

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-520004

(P2004-520004A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/566

F I

C 1 2 N 15/00

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/566

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 69 頁)

(21) 出願番号 特願2001-584572 (P2001-584572)
 (86) (22) 出願日 平成12年6月12日 (2000.6.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年11月12日 (2002.11.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/016130
 (87) 国際公開番号 W02001/088190
 (87) 国際公開日 平成13年11月22日 (2001.11.22)
 (31) 優先権主張番号 60/204,057
 (32) 優先日 平成12年5月12日 (2000.5.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, JP

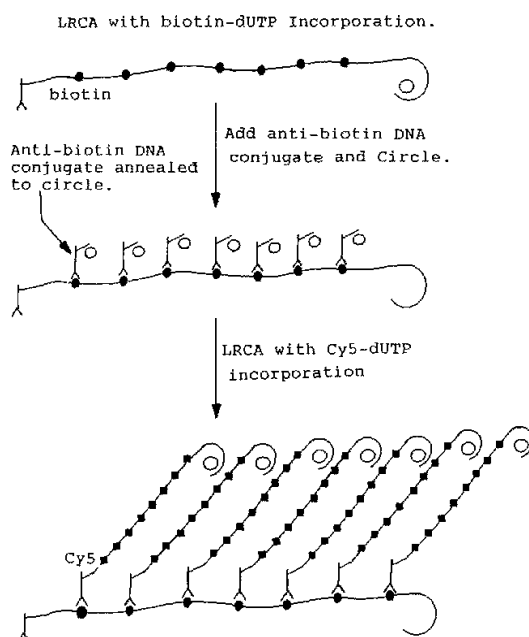
(71) 出願人 501305394
 モレキュラー ステージング, インコーポ
 レイテッド
 アメリカ合衆国, O 6 5 1 1 コネティ
 カット, ニューヘブーン, ジョージ ストリ
 ート 3 0 0, スイート 7 0 1
 (74) 代理人 100066061
 弁理士 丹羽 宏之
 (72) 発明者 キングズモア, スティーブン, エフ.
 アメリカ合衆国, O 6 4 3 7 コネティカ
 ット, ギルフォード, ポダンク ロード
 6 0 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸配列のポリプライムド増幅

(57) 【要約】

高速ではあるが高い特異性と制御で選択された核酸の増幅のための方法が、二次、三次、四次、またはそれ以上の高次のプラットフォーム、とりわけ線型または対数のローリングサークル増幅の一次産物の範囲内で、選択された配列を増幅するように特に設計されたものを使用して開示され、また更に増幅産物を検出する能力を高めるのに役立つ特定の検出またはレポーター分子と共に前記配列を増幅する事が開示される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸配列を選択的に増幅する一つのプロセスであって、

(a) 少なくとも 1 個の一本鎖非環状第 1 ステージオリゴヌクレオチドプライマー (P 1) と少なくとも 1 個の一本鎖第 1 ステージ増幅標的サークル (A T C 1) を混合してプライマー - A T C サンプル混合物を産生し、

(b) 前記プライマー - A T C 1 サンプル混合物を、オリゴヌクレオチドプライマー (P) と増幅標的サークル (A T C 1) の間で雑種形成を促進する条件の下で培養して雑種化プライマー - A T C 1 サンプル混合物を形成し、また雑種化プライマー - A T C 1 複合体への形成を通過するのに十分な時間を与え、

(c) D N A ポリメラーゼと少なくとも 2 個のデオキシヌクレオチド三リン酸を前記雑種化プライマー - A T C 1 サンプル混合物と混合してポリメラーゼ - プライマー - A T C 1 サンプル混合物を産生し、更にポリメラーゼ - プライマー - A T C 1 混合物を、増幅標的サークルの複製を促進する条件の下で培養して一次タンデム配列 D N A (T S - D N A) を形成し、

(d) 前記ポリメラーゼ - プライマー - A T C 1 混合物に少なくとも 1 個の第 2 ステージプライマーオリゴヌクレオチド (P 2) を付加し、前記 P 2 は前記一次 T S - D N A に存在する 1 個またはそれ以上の配列に相補である配列を持つ第 1 部分、またはセグメントと、3' - O H 末端を含み、前記一次 T S - D N A に相補でない配列を持つ第 2 部分より成り、その条件の下で P 2 の前記第 1 部分の雑種形成を促進し、これにより T S - D N A - P 2 複合体を形成し、

(e) 1 個またはそれ以上の第 2 ステージ増幅標的サークル (A T C 2) を (d) の混合物に付加し、その条件の下で前記 A T C 2 の前記 P 2 の第 2 部分への雑種形成を促進してタンデム配列 - P 2 - A T C 2 混合物を形成し、ここで (e) の増幅標的サークルの複製が二次タンデム配列 D N A の形成を生じる、
ことを含むことを特徴とするプロセス。

10

20

【請求項 2】

請求項 1 記載のプロセスであって、更に以下の追加のステップ、すなわち

(f) 前記ポリメラーゼ - プライマー - A T C 2 混合物に少なくとも 1 個の第 3 ステージプライマーオリゴヌクレオチド (P 3) を付加し、前記 P 3 は前記二次 T S - D N A に存在する 1 個またはそれ以上の配列に相補である配列を持つ第 1 部分、またはセグメントと、3' - O H 末端を含み、前記二次 T S - D N A に相補でない配列を持つ第 2 部分より成り、その条件の下で P 3 の前記第 1 部分の前記二次 T S - D N A への雑種形成を促進し、これにより T S - D N A - P 3 複合体を形成し、

(g) 1 個またはそれ以上の第 3 ステージ増幅標的サークル (A T C 3) を (f) の混合物に付加し、その条件の下で P 3 の前記第 2 部分に対して前記 A T C 3 の雑種形成を促進してタンデム配列 - P 3 - A T C 3 混合物を形成し、ここで (f) の増幅標的サークルの複製が三次タンデム配列 D N A の形成を生じる、
ステップを含むことを特徴とするプロセス。

30

40

【請求項 3】

請求項 2 記載のプロセスであって、更に以下の追加のステップ、すなわち

(h) 前記ポリメラーゼ - プライマー - A T C 3 混合物に少なくとも 1 個の第 4 ステージプライマーオリゴヌクレオチド (P 4) を付加し、前記 P 4 は前記三次 T S - D N A に存在する 1 個またはそれ以上の配列に相補である配列を持つ第 1 部分、またはセグメントと、3' - O H 末端を含み、前記三次 T S - D N A に相補でない配列を持つ第 2 部分より成り、その条件の下で P 4 の前記第 1 部分の前記三次 T S - D N A への雑種形成を促進し、これにより T S - D N A - P 4 複合体を形成し、

(i) 1 個またはそれ以上の第 4 ステージ増幅標的サークル (A T C 4) を (h) の混合物に付加し、その条件の下で P 4 の前記第 2 部分に対して前記 A T C 4 の雑種形成を促進してタンデム配列 - P 4 - A T C 4 混合物を形成し、ここで (h) の増幅標的サークルの

50

複製が、四次タンデム配列DNAの形成を生じる、ステップを含むことを特徴とするプロセス。

【請求項4】

請求項1、2、または3記載のプロセスであって、ここで増幅標的サークルが、同一であることを特徴とするプロセス。

【請求項5】

請求項1、2、または3記載のプロセスであって、ここで増幅標的サークルが、与えられたステージ内で同一であることを特徴とするプロセス。

【請求項6】

請求項1、2、または3記載のプロセスであって、ここで1個のステージの増幅標的サークルが、1個またはそれ以上の他のステージの増幅標的サークルと異なることを特徴とするプロセス。 10

【請求項7】

請求項1、2、または3記載のプロセスであって、ここで前記二次または高次ステージプライマーの第1の部分が、相互に同一であることを特徴とするプロセス。

【請求項8】

請求項1、2、または3記載のプロセスであって、ここで与えられたステージ内での前記二次または高ステージプライマーの第2部分が、相互に同一であることを特徴とするプロセス。

【請求項9】 20

請求項1、2、または3記載のプロセスであって、更にタンデム配列DNA(TS-DNA)の存在を検出することを含むことを特徴とするプロセス。

【請求項10】

請求項9記載のプロセスであって、ここで複製を促進するステップ(c)の状態が、前記混合物内に第1レポーター分子と結合するdNTP基質の存在を含み、またここで前記第1レポーター分子が、これにより前記タンデム配列DNAにとり込まれることを特徴とするプロセス。

【請求項11】

請求項10記載のプロセスであって、ここでプライマーオリゴヌクレオチドP2が、前記第1レポーター分子に結合できる第1反応性分子に結合することを特徴とするプロセス。 30

【請求項12】

請求項11記載のプロセスであって、ここでプライマーP2を伸長するのに使用されるdNTPsが、第2レポーター分子と結合し、このようにして前記第2レポーター分子が二次タンデム配列DNAにとり込まれることになることを特徴とするプロセス。

【請求項13】

請求項12記載のプロセスであって、ここでプライマーオリゴヌクレオチドP3が、前記第2レポーター分子に結合できる第2反応性分子と結合することを特徴とするプロセス。

【請求項14】

請求項13記載のプロセスであって、ここでプライマーP3を伸張するために使用されるdNTPsが、第3レポーター分子と結合し、このようにして前記第3レポーター分子が三次タンデム配列DNAにとり込まれることになることを特徴とするプロセス。 40

【請求項15】

請求項14記載のプロセスであって、ここでプライマーオリゴヌクレオチドP4が、前記第3レポーター分子に結合できる第3反応性分子に結合することを特徴とするプロセス。

【請求項16】

請求項1、10、12または14記載のプロセスであって、ここで前記dNTPが、dUTP、dCTP、dATP、dGTP、前記のものとは異なる自然発生dNTP、dNTPの類似体、及び普遍塩基を持つdNTPより成るグループより選択される部材であることを特徴とするプロセス。

【請求項17】

請求項 10、12、または 14 記載のプロセスであって、ここで前記レポーター分子が、
ピオチン、ジゴキシゲニン、ハプテン、酵素、質量標識およびこれらを組み合わせたもの
より成るグループから選択されることを特徴とするプロセス。

【請求項 18】

請求項 17 記載のプロセスであって、ここで少なくとも 2 個の第 1、第 2 および第 3 レポ
ーター分子が、化学的に別個のものであることを特徴とするプロセス。

【請求項 19】

請求項 11、13、または 15 記載のプロセスであって、ここで少なくとも 2 個の前記第
1、第 2 および第 3 反応性分子が、化学的に別個のものであることを特徴とするプロセス
。

10

【請求項 20】

請求項 19 記載のプロセスであって、ここで前記反応性分子が、酵素および抱合体より成
るグループから選択されることを特徴とするプロセス。

【請求項 21】

請求項 20 記載のプロセスであって、ここで前記抱合体が、抗ピオチン DNA、抗ジオキ
シゲニン DNA、二本鎖結合タンパク質、一本鎖結合タンパク質、およびアプタマーより
成るグループから選択される部材を含むことを特徴とするプロセス。

【請求項 22】

請求項 21 記載のプロセスであって、ここで前記結合タンパク質が、DNA または RNA
と結合することを特徴とするプロセス。

20

【請求項 23】

請求項 10、12、または 14 記載のプロセスであって、ここで前記レポーター分子が、
Cy5 または Cy3 であることを特徴とするプロセス。

【請求項 24】

請求項 10、12、または 14 記載のプロセスであって、ここで前記レポーター分子が、
フルオロフォアであることを特徴とするプロセス。

【請求項 25】

請求項 1、2、または 3 記載のプロセスであって、ここで前記プライマーが、長さで 2 乃
至 15 ヌクレオチドからのものであることを特徴とするプロセス。

【請求項 26】

請求項 1、2、または 3 記載のプロセスであって、ここで前記 1 個またはそれ以上のプラ
イマーが、雑種形成、共有結合またはポリヌクレオチドの三重式の形成より成るグループ
から選択される化学連鎖を通じて TS-DNA に付着することを特徴とするプロセス。

30

【請求項 27】

請求項 1、2、または 3 記載のプロセスであって、ここで少なくとも 1 個のプライマーが
、双極性であることを特徴とするプロセス。

【請求項 28】

請求項 1、2、または 3 記載のプロセスであって、ここで少なくとも 1 個のプライマーが
、固体支持材に付着されることを特徴とするプロセス。

【請求項 29】

請求項 28 記載のプロセスであって、ここで前記固体支持材が、ガラスまたはプラスチッ
クで作られていることを特徴とするプロセス。

40

【請求項 30】

請求項 1、2、または 3 記載のプロセスであって、ここで 1 個、またはそれ以上のタンデ
ム配列 DNA 産物が、検出されることを特徴とするプロセス。

【請求項 31】

請求項 30 記載のプロセスであって、ここで前記検出が、雑種形成プローブ、フルオロフ
ォア、リガンド結合分子、抗体、FKBP フォールド結合分子、酵素、受容体、核酸結合
タンパク質、リボソームまたは他の RNA 結合タンパク質、アフィニティー作用薬および
アプタマーより成るグループから選択されるデコレーターの使用により達成されることを

50

特徴とするプロセス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本出願は、2000年5月12日に受理された合衆国暫定特許出願番号第60/204057の利益を主張し、その開示は全体としてここに組み込まれている。

【0002】

本発明は、従来のローリングサークル法を上回る量と反応速度の利点を持つ生産物種の検出の向上を提供するように、ローリングサークル増幅で多段プラットフォームを確立するためのプロセスに関する。

10

【0003】

【発明の背景】

標的DNA分子を増幅する手段は、このような増幅DNAが、続くDNA配列化、クローニング、地図化、遺伝子型化、プローブの生成、および診断による同定を含む方法にしばしば利用されることが多い。

【0004】

これまでの所、核酸の検出に基づき感受性診断検定を可能にするようにいくつかの方法が開発されてきた。その大部分はDNAより成る選択された標的およびまたはプローブの増幅の周辺で設計されたものであり、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、自給配列複製(3SR)、核酸配列ベースの増幅(NASBA)、鎖置換増幅(SDA)、およびQβレプリカーゼでの増幅などが含まれている(バーケンマイヤーおよびマシャヴァール, ウイルス学方法ジャーナル, 35巻: 117-126ページ(1991年); ランディグレン, トレンズ・ジェネティクス, 9巻: 199-202ページ(1993年))。これらの方法のいくつかは、相対的に低い量的測定の精度、とりわけ多重検定(1個以上の標的が同時に検定される場合、マルチプレックスシーケンス法)での精度の低いことに難点がある。これらの欠点は、ローリングサークル増幅(RCA)法により殆んど解決された。

20

【0005】

これまでに、M13などのバクテリオファージからのプラスミドまたはDNAなどの環状DNA分子を増幅するいくつかの方法が使用されてきた。その一つは、大腸菌の適切な宿主菌株でのこれら分子の増殖であり、それに続く十分立証されたプロトコルによるDNAの増幅であった。(サンプルック, J., フリッツ, E. F., マニエイタス, T., 分子クローニング, ラボラトリーマニュアル, 1989年, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス, コールド・スプリング・ハーバー ニューヨーク)。またPCRは、M13などのバクテリオファージからのプラスミドおよびDNAなどのようなDNA標的において、決まった配列を増幅するためにしばしば使用された方法であった。(PCRプロトコルズ, 1990年, M. A. イニス, D. H. ゲルフアンド, J. J. スニンスキー編, アカデミック・プレス, サンディエゴ)。これらの方法のいくつかは、労力を要し、費用が高く、時間がかかり、効率が悪く、また感受性を欠いていることで難点がある。

30

【0006】

これらの方法を改良したものとして、線型ローリングサークル増幅(LRCA)は、環状標的DNA分子にアニーリングされたプライマーを使用し、DNAポリメラーゼが付加される。LRCAに対する改良は、LRCA産物鎖に対してアニーリングする付加プライマーと共に指数RCA(ERCA)の使用である。従って二本鎖DNAを産出することができ、指数増幅はHRCAとして引用される鎖置換反応を経由して起こすことができる(ライザーディ, P. M. 他, ネイチャー・ジェネティクス, (1998年)19巻, 225-231ページ)。

40

【0007】

多重検定の複合標的は、例えばウイルスまたは他の微生物である。かくしてウイルス感染

50

患者の臨床状態は、ウイルス負荷に（例えばHIV感染で）大きく依存しており、従ってこのようなウイルス負荷を量的に決定する手段は、とりわけ価値がある。このような多重検定においては、異なる標的、例えば異なるウイルス、またはウイルスの異なる菌株の測定が正確に決定されねばならず、また異なる標的の比率が、標的配列の比率の真のインジケータでなければならないということが重要である。このような目的のために、多重、指数核酸増幅法がしばしば用いられたが、多重ローリングサークル増幅法のみが、多重検定システムの多くの目標に合致して成功を遂げている [ライザーディ, 合衆国特許番号 5, 854, 033号参照、その開示はここで全体として引用例として組み込まれている]

。

【0008】

しかしこのような方法には過誤の源が存在し、例えば構造的差異が異なる効率に導く場合ならば、異なる事象は異なる標的配列を伴い、または産物鎖アニーリングの速度の差は、異なる標的配列で異なり、前記プライミング事象と競争する速度を変えることに導くであろう。すなわちその構造と安定性を異にする種を同時に発生する多重連続反応効果を持つ作用（その事象が連続反応の反復により拡大されるもの）、および一つのサイクルから他のサイクルへの増幅からの産出での小さな差が最終産物の比率の望ましくない大きな差に帰着するように指数的に拡大される可能性などのプライミング事象と競争する速度の変化に導くことができる。RCA法は信号収率の故で誤りを克服した。というのは増幅収率が標的の量に比例するからである（すなわち検出効率は標的DNAの十分な量を利用できるかどうかには依存せず、そのため標的のほんの僅かな量でさえ非常に大きな信号感受性を提供することができる）。

【0009】

DNA増幅のためのもっとも初期の方法はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）であり、これはDNAの線型セグメントのみで操作し、その増幅が望ましいDNAのセグメントの5' - および3' - 末端の特異的プライマー配列を用いて線型セグメントを産出した。この方法を改良したものとして、線型ローリングサークル増幅法（LRCA）は、開環状プローブに雑種形成する標的DNA配列を使用して複合体を形成し、それは次いで連結されて増幅標的サークルを産出し、プライマー配列とDNAポリメラーゼが加えられた。増幅標的サークル（ATC）は、そのように新しいDNAが作られる鋳型を形成し、それによりATCに相補である反復配列の連続配列としてプライマー配列を伸長したが、1時間当たり約数千の複製のみが生成されるだけにとどまった。LRCAの改良は、複製補体配列に結合する追加のプライミング配列での指数RCA（ERCA）の使用で増幅の新しいセンターを提供し、これにより指数的反応速度と大きく増加した増幅を提供される。指数ローリングサークル増幅（ERCA）は鎖置換反応のカスケードを利用するが、それは当初の一本鎖RCA産物を鋳型として使用することに限定され、更なるDNA合成には前記産物に付着するけれども、追加のローリングサークル増幅のない個別の一本鎖プライマーを使用する。

【0010】

これらの方法すべては、とりわけ稀有遺伝事象、例えばまれな突然変異に対し、ならびにマルチプレックス化に関する制限および柔軟な検出手順に対しての感受性の欠除という難点がある。

【0011】

本発明の方法（ここでポリプライムドローリングサークル増幅法 - PPRCAとして引用されるもの）は、線型ローリングサークル増幅の感受性を改良する手順を採用し、一方RCAの追加のステージ、またはプラットフォームを使用する正確な指数増幅を採用する（従ってそれによりより大きな感受性をもたらす）ことによる高い特異性を保持し、連続反応段階への信頼性を除去するが、指数RNAの利点と固相に増幅する能力を保持することにより前記の不利益を避ける。本発明は、ローリングサークル増幅法の新しい適用に高度に有用である低コスト、稀有事象に対する感受性、柔軟性、とりわけ検出試薬の使用の際の柔軟性、および汚染の低いリスクなどの利点を持つ。

【 0 0 1 2 】

【 発明の概要 】

本発明は、単一ヌクレオチド（単一ヌクレオチド多型 - S N P ）としてできるだけ小さな変化、または突然変異を含む標的 D N A 分子の遺伝子型での差異を検出し、同じく D N A の与えられたサンプルでこのような突然変異の相対的存在の量的測定を提供する手段としての前記標的 D N A 分子の選択的増幅のプロセスに関する。

【 0 0 1 3 】

本発明は、更に線型または指数ローリングサークル増幅の一次産物内で選択された配列を増幅するように特に設計された二次、三次、四次またはより高次の位のプラットフォームを用い、また増幅産物を検出する能力を高めるのに役立つ特化されたデテクターまたはレポーター分子と共に前記配列を増幅するその選択的増幅により、標的 D N A 分子の選択的検出のための方法を提供する。

10

【 0 0 1 4 】

別個の実施例においては、本発明の方法内で有用なレポーター分子は、ビオチン、ジゴキシゲニン、ハプテンおよび質量標識またはこれらのいずれかの組合せなどの分子を含む。

【 0 0 1 5 】

他の実施例においては、本発明は、異なる種類のデテクターおよびレポーター結合分子のための連続反応を提供するために、選択されたヌクレオチドを採用し、この連続反応は、生成するローリングサークル産物を検出するのに利点を提供するように選択的に構築され構成された異なるデオキシヌクレオシドリ酸、同じく無塩基ヌクレオチドを及びヌクレオシドを利用する。レポーター分子は更に酵素、フルオロフォアおよび各種の抱合体を含む。

20

【 0 0 1 6 】

本発明の更なる見地は、環状 D N A 標的の増幅を高めるプロセスに関する。それは線型ローリングサークル増幅の単一プライムド鋳型環状 D N A 分子への感受性を改良する。

【 0 0 1 7 】

【 発明の説明 】

本発明の方法は、一次タンデム配列（ T S - D N A ）産物から発生する二次、三次、四次、およびより高次の位の増幅プロセスに起因して、非常に多く増加した増幅を提供する。このような D N A は、ローリングサークル増幅の最初または一次産物であり、またローリングサークル、または鋳型として使用される増幅標的サークル（ A T C ）で見出される配列のタンデム反復を含有する無傷の一本鎖を含む。このようなタンデム配列それぞれは、それ自身を T S - D N A に沿って次いで複製される追加のプライマーと結合するように役立たせることができ、各複製フォークは、その前にあるプライマーを置換し、それにより 1 種の指数 R C A （ローリングサークル増幅）を提供する。

30

【 0 0 1 8 】

本発明において、このようなプライマーは付着のためだけに使用され、タンデム配列と結合した後では、一次または後の T S - D N A 産物のいずれかである D N A 産物は、真に指数増幅のための追加鋳型として作用する追加増幅標的サークルに付着のための追加配列を提供する。かくして増幅の速度と範囲は最初の T S - D N A 産物に結合できるプライマー数に限定されず、代って、各ステージ、またはプラットフォームで増幅の追加のステージの核として作用するステージに進行する。かくして本発明に基づいて、最初または一次 T S - D N A 産物に依存する各タンデム配列は、タンデム配列増幅の新しい全世代の種子として機能し、また、それから形成された各二次 T S - D N A 産物も無限に追加の種子を含む。他のものと同じように、単一ヌクレオチド多型を含む増幅および稀有遺伝さえ検出する本発明のユニークな感受性を提供することが本特徴である。

40

【 0 0 1 9 】

前記に従って、本発明の一つの実施例は、一次 R C A 産物に固定されたまま残り、これにより増幅の増加、同じく検出の感受も増加、および汚染の機会の減少を提供する二次増幅を持つ。他の実施例では、二次増幅は一次増幅反応と同時に起こり、適切な増幅に必要と

50

される数多くのステップで速度と経済性の増大を来たしている。本発明のプロセスは、ポリメラーゼリードスルー（すなわち複製フォークを進めることによる続くプライマーとその新しく合成された尾部の取り替え）に起因する二次増幅鎖の取り替えから起こる所謂高分枝 R C A の不利益を克服する。

【0020】

現在使用される R C A 手順においては、多分標的 D N A 配列と結合するプライマー配列は、増幅標的サークルを形成するために追加配列との反応を許され、その大部分は図 1 の初期段階（A 乃至 D 段階）で示される。しかし高分枝鎖は、次いでタンデム配列 D N A に沿って依存する配列に結合するプライマーを加えることで形成される（図 1、D）。それらのプライマーは、D N A 合成の追加のラウンドを開始し、D N A ポリメラーゼと反応して（鑄型として）T S - D N A に沿って合成される新しい鎖を形成し、新しく形成された各鎖はその前方（すなわち 3' - 方向で）雑種形成鎖を置換し、その結果、鑄型として D N A の長い配列が存在し、数多くの配列がその上に合成され、一方このような新規に形成された各配列は、その 5' 末端でその後合成された配列により置換される。T S - D N A の新しい各セグメントは、もとの A T C から予定どおりに起こるので、新しいプライマーは、そのセグメントを結合し、新しい D N A 鎖を開始し、かくして新規に形成された鎖は、それが更に A T C の近辺から更に除かれているように長さを増加している（例えば、図 11 に示された合衆国特許番号 5, 854, 033 号を参照されたい）。

10

【0021】

ここで開示されたプロセスに従って、1 個またはそれ以上のプライマーを、雑種形成、共存結合またはポリヌクレオチド三倍体より成るグループから選択された化学的連結反応を通じて T S - D N A 産物に付加することができる。

20

【0022】

本発明のポリプライムドロリングサークル増幅法（P P R C A）は、線型または高分枝ローリングサークル増幅法よりも優れた改良を提供し、そこでは、反応速度は真に事実上、指数的であり（製品が形成され、または多重出発部位から幾何学的増加量で増幅され）、一方 R C A T S - D N A 産物に結合し、または少なくとも 1 個の実施例では、もとのまたは一次 T S - D N A 産物に類似し、または類似していない追加のタンデム配列 D N A 産物を産出するために、追加の増幅標的サークルに結合する追加のセットのプライマー（P 2）を使用することで鎖の置換を避ける。かくして本発明のこの方法は、増幅の一次およびその後のすべてのラウンドを効果的に分離する。

30

【0023】

視点を変えて、他の R C A 法においては、第 2 D N A 増幅は、当初の T S - D N A を鑄型として使用する D N A 合成を開始するプライマーから誘導され、かくしてすべての二次 T S - D N A は、必ず構造的に当初の一次 T S - D N A 産物の配列に関連する事になり、またそのように鎖置換が必要とされる。本発明のポリプライムド R C A において、二次プライマー（すなわち P 2）は別のセグメントを持つことができ、その一つは一次 T S - D N A に結合する（固定させる目的のための）ものであり、またすべての二次、および多分三次、四次、および高次の位のラウンドの増幅が P 2 プライマー、または P 3 プライマー、もしくは P 4 プライマー等に結合する A T C s を増幅するように完全に異なる完全に異なった増幅標的サークル（A T C）に相補であるプライマーとして役立つ追加のセグメントを持つことができる。ここで開示された P P R C A 法を使用して、反応条件が許す条件下で、望ましいできるだけ多くのステージの増幅を生成することが可能であり、ここで各ステージの増幅は、各組がヌクレオチド配列において異なる A T C の潜在的に異なる組の A T C s を複製し、またここで各ステージは、そのそれぞれが複製される A T C 鑄型の組に基づいて、タンデム反復のそれ自身のコンカテマー（鎖状体）である新しい T S - D N A を生成する。

40

【0024】

本発明のこの方法の見本実施例は図 1 に記載され、これは本発明のポリプライムドロリングサークル増幅（P P R C A）法の一つの実施例を図形で示している。ここでオリゴヌ

50

クレオチドプライマー（長さ約 20 - 50 塩基）は、増幅標的サークルに相補の領域（長さ約 65 - 150 塩基）（（A）参照）と、短い非相補領域を持つオリゴヌクレオチドプライマーである。Bでは、オリゴヌクレオチドプライマー（長さ20 - 50 塩基）の相補領域は、LRCA（C）に記載されたように、酵素、dNTPs、等を加えて増幅標的サークルに特異的に雑種形成する。（D）は初期のセグメントに置換するDNAポリメラーゼを持つRCAプライマーの伸長を示す。Eでは、標的サークル（長さ16 - 50 塩基）に同一の領域と非相補領域（長さ2 - 10 塩基）を持つ第2オリゴヌクレオチドプライマー（長さ20 - 50 塩基）が、タンデム反復RCA産物に雑種形成する。Fでは、プライマー2の3'末端に相補である領域を持つ第2増幅標的サークル（長さ約70 - 150 塩基）が、プライマー2に雑種形成し、（環状鑄型に沿って）その3'末端からRCAを開始する。ある実施例においては、第2増幅標的サークルは、一次ATCに配列で同一または類似である。Gでは、その結果は、線型ローリングサークル足場から形成され、かくして指数増幅を産出する一連の線型RCA-TS-DNA産物になることが見られる。本発明に基づく方法は、更に三次合成および更なる増幅産物の更なる累乘法を提供する二次鎖のプライマー相補配列を採用することができる。

10

20

30

40

50

【0025】

本発明に従って、オリゴヌクレオチドプライマー（プライマー1またはP1）は、ローリングサークル複製プライマーとして作用し、ATCに対する「プライマー相補部分」に相補である配列を持つ単なるオリゴヌクレオチドである。この配列はプライマーP1の「相補部分」として引用される。オリゴヌクレオチドプライマー（P1など）の相補部分および増幅標的サークルのプライマー補体部分は、それらが相互に相補である限り、いずれか望ましい配列を持つことができる。P1のこのような配列は、増幅標的サークルのいずれか他の部分には相補ではなく、あるいはプライマーが完全に前記ATCに結合するATCの配列の殆んどに対して相補である場合もあり、望ましくはプライマーに結合しないATCの小さなセグメントを持つこともある。

【0026】

本発明に有用であるローリングサークル複製（RCA）プライマー（P1）の相補部分は、プライマーとプライマー補体部分の間で、特異的また安定した雑種形成を支持するいずれかの長さのものであることができる。一般にこの長さは10乃至35のヌクレオチド、しかし望ましくは16乃至20の長さのヌクレオチドである。

【0027】

本発明のオリゴヌクレオチドプライマーは、前記のとおり、ATCの部分、またはすべてに対して非相補のセグメントを持つこともある。このような非相補部分が存在する時には、RCAの間の鎖置換を促進するのに役立つ。このようなオリゴヌクレオチドプライマーの非相補部分は、いろいろな長さのものがあるが、一般的には長さ1乃至100のヌクレオチドであり、望ましくは4乃至8ヌクレオチドの長さである。

【0028】

本発明のプロセスに有用な増幅標的サークル（ATC）は、環状一本鎖DNA分子であり、一般には40乃至1000のヌクレオチド、望ましくは約50乃至150のヌクレオチド、またもっとも望ましくは約50乃至100のヌクレオチドを含む。ここで開示されるプロセスに有用なATCsは、異なる部分、またはセグメントを持つことができ、それらを異なる目的のために特に有用なものにする。このような部分の少なくとも1個は、1個またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーに相補となるであろう。

【0029】

ここで開示されたプロセスに有用なATCsとして、プライマー補体部分は、増幅標的サークルの必要とされる要素である。他の部分は随意のものであり、任意に決定された配列を持つように選択することができる。不適合またはギャップなしで長さ約6個のヌクレオチド以上の相補領域のない場合という条件に合致して、ATCsが自己相補性であるいずれの配列も持たないことが望ましい。このプロセスで有用なATCは、ライザーディ、合衆国特許第5,854,033号（その開示はここで全体として引用例で組み込まれてい

る)、およびライザーディ他、等温ローリングサークル増幅を用いる突然変異検出と単一分子計数、ネイチャー・ジェネティクス、19巻、225-232ページ(1998年)。

【0030】

ある実施例では、例えばオリゴヌクレオチドの一つは、2個のアーム部(すなわち標的認識を随意に提供する一つのアーム部と、サークルを用いてRCAの開始のためのプライマーとして随意に作用するもう一つのアーム部を持つ3'-5'-3'オリゴヌクレオチド)を持つ。その源を持つこのような「双極性」(3'-5'-3')オリゴヌクレオチドは、ライザーディ他(1998年前掲同書)で示されている。このような双極性プライマーは、ここで使用されるプライマーP1が双極性プライマーである場合のような固形基質に付着するものとしての用途を見出している。現在利用できるRCA法などとは異なり、このような双極性プライマーは本発明の方法に有用である。というのは、本発明はプライマー置換を避けるためである。かくしてもしこのようなプライマーが、指数または高分技RCAで、例えばP2プライマーとして採用されたとすると(高分技RCAの処置の説明についてはライザーディ他(1998年)参照)、置換されるべき5'末端がないために鎖置換作用は失敗するであろう(すなわち、この結果は、プライマーの双極性の故で間違った配向でTS-DNAと結合するプライマーになるであろう)し、またその結果は増幅が起きないであろう。このようなRCA法において、双極性プライマーは、P1プライマーとしてのみ用途を見出す。本発明のプロセスでは、使用されるプライマーのいずれも双極性のものである。

10

20

【0031】

PPRCAにおいては、増幅は各プライマーで起こり、これにより各プライマーにより複製される一次ATC(またはATC1)に相補であるセグメントのタンデム反復(すなわちTS-DNA)のコンカテマーを形成する。その双極性プライマーはP2プライマーとしての使用が利用でき、何故なら本発明の方法は鎖置換を避け、また、双極性プライマーがその各端部に3'-OHを持つために、それが増幅の追加のステージでプライマーとして使用されると自動的に適切な配向にあるようにするためである。加えて、双極性プライマーが各端部に3'-OHを持つために、それはややもすれば生じるかもしれない鎖の置換を短縮するのに役立つ。更に、双極性プライマーの各端部の3'-OHが存在するために、TS-DNAおよび二次、またはより高い位のATCs(ATC2、ATC3、ATC4、およびその他)の相補配列はプライマー配列内でどのような形状にも配列することができる。

30

【0032】

増幅サークルのサイズ、および使用されるDNAに依存して、PPRCAは、サークルの数(採用される特定のプライマーおよび標的配列のためにしばしば特別に決定される)、DNAポリメラーゼ、dNTPsおよび Mg^{2+} を最適化することができる増幅(および感受性)のきわめて高い度合を達成する。この反応の産物は、(例えばサークルの領域に同一の蛍光標識オリゴヌクレオチド、または他の標識オリゴヌクレオチドを用いて)随意に装飾され検出される。

【0033】

RCAを用いて増幅される核酸の検出と量的評価を助けるために、検出標識を増幅核酸にとり込むことができ、または検出分子のために標識を連結することができる。このような検出標識は、直接または間接的に増幅核酸と会合できるいずれかの分子であり、それはまた直接または間接的に測定および検出可能な信号となって現れる。核酸へのとり込みまたは核酸プローブに結合する多くのこのような標識は、従来の技術に習熟した者にとって既知である。その例としては、放射性同位元素、蛍光分子、酵素、抗体、およびリガンドを含む。

40

【0034】

適切な蛍光標識の例は、フルオレセイン、5,6-カルボキシメチルフルオレセイン、テキサスレッド、ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾル-4-イル(NBD)、ク

50

マリン、ダンシルクロリド、およびローダミンを含む。望ましい蛍光標識はフルオレセイン（5 - カルボキシフルオロセイン - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル）およびローダミン（5 , 6 - テトラメチルローダミン）である。これらはモレキュラー・プローブ、ユージン、オレゴンおよびリサーチ・オーガニクス、クリーブランド、オハイオなどの各種の商業源から得ることができる。

【0035】

標識ヌクレオチドは、検出標識の望ましい形態であり、その理由は、それらが合成の間に直接 R C A の産物にとり込むことができるからである。増幅 D N A にとり込むことのできる検出標識の例は、B r d U r d（ホイおよびシムケ、突然変異研究、290巻：217 - 230ページ（1993年））、B r U T P（ウォンシック他、細胞生物学ジャーナル、122巻：283 - 293ページ（1993年））、およびピオチンで修飾されたヌクレオチド（ランガー他、全米科学アカデミー紀要、78巻：6633ページ（1981年））、またはジゴキシゲニンなどのような適切なハプテン（カークホーフ、アナリティカル・バイオケミストリー、205巻：359 - 364ページ（1992年））などのようなヌクレオチド類似体を含む。適切な蛍光標識ヌクレオチドは、フルオレセイン - イソチオシアネート - d U T P、シアニン - 3 - d U T P およびシアニン - 5 - d U T P である（ユー他、核酸研究、22巻：3226 - 3232ページ、（1994年））。D N A の望ましいヌクレオチド類似体検出標識は、B r d U r d（B U D R 三リン酸、シグマ）、および望ましいヌクレオチド類似体検出標識は、ピオチン - 16 - ウリジン - 5' - 三リン酸、（ピオチン - 16 - d U T P、ペーリンガー・マンハイム）である。

10

20

【0036】

かくして本発明に従って、レポーター分子は、同じプライマーまたは T S - D N A の部分としてか、あるいは別個のプライマーまたは T S - D N A s の部分のいずれかとして、ピオチン、ジゴキシゲニン、ハプテン、酵素、および質量標識またはこれらのいずれかの組合せより成るグループから選択される部材を含むことができる。かくしてこれは、プライマー、A T C s または T D - D N A 産物のいずれかの異なる D N A s を含み、ここで1個またはそれ以上のこのような構造は、標識の異なる型、または同じ型の異なる標識を、もしくは異なるが同一標識のそれぞれで標識される。例えば、1個の構造は質量標識で、また他のものは蛍光標識で、あるいはあるものは質量標識でまた他のものは異なる質量標識で、もしくはそれぞれが同じ質量標識に結合されて標識化することができた。追加として、2個またはそれ以上のポリヌクレオチド、または本発明の範囲内のオリゴヌクレオチドは、本発明の方法に従って開示されたように、同一反応混合物内で、または同じシリーズの範囲内で、このように標識される。

30

【0037】

も一つの実施例において、本発明は d N T P に付着するレポーター分子の用途を特徴付け、ここで前記レポーター分子はポリメラーゼの作用によりタンデム配列 D N A にとり込まれる。このようなレポーター分子は、従来の技術に記載されたもののいずれかである。例えば、ジゴキシゲニンなどのハプテン、ピオチン、エストラジオール、フルオレセイン、または他のものが抱合体化されたデオキシヌクレオチド三リン酸であり、高分子量 D N A に取り込みのためのポリメラーゼの基質として採用されている。同様に N 7 - または N 9 - デアザプリンヌクレオチドまたは 2' フルオロ 2' デオキシヌクレオチドなどの所謂普遍ヌクレオチドなどを含む修飾ヌクレオチドは、酵素 D N A 合成に採用された。同じように本発明は、本発明のプロセスにより産生される各種のタンデム配列 D N A の同定および定量化のための各種の決定方法に同じく適用できる。このような検出方法の例は、必ずしもそれに限定されないが、顕微鏡または蛍光スキャナーによる蛍光検出、酵素検出、または M A L D I - T O F 質量分光計などを含む。質量標識ジデオキシ N T P s は核酸研究、1998年6月1日；26巻（11号）：2827 - 8ページ）に記載されており、ここに引用例としてとり込まれている。

40

【0038】

他の実施例において、本発明はレポーター分子に結合したタンデム配列 D N A の検出に

50

役立つ反応性分子を記載する。代替的实施例において、前記反応性分子のレポーター分子への結合は可逆性である。従来の技術に記載された可逆分子相互作用の例は、酵素：基質および抗体：ハプテン相互作用、金属イオン、温度または補因子依存性相互作用でタンパク質およびまたはDNA抱合体を伴うもの、金属イオン：キレーター相互作用、などを含む。本発明に採用できる酵素の例は、従来の技術に習熟した者にとっては公知であり、また西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、およびルシフェラーゼを含む。

【0039】

本発明に従って、レポーター分子の検出は、レポーターと結合しそれを認識するタンパク質部分と、追加の検出標識を含む、DNA部分とを含有する抱合体で前記レポーター分子を結合することで達成される。代替実施例においては、前記DNA部分は、1個またはそれ以上の検出標識を含み、または追加のポリメラーゼ伸長反応のイニシエーターとして役立つ。代替実施例においては、前記タンパク質は、二本鎖または一本鎖結合タンパク質またはアプタマーを含む。アプタマーは、標的分子と結合する一本鎖オリゴヌクレオチドである。それらは数多くの文献、例えばMol, Diagn, 1999年12月, 4(4) 381-388ページに記載されている。

10

【0040】

増幅核酸、例えばピオチンなどにとり込まれる検出標識は、従来の技術で周知の感受性法を用いて連続して検出できる。例えば、ピオチンは、ストレプトアビジンアルカリ性ホスファターゼ抱合体(トロピックス, インコーポレイテッド)を用いて検出でき、これはピオチンと結合し適当な基質の化学発光により次いで検出される(例えば化学発光基質は、CSPD(R)(ジソジウム3-(4-メトキシスピロ{1,2-ジオクスエタン-3-2'--(5'-クロロ)トリシクロ[デクロン]-4-イル}フェニルホスフェート); CDP-スター(R)(ジソジウム2-クロロ-5-(4-メトキシスピロ{1,2-ジオクスエタン-3-2'--(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン}-4-イル)フェニルホスフェート)、およびAMPPD(R)(ジソジウム3-(4-メトキシスピロ{1,2-ジオクスエタン-3-2'-トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]フェニルホスフェートなどがある)。(これらすべてはトロピックス, インコーポレイテッドから利用可能である。www.tropix.com参照)。

20

【0041】

これらの検出標識の2個またはそれ以上と結合する分子もまた検出標識であると考えられる。検出標識により生成される信号を検出し測定する方法は、従来の知識を有する者には公知である。例えば、放射性同位元素はシンチレーション計数または直接視覚化により検出することができ、また蛍光分子は分光光度計で検出できる。このような検出分子は増幅核酸と相互作用し、1個またはそれ以上の検出標識がそこに結合される。

30

【0042】

本発明に従って形成されたタンデム配列DNA産物のいずれかを検出するのに使用される分子の例は、必ずしもそれに限定されないが、雑種形成プローブを含むデコレーターまたは装飾作用薬、ここで開示された蛍光剤のいずれかのもの、リガンド結合分子(例えばアビジンなど)、抗体、FKBPフォールド結合分子(例えばラパマイシンなど)、酵素、レセプター、核酸結合タンパク質(例えば転写因子など)、リボソームまたは他のRNA結合タンパク質、アフィニティー剤(例えばアプタマー、すなわち、分子リガンドにアフィニティーを持つ核酸[マーシャル他, カレント・バイオロジー, 5巻, 729-734ページ(1997年)を検討のために参照のこと]、および従来の技術に習熟した者に公知でかつRCAプライマーまたは検出標識との抱合に適した他の薬剤、などを含む。

40

【0043】

本発明の一つの実施例は、図1(ステップE)で図形により記載されている。ここで二次DNAプライマー(P2)は、タンデムDNA産物に結合する。このようなプライマーは、前記プライマーP2の5'末端またはその近くに位置する配列を持ち、また当初の線型RCAにより産生されるタンデム配列DNAの部分、またはセグメントに相補である第1

50

部分、または 5' - 部分を一般に持つ。二次プライマーもまた、前記プライマー P 2 の 3' 末端に、またはその近くに位置し、増幅標的サークル (A T C) の部分に相補である配列を持つ第 2 部分または 3' - 部分を一般に所有し、その A T C は、本プロセスの当初の段階で使用された A T C と同じ、または類似した、もしくはそれと異なる配列を持つことができる。二次プライマーの T S - D N A 相補部分は、T S - D N A のいずれの配列にも相補であることができる。しかし相互のプライマーの雑種形成を予防するために、ローリングサークル複製プライマーに適合する T S - D N A 配列には相補であるべきではないことが望ましい。二次 D N A プライマー (P 2) の相補部分は、T S - D N A または A T C のいずれかで、プライマーとその相補配列の間の特異的かつ安定した雑種形成を支持するどのような長さのものであってもよい。一般には、これは長さで 12 乃至 35 ヌクレオチドであるが、望ましくは長さで 18 乃至 25 ヌクレオチドである。

10

【0044】

本発明で有用なオリゴヌクレオチドと A T C s は、確立したオリゴヌクレオチド合成法を用いて合成することができる。オリゴヌクレオチドの合成法は、従来の知識で公知である。このような方法は、標準の酵素消化法からヌクレオチド断片分離までにわたることができる (例えば、サンプルック他, 分子クロニング: ラボラトリーマニュアル, 第二版, コールド・スプリング・ハーバー, ニューヨーク, (1989年), ウー他, 遺伝子バイオテクノロジーの方法 (C R C プレス, ニューヨーク, ニューヨーク, 1997年)、および組換え遺伝子発現プロトコル、分子生物学第 62 巻所収、(トゥアン, 編, ファーナ・プレス, トトワ, ニュージャージー, 1997年) これらの開示は引用例としてここにとり込まれている) 他、純粋に合成法としては、例えばミリゲンまたはベックマンシステム 1 プラス D N A 合成機を使用するシアノエチルホスホルアミダイト法によるものもある (例えばミリゲン・バイオリサーチ, パーリントン, マサチューセッツのモデル 8700 自動合成機、または A B 1 モデル 380B)。オリゴヌクレオチドを作るのに有用な合成法は、更に生田他, マニュアル・レビュー・オブ・バイオケミストリー, 53 巻: 323 - 356 ページ (1984年) (ホスホトリエステルとホスファイト法)、およびナラン他, 酵素学の方法, 65 巻: 610 - 620 ページ (1980年)、(ホスホトリエステル法) により記載されている。タンパク質核酸分子は、ニールセン他, バイオコンジュゲートケミカルズ, 5 巻 3 - 7 ページ (1994年) に記載されたものなどの既知の方法を用いて作ることができる。

20

30

【0045】

ここに記載されたオリゴヌクレオチドの多くのものは、安定したハイブリッド (雑種細胞) がその間に形成できるように、他のオリゴヌクレオチドまたは核酸のある部分に相補であるように設計されている。これらのハイブリッドの安定性については、レスニックおよびフライヤー・バイオケミストリー, 34 巻: 10807 - 10815 ページ (1995年)、マグロー他, バイオテクニク, 8 巻: 674 - 678 ページ (1990年)、およびリシュリック他, 核酸研究, 18 巻: 6409 - 6412 ページ (1990年) に記載されたもののような既知の方法を使用して計算することができる。

【0046】

本発明の A T C、またはオリゴヌクレオチドプライマーでさえもいずれの手段が便利であれば、それを利用してある型の固定支持部に付着する形で使用することができる。このような支持部への付着は、本発明の方法 (すなわち P P R C A) を使用してローリングサークル増幅により産生されるタンデム配列 D N A の検出を容易にするように、固定支持部に対し前記のプライマーまたは A T C を付着するのに役立つある種の型の生物または他のもののポリマーなどのある分子種であることができる。

40

【0047】

本発明の方法に有用なこのような固定支持部は、オリゴヌクレオチドが結合できるいずれの固定物質をも含むことができる。これはアクリルアミド、セルロース、ニトロセルロース、ガラス、ポリスチレン、ポリエチレンビニルアセテート、ポリプロピレン、ポリメタ

50

カーボネート、テフロン（Ｒ）、フルオロカーボン、ナイロン、シリコンゴム、ポリアンハイドライド、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリオルトエステル、フマル酸ポリプロピル、コラーゲン、グリコサミノグリカン、およびポリアミノ酸などの物質を含む。固定相基質は、薄層フィルムまたは膜、ビート、びん、皿、繊維、織布、形状ポリマー、粒子および微粒子を含むいずれかの有用な形態を持つことができる。固定相基質の望ましい形態は、ガラススライドまたはマイクロタイタ皿（例えば標準 96 ウエル皿）である。更なる準備のためには、合衆国特許第 5,854,033 号に記載されたものを参照されたい。

【0048】

オリゴヌクレオチドを固定相基質に固定する方法は十分に確立されている。アドレスプロ
10
ープおよび検出プローブを含むオリゴヌクレオチドは、確立された結合法を用いて、基質
と結合することができる。例えば、適切な付着法は、ピーズ他、全米科学アカデミー紀要
, 91 巻 (11 号): 5022 - 5026 ページ (1994 年) に記載されている。オリ
ゴヌクレオチドを固定相基質に付着させる望ましい方法は、グオ他、核酸研究, 22 巻,
5456 - 5465 ページ (1994 年) に記載されている。

【0049】

ＲＣＡのローリングサークル複製段階で有用なＤＮＡポリメラーゼは、プライムド一本鎖
サークルのローリングサークルの複製を実行しなければならない。このようなポリメラー
ゼは、ここでローリングサークルＤＮＡポリメラーゼとして引用されている。ローリング
20
サークル複製に関しては、ＤＮＡポリメラーゼが鋳型鎖に相補である鎖を置換できること
が望ましく、この置換は鎖置換と名付けられ、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠い
ている。鎖置換は、ＡＴＣの多重タンデム複製の合成をもたらすのに必要である。5'→
3'のエキソヌクレアーゼ活性は、もしそれが存在するなら、合成鎖の破壊を来たすこと
になるであろう。開示された方法で使用されるＤＮＡポリメラーゼが、高度に進んでいる
ことも望ましい。開示された方法での使用にＤＮＡポリメラーゼの適合性は、ローリング
サークルに複製を実行するその能力を評価することにより、容易に決定することができる
。望ましいローリングサークルＤＮＡポリメラーゼはバクテリオファージφ-29 ＤＮ
Ａポリメラーゼ（合衆国特許番号 5,198,543 号、5,001,050 号、ブラン
コ他）、ファージ M2 ＤＮＡポリメラーゼ（松本他、遺伝子 84 巻: 247 ページ、
30
(1989 年)、ファージ φ-PRD1 ＤＮＡポリメラーゼ（ジャン他、全米科学アカデ
ミー紀要, 84 巻: 8287 ページ (1987 年)）、VENT.RTM. ＤＮＡポリメ
ラーゼ（コン他、生物学化学ジャーナル, 268 巻: 1965 - 1975 (1993 年)
）、ＤＮＡポリメラーゼ I のクレウノ断片（ジェイコブセン他、生化学ヨーロピアン・ジ
ャーナル 45 巻: 623 - 627 ページ (1974 年)）、T5 ＤＮＡポリメラーゼ（
チャタージー他、遺伝子 97 巻: 13 - 19 ページ (1991 年)）、PRD1 ＤＮＡ
ポリメラーゼ（ズーおよび伊藤、バイオキミカルバイオフィジカル・アクタ, 1219 巻
: 267 - 276 ページ、(1994 年)および T4 ＤＮＡポリメラーゼホロ酵素（カ
ブードおよびベンコビッチ、カレント・バイオリジー: 5 巻 149 - 157 ページ (19
95 年)）。φ-29 ＤＮＡポリメラーゼがもっとも望ましい。同じく望ましいポリメ
ラーゼは、T7 生のポリメラーゼおよび Bst ポリメラーゼを含む。
40

【0050】

ＲＣＡ期間中の鎖置換は、鎖置換因子、例えばヘリカーゼなどのようなものの使用を通じ
て促進することができる。一般に、例えば ＤＮＡポリメラーゼがこのような因子の不在下
でローリングサークル複製を実行しないとしても、鎖置換因子の存在下でローリングサー
クル複製を実行できる ＤＮＡポリメラーゼはいずれも本発明のプロセスでの使用に適して
いる。ＲＣＡで有用な鎖置換因子は BMRF1 ポリメラーゼアクセサリサブユニット（
鶴見他、ウイルス学ジャーナル, 67 巻 (12 号) 7648 - 7653 ページ (1993
年)）、アデノウイルス ＤＮＡ結合タンパク質（ツァイーデルヘルト、およびファン・デ
ル・フリート、ウイルス学ジャーナル, 68 巻 (2 号): 1158 - 1164 ページ (1
994 年参照)。ヘルペス単純性ウイルスタンパク質 ICP8（ベーマーおよびレーマン
50

、ウイルス学ジャーナル、67巻(2号):711-715ページ(1993年);スクーライター、およびレーマン、全米科学アカデミー紀要、91巻(22号)、10665-10669ページ(1994年)、一本鎖DNA結合タンパク質(SSB;リグラーおよびロマーノ、J. Biol. Chem., 267巻:13629-13635ページを含む。

【0051】

ローリングサークル複製を実行するためのポリメラーゼの能力は、ファイアーおよびスー、全米科学アカデミー紀要、92巻:4641-4645ページ(1995年)、およびライザーディ(合衆国特許番号5,854,033号、例えば実施例1など)に記載されたものなどのような、ポリメラーゼをローリングサークル複製で使用するにより決定

10

【0052】

前記に従って、本発明は核酸を選択的に増幅するためのプロセスに関し、

(a) プライマーATCサンプル混合物を産出するために、少なくとも1個の一本鎖非環状第1ステージオリゴヌクレオチドプライマー(P1)と、少なくとも1個の一本鎖第1ステージ増幅標的サークル(ATC1)を混合し、

(b) 雑種形成プライマー-ATC1サンプル混合物を形成するために、オリゴヌクレオチドプライマーと増幅標的サークルの間で雑種形成を促進する条件下で前記プライマー-ATC1サンプル混合物を培養し、また雑種形成プライマー-ATC1複合体を形成するのに十分な時間を与え、

20

(c) ポリメラーゼ-プライマー-ATC1サンプル混合物を産出するために、DNAポリメラーゼと少なくとも2個のデオキシヌクレオチド三リン酸を前記雑種形成プライマー-ATC1サンプル混合物と混合し、また一次タンデム配列DNA(TS-DNA)を形成するために増幅標的サークルの複製を促進する条件下でポリメラーゼ-プライマー-ATC1混合物を培養し、

(d) P2の第1部分の一次TS-DNAへの雑種形成を促進しこれによりTS-DNA-P2複合体を形成するという条件下で、前記一次TS-DNAに存在する1個またはそれ以上の配列に相補である配列を持つ第1部分、またはセグメント、および前記一次TS-DNAに相補でない配列を持つ遊離3'-OH末端を含む第2部分、より成る少なくとも1個の第2ステージプライマーオリゴヌクレオチド(P2)を、前記ポリメラーゼ-プ

30

ライマー-ATC1混合物に加え、
(e) タンデム配列-P2-ATC混合物を形成するために、P2の前記第2部分への前記ATC2の雑種形成を促進するという条件下で、1個またはそれ以上の第2ステージ増幅標的サークル(ATC2)を(d)の混合物に加え、ここで(e)の増幅標的サークルの複製が、追加の、ここでは二次タンデム配列DNA(つまり2⁰-TS-DNA)の形成に帰着する、

ことを含むプロセスに関する。

【0053】

本発明に従ってここで開示されるように、「第1ステージ」という用語は、一次タンデム配列DNAを形成するための線型RCA反応の当初のステップを引用する。

40

【0054】

更に本発明に従って、ここで開示された方法は増幅の一つの水準に限定するものではなく、追加のステージを容易に促進する。かくして、本発明は更に追加ステージのプライマーおよび増幅標的サークルが採用され、唯一の制約が使用者の性向と必要性に見出される増幅の追加のラウンド、またはステージに関する。

【0055】

これらに基づいて、本発明は、選択されたDNA配列の増幅に対し既に列挙したプロセスに加えて、更に以下に述べるステップ、すなわち、

(f) P3の第1部分の二次TS-DNAへの雑種形成を促進しこれによりTS-DNA-P3複合体を形成するという条件下で、前記二次TS-DNAに存在する1個またはそ

50

れ以上の配列に相補である配列を持つ第 1 部分、またはセグメント、および前記二次 T S - D N A に相補でない配列を持つ 3' - O H 末端を含む第 2 部分、より成る少なくとも 1 個の第 3 ステージプライマーオリゴヌクレオチド (P 3) を、前記ポリメラーゼ - プライマー - A T C 2 混合物に加え、

(g) タンデム配列 - P 3 - A T C 3 混合物を形成するために、P 3 の前記第 2 部分への前記 A T C 3 の雑種形成を促進するという条件下で、1 個またはそれ以上の第 3 ステージ増幅標的サークル (A T C 3) を (f) の混合物に加え、ここで (f) の増幅標的サークルの複製が、三次タンデム配列 D N A の形成に帰着する、ステップを含む。

【 0 0 5 6 】

増幅の追加のステージまたは水準に対し、本発明は更に以下の追加のステップ、すなわち (h) P 4 の第 1 部分の三次 T S - D N A への雑種形成を促進しこれにより T S - D N A - P 4 複合体を形成するという条件下で、前記三次 T S - D N A に存在する 1 個またはそれ以上の配列に相補である配列を持つ第 1 部分、またはセグメント、および前記三次 T S - D N A に相補でない配列を持つ 3' - O H 末端を含む第 2 部分、より成る少なくとも 1 個の第 4 ステージプライマーオリゴヌクレオチド (P 4) を、前記ポリメラーゼ - プライマー - A T C 3 混合物に加え、

(i) タンデム配列 - P 4 - A T C 4 混合物を形成するために、P 4 の前記第 2 部分への前記 A T C 4 の雑種形成を促進するという条件下で、1 個またはそれ以上の第 4 ステージ増幅標的サークル (A T C 4) を (h) の混合物に加え、ここで (h) の増幅標的サークルの複製が、四次タンデム配列 D N A の形成に帰着する、ステップを含む。

【 0 0 5 7 】

もち論これは、ここに特に記載されたもの以外にも十分に通用し続けることができる。

【 0 0 5 8 】

このような一つの実施例において、本発明はすぐ前に記載したもののようなプロセスに関し、ここで複製を促進する前記ステップ (c) の条件は、第 1 レポーター分子に結合する d N T P 基質の前記混合物での存在を含み、また前記第 1 レポーター分子がこれにより前記タンデム配列 D N A にとり込まれる。このような実施例において、プライマーオリゴヌクレオチド P 2 は、前記第 1 レポーター分子に結合できる第 1 反応性分子に結合するであろう。

【 0 0 5 9 】

本発明のプロセスは、更に実施例を含み、この実施例では、プライマー P 2 を伸長するために使用され、そのため d N T P s は第 2 レポーター分子に結合し、こうして前記第 2 レポーター分子は、二次タンデム配列 D N A にとり込まれることになる。この実施例では、プライマーオリゴヌクレオチド P 3 は、前記第 2 レポーター分子に結合できる第 2 反応性分子に結合するであろう。

【 0 0 6 0 】

更なる実施例において、本発明のプロセスは状況を含み、ここでプライマー P 3 を伸長するために使用される d N T P s は、第 3 レポーター分子に結合し、このようにして前記第 3 レポーター分子は前に記載の三次タンデム配列 D N A にとり込まれる。更にこのような実施例において、プライマーオリゴヌクレオチド P 4 は、前記第 3 レポーター分子に結合できる第 3 反応性分子に結合するであろう。

【 0 0 6 1 】

このプロセスは、もち論ここで記載されたように、P P R C A の望ましいラウンドを何回となく続けることができる。

【 0 0 6 2 】

本発明の実施例のいずれにおいても、d N T P s は、d U T P、d C T P、d A T P、d G T P、前記のものとは異なる自然発生 d N T P、および d N T P の類似体および普遍塩基を持つ d N T P より成るグループから選択される部材である。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 3 】

本発明に基づき開示されたプロセスは、多重標的配列とプライマーが使用されるような多重適用に対しきわめて有用である。最初に、プライマー（P 1）は、増幅標的サークル（A T C 1）の配列のすべてまたは一部がそうであるように、お互いに異なるであろう。ここでプライマーまたはA T Cの後でのディジットの利用は、多数のステージでの増幅のステージ、あるいは本発明のポリプライムドR C A（またはP P R C A）の増幅のステージを示す。かくしてプライマーと増幅標的サークルは、与えられたステージで使用される集団内で異なることもあり、また与えられたステージで同一であるが、ステージからステージへ変る際に異なることもある。更にP 1より後のプライマー（すなわちP 2より先のプライマー）はすべて少なくとも2個の部分と、あるいはセグメント、または配列を持ち、その内1つは第1部分と名付けられ、実行される特定のプロセスの初期段階で合成されるT S - D N Aに相補的であり、また、このような初期段階で合成されたT S - D N Aに付着のためのプローブとして役立つ。後期のプライマーも同じく典型的には第2部分を有し、通常第1のものに隣接し、また第2のものは典型的には3' - O H基を持ち、前記プライマーの3'末端を示し、ここで前記第2部分は増幅標的サークルの少なくとも一部分に相補的である。かくして前記プライマーの第1および第2部分は、一般に異なる構造あるいは配列のものであり、もっともこれはここで開示された方法の絶対的条件ではない。

10

【 0 0 6 4 】

本発明の多重ステージプライマーは、与えられたステージまたはステージ間で同一または異なっている。同じことがここで使用された増幅標的サークルにとっても言える。

20

【 0 0 6 5 】

特異的な実施例において、与えられたステージのプライマーオリゴヌクレオチドは、すべて同じ構造（すなわち同じ配列）を持つこともある。このような場合には、この同じステージの増幅標的サークルは、同じまたは類似の構造を持つであろう。何故なら、それらはプライマーに対して相補的であるからである。P 1の後では、プライマーオリゴヌクレオチドの第2部分にのみA T C sが結合するために、プライマーにとっては与えられたステージで同一の第1部分でしか異なる第2部分を持ち、かくして同じタンデム配列D N Aに結合するか、その第2部分の配列が異なる故で、A T C sの集団を分離することが可能となる。増幅の各ラウンドがプライマーとA T Cの第2部分のみを使用することで生じる故に、第1部分は随意にそれまでのラウンドのT S - D N Aに結合して残り、本発明の方法では鎖またはプライマーの置換は必要でなくなる。

30

【 0 0 6 6 】

本発明に基づくプロセスは、更にタンデム配列D N Aの存在を検出することを含む。この検出は必ずしもそれに限定されないが、複製を促進する前記（c）のステップの条件が、レポーター分子に結合するd N T P基質の混合物に存在し、また前記レポーター分子が、それにより前記タンデム配列D N Aにとり込まれるプロセスを含む。望ましいレポーター分子はビオチンであり、またd N T Pは、d A T P、d G T P、d T T P、d C T P、およびd U T Pを含むことができる。もち論増幅の各ラウンドは、更にいずれかと与えられた標的配列を検出する能力を高め、とりわけ複合標的配列が高度に特異的ではあるが、別個の検出分子またはレポーター分子を用いて同時に検出される場合にその検出能力を高める。

40

【 0 0 6 7 】

本発明は更に前に記載のプロセスに関し、しかし更にステップ（d）、（f）または（h）のプライマーオリゴヌクレオチドを含み、ここで前記プライマーオリゴヌクレオチドは、前記レポーター分子と結合できる反応性分子と結合する。本発明の一つの実施例では、前記反応性分子は抱合体であり、望ましい実施例では抗ビオチンD N A抱合体である。

【 0 0 6 8 】

本発明は、更に一つのプロセスに関し、ここで前に記載した（ここに記載された方法の内ステップ（e）、または（g）、あるいは（i）などの）複製を促進する条件は、レポーター分子に結合するd N T P基質の混合物に存在することを含み、またここで前記レポ

50

ター分子は、これにより本発明のプロセスにより産生されるタンデム配列DNAにとり込まれる。望ましい実施例では、前記レポーター分子はCy5またはCy3である。ここで再度、dNTPは、dUTPを含む一般のdNTPsである。

【0069】

図2で記載したように、本発明の一実施例において、サンプルPPRCAは、抗ビオチンDNA抱合体を使用して環化される。ここでもとのTS-DNA産物へのdUTP（または他の適切なデオキシヌクレオシド三リン酸）での抱合体としてビオチン（または他の適切なハプテン）のとり込みは、固定化産物オリゴヌクレオチドからの産物を生じる。TS-DNAに結合する抗体DNA抱合体を加え、これにより結合抱合体で信号検出の増加を生じ、これが一次増幅産物を検出する第2RCA反応のための架台として役立つ。図のステップ2で示されるように、検出の第2水準は、複合タンデム配列DNAに、別の異なる信号検出分子またはレポーター分子、ここではCy5を持つプライマーを加えることで与えられ、このCy5は、RCAの追加のラウンドで信号増幅の増加を提供する。本発明の一つの重要な見地は、指数RCAで使用されるポリメラーゼ読み通しの間での多分枝化プライマーの鎖置換を除去することである。

10

【0070】

このような一つの実施例において、増幅により検出される標的ヌクレオチドは、同じATCの部分として一緒に一本鎖環状DNAにとり込まれる。これらの同じATCsは、次いで各連続ステージの増幅に使用することができ、また標的配列のそれぞれは、他の標的配列と同時に増幅される。

20

【0071】

前記に加えて、本発明のプライマーオリゴヌクレオチドは、分枝鎖となっており、そのため単一プライマーは、数多くの分枝点の末端で1個またはそれ以上の同じまたは別個の配列を持っており、そのそれぞれは同じまたは、異なる増幅標的サークルに相補であり、もっとも有利なものとしては、前記分枝化オリゴヌクレオチドプライマーの一つの末端であり、例えば後者がここに記載された固定支持材などのようなある型の固定支持材に付着されたデンドリマーなどである。このような分枝化鎖プライマーオリゴヌクレオチドの使用は、これにより本発明の方法を用い増幅の追加の水準を提供する。

【0072】

本発明の方法を実行するに当り、前記環状DNAは、パドロックプローブから誘導することができ、また標的配列の部分はパドロックギャップフィル手続から誘導される[ニルソン他,「パドロックプローブ:局在DNA検出のための環状化オリゴヌクレオチド」サイエンス,265巻:2085-2088ページ(1994年),ライザーディ,合衆国特許第5,854,031号]。

30

【0073】

前記の通り、本発明のこれらの実施例は、更に本発明のプロセスにより産生されるタンデム配列DNAを検出することを含む。ここで更に、前記産物を検出する際に、複製を促進するステップ(c)の条件は、レポーター分子に結合する例えばdUTPを含むdNTP基質の前記混合物での存在を含み、ここで前記レポーター分子は、これにより前記タンデム配列DNAにとり込まれる。特定の実施例において、レポーター分子はビオチンである。

40

【0074】

本発明はここで直前に記載された実施例を含み、ここでステップ(d)のプライマーオリゴヌクレオチドは、前記レポーター分子に結合できる反応性分子に結合する。望ましい実施例において、この反応性分子は抱合体であり、とりわけ抗ビオチンDNA抱合体である。もっとも望ましい実施例では、レポーター分子はCy5である。

【0075】

本発明の手順を実行するにあたり、特定の緩衝液、培地、試薬、細胞、培養条件その他への言及は、それを限定することを意図するものではなく、議論が提示される特殊な前後関係で、通常の知識を有する者が関心があるまたは価値があるものとして認識するすべての

50

関連する物質を含むように読み取られるべきであることは理解されねばならない。例えば、この一つの緩衝液または培養培地をも一つのものに置換して、しかも同一ではないにしても類似の結果を達成することはしばしば可能である。従来の技術に習熟した者は、無駄な実験を行うことなく、ここで開示された方法と手順を使用して、その目的に最適に役立つようにそのような置換を行うことができるようなシステムと方法論についての十分な知識を有するであろう。

【0076】

本発明は、これから以下の限定されない実施例にしてより更に詳細に記載されるであろう。これらの実施例の開示を適用するに際して、本発明に基づき開示される方法の他の異なる実施例も、関連する技術に習熟した者に間違いなくそれら自身を提示するものとなるであろうことは十分に留意しておかなければならない。

【0077】

【発明を実施するための最良の形態】

(実施例1)

抗ビオチン抱合体を使用する P P R C A

P B S 内で 50 nM の DNA サークルがアニーリングされ、ガラススライドでプライマーを固定された。スライドは 1 分、40 mM のトリス、pH 7.5、25 mM の NaCl、10 mM、MgCl₂ で洗浄され、臨床デスクトップ遠心機で 1 分 1000 rpm で遠心脱水された。

【0078】

下記の P P R C A 反応混合物が使用された：1 X シークエナーゼ反応緩衝液 0.4 mM dATP、0.4 mM dCTP、0.4 mM dGTP、0.3 mM dTTP、0.1 mM ビオチン-16-dUTP、0.01 U/μl T7 DNA ポリメラーゼ、0.03 μg/ml SSB、0.05 μM 装飾オリゴ(5'-Cy5 および 3'-Cy5)。

【0079】

P P R C A 反応混合物は次いでガラススライドに加えられ、37 °C で 30 分培養された。約 50 nM のサークルが、P B S の 1 ng/μl、抗ビオチン DNA 抱合体、0.05 % トウイーン 20、1 mM の EDTA で 37 °C、30 分予備アニーリングされた。スライドは次いで 2 分、P B S、0.05 % トウイーン 20、室温で 2 度洗浄され、P B S / 0.05 % トウイーン 20 でリンスされた。

【0080】

サークルと抗ビオチン抱合体の予備アニーリング混合物が次いでスライドに加えられ、37 °C で 30 分培養され、スライドは 2 度それぞれ 2 分間、P B S、0.05 % トウイーン 20 で洗浄された。

【0081】

下記の P P R C A 反応混合物が用意された。：1 X シークエナーゼ反応緩衝液、0.4 mM dATP、0.4 mM dCTP、0.4 mM dGTP、0.3 mM dTTP、0.1 mM Cy5-dUTP、0.01 U/μl T7 DNA ポリメラーゼ、0.03 μg/ml SSB (一本鎖結合タンパク質)。

【0082】

この混合物はスライドに加えられ、37 °C で 30 分培養された。スライドは次いで 2 回 2 分 2 X S S C / 0.05 % トウイーン 20 で室温で 1000 rpm、1 分で遠心脱水された。

【0083】

(実施例2)

装飾プライマーでの P P R C A

P B S 内で約 50 nM のサークルがガラススライド上で固定プライマーにアニーリングされ、スライドは 1 分、40 mM トリス pH 7.5、25 mM の NaCl、10 mM の MgCl₂ で 1 分洗浄され、次いで臨床デスクトップ遠心機で 1000 rpm、1 分遠心脱水さ

れた。

【0084】

下記のPPRCA反応混合物が用意された：1Xシークエナーゼ反応緩衝液、0.4mM dATP、0.4mM dCTP、0.4mM dGTP、0.3mM dTTP、0.1mM Cy5-dUTP、1U/u1シークエナーゼ、0.03ug/ml SSB（一本鎖結合タンパク質）および0.05uM装飾プライマー（5'-Cy5）。

【0085】

この反応混合物は次いでガラススライドに加えられ、37℃で30分培養された。スライドは次いで2回2分、2X SSC/0.05%トウィーン20で室温で洗浄され、また1X SSCでリンスされた。これは前記の通り遠心脱水された。

10

【図面の簡単な説明】

【図1(a)】本発明のポリプライムドローリングサークル増幅(PPRCA)法の1実施例の概要を示す図。ここで、増幅標的サークル(ATC)に相補である領域を持つオリゴヌクレオチドプライマーは、ATCと結合される。Bでは、2個が酵素、dNTPsなどの追加で雑種形成し、プライマーを鋳型(c)としてATCに沿って伸長する。DはDNAポリメラーゼが初期のセグメントを置換したRCAプライマーの伸長を示す。Eでは、標的サークルと同一の領域を持つ追加のオリゴヌクレオチドプライマーと、非相補性領域とが、タンデム反復RCA産物に雑種形成する。Fでは、第2増幅標的サークルがプライマー2に雑種形成し、その3'末端からRCAを開始する。Gでは、線型RCA産物が線型ローリングサークル足場から形成され、かくして増幅の追加の水準を提供する。

20

【図1(b)】図1(a)と同じ。

【図2】抗ピオチンDNA抱合体を使用するサンプルPPRCA運転を示す図。ここで最初のTS-DNA産物へのdUTP（または他の適切なデオキシヌクレオシド三リン酸）で抱合体としてピオチン（または他の適切なハプテン）のとり込みは、固定された産物からの産物に帰着する。追加抗体DNA抱合体は、TS-DNAと結合し、これにより、一次増幅産物を検出するため第2RCA反応の架台として役立つ結合抱合体での信号検出の増加を生じる。図のステップ2で示されるように、第2水準の検出は、複合タンデム配列DNA産物に、異なる信号検出分子またはレポーター分子、ここでCy5を所有するプライマーの追加により与えられ、このCy5はRCAの追加のラウンドのための信号増幅の増加を提供する。本発明の重要な見地は、それが指数RCAで使用されるポリメラーゼ読み取りの間の多分枝プライマーの鎖置換を排除することである。

30

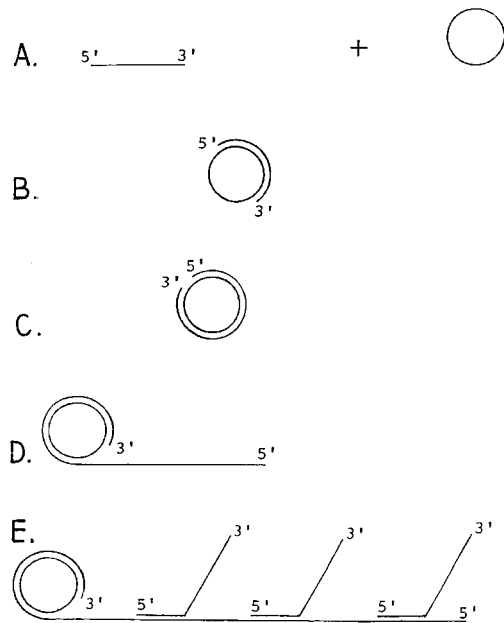
【図3】本発明（ここでは抗ピオチン抱合体システム）のPPRCAプロセスにより提供される信号強度の増加を示すプロット。PPRCAの信号強度は、従来の線型ローリングサークル増幅（図の左側のカラム1におけるLRCA制御）法（Cy5-dUTPとり込みを使用するもの）の約100倍大きい。

【図4】蛍光標識装飾プライマーを用いる分枝RCAとタンデム配列DNAへの蛍光dUTPとり込みを示す図。装飾プライマーはRCA産物に直接アニリングされ、DNAポリメラーゼにより伸長される。蛍光標識dUTPのとり込みは、装飾プライマーの伸長と鎖置換により形成される当初のTS-DNA産物と分枝配列の両方で修飾ヌクレオチドのとり込みにより、信号強度の増加を可能にするが、ここで最初のRCAでのTS-DNA

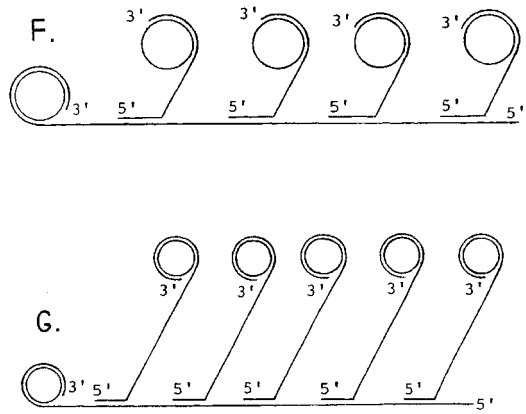
40

【図5】装飾プライマーを用いるLRCA信号の増加を示すグラフ（図3と同じく左側のカラム1でのLRCA制御）。

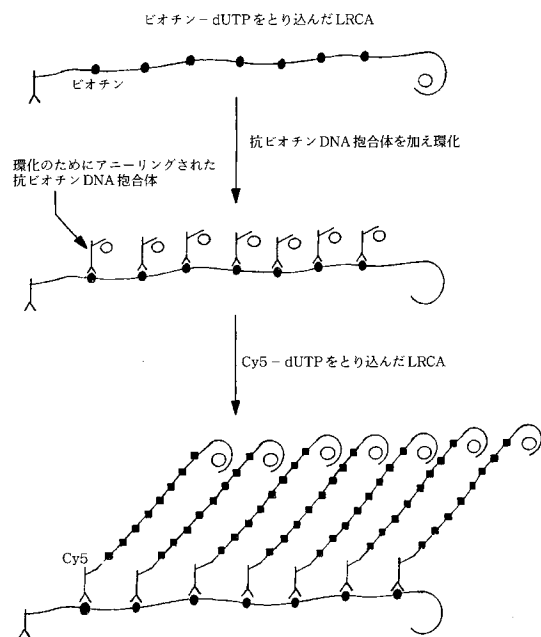
【図 1 (a)】



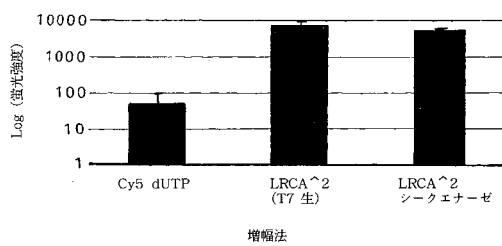
【図 1 (b)】



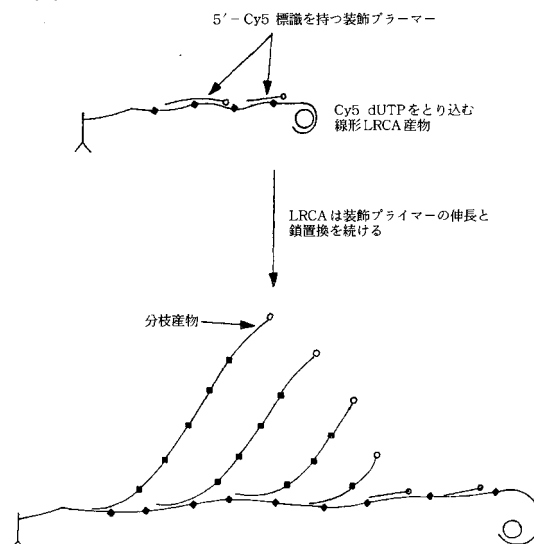
【図 2】



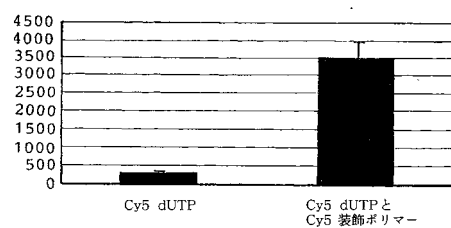
【図 3】



【図 4】



【 図 5 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

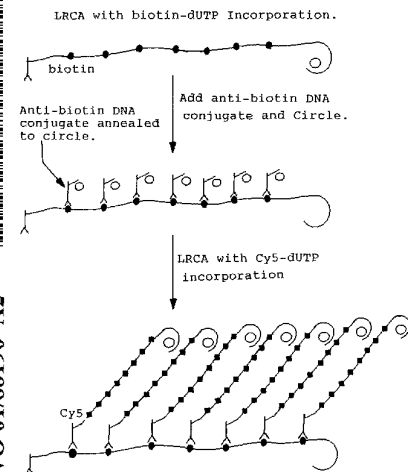
(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
22 November 2001 (22.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/88190 A2

- (51) International Patent Classification: **C12Q 1/68** **LAMBERT, Jeremy, P.**; 376 Charles Drive, Cheshire, CT 06410 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US00/16130
- (22) International Filing Date: 12 June 2000 (12.06.2000) (74) Agents: **GRANT, Alan, J.** et al.; Carella, Byrne, Bain, Gillilan, Cecchi, Stewart & Olstein, 6 Becker Farm Road, Roseland, NJ 07068 (US).
- (25) Filing Language: English (81) Designated States (national): AU, JP.
- (26) Publication Language: English (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (30) Priority Data: 60/204,057 12 May 2000 (12.05.2000) US
- (71) Applicant: **MOLECULAR STAGING, INC.** [US/US]; 66 High Street, Guilford, CT 06437 (US). — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- (72) Inventors: **KINGSMORE, Stephen, F.**; 609 Podunk Road, Guilford, CT 06437 (US). **WILTSHIRE, Richard, Steven**; 2 Zwicks Farm Road, Plantsville, CT 06479 (US). For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: POLY-PRIMED AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES



(57) Abstract: Methods for the amplification of selected nucleic acids at high rate but with high specificity and control are disclosed using a secondary, tertiary, quaternary or higher order platform especially designed to amplify selected sequences within the primary product of linear or exponential rolling circle amplification and amplifying said sequences along with specialized detector or reporter molecules that serve to enhance the ability to detect the amplification products.

WO 01/88190 A2

WO 01/88190

PCT/US00/16130

POLY-PRIMED AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES

5

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application 60/204057, filed May 12, 2000, the disclosure of which is incorporated herein in its entirety.

10

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to processes for establishing multi-tier platforms in rolling circle amplification so as to provide enhanced detection of product species with quantitative and kinetic advantages over previous rolling circle methods.

20

BACKGROUND OF THE INVENTION

A means of amplifying circular target DNA molecules is of value because such amplified DNA is frequently used in subsequent methods including DNA sequencing, cloning, mapping, genotyping, generation of probes, and diagnostic identification.

Heretofore, several useful methods have been developed that permit sensitive diagnostic assays based on detection of nucleic acids. Most are designed around the amplification of selected targets and/or probes composed of DNA, including the polymerase chain reaction (PCR), ligase chain reaction (LCR), self-sustained sequence replication (3SR), nucleic acid

WO 01/88190

PCT/US00/16130

sequence based amplification (NASBA), strand displacement amplification (SDA), and amplification with Q β replicase (Birkenmeyer and Mushahwar, *J. Virological Methods*, 35:117-126 (1991); Landegren, *Trends Genetics*, 9:199-202 (1993)). Some of these methods suffer from relatively low
5 precision in quantitative measurements, especially noticeable in multiplex assays (where more than one target is to be assayed simultaneously). These shortcomings have been largely overcome by rolling circle amplification (RCA) methods.

10 Previously, several methods have been employed to amplify circular DNA molecules such as plasmids or DNA from bacteriophage such as M13. One has been propagation of these molecules in suitable host strains of *E. coli*, followed by isolation of the DNA by well-established protocols (Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning, A*
15 *Laboratory Manual*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). PCR has also been a frequently used method to amplify defined sequences in DNA targets such as plasmids and DNA from bacteriophage such as M13 (PCR Protocols, 1990, Ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, Academic Press, San Diego.) Some of these
20 methods suffer from being laborious, expensive, time-consuming, inefficient, and lacking in sensitivity.

As an improvement on these methods, linear rolling circle amplification (LRCA) uses a primer annealed to the circular target DNA molecule and DNA
25 polymerase is added. An improvement on LRCA is the use of exponential RCA (ERCA), with additional primers that anneal to LRCA product strand. Therefore, double stranded DNA can be produced, and exponential amplification can occur via strand displacement reactions referred to a HRCA (Lizardi, P. M. et al. *Nature Genetics*, (1998) 19. 225-231).

30

WO 01/88190

PCT/US00/16130

The multiple targets of multiplexed assays may, for example, be viruses or other microorganisms. Thus, the clinical condition of a virus-infected patient may depend heavily on viral load (for example, in HIV infections) and so a means for quantitatively determining such viral load is of especial value. In such multiplex assays, it is important that measurements of different targets, such as different viruses, or different strains of virus, be accurately determined and that the ratio of different targets be a true indicator of the ratio of the target sequences. For such purposes, multiplexed, exponential nucleic acid amplification methods have often been employed, but only multiplexed rolling circle amplification has been successful in meeting many of the goals of multiplexed assay systems [See: Lizardi, U.S. Patent No. 5,854,033 the disclosure of which is hereby incorporated by reference in its entirety].

However, there are sources of error in such methods, such as where structural differences lead to different efficiencies, for example, different events are involved for different target sequences, or differences in the rates of product strand annealing may differ for different target sequences and lead to varying rates of competition with the aforementioned priming events, the effects of having multiple ligation effects occurring simultaneously for species of differing structure and stability (which events may be magnified by repetition of the ligation reactions), and the possibility that small differences in yield from one cycle of amplification to another may be magnified exponentially to result in undesirably large differences in the ratios of the final product. RCA methods have overcome errors due to signal yields, since amplification yields are proportional to the amount of target (i.e., detection efficiency is not dependent on the availability of ample amounts of target DNA so that even minute amounts of target can provide enormous signal sensitivity).

30

WO 01/88190

PCT/US00/16130

The earliest method for DNA amplification was the polymerase chain reaction (PCR) which operated only on linear segments of DNA and produced linear segments using specific primer sequences for the 5'- and 3'-ends of a segment of DNA whose amplification was desired. As an improvement on this method, linear rolling circle amplification (LRCA) uses a target DNA sequence that hybridizes to an open circle probe to form a complex that is then ligated to yield an amplification target circle and a primer sequence and DNA polymerase is added. The amplification target circle (ATC) forms a template on which new DNA is made, thereby extending the primer sequence as a continuous sequence of repeated sequences complementary to the ATC but generating only about several thousand copies per hour. An improvement on LRCA is use of exponential RCA (ERCA) with additional priming sequences that bind to the replicated ATC-complement sequences to provide new centers of amplification, thereby providing exponential kinetics and greatly increased amplification. Exponential rolling circle amplification (ERCA) employs a cascade of strand displacement reactions but is limited to use of the initial single stranded RCA product as a template for further DNA synthesis using individual single stranded primers that attach to said product but without additional rolling circle amplification.

All of these methods suffer from a lack of sensitivity, especially to rare genetic events, such as infrequent mutations, as well as to limits on multiplexing and the availability of flexible detection procedures.

The method of the present invention (referred to herein as Poly-Primed Rolling Circle Amplification - PPRCA) avoids such disadvantages by employing a procedure that improves on the sensitivity of linear rolling circle amplification while retaining high specificity by employing true exponential amplification using additional stages, or platforms, of RCA (thereby affording greater sensitivity) while eliminating any reliance on a ligation step yet

WO 01/88190

PCT/US00/16130

retaining the advantages of exponential RCA and the ability to amplify on a solid phase. The present invention has the advantages of being highly useful in new applications of rolling circle amplification, low cost, sensitivity to rare events, flexibility, especially in the use of detection reagents, and low risk of
5 contamination.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

10

The present invention relates to a process for the selective amplification of target DNA molecules as a means of detecting differences in the genotype of said DNA molecules, including changes, or mutations, as slight as a single nucleotide (a single nucleotide polymorphism – SNP) as
15 well as providing a quantitative measure of the relative presence of such mutations in a given sample of DNA.

The present invention further provides a method for the selective detection of target DNA molecules by selective amplification thereof using
20 secondary, tertiary, quaternary or higher order platforms especially designed to amplify selected sequences within the primary product of linear or exponential rolling circle amplification and amplifying said sequences along with specialized detector or reporter molecules that serve to enhance the ability to detect the amplification products.

25

In separate embodiments, the reporter molecules useful within the methods of the present invention include such molecules as biotin, digoxigenin, hapten and mass tags or any combination of these.

WO 01/88190

PCT/US00/16130

In other embodiments, the present invention employs selected nucleotides, or functionally equivalent structures, to provide linkages for detectors and reporter binding molecules of different kinds, such linkages utilizing different deoxynucleoside phosphates as well as abasic nucleotides and nucleosides selectively structured and configured so as to provide an advantage in detecting the resulting rolling circle products. Reporter molecules may also include enzymes, fluorophores and various conjugates.

A further aspect of the present invention relates to a process for the enhanced amplification of circular DNA targets. It improves on the sensitivity of linear rolling circle amplification with singly-primed template circular DNA molecules.

15

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows a schematic for one embodiment of the poly-primed rolling circle amplification (PPRCA) method of the present invention. Here, an oligonucleotide primer having a region complementary to an amplification target circle (ATC) is combined with an ATC. In B, the two are allowed to hybridize with addition of enzyme, dNTPs, etc., extending the primer along the ATC as template (C). D shows extension of the RCA primer with DNA polymerase displacing the earlier segment. In E, an additional oligonucleotide primer with a region identical to the target circle and a non-complementary region hybridizes to the tandemly repeated RCA product. In F, a second amplification target circle hybridizes to primer 2 and initiates RCA from the 3'-end thereof. In G, linear RCA products are formed from the linear rolling circle scaffold, thus affording an additional level of amplification.

30

WO 01/88190

PCT/US00/16130

Figure 2 shows a sample PPRCA run using an anti-biotin DNA conjugate. Here, incorporation of biotin (or other suitable hapten) as a conjugate with dUTP (or other suitable deoxynucleoside triphosphate) on the initial TS-DNA product results in product from immobilized product
5 oligonucleotides. Added antibody-DNA conjugates bind to the TS-DNA and thereby give rise to increased signal detection with the bound conjugates then serving as the platform for a second RCA reaction to detect the primary amplified product. As shown for step 2 in the figure, a second level of detection is afforded by addition to the multiple tandem sequence DNA product
10 of primers possessing a separate and different signal detection molecule or reporter molecule, here Cy5, which affords increased signal amplification for an additional round of RCA. An important aspect of the present invention is that it eliminates the strand displacement of hyperbranching primers during polymerase read-through used in exponential RCA.

15

Figure 3 is a plot showing the increase in signal intensity afforded by the PPRCA processes of the present invention (here using an anti-biotin conjugate system). The signal intensity with PPRCA is about 100-fold greater than conventional linear rolling circle amplification (LRCA control in
20 column 1 on the left of the figure) methods (using Cy5-dUTP incorporation).

Figure 4 shows branched RCA using fluor-labeled decorating primers and fluor-dUTP incorporation into the tandem sequence DNA. The decorating primers are annealed directly to the RCA product and extended by DNA
25 polymerase. Incorporation of fluor-labeled dUTP allows for increased signal intensity by incorporation of the modified nucleotide in both the initial TS-DNA product and the branched sequence that is formed by extension and strand displacement of the decorating primers but wherein the dUTP bound to TS-DNA in the first RCA is different from that bound in the second and any higher
30 stages.

WO 01/88190

PCT/US00/16130

Figure 5 is a graph showing the increase in LRCA signal using decorating primers (LRCA control in column 1 on left as with Figure 3).

5

DETAILED SUMMARY OF THE INVENTION

The methods of the present invention provide greatly increased
10 amplification due to secondary, tertiary, quaternary, and higher order
amplification processes occurring from a primary tandem sequence (TS-DNA)
product. Such a DNA is the initial or primary product of rolling circle
amplification and comprises an unbroken single strand containing tandem
repeats of the sequence found in the rolling circle, or amplification target
15 circle (ATC), used as the template. Each such tandem sequence can itself
serve to bind additional primers that are then replicated along the TS-DNA,
each replication fork displacing the primer before it and thereby providing a
kind of exponential RCA.

20 In the present invention, such primers are used for attachment only
and, after binding to a tandem sequence DNA product, either the primary or
later TS-DNA product, provide an additional sequence for attachment of
additional amplification target circles that act as additional templates for a
truly exponential amplification. Thus, the rate and extent of amplification is
25 not limited to the number of primers that can bind to the initial TS-DNA
product but instead proceeds in stages, with each stage, or platform, acting
as a nucleus for additional stages of amplification. Thus, in accordance with
the present invention, each tandem sequence present on the initial or primary
TS-DNA product acts as a seed for a whole new generation of tandem
30 sequence amplifications, and each secondary TS-DNA product formed

WO 01/88190

PCT/US00/16130

therefrom also comprises additional seeds, *ad infinitum*. It is this feature, as well as others, that provides the unique sensitivity of the present invention for amplification and detection of even rare genetic occurrences, including single nucleotide polymorphisms.

5

In accordance with the foregoing, one embodiment of the present invention has the secondary amplification products remaining fixed to the primary RCA product, thereby providing increased amplification, as well as detection sensitivity, and decreased opportunities for contamination. In other
10 embodiments, secondary amplifications occur simultaneously with the primary amplification reaction resulting in greater speed and economy in the number of steps required for adequate amplification. The processes of the present invention overcome the disadvantages of so-called hyperbranched RCA arising from displacement of secondary amplification strands due to
15 polymerase read through (i.e., the displacement of subsequent primers and their newly synthesized tails by progressing replication forks.

In currently used RCA procedures, a primer sequence, possibly bound to a target DNA sequence, is allowed to react with an additional sequence to
20 form an amplification target circle, much as that shown in the early steps of Figure 1 (steps A through D). However, hyperbranched chains are then formed by adding primers that bind to sequences present along the tandem sequence DNA (Fig. 1, at D). These primers initiate additional rounds of DNA synthesis by reacting with DNA polymerase to form new chains that are
25 synthesized along the TS-DNA (as template) with each newly formed chain displacing the hybridized chain ahead of it (i.e., in the 3'-direction), the result being a long sequence of DNA as template with numerous new sequences being synthesized thereon while each such newly formed sequence is displaced at its 5'-end by the sequence being synthesized behind it. As each
30 new segment of TS-DNA comes off of the original ATC, a new secondary

WO 01/88190

PCT/US00/16130

primer binds to that segment and initiates a new DNA chain so that the newly formed chains increase in length as they become farther removed from the vicinity of the ATC (see, for example, U.S. Patent 5,854,033 at Figure 11 thereof).

5

In accordance with the processes disclosed herein, one or more primers can attach to a TS-DNA product through a chemical linkage selected from the group consisting of hybridization, a covalent bond or formation of a polynucleotide triplex.

10

The poly-primed rolling circle amplification (PPRCA) of the present invention offers an improvement over linear or hyperbranched rolling circle amplification in that the kinetics are truly exponential in nature (with products being formed, or amplified, in geometrically increasing amounts from multiple starting sites) while avoiding strand displacement by using an additional set of primers (P2) that bind to an RCA TS-DNA product and, in at least one embodiment, to additional amplification target circles to yield additional tandem sequence DNA products that may or may not be similar to the original or primary TS-DNA product. Thus, the method of the present invention effectively decouples the primary and all later rounds of amplification.

Put differently, in other RCA methods, the secondary DNA amplification is derived from primers that initiate DNA synthesis using the initial TS-DNA product as template so that all secondary TS-DNA is necessarily structurally related to the sequence of the initial, or primary, TS-DNA product, and so strand displacement is necessitated. In the polyprimed RCA of the present invention, a secondary primer (or P2) can have separate segments, one that binds to the primary TS-DNA (for anchorage purposes only) and an additional segment that serves as a primer while being

30

WO 01/88190

PCT/US00/16130

complementary to a completely distinct amplification target circle (ATC) so that all of the secondary, and possibly tertiary, quaternary, and higher order rounds of amplification, amplify the ATCs that bind to the P2 primers, or the P3 primers, or the P4 primers, etc. Using the PPRCA methodology disclosed

5 herein it is possible to generate as many stages of amplification as is desired, providing the reactions conditions permit, wherein each stage of amplification replicates a potentially different set of ATCs, each set differing in nucleotide sequence and wherein each stage generates a new TS-DNA

10 templates that it is being copied.

A sample embodiment of the methods of the present invention is described in Figure 1, which shows a schematic for one embodiment of the poly-primed rolling circle amplification (PPRCA) method of the present

15 invention. Here, an oligonucleotide primer (about 20-50 bases in length) with a region complementary to the amplification target circle (about 65 – 150 bases in length) (see A) and with a short non-complementary region. In B, the complementary region of the oligonucleotide primer (20-50 bases long) hybridizes specifically to the amplification target circle, with addition of

20 enzyme, dNTPs, etc., as described for LRCA (C). D shows extension of the RCA primer with DNA polymerase displacing the earlier segment. In E, the second oligonucleotide primer (20-50 bases long) with a region identical to the target circle (16-50 bases long) and a non-complementary region (2-10 bases long) hybridizes to the tandemly repeated RCA product. In F, a second

25 amplification target circle (about 70-150 bases in length) with a region complementary to the 3'-end of primer 2 hybridizes to primer 2 and initiates RCA from the 3'-end thereof (along the circular template). In some embodiments, the second amplification target circle may be identical, or similar, in sequence to the primary ATC. In G, the result is seen to be a

30 series of linear RCA TS-DNA products formed from the linear rolling circle

WO 01/88190

PCT/US00/16130

scaffold, thus affording exponential amplification. Methods according to the present invention can also employ further primer complementary sequences on the secondary strand to provide tertiary synthesis and further exponentiation of the amplified product.

5

In accordance with the present invention, the oligonucleotide primer (primer 1 or P1) acts as a rolling circle replication primer and is simply an oligonucleotide having sequence complementary to a "primer complement portion" an ATC. This sequence is referred to as the "complementary portion" of the primer P1. The complementary portion of an oligonucleotide primer (such as P1) and the primer complement portion of the amplification target circle can have any desired sequence so long as they are complementary to each other. Such sequence on P1 may not be complementary to some other portion of the amplification target circle or may be complementary to most of the sequence of the ATC the primer completely binds to said ATC, preferably with a small segment of the ATC not bound to the primer.

The complementary portion of the rolling circle replication (RCA) primers (P1) useful in the present invention can be any length that supports specific and stable hybridization between the primer and the primer complement portion. Generally this is 10 to 35 nucleotides long, but is preferably 16 to 20 nucleotides long.

The oligonucleotide primers of the present invention may, as described above, have segments non-complementary to a portion, or all, of the ATC. Such non-complementary portions, when present, serve to facilitate strand displacement during RCA. The non-complementary portion of such oligonucleotide primers may be any length, but is generally 1 to 100 nucleotides long, and preferably 4 to 8 nucleotides long.

WO 01/88190

PCT/US00/16130

Amplification target circles (ATC) useful in the processes of the present invention are circular single-stranded DNA molecules, generally containing between 40 to 1000 nucleotides, preferably between about 50 to 150 nucleotides, and most preferably between about 50 to 100 nucleotides. The ATCs useful in the processes disclosed herein may have functionally different portions, or segments, making them particularly useful for different purposes. At least one such portion will be complementary to one or more oligonucleotide primers.

10

For ATCs useful in the processes disclosed herein, the primer complement portion is a required element of an amplification target circle. Other portions are optional and can be selected to have an arbitrarily determined sequence. It is preferred that ATCs do not have any sequences that are self-complementary, a condition met if there are no complementary regions greater than about six nucleotides long without a mismatch or gap. ATCs useful in the process have been described in Lizardi, U.S. Patent 5,854,033 (the disclosure of which is hereby incorporated by reference in its entirety) and in Lizardi et al, Mutation Detection and Single-Molecule Counting Using Isothermal Rolling Circle Amplification, *Nature Genetics*, **19**, 225-232 (1998).

In some embodiments, one of the oligonucleotide primers may have, for example, 2 arms (i.e., is a 3'-5'-3' oligonucleotide, with one arm optionally providing target recognition and another that optionally acts as a primer for initiation of RCA with a circle). An example of such "bipolar" (3'-5'-3') oligonucleotides, with sources thereof, is shown in Lizardi et al (1998, *supra*). Such bipolar primers find use for attachment to a solid substrate, such as where primer P1 used herein is a bipolar primer. Unlike with presently available RCA methods, such bipolar primers are useful in the

25

30

WO 01/88190

PCT/US00/16130

methods of the present invention because the present invention avoids primer displacement. Thus, if such primers were employed as, for example, P2 primers in exponential or hyperbranched RCA (see Lizardi et al (1998) for a description of the latter procedure) the strand displacement action would fail because there would be no 5'-end to be displaced (i.e., the result would be primers bound to the TS-DNA in the wrong orientation because of the bipolarity of the primers) and the result would be no amplification. In such RCA methods, bipolar primers find use only as P1 primers. In the processes of the present invention, any of the primers used may be bipolar.

10

In PPRCA, amplification occurs with each primer, thereby forming a concatemer of tandem repeats (i.e., a TS-DNA) of segments complementary to the primary ATC (or ATC 1) being replicated by each primer. Bipolar primers therefor are available for use as P2 primers because the method of the present invention avoids strand displacement and, since the bipolar primers have a 3'-OH at each end, they are automatically in the proper orientation for use as a primer for additional stages of amplification. In addition, because the bipolar primers have a 3'-OH at each end, they serve to curtail any strand displacement that might otherwise occur. Further, because of the presence of a 3'-OH at each end of the bipolar primer, the TS-DNA and secondary, or higher order, ATCs (ATC 2, ATC 3, ATC 4, and so on) complementary sequences can be arranged in any configuration within the primer sequence.

25

Depending upon the size of the amplified circle, and the DNA polymerase used, PPRCA achieves an extremely high degree of amplification (and sensitivity) that can be optimized for the numbers of circles (often determined ad hoc for the particular primers and target sequences to be employed), DNA polymerases, dNTPs and Mg^{2+} . The product of this reaction is then optionally decorated and detected (for example, using a fluor-tagged

30

WO 01/88190

PCT/US00/16130

oligonucleotide, or other tagged oligonucleotide, of sequence identical to a region of the circle).

To aid in detection and quantitative evaluation of nucleic acids amplified using RCA, detection labels can be directly incorporated into amplified nucleic acids or can be coupled to detection molecules. Such a detection label is any molecule that can be associated with amplified nucleic acid, directly or indirectly, and which results in a measurable, detectable signal, either directly or indirectly. Many such labels for incorporation into nucleic acids or coupling to nucleic acid probes are known to those of skill in the art. Examples include radioactive isotopes, fluorescent molecules, phosphorescent molecules, enzymes, antibodies, and ligands.

Examples of suitable fluorescent labels include fluorescein, 5,6-carboxymethyl fluorescein, Texas red, nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD), coumarin, dansyl chloride, and rhodamine. Preferred fluorescent labels are fluorescein (5-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide ester) and rhodamine (5,6-tetramethyl rhodamine). These can be obtained from a variety of commercial sources, including Molecular Probes, Eugene, OR and Research Organics, Cleveland, Ohio.

Labeled nucleotides are preferred form of detection label since they can be directly incorporated into the products of RCA during synthesis. Examples of detection labels that can be incorporated into amplified DNA include nucleotide analogs such as BrdUrd (Hoy and Schimke, *Mutation Research*, **290**:217-230 (1993)), BrUTP (Wansick et al., *J. Cell Biology*, **122**:283-293 (1993)) and nucleotides modified with biotin (Langer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**:6633 (1981)) or with suitable haptens such as digoxigenin (Kerkhof, *Anal. Biochem.*, **205**:359-364 (1992)). Suitable fluorescence-labeled nucleotides are Fluorescein-isothiocyanate-dUTP,

WO 01/88190

PCT/US00/16130

Cyanine-3-dUTP and Cyanine-5-dUTP (Yu et al., *Nucleic Acids Res.*, 22:3226-3232 (1994)). A preferred nucleotide analog detection label for DNA is BrdUrd (BUDR triphosphate, Sigma), and a preferred nucleotide analog detection label is Biotin-16-uridine-5'-triphosphate (Biotin-16-dUTP, 5 Boehringer Mannheim).

Thus, in accordance with the present invention, reporter molecules may include a member selected from the group consisting of biotin, digoxigenin, hapten, an enzyme, and a mass tag or any combination of these, either as part of the same primer or TS-DNA or as part of separate primers or TS-DNAs. Thus, this could comprise separate DNAs, either 10 primers, ATCs or TD-DNA products wherein one or more such structures are tagged, each with a different type of tag or a different tag of the same type or separate but identical tags. For example, one structure could be tagged 15 with a mass tag and the other with a fluorescent tag, or one with a mass tag and the other with a different mass tag, or each coupled to the same mass tag. Additionally, two or more polynucleotides, or oligonucleotides within the present invention may be tagged in this way within the same reaction mixture or within the same series of reactions as disclosed according to the 20 methods of the present invention.

In another embodiment, the invention features the use of a reporter molecule attached to a dNTP wherein said reporter molecule is incorporated into tandem sequence DNA by the action of the polymerase. Such reporter 25 molecules may be any that are described in the art. For example, haptens, such as, digoxigenin, biotin, estradiol, fluorescein, or other have been conjugated to deoxy-nucleotide triphosphates and employed as substrates for polymerases for incorporation into high molecular weight DNA. Similarly, modified nucleotides such as N7- or N9-deazapurine nucleotide or 2' fluoro 30 2' deoxy nucleotides, including so-called universal nucleotides, have been

WO 01/88190

PCT/US00/16130

employed for enzymatic DNA synthesis. This invention is equally adaptable to a variety of detection methods for identification and quantification of the tandem sequence DNA produced by the process of this invention. Examples of such detection methods include, but are not limited to, fluorescence detection, such as in a microscope or fluorescence scanner, enzymatic detection, or MALDI-TOF mass spectroscopy. Mass tagged dideoxy NTPs have been described in (Nucleic Acids Res 1998 Jun 1;26(11):2827-8) and is hereby incorporated by reference.

10 In other embodiments, the invention describes a reactive molecule that binds to the reporter molecule and aids in detection of the tandem sequence DNA. In alternative embodiments, said binding of reactive molecule to reporter molecule is reversible. Examples of reversible molecular interactions described in the art include: enzyme:substrate and antibody:hapten
15 interactions, metal ion, temperature or cofactor dependent interactions involving proteins and/or DNA complexes, metal ion:chelator interactions, and so on. Examples of enzymes that can be employed in the invention are known to those skilled in the art, and include, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, and luciferase.

20 In accordance with the present invention, detection of reporter molecules can be achieved by binding said reporter molecules with a conjugate that contains a protein portion that binds to and recognizes the reporter and a DNA portion that may contain additional detection labels. In
25 alternative embodiments, said DNA portion may contain one or more detection tags or serve as an initiator for additional polymerase extension reactions. In alternative embodiments, said protein or proteins comprise double-strand or single strand binding protein or an aptamer. Aptamers are single-stranded oligonucleotides that bind to target molecules. They have

WO 01/88190

PCT/US00/16130

been described in numerous publications, e.g., Mol Diagn 1999 Dec;4(4):381-8.

Detection labels that are incorporated into amplified nucleic acid, such as biotin, can be subsequently detected using sensitive methods well-known in the art. For example, biotin can be detected using streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (Tropix, Inc.), which is bound to the biotin and subsequently detected by chemiluminescence of suitable substrates (for example, chemiluminescent substrates like CSPD[®] (disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3-2'-(5'-chloro)tricyclo[decan]-4-yl)phenyl phosphate); CDP-*Star*[®] (disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3-2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl) phenyl phosphate) and AMPPD[®] (disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3-2'-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]phenyl phosphate) (all available from Tropix, Inc. – see: www.tropix.com).

Molecules that combine two or more of these detection labels are also considered detection labels. Methods for detecting and measuring signals generated by detection labels are known to those of skill in the art. For example, radioactive isotopes can be detected by scintillation counting or direct visualization and fluorescent molecules can be detected with fluorescent spectrophotometers. Such detection molecules interact with amplified nucleic acid and have one or more detection labels are coupled.

Examples of molecules for use in detecting any of the tandem sequence DNA products formed according to the invention include, but are not limited to, decorators, or decorating agents, including hybridization probes, any of the fluorescent agents disclosed herein, ligand binding molecules (such as avidin), antibodies, FKBP fold binding molecules (such as rapamycin), enzymes, receptors, nucleic acid binding proteins (such as transcription factors), ribosomal or other RNA binding proteins, affinity agents (such as aptamers,

WO 01/88190

PCT/US00/16130

which are nucleic acids with affinity for small molecule ligands [See: Marshall et al, *Current Biology*, 5, 729-734 (1997) for a review], and other agents known to those skilled in the art and suitable for conjugation with an RCA primer or detection tag.

5

One embodiment of the present invention is described schematically in Figure 1 (step E). Here, secondary DNA primers (P2) bind to the tandem sequence DNA product. Such primers commonly have a first portion, or 5'-portion, having a sequence located at or near the 5'-end of said primer P2 and which is complementary to a portion, or segment, of the tandem sequence DNA being produced by the initial linear RCA. The secondary primers also commonly possess a second portion, or 3'-portion, located at or near the 3'-end of said primer P2, and which have a sequence that is complementary to a portion of an amplification target circle (ATC), which ATC may have a sequence the same as, similar to, or different from the ATC used in the initial step of this process. The TS-DNA complementary portion of the secondary primer may be complementary to any sequence in TS-DNA. However, it is preferred that it not be complementary TS-DNA sequence matching the rolling circle replication primer in order to prevent hybridization of the primers to each other. The complementary portion of a secondary DNA primer (P2) can be any length that supports specific and stable hybridization between the primer and its complementary sequence, either in TS-DNA or in an ATC. Generally this is 12 to 35 nucleotides long, but is preferably 18 to 25 nucleotides long.

25

Oligonucleotide primers and ATCs useful in the present invention can be synthesized using established oligonucleotide synthesis methods. Methods of synthesizing oligonucleotides are well known in the art. Such methods can range from standard enzymatic digestion followed by nucleotide fragment isolation (see for example, Sambrook, et al., *Molecular*

30

WO 01/88190

PCT/US00/16130

Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Wu et al, *Methods in Gene Biotechnology* (CRC Press, New York, NY, 1997), and *Recombinant Gene Expression Protocols*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 62, (Tuan, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 1997),
5 the disclosures of which are hereby incorporated by reference) to purely synthetic methods, for example, by the cyanoethyl phosphoramidite method using a Milligen or Beckman System 1Plus DNA synthesizer (for example, Model 8700 automated synthesizer of Milligen-Bioscience, Burlington, Mass. or ABI Model 380B). Synthetic methods useful for making oligonucleotides
10 are also described by Ikuta et al., *Ann. Rev. Biochem.* **53**:323-356 (1984), (phosphotriester and phosphite-triester methods), and Narang et al., *Methods Enzymol.*, **65**:610-620 (1980), (phosphotriester method). Protein nucleic acid molecules can be made using known methods such as those described by Nielsen et al., *Bioconjug. Chem.* **5**:3-7 (1994).

15

Many of the oligonucleotides described herein are designed to be complementary to certain portions of other oligonucleotides or nucleic acids such that stable hybrids can be formed between them. The stability of these hybrids can be calculated using known methods such as those described in
20 Lesnick and Freier, *Biochemistry* **34**:10807-10815 (1995), McGraw et al., *Biotechniques* **8**:674-678 (1990), and Rychlik et al., *Nucleic Acids Res.* **18**:6409-6412 (1990).

The ATCs of the present invention, or even the oligonucleotide
25 primers, can be used in a form in which they are attached, by whatever means is convenient, to some type of solid support. Attachment to such supports can be by means of some molecular species, such as some type of polymer, biological or otherwise, that serves to attach said primer or ATC to a solid support so as to facilitate detection of tandem sequence DNA

WO 01/88190

PCT/US00/16130

produced by rolling circle amplification using the methods of the invention (i.e., PPRCA).

Such solid-state substrates useful in the methods of the invention can include any solid material to which oligonucleotides can be coupled. This includes materials such as acrylamide, cellulose, nitrocellulose, glass, polystyrene, polyethylene vinyl acetate, polypropylene, polymethacrylate, polyethylene, polyethylene oxide, glass, polysilicates, polycarbonates, teflon, fluorocarbons, nylon, silicon rubber, polyanhydrides, polyglycolic acid, polylactic acid, polyorthoesters, polypropylfumerate, collagen, glycosaminoglycans, and polyamino acids. Solid-state substrates can have any useful form including thin films or membranes, beads, bottles, dishes, fibers, woven fibers, shaped polymers, particles and microparticles. A preferred form for a solid-state substrate is a glass slide or a microtiter dish (for example, the standard 96-well dish). For additional arrangements, see those described in U.S. Patent No. 5,854,033.

Methods for immobilization of oligonucleotides to solid-state substrates are well established. Oligonucleotides, including address probes and detection probes, can be coupled to substrates using established coupling methods. For example, suitable attachment methods are described by Pease et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(11):5022-5026 (1994). A preferred method of attaching oligonucleotides to solid-state substrates is described by Guo et al., *Nucleic Acids Res.* **22**:5456-5465 (1994).

DNA polymerases useful in the rolling circle replication step of RCA must perform rolling circle replication of primed single-stranded circles. Such polymerases are referred to herein as rolling circle DNA polymerases. For rolling circle replication, it is preferred that a DNA polymerase be capable of displacing the strand complementary to the template strand, termed strand

WO 01/88190

PCT/US00/16130

displacement, and lack a 5' to 3' exonuclease activity. Strand displacement is necessary to result in synthesis of multiple tandem copies of the ATC. A 5' to 3' exonuclease activity, if present, might result in the destruction of the synthesized strand. It is also preferred that DNA polymerases for use in

5 the disclosed method are highly processive. The suitability of a DNA polymerase for use in the disclosed method can be readily determined by assessing its ability to carry out rolling circle replication. Preferred rolling circle DNA polymerases are bacteriophage ϕ -29 DNA polymerase (U.S. Pat. Nos. 5,198,543 and 5,001,050 to Blanco et al.), phage M2 DNA polymerase

10 (Matsumoto et al., *Gene* 84:247 (1989)), phage ϕ -PRD1 DNA polymerase (Jung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8287 (1987)), VENT.RTM. DNA polymerase (Kong et al., *J. Biol. Chem.* 268:1965-1975 (1993)), Klenow fragment of DNA polymerase I (Jacobsen et al., *Eur. J. Biochem.* 45:623-627 (1974)), T5 DNA polymerase (Chatterjee et al., *Gene* 97:13-19 (1991)),

15 PRD1 DNA polymerase (Zhu and Ito, *Biochim. Biophys. Acta* 1219:267-276 (1994)), and T4 DNA polymerase holoenzyme (Kaboord and Benkovic, *Curr. Biol.* 5:149-157 (1995)). ϕ -29 DNA polymerase is most preferred. Equally preferred polymerases include T7 native polymerase and Bst polymerase.

20 Strand displacement during RCA can be facilitated through the use of a strand displacement factor, such as helicase. In general, any DNA polymerase that can perform rolling circle replication in the presence of a strand displacement factor is suitable for use in the processes of the present invention, even if the DNA polymerase does not perform rolling circle

25 replication in the absence of such a factor. Strand displacement factors useful in RCA include BMRF1 polymerase accessory subunit (Tsurumi et al., *J. Virology* 67(12):7648-7653 (1993)), adenovirus DNA-binding protein (Zijderveld and van der Vliet, *J. Virology* 68(2):1158-1164 (1994)), herpes simplex viral protein ICP8 (Boehmer and Lehman, *J. Virology* 67(2):711-715

WO 01/88190

PCT/US00/16130

(1993); Skaliter and Lehman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(22):10665-10669 (1994)), single-stranded DNA binding proteins (SSB; Rigler and Romano, *J. Biol. Chem.* **270**:8910-8919 (1995)), and calf thymus helicase (Siegel et al., *J. Biol. Chem.* **267**:13629-13635 (1992)).

5

The ability of a polymerase to carry out rolling circle replication can be determined by using the polymerase in a rolling circle replication assay such as those described in Fire and Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:4641-4645 (1995) and in Lizardi (U.S. Patent No. 5,854,033, e.g., Example 1 therein).

10

In accordance with the foregoing, the present invention relates to a process for selectively amplifying nucleic acid sequences, comprising:

(a) mixing at least one single stranded non-circular first-stage oligonucleotide primer (P1) and at least one single stranded first-stage amplification target circle (ATC1) to produce a primer-ATC sample mixture;

(b) incubating said primer-ATC1 sample mixture under conditions that promote hybridization between the oligonucleotide primer and the amplification target circle to form a hybridized primer-ATC1 sample mixture and allowing sufficient time to pass for hybridized primer-ATC1 complexes to form;

(c) mixing a DNA polymerase and at least two deoxynucleotide triphosphates with said hybridized primer-ATC1 sample mixture to produce a polymerase-primer-ATC1 sample mixture and incubating the polymerase-primer-ATC1 mixture under conditions that promote replication of the amplification target circles to form a primary tandem sequence DNA (TS-DNA);

(d) adding to said polymerase-primer-ATC1 mixture at least one second-stage primer oligonucleotide (P2) comprising a first portion, or segment, having a sequence complementary to one or more sequences present in said primary TS-DNA and a second portion, including a free 3'-OH

WO 01/88190

PCT/US00/16130

end, having a sequence not complementary to said primary TS-DNA, under conditions promoting hybridization of said first portion of P2 to said primary TS-DNA thereby forming a TS-DNA-P2 complex;

5 (e) adding one or more second-stage amplification target circles (ATC2) to the mixture in (d) under conditions promoting hybridization of said ATC2 to said second portion of P2 to form a tandem sequence-P2-ATC mixture, wherein replication of the amplification target circles of (e) results in formation of additional, or, in this case, secondary tandem sequence DNA (or 2°-TS-DNA).

10

As disclosed herein according to the present invention, the term "first-stage" refers to the initial step of a linear RCA reaction to form primary tandem-sequence DNA.

15

Also in accordance with the present invention, the methods disclosed herein are in no way limited to one level of amplification and additional stages are easily facilitated. Thus, the present invention further relates to additional rounds, or stages, of amplification with additional stage primers and amplification target circles being employed and the only limit being found in the inclinations and needs of the user.

20

In accordance therewith, the present invention, in addition to the already recited process for amplification of selected DNA sequences, further comprises the additional steps of:

25

(f) adding to said polymerase-primer-ATC2 mixture at least one third-stage primer oligonucleotide (P3) comprising a first portion, or segment, having a sequence complementary to one or more sequences present in said secondary TS-DNA and a second portion, including a 3'-OH end, having a sequence not complementary to said secondary TS-DNA, under conditions promoting hybridization of said first portion of P3 to said secondary TS-DNA thereby forming a TS-DNA-P3 complex;

30

WO 01/88190

PCT/US00/16130

(g) adding one or more third-stage amplification target circles (ATC3) to the mixture in (f) under conditions promoting hybridization of said ATC3 to said second portion of P3 to form a tandem sequence-P3-ATC3 mixture, wherein replication of the amplification target circles of (f) results in
5 formation of tertiary tandem sequence DNA.

For an additional stage or level of amplification, the processes of the present invention further comprises the additional steps of:

(h) adding to said polymerase-primer-ATC3 mixture at least one fourth-
10 stage primer oligonucleotide (P4) comprising a first portion, or segment, having a sequence complementary to one or more sequences present in said tertiary TS-DNA and a second portion, including a 3'-OH end, having a sequence not complementary to said tertiary TS-DNA, under conditions promoting hybridization of said first portion of P4 to said tertiary TS-DNA
15 thereby forming a TS-DNA-P4 complex;

(i) adding one or more fourth-stage amplification target circles (ATC4) to the mixture in (h) under conditions promoting hybridization of said ATC4 to said second portion of P4 to form a tandem sequence-P4-ATC4 mixture, wherein replication of the amplification target circles of (h) results in
20 formation of quaternary tandem sequence DNA.

Of course, this can be continued round after round to levels well beyond those expressly described herein.

25 In one such embodiment, the present invention relates to a process such as that just described wherein the conditions of step (c) (above) that promote replication include the presence in said mixture of a dNTP substrate bound to a first reporter molecule and wherein said first reporter molecule is thereby incorporated into said tandem sequence DNA. In such an embodiment, the

WO 01/88190

PCT/US00/16130

primer oligonucleotide P2 may be bound to a first reactive molecule capable of binding to said first reporter molecule.

5 The process of the present invention also include embodiments wherein the dNTPs used to extend primer P2 are bound to a second reporter molecule such that said second reporter molecule becomes incorporated into the secondary tandem sequence DNA. In this embodiment, the primer oligonucleotide P3 may be bound to a second reactive molecule capable of binding to said second reporter molecule.

10

In a further embodiment, the processes of the present invention include situations wherein the dNTPs used to extend primer P3 are bound to a third reporter molecule such that said third reporter molecule becomes incorporated into the tertiary tandem sequence DNA described above. In a further such embodiment, the primer oligonucleotide P4 may be bound to a third reactive molecule capable of binding to said third reporter molecule.

20 This process can, of course, continue for any number of desired rounds of PPRCA as described herein.

In any of the embodiments of the present invention, dNTPs are members selected from the group consisting of dUTP, dCTP, dATP, dGTP, a naturally occurring dNTP different from the foregoing, an analog of a dNTP, and a dNTP having a universal base.

25

The processes disclosed according to the present invention are highly useful for multiplexing applications, where multiple target sequences and primers are to be used. At the outset, primers (P1) may differ from each other as may all or part of the sequences of the amplification target circles (ATC1). Here, the use of a digit after the primer or ATC indicates a stage of

30

WO 01/88190

PCT/US00/16130

amplification in the multi-stage, or polyprimed RCA (or PPRCA) of the present invention. Thus, the primers and amplification target circles may differ within the population used in a given stage, or may be the same in a given stage but differ from stage to stage. Further, primers beyond P1 (i.e.,
5 P2 onward) all have at least two portions, or segments, or sequences, one of which, denoted a first portion, is complementary to the TS-DNA synthesized in the earlier steps of the particular process being carried out, and serve as probes for attachment to the TS-DNA synthesized in such earlier steps. The later primers also typically have a second portion, usually contiguous to the
10 first, with the second also typically including a 3'-OH group and denoting a 3'-end of said primer, wherein said second portion is complementary to at least one portion of an amplification target circle. Thus, the first and second portions of said primers will commonly be of different structure, or sequence, although this is not an absolute requirement of the methods
15 disclosed herein.

The multi-stage primers of the present invention may be the same or different in structure either at a given stage or between stages. The same is true for the amplification target circles used herein.
20

In a specific embodiment, the primer oligonucleotides of a given stage may all have the same structure (i.e., the same sequence). Where this is the case, the amplification target circles of this same stage will likewise have the same, or similar, structures since they are to be complementary to the
25 primers. Because the ATCs bind only to the second portion of primer oligonucleotides beyond P1, it is possible for primers in a given stage to have identical first portions but have different second portions and thus bind to the same tandem sequence DNA but to separate populations of ATCs because of the difference in sequence of their second portions. Because
30 each round of amplification occurs using only the second portion of the

WO 01/88190

PCT/US00/16130

primer and an ATC, with the first portion optionally remaining bound to the TS-DNA of the previous round, there is no need for strand or primer displacement in the methods of the present invention.

5 The processes according to the present invention may further comprise detecting the presence of tandem sequence DNA. Such detection may include, but is not limited to, a process wherein the conditions of step (c) above that promote replication include the presence in the mixture of a dNTP substrate bound to a reporter molecule and wherein said reporter
10 molecule is thereby incorporated into said tandem sequence DNA. A preferred reporter molecule is biotin and the dNTP can include any of the dNTPs, including dATP, dGTP, dTTP, dCTP, and dUTP. Of course, each round of amplification further enhances the ability to detect any given target sequence, especially where multiple target sequences are to be detected
15 simultaneously using highly specific, but separate, detector or reporter molecules.

 The present invention further relates to a process as described above, but further comprising a primer oligonucleotide, as in step (d), or (f), or (h),
20 wherein said primer oligonucleotide is bound to a reactive molecule capable of binding to said reporter molecule. In one embodiment of the present invention, said reactive molecule is a conjugate, with a preferred embodiment being an anti-biotin-DNA conjugate.

25 The present invention further relates to a process wherein the conditions, described above, that promote replication (such as steps (e), or (g), or (i) in the methods described herein) include the presence in the mixture of a dNTP substrate bound to a reporter molecule and wherein said reporter molecule is thereby incorporated into the tandem sequence DNA
30 produced by the process of the invention. In a preferred embodiment, said

WO 01/88190

PCT/US00/16130

reporter molecule is Cy5 or Cy3. Here, again, the dNTP may include any of the common dNTPs, including dUTP.

5 In one embodiment of the present invention, as described in Figure 2, a sample PPRCA is run using an anti-biotin DNA conjugate. Here, incorporation of biotin (or other suitable hapten) as a conjugate with dUTP (or other suitable deoxynucleoside triphosphate) on the initial TS-DNA product results in product from immobilized product oligonucleotides. Added antibody-DNA conjugates bind to the TS-DNA and thereby give rise to increased signal detection with the bound conjugates then serving as the platform for a second RCA reaction to detect the primary amplified product. As shown for step 2 in the figure, a second level of detection is afforded by addition to the multiple tandem sequence DNA product of primers possessing a separate and different signal detection molecule or reporter molecule, here Cy5, which affords increased signal amplification for an additional round of RCA. An important aspect of the present invention is that it eliminates the strand displacement of hyperbranching primers during polymerase read-through used in exponential RCA.

20 In one such embodiment, target nucleotides to be detected by amplification are incorporated into single stranded circular DNAs amplified together as part of the same ATC. These same ATCs can then be used in each successive stage of amplification and each of the target sequences is amplified simultaneously with other target sequences.

25 In addition to the foregoing, the primer oligonucleotides of the present invention may be branched chains so that a single primer contains one or more of the same or different sequences at the end of a number of branch points, each complementary to the same or different amplification target circles, most advantageously with one end of said branched oligonucleotide

30

WO 01/88190

PCT/US00/16130

primers, such as where the latter are dendrimers, attached to some type of solid support, such as the solid supports described hereinabove. Use of such branched chain primer oligonucleotide thereby provides an added level of amplification using the methods of the present invention.

5

In carrying out the methods of the present invention, said circular DNA may be derived from a padlock probe and a portion of a target sequence is derived from a padlock gap-fill in procedure. [See: Nilsson et al., "Padlock Probes: Circularizing Oligonucleotides for Localized DNA Detection", *Science*, 265:2085-2088 (1994), Lizardi, U.S. Patent 5,854,033]

10

As before, these embodiments of the present invention may further comprise detecting the tandem sequence DNA produced by the process of the invention. Here, again, in detecting said product the conditions of step (c) that promote replication include the presence in said mixture of a dNTP substrate, including, for example, dUTP, bound to a reporter molecule and wherein said reporter molecule is thereby incorporated into said tandem sequence DNA. In a particular embodiment, the reporter molecule is biotin.

15

The present invention may further comprise this just described embodiment wherein the primer oligonucleotide of step (d) is bound to a reactive molecule capable of binding to said reporter molecule. In preferred embodiments, this reactive molecule is a conjugate, especially an anti-biotin-DNA conjugate. In a most preferred embodiment, the reporter molecule is Cy5.

20

25

In carrying out the procedures of the present invention it is of course to be understood that reference to particular buffers, media, reagents, cells, culture conditions and the like are not intended to be limiting, but are to be read so as to include all related materials that one of ordinary skill in the art

30

WO 01/88190

PCT/US00/16130

would recognize as being of interest or value in the particular context in which that discussion is presented. For example, it is often possible to substitute one buffer system or culture medium for another and still achieve similar, if not identical, results. Those of skill in the art will have sufficient
5 knowledge of such systems and methodologies so as to be able, without undue experimentation, to make such substitutions as will optimally serve their purposes in using the methods and procedures disclosed herein.

The present invention will now be further described by way of the
10 following non-limiting examples. In applying the disclosure of these examples, it should be kept clearly in mind that other and different embodiments of the methods disclosed according to the present invention will no doubt suggest themselves to those of skill in the relevant art.

15

EXAMPLE 1**PPRCA Using an Anti-biotin DNA conjugate**

20 Fifty nM DNA circles in PBS were annealed to immobilized primers on glass slide. The slide was washed for 1 minute in 40 mM Tris pH 7.5, 25 mM NaCl, 10mM MgCl₂ and spun dry in clinical desktop centrifuge for 1 minute at 1000 rpm.

25 The following PPRCA reaction mixture was used: 1X Sequenase Reaction Buffer 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP, 0.3 mM dTTP, 0.1 mM biotin-16-dUTP, 0.01 U/μl T7 DNA Polymerase, 0.03 ug/ml SSB, 0.05 uM decorating oligo (5'-Cy5 and 3'-Cy5).

WO 01/88190

PCT/US00/16130

The PPRCA reaction mixture was then added to a glass slide and incubate at 37°C for 30 minutes. About 50 nM Circle were pre-annealed to 1 ng/ul anti-biotin DNA conjugate in PBS, 0.05% Tween 20, 1mM EDTA at 37°C for 30 minutes. The slide was then washed for two minutes in PBS, 0.05% Tween 20 at room temperature and rinsed in PBS/0.05% Tween 20.

A pre-annealed mixture of circles and anti-biotin DNA conjugate was then added to the slide and incubated at 37°C for 30 minutes, the slide was washed twice for two minutes in PBS, 0.05% Tween 20.

The following PPRCA reaction mixture was prepared: 1X Sequenase Reaction Buffer, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP, 0.3 mM dTTP, 0.1 mM Cy5-dUTP, 0.01 U/ul T7 DNA Polymerase, 0.03 ug/ml SSB (single stranded binding proteins).

This mixture was added to the slide and incubated at 37°C for 30 minutes. The slide was then washed twice for two minutes in 2X SSC/0.05% Tween 20 at room temperature and rinse in 1X SSC and spun-dry in clinical desktop centrifuge at 1000 rpm for 1 minute.

EXAMPLE 2

PPRCA with Decorating Primers

About 50 nM circles in PBS were annealed to immobilized primers on a glass slide and the slide washed for 1 minute in 40 mM Tris pH 7.5, 25 mM NaCl, 10mM MgCl₂ and then spun dry in clinical desktop centrifuge for 1 minute at 1000 rpm.

WO 01/88190

PCT/US00/16130

The following PPRCA reaction mixture was prepared: 1X
Sequenase Reaction Buffer, 0.4 mM dATP, 0.4 mM dCTP, 0.4 mM dGTP,
0.3 mM dTTP, 0.1 mM Cy5-dUTP, 1 U/ul Sequenase, 0.03 ug/ml SSB
5 (single-strand binding protein), and 0.05 uM decorating primer (5'-Cy5).

This reaction mixture was then added to a glass slide and incubated at
37°C for 30 minutes. The slide was then washed twice for two minutes in
2X SSC/0.05% Tween 20 at room temperature and rinsed in 1X SSC. It was
10 spun dry as previously described.

15

20

25

30

WO 01/88190

PCT/US00/16130

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A process for selectively amplifying nucleic acid sequences, comprising:
- 5 (a) mixing at least one single stranded non-circular first-stage oligonucleotide primer (P1) and at least one single stranded first-stage amplification target circle (ATC1) to produce a primer-ATC sample mixture;
- (b) incubating said primer-ATC1 sample mixture under conditions that promote hybridization between the oligonucleotide primer (P) and the
- 10 amplification target circle (ATC1) to form a hybridized primer-ATC1 sample mixture and allowing sufficient time to pass for hybridized primer-ATC1 complexes to form;
- (c) mixing a DNA polymerase and at least two deoxynucleotide triphosphates with said hybridized primer-ATC1 sample mixture to produce a
- 15 polymerase-primer-ATC1 sample mixture and incubating the polymerase-primer-ATC1 mixture under conditions that promote replication of the amplification target circles to form a primary tandem sequence DNA (TS-DNA);
- (d) adding to said polymerase-primer-ATC1 mixture at least one
- 20 second-stage primer oligonucleotide (P2) comprising a first portion, or segment, having a sequence complementary to one or more sequences present in said primary TS-DNA and a second portion, including a 3'-OH end, having a sequence not complementary to said primary TS-DNA, under conditions promoting hybridization of said first portion of P2 to said primary
- 25 TS-DNA thereby forming a TS-DNA-P2 complex;
- (e) adding one or more second-stage amplification target circles (ATC2) to the mixture in (d) under conditions promoting hybridization of said ATC2 to said second portion of P2 to form a tandem sequence-P2-ATC2 mixture, wherein replication of the amplification target circles of (e) results in
- 30 formation of secondary tandem sequence DNA.

WO 01/88190

PCT/US00/16130

2. The process of claim 1, further comprising the additional steps of:

- (f) adding to said polymerase-primer-ATC2 mixture at least one third-stage primer oligonucleotide (P3) comprising a first portion, or segment, having a sequence complementary to one or more sequences present in said secondary TS-DNA and a second portion, including a 3'-OH end, having a sequence not complementary to said secondary TS-DNA, under conditions promoting hybridization of said first portion of P3 to said secondary TS-DNA thereby forming a TS-DNA-P3 complex;
- (g) adding one or more third-stage amplification target circles (ATC3) to the mixture in (f) under conditions promoting hybridization of said ATC3 to said second portion of P3 to form a tandem sequence-P3-ATC3 mixture, wherein replication of the amplification target circles of (f) results in formation of tertiary tandem sequence DNA.

3. The process of claim 2, further comprising the additional steps of:

- (h) adding to said polymerase-primer-ATC3 mixture at least one fourth-stage primer oligonucleotide (P4) comprising a first portion, or segment, having a sequence complementary to one or more sequences present in said tertiary TS-DNA and a second portion, including a 3'-OH end, having a sequence not complementary to said tertiary TS-DNA, under conditions promoting hybridization of said first portion of P4 to said tertiary TS-DNA thereby forming a TS-DNA-P4 complex;
- (i) adding one or more fourth-stage amplification target circles (ATC4) to the mixture in (h) under conditions promoting hybridization of said ATC4 to said second portion of P4 to form a tandem sequence-P4-ATC4 mixture, wherein replication of the amplification target circles of (h) results in formation of quaternary tandem sequence DNA.

4. The process of claim 1, 2, or 3 wherein the amplification target

circles are identical.

WO 01/88190

PCT/US00/16130

5. The process of claim 1, 2, or 3 wherein the amplification target circles are identical within a given stage.
- 5 6. The process of claim 1, 2 or 3 wherein the amplification target circles of one stage are different from the amplification target circles of one or more of the other stages.
7. The process of claim 1, 2 or 3 wherein the first portion of said
10 second or higher stage primers are identical to each other.
8. The process of claim 1, 2 or 3 wherein the second portion of said second or higher stage primers within a given stage are identical to each other.
- 15 9. The process of claim 1, 2, or 3 further comprising detecting the presence of tandem sequence DNA (TS-DNA).
10. The process of claim 9 wherein the conditions of step (c) that
20 promote replication include the presence in said mixture of a dNTP substrate bound to a first reporter molecule and wherein said first reporter molecule is thereby incorporated into said tandem sequence DNA.
11. The process of claim 10 wherein the primer oligonucleotide P2 is
25 bound to a first reactive molecule capable of binding to said first reporter molecule.
12. The process of claim 11 wherein the dNTPs used to extend primer
P2 are bound to a second reporter molecule such that said second reporter
30 molecule becomes incorporated into the secondary tandem sequence DNA.

WO 01/88190

PCT/US00/16130

13. The process of claim 12 wherein the primer oligonucleotide P3 is bound to a second reactive molecule capable of binding to said second reporter molecule.
- 5
14. The process of claim 13 wherein the dNTPs used to extend primer P3 are bound to a third reporter molecule such that said third reporter molecule becomes incorporated into the tertiary tandem sequence DNA.
- 10
15. The process of claim 14 wherein the primer oligonucleotide P4 is bound to a third reactive molecule capable of binding to said third reporter molecule.
- 15
16. The process of claims 1, 10, 12 or 14 wherein said dNTP is a member selected from the group consisting of dUTP, dCTP, dATP, dGTP, a naturally occurring dNTP different from the foregoing, an analog of a dNTP, and a dNTP having a universal base.
- 20
17. The process of claims 10, 12, or 14, wherein said reporter molecule is selected from the group consisting of biotin, digoxigenin, hapten, an enzyme, a mass tag and any combination thereof.
- 25
18. The process of claim 17 wherein at least two of the first, second and third reporter molecules are chemically distinct.
19. The process of claims 11, 13, or 15 wherein at least two of said first, second and third reactive molecules are chemically distinct.
- 30
20. The process of claim 19 wherein said reactive molecules are selected from the group consisting an enzyme and a conjugate.

WO 01/88190

PCT/US00/16130

21. The process of claim 20 wherein said conjugate comprises a member selected from the group consisting of anti-biotin-DNA, anti-digoxigenin-DNA, a double stranded binding protein, a single-stranded binding protein, and an aptamer.
- 5
22. The process of claim 21 wherein said binding protein binds DNA or RNA.
23. The process of claims 10, 12, or 14 wherein said reporter molecule is Cy5 or Cy3.
- 10
24. The process of claim 10, 12, or 14 wherein said reporter molecule is a fluorophore.
- 15
25. The process of claims 1, 2, or 3 wherein said primers are from 2 to 15 nucleotides in length.
26. The process of claims 1, 2, or 3 wherein said one or more primers attach to a TS-DNA product through a chemical linkage selected from the group consisting of hybridization, a covalent bond or formation of a polynucleotide triplex.
- 20
27. The process of claims 1, 2, or 3 wherein at least one primer is bipolar.
- 25
28. The process of claims 1, 2, or 3 wherein at least one primer is attached to a solid support.
29. The process of claim 28 wherein said solid support is made of glass or plastic.
- 30

WO 01/88190

PCT/US00/16130

30. The process of claims 1, 2, or 3 wherein one or more of the tandem sequence DNA products are detected.

31. The process of claim 30 wherein said detection is accomplished by
5 use of a decorator selected from the group consisting of hybridization probes, fluorophores, ligand binding molecules, antibodies, FKBP fold binding molecules, enzymes, receptors, nucleic acid binding proteins, ribosomal or other RNA binding proteins, affinity agents and aptamers.

10

15

20

25

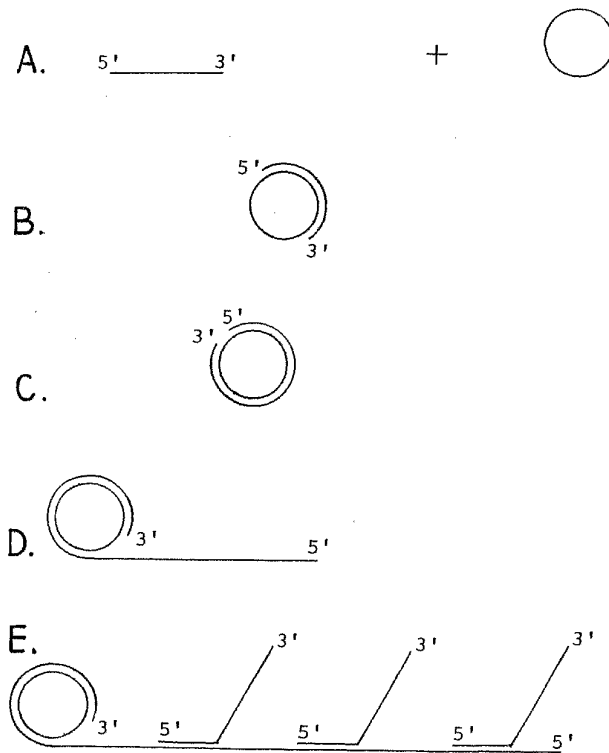
30

WO 01/88190

PCT/US00/16130

1 / 6

FIG. 1(a)



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 1(b)

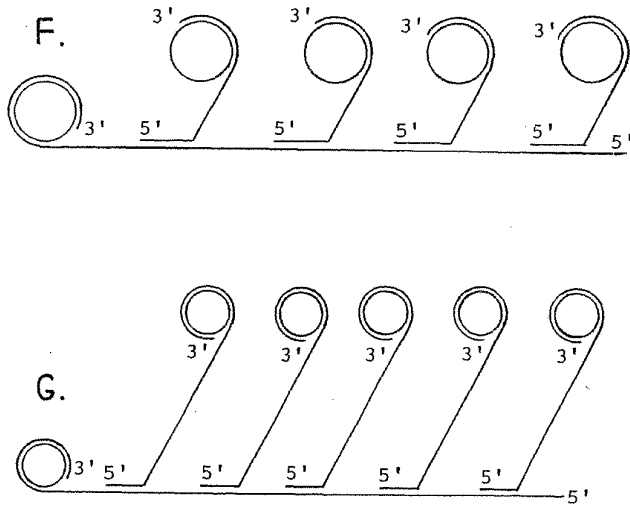
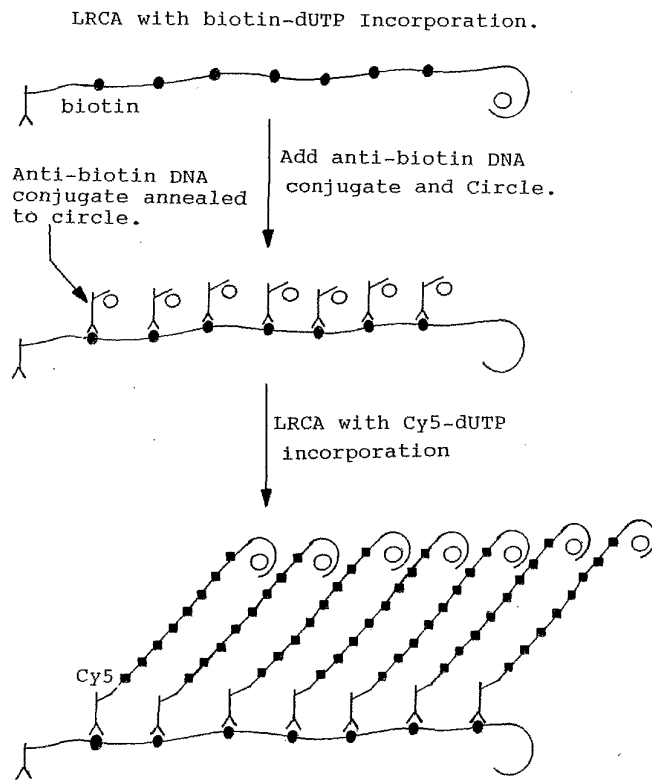


FIG. 2



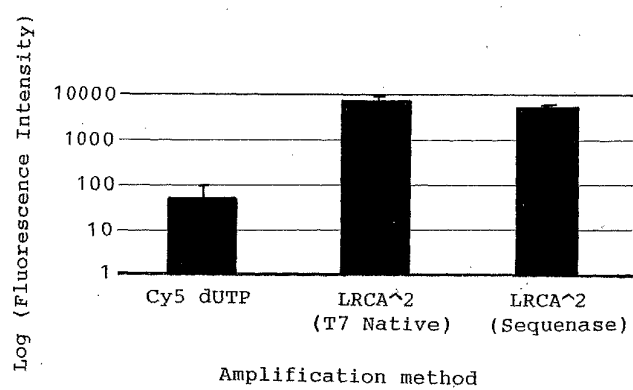
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/88190

PCT/US00/16130

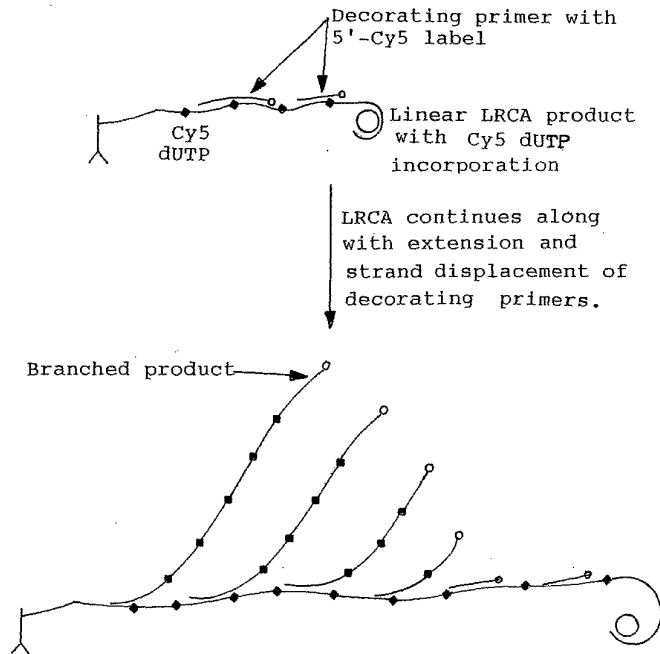
4 / 6

FIG. 3



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 4

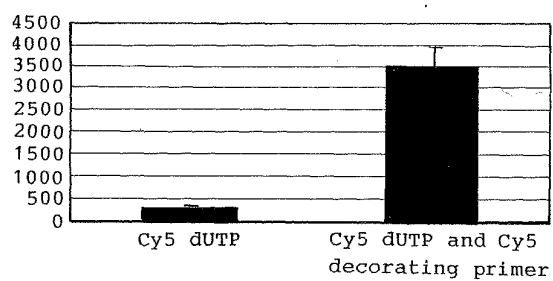


WO 01/88190

PCT/US00/16130

6 / 6

FIG. 5



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

フロントページの続き

(72)発明者 ウィルトシャー, リチャード, スティーブン

アメリカ合衆国, 0 6 4 7 9 コネティカット, プランツビル, ツウィックス ファーム ロード
2

(72)発明者 ランバート, ジェレミー, ピー.

アメリカ合衆国, 0 6 4 1 0 コネティカット, チェシャー, チャールズ ドライブ 3 7 6

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 HA19