

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成26年1月23日(2014.1.23)

【公表番号】特表2013-511292(P2013-511292A)

【公表日】平成25年4月4日(2013.4.4)

【年通号数】公開・登録公報2013-016

【出願番号】特願2012-541159(P2012-541159)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

【手続補正書】

【提出日】平成25年11月25日(2013.11.25)

【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】

a) 標的核酸を含有すると思われる試料を調製するステップと、

b) 前記試料、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブ、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブ、および任意付加的な第 3 のオリゴヌクレオチドプローブならびに配列特異的エンドヌクレアーゼを含む反応混合物を調製するステップであって、

第 1 のオリゴヌクレオチドプローブおよび第 2 のオリゴヌクレオチドプローブは第 1 の配列、第 2 の配列をそれぞれ含み、

第 1 のオリゴヌクレオチドプローブおよび第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの第 1 の配列は、前記標的核酸の非重複配列に相補的であり、

第 1 のオリゴヌクレオチドプローブおよび第 2 のオリゴヌクレオチドプローブのそれぞれの第 2 の配列は互いに相補的であり、したがって、前記配列特異的エンドヌクレアーゼによって認識される二重鎖制限部位を形成し、

第 1 のオリゴヌクレオチドプローブ、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブ、または第 3 のオリゴヌクレオチドプローブのうちの少なくとも 1 つは、前記制限部位の片側に配置された検出可能な標識および前記制限部位の反対側に配置された消光部分を含み、

前記第 1 または第 2 のプローブは検出可能な標識を有するとき、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブおよび第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの第 1 の配列は前記標的核酸の非重複核酸配列と選択的にハイブリダイズし、第 1 のオリゴヌクレオチドプローブおよび第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 の配列は互いに選択的にハイブリダイズし、それによって前記二重鎖制限部位を形成し、その結果、前記標的核酸が前記試料中に存在していれば、前記配列特異的エンドヌクレアーゼが前記二重鎖を前記制限部位で切断し、前記標識の検出が可能となり、標的生物の核酸からおおよそ互いからオリゴヌクレオチドプローブの残りの部分を変性させるか、または、

前記第 1 のオリゴヌクレオチドプローブおよび第 2 のオリゴヌクレオチドプローブは標識されておらず、および、前記第 2 のオリゴヌクレオチドプローブはさらに第 3 の配列を含み、第 3 の配列の少なくとも一部分は、前記第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの前記第 2 の配列とヘアピンを形成し、前記第 1 のオリゴヌクレオチドプローブおよび第 2 のオリゴヌクレオチドプローブが前記標的核酸と結合していない場合に、前記ヘアピンは前記第 2 のオリゴヌクレオチドプローブが前記第 1 のオリゴヌクレオチドプローブとハイブリ

ダイズすることを妨げ、

前記第3の配列の前記一部分は、前記第3のオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズして、二重鎖制限部位を形成し、

前記第3のオリゴヌクレオチドプローブは、前記二重鎖制限部位を形成する、前記第2のオリゴヌクレオチドプローブの前記第3の配列とハイブリダイズする第1の配列の片側に配置された検出可能な標識を含む非標的特異的オリゴヌクレオチドプローブ、および、前記第3のオリゴヌクレオチドプローブの前記第1の配列の反対側に配置された消光部分を含み、

前記標的核酸が前記試料中に存在する場合は、前記第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴヌクレオチドプローブの前記第1の配列を、前記標的核酸の前記非重複配列と選択的にハイブリダイズさせ、

それにより、前記ヘアピンループの変性させ、および、前記第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴヌクレオチドプローブの前記第2の配列間のハイブリダイゼーションさせ、前記配列特異的エンドヌクレアーゼによる前記制限部位での以前に形成された二重鎖を切断させ、前記第3の配列の前記第2のオリゴヌクレオチドプローブから分離させ、ならびに前記第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴヌクレオチドプローブの前記標的核酸から解離させ、および、複数のサイクルを施し、

前記複数のサイクルは：i) 化学修飾された二重鎖制限部位の形成する、前記第2のオリゴヌクレオチドプローブの前記第3の配列と前記第3のオリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーション、ii) 化学修飾された二重鎖制限部位の形成配列特異的制限エンドヌクレアーゼによる、化学修飾された二重鎖制限部位の一本鎖のニッキング、iii) 標識の消光物質からの遊離、iv) 前記第3のオリゴヌクレオチドプローブの前記第2のオリゴヌクレオチドプローブの前記第3の配列からの解離、であり、および、

試料中の標的核酸の存在を示す標識からシグナルを検出する、ステップと、  
を含むことを特徴とする、

試料中の標的核酸の存在または非存在を検出する方法。

【請求項2】

前記反応混合物は、熱サイクリングに供されて、前記標的核酸から切断されたオリゴヌクレオチドを変性させることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

熱サイクリング温度は、融解曲線を基準として選択されることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記反応混合物は、i) 前記標的核酸に対する第1のオリゴヌクレオチドプローブの融解温度、ii) 前記標的核酸に対する第2のオリゴヌクレオチドプローブの融解温度、ならびにiii) 第1のオリゴヌクレオチドプローブおよび第2のオリゴヌクレオチドプローブで形成されたハイブリッドの融解温度よりも高いハイブリダイゼーション温度に維持されることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

a) 標的核酸を含有すると思われる試料を調製するステップと、

b) 以下：

i) 前記試料、

ii) 第1の配列および第2の配列を有する第1のオリゴヌクレオチドプローブ、第1の配列および第2の配列を有する第2のオリゴヌクレオチドプローブ、第1の配列および第2の配列を有する第3のオリゴヌクレオチドプローブ、ならびに

iii) 配列特異的エンドヌクレアーゼ

を含む反応混合物を調製するステップであって、

第1のオリゴヌクレオチドプローブは、標的核酸配列に相補的な第1の配列および第2のオリゴヌクレオチドプローブの第1の配列に相補的な第2の配列を有し、第2の配列の第1の部分は、制限部位の化学修飾された一本鎖部分であり、第1のオリゴヌクレオチド

プローブの第 1 の配列および第 2 の配列の一部は二次構造を形成し、

第 2 のオリゴヌクレオチドプローブは、前記標的と直接ハイブリダイズしないプローブであり、第 2 のプローブの第 1 の配列の一部は、第 1 のプローブの第 2 の配列の化学修飾された一本鎖部分に相補的であり、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 の配列は、第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの第 1 の配列に相補的であり、第 2 のプローブの第 2 の配列の一部は、制限部位の化学修飾された一本鎖部分であり、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの第 1 の配列および第 2 の配列は部分的に重複し、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの第 1 の配列および第 2 の配列の少なくとも一部は二次構造を形成し、

第 3 のオリゴヌクレオチドプローブは、前記標的と直接ハイブリダイズしないプローブであり、第 1 の配列は、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの制限部位の化学修飾された一本鎖部分に相補的な一部を含み、第 1 の配列上に配置された検出可能な標識または消光部分をさらに含み、第 2 の配列は、第 1 の配列の一部とヘアピンループを形成し、第 2 の配列上に配置された検出可能な標識または消光部分を有し、その結果、前記消光部分が、第 3 のオリゴヌクレオチドプローブ上のその相対的位置のために、前記検出可能な標識のシグナルを遮断し、

前記標的核酸が前記試料中に存在していれば、前記標的核酸を第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの第 1 の配列と選択的にハイブリダイズさせて、第 1 の複合体を形成させ、複数のサイクルで、i) 第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 の配列の少なくとも一部分と第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの第 1 の配列とを選択的にハイブリダイズさせて、第 2 の複合体を形成させ、ii) 二重鎖制限部位の化学修飾された一本鎖を形成する第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 の配列の一部と第 2 のプローブ上の相補的配列とのハイブリダイゼーションによって形成された前記二重鎖制限部位の一本鎖部分を切断し、それによって、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 の配列を第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの第 1 の配列の非重複部分から分離させ、iii) 第 2 のオリゴヌクレオチドプローブを第 1 の複合体から解離させ、

複数のサイクルで、i) 第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 の配列を第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの第 1 の配列と選択的にハイブリダイズさせて、第 3 の複合体を形成させ、それによって、標識を消光物質から分離させ、シグナルを遊離させ、ii) 第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 の配列の前記一部分と第 3 のオリゴヌクレオチドプローブの第 1 の配列上の相補的配列とのハイブリダイゼーションによって形成された一本鎖二重鎖制限部位を切断し、iii) 標識を消光物質から遊離させ、iv) 第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの第 2 の配列を第 3 のオリゴヌクレオチドプローブから解離させ、

前記試料中の前記標的核酸の存在を示す、前記標識から生成されるシグナルを検出するステップと

を含むことを特徴とする、試料中の標的核酸の存在または非存在を検出する方法。

【請求項 6】

前記二次構造はヘアピンであることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記核酸標的配列は、ヒトパピローマウイルス 16 型およびヒトパピローマウイルス 58 型からなる群から選択されるヒトパピローマウイルス核酸であることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記標的核酸は配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択されることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

第 1 のオリゴヌクレオチドプローブは配列番号 1 であり、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブは配列番号 2 であり、第 3 のオリゴヌクレオチドプローブは配列番号 3 であることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

前記配列特異的エンドヌクレアーゼは、B s o B I、H i n c I I、A v a I、N c i IおよびF n u 4 Hからなる群から選択される酵素であることを特徴とする、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記配列特異的エンドヌクレアーゼはB s o B Iであることを特徴とする、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記検出可能な標識は蛍光物質であることを特徴とする、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記蛍光物質はキサンテン色素であることを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記消光物質はローダミン色素であることを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記反応混合物は遮断プローブをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記化学修飾された制限部位は半修飾されていることを特徴とする、請求項 1 または 5 に記載の方法。