

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-13122

(P2005-13122A)

(43) 公開日 平成17年1月20日(2005.1.20)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 6 3
	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2003-183694 (P2003-183694)	(71) 出願人	302019245 タカラバイオ株式会社 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号
(22) 出願日	平成15年6月27日 (2003. 6. 27)	(72) 発明者	鳥田 雅光 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラ バイオ株式会社内
		(72) 発明者	日野 文嗣 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラ バイオ株式会社内
		(72) 発明者	加藤 郁之進 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラ バイオ株式会社内
		Fターム(参考)	4B024 AA11 CA01 CA11 HA11 4B063 QA01 QA05 QA12 QA18 QQ42 QQ52 QR32 QR53 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02

(54) 【発明の名称】 遺伝子増幅試薬の安定化方法

(57) 【要約】

【課題】 試薬の操作中ならびに保存中に、増幅反応が進んでしまうという問題を克服し、等温での核酸増幅に使用される試薬の安定性、性能ならびに使用操作の簡便性を大幅に改善すること。

【解決手段】 増幅に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマーに対して標的遺伝子配列と競合する配列を有するオリゴヌクレオチドであり、かつ、当該オリゴヌクレオチドと前記キメラオリゴヌクレオチドプライマーの間のT_m値に対する、前記キメラオリゴヌクレオチドプライマーと該プライマーの塩基配列と実質的に相補的な標的遺伝子の核酸配列との間のT_m値の比が、1.2~3.3の範囲であり、さらに当該オリゴヌクレオチドの3'末端が伸長できないようにブロックされたオリゴヌクレオチドを少なくとも一つ、遺伝子増幅反応液中に共存させる方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

遺伝子増幅試薬の安定化方法であって、遺伝子増幅反応に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマーと実質的に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用し、当該オリゴヌクレオチドと前記キメラオリゴヌクレオチドプライマーの間の T_m 値に対する、前記キメラオリゴヌクレオチドプライマーと該プライマーの塩基配列と実質的に相補的な標的遺伝子の核酸配列との間の T_m 値の比が、 $1.2 \sim 3.3$ の範囲であり、さらに当該オリゴヌクレオチドの3'末端が伸長できないようにブロックされたオリゴヌクレオチドを少なくとも一つ、遺伝子増幅反応液中に共存させることを特徴とする方法。

【請求項2】

オリゴヌクレオチドがDNA又はRNAオリゴヌクレオチド、あるいはDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】

請求項1又は2のいずれか1項に記載の方法のためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は遺伝子増幅反応における試薬およびキットの安定性・操作条件の簡便化の改良に関し、特に等温遺伝子増幅法の改良に関する。

【0002】

【従来技術】

近年、目的の遺伝子を増幅する技術は、数多く報告されている。

例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法 (例えば、特許文献1~3参照)、LCR (Ligase Chain Reaction) 法 (例えば、特許文献4参照)、さらに最近では温度サイクリングを必要とせず、一定温度で遺伝子を増幅する遺伝子増幅法である、SDA (Strand Displacement Amplification) 法 (例えば、特許文献5参照)、改良SDA法 (例えば、特許文献6~8参照)、LAMP (Loop-mediated isothermal Amplification) 法 (例えば、特許文献9参照)、ICAN (Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids) 法 (例えば、特許文献10または11参照) など様々な方法が報告されている。

【0003】

上記遺伝子増幅法においては、頻繁に非特異的増幅が生じるという問題点を解決するため、色々な解決策がとられてきた。例えば、PCR法においては、その一つとしてホットスタート法とよばれる高温になって初めて核酸ポリメラーゼを働かすことによって非特異的増幅を解決しようとする方法がある。この方法には、ポリメラーゼに対する抗体を使用する方法 (例えば、非特許文献1参照)、高温で融解するワックス内にマグネシウムをトラップさせる方法 (例えば、特許文献12または13参照)、ある種の核酸によって核酸ポリメラーゼを可逆的に阻害させる方法 (Ampli Taq Gold (パーキンエルマー社製)) などが存在する。

これらの方法は、 $65 \sim 98$ という変性・増幅温度を用いるPCR法においては有用な改良法であるが、 $40 \sim 65$ という中程度高温で等温で遺伝子増幅反応を行う上記遺伝子増幅方法などには活用できない技術であった。

【0004】

また、増幅反応における特異性を高める、つまり希望しない副反応を阻害する方法としては、非伸長性のオリゴブロッカーを増幅用プライマー間に設定しこの共存下でPCR反応を実施する方法 (例えば、特許文献14参照)、ペプチド核酸を用いるPCR法 (例えば、非特許文献2または特許文献15参照) などが開示されている。しかしながら、これらの方法は中程度高温での等温遺伝子増幅法には適応し難い方法である。そして上記に挙げ

10

20

30

40

50

た改良法は、特にPCR法における非特異的増幅を阻害することに限定されており、等温遺伝子増幅法における試薬混合物の安定性や煩雑な操作の改善を可能にするものではなかった。

【0005】

その他の増幅反応における特異性を高める方法としては、伸長反応温度以下ではセルフアニーリング（自己ループ化）するプライマーを用いるPCR法（例えば、非特許文献3参照）がある。しかしながら、このようなループプライマーを作成するためにはプライマー配列そのものに加え、10mer程度のループ形成用オリゴヌクレオチド部分を追加合成しなければならない。また、該方法に使用するプライマーは30～40mer必要であり、ループ部分と合わせると計40～50merと非常に長いものとなり、一般的に使用されるプライマーの使用条件にそぐわず、工業的でもない。さらに、該方法は、60～72のアニーリング温度が必要であり、さらにPCR1サイクル毎に2ずつアニーリング温度を上昇させていかなければならない。このように、該方法は非常に煩雑でありかつ等温遺伝子増幅法には使用できない方法である。

10

【0006】

また、2本鎖プライマー対および鎖置換型DNAポリメラーゼを用いるPCR法（例えば、特許文献16参照）がある。該方法は、ホモジニアス遺伝子増幅法であり、プライマーの鑄型鎖への非特異的結合を阻害するための伸長できない少なくとも1つのエネルギー衰弱型オリゴヌクレオチドを共存させる方法である。しかしながら、試薬混合物の安定性に関しては何ら言及されていない。

20

【0007】

さらに、中程度高温での等温遺伝子増幅法に使用される核酸ポリメラーゼは、40から65に至適な温度を持っているが、5から37においてもそれなりのプライマー伸長活性を示す。従って、中程度高温での等温遺伝子増幅法を実施する場合は、非特異的な増幅が生じるのを防止するために、増幅混合物は氷上で取り扱いさらに核酸を含有する検体を該増幅混合物に添加した後も氷上で取り扱い予め適温に加熱されたヒーターあるいは温浴中に一気に入れて反応を開始するという、大変面倒な取り扱いを余儀なくされていた。

また、多検体を一度に測定する場合には、全検体の反応液を調製するための所要時間がかかりかかり、最初に調製された反応液では、予定の反応開始、すなわち所定の温度でのインキュベーション開始までの間に反応が進んだり、副反応が進行したりして再現性に乏しい結果となる場合があった。

30

さらに、一度調製した試薬は通常の冷蔵庫で保存しておいても、数時間から数日で増幅反応が起ってしまい、調製後の試薬の保存性が悪いといった問題点があった。

そして、再現性を改善するため、これら多くの増幅法では標的遺伝子とプライマーをあらかじめ変性アニーリングさせるため加熱後冷却したり、アルカリ処理後中和したりといった面倒な前処理を余儀なくされていた。

【0008】

【特許文献1】

米国特許第4,683,195号

40

【0009】

【特許文献2】

米国特許第4,683,202号

【0010】

【特許文献3】

米国特許第4,800,159号

【0011】

【特許文献4】

欧州特許出願第320308号

【0012】

50

- 【特許文献 5】
特公平 7 - 1 1 4 7 1 8 号
- 【0013】
【特許文献 6】
米国特許第 5, 1 9 6, 7 7 7 号
- 【0014】
【特許文献 7】
国際公開第 9 5 / 2 5 1 8 0 号パンフレット
- 【0015】
【特許文献 8】 10
国際公開第 9 9 / 4 9 0 8 1 号パンフレット
- 【0016】
【特許文献 9】
国際公開第 0 0 / 2 8 0 8 2 号パンフレット
- 【0017】
【特許文献 10】
国際公開第 0 0 / 5 6 8 7 7 号パンフレット
- 【0018】
【特許文献 11】 20
国際公開第 0 2 / 1 6 6 3 9 号パンフレット
- 【0019】
【特許文献 12】
米国特許第 5, 5 9 9, 6 6 0 号
- 【特許文献 13】
米国特許第 6, 4 0 3, 3 4 1 号
- 【特許文献 14】
米国特許第 5, 8 4 9, 4 9 7 号
- 【特許文献 15】
米国特許第 5, 8 9 1, 6 2 5 号
- 【特許文献 16】 30
米国特許第 5, 3 4 8, 8 5 3 号
- 【非特許文献 1】
バイオテクニクス (B i o t e c h n i q u e s)、第 2 5 巻、第 7 1 6 ~ 7 2 2 ページ (1 9 9 8 年)
- 【非特許文献 2】
ヌクレック・アシズ・リサーチ (N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h)、第 2 0 巻、第 2 4 9 3 ~ 2 4 9 6 ページ (1 9 9 2 年)
- 【非特許文献 3】
バイオテクニクス (B i o t e c h n i q u e s)、第 2 9 巻、第 1 0 1 8 ~ 1 0 2 4 ページ (2 0 0 0 年) 40
- 【0020】
【発明が解決しようとする課題】
本発明の目的は、試薬の操作中ならびに保存中に、4 という低温であっても増幅反応が進んでしまうという問題を克服し、等温での核酸増幅に使用される試薬の安定性、性能ならびに使用操作の簡便性を大幅に改善することにある。
- 【0021】
【課題を解決するための手段】
- 【0022】
本発明者らは、増幅に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマーに対して標的遺伝子配列と競合する配列を有するオリゴヌクレオチドであり、かつ、当該オリゴヌクレオチド 50

と前記キメラオリゴヌクレオチドプライマーの間の T_m 値に対する、前記キメラオリゴヌクレオチドプライマーと該プライマーの塩基配列と実質的に相補的な標的遺伝子の核酸配列との間の T_m 値の比が、1.2~3.3の範囲であり、さらに当該オリゴヌクレオチドの3'末端が伸長できないようにブロックされたオリゴヌクレオチドを少なくとも一つ、遺伝子増幅反応液中に共存させることにより、上記課題を解決できることを見出した。

【0023】

さらに本発明者らは、核酸ポリメラーゼの至適温度までは伸長できないオリゴヌクレオチドがキメラオリゴヌクレオチドプライマーに結合しており、該至適温度になった時点で該オリゴヌクレオチドは前記プライマーから解離し、該プライマーが標的遺伝子に結合し、核酸ポリメラーゼによって伸長し、増幅を行うことで、標的遺伝子とプライマーとが室温下で共存していても、試薬の安定性が改善されることを見出し、本発明を完成させた。

10

【0024】

本発明の第1の発明は、遺伝子増幅試薬の安定化方法であって、遺伝子増幅反応に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマーと実質的に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用し、当該オリゴヌクレオチドと前記キメラオリゴヌクレオチドプライマーの間の T_m 値に対する、前記キメラオリゴヌクレオチドプライマーと該プライマーの塩基配列と実質的に相補的な標的遺伝子の核酸配列との間の T_m 値の比が、1.2~3.3の範囲であり、さらに当該オリゴヌクレオチドの3'末端が伸長できないようにブロックされたオリゴヌクレオチドを少なくとも一つ、遺伝子増幅反応液中に共存させることを特徴とする方法に関する。

20

【0025】

本発明の第1の発明において、オリゴヌクレオチドがDNA又はRNAオリゴヌクレオチド、あるいはDNA-RNAキメラオリゴヌクレオチドであってもよい。

【0026】

本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明の方法のためのキットに関する。

【0027】

【発明の実施の形態】

本明細書においてデオキシリボヌクレオチド(本明細書中ではdNとも記載する)とは、糖部分がD-2-デオキシリボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、例えば、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、チミンを有するものが挙げられる。さらに、7-デアザグアノシン等の修飾塩基を有するデオキシリボヌクレオチドやデオキシイノシンヌクレオチドのようなデオキシリボヌクレオチドアナログも上記のデオキシリボヌクレオチドに包含される。

30

【0028】

本明細書においてリボヌクレオチド(本明細書中ではNとも記載する)とは、糖部分がD-リボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルを有するものが挙げられる。さらに、当該リボヌクレオチドには修飾リボヌクレオチドが包含され、例えば 位のリン酸基の酸素原子を硫黄原子に置き換えた修飾リボヌクレオチド[(- S)リボヌクレオチド、(- S)Nとも記載する]やその他の誘導体等も含まれる。

40

【0029】

本明細書において3'末端側とは、核酸、例えば、プライマーにおいてその中央より3'末端にかけての部分指す。同様に5'末端側とは、核酸においてその中央より5'末端にかけての部分指す。

【0030】

本明細書においてDNAポリメラーゼとは、DNA鎖を鋳型として新たなDNA鎖を合成する酵素のことを言い、天然型のDNAポリメラーゼの他、前記活性を有する変異体酵素も包含される。当該酵素としては、例えば鎖置換(Strand displacement)活性を有するDNAポリメラーゼ、5'→3'エキソヌクラーゼ活性を有していないDNAポリメラーゼ、逆転写酵素活性やエンドヌクラーゼ活性を併せ持つDNAポ

50

リメラーゼが挙げられる。

【0031】

本明細書において「鎖置換活性」とは、鋳型となる核酸配列に従ってDNA複製を行う際、DNA鎖を置き換えながら進行し、鋳型鎖にアニーリングしている相補鎖を遊離させる、即ち鎖置換 (strand displacement) することができる活性のことをいう。また、本明細書においては、鎖置換により鋳型となる核酸配列から遊離したDNA鎖のことを「置換鎖」と称する。

【0032】

本明細書において「T_m値」とは、DNAの2本鎖が熱変性して1本鎖になる温度のことをいう。言い換えれば、鋳型DNAとオリゴヌクレオチドが2本鎖を形成する理論的な限界温度のことを言う。当該T_m値は計算により算出する事ができる。特に限定はされないが、例えば最近接塩基対法 (Nearest Neighbor method)、Wallance法、あるいはGC%法が例示される。

10

【0033】

最近接塩基対法では、

$$T_m = (1000 H) / (-10.8 + S + R \ln(Ct/4)) - 273.15 + 16.6 \log [Na^+]$$

H ; ハイブリッドにおける最近接エンタルピー変化の合計 [kcal/mol]

-10.8 ; S (initiation) [cal/mol·K]

S ; ハイブリッドにおける最近接エントロピー変化の合計 [cal/mol·K]

20

R ; 気体定数 (1.987 cal/deg·mol)

Ct ; オリゴの total モル濃度 [mol/l]

Na⁺ ; Na⁺ のモル濃度 [mol/l]

で算出でき、特に限定はされないが、パラメーターをオリゴの total モル濃度は 0.5 μM、Na⁺ のモル濃度は 50 mM に設定する場合は例示される。

【0034】

Wallance法では、

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$$

(A, T, G, C・・・各ヌクレオチドの発生数)

で算出できる。

30

【0035】

GC%法では、

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log [Na^+] + 41(XG + XC) - 500/L - 0.62F$$

Na⁺ ; Na⁺ のモル濃度 [mol/l]

XG, XC ; GおよびCのモル分率

L ; 二本鎖を形成する部分のオリゴヌクレオチドの長さ

F ; ホルムアミドのモル濃度

で算出できる。

40

【0036】

本発明の方法においてT_m値の調節は、例えば(1)Sensible decoyの配列に変異を持たせる、(2)核酸アナログを導入する、(3)プライマーよりも短い配列を設定する、(4)使用するバッファの塩濃度を調整する、などといった方法が利用できる。

【0037】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1)本発明の方法

本発明の方法は、遺伝子増幅試薬の安定化のためのオリゴヌクレオチドの使用を特徴とする。即ち、遺伝子増幅反応に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマーと実質的に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであって、当該オリゴヌクレオチドと前記キ

50

メラオリゴヌクレオチドプライマーの間のT_m値に対する、前記キメラオリゴヌクレオチドプライマーと該プライマーの塩基配列と実質的に相補的な標的遺伝子の核酸配列との間のT_m値の比が、1.2~3.3の範囲であり、さらに当該オリゴヌクレオチドの3'末端は使用される条件において核酸鎖が伸長されないよう修飾されているオリゴヌクレオチドを遺伝子増幅反応に共存させることが好ましい。なお、ここで「実質的に相補的な核酸配列」とは、使用される反応条件において鋳型となるDNAにアニーリング可能な核酸配列を意味する。以下、本発明の当該オリゴヌクレオチドをSensible decoyと称する。

【0038】

上記Sensible decoyは、デオキシリボヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドであるものが好ましい。該Sensible decoyは、特に限定されるものではないが、核酸増幅反応に使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーにアニーリング可能な配列であればよく、その長さはプライマー長と同等あるいはそれ以上またはそれ未満でもよい。好ましくは、使用するプライマー長未満のオリゴヌクレオチドであり、かつ該Sensible decoyとキメラオリゴヌクレオチドプライマーとの間のT_m値に対する、前記キメラオリゴヌクレオチドプライマーと該プライマーの塩基配列と実質的に相補的な標的遺伝子の核酸配列との間のT_m値の比〔(キメラオリゴヌクレオチドプライマーと該プライマーの塩基配列と実質的に相補的な標的遺伝子の核酸配列との間のT_m値)/(Sensible decoyとキメラオリゴヌクレオチドプライマーとの間のT_m値)〕は、好ましくは1.2~3.3の範囲、さらに好ましくは1.5~2.5の範囲である。前記T_m値は、最近接塩基対法、Wallance法、あるいはGC%法で算出する事ができ、特に、最近接塩基対法、Wallance法が好適である。

10

20

【0039】

本発明のSensible decoyには、Sensible decoyとしての機能を失わない範囲で1以上の核酸アナログを含有させることができ、さらに当該核酸アナログは複数の種類を組み合わせ使用することもできる。該核酸アナログとしては、特に限定するものではないが、例えば、デオキシイノシンヌクレオチド、デオキシウラシルヌクレオチド、あるいは7-デアザグアニンなどの修飾塩基を有するデオキシリボヌクレオチドアナログ、リボース誘導体を有する核酸アナログ等を使用することができる。

【0040】

また、本発明のSensible decoyは、その3'末端が使用される条件において核酸鎖が伸長されないよう修飾されている。修飾方法は特に限定されるものではないが、公知の化学合成法を使用することができ、アミノ化、ビオチン化、リン酸化等の方法を使用することができる。

30

【0041】

本発明に使用されるSensible decoyは、任意の核酸配列を持つように、例えばアプライド バイオシステムズ社(ABI社、Applied Biosystems Inc.)のDNAシンセサイザー394型を用いて、ホスホアミダイト法により合成できる。また、別法としてリン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスホネート法等があるが、いかなる方法で合成されたものであっても良い。

40

【0042】

本発明の方法において上記Sensible decoyは、目的の遺伝子の核酸断片を複製あるいは増幅させる際に使用するプライマーと実質的に相補的な塩基配列を有するため、プライマーとアニーリングすることができる。また、上記複製あるいは増幅反応中においては、Sensible decoyは当該プライマーがハイブリダイズする目的の遺伝子の核酸鎖と競合する。その結果、本発明の方法において、目的の遺伝子の核酸断片を特異的に、言い換えれば、非特的な複製あるいは増幅を抑制させることができる。

【0043】

本発明の方法において、DNAポリメラーゼには、DNAの鎖置換(strand displacement)活性を有するDNAポリメラーゼを使用することができる。また

50

、実質的に5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を有しないものが特に好適に使用することができる。

本発明に使用されるDNAポリメラーゼは、上記の鎖置換活性を有するものであれば特に限定はなく、例えば、バチルス カルドテナクス (*Bacillus caldotenax*、以下、B.c.aと称す)やバチルス ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*、以下B.s.tと称す)等の好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼの5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体や、大腸菌 (*Escherichia coli* 以下、E.coliと称す)由来のDNAポリメラーゼIのラージフラグメント(クレノウ断片)等が挙げられる。また、本発明に使用できるDNAポリメラーゼは、常温性から耐熱性のいずれのものも好適に使用できる。

10

【0044】

B.c.aは生育至適温度が約70℃である好熱性細菌であり、この細菌由来のB.c.a DNAポリメラーゼは、DNA依存DNAポリメラーゼ活性、RNA依存DNAポリメラーゼ活性(逆転写活性)、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性、3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を持つことが知られている。上記の酵素は、その本来の起源より精製して取得されたもの、あるいは遺伝子工学的に生産された組み換えタンパク質の何れであっても良い。また、該酵素は、遺伝子工学的あるいはその他の手法によって置換、欠失、付加、挿入等の改変を加えたものであっても良く、このような酵素の例として、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を欠損させたB.c.a DNAポリメラーゼである、B.c.a BEST DNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製)等が挙げられる。

20

【0045】

また、本発明におけるRNase Hは、本発明の方法に使用できるものであれば特に限定はなく、例えば、種々のウイルス、ファージ、原核、真核生物由来のいずれであってもよい。さらに、細胞性RNase Hあるいはウイルス性RNase Hのいずれであってもよい。例えば、上記細胞性RNase Hとしては大腸菌RNase HIが、ウイルス性RNase HとしてはHIV-1由来RNase Hが例示される。本発明の方法においてRNase Hは、I型、II型、III型のいずれもが使用できる。特に限定はされないが、例えば大腸菌由来RNase HI、ピロコッカス属細菌由来、アルカエオグロバス属細菌由来あるいはサーモコッカス属細菌由来のRNase HII、あるいはバチルス・カルドテナクス (*Bacillus caldotenax*)、サーモトガ・マリチマ (*Thermotoga maritima*)、メタノコッカス・ヤナシ (*Methanococcus jannashi*)、サーモコッカス・リトラリス (*Thermococcus litoralis*)由来のリボヌクレアーゼHが好適に使用できる。

30

【0046】

また、本発明の方法に使用するエンドヌクレアーゼ、例えば、RNase Hの切断反応の効率はプライマーの3'末端近傍の塩基配列に左右され、所望のDNAの増幅効率に影響することが考えられるので、使用するRNase Hに最適なプライマーをデザインすることは当然のことである。

【0047】

本発明に使用される反応バッファーには、緩衝成分、マグネシウム塩やその他の金属塩、dNTPを含有するものが使用される。また、使用する酵素の金属要求性等に応じて塩の種類及び濃度を最適化するのは当然のことである。緩衝成分は、特に限定はないが、例えば、ピシン、トリシン、ヘペス、トリス、リン酸塩(リン酸ナトリウム、リン酸カリウム等)が好適に使用できる。特にピシン、トリシン、ヘペス、あるいはリン酸塩を緩衝成分として含有するバッファーが本発明に好適である。従って、反応温度、使用するエンドヌクレアーゼあるいはDNAポリメラーゼ等によって、最適な緩衝液を選択すればよい。

40

【0048】

該緩衝成分の最終濃度は5 mM ~ 100 mMの範囲、特に好ましくは15 mM ~ 50 mMの範囲であり、またpH 6.0 ~ 9.5、特に好ましくはpH 7.0 ~ 9.2の範囲の

50

ものが使用される。例えば、22 mM ~ 46 mMのトリシンを含有するpH 7.5 ~ 9.2のバッファー、25 mM ~ 50 mMのリン酸カリウムを含有するpH 7.0 ~ 8.0のバッファー、16 mM ~ 40 mMのヘPes - 水酸化カリウムを含有するpH 7.0 ~ 8.0のバッファーが好適に使用できる。また、マグネシウム塩としては、特に限定はないが、例えば、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウムあるいは硫酸マグネシウムが好適に使用でき、その濃度は、最終濃度で1 mM ~ 20 mM、特に好ましくは2 mM ~ 10 mMの範囲である。また、カリウム塩を含んでいても良く、例えば酢酸カリウムの場合、最終濃度で80 mM ~ 120 mMの範囲が好ましい。さらに、DNA伸長反応の基質となるdNTPs (dATP、dCTP、dGTP、dTTP混合物)は、最終濃度で、それぞれ0.1 mM ~ 3.0 mM、特に好ましくは0.2 mM ~ 1.2 mMの範囲である。使用するプライマーの量は、反応液量50 µl当たり1 pmol ~ 1000 pmolの範囲であり、特に10 pmol ~ 150 pmolの範囲が好ましい。さらに、反応液中には増幅反応の安定化等を目的とした添加物を共存させることができ、それぞれ最終濃度として0.1%以下のウシ血清アルブミン(BSA)、10%以下のジメチルスルホキシド(DMSO)、4 mM以下のプトレスシン2塩酸塩あるいは0.01%以下のプロピレンジアミンを添加してもよい。この他、NMP(1-メチル-2-ピロロリジノン)、グリセロール、ポリエチレングリコール、ジメチルスルホキシドおよび/またはホルムアミドを含んでもよく、これらの有機溶媒の添加により、オリゴヌクレオチドプライマーの非特異的なアニーリングが軽減されることが期待される。

10

20

30

40

50

【0049】

本明細書において、鋳型となる核酸、すなわちDNAまたはRNAは、当該核酸を含む可能性のあるあらゆる試料から調製、あるいは単離したものでよい。さらに、上記試料を直接、本発明の核酸増幅反応に使用してもよい。このような核酸を含む試料には特に限定はないが、例えば、全血、血清、パフィーコート、尿、糞便、脳脊髄液、精液、唾液、組織(例えば、癌組織、リンパ節等)、細胞培養物(例えば、哺乳動物細胞培養物及び細菌培養物等)のような生体由来試料、ウイロイド、ウイルス、細菌、カビ、酵母、植物及び動物のような核酸含有試料、ウイルス又は細菌のような微生物が混入もしくは感染している可能性のある試料(食品、生物学的製剤等)、あるいは土壌、排水のような生物を含有する可能性のある試料が挙げられる。また、前記試料等を公知の方法で処理することによって得られる核酸含有調製物であっても良い。該調製物としては、例えば細胞破碎物やそれを分画して得られる試料、該試料中の核酸、あるいは特定の核酸分子群、例えば、mRNAを富化した試料等が本発明に使用できる。さらに上記試料中に含まれる核酸が公知方法で増幅されたDNAあるいはRNA等の核酸等も好適に使用できる。

【0050】

これら材料からの核酸含有調製物の調製には特に限定はなく、例えば、界面活性剤による溶解処理、超音波処理、ガラスビーズを用いた振盪攪拌、フレンチプレスの使用等により行うことができる。幾つかの例においては、さらに操作を加えて核酸を精製することが有利である(例えば、内在性ヌクレアーゼが存在するとき)。これらの例において、核酸の精製はフェノール抽出、クロマトグラフィー、イオン交換、ゲル電気泳動または密度勾配遠心分離等の公知方法により実施される。

【0051】

本発明に使用される核酸増幅反応としては、特に限定されるものではないが、PCR法、LCR法、SDA法、改良SDA法、LAMP法、ICAN法など公知の核酸増幅方法を使用することができ、好適にはICAN法が使用できる。

【0052】

RNA由来の配列を有する核酸を増幅したい場合には、当該RNAを鋳型とした逆転写反応によって合成されたcDNAを鋳型として本発明の方法を実施すればよい。本発明の方法に適用することができるRNAには、逆転写反応に使用されるプライマーが作製可能なものであれば特に制限はなく、試料中の全RNAの他、mRNA、tRNA、rRNA等のRNA分子群、あるいは特定のRNA分子種が挙げられる。

【0053】

(2) 本発明のキット

本発明は、標的遺伝子の核酸の増幅あるいは検出方法に使用されるキットを提供する。1つの実施態様において、該キットは、パッケージされた形態において、本発明の方法におけるDNAポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼの使用のための指示書を含むことを特徴とする。さらに、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼならびに鎖置換反作用緩衝液を含むキットは本発明の方法に好適に使用される。あるいは、市販の鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼおよび/またはエンドヌクレアーゼを指示書に従って選択し、使用してもよい。さらに、RNAを鋳型とする場合の逆転写反作用試薬を含んでもよい。

10

【0054】

上記「指示書」とは、当該キットの使用法、例えば本発明の方法のための試薬液の調製方法、推奨される反応条件等を記載した印刷物であり、パンフレットまたはリーフレット形式の取り扱い説明書のほか、キットに添付されたラベル、キットが納められたパッケージ等に記載されたものを含む。さらに、インターネットのような電子媒体を通し、開示、提供された情報も含まれる。

【0055】

さらに、本発明のキットにおいては、ピシン、トリシン、ヘペス、リン酸塩あるいはトリス緩衝成分を含有する反応バッファー、及びアニーリング溶液が含まれていてもよい。また、鎖置換能を有するDNAポリメラーゼやRNase Hが含まれていてもよい。さらに、修飾されたデオキシリボヌクレオチドあるいはデオキシヌクレオチド3リン酸のアナログを含有していてもよい。

20

【0056】

さらに、標的核酸の検出方法に使用されるキットは、上記の指示書、増幅反応のための試薬類の他、標的核酸の増幅に適したキメラオリゴヌクレオチドプライマー、Sensibile decoy、増幅された標的核酸を検出するための試薬、例えばプローブ等を含むものであってもよい。

また、本発明のキットは、上記の本発明に使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマー、Sensibile decoy、及び/又は本発明のプローブを含有するキットも包含する。

30

【0057】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

なお、以下の実施例において用いた合成DNAは、ABI社の合成機によって製造した。ICAN法は、国際公開第02/16639号パンフレット記載の方法で行った。また、本発明で用いたAfu(Archaeoglobus fulgidus)由来RNase Hは、国際公開第02/22831号パンフレット記載の方法で調製した。

【0058】

実施例1 Sensibile decoyによるICAN法におけるICAN増幅試薬ミックスチャーの安定化

40

実施例1

(1) クラミジア/リン菌遺伝子のICAN法による増幅における室温放置での増幅試薬ミックスチャーの安定化の検討

クラミジア(CT) cryptic plasmid領域より、センスプライマー(配列番号1)および5'末端をピオチン標識したアンチセンスプライマー(配列番号2)を設計、合成した。また、Sensibile decoyとして、3'末端をアミノ修飾したセンスプライマー(配列番号3)および3'末端をアミノ修飾したアンチセンスプライマー(配列番号4)を設計、合成した。

リン菌(NG)cppB遺伝子より、センスプライマー(配列番号5)および5'末端を

50

ビオチン標識したアンチセンスプライマー（配列番号6）を設計、合成した。また、S e n s i b l e d e c o y として、3'末端をアミノ修飾したセンスプライマー（配列番号7）および3'末端をアミノ修飾したアンチセンスプライマー（配列番号8）を設計、合成した。

【0059】

上記プライマーのみを含む増幅試薬ミクスチャー、およびプライマーおよびS e n s i b l e d e c o y を含む増幅試薬ミクスチャーをそれぞれ調製した。以下の表1にその組成を示す。（18反応あたりの容量を表示）

【0060】

【表1】

10

表1

	増幅試薬A	増幅試薬B
5×反応緩衝液(pH7.8)	180 μ l	180 μ l
10mM dNTP	45 μ l	45 μ l
プライマーCT-1F (100 μ M)	9 μ l	9 μ l
プライマーCT-1R (100 μ M)	9 μ l	9 μ l
プライマーNG-1F (100 μ M)	9 μ l	9 μ l
プライマーNG-10R (100 μ M)	9 μ l	9 μ l
S e n s i b l e d e c o y CT-1FC (100 μ M)	—	9 μ l
S e n s i b l e d e c o y CT-1RC (100 μ M)	—	9 μ l
S e n s i b l e d e c o y NG-1FC (100 μ M)	—	9 μ l
S e n s i b l e d e c o y NG-1RC (100 μ M)	—	9 μ l
Afu RNaseHII(17.5U/ μ l)	4.5 μ l	4.5 μ l
BcaBEST DNA ポリメラーゼ(22U/ μ l)	3.6 μ l	3.6 μ l
H ₂ O	120.9 μ l	84.9 μ l
計	390 μ l	390 μ l

20

30

40

【0061】

この増幅試薬に40 μ lの90mM酢酸マグネシウム液および20 μ lの内部標準（I n t e r n a l c o n t r o l）DNA（0.9pg/ μ l）を加え、室温に70分間放置した。その後、1反応あたり25 μ lずつ分注し、等容量のテンプレートDNAを加え

50

、変性・アニーリング操作をすることなく55℃、1時間の増幅反応を行った。増幅後、固層プレート発光法により増幅産物を検出した。以下の表2に結果を示す。

【0062】

【表2】

表2

	発光強度 (RLU)					
	増幅試薬A			増幅試薬B		
	CT	NG	IC	CT	NG	IC
0コピーCT/NG	7	8	33	2	9	1063
10コピーNG	5	1	1	10	2494	733
100コピーNG	5	1	1	5	4156	32
100コピーCT	1	1	1	5000	15	625
1000コピーCT	1	1	1	5000	7	32

10

20

【0063】

表2に示したように、増幅試薬A(従来法)では増幅不良を起こし目的の遺伝子を検出することができなかった。一方、増幅試薬Bでは安定した増幅反応を示し、目的遺伝子を検出することが可能であった。すなわち、本発明の方法が増幅反応の安定化に寄与することが確認できた。

【0064】

(2)クラミジア/リン菌遺伝子のICAN法による増幅における冷蔵での増幅試薬ミックスチャーの安定化の検討

上記実施例1(1)と同様の方法で、増幅試薬A、Bそれぞれに40μlの90mM酢酸マグネシウム液および20μlの内部標準DNA(0.9pg/μl)を加え、4℃、1週間保存し、冷蔵保存試験を行った。以下の表3に結果を示す。

30

【0065】

【表3】

表 3

	発光強度 (RLU)					
	増幅試薬 A			増幅試薬 B		
	CT	NG	IC	CT	NG	IC
0コピーCT/NG	1	1	1	1	8	1337
10コピーNG	2	1993	48	11	1247	172
100コピーNG	10	4508	58	10	2526	121
100コピーCT	4141	7	8	5000	7	670
1000コピーCT	5000	2	3	5000	3	3

10

【0066】

表3に示したように、増幅試薬Aにおいては目的遺伝子CTおよびNGの検出は可能であったが、IC(内部標準)の増幅不良を起こし、0コピー区画においてさえICは検出されなかった。一方、増幅試薬Bにおいては変性・アニーリング操作をすることなく安定した増幅を示し、全て目的遺伝子を検出することができた。すなわち、本発明の方法が、低温、長期期間の保存・安定化に好適であることが確認できた。

20

【0067】

実施例2 クラミジア/リン菌遺伝子のICAN法による増幅における再現性の改善
 上記実施例1(1)と同様の方法で増幅試薬Aと増幅試薬Bそれぞれに40μlの90mM酢酸マグネシウム液および20μlの内部標準DNA(0.9pg/μl)を加え、低コピー数のCT, NGテンプレートを用いて変性・アニーリング操作をすることなく10回の反応を行い同時再現性を比較した。以下の表4に結果を示す。

【0068】

30

【表4】

表4

	陽性判定性	
	増幅試薬A	増幅試薬B
10コピーNG	5/10	10/10
100コピーNG	10/10	10/10
100コピーCT	3/10	10/10
1000コピーCT	10/10	10/10

40

【0069】

表4に示したように、本発明のSensible decoyを含む増幅試薬Bの方が良好な再現性が得られた。

【0070】

実施例3 HPV6、11遺伝子ICAN増幅における増幅の安定化

50

HPV6 遺伝子より、5'末端をビオチン標識したセンスプライマー（配列番号9）およびアンチセンスプライマー（配列番号10）を設計、合成した。また、Sensible decoyとして、3'末端をアミノ修飾したセンスプライマー（配列番号12）および3'末端をアミノ修飾したアンチセンスプライマー（配列番号13）を設計、合成した。

HPV11 遺伝子より、アンチセンスプライマー（配列番号11）を設計、合成した。センスプライマーは、HPV6 遺伝子の5'末端をビオチン標識したセンスプライマー（配列番号9）を用いた。また、Sensible decoyとして、3'末端をアミノ修飾したアンチセンスプライマー（配列番号14）を設計、合成した。センスプライマーは、HPV6 遺伝子の3'末端をアミノ修飾したセンスプライマー（配列番号12）を用いた。 10

【0071】

上記実施例1-(1)と同様の方法で、Sensible decoyを含まない増幅試薬A、Sensible decoyを含む増幅試薬Bを調製し、それぞれに40 μ lの90mM酢酸マグネシウム液および20 μ lの内部標準DNA(0.9pg/ μ l)を加え、変性・アニーリング操作することなく等温増幅させた。以下の表5に結果を示す。

【0072】

【表5】

表5

サンプル	発光強度 (RLU)	
	増幅試薬A	増幅試薬B
100コピー-HPV6	1	1650
1000コピー-HPV6	3012	3999
100コピー-HPV11	4	1915
1000コピー-HPV11	2373	2901

20

30

【0073】

表5に示したようにHPV6、11DNAの増幅を比較した結果、本発明の方法を用いることにより低コピー数での増幅に改善が認められた。

【0074】

【発明の効果】

上記の、本発明のオリゴヌクレオチド(Sensible decoy)を使用する遺伝子増幅方法は、中程度高温における等温遺伝子増幅方法に有用である。また、本発明の方法は、増幅試薬の保存・安定化方法として有効である。 40

【0075】

【配列表フリーテキスト】

SEQ ID NO:1 ; Chimeric oligonucleotide to detect Chlamydia trachomatis cryptic plasmid gene. "Nucleotides 19 to 22 are ribonucleotides - other nucleotides are deoxyribonucleotides."

SEQ ID NO:2 ; Chimeric oligonucleotide to detect Chlamydia trachomatis cryptic plasmid gene. "Nucleotides 16 to 18 are r 50

ribonucleotides - other nucleotides are deoxyribonucleotides, and 5' end is labeled by biotin."

SEQ ID NO:3 ; The 3'-OH group of nucleotide at 3' end is protected with amino group.

SEQ ID NO:4 ; The 3'-OH group of nucleotide at 3' end is protected with amino group.

SEQ ID NO:5 ; Chimeric oligonucleotide to detect *Neisseria gonorrhoea* cppB gene. "Nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides - other nucleotides are deoxyribonucleotides." 10

SEQ ID NO:6 ; Chimeric oligonucleotide to detect *Neisseria gonorrhoea* cppB gene. "Nucleotides 15 to 17 are ribonucleotides - other nucleotides are deoxyribonucleotides, and 5' end is labeled by biotin." 20

SEQ ID NO:7 ; The 3'-OH group of nucleotide at 3' end is protected with amino group.

SEQ ID NO:8 ; The 3'-OH group of nucleotide at 3' end is protected with amino group.

SEQ ID NO:9 ; Chimeric oligonucleotide to detect HPV6 gene. "Nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides - other nucleotides are deoxyribonucleotides, and 5' end is labeled by biotin." 30

SEQ ID NO:10 ; Chimeric oligonucleotide to detect HPV6 gene. "Nucleotides 20 to 22 are ribonucleotides - other nucleotides are deoxyribonucleotides." 30

SEQ ID NO:11 ; Chimeric oligonucleotide to detect HPV11 gene. "Nucleotides 20 to 22 are ribonucleotides - other nucleotides are deoxyribonucleotides." 30

SEQ ID NO:12 ; The 3'-OH group of nucleotide at 3' end is protected with amino group. 40

SEQ ID NO:13 ; The 3'-OH group of nucleotide at 3' end is protected with amino group.

SEQ ID NO:14 ; The 3'-OH group of nucleotide at 3' end is protected with amino group.

【0076】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> The stabilization method of a gene amplification reagent

10

<130> T-1819

<140>

<141>

<160> 14

20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect Chlamydia trachomatis cryptic plasmid gene. "Nucleotides 19 to 22 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

<400> 1

tcctgtgacc ttcattatgu ca

22

40

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect Chlamydia trachomatis cryptic plasmid gene. "Nucleotides 16 to 18 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides, and 5' end is labeled by biotin."

10

<400> 2

cggagtacaa acgccuag

18

20

<210> 3

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The 3'-OH group of nucleotide at 3' end is protected with amino group.

30

<400> 3

ataatgaagg

10

<210> 4

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The 3'-OH group of nucleotide at 3' end is protected with amino group.

10

<400> 4

ggcgtttgta

10

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect Neisseria gonorrhoea cppB gene.

"Nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

30

<400> 5

cttggcttca atgcctcguu

20

<210> 6

<211> 17

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect *Neisseria gonorrhoea* cppB gene.

"Nucleotides 15 to 17 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides, and 5' end is labeled by biotin."

10

<400> 6

cgaaagccgcc agcauag

17

<210> 7

<211> 10

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The 3'-OH group of nucleotide at 3' end is protected with amino group.

30

<400> 7

gaggcatiga

10

<210> 8

<211> 10

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The 3'-OH group of nucleotide at 3' end is protected with amino group.

<400> 8

tgctggcggc

10

10

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect HPV6 gene. "Nucleotides 18 to 20 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides, and 5' end is labeled by biotin."

<400> 9

igcctacact gctggacaac

20

30

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect HPV6 gene. "Nucleotides 20 to 22 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

<400> 10

gttgcaggtc taatacaata uc

22

10

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Chimeric oligonucleotide to detect HPV11 gene. "Nucleotides 20 to 22 are ribonucleotides- other nucleotides are deoxyribonucleotides."

20

<400> 11

gctgcaggtc tagtactata uc

22

<210> 12

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> The 3'-OH group of nucleotide at 3' end is protected with amino group.

40

<400> 12

gtccagcagt

10

<210> 13

<211> 10

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The 3'-OH group of nucleotide at 3' end is protected with amino group.

<400> 13

atgtattag

10

20

<210> 14

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> The 3'-OH group of nucleotide at 3' end is protected with amino group.

<400> 14

atagtactag

10

40