

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-502464
(P2004-502464A)

(43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int.Cl.⁷

C12N 15/09
C12M 1/00
C12Q 1/68
GO1N 33/53
GO1N 33/543

F 1

C12N 15/00 Z N A A
C12M 1/00 A
C12Q 1/68 A
GO1N 33/53 M
GO1N 33/543 521

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4
4 B 0 2 9
4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 107 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-509521 (P2002-509521)
(86) (22) 出願日 平成13年7月6日 (2001.7.6)
(85) 翻訳文提出日 平成15年1月7日 (2003.1.7)
(86) 國際出願番号 PCT/GB2001/003024
(87) 國際公開番号 WO2002/004668
(87) 國際公開日 平成14年1月17日 (2002.1.17)
(31) 優先権主張番号 0016814.6
(32) 優先日 平成12年7月7日 (2000.7.7)
(33) 優先権主張国 イギリス (GB)

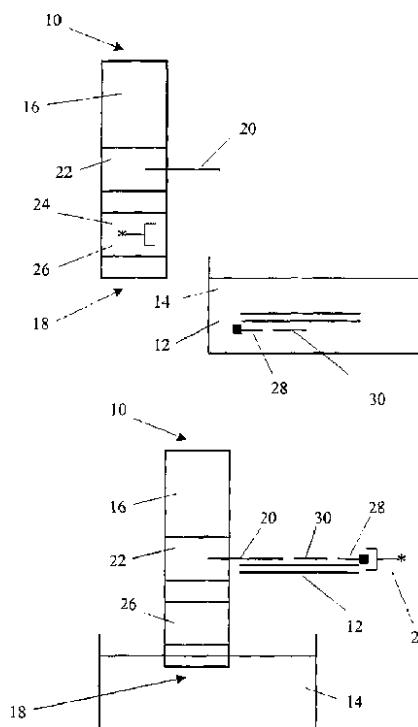
(71) 出願人 503013945
リー, エレン
イギリス国, ケンブリッジ シービー2
2ピートニー, ロング ロード, イースト
アングリア ブラッド センター サイ
ト, デパートメント オブ ヒーマトロジ
ー・ダイアグノスティック ディベロップ
メント, ユニバーシティ オブ ケンブリ
ッジ
(74) 代理人 100077517
弁理士 石田 敏
(74) 代理人 100092624
弁理士 鶴田 準一
(74) 代理人 100108903
弁理士 中村 和広

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ディップスティック検定における標的核酸の改良型捕捉および検出

(57) 【要約】

ディップスティック検定におけるヘルパークローブの使用が記載される。試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するためのディップスティック検定において、試料溶液はディップスティックの接触端に連結されて、試料溶液をディップスティックの接触端と接触させて、毛管作用により試料溶液をディップスティックの捕捉帯に移動させ、そこで、標的核酸が捕捉される。標的核酸は、標的核酸とハイブリダイズし得る捕捉クローブにより捕捉帯で捕捉され得る。標的核酸とハイブリダイズし得る標識化検出クローブを用いて、捕捉帯で標的核酸を検出し得る。ヘルパークローブは、捕捉および/または検出クローブと標的核酸との結合を強化するために用いられ、それにより標的核酸検出の感度を改良し得る。ディップスティックおよびキットも記載される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端；及び上記接触端から遠く離れた上記クロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブであって、上記標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る捕捉プローブを有するストリップを提供し、

b) 以下の：

検出プローブであって、上記検出プローブと標的核酸との付着のための条件下で上記標的核酸に付着することができ、それにより上記検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にするもの；及び

上記標的核酸の二次配列とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得る一次ヘルパープローブ、

とともに試料溶液をインキュベートし、ここで、試料溶液および一次ヘルパープローブは一次ヘルパープローブと二次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされ、

c) 上記検出プローブ、上記一次ヘルパープローブおよび標的核酸間に形成される複合体が毛管作用により上記捕捉帯に移動して、上記捕捉プローブと上記複合体の上記標的核酸とのハイブリダイゼーションにより上記捕捉帯に結合し得るよう、上記クロマトグラフィーストリップの上記接触端と上記試料溶液を接触させ、そして

d) 上記捕捉帯での検出プローブの存在を確認する

ことを包含する方法。

【請求項 2】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端；及び接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分を有するストリップを提供し、

b) 以下の：

検出プローブと標的核酸との付着のための条件下で標的核酸と付着し、それにより検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出プローブ、

捕捉プローブと一次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下で標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る捕捉プローブであって、一次配列とハイブリダイズした場合、捕捉プローブが捕捉部分により結合され得る捕捉プローブ、および

標的核酸の二次配列とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得る一次ヘルパープローブ

とともに試料溶液をインキュベートし（ここで、試料溶液および一次ヘルパープローブは一次ヘルパープローブと二次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる）、

c) 検出プローブ、捕捉プローブ、一次ヘルパープローブおよび標的核酸間に形成される複合体が毛管作用により捕捉帯に移動して、捕捉部分と複合体の捕捉プローブとの結合により捕捉帯に結合し得るよう、クロマトグラフィーストリップの接触端と試料溶液を接触させ、そして

d) 捕捉帯での検出プローブの存在を確認する

ことを包含する方法。

【請求項 3】

二次配列が一次配列から 10 ヌクレオチドまでの間隔である請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

二次配列が一次配列のすぐ隣である請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

10

20

30

40

50

試料溶液が標的核酸の三次配列とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得る二次ヘルパープローブとともにインキュベートされる前記請求項のいずれかに記載の方法であって、試料溶液および二次ヘルパープローブが二次ヘルパープローブと三次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる方法。

【請求項 6】

二次および三次配列が一次配列と側面を接する請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

三次配列が一次配列から 10 ヌクレオチドまでの間隔である請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

三次配列が一次配列のすぐ隣である請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

検出プローブが、標的核酸とハイブリダイズし得るフック検出プローブならびにフック検出プローブとハイブリダイズし得る普遍検出プローブを含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

検出プローブが、検出プローブを標的核酸に付着する標的核酸の四次配列とハイブリダイズし得る前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

試料溶液が標的核酸の四次配列とハイブリダイズし、それにより検出プローブと四次配列とのハイブリダイゼーションを強化し得る三次ヘルパープローブとともにインキュベートされる請求項 10 記載の方法であって、三次ヘルパープローブおよび試料溶液が三次ヘルパープローブと四次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる方法。

【請求項 12】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端；及び接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブであって、標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る捕捉プローブを有するストリップを提供し、

b) 試料溶液を、標的核酸とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパープローブと接触させ（ここで、試料溶液はヘルパープローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下でヘルパープローブと接触される）、

c) ヘルパープローブおよび標的核酸間に形成される複合体が、捕捉プローブと複合体の標的核酸とのハイブリダイゼーションにより捕捉帯で捕捉され得るよう、クロマトグラフィーストリップの接触端と試料溶液を接触させて、毛管作用により試料溶液を捕捉帯に移動させ、そして

d) 捕捉帯での標的核酸の存在を確認することを包含する方法。

【請求項 13】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端；及び接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分を有するストリップを提供し、

b) 以下の：

捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下で標的核酸とハイブリダイズし得る捕捉プローブであって、捕捉プローブが標的核酸とハイブリダイズした場合に捕捉部分により結合され得る捕捉プローブ、および

標的核酸とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼー

10

20

30

40

50

ションを強化し得るヘルパー探査針

とともに試料溶液をインキュベートし(ここで、試料溶液およびヘルパー探査針はヘルパー探査針と標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下で接触される)、

c) 捕捉探査針、ヘルパー探査針および標的核酸間に形成される複合体が、捕捉部分と複合体の捕捉探査針との結合により捕捉帯で捕捉され得るよう、クロマトグラフィーストリップの接触端と試料溶液を接触させて、毛管作用により試料溶液を捕捉帯に移動させ、そして

d) 捕捉帯での標的核酸の存在を確認する

ことを包含する方法。

【請求項14】

捕捉探査針が、フック捕捉とハイブリダイズされる普遍捕捉探査針を含む前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の:

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端; 及び接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉探査針であって、標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る捕捉探査針を有するストリップを提供し、

b) 以下の:

検出探査針と標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下で標的核酸の二次配列とハイブリダイズし、それにより検出探査針を利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出探査針、および

標的核酸の三次配列とハイブリダイズし、それにより検出探査針と二次配列とのハイブリダイゼーションを強化し得る一次ヘルパー探査針

とともに試料溶液をインキュベートし(ここで、試料溶液および一次ヘルパー探査針は一次ヘルパー探査針と三次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる)、

c) 検出探査針、一次ヘルパー探査針および標的核酸間に形成される複合体が毛管作用により捕捉帯に移動し、捕捉探査針と複合体の標的核酸とのハイブリダイゼーションにより捕捉帯に結合し得るよう、クロマトグラフィーストリップの接触端と試料溶液を接触させて、そして

d) 捕捉帯での検出探査針の存在を確認する

ことを包含する方法。

【請求項16】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の:

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端; 及び接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分を有するストリップを提供し、

b) 以下の:

捕捉探査針と一次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下で標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る捕捉探査針であって、一次配列とハイブリダイズした場合、捕捉部分により結合され得る捕捉探査針、

検出探査針と二次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下で標的核酸の二次配列とハイブリダイズし、それにより検出探査針を利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出探査針、および

標的核酸の三次配列とハイブリダイズし、それにより検出探査針と標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得る一次ヘルパー探査針

とともに試料溶液をインキュベートし(ここで、試料溶液および一次ヘルパー探査針は一次ヘルパー探査針と三次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる)、

10

20

30

40

50

c) 検出プローブ、捕捉プローブ、一次ヘルパー プローブおよび標的核酸間に形成される複合体が毛管作用により捕捉帯に移動して、捕捉部分と複合体の捕捉プローブとの結合により捕捉帯に結合し得るよう、クロマトグラフィーストリップの接触端と試料溶液を接触させ、そして

d) 捕捉帯での検出プローブの存在を確認することを包含する方法。

【請求項 17】

三次配列が二次配列から 10 ヌクレオチドまでの間隔である請求項 15 または 16 記載の方法。

【請求項 18】

三次配列が二次配列のすぐ隣である請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

試料溶液が標的核酸の四次配列とハイブリダイズし、それにより検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得る二次ヘルパー プローブとともにインキュベートされる請求項 15 ~ 18 のいずれかに記載の方法であって、試料溶液および二次ヘルパー プローブが二次ヘルパー プローブと四次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる方法。

【請求項 20】

三次および四次配列が二次配列と側面を接する請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

四次配列が二次配列から 10 ヌクレオチドまでの間隔である請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

四次配列が二次配列のすぐ隣である請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

捕捉プローブが、フック捕捉プローブとハイブリダイズされ得る普遍捕捉プローブを含む請求項 15 ~ 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

試料溶液中のプローブと標的核酸のハイブリダイゼーションが単一工程で実行される前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし得る捕捉プローブ、ならびに接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定されるヘルパー プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパー プローブを有するストリップを提供し、

b) クロマトグラフィーストリップの接触端を試料溶液と接触させて、毛管作用により試料溶液を捕捉帯に移動させ、それによりクロマトグラフィーストリップからヘルパー プローブを放出し、そしてそれが捕捉帯に移動すると、放出ヘルパー プローブを試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズさせ、したがって標的核酸およびヘルパー プローブを含む複合体が、捕捉プローブと複合体の標的核酸とのハイブリダイゼーションにより捕捉帯で捕捉され得る、そして

c) 捕捉帯での標的核酸の存在を確認することを包含する方法。

【請求項 26】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分、ならびに接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定される捕捉

10

20

30

40

50

プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、そして捕捉プローブが標的核酸とハイブリダイズした場合、捕捉部分により結合され得る捕捉プローブを有するストリップを提供し、

b) 以下の :

ヘルパー プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下で標的核酸とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸のハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパー プローブ

とともに試料溶液をインキュベートし、

c) クロマトグラフィーストリップの接触端を試料溶液と接触させて、毛管作用により試料溶液を捕捉帯に移動させ、それによりそれが捕捉帯に移動すると、放出捕捉プローブが試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズし得るよう、そして標的核酸、捕捉プローブおよびヘルパー プローブを含む複合体が、捕捉部分を複合体の捕捉プローブに結合することにより捕捉帯で捕捉され得るよう、クロマトグラフィーストリップから捕捉プローブを放出し、そして

d) 捕捉帯での標的核酸の存在を確認することを包含する方法。

【請求項 27】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の :

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブ、接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定される捕捉プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、そして捕捉プローブが標的核酸とハイブリダイズした場合、捕捉部分により結合され得る、そしてヘルパー プローブが接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定され、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得る捕捉プローブを有するストリップを提供し、

b) クロマトグラフィーストリップの接触端を試料溶液と接触させて、毛管作用により試料溶液を捕捉帯に移動させ、それによりクロマトグラフィーストリップから捕捉プローブおよびヘルパー プローブを放出し、それが捕捉帯に移動すると、放出捕捉プローブおよびヘルパー プローブが試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズし得るよう、そして標的核酸、捕捉プローブおよびヘルパー プローブを含む複合体が、捕捉部分を複合体の捕捉プローブに結合することにより捕捉帯で捕捉され得るよう、クロマトグラフィーストリップから捕捉プローブおよびヘルパー プローブを放出し、そして

d) 捕捉帯での標的核酸の存在に関して確認することを包含する方法。

【請求項 28】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の :

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし得る捕捉プローブ、ならびに接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定された検出プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出プローブを有するストリップを提供し、

b) 以下の :

標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパー プローブ

を用いて試料溶液をインキュベートし（ここで、試料溶液およびヘルパー プローブはヘルパー プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる）、

c) クロマトグラフィーストリップの接触端を試料溶液と接触させて、毛管作用により試

10

20

30

40

50

料溶液を捕捉帯に移動させ、それにより、それが捕捉帯に移動すると、放出捕捉プローブが試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズし得るよう、そして標的核酸、ヘルパープローブおよび検出プローブを含む複合体が、捕捉プローブと複合体の標的核酸とのハイブリダイゼーションにより捕捉帯で捕捉され得るよう、クロマトグラフィーストリップから検出プローブを放出し、そして

d) 捕捉帯での検出プローブの存在を確認することを包含する方法。

【請求項 29】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし得る捕捉プローブ、接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定された検出プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出プローブ、ならびに接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定されたヘルパープローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化するヘルパープローブを有するストリップを提供し、

b) クロマトグラフィーストリップの接触端を試料溶液と接触させて、毛管作用により試料溶液を捕捉帯に移動させ、それにより、それが捕捉帯に移動すると、放出ヘルパープローブおよび検出プローブが試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズし得るよう、そして標的核酸、ヘルパープローブおよび検出プローブを含む複合体が、捕捉プローブと複合体の標的核酸とのハイブリダイゼーションにより捕捉帯で捕捉され得るよう、クロマトグラフィーストリップからヘルパープローブおよび検出プローブを放出し、そして

d) 捕捉帯での検出プローブの存在に関して調査することを包含する方法。

【請求項 30】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分、ならびに接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定された捕捉プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、そして捕捉プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合、捕捉部分により結合され得る捕捉プローブを有するストリップを提供し、

b) 以下の：

標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出プローブ、ここで、検出プローブは、検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下で試料溶液とともにインキュベートされる、および

標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化するヘルパープローブ

とともに試料溶液をインキュベートし（ここで、試料溶液およびヘルパープローブはヘルパープローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる）、

c) クロマトグラフィーストリップの接触端を試料溶液と接触させて、毛管作用により試料溶液を捕捉帯に移動させ、それにより、それが捕捉帯に移動すると、放出捕捉プローブが試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズし得るよう、そして標的核酸、捕捉プローブ、ヘルパープローブおよび検出プローブを含む複合体が、捕捉部分と複合体の捕捉プローブとの結合により捕捉帯で捕捉され得るよう、クロマトグラフィーストリップから捕捉プローブを放出し、そして

10

20

30

40

50

d) 捕捉帯での検出プローブの存在に関して調査することを包含する方法。

【請求項 3 1】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分、ならびに接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定された検出プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出プローブを有するストリップを提供し、
b) 以下の：

捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下で標的核酸とハイブリダイズし得る捕捉プローブであって、標的核酸とハイブリダイズしていた場合に捕捉部分により結合され得る捕捉プローブ、および

ヘルパー プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下で、標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパー プローブ

とともに試料溶液をインキュベートし、

c) クロマトグラフィーストリップの接触端を試料溶液と接触させて、毛管作用により試料溶液を捕捉帯に移動させ、それにより、それが捕捉帯に移動すると、放出検出プローブが試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズし得るよう、そして標的核酸、捕捉プローブ、ヘルパー プローブおよび検出プローブを含む複合体が、捕捉部分と複合体の捕捉プローブとの結合により捕捉帯で捕捉され得るよう、クロマトグラフィーストリップから検出プローブを放出し、そして

d) 捕捉帯での検出プローブの存在に関して調査する

ことを包含する方法。

【請求項 3 2】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分、接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定された検出プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出プローブを有するストリップを提供し、
b) 以下の：

標的核酸とハイブリダイズし、捕捉プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合、捕捉部分により結合され得る捕捉プローブであって、捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下で試料溶液とともにインキュベートされる捕捉プローブ、および

標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパー プローブであって、ヘルパー プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下で、試料溶液とともにインキュベートされるヘルパー プローブ

とともに試料溶液をインキュベートし、

c) クロマトグラフィーストリップの接触端を試料溶液と接触させて、毛管作用により試料溶液を捕捉帯に移動させ、それにより、それが捕捉帯に移動すると、放出検出プローブおよびヘルパー プローブが試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズし得るよう、そして標的核酸、捕捉プローブ、ヘルパー プローブおよび検出プローブを含む複合体が、捕捉部分と複合体の補足プローブとの結合により捕捉帯で捕捉され得るよう、クロマトグラフィーストリップから検出プローブおよびヘルパー プローブを放出し、そして

d) 捕捉帯での検出プローブの存在に関して調査する
ことを包含する方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 3】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分、接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定された検出プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出プローブ、ならびに接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定される捕捉プローブであって、標的核酸とハイブリダイズしていた場合、捕捉部分により結合され得る捕捉プローブを有するストリップを提供し、 b) ヘルパー プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下で標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブと標的核酸のハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパー プローブであって、試料溶液とともにインキュベートされるヘルパー プローブ

10

を用いて試料溶液をインキュベートし、

c) クロマトグラフィーストリップの接触端を試料溶液と接触させて、毛管作用により試料溶液を捕捉帯に移動させ、それにより、それが捕捉帯に移動すると、放出検出プローブおよび放出捕捉プローブが試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズし得るよう、そして標的核酸、捕捉プローブ、ヘルパー プローブおよび検出プローブを含む複合体が、捕捉部分と複合体の補足プローブとの結合により捕捉帯で捕捉され得るよう、クロマトグラフィーストリップから検出プローブおよび捕捉プローブを放出し、そして

20

d) 捕捉帯での検出プローブの存在に関して調査する

ことを包含する方法。

【請求項 3 4】

試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分、接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定された検出プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出プローブ、接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定されたヘルパー プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパー プローブ、ならびに接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定される捕捉プローブであって、標的核酸とハイブリダイズしていた場合、捕捉部分により結合され得る捕捉プローブを有するストリップを提供し、 b) クロマトグラフィーストリップの接触端を試料溶液と接触させて、毛管作用により試料溶液を捕捉帯に移動させ、それにより、それが捕捉帯に移動すると、放出検出プローブ、ヘルパー プローブおよび捕捉プローブが試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズし得るよう、そして標的核酸、捕捉プローブ、ヘルパー プローブおよび検出プローブを含む複合体が、捕捉部分と複合体の捕捉プローブとの結合により捕捉帯で捕捉され得るよう、クロマトグラフィーストリップから検出プローブ、ヘルパー プローブおよび捕捉プローブを放出し、そして

30

c) 捕捉帯での検出プローブの存在に関して調査する

ことを包含する方法。

【請求項 3 5】

標的核酸を含入すると思われる試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

i) 以下の：

クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、および接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブであって、標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る捕捉プローブ

40

50

を有するストリップを含むディップスティック

i i) 標的核酸の二次配列とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパークローブ、そして任意に

i i i) 標的核酸と付着して、標的核酸の直接または間接的検出を可能にし得る検出プローブ

を含むキット。

【請求項 3 6】

ヘルパークローブが接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定される請求項 3 5 記載のキット。

【請求項 3 7】

標的核酸を含入すると思われる試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

i) 以下の：

クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、および接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブであって、標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る捕捉プローブを有するストリップを含むディップスティック

i i) 標的核酸の二次配列とハイブリダイズして、標的核酸の直接または間接的検出を可能にし得る検出プローブ、そして

i i i) 標的核酸の三次配列とハイブリダイズし、それにより検出プローブと二次配列とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパークローブ

を含むキット。

【請求項 3 8】

検出プローブが接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定される請求項 3 7 記載のキット。

【請求項 3 9】

検出プローブおよびヘルパークローブが接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定される請求項 3 7 記載のキット。

【請求項 4 0】

標的核酸を含入すると思われる試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

i) 以下の：

クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、および接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分を有するストリップ

を含むディップスティック

i i) 標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る、そして捕捉プローブが一次配列とハイブリダイズしていた場合、捕捉部分により結合され得る捕捉プローブ

i i i) 標的核酸の二次配列とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパークローブ、そして任意に

i i i i) 標的核酸と付着して、標的核酸の直接または間接的検出を可能にし得る検出プローブ

を含むキット。

【請求項 4 1】

捕捉プローブが接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定される請求項 4 0 記載のキット。

【請求項 4 2】

捕捉プローブおよびヘルパークローブが接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定される請求項 4 0 記載のキット。

【請求項 4 3】

10

20

30

40

50

標的核酸を含入すると思われる試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

i) 以下の：

クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、および接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分を有するストリップ

を含むディップスティック

i i) 標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る、そして捕捉プローブが一次配列とハイブリダイズしていた場合、捕捉部分により結合され得る捕捉プローブ

i i i) 標的核酸の二次配列とハイブリダイズして、標的核酸の直接または間接的検出を可能にし得る検出プローブ、そして

i v) 標的核酸の三次配列とハイブリダイズし、それにより検出プローブと二次配列とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパー プローブ

を含むキット。

【請求項 4 4】

捕捉プローブおよび / または検出プローブが接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定される請求項 4 3 記載のキット。

【請求項 4 5】

ヘルパー プローブおよび検出プローブ、そして任意に捕捉プローブが接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定される請求項 4 3 記載のキット。

【請求項 4 6】

試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するためのクロマトグラフィーストリップであって、以下の：試料溶液を接触させるための接触端；接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分であって、標的核酸とハイブリダイズし得る捕捉プローブ；ならびに接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能に固定されたヘルパー プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパー プローブを包含するストリップ。

【請求項 4 7】

試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するためのクロマトグラフィーストリップであって、以下の：試料溶液を接触させるための接触端；接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし得る捕捉プローブ；ならびに接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能に固定されたヘルパー プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパー プローブを包含するストリップ。

【請求項 4 8】

試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するためのクロマトグラフィーストリップであって、以下の：

試料溶液を接触させるための接触端；

接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分であって、標的核酸とハイブリダイズした捕捉プローブを結合し得る捕捉部分；

接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能に固定された捕捉プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし得る捕捉プローブ；ならびに任意に接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能に固定されたヘルパー プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパー プローブを包含するストリップ。

【請求項 4 9】

試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するためのクロマトグラフィーストリップであって、以下の：

10

20

30

40

50

試料溶液を接触させるための接触端；

接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分であって、標的核酸とハイブリダイズした捕捉プローブを結合し得る捕捉部分；

接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定された検出プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出プローブ；ならびに任意に

i) 接触端および捕捉帯間のクロマトグラフィーストリップに放出可能的に固定された捕捉プローブであって、標的核酸とハイブリダイズし、そして捕捉部分により結合され得る捕捉プローブ；および / または

i i) 標的核酸とハイブリダイズし、それにより検出プローブと標的核酸とのハイブリダ 10
イゼーションを強化し得るヘルパー プローブ

を包含するストリップ。

【請求項 5 0】

試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するためのディップスティック検定におけるヘルパー プローブの使用。

【請求項 5 1】

ヘルパー プローブが捕捉プローブまたは検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化する請求項 5 0 記載の使用。

【請求項 5 2】

配列番号 1 ~ 1 8 のいずれかの配列に対応する配列を有する実質的単離核酸分子または核酸類似体。 20

【請求項 5 3】

試料溶液中の C T 標的核酸の存在に関する試験における C T 標的核酸の検出を強化するためのヘルパー プローブとしての請求項 5 2 記載の実質的単離核酸分子または核酸類似体の使用。

【請求項 5 4】

試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するための請求項 3 5 ~ 4 9 のいずれかに記載のキットまたはクロマトグラフィーストリップの使用。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本発明は、ディップスティックによる核酸の検出改良のための方法に関する。本発明の方法は、例えばクラミジア属細菌のトラコマクラミジア Chlamydia trachomatis (C T) のような病原性微生物に患者が感染しているか否かを同定するために、試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するために用いられる。 30

【0 0 0 2】

試料溶液中の標的核酸の存在に関して試験するためのいくつかの慣用的方法は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を用いた標的核酸の増幅によっている。この反応は少量の標的核酸の検出を可能にする一方、それは結果が得られる前に数時間要する。これは、例えば患者の待ち時間を最小限にするために、しばしばできるだけ速く結果を得ることが望ましいため、有意の欠点を有し得る。このような方法のさらなる欠点は、反応を実施するための高価な専門家装備および相対的高価試薬に対する要件である。 40

【0 0 0 3】

これに対照するものとして、ディップスティックは、任意の専門家装備に対する要件を伴わずに非増幅化標的核酸を検出し得る。結果は、 P C R ベースの方法より、したがって患者からの 1 回来院で、はるかに迅速に得られる。その場合、患者は同一来院で治療され得る。これは、患者が後日の治療のために戻ってくる見込みはありそうもなく、またはそれはできない場合に特に有益である。ディップスティック試験を実施する経費は、 P C R ベース試験の経費より有意に低い可能性もある。

【0 0 0 4】

米国特許第 5 , 310 , 650 号に記載された典型的慣用的ディップスティックでは、一 50

本鎖DNA捕捉プローブは、フィルターの一端（接触端）から遠く離れた捕捉帯でニトロセルロースフィルター上に固定される。捕捉プローブの配列は、検出される標的核酸の一次領域の配列と相補的である。標的化一本鎖DNA検出プローブは、フィルターの捕捉帯および接触端間に位置するプローブ帯でニトロセルロースフィルター上に放出可能的に固定される。検出プローブの配列は、標的核酸の二次領域（一次領域とは異なる）の配列と相補的である。

【0005】

標的DNAを含有すると思われる試料溶液中の標的DNAを検出するために、ニトロセルロースフィルターの接触端は試料溶液と接触される。試料溶液は毛管作用によりフィルターに吸い上げられ、プローブ帯および捕捉帯を通過する。試料溶液がプローブ帯を通過すると、それは検出プローブを流動させて、それを捕捉帯に向かって試料溶液とともに上昇させる。流動化検出プローブは次に、試料溶液中に存在する任意の標的DNAの二次領域とハイブリダイズし得る。ハイブリダイズ化検出プローブおよび標的DNAが捕捉帯に達すると、標的DNAの一次領域は固定化捕捉プローブとハイブリダイズし得る。それにより三成分複合体が、標的核酸、捕捉プローブおよび標識化検出プローブ間に形成される。したがって捕捉帯での標識の存在は、標的DNAが試料溶液中に存在することを示す。

【0006】

第二の型の慣用的ディップスティックに関しては、標識化DNA検出プローブはニトロセルロースフィルター上に固定されない。その代わり、検出プローブは、検出プローブと試料溶液中の任意の標的核酸とのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で試料溶液に付加される。次にニトロセルロースフィルターの接触端は試料溶液と接触され、そして試料溶液がディップスティックに吸い上げられると、検出プローブとハイブリダイズされる標的核酸はニトロセルロースフィルターを上昇し、捕捉プローブにより捕捉され得る。

【0007】

結果は、標的核酸の増幅を要する検出方法より迅速に慣用的ディップスティックを用いて得られるが、しかし慣用的ディップスティックによる核酸検出の感度は、低いことがある。慣用的ディップスティックによる二本鎖標的核酸の検出感度は、特に標的核酸のサイズが増大すると特に低く、そして環状二本鎖標的核酸は事実上、慣用的ディップスティックを用いて検出されないと思われる。その結果として試料溶液中の標的核酸の存在は、時として検出され得ない。したがって標的核酸検出の感度、特にディップスティックによる二本鎖および環状二本鎖核酸検出の感度を改良するのが望ましい。

【0008】

そのもっとも広義において、本発明は、捕捉および／または検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化するためのディップスティック検定におけるヘルパープローブの使用を提供する。

【0009】

「ディップスティック検定」という用語は、本明細書中で用いる場合、試料溶液がディップスティックと接触されて、毛管作用により試料溶液をディップスティックの捕捉帯に移動させ、それにより試料溶液中の標的核酸を捕捉帯で捕捉し、検出させ得るディップスティックを用いた任意の検定を意味する。

【0010】

本発明の第一の局面によれば、試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

- a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端；及び接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブであって、標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る捕捉プローブを有するストリップを提供し、
- b) 検出プローブと標的核酸との付着のための条件下で標的核酸と付着し、それにより検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出プローブ、およ

10

20

30

40

50

び標的核酸の二次配列とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得る一次ヘルパープローブとともに試料溶液をインキュベートし（ここで、試料溶液および一次ヘルパープローブは一次ヘルパープローブと二次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる）、

c) 検出プローブ、一次ヘルパープローブおよび標的核酸間に形成される複合体が毛管作用により捕捉帯に移動して、捕捉プローブと複合体の標的核酸とのハイブリダイゼーションにより捕捉帯に結合し得るよう、クロマトグラフィーストリップの接触端と試料溶液とを接触させ、そして

d) 捕捉帯での検出プローブの存在を確認することを包含する方法が提供される。

10

【0011】

本発明の第一の局面によって、標的核酸を含入すると思われる試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

i) 以下の：

クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、および接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブであって、標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る捕捉プローブを有するストリップを含むディップスティック

i i) 標的核酸の二次配列とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得る一次ヘルパープローブ、そして任意に

20

i i i) 標的核酸と付着して、検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にし得る検出プローブ

を含むキットも提供される。

【0012】

「クロマトグラフィーストリップ」という用語は、本明細書中で用いる場合、毛管現象により溶液を輸送し得る物質の任意の多孔性ストリップを意味する。

検出プローブおよび一次ヘルパープローブは、任意の順序で試料溶液とともにインキュベートされ得るし、あるいはそれらは同時に試料溶液中に付加され得る。

【0013】

クロマトグラフィーストリップの接触端は、普通は過程（b）にしたがって検出プローブおよび一次ヘルパープローブとともに試料溶液がインキュベートされた後に、試料溶液と接触される、と理解される。しかしながら、段階（b）が完了した後に接触端が試料溶液と接触される、ということは本発明の作業のために不可欠であるというわけではない - クロマトグラフィーストリップの接触端は、段階（b）の前または最中に試料溶液と接触され得る。

30

【0014】

本発明の第一の局面の捕捉プローブは、単一プローブまたは1つより多いプローブを含み得る。例えば捕捉プローブは、クロマトグラフィーストリップに固定された普遍捕捉プローブ、ならびに普遍捕捉プローブとハイブリダイズされるフック捕捉プローブを包含し、フックプローブは標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る。

40

【0015】

捕捉プローブとして普遍プローブおよびフックプローブを用いことの利点は、それらに固定された普遍プローブを有するクロマトグラフィーストリップを用いて任意の標的核酸を検出し得るという点である。所望の標的核酸とハイブリダイズし得るフックプローブは簡単に選定され、そしてクロマトグラフィーストリップを用いて所望の標的核酸の存在に関して試験する前に、普遍プローブとハイブリダイズされる。

【0016】

本発明の第二の局面によれば、試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端および

50

接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分を有するストリップを提供し、

b) 以下の：

検出プローブと標的核酸との付着のための条件下で標的核酸と付着し、それにより検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出プローブ、

捕捉プローブと一次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下で標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る捕捉プローブであって、一次配列とハイブリダイズした場合、捕捉部分により結合され得る捕捉プローブ、および

標的核酸の二次配列とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得る一次ヘルパー プローブ

とともに試料溶液をインキュベートし（ここで、試料溶液および一次ヘルパー プローブは一次ヘルパー プローブと二次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる）、

c) 検出プローブ、捕捉プローブ、一次ヘルパー プローブおよび標的核酸間に形成される複合体が毛管作用により捕捉帯に移動して、捕捉部分と複合体の捕捉プローブとの結合により捕捉帯に結合し得るよう、クロマトグラフィーストリップの接触端と試料溶液とを接触させ、そして

d) 捕捉帯での検出プローブの存在を確認することを包含する方法が提供される。

【0017】

本発明の第二の局面によれば、試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

i) 以下の：

クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端、および接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分を有するストリップ

を含むディップスティック

i i) 標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る、そして捕捉プローブが一次配列とハイブリダイズしていた場合、捕捉部分により結合され得る捕捉プローブ

i i i) 標的核酸の二次配列とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと一次配列とのハイブリダイゼーションを強化し得る一次ヘルパー プローブ、そして任意に

i v) 標的核酸と付着して、標的核酸の直接または間接的検出を可能にし得る検出プローブ

を含むキットも提供される。

【0018】

本発明の第二の局面の捕捉部分は、捕捉プローブとハイブリダイズし得る普遍捕捉プローブを包含し得る。あるいは捕捉部分は、一旦捕捉プローブが標的核酸とハイブリダイズすれば、捕捉プローブと非塩基対合相互作用により結合し得る。

【0019】

例えば捕捉部分は、捕捉プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合、形成された二重鎖と結合し得る抗体または抗体断片を含み得る。あるいは捕捉プローブは、捕捉部分により結合され得る捕捉リガンドを包含し得る。捕捉プローブが捕捉リガンドを含む場合、捕捉部分は抗体または抗体断片を包含し得る。捕捉リガンドがビオチンを含む場合、捕捉部分は抗ビオチン抗体またはストレプタビジン、アビジン、またはビオチン結合活性を保有するそれらの誘導体を含み得る。

【0020】

本発明の第一および第二の局面の二次配列は、一次配列に対して標的核酸の異なる領域中に存在すべきである。好ましくは二次配列は、一次配列から10ヌクレオチドまでの間隔である。さらに好ましくは、二次配列は一次配列のすぐ隣である。

【0021】

10

20

30

40

50

本発明の第一および第二の局面の好ましい方法において、試料溶液は、標的核酸の三次配列とハイブリダイズし、それにより捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得る二次ヘルパープローブとともにインキュベートされ、試料溶液および二次ヘルパープローブは二次ヘルパープローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる。

【0022】

三次配列は、一次および二次配列に対して標的核酸の異なる領域中に存在すべきである。好ましくは二次および三次配列は一次配列と側面を接する。さらに好ましくは、二次および三次配列は、一次配列の各側面が10ヌクレオチドまでの間隔である。最も好ましくは、二次および三次配列は一次配列の各側面に直接隣接する。

10

【0023】

捕捉プローブ、検出プローブおよびヘルパープローブは、核酸または核酸類似体を含み得る。捕捉プローブは、單一プローブまたは1つより多いプローブを含み得る。

【0024】

本発明の第一および第二の局面の検出プローブは、標的核酸と共有結合し、それにより標的核酸の直接検出を可能にする標識であり得る。あるいは検出プローブは、標的核酸と共有結合し、それによりリガンドと結合し得るリガンド結合部分を用いて標的核酸の間接的検出を可能にするリガンドであり得る。検出プローブは、標的核酸に検出プローブを共有結合するために標的核酸と反応する前駆体の形態で試料溶液中に付加され得る。

20

【0025】

あるいは検出プローブは、非共有的相互作用により、標的核酸に付着し得る。例えば検出プローブは、標的核酸の四次配列とハイブリダイズし得る。それにより検出プローブは、非共有的相互作用により検出プローブが標的核酸と結合していた場合には、標的核酸の直接検出を可能にし得る。あるいは検出プローブはリガンドを含み、それにより、検出プローブが非共有的相互作用により標的核酸と結合していた場合、リガンド結合部分を用いて標的核酸の間接的検出を可能にし得る。

30

【0026】

好ましい標識は、非放射性標識である。適切な標識の例としては、テキスタイル染料、金属ゾル、例えばコロイド金および着色粒子、例えば着色ラテックス粒子が挙げられる。適切なリガンドの例としては、ビオチン（例えば抗ビオチン抗体により、またはストレブタビジンまたはアビジンあるいはビオチン結合活性を保有するその誘導体により検出可能）、フルオロセイン（例えば抗フルオロセイン抗体により検出可能）、および2,4-ジニトロフェノール（DNP）（例えば抗DNP抗体により検出可能）が挙げられる。

40

【0027】

標的核酸の検出感度のさらなる改良は、試料溶液が三次ヘルパープローブとともに、好ましくは四次ヘルパープローブともインキュベートされる場合に得られる。三次ヘルパープローブは標的核酸の五次配列とハイブリダイズし、そして四次ヘルパープローブは標的核酸の六次配列とハイブリダイズして、それにより検出プローブと四次配列とのハイブリダイゼーションを強化し得る。試料溶液ならびに三次および四次ヘルパープローブは、三次および四次ヘルパープローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる。

40

【0028】

三次および四次ヘルパープローブを用いた検出感度の任意の有意の強化は、標的核酸の一次および四次配列が少なくとも200ヌクレオチド離れている場合に観察されるだけであり得る、と考えられる。

【0029】

好ましくは五次および六次配列は、四次配列と側面を接する。さらに好ましくは、五次および六次配列は、四次配列の各側面で10ヌクレオチドまでの間隔である。最も好ましくは、五次および六次配列は、四次配列の各側面で直接隣接する。

【0030】

50

本発明の第三の局面によれば、試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端；及び接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブであって、標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る捕捉プローブを有するストリップを提供し、

b) 以下の：

検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのための条件下で標的核酸の二次配列とハイブリダイズし、それにより検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出プローブ、および

標的核酸の三次配列とハイブリダイズし、それにより検出プローブと二次配列とのハイブリダイゼーションを強化し得る一次ヘルパープローブ

とともに試料溶液をインキュベートし（ここで、試料溶液および一次ヘルパープローブは一次ヘルパープローブと三次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる）、

c) 検出プローブ、一次ヘルパープローブおよび標的核酸間に形成される複合体が毛管作用により捕捉帯に移動し、捕捉プローブと複合体の標的核酸とのハイブリダイゼーションにより捕捉帯に結合し得るよう、クロマトグラフィーストリップの接触端と試料溶液を接触させて、そして

d) 捕捉帯での検出プローブの存在を確認する
ことを包含する方法が提供される。

【0031】

本発明の第三の局面によれば、標的核酸を含入すると思われる試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

i) 以下の：

クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端；及び接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉プローブであって、標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る捕捉プローブを有するストリップを含むディップスティック

i i) 標的核酸の二次配列とハイブリダイズして、標的核酸の直接または間接的検出を可能にし得る検出プローブ、そして

i i i) 標的核酸の三次配列とハイブリダイズし、それにより検出プローブと二次配列とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパープローブ
を含むキットも提供される。

【0032】

本発明の第三の局面の捕捉プローブは、單一プローブまたは1つより多いプローブを含み得る。例えば捕捉プローブは、クロマトグラフィーストリップに固定された普遍捕捉プローブ、ならびに普遍捕捉プローブとハイブリダイズされるフック捕捉プローブを含み得るし、フックプローブは標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る。

【0033】

本発明の第四の局面によれば、試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験方法であって、以下の：

a) クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端；及び接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分を有するストリップを提供し、

b) 以下の：

捕捉プローブと一次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下で標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る捕捉プローブであって、一次配列とハイブリダイズした場合、捕捉部分により結合され得る捕捉プローブ、

検出プローブと二次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下で標的核酸の二次配

10

20

30

40

50

列とハイブリダイズし、それにより検出プローブを利用して標的核酸の直接または間接的検出を可能にする検出プローブ、および

標的核酸の三次配列とハイブリダイズし、それにより検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得る一次ヘルパー プローブ

とともに試料溶液をインキュベートし（ここで、試料溶液および一次ヘルパー プローブは一次ヘルパー プローブと三次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる）、

c) 検出プローブ、捕捉プローブ、一次ヘルパー プローブおよび標的核酸間に形成される複合体が毛管作用により捕捉帯に移動して、捕捉部分と複合体の捕捉プローブとの結合により捕捉帯に結合し得るよう、クロマトグラフィーストリップの接触端と試料溶液を接触させ、そして

d) 捕捉帯での検出プローブの存在を確認することを包含する方法が提供される。

【0034】

本発明の第四の局面によれば、標的核酸を含むすると思われる試料溶液中の標的核酸の存在に関する試験キットであって、以下の：

i) 以下の：

クロマトグラフィーストリップであって、試料溶液を接触させるための接触端；及び接触端から遠く離れたクロマトグラフィーストリップの捕捉帯に固定された捕捉部分を有するストリップ

を含むディップスティック

i i) 標的核酸の一次配列とハイブリダイズし得る、そして捕捉プローブが一次配列とハイブリダイズしていた場合、捕捉部分により結合され得る捕捉プローブ

i i i) 標的核酸の二次配列とハイブリダイズして、標的核酸の直接または間接的検出を可能にし得る検出プローブ、そして

i v) 標的核酸の三次配列とハイブリダイズし、それにより検出プローブと二次配列とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパー プローブ

を含むキットも提供される。

【0035】

本発明の第四の局面の捕捉部分は、捕捉プローブとハイブリダイズし得る普遍捕捉プローブを含み得る。あるいは捕捉部分は、一旦捕捉プローブが標的核酸とハイブリダイズしたら、非塩基対合性相互作用により捕捉プローブと結合し得る。

【0036】

例えば捕捉部分は、捕捉プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合、形成された二重鎖と結合し得る抗体または抗体断片を含み得る。あるいは捕捉プローブは、捕捉部分により結合され得る捕捉リガンドを含み得る。捕捉プローブが捕捉リガンドを含む場合、捕捉部分は抗体または抗体断片を含み得る。捕捉リガンドがビオチンを含む場合、捕捉部分は抗ビオチン抗体またはストレプタビジン、アビジン、またはビオチン結合活性を保有するそれらの誘導体を含み得る。

【0037】

本発明の第三および第四の局面の検出プローブは、標識化され、それにより標的核酸とハイブリダイズしていた場合、標的核酸の直接検出を可能にし得る。あるいは検出プローブは、リガンドであり、それにより、検出プローブが標的核酸とハイブリダイズしていた場合、リガンド結合部分を用いて標的核酸の間接的検出を可能にし得る。

【0038】

本発明の第三および第四の局面の方法における三次配列は、好ましくは二次配列から10ヌクレオチドまでの間隔である。さらに好ましくは、三次配列は二次配列のすぐ隣である。

【0039】

好ましくは、本発明の第三および第四の局面の方法においては、試料溶液は、標的核酸の

10

20

20

30

40

50

四次配列とハイブリダイズし、それにより検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得る二次ヘルパー プローブとともにインキュベートされる（この場合、試料溶液および二次ヘルパー プローブは、二次ヘルパー プローブと四次配列とのハイブリダイゼーションのための条件下でインキュベートされる）。

【0040】

好ましくは、本発明の第三および第四の局面の方法に関しては、三次および四次配列は二次配列と側面を接する。さらに好ましくは、四次配列は二次配列と10ヌクレオチドまでの間隔である。最も好ましくは、四次配列は二次配列のすぐ隣である。

【0041】

本発明の第三および第四の局面の方法における一次および二次ヘルパー プローブを用いた検出感度の任意の有意の強化は、標的核酸の一次および二次配列が少なくとも200ヌクレオチドは慣れている場合に観察されるだけである、と考えられる。 10

【0042】

本発明のキットの検出プローブが検出リガンドを含む場合、キットはさらに、検出リガンドと結合し、それにより検出プローブおよび検出リガンド結合部分を利用して標的核酸の検出を可能にする標識化検出リガンド結合部分を包含し得る。検出リガンド結合部分は、抗体、抗体断片または非抗体であり得る。

【0043】

本発明のキットはさらに、クロマトグラフィーストリップを利用して試料溶液中の標的核酸の検出を可能にするために必要な任意の試薬を含み得る。 20

配列番号1～18のいずれかの配列に対応する配列を有する実質的単離核酸分子または核酸類似体も、本発明により提供される。

【0044】

試料溶液中のCT標的核酸の存在に関する試験におけるCT標的核酸の検出を強化するためのヘルパー プローブとしての本発明の実質的単離核酸分子または核酸類似体の使用も、本発明により提供される。

【0045】

本発明の方法に用いられるヘルパー プローブは、捕捉または検出プローブと一本鎖または二本鎖標的核酸との結合を強化し得る。標的核酸が一本鎖である場合、ヘルパー プローブは、捕捉／検出プローブが結合する標的核酸の領域で標的拡散が有意の二次構造を形成しないことを保証することにより、捕捉／検出プローブと標的核酸との結合を強化し得る、と考えられる。 30

【0046】

ヘルパー プローブが結合する標的核酸の領域は、常に捕捉／検出プローブが結合する領域の近くであるかまたはすぐ隣であるというわけではない、と理解される。ヘルパー プローブと標的核酸の一領域とのハイブリダイゼーションは、遠隔位置でその二次構造を変え、それにより捕捉／検出プローブをその遠隔位置で標的核酸により容易に結合させる。

【0047】

したがって、ヘルパー プローブが結合する標的核酸の領域は、標的核酸の、そして捕捉／検出プローブの同一性によって異なると考えられる。しかしながら当業者は、異なるプローブおよび異なるプローブ長を用いて実験することにより、どのヘルパー プローブがもっとも有効であるかを容易に確定し得る。 40

【0048】

標的核酸が二本鎖である場合、ヘルパー プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションは、捕捉または検出プローブが結合する領域における標的核酸の二本鎖を切り開くことにより、捕捉または検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化する、と考えられる。したがって、二本鎖標的核酸に関しては、普通はヘルパー プローブは、捕捉または検出プローブが結合する領域に隣接して結合する。

【0049】

ヘルパー プローブが捕捉または検出プローブと標的核酸との結合を強化するためには、ヘ 50

ルパーープローブは、捕捉または検出プローブが標的核酸とハイブリダイズされる前またはそれと同時に標的核酸とハイブリダイズされるべきであるが、しかし捕捉または検出プローブが標的核酸とハイブリダイズされた後ではない。

【0050】

いくつかの実施態様では、ヘルパーープローブは、捕捉および検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得る。これは、例えばヘルパーープローブが捕捉および検出プローブ間の標的核酸の領域とハイブリダイズする場合に達成され得る。

【0051】

本発明のその他の実施態様では、毛管作用による接触端から捕捉帯への試料溶液の移動が各プローブをクロマトグラフィーストリップから試料溶液中に放出させるような方法で、接触端および捕捉帯間で、クロマトグラフィーストリップに1つまたはそれ以上のプローブが放出可能に固定され得る。次に放出プローブは、試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズし得る。

【0052】

検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化し得るヘルパーープローブが提供される本発明の実施態様に関しては、ヘルパーープローブ（好ましくは検出プローブとともに）は、試料溶液がクロマトグラフィーストリップの接触端と接触された後にクロマトグラフィーストリップの捕捉帯と接触され得て、捕捉帯での標的核酸の捕捉を可能にする。これは、ヘルパーープローブ（および検出プローブ）を含有する別個のヘルパーープローブ溶液を捕捉帯に直接的に適用することにより、あるいはクロマトグラフィーストリップの接触端を試料溶液後にヘルパーープローブ溶液と接触させて、それにより、ヘルパーープローブをもう監査用により捕捉帯に移動させることにより達成され得る。検出プローブがヘルパーープローブ溶液中に存在しない場合、これはヘルパーープローブ後に捕捉帯と接触される必要がある。

【0053】

しかしながら本発明の好ましい方法においては、プローブと標的核酸（捕捉プローブが捕捉帯で固定される場合以外）とのハイブリダイゼーションは、試料溶液がクロマトグラフィーストリップと接触される前に、試料溶液中で実行される。最も好ましくは、プローブのハイブリダイゼーションは、單一段階で実行される。これは本方法を簡素化し、それによりそれらをかなり迅速且つ容易に実行させる。

【0054】

多段階ハイブリダイゼーションは、異なるプローブと試料溶液中の標的核酸との連続ハイブリダイゼーションにより、あるいはディップスティックを、各々異なるプローブを含有する異なる溶液と接触することにより実行され得る。通常は、多段階ハイブリダイゼーションの後者の方法は、異なるプローブ溶液を用いて各接触間のディップスティックを洗浄することを包含する。

【0055】

多段階ハイブリダイゼーションが好ましい環境が存在し得るが、しかしそれより簡単且つ迅速なフォーマットの一段階ハイブリダイゼーションが通常は好ましい、と理解される。

【0056】

試料溶液はハイブリダイゼーション反応を單一ハイブリダイゼーション段階で起こさせ、そして非塩基対合相互作用を起こさせて（例えば検出リガンドと検出リガンド結合部分との間、ならびに捕捉リガンドと捕捉リガンド結合部分との間）、そして標的核酸および1つまたはそれ以上のハイブリダイズ化プローブおよび（任意に）リガンド結合部分を含む複合体を毛管作用によりディップスティックまで押し上げるための適切な組成物を有する、というのが最も好ましい。

【0057】

このような試料溶液を用いて、ハイブリダイゼーション反応は次に單一段階で実行され、そして試料溶液がディップスティックの接触端と直接接触される前に（試料溶液を先ず希釈し、または変える必要性を伴わずに）、任意のリガンド・リガンド結合部分相互作用が

10

20

30

40

50

起こり得る、と理解される。リガンド - リガンド結合部分相互作用は、試料溶液が捕捉帯に移動すると、所望によりディップスティック上で付加的にまたは代替的に起こり得る。標的核酸の簡単且つ迅速なディップスティック検出は、それにより促される。

【 0 0 5 8 】

このような結果は、塩、洗剤およびブロッキングタンパク質、例えば B S A または粉乳を含有する標準ハイブリダイゼーション緩衝液（例えば S S P E 緩衝液またはトリス緩衝液）を含む試料溶液を用いて達成される、ということをわれわれは見出した。このような検定を用いた標的核酸の検出感度は、他のディップスティック検定とほぼ等しいかまたはそれより良好であることが判明した。

【 0 0 5 9 】

添付の図面を参照しながら、本発明の実施態様を例としてここで説明する。

【 0 0 6 0 】

以下の実施例は、本発明の方法を用いて標的核酸の検出感度改良を例証する。実施例は、クラミジア属細菌のトラコーマクラミジア *C h l a m y d i a t r a c h o m a t i s* (C T) の隠れたプラスミドの D N A 断片の検出に関する。

【 0 0 6 1 】

CTは、性感染病の最も一般的な原因の1つである。CT感染は、不妊症を引き起こし得るし、そして妊娠中には、自然流産を、さらに出産時または出産後子宮内膜炎を生じ得る。新生児において、CT感染は失明および慢性呼吸疾患を引き起こし得る。感染男性の約10%、および感染女性の約70%がCT感染の症状を示さない。したがって、病気の初期治療が開始され得るよう、CT感染の的確な診断が重要である。

【 0 0 6 2 】

以下の実施例では、ディップスティック10を用いて、試料溶液14中の二本鎖CT標的核酸12を検出しようと試みた。ディップスティック10は、試料溶液14を接触するための接触端18を有するニトロセルロースのストリップ16、ならびに接触端18から遠く離れたニトロセルロースストリップ16の捕捉帯22に固定された捕捉プローブ20を包含する。抗ビオチン抗体染料接合体24は、接触端18と捕捉帯22との間に位置するニトロセルロースストリップの接合体帯26で放出可能的に固定される。捕捉プローブ20は、標的核酸12の一方の鎖（一次鎖）の一次配列とハイブリダイズし得る。

【 0 0 6 3 】

二本鎖標的核酸12の一次鎖の異なる領域と各々ハイブリダイズし得る検出プローブ28およびヘルバープローブ30は次に、試料溶液14に付加される。検出プローブ28は、ビオチンに結合された（当業者に周知の方法を用いて）核酸を含む。検出プローブ28およびヘルバープローブ30を含む試料溶液14は次に、少なくとも検出プローブ28およびヘルバープローブ30が結合する一次鎖の領域で互いから二本鎖標的核酸12の相補鎖を分離するのに十分な温度に加熱され、次いで冷却されて、検出プローブ28およびヘルバープローブ30と二本鎖標的核酸の一次鎖とのハイブリダイゼーションを可能にする。検出プローブおよびヘルバープローブが一次鎖とハイブリダイズすると、二次鎖は一次鎖と再アニーリングするが、しかし検出プローブ28およびヘルバープローブ30により結合される一次鎖の領域との再アニーリングは妨げられる。

【 0 0 6 4 】

ディップスティック10の接触端18は次に、試料溶液14と接触される。試料溶液14、ならびに検出プローブ28およびヘルバープローブ30とハイブリダイズされた任意の標的核酸12は、毛管作用によりディップスティック10を上昇する。試料溶液14が接合体帯26を通過すると、それは抗ビオチン抗体 - 染料接合体24を流動化する。放出された抗ビオチン抗体 - 染料接合体24は次に、標的核酸12とハイブリダイズした検出プローブ28に結合されたビオチンと結合する。

【 0 0 6 5 】

抗ビオチン抗体 - 染料接合体24、検出プローブ28、ヘルバープローブ30および標的核酸12間に形成される複合体は次に、ディップスティック10を上昇して捕捉帯22ま

10

20

30

40

50

で移動し、そこで複合体の標的核酸が固定化捕捉プローブ 20 とハイブリダイズし得る。捕捉プローブ 20 は、それが捕捉帯 22 を通って移動すると、試料溶液 14 により流動化され得ないような方法で捕捉帯 22 に固定される。その結果として、捕捉プローブに結合された複合体は捕捉帯中に残存し、捕捉帯での抗ビオチン抗体 - 染料接合体の染料の存在により検出され得る。

【 0 0 6 6 】

試料溶液中に C T 標的核酸が存在しない場合、検出プローブ 28 は捕捉帯 22 で捕捉され得ず、したがって染料は捕捉帯で可視的でない。試料溶液中の C T 標的核酸が存在するが、しかし不十分量の標的核酸が捕捉帯で捕捉され得る場合には、試料溶液中の標的核酸の存在は検出されない。

10

【 0 0 6 7 】

前記の標的核酸の捕捉は、以下の実施例では直接プローブ捕捉と呼ばれる。以下の実施例 5 では、2 つのさらなる捕捉フォーマット、即ち普遍プローブ捕捉および抗体捕捉が用いられる。普遍プローブ捕捉は、ディップスティックの捕捉帯に固定された普遍プローブとハイブリダイズされたフックプローブを用いる標的核酸の捕捉によっている。フックプローブは、標的核酸とハイブリダイズし得る。捕捉の方法は直接プローブ捕捉と同一であるが、但し、捕捉プローブは普遍およびフックプローブにより置換される。

【 0 0 6 8 】

抗体捕捉に関しては、抗体は、捕捉プローブの代わりにディップスティックの捕捉帯に固定される。捕捉プローブは、抗体により結合され得る、そしてヘルパーおよび検出プローブとともに試料溶液に付加されるリガンド（例えば D N P ）と結合されたプローブを包含する。捕捉プローブは、試料溶液が加熱され、次にヘルパーおよび検出プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションのために冷却されると、標的核酸とハイブリダイズする。

20

【 0 0 6 9 】

ディップスティックの接触端は、試料溶液中での捕捉、ヘルパーおよび検出プローブのインキュベーション後に試料溶液と接触される。標的核酸、捕捉プローブ、ヘルパー プローブおよび検出プローブ（抗ビオチン抗体 - 染料接合体により結合される）を含有する複合体は次に、捕捉帯に固定された抗体により捕捉帯で捕捉される。試料溶液中の標的核酸の存在はまた、捕捉帯での抗ビオチン抗体 - 染料接合体の存在により検出される。したがって捕捉プローブと標的とのハイブリダイゼーションは、ディップスティック上というよりもむしろ、試料溶液中で起こる。

30

【 0 0 7 0 】

標的核酸の検出感度は、捕捉プローブがハイブリダイズする標的核酸の領域と検出プローブがハイブリダイズする領域との間の距離が 26 ヌクレオチド未満である場合、低減され得る、ということが判明した。したがって、これらの領域間の距離は少なくとも 26 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 200 ヌクレオチドである、というのが好ましい。

【 0 0 7 1 】

実施例 1

実験設定

捕捉フォーマット：直接プローブ捕捉（ c p ）配列番号 13 （ディップスティック上に固定）；

40

検出フォーマット：検出プローブ（ d p ）（ 10^{12} コピーでビオチンに結合された配列番号 14 、 15 、 16 または 17 の核酸、ならびに検出プローブを検出するための抗ビオチン抗体接合体を含む）；

標的 D N A : 872 b p D N A ($10^{11} \sim 10^9$ コピー)。

ヘルパー プローブ： H P 配列番号 1' (24 m e r 、 G + C = 9 ヌクレオチド、 T m = 72.2 。これは標的核酸とハイブリダイズした場合に捕捉プローブの 5' 末端から 11 ヌクレオチドの間隔の標的の配列とハイブリダイズする) または H P 配列番号 1 (24 m e r 、 G + C = 8 ヌクレオチド、 T m = 70.5 。これは標的核酸とハイブリダイズした場合に捕捉プローブの 5' 末端のすぐ隣の標的核酸の配列とハイブリダイズする)

50

(1 0 ¹ ₂ コピー)。

【 0 0 7 2 】

【表 1】

結果

ターゲット・コピー	10 ¹¹	10 ¹⁰	5×10 ⁹	10 ⁹	
対照 (ヘルパーなし)	2.5	0.0	0.0	0.0	10
HP SEQ ID No1'	3.0	1.0	0.0	0.0	
HP SEQ ID No1	5.0	3.5	2.5	0.0	

【 0 0 7 3 】

結論

ヘルパー プローブは、標的核酸検出の感度を 10 倍以上改良する。標的核酸とハイブリダイズしていた場合に捕捉プローブの 5' 末端のすぐ隣の標的核酸の配列とハイブリダイズする H P 配列番号 1 は、標的核酸とハイブリダイズしていた場合に捕捉プローブの 5' 末端から 11 ヌクレオチドの間隔の標的核酸の配列とハイブリダイズする H P 配列番号 1' 20 より強いヘルパー作用を有する。H P 配列番号 1 は、H P 配列番号 1' 2' より 2' 高い T m を有する。しかしながら捕捉プローブおよびヘルパー プローブ間の距離は、T m および G + C 含量より重要であると考えられる。

【 0 0 7 4 】

実施例 2

実験設定

捕捉フォーマット：直接プローブ捕捉 (c p) 配列番号 1 4 (ディップスティック上に固定)；

検出フォーマット：検出プローブ (d p) (1 0 ¹ ₂ コピーでビオチンに結合された配列番号 1 3 の核酸、ならびに抗ビオチン抗体接合体を含む)；

標的 D N A : 4 1 6 b p D N A (5 × 1 0 ¹ ₀ コピー)。

ヘルパー プローブ：H P 配列番号 1' 、H P 配列番号 2 、H P 配列番号 3 、配列番号 1 5 、配列番号 1 6 および配列番号 1 7 の組合せ (1 0 ¹ ₂ コピー)。

【 0 0 7 5 】

結果

図 4 参照。

【 0 0 7 6 】

結論

捕捉プローブにより認識される配列のすぐ隣の標的核酸の配列とハイブリダイズするヘルパー プローブは、本実施例における標的核酸の検出感度に及ぼす最強の強化作用を有する (ヘルパー プローブを欠く対照に関する 1 . 5 と比較してシグナル 4 . 5)。

捕捉プローブにより認識される配列のすぐ隣の標的核酸の配列とハイブリダイズするヘルパー プローブによる標的核酸の検出の感度に及ぼす作用は、捕捉プローブにより認識される配列から遠く離れた標的核酸の配列とハイブリダイズするヘルパー プローブの作用よりもはるかに強い (シグナル 2 . 5 と比較してシグナル 4 . 5)。

【 0 0 7 7 】

実施例 3

50

20

30

40

50

実験設定

捕捉フォーマット：直接プローブ捕捉（c p）配列番号14（ディップスティック上に固定）；

検出フォーマット：検出プローブ（ 10^{1^2} コピーでビオチンに結合された配列番号13（d1）、15（d3）、16（d4）または17（d5）の核酸、ならびに抗ビオチン抗体接合体を含む）；

標的DNA：872 bp DNA（ 10^{1^0} コピー）。

ヘルパー プローブ：ヘルパー プローブ h1 = HP 配列番号1、h2 = HP 配列番号2、h3 = HP 配列番号3、h4 = HP 配列番号4 の組合せ（ 10^{1^2} または 10^{1^3} コピー）。

10

【0078】

【表2】

結果

ヘルパー・ プローブ	E12コピー						E13コピー
添加	0	h2+h3	h2	h3	h1+h2+h3	h1+h2+h3+h4	h1+h2+h3+h4
シグナル	1.5	3.5	2.5	3	3.5	3.5	3.5

20

【0079】

結論

捕捉プローブにより認識される配列の各側面に隣接する標的核酸の配列とハイブリダイズするヘルパー プローブ（h2 および h3）は、ヘルパー プローブの1つのみを用いた検出感度と比較して、検出感度を増強する。

ヘルパー プローブの濃度増大（ 10^{1^2} コピーと比較して 10^{1^3} コピー）は、本実施例における検出感度にいかなる作用も及ぼさなかった。

【0080】

実施例4実験設定

捕捉フォーマット：直接プローブ捕捉（c p）配列番号14（ディップスティック上に固定）；

検出フォーマット：検出プローブ（ 10^{1^2} コピーでビオチンに結合された配列番号13（d1）、15（d3）、16（d4）または17（d5）の核酸、ならびに抗ビオチン抗体接合体を含む）；

ヘルパー プローブ：ヘルパー プローブ h1 = HP 配列番号1、h2 = HP 配列番号2、h3 = HP 配列番号3、h4 = HP 配列番号4 の組合せ（ 10^{1^2} または 10^{1^3} コピー）。

40

標的：環状二本鎖DNAプラスミドpCTL15B（5.1 Kbp）およびpCTL131（6.3 Kbp）、陰性対照として作用するための捕捉および検出プローブに対する相補的配列を欠くプラスミドpCTL130、ならびに陽性対照として作用するための 10^{1^1} コピーでの二本鎖線状DNA（872 bp）。

【0081】

【表3】

結果

ターゲット	h2+h3	h1+h2+h3+h4	hpなし
pCTL130	0.0	0.0	0.0
pCTL131	1.5	1.5	0.0
pCTL15B	1.5	1.5	0.0
872 bp DNA	5.0	5.0	3.5

10

【 0 0 8 2 】

結論

捕捉プローブにより認識される配列に隣接する標的核酸の配列とハイブリダイズするヘルパー プローブを用いて、環状二本鎖DNA(5Kbpより長い)が検出され得た。

捕捉プローブにより認識される配列から遠く離れているが、しかし検出プローブにより認識される配列に隣接する標的核酸の配列とハイブリダイズするヘルパー プローブ(ヘルパー プローブh1およびh4)は、本実施例中の核酸検出の感度を増強しなかった。この実施例における条件下で、ヘルパー プローブは主に、捕捉プローブとディップスティック得の二本鎖環状標的核酸とのハイブリダイゼーションを強化すると思われる。

20

【 0 0 8 3 】

環状二本鎖DNA標的(5.1Kbpまたは6.3Kbp)の検出感度は、線状二本鎖872bpDNAの検出感度より低い。標的核酸のサイズが増大すると、検出および捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションの効率は低減すると予測される。抗ビオチン抗体-染料接合体への検出プローブの接近可能性も、標的サイズが増大すると低減されると考えられる。二本鎖標的核酸の検出は、検出プローブおよび捕捉プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションの効率が低減するために、一本鎖標的核酸の検出より低効率であると思われる。抗ビオチン抗体-染料接合体への検出プローブの接近可能性は、一本鎖標的核酸と比較して、二本鎖に関して低減されると考えられる。

30

【 0 0 8 4 】

実施例 5

実験設定

捕捉配列：配列番号15

捕捉フォーマット：

i) 直接プローブ捕捉 - プローブ配列番号15(ディップスティック上に固定)；
ii) 普遍プローブ捕捉 - 普遍プローブの配列と相補的な配列を有するフックプローブと、ならびに標的DNA配列(配列番号15)とハイブリダイズされた20ヌクレオチド普遍プローブ(ディップスティック上に固定)；

40

iii) 抗体捕捉 - 抗DNP抗体(ディップスティック上に固定)。DNPに結合され、そして試料溶液中の標的核酸とハイブリダイズされた配列番号15の核酸を含む捕捉プローブ。

検出フォーマット：検出プローブ($10^{1\sim 2}$ コピーでビオチンに結合された配列番号13、14、16または17の核酸、ならびに抗ビオチン抗体接合体を含む)；

ヘルパー プローブ：HP配列番号3およびHP配列番号4($10^{1\sim 2}$ コピー)。

標的：872bpDNA($10^{1\sim 1} \sim 10^8$ コピー)。

【 0 0 8 5 】

結果

50

図 7 参照；

【 0 0 8 6 】

結論

ヘルパー プローブは、直接 プローブ 捕捉（前記（i）参照）および普遍 プローブ 捕捉（前記（i i）参照）を用いて、標的核酸検出の感度を改良した。これらの結果は、ヘルパー プローブがディップスティック上の核酸間のハイブリダイゼーションを強化する、という実施例2、3および4の結論を支持する。

【 0 0 8 7 】

実施例 6

実験設定

捕捉フォーマット：直接 プローブ 捕捉（c p）（配列番号 10）（ディップスティック上に固定）；

検出フォーマット：検出 プローブ（d p）（ $10^{1/2}$ コピーでビオチンに結合された配列番号 13 の核酸、ならびに抗ビオチン抗体接合体を含む）；

ヘルパー プローブ：配列番号 10 により認識される配列に隣接する標的核酸の配列とハイブリダイズする H P 配列番号 5 および H P 配列番号 6；配列番号 13 により認識される配列に隣接する標的核酸の配列とハイブリダイズする H P 配列番号 1 および H P 配列番号 2（ $10^{1/2}$ コピー）。

標的：872 bp DNA（ $5 \times 10^{1/0}$ コピー）。

【 0 0 8 8 】

結果

図 8 参照

結論

捕捉 プローブ および 検出 プローブ が 200 n t より 遠く はなれた 標的核酸の配列とハイブリダイズする 場合、 標的核酸の 検出 感度は、 検出 プローブ により 認識される 配列の 各側面に隣接する 標的核酸の配列とハイブリダイズする ヘルパー プローブ により、 改良された。

【 0 0 8 9 】

実施例 7

C T 検出に及ぼすヘルパー プローブの作用

実験設定

捕捉 フォーマット：

直接 プローブ 捕捉：ディップスティック 膜上に 固定された B S A に 結合された 配列番号 15 の 核酸を 含む プローブ；

抗体 捕捉：ディップスティック 膜に 固定された 抗 D N P 抗体（- D N P 捕捉）； D N P に 結合された 配列番号 15 の 核酸を 含む 捕捉 プローブ。

検出 フォーマット：検出 プローブ（いくつかの ビオチン 検出 リガンド に 各々 結合された 配列番号 18 または 13 の 核酸、ならびに 抗ビオチン抗体接合体を 含む）（検出 プローブ の $10^{1/2}$ コピー）；

ヘルパー プローブ：H P 配列番号 3 および H P 配列番号 4（ $10^{1/2}$ コピー）；ヘルパー プローブは、捕捉 プローブ により 認識される 標的核酸の 領域に隣接して ハイブリダイズ し 得る。

標的： 2.4×10^7 コピー での C T 基本 小体。

【 表 4 】

10

20

30

40

結果

捕獲 :	直接プローブ捕獲		Ab捕獲	
	ヘルパー	シグナル	ヘルパー	シグナル
	あり	なし	あり	なし
	4.0	2.5	1.5	0.5

10

実施例 7 からの結論

直接プローブ捕獲または抗体捕獲を用いた C T 細胞の隠れたプラスミドの検出は、ヘルパー プローブの使用により改良された。

本発明によるヘルパー プローブの使用は、ディップスティック膜上または溶液中で起こるハイブリダイゼーションを強化すると思われる。

前記の実施例 1 ~ 7において、ヘルパー プローブは、捕獲および検出プローブの鎖と同じ二本鎖標的核酸の一鎖とハイブリダイズする。標的核酸の検出感度の増強は、ヘルパー プローブが、捕獲および検出プローブにより認識される鎖に対して二本鎖標的核酸の反対鎖とハイブリダイズした同様の実験では、観察されなかった。 20

【 0 0 9 0 】

実施例 8

トラコーマクラミジア Chlamydia trachomatis の一段階核酸ディップスティック検定検出

実験設定 :

試薬 :

捕獲フォーマット : B S A 搾体を介してディップスティック膜上に固定されたオリゴヌクレオチドプローブ捕獲 ;

検出フォーマット : 多ビオチン標識化検出体プローブ ;

30

抗ビオチン抗体 - コロイド金接合体 ;

試料調製 : トラコーマクラミジア Chlamydia trachomatis (C t) 基本小体 (E B) 細胞を、 P B S 緩衝液中で 10^6 コピー / μl ~ 10^3 コピー / μl の濃度で調製し、 100 で 20 分間加熱した。 40

【 0 0 9 1 】

ハイブリダイゼーション / ディップスティック実行緩衝液 : 塩、洗剤およびプロッキングタンパク質、例えば B S A または粉乳を含有する標準ハイブリダイゼーション緩衝液。

方法 :

検出プローブ、ヘルパー プローブおよび 5×10^6 ~ 5×10^3 コピーの E B を $80 \mu l$ に作製したハイブリダイゼーション緩衝液中に希釈し、 100 で 7 分間加熱した。次に混合物を手短に遠心分離して、すべての液体を収集し、 $20 \mu l$ の抗ビオチン A b コロイド金と混合した。全 $100 \mu l$ の混合物をディップスティック上に吸い上げさせて、シグナルを発現させた。

【 0 0 9 2 】

結果および考察

以下の表および図 9 (付属のパワーポイント文書参照) に提示した結果は、試料調製段階を含めて 1 時間未満で、一段階核酸ディップスティック検定を用いて C t E B の約 10^4 コピーが検出され得たことを示す。 50

【 0 0 9 3 】

そのように提示されたディップスティック検出検定は他のサンドイッチハイブリダイゼー

ション検定とほぼ等しい検出感度を有するが、しかしそれは、速度および簡便性という大きい利点を有する。

【0094】

例えばPCT WO 93/1322に開示されたCtの検出のためのサンドイッチハイブリダイゼーション検定は、複雑な多構成成分微小滴定プレートフォーマット検定であり、これは5時間未満では成し遂げられなかつた。この検定は、限定順序でのその構成成分の漸次付加を要する多段階検定であつて、すべての新規の構成成分の付加後にインキュベーションおよび洗浄段階を伴う。

【0095】

本発明の目的の核酸ディップスティック検定は、構成成分の付加および洗浄のための異なる段階を必要とせずに、一段階で実行し得る。このサンドイッチハイブリダイゼーション検定は、ハイブリダイゼーションおよびその他の親和性対形成のためにそれらを有益にさせるために、1つより多い溶液条件を必要としない。同一溶液条件は、同様にディップスティック膜を通過する構成成分の自由移動に役立つ。10

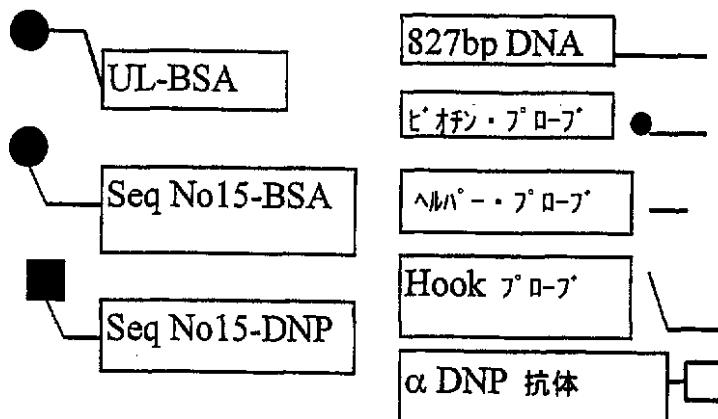
【0096】

本発明の方法は、ディップスティックによる標的核酸の検出感度を有意に増強する、ということが見出された。特に二本鎖核酸および環状二本鎖標的核酸の検出は、大いに改良される。

【表5】

図面凡例

図 7



10

20

30

	A) Ab捕獲	B) 直接プローブ捕獲	C) ユニバーサル・プローブ捕獲
シグナル5xE9	3.5	2.0	3.0
感受性	E9	5xE9	E9
	D) Ab捕獲-ヘルパー・プローブなし	E) 直接プローブ捕獲-ヘルパー・プローブあり	F) ユニバーサル・プローブ捕獲-ヘルパー・プローブあり
シグナル5xE9	3.5	4.0	3.0
感受性	E9	5xE8	5xE8(ひじょうに弱い)

図 9

Chlamydia trachomatisの1ステップ核酸ディップスティック・アッセイ検出
数字は、Chlamydia trachomatisの基本小体の数を示す。

*NC: ネガティブ・コントロール

図10

表: Chlamydia trachomatisの1ステップ核酸ディップスティック・アッセイ検出

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、本発明の実施態様にしたがって標的核酸を検出するために用いられるディップスティックを示す。

【図 2】

図 2 は、本発明にしたがって用いられ得るヘルパー・プローブの配列を列挙する。

【図 3】

図 3 は、実施例 1 に関する実験設定を示す。

【図 4】

50

図4は、実施例2に関する実験設定を示す。

【図5】

図5は、実施例3に関する実験設定を示す。

【図6】

図6は、実施例4に関する実験設定を示す。

【図7】

図7は、実施例5に関する実験設定を示す。

【図8】

図8は、実施例6に関する実験設定を示す。

【図9】

図9は、一段階ハイブリダイゼーション検定の結果を示す。

【図10】

図10は、トラコーマクラミジア *Chlamydia trachomatis* の一段階核酸ディップスティック検定検出結果を示す。

10

【図10】

Figure 10

$E3 \times 10^6$	10^6	5×10^5	2.5×10^5	10^5	7.5×10^4	5×10^4	2.5×10^4	10^4	5×10^3	NC^{**}
初期 シグナル	2.20*	2.59*	3.30*	4.30*	5.35*	8.10*	8.45*	14.05*	24*	-
10日にあける シグナル	4	3	2.5	2	1.5	1	1	0.5	0	-
20日にあける シグナル	5	4	3.5	3	2.5	2	1.5	1	0.25	0
30日にあける シグナル	5	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0
1hにあける シグナル	5	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.0	0.5	0
									

**Chlamydia trachomatis*の基本小体(モダ)数
**SC:ネガティブ、コントロール

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 January 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/04668 A2(51) International Patent Classification⁵: C12Q 1/68.
G01N 30/00Anastassova [BG/GB]; 62 Greystoke Road, Cambridge
CB1 8DS (GB). HAZELWOOD, Shann, Christopher
[GB/GJ]; 26 Berton Grove, Reddington, Haverhill, Suffolk
CB9 7PT (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB01/03024

(74) Agent: DAVIES, Jonathan, Mark; Reddie & Grose, 16
Theobalds Road, London WC1X 8PL (GB).

(22) International Filing Date: 6 July 2001 (06.07.2001)

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AU, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, IL, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TI, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YE, ZA,
ZW.

(25) Filing Language: English

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GL, GM,
KE, LS, MW, NZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,

(26) Publication Language: English

(85) Priority Data: 0016814.6 7 July 2000 (07.07.2000) GB

(30) Priority Data: 0016814.6 7 July 2000 (07.07.2000) GB

{Continued on next page}

(71) Applicant and

(72) Inventor: LEE, Helen [FR/GB]; University of Cam
bridge, Department of Haematology - Diagnostic De
velopment, East Anglia Blood Centre Site, Long Road,
Cambridge CB2 2PT (GB).

(73) Inventors: and

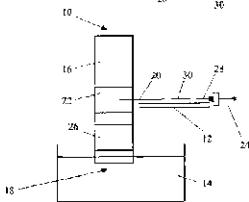
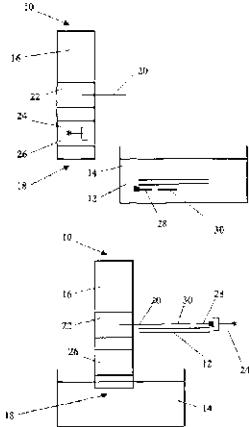
(75) Inventors/Applicants (for US only): DINEVA, Magda

(54) Title: IMPROVED CAPTURE AND DETECTION OF TARGET NUCLEIC ACID IN DIPSTICK ASSAYS

(57) **Abstract:** Use of helper probes in dipstick assays is described. In a dipstick assay to test for the presence of a target nucleic acid in a sample solution, the sample solution is connected with the contact end of the dipstick to cause the sample solution to connect with the capture end of the dipstick to cause the sample solution to move by capillary action to a capture zone of the dipstick at which target nucleic acid is captured. The target nucleic acid may be captured at the capture zone by a capture probe capable of hybridising to the target nucleic acid. A labelled detection probe capable of hybridising to the target nucleic acid may be used to detect the target nucleic acid at the capture zone. A helper probe may be used to enhance the binding of the capture and/or detection probe to the target nucleic acid, thereby improving the sensitivity of target nucleic acid detection. Dipsticks and kits are also described.



WO 02/04668 A2



WO 02/04668 A2

IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GW, MU, MR, NE, SN, TD, TG).
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

- 1 -

Improved Capture and Detection of Target Nucleic Acid in Dipstick Assays

The present invention relates to methods for improved 5 detection of nucleic acid by dipsticks. Methods of the invention are used to test for the presence of a target nucleic acid in a sample solution, for example to identify whether a patient is infected with a disease causing microorganism such as *Chlamydia trachomatis* (CT).

10 Some conventional methods for testing for the presence of a target nucleic acid in a sample solution rely on amplification of the target nucleic acid using the polymerase chain reaction (PCR). Whilst this reaction allows detection of small quantities of target nucleic acid, it can 15 take several hours before a result is obtained. This can be a significant disadvantage because it is often desired to obtain the result as soon as possible, for example, to keep patient waiting times to a minimum. Further disadvantages of such methods are the requirement for expensive specialist 20 equipment to perform the reaction and the relatively high cost of the reagents.

In contrast, dipsticks can detect unamplified target nucleic acid without the requirement for any specialist equipment. The results can be obtained much more rapidly than PCR-based 25 methods and, therefore, in a single visit from a patient. The patient can then be treated in the same visit. This is particularly advantageous where the patient is unlikely to, or cannot return for treatment at a later date. The cost of performing a dipstick test can also be significantly lower 30 than the cost of a PCR-based test.

- 2 -

In a typical conventional dipstick described in US 5,310,650, a single stranded DNA capture probe is immobilised on a nitrocellulose filter at a capture zone remote from one end of the filter (the contact end). The 5 sequence of the capture probe is complementary to the sequence of a first region of the target nucleic acid to be detected. A labelled single stranded DNA detection probe is releasably immobilised on the nitrocellulose filter at a probe zone located between the capture zone and the contact 10 end of the filter. The sequence of the detection probe is complementary to the sequence of a second region (distinct from the first region) of the target nucleic acid.

To detect target DNA in a sample solution thought to contain target DNA, the contact end of the nitrocellulose filter is 15 contacted with the sample solution. The sample solution wicks up the filter by capillary action and passes the probe zone and the capture zone. As the sample solution passes the probe zone, it mobilises the detection probe and causes it to rise with the sample solution towards the capture zone. 20 Mobilised detection probe can then hybridise to the second region of any target DNA present in the sample solution. When the hybridised detection probe and target DNA arrive at the capture zone, the first region of the target DNA can hybridise to the immobilised capture probe. A ternary 25 complex is thereby formed between the target nucleic acid, the capture probe and the labelled detection probe. Presence of label at the capture zone, therefore, indicates that target DNA is present in the sample solution.

With a second type of conventional dipstick, the labelled 30 DNA detection probe is not immobilised on the nitrocellulose filter. Instead the detection probe is added to the sample

- 3 -

solution under conditions allowing hybridisation of the detection probe to any target nucleic acid in the sample solution. The contact end of the nitrocellulose filter is then contacted with the sample solution and as the sample 5 solution wicks up the dipstick, target nucleic acid which is hybridised to the detection probe rises up the nitrocellulose filter and may be captured at the capture zone by the capture probe.

Although results can be obtained more rapidly using 10 conventional dipsticks than detection methods which require amplification of the target nucleic acid, the sensitivity of nucleic acid detection by conventional dipsticks can be low. The sensitivity of detection of double stranded target 15 nucleic acid by conventional dipsticks can be particularly low especially as the size of the target nucleic acid increases, and circular double stranded target nucleic acid is thought to be virtually undetectable using conventional dipsticks. Consequently, the presence of target nucleic acid in a sample solution can sometimes be undetected. It is 20 desired, therefore, to improve the sensitivity of target nucleic acid detection, in particular the sensitivity of double stranded and circular double stranded target nucleic acid detection by dipsticks.

In its broadest sense, the invention provides use of a 25 helper probe in a dipstick assay to enhance the hybridisation of a capture and/or detection probe to the target nucleic acid.

The term "dipstick assay" as used herein means any assay 30 using a dipstick in which sample solution is contacted with the dipstick to cause sample solution to move by capillary

- 4 -

action to a capture zone of the dipstick thereby allowing target nucleic acid in the sample solution to be captured and detected at the capture zone.

According to a first aspect of the invention there is 5 provided a method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:

a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; and a capture probe immobilised at a capture zone of the chromatographic strip 10 remote from the contact end, the capture probe being capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid;

b) incubating the sample solution with a detection probe capable of attaching to the target nucleic acid under 15 conditions for attachment of the detection probe to target nucleic acid, thereby allowing direct or indirect detection of target nucleic acid utilising the detection probe; and a first helper probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing 20 hybridisation of the capture probe to target nucleic acid, the sample solution and the first helper probe being incubated under conditions for hybridisation of the first helper probe to target nucleic acid;

c) contacting the contact end of the chromatographic strip 25 with the sample solution so that a complex formed between the detection probe, the first helper probe and target nucleic acid can move by capillary action to the capture zone and bind to the capture zone by hybridisation of the capture probe to target nucleic acid of the complex; and

d) checking for the presence of detection probe at the 30 capture zone.

- 5 -

There is also provided according to the first aspect of the invention a kit for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution suspected of containing target nucleic acid which comprises:

- 5 i) a dipstick comprising:
 - a chromatographic strip having a contact end for contacting the sample solution; and
 - a capture probe immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture probe being capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid;
- 10 ii) a first helper probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid; and optionally
- 15 iii) a detection probe capable of attaching to target nucleic acid to allow direct or indirect detection of the target nucleic acid utilising the detection probe.

The term "chromatographic strip" used herein means any porous strip of material capable of transporting a solution by capillarity.

The detection probe and the first helper probe may be incubated with the sample solution in any order or they may be added at the same time to the sample solution.

25 It will be understood that the contact end of the chromatographic strip will normally be contacted with the sample solution after the sample solution has been incubated with the detection probe and the first helper probe according to step (b). However, it is not essential for the 30 working of the invention that the contact end is contacted

- 6 -

with the sample solution after step (b) has been completed - the contact end of the chromatographic strip may be contacted with the sample solution before or during step (b).

5 The capture probe of the first aspect of the invention may comprise a single probe, or more than one probe. For example the capture probe may comprise a universal capture probe immobilised to the chromatographic strip and a hook capture probe hybridised to the universal capture probe, the hook probe being capable of hybridising to the first sequence of
10 the target nucleic acid.

An advantage of using a universal probe and a hook probe as the capture probe is that chromatographic strips which have the universal probe immobilised to them may be used to
15 detect any target nucleic acid. A hook probe capable of hybridising to the desired target nucleic acid is simply selected and hybridised to the universal probe before the chromatographic strip is used to test for the presence of the desired target nucleic acid.

20 According to a second aspect of the invention there is provided a method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:
a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; and a capture moiety
25 immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end;
b) incubating the sample solution with:
a detection probe capable of attaching to the target nucleic acid under conditions for attachment of the detection probe
30 to target nucleic acid, thereby allowing direct or indirect

- 7 -

- detection of target nucleic acid utilising the detection probe;
- a capture probe capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid under conditions for hybridisation of the capture probe to the first sequence, the capture probe being capable of being bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the first sequence; and
- 10 a first helper probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to target nucleic acid, the sample solution and the first helper probe being incubated under conditions for hybridisation of the first helper probe to the second sequence;
- 15 c) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution so that a complex formed between the detection probe, the capture probe, the first helper probe and target nucleic acid can move by capillary action to the capture zone and bind to the capture zone by binding 20 of the capture moiety to the capture probe of the complex; and
- d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.

According to the second aspect of the invention there is 25 also provided a kit for testing for the presence of a target nucleic acid in a sample solution which comprises:

i) a dipstick comprising:

a chromatographic strip having a contact end for contacting the sample solution; and a capture moiety immobilised at a 30 capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end;

- 8 -

- ii) a capture probe capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid and which can be bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the first sequence;
- 5 iii) a first helper probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to the first sequence; and optionally
- 10 iii) a detection probe capable of attaching to the target nucleic acid to allow direct or indirect detection of the target nucleic acid.

The capture moiety of the second aspect of the invention may comprise a universal capture probe capable of hybridising to the capture probe. Alternatively the capture moiety may be 15 capable of binding by non base pairing interaction to the capture probe once the capture probe has hybridised to the target nucleic acid.

For example, the capture moiety may comprise an antibody or antibody fragment capable of binding to the duplex formed 20 when the capture probe has hybridised to the target nucleic acid. Alternatively, the capture probe may comprise a capture ligand which can be bound by the capture moiety. When the capture probe comprises a capture ligand the capture moiety may comprise an antibody or antibody 25 fragment. If the capture ligand comprises biotin the capture moiety may comprise an anti-biotin antibody or streptavidin, avidin, or a derivative thereof which retains biotin binding activity.

The second sequence of the first and second aspects of the invention should be in a different region of the target 30

- 9 -

nucleic acid to the first sequence. Preferably the second sequence is spaced upto 10 nucleotides from the first sequence. More preferably the second sequence is immediately adjacent the first sequence.

5 In preferred methods of the first and second aspects of the invention the sample solution is incubated with a second helper probe capable of hybridising to a third sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to target nucleic acid, the sample
10 solution and the second helper probe being incubated under conditions for hybridisation of the second helper probe to target nucleic acid.

The third sequence should be in a different region of the target nucleic acid to the first and second sequences.
15 Preferably the second and third sequences flank the first sequence. More preferably the second and third sequences are spaced upto 10 nucleotides each side of the first sequence. Most preferably the second and the third sequence are immediately adjacent each side of the first sequence.

20 The capture probe, detection probe and helper probes may comprise nucleic acids or nucleic acid analogues. The capture probe may comprise a single probe, or more than one probe.

25 The detection probe of the first and second aspects of the invention may be a label which covalently attaches to the target nucleic acid thereby allowing direct detection of target nucleic acid. Alternatively the detection probe may be a ligand which covalently attaches to the target nucleic acid thereby allowing indirect detection of target nucleic

- 10 -

acid using a ligand binding moiety capable of binding to the ligand. The detection probe may be added to the sample solution in the form of a precursor which reacts with the target nucleic acid to covalently attach the detection probe to the target nucleic acid.

Alternatively, the detection probe may be capable of attaching to the target nucleic acid by non covalent interaction. For example, the detection probe may be capable of hybridising to a fourth sequence of the target nucleic acid. The detection probe may be labelled thereby allowing direct detection of the target nucleic acid when the detection probe has attached to the target nucleic acid by non covalent interaction. Alternatively, the detection probe may comprise a ligand thereby allowing indirect detection of the target nucleic acid using a ligand binding moiety when the detection probe has attached to the target nucleic acid by non covalent interaction.

Preferred labels are non radioactive labels. Examples of suitable labels include textile dyes, metal sol such as colloidal gold and coloured particles such as coloured latex particles. Examples of suitable ligands include biotin (detectable for example by an anti-biotin antibody, or by streptavidin or avidin or a derivative thereof which retains biotin binding activity), fluorescein (detectable for example by an anti-fluorescein antibody), and 2,4-dinitrophenol (DNP) (detectable for example by an anti-DNP antibody).

Further improved sensitivity of detection of target nucleic acid may be obtained if the sample solution is incubated with a third and, preferably, also with a fourth helper

- 11 -

probe. The third helper probe is capable of hybridising to a fifth sequence of the target nucleic acid and the fourth helper probe is capable of hybridising to a sixth sequence of the target nucleic acid, thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the fourth sequence. The sample solution and the third and fourth helper probes are incubated under conditions for hybridisation of the third and fourth helper probes to target nucleic acid.

It is possible that any significant enhancement of the sensitivity of detection using the third and fourth helper probes may only be observed when the first and the fourth sequences of the target nucleic acid are at least 200 nucleotides apart.

Preferably the fifth and sixth sequences flank the fourth sequence. More preferably the fifth and sixth sequences are spaced upto 10 nucleotides each side of the fourth sequence. Most preferably the fifth and sixth sequences are immediately adjacent each side of the fourth sequence.

According to a third aspect of the invention there is provided a method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:

- a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; and a capture probe immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture probe being capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid;
- b) incubating the sample solution with:
a detection probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid under conditions for

- 12 -

- hybridisation of the detection probe to target nucleic acid, thereby allowing direct or indirect detection of target nucleic acid utilising the detection probe; and a first helper probe capable of hybridising to a third sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the second sequence, the sample solution and the first helper probe being incubated under conditions for hybridisation of the first helper probe to the third sequence;
- 10 c) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution so that a complex formed between the detection probe, the first helper probe and target nucleic acid can move by capillary action to the capture zone and bind to the capture zone by hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid of the complex; and
- 15 d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.

According to the third aspect of the invention there is also provided a kit for testing for the presence of a target nucleic acid in a sample solution suspected of containing target nucleic acid which comprises:

- 17 i) a dipstick comprising:
a chromatographic strip having a contact end for contacting the sample solution; and a capture probe immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture probe being capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid;
- 23 ii) a detection probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid to allow direct or
25 indirect detection of the target nucleic acid; and

- 13 -

iii) a first helper probe capable of hybridising to a third sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the second sequence.

The capture probe of the third aspect of the invention may 5 comprise a single probe, or more than one probe. For example the capture probe may comprise a universal capture probe immobilised to the chromatographic strip and a hook capture probe hybridised to the universal capture probe, the hook probe being capable of hybridising to the first sequence of 10 the target nucleic acid.

According to a fourth aspect of the invention there is provided a method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:
15 a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; and a capture moiety immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end;
b) incubating the sample solution with:
a capture probe capable of hybridising to a first sequence 20 of the target nucleic acid under conditions for hybridisation of the capture probe to the first sequence, the capture probe being capable of being bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the first sequence;
25 a detection probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid under conditions for hybridisation of the detection probe to the second sequence, thereby allowing direct or indirect detection of target nucleic acid utilising the detection probe; and
30 a first helper probe capable of hybridising to a third sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing

- 14 -

- hybridisation of the detection probe to target nucleic acid, the sample solution and the first helper probe being incubated under conditions for hybridisation of the first helper probe to the third sequence;
- 5 c) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution so that a complex formed between the detection probe, the capture probe, the first helper probe and target nucleic acid can move by capillary action to the capture zone and bind to the capture zone by binding of the capture moiety to the capture probe of the complex; and
- 10 d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.

According to the fourth aspect of the invention there is also provided a kit for testing for the presence of a target nucleic acid in a sample solution suspected of containing target nucleic acid which comprises:

- 15 i) a dipstick comprising:
a chromatographic strip having a contact end for contacting the sample solution, and a capture moiety immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end;
- 20 ii) a capture probe capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid and which can be bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the first sequence;
- 25 iii) a detection probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid to allow direct or indirect detection of the target nucleic acid; and
- 30 iv) a first helper probe capable of hybridising to a third sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the second sequence.

- 15 -

The capture moiety of the fourth aspect of the invention may comprise a universal capture probe capable of hybridising to the capture probe. Alternatively the capture moiety may be capable of binding by non base pairing interaction to the capture probe once the capture probe has hybridised to the target nucleic acid.

For example, the capture moiety may comprise an antibody or antibody fragment capable of binding to the duplex formed when the capture probe has hybridised to the target nucleic acid. Alternatively, the capture probe may comprise a capture ligand which can be bound by the capture moiety. When the capture probe comprises a capture ligand the capture moiety may comprise an antibody or antibody fragment. If the capture ligand comprises biotin the capture moiety may comprise an anti-biotin antibody or streptavidin, avidin, or a derivative thereof which retains biotin binding activity.

The detection probe of the third and fourth aspects of the invention may be labelled thereby allowing direct detection of the target nucleic acid when the detection probe has hybridised to the target nucleic acid. Alternatively, the detection probe may comprise a ligand thereby allowing indirect detection of the target nucleic acid using a ligand binding moiety when the detection probe has hybridised to the target nucleic acid.

The third sequence in methods of the third and fourth aspect of the invention is preferably spaced upto 10 nucleotides from the second sequence. More preferably the third sequence is immediately adjacent the second sequence.

- 16 -

Preferably in methods of the third and fourth aspects of the invention the sample solution is incubated with a second helper probe capable of hybridising to a fourth sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to target nucleic acid, the sample solution and the second helper probe being incubated under conditions for hybridisation of the second helper probe to the fourth sequence.

Preferably with methods of the third and fourth aspects of the invention the third and fourth sequences flank the second sequence. More preferably the fourth sequence is spaced upto 10 nucleotides from the second sequence. Most preferably the fourth sequence is immediately adjacent the second sequence.

It is possible that any significant enhancement of the sensitivity of detection using the first and second helper probes in methods of the third and fourth aspects of the invention may only be observed when the first and the second sequences of the target nucleic acid are at least 200 nucleotides apart.

If the detection probe of a kit of the invention comprises a detection ligand, the kit may further comprise a labelled detection ligand binding moiety capable of binding to the detection ligand thereby enabling detection of target nucleic acid utilising the detection probe and the detection ligand binding moiety. The detection ligand binding moiety may be an antibody, an antibody fragment or a non antibody.

- 17 -

Kits of the invention may further comprise any reagent required to allow detection of target nucleic acid in the sample solution utilising the chromatographic strip.

There is also provided according to the invention a substantially isolated nucleic acid molecule or nucleic acid analogue having a sequence corresponding to the sequence of any of SEQ ID NOS: 1-18.

There is also provided according to the invention use of a substantially isolated nucleic acid molecule or nucleic acid analogue of the invention as a helper probe to enhance detection of CT target nucleic acid in a test for the presence of such target nucleic acid in a sample solution.

The helper probes used in methods of the invention may enhance the binding of capture or detection probes to single stranded or double stranded target nucleic acid. Where the target nucleic acid is single stranded, it is thought that the helper probe may enhance the binding of the capture/detection probe to the target nucleic acid by ensuring that the target nucleic acid does not form significant secondary structure in the region of the target nucleic acid to which the capture/detection probe binds.

It will be appreciated that the region of the target nucleic acid to which the helper probe binds may not always be close to or immediately adjacent the region to which the capture/detection probe binds. Hybridisation of a helper probe to one region of target nucleic acid could alter its secondary structure at a remote location, thereby allowing a capture/detection probe to bind more easily to the target nucleic acid at that remote location.

- 18 -

Consequently, the region of the target nucleic acid to which the helper probe binds is likely to differ depending on the identity of the target nucleic acid and of the capture/detection probe. However, a person skilled in the art can readily determine which helper probes are most effective by experimenting with different probes and different lengths of probe.

Where the target nucleic acid is double stranded, it is thought that hybridisation of a helper probe to the target nucleic acid enhances hybridisation of the capture or detection probe to the target nucleic acid by opening up the double strands of the target nucleic acid in the region in which the capture or detection probe binds. Consequently, for double stranded target nucleic acid, it will normally be expected that a helper probe binds adjacent the region to which the capture or detection probe binds.

In order for a helper probe to enhance the binding of a capture or detection probe to the target nucleic acid, the helper probe should be hybridised to the target nucleic acid before or at the same time as the capture or detection probe is hybridised to the target nucleic acid, but not after the capture or detection probe has been hybridised to the target nucleic acid.

In some embodiments, a helper probe may enhance the hybridisation of a capture and a detection probe to the target nucleic acid. This may be achieved, for example, if the helper probe hybridises to a region of the target nucleic acid between the capture and detection probes.

- 19 -

In other embodiments of the invention, one or more of the probes may be releasably immobilised to the chromatographic strip, between the contact end and the capture zone, in such a way that movement of the sample solution from the contact end to the capture zone by capillary action will cause the or each probe to be released from the chromatographic strip into the sample solution. Released probe can then hybridise to target nucleic acid in the sample solution.

For embodiments of the invention in which a helper probe is provided which is capable of enhancing hybridisation of a detection probe to the target nucleic acid, the helper probe (preferably with the detection probe) may be contacted with the capture zone of the chromatographic strip after the sample solution has been contacted with the contact end of the chromatographic strip to allow capture of target nucleic acid at the capture zone. This may be achieved by applying a separate helper probe solution containing the helper probe (and detection probe) directly to the capture zone, or by contacting the contact end of the chromatographic strip with the helper probe solution after the sample solution, thereby causing the helper probe to move by capillary action to the capture zone. If the detection probe is not in the helper probe solution, this will need to be contacted with the capture zone after the helper probe.

However, in preferred methods of the invention, hybridisation of the probes to target nucleic acid (other than where a capture probe is immobilised at the capture zone) is carried out in the sample solution before the sample solution is contacted with the chromatographic strip. Most preferably hybridisation of the probes is carried out

- 20 -

in a single step. This simplifies the methods, thereby making them considerably quicker and easier to perform.

Multiple step hybridisation may be carried out by sequential hybridisation of the different probes to the target nucleic acid in the sample solution, or by contacting the dipstick with different solutions each containing a different probe. Usually, the latter method of multiple step hybridisation will involve washing the dipstick between each contact with a different probe solution.

Whilst there may be circumstances in which multiple step hybridisation is preferred, it will be appreciated that the simpler and quicker format of one step hybridisation will usually be preferred.

It is most preferred that the sample solution is of suitable composition to allow the hybridisation reactions to take place in a single hybridisation step and also to allow non base pairing interactions to take place (for example between a detection ligand and a detection ligand binding moiety and between a capture ligand and a capture ligand binding moiety) and transport a complex comprising target nucleic acid and one or more hybridised probes and (optionally) ligand binding moieties by capillary action up the dipstick.

Using such a sample solution, it will be appreciated that the hybridisation reactions can then be carried out in a single step, and any ligand-ligand binding moiety interactions can take place, before the sample solution is contacted directly with the contact end of the dipstick (without the need to first dilute or alter the sample solution). Ligand-ligand binding moiety interactions can

- 21 -

additionally or alternatively take place on the dipstick if desired as the sample solution travels to the capture zone. Simple and rapid dipstick detection of target nucleic acid is thereby facilitated.

5 We have found that such results are achieved with sample solutions comprising a standard hybridisation buffer (such as SSPE buffer or Tris buffer) with salt, detergent and a blocking protein such as BSA or powdered milk. The sensitivity of detection of target nucleic acid using such 10 assays has been found to be about equal to or better than that of other dipstick assays.

Embodiments of the invention are now described by way of example with reference to the accompanying drawings in which:

15 Figure 1 shows a dipstick used to detect target nucleic acid in accordance with an embodiment of the invention; Figure 2 lists the sequences of helper probes which can be used in accordance with the invention; Figure 3 shows the experimental setup for Example 1; 20 Figure 4 shows the experimental setup for Example 2; Figure 5 shows the experimental setup for Example 3; Figure 6 shows the experimental setup for Example 4; Figure 7 shows the experimental setup for Example 5; Figure 8 shows the experimental setup for Example 6; 25 Figure 9 shows the results of a one-step hybridisation assay.

The following examples illustrate improved sensitivity of detection of target nucleic acid using methods of the invention. The examples relate to detection of a DNA

- 22 -

fragment of the cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis* (CT).

CT is one of the most common causes of sexually transmitted disease. CT infections can cause infertility and, during pregnancy, can result in spontaneous abortion, still birth or postpartum endometritis. In neonates, CT infection can cause blindness and chronic respiratory disease. Approximately 10% of infected men and upto 70% of infected women do not show symptoms of CT infection. Consequently, accurate diagnosis of CT infection is important so that early treatment of the disease can be initiated.

In the following examples a dipstick 10 is used to try to detect double stranded CT target nucleic acid 12 in a sample solution 14. The dipstick 10 comprises a strip of nitrocellulose 16 having a contact end 18 for contacting the sample solution 14 and a capture probe 20 immobilised at a capture zone 22 of the nitrocellulose strip 16 remote from the contact end 18. An anti-biotin antibody-dye conjugate 24 is releasably immobilised at a conjugate zone 26 of the nitrocellulose strip located between the contact end 18 and the capture zone 22. The capture probe 20 is capable of hybridising to a first sequence of one strand (the first strand) of the target nucleic acid 12.

A detection probe 28 and a helper probe 30 each capable of hybridising to distinct regions of the first strand of the double stranded target nucleic acid 12 are then added to the sample solution 14. The detection probe 28 comprises a nucleic acid coupled to biotin (using methods well known to those of skill in the art). The sample solution 14 containing the detection probe 28 and the helper probe 30 is

- 23 -

then heated to a temperature sufficient to separate the complementary strands of the double stranded target nucleic acid 12 from each other at least in the region of the first strand to which the detection probe 28 and helper probe 30 bind, and then cooled to allow hybridisation of the detection probe 28 and the helper probe 30 to the first strand of the double stranded target nucleic acid. As the detection probe and helper probe hybridise to the first strand, the second strand re-anneals to the first strand, 5 but is prevented from re-annealing to the region of the first strand which is bound by the detection probe 28 and the helper probe 30.

The contact end 18 of the dipstick 10 is then contacted with the sample solution 14. The sample solution 14 and any 15 target nucleic acid 12 hybridised to the detection probe 28 and the helper probe 30 moves up the dipstick 10 by capillary action. As the sample solution 14 passes the conjugate zone 26, it mobilises the anti-biotin antibody-dye conjugate 24. Released anti-biotin antibody-dye conjugate 24 20 can then bind to the biotin coupled to the detection probe 28 hybridised to the target nucleic acid 12.

Complex formed between the anti-biotin antibody-dye conjugate 24, the detection probe 28, the helper probe 30 and the target nucleic acid 12 then moves up the dipstick 10 25 to the capture zone 22 where the target nucleic acid of the complex can hybridise to the immobilised capture probe 20. The capture probe 20 is immobilised at the capture zone 22 in such a way that it cannot be mobilised by the sample solution 14 as it moves past the capture zone 22. 30 Consequently, the complex bound to the capture probe remains in the capture zone and can be detected by the presence of

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 24 -

the dye of the anti-biotin antibody-dye conjugate at the capture zone.

If there is no CT target nucleic acid in the sample solution, the detection probe 28 cannot be captured at the capture zone 22 and so no dye is visible at the capture zone. If there is CT target nucleic acid in the sample solution, but insufficient amounts of the target nucleic acid can be captured at the capture zone the presence of the target nucleic acid in the sample solution will not be detected.

The capture of target nucleic acid described above is referred to as direct probe capture in the examples below. In example 5 below two further capture formats were used - universal probe capture and antibody capture. Universal probe capture relies on capture of the target nucleic acid using a hook probe hybridised to a universal probe immobilised to the capture zone of the dipstick. The hook probe is capable of hybridising to the target nucleic acid. The method of capture is identical to direct probe capture except the capture probe is replaced by the universal and hook probes.

With antibody capture, an antibody is immobilised at the capture zone of the dipstick instead of the capture probe. The capture probe comprises a probe coupled to a ligand (such as DNP) which can be bound by the antibody and is added to the sample solution with the helper and detection probes. The capture probe hybridises to target nucleic acid when the sample solution is heated and then cooled in order to hybridise the helper and detection probes to the target nucleic acid.

- 25 -

The contact end of the dipstick is contacted with the sample solution after incubation of the capture, helper and detection probes in the sample solution. Complex containing the target nucleic acid, capture probe, helper probe and detection probe (bound by the anti-biotin antibody-dye conjugate) is then captured at the capture zone by the antibody immobilised at the capture zone. Presence of target nucleic acid in the sample solution is again detected by the presence of the anti-biotin antibody-dye conjugate at the capture zone. Thus, hybridisation of the capture probe to the target occurs in the sample solution rather than on the dipstick.

It has been found that the sensitivity of detection of target nucleic acid can be reduced if the distance between the region of the target nucleic acid to which the capture probe hybridises and the region to which the detection probe hybridises is less than 26 nucleotides. Thus, it is preferred that the distance between these regions is at least 26 nucleotides and preferably at least 200 nucleotides.

Example 1

Experimental setup

Capture format: direct probe capture (dp) Seq ID No 13 immobilised on dipstick;

Detection format: detection probe (dp) comprising nucleic acid of Seq ID No 14, 15, 16, or 17 coupled to biotin at 10^{12} copies, and an anti-biotin antibody-dye conjugate to detect the detection probe;

Target DNA: 872 bp DNA at 10^{11} - 10^9 copies.

- 26 -

Helper probes: HP SEQ ID No 1' (24 mer, G+C= 9 nucleotides, $T_m= 72.2^\circ\text{C}$, which hybridises to a sequence of the target spaced 11 nucleotides from the 5'-end of the capture probe when hybridised to the target nucleic acid) or HP SEQ ID No 1 (24 mer, G+C= 8 nucleotides, $T_m= 70.5^\circ\text{C}$, which hybridises to sequence of the target nucleic acid immediately adjacent the 5'-end of capture probe when hybridised to the target nucleic acid) at 10^{12} copies.

		<u>Results</u>		
		10^{21}	10^{20}	5×10^9
10	Target copies			
		10^{21}	10^{20}	5×10^9
15	Control (no helper)	2.5	0.0	0.0
	HP SEQ ID No 1'	3.0	1.0	0.0
20	HP SEQ ID No 1	5.0	3.5	2.5
				0.0

Conclusions

15 A helper probe improves the sensitivity of target nucleic acid detection by more than 10-fold.

HP SEQ ID NO:1, which hybridises to a sequence of the target nucleic acid immediately adjacent the 5'-end of the capture probe when this has hybridised to the target nucleic acid,

20 has a stronger helper effect than HP SEQ ID NO:1', which hybridises to a sequence of the target nucleic acid which is spaced 11 nucleotides from the 5'-end of the capture probe when this has hybridised to the target nucleic acid. HP SEQ ID NO:1 has a 2°C higher T_m than HP SEQ ID NO: 1'. However,

25 the distance between the capture probe and the helper probe is thought to be more important than the T_m and G+C content.

Example 2Experimental setup

- 27 -

Capture format: direct probe capture (cp) (Seq ID No 14) immobilised on dipstick;
Detection format: detection probe (dp) comprising nucleic acid of Seq ID No 13 coupled to biotin at 10^{12} copies, and an anti-biotin antibody-dye conjugate;
Target DNA: 416 bp DNA at 5×10^{10} copies.
Helper probes: combinations of helper probe HP SEQ ID No 1, HP SEQ ID No 2, HP SEQ ID No 3, Seq ID No 15, Seq ID No 16 and Seq ID No 17 at 10^{12} copies.

10 **Results**

See Figure 4

Conclusions

Helper probes which hybridise to a sequence of the target nucleic acid immediately adjacent the sequence recognised by the capture probe have the strongest enhancing effect on the sensitivity of detection of target nucleic acid in this example (compare signal 4.5 with 1.5 for control lacking helper probe).

The effect on the sensitivity of detection of target nucleic acid by helper probes which hybridise to a sequence of the target nucleic acid immediately adjacent the sequence recognised by the capture probe is much stronger than the effect of helper probes which hybridise to sequences of the target nucleic acid distant from the sequence recognised by the capture probe (compare signal 4.5 with signal 2.5).

Example 3

Experimental set up

Capture format: direct probe capture (cp) Seq ID No 14 (immobilised on the dipstick);

- 28 -

Detection format: detection probe comprising nucleic acid of Seq ID No 13 (d1), 15 (d3) 16 (d4) or 17 (d5) coupled to biotin at 10^{12} copies, and an anti-biotin antibody-dye conjugate;

5 Target DNA: 872 bp DNA at 10^{10} copies.

Helper probes: combinations of helper probes h1 = HP SEQ ID No 1, h2 = HP SEQ ID No 2, h3 = HP SEQ ID No 3, h4 = HP SEQ ID No 4, at 10^{12} or 10^{13} copies.

Results

10	helper probe	at 10^{12} copies					at 10^{13} copies
		0	h2+h3	h3	h3	h1+h2+h3	
	added	0	h2+h3	h3	h3	h1+h2+h3	h1+h2+h3+h4
	signal	1.5	3.5	2.5	3	3.5	3.5

Conclusions

15 Helper probes (h2 and h3) which hybridise to sequences of the target nucleic acid adjacent each side of the sequence recognised by the capture probe enhance the sensitivity of detection compared to the sensitivity of detection using only one of the helper probes.

20 Increasing the concentration of helper probe (10^{13} compared to 10^{12} copies) did not have any effect on the sensitivity of detection in this example.

Example 4

Experimental setup

25 Capture format: direct probe capture (cp) Seq ID No 14 (immobilised on the dipstick);

- 29 -

Detection format: detection probe comprising nucleic acid of Seq ID No 13 (d1), 15 (d3) 16 (d4) or 17 (d5) coupled to biotin at 10^{12} copies, anti-biotin antibody-dye conjugate; Helper probes: combinations of helper probe h1 = HP SEQ ID N1, h2 = HP SEQ ID No 2, h3 = HP SEQ ID No 3, h4 = HP SEQ ID No 4, at 10^{12} or 10^{13} copies; Targets: circular double stranded DNA plasmids pCTL15B (5.1 Kbp) and pCTL131(6.3 Kbp), plasmid pCTL130 lacking complementary sequences to the capture and detection probes to act as a negative control, and double stranded linear DNA (872 bp) at 10^{11} copies to act as a positive control.

Result

target	h2 + h3	h1+h2+h3+h4	without hp
pCTL130	0.0	0.0	0.0
pCTL131	1.5	1.5	0.0
pCTL15B	1.5	1.5	0.0
872 bp DNA	5.0	5.0	3.5

Conclusion

Circular double stranded DNA, longer than 5 Kbp, could be detected using helper probes which hybridise to sequence of the target nucleic acid adjacent the sequence recognised by the capture probe. Helper probes which hybridise to sequence of the target nucleic acid distant from the sequence recognised by the capture probe but adjacent the sequence recognised by the detection probe (helper probes h1 and h4) did not enhance the sensitivity of nucleic acid detection in this example. Under the conditions in this example the helper probes appear primarily to enhance hybridisation of the capture probe to the double stranded circular target nucleic acid on the dipstick.

- 30 -

The sensitivity of detection of the circular double stranded DNA targets (5.1 Kbp or 6.3 Kbp) is lower than the sensitivity of detection of the linear double stranded 872 bp DNA. As the size of the target nucleic acid increases, 5 the efficiency of hybridisation of the detection and capture probes to the target nucleic acid is expected to reduce. The accessibility of the detection probe to the anti-biotin antibody-dye conjugate is also thought to be reduced as the target size increases. Detection of double stranded target 10 nucleic acid is thought to be less efficient than detection of single stranded target nucleic acid because the efficiency of hybridisation of the detection probe and the capture probe to the target nucleic acid decreases. The accessibility of the detection probe to the anti-biotin antibody-dye conjugate is also thought to be reduced for 15 double stranded compared to single stranded target nucleic acid.

Example 5

Experimental setup

20 Capture sequence: SEQ ID No 15
Capture formats:
i) direct probe capture - probe Seq ID No 15 immobilised on
the dipstick;
ii) universal probe capture - 20 nucleotide universal probe
25 immobilised on the dipstick hybridised to a hook probe with
sequence complimentary to the sequence of the universal
probe and to the target DNA sequence (SEQ ID No 15);
iii) antibody capture - anti-DNP antibody immobilised on the
dipstick, capture probe comprising nucleic acid of SEQ ID No
30 15 coupled to DNP and hybridised to the target nucleic acid
in the sample solution;

- 31 -

Detection format: detection probe comprising nucleic acid of Seq ID No 13, 14, 16 or 17 coupled to biotin at 10^{11} copies, anti-biotin antibody-dye conjugate;
Helper probes: HP SEQ ID No 3 and HP SEQ ID No 4, at 10^{12} copies;
Target: 872 bp DNA at 10^{11} to 10^8 copies.

Results

See figure 7;

Conclusion

10 The helper probes improved the sensitivity of detection of target nucleic acid using direct probe capture (see (i) above) and universal probe capture (see (ii) above). These results support the conclusions of examples 1, 3 and 4 that helper probes enhance hybridisation between nucleic acids on the dipstick.

Example 6

Experimental Setup

Capture format: Direct probe capture (cp) (SEQ ID No 10) immobilised on the dipstick;
20 Detection format: detection probe (dp) comprising nucleic acid of Seq ID No 13 coupled to biotin at 10^{11} copies, anti-biotin antibody-dye conjugate;
Helper probes: HP SEQ ID No 5 and HP SEQ ID No 6 which hybridise to a sequence of the target nucleic acid adjacent 25 the sequence recognised by SEQ ID No 10; HP SEQ ID No 1 and HP SEQ ID No 2 which hybridise to sequence of the target nucleic acid adjacent the sequence recognised by SEQ ID No 13 at 10^{12} copies;
Target: 872 bp DNA at 5×10^{10} copies.

- 32 -

Results

See Figure 8.

Conclusion

When the capture probe and detection probe hybridise to sequences of the target nucleic acid which are more than 200nt apart, the sensitivity of detection of target nucleic acid was improved with helper probes that hybridise to sequence of the target nucleic acid adjacent each side of the sequence recognised by the detection probe.

10 Example 7

Effect of helper probes on CT detection

Experimental Setup

Capture sequence: SEQ ID No 15

Capture formats:

15 Direct probe capture: probe comprising nucleic acid of Seq ID No 15 coupled to BSA immobilised to the dipstick membrane;
Antibody capture: Anti-DNP antibody (α -DNP capture) immobilised to the dipstick membrane; capture probe comprising nucleic acid of SEQ ID No 15 coupled to DNP.
20 Detection format: detection probe comprising nucleic acid of Seq ID No 18 or 13 each coupled to several biotin detection ligands, and an anti-biotin antibody - dye conjugate. 10^2 copies of the detection probes;
25 Helper probes: HP SEQ ID No 3 and HP SEQ ID No 4, at 10^{12} copies. The helper probes are capable of hybridising adjacent the region of the target nucleic acid recognised by the capture probe;
Target: CT Elementary Bodies's at $2.4 \cdot 10^7$ copies/test.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 33 -

Results

Capture:	Direct Probe		Ab Capture	
	Capture			
Helpers	Yes	No	Yes	No
Signal	4.0	2.5	1.5	0.5

5 Conclusions from example 7

Detection of the cryptic plasmid of CT cells using direct probe capture or antibody capture was improved by the use of helper probes.
Use of helper probes in accordance with the invention
10 appears to enhance hybridisation occurring on the dipstick membrane or in solution.

In examples 1 to 7 above, the helper probes hybridise to the same strand of the double stranded target nucleic acid as the capture and detection probes. No enhancement of the
15 sensitivity of detection of target nucleic acid was observed in similar experiments in which the helper probes hybridised to the opposite strand of the double stranded target nucleic acid to the strand recognised by the capture and detection probes.

- 34 -

Example 8

One-step Nucleic Acid Dipstick Assay Detection of Chlamydia trachomatis

Experimental Set-up:

5 **Reagents:**

Capture format: oligonucleotide probe capture immobilised on dipstick membrane via BSA carrier;

Detection format: multiple biotin labelled detector probe; anti-biotin antibody - colloidal gold conjugate;

10 **Sample preparation:** *Chlamydia trachomatis* (Ct) elementary bodies (EB) celles were prepared in oconcentrations from 10⁰ copies/μl to 10³ copies/μl in PBS buffer and heated at 100°C for 20 minutes;

15 **Hybridisation/dipstick running buffer:** Standard hybridisation buffer comprising salt, detergent and a blocking protein such as BSA or powdered milk.

Method:

20 The detection probe, helper probe and 5x10⁰ - 5x10³ copies of EB diluted in hybridisation buffer made up to 80 μl and heated at 100°C for 7 minutes. The mixture was then centrifuged briefly to collect all the liquid and mixed with 20 μl anti-biotin Ab colloidal gold. The whole 100μl mixture were wicked up on dipstick and let to develop a signal.

25 **Results and Discussion**

26 The results presented in the Table below and Figure 9 (see the attached power point document) show that about 10⁴ copies of Ct EB could be detected with one step nucleic acid dipstick assay in less than an hour including the sample preparation step.

- 35 -

Although the so presented dipstick detection assay has a sensitivity of detection about equal to other sandwich hybridisation assays it has the major advantages of speed and simplicity.

5 A sandwich hybridisation assay for detection of Ct disclosed in PCT WO 93/1322 for example, is a complex multi-component microtitre plate format assay, which could not be accomplished for less than 5 hours. This assay is a multi-step assay, which requires a gradual addition of its
10 components in a defined order with incubations and washing steps after the addition of every new component.

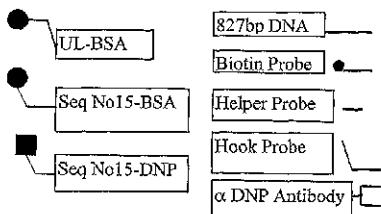
The nucleic acid dipstick assay subject of this invention could be done in one step with no need of different steps for addition of components and washings. This sandwich
15 hybridisation assay does not require more than one solution conditions in order to render them advantageous for hybridisation and other affinity pair formations. The same solution conditions could serve a free migration of the components through the dipstick membrane as well.

- 36 -

Methods of the invention have been found to significantly enhance the sensitivity of detection of target nucleic acids by dipsticks. In particular, detection of double stranded nucleic acid and circular double stranded target nucleic acid is greatly improved.

Figure legends

Figure 7



	A) Ab Capture	B) Direct Probe Capture	C) Universal Probe Capture
Signal 5xE9	3.5	2.0	3.0
Sensitivity	E9	5xE9	E9
	D) Ab Capture – with helper probes	E) Direct Probe Capture – with helper probes	F) Universal Probe Capture – with helper probes
Signal 5xE9	3.5	4.0	3.0
Sensitivity	E9	5xE8	5xE8 (very faint)

Figure 9

One-step nucleic acid dipstick assay detection of *Chlamydia trachomatis*The numbers indicate the number of elementary bodies of *Chlamydia trachomatis*

*NC: Negative control

Figure 10

Table: One-step nucleic acid dipstick assay detection of *Chlamydia trachomatis*

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

- 37 -

Claims

1. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:
 - a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; and a capture probe immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture probe being capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid;
 - 10 b) incubating the sample solution with:
a detection probe capable of attaching to the target nucleic acid under conditions for attachment of the detection probe to target nucleic acid, thereby allowing direct or indirect detection of target nucleic acid utilising the detection probe; and
a first helper probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to target nucleic acid, the sample solution and the first helper probe being 15 incubated under conditions for hybridisation of the first helper probe to the second sequence;
 - c) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution so that a complex formed between the detection probe, the first helper probe and target 20 nucleic acid can move by capillary action to the capture zone and bind to the capture zone by hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid of the complex; and
 - d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.
2. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:

- 38 -

- a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; and a capture moiety immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end;
- 5 b) incubating the sample solution with:
 - a detection probe capable of attaching to the target nucleic acid under conditions for attachment of the detection probe to target nucleic acid, thereby allowing direct or indirect detection of target nucleic acid utilising the detection probe;
 - 10 a capture probe capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid under conditions for hybridisation of the capture probe to the first sequence, the capture probe being capable of being bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the first sequence; and
 - 15 a first helper probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to target nucleic acid,
 - 20 the sample solution and the first helper probe being incubated under conditions for hybridisation of the first helper probe to the second sequence;
 - 25 c) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution so that a complex formed between the detection probe, the capture probe, the first helper probe and target nucleic acid can move by capillary action to the capture zone and bind to the capture zone by binding of the capture moiety to the capture probe of the complex; and
 - 30 d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 39 -

3. A method according to claim 1 or 2 in which the second sequence is spaced upto 10 nucleotides from the first sequence.
4. A method according to claim 3 in which the second sequence is immediately adjacent the first sequence.
5. A method according to any preceding claim in which the sample solution is incubated with a second helper probe capable of hybridising to a third sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to target nucleic acid, the sample solution and the second helper probe being incubated under conditions for hybridisation of the second helper probe to the third sequence.
6. A method according to claim 5 in which the second and third sequences flank the first sequence.
7. A method according to claim 6 in which the third sequence is spaced upto 10 nucleotides from the first sequence.
8. A method according to claim 7 in which the third sequence is immediately adjacent the first sequence.
9. A method according to any preceding claim in which the detection probe comprises a hook detection probe capable of hybridising to the target nucleic acid and a universal detection probe capable of hybridising to the hook detection probe.

- 40 -

10. A method according to any preceding claim in which the detection probe is capable of hybridising to a fourth sequence of the target nucleic acid to attach the detection probe to the target nucleic acid.
- 5 11. A method according to claim 10 in which the sample solution is incubated with a third helper probe capable of hybridising to a fifth sequence of the target nucleic acid thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the fourth sequence, the third helper probe and the sample 10 solution being incubated under conditions for hybridisation of the third helper probe to the fifth sequence.
12. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:
 - a) providing a chromatographic strip having: a contact end 15 for contacting the sample solution; and a capture probe immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture probe being capable of hybridising to the target nucleic acid;
 - b) contacting the sample solution with a helper probe 20 capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid, the sample solution being contacted with the helper probe under conditions for hybridisation of the helper probe to the target nucleic acid;
 - c) contacting the contact end of the chromatographic strip 25 with the sample solution to cause sample solution to move by capillary action to the capture zone so that a complex formed between the helper probe and target nucleic acid can be captured at the capture zone by hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid of the complex; and
- 30

- 41 -

- d) checking for the presence of target nucleic acid at the capture zone.
- 13. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:
 - 5 a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; and a capture moiety immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end;
 - b) contacting the sample solution with:
 - 10 a capture probe capable of hybridising to the target nucleic acid under conditions for hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid, the capture probe being capable of being bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the target nucleic acid; and
 - 15 a helper probe capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid, the sample solution and the helper probe being contacted under conditions for hybridisation of the helper probe to the target nucleic acid;
 - 20 c) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution to cause sample solution to move by capillary action to the capture zone so that a complex formed between the capture probe, the helper probe and target nucleic acid can be captured at the capture zone by binding of the capture moiety to the capture probe of the complex; and
 - 25 d) checking for the presence of target nucleic acid at the capture zone.

- 42 -

14. A method according to any preceding claim in which the capture probe comprises a universal capture probe hybridised to a hook capture.
15. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:
- a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; and a capture probe immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture probe being capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid;
 - b) incubating the sample solution with:
 - a detection probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid under conditions for hybridisation of the detection probe to target nucleic acid, thereby allowing direct or indirect detection of target nucleic acid utilising the detection probe; and
 - a first helper probe capable of hybridising to a third sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the second sequence, the sample solution and the first helper probe being incubated under conditions for hybridisation of the first helper probe to the third sequence;
 - c) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution so that a complex formed between the detection probe, the first helper probe and target nucleic acid can move by capillary action to the capture zone and bind to the capture zone by hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid of the complex; and
 - d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.

- 43 -

16. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:
- a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; and a capture moiety 5 immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end;
 - b) incubating the sample solution with:
 - 10 a capture probe capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid under conditions for hybridisation of the capture probe to the first sequence, the capture probe being capable of being bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the first sequence;
 - 15 a detection probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid under conditions for hybridisation of the detection probe to the second sequence, thereby allowing direct or indirect detection of target nucleic acid utilising the detection probe; and
 - 20 a first helper probe capable of hybridising to a third sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to target nucleic acid, the sample solution and the first helper probe being incubated under conditions for hybridisation of the first helper probe to the third sequence;
 - 25 c) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution so that a complex formed between the detection probe, the capture probe, the first helper probe and target nucleic acid can move by capillary action to the capture zone and bind to the capture zone by binding of the capture moiety to the capture probe of the complex; and
 - 30 d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.

- 44 -

17. A method according to claim 15 or 16 in which the third sequence is spaced upto 10 nucleotides from the second sequence.
18. A method according to claim 17 in which the third sequence is immediately adjacent the second sequence.
19. A method according to any of claims 15 to 18 in which the sample solution is incubated with a second helper probe capable of hybridising to a fourth sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to target nucleic acid, the sample solution and the second helper probe being incubated under conditions for hybridisation of the second helper probe to the fourth sequence.
20. A method according to claim 19 in which the third and fourth sequences flank the second sequence.
21. A method according to claim 20 in which the fourth sequence is spaced upto 10 nucleotides from the second sequence.
22. A method according to claim 21 in which the fourth sequence is immediately adjacent the second sequence.
23. A method according to any of claims 15 to 22 in which the capture probe comprises a universal capture probe hybridised to a hook capture probe.
24. A method according to any preceding claim in which hybridisation of the probes to target nucleic acid in the sample solution is carried out in a single step.

- 45 -

25. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:
- a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; a capture probe immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture probe being capable of hybridising to the target nucleic acid; and a helper probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the helper probe being capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid;
 - b) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution to cause sample solution to move by capillary action to the capture zone, thereby releasing helper probe from the chromatographic strip and allowing released helper probe to hybridise to target nucleic acid in the sample solution as it travels to the capture zone, so that a complex comprising target nucleic acid and helper probe can be captured at the capture zone by hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid of the complex; and
 - c) checking for the presence of target nucleic acid at the capture zone.
- 25 26. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:
- a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; a capture moiety immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end; and a capture probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the capture probe being capable of

- 46 -

hybridising to the target nucleic acid and capable of being bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the target nucleic acid;

b) incubating the sample solution with:

5 a helper probe capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to target nucleic acid, under conditions for hybridisation of the helper probe to the target nucleic acid; and

10 c) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution to cause sample solution to move by capillary action to the capture zone, thereby releasing capture probe from the chromatographic strip so that released capture probe can hybridise to target nucleic acid

15 in the sample solution as it travels to the capture zone, and so that a complex comprising target nucleic acid, capture probe and helper probe can be captured at the capture zone by binding of the capture moiety to the capture probe of the complex; and

20 d) checking for the presence of target nucleic acid at the capture zone.

27. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:

25 a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; a capture moiety immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end; a capture probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the capture probe being capable of 30 hybridising to the target nucleic acid and capable of being bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the target nucleic acid; and a helper probe

- 47 -

releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the helper probe being capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to target nucleic acid; and

5 b) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution to cause sample solution to move by capillary action to the capture zone, thereby releasing capture probe and helper probe from the chromatographic

10 strip so that released capture probe and helper probe can hybridise to target nucleic acid in the sample solution as it travels to the capture zone, and so that a complex comprising target nucleic acid, capture probe and helper probe can be captured at the capture zone by binding of the

15 capture moiety to the capture probe of the complex; and

d) checking for the presence of target nucleic acid at the capture zone.

28. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:

20 a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; a capture probe immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture probe being capable of hybridising to the target nucleic acid; and a detection

25 probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the detection probe being capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby allowing direct or indirect detection of target nucleic acid utilising the detection probe;

30 b) incubating the sample solution with:

a helper probe capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection

- 48 -

probe to the target nucleic acid, the sample solution and the helper probe being incubated under conditions for hybridisation of the helper probe to the target nucleic acid;

- 5 c) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution to cause sample solution to move by capillary action to the capture zone, thereby releasing detection probe from the chromatographic strip so that released detection probe can hybridise to target nucleic acid in the sample solution as it travels to the capture zone, and so that a complex comprising target nucleic acid, helper probe, and detection probe can be captured at the capture zone by hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid of the complex; and
- 10 d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.

- 15 29. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:
 - a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; a capture probe immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture probe being capable of hybridising to the target nucleic acid; a detection probe releasably immobilised to the chromatographic strip between 20 the contact end and the capture zone, the detection probe being capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby allowing direct or indirect detection of target nucleic acid utilising the detection probe; and a helper probe releasably immobilised to the chromatographic strip 25 between the contact end and the capture zone, the helper probe being capable of hybridising to the target nucleic acid;

- 49 -

acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the target nucleic acid; and
5 b) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution to cause sample solution to move by capillary action to the capture zone, thereby releasing helper probe and detection probe from the chromatographic strip so that released helper probe and detection probe can hybridise to target nucleic acid in the sample solution as it travels to the capture zone, and so that a complex comprising target nucleic acid, helper probe, and detection probe can be captured at the capture zone by hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid of the complex; and
10 d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.

30. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:
a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; a capture moiety immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end; and a capture probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the capture probe being capable of hybridising to the target nucleic acid and being capable of being bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the target nucleic acid;
b) incubating the sample solution with:
a detection probe capable of hybridising to the target nucleic acid thereby allowing direct or indirect detection
25 of target nucleic acid utilising the detection probe, the detection probe being incubated with the sample solution

- 50 -

- under conditions for hybridisation of the detection probe to the target nucleic acid; and
- a helper probe capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the target nucleic acid, the sample solution and the helper probe being incubated under conditions for hybridisation of the helper probe to the target nucleic acid;
- 5 c) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution to cause sample solution to move by capillary action to the capture zone thereby releasing capture probe from the chromatographic strip so that released capture probe can hybridise to target nucleic acid in the sample solution as it travels to the capture zone,
- 10 and so that a complex comprising target nucleic acid, capture probe, helper probe, and detection probe can be captured at the capture zone by binding of the capture moiety to the capture probe of the complex; and
- 15 d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.
- 20
31. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:
- a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; a capture moiety immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end; and a detection probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the detection probe being capable of hybridising to the target nucleic acid
- 25 thereby allowing direct or indirect detection of target nucleic acid utilising the detection probe;
- b) incubating the sample solution with:
- 30

- 51 -

a capture probe capable of hybridising to the target nucleic acid and capable of being bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the target nucleic acid, under conditions for hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid; and

5 a helper probe capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the target nucleic acid, under conditions for hybridisation of the helper probe to the target nucleic acid;

10 c) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution to cause sample solution to move by capillary action to the capture zone, thereby releasing detection probe from the chromatographic strip so that

15 released detection probe can hybridise to target nucleic acid in the sample solution as it travels to the capture zone, and so that a complex comprising target nucleic acid, capture probe, helper probe, and detection probe can be captured at the capture zone by binding of the capture

20 moiety to the capture probe of the complex; and

d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.

32. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:

25 a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; a capture moiety immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end; a detection probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact

30 end and the capture zone, the detection probe being capable of hybridising to the target nucleic acid thereby allowing direct or indirect detection of target nucleic acid

- 52 -

utilising the detection probe; and a helper probe releasably immobilised to the chromatographic strip, the helper probe being capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the target nucleic acid;

5 b) incubating the sample solution with:

a capture probe capable of hybridising to the target nucleic acid and capable of being bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the target nucleic acid,

10 the capture probe being incubated with the sample solution under conditions for hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid; and

a helper probe capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the target nucleic acid, the helper probe being incubated with the sample solution under conditions for hybridisation of the helper probe to the target nucleic acid;

15 c) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution to cause sample solution to move by capillary action to the capture zone, thereby releasing detection probe and helper probe from the chromatographic strip so that released detection probe and helper probe can hybridise to target nucleic acid in the sample solution as it travels to the capture zone, and so that a complex comprising target nucleic acid, capture probe, helper probe, and detection probe can be captured at the capture zone by binding of the capture moiety to the capture probe of the complex; and

20 d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.

- 53 -

33. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:
- a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; a capture moiety 5 immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end; a detection probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the detection probe being capable of hybridising to the target nucleic acid thereby allowing 10 direct or indirect detection of target nucleic acid utilising the detection probe; and a capture probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the capture probe being capable of hybridising to the target nucleic acid and 15 capable of being bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the target nucleic acid;
 - b) incubating the sample solution with a helper probe capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to 20 target nucleic acid, the helper probe being incubated with the sample solution under conditions for hybridisation of the helper probe to the target nucleic acid;
 - c) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution to cause sample solution to move by 25 capillary action to the capture zone, thereby releasing detection probe and capture probe from the chromatographic strip so that released detection probe and released capture probe can hybridise to target nucleic acid in the sample solution as it travels to the capture zone, and so that a complex comprising target nucleic acid, capture probe, helper probe, and detection probe can be captured at the 30 capture zone by binding of the capture moiety to the capture probe of the complex; and

- 54 -

d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.

34. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:

- 5 a) providing a chromatographic strip having: a contact end for contacting the sample solution; a capture moiety immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end; a detection probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the detection probe being capable of hybridising to the target nucleic acid thereby allowing direct or indirect detection of target nucleic acid utilising the detection probe; a helper probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact 10 end and the capture zone, the helper probe being capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the target nucleic acid;
- 15 and a capture probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the capture probe being capable of hybridising to the target nucleic acid and capable of being bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the target nucleic acid;
- 20 b) contacting the contact end of the chromatographic strip with the sample solution to cause sample solution to move by capillary action to the capture zone, thereby releasing detection probe, helper probe and capture probe from the chromatographic strip so that released detection probe, 25 helper probe and capture probe can hybridise to target nucleic acid in the sample solution as it travels to the capture zone, and so that a complex comprising target

- 55 -

nucleic acid, capture probe, helper probe, and detection probe can be captured at the capture zone by binding of the capture moiety to the capture probe of the complex; and
c) checking for the presence of detection probe at the
capture zone.

35. A kit for testing for the presence of a target nucleic acid in a sample solution suspected of containing target nucleic acid which comprises:
i) a dipstick comprising:
10 a chromatographic strip having a contact end for contacting the sample solution; and
a capture probe immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture probe being capable of hybridising to a first
15 sequence of the target nucleic acid;
ii) a helper probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid; and optionally
20 iii) a detection probe capable of attaching to the target nucleic acid to allow direct or indirect detection of the target nucleic acid.

36. A kit according to claim 35 in which the helper probe is releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone.

37. A kit for testing for the presence of a target nucleic acid in a sample solution suspected of containing target nucleic acid which comprises:
i) a dipstick comprising:

- 56 -

a chromatographic strip having a contact end for contacting the sample solution; and a capture probe immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture probe being capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid;
5 ii) a detection probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid to allow direct or indirect detection of the target nucleic acid; and
 iii) a helper probe capable of hybridising to a third sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the second sequence.
10

38. A kit according to claim 37 in which the detection probe is releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone.

15 39. A kit according to claim 37 in which the detection probe and the helper probe are releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone.

20 40. A kit for testing for the presence of a target nucleic acid in a sample solution suspected of containing target nucleic acid which comprises:
 i) a dipstick comprising:
 a chromatographic strip having a contact end for contacting the sample solution; and a capture moiety immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end;
 25 ii) a capture probe capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid and which can be bound by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the first sequence;
30

- 57 -

- iii) a helper probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to the first sequence; and optionally
- 5 iii) a detection probe capable of attaching to the target nucleic acid to allow direct or indirect detection of the target nucleic acid.
- 10 41. A kit according to claim 40 in which the capture probe is releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone.
- 42. A kit according to claim 40 in which the capture probe and the helper probe are releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone.
- 15 43. A kit for testing for the presence of a target nucleic acid in a sample solution suspected of containing target nucleic acid which comprises:
 - i) a dipstick comprising:
 - a chromatographic strip having a contact end for contacting
 - 20 the sample solution; and a capture moiety immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end;
 - ii) a capture probe capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid and which can be bound
 - 25 by the capture moiety when the capture probe has hybridised to the first sequence;
 - iii) a detection probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid to allow direct or indirect detection of the target nucleic acid; and

- 58 -

iv) a helper probe capable of hybridising to a third sequence of the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the second sequence.

44. A kit according to claim 43 in which the capture probe and/or the detection probe is releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone.

45. A kit according to claim 43 in which the helper probe and the detection probe, and optionally the capture probe, are releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone.

46. A chromatographic strip for testing for the presence of a target nucleic acid in a sample solution which comprises: a contact end for contacting the sample solution; a capture probe immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture probe being capable of hybridising to the target nucleic acid; and a helper probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the helper probe being capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid.

47. A chromatographic strip for testing for the presence of a target nucleic acid in a sample solution which comprises: a contact end for contacting the sample solution; a capture probe immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture probe being capable of hybridising to the target nucleic acid; and a helper probe releasably immobilised to the chromatographic

- 59 -

strip between the contact end and the capture zone, the helper probe being capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of a detection probe to the target nucleic acid.

5 48. A chromatographic strip for testing for the presence of a target nucleic acid in a sample solution which comprises: a contact end for contacting the sample solution; a capture moiety immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture moiety being capable of binding a capture probe hybridised to the target nucleic acid; a capture probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the capture probe being capable of hybridising 10 to the target nucleic acid; and optionally a helper probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the helper probe being capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid.

49. A chromatographic strip for testing for the presence of a target nucleic acid in a sample solution which comprises: a contact end for contacting the sample solution; a capture moiety immobilised at a capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end, the capture moiety being capable of binding a capture probe hybridised to the target nucleic acid; a detection probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the detection probe being capable of hybridising to the target nucleic acid thereby allowing

- 60 -

direct or indirect detection of target nucleic acid utilising the detection probe; and optionally:

- 5 i) a capture probe releasably immobilised to the chromatographic strip between the contact end and the capture zone, the capture probe being capable of hybridising to the target nucleic acid and capable of being bound by the capture moiety; and/or
- 10 ii) a helper probe capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the target nucleic acid.

50. Use of a helper probe in a dipstick assay to test for the presence of target nucleic acid in a sample solution.

51. Use according to claim 50 in which the helper probe enhances hybridisation of a capture probe or a detection probe to the target nucleic acid.

52. A substantially isolated nucleic acid molecule or nucleic acid analogue having a sequence corresponding to the sequence of any of SEQ ID NOS: 1-18.

53. Use of a substantially isolated nucleic acid molecule or nucleic acid analogue according to claim 52 as a helper probe to enhance detection of CT target nucleic acid in a test for the presence of CT target nucleic acid in a sample solution.

54. Use of a kit or chromatographic strip according to any of claims 35 to 49 to test for the presence of a target nucleic acid in a sample solution.

WO 02/04668

1/7

PCT/GB01/03024

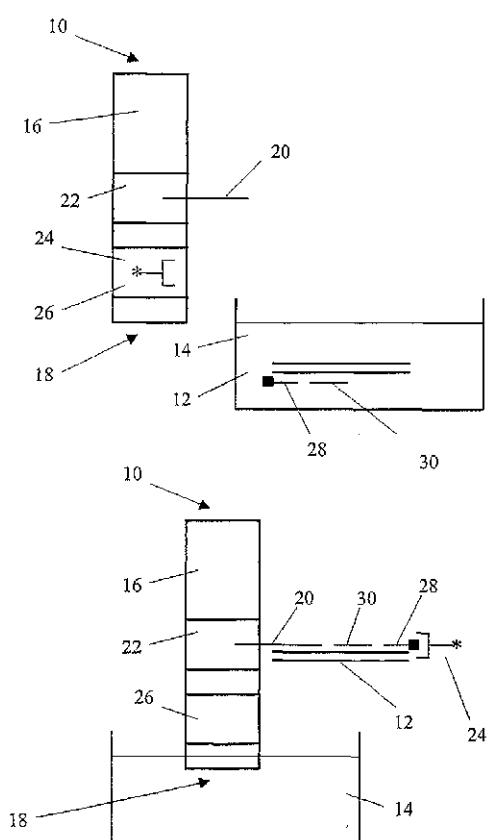


Figure 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Figure 2

HP SEQ ID No 1: 5' GAT AAA ATC CCT TTA CCC ATG AAA
HP SEQ ID No 1: 5' CTT GCT GCA AAG ATA AAA TCC CTT
HP SEQ ID No 2: 5' TAA AAT GTC CTG ATT AGT GAA ATA AT
HP SEQ ID No 3: 5' TCG GTA TTT TTT TAT ATA AAC ATG AAA A
HP SEQ ID No 4: 5' TGC AAG ATA TCG AGT ATG CGT TGT TA
HP SEQ ID No 5: 5' AAA GGG AAA ACT CTT GCA GA
HP SEQ ID No 6: 5' TCT TTT CTA AAG ACA AAA AAG ATC CTC GAT

SEQ ID No 7: 5' CTT GCT GCT CGA ACT TGT TTA GTA C
SEQ ID No 8: 5' AGA AGT CTT GGC AGA GGA AAC TTT T
SEQ ID No 9: 5' CTA GAA TTA GAT TAT GAT TTA AAA GGG
SEQ ID No 10: 5' TTC ATA TCC AAG GAC AAT AGA CCA A
SEQ ID No 11: 5' TGA TCT ACA AGT ATG TTT GTT GAG T
SEQ ID No 12: 5' TGC ATA ATA ACT TCG AAT AAG GAG AAG
SEQ ID No 13: 5' TCC CTC GTG ATA TAA CCT ATC CG
SEQ ID No 14: 5' CAG GTT GTT AAC AGG ATA GCA CGC
SEQ ID No 15: 5' CTC GTT CCG AAA TAG AAA ATC GCA
SEQ ID No 16: 5' GGT AAA GCT CTG ATA TTT GAA GAC
SEQ ID No 17: 5' CTG AGG CAG CTT GCT AAT TAT GAG T
SEQ ID No 18: 5' GTT GGG AAA AAT AGA CAT GGA TCG G

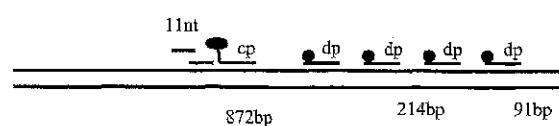
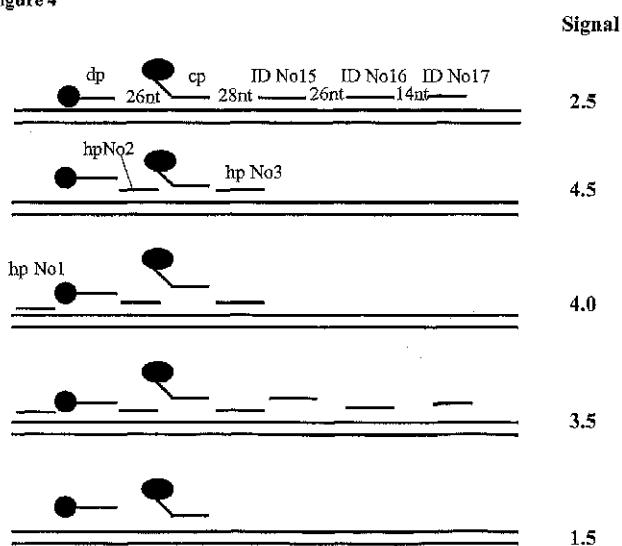
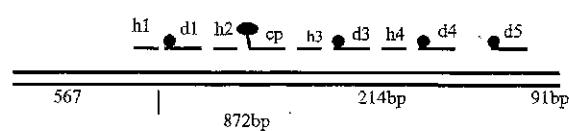
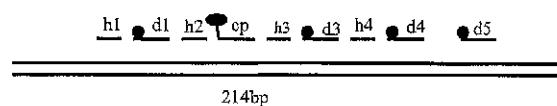
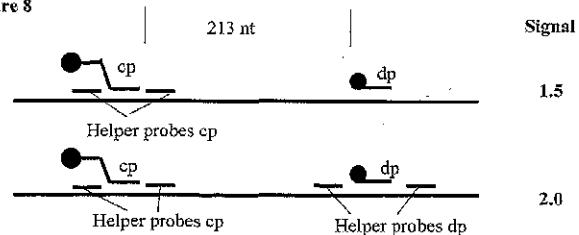
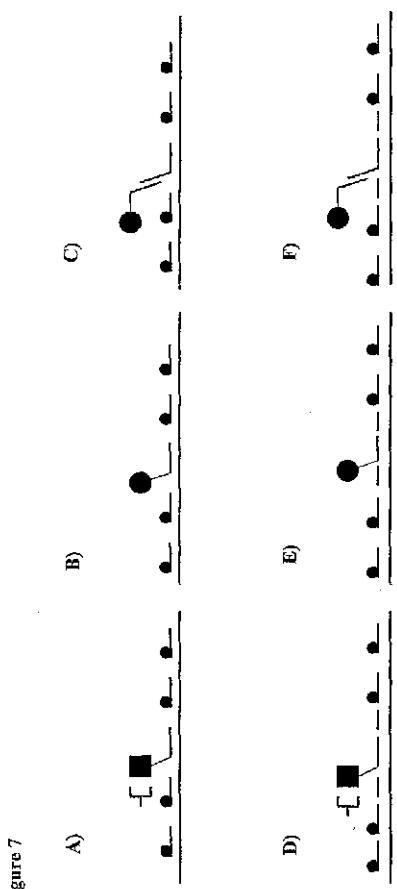
Figure 3**Figure 4**

Figure 5**Figure 6****Figure 8**



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

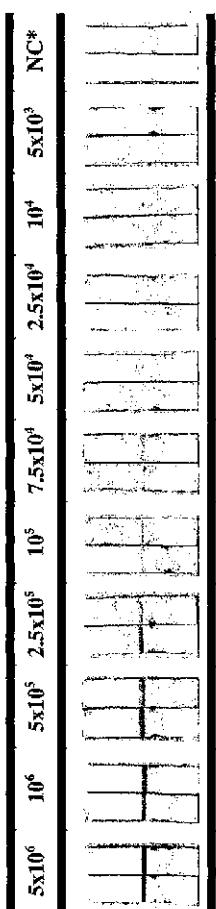


Figure 9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Figure 10

No EB*	5x10 ⁶	10 ⁶	5x10 ⁵	2.5x10 ⁵	10 ⁵	7.5x10 ⁴	5x10 ⁴	2.5x10 ⁴	10 ⁴	5x10 ³	NC**
Time first signal	2.20*	2.50*	3.30*	4.30*	5.35*	8.10*	8.45*	14.05*	24*	-	-
Signal at 10 ⁵	4	3	2.5	2	1.5	1	1	0.5	0	0	0
Signal at 20 ⁵	5	4	3.5	3	2.5	2	1.5	1	0.25	0	0
Signal at 30 ⁵	5	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0	0
Signal at 1 h	5	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.0	0.5	0	0

*Number elementary bodies (EB) of *Calymydia trachomatis*

**NC: Negative control

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 January 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/004668 A3(51) International Patent Classification⁵:
G01N 3/090

C12Q 1/68.

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DINEVA, Magda,

(21) International Application Number: PCT/GB01/03024

Anastassova (BG/GB); 02 Grescote Road, Cambridge

(22) International Filing Date: 6 July 2001 (06.07.2001)

CB1 3DS (GB); HAZELWOOD, Shaun, Christopher

(25) Filing Language: English

(GB/GB); 26 Barton Grove, Kedington, Haverhill, Suffolk

(26) Publication Language: English

CB9 7PT (GB).

(30) Priority Data:
0016813.6 7 July 2000 (07.07.2000) GB

(74) Agent: DAVIES, Jonathan, Mark, Reddie & Grose, 15

(71) Applicant and

Thresholds Road, London WC1X 8PL (GB).

(72) Inventor: LEE, Helen (FR/GB); University of Cam-

bridge, Department of Haematology - Diagnostic De-

velopment, Bas Anglia Blood Centre Site, Long Road,

Cambridge CB2 2PT (GB).

(81) Designated States (initially): AE, AG, AL, AM, AT, AU,

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, DZ, CA, CH, CX, CO, CR, CU,

CY, DE, DK, DM, DZ, EC, EH, ES, FI, GH, GI, GE, GH,

GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, ME, MN, MW,

MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SL, SK,

SL, TM, TR, TZ, CA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,

ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GII, GM,

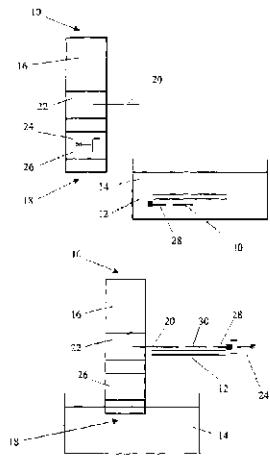
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian

{Continued on next page}

(54) Title: IMPROVED CAPTURE AND DETECTION OF TARGET NUCLEIC ACID IN DIPSTICK ASSAYS



WO 02/004668 A3



WO 02/004668 A3



patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AL, BI, CH, CY, DL, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR); OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GW, ML, MR, KE, SN, TD, TG);

Published:
with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
6 February 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidelines Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/GB 01/03024
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 C12Q1/68 GOIN30/90		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum document searched (Classification system, followed by classification symbols) IPC 7 C12Q GOIN		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of its relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 318 650 A (MCMAHON MICHAEL E ET AL) 18 May 1994 (1994-05-18) cited in the application abstract column 10, line 62 -column 11, line 8 column 11, line 65 -column 12, line 68; claims 1,7,18; figures 1-3; example 5	48,49,54
Y	EP 0 318 245 A (ML TECHNOLOGY VENTURES) 31 May 1989 (1989-05-31)	1-8, 10-22, 24-51,54
* see especially the claims * the whole document		
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
"A" document relating the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"B" earlier document but published on or after the International filing date		
"C" document which may disclose an priority, claiming or which is related to or enables the publication of another invention or other specific reader (as specified)		
"D" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other event published prior to the International filing date but later than the priority date claimed		
"E" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
"F" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
"G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents or is taken in conjunction with the prior art		
"H" document which discloses an invention similar to the invention in the patent family		
Date of the actual conclusion of the International search		Date of mailing of the International search report
30 September 2002		15.11.2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office P.O. Box 8043 Patentanlagen 2 D-2233 MV-Hamburg Tel. (031-70) 340-2040, fax 31 651 400 41 Fax: (031-70) 340-2016		Authorized Officer Knehr, H

to PCTISA21 (Form sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 01/03024

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 27681 A (DU PONT) 12 October 1995 (1995-10-12) abstract page 6, line 19 - page 7, line 14 page 11, line 24 - page 12, line 27 page 49, line 14 - line 25 page 56, line 1 - line 13; claims 1-10; figures 1-3 ---	1-51,54
Y	WO 00 09756 A (PERKIN ELMER CORP) 24 February 2000 (2000-02-24) abstract; figures 2,5 ---	1,9,12, 14-16,23
A	WO 94 29696 A (QUIDEL CORP) 22 December 1994 (1994-12-22) abstract; claims 1-34; figure 1 ---	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/GB 01/03024
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 5.4(a). 		
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p style="text-align: center;">see additional sheet</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without other justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.: <p style="text-align: center;">claims 1-51, 54</p>		
<p>Remark on Protest</p> <p style="text-align: center;">[] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p style="text-align: center;">[] No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>		

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1990)

International Application No. PCT/GB 01/03024

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-51, 54

Methods for testing for the presence of target nucleic acid in a sample, kits and chromatographic strips suitable for such methods, use of a helper probe in a dipstick assay testing for such target nucleic acid, as well as use of such kits or chromatographic strips for testing for such target nucleic acid.

Invention 2: Claims 52-53

Invention 2:
Isolated nucleic acid molecule having a sequence corresponding to any of SEQ ID NOS:1-18, as well as the use of such a nucleic acid molecule as helper probe.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			
Information on patent family members			
		International Application No. PCT/GB 01/03024	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5310650	A 10-05-1994	US 4960691 A AT 157404 T AU 636875 B2 AU 5119690 A CA 2012355 A1 DE 69011318 D1 EP 0387696 A2 JP 2283299 A AT 85130 T AU 598671 B2 AU 7903187 A CA 1303493 A1 DE 3783845 D1 DE 3783845 T2 EP 0252328 A2 ES 2038973 T3 JP 2086308 C JP 7036017 B JP 63096559 A	02-10-1990 15-05-1997 13-05-1993 20-09-1990 17-09-1990 02-10-1997 19-09-1998 20-11-1990 15-02-1993 05-07-1990 31-03-1988 16-06-1992 11-03-1993 09-06-1993 06-04-1988 16-08-1993 22-08-1996 19-04-1995 27-04-1988
EP 0318245	A 31-05-1989	US 5030557 A AT 106947 T AU 2611288 A AU 613988 B2 CA 1319336 A1 DE 3850055 D1 DE 3850055 T2 DK 361289 A EP 0318245 A2 ES 2056115 T3 FI 893526 A JP 2582250 T JP 2820749 B2 KR 9615893 B1 NO 892990 A PT 89050 A, B WO 8904876 A1	09-07-1991 15-06-1994 14-06-1989 15-08-1991 22-06-1993 14-07-1994 29-09-1994 20-09-1989 31-05-1989 01-10-1994 21-07-1989 26-07-1990 05-11-1998 23-11-1996 13-09-1989 01-12-1988 01-06-1989
WO 9527081	A 12-10-1995	WO 9527081 A1 US 6837127 A	12-10-1995 14-03-2000
WO 0009756	A 24-02-2000	US 6232067 B1 AU 5560199 A WO 0009756 A1 US 6258539 B1	15-05-2001 06-03-2000 24-02-2000 16-07-2001
WO 9429696	A 22-12-1994	EP 0795426 A1 JP 8511621 T WO 9429696 A1	19-04-1996 03-12-1996 22-12-1994

Form PCT/ISA/210 (patent family format) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 01 N 33/569	G 01 N 33/569	Z
G 01 N 33/571	G 01 N 33/571	

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,S,D,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74) 代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(74) 代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72) 発明者 リー, エレン

イギリス国, ケンブリッジ シービー 2 2 ピー・ティー, ロング ロード, イースト アングリア
ブラッド センター サイト, デパートメント オブ ヒーマトロジー - ダイアグノスティック
ディベロップメント, ユニバーシティ オブ ケンブリッジ

(72) 発明者 ディネバ, マグダ アナスタソバ

イギリス国, ケンブリッジ シービー 1 8 ディーエス, グレイストーク ロード 62

(72) 発明者 ヘイズルウッド, ショーン クリストファー

イギリス国, サフォーク シービー 9 7 ピー・ティー, ヘイバーヒル, ケディントン, パートン
グローブ 26

F ターム(参考) 4B024 AA13 AA19 CA01 CA09 CA11 HA13 HA14 HA20

4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC01 CC02 CC03 CC10 FA12 FA15

4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ06 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR39

QR55 QR56 QR84 QS17 QS34 QS35 QS39 QX02