

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7611859号
(P7611859)

(45)発行日 令和7年1月10日(2025.1.10)

(24)登録日 令和6年12月26日(2024.12.26)

(51)国際特許分類

C 1 2 Q	1/6876(2018.01)	C 1 2 Q	1/6876	Z
C 1 2 Q	1/6837(2018.01)	C 1 2 Q	1/6837	Z
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851	Z
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 N	9/22 (2006.01)	C 1 2 N	9/22	

請求項の数 16 (全66頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-569060(P2021-569060)
 (86)(22)出願日 令和2年5月20日(2020.5.20)
 (65)公表番号 特表2022-533228(P2022-533228
 A)
 (43)公表日 令和4年7月21日(2022.7.21)
 (86)国際出願番号 PCT/US2020/033884
 (87)国際公開番号 WO2020/236992
 (87)国際公開日 令和2年11月26日(2020.11.26)
 審査請求日 令和5年5月19日(2023.5.19)
 (31)優先権主張番号 62/850,239
 (32)優先日 令和1年5月20日(2019.5.20)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 517332524
 インシリクサ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 89, サニーベール, ハームリン コ
 ート 1000
 (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74)代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74)代理人 230113332
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 光によりトリガーされる核酸構築物および分子検出のための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ネステッドポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のための光停止型プライマー対および光開始型プライマー対を含む組成物であって、

前記光停止型プライマー対および光開始型プライマー対の各メンバーが独立して、

- a) 複数のスクレオチドと、
- b) 1つまたは複数の光切断性部分と

を含む核酸構築物であり、

前記光停止型プライマー対の前記核酸構築物が、前記ネステッドPCRにおいて活性であり、前記光停止型プライマー対の前記核酸構築物が、前記光停止型プライマー対上の前記1つまたは複数の光切断性部分の非存在下では前記ネステッドPCRにおいて不活性であるように構成され、

前記光開始型プライマー対の前記核酸構築物が、前記ネステッドPCRにおいて不活性であり、前記光開始型プライマー対の前記核酸構築物が、前記光開始型プライマー対上の前記1つまたは複数の光切断性部分の非存在下では前記ネステッドPCRにおいて活性であるように構成され、

前記1つまたは複数の光切断性部分の各々が独立して、

- a) 前記核酸構築物の3'末端に位置するか、
- b) 前記核酸構築物の5'末端に位置するか、
- c) 前記3'末端と前記5'末端との間に位置するか、

d) 前記複数のヌクレオチドのヌクレオチドの核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、

e) 前記ヌクレオチドのリボース上もしくはそれに接続して位置するか、

f) 前記複数のヌクレオチドの前記ヌクレオチドと別のヌクレオチドとの間にそれらに接続して位置するか、または

g) それらの組合せであり、

前記光停止型プライマー対が前記光開始型プライマー対に隣接していることにより、前記光停止型プライマー対の活性形態によって產生されたアンブリコンが、前記光開始型プライマー対の活性形態の鑄型として使用される、組成物。

【請求項 2】

前記光停止型プライマー対の前記核酸構築物が、前記光停止型プライマー対上の前記 1 つまたは複数の光切断性部分の非存在下ではヘアピン構造を形成するように構成される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記光停止型プライマー対の前記 1 つまたは複数の光切断性部分が、前記光停止型プライマーの 5' 末端に位置する、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記光停止型プライマー対の前記核酸構築物が、前記光停止型プライマー対上の前記 1 つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記ネステッド P C R において不活性である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記光開始型プライマー対の前記核酸構築物が、前記光開始型プライマー対上の前記 1 つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記ネステッド P C R において活性であるように構成される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記光開始型プライマー対の前記 1 つまたは複数の光切断性部分が、前記 3' 末端に位置する、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記光開始型プライマー対の前記光切断性部分の各々が、前記 3' 末端と前記 5' 末端との間および核酸塩基上に位置する、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記光開始型プライマー対の前記 1 つまたは複数の光切断性部分の前記光切断性部分が、独立して、前記光開始型プライマーの前記核酸構築物の前記 3' 末端と前記 5' 末端との間および前記複数のヌクレオチドの前記 2 つの連続したメンバーの間に位置する、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記光開始型プライマー対の前記核酸構築物の各々が、第 1 の核酸セクションおよび前記第 1 の核酸セクションに相補的な第 2 の核酸セクションを含み、別のヘアピン構造を形成する、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記光開始型プライマー対の前記第 1 の核酸セクションおよび前記第 2 の核酸セクションが、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を含まない、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記光停止型プライマー対の前記各メンバーが、鑄型核酸分子に相補的な第 1 の配列を有し、前記鑄型核酸分子に相補的な前記第 1 の配列が、前記光停止型プライマー対の前記各メンバーの 3' 末端に位置する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記光開始型プライマー対の前記各メンバーが、前記鑄型核酸分子に相補的な第 2 の配列を有し、前記第 1 の配列が、前記鑄型核酸分子に関して前記第 2 の配列に隣接する、請求

10

20

30

40

50

項 1_1 に記載の組成物。

【請求項 1_3】

請求項 1 ~ 1_2 のいずれか一項に記載の組成物を使用して前記ネステッド P C R を行う方法であって、

a) 前記光停止型プライマー対および前記光開始型プライマー対を含む前記組成物、内部核酸配列を含む少なくとも 1 つの鑄型核酸分子、およびポリメラーゼを含む反応混合物を用意するステップであって、前記内部核酸配列が、前記鑄型核酸分子内で入れ子になっている、ステップと、

b) 前記反応混合物を、前記鑄型核酸分子を増幅するために前記光停止型プライマー対を使用する第 1 の鎖伸長の条件に供し、それによって、前記鑄型核酸分子のアンプリコンまたは前記鑄型核酸分子の相補配列を形成するステップと、

c) 前記反応混合物に光の光子を照射し、それによって、前記光停止型プライマー対を不活性化して、前記第 1 の鎖伸長を停止させ、前記光開始型プライマー対を活性化させて、前記活性化された光開始型プライマー対を使用する第 2 の鎖伸長を開始させ、前記内部核酸配列のアンプリコンまたは前記内部核酸配列の相補配列を形成するステップとを含み、a) ~ c) が密閉チューブ様式で行われる、方法。

【請求項 1_4】

1) 前記光停止型プライマー対および前記光開始型プライマー対の存在下で 2 つ以上のヌクレオチド配列に対して前記ネステッド P C R を実行し、流体中に 2 つ以上のアンプリコンを产生するステップと；

2) 独立して処理可能な位置にある複数の核酸プローブを有する固体表面を備えたアレイを用意するステップであって、前記アレイが、前記流体と接触するように構成される、ステップと；

3) 前記流体が前記アレイと接触している間に、前記複数の核酸プローブのうちの 2 つ以上の核酸プローブに対する前記 2 つ以上のアンプリコンのハイブリダイゼーションを測定して、アンプリコンハイブリダイゼーション測定値を得るステップであって、前記アンプリコンがクエンチャーを含む、ステップとをさらに含む、請求項 1_3 に記載の方法。

【請求項 1_5】

前記ネステッド P C R が定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - P C R) であり、前記方法が、1) 表面および複数の異なるプローブを有する固体支持体を備えたアレイを用意するステップであって、前記複数の異なるプローブが、異なる処理可能な位置において前記表面に固定され、処理可能な位置の各々が蛍光部分を備える、ステップと；

2) 複数のヌクレオチド配列を含む試料に対して P C R 増幅を実行するステップであって；前記 P C R 増幅が流体中で実施され、(i) 各核酸配列についての前記光停止型プライマー対および前記光開始型プライマー対の各々がクエンチャーを含み；かつ、(i i) 前記流体が前記複数の異なるプローブと接触しており、前記 P C R 増幅において產生されたアンプリコンが前記複数のプローブとハイブリダイズし、それによって、前記蛍光部分からのシグナルをクエンチする、ステップと；

3) 前記処理可能な位置の各々において前記蛍光部分からの前記シグナルを経時的に検出するステップと；

4) 経時的に検出された前記シグナルを使用して、前記流体中の前記アンプリコンの量を決定するステップと；

5) 前記流体中の前記アンプリコンの前記量を使用して、前記試料中の前記ヌクレオチド配列の量を決定するステップ

をさらに含む、請求項 1_3 に記載の方法。

【請求項 1_6】

前記ネステッド P C R が定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - P C R) であり、前記方法が、

1) 前記光開始型プライマー対が限定プライマーおよび過剰プライマーを含み；

2) 前記鑄型核酸分子および前記限定プライマーの増幅産物として少なくとも 1 つの標的

10

20

30

40

50

核酸分子を得るのに十分な条件下で前記反応混合物を前記Q - P C Rに供するステップであって、少なくとも1つの標的核酸分子が前記限定プライマーを含む、ステップと；
 3) (i) 基材であって、異なる個々に処理可能な位置において前記基材の表面に固定された複数のプローブを備え、前記プローブが、前記限定プライマーと相補的な配列を有し前記限定プライマーを捕捉できる、基材、および(i)前記処理可能な位置から少なくとも1つのシグナルを検出するように構成された検出器のアレイであって、前記少なくとも1つのシグナルが、前記複数のプローブのうちの個々のプローブとの前記限定プライマーの結合を示す、検出器のアレイ、を有するセンサアレイと、前記反応混合物とを接触させるステップと；

4) 前記検出器のアレイを使用して、前記核酸增幅反応中の複数の時点で、1つ以上の前記処理可能な位置からの前記少なくとも1つのシグナルを検出するステップと；

5) 前記複数のプローブのうちの前記個々のプローブとの前記限定プライマーの結合を示す前記少なくとも1つのシグナルに基づき、前記標的核酸分子を検出するステップとをさらに含む、請求項1_3に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2019年5月20日に出願された米国仮特許出願第62/850,239号に対する優先権を主張し、これは、あらゆる目的で参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

核酸(NA)試験は、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)分子の特定の配列の遺伝子構造を検出、定量、および特定するために使用される、固有の分析技法である。NA試験は、多くの用途を有し、ライフサイエンス研究および分子診断の両方において広く使用されている。用途および試験場所とは関係なく、試験試料中の遺伝子材料(RNAまたはDNAコピー)の量は、典型的には非常にわずかであり、直接的に検出することができないため、物理化学的、生化学的、または酵素的な方法を使用して、生成される標的特異的シグナルを増強して、確実により感度の高い試験となるようにすることは、非常に一般的である。これらの方法のうちのいくつかは、分子增幅プロセス、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を利用して、標的NAのコピー数を増加させる。そのような試験は、分類され、広く知られており、核酸增幅試験(NAAT)として従来的に分類されている。加えて、増幅の方法としては、例えば、鎖置換増幅(SDA)、および核酸配列に基づく増幅(NASBA)、およびローリングサークル増幅(RCA)が挙げられる。

【0003】

NAAT方法は、様々な異なる性能基準を有し、これには、分析感度、特異度、検出限界(LOD)、定量範囲、検出ダイナミックレンジ(DDR)、および所要時間(TAT)が含まれる。異なる用途には異なる基準が必要となり、使用される方法に応じて、常に妥協点が存在する。例えば、感染性疾患用途では、臨床標本中の感染病原体の存在または非存在を正確に特定することが重要である。したがって、1回の試験で数種類の生物のLODを提供するNAAT方法が必要であるが、定量範囲の重要性は低く、これは、患者の処置があまりその情報に依存しないためである。一方で、遺伝子発現用途では、臨床試料中のメッセンジャーRNA(mRNA)の濃度が比較的高く、DDRが、LODよりもはるかに重要となる。

【0004】

現在、特定の酵素、試薬、および温度プロファイルを使用して、特定の配列を増幅させ検出する、NA検出のための様々なNAAT方法が存在する。本発明において、本発明者らは、特定のNAAT方法に含めた場合にそれらの性能基準を改善することができる、方

10

20

30

40

50

法および分子構造について説明する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明では、分子検出アッセイに組み込むことにより、広く定義されるアッセイ検出性能を改善し、作業フローの複雑性およびその所要時間を低減することができる、固有の核酸（NA）構築物および方法について、説明する。

【0006】

本開示の態様は、感光性化学部分を含むNA構築物であって、第1の分子状態にあり、光への曝露の後に、第2の分子状態へと変化するように構成される、NA構築物と、少なくとも1つの試薬と、少なくとも1つの酵素とを含む反応チャンバーであって、光が核酸構築物に到達するのを可能にするように構成される、反応チャンバーを提供する。

【0007】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、NA構築物は、オリゴヌクレオチドプライマーまたはプローブである。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、少なくとも1つの酵素は、ポリメラーゼ、逆転写酵素、ターミナルトランスフェラーゼ、エクソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、またはリガーゼである。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、少なくとも1つの試薬は、1つまたは複数の増幅試薬を含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、標的NAをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、酵素は、標的NA、少なくとも1つの試薬、およびNA構築物と関連する反応を触媒するように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第1の分子状態にあるNA構築物は、反応において活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第2の分子状態にあるNA構築物は、反応において不活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第1の分子状態にあるNA構築物は、反応において不活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第2の分子状態にあるNA構築物は、反応において活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、別の感光性化学部分を含む別のNA構築物をさらに含み、別のNA構築物は、第3の分子状態にあり、別のNA構築物は、別の光への曝露の後に、第4の分子状態に変化するように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、別の光は、光である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第1の分子状態にあるNA構築物は、反応において活性であるように構成され、第3の分子状態にある別のNA構築物は、反応において不活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第2の分子状態にあるNA構築物は、反応において不活性であるように構成され、第4の分子状態にある別のNA構築物は、反応において活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第1の分子状態にあるNA構築物および第3の分子状態にある別のNA構築物は、反応において活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第2の分子状態にあるNA構築物および第4の分子状態にある他のNA構築物は、反応において不活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第1の分子状態にあるNA構築物および第3の分子状態にある別のNA構築物は、反応において不活性であるように構成される。

【0008】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第2の分子状態にあるNA構築物および第4の分子状態にある別のNA構築物は、反応において活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、酵素は、ポリメラーゼであり、反応は、ポリメラーゼ連鎖反応であり、NA構築物は、オリゴヌクレオチドプライマーである。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、感光性化学部分は、NA構築物の3'末端、5'末端、または中央に位置する。本明細書において提供され

10

20

30

40

50

る態様の一部の実施形態では、NA構築物は、追加の感光性化学部分をさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第5の分子状態は、第1の分子状態であり、第6の分子状態は、第2の分子状態である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、反応チャンバーは、密閉チューブ反応チャンバーである。

【0009】

本開示の別の態様は、反応を行うことであって、反応チャンバーを活性化して反応を行うステップであって、反応チャンバーが、第1の分子状態にある感光性化学部分を含む核酸構築物、少なくとも1つの試薬、および少なくとも1つの酵素を含む、ステップと、反応チャンバー内の核酸構築物に到達するように光を活性化し、それによって、核酸構築物を第2の分子状態へと変化させるステップとを含む、反応を行うことを提供する。

10

【0010】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、NA構築物は、オリゴヌクレオチドプライマーまたはプローブである。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、少なくとも1つの酵素は、ポリメラーゼ、逆転写酵素、ターミナルトランスフェラーゼ、エクソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、またはリガーゼである。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、少なくとも1つの試薬は、1つまたは複数の增幅試薬を含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、反応チャンバーは、標的核酸をさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、酵素は、標的核酸の、少なくとも1つの試薬および核酸構築物との反応を触媒する。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第1の分子状態にある核酸構築物は、反応において活性である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第1の分子状態にある核酸構築物は、反応において不活性である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第2の分子状態にある核酸構築物は、反応において活性である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、反応チャンバーは、第3の分子状態にある別の感光性化学部分を含む別の核酸構築物をさらに含み、別の核酸構築物は、別の光への曝露の後に、第4の分子状態へと変化するように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、別の光は、光であり、光を活性化するステップにより、核酸構築物を活性化する。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、別の核酸構築物に到達するように別の光を活性化するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、光を活性化するステップの後に、反応において核酸構築物を非活性化するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、光を活性化するステップの後または別の光を活性化するステップの後に、別の核酸構築物を活性化するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、光を活性化するステップまたは別の光を活性化するステップの後に、別の核酸構築物を非活性化するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、光を活性化するステップの後に、反応において核酸構築物を活性化するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、光を活性化するステップまたは別の光を活性化するステップの後に、別の核酸構築物を非活性化するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、光を活性化するステップまたは別の光を活性化するステップの後に、別の核酸構築物を活性化するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、反応は、伸長、消化、転写、末端転移、またはライゲーションである。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、反応チャンバーにおいて反応を行う場合、外部試薬は、反応チャンバーに添加されない。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、反応チャンバーにおいて反応を行う場合、核酸構築物、少なくとも1つの試薬、または少なくとも1つの酵素のいずれも、反応チャンバーから除去されず、酵素は、ポリメラーゼであり、反応は、ポリメラーゼ連鎖反応であり、核酸構築物は、オリゴヌクレオチドプライマーである。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、感光性化学部分は、核酸構築物の3末端、5末端、または中央に位置する。

20

30

40

50

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、追加の感光性化学部分をさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、標的核酸は、メジャー対立遺伝子およびマイナー対立遺伝子を含み、反応は、ポリメラーゼ連鎖反応である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、メジャー対立遺伝子に相補的な配列を含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第1の分子状態にある核酸構築物は、メジャー対立遺伝子のアンプリコンの作製に関して、ポリメラーゼ連鎖反応において不活性である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第2の分子状態にある核酸構築物は、メジャー対立遺伝子のアンプリコンの作製に関して、ポリメラーゼ連鎖反応において活性である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第2の分子状態にある核酸構築物は、メジャー対立遺伝子のアンプリコンの作製に関して、ポリメラーゼ連鎖反応において不活性である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、別の核酸構築物は、マイナー対立遺伝子のプライマーであり、方法は、光を活性化するステップの前に、マイナー対立遺伝子のアンプリコンを產生させるステップをさらに含む。

【0011】

本開示の態様は、a)複数のヌクレオチドと、b)1つまたは複数の光切断性部分とを含む核酸構築物であって、1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、a)核酸構築物の3'末端に位置するか、b)核酸構築物の5'末端に位置するか、c)3'末端と5'末端との間に位置するか、d)核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、e)リボース上もしくはそれに接続して位置するか、f)複数のヌクレオチドの2つの連続するメンバーの間にそれらに接続して位置するか、またはg)それらの組合せである、核酸構築物を提供する。

【0012】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、生化学的反応において不活性であるように構成され、生化学的反応は、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、ライゲーション、ターミナルトランスフェラーゼ伸長、ハイブリダイゼーション、エクソヌクレアーゼ消化、エンドヌクレアーゼ消化、または制限消化である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、1つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、核酸分子は、生化学的反応において活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、プライマーであり、生化学的反応は、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、1つまたは複数の光切断性部分は、3'末端に位置する。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれは、独立して、3'末端と5'末端との間および選択された核酸塩基上に位置する。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれは、独立して、3'末端と5'末端との間および複数のヌクレオチドの2つの連続したメンバーの間に位置する。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、3'末端は、生化学的反応において不活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、第1の核酸セクションおよび第2の核酸セクションに相補的な第2の核酸セクションを含み、核酸構築物は、ヘアピン構造を形成するように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第1の核酸セクションおよび第2の核酸セクションは、1つまたは複数の光切断性部分を含まない。

【0013】

本開示の態様は、本開示の核酸構築物を使用して、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、a)核酸構築物、少なくとも1つの鑄型核酸分子、ポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、核酸構築物が、鑄型核酸分子と相補的な配列を有する、ステップと、b)反応混合物を、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供するステップと、c)反応混合物または核酸構築物に光の光子を照射し、それによって

、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行するステップとを含む、方法を提供する。

【0014】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、b)の供するステップは、c)の実行するステップを作動させない。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、c)の照射するステップの前に、反応混合物中でインタクトなままである。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、c)において、1つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、c)において、核酸分子を形成するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、c)の実行するステップは、c)において照射するステップの後に形成される核酸分子を、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長のプライマーとして使用するステップを含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、反応混合物は、別のプライマーをさらに含み、別のプライマーは、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長において活性である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、別のプライマーは、c)の照射するステップの前に、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長において活性である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、b)のポリメラーゼに触媒される鎖伸長により、別のプライマーを含むアンプリコンが産生される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)であり、方法は、c)において、1)本開示の核酸構築物の存在下において、2つまたはそれを上回るヌクレオチド配列に、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行して、流体中に2つまたはそれを上回るアンプリコンを産生させるステップと、2)独立して処理可能な位置に複数の核酸プローブを有する固体表面を含むアレイを用意するステップであって、アレイが、流体と接触するように構成される、ステップと、3)流体がアレイと接触している間に、2つまたはそれを上回るアンプリコンの、複数の核酸プローブのうちの2つまたはそれを上回る核酸プローブへのハイブリダイゼーションを測定して、アンプリコンハイブリダイゼーション測定値を得るステップであって、アンプリコンが、クエンチャーを含む、ステップとをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)であり、方法は、c)において、1)表面および複数の異なるプローブを有する固体支持体を含むアレイを用意するステップであって、複数の異なるプローブが、異なる処理可能な位置で表面に固定されており、各処理可能な位置が、蛍光部分を含む、ステップと、2)複数のヌクレオチド配列を含む試料にPCR增幅を実行するステップであって、PCR增幅が、流体中で行われ、(i)本開示の核酸構築物が、各核酸配列のPCRプライマーであり、クエンチャーを含み、(ii)流体が、複数の異なるプローブと接触しており、PCR增幅において産生されるアンプリコンが、複数のプローブとハイブリダイズし、それによって、蛍光部分からのシグナルをクエンチする、ステップと、3)処理可能な位置のそれぞれにおいて蛍光部分からのシグナルを経時的に検出するステップと、4)経時に検出されたシグナルを使用し、流体中のアンプリコンの量を決定するステップと、5)流体中のアンプリコンの量を使用して、試料中のヌクレオチド配列の量を決定するステップとをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)であり、方法は、c)において、1)少なくとも1つの鑄型核酸分子を含有する核酸試料、プライマー対、およびポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、プライマー対が、鑄型核酸分子との配列相補性を有し、プライマー対が、限定プライマーおよび過剰プライマーを含み、限定プライマーおよび過剰プライマーのうちの少なくとも1つが、本開示の核酸構築物である、ステップと、2)反応混合物を、鑄型核酸分子および限定プライマーの増幅産物として少なくとも1つの標的核酸分子を得るのに十分な条件下において、Q-PCRに供するステップであって、少なくとも1つの標的核酸分子が、限定プライマーを含む、ステップと、3)反応混合物を、(i)異なる個別に処理可能な位置で基板の表面に固定された複数のプローブを含む基板であって、プローブが、限定プライマーとの配

10

20

30

40

50

列相補性を有し、限定プライマーを捕捉することができる、基板と、(i i)処理可能な位置からの少なくとも1つのシグナルを検出するように構成される検出器アレイであって、少なくとも1つのシグナルが、限定プライマーが複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを有するセンサーライドと接触させるステップと、4)検出器アレイを使用して、核酸増幅反応中の複数の時点で、1つまたは複数の処理可能な位置からの少なくとも1つのシグナルを検出するステップと、5)限定プライマーが複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す少なくとも1つのシグナルに基づいて、標的核酸分子を検出するステップとをさらに含む。

【0015】

本開示の態様は、本開示の核酸構築物を使用して、少なくとも1つの標的核酸分子をアッセイするためのシステムであって、1)少なくとも1つの鑄型核酸分子を含有する核酸試料、鑄型核酸分子に相補的な配列を有するプライマー対、およびポリメラーゼを含む反応混合物を含む反応チャンバーであって、プライマー対が、限定プライマーおよび過剰プライマーを含み、限定プライマーおよび過剰プライマーのうちの少なくとも1つが、本開示の核酸構築物であり、反応混合物を含む反応チャンバーが、反応混合物に対する核酸増幅反応を促進して、鑄型核酸の増幅産物として少なくとも1つの標的核酸分子を得るように構成される、反応チャンバーと、2)(i)異なる個別に処理可能な位置で基板の表面に固定された複数のプローブを含む基板であって、プローブが、限定プライマーとの配列相補性を有し、限定プライマーを捕捉することができる、基板と、(i i)処理可能な位置からの少なくとも1つのシグナルを検出するように構成される検出器アレイであって、少なくとも1つのシグナルが、限定プライマーが複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを含む、センサーライドと、3)センサーライドに連結され、(i)反応混合物を核酸増幅反応に供し、(i i)核酸増幅反応中の複数の時点で、処理可能な位置のうちの1つまたは複数からの少なくとも1つのシグナルを検出するようにプログラムされる、コンピュータープロセッサーとを備える、システムを提供する。

10

20

【0016】

本開示の態様は、a)複数のヌクレオチドと、b)1つまたは複数の光切断性部分とを含む核酸構築物であって、1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、a)核酸構築物の3'末端と核酸構築物の5'末端との間に位置するか、b)核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、c)リボース上もしくはそれに接続して位置するか、d)複数のヌクレオチドの2つの連続するメンバーの間にそれらに接続して位置するか、またはe)それらの組合せである、核酸構築物を提供する。

30

【0017】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、生化学的反応において活性であるように構成され、生化学的反応は、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、ライゲーション、ターミナルトランスフェラーゼ伸長、ハイブリダイゼーション、エクソヌクレアーゼ消化、エンドヌクレアーゼ消化、または制限消化である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、1つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、核酸分子は、生化学的反応において活性である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、1つまたは複数の光切断性部分の光切断のすぐ後に、核酸分子を形成するように構成され、核酸分子は、生化学的反応において活性であり、核酸分子は、3'末端の近傍に位置する。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、プライマーであり、生化学的反応は、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長である。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれは、独立して、3'末端と5'末端との間および選択された核酸塩基上に位置する。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、1つまたは複数の光切断性部分の非存在下において、ヘアピン構造を形成するように構成され、それによって、1つまたは複

40

50

数の光切断性部分の非存在下において、プライマーとして不活性になっている。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれ、独立して、3'末端と5'末端との間および複数のヌクレオチドの2つの連続したメンバーの間に位置する。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、錆型核酸分子に相補的な第1の配列を含み、第1の配列は、3'末端またはその近傍に位置する。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、錆型核酸分子に相補的な第2の配列をさらに含み、第2の配列は、5'末端またはその近傍に位置し、1つまたは複数の光切断性部分のうちの少なくとも1つは、第1の配列と第2の配列との間に位置する。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、1つまたは複数の光切断性部分は、少なくとも1つのヌクレオチドによって、第1の配列および/または第2の配列から分離している。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、第1の配列および第2の配列の両方が錆型核酸分子とハイブリダイズした場合に、第1の配列と第2の配列との間でヘアピンループを形成するように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第2の配列は、5'と5'との連結で、核酸構築物の残りへの接続を含み、第2の配列は、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長において非伸長性であるように構成される。

【0018】

本開示の態様は、本開示の核酸構築物を使用して、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、a)核酸構築物、錆型核酸分子、ポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、核酸構築物が、少なくとも第1の配列を含む、ステップと、b)反応混合物を、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供し、それによって、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行するステップと、c)反応混合物または核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を停止させるステップとを含む、方法を提供する。

【0019】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、c)において、1つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、c)において、照射するステップの後に、核酸分子を形成するステップをさらに含み、核酸分子は、錆型核酸分子から解離する。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸分子は、ヘアピン構造を形成し、ヘアピン構造は、第1の配列の少なくとも一部を含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸分子は、第1の配列を含む。

【0020】

本開示の態様は、光作動型ネステッドポリメラーゼ連鎖反応（P C R）を行う方法であって、a)第1のプライマー対、第2のプライマー対、内部核酸配列を含む錆型核酸分子、およびポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、第1のプライマー対の各メンバーが、独立して、本開示の核酸構築物であり、第2のプライマー対の各メンバーが、独立して、本開示の核酸構築物であり、内部核酸配列が、錆型核酸分子内で入れ子になっている、ステップと、b)反応混合物を、第1のプライマー対を使用して第1の鎖伸長の条件に供して、錆型核酸分子を増幅させ、それによって、錆型核酸または錆型核酸分子の相補的配列のアンプリコンを形成するステップと、c)反応混合物に光の光子を照射し、それによって、第1のプライマー対を非活性化させ、第1の伸長を停止させ、第2のプライマー対を活性化し、活性化された第2のプライマー対を使用して第2の鎖伸長を開始し、内部核酸配列または内部核酸配列の相補的配列のアンプリコンを形成するステップとを含み、a)～c)が、密閉チューブ様式で行われる、方法を提供する。

【0021】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、光作動型P C Rは、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（Q - P C R）であり、方法は、1)第1のプライマー対および第2のプライマー対の存在下において、2つまたはそれを上回るヌクレオチド配列に、光作動型P C Rを実行して、流体中に2つまたはそれを上回るアンプリコンを產生させるステッ

と、2)独立して処理可能な位置に複数の核酸プローブを有する固体表面を含むアレイを用意するステップであって、アレイが、流体と接触するように構成される、ステップと、3)流体がアレイと接触している間に、2つまたはそれを上回るアンプリコンの、複数の核酸プローブのうちの2つまたはそれを上回る核酸プローブへのハイブリダイゼーションを測定して、アンプリコンハイブリダイゼーション測定値を得るステップであって、アンプリコンが、クエンチャーを含む、ステップとをさらに含む。

【 0 0 2 2 】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、光作動型PCRは、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)であり、方法は、1)表面および複数の異なるプローブを有する固体支持体を含むアレイを用意するステップであって、複数の異なるプローブが、異なる処理可能な位置で表面に固定されており、各処理可能な位置が、蛍光部分を含む、ステップと、2)複数のヌクレオチド配列を含む試料にPCR增幅を実行するステップであって、PCR增幅が、流体中で行われ、(i)各核酸配列の第1のプライマー対および第2のプライマー対のそれぞれが、クエンチャーレを含み、(ii)流体が、複数の異なるプローブと接触しており、PCR增幅において産生されるアンプリコンが、複数のプローブとハイブリダイズし、それによって、蛍光部分からのシグナルをクエンチする、ステップと、3)処理可能な位置のそれぞれにおいて蛍光部分からのシグナルを経時的に検出するステップと、4)経時的に検出されたシグナルを使用し、流体中のアンプリコンの量を決定するステップと、5)流体中のアンプリコンの量を使用して、試料中のヌクレオチド配列の量を決定するステップとをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、光作動型PCRは、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)であり、方法は、1)少なくとも1つの鋳型核酸分子を含有する核酸試料、プライマー対、およびポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、プライマー対が、鋳型核酸分子との配列相補性を有し、プライマー対が、限定プライマーおよび過剰プライマーを含み、限定プライマーおよび過剰プライマーのうちの少なくとも1つが、本開示の核酸構築物である、ステップと、2)反応混合物を、鋳型核酸分子および限定プライマーの増幅産物として少なくとも1つの標的核酸分子を得るのに十分な条件下において、Q-PCRに供するステップであって、少なくとも1つの標的核酸分子が、限定プライマーを含む、ステップと、3)反応混合物を、(i)異なる個別に処理可能な位置で基板の表面に固定された複数のプローブを含む基板であって、プローブが、限定プライマーとの配列相補性を有し、限定プライマーを捕捉することができる、基板と、(ii)処理可能な位置からの少なくとも1つのシグナルを検出するように構成される検出器アレイであって、少なくとも1つのシグナルが、限定プライマーが複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを有するセンサーレイと接触させるステップと、4)検出器アレイを使用して、核酸増幅反応中の複数の時点で、1つまたは複数の処理可能な位置からの少なくとも1つのシグナルを検出するステップと、5)限定プライマーが複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す少なくとも1つのシグナルに基づいて、標的核酸分子を検出するステップとをさらに含む。

【 0 0 2 3 】

本開示の態様は、 a) 複数のヌクレオチドと、 b) 1つまたは複数の光切断性部分とを含む核酸構築物であって、 1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、 a) 核酸構築物の 3' 末端と核酸構築物の 5' 末端との間に位置するか、 b) 核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、 c) リボース上もしくはそれに接続して位置するか、 d) 複数のヌクレオチドの 2つの連続するメンバーの間にそれらに接続して位置するか、または e) それらの組合せである、核酸構築物を提供する。

【 0 0 2 4 】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、プローブであり、核酸構築物は、標的核酸分子とのハイブリダイゼーションにおいて不活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、1つまたは複数の光遮断性部分の光遮断の後に、核酸分子を形成するように構成され、核

酸分子は、標的核酸分子とのハイブリダイゼーションにおいて活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、1つの遊離末端を含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、固定末端またはポリメラーゼに触媒される鎖伸長において非伸長性である末端を含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれは、独立して、3'末端と5'末端との間および選択された核酸塩基上に位置し、選択された核酸塩基は、1つまたは複数の光切断性部分の非存在下において、標的核酸分子とハイブリダイズするように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれは、独立して、3'末端と5'末端との間および複数のヌクレオチドの2つの連続したメンバーの間に位置する。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、第1の核酸セクションおよび第1の核酸セクションに相補的な第2の核酸セクションを含み、核酸構築物は、ヘアピン構造を形成するように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第1の核酸セクションおよび第2の核酸セクションは、1つまたは複数の光切断性部分を含まない。

【0025】

本開示の態様は、本開示の核酸構築物を使用して、ハイブリダイゼーションを行う方法であって、a)核酸構築物および標的核酸分子を含む、反応混合物を用意するステップと、b)反応混合物を、ハイブリダイゼーションの条件に供するステップと、c)反応混合物または核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、ハイブリダイゼーションを実行するステップとを含む、方法を提供する。

【0026】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、b)の供するステップは、c)の実行するステップを作動させない。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、c)の照射するステップの前に、反応混合物中でインタクトなままである。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、c)において、1つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、c)において、核酸分子を形成するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、照射するステップは、核酸構築物のヘアピン構造を破断させ、核酸分子を形成する。

【0027】

本開示の態様は、a)複数のヌクレオチドと、b)1つまたは複数の光切断性部分とを含む核酸構築物であって、1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、a)核酸構築物の3'末端と核酸構築物の5'末端との間に位置するか、b)核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、c)リボース上もしくはそれに接続して位置するか、d)複数のヌクレオチドの2つの連続するメンバーの間にそれらに接続して位置するか、またはe)それらの組合せである、核酸構築物を提供する。

【0028】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、プローブであり、核酸構築物は、標的核酸分子とのハイブリダイゼーションにおいて活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、1つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、核酸分子は、標的核酸分子とのハイブリダイゼーションにおいて不活性であるように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、1つの遊離末端を含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、固定末端またはポリメラーゼに触媒される鎖伸長において非伸長性である末端を含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれは、独立して、3'末端と5'末端との間および複数のヌクレオチドの2つの連続したメンバーの間に位置する。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれは、独立して、3'末端と5'末端との間および選

10

20

30

40

50

択された核酸塩基上に位置し、選択された核酸塩基は、1つまたは複数の光切断性部分の非存在下において、核酸構築物の別の核酸塩基とハイブリダイズするように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、第1の核酸セクションおよび第1の核酸セクションに相補的な第2の核酸セクションを含み、核酸構築物は、1つまたは複数の光切断性部分の非存在下において、ヘアピン構造を形成するように構成される。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、第1の核酸セクションまたは第2の核酸セクションは、1つまたは複数の光切断性部分を含む。

【0029】

本開示の態様は、本開示の核酸構築物を使用して、ハイブリダイゼーションを行う方法であって、a)核酸構築物および標的核酸分子を含む、反応混合物を用意するステップと、b)反応混合物を、ハイブリダイゼーションの条件に供するステップと、c)反応混合物または核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、ハイブリダイゼーションを停止させるステップとを含む、方法を提供する。

10

【0030】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、c)において、1つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、c)において、核酸分子を形成するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、c)において、核酸分子にヘアピン構造を形成するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行うステップをさらに含み、1)反応混合物が、ポリメラーゼおよびプライマーをさらに含み、b)において、核酸構築物が、b)において標的核酸分子とハイブリダイズし、2)b)において反応混合物を、プライマーを使用してポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供し、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、核酸構築物が標的核酸分子と二重鎖を形成する位置またはその近傍で停止され、3)c)の照射するステップの後に、二重鎖を除去し、核酸構築物と以前にハイブリダイズしていた一本鎖配列を露出させ、それによって、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が継続され、一本鎖配列を通じて伸長することが可能となる。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)であり、方法は、1)本開示の核酸構築物の存在下において、標的核酸分子を含む2つまたはそれを上回るヌクレオチド配列に、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行し、それによって、流体中に2つまたはそれを上回るアンプリコンを产生させるステップと、2)独立して処理可能な位置に複数の核酸プローブを有する固体表面を含むアレイを用意するステップであって、アレイが、流体と接触するように構成される、ステップと、3)流体がアレイと接触している間に、2つまたはそれを上回るアンプリコンの、複数の核酸プローブのうちの2つまたはそれを上回る核酸プローブへのハイブリダイゼーションを測定して、アンプリコンハイブリダイゼーション測定値を得るステップであって、アンプリコンが、クエンチャーレを含む、ステップとをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)であり、方法は、1)表面および複数の異なるプローブを有する固体支持体を含むアレイを用意するステップであって、複数の異なるプローブが、異なる処理可能な位置で表面に固定されており、各処理可能な位置が、蛍光部分を含む、ステップと、2)標的核酸分子を含む複数のヌクレオチド配列を含む試料にPCR增幅を実行するステップであって、PCR增幅が、本開示の核酸構築物を含む流体中で行われ、(i)各核酸配列のPCRプライマーが、クエンチャーレを含み、(ii)流体が、複数の異なるプローブと接触しており、PCR增幅において产生されるアンプリコンが、複数のプローブとハイブリダイズし、それによって、蛍光部分からのシグナルをクエンチし、照射が、PCR中に行われる、ステップと、3)処理可能な位置のそれれにおいて蛍光部分からのシグナルを経時的に検出するステップと、4)経時的に検出されたシグナルを使用し、流体中のアンプリコンの量を決定するステップと、5)流体中のアンプリコンの量を使用して、試料中のヌクレオチド配列の量を決定す

20

30

40

50

るステップとをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長は、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（Q - P C R）であり、方法は、1) 標的核酸分子を含む少なくとも1つの鑄型核酸分子を含有する核酸試料、プライマー対、およびポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、プライマー対が、少なくとも1つの鑄型核酸分子との配列相補性を有し、プライマー対が、限定プライマーおよび過剰プライマーを含み、反応混合物が、本開示の核酸構築物のうちの少なくとも1つをさらに含む、ステップと、2) 反応混合物を、鑄型核酸分子および限定プライマーの増幅産物を得るのに十分な条件下において、Q - P C Rに供するステップであって、アンプリコンが、限定プライマーを含む、ステップと、3) 反応混合物を、(i)異なる個別に処理可能な位置で基板の表面に固定された複数のプローブを含む基板であって、プローブが、限定プライマーとの配列相補性を有し、限定プライマーを捕捉することができる、基板と、(ii)処理可能な位置からの少なくとも1つのシグナルを検出するように構成される検出器アレイであって、少なくとも1つのシグナルが、限定プライマーが複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを有するセンサーレイと接触させるステップと、4) 検出器アレイを使用して、核酸増幅反応中の複数の時点で、1つまたは複数の処理可能な位置からの少なくとも1つのシグナルを検出するステップと、5) 限定プライマーが複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す少なくとも1つのシグナルに基づいて、標的核酸分子を検出するステップとをさらに含む。

【0031】

本開示の態様は、a) 複数のヌクレオチドと、b) 核酸構築物の5'末端における1つまたは複数の光切断性部分とを含む核酸構築物であって、核酸構築物の5'末端が、エクソヌクレアーゼによる切断に耐性であるように構成され、1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、a) 核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、b) リボース上もしくはそれに接続して位置するか、またはc) それらの組合せである、核酸構築物を提供する。

【0032】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、1つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、核酸分子は、エクソヌクレアーゼによる切断に耐性ではない。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、標的核酸分子にハイブリダイズし、エクソヌクレアーゼによる切断に耐性なままであるように構成される。

【0033】

本開示の態様は、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、a) 本開示の核酸構築物、標的核酸分子、プライマー、ポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、標的核酸分子が、核酸構築物に相補的な核酸配列を含む、ステップと、b) 反応混合物を、標的核酸分子を鑄型として使用して、プライマーのポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供するステップと、c) 反応混合物または核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、核酸配列を通じたポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行するステップとを含む、方法を提供する。

【0034】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、b) の供するステップは、c) の実行するステップを作動させない。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物は、c) の照射するステップの前に、反応混合物中でインタクトなままである。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、c) において、1つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、方法は、c) において、核酸分子を形成するステップをさらに含む。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、c) の実行するステップは、c) において照射するステップの後に形成される核酸分子を、エクソヌクレアーゼによって消化させるステップを含み、ポリメラーゼは、エクソヌクレアーゼで

10

20

30

40

50

ある。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、c)の実行するステップは、照射するステップの後および/または消化させるステップの後に、核酸配列を通じてプライマーを伸長させるステップを含む。

【0035】

本開示の態様は、核酸構築物を使用して、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、a)核酸構築物、錫型核酸分子、ポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、核酸構築物が、少なくとも、3'末端またはその近傍に位置する第1の配列および5'末端またはその近傍に位置する第2の配列を含み、第1の配列が、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長において活性である、ステップと、b)反応混合物を、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供し、それによって、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行し、第1の配列および第2の配列の両方の配列または第1の配列および第2の配列の両方に相補的な配列を含む、複数の第1のアンプリコンを産生させるステップと、c)反応混合物または核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、核酸構築物を切断し、第1の配列または第1の配列に相補的な配列を含む複数の第2のアンプリコンを産生させるステップであって、複数の第2のアンプリコンのそれぞれが、第2の配列も第2の配列に相補的な配列も含有しないことを条件とする、ステップとを含む、方法を提供する。

10

【0036】

本開示の態様は、本開示の核酸構築物のうちの少なくとも1つを使用して、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、a)核酸構築物、錫型核酸分子、ポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップと、b)反応混合物を、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供するステップと、c)反応混合物または核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行するステップとを含み、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、PCR、RT-PCR、QPCR、またはqRT-PCRである、方法を提供する。

20

【0037】

本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物のうちの少なくとも1つは、PCR、RT-PCR、QPCR、またはqRT-PCRのプライマーである。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物のうちの少なくとも1つは、PCR、RT-PCR、QPCR、またはqRT-PCRの溶液相プローブである。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物のうちの少なくとも1つは、PCR、RT-PCR、QPCR、またはqRT-PCRの固定プローブである。本明細書において提供される態様の一部の実施形態では、核酸構築物のうちの少なくとも1つは、2つを上回る核酸構築物であり、PCR、RT-PCR、QPCR、またはqRT-PCRのプライマー、PCR、RT-PCR、QPCR、またはqRT-PCRの溶液相プローブ、およびPCR、RT-PCR、QPCR、またはqRT-PCRの固定プローブの組合せであり、これらのそれぞれは、独立して選択される。

30

【0038】

本開示の態様は、マイクロアレイデータを定量する自動化マイクロアレイシステムであって、a)表面および複数の異なるプローブを有する固体支持体であって、複数の異なるプローブが、表面に固定されている、固体支持体と、b)検体を含む流体体積であって、流体体積が、固体支持体と接触しており、複数の異なるプローブのうちの少なくとも1つおよび検体が、本開示の核酸構築物のうちの少なくとも1つを含む、流体体積と、c)流体体積が固体支持体と接触している間に、固体支持体上の複数のスポットのそれぞれから複数の時点で測定されるシグナルを検出するように構成される、検出器または検出アセンブリーであって、シグナルが、光学シグナルまたは電気化学シグナルである、検出器または検出アセンブリーと、d)シグナルをマイクロアレイデータに変換するように構成されるコンピューターであって、マイクロアレイデータを、処理方法に従って、コンピューターによって処理させるように構成される命令をさらに含み、処理方法は、1)(i)分析表示、および(ii)固体支持体上に少なくとも1つの標準的なプローブを使用したマイクロアレイのキャリブレーションによるものを含む、複数の異なるプローブと検体との間

40

50

の相互作用の推定値を決定するステップと、2)ハイブリダイゼーション、交差ハイブリダイゼーション、および状態間での非束縛遷移確率 (unbound transition probability) をモデリングすることを含むマルコフ連鎖モデルでの推定値を利用する、確率行列を生成するステップと、3)検出器または検出器アセンブリーを使用して、親和性に基づくアレイデータを得るステップと、4)親和性に基づくアレイデータを、確率行列に適用するステップと、5)非特異的相互作用をノイズではなく干渉と考えることによって、非特異的相互作用を利用しそれを抑制しない、最大尤度推定アルゴリズム、最大事後確率基準、制約付き最小二乗計算法、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、最適化アルゴリズムを適用するステップと、6)最適化された親和性に基づくアレイデータを、ユーザーに出力するステップであって、最適化された親和性に基づくアレイデータが、検出器または検出器アセンブリーを使用することによって得られる親和性に基づくアレイデータと比較して、改善されたシグナル対ノイズ比を有する、ステップとを含む、コンピューターとを備える、自動化マイクロアレイシステムを提供する。

【0039】

本開示の態様は、順に、本開示の核酸構築物のうちの少なくとも1つを含む分子認識層と、光学層と、サンドイッチ構成で組み込まれるセンサー層とを備える一体型バイオセンサーアレイであって、a)分子認識層が、異なる独立して処理可能な位置に付着した複数の異なるプローブを含み、独立して処理可能な位置のそれぞれが、分子認識層の単一の側面に位置する単一の源から直接的に励起光子束を受容するように構成され、分子認識層が、光学層に光を伝達し、複数の異なるプローブのうちの1つが、核酸構築物のうちの少なくとも1つを含み、b)光学層が、光学フィルター層を含み、光学層が、分子認識層からセンサー層へ光を伝達し、それによって、伝達された光がフィルタリングされ、センサー層が、光学層を通じて伝達されたフィルタリングされた光を検出する光学センサーアレイを含み、センサー層が、C M O S 製造プロセスを使用して製造されたセンサー素子を含み、分子認識層、光学層、およびセンサー層が、分子層が光学層と接触し、光学層がセンサー層と接触する、一体型構造を構成する、一体型バイオセンサーアレイを提供する。

【0040】

参照による組込み

本明細書において言及されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、各個別の刊行物、特許、または特許出願が、具体的かつ個別に参照により組み込まれると示される場合と同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0041】

本発明の新規な特性は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載されている。本発明の特性および利点のより良好な理解は、例証的な実施形態について記載し、本発明の原理が利用されている、以下の詳細な説明、ならびに添付の図面 (drawing) (本明細書において同様に「図 (figure)」および「図 (FIG.)」) を参照することによって得られる。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】図1は、光切斷性基 (L G = 脱離基) の例を示す。

【0043】

【図2】図2は、光切斷性結合を含む例示的な核酸分子を示す。

【0044】

【図3】図3は、光切斷性構造を有する試薬の例を示す。

【0045】

【図4】図4は、3'末端伸長阻害剤を含む核酸構築物の例を示す。

【0046】

【図5】図5は、3'末端伸長阻害剤の試薬の例を示す。

【0047】

【図6】図6は、5'末端エクソヌクレアーゼ阻害剤を含む核酸構築物の例を示す。

10

20

30

40

50

【0048】

【図7】図7は、5'末端エクソヌクレアーゼ阻害剤の例を示す。

【0049】

【図8】図8は、光切断性塩基対合阻害剤を含む核酸構築物の例を示す。

【0050】

【図9】図9は、光切断性塩基対合阻害剤の試薬の例を示す。

【0051】

【図10】図10は、光開始型プライマーの例を示す。

【0052】

【図11】図11A～11Dは、光停止型プライマーの例を示す。

10

【0053】

【図12】図12A～12Bは、光開始型ハイブリダイゼーションプローブの例を示す。

【0054】

【図13】図13は、光停止型ハイブリダイゼーションプローブの例を示す。

【0055】

【図14】図14は、5'末端エクソヌクレアーゼ保護剤の例を概略的に示す。

【0056】

【図15】図15は、光作動型ネステッドPCRの例を概略的に示す。

【0057】

【図16】図16は、光作動型ネステッドPCRの別の例を概略的に示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0058】

本発明の様々な実施形態が本明細書において示され、説明されているが、そのような実施形態が例示として提供されるにすぎないことは、当業者には明らかであろう。当業者であれば、本発明から逸脱することなく、多数の変形、変更、および置換を想起し得る。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する様々な代替形を、用いることができることを理解されたい。

【0059】

本開示は、構築物が光の光子によって光化学様式でトリガーされると、その化学構造を変換し、それによって、その化学的/生化学的機能を変化させることができるような固有の特性を有する、化学的に改変されており光によりトリガーされる核酸(NA)構築物を提供する。化学的に改変されたNA構築物のこれらの光によりトリガーされる特性変化を、分子検出反応/プロセスに利用することができる。

30

【0060】

一部の実施形態では、光によりトリガーされるNA構築物は、ライフサイエンス研究および分子診断において使用されるNA検出アッセイにおいて使用することができる。これらのアッセイにおいて、NA分子は、アッセイの標的であり、かつ/またはアッセイの分子認識エレメントとして使用される。光の光子をシステムに適切に適用することによって、光によりトリガーされるNA構築物が、アッセイ検出精度を向上させ、かつ/または作業フローの複雑さを低減し、かつ/または所要時間を短縮することができるよう、光によりトリガーされるNA構築物が、アッセイに追加される。他の利点もまた可能である。

40

【0061】

一部の例示的な検出アッセイは、ポリメラーゼ連鎖反応プロセスを使用するNA增幅試験(NAAT)、2次元および処理可能なDNAマイクロアレイを利用するNA親和性に基づく検出システム、ならびに固相の合成によるシーケンシング(SBS)方法を組み込むDNAシーケンシングアレイである。

光によりトリガーされる核酸構築物および操作におけるそれらの使用

【0062】

「光によりトリガーされる核酸構築物」または「NA構築物」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、1)光の光子に曝露する前に、第1の分子状態で存在し得る

50

1つまたは複数の感光性システムまたは感光性化学部分、および2) 1つまたは複数の感光性システムまたは感光性化学部分に共有結合的または非共有結合的に連結された1つまたは複数のDNAまたはRNA分子を含む、NA分子を指す。光の光子が、核酸構築物中の1つまたは複数の感光性システムまたは化学部分に適用されると、1つまたは複数の感光性システムまたは感光性化学部分が、第1の分子状態から第2の分子状態へと変化し、これにより、NA構築物の生化学的特性が変化する。例えば、光の光子は、1つまたは複数の感光性システムまたは感光性化学部分の化学結合(複数可)を破断または作製することによって、NA構築物に化学変化を引き起こし得る。

【0063】

NA構築物は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900個のNA分子を含み得る。NA構築物は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900個のNA分子を含む。NA構築物は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900個以下のNA分子を含み得る。

【0064】

「感光性システム」または「感光性化学部分」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、光不安定性化学結合(複数可)を含む、単一のまたは各種の化学構造を指す。感光性システムまたは感光性化学部分は、波長特異的光子を吸収して、感光性システムまたは感光性化学部分が関与し得るある特定の化学反応の反応速度を増加させることができる。感光性(light-sensitive)、光切断性(light-cleavable)、光活性化性(light-activatable)、光不安定性(photo-labile)、光活性化性(photoactivatable)、または光切断性(photo-cleavable)などの他の説明的な言葉もまた、感光性(photo-sensitive)という言葉と互換可能に使用することができる。

【0065】

「分子状態」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、1つまたは複数の特定の分子、例えば、NA構築物などと関連する原子構造および分子構造、ならびに化学的、物理化学的、生化学的、電気化学的、および光化学的特性を指す。

【0066】

「生化学的特性」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、生物学的反応および化学反応におけるNA構築物の特徴を指す。核酸構築物の生化学的特性は、NA構築物の分子状態に応じて変化し得る。NA構築物の分子状態は、1つまたは複数の感光性システムまたは感光性化学部分の反応によって変化し得る。加えて、第1の分子状態にあるNA構築物の生化学的特性は、第2の分子状態にあるものとは異なり得る。

【0067】

一部の実施形態では、第1の分子状態は、NA構築物の不活性な分子状態であり、一方で第2の分子状態は、NA構築物の活性な分子状態である。一部の実施形態では、第1の分子状態は、NA構築物の活性な分子状態であり、一方で第2の分子状態は、NA構築物の不活性な分子状態である。

【0068】

各NA構築物は、生化学的反応における異なる反応性を含め、異なる生化学的特性を有し得る。生化学的特性の例には、例えば、NA構築物が、特定の生化学的反応、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応またはハイブリダイゼーション反応などを促進し得るか、遮断し得るか、またはそれに関与し得るかが含まれ得る。異なる生化学的特性は、光の光子によってトリガーされ得る。

【0069】

NA構築物の生化学的特性は、NA構築物の異なる分子状態を含み得る。例えば、第1

10

20

30

40

50

の分子状態にある N A 構築物の生化学的特性は、第 2 の分子状態にある N A 構築物の生化学的特性とは異なり得る。第 1 の分子状態および第 2 の分子状態にある N A 構築物の生化学的特性は、光の光子が、N A 構築物が関与し得る特定の分子反応を開始および / または停止させることができるように、設計され得る。分子状態におけるそのような変化は、光の光子によってトリガーされ得る。プライマーの生化学的特性の例は、活性なプライマーまたは不活性なプライマーなどであり得る。一部の実施形態では、本開示は、伸長反応において、プライマーを、光の光子によって、「活性」および「不活性」な分子状態の間でトグルする (toggle) 方法およびシステムについて記載している。一部の実施形態では、活性 / 不活性の分子状態の切り替えは、核酸構築物内の光切断性結合を切断することによって作動させることができる。本開示において、「潜在性」、「不活性化」、「不活性 (inert)」、および「非機能性」という用語は、「不活性 (inactive)」という用語と同義である。同様の専門用語が、「プローブ」を説明する際に使用される。

【0070】

N A 構築物は、典型的に、反応チャンバーに存在し、そこに、光の光子が、光源システムによって適用され得る。

【0071】

1. 感光性システムまたは感光性化学部分

感光性システムまたは感光性化学部分は、光不安定性化学結合（複数可）を含む、单一または複数の化学構造であり得る。感光性システムまたは感光性化学部分は、光の光子が照射されると、その構造または化学的特性 (chemical propertied) を変化させ得る。感光性システムまたは感光性化学部分は、波長特異的光子を吸収して、感光性システムまたは感光性化学部分が促進または関与し得るある特定の化学反応の反応速度を増加させることができる。例えば、これらの化学反応は、

- ・感光性システムもしくは感光性化学部分の化学構造を変化させるか、
- ・感光性システム、感光性化学部分の構造を複数のより小さな構造へと破断させるか、
- ・外部化学構造を感光性システムに付加するか、または
- ・感光性システムもしくは感光性化学部分内で 1 つもしくは複数の分子内結合を形成するか、
- ・2 つもしくはそれを上回る感光性システムもしくは感光性化学部分もしくは外部化学構造（感光性システムおよび感光性化学部分に対する）の間で 1 つもしくは複数の分子間結合を形成するか、または
- ・それらの組合せを行うことができる。

【0072】

一部の実施形態では、感光性システムまたは感光性化学部分は、核酸分子の構造内に組み込まれ得る。例えば、感光性システムまたは感光性化学部分は、

- ・N A の官能基（複数可）、例えば、核酸塩基のヘテロ原子もしくはリボース環の 3' - O H に配置されるか、
- ・2 つの N A 配列間のリンカー基の一部として使用され、光の光子の存在下において、リンカー基が、より小さな基へと破断され、それによって、2 つの以前に連結されていた N A 配列が 2 つの独立した核酸配列に分離する（すなわち、もはや連結されていない）か、
- ・N A 鎖の 5' 末端に配置され、感光性システムもしくは感光性化学部分の存在により、核酸鎖の 5' 末端、例えば、末端 N A の 5' リン酸基上の光不安定性基において、ある特定の生化学的反応が起こることが防止されるか、
- ・N A 鎖の 3' 末端に配置され、感光性システムもしくは感光性化学部分の存在により、N A 鎖の 3' 末端、例えば、末端 N A の 3' - O H 基の光不安定性基において、ある特定の生化学的反応が起こることが防止されるか、または
- ・それらの組合せであってよい。

【0073】

一部の感光性化学部分の例は、Mayer, G. and Heckel, A., "Biologically active molecules with a 'light switch'," *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006; 45(30),

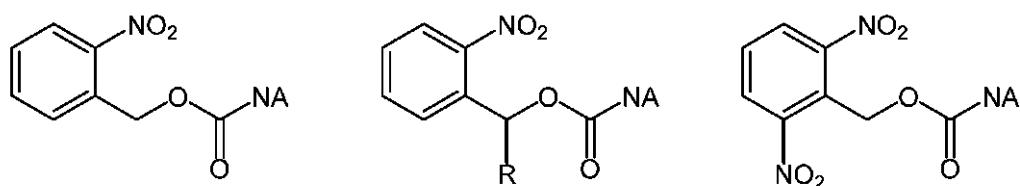
pp.4900-4921において見出すことができ、これは、参照により全体として本明細書に組み込まれる。一部の感光性化学部分の例としては、オルト - ニトロベンジルオキシリンカー、オルト - ニトロベンジルアミノリンカー、アルファ置換オルト - ニトロベンジルリンカー、オルト - ニトロペラトルリンカー、フェナシルリンカー、パラ - アルコキシフェナシルリンカー、ベンゾインリンカー、またはピバロイルリンカーを挙げることができる。R.J.T. Mikkelsen, "Photolabile Linkers for Solid-phase Synthesis," ACS Comb. Sci. 2018; 20(7):377-399、S. Peukert and B. Giese, "The Pivaloyl glycol Anchor Group: A New Platform for a Photolabile Linker in Solid-Phase Synthesis," J. Org. Chem. 1998, 63(24): 9045-9051を参照されたく、これらのそれぞれは、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

10

【0074】

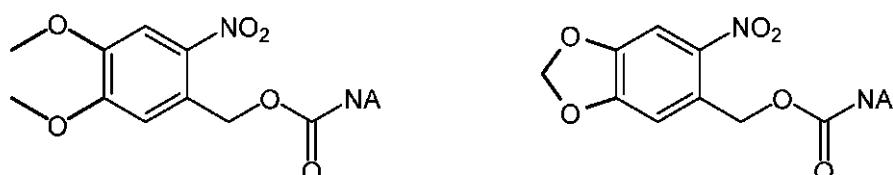
例えば、ニトロベンジルに基づく化学部分は、例えば、以下に示されるものなどであり得る。

【化1】



20

Rは、Hではない



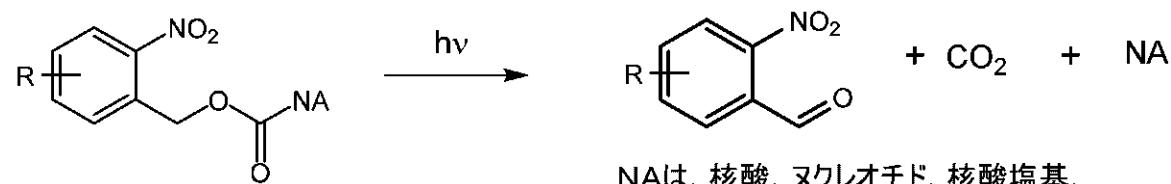
30

NAは、核酸、ヌクレオチド、核酸塩基、5'リン酸、
またはリンカーの一部である

【0075】

ニトロベンジルに基づく化学部分は、入射光子によりノリッシュII型機序を受けて、以下に示される切断された産物を得ることができる。

【化2】



40

NAは、核酸、ヌクレオチド、核酸塩基、
またはリンカーの一部である

【0076】

光切斷性基の一部の例は、図1に見出すことができる。LGは、図1において脱離基を指す。とりわけ、4 - メトキシ - 7 - ニトロインドリニル (MNI)、1 - ニトロベンジル (ONB)、3 - (4,5 - デメトキシ - 2 - ニトロフェニル) 2 - プチル (DMNPB) 4 - カルボキシメトキシ - 5,7 - デニトロインドイニル (CDNI) が、一部の例である。

【0077】

2. 分子状態

50

「分子状態」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、1つまたは複数の特定の分子、例えば、N A 構築物などと関連する原子構造および分子構造、ならびに化学的、物理化学的、生化学的、電気化学的、および光化学的特性を指す。例えば、N A 構築物は、所定の水性環境内、または他の分子の存在下における核酸の他の反応条件下において、その分子状態を示し得る。N A 構築物の分子状態には、N A 構築物が、例えば、ライゲーション、カップリング反応、鎖伸長、鎖消化などといったある特定の反応を受ける傾向が含まれ得る。

【 0 0 7 8 】

N A 構築物の生化学的特性は、N A 構築物の異なる分子状態を含み得る。例えば、第1の分子状態にあるN A 構築物の生化学的特性は、第2の分子状態にあるN A 構築物の生化学的特性とは異なり得る。第1の分子状態および第2の分子状態にあるN A 構築物の生化学的特性は、光の光子が、N A 構築物が関与し得る特定の分子反応を開始および/または停止させることができるように、設計され得る。分子状態におけるそのような変化は、光の光子によってトリガーされ得る。例えば、光化学的反応は、核酸試薬の分子構造を変化させ、それによって、生化学的反応における核酸試薬の生化学的特性および反応性を変化させ得る。

【 0 0 7 9 】

例えば、N A 構築物は、「活性なプライマー」であり得、これは、ポリメラーゼ酵素によって促進されるヌクレオチド付加（すなわち、成長する鎖の伸長）を補助し得る従来的なP C Rの意味でのプライマーである。換言すると、活性なプライマーは、実験条件において、相補的な鋳型配列と塩基対合して、逆平行二重鎖構造を形成することができる。ポリメラーゼ酵素が別のヌクレオチドを付加することができる天然の（利用可能な）3' - ヒドロキシル基を有し、したがって、プライマーを少なくとも1塩基伸長させることができる。「不活性なプライマー」は、鋳型鎖に適切に結合する能力がないこと（塩基対合できないこと）、または利用可能な末端ヌクレオチドの3' - ヒドロキシル基の非存在のいずれかに起因して、ヌクレオチドの付加を補助することも促進することもできない、プライマーであり得る。例えば、末端ヌクレオチドの3' - ヒドロキシル基に光切断性化学部分を配置することにより、ポリメラーゼ反応を遮断することができる。光に曝露されると、3' - ヒドロキシル基上の光切断性化学部分が除去され得、結果として得られる遊離3' - ヒドロキシル基が、成長する鎖の伸長に利用可能となり得る。同様の機序は、N A 上のライゲーション部位を遮断および脱ブロックするという点で、リガーゼ触媒反応において適用することができる。塩基対合阻害剤の他の例は、立体上の理由または他の化学的な理由に起因して、D N A鎖がその相補鎖に結合することを防止するようにD N Aの少なくとも1つの鎖（例えば、成長する鎖）に配置される、化学基であり得る。

【 0 0 8 0 】

一部の実施形態では、本開示は、伸長反応において、プライマーを、光の光子によって、「活性」および「不活性」な分子状態の間でトグルする方法およびシステムについて記載している。プライマーの分子状態を変化させることによって、本開示は、特に、「密閉チューブ」方法（すなわち、P C R反応が開始した後に添加される追加の試薬がない）およびN A增幅に基づく診断の分野において非常に望ましい「多重」方法について、新規な增幅戦略を可能にすることができる。本開示は、增幅反応中に、試薬を添加することも除去することもなく、反応間で反応チャンバーを変更することもなしに、プライマーセットの組成（および特性、例えば、分子状態）を効果的に変化させる方法について記載している。したがって、「不活性」な分子状態は、特定のプライマーのステータスおよび機能的状態を説明するものであり、その使用について説明するものではない。不活性なプライマーは、光への曝露によって活性となり得、逆もまた同様であり得る。以下の例は、単純さおよび実証のために個々の構成成分を示しているが、一部の複雑な多重アッセイは、最大で10、20、30、40、50、60、70、80、90、100個のプライマー、またはさらにはそれよりも多くの必要とする場合がある。活性/不活性の分子状態の切り替えは、同じ光への曝露または異なる光への曝露によってトリガーされ得る。例えば、ある

10

20

30

40

50

光切断性化学部分は、ある波長の光で反応し得、一方で別の光切断性化学部分は、別の波長の光で反応し得る。

【0081】

一部の実施形態では、活性 / 不活性の分子状態の切り替えは、N A 構築物内の光切断性結合を切断し、それによって、もともとの核酸鎖を部分に切り分けることによって、作動させることができる。一部の実施形態では、活性 / 不活性の分子状態の切り替えは、N A 構築物内の光切断性結合を切断し、それによって、N A 構築物のある特定の核酸単位からブロック基を除去することによって、作動される。例えば、光に曝露されると、塩基対合阻害剤上のブロック基が除去され得、N A 構築物のN A 配列は、インタクトなままとなる（すなわち、N A 構築物の配列の長さおよび同一性は、ブロック基の除去の前および後で同じままである）。

10

【0082】

本開示において、「潜在性」、「不活性化」、「不活性 (inert)」、および「非機能性」という用語は、「不活性 (inactive)」という用語と同義である。同様の専門用語が、シグナル伝達に関連し、PCRなどのポリメラーゼ触媒される伸長には関与しない、「プローブ」について記載する場合に使用される。

【0083】

3. 生化学的特性

「生化学的特性」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、生物学的反応および化学反応におけるN A 構築物の特徴を指し、これには、例えば、N A 構築物が、ある特定の生物学的反応または化学反応に関与する傾向または能力が含まれる。加えて、第1の分子状態にあるN A 構築物の生化学的特性は、第2の分子状態にあるものとは異なり得る。そのような生化学的特性の1つの例は、N A 構築物が、光の光子による照射後に分子反応を開始または停止させる能力であり得る。例えば、生化学的特性としては、

20

- ・一本鎖形式のN A 構築物が、それ自体と塩基対を形成し、ヘアピン構造を形成するか、またはN A 構築物の別のコピーとホモ二量体を形成するか、別のN A 分子とヘテロ二量体を形成する、

- ・DNAポリメラーゼ酵素が、鋳型N A を使用してN A 構築物を伸長させる、

- ・RNAポリメラーゼ酵素が、鋳型N A を使用してN A 構築物を伸長させる、

- ・逆転写酵素が、鋳型N A を使用してN A 構築物を伸長させる、

- ・ターミナルトランスフェラーゼ酵素が、N A 構築物を伸長させる、

30

- ・エクソヌクレアーゼ酵素が、N A 構築物を消化する、

- ・エンドヌクレアーゼ酵素が、N A 構築物を破断する、

- ・制限酵素が、N A 構築物を、その配列内の特定の座標で破断する、および

- ・リガーゼ酵素が、N A 構築物を基質または鋳型として使用する

能力が挙げられるが、これらに限定されない。

【0084】

核酸構築物の生化学的特性は、N A 構築物の分子状態に応じて変化し得る。N A 構築物の分子状態は、1つまたは複数の感光性システムまたは感光性化学部分の反応によって変化し得る。

40

【0085】

4. 反応チャンバー

「反応チャンバー」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、水溶液または他の媒体を格納し、N A 構築物が中に存在する、物理的システムを指す。反応チャンバーは、光の光子が、内部に存在するN A 構築物に到達するのを可能にし得、チャンバー内の温度、例えば、水溶液の温度を設定し動的に変更するための温度制御を有し得る。

【0086】

一部の実施形態では、反応チャンバーは、約0.1ナノリットル (nL) ~ 約10ミリリットル (mL) の範囲の容積を有し得る。一部の事例では、反応チャンバーは、約1マイクロリットル (μL) ~ 約100 μL の範囲の容積を有し得る。一部の実施形態では、

50

反応チャンバーは、約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.2、3.4、5.6、7.8、9.10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、または 900 nL である。一部の実施形態では、反応チャンバーは、約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.2、3.4、5.6、7.8、9.10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、または 900 μL である。一部の実施形態では、反応チャンバーは、約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.2、3.4、5.6、7.8、9.10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、または 900 mL である。

10

【0087】

反応チャンバーは、約 4 ~ 約 100 の範囲の温度を有し得る。反応チャンバーの温度は、約 ± 0.01、± 0.02、± 0.03、± 0.04、± 0.05、± 0.06、± 0.07、0.08、± 0.09、± 0.1、± 0.2、± 0.3、または ± 0.4 の精度で制御され得る。一部の実施形態では、反応チャンバーの温度は、約 30 ~ 約 95 の範囲であり得、温度を制御する精度は、± 0.1 以内で制御され得る。

【0088】

5. 光

「光」という用語は、反応チャンバーに関連して本明細書で使用される場合、一般に、特定の波長内に限定された、ある持続時間の間反応チャンバーに適用される、光子束を指す。光の波長は、約 200 ナノメートル (nm) ~ 約 2000 nm であり得る。一部の実施形態では、光の波長は、約 200 nm ~ 約 400 nm、約 300 nm ~ 約 500 nm、または約 400 nm ~ 約 600 nm であり得る。一部の実施形態では、光の総光強度は、約 0.001 mW/cm² ~ 約 1,000 mW/cm²、約 0.01 mW/cm² ~ 約 100 mW/cm²、約 0.1 mW/cm² ~ 約 10 mW/cm²、約 0.05 mW/cm² ~ 約 20 mW/cm²、または約 0.02 mW/cm² ~ 約 50 mW/cm² であり得る。光への曝露時間の持続は、約 0.1 秒 ~ 約 10,000 秒、0.25 秒 ~ 約 5,000 秒、約 0.5 秒 ~ 約 1,000 秒、約 0.75 秒 ~ 約 500 秒、約 1 秒 ~ 約 100 秒であり得る。

20

【0089】

6. 光源

「光源システム」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、所定の波長内の光の光子を協調して生成し、核酸構築物に適用されるそのパワーを制御する、デバイスの組合せを指す。光源システムは、発光ダイオード (LED)、レーザー源、白熱灯、またはガス放電灯であり得る光子源を含み得る。光源システムは、光出力パワーを制御するためのパワー制御デバイスを含み得る。光源システムは、その出力光が所望される波長内であることを確実にするために、波長選択的光学フィルターを含み得る。光源システムは、その出力される光子束を集中および / またはコリメートするための光学デバイスを含み得る。

30

【0090】

感光性を作動させるための核酸の改变

様々な方法を使用して、光化学的特性を有する NA 分子または構造を作製することができる。例えば、方法は、固体支持体ホスホラミダイト化学の使用を含み得る。方法は、核酸配列を固体支持体上で、改变が所望され得る位置まで合成または成長させることを含み得る。次に、特別なホスホラミダイトが、改变位置において、成長している核酸分子にカップリングされ得る。改变された核酸分子は、改变の後に伸長させる場合もさせない場合もある。反応が完了すると、次いで、核酸分子は、固体支持体から切断され得る。切断された核酸分子は、追加の反応または処置 (例えば、精製、改变など) に供する場合も供さない場合もある。

40

50

【0091】

感光性システムまたは感光性化学部分の例は、上述のように、ヌクレオチドの一部（リボース部分もしくは核酸塩基部分もしくは核酸の化学部分のいずれかの間）の光切斷性基、または2つの一本鎖核酸の間のリンカーの一部であり得る。リンカーは、2つの光切斷性結合を有し得、そのそれぞれが、核酸セグメントと結合する。本開示の他の箇所に示されるように感光性を作動させることができる核酸の改変は、多種類存在し得る。以下は、いくつかの具体的な例である。

【0092】

1. 光切斷性構造

図2は、光切斷性結合を含む例示的なNA分子を示す。光切斷性NA構造において、2つの核酸断片は、1つまたは複数の光切斷性結合が含まれ得る感光性システムまたは感光性化学部分によって、一緒に連結され得る。光切斷性NA構造分子が、光源からの光に曝露されると、分子は、光切斷性結合の存在に起因して、2つまたはそれを上回るセグメントに切斷され得る。結果として、もともとのNA配列（A）が、例えば、図2に示されるような配列（A1）および配列（A2）の2つより小さい片へと破断され得る。

10

【0093】

一部の実施形態では、感光性システムは、破断の後に、切斷された化学残基が、放出された配列（A1）の3'末端および/または配列（A2）の5'末端に残るように、設計され得る。配列（A）は、一本鎖NAであっても二本鎖NAであってもよい。配列（A）が二本鎖NAである場合、各鎖において、少なくとも1つの光切斷性結合が存在し得る。一部の実施形態では、光切斷性結合の位置は、破断により配列（A1）および配列（A2）それぞれに平滑末端が生じ得るように、同じ対合しているNAに隣接していてもよい。一部の実施形態では、光切斷性結合の位置は、切断後に（after the cleavable）、配列（A1）および配列（A2）が付着末端（オーバーハング）を有し得るように、各鎖において互い違いになっていてもよい。

20

【0094】

光切斷性結合（複数可）を有する例示的な化合物は、図3に示されている。図3に示されるように、この化合物を、NA構築物の化学的核酸分子合成において、他のDMTホスホラミダイト含有モノマーとともに使用して、光切斷性結合（複数可）をNAの鎖に挿入することができる。図3に示される例において、O-ニトロベンジル光不安定性プロック基は、NA分子の2つのセグメントを連結することができる。照射なしであれば、光不安定性結合は、NA構築物においてインタクトである。インタクトなNA構築物は、NA構築物の生化学的特性の分子状態1を示し得る。次いで、光源への曝露により、NA構築物分子は、2つの別個の核酸断片に切斷され得、2つの新たに形成されたNA断片に、それぞれ、3' - ヒドロキシル末端および5' - リン酸化末端をもたらし得る。光不安定性結合（複数可）の破断に起因して、もともとのNA構築物の分子状態は、2つの核酸断片と関連する新しい分子状態へと変化し得る。これが、光によりトリガーされる分子状態変化の例である。

30

【0095】

2. 3'末端伸長阻害剤

3'末端伸長阻害剤を含むNA構築物において、感光性システムまたは感光性化学部分は、NA配列の3'末端単位に化学的に付着され得る。3'末端伸長阻害剤の存在に起因して、3'伸長部位は、ポリメラーゼ、転写酵素、およびターミナルトランスフェラーゼなどを含むがこれらに限定されない伸長酵素が遮断され、その結果、酵素は、3'末端の末端単位から成長する鎖を伸長させることができず、酵素による成長する鎖の伸長が、阻害される。しかしながら、光への曝露により、遮断が除去され、酵素が成長する鎖を伸長させることができ可能となり得る。NA構築物の例は、図4に示されており、ここで、DNAポリメラーゼによって促進される化学反応は、最初は、プライマーの3'末端における感光性システムまたは感光性化学部分の存在によって遮断されている。次いで、光への曝露により、プロック基が除去され、酵素が、鋳型を使用してプライミングされたDNAを合成すること

40

50

が可能となり得る。この事例において、光は、分子へと指向され、ポリメラーゼ阻害剤が、分子から除去され得、分子がポリメラーゼによって伸長可能となる。

【 0 0 9 6 】

3' 末端ポリメラーゼ伸長阻害剤に挿入することができる 3' 末端の末端単位の例は、図 5 に示されている。D M T ホスホラミダイトモノマーおよびこの 3' 末端の末端単位は、核酸分子（オリゴヌクレオチド）の化学合成において使用することができる。3' 末端の末端単位が、3' 末端に導入されると、光への曝露の非存在下では、3' 末端の末端単位のリボース環の 3' ヒドロキシル基上の O - ニトロベンジル光不安定性ブロック基は、D N A ポリメラーゼによるその位置における伸長を防止し得る。光への曝露により、ブロック基が除去され得、リボース環上の裸の 3' ヒドロキシ基が現われ、N A 構築物の伸長能力が回復され得る。

10

【 0 0 9 7 】

3. 5' 末端エクソヌクレアーゼ保護剤

5' 末端エクソヌクレアーゼ保護剤を含むN A 構築物において、感光性システムまたは感光性化学部分は、核酸配列の 5' 末端の末端単位に化学的に付着され得る。5' 末端エクソヌクレアーゼ保護剤の存在に起因して、エクソヌクレアーゼ酵素による鎖の 5' 末端消化が遮断され得、鎖は、切断または消化から保護される。光への曝露により、遮断が除去され、5' から 3' への鎖消化が可能となり得る。例えば、そのような核酸構築物は、図 6 に示されており、ここで、D N A ポリメラーゼ 5' 末端エクソヌクレアーゼの活性は、最初は、遮断され得、光への曝露および 5' 末端ブロック基の除去により、活性が回復され、酵素が、図 6 に示されるように鎖を消化することが可能となり得る。5' 末端エクソヌクレアーゼ保護剤として使用することができる感光性システムまたは感光性化学部分の例は、図 7 に示されている。ヌクレオチドにおける 5' リン酸ジエステル上の疎水性尾部は、エクソヌクレアーゼによる 5' 末端におけるヌクレオチドを含む核酸の消化を遮断し得る。核酸の光への曝露により、5' - リン酸上のブロック基が除去され、5' 末端ヌクレオチドにおけるエクソヌクレアーゼによる消化が可能となり得る。

20

【 0 0 9 8 】

4. 塩基対合阻害剤

塩基対合阻害剤を含むN A 構築物において、感光性システムまたは感光性化学部分は、N A 構築物内のヌクレオチド単位の 1 つまたは複数の核酸塩基に化学的に付着され得る。塩基対合阻害剤は、核酸配列内でタンデムであってもよく、または核酸配列内に分布していてもよい。塩基対合阻害剤の存在により、N A 構築物に相補的な配列の塩基対合が阻害され得る。その後の光への曝露により、ブロック基が除去され、脱ブロックされたN A 構築物と相補的配列との間で通常の塩基対合が生じることが可能となり得る。そのようなN A 構築物の例は、図 8 に示されており、これは、感光性塩基対合阻害剤を含む例示的なN A 分子を示している。N A 分子が、光源に曝露されていない場合、塩基対合阻害剤の存在に起因して、N A 分子の少なくともサブユニットは、塩基対合能力が欠如している。そのような塩基対合能力は、核酸分子を所与の期間（例えば、約 1 分間もしくはそれよりも長く、2 分間、3 分間、4 分間、5 分間、6 分間、7 分間、8 分間、9 分間、10 分間、11 分間、12 分間、13 分間、14 分間、15 分間、16 分間、17 分間、18 分間、19 分間、20 分間、またはそれよりも長く）光源に供することによって、回復され得る。あるいは、核酸分子を、光分解が完了するまで光源に供してもよい。

30

【 0 0 9 9 】

様々な化合物、例えば、図 9 に示される化合物を、感光性塩基対合阻害剤として使用することができる。図 9 に示される試薬および他のD M T ホスホラミダイトモノマーは、化学的N A 分子合成において使用することができる。導入されると、O - ニトロベンジル光不安定性ブロック基を使用して、立体障害および / または水素結合の欠如に起因して、ワトソン - クリック塩基対合を防止することができる。光源（例えば、U V 光）への曝露により、ブロック基（核酸塩基上に示されている）が、除去されて、核酸分子の塩基対合能力が回復され得る。核酸塩基上の光切断性化学部分を含む感光性塩基対合阻害剤、例えば

40

50

、図9に示される化合物（または核酸塩基上のヘテロ原子、例えば、窒素または酸素に付着した光切断性化学部分を有する異なる核酸塩基を有する他の類似の化合物）などは、H. Lusic, et al., "Photochemical DNA Activation," Org. Lett., 2007, 9(10): 1903-1906、米国公開第2010/0099159号に従って作製することができ、これらのそれぞれは、参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【0100】

上に開示される核酸に対する異なる化学的改変を使用して、以下に示されるように、異なる利用のために、異なる種類のNA構築物を構築することができる。

【0101】

光によりトリガーされる核酸構築物の種類およびそれらの使用

10

NA分子が光の光子に曝露されたときにトリガーされ得る、分子検出に関係する固有の生化学的特性を有するNA構築物もまた、本明細書において提供される。これらのNA構築物は、反応チャンバーにおいて使用されている間、一般的な分子検出アッセイにおいて使用される生化学的反応の速度、特異度、収率、および忠実性を増強または減少させることができる。例示的な反応は、とりわけ、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、ライゲーション、ターミナルトランスクレオチド伸長、ハイブリダイゼーション、エクソヌクレアーゼ消化、エンドヌクレアーゼ消化、および制限消化である。反応が、標的および/または試薬および/または触媒および/またはその他として機能するNA構成成分から構成される場合、本開示を使用して、本来の構成成分をNA構築物で置き換えるか、または本来の構成成分にNA構築物を挿入することによって、反応を和らげることができる。光化学的特性を有する核酸分子または構造の例としては、プライマー、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド含有分子、ヌクレオチド、または核酸プローブが挙げられるが、これらに限定されない。核酸プローブには、所与の反応（例えば、PCRまたはRT-PCR）中または終了時に標的検体（例えば、アンプリコン）と選択的に相互作用し得るハイブリダイゼーションプローブが含まれ得る。以下に示されるように、多数の異なる種類の核酸構築物が存在し得る。

20

【0102】

1. 光開始型プライマー

光開始型プライマーは、感光性システムもしくは感光性化学部分、または感光性システムもしくは感光性化学部分を含むかもしくはそれに接続されたブロック基の存在に起因して、相補的なNA配列鑄型と塩基対合することができない、および/または核酸合成酵素の開始部位を創出することができない、NA配列である。光が適用されると、これらの光開始型プライマーは、ブロック基を除去し、続いて、核酸鑄型および核酸合成酵素の存在下において、核酸合成を作動させるようになり得る。

30

【0103】

図10は、光開始型プライマーの例およびそれらの生化学的プロセスにおける適用を示し、それらの対応する例示的な配列は、表Iに列挙されている。一実施形態では、プライマーは、線形NA構築物（例えば、プライマー）に、内部光切断性結合改変を含み得、ここで、光開始型プライマーは、光への曝露により、遮断鎖が除去され得、結果として得られるプライマーが、ポリメラーゼが作用するための適切な開始部位を形成することができるよう、光切断性改変を有して設計されている（図10、一番上のパネル）。別の実施形態では、プライマーは、核酸構築物（例えば、プライマー）の3'末端に、ポリメラーゼ遮断剤を含み得、ここで、光開始型プライマーは、光を適用すると、阻害が除去され、それによって、ポリメラーゼが作用するための適切な開始部位を創出することができるよう、3'末端伸長阻害剤改変を使用して設計されている（図10、上から2つ目のパネル）。一実施形態では、プライマーは、NA構築物（例えば、プライマー）の配列内に分布した1つまたは複数の塩基対合阻害剤を含み得、ここで、光開始型プライマーは、最初は、塩基対合阻害剤を含むプライマーが、鑄型にハイブリダイズすることもポリメラーゼの開始部位を形成することもできないように、塩基対合阻害剤改変を使用して設計されている

40

50

。光に曝露されると、阻害が除去され得、結果として得られるプライマーは、ポリメラーゼが作用するための適切な開始部位を創出することができる（図10、上から3つ目のパネル）。別の実施形態では、プライマーは、ヘアピン構造の核酸（例えば、ヘアピンプライマー）内に切斷性結合を含み得、光開始型プライマーは、光切斷性ヘアピンモノマー構造を使用して設計されている。最初は、プライマーの3'末端領域は、ヘアピンの存在に起因して、塩基対合に利用することができない可能性がある。光に曝露されると、ヘアピンが破壊され得、結果として得られるプライマーは、伸長に利用することが可能となり得る（図10、一番下のパネル）。一部の実施形態では、プライマーは、光源に曝露される前は、核酸構築物上の感光性システムまたは感光性化学部分の存在に起因して、活性ではない（すなわち、不活性な分子状態にある）場合がある。しかしながら、光開始型プライマーを、光源に供されると、光源からの光により、阻害剤／遮断剤のうちのいくつかもしくはすべてが除去されるか、または光開始型プライマーに含まれる切斷性結合が切斷され、それによって、プライマーの能力が、活性な分子状態へと回復し得る。

【0104】

【表1】

表I:光開始型プライマーの例示的な配列

配列番号	配列	プライマーの種類
1	5'- CTCGGTCGTCCAATATCGAA[PC]AACT- 3'-[EI]	内部切斷性結合改変
2	5'-CTCGGTCGTCCAATATCGAA-3'- [PCEI]	3' -末端伸長阻害剤改変
3	5'-CTCGGT*CGTC*C*AATATCGA*A*-3'	塩基対合阻害剤
4	5'-TTCGATATT[PC]CTCGGTCGTCC AATATCGAA-3'	ヘアピン内の切斷性結合

10

20

30

[PC]: 光切斷性改変

[EI]: 伸長阻害剤

[PCEI]: 光切斷性ポリメラーゼ伸長阻害剤

N*: 光切斷性/光除去可能な塩基対合阻害剤を有する核酸塩基

【0105】

2. 光停止型プライマー

光停止型プライマーは、核酸錠型の存在下において、ポリメラーゼの開始部位として作用し、NA合成を促進することができる、NA構築物である。光が適用されると、これらの光停止型プライマーは、不活性となり得、さらなるNA合成を作動させることができない。光停止型プライマーは、光への曝露の前には活性であり得るが、光源に供された後には、不活性となり得る。図11A～11Dは、光停止型プライマーの例およびそれらの適用を示し、それらの対応する例示的な配列は、表IIに列挙されている。

【0106】

図11Aおよび11Bは、光切斷性改変を含む光停止型協同的プライマーの例を示す。光を適用することにより、NA構築物が破断され、続いて、プライミングが熱力学的に不利になり得る。プライマーは、プライマーの2つのセグメントの間に切斷性結合を含み得、安定なプライマー-錠型ヘテロ二量体を形成するためには、プライマーの2つの連結さ

40

50

れたセグメントが、同じ鑄型にハイブリダイズすることを必要とし得る。プライマーは、光への曝露の前は、酵素反応に活性であり得る。光へ曝露された後は、協同的プライマーの2つのセグメントは、切断性結合の切断に起因して、分離され得、不活性となり得るが、これは、1つのセグメントのみが鑄型に結合することが、各セグメントのプライマー-鑄型ヘテロ二量体にとって熱力学的に不利になり得るためである。

【0107】

図11Cおよび11Dは、光停止型ハイブリダイゼーションプライマーの例を示す。図11Cにおいて、光停止型プライマーは、光を適用することにより、プライマーを別個の部分へと破断させることができ、続いて、変換されるプライマー-鑄型ヘテロ二量体の塩基対合の強度を低減させ得、結果として、プライミングが、熱力学的に不利になり、プライマー-鑄型ヘテロ二量体が破断され得るように、光切断性改変を有して設計されている。図11Dにおいて、光停止型プライマーは、プライマーの配列に分布している塩基対合阻害剤改変を使用して設計されている。光を適用することにより、阻害が除去され得、続いて、変換されたプライマーの安定なヘアピン構造が創出され得る。変換されたプライマーは、ヘアピン構造を形成するので、プライマー-鑄型ヘテロ二量体は、それが、ヘアピン構造の分子内ハイブリダイゼーションと比較して、分子間ハイブリダイゼーションにとって熱力学的に不利になるため、破壊され得る。

【0108】

【表2】

表II:光停止型プライマーの例示的な配列

配列番号	配列	プライマーの種類
5	5'-CTCGGTCGTCCA [PC] ATATCGAA-3'	内部光切断性結合改変
6	5'- T*TC*G*AT*ATT [LK]CTCGGTCGTCC AATATCGAA-3'	塩基対合阻害剤
7	5'-CGTCCAATATCGAA-3'[LK][PC][LK]5'-CTCGGT-3'	光切断性改変を有する協同的プライマー系
8	3'-CTGGCTC-5'[LK][PC][LK]5'- GTCCAATATCGAA-3'	光切断性改変を有する協同的プライマー系

[LK]: 非伸長性リンカー

[PC]: 光切断性改変

N*: 光切断性/光除去可能な塩基対合阻害剤を有する核酸塩基

【0109】

3. 光開始型ハイブリダイゼーションプローブ

光開始型ハイブリダイゼーションプローブは、光が適用された後にのみ、それらの相補的配列を特異的に同定し、それらと塩基対合することができる、NA構築物である。それよりも以前は、光開始型ハイブリダイゼーションプローブは、不活性であり、それらの相補的配列にハイブリダイズすることができない。光開始型ハイブリダイゼーションプローブの例は、図12Aおよび12Bに示されており、それらの対応する例示的な配列は、表I I Iに列挙されている。

【0110】

図12Aにおいて、光開始型ハイブリダイゼーションプローブは、塩基対合阻害剤改変を使用して設計されている。最初は、塩基対合阻害剤を含む光開始型ハイブリダイゼーシ

10

20

30

40

50

ヨンプローブは、その相補的配列にハイブリダイズすることができない。光を適用することにより、塩基対合阻害剤の除去に起因してハイブリダイゼーションに対する阻害が除去され得、塩基対合が可能となり得、それによって、変換された光開始型ハイブリダイゼーションプローブが、その相補的配列にハイブリダイズすることができる。

【0111】

図12Bにおいて、光開始型ハイブリダイゼーションプローブは、光切斷性ヘアピンモノマー構造を含むように設計されている。最初は、プローブがその相補的配列に塩基対合することは、分子内ハイブリダイゼーションを有するヘアピンモノマーの存在に起因して、熱力学的に不利である。光を適用することにより、プローブを2つの別個の部分に切り分けることによってヘアピンが破壊され、変換されたプローブが、その相補的配列への塩基対合およびハイブリダイゼーションに利用可能となり得る。

【0112】

【表3】

表III:光開始型ハイブリダイゼーションプローブの例示的な配列

配列番号	配列	ハイブリダイゼーションプローブの種類
9	5'-ACC <u>G</u> TTAG <u>G</u> GAT <u>G</u> C-3'-[EI]	塩基対合阻害剤
10	5'- GCATCCTAACGGTTAA[PC]AATACCGTTAGGATGC- 3'-[EI]	光切斷性改変を有するヘアピン

[EI]: 伸長阻害剤

[PC]: 光切斷性改変

N*: 光切斷性/光除去可能な塩基対合阻害剤を有する核酸塩基

【0113】

4. 光停止型ハイブリダイゼーションプローブ

光停止型ハイブリダイゼーションプローブは、それらの相補的配列を特異的に同定し、それらと塩基対合することができる、核酸構築物である。しかしながら、光への曝露により、それらは、不活性となり得、もはやそれらの相補的配列にハイブリダイズすることができない。

【0114】

図13において、光停止型ハイブリダイゼーションプローブ構造の例が示されており、それらの対応する例示的な配列は、表IVに列挙されている。

【0115】

図13の上部パネルにおいて、光停止型ハイブリダイゼーションプローブは、光停止型ハイブリダイゼーションプローブの2つのセグメントを連結させる光切斷性改変を含むように設計されている。光への曝露の前には、光停止型ハイブリダイゼーションプローブの両方のセグメントが、標的NAにハイブリダイズし、それによって、活性な分子状態にとどまっている。光への曝露により、光停止型ハイブリダイゼーションプローブは、光切斷性結合を破断させ、それによって、2つの連結されていない光停止型核酸プローブのセグメントが生じ得、プローブ-錆型ヘテロ二量体形成が熱力学的に不利になり得る。例えば、少なくとも1つのセグメントは、標的核酸に対して非相補的な配列を有するように設計することができ、標的核酸とハイブリダイズしていないかまたは光停止型ハイブリダイゼーションプローブの他のセグメントと分離している場合に、シグナルの変化をもたらし得る。変換された光停止型ハイブリダイゼーションプローブの少なくとも1つのセグメントは、不活性な分子状態にあり得る。

10

20

30

40

50

【0116】

図13の下部パネルにおいて、光停止型ハイブリダイゼーションプローブは、1つまたは複数の塩基対合阻害剤を含むように設計されている。光への曝露の前には、塩基対合阻害剤の存在により、光停止型ハイブリダイゼーションプローブ内でのヘアピン構造を形成する自己塩基対合が防止され得る。代わりに、光停止型ハイブリダイゼーションプローブは、標的核酸にハイブリダイズし、それによって、活性な分子状態にとどまっている。光への曝露により、光停止型ハイブリダイゼーションプローブは、塩基対合阻害が除去され得、変換された光停止型ハイブリダイゼーションプローブの少なくとも1つのセグメントの安定なヘアピン構造を創出し得、それによって、プローブ-鑄型ヘテロ二量体形成が熱力学的に不利になり得る。光停止型ハイブリダイゼーションプローブのヘアピン構造は、不活性な分子状態にあり得る。

10

【0117】

【表4】

表IV:光停止型ハイブリダイゼーションプローブの例示的な配列

配列番号	配列	ハイブリダイゼーションプローブの種類
11	5'-ACCGTTA[PC]GGATGC-3'-[EI]	光切断性改変
12	5'- GC*A*TCCT*AACG*G*T[LK]AATACCGTTAGGATGC- 3'-[EI]	塩基対合阻害剤

20

[EI]: 伸長阻害剤

[PC]: 光切断性改変

N*: 光切断性/光除去可能な塩基対合阻害剤を有する核酸塩基

【0118】

30

5. 光開始型 5' 末端エクソヌクレアーゼプローブ

光開始型 5' 末端エクソヌクレアーゼプローブは、光によって除去することができる 5' 末端エクソヌクレアーゼ保護剤改変を含む、NA構築物である。5' 末端エクソヌクレアーゼ保護剤は、NA配列の 5' 末端の末端単位に化学的に付着した感光性システムまたは感光性化学部分であり得る。5' 末端エクソヌクレアーゼ保護剤の存在に起因して、エクソヌクレアーゼ酵素による核酸鎖の 5' 末端消化が遮断され得、核酸鎖は、切断または消化から保護される。光開始型 5' 末端エクソヌクレアーゼプローブは、不活性な分子状態にある。光への曝露により、5' 末端エクソヌクレアーゼ保護剤が除去され得、5' から 3' への鎖消化が促進され得る。例えば、そのような核酸構築物は、図14に示されており、ここで、DNAポリメラーゼ 5' 末端エクソヌクレアーゼは、最初は、遮断されており、光への曝露により、ブロック基が除去され、酵素が鎖を消化することが可能となり得る。

40

【0119】

一般に、核酸塩基上のヘテロ原子、3' - OH、5' - OH、およびリン酸基（3' 位または 5' 位のいずれか）は、例えば、図1に示されるいずれか1つのような、感光性化学部分に結合することができる。光切断性リンカーは、光への曝露により、1つまたは複数の感光性化学部分が、それらが付着している核酸断片から破断され得るように、リンカーの末端に付着された1つまたは複数の感光性化学部分を有し得る。様々な光切断性化学部分を、様々な様式で使用することができる。

【実施例】

【0120】

50

光によりトリガーされるN A構築物を用いた実施形態

(実施例1)

光開始型PCR

この実施例では、図15に示されるように、光開始型プライマー対を、PCRアッセイにおいて使用する。図15に示されるように、PCRおよびプライマーの伸長は、光を適用した後に開始されるが、光が適用される前には開始され得ない。光への曝露の前には、プライマーが、3'末端伸長阻害剤（すなわち、プライマーの3'末端におけるポリメラーゼ阻害剤）の存在に起因して不活性であるため、重合も指数関数的増幅も起こり得ない。この方法の利点は、例えば、試料の、反応または他の前処理ステップへの導入の間の室温（もしくはより低温での）非特異的DNA増幅に起因する所望されない産物および/またはプライマー二量体の存在を低減させ得ることであり得る。光への曝露により、3'末端伸長阻害剤が除去され得、プライマーが、ポリメラーゼに触媒される伸長（すなわち、成長する鎖の伸長（extension）、伸長（elongation））において活性となり得る。

【0121】

これ以降「光開始型PCR」と称され得るこの方法は、他のPCR方法、例えば、高温での加熱により増幅プロセスを活性化するホットスタートPCR方法などの代替法となり得る。Sharkey DJ, Scallice ER, Christy KG, Atwood SM, Daiss JL, "Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction See Bio/Technology," 1994, 12(5): 506-9、N. Paul, J. Shum, T. Le, "Hot start PCR," Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2010, 630: 301-18。したがって、光開始型PCRは、熱不安定性スイッチとして作用する試薬および分子を含まなくてもよい。

【0122】

本発明の一部の実施形態では、光開始型PCRおよびホットスタートPCRのいずれの方法を使用しても、増幅が、低温およびPCRの前に不活性なままであることをより確実にことができる。

【0123】

本発明の一部の実施形態では、光開始型PCRは、定量的PCR(Q-PCR)システムに含まれる。一部の実施形態では、光開始型PCRを用いる方法は、(a)1つの光開始型プライマーの存在下において、2つまたはそれを上回るヌクレオチド配列に核酸増幅を実行して、流体中に2つまたはそれを上回るアンプリコンを産生させるステップと、(b)独立して処理可能な位置に複数の核酸プローブを有する固体表面を含むアレイを用意するステップであって、前記アレイが、前記流体と接触するように構成される、ステップと、(c)流体がアレイと接触している間に、アンプリコンの、2つまたはそれを上回る核酸プローブへのハイブリダイゼーションを測定して、アンプリコンハイブリダイゼーション測定値を得るステップであって、アンプリコンが、クエンチャーを含む、ステップとを含む、Q-PCR方法である。一部の実施形態では、光プライマーを含むプライマーを使用して、アンプリコンが創出され、プライマーは、クエンチャーを含む。一部の実施形態では、プライマー対におけるプライマーのうちの一方は、クエンチャーを含む。一部の実施形態では、プライマー対における両方のプライマーは、クエンチャーを含む。一部の実施形態では、クエンチャーは、アンプリコンが形成されるときにそこに組み込まれる。一部の実施形態では、デオキシヌクレオチド三リン酸(d-NTP)を使用して、アンプリコンが作製され、アンプリコンを作製するために使用されるd-NTPのうちの1つまたは複数は、クエンチャーを含む。一部の実施形態では、アンプリコンハイブリダイゼーション測定は、固体表面に付着した蛍光部分からの蛍光を測定することによって実行される。一部の実施形態では、蛍光部分は、核酸プローブに共有結合的に付着している。一部の実施形態では、蛍光部分は、基板に付着しており、核酸プローブには共有結合的に付着していない。一部の実施形態では、アンプリコンは、クエンチャーを含み、ハイブリダイゼーションを測定するステップは、核酸プローブへのアンプリコンのハイブリダイゼーション

10

20

30

40

50

ヨンに起因する蛍光の減少を測定することによって実行される。

【0124】

一部の実施形態では、光開始型PCRを用いる方法は、(a)表面および複数の異なるプローブを有する固体支持体を含むアレイを用意するステップであって、異なるプローブが、異なる処理可能な位置で表面に固定されており、各処理可能な位置が蛍光部分を含む、ステップと、(b)複数のヌクレオチド配列を含む試料にPCR增幅を実行するステップであって、PCR增幅が、流体中で行われ、(i)各核酸配列のPCRプライマーが、光開始型プライマーであり、クエンチャーレベルを含み、(ii)流体が、プローブと接触しており、それによって、增幅された分子が、プローブとハイブリダイズすることができ、それによって、蛍光部分からのシグナルをクエンチする、ステップと、(c)処理可能な位置で蛍光部分からのシグナルを経時的に検出するステップと、(d)経時的に検出されたシグナルを使用して、流体中の増幅された分子の量を決定するステップと、(e)流体中の増幅された分子の量を使用して、試料中のヌクレオチド配列の量を決定するステップとを含む、Q-PCR方法である。一部の実施形態では、増幅された分子の量を決定するステップは、PCR增幅の複数の温度サイクルの間またはその後に実行される。一部の実施形態では、各核酸配列について1つを上回るPCRプライマーが、クエンチャーレベルを含む。一部の実施形態では、処理可能な位置で蛍光部分からのシグナルを経時的に検出するステップは、増幅された分子のプローブとのハイブリダイゼーションの速度を測定することを含む。一部の実施形態では、試料は、メッセンジャーRNAまたはメッセンジャーRNAに由来するヌクレオチド配列を含み、試料中の核酸配列の量の決定を使用して、試料が由来する細胞または細胞群における遺伝子発現のレベルを決定する。一部の実施形態では、試料は、ゲノムDNAまたはゲノムDNAに由来するヌクレオチド配列を含み、試料中の核酸配列の量の決定を使用して、試料が由来する細胞または細胞群の遺伝子構成を決定する。一部の実施形態では、2つまたはそれを上回る異なるヌクレオチド配列に対応する2つまたはそれを上回るPCRプライマーは、異なるクエンチャーレベルを有する。一部の実施形態では、2つまたはそれを上回る異なる処理可能な位置は、異なる蛍光部分を含む。一部の実施形態では、異なるクエンチャーレベルまたは異なる蛍光部分を使用して、交差ハイブリダイゼーションを決定する。一部の実施形態では、個体の健康状態を決定するための診断試験であって、そのような個体からの試料に、光開始型プライマーを使用してQ-PCR方法を実行することを含む、診断試験。

【0125】

一部の実施形態では、Q-PCR方法は、少なくとも1つの標的核酸分子をアッセイするための方法であって、(a)少なくとも1つの鋳型核酸分子を含有する核酸試料、前記光開始型プライマーを含むプライマー対、およびポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、プライマー対が、鋳型核酸分子との配列相補性を有し、プライマー対が、限定プライマーおよび過剰プライマーを含む、ステップと、(b)反応混合物を、鋳型核酸分子および限定プライマーの増幅産物として少なくとも1つの標的核酸分子を得るのに十分な条件下において、核酸増幅反応に供するステップであって、少なくとも1つの標的核酸分子が、限定プライマーを含む、ステップと、(c)反応混合物を、(i)異なる個別に処理可能な位置で基板の表面に固定された複数のプローブを含む基板であって、プローブが、限定プライマーとの配列相補性を有し、限定プライマーを捕捉することができる、基板と、(ii)処理可能な位置からの少なくとも1つのシグナルを検出するように構成される検出器アレイであって、少なくとも1つのシグナルが、限定プライマーが複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを有するセンサーレイと接触させるステップと、(d)検出器アレイを使用して、核酸増幅反応中の複数の時点での、1つまたは複数の処理可能な位置からの少なくとも1つのシグナルを検出するステップと、(e)限定プライマーが複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す少なくとも1つのシグナルに基づいて、標的核酸分子を検出するステップとを含む、方法である。一部の実施形態では、少なくとも1つのシグナルは、プローブが限定プライマーに結合すると、生じる。一部の実施形態では、反応混合物は、異なる核

10

20

30

40

50

酸配列を有する複数の限定プライマーを含み、プローブは、複数の限定プライマーに特異的に結合する。一部の実施形態では、反応混合物は、反応混合物を保持し、プローブが限定プライマーに結合するのを可能にするように構成される、反応チャンバーにおいて提供される。一部の実施形態では、方法は、プローブが限定プライマーと結合する速度を分析することによって、複数の時点で検出された少なくとも1つのシグナルを、少なくとも1つの錆型核酸分子のもともとの濃度と相關付けるステップをさらに含む。一部の実施形態では、プローブは、オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、標的核酸分子は、個々のプローブにハイブリダイズすると、ヘアピンループを形成する。一部の実施形態では、センサーチャンバーは、少なくとも約100個の一体型センサーを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのシグナルは、エネルギー受容体とエネルギー供与体との間の相互作用を示す、光学シグナルである。一部の実施形態では、エネルギー受容体は、過剰プライマーおよび/または限定プライマーに連結されている。一部の実施形態では、エネルギー受容体は、標的核酸分子に連結されている。一部の実施形態では、エネルギー受容体は、クエンチャーである。一部の実施形態では、エネルギー供与体は、フルオロフォアである。一部の実施形態では、少なくとも1つのシグナルは、電極と酸化還元標識との間の相互作用を示す、電気シグナルである。一部の実施形態では、酸化還元標識は、過剰プライマーおよび/または限定プライマーに連結されている。一部の実施形態では、酸化還元標識は、標的核酸分子に連結されている。一部の実施形態では、(d)は、バックグラウンドと比べて、少なくとも1つのシグナルの増加を測定することを含む。一部の実施形態では、(d)は、バックグラウンドと比べて、少なくとも1つのシグナルの減少を測定することを含む。一部の実施形態では、標的核酸分子は、少なくとも約90%の感度で検出される。一部の実施形態では、少なくとも1つのシグナルは、標的核酸分子を含む反応混合物が、センサーチャンバーと流体接触している間に検出される。一部の実施形態では、(b)は、錆型核酸との配列相補性を有する複数の標的核酸分子を生成することを含む。一部の実施形態では、検出器アレイは、処理可能な位置からの複数のシグナルを検出するように構成され、複数のシグナルのそれぞれは、限定プライマーが、複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す。一部の実施形態では、(d)は、検出器アレイを使用して、複数の時点で、処理可能な位置からの複数のシグナルを検出することを含み、複数のシグナルのそれぞれは、限定プライマーが、複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す。一部の実施形態では、(e)は、限定プライマーを特定することを含む。

【0126】

一部の実施形態では、本開示は、少なくとも1つの標的核酸分子をアッセイするためのシステムであって、(a)少なくとも1つの錆型核酸分子を含有する核酸試料、錆型核酸分子に相補的な配列を有するプライマー対、およびポリメラーゼを含む反応混合物を含む反応チャンバーであって、プライマー対が、限定プライマーおよび過剰プライマーを含み、反応混合物を含む反応チャンバーが、反応混合物に対する核酸增幅反応を促進して、錆型核酸の增幅産物として少なくとも1つの標的核酸分子を得るように構成される、反応チャンバーと、(b)(i)異なる個別に処理可能な位置で基板の表面に固定された複数のプローブを含む基板であって、プローブが、限定プライマーとの配列相補性を有し、限定プライマーを捕捉することができる、基板と、(ii)処理可能な位置からの少なくとも1つのシグナルを検出するように構成される検出器アレイであって、少なくとも1つのシグナルが、限定プライマーが複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを含む、センサーチャンバーと、(c)センサーチャンバーに連結され、(i)反応混合物を、核酸增幅反応に供し、(ii)核酸增幅反応中の複数の時点で、処理可能な位置のうちの1つまたは複数からの少なくとも1つのシグナルを検出するようにプログラミングされる、コンピュータープロセッサーとを備える、システムを提供する。

【0127】

一部の実施形態では、Q-PCR方法は、少なくとも1つの錆型核酸分子をアッセイするための方法であって、(a)(i)第1のピクセルに固定された複数の第1のプローブ

10

20

30

40

50

、第2のピクセルに固定された複数の第2のプローブを含む基板であって、第1のプローブが、プライマーセットの個々のプライマーを捕捉するように構成され、第2のプローブが、対照核酸分子を捕捉するように構成される、基板と、(i i) 第1のピクセルからの少なくとも1つの第1のシグナルおよび第2のピクセルからの少なくとも1つの第2のシグナルを検出するように構成される検出器アレイであって、少なくとも1つの第1のシグナルと少なくとも1つの第2のシグナルとの間の経時的な差が、個々のプライマーが複数の第1のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを含む、センサーリアレイを活性化するステップと、(b) 反応混合物を、鑄型核酸分子の増幅産物として少なくとも1つの標的核酸分子を得るのに十分な条件下において、核酸増幅反応に供するステップであって、反応混合物が、(i) 鑄型核酸分子を含有するかまたは含有することが疑われる核酸試料、(i i) プライマーセット、(i i i) 対照核酸分子、および(i v) 重合酵素を含み、プライマーセットの個々のプライマーが、鑄型核酸分子との配列相補性を有する、ステップと、(c) 検出器アレイを使用して、核酸増幅反応中の複数の時点で、少なくとも1つの第1のシグナルおよび少なくとも1つの第2のシグナルを検出するステップと、(d) 少なくとも1つの第1のシグナルと少なくとも1つの第2のシグナルとの間の差を使用して、鑄型核酸分子を検出するステップとを含む、方法である。
一部の実施形態では、少なくとも1つの第1のシグナルは、個々のプローブが個々のプライマーに結合すると生じ、少なくとも1つの第2のシグナルは、第2のプローブの追加のプローブが対照核酸分子に結合すると生じる。一部の実施形態では、対照核酸分子は、増幅反応において増幅されない。一部の実施形態では、反応混合物は、複数の鑄型核酸分子を含み、第1のプローブは、複数の鑄型核酸分子の増幅産物としての複数の標的核酸分子に特異的に結合する。一部の実施形態では、プライマーセットは、異なる核酸配列を有する複数の個々のプライマーを含み、第1のプローブは、複数の個々のプライマーに特異的に結合するように構成される。一部の実施形態では、反応混合物は、反応混合物を保持し、第1および第2のプローブが個々のプライマーおよび対照核酸分子に結合することを可能にするように構成される、反応チャンバーにおいて提供される。一部の実施形態では、方法は、プローブがプライマーセットの個々のプライマーと結合する速度を分析することによって、複数の時点で検出された少なくとも1つの第1のシグナルを、少なくとも1つの鑄型核酸分子の初期濃度と相關付けるステップをさらに含む。一部の実施形態では、第1のプローブまたは第2のプローブは、オリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、センサーリアレイは、少なくとも約100個の一体型センサーを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの第1のシグナルは、個々のプライマーおよび個々のプローブと関連する第1のエネルギー受容体と第1のエネルギー供与体との間の第1の相互作用を示す、第1の光学シグナルであり、少なくとも1つの第2のシグナルは、対照核酸分子および第2のプローブの追加のプローブと関連する第2のエネルギー受容体と第2のエネルギー供与体との間の第2の相互作用を示す、第2の光学シグナルである。一部の実施形態では、第1のエネルギー受容体は、個々のプライマーに連結され、第2のエネルギー受容体は、対照核酸分子に連結される。一部の実施形態では、第1のエネルギー受容体は、第1のクエンチャヤーであり、第2のエネルギー受容体は、第2のクエンチャヤーである。一部の実施形態では、第1のエネルギー供与体は、第1のフルオロフォアであり、第2のエネルギー供与体は、第2のフルオロフォアである。一部の実施形態では、第1のエネルギー供与体は、第1のプローブに連結され、第2のエネルギー供与体は、第2のプローブに連結される。一部の実施形態では、標的核酸分子は、少なくとも約90%の感度で検出される。一部の実施形態では、少なくとも1つの第1のシグナルは、標的核酸分子を含む反応混合物が、センサーリアレイと流体接触している間に検出される。

【0128】

一部の実施形態では、Q - PCRシステムは、少なくとも1つの鑄型核酸分子をアッセイするためのものであり、(a) 反応混合物を含む反応チャンバーであって、反応混合物が、(i) 鑄型核酸分子を含有するかまたは含有することが疑われる核酸試料、(i i)

10

20

30

40

50

個々のプライマーを含むプライマーセット、(i i i) 対照核酸分子、および(i v)重合酵素を含み、プライマーセットの個々のプライマーが、鑄型核酸分子との配列相補性を有し、反応混合物を含む反応チャンバーが、鑄型核酸分子の増幅産物(複数可)として少なくとも1つの標的核酸分子を得るのに十分な条件下において、反応混合物を用いた核酸増幅反応を促進するように構成され、核酸増幅反応が、対照核酸のいずれの増幅産物ももたらさない、反応チャンバーと、(b)(i) 第1のピクセルに固定された複数の第1のプローブ、第2のピクセルに固定された複数の第2のプローブを含む基板であって、第1のプローブが、プライマーセットの個々のプライマーを捕捉するように構成され、第2のプローブが、対照核酸分子を捕捉するように構成される、基板と、(i i) 第1のピクセルからの少なくとも1つの第1のシグナルおよび第2のピクセルからの少なくとも1つの第2のシグナルを検出するように構成される検出器アレイであって、少なくとも1つの第1のシグナルと少なくとも1つの第2のシグナルとの間の経時的な差が、個々のプライマーが複数の第1のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを含む、センサーチューブと、(c) センサーチューブに連結され、(i) 反応混合物を、核酸増幅反応に供し、(i i) 核酸増幅反応中の複数の時点で、少なくとも1つの第1のシグナルおよび少なくとも1つの第2のシグナルを検出するようにプログラムされる、コンピュータープロセッサーとを備える。一部の実施形態では、コンピュータープロセッサーは、少なくとも1つの第1のシグナルと少なくとも1つの第2のシグナルとの間の差を使用して、鑄型核酸分子を検出するようにプログラムされる。一部の実施形態では、反応混合物は、複数の鑄型核酸分子を含み、第1のプローブは、複数の鑄型核酸分子の増幅産物としての複数の標的核酸分子に特異的に結合する。一部の実施形態では、プライマーセットは、異なる核酸配列を有する複数の個々のプライマーを含み、第1のプローブは、複数の個々のプライマーに特異的に結合するように構成される。一部の実施形態では、検出器アレイは、光学検出器を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの第1のシグナルは、個々のプライマーおよび個々のプローブと関連する第1のエネルギー受容体と第1のエネルギー供与体との間の第1の相互作用を示す、第1の光学シグナルであり、少なくとも1つの第2のシグナルは、対照核酸分子および第2のプローブの追加のプローブと関連する第2のエネルギー受容体と第2のエネルギー供与体との間の第2の相互作用を示す、第2の光学シグナルである。一部の実施形態では、光学検出器は、相補型金属酸化物半導体デバイスを含む。一部の実施形態では、検出器アレイは、電気検出器を含む。一部の実施形態では、電気検出器は、相補型金属酸化物半導体デバイスを含む。一部の実施形態では、センサーチューブは、少なくとも約100個の一体型センサーを含む。

【0129】

様々な技法および技術を、マイクロアレイまたはCMOSバイオチップを使用してQ-PCRを行うために使用することができる。例えば、いくつかのそのような技法は、米国特許第8,048,626号、米国特許第9,499,861号、および米国特許第10,174,367号に記載されており、これらのそれぞれは、あらゆる目的で参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0130】

本発明の一部の実施形態では、光除去可能な遮断は、NA親和性に基づく検出システム、例えば、DNAマイクロアレイに含まれる。本質的に大規模並列の親和性に基づくバイオセンサーであるDNAマイクロアレイは、主として、遺伝子発現レベルを測定するため、すなわち、DNAデータのメッセンジャーRNA分子(mRNA)への転写のプロセスを定量するために使用される。mRNAに転写された情報は、さらに、細胞における機能の大部分を実行する分子であるタンパク質へと翻訳される。したがって、遺伝子発現レベルを測定することによって、研究者らは、細胞または生物全体の機能性に関する重要な情報を推測することができる可能性がある。したがって、典型的な発現レベルからの変動は、しばしば、疾患の指標であり、したがって、DNAマイクロアレイ実験は、疾患の遺伝的原因についての貴重な識見を提供し得る。実際に、DNAマイクロアレイ技術の最終的な目標の1つは、分子診断の発展および個別化医療の創出を可能にすることである。

10

20

30

40

50

【0131】

DNAマイクロアレイは、基本的に、結合が、相補的DNA鎖が互いに特異的に結合して、より低いエネルギー状態において構造体を創出するプロセスであるハイブリダイゼーションに基づいています。親和性に基づくバイオセンサーである。典型的に、DNAマイクロアレイの表面は、それぞれが認識エレメントとして一本鎖DNAオリゴヌクレオチド捕捉分子を含有する、スポットのアレイ（グリッド）からなり、その位置は、ハイブリダイゼーションおよび検出のプロセスの間、固定されている。各一本鎖DNA捕捉分子は、厳密なプラットフォームおよび適用に応じて、典型的に、25～70塩基の長さを有する。DNAマイクロアレイ検出プロセスにおいて、まず、定量する必要のあるmRNAを使用して、蛍光標識されたcDNAを生成し、これを、マイクロアレイに適用する。適切な実験条件（例えば、温度および塩濃度）下において、マイクロアレイと完全一致する標識されたcDNA分子は、相補的な捕捉オリゴにハイブリダイズ、すなわち、結合する。いずれにせよ、cDNAは、完全一致ではなく部分的な相補体にすぎない（ミスマッチを有する）オリゴヌクレオチドに非特異的に交差ハイブリダイズし得るため、いくつかの非特異的結合が、常に存在する。さらに、各スポットにおける蛍光強度を測定して、ハイブリダイゼーションプロセスおよびしたがって遺伝子発現レベルに相関性を有する画像を得る。

10

【0132】

分子認識アッセイは、一般に、2種類の分子間での結合事象を検出することを含む。結合の強度は、「親和性」と称され得る。生物学的分子間の親和性は、例えば、水素結合、疎水性相互作用、静電相互作用、およびファンデルワールス力を含む、非共有結合的分子間相互作用によって影響を受ける。本明細書において企図されるものなどの多重結合実験において、複数の検体およびプローブが含まれる。例えば、実験は、複数の異なる核酸分子間または異なるタンパク質間での結合を試験することを含み得る。そのような実験において、検体は、高い親和性を有するプローブに優先的に結合する。したがって、特定のプローブが、結合事象に関与していることを決定することにより、使用している検出システムの検出の閾値レベルを満たすために十分なプローブに対する親和性を有する検体が試料中に存在することが示される。プローブと検体との間の結合の特異度および強度に基づいて、結合パートナーの同一性を決定することが可能であり得る。

20

【0133】

DNAマイクロアレイの観点から解決策を開発するに当たり、本発明は、（i）交差ハイブリダイゼーションを、ノイズではなく干渉としてとらえるプロセス（無線通信の干渉と同様に、交差ハイブリダイゼーションが実際にシグナルコンテンツを有する）、（ii）ハイブリダイゼーションおよび交差ハイブリダイゼーションの確率論的プロセスとしてのモデル、（iii）モデルを構築するための分析方法（例えば、融解温度またはギブズ自由エネルギー関数）の使用、および実験データを使用してモデルを微調整すること、（iv）遺伝子発現レベルの検出および定量を、確率論的推定問題としてとらえること、ならびに（v）最適推定値の構築を提供する。本発明は、上述の不確定さを考慮し利用することによって、マイクロアレイにおいて標的を最適に検出し、定量するために、統計学的シグナル処理技法を使用する。

30

【0134】

様々な技法および技術を、基板または支持体において生物学的材料のアレイを合成するために使用することができる。例えば、いくつかのそのような技法は、米国特許第9,223,929号および米国特許第9,133,504号に記載されており、これらのそれぞれは、あらゆる目的で参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0135】

本発明の一部の実施形態では、光除去可能な遮断は、CMOSバイオチップシステムに含まれる。一部の実施形態では、本開示は、サンドイッチ構成またはタンデムで、追加の層と一緒に、例えば、別の層が分子認識層、光学層、およびセンサー層のいずれかの間に挿入されて一体化された、NA構築物を含む分子認識層、光学層、およびセンサー層を順に含む、完全一体型バイオセンサーハイブリダイゼーションアレイを提供する。分子認識層は、開放表面、および

50

異なる独立して処理可能な位置で開放表面に付着した複数の異なるプローブを含む。分子認識層はまた、光を光学層へと伝達し得る。光学層は、光学フィルター層を含み、光学層が、分子認識層からセンサー層へ光を伝達する。層間での光の伝達は、光学層によってフィルタリングされ得る。センサー層は、光学層を通じて伝達されたフィルタリングされた光を検出する光学センサーアレイを含む。加えて、分子認識層と流体接触する検体を含む流体体積が存在し得る。流体体積は、N A 構築物を含み得る。

【 0 1 3 6 】

本開示の一体型バイオセンサーアレイは、検体の結合をリアルタイムで測定することができる。アッセイの結合動態を検出することができる一体型バイオセンサーマイクロアレイは、親和性に基づくアッセイと接触している。バイオセンサーアレイは、プローブへの結合をリアルタイムで検出するためのセンサーと光通信で結合プローブを含む分子認識層を含む。

10

【 0 1 3 7 】

捕捉プローブ層、蛍光放出フィルター、および画像センサーを含む、複数のプローブへの検体の結合のリアルタイム測定のための一体型の蛍光に基づくマイクロアレイシステムは、標準的な相補型金属酸化物半導体（C M O S）プロセスを使用して構築することができる。

【 0 1 3 8 】

本発明のある実施形態では、センサー層の光学センサーアレイは、半導体に基づくセンサーアレイの一部である。半導体に基づくセンサーアレイは、有機半導体または無機半導体のいずれであってもよい。一部の実施形態では、半導体デバイスは、シリコンに基づくセンサーである。本発明において有用なセンサーの例としては、電荷結合素子（C C D）、C M O Sデバイス、およびデジタルシグナルプロセッサーが挙げられるが、これらに限定されない。センサー層の半導体デバイスはまた、一体型インピクセル（in-pixel）光電流検出器も含み得る。検出器は、容量型トランスインピーダンス増幅器（C T I A）を含み得る。

20

【 0 1 3 9 】

別の実施形態では、半導体デバイスは、デジタル変換器に対するインピクセルアナログを有する。別の実施形態では、センサー層の光学センサーアレイは、フォトダイオードアレイであり得る。

30

【 0 1 4 0 】

センサー層は、C M O Sプロセスを使用して創出され得る。半導体検出プラットフォームは、リアルタイムマイクロアレイ（R T - μ A r r a y）の結合事象を測定することができる一体型システムのアセンブリーであり得る。一部の実施形態では、一体型デバイスシステムは、R T - μ A r r a yアッセイと接触してまたはその近傍に設置されるトランスデューサーアレイを含む。

【 0 1 4 1 】

R T - μ A r r a yの半導体検出プラットフォームは、R T - μ A r r a yプラットフォームの標的およびプローブ結合事象からのシグナルを受信および/または分析するための独立したトランスデューサーアレイを含み得る。複数のトランスデューサーが、集合的に機能して、任意の個々のマイクロアレイスポットにおけるいくつかの結合事象を測定することができる。例えば、あるスポット専用のトランスデューサーにより、個々の測定されるシグナルを加算および/または平均することができる。

40

【 0 1 4 2 】

光学センサーアレイに接続された検出回路を、センサー層に埋め込むことができる。シグナル処理回路もまた、光学センサーアレイに接続し、センサー層に埋め込むことができる。一部の実施形態では、トランスデューサーおよび/または検出回路および/または分析システムは、半導体基板に製造および/または埋め込まれた電子部品を使用して、実装される。そのような製造技法の例としては、シリコン製造プロセス、マイクロ電気機械的表面マイクロマシニング、C M O S製造プロセス、C C D製造プロセス、シリコンに基づ

50

く両極性製造プロセス、およびヒ化ガリウム製造プロセスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0143】

トランスデューサーアレイは、画像センサーアレイであり得る。そのような画像アレイの例としては、CMOS画像センサーアレイ、CMOS線形光学センサー、CCD画像センサー、およびCCD線形光学センサーが挙げられるが、これらに限定されない。画像センサーを使用して、一体型バイオセンサーアレイプラットフォーム内のプローブ／検体の相互作用の活性を検出することができる。

【0144】

様々な技法および技術を、CMOSバイオチップシステムを作製および／または使用するためには使用することができる。例えば、いくつかのそのような技法は、米国特許第8,637,436号および米国特許第8,969,781号に記載されている。

10

【0145】

(実施例2)

光作動型ネステッドPCR

この実施例では、図16に示されるように、2つのプライマー対を使用する。一方の対は、光開始型であり、他方は、光停止型である。PCRサイクル内の特定の時点において、光を適用して、光停止型プライマー対を不活性化し、光開始型対を活性化する。

【0146】

一部の実施形態では、光停止型プライマー対は、光停止型プライマー対の活性形態によって生成されるアンブリコンが、光開始型プライマー対の活性形態の鋳型として使用されるように、光開始型プライマー対に隣接している（図16を参照されたい）。このシステムの利点は、これが、鋳型における予想外のプライマー結合部位の増幅に起因して産生され得る、非特異的アンブリコンおよび産物を低減させることによって、増幅の特異度および感度を増加させることができることである。

20

【0147】

これ以降「光作動型ネステッドPCR」と称され得るこの方法は、2つのPCR増幅が、2つの異なる反応チャンバーにおいてタンデムで実行される従来的なネステッドPCR方法の代替法となり得る。G. Bein, R. Glaeser, & H. Kirchner, "Rapid HLA-D RB1 genotyping by nested PCR amplification. Tissue antigens," 1992, 39(2): 68-73、M. Pfeffer, B. Linssen, M.D. Parker, and R.M. Kinney, "Specific detection of Chikungunya virus using a RT-PCR/nested PCR combination," Journal of Veterinary Medicine, Series B, 2002, 49(1): 49-54を参照されたい。光開始型ネステッドPCRの利点は、しかしながら、両方の増幅が、同じ反応かつ密閉チューブ様式で起こり得ることである。

30

【0148】

本発明の一部の実施形態では、光作動型ネステッドPCRは、Q-PCRシステムに含まれる。実施例1において開示されるデバイス、システム、および方法は、適切なNA構築物を、光作動型ネステッドPCRにおいて、光開始型プライマー対および／または光停止型プライマー対として使用し、光作動型ネステッドPCRを実行するプロセスにおいて、反応混合物に照射して、特定のPCRプロセスを開始または停止させることによって、本明細書で改変および適用することができる。

40

【0149】

本発明の一部の実施形態では、光除去可能な遮断は、NA親和性に基づく検出システム、例えば、DNAマイクロアレイに含まれる。

【0150】

本発明の一部の実施形態では、光除去可能な遮断は、CMOSバイオチップシステムに含まれる。

【0151】

(実施例3)

50

光除去可能な遮断

この実施例では、光停止型ハイブリダイゼーションプローブを、ポリメラーゼ連鎖反応または他のプライマーにより開始される分子増幅反応において、配列選択的遮断剤として使用する。P.L. Dominguez, and M.S. Kolodney, "Wild-type blocking polymerase chain reaction for detection of single nucleotide minority mutations from clinical specimens," *Oncogene*, 2005, 24(45):6830-6834. J.F. Huang, et al., "Single-tubed wild-type blocking quantitative PCR detection assay for the sensitive detection of codon 12 and 13 KRAS mutations," *PLoS one*, 2015, 10(12)を参照されたい。

【0152】

一部の実施形態では、光停止型ハイブリダイゼーションプローブは、野生型配列のPCR増幅を阻害し、同時に、変異体配列の合成を可能にする。これを行うことにより、野生型アンプリコン対変異体アンプリコンの比は、増幅が進行するにつれて、減少する。これにより、PCRの終了時に、変異体のより良好な検出が容易となる。光停止型構築物の種類の存在により、光による遮断剤の除去がさらに可能となり、ハイブリダイゼーションプローブの干渉なしに、クリーンなPCR産物が産生される。

【0153】

本発明の一部の実施形態では、光除去可能な遮断は、Q-PCRシステムに含まれる。実施例1において開示されるデバイス、システム、および方法は、適切なNA構築物を、光開始型PCRプロセスとタンデムで、光除去可能な遮断プローブとして使用し、光開始型PCRを実行するプロセスにおいて、反応混合物に照射して、特定のPCRプロセスを開始または停止させることによって、本明細書で改変および適用することができる。

【0154】

本発明の一部の実施形態では、光除去可能な遮断は、NA親和性に基づく検出システム、例えば、DNAマイクロアレイに含まれる。実施例1に開示されているデバイス、システム、および方法は、適切なNA構築物を、NA親和性に基づく検出システム、例えば、DNAマイクロアレイにおいて、光除去可能な遮断プローブとして使用することによって、本明細書で改変および適用することができる。NA親和性に基づく検出システムを使用して、例えば、標的核酸を検出する場合、光除去可能な遮断プローブは、標的核酸、固定プローブ、または溶液に基づくプローブ、またはそれらの組合せと相互作用し得る。NA親和性に基づく検出システムを実行するプロセスにおいて、反応混合物に照射することによって、異なるアンプリコンが産生され得、かつ/または異なるハイブリダイゼーション事象が、NA親和性に基づく検出システムによって検出され得る。

【0155】

本発明の一部の実施形態では、光除去可能な遮断は、CMOSバイオチップシステムに含まれる。実施例1に開示されているデバイス、システム、および方法は、適切なNA構築物を、CMOSバイオチップシステムにおいて、光除去可能な遮断プローブとして使用することによって、本明細書で改変および適用することができる。CMOSバイオチップシステムを使用して、例えば、標的核酸を検出する場合、光除去可能な遮断プローブは、標的核酸、固定プローブ、または溶液に基づくプローブ、またはそれらの組合せと相互作用し得る。CMOSバイオチップシステムを実行するプロセスにおいて、反応混合物に照射することによって、NA親和性に基づく検出システムを実行するプロセスにおいて、反応混合物に照射することによって、異なるアンプリコンが産生され得、かつ/または異なるハイブリダイゼーション事象が、CMOSバイオチップシステムによって検出され得る。

【0156】

(実施例4)

光アンカー型プライマー

この実施例では、光停止型プライマーを使用して、PCR中にプライマーの有効な長さを変更する。

【0157】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、光停止型プライマーは、特定の回数のPCRサイクルの後に、プライマーのもともとの5'末端に由来する不活性な部分、および光切断後にPCRを継続することができるもともとの3'末端に由来する活性な（伸長可能な）部分の2つの部分に切断される。これにより、初回のPCRサイクルにおいて高い融解温度（T_M）を有するアンカー型プライマーの設計が可能となる。光への曝露により、プライマーの長さは、プライマーのT_Mを低減させるため、および結果として得られるアンプリコンの長さを低減させるための両方のために、短縮される。この方法の適用には、初期PCRサイクルにおいて鋳型内のミスマッチに適応するため、かつ／またはRNAもしくはDNA鋳型のいずれかにおいて二次構造を克服するための、高T_Mプライマーの設計が含まれる。

【0158】

10

本発明の一部の実施形態では、光アンカー型プライマーは、Q-PCRシステムに含まれる。実施例1に開示されているデバイス、システム、および方法を、適切なNA構築物を光アンカー型PCRプロセスにおいて光アンカー型プライマーとして使用することによって、本明細書で改変および適用することができる。光に曝露する前、生成されたアンプリコンは、全長の光アンカー型プライマーを含み得る。反応混合物に照射することにより、新しいプライマー対を产生することができる。各新しいプライマーは、対応する全長光アンカー型プライマーよりも長さが短い。したがって、新しいプライマー対を用いて產生されるアンプリコンは、光に曝露する前よりも長さが短くなり得る。異なる長さを有するアンプリコンの2つのセットを、同じ鋳型核酸分子を使用して生成することができる。

【0159】

20

本発明の一部の実施形態では、光アンカー型プライマーは、NA親和性に基づく検出システム、例えば、DNAマイクロアレイに含まれる。

【0160】

本発明の一部の実施形態では、光アンカー型プライマーは、CMOSバイオチップシステムに含まれる。

【0161】

本開示において使用される他の用語

「定量的PCR」または「Q-PCR」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、核酸配列の定性的および定量的決定に使用することができるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プロセスを指す。一部の事例では、Q-PCRは、リアルタイムPCRと同義である。Q-PCRは、増幅サイクルの関数としての増幅産物（またはアンプリコン）の量の測定を含み、そのような情報を使用して、もともとの試料に存在していたアンプリコンに対応する核酸配列の量を決定し得る。

30

【0162】

「逆転写ポリメラーゼ連鎖反応」または「RT-PCR」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、リボ核酸（RNA）鎖が、逆転写酵素という酵素を使用して、まず、そのDNA相補体（相補的なDNA、またはcDNA）に逆転写される、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のバリエントを指す。結果として得られるcDNAは、続いて、従来的なPCRを使用して増幅される。RT-PCRは、cDNAの2つの鎖のそれぞれにおける所定の配列に相補的であるプライマー対を利用する。これらのプライマーは、次いで、DNAポリメラーゼによって伸長され、各PCRサイクルの後に、鎖のコピーが作製され、指数関数的増幅をもたらす。「定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応」または「qRT-PCR」という用語は、本明細書で使用される場合、Q-PCR反応において行われると同様に、RT-PCR反応のリアルタイム検出を指す。

40

【0163】

本開示において、QPCRについて開示する場合のすべての方法またはシステムは、当業者に公知である対応する変更を行った後に、qRT-PCRに適用することができる。

【0164】

「プローブ」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、特定の標的核酸配列に結合することができる分子種または他のマーカーを指す。プローブは、任意の種類の分

50

子または粒子であり得る。プローブは、分子を含み得、直接的にまたはリンカー分子を介して、基板または他の固体表面に結合され得る。

【0165】

「検出器」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、シグナルを検出することができる、光学的および/または電子的構成成分を一般に含む、デバイスを指す。

【0166】

「変異」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、点変異、一塩基多型 (S N P)、挿入、欠失、置換、転位、転座、コピー数変動、または別の遺伝子変異、変更、もしくは配列変動などの遺伝子変異または配列変動を指す。

【0167】

「約」または「ほぼ」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に、指定された量の ± 15 %、10 %、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 %、または 1 % 以内を指す。

【0168】

「標識」という用語は、本明細書で使用される場合、標的分子に内在するものではない固有の特徴を提供することによって、標的分子を区別可能および追跡可能にするための、標的分子に結合することができる特定の分子構造を指す。

【0169】

「限定」という用語は、化学反応または生物学的反応の文脈において本明細書で使用される場合、一般に、化学反応または生物学的反応 (例えば、PCR) の完了の際に、種が、反応体積中に存在する可能性がないように、所与の反応体積中に限られた (例えば、化学量論的に限られた) 量である種を指す。

10

【0170】

「過剰」という用語は、化学反応または生物学的反応の文脈において本明細書で使用される場合、一般に、化学反応または生物学的反応 (例えば、PCR) の完了の際に、種が、反応体積中に存在し得るように、所与の反応体積中に過剰な (例えば、化学量論的に限られた) 量である種を指す。

【0171】

「ヌクレオチド」という用語は、本明細書で使用される場合、核酸、例えば、デオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA) のモノマー、またはサブユニットとして機能し得る分子を指す。ヌクレオチドは、デオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) またはそのアナログ、例えば、リン酸鎖に複数のリン酸、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のリン酸を有する分子であり得る。ヌクレオチドには、一般に、アデノシン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T)、およびウラシル (U)、またはそれらのバリエントが含まれ得る。ヌクレオチドは、成長している核酸の鎖に組み込むことができる任意のサブユニットを含み得る。そのようなサブユニットは、A、C、G、T、もしくは U であるか、あるいは 1 つもしくは複数の相補的な A、C、G、T、もしくは U に特異的であるか、またはプリン (すなわち、A もしくは G、またはそれらのバリエント) もしくはピリミジン (すなわち、C、T、もしくは U、またはそれらのバリエント) に相補的である、任意の他のサブユニットであり得る。サブユニットは、個々の核酸塩基または塩基の群 (例えば、AA、TA、AT、GC、CG、CT、TC、GT、TG、AC、CA、またはそれらのウラシル対応物) が、分解されるのを可能にし得る。ヌクレオチドは、標識されていても、標識されていてもよい。標識されたヌクレオチドは、検出可能なシグナル、例えば、光学的、静電的、または電気化学的シグナルを生じ得る。

20

30

【0172】

Q-PCR プロセスは、以下の非限定的な例において説明することができる。PCR 反応は、試料中の所与の核酸配列を增幅するように設計されたプライマー対を用いて行われる。適切な酵素およびヌクレオチド、例えば、デオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) を、反応物に添加し、反応物を、いくつかの増幅サイクルに供する。各サイクルから生じ得る。

40

50

成されるアンプリコンの量を検出するが、初期のサイクルでは、アンプリコンの量は、検出閾値を下回り得る。増幅は、指数関数期、続いて非指数関数的プラトー期という2つの期で起こり得る。指数関数期の間、PCR産物の量は、各サイクルでおよそ2倍となる。反応が進行するにつれて、しかしながら、反応の構成成分が消費され、最終的に、構成成分のうちの1つまたは複数が限定的となる。この時点で、反応は、緩やかになり、プラトー期に入る。最初は、アンプリコンの量は、バックグラウンドレベルまたはそれを下回ったままであり、アンプリコン産物が指数関数的に蓄積されても、増加は検出可能ではない。最終的には、十分な増幅産物が蓄積されて、検出可能なシグナルが生じる。これが起こるサイクルの回数は、閾値サイクルまたはC_tと称される。C_t値は、試薬が限定されていない指数関数期において測定されるため、Q-PCRを使用して、確実かつ正確に、反応中に存在する初期の鑄型量を計算することができる。反応のC_tは、主として、増幅反応の開始時に存在するアンプリコンに対応する核酸配列の量によって決定され得る。多数の鑄型が、反応の開始時に存在している場合、バックグラウンドを上回るシグナルを得るのに十分な産物が蓄積するためには、比較的少ない増幅サイクルが必要とされ得る。したがって、反応は、低いかまたは早期のC_tを有し得る。対照的に、反応の開始時に存在している鑄型が、少量である場合、蛍光シグナルがバックグラウンドを上回って上昇するためには、より多くの増幅サイクルが必要とされ得る。したがって、反応は、高いかまたは後期のC_tを有し得る。本明細書に提供される方法およびシステムは、単一の増幅反応において、単一の流体中で複数のアンプリコンの蓄積の測定を、したがって、上述のQ-PCRの手法による同じ試料における複数の核酸配列の量の決定を可能にする。

【0173】

本明細書で使用される場合、「リアルタイム」という用語は、一般に、移行相または生物学的平衡のいずれかで、反応が起こっている間に、反応のステータスを測定することを指す。リアルタイム測定は、反応が終了した後に行う測定とは対照的に、進行中の事象をモニタリング、測定、または観察するのと同時に実行される。したがって、「リアルタイム」アッセイまたは測定は、一般に、蛍光などの測定および定量される結果だけでなく、様々な時点、すなわち、ナノ秒、マイクロ秒、ミリ秒、秒、分、時間などで、これを表すことも含有する。「リアルタイム」には、ある期間にわたってシグナルを特徴付けるために、複数の読み取りを行うことを含む、シグナルの動力学的な生成物の検出が含まれ得る。例えば、リアルタイム測定は、検体の量の増加または減少の速度の決定を含み得る。リアルタイムでのシグナルの測定は、シグナルの変化を測定することによって速度を決定するのに有用であり得るが、一部の事例では、シグナルの変化がないことの測定もまた、有用であり得る。例えば、経時的なシグナルの変化の欠如は、反応（例えば、結合、ハイブリダイゼーション）が、定常状態に達していることを示し得る。

【0174】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「核酸」、および「核酸分子」という用語は、一般に、リボヌクレオチド(RNA)またはデオキシリボヌクレオチド(DNA)のいずれかである、様々な長さ（例えば、20塩基～5000キロ塩基）のヌクレオチド（ポリヌクレオチド）のポリマー形態を指す。この用語は、分子の一次構造のみを指し得る。したがって、用語は、三本鎖、二本鎖、および一本鎖DNA、ならびに三本鎖、二本鎖、および一本鎖RNAを含み得る。これは、メチル化および/またはキャッピングなどによる変更、ならびに変更されていない形態のポリヌクレオチドも含み得る。

【0175】

核酸は、ホスホジエステル結合（すなわち、天然の核酸）を含み得る。核酸は、例えば、ホスホラミド（例えば、Beaucage et al., Tetrahedron 49(10):1925 (1993)および米国特許第5,644,048号を参照されたい）、ホスホジチオエート（例えば、Briu et al., J. Am. Chem. Soc. 111:2321 (1989)を参照されたい、O-メチルホスホアミダイト連結（例えば、Eckstein, Oligonucleotides and Analogue: A Practical Approach, Oxford University Pressを参照されたい）、ならびに

10

20

30

40

50

ペプチド核酸 (PNA) 骨格および連結 (例えば、Carlsson et al., *Nature* 380:207 (1996)を参照されたい) を含む、代替的な骨格を有し得る核酸アナログを含んでもよい。核酸は、陽性骨格 (例えば、Denpcy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097 (1995)を参照されたい、非イオン性骨格 (例えば、米国特許第5,386,023号、同第5,637,684号、同第5,602,240号、同第5,216,141号、および同第4,469,863号、Kiedrowski et al., *Angew. Chem. Int. Ed. English* 30:423 (1991)、Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988)、Letsinger et al., *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597 (1994)、Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook, Mesmaeker et al., *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4:395 (1994)、Jeffs et al., *J. Biomolecular NMR* 34:17 (1994)、*Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)を参照されたい)、および非リボース骨格 (例えば、米国特許第5,235,033号および同第5,034,506号、ならびにChapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cookを参照されたい) を有するものを含む、他のアナログ核酸を含み得る。核酸は、1つまたは複数の炭素環式糖 (例えば、Jenkins et al., *Chem. Soc. Rev.* (1995) pp 169-176を参照されたい) を含み得る。リボース-リン酸骨格のこれらの変更により、標識の付加を促進する、または生理学的環境におけるそのような分子の安定性および半減期を増加させることができる。

【0176】

本明細書で使用される場合、「アンプリコン」という用語は、一般に、PCRによってなど、ヌクレオチド配列の増幅により生成される、分子種を指す。アンプリコンは、ポリヌクレオチド、例えば、RNAもしくはDNAまたはそれらの混合物であってもよく、アンプリコンにおけるヌクレオチドの配列は、それが生成されたヌクレオチド配列 (すなわち、配列に対応するかまたはそれに相補的であるかのいずれか) の配列と相関し得る。アンプリコンは、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得る。一部の事例では、アンプリコンは、アンプリコンに組み込まれた1つまたは複数のプライマーを使用することによって生成され得る。一部の事例では、アンプリコンは、ポリメラーゼ連鎖反応またはPCR増幅において生成され得、ここで、2つのプライマーを使用して、相補的な一本鎖アンプリコンの対または二本鎖アンプリコンが產生され得る。

【0177】

本明細書で使用される場合、「プローブ」という用語は、一般に、核酸配列に結合することができる分子種またはマーカーを指す。プローブは、任意の種類の分子または粒子であり得る。プローブは、分子を含み得、直接的にまたはリンカー分子を介して、基板または表面に結合され得る。

本明細書で使用される場合、単数形の「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈により別途明確に示されない限り、複数形の参照物を含む。

【0178】

本発明の好ましい実施形態が本明細書において示され、説明されているが、そのような実施形態が例示として提供されるにすぎないことは、当業者には明らかであろう。本発明が本明細書内に提供されている特定の実施例によって制限されることは、意図されない。本発明は、前述の明細書を参照して記載されているが、本明細書における実施形態の説明および例示は、制限的な意味で解釈されることを意味するものではない。当業者であれば、本発明から逸脱することなく、多数の変形、変更、および置換を想起するであろう。さらに、本発明のすべての態様は、本明細書において記載されている特定の表現、構成、または相対的比率に制限されず、それらは、様々な条件および変数に依存することを理解すべきである。本明細書において記載される本発明の実施形態に対する様々な代替形を、本発明の実施に用いることができるることを理解されたい。したがって、本発明は、あらゆるそのような代替形、修正形、変形、または均等物も網羅すべきであることが企図され

10

20

30

40

50

る。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定めること、ならびにこれらの特許請求の範囲内の方法および構造、ならびにそれらの均等物が、それによって網羅されることが意図される。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

a) 感光性化学部分を含む核酸構築物であって、第 1 の分子状態にあり、光への曝露の後に、第 2 の分子状態へと変化するように構成される、核酸構築物と、

b) 少なくとも 1 つの試薬と、

c) 少なくとも 1 つの酵素と

を含む反応チャンバーであって、

10

前記光が前記核酸構築物に到達することを可能にするように構成される、反応チャンバー。

(項目 2)

前記核酸構築物が、オリゴヌクレオチドプライマーまたはプローブである、項目 1 に記載の反応チャンバー。

(項目 3)

前記少なくとも 1 つの酵素が、ポリメラーゼ、逆転写酵素、ターミナルトランスフェラーゼ、エクソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、またはリガーゼである、項目 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目 4)

前記少なくとも 1 つの試薬が、1 つまたは複数の増幅試薬を含む、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

20

(項目 5)

標的核酸をさらに含む、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目 6)

前記酵素が、前記標的核酸、前記少なくとも 1 つの試薬、および前記核酸構築物と関連する反応を触媒するように構成される、項目 5 に記載の反応チャンバー。

(項目 7)

前記第 1 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において活性であるように構成される、項目 6 に記載の反応チャンバー。

(項目 8)

前記第 2 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において不活性であるように構成される、項目 7 に記載の反応チャンバー。

30

(項目 9)

前記第 1 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において不活性であるように構成される、項目 6 に記載の反応チャンバー。

(項目 10)

前記第 2 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において活性であるように構成される、項目 9 に記載の反応チャンバー。

(項目 11)

別の感光性化学部分を含む別の核酸構築物をさらに含み、前記別の核酸構築物が、第 3 の分子状態にあり、前記別の核酸構築物が、別の光への曝露の後に、第 4 の分子状態へと変化するように構成される、項目 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

40

(項目 12)

前記別の光が、前記光である、項目 11 に記載の反応チャンバー。

(項目 13)

前記第 1 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において活性であるように構成され、前記第 3 の分子状態にある前記別の核酸構築物が、前記反応において不活性であるように構成される、項目 11 または項目 12 に記載の反応チャンバー。

(項目 14)

前記第 2 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において不活性であるように構

50

成され、前記第4の分子状態にある前記別の核酸構築物が、前記反応において活性であるように構成される、項目11～13のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目15)

前記第1の分子状態にある前記核酸構築物および前記第3の分子状態にある前記別の核酸構築物が、前記反応において活性であるように構成される、項目11または項目12に記載の反応チャンバー。

(項目16)

前記第2の分子状態にある前記核酸構築物および前記第4の分子状態にある前記別の核酸構築物が、前記反応において不活性であるように構成される、項目11、12、および15のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

10

(項目17)

前記第1の分子状態にある前記核酸構築物および前記第3の分子状態にある前記別の核酸構築物が、前記反応において不活性であるように構成される、項目11または項目12に記載の反応チャンバー。

(項目18)

前記第2の分子状態にある前記核酸構築物および前記第4の分子状態にある前記別の核酸構築物が、前記反応において活性であるように構成される、項目11、12、および17のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目19)

前記酵素が、前記ポリメラーゼであり、前記反応が、ポリメラーゼ連鎖反応であり、前記核酸構築物が、前記オリゴヌクレオチドプライマーである、項目6～18のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

20

(項目20)

前記感光性化学部分が、前記核酸構築物の3末端、5末端、または中央に位置する、項目1～19のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目21)

前記核酸構築物が、追加の感光性化学部分をさらに含む、項目1～20のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目22)

第5の分子状態が、前記第1の分子状態であり、第6の分子状態が、前記第2の分子状態である項目1～21のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

30

(項目23)

密閉チューブ反応チャンバーである、項目1～22のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目24)

反応を行う方法であって、

反応チャンバーを活性化して、反応を行うステップであって、前記反応チャンバーが、

a) 第1の分子状態にある感光性化学部分を含む核酸構築物と、

b) 少なくとも1つの試薬と、

c) 少なくとも1つの酵素と

を含む、ステップと、

40

前記反応チャンバー内の前記核酸構築物に到達するように光を活性化し、それによって、前記核酸構築物を第2の分子状態へと変化させるステップとを含む、方法。

(項目25)

前記核酸構築物が、オリゴヌクレオチドプライマーまたはプローブである、項目24に記載の方法。

(項目26)

前記少なくとも1つの酵素が、ポリメラーゼ、逆転写酵素、ターミナルトランスフェラーゼ、エクソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、またはリガーゼである、項

50

目 2 4 または項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記少なくとも 1 つの試薬が、1 つまたは複数の增幅試薬を含む、項目 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 8)

前記反応チャンバーが、標的核酸をさらに含む、項目 2 4 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 9)

前記酵素が、前記標的核酸の、前記少なくとも 1 つの試薬および前記核酸構築物との前記反応を触媒する、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記第 1 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において活性である、項目 2 4 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1)

前記第 2 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において不活性である、項目 2 4 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2)

前記第 1 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において不活性である、項目 2 4 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 3)

前記第 2 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において活性である、項目 2 4 ~ 2 9 および 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 4)

前記反応チャンバーが、第 3 の分子状態にある別の感光性化学部分を含む別の核酸構築物をさらに含み、前記別の核酸構築物が、別の光への曝露の後に、第 4 の分子状態へと変化するように構成される、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記別の光が、前記光であり、前記光を前記活性化するステップにより、前記核酸構築物を活性化する、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記別の核酸構築物に到達するように前記別の光を活性化するステップをさらに含む、項目 3 4 または項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 7)

前記光を前記活性化するステップの後に、前記反応において前記核酸構築物を不活性化するステップをさらに含む、項目 3 4 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 8)

前記光を前記活性化するステップの後または前記別の光を前記活性化するステップの後に、前記別の核酸構築物を活性化するステップをさらに含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記光を前記活性化するステップまたは前記別の光を前記活性化するステップの後に、前記別の核酸構築物を非活性化するステップをさらに含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記光を前記活性化するステップの後に、前記反応において前記核酸構築物を活性化するステップをさらに含む、項目 3 4 ~ 3 6 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記光を前記活性化するステップまたは前記別の光を前記活性化するステップの後に、前記別の核酸構築物を非活性化するステップをさらに含む、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記光を前記活性化するステップまたは前記別の光を前記活性化するステップの後に、前記別の核酸構築物を活性化するステップをさらに含む、項目 4 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目43)

前記反応が、伸長、消化、転写、末端転移、またはライゲーションである、項目34～42のいずれか一項に記載の方法。

(項目44)

前記反応チャンバーにおいて前記反応を行う場合、外部試薬が、前記反応チャンバーに添加されない、項目34～43のいずれか一項に記載の方法。

(項目45)

前記反応チャンバーにおいて前記反応を行う場合、前記核酸構築物、前記少なくとも1つの試薬、または前記少なくとも1つの酵素のいずれも、前記反応チャンバーから除去されない、項目34～44のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目46)

前記酵素が、前記ポリメラーゼであり、前記反応が、ポリメラーゼ連鎖反応であり、前記核酸構築物が、前記オリゴヌクレオチドプライマーである、項目24～45のいずれか一項に記載の方法。

(項目47)

前記感光性化学部分が、前記核酸構築物の3末端、5末端、または中央に位置する、項目24～46のいずれか一項に記載の方法。

(項目48)

前記核酸構築物が、追加の感光性化学部分をさらに含む、項目24～47のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目49)

前記標的核酸が、メジャー対立遺伝子およびマイナー対立遺伝子を含み、前記反応が、ポリメラーゼ連鎖反応である、項目28～48のいずれか一項に記載の方法。

(項目50)

前記核酸構築物が、前記メジャー対立遺伝子に相補的な配列を含む、項目49に記載の方法。

(項目51)

前記第1の分子状態にある前記核酸構築物が、前記メジャー対立遺伝子のアンプリコンの作製に関して、前記ポリメラーゼ連鎖反応において不活性である、項目50に記載の方法。

30

(項目52)

前記第2の分子状態にある前記核酸構築物が、前記メジャー対立遺伝子の前記アンプリコンの作製に関して、前記ポリメラーゼ連鎖反応において活性である、項目51に記載の方法。

(項目53)

前記第2の分子状態にある前記核酸構築物が、前記メジャー対立遺伝子の前記アンプリコンの作製に関して、前記ポリメラーゼ連鎖反応において不活性である、項目51に記載の方法。

(項目54)

前記別の核酸構築物が、前記マイナー対立遺伝子のプライマーであり、前記方法が、前記光を前記活性化するステップの前に前記マイナー対立遺伝子のアンプリコンを産生させるステップをさらに含む、項目49～53のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目55)

a) 複数のヌクレオチドと、

b) 1つまたは複数の光切断性部分と

を含む核酸構築物であって、

前記1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、

a) 前記核酸構築物の3'末端に位置するか、

b) 前記核酸構築物の5'末端に位置するか、

c) 前記3'末端と前記5'末端との間に位置するか、

50

- d) 核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、
- e) リボース上もしくはそれに接続して位置するか、
- f) 前記複数のヌクレオチドの 2 つの連続したメンバーの間にそれらに接続して位置するか、または
- g) それらの組合せである、核酸構築物。

(項目 5 6)

前記核酸構築物が、生化学的反応において不活性であるように構成され、前記生化学的反応が、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長、ポリメラーゼ連鎖反応（ P C R ）、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ R T - P C R ）、ライゲーション、ターミナルトランスフェラーゼ伸長、ハイブリダイゼーション、エクソヌクレアーゼ消化、エンドヌクレアーゼ消化、または制限消化である、項目 5 5 に記載の核酸構築物。

10

(項目 5 7)

前記核酸構築物が、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記生化学的反応において活性であるように構成される、項目 5 5 または項目 5 6 に記載の核酸構築物。

(項目 5 8)

前記核酸構築物が、プライマーであり、前記生化学的反応が、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長である、項目 5 5 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 5 9)

前記 1 つまたは複数の光切断性部分が、前記 3 ' 末端に位置する、項目 5 8 に記載の核酸構築物。

20

(項目 6 0)

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記 3 ' 末端と前記 5 ' 末端との間および選択された核酸塩基上に位置する、項目 5 8 に記載の核酸構築物。

(項目 6 1)

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記 3 ' 末端と前記 5 ' 末端との間および前記複数のヌクレオチドの前記 2 つの連続したメンバーの間に位置する、項目 5 8 に記載の核酸構築物。

(項目 6 2)

前記 3 ' 末端が、前記生化学的反応において不活性であるように構成される、項目 6 1 に記載の核酸構築物。

30

(項目 6 3)

第 1 の核酸セクションおよび前記第 1 の核酸セクションに相補的な第 2 の核酸セクションを含み、ヘアピン構造を形成するように構成される、項目 6 1 に記載の核酸構築物。

(項目 6 4)

前記第 1 の核酸セクションおよび前記第 2 の核酸セクションが、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を含まない、項目 6 3 に記載の核酸構築物。

(項目 6 5)

項目 5 5 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物を使用して、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、

40

- a) 前記核酸構築物、少なくとも 1 つの鑄型核酸分子、ポリメラーゼを含む反応混合物を用意するステップであって、前記核酸構築物が、前記鑄型核酸分子と相補的な配列を有する、ステップと、

- b) 前記反応混合物を、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供するステップと、

- c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行するステップとを含む、方法。

(項目 6 6)

前記 b) の供するステップが、前記 c) の実行するステップを作動させない、項目 6 5 に記載の方法。

50

(項目 6 7)

前記核酸構築物が、前記 c) の照射するステップの前に、前記反応混合物中でインタクトなままである、項目 6 5 または項目 6 6 に記載の方法。

(項目 6 8)

c) において、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む、項目 6 5 ~ 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 9)

c) において、前記核酸分子を形成するステップをさらに含む、項目 6 5 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 0)

前記 c) の実行するステップが、c) において前記照射するステップの後に形成される前記核酸分子を、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長のプライマーとして使用するステップを含む、項目 6 5 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 7 1)

前記反応混合物が、別のプライマーをさらに含み、前記別のプライマーが、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長において活性である、項目 6 5 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 2)

前記別のプライマーが、前記 c) の照射するステップの前に、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長において活性である、項目 7 1 に記載の方法。

20

(項目 7 3)

前記 b) のポリメラーゼに触媒される鎖伸長により、前記別のプライマーを含むアンブリコンが産生される、項目 7 1 または項目 7 2 に記載の方法。

(項目 7 4)

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - P C R) であり、前記方法が、c) において、

1) 項目 5 5 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物の存在下において、2 つまたはそれを上回るスクレオチド配列に、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行して、流体中に 2 つまたはそれを上回るアンブリコンを産生させるステップと、

2) 独立して処理可能な位置に複数の核酸プローブを有する固体表面を含むアレイを用意するステップであって、前記アレイが、前記流体と接触するように構成される、ステップと、

30

3) 前記流体が前記アレイと接触している間に、前記 2 つまたはそれを上回るアンブリコンの、前記複数の核酸プローブのうちの 2 つまたはそれを上回る核酸プローブへのハイブリダイゼーションを測定して、アンブリコンハイブリダイゼーション測定値を得るステップであって、前記アンブリコンが、クエンチャーラーを含む、ステップとをさらに含む、項目 6 5 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 5)

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - P C R) であり、前記方法が、c) において、

40

1) 表面および複数の異なるプローブを有する固体支持体を含むアレイを用意するステップであって、前記複数の異なるプローブが、異なる処理可能な位置で前記表面に固定されており、各処理可能な位置が、蛍光部分を含む、ステップと、

2) 複数のスクレオチド配列を含む試料に P C R 増幅を実行するステップであって、前記 P C R 増幅が、流体中で実行され、(i) 項目 5 5 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物が、各核酸配列の P C R プライマーであり、クエンチャーラーを含み、(i i) 前記流体が、前記複数の異なるプローブと接触しており、前記 P C R 増幅で産生されたアンブリコンが、前記複数のプローブとハイブリダイズし、それによって、前記蛍光部分からのシグナルをクエンチする、ステップと、

3) 前記処理可能な位置のそれぞれにおいて前記蛍光部分からの前記シグナルを経時的に

50

検出するステップと、

4) 経時的に検出された前記シグナルを使用し、前記流体中の前記アンプリコンの量を決定するステップと、

5) 前記流体中の前記アンプリコンの前記量を使用して、前記試料中の前記ヌクレオチド配列の量を決定するステップと

をさらに含む、項目 65～73 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 76)

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - PCR) であり、前記方法が、c) において、

1) 少なくとも 1 つの鑄型核酸分子を含有する核酸試料、プライマー対、およびポリメラーゼを含む、前記反応混合物を用意するステップであって、前記プライマー対が、前記鑄型核酸分子との配列相補性を有し、前記プライマー対が、限定プライマーおよび過剰プライマーを含み、前記限定プライマーおよび前記過剰プライマーのうちの少なくとも 1 つが、項目 55～64 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物である、ステップと、

10

2) 前記反応混合物を、前記鑄型核酸分子および前記限定プライマーの増幅産物として少なくとも 1 つの標的核酸分子を得るのに十分な条件下において、前記 Q - PCR に供するステップであって、少なくとも 1 つの標的核酸分子が、前記限定プライマーを含む、ステップと、

3) 前記反応混合物を、(i) 異なる個別に処理可能な位置で基板の表面に固定された複数のプローブを含む前記基板であって、前記プローブが、前記限定プライマーとの配列相補性を有し、前記限定プライマーを捕捉することができる、基板と、(ii) 前記処理可能な位置からの少なくとも 1 つのシグナルを検出するように構成される検出器アレイであって、前記少なくとも 1 つのシグナルが、前記限定プライマーが前記複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを有するセンサーハイドロゲン接触させるステップと、

20

4) 前記検出器アレイを使用して、前記核酸増幅反応中の複数の時点で、1 つまたは複数の前記処理可能な位置からの前記少なくとも 1 つのシグナルを検出するステップと、

5) 前記限定プライマーが前記複数のプローブの前記個々のプローブと結合していることを示す前記少なくとも 1 つのシグナルに基づいて、前記標的核酸分子を検出するステップとをさらに含む、項目 65～73 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 77)

項目 55～64 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物を使用して、少なくとも 1 つの標的核酸分子をアッセイするためのシステムであって、

1) 少なくとも 1 つの鑄型核酸分子を含有する核酸試料、前記鑄型核酸分子に相補的な配列を有するプライマー対、およびポリメラーゼを含む反応混合物を含む反応チャンバーであって、前記プライマー対が、限定プライマーおよび過剰プライマーを含み、前記限定プライマーおよび前記過剰プライマーのうちの少なくとも 1 つが、項目 55～64 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物であり、前記反応混合物を含む前記反応チャンバーが、前記反応混合物に対する核酸増幅反応を促進して、少なくとも 1 つの標的核酸分子を前記鑄型核酸の増幅産物として得るように構成される、反応チャンバーと、

40

2) (i) 異なる個別に処理可能な位置で基板の表面に固定された複数のプローブを含む前記基板であって、前記プローブが、前記限定プライマーとの配列相補性を有し、前記限定プライマーを捕捉することができる、基板と、(ii) 前記処理可能な位置からの少なくとも 1 つのシグナルを検出するように構成される検出器アレイであって、前記少なくとも 1 つのシグナルが、前記限定プライマーが前記複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを含む、センサーハイドロゲン接触させるステップと、

3) 前記センサーハイドロゲンに連結され、(i) 前記反応混合物を前記核酸増幅反応に供し、(ii) 前記核酸増幅反応中の複数の時点で、前記処理可能な位置のうちの 1 つまたは複数からの前記少なくとも 1 つのシグナルを検出するようにプログラミングされる、コンピュータープロセッサーと

50

を備える、システム。

(項目 7 8)

a) 複数のヌクレオチドと、
b) 1つまたは複数の光切断性部分と
を含む核酸構築物であって、

前記1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、

a) 前記核酸構築物の3'末端と前記核酸構築物の5'末端との間に位置するか、
b) 核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、
c) リボース上もしくはそれに接続して位置するか、
d) 前記複数のヌクレオチドの2つの連続したメンバーの間にそれらに接続して位置するか、または
e) それらの組合せである、核酸構築物。

(項目 7 9)

前記核酸構築物が、生化学的反応において活性であるように構成され、前記生化学的反応が、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、ライゲーション、ターミナルトランスフェラーゼ伸長、ハイブリダイゼーション、エクソヌクレアーゼ消化、エンドヌクレアーゼ消化、または制限消化である、項目7 8に記載の核酸構築物。

(項目 8 0)

前記核酸構築物が、前記1つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記生化学的反応において不活性である、項目7 8および項目7 9に記載の核酸構築物。

(項目 8 1)

前記核酸構築物が、前記1つまたは複数の光切断性部分の光切断のすぐ後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記生化学的反応において活性であり、前記核酸分子が、前記3'末端の近傍に位置する、項目7 8および項目7 9に記載の核酸構築物。

(項目 8 2)

前記核酸構築物が、プライマーであり、前記生化学的反応が、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長である、項目7 8～8 1のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 8 3)

前記1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記3'末端と前記5'末端との間および選択された核酸塩基上に位置する、項目8 2に記載の核酸構築物。

(項目 8 4)

前記1つまたは複数の光切断性部分の非存在下において、ヘアピン構造を形成するように構成され、それによって、前記1つまたは複数の光切断性部分の前記非存在下において前記プライマーとして不活性となっている、項目8 3に記載の核酸構築物。

(項目 8 5)

前記1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記3'末端と前記5'末端との間および前記複数のヌクレオチドの前記2つの連続したメンバーの間に位置する、項目8 2に記載の核酸構築物。

(項目 8 6)

前記核酸構築物が、鑄型核酸分子に相補的な第1の配列を含み、前記第1の配列が、前記3'末端またはその近傍に位置する、項目8 2～8 5のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 8 7)

前記核酸構築物が、前記鑄型核酸分子に相補的な第2の配列をさらに含み、前記第2の配列が、前記5'末端またはその近傍に位置し、前記1つまたは複数の光切断性部分のうちの少なくとも1つが、前記第1の配列と前記第2の配列との間に位置する、項目8 6に記載の核酸構築物。

10

20

30

40

50

(項目 8 8)

前記 1 つまたは複数の光切断性部分が、少なくとも 1 つのスクレオチドによって、前記第 1 の配列および / または前記第 2 の配列から分離している、項目 8 7 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 8 9)

前記第 1 の配列および前記第 2 の配列の両方が前記錆型核酸分子とハイブリダイズした場合に、前記第 1 の配列と前記第 2 の配列との間でヘアピンループを形成するように構成される、項目 8 7 または項目 8 8 に記載の核酸構築物。

(項目 9 0)

前記第 2 の配列が、5' と 5' との連結で、前記核酸構築物の残りへの接続を含み、前記第 2 の配列が、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長において非伸長性であるように構成される、項目 8 7 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 9 1)

項目 7 8 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物を使用して、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、

a) 前記核酸構築物、前記錆型核酸分子、ポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、前記核酸構築物が、少なくとも前記第 1 の配列を含む、ステップと、

b) 前記反応混合物を、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供し、それによつて、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行するステップと、

c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を停止させるステップとを含む、方法。

(項目 9 2)

c) において、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む、項目 9 1 に記載の方法。

(項目 9 3)

c) において、前記照射するステップの後に、前記核酸分子を形成するステップをさらに含み、前記核酸分子が、前記錆型核酸分子から解離する、項目 9 1 または項目 9 2 に記載の方法。

(項目 9 4)

前記核酸分子が、ヘアピン構造を形成し、前記ヘアピン構造が、前記第 1 の配列の少なくとも一部を含む、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 5)

前記核酸分子が、前記第 1 の配列を含む、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 6)

光作動型ネステッドポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を行う方法であって、

a) 第 1 のプライマー対、第 2 のプライマー対、内部核酸配列を含む錆型核酸分子、およびポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、前記第 1 のプライマー対の各メンバーが、独立して、項目 7 8 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物であり、前記第 2 のプライマー対の各メンバーが、独立して、項目 5 5 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物であり、前記内部核酸配列が、前記錆型核酸分子内で入れ子になっている、ステップと、

b) 前記反応混合物を、前記第 1 のプライマー対を使用して第 1 の鎖伸長の条件に供して、前記錆型核酸分子を増幅させ、それによって、前記錆型核酸または前記錆型核酸分子の相補的配列のアンプリコンを形成するステップと、

c) 前記反応混合物に光の光子を照射し、それによって、前記第 1 のプライマー対を非活性化させ、前記第 1 の伸長を停止させ、前記第 2 のプライマー対を活性化し、前記活性化された第 2 のプライマー対を使用して第 2 の鎖伸長を開始させ、前記内部核酸配列または前記内部核酸配列の相補的配列のアンプリコンを形成するステップとを含み、

10

20

30

40

50

a) ~ c) が、密閉チューブ様式で行われる、方法。

(項目 97)

前記光作動型 PCR が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q-PCR) であり、前記方法が、

1) 前記第 1 のプライマー対および第 2 のプライマー対の存在下において、2 つまたはそれを上回るスクレオチド配列に、前記光作動型 PCR を実行して、流体中に 2 つまたはそれを上回るアンプリコンを産生させるステップと、

2) 独立して処理可能な位置に複数の核酸プローブを有する固体表面を含むアレイを用意するステップであって、前記アレイが、前記流体と接触するように構成される、ステップと、

3) 前記流体が前記アレイと接触している間に、前記 2 つまたはそれを上回るアンプリコンの、前記複数の核酸プローブのうちの 2 つまたはそれを上回る核酸プローブへのハイブリダイゼーションを測定して、アンプリコンハイブリダイゼーション測定値を得るステップであって、前記アンプリコンが、クエンチャーラーを含む、ステップとをさらに含む、項目 96 に記載の方法。

(項目 98)

前記光作動型 PCR が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q-PCR) であり、前記方法が、

1) 表面および複数の異なるプローブを有する固体支持体を含むアレイを用意するステップであって、前記複数の異なるプローブが、異なる処理可能な位置で前記表面に固定されており、各処理可能な位置が、蛍光部分を含む、ステップと、

2) 複数のスクレオチド配列を含む試料に PCR 増幅を実行するステップであって、前記 PCR 増幅が、流体中で実行され、(i) 各核酸配列の前記第 1 のプライマー対および前記第 2 のプライマー対のそれぞれが、クエンチャーラーを含み、(ii) 前記流体が、前記複数の異なるプローブと接触しており、前記 PCR 増幅において産生されたアンプリコンが、前記複数のプローブとハイブリダイズし、それによって、前記蛍光部分からのシグナルをクエンチする、ステップと、

3) 前記処理可能な位置のそれぞれにおいて前記蛍光部分からの前記シグナルを経時的に検出するステップと、

4) 経時的に検出された前記シグナルを使用し、前記流体中の前記アンプリコンの量を決定するステップと、

5) 前記流体中の前記アンプリコンの前記量を使用して、前記試料中の前記スクレオチド配列の量を決定するステップとをさらに含む、項目 96 に記載の方法。

(項目 99)

前記光作動型 PCR が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q-PCR) であり、前記方法が、

1) 少なくとも 1 つの鑄型核酸分子を含有する核酸試料、プライマー対、およびポリメラーゼを含む、前記反応混合物を用意するステップであって、前記プライマー対が、前記鑄型核酸分子との配列相補性を有し、前記プライマー対が、限定プライマーおよび過剰プライマーを含み、前記限定プライマーおよび前記過剰プライマーのうちの少なくとも 1 つが、項目 55 ~ 64 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物である、ステップと、

2) 前記反応混合物を、前記鑄型核酸分子および前記限定プライマーの増幅産物として少なくとも 1 つの標的核酸分子を得るのに十分な条件下において、前記 Q-PCR に供するステップであって、少なくとも 1 つの標的核酸分子が、前記限定プライマーを含む、ステップと、

3) 前記反応混合物を、(i) 異なる個別に処理可能な位置で基板の表面に固定された複数のプローブを含む前記基板であって、前記プローブが、前記限定プライマーとの配列相補性を有し、前記限定プライマーを捕捉することができる、基板と、(ii) 前記処理可

10

20

30

40

50

能な位置からの少なくとも 1 つのシグナルを検出するように構成される検出器アレイであつて、前記少なくとも 1 つのシグナルが、前記限定プライマーが前記複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを有するセンサーリードと接触させるステップと、

4) 前記検出器アレイを使用して、前記核酸増幅反応中の複数の時点で、1 つまたは複数の前記処理可能な位置からの前記少なくとも 1 つのシグナルを検出するステップと、

5) 前記限定プライマーが前記複数のプローブの前記個々のプローブと結合していることを示す前記少なくとも 1 つのシグナルに基づいて、前記標的核酸分子を検出するステップとをさらに含む、項目 9 6 に記載の方法。

(項目 100)

10

a) 複数のヌクレオチドと、

b) 1 つまたは複数の光切断性部分と

を含む核酸構築物であつて、

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、

a) 前記核酸構築物の 3' 末端と前記核酸構築物の 5' 末端との間に位置するか、

b) 核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、

c) リボース上もしくはそれに接続して位置するか、

d) 前記複数のヌクレオチドの 2 つの連続したメンバーの間にそれらに接続して位置するか、または

e) それらの組合せである、核酸構築物。

20

(項目 101)

プローブであり、標的核酸分子とのハイブリダイゼーションにおいて不活性であるように構成される、項目 100 に記載の核酸構築物。

(項目 102)

前記核酸構築物が、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記標的核酸分子との前記ハイブリダイゼーションにおいて活性であるように構成される、項目 100 または項目 101 に記載の核酸構築物。

(項目 103)

1 つの遊離末端を含む、項目 100 ~ 102 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

30

(項目 104)

固定末端またはポリメラーゼに触媒される鎖伸長において非伸長性である末端を含む、項目 100 ~ 103 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 105)

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記 3' 末端と前記 5' 末端との間および選択された核酸塩基上に位置し、前記選択された核酸塩基が、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の非存在下において、前記標的核酸分子とハイブリダイズするように構成される、項目 102 ~ 104 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 106)

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記 3' 末端と前記 5' 末端との間および前記複数のヌクレオチドの前記 2 つの連続したメンバーの間に位置する、項目 102 ~ 104 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

40

(項目 107)

第 1 の核酸セクションおよび前記第 1 の核酸セクションに相補的な第 2 の核酸セクションを含み、ヘアピン構造を形成するように構成される、項目 106 に記載の核酸構築物。

(項目 108)

前記第 1 の核酸セクションおよび前記第 2 の核酸セクションが、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を含まない、項目 107 に記載の核酸構築物。

(項目 109)

項目 100 ~ 108 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物を使用して、前記ハイブリ

50

ダイゼーションを行う方法であって、

- a) 前記核酸構築物および前記標的核酸分子を含む反応混合物を用意するステップと、
 - b) 前記反応混合物を、前記ハイブリダイゼーションの条件に供するステップと、
 - c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、前記ハイブリダイゼーションを実行するステップと
- を含む、方法。

(項目 110)

前記 b) の供するステップが、前記 c) の実行するステップを作動させない、項目 109 に記載の方法。

(項目 111)

前記核酸構築物が、前記 c) の照射するステップの前に、前記反応混合物中でインタクトなままである、項目 109 または項目 110 に記載の方法。

(項目 112)

c) において、前記 1つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む、項目 109 ~ 111 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 113)

c) において、前記核酸分子を形成するステップをさらに含む、項目 109 ~ 112 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 114)

前記照射するステップが、前記核酸構築物の前記ヘアピン構造を破断させ、前記核酸分子を形成する、項目 113 に記載の方法。

(項目 115)

- a) 複数のヌクレオチドと、
 - b) 1つまたは複数の光切断性部分と
- を含む核酸構築物であって、

前記 1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、

- a) 前記核酸構築物の 3' 末端と前記核酸構築物の 5' 末端との間に位置するか、
- b) 核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、
- c) リボース上もしくはそれに接続して位置するか、
- d) 前記複数のヌクレオチドの 2つの連続したメンバーの間にそれらに接続して位置するか、または
- e) それらの組合せである、核酸構築物。

(項目 116)

プローブであり、標的核酸分子とのハイブリダイゼーションにおいて活性であるように構成される、項目 115 に記載の核酸構築物。

(項目 117)

前記核酸構築物が、前記 1つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記標的核酸分子との前記ハイブリダイゼーションにおいて不活性であるように構成される、項目 115 または項目 116 に記載の核酸構築物。

(項目 118)

1つの遊離末端を含む、項目 115 ~ 117 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 119)

固定末端またはポリメラーゼに触媒される鎖伸長において非伸長性である末端を含む、項目 115 ~ 118 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 120)

前記 1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記 3' 末端と前記 5' 末端との間および前記複数のヌクレオチドの前記 2つの連続したメンバーの間に位置する、項目 115 ~ 119 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 121)

10

20

30

40

50

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記 3' 末端と前記 5' 末端との間および選択された核酸塩基上に位置し、前記選択された核酸塩基が、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の非存在下において、前記核酸構築物の別の核酸塩基とハイブリダイズするように構成される、項目 115 ~ 119 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 122)

第 1 の核酸セクションおよび前記第 1 の核酸セクションに相補的な第 2 の核酸セクションを含み、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の非存在下において、ヘアピン構造を形成するように構成される、項目 115 ~ 119 および項目 112 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 123)

前記第 1 の核酸セクションまたは前記第 2 の核酸セクションが、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を含む、項目 122 に記載の核酸構築物。

(項目 124)

項目 115 ~ 123 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物を使用して、前記ハイブリダイゼーションを行う方法であって、

a) 前記核酸構築物および前記標的核酸分子を含む反応混合物を用意するステップと、
b) 前記反応混合物を、前記ハイブリダイゼーションの条件に供するステップと、
c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、前記ハイブリダイゼーションを停止させるステップと
を含む、方法。

(項目 125)

c) において、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む、項目 124 に記載の方法。

(項目 126)

c) において、前記核酸分子を形成するステップをさらに含む、項目 124 または項目 125 に記載の方法。

(項目 127)

c) において、前記核酸分子に前記ヘアピン構造を形成するステップをさらに含む、項目 126 に記載の方法。

(項目 128)

ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行うステップをさらに含み、

1) 前記反応混合物が、ポリメラーゼおよびプライマーをさらに含み、b) において、前記核酸構築物が、b) において前記標的核酸分子とハイブリダイズし、
2) b) において、前記反応混合物を、前記プライマーを使用して、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供し、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、前記核酸構築物が前記標的核酸分子と二重鎖を形成する位置またはその近傍で停止し、
3) 前記 c) の照射するステップの後に、前記二重鎖を除去し、前記核酸構築物と以前にハイブリダイズしていた一本鎖配列を露出させ、それによって、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が継続され、前記一本鎖配列を通じて伸長することが可能となる、項目 124 ~ 127 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 129)

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - PCR) であり、前記方法が、

1) 項目 115 ~ 123 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物の存在下において、項目 128 に従って、前記標的核酸分子を含む 2 つまたはそれを上回るヌクレオチド配列に、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行し、それによって、流体中に 2 つまたはそれを上回るアンプリコンを产生させるステップと、

2) 独立して処理可能な位置に複数の核酸プローブを有する固体表面を含むアレイを用意するステップであって、前記アレイが、前記流体と接触するように構成される、ステップと、

10

20

30

40

50

3) 前記流体が前記アレイと接触している間に、前記2つまたはそれを上回るアンプリコンの、前記複数の核酸プローブのうちの2つまたはそれを上回る核酸プローブへのハイブリダイゼーションを測定して、アンプリコンハイブリダイゼーション測定値を得るステップであって、前記アンプリコンが、クエンチャーを含む、ステップとをさらに含む、項目128に記載の方法。

(項目130)

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)であり、前記方法が、

1) 表面および複数の異なるプローブを有する固体支持体を含むアレイを用意するステップであって、前記複数の異なるプローブが、異なる処理可能な位置で前記表面に固定されており、各処理可能な位置が、蛍光部分を含む、ステップと、

2) 前記標的核酸分子を含む複数のスクレオチド配列を含む試料にPCR增幅を実行するステップであって、前記PCR增幅が、項目115～123のいずれか一項に記載の前記核酸構築物を含む流体中で行われ、(i) 各核酸配列のPCRプライマーが、クエンチャーを含み、(ii) 前記流体が、前記複数の異なるプローブと接触しており、前記PCR增幅において産生されたアンプリコンが、前記複数のプローブとハイブリダイズし、それによって、前記蛍光部分からのシグナルをクエンチし、前記照射するステップが、前記PCR中に行われる、ステップと、

3) 前記処理可能な位置のそれぞれにおいて前記蛍光部分からの前記シグナルを経時的に検出するステップと、

4) 経時的に検出された前記シグナルを使用し、前記流体中の前記アンプリコンの量を決定するステップと、

5) 前記流体中の前記アンプリコンの前記量を使用して、前記試料中の前記スクレオチド配列の量を決定するステップと

をさらに含む、項目128に記載の方法。

(項目131)

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)であり、前記方法が、

6) 前記標的核酸分子を含む少なくとも1つの鑄型核酸分子を含有する核酸試料、プライマー対、およびポリメラーゼを含む、前記反応混合物を用意するステップであって、前記プライマー対が、前記少なくとも1つの鑄型核酸分子との配列相補性を有し、前記プライマー対が、限定プライマーおよび過剰プライマーを含み、前記反応混合物が、項目115～123のいずれか一項に記載の前記核酸構築物のうちの少なくとも1つをさらに含む、ステップと、

7) 前記反応混合物を、前記鑄型核酸分子および前記限定プライマーの增幅産物を得るのに十分な条件下において、前記Q-PCRに供するステップであって、アンプリコンが、前記限定プライマーを含む、ステップと、

8) 前記反応混合物を、(i)異なる個別に処理可能な位置で基板の表面に固定された複数のプローブを含む前記基板であって、前記プローブが、前記限定プライマーとの配列相補性を有し、前記限定プライマーを捕捉することができる、基板と、(ii)前記処理可能な位置からの少なくとも1つのシグナルを検出するように構成されるであって、前記少なくとも1つのシグナルが、前記限定プライマーが前記複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを有するセンサーアレイと接触させるステップと、

9) 前記検出器アレイを使用して、前記核酸增幅反応中の複数の時点で、1つまたは複数の前記処理可能な位置からの前記少なくとも1つのシグナルを検出するステップと、

10) 前記限定プライマーが前記複数のプローブの前記個々のプローブと結合していることを示す前記少なくとも1つのシグナルに基づいて、前記標的核酸分子を検出するステップと

をさらに含む、項目128に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 132)

a) 複数のヌクレオチドと、
 b) 前記核酸構築物の 5' 末端における 1 つまたは複数の光切断性部分であって、前記核酸構築物の前記 5' 末端が、エクソヌクレアーゼによる切断に耐性であるように構成される光切断性部分と
 を含む核酸構築物であって、

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、

- a) 核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、
 b) リボース上もしくはそれに接続して位置するか、または
 c) それらの組合せである、核酸構築物。

(項目 133)

前記核酸構築物が、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記エクソヌクレアーゼによる前記切断に耐性ではない、項目 132 に記載の核酸構築物。

(項目 134)

標的核酸分子にハイブリダイズし、前記エクソヌクレアーゼによる前記切断に耐性なままであるように構成される、項目 132 または項目 133 に記載の核酸構築物。

(項目 135)

ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、

- a) 項目 132 ~ 134 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物、前記標的核酸分子、プライマー、ポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、前記標的核酸分子が、前記核酸構築物に相補的な核酸配列を含む、ステップと、
 b) 前記反応混合物を、前記標的核酸分子を錫型として使用して、前記プライマーの前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供するステップと、
 c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、前記核酸配列を通じた前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行するステップと
 を含む、方法。

(項目 136)

前記 b) の供するステップが、前記 c) の実行するステップを作動させない、項目 135 に記載の方法。

(項目 137)

前記核酸構築物が、前記 c) の照射するステップの前に、前記反応混合物中でインタクトなままである、項目 135 または項目 136 に記載の方法。

(項目 138)

c) において、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む、項目 135 ~ 137 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 139)

c) において、前記核酸分子を形成するステップをさらに含む、項目 135 ~ 138 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 140)

前記 c) の実行するステップが、c) において前記照射するステップの後に形成される前記核酸分子を、前記エクソヌクレアーゼによって消化させるステップを含み、前記ポリメラーゼが、前記エクソヌクレアーゼである、項目 135 ~ 139 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 141)

前記 c) の実行するステップが、前記照射するステップの後および / または前記消化するステップの後に、前記プライマーを、前記核酸配列を通じて伸長させるステップを含む、項目 135 ~ 140 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 142)

項目 78、79、81、82、および 85 ~ 88 のいずれか一項に記載の前記核酸構築

10

20

30

40

50

物を使用して、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、

a) 前記核酸構築物、前記錆型核酸分子、ポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、前記核酸構築物が、少なくとも、前記3'末端またはその近傍に位置する前記第1の配列および前記5'末端またはその近傍に位置する前記第2の配列を含み、前記第1の配列が、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長において活性である、ステップと、

b) 前記反応混合物を、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供し、それによつて、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行し、前記第1の配列および前記第2の配列の両方の配列、または前記第1の配列および前記第2の配列の両方に相補的な配列を含む、複数の第1のアンブリコンを產生させるステップと、

c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、それによつて、前記核酸構築物を切断し、前記第1の配列または前記第2の配列に相補的な配列を含む複数の第2のアンブリコンを產生させるステップであって、前記複数の第2のアンブリコンのそれらが、前記第2の配列も前記第2の配列に相補的な配列も含有しないことを条件とする、ステップと

を含む、方法。

(項目143)

項目55～64、78～90、100～108、および115～123のいずれか一項に記載の前記核酸構築物のうちの少なくとも1つを使用して、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、

a) 前記核酸構築物、前記錆型核酸分子、ポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップと、

b) 前記反応混合物を、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供するステップと、

c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、

それによつて、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行するステップと

を含み、

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、PCR、RT-PCR、QPCR、またはqRT-PCRである、方法。

(項目144)

前記核酸構築物のうちの前記少なくとも1つが、独立して、

a) 前記PCR、RT-PCR、QPCR、もしくはqRT-PCRのプライマー、

b) 前記PCR、RT-PCR、QPCR、もしくはqRT-PCRの溶液相プローブ、または

c) 前記PCR、RT-PCR、QPCR、もしくはqRT-PCRの固定プローブである、項目143に記載の方法。

(項目145)

マイクロアレイデータを定量する自動化マイクロアレイシステムであって、

a) 表面および複数の異なるプローブを有する固体支持体であって、前記複数の異なるプローブが、前記表面上に固定されている、固体支持体と、

b) 検体を含む流体体積であって、前記流体体積が、前記固体支持体と接触しており、前記複数の異なるプローブのうちの少なくとも1つおよび前記検体が、項目55～64、78～90、100～108、および115～123のいずれか一項に記載の前記核酸構築物のうちの少なくとも1つを含む、流体体積と、

c) 前記流体体積が前記固体支持体と接触している間に、前記固体支持体上の複数のスポットのそれから複数の時点で測定されるシグナルを検出するように構成される、検出器または検出アセンブリーであって、前記シグナルが、光学シグナルまたは電気化学シグナルである、検出器または検出アセンブリーと、

d) シグナルをマイクロアレイデータに変換するように構成されるコンピューターであつて、前記マイクロアレイデータを、処理方法に従つて、前記コンピューターによって処理させるように構成される命令をさらに含み、前記処理方法は、

1) (i) 分析表示、および(ii) 前記固体支持体に少なくとも1つの標準的なプロ

10

20

30

40

50

ープを使用した前記マイクロアレイのキャリブレーションによるものを含む、前記複数の異なるプローブと前記検体との間の相互作用の推定値を決定するステップと、

2) ハイブリダイゼーション、交差ハイブリダイゼーション、および状態間での非束縛遷移確率をモデリングすることを含むマルコフ連鎖モデルでの推定値を利用する、確率行列を生成するステップと、

3) 前記検出器または前記検出器アセンブリーを使用して、親和性に基づくアレイデータを得るステップと、

4) 前記親和性に基づくアレイデータを、前記確率行列に適用するステップと、

5) 非特異的相互作用をノイズではなく干渉と考えることによって、前記非特異的相互作用を利用しそれを抑制しない、最大尤度推定アルゴリズム、最大事後確率基準、制約付き最小二乗計算法、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、最適化アルゴリズムを適用するステップと、

6) 最適化された親和性に基づくアレイデータを、ユーザーに出力するステップであって、前記最適化された親和性に基づくアレイデータが、前記検出器または前記検出器アセンブリーを使用することによって得られる前記親和性に基づくアレイデータと比較して、改善されたシグナル対ノイズ比を有する、ステップと

を含む、コンピューターと
を備える、システム。

(項目146)

順に、

項目55～64、78～90、100～108、および115～123のいずれか一項に記載の前記核酸構築物のうちの少なくとも1つを含む、分子認識層と、光学層と、

サンドイッチ構成で組み込まれるセンサー層と
を備える一体型バイオセンサーアレイであって、

a) 前記分子認識層が、異なる独立して処理可能な位置に付着した複数の異なるプローブを含み、前記独立して処理可能な位置のそれぞれが、前記分子認識層の単一の側面に位置する単一の源から直接的に励起光子束を受容するように構成され、前記分子認識層が、前記光学層に光を伝達し、前記複数の異なるプローブのうちの1つが、前記核酸構築物のうちの前記少なくとも1つを含み、

b) 前記光学層が、光学フィルター層を含み、前記光学層が、前記分子認識層から前記センサー層へ光を伝達し、それによって、前記伝達された光がフィルタリングされ、

c) 前記センサー層が、前記光学層から伝達された前記フィルタリングされた光を検出する光学センサーアレイを含み、前記センサー層が、CMOS製造プロセスを使用して製造されたセンサー素子を含み、前記分子認識層、前記光学層、および前記センサー層が、前記分子層が前記光学層と接触し、前記光学層が前記センサー層と接触する一体型構造を構成する、一体型バイオセンサーアレイ。

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

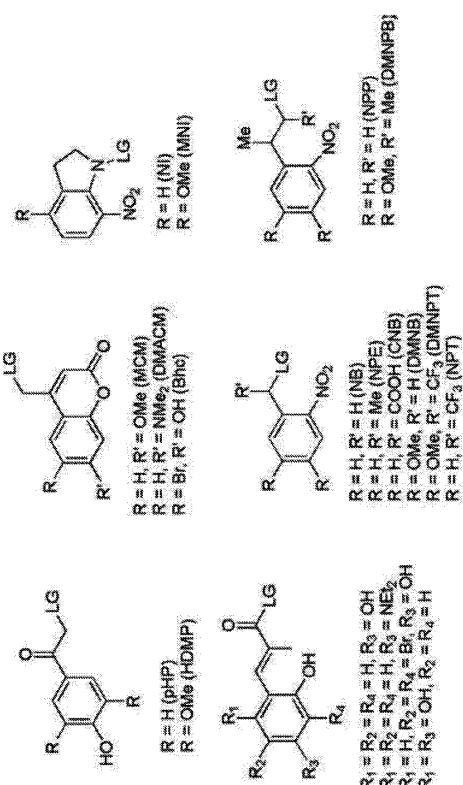


FIG. 1

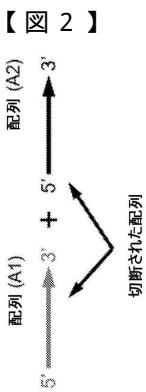


FIG. 2

【図3】

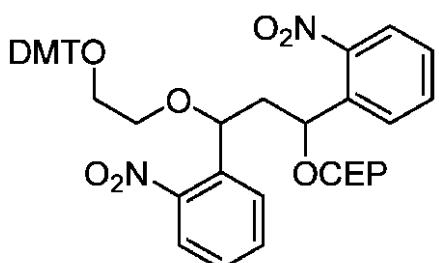


FIG. 3

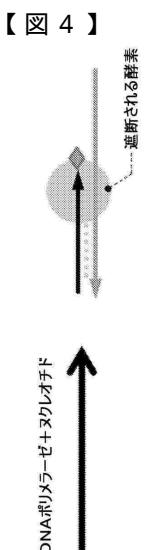
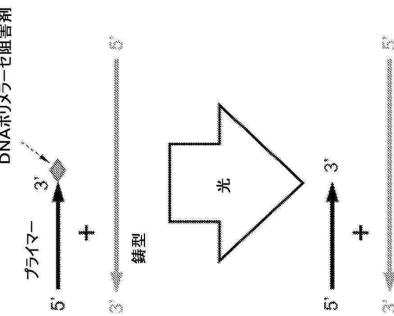


FIG. 4



10

20

30

40

50

【図 5】

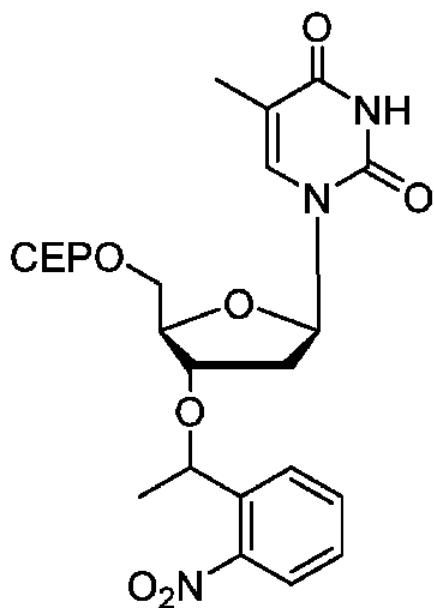


FIG. 5

【図 6】

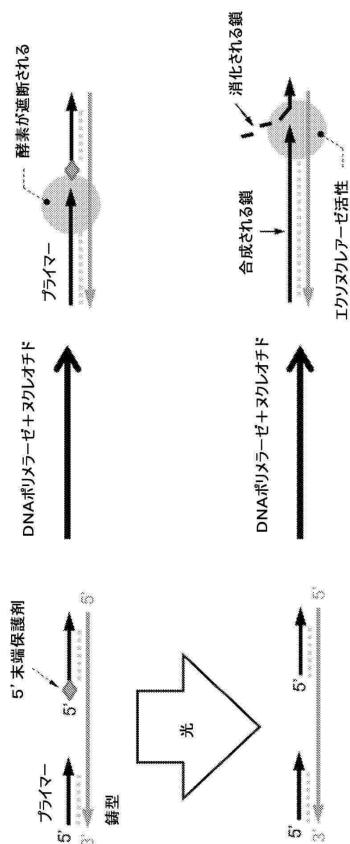


FIG. 6

10

20

30

40

【図 7】

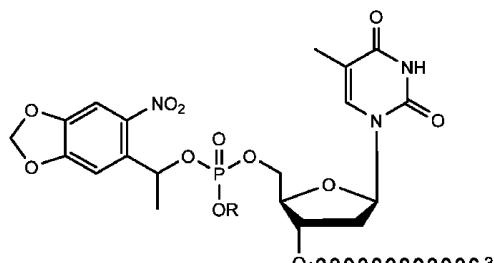


FIG. 7

【図 8】

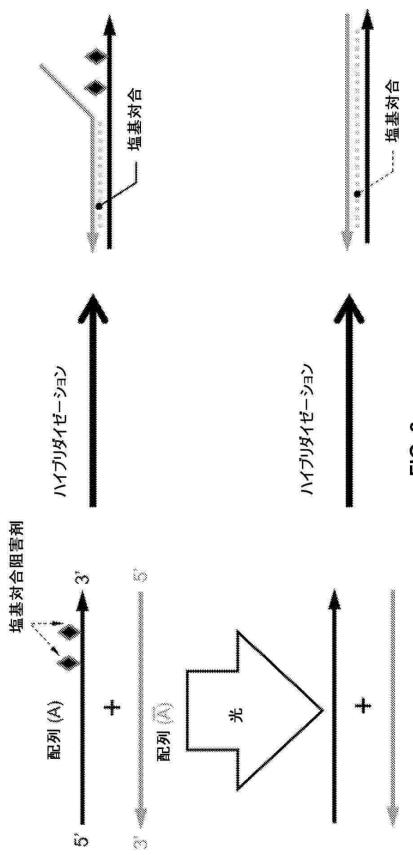


FIG. 8

50

【図 9】

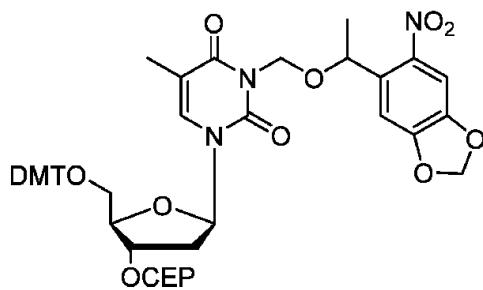


FIG. 9

【図 10】

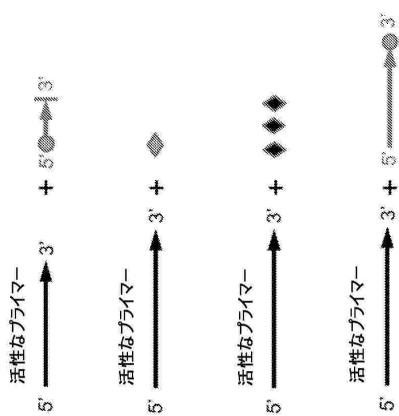
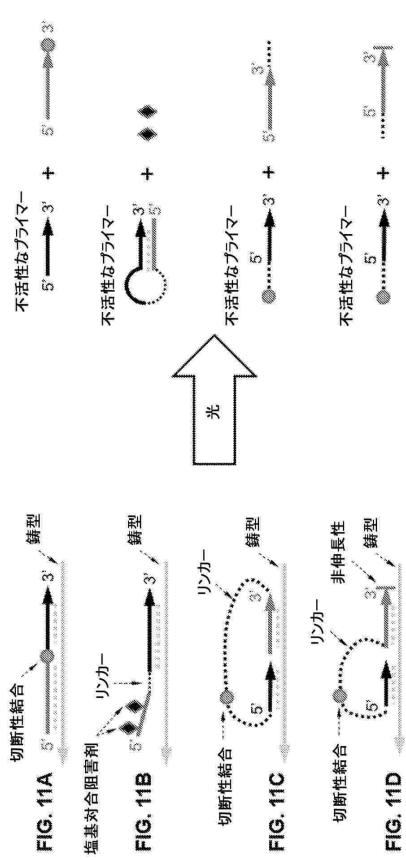
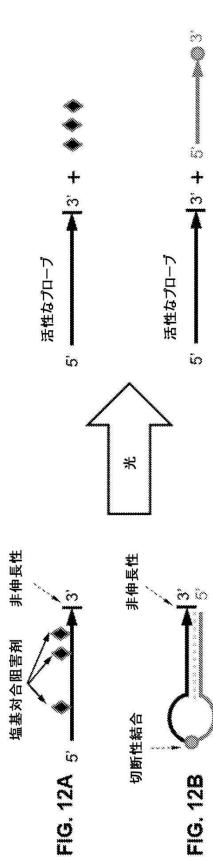


FIG. 10

【図 11】



【図 12】



【図 1 3】

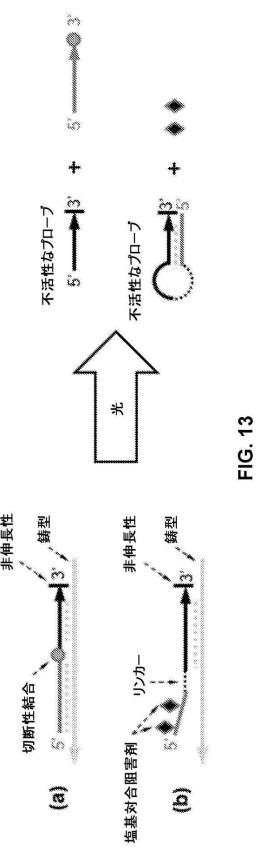


FIG. 13

【図 1 4】

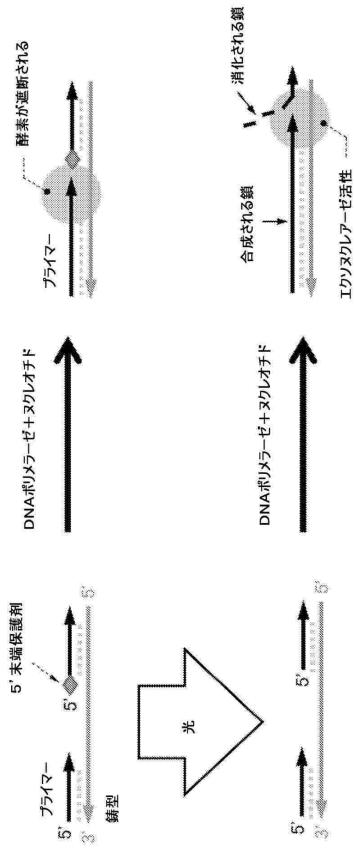


FIG. 14

10

20

【図 1 5】

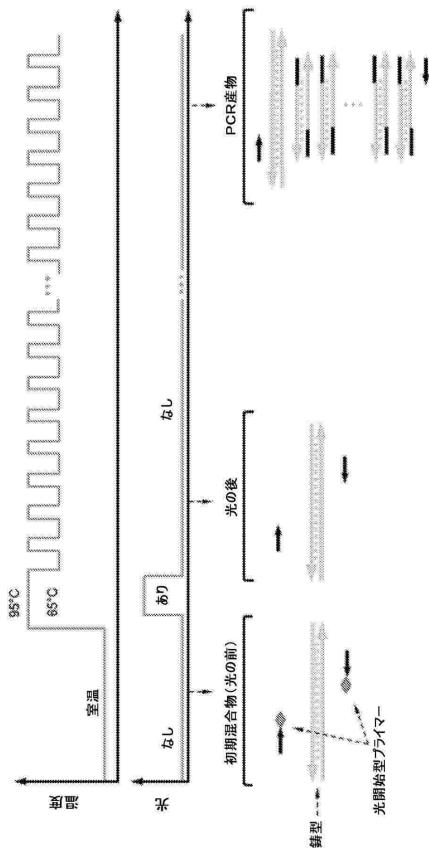


FIG. 15

30

【図 1 6】

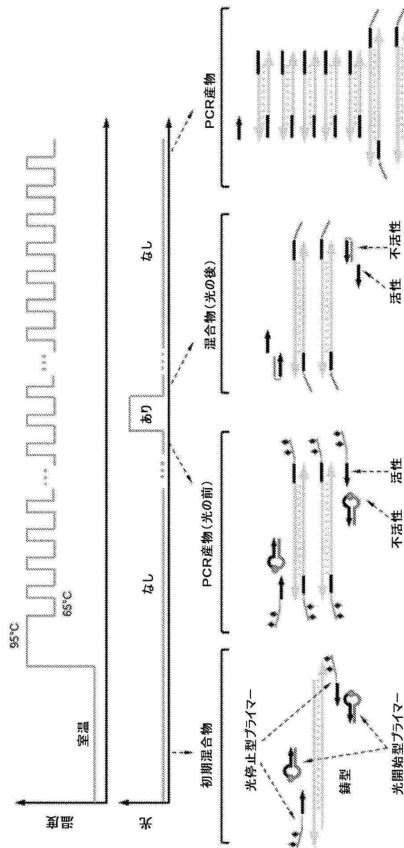


FIG. 16

40

50

【配列表】

0007611859000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 12 M	1/00 (2006.01)	F I	C 12 M	1/00	A
C 12 M	1/34 (2006.01)		C 12 M	1/34	D

(72)発明者 ハッシビ, アルジヤン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 95054, サンタ クララ, カーライル コート 4515,
ナンバー 3301

(72)発明者 クイメリス, ロバート ジー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94303, パロ アルト, モントローズ アベニュー 785

(72)発明者 ペイ, レイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 95118, サン ノゼ, ブランハム レーン 1642, ユニット シー

(72)発明者 ジョンソン, カーステン エー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94061, レッドウッド シティ, エデン パウワー レーン 1028

(72)発明者 イーバート, ジェシカ シー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94040, マウンテン ビュー, デル メディオ アベニュー 541, アパートメント 125

(72)発明者 マニカム, アルン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 95136, サン ノゼ, マーブル アーチ アベニュー 319

(72)発明者 ヴァン, トラン ティー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 95129, サン ノゼ, マリブ ドライブ 1185

審査官 高 美葉子

(56)参考文献

特表2017-507656 (JP, A)

米国特許出願公開第2013/0052690 (US, A1)

特開2013-005803 (JP, A)

Chem Commun(Camb)(2008), Vol.28, No.4, p.462-464

J. AM. CHEM. SOC.(2010), Vol.132, p.6183-6193

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 12 Q 1/00 - 3/00

C 12 M 1/00 - 3/10

C 12 N 9/00 - 9/99

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)