

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載
 【部門区分】第 1 部門第 1 区分
 【発行日】平成 24 年 4 月 19 日 (2012.4.19)

【公表番号】特表 2011-514163 (P2011-514163A)
 【公表日】平成 23 年 5 月 6 日 (2011.5.6)
 【年通号数】公開・登録公報 2011-018
 【出願番号】特願 2010-550908 (P2010-550908)
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

【手続補正書】

【提出日】平成 24 年 3 月 2 日 (2012.3.2)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的核酸を分析する方法であって、

a) 合成プローブ及び熱安定性 F E N - 1 エンドヌクレアーゼの存在下にて、前記合成プローブが増幅反応中に切断されて切断断片を生成する条件下で、標的核酸をポリメラーゼ連鎖反応により増幅する工程であって、前記合成プローブが分析物特異的部分及び非標的部分を含むフットプリントプローブであり、前記非標的部分が前記標的核酸に対して実質的に非相補的であり、前記分析物特異的部分の長さが 1 2 ヌクレオチド以下であり、前記分析物特異的部分が前記標的核酸に対して相補的である最高 1 2 ヌクレオチドを含み、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記等温反応を実施する温度より少なくとも 5 低い前記標的に対する計算 T_m 値を有し、又は前記増幅反応が熱サイクル反応である場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記熱サイクルで用いられる最低温度より少なくとも 5 低い前記標的に対する計算 T_m 値を有する、上記工程と；

b) 前記増幅反応中に前記切断断片を検出する工程と、を含む方法。

【請求項 2】

前記増幅が等温反応で行われる場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記等温反応を実施する温度より少なくとも 8 低い前記標的に対する計算 T_m 値を有し、又は前記増幅反応が熱サイクル反応である場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記熱サイクルで用いられる最低温度より少なくとも 8 低い前記標的に対する計算 T_m 値を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記増幅が等温反応で行われる場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記等温反応を実施する温度より少なくとも 10 低い前記標的に対する計算 T_m 値を有し、又は前記増幅反応が熱サイクル反応である場合、前記フットプリントプローブの前記分析物特異的部分が、前記熱サイクルで用いられる最低温度より少なくとも 10 低い前記標的に対する計算 T_m 値を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記合成プローブが標識されていない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記合成プローブが非天然ヌクレオチドを含まない、及び/又は副溝バインダー部分を含まない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記合成プローブの前記非標的部分の長さが少なくとも 10 ヌクレオチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記標的核酸が RNA であり、前記方法が前記増幅前に又は前記増幅と同時に前記 RNA を逆転写する工程を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記増幅がプライマーオリゴヌクレオチドを使用するものであり、前記合成プローブの前記分析物特異的部分が、前記標的核酸に対する少なくとも 1 つのプライマーオリゴヌクレオチドの計算 T_m 値より少なくとも 5 低い前記標的核酸に対する計算 T_m 値を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記合成プローブの前記分析物特異的部分が、前記標的核酸に対する少なくとも 1 つのプライマーオリゴヌクレオチドの計算 T_m 値より少なくとも 8 低い前記標的核酸に対する計算 T_m 値を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記合成プローブの前記分析物特異的部分が、前記標的核酸に対する少なくとも 1 つのプライマーオリゴヌクレオチドの計算 T_m 値より少なくとも 10 低い前記標的核酸に対する計算 T_m 値を有する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記プローブの前記分析物特異的部分が、11 以下のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記プローブの前記分析物特異的部分が、10 以下のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記プローブの前記分析物特異的部分が、9 以下のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記プローブの前記分析物特異的部分が、8 以下のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記プローブの前記分析物特異的部分が、7 以下のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記プローブの前記分析物特異的部分が、6 以下のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記プローブが切断される前に切断構造が形成され、前記切断構造が、a) 前記標的核酸の第 1 の領域における前記合成プローブ、及び b) 前記標的核酸の第 1 の領域の下流に存在する前記標的核酸の第 2 の領域における第 2 のオリゴヌクレオチドと、前記標的核酸との会合により形成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記標的核酸の第 2 の領域が第 1 の領域に隣接している、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記切断構造において、第 2 のオリゴヌクレオチドの 3' 末端において少なくとも 1 個のヌクレオチドが、前記プローブと前記標的核酸とのハイブリダイゼーション領域と重複

する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

前記切断構造において、第2のオリゴヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドが、前記標的核酸に対して非相補的である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

第2のオリゴヌクレオチドが前記増幅で用いられるプライマーオリゴヌクレオチドでもある、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 22】

前記切断断片の検出が、1つ以上の前記切断断片を合成検出オリゴヌクレオチドと会合させることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

前記合成検出オリゴヌクレオチドが標識を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 24】

前記標識が蛍光標識である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記合成検出オリゴヌクレオチドが蛍光クエンチャー部分を更に含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記切断断片が、前記合成検出オリゴヌクレオチドと会合したとき、前記熱安定性 FEN-1 エンドヌクレアーゼにより切断可能な切断構造を形成する、請求項 20 に記載の方法。