(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4629095号
(P4629095)
(45)発行日　平成23年2月9日(2011.2.9)　(24)登録日　平成22年11月19日(2010.11.19)

(51)Int.Cl.　F I
C12N 15/09 (2006.01)　C12N 15/00 ZNAA
C12Q 1/68 (2006.01)　C12Q 1/68 A

請求項の数 39　(全 16 頁)

(21)出願番号　特願2007-506555(P2007-506555)
(86)(22)出願日　平成17年3月31日(2005.3.31)
(65)公表番号　特表2007-531528(P2007-531528A)
(43)公表日　平成19年11月8日(2007.11.8)
(86)国際出願番号　PCT/US2005/010898
(87)国際公開番号　WO2005/098044
(87)国際公開日　平成17年10月20日(2005.10.20)
審査請求日　平成19年6月25日(2007.6.25)
(31)優先権主張番号　60/558,421
(32)優先日　平成16年4月1日(2004.4.1)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　510099866
ジェニスフィア・エルエルシー
アメリカ合衆国ペンシルバニア州１９４４０，ハットフィールド，スターリング・ドライブ　２８０１
(74)代理人　100099623
弁理士　奥山　尚一
(74)代理人　100096769
弁理士　有原　幸一
(74)代理人　100107319
弁理士　松島　鉄男
(74)代理人　100114591
弁理士　河村　英文
(74)代理人　100118407
弁理士　吉田　尚美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】プロモーターテンプレートを使用して核酸配列を増幅する方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
センスＲＮＡ（ｓＲＮＡ）分子を作製する方法であって、
ａ）５’および３’末端を有する１本鎖ｃＤＮＡ分子を供するステップと；
ｂ）前記１本鎖ｃＤＮＡ分子の３’末端にオリゴデオキシヌクレオチドテイルを接続するステップと；
ｃ）前記オリゴデオキシヌクレオチドテイルに１本鎖プロモーターテンプレートをアニーリングするステップであって、前記１本鎖プロモーターテンプレートがＤＮＡポリメラーゼで伸長されないものである、ステップと；
ｄ）前記１本鎖プロモーターテンプレートが２本鎖プロモーターに変換されるように前記オリゴデオキシヌクレオチドテイルを伸長するステップと；
ｅ）前記２本鎖プロモーターを認識するＲＮＡポリメラーゼを使用してＲＮＡ転写を開始するステップと
を含み、これによってセンスＲＮＡ分子を作製する方法。
【請求項２】
ａ）が、５’および３’末端を有するｍＲＮＡ転写物を供するステップと；前記ｍＲＮＡ転写物から１本鎖ｃＤＮＡ分子を合成するステップとを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
１本鎖ｃＤＮＡ分子の合成が、ｍＲＮＡ分子とＲＮａｓｅ　Ｈ－逆転写酵素を反応させるステップを含む、請求項２に記載の方法。

【請求項４】
１本鎖ｃＤＮＡ分子の合成が、ｍＲＮＡ分子とオリゴｄＴプライマーを反応させるステップをさらに含む、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
１本鎖ｃＤＮＡ分子の合成が、ｍＲＮＡ分子とランダムプライマーを反応させるステップをさらに含む、請求項３に記載の方法。
【請求項６】
オリゴデオキシヌクレオチドテイルを接続する前に、１本鎖ｃＤＮＡ分子を精製するステップをさらに含む、請求項２に記載の方法。
【請求項７】
１本鎖ｃＤＮＡ分子を精製する前に、ｍＲＮＡ転写物を分解するステップをさらに含む、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
オリゴデオキシヌクレオチドテイルがホモポリマーテイルである、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
ホモポリマーテイルがポリｄＴテイルである、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを使用して、オリゴデオキシヌクレオチドテイルが１本鎖ｃＤＮＡ分子の３’末端に接続される、請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
１本鎖プロモーターテンプレートの３’末端に存在する一連の相補的なデオキシヌクレオチドを介して、１本鎖プロモーターテンプレートがオリゴデオキシヌクレオチドテイルにアニーリングされる、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
１本鎖プロモーターテンプレートが、Ｔ７、Ｔ３またはＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
３’アミノ修飾因子、３’デオキシターミネーターまたは３’ジデオキシターミネーターによって、１本鎖プロモーターテンプレートが３’末端においてブロックされている、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
ＲＮＡ転写を開始する前に、ランダムプライマーを使用して２本鎖ｃＤＮＡを合成し、これによってランダムープライミングした第２鎖ｃＤＮＡフラグメントを作製するステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
ＲＮＡ転写を開始する前に、ランダムープライミングした第２鎖ｃＤＮＡフラグメントを一体としてライゲーションする、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
Ｔ７、Ｔ３またはＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼを使用してＲＮＡ転写が開始される、請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
得られたｓＲＮＡ分子を増幅するステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
オリゴｄＴとランダムプライマーの組み合わせを使用して、ｓＲＮＡ増幅が開始される、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
オリゴｄＴプライマーを使用してｓＲＮＡ増幅が開始され、得られたｓＲＮＡ分子がポリＡテイルを含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項２０】

ランダムプライマーを使用してｓＲＮＡ増幅が開始される、請求項１７に記載の方法。
【請求項２１】
得られたｓＲＮＡ分子にポリＡテイルを付加するステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２２】
ポリＡポリメラーゼを使用してポリＡテイルが付加される、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
得られたｓＲＮＡ分子を逆転写し、これによって１本鎖ｃＤＮＡ分子を作製するステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２４】
逆転写が、１本鎖ｃＤＮＡ分子に検出可能であるように標識したヌクレオチドを導入するステップを含む、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
検出可能であるように標識したヌクレオチドが蛍光染料を含む、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
蛍光染料がｃｙ３またはｃｙ５である、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
得られたｃＤＮＡ分子に少なくとも１つの検出可能な標識を接続するステップをさらに含む、請求項２３に記載の方法。
【請求項２８】
検出可能な標識が、核酸デンドリマーを介してｃＤＮＡ分子に接続される、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
ｍＲＮＡ転写物が哺乳類起源のものである、請求項２に記載の方法。
【請求項３０】
ｍＲＮＡ転写物がヒト起源のものである、請求項２に記載の方法。
【請求項３１】
ｍＲＮＡ転写物が、分解されたＲＮＡを含む生物起源から単離される、請求項２に記載の方法。
【請求項３２】
ａ）が、５’および３’末端を有するｍｉＲＮＡ分子を供するステップと；前記ｍｉＲＮＡ分子から１本鎖ｃＤＮＡ分子を合成するステップとを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３３】
ａ）が、ｍｉＲＮＡ分子にポリＡテイルを付加するステップをさらに含む、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
ポリＡポリメラーゼを使用してポリＡテイルが付加される、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
１本鎖ｃＤＮＡ分子の合成が、ｍｉＲＮＡ分子とオリゴｄＴプライマーを反応するステップをさらに含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
ＤＮＡポリメラーゼで伸長されない１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートと、前記テンプレートを使用してｓＲＮＡ分子を作製するための指示を含む教材とを含む、請求項１～３５のいずれかに記載された方法に使用するためのキット。
【請求項３７】
５’および３’末端を有する１本鎖ｃＤＮＡ分子の３’末端にオリゴデオキシヌクレオチドテイルを接続するための少なくとも１つの第１の酵素と、前記ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートを２本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターに変換するための少なくとも１つの第２の酵素とをさらに含み、前記教材が、前記テンプレートならびに前記第

１および第２の酵素を使用してｓＲＮＡ分子を作製するための指示をさらに含む、請求項３６に記載のキット。

【請求項３８】

前記ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートがＴ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートを含み、前記第１の酵素が末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを含み、前記第２の酵素がクレノウ酵素を含み、前記キットが、以下の成分：

オリゴｄＴ$_{24}$プライマー；

ランダム９ｍｅｒプライマー；

ｄＮＴＰミックス；

ＲＮａｓｅ阻害剤；

ｄＴＴＰテイリングミックス；

１０Ｘ反応緩衝液；

Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ；

ヌクレアーゼ－フリー水

をさらに含み、ｓＲＮＡ分子を作製するための前記教材が、前記テンプレート、前記第１および第２の酵素ならびに前記成分を使用してｓＲＮＡ分子を作製するための指示をさらに含む、請求項３７に記載のキット。

【請求項３９】

検出可能であるように標識したｃＤＮＡを、請求項２４、２５、２６、２７、または２８に記載の方法により作製するステップと、前記検出可能であるように標識したｃＤＮＡを核酸マイクロアレイに接触させるステップとを含む、核酸マイクロアレイをプロービングする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

［関連出願の相互参照］

本願は、合衆国法典第３５編第１１９条（ｅ）に準拠して、内容が参照により本明細書に組み入れられる、2004年4月1日提出の米国出願第60/558,421号の利益を主張する。

【０００２】

［技術分野］

本発明は、核酸を増幅する分野に関する。

【背景技術】

【０００３】

マイクロアレイ技術は、遺伝子発現プロファイルを作製し、分析する強力なツールとなっている。しかし、マイクロアレイ発現分析は、一般に、入手不可能であることが多い大量のＲＮＡを必要とする(Wang, et al., BioTechniques 34:394-400(2003)参照)。この問題を克服するためにいくつかのＲＮＡ増幅技法が開発されている。しかし、これらの技法は、一般に、増幅バイアスとして周知の現象を受ける（例えば、米国特許第6,582,906号参照）。これらの場合では、増幅されたＲＮＡ分子集団は、元の試料に存在するＲＮＡ分子集団に比例しない。

【０００４】

例えば、Eberwineら（米国特許第5,545,522号；同第5,716,785号；同第5,891,636号；同第5,958,688号；および同第6,291,170号参照）によって開示されている方法では、オリゴヌクレオチド化合物を増幅に使用し、当該オリゴヌクレオチド化合物にＴ７プロモーターおよびプライマーが供される。オリゴヌクレオチド化合物を使用して最初のｍＲＮＡ転写物からｃＤＮＡコピーを作製し、その後第２鎖を合成して、２本鎖のｃＤＮＡを作製する。ＲＮＡ増幅は、オリゴヌクレオチド化合物のプロモーター部分を介して実施され、転写はｃＤＮＡから進行する。第２鎖を転写に使用するので、Eberwineの方法は、最初のｍＲＮＡ配列にアンチセンスである増幅ＲＮＡを作製する。

【０００５】

しかし、Eberwineの方法は、使用酵素の不完全な処理能力（すなわち、酵素が核酸分子に接続していられないこと）およびＲＮＡポリメラーゼプロモーターの位置決めにより、ステップの各々において３’バイアスが導入される（例えば、米国特許第6,582,906号および米国特許公報US2003/0104432号）。例えば、第１鎖ｃＤＮＡを作製するために使用するオリゴヌクレオチド化合物は、メッセージの３’末端に対応するｃＤＮＡの５’末端にプロモーターを置く。このことと、（おそらく長いポリＡテイル領域によりまたはテンプレートの二次および三次構造による妨害により）一部のテンプレートの転写を完了することができないことが合わさって、増幅されたアンチセンスＲＮＡ集団に３’バイアスが生じることがある。また、ＤＮＡポリメラーゼによる第２鎖ｃＤＮＡ合成が不完全である場合には、これらのｃＤＮＡは機能的なプロモーターを欠損し、増幅された集団における元のＲＮＡ分子の発現が低下する（または完全に欠如する）。

【発明の開示】

【０００６】

出願人らは、ＤＮＡポリメラーゼで伸長されない１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターをｓＲＮＡのインビトロにおける転写に使用する、種々の核酸テンプレートからセンスＲＮＡ（ｓＲＮＡ）分子を作製する方法を発明した。伸張不可能なプロモーターテンプレートの使用は、ＤＮＡポリメラーゼ－媒介性第２鎖ｃＤＮＡ合成の開始点として働くことができるプロモータープライマーの使用より効率的であることを出願人らは発見した。

【０００７】

本発明の一態様は、ｓＲＮＡ分子を作製する方法であって：５’および３’末端を有する１本鎖ｃＤＮＡ分子を供するステップと；１本鎖ｃＤＮＡ分子の３’末端にオリゴデオキシヌクレオチドテイルを接続するステップと；オリゴデオキシヌクレオチドテイルに１本鎖ポリメラーゼプロモーターテンプレートをアニーリングするステップであって、１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートがＤＮＡポリメラーゼで伸長されないものであるステップと；１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートが２本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターに変換されるようにオリゴデオキシヌクレオチドテイルを伸長するステップと；２本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターを認識するＲＮＡポリメラーゼを使用してＲＮＡ転写を開始するステップとを含み、これによってｓＲＮＡ分子を作製する方法に関する。

【０００８】

本発明の別の態様は、ｓＲＮＡ分子を作製する方法であって、５’および３’末端を有するＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）転写物を供するステップと；ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）転写物から５’および３’末端を有する１本鎖ｃＤＮＡ分子を合成するステップと；１本鎖ｃＤＮＡ分子の３’末端にオリゴデオキシヌクレオチドテイルを接続するステップと；オリゴデオキシヌクレオチドテイルに１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートをアニーリングするステップであって、１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートがＤＮＡポリメラーゼで伸張されないものであるステップと；１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートが２本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターに変換されるようにオリゴデオキシヌクレオチドテイルを伸張するステップと；２本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターを認識するＲＮＡポリメラーゼを使用してＲＮＡ転写を開始するステップとを含み、これによってｓＲＮＡ分子を作製する方法に関する。

【０００９】

出願人らは、また、種々の核酸テンプレートからセンスＲＮＡ分子を作製するためのキットであって、ＤＮＡポリメラーゼで伸張されない１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートをｓＲＮＡ分子のインビトロにおける転写に使用するキットを発明した。

【００１０】

従って、本発明のさらに別の態様は、ＤＮＡポリメラーゼで伸長されない１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートと、テンプレートを使用してｓＲＮＡ分子を作製するための教材とを含む、少なくとも１つのｓＲＮＡ分子を作製するためのキットに関する。一部の実施態様において、キットは、５’および３’末端を有する１本鎖ｃＤＮＡ分

子の３’末端にオリゴデオキシヌクレオチドテイルを接続するための少なくとも１つの酵素と、ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートを２本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターに変換するための少なくとも１つの酵素とをさらに含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１１】

本発明は、ｓＲＮＡ分子を作製するための方法およびキットに関する。「ｓＲＮＡ分子」、「ＲＮＡ分子」、「ｍＲＮＡ分子」および「ｃＤＮＡ分子」という用語は、各々、１つの分子、１つの種の複数の分子および異なる種の複数の分子を含むことが意図されている。本発明の方法は、少なくとも１つの１本鎖ｃＤＮＡ分子の３’末端にオリゴデオキシヌクレオチドテイルを接続するステップと；オリゴデオキシヌクレオチドテイルに１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートをアニーリングするステップであって、１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートがＤＮＡポリメラーゼで伸張されないものであるステップと；１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートが２本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターに変換されるようにオリゴデオキシヌクレオチドテイルを伸張するステップとを含む。次いで、得られたプロモーター－含有１本鎖ｃＤＮＡを使用して、ＲＮＡポリメラーゼとのインビトロ転写反応に使用して、１つ以上のｓＲＮＡ分子を作製する。このようなｓＲＮＡ分子は、１本鎖ｃＤＮＡを得た元のＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）転写物の増幅されたコピーである。

【００１２】

本発明の方法は、第１鎖ｃＤＮＡ分子の５’末端にプロモーター配列を導入する現在利用可能な技術とは別個である。そのような技術では、ＲＮＡ転写は、元のｍＲＮＡ転写物に対して第１鎖ｃＤＮＡ合成と同じ方向に進行し、元のｍＲＮＡ転写物の３’ポリＡテイルに近位のヌクレオチドに一致したバイアスを含むアンチセンスＲＮＡ分子が作製される。ｃＤＮＡ分子の３’末端にプロモーター配列を導入することによって、本発明の方法は、元のＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）転写物の両方の末端の遺伝情報をコピーし、増幅することが可能になる。得られたｓＲＮＡ分子は、完全長の元のＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）転写物の各々を従来技術の方法によって得られるものよりよく代表しており、ｍＲＮＡ転写物の混合物中のＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）転写物の各々の相対的な量をよく反映している。本発明の方法は、追加のプライミングバイアスを導入しないで、ランダムプライミングと組み合わせることもできる。ｓＲＮＡ分子は、下流のアッセイにおけるより効率的な使用のためのポリＡテイルを含んでもよい。さらに、本発明の方法は、３’末端でブロックされているＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートを用い、これにより、ＤＮＡポリメラーゼによりテンプレートを２本鎖ポリメラーゼプロモーターへ変換する際の問題のある第２鎖ｃＤＮＡ合成を妨害するため、現在利用可能な技法より効率がよい（例えば、WO 02/065093号参照）。

【００１３】

本発明の方法は、分子生物学分野の通常の技法を使用する。一般的な分子生物学方法を開示する基本的なテキストには、Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3d ed. 2001)およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1994)が挙げられる。

【００１４】

第１鎖ｃＤＮＡ分子を合成するための数多くの方法および市販のキットは当技術分野において周知である。例には、Superscript（商標）２本鎖ｃＤＮＡ合成(Double Strand cDNA Synthesis)キット(Invitrogen, Carlsbad, CA)、Array 50（商標）、Array50（商標）、Array350（商標）およびArray900（商標）検出(Detection)キット(Genisphere,Hatield, PA)ならびにCyScribe（商標）ポスト－ラベリング(Post-Labelling)キット(Amersham, Piscataway, NJ)が挙げられる。一般に、関心対象の起源由来の高品質ｍＲＮＡ分子（すなわち、元のｍＲＮＡ転写物）を逆転写反応のテンプレートとして使用する。ＲＮＡは、任意の生物または環境試料において見られるビリオン、原核生物および真核生物起源を含む任意の組織または細胞起源から入手することができる。好ましくは、起源は真核生物組

織であり、さらに好ましくは哺乳類組織であり、最も好ましくは、ヒト組織である。他の実施態様において、テンプレートＲＮＡはミクロＲＮＡ（「ｍｉＲＮＡ」）の形態であってもよい。ミクロＲＮＡは生物において天然に作製される非常に大きいグループの小型ＲＮＡであり、その少なくとも一部は標的遺伝子の発現を調節する。ｍｉＲＮＡは、標準的な技法、例えば、ミクロＲＮＡ単離キット(Stratagene, La Jolla,CA)；QuickPrep Micro RNA精製キット(Amersham Pharmacia Biotech Inc. , Piscataway, NJ)を使用してＲＮＡから作製することができる。

【００１５】

任意の逆転写酵素を、耐熱性およびＲＮａｓｅ　Ｈ⁻逆転写酵素を含む逆転写反応に使用することができる。好ましくは、ＲＮａｓｅ　Ｈ⁻逆転写酵素を使用する。

【００１６】

第１鎖ｃＤＮＡ合成のためのプライマーは、市販品を入手してもまたは当技術分野において周知の技法を使用して合成し、精製してもよい。第１鎖ｃＤＮＡ合成のためのプライマーは、３’末端にオリゴｄＴテイルを含む１本鎖オリゴデオキシヌクレオチドを含む。テイルは、一般に、長さ約１０～約３０ヌクレオチド、好ましくは長さ約１７～約２４ヌクレオチドの範囲であり、３’ポリＡテイルを含む任意の元のＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）転写物にアニーリングする（図１ａ参照）。または、ランダムプライマーを使用して逆転写反応を開始することができる。プライマーは、一般に、長さ約４～約２０ヌクレオチド、好ましくは、約６～約９ヌクレオチドの範囲であり、元のＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）転写物の各々の長さ方向の種々の位置にアニーリングする。ランダムプライマーを使用すると、最終的に、オリゴｄＴプライマーを使用して作製されるものより完全長の元のＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）転写物の各々をよく代表しているｓＲＮＡ分子を作製することができることを当業者は認識している。さらに、開示されている方法の最初のステップにおいてｃＤＮＡを作製するためのランダムプライマーの使用は、分解型ＲＮＡまたは細菌由来のＲＮＡなどの、通常では増幅を受けないと思われるＲＮＡを使用して増幅されたｓＲＮＡ分子を作製することができることを意味する。ランダムプライマーは、その後のインビトロにおける転写中に作製される増幅されたｓＲＮＡ分子がポリＡテイルを含むように、５’末端にオリゴｄＴ領域（長さ約１０～約３０ヌクレオチド、好ましくは、長さ約１７～約２４ヌクレオチドの範囲である）を含むように修飾することができる。

【００１７】

第１鎖ｃＤＮＡ合成後、ＲＮＡは、一般に、第１鎖ｃＤＮＡ分子の精製前に分解される（図１ｂ参照）。ＮａＯＨによる処理などのＲＮＡを分解する任意の方法を使用することができる。または、ＲＮＡは無傷であってもよく、第１鎖ｃＤＮＡ分子はＲＮＡ／ｃＤＮＡ２本鎖から精製される。ＤＮＡ分子を精製するための数多くの方法およびキットが存在する。例には、MinElute（商標）PCR精製キット(Qiagen, Valencia, CA)、SpinPrep（商標）PCR クリーン－アップ(Clean-up)キット(Novagen, Madison, WI)および同様のＤＮＡ分画原理に基づいた他の精製システムが挙げられる。

【００１８】

第１鎖ｃＤＮＡ精製後、１本鎖オリゴデオキシヌクレオチドテイルをｃＤＮＡ分子の３’末端に接続する（図１ｃ参照）。オリゴデオキシヌクレオチドテイルは、デオキシヌクレオチドを１本鎖ＤＮＡに接続する任意の手段によって導入されうる。好ましくは、オリゴデオキシヌクレオチドテイルは、適当なデオキシヌクレオチドの存在下において末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼまたは他の好適な酵素を使用して１本鎖ｃＤＮＡに接続される。好ましくは、オリゴデオキシヌクレオチドテイルはホモポリマーテイル（すなわち、ポリｄＡ、ポリｄＧ、ポリｄＣまたはポリｄＴ）である。好ましくは、オリゴデオキシヌクレオチドテイルはポリｄＴテイルであり、一般に長さ約３～５００ヌクレオチド超の範囲であり、好ましくは、長さ約２０～約１００ヌクレオチドの範囲である。

【００１９】

１本鎖ｃＤＮＡ分子の３’末端への１本鎖オリゴヌクレオチドテイルの接続後、１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートを３’オリゴデオキシヌクレオチドテイル

に接続する（図１ｄ参照）。これは、３’オリゴデオキシヌクレオチドテイルと１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートの３’末端に存在する一連の相補的なデオキシヌクレオチド間の相補的な塩基対形成によって実施される。例えば、オリゴヌクレオチドテイルがポリｄＴテイルである場合には、プロモーターテンプレートは、３’末端にアデノシン塩基の配列を含み、一般に長さ約３～５０ヌクレオチド超の範囲であり、好ましくは、長さ約１０～約３０ヌクレオチドの範囲である。３’プロモーターテンプレート配列の特定のヌクレオチド配列は３’オリゴデオキシヌクレオチドテイルの特定のヌクレオチド配列に完全に相補的である必要はなく、３’プロモーターテンプレート配列の長さは互いに相補的であると考えられる配列の３’オリゴデオキシヌクレオチドテイルの長さと同じである必要はない。必要とされることは、ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートがｃＤＮＡ分子の３’末端のオリゴデオキシヌクレオチドテイルにアニーリングするように２つの配列間に十分な相補性があることだけであることを当業者は認識している。

【００２０】

１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートは、ＲＮＡポリメラーゼによって特異的に認識されるプロモーター配列も５’末端に含む。ポリメラーゼによって認識される特異的なプロモーター配列が公知である限り、任意のＲＮＡポリメラーゼを使用することができる。好ましくは、使用するプロモーター配列は、Ｔ７、Ｔ３またはＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼなどのバクテリオファージＲＮＡポリメラーゼによって認識される。例示的なＴ７ポリメラーゼプロモーターセンス配列はTAATACGACTCACTATAGGG（配列番号：１）である。例示的なＴ３ポリメラーゼプロモーターセンス配列はAATTAACCCTCACTAAAGG（配列番号：２）である。例示的なＳ６ポリメラーゼプロモーターセンス配列はAATTTAAGGTGACACTATAGAA（配列番号：３）である。

【００２１】

１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートは、ＤＮＡポリメラーゼで伸張しないように３’末端がブロックされている。従って、（クレノーＤＮＡポリメラーゼなどの）ＤＮＡポリメラーゼの添加は１本鎖プロモーターテンプレートを２本鎖ＲＮＡポリメラーゼに変換するが、第２鎖ｃＤＮＡの合成を触媒しない（図１ｅ参照）。ＤＮＡポリメラーゼで伸張されえないプロモーターテンプレートを使用すると、ＤＮＡポリメラーゼ－媒介性第２鎖ｃＤＮＡ合成のための開始点として働くことができるプロモータープライマーを使用することと比較して、増幅されていないＲＮＡ試料に見られるｍＲＮＡ転写物の相対量がより正確に維持されることを出願人らは見出した。プロモーターテンプレートは、合成中または合成後に接続される末端ブロック基、化合物または部分を含むことなどによって、ＤＮＡポリメラーゼで伸張されえないようにする任意の手段によってブロックすることができる。好ましくは、プロモーターテンプレートは、３’アミノ修飾因子、３’デオキシターミネーター、３’ジデオキシターミネーターまたは同様の分子でブロックされる。好適な遮断剤は本明細書に記載するもののいずれかに制限されるべきではなく、ＤＮＡポリメラーゼがＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートの３’末端を伸張することを妨害すると思われる任意の部分を含んでもよい。

【００２２】

本発明の方法は好ましくは第２鎖ｃＤＮＡを合成することなしに実施されるが、必要に応じて、ランダムプライマーを使用して１本鎖プロモーターテンプレートを２本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターへ変換する際に第２鎖ｃＤＮＡが合成されることがあることを当業者は認識している。ランダムプライマーは第１鎖ｃＤＮＡの種々の位置にアニーリングし、プロモーターテンプレートとは異なり、プロモーター合成中にＤＮＡポリメラーゼによって伸張されうる。種々の第２鎖ｃＤＮＡフラグメントを必要に応じてライゲーションして、１つの第２鎖ｃＤＮＡ分子を作製してもよい。このような第２鎖ｃＤＮＡ分子はインビトロ転写中に第１鎖ｃＤＮＡを安定化して（例えば、二次および三次構造を除去する）、ｓＲＮＡ分子の収率を高くすることができる。

【００２３】

１本鎖プロモーターテンプレートの２本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターへの変換後

、適当なＲＮＡポリメラーゼおよびリボヌクレオチドの添加によってインビトロ転写が開始される（図１ｆ参照）。このような転写によって大量の増幅されたｓＲＮＡを作製することができる。インビトロにおける転写を実施するための方法およびキットは当技術分野において周知であり、MEGAscript（商標）転写キット(Ambion, Austin, TX)およびAmpliScribe（商標）高収率転写キット(High Yield Transcription kit)(Epicentre Technologies, Madison, WI)が挙げられる。

【００２４】

得られたｓＲＮＡ分子に、記載されているものと同じ方法を使用して追加のラウンドの増幅を実施することができる。例えば、オリゴｄＴ－媒介性第１鎖ｃＤＮＡから作製されるｓＲＮＡ分子（すなわち、第１ラウンドのｓＲＮＡ分子）は、ポリＡテイル（これは、第２ラウンドのオリゴｄＴ－媒介性第１鎖ｃＤＮＡ合成のプライミング部位として働くことができる。）を３’末端に再生している。または、ランダムプライマーを使用して、第１ラウンドのｓＲＮＡ分子から第１鎖ｃＤＮＡを逆転写してもよい。オリゴｄＴおよびランダムプライマーの組み合わせおよび混合物を第２ラウンドのｃＤＮＡ合成に使用してもよい。次いでプロモーターテンプレートを上記の第２ラウンドのｃＤＮＡ分子に添加し、次に適当なＲＮＡポリメラーゼを用いて第２ラウンドのインビトロにおける転写を実施する。追加のラウンドの増幅を実施することにより、最初の増幅ラウンドにおいて少量のｍＲＮＡを使用することができる。

【００２５】

市販のポリＡテイリングキットを使用して、ポリＡテイルを欠損する増幅されたｓＲＮＡ分子（従来のランダムプライマー－媒介性の第１鎖ｃＤＮＡから作製されるものなど）の３’末端にポリＡテイルを付加することができる。このようなキットの例はポリ（Ａ）テイリングキット(Ambion)である。または、適当な緩衝液中でポリＡポリメラーゼ(Amersham、InvitrogenおよびAmbion社製)をＡＴＰおよび増幅されたｓＲＮＡ分子と組み合わせたものを使用してｓＲＮＡ分子の３’末端にポリＡテイルを合成することができる。ポリＡテイルを付加することによって、増幅されたｓＲＮＡ分子を使用することができる下流のアッセイの数および種類が増加し、そのようなアッセイにおけるより安価なＲＮＡラベリング代替物を使用することができる。

【００２６】

本発明の方法によって作製されるｓＲＮＡ分子は、遺伝子発現研究、遺伝子クローニングおよびサブトラクティブハイブリダイゼーションを含む、ｍＲＮＡを典型的に使用する任意の目的に直接使用することができる。例えば、ランダムプライマー、オリゴｄＴプライマーまたはそれらの組み合わせを使用して、ｓＲＮＡ分子を最初にｃＤＮＡ分子に逆転写してもよい。逆転写反応は、蛍光標識ヌクレオチドなどの検出可能であるように標識したヌクレオチドの存在下において実施することができる。このようなヌクレオチドには、Ｃｙ３およびＣｙ５で標識したヌクレオチドが挙げられる。または、ｃＤＮＡ分子は合成後に標識される。好ましくは、ｃＤＮＡ分子は、核酸デンドリマーを介して、３ＤＮＡ（商標）技術(Genisphere)を使用して合成後に標識される。これらのデンドリマーは、Nilsen, et al., J. Theor. Biol.,187:273-284 (1997); Stears, et al., Physiol. Genomics 3:93-99(2000)；米国特許第5,175,270号；同第5,484,904号；同第5,487,973号；同第6,072,043号；同第6,110,687号；および同第6,117,631号にさらに記載されている。

【００２７】

本発明のｓＲＮＡ分子から作製される標識された１本鎖ｃＤＮＡ分子は、遺伝子発現研究のプローブとして有用である。ｃＤＮＡ分子は、相補的なポリヌクレオチドを含む核酸マイクロアレイにアニーリングすることができる。好ましくは、マイクロアレイはGeneChip（商標）マイクロアレイ(Affymetrix, Santa Clara, CA)である。本発明の方法によって作製されるｓＲＮＡ分子は完全長の元のＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）転写物の各々をよく代表しており、元のＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）転写物の各々の相対的な量をよく反映するので、従来の核酸増幅技法を使用して得られるものと比較して、遺伝子発現研究のために得られる結果は有意義となりうる（例えば、精度が高い）。

【００２８】
本発明は、さらに、本発明の方法を実施するための試薬を含むキットまたはパッケージを提供する。このようなキットは、種々の研究および診断への適用に使用することができる。例えば、本発明の方法およびキットを使用して、異なる細胞もしくは組織、同じ細胞もしくは組織の異なる亜集団、同じ細胞もしくは組織の異なる生理的状態、同じ細胞もしくは組織の異なる発生段階または同じ組織の異なる細胞集団において１つ以上の遺伝子の発現の比較分析を促進することができる。
【００２９】
本発明により多種多様のキットを調製することができる。例えば、キットは、ＤＮＡポリメラーゼで伸張されない１本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレート（例えば、３’ブロッカーまたはブロッキング部分が結合しているテンプレート）、およびテンプレートを使用してｓＲＮＡ分子を作製するための教材を含んでもよい。教材は、典型的には、書面また印刷物を含むが、それらはこれに限定されない。このような指示を記憶し、それらをエンドユーザーへ伝えることができる任意の媒体が本発明によって考慮されている。このような媒体には、電子的記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学的媒体（例えば、ＣＤ　ＲＯＭ）等が挙げられるが、それに限定されるわけではない。このような媒体は、このような教材を提供するインターネットサイトのアドレスを含んでもよい。
【００３０】
本発明のキットは、以下の成分または試薬：逆転写酵素；ＲＮａｓｅ阻害剤；オリゴデオキシヌクレオチドテイルを１本鎖ｃＤＮＡ分子に接続するための酵素（例えば、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ）；ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートを２本鎖ＲＮＡポリメラーゼプロモーターに変換するための酵素（例えば、クレノー酵素）；およびプロモーターを認識するＲＮＡポリメラーゼ（例えば、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ）の１つ以上を含んでもよい。キットは、本発明の方法によるｓＲＮＡ分子の作製に適合可能な緩衝液、プライマー（例えば、オリゴｄＴプライマー、ランダムプライマー）、ヌクレオチド、標識ヌクレオチド、ＲＮａｓｅ－フリー水、容器、バイアル、反応チューブ等もさらに含んでもよい。成分および試薬は、好適な保存媒体を含有する容器内で個別に提供されてもまたは組み合わせて提供されてもよい。
【００３１】
本発明の方法による具体的な実施態様をここで以下の実施例において記載する。実施例は例示的にすぎず、いかなる方法においても開示の残りを限定するものと意図されていない。
【実施例】
【００３２】
［実施例１］
〔第１鎖ｃＤＮＡ合成〕
簡単に説明すると、RNAqueous（商標）キット(Ambion)を使用して精製した１～１０μｌの総ラット脳ＲＮＡ（最高１μｇ）を２μｌのオリゴｄＴ$_{24}$プライマー（５０ｎｇ／μｌ）（5’-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3’；配列番号４）と混合し、ＲＮａｓｅ－フリー水で１１μｌにした。ＲＮＡ／プライマー混合物を８０℃において１０分加熱し、速やかに氷上で１～２分間冷却した。次いで、混合物を９μｌのマスター混合物溶液と混合して、最終容量を、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．３）、７５ｍＭ　ＫＣｌ、３ｍＭ　$MgCl_2$、１０ｍＭ　ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、０．５ｍＭ各ｄＮＴＰ、１０Ｕ　Superase-In（商標）(Ambion)および２００Ｕ　Superscript（商標）II逆転写酵素(Invitrogen)を含む２０μｌにした。混合物を短時間遠心分離し、４２℃において２時間インキュベーションした。３．５μｌの０．５Ｍ　ＮａＯＨ／５０ｍＭ　ＥＤＴＡを添加し、６５℃において１５分加熱することによって反応を停止した。短時間の遠心分離後、５μｌの１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５で中和し、１×ＴＥ、ｐＨ８．０で５０μｌに調節した。製造業者のプロトコールによりMinElute（商標）ＰＣＲ精製キット

(Qiagen)を使用して反応液を精製した。製造業者提供の１０μｌ　ＥＢ緩衝液で第１鎖ｃＤＮＡ分子を溶出した。

【００３３】

〔第１鎖ｃＤＮＡのテイリング〕

第１鎖ｃＤＮＡ分子を８０℃１０分加熱し、速やかに氷上１～２分冷却した。次いで、ｃＤＮＡ分子の１０μｌ溶液を１５μｌのマスター混合物溶液と混合し、最終容量を、６．５μｌ　ＲＮａｓｅ－フリー水、１×テイリング緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．０，１０ｍＭ　$MgCl_2$）、１．５ｍＭ　ｄＴＴＰおよび３０Ｕ末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(Invitrogen)を含む２５μｌにした。混合物を短時間遠心分離し、３７℃において３０分インキュベーションした。８０℃において１５分加熱し、室温において１～２分冷却することによって反応を停止した。

【００３４】

〔Ｔ７プロモーター合成〕

３’アミノ修飾因子（5’-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA AAA AAA AAA AAA AAA AX-3’；配列番号５）を含む２μｌのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレート（２５０ｎｇ／μｌ）をオリゴｄＴ－テイルドｃＤＮＡ分子に添加して、混合物を３７℃において１０分インキュベーションし鎖をアニーリングした。次いでテイルドｃＤＮＡ／プロモーターテンプレート混合物の２７μｌ溶液を２３μｌのマスター混合物溶液と混合して、最終容量を、１４μｌ　ＲＮａｓｅ－フリー水、１×ポリメラーゼ緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．０，１０ｍＭ　$MgCl_2$）、０．４ｍＭ各ｎＮＴＰおよび２０ＵラージＤＮＡポリメラーゼＩ（クレノー酵素）(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)を含む５０μｌにした。混合物を短時間遠心分離し、室温において３０分インキュベーションした。反応液を、１×ＴＥ，ｐＨ８．０で１００μｌに調節した。製造業者のプロトコールによりMinElute（商標）PCR精製キットを使用して反応液を精製した。製造業者提供の１０μｌ　ＥＢ緩衝液でＴ７－プロモーター－ｃＤＮＡ分子を溶出した。

【００３５】

〔インビトロにおける転写〕

１μｌのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートをＴ７－プロモーター－ｃＤＮＡ分子に添加し、ＲＮａｓｅ－水で容量を１７μｌに調節した。混合物を３７℃において１０～１５分加熱して、Ｔ７プロモーターＤＮＡ鎖を再－アニーリングし、次いで１３μｌのマスター混合物溶液と混合して、最終容量を、１×反応緩衝液、５ｍＭ各ｒＮＴＰおよび２μｌのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ（MEGAscript（商標）転写キット、Ambion）を含む３０μｌにした。混合物を短時間遠心分離し、３７℃ヒートブロックにおいて１５分インキュベーションし、次に３７℃のエアーハイブリダイゼーションオーブンにおいて６～１４時間インキュベーションした。製造業者のプロトコールによりRneasy（商標）キットを使用して増幅したｓＲＮＡ分子を精製した。ｓＲＮＡ分子を５０μｌのＲＮａｓｅ－フリー水で溶出し、同じ溶離液で再－溶出し、波長比２６０／２８０のＵＶ－分光光度計によって定量した。

【００３６】

［実施例２］

実施例１の方法を実施したが、オリゴdT_{24}プライマーの代わりにランダムプライマーを使用して第１鎖ｃＤＮＡ合成を実施した。簡単に説明すると、１～１０μｌの総ＲＮＡ（最高１μｇ）を２μｌのランダム９ｍｅｒプライマー（２５０ｎｇ／μｌ）（5’-NNN NNN NNN-3’；配列番号６）と混合し、ＲＮａｓｅ－フリー水で１１μｌにした。ＲＮＡ／プライマー混合物を８０℃において１０分加熱し、速やかに氷上で１～２分冷却した。次いで、混合物を９μｌのマスター混合物溶液と混合して、最終容量を、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．３）、７５ｍＭ　ＫＣｌ、３ｍＭ　$MgCl_2$、１０ｍＭジチオスレイトール、０．５ｍＭ各ｄＮＴＰ、１０Ｕ　Superase-In（商標）および２００Ｕ　Superscript（商標）II逆転写酵素を含む２０μｌにした。混合物を短時間遠心分離し、４２℃において２時間インキュベーションした。３．５μｌの０．５Ｍ　ＮａＯＨ／５０ｍ

Ｍ　ＥＤＴＡを添加し、６５℃において１５分加熱することによって反応を停止した。短時間の遠心分離後、５μｌの１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５で反応液を中和し、１×ＴＥ、ｐＨ８．０で５０μｌに調節した。製造業者のプロトコールにより、MinElute（商標）PCR精製キットを使用して反応液を精製した。製造業者提供の１０μｌのＥＢ緩衝液で第１鎖ｃＤＮＡ分子を溶出し、実施例１に記載するようにさらに処理した。

【００３７】

［実施例３］

実施例１および２の方法のどちらかを実施したが、第１鎖ｃＤＮＡ合成後のＲＮＡは、MiniElute（商標）精製カラムへの適用前は無傷（すなわち、塩基加水分解されていない）であった。製造業者のプロトコールにより、MinElute（商標）PCR精製キットを使用して反応液を精製した。製造業者提供の１０μｌのＥＢ緩衝液で第１鎖ｃＤＮＡ分子を溶出し、実施例１に記載するようにさらに処理した。

【００３８】

［実施例４］

ポリ（Ａ）テイリングキット(Ambion)を使用して、実施例２および３のランダムプライマー方法によって作製した増幅したｓＲＮＡ分子にポリＡテイルを添加した。Array 350（商標）検出キット(Genisphere)を使用してポリＡ－テイルドｓＲＮＡを標識ｃＤＮＡに変換し、検出キットの製品マニュアルに記載されている標準的な技法によってマイクロアレイにハイブリダイゼーションした。

【００３９】

［実施例５］

上記の方法で作製した種々の量のｓＲＮＡを、臭化エチジウムで染色した１％アガロース変性ゲル上で可視化した。図２からわかるように、本発明の方法（SenseAmpレーンＥ～Ｇと識別されている）は、市販のEberwine－系方法（MessageAmp（商標）、Ambion、レーンＢ～Ｄと識別されている）と比較したとき、大量の(larger)増幅ＲＮＡ分子を作製する。出発ＲＮＡ試料を最高～１０００倍上回る増幅収率が本発明の方法を使用して達成された。MessageAmp（商標）を使用して作製した増幅アンチセンスＲＮＡ（ａＲＮＡ）と本発明の方法を使用して作製した増幅ｓＲＮＡの比較から作製される実験データは、本発明の方法は、元の未増幅ＲＮＡ試料において見られるｍＲＮＡ転写物の相対量を維持する際にEberwineの方法より精度が高いことを示している。ピアソンのＬｏｇ相関係数は、それぞれ、０．９３および０．８６であった。未増幅試料と増幅試料の完璧な相関は、ピアソンのＬｏｇ相関１．００によって反映されると思われる。

【００４０】

［実施例６］

実施例１および３のオリゴｄＴ方法のどちらかを実施したが、精製ｓＲＮＡ分子に第２ラウンドのＲＮＡ増幅を実施した。簡単に説明すると、第１ラウンドの増幅ｓＲＮＡ分子を含むインビトロ転写反応液を３０μｌＲＮａｓｅ－フリー水でRneasy（商標）から溶出し、同じ溶離液で再溶出した。溶離液を、１μｌのオリゴｄＴ$_{24}$プライマー（５０ｎｇ／μｌ）（配列番号４）および２μｌのランダム９ｍｅｒプライマー（２５ｎｇ／μｌ）（配列番号６）と混合し、ＲＮａｓｅ－フリー水で３７μｌにした。ＲＮＡ／プライマー混合物を８０℃において１０分加熱し、速やかに氷上で１～２分冷却した。次いで、混合物を２３μｌのマスター混合物溶液と混合し、最終容量を、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．３）、７５ｍＭ　ＫＣｌ、３ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$、１０ｍＭジチオスレイトール（ＤＴＴ）、０．３３ｍＭ各ｄＮＴＰ、１０Ｕ　Superase-In（商標）および２００Ｕ　Superscript（商標）II逆転写酵素を含む６０μｌにした。混合物を短時間遠心分離し、４２℃において２時間インキュベーションした。反応液を、１×ＴＥ、ｐＨ８．０で１００μｌに調節した。製造業者のプロトコールによりMinElute（商標）ＰＣＲ精製キットを使用して反応液を精製した。製造業者提供の１０μｌ　ＥＢ緩衝液で第１鎖ｃＤＮＡ分子を溶出した。

【００４１】

第１鎖ｃＤＮＡ分子を８０℃において１０分加熱し、速やかに氷上で１～２分冷却した。次いで、ｃＤＮＡ分子の１０μｌ溶液を１５μｌのマスター混合溶液と混合して、最終容量を、６．５μｌＲＮａｓｅ－フリー水、１×テイリング緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．０，１０ｍＭ　$MgCl_2$）、１．５ｍＭ　ｄＴＴＰおよび３０Ｕ末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを含む２５μｌにした。混合物を短時間遠心分離し、３７℃において３０分インキュベーションした。８０℃において１５分加熱し、室温において１～２分冷却することによって反応を停止した。

【００４２】

３’アミノ修飾因子（配列番号：５）を含む２μｌのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレート（２５０ｎｇ／μｌ）をオリゴｄＴ－テイルドｃＤＮＡ分子に添加し、混合物を３７℃において１０分インキュベーションして鎖をアニーリングした。次いで、テイルドｃＤＮＡ／プロモーターテンプレート混合物の２７μｌ溶液を２３μｌのマスター混合物溶液と混合して、最終容量を、１４μｌのＲＮａｓｅ－フリー水、１×ポリメラーゼ緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．０，１０ｍＭ　$MgCl_2$）、０．４ｍＭ各ｎＮＴＰおよび２０ＵラージＤＮＡポリメラーゼＩ（クレノー酵素）を含む５０μｌにした。混合物を短時間遠心分離し、室温において３０分インキュベーションした。１×ＴＥ，ｐＨ８．０で反応液を１００μｌに調節した。製造業者のプロトコールによりMinElute（商標）PCR精製キットを使用して反応液を精製した。製造業者提供の１０μｌ　ＥＢ緩衝液で第１鎖ｃＤＮＡ分子を溶出した。

【００４３】

１μｌのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレートをＴ７－プロモーター－ｃＤＮＡ分子に添加し、ＲＮａｓｅ－水で容量を１６μｌに調節した。混合物を３７℃において１０～１５分加熱して、Ｔ７プロモーターＤＮＡ鎖を再－アニーリングし、次いで２４μｌのマスター混合物溶液と混合して、最終容量を、１×反応緩衝液、７．５ｍＭ各ｒＮＴＰおよび４μｌのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ（MEGAscript（商標）転写キット、Ambion）を含む４０μｌにした。混合物を短時間遠心分離し、３７℃ヒートブロックにおいて１５分インキュベーションし、次に３７℃のエアーハイブリダイゼーションオーブンにおいて６～１４時間インキュベーションした。製造業者のプロトコールによりRneasy（商標）キットを使用して増幅した第２ラウンドのｓＲＮＡ分子を精製した。第２ラウンドのｓＲＮＡ分子を５０μｌのＲＮａｓｅ－フリー水で溶出し、同じ溶離液で再溶出し、波長比２６０／２８０のＵＶ－分光光度計によって定量し、臭化エチジウムで染色した１％アガロース変性ゲルで可視化した。

【００４４】

［実施例７］

ｓＲＮＡ分子を作製するためのキットは以下の成分を集合させたものであった：

オリゴdT_{24}プライマー（５０ｎｇ／μｌ）；

ランダム９ｍｅｒプライマー（２５０ｎｇ／μｌ）；

ｄＮＴＰミックス（各１０ｍＭ）；

Superase-In（商標）(Ambion)；

ｄＴＴＰテイリングミックス（１０ｍＭ）；

１０×反応緩衝液（１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．０、１００ｍＭ　$MgCl_2$）；

末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（１５～３０Ｕ／μｌ）；

Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターテンプレート（５０ｎｇ／μｌ）；

クレノー酵素（１～７．５Ｕ／μｌ）；および

ヌクレアーゼ－フリー水。

【００４５】

成分を番号をつけたバイアルに入れ、キット要素を使用して、増幅ｓＲＮＡ分子を作製するための印刷された教材と共に容器に入れた。

【００４６】

本明細書に引用されている全ての刊行物、共に特許公報および特許以外の報告は、本発明が属する分野の当業者のレベルを示している。全てのこれらの刊行物は、個々の刊行物各々が、参照により組み入れられていることにより具体的且つ個別に示されているものと同じ程度で全体の内容が参照により本明細書に組み入れられている。

【００４７】

本発明は特定の実施態様を参照して記載されているが、これらの実施態様は本発明の原理および適用を例示しているにすぎないことが理解されるべきである。従って、数多くの改良を例示的な実施態様に加えることができることおよび特許請求の範囲によって規定される本発明の精神および範囲から逸脱しないで他のアレンジを工夫することができることが理解されるべきである。

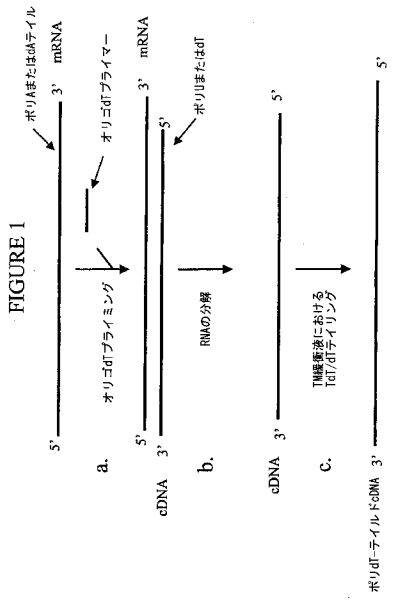
【図面の簡単な説明】

【００４８】

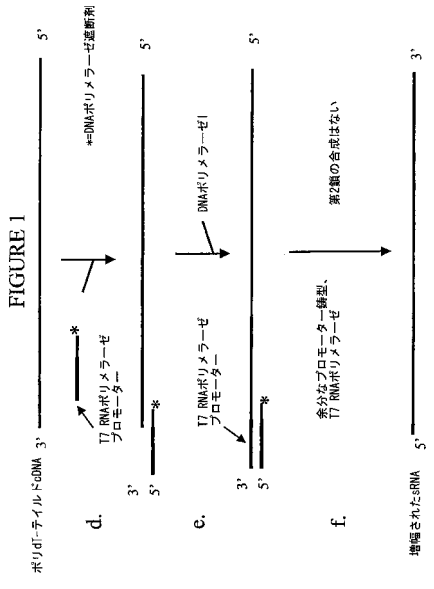
【図１】本発明の方法の実施態様を図示するフローチャートである。

【図２】本発明の方法によって作製される種々の量のｓＲＮＡを、臭化エチジウムで染色した１％アガロース変性ゲル上で可視化したものを図示する写真である。

【図１Ａ】

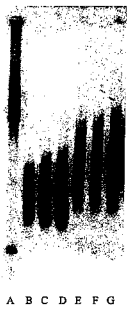


【図１Ｂ】



【図２】

FIGURE 2



A B C D E F G

A:123bpラダー
B: MessageAmp™ 1.4 μg aRNA
C: MessageAmp™ 3.5 μg aRNA
D: MessageAmp™ 7.0 μg aRNA
E: SenseAmp 1.5 μg sRNA
F: SenseAmp 2.5 μg sRNA
G: SenseAmp 6.0 μg sRNA

フロントページの続き

(74)代理人 100125380
弁理士 中村 綾子
(74)代理人 100125036
弁理士 深川 英里
(74)代理人 100142996
弁理士 森本 聡二
(74)代理人 100154298
弁理士 角田 恭子
(74)代理人 100162330
弁理士 広瀬 幹規
(72)発明者 ゲッツ，ロバート・シー
アメリカ合衆国ペンシルヴァニア州１９４２６，カレッジヴィル，ウィンターベリー・レイン ２１８
(72)発明者 シュウォーム，ジェイミー
アメリカ合衆国ペンシルヴァニア州１９４２６，カレッジヴィル，ドッグウッド・レイン ８１４

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 特表２００２－５０５０８７（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００３／０１０４４３２（ＵＳ，Ａ１）
米国特許出願公開第２００２／０００１５４９（ＵＳ，Ａ１）
米国特許出願公開第２００３／００４４８０８（ＵＳ，Ａ１）
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., １９９０年 3月, Vol.87, No.5, pp.1663-1667

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00-15/90
C12Q 1/00- 1/70
PubMed