

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] （参考）
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 G 0 5 2
1/28		21/78	C 2 G 0 5 4
21/78		37/00	102
37/00	102	1/28	J

審査請求 未請求 予備審査請求（全157数）

(21)出願番号	特願2000－611050(P2000－611050)	(71)出願人	ナノゲン / ベクトン・ディッキンソン・パートナーシップ NANOGEN / BECTON DICKINSON PARTNERSHIP アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、パシフィック・センター・コート10398番
(86)(22)出願日	平成12年4月11日(2000.4.11)	(72)発明者	マイケル・アイ・ネレンバーク アメリカ合衆国92037カリフォルニア州ラ・ホラ、ギルマン・コート8178番
(85)翻訳文提出日	平成13年10月12日(2001.10.12)	(74)代理人	弁理士 青山 葆 （外1名）
(86)国際出願番号	PCT/US00/09711		
(87)国際公開番号	W000/62036		
(87)国際公開日	平成12年10月19日(2000.10.19)		
(31)優先権主張番号	09/290,632		
(32)優先日	平成11年4月12日(1999.4.12)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 鎖置換増幅およびバイオエレクトロニック・マイクロチップ技術を用いる核酸配列の増幅および分離

(57)【要約】

マイクロエレクトロニック・マイクロチップ技術と組合せて新規な鎖置換増幅技術を用いる試料中の核酸配列を多重増幅および分析するための事項のデバイス、方法および組成物を記載し、開示する。詳細には、試料中の核酸を増幅させてアンプリコンを形成させ、該アンプリコンをバイオエレクトロニック・マイクロチップの特定の電子的にアドレス指定可能な捕捉部位にアドレス指定し、該アドレス指定したアンプリコンを捕捉し標識し、ついで、該捕捉部位を標識の存在について分析する。試料は鎖置換増幅を用いて増幅し得る。また、本発明は、当業者によく知られている他の増幅法にも従う。捕捉および標識工程は、配列特異的レポーターを用いるユニバーサル捕捉の方法、またはユニバーサル・レポーターを用いる配列特異的捕捉の方法によって行い得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a. 関心のある標的核酸の少なくとも1を複数の電子的にアドレス指定可能な捕捉部位を有するバイオエレクトロニック・マイクロチップに導入し；

b. 該標的核酸を増幅させて該標的核酸のアンプリコンを形成させ；

c. 該アンプリコンを該マイクロチップの該複数の電子的にアドレス指定可能な捕捉部位のうちのいずれかにアドレス指定し；

d. 該アンプリコンに対して特異性を有する捕捉プローブによって、(c)の特定した電子的にアドレス指定可能な捕捉部位に該アンプリコンを捕捉させ；ついで

e. 該捕捉されたアンプリコンの存在を検出する
工程を含むバイオエレクトロニック・マイクロチップを用いて関心のある標的核酸を増幅、多重アッセイ、および検出する方法。

【請求項2】 標的核酸の増幅を鎖置換増幅によって行う請求項1記載の方法。

【請求項3】 (c)におけるアンプリコンのアドレス指定を、受動的ハイブリダイゼーションによって行う請求項1記載の方法。

【請求項4】 (c)におけるアンプリコンのアドレス指定を、該捕捉部位の電子的バイアスによって行う請求項1記載の方法。

【請求項5】 標的核酸の増幅を、鎖置換増幅、対立遺伝子一特異的鎖置換増幅、核酸配列ベース増幅、および連結ベース鎖置換増幅よりなる群から選択される方法のうちの少なくとも1によって行う請求項1記載の方法。

【請求項6】 標的核酸の増幅をPCRによって行う請求項1記載の方法。

【請求項7】 該増幅を切断不可能プライマーを用いて一部分行う請求項1記載の方法。

【請求項8】 該増幅、多重アッセイおよび検出を、互いに連続的または同時のいずれかで行う請求項1記載の方法。

【請求項9】 アンプリコンの検出を、蛍光、化学ルミネセンス、エレクトロ化学ルミネセンスのうちの少なくとも1によって行う請求項1記載の方法。

【請求項10】 関心のある標的核酸が、血液、唾液、大便、組織、培地、精液、毛髪、尿、食物、水、ならびに血液、唾液、大便、組織、培地、精液、毛髪、尿、食物および水のうちの少なくとも1を接種した培養液よりなる群から選択される起源由来である請求項1記載の方法。

【請求項11】 関心のある核酸が、細菌、ウイルス、ヒト、動物、または植物よりなる群から選択される起源由来である請求項1記載の方法。

【請求項12】 a. 関心のある標的核酸のうちの少なくとも1を、複数の電子的にアドレス指定可能な捕捉部位を有するバイオエレクトロニック・マイクロチップに導入し；

b. 該関心のある標的核酸を該捕捉部位のうちの少なくとも1に電子的にアドレス指定し；

c. 該標的核酸を増幅させて、該標的核酸のアンプリコンを形成させ；

d. 該標的核酸の該アンプリコンを、該アンプリコンに特異性を有する捕捉プローブによって該マイクロチップの特定の捕捉部位に捕捉させ；ついで

e. 該捕捉されたアンプリコンの存在を検出する

工程を含むバイオエレクトロニック・マイクロチップを用いて関心のある標的核酸を増幅、多重アッセイ、および検出する方法。

【請求項13】 標的核酸の増幅を鎖置換増幅によって行う請求項12記載の方法。

【請求項14】 標的核酸の増幅を、鎖置換増幅、対立遺伝子一特異的鎖置換増幅、核酸配列ベース増幅、および連結ベース鎖置換増幅よりなる群から選択される少なくとも1の方法によって行う請求項12記載の方法。

【請求項15】 標的核酸の増幅をPCRによって行う請求項12記載の方法。

【請求項16】 該増幅を切断不可能プライマーを用いて一部分行う請求項12記載の方法。

【請求項17】 該増幅、多重アッセイおよび検出を、互いに連続的または同時のいずれかで行う請求項12記載の方法。

【請求項18】 アンプリコンの検出を、蛍光、化学ルミネセンス、および

エレクトロ化学ルミネセンスのうちの少なくとも1によって行う請求項12記載の方法。

【請求項19】 関心のある標的核酸が、血液、唾液、大便、組織、培地、精液、毛髪、尿、食物、水、ならびに血液、唾液、大便、組織、培地、精液、毛髪、尿、食物および水のうちの少なくとも1を接種した培養液よりなる群から選択される起源由来である請求項12記載の方法。

【請求項20】 関心のある核酸が、細菌、ウイルス、ヒト、動物、または植物よりなる群から選択される起源由来である請求項12記載の方法。

【請求項21】 a. 試料をマイクロチップに導入し；

b. つづく試料を導入する前に、該順次導入した試料の各々を核酸増幅反応に付して、該試料に含まれる特定の核酸のアンプリコンを形成させ；

c. (b)における各導入した試料から形成された該アンプリコンを、各次の試料を導入する前に、その個々の固定化用の特定の該捕捉部位によって捕捉させ；

d. 工程(a)、(b)および(c)の該試料の添加、増幅、および捕捉の後に、該試料のいずれかに由来する固定化アンプリコンに特異性を有する標識を該マイクロチップに導入し；ついで

e. 標識アンプリコンの存在を検出する

工程を含む複数の電子的にアドレス指定可能な捕捉部位を有する単一オープンアレイの電子的にアドレス指定可能なマイクロチップで複数試料中の特異的核酸配列を検出する方法。

【請求項22】 該(b)の増幅反応が、PCR増幅、鎖置換増幅、対立遺伝子-特異的鎖置換増幅、核酸配列ベース増幅、および連結ベース鎖置換増幅よりなる群から選択される請求項21記載の方法。

【請求項23】 該試料を順次に導入および増幅させる請求項22記載の方法。

【請求項24】 該(c)におけるアンプリコンの捕捉を、受動的ハイブリダイゼーションによって行う請求項21記載の方法。

【請求項25】 該(c)におけるアンプリコンの捕捉を、該捕捉部位の電

子のバイアスによって行う請求項21記載の方法。

【請求項26】 該標識が複数の標識オリゴヌクレオチドを含み、ここに該オリゴヌクレオチドの各々が該固定化アンプリコンのうちのいずれか1に相補的なヌクレオチド配列を有する請求項21記載の方法。

【請求項27】 該標識が標識オリゴヌクレオチドのセットを含み、ここに各セットが特異的試料に相補的なヌクレオチド配列を有し、さらに、該セットを順次該マイクロチップに導入し、その個々の固定化アンプリコンを含む捕捉部位に連続的かつ電子的にアドレス指定する請求項21記載の方法。

【請求項28】 該標識が標識オリゴヌクレオチドのセットを含み、ここに各セットが特異的試料に相補的なヌクレオチド配列を有し、さらに該セットを該マイクロチップに順次に導入してその個々の固定化アンプリコンを含む捕捉部位に受動的に捕捉させる請求項21記載の方法。

【請求項29】 該増幅、捕捉および検出を、互いに連続的または同時のいずれかで行う請求項21記載の方法。

【請求項30】 標識アンプリコンの存在を蛍光、化学ルミネセンス、およびエレクトロ化学ルミネセンスのうちの少なくとも1によって検出する請求項21記載の方法。

【請求項31】 該試料が、血液、唾液、大便、組織、培地、精液、毛髪、尿、食物、水、ならびに血液、唾液、大便、組織、培地、精液、毛髪、尿、食物および水のうちの少なくとも1を接種した培養液よりなる群から選択される起源由来である請求項21記載の方法。

【請求項32】 関心のある核酸が、細菌、ウイルス、ヒト、動物、または植物よりなる群から選択される起源由来である請求項21記載の方法。

【請求項33】 a. 各試料を核酸増幅反応に付して、該試料の各々に含まれる特定の核酸のアンプリコンを形成させ；

b. 該反応の後に、該試料の各々を該マイクロチップに導入し；

c. つづく導入試料の導入の前に、(b)の導入した試料の各々を、特定の電子的にアドレス指定可能な捕捉部位への該試料の電子的指向化アドレス指定に付し；

- d. (c) の電子的指向化試料を捕捉部位に固定化し；
 - e. (d) における該試料の固定化後に、該試料のうちのいずれかに由来する固定化アンプリコンに特異性を有する標識を該マイクロチップに導入し；ついで
 - f. 標識したアンプリコンの存在を検出する
- 工程を含む複数の電子的にアドレス指定可能な捕捉部位を有する単一オープン・アレイの電子的にアドレス指定可能なマイクロチップで複数の試料中の特異的核酸配列を検出する方法。

【請求項34】 該(a)の増幅反応が、PCR増幅、鎖置換増幅、対立遺伝子一特異的鎖置換増幅、核酸配列ベース増幅、および連結ベース鎖置換増幅よりなる群から選択される請求項33記載の方法。

【請求項35】 該試料を順次に導入し、増幅させる請求項33記載の方法。

【請求項36】 該標識が複数の標識オリゴヌクレオチドを含み、ここに各オリゴヌクレオチドが該固定化アンプリコンのうちのいずれか1に相補的なヌクレオチド配列を有する請求項33記載の方法。

【請求項37】 該標識が標識オリゴヌクレオチドのセットを含み、ここに各セットが特異的な試料に相補的なヌクレオチド配列を有し、さらに該セットを該マイクロチップに順次に導入し、その個々の固定化アンプリコンを含有する捕捉部位に電子的にアドレス指定する請求項33記載の方法。

【請求項38】 該標識が標識オリゴヌクレオチドのセットを含み、ここに各セットが特異的な試料に相補的なヌクレオチド配列を有し、さらに該セットを該マイクロチップに順次に導入し、その個々の固定化アンプリコンを含有する捕捉部位に受動的に捕捉させる請求項33記載の方法。

【請求項39】 該増幅、捕捉および検出を、互いに連続的または同時のいずれかで行う請求項33記載の方法。

【請求項40】 標識アンプリコンの存在を、蛍光、化学ルミネセンス、およびエレクトロ化学ルミネセンスのうちの少なくとも1によって検出する請求項33記載の方法。

【請求項41】 該試料が、血液、唾液、大便、組織、培地、精液、毛髪、

尿、食物、水、ならびに血液、唾液、大便、組織、培地、精液、毛髪、尿、食物および水のうちの少なくとも1を接種した培養液よりなる群から選択される起源由来である請求項33記載の方法。

【請求項42】 関心のある核酸が、細菌、ウイルス、ヒト、動物、または植物よりなる群から選択される起源由来である請求項33記載の方法。

【請求項43】 a. 関心のある標的核酸を電子的にアドレス指定可能なマイクロチップと接触させ、ここに該マイクロチップは電子的バイアスに感受性である複数の捕捉部位を有し；

b. 該電子的バイアスを用いて、該標的核酸が該標的核酸の塩基配列の相補的塩基配列を有する核酸プローブと接触およびハイブリダイズするように該捕捉部位にすぐ近くに該標的核酸を輸送および濃縮し、ここに該プローブはさらに該部位に共有結合または非共有結合のいずれかで結合し；

c. 鎖置換増幅プライマーのセットを用いて鎖置換増幅反応を行って、該標的核酸の増幅産物を形成させ、ここに該プライマーのセットはプライマーの対を含み、その該対の各々は該標的の核酸配列の反対の鎖に相補的な配列を有し、さらに該プライマーは（1）該部位に位置する該核酸プローブ、（2）係留鎖置換増幅プライマー、（3）分岐鎖置換増幅プライマー、（4）非分岐鎖置換増幅プライマー、（5）連結ベース鎖置換増幅プライマー、（6）切断不可鎖置換増幅プライマー、（7）係留分岐鎖置換増幅プライマー、（8）係留非分岐鎖置換増幅プライマー、（9）係留連結ベース鎖置換増幅プライマー、および（10）係留切断不可鎖置換増幅プライマーよりなる群から選択され；ついで

d. 該増幅産物を検出し、ここに該産物の検出を（1）該産物に結合するであろう標識レポーター分子を準備し、（2）該産物に結合するであろう蛍光色素で標識した分子を準備し、（3）該産物に結合するであろう化学ルミネセンス・レポーターで標識した分子を準備し、および（4）該産物に結合するであろうエレクトロ化学ルミネセンス・レポーターで標識した分子を準備するよりなる群から選択される方法によって行い、さらに該方法が1、2、または4のいずれかの該標識またはレポーターの存在の観察を含む

ことよるなる関心のある複数の標的核酸の多重増幅および検出の方法。

【請求項44】 該増幅および検出を互いに連続的または同時のいずれかで行う請求項43記載の方法。

【請求項45】 該増幅を切断不可プライマーを用いて一部分行う請求項43記載の方法。

【請求項46】 a. 第V因子、ヘモクロマトーシスまたは細菌に特異的な1またはそれを超えるオリゴヌクレオチド、ここに該オリゴヌクレオチドは配列番号：1-62よりなる群から選択される増幅プライマー、バンパー・プライマー、捕捉プローブ、および／またはシグナル・プローブを含むを含むバイオエレクトロニック・マイクロチップと組合せてSDA反応を行うためのキット。

【請求項47】 該シグナル・プローブが検出可能な標識で標識されている請求項46記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明は、能動的、多段階および多重の核酸配列の分離、増幅および診断分析を行うための事項のデバイス、方法および組成物に関する。一般的に、それは、試料中の核酸配列の増幅および分析用の事項のデバイス、方法および組成物に関する。より詳細には、本発明は、バイオエレクトロニック・マイクロチップ技術と組合せた新規な鎖置換増幅技術を用いて核酸を増幅および分析するための事項の方法、デバイスおよび組成物に関する。本発明のデバイスおよび方法は、種々の適用に有用であり、これには、例えば疾病診断（感染性ほか）、遺伝子解析、農業および環境適用、薬剤の発見、ファーマコゲノミクス、ならびに食物および／または水のモニターおよび分析が含まれる。

【0002】**発明の背景**

以下の記載は、本発明に関する情報の概要を提供する。本明細書中に提供するいずれかの情報がここに特許請求する発明に対して先行技術となることも、特異的または潜在的に参照するいずれかの刊行物がその発明に対して先行技術となることも許されない。

【0003】**定義**

本発明の以下の記載には、本明細書中で用いている本発明の分野に特異的な膨大な技術用語を含めた。一般的に、これらの用語の意味は当業者に知られており、以下にさらに記載する：

【0004】

本明細書中で用いる“試料”とは、関心のある1またはそれを超える核酸の存在につきアッセイする物質をいう。関心のある核酸または核酸群は他の核酸の混合物中に存在し得る。関心のある核酸を含有する試料は、多くの方法で得ることができる。以下のものが試料を表すと想定される：細胞ライゼート、精製ゲノミックDNA、ヒトまたは動物からのごとき体液、臨床試料、食物試料、他。

【0005】

本明細書中で用いる“標的核酸”および“標的配列”なる語句は、相互交換可能に用いる。両方の語句とも核酸配列をいい、その存在または不存在が検出に望まれる。標的核酸は一本鎖または二本鎖とし得、二本鎖の場合には、本明細書中に記載する方法または他のよく知られている方法を用いてそれを検出する前に、一本鎖形態に変性し得る。さらに、標的核酸は大部分の顕著なDNAまたはRNAのいずれの形態の核酸ともなり得る。

【0006】

本明細書中で用いる“増幅”とは、関心のある特定の核酸標的のコピー数における増加をいい、ここに該コピーは“アンプリコン”または“増幅産物”とも呼ばれる。

本明細書中で用いる“増幅成分”とは、関心のある標的核酸のアンプリコンまたは増幅産物を形成する増幅反応を行うために必要な酵素、緩衝液および核酸のごとき反応材料をいう。

本明細書中で用いる“多重増幅”なる語句は、関心のある1を超える核酸の増幅をいう。例えば、それは、同一試料からの複数の配列の増幅または試料中の幾つかの配列のうちの1の増幅をいうことができ、これは出典明示して本明細書の一部とみなす、米国特許第5,422,252号および第5,470,723号に記載されている。その語句は、同時または段階を追う様式のいずれかで複数の試料中に存在する1またはそれを超える配列の増幅をもいう。

【0007】

本明細書中で用いる“オリゴヌクレオチド”とは、2またはそれを超える、好ましくは3を超えるデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含む分子をいう。オリゴヌクレオチドの長さは、それをいかにして用いるかに依存するであろう。オリゴヌクレオチドは、合成またはクローニングに由来し得る。オリゴヌクレオチドは、タンパク質核酸(PNA)をも含み得る。

【0008】

本明細書中で用いる“プローブ”とは、標的核酸に選択的に結合することができる、知られている配列の核酸をいう。より詳細には、“プローブ”とは、選択

したストリンジェントな条件下で当該プローブと核酸鎖がハイブリダイズするように、プローブ (probe) される核酸の1の鎖の配列に十分に相補的に設計されたオリゴヌクレオチドをいう。特異的な型のオリゴヌクレオチド・プローブを本発明の種々の具体例で用いる。例えば、“連結プローブ”とは、関心のある標的核酸および増幅プローブの双方に結合するように設計された1の型のプローブを記載する。さらに、“連結したプローブ”または“連結したプローブ・テンプレート”とは、一対の連結プローブの間の連結反応の最終産物をいう。

【0009】

本明細書中で用いる“プライマー分子”および“プライマー”なる語は、相互交換可能に用いる。プライマーは、“ブロック”されてさらなる核酸に共有結合し得ないか、またはブロックされておらず、DNAポリメラーゼまたは逆転写酵素によって触媒されるごとき核酸鎖の伸長を許容する3'末端の化学基を有するか、のいずれかの3'末端を有する核酸分子である。

【0010】

本明細書中で用いる“増幅プライマー”なる語句は、標的核酸配列を増幅するために用いるオリゴヌクレオチド・プライマーをいう。

本明細書中で用いる“プライマー伸長”なる語句は、遊離3'-プライム (3') ヒドロキシル基からの核酸鎖のDNAポリメラーゼ誘導伸長をいい、それによって反対鎖に相補的な核酸の鎖を生成する。

本明細書中で用いる“アンプリコン”なる語は、増幅反応の産物をいう。用いた両方のプライマーが標的配列にハイブリダイズする場合には、増幅した核酸も含み得る。用いたプライマーのうちの1が標的配列にハイブリダイズしない場合には、アンプリコンは増幅した核酸を含み得ない。したがって、この用語は一般的に本明細書中で用い、増幅した核酸の存在を意味しない。

本明細書中で用いる“電子的にアドレス指定可能な”とは、核酸および酵素ならびに他の増幅成分のごとき材料を、マイクロチップの捕捉部位の電子的バイアスによってマイクロチップ上の1の位置からもう1の位置に指向させるマイクロチップの能力をいう。“電子的バイアス”とは、マイクロチップ上の捕捉部位または他の位置における電荷を、溶液中のマイクロチップと接触している帯電分子

がマイクロチップ上の1の位置に向けてもしくはそこから離れてまたは1の位置からもう1の位置に指向され得るように、正味プラスおよび正味マイナスの電荷の間で操作し得ることを意味する。

【0011】

本明細書中で用いる“捕捉部位”なる語句は、電子的にアドレス指定可能なマイクロチップ上の特定の位置をいい、そこで電子的バイアスを開始し、そこで核酸プローブおよび標的分子のごとき分子にかかるバイアスによって結合またはアドレス指定する。

本明細書中で用いる“係留 (anchored)”なる用語は、SDA反応で用いるプライマー核酸または標的核酸を捕捉するために用いる核酸プローブのごとき、マイクロチップ上の特定の場所へ分子が結合することによる固定をいう。

【0012】

本明細書中で用いる“分岐プライマー対”なる用語は、増幅反応でプライマーとして用い得るオリゴヌクレオチドの対をいい、これはオリゴヌクレオチドがハイブリダイゼーションおよび増幅プライマーとしての使用に感受性であるように化学基を介して一緒に連結している。

本明細書中で用いる“プライマー捕捉プローブ”なる用語は、選択した標的核酸にハイブリダイズさせるために用い、かつ、捕捉部位へのかかる核酸用の係留支持体を提供するオリゴヌクレオチドをいう。さらに、かかるオリゴヌクレオチドは該標的核酸を増幅するための増幅プライマーとしても機能し得る。

本明細書中で用いる“ハイブリダイゼーション”および“結合”は相互交換可能に用い、相補的核酸配列の互いの非共有結合または“塩基対形成”をいう。特定のプローブがポリヌクレオチドと塩基対形成したままであるか否かは、相補性の程度、プローブの長さ、および結合条件のストリンジェンシーに依存する。ストリンジェンシーが高ければ高いほど、相補性の程度もより高いにちががなく、および／または安定なままの結合または塩基対形成するプローブは長い。

【0013】

本明細書中で用いる“ストリンジェンシー”とは、極度のpH、高温、および塩濃度のごとき核酸を付する条件の組合せをいい、それは二本鎖核酸の成分一本

鎖への解離を生じる。“高ストリンジェンシー”なる語句は、特異的な塩基対形成のみが起こるような十分にストリンジェントまたは制限的であるハイブリダイゼーション条件をいう。特異性は、(J. Mol. Biol., 98:503 (1975)に記載されているとき)標準的なサザン・ハイブリダイゼーション・プロトコール下でオリゴヌクレオチド・プローブまたは緊密に関連する配列を用いてユニーク配列の検出を許容するのに十分でなければならない。

本明細書中で用いる“エンドヌクレアーゼ”とは、DNA分子内の部位でDNAを切断する酵素(例えば、制限エンドヌクレアーゼ、他)をいう。

本明細書中で用いる“制限エンドヌクレアーゼ認識部位”とは、DNA制限エンドヌクレアーゼによって酵素的に認識および作用される二本鎖DNA中のヌクレオチドの特異的配列をいう。

【0014】

本明細書中で用いる“切れ目を入れる”なる用語は、5'ヌクレオチドが遊離3'ヒドロキシル基を有し、かつ、3'ヌクレオチドが5'リン酸基を有するように2のヌクレオチド間の結合を破壊することによって、二本鎖核酸のうちの一本鎖を切断することをいう。切れ目を入れることは、制限エンドヌクレアーゼを用いて行うことが好ましく、この制限エンドヌクレアーゼは制限エンドヌクレアーゼ認識部位内の適当な場所で二本鎖核酸の切れ目を入れることを触媒することが好ましい。

【0015】

本明細書中で用いる“改変ヌクレオチド”なる語句は、天然のヌクレオチドおよびヌクレオチド三リン酸とは組成および／または構造において異なるヌクレオチドまたはヌクレオチド三リン酸をいう。本明細書中で用いる改変ヌクレオチドまたはヌクレオチド三リン酸は、制限エンドヌクレアーゼ認識部位が存在する二本鎖核酸の一本鎖に改変が存在する場合には、改変ヌクレオチドまたはヌクレオチド三リン酸が制限酵素による切断に対して改変された鎖を保護するように改変することが好ましい。したがって、改変ヌクレオチドまたはヌクレオチド三リン酸の存在は、二本鎖核酸の切断よりも切れ目を入れることを助長する。

【0016】

本明細書中で用いる“DNAポリメラーゼ”なる語句は、5'から3'の向きで核酸の3'ヒドロキシル末端にヌクレオチドを組込むことができる酵素をいう。本明細書中に記載する方法に従って用いることができるDNAポリメラーゼの例には、イー・コリ (E.coli) DNAポリメラーゼ I、一般的には“クレノウ”ポリメラーゼとして知られているイー・コリ DNAポリメラーゼ I の大きなタンパク質加水分解フラグメント、“Taq”ポリメラーゼ、T7ポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ、T4ポリメラーゼ、T5ポリメラーゼ、逆転写酵素、エキソ-BCAポリメラーゼ、他が含まれる。

【0017】

本明細書中で用いる“置換”なる用語は、もう1の分子の直近から1の分子を除去することをいう。二本鎖オリゴヌクレオチドおよび／または核酸に関しては、該用語は二本鎖核酸分子を一本鎖にすることをいい、すなわち1の鎖が別の鎖から置換されることをいう。二本鎖核酸の1の鎖の置換は、制限エンドヌクレアーゼが二本鎖核酸に切れ目を入れて遊離の3'ヒドロキシを創製し、これをDNAポリメラーゼによって用いて核酸の新たな鎖の合成を触媒する場合に生じ得る。それとは別に、電子的にアドレス指定可能なマイクロチップの電子的バイアスの作用によって1の核酸をもう1の核酸に置換し得る。

【0018】

本明細書中で用いる“リガーゼ”とは、ヌクレオチドの3'ヒドロキシル基を第2のヌクレオチドの5'リン酸基に共有結合することができる酵素をいう。リガーゼの例には、イー・コリ DNAリガーゼ、T4 DNAリガーゼ、他が含まれる。

本明細書中で用いる“連結する”とは、2の核酸分子を共有結合させて単一の核酸分子を形成させることをいう。これは、典型的には、リガーゼを用いる処理によって行い、これは1の配列の5'末端と他の配列の3'末端の間のホスホジエステル結合の形成を触媒する。しかしながら、発明の文脈において、“連結する”なる用語は、かかる配列を例えば化学的手段によって結合する他の方法も包含することを意図する。

【0019】

本明細書中で用いる“結合する”とは、一般的に1の基を他の基に結合することをいう。例えば、オリゴマーおよびプライマーを捕捉部位の表面に結合し得る。結合機構に関して、方法は、ビオチニル化プライマー、アンプリコンおよびストレプトアビジンに対するプローブ、他のごときビオチン基の連結、非共有結合、結合のごとき結合手段を含むことを意図する。

【0020】

本明細書中で用いる“近位の”なる用語は、互いに直近に存在する核酸分子に参照して用いる。該用語は、リガーゼ酵素によってそれらが連結され得るように、1の核酸の5'末端が第2の核酸の3'末端と並列することを許容する2の核酸分子間の十分な近接をもいう。

本明細書中で用いる“対立遺伝子特異的”なる用語は、同一遺伝子の他の対立遺伝子の実質的な検出、増幅またはオリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーションなしの、遺伝子の1の対立遺伝子の検出、増幅またはオリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーションをいう。

【0021】

本明細書中で用いる“3-プライム”または“3'”なる用語は、核酸に関する特定の向きをいう。核酸は5-プライム(5')または3-プライム(3')のいずれかで核酸の2の末端が識別されるように、異なる化学的な向きを有する。核酸の3'末端は、末端ペントース糖の3'炭素に結合した遊離ヒドロキシル基を含む。核酸の5'末端は、末端ペントース糖の5'炭素に結合した遊離ヒドロキシルまたはリン酸基を含む。

本明細書中で用いる“遊離3-プライム(3')ヒドロキシル基”なる語句は、核酸の鎖の3'末端に位置するヒドロキシル基の存在をいう。該語句は、遊離ヒドロキシルがそれが新たな核酸合成を支持することができるように機能的であるという事実をもいう。

【0022】

本明細書中で用いる“5-プライム・オーバーハング”なる語句は、2の鎖の末端が共に伸長しているのではなく、1の鎖の5'末端が対峙する相補鎖の3'末端を超えて伸長するように平滑末端を有していない二本鎖核酸分子をいう。線状

核酸分子については0、1または2の5'オーバーハングを有することが可能である。5'オーバーハングの意義は、それが3'ヒドロキシル基が1の鎖上に存在し、一本鎖核酸の配列が対峙する鎖上に存在する領域を提供することである。DNAポリメラーゼは、マイナス鎖の遊離3'ヒドロキシルから開始して、核酸の一本鎖部分に相補的な核酸鎖を合成し得る。

【0023】

本明細書中で用いる“バンパー・プライマー”なる用語は、SDA反応においてプライマー伸長産物を置換するために用いるプライマーをいう。バンパー・プライマーは、バンパー・プライマーの伸長が下流増幅プライマーおよびその伸長産物を置換するように、増幅プライマーの上流の標的配列にアニーリングする。

【0024】

本明細書中で用いる“検出された”および“検出”なる用語は、相互交換可能に用い、標的核酸またはその増幅した核酸産物の存在または不存在の識別をいう。

本明細書中で用いる“標識”とは、増幅産物を検出する能力を提供する化学基をいう。例えば、核酸上の標識は、 ^{32}P のごとき放射性同位元素または共有もしくは非共有結合発色団、蛍光基、酵素、抗原、特異的反応性を有する基、化学ルミネセンス基、および電気化学的に検出可能な基のごとき非放射性分子を含み得る。

【0025】

上記の定義は、本発明の趣旨を限定すると理解してはならない。むしろ、それらを用いて、明細書中の言葉を解釈し、適当な場合には、請求の範囲の言葉を解釈すべきである。これらの用語は、本発明の記載の文脈でより十分に理解し得る。上記に定義しなかったかまたはその文脈に基づいて解釈することができない用語が詳細な説明または請求の範囲に含まれる場合には、当業者によって理解されるのと同じ意味を有すると解釈されるべきである。

【0026】

背景技術

遺伝子の核酸配列を決定することは、多くの状況において重要である。例えば

、多くの疾病は正常な遺伝子に対する遺伝子配列中の突然変異によってかまたはそれと関連して引き起こされる。かかる突然変異には、“点突然変異”と呼ばれる1のみの塩基の他のものへの置換が含まれ得る。幾つかの例において、点突然変異はそれを遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列中の変化をコードすることによって疾病の重篤な臨床的病徴が引き起こされ得る。例えば、鎌状赤血球貧血症はかかる点突然変異から生じる。

【0027】

遺伝子のコピー数における増減と関連する疾病も存在する。したがって、配列中の変化の存在または不存在を決定することが重要であるのみならず、試料中のかかる配列の量を疾病の診断または疾病を発病する危険性の判定に用いることができる。さらに、原核生物および真核生物の両方の遺伝子配列中の変化が遺伝材料の源を同定するのに非常に貴重であることが証明されている（例えば、制限断片長多型（RFLP）によって他人から1のヒトをまたはDNAの源を同定すること）。

【0028】

微生物またはウイルスによって引き起こされるある種の感染症は、感染性生物に独特の核酸配列を検出することによって診断することもできる。種々の製品の安全性が関心事である、例えば献血された血液、血液製剤および器官の医療分野におけるような、ならびに食物および水の供給者の安全性が公衆の健康に重要である場合には、ウイルス、寄生体および他の微生物由来の核酸配列の検出も重要である。

【0029】

したがって、試料からの核酸の単離による特異的な核酸配列の同定および配列への探求の検出は、それによってヒトが疾病、生物または個人の存在を決定することができる機構を提供する。一般的に、かかる検出は、関心のある標的核酸配列に対して一部分相補的である合成核酸“プローブ”配列を用いることによって行う。

【0030】

前記したごとく核酸の存在を検出することが望ましいが、核酸配列への探求が

極めて少数（例えば 10^7 未満）で試料起源中に存在する場合がある。少ない標的分子数の条件は、それを検出し得るために標的配列の数を増幅するために研究室技術を行う必要を生じる。数ある中の一部を挙げるにすぎないが、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、鎖置換増幅（SDA）、および核酸配列ベース増幅（NASBA）のごとき標的化配列を増幅する多くのよく知られた方法が存在する。これらの方法は、以下の参考文献に一般的に記載されている：（PCR）米国特許第4,683,195号、第4,683,202号および第4,800,159号；（LCR）1989年6月14日に公開された欧州特許出願番号第320,308号；（SDA）米国特許第5,270,184号および第5,455,166号、ならびにPCR Methods and Applications, 3(1):1-6 (1993), Cold Spring Harbor Laboratory Press中のG. T. Walkerによる“Empirical Aspects of Strand Displacement Amplification”；および（NASBA）“Methods in Molecular Biology, Vol. 28: Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes, 1994編. P.G. Isaac, Humana Press, Inc., Totowa, NJ”中の36章、L. Malekらによる“Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA™)”（前記の各参考文献は出典明示して本明細書の一部とみなす）。

【0031】

標的核酸増幅した産物、すなわち“アンプリコン”の分析および／または同定に関しては、比較サイズ、相対移動分析（例えば、サザンブロット分析）およびハイブリダイゼーション分析を含む他のよく知られている技術が典型的に用いられている。しかしながら、比較サイズまたは相対移動分析は最適でない。それらは望ましくない程度で遅くかつ不正確だからである。さらに、ハイブリダイゼーション分析はこれらの方法に超える多くの利点を供するが、ハイブリダイゼーション分析は本発明の教示と比較して迅速でも高感度でもない。

【0032】

PCR技術に関してはサーマルサイクリングを要するため、PCRはマイクロエレクトロニック環境における使用に最適でない。サーマルサイクリングによって引き起こされる熱的揺らぎがマイクロチップの表面に位置する捕捉部位に有害だからである。そのうえ、サーマルサイクリングは、（例えば、均一な加熱を保

証するため、他の)複雑な機器、および分析を完了する許容できない時間の長さ(各工程を順次に起こさなければならないからである)の必要を含む他の問題も生じる。

【0033】

PCRとは反対に、SDA技術はマイクロエレクトロニック環境で有用である。それはPCRの前記した望ましくない特徴の幾つかを克服するからである。例えば、それは、等温方法であって増幅プロセスは非同時性であり、したがってより迅速である。SDAの使用はPCRを超える利点を有するが、最近行われているSDAスキームには、典型的に、(例えば、前掲の米国特許第5,455,166号に開示されている)溶液ベース増幅プロトコルの使用が含まれる。SDA技術の最近の修飾は、米国特許第5,624,825号に記載されているごとく、増幅用の個々に設計したプライマーの数を最小限化するための技術を進歩させている。しかしながら、かかる進歩は、電子制御されたハイブリダイゼーションの本発明において実現された向上から利益を受けていない。

【0034】

他の増幅法には、固体支持体に結合したプローブの使用が含まれる。しかしながら、かかる手法は、本明細書中に示し、かつ、電子的にアドレス指定可能なマイクロチップと結合して行う“係留”SDAと比較して、当該技術分野における認識し得る進歩を供していない。例えば、米国特許第5,380,489号は、核酸増幅方法および標的核酸の検出方法を開示するが、ここでは標的分子をより簡便に捕捉および検出し得るように接着因子を用いて捕捉プローブを固定している。この方法は、本発明が行っているようには、同時の増幅、捕捉および検出の争点を扱っていない。もう1の例において、米国特許第5,474,895号はポリスチレン支持体ベース・サンドイッチアッセイを用いる核酸の検出を開示している。再度、かかる方法は、単に、受動的ハイブリダイゼーションにつづく、プローブの二次的受動的ハイブリダイゼーション後の二次的検出を含むにすぎない。

【0035】

マイクロチップ・アレイも、核酸の増幅および検出に関連して用いられている。例えば、発現モニター用に小型デバイスが首尾よく開発されている。例えば、

M. Schenaら, 270, Science 467-470 (1995), M. Schenaら, 93, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 10614-619 (1996), J. DeRisiら, 14, Nat. Genet. 457-60 (1996), R. A. Hellerら, 94, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2150-55 (1997)およびJ. DeRisiら, 278, Science, 680-86 (1997)を参照されたい。小型デバイスは、アンプリコン内の単一ヌクレオチド多型 (SNPs) の分析用にも首尾よく開発されている。例えば、Z. Guoら, 15, Nat. Biotechnol. 331-35 (1997)、およびE. Southern, 12 Trends Genet. 110-15 (1996) (前記の各刊行物は出典明示して本明細書の一部とみなす) を参照されたい。これらのデバイスは、マイクロチップ技術の速度および感度とハイブリダイゼーションの特異性とを結合する潜在能力を供する。しかしながら、本目的に好適ないずれの小型デバイスも首尾よく提供されていない。

【0036】

例えば、微小デバイスを用いて同時に複数のアンプリコンが分析されているが (すなわち多重分析)、かかる多重分析はハイブリダイゼーション条件が試験する各アンプリコンに和合性である場合にのみ可能であった。この不利益は、注意深い捕捉プローブ設計によって、非常に長い捕捉 (例えば、発現モニター用の cDNA) の使用によって (例えば、R. A. Hellerら, (1997)前掲、およびM. Schenaら, (1995)前掲を参照されたい)、またはより短い捕捉オリゴヌクレオチド配列の過度な重複性および重複によって部分的に補い得る。しかしながら、ひとまとめにして考えると、これらの考慮すべき事柄は大部分のマイクロチップ・デバイスの使用に対して制限を課している。さらに、短いオリゴヌクレオチド捕捉配列と共に用いたとき高レベルの重複性は、大きなアレイおよび得られたデータを解釈するための複雑なインフォーマティクス・プログラムの必要を生じ、なおある種の配列—特異的領域が分析するのに困難なまま残り得る。別法として、長い捕捉オリゴヌクレオチドの使用により、均一に上昇したハイブリダイゼーション温度の使用が許容される。しかしながら、長い捕捉プローブおよび高いハイブリダイゼーション温度 (例えば、45ないし75℃の範囲) の使用は、非常に関連性の高い配列の単一塩基対誤対合分析を妨げる。

【0037】

マイクロチップ上の増幅産物の捕捉の前に受動的ハイブリダイゼーションおよび溶液ベース増幅に依存するという点において、なおもう1の欠点が従来のマイクロチップでは明らかになってきている（例えば、米国特許第5,202,231号および第5,545,531号、ならびにE. Southernら, Genomics 13, 1008-1017 (1992); M. Schenaら, Science 279, 467-470 (1995); M. Cheeら, Science 274, 610-614 (1996);ならびにD. J. Lockhartら, Nature Biotechnology 14, 1675-1680 (1996)）（すべて出典明示して本明細書の一部とみなす））。

【0038】

さらに、これらのデバイスの多くは、複数の試料から標的分子の増幅を同時に分析および／または検出することができない。巨視的なデバイスにおいては、この後者の問題は、試料間に最小限のコンタミネーションしか存在せずに個々の試料がユニークな幾何学的位置を占める“ドット・ブロット”形式によって従来取扱われている。それに対して、大部分のマイクロチップについて、検出および分析の問題は、通常、微視的なスケールという以外はドット・ブロットの巨視的沈澱と同様な高価かつ複雑な核酸沈澱技術を要する。

【0039】

もう1の最近の開示（国際公開W096/01836）においては、電子マイクロチップが核酸のPCR型増幅と結合して用いられている。しかしながら、特定の捕捉部位で標的アンプリコンの量を増加させるための増幅酵素および制限酵素の同時の使用を必要とする増幅系は、その系において予期されておらず、可能でもなかった。むしろ、捕捉した核酸種の制限消化は、酵素切断につづいて起こる標的種の検出とPCR型増幅法の後の捕捉部位からの二本鎖核酸種の除去と結合して考えられていた。さらに、該系は、PCR反応において機能的であった標的核酸の1の鎖のみに相補的な係留増幅プライマーを提供した。

【0040】

他のマイクロチップベースの増幅および検出プラットフォームと同様に、国際公開W096/01836号公報で概念化された発明は、本明細書中に開示する電子的にアドレス指定可能なマイクロチップ上のSDAと比較して実質的に制限されている。その公報に教示されている標的種のPCR型増幅は、二本鎖種の破壊ならび

に溶液ベースの逆プライマーの機能性を必要とするからである。かかる状況はプライマー-プライマー相互作用による効率的な増幅の低下を引き起こす一方で、制限酵素の使用が反応緩衝液条件における揺らぎにより阻害される。

【0041】

最後に、核酸の増幅および検出の他の態様は問題を含んでおり、および／または最適でない。1のかかる問題は、制限酵素による核酸の制限エンドヌクレアーゼ切断における特異性の喪失であった。例えば、幾つかの制限エンドヌクレアーゼが高い浸透圧または低い水分活性ではそのDNA認識配列についての特異性を喪失することが知られている。C. R. Robinsonら, J. Mol. Biol., 234:302-306 (1993)。低い水分活性では、制限エンドヌクレアーゼは正常な認識部位から1塩基対異なる認識部位でDNAを切断するであろう。1塩基対離れた認識部位は“スター”部位と呼ばれ、これらのスター部位のエンドヌクレアーゼの認識および切断は“スター活性”と呼ばれている。

【0042】

Robinsonらは、結合水がEcoRIのDNA切断の配列特異性に関係することを見出し (Biochemistry 33(13): 3787-3793 (1994))、さらに反応を0ないし100気圧の高圧で行うことによって静水圧を上昇させると、EcoRI、PvuIIおよびBamHIについて浸透圧により誘導されるスター活性が阻害されて最終的には排除されるが、EcoRVについてはこれらの現象が起きないことを見出した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3444-3448 (1995))。制限エンドヌクレアーゼに依存するSDAに伴う1の再発性の問題は、スター活性によるプライマー非依存的様式で非一標的配列が増幅される頻度である。したがって、SDA反応におけるスター活性を低下または排除する必要がある。本発明の1の具体例において、本発明者らは、高圧SDA法の適用によるSDA反応におけるかかるスター活性の排除を提供する。

【0043】

スター活性を排除することによってSDA技術を進歩させることに加えて、本発明者らは、バイオエレクトロニック・マイクロチップと組合せてSDAを用いる核酸の検出における種々の他の利点も提供する。例えば、核酸配列の増幅およ

び分離は、連結－依存性S D Aを用いて行い得る。捕捉工程によって出発材料から増幅産物を分離することを必要とする、または連結前に結合したプローブから遊離連結プローブを分離することを必要とする当該技術分野で知られている連結－依存性増幅法に対して、本発明は単離工程を分離する必要性を排除する。さらに、本発明は、当該技術分野で用いられていると同様なバンパー・プライマーの必要性を排除することによって、S D A増幅プロセス時を改良している。例えば、典型的な連結－依存的増幅法には、増幅の間に用いるプライマーのうちの1を標識することによる捕捉工程が含まれる。分離を連結の前に起こさせて、プライマーのテンプレート非依存的連結を防ぐことができ、あるいは、分離を連結後に行って非－標識／増幅DNAから標的DNAアンプリコンを単離し得る。この標識を含有する標的DNAアンプリコンは、非－標識／増幅DNAから分離する。この分離は、増幅後の余分な工程を必要とする。試料のこの余分な操作は、手法の複雑性を増大させ、それによって、それはP C Rのごとき他の最新のDNA増幅法に対する単純な別法としてあまり有用でないものとなる。また、この試料の余分な操作は増幅手法の自動化を妨げる。本発明の1の具体例において、かかる余分な工程を排除する連結－依存的S D A法を提供し、これは標的核酸の増幅および検出の自動化を促進する。

【0044】

他の具体例において、本発明者らは、S D Aおよび電子的にアドレス指定可能なマイクロチップを用いる核酸の増幅および検出技術におけるさらなる進歩を提供し、その進歩は関心のある標的核酸配列を効率的かつ最適に増幅し、検出し、および分析するための事項のデバイス、方法および組成物に存在する要望を集合的に示す。

【0045】

発明の概要

本発明は、核酸配列の多重増幅、検出および分析用の事項のデバイス、方法および組成物に広く関し、ここでは増幅、検出および分析をバイオエレクトロニクス・マイクロチップ技術と組合せたS D Aを用いて最適に行う。本発明は、関心のある標的核酸を増幅する種々の効率的かつ最適な方法、ならびに、得られたア

ンプリコンを分析するための方法を提供する。加えて、本発明は、単一のオープン・バイオエレクトロニック・マイクロチップ上で標的核酸を含有する複数の試料の増幅および分析（順次または同時のいずれか）を可能とする。

【0046】

本発明の1の態様において、マイクロチップ・デバイスは電子制御された微小電極アレイである。出典明示して本明細書の一部とみなす、国際公開W0 96/01836号を参照されたい。大部分の他のマイクロチップ・デバイスの受動的ハイブリダイゼーション環境に対して、本発明の電子マイクロチップ・デバイス（または能動的マイクロアレイ・デバイス）は、核酸を能動的に輸送するかまたは電子的にアドレス指定して、微小電極アレイの表面上の場所に分離し、かつ、それらの場所にアドレス指定された核酸を“捕捉部位”と指定された特定の場所のマイクロチップの表面またはその部位に以前に結合した核酸のいずれかに結合する能力を供する。R. Sosnowskiら, 94, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 119-123 (1997) およびC. Edmanら, 25, Nucleic Acids Res., 4907-14 (1997)を参照されたい。これらの能動的マイクロアレイの使用は、受動的マイクロデバイスによって出くわしていた多くの制限を回避する。

【0047】

本発明の能動的マイクロチップ・アレイは、捕捉オリゴヌクレオチドのサイズ依存性および能動的マイクロデバイスの複雑性要件を克服する。また、本発明のマイクロチップ・アレイは、関心のある核酸を含有する異なる試料を種々の微小電極場所を選択的かつ独立して標的化することによって、同一のオープン・マイクロアレイ表面で複数の独立した試料分析を許容する。他言すれば、それは、オープン・アレイ上の平行な複数試料のプロセッシングを許容する。前述したごとく、伝統的な核酸検出法は、分解可能なシグナルを達成するために必要なしばしば長い増幅およびハイブリダイゼーション時間によって制限される。かかる方法に対するさらなる制限は、その分析表面で多重ハイブリダイゼーション事象を行うことができないことであり、それによっていずれか1のアッセイで入手可能な情報が制限される。これらの制限は両方とも、アレイ上の特異的部位にDNAを選択的に標的化しかつ濃縮することができる能動的マイクロエレクトロニック・ア

レイの使用によって本発明においては克服される。このデバイスのさらなる強みは、電子的ハイブリダイゼーションおよび変性を行って、単一塩基多型を識別する力である。したがって、この能動的微小電極アレイは、他のマイクロデバイスで示されたものを超える、共通プラットフォーム上で広範な種々のタスクを取扱う融通性を示す。

【0048】

本発明は、好ましくは伝統的なPCRとは異なる増幅方法を使用する。詳細には、本発明は、鎖置換増幅（SDA）を使用する。SDAは、複雑なバックグラウンドにわたる少数の標的分子を迅速（例えば、約15－45分で）かつ対数的に増幅させるのに十分な感度および頑丈さを有する増幅法である。例えば、C. Spargoら, 10, Molecular and Cellular Probes, 247-56 (1996)を参照されたい。PCRに対して、SDAはより単純な熱的制御および関連器具設計を必要とする等温技術である。SDAは、核酸を迅速に分析するための統一した増幅－ハイブリダイゼーション－検出系とより和合する（すなわち、全ての工程が1の場所、例えばマイクロアレイ・チップに統一された系である）。これは、主として、電子的にアドレス指定可能なマイクロチップのマイクロアレイに対して有害となり得る条件（例えば、熱的サイクリング）をSDAが必要としないという事実による。

【0049】

プローブが標的を捕捉するように設計され、かつ、アンプリコン核酸分子がマイクロアレイの表面に係留される受動的ハイブリダイゼーションにおける増幅反応の効率は、つなぐ表面に位置する適当なプライマーに対する標的核酸種のハイブリダイゼーションの低い頻度により、増幅の初期相の間は制限される。典型的には、このプロセスには、低容積の溶液でさえ、数時間を要する。しかしながら、このプロセスの効率は、“係留”プライマーの近くに核酸を電子的に濃縮する（すなわち、アドレス指定する）ことによって劇的に上昇し、それによって、溶液相の標的核酸と係留プライマーとの間の遭遇する頻度が上昇する。従来の概念がマイクロアレイ上の特異的部位に係留されたPCR増幅に必要な2の増幅プライマーのうちの1のみと結合したPCRを用いていたのに対して、本発明はSD

Aに必要な両方の増幅プライマーがマイクロアレイの特異的な捕捉サイトに係留されていることを意図する。したがって、本発明の1の具体例において、以下に記載するごとく、増幅反応緩衝液、酵素、ヌクレオチド、他の導入の前に、マイクロチップの表面に標的核酸を電子的に濃縮し、ハイブリダイズさせることは、“係留SDA”のごとき“係留”増幅反応に大きな利益を与える。相補的な係留増幅プライマーに対するテンプレート核酸分子の迅速な濃縮およびつづく特異的なハイブリダイゼーションにより、アレイの表面を洗浄して、反応環境から望ましくないおよび恐らくは妨害する非一標的核酸を除去することが許容される。

【0050】

マイクロアレイ上の特異的场所への標的核酸の電子的アドレス指定を用いることは、従来の能動的ハイブリダイゼーション技術を超える少なくとも3の他の利点を有する。第1に、増幅プロセスの全体時間および効率が劇的に改善される。主要な律速段階（テンプレートが係留プライマーを見出すために要する時間のもの）が全体の反応速度から除去されるからである。また、電子的アドレス指定の使用は、係留増幅プローブに対する標的種のハイブリダイゼーションが等しい時間に非一電子的な能動的ハイブリダイゼーション・マイクロアレイ上のいずれかの特定の部位に見出されるであろう標的分子の数と比較して選択された部位における標的分子の数を増加させるように、標的核酸を電子的に濃縮するようにも作用する。これは、増幅プロセス用の出発分子の絶対数を劇的に増加させて、増幅産物の全体収率および少ない出発テンプレート数に対する感度の両方における改善を生じる。

【0051】

第2の利点は、別々の標的核酸をアレイ表面上の特異的な場所に適用することができ、それによって、複数の異なる核酸試料を1のアレイ上で同時に増幅することが許容されることである。別法として、核酸試料は幾つかの異なる場所に標的化することもでき、その各場所には複数の異なる増幅反応を単一の試料から同時に行うことができるように特異的なセットの増幅プライマーが含まれる。前に注記したごとく、反応混合物から不必要かつハイブリダイズしなかったDNAを除去する能力は、このプロセスを非常に助ける。

【0052】

このアプローチに対する第3の利点は、増幅反応後にアレイ上の特異的部位にアドレス指定され、結合されたアンプリコンを、(1) 蛍光標識ヌクレオチドの導入、または(2) 増幅した材料の変性につづくつなげたアンプリコンに対して特異性を有する適当なレポーター・オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによる反応の終点におけるオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションのごときによって、つづく分析に部位一特異的な様式で利用できることである。

【0053】

本明細書中に記載するごとく、従来の方法の前記した制限を克服するための電子的にアドレス指定可能なマイクロチップおよびSDAの組合せと結合して用いる電子的標的化の能力は、アンプリコン分析の2の例で示される。第1に、より詳細に後記するごとく、多くの種の細菌によって共有されている共通の保存性の高い遺伝子座(例えば、16S rRNA)の使用を、個々の試料の多重比較分析に適用して異なる細菌の型を同定し得る。第2に、より詳細に後記するごとく、本発明の電子的マイクロアレイを用いて、ヒト第V因子Leiden(R506Q)遺伝子突然変異の存在について複数の個別の患者試料を同時に分析する。ヒト第V因子Leiden(R506Q)遺伝子は活性化プロテインC耐性および脈管血栓症に対する素因を示す。この例は、複数の患者からの首尾よい平行試料分析を示す。この多重患者試料分析に用いた試験試料は、本発明のもう1の態様、すなわち、より詳細に後記するごとく、SDAを用いる対立遺伝子一特異的な増幅方法を提供する。

【0054】

本発明の他の態様は、種々の新たな増幅法に指向される。本発明のかかる新規なSDA法は、種々の分析用のアンプリコンを提供するのに有用である。例えば、本明細書中に記載するSDA法の幾つかは、電子的にアドレス指定可能なマイクロチップアレイ上で増幅を行うための増幅条件を最適化するのに有用である。他のSDA法は、電子的にアドレス指定可能なマイクロチップアレイ上の使用に特に適したアンプリコンを提供するのに有用である。なお他のSDA法は電子的にアドレス指定可能なマイクロチップアレイ上で行う分析について分析条件を最

適化するのに有用である。

【0055】

より詳細には、本発明のS D A法の1の具体例は、対立遺伝子—特異的S D A法を含む。該方法は、好ましくは特異的対立遺伝子を含む鎖のみを選択的に増幅させる。該方法は、好ましくはその3'末端が目的の対立遺伝子のヌクレオチド配列を相補するように設計された増幅プライマーを用いる。該プライマーは、好ましくはその5'末端にビオチン基を含んで、増幅の前または電子的標的化後の増幅の後のいずれかに、捕捉部位にアンプリコンおよび／または標的核酸を捕捉するための容易な技術を提供する。さらに、もう1の対立遺伝子—特異的な具体例において、所与の遺伝子の対立遺伝子の存在について核酸を含有する複数の試料を分析するための方法を提供し、それは、“2本の鎖の”S D Aによって各試料中の核酸を増幅させてアンプリコンを産生させ、ここに第1の増幅は第1の対立遺伝子に特異的なプライマーを用い、第2の増幅は第2の対立遺伝子に特異的なプライマーを用い、アンプリコンをマイクロアレイ上に電子的にアドレス指定し、結合したアンプリコンに1またはそれを超えるレポーター・プローブをハイブリダイズさせ、ついでマイクロアレイ上のレポーター・プローブの存在および場所を検出することを含む。

【0056】

本発明のもう1の具体例において、S D Aおよび電子的にアドレス指定可能なマイクロチップ上の増幅産物の同時検出の独特な組合せを提供する。好ましい具体例において、S D Aは電子的マイクロチップ上の指定された位置の表面で行い、ここに増幅に必要な上流および下流の両方のプライマーはマイクロアレイ上の同一の分離捕捉部位に係留される。1のかかる具体例において、マイクロチップの表面に“係留された”ユニークな分岐基を用いてプライマーを対形成させる。この分岐プライマー対の設計は、互いに所定の距離および場所を有する接近して離れたプライマーを提供する。さらに、この配置は、それによってS D Aの速度を制御し得る手段を提供する。さらに、本発明の他の要素と組合せて、プライマー対の場所に生成される一本鎖増幅産物は、さらなるS D A用に電子的マイクロチップ上の同一または隣接する指定された捕捉部位に、使用されなかった分岐プ

ライマー対によって容易かつ迅速にアドレス指定され、捕捉され得る。

【0057】

好ましい具体例において、前記プライマー対の各プライマーは、さらに、標的分子と相補的な核酸配列を有する核酸配列の5'に位置するエンドヌクレアーゼ制限部位の1の鎖をコードする核酸配列を含む。さらなる好ましい具体例において、プライマー中の制限部位の配列は、核酸骨格が制限酵素の作用によって切断可能である天然のリン酸骨格を含む点において未改変である。さらに、SDAにおいて有用な制限部位は、HincII、HindII、BsoBI、AvaI、Fnu4HI、Tth111IおよびNciIのごとき、出典明示して本明細書の一部とみなす参考文献に開示されているSDA手法で典型的に用いられるいずれの制限部位ともし得る。また、この方法に用い得る他のエンドヌクレアーゼには、BstXI、BsmI、BsrI、BsaI、NlaV、NspI、PflMI、HphI、AlwI、FokI、AccI、TthIII、MraI、MwoI、BsrBI、BstNI、BstOIおよびBsmAIが含まれる。さらに、酵素は必ずしも好熱性でなくてもよい。さらに、プライマー伸長の間に生成される二本鎖SDA増幅産物は、二本鎖SDA増幅産物が正常なSDA増幅用のプライマー制限部位に適当に“切り目を入れる”ことができるように、ヘミメチル化またはヘミホスホロチエート化（または、当業者に知られている他のヘミ改変形）となることがさらに好ましい具体例である。例えば、置換デオキシヌクレオシド三リン酸は、それが置換デオキシヌクレオチドを含有する鎖中の切断は阻害するが、他の鎖の切断は阻害しないように改変すべきである。かかる置換デオキシヌクレオシド三リン酸の例には、2'デオキシアデノシン 5'-O-（1-チオ三リン酸）、5-メチルデオキシシチジン 5'-三リン酸、2'-デオキシウリジン 5'-三リン酸、および7-デアザ-2'-デオキシグアノシン 5'-三リン酸が含まれる。

【0058】

別の好ましい具体例において、制限部位の核酸骨格が前記したごとく改変されていることを要しない制限部位をSDA手法で用い得る。例えば、BstNBIは、一本鎖切れ目を行う改変を必要としないため、その制限部位と結合して用い

て核酸に切れ目を入れ得る。その代わりに、B s t N B I は天然活性として一本鎖に切れ目を入れる。

【0059】

標的配列に相補的なプライマー対の核酸セグメントは、マイクロチップ上のS D Aの適正な機能に適切な温度および緩衝液の条件下におけるハイブリダイゼーションを許容するであろういずれかの有用な長さとし得る。典型的には、プライマー対の標的配列は、あり得る場合には、もう1のもののから60ないし120塩基上流または下流に離れたいずれかの場所に存在する標的核酸の部分と相補的である配列を有する。全ての場合において、プライマー対の各プライマーは、標的配列の異なる鎖（すなわち、プラス鎖またはマイナス鎖）に対して相補的である。さらに、プライマー対が分岐した基上に存在する場合には、分岐結合基上のプライマーの間の距離は分子スペーサー・エレメントによって調節して、S D A反応の効率を最適に高め得る。かかるスペーサー・エレメントはポリエチレングリコール・ポリマー、ポリアミノ酸または核酸を含み得る。

【0060】

もう1の好ましい具体例において、離れたプライマーは、それらの対応する5'末端で分岐した分子構造（例えば、‘ Y ’形状構造）に結合し得る。ついで、分岐構造それ自体をYの遊離分岐を介してマイクロチップ上の指定した捕捉パッド部位に係留する。マイクロチップ表面への結合法は、当該技術分野でよく知られているストレプトアビジン／ビオチン・カップリングによるものとし得る。別法として、結合法には、出典明示して本明細書の一部とみなす、米国特許第5,668,258号、第5,668,257号、第5,677,431号、第5,648,470号、第5,623,055号、第5,594,151号および第5,594,111号のいずれかに開示されているものに匹敵する方法が含まれ得る。1の好ましい具体例において、分岐分子はアミノ酸に結合した核酸によって形成する。もう1の別の具体例において、分岐分子は、ポリエチレングリコール・ポリマー、ポリアミノ酸または核酸のごとき異なるスペーサーを核酸プライマーおよび二官能性分岐アミノ酸（例えば、リジン）の間に付加することによって形成する。

【0061】

なおもう1の具体例において、係留S D A増幅プライマーは必ずしも分岐していなくてもよいが、その代わりに単に互いに極めて近接する捕捉部位に個別に係留する。結合法は前記したごとく行い得る。

【0062】

本発明のもう1の好ましい態様において、標的核酸の増幅は係留プライマー対の部位で排他的に行い、それによって、溶液ベース増幅に一般に関連する増幅速度の不確実性を回避する。詳細には、溶液ベース増幅と比較して、複数の標的の増幅または多重増幅は著しく改善される。かかる改善がプライマー間の競合の回避および／または標的部位への結合を阻害し得るプライマー-プライマー相互作用の回避による可能性がある。標的分子およびS D A産物の捕捉パッドS D A部位への電子的アドレス指定の結合した影響によって、および増幅を許容するプライマー（すなわち、分岐または非分岐のプライマー対）を固定された場所に係留する事実によって、増幅は1の場所で維持される。

【0063】

本発明のもう1の好ましい態様において、標的核酸は増幅の前にマイクロチップ上の特異的部位に電子的にアドレス指定される。この態様は幾つかの方法において受動的ハイブリダイゼーション技術を超える進歩である。第1に、標的核酸種を含有する試料溶液中の核酸はマイクロチップ上の特異的部位に電子的にアドレス指定されるため、標的分子は標的分子を捕捉するよう設計されたプライマー対に接触する好ましい利点を有する。第2に、一本鎖核酸標的分子を創製しなければならない事象においては、一本鎖種の形成を許容する試料溶液中の条件は、P C Rおよび溶液ベース増幅では通常に行われている反復的よりもむしろ一度のみで行わなければならない。第3に、標的種をチップ上の特異的捕捉部位に電子的にアドレス指定し、アニーリングさせることは、低塩濃度下で行い得、これは古典的受動的ハイブリダイゼーション技術とは著しく対立する状況である。低塩濃度条件（および電子的アドレス指定）は、捕捉プライマーへの一本鎖標的種のハイブリダイゼーションを高める。かかる条件は標的核酸鎖のその対応する相補鎖への再アニーリングの低下を助長するからである。

【0064】

もう1の好ましい具体例において、本発明の係留SDA法は改善した効率を提供する。1または他の係留プライマーの標的アニーリング位置に対して5'側の標的上の位置に標的分子をアニーリングさせるのに1の標的特異的な“バンパー”プライマーしか必要でないからである。もう1の具体例において、2のバンパー・プライマーを（伝統的SDAにおいてとして）含み得るが、2のプライマーを含める必要はない。むしろ、2のバンパー・プライマーの使用は、分岐プライマー対によって最初に捕捉された標的核酸の2の鎖のうちのいずれかに依存するプライマー捕捉プローブのうちのいずれか1の向きに依存して、プライマー捕捉プローブのいずれか1の対のいずれかの向きからのプライミングの開始を促進するだけである。2のバンパー・プライマーを含めることは、アンプリコン形成の速度をさらに高め得る。

【0065】

本発明のなもう1の態様において、高圧下でSDAを用いて試料中の標的核酸配列（およびその相補鎖）を増幅させる方法を提供する。圧力を上昇することにより、増幅の効率が向上する。制限エンドヌクレアーゼのその標的配列に対する特異性が高められるからである。該方法には、1）試料から標的配列を含有することが疑われる核酸を単離し、2）標的配列の一本鎖フラグメントを創製し、3）（a）核酸ポリメラーゼ、（b）デオキシリボヌクレオシド三リン酸、ホスホロチオエート化dNTP、エンドヌクレアーゼ、および（c）（i）標的フラグメントの3'末端付近の標的の部分のまたはそれに沿ってときどき存在する領域に相補的であって、かつ、（ii）さらに、制限エンドヌクレアーゼに対する認識配列である配列をその5'末端に有する少なくとも1のプライマーを含む混合物を添加し、ついで4）該混合物を増幅産物を生成するのに十分な時間高圧で反応させる工程が含まれる。標的核酸フラグメントが二本鎖核酸を含む場合には、該方法は核酸フラグメントを変性させて一本鎖標的配列を形成させることをさらに含む。核酸がRNAを含む場合には、最初にRNAをDNAに変換させるために逆転写酵素を用いることが好ましいが、RNAは本発明の全ての具体例において特異的に含まれる。

【0066】

さらなる具体例において、電子的マイクロチップと結合したS D Aの方法を提供し、ここにおいてS D A反応は連結ベースである。この具体例においては、2セットのプライマーを用い、ここに1のプライマーセットは互いに近接する標的配列の1の鎖にプライマーが結合するように設計され、一方第2のセットの各プライマーは第1のプライマーセットのプライマーのうちの1の部分に結合するように設計され、一方、第2のプライマーセットの他のものは第1のプライマーセットの他のものの部分に相補的である（すなわち、標的鎖配列と同一）。この具体例を用いる場合、バンパー・プライマーの関与なしにS D Aを行い得ることは明らかであろう。好ましい具体例において、2のプライマーセットのうちの1は本明細書中に記載するごとく“係留”し得る。

【0067】

もう1の具体例において、連結ベースS D Aの方法を提供し、ここに当該方法は電子的マイクロチップによって補助されない。この具体例においては、とりわけ、いずれのプライマーも係留する必要がなく、多重増幅の間にプライマーセットを分離することを補助する手法である。プライマーがユニバーサル--標的配列を‘正確な’プライマーに指向させる必要がない、だからである。

【0068】

連結ベースS D A法の特定の具体例においては、標的配列にアニーリングするように設計したプローブセットは、連結して、S D Aを支持することができる“連結プローブテンプレート”を形成するようにならなければならない。さらに好ましい具体例において、連結ベースの反応は、多重試験における全ての標的分子の増幅に普遍的に適用可能である増幅プライマーの単一对（すなわち、上記した第2のプライマーセット）を用い、ついでそれは低下した非--標的増幅ならびにバンパー・プライマーの不存在による低下したプライマー競合相互作用を供する。

【0069】

さらに好ましい具体例において、連結プローブ・テンプレートは、初期S D A反応工程の間にその3'末端から伸長し得ないように改変する。適切な連結プローブを改変することにより、より詳細に後記するごとく、その3'末端が切断可

能な制限部位となるであろうものの形成により制限エンドヌクレアーゼによって切断され得る二本鎖核酸の形成が防がれる。この改変は、連結プローブの標的配列非依存的連結から生じ得る連結プローブ・テンプレートの増幅も防ぐ。

【0070】

連結ベースSDA法のもう1の好ましい具体例において、関心のある核酸を標的化し、連結プローブ・テンプレートを作製するのに用いたプローブの対は、その対の各プローブが標的結合配列および“増幅プライマー”結合配列（すなわち、前記した第2のプライマーセット）を含む点において二機能性である。標的結合に特異的な配列は、それが標的DNAの近接配列に相補的であるように選択する。増幅で用いた核酸配列を有する連結プローブ・テンプレート・プライマーの部分は、SDAの間に関心のある全ての標的種について増幅プライマーの単一セットを用い得るように選択する。

【0071】

さらなる具体例において、第1の増幅プライマーは、2の5'オーバーハングが生成されるように、連結プローブ・テンプレートの3'末端の連結プローブ・テンプレートに結合する。図23(a)を参照されたい。5'オーバーハングを有する二本鎖核酸は、通常、DNAポリメラーゼによるマイナス鎖の3'末端からの核酸合成を支持することができる。当該技術分野でよく知られているごとく、対峙する鎖に相補的である鎖に塩基を取り込ませることによって、核酸の1の鎖の長さを伸長することによりDNAポリメラーゼは機能する。

【0072】

しかしながら、さらなる好ましい具体例において、連結プローブ・テンプレートの3'末端からの核酸合成は、それが伸長することを抑える改変を有する3'末端により妨げられる。当業者であれば、この改変が、限定されるものではないが、連結プローブと増幅プライマーとの間に3'塩基誤対合を生成する；3'末端ジデオキシヌクレオチドを用いる；あるいは、例えばリン酸基で遊離3'ヒドロキシル基を置換える、ビオチン基、または当業者によく知られている他のブロッキング基を付加することによって、核酸骨格のペントース糖の3'炭素に存在する化学基を改変する、を含む多くの形態をとり得ることは理解する（出典明示して

本明細書の一部とみなす、標的非依存的連結を防ぐために連結プローブの末端を改変するために用いることができる種々の試薬を論じている、米国特許第5,516,663号、第5,573,907号および第5,792,607号を参照されたい)。この改変は、連結ベース増幅プロセスの間にエンドヌクレアーゼによって不適切に“切れ目”が入れられ得る二本鎖核酸の形成を妨害する。この改変は、連結プローブの標的配列非依存的連結から生じ得る連結プローブ・テンプレートの増幅も妨害し、連結プローブがプライマーに結合する場合に3'伸長を妨害する。この改変は、さらなる捕捉工程なしに、連結および増幅反応も進行させる。

【0073】

さらなる好ましい具体例において、連結プローブは、エンドヌクレアーゼ制限部位が連結プローブ・テンプレートの5'および3'末端付近に位置するように、エンドヌクレアーゼ制限部位をコードする配列を含むように設計する。反応混合物中に存在する制限エンドヌクレアーゼは、SDAが進行し得るように二本鎖核酸に切れ目を入れ得る。切断よりもDNAに切れ目を入れることを起こす。連結プローブの5'末端に相補的な鎖は、改変ヌクレオチド（例えば、dATP α SまたはdCTP α S）を含むヌクレオチドを用いてSDAの間に合成するからである。

【0074】

さらなる具体例において、（前記したごとく、それらの増幅が溶液中のSDAによって引き起こされるかまたは増幅の前に捕捉部位にアドレス指定されたプライマーによって捕捉部位で直接引き起こされるかにかかわらず）それらの対応する形成後に連結ベースのSDAから生じるアンプリコンを捕捉部位にアドレス指定し得る。

【0075】

本発明のなおもう1の具体例において、それによって試料中の標的核酸の存在を検出し得る幾つかの手段が、電子的にアドレス指定可能なチップと係留SDAの結合した適用により利用可能である。例えば、好ましい具体例において、捕捉部位にアドレス指定されたアンプリコンは、蛍光によって直接的に分離し得る。すなわち、検出がアンプリコンの生成と同時にるように緩衝液に蛍光色素を含

ませ得る。かかる蛍光化合物の例には、ボジピー (Bodipy) 誘導体、Cy 誘導体、フルオレセイン誘導体、およびローダミン誘導体が含まれ、これらは全て当該技術分野でよく知られている。別法として、捕捉部位における核酸の検出は、化学ルミネセンスまたはエレクトロ化学ルミネセンスを用いて直接的に行い得る。化学ルミネセンスはレポーター・オリゴヌクレオチドに結合した酵素の使用を取り込み、それは、適当な基質で活性化した場合、ルミネセンス・シグナルを発する。かかる酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼが含まれ、両方とも当該技術分野でよく知られている。エレクトロ化学ルミネセンス (ECL) は、6桁の大きさにわたるダイナミックレンジを有する非常に感度の高いプロセスである (200 fmol/L)。この系においては、反応種は電極の表面で安定な前駆体から生成する。これらの前駆体は互いに反応して、DNA鎖に結合した標識の励起状態を形成する。励起状態は通常の蛍光機構を通して基底状態に減衰し、 620 nm の波長を有する光子を発する。

【0076】

本明細書中に開示するプライマーを用いて生成した増幅産物は、例えば、エチジウムブロミドで染色したポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲル上で、特徴的なサイズによっても検出し得る。別法として、増幅した標的配列は、アッセイ・プローブによっても検出し得、これは検出可能な標識で標識したオリゴヌクレオチドである。1の具体例において、少なくとも1の標識アッセイプローブを、ハイブリダイゼーションによって (ディテクター・プローブ)、Walkerら (1992, Nucl. Acids. Res., 20: 1691-1696) によって記載されているハイブリダイゼーションおよび伸長によって (ディテクター・プローブ)、またはEP 0678582号に記載されているハイブリダイゼーション、伸長および二本鎖形態への変換によって、増幅した標的配列の検出に用い得る (単一プライマー)。好ましくは、アッセイ・プローブは、増幅プライマー間に存在する標的中の配列にハイブリダイズするように選択する。すなわち、それは、内部アッセイプローブとすべきである。別法として、その標的結合配列に対する増幅プライマーは、アッセイプローブとしても用い得る。

【0077】

アッセイプローブの検出可能な標識は、標的核酸の存在の表示として直接的または間接的のいずれかで検出し得る基である。標識の直接検出においては、当該技術分野で知られているごとく、アッセイ・プローブをラジオアイソトープで標識し、オートラジオグラフィーによって検出し得るか、または蛍光基で標識し、蛍光によって検出し得る。別法として、アッセイ・プローブは、それをアドレス指定可能とするためにはさらなる試薬を要する標識を付けることによって間接的に検出し得る。間接的に検出可能な標識には、例えば、標識した特異的結合パートナー（例えば、抗体または抗原／ハプテン）に結合することによって検出し得る、化学ルミネセンス剤、見える反応産物を生成する酵素、およびリガンド（例えば、ハプテン、抗体または抗原）が含まれる。リガンドは、固相にリガンドー標識オリゴヌクレオチド（捕捉プローブ）を固定化して、その検出を促進するのにも有用である。特に有用な標識には、（標識したアビジンまたはストレプトアビジンに結合することによって検出可能な）ビオチンおよび（酵素基質を添加して発色反応産物を生成することによって検出可能な）西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼのごとき酵素が含まれる。オリゴヌクレオチドにかかる標識を付加する、またはその中にかかる標識を含ませる方法は当該技術分野でよく知られており、これらいずれの方法も本発明における使用に好適である。

【0078】

用い得る特異的な検出方法の例には、米国特許第5,470,723号に記載されているごとく、ビオチン化捕捉プローブおよび酵素コンジュゲート・ディテクター・プローブを用いて増幅産物を検出する化学ルミネセンス法が含まれる。これらの2のアッセイ・プローブを（2の増幅プライマーの結合部位間の）標的配列のアッセイ領域中の異なる部位にハイブリダイゼーションさせた後に、複合体が捕捉プローブによってストレプトアビジン被覆したマイクロタイタープレート上に捕捉され、化学ルミネセンス・シグナルが発せられてルミノメーターで判読する。増幅産物を検出するためのもう1の別法として、EP 0678582号に記載されているシグナル・プライマーをS D A反応に含め得る。この具体例においては、標識し

た二次増幅産物を標的増幅依存性様式でS D Aの間に生成し、関連する標識によって標的増幅の指標として検出し得る。

【0079】

もう1の別の検出方法において、標的特異的プライマー（すなわち、バンパープライマーまたは係留プライマーでないプライマーである標的シグナル・プライマー）を、増幅工程手法に含め得る係留プライマーまたはバンパープライマー部位以外の位置の標的配列にアニーリングするように設計する。このシグナル・プライマーはシグナル分子で標識し得、ついでこれを用いて、S D Aの間にシグナル・プライマーの伸長から形成された伸長産物を検出し得る。例えば、かかる標識は、その捕捉が蛍光色素の存在によって検出し得るストレプトアビジンを含むするマイクロチップ場所に捕捉し得るビオチンを含み得る。

【0080】

なおもう1の本発明の態様において、シグナル・プライマー伸長産物またはアンプリコンの使用は、それによって他のものを超える1の標的アンプリコン鎖のモル比率を、標的配列の一本鎖増幅種がマイクロチップ上の特異的な部位に位置する捕捉プローブによる捕捉について維持され得るように生成し得る手段を提供する。換言すれば、シグナル・プライマーは、“非対称S D A”を許容する。さらに、増幅したシグナルを付けたアンプリコンは、二次捕捉部位に電子的にアドレス指定することができ、これは、高い検出のためにバックグラウンド・シグナルにおけるさらなる低下を促進する。

【0081】

商業的簡便性については、核酸の特異的検出および同定用の増幅プライマーは、キットの形態で梱包し得る。典型的には、かかるキットは、少なくとも一对の増幅プライマーを含む。核酸増幅反応を行うための試薬を標的・特異的増幅プライマーと共に含めることができ、これには、例えば緩衝液、さらなるプライマー、ヌクレオチド三リン酸、酵素、他が含まれる。キットの成分は、所望により発明の方法の特異的な具体例を行うための使用説明書を含んでいてもよい、通常の容器と一緒に梱包される。他の任意成分もキットに含めることができ、これは、例えばアッセイ・プローブとして使用するのに好適な標識で標識したオリゴ

ヌクレオチド、および／または標識を検出するための試薬もしくは手段を含む。

【0082】

好ましい具体例の詳細な説明

本発明は、試料中の核酸配列を増幅させるためのならびにそれらの配列を分析するための事項のデバイス、方法および組成物に広く関する。該増幅および分析は、SDAおよびバイオエレクトロニック・マイクロチップ技術を用いて最適に成される。

【0083】

実施例1

本発明の好ましい具体例において、電子的に制御された微小電極アレイを含むマイクロチップ・デバイスを、関心のある標的核酸を分析するために提供される。他のマイクロチップ・デバイスで使用される均一なハイブリダイゼーション反応環境および受動的ハイブリダイゼーションに対して、本発明の電子的マイクロチップベースのデバイスは、標的および／またはプライマー核酸を微小電極アレイの表面上の分離した場所の捕捉プローブに積極的に輸送およびハイブリダイズさせる能力を供する。

【0084】

ここで、図1Aおよび1Bに参照して、本発明の中で具体化される電子的にアドレス指定可能なマイクロチップベースのハイブリダイゼーション系の単純化バージョンを図示する。一般的には、基板10は電子的にアドレス指定可能な微小場所12のマトリクスまたはアレイを支持し、それは四角形または円形のごときいずれかの構造形状とし得る。説明の単純のため、図1Aの種々の微小場所は12A、12B、12Cおよび12Dと標識している。浸透層14は電極12の上方に配されており、全デバイス表面にわたって広がり得る。浸透層14はそれを通しての比較的小さい帯電基の輸送は許容するが、核酸のごとき大きな帯電基の運動は制限して、捕捉部位の浸透層の下方に位置する電極12と大きな帯電基が容易に直接接触することを抑制する。浸透層14は、電極12と直接接触した場合に起こり得る電気化学分解をも低下させる。ときとして、電気化学分解は、電気化学分解反応の間の電極表面の反応性ラジカル種および極端なpHの両方の形

成によって誘導される。さらに、浸透層は電極表面への核酸の強力な、非特異的吸着を最小限化するようにも作用する。結合領域または捕捉部位16は、浸透層14上に配され、標的物質に対する特異的結合部位を提供する。図1Aにおける捕捉部位16は、電極12A-Dの同定に対応して、各々、16A、16B、16Cおよび16Dと標識している。

【0085】

マイクロチップの中央領域は、複数の捕捉部位16を含有する領域の上方に試料拡散を位置させるための貯蔵部18を含む。好ましい具体例において、貯蔵部18内に位置する帯電した標的またはプローブ核酸のごとき帯電分子20は、いずれかの特異的な微小場所12に輸送され得る。活性化した場合、微小場所12は、電極12Aに向けてのいずれかの帯電分子20（例えば、プローブ、標的核酸またはアンプリコン）の自由場電気泳動輸送を発生させる。さらなる具体例において、プラスのバイアスで電極12Aをアドレス指定し、電極12Dをマイナスのバイアスでアドレス指定すると、電極12Aおよび12Dの間を走る力の電気泳動線22を生じ、さらにマイナス電荷を有する帯電分子20のプラス電極12Aに向けての輸送を生じる。正味マイナス電荷を有する帯電物質20は、電気泳動力下でマイナスに帯電した電極12Dに向けて運動する。電気泳動力下のその運動の結果として正味マイナスに帯電した分子20が捕捉部位16A浸透層に接触すると、帯電分子20は捕捉部位結合層16Aに結合するようになる。結合は以下に論じる多くの方法によって成し得、それには捕捉部位16に係留された相補的核酸プローブへの標的帯電分子20のハイブリダイゼーションによる結合が含まれる。

【0086】

本発明の電子的にアドレス指定可能なマイクロチップ・アレイは、捕捉プローブ・オリゴヌクレオチドのサイズ制限および受動的マイクロチップ・デバイスの複雑性要件を克服する。アドレス指定可能なマイクロチップは、少なくとも一部分、鎖分離に対する必要を大きく低下させる。核酸を捕捉部位に捕捉および増幅する前に溶液中に存在する二本鎖核酸の寄生を阻害する低イオン環境の電流系における使用だからである。さらに、本発明のマイクロチップ・アレイは、異なる

核酸試料を種々の微小電極場所を選択的かつ独立的に標的化することによって同一のオープン・マイクロアレイ表面上における複数の独立した試料分析（すなわち、多重試料分析）を許容する。換言すれば、それは、オープン・アレイ上の平行した複数の試料プロセッシングを許容する。後に詳記するごとく、受動的ハイブリダイゼーション法の前記した制限を克服する電子的標的化の能力を、以下の2の実施例AおよびBにおいて説明する。

【0087】

実施例A－試料中の単一標的核酸の平行分析

第1の実施例において、試験試料中の単一核酸の捕捉および検出の平行分析は、異なる細菌種によって共有される共通遺伝子座（16S rRNA）を用いて行った。個々の試料の複数比較分析を用いて異なる細菌の型を同定した。

16S リボソームRNAサブユニットの二次構造要件は16S rRNA遺伝子中の高度に保存された核酸配列を要求する。したがって、異なる種の細菌間でこの遺伝子中に制限された配列多様性が存在する。全体の高度な保存性にもかかわらず、16S rRNA遺伝子に微小な不均質のポケットが存在し、それは極めて関連する細菌種の間を識別するために活用し得る（例えば、C. Woese, 51, Microbiol. Revs., 221-271 (1987)を参照されたい）。

【0088】

保存された配列によるこれらの微小な不均質を一括することは、保存された配列を含有するほぼ全ての細菌種に対して共通増幅（すなわち、種にかかわらず同一のプライマーを用いる均一な増幅）用の多くのプライマーを設計する機会を提供する。図2Aに示すごとく、多型領域を挟む保存領域中にSDAプライマーを設計し、SDA反応に用いた。得られたアンプリコンには、16S rRNA遺伝子の“微小な不均質ドメイン”の種々の配列を含んでいた。これを種々の方法によって分析した。

【0089】

以下に示すごとく、共通SDAプライマーは、種一特異的アンプリコンを生成するために用い得、これをついで活動マイクロエレクトロニック・アレイ上のハイブリダイゼーションによって簡便に分析することができる。同様な実験が標的

増幅の手段としてPCRを用いて報告されている。例えば、D. Lintonら, 35, J. Clin. Microbiol., 2568-72 (1997), M. Hughesら, 35, J. Clin. Microbiol., 2464-71 (1997)を参照されたい。しかしながら、本発明はサンドイッチ・アッセイを用い、その中では、一本鎖捕捉プローブをアレイ上に電子的に沈澱させ、標的核酸またはそのアンプリコンとしての帯電分子の1の鎖を捕捉するように作用する。好ましい具体例において、核酸捕捉プローブのごとき複数の分子を、アレイの異なるパッドに電子的に沈澱させ得る。帯電分子を捕捉部位に捕捉させた後に、捕捉分子は、当該捕捉分子に結合する標識レポーター・プローブによって検出し得る。

【0090】

図2Aに概要的に図示するごとく、その3'末端近くの16S rRNA遺伝子は、両方の末端で保存された配列26によって挟まれた多型配列24の20を超えて広がる連続ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド領域を有する。本明細書中の配列表で特定する各細菌種のユニーク配列24を、電子的にアドレス指定可能なマイクロチップにおけるSDA反応に用いて、これらの多型配列およびそれらの対応するアンプリコンを特異的な捕捉部位に捕捉することによって異なる細菌種間を識別することができることを示す。より詳細には、細菌リボソームRNAの小サブユニットの高度に保存されたループIII構造に相補的な核酸配列を有するプライマーを設計する。配列中の種-特異的な対立遺伝子または点突然変異に相補的な3'塩基も設計し、作製した。図2Aに示すごとく、このプライマー構造により、同一の保存された核酸配列を有するいずれかの特定の群の生物に対するSDA増幅およびバンパー・プライマーを設計することが促進される。プライマーは、それがSDAにおいて使用するための“ユニバーサル”として群の生物を検出するようにも作製し得る。

【0091】

特異的な例において、細菌（イー・コリ (*E. coli*) 0157:H7, サルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)、シゲラ・ディセンテリア (*Shigera dysenteriae*)、および／またはカンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)）からのゲノミックDNAを増幅した。（より詳細に後記する）“

共通”プライマーをコードする同セットの16S rRNAを各SDA反応で用いた。SDA反応の産物を2%アガロースゲル上で分離して、異なる細菌種間の増幅効率を比較した。得られたゲルを図2Bに示す。ここではイー・コリ0157:H7、サルモネラ・チフィウムおよびシゲラ・ディセンテリアの各々について、ならびにカンピロバクター・ジェジュニからのゲノミックDNAを利用した他の実験において（データは示さず）同一レベルの増幅効率を得られた。以下の表Iは、これらの細菌種の増幅およびマイクロアレイ分析に用いたオリゴヌクレオチド配列を示す。

【0092】

2の異なるアプローチを用いて、増幅産物を分析した。第1の分析アプローチは、共通およびユニバーサル捕捉プローブならびに配列特異的プライマーを用いた（すなわち、ユニバーサル捕捉／特異的レポーター法）。第2の分析アプローチは、識別する捕捉プライマーおよびユニバーサル・プライマーを用いた（すなわち、特異的捕捉／ユニバーサル・レポーター法）。図2Cおよび2Dに示ごとく、ユニバーサル捕捉プローブ28およびユニバーサル・レポーター32は、遺伝子の保存領域26の少なくとも一部分に広がるように設計した（図2A）。また、図2Cおよび2Dに示すごとく、配列特異的捕捉プローブ35および配列特異的レポーター34は、多型領域24の少なくとも一部分に広がるように設計した（図2A）。

【0093】

ユニバーサル捕捉プローブ28を用いて核酸を捕捉する場合には、標的核酸とユニバーサル捕捉プローブとの間のハイブリダイゼーションの初期工程は、幾つかの理由により電子的に行った。第1に、電子的ハイブリダイゼーションは、非常に希釈された標的またはアンプリコンのごとき低濃度の材料で作動する場合に重要であるハイブリダイゼーションの動力学を大きく加速する。第2に、用いた緩衝液系の極めて低いイオン強度、標的およびアンプリコンが一本鎖のままでプローブによる捕捉を促進し、標的またはアンプリコンの相補鎖からより低い競合、ならびに、したがって、捕捉プローブに対する核酸のより高い正味特異的な結合のためである。その結果、電子的ハイブリダイゼーションは、捕捉プローブの

部位における遥かに高いレベルの核酸ハイブリダイゼーションを許容し、より高い検出および識別感度を生じる。

【0094】

この実施例の各場合において、レポーター・ハイブリダイゼーションは受動的、すなわち電子工学の助けなしに高い塩および温度で行う、であるが、電子工学を用いてもよい。この特定の実施例においては、一本鎖標識オリゴヌクレオチドの濃度は高いため、電子的ハイブリダイゼーション条件の使用を介して得られる実践的な動力学利点がほとんどなかった。しかしながら、異なる環境下では、レポーター・ハイブリダイゼーションの間の電子工学の使用は利点となり得る。

【0095】

図3Aに示すごとく、アンプリコンをマイクロチップ上の捕捉部位にアドレス指定し、蛍光レポーター分子によって検出した（後記する）。図2Aで論じた細菌16S rRNA標的の増幅産物がハイブリダイズした捕捉部位上の相対蛍光は高度に識別された（すなわち、多型特異的サルモネラ・レポーター、多型シゲラ・レポーター、および多型カンピロバクター・レポーター）。これらの実験において、ユニバーサル捕捉プローブ（“S”）を、対照としての非特異的捕捉プローブ（“NS”）と一緒に最初にマイクロチップにアドレス指定した。ついで、各菌株一特異的SDA反応からのアンプリコンを、各対応する列にアドレス指定し、特異的レポーター・プローブで受動的にハイブリダイズさせた。図3Aはサルモネラ特異的レポーターについての結果を示す。浸透層へのレポーター・プローブの非特異的結合の対照として、マイナス捕捉／マイナス標的対照も行った（-C/-T）。図示するごとく、捕捉部位にアドレス指定したサルモネラ・アンプリコンのみがプラスのシグナルを供した。図3Bに示すごとく、図3Aに示すサルモネラについて高い識別比が得られたのみならず、高い識別比は種々の他の細菌標的間についても示された（蛍光イメージ・データは示さず）。

【0096】

配列特異的捕捉プローブを用いて核酸を捕捉した場合には、標的と捕捉プローブとの間のハイブリダイゼーションの初期段階も電子的に行った。前記のユニバーサル捕捉実施例におけるごとく、レポーター配列は、16S rDNAアンプ

リコン26の保存された領域を認識するように設計した。図3Cに示すごとく、このアプローチは、対合と誤対合との間になおより高い識別比を供した。

【0097】

実施例B—複数の標的核酸の同時分析

第2の実施例において、多重アンプリコン分析を本発明の電子的マイクロアレイ上で行った。この実施例においては、ヒト第V因子Leiden (R506Q) 遺伝子（これは、活性化プロテインC耐性および種々の血栓症に対する素因を示す）の存在を検出するために複数の患者試料からの標的核酸を捕捉部位に順次アドレス指定した。この実施例においては、捕捉プローブは、R506Q遺伝子の対立遺伝子に特異的であるように設計し、それによって対立遺伝子—特異的SDAを検出する方法を提供する。

【0098】

本明細書中で説明するごとく、オープン・マイクロアレイ上の各捕捉部位は個別に電子制御し得るため、複数の試料を分析し得る。各試料増幅反応の増幅およびポジション—特異的な標的化の後に、標的化アンプリコンの存在または不存在について部位特異的な様式でアレイを評価した。試験系は幾つかの血液試料中のヒト第V因子Leiden突然変異の存在または不存在を検査した。X. Liuら, 4 Mol. Pathol., 191-197 (1995)を参照されたい。Leiden突然変異は第V因子遺伝子のプロテインC切断部位における単一の点突然変異である。この突然変異が患者において同型接合存在を有する場合、それは活性化プロテインC耐性および深刻な脈管血栓症に対する素因に通じる。例えば、R. Bertinaら, 369, Nature, 64-67 (1994)を参照されたい。

【0099】

識別における助けるために、対立遺伝子—特異的SDAアッセイを開発した。対立遺伝子—特異的SDAは、正常または突然変異第V因子Leiden対立遺伝子のいずれかを選択的に増幅するように設計した。アンチセンス向きのSDA増幅プライマーは、エキソン10のセンス鎖が存在して、正常ヌクレオチド塩基GまたはLeiden点突然変異ヌクレオチド塩基Aのいずれかに相補的な3'末端を有して設計した。後記の表Iは、第V因子遺伝子の増幅およびマイクロアレイ分析に用

いたオリゴヌクレオチドを示す。対応するセンス・プライマーは全反応において共通した。しかしながら、センス・プライマーは、電子的標的化の後にアレイ上のいずれかのアンプリコンを捕捉するための容易な機構を提供するために、その5'末端にビオチン基を導入することによって改変した。

【0100】

【表1】

表 I: 増幅およびマイクロアレイ分析に用いたオリゴヌクレオチド		
細菌 16S	配列 (5'-3') ¹	ポジション ²
BBs	CAAATGAATTGACGGGGGCC (配列番号 1)	927-946
Bba	AAGGGTTGCGCTCGT (配列番号 2)	1134-1120
Bas	ACCGCATCGAATGCATGTCCTCGGGTGCA TGTGGTTTAAT (配列番号 3)	961-975
Baa	ACGATTTCAGCTCCAGACTTCTCGGGTAAC ATTTACAACAC (配列番号 4)	1114-1090
Br ecoli	btr-CTCATCTCTGAAACTTC (配列番号 11)	
Brsdys	btr-CGTATCTCTACAAGGTTC (配列番号 12)	
Brstyp	btr-TCCATCTCTGGATTCTTC (配列番号 13)	
Brcej	btr-CATATCTCTATAAGGTTC (配列番号 14)	
ヒト第V因子	配列 (5'-3') ¹	ポジション ²
FVBs	ACTACAGTGACGTGGACATC (配列番号 5)	
FVBa	TGTTATCACACTGGTGCTAA ³ (配列番号 6)	
FVAs	bio- ACCGCATCGAATGCATGTCCTCGGGTCTC TGGGCTAATAGGA (配列番号 7)	
FVA wt	ACGATTTCAGCTCCAGACTTCTCGGGTAAT ACCTGTATTCTCTC (配列番号 8)	
FVA m	ACGATTTCAGCTCCAGACTTCTCGGGTAAT ACCTGTATTCTCTC (配列番号 9)	
FVR	btr-CTGTATTCTCTCGCTGTC (配列番号 10)	

【0101】

¹増幅プライマーにおいて、B s o B 1 認識部位はボールドフェイスで示し、ゲノム相同性は下線を引き、第V因子対立遺伝子-特異的3'末端はイタリックのボールドフェイスで示す。記号“bio”はビオチン・コンジュゲートを表し、“btr”は蛍光ボジピー・テキサス・レッド・トン寿ゲートを示す。FVRは第

V因子についてのレポーター、FVAは増幅用のセンス鎖で、一方、FVAwtおよびFVA_mは各々野生型および突然変異についての増幅プライマーである。FVBsおよびFVBaは第V因子についてのセンスおよびアンチセンス・バンパー・プライマーである。

²細菌16S配列はGenBankから、ヒト第V因子配列とはGenbank受入番号L32764をいう。

【0102】

この多重第V因子遺伝子実験においては、患者の第V因子Leiden突然変異状況の先の知見なしに、4の臨床DNA試料を2回分析した。2の対立遺伝子—特異的DNA反応を試料（正常または突然変異プライマーのいずれかを含有する）当りに行い、各患者の遺伝子型を調べた。増幅は平行で行った。5のこれらのペアの反応からのPAGE結果を図4Aに示し、ここではこれらの条件下の対立遺伝子—特異的増幅反応が非常に特異的であることが示されている。すなわち、目に見える突然変異または正常一型のアンプリコンの選択的な不存在は、増幅反応が、これらの個人における第V因子Leiden突然変異の存在または不存在に対して感受性であることを示している。

【0103】

ゲル分析によって決定した増幅材料の存在または不存在にかかわらず、全てのアンプリコン反応は均一に処理し、マイクロアレイ上の特異的場所に順次標的化した。3のDNA患者試料からの代表的な結果を図4Bに示す。これらの試料は2回標的化した。標的アンプリコン上の保存領域に相補的なハイブリダイズしたレポーター・オリゴヌクレオチド（すなわち、“ユニバーサル”レポーター・プローブ）からの蛍光シグナルの存在または不存在は、第V因子アンプリコンの存在または不存在を示す。示され得るように、蛍光シグナルは、図4Aで示されたゲルの結果とよく相関する。

【0104】

図4Aに示されるごとく、プラス・シグナルはバックグラウンド・シグナルよりも数倍大きかった。一般に、真の突然変異シグナルは野生型アンプリコンからのものよりも低い（図4Bに示されるごとく）。部位は、単純に、プラス・シグ

ナルを非アドレス指定した捕捉部位に存在するバックグラウンド蛍光を少なくとも2倍超えるものとする基準を作成することによって評点付けした。後記の表 I I に示すごとく、ゲル分析による増幅した材料の存在とアレイ上の強力または適度な蛍光シグナルの存在との間には完全な相関が存在した。

【0105】

蛍光シグナルの強度は、増幅材料の見かけの量に近づいた。このことは、図4 Aおよび4 Bにおける患者961 aからのDNAで示されたとき、明らかにあまり効率的でない増幅反応を用いた試料において最も顕著であった。要するに、これらの結果は、試料適用につづく単一レポーター検出による多重試料分析がマイクロエレクトロニクス・アレイを用いて作動すること、ならびに、このプロセスが同一または同様な分析における他の形態の分析、例えばゲル電気泳動、を補いまたは置換わるように作用し得ることを示している。

【0106】

これらの試料はそれらの突然変異状況を知る前に分析したため、増幅反応の見かけの対立遺伝子特異性が、実際に臨床状況に対応していたか否かを判定することに関心があった。後記の表 I I に示すごとく、対立遺伝子一特異的増幅反応の感度は、PCRおよびMn I I 制限部位分析によって決定した各試料の第V因子Leiden突然変異の状況と感染に一致した。(R. Press、未発表の知見)。したがって、対立遺伝子一特異的SDAと結合して、電子的にアドレス指定可能なアレイ上のアンプリコン生成物形成の分析は、複数の患者試料における遺伝子点突然変異を検出するための有用な方法である。

【0107】

【表2】

表 II: 対立遺伝子特異的第V因子のSDA増幅結果						
患者	サンプル日付	PAGE ¹		マイクロアレイ ¹		遺伝子型 ²
		wt	mut	wt	mut	
951961	04/10/97	X	X	X	X	異型接合
951961	06/04/97	X	X	X	X	異型接合
952018	04/10/97	X	O	X	O	同型接合 wt
952018	06/04/97	X	O	X	O	同型接合 wt
960286	04/10/97	O	X	O	X	同型接合 mut
960286	06/04/97	O	X	O	X	同型接合 mut

【0108】

¹ “X”はプラスを示し、“O”はマイナスを示す。

² 遺伝子型は当業者によく知られている方法によってMn-1制限酵素を用いるPCR-RFLPによって決定した。

【0109】

前記したデータで用いた実験プロトコール

材料—デオキシヌクレオチド5'-三リン酸(dGTP、dATP、TTP)はPharmacia, Alameda, Californiaから購入した。2'-デオキシシトシン 5'-O-(1-チオリン酸)(dCTPαS)、BsoB1制限エンドヌクレアーゼおよびBstポリメラーゼはBecton Dickinson, Sparks, Marylandによって供給された。オリゴヌクレオチドはOligos, Etc., Wilsonville, Oregonによって合成した。

【0110】

SDA増幅—増幅反応は30 μlの容量中、1 μgのゲノミックDNA(16S)または0.1 μgのゲノミックDNA(第V因子)のいずれかを利用した。増幅条件および濃度は、以下の変化で以前に示されたもの(C. Spargoら, 10 Molecular and Cellular Probes 247-256 (1996))から適合した:

出典明示して本明細書の一部とみなす、M. A. Millaら, Biotechniques, v24, p. 392-396, 1998年3月に開示され、その中で使用されたエキソ—BCAポリメラーゼに代る5'から3'エキソヌクレアーゼ欠失ポリメラーゼBst。16S増幅については、25 U/反応(Bst)および60 U/反応(BsoB1)を用いた。増幅反応に用いたオリゴヌクレオチドを前記表Iに示す。反応は、60℃にて30分間進行させ、10 μLの100 mM EDTAの添加によって終結させ、ついで-20℃にて保存した。

【0111】

ゲル電気泳動—増幅反応は、1%アガロース・ゲルまたは6%ポリアクリルアミド・ミニゲル(Novex, San Diego, California)のいずれかにつづいてエチジウム・ブロミド染色を用いる標準的なプロトコールで分析した。

エレクトロニック・マイクロアレイ分析—マイクロエレクトロニック・アレイ

・アセンブリは以前に記載されている。R. Sosnowskiら, 94 J. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 119-123 (1997)を参照されたい。捕捉オリゴヌクレオチド：GGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTC、Genbank遺伝子座988-1014bp（配列番号：15）およびアンプリコン（16S）またはレポーター・オリゴヌクレオチド（第V因子）のハイブリダイゼーションの電子的標的に用いた条件は他の場所で報告する。R. Sosnowski、前掲およびC. Edmanら, 25 J. Nucleic Acids Res. 4907-4914 (1997)を参照されたい。簡単には、蒸留水で予め平衡化したG6カラム（Biorad, Hercules, California）を介して2分間広げるか、または蒸留水に対して約5時間以上マルチウェル・プレート（Millipore, Bedford, Massachusetts）中に透析するか、のいずれかで粗製増幅反応を行った。ついで、調製した試料を100mMヒスチジンと1:1の比で混合し、電子的にアドレス指定する前に5分間95℃にて加熱した。16Sアンプリコンの分析については、アンプリコンの電子的ハイブリダイゼーションを行い、つづいて特異的細菌配列に相同的な蛍光標識オリゴヌクレオチド・レポーターの6×SSC中のハイブリダイゼーションを行った。特異的ヌクレオチド配列を前記表Iに示す。受動的ハイブリダイゼーションは、室温にて30分間進行させた。マイクロチップは、0.1×STE/1%SDSにつづいて1×STEを用いて5ないし8回洗浄した。16S細菌rRNA配列—特異的ビオチン—捕捉および検出用の共通btr—標識レポーターを持する同様な条件を、前記の単一標的実験に用いた。第V因子アンプリコンの分析については、蛍光標識オリゴヌクレオチド（btr-CTGTATTGCTCGCCTGTC）（配列番号：10）を6×SSCに導入し、室温にて30分間ハイブリダイズさせた。ついで、アレイを0.1×STE/1%SDSにつづいて1×STEで洗浄した。

【0112】

実施例2

ここで、本発明の電子的増幅態様に転じて、標的核酸を捕捉部位に位置する係留プライマーの付近に電子的に濃縮し、SDAまたは他の増幅方法で用いた。標的核酸はSDA反応成分（例えば、酵素、ヌクレオチド、他）を導入する前にマイクロチップ捕捉部位の表面に電子的に濃縮し、結合分子（例えば、捕捉プロ

ブ) にハイブリダイズさせ得、それによって、効率を高め、標的核酸の捕捉部位上の係留捕捉プライマーに対するハイブリダイゼーションに必要な時間を短縮し得る。SDA反応成分の添加前のマイクロアレイ上の特異的场所に対する標的核酸のハイブリダイゼーションは、アレイ表面を洗浄して望ましくないおおよそらく反応環境からの非標的核酸を妨害することを許容する。したがって、係留SDAのごとき増幅反応は、電子的にアドレス指定可能なマイクロアレイ系を用いることによって大きな恩恵を受け得る。

【0113】

増幅反応それ自体の成分（テンプレートおよび増幅プライマーなしに）を導入し、増幅反応を進行させた。テンプレート分子の電子的標的化を用いる少なくとも3の利点が存在する。第1は増幅プロセスの全体時間および効率が劇的に改善することである。主たる律速段階（係留プライマーを見出すためにテンプレートに必要な時間のもの）が全体反応速度から除去されるからである。また、電子的濃縮およびハイブリダイゼーションの使用は、等しい時間の間の非電子的な受動的ハイブリダイゼーションと比較して、選択された部位における標的分子の数を増加させ、それによって増幅用の出発テンプレート分子の絶対数を増加させて、増幅プロセスの全体収率およびより少ない出発テンプレート数に対する系の感度の両方における改善を生じる。

【0114】

第2の利点は、アレイ表面上の特異的场所に分離した標的核酸試料を適用し得、それによって1のアレイ上で複数の異なる核酸を同時に増幅させ得ることである。別法として、核酸は、複数の異なる増幅反応が単一の試料から同時に行い得るように、各々、特異的なセットの増幅プライマーを含有する幾つかの異なる場所に標的化することもできる。前に注記したごとく、反応混合物から不要なおおよびハイブリダイズしなかった核酸を除去する能力は、このプロセスを非常におおいに助ける。

【0115】

このアプローチに対する第3の利点は、増幅反応後に、増幅反応の過程の間に蛍光標識ヌクレオチドを導入するかまたは標識ヌクレオチドを取込ませることの

いずれかによって、あるいは捕捉部位に結合したアンプリコンの変性による反応の終点に適当なレポーター・オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせることによって、捕捉アンプリコンをつづく分析の部位-特異的な様式で利用可能であることである。

【0116】

この電子的アドレス指定具体例において、実験プロトコールは、マイクロチップアレイ上の係留SDAプライマー（配列番号：20および21）に対する第V因子をコードするテンプレート核酸の電子的ハイブリダイゼーションを用いることによって係留第V因子 SDA感度を向上するように設計した。SDAプライマーはその対応する5'末端でビオチニル化した。これらのプライマーは、BsoBI酵素切断部位も含む。反応混合物には、SDA用のバンパー・プライマー（配列番号：22および23）を含ませた。マイクロチップ・アレイは、当該マイクロチップの外側電極からストレプトアビジン-アガロース層を削ることによって調製した。チップの縁部はRain-Xで防水化し、表面は綿棒アプリケーションで磨いて掃除した。アレイはmilli-Q水を用いて室温にて少なくとも30分間インキュベートした。

【0117】

マイクロチップ上の電子的アドレス指定用に溶液を調製した。50mMヒスチジン緩衝液中の1 μ MのSDAプライマー、50mMヒスチジン緩衝液中の1 μ Mのビオチニル化T12-brtオリゴヌクレオチド、および50mMヒスチジン洗浄用緩衝液を調製した。マイクロチップは50mMヒスチジン緩衝液で洗浄し、標準的なA/Cプロトコール（800nアンペアで25秒）を用いてビオチニル化T12-btr・オリゴヌクレオチドを選択した捕捉部位にアドレス指定して、ストレプトアビジン・マイクロチップの質をチェックした。SDAプライマーは、標準的なA/Cプロトコールを用いて示す選択した捕捉部位にアドレス指定した。

【0118】

（受動的ハイブリダイゼーションとは反対に）電子的ハイブリダイゼーション実験については、二本鎖PCR核酸テンプレートを最初に95℃にて変性させ、

ついで等容量の100mMヒスチジン緩衝液をテンプレートに添加した。ついで、テンプレート混合物を、ハイブリダイゼーション用の標準的なA/Cプロトコール(1.6 μ Amp、60秒)を用いて捕捉SDAプライマーに電子的にハイブリダイズさせた。

【0119】

受動的ハイブリダイゼーション実験については、非対称PCR核酸テンプレートを最初に95℃にて5分間変性させた。ついで、20×SSC(3M NaCl、0.3Mクエン酸ナトリウム)ストック溶液を用いて4×SSC濃度とし、20 μ lの混合物をマイクロチップ(それは以前にSDAプライマーで電子的にアドレス指定されている)上にピペットで添加し、室温にて一晩インキュベートした。

【0120】

インキュベーション後、そのマイクロチップ・アレイを水で2×洗浄し、1mg/mlのBSAと一緒に室温にて30分間インキュベートして、いずれの非特異的結合部位をもブロックした。そのマイクロチップを水で再度洗浄し(2×)、60℃にて5分間予め温めた。全てのSDA溶液も60℃にて5分間予め温めた。予め温めた後に、水をマイクロチップから除去し、給湿チャンバー中で、10 μ lのSDA反応混合物(40mMの K_2HPO_4 、pH7.6、1.6mMの各dCTP α S、dTTP、dATPおよびdGTP、8.3mMのMgCl₂、1.3単位のBsoBIおよび0.5単位のBstポリメラーゼ)と一緒に60℃にて30分間インキュベートした。反応は、マイクロチップ表面上の上清を、2 μ lの100mM EDTAを含有するエッペンドルフ・チューブに取り出すことによって停止させた。

【0121】

SDA反応後に、マイクロチップを0.5×SSC、pH7.2で3×洗浄した。ついで、0.5×SSC、pH12.0を4分間添加して、SDA産物をマイクロチップ上でインーサイチュで変性させ、マイクロチップをさらなる緩衝液で毎分後に洗浄した。ついで、マイクロチップを0.5×SSC、pH7.2で少なくとも3回、ついで4×SSC、pH7.2で少なくとも3回洗浄した。そのマイ

クロチップを4×SSC中、(配列番号:24または44のごとき) b t rー標識レポーター・オリゴヌクレオチドの1 μM混合物と室温にて3分間インキュベートし、室温にて4×SSCでよく洗浄し、ついでイメージした。

【0122】

異なる部位における第V因子 SDAプライマーでアドレス指定したマイクロチップ上の第V因子テンプレートの受動的ハイブリダイゼーションについては、マイクロチップを、第V因子 SDAプライマーまたはSDA反应用のネガティブ・コントロールとしてB s o B I 部位を欠いている第V因子 SDAプライマーのいずれかでアドレス指定した。ネガティブ・コントロールはB s o B I 部位を欠いているため、反応はテンプレートの結合時にプライマー伸長のみを行い得、SDA増幅は行い得ない。この反応は、非-特異的結合の存在ならびにレポーター・オリゴヌクレオチドがそれと反応し得る非-特異的増幅産物の産生を制御する。いずれのテンプレート制御も存在しない。ついで、これらのマイクロチップを、蛍光透視法的に標識したb t rーレポーター・オリゴヌクレオチドを有する第V因子アンプリコンについて蛍光透視法的に分析した。SDA産物はSDAテンプレートを一晚受動的にハイブリダイズさせたマイクロチップにのみ見られた(図6C)。テンプレートを含まない対照マイクロチップ(図6A)またはB s o B I を反応物にインキュベートしなかったマイクロチップ(SDA反応についてのもう1のネガティブ・コントロール)(図6B)においては、産物は見られなかった。受動的にハイブリダイズしたマイクロチップ(図6C)においては、SDA産物はSDAプライマーをアドレス指定した領域にのみ見られたが、アレイの切断不可能なSDAプライマークアドラントにおいては見られず、検出された産物が特異的であって、SDAベースのプロセスによって駆動されることが確認された。このアッセイの欠点は、SDA反応後に見られるイメージが非常に弱く、非希釈テンプレート・レベルについて1 sの積算時間で14のMFI(平均蛍光イメージ)値を有することである。

【0123】

マイクロチップ上の係留SDAプライマーに対する第V因子炎プレートの電子的ハイブリダイゼーションについては、テンプレートのハイブリダイゼーション

を電子的アドレス指定によって促進した以外は、受動的ハイブリダイゼーションについて行った平行の様式で実験を行った。さらに、テンプレートも順次希釈した。対照として、第V因子テンプレートの受動的ハイブリダイゼーションを行い、SDA反応におけるバックグラウンドを超える非常に小さい増加（ほぼ1 MFI単位）を生じた。再度、切断不可能プライマー・クアドラントにおいてシグナルは見られず、これはこの系におけるSDA指向増幅の必要を示している。それとは反対に、電子的にハイブリダイズしたマイクロチップはSDAプライマー・クアドラントにおいてシグナルを示し（図8）、全ての試験した希釈において顕著なシグナルを示した（図9）。第V因子テンプレートの1：100の希釈においてでさえ、シグナルは、ほぼ19.4 MFI/秒で、なお非常に高かった。電子的にアドレス指定可能なマイクロチップの1：100希釈のMFIシグナルは、この実験における受動的にハイブリダイズしたチップからのシグナルよりも19.4倍高く（かつ、テンプレートを希釈しなかった前記の受動的ハイブリダイゼーション実験におけるよりも1.4倍高い）、SDAアッセイの効率も電子的ハイブリダイゼーション・プロトコルを用いることによってほぼ140-1940%上昇することが供された。これは、マイクロチップに係留されたSDAプライマーに対するテンプレートの電子的ハイブリダイゼーションがアッセイの感度をほぼ1000倍高めることを示している。さらに、全体のSDA実験を行うために要する時間は（有効な結合レベルを達成するためにはテンプレートを一晩インキュベートすることが必要な受動的ハイブリダイゼーションと比較して）まる1作業日短縮された。

【0124】

もう1の実施例において、本発明者らは、捕捉部位への標的分子の電子的アドレス指定が核酸配列ベース増幅（NASBA）として知られる技術を用いてDNAまたはRNA標的核酸の増幅を促進することを示す。この方法においては、3の異なる酵素活性を増幅の等温方法と調和した様式で用いる。この電子的に媒介するプロセスにおいては、異なる配列の同時または多重増幅は、部位特異的標的化および増幅によってかまたは複数のプライマー・セットを用いるかのいずれかによって可能である。さらに、本発明において実施するNASBAは、増幅溶液

中で係留したまたは溶液ベースのプライマーのいずれかで用い得る。いずれの場合においても、その対応する増幅プライマーへの標的の電子的アドレス指定を用いて反応を高める。

【0125】

この実施例においては、標的核酸配列を最初にマイクロチップ上の分離した場所に電子的にハイブリダイズさせた。電子的洗浄もしくは受動的（非電子的）洗浄またはそれら2つの組合せのいずれかによって、望ましくないまたは非一特異的結合核酸を除去する。洗浄工程の後に、ハイブリダイゼーション溶液を、増幅プライマー、ヌクレオチド、塩化マグネシウムおよび酵素または増幅に必要な酵素活性を含む緩衝液カクテルで取り替えた（その酵素活性とは、逆転写酵素活性；RNアーゼH活性；およびRNAポリメラーゼ活性である。これらの酵素の活性は、NASBAの様式と同様な様式で単離した配列を増幅するように協同して作用する）。増幅サイクルを完了したら、増幅した材料を電子的に単離および捕捉し、ついで当該技術分野で知られている種々の方法によって定量化（すなわち、検出）した。一般的に、かかる検出は、例えば、新たに合成した領域に特異的な捕捉オリゴヌクレオチドまたは“サンドイッチ・アッセイ”における蛍光標識オリゴヌクレオチドを用いて行い得る。

【0126】

このプロセスの各ステージは存在する技術と比較して増加した。例えば、標的配列の電子的標的化につづく適当な捕捉オリゴ（例えば、増幅用のプライマー）を用いるその特異的ハイブリダイゼーションは、望ましくないまたは夾雑しているDNAまたはRNAの電子的除去を許容する。非特異的な結合および増幅を引き起こし得る非特異的ヌクレオチドの除去は、非常に複雑な増幅事象が同時に起こることならびにより特異的な増幅を許容する。さらに、全ての増幅用プライマーが係留されている場合には、異なる標的配列を用いる増幅事象をチップまたはデバイス上の異なる場所で同時に、すなわち多重反応で起こし得る。酵素それ自体も標的化し得、これは増幅事象またはステージを媒介することにおいてより高い精密さを許容する。最後に、増幅反応の産物も別の部位に標的化して定量化し得、これは続いて起こる増幅反応の進行を許容する。

【0127】

その実験に限定されるものではないが1の代表において、HTLV1プラスミドのNASBA増幅を、3の異なるテンプレート・プラスミドの濃度（ほぼ1 ng、1 pgおよび1 fg）を用いて溶液中で行った。該反応は、95℃のDNAテンプレートの初期溶解につづく、50℃にて15分間の等温アニーリング工程を用いた。アニーリング反応は、8 μlの2.5×NASBA混合物（100 μLの25 mM NTP混合物、Pharmacia ロット番号60920250111；50 μLの25 mM dNTP混合物、Pharmacia ロット番号6092035011；50 μLの1 M トリス、pH 8.5；31.25 μLの2 M KCl；15 μLの1 M MgCl₂；および253.75 μLの滅菌水）、1 μlの5 μM濃度のオリゴヌクレオチド・プライマー（#885；5'AATTCTAA TACGACTCAC TATAGGGAGA GGTGATCTGATGTCTGGAC AGG3'）（配列番号：16）、および1 ng、1 pg、1 fgおよび0の最終濃度を達成する4の別々の試験管中の1 μgのHTLV1プラスミドの3の希釈のうちの1（または、なし）よりなる。95℃の変性工程を生存しないであろう酵素は増幅工程の最初に添加した。したがって、1 μLの100 mM DTT（ジチオスライツール）およびついで0.5 μLのAMVERT（Boehringer MannheimからのAMV逆転写酵素（カタログ番号1495 062；ロット番号83724624-76））は、50℃工程で添加した。反応は、95℃に5分間加熱することによって終結させた。試験間を氷上に置いた。

【0128】

アニーリング反応の後に、10 μLの2.5×NASBA混合物；1 μLの250 mM DTT；0.3 μLのRNアーゼH（Boehringer MannheimからのリボヌクレアーゼH、カタログ番号786 349；ロット番号13656445-05）；2.5 μLの酵素混合物（Boehringer Mannheimからの20 μl T7ポリメラーゼ、ロット番号83495822-31；8 μl AMV RT；0.2 μl RNアーゼH；およびPharmacia番号6078914011からの2.5 μgのRNアーゼおよびDNアーゼ・フリーのBSA（牛血清アルブミン））；6 μLのプライマー混合物（5 μLの5 μMプライマー番号885；5 μLの5 μM プライマー#882：ACTTCCCAGGGTTTGGACAGAGT（配列番号：17）；18.75 μLの100% DMSO；ならびに1.25

μL の H_2O) ; および各々別々の試験管に入れた、4のアニーリング反応試験管からの2 μL のプライムドDNAよりなる4の試験管においても増幅反応を設定した。反応物は40℃にて60分間インキュベートし、ついで氷上に置いた。ついで、反応物(10 μL)を2%アガロースゲル上で分離し、エチジウム・ブロミドで染色した。

【0129】

最高濃度の出発テンプレート・プラスミドは最大量の産物を産生し、一方より低い2の濃度は少ししかまたは全く産物を産生しなかった(図10a)。1 ng 反応物の産物(ゲル上の明るいバンド)をゲルから切出し、ついで50 mMのヒスチジン中で200-倍、500-倍または1000-倍のいずれかに希釈した。1 pgのテンプレート反応の反応産物も比較用に200-倍に希釈した。ついで、これらの反応産物希釈物を、1分間の500 μA 定電流を用いて、特異的(500 μM のXL5 R.bio, 5'TTCTTTTCGGATACCCAGTCTACGTGTTTG3'(配列番号: 18)または非特異的(ATAS.bio) 予め標的化した捕捉抗体のいずれかを含有するマイクロアレイ上の捕捉部位に電子的に標的化し、緩衝液を交換し、洗浄することなく次の捕捉部位に標的化した。反応産物を標的化した後に、捕捉部位をヒスチジン(50 mM)で5×洗浄し、25℃にて15分間、受動的に導入した蛍光標識レポーターオリゴ(HTVPXS.313TR; (NH₂)-ACTTCCCAGGGTTTGGACAGAGT3'(配列番号: 19) 15 μL)を用いて、各場所の蛍光を評価した(図10b)。1 mLの0.2×STE/1%SDSで3回洗浄し、STE/SDS中でさらに5分間洗浄した後に、捕捉部位を洗浄し、2秒のイメージをとった。その後、緩衝液をヒスチジンに取り替え、200 μA /パッドのカラムによって1分間捕捉部位を流し、洗浄し、2秒のイメージをとった。増幅した反応物の電子的サンドイッチ・アッセイの結果は、図10bに示すごとく、導入した増幅産物の相対量に平行した。

【0130】

実施例3

なおもう1の実施例において、係留SDAを、好ましくは特異的部位への標的核酸の電子的標的化を用いて、かつ、好ましくは大きな比率の性状SDAプライ

マーと組合せた切断不可能オリゴヌクレオチド（すなわち、切断不可能プライマーはS D Aに必要な必須の制限エンドヌクレアーゼ部位を含まないが、それは他の態様においてS D Aプライマーと同一である）をアレイ上の特異的部位に含めて行った。ついで、特異的部位へのテンプレート核酸の電子的標的化につづく増幅およびレポーター・ハイブリダイゼーションを用いて係留S D Aを行う。正常プライマーに対する切断不可能の最適比は経験的に決定し、レポーター標識から得たシグナルに基づく。別法として、つづく切断および分析または他の操作の目的で、他の部位および／または官能基をこれらの増幅不可能プライマーに導入し得る。これらの切断不可能プライマーの主たる基準は、標的核酸またはその増幅産物に十分なホモロジーを3'末端が含んで、ハイブリダイスし、ポリメラーゼによるプライマー伸長の基礎として作用することである。

【0131】

この実施例の特異的な実験において、異なる比率の標準第V因子増幅プライマーを、もはやB s o B I 部位が存在しないプライマーと混合した。これらの混合物をアレイ上の異なる場所に標的化し、希釈した第V因子 P C R アンプリコンを各場所に標的化した。ついで、全体のアレイを洗浄し、S D A 増幅反応成分を含有する混合物（増幅プライマーを除く）を添加した。変性後に増幅反応を60℃にて30分間進行させ、ボジピー-テキサスレッド標識レポーター・プローブを塩化してハイブリダイズさせた。ついで、各部位に存在する蛍光を定量化した。

【0132】

この実験に続く実験プロトコールは、以下の通りであった。最初に、外側電極からいずれのアガロースをも削り取り、各マイクロチップの表面をR a i n - X で処理することによって、電子的アドレス指定およびハイブリダイゼーション用のマイクロチップを調製した。該チップを3回水洗し、水中で少なくとも30分間放置した。ついで、第V因子 S D A プライマー（すなわち、配列番号：20および21）および切断不可能（NC）プライマー（すなわち、配列番号：42および43）を合計2 μMまで希釈し（S D A プライマーと混合した0-100%の切断不可能プライマーから、後記の表 I I I を参照されたい）、等容量の1

0.0 mMのヒスチジンを添加して5.0 mMのヒスチジン緩衝液中の1 μ Mプライマー溶液を作製した。次に、10 nM b t r-T12および1 μ M A T A-5オリゴを5.0 mMヒスチジン中に対照として調製した。ついで、第V因子テンプレート S D Aを適当な濃度まで希釈し、95.5 $^{\circ}$ Cにて約5分間インキュベートした。等容量の100 mMヒスチジンを添加して、最終濃度5.0 mMのヒスチジン緩衝液を作製した。

【0133】

【表3】

表 III: S D Aプライマー混合物に対する切断不可プライマー		
% 切断不可プライマー	2 μ M NCプライマー(μ l)	2 μ M SDAプライマー(μ l)
0	0	100
10	10	90
20	20	80
30	30	70
40	40	60
50	50	50
60	60	40
70	70	30
80	80	20
90	90	10
100	100	0

【0134】

ついで、S D A／切断不可能プライマー混合物ならびに対照を電子的にアドレス指定し、テンプレートを各マイクロチップ・アレイにハイブリダイズさせた。イメージをとり、マイクロチップを3回水洗し、1 mg/mlのB S Aと室温にて30分間インキュベートした。ついで、マイクロチップを2回水洗し、給湿チャンバー中（すなわち、湿らせたWhatman 3MMろ紙を有するペトリ皿）、60 $^{\circ}$ Cにて5分間予めインキュベートした。

【0135】

4.0 mMのK₂HPO₄、1.6 mMのd C T P α S、1.6 mMのd T T P、1.6 mMのd C T P、および1.6 mMのd G T P、8.3 mMのMg C l₂、1.3単位のB s o B I酵素、ならびに0.5単位のB s tポリメラーゼを含むS D A混合物を、60 $^{\circ}$ Cにて5分間予めインキュベートした。水をマイクロチップから除去し、10 μ lの予め温めたS D A混合物をマイクロチップを冷却するこ

となく、各マイクロチップに添加した。ついで、マイクロチップを60℃にて30分間インキュベートした。ついで、各マイクロチップから溶液を取り出し、それを2μlの100mM EDTAを含有するエッペンドルフ・チューブに移すことによってSDA反応を終結させた。ついで、非-変性ポリアクリルアミド・ゲル上で上清を分析した。

【0136】

そのマイクロチップを0.5×SSC溶液で少なくとも3回洗浄し、ここにSSC溶液は75mMのNaClおよび7.5mMのクエン酸ナトリウム、pH7.2を含む。次に、マイクロチップを、溶液を約毎分にピペットで上下させつつ、0.5×SSC、pH12溶液中で4分間インキュベートさせた。各マイクロチップを0.5×SSC、pH7.2で少なくとも3回洗浄し、ついで4×SSC溶液で再度3回洗浄した。ついで、4×SSC中の1μMのレポーター・オリゴヌクレオチドの受動的ハイブリダイゼーションを室温にて3分間行った。各マイクロチップを4×SSCでよく洗浄した。必要なら、0.2×SSC/1%SDSを用いてさらなるストリンジェント洗浄を室温にて5分間行った。ついで、マイクロチップを0.2×SSCでよく洗浄した。最後に、マイクロチップを適当なレーザーおよびフィルターでイメージし、各部位に存在する蛍光を定量化した。この実験からの結果を図11に示す。図11に示すごとく、係留SDA用のSDAプライマーに含まれる10%最適パーセントの切断不可能SDAプライマーは、切断不可能プライマー不存在下(0%)を超える特異的シグナルにおけるほぼ2倍の増加を与えた。予想されたごとく、SDAプライマーに対する切断不可能の比が上昇すると、SDA反応の効率は検出し得るSDA増幅が全く見られないレベルまで低下した。これは、効果においては二本鎖テンプレートの変性の前に切れ目を入れ得るいずれかのシグナルを保持する、SDAプライマー混合物への切断不可能プライマーの添加が、係留SDAにおけるシグナル強度を改善することを示す。

【0137】

実施例4

もう1つの具体例において、本発明の増幅方法は対立遺伝子-特異的SDA方

法を含む。該方法は、好ましくは、特異的対立遺伝子を含む鎖のみを選択的に増幅する。該方法は、好ましくは、それらの各3'末端が、所望の対立遺伝子のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド塩基を含むように設計された増幅プライマーを利用する。該プライマーの少なくとも1つは、好ましくは、電子標的化および増幅に続くアレイヘアンプリコンを捕捉する容易なメカニズムを供するためにその5'末端にビオチン部位を含むことができる。一般に、本実施例のプロセスの特異性は、プライマーの3'末端ヌクレオチドが標的配列に相補的でない場合に核酸鎖伸長の低い効率に由来する。

【0138】

この例の修飾において、個々の増幅された患者の核酸試料をマイクロアレイ上の別の位置に固定化し、全ての試料を遺伝子または対立遺伝子—特異的レポータープローブで同時にプローブする。個々の患者の試料は、SDAの間にビオチンを試料に導入することによって固定化される。制限切断部位を有しない、従って、切断可能でない5'ビオチンリンカーを含むSDAプライマーの1つを添加する。試料を変性し、個々の捕捉部位にアドレス指定させる。各患者からの一本鎖アンプリコンを個々の捕捉部位に固定化する。一旦全ての患者の試料が固定化されれば、それらを全て同時かつ平行してプローブする。かくして、開いたマイクロチップを用いて、最小の交差—汚染でもって複数の患者の試料を分析する。

【0139】

この例では、ビオチン化プライマーは、好ましくは、増幅で用いるフランキングプライマーの切断不能バージョンまたは内部配列のいずれかである。いずれの場合においても、それは死滅した目的生成物（すなわち、さらに増幅されないもの）を形成する。プライマーは、好ましくは、全プライマーが産物に変換されるように限定された量で存在させる。例えば、第V因子Leiden突然変異のごとき遺伝子突然変異につきスクリーニングする場合、2つの対立遺伝子（野生型および突然変異体）があるにすぎない。増幅は、野生型遺伝子座に対して特異的であるが、対立遺伝子に対しては特異的でないプライマー（すなわち、突然変異体）を用いて行われる。内部ビオチン化プライマーは、もし対立遺伝子が存在すれば、伸長を通じて全長アンプリコンよりも短い産物に変換される。次いで、該断片を

パッドにアドレス指定させ、引き続いて、対立遺伝子-特異的プローブでプローブするか、あるいは対立遺伝子-特異的ビオチン化内部プローブを用いる。増幅は蛍光標識ヌクレオチドの存在下で行うことができる。好ましくは、次いで、異なるパッドにアドレス指定される（野生型および突然変異体対立遺伝子のための）対立遺伝子-特異的プライマーとの2つの別々の反応で各患者の試料が増幅されるか、あるいは、2つの異なる色で蛍光を発するレポーター分子を用いて2つの反応を同時に行い、両方の産物を同一の捕捉部位にアドレス指定させる（この場合、その患者についての部位に残る発蛍光団によって、遺伝子型が決定されるであろう）。

（対立遺伝子-特異的方法および技術のさらなる具体例については実施例1Bを参照）。

【0140】

実施例5

もう1つの具体例において、SDA産物を同時に生じさせ、本発明のマイクロチップ上のフローセル領域において好熱性SDA（tSDA）を行うことによって、マイクロチップに特異的に捕捉することができる。（tSDAに対する議論については米国特許5,468,211号およびシグナルプライマー伸長に対する議論は米国特許5,547,861号参照（双方を引用して一体化させる））。tSDAとは、ストリンジェント・ハイブリダイゼーションを容易にするために40°Cを超える温度での操作を可能とする好熱酵素を用いるSDAを意味する。増幅に先立ち、5'ビオチン修飾を有する内部捕捉配列を、好ましくは、特異的ストレプトアビジン-含有捕捉部位の位置に固定化する。一本鎖アンプリコンはSDAプロセスの間に溶液中で生じるので、アンプリコンの画分は、固定化された捕捉オリゴヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする。ハイブリダイズされた鎖の検出は、好ましくは、本開始を通じて記載した方法のうちの1つを介して行われる。該方法のこの具体例は（例えば、約10 μ lのオーダーの）非常に小さな試料容量の使用を可能とし、好ましくは別々の捕捉部位に位置し、SDAプライミングを行うのに使用される配列に対して内部である捕捉用配列の使用により、特異性制御を可能とする。さらに、SDA反応の間に生じ、それにより、同時

SDAおよびSDA反応および生じたアンプリコンのモニタリングを容易とするので、捕捉された配列の検出は「リアルタイム」で起こり得る。

【0141】

この方法に関しては、検出用の蛍光種を取り込むのに2つの例示的なスキームがある。検出用蛍光種を取り込むための第1のスキームでは、図5Aに示すように、さらなるオリゴヌクレオチド36を増幅反応に含める。このさらなるオリゴヌクレオチドは蛍光標識され、増幅プロセスによって生じたその一本鎖コンプレマーに結合する。結合に際し、SDA反応で用いるポリメラーゼ37によって、このプライマーから5'ないし3'方向に重合が開始される。規則的な増幅プロセスの間に、増幅プライマーとして機能するオリゴヌクレオチドは、蛍光標識種と同一鎖に対して5'上流に結合する。ポリメラーゼ伸長はこのプライマーから起こるため、蛍光標識された鎖は置き換えられ、一本鎖種としてアレイ上の溶液に放出される。アレイ上には、予めアドレス指定された係留相補的オリゴヌクレオチドがある。これらは、蛍光標識オリゴヌクレオチドの一部を捕捉するように働き、アレイ上に蛍光シグナルを供し、これは位置一特異的であって、(従って配列特異的であり)反応の間にわたって増加し続ける。

【0142】

検出用の蛍光種を取り込むための第2のスキームにおいて、図5Bに示されるように、係留捕捉オリゴヌクレオチドは、SDA反応40を支持することができる未改変エンドヌクレアーゼ制限配列か、あるいはエンドヌクレアーゼ45によって認識されない改変された配列を有する。これらの係留捕捉プライマー種40および45を用いて、増幅反応の一本鎖産物42を結合させる。これらの捕捉オリゴヌクレオチド種40および45は、ポリメラーゼ活性によるオリゴヌクレオチド伸長のための部位として働く。増幅反応の完了に際して、好ましくは、(例えば、pH12でのアルカリ性を含めた)電子または化学的方法によって、二本鎖物質は融解し、元のアンプリコンおよび伸長産物43を放出する。アレイを洗浄し、次いで、蛍光標識されたオリゴヌクレオチド44を導入する。これらのレポーター・オリゴヌクレオチドは、捕捉オリゴヌクレオチド40および45のポリメラーゼ伸長部分のみに特異的にハイブリダイズする。このスキームにおいて

、切断不能オリゴヌクレオチドに対する切断可能オリゴヌクレオチドの比率は、約10：1であるのが好ましい。この比率は、レポータープローブによる検出用の捕捉部位に残存する十分な数の切断されていない伸長産物を供しつつ、増幅反応を最適に進行させると考えられている。

【0143】

実施例6

本発明のさらにもう1つの具体例において、SDAは、好ましくは、以下の条件下で電子的にアドレス指定可能なマイクロチップ上で直接的に行う。まず試料を調製し、約5kB未満までランダムに剪断する。次いで、試料を変性し、5'および3' SDAプライマー双方を含有する単一の捕捉部位に標的核酸を捕捉する。捕捉プライマーの直ぐ上流にある領域にハイブリダイズする「バンパー・プライマー」を、捕捉オリゴヌクレオチドの約1／10の相対濃度で添加する。SDA混合物（すなわち、3つの未改変dNTP、1つのチオール改変NTP、（および、恐らくは、蛍光標識されたNTP）および好ましくは好熱エキソ（－）DNAポリメラーゼと制限酵素）を受動的に添加する。次いで、マイクロチップを約40ないし60℃まで加熱し、SDAを進行させる。

【0144】

SDA反応および産物アンプリコンの「リアルタイム」検出は蛍光エネルギー交換または消光を可能とするNTPを取り込むことによって可能である。例えば、ボジピー・テキサスレッドを含有するNTPを、Cy5を含有するものと組み合わせる。ポリメラーゼ伸長を介するNTPの取り込みは、蛍光エネルギーのシフトをモニターすることによって継続的にモニターすることができる。

1つの理論の元では、パッド上の隣接オリゴヌクレオチドの間の好ましい最小の見積もられた間隔は約1.25nm ($10^4 \text{ODNs} / 80 \mu\text{m}^2 = 100 \times 10^6 / 80 \times (10^3)^2 \text{nm}^2 = 1.25 \text{ODN} / \text{nm}^2$) であると考えられる。もしオリゴヌクレオチド架橋がSDAを開始させるのに必要であれば、最適な増幅を可能とするSDA断片の最適な長さを経験的に決定することができると考えられる。出発点として、100bp = 34nmは妥当なようである。

【0145】

実施例7

この具体例においては、増幅プライマー、標的DNAおよび酵素分子の間の空間的關係を変更する係留SDA反応の新規な方法を提供する。両増幅プライマーは相互に近接されるので、SDA反応の効率は現実には増加する。また、増幅プライマーの間の空間的關係は、プライマーの間のリンカー・エレメントを変更することによって調製することもでき、それにより、プライマーの化学量論的比率、プライマーの局所的濃度、部位特異的テンプレート捕捉、およびプライマーの空間的關係の正確な定義を可能として、カップリング協働様式にてSDAメカニズムを設定し、標的DNAの指数関数的増幅に益することができる。

【0146】

さて、図12または図15を参照し、SDA標的捕捉プライマーを、電子的にアドレス指定可能なマイクロチップ上の特異的領域または捕捉部位5に結合させる。捕捉プライマーは、注目する標的核酸に特異的なSDAで要求される上流および下流プライマー対双方が捕捉部位において相互に近接するように各部位に結合される。図12については、分岐した構造3を捕捉部位5に、およびプラスおよびマイナス鎖SDA核酸プライマーの5'末端に結合させる。各プライマーについては、未改変制限部位配列1（すなわち、ヘミ修飾制限部位の未改変鎖）を、標的特異的捕捉配列2および4の5'側に位置させる。図15については、線状プラスおよびマイナス鎖核酸SDAプライマーを、それらの各5'末端において捕捉部位5に結合させる。分岐プライマー対と同様に、線状SDAプライマーは、標的特異的捕捉配列7および8に対して5'側に未改変制限部位6配列を含む。

【0147】

マイクロチップは、ここに引用して一体化させる米国特許第5,605,662号に開示された方法のごとき当該分野で知られた教示に従って調製することができる。この例においては、SDAプライマーの添加に先立って、ストレプトアビジン-アガロース層をマイクロチップの外部電極から掻き落とした。各マイクロチップのエッジはRain-X (Unelko Corporation, Scottsdale, Arizona) で耐水性とし、マイクロチップの表

面は脱脂綿アプリケーターで緩衝化し、清浄化した。マイクロチップを使用前に室温にて約30分間、ミリーQ水と共にインキュベートした。

【0148】

次いで、50mMヒスチジン緩衝液でマイクロチップを洗浄し、50mMヒスチジン緩衝液中に発蛍光団を有するビオチン化オリゴヌクレオチド（例えば、オリゴdT12-btr）を、標準A/Cでプロトコル（25秒間の80nAmp）を用いて捕捉部位にアドレス指定させ、ストレプトアビジン・マイクロチップの品質をチェックした。btr用の適当な励起および発光フィルターを用いてbtr発蛍光団をイメージした。SDAプライマー（配列番号20および21）を、同標準A/Cプロトコルを用いて、選択された捕捉部位にアドレス指定させた。

【0149】

図13に示すごとく、SDAは捕捉部位で行われる。二本鎖標的種の変性に続き、まず、一本鎖標的分子（例えば、図13に示されるプラス鎖10+）を捕捉部位にアドレス指定させる。種々のテンプレートの電子的ハイブリダイゼーションでは、二本鎖DNA標的配列をまず95℃で変性し、等しい容量の100mMヒスチジン緩衝液と混合した。次いで、ハイブリダイゼーション用の標準A/Cプロトコル（60秒間の1.6μAmp）を用い、テンプレート混合物を捕捉SDAプライマーに電子的にハイブリダイズさせた。テンプレート混合物のハイブリダイゼーション後に、マイクロチップを水で2回洗浄し、1mg/mlのBSAと共に、室温で30分間インキュベートして、いずれの非特異的結合部位もブロックした。マイクロチップを再度水で2回洗浄し、60℃にて5分間予備加温した。また、全てのSDA溶液も60℃にて5分間予備加温した。予備加温後に、水を除去し、給湿チャンバー中、10μl SDA反応混合物（40mM K_2HPO_4 pH7.6mMの各dCTPαS、dTTP、dATPおよびdGTP、8.3mM $MgCl_2$ 、1.3単位のBsoBIおよび0.5単位のBstポリメラーゼ）と共に60℃にて30分間、マイクロチップをインキュベートした。マイクロチップ表面からの上清を2μlの100mM EDTAを含むエッペンドルフ・チューブへ取り出すことによって反応を停止させた。

【0150】

図13に示すごとく、プラスおよびマイナス鎖双方の標的核酸の鎖伸長は置換を受けて、プラスおよびマイナス一本鎖アンプリコン（例えば12-および13+）を形成する。該プラスおよびマイナス鎖のアンプリコンは、各々、未使用プライマー対組に隣接してまたはその近くに電子的にハイブリダイズさせることができる。

【0151】

この例においては、SDA反応に続き、マイクロチップを0.5×SSC、pH7.2で3回洗浄した。次いで、0.5×SSC、pH12.0を添加して、SDA産物をイン・サイチュにてマイクロチップ上で4分間変性し、ここに、マイクロチップは1分ごとに新鮮な緩衝液で洗浄した。次いで、マイクロチップを0.5×SSC、pH7.2で少なくとも3回、4×SSC、pH7.2で約3回洗浄した。次いで、4×SSC中のb t r-標識レポーターオリゴヌクレオチドの1 μM混合物と共に、マイクロチップを室温で3分間インキュベートし、続いて、室温にて4×SSCで十分に洗浄し、次いで、適当なレーザーおよび励起／発光フィルターにてイメージした。

【0152】

係留SDAの効率を示すのを簡単にするために、この例は増幅に続いてSDA産物の検出を行うが、検出は、プローブの末端の3' OHよりはむしろ3' リン酸基を取り込むことによるごとく、それらの各3' 末端でブロックされた標識標的特異的プローブを用いて増幅の間に行うことができる。そのような標識されたプローブは、さらに、標的としての増大するシグナルの検出を可能とする捕捉部位に電子的にアドレス指定させることができる一本鎖核酸を含むことができ、プローブそれ自体がSDA伸長または増幅プロセスに参加することをなくして、アンプリコン種は捕捉パッド部位で増幅される。

【0153】

前記した電子制御される係留SDAに加えて、2つのさらなるプロトコルを対照として追跡し、ここに、受動的ハイブリダイゼーション、続いて係留SDAによって標的核酸は捕捉され、SDAは溶液中で行った。まず、受動的ハイブリダ

イゼーション実験において、二本鎖標的核酸をまず95℃にて5分間変性した。次いで、20×SSC（3M NaCl、0.3Mクエン酸ナトリウム）ストック溶液で4×SSC濃度とし、20μlの混合物を、（SDAプライマーで予め電子的にアドレス指定された）マイクロチップにピペットで移し、室温にて一晩インキュベートした。プライマーへの標的ハイブリダイゼーションに続いて、SDA実験を前記したごとく行った。

【0154】

第2に、SDAを溶液中で行う場合、マイクロチップは使用しなかった。この理由は、溶液ベースのSDAを行う目的は、溶液中とマイクロチップ上にて、標的種を複数の様式で増幅する能力を比較することにあつたからである。溶液ベースのSDA実験は、前記したごとく合計50μlのSDA混合物にてエッペンドルフ・チューブ中で行った。

【0155】

この例の第1の方法では、電子的にアドレス指定可能なマイクロチップ上の特異的位置にアドレス指定されたプライマー対を用い、3つの異なる標的核酸種をSDAによって増幅した。超純粋ヒト胎盤DNA、クラミジア（*Chlamydia*）ゲノムテンプレートおよびデオキシヌクレオシド三リン酸はBecton Dickinsonから入手した。ヘモクロマトーシスと関連する遺伝子配列および第V因子の存在を検出するよう指令された核酸用の標的テンプレートは、SDAバンパー・プライマー（配列番号22および23）およびヒト胎盤DNAを用いて得られた。そのようなテンプレートを増幅するためのPCR反応条件は増幅分野の当業者によく知られている。各テスト標的種のためのSDA捕捉プライマー対、バンパーおよびシグナル・プローブはOligos, Etc.（Oregon）によって合成し、PAGE-精製した。プライマー配列にコードされた制限部位はBsoBIであつた。

【0156】

以下のものは、標的種の各々についての種々のSDAプライマーおよびシグナル・プローブのリストである。：

SDAプライマーbiofacV10sSDA. 213（配列番号20）

5' [b i o t] ACCGCATCGAATGCATGTCCTCGGGTCT
CTGGGCTAATAGGA3'

SDAプライマーb i o f a c V a S D A. 297 (配列番号21)

5' [b i o t] ACGATTCAGCTCCAGACTTCTCGGGTCA
GAATTTCTGAAAGG3'

バンパー・プライマーf a c V 1 0 s. 179 (配列番号22) 5'

ACTACAGTGACGTGGACATC3'

バンパー・プライマーf a c V 1 0 a. -127 (配列番号23) 5'

TGTTATCACACTGGTGCTAA3'

シグナル・プローブf a c V 1 0 a. 276 (配列番号24) 5' [BTR]

CTGTATTCTCTCGCCTGTC3'

SDAプライマーc h l a A L 1. 4811 (配列番号25)

5' [b i o t] CACGTAGTCAATGCATGTCCTCGGGTAC
AACATCAACACCTG3'

SDAプライマーc h l a A R 1. 4858 (配列番号26)

5' [b i o t] ACGATTCAGCTCCAGACTTCTCGGGTGA
GACTGTTAAAGATA3'

バンパー・プライマーc h l a B L 1 (配列番号27) 5' CAGCAAATA
ATCCTTGG3'

バンパー・プライマーc h l a B R 1 (配列番号28) 5' CATTGGTTG
ATGGATTATT3'

シグナルプローブc h l a D I L. 4826 (配列番号29) 5' [BTR] G
TCGCAGCCAAAATG3'

シグナルプローブc h l a C P 2. 4841 (配列番号30) 5' [BRR] T
TCCATCAGAAGCTGT3'

SDAプライマーh a e m s d a s. 6679 (配列番号31)

5' [b i o t] CACGTAGTCAATGCATGTCCTCGGGTAT
AACCTTGGCTGTAC3'

SDAプライマーh a e m s d a a. 6773 (配列番号32)

5' [biot] ACGATTCAGCTCCAGACTTCTCGGGTGC
TCTCATCAGTCACA 3'

バンパー・プライマー haempcrs. 6596 (配列番号33) 5'

TGAAGGATAAGCAGCCAAT 3'

バンパー・プライマー haempcra. 6773 (配列番号34) 5'

CTCCTCTCAACCCCCCAATA 3'

シグナルプローブ haemreps. 6712 (配列番号35) 5'

[BTR] AGATATACGTGCCAGGTG 3'

シグナルプローブ haemreps. 6733 (配列番号36) 5'

[BTR] CTGATCCAGGCCTGGGTG 3'

【0157】

図16に示すごとく、第V因子 (FAC V) についてのビオチン化SDAプライマー、クラミジア (CHL) およびヘモクロマトーシス (HC) を、ストレプトアビジン-含有マイクロチップにつなぎ、第V因子、クラミジアおよびヘモクロマトーシス・テンプレートを電子的にプライマーにハイブリダイズさせた。また、対照テンプレートT12もつないだ。

【0158】

前記したごとく、係留SDAを60℃にて30分間、イン・サイチュにてマイクロチップ上で行い、それに従い処理した。理解されるごとく、テンプレートがマイクロチップ上のSDAプライマーにハイブリダイズしない場合、CDAアンプリコンは検出できない (図17)。しかしながら、テンプレートの混合物がSDAプライマーにハイブリダイズする場合、3つのアンプリコンシステムの同時増幅が観察できる (図18ないし20)。従って、全ての3つのタイプのSDAプライマーの存在下でテンプレートの1つの種のみがハイブリダイズする場合、対応するSDAプライマーがつながれた領域のみがシグナルを示し、増幅が起こったことを示す。これは、マイクロチップ上でイン・サイチュで行う場合の係留SDAシステムの特異性ならびに柔軟性を確認する。興味深いことには、図21に示すごとく、同一の3つのSDAプライマー組を用いて溶液ベースのSDAを行う場合、多重増幅は大いに危うくなる。第V因子、クラミジアおよびヘモク

ロマトーシスについて別々に、ならびに1つの反応(ALL)にて一緒に、溶液SDAを行い、続いて6.0%非変性ポリアクリルアミドゲルで分析した。理解されるごとく、別々に行う場合、全ての3つの系は増幅される。しかしながら、全ての3つのプライマー組およびテンプレートを1つの反応に組み合わせる場合、第V因子増幅は大いに低下する。加えて、受動的ハイブリダイゼーションによってテンプレートがプライマーにハイブリダイズした場合、恐らくは、テンプレートの再アニーリングによって引き起こされた効果的でないハイブリダイゼーションのため、増幅効率はかなり低下した。これらの結果は、溶液ベースおよび／または受動的ハイブリダイゼーション系で観察できるごとく、障害なくして、標的種の多重増幅および検出を行うことができる多重増幅系のための本発明のそれのごときシステムにつき当該分野での要求を強調する。

この例の第2の具体例において、分岐したSDA標的捕捉プライマー対の調製は多数の手段によって合成することができる。好ましい具体例においては、分岐した部位は後記するごとく生じさせることができる。まず、図22に示すごとく、Y-プライマー合成用の出発物質は、tert-ブチルオキシカルボニル保護 α -アミノ末端を持つビオチン-コンジュゲートドリシンである。該 α -アミノ末端のtert-ブチルオキシカルボニル(TBC)部位は、別々に、SDAプライマーアームの選択的結合を可能とする。この場合、 α -アミノ末端は保護されるが、 α -アミノ末端はカルボン酸と反応することができ、SDAセンスプライマーが α -アミノ末端に結合するのを可能とする。次いで、 α -アミノ末端をトリフルオロ酢酸/ジクロロメタン(TFA/DCM)で脱保護することができ、これはtert-ブチルオキシカルボニル部位を除去し、カルボン酸末端を介するSDAアンチセンスプライマーの結合を可能とする。この結合配列は、両SDAプライマーがそれらの各5'末端の分岐部位にアドレス指定されるY-プライマーの形成を可能とする。次いで、得られたY-形状プライマー対を、マイクロチップ上のストレプトアビジン浸透層に結合させることができる。

【0159】

係留SDAについてのY-形状プライマー対の合成は、1) SDAプライマーを相互に相対的に近接させ、それにより、1つの鎖の伸長されたアンプリコンの

間の相互作用の速度および反対側の鎖プライマーへの切断されたアンプリコンの引き続きでの結合を増加させることによって、および2) 通常のオリゴヌクレオチドSDAプライマーにわたる与えられた領域中のプライマーの密度を増加させることによって、SDA反応の全効率を2倍増加させることを意図する。前記した合成プロトコルにおいて、Y-プライマーがストレプトアビジン-ビオチン結合を介してマイクロチップ浸透層に結合され；しかしながら、限定されるのではないが、マクロ分子上へのプロリンクス、R-SHまたはいずれかの他の官能基を含めた他のアミド-結合の結合化学を用いることができる。前記したSDA反応を行うのに分岐プライマー対を用いることができる。

【0160】

実施例8

さらにもう1つの例は、SDAの間に生じるセンスおよびアンチセンスアンプリコンの間のハイブリダイゼーションの問題を扱うための非対称増幅方法を提供する。SDAを用いる場合、一般に、センスおよびアンチセンス鎖は等しい量で生じる。増幅の典型的な条件下では、相補鎖は一緒にハイブリダイズする。しかしながら、（捕捉オリゴヌクレオチドへのアンプリマーのハイブリダイゼーションおよび蛍光標識レポーターオリゴヌクレオチドによるハイブリダイズした物質の検出双方のための）マイクロエレクトロニックアレイ上の特異的部位へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、アンプリコンからの一本鎖種の生成を必要とする。従って、一緒にハイブリダイズする相補鎖は、1つの鎖が他方よりも余計に増幅されるのでなければ（すなわち、増幅が非対称でなければ）、アレイ上の捕捉へのハイブリダイゼーションに先立ちおよび／または標識レポーターによる検出に先立ち分離されなければならない。これは、通常、電子アドレッシングの前または後に熱または化学変性を用いて行われる。非対称増幅は、そのような熱サイクル工程に対する必要性を排除する。

【0161】

非対称増幅の鍵となる特徴は、その相補的アンプリコン配列にわたる1つのアンプリコンの優勢を生じさせることである。溶液環境において、この方法は、典型的には、増幅プライマーの比例しない比率を持たせることによって達成される

。増幅プロセスの最初の段階において、テンプレートに対して大過剰の効果的な濃度のセンスおよびアンチセンス増幅プライマーは、元の二本鎖テンプレート物質の指数関数的増幅に導く環境を作り出す。反応が進行するにつれ、元々少量で存在する増幅プライマーは効果的に消費され、それにより、過剰に残存するプライマーによる直線的増幅の条件に至る。S D Aの間における増幅された物質のポリメラーゼ媒介置換の特別の効果は、この直線的に増幅された物質が溶液中で遊離しており、二本鎖種の変性の必要性なくしてハイブリダイゼーションで利用できることを保証する。本発明の目的に関しては、別のアプローチは、両方のプライマーを同一の濃度にて、溶液中に入れるが、1つの鎖の創生を部分的には阻害するか、または「毒する」競合体を加えることである。時間がたつと、これは増幅された標的の1つの鎖の圧倒性に導く。

【0162】

捕捉プローブをつなげた場合、支配的な1つの鎖の創生は、溶液中で生じそこに放出されるアンプリコンの1つの鎖に相補的な係留捕捉プローブを設計することによって増強することができる。好ましい具体例において、捕捉プライマーは2つの点で正常なS D Aプライマーとは異なる。まず、それらは好ましくは機能的な制限部位を保有せず、それにより、エンドヌクレアーゼのニッキング／ポリメラーゼ伸長－置換工程をブロックする。第2に、捕捉プローブの3'末端は、好ましくは、ポリメラーゼ活性による伸長に適したものではない。S D Aの間に、この修飾された捕捉プライマーは効果的にアンプリコン鎖にハイブリダイズし、それをS D A経路からはずし、従って、それはさらなる増幅で利用できない。そのような単一鎖の捕捉は、S D Aが起こりつつある部位から離れた位置に位置する捕捉部位で起こるように仕向けることができる。かくして、アンプリコン集団のストランディッドネスの偏りが生じ、これは、増幅産物の1つの鎖の量の制限により非対称増幅の効果的な形態である。

【0163】

もう1つの例において、非対称増幅は、プライマーの与えられた組のプライマーのうちの1つの競合的阻害剤をS D A反応に含めることによって増強させることができる。前記した例におけるごとく、競合プライマーは、好ましくは、伸長

できないか、または切断できないかのいずれかである。競合プライマーを含めると、直線的反応プロセスを通じて単一鎖の創生に向けて反応を偏らせる。

オリゴヌクレオチド配列は、3' OH末端のブロッキング、およびテンプレート配列に対する3'末端ヌクレオチドのミスマッチを含めた種々の手段を用いて伸長不可能とされる。オリゴヌクレオチド配列は、ホスホロチオエートのごとき修飾された結合を含めることを介してオリゴヌクレオチド骨格を修飾することによって、またはより単純には、制限エンドヌクレアーゼ認識部位において配列を変更することによって切断不能とされる。それ自体修飾されたプローブはハイブリダイゼーションに対して十分にコンピテントのままである。競合体の配列は、好ましくは、増幅プライマーの1つのそれと同一（またはほとんど同一）である。従って、競合体は標的配列とのハイブリダイゼーションにつき増幅プライマーと競合することができる。標的配列に結合すると、競合体は、1) DNAポリメラーゼによって伸長できないか、2) 伸長されて、標的配列のコピーを生じさせることができる。競合体を伸長させる場合、競合体は、標的配列の得られたコピーが制限酵素によって切断できないように修飾される。使用される増幅方法に応じて、異なるタイプの競合体が用いられる。

【0164】

PCRにおいて、競合体は伸長できないように修飾される。適当な修飾は前記した通りである。反応の各サイクルにおいて、競合体は、利用できる標的配列へのハイブリダイゼーションにつきPCRプライマーのうちの1つと競合する。例えば、競合体がPCRプライマーの濃度の10%で添加される反応において、ほぼ10%のハイブリダイゼーション事象が、伸長産物が生じ得ない点で不成功となろう。反対のPCRプライマーは、全ての利用でき標的配列に自由にハイブリダイズし、伸長される。従って、2つの伸長産物の相対的数の約10%の偏りが、いずれの与えられたサイクルにおいても生じる。標的濃度が低いので初期サイクルでの10%偏りは有意ではなく、そのような偏りが（伸長産物のnM量以上が生じる場合には）後期段階のサイクルで高い濃度の一本鎖物質を生じるであろう。

【0165】

S D Sにおいて、いくつかの方法が好ましい。伸長不可能競合体の使用は、ニッキングおよび伸長反応が一本鎖の置換された産物の1つを優先的に生じさせるようにする二本鎖テンプレートの生成を偏らせるであろう。伸長可能で切断不能な競合体の使用は、ニッキング／置換反応に参加できない二本鎖産物を生じさせることによって非対称に導く。1つの鎖のみがニックされ、置き換えることができる場合、切断不能プライマーから生じた伸長産物は二本鎖分子の一部となるので、両方のタイプの競合体の使用が最適であろう（図14参照）。

【0166】

実施例9

本発明のこの実施例において、電子的にアドレス指定可能なマイクロチップと組み合わせてS D Aが行われ、ここに、S D A反応の気圧を上昇させる。

ゲノム核酸が用いられる場合、それはほぼ250ないし500bpの間の断片に切断されるのが好ましい。これは、H h a I、F o k IまたはD p n Iのごとき切断酵素によって行うことができる。酵素および配列の長さの選択は、希望する標的配列が生じた断片内にその全部が含まれるか、あるいは標的配列の少なくとも十分な部分が断片中に存在して、S D A増幅プライマーの十分な結合を供するようにすべきである。断片を生じさせるための他の方法は、P C Rおよび音波処理を含む。

【0167】

この方法で用いられるプライマーは、一般に、25ないし100ヌクレオチドの長さを有する。ほぼ40ヌクレオチドのプライマーが好ましい。プライマー核酸配列は、高ストリンジェンシー条件下でプライマーおよびテンプレート核酸の間のハイブリダイゼーションが起こるように標的配列に対して実質的に相同であるべきである。

【0168】

標的核酸断片は、変性させてそれを一本鎖とし、標的鎖へのプライマーの結合を可能とする。反応の温度をほぼ95℃まで上昇させるのが、核酸を変性させるための好ましい方法である。他の方法はpHを上昇させることを含むが、これは、プライマーを標的に結合させるためにpHを低下させることを必要とするであら

う。一本鎖標的分子の形成に続き、本明細書中に記載した多数の実施例で議論したごとくにSDAを行う。典型的には、SDA反応は、増幅の間における1つの鎖のニックングを容易とするための、プライマー伸長の間における少なくとも1つの置換されたヌクレオチドの使用を含む。ヌクレアーゼは、前記したSDAで典型的には有用であるいずれのヌクレアーゼであってもよい。

【0169】

この方法の好ましい具体例において、気圧は、SDA反応の成分を合わせる前または後いずれかに上昇させる。該圧力を上昇させて、スター (star) 活性を低下させ、その標的に対する制限エンドヌクレアーゼの特異性を効果的に増大させる。上昇した圧力の適用は、テンプレート核酸とのプライマーの相互作用の特異性および使用される酵素の全反応速度も上昇させることができ、それにより、その特異性を増加させつつ、SDA反応に必要な時間を短くする。スター活性を低下させることによって、テンプレート非依存性増幅は減少し、それにより、非特異的増幅による試薬の競合的消費を減少させる。

【0170】

上昇した圧力は、種々の方法によって増幅の間に適用することができる。例えば、反応は高圧容器中で行うことができるであろう。また、高圧装置 (High Pressure Equipment Co., Erie, PA) またはその一部に装着した反応チャンバーに容器を入れることによって、反応を行うこともできる。それによって、標的核酸、ヌクレオシド三リン酸および酵素を含有する水溶液に圧力を適用することができるシリコーン油 (Sigma) のごとき非混和性相で水性反応媒体を覆うのが有利であろう。好ましくは、圧力は約100ないし約500気圧の範囲で上昇させる。

この方法で有用なポリメラーゼは、切れ目部位において5'から3'への重合を開始させるポリメラーゼを含む。該ポリメラーゼは重合された鎖を切れ目から下流を置き換えるべきであり、重要なことには、いずれの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性も欠き、熱安定性でもあるべきである。DNAポリメラーゼIの大きな断片およびDNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠損クレノウ断片ならびにBstポリメラーゼからの同様の断片 (New England Biochemicals, Beverly, Mass.) のごときポリメラーゼが好ましい。SEQUENASE1.0およびSEQUENASE2.

0 (U.S. Biochemical)、T5 DNAポリメラーゼおよびPhi 29 DNAポリメラーゼもまた有用である。一般に、好熱性DNAポリメラーゼが好ましい。Bacillus stearothermophilus New England Biochemicals, Beverly, Mass.)からのBst DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ欠損好熱性クレノウ断片が最も好ましい。

【0171】

この方法においては、変性が起こってしまった後に単一の反応温度を用いることができ、そのような温度は、非特異的結合を最小化するストリンジェンシーのレベルを設定するのに十分高いが、標的鎖への特異的ハイブリダイゼーションを可能とするには十分に低くすべきである。加えて、好ましくは、約45℃ないし65℃の温度の使用は効果的な酵素活性を支持するはずである。酵素および核酸の変性は回避すべきである。

【0172】

SDA反応サイクルの間に、理論的には約20反復またはサイクルの結果、約 10^6 倍の増幅となる（すなわち、 $SDA \times 2^{20} = 10^6$ ）。典型的には、 10^8 倍以上の増幅が約30分の増幅で観察される。

配列決定のための高忠実度一本鎖核酸プローブまたは一本鎖テンプレートの生成を含めた種々の使用では、高圧SDAが便利である。この目標では、単一のプライマーにて、あるいは1つのプライマーが他のプライマーよりも過剰である場合には、2つのプライマーを用いて高圧SDAを行うことができる。その結果、他方よりも1つの置き換えられた一本鎖が過剰に生産される。

【0173】

次いで、増幅された標的の存在は、いずれかの数の方法によって検出することができる。1つの方法は、ゲル電気泳動によって特異的サイズの反応産物を検出することである。この方法は、使用されるヌクレオチドが ^{32}P のごとき放射性標識で標識される場合に特に有用である。他の方法は、ビオチンのごとき物理的標識でヌクレオチドを標識することを含む。次いで、ペルオキシダーゼのごときシグナル発生酵素に結合したアビジンによって、ビオチン含有反応産物を同定することができる。もう1つの方法は、蛍光標識内部プライマーの伸長である。

本発明の実施で有用な検出系は、分離を要しない同種系、および異種系を含む。各系において、1以上の検出マーカーを用い、検出系からの反応または発光を好ましくは自動手段によってモニターする。同種系の例は、蛍光偏光、酵素媒介免疫アッセイ、蛍光エネルギー移動、ハイブリダイゼーション保護（例えば、アクリジニウムルミネセンス）およびクローン化酵素ドナー免疫アッセイを含む。異種系の例は、（ペルオキシダーゼアルカリ性ホスファターゼおよびベーターガラクトシターゼのごとき）酵素標識、（酵素標識および直接的蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）のごとき）蛍光標識、ケミルミネセンスおよびバイオルミネセンスを含む。リポソームまたは他の袋様粒子を色素および他の検出マーカーで充填することができ、そのような検出系で用いることができる。これらの系において、検出マーカーを捕捉部位に直接的または間接的に結合させることができるか、あるいは受容体に対するリガンドによって認識することができる受容体の存在下で、増幅された産物を生じさせることができる。

【0174】

上昇した圧力下での鎖 - 置換増幅（SDA）についてのプロトコル

増幅反応は、50 μ l の全容量にてほぼ100 ngのゲノムDNA（第V因子）を利用する。ゲノムDNA（ヒト胎盤DNA； Becton-Dickinson）を95℃にて5分間変性し、続いて、遠心して濃縮物を収集する。次に、1 μ l のSDAプライマーを添加し（50 μ Mの各反応）、60℃にて5分間インキュベートする。SDA混合物（40mM K_2HPO_4 pH7.6、1.4mMの各CTP、 α S、dTTP、tATPおよびdGTP、8.3mM $MgCl_2$ 、40単位/rxn BsoBI（New England Biochemicals）、15.6単位/rxn Bstポリメラーゼ（New England Biochemicals）、および0.05 μ Mの各SDAバンパー・プライマーを添加し60℃にて5分間予備加温し、続いて、該混合物をSDAプライマーおよび標的試料に添加する。シリコン油を反応チューブの頂部に添加し、高压チャンバー中に入れる。圧力を100および500気圧の間まで上昇させ、60℃にて30分間インキュベートする。反応時間につき、圧力を気圧まで低下させ、10 μ l の100mM EDTAの添加によって停止させる。SDA産物は、6%非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動するこ

とによって可視化される。該ゲルを臭化エチジウムで染色し、UV - 蛍光下で写真を撮る。

【0175】

別法として、ポリメラーゼおよび／または制限エンドヌクレアーゼの添加に先立って温度／圧力を上昇させるデバイスを用いることができる。

上昇した圧力の使用は、前記した係留SDAまたはいずれかのSDA手法の実行で用いることもできる。具体的には、係留SDAが電子的にアドレス指定可能なマイクロチップで行われる場合、プライマー非依存性増幅を減少させることによって、上昇圧はスター活性を減少させ、効率を増大させるべきである。

【0176】

実施例10

もう1つの例において、SDA反応が「連結－依存性」または「連結－ベース」である電子的にアドレス指定可能なマイクロチップと組み合わせてSDAを用いることができる。この方法は、1対のユニバーサル増幅プライマーを用いて、連結されたプローブをSDA増幅することを含む。増幅プライマーは、反応が多重化されるか、または単数標的に向けられるかにかかわらず、テスト反応で全ての連結プローブを増幅するようにそれが設計されている意味で普遍的である。連結されたプローブは、標的配列にハイブリダイズされた1対の連結プローブを一緒に連結することによって形成される。バンパープライマーは必要ではない。

【0177】

もう1つの具体例において、連結－ベースのSDAの方法が提供され、該方法は電子マイクロチップによって援助されない。この具体例において、とりわけ、いずれかのプライマーをつなぐ必要はなく、これは、プライマーは普遍的である、すなわち標的配列を特異的プライマーに向ける必要性がないゆえに、多重増幅の間にプライマー組を分離するのを助ける手法である。

【0178】

オリゴヌクレオチド試薬の以下の機能的記載は、それらの現実の物理的組成を規定し、または限定する意図ではない。むしろ、該記載は、各試薬がある機能的特徴を呈することを示すにすぎない。かくして、特異的核酸配列が1を超える機

能を達成することができる場合、与えられたオリゴヌクレオチド試薬の機能的領域は重複するか、または、事実共伸長できることに注意すべきである。加えて、いずれの与えられたオリゴマーにおける個々の塩基配列も、注目する標的核酸、S D Aでの使用のために選択された制限酵素、または増幅プライマーの一部のために選択された任意の配列および連結プローブに依存し、従って、ある程度の普遍性を増幅プロトコルに取り込むことができる。

【0179】

操作において、図23 (a-c) に示すごとく、連結ベースのS D A方法は、標的上の隣接核酸配列にアニールする一对の連結プローブを用いる。機能的には、連結プローブの対は、それらが標的にアニールして連結されたプローブテンプレートを形成しつつ、一緒に連結されうるように標的核酸配列に結合する。連結は、連結プローブ対の双方の連結プローブの標的配列へのハイブリダイゼーションに続いてのみ起こる。

【0180】

第1の連結プローブは3つの機能的領域：標的核酸にハイブリダイズできる5'領域；中央領域；および第1の増幅プライマーにハイブリダイズできる核酸配列を含む3'領域に分けることができる。また、第2の連結プローブは、3つの機能的領域：第2の増幅プライマーに見出される核酸配列と同一の核酸配列を有しかつ、制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有する5'領域；中央領域；および標的核酸にハイブリダイズすることができる3'領域に分けることができる。

増幅プライマーに関しては、第1の増幅プライマーは2つの機能的領域：制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含有する5'領域および第1の連結プローブにハイブリダイズすることができる3'領域に分けることができる。また、第2の増幅プライマーは、2つの機能的領域：DNA制限エンドヌクレアーゼに対する認識部位を含有する5'領域および第2の連結プローブの5'領域と同一の配列を有する核酸配列を含む3'領域に分けることができる。

【0181】

連結ベースのS D A反応は、多数の構成要素である工程を含む。工程1において、連結プローブの該対は、第2の連結プローブが、第1の連結プローブのハ

イブリダイゼーション位置に対して3'側にある標的上の位置にて標的鎖にハイブリダイズするように一本鎖標的核酸の隣接配列にアニールする。工程2において、DNAリガーゼは2つの連結プローブの連結を触媒して、連結されたプローブテンプレートを形成する。好ましい具体例において、連結されたプローブテンプレートの3'末端を修飾して、その末端からのプライマー伸長を防止する(図23(a-c))。

【0182】

工程3において、第1の増幅プライマーは、該増幅プライマーがテンプレートの末端を超えて伸び、5'突出を形成するように、連結されたプローブテンプレートの3'末端に結合する。好ましい具体例において、DNAポリメラーゼは、第1の増幅プライマーの3'末端からの新しいDNA合成を触媒し、連結されたプローブが標的核酸から置き換えられるようにする。この結果、一本鎖標的核酸が放出され、5'突出を有する二本鎖DNAオリゴヌクレオチドが作り出される(標識された産物I、図23)。一本鎖標的核酸の放出および二本鎖オリゴヌクレオチドの創生はバンパー・プライマーの助けを借りることなく起こる。さらに、標的一本鎖は、連結されていない第1および第2連結プローブのさらなる結合で利用できるようになる。

【0183】

産物Iは、かくして、連結されたプローブテンプレートに対応する5'から3'の配列を有する第1の鎖、および第1の増幅プライマーの5'末端に対応するその5'末端にさらなる核酸配列を持つ連結されたプローブテンプレート鎖に相補的な第2の鎖を含む。この2本鎖DNA分子は、ユニバーサル増幅プライマーによって結合でき、増幅できる一本鎖DNA分子を生ずる一連のSDA反応を受けることができる。また、これらの反応に由来する2本鎖DNA分子は増幅に対して感受性でもある。制限エンドヌクレアーゼによるニッキング、続いてのプライマー伸長および鎖置換は2本鎖DNA出発物質を実質的に再生する。一緒に考え合わせると、これらの連結-依存性SDA反応は、連結されたプローブに対応するオリゴヌクレオチド配列を結局は増幅し、それにより、標的配列の検出を可能とする。これらの反応は後で詳細に記載する。

【0184】

工程5において、産物Iは制限酵素によって切れ目を入れられて、産物IIを生じる。工程6において、産物IIはプライマー伸長および当該切れ目からの鎖置換を受け、その結果、産物IIIおよび産物IVが得られる。産物IIIは、(産物Iの第1の鎖に対応する)産物IIIの第1の鎖が第1の増幅プライマーの5'末端に相補的なその3'末端においてさらなる配列を含有する以外は産物Iと実質的に同一である。産物IVは、この鎖が制限エンドヌクレアーゼによって切れ目を入れた場所の3'側に位置する産物IIの第1の鎖を含む配列を持つ1本鎖分子である。

【0185】

工程7において、産物IIIは制限エンドヌクレアーゼによって切れ目を入れられて産物Vを生じる。工程8において、産物Vはプライマー伸長および鎖置換を受けて産物VIおよび産物VIIを生じる。産物VIは産物IIIと実質的に同一である。産物VIIは、切れ目を入れた部位の3'側に位置する産物Vの切れ目を入れた鎖を含む1本鎖DNA分子である。

【0186】

工程9において、第2の増幅プライマーは産物VIIに結合する。工程10において、産物VIIは両方向のプライマー伸長反応を受けて産物VIIIを生じる。産物VIIIは2本鎖核酸分子であり、第1の鎖は産物VIIに対応する配列+第2の増幅プライマーの5'領域に相補的なさらなる3'配列を有し、第2の鎖は第1の鎖に相補的である。工程11において、産物VIIIは制限エンドヌクレアーゼで切れ目を入れられて産物IXを生じる。産物IXは、産物IXの5'末端が第2の増幅プライマーの5'領域に対応する核酸中に切れ目を含有する以外は産物VIIIと実質的に同一である。工程12において、産物IXはプライマー伸長および鎖置換を受けて産物XおよびXIを生じる。産物Xは産物VIIIと同一である。産物XIは、産物IXの切れ目を入れた鎖上の、当該切れ目の3'側の配列に対応する配列を持つ1本鎖核酸分子である。工程13において、産物XIには第1の増幅プライマーが結合し、工程14においては、両方向のプライマー伸長の結果、産物XIIが得られる。産物XIIは、それが、工程

6の後であって、工程7に先立って前記した反応経路に入ることができる意味で、産物IIIと同様な二本鎖核酸分子である。かくして、連結-依存性SDA経路の最初の反応産物は結局は実質的に再生される。

【0187】

前記したごとく、該SDA反応は係留プローブを用いて行うことができる。連結-ベースのSDAに関しては、係留プローブは、好ましくは、増幅プライマーの一方または双方、あるいは連結プローブの一方または双方である。

【0188】

実施例10についての実験データ

実験1

この例では、標的核酸の好ましい連結-ベースのSDAのための一般的なプロトコルが提供される。反応成分の濃度および容量、ならびに時間および温度プロフィールは必要であれば調整することができる。容量は25 μ l 連結反応容量およびSDAのための50 μ l 最終反応溶液をとる。

【0189】

250 μ l マイクロ遠心管において、25 μ l 連結反応容量中の各プローブの最終濃度が5 nMとなるように、連結プローブ水溶液の5 μ l アリコットを添加する。次に、10 μ l の非特異的（担体）DNA（例えば、子ウシ胸腺DNA）を20ないし100 μ l/ml の最終濃度まで添加する。次に、適当な濃度のテンプレート核酸（例えば、細胞溶解物または精製されたゲノムDNA）を含有する5 μ l の試料を添加し、該チューブを60°Cに3分間置いて温度平衡を行う。平衡に続き、熱安定性DNAリガーゼを含有する5 μ l の溶液を、DNAリガーゼの機能を発揮させ、プローブ・ハイブリダイゼーションを可能とするのに必要な緩衝液成分の十分な5×強度混合物と共に添加する。表IV参照。

【0190】

25 μ l 連結反応を60°Cにて15分間インキュベートし、次いで、さらなる緩衝液成分dNTPおよび増幅プライマーを含有する20 μ l のSDAストック混合物を、表Vに示した最終反応濃度（50 μ l 中）を得るように添加する。1つの具体例において、反応を95°Cまで3分間加熱して、テンプレートからの連

結されたプローブを変性し、次いで、チューブを60℃にて3分間平衡化するさらなる工程を含める。この反応混合物に、SDA酵素を含有する5μlの液体を添加して、50μlの最終反応容量中以下の最終濃度とする：

B S O B 1 制限酵素：0.8 酵素単位／μl (40 U／rxn)

B s t DNA ポリメラーゼ：0.32 酵素単位／μl (16 U／rxn)

反応混合物を60℃にて30分間インキュベートし、次いで、反応混合物を氷上に置くことによって反応を停止させる。

【0191】

【表4】

表 IV

緩衝液成分	各リガーゼのための反応中の最終濃度	
	<i>Taq</i> DNAリガーゼ (1 U/rxn)	<i>Pfu</i> DNAリガーゼ (0.2 U/rxn)
トリス-HCl pH 7.6	10 mM	10 mM
酢酸カリウム	25 mM	25 mM
酢酸マグネシウム	10 mM	10 mM
ジチオスレイトール	1 mM	1 mM
ニコチンアミド腺嘌呤核糖核苷酸	1 mM	なし
アデノシン三リン酸	なし	10 μM

【0192】

【表5】

表 V

SDA 成分	50μL 反応中の最終濃度 (注：凍結反応からの寄与を含む)
リン酸カリウム	35 mM
ウシ血清アルブミン	80 μg/ml
酢酸マグネシウム	10 mM
デオキシヌクレオチド三リン酸 (dATP, dC _α sTP, dGTP, TTP の同等混合物)	1.4 mM
増幅プライマー (S1 および S2)	250 nM

【0193】

実験2

このさらなる例において、潜在的に試料中に存在する（その一部を図23dおよび示された配列番号41に示す）*Salmonella* spaQ 遺伝子を増幅する。図23（d）に示された連結プローブLP1（配列番号37）およびLP2（配列番号38）ならびに増幅プライマーS1（配列番号39）およびS2

(配列番号40)を用いて、実験1に記載された反応プロトコルを行う。実験2に記載された例は一般的な適応性を有することを意図する。spaQ遺伝子に相補的な連結プローブL1およびL2の配列を、注目するもう1の標的核酸に相補的な配列で置き換えることによって、増幅プライマーS1およびS2に使用される異なる標的-特異的連結プローブを作り出すことができよう。さらに、図23(d)に示されたものごとき増幅プライマーS1およびS2を、1を超える標的核酸の多重増幅で用いることができる。

【0194】

実験3

連結プローブの高濃度においては、リガーゼは標的非依存的に連結プローブの連結を触媒することができる。得られた連結プローブはSADを支持することができ、かくして、偽陽性シグナルを生じうる。このさらなる例において、連結-依存性SDAの好ましい態様が記載され、ここに、この問題は、連結プローブを最初はリガーゼによって一緒に連結できないようにすることによって克服される。この具体例において、1対の連結不可能プローブが連結可能とされて、標的特異的連結-依存性SADを可能とする。

【0195】

一般に、標的非依存性であるバックグラウンド分子の増幅は、連結接合内に含まれる連結プローブの末端を修飾することによって防止することができる。これはいくつかの方法で行うことができる。1つのそのような修飾は、第2の連結プローブ（上流プローブ）の3'末端ヌクレオチドに存在する3'ヒドロキシル基の（除去、ブロッキング等を含めた）修飾を含む。もう1つのそのような修飾は、第1の連結プローブ（下流プローブ）の5'末端ヌクレオチドに存在する5'リン酸基の（除去、ブロッキング等を含めた）修飾を含む。種々の方法があり、考案でき、ここにこれらの修飾の除去および／または変更は標的DNAの存在下で優先的に起こる。

【0196】

具体的には、この例の1つの態様は、第2の連結プローブ（上流プローブ）の3'末端ヌクレオチドに存在する3'ヒドロキシル基を修飾して、連結プローブ

間の平滑末端連結を防止する。修飾された連結不可能プローブをエンドヌクレアーゼ、好ましくは、エンドヌクレアーゼ I V を用いて連結能力があるようにする。この試薬はオリゴヌクレオチドから 3' 末端ヌクレオチドを切り出すことができ、かくして、これを用いて第 2 の連結プローブの 3' 末端ヌクレオチドを切り出して、3' ヒドロキシル基を持つ新しい 3' 末端ヌクレオチドを得る。この反応は、連結プローブ基質が標的 DNA と会合する場合により好ましく、連結プローブ基質が他の DNA 分子と会合しない場合は、より好ましくない。その結果、一旦連結プローブが標的 DNA に結合すれば、エンドヌクレアーゼ（好ましくはエンドヌクレアーゼ I V）は第 2 の連結プローブの 3' 末端ヌクレオチドを切り出して、3' ヒドロキシル基を持つ新しい 3' 末端ヌクレオチドを得る。第 1 の連結プローブの遊離 5' リン酸基と共に第 2 の連結プローブの遊離 3' ヒドロキシル基は、今や、DNA リガーゼによる連結用の基質である。

【0197】

基質オリゴヌクレオチドが 2 本鎖である場合はエンドヌクレアーゼはより効果的に働く傾向があるので、それは、このプローブが標的 DNA に結合した場合には第 2 の連結プローブの 3' 末端ヌクレオチドを優先的に切り出すであろうが、それが溶液中に遊離している場合にはそうはできない。該エンドヌクレアーゼは、連結—不能連結プローブを、それが標的 DNA に存在する場合に、まず優先的に連結コンピテントとするので、バックグラウンド分子の標的非依存性増幅は減少する。

【0198】

この例のもう 1 つの態様は、連結プローブの間の平滑末端連結を防止するための第 1 の連結プローブ（下流プローブ）の 5' 末端ヌクレオチドに存在する 5' リン酸基の（除去、ブロッキング等を含めた）修飾を提供する。修飾された連結不可能なプローブは、エキソヌクレアーゼ活性を持つ DNA ポリメラーゼを用いて連結能があるようにされる。この試薬は、DNA の重合（新しい DNA 合成）が上流プローブ（第 2 の連結プローブ）の 3' 末端から下流（第 1 の連結）プローブの 5' 末端へと起こることを可能とする。ポリメラーゼが第 1 の連結プローブの 5' 末端に接触すると、それは 5' 末端からヌクレオチドを切り出し始める

。それはヌクレオチドを第1の連結プローブから切り出すので、ヌクレオチドは第2の連結プローブの3'末端に付加される。本質的には、これは「ギャップ」を第1および第2の連結プローブの間に移動させ、当該接合は5'から3'ヘトリガーゼによって連結される。溶液に存在する遊離ヌクレオチドの量および／またはタイプを制御することによって、切り出しおよび置換の程度を制限することができる。ポリメラーゼの解離に続き、該接合は遊離3'ヒドロキシル基および遊離5'リン酸基を含有し、この双方はDNAリガーゼによる連結のための基質である。前記で示したごとく、この反応は、連結プローブの基質が標的DNAと会合する場合により好ましく、連結プローブ基質は他のDNA分子と会合していない場合により好ましくない。再度、これは、連結プローブを連結可能とする反応が、連結プローブがアニールされてdsDNAを形成するのを好むからである。当業者に理解されるごとく、そのようなアニーリングは、非標的DNAにアニールするよりもむしろ標的DNAに対して好ましい。かくして、バックグラウンド分子の非依存的増幅は減少する。

【0199】

この例のさらにもう1つの態様は、塩基誤対合を用いる連結のブロッキングを提供する。ここに、下流（第1）プローブの5'末端に1以上の誤対合塩基を持たせることによって、第1および第2の連結プローブの間の連結は防止される。もしプローブが誤対合塩基を含有すると言われているならば、プローブは、標的DNAと相補的なプローブの領域において、標的DNA配列に相補的ではないヌクレオチドを含有することを意味すると理解されるべきである。誤対合塩基は、前記した例におけるごとく、誤対合塩基がDNAポリメラーゼで切り出されるまでDNAリガーゼによる連結を妨げる。

【0200】

本発明のエキソヌクレアーゼ／リガーゼ依存的SDA（XL-SDA）態様を示すため、このさらなる例に記載するごとく、表VIに示された連結プローブの9つの組を合成した。これらのプローブは種々の示された細菌種を同定するように設計した。該プローブは特異的細菌遺伝子に相補的な領域およびSDA増幅プライマー結合のために設計された領域を有する。

【0201】

【表6】

表 VI

細菌遺伝子、 産物	同定された属/ 種/血清タイプ	連結プローブ 1 (5'-3')	連結プローブ 2 (5'-3')
<i>stx</i> ₁ , Shiga-様 トキシン-I	Shiga トキシン- <i>E. coli</i> (STEC) および <i>Shigella</i> <i>disenteriae</i> タイプ I を生産	GAGGGCGGTTTAATAA TCTACGGTGGTCGAGT ACGCCTTAA (配列番号 45)	CGATTCCGCTCCAGACTT CTCGGGTGTACTGAGATC CCCTTGTCAGAGGGATAG ATCCAGAGG (配列番号 46)
<i>stx</i> ₂ , Shiga-様 トキシン-II	STEC	GATGGAGTTCAGTGGT AATACAATGTGGTCGA GTACGCCTTAA (配列 番号 47)	CGATTCCGCTCCAGACTT CTCGGGTGTACTGAGATC CCCTGGTTTCATCATATCT GGCGTT (配列番号 48)
<i>eaeA</i> , インチミン	<i>E. coli</i> O157:H7	GACGCTGCTCACTAGA TGTCTAGGTCGAGTAC GCCTTAA (配列番号 49)	CGATTCCGCTCCAGACTT CTCGGGTGTACTGAGATC CCCTGGTTATAAGTGCTT GATACTCCAG (配列番号 50)
<i>spaQ</i> , 表面抗原 提示タンパク質	<i>Salmonella</i> 種	GATGATGTCATGTTGC AATGTCCTGGTCGAGT ACGCCTTAA (配列番号 51)	CGATTCCGCTCCAGACTT CTCGGGTGTACTGAGATC CCCTCATTTAACTATCCC GTCTCGT (配列番号 52)
<i>gnd</i> , 6-ホスホ グルコネート デヒドロゲナ ーゼ	<i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella</i> <i>paratyphi</i>	GAGTAATTACCGTCTT CATCTTTTTTGGTCGA GTACGCCTTAA (配列番 号 53)	CGATTCCGCTCCAGACTT CTCGGGTGTACTGAGATC CCCTGGCTTCATCAAGAA TAACATCTATC (配列番号 54)
<i>ipaH</i> , 病原性- 関連遺伝子	<i>Shigella</i> 種 および 腸侵害性 <i>E. coli</i>	GATTACGGAAGTGGT CTCCCTTGTCGAGTA CGCCTTAA (配列番号 55)	CGATTCCGCTCCAGACTT CTCGGGTGTACTGAGATC CCCTTCAGAAGCCGTGAA GAGAATG (配列番号 56)
<i>sodB</i> , スーパー オキシドジムス ターゼ	<i>Campylobacter</i> 種	GACCAAACCATCCTG AACCATGGTCGAGTAC GCCTTAA (配列番号 57)	CGATTCCGCTCCAGACTT CTCGGGTGTACTGAGATC CCCTTTCTAGTTTTTGATT TTAGTATTATA (配列番号 58)
<i>asd</i> , アスパル テートセミアル デヒドデヒドロ ゲナーゼ	<i>Vibrio</i> 種	GAGTAGAGGTATGTGA TGAGCCAATGGTCGAG TACGCCTTAA (配列番号 59)	CGATTCCGCTCCAGACTT CTCGGGTGTACTGAGATC CCCTCTTTGGCTAAACTC GGTTTTT (配列番号 60)
<i>lcrV</i> , <i>Yersinia</i> V- 抗原	<i>Yersinia</i> 種	GATTAGCTGAGCTTAC CGCCGTGGTCGAGTAC GCCTTAA (配列番号 61)	CGATTCCGCTCCAGACTT CTCGGGTGTACTGAGATC CCCTCCGTAGCAAGTTGC GTGAAG (配列番号 62)

【0202】

反応における連結プローブの数が順番：1組 (*spaQ*)、5組 (*spaQ*、*stx*₁、*stx*₂、*sodB*、*ipaH*)、6組 (5+*lcrV*として)、7組 (6+*asd*として)、8組 (7+*eaeA*として)、9組 (8+*gnd*とし

て)で増加するように、かつ各プローブの最終濃度が5 nMとなるように連結－SDA反応の同一組に添加された。

【0203】

ゲノム同等体の見積もられた数が 10^5 、 10^4 、 10^3 または陰性対照としてのゼロとなるように、*Salmonella enteritidis*ゲノムDNAの全抽出物をテンプレートとして添加した。XL－SDA反応は後記するごとく行い、ゲル電気泳動およびマイクロ電極アレイ上での電子ハイブリダイゼーション双方によって反応産物を分析した。

【0204】

反応成分の濃度および容量および時間／温度プロフィールは要すれば調整することができるが、XL－SDA反応は以下のごとく行った。用いた容量は25 μ lの連結反応容量および50 μ lのSDA用の最終反応容量を採用する。

250 μ lのマイクロ遠心管において、以下の試薬の溶液を組み合わせ、示された最終濃度を得た：(1) 5 nMの各プローブのプローブ濃度を与えるための2 (またはそれ以上) の標的－特異的連結プローブ (例えば、注目する標的配列の一部に実質的に相補的な5' 配列およびユニバーサル増幅プライマーに相補的な3' 配列を有するプローブエキソ－LP1ならびにLP1の下流に位置した標的配列の一部に実質的に相補的な3' 末端配列および第2のユニバーサル増幅プライマーと同一の5' 末端配列を有するプローブエキソ－LP2)；および、(2) 注目するテンプレートDNAを含有する溶液。

【0205】

エキソヌクレアーゼ／連結反応は以下のものを添加することによって開始させた：(Taq DNAリガーゼまたはPfu DNAリガーゼのごとき) 熱安定性DNAリガーゼ；(Taq DNAポリメラーゼのごとき) 5'－3' エキソヌクレアーゼ活性を有する熱安定性DNAポリメラーゼ；以下の表VIIに示された最終濃度を与える緩衝液塩；および25 μ l 反応中2.8 mMのdATP。

【0206】

【表7】

表 VII

緩衝液成分	各リガーゼのための反応における最終濃度	
	<i>Taq</i> DNAリガーゼ (1 U/rxn)	<i>Pfu</i> DNAリガーゼ (0.2 U/rxn)
トリス-HCl pH 7.6	10 mM	10 mM
酢酸カリウム	25 mM	25 mM
酢酸マグネシウム	10 mM	10 mM
ジチオスレイトール	1 mM	1 mM
ニコチンアミドアデニン ジヌクレオチド	1 mM	なし
アデノシン三リン酸	なし	10 μ M

【0207】

連結／エキソヌクレアーゼ反応は60℃にて15ないし30分間インキュベートした。次いで、さらなる緩衝液成分、最終反応が全ての4つのdNTPを含有するようなdNTPの混合物、および増幅プライマーを含有する20 μ lのSDAストック混合物を、図VII Iに示された最終反応濃度（50 μ l中）となるように添加する。

【0208】

【表8】

表 VIII

SDA 成分	50 μ l反応中の最終濃度
リン酸カリウム	35 mM
ウシ血清アルブミン	80 μ g/ml
酢酸マグネシウム	10 mM
デオキシヌクレオチド三リン酸(dGTP, dC ₆₅ TP, TTP)	1.4 mM
増幅プライマー (S1および S2)	250 nM

【0209】

次いで、SDA酵素を含有する5 μ lの溶液を以下の最終濃度となるように添加する：0.8酵素単位/ μ l（40U/rxn）のBsoB1制限酵素および0.32酵素単位/ μ l（16U/rxn）のBst DNAポリメラーゼ。次いで、この反応混合物を60℃にて30分間インキュベートしてSDA反応を進行させる。この反応はそれを氷上に置くことによって停止させ、増幅した産物を検出する。

【0210】

生じた反応生成物を、アクリルアミドゲル電気泳動およびマイクロ電極アレイ上での電子ハイブリダイゼーション双方によって分析した。アクリルアミドゲル電気泳動による5 μ lのXL-SDA反応の分析は、連結プローブの全ての組合せにおいて、特異的増幅産物がテンプレート濃度依存的に作成されたことを示した。Salmonella enteritidis spaQ遺伝子配列の特異的増幅を示すために、連結-SDA反応産物をマイクロ電極アレイ上で分析し、ここに、細菌遺伝子の5つについての特異的捕捉プローブは異なる位置に予め配置される。図24は、分析した全ての試料において、spaQ配列が検出されたことを示す。

【0211】

これまでのものは、本発明の具体例を説明することを意図し、断じて本発明を限定することを意図しない。本発明の真の精神および範囲を逸脱することなく、本発明の多数の変形および修飾を行うことができる。当業者に理解されるごとく、前記した具体例の各々は組み合わせて一緒に用いることができる。例えば、SDAは電子的にアドレス指定可能なマイクロチップと組み合わせて行うことができ、ここに、（注目する連結プローブまたは他の標的核酸に対して相補的な配列を有する分岐または非分岐プライマー対のごとき）標的核酸に特異的な増幅プライマーを電子的にアドレス指定可能な捕捉パッドにつなげ、標的核酸をそのような捕捉パッドに電子的にアドレス指定させ、高圧下でSDAを行う。もう1つの例において、SDAは電子的にアドレス指定可能なマイクロチップと組み合わせて行うことができ、ここに、（分岐または非分岐プライマー対のごとき）対立遺伝子-特異的増幅プローブを電子的にアドレス指定可能な捕捉パッドにつなげ、標的核酸をそのような捕捉パッドに電子的にアドレス指定させ、高圧下で、別法として気圧においてSDAを行う。さらにもう1つの組合せ例において、SDAは電子的にアドレス指定可能なマイクロチップと組み合わせて行うことができ、ここに、SDA反応は切断不能プライマーを用い、あるいは非対称増幅条件下で行われる。加えて、他の組合せは、上昇したまたは通常気圧下で電子的にアドレス指定可能なマイクロチップと組み合わせた連結-ベースのSDAを含む。当

業者に理解されるごとく、多くの他の組合せが可能である。

【0212】

特定の修飾に関して本発明を記載してきたが、その詳細は限定と解釈されるべきではなく、本発明の精神および範囲を逸脱することなく変形および修飾を施すことができ、そのような同等な具体例はここに含まれるべきであると理解される。

【0213】

全ての刊行物および特許出願は、各個々の刊行物または特許出願が引用によって具体的かつ個々に一体化されると示されるごとく引用によって本明細書に一体化される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nerenberg, Michael I.
 Edman, Carl F.
 Spargo, Catherine A.
 Walker, G. Terrance

<120> AMPLIFICATION AND SEPARATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES
 USING STRAND DISPLACEMENT AMPLIFICATION AND
 BIOELECTRONIC
 MICROCHIP TECHNOLOGY

<130> 235/139

<140> TO BE ASSIGNED

<141> HERewith

<160> 62

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> conserved 16S bacterial sequence

<400> 1

caaatgaatt gacgggggcc

20

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> conserved 16S bacterial sequence

<400> 2

aagggttgcg ctctg

15

<210> 3
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> conserved 16S bacterial sequence

<400> 3

accgcatcga atgcatgtcc tcgggtgcat gtggtttaat

40

<210> 4
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> conserved 16S bacterial sequence

<400> 4

acgattcagc tcagacttc tcgggtaaca ttccacaaca c

41

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> human

<400> 5

actacagtga cgtggacatc

20

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> human

<400> 6

tgttatcaca ctggtgctaa

20

<210> 7
<211> 42
<212> DNA
<213> human

<400> 7

accgcatcga atgcatgtcc tcgggtctct ggcctaataag ga

42

<210> 8
<211> 42
<212> DNA
<213> human

<400> 8

acgattcagc tccagacttc tcgggtaata cctgtattcc tc

42

<210> 9
<211> 42
<212> DNA
<213> human

<400> 9

acgattcagc tccagacttc tcgggtaata cctgtattcc tt

42

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> human

<400> 10

ctgtattcct cgcctgtc

18

<210> 11

<211> 18
<212> DNA
<213> E. coli

<400> 11

ctcatctctg aaaacttc

18

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> Shigella dysenteriae

<400> 12

cgtatctcta caaggttc

18

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> Salmonella typhimurium

<400> 13

tccatctctg gattcttc

18

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> Campylobacter Jejuni

<400> 14

catatctcta taagggtc

18

<210> 15
<211> 27

<212> DNA

<213> conserved 16S bacterial sequence

<400> 15

ggatgtcaag accaggtgaag gttcttc

27

<210> 16

<211> 50

<212> DNA

<213> human T-cell leukemia virus-1

<400> 16

aattctaata cgactcacta tagggagagg tgatctgatg tctggacagg

50

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> human T-cell leukemia virus-1

<400> 17

acttcccagg gtttggacag agt

23

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> human T-cell leukemia virus-1

<400> 18

ttcttttcgg ataccagtc tacgtgtttg

30

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> human T-cell leukemia virus-1

<400> 19

acttcccagg gtttgacag agt

23

<210> 20

<211> 42

<212> DNA

<213> human

<400> 20

accgcacga atgcacgtcc tcgggtctct gggtcaatag ga

42

<210> 21

<211> 42

<212> DNA

<213> human

<400> 21

acgattcagc tccagacttc tcgggtcaga attctgaaa gg

42

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> human

<400> 22

actacagtga cgtggacatc

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> human

<400> 23

tgttatcaca ctggtgctaa

20

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> human

<400> 24

ctgtattcct cgcctgtc

18

<210> 25

<211> 42

<212> DNA

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 25

cacgtagtica atgcatgtcc tcgggtacaa catcaacacc tg

42

<210> 26

<211> 42

<212> DNA

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 26

acgattcagc tcagacttc tcgggtgaga ctgttaaga ta

42

<210> 27

<211> 17

<212> DNA

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 27

cagcaataa tccttgg

17

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 28

cattggttga tggattatt

19

<210> 29

<211> 15

<212> DNA

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 29

gtcgcagcca aaatg

15

<210> 30

<211> 16

<212> DNA

<213> Chlamydia trachomatis

<400> 30

ttccatcaga agctgt

16

<210> 31

<211> 42

<212> DNA

<213> human

<400> 31

cacgtagtca atgcatgtcc tcgggtataa ccttggctgt ac

42

<210> 32
<211> 42
<212> DNA
<213> human

<400> 32

acgattcagc tccagacttc tcgggtgctc tcatcagtca ca

42

<210> 33
<211> 19
<212> DNA
<213> human

<400> 33

tgaaggataa gcagccaat

19

<210> 34
<211> 19
<212> DNA
<213> human

<400> 34

ctctctctcaa cccccaata

19

<210> 35
<211> 18
<212> DNA
<213> human

<400> 35

agatatacgt gccagggtg

18

<210> 36

<211> 18

<212> DNA

<213> human

<400> 36

ctgatccagg cctgggtg

18

<210> 37

<211> 45

<212> DNA

<213> Salmonella

<400> 37

aattccgcat gagctgggta atgtgtgtact gtagtaatgc tctgc

45

<210> 38

<211> 70

<212> DNA

<213> Salmonella

<400> 38

cctatcaatt tacctactaa atcacgatta tccccatagag tcatgtgggc tcttcagacc
tcgccttagc

60

70

<210> 39

<211> 40

<212> DNA

<213> synthetic

<400> 39

accgcatcga atgcatgtct cgggtaaggc gtactcgacc

40

<210> 40
<211> 40
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 40

cgattccgct ccagacttct cgggtgtact gagatccct

40

<210> 41
<211> 48
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 41

caacatgaca tcattacgag acgggatagt taaatggatg atttagtg

48

<210> 42
<211> 42
<212> DNA
<213> human

<400> 42

accgcatcga atgcatgtcc tcgggtctct gggctaataag ga

42

<210> 43
<211> 42
<212> DNA
<213> human

<400> 43

acgattcaga tcagaattc tcgggtcaga atttctgaaa gg

42

<210> 44
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> human

<400> 44

acttctaattc tctaagagca g

21

<210> 45
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> synthetic

<400> 45

gagggcgggt taataatcta cgggtgtcga gtacgcctta a

41

<210> 46
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> synthetic

<400> 46

cgattccgct ccagacitct cgggtgtact gagatccctc tctcagaggg atagatccag
 agg

60

63

<210> 47
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> synthetic

<400> 47

gatggagttc agiggtaata caatgtggtc gactacgcct taa

43

<210> 48
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> synthetic

<400> 48

cgattccgct ccagacttct cgggtgtact gagatccct ggttcatca tatctggcgt 60
 t 61

<210> 49
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> synthetic

<400> 49

gacgtgctc actagatgtc taggtcgagt acgccttaa 39

<210> 50
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> synthetic

<400> 50

cgattccgct ccagacttct cgggtgtact gagatccct gggtataagt gcttgatact 60
 ccag 64

<210> 51
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> synthetic

<400> 51

gatgatgtca tgttgcaatg tcttggtcga gtacgcctta a 41

<210> 52

<211> 61
 <212> DNA
 <213> synthetic

<400> 52

cgattccgct ccagacttct cgggtgtact gagatccct catttaacta tcccgctcg 60
 t 61

<210> 53
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> synthetic

<400> 53

gagtaattac cgtcttcac ttttttggc cgagtacgc ttaa 44

<210> 54
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> synthetic

<400> 54

cgattccgct ccagacttct cgggtgtact gagatccct ggcttcacat agaataacat 60
 ctatc 65

<210> 55
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> synthetic

<400> 55

gatttacgga cgggtctcc ctgggtcgag tacgccttaa 40

<210> 56
 <211> 61

<212> DNA
<213> synthetic

<400> 56

cgattccgct ccagacttct cgggtgtact gagatccct tcagaagccg tgaagagaat 60
g 61

<210> 57
<211> 39
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 57

gaccaaacc atcctgaacc atggtcgagt acgccttaa 39

<210> 58
<211> 67
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 58

cgattccgct ccagacttct cgggtgtact gagatccct ttctagttt tgatttttag 60
tattata 67

<210> 59
<211> 42
<212> DNA
<213> synthetic

<400> 59

gagtagaggt atgtgatgag ccaatggcgc agtacgcctt aa 42

<210> 60
<211> 61
<212> DNA

```

<213> synthetic
<400> 60
cgattccgct ccagacttct cgggtgtact gagatccct cttggctaa actcggttt 60
c 61

<210> 61
<211> 39
<212> DNA
<213> synthetic
<400> 61

gattagctga gcttaccgcc gtggcagagt acgccttaa 39

<210> 62
<211> 60
<212> DNA
<213> synthetic
<400> 62

cgattccgct ccagacttct cgggtgtact gagatccct ccgtagcaag ttgcgtgaag 60

```

【図面の簡単な説明】

【図1A】 図1Aは、本発明のバイオエレクトロニック・チップの具体例の断面図を示す。

【図1B】 図1Bは、図1Aからのバイオエレクトロニック・チップの斜視図を示す。

【図2A】 図2Aは、双方の側部を保存領域（各細菌株で同一配列を有する）によって挟まれた多様領域（細菌株当り異なる配列を有する）を含む細菌16S rRNA遺伝子の概略図を示す。BBsおよびBbaは、各々、細菌のセンスおよびアンチセンス・バンパープライマーを表す。BasおよびBaaは、各々、細菌のセンスおよびアンチセンス増幅プライマーを表す。試験した細菌株の同定は、配列表に記する。

【図2B】 図2Bは、各菌株からの多様領域の特異的な増幅を示す、エチジウム・ブロマイドで染色した1%アガロースゲル上で分解した16S rRNAをコードするSDA増幅産物の結果を示す。

【図2C】 図2Cは、本発明のマイクロアレイ上の核酸ハイブリダイゼーション

ョンに用いたサンドイッチ・アッセイ形式の1の態様を示し、ここではアッセイ形式はユニバーサル捕捉プローブおよび配列特異的レポーターを利用している。

【図2D】 図2Dは、本発明のマイクロアレイ上の核酸ハイブリダイゼーションに用いるサンドイッチアッセイ形式を示し、ここではアッセイ形式は配列特異的捕捉プローブおよびユニバーサル・レポーターを利用している。

【図3A】 図3Aは、マイクロアレイ上のSDAアンプリコンの能動ハイブリダイゼーションに用いたサルモネラ (Salmonella) ー特異的BTR標識レポーターを示し、ここではマイクロアレイの捕捉部位は、捕捉プローブまたは浸透層自体へのレポーター・オリゴヌクレオチドの非特異的結合の対照として、捕捉プローブを含有するが標的を含有しない部位 (+C/-T) および捕捉プローブまたは標的を含有しない部位 (C-/T-) を含む。

【図3B】 図3Bは、ユニバーサル捕捉プローブを用いてSDAアンプリコンを生成し、マイクロアレイ上の個々の部位に電子的にアドレス指定し、(16S rRNA遺伝子の多様領域に指定した) 配列ー特異的btrー標識レポーター・プローブが能動的にハイブリダイズして種々の細菌株を識別した場合の、各細菌に認められた相対蛍光の比較を示す。

【図3C】 図3Cは、配列ー特異的捕捉プローブを用いてSDAアンプリコンを生成し、マイクロアレイ上の個々の部位に電子的にアドレス指定し、(16S rRNA遺伝子の保存領域に指定した) btrー標識レポーター・プローブが捕捉物質に能動的にハイブリダイスした場合の、各筋に認められた相対蛍光の比較を示す。

【図4A】 各々の第V因子 Leiden突然変異につき分析する5の患者試料からの対立遺伝子ー特異的反応のポリアクリルアミド・ゲル分析を示し、ここでは各ゲノミックDNA試料を、正常遺伝子型 (第V因子 R506)、W、またはLeiden突然変異 (第V因子 Q506)、Mのいずれかを用いて対立遺伝子ー特異的SDAで2回増幅した。

【図4B】 図4Aの5の患者の試料のうちの3からの対立遺伝子ー特異的反応物のアレイ上の各アドレス指定された部位に存在する蛍光を比較した棒グラフを示す。

【図5A】 図5Aは、検出目的用の増幅反応に蛍光種を取込ませる第1のスキームの図を示す。

【図5B】 図5Bは、検出目的用の増幅反応に蛍光種を取込ませる第2のスキームの図を示す。

【図6A】 図6Aは、マイクロチップの蛍光分析を示し、ここではSDAテンプレートは対照として存在しない。

【図6B】 図6Bは、マイクロチップの蛍光分析を示し、ここでは対照として反応物中にBs o B Iは含まれない。

【図6C】 図6Cは、マイクロチップの蛍光分析を示し、ここではSDAテンプレートを一晩能動的にハイブリダイズさせた。

【図7】 図7は、図6A-6Cの蛍光分析の平均蛍光イメージを示す。

【図8】 図8は、マイクロチップの蛍光分析を示し、ここではSDAテンプレートを電子的に標的化した。

【図9】 図9は、図8のSDAテンプレート中の第V因子 PCRの力価を示す。

【図10A】 図10Aは、NASBA増幅のゲル生成物を示す。

【図10B】 図10Bは、マイクロアレイに電子的に標的化した後のNASBA Taxプラスミドのサンドイッチ・アッセイ結果の蛍光分析を示す。

【図11】 図11は、第V因子係留SDAにおける切断不可SDAプライマーの力価のグラフを示す。

【図12】 図12は、分岐プライマー設計の態様を示す係留プライマーの概略図である。

【図13】 分岐プライマー対部位で標的核酸配列からアンプリコンを生成する段階的プロセスを示す概略図である。

【図14】 シグナルを有するアンプリコンをシグナル検出用の捕捉パッドに電子的にアドレス指定し得るように、核酸アンプリコン鎖の非対称比を生成するためにシグナル・プライマーを用いる性質を示す概略図である。

【図15】 図15は、係留非一分岐SDA標的プライマーを示す概略図である。

【図16】 図16は、実施例7で説明するごとく、試験した種々の標的種がアドレス指定されるパッド上の場所を有するマイクロチップ・パッドのレイアウトを示す図である。

【図17】 図17は、対照S DA反応の写真であり、ここでは標的核酸は存在しない。

【図18】 図18は、4の捕捉部位のみ以前にアドレス指定された第V因子に特異的なS DA捕捉プライマー対のみに対する複数の標的種存在下のS DA増幅第V因子標的の特異的な局在を示す写真である。

【図19】 図19は、特異的捕捉部位に以前にアドレス指定された第V因子およびクラミジアに特異的な複数の標的種およびS DA捕捉プライマー対の存在下で増幅させたS DA増幅した第V因子およびクラミジア標的の特異的な局在を示す写真である。

【図20】 図20は、特異的捕捉部位に以前にアドレス指定された第V因子、クラミジアおよびヘモクロマトーシスに特異的な複数の標的種およびS DA捕捉プライマー対の存在下で増幅させたS DA増幅した第V因子、クラミジア、およびヘモクロマトーシスの特異的局在を示す写真である。

【図21】 図21は、第V因子、クラミジアおよびヘモクロマトーシス遺伝子標的についての多重溶液ベースのS DA反応の結果を示すPAGEゲルである。マイナス・レーンテンプレートDNAが存在しない場合を示し、一方プラス・レーンテンプレートDNAを添加した場合を示す。

【図22】 図22は、分岐S DAプライマー対を合成するための提案反応配列を示す図である。

【図23A】 図23Aは、標的核酸配列の連結－依存性増幅用の反応経路を図示する。

【図23B】 図23Bは、標的核酸配列の連結－依存性増幅用の反応経路を図示する。

【図23C】 図23Cは、標的核酸配列の連結－依存性増幅用の反応経路を図示する。

【図23D】 図23Dは、図23A－Cで説明した方法を用いて試料中に存

在するサルモネラ *spaQ* 遺伝子を検出するために用いる連結プローブおよび増幅プライマーを示す。

【図24】 図24は、分離した場所に予め配した5の細菌遺伝子用の捕捉プローブを有する微小電極アレイと結合した、実施例10で説明するごとく、本発明のエキソヌクレアーゼ連結依存性SDA態様を用いる特異的増幅を示すグラフである。

【図1】

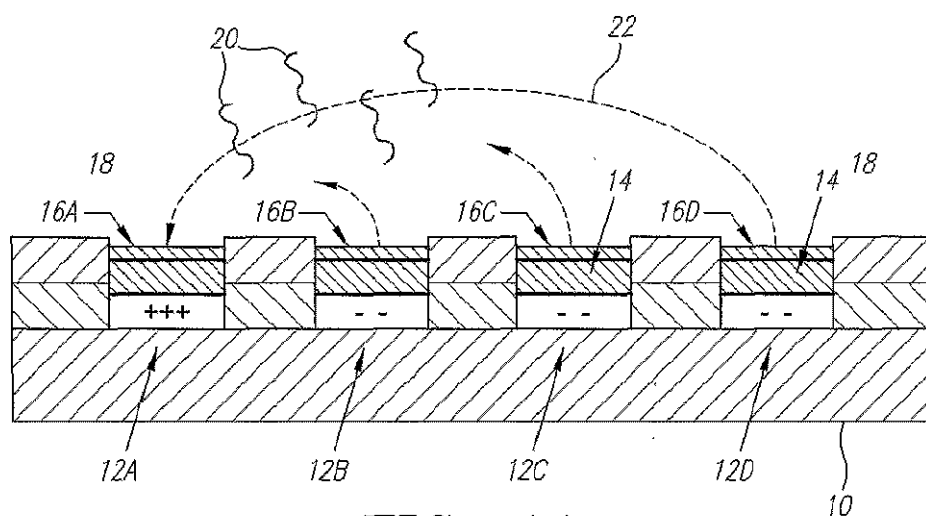


FIG. 1A

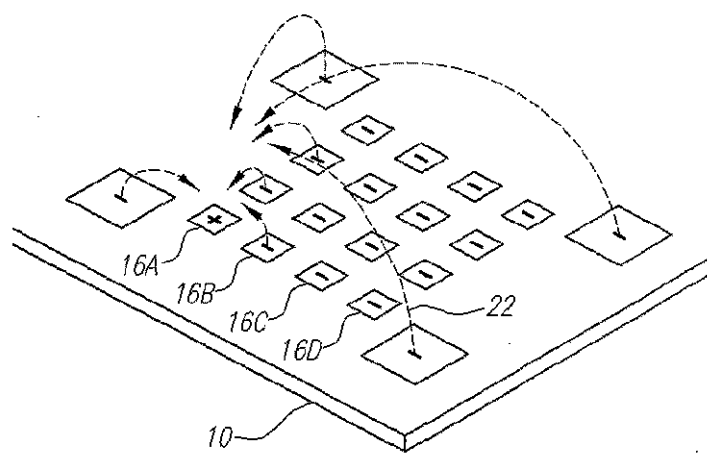
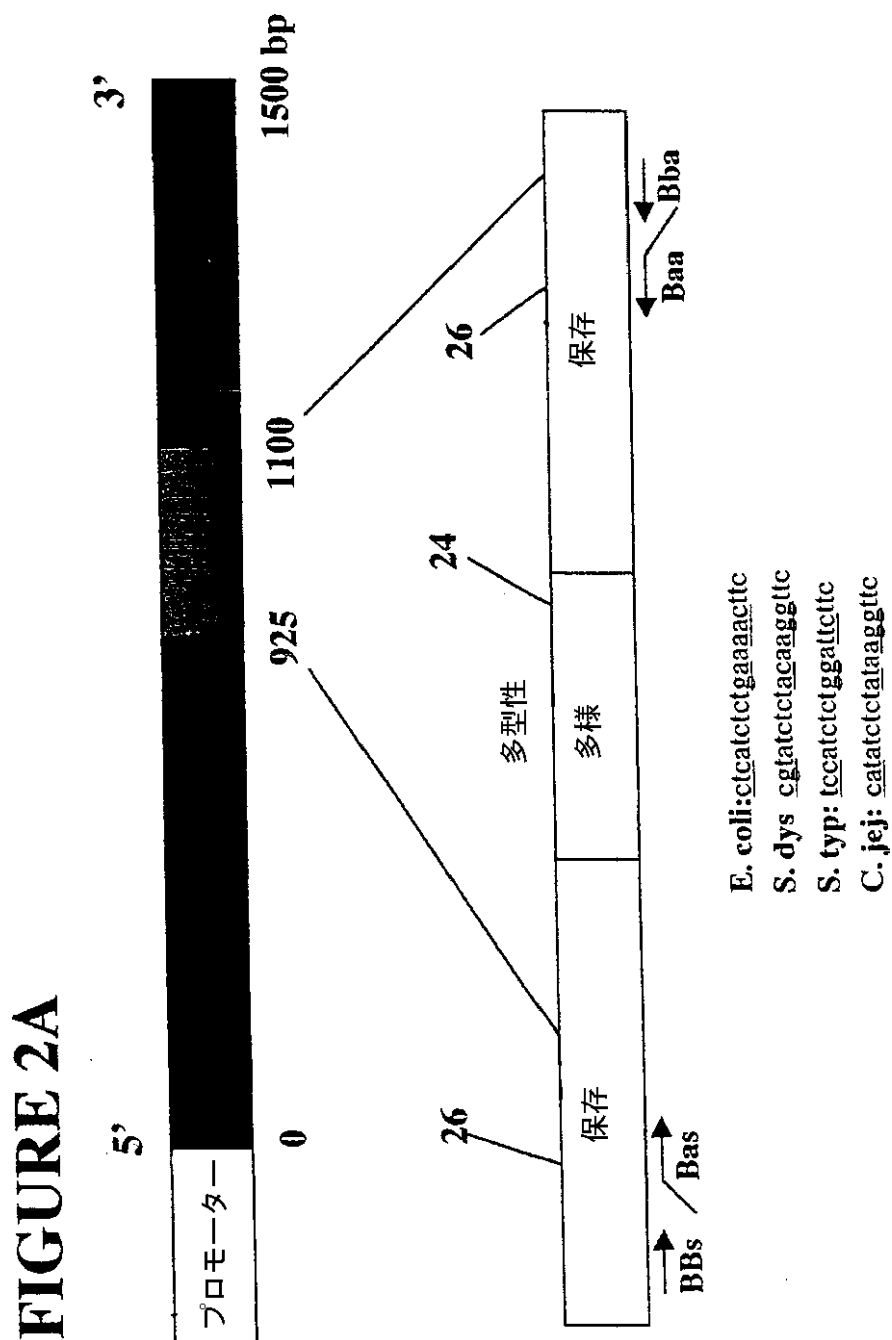
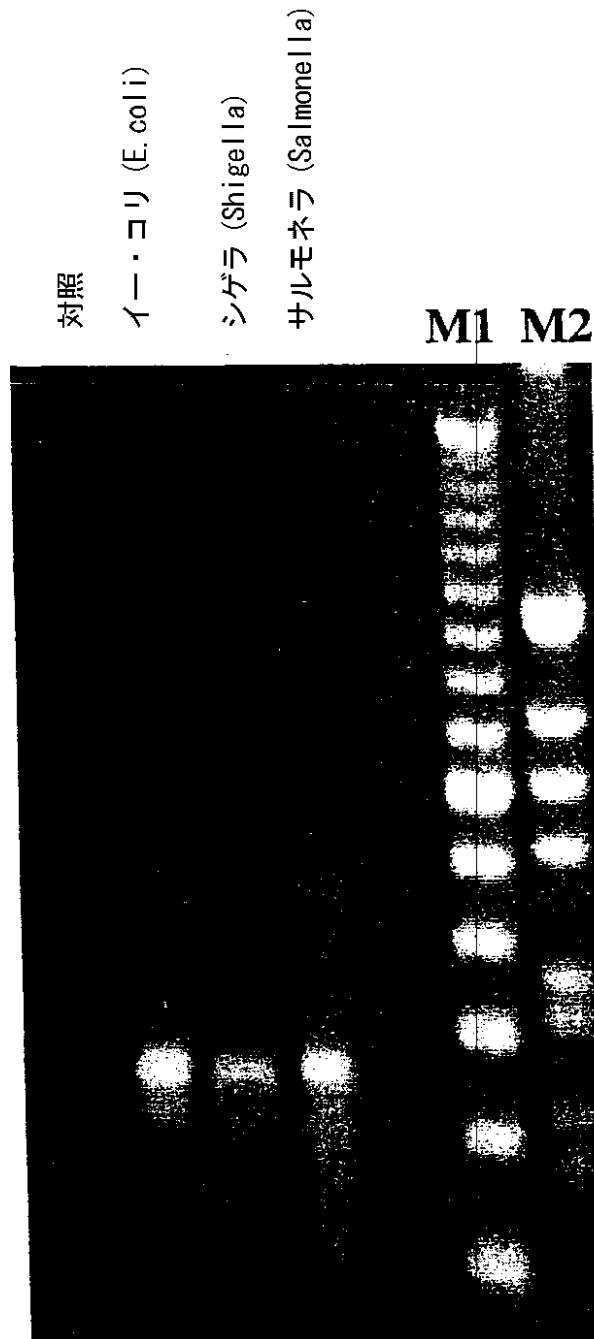


FIG. 1B

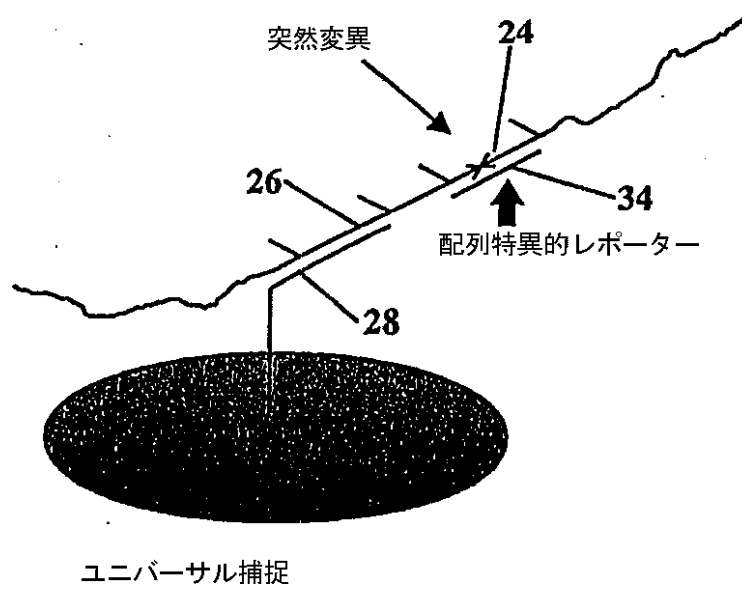
【図2A】



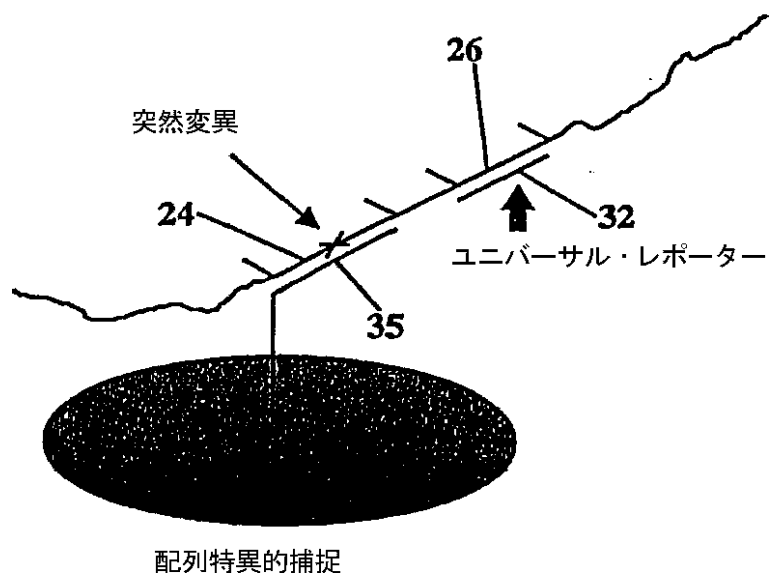
【図2B】

FIGURE 2B

【図2C】

FIGURE 2C

【図2D】

FIGURE 2D

【図3A】

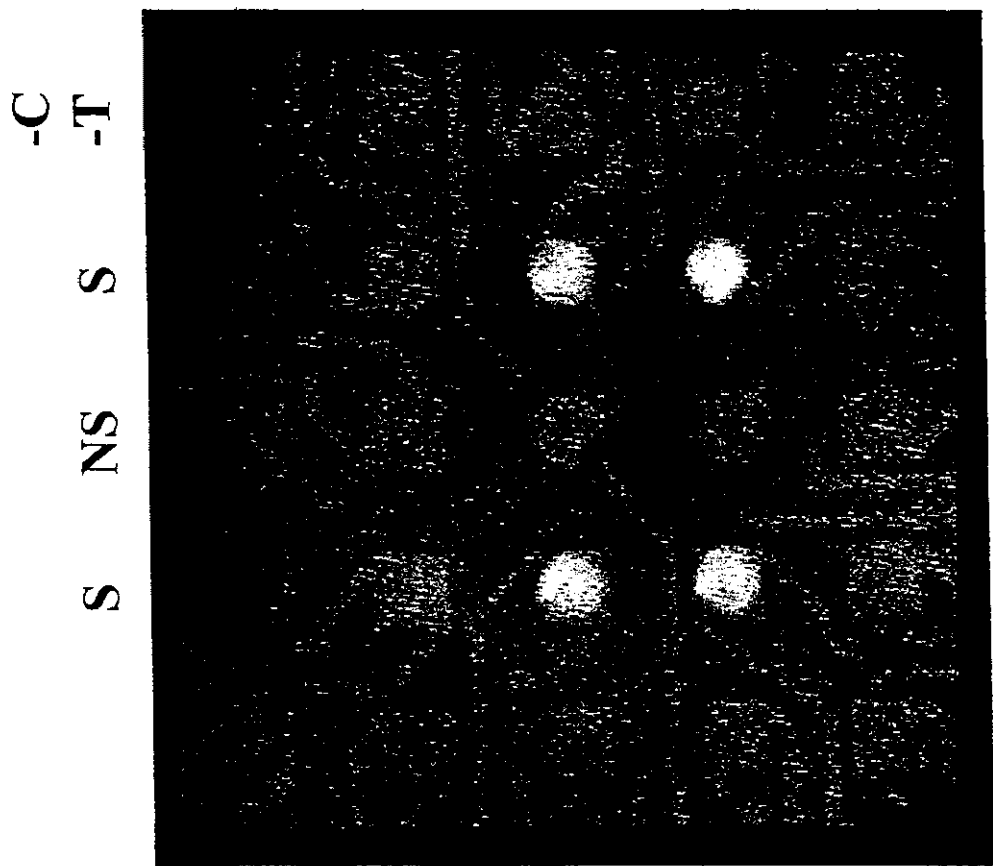


FIGURE 3A

カンピロバクター (Campylobacter)

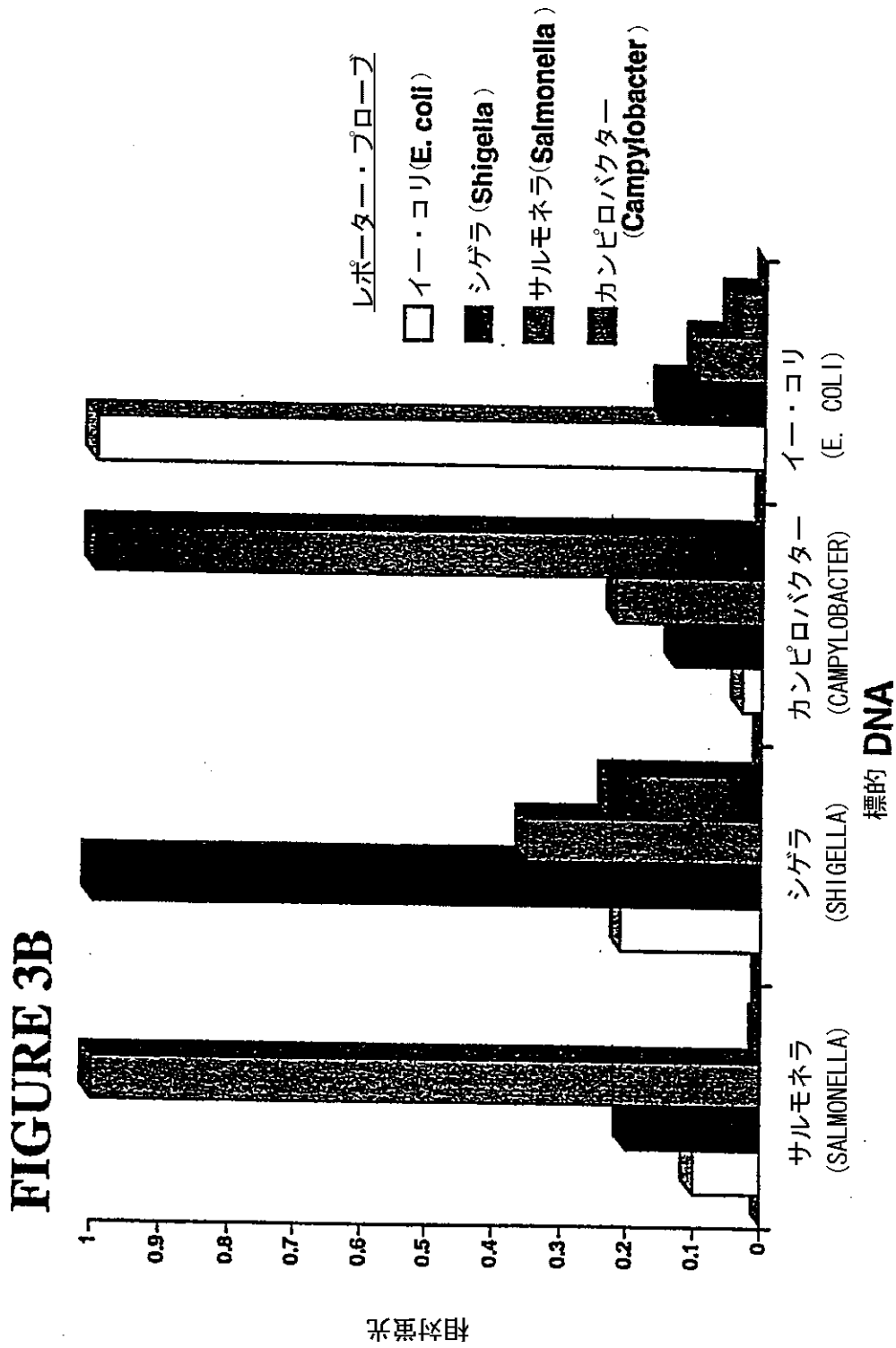
シゲラ (Shigella)

サルモネラ (Salmonella)

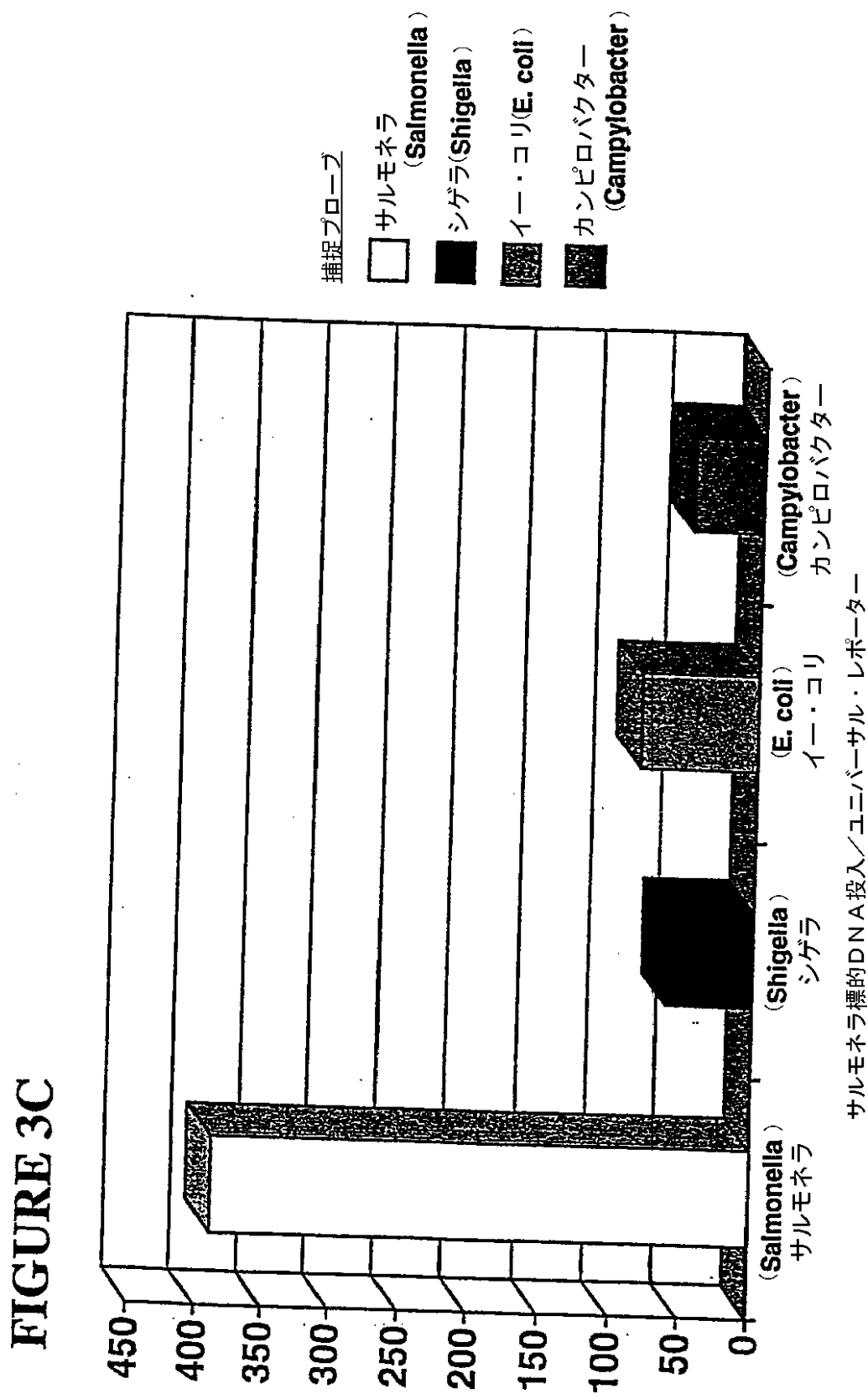
サルモネラ (Salmonella)

+C, -T

【図3B】



【図3C】

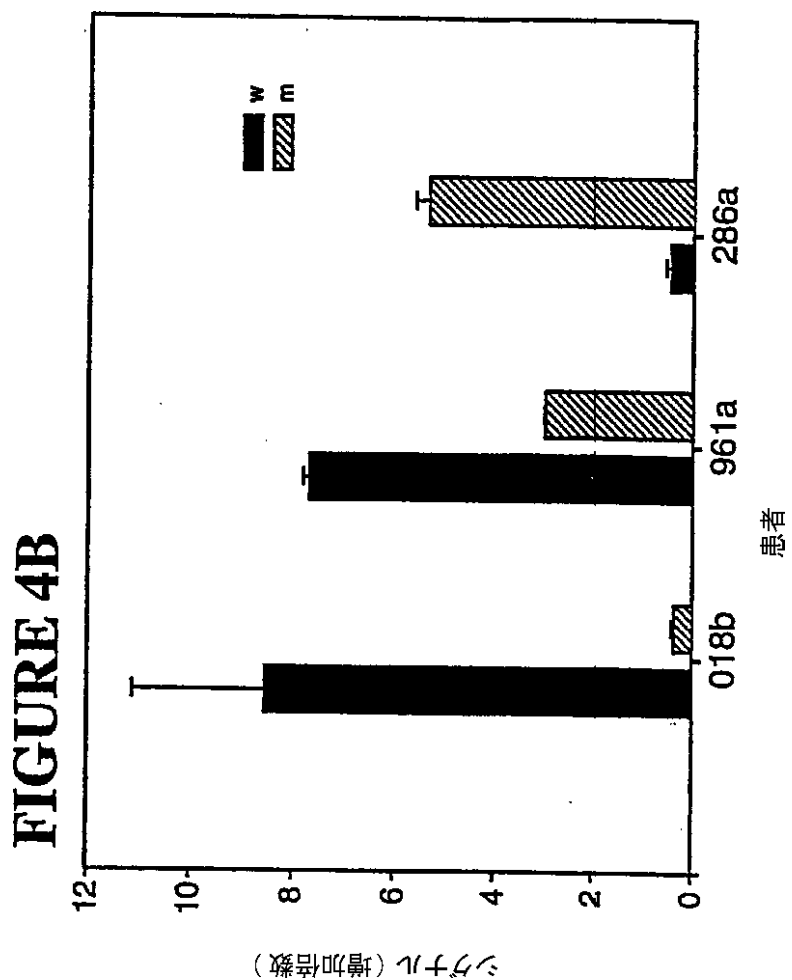


【図4A】

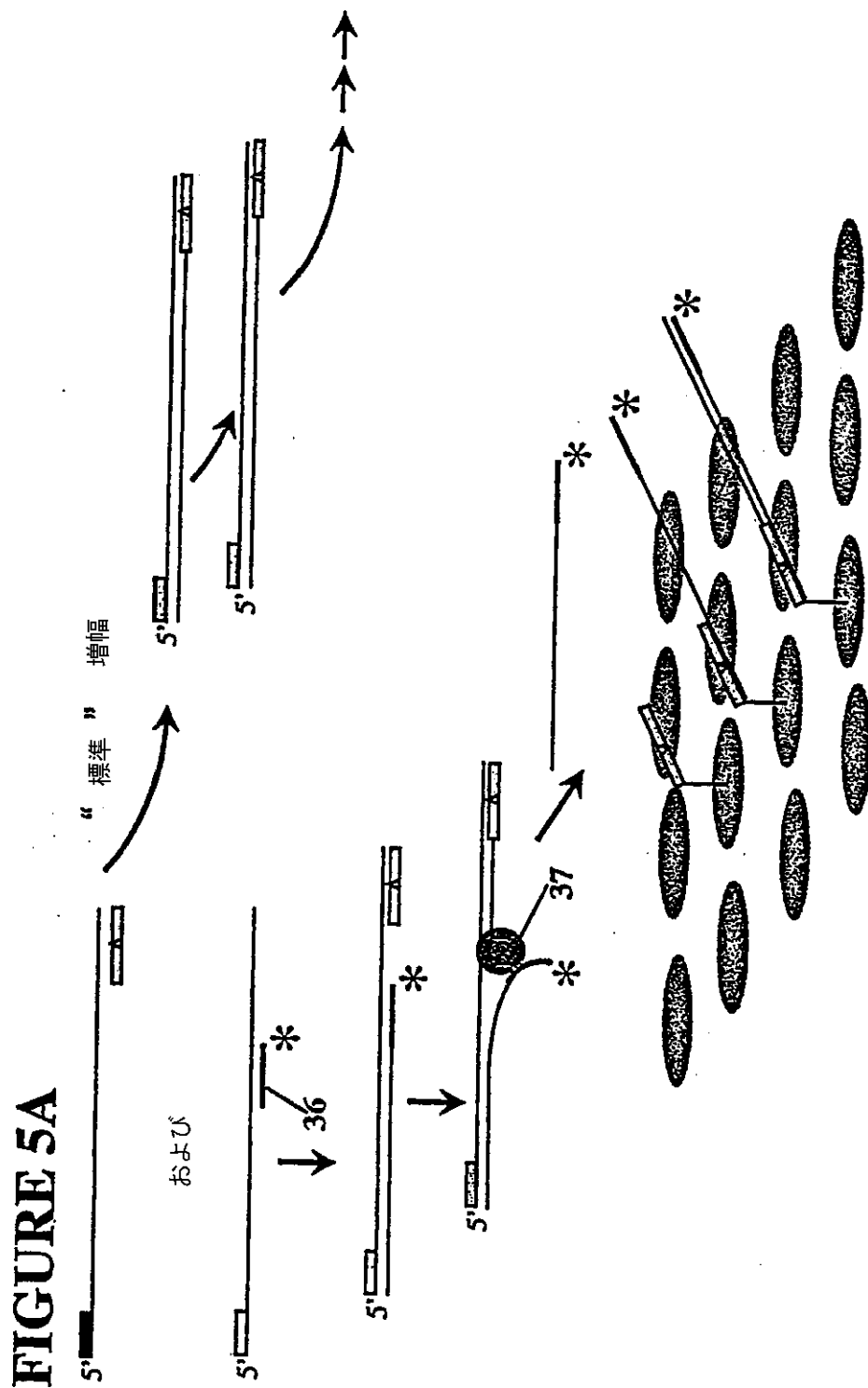
FIGURE 4A



【図4B】

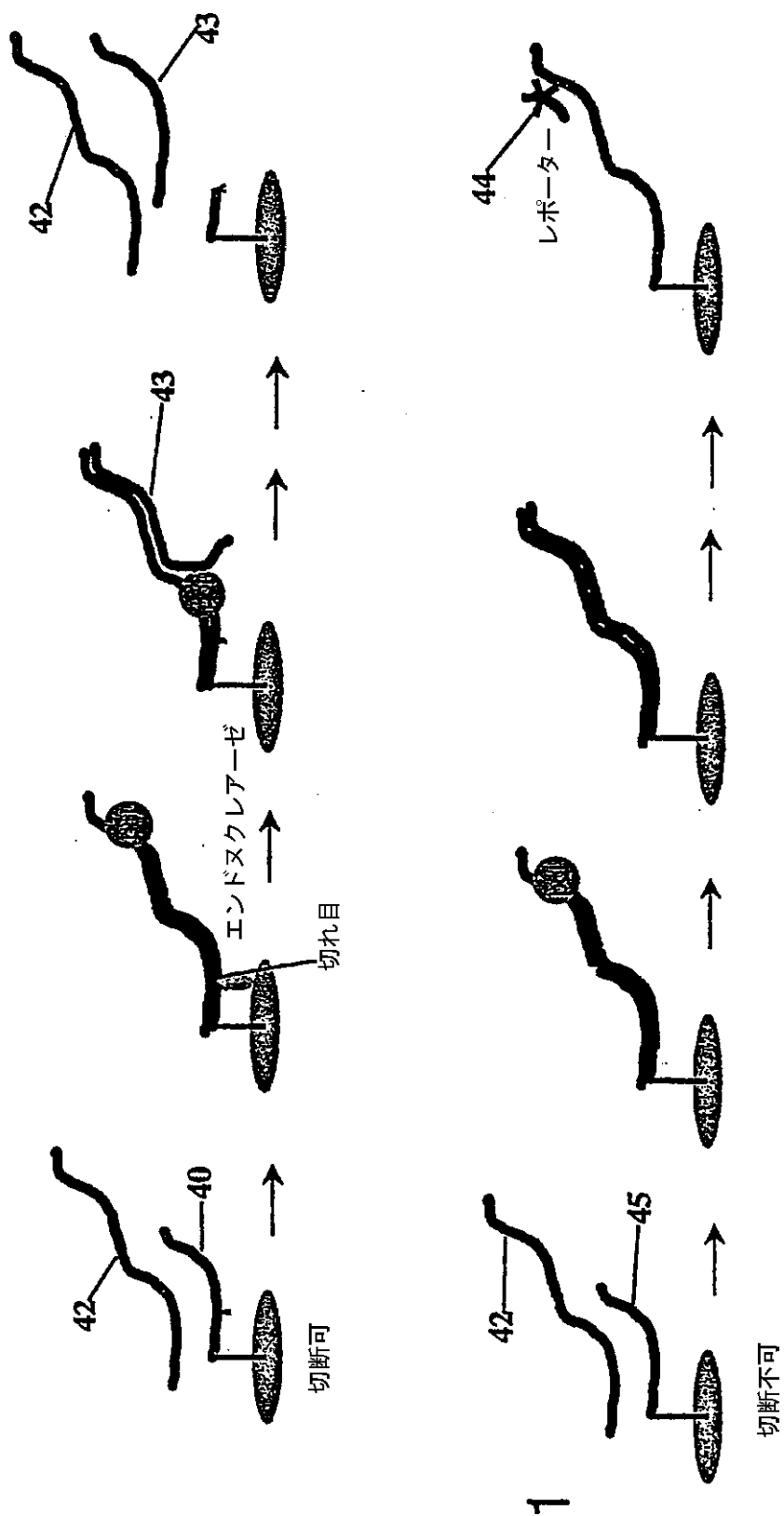


【図5A】



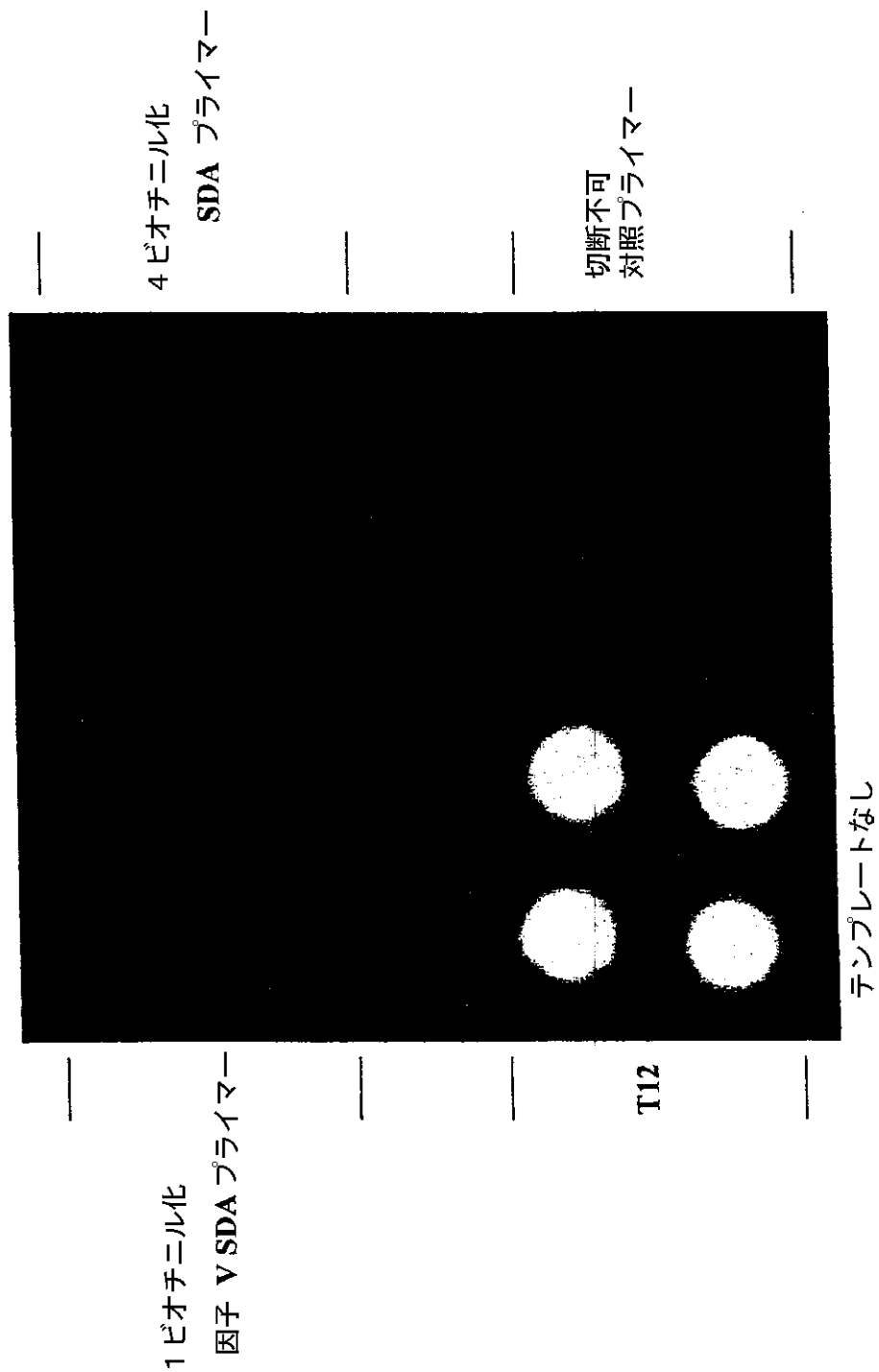
【図5B】

FIGURE 5B



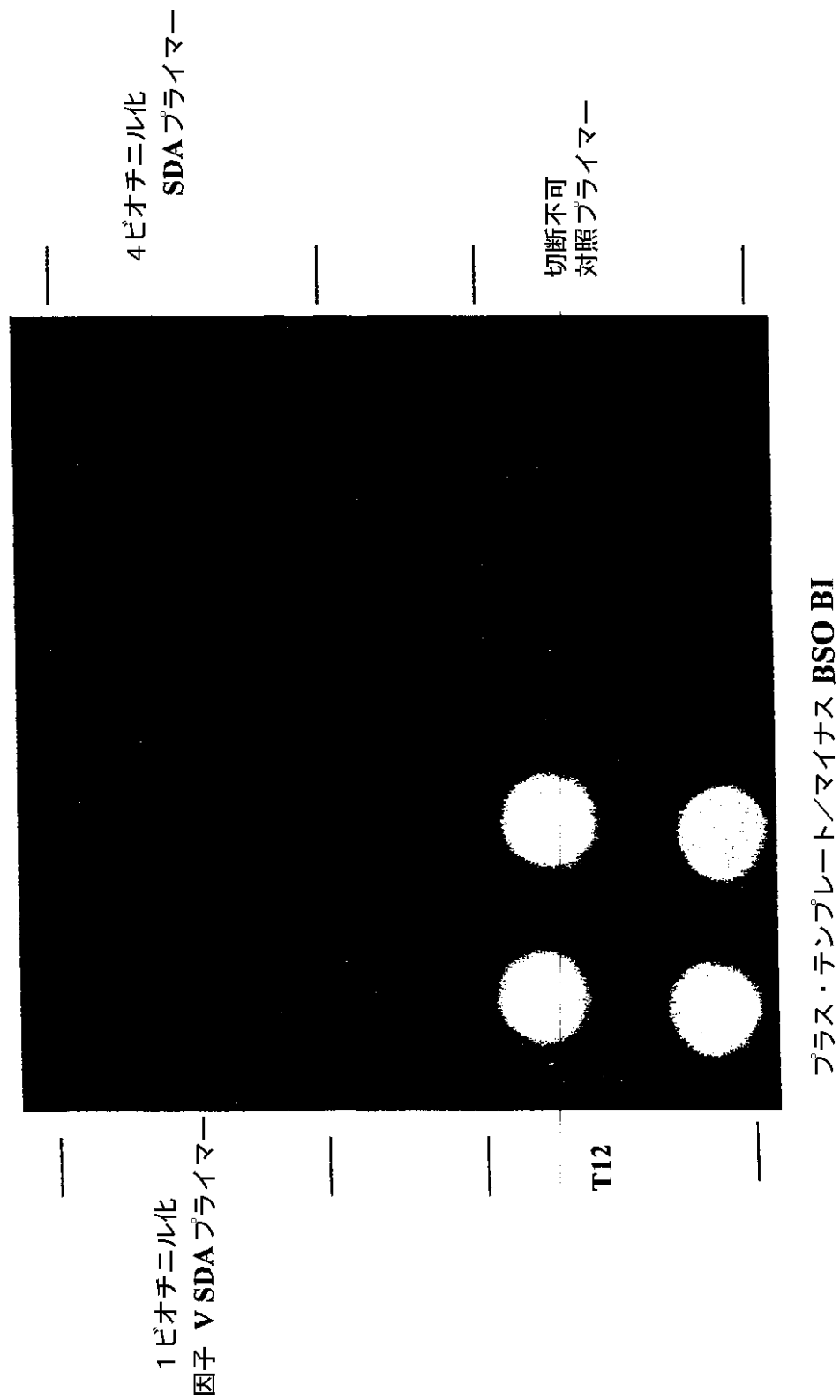
【図6A】

FIGURE 6A



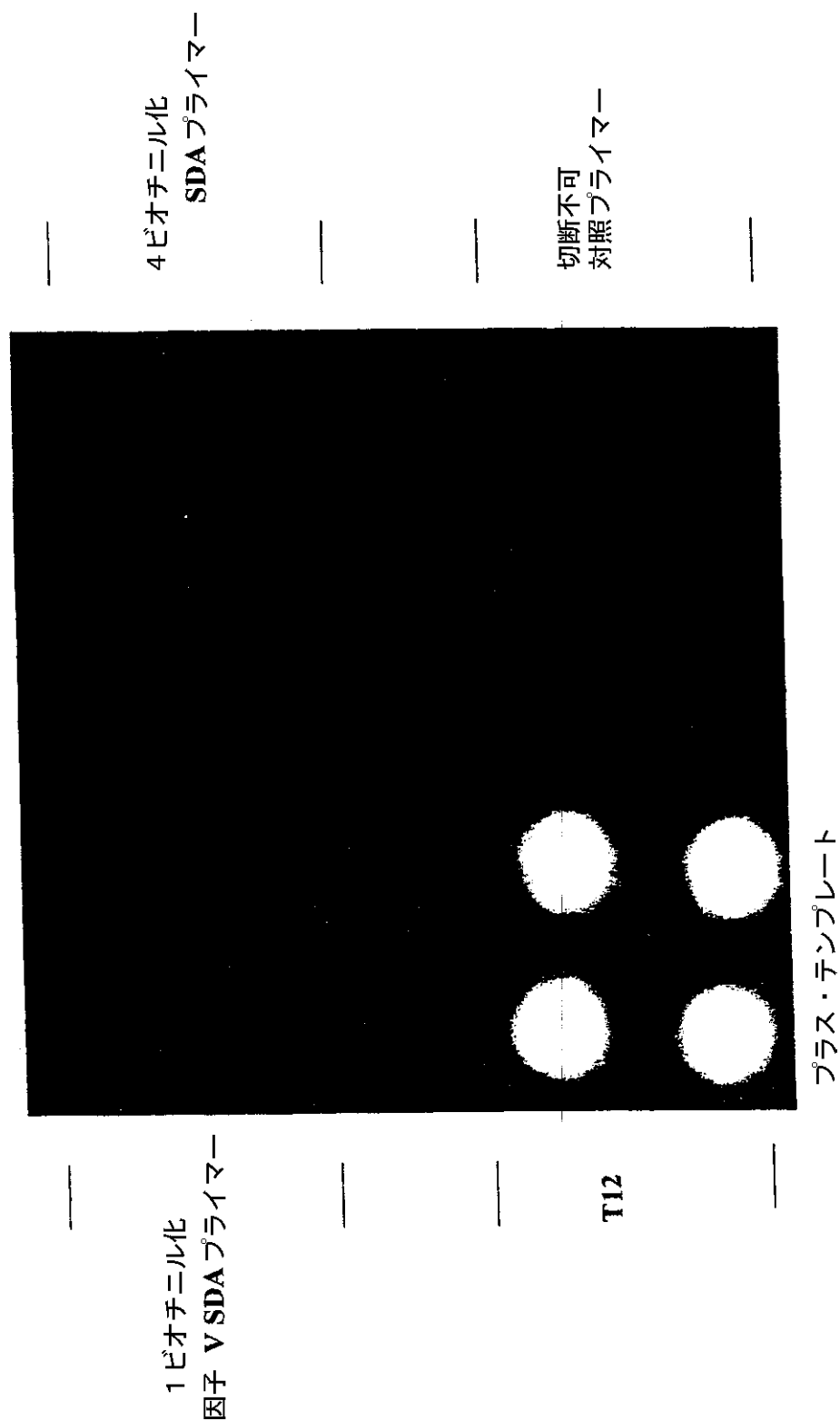
【図6B】

FIGURE 6B



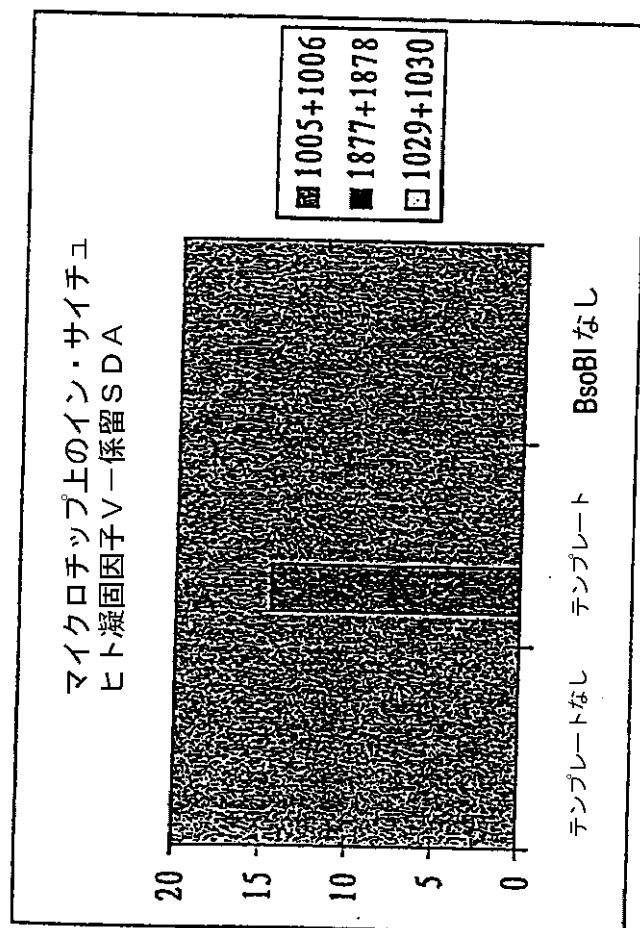
【図6C】

FIGURE 6C



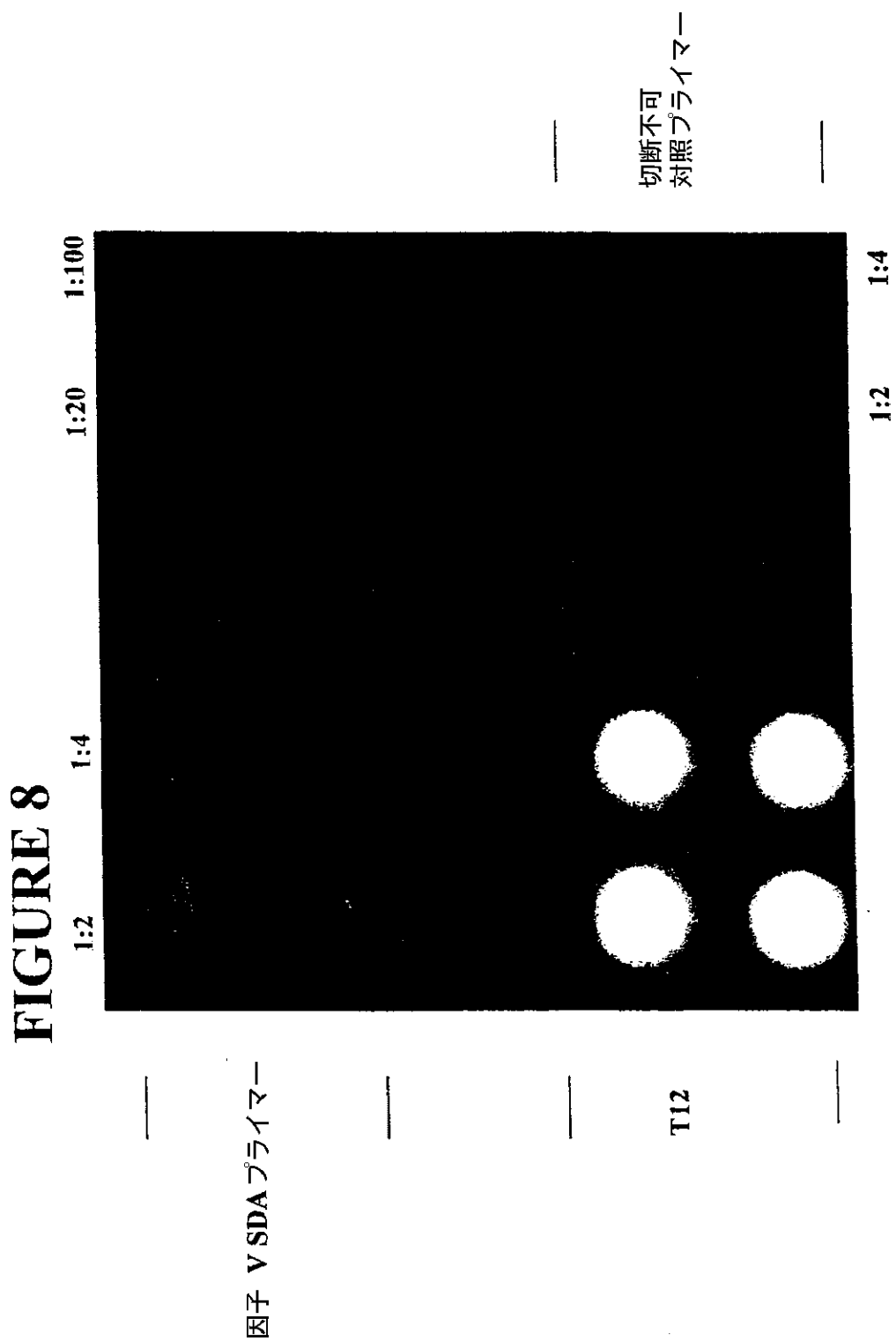
【図7】

FIGURE 7



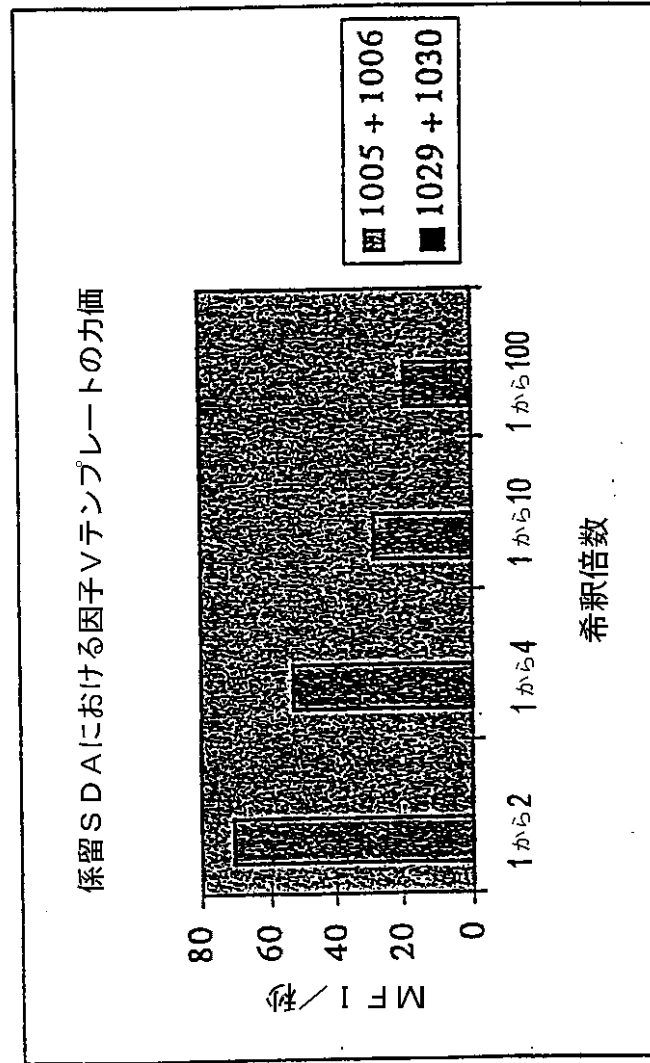
1005 + 1006 = 1 ビオチニル化プローブ
 1877 + 1878 = 4 ビオチニル化プローブ
 1029 + 1030 = 切断不可対照プライマー

【図8】



【図9】

FIGURE 9

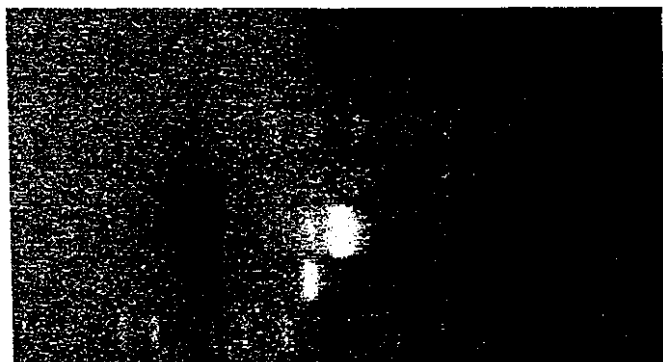


1005 + 1006 = 因子V SDAプライマー
 1029 + 1030 = 切断不可対照プライマー

【図10A】

FIGURE 10A

1 2 3 4 5 6

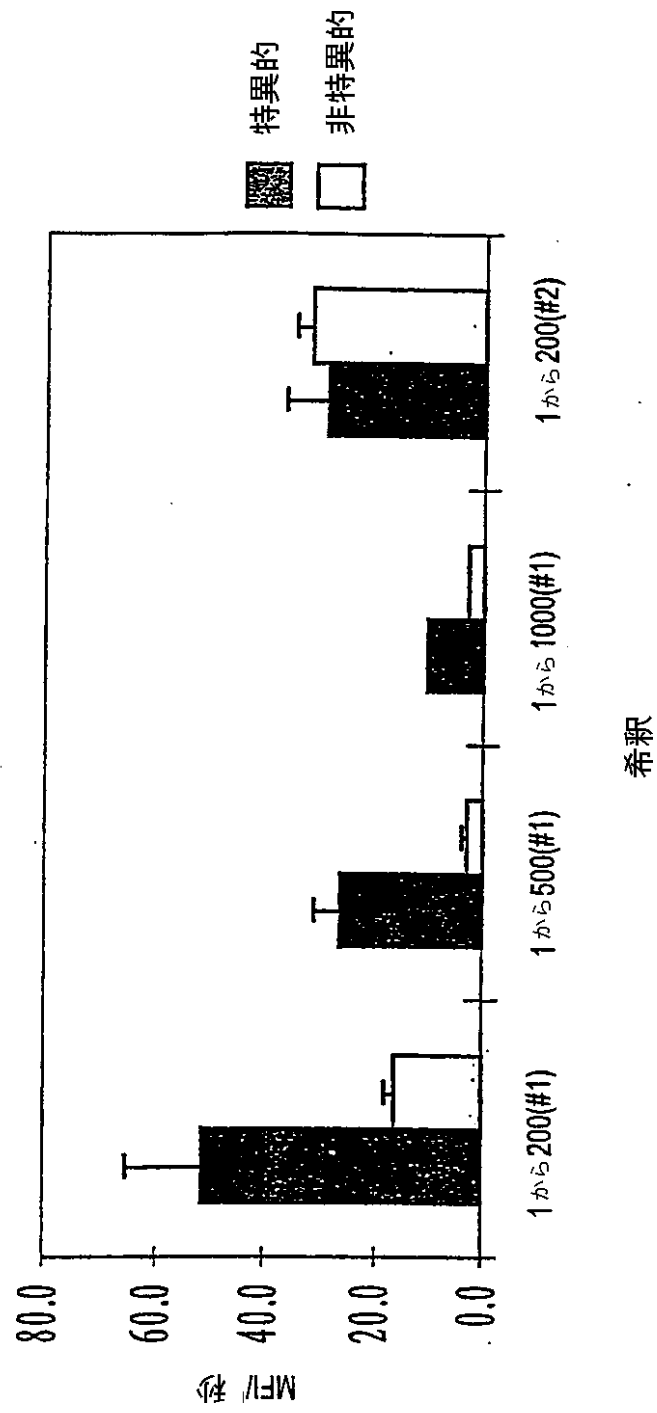


レーン

1. 分子量マーカー
2. PCR 増幅
3. NASBA 1X テンプレート
4. NASBA 1,000X 希釈テンプレート
5. NASBA 1,000,000X 希釈テンプレート
6. NASBA - テンプレートなし

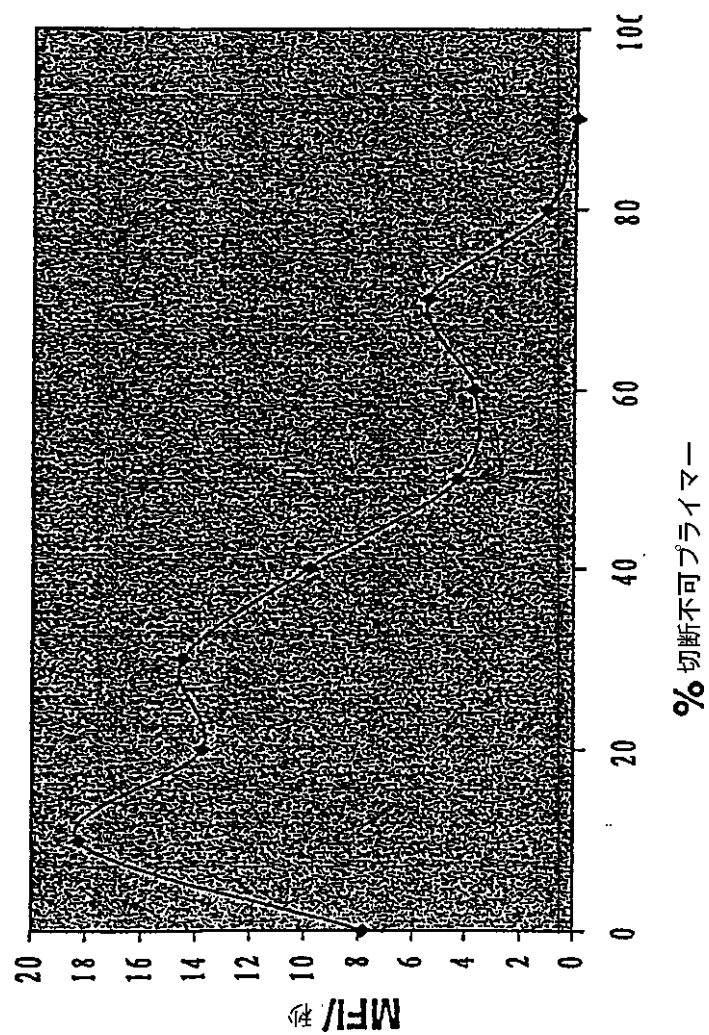
【図10B】

FIGURE 10B



【図11】

FIGURE 11



【図12】

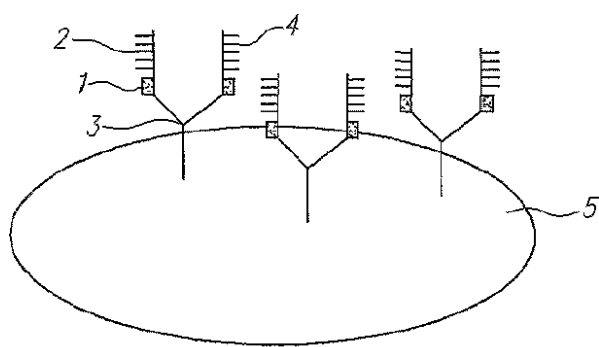
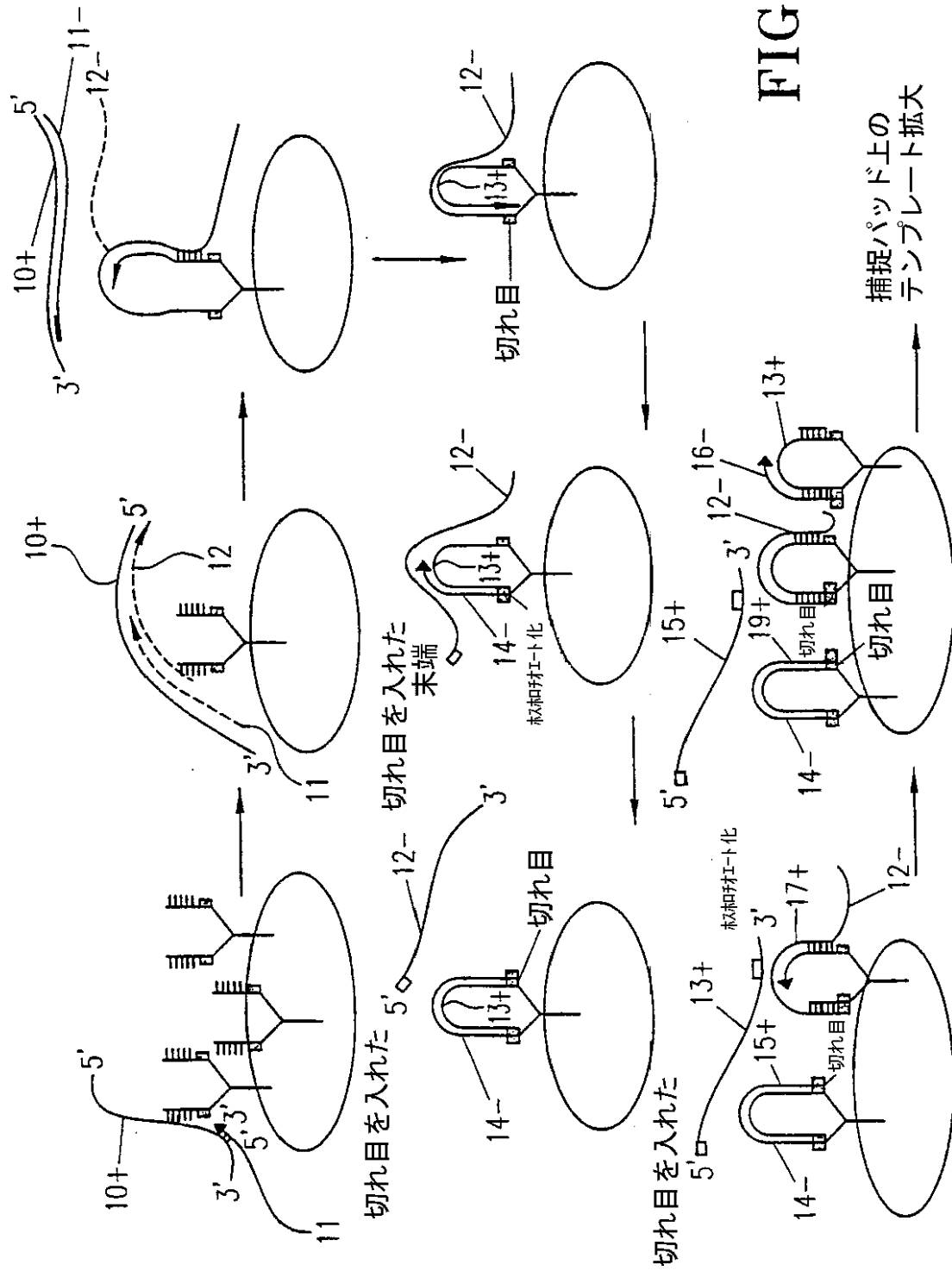
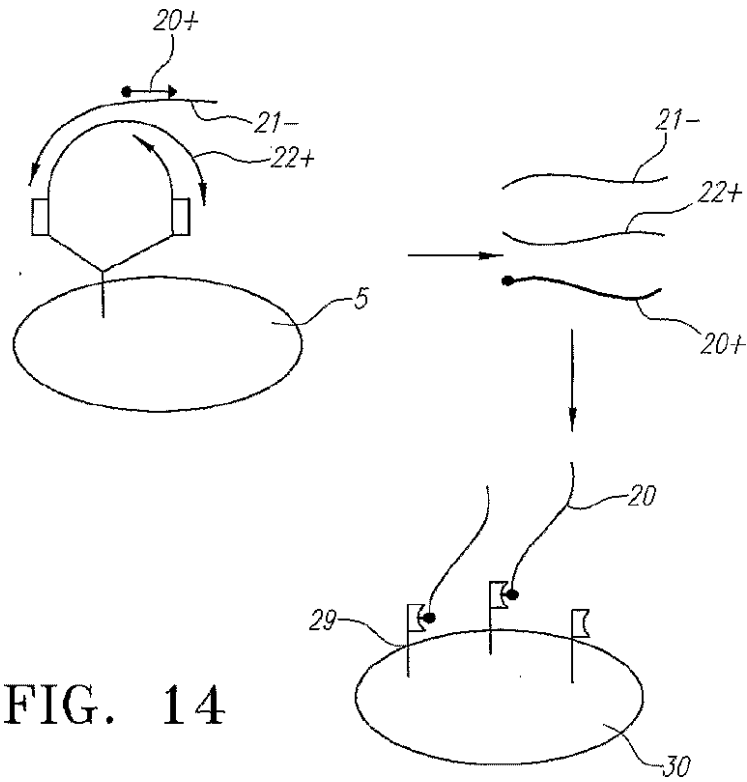


FIG. 12

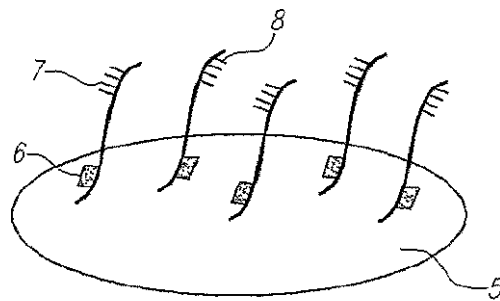
【図13】



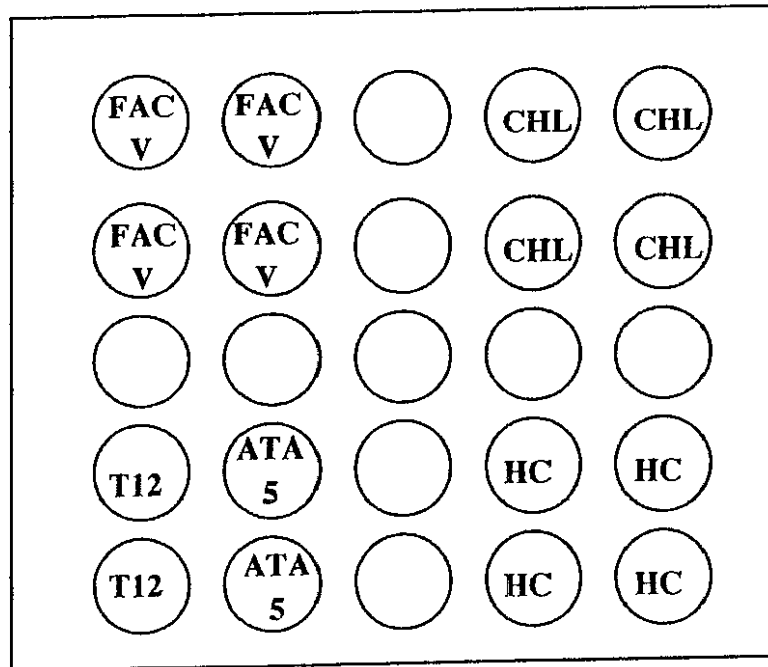
【図14】



【図15】



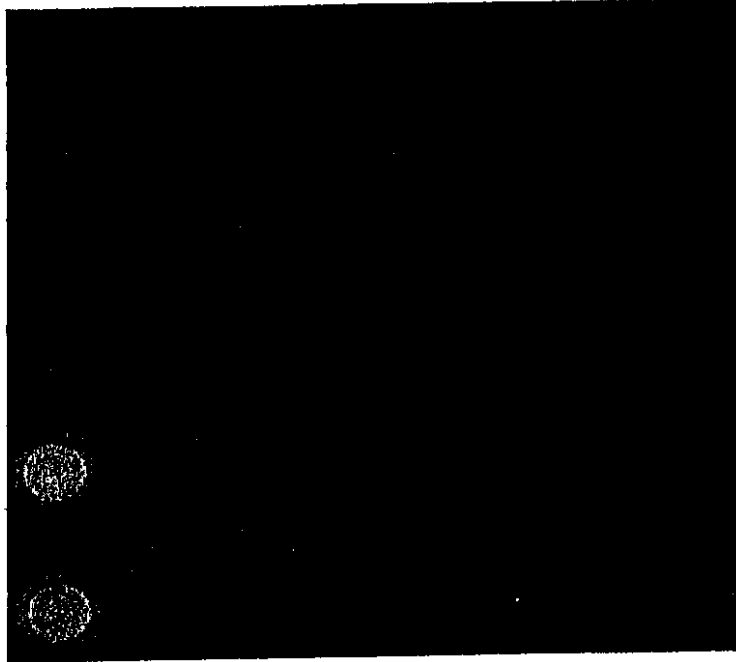
【図16】

FIGURE 16

実験的レイアウト

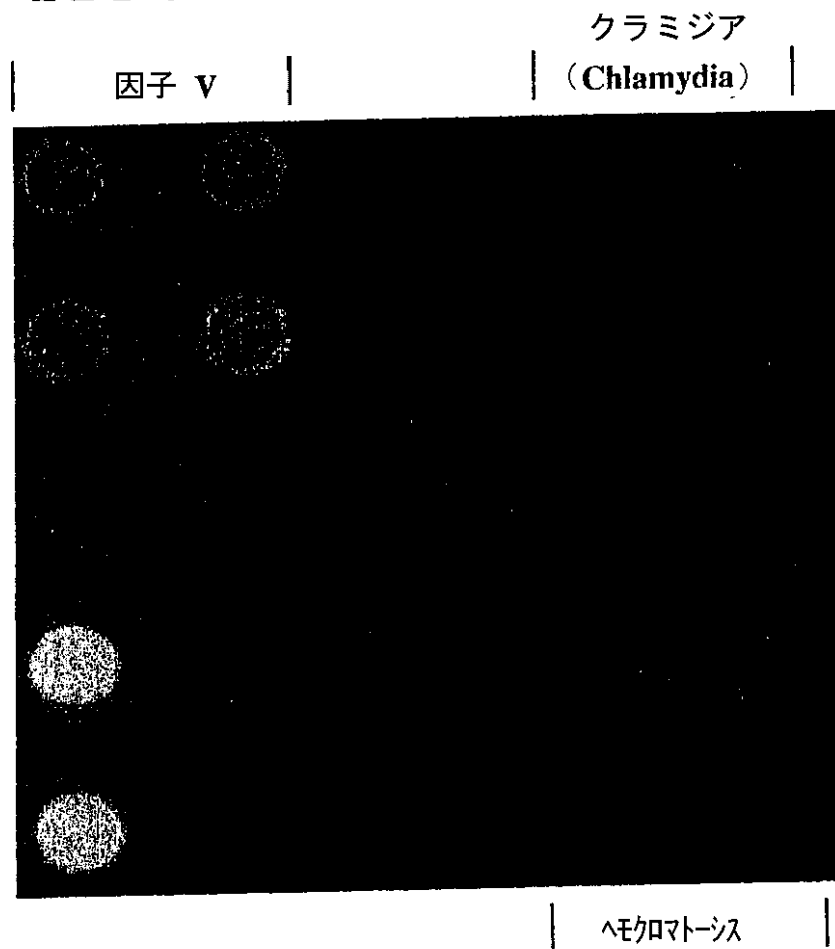
【図17】

FIGURE 17



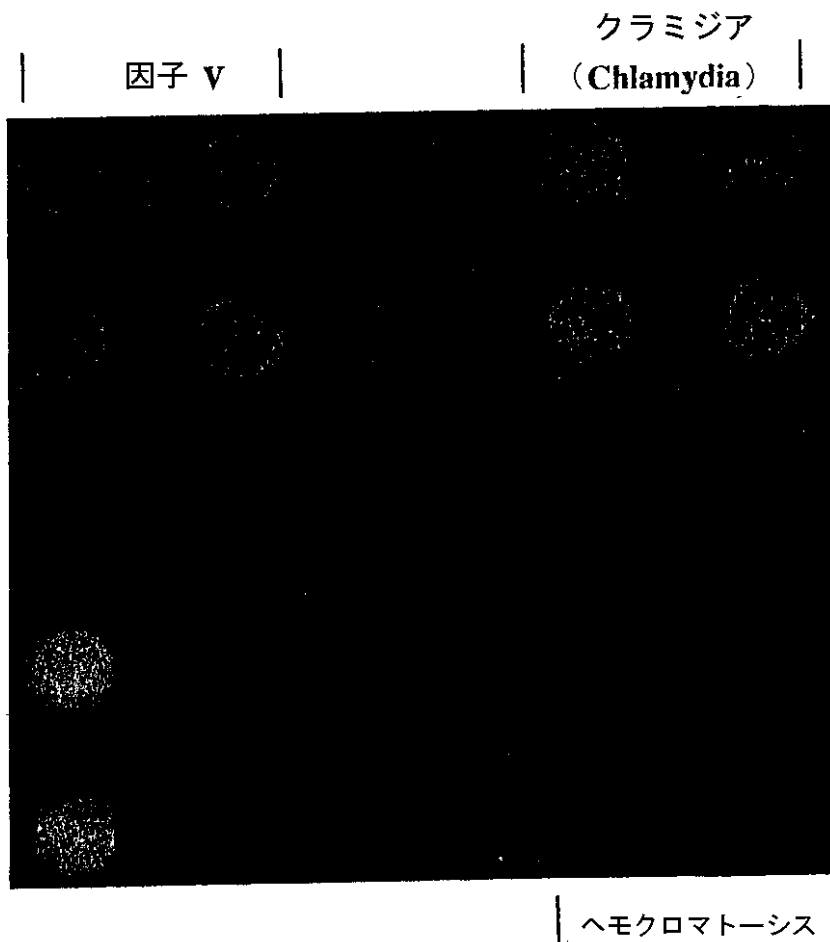
対照 - テンプレートなし +
全レポーター・オリゴ

【図18】

FIGURE 18

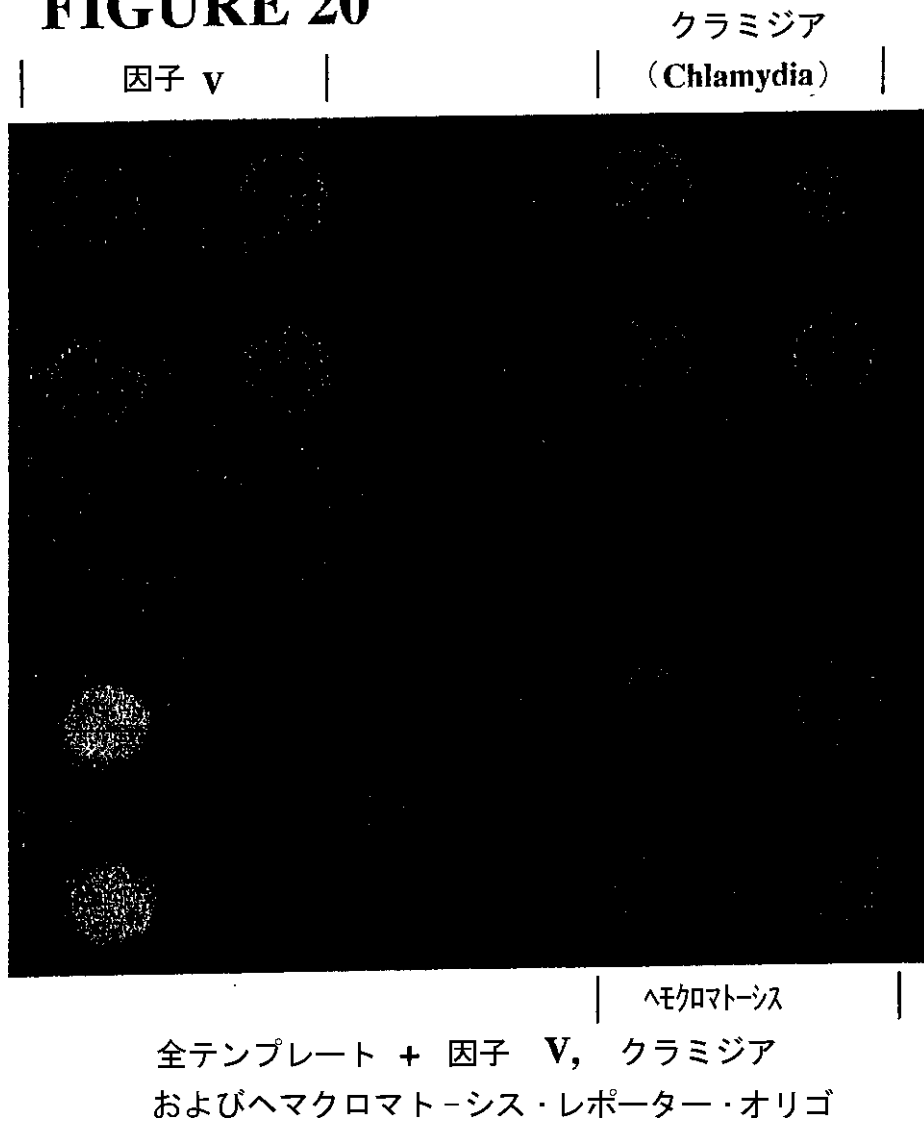
全テンプレート + 因子 V レポーター・オリゴ

【図19】

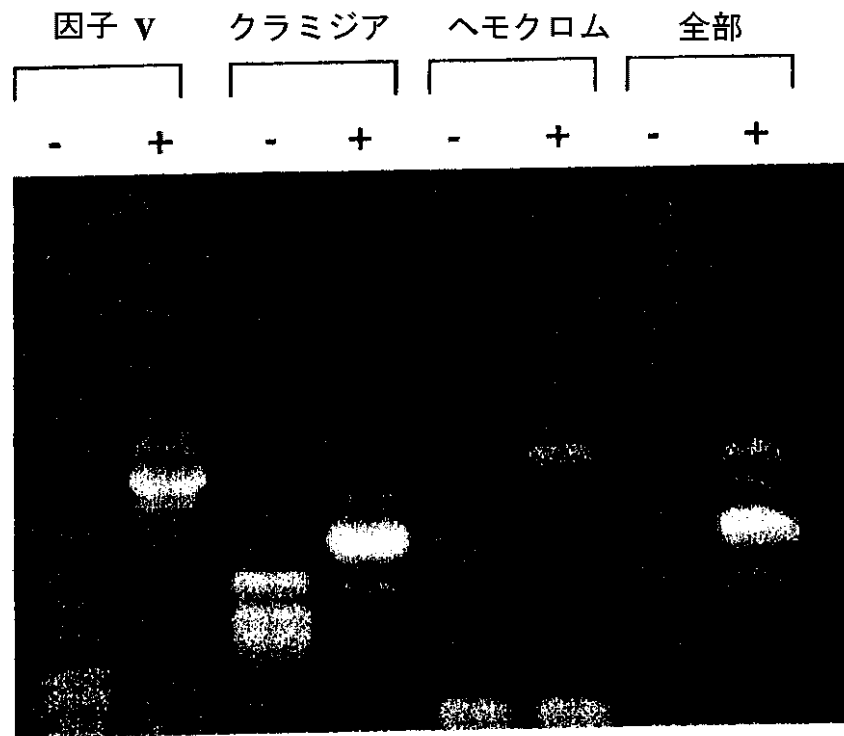
FIGURE 19

全テンプレート + 因子 V, クラミジア
レポーター・オリゴ

【図20】

FIGURE 20

【図21】

FIGURE 21

対照溶液 SDA 反応

【図22】

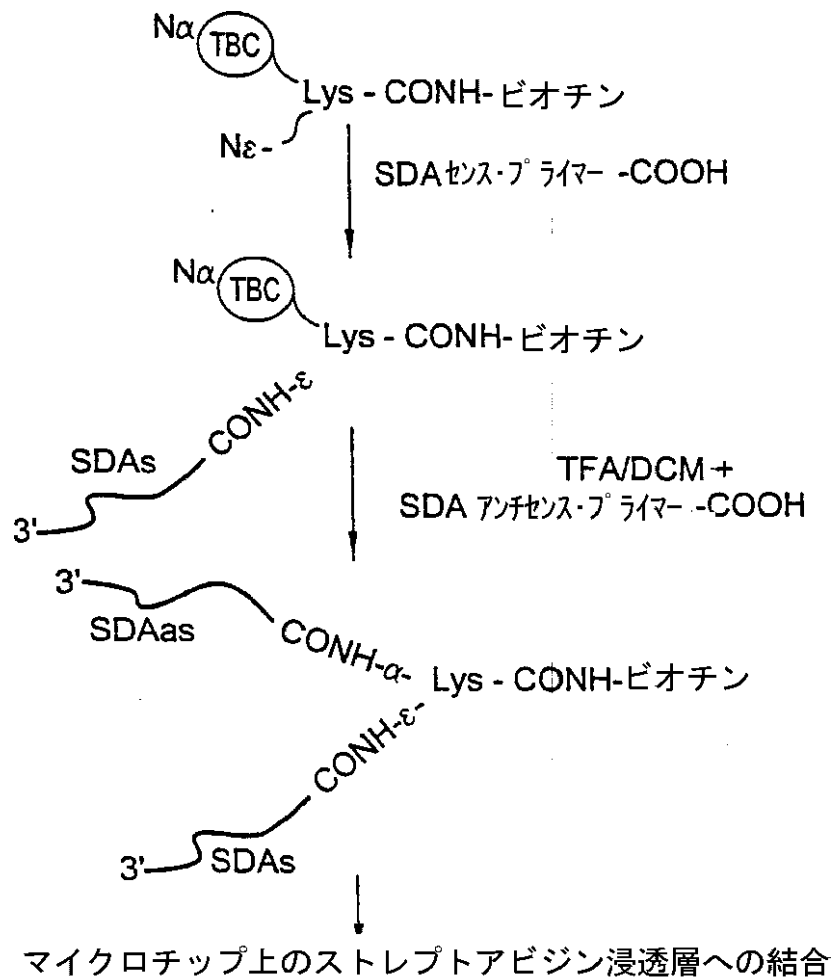


FIG. 22

【図23A】

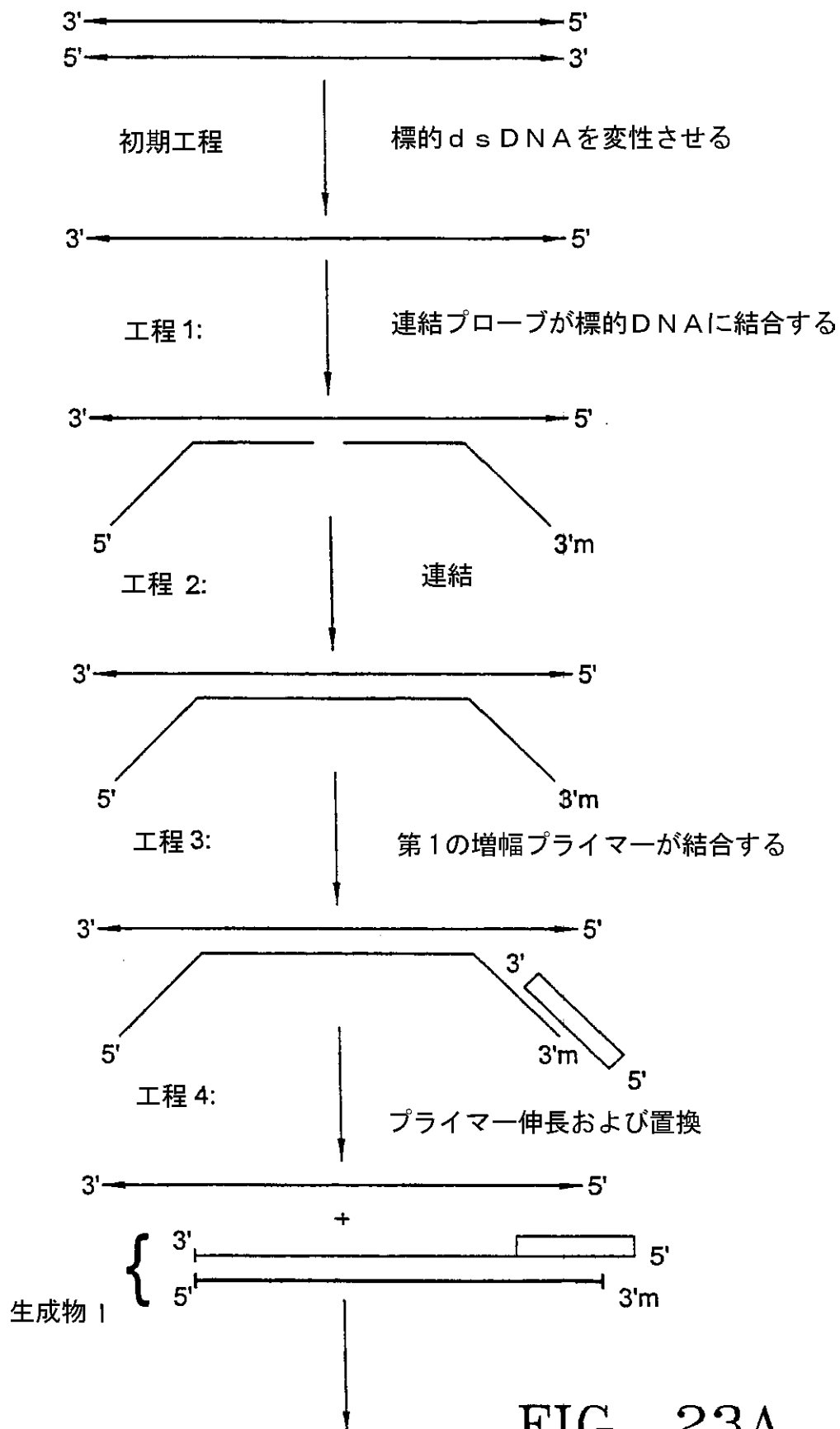


FIG. 23A

【図23B】

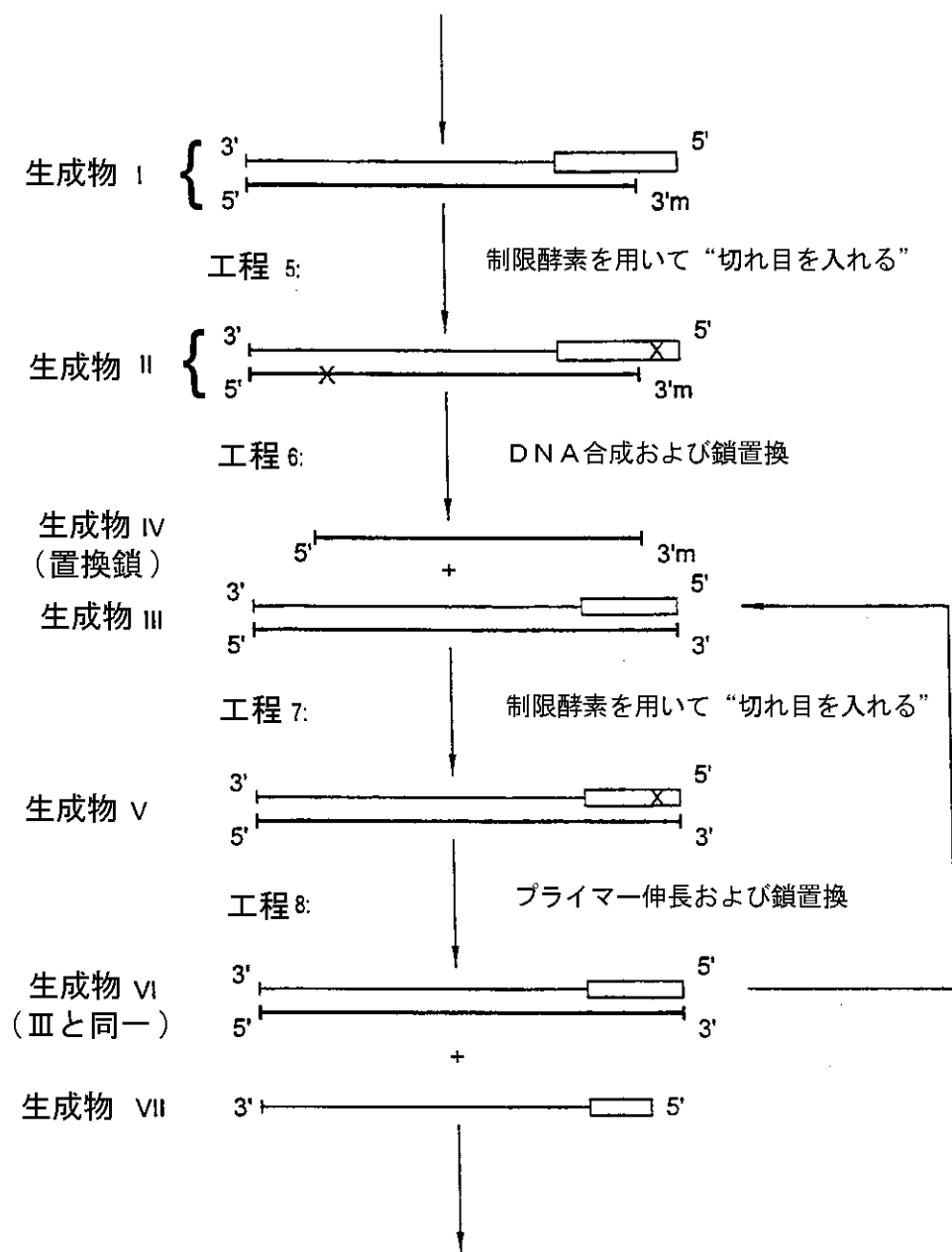


FIG. 23B

【図23C】

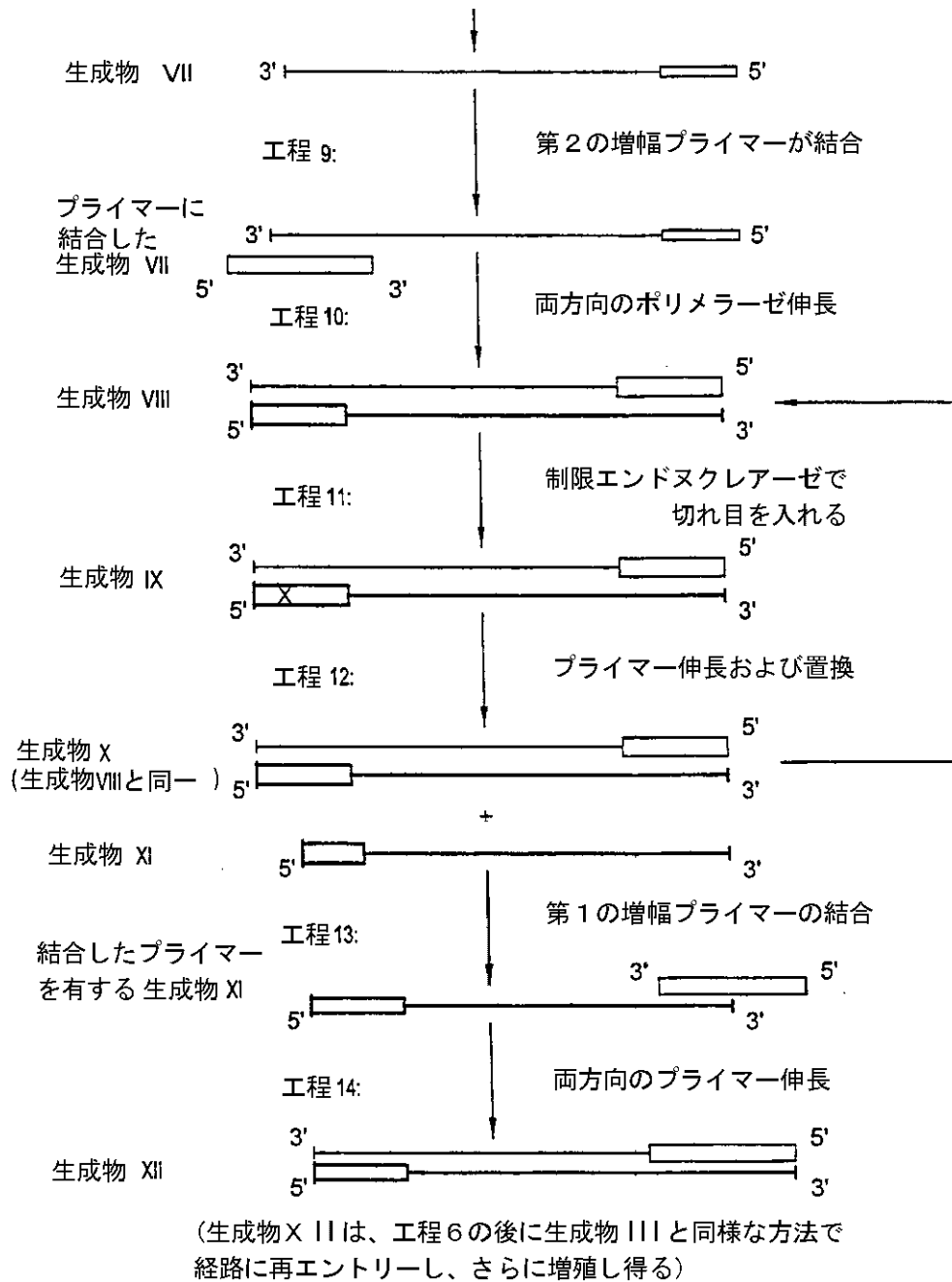
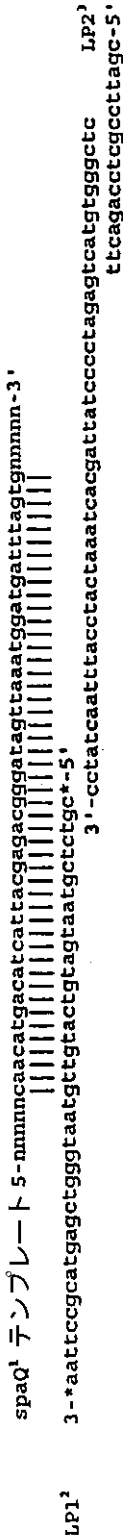


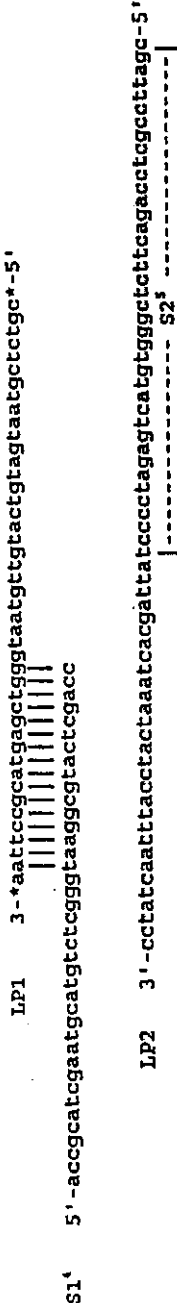
FIG. 23C

Fig. 23 D サルモネラ spaQ 遺伝子の連結依存的検出

連結プロローブ LP1 および LP2:



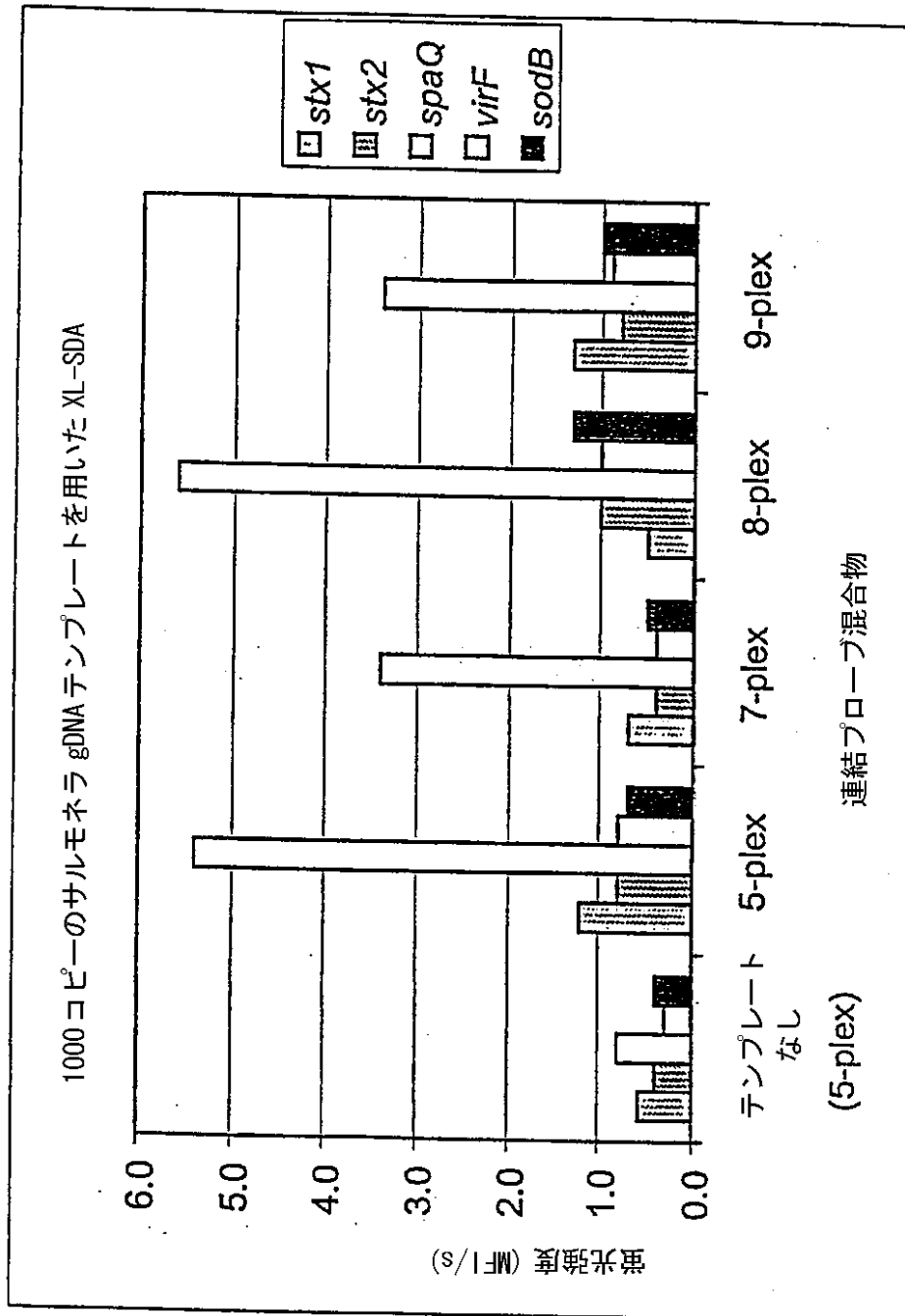
増幅プライマー配列 S1 および S2:



¹ spaQ (配列番号 41)
² LP1 (配列番号 37): * = リン酸
5' LP1 上の 5' リン酸が連結可能な末端を供する
3' LP1 上の 3' リン酸がポリメラーゼ伸長をブロックする
³ LP2 (配列番号 38)
⁴ S1 (配列番号 39)
⁵ S2 (配列番号 40)

【図24】

Fig. 24



1000 のサルモネラ・ゲノミック DNA と XL-SDA 反応の微小電極アレイを用いた電子的ハイブリダイゼーション

【手続補正書】

【提出日】 平成13年12月17日(2001. 12. 17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 特許請求の範囲

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a. 1またはそれを超える試料中の関心のある少なくとも1の標的核酸を、複数の電子的にアドレス指定可能な捕捉部位を有するバイオエレクトロニック・マイクロチップに導入し；

b. 該標的核酸を、それに結合している少なくとも第1のPCRオリゴヌクレオチド・プライマーを有する少なくとも1の捕捉部位に電子的にアドレス指定し、ここに該第1のPCRプライマーは増幅すべき標的核酸に特異的な配列を含み；

c. 増幅すべき標的核酸を捕捉部位の第1のPCRプライマーにハイブリダイズさせ；

d. ハイブリダイズした標的核酸と、DNAポリメラーゼ活性を含む、PCRを支持するために必要な酵素および試薬と接触させ；ついで

e. PCRによって標的核酸を増幅させてアンプリコン種を生成させることを含む、バイオエレクトロニック・マイクロチップを用いて1またはそれを超える試料中の関心のある1またはそれを超える標的核酸を増幅させる方法。

【請求項2】 ハイブリダイズした標的核酸を、第2のPCRオリゴヌクレオチド・プライマーとも接触させる請求項1記載の方法。

【請求項3】 さらに、十分なマイナス荷電を捕捉部位と結合する電極に通して電子的に誘導したストリンジェンシーを生成させて、工程(c)において形成した誤対合ハイブリダイズした標的核酸を除去することを含む請求項1記載の方法。

【請求項4】 生成したアンプリコンの少なくとも一部分が捕捉部位に係留

される請求項1記載の方法。

【請求項5】 さらに、(f)少なくとも1のアンプリコン種を検出する工程を含む請求項1記載の方法。

【請求項6】 1を超える試料からの標的核酸を増幅させ、さらに、各さらなる試料の標的核酸を工程a)ないしe)に付すことを含む請求項1記載の方法。

【請求項7】 接触工程d)および増幅工程e)が、1を超える試料の標的核酸に対して同時である請求項6記載の方法。

【請求項8】 関心のある各標的核酸配列について、

a. 上流オリゴヌクレオチド連結プローブおよび下流オリゴヌクレオチド連結プローブの両方が標的核酸配列と接触しつつ上流オリゴヌクレオチド連結プローブの3'末端が下流オリゴヌクレオチド連結プローブの5'末端に並置するように、上流および下流オリゴヌクレオチド連結プローブを標的核酸配列の近接核酸配列と接触させ；

b. 上流および下流プローブをそれらの対応する並置した末端で互いに連結させて、連結された標的プローブ・テンプレートを形成させ；ついで

c. 鎖置換増幅反応において連結された標的プローブ・テンプレートを用いて、連結された標的プローブ・テンプレートのアンプリコンを形成させることを含み、ここに該鎖置換反応が第1および第2のSDAプライマーを利用し、該第1および第2のSDAプライマーが連結された標的プローブ・テンプレートに特異的な配列の上流に制限エンドヌクレアーゼ配列を含み、

ここに、工程a、bおよびcが同時に起こることを特徴とする関心のある少なくとも1の標的核酸配列を増幅させる方法。

【請求項9】 アンプリコンの検出を、蛍光、化学ルミネセンス、電気化学ルミネセンスのうちの少なくとも1によって行う請求項1記載の方法。

【請求項10】 関心のある標的核酸が、血液、唾液、大便、組織、培地、精液、毛髪、尿、食物、水、ならびに血液、唾液、大便、組織、培地、精液、毛髪、尿、食物および水のうちの少なくとも1を接種した培養液よりなる群から選択される起源由来である請求項1記載の方法。

【請求項11】 複数の標的核酸配列を同一の反応混合物内で同時に増幅させる請求項8記載の方法。

【請求項12】 第1のSDAプライマーが全ての連結された標的プローブ・テンプレートにハイブリダイズすることができるユニバーサル増幅プライマーであって、第2のSDAプライマーが全ての連結された標的プローブ・テンプレートの一部に同一のヌクレオチド配列を含むユニバーサル増幅プライマーである請求項11記載の方法。

【請求項13】 バンパー・プライマーを鎖置換増幅で用いない請求項8記載の方法。

【請求項14】 連結された標的プローブ・テンプレートのアンプリコンを検出する請求項8記載の方法。

【請求項15】 鎖置換増幅工程(c)において、少なくとも1の修飾核酸をアンプリコンに取込み、ここに修飾が制限エンドヌクレアーゼによる修飾核酸を含むポリヌクレオチドの切断を妨害する請求項8記載の方法。

【請求項16】 工程(c)における鎖置換増幅が、第2のSDAプライマーに対して等しくない有効濃度比の第1のSDAプライマーを利用し、ここに第1および第2のSDAプライマーがプライマーのセットを形成し、ここにアンプリコンの非対称集団が工程(c)で生成することを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項17】 少なくとも1の第1および第2のSDAプライマーを標識する請求項8記載の方法。

【請求項18】 対立遺伝子特異的な鎖置換増幅を、2またはそれを超える知られている対立遺伝子を有する遺伝子をコードする関心のある標的核酸について行い、

ここに、上流および下流連結プローブ配列を、連結プローブが、上流プローブの3'末端の最も近く(proximate)または下流プローブの5'末端の最も近くで、対立遺伝子の決定因子である標的核酸配列の一部に接触するように、遺伝子の特定の対立遺伝子に特異的であるように選択し、

ここに、工程(b)において、標的核酸配列が対立遺伝子決定因子配列を含む

場合にのみ連結プローブが連結するように、標的核酸がそれに対して連結プローブを選択する対立遺伝子の配列決定因子を含まない場合、プローブのうちの1の並置末端が誤整列し、および

ここに、工程(c)において、対立遺伝子決定因子配列が標的核酸配列内に含まれる場合、アンプリコンが鎖置換増幅によって生成することを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項19】 関心のある各標的核酸配列について、

a. 上流オリゴヌクレオチド連結プローブおよび下流オリゴヌクレオチド連結プローブの両方が標的核酸配列と接触しつつ上流プローブの3'末端が下流プローブの5'末端に並置するように、上流および下流オリゴヌクレオチド連結プローブを標的核酸配列の近接核酸配列と接触させ；

b. 上流および下流プローブをそれらの対応する並置末端で互いに連結させて、連結された標的プローブ・テンプレートを形成させ；ついで

c. 鎖置換増幅反応において連結した標的プローブ・テンプレートを用いて、連結された標的プローブ・テンプレートのアンプリコンを形成させることを含み、ここに鎖置換反応が第1および第2のSDAプライマーを利用し、該第1および第2のSDAプライマーが連結した標的プローブ・テンプレートに特異的な配列の上流に制限エンドヌクレアーゼ配列を含み、

ここに、鎖置換増幅反応においてバンパー・プライマーを用いないことを特徴とする関心のある少なくとも1の標的核酸配列を多重増幅させる方法。

【請求項20】 複数の標的核酸配列を同一の反応混合物内で同時に増幅させる請求項19記載の方法。

【請求項21】 第1のSDAプライマーが全ての連結された標的プローブ・テンプレートにハイブリダイズすることができるユニバーサル増幅プライマーであって、第2のSDAプライマーが全ての連結された標的プローブ・テンプレートの一部分に同一であるヌクレオチド配列を含むユニバーサル増幅プライマーである請求項20記載の方法。

【請求項22】 連結された標的プローブ・テンプレートのアンプリコンを検出する請求項19記載の方法。

【請求項23】 鎖置換増幅工程(c)において、少なくとも1の修飾核酸がアンプリコンに取込まれ、ここに修飾が制限エンドヌクレアーゼによる修飾核酸を含むポリヌクレオチドの切断を妨害することを特徴とする請求項19記載の方法。

【請求項24】 a. 上流オリゴヌクレオチド連結プローブおよび下流オリゴヌクレオチド連結プローブの両方が標的核酸配列と接触しつつ上流プローブの3'末端が下流プローブの5'末端に並置するように、上流および下流オリゴヌクレオチド連結プローブを標的核酸配列の近接核酸配列と接触させ、ここに上流および下流オリゴヌクレオチド連結プローブは最初に互いに連結することができず；

b. 上流および下流オリゴヌクレオチド連結プローブが互いに連結することができるようにし；

c. 上流および下流プローブをそれらの対応する並置末端で互いに連結させて、連結した標的プローブ・テンプレートを形成させ；ついで

d. 鎖置換増幅反応において連結した標的プローブ・テンプレートを用いて、連結された標的プローブ・テンプレートのアンプリコンを形成させることを含み、ここに鎖置換反応が第1および第2のSDAプライマーを利用し、第1および第2のSDAプライマーが連結された標的プローブ・テンプレートに特異的な配列の上流に制限エンドヌクレアーゼ配列を含むことを特徴とする関心のある少なくとも1の標的核酸配列を増幅させる方法。

【請求項25】 互いに連結することができるようにすることが、少なくとも1の連結プローブから1またはそれを超える末端ヌクレオチドを除去することを含む請求項24記載の方法。

【請求項26】 関心のある各標的核酸配列について、

a. 上流オリゴヌクレオチド連結プローブおよび下流オリゴヌクレオチド連結プローブの両方が標的核酸配列と接触しつつ上流プローブの3'末端が下流プローブの5'末端に並置するように、上流および下流オリゴヌクレオチド連結プローブを標的核酸配列の近接核酸配列と接触させ；

b. 上流および下流プローブをそれらの対応する並置末端で互いに連結させて

、連結された標的プローブ・テンプレートを形成させ；ついで

c. 鎖置換増幅反応において、連結された標的プローブ・テンプレートを用いて連結された標的プローブ・テンプレートのアンプリコンを形成させることを含み、ここに鎖置換反応が第1および第2のSDAプライマーを利用し、第1および第2のSDAプライマーが連結された標的プローブ・テンプレートに特異的な配列の上流に制限エンドヌクレアーゼ配列を含み、

ここに、標的配列、連結した標的プローブ・テンプレート、およびアンプリコンよりなる群から選択される少なくとも1の核酸を、工程(d)において、バイオエレクトロニック・マイクロチップ上の複数の捕捉部位のいずれかに電子的にアドレス指定することを特徴とする電子的にアドレス指定可能なマイクロチップを用いて少なくとも1の試料からの関心のある少なくとも1の標的核酸配列を増幅させる方法。

【請求項27】 標的配列を、接触工程(a)の前に工程(d)において電子的にアドレス指定する請求項26記載の方法。

【請求項28】 連結されたプローブ・テンプレートを、連結工程(b)の後に、工程(d)において電子的にアドレス指定する請求項26記載の方法。

【請求項29】 アンプリコンを、増幅工程(c)の後に、工程(d)において電子的にアドレス指定する請求項26記載の方法。

【請求項30】 複数の標的核酸配列を同一反応混合物内で同時に増幅させる請求項26記載の方法。

【請求項31】 第1のSDAプライマーが全ての連結された標的プローブ・テンプレートにハイブリダイズすることができるユニバーサル増幅プライマーであって、第2のSDAプライマーが全ての連結された標的プローブ・テンプレートの一部分に同一であるヌクレオチド配列を含むユニバーサル増幅プライマーである請求項30記載の方法。

【請求項32】 1を超える試料からの標的核酸を増幅させる請求項26記載の方法。

【請求項33】 増幅工程(c)が1を超える試料の標的核酸について同時に起こる請求項32記載の方法。

【請求項34】 鎖置換増幅においてバンパー・プライマーを用いない請求項26記載の方法。

【請求項35】 さらに、工程（d）の後に電子的洗浄工程を含んで、捕捉部位に電子的にアドレス指定された非ハイブリダイズ核酸を除去する請求項26記載の方法。

【請求項36】 さらに、十分なマイナス荷電を捕捉部位と結合する電極に通して電子的に誘導したストリンジェンシーを生成させて、工程（d）において形成した誤対合ハイブリダイズした標的核酸を除去することを含む請求項26記載の方法。

【請求項37】 第1および第2のSDAプライマーが、鎖置換増幅を支持する能力を有する分岐プライマー構造内に含まれ、ここに分岐プライマーが捕捉部位に結合していることを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項38】 少なくとも幾つかのアンプリコン種が捕捉部位に係留される請求項26記載の方法。

【請求項39】 連結された標的プローブ・テンプレートのアンプリコンを検出する請求項26記載の方法。

【請求項40】 捕捉部位が、それに結合した、連結プローブ、伸長不可能となるよう修飾された3'末端を有する連結プローブ、および捕捉プローブよりなる群から選択される少なくとも1の核酸を有する請求項26記載の方法。

【請求項41】 鎖置換増幅工程（c）において、少なくとも1の修飾核酸がアンプリコンに取込まれ、ここに修飾が制限エンドヌクレアーゼによる修飾核酸を含むポリヌクレオチドの切断を妨害することを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項42】 工程（c）の鎖置換増幅が、第2のSDAプライマーに対して等しくない有効濃度比の第1のSDAプライマーを利用し、ここに第1および第2のSDAプライマーがプライマーのセットを形成し、ここにアンプリコン種の非対称集団が工程（c）において生成することを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項43】 第1および第2のSDAプライマーの少なくとも1を標識

する請求項26記載の方法。

【請求項44】 対立遺伝子特異的な鎖置換増幅を、2またはそれを超える知られている対立遺伝子を有する遺伝子をコードする関心のある標的核酸について行い、

ここに、連結プローブが、上流プローブの3'末端の最も近くまたは下流プローブの5'末端の最も近くで、対立遺伝子の決定因子である標的核酸配列の一部に接触するように、遺伝子の特定の対立遺伝子に特異的であるように上流および下流連結プローブ配列を選択し、

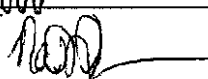
ここに、工程(b)において、標的核酸配列が対立遺伝子決定因子配列を含む場合にのみ連結プローブが連結するように、標的核酸がそれに対して連結プローブを選択した対立遺伝子の配列決定因子を含まない場合、プローブのうちの1の並置末端が誤整列され、および

ここに、工程(c)において、対立遺伝子決定因子配列が標的核酸配列内に含まれる場合、アンプリコンが鎖置換増幅によって生成することを特徴とする請求項26記載の方法。

【請求項45】 遺伝子が複数の知られている対立遺伝子を含み、標的核酸が複数の捕捉部位にアドレス指定される請求項44記載の方法。

【請求項46】 第V因子、ヘモクロマトーシスまたは細菌に特異的な1またはそれを超えるオリゴヌクレオチドを含み、ここに該オリゴヌクレオチドが配列番号：1-62よりなる群から選択される増幅プライマー、バンパー・プライマー、捕捉プローブ、および／またはシグナル・プローブを含むことを特徴とするバイオエレクトロニック・マイクロチップで使用するための連結ベースのSDA反応を行うためのキット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/09711															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 15/06; C12Q 1/68; C12P 19/34 US CL : 422/68.1; 435/6, 91.2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 422/68.1; 435/6, 91.2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,605,662 A (HELLER et al) 25 February 1997 (25.02.1997), see entire document.</td> <td>1-45</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,641,658 A (ADAMS et al) 24 June 1997 (24.06.1997), see entire document.</td> <td>1-45</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>EDMAN et al. Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips. Nucleic Acids Research. December 1997, Vol. 25, No. 24, pages 4907-4914, see entire document.</td> <td>1-45</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 9521938 A1 (RIJCS UNIVERSITEIT LEIDEN) 17 August 1995 (17.08.1995), see entire document.</td> <td>46-47</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 5,605,662 A (HELLER et al) 25 February 1997 (25.02.1997), see entire document.	1-45	Y	US 5,641,658 A (ADAMS et al) 24 June 1997 (24.06.1997), see entire document.	1-45	Y	EDMAN et al. Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips. Nucleic Acids Research. December 1997, Vol. 25, No. 24, pages 4907-4914, see entire document.	1-45	Y	WO 9521938 A1 (RIJCS UNIVERSITEIT LEIDEN) 17 August 1995 (17.08.1995), see entire document.	46-47
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
Y	US 5,605,662 A (HELLER et al) 25 February 1997 (25.02.1997), see entire document.	1-45															
Y	US 5,641,658 A (ADAMS et al) 24 June 1997 (24.06.1997), see entire document.	1-45															
Y	EDMAN et al. Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips. Nucleic Acids Research. December 1997, Vol. 25, No. 24, pages 4907-4914, see entire document.	1-45															
Y	WO 9521938 A1 (RIJCS UNIVERSITEIT LEIDEN) 17 August 1995 (17.08.1995), see entire document.	46-47															
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.																	
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">* Special categories of cited documents:</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			* Special categories of cited documents:		"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed				
* Special categories of cited documents:																	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family																
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
Date of the actual completion of the international search 14 June 2000 (14.06.2000)		Date of mailing of the international search report 03 JUL 2000															
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Young J. Kim  Telephone No. (703) 308-0196															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US00/09711

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3: STN Commercial Database (Biosis, Medline, Embase, Embal, SciSearch, BiotechDS, CAPIus)
WEST 2.0 (USPT, DWPI, TDBD, JPAB, EPAB)
Search Terms: chip, array, solid support, microarray, glass slide, electric field, biasing, PCR, LCR, strand displacement

フロントページの続き

- (72)発明者 カール・エフ・エドマン
アメリカ合衆国92130カリフォルニア州サ
ンディエゴ、エル・カミノ・レアル12545
番
- (72)発明者 ジョン・ジェイ・カリノ
アメリカ合衆国92130カリフォルニア州サ
ンディエゴ、シー・ノール・コート13129
番
- (72)発明者 ルイス・オー・ジェルー
アメリカ合衆国92130カリフォルニア州サ
ンディエゴ、ジョージア・ストリート3907
番
- (72)発明者 ジョナサン・エム・ダイバー
アメリカ合衆国92131カリフォルニア州サ
ンディエゴ、サンシャイン・パーク・コー
ト11909番
- Fターム(参考) 2G052 AA28 AA35 AA36 AA37 AB20
AD26 AD46 FD20 GA11 GA30
JA04 JA09 JA11
2G054 AA06 AB04 BA04 BB20 CA22
CD01 CE02 EA01 EA03 JA04
JA07

专利名称(译)	使用链置换扩增和生物电子微芯片技术扩增和分离核酸序列		
公开(公告)号	JP2002541475A	公开(公告)日	2002-12-03
申请号	JP2000611050	申请日	2000-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	NANOGENBECTON迪金森PARTNERSHIP		
申请(专利权)人(译)	Nanogen / Becton Dickinson公司合作		
[标]发明人	マイケルアイネレンバーグ カールエフエドマン ジョンジェイカリノ ルイスオージェル ジョナサンエムダイバー		
发明人	マイケル・アイ・ネレンバーグ カール・エフ・エドマン ジョン・ジェイ・カリノ ルイス・オー・ジェル ジョナサン・エム・ダイバー		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 C12Q1/6825 C12Q1/6837 C12Q1/6844 G01N1/28 G01N21/78 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6844 C12P19/34 C12Q1/6825 C12Q1/6837 C12Q2537/143 C12Q2531/119 C12Q2565/501 C12Q2565/607		
FI分类号	G01N33/53.M G01N21/78.C G01N37/00.102 G01N1/28.J		
F-TERM分类号	2G052/AA28 2G052/AA35 2G052/AA36 2G052/AA37 2G052/AB20 2G052/AD26 2G052/AD46 2G052/FD20 2G052/GA11 2G052/GA30 2G052/JA04 2G052/JA09 2G052/JA11 2G054/AA06 2G054/AB04 2G054/BA04 2G054/BB20 2G054/CA22 2G054/CD01 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EA03 2G054/JA04 2G054/JA07		
优先权	09/290632 1999-04-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述和公开了使用新颖的链置换扩增技术结合微电子微芯片技术对样品中的核酸序列进行多重扩增和分析的装置，方法和组合物。具体而言，将样品中的核酸扩增以形成扩增子，将其寻址到生物电子微芯片和寻址的扩增子上的特定电子可寻址捕获位点 捕获并标记，然后分析捕获部位是否存在标记。可以使用链位移扩增来扩增样品。本发明还遵循本领域技术人员熟知的其他扩增方法。捕获和标记步骤可以通过使用序列特异性报道分子的通用捕获方法或使用通用报告子的序列特异性捕获的方法来执行。

表 1: 増幅およびマイクロアレイ分析に用いたオリゴヌクレオチド		
細菌 16S	配列 (5'-3') ¹	ポジション ²
BBs	CAAATGAATTGACGGGGGCC (配列番号 1)	927-946
Bba	AAGGGTTGCGCTCGT (配列番号 2)	1134-1120
Bas	ACCGCATCGAATGCATGCTCGGGTGCA TGTGGTTTAAT (配列番号 3)	961-975
Baa	ACGATTCAGCTCCAGACTTCTCGGGTAAC ATTTCACAACAC (配列番号 4)	1114-1090
Br ecoli	btr-CTCATCTCTGAAAACITC (配列番号 11)	
Brsdys	btr-CGTATCTCTACAAGGTTT (配列番号 12)	
Brstyp	btr-TCCATCTCTGGATTCTTC (配列番号 13)	
Brcjei	btr-CATATCTCTATAAGGTTT (配列番号 14)	
ヒト第V因子	配列 (5'-3') ¹	ポジション ²
FVBs	ACTACAGTGACGTGGACATC (配列番号 5)	
FVBa	TGTTATCACACTGGTGCTAA ³ (配列番号 6)	
FVAs	bio-ACCGCATCGAATGCATGCTCGGGTCTC TGGGCTAATAGGA (配列番号 7)	
FVA wt	ACGATTCAGCTCCAGACTTCTCGGGTAAT ACCTGTATTCCTC (配列番号 8)	
FVA m	ACGATTCAGCTCCAGACTTCTCGGGTAAT ACCTGTATTCCTC (配列番号 9)	
FVR	btr-CTGTATTCTCGCCTGTC (配列番号 10)	