

【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26年9月4日(2014.9.4)

【公表番号】特表2013-540423(P2013-540423A)

【公表日】平成25年11月7日(2013.11.7)

【年通号数】公開・登録公報2013-061

【出願番号】特願2013-519840(P2013-519840)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/483 (2006.01)

G 0 1 N 27/416 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 33/483 E

G 0 1 N 27/46 3 3 6 G

【手続補正書】

【提出日】平成26年7月14日(2014.7.14)

【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】

一本鎖オリゴヌクレオチドの検出のためのプローブ分子のナノポアシステムにおける使用であって、前記プローブが、

a) ターゲットのオリゴヌクレオチドに対して相補的な配列を有する中心ドメインと、

b) 前記中心ドメインの 5 末端又は3 末端の少なくとも一方にタグ付けされた末端伸長部と

を含む前記使用。

【請求項 2】

前記末端伸長部が、荷電されたポリマーを含むか、又は少なくとも 1 つの末端伸長部が、荷電されたポリペプチド又はオリゴヌクレオチドである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記の荷電されたポリペプチドが、少なくとも 2 つの正に荷電されたアミノ酸残基及び / 又は少なくとも 2 つの芳香族アミノ酸残基を含む、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

前記の伸長部のオリゴヌクレオチドが、約 8 ヌクレオチドないし約 30 ヌクレオチドを含む、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 5】

前記のターゲットのオリゴヌクレオチドが、DNA 分子、RNA 分子又は m i R N A もしくはその断片であり、その際、前記断片は、前記 m i R N A 分子の少なくとも 15 ヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 6】

サンプル中のオリゴヌクレオチドをナノポアシステムで検出する方法であって、

a) ターゲットのオリゴヌクレオチドを含むと疑われるサンプルと、前記ターゲットのオリゴヌクレオチドに対して相補的な配列を有する中心ドメイン及びその3'末端と5'末端の少なくとも一方にタグ付けされた末端伸長部を含むプローブとを混合して、サンプル混合物を作成する工程と、

b) 前記サンプル混合物に、デュアルチャンバーナノポアシステムのcis側コンパートメントにおいて、前記のプローブとターゲットのオリゴヌクレオチドがハイブリダイズしたものが、前記システムのナノポアを通じてアンジッピングプロセスによって移行するのを駆動するのに十分な電圧をかける工程と、

c) 前記のナノポアシステムにおいて経時的に電流パターンを分析する工程と、  
を含み、

工程a)において、前記プローブの中心ドメインは、前記ターゲットのオリゴヌクレオチドにハイブリダイズでき、

工程c)において、前記サンプル中での前記のオリゴヌクレオチドの存在は、前記のサンプル単独又は前記プローブ単独で生ずるバックグラウンドの電流ブロックとは区別される、少なくとも1つのシグネチャ電流ブロックによって示される、前記検出方法。

【請求項7】

前記のシグネチャ電流ブロックが、i) バックグラウンド電流ブロックとは異なる時間の電流ブロック、ii) バックグラウンド電流ブロックとは異なる数の別個の電流遮断レベル、iii) バックグラウンド電流ブロックとは異なる発生順序の電流遮断レベル、iv) バックグラウンド電流ブロックとは異なる、遮断レベルでの電流振幅、v) バックグラウンド電流ブロックとは異なる各遮断レベルの電流振幅、の少なくとも1つ又は(i)、(ii)、(iii)、(iv)もしくは(v)の任意の組み合わせを含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記プローブの末端伸長部が、(a) 荷電されたポリマー、(b) 荷電されたポリペプチド、(c) オリゴヌクレオチド、(d) 約8～約30ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド、(e) ホモポリマー、コポリマーもしくはヘテロポリマー、又は(d) ポリデオキシシトシン、ポリデオキシシアデノシンもしくはポリデオキシチミンオリゴヌクレオチドのいずれか1つである、請求項6又は7に記載の方法。

【請求項9】

前記の末端伸長部が、少なくとも2つの正に荷電されたアミノ酸残基及び/又は少なくとも2つの芳香族アミノ酸残基を含む荷電されたポリペプチドを含む、請求項6又は7に記載の方法。

【請求項10】

前記の荷電されたポリペプチドは、前記プローブが前記ターゲットのオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたときに正味の正電荷を提供する、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記のナノポアが、ポアのtrans側開口部に負に荷電された残基の環状部を含む、請求項6又は7に記載の方法。

【請求項12】

前記のナノポアが、K131D又はK131Eのアミノ酸置換を含む溶血素の変異体を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記のターゲットのオリゴヌクレオチドが、DNA分子、RNA分子又はmiRNAもしくはその断片であり、その際、前記断片は、前記miRNA分子の少なくとも15ヌクレオチドを含む、請求項6又は7に記載の方法。

【請求項14】

サンプル中の2もしくはそれより多くの異なるターゲットのオリゴヌクレオチドであって少なくとも1つのヌクレオチドだけ異なるヌクレオチドをナノポアシステムで検出する

方法であって、

a) 前記の異なるターゲットのオリゴヌクレオチドを含むと疑われるサンプルと、前記ターゲットのオリゴヌクレオチドに対して完全にもしくは部分的に相補的な配列を有する中心ドメイン及びその3'末端と5'末端の少なくとも一方にタグ付けされた末端伸長部を含むプローブとを混合して、サンプル混合物を作成する工程と、

b) 前記サンプル混合物に、デュアルチャンバーナノポアシステムのcis側コンパートメントにおいて、前記のプローブとターゲットのオリゴヌクレオチドがハイブリダイズしたものが、前記システムのナノポアを通じてアンジッピングプロセスによって移行するのを駆動するのに十分な電圧をかける工程と、

c) 前記のナノポアシステムにおいて経時的に電流パターンを分析する工程と、  
を含み、

工程a)において、前記プローブの中心ドメインは、前記ターゲットのオリゴヌクレオチドにハイブリダイズでき、

工程c)において、前記サンプル中での前記の2もしくはそれより多くの異なるターゲットのオリゴヌクレオチドの存在は、2もしくはそれより多くの異なるシグネチャ電流プロックによって示される、前記検出方法。

【請求項15】

プローブと、ナノポアとを含むキットであって、前記プローブが、

a) ターゲットのオリゴヌクレオチドに対して相補的な配列を有する中心ドメインと、

b) 前記中心ドメインの5'末端又は3'末端の少なくとも一方又は両方にタグ付けされた末端伸長部と

を含み、前記末端伸長部が、(i)荷電されたポリマー、(ii)荷電されたポリペプチド、(iii)オリゴヌクレオチド、(iv)約8～約30ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド、(v)ホモポリマー、コポリマーもしくはヘテロポリマー、又は(vi)ポリデオキシシトシン、ポリデオキシアデノシンもしくはポリデオキシチミンオリゴヌクレオチドのいずれか1つである前記キット。