

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成28年9月23日(2016.9.23)

【公表番号】特表2016-504041(P2016-504041A)

【公表日】平成28年2月12日(2016.2.12)

【年通号数】公開・登録公報2016-010

【出願番号】特願2015-552042(P2015-552042)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 M 1/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成28年8月4日(2016.8.4)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

P C R 実験における温度較正方法であって、下記工程を含む前記方法：

- a) マルチウェルプレートの各ウェルに、蛍光性非共有結合二本鎖 D N A 結合色素を含む試料中の特定の標的核酸を増幅するための反応混合物を供給する工程、
- b) ドナー発色団が二本鎖オリゴヌクレオチドの第 1 鎖に共有結合し、アクセプター発色団が二本鎖オリゴヌクレオチドの第 2 鎖に共有結合する二本鎖オリゴヌクレオチドを各ウェルに供給する工程、
- c) 特定の標的核酸を各ウェルで増幅させる工程、
- d) 増幅された特定の標的核酸を各ウェルで融解し、蛍光性非共有結合二本鎖 D N A 結合色素からの光の放出を減少させ、二本鎖オリゴヌクレオチドを各ウェルで融解し、ドナー発色団とアクセプター発色団とを空間的に分離することによって、ドナー発色団からの光の放出を増加させ、又はアクセプター発色団からの光の放出を減少させる工程、
- e) 蛍光性非共有結合二本鎖 D N A 結合色素からの光の放出の減少を検出することによって増幅された特定の標的核酸の融解温度値を各ウェルで監視し、ドナー発色団からの光の放出の増加又はアクセプター発色団からの光の放出の減少を検出することによって、二本鎖オリゴヌクレオチドの融解温度値を各ウェルで別々に監視する工程、及び、
- f) 二本鎖オリゴヌクレオチドの融解温度値のウェル間差に基づいて、増幅された特定の標的核酸に対する融解温度値を各ウェルで補正する工程。

【請求項 2】

特定の標的核酸が一塩基多型を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

ドナー発色団が二本鎖オリゴヌクレオチドの第 1 鎖内のヌクレオチドに共有結合し、アクセプター発色団が二本鎖オリゴヌクレオチドの第 2 鎖内のヌクレオチドに共有結合し、第 1 鎖内のヌクレオチド及び第 2 鎖内のヌクレオチドが相補的な塩基対を形成する、請求項 1 又は 2 の方法。

【請求項 4】

ドナー発色団が二本鎖オリゴヌクレオチドの第1鎖の5'末端に共有結合し、アクセプター発色団は二本鎖オリゴヌクレオチドの第2鎖の3'末端に共有結合しているか、又はドナー発色団は二本鎖オリゴヌクレオチドの第1鎖の3'末端に共有結合し、アクセプター発色団は二本鎖オリゴヌクレオチドの第2鎖の5'末端に共有結合している、請求項3の方法。

【請求項 5】

蛍光性非共有結合二本鎖DNA結合色素の光の波長及びドナー発色団の光の波長が互いに分離されている、請求項1～4の方法。

【請求項 6】

蛍光性非共有結合二本鎖DNA結合色素が、LightCycler（登録商標）480 Resolight Dyeである、請求項1～5の方法。

【請求項 7】

ドナー発色団がCy5である、請求項1～6の方法。

【請求項 8】

アクセプター発色団が消光剤分子である、請求項1～7の方法。

【請求項 9】

消光剤分子は、BHQ-1、BHQ-2、BHQ-3、及びBHQ-4からなる群から選択される暗消光剤である、請求項8の方法。

【請求項 10】

二本鎖オリゴヌクレオチドは、二本鎖オリゴヌクレオチドの融解温度と増幅された特定の標的核酸の融解温度との差が5℃以下であるように設計される、請求項1～10の方法。

【請求項 11】

二本鎖オリゴヌクレオチドが、二本鎖オリゴヌクレオチドの融解温度と増幅された特定の標的核酸の融解温度が同一であるように設計される、請求項1～9の方法。

【請求項 12】

請求項1～11のPCR実験における温度較正を行うためのキットであって、下記を含む前記キット：

- a) 試料中の特定の標的核酸配列を増幅するために必要な全ての試薬、
- b) 蛍光性非共有結合二本鎖DNA結合色素、及び、
- c) ドナー発色団が二本鎖オリゴヌクレオチドの第1鎖に共有結合し、アクセプター発色団が二本鎖オリゴヌクレオチドの第2鎖に共有結合する二本鎖オリゴヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項1～11のPCR実験における温度較正を行うための反応混合物であって、下記を含む前記反応混合物：

- a) 標的核酸配列、
- b) 特定の標的核酸配列を増幅するために必要な全ての試薬、
- c) 蛍光性非共有結合二本鎖DNA結合色素、及び、
- d) ドナー発色団が二本鎖オリゴヌクレオチドの第1鎖に共有結合し、アクセプター発色団が二本鎖オリゴヌクレオチドの第2鎖に共有結合する二本鎖オリゴヌクレオチド。