

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-99332
(P2013-99332A)

(43) 公開日 平成25年5月23日(2013.5.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
G O 1 N 27/447 (2006.01)	G O 1 N 27/26 3 3 1 K	

審査請求 有 請求項の数 35 O L 外国語出願 (全 92 頁)

(21) 出願番号	特願2012-267086 (P2012-267086)	(71) 出願人	505188630
(22) 出願日	平成24年12月6日 (2012.12.6)		プリメラディーエックス インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2006-507112 (P2006-507112) の分割		アメリカ合衆国 02048 マサチューセッツ州 マンスフィールド フォーブズブルバード 171 スイート 2000
原出願日	平成16年3月11日 (2004.3.11)	(74) 代理人	100083806
(31) 優先権主張番号	10/387,286		弁理士 三好 秀和
(32) 優先日	平成15年3月12日 (2003.3.12)	(74) 代理人	100095500
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 伊藤 正和
		(74) 代理人	100111235
			弁理士 原 裕子

最終頁に続く

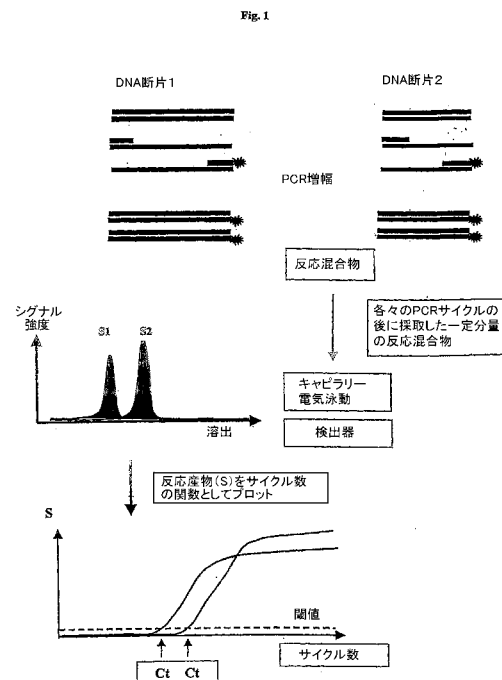
(54) 【発明の名称】 リアルタイム遺伝子発現プロフィール解析

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 1つ以上の対象となる拡散配列の増幅をリアルタイムでモニタリングする方法を提供する。

【解決手段】 (a) 核酸サンプルを第1および第2のオリゴヌクレオチドプライマーと接触させるステップと、(b) ステップ(a) で得られた混合物を増幅処理にかけるステップと、(c) 混合物の一定分量を採取し、その一定分量における核酸分子を分離し、少なくとも1つの検出可能なマーカの取り込みを検出するステップを含む方法。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象となる核酸配列の増幅をモニタリングする方法であって、前記方法が：

(a) 核酸サンプルを第1および第2のオリゴヌクレオチドプライマーと接触させるステップ（ここで、前記第1のオリゴヌクレオチドプライマーは前記対象となる核酸配列を含有する核酸分子と特異的にハイブリダイズし、かつ前記第2のオリゴヌクレオチドプライマーは前記対象となる核酸配列の相補物に含まれる配列と特異的にハイブリダイズし、ここで、1つのオリゴヌクレオチドプライマーのプライマー伸長産物は、その相補物から解離した場合に、他のプライマーの伸長産物を合成するための鋳型となることができ、そしてここで、前記第1および前記第2のプライマーの少なくとも1つが検出できるように標識されている）と；

(b) ステップ(a)で得られた混合物を増幅処理にかけるステップ（ここで、前記処理は、核酸鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニールリング、およびアニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長のサイクルを少なくとも2回含む）と；

(c) 前記混合物の一定分量を採取し、前記一定分量における核酸分子を分離し、前記の少なくとも1つの蛍光標識の取り込みを検出するステップ（ここで、前記採取は、ステップ(b)の前記サイクリング処理中、少なくとも1回の前記サイクルの後に実施され、ここで、前記核酸分子の分離および前記取り込みの検出は、ステップ(b)の前記処理中にリアルタイムで実施され、かつここで、前記検出はリアルタイムで前記増幅のモニタリングを可能にする）

とを含む、方法。

【請求項 2】

前記検出可能な標識が吸光色素、蛍光色素または放射性標識を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記検出可能な標識が蛍光色素を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ(c)が前記増幅処理中の各々のサイクルの後に実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記核酸分子の分離がキャピラリー電気泳動を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記サンプルが逆転写反応の産物を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ステップ(a)～(c)が、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記モジュール装置がロボットアームを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記モニタリングが、前記サンプル中の前記対象となる配列を含む核酸の存在量の測定を可能にする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

対象となる核酸配列のセットの増幅をモニタリングする方法であって、前記方法が：

(a) 反応容器内で核酸サンプルをオリゴヌクレオチドプライマー対のセットと接触させるステップであって、

各々の前記対は、前記対象となる核酸配列を含有する核酸分子と特異的にハイブリダイズする第1のオリゴヌクレオチドプライマー、および前記対象となる核酸配列の相補物に含まれる配列と特異的にハイブリダイズする第2のオリゴヌクレオチドプライマーを含み、ここで、1つのオリゴヌクレオチドプライマーのプライマー伸長産物は、その相補物が

10

20

30

40

50

ら解離した場合、他のプライマーの伸長産物の合成のための鑄型となることができ；

各々の前記オリゴヌクレオチド対は、対象となる核酸配列の1つに特異的であり；

前記セットにおける各々のオリゴヌクレオチドプライマー対を選択することで、後の増幅処理において、区別可能なサイズの増幅産物が得られるようにし；そして

各々の前記オリゴヌクレオチド対における1つのオリゴヌクレオチドは検出できるように標識される、ステップと；

(b) ステップ(a)で得られた混合物を、核酸鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニーリング、およびアニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長の反復サイクルを少なくとも2回含む増幅処理にかけるステップ(ここで、増幅処理中に、少なくとも1回の前記反復サイクルの後に、前記混合物の一定分量を前記反応容器から採取して、前記一定分量中の核酸分子を分離する)と；

(c) 前記一定分量中に存在する区別可能なサイズのプライマー伸長産物における検出可能な標識の取り込みを検出するステップ(ここで、前記検出が前記対象となる核酸配列の増幅のリアルタイムプロフィールを提供する)

とを含む、方法。

【請求項11】

前記検出可能な標識が、吸光色素、蛍光色素または放射性標識を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記検出可能な標識が蛍光色素を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記増幅処理における各々のサイクルの後に一定分量が採取され、そして前記一定分量中の核酸分子が分離および検出される、請求項10に記載の方法。

【請求項14】

前記核酸分子の分離がキャピラリー電気泳動を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項15】

前記サンプルが逆転写反応の産物を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項16】

前記ステップ(a)~(c)が、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される、請求項10に記載の方法。

【請求項17】

前記モジュール装置がロボットアームを含む、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記モニタリングが、前記サンプル中の前記対象となる核酸配列のセットを含む核酸の存在量の測定を可能にする、請求項10に記載の方法。

【請求項19】

対象となる核酸配列のセットの増幅をモニタリングする方法であって、前記方法が：

(a) 鑄型核酸サンプルにアニールした逆転写プライマーの伸長によって、複数の逆転写産物を合成するステップ(ここで、各々の前記逆転写産物は前記逆転写プライマーに含まれる共通配列タグを含む)と；

(b) 反応容器内で前記逆転写産物を(i)前記対象となる核酸配列のセットを認識するオリゴヌクレオチドプライマーのセット(ここで、各々のオリゴヌクレオチドプライマーを選択することで、後の増幅処理において区別可能なサイズの増幅産物を生成するようにする)、および(ii)前記共通配列タグを含む検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマーと接触させるステップと；

(c) ステップ(b)から得られた混合物を、核酸鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニーリング、およびアニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長の反復サイクルを少なくとも2回含む増幅処理にかけるステップ(ここで、増幅処理中に、少なくとも1回の前記反復サイクルの後に、前記混合物の一定分量を前記反応容器から採取して、前記一

10

20

30

40

50

定分量中の核酸分子を分離する)と;

(d) 前記一定分量中に存在する区別可能なサイズのプライマー伸長産物における前記検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマーの取り込みを検出するステップ(ここで、前記検出が前記対象となる核酸配列のセットの増幅のプロフィールを提供する)とを含む、方法。

【請求項 20】

前記検出可能な標識が、吸光色素、蛍光色素または放射性標識を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記検出可能な標識が蛍光色素を含む、請求項 20 に記載の方法。

10

【請求項 22】

前記増幅処理における各々のサイクルの後に一定分量が採取され、そして前記一定分量中の核酸分子が分離および検出される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

一定分量の採取、分離および検出のステップが、前記増幅のリアルタイムモニタリングを可能にする、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 24】

前記核酸分子の分離がキャピラリー電気泳動を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 25】

前記ステップ(a)~(d)が、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される、請求項 19 に記載の方法。

20

【請求項 26】

前記モジュール装置がロボットアームを含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記モニタリングが、前記サンプル中の前記対象となる核酸配列のセットを含む核酸の存在量の測定を可能にする、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 28】

対象となる核酸配列のセットの増幅をモニタリングする方法であって、前記方法が:

(a) 鋳型核酸サンプルにアニールした逆転写プライマーの伸長によって、複数の逆転写産物を合成するステップ(ここで、各々の前記逆転写産物は前記逆転写プライマーに含まれる第1の共通配列タグを含む)と;

30

(b) 第2の共通配列タグを含むオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、相補的cDNA鎖を合成するステップ(ここで、各々のオリゴヌクレオチドプライマーを選択することで、後の増幅処理において区別可能なサイズの増幅産物を生成するようにする)と;

(c) 反応容器内でステップ(a)および(b)の核酸合成産物を、前記第1および第2の共通配列タグを含むオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドプライマーのセットと接触させるステップ(ここで、前記第1および第2のオリゴヌクレオチドの1つは検出可能に標識されている)と;

(d) ステップ(c)から得られた混合物を、核酸鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニーリング、およびアニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長の反復サイクルを少なくとも2回含む増幅処理にかけるステップ(ここで、増幅処理中に、少なくとも1回の前記反復サイクルの後に、前記混合物の一定分量を前記反応容器から採取して、前記一定分量中の核酸分子を分離する)と;

40

(e) 前記一定分量中に存在する区別可能なサイズのプライマー伸長産物における前記検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマーの取り込みを検出するステップ(ここで、前記検出が前記対象となる核酸配列のセットの増幅のプロフィールを提供する)とを含む、方法。

【請求項 29】

前記検出可能な標識が、吸光色素、蛍光色素または放射性標識を含む、請求項 28 に記

50

載の方法。

【請求項 30】

前記検出可能な標識が蛍光色素を含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記増幅処理における各々のサイクルの後に一定分量が採取され、そして前記一定分量中の核酸分子が分離および検出される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 32】

一定分量の採取、分離および検出のステップが、前記増幅のリアルタイムモニタリングを可能にする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 33】

前記核酸分子の分離がキャピラリー電気泳動を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 34】

前記ステップ (a) ~ (d) が、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 35】

前記モジュール装置がロボットアームを含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記モニタリングが、前記サンプル中の前記対象となる核酸配列のセットを含む核酸の存在量の測定を可能にする、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 37】

サンプルのセットの中で対象となる核酸配列の発現を比較する方法であって、前記方法が：

(a) 各サンプルに対して異なるサンプル特異的な配列タグを含むオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、前記サンプルのセットの各々のメンバーから複数の第 1 鎖 cDNA を別々に合成するステップと；

(b) ステップ (a) 由来の等量の前記第 1 鎖 cDNA を混合するステップと；

(c) ステップ (b) で得られた混合物を反応容器内で以下：

(i) ステップ (a) で用いた各々のサンプル特異的な配列タグに対応する、分離した、識別可能で検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマー（ここで前記プライマーは、前記サンプル特異的なタグを含む核酸分子への前記プライマーの特異的なアニーリングを可能にするのに十分な、前記サンプル特異的な配列タグに含まれる配列を含む）、および

(ii) 前記対象となる配列を含む核酸分子への前記プライマーの特異的なアニーリングを可能にするのに十分な、前記対象となる核酸配列と相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドプライマー（ここで、サンプル特異的な配列タグに対応する前記プライマー、および対象となる前記核酸配列と相補的な配列を含む前記プライマーは、プライマー伸長産物を生成し、これはその相補物から解離した場合、他のプライマーのプライマー伸長産物の合成のための鋳型となり得る）

を含むオリゴヌクレオチドプライマーと接触させるステップと；

(d) ステップ (c) の混合物を、核酸鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニーリング、およびアニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長の反復サイクルを少なくとも 2 回含む増幅処理にかけるステップと；

(e) 前記増幅処理中に、少なくとも 1 回の前記反復サイクルの後に、一定分量を前記反応容器から採取し、前記一定分量中の核酸を分離し、そして各々のサンプル特異的な配列タグに対応する識別可能で検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマー伸長産物を検出するステップ（ここで、前記核酸分子の分離および前記取り込みの検出は、ステップ (d) の前記処理中にリアルタイムで実施され、ここで、前記検出はリアルタイムで前記増幅のモニタリングを可能にする）と；

(f) 前記サンプル特異的なタグに対応する前記標識由来の検出可能なシグナルを比較

10

20

30

40

50

することによって、前記サンプル間で前記対象となる遺伝子の発現を比較するステップとを含む、方法。

【請求項 38】

前記検出可能な標識が、吸光色素、蛍光色素または放射性標識を含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記検出可能な標識が蛍光色素を含む、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

一定分量を採取し、前記一定分量中の核酸を分離し、そしてプライマー伸長産物を検出する前記ステップが、前記増幅処理中の各々のサイクルの後に実施される、請求項 37 に記載の方法。

10

【請求項 41】

前記核酸分子の分離がキャピラリー電気泳動を含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 42】

前記ステップ (a) ~ (c) が、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 43】

前記モジュール装置がロボットアームを含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

核酸配列のセットの増幅をモニタリングする方法であって、前記方法が：

20

(a) 逆転写産物のセット中に存在する核酸配列のセットを増幅するステップであって

、
前記増幅は、鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニーリング、およびアニーリングしたプライマーのポリメラーゼ伸長の少なくとも2回のサイクルの処理を含み、ここで、前記セット中の各々の逆転写産物は、逆転写プライマーの伸長によって作製されたものであり、前記逆転写産物のセットは以下：逆転写産物の1つ以上のサブセットを含み、ここで、各々のサブセットは1つの核酸サンプル由来の複数の逆転写産物を含み、ここで、逆転写産物の各々のサブセットのメンバーは、前記逆転写プライマー内に取り込まれたサンプル特異的な配列タグを含み、

30

ここで、前記増幅は前記逆転写産物のセットを以下のオリゴヌクレオチドプライマーの2つのセット：

(i) 遺伝子特異的プライマーのセット（ここで、前記セット中の各々の遺伝子特異的プライマーは核酸サンプル中で発現する特定の核酸配列を認識し、そしてここで、前記セット中の他の遺伝子特異的プライマーと共に生成する増幅産物とサイズで区別可能な増幅産物が生成されるように、前記セット中の各々の遺伝子特異的プライマーを選択する）、および

(ii) サンプル特異的なプライマーのセット（ここで、各々のサンプル特異的なプライマーは、前記逆転写プライマー内に取り込まれたサンプル特異的なタグに特異的にハイブリダイズし、そしてここで、前記サンプル特異的なプライマーのセット中の各々のサンプル特異的なプライマーは、識別可能に標識されている）と接触させることを含む、ステップと；

40

(b) 前記処理中に、プライマー伸長ステップの後に、増幅混合物の一定分量を採取し、そして前記一定分量中の核酸を分離するステップと；

(c) 前記一定分量中の各々のサンプル特異的なプライマーの取り込みを検出するステップ

とを含む方法であって、

ここで、前記検出は、各サンプルにおいて、前記遺伝子特異的プライマーのセットによって認識される核酸のセットの増幅をリアルタイムでモニターする、方法。

【請求項 45】

50

一定分量を採取し、前記一定分量中の核酸を分離し、そしてプライマー伸長産物を検出する前記ステップが、前記増幅処理中の各々のサイクルの後に実施される、請求項44に記載の方法。

【請求項46】

前記サンプル特異的プライマーが、蛍光色素、吸光色素または放射性標識で識別可能に標識されている、請求項44に記載の方法。

【請求項47】

前記サンプル特異的プライマーが、蛍光色素で識別可能に標識されている、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記核酸分子の分離がキャピラリー電気泳動を含む、請求項44に記載の方法。

【請求項49】

前記ステップ(a)~(c)が、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される、請求項44に記載の方法。

【請求項50】

前記モジュール装置がロボットアームを含む、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記モニタリングが、前記逆転写産物が作製されたサンプル中の前記対象となる核酸配列のセットを含む核酸の存在量の測定を可能にする、請求項44に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

背景

感度がよくそして選択的な特定の核酸配列の増幅を特色とするポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、例えば、クローニング、遺伝子発現解析、DNAシーケンシング、遺伝子地図作成および診断学での利用において、ほとんど比類ない重要なリサーチ手段となってきた。

【0002】

PCR法の主要な特質の1つはその速さであり、しばしば標的配列を数分~数時間以内に増幅する一方、PCR反応のリアルタイムモニタリングをする必要がある。これは定量PCR法について特に当てはまることであり、検出可能なPCR産物の存在量を、それが増幅されたサンプル中の鋳型の存在量と相関させようとする。それらの方法において、PCR増幅が、産物の存在量がもはや元の鋳型の存在量を反映しなくなる安定期または静止期に達するために、そして増幅効率における配列特異的変動がそのプロセスによって増大するために、増幅におけるある時点での標的産物の量を視覚化可能にすることがしばしば重要となる。

【0003】

さらに、増幅反応のリアルタイムモニタリングが、複数標的の増幅においてはるかに正確な標的DNAの初期濃度の定量を可能にするのは、終濃度の相対値が反応中の過去の相対濃度値を考慮に入れることで決定され得るためである。リアルタイムモニタリングはまた、増幅反応の効率を評価することを可能にし、サンプル中に反応阻害物質が存在するか否かを示すことができる。

【0004】

Hollandら(1991, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 7276-7280)、米国特許第5,210,015号等は、蛍光ベースのアプローチを開示することでPCR中の増幅産物のリアルタイム計測を提供してきた。そのようなアプローチは、インターカレート色素(臭化エチジウム)を用いて二本鎖DNAの存在量を示すか、または蛍光-消光ペア(「Taq-Man」法とも呼ばれる)を含むプローブを用いる(増幅中にプローブが切断されることで蛍光分子が遊離し、その濃度が二本鎖DNAの存在量に比例する)かのどちらかであった。増幅中に、プローブは標的配列とハイブリダイズした際にポリメラーゼのヌクレアーゼ活性によって分解され、蛍光分子を消光分子から解離させ、それによってレポーター分子由来の蛍光を発生さ

10

20

30

40

50

せる。

【0005】

Taq-Man法は、レポーター分子-消光分子ペアを含むオリゴヌクレオチドプローブを用い、これは標的ポリヌクレオチド「下流」（つまり、プライマー結合部位の伸長方向）の領域に特異的にアニールする。レポーター分子および消光分子は、互いに十分に近接したプローブ上に存在することで、レポーター分子が励起された場合には必ず、励起状態のエネルギーが無放射的に消光分子に移行して、無放射的に消散するか、またはレポーター分子とは異なる発光周波数で発光する。DNAポリメラーゼによる鎖伸長の間に、プローブは銹型にアニールして、ポリメラーゼの5' 3' エキソヌクレアーゼ活性によって消化される。プローブが消化された結果、レポーター分子は消光分子から事実上分離し、消光分子はもはやレポーター分子の蛍光を消光するのに十分なほどにはレポーター分子と近接していない。従って、増幅中により多くのプローブが消化されるほど溶液中のレポーター分子の数は増加し、ゆえに消光されないレポーター分子の数が増加する結果となり、これがより強い蛍光シグナルを発する。

10

【0006】

他の最も一般的に用いられるリアルタイムPCR法は、「分子ビーコン」と呼ばれる技術を用いる。このアプローチもまた、オリゴヌクレオチドプローブ上の消光基-蛍光基ペアの存在に基づく。ビーコン法において、プローブはステムループ構造を有するよう設計され、そして分子の両端を蛍光基およびこの蛍光基の消光基で各々標識する。標的ポリヌクレオチドの非存在下で、分子の片側における相補配列はステム形成を可能にし、分子の標識化末端を引き合わせるにより、蛍光基からの蛍光が消失する。標的ポリヌクレオチド（ビーコンプローブのループおよびステム構造の一部と相補的な配列を有する）の存在下で、プローブの標的物への分子間ハイブリダイゼーションはエネルギー的に分子内ステムループ形成より有利であり、蛍光基と消光基とが分離する結果、蛍光シグナルが蛍光基の励起によって発せられる。より多くの標的が存在するほど、より多くのプローブがそれにハイブリダイズし、より多くの蛍光基が消光から開放され、リアルタイムに増幅プロセスの読み取りを提供する。

20

【0007】

Taq-Manおよびビーコン技術の双方は、各々の遺伝子標的配列に対して特異的な個々の二重標識プローブを作製する必要があるという点で制限される。

30

【0008】

リアルタイム増幅における「マルチプレックス」（同一の増幅反応において、複数の遺伝子の解析を実施する）への能力は、一般に使用される蛍光色素の光学分離に制限される。一般的には、マルチプレックスリアルタイム反応において解析され得る遺伝子の最大数は、4つに制限される。さらに、定量解析は増幅の非特異的産物の存在によってしばしば困難となり得る。

【0009】

キャピラリー電気泳動は、遺伝子発現を定量的に検出するのに用いられてきた。Rajevicら（2001, Pflugers Arch. 442(6 Suppl 1):R190-2）は、多くの腫瘍遺伝子の発現における相違を同時に検出するために7種のプライマー対を用いることによって、腫瘍遺伝子の異なる発現を検出する方法を開示する。センスプライマーは蛍光色素で5'末端標識され、マルチプレックス蛍光RT-PCRの結果を、ABI-PRISM 310 Genetic Analyzerにおけるキャピラリー電気泳動によって解析した。Borsonら（1998, Biotechniques 25:130-7）は、産物の迅速な分離および検出のためのキャピラリー電気泳動（CE）と連結した、定量的な競合逆転写PCR（QC-RT-PCR）に基づいた、少量mRNA転写物の信頼性のある定量的ための方法を記載する。Georgeら（1997, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 695:93-102）は、ESTパターンを生じる蛍光ディファレンシャルディスプレイの同定をするためのキャピラリー電気泳動システム（ABI 310）の利用を記載する。Odinら（1999, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 734:47-53）は、PCR増幅cDNAの分離および定量的ための多色検出による自動キャピラリーゲル電気泳動を記載する。

40

50

【0010】

Omoriら(2000, Genomics 67:140-5)は、オリゴ(dT)プライマーを用いた2種の独立した逆転写cDNAサンプルにおける競合PCRによって、市販のβ-グロブリンmRNAの量を測定および比較する。オリゴ(dT)プライマーは、3'オリゴ(dT)配列および5'共通配列を共有する。さらに、各サンプルに対するオリゴ(dT)プライマーはまた、3'オリゴ(dT)配列と5'共通配列との間に独自の29ヌクレオチド配列を含む。第1鎖cDNAの合成後、遺伝子特異的プライマーおよび共通配列と相補的な独自に標識したプライマーを用いてPCRを行って、cDNAを増幅する。増幅したPCR産物を次に、蛍光スキャナーの検出プレート上にスポットングすることで解析する。

【0011】

当技術分野において、リアルタイムPCR法に必要なのは、PCR反応における産物の全範囲での視覚化を可能にすることである。サンプル特異的な様式で同じ反応における多重産物の増幅プロセスをモニターする方法の必要性と同様に、当技術分野においてリアルタイムPCR法にさらに必要なのは、同じ反応における多重増幅産物についての増幅プロセスのモニタリングを可能にすることである。

【発明の概要】

【0012】

本発明は、1つ以上の対象となる核酸配列の増幅をモニタリングする方法に関する。より詳細には、本発明は対象となる配列の増幅をリアルタイムでモニタリングする方法に関する。本明細書に記載する方法は、2つ以上のサンプル由来の1つまたは2つ以上の配列の増幅をモニタリングする方法のみならず、1つのサンプル由来の1つの配列または2つ以上の配列の増幅をモニタリングする方法を提供する。本発明のモニタリング法は、1つ以上の元のサンプル中の1つ以上の標的核酸(特に標的RNA種)の存在量の改良した測定を可能にする。

【0013】

本発明は対象となる核酸配列の増幅のモニタリングのための方法を包含し、本方法は：(a)核酸サンプルを第1および第2のオリゴヌクレオチドプライマーと接触させるステップ(ここで第1のオリゴヌクレオチドプライマーは対象となる核酸配列を含有する核酸分子と特異的にハイブリダイズし、かつ第2のオリゴヌクレオチドプライマーは対象となる核酸配列の相補鎖と特異的にハイブリダイズし、ここで、1つのオリゴヌクレオチドプライマーのプライマー伸長産物は、その相補物から解離した場合に、他のプライマーの伸長産物を合成するための鋳型となることができ、そしてここで、第1および第2のプライマーの少なくとも1つが標識されており、好ましくは検出可能なマーカで標識されている)と；(b)ステップ(a)で得られた混合物を増幅処理にかけるステップ(ここでこの処理は核酸鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニーリングおよびアニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長のサイクルを少なくとも2回含む)と；(c)混合物の一定分量を採取し、その一定分量における核酸分子を分離し、少なくとも1つの検出可能なマーカの取り込みを検出するステップ(ここで採取はステップ(b)のサイクリング処理中、少なくとも1回のサイクルの後に実施し、ここで、核酸分子を分離するステップおよび取り込みを検出するステップは、ステップ(b)の処理中にリアルタイムで実施し、かつここで、検出はリアルタイムで増幅のモニタリングを可能にする)とを含む。

【0014】

1つの実施形態において、検出可能な標識は、吸光色素、蛍光色素または放射性標識を含む。好ましい実施形態において、検出可能な標識は蛍光色素を含む。

【0015】

1つの実施形態において、ステップ(c)は増幅処理における各々のサイクルの後に実施される。

【0016】

別の実施形態において、核酸分子の分離のステップは、キャピラリー電気泳動を含む。

【0017】

10

20

30

40

50

別の実施形態において、サンプルは逆転写反応の産物を含む。

【0018】

別の実施形態において、ステップ(a)~(c)は、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される。好ましい実施形態において、モジュール装置はロボットアームを含む。

【0019】

別の実施形態において、モニタリングはサンプル中の対象となる配列を含む核酸の存在量の測定を可能にする。

【0020】

本発明はさらに、対象となる核酸配列のセットの増幅をモニタリングする方法を包含し、本方法は：(a)反応容器内で核酸サンプルをオリゴヌクレオチドプライマー対のセットと接触させるステップ(ここで、各々の対は対象となる核酸配列を含有する核酸分子と特異的にハイブリダイズする第1のオリゴヌクレオチドプライマー、および対象となる核酸配列の相補鎖と特異的にハイブリダイズする第2のオリゴヌクレオチドプライマーを含み、ここで、1つのオリゴヌクレオチドプライマーのプライマー伸長産物は、その相補物から解離した場合、他のプライマーの伸長産物の合成のための鑄型となることができ；オリゴヌクレオチド対の各々は対象となる核酸配列の1つに特異的であり；そのセットにおける各々のオリゴヌクレオチドプライマー対を選択することで、後の増幅処理において、区別可能なサイズの増幅産物が得られ；そしてオリゴヌクレオチド対の各々における1つのオリゴヌクレオチドは検出可能に標識される)と；(b)ステップ(a)で得られた混合物を、核酸鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニールおよびアニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長の反復サイクルを少なくとも2回含む増幅処理にかけるステップ(ここで、増幅処理中、少なくとも1回の反復サイクルの後に、混合物の一定分量を反応容器から採取して、その一定分量中の核酸分子を分離する)と；(c)その一定分量に存在する区別可能なサイズのプライマー伸長産物における検出可能な標識の取り込みを検出するステップ(ここで、この検出は対象となる核酸配列の増幅のリアルタイムプロフィールを提供する)とを含む。

【0021】

1つの実施形態において、検出可能な標識は吸光色素、蛍光色素または放射性標識を含む。好ましい実施形態において、検出可能な標識は蛍光色素を含む。

【0022】

1つの実施形態において、増幅処理における各々のサイクルの後に一定分量を採取し、そして一定分量中の核酸分子を分離および検出する。

【0023】

別の実施形態において、核酸分子の分離のステップはキャピラリー電気泳動を含む。

【0024】

別の実施形態において、サンプルは逆転写反応の産物を含む。

【0025】

別の実施形態において、ステップ(a)~(c)は、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される。好ましい実施形態において、モジュール装置はロボットアームを含む。

【0026】

別の実施形態において、モニタリングはサンプル中の対象となる核酸配列のセットを含む核酸の存在量の測定を可能にする。

【0027】

本発明はさらに、対象となる核酸配列のセットの増幅をモニタリングする方法を包含し、本方法は：(a)鑄型核酸サンプルにアニールした逆転写プライマーの伸長によって、複数の逆転写産物を合成するステップ(ここで、各々の逆転写産物は逆転写プライマーに含まれる共通配列タグを含む)と；(b)反応容器内の逆転写産物を(i)対象となる核酸配列のセットを認識するオリゴヌクレオチドプライマーのセット(ここで、各々のオリゴ

10

20

30

40

50

ヌクレオチドプライマーを選択することで、後の増幅処理において区別可能なサイズの増幅産物が得られる)、および(ii)共通配列タグを認識する検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマーと接触させるステップと; (c) ステップ(b)から得られた混合物を、核酸鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニールおよびアニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長の反復サイクルを少なくとも2回含む増幅処理にかけるステップ(ここで、増幅処理中、少なくとも1回の反復サイクルの後に、混合物の一定分量を反応容器から採取して、その一定分量中の核酸分子を分離する)と; (d) その一定分量中に存在する区別可能なサイズのプライマー伸長産物における検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマーの取り込みを検出するステップ(ここで、この検出は対象となる核酸配列のセットの増幅のプロフィールを提供する)とを含む。

10

【0028】

1つの実施形態において、検出可能な標識は、吸光色素、蛍光色素または放射性標識を含む。好ましい実施形態において、検出可能な標識は蛍光色素を含む。

【0029】

1つの実施形態において、増幅処理における各々のサイクルの後に一定分量を採取し、そして一定分量中の核酸分子を分離および検出する。好ましい実施形態において、採取した各々の一定分量について、反応物を反応混合物(プライマー、ヌクレオチドおよびポリメラーゼを含む)の一定分量で再補充して、サンプルの採取による体積損失を補填する。

【0030】

別の実施形態において、一定分量の採取、分離および検出ステップは、増幅のリアルタイムモニタリングを可能にする。

20

【0031】

別の実施形態において、核酸分子の分離のステップはキャピラリー電気泳動を含む。

【0032】

別の実施形態において、ステップ(a)~(d)は、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される。好ましい実施形態において、モジュール装置はロボットアームを含む。

【0033】

別の実施形態において、モニタリングはサンプル中の対象となる核酸配列のセットを含む核酸の存在量の測定を可能にする。

30

【0034】

本発明はさらに、サンプルのセットの中で対象となる核酸配列の発現を比較する方法を包含し、本方法は:(a)各サンプルに対し、異なるサンプル特異的な配列タグを含有するオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、サンプルのセットの各々のメンバーから複数の第1鎖cDNAを別々に合成するステップと;(b)ステップ(a)由来の等量の第1鎖cDNAを混合するステップと;(c)ステップ(b)で得られた混合物を反応容器内で以下:(i)ステップ(a)で用いた各々のサンプル特異的な配列タグに対応する、別個の、識別可能に検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマー(ここで、前記プライマーは、サンプル特異的なタグと相補的な配列を含む核酸分子へのプライマーの特異的なアニールを可能にするのに十分な、サンプル特異的な配列タグに含まれる配列を含む)、および(ii)対象となる配列を含有する核酸分子へのプライマーの特異的なアニールを可能にするのに十分な、対象となる核酸配列と相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドプライマー(ここで、サンプル特異的な配列タグに対応するプライマーおよび対象となる核酸配列と相補的な配列を含有するプライマーは、プライマー伸長産物を生成し、これはその相補物から解離した場合、他のプライマーのプライマー伸長産物の合成のための鋳型となり得る)を含むオリゴヌクレオチドプライマーと接触させるステップと;(d)ステップ(c)の混合物を、核酸鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニールおよびアニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長の反復サイクルを少なくとも2回含む増幅処理にかけるステップと;(e)増幅処理中、少なくとも1回の反復サイクルの後に、一定分量を反応容器から採取して、その一定分量中の核酸を分離し、そして各々のサンプル特異

40

50

的な配列タグに対応する識別可能で検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを含むプライマー伸長産物を検出するステップ（ここで、核酸分子の分離および取り込みの検出はステップ（d）の処理中にリアルタイムで実施され、ここで、検出はリアルタイムで増幅のモニタリングを可能にする）と；（f）サンプル特異的なタグに対応する標識由来の検出可能なシグナルを比較し、それによりサンプル間で対象となる遺伝子の発現を比較するステップとを含む。

【0035】

1つの実施形態において、検出可能な標識は、吸光色素、蛍光色素または放射性標識を含む。好ましい実施形態において、検出可能な標識は蛍光色素を含む。

【0036】

1つの実施形態において、一定分量を採取するステップ、その一定分量中の核酸を分離するステップ、およびプライマー伸長産物を検出するステップは、増幅処理中の各々のサイクルの後に実施される。

【0037】

別の実施形態において、核酸分子の分離のステップはキャピラリー電気泳動を含む。

【0038】

別の実施形態において、ステップ（a）～（c）は、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される。

【0039】

別の実施形態において、モジュール装置はロボットアームを含む。

【0040】

本発明はさらに、核酸配列のセットの増幅をモニタリングする方法を包含し、本方法は：（a）逆転写産物のセット中に存在する核酸配列のセットを増幅するステップ〔ここで、増幅は、鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニールおよびアニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長の少なくとも2回のサイクルの処理を含み、ここで、セット中の各々の逆転写産物は、逆転写プライマーの伸長によって作製されたものであり、逆転写産物のセットは以下：逆転写産物の1つ以上のサブセットを含み、ここで、各々のサブセットは1つの核酸サンプル由来の複数の逆転写産物を含有し、ここで、逆転写産物の各々のサブセットのメンバーは、逆転写プライマー内に取り込まれたサンプル特異的な配列タグを含み、ここで、増幅は、逆転写産物のセットを以下のオリゴヌクレオチドプライマーの2つのセット：（i）遺伝子特異的プライマーのセット（ここで、セット中の各々の遺伝子特異的プライマーは核酸サンプル中で発現する特定の核酸配列を認識し、そしてここで、セット中の他の遺伝子特異的プライマーで生成する増幅産物とサイズで区別可能な増幅産物が生成されるように、セット中の各々の遺伝子特異的プライマーを選択する）、および（ii）サンプル特異的なプライマーのセット（ここで、各々のサンプル特異的なプライマーは、逆転写プライマー内に取り込まれたサンプル特異的なタグに特異的にハイブリダイズし、そしてここで、サンプル特異的なプライマーのセット中の各々のサンプル特異的なプライマーは、識別できるように標識される）と接触させることを含む〕と；（b）処理中に、プライマー伸長ステップの後、増幅混合物の一定分量を採取し、そしてその一定分量中の核酸を分離するステップと；（c）一定分量中の各々のサンプル特異的なプライマーの取り込みを検出するステップ（ここで、検出は、各サンプルにおいて、遺伝子特異的プライマーのセットによって認識される核酸のセットの増幅をリアルタイムでモニターする）とを含む。

【0041】

1つの実施形態において、検出可能な標識は、吸光色素、蛍光色素または放射性標識を含む。好ましい実施形態において、検出可能な標識は蛍光色素を含む。

【0042】

1つの実施形態において、一定分量を採取し、その一定分量中の核酸を分離し、そしてその中のプライマー伸長産物を検出するステップは、増幅処理中の各々のサイクルの後に

10

20

30

40

50

実施される。

【0043】

別の実施形態において、核酸分子の分離のステップはキャピラリー電気泳動を含む。

【0044】

別の実施形態において、ステップ(a)～(c)は、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される。好ましい実施形態において、モジュール装置はロボットアームを含む。

【0045】

別の実施形態において、モニタリングは前記の逆転写産物が作製されたサンプル中の対象となる核酸配列のセットを含む核酸の存在量の測定を可能にする。

10

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】図1は、本明細書で詳細に記載する本発明の異なる態様の好ましい実施形態を図解的に示した図である。

【図2】図2は、本明細書で詳細に記載する本発明の異なる態様の好ましい実施形態を図解的に示した図である。

【図3】図3は、本明細書で詳細に記載する本発明の異なる態様の好ましい実施形態を図解的に示した図である。

【図4】図4は、本明細書で詳細に記載する本発明の異なる態様の好ましい実施形態を図解的に示した図である。

20

【図5】図5は、本明細書で詳細に記載する本発明の異なる態様の好ましい実施形態を図解的に示した図である。

【図6】図6は、本明細書で詳細に記載する本発明の異なる態様の好ましい実施形態を図解的に示した図である。

【図7】図7は、1回の増幅反応における複数の増幅産物の定量的検出を試験する実験の結果を示す。

【図8】図8は、既知の量の異なるRNAを用いた発現差異解析の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0047】

定義

30

本明細書で使用する用語「サンプル」は、自然環境から単離され、ポリヌクレオチドを含む生体物質を指す。本発明の「サンプル」は、精製もしくは単離されたポリヌクレオチドから構成されてもよく、またはポリヌクレオチドを含有する組織サンプル、体液サンプルもしくは細胞サンプル等の生体サンプルを含んでもよい。体液は、血液、血漿、唾液、尿、脳脊髄液、洗浄液および白血球泳動サンプルを含む。本発明のサンプルは、ポリヌクレオチドを含むあらゆる植物、動物、細菌またはウイルス材料であり得る。

【0048】

本明細書で使用する「オリゴヌクレオチドプライマー」は、鋳型ポリヌクレオチドにアニールすることおよび鋳型ポリヌクレオチドと相補的な伸長産物を産生するための3'末端を提供することが可能なポリヌクレオチド分子（つまりDNAまたはRNA）を指す。開始および伸長のための条件は、通常、4種の異なるデオキシリボヌクレオシド三リン酸、およびDNAポリメラーゼまたは逆転写酵素等の重合促進剤が、適切なバッファー（「バッファー」は、補因子であるかまたはpH、イオン強度等に作用する置換を含む）中で、適切な濃度で存在することを含む。本発明のプライマーは、一本または二本鎖であり得る。プライマーは、増幅における最大効率のためには一本鎖であり、そしてプライマーおよびその相補体は二本鎖ポリヌクレオチドを形成する。本発明において有用な「プライマー」は、ヌクレオチド長が100以下であり、例えば90または80または70または60または50または40または30または20または15または10ヌクレオチド長以下である。

40

【0049】

本明細書で使用する用語「特異的にハイブリダイズする」は、特定のハイブリダイゼー

50

ション条件下において、プローブまたはプライマーが標的配列を含有するサンプル中の標的配列にのみハイブリダイズすることを意味する。特定のハイブリダイズ条件は、増幅処理におけるアニーリングステップのための条件（つまり、予測される T_m に基づいて選択されるアニーリング温度および選択したポリメラーゼ酵素に適切な塩条件）を含む。

【0050】

本明細書で使用する用語「対象となる核酸配列」または「標的配列」は、サンプルにおける核酸配列を指し、その存在または存在量を測定することが望まれるものである。対象となる配列は、ほとんどの場合RNA発現単位または遺伝子の転写物であるが、あらゆる核酸配列であってよく、それらは例えばウイルス、細菌、真菌もしくはより高等な真核生物ゲノムに含まれる配列または人工もしくは合成配列である。

10

【0051】

本明細書で使用する用語「増幅処理」は、対象となる核酸配列の存在量を特異的に増幅するプロセスを意味する。本発明の増幅処理は、熱変性、オリゴヌクレオチドプライマーの鑄型分子へのアニーリング、およびアニールしたプライマーの核酸ポリメラーゼ伸長の反復サイクルを少なくとも2回、そして好ましくは少なくとも5、10、15、20、25、30、35回またはそれ以上含む。これらの各々のステップに必要な条件および時間は当技術分野においてよく知られている。増幅処理を用いて達成される増幅は、好ましくは指数関数的であるが、しかし直線的にもなり得る。本発明の増幅処理は、好ましくはサーマルサイクラー内で実施され、その多くは市販のものである。

20

【0052】

本明細書で使用する用語「鎖の解離」は、核酸サンプルの処理を行うことを意味し、そうすることで相補的な二本鎖分子が2本の一本鎖に解離してオリゴヌクレオチドプライマーにアニーリングすることができるようになる。本発明の鎖の解離は、核酸サンプルをその T_m 以上に加熱することで達成される。一般的には、核酸ポリメラーゼに適したバッファー中に核酸分子を含むサンプルに関して、94℃まで加熱することは本発明の鎖の解離を達成するのに十分である。例示的なバッファーは、50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH8.8@25℃)、0.5~3mM MgCl₂および0.1%BSAを含む。

30

【0053】

本明細書で使用する用語「プライマーのアニーリング」は、オリゴヌクレオチドプライマーを鑄型核酸鎖にハイブリダイズ可能にすることを意味する。プライマーのアニーリングのための条件は、プライマーの長さおよび配列によって変化し、そしてそのプライマーに対して算出された T_m に基づく。一般的に、増幅処理におけるアニーリングステップは、鎖の解離のステップの後に、プライマー配列に対して算出された T_m に基づく温度まで、そのようなアニーリングを可能にするのに十分な時間に渡って温度を低下させることを含む。 T_m は、当業者により広く利用可能な多くのアルゴリズム（例えば、Oligo（商標）、Primer Designおよびインターネットで利用可能なプログラムであり、Primer3およびOligo Calculatorを含む）のいずれかを用いて容易に予測することができる。大抵の増幅処理に関して、アニーリング温度は予測された T_m より約5℃低くなるように選択されるが、 T_m 付近およびそれ以上の温度（例えば、予測された T_m の1~5℃以下または予測された T_m の1~5℃以上）を使用することができ、同様に予測された T_m の5℃以下または以上の温度（例えば、6℃以下、8℃以下、10℃以下、および6℃以上、8℃以上または10℃以上）を使用することができる。一般的に、アニーリング温度が T_m に近いほど、アニーリングがより特異的になる。プライマーアニーリングの時間は、反応物の体積に大きく依存し、体積が大きいほどより長い時間を要するが、さらにプライマーおよび鑄型の濃度にも依存し、鑄型に対するプライマーの相対濃度が高いほど、相対濃度が低い場合に比べて要する時間はより短い。体積および相対的なプライマー/鑄型濃度に依存して、増幅処理中のプライマーアニーリングステップは約1秒~5分間となり得るが、しかし一般的には10秒~2分間、好ましくは約30秒~2分間である。

30

40

【0054】

本明細書で使用する用語「ポリメラーゼ伸長」は、核酸ポリメラーゼによる、アニーリ

50

ングしたプライマーの3'末端における、少なくとも1つの相補的ヌクレオチドの鋳型依存的な取り込みを意味する。ポリメラーゼ伸長は、好ましくは2つ以上のヌクレオチドが増加することであり、好ましくは鋳型の全長に相当するヌクレオチドまでおよびそれを含むものである。ポリメラーゼ伸長のための条件は、ポリメラーゼの独自性により変化する。ポリメラーゼ伸長の温度は、酵素の既知の活性特性に基づく。一般的には、酵素はその至適伸長温度以下で少なくとも活性の一部を保持するが、最も一般的に用いられる耐熱性ポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼおよびそれらの変異体）によるポリメラーゼ伸長は、65 ~ 75 で、好ましくは約68~72 で実施される。

【0055】

本明細書で使用する用語「一定分量 (aliquot)」は、サイクリング処理中に採取された増幅反応物のサンプルを指す。一定分量は、反応物の総体積より少なく、そして好ましくは体積で0.1~30%である。本発明の1つの実施形態において、採取した各々の一定分量に対し、反応に必要な試薬（例えば、バッファー、塩、ヌクレオチドおよびポリメラーゼ酵素）を含有する等量の反応バッファーが加えられる。

10

【0056】

本明細書で使用する用語「核酸分子の分離」は、サンプルまたは一定分量中の核酸分子を、サイズまたは荷電に基づいて物理的に分離するプロセスを指す。電気泳動分離が好ましく、そしてキャピラリー電気泳動分離が最も好ましい。

【0057】

本明細書で使用する用語「リアルタイム」は、核酸増幅反応における産物の蓄積の計測が少なくとも開始し、そして好ましくは増幅処理の間またはそれと同時に完了することを意味する。従って、「リアルタイム」であると考えられる計測プロセスに関して、各々の一定分量における増幅産物の計測または検出の開始は少なくとも、増幅プロセスと同時にある。「開始する」は、一定分量が採取され、かつ分離装置（例えば、キャピラリー電気泳動キャピラリー）内にセットされて分離が始まることを意味する。計測の完了は、一定分量由来の分離された核酸中の標識種の検出である。分離および検出のために必要な時間が増幅処理の個々のサイクルの時間を超過し得るため、増幅産物の検出において増幅処理の完了を最大120分まで経過する遅延があり得る。好ましくはそのような遅延または遅滞は30分未満であり（例えば、25分、20分、15分、10分、5分、4分、3分、2分、1分以下）、遅延または遅滞がないことを含む。

20

30

【0058】

本明細書で使用する用語「キャピラリー電気泳動」は、増幅反応物由来の一定分量中の核酸分子の電気泳動分離を意味し、この分離はキャピラリー管内で実施される。キャピラリー管は内径約10~300 μmのものが使用可能であり、長さが約0.2cm~約3mの範囲であり得るが、しかし好ましくは0.5cm~20cmの範囲内、最も好ましくは0.5cm~10cmの範囲内である。さらに、マイクロ流体マイクロキャピラリー（例えば、CaliperまたはAgilent Technologiesより入手可能）の使用は、特に「キャピラリー電気泳動」の手段の範囲内に意図される。本明細書で使用する用語「逆転写反応」は、in vitro酵素反応を指し、ここで鋳型RNAと相補的なDNA鎖の鋳型依存的な重合が起こる。逆転写は鋳型RNAにアニールしたオリゴヌクレオチドプライマーの伸長により実施され、そして多くの場合、ウイルス逆転写酵素を使用し、それらはAMV（トリ骨髄芽球症ウイルス）逆転写酵素もしくはMMLV（モロニーマウス白血病ウイルス）逆転写酵素、またはRNAを鋳型として使用することが可能な耐熱性DNAポリメラーゼ（例えばTfh DNAポリメラーゼ）等である。逆転写のための条件および方法は当技術分野においてよく知られている。逆転写のための例示的な条件は以下を含む：AMV逆転写酵素については、37~55 で、50mM Tris-HCl, pH8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.8mM dNTP, 50Uの逆転写酵素および1~5 μgの鋳型RNAならびにその他の添加物（例えば、BSA、グリセロール、炭水化物(グルコース、トレハロース)）を含むバッファー中で反応；MMLV逆転写酵素については、37~55 で、50mM Tris-HCl, pH8.3, 30mM KCl, 8mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.8mM dNTP, 50Uの逆転写酵素および1~5 μgの鋳型RNAならびにその他の添加物（例えば、BSA、グリセロール、炭水化物(グルコース、トレ

40

50

ハロース))を含むバッファー中で反応。

【0059】

本明細書で使用する用語「モジュール装置」は、本発明の方法の特定のプロセスが実施される個々のユニットを含む装置を意味する。モジュール装置の個々のユニットは、物理的に接続され得るが、必ずしもその必要はなく、しかし個々のユニットがコンピューターなどの中央制御装置によって制御されることが好ましい。本発明の有用なモジュール装置の例示は、サーマルサイクラーユニット、サンプラーユニットおよび蛍光検出器を備えたキャピラリー電気泳動ユニットを有する。本発明の有用なモジュール装置はまた、サンプルをサイクリング反応から電気泳動ユニットへ移送するためのロボットアームを含む。

【0060】

本明細書で使用する用語「サンプリング装置」は、増幅処理中の増幅物から一定分量を採取する機構を指す。本発明の有用なサンプリング装置は、好ましくはサイクリング反応のコンタミネーションを最小限にするように調整されており、それは例えば、1つのサンプルを採取した後に廃棄されるピペット用チップもしくは針のどちらかを使用すること、または各サンプルを採取した後に針もしくはチップを洗浄するステップを1回以上組み込むことによる。あるいはまた、サンプリング装置はキャピラリー電気泳動に使用するキャピラリーを直接的に増幅反応物と接触させることで、その一定分量をキャピラリー内に充填するようにすることができる。あるいはまた、サンプル装置は特定のサイクルで開く制御可能なバルブと接続した流体路(例えばチューブ)を含み得る。当技術分野で知られるサンプリング装置は、例えばmultipurpose Robbins Scientific Hydra 96 pipettorであり、これは96穴プレートへのまたはそこからのサンプリングに適している。これおよびその他は、本発明の方法に従った使用に容易に適応し得る。

【0061】

本明細書で使用する用語「ロボットアーム」は、好ましくはマイクロプロセッサによって制御された装置を意味し、これはサンプル、チューブ、またはサンプルを含むプレートを、ある場所から別の場所へ物理的に移送する。各々の場所は、本発明の有用なモジュール装置内のユニットであり得る。本発明の有用なロボットアームの例示は、Mitsubishi RV-E2 Robotic Armである。ロボットアームの制御のためのソフトウェアは、一般的にはそのアームの製造元より入手できる。

【0062】

本明細書で使用する用語「核酸の存在量」は、サンプルまたは一定分量中に存在する特定の標的核酸配列の量を指す。量は一般的に、既知の濃度またはコピー数の標準の量と比較した、標的配列の濃度またはコピー数に関する相対量として計測される。あるいはまた、ある未知のサンプル中の量は、別の未知のサンプル中の量と比較して計測される。本明細書で使用する核酸の存在量は、検出可能な標識(多くの場合は蛍光標識)の強度に基づいて計測される。本発明の方法は、核酸サンプル中の1つ以上の標的配列の相対量を、その標的配列またはそのサンプル由来の配列の増幅プロフィールから推定することを可能にする。

【0063】

本明細書で使用する用語「増幅産物」は、特定のポリヌクレオチド配列の一部のコピーおよび/またはその相補配列であるポリヌクレオチドを指し、これはヌクレオチド配列において鑄型ポリヌクレオチド配列およびその相補配列に相当する。本発明の「増幅産物」は、DNAまたはRNAであり得、そして二本鎖または一本鎖であり得る。

【0064】

本明細書で使用する用語「区別可能なサイズの増幅産物」は、異なるサイズの増幅産物から分割可能な増幅産物を意味する。「異なるサイズ」は、長さが少なくとも1つのヌクレオチド異なる核酸分子を指す。一般的に、本発明の有用な区別可能なサイズの増幅産物は、本発明の既定の方法を用いた分離プロセスに対する分割(resolution)の限界より多くのヌクレオチド以上異なる。例えば、分離の分割限界が1塩基の場合、区別可能なサイズの増幅産物は長さが少なくとも1塩基異なるが、2塩基、5塩基、10塩基、20塩基、50塩

10

20

30

40

50

基、100塩基以上異なり得る。分割の限界が例えば10塩基の場合、区別可能なサイズの増幅産物は、少なくとも10塩基異なるが、11塩基、15塩基、20塩基、30塩基、50塩基、100塩基以上異なり得る。

【0065】

本明細書で使用する用語「プロフィール」または同義語「増幅曲線」および「増幅プロット」は数学的曲線を意味し、これは増幅処理中の2つ以上のステップにおいて対象となる核酸配列内に取り込まれた検出可能な標識由来のシグナルを表し、サンプルが採取されたサイクル数の関数としてプロットされる。このプロフィールは、好ましくは個々の反応サンプル中の核酸のキャピラリー電気泳動分離の後に検出された各バンドの蛍光をプロットすることによって得られる。ほとんどの市販の蛍光検出器は、検出されたシグナルに基づき曲線が得られるソフトウェアと連動している。

10

【0066】

本明細書で使用する用語「第1鎖cDNA」は、逆転写反応の産物を意味する。

【0067】

本明細書で使用する用語「サンプル特異的な配列タグ」は、特定のサンプル源由来のポリヌクレオチド分子を特定するために使用するポリヌクレオチド配列を指す。本発明の「サンプル特異的な配列タグ」は、単離または合成したポリヌクレオチドのサンプル源を指し、そして1つのサンプルの単離または合成したポリヌクレオチドと他のサンプルのそれらとを識別する。従って、サンプル特異的な配列タグは識別可能な特異的配列独自性を有する。「特異的配列独自性」は、1つのサンプル特異的な配列が別のサンプル特異的な配列と、少なくとも1ヌクレオチド、例えば少なくとも2または3または4または5または10または15または20以上、60以下のヌクレオチドにおいて異なるものであることを意味する。

20

【0068】

本明細書で使用する用語「識別可能に標識」は、1つの標識化オリゴヌクレオチドプライマーまたはそれが取り込まれた核酸分子由来のシグナルが、別のそのような標識化プライマーまたは核酸分子由来のシグナルと識別可能であることを意味する。検出可能な標識は、例えば吸光色素、蛍光色素または放射性標識を含み得る。蛍光色素が好ましい。一般的には、蛍光シグナルはピーク発光波長が少なくとも20nm離れていれば、別の蛍光シグナルと識別可能である。特に、ある反応における蛍光の発光ピークが幅広く、狭いかまたはより鋭いピークではない場合には、より大きなピーク分離が好ましい。

30

【0069】

本明細書で使用する用語「セット」は、核酸サンプル、プライマーまたは他の成分の群を意味する。セットは、既知の数の、そして少なくとも2つのそのような成分を含む。

【0070】

本明細書で使用する用語「サブセット」は、本明細書で定義するセットに含まれる群を意味し、ここで前記サブセット群はセットのすべてのメンバーより少ない。本明細書で使用するサブセットは、1つの成分から構成され得るが、好ましくは1つ以上の成分である。

【0071】

1回の反応において調査され得る遺伝子の数は、産物サイズの計測可能な相違（1~2塩基）およびPCR産物の分離可能なサイズ（500~1000bp）に基づいて推定することができ、そして1000程もの大きさであり得るが、好ましくは100~200であり得る。

40

【0072】

本発明の詳細な説明

本発明は、1つの個体またはサンプル中および2つ以上の個体またはサンプル間の双方における、遺伝子発現のレベルを解析するための方法に関する。本方法は、サンプル中の対象となる配列の1つ以上のコピーを、それらのコピーをサンプル中に存在する他の配列のバックグラウンドを超えて検出するのに十分に多く、定量的に産生するためのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の能力に依存する。

【0073】

PCRにおいて、2つのオリゴヌクレオチドプライマー、鋳型および耐熱性核酸ポリメラー

50

ぜが使用される。一般的なPCRスキームにおいて、オリゴヌクレオチドプライマーの1つが鋳型核酸鎖にアニールする。アニールしたプライマーは、耐熱性鋳型依存的核酸ポリメラーゼによって伸長し、そして重合産物が第2のプライマーと相補的な配列を有することで、重合産物は第2のプライマーの伸長のための鋳型となることができる。重合産物は熱的に変性して鎖を解離し、そしてプライマー対は各々の鎖にアニールして伸長する。各々の伸長産物が後の伸長反応のための鋳型となるために、標的配列は指数関数的に増幅される。

【0074】

反応において生成されるPCR産物の量は、元のサンプル中に存在する鋳型の量を反映し得る。PCRは遺伝子発現の定量的解析における強力な手段である一方、検出される産物の量が元のサンプル中に存在する標的RNAまたはDNAの量を正確に反映することを確実にするためには、定量PCRには注意深くそして時には複雑な制御が必要であることが当技術分野において知られている。定量PCRは、例えばReischlおよびKochanowski, 1995; Mol. Biotechnol. 3:55-71ならびにJungら, 2000, Clin. Chem. Lab. Med. 38:833-836によって記載されている。

10

【0075】

PCR増幅は、増幅の指数関数期の間だけに定量的である。指数関数期の後には安定期に移行し、検出される産物の量は初めのサンプル中に存在する標的配列の量を正確に反映しない。プライマーおよびヌクレオチド供給の枯渇、リン酸の蓄積および増幅産物そのものの蓄積はすべて、投入した核酸の量と増幅の指数関数期の後に産出したPCR産物の量との間の非直線性に寄与する。さらに、2つ以上の異なる標的を増幅する場合、1つの産物の別の産物に対する増幅効率における差異は、元のサンプル中に存在する標的分子の相対的な定量において不正確性を生じるだろう。従って、定量PCR法から有意義な結果を得るためには、生成する産物の量だけでなく、産物がどのようにそしていつ生成したかがモニターできることが重要である。

20

【0076】

本発明の方法は、定量PCRに伴う多くの問題を解決する。例えば、本明細書に提供される方法は、生成した増幅産物の量の測定を可能にし、そして産物が生成された様子を示す曲線を同時に提供する。本方法はまた、所望の産物由来の増幅シグナルと人工産物（プライマーダイマー形成またはミスプライミング事象等）由来の増幅シグナルとを区別することを可能にする。

30

【0077】

1つの態様において、本発明は1つのサンプルからの単一の標的核酸の増幅をモニタリングする方法を提供する。本発明のこの態様および別の態様は、DNA、RNAまたはこれらの混合物を含むサンプルからのポリヌクレオチド配列の増幅をモニタリングするのに適しているが、サンプル中のRNA転写レベルの計測または比較における適用が最もよく見られるだろう。RNA転写物の計測のためには、逆転写ステップが必要である。逆転写の方法は、当技術分野においてよく知られている。望ましいアッセイに応じて、逆転写は非特異的プライマー（例えば、オリゴdT含有プライマーまたはランダムプライマーの集合体）を用いて実施することができ、あるいは逆転写は対象となる遺伝子に特異的なプライマーを用いて実施することができる。

40

【0078】

この態様において、核酸サンプルは、加熱変性、プライマーのアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを少なくとも2回含むPCR増幅処理を受ける。増幅処理は好ましくは2~35サイクル、より好ましくは10~30サイクル、より好ましくは15~25サイクルを含む。この処理はオリゴヌクレオチドプライマー対を用い、対象となる単一配列がサンプル中に存在する場合、この配列の特異的な増幅がもたらされる。オリゴヌクレオチドプライマーの1つが蛍光標識されることで、各々の二本鎖増幅産物が検出可能な蛍光マーカを持つ。

【0079】

50

本発明のこの態様において、サイクリング処理中に、変性、プライマーのアニーリング、およびプライマー伸長の少なくとも1回のサイクルの後、サンプルまたは反応物の一定分量をチューブまたは反応容器から採取して、その一定分量中の核酸を分離および検出する。分離および検出は、サイクリング処理と同時に実施することで、サイクリングが起きている間に、サイクル数の関数として産物存在量を表す曲線が得られる。本明細書で使用する用語「同時に」は、分離がサイクリング処理進行中に少なくとも開始することを意味する。使用する分離技術（例えばキャピラリー電気泳動）ならびにある反応で分離され得る種類の数およびサイズによって、分離にはほとんどの場合、一定分量当たり約1~120分が必要となる。従って、分離ステップが各々のサイクルの時間より長くかかる場合、そしてサンプルを例えばすべてのサイクルの後毎に採取する場合には、分離ステップは全サイクリング処理の完了後に完了する。しかしながら、本明細書で使用するように、各サンプルの分離がサイクリング処理中に開始した限り、この状況はやはり「同時」分離であると考えられる。同時分離は最も好ましくはロボットサンプラーを用いることによって実施され、これは、サンプルをサイクリング反応物から採取した後に、迅速にサンプルを分離装置に置くものである。

10

20

30

40

50

【0080】

上記の方法において、増幅反応をリアルタイムでモニターすることができ、そして標的産物の存在量と元のサンプルにおける標的配列の量との関係を、他の定量PCR法によって達成されるよりも、より迅速かつより正確に引き出すことが可能である。一定分量の採取（本明細書において「サンプリング」を指す）、核酸分離および検出は、本明細書の以下に記載されるとおりに実施することができる。

【0081】

本方法は、リアルタイムPCR法によって提供される利便性をさらに伸ばし、そしてまたこれらの方法が本来的に有するいくつかの共通して生じる問題を解決する。PCR増幅反応の開始において、PCR産物の量は多くの機器の検出限界以下であり、定量的な差異は観察できない。通常、細胞当たり数コピーのレベルで存在する稀な遺伝子転写物を検出するために、PCR産物をかなり後のステージでモニタリングすることが必要である。一般的には、これらの遺伝子の検出が困難であるのは、それらの稀な転写物が検出可能なレベルにまで増幅する前に反応が停止してしまうためである。増幅曲線の間中区域は、シグナルが検出限界以上で生じ、そして対数期に入る場合には、遺伝子発現における定量的差異を検出するための最良のシグナルを構成する。しかし、反応の指数関数的性質のために、この段階は比較的短く、そして反応が後の静止期に入る前の数サイクルだけ続く。PCR増幅のこの後の静止期において、PCR産物の蓄積は、さらなる基質の欠乏、ポリメラーゼの欠乏、産物によるポリメラーゼ活性の阻害等の因子またはこれらの組み合わせによって飽和に達する。静止期は遺伝子発現における定量的差異を検出するための機会をほとんど提供しない。従って、事前に決定された回数 of サイクル後にPCR産物を定量する方法のみが、偶然に増幅の対数期にある遺伝子を同定することができ、ゆえに増幅プロセスにおける初期または後期のどちらかで識別されて検出されるに過ぎない遺伝子を見落とすことだろう。

【0082】

本発明がこの限界を克服するのは、これが各々の独立した増幅断片についての完全な増幅曲線を明示するからである。さらに、これは発現の差異を測定するための定量的な基準を提供する。リアルタイム定量PCRの実施において、実験的に定義されるパラメーター「 C_t 」は、定量PCR反応から生じるシグナルが「閾値」を超えて初めて生じる時点でのサイクル数を指し、つまりこれが標的核酸配列の増幅の初めての確実な検出である。「確実な」は、シグナルがPCR中の増幅産物の検出可能なレベルを反映することを意味する。 C_t は一般的に未知の量の標的核酸の開始量と関連しており、つまり、標的が少量であるほど C_t がより後になる。 C_t は単純な数式：

$\text{Log}(\text{コピー数}) = aC_t + b$ 、ここでaおよびbは定数
により、初めのコピー数またはDNAの開始濃度と関連する。

【0083】

従って、2つの異なるサンプル由来の同一遺伝子の断片に対する C_t を計測することによって、これらのサンプル中のこの遺伝子の元の相対濃度を容易に評価することができる。

【0084】

PCR増幅の最も興味深い特性の1つは、1回の反応においていくつかの標的配列の増幅を組み合わせる能力であり、このことはPCRアッセイの時間および費用において有意な節約を提供し得る。いくつかの方法を用いることが可能であり、これらは1回の増幅反応において複数の異なるポリヌクレオチド配列の共増幅を可能にする。例えば、Markoulatosら、2002, J. Clin. Lab. Anal. 16:47-51およびBroudeら、2001, Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 11:327-332を参照せよ。しかしながら、これらの方法の多くは定量的なデータを提供することはなく、そして主として特定の配列の存在または不存在を検出するために用いられる。マルチプレックスリアルタイムの適用は、蛍光色素の光学分離により1回の反応において組み合わせることができる遺伝子の数が制限されている。さらに、これらの方法は多くの場合、特異的増幅産物と非特異的増幅産物とを見分けることが不可能であり、さらに定量的解析を困難にし、そして面倒なアッセイの最適化を要する。

10

【0085】

別の態様において、本発明は1回の反応で解析可能な遺伝子の数の限界を解消する。特に、本発明はサンプル中の2つ以上のポリヌクレオチド配列の増幅をモニターすることを可能にする。本方法は2つ以上の配列に対する増幅プロフィールをもたらし、これは増幅の対数期間のシグナル強度を、元のサンプル中に存在するこれらの配列の相対量と関連付けることを可能にする。

20

【0086】

本発明のこの態様において、オリゴヌクレオチドプライマーのセットが使用され、そして前記セットは2つ以上の対象となる遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドPCRプライマー対から成る。プライマー対の各々のうち1つのプライマーは、蛍光マーカで蛍光標識される。本発明のこの態様の例示は、図1に概略的に示す。1つの実施形態において、異なるプライマーは同一のマーカで標識され得る。その場合、異なる増幅産物に対するプライマーは、増幅産物のサイズが区別されるように選択される。本文中で使用される「区別される」は配列長における違いを指し、選択された分離技術を用いて識別することが可能である；わずか1ヌクレオチドが異なる増幅産物は、分離技術（例えば、キャピラリー電気泳動（下記参照））がこの違いを分離することが可能である限り区別される。本発明の有用なPCR産物は、一般的には少なくとも50bpの長さであり、そして約5,000bpの長さであり得る。多くの場合、本発明の有用なPCR断片の長さは、約50~1000bpの長さであり、好ましくは50~500bpである。

30

【0087】

別の実施形態において、PCRプライマー対の各々の1つのメンバーは蛍光基で蛍光標識されており、これは他のプライマー対の各々のメンバーを標識する蛍光基とスペクトルで識別可能である。この実施形態において、予想される増幅産物のサイズが区別されることが可能であるが、しかし区別される必要はない。ある反応において使用されるスペクトルで識別可能な蛍光基は、消失するかまたは同じ反応において他の蛍光基とのエネルギー転移を行うことのないように選択されると思われる。

40

【0088】

1つのサンプルにおける異なる配列を同時に検出する能力をさらに増強する実施形態において、オリゴヌクレオチド対を選択することで、各々の対が異なるサイズの断片を生じるか、もしくは異なる蛍光基で標識されるかのどちらか、またはその両方となるようにする。この実施形態において、同じサイズの異なる産物はスペクトルで区別される蛍光基を有し、そして同じ蛍光基で標識される異なる産物は異なるサイズを有する。

【0089】

本発明のこの態様において、一度望ましい標識の組み合わせおよび予想される産物のサイズが選択されると、核酸ポリメラーゼ、ヌクレオチドおよび必要なバッファーを含むPCR反応混合液中で、核酸サンプルをプライマー対のセットと接触させる。反応混合液を次

50

に、加熱変性、プライマーのアニーリング、およびプライマー伸長の反復サイクルを含むPCR増幅処理にかける。この処理中に、反応物の一定分量を本明細書に記載するように採取し（下記の「サンプリング」の節を参照）、そして一定分量中の核酸を、これもまた本明細書において以下に記載されるように分離する。本発明のこの態様において、他の態様においてと同様に、分離プロセスはサイクリング反応と同時に実施され、そして増幅された核酸はそれらのマーカの蛍光によって検出される。

【0090】

分離および検出ステップは、予想される産物サイズおよび使用されるスペクトルで識別可能なマーカの組み合わせに依存して、サイズ、蛍光マーカまたはその双方によって増幅産物を同定することを可能にする。従って、産物が同一のマーカを持つ場合、分離は同一の標識を含む断片の「ラダー」をもたらす、そして断片サイズはある産物を別の産物と識別する。産物が異なる標識を持つ場合、分離は増幅産物を同定する各々の異なる標識を含むバンドをもたらす。最後に、産物が異なるサイズとなるよう、そして区別されるように標識されるよう選択される場合、産物は蛍光の波長および断片のサイズによって一意的に同定される。

【0091】

産物の同定に加え、検出ステップは採取した各々のサイクルに存在する各々の産物の存在量を測定する。この存在量が各々の断片についてプロットされ得ることで、断片特異的な増幅プロファイルが得られ、これは元のサンプルにおいて各々の検出される断片によって示される配列の相対存在量を推定するために使用され得る。

【0092】

本発明の別の態様において、1つのサンプル中に存在する核酸断片のセットの増幅は、核酸断片のセットにおける各々の対象となる核酸に対して特異的なフォワードおよびリバースオリゴヌクレオチドプライマー対のセットを用いることによってモニターされ得る。プライマー対を選択することで、各々の対の増幅産物が同一の反応において他の増幅産物と比較して区別されるサイズとなるようにする。二本鎖DNAにのみ結合する蛍光色素（例えば、SYBR-Green; Molecular Probes Inc., Eugene, OR）の存在下でPCR増幅を実施する。増幅処理中に、反応物の一定分量を採取し、そして一定分量中の核酸を本明細書に記載するように分離する。本発明のこの態様において、他の態様においてと同様に、分離プロセスはサイクリング反応と同時に実施され、そして増幅された二本鎖核酸は蛍光およびサイズによって検出される。各々の増幅断片の存在量は、結合色素の蛍光強度によって同定される。区別されるサイズの増幅産物は、増幅反応を通して各々の対象となる核酸の増幅をモニターできるようにし、それによって各々の対象となる核酸断片についての増幅曲線が得られる。曲線は、核酸断片のセットの各々のメンバーがどのサイクルにおいて増幅の対数期にあるかを示し、それによって元のサンプルにおけるセットの各々のメンバーの相対存在量の推定を可能にする。本発明のこの態様は、図2に概略的に示す。

【0093】

別の態様において、本発明は1つのサンプル中に存在するポリヌクレオチド配列のセットの増幅をモニタリングする別の方法を提供する。この方法において、サンプル中のRNAは、5'末端に10~40ヌクレオチドのタグ配列を含み、そして特異的な遺伝子標的となり得るかまたはオリゴdTストレッチ（ストレッチは一般的には8~30ヌクレオチド長、好ましくは12~24ヌクレオチド）に相当し得るmRNAと相補的な配列を含むプライマーを用いて逆転写される。タグ配列は、調査される生物のゲノム中に見られない配列であるべきであり、そして合成物であり得るか、ランダムであり得るか、または別の種由来であり得る。タグ配列は、あるPCR反応の塩およびアニーリング温度の条件の下で、相補的な配列を含むポリヌクレオチドとの特異的なアニーリングを提供するのに十分な長さであるべきである。これらの条件、特にアニーリング温度は変化するが、そのような温度はタグ配列の既知のまたは推定される T_m に基づいて決定される。市販のプログラムはOligo（商標）、Primer Designおよびインターネットで使用可能なプログラム（Primer3およびOligo Calculatorを含む）を含むが、これらは本発明の有用なポリヌクレオチド配列の T_m を推定するた

10

20

30

40

50

めに使用することができる。本発明のこの態様および他の態様において有用なタグ配列は、50~60 の範囲の T_m を有するように選択されるべきである。

【0094】

上記のプライマー（例えば、オリゴdT-TagプライマーまたはmRNA相補体-Tagプライマー）を用いたサンプル中のRNAの逆転写は、逆転写産物の集団を生じ、これらの各々はmRNAに相補的な配列の5' にタグ配列を有する（例えば、オリゴdTストレッチまたはmRNA相補的ストレッチ）。逆転写サンプルに見られるポリヌクレオチド配列のセットを増幅するために、逆転写反応物またはその一定分量を（i）対象となる核酸配列のセットを認識するか、またはそれと特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび（ii）すべての逆転写産物に共通する配列タグを含む検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマーと混合する。本発明のこの態様において、対象となる転写物のセットのメンバーに対して特異的な各々のオリゴヌクレオチドプライマーを選択することで、後の増幅処理において区別されるサイズの増幅産物が生成するようにする。

10

【0095】

次に、プライマーと逆転写産物との混合物を本発明の先の態様においてと同様に増幅処理にかける。各々の増幅産物は他の予想される断片と区別されるサイズであり、そして各々の増幅産物がまた、検出可能な標識、好ましくは蛍光基を含むことで、分離後に断片が容易に検出され得る。

【0096】

本発明の他の態様においてと同様に、増幅反応物のサンプルはサイクリング処理中に採取され、そしてこの増幅産物は分離および検出される。増幅産物の同定は、これらのサイズによって決定され、そして各々のサイクルにおける各々の増幅産物の存在量は予想されるサイズの産物における標識の強度によって測定される。サンプリングおよび分離によって得られる増幅曲線は、セットの各々のメンバーの増幅についてのプロフィールを提供する。このプロフィールは、どのサイクルで転写物のセットの各々のメンバーまたは対象となる遺伝子が増幅の対数期にあるかを示し、それによって元のサンプルにおけるセットの各々のメンバーの相対存在量を推定することを可能にする。本発明のこの態様は、図3に概略的に示す。

20

【0097】

別の態様において、本発明は2つのサンプル間で対象となる核酸配列の発現を比較するための方法を提供する。サンプル中のRNAは、5' 末端に15~40ヌクレオチドのタグ配列を含み、そして遺伝子特異的となり得るかまたはオリゴdTストレッチ（ストレッチは一般的には8~30ヌクレオチド長、好ましくは12~24ヌクレオチド）に相当し得るmRNAと相補的な配列を含むプライマーを用いて逆転写される。各々のサンプルの逆転写は、逆転写産物の集団を生じ、これらの各々はサンプル特異的な配列タグを有する。サンプル特異的なタグは8~30ヌクレオチド長の独自の配列であり、好ましくは12~24ヌクレオチド長であり、上記のPCRアニーリング反応のための塩および温度条件の下で、相補配列に特異的にハイブリダイズまたはアニールする。

30

【0098】

逆転写反応物を分離した後、相補的なDNA鎖の合成が、その5' 末端において8~40ヌクレオチドの独自の配列タグ（tag 2）の次に遺伝子特異的な配列（8~30ヌクレオチド）を含むプライマーを用いて開始される。DNAポリメラーゼを用いたプライマー伸長の後、未反応のプライマーを熱感受性ヌクレアーゼによって除去し、これは次に上昇させた温度でのインキュベーションによって分解した。本発明のこの態様において、対象となる転写物のセットのメンバーに特異的な相補的DNA鎖のプライミングに使用される各々のオリゴヌクレオチドプライマーを選択することで、後の増幅処理において区別されるサイズの増幅産物が得られる。

40

【0099】

合成DNAサンプルに見られるポリヌクレオチド配列のセットを増幅するために、反応物またはその一定分量を（i）特定の配列 tag2を含むオリゴヌクレオチドプライマーおよび

50

(ii) すべての逆転写産物に共通する配列タグを含む検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマーと混合する。選択した配列のセットを増幅させるために、2つのプライマーしか使用しないことは、PCR増幅の複雑性を低減させ、そして増幅収率を向上させる。

【0100】

本発明の他の態様においてと同様に、増幅反応物のサンプルはサイクリング処理中に採取され、そして増幅産物を分離および検出する。増幅産物の同定は、これらのサイズによって決定され、そして各々のサイクルでの各々の増幅産物の存在量は予想されるサイズの産物における標識の強度によって測定される。サンプリングおよび分離によって得られる増幅曲線は、セットの各々のメンバーの増幅についてのプロフィールを提供する。このプロフィールは、どのサイクルで転写物のセットの各々のメンバーまたは対象となる遺伝子が増幅の対数期にあるかを示し、それによって元のサンプルにおけるセットの各々のメンバーの相対存在量を推定することを可能にする。本発明のこの態様の例示は、図4および6に概略的に示す。図4において、異なるサイズの増幅産物は同じ蛍光標識で検出される。もう一方の図6では、同じサイズの増幅産物は、サンプル特異的なTagプライマーにおける識別可能な蛍光標識によって識別される。

10

【0101】

別の態様において、その例示は、図5に概略的に示され、本発明は2つのサンプル間で対象となる核酸配列の発現を比較するための方法を提供する。サンプル中のRNAは、5'末端に8~30ヌクレオチドのタグ配列を含み、そして遺伝子特異的となり得るかまたはオリゴdTストレッチ（ストレッチは一般的には8~30ヌクレオチド長、好ましくは12~24ヌクレオチド）に相当し得るmRNAと相補的な配列を含むプライマーを用いて逆転写される。従って、各々のサンプルの逆転写は逆転写産物の集団を生じ、これらの各々はサンプル特異的な配列タグを有する。サンプル特異的なタグは8~30ヌクレオチド長の独自の配列であり、好ましくは12~24ヌクレオチド長であり、上記のPCRアニーリング反応のための塩および温度条件下で、相補配列に特異的にハイブリダイズまたはアニールする。

20

【0102】

逆転写反応物を分離した後、比較する各々のサンプルについて、等量の逆転写反応物を混合し、そしてこの混合物をPCR増幅処理における鋳型として使用する。この増幅反応のために、以下のようなプライマーを使用する：(i) 逆転写ステップに使用する各々のサンプルに特異的な配列タグに対応する別々の識別できるように蛍光標識したオリゴヌクレオチドプライマー（サンプル特異的なタグと相補的な配列を含む核酸分子へのプライマーの特異的なアニーリングを可能にする温度および塩条件下（上記の T_m 予測の議論を参照せよ）である場合、サンプル特異的な配列は、そのようなアニーリングを可能にするのに十分な長さであるべきである）；および(ii) 対象となる配列に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー（つまり、本明細書に記載されるように、アニーリングを可能にする条件下で、対象となる配列を含有する核酸分子へのプライマーの特異的なアニーリングを可能にするのに十分な、対象となる核酸配列と相補的な配列を含む）。対象となる遺伝子または転写物に特異的なプライマーを一般的に選択することで、50~5,000bp、好ましくは50~1,000、より好ましくは50~500bpの産物が増幅により得られるようにする。

30

40

【0103】

サイクリング処理中に、サンプルは増幅反応物から採取され、そして増幅された核酸は、本明細書に記載される本発明の他の態様においてと同様に、分離および検出される。分離および検出プロセスは、元の各サンプルについて特異的なプライマーに付着された識別可能な標識を検出するため、このプロセスは各サンプル由来の対象となる遺伝子に対する別々の増幅プロフィールをもたらす。遺伝子特異的または転写物特異的プライマー（これは「上流の」プライマーである）と競合するため、増幅の偏りの影響が減少し、そして増幅プロフィールは、異なる元のサンプル中の対象となる遺伝子の相対存在量を推定したり、また既知の標準との比較における相対存在量を提供するために使用され得る。

【0104】

50

別の態様において、本発明は核酸配列のセットの増幅をモニタリングするための方法を提供する。この方法において、逆転写産物のセットに存在する核酸配列のセットは、加熱変性、プライマーのアニーリングおよびポリメラーゼ伸長の反復サイクルを少なくとも2回含むPCR増幅処理において増幅される。

【0105】

逆転写産物のセットは逆転写産物のサブセットから構成され、ここで各々のサブセットは1つのRNAサンプル由来の逆転写物の集団である。各々のサブセットは、5'末端に15~40ヌクレオチドのタグ配列、そして遺伝子特異的となり得るかまたはオリゴdTストレッチ（ストレッチは一般的には8~30ヌクレオチド長、好ましくは12~24ヌクレオチド）に相当し得るmRNAと相補的な配列を含むプライマーを用いて、RNAのサンプルを逆転写することによって生成される。次に、等量の逆転写サブセットを混合することで、後の増幅処理のための増幅鑄型として使用される逆転写産物のセットを形成する。

10

【0106】

この態様についてのPCR増幅処理は、以下のような2つの増幅プライマーのセットと混合した逆転写産物のセットを含む鑄型と接触させることによって実施される；(i) 遺伝子特異的プライマーのセットであって、ここでセット中の各々の遺伝子特異的プライマーは、核酸サンプル中の対象となる特異的核酸配列（つまり、発現するかもしくは発現すると考えられる配列）を認識するか、またはそれと特異的にハイブリダイズする（セット中の各々の遺伝子特異的プライマーを選択することで、そのセット中の他の遺伝子特異的プライマーで生成された増幅産物とサイズにおいて区別される増幅産物が生成される）；および(ii) サンプル特異的なプライマーのセット。各々のサンプル特異的なプライマーを選択することで、本明細書に記載するようなPCRアニーリング条件下で、1つのサンプル由来の逆転写産物中に取り込まれたサンプル特異的なタグと特異的にハイブリダイズするようにする。サンプル特異的なプライマーのセットにおける各々のサンプル特異的なプライマーもまた、識別できるように標識される。

20

【0107】

増幅処理のサイクル中に、本明細書において上記に記載される本発明の他の態様についてと同様に、サンプルを採取し、核酸を分離および検出する。検出は、対象となる転写物に相当する各々の区別されるサイズの断片の存在量のプロフィールを提供し、そしてサンプル特異的なプローブへの識別可能な標識は、個々のサンプルから生じるシグナルを識別することを可能にする。従って、この方法は異なるサンプルのセットにおける遺伝子のセットの相対存在量を比較することを可能にする。この方法は、細胞型または組織において関係しているかまたは無関係な遺伝子群における処理（例えば薬剤処理）の効果をモニタリングするのに特に有用である。

30

【0108】

増幅産物の分離および検出がサイクリング処理と同時に実施されるために、そして分離（例えばCEによる）が非常に迅速なために、本明細書に記載する方法は増幅プロフィールのリアルタイムの作製を可能にし、これは調査するサンプル中の核酸種の相対存在量を測定するのに有用である。

【0109】

40

A) サンプリング

増幅処理中のサンプリングは、望ましい任意の回数またはパターンで実施され得る。サンプリングは前記処理における各々のサイクルの後に行われるのが好ましいが、しかしより少ない回数（例えば2サイクル毎、3サイクル毎、4サイクル毎等）のサンプリングもまた採用され得る。一定のサンプル間隔が多くの場合望ましい一方で、サンプリングが一定の間隔で実施される必要はない。1つの例示として、サンプリング手順は、初めの5サイクルについては全サイクルの後のサンプリング、そして次に1サイクルおきのサンプリングを含み得る。

【0110】

サンプリングは、反応物から一定分量を手動でピペティングするような単純なもので

50

あり得るが、しかし好ましくは自動化することで一定分量が予定されたサンプリング間隔で機械的に採取されるようにする。本発明のこの態様および他の態様について、サイクリングがマイクロタイターまたはマルチウェルプレート形式において実施されることが好ましいが、そうでなくてもよい。この形式は、複数の反応ウェルを含むプレートを使用し、アッセイプロセスの処理能力を向上させるだけでなく、また、プレートのモジュールの性質およびプレート上におけるウェルの一定のグリッドの配置のため、自動化されたサンプリングステップによく適応する。本発明で有用な一般的なマイクロタイタープレート設計は、例えば12、24、48、96、384またはそれ以上のウェルを有するが、しかし、プレートに物理的に適合し、そして所望の反応物体積（通常10～100 μ l）に適合する任意の数のウェルが本発明に従って使用され得る。一般的には、96または384ウェルのプレート形式が好ましい。

10

【0111】

自動化されたサンプリングプロセスは、プログラムされた手順として容易に実行され、そしてサンプリングにおける人為的ミス（つまりサンプルサイズおよびサンプル本体の追跡におけるミス）ならびにサンプリングする者からの汚染の可能性の双方を回避する。サーマルサイクラーから一定分量を採取することが可能なロボットサンプラーは、当技術分野において利用可能である。例えば、Mitsubishi RV-E2 Robotic Armは、SciClone（商標）Liquid HandlerまたはRobbins Scientific Hydra 96ピペッターと組み合わせて使用され得る。

20

【0112】

本発明の有用なロボットサンプラーは、サーマルサイクラーと統合することができ、またサンプラーおよびサイクラーは設計においてモジュール式であり得る。サイクラーおよびサンプラーが統合されている場合、サーマルサイクリングおよびサンプリングは同じ場所で起こり、サンプルはプログラムされた間隔でロボットサンプラーによって採取される。サイクラーおよびサンプラーが設計においてモジュール式である場合、サイクラーおよびサンプラーは別々のモジュールである。1つの実施形態において、アッセイプレートは、例えばロボットアームによって、物理的にサイクラーからサンプラーへ動かされ、そしてサイクラーへ戻される。

【0113】

サンプリングステップで採取された一定分量の体積は、例えば増幅反応物の総体積、産物検出の感度および使用した分離の様式に依存して変化し得る。増幅物体積は数 μ l～数百 μ l（例えば、5 μ l、10 μ l、20 μ l、40 μ l、60 μ l、80 μ l、100 μ l、120 μ l、150 μ lまたは200 μ lまたはそれ以上）まで、好ましくは10～150 μ lの範囲、より好ましくは10～100 μ lの範囲で変化し得る。一定分量の体積は反応混合物の0.1～30%まで変化し得る。

30

【0114】

B) 核酸の分離

本発明の核酸の分離は、核酸の分離に適した任意の手段によって達成することができ、例えば、電気泳動、HPLCまたは質量分析法を含む。分離は好ましくはキャピラリー電気泳動（CE）で実施される。

【0115】

CEは、微量のサンプルの分析に有効な分析的分離技術である。CE分離は、「担体電解質」と呼ばれる電気伝導性媒体で充填された径の小さいキャピラリー管において実施される。電場がキャピラリー管の両端の間かけられ、そしてサンプル中の種は一方の電極からもう一方の電極へ、チューブ内の流体運動の速度に依存するのに加えて、各々の種の電気泳動度に依存した速度で動く。CEはキャピラリー内のゲルまたは液体（バッファー等）を用いて実施され得る。単液様式は「フリーゾーン電気泳動」として知られるが、これにおいて分離はサンプル種の自由溶液の移動度における違いに基づいて分離される。別の溶液様式において、疎水性における違いに基づく有効な分離のためにミセルが使用される。これはミセル動電キャピラリークロマトグラフィー（MECC）として知られる。

40

【0116】

50

CEは荷電に基づいて核酸分子を分離し、これはヌクレオチドのサイズまたは数によるそれらの分離を効果的にもたらず。多くの断片が生成される場合、これらはサイズの小さい順にキャピラリーの末端近くの蛍光検出器を通過する。つまり、より小さな断片がより大きなものより先に移動して、初めに検出される。

【0117】

CEは従来の電気泳動より有意に優れた点を、主に分離の速度、必要なサンプルのサイズが小さいこと(1~50nlのオーダー)、そして高い分割能において提供する。例えば、CEを用いた分離速度は従来のゲル電気泳動より10~20倍速くなり得、そして泳動後の染色を必要としない。CEは高い分割能を提供し、わずか1塩基対により異なる約10~1,000bpの範囲の分子を分離する。キャピラリーの広い表面積が効果的に熱を放散させるため、高電圧の使用を可能にするので、高い分割能がある程度までは可能である。さらに、バンド幅の拡大はキャピラリーの内径が小さいために最小限にされる。フリーゾーン電気泳動において、電気浸透または電気浸透流(EOF)の現象が起こる。これは液体の大量流出であり、荷電に関係なくすべてのサンプル分子に影響を与える。特定の条件下において、EOFはフリーゾーンCEにおける分割能および分離速度を向上させるのに寄与し得る。

10

【0118】

CEは当技術分野でよく知られている方法によって実施することができ、それは例えば米国特許6,217,731号、6,001,230号および5,963,456号に記載され、これらは参照により本明細書に組み入れる。高い処理能のCE装置は市販のものを利用でき、これらは例えばSpectrumedix Corporation(State College, PA)のHTS9610 High Throughput Analysis SystemおよびSCE 9610完全自動化96-キャピラリー電気泳動遺伝子解析システムである。他には、Beckman Instruments Inc(Fullerton, CA)のP/ACE 5000シリーズ、およびABI PRISM 3100遺伝子分析装置(Applied Biosystems, Foster City, CA)を含む。これらの装置の各々は、CEカラムの末端付近でサンプル中の分子からの光の放出をモニターする蛍光検出器を含む。標準的な蛍光検出器は、蛍光放出の多数の異なる波長を識別することが可能であり、増幅サンプルから1回のCEの実施において複数の蛍光標識種を検出する能力を提供する。

20

【0119】

CE分離の処理能を向上させる別の手段は、複数のキャピラリー、好ましくは多数のキャピラリーを使用することである。キャピラリーアレイ電気泳動(CAE)装置は96のキャピラリー容量(例えば、Molecular DynamicsのMegaBACE機器)およびそれ以上、1000以下のキャピラリーで開発されてきた。近接して並置された複数のキャピラリー間で散乱する光によって引き起こされるDNA由来の蛍光の検出における問題を回避するために、共焦点蛍光スキャナーが使用され得る(Quesadaら, 1991, Biotechniques 10:616-25)。

30

【0120】

分離(および検出)のための装置は、サーマルサイクリングおよびサンプリングのために使用する装置と別々のものまたは統合されたものであり得る。本発明に従い、分離ステップはサイクリング処理と同時に開始されるため、サンプルは好ましくは増幅反応物から直接採取され、そして分離装置に置かれることで、分離は増幅と同時に進行する。従って、必要なことではないが、分離装置がサーマルサイクリングおよびサンプリング装置と統合されていることが好ましい。1つの実施形態において、この装置はモジュールであり、サーマルサイクリングモジュールおよび分離/検出モジュールを含み、これはサンプルをサーマルサイクリング反応物から採取して分離/検出装置に置くロボットサンプラーを備えている。

40

【0121】

C) 検出

本発明において有用な増幅産物検出法は、蛍光標識の励起スペクトル内の光で照射された場合に、標識されたプライマーによって放射される蛍光強度を計測する。蛍光検出技術は高度に発展し、そして非常に感度が良く、場合によっては1分子に至るまでの実証された検出を伴う。高感度の蛍光検出は、多くの市販のプレートリーダー、マイクロアレイ検

50

出セットアップおよびCE装置の標準的な態様である。CE機器について、励起および発光シグナルの光ファイバー伝送が多くの場合採用される。Spectrumedix、Applied Biosystems、Beckman CoulterおよびAgilentの各社が、本明細書に記載する方法のために必要な蛍光検出に十分な蛍光検出器を備えたCE機器を販売している。

【0122】

2つ以上の異なる蛍光標識由来の蛍光シグナルは、その発光のピーク波長が各々スペクトルにおいて20nm以上離れている場合に、互いに識別され得る。一般的に、特に選択した蛍光基が広い発光波長ピークを有する場合、当業者はピーク波長の間隔がより大きい蛍光基を選択する。このことは、サンプル中に同時に含まれることおよび検出されることが所望される異なる蛍光基が多いほど、それらの発光ピークをより狭くする必要があるということになる。

【0123】

D) 蛍光マーカー

本発明において有用な多数の蛍光マーカーは、市販のものを入手可能である。例えば、Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) は、多様な蛍光色素を販売している。非限定的な例示は、数例を挙げると、Cy5、Cy3、TAMRA、R6G、R110、ROX、JOE、FAM、Texas Red (商標) およびOregon Green (商標) を含む。本発明において有用な蛍光色素は、当技術分野でよく知られている方法を用いて、オリゴヌクレオチドプライマーに連結され得る。例えば、蛍光標識をオリゴヌクレオチドに付加するための1つの一般的な方法は、色素のNヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステルを標的の活性アミノ基と反応させることである。ヌクレオチドは活性アミノ基を有するように修飾され、それらは例えば核酸塩基にアリルアミノ基を含むことによる。アリルアミンを介した標識は、例えば米国特許5,476,928号および5,958,691号に記載され、これらは参照により本明細書に組み入れる。ヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを蛍光標識する他の手段は、当業者によく知られている。

【0124】

E) 増幅したDNAからの蛍光シグナルと元のサンプル中に存在する核酸レベルとの間の相互関係

発現プロファイリングについてPCR増幅を使用することに関する1つの問題点は、起こり得る増幅の偏りである。いくつかの配列は他より高い効率で増幅される。この偏りが、開始サンプルと比較した場合のPCR産物の最終的な発現量を変化させ得る。さらに、RNA抽出の効率および増幅効率を測定することが困難なため、定量PCRは、あるサンプル中の標的RNAの絶対量を測定するためというよりはむしろ、2つのサンプル間の遺伝子発現における相対的な違いを調べるために最も容易に用いられる。検出された蛍光シグナル強度は (例えば、CE分離の後) 記録され、そして2つのサンプルにおける標的配列からの各ピークの相対的な割合を測定するために使用され得る。

【0125】

好ましい実施形態において、2つ以上のサンプル由来のcDNAが同じPCR反応において増幅される。各々の標的cDNA分子は、共通のプライマーおよびサンプル特異的なプライマーで増幅され、異なるサンプル由来のcDNAを、同じ共通のプライマーに対して競合するようにする。この競合のために、2つのサンプル由来の増幅産物の量の比は、2つのサンプルの各々における最初の標的ポリヌクレオチドの量の比を反映する。サンプルA由来のシグナルの量のサンプルBのそれに対する比が1であるというのは、サンプル中の標的ポリヌクレオチドの最初の量が同量であることを表し、つまり2つのサンプルにおいて標的ヌクレオチドの発現に差がないということである。A/Bの比が1より大きいというのは、サンプルAにおける標的ポリヌクレオチドの量がサンプルBにおけるものよりも多いことを表す。A/Bの比が1より小さいというのは、サンプルAにおける標的ポリヌクレオチドの量がサンプルBにおけるものよりも少ないことを表す。比が1より大きいかまたは小さい場合、標的ポリヌクレオチドは2つのサンプルにおいて異なった発現をしている。同種の生物由来の2つのサンプルに存在する多くのポリヌクレオチドのレベルがほぼ似ていることが予想され、こ

10

20

30

40

50

れは、単一種の同じメンバーまたは異なるメンバーのどちらか由来の2つのサンプル間で比較したほとんどの遺伝子産物について1に近い比をもたらす。本発明の実施において、異なるサンプル由来の同じ遺伝子に対するシグナルに関して、比が2より大きいかまたは0.5より小さいポリヌクレオチドは、2つのサンプルにおいて異なる発現をするポリヌクレオチドであると考えられる。

【0126】

1つの個体からの異なる組織由来の2つのサンプル間または同種の2つの個体由来のサンプル間の発現における違いは、大抵、比較的少数の遺伝子に限定される。従って、本発明に記載する比較方法の能力は、ほとんどの遺伝子において類似した発現のバックグラウンドの中からわずかな個々の遺伝子における違いを解明する能力にある。

10

【0127】

組織間または同種の個体間における大部分の遺伝子の発現の類似性もまた利点として利用できる。2つのサンプルにおける特定のポリヌクレオチドの比が一般的な比 (common ratio) に対してさらに測定され得ることで、2つのサンプル間で発現が異なるか否かを判定するようにする。本明細書で使用する用語「一般的な比」は、2つのサンプル間で発現するすべての遺伝子の相対的な一定の比を意味する。一般的な比の変化は、未処理のサンプルと比較した処理したサンプルにおける特定のシグナル伝達経路の活性化等の特定の事象によって引き起こされる特定の変化というよりはむしろ、開始材料の総量における広範囲の変化を反映する。特定の遺伝子の発現比をこの一般的な比と比較することによって、その特定の遺伝子の発現が比較するサンプル間で異なるか否かが即時に明らかとなるだろう。

20

【0128】

2つのサンプルが別々のPCR反応において増幅される場合、内部対照が各PCR増幅物について提供され得、そして各サンプルの増幅物はまず、比を計算する前に内部対照に対して標準化される。定量PCRのための内部対照の使用は当技術分野においてよく知られており、例えばAusubelらに記載される。対照には2つの基本型がある：1つ目は、一般的に外在性対照 (exogenous control) として知られ (Gillilandら(1990) PCR Protocols, Innisら編集, pp. 60-69, Academic Press; Wangら(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9717-9721、これら双方は明確に参照により本明細書に組み入れる)、そして2つ目は内在性対照 (endogenous control) として知られる (Dvekslerら(1992) PCR Methods and Applications 6:283-285; Spanakis(1993) Nucleic Acids Research 21:3809-3819、これら双方は明確に参照により本明細書に組み入れる)。

30

【0129】

外在性対照は、人為的に誘導した核酸分子を使用することを含み、これは抽出ステップまたはPCRステップに、既知の濃度で添加される。定量のための内部標準として働くようにするために外在性核酸を既知の濃度で添加するという概念は、Chellyら(1988)Nature 33:858-860に記載され、これは明確に参照により本明細書に組み入れる。標的配列と同じプライマーで増幅された対照の断片を使用することは、内部標準に対する標的配列の増幅効率をより正確に反映する (例えば、WO 93/02215; WO 92/11273; 米国特許5,213,961号および5,219,727号を参照、これらすべては参照により本明細書に組み入れる)。類似の方法が、NASBA (Kievitsら, 1991, J Virol Methods. 35:273-86) またはSDA (Walker, 1994, Nucleic Acids Res. 22:2670-7) 等の等温増幅反応を用いた核酸の定量計測に有効であることが証明されてきた。

40

【0130】

内在性対照を使用することにより、抽出効率における変動を補正することができる。対照の選択は、いくつかの必要条件がそれが機能するのに適合しなくてはならないということにおいて重要である。第1の必要条件は、対照のコピー数が一定に維持されなくてはならないことである。第2の必要条件は、対照がモニターされる配列と類似した効率で増幅されなくてはならないことである。いくつかの構成的に発現する遺伝子が対照の候補として考えられてきたのは、これらの遺伝子の発現が様々な条件を通して比較的一定であるた

50

めである。例示は、 β -アクトチン遺伝子、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (GAPDH) および16SリボソームRNA遺伝子を含むが、これらに限定されない。

【実施例】

【0131】

実施例1. 1回の増幅反応における複数の増幅産物の定量的検出

サンプルDNA構築物 : pcDNA3ベクター (Invitrogen) 内にクローニングされたDNA断片を、フォワードプライマー (5'-ATCGAAATTAATACGACTCACTAT-3') およびリバースプライマー (5'-AGCTCTAGCATTCTAGGTGACACTA-3') を用いたPCR反応において増幅させた。増幅されたDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって精製し、そして精製キット (Qiagen) を用いてゲルから抽出した。独自の配列タグを含む相当するRNA断片を、T7 RNAポリメラーゼ転写キット (Invitrogen) を用いて調製し、そして「RNA Easy」RNA精製キット (Qiagen) によって精製した。RNA断片の濃度は、SmartSpec 3000分光光度計 (Bio-Rad) において計測した。

10

【0132】

固形担体に共有結合したオリゴヌクレオチドの調製 : オリゴヌクレオチドTJLF (5'-AATTCCGCGCCGAATAATATTAAGCTCTAGCATTCTAG-3') および (5'-AATTCCGCGCGATTATTTATTAGCTCTAGCATTAG-3') は、配列タグLFAM 2 (5'-CCGCGCCGAATAATATTA-3') およびLROX (5'-CCCGCGCGATTATTTATTA-3') ならびに5'チオール修飾を含み、ヨードアセチル基を含むポリマービーズに結合させた。オリゴヌクレオチド (12.5 μ M) を、5 \times TEバッファー (50mM Tris, 5mM EDTA, pH8.0) および200 μ M TCEP (Molecular probes) で前洗浄した200 μ lのThiolink beads (Pierce) と共に、1時間、室温で一定の攪拌を行いながらインキュベートした。未反応のヨードアセチル基は、1% β -メルカプトエタノールで室温においてインキュベートすることによりクエンチした。ビーズを5 \times TEバッファーで4回、5 \times TEで75 $^{\circ}$ Cにて2回洗浄し、RT (逆転写) バッファーで室温にて1回洗浄し、そしてRTバッファーで95 $^{\circ}$ Cにて2回洗浄した (すべての洗浄は1mlのバッファーで)。調製されたビーズは、RTバッファー中に50%懸濁液となるように作成した。

20

【0133】

逆転写反応 : 10 μ lの修飾化ビーズ (TJLFまたはTJLR1) を1 μ lのdNTP (10mM)、1 μ lのサンプルRNA (VS31 (53pg) およびVS67 (1.1pg)、TJLFビーズ、VS68 (0.058pg) およびVS67 (0.094pg)、TJLR1ビーズ) と混合し、70 $^{\circ}$ Cで5分間加熱して4 $^{\circ}$ Cで冷却し、そして10 μ lの反応混合液 (4倍に希釈した1 μ lのSuperscript reverse transcriptase (Invitrogen)、2 μ lの0.1M DTT、4 μ lの5 \times 反応バッファー (Invitrogen)、10 μ lの水) を添加した。反応混合液は、42 $^{\circ}$ Cで1時間、65 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートした。RNAは、3.5 μ lの0.5M NaOHを添加して65 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した後3.5 μ lの1M Tris (pH7.5) を添加することによって加水分解した。ビーズを100 μ lのPCRバッファーで洗浄した。

30

【0134】

第2鎖合成 : 10 μ lのPCRバッファー (Pwo DNAポリメラーゼ (Roche) のためのもの)、2mlの25mM MgCl₂、2 μ lの10mM dNTP、0.5 μ lのPwo DNAポリメラーゼ (Roche)、0.5 μ lのHot-Start Taqポリメラーゼ (Qiagen)、1 μ lの100 μ M オリゴヌクレオチド (LHA (5'-CCATACGACGTCCCAGACTA-3')、サンプルRNAの5'末端に存在する配列と一致する) を含み、水により100 μ lとした100 μ lの反応混合液を10 μ lのビーズと混合し、95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱して、2回の反応サイクル (95 $^{\circ}$ Cで30秒、56 $^{\circ}$ Cで30秒、72 $^{\circ}$ Cで2分間) にかけた。ビーズを100 μ lのPCRバッファーで洗浄し、そして50 μ lの同じバッファーで溶出した。

40

【0135】

PCR増幅 : PCR反応は、以下のように組み立てられる : 20 μ lの合成DNA、8 μ lの10 \times PCRバッファー、3.2 μ lの25mM MgCl₂、0.8 μ lの100 μ M LHAプライマー、1 μ lの100 μ M LFAMプライマー (FAMで5'標識された、5'-CCGCGCCGAATAATATTA-3') およびLROXプライマー (Roxで5'標識された、5'-CCCGCGCGATTATTTATTA-3')、0.5 μ lのTaqポリメラーゼ、0.5 μ lのPwoポリメラーゼ、2 μ lの10mM dNTP、65 μ lの水 ; ミネラルオイルで重層し、35サイクル (95 $^{\circ}$ Cで30秒、60 $^{\circ}$ Cで15秒、72 $^{\circ}$ Cで1分30秒) に渡って増幅した。15サイクル目から、反応を各サイクルの最終ステップの後に中断して、10 μ lの一定分量を採取し、反応物を1

50

0 μ lの反応混合物（サンプルDNA以外は上記と同じ組成）で補充した。サンプルに1 μ lの50 \times TEバッファーを添加し、ホルムアミドで10倍希釈して、96キャピラリー電気泳動システム（Spectrumedix）で解析を実施する前に、95 $^{\circ}$ で5分間変性させた。PCR産物の定量は、対応する泳動のクロマトグラムにおけるピーク面積の積分によって測定した。図7に示す増幅曲線は、PCR産物量をサイクル数に対してプロットすることで再現した。

【0136】

実施例2．既知量のサンプルRNAを用いた異なる発現の解析

対照RNAの2つのサンプルをヌクレアーゼ非含有水中で調製した：

サンプル1：VS31 RNA 53pg/ μ lおよびVS32 RNA 42pg/ μ lを含み、

サンプル2：VS31 RNA 53pg/ μ lおよびVS32 RNA 102pg/ μ lを含む。

10

【0137】

3 μ lの各サンプルを、1.25 μ lの20mM dNTP、1 μ lの100 μ Mプライマー（サンプル1に対してJLFam(5'-CCGCGCCGAATAATATTAAGCTCTAGCATTTAG-3')、およびサンプル2に対してJLRox1(5'-CCC GCGGATTATTTATTAGCTCTAGCATTTAG-3')）ならびにヌクレアーゼ非含有水と混合して10 μ lとした。RNAを80 $^{\circ}$ で2分間に渡り変性させ、氷上で冷却した。15 μ lの反応混合液を添加して、42 $^{\circ}$ で1時間インキュベートした。

【0138】

RT反応混合液：

5 \times バッファー	5 μ l	
0.1mM DTT	2.5 μ l	
Superscript II RT (200 U/ μ l)	0.5 μ l	(RNAの量によって25 ~ 100 U)
80%トレハロース	6.4 μ l	
10mg/ml BSA	0.5 μ l	
SUPERase In (20 U/ μ l)	1 μ l	

20

【0139】

RT反応の最終組成：RNA, 50mM Tris-HCl, pH8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10 μ M DTT, 50U SS II RT, 20%トレハロース, 0.25mg/ml BSA, 1mM dNTP, 15.7%グリセロール, 5 μ Mプライマー, 1U SUPERase In

【0140】

RNAの分解：

1UのRNAseH (Invitrogen) を各々のチューブに添加して、37 $^{\circ}$ で20分間インキュベートした後に、75 $^{\circ}$ で15分間インキュベートして、RNAse Hを失活させた。5 μ l EXO-SAP-ITヌクレアーゼ (USB) をRT反応液に添加し、37 $^{\circ}$ で20分間インキュベートして未使用のプライマーを分解することにより後のPCR解析における干渉を回避し、次に80 $^{\circ}$ で15分間インキュベートすることにより酵素を失活させた。

30

【0141】

第2鎖合成：

5 μ lのRT反応液をSSS反応混合液と混合した：

10 \times Vent バッファー	5.0 μ l	
20mM dNTP	0.5 μ l	
DMSO	1.0 μ l	
Q液	10 μ l	
100 μ M-HA	0.5 μ l	
Ventポリメラーゼ	0.5 μ l	Vent DNAポリメラーゼ (New England Biolabs)
水	27.5 μ l	

40

【0142】

第2鎖は、記載するようにサーモサイクラーにおいて調製した。

1 \times 94 /5分* 50 /5分** 68 /5分* *94 で第2鎖プライマーを添加

2 \times 95 /2分 40 /5分 68 /5分 **72 でVentを添加

1 \times 72 /10分

50

【 0 1 4 3 】

PCR増幅：

20 μ l の調製cDNAを下記のものと混合した：

10 x Vent バッファー	7.0 μ l	
20mM dNTP	0.7 μ l	
DMSO	4 μ l	
Q液 (Qiagen)	15.0 μ l	
LHA (100mM)	0.8 μ l	
LFAM2プライマー (100mM)	1 μ l	(Fam(Applied Biosystems)で5' 標識されている)
LROXプライマー (100mM)	1 μ l	(Rox(Applied Biosystems)で5' 標識されている)
Taqポリメラーゼ (Qiagen)	0.5 μ l	
Ventポリメラーゼ	0.5 μ l	
水	全量を100 μ lとする	

10

【 0 1 4 4 】

反応混合液をミネラルオイルで重層し、35サイクルに渡りPCR増幅にかけた(95 で30秒、60 で15秒、72 で1分30秒)。15サイクル目から、反応を各サイクルの最終ステップの後に中断して、10 μ l の一定分量を採取し、反応物を10 μ l の反応混合物(サンプルDNA以外は上記と同じ組成)で補充した。サンプルに1 μ l の50 x TEバッファーを添加し、ホルムアミドで10倍に希釈して、標識したDNAサイズ標準(50 ~ 1000bp, Bio Ventures)と混合し、そして96キャピラリー電気泳動システム(Spectrumedix)で解析を実施する前に95 で5分間変性させた。PCR産物の定量は、対応する泳動のクロマトグラムにおけるピーク面積の積分によって測定し、共注入した標準の量によって標準化した。図8に示す増幅曲線は、PCR産物量をサイクル数に対してプロットすることで再現した。データは予想された結果と一致しており、つまり、VS31 RNA(図におけるRNA 1)に対する閾値サイクル数(C_t)がサンプル間で等しく、そしてVS32 RNA(図におけるRNA 2)については、サンプル2に対する C_t がサンプル1に対する C_t より小さい。

20

【 0 1 4 5 】

本発明の実行が採用するのは、特記しない限り、分子生物学、微生物学および組み換えDNA技術の従来技術であり、それらは当技術分野の範囲内である。そのような技術は、文献にすべて開示されている。例えば、Sambrook, FritschおよびManiatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, 編, 1984); Polynucleotide Hybridization (B.D. HarnesおよびS.J. Higgins, 編, 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal, 1984); ならびにシリーズ, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Short Protocols In Molecular Biology, (Ausubelら, 編, 1995)を参照せよ。本明細書に記載するすべての特許、特許出願および出版物は、上記および下記の双方ともに、参照により本明細書に組み入れる。

30

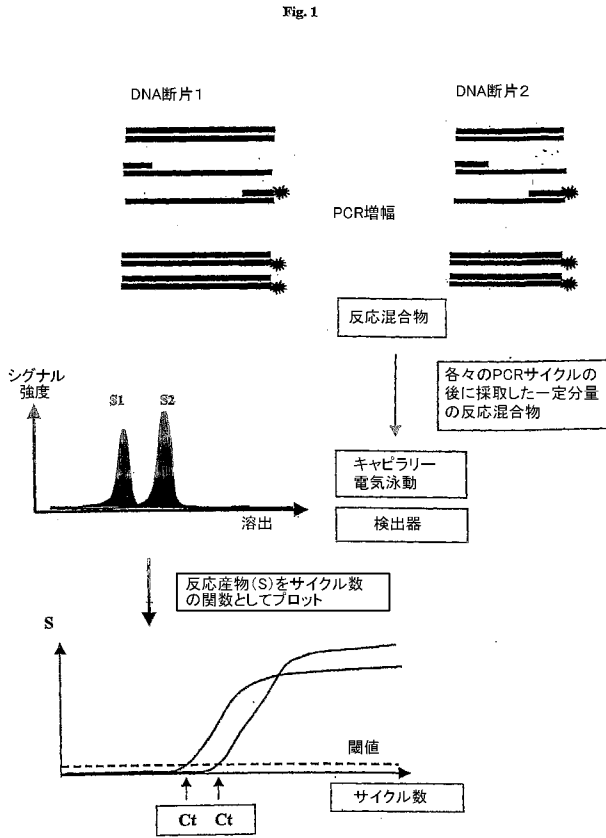
【 0 1 4 6 】

他の実施形態

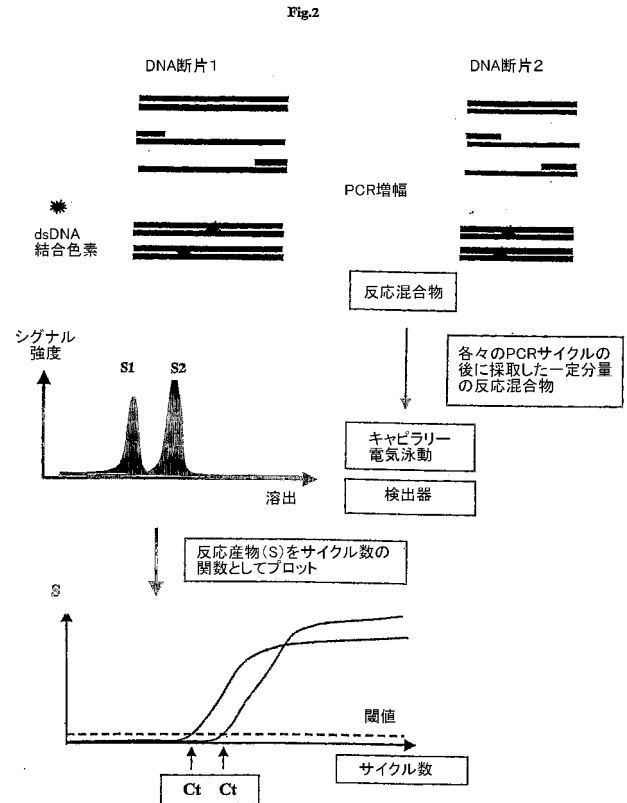
本発明が、その好ましい実施形態に関して特に示され、そして記載されると同時に、添付の特許請求の範囲によって包含される本発明の範囲から逸脱することなく、形式および詳細における様々な変更がなされることが、当業者によって理解されるであろう。

40

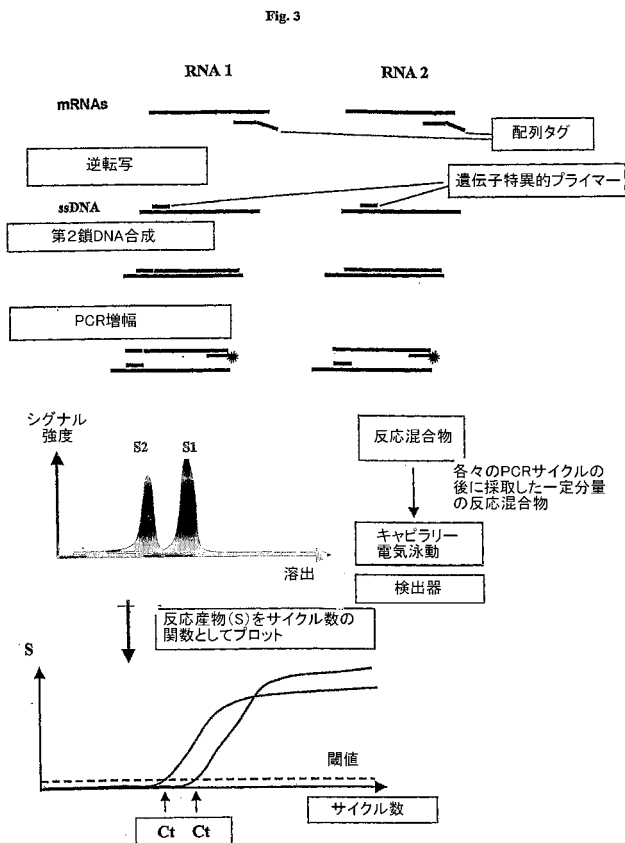
【 図 1 】



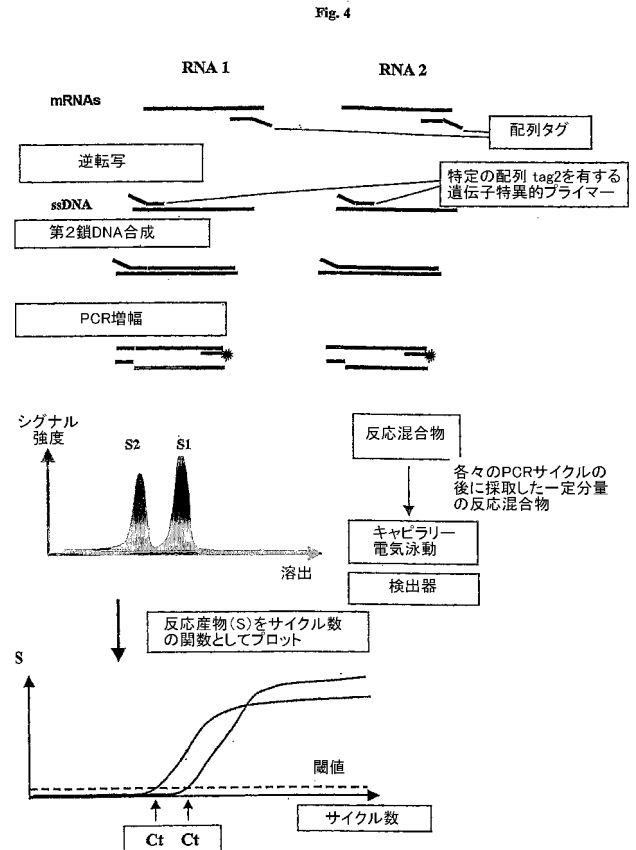
【 図 2 】



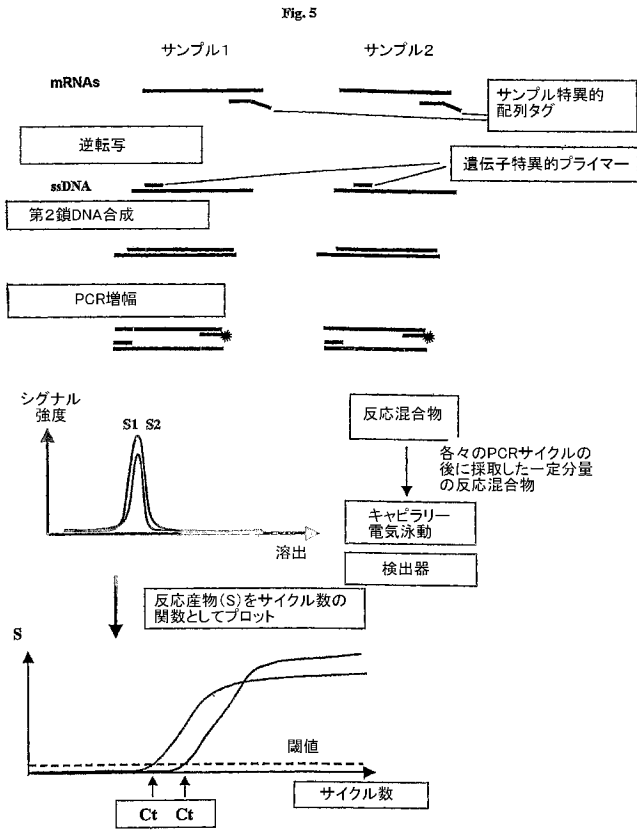
【 図 3 】



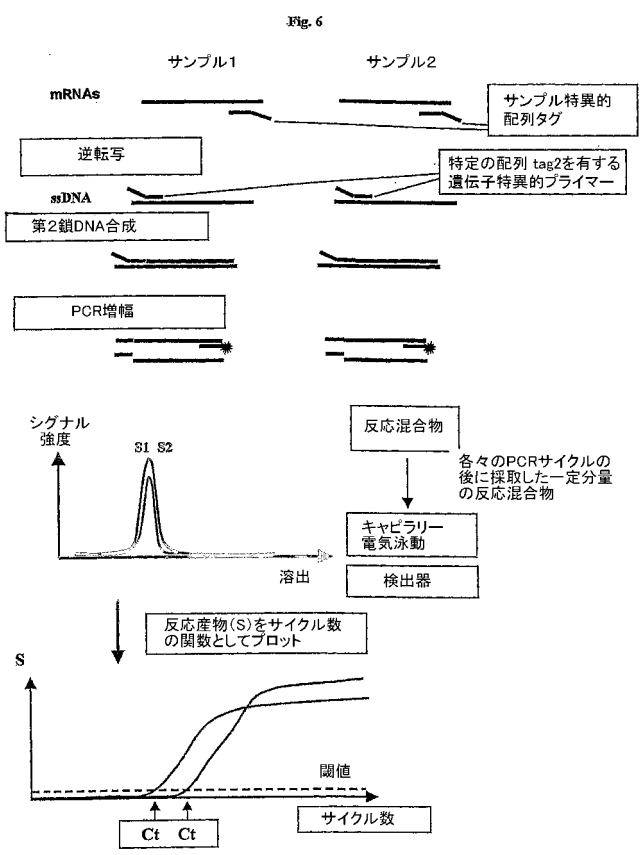
【 図 4 】



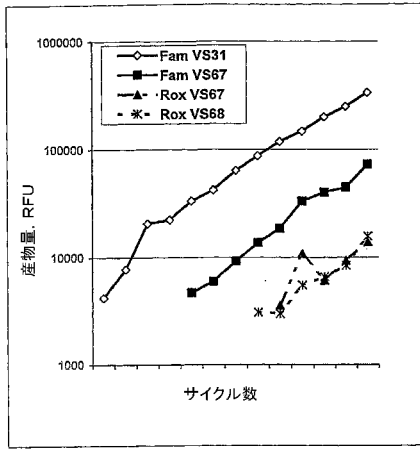
【 図 5 】



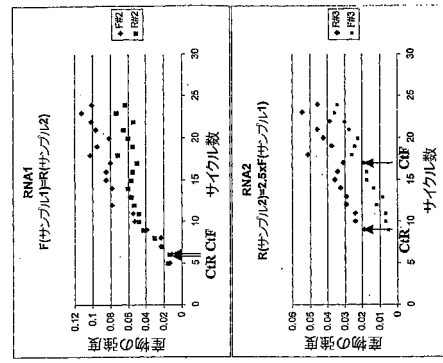
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



定量的差異のリカバリー

2つの異なるRNAを含む2つのサンプル

サンプル1 サンプル2

VS31 等濃度

VS32 サンプル2において2.54倍多い

予想される結果:

RNA1

両サンプルについての閾値サイクル(Ct)は等しい

RNA2

サンプル2(R)についての閾値サイクル(Ct)は、サンプル1(F)についての閾値サイクル(Ct)より小さい

【配列表】

2013099332000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成24年12月12日(2012.12.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも4つの異なる、対象となる核酸配列の増幅をモニタリングする方法であって

(a) 反応容器内で核酸サンプルを少なくとも4組のオリゴヌクレオチドプライマー対と接触させるステップであって、

各々の前記対は、前記対象となる核酸配列を含有する核酸分子と特異的にハイブリダイズする第1のオリゴヌクレオチドプライマー、および前記対象となる核酸配列の相補物に含まれる配列と特異的にハイブリダイズする第2のオリゴヌクレオチドプライマーを含み、1つのオリゴヌクレオチドプライマーのプライマー伸長産物は、その相補物から解離した場合、他のプライマーの伸長産物の合成のための鑄型となることができ、

各々の前記オリゴヌクレオチドプライマー対は、対象となる核酸配列の1つに特異的であり、

前記少なくとも4組のオリゴヌクレオチドプライマー対のうちの各々のオリゴヌクレオチドプライマー対を選択することで、後の増幅処理において、区別可能なサイズの増幅産物が得られるようにし、そして

各々の前記オリゴヌクレオチドプライマー対における1つのオリゴヌクレオチドプライマーは検出できるように標識される、
ステップと、

(b) 前記ステップ(a)で得られた混合物を、核酸鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニリング、およびアニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長の反復サイクルを少なくとも2回含む増幅処理にかけるステップであって、前記増幅処理中において、複数回の前記反復サイクルの後に、前記混合物の一定分量を前記反応容器から採取して、前記一定分量中の核酸分子を分離し、そして採取した一定分量と同量の、前記核酸サンプルを含まず、かつ前記プライマー、ヌクレオチドおよびポリメラーゼを含む反応混合物を、一定分量で補充するステップと、

(c) 前記一定分量中に存在する区別可能なサイズのプライマー伸長産物における検出可能な標識の取り込みを検出するステップであって、前記検出が、サイクリング処理と同時に実施され、かつ前記少なくとも4つの対象となる核酸配列の増幅のリアルタイムプロフィールを提供するステップと、

(d) ステップ(c)で検出された、区別可能なサイズのプライマー伸長産物のそれぞれについて、サイクル数 C_t を算出するステップであって、プライマー伸張産物の量が予め定義された閾値と交差し、閾値サイクル数と前記サンプル中の標的核酸の量とを関連づけるステップ

とを含む、方法。

【請求項2】

前記検出可能な標識が、吸光色素、蛍光色素または放射性標識を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記検出可能な標識が蛍光色素を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記増幅処理における各々のサイクルの後に一定分量が採取され、そして前記一定分量中の核酸分子が分離および検出される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

核酸分子の分離がキャピラリー電気泳動を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記サンプルが逆転写反応の産物を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ステップ (a) ~ (c) が、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記モジュール装置がロボットアームを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記モニタリングが、前記サンプル中の前記少なくとも 4 つの対象となる核酸配列を含む核酸の存在量の測定を可能にする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

少なくとも 4 つの異なる、対象となる核酸配列の増幅をモニタリングする方法であって

(a) 鋳型核酸サンプルにアニールした逆転写プライマーの伸長によって、複数の逆転写産物を合成するステップであって、各々の前記逆転写産物は前記逆転写プライマーに含まれる共通配列タグを含むステップと、

(b) 反応容器内で前記逆転写産物を、

(i) 前記少なくとも 4 つの対象となる核酸配列を認識する少なくとも 4 つのオリゴヌクレオチドプライマーであって、各々のオリゴヌクレオチドプライマーは、後の増幅処理において区別可能なサイズの増幅産物を生成するように選択される、オリゴヌクレオチドプライマー、および

(ii) 前記共通配列タグを含む、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマ

ーと接触させるステップと、

(c) 前記ステップ (b) から得られた混合物を、核酸鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニーリング、およびアニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長の反復サイクルを少なくとも 2 回含む増幅処理にかけるステップであって、前記増幅処理中において、複数回の前記反復サイクルの後に、前記混合物の一定分量を前記反応容器から採取して、前記一定分量中の核酸分子を分離し、そして採取した一定分量と同量の、前記核酸サンプルを含まず、かつ前記プライマー、ヌクレオチドおよびポリメラーゼを含む反応混合物を一定分量で補充するステップと、

(d) 前記一定分量中に存在する区別可能なサイズのプライマー伸長産物における前記検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマーの取り込みを検出するステップであって、前記検出が、サイクリング処理と同時に実施され、かつ前記少なくとも 4 つの対象となる核酸配列の増幅のプロフィールを提供するステップと、

(e) ステップ (d) で検出された、区別可能なサイズのプライマー伸長産物のそれぞれについて、サイクル数 C_i を算出するステップであって、プライマー伸張産物の量が予め定義された閾値と交差し、閾値サイクル数と前記サンプル中の標的核酸の量とを関連づけるステップとを含む、方法。

【請求項 11】

前記検出可能な標識が、吸光色素、蛍光色素または放射性標識を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記検出可能な標識が蛍光色素を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記増幅処理における各々のサイクルの後に一定分量が採取され、そして前記一定分量中の核酸分子が分離および検出される、請求項 1 0に記載の方法。

【請求項 1 4】

一定分量の採取、分離および検出のステップが、前記増幅のリアルタイムモニタリングを可能にする、請求項 1 0に記載の方法。

【請求項 1 5】

核酸分子の分離がキャピラリー電気泳動を含む、請求項 1 0に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記ステップ (a) ~ (d) が、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される、請求項 1 0に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記モジュール装置がロボットアームを含む、請求項 1 6に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記モニタリングが、前記サンプル中の前記少なくとも 4 つの対象となる核酸配列を含む核酸の存在量の測定を可能にする、請求項 1 0に記載の方法。

【請求項 1 9】

少なくとも 4 つの異なる、対象となる核酸配列の増幅をモニタリングする方法であって

(a) 鋳型核酸サンプルにアニールした逆転写プライマーの伸長によって、複数の逆転写産物を合成するステップであって、各々の前記逆転写産物は前記逆転写プライマーに含まれる第 1 の共通配列タグを含むステップと、

(b) 第 2 の共通配列タグを含むオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、相補的 c D N A 鎖を合成するステップであって、各々のオリゴヌクレオチドプライマーを選択することで、後の増幅処理において区別可能なサイズの増幅産物を生成するようにするステップと、

(c) 反応容器内で前記ステップ (a) および (b) の核酸合成産物を、前記第 1 および第 2 の共通配列タグを含むオリゴヌクレオチドを含む少なくとも 4 つのオリゴヌクレオチドプライマと接触させるステップであって、前記第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドの 1 つは検出可能に標識されているステップと、

(d) 前記ステップ (c) から得られた混合物を、核酸鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニリング、およびアニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長の反復サイクルを少なくとも 2 回含む増幅処理にかけるステップであって、前記増幅処理中において、複数回の前記反復サイクルの後に、前記混合物の一定分量を前記反応容器から採取して、前記一定分量中の核酸分子を分離し、そして採取した一定分量と同量の、前記核酸サンプルを含まず、かつ前記プライマー、ヌクレオチドおよびポリメラーゼを含む反応混合物を一定分量で補充するステップと、

(e) 前記一定分量中に存在する区別可能なサイズのプライマー伸長産物における前記検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマーの取り込みを検出するステップであって、前記検出が、サイクリング処理と同時に実施され、かつ前記少なくとも 4 つの対象となる核酸配列の増幅のプロフィールを提供するステップと、

(f) ステップ (e) で検出された、区別可能なサイズのプライマー伸長産物のそれぞれについて、サイクル数 C_i を算出するステップであって、プライマー伸張産物の量が予め定義された閾値と交差し、閾値サイクル数と前記サンプル中の標的核酸の量とを関連づけるステップ

とを含む、方法。

【請求項 2 0】

前記検出可能な標識が、吸光色素、蛍光色素または放射性標識を含む、請求項 1 9に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記検出可能な標識が蛍光色素を含む、請求項 2 0に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記増幅処理における各々のサイクルの後に一定分量が採取され、そして前記一定分量中の核酸分子が分離および検出される、請求項 1 9に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記一定分量の採取、分離および検出のステップが、前記増幅のリアルタイムモニタリングを可能にする、請求項 1 9に記載の方法。

【請求項 2 4】

核酸分子の分離がキャピラリー電気泳動を含む、請求項 1 9に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記ステップ (a) ~ (d) が、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される、請求項 1 9に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記モジュール装置がロボットアームを含む、請求項 2 5に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記モニタリングが、前記サンプル中の前記少なくとも 4 つの対象となる核酸配列を含む核酸の存在量の測定を可能にする、請求項 1 9に記載の方法。

【請求項 2 8】

少なくとも 4 つの異なる、核酸配列の増幅をモニタリングする方法であって、

(a) 逆転写産物のセット中に存在する少なくとも 4 つの異なる核酸配列を増幅するステップであって、

前記増幅は、鎖の解離、オリゴヌクレオチドプライマーのアニールリング、およびアニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長の少なくとも 2 回のサイクルの処理を含み、

前記セット中の各々の逆転写産物は、逆転写プライマーの伸長によって作製されたものであり、

前記逆転写産物のセットは、逆転写産物の 1 つ以上のサブセットを含み、ここで、各々のサブセットは 1 つの核酸サンプル由来の少なくとも 4 つの逆転写産物を含み、逆転写産物の各々のサブセットのメンバーは、前記逆転写プライマー内に取り込まれたサンプル特異的な配列タグを含み、

かつ、

前記増幅は、前記逆転写産物のセットを、以下のオリゴヌクレオチドプライマー：

(i) 少なくとも 4 つの遺伝子特異的プライマーのセットであって、前記セット中の各々の前記遺伝子特異的プライマーは、核酸サンプル中で発現する特定の核酸配列を認識し、かつ、前記セット中の各々の前記遺伝子特異的プライマーを選択することで、前記セット中の他の遺伝子特異的プライマーと共に生成する増幅産物とサイズで区別可能な増幅産物を生成するようにする、遺伝子特異的プライマーのセット、および

(i i) サンプル特異的なプライマーのセットであって、各々のサンプル特異的なプライマーは、前記逆転写プライマー内に取り込まれたサンプル特異的なタグに特異的にハイブリダイズし、かつ、前記サンプル特異的なプライマーのセット中の各々のサンプル特異的なプライマーは、識別可能に標識されている、サンプル特異的なプライマーのセットの 2 つのセットと接触させることを含む、ステップと、

(b) 前記処理中において、プライマー伸長ステップの後に、増幅混合物の一定分量を採取し、前記一定分量中の核酸を分離するステップと、

(c) 前記一定分量中の各々のサンプル特異的なプライマーの取り込みを検出するステップであって、前記検出は、各サンプルにおいて、前記遺伝子特異的プライマーのセットによって認識される少なくとも 4 つの核酸のセットの増幅をリアルタイムでモニターするステップと、

(d) ステップ (c) で検出された、各サンプル中の区別可能なサイズの増幅産物のそれぞれについて、サイクル数 C_t を算出するステップであって、増幅産物の量が予め定義さ

れた閾値と交差し、閾値サイクル数と前記サンプル中の標的核酸の量とを関連づけるステップ

とを含む、方法。

【請求項 29】

前記一定分量を採取し、前記一定分量中の核酸を分離し、そしてプライマー伸長産物を検出する前記ステップが、前記増幅処理中の各々のサイクルの後に実施される、請求項 28に記載の方法。

【請求項 30】

前記サンプル特異的プライマーが、蛍光色素、吸光色素または放射性標識で識別可能に標識されている、請求項 28に記載の方法。

【請求項 31】

前記サンプル特異的プライマーが、蛍光色素で識別可能に標識されている、請求項 30に記載の方法。

【請求項 32】

核酸分子の分離がキャピラリー電気泳動を含む、請求項 28に記載の方法。

【請求項 33】

前記ステップ (a) ~ (c) が、サーマルサイクラー、サンプリング装置、キャピラリー電気泳動装置および蛍光検出器を含むモジュール装置において実施される、請求項 28に記載の方法。

【請求項 34】

前記モジュール装置がロボットアームを含む、請求項 33に記載の方法。

【請求項 35】

前記モニタリングが、前記逆転写産物が作製されたサンプル中の前記少なくとも 4 つの対象となる核酸配列を含む核酸の存在量の測定を可能にする、請求項 28に記載の方法。

フロントページの続き

(72)発明者 スレブネブ、 ヴラジミール アイ .

アメリカ合衆国 0 2 4 6 1 マサチューセッツ州 ニュートン ディッカーマン ロード 5 7

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 HA14

4B063 QA01 QA18 QQ42 QR32 QR62 QS24 QS34 QX02 QX07

【外国語明細書】

TITLE OF THE INVENTION
REAL TIME GENE EXPRESSION PROFILING

BACKGROUND

The Polymerase Chain Reaction (PCR), with its sensitive and selective amplification of specific nucleic acid sequences has become a research tool of almost unparalleled importance, with applications in, for example, cloning, gene expression analysis, DNA sequencing, genetic mapping and diagnostics.

While one of the major attributes of the PCR process is its speed, often amplifying target sequences within minutes to hours, there is a need for real-time monitoring of PCR reactions. This is especially true for quantitative PCR methods, which seek to correlate the abundance of a detectable PCR product with the abundance of the template in the sample from which it was amplified. In those methods, because PCR amplification reaches a plateau or stationary phase in which the abundance of product no longer reflects the abundance of original template, and because sequence-specific variations in amplification efficiency are magnified by the process itself, it is often important to be able to visualize the amount of a target product at a given point in the amplification.

Moreover, real time monitoring of an amplification reaction permits far more accurate quantification of starting target DNA concentrations in multiple-target amplifications, because the relative values of close concentrations can be resolved by taking into account the history of the relative concentration values during the reaction. Real time monitoring also permits the efficiency of the amplification reaction to be evaluated, which can indicate whether reaction inhibitors are present in a sample.

Holland et al. (1991, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 7276-7280), U.S. Pat. No. 5,210,015 and others have disclosed fluorescence-based approaches to provide real time measurements of amplification products during PCR. Such approaches have either employed intercalating dyes (such as ethidium bromide) to indicate the amount of double-stranded DNA present or they have employed probes containing fluorescence-quencher pairs (also referred to as the "Taq-Man" approach) where the probe is cleaved during amplification to release a fluorescent molecule the concentration of which is proportional to the amount of double-stranded DNA present. During amplification, the probe is digested by the nuclease activity of a polymerase when hybridized to the target sequence to cause the fluorescent molecule to be

separated from the quencher molecule, thereby causing fluorescence from the reporter molecule to appear.

The Taq-Man approach uses an oligonucleotide probe containing a reporter molecule - quencher molecule pair that specifically anneals to a region of a target polynucleotide "downstream", i.e. in the direction of extension of primer binding sites. The reporter molecule and quencher molecule are positioned on the probe sufficiently close to each other such that whenever the reporter molecule is excited, the energy of the excited state nonradiatively transfers to the quencher molecule where it either dissipates nonradiatively or is emitted at a different emission frequency than that of the reporter molecule. During strand extension by a DNA polymerase, the probe anneals to the template where it is digested by the 5' to 3' exonuclease activity of the polymerase. As a result of the probe being digested, the reporter molecule is effectively separated from the quencher molecule such that the quencher molecule is no longer close enough to the reporter molecule to quench the reporter molecule's fluorescence. Thus, as more and more probes are digested during amplification, the number of reporter molecules in solution increases, thus resulting in an increasing number of unquenched reporter molecules which produce a stronger and stronger fluorescent signal.

The other most commonly used real time PCR approach uses the so-called "molecular beacons" technology. This approach is also based upon the presence of a quencher-fluorophore pair on an oligonucleotide probe. In the beacon approach, a probe is designed with a stem-loop structure, and the two ends of the molecule are labeled with a fluorophore and a quencher of that fluorophore, respectively. In the absence of target polynucleotide, the complementary sequences on either end of the molecule permit stem formation, bringing the labeled ends of the molecule together, so that fluorescence from the fluorophore is quenched. In the presence of the target polynucleotide, which bears sequence complementary to the loop and part of the stem structure of the beacon probe, the intermolecular hybridization of the probe to the target is energetically favored over intramolecular stem-loop formation, resulting in the separation of the fluorophore and the quencher, so that fluorescent signal is emitted upon excitation of the fluorophore. The more target present, the more probe hybridizes to it, and the more fluorophore is freed from quenching, providing a read out of the amplification process in real time.

Both the Taq-Man and Beacons technologies are limited in that specialized individual double-labeled probes need to be generated for each gene target sequence.

The ability to “multiplex” (perform analysis of multiple genes in the same amplification reaction) in real-time amplification is limited to the optical separation of the commonly used fluorescence dyes. Typically, the maximal number of genes that can be analyzed in multiplex real-time reaction is limited to 4. In addition, the quantitative analysis often can be complicated by the presence of non-specific products of amplification

Capillary electrophoresis has been used to quantitatively detect gene expression. Rajevic et al. (2001, *Pflugers Arch.* 442(6 Suppl 1):R190-2) discloses a method for detecting differential expression of oncogenes by using Seven pairs of primers for detecting the differences in expression of a number of oncogenes simultaneously. Sense primers were 5' end-labelled with a fluorescent dye and multiplex fluorescent RT-PCR results were analyzed by capillary electrophoresis on ABI-PRISM 310 Genetic Analyzer. Borson et al. (1998, *Biotechniques* 25:130-7) describes a strategy for dependable quantitation of low-abundance mRNA transcripts based on quantitative competitive reverse transcription PCR (QC-RT-PCR) coupled to capillary electrophoresis (CE) for rapid separation and detection of products. George et al., (1997, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 695:93-102) describes the application of a capillary electrophoresis system (ABI 310) to the identification of fluorescent differential display generated EST patterns. Odin et al. (1999, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 734:47-53) describes an automated capillary gel electrophoresis with multicolor detection for separation and quantification of PCR-amplified cDNA.

Omori et al. (2000, *Genomics* 67:140-5) measures and compares the amount of commercially purchased α -globin mRNA by competitive PCR in two independently reverse transcribed cDNA samples using oligo(dT) primers. The oligo(dT) primers share a 3' oligo(dT) sequence and a 5' common sequence. In addition the oligo(dT) primer for each sample also contains a unique 29 nucleotide sequence between the 3' oligo(dT) sequence and the 5' common sequence. After the synthesis of first strand cDNA, PCR is performed to amplify the cDNA using a gene-specific primer and a uniquely labeled primer complementary to the common sequence. The amplified PCR products are then analyzed by spotting onto a detection plate of a fluorescence scanner.

There is a need in the art for real-time PCR methods that permit the visualization of the entire range of products in the PCR reaction. There is a further need in the art for real-time PCR methods that permit the monitoring of the amplification process for multiple amplification

products in the same reaction, as well as a need for methods that monitor the amplification process for multiple products in the same reaction in a sample-specific manner.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention relates to methods of monitoring the amplification of one or more nucleic acid sequences of interest. More particularly, the invention relates to methods of monitoring the amplification of sequences of interest in real time. The methods disclosed herein provide methods for monitoring the amplification of one sequence or two or more sequences from a single sample, as well as methods for monitoring the amplification of one or more than one sequence from two or more samples. The monitoring methods of the invention permit improved determination of the abundance of one or more target nucleic acids, especially target RNA species, in one or more original samples.

The invention encompasses a method for monitoring the amplification of a nucleic acid sequence of interest, the method comprising: (a) contacting a nucleic acid sample with a first and a second oligonucleotide primer, wherein the first oligonucleotide primer specifically hybridizes with a nucleic acid molecule comprising the nucleic acid sequence of interest, and the second oligonucleotide primer specifically hybridizes with the complementary strand of the nucleic acid sequence of interest, wherein the primer extension product of one oligonucleotide primer, when separated from its complement, can serve as a template for the synthesis of the extension product of the other primer, and wherein at least one of the first and the second primers is labeled and preferably, labeled with a detectable marker; (b) subjecting the mixture resulting from step (a) to an amplification regimen, the regimen comprising at least two cycles of nucleic acid strand separation, oligonucleotide primer annealing, and polymerase extension of annealed primers; and (c) removing an aliquot of the mixture, separating nucleic acid molecules in the aliquot, and detecting incorporation of the at least one detectable marker, wherein the removing is performed during the cycling regimen of step (b), following at least one of the cycles, wherein the separating nucleic acid molecules step and the detecting incorporation step is performed in real time during the regimen of step (b) and wherein the detection permits the monitoring of the amplification in real time.

In one embodiment, the detectable label comprises a light-absorbing dye, a fluorescent dye or a radioactive label. In a preferred embodiment, the detectable label comprises a fluorescent dye.

In one embodiment, step (c) is performed after each cycle in the amplification regimen.

In another embodiment, the step of separating nucleic acid molecules comprises capillary electrophoresis.

In another embodiment, the sample comprises products of a reverse-transcription reaction.

In another embodiment, steps (a)–(c) are performed in a modular apparatus comprising a thermal cycler, a sampling device, a capillary electrophoresis device and a fluorescence detector. In a preferred embodiment, the modular device comprises a robotic arm.

In another embodiment, the monitoring permits the determination of the abundance of nucleic acid comprising the sequence of interest in the sample.

The invention further encompasses a method for monitoring the amplification of a set of nucleic acid sequences of interest, the method comprising: (a) contacting a nucleic acid sample in a reaction vessel with a set of pairs of oligonucleotide primers, wherein: each pair comprises a first oligonucleotide primer that specifically hybridizes with a nucleic acid molecule comprising the nucleic acid sequence of interest, and a second oligonucleotide primer that specifically hybridizes with the complementary strand of the nucleic acid sequence of interest, wherein the primer extension product of one oligonucleotide primer, when separated from its complement, can serve as a template for the synthesis of the extension product of the other primer; each pair of oligonucleotides is specific for one nucleic acid sequence of interest; each oligonucleotide primer pair in the set is selected so that it generates a distinctly sized amplification product in a subsequent amplification regimen; and one oligonucleotide in each the pair of oligonucleotides is detectably labeled; (b) subjecting the mixture resulting from step (a) to an amplification regimen comprising at least two iterative cycles of nucleic acid strand separation, oligonucleotide primer annealing and polymerase extension of annealed primers, wherein during the amplification regimen, following at least one of the iterative cycles, an aliquot of the mixture is removed from the reaction vessel and nucleic acid molecules in the aliquot are separated; (c) detecting the incorporation of detectable label in a distinctly sized primer extension product present in the aliquot, wherein the detecting provides a real time profile of the amplification of the nucleic acid sequences of interest.

In one embodiment, the detectable label comprises a light-absorbing dye, a fluorescent dye or a radioactive label. In a preferred embodiment, the detectable label comprises a fluorescent dye.

In one embodiment, an aliquot is removed and nucleic acid molecules in the aliquot are separated and detected after each cycle in the amplification regimen.

In another embodiment, the step of separating nucleic acid molecules comprises capillary electrophoresis.

In another embodiment, the sample comprises products of a reverse-transcription reaction.

In another embodiment, steps (a) –(c) are performed in a modular apparatus comprising a thermal cycler, a sampling device, a capillary electrophoresis device and a fluorescence detector. In a preferred embodiment, the modular apparatus comprises a robotic arm.

In another embodiment, the monitoring permits the determination of the abundance of nucleic acids comprising the set of nucleic acid sequences of interest in the sample.

The invention further encompasses a method of monitoring the amplification of a set of nucleic acid sequences of interest, the method comprising: (a) synthesizing a plurality of reverse transcription products by extension of a reverse transcription primer annealed to a template nucleic acid sample, wherein each of the reverse-transcription products comprises a common sequence tag comprised by the reverse-transcription primer; (b) contacting the reverse-transcription products in a reaction vessel with (i) a set of oligonucleotide primers that recognize the set of nucleic acid sequences of interest, wherein each oligonucleotide primer is selected so that it generates a distinctly sized amplification product in a subsequent amplification regimen, and (ii) a detectably labeled oligonucleotide primer that recognizes the common sequence tag; (c) subjecting the mixture resulting from step (b) to an amplification regimen comprising at least two iterative cycles of nucleic acid strand separation, oligonucleotide primer annealing and polymerase extension of annealed primers, wherein during the amplification regimen, following at least one of the iterative cycles, an aliquot of the mixture is removed from the reaction vessel and nucleic acid molecules in the aliquot are separated; (d) detecting the incorporation of the detectably labeled oligonucleotide primer in a distinctly sized primer extension product present

in the aliquot, wherein the detecting provides a profile of the amplification of the set of nucleic acid sequences of interest.

In one embodiment, the detectable label comprises a light-absorbing dye, a fluorescent dye or a radioactive label. In a preferred embodiment, the detectable label comprises a fluorescent dye.

In one embodiment, an aliquot is removed and nucleic acid molecules in the aliquot are separated and detected after each cycle in the amplification regimen. In a preferred embodiment, for each aliquot removed, a reaction is replenished with an aliquot of reaction mixture (comprising primers, nucleotides and polymerase) to compensate for the volume loss due to sample removal.

In another embodiment, the aliquot removal, separating and detecting steps permit the real-time monitoring of the amplification.

In another embodiment, the step of separating nucleic acid molecules comprises capillary electrophoresis.

In another embodiment, the steps (a)–(d) are performed in a modular apparatus comprising a thermal cycler, a sampling device, a capillary electrophoresis device and a fluorescence detector. In a preferred embodiment, the modular device comprises a robotic arm.

In another embodiment, the monitoring permits the determination of the abundance of nucleic acids comprising the set of nucleic acid sequences of interest in the sample.

The invention further encompasses a method for comparing the expression of a nucleic acid sequence of interest between a set of samples, the method comprising: (a) separately synthesizing a plurality of first strand cDNAs from each member of the set of samples using, for each sample, an oligonucleotide primer comprising a different sample-specific sequence tag; (b) mixing equal amounts of the first strand cDNAs from step (a); (c) contacting the mixture resulting from step (b) in a reaction vessel with oligonucleotide primers comprising: (i) a separate, distinguishably detectably labeled oligonucleotide primer corresponding to each sample-specific sequence tag used in step (a), wherein the primer comprises sufficient sequence comprised by the sample specific sequence tag to permit specific annealing of the primer to a nucleic acid molecule comprising sequence complementary to the sample-specific tag; and (ii) an oligonucleotide primer comprising sufficient sequence complementary to the nucleic acid

sequence of interest to permit specific annealing of the primer to a nucleic acid molecule comprising the sequence of interest; wherein the primers corresponding to the sample-specific sequence tags and the primer comprising sequence complementary to the nucleic acid sequence of interest generate primer extension products that, when separated from their complements, can serve as template for the synthesis of a primer extension product of the other primer; and (d) subjecting the mixture of step (c) to an amplification regimen comprising at least two iterative cycles of strand separation, oligonucleotide primer annealing, and polymerase extension of the annealed primers; (e) removing, during the amplification regimen, following at least one of the iterative cycles, an aliquot from the reaction vessel, separating nucleic acids in the aliquot and detecting primer extension products comprising distinguishably detectably labeled oligonucleotide primer corresponding to each sample-specific sequence tag, wherein the separating nucleic acid molecules and the detecting incorporation is performed in real time during the regimen of step (d) and wherein the detection permits the monitoring of the amplification in real time; (f) comparing the detectable signals from the labels corresponding to the sample-specific tags, thereby comparing the expression of the gene of interest between the samples.

In one embodiment, the detectable label comprises a light-absorbing dye, a fluorescent dye or a radioactive label. In a preferred embodiment, the detectable label comprises a fluorescent dye.

In one embodiment, the steps of removing an aliquot, separating nucleic acids in the aliquot and detecting primer extension products is performed after each cycle in the amplification regimen.

In another embodiment, the step of separating nucleic acid molecules comprises capillary electrophoresis.

In another embodiment, the steps (a)–(c) are performed in a modular apparatus comprising a thermal cycler, a sampling device, a capillary electrophoresis device and a fluorescence detector.

In another embodiment, the modular device comprises a robotic arm.

The invention further encompasses a method of monitoring the amplification of a set of nucleic acid sequences, the method comprising: (a) amplifying a set of nucleic acid sequences

present in a set of reverse-transcription products wherein the amplifying comprises a regimen of at least two cycles of strand separation, oligonucleotide primer annealing and polymerase extension of the annealed primers, wherein each reverse transcription product in the set was made by extension of a reverse-transcription primer, the set of reverse transcription products comprising: one or more subsets of reverse-transcription products, wherein each subset comprises a plurality of reverse-transcription products from a single nucleic acid sample, wherein the members of each subset of reverse-transcription products comprise a sample-specific sequence tag incorporated into the reverse-transcription primer, wherein the amplifying comprises contacting the set of reverse-transcription products with two sets of oligonucleotide primers: (i) a set of gene-specific primers, wherein each gene specific primer in the set recognizes a specific nucleic acid sequence expressed in a nucleic acid sample, and wherein each gene specific primer in the set is selected so as to generate an amplification product that is distinct in size from amplification products generated with other gene specific primers in the set; and (ii) a set of sample specific primers, wherein each sample specific primer specifically hybridizes to a sample specific tag incorporated into a the reverse-transcription primer, and wherein each sample specific primer in the set of sample specific primers is distinguishably labeled; (b) during the regimen, following a primer extension step, removing an aliquot of the amplification mixture and separating nucleic acids in the aliquot; and (c) detecting incorporation of each sample specific primer in the aliquot; wherein the detecting monitors, in each sample, in real time, the amplification of the set of nucleic acids recognized by the set of gene specific primers.

In one embodiment, the detectable label comprises a light-absorbing dye, a fluorescent dye or a radioactive label. In a preferred embodiment, the detectable label comprises a fluorescent dye.

In one embodiment, the steps of removing an aliquot, separating nucleic acids in the aliquot and detecting primer extension products therein is performed after each cycle in the amplification regimen.

In another embodiment, the step of separating nucleic acid molecules comprises capillary electrophoresis.

In another embodiment, the steps (a)–(c) are performed in a modular apparatus comprising a thermal cycler, a sampling device, a capillary electrophoresis device and a

fluorescence detector. In a preferred embodiment, the modular apparatus comprises a robotic arm.

In another embodiment, the monitoring permits the determination of the abundance of nucleic acids comprising the set of nucleic acid sequences of interest in a sample from which said reverse-transcription products are made.

Definitions

As used herein, the term “sample” refers to a biological material which is isolated from its natural environment and containing a polynucleotide. A “sample” according to the invention may consist of purified or isolated polynucleotide, or it may comprise a biological sample such as a tissue sample, a biological fluid sample, or a cell sample comprising a polynucleotide. A biological fluid includes blood, plasma, sputum, urine, cerebrospinal fluid, lavages, and leukophoresis samples. A sample of the present invention may be any plant, animal, bacterial or viral material containing a polynucleotide.

As used herein, an “oligonucleotide primer” refers to a polynucleotide molecule (i.e., DNA or RNA) capable of annealing to a polynucleotide template and providing a 3' end to produce an extension product which is complementary to the polynucleotide template. The conditions for initiation and extension usually include the presence of four different deoxyribonucleoside triphosphates and a polymerization-inducing agent such as DNA polymerase or reverse transcriptase, in a suitable buffer (“buffer” includes substituents which are cofactors, or which affect pH, ionic strength, etc.) and at a suitable temperature. The primer according to the invention may be single- or double-stranded. The primer is single-stranded for maximum efficiency in amplification, and the primer and its complement form a double-stranded polynucleotide. “Primers” useful in the present invention are less than or equal to 100 nucleotides in length, e.g., less than or equal to 90, or 80, or 70, or 60, or 50, or 40, or 30, or 20, or 15, or equal to 10 nucleotides in length.

As used herein, the term “specifically hybridizes” means that under given hybridization conditions a probe or primer hybridizes only to the target sequence in a sample comprising the target sequence. Given hybridization conditions include the conditions for the annealing step in an amplification regimen, i.e., annealing temperature selected on the basis of predicted T_m , and salt conditions suitable for the polymerase enzyme of choice.

As used herein, the term “nucleic acid sequence of interest” or “target sequence” refers to a nucleic acid sequence, in a sample, for which one wishes to determine the presence or abundance. The sequence of interest will most often be a transcript of an RNA expression unit or gene, but can be any nucleic acid sequence, e.g., a sequence comprised in a viral, bacterial, fungal or higher eukaryotic genome, or an artificial or synthetic sequence.

As used herein, the term “amplification regimen” means a process of specifically amplifying the abundance of a nucleic acid sequence of interest. An amplification regimen according to the invention comprises at least two, and preferably at least 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 or more iterative cycles of thermal denaturation, oligonucleotide primer annealing to template molecules, and nucleic acid polymerase extension of the annealed primers. Conditions and times necessary for each of these steps are well known in the art. Amplification achieved using an amplification regimen is preferably exponential, but can alternatively be linear. An amplification regimen according to the invention is preferably performed in a thermal cycler, many of which are commercially available.

As used herein, the term “strand separation” means treatment of a nucleic acid sample such that complementary double-stranded molecules are separated into two single strands available for annealing to an oligonucleotide primer. Strand separation according to the invention is achieved by heating the nucleic acid sample above its T_m . Generally, for a sample containing nucleic acid molecules in buffer suitable for a nucleic acid polymerase, heating to 94°C is sufficient to achieve strand separation according to the invention. An exemplary buffer contains 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8@ 25°C), 0.5 to 3 mM MgCl₂, and 0.1% BSA.

As used herein, the term “primer annealing” means permitting oligonucleotide primers to hybridize to template nucleic acid strands. Conditions for primer annealing vary with the length and sequence of the primer and are based upon the calculated T_m for the primer. Generally, an annealing step in an amplification regimen involves reducing the temperature following the strand separation step to a temperature based on the calculated T_m for the primer sequence, for a time sufficient to permit such annealing. T_m can be readily predicted by one of skill in the art using any of a number of widely available algorithms (e.g., Oligo™, Primer Design and programs available on the internet, including Primer3 and Oligo Calculator). For most amplification regimens, the annealing temperature is selected to be about 5°C below the predicted T_m , although temperatures closer to and above the T_m (e.g., between 1°C and 5°C below the predicted T_m or between 1°C and 5°C above the predicted T_m) can be used, as can

temperatures more than 5°C below or above the predicted T_m (e.g., 6°C below, 8°C below, 10°C below or lower and 6°C above, 8°C above, or 10°C above). Generally, the closer the annealing temperature is to the T_m , the more specific is the annealing. Time of primer annealing depends largely upon the volume of the reaction, with larger volumes requiring longer times, but also depends upon primer and template concentrations, with higher relative concentrations of primer to template requiring less time than lower. Depending upon volume and relative primer/template concentration, primer annealing steps in an amplification regimen can be on the order of 1 second to 5 minutes, but will generally be between 10 seconds and 2 minutes, preferably on the order of 30 seconds to 2 minutes.

As used herein, the term “polymerase extension” means the template-dependent incorporation of at least one complementary nucleotide, by a nucleic acid polymerase, onto the 3' end of an annealed primer. Polymerase extension preferably adds more than one nucleotide, preferably up to and including nucleotides corresponding to the full length of the template. Conditions for polymerase extension vary with the identity of the polymerase. The temperature of polymerase extension is based upon the known activity properties of the enzyme. In general, although the enzymes retain at least partial activity below their optimal extension temperatures, polymerase extension by the most commonly used thermostable polymerases (e.g., Taq polymerase and variants thereof) is performed at 65°C to 75°C, preferably about 68-72°C.

As used herein, the term “aliquot” refers to a sample of an amplification reaction taken during the cycling regimen. An aliquot is less than the total volume of the reaction, and is preferably 0.1-30 % in volume. In one embodiment of the invention, for each aliquot removed, an equal volume of reaction buffer containing reagents necessary for the reaction (e.g., buffer, salt, nucleotides, and polymerase enzyme) is introduced.

As used herein, the term “separating nucleic acid molecules” refers to the process of physically separating nucleic acid molecules in a sample or aliquot on the basis of size or charge. Electrophoretic separation is preferred, and capillary electrophoretic separation is most preferred.

As used herein, the term “real time” means that the measurement of the accumulation of products in a nucleic acid amplification reaction is at least initiated, and preferably completed during or concurrent with the amplification regimen. Thus, for the measurement process to be considered “real time”, at least the initiation of the measurement or detection of amplification products in each aliquot is concurrent with the amplification process. By “initiated” is meant that

an aliquot is withdrawn and placed into a separation apparatus, e.g., a capillary electrophoresis capillary, and separation is begun. The completion of the measurement is the detection of labeled species in the separated nucleic acids from the aliquot. Because the time necessary for separation and detection may exceed the time of each individual cycle of the amplification regimen, there may be a lag in the detection of the amplification products of up to 120 minutes beyond the completion of the amplification regimen. Preferably such lag or delay is less than 30 minutes, e.g., 25 minutes, 20 minutes, 15 minutes, 10 minutes, 5 minutes, 4 minutes, 3 minutes, 2 minutes, 1 minute or less, including no lag or delay.

As used herein, the term “capillary electrophoresis” means the electrophoretic separation of nucleic acid molecules in an aliquot from an amplification reaction wherein the separation is performed in a capillary tube. Capillary tubes are available with inner diameters from about 10 to 300 μm , and can range from about 0.2 cm to about 3 m in length, but are preferably in the range of 0.5 cm to 20 cm, more preferably in the range of 0.5 cm to 10 cm. In addition, the use of microfluidic microcapillaries (available, e.g., from Caliper or Agilent Technologies) is specifically contemplated within the meaning of “capillary electrophoresis.” As used herein, the term “reverse transcription reaction” refers to an in vitro enzymatic reaction in which the template-dependent polymerization of a DNA strand complementary to an RNA template occurs. Reverse transcription is performed by the extension of an oligonucleotide primer annealed to the RNA template, and most often uses a viral reverse-transcriptase enzyme, such as AMV (avian myeloblastosis virus) reverse transcriptase, or MMLV (Moloney murine leukemia virus) reverse transcriptase or thermostable DNA polymerase capable of using RNA as a template (e.g. Tfh DNA polymerase). Conditions and methods for reverse transcription are well known in the art. Exemplary conditions for reverse transcription include the following: for AMV reverse transcriptase – reaction at 37-55°C in buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 0.8 mM dNTPs, 50 units of reverse transcriptase, and 1-5 μg of template RNA and other additives (e.g BSA, glycerol, carbohydrates (glucose, trehalose)); for MMLV reverse transcriptase – reaction at 37-55°C in buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 30 mM KCl, 8 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 0.8 mM dNTPs, 50 units of reverse transcriptase, and 1-5 μg of template RNA and other additives (e.g BSA, glycerol, carbohydrates (glucose, trehalose)).

As used herein, the term “modular apparatus” means an apparatus that comprises individual units in which certain processes of the methods according to the invention are

performed. The individual units of a modular apparatus can be but are not necessarily physically connected, but it is preferred that the individual units are controlled by a central control device such as a computer. An example of a modular apparatus useful according to the invention has a thermal cycler unit, a sampler unit, and a capillary electrophoresis unit with a fluorescence detector. The modular apparatus useful according to the invention can also comprise a robotic arm to transfer samples from the cycling reaction to the electrophoresis unit.

As used herein, the term “sampling device” refers to a mechanism that withdraws an aliquot from an amplification during the amplification regimen. Sampling devices useful according to the invention will preferably be adapted to minimize contamination of the cycling reaction(s), by, for example, using pipeting tips or needles that are either disposed of after a single sample is withdrawn, or by incorporating one or more steps of washing the needle or tip after each sample is withdrawn. Alternatively, the sampling device can contact the capillary to be used for capillary electrophoresis directly with the amplification reaction in order to load an aliquot into the capillary. Alternatively, the sample device can include a fluidic line (e.g. a tube) connected to the controllable valve which will open at particular cycle. Sampling devices known in the art include, for example, the multipurpose Robbins Scientific Hydra 96 pipettor, which is adapted to sampling to or from 96 well plates. This and others can be readily adapted for use according to the methods of the invention.

As used herein, the term “robotic arm” means a device, preferably controlled by a microprocessor, that physically transfers samples, tubes, or plates containing samples from one location to another. Each location can be a unit in a modular apparatus useful according to the invention. An example of a robotic arm useful according to the invention is the Mitsubishi RV-E2 Robotic Arm. Software for the control of robotic arms is generally available from the manufacturer of the arm.

As used herein, the term “abundance of nucleic acid” refers to the amount of a particular target nucleic acid sequence present in a sample or aliquot. The amount is generally measured as a relative amount in terms of concentration or copy number of the target sequence relative to the amount of a standard of known concentration or copy number. Alternatively, the amount in one unknown sample is measured relative to the amount in another unknown sample. As used herein, abundance of a nucleic acid is measured on the basis of the intensity of a detectable label, most often a fluorescent label. The methods of the invention permit one to extrapolate the

relative amount of one or more target sequences in a nucleic acid sample from the amplification profile of that target sequence or sequences from that sample.

As used herein, the term “amplified product” refers to polynucleotides which are copies of a portion of a particular polynucleotide sequence and/or its complementary sequence, which correspond in nucleotide sequence to the template polynucleotide sequence and its complementary sequence. An “amplified product,” according to the invention, may be DNA or RNA, and it may be double-stranded or single-stranded.

As used herein, the term “distinctly sized amplification product” means an amplification product that is resolvable from amplification products of different sizes. “Different sizes” refers to nucleic acid molecules that differ by at least one nucleotide in length. Generally, distinctly sized amplification products useful according to the invention differ by greater than or equal to more nucleotides than the limit of resolution for the separation process used in a given method according to the invention. For example, when the limit of resolution of separation is one base, distinctly sized amplification products differ by at least one base in length, but can differ by 2 bases, 5 bases, 10 bases, 20 bases, 50 bases, 100 bases or more. When the limit of resolution is, for example, 10 bases, distinctly sized amplification products will differ by at least 10 bases, but can differ by 11 bases, 15 bases, 20 bases, 30 bases, 50 bases, 100 bases or more.

As used herein, the term “profile” or the equivalent terms “amplification curve” and “amplification plot” mean a mathematical curve representing the signal from a detectable label incorporated into a nucleic acid sequence of interest at two or more steps in an amplification regimen, plotted as a function of the cycle number from which the samples were withdrawn. The profile is preferably generated by plotting the fluorescence of each band detected after capillary electrophoresis separation of nucleic acids in the individual reaction samples. Most commercially available fluorescence detectors are interfaced with software permitting the generation of curves based on the signal detected.

As used herein, the term “first strand cDNAs” means the products of a reverse transcription reaction.

As used herein, the term “sample-specific sequence tag” refers to a polynucleotide sequence which is used to identify a polynucleotide molecule derived from a specific sample source. A “sample-specific sequence tag” of the present invention indicates the sample source of an isolated or synthesized polynucleotide and distinguishes an isolated or synthesized

polynucleotide of one sample from that of another sample. Therefore, a sample-specific sequence tag has a specific sequence identity which can be identified. By “specific sequence identity” is meant that one sample-specific sequence should be different from another sample-specific sequence in at least one nucleotide, for example, in at least 2, or 3, or 4, or 5, or 10, or 15, or 20, or more, up to 60 nucleotides.

As used herein, the term “distinguishably labeled” means that the signal from one labeled oligonucleotide primer or a nucleic acid molecule into which it is incorporated can be distinguished from the signal from another such labeled primer or nucleic acid molecule. Detectable labels can comprise, for example, a light-absorbing dye, a fluorescent dye, or a radioactive label. Fluorescent dyes are preferred. Generally, a fluorescent signal is distinguishable from another fluorescent signal if the peak emission wavelengths are separated by at least 20 nm. Greater peak separation is preferred, especially where the emission peaks of fluorophores in a given reaction are wide, as opposed to narrow or more abrupt peaks.

As used herein, the term “set” means a group of nucleic acid samples, primers or other entities. A set will comprise a known number of, and at least two of such entities.

As used herein, the term “subset” means a group comprised by a set as defined herein, wherein the subset group is less than every member of the set. A subset as used herein can consist of a single entity, but is preferably more than one entity.

The number of genes that could be investigated in a single reaction can be estimated based on the measurable difference of the product size (1-2 bases) and on the separable size of PCR products (500-1000bp) and can be as high as 1000, but preferably 100-200.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figures 1-6 are diagrams schematically showing preferred embodiments of different aspects of the invention described in detail herein below.

Figure 7 shows the results of experiments testing the quantitative detection of multiple amplicons in a single amplification reaction.

Figure 8 shows the results of a differential expression analysis using known amounts of different RNAs.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention relates to methods for analyzing levels of gene expression, both in a single individual or sample and between two or more individuals or samples. The methods rely on the ability of the polymerase chain reaction (PCR) to quantitatively produce copies of one or more sequences of interest in a sample in a number sufficient to detect those copies above the background of other sequences present in the sample.

In PCR, two oligonucleotide primers, a template and a thermostable nucleic acid polymerase are used. In the general PCR scheme, one of the oligonucleotide primers anneals to a template nucleic acid strand. The annealed primer is extended by the thermostable template-dependent nucleic acid polymerase, and that polymerization product has a sequence complementary to the second primer such that the polymerization product can serve as template for the extension of the second primer. The polymerization product is thermally denatured to separate the strands, and the pair of primers is annealed to the respective strands and extended. Because each extension product serves as the template for subsequent extension reactions, the target sequence is exponentially amplified.

The amount of PCR product produced in a reaction can reflect the amount of template present in the original sample. While PCR is a powerful tool in the quantitative analysis of gene expression, it is known in the art that quantitative PCR requires careful and sometimes elaborate controls in order to ensure that the amount of product detected accurately reflects the amount of target RNA or DNA present in the original sample. Quantitative PCR is described, for example by Reischl & Kochanowski, 1995; *Mol. Biotechnol.* 3:55-71, and Jung et al, 2000, *Clin. Chem. Lab. Med.* 38:833-836.

PCR amplification is only quantitative during the exponential phase of the amplification. After the exponential phase gives way to a plateau, the amount of product detected does not accurately reflect the amount of target sequence present in the initial sample. The exhaustion of primer and nucleotide supplies, the accumulation of phosphate and the accumulation of amplified products themselves all contribute to non-linearity between the amount of input nucleic acid and the amount of output PCR product after the exponential phase of the amplification. In addition, when two or more distinct targets are amplified, differences in the efficiency of amplification of one product versus another will result in inaccuracy in the relative quantitation of target molecules present in the original sample. Thus, in order to obtain

meaningful results from quantitative PCR methods, it is important to be able to monitor not only the amount of product generated, but how and when that product was generated.

The methods according to the invention overcome a number of the difficulties involved in quantitative PCR. For example, the methods provided herein permit the determination of the amount of amplification product made and simultaneously provide a curve showing the manner in which the product was made. The methods also permit the distinction between amplification signal arising from desired product and from artifacts, such as primer dimer formation or mispriming events.

In one aspect, the invention provides a method of monitoring the amplification of a single target nucleic acid from one sample. This and other aspects of the invention are suited for monitoring the amplification of polynucleotide sequences from samples containing DNA, RNA, or a mixture of these, but will most often find application in measuring or comparing RNA transcript levels in a sample. For the measurement of RNA transcripts, a reverse-transcription step is required. Reverse-transcription methods are well known in the art. Depending upon the desired assay, reverse-transcription can be performed using a non-specific primer (e.g., an oligo-dT-containing primer or a collection of random primers), or reverse-transcription can be performed using a primer specific for a gene of interest.

In this aspect, a nucleic acid sample is subjected to a PCR amplification regimen comprising at least two cycles of thermal denaturation, primer annealing and primer extension. The amplification regimen will preferably comprise 2 to 35 cycles, more preferably 10 to 30 cycles, more preferably 15 to 25 cycles. The regimen uses a pair of oligonucleotide primers that result in the specific amplification of a single sequence of interest if that sequence is present in the sample. One of the oligonucleotide primers is fluorescently labeled, such that each double-stranded amplification product will bear a detectable fluorescent marker.

During the cycling regimen, following at least one of the cycles of denaturation, primer annealing and primer extension in this aspect of the invention, a sample or aliquot of the reaction is withdrawn from the tube or reaction vessel, and nucleic acids in the aliquot are separated and detected. The separation and detection are performed concurrently with the cycling regimen, such that a curve representing product abundance as a function of cycle number is generated while the cycling occurs. As used herein, the term "concurrently" means that the separation is at least initiated while the cycling regimen is proceeding. Depending upon the separation

technology used (e.g., capillary electrophoresis) and the number and size of species to be separated in a given reaction, the separation will most often require on the order of 1-120 minutes per aliquot. Thus, when separation steps take longer than the duration of each cycle, and when samples are withdrawn after, for example, every cycle, the separation steps will be completed after the completion of the full cycling regimen. However, as used herein, this situation is still considered to be “concurrent” separation, as long as the separation of each sample was initiated during the cycling regimen. Concurrent separation is most preferably performed through use of a robotic sampler that deposits the samples to the separation apparatus immediately after the samples are withdrawn from the cycling reaction.

In the manner described above, one can monitor the amplification reaction in real time, and the correlation between target product abundance and amount of target sequence in the original sample can be drawn more rapidly and more accurately than is achievable by other quantitative PCR methods. Aliquot removal (referred to herein as “sampling,” nucleic acid separation, and detection can be performed as described herein below.

This method further extends the advantages offered by real-time PCR methods and also solves several commonly occurring problems inherent to these methods. At the beginning of the PCR amplification reaction, the amount of PCR product is below the detection limit of most instruments and no quantitative difference can be observed. For the detection of rare gene transcripts which are normally present at the level of several copies per cell, monitoring PCR products at very late stages will be necessary. Typically, detection of these genes will be difficult because the reaction is stopped before those rare transcripts are amplified to a detectable level. The middle section of the amplification curve, when the signal arises above the detection limit and enters a logarithmic phase, constitutes the best signal for detecting quantitative differences in gene expression. However, due to the exponential nature of the reaction, this phase is relatively short and lasts only a few cycles before the reaction goes into a later stationary phase. In this later stationary phase of PCR amplification, accumulation of PCR products are saturated due to factors such as lack of additional substrates, lack of polymerase, inhibition of polymerase activity by the product, or a combination thereof. The stationary phase provides little opportunity for detecting quantitative differences in gene expression. Therefore, methods that quantify PCR product after a predetermined number of cycles can only identify genes that happen to be in the logarithmic phase of the amplification and would thus miss those genes that are only differentially detected either earlier or later in the amplification process.

The instant invention overcomes this limitation because it defines a complete amplification curve for each individual amplified fragment. Moreover, it provides a quantitative basis for measuring expression differences. In the practice of real time quantitative PCR, the experimentally defined parameter “ C_t ” refers to the cycle number at which the signal generated from a quantitative PCR reaction first rises above a “threshold”, i.e., where there is the first reliable detection of amplification of a target nucleic acid sequence. “Reliable” means that the signal reflects a detectable level of amplified product during PCR. C_t generally correlates with starting quantity of an unknown amount of a target nucleic acid, i.e., lower amounts of target result in later C_t . C_t is linked to the initial copy number or concentration of starting DNA by a simple mathematical equation:

$$\text{Log}(\text{copy number}) = aC_t + b, \text{ where } a \text{ and } b \text{ are constants.}$$

Therefore, by measuring C_t for the fragments of the same gene originating from two different samples, the original relative concentration of this gene in these samples can be easily evaluated.

One of the most interesting features of the PCR amplification is the ability to combine amplification of several target sequences in a single reaction which can provide a significant savings in time and cost of PCR assays. There are several methods available that permit the co-amplification of multiple different polynucleotide sequences in a single amplification reaction. See e.g., Markoulatos et al. 2002, *J. Clin. Lab. Anal.* 16:47-51 and Broude et al., 2001, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 11:327-332. However, the majority of these methods do not provide quantitative data and are primarily used for the detection of the presence or absence of the particular sequences. Multiplex real-time applications are limited in the number of genes that could be combined in a single reaction by the optical separation of fluorescent dyes. In addition, these methods often cannot discriminate between specific and non-specific amplification products, further complicating quantitative analysis and requiring laborious assay optimization.

In another aspect, the invention eliminates the limits on the number of genes that can be analyzed in a single reaction. Specifically, the invention permits the monitoring of the amplification of more than one polynucleotide sequence in a sample. The method generates an amplification profile for two or more sequences that permits one to correlate signal strength during the logarithmic phase of the amplification to the relative amount of those sequences present in the original sample.

In this aspect of the invention, a set of oligonucleotide primers is used, and the set is comprised of pairs of oligonucleotide PCR primers specific for the two or more genes of interest. One primer of each pair of primers is fluorescently labeled with a fluorescent marker. An example of this aspect of the invention is depicted schematically in Figure 1. In one embodiment, the different primers can be labeled with the same fluorescent marker. In that instance, the primers for the different amplification products are selected such that the sizes of the amplified products are distinct. As used in this context, "distinct" refers to a difference in sequence length that can be distinguished using the selected separation technology; amplified products differing by as little as a single nucleotide are distinct as long as the separation technology (e.g., capillary electrophoresis – see below) is capable of resolving that difference. PCR products useful according to the invention will generally be at least 50 bp in length, and can be as long as about 5,000 bp. Most often, PCR fragment lengths useful according to the invention will be on the order of 50-1000 bp in length, preferably 50-500 bp.

In another embodiment, one member of each pair of PCR primers is fluorescently labeled with a fluorophore that is spectrally distinguishable from the fluorophores labeling a member of each other pair of primers. In this embodiment, the sizes of the expected amplification products can be, but need not be distinct. It is assumed that spectrally distinguishable fluorophores used in a given reaction are selected such that they do not quench or engage in energy transfer with other fluorophores in the same reaction.

In an embodiment that further increases the capacity for simultaneous detection of different sequences in a single sample, the pairs of oligonucleotides are selected such that each pair generates either a distinctly sized fragment or is labeled with a distinct fluorophore or both. In this embodiment, different products that are the same size will have spectrally distinct fluorophores, and different products that are labeled with the same fluorophore will have distinct sizes.

In this aspect of the invention, once the desired combination of label and expected product sizes is selected, the nucleic acid sample is contacted with the set of pairs of primers, in a PCR reaction mixture comprising a nucleic acid polymerase, nucleotides and necessary buffer. The reaction mixture is then subjected to a PCR amplification regimen comprising iterative cycles of thermal denaturing, primer annealing, and primer extension. During this regimen, aliquots of the reaction are removed as described herein (see "Sampling" section, below) and the nucleic acids in the aliquot are separated as also described herein below. In this aspect of the

invention, as in the others, the separation process is performed concurrently with the cycling reaction, and amplified nucleic acids are detected by the fluorescence of their markers.

The separation and detection steps permits the identification of amplified products by their size, fluorescent marker, or both, depending upon the combination of expected product sizes and spectrally distinguishable markers used. Thus, when the products bear the same marker, the separation will generate a "ladder" of fragments comprising the same label, and fragment size will distinguish one product from another. When the products bear different labels, the separation will generate bands comprising each different label that identify the amplified products. Finally, when the products are selected to be of distinct sizes and be distinctly labeled, the products are uniquely identified by the wavelength of fluorescence and the size of the fragment.

Aside from identifying the products, the detection step determines the abundance of each product present at each cycle sampled. This abundance can be plotted for each fragment to generate a fragment-specific amplification profile which can be used to extrapolate the relative abundance of the sequence represented by each detected fragment in the original sample.

In another aspect of the invention, the amplification of a set of nucleic acid fragments present in a single sample can be monitored by using a set of pairs of forward and reverse oligonucleotide primers specific for each nucleic acid fragment of interest in the set of nucleic acid fragments. Primer pairs are selected so that the amplification product of each pair will be distinctly sized relative to other amplification products in the same reaction. PCR amplification is performed in the presence of a fluorescent dye (e.g., SYBR-Green; Molecular Probes Inc., Eugene, OR) that binds only double-stranded DNA. During the amplification regimen, aliquots of the reaction are removed and the nucleic acids in the aliquot are separated as described herein. In this aspect of the invention, as in the others, the separation process is performed concurrently with the cycling reaction, and amplified double-stranded nucleic acids are detected by fluorescence and size. The abundance of each amplified fragment is identified by fluorescence intensity of the bound dye. The distinct sizes of the amplification products permit one to monitor the amplification of each nucleic acid fragment of interest throughout the amplification reaction, thereby generating an amplification curve for each nucleic acid fragment of interest. The curve indicates at which cycle each member of the set of nucleic acid fragments was in the logarithmic phase of amplification, thereby permitting extrapolation of the relative abundance of each

member of the set in the original sample. This aspect of the invention is depicted schematically in Figure 2.

In another aspect, the invention provides an alternative method of monitoring the amplification of a set of polynucleotide sequences present in a single sample. In this method, RNAs in a sample are reverse transcribed using a primer that comprises, at the 5' end, a tag sequence of 10-40 nucleotides and sequence complimentary to mRNA that can be of the specific gene target or can represent an oligo-dT stretch (which stretch is generally 8-30 nucleotides long, preferably 12-24 nucleotides). The tag sequence should be a sequence that is not represented in the genome of the organism being investigated, and can be synthetic, random or derived from another species. The tag sequence should be long enough to provide specific annealing with a polynucleotide comprising a complementary sequence under the salt and annealing temperature conditions of a given PCR reaction. These conditions, particularly annealing temperature, vary, but such temperature is determined on the basis of the known or predicted T_m of the tag sequence. Commercial programs, including Oligo™, Primer Design and programs available on the internet, including Primer3 and Oligo Calculator can be used to predict the T_m of a polynucleotide sequence useful according to the invention. The tag sequence useful in this and other aspects of the invention should be selected to have a T_m in the range of 50°-60°C.

Reverse-transcription of RNAs in a sample using the primer described above (e.g. oligo-dT-Tag primer or mRNA complement-Tag primer) will result in a population of reverse-transcription products that each bears the tag sequence 5' of the sequence complimentary to mRNA (e.g. oligo-dT stretch or mRNA complement stretch). In order to amplify a set of polynucleotide sequences represented in the reverse-transcribed sample, the reverse-transcription reaction or an aliquot of it is mixed with with (i) a set of oligonucleotide primers that recognize or specifically hybridize to the set of nucleic acid sequences of interest, and (ii) a detectably labeled oligonucleotide primer that comprises the sequence tag common to all of the reverse-transcription products. In this aspect of the invention, each oligonucleotide primer specific for a member of the set of transcripts of interest is selected so that it generates a distinctly sized amplification product in the subsequent amplification regimen.

The mixture of primers and reverse transcription products is then subjected to an amplification regimen as in the previous aspects of the invention. Each amplification product will be a distinct size from the other expected fragments, and each amplification product will

also comprise a detectable label, preferably a fluorophore, such that the fragments can be readily detected after separation.

As in other aspects of the invention, samples of the amplification reaction are taken during the cycling regimen and the amplification products are separated and detected. The identities of the amplification products are determined by their size, and the abundance of each amplification product at each cycle is determined by the intensity of label in the product of the expected size. The amplification curve generated by the sampling and separation provides a profile for the amplification of each member of the set. This profile indicates at which cycle each member of the set of transcripts or genes of interest was in the logarithmic phase of amplification, thereby permitting extrapolation of the relative abundance of each member of the set in the original sample. This aspect of the invention is depicted schematically in Figure 3.

In another aspect, the invention provides a method for comparing the expression of a nucleic acid sequence of interest between a two samples. RNAs in a sample are reverse transcribed using a primer that comprises, at its 5' end, a tag sequence of 15-40 nucleotides and sequence complimentary to mRNA that can be gene specific or can represent an oligo-dT stretch (which stretch is generally 8-30 nucleotides long, preferably 12-24 nucleotides). Reverse-transcription of each sample will result in a population of reverse-transcription products each bearing a sample-specific sequence tag. Sample-specific tags are unique sequences of 8-30 nucleotides in length, preferably 12-24 nucleotides in length, that specifically hybridize or anneal to a complementary sequence under salt and temperature conditions for PCR annealing reactions as described above.

Following separate reverse-transcription reactions, the synthesis of the complimentary DNA strand is initiated with primers that contain at their 5' ends a unique sequence tag (tag 2) of 8-40 nucleotides followed by gene-specific sequence (8-30 nucleotides). Following the primer extension with DNA polymerase, the unreacted primers are eliminated by heat-sensitive nuclease which is then destroyed by incubation at increased temperature. In this aspect of the invention, each oligonucleotide primer used for priming of the complimentary DNA strand specific for a member of the set of transcripts of interest is selected so that it generates a distinctly sized amplification product in the subsequent amplification regimen.

In order to amplify a set of polynucleotide sequences represented in the synthesized DNA sample, the reaction or an aliquot of it is mixed with (i) oligonucleotide primer that comprises

the specific sequence tag₂, and (ii) a detectably labeled oligonucleotide primer that comprises the sequence tag common to all of the reverse-transcription products. The use of only 2 primers for amplification of the set of selected sequences will decrease the complexity of PCR amplification and improve the amplification yield.

As in other aspects of the invention, samples of the amplification reaction are taken during the cycling regimen and the amplification products are separated and detected. The identities of the amplification products are determined by their size, and the abundance of each amplification product at each cycle is determined by the intensity of label in the product of the expected size. The amplification curve generated by the sampling and separation provides a profile for the amplification of each member of the set. This profile indicates at which cycle each member of the set of transcripts or genes of interest was in the logarithmic phase of amplification, thereby permitting extrapolation of the relative abundance of each member of the set in the original sample. Examples of this aspect of the invention are schematically depicted in Figures 4 and 6. In Figure 4, amplification products of different size are detected with the same fluorescent label. In the alternative Figure 6, amplification products of the same size are distinguished by distinguishable fluorescent labels on the sample-specific Tag primers.

In another aspect, an example of which is depicted schematically in Figure 5, the invention provides a method for comparing the expression of a nucleic acid sequence of interest between a two samples. RNAs in a sample are reverse transcribed using a primer that comprises, at its 5' end a tag sequence of 8-30 nucleotides and sequence complimentary to mRNA that can be gene specific or can represent an oligo-dT stretch (which stretch is generally 8-30 nucleotides long, preferably 12-24 nucleotides). Thus, reverse-transcription of each sample will result in a population of reverse-transcription products each bearing a sample-specific sequence tag. Sample-specific tags are unique sequences of 8-30 nucleotides in length, preferably 12-24 nucleotides in length, that specifically hybridize or anneal to a complementary sequence under salt and temperature conditions for PCR annealing reactions as described above.

Following separate reverse-transcription reactions, one for each sample being compared, equal amounts of the reverse-transcription reactions are mixed and the mixture is used as template in a PCR amplification regimen. For this amplification regimen, primers are used as follows: (i) a separate, distinguishably fluorescently labeled oligonucleotide primer corresponding to each sample-specific sequence tag used in the reverse transcription step—the sample-specific sequence should be long enough to permit specific annealing of the primer to a

nucleic acid molecule comprising sequence complementary to the sample-specific tag when under temperature and salt conditions that permit such annealing (see discussion of T_m prediction above); and (ii) an oligonucleotide primer specific for the sequence of interest (i.e., comprising sufficient sequence complementary to the nucleic acid sequence of interest to permit specific annealing of the primer to a nucleic acid molecule comprising the sequence of interest under conditions that permit that annealing, as described herein). The primer specific for the gene or transcript of interest will generally be selected such that a product of 50-5,000 bp is generated upon amplification, preferably 50-1000, more preferably 50-500 bp.

During the cycling regimen, samples are withdrawn from the amplification reaction, and amplified nucleic acids are separated and detected as in other aspects of the invention described herein. Because the separation and detection process detects the distinguishable labels attached to the primers specific for each sample of origin, this process generates a separate amplification profile for the gene of interest from each sample. Because there is competition for the gene- or transcript-specific primer (that is, the “upstream” primer), the effects of amplification bias are lessened, and the amplification profiles can be used to extrapolate the relative abundance of the gene of interest in the different original samples or to provide a relative abundance in comparison with a known standard.

In another aspect, the invention provides a method for monitoring the amplification of a set of nucleic acid sequences. In this method, a set of nucleic acid sequences present in a set of reverse-transcription products is amplified in a PCR amplification regimen involving at least two iterative cycles of thermal denaturing, primer annealing and polymerase extension.

The set of reverse transcription products is made up of subsets of reverse-transcription products, where each subset is the reverse-transcript population generated from one RNA sample. Each subset is made by reverse-transcribing a sample of RNA using a primer that comprises, at its 5' end a tag sequence of 15-40 nucleotides and sequence complimentary to mRNA that can be gene specific or can represent an oligo-dT stretch (which stretch is generally 8-30 nucleotides long, preferably 12-24 nucleotides). Equal amounts of the reverse-transcript subsets are then mixed to form the set of reverse-transcription products used as an amplification template for the subsequent amplification regimen.

The PCR amplification regimen for this aspect is performed by contacting the template comprising the mixed set of reverse-transcription products with two sets of amplification primers

as follows: (i) a set of gene-specific primers, wherein each gene specific primer in the set recognizes or specifically hybridizes to a specific nucleic acid sequence of interest (i.e., a sequence expressed or thought to be expressed) in a nucleic acid sample - each gene specific primer in the set is selected so as to generate an amplification product that is distinct in size from amplification products generated with other gene specific primers in that set; and (ii) a set of sample specific primers. Each sample specific primer is selected such that it specifically hybridizes to the sample specific tag incorporated into the reverse-transcription products from one sample under PCR annealing conditions as described herein. Each sample specific primer in the set of sample specific primers is also distinguishably labeled.

During the cycling of the amplification regimen, samples are withdrawn and nucleic acids are separated and detected as for the other aspects of the invention described herein above. The detection provides a profile of the abundance of each distinctly-sized fragment representing a transcript of interest, and the distinguishable labels on the sample-specific probes permit one to distinguish signal arising from the individual samples. Thus, the method permits one to compare the relative abundance of a set of genes among a set of different samples. This method is particularly useful for monitoring the effect of a treatment, e.g., a drug treatment, on a group of related or unrelated genes in a cell type or tissue.

Because the separation and detection of the amplification products is performed concurrently with the cycling regimen, and because separation by, for example, CE, is very fast, the methods described herein permit the real time generation of amplification profiles that are useful for determining the relative abundance of nucleic acid species in the samples investigated.

A) Sampling

Sampling during the amplification regimen can be performed at any frequency or in any pattern desired. It is preferred that sampling occurs after each cycle in the regimen, although less frequent sampling can also be used, for example, every other cycle, every third cycle, every fourth cycle, etc. While a uniform sample interval will most often be desired, there is no requirement that sampling be performed at uniform intervals. As just one example, the sampling routine may involve sampling after every cycle for the first five cycles, and then sampling after every other cycle.

Sampling can be as simple as manually pipetting an aliquot from the reaction, but is preferably automated such that the aliquot is withdrawn robotically at predetermined sampling

intervals. For this and other aspects of the invention, it is preferred, although not necessary that the cycling be performed in a microtiter or multiwell plate format. This format, which uses plates comprising multiple reaction wells, not only increases the throughput of the assay process, but is also well adapted for automated sampling steps due to the modular nature of the plates and the uniform grid layout of the wells on the plates. Common microtiter plate designs useful according to the invention have, for example 12, 24, 48, 96, 384 or more wells, although any number of wells that physically fit on the plate and accommodate the desired reaction volume (usually 10-100 μl) can be used according to the invention. Generally, the 96 or 384 well plate format is preferred.

An automated sampling process can be readily executed as a programmed routine and avoids both human error in sampling (i.e., error in sample size and tracking of sample identity) and the possibility of contamination from the person sampling. Robotic samplers capable of withdrawing aliquots from thermal cyclers are available in the art. For example, the Mitsubishi RV-E2 Robotic Arm can be used in conjunction with a SciCloneTM Liquid Handler or a Robbins Scientific Hydra 96 pipettor.

The robotic sampler useful according to the invention can be integrated with the thermal cycler, or the sampler and cycler can be modular in design. When the cycler and sampler are integrated, thermal cycling and sampling occur in the same location, with samples being withdrawn at programmed intervals by a robotic sampler. When the cycler and sampler are modular in design, the cycler and sampler are separate modules. In one embodiment, the assay plate is physically moved, e.g., by a robotic arm, from the cycler to the sampler and back to the cycler.

The volume of an aliquot removed at the sampling step can vary, depending, for example, upon the total volume of the amplification reaction, the sensitivity of product detection, and the type of separation used. Amplification volumes can vary from several microliters to several hundred microliters (e.g., 5 μl , 10 μl , 20 μl , 40 μl , 60 μl , 80 μl , 100 μl , 120 μl , 150 μl , or 200 μl or more), preferably in the range of 10-150 μl , more preferably in the range of 10-100 μl . Aliquot volumes can vary from 0.1 to 30 % of the reaction mixture.

B) Separation of nucleic acids

Separation of nucleic acids according to the invention can be achieved by any means suitable for separation of nucleic acids, including, for example, electrophoresis, HPLC or mass spectrometry. Separation is preferably performed by capillary electrophoresis (CE).

CE is an efficient analytical separation technique for the analysis of minute amounts of sample. CE separations are performed in a narrow diameter capillary tube, which is filled with an electrically conductive medium termed the "carrier electrolyte." An electric field is applied between the two ends of the capillary tube, and species in the sample move from one electrode toward the other electrode at a rate which is dependent on the electrophoretic mobility of each species, as well as on the rate of fluid movement in the tube. CE may be performed using gels or liquids, such as buffers, in the capillary. In one liquid mode, known as "free zone electrophoresis," separations are based on differences in the free solution mobility of sample species. In another liquid mode, micelles are used to effect separations based on differences in hydrophobicity. This is known as Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (MECC).

CE separates nucleic acid molecules on the basis of charge, which effectively results in their separation by size or number of nucleotides. When a number of fragments are produced, they will pass the fluorescence detector near the end of the capillary in ascending order of size. That is, smaller fragments will migrate ahead of larger ones and be detected first.

CE offers significant advantages of over conventional electrophoresis, primarily in the speed of separation, small size of the required sample (on the order of 1-50 nl), and high resolution. For example, separation speeds using CE can be 10 to 20 times faster than conventional gel electrophoresis, and no post-run staining is necessary. CE provides high resolution, separating molecules in the range of about 10-1,000 base pairs differing by as little as a single base pair. High resolution is possible in part because the large surface area of the capillary efficiently dissipates heat, permitting the use of high voltages. In addition, band broadening is minimized due to the narrow inner diameter of the capillary. In free-zone electrophoresis, the phenomenon of electroosmosis, or electroosmotic flow (EOF) occurs. This is a bulk flow of liquid that affects all of the sample molecules regardless of charge. Under certain conditions EOF can contribute to improved resolution and separation speed in free-zone CE.

CE can be performed by methods well known in the art, for example, as disclosed in U.S. Patent Nos. 6,217,731; 6,001,230; and 5,963,456, which are incorporated herein by reference.

High throughput CE equipment is available commercially, for example, the HTS9610 High Throughput Analysis System and SCE 9610 fully automated 96-capillary electrophoresis genetic analysis system from Spectrumedix Corporation (State College, PA). Others include the P/ACE 5000 series from Beckman Instruments Inc (Fullerton, CA) and the ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Each of these devices comprises a fluorescence detector that monitors the emission of light by molecules in the sample near the end of the CE column. The standard fluorescence detectors can distinguish numerous different wavelengths of fluorescence emission, providing the ability to detect multiple fluorescently labeled species in a single CE run from an amplification sample.

Another means of increasing the throughput of the CE separation is to use a plurality of capillaries, or preferably an array of capillaries. Capillary Array Electrophoresis (CAE) devices have been developed with 96 capillary capacity (e.g., the MegaBACE instrument from Molecular Dynamics) and higher, up to and including even 1000 capillaries. In order to avoid problems with the detection of fluorescence from DNA caused by light scattering between the closely juxtaposed multiple capillaries, a confocal fluorescence scanner can be used (Quesada et al., 1991, *Biotechniques* 10:616-25).

The apparatus for separation (and detection) can be separate from or integrated with the apparatus used for thermal cycling and sampling. Because according to the invention the separation step is initiated concurrently with the cycling regimen, samples are preferably taken directly from the amplification reaction and placed into the separation apparatus so that separation proceeds concurrently with amplification. Thus, while it is not necessary, it is preferred that the separation apparatus is integral with the thermal cycling and sampling apparatus. In one embodiment, this apparatus is modular, comprising a thermal cycling module and a separation/detection module, with a robotic sampler that withdraws sample from the thermal cycling reaction and places it into the separation/detection apparatus.

C) Detection

Amplification product detection methods useful according to the invention measure the intensity of fluorescence emitted by labeled primers when they are irradiated with light within the excitation spectrum of the fluorescent label. Fluorescence detection technology is highly developed and very sensitive, with documented detection down to a single molecule in some instances. High sensitivity fluorescence detection is a standard aspect of most commercially-

available plate readers, microarray detection set-ups and CE apparatuses. For CE equipment, fiber optic transmission of excitation and emission signals is often employed. Spectrumedix, Applied Biosystems, Beckman Coulter and Agilent each sell CE equipment with fluorescence detectors sufficient for the fluorescence detection necessary for the methods described herein.

The fluorescence signals from two or more different fluorescent labels can be distinguished from each other if the peak wavelengths of emission are each separated by 20 nm or more in the spectrum. Generally the practitioner will select fluorophores with greater separation between peak wavelengths, particularly where the selected fluorophores have broad emission wavelength peaks. It follows that the more different fluorophores one wishes to include and detect concurrently in a sample, the narrower should be their emission peaks.

D) Fluorescent markers

Numerous fluorescent markers useful according to the invention are commercially available. For example, Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) sells a wide variety of fluorescent dyes. Non-limiting examples include Cy5, Cy3, TAMRA, R6G, R110, ROX, JOE, FAM, Texas Red™, and Oregon Green™, just to name a few. Fluorescent dyes useful according to the invention can be attached to oligonucleotide primers using methods well known in the art. For example, one common way to add a fluorescent label to an oligonucleotide is to react an N-Hydroxysuccinimide (NHS) ester of the dye with a reactive amino group on the target. Nucleotides can be modified to carry a reactive amino group by, for example, inclusion of an allyl amine group on the nucleobase. Labeling via allyl amine is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,476,928 and 5,958,691, which are incorporated herein by reference. Other means of fluorescently labeling nucleotides, oligonucleotides and polynucleotides are well known to those of skill in the art.

E) Correlation between fluorescence signal from amplified DNA and nucleic acid levels present in the original sample.

One source of concern regarding the use of PCR amplification for expression profiling is a potential bias of amplification. Some sequences are amplified with higher efficiency than others. This bias can change the final representation of PCR products when compared with the starting sample. Further, because of difficulties in determining the efficiency of RNA extraction and the efficiency of amplification, quantitative PCR is most readily used to examine relative differences in gene expression between two samples, rather than to measure the absolute amount

of a target RNA in a given sample. The detected fluorescent signal strength (e.g., following CE separation) can be recorded and used to determine the relative ratio of each peak from a target sequence in two sample.

In a preferred embodiment, cDNAs derived from two or more samples are amplified in the same PCR reaction. Each target cDNA molecule is amplified by a common primer and a sample specific primer, such that cDNAs from different samples will compete for the same common primer. Because of this competition, the ratio of the amounts of the amplified products from two samples reflects the ratio of the amounts of the initial target polynucleotide in each of the two samples. A ratio of 1 for the amount of signal from sample A to that from sample B indicates the same initial amount of the target polynucleotide in the samples, i.e., the target polynucleotide is not differentially expressed in the two samples. An A/B ratio of greater than 1 indicates a higher amount of the target polynucleotide in sample A than in sample B. An A/B ratio of less than 1 indicates a lesser amount of the target polynucleotide in sample A than in sample B. When the ratio is greater than or less than 1, the target polynucleotide is differentially expressed in the two samples. It is expected that the levels of many polynucleotides present in two samples from the same species of organism will be approximately similar, resulting in a ratio near 1 for most gene products compared between two samples from either the same or different members of a single species. In practice according to the invention, a polynucleotide with a ratio greater than 2 or less than 0.5 relative to signal for the same gene from a different sample is regarded as a differentially expressed polynucleotide in the two samples.

The differences in expression between two samples from different tissues from one individual or between samples from two individuals of the same species are most likely limited to relatively few genes. Thus, the power of the methods of comparison described herein lies in their ability to resolve differences in the few individual genes from among a background of similar expression in most genes.

The similarity of the expression of the majority of genes between tissues or between individuals of the same species can also be used to advantage. The ratio of a particular polynucleotide in two samples can be further measured against a common ratio in order to determine whether it is differentially expressed between the two samples. The term "common ratio" as used herein means a relatively constant ratio of all genes expressed between two samples. Changes in the common ratio reflect a global change in the amount of total starting material, rather than a specific change caused by certain events such as activation of a particular

signal transduction pathway in a treated sample as compared to an untreated sample. By comparing the ratio of expression of a particular gene with this common ratio, it will be immediately apparent whether the expression of that particular gene is different between the samples being compared.

If the two samples are amplified in separate PCR reactions, an internal control can be provided for each PCR amplification and the amplification of each sample is first normalized to the internal control before the ratio is calculated. The use of internal controls for quantitative PCR is well-known in the art, for example, as described in Ausubel et al. There are two basic types of control: the first is commonly known as an exogenous control (Gilliland et al. (1990) PCR Protocols, Innis et al. ed., pp. 60-69, Academic Press; Wang et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9717-9721, both of which are specifically incorporated herein by reference), and the second, is known as an endogenous control (Dveksler et al. (1992) PCR Methods and Applications 6:283-285; Spanakis (1993) Nucleic Acids Research 21:3809-3819, both of which are specifically incorporated herein by reference).

Exogenous controls involve the use of an artificially introduced nucleic acid molecule that is added, either to the extraction step or to the PCR step, in a known concentration. The concept of adding an exogenous nucleic acid at a known concentration in order to act as an internal standard for quantitation was introduced by Chelly et al. (1988) Nature 333:858-860, which is specifically incorporated herein by reference. The use of a control fragment that is amplified with the same primers as the target sequence more accurately reflects target sequence amplification efficiency relative to the internal standard (see, for example, WO 93/02215; WO 92/11273.; U.S. Patent Nos. 5,213,961 and 5,219,727, all of which are incorporated herein by reference). Similar strategies have proven effective for quantitative measurement of nucleic acids utilizing isothermal amplification reactions such as NASBA (Kievits et al., 1991, J Virol Methods. 35:273-86) or SDA (Walker, 1994, Nucleic Acids Res. 22:2670-7).

The use of an endogenous control can compensate for variations in extraction efficiency. Choice of controls is important in that several requirements must be met in order for it to work. The first requirement is that the copy number of the control must remain constant. The second requirement is that the control must amplify with similar efficiency to the sequence being monitored. Several constitutively expressed genes have been considered as control candidates, because the expression of these genes is relatively constant over a variety of conditions.

Examples include, but are not limited to, the β -actin gene, the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH), and the 16S ribosomal RNA gene.

EXAMPLES

Example 1. Quantitative Detection Of Multiple Amplicons In A Single Amplification Reaction

Sample DNA constructs: DNA fragments cloned in pcDNA3 vector (Invitrogen) were amplified in PCR reaction using forward primer (5'-ATCGAAATTAATACGACTCACTAT-3') and reverse primer (5'-AGCTCTAGCATTTAGGTGACACTA-3'). Amplified DNA fragments were purified by agarose gel electrophoresis and extracted from the gel using a purification kit (Qiagen). Corresponding RNA fragments containing unique sequence tags were prepared using T7 RNA polymerase transcription kit (Invitrogen) and purified by "RNA Easy" RNA purification kit (Qiagen). Concentration of RNA fragments was measured on SmartSpec 3000 spectrophotometer (Bio-Rad).

Preparation of oligonucleotides covalently coupled to solid support: Oligonucleotides TJLF (5'-AATTCGCGCCGAATAATATTAAGCTCTAGCATTAG-3') and (5'-AATTCGCGCGGATTATTTATTAGCTCTAGCATTAG-3') containing sequence tags LFAM 2(5'-CCGCGCCGAATAATATTA-3') and LROX (5'-CCCGCGCGGATTATTTATTA-3') and 5'thiol modification were coupled to polymer beads containing iodoacetyl groups. Oligonucleotides (12.5 μ M) were incubated with 200 μ l of Thiolink beads (Pierce) pre-washed with 5xTE buffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8.0) and 200 μ M TCEP (Molecular probes) for 1 hour at room temperature under constant mixing. Unreacted iodoacetyl groups were quenched by incubation with 1% beta-mercaptoethanol at room temperature. Beads were washed 4 times with 5xTE buffer, 2 times 5xTE at 75°C, 1 wash with RT (reverse transcription) buffer at room temperature and 2 washes with RT buffer at 95 C (all washes with 1 ml of buffer). Prepared beads were made as 50% suspension in RT buffer.

Reverse transcription reaction: 10 μ l of modified beads (TJLF or TJLR1) were combined with 1 μ l of dNTP (10 mM), 1 μ l of sample RNAs (VS31 (53 pg) and VS67 (1.1 pg), TJLF beads, VS68(0.058 pg) and VS67(0.094 pg), TJLR1 beads) heated for 5 min at 70°C, cooled at 4°C and supplemented with 10 μ l of the reaction mix (1 μ l of Superscript reverse transcriptase (Invitrogen) diluted 4 times, 2 μ l of 0.1 M DTT, 4 μ l of 5x reaction buffer (Invitrogen), 10 μ l of water). The reaction mixture was incubated for 1 hour at 42°C, 10 min at 65°C. RNA was

hydrolyzed by addition of 3.5 ul of 0.5M NaOH and heating 5 min at 65°C followed by addition of 3.5 ul of 1 M Tris, pH 7.5. Beads were washed with 100 ul of PCR buffer.

2nd strand synthesis: 100 ul of the reaction mixture containing 10 ul of PCR buffer (for Pwo DNA polymerase, (Roche)), 2 ml of 25 mM MgCl₂, 2ul of 10mM dNTPs, 0.5 ul Pwo DNA polymerase (Roche), 0.5 ul of Hot-Start Taq polymerase (Qiagen), 1 ul of 100 uM oligonucleotide (LHA (5'-CCATACGACGTCCAGACTA-3')), identical to the sequence present at the 5' end of the sample RNAs) and water to 100 ul, was combined with 10 ul of beads, heated for 5 min at 95°C, and subjected to 2 reaction cycles (30 s at 95°C, 30 s at 56°C, 2 min at 72°C). Beads were washed with 100 ul of the PCR buffer and eluted in 50 ul of the same buffer.

PCR amplification: The PCR reaction was assembled as follows: 20 ul of the synthesized DNA, 8 ul of 10xPCR buffer, 3.2 ul of 25 mM MgCl₂, 0.8 ul of 100 uM LHA primer, 1 ul of 100 uM LFAM primer (5'-labeled with FAM, 5'-CCGCGCCGAATAATATTA-3') and LROX primer (5'-labeled with ROX, 5'-CCCGGCGGATT ATTTATTA-3'), 0.5 ul of Taq polymerase, 0.5 ul of Pwo polymerase, 2 ul of 10 mM dNTPs, 65 ul of water; overlaid with mineral oil and amplified for 35 cycles (30 s at 95°C, 15 s at 60°C, 1 min 30 s at 72°C). Starting with the cycle 15, reaction was paused after final step of each cycle to withdraw 10 ul aliquots and to replenish reaction with 10 ul of the reaction mixture (same composition as above with exception of sample DNA). Samples were supplemented with 1 ul of 50xTE buffer, diluted 10-fold with formamide, and denatured for 5 min at 95°C before analysis performed on 96 capillary electrophoresis system (Spectrumedix). Quantities of PCR products were determined by integration of the peak areas on the chromatograms of the corresponding runs. The amplification curve shown in Figure 7 was reconstructed by plotting PCR product quantity versus cycle number.

Example 2. Analysis Of Differential Expression Using Known Quantities Of Sample RNAs.

Two samples of control RNAs were prepared in nuclease-free water:

sample 1 containing: VS31 RNA 53pg/ul and VS32 RNA 42 pg/ul

sample 2 containing: VS31 RNA 53 pg/ul and VS32 RNA 102 pg/ul.

3 ul of each sample were mixed with 1.25 ul 20 mM dNTP, 1 ul of 100 uM primer (JLFam (5'-CCGCGCCGAATAATATTAAGCTCTAGCATTAG-3') for sample 1 and JLRox1 (5'-CCCGGCGGATTATTTATTAGCTCTAGCATTAG-3') for sample 2) and nuclease free water to 10 ul. RNA was denatured for 2 min at 80°C and cooled on ice. 15 ul of reaction mixture was added and incubated for 1 hour at 42°C.

RT reaction mixture:

5X buffer	5ul
0.1mM DTT	2.5ul
Superscript II RT (200U/ul)	0.5ul (25 to 100U depending on quantity of RNA)
80% trehalose	6.4ul
10mg/ml BSA	0.5ul
SUPERase In (20U/ul)	1ul

Final composition of RT reaction: RNA, 50mM Tris-HCl, pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10uM DTT, 50U SS II RT, 20% trehalose, 0.25mg/ml BSA, 1mM dNTP, 15.7% glycerol, 5uM primer, 1U SUPERase In

Destruction of RNA:

1U of RNaseH (Invitrogen) was added to each tube and incubated at 37°C for 20 minutes followed by 75°C for 15 minutes to kill the RNase H. 5 ul EXO-SAP-IT nuclease (USB) was added to the RT reaction and incubated for 20 minutes at 37°C to destroy unused primers to avoid interference in subsequent PCR analysis, followed by 15 minutes at 80°C to inactivate the enzyme.

Second strand synthesis:

5ul of the RT reaction was combined with the SSS reaction mixture:

10X Vent buffer	5.0 ul	
20mM dNTP	0.5 ul	
DMSO	1.0 ul	
Q solution	10 ul	
100 uM -HA	0.5 ul	
Vent Polymerase	0.5 ul	Vent DNA Polymerase (New England Biolabs)
water	27.5 ul	

The second strand was prepared in thermocycler as indicated.

1X 94°C/5min* 50°C/5min** 68°C/5min *Add 2nd strand primer at 94°C

2X 95°C/2min 40°C/5min 68°C/5min **Add Vent at 72°C
 1X 72°C/10min

PCR Amplification:

20 ul of prepared cDNA were combined with:

10X Vent buffer	7.0 ul
20mM dNTP	0.7 ul
DMSO	4 ul
Q solution (Qiagen)	15.0 ul
LHA (100 mM)	0.8 ul
LFAM2 primer (100 mM)	1 ul (5'-labeled with Fam (Applied Biosystems))
LROX primer (100 mM)	1 ul (5'-labeled with Rox (Applied Biosystems))
Taq Polymerase (Qiagen)	0.5 ul
Vent Polymerase	0.5 ul
Water	to 100 ul

The reaction mixtures were overlaid with mineral oil and subjected to PCR amplification for 35 cycles. (30 s at 95°C, 15 s at 60°C, 1 min 30 s at 72°C). Starting with the cycle 15, reaction was paused after final step of each cycle to withdraw 10 ul aliquots and to replenish reaction with 10 ul of the reaction mixture (same composition as above with exception of sample DNA). Samples were supplemented with 1 ul of 50xTE buffer, diluted 10 fold with formamide, mixed with labeled DNA size standards (50-1000 bp, BioVentures) and denatured for 5 min at 95°C before analysis performed on 96 capillary electrophoresis system (Spectrumedix). Quantities of PCR products were determined by integration of the peak areas on the chromatograms of the corresponding runs and normalized by the quantity of co-injected standard. The amplification curves shown in Figure 8 were reconstructed by plotting PCR product quantity versus cycle number. The data are in agreement with the expected results, i.e., that the threshold cycle number (C_t) for VS31 RNA (RNA 1 in the figure) was the same between samples, and for VS32 RNA (RNA 2 in the figure), the C_t for sample 2 is less than the C_t for sample 1.

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology, microbiology and recombinant DNA techniques, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See,

e.g., Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition ; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Polynucleotide Hybridization (B.D. Harnes & S.J. Higgins, eds., 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal, 1984); and a series, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Short Protocols In Molecular Biology, (Ausubel et al., ed., 1995). All patents, patent applications, and publications mentioned herein, both supra and infra, are hereby incorporated by reference.

OTHER EMBODIMENTS

While this invention has been particularly shown and described with references to preferred embodiments thereof, it will be understood by those skilled in the art that various changes in form and details may be made therein without departing from the scope of the invention encompassed by the appended claims.

SEQUENCE LISTING

<110> Sention, Inc.
 Slepnev, Vladimir

<120> Real Time Gene Expression Profiling

<130> 19781/2038

<140> Not Yet Assigned

<141> 2004-03-11

<150> US 10/387,286

<151> 2003-03-12

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic PCR primer that hybridizes to sequence in cloning
 vector pCDNA3 (Invitrogen)

<400> 1
 atcgaaatta atacgactca ctat 24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic PCR primer that hybridizes to sequence in cloning
 vector pCDNA3 (Invitrogen)

<400> 2
 agctctagca tttaggtgac acta 24

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence-tagged synthetic oligonucleotide primer used for reverse transcription.

<400> 3
aattccgcgc cgaataatat taagctctag catttag 37

<210> 4

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Sequence-tagged synthetic oligonucleotide primer used for reverse transcription.

<400> 4
aattcccggc ggattattta ttagctctag catttag 37

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence tag used in amplification

<400> 5
ccgcgccgaa taatattaa 19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence tag used in amplification

<400> 6
cccggcggat tatttatta 19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic PCR primer identical to the sequence present at the 5' end of the sample RNAs in Example 1.

<400> 7
ccatacgacg tcccagacta 20

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide primer used for reverse transcription in Example 2.

<400> 8
ccgcgcggaa taatattaag ctctagcatt tag 33

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide primer used for reverse transcription in Example 2.

<400> 9
cccggcggat tatttattag ctctagcatt tag 33

CLAIMS

1. A method for monitoring the amplification of a nucleic acid sequence of interest, said method comprising:

(a) contacting a nucleic acid sample with a first and a second oligonucleotide primer, wherein said first oligonucleotide primer specifically hybridizes with a nucleic acid molecule comprising said nucleic acid sequence of interest, and said second oligonucleotide primer specifically hybridizes with a sequence comprised by the complement of said nucleic acid sequence of interest, wherein the primer extension product of one oligonucleotide primer, when separated from its complement, can serve as a template for the synthesis of the extension product of the other primer, and wherein at least one of said first and said second primers is detectably labeled;

(b) subjecting the mixture resulting from step (a) to an amplification regimen, said regimen comprising at least two cycles of nucleic acid strand separation, oligonucleotide primer annealing, and polymerase extension of annealed primers;

(c) removing an aliquot of said mixture, separating nucleic acid molecules in said aliquot, and detecting incorporation of said at least one fluorescent label, wherein said removing is performed during said cycling regimen of step (b), following at least one of said cycles, wherein said separating nucleic acid molecules and said detecting incorporation is performed in real time during said regimen of step (b) and wherein said detection permits the monitoring of said amplification in real time.

2. The method of claim 1 wherein said detectable label comprises a light-absorbing dye, a fluorescent dye or a radioactive label.

3. The method of claim 2 wherein said detectable label comprises a fluorescent dye.

4. The method of claim 1 wherein step (c) is performed after each cycle in said amplification regimen.

5. The method of claim 1 wherein said separating nucleic acid molecules comprises capillary electrophoresis.

6. The method of claim 1 wherein said sample comprises products of a reverse-transcription reaction.
7. The method of claim 1 wherein said steps (a)–(c) are performed in a modular apparatus comprising a thermal cycler, a sampling device, a capillary electrophoresis device and a fluorescence detector.
8. The method of claim 7 wherein said modular device comprises a robotic arm.
9. The method of claim 1 wherein said monitoring permits the determination of the abundance of nucleic acid comprising said sequence of interest in said sample.
10. A method for monitoring the amplification of a set of nucleic acid sequences of interest, said method comprising:

(a) contacting a nucleic acid sample in a reaction vessel with a set of pairs of oligonucleotide primers, wherein:

each said pair comprises a first oligonucleotide primer that specifically hybridizes with a nucleic acid molecule comprising said nucleic acid sequence of interest, and a second oligonucleotide primer that specifically hybridizes with a sequence comprised by the complement of said nucleic acid sequence of interest, wherein the primer extension product of one oligonucleotide primer, when separated from its complement, can serve as a template for the synthesis of the extension product of the other primer;

each said pair of oligonucleotides is specific for one nucleic acid sequence of interest;

each oligonucleotide primer pair in said set is selected so that it generates a distinctly sized amplification product in a subsequent amplification regimen; and

one oligonucleotide in each said pair of oligonucleotides is detectably labeled;

(b) subjecting the mixture resulting from step (a) to an amplification regimen comprising at least two iterative cycles of nucleic acid strand separation, oligonucleotide primer annealing and polymerase extension of annealed primers, wherein during the amplification regimen, following at least one of said iterative cycles, an aliquot of said mixture is removed from said reaction vessel and nucleic acid molecules in said aliquot are separated;

(c) detecting the incorporation of detectable label in a distinctly sized primer extension product present in said aliquot, wherein said detecting provides a real time profile of the amplification of said nucleic acid sequences of interest.

11. The method of claim 10 wherein said detectable label comprises a light-absorbing dye, a fluorescent dye, or a radioactive label.

12. The method of claim 11 wherein said detectable label comprises a fluorescent dye.

13. The method of claim 10 wherein an aliquot is removed and nucleic acid molecules in said aliquot are separated and detected after each cycle in said amplification regimen.

14. The method of claim 10 wherein said separating nucleic acid molecules comprises capillary electrophoresis.

15. The method of claim 10 wherein said sample comprises products of a reverse-transcription reaction.

16. The method of claim 10 wherein said steps (a)–(c) are performed in a modular apparatus comprising a thermal cycler, a sampling device, a capillary electrophoresis device and a fluorescence detector.

17. The method of claim 16 wherein said modular device comprises a robotic arm.

18. The method of claim 10 wherein said monitoring permits the determination of the abundance of nucleic acids comprising said set of nucleic acid sequences of interest in said sample.

19. A method of monitoring the amplification of a set of nucleic acid sequences of interest, said method comprising:

(a) synthesizing a plurality of reverse transcription products by extension of a reverse transcription primer annealed to a template nucleic acid sample, wherein each of said reverse-transcription products comprises a common sequence tag comprised by said reverse-transcription primer;

(b) contacting said reverse-transcription products in a reaction vessel with (i) a set of oligonucleotide primers that recognize said set of nucleic acid sequences of interest, wherein each oligonucleotide primer is selected so that it generates a distinctly sized amplification

product in a subsequent amplification regimen, and (ii) a detectably labeled oligonucleotide primer that comprises said common sequence tag;

(c) subjecting the mixture resulting from step (b) to an amplification regimen comprising at least two iterative cycles of nucleic acid strand separation, oligonucleotide primer annealing and polymerase extension of annealed primers, wherein during the amplification regimen, following at least one of said iterative cycles, an aliquot of said mixture is removed from said reaction vessel and nucleic acid molecules in said aliquot are separated;

(d) detecting the incorporation of said detectably labeled oligonucleotide primer in a distinctly sized primer extension product present in said aliquot, wherein said detecting provides a profile of the amplification of said set of nucleic acid sequences of interest.

20. The method of claim 19 wherein said detectable label comprises a light absorbing dye, a fluorescent dye, or a radioactive label.

21. The method of claim 20 wherein said detectable label comprises a fluorescent dye.

22. The method of claim 19 wherein an aliquot is removed and nucleic acid molecules in said aliquot are separated and detected after each cycle in said amplification regimen.

23. The method of claim 19 wherein the aliquot removal, separating and detecting steps permit the real-time monitoring of said amplification.

24. The method of claim 19 wherein said separating nucleic acid molecules comprises capillary electrophoresis.

25. The method of claim 19 wherein said steps (a)–(d) are performed in a modular apparatus comprising a thermal cycler, a sampling device, a capillary electrophoresis device and a fluorescence detector.

26. The method of claim 25 wherein said modular device comprises a robotic arm.

27. The method of claim 19 wherein said monitoring permits the determination of the abundance of nucleic acids comprising said set of nucleic acid sequences of interest in said sample.

28. A method of monitoring the amplification of a set of nucleic acid sequences of interest, said method comprising:

(a) synthesizing a plurality of reverse transcription products by extension of a reverse transcription primer annealed to a template nucleic acid sample, wherein each of said reverse-transcription products comprises a first common sequence tag comprised by said reverse-transcription primer;

(b) synthesizing a complimentary cDNA strand using oligonucleotide primers comprising a common second sequence tag, wherein each oligonucleotide primer is selected so that it generates a distinctly sized amplification product in a subsequent amplification regimen.

(c) contacting the nucleic acid synthesis products of steps (a) and (b) in a reaction vessel with a set of oligonucleotide primers comprising oligonucleotides comprising said first and second common sequence tags, wherein one of said first and second oligonucleotides is detectably labeled;

(d) subjecting the mixture resulting from step (c) to an amplification regimen comprising at least two iterative cycles of nucleic acid strand separation, oligonucleotide primer annealing and polymerase extension of annealed primers, wherein during the amplification regimen, following at least one of said iterative cycles, an aliquot of said mixture is removed from said reaction vessel and nucleic acid molecules in said aliquot are separated;

(e) detecting the incorporation of said detectably labeled oligonucleotide primer in a distinctly sized primer extension product present in said aliquot, wherein said detecting provides a profile of the amplification of said set of nucleic acid sequences of interest.

29. The method of claim 28 wherein said detectable label comprises a light-absorbing dye, a fluorescent dye, or a radioactive label.

30. The method of claim 29 wherein said detectable label comprises a fluorescent dye.

31. The method of claim 28 wherein an aliquot is removed and nucleic acid molecules in said aliquot are separated and detected after each cycle in said amplification regimen.

32. The method of claim 28 wherein the aliquot removal, separating and detecting steps permit the real-time monitoring of said amplification.

33. The method of claim 28 wherein said separating nucleic acid molecules comprises capillary electrophoresis.

34. The method of claim 28 wherein said steps (a)–(d) are performed in a modular apparatus comprising a thermal cycler, a sampling device, a capillary electrophoresis device and a fluorescence detector.

35. The method of claim 34 wherein said modular apparatus comprises a robotic arm.

36. The method of claim 28 wherein said monitoring permits the determination of the abundance of nucleic acids comprising said set of nucleic acid sequences of interest in said sample.

37. A method for comparing the expression of a nucleic acid sequence of interest between a set of samples, said method comprising:

(a) separately synthesizing a plurality of first strand cDNAs from each member of said set of samples using, for each sample, an oligonucleotide primer comprising a different sample-specific sequence tag;

(b) mixing equal amounts of said first strand cDNAs from step (a);

(c) contacting the mixture resulting from step (b) in a reaction vessel with oligonucleotide primers comprising:

(i) a separate, distinguishably detectably labeled oligonucleotide primer corresponding to each sample-specific sequence tag used in step (a), wherein said primer comprises sufficient sequence comprised by said sample specific sequence tag to permit specific annealing of said primer to a nucleic acid molecule comprising said sample-specific tag;

(ii) an oligonucleotide primer comprising sufficient sequence complementary to said nucleic acid sequence of interest to permit specific annealing of said primer to a nucleic acid molecule comprising said sequence of interest;

wherein said primers corresponding to said sample-specific sequence tags and said primer comprising sequence complementary to said nucleic acid sequence of interest generate primer extension products that, when separated from their complements, can serve as template for the synthesis of a primer extension product of the other primer; and

(d) subjecting the mixture of step (c) to an amplification regimen comprising at least two iterative cycles of strand separation, oligonucleotide primer annealing, and polymerase extension of the annealed primers;

(e) removing, during said amplification regimen, after at least one of said iterative cycles, an aliquot from said reaction vessel, separating nucleic acids in said aliquot and detecting primer extension products comprising distinguishably detectably labeled oligonucleotide primer corresponding to each sample-specific sequence tag, wherein said separating nucleic acid molecules and said detecting incorporation is performed in real time during said regimen of step (d) and wherein said detection permits the monitoring of said amplification in real time;

(f) comparing the detectable signals from said labels corresponding to said sample-specific tags, thereby comparing the expression of said gene of interest between said samples.

38. The method of claim 37 wherein said detectable label comprises a light-absorbing dye, a fluorescent dye, or a radioactive label.

39. The method of claim 38 wherein said detectable label comprises a fluorescent dye.

40. The method of claim 37 wherein said steps of removing an aliquot, separating nucleic acids in said aliquot and detecting primer extension products is performed after each cycle in said amplification regimen.

41. The method of claim 37 wherein said separating nucleic acid molecules comprises capillary electrophoresis.

42. The method of claim 37 wherein said steps (a) –(c) are performed in a modular apparatus comprising a thermal cycler, a sampling device, a capillary electrophoresis device and a fluorescence detector.

43. The method of claim 42 wherein said modular device comprises a robotic arm.

44. A method of monitoring the amplification of a set of nucleic acid sequences, said method comprising:

(a) amplifying a set of nucleic acid sequences present in a set of reverse-transcription products wherein said amplifying comprises a regimen of at least two cycles of strand separation, oligonucleotide primer annealing and polymerase extension of the annealed primers, wherein each reverse transcription product in said set was made by extension of a reverse-transcription primer, said set of reverse transcription products comprising:

one or more subsets of reverse-transcription products, wherein each subset comprises a plurality of reverse-transcription products from a single nucleic acid sample, wherein the members of each subset of reverse-transcription products comprise a sample-specific sequence tag incorporated into said reverse-transcription primer, wherein said amplifying comprises contacting said set of reverse-transcription products with two sets of oligonucleotide primers:

(i) a set of gene-specific primers, wherein each gene specific primer in said set recognizes a specific nucleic acid sequence expressed in a nucleic acid sample, and wherein each gene specific primer in said set is selected so as to generate an amplification product that is distinct in size from amplification products generated with other gene specific primers in said set; and

(ii) a set of sample specific primers, wherein each sample specific primer specifically hybridizes to a sample specific tag incorporated into a said reverse-transcription primer, and wherein each sample specific primer in said set of sample specific primers is distinguishably labeled;

(b) during said regimen, following a primer extension step, removing an aliquot of the amplification mixture and separating nucleic acids in said aliquot; and

(c) detecting incorporation of each sample specific primer in said aliquot;

wherein said detecting monitors, in each sample, in real time, the amplification of the set of nucleic acids recognized by said set of gene specific primers.

45. The method of claim 44 wherein said steps of removing an aliquot, separating nucleic acids in said aliquot and detecting primer extension products is performed after each cycle in said amplification regimen.

46. The method of claim 44 wherein said sample-specific primer is distinguishably labeled with a fluorescent dye, a light-absorbing dye, or a radioactive label

47. The method of claim 46 wherein said sample-specific primer is distinguishably labeled with a fluorescent dye.

48. The method of claim 44 wherein said separating nucleic acid molecules comprises capillary electrophoresis.

49. The method of claim 44 wherein said steps (a) –(c) are performed in a modular apparatus comprising a thermal cycler, a sampling device, a capillary electrophoresis device and a fluorescence detector.

50. The method of claim 49 wherein said modular device comprises a robotic arm.

51. The method of claim 44 wherein said monitoring permits the determination of the abundance of nucleic acids comprising said set of nucleic acid sequences of interest in a sample from which said reverse-transcription products are made.

(57) Abstract: The invention relates to methods of monitoring the amplification of one or more nucleic acid sequences of interest. More particularly, the invention relates to methods of monitoring the amplification of sequences of interest in real time. The methods disclosed herein provide methods for monitoring the amplification of one sequence or two or more sequences from a single sample, as well as methods for monitoring the amplification of one or more than one sequence from two or more samples. The monitoring methods of the invention permit improved determination of the abundance of one or more target nucleic acids, especially target RNA species, in one or more original samples.

Representative Drawing

Fig.1

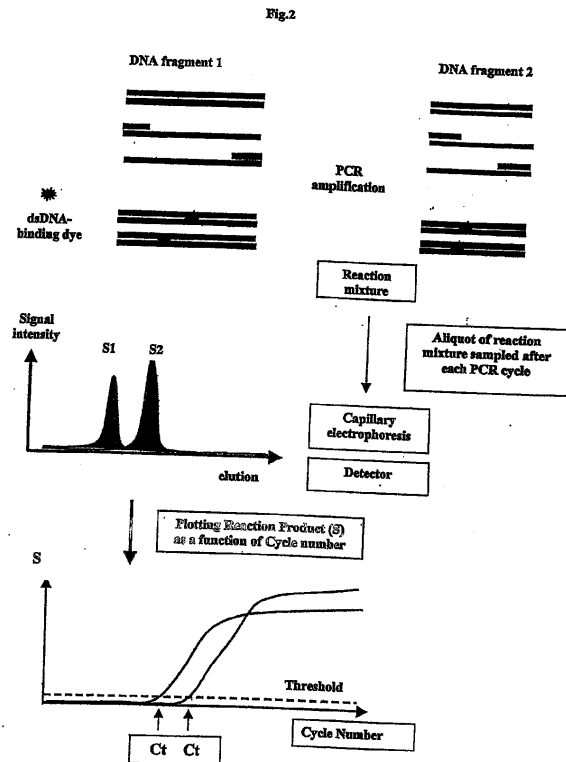
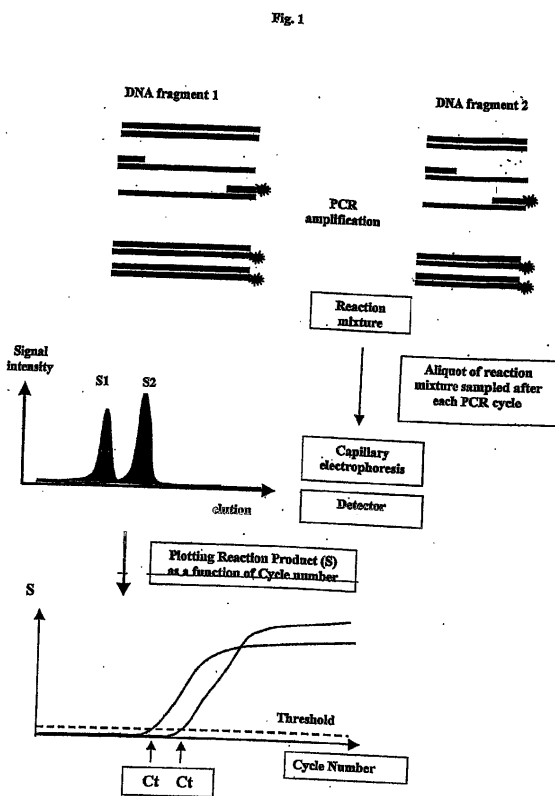


Fig. 3

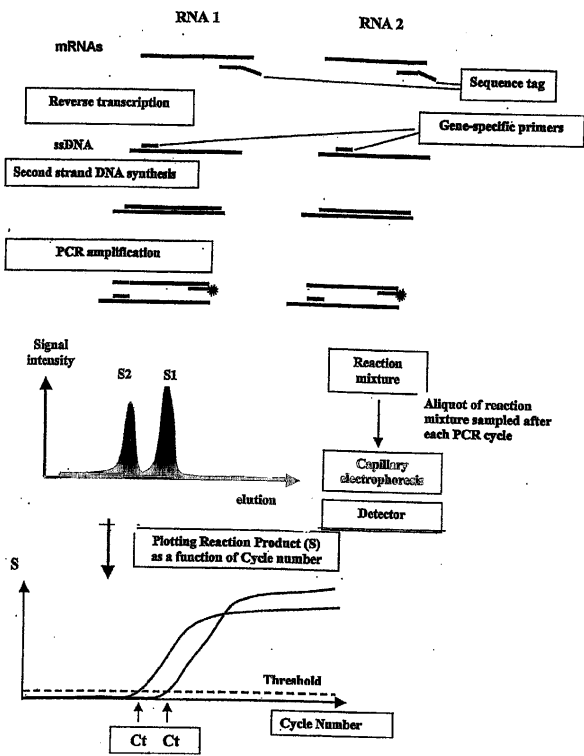


Fig. 4

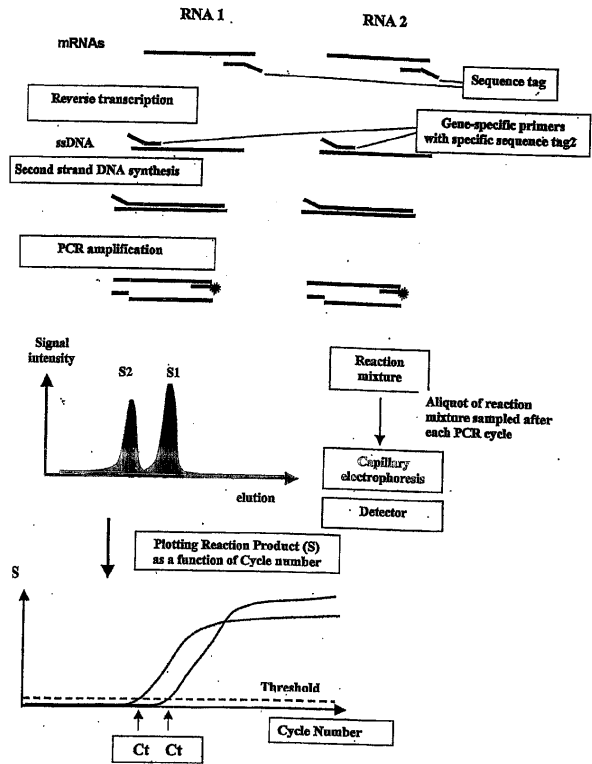


Fig. 5

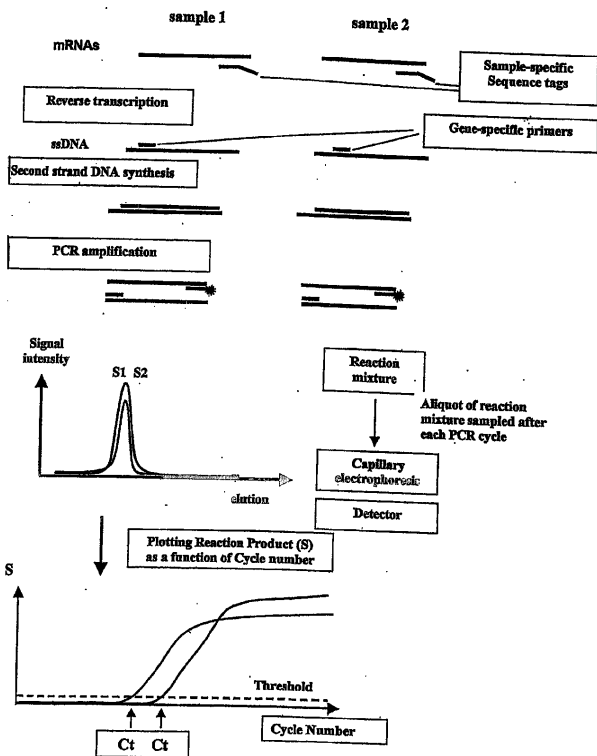
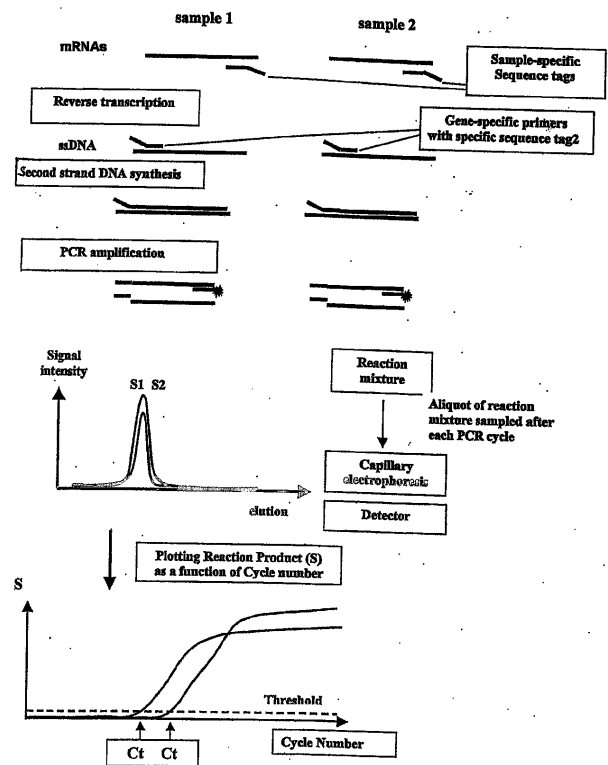


Fig. 6



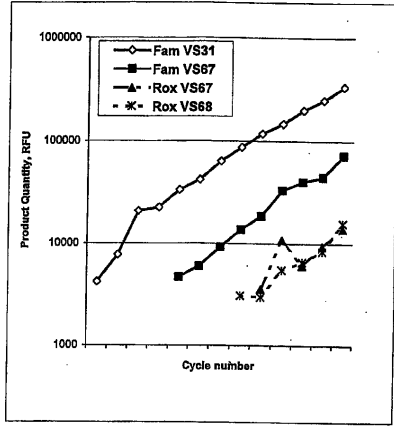


FIGURE 7

FIGURE 8

Recovery of Quantitative difference

Two samples containing two different RNAs

Sample 1

VS31 equal concentration

VS32 2.5 times more in sample 2

Expected results:

RNA1

Threshold cycles (Ct) for both samples is equal

RNA2

Threshold cycle (Ct) for sample 2 (B) is less than

Threshold cycle (Ct) for sample 1 (A)

