

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4638043号
(P4638043)

(45) 発行日 平成23年2月23日 (2011.2.23)

(24) 登録日 平成22年12月3日 (2010.12.3)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 M 1/00	(2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A

請求項の数 55 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2000-588399 (P2000-588399)	(73) 特許権者	506141546
(86) (22) 出願日	平成11年12月13日 (1999.12.13)		パシフィック バイオサイエンシーズ オ ブ カリフォルニア, インコーポレイテ ッド
(65) 公表番号	特表2002-532104 (P2002-532104A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 25, メンロ パーク, アダムス ド ライブ 1505
(43) 公表日	平成14年10月2日 (2002.10.2)	(74) 代理人	100078282
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/029585		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開番号	W02000/036152	(74) 代理人	100062409
(87) 国際公開日	平成12年6月22日 (2000.6.22)		弁理士 安村 高明
審査請求日	平成18年11月14日 (2006.11.14)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	60/112,078		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成10年12月14日 (1998.12.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/115,496		
(32) 優先日	平成11年1月11日 (1999.1.11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリメラーゼ合成による、単一分子の核酸の配列決定のためのシステムおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的核酸の遺伝子型決定または配列決定の方法であって、以下の工程：

i . 単一分子配置において、固体支持体上に核酸ポリメラーゼまたは該標的核酸を固定化する工程；

i i . 該固体支持体を溶液と接触させる工程であって、該溶液は以下：

(a) 該ポリメラーゼが固定化される場合は、標的核酸、または該標的核酸が固定化される場合は、ポリメラーゼ；

(b) 配列決定される領域の下流の該標的核酸の領域を相補する、プライマー核酸；

(c) 各々の型の塩基が、__ホスフェート部分上に示差的に標識化されるヌクレオチド三リン酸 [N T P] であって、該標識が、該ポリメラーゼの伸長産物への N T P の取り込みに際して、選択的に検出可能な固有のシグナルを提供するヌクレオチド三リン酸 [N T P]、

を含む工程；

i i i . 該ポリメラーゼに、該プライマーを、連続的に伸長させ、N T P を取り込ませて、該標的核酸に対する相補体を作製する工程；および

i v . 該標識化 N T P からの該固有のシグナルを検出することにより、該プライマーの伸長を決定して、該標的核酸を遺伝子型決定または配列決定する工程、を包含する、方法。

【請求項2】

10

20

前記溶液が、少なくとも2つの異なる型のdNTPを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記dNTPが、ホスフェートが前記ヌクレオチドから切除される場合に、示差的に蛍光発光する蛍光標識を用いて該ホスフェート上に標識化される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記固体支持体の表面が、ポリメラーゼまたは標的DNAの単一分子を各々が保有する位置のアレイを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記ポリメラーゼが、固体支持体上へ個々の単一分子のアレイとして固定化される、請求項1に記載の方法。

10

【請求項6】

前記標的DNAが、単一ヌクレオチド多型である、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記溶液が単一dNTPを含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記検出が、標的DNAの配列を提供するための異なる型のdNTPの連続的な検出である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記NTPが、ホスフェート上の蛍光団、および消光部分で標識化される、請求項1に記載の方法。

20

【請求項10】

前記検出器が光学的読み取り装置である、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記固体支持体に接触する前記溶液が前記固定化ポリメラーゼまたは標的DNAを通過して流れる、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

前記標的核酸がデオキシヌクレオチド酸であり、前記ポリメラーゼが、DNA依存性DNAポリメラーゼまたはRNA依存性DNAポリメラーゼのいずれかであり、そして前記NTPがdNTPである、請求項1に記載の方法。

30

【請求項13】

前記標的核酸が二本鎖DNAであり、そして前記ポリメラーゼがRNAポリメラーゼであり、そして前記NTPがrNTPである、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

標的核酸を遺伝子型決定または配列決定するためのシステムであって、以下：

i . 単一分子配置において固定化核酸ポリメラーゼまたは該標的核酸を保有する表面を有する固体支持体；

ii . 該表面に接触させるための溶液であって、以下：

(a) 該ポリメラーゼが固定化される場合は、標的核酸、または該標的核酸が固定化される場合は、ポリメラーゼ；

40

(b) モル過剰のヌクレオチド三リン酸[NTP]であって、各々の型のNTP塩基が、ホスフェート部分上に示差的に標識化され、そしてここで該標識が、ポリメラーゼ伸長産物中への該NTPの取り込みに際して選択的に検出され得る固有のシグナル提供する、モル過剰のヌクレオチド三リン酸[NTP]を含む、溶液を備える、システム。

【請求項15】

請求項14に記載のシステムであって、ここで前記ポリメラーゼがDNA依存性DNAポリメラーゼであり、前記標的核酸がDNAであり、そして前記NTPがdNTPであり、該システムが、配列決定される領域の下流で該標的核酸の領域に相補的であるプライマー核酸をさらに備える、システム。

50

【請求項 16】

前記表面が、固定化DNA依存性DNAポリメラーゼを保有する、請求項14に記載のシステム。

【請求項 17】

前記溶液が、少なくとも2つの異なる型のdNTPを含む、請求項14に記載のシステム。

【請求項 18】

前記固体支持体の表面が、単一分子のポリメラーゼまたは標的核酸を各々が保有する位置のアレイを備える、請求項14に記載のシステム。

【請求項 19】

前記固体支持体の表面が、単一分子のポリメラーゼを各々が保有する位置のアレイを備える、請求項14に記載のシステム。

【請求項 20】

ホスフェートが前記ヌクレオチドから切除される場合に、前記NTPが、示差的に蛍光発光する蛍光標識を用いて、該ホスフェートに標識化される、請求項14に記載のシステム。

【請求項 21】

前記標的核酸がDNAであり、そしてここで該DNAが、野生型DNA由来の単一ヌクレオチド多型を有する、請求項14に記載のシステム。

【請求項 22】

前記溶液が単一のdNTPを含む、請求項14に記載のシステム。

【請求項 23】

前記ポリメラーゼがRNA依存性DNAポリメラーゼであり、前記標的核酸がRNAであり、そして前記NTPがdNTPである、請求項14に記載のシステム。

【請求項 24】

前記ポリメラーゼがDNA依存性RNAポリメラーゼであり、前記標的核酸が二本鎖DNAであり、そして前記NTPがrNTPである、請求項14に記載のシステム。

【請求項 25】

光学的読み取り装置をさらに備える、請求項14に記載のシステム。

【請求項 26】

請求項14に記載のシステムであって、該システムは、電極をさらに備え、該電極は、前記溶液の流れを、前記固定化ポリメラーゼまたは標的核酸に接触させるために十分な、前記固体支持体を横切る電圧勾配を提供するように配置される、システム。

【請求項 27】

複数の標的核酸分子を配列決定するための方法であって、該方法は、

該複数の標的核酸分子を、複数の型のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログを含む重合反応に供し、それぞれの標的核酸分子に相補的な伸長核酸鎖の集団を得る工程であって、ここで該標的核酸分子および/または核酸ポリメラーゼは単一分子配置で支持体に付着されており、該ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログの少なくとも1つの型は、各々の型の塩基がホスフェート部分上に示差的に標識化されるヌクレオチド三リン酸 [NTP]を含む、工程；および

取り込み事象の時間順序を光学的に同定する工程であって、該取り込み事象のうちの少なくとも1つは、該タグ付けされたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログの、該集団における少なくとも1つの伸長核酸鎖への取り込みに関し、ここで、タグ付けされたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログに関する各事象は、該第一のタグの検出可能特性における変化によって特徴付けられる、方法。

【請求項 28】

複数の標的核酸を配列決定するための方法であって、該方法は、

該複数の標的核酸分子を、複数の型のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログの存在下で重合反応に供し、それぞれの標的核酸分子に相補的な伸長核酸鎖の集団を得る工程で

10

20

30

40

50

あって、ここで該標的核酸分子および/または核酸ポリメラーゼは単一分子配置で支持体に付着されており、少なくとも1つの型のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログは、各々の型の塩基がホスフェート部分上に示差的に標識化されるヌクレオチド三リン酸 [N T P]を含む、工程；および

取り込み事象の時間順序を、リアルタイムまたはほぼリアルタイムで光学的に同定する工程であって、該取り込み事象のうちの少なくとも1つは、該タグ付けされたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログの、該集団における少なくとも1つの伸長核酸鎖への取り込みに関し、ここで、タグ付けされたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログに関する各事象は、該第一のタグの検出可能特性における変化によって特徴付けられる、方法。

【請求項29】

前記ポリメラーゼは、DNAポリメラーゼ、逆転写酵素、およびそれらの混合物からなる群より選択される、請求項27または28に記載の方法。

【請求項30】

前記ポリメラーゼは、熱安定性ポリメラーゼまたは熱分解性ポリメラーゼである、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記標的核酸分子は、二本鎖DNA、一本鎖DNA、一本鎖DNAヘアピン、およびDNA/RNAハイブリッドからなる群より選択される、請求項27に記載の方法。

【請求項32】

前記ヌクレオチドアナログは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、修飾リボヌクレオチド、修飾デオキシリボヌクレオチド、ペプチドヌクレオチド、修飾ペプチドヌクレオチド、および修飾ホスフェート-糖骨格ヌクレオチドからなる群より選択される、請求項27に記載の方法。

【請求項33】

前記タグ付けされたヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログ型はさらに、1つのさらなるタグまたは複数のさらなるタグを含む、請求項27に記載の方法。

【請求項34】

前記第一のタグは、発色体、蛍光部分、色素、および蛍光ナノ粒子からなる群より選択される、請求項27に記載の方法。

【請求項35】

前記さらなるタグまたは前記複数のさらなるタグは、塩基、糖部分、またはホスフェートにおいて前記ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログに付着される、請求項33に記載の方法。

【請求項36】

各ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログ型は第一のタグを含み、該第一のタグにより、該ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログ型が前記同定工程の間識別可能になる、請求項27に記載の方法。

【請求項37】

前記複数のヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログのうちの3つまたはそれ未満が、異なるタグを有する、請求項33に記載の方法。

【請求項38】

異なる型の前記ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログが、同一のタグを有するが、該ヌクレオチドもしくはヌクレオチドアナログの異なる特性、および/または該タグの発光特性によって識別可能である、請求項33に記載の方法。

【請求項39】

同定する工程が、蛍光エネルギー移動のレベルにおける変化を検出することによって実施される、請求項27または28に記載の方法。

【請求項40】

前記同定する工程が、スペクトル波長判別、蛍光持続時間の測定および分離、蛍光団同定、バックグラウンド抑制、またはそれらの組み合わせによって実施される、請求項27ま

10

20

30

40

50

たは 28 に記載の方法。

【請求項 41】

前記複数の標的核酸が、前記支持体に付着されている、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 42】

各標的核酸は、前記支持体に付着された別個のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 43】

前記 DNA ポリメラーゼが、前記支持体に付着されている、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 44】

前記同定する工程が、遊離ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログから生じるバックグラウンドノイズを減少することによって実施される、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 45】

前記タグは、前記ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログの末端ホスフェートに付着される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 46】

前記同定する工程は、前記ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログに付着された前記タグを検出することによって行われる、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記ポリメラーゼは 3' から 5' へのエキソヌクレオチド活性を欠く、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 48】

請求項 1、27 および 28 のいずれか 1 項に記載の方法に従う、表面を有する固体支持体の使用であって、該表面が、該固体支持体に結合される核酸ポリメラーゼアレイを有し、ここで該アレイのメンバーがポリメラーゼの個々の分子からなる、使用。

【請求項 49】

前記アレイのメンバーがアドレス指定されている、請求項 48 に記載の使用。

【請求項 50】

前記ポリメラーゼが DNA 依存性 DNA ポリメラーゼである、請求項 48 に記載の使用。

【請求項 51】

前記ポリメラーゼが DNA 依存性 RNA ポリメラーゼである、請求項 48 に記載の使用。

【請求項 52】

請求項 14 に記載のシステムの使用であって、前記固体支持体の表面は、該固体支持体に結合される核酸ポリメラーゼアレイを有し、ここで該アレイのメンバーがポリメラーゼの個々の分子からなる、使用。

【請求項 53】

前記アレイのメンバーがアドレス指定されている、請求項 52 に記載の使用。

【請求項 54】

前記ポリメラーゼが DNA 依存性 DNA ポリメラーゼである、請求項 52 に記載の使用。

【請求項 55】

前記ポリメラーゼが DNA 依存性 RNA ポリメラーゼである、請求項 52 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(関連出願に対する相互参照)

本願は、1998年12月14日に出願された米国仮特許出願第 60/112,078 号

10

20

30

40

50

、および1999年1月11日に出願された同第60/115,496号(これらの開示は、全ての目的のためにそれらの全体において、参考として本明細書により援用される)に対して優先権を請求する。

【0002】

(連邦政府により援助された研究および開発下でなされる発明に対する権利に関する記載)

[該当なし]

(発明の分野)

本発明は、単一分子配置における核酸を配列決定および遺伝子型決定するための改良された方法に関する。この方法は、ポリメラーゼ伸長産物が作製される場合に、ヌクレオチド三リン酸[NTP]から放出される蛍光標識ピロリン酸[PPi]部分の単一分子の検出を含む。

10

【0003】

(発明の背景)

以前の非電気泳動的な配列決定方法および遺伝子決定方法は、組み込まれたヌクレオチドからのPPi放出の連続的検出を利用しなかった。PPi配列決定の先行技術(www.pyrosequencing.com)において、各々のヌクレオチド(アデノシン5'-リン酸「A」、シチジン5'-リン酸「C」、グアノシン5'-リン酸、ウリジン5'-リン酸「U」、およびチミジン5'-リン酸「T」)は、核酸標的およびポリメラーゼを含む反応混合物に別々に加えられた。現在のヌクレオチドは、次のヌクレオチドが加えられる前に除去される。ヌクレオチドの取り込みは、NTPからのPPiの放出により達成され、PPiについての二次的なアッセイにより検出される。NTPのPPi部分は標識化されないため、二次的なアッセイが、必要とされる。1サイクルあたり、1つのヌクレオチドのみが試験され得る; 4つ全てのNTPが、同時に存在するとする場合、重合反応は無制御で続き、そして配列情報は得られえない。読み取り長は、サンプル中の標的核酸分子の間での同期化の損失により制限される。

20

【0004】

他の非電気泳動的な方法(例えば、マイクロビーズに結合されたDNAフラグメント上でのプローブの段階的な連結および切断)は、各々のサイクルで必然的に減衰する、DNA分子の同期化を必要とする。

30

【0005】

本方法は、これらの問題を解決し、そして他の配列決定方法を越える利点を有する。4つ全てのヌクレオチドが同時に添加される場合、段階的なヌクレオチドの添加は、不必要である。ポリメラーゼが、伸長している核酸[NA]鎖の中へ4つ全てのヌクレオチドを連続的に取り込む場合、配列情報は、連続して生成される。単一分子が別々に観察されるので、同期化の損失は無い。単一分子の分析はまた、生物から直接取り出したNAフラグメントの使用を可能にする。本方法を用いて、クローニング工程または増幅工程を使用して、配列決定のためにNAを調製することは、もはや必要ないが、このように調製されたNAは、依然として配列決定され得る。さらに、単一の表面上の、多くの異なる核酸を、同時に配列決定および遺伝子型決定する可能性が存在する。

40

【0006】

(発明の要旨)

本発明は、以下の工程を包含する標的核酸[NA]を遺伝子型決定または配列決定する方法を提供する: i. 単一分子配置における固体支持体上に核酸ポリメラーゼまたは標的核酸を固定化する工程; ii. 以下を含む溶液と固体支持体を接触させる工程: (a) このポリメラーゼが固定化される場合は、標的核酸、またはこの標的核酸が固定化される場合は、ポリメラーゼ; (b) 配列決定される領域の下流の標的核酸の領域を相補するプライマー核酸; (c) 各々の型の塩基が、ホスフェート部分で示差的に標識化されるNTPであって、ここでこれらの標識がポリメラーゼ伸長産物へのNTPの取り込みに際して選択的に検出可能な固有のシグナルを提供する、NPT; iii. ポリメラーゼに、プライマ

50

ーを連続的に伸長させ、NTPを組み込ませて、標的核酸に対する相補体を作製する工程；およびiv. 標識NTPから固有のシグナルを検出することにより、プライマーの伸長を決定して、標的核酸を遺伝子型決定または配列決定する工程。この方法は、少なくとも2つの異なるNTPの型を含む溶液を使用し得る。

【0007】

ホスフェートがヌクレオシドから切除される場合、このNTPが、示差的に蛍光発光する蛍光標識を用いてホスフェート上に標識化されることは、好ましい。固定化部分はさらに、ポリメラーゼまたは標的核酸の単一分子を各々が保有する位置のアレイを含み得る。この固定化部分は、固体支持体上の個々の単一分子のアレイとして位置するポリメラーゼであり得る。遺伝子型決定のために、この標的核酸は、単一ヌクレオチド多型であり得る。このような環境において、単一型のNTPを有する溶液を加えることだけを必要とする。配列決定に関して、決定は、異なるNTPの型の連続的な決定を含み、標的核酸の配列を提供する。好ましい実施形態では、このdNTPは、ホスフェートおよび消光部分に、蛍光団を用いて標識化される。別の好ましい実施形態では、固体支持体に接触する溶液は、固定化ポリメラーゼまたは標的NAを過ぎて流れる。このポリメラーゼは、DNA依存性もしくはRNA依存性のDNAポリメラーゼまたはDNA依存性RNAポリメラーゼであり得る。このNTPは、標的核酸および使用されるポリメラーゼに依存して、リボヌクレオチド三リン酸[rNTP]またはデオキシヌクレオチド三リン酸[dNTP]であり得る。

【0008】

本発明はさらに、以下を含む標的NAを遺伝子型決定または配列決定するためのシステムを含む：i. 単一分子配置における固定化核酸ポリメラーゼまたは固定化標的NAを保有する表面を有する固体支持体；ii. 以下を含む表面を接触するための溶液：(a) ポリメラーゼが固定化される場合は、標的NA、または標的NAが固定化される場合は、ポリメラーゼ；(b) ここで、このポリメラーゼがプライマー核酸の使用を必要とし、配列決定される領域の下流の標的NAの領域を相補する添加されたプライマーが存在する；(c) 各々の型のNTP塩基が、ホスフェート部分で示差的に標識化され、そしてこの標識が、ポリメラーゼ伸長産物中へのNTPの取り込みの際して選択的に検出される固有のシグナルを提供するモル過剰なNTP。このシステムは、方法に関して上記で同定された同じ実施形態を包含する。このシステムが流れている溶液を含む場合、この流れによる力は、機械的に生成されるか、または電極を使用して電気浸透的に(electroosmotically)生成され得る。

【0009】

本発明はさらに、表面を有する固体支持体を提供し、この表面は、表面に結合される核酸ポリメラーゼアレイを有し、このアレイのメンバーは、ポリメラーゼの個々の分子からなる。このアレイのメンバーは、その位置を規定するために、必要に応じて用意され、そして部位間の比較情報は、生成され得、そして光学的読み取り装置により記録され得る。固体支持体は、それに結合されるDNA依存性DNAポリメラーゼ、またはDNA依存性RNAポリメラーゼ、またはRNA依存性DNAポリメラーゼ(逆転写酵素)を有し得る。好ましくは、この固定化部分は、単一分子配置においてある。

【0010】

(定義)

アレイの状況における「アドレス可能な」は、個別かつ規定される領域内に位置される、アレイのメンバーをいう。

【0011】

「アレイ」は、標的核酸または固体支持体に結合する核酸ポリメラーゼのいずれかを有する1つより多い部位または位置を有する固体支持体をいう。

【0012】

配列決定または遺伝子型決定の状況における「配列決定される領域の下流の標的核酸の領域を相補する」は、プライマーが、ポリメラーゼによって3'方向に伸長される事実をい

10

20

30

40

50

う。従って、プライマーの3'末端として決定される標的配列に対する標的3'の部分配列(下流)に結合するプライマーが、伸長される。

【0013】

「遺伝子型決定」は、必ずしも全体のDNAの配列の内容を決定することなく、標的DNAの対立遺伝子の内容の決定することである。これは、配列決定のサブセットである。例えば、2つの既知の対立遺伝子の形態の間の、一塩基の差異の決定による単一ヌクレオチド多型の同定は、配列決定される全ての標的DNAを必要としない配列決定の形態である。

【0014】

「固定化」は、反応溶液中で標的核酸またはポリメラーゼの放出を妨げる方法による、固体支持体への標的核酸またはポリメラーゼの結合をいう。この方法は、共有結合またはイオン結合または疎水結合であり得る。

10

【0015】

「光学的読み取り装置」は、標識dNTPから発する光を検出および記録し得るデバイスをいう。

【0016】

「配列決定」は、核酸における塩基の順序および位置の決定をいう。

【0017】

「単一分子配置」は、アレイのメンバーが規定される位置内に位置される個々の分子として提示される固体支持体上の分子のアレイをいう。このメンバーは、同じであるか、または異なり得る。

20

【0018】

ヌクレオチド三リン酸[NTP]の状況における「塩基の型」は、ポリメラーゼのための基質として認識され得るヌクレオチドをいう。典型的な塩基としては、アデニン塩基、シトシン塩基、グアニン塩基、ウラシル塩基、またはチミジン塩基が挙げられ、ここで、この型は、異なる塩基を保有するNTPの集団内の塩基を有するヌクレオチドの部分集団をいう。他の稀な(rarer)塩基またはアナログは、キサンチンまたはヒポキサンチンまたはメチル化シトシンなどに置換され得る。

【0019】

(詳細な説明)

30

(1. 序論)

本発明は、核酸を遺伝子型決定および配列決定するための新規手段を提供する。本明細書中に記載されるこの方法は、伸長生成物中にそれらのそれぞれのNTPを取り込むRNA依存性ポリメラーゼまたはDNA依存性ポリメラーゼとして、一度に同定される個々の蛍光発生的なNTP分子を使用する。このNTPは、以下の2つの付加物を輸送する：ホスフェートに付加される蛍光色素、および塩基または糖または色素のいずれかに付加される蛍光消光体。この消光体が、塩基または糖に付加される場合、このNTPは、伸長産物中へ取り込まれる際に加水分解され、そしてこの遊離ピロリン酸色素部分は、蛍光発光性になる。この現在非消光である遊離色素は蛍光になり、そしてこの発生は、顕微鏡下でビデオレートで画像化される。

40

【0020】

流動する流れは、親分子から色素を払拭する。4つ全てのNTPは、同時に存在する。ポリメラーゼが標的核酸に沿って移動し続ける場合、このヌクレオチド配列は、放出される色素の順序から読み取られる。

【0021】

(2. 標的核酸の供給源)

標的核酸は、重要ではなく、種々の標準の供給源から生じ得る。供給源は、mRNA、リボソームRNA、ゲノムDNAまたはcDNAであり得る。この標的が生物学的供給源由来である場合、核酸を抽出するための種々の公知の手順が存在し、そして必要に応じて、遺伝子型決定作業または配列決定作業のために都合のよい濃度まで増幅される。核酸は、

50

ヒト、動物または植物の任意の生細胞から得られうる。ヒト、病原菌およびウイルスは、特に興味深い供給源である。

【0022】

核酸の増幅方法もまた、公知である。好ましくは、この増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により行われる（米国特許第4,683,202号、同第4,683,195号、および同第4,889,818号；Gyllensteinら、1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7652-7656；Ochmanら、1988, Genetics 120:621-623；Lohら、1989, Science 243:217-220；Innisら、1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, Calif）。当該分野で公知の他の増幅方法は使用され得、以下が挙げられるがこれらに限定されない：Q-レプリカーゼを用いるリガーゼ連鎖反応（EP320,308を参照のこと）、またはKrickaら、1995, Molecular Probing, Blotting, and Sequencing, 第1章、および表IX, Academic Press, New Yorkに列挙される方法。

10

【0023】

(3. 固定化)

本発明において使用される単一分子アレイとしては、支持体、生物反応性層または生物接着性層、および生物耐性層が挙げられる。この支持体は、ガラス、シリカ、プラスチックまたは任意の他の従来の非反応性物質（これは、蛍光検出方法のために、有意なノイズまたはバックグラウンドを生じない）であり得る。この生物接着層は、金、ニッケルまたは銅のようなイオン吸着物質（MontemagnoおよびBachand（1999）Constructing nanomechanical devices powered by biomolecular motors. Nanotechnology 10:225-231）、タンパク質吸着性プラスチック（例えば、ポリスチレン（米国特許第5,858,801号）、または共有結合反応物（例えば、チオール基）であり得る。生物接着性層のパターン化アレイを作製するために、支持体上をコートされる電子感応性ポリマー（例えば、ポリメチルメタクリル酸（PMMA））は、電子線を用いて任意の所望のパターンで、エッチングされ得、続いて、増感ポリマーを除去するために現像される。次いで、ポリマー中の孔は、金属（例えば、ニッケル）でコートされ、そしてこのポリマーは、溶媒で除去され、基板上に金属ポストのパターンを残す。この電子線リソグラフィ法は、非常に高度な空間的分解、およびパターン化アレイにおける各々の点でちょうど1分子を固定化するのに必要とされる小さい造形サイズを提供する。高分解性のパターン化アレイを作製するための第二の手段は、原子間力顕微鏡である。第三の手段は、X線リソグラフィである。

20

30

【0024】

生物製剤は、金属製生物吸着パターンに結合する生物製剤上にポリヒスチジンタグを供給することにより、生物接着性パターンに付着され得る。付着のための他の慣用的な手段は、相同二官能性架橋剤および相異二官能性架橋試薬を使用する。相同二官能性試薬は、2つの同一の官能基を有する一方、異種二官能性試薬は、生物製剤を生物接着性物に連結するための2つの類似しない官能基を含む。膨大な量の異種二官能性架橋剤は、一級アミン反応性基およびチオール反応性基を含む。共有結合性架橋剤は、ジスルフィド（S-S）、グリコール（-CH(OH)-CH(OH)-）、アゾ（-N=N-）、スルホン（S=(O₂-）、エステル（-C(=O)-O-）、またはアミド（-C(=O)-N-）架橋を形成し得る試薬から選択される。

40

【0025】

生物耐性層は、生物接着性層への生物製剤の結合の前または後のいずれかに、生物吸着性層上に置かれるか、または載せられ得る。この生物耐性層は、生物製剤に結合しない任意の物質である。例としては、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、リゾチーム、オクトキシノール、ブロックコポリマーを含むポリソルベート20（ポリエテネソルビタンモノラウリ

50

ン酸)およびポリエチレンオキシド、ならびに界面活性剤が挙げられる(米国特許第5,858,801号)。この層の堆積は、スプレー、浸漬および蒸着(金属)を含む従来の手段により行われる。

【0026】

(4. NTPの標識化)

(A. ホスフェート蛍光団の結合)

本発明の方法は、ポリメラーゼが単一核酸分子中へdNTP分子を取り込む場合に、個々の蛍光発生的なdNTP分子を検出および同定することに関する。特定の局面では、蛍光色素は、ホスフェートに結合され、そして消光剤は、核酸塩基に結合される。このように、本発明は、ヌクレオチド三リン酸(NTP)プローブを提供し、以下を含む：NTPに結合される蛍光団部分を有するホスフェートを有するNTP；蛍光団部分の蛍光を妨げるために、蛍光団部分に十分に近位の消光部分；ここで、ホスフェートがNTPに結合され、そしてこのホスフェートがNTPから解離される場合に消光される場合、蛍光団部分は、少なくとも約5倍の消光効果、好ましくは少なくとも10倍の消光効果で消光される。

10

【0027】

好ましい局面において、NTPプローブは、-ホスフェート部分に付着した蛍光色素および核酸塩基に付着した消光剤を有するdNTPプローブである。適切な核酸塩基は、以下を含むが、これらに限定されない：アデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、チミン、デアザアデニンおよびデアザグアノシン。消光されたdNTPは、-ホスフェートがNTPに付着される場合、非蛍光であり、その後、-ホスフェートがNTPに付着されない場合、蛍光になる。

20

【0028】

(B. 蛍光消光)

一分子検出において、高い消光効果は、蛍光バックグラウンドを減少するとして有利であり、従って、より高いヌクレオチド濃度の使用が可能である。いくつかの消光機構が存在する(例えば、G. G. Guilbault, Practical Fluorescence, Marcel Dekker, New York, 1973を参照のこと)。特定の局面において、消光は、蛍光団と消光剤との間に重複するスペクトルに依存し、そして長い範囲(蛍光共鳴エネルギー移動、FRET)で機能する。他の局面において、蛍光団および消光剤は、分子軌道間で相互作用し、蛍光団と消光剤との間の接触(例えば、電子移動機構)を必要とする。さらに他の局面において、基底状態(ground-state)複合体消光機能が生じ得る。すべてのこのような消光機構は、本発明の範囲内である。

30

【0029】

特定の局面において、蛍光団部分は、直接的かまたはリンカーを介する-ホスフェートへの付着のために誘導体化された蛍光有機色素である。好ましくは、消光剤部分はまた、有機色素であり、これは、蛍光であってもなくてもよく、本発明の特定の実施形態に依存する。例えば、本発明の1つの実施形態において、蛍光団および消光剤はともに蛍光である。1つの実施形態において、蛍光エネルギー移動機構が使用され得、ここで、第一の蛍光団(例えば、フルオレセイン)が励起され、発光が第二の蛍光団(例えば、ローダミン)に読み取られる。これらの系において、脱消光は、-ホスフェートに付着された蛍光団の加水分解によって達成される。

40

【0030】

別の実施形態において、蛍光団および消光剤は、電子移動機構によって機能する。この局面において、非蛍光消光剤(例えば、DABCYLまたはジニトロフェニル(図1を参照のこと))は、励起された蛍光団からのエネルギーを吸収するが、発光のエネルギーを放出しない。これらの消光剤は、発色体分子として言及され得る。

【0031】

蛍光分子および発色体分子およびこれらの関連光学的特性の完全な表を提供するための文

50

献中に、入手可能な多くの実際的ガイダンスが存在する(例えば、Berlman、Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules、第2版(Academic Press、New York、1971); Griffiths、Colour and Constitution of Organic Molecules(Academic Press、New York、1976); Bishop編、Indicators(Pergamon Press、Oxford、1972); Haugland、Handbook of Fluorescence Probes and Research Chemicals(Molecular Probes、Eugene、1992) Pringsheim、Fluorescence and Phosphorescence(Interscience Publishers、New York、1949)などを参照のこと)。さらに、以下の参考文献によって例証されるようにヌクレオチドに付加され得る一般の反応基を介する、共有結合性の付着のための誘導体化蛍光団および消光剤分子に関する文献中に、広範なガイダンスが存在する: Hauglandら(前出)、Ullmanら、米国特許第3,996,345号; Khannaら、米国特許第4,351,760号。

10

【0032】

蛍光エネルギー移動(FET)の原理に基づいて操作する適切なドナーおよびアクセプターは、以下を含むが、これらに限定されない: 4-アセトアミド-4'-イソチオシアナートスチルベン-2,2'-ジスルホン酸; アクリジンおよび誘導体: アクリジン、アクリジンイソチオシアネート; 5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸(EDANS); 4-アミノ-N-[3-ビニルスルホニル]フェニル]ナフタルイミド-3,5ジスルホネート; N-(4-アミノ-1-ナフチル)マレイミド; アントラニルアミド; BODIPY; Brilliant Yellow; クマリンおよび誘導体: クマリン、7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC、Coumarin 120)、7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン(Coumarin 151); シアニン色素; シアノシン; 4',6-ジアミニジド-2-フェニルインドール(DAPI); 5',5''-ジブロモピロガロール-スルホナフタレイン(sulfonaphthalein)(Bromopyrogallol Red); 7-ジエチルアミノ-3-(4'-イソチオシアナトフェニル)-4-メチルクマリン; ジエチレントリアミン6酢酸; 4,4'-ジイソチオシアナトジヒドロスチルベン-2,2'-ジスルホン酸; 4,4'-ジイソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸; 5-[ジメチルアミノ]ナフタレン-1-スルホニル塩化物(DNS、塩化ダンシル); 4-ジメチルアミノフェニルアゾフェニル-4'-イソチオシアネート(DABITC); エオシンおよび誘導体: エオシン、エオシンイソチオシアネート、エリトロシンおよび誘導体: エリトロシンB、エリトロシン、イソチオシアネート; エチジウム; フルオレセインおよび誘導体: 5-カルボキシフルオレセイン(FAM)、5-(4,6-ジクロロトリアジン-2-イル)アミノフルオレセイン(DTAF)、2',7'-ジメトキシ-4'5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(JOE)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、QFITC、(XFITC); フルオレサミン; IR144; IR1446; Malachite Greenイソチオシアネート; 4-メチルウンベリフェロンオルソクレゾールフタレイン; ニトロチロシン; パラローザニリン; フェノールレッド; B-フィコエリトリン; o-フタルジアルデヒド; ピレンおよび誘導体: ピレン、酪酸ピレン、スクシンミニジル-1-ピレン; プチレート定量ドット(quantum dot); Reactive Red 4(Cibacron™ Brilliant Red 3B-A)ローダミンおよび誘導体: 6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、6-カルボキシローダミン(R6G)、リスアミン(lissamine)ローダミンBスルホニルクロライドローダミンB、ローダミン123、ローダミンXイソチオシアネート、スルホローダミンB、スルホローダミン101、スルホローダミン101のスルホニルクロライド誘導体(Texas Red); N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダ

20

30

40

50

ミン (T A M R A) ; テトラメチルローダミン ; テトラメチルローダミンイソチオシアネート (T R I T C) ; リボフラビン ; ロソリック酸 (r o s o l i c a c i d) ; テルビウムキレート誘導体 ; C y 3 ; C y 5 ; C y 5 . 5 ; C y 7 ; I R D 7 0 0 ; I R D 8 0 0 ; L a J o l l a B l u e ; フタロシアン ; およびナフタロシアン。

【 0 0 3 3 】

好ましい蛍光団 - 消光剤対は、フルオレセインを含むキサンテン色素、およびローダミン色素を含むが、これらに限定されない。これらの化合物の多くの適切な形態は、これらのフェニル部分に置換基を有して広範に市販されており、フェニル部分は、結合部位としてまたは - ホスフェートもしくは核酸塩基との付着のための結合官能基として使用され得る。蛍光化合物の別の基は、ナフチルアミンであり、これは、位または位にアミノ基を有する。以下は、このようなナフチルアミン化合物の中に含まれる：1 - ジメチルアミノナフチル - 5 - スルホネート、1 - アニリノ - 8 - ナフタレンスルホネートおよび 2 - p - トルイジニル - 6 - ナフタレンスルホネート。他の色素は以下を含む：3 - フェニル - 7 - イソシアネートクマリン、アクリジン (例えば、9 - イソチオシアナトアクリジンおよびアクリジンオレンジ ; N - (p - (2 - ベンゾオキサゾリル) フェニル) マレイミド ; ベンゾオキサジアゾール、スチルベン、ピレンなど。

10

【 0 0 3 4 】

好ましくは、蛍光団 / 消光剤対は、フルオレセイン色素およびローダミン色素より選択される。これらの色素およびヌクレオチドへの付着のための適切な結合方法論は、多くの参考文献に記載される。(K h a n n a ら (上 記) ; M a r s h a l l , H i s t o c h e m i c a l J . , 7 : 2 9 9 - 3 0 3 (1 9 9 5) ; M e n c h e n ら、米国特許第 5 , 1 8 8 , 9 3 4 号 ; M e n c h e n ら、欧州特許出願第 8 7 3 1 0 2 5 6 . 0 ; および B e r g o t らに対して発光された米国特許第 5 , 3 6 6 , 8 6 0 号を参照のこと)。

20

【 0 0 3 5 】

好ましい実施形態において、消光剤 4 - (4 ' - ジメチルアミノフェニルアゾ) 安息香酸 (D A B C Y L) が使用される。消光剤 D A B C Y L (図 1 を参照のこと) は、一般に蛍光発生的なプローブを使用して、DNAハイブリダイゼーション (分子ビーコン) またはプロテアーゼ活性を検出する。D A B C Y L は、4 7 5 n m と 8 0 5 n m との間で励起し、9 0 ~ 9 9 . 9 % の範囲の測定有効性を有する広範な種々の色素由来のフルオレセインを消光する (S . T y a g i ら、N a t . B i o t e c h n o l . 1 6 , 4 9 (1 9 9 8) ; および G . T . W a n g ら、T e t r a h e d r o n L e t t . 3 1 , 6 4 9 3 (1 9 9 0) を参照のこと) 。任意の特定の理論によって束縛されていないが、D A B C Y L の消光機構は、好ましくは、蛍光共鳴エネルギー移動よりも電子移動に関与すると考えられる。なぜなら、波長非依存的であるからである。等しく好ましい実施形態において、消光剤ジニトロフェニル (D N P) またはトリニトロフェニル (T N P) が使用される。

30

【 0 0 3 6 】

任意の特定の試験において測定される消光有効性は、以下に依存する：(夾雑遊離色素または切断された分子が蛍光を発する) 色素 - 消光剤対の純度 ; 色素と消光剤との間の電子結合および物理的距離 (より近接するのが、通常よりよい) ; および色素の励起状態持続時間 (l i f e t i m e) (時間が長くなるにつれて、電子移動のための機会が大きくなる) 。

40

【 0 0 3 7 】

特定の実施形態において、特定の可視色素およびほぼ I R 色素は、十分な蛍光であり、そして単一分子として検出するのに写真安定性 (p h o t o s t a b l e) であることが公知である。この局面において、可視色素である B O D I P Y R 6 G (5 2 5 / 5 4 5) 、およびより大きい色素である L I - C O R の近赤外線の色素、I R D - 3 8 (7 8 0 / 8 1 0) は、単一分子感度を用いて検出され得、そして本発明を実行するために使用される。

【 0 0 3 8 】

以下の参考文献によって例示されるような、蛍光団または消光剤部分がヌクレオチドに付

50

着するための多くの連結部分、および方法論が、存在する：Eckstein編、Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1991); Zuckermanら、Nucleic Acids Research、15:5305-5321 (1987) (オリゴヌクレオチド上の3'チオール基); Sharmaら、Nucleic Acids Research、19:3019 (1991) (3'スルフヒドリル基); Giustiら、PCR Methods and Applications、2:223-227 (1993) およびFungら、米国特許第4,757,141号 (Applied Biosystems, Foster City, Calif. から入手可能なAminolink™ I Iを介する5'ホスホアミノ基) Stabinsky、米国特許第4,739,044号 (3'アミノアルキルホスホリル基); Agrawalら、Tetrahedron Letters、31:1543-1546 (1990) (ホスホラミデート結合を介する付着); Sproatら、Nucleic Acids Research、15:4837 (1987) (5'メルカプト基); Nelsonら、Nucleic Acids Research、17:7187-7194 (1989) (3'アミノ基) など。

【0039】

図2を参照して、本発明の種々のdNTPの構造のいくつかの塩基への好ましいリンカーを示す。さらに、DABCYLは、本方法によって要求される範囲における消光有効性を有する波長非依存的なフルオレセイン消光剤である。よりよい消光は、より高いdNTP濃度およびより速い代謝回転を可能にする。特定の局面において、消光剤は、色素を付加するために代表的に使用される同一の核酸塩基部位に連結される(図1を参照のこと)。ポリメラーゼがDNAに沿って前進する場合、消光剤は、すべての組み込まれた塩基において残存する。特定の局面において、消光剤は、図1に示されるC5リンカーを用いてdNTPと共有結合的に付着される。特定の実施形態において、消光剤部分は、リンカーを介して蛍光団部分に付着される。特定の他の実施形態において、消光剤は、dNTPの糖に付着され得る。

【0040】

一般には、ヌクレオシド標識は、公知の結合、結合基、および関連相補官能基を用いる、任意の多くの公知のヌクレオチド標識技術を用いて達成され得る。消光剤部分およびヌクレオシドに結合する結合は、関連するポリメラーゼと互換性があるべきであり、蛍光団部分のフルオレセインを消光すべきではない。

【0041】

好ましくは、消光剤は、ピリミジン塩基の5炭素および7-デアザプリン塩基の7炭素に共有結合される。本発明に用い得る、いくつかの適切な塩基標識手順は報告されている(例えば、Gibsonら、Nucleic Acids Research、15:6455-6467 (1987); Gebeyehuら、Nucleic Acids Research、15:4513-4535 (1987); Haralambidisら、Nucleic Acids Research、15:4856-4876 (1987); Nelsonら、Nucleosides and Nucleotides、5(3)233-241 (1986); Bergstromら、JACS、111、374-375 (1989); 米国特許第4,855,225号、同5,231,191号および同5,449,767号、これらのそれぞれが本明細書中に参考として援用される)。好ましくは、結合は、アセチレンアミド(acetylenic amido)結合またはアルケンアミド(alkenic amido)結合であって、消光剤とヌクレオチド塩基との間の結合は、色素の活性化N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルが、ヌクレオチドのアルキニルアミノ誘導体化塩基またはアルケニルアミノ誘導体化塩基と反応することによって形成される。より好ましくは、生じる結合は、図2に示される。

【0042】

アルキニルアミノ誘導体化ヌクレオシドの合成は、Hobbsらによる欧州特許出願第8

10

20

30

40

50

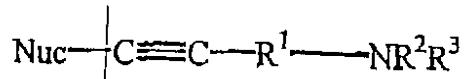
7305844.0、およびHobbsら、J. Org. Chem. 54:3420(1989)によって教示され、これは、本明細書中に参考として援用される。これらに教示されるように、アルキニルアミノ誘導体化ヌクレオチドは、適切なハロデオキシヌクレオシドを置換することによって形成される(通常、フラスコ中の5-ヨードピリミジンおよび7-ヨード-デアザプリンデオキシヌクレオチドおよびCu(I)は、アルゴンをフラッシュして空気を除き、乾燥DMFを加えた後、アルキニルアミン、トリエチルアミンおよびPd(0)を添加する)。反応混合物は、数時間または薄層クロマトグラフィーがハロデオキシヌクレオチドの消費を示すまで攪拌され得る。

【0043】

Hobbsらに対して1991年9月19日に発行された米国特許第5,047,519号に教示されるように、アルキニルアミノリンカーは以下の構造:

【0044】

【化1】



を有し、ここでR¹は置換されたか置換されていない1~20原子のジラジカル部分であり、Nucは、プリン塩基またはピリミジン塩基であり、直鎖R¹はアルキレンC₁-C₂₀であり、必要に応じて、鎖内に二重結合、三重結合、アリール基またはN、OまたはSのようなヘテロ原子を含む。ヘテロ原子は、エーテル、チオエーテル、エステル、アミンまたはアミドのような官能基の一部であり得る。好ましくは、R¹は直鎖アルキレンC₁-C₂₀であり;最も好ましくはR¹はCH₂である。R¹上の置換基は、C₁-C₆アルキル基、アリール基、エステル基、エーテル基、アミン基、アミド基またはクロロ基を含み得る。R²およびR³は、独立してH、アルキル、C₁-C₄、または保護基(例えば、アシル、アルコキシカルボニル、蛍光団、消光剤またはスルホニル)である。好ましくは、R²はHであり、R³は消光剤である。アルキニルアミノリンカーは、好ましくは、ピリミジンヌクレオチドの5位およびプリンヌクレオチドの7位に付着される。

【0045】

好ましい実施形態において、消光剤-スルホNHS誘導体(例えば、DABCYL-スルホNHS)は、DABCYLを用いて、そして窒素大気下で、DABCYLをN-ヒドロキシルスルホスクシニミドおよびN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドと反応させることによって調製される(図1を参照のこと)。DABCYL-スルホNHS誘導体は、アミノアリル-dNTP(例えば、アミノアリル-dNTP)と反応されてDABCYL-dNTPを産生する。DABCYL-dUTPおよびシスタミンジヒドロクロリドを用いて、DABCYL-dUTP-チオール誘導体が生成され得る。従って、蛍光団が付着した-ホスフェートを有するNTPは、例えば、DABCYL-dUTP-チオールをBODIPY-TR-ヨードアセトアミド(Molecular Probes D-6011から市販される)と反応させることによって産生されてDABCYL-dNTP-BODIPY-TRを生成し得る。

【0046】

(C. 消光効果)

本発明は、そこに付着された蛍光団部分を-ホスフェートを有するNTP分子を提供する。蛍光団部分は、-ホスフェートがNTPに付着される場合、少なくとも約5倍の消光効果を有する消光を示し、-ホスフェートがNTPから解離する場合は消光しない、すなわち、蛍光である。好ましくは、蛍光団部分は、少なくとも約3倍の消光効果~約100倍の消光効果を有する消光を示す。より好ましい実施形態において、蛍光団部分は、少なくとも約100倍の消光効果~約1000倍の消光効果を有する消光を示す。

【0047】

本発明のNTPの消光効果は、容易に決定される慣用的なパラメータである。当業者に明

10

20

30

40

50

らかなように、消光効果は、必要に応じてレーザー励起光を有する蛍光光度計で測定され得る。Stern-Volmer式の初期の議論に類似して、消光効果は、以下

【0048】

【化2】

$$F_0 - F / F_0$$

に等しく、ここで、 F_0 は消光しないNTPの蛍光であり、 F は消光した蛍光である。消光したNTPのサンプル中のすべての蛍光を排除する確実な方法がないので、非消光測定値 F_0 は、色素単独を含む別のサンプル中で行われ得、そして消光測定値 F は、消光dNTPと同一濃度で作製され得る。

10

【0049】

本発明の化合物は、少なくとも3倍の消光効果を有する。完全な蛍光色素は、1の F_0 値を有する一方、90%まで消光された色素は、0.100の F 値を有する。90%まで消光された化合物は、0.9の消光効果を有するか、または10倍消光される。従って、本発明の化合物について、 F は、以下のように特徴付けられる： $0.670 < F < 0.999$ 、すなわち、この化合物は、約3倍～約1000倍の間の消光効果を有する。好ましくは、本発明の化合物の消光効果は、少なくとも約5倍～約1000倍であり、そしてより好ましくは、消光効果は、少なくとも約10倍～1000倍である。

20

【0050】

本発明において、ピロリン酸の検出は、脱消光による蛍光シグナルの生成またはピロリン酸に反応して消光した蛍光色素を刺激することに依存する。効率的な消光は、より低いバックグラウンドを提示し、ピロリン酸による脱消光におけるシグナル対ノイズの比を増加する。不完全な消光は、各々の色素分子から低いレベルの蛍光バックグラウンドを生じる。さらなるバックグラウンド蛍光は、例えば、色素を消光部分に結合する結合の破損による偶然の（すなわち、ピロリン酸非依存的な）脱消光のために、十分な蛍光である色素分子のいくつかによって寄与される。従って、バックグラウンド蛍光は、2つの成分を有する：すべての色素分子からの低レベルの蛍光（本明細書中で「分散蛍光バックグラウンド」という）およびいくつかの分子からの完全な強度の蛍光（本明細書中で「局在蛍光バックグラウンド」という）。

30

【0051】

多重標識スキームが利用される場合において、種々の候補標識の最大吸収の平均に近似する波長が、使用され得る。あるいは、多重励起が実施され得、各々の励起は、特定の標識の最大吸収に対応する波長を使用する。表Iは、種々の型の蛍光団およびこれらの対応する最大吸収の例を列挙する。

【0052】

【表I】

TABLE I

候補蛍光団	吸収/発光
Rho123	507/529
R6G	528/551
BODIPY 376/589	576/589
BODIPY TR	588/616
ナイルブルー	627/660
BODIPY 650/665	650/665
スルホIRD700	680/705
NN382	778/806
テトラメチルローダミン	550
ローダミン X	575
Cy3 TM	550
Cy5 TM	650
Cy7 TM	750

(5 . 種々の反応試薬)

本発明での使用のために選択されるポリメラーゼは、重要ではない。好ましいポリメラーゼは、核酸塩基上および - ホスフェート上の両方の標識に寛容であり得る。ポリメラーゼは、少なくとも99%の保障(組み込み精度)および少なくとも20ヌクレオチドの進化性(酵素がDNAから解離する前に組み込まれたヌクレオチドの数)を有するべきであり、より大きな進化性を有することが好ましい。例示は、T7 DNAポリメラーゼ、T5 DNAポリメラーゼ、HIV逆転写酵素、E. coli DNA pol I、T4 DNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼおよびE. coli RNAポリメラーゼを含む。これらのポリメラーゼのエンドヌクレアーゼ欠損バージョンが好ましい。

【 0 0 5 3 】

プライマー(DNAポリメラーゼ)またはプロモーター(RNAポリメラーゼ)は、従来の核酸合成技術を用いて合成的に作製される。プローブの相補鎖は、標準化学、例えば、ホスホラミダイト化学(例えば、以下の参考文献に開示される)を用いて、自動化DNA合成器(例えば、Applied Biosystems, Inc. (Foster City, Calif)のモデル392または394 DNA/RNA Synthesizer)で簡便に合成される: BeaucageおよびIyer、Tetrahedron、48:2223-2311(1992); Molkoら、米国特許第4,980,460号; Kosterら、米国特許第4,725,677号; Caruthersら、米国特許第4,415,732号; 同4,458,066号; および同4,973,679号など。代替の化学(例えば、非天然骨格基(例えば、ホスホロチオエート、ホスホラミデートなど)を生じる)はまた、生じるオリゴヌクレオチドがポリメラーゼと互換性があるという条件で利用され得る。これらは、Operon Inc. (Alameda, C

a l i f o r n i a) のようなオリゴヌクレオチド注文を専門にする種々の企業から商業的に購入し得る。

【 0 0 5 4 】

ポリメラーゼと組み合わせるプライマーは、標的DNAを配列決定するのに使用され得る。プライマー長は、相補的鋳型DNAとのハイブリダイゼーションを提供するために選択される。プライマーは、一般に少なくとも10bp長であり、通常は、少なくとも10bp長と30bp長との間である。プライマー長は、対象の標的DNA上の公知の内部部位にハイブリダイズされるように設計される。あるいは、プライマーは、リガーゼによって標的DNAの末端に連結された合成オリゴヌクレオチドアダプターに結合し得る。プロモーターが用いられる場合に類似して、プライマーは、標的DNAの内部であり得るか、またはアダプターとして末端に連結され得る。

10

【 0 0 5 5 】

(6 . 反応条件)

配列決定のための反応混合物は、水溶性緩衝媒体を含み、これは、特定のポリメラーゼに最適化される。一般には、緩衝液は、一価イオンの原料、二価カチオンの原料および緩衝化剤を含む。一価イオンの任意の簡便な原料(例えば、KCl、K-酢酸、NH₄-酢酸、K-グルタミン酸、NH₄Cl、硫酸アンモニウムなど)が利用され得、ここで、緩衝液中に存在する一価イオンの原料の量は、代表的には、約500~20,000、通常は、約1000~10,000、そしてより通常には、約3,000~6,000 micromhosの範囲の伝導度を提供するのに十分な量存在する。

20

【 0 0 5 6 】

二価カチオンは、マグネシウム、マンガン酵素(manganese)、亜鉛などであり得、カチオンは代表的にはマグネシウムである。MgCl₂、Mg酢酸などを含むマグネシウムカチオンの任意の簡便な原料が使用され得る。緩衝液中に存在するMgイオンの量は、0.5~2.0mMの範囲であり得るが、好ましくは、約1~1.2mMの範囲で、さらに好ましくは、2~10mMであり、そして理想的には約5mMである。

【 0 0 5 7 】

緩衝液中に存在し得る代表的な緩衝化剤または塩としては、Tris、Tricine、HEPES、MOPSなどが挙げられ、ここでこの緩衝化剤の量は、代表的には、約5~150mMの範囲、通常、約10~100mMの範囲、およびより通常には、約20~50mMの範囲であり、ここで特定の好ましい実施形態において、この緩衝化剤は、約6.0~9.5の範囲のpH(ここで、最も好ましいのは、25にて、pH7.6である)を提供するのに十分な量で存在する。緩衝媒体中に存在し得る他の薬剤としては、EDTA、EGTAのようなキレート剤が挙げられる。

30

【 0 0 5 8 】

(7 . サンプル収納)

固体支持体は、必要に応じて、固定化された部分を通して流れる反応物の再生を可能にする入口および出口を有するフローチャンバに収納される。このフローチャンバは、プラスチックまたはガラスから作製され得、そして顕微鏡または光学リーダーによって表示される平面において開放性または透明のいずれかであるべきである。電気浸透圧的フローは、固体支持体上に固定された電荷、およびこの固体支持体の反対側の末端に配置される2つの電極の間を通過する電圧傾度(電流)を必要とする。フローチャンバは、別々の順序のために複数のチャンネルに分割され得る。マイクロフローチャンバの例が既存する。例えば、Fuら(Nat. Biotechnol. (1999) 17:1109)は、ソーティングのために電気浸透圧的フローを利用する3μm×4μmのチャンネルを備える微小组み立て(microfabricated)蛍光細胞分析分離装置を記載する。

40

【 0 0 5 9 】

(8 . 蛍光団の検出)

本発明は、溶液中の1分子の画像化を必要とする。この目的を達成する種々の公知の方法が存在する。この技術を記載する一般的な概説が入手可能である。概説としては、Bac

50

heら編、1996、Single molecule optical detection, imaging, and spectroscopy, Weinheim: VCM, および Plakhotnikら、Single-molecule spectroscopy, Ann. Rev. Phys. Chem. 48: 181-212が挙げられる。一般的に、これらの方法は、カメラを備えた顕微鏡を使用するレーザー活性化蛍光の検出を含む。これは、時には、高性能光子検出システム (high-efficiency photon detection system) と称される。Nieら、1994、Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy, Science 266: 1018-1019。1分子の検出は、1つの分子のみが存在すると考えられる統計学的理由を有する視野 (均質アッセイ)、または1つの実際の付着点のみが存在する視野 (異質アッセイ) にその検出を限定することを含む。本発明の1分子蛍光検出は、光学セットアップを使用して実施され得、このセットアップとしては、近距離場 (near-field) 走査顕微鏡、遠距離場 (far-field) 共焦点顕微鏡、広視野落射照明 (wide-field epi-illumination)、および全内部反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡が挙げられる。二次元画像化蛍光検出のために、顕微鏡は、代表的には、全内部反射顕微鏡である。Valeら、1996、Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules, Nature 380: 451、XuおよびYeung 1997、Direct Measurement of Single-Molecule Diffusion and Photodecomposition in Free Solution, Science 275: 1106-1109。

【0060】

適切な光子検出器としては、フォトダイオードおよび増感化CCDカメラが挙げられるがこれらに限定されない。好ましい実施形態において、増感化電荷結合素子 (ICCD) カメラが使用される。ガラススライドの表面近くの流体中の個々の蛍光色素分子を画像化するためのICCDカメラの使用は、いくつかの理由により有利である。ICCD光学セットアップを用いることにより、蛍光団の一続きの画像 (映像) を獲得することが可能である。特定の局面において、本発明のNTPの各々は、それ自体と結合する独特の蛍光団を有し、4つのカメラおよび4つの励起レーザーを有する4色装置が使用され得る。従って、この光学セットアップを使用してDNAを配列決定することが可能である。さらに、顕微鏡スライド上に広がる多くの異なるDNA分子は、同時に、画像化および配列決定され得る。さらに、画像分析アルゴリズムの使用によって、1つの色素の経路を追跡し、そしてこれらを、固定されたバックグラウンド蛍光、および本来の上流から視野に動く「偶発的に脱消光される (accidentally dequenched)」色素と区別することが可能である。

【0061】

特定の局面において、1分子のICCD検出に好ましい幾何学は、全内部反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡である。TIRFにおいて、レーザービームは、ガラス-水界面で全反射する。光学視野は、この反射界面で急激に終わらないが、その強度は、距離とともに指数関数的に低下する。この界面での薄い「消えていく (evanescent)」光学視野は、低いバックグラウンドを提供し、そして、可視波長で12:1のシグナル対ノイズ比を有する1分子の検出を可能にする (M. Tokunagaら、Biochem and Biophys. Res. Com. 235, 47 (1997) および P. Ambrose, Cytometry, 36, 244 (1999) を参照のこと)。

【0062】

ガラスを越える視野の透過は、波長およびレーザービームの入射角に依存する。より深い透過は、より長い波長によりおよび臨界角の制限内の通常表面に対するより小さな角度により得られる。代表的なアッセイにおいて、蛍光団は、表面から約200 μm以内で検出され、これは、DNAの約600塩基対の輪郭長に対応する。好ましくは、Xuおよび

10

20

30

40

50

Yeungによって記載されるような1分子画像化のためにプリズム型TIRF幾何学が使用される(X-H.N.Xuら、Science, 281, 1650(1998)を参照のこと)。

【0063】

1分子検出は、フローサイトメトリーを使用して達成され得、ここでフローサンプルは、小容量を規定するために使用される空間的なフィルターで集中されたレーザーを通じて通過される。米国特許第4,979,824号は、この目的のためのデバイスを記載する。米国特許第4,793,705号は、フローセルにおいて粒子のフロートレイン中の個々の分子を同定するための検出システムを詳細に記載し、そして特許請求する。'705特許はさらに、異なる蛍光核酸塩基特異的標識を検出するために、複数のレーザー、フィルターおよび検出器を配置する方法を記載する。米国特許第4,962,037号はまた、本明細書中に記載されるように、ポリメラーゼを使用して合成するよりもむしろ、ヌクレアーゼを使用して塩基を切断して、DNAおよびRNA配列を得るために、標識されたヌクレオチドの順序づけられたトレインを検出するための方法を記載する。固体支持体上での1分子検出は、Ishikawara(1994) Single-molecule detection by laser-induced fluorescence technique with a position-sensitive photon-counting apparatus, Jan. J. Appl. Phys. 33: 1571-1576に記載される。Ishikawaは、蛍光顕微鏡に接続された光子計数カメラシステムを含む代表的な装置を記載する。Leeら(1994) Laser-induced fluorescence detection of a single molecule in a capillary, Anal. Chem., 66: 4142-4129は、水晶キャピラリーチューブ中の1分子を検出するための装置を記載する。レーザーの選択は、標識および必要な光の質に依存する。ダイオード、ヘリウムネオン、アルゴンイオン、アルゴン-クリプトン混合イオン、およびNd:YAGレーザーが、本発明に有用である。

【0064】

本発明は、PPiが放出されるような核酸の合成を検出するために設計された構成要素のシステムとして考えられ得る。図4は、このシステムの概略図を提供し、これは、実施例2に詳細に記載される。図5は、固体支持体(15)の表面に、標識されたdTNP(17)の取り込みによって伸長される標的DNA(13)とともに固定されるポリメラーゼ(14)の代表的な配置を例示する。より詳細には、この標的DNAは、プライマーにハイブリダイズされ、このプライマーは、束縛されたDNA依存性DNAポリメラーゼによって生成される伸長産物となる。

【0065】

図6は、固体支持体(15)に固定された二本鎖DNA依存性RANポリメラーゼ(19)を使用する、二本鎖DNA分子(18)の連続的な配列の読み取りを例示し、ここで伸長産物は、標識されたrNTP(21)から新たなRNA(20)として転写される。より詳細には、二本鎖DNAテンプレートは、ポリメラーゼプロモーター配列の配列認識によって、RNAポリメラーゼに結合する。この配列は、新生RNAを生じる酵素によってDNAトラベルとして読み取られる。RNAおよびDNAが放出される後、この酵素は、通過する次のDNA分子の配列を読み取るように準備される。

【0066】

これらのスキームは、活性部位が表面で消失する明視野に残り、その結果、消光したdTNPから放出されるどの色素も照射されることを保証する。標的核酸分子(テンプレート)よりもむしろポリメラーゼを束縛することが簡便である。なぜなら、これは、1つの固定された酵素が多くの異なるDNA分子の配列を読み取る連続配列読み取りプロセスを提供するからである。

【0067】

本明細書において引用される全ての刊行物および特許は、個々の刊行物または特許明細書

10

20

30

40

50

の各々が、参考として援用されることを具体的かつ個々に示されるのと同様に、本明細書中で参考として援用される。

【0068】

前述の本発明を、理解の明確化の目的のために例示および例によっていくらか詳細に記載してきたが、特定の変化および改変が、添付の特許請求の範囲の思想または範囲を逸脱せずに、本発明に対してなされ得ることは、本発明の教示を顧て当業者に容易に明らかである。

【0069】

(実施例)

以下の実施例は、例示のためにのみ提供され、そして限定のためではない。当業者は本質的に類似の結果を得るために変化され得るかまたは改変され得る種々の非必須パラメータを容易に認識する。

10

【0070】

(実施例1. ポリメラーゼアレイ)

本実施例は、ニッケルナノドットのアレイを組み立て (fabricate) して各ドットにポリメラーゼを付着させる方法を示す。必要な装置は、スピナー (PWM202 Eビームレジストスピナー、Headway Research Inc.)、エバポレーター (SC4500 温熱性電子銃 (thermal e-gun) エバポレーター、CVC Products Inc.) および走査型電子顕微鏡 (Nabity パターンジェネレーターを備える Leo982、Leo Electron Microscopy Inc.) を含む。

20

【0071】

スピナー上の 25 mm の直径の顕微鏡用カバーガラスを、アセトンおよびイソプロピルアルコール (IPA) を交互にスプレーし、そして最後の IPA フィルムを、乾燥するまでスピンすることによって、清浄する。スピナー中のカバーガラスを、0.5 ml の PMMA (ポリ (ポリメチルメチルアクリレート)、MW 496 kDa、クロロベンゼン中) でコーティングし、過熱板 (hot plate) 上で 170 °C にて 10 分間焼成し、0.5 mm の PMMA (MW 950 kDa、メチルイソブチルケトン [MIBK] 中 2%) でコーティングし、そして再度焼成する。導電層を、100 Å の金をエバポレートすることによって、CVC SC4500 中の PMMA フィルムに適用する。電子顕微鏡を使用して、CAD 図 (Design CAD, 50 nm スポット、10 μm のセンター間空間 (center-to-center)、200 × 200 ドットアレイ) によって具体化されるように、Leo982 上のパターンジェネレーターを使用して、PMMA フィルムにアレイパターンをエッチングする。

30

【0072】

金属を、曝露したカバーガラスを Gold Etch (15 ~ 17% ヨウ化ナトリウム) に 7 秒間置き、続いて IPA および水でリンスすることによって、取り除く。タンタル (50 Å) およびニッケル (100 Å) を CVC SC4500 中のカバーガラス上に蒸着させる。アセトンおよび塩化メチレンの 1 : 1 混合物中の PMMA を 10 ~ 15 分間除去し、続いて数秒間超音波処理し、そして IPA および水でリンスする。

40

【0073】

使用の直前に、ポリヒスチジンタグ化 Klenow DNA ポリメラーゼ exo⁻ の 10 ml の 15 nM 溶液 (リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS; Harlow E., Lane D., 1988, Antibodies A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory ISBN 0-87969-14-2) 中で、TOPO クローニングベクターおよび ProBond Resin, Invitrogen Inc., を使用して調製した) を、カバーガラスに付着させ、20 分後に、PBS でカバーガラスを洗浄し、そして直ぐに使用する。

【0074】

(実施例2. 二色性1分子画像化顕微鏡)

50

図4に記載される顕微鏡を使用して、実施例1において得られたカバーガラスの表面上の1分子事象を検出する。顕微鏡を、整調可能な波長で光を発するマルチカラー混合ガスレーザー(1)に適合させる。このレーザービームを、最初に、レーザーラインフィルター(10)に通過させて、所望でない波長を透過させる。焦点を合わせていない出力を、カバーガラス(3)の下に直接配置した融合シリカ直角プリズム(2)に通す。サンプル(4)分子を、カバーガラス上の緩衝溶液におく。

【0075】

プリズムに進入するレーザー光を、融合シリカと緩衝溶液との間の臨界角度を超えるような角度で屈折させる。従ってその光は、プリズム内に完全に反射され、緩衝液中に全反射(TIR)消失領域(9)を生じる。目的の領域を、緩衝液中に直接浸された対物レンズ(5)を有する顕微鏡(6)を使用して画像化する。顕微鏡出力における蛍光放射は、多重波長ビュアー(7)を通過し、これは異なる波長で空間的に画像を分離する。これは、異なる波長で生じる事象の区別を可能にする。

10

【0076】

その画像が、増感化CCD(ICCD)カメラ(8)のアレイ上に投射され、そこからデジタル化され、そして記憶装置(11)に保存される。画像分析アルゴリズム(12)を、記憶装置に保存された画像に対して実行する。これらのアルゴリズムは、バックグラウンド由来のシグナルを区別し、分子を追跡し、そして他のシグナル処理機能を実行し得る。記憶およびシグナル処理は、コンピューターまたはマイクロプロセッサにより制御される特殊化デジタルシグナル処理(DSP)チップにおいてオフラインで実行され得る。

20

【0077】

(実施例3. 二重標識ヌクレオチドの合成

(実施例3A. DABCYL-dUTP-BODIPY TRの合成(図3))。

【0078】

(a. DABCYL-スルホNHSの調製)

DABCYL(108mg、0.4ミリモル; Aldrich 25,019-8メチルレッド)を、乾燥N,N-ジメチルホルムアミド(10mL; Aldrich 22,705-6)および乾燥ピリジン(96mg、1.2ミリモル; Aldrich 27,097-0)の混合物中に溶解した。N-ヒドロキシスルホスクシンイミド(260mg、1.2ミリモル; Pierce 24510)およびN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(250mg、1.2ミリモル; Pierce 20320)を添加し、そしてその混合物を50で2時間、窒素大気下で攪拌した。反応を、TLC(MKC18F逆相; Whatman 4803-110; 0.1Mのトリエチルアンモニウムアセテート、pH7、80%アセトニトリル中で展開した)によってモニターした。エーテルで希釈した後、上清をデカントし、生成物をフィルター上でエーテルを用いて洗浄し、乾燥し、そして-20で乾燥保存した。

30

【0079】

(b. DABCYL-dUTPの合成)

アミノアシル-dUTP(10mg、20μモル; Sigma A0410)を、3mLの0.1M炭酸ナトリウムpH8.3中DABCYL-スルホNHS(30mg、30μモル; 工程A由来)と混合した。その混合物を、暗室において4時間、室温でインキュベートし、そしてこの反応をTLCによってモニターした(工程Aと同様)。そのDABCYL-dUTP生成物を、緩衝液Aに混合された0%~100%の緩衝液Bの20分にあたる直線勾配を使用して、逆相HPLCによって精製した(緩衝液Aは、水中0.1Mトリエチルアンモニウムアセテート、pH7、4%アセトニトリル; 緩衝液Bは、80%のアセトニトリルを有する緩衝液Aと同様)。

40

【0080】

(c. DABCYL-dUTPチオール)

DABCYL-dUTP(9mg、12μモル; 工程B由来)を1mLの0.1M MES pH5.7(Sigma M3023)に溶かし、そしてpHを5.75に調節し

50

た。シスタミンジヒドロクロリド (10 mg、44 μ mol; Sigma C8707) を2.5 mLの0.1 M MES pH 5.7に溶解し、そしてpHを5.75に調節した。EDC (9 mg、47 μ mol; Pierce 22980) を、0.5 mLの0.1 M MES pH 5.7に溶解し、そしてすぐにDABCYL-dUTP溶液に添加した。10分後、シスタミン溶液を添加し、そして室温で反応が進行する間pHを5.5と5.8の間に維持した。2時間後、pHを7.0に調節し、そしてサンプルを-20 で保存した。その生成物を、工程Bと同様に逆相HPLCによって精製した。

【0081】

(d. DABCYL-dUTP-BODIPY TRの合成)

DABCYL-dUTP-チオール (2.5 mg、3 μ mol; 工程C由来) を、5.4 mLの5 mM TCEP (Pierce 20490)、pH 7.5に調節された30 mM リン酸ナトリウム中に溶解した。BODIPY TR-ヨードアセトアミド (5 mg、7.4 μ mol; Molecular Probes D-6011) を2.6 mLのN,N-ジメチルホルムアミドに溶解し、そしてDABCYL-dUTP-チオール溶液に添加した。5時間、暗室において室温で静置した後、その生成物を、工程Bと同様に逆相HPLCによって精製した。

10

【0082】

(e. 消失効率の決定)

DABCYL-dUTP-BODIPY TRの消失効率を、以下のように決定した。第1に、色素BODIPY TRを含むサンプルの蛍光を測定する。第2に、付着した蛍光 20
 団部分 (すなわち、DABCYL-dUTP-BODIPY TR) をともなう リン酸を有するヌクレオチド三リン酸の同じ濃度を含むサンプルを、測定する。その後、消失効率 (これは、 $F_0 - F / F_0$ と等しく、ここで F_0 は、BODIPY TR単独の蛍光であり、そしてFはDABCYL-dUTP-BODIPY TRの蛍光である) を計算する。DABCYL-dUTP-BODIPY TRの蛍光消失率は、BODIPY TR単独と比較して、少なくとも5倍である。

20

【0083】

(実施例3B. Rho-dUTP-BODIPY TRおよびRho-dCTP-BODIPY TRの合成)

(a. Rho-dUTPの合成)

アミノアシル-dUTP (20 μ mol; Sigma A0410) を、3 mLの0.1 M 炭酸ナトリウム pH 8.3、20% DMF中に5-カルボキシローダミン6G、スクシンイミジルエステル (30 μ mol、Molecular Probes C-6127) とともに混合した。その混合物を、室温で、暗室中でインキュベートし、そしてその反応物を、TLC (MKC18F逆相; Whatman 4803-110; 0.1 Mのトリエチルアンモニウムアセテート、pH 7、80%アセトニトリル中で展開) によってモニターした。そのRho-dUTP生成物を、緩衝液Aに混合された0%~100%の緩衝液Bの20分にわたる直線勾配を使用して、逆相HPLCによって精製した (緩衝液Aは、水中0.1 Mトリエチルアンモニウムアセテート、pH 7、4%アセトニトリル; 緩衝液Bは、80%のアセトニトリルを有する緩衝液Aと同様)。

30

40

【0084】

(b. Rho-dUTP-チオールの合成)

Rho-dUTP (12 μ mol; 工程a由来) を、1 mLの0.1 M MES pH 5.7 (Sigma M 3023) に溶解し、そしてpHを5.75に調節した。シスタミンジヒドロクロリド (44 μ mol; Sigma C8707) を2.5 mLの0.1 M MES pH 5.7中に溶かし、そしてpHを5.75に調節した。EDC (47 μ mol; Pierce 22980) を0.5 mLの0.1 M MES pH 5.7中に溶かし、そしてすぐに、Rho-dUTP溶液に添加した。10分後、このシスタミン溶液を添加し、そして反応が室温で進行する間、pHを5.5と5.8の間に維持した。2時間後、pHを7.0に調節し、そしてサンプルを-20 で保存した。その生成物を、逆相 50

HPLCによって、工程 a に記載されるように精製した。

【0085】

(c. Rho - dUTP - BODIPY TRの合成)

Rho - dUTP - チオール (3 μ mol; 工程 b 由来) を 5.4 ml の 5 mM TCEP (Pierce 20490)、pH 7.5 に調節された 30 mM リン酸ナトリウム中に溶かした。BODIPY TR - ヨードアセトアミド (7.4 μ mol; Molecular Probes D-6011) を 2.6 ml の N,N - ジメチルホルムアミド中に溶かし、そして Rho - dUTP - チオール溶液に添加した。暗室において 5 時間、室温で静置した後、その生成物を、工程 a のように逆相 HPLC によって、精製した。

【0086】

(d. Rho - dUTP - BODIPY TRの合成)

標識 dCTP を、dUTP を アミノアリル - dCTP に置換した以外は、本質的に dUTP について記載されたように、作製した。アミノアリル - dCTP を、dUTP の代わりに dCTP を使用したこと以外は、米国特許第 5,476,928 号に従って、合成した。

【0087】

(実施例 4. 遺伝子型決定)

この実施例は、1 個の DNA 分子に対する、配列ベースの遺伝子型決定アッセイを例示する。標的は、嚢胞性線維症膜内外伝導性調節遺伝子 (Welsh MJら、1993. J. Cell Science 106S: 235 - 239) の () F508 欠失である。ゲノム DNA を、CFTR ホモ接合性個体の全血から単離する (Wizard Genomic DNA Purification Kit Cat. No. A1120, Promega Inc.)。CFTR 遺伝子の 54 ヌクレオチドセグメントを、プライマー 5' CACCAATTAAGAAAATATCAT (プライマー 1 配列番号 1) および 5' - ビオチニル - CTGTATCTATATTCATCATAG (プライマー 2 配列番号 2) を使用して、PCR によって増幅する。

【0088】

カスタムプライマーを、商業上の供給源 (例えば、Operon Technologies, Alameda, CA) から得る。プライマー 1 は、() F508 欠失に隣接する CFTR 配列にハイブリダイズする; プライマー 1 に対する第 1 の 3' ヌクレオチドは、正常な対立遺伝子内のシトシンまたは欠失変異体内のチミンである (以下の表 2 を参照のこと; Vaughan P, McCarthy T. 1998 Nuc Acids Res 26: 810 - 815 から)。増幅条件は、50 μ l の最終容量内に、200 ng のゲノム DNA、0.2 mM の各 dATP、dCTP、dGTP、および dUTP、0.2 μ M の各プライマー、2.0 mM MgCl₂、1 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼ、50 mM KCl、10 mM Tris - HCl (pH 9.25)、0.1% Triton X-100 (94 30 秒間、52 30 秒間、72 15 秒間の 30 サイクル; 使用されるサーマルサイクラーデバイスの特定の特徴に依存して、Mg 濃度およびサイクリングパラメーターの最適化が必要であり得る)。

【0089】

ストレプトアビジン被膜磁気ビーズ (DYNAPURE Dye Terminator Removal kit, Dynal A.S.) 上の PCR 産物を精製し、そしてゲノム DNA を 2 μ l の精製された増幅産物と置換すること、およびプライマー 1 に相補的な一本鎖 DNA 産物を過剰に産生するために、プライマー 1 を除外すること以外は、上記と同じ条件下で 15 サイクル、再増幅する。dNTP を、上記の磁気ビーズを使用して、増幅産物 (「テンプレートプライマー」) から除去する。

【0090】

10 μ l の反応混合物 (30 nM テンプレートプライマー、100 nM プライマー 1、1 nM Rho - dCTP - BTR (実施例 3)、10 mM Tris - HCl (pH 7.5)、5 mM MgCl₂、7.5 mM ジチオスレイトール) を実施例 2 の 2 色 1 分子画

10

20

30

40

50

像処理顕微鏡上のポリメラーゼアレイ上に配置し、20分間の一連の画像を取得する。同様に、第1サンプルのRho-dCTP-BTRがRho-dUTP-BTR(実施例3)で置き換えられている以外は、第1サンプルと同一である第2サンプルを分析する。2つの結合した色素が互いに分離することによって示される取り込み事象についての画像セットを分析する。dCTP(サンプル1)およびdUTP(サンプル2)を使用して観察された事象の数を、試験CFTR遺伝子が正常対立遺伝子か、または欠失対立遺伝子かを決定するために比較する。

【0091】

【表2】

表 2

10

正常対立遺伝子

CACCATTAAGAAAATATCATCUUUGGUGUUUCCUAUGAUGAAUUAUGAUA

CAG 配列番号3

GUGGUAAUUUCUUUUAUAGUAGAAACCACAAAGGATACTACTTATATCTAT

GTC

20

欠失変異体

CACCATTAAGAAAATATCATUGGUGUUUCCUAUGAUGAAUUAUGAUACAG

配列番号4

GUGGUAAUUUCUUUUAUAGUAAACCACAAAGGATACTACTTATATCTATGTC

プライマーには、下線を引いてある(左側がプライマー1、右側がプライマー2)。3つの欠失塩基対は、正常な配列内の太字で示されている。

【0092】

30

(実施例5. 配列決定)

配列決定は、遺伝子型決定(実施例4)に関して達成され、プライマーの1ヌクレオチド下流よりも多くを読み取ることを伴う。

【0093】

(a) BODIPY TR-dUTP-ローダミンの合成)

BODIPY TR-dUTPを作製するために、実施例3aの手順に従って、実施例3aのローダミンをBODIPY TR-X STPエステル(Molecular Probes B-10003)と置換する。実施例3bのように、チオールを有するBODIPY TR-dUTPを誘導体化し、そして、テトラメチルローダミン-5-ヨードアセトアミドジヒドロヨージド(Molecular Probes T-6006)を、実施例3cのようなそのチオールに結合させる。

40

【0094】

(b) 配列決定)

同じ正常な対立遺伝子DNAテンプレートを、実施例4において調製されるように使用する。10μlの反応混合物(30nMのテンプレート-プライマー、100nMのプライマー1、1nMのBODIPY TR-dUTP-Rho(実施例5a)、1nMのRho-dCTP-BODIPY TR(実施例3d)、10mM Tris-HCl(pH 7.5)、5mM MgCl₂、7.5mMのジチオスレイトール)を、実施例2の2色1分子画像処理顕微鏡上のポリメラーゼアレイ上に配置し、そして画像シリーズを獲得する。dUTPの組み込みは、ローダミンの放出を伴う、2つの色素の分離によって観察さ

50

れる。d C T Pの組み込みは、同じ2つの色素の分離によって検出されるが、B O D I P Yに代わり、ローダミンの放出を伴う。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、リンカーを介してウラシルに接続される消光部分の化学的構造である。

【図2】 図2は、消光部分をも保有するヌクレオチドの、ホスフェートに連結される色素を記載する。

【図3】 図3は、ホスフェート上に蛍光団を有しかつ塩基上に消光部分を有するヌクレオチドを生成するための、合成経路の概要である。

【図4】 図4は、標的核酸のポリメラーゼ合成配列決定のためのシステムの概要である。

【図5】 図5は、DNAポリメラーゼが固体支持体上に固定化され、そして標的核酸がDNAである方法の概略図である。

【図6】 図6は、RNAポリメラーゼが固体支持体上に固定化され、そして標的核酸が二本鎖DNAである方法の概略図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

Seq. ID. No 1

CACCATTAAGAAAATATCAT

20

Seq. ID No. 2

Biotinyl-CTGTATCTATATTCATCATAG

Seq. ID. No. 3

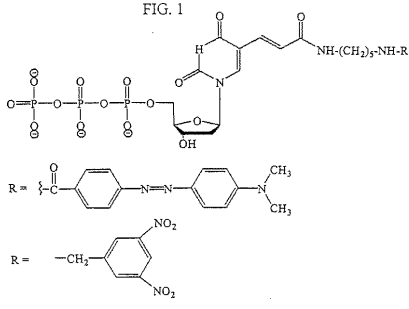
CACCATTAAGAAAATATCATCUUUGGUGUUUCCUAUGAUGAAUUAUAGAUACAG

Seq. ID. No. 4.

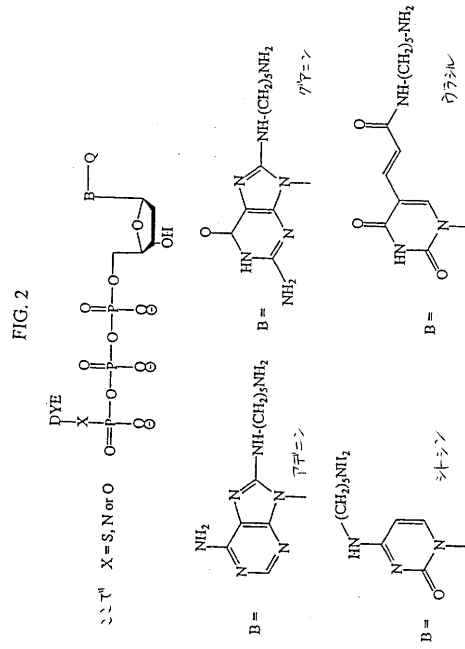
CACCATTAAGAAAATATCATUGGUGUUUCCUAUGAUGAAUUAUAGAUACAG

30

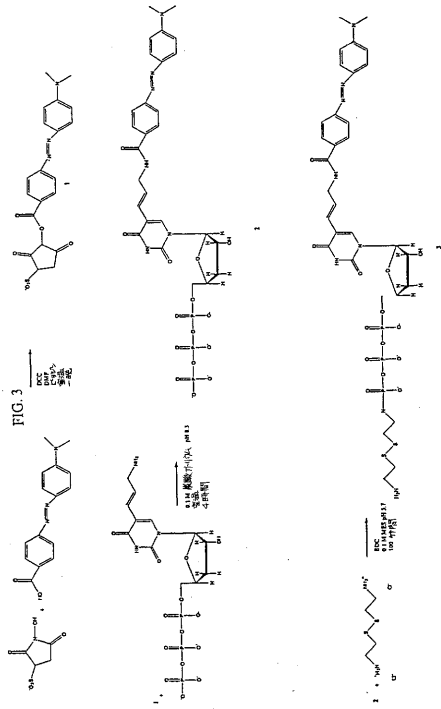
【 図 1 】



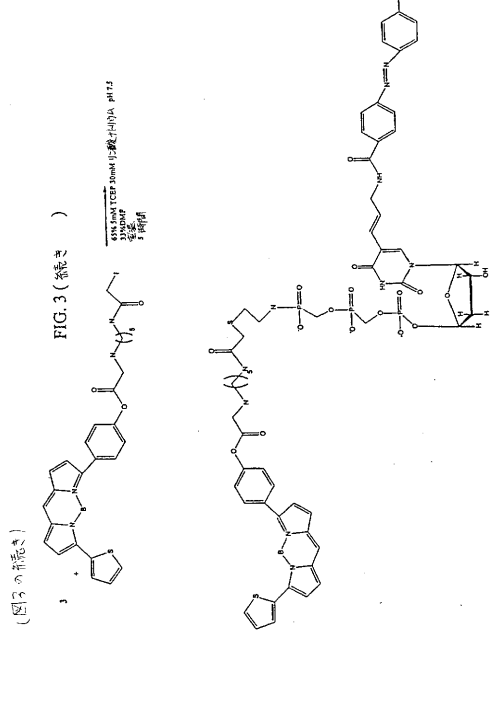
【 図 2 】



【 図 3 】



(図 3 の 続 き)



フロントページの続き

(72)発明者 ウィリアムズ, ジョーン ジー. ケイ.
アメリカ合衆国 ネブラスカ 68516, リンカーン, パイン レイク コート 6901

審査官 富永 みどり

(56)参考文献 国際公開第98/044152(WO, A1)
特開平03-505971(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00-90

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed

JSTPlus(JDreamII)