明確である。

【0220】

一実現例によれば、上記繰り返しが上記PTOに対する上流プライマーを使用して変性  
過程と共に行われる場合、上記繰り返しは下流プライマーの存在下で行われ、特にPCR  
によって行われる。上記PTOに対する上流プライマー及び下流プライマーの使用は、タ  
ーゲット核酸配列を増幅させることができる。

10

【0221】

一実現例によれば、上記繰り返しが上記PTOに対する上流プローブを使用して変性過  
程と共に行われる場合、上記繰り返しは下流プライマーの存在下で行われる。

【0222】

本発明においては検出及び/又は増幅しようとするターゲット核酸配列が、全てのDN  
A(gDNA及びcDNA)及びRNA分子を含んである特定の配列又は長さを持つよう  
に要求しない。上記ターゲット核酸配列は、一本又は二本鎖であってもよい。

【0223】

mRNAを初期物質として用いる場合、アニーリングステップ実施の以前に逆転写ステ  
ップが必須であり、これの詳細な内容は、Joseph Sambrookなど、Mo  
lecular Cloning, A Laboratory Manual, Co  
ld Spring Harbor Laboratory Press, Co  
ld Spring Harbor, N.Y.(2001); 及びNoonan, K.  
F. など、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又はmRNAにハイブ  
リダイゼーションされるオリゴヌクレオチドdTプライマーが用いられることができる。

20

【0224】

検出及び/又は増幅できる上記ターゲット核酸配列はある天然(naturally  
occurring)の原核細胞核酸、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人間を含む高等動物)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・パール・ウイル  
ス、肝炎ウイルス、ポリオウイルスなど)核酸又はウイロイド核酸もいずれも含む。

30

【0225】

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(IP  
CR)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用し、これはタンパク質を含んだ多様な種類のターゲットを  
検出するのに広く適用される(Sanoなど、Science 258 pp:120  
-122(1992)、米国特許第5,665,539号、Niemyerなど、Tr  
ends in Biotechnology 23 pp:208-216(2005  
)、米国出願公開番号第2005/0239108号及びYeなど、Journal o  
f Environmental Science 22 pp:796-800(20  
10))。

40

【0226】

また、本発明はヌクレオチド変異の検出に有用である。好ましくは、ターゲット核酸配  
列はヌクレオチド変異を含む。本明細書において使用される用語「ヌクレオチド変異」と  
は、連続的なDNAセグメント又は配列が類似するDNAセグメントで特定位置のDNA

50

配列での全ての単一又は複数のヌクレオチド置換、欠失又は挿入を意味する。このような連続的なDNAセグメントは1つの遺伝子又は1つの染色体のある他の部位を含む。このようなヌクレオチド変異は、突然変異 (mutant) 又は多型対立遺伝子変異 (polymorphic allele variations) であってもよい。例えば、本発明によって検出されるヌクレオチド変異は、SNP (single nucleotide polymorphism)、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、ヒトゲノムにある多様な変異 (例えば、MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase) 遺伝子の変異)、病原体の薬剤耐性に係る変異及びがん発生関連の変異を含む。上記使用された用語「ヌクレオチド変異」は核酸配列の特定位置にあるいずれの変異も含む。すなわち、用語「ヌクレオチド変異」は、野生型及び核酸配列の特定位置にあるいずれの突然変異型も含む。

10

## 【0227】

ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異を検出する本発明において、使用されるプライマー又はプローブがターゲット核酸配列の上記ヌクレオチド変異に対して相補的な配列を持つ場合、上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においてマッチングテンプレート (matching template) と記載される。使用されるプライマー又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対して非相補的な配列を持つ場合、上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においてミスマッチングテンプレート (mismatching template) と記載される。

20

## 【0228】

ヌクレオチド変異の検出のために、上流プライマーの3'末端はターゲット核酸配列でのヌクレオチド変異位置の向かい側に位置するようにデザインすることができる。一実現例によれば、上流プライマーの3'末端はターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に対して相補的な配列を持つ。ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に対して相補的な配列を持つ上流プライマーの3'末端はマッチングテンプレートにアニーリングされ伸長されてPTO切断を誘導する。結果物としてのPTO断片はCTOにハイブリダイゼーションされて、ターゲットシグナルを提供する。逆に、上流プライマーの3'末端がミスマッチングテンプレートでヌクレオチド変異にミスマッチされる場合、上流プライマー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ても、伸長反応のためにプライマーの3'末端のアニーリングが必須な条件の下では伸長されず、よってターゲットシグナルが発生されない。

30

## 【0229】

または、ターゲット核酸配列のヌクレオチド変異に対して相補的な配列を持つPTOのハイブリダイゼーションに依存的なPTO切断を用いることができる。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対して相補的な配列を持つPTOは、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た後、切断される。結果物としてのPTO断片はCTOにハイブリダイゼーションされて、ターゲットシグナルを提供する。一方、調節された条件の下で、PTOはヌクレオチド変異位置に非相補的な配列を持つミスマッチングテンプレートにはハイブリダイゼーションされず、切断されない。このような場合、好ましくはPTOのヌクレオチド変異に対する相補的な配列は、PTOの3'ターゲッティング部位の中間に位置する。

40

## 【0230】

一実現例によれば、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する。

## 【0231】

または、本発明は、特定の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を持つPTOを使用する。上記PTOの3'ターゲッティング部位の5'末端の一部は、ヌクレオチド変異検出のためにターゲット核酸配列でヌクレオチド変異に位置し、上記PTOの3'ター

50

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でヌクレオチド変異に対して相補的な配列を持つ。

【0232】

上記PTOがヌクレオチド変異区別サイトに対して相補的なヌクレオチド変異を持つターゲット核酸配列(すなわち、マッチテンプレート)とハイブリダイゼーションされると、3'ターゲット部位の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。一方、上記PTOがヌクレオチド変異区別サイトに対して非相補的なヌクレオチド変異を持つターゲット核酸配列(すなわち、ミスマッチテンプレート)とハイブリダイゼーションされると、3'ターゲット部位の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。

10

【0233】

本明細書においてPTOに関連して使用される用語「ヌクレオチド変異区別サイト」とは、ターゲット核酸配列でヌクレオチド変異に対するPTOの3'ターゲット部位の5'末端の一部の相補的な配列を意味する。

【0234】

このように関心のあるヌクレオチド変異に対する区別されるハイブリダイゼーションパターンは、PTOの初期切断位置での差を提供し、これによって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在有無によってシグナル差が発生するということは注目に値する。

【0235】

関心のあるヌクレオチド変異の存在下で第1断片は、PTOとマッチングテンプレートと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不在下で第2断片は、PTOとミスマッチングテンプレートとのハイブリッドの切断によって生成される。上記第2断片は追加の3'末端部位を含み、これは第2断片を第1断片と異ならせる。

20

【0236】

単一ヌクレオチド変異の検出に関する一実現例において、上記PTOの3'ターゲット部位の5'末端の一部は、ターゲット核酸配列で単一ヌクレオチド変異に対して相補的な配列を持つ。上述したように、マッチテンプレートとハイブリダイゼーションされたPTOの切断は、PTOの3'ターゲット部位の5'末端に対して3'方向に隣接した位置で誘導されることができ、例えば、上流プライマー伸長依存的な切断の誘導下でそうである。上記PTO断片の3'末端は上記単一ヌクレオチド変異に対して相補的なヌクレオチドを持つ。上記PTO断片は上記ヌクレオチド変異に対応する配列を含むキャプチャリング部位を持つCTOとハイブリダイゼーションされ、伸長されて伸長二重体を生成し、ターゲットシグナルを提供する。同一の上記PTOが単一ヌクレオチド変異を除いてマッチテンプレートと同一の配列を持つミスマッチテンプレートとハイブリダイゼーションすると、上記PTOの切断は、上記PTOの3'ターゲット部位の5'末端から3'方向に2個のヌクレオチド離隔した位置で発生することができる。上記PTO断片の3'末端は、上記単一ヌクレオチド変異に相補的なヌクレオチド以外にも追加で切断されたヌクレオチドを持つ。追加で切断されたヌクレオチドとハイブリダイゼーションされる上記CTOの位置が、追加で切断されたヌクレオチドに非相補的な配列を持つようにデザインされる場合、上記PTO断片の3'末端は上記CTOとハイブリダイゼーションされず、その結果、調節された条件で上記PTO断片は伸長されない。

30

40

【0237】

一実現例によれば、上記3'ターゲット部位の5'末端の一部にヌクレオチド変異に対する相補的な配列を持つ上記PTOの切断位置は、マッチテンプレート又はミスマッチテンプレートとのハイブリダイゼーションに依存的に変化し、ハイブリダイゼーションイベントから放出された上記PTO断片は、好ましくはその3'末端の一部、より好ましくはその3'末端に異なる配列を持つ。

【0238】

50

一実現例によれば、上記 P T O 断片の 3' 末端の一部の差を考慮した C T O ヌクレオチド配列の選択は、ミスマッチテンプレートからマッチテンプレートを区別できるようにする。

【 0 2 3 9 】

一実現例によれば、2つのうちいずれの P T O 断片の生成も、C T O 上で伸長反応によって明らかに検出されることができる。

【 0 2 4 0 】

一実現例によれば、上記第 2 断片が C T O のキャプチャリング部位にハイブリダイゼーションされる場合、C T O が上記第 2 断片の上記追加の 3' 末端部位とハイブリダイゼーションされなくて、上記第 2 断片の伸長が防止されるように C T O の配列を選択する。

10

【 0 2 4 1 】

本発明において説明したように、上記第 1 断片の伸長は上記伸長二重体の切断発生によって検出される。

【 0 2 4 2 】

本発明の一実現例によれば、上記 P T O の 3' ターゲッティング部位の 5' 末端の一部は、ヌクレオチド変異区別サイトから 1 ~ 10 ヌクレオチド（より好ましくは 1 ~ 5 ヌクレオチド）離隔した位置以内に位置した非塩基対部分（non-base pairing moiety）を含む。

【 0 2 4 3 】

P T O が変異区別サイトに対して非相補的なヌクレオチド変異を持つターゲット核酸配列とハイブリダイゼーションされる場合、上記非塩基対部分は 3' ターゲッティング部位の 5' 末端の一部がターゲットヌクレオチド配列と二本鎖を形成することを防止する。

20

【 0 2 4 4 】

非塩基対部分（例えば、人為的なミスマッチヌクレオチド）の利用は、ヌクレオチド変異に対する P T O の区別能力を向上する。

【 0 2 4 5 】

本発明の一実現例によれば、ヌクレオチド変異区別サイトに対して相補的なヌクレオチド変異を持つターゲット核酸配列に P T O がハイブリダイゼーションされる場合、非塩基対部分は 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抑制しない。

【 0 2 4 6 】

30

本発明の一実現例によれば、非塩基対部分は、上記 P T O とマッチテンプレートとのハイブリッドの初期切断位置と、上記 P T O とミスマッチテンプレートとのハイブリッドの初期切断位置との距離を拡大させる。

【 0 2 4 7 】

一実現例によれば、非塩基対部分配列の導入は初期切断位置を調節することができ、特に、上記 P T O とミスマッチテンプレートとのハイブリッドの初期切断位置を調節することができる。

【 0 2 4 8 】

一実現例によれば、非塩基対部分はヌクレオチド変異区別サイトの下流に位置する。

【 0 2 4 9 】

40

非塩基対部分は、ターゲット核酸配列間で塩基対を形成しないいずれの部分も含む。好ましくは、非塩基対部分は、( i ) 人為的なミスマッチ塩基、塩基対を形成できないように修飾された非塩基対塩基又はユニバーサル塩基を含むヌクレオチド、( i i ) 塩基対を形成できないように修飾された非塩基対ヌクレオチド、又は( i i i ) 非塩基対形成化合物（non-base pairing chemical compound）である。

【 0 2 5 0 】

例えば、非塩基対部分は、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、ホスホリチオエート結合、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

50

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ア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また非塩基対部分として用いられる。非塩基対部分としてのユニバーサル塩基はPTOの切断位置を調整するのに有用である。

【0251】

デオキシイノシン、1-(2'-デオキシ-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型塩基間の結合より低い結合力を有し、ユニバーサル塩基は特定のハイブリダイゼーション条件下で非塩基対部分として用いられることができる。

【0252】

5'末端の一部に導入された非塩基対部分は、好ましくは1~10個の部分、より好ましくは1~5個の部分、さらに好ましくは1~2個の部分を持つ。5'末端の一部の多数の非塩基対部分は連続的又は不連続的に存在することができる。好ましくは、非塩基対部分は2~5個の連続的な部分を持つ。

【0253】

好ましくは、非塩基対部分は非塩基対形成化合物である。

【0254】

一実施例によれば、PTOのヌクレオチド変異区別サイト及び非塩基対部分は、3'ターゲット部位の5'末端から10ヌクレオチド(より好ましくは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ヌクレオチド又は1ヌクレオチド、さらに好ましくは1ヌクレオチド)離隔した位置以内に位置する。

【0255】

一実施例によれば、PTOはブロッカー(blocker)として5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素による切断に対して耐性を持つ少なくとも1個のヌクレオチドを含むブロッカー部位を持ち、上記ブロッカー部位は初期切断位置を調節するか、1つの位置又は位置等で切断を防止するために位置する。

【0256】

ヌクレオチド変異の検出効率を改善させるために、本発明はPCRクランピング法で行われることができる。PNAを使用する代表的なPCRクランピング法は、Henrikなど、Nucleic Acid Research 21:5332-5336(1993)及びLuoなど、Nucleic Acid Research Vol. 34, No. 2 e12(2006)に開示されている。例えば、PNAを使用するPCRクランピング技術は変異型(mutant type)ヌクレオチド変異を持つ核酸配列は増幅するが、野生型(wild type)ヌクレオチド変異を持つ核酸配列は増幅しない。PCRクランピングに続き、PTOCEアッセイを行うと、ヌクレオチド変異をより効果的に検出することができる。特に、PCRクランピング技術は、特異的なタイプのヌクレオチド変異を持つ核酸配列のみを増幅させるから、PCRクランピング技術と本発明の方法とを結合すれば、より効果的な方式で少数の変異体(minority-variant)を検出することができる。

【0257】

5'末端部位にヌクレオチド変異区別部位を持つプローブが mismatches テンプレートとハイブリダイゼーションされる場合、これの5'末端部位は特定の条件下で一本鎖を形成することができる。上記プローブはPTOに該当することができる。上記シグナルは本発明のPTOアッセイによって生成されることができる。このような接近は、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持つターゲット核酸配列の検出に有用である。

【0258】

一実施例によれば、本発明に用いられるターゲット核酸配列は前増幅された核酸配列である。前増幅された核酸配列の利用は、本発明のターゲット検出の感度及び特異性をか

10

20

30

40

50

なり高く増加させる。

【0259】

好ましい一実現例によれば、上記方法は、PTOに対する下流プライマーの存在下で行われる。

【0260】

少なくとも2種のターゲット核酸配列が同時に検出(マルチプレックス)されるという点で、本発明の利点が一層目立つ。

【0261】

一実現例によれば、上記方法は、少なくとも2種(より好ましくは少なくとも3種、さらに好ましくは少なくとも5種)のターゲット核酸配列を検出するために行われる。

10

【0262】

一実現例によれば、上記方法は、少なくとも2種(より好ましくは少なくとも3種、さらに好ましくは少なくとも5種)のターゲット核酸配列を検出するために行われ;上記上流オリゴヌクレオチドは少なくとも2種(より好ましくは少なくとも3種、さらに好ましくは少なくとも5種)のオリゴヌクレオチドを含み、PTOは少なくとも2種(より好ましくは少なくとも3種、さらに好ましくは少なくとも5種)のPTOを含み、CTOは少なくとも2種(より好ましくは少なくとも3種、さらに好ましくは少なくとも5種)のCTOを含み、SOは少なくとも2種(好ましくは少なくとも3種、より好ましくは少なくとも5種)のSOを含む。

【0263】

20

特定の実現例において、少なくとも2種のターゲット核酸配列が存在する場合、これに対応する少なくとも2種のシグナルが提供される。

【0264】

少なくとも2種のターゲット核酸配列を検出するための上記方法で、上記SOに対する上流オリゴヌクレオチドが使用される場合、上記上流オリゴヌクレオチドは上記SOに対する少なくとも2種の上流オリゴヌクレオチドを含む。

【0265】

一実現例によれば、本発明は、上記PTOに対する少なくとも2種の下流プライマーを使用して行われる。

【0266】

30

本発明は液相又は固相で行われることができる。

【0267】

固相に固定化されたSOを用いたターゲット検出

一実現例によれば、本発明は固相で行われ、SOはその5'末端又は3'末端を通じて固相基質上に固定化される(参照:図6)。固相では、固相基質上で提供されるターゲットシグナルを測定する。

【0268】

固相反応のために、SOはその5'末端又は3'末端(好ましくは、3'末端)を通じて固相基質の表面に直接又は間接に(好ましくは間接)固定化される。また、SOは共有又は非共有結合方式で固相基質の表面上に固定化されることができる。固定化されたSOが固相基質の表面に間接に固定化される場合、適当なリンカーを用いる。本発明において有用なリンカーは、固相基質の表面上のプロープ固定化に用いられるいずれのリンカーも含むことができる。例えば、アミン基を持つアルキル又はアリアル化合物、又はチオール基を持つアルキル又はアリアル化合物がリンカーとしてSO固定化に用いられることができる。また、ポリ(T)テール又はポリ(A)テールがリンカーとして使用されることができる。

40

【0269】

好ましい一実現例によれば、本発明において用いら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、当業界に公知されたいずれのものも含むことができる。本発明の全ての過程、すなわち、ターゲット核酸配列とのハイブリ

50

ダイゼーション、切断、伸長、融解及び蛍光検出はマイクロアレイ上で行われる。マイクロアレイ上に固定化されたCTOは、ハイブリダイゼーションアレイ要素 (hybridizable array element) として用いられる。マイクロアレイを作製するための固相基質は、金属 (例えば、金、金と銅の合金、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/SiO<sub>2</sub> ウエハ、ゲルマニウム、ヒ化ガリウム、カーボン、カーボンナノチューブ、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、これに限定されるものではない。本発明の多数の固定化されたSOは、固相基質上の1つのアドレス可能な (addressable) 部位又は複数のアドレス可能な部位に固定化されることができ、固相基質は2 ~ 1, 000, 000個のアドレス可能な部位を含むことができる。フォトリソグラフィー、インクジェット、機械的なマイクロスポッティング及びこれと類似する方法のような従来の作製技術によって、アレイ又は特定応用のためのアレイを生産するために固定化されたCTOが作製 (fabricate) されることができ。

10

## 【0270】

固相で行う本発明は、固定化されたSO上の標識は物理的に離隔しているから、一種類の標識を用い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。よって、固相で本発明によって検出可能なターゲット核酸配列の数は制限されない。

## 【0271】

一実現例によれば、上記SOはそれの3'末端又は5'末端を通じて固相基質の表面上に固定化され、上記SOは単一標識を持ち、上記伸長鎖/SOハイブリッドのSO切断は単一標識を持つ断片を生成させ、上記断片は固相基質上から放出され、それによってシグナル変化が上記固相基質上で発生して上記伸長鎖/SOハイブリッドのSO切断の発生を検出する。

20

## 【0272】

共焦点検出装置 (confocal detection devices) を使用する場合、上記固相基質上でのシグナルは、液相で懸濁される標識に影響されることなく検出することができる。

## 【0273】

上記固定化されたSOを使用する本発明は、ハイブリダイゼーション、切断反応及び増幅のために単一の反応容器で行うことができ、リアルタイム方式でターゲット増幅によるシグナル変化を提供することができる。または、上記固定化されたSOの切断反応が個別容器で行われる場合、固相で時間依存的なシグナル変化はリアルタイム方式で検出することができる。

30

## 【0274】

ターゲット核酸配列の増幅を伴う一実現例

本発明は、ターゲット核酸配列を合成することができる上流プライマー及び下流プライマーで構成されたプライマー対を用いてターゲット核酸配列の増幅を同時に共に行った。

## 【0275】

本発明のまた他の様態によれば、本発明は、次のステップを含み、PTO切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断 (PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Cleavage: PCE-SC) アッセイによってDNA又は核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法を提供する：

40

## 【0276】

(a) 上記ターゲット核酸配列を、上流プライマー及び下流プライマーを含むプライマー対及びPTO (Probing and Tagging Oligonucleotide) とハイブリダイゼーションさせるステップであって；上記上流プライマー及び上記下流プライマーそれぞれは、上記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイゼーションヌクレオチド配列を含み；上記PTOは、(i) 上記ターゲット核酸配列に相補的な

50

ハイブリダイゼーション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)上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'タグging部位を含み；上記3'ターゲッティング部位は上記ターゲット核酸配列にハイブリダイゼーションされ、上記5'タグging部位は上記ターゲット核酸配列にハイブリダイゼーションされず；上記PTOは上記上流プライマーと上記下流プライマーとの間に位置し；上記PTOはそれの3'末端がブロッキングされて伸長が防止され；

【0277】

(b) 上記PTOの切断のための条件下で5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素に上記ステップ(a)の結果物を接触させるステップであって；上記上流プライマー又はその伸長鎖は5'ヌクレアーゼ活性を持つ上記酵素による上記PTOの切断を誘導して、上記PTOの5'タグging部位又は5'タグging部位の一部を含む断片を放出し；

10

【0278】

(c) 上記PTOから放出された上記断片とCTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)とをハイブリダイゼーションさせるステップであって；上記CTOは3'5'の方向に、(i)上記PTOの上記5'タグging部位又は上記5'タグging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)上記PTOの5'タグging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；上記PTOから放出された上記断片は、上記CTOの上記キャプチャリング部位にハイブリダイゼーションされ；

20

【0279】

(d) 鋳型依存的な核酸ポリメラーゼ及び上記ステップ(c)の結果物を用いて伸長反応を行うステップであって、上記CTOのキャプチャリング部位にハイブリダイゼーションされた上記断片は伸長され、上記CTOのテンプレティング部位に相補的な伸長配列を含む伸長鎖を生成して伸長二重体を形成し；

【0280】

(e) 上記伸長鎖とSO(Signaling Oligonucleotide)とをハイブリダイゼーションして伸長鎖/SOハイブリッドを形成させるステップであって、上記SOは、上記伸長鎖に相補的な配列及び少なくとも1つの標識を含み；

【0281】

30

(f) 核酸分解酵素(nucleolytic enzyme)を用いて上記伸長鎖/SOハイブリッドの上記SOを切断して、上記SOの切断された断片を生成させるステップ；及び

【0282】

(g) 上記ステップ(f)で切断反応の発生を検出するステップであって；上記検出は、上記SOに連結された標識から提供されるシグナルを測定して行い、上記伸長鎖/SOハイブリッドの上記SOに対する切断反応の発生は、上記ターゲット核酸配列の存在を示す。

【0283】

本発明の一実現例は、上述された本発明のステップを行うため、これら間で共通する内容は、本明細書の過度な複雑性を避けるためにその記載を省略する。

40

【0284】

一実現例によれば、上記方法は、繰り返しサイクルの間に変性過程を含んで上記ステップ(a)~(g)を全部又は一部繰り返すステップをさらに含む。反応の繰り返しはターゲット核酸配列の増幅を伴う。特に、上記増幅は、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号及び第4,800,159号に開示されたPCR(polymerase chain reaction)によって行う。

【0285】

一実現例によれば、上記方法は、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行われる。

50

## 【0286】

II. 上流オリゴヌクレオチド独立的な5'ヌクレアーゼ活性に基づくPCE-SCアッセイによるターゲット核酸の検出

本発明の他の一様態によれば、本発明は、次のステップを含み、PTO切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断(PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Cleavage: PCE-SC)アッセイによってDNA又は核酸混合物からターゲット核酸配列を検出する方法を提供する:

## 【0287】

(a) 上記ターゲット核酸配列をPTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)とハイブリダイゼーションさせるステップであって;上記PTOは、(i)上記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイゼーション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)上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'タグging部位を含み;上記3'ターゲッティング部位は上記ターゲット核酸配列にハイブリダイゼーションされ、上記5'タグging部位は上記ターゲット核酸配列にハイブリダイゼーションされず;

10

## 【0288】

(b) 上記PTOの切断のための条件下で5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素に上記ステップ(a)の結果物を接触させるステップであって;上記PTOは上記5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素によって切断され、このような上記切断は、上記PTOの5'タグging部位又は5'タグging部位の一部を含む断片を放出し;

20

## 【0289】

(c) 上記PTOから放出された上記断片とCTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)とをハイブリダイゼーションさせるステップであって;上記CTOは3' 5'の方向に、(i)上記PTOの5'タグging部位又は5'タグging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)上記PTOの5'タグging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、上記PTOから放出された上記断片は、上記CTOの上記キャプチャリング部位にハイブリダイゼーションされ;

30

## 【0290】

(d) 鋳型依存的な核酸ポリメラーゼ及び上記ステップ(c)の結果物を用いて伸長反応を行うステップであって、上記CTOのキャプチャリング部位にハイブリダイゼーションされた上記断片は伸長され、上記CTOのテンプレティング部位に相補的な伸長配列を含む伸長鎖を生成して伸長二重体を形成し;

## 【0291】

(e) 上記伸長鎖とSO(Signaling Oligonucleotide)とをハイブリダイゼーションして伸長鎖/SOハイブリッドを形成させるステップであって、上記SOは、上記伸長鎖に相補的な配列及び少なくとも1つの標識を含み;

## 【0292】

(f) 核酸分解酵素(nucleolytic enzyme)を用いて上記伸長鎖/SOハイブリッドの上記SOを切断して、上記SOの切断された断片を生成させるステップ;及び

40

## 【0293】

(g) 上記ステップ(f)で切断反応の発生を検出するステップであって;上記検出は、上記SOに連結された標識から提供されるシグナルを測定して行い、上記伸長鎖/SOハイブリッドの上記SOに対する切断反応の発生は、上記ターゲット核酸配列の存在を示す。

## 【0294】

上流オリゴヌクレオチド独立的な5'ヌクレアーゼ活性に基づく本発明の方法は、上流

50

オリゴヌクレオチドを使用しないことを除いて上流オリゴヌクレオチドを用いた P C E - S C アッセイと同一であるため、これら間で共通する内容は、本明細書の過度な複雑性を避けるためにその記載を省略する。

【 0 2 9 5 】

興味深いことに、上流オリゴヌクレオチド独立的な 5'ヌクレアーゼ活性に基づく本発明の方法は、実際に上流オリゴヌクレオチドを使用しなくても P C E - S C アッセイを通じてターゲットシグナルを提供する。

【 0 2 9 6 】

本発明の方法のために、上流オリゴヌクレオチド独立的な 5'ヌクレアーゼ活性を持つ従来の酵素が使用されることができる。5'ヌクレアーゼ活性を持つ鋳型依存的なポリメ  
10  
ラーゼのうちいくつかの酵素は、上流オリゴヌクレオチド独立的な 5'ヌクレアーゼ活性を持つ（たとえば、Taq DNAポリメラーゼ）。

【 0 2 9 7 】

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るとき、本発明の P C E - S C アッセイは、好ましくは上流オリゴヌクレオチドを用いて行う。

【 0 2 9 8 】

ターゲット検出のためのキット

本発明のまた他の様態によれば、本発明は、次を含む P T O 切断及び伸長依存的なシグ  
20  
ナリングオリゴヌクレオチド切断 ( P T O Cleavage and Extension - Dependent Signaling Oligonucleotide Cleavage : P C E - S C ) アッセイによって DNA 又は核酸混合物から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：

【 0 2 9 9 】

( 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 : P T O ) ; 上記 P T O は、( i ) 上記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイゼーションヌクレオチド配列を含む 3' タグ  
30  
ゲッティング部位；及び ( i i ) 上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' タグging部位を含み；上記 P T O の 3' タグゲッティング部位は上記ターゲット核酸配列にハイブリダイゼーションされ、上記 5' タグging部位はターゲット核酸配列とハイブリダイゼーションされず；

【 0 3 0 0 】

( b ) 上流オリゴヌクレオチド ( upstream oligonucleotide ) ; 上記上流オリゴヌクレオチドは、上記ターゲット核酸配列に相補的なハイブリダイ  
ゼーションヌクレオチド配列を含み；上記上流オリゴヌクレオチドは上記 P T O より上流に位置し、上記上流オリゴヌクレオチド又はその伸長鎖は 5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素による上記 P T O の切断を誘導して、上記 P T O の 5' タグging部位又は 5' タグging部位の一部を含む断片を放出し；

【 0 3 0 1 】

( 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 ( Capturing and Templating Oligonucleotide : C T O ) ; 上記 C T O は 3' 5' の順序で、( i ) 上記 P T O の 5' タグging部位又は 5' タ  
40  
グging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 ) 上記 P T O の 5' タグging部位及び 3' タグ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；上記 P T O から放出された上記断片は、上記 C T O のキャプチャリング部位とハイブリダイゼーションされて伸長され、上記 C T O のテンプレティング部位と相補的な伸長配列を含む伸長鎖を生成して伸長二重体を形成し；

【 0 3 0 2 】

( d ) 少なくとも 1 つの標識を持つシグナリングオリゴヌクレオチド ( Signaling Oligonucleotide : S O ) ; 上記 S O は上記伸長鎖に相補的な  
50

配列を含み；上記S Oは、上記伸長鎖とハイブリダイゼーションして伸長鎖 / S Oハイブリッドを生成し；及び

【0303】

(e) 核酸分解酵素 (nucleolytic enzyme)；上記核酸分解酵素は、上記伸長鎖 / S Oハイブリッドの上記S Oを切断する。

【0304】

本発明のキットは、上述した本発明の検出方法を行うためのものであって、これら間で共通する内容は、本明細書の過度な複雑性を避けるためにその記載を省略する。

【0305】

本発明の一実現例によれば、上記S Oは、上記伸長配列にハイブリダイゼーション可能な配列を含む。

10

【0306】

本発明の一実現例によれば、上記核酸分解酵素は5'ヌクレアーゼであり、上記伸長鎖 / S Oハイブリッドの形成は5'ヌクレアーゼに対する切断位置を生成させ、上記伸長鎖 / S Oハイブリッドの上記S Oは、5' 3'の方向に5'ヌクレアーゼによって切断される。

【0307】

本発明の一実現例によれば、上記核酸分解酵素は5'ヌクレアーゼであり、上記キットは、S Oの上流に位置した上流オリゴヌクレオチドをさらに含み、上記伸長鎖 / S OハイブリッドのS Oは、上記上流オリゴヌクレオチド又はその伸長鎖に依存的な5'ヌクレ

20

【0308】

本発明の一実現例によれば、上記上流オリゴヌクレオチドは、上流プライマー又は上流プローブである。

【0309】

本発明の一実現例によれば、上記核酸分解酵素はリボヌクレアーゼであり、上記S OはRNA配列を含み、上記伸長鎖 / S Oハイブリッドの形成はDNA - RNAハイブリダイゼーション二重体を生成し、上記伸長鎖 / S OハイブリッドのS Oはリボヌクレアーゼによって切断される。

【0310】

30

本発明の一実現例によれば、上記核酸分解酵素は制限酵素であり、上記S Oは上記制限酵素によって認識される配列を含み、上記伸長鎖 / S OハイブリッドのS Oは上記制限酵素によって切断される。

【0311】

本発明の一実現例によれば、上記伸長鎖 / S Oハイブリッドの形成は、DNA二重体、RNA二重体又はDNA - RNAハイブリダイゼーション二重体を切断することができる核酸分解酵素に対する切断位置を生成させる。

【0312】

本発明の一実現例によれば、上記核酸分解酵素は5'ヌクレアーゼであり、上記5'ヌクレアーゼは、5'ヌクレアーゼ活性又はFENヌクレアーゼを持つ鋳型依存的なDNA

40

ポリメラーゼである。

【0313】

本発明の一実現例によれば、上記S Oは、レポーター分子及びクエンチャー分子を含む相互作用的な二重標識を持ち、上記核酸分解酵素に対する切断位置は、上記S Oに連結された上記レポーター分子とクエンチャー分子との間に位置し、上記伸長鎖 / S OハイブリッドのS O切断は、上記レポーター分子とクエンチャー分子とを互いに分離させる。

【0314】

本発明の一実現例によれば、上記S Oは単一標識を持ち、上記伸長鎖 / S OハイブリッドのS O切断は上記単一標識を持つ断片を生成させ、上記伸長鎖 / S OハイブリッドのS O切断の発生は、上記単一標識された断片の放出を検出することで検出される。

50

## 【0315】

本発明の一実施例によれば、上記単一標識は蛍光標識である。

## 【0316】

本発明の一実施例によれば、上記SOは、5'方向に上記伸長鎖に非相補的な配列を含む5'タグging部位を含む。

## 【0317】

本発明の一実施例によれば、上記SOに連結された少なくとも1つの標識は、上記SOの5'タグging部位に連結される。

## 【0318】

本発明の一実施例によれば、上記PTO、CTO及び/又はSOは、その3'末端は10  
その伸長が防止されるようにブロックされる。

## 【0319】

本発明の一実施例によれば、上記上流オリゴヌクレオチドは、上流プライマー又は上流  
プローブである。

## 【0320】

本発明の一実施例によれば、上記キットは、上記ターゲット核酸配列とハイブリダイゼ  
ーションされたPTOの切断のために5'ヌクレアーゼ活性を持つ酵素をさらに含む。

## 【0321】

本発明の一実施例によれば、上記SOは、その3'末端又は5'末端を通じて固相基  
質の表面上に固定化され、上記SOは単一標識を持つ。20

## 【0322】

本発明の一実施例によれば、上記キットは、少なくとも2種のターゲット核酸配列を検  
出するためのキットであり、上記上流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、上記PTOは少なくとも2種のPTOを含み、上記CTOは少なくとも  
2種のCTOを含み、上記SOは少なくとも2種のSOを含む。

## 【0323】

本発明の一実施例によれば、上記上流オリゴヌクレオチドは上流プライマーであり、上  
記キットは、上記上流プライマーの伸長のために鑄型依存的な核酸ポリメラーゼをさら  
に含む。

## 【0324】

本発明の一実施例によれば、上記キットは、下流プライマーをさらに含む。30

## 【0325】

上述した本発明の全てのキットは、緩衝液、DNAポリメラーゼ補助因子及びデオキシ  
リボヌクレオチド5'-トリホスフェートのようなターゲット増幅PCR反応(例えば、  
PCR反応)を行うのに要求される試薬を選択的に含むことができる。または、上記キッ  
トは、さらに、多様なポリヌクレオチド分子、逆転写酵素、多様な緩衝液及び試薬、及び  
DNAポリメラーゼ活性を抑制する抗体を含むことができる。上記キットは、さらに、陽  
性及び陰性対照群反応を行うのに必要な試薬を含むことができる。与えられた反応で使  
用される試薬の最適量は、当業者によって容易に決定されることができる。上記キットは、  
一般的に上述した成分が別途の包装又は区画に含まれるように適用される。40

## 【0326】

以下、実施例を通じて本発明をより詳しく説明する。これら実施例は単に本発明をより  
具体的に説明するためのものであって、本発明の要旨によって本発明の範囲がこれら実  
施例によって制限されないということは、当業界における通常の知識を有する者にとって自  
明であろう。

## 【実施例】

## 【0327】

実施例1: PTO切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断(PTO  
Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Cleavage; PCE-SC)アッセイ 50

## の評価

新規な PTO 切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断 (PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Cleavage; PCE-SC) アッセイを用いてターゲット核酸配列を検出できるかを実験した。

### 【0328】

5'ヌクラーゼ活性を持つ Taq DNAポリメラーゼは上流プライマーの伸長、PTOの切断、PTO断片の伸長及びSOの切断のために使用した。

### 【0329】

PTO及びCTOは標識せず、3'末端をカーボンスペーサーでブロックした。Neisseria gonorrhoeae (NG) 遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドをターゲット鋳型として用いた。SOは5'末端に蛍光レポーター標識分子(FAM)を含み、3'末端にクエンチャー分子(BHQ-1)を含む。

### 【0330】

図2は、本実施例で用いられたPCE-SCアッセイを図式的に示す。

### 【0331】

本実施例で使用された合成鋳型、上流プライマー、PTO、CTO及びSOの配列は、次のとおりである：

NG-T 5' - AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGGCAT  
GATGCTTTCTTTTGTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA  
CCGATCCATTGAAAAA - 3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5' - CAATGGATCGGTATCACTCGC - 3' (SEQ  
ID NO: 2)

NG-PTO 5' - ACGACGGCTTGGCT TGCCCTCATTGGCG  
TGTTTCG [C3 spacer] - 3' (SEQ ID NO: 3)

NG-CTO 5' - GTCGTACCGAGATGCGCTTCTGATTCGT  
GCGCTGGATACCCTGACGATATCCAGCCAAGCCGTCGTGC  
TGT [C3 spacer] - 3' (SEQ ID NO: 4)

NG-SO 5' - [FAM] TGCGCTGGATACCCTGACGATATC  
C [BHQ-1] - 3' (SEQ ID NO: 5)

(下線を引いた文字はPTOの5'タグ部位を示す。)

### 【0332】

NG遺伝子に対する合成鋳型 (SEQ ID NO: 1) 2 pmole、上流プライマー (SEQ ID NO: 2) 10 pmole、PTO (SEQ ID NO: 3) 5 pmole、CTO (SEQ ID NO: 4) 0.5 pmole、SO (SEQ ID NO: 5) 5 pmole 及び 2x マスターミックス (2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、200 μM dNTPs、1.6 unit の H-Taq DNAポリメラーゼ) (Solgent, Korea) 10 μL を含有した 20 μL の最終体積で反応を行った；上記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー (CFX96, Bio-Rad) に位置させた；上記反応混合物を 95 ° で 15 分間変性させ、95 ° で 30 秒、60 ° で 60 秒及び 72 ° で 30 秒の過程を 30 回繰り返した。発生されたシグナルの検出は、毎サイクルごとに変性ステップ (95 °) で行った。

### 【0333】

変性温度 (95 °) での検出は、検出されたシグナルが SO 切断によって発生された標識断片から提供されるようにする。

### 【0334】

図7に示すように、蛍光シグナルは、鋳型が存在する場合に検出された。鋳型、PTO、CTO又はSOがない場合、シグナルは検出されなかった。

### 【0335】

実施例2：上流オリゴヌクレオチド依存的なSO切断を用いたPCE-SCアッセイの評

10

20

30

40

50

価

本発明者らは、SOの上流に位置した上流オリゴヌクレオチド( upstream oligonucleotide; UO)を用いるPCE-SCアッセイを通じてターゲット核酸配列を検出できるかを追加で実験した。

【0336】

5'ヌクレアーゼ活性を持つTaq DNAポリメラーゼは、上流プライマーの伸長、PTOの切断、PTO断片の伸長、UOの伸長及びSOの切断のために使用した。

【0337】

PTO及びCTOは標識せず、3'末端をカーボンスペーサーでブロックした。NG遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドをターゲット鋳型として使用した。SOは5'末端に蛍光レポーター分子(FAM)を含み、3'末端にクエンチャー分子(BHQ-1)を含む。UOはSOの上流に位置し、UOの伸長生成物はTaq DNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性によってSOの切断を誘導する。

【0338】

図4は、本実施例で用いられたPCE-SCアッセイを図式的に示す。

【0339】

本実施例で使用された合成鋳型、上流プライマー、PTO、CTO、SO及びUOの配列は次のとおりである：

NG-T 5' - AAATATGCGAAACACGCCAATGAGGGGGCAT  
GATGCTTTCTTTTGTCTTGCTCGGCAGAGCGAGTGATA  
CCGATCCATTGAAAAA-3' (SEQ ID NO: 1)

NG-R 5' - CAATGGATCGGTATCACTCGC-3' (SEQ  
ID NO: 2)

NG-PTO 5' - ACGACGGCTTGGCT TGCCCTCAATTGGCG  
TGTTTCG[C3 spacer]-3' (SEQ ID NO: 3)

NG-CTO 5' - GTCGTACCGAGATGCGCTTCTGATTCGT  
GCGCTGGATACCCTGACGATATCCAGCCAAGCCGTCGTGC  
TGT[C3 spacer]-3' (SEQ ID NO: 4)

NG-SO 5' - [FAM]TGCGCTGGATACCCTGACGATATC  
C[BHQ-1]-3' (SEQ ID NO: 5)

UO 5' - TACCGAGATGCGCTTCTG-3' (SEQ ID NO  
: 6)

(下線を引いた文字はPTOの5'タグ部位を示す。)

【0340】

NG遺伝子に対する合成鋳型(SEQ ID NO: 1) 2 pmole、上流プライマー(SEQ ID NO: 2) 10 pmole、PTO(SEQ ID NO: 3) 5 pmole、CTO(SEQ ID NO: 4) 0.5 pmole、SO(SEQ ID NO: 5) 5 pmole、UO(SEQ ID NO: 6) 3 pmole及び2xマスターミックス(2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、200 μM dNTPs、1.6 unitのH-Taq DNAポリメラーゼ)(Solgent, Korea) 10 μLを含有した20 μLの最終体積で反応を行った；上記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー(CFX96, Bio-Rad)に位置させた；上記反応混合物を95 °Cで15分間変性させ、95 °Cで30秒、60 °Cで60秒及び72 °Cで30秒の過程を30回繰り返した。発生されたシグナルの検出は、毎サイクルごとに変性ステップ(95 °C)で行った。変性温度(95 °C)での検出は、検出されたシグナルがSO切断によって発生された標識断片から提供されるようにする。

【0341】

図8に示すように、蛍光シグナルは、鋳型が存在する場合に検出された。鋳型がない場合、シグナルは検出されなかった。

【0342】

10

20

30

40

50

### 実施例 3 : P T O の上流プライマー-独立的な切断を用いた P C E - S C アッセイの評価

本発明者らは、P T O の上流に位置した上流プライマーを使用しない P C E - S C アッセイを通じてターゲット核酸配列を検出できるかを追加で評価した。

#### 【 0 3 4 3 】

5 'ヌクレアーゼ活性を持つ T a q DNAポリメラーゼは、P T O の切断、P T O 断片の伸長、U O の伸長及び S O の切断のために使用した。

#### 【 0 3 4 4 】

P T O 及び C T O は標識せず、3 '末端をカーボンスペーサーでブロックした。N G 遺伝子に対する合成オリゴヌクレオチドをターゲット鑄型として使用した。S O は 5 '末端に蛍光レポーター分子 ( F A M ) を含み、3 '末端にクエンチャー分子 ( B H Q - 1 ) を含む。本実施例で P T O は、上記 P T O の上流に位置した上流プライマーの関与なしで T a q DNAポリメラーゼの 5 'ヌクレアーゼ活性によって切断される。U O は S O の上流に位置し、U O の伸長生成物は T a q DNAポリメラーゼの 5 'ヌクレアーゼ活性によって S O の切断を誘導する。

#### 【 0 3 4 5 】

本実施例で使用された合成鑄型、P T O、C T O、S O 及び U O の配列は次のとおりである：

NG - T 5 ' - A A A T A T G C G A A A C A C G C C A A T G A G G G G G C A T  
G A T G C T T T T C T T T T T G T T C T T G C T C G G C A G A G C G A G T G A T A  
C C G A T C C A T T G A A A A A - 3 ' ( S E Q I D N O : 1 )

NG - P T O 5 ' - A C G A C G G C T T G G C T G C C C C T C A T T G G C G  
T G T T T C G [ C 3 s p a c e r ] - 3 ' ( S E Q I D N O : 3 )

NG - C T O 5 ' - G T C G T A C C G A G A T G C G C T T C T G A T T C G T  
G C G C T G G A T A C C C T G A C G A T A T C C A G C C A A G C C G T C G T G C  
T G T [ C 3 s p a c e r ] - 3 ' ( S E Q I D N O : 4 )

NG - S O 5 ' - [ F A M ] T G C G C T G G A T A C C C T G A C G A T A T C  
C [ B H Q - 1 ] - 3 ' ( S E Q I D N O : 5 )

U O 5 ' - T A C C G A G A T G C G C T T C T G - 3 ' ( S E Q I D N O : 6 )

( 下線を引いた文字は P T O の 5 ' タギング部位を示す。 )

#### 【 0 3 4 6 】

N G 遺伝子に対する合成鑄型 ( S E Q I D N O : 1 ) 2 p m o l e、P T O ( S E Q I D N O : 3 ) 5 p m o l e、C T O ( S E Q I D N O : 4 ) 0 . 5 p m o l e、S O ( S E Q I D N O : 5 ) 5 p m o l e、U O ( S E Q I D N O : 6 ) 3 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 <sub>2</sub>、2 0 0 μ M d N T P s、1 . 6 u n i t の H - T a q DNAポリメラーゼ ) ( S o l g e n t , K o r e a ) 1 0 μ L を含有した 2 0 μ L の最終体積で反応を行った；上記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー ( C F X 9 6 , B i o - R a d ) に位置させた；上記反応混合物を 9 5 ° で 1 5 分間変性させ、9 5 ° で 3 0 秒、6 0 ° で 6 0 秒及び 7 2 ° で 3 0 秒の過程を 3 0 回繰り返した。発生されたシグナルの検出は、毎サイクルごとに変性ステップ ( 9 5 ° ) で行った。変性温度 ( 9 5 ° ) での検出は、検出されたシグナルが S O 切断によって発生された標識断片から提供されるようにする。

#### 【 0 3 4 7 】

図 9 に示すように、蛍光シグナルは、鑄型が存在する場合に検出された。鑄型がない場合、シグナルは検出されなかった。

#### 【 0 3 4 8 】

### 実施例 4 : P C E - S C アッセイを用いたターゲット核酸配列の検出

本発明者らは、P C E - S C アッセイを用いてターゲット核酸配列を検出できるかを追加で評価した。

## 【0349】

5'ヌクレアーゼ活性を持つTaq DNAポリメラーゼは、上流プライマー及び下流プライマーの伸長、PTOの切断、PTO断片の伸長、UOの伸長及びSOの切断のために使用した。

## 【0350】

PTO及びCTOは標識せず、3'末端をカーボン Spacer でブロックした。NG遺伝子のゲノムDNAをターゲット鋳型として使用した。SOは5'末端に蛍光レポーター分子(FAM)を含み、3'末端にクエンチャー分子(BHQ-1)を含む。UOはSOの上流に位置し、UOの伸長生成物はTaq DNAポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性によってSOの切断を誘導する。

10

## 【0351】

本実施例で使用された上流プライマー、下流プライマー、PTO、CTO、SO及びUOの配列は次のとおりである：

NG-F 5' - T A C G C C T G C T A C T T T C A C G C T - 3' (SEQ ID NO: 7)

NG-R 5' - C A A T G G A T C G G T A T C A C T C G C - 3' (SEQ ID NO: 2)

NG-PTO 5' - A C G A C G G C T T G G C T G C C C C T C A T T G G C G T G T T T C G [C3 spacer] - 3' (SEQ ID NO: 3)

NG-CTO 5' - G T C G T A C C G A G A T G C G C T T C T G A T T C G T G C G C T G G A T A C C C T G A C G A T A T C C A G C C A A G C C G T C G T G C T G T [C3 spacer] - 3' (SEQ ID NO: 4)

20

NG-SO 5' - [FAM] T G C G C T G G A T A C C C T G A C G A T A T C C [BHQ-1] - 3' (SEQ ID NO: 5)

UO 5' - T A C C G A G A T G C G C T T C T G - 3' (SEQ ID NO: 6)

(下線を引いた文字はPTOの5'タグ部位を示す。)

## 【0352】

NGのゲノムDNA 100 pg、上流プライマー(SEQ ID NO: 2) 10 pmole、下流プライマー(SEQ ID NO: 7) 10 pmole、PTO(SEQ ID NO: 3) 5 pmole、CTO(SEQ ID NO: 4) 0.5 pmole、SO(SEQ ID NO: 5) 5 pmole、UO(SEQ ID NO: 6) 3 pmole及び2xマスターミックス(2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、200 μM dNTPs、1.6 unitのH-Taq DNAポリメラーゼ)(Solgent, Korea) 10 μLを含有した20 μLの最終体積で反応を行った；上記反応混合物を含有しているチューブをリアルタイムサーマルサイクラー(CFX96, Bio-Rad)に位置させた；上記反応混合物を95 °Cで15分間変性させ、95 °Cで30秒、60 °Cで60秒及び72 °Cで30秒の過程を40回繰り返した。発生されたシグナルの検出は、毎サイクルごとに変性ステップ(95 °C)で行った。変性温度(95 °C)での検出は、検出されたシグナルがSO切断によって発生された標識断片から提供されるようにする。

30

40

## 【0353】

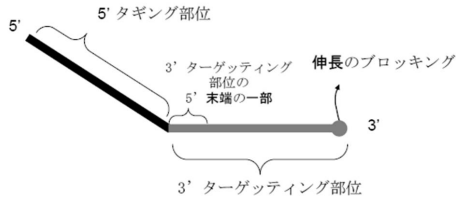
図10に示すように、蛍光シグナルは、鋳型が存在する場合に検出された。鋳型がない場合、シグナルは検出されなかった。

## 【0354】

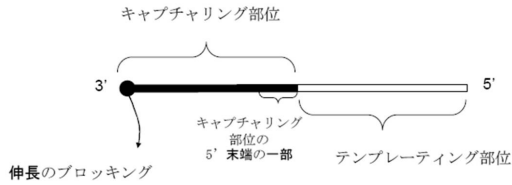
以上、本発明の特定の部分を詳細に記述したが、当業界の通常の知識を有する者にとってこのような具体的な記述は単に好ましい実現例に過ぎず、本発明の範囲がこれに制限されないことは明らかである。したがって、本発明の実質的な範囲は、添付の請求項とそれの等価物によって定義されると言える。

【 図 1 】

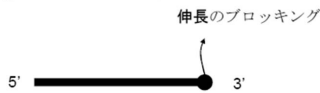
A. プロービングアンドタグgingオリゴヌクレオチド (Probing and Tagging Oligonucleotide: PTO)



B. キャプチャリングアンドテンプレートingオリゴヌクレオチド (Capturing and Templating Oligonucleotide: CTO)

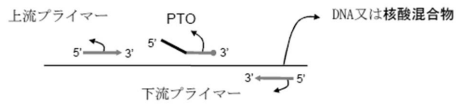


C. シグナリングオリゴヌクレオチド (Signaling Oligonucleotide: SO)

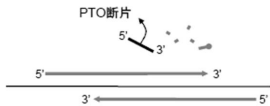


【 図 3 】

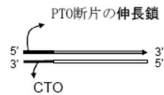
A. ハイブリダイゼーション



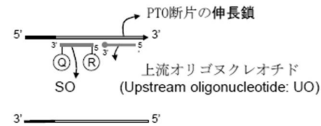
B. プライマー伸長及びPTO切断



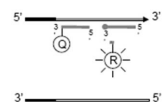
C. CTOとPTO断片のハイブリダイゼーション及び伸長



D. 伸長鎖とSO及びUOとのハイブリダイゼーション

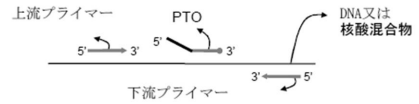


E. 5'ヌクレアーゼによるSOの切断及び検出

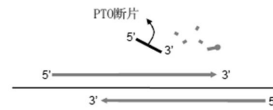


【 図 2 】

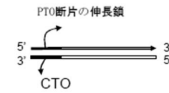
A. ハイブリダイゼーション



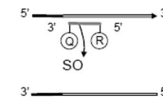
B. プライマー伸長及びPTO切断



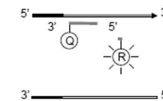
C. CTOとPTO断片とのハイブリダイゼーション及び伸長



D. 伸長鎖とSOとのハイブリダイゼーション

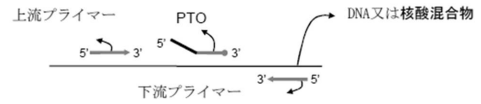


E. 5'ヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼ又は制限酵素によるSOの切断及び検出

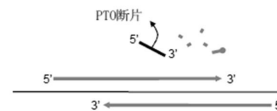


【 図 4 】

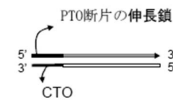
A. ハイブリダイゼーション



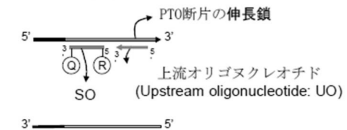
B. プライマー伸長及びPTO切断



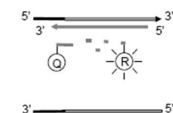
C. CTOとPTO断片とのハイブリダイゼーション及び伸長



D. 伸長鎖とSO及びUOとのハイブリダイゼーション

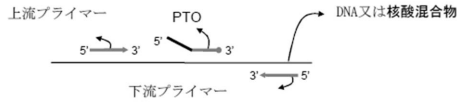


E. 5'ヌクレアーゼによるSOの切断及び検出

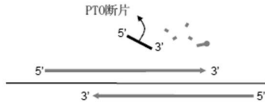


【図5】

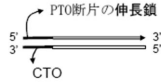
A. ハイブリダイゼーション



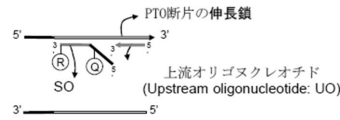
B. プライマー伸長及びPTO切断



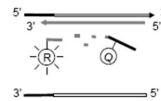
C. CTOとPTO断片とのハイブリダイゼーション及び伸長



D. 伸長鎖とS0及びU0とのハイブリダイゼーション

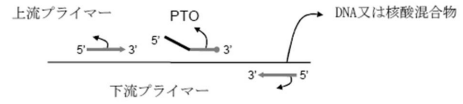


E. 5' スクレアーゼによるS0の切断及び検出

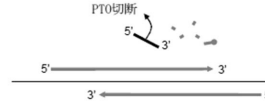


【図6】

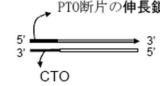
A. ハイブリダイゼーション



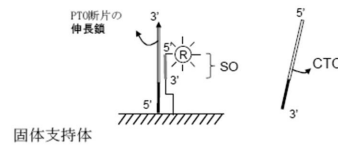
B. プライマー伸長及びPTO切断



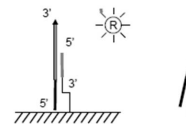
C. CTOとPTO断片とのハイブリダイゼーション及び伸長



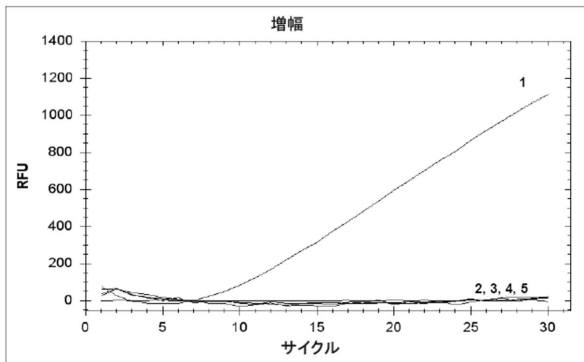
D. 伸長鎖とS0とのハイブリダイゼーション



E. 5' スクレアーゼ、リボスクレアーゼ又は制限酵素によるS0の切断及び検出



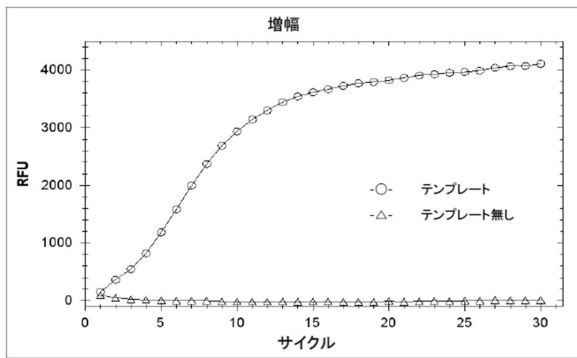
【図7】



No.	テンプレート <sup>1)</sup>	上流プライマー <sup>2)</sup>	PTO <sup>3)</sup>	CTO <sup>4)</sup>	S0 <sup>5)</sup>
1	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	+
3	+	+	-	+	+
4	+	+	+	-	+
5	+	+	+	+	-

- 1) テンプレートは*Neisseria gonorrhoeae*に対する合成オリゴヌクレオチドである。
- 2) 上流プライマーはPTOの上流に位置する。
- 3) PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)はその3'末端がカーボンスペーサーでブロックされる。
- 4) CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)はその3'末端がカーボンスペーサーでブロックされる。
- 5) S0(Signaling Oligonucleotide)はその5'末端に蛍光分子及びその3'末端にクエンチャー分子を持つ。

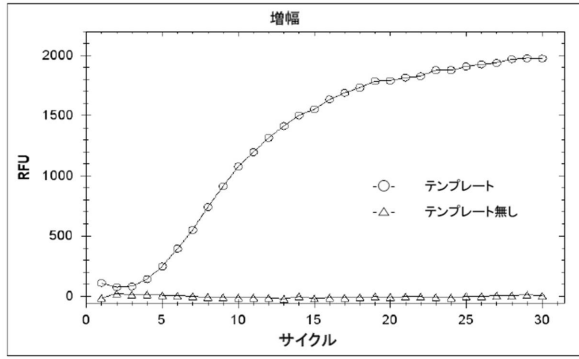
【図8】



テンプレート <sup>1)</sup>	上流プライマー <sup>2)</sup>	PTO <sup>3)</sup>	CTO <sup>4)</sup>	S0 <sup>5)</sup>	UO <sup>6)</sup>
+	+	+	+	+	+
-	+	+	+	+	+

- 1) テンプレートは*Neisseria gonorrhoeae*に対する合成オリゴヌクレオチドである。
- 2) 上流プライマーはPTOの上流に位置する。
- 3) PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)はその3'末端がカーボンスペーサーでブロックされる。
- 4) CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)はその3'末端がカーボンスペーサーでブロックされる。
- 5) S0(Signaling Oligonucleotide)はその5'末端に蛍光分子及びその3'末端にクエンチャー分子を持つ。
- 6) UO(Upstream Oligonucleotide)はS0の上流に位置する。

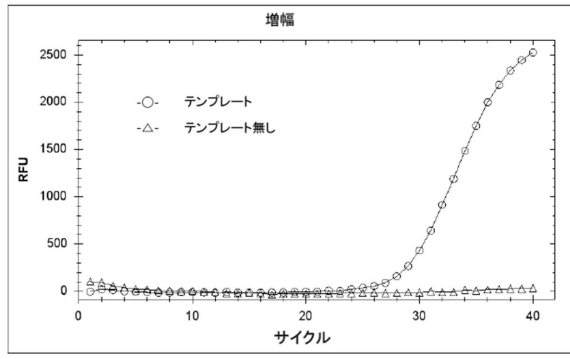
【図 9】



テンプレート <sup>1)</sup>	上流プライマー <sup>2)</sup>	PTO <sup>3)</sup>	CTO <sup>4)</sup>	SO <sup>5)</sup>	UO <sup>6)</sup>
+	-	+	+	+	+
-	-	+	+	+	+

- 1) テンプレートは*Neisseria gonorrhoeae*に対する合成オリゴヌクレオチドである。
- 2) 上流プライマーはPTOの上流に位置する。
- 3) PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)はその3'末端がカーボンスペーサーでブロックされる。
- 4) CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)はその3'末端がカーボンスペーサーでブロックされる。
- 5) SO(Signaling Oligonucleotide)はその5'末端に蛍光分子及びその3'末端にクエンチャー分子を持つ。
- 6) UO(Upstream Oligonucleotide)はSOの上流に位置する。

【図 10】



テンプレート <sup>1)</sup>	プライマー <sup>2)</sup>	PTO <sup>3)</sup>	CTO <sup>4)</sup>	SO <sup>5)</sup>	UO <sup>6)</sup>	Ct
+	+	+	+	+	+	28.51
-	+	+	+	+	+	-

- 1) テンプレートは*Neisseria gonorrhoeae*のゲノムDNAである。
- 2) プライマーは上流プライマー及び下流プライマーである。
- 3) PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)はその3'末端がカーボンスペーサーでブロックされる。
- 4) CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)はその3'末端がカーボンスペーサーでブロックされる。
- 5) SO(Signaling Oligonucleotide)はその5'末端に蛍光分子及びその3'末端にクエンチャー分子を持つ。
- 6) UO(Upstream Oligonucleotide)はSOの上流に位置する。

【配列表】

0006096885000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 チュン・ジョン ユーン

大韓民国 135-100 ソウル カンナム-グ ヨンドン-デロ 142ギル 21 チョン  
ダム 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 138-240 ソウル ソンパ-グ シンチョン-ドン #17 パーク リオ ア  
パートメント 112-3501

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 特表2015-505470(JP,A)

国際公開第2011/037306(WO,A1)

国際公開第2011/028041(WO,A1)

特表2008-519605(JP,A)

特開2003-334097(JP,A)

特表2015-520603(JP,A)

特表2014-515604(JP,A)

特表2013-538041(JP,A)

nature biotechnology, 1999年, Vol.17, p.292-296

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00-15/90

PubMed

(54)【発明の名称】PTO切断及び伸長依存的なシグナリングオリゴヌクレオチド切断を用いたターゲット核酸配列の検出{Detection of Target Nucleic Acid Sequence by PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Cleavage}