

(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.<sup>7</sup>

C 1 2 N 15/09

C 1 2 M 1/00

C 1 2 Q 1/68

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/543

F I

C 1 2 N 15/00

C 1 2 M 1/00

C 1 2 Q 1/68

G O 1 N 33/53

G O 1 N 33/543 5 2 1

Z N A A

A

A

M

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 2 9

4 B O 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) 国際出願番号 PCT/GB2001/003024

(87) 国際公開番号 W02002/004668

(87) 国際公開日 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 ビーティー, ロング ロード, イースト

アングリア プラッド センター サイト

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 敬

(74) 代理人 100092624

弁理士 鶴田 準一

(74) 代理人 100108903

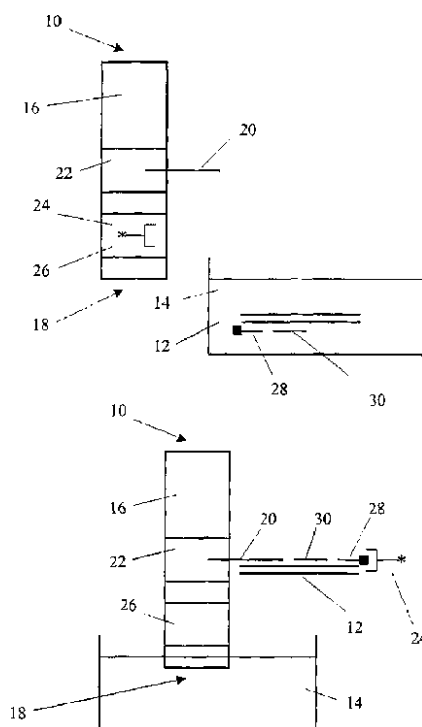
弁理士 中村 和広

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プ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プ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プローブを用いて、捕捉帯で標的核酸を検出し得る。ヘルパープローブは、捕捉および/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。

10

20

## 【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。

30

40

## 【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】

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接触される）、

c) 捕捉プローブ、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】

捕捉プローブが、フック捕捉とハイブリダイズされる普遍捕捉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 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

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 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）、

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

40

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】

標的核酸を含有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

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プローブ、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 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プローブ

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 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プローブ、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 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 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：

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。 10

#### 【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ーマクラミジア *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を要する。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 , 3 1 0 , 6 5 0 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。

10

【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帯で捕捉され得る。

20

【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。

30

【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。

40

【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

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

ii) 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

iii) 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

ii) 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

iii) 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

iv) 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トタビジン、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】

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、単一プローブまたは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。

【0025】

あるいは検出プローブは、非共有相互作用により、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。

20

【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、またはストレプト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（例えば抗フルオレ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。

30

【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

10

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

20

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

ii) 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

30

iii) 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、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】

40

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

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

10

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部分を有するストリップ

20

を含むディップスティック

ii) 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

iii) 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

iv) 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。

30

#### 【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トタビジン、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】

40

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

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。

【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。

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。

【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。

【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

ルパープローブは、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的に固定され得る。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。

10

【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プローブ溶液と接触させて、それにより、ヘルパ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プローブ溶液中に存在しない場合、これはヘルパープローブ後に捕捉帯と接触される必要がある。

20

【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、単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。

30

【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単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。

40

【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単一段階で実行され、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

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 】

C T は、性感染症の最も一般的な原因の 1 つである。C T 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、C T 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 1 0 %、および感染女性の約 7 0 % が C T 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、C T 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 1 0 を用いて、試料溶液 1 4 中の二本鎖 C T 標的核酸 1 2 を検出しようと試みた。ディップスティック 1 0 は、試料溶液 1 4 を接触するための接触端 1 8 を有するニトロセルロースのストリップ 1 6、ならびに接触端 1 8 から遠く離れたニトロセルロースストリップ 1 6 の捕捉帯 2 2 に固定された捕捉プローブ 2 0 を包含する。抗ビオチン抗体染料接合体 2 4 は、接触端 1 8 と捕捉帯 2 2 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 2 6 で放出可能的に固定される。捕捉プローブ 2 0 は、標的核酸 1 2 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 1 2 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 2 8 およびヘルパープローブ 3 0 は次に、試料溶液 1 4 に付加される。検出プローブ 2 8 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 2 8 およびヘルパープローブ 3 0 を含む試料溶液 1 4 は次に、少なくとも検出プローブ 2 8 およびヘルパープローブ 3 0 が結合する一次鎖の領域で互いから二本鎖標的核酸 1 2 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 2 8 およびヘルパープローブ 3 0 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パ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 2 8 およびヘルパープローブ 3 0 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 1 0 の接触端 1 8 は次に、試料溶液 1 4 と接触される。試料溶液 1 4、ならびに検出プローブ 2 8 およびヘルパープローブ 3 0 とハイブリダイズされた任意の標的核酸 1 2 は、毛管作用によりディップスティック 1 0 を上昇する。試料溶液 1 4 が接合体帯 2 6 を通過すると、それは抗ビオチン抗体 - 染料接合体 2 4 を流動化する。放出された抗ビオチン抗体 - 染料接合体 2 4 は次に、標的核酸 1 2 とハイブリダイズした検出プローブ 2 8 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 2 4、検出プローブ 2 8、ヘルパープローブ 3 0 および標的核酸 1 2 間に形成される複合体は次に、ディップスティック 1 0 を上昇して捕捉帯 2 2 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を通して移動すると、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、捕捉帯での抗ピオチン抗体-染料接合体の染料の存在により検出され得る。

#### 【0066】

試料溶液中にCT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CT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

#### 【0067】

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行われる。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。

#### 【0068】

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DNP）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

#### 【0069】

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（抗ピオチン抗体-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、捕捉帯での抗ピオチン抗体-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むしろ、試料溶液中で起こる。

30

#### 【0070】

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。

#### 【0071】

#### 実施例1

#### 実験設定

捕捉フォーマット：直接プローブ捕捉（cp）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（dp）（ $10^{12}$ コピーでピ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ピオチン抗体接合体を含む）；

標的DNA：872 bp DNA（ $10^{11} \sim 10^9$ コピー）。

ヘルパープローブ：HP配列番号1'（24 mer、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HP配列番号1（24 mer、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

( $10^{12}$  コピー)。

【0072】

【表1】

## 結果

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

10

【0073】

## 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HP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HP配列番号1'より強いヘルパー作用を有する。HP配列番号1は、HP配列番号1'より2%高いTm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、TmおよびG+C含量より重要であると考えられる。

20

【0074】

## 実施例2

### 実験設定

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

30

検出フォーマット：検出プローブ (dp) ( $10^{12}$  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)；

標的DNA：416 bp DNA ( $5 \times 10^{10}$  コピー)。

ヘルパープローブ：HP配列番号1'、HP配列番号2、HP配列番号3、配列番号15、配列番号16および配列番号17の組合せ ( $10^{12}$  コピー)。

【0075】

## 結果

図4参照。

【0076】

40

## 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はるかに強い (シグナル2.5と比較してシグナル4.5)。

【0077】

## 実施例3

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 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（ $10^{12}$  コピーでビオチンに結合された配列番号 1 3（d 1）、1 5（d 3）、1 6（d 4）または 1 7（d 5）の核酸、ならびに抗ビオチン抗体接合体を含む）；

標的 DNA：8 7 2 b p DNA（ $10^{10}$  コピー）。

ヘルパープローブ：ヘルパープローブ h 1 = H P 配列番号 1、h 2 = H P 配列番号 2、h 3 = H P 配列番号 3、h 4 = H P 配列番号 4 の組合せ（ $10^{12}$  または  $10^{13}$  コピー）

10

【 0 0 7 8 】

【 表 2 】

結果

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

20

【 0 0 7 9 】

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（h 2 および h 3）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（ $10^{12}$  コピーと比較して  $10^{13}$  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。

30

【 0 0 8 0 】

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 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（ $10^{12}$  コピーでビオチンに結合された配列番号 1 3（d 1）、1 5（d 3）、1 6（d 4）または 1 7（d 5）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 h 1 = H P 配列番号 1、h 2 = H P 配列番号 2、h 3 = H P 配列番号 3、h 4 = H P 配列番号 4 の組合せ（ $10^{12}$  または  $10^{13}$  コピー）

40

標的：環状二本鎖 DNA プラスミド p C T L 1 5 B（5 . 1 K b p）および p C T L 1 3 1（6 . 3 K b p）、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 p C T L 1 3 0、ならびに陽性対照として作用するための  $10^{11}$  コピーでの二本鎖線状 DNA（8 7 2 b p）。

【 0 0 8 1 】

【 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（5 Kbp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（5.1 Kbpまたは6.3 Kbp）の検出感度は、線状二本鎖872 bp DNA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 1 5

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 1 5（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 1 5）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）；
- 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 1 5の核酸を含む捕捉プローブ。

40

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 1 3、1 4、1 6または1 7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（ $10^{1-2}$  コピー）。

標的：872 bp DNA（ $10^{1-1} \sim 10^8$  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 1 0）（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）（ $10^{12}$  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）；

ヘルパープローブ：配列番号 1 0 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 1 3 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（ $10^{12}$  コピー）。

標的：8 7 2 b p D N A（ $5 \times 10^{10}$  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 2 0 0 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 1 5 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 1 5 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 1 8 または 1 3 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  $10^{12}$  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（ $10^{12}$  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  $\times 10^7$  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	あり	なし	あり	なし
シグナル	4.0	2.5	1.5	0.5

10

### 実施例 7 からの結論

直接プローブ捕捉または抗体捕捉を用いた 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、捕捉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、捕捉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出

実験設定：

試薬：

捕捉フォーマット： B S A 担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捉；

検出フォーマット： 多ピオチン標識化検出体プローブ；

30

抗ピオチン抗体 - 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 /  $\mu\text{l}$  ~  $10^3$  コピー /  $\mu\text{l}$  の濃度で調製し、 100 で 20 分間加熱した。

【 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。

方法：

検出プローブ、ヘルパープローブおよび  $5 \times 10^6$  ~  $5 \times 10^3$  コピーの E B を 80  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  の抗ピオチン A b コロイド金と混合した。全 100  $\mu\text{l}$  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。

40

【 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出を用いて C t E B の約  $10^4$  コピーが検出され得たことを示す。

【 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

50

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。

【 0 0 9 4 】

例えば P C T W O 9 3 / 1 3 2 2 に開示された C t 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った。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って、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。

【 0 0 9 5 】

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。

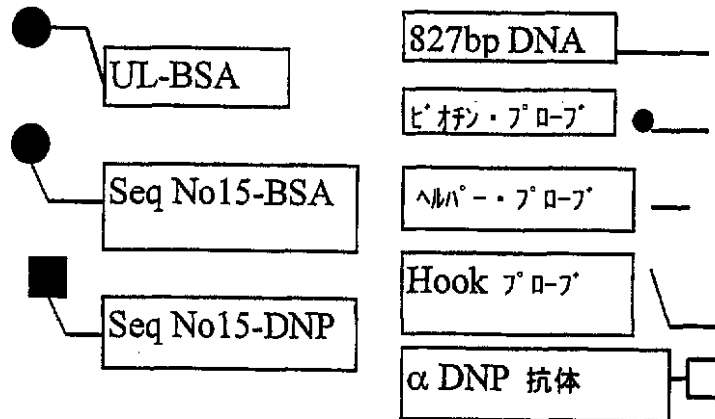
【 0 0 9 6 】

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

	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)

30

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

EB 数*	5x10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>	2.5x10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	7.5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>	2.5x10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>3</sup>	NC**
初期 シグナル	2.20'	2.50'	3.30'	4.30'	5.35'	8.10'	8.45'	14.05'	24'	-	-
10'に於ける シグナル	4	3	2.5	2	1.5	1	1	0.5	0	0	0
20'に於ける シグナル	5	4	3.5	3	2.5	2	1.5	1	0.25	0	0
30'に於ける シグナル	5	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0	0
1hに於ける シグナル	5	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.0	0.5	0	0

\*Chlamydia trachomatis の基本小体 (EB) 数

\*\*NC: 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 Classification: C12Q 1/68,  
G01N 30/89

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

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

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

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

(71) Applicant and  
(72) Inventor: LEE, Helen [GB/GB], University of Cambridge, Department of Haematology - Diagnostic Development, East Anglia Blood Centre Site, Long Road, Cambridge CB2 2PT (GB).(73) Inventors and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): DINEVA, Magda,

Anastassova [BG/GB], 62 Greystoke Road, Cambridge CB1 8DS (GB); HAZELWOOD, Shann, Christopher [GB/GB], 26 Barton Grove, Kedington, Haverhill, Suffolk CB9 7PT (GB).

(74) Agent: DAVIES, Jonathan, Mark; Reidd &amp; Crose, 16 Thobalds Road, London WC1X 8PL (GB).

(81) Designated States (national): 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, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, GU, IL, IN, IT, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

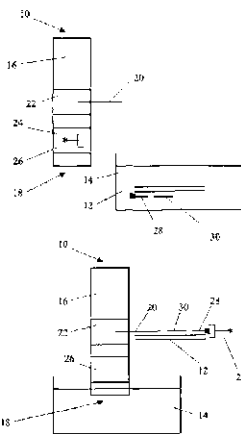
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GL, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, UG, UZ, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,

[Continued on next page]

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



WO 02/04668 A2



(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 contacted with the contact end of the dipstick to cause the sample solution to be contacted with the contact 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



IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR, OAPI patent (BF, BJ, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, 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



WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 1 -

Improved Capture and Detection of Target Nucleic Acid in  
Dipstick Assays

5 The present invention relates to methods for improved  
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.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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 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 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 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. 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 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 DNA detection probe is not immobilised on the nitrocellulose filter. Instead the detection probe is added to the sample

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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 nucleic acid by conventional dipsticks can be particularly  
15 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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 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 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 incubated under conditions for hybridisation of the first helper probe to target nucleic acid;
- 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 target nucleic acid of the complex; and
- d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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 dipetick 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  
10 capture probe being capable of hybridising to a first sequence of the target nucleic acid;
- 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  
15 acid; and optionally
- 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  
20 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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 (c).

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  
10 probe being capable of hybridising to the first sequence of 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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

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;

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

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

According to the second aspect of the invention there is 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 capture zone of the chromatographic strip remote from the contact end;

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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

30   invention should be in a different region of the target



WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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.

The detection probe of the first and second aspects of the invention may be a label which covalently attaches to the  
25 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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  
5 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  
15 capture probe to the target nucleic acid of the complex; and  
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  
20 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 probe immobilised at a  
25 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;  
ii) a detection probe capable of hybridising to a second sequence of the target nucleic acid to allow direct or  
30 indirect detection of the target nucleic acid; and

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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.

5 The capture probe of the third 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.

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:
- 20 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;
- 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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  
10 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 fourth aspect of the invention there is  
15 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:

- 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  
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.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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  
5 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  
10 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  
15 nucleotides apart.  
20

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  
25 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.



WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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.

5 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.

10 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.

15 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  
20 significant secondary structure in the region of the target nucleic acid to which the capture/detection probe binds.

25 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.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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  
5 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,  
10 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 DMP) 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.



WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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  
5 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  
10 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  
15 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  
20 nucleotides.

#### Example 1

##### Experimental setup

Capture format: direct probe capture (cp) Seq ID No 13 immobilised on dipstick;  
25 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.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 26 -

Helper probes: HP SEQ ID No 1' (24 mer, G+C= 9 nucleotides, T<sub>m</sub>= 72.2°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<sub>m</sub>= 70.5°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<sup>12</sup> copies.

#### Results

	10 <sup>11</sup>	10 <sup>10</sup>	5x10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>
Target copies	10 <sup>11</sup>	10 <sup>10</sup>	5x10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>
Control (no helper)	2.5	0.0	0.0	0.0
HP SEQ ID No1'	3.0	1.0	0.0	0.0
HP SEQ ID No1	5.0	3.5	2.5	0.0

#### Conclusions

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, 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<sub>m</sub> than HP SEQ ID NO: 1'. However, the distance between the capture probe and the helper probe is thought to be more important than the T<sub>m</sub> and G+C content.

#### Example 2

#### Experimental setup

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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  
5 anti-biotin antibody-dye conjugate;

Target DNA: 416 bp DNA at  $5 \times 10^{10}$  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  
15 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  
20 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  
25 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);

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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 No1, 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

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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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 No1, h2 = HP SEQ ID No 2, h3 = HP SEQ ID No 3, h4 = HP SEQ ID No 4, at  $10^{11}$  or  $10^{10}$  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 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.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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, 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 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 double stranded compared to single stranded target nucleic acid.

#### Example 5

##### Experimental setup

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 immobilised on the dipstick hybridised to a hook probe with sequence complementary 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 15 coupled to DNP and hybridised to the target nucleic acid in the sample solution;

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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

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;

Detection format: detection probe (dp) comprising nucleic acid of Seq ID No 13 coupled to biotin at  $10^{12}$  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 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  $10^{14}$  copies;

Target: 872 bp DNA at  $5 \times 10^{16}$  copies.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 32 -

Results

See Figure 8.

Conclusion

5 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 7Effect of helper probes on CT detectionExperimental 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 ( $\alpha$ -DNP capture) immobilised to the dipstick membrane; capture probe

20 comprising nucleic acid of SEQ ID No 15 coupled to DNP.  
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.  $10^{12}$  copies of the detection probes;

25 Helper probes: HP SEQ ID No 3 and ZP 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  $2.4 \times 10^7$  copies/test.



WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 33 -

Results

Capture:	Direct Probe		Ab Capture	
	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.

10 Use of helper probes in accordance with the invention 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.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 34 -

Example 8One-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) cells were prepared in concentrations from  $10^4$  copies/ $\mu$ l to  $10^3$  copies/ $\mu$ l in PBS buffer and heated at  $100^\circ\text{C}$  for 20 minutes;Hybridisation/dipstick running buffer: Standard

15 hybridisation buffer comprising salt, detergent and a blocking protein such as BSA or powdered milk.

Method:20 The detection probe, helper probe and  $5 \times 10^4$  -  $5 \times 10^3$  copies of EB diluted in hybridisation buffer made up to 80  $\mu$ l and heated at  $100^\circ\text{C}$  for 7 minutes. The mixture was then centrifuged briefly to collect all the liquid and mixed with 20  $\mu$ l anti-biotin Ab colloidal gold. The whole 100 $\mu$ l mixture were wicked up on dipstick and let to develop a signal.25 Results and DiscussionThe results presented in the Table below and Figure 9 (see the attached power point document) show that about  $10^4$  copies of Ct EB could be detected with one step nucleic acid dipstick assay in less than an hour including the sample preparation step.  
30

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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.

20

WO 02/04668

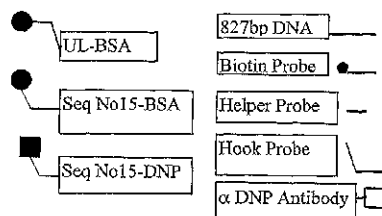
PCT/GB01/03024

- 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*

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 37 -

Claims

1. 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 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
- 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, the sample solution and the first helper probe being incubated under conditions for hybridisation of the first helper probe to the second sequence;
- 20 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
- 25 d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.
- 30 2. A method for testing for the presence of target nucleic acid in a sample solution which comprises:

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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
- 10 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
- 15 capture moiety when the capture probe has hybridised to the first sequence; 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,
- 20 the sample solution and the first helper probe being 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
- 25 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
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.
- 10
6. A method according to claim 5 in which the second and third sequences flank the first sequence.
- 15
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.
- 20
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.
- 25

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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:

- 15 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 the target nucleic acid;
- 20 b) contacting the sample solution with 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 being contacted with the helper probe under conditions for hybridisation of the helper probe to the target nucleic acid;
- 25 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 helper probe and target nucleic acid can be captured at the capture zone by hybridisation of the  
30 capture probe to the target nucleic acid of the complex; and



WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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.

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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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:

a) providing a chromatographic strip having: a contact end  
25 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

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

10       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 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;

25       b) incubating the sample solution with:

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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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 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 between the contact end and the capture zone, the helper probe being capable of hybridising to the target nucleic acid
- 20
- 25
- 30



WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 49 -

acid and thereby enhancing hybridisation of the detection probe to the target nucleic acid; and

- 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
- 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 of target nucleic acid utilising the detection probe, the detection probe being incubated with the sample solution

under conditions for hybridisation of the detection probe to the target nucleic acid; and

9

10

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; 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 thereby allowing direct or indirect detection of target nucleic acid utilising the detection probe;

b) incubating the sample solution with:

b) incubating the sample solution with:

30

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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 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 moiety to the capture probe of the complex; and

20 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 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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
- 15     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;
- c) contacting the contact end of the chromatographic strip
- 20     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
- 25     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
- 30     d) checking for the presence of detection probe at the capture zone.

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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 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; 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;
- 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 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 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 capture zone by binding of the capture moiety to the capture probe of the complex; and

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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  
10 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  
15 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;
- and a capture probe releasably immobilised to the  
20 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;
- 25 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,  
30 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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:

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;

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

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:

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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

10    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.

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.

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:

20    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



WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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.

41. A kit according to claim 40 in which the capture probe is releasably immobilised to the chromatographic strip  
10   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:

20   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;

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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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.

5 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.

10 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.

15 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  
20 helper probe being capable of hybridising to the target nucleic acid and thereby enhancing hybridisation of the capture probe to the target nucleic acid.

25 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

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 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  
10 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  
15 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  
20 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  
25 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  
30 capture zone, the detection probe being capable of hybridising to the target nucleic acid thereby allowing

WO 02/04668

PCT/GB01/03024

- 60 -

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

- 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
- 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

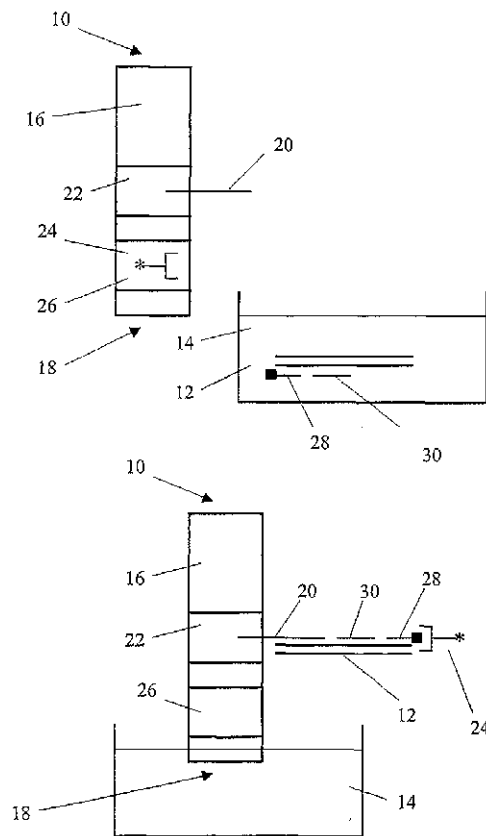


Figure 1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04668

2/7

PCT/GB01/03024

**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

WO 02/04668

3/7

PCT/GB01/03024

Figure 3

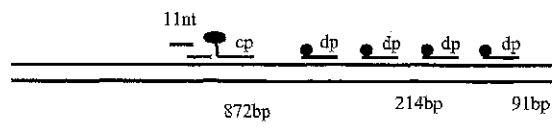
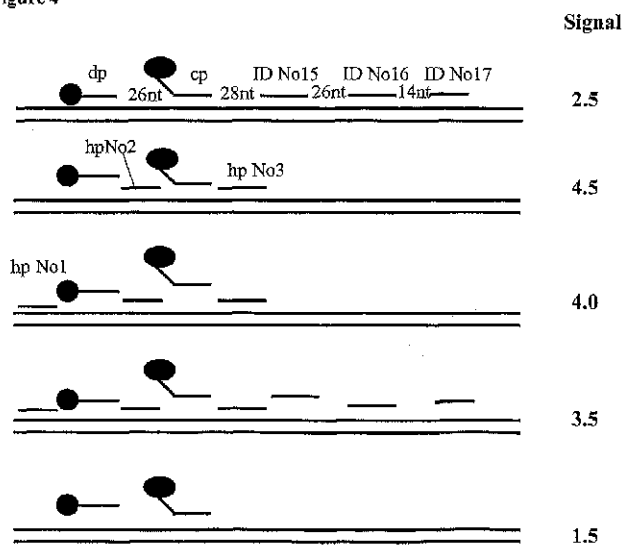


Figure 4



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04668

4/7

PCT/GB01/03024

Figure 5

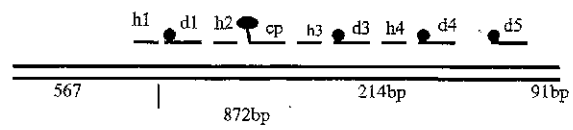


Figure 6

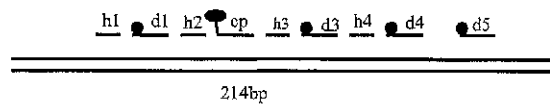
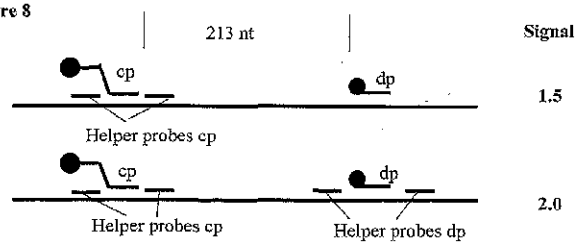


Figure 8



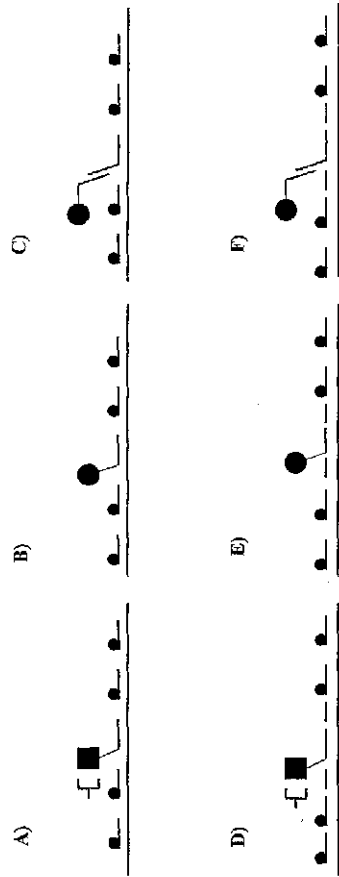


WO 02/04668

5/7

PCT/GB01/03024

Figure 7



WO 02/04668

6/7

PCT/GB01/03024

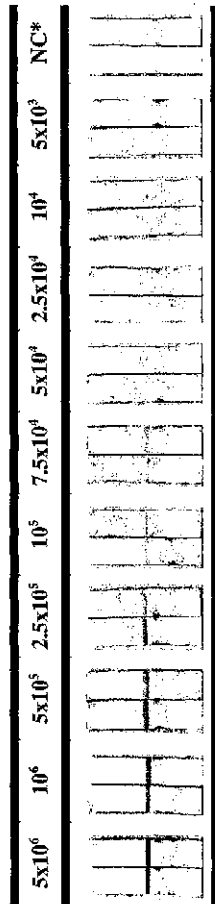


Figure 9

WO 02/04668

7/7

PCT/GB01/03024

Figure 10

No EB*	5x10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>	2.5x10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	7.5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>	2.5x10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>3</sup>	NC**
Time first signal	2.20'	2.50'	3.30'	4.30'	5.35'	8.10'	8.45'	14.05'	24'	-	-
Signal at 10'	4	3	2.5	2	1.5	1	1	0.5	0	0	0
Signal at 20'	5	4	3.5	3	2.5	2	1.5	1	0.25	0	0
Signal at 30'	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 *Chlamydia 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

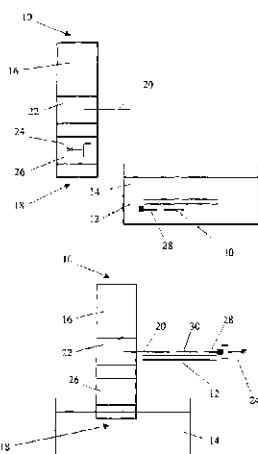
- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68, G01N 30/90 (72) Inventors: and  
(75) Inventors/Applicants *for (S only)*: DINEVA, Magda, Anastassova [BG/GB]; 62 Greylock Road, Cambridge CB1 8DS (GB); HAZELWOOD, Shaun, Christopher [GB/GB]; 26 Barton Grove, Kedington, Haverhill, Suffolk CB9 7PT (GB).
- (21) International Application Number: PCT/GB01/03024
- (22) International Filing Date: 6 July 2001 (06.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0016813.6 7 July 2000 (07.07.2000) GB
- (71) Applicant and  
(72) Inventor: LEE, Helen [GB/GB]; University of Cambridge, Department of Haematology - Diagnostic Development, Box Anglia Blood Centre Site, Long Road, Cambridge CB2 2PT (GB).
- (74) Agent: DAVIES, Jonathan, Mark; Rickle & Gorse, 15 Trevellick Road, London WC1X 8PL (GB).
- (81) Designated States *regionally*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GR, GT, HK, GM, HR, HU, 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, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States *regionally*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, 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



(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 contacted with the contact end of the dipstick to cause the sample solution to be contacted with the contact 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 hybridizing to the target nucleic acid. A labelled detection probe capable of hybridizing 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 02/004668 A3



patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European  
patent (AT, DE, CH, CY, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,  
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI,  
CG, CL, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

**Published:**  
with international search report

*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.*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/GB 01/03024

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C1201/68 G01N30/90

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C120 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data were processed during the internal and search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPQ-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

### B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category: Citation of document with indication where incorporated in the relevant paragraph

Retayant's claim No.

X	US 5 318 650 A (MCMAHON MICHAEL E ET AL) 10 May 1994 (1994-05-10) cited in the application abstract column 10, line 62 -column 11, line 8 column 11, line 65 -column 12, line 68; claims 1,7,16; figures 1-3; example 5	48,49,54      1-47,50, 51
Y	EP 0 318 245 A (NL TECHNOLOGY VENTURES) 31 May 1989 (1989-05-31)	1-8, 10-22, 24-51,54
	* see especially the claims * the whole document	

☒ Further documents are filed in the continuation of box C.

☒ 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

\* Earlier document but published on or after the information filing date

7. document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another document.

\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or sale, etc.

This document published prior to the international filing date but  
later than the priority date claimed

\* Later document published after the International Day date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention.

\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to

"Y" 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, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*g\* documents members of the same patent family

Date of the actual completion of the international section

Date of mailing of the international search report

30 September 2002

15 11 2002

Name and mailing address in the USA  
Compan Patent Office P.B. 5818 Patenzien 2  
M - 2280 HV Hjalvik  
Tel. (01-70) 340 2040, Ex. 31 551 ext. 01,  
Fax (01-70) 340 2046

Authorized officer \_\_\_\_\_

Knehr, M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GE 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	W0 95 27081 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	W0 00 09756 A (PERKIN ELMER CORP) 24 February 2000 (2000-02-24) abstract; figures 2, 5 -----	1, 9, 12, 14-16, 23
A	W0 94 29696 A (QUIDEL CORP) 22 December 1994 (1994-12-22) abstract; claims 1-34; figure 1 -----	

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/GB 01/03024
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
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 6.4(a).	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
see additional sheet	
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 effect 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.: <div style="margin-left: 40px;">claims 1-51, 54</div>	
Remark on Protest	
<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	



International Application No. PCT/GB 01/03024

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 219

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

International Application No.

Information on patent family members

PCT/GB 01/03024

Parent document cited in search report	Publication date	Parent family member(s)	Publication date
US 5310650 A	18-05-1994	US 4960691 A	02-10-1990
		AT 157404 T	15-09-1997
		AU 636675 B2	13-05-1993
		AU 5119690 A	20-09-1999
		CA 2012355 A1	17-09-1990
		DE 69031318 D1	02-10-1997
		EP 0387996 A2	19-09-1990
		JP 2283299 A	20-11-1990
		JP 05130 T	15-02-1993
		AU 598871 B2	05-07-1990
		AU 7903187 A	31-03-1988
		CA 1303493 A1	16-06-1992
		DE 3783845 D1	11-03-1993
		DE 3783845 T2	09-06-1993
		EP 0262328 A2	06-04-1988
		ES 2038973 T3	16-08-1993
		JP 2086308 C	23-08-1996
		JP 7036017 B	19-04-1995
		JP 63096559 A	27-04-1988
EP 0318245 A	31-05-1989	US 5030557 A	09-07-1991
		AT 106947 T	15-06-1994
		AU 2611288 A	14-06-1989
		AU 613989 B2	15-08-1991
		CA 1319336 A1	22-06-1993
		DE 3850055 D1	14-07-1994
		DE 3850055 T2	29-09-1994
		DK 361289 A	20-09-1989
		EP 0318245 A2	31-05-1989
		ES 2056115 T3	01-10-1994
		FI 893526 A	21-07-1989
		JP 2592250 T	26-07-1990
		JP 2020749 B2	05-11-1998
		KR 9615893 B1	23-11-1996
		NO 892990 A	13-09-1989
		PT 89050 A ,B	01-12-1988
		NO 8904876 A1	01-06-1989
WO 9527081 A	12-10-1995	WO 9527081 A1	12-10-1995
		US 6037127 A	14-03-2000
WO 0009756 A	24-02-2000	US 6232067 B1	15-05-2001
		AU 5560199 A	06-03-2000
		WO 0069756 A1	24-02-2000
		US 6258539 B1	10-07-2001
WO 9429696 A	22-12-1994	EP 0795426 A1	10-04-1996
		JP 8511621 T	03-12-1996
		WO 9429696 A1	22-12-1994

Form PCT/ISAAC10 (parent family entered) (July 1999)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	Z
G 0 1 N 33/571	G 0 1 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,SD,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 6 2

(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, バートン  
グローブ 2 6

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