

【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】令和 5 年 5 月 29 日(2023.5.29)

【国際公開番号】WO2020/236992

【公表番号】特表 2022-533228(P2022-533228A)

【公表日】令和 4 年 7 月 21 日(2022.7.21)

【年通号数】公開公報(特許)2022-132

【出願番号】特願 2021-569060(P2021-569060)

【国際特許分類】

10

C 1 2 Q 1/6876(2018.01)

C 1 2 Q 1/6837(2018.01)

C 1 2 Q 1/6851(2018.01)

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

C 1 2 N 9/22(2006.01)

C 1 2 M 1/00(2006.01)

C 1 2 M 1/34(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6876 Z

C 1 2 Q 1/6837 Z

C 1 2 Q 1/6851 Z

C 1 2 Q 1/686 Z

C 1 2 N 9/22

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 M 1/34 D

20

【手続補正書】

【提出日】令和 5 年 5 月 19 日(2023.5.19)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

30

【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) 複数のヌクレオチドと、

b) 1 つまたは複数の光切断性部分と

を含む核酸構築物であって、

前記 1 つまたは複数の光切断性部分の光切断性部分が、

___ a) 前記核酸構築物の 3' 末端に位置するか、

40

b) 前記核酸構築物の 5' 末端に位置するか、

c) 前記 3' 末端と前記 5' 末端との間に位置するか、

d) 前記複数のヌクレオチドのヌクレオチドの核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、

e) 前記ヌクレオチドのリボース上もしくはそれに接続して位置するか、

f) 前記複数のヌクレオチドの前記ヌクレオチドと別のヌクレオチドとの間にそれらに接続して位置するか、または

g) それらの組合せである、核酸構築物。

【請求項 2】

前記核酸構築物が、生化学的反応において不活性であるように構成され、前記生化学的

50

反応が、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、ライゲーション、ターミナルトランスフェラーゼ伸長、ハイブリダイゼーション反応、エクソヌクレアーゼ消化、エンドヌクレアーゼ消化、または制限消化である、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 3】

前記核酸構築物が、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記生化学的反應において活性であるように構成される、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 4】

前記核酸構築物が、プライマーを含み、前記生化学的反應が、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長である、請求項 2 に記載の核酸構築物。 10

【請求項 5】

前記 1 つまたは複数の光切断性部分の前記光切断性部分が、前記 3' 末端に位置する、請求項 4 に記載の核酸構築物。

【請求項 6】

前記光切断性部分が、前記 3' 末端と前記 5' 末端との間および核酸塩基上に位置する、請求項 4 に記載の核酸構築物。

【請求項 7】

前記 1 つまたは複数の光切断性部分の前記光切断性部分が、独立して、前記 3' 末端と前記 5' 末端との間および前記複数のヌクレオチドの前記 2 つの連続したメンバーの間に位置する、請求項 4 に記載の核酸構築物。 20

【請求項 8】

前記 3' 末端が、前記生化学的反應において不活性であるように構成される、請求項 4 に記載の核酸構築物。

【請求項 9】

第 1 の核酸セクションおよび前記第 1 の核酸セクションに相補的な第 2 の核酸セクションを含み、ヘアピン構造を形成するように構成される、請求項 7 に記載の核酸構築物。

【請求項 10】

前記第 1 の核酸セクションおよび前記第 2 の核酸セクションが、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を含まない、請求項 9 に記載の核酸構築物。 30

【請求項 11】

ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、
a) 核酸構築物、少なくとも 1 つの鋳型核酸分子、ポリメラーゼを含む反応混合物を用意するステップであって、前記核酸構築物が、前記鋳型核酸分子と相補的な配列を有し、前記核酸構築物が、

i) 複数のヌクレオチドと、

ii) 1 つまたは複数の光切断性部分と

を含み、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の光切断性部分が、

i) 前記核酸構築物の 3' 末端に位置するか、

ii) 前記核酸構築物の 5' 末端に位置するか、 40

iii) 前記 3' 末端と前記 5' 末端との間に位置するか、

iv) 前記複数のヌクレオチドのヌクレオチドの核酸塩基上もしくははそれに接続して位置するか、

v) 前記ヌクレオチドのリボース上もしくははそれに接続して位置するか、

vi) 前記複数のヌクレオチドの前記ヌクレオチドと別のヌクレオチドとの間にそれらに接続して位置するか、または

vii) それらの組合せである、ステップと、

b) 前記反応混合物を、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供するステップと、

c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、前記ポリ 50

メラーゼに触媒される鎖伸長を実行するステップとを含む、方法。

【請求項 1 2】

前記核酸構築物が、前記 c) の照射するステップの前に、前記反応混合物中でインタクトなままであり、c) が、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を切断して、前記核酸分子を形成するステップをさらに含み、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記 c) の実行するステップが、c) において前記照射するステップの後に形成される前記核酸分子を、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長のプライマーとして使用するステップを含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記反応混合物が、別のプライマーをさらに含み、前記別のプライマーが、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長において活性である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記別のプライマーが、前記 c) の照射するステップの前に、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長において活性である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記 b) のポリメラーゼに触媒される鎖伸長により、前記別のプライマーを含むアンブリコンが産生される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記アンブリコンが、クエンチャーを含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の間に、光学シグナル、光学シグナルの増加、または光学シグナルの減少を検出することをさらに含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記反応混合物が、核酸プローブのアレイの表面上に、前記表面上の複数の独立して処理可能な位置で接触している、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記複数の核酸プローブを用いた前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長反応の 2 つまたはそれを上回るアンブリコンへのハイブリダイゼーションを測定することをさらに含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 7 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 7 8】

本発明の好ましい実施形態が本明細書において示され、説明されているが、そのような実施形態が例示として提供されるにすぎないことは、当業者には明らかであろう。本発明が本明細書内に提供されている特定の実施例によって制限されることは、意図されない。本発明は、前述の明細書を参照して記載されているが、本明細書における実施形態の説明および例示は、制限的な意味で解釈されることを意味するものではない。当業者であれば、本発明から逸脱することなく、多数の変化形、変更、および置換を想起するであろう。さらに、本発明のすべての態様は、本明細書において記載されている特定の表現、構成、または相対的比率に制限されず、それらは、様々な条件および変数に依存することを理解すべきである。本明細書において記載される本発明の実施形態に対する様々な代替形を、本発明の実施に用いることができることを理解されたい。したがって、本発明は、あらゆるそのような代替形、修正形、変化形、または均等物も網羅すべきであることが企図される。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定めること、ならびにこれらの特許請求の範囲内の方法および構造、ならびにそれらの均等物が、それによって網羅されることが意図

10

20

30

40

50

される。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

a) 感光性化学部分を含む核酸構築物であって、第1の分子状態にあり、光への曝露の後に、第2の分子状態へと変化するように構成される、核酸構築物と、

b) 少なくとも1つの試薬と、

c) 少なくとも1つの酵素と

を含む反応チャンバーであって、

前記光が前記核酸構築物に到達することを可能にするように構成される、反応チャンバー。

10

(項目2)

前記核酸構築物が、オリゴヌクレオチドプライマーまたはプローブである、項目1に記載の反応チャンバー。

(項目3)

前記少なくとも1つの酵素が、ポリメラーゼ、逆転写酵素、ターミナルトランスフェラーゼ、エクソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、またはリガーゼである、項目1～2のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目4)

前記少なくとも1つの試薬が、1つまたは複数の増幅試薬を含む、項目1～3のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

20

(項目5)

標的核酸をさらに含む、項目1～4のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目6)

前記酵素が、前記標的核酸、前記少なくとも1つの試薬、および前記核酸構築物と関連する反応を触媒するように構成される、項目5に記載の反応チャンバー。

(項目7)

前記第1の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において活性であるように構成される、項目6に記載の反応チャンバー。

(項目8)

前記第2の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において不活性であるように構成される、項目7に記載の反応チャンバー。

30

(項目9)

前記第1の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において不活性であるように構成される、項目6に記載の反応チャンバー。

(項目10)

前記第2の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において活性であるように構成される、項目9に記載の反応チャンバー。

(項目11)

別の感光性化学部分を含む別の核酸構築物をさらに含み、前記別の核酸構築物が、第3の分子状態にあり、前記別の核酸構築物が、別の光への曝露の後に、第4の分子状態へと変化するように構成される、項目1～10のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

40

(項目12)

前記別の光が、前記光である、項目11に記載の反応チャンバー。

(項目13)

前記第1の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において活性であるように構成され、前記第3の分子状態にある前記別の核酸構築物が、前記反応において不活性であるように構成される、項目11または項目12に記載の反応チャンバー。

(項目14)

前記第2の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において不活性であるように構成され、前記第4の分子状態にある前記別の核酸構築物が、前記反応において活性である

50

ように構成される、項目 11 ~ 13 のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目 15)

前記第 1 の分子状態にある前記核酸構築物および前記第 3 の分子状態にある前記別の核酸構築物が、前記反応において活性であるように構成される、項目 11 または項目 12 に記載の反応チャンバー。

(項目 16)

前記第 2 の分子状態にある前記核酸構築物および前記第 4 の分子状態にある前記別の核酸構築物が、前記反応において不活性であるように構成される、項目 11、12、および 15 のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目 17)

前記第 1 の分子状態にある前記核酸構築物および前記第 3 の分子状態にある前記別の核酸構築物が、前記反応において不活性であるように構成される、項目 11 または項目 12 に記載の反応チャンバー。

(項目 18)

前記第 2 の分子状態にある前記核酸構築物および前記第 4 の分子状態にある前記別の核酸構築物が、前記反応において活性であるように構成される、項目 11、12、および 17 のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目 19)

前記酵素が、前記ポリメラーゼであり、前記反応が、ポリメラーゼ連鎖反応であり、前記核酸構築物が、前記オリゴヌクレオチドプライマーである、項目 6 ~ 18 のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目 20)

前記感光性化学部分が、前記核酸構築物の 3 末端、5 末端、または中央に位置する、項目 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目 21)

前記核酸構築物が、追加の感光性化学部分をさらに含む、項目 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目 22)

第 5 の分子状態が、前記第 1 の分子状態であり、第 6 の分子状態が、前記第 2 の分子状態である項目 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目 23)

密閉チューブ反応チャンバーである、項目 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の反応チャンバー。

(項目 24)

反応を行う方法であって、

反応チャンバーを活性化して、反応を行うステップであって、前記反応チャンバーが、

a) 第 1 の分子状態にある感光性化学部分を含む核酸構築物と、

b) 少なくとも 1 つの試薬と、

c) 少なくとも 1 つの酵素と

を含む、ステップと、

前記反応チャンバー内の前記核酸構築物に到達するように光を活性化し、それによって、前記核酸構築物を第 2 の分子状態へと変化させるステップと

を含む、方法。

(項目 25)

前記核酸構築物が、オリゴヌクレオチドプライマーまたはプローブである、項目 24 に記載の方法。

(項目 26)

前記少なくとも 1 つの酵素が、ポリメラーゼ、逆転写酵素、ターミナルトランスフェラーゼ、エクソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、またはリガーゼである、項目 24 または項目 25 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 2 7)

前記少なくとも 1 つの試薬が、1 つまたは複数の増幅試薬を含む、項目 2 4 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 8)

前記反応チャンバーが、標的核酸をさらに含む、項目 2 4 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 9)

前記酵素が、前記標的核酸の、前記少なくとも 1 つの試薬および前記核酸構築物との前記反応を触媒する、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記第 1 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において活性である、項目 2 4 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1)

前記第 2 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において不活性である、項目 2 4 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2)

前記第 1 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において不活性である、項目 2 4 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 3)

前記第 2 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記反応において活性である、項目 2 4 ~ 2 9 および 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 4)

前記反応チャンバーが、第 3 の分子状態にある別の感光性化学部分を含む別の核酸構築物をさらに含み、前記別の核酸構築物が、別の光への曝露の後に、第 4 の分子状態へと変化するように構成される、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記別の光が、前記光であり、前記光を前記活性化するステップにより、前記核酸構築物を活性化する、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記別の核酸構築物に到達するように前記別の光を活性化するステップをさらに含む、項目 3 4 または項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 7)

前記光を前記活性化するステップの後に、前記反応において前記核酸構築物を不活性化するステップをさらに含む、項目 3 4 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 8)

前記光を前記活性化するステップの後または前記別の光を前記活性化するステップの後に、前記別の核酸構築物を活性化するステップをさらに含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記光を前記活性化するステップまたは前記別の光を前記活性化するステップの後に、前記別の核酸構築物を非活性化するステップをさらに含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記光を前記活性化するステップの後に、前記反応において前記核酸構築物を活性化するステップをさらに含む、項目 3 4 ~ 3 6 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記光を前記活性化するステップまたは前記別の光を前記活性化するステップの後に、前記別の核酸構築物を非活性化するステップをさらに含む、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記光を前記活性化するステップまたは前記別の光を前記活性化するステップの後に、前記別の核酸構築物を活性化するステップをさらに含む、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 3)

10

20

30

40

50

前記反応が、伸長、消化、転写、末端転移、またはライゲーションである、項目 3 4 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 4)

前記反応チャンバーにおいて前記反応を行う場合、外部試薬が、前記反応チャンバーに添加されない、項目 3 4 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 5)

前記反応チャンバーにおいて前記反応を行う場合、前記核酸構築物、前記少なくとも 1 つの試薬、または前記少なくとも 1 つの酵素のいずれも、前記反応チャンバーから除去されない、項目 3 4 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 6)

前記酵素が、前記ポリメラーゼであり、前記反応が、ポリメラーゼ連鎖反応であり、前記核酸構築物が、前記オリゴヌクレオチドプライマーである、項目 2 4 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 7)

前記感光性化学部分が、前記核酸構築物の 3 末端、5 末端、または中央に位置する、項目 2 4 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 8)

前記核酸構築物が、追加の感光性化学部分をさらに含む、項目 2 4 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 9)

前記標的核酸が、メジャー対立遺伝子およびマイナー対立遺伝子を含み、前記反応が、ポリメラーゼ連鎖反応である、項目 2 8 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 0)

前記核酸構築物が、前記メジャー対立遺伝子に相補的な配列を含む、項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記第 1 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記メジャー対立遺伝子のアンプリコンの作製に関して、前記ポリメラーゼ連鎖反応において不活性である、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記第 2 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記メジャー対立遺伝子の前記アンプリコンの作製に関して、前記ポリメラーゼ連鎖反応において活性である、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 3)

前記第 2 の分子状態にある前記核酸構築物が、前記メジャー対立遺伝子の前記アンプリコンの作製に関して、前記ポリメラーゼ連鎖反応において不活性である、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記別の核酸構築物が、前記マイナー対立遺伝子のプライマーであり、前記方法が、前記光を前記活性化するステップの前に前記マイナー対立遺伝子のアンプリコンを産生させるステップをさらに含む、項目 4 9 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 5)

a) 複数のヌクレオチドと、

b) 1 つまたは複数の光切断性部分と

を含む核酸構築物であって、

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、

a) 前記核酸構築物の 3' 末端に位置するか、

b) 前記核酸構築物の 5' 末端に位置するか、

c) 前記 3' 末端と前記 5' 末端との間に位置するか、

d) 核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、

10

20

30

40

50

e) リボース上もしくはそれに接続して位置するか、

f) 前記複数のヌクレオチドの2つの連続したメンバーの間にそれらに接続して位置するか、または

g) それらの組合せである、核酸構築物。

(項目56)

前記核酸構築物が、生化学的反應において不活性であるように構成され、前記生化学的反應が、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長、ポリメラーゼ連鎖反應(PCR)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反應(RT-PCR)、ライゲーション、ターミナルトランスフェラーゼ伸長、ハイブリダイゼーション、エクソヌクレアーゼ消化、エンドヌクレアーゼ消化、または制限消化である、項目55に記載の核酸構築物。

10

(項目57)

前記核酸構築物が、前記1つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記生化学的反應において活性であるように構成される、項目55または項目56に記載の核酸構築物。

(項目58)

前記核酸構築物が、プライマーであり、前記生化学的反應が、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長である、項目55~57のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目59)

前記1つまたは複数の光切断性部分が、前記3'末端に位置する、項目58に記載の核酸構築物。

20

(項目60)

前記1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記3'末端と前記5'末端との間および選択された核酸塩基上に位置する、項目58に記載の核酸構築物。

(項目61)

前記1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記3'末端と前記5'末端との間および前記複数のヌクレオチドの前記2つの連続したメンバーの間に位置する、項目58に記載の核酸構築物。

(項目62)

前記3'末端が、前記生化学的反應において不活性であるように構成される、項目61に記載の核酸構築物。

30

(項目63)

第1の核酸セクションおよび前記第1の核酸セクションに相補的な第2の核酸セクションを含み、ヘアピン構造を形成するように構成される、項目61に記載の核酸構築物。

(項目64)

前記第1の核酸セクションおよび前記第2の核酸セクションが、前記1つまたは複数の光切断性部分を含まない、項目63に記載の核酸構築物。

(項目65)

項目55~64のいずれか一項に記載の前記核酸構築物を使用して、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、

a) 前記核酸構築物、少なくとも1つの鋳型核酸分子、ポリメラーゼを含む反応混合物を用意するステップであって、前記核酸構築物が、前記鋳型核酸分子と相補的な配列を有する、ステップと、

40

b) 前記反応混合物を、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供するステップと、

c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行するステップとを含む、方法。

(項目66)

前記b)の供するステップが、前記c)の実行するステップを作動させない、項目65に記載の方法。

50

(項目 6 7)

前記核酸構築物が、前記 c) の照射するステップの前に、前記反応混合物中でインタクトなままである、項目 6 5 または項目 6 6 に記載の方法。

(項目 6 8)

c) において、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む、項目 6 5 ~ 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 9)

c) において、前記核酸分子を形成するステップをさらに含む、項目 6 5 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 0)

前記 c) の実行するステップが、c) において前記照射するステップの後に形成される前記核酸分子を、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長のプライマーとして使用するステップを含む、項目 6 5 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 1)

前記反応混合物が、別のプライマーをさらに含み、前記別のプライマーが、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長において活性である、項目 6 5 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 2)

前記別のプライマーが、前記 c) の照射するステップの前に、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長において活性である、項目 7 1 に記載の方法。

(項目 7 3)

前記 b) のポリメラーゼに触媒される鎖伸長により、前記別のプライマーを含むアンブリコンが産生される、項目 7 1 または項目 7 2 に記載の方法。

(項目 7 4)

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - PCR) であり、前記方法が、c) において、

1) 項目 5 5 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物の存在下において、2 つまたはそれを上回るヌクレオチド配列に、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行して、流体中に 2 つまたはそれを上回るアンブリコンを産生させるステップと、

2) 独立して処理可能な位置に複数の核酸プローブを有する固体表面を含むアレイを用意するステップであって、前記アレイが、前記流体と接触するように構成される、ステップと、

3) 前記流体が前記アレイと接触している間に、前記 2 つまたはそれを上回るアンブリコンの、前記複数の核酸プローブのうちの 2 つまたはそれを上回る核酸プローブへのハイブリダイゼーションを測定して、アンブリコンハイブリダイゼーション測定値を得るステップであって、前記アンブリコンが、クエンチャーを含む、ステップとをさらに含む、項目 6 5 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 5)

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - PCR) であり、前記方法が、c) において、

1) 表面および複数の異なるプローブを有する固体支持体を含むアレイを用意するステップであって、前記複数の異なるプローブが、異なる処理可能な位置で前記表面に固定されており、各処理可能な位置が、蛍光部分を含む、ステップと、

2) 複数のヌクレオチド配列を含む試料に PCR 増幅を実行するステップであって、前記 PCR 増幅が、流体中で実行され、(i) 項目 5 5 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物が、各核酸配列の PCR プライマーであり、クエンチャーを含み、(ii) 前記流体が、前記複数の異なるプローブと接触しており、前記 PCR 増幅で産生されたアンブリコンが、前記複数のプローブとハイブリダイズし、それによって、前記蛍光部分からのシグナルをクエンチする、ステップと、

3) 前記処理可能な位置のそれぞれにおいて前記蛍光部分からの前記シグナルを経時的に

10

20

30

40

50

検出するステップと、

4) 経時的に検出された前記シグナルを使用し、前記流体中の前記アンプリコンの量を決定するステップと、

5) 前記流体中の前記アンプリコンの前記量を使用して、前記試料中の前記ヌクレオチド配列の量を決定するステップと

をさらに含む、項目 6 5 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 6)

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - PCR) であり、前記方法が、c) において、

1) 少なくとも 1 つの鋳型核酸分子を含有する核酸試料、プライマー対、およびポリメラーゼを含む、前記反応混合物を用意するステップであって、前記プライマー対が、前記鋳型核酸分子との配列相補性を有し、前記プライマー対が、限定プライマーおよび過剰プライマーを含み、前記限定プライマーおよび前記過剰プライマーのうちの少なくとも 1 つが、項目 5 5 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物である、ステップと、

2) 前記反応混合物を、前記鋳型核酸分子および前記限定プライマーの増幅産物として少なくとも 1 つの標的核酸分子を得るのに十分な条件下において、前記 Q - PCR に供するステップであって、少なくとも 1 つの標的核酸分子が、前記限定プライマーを含む、ステップと、

3) 前記反応混合物を、(i) 異なる個別に処理可能な位置で基板の表面に固定された複数のプローブを含む前記基板であって、前記プローブが、前記限定プライマーとの配列相補性を有し、前記限定プライマーを捕捉することができる、基板と、(ii) 前記処理可能な位置からの少なくとも 1 つのシグナルを検出するように構成される検出器アレイであって、前記少なくとも 1 つのシグナルが、前記限定プライマーが前記複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを有するセンサーアレイと接触させるステップと、

4) 前記検出器アレイを使用して、前記核酸増幅反応中の複数の時点で、1 つまたは複数の前記処理可能な位置からの前記少なくとも 1 つのシグナルを検出するステップと、

5) 前記限定プライマーが前記複数のプローブの前記個々のプローブと結合していることを示す前記少なくとも 1 つのシグナルに基づいて、前記標的核酸分子を検出するステップと

をさらに含む、項目 6 5 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 7)

項目 5 5 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物を使用して、少なくとも 1 つの標的核酸分子をアッセイするためのシステムであって、

1) 少なくとも 1 つの鋳型核酸分子を含有する核酸試料、前記鋳型核酸分子に相補的な配列を有するプライマー対、およびポリメラーゼを含む反応混合物を含む反応チャンバーであって、前記プライマー対が、限定プライマーおよび過剰プライマーを含み、前記限定プライマーおよび前記過剰プライマーのうちの少なくとも 1 つが、項目 5 5 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物であり、前記反応混合物を含む前記反応チャンバーが、前記反応混合物に対する核酸増幅反応を促進して、少なくとも 1 つの標的核酸分子を前記鋳型核酸の増幅産物として得るように構成される、反応チャンバーと、

2) (i) 異なる個別に処理可能な位置で基板の表面に固定された複数のプローブを含む前記基板であって、前記プローブが、前記限定プライマーとの配列相補性を有し、前記限定プライマーを捕捉することができる、基板と、(ii) 前記処理可能な位置からの少なくとも 1 つのシグナルを検出するように構成される検出器アレイであって、前記少なくとも 1 つのシグナルが、前記限定プライマーが前記複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを含む、センサーアレイと、

3) 前記センサーアレイに連結され、(i) 前記反応混合物を前記核酸増幅反応に供し、(ii) 前記核酸増幅反応中の複数の時点で、前記処理可能な位置のうちの 1 つまたは複数からの前記少なくとも 1 つのシグナルを検出するようにプログラミングされる、コンピ

10

20

30

40

50

ュータープロセッサと
を備える、システム。

(項目 7 8)

a) 複数のヌクレオチドと、
b) 1 つまたは複数の光切断性部分と

を含む核酸構築物であって、

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、

a) 前記核酸構築物の 3' 末端と前記核酸構築物の 5' 末端との間に位置するか、

b) 核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、

c) リボース上もしくはそれに接続して位置するか、

d) 前記複数のヌクレオチドの 2 つの連続したメンバーの間にそれらに接続して位置する
か、または

e) それらの組合せである、核酸構築物。

(項目 7 9)

前記核酸構築物が、生化学的反應において活性であるように構成され、前記生化学的反應が、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長、ポリメラーゼ連鎖反應 (PCR)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反應 (RT-PCR)、ライゲーション、ターミナルトランスフェラーゼ伸長、ハイブリダイゼーション、エクソヌクレアーゼ消化、エンドヌクレアーゼ消化、または制限消化である、項目 7 8 に記載の核酸構築物。

(項目 8 0)

前記核酸構築物が、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記生化学的反應において不活性である、項目 7 8 および項目 7 9 に記載の核酸構築物。

(項目 8 1)

前記核酸構築物が、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の光切断のすぐ後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記生化学的反應において活性であり、前記核酸分子が、前記 3' 末端の近傍に位置する、項目 7 8 および項目 7 9 に記載の核酸構築物。

(項目 8 2)

前記核酸構築物が、プライマーであり、前記生化学的反應が、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長である、項目 7 8 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 8 3)

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記 3' 末端と前記 5' 末端との間および選択された核酸塩基上に位置する、項目 8 2 に記載の核酸構築物。

(項目 8 4)

前記 1 つまたは複数の光切断性部分の非存在下において、ヘアピン構造を形成するように構成され、それによって、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の前記非存在下において、前記プライマーとして不活性となっている、項目 8 3 に記載の核酸構築物。

(項目 8 5)

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記 3' 末端と前記 5' 末端との間および前記複数のヌクレオチドの前記 2 つの連続したメンバーの間に位置する、項目 8 2 に記載の核酸構築物。

(項目 8 6)

前記核酸構築物が、鋳型核酸分子に相補的な第 1 の配列を含み、前記第 1 の配列が、前記 3' 末端またはその近傍に位置する、項目 8 2 ~ 8 5 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 8 7)

前記核酸構築物が、前記鋳型核酸分子に相補的な第 2 の配列をさらに含み、前記第 2 の配列が、前記 5' 末端またはその近傍に位置し、前記 1 つまたは複数の光切断性部分のうちの少なくとも 1 つが、前記第 1 の配列と前記第 2 の配列との間に位置する、項目 8 6 に

10

20

30

40

50

記載の核酸構築物。

(項目 8 8)

前記 1 つまたは複数の光切断性部分が、少なくとも 1 つのヌクレオチドによって、前記第 1 の配列および / または前記第 2 の配列から分離している、項目 8 7 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 8 9)

前記第 1 の配列および前記第 2 の配列の両方が前記鑄型核酸分子とハイブリダイズした場合に、前記第 1 の配列と前記第 2 の配列との間でヘアピンループを形成するように構成される、項目 8 7 または項目 8 8 に記載の核酸構築物。

(項目 9 0)

前記第 2 の配列が、5' と 5' との連結で、前記核酸構築物の残りへの接続を含み、前記第 2 の配列が、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長において非伸長性であるように構成される、項目 8 7 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 9 1)

項目 7 8 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物を使用して、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、

- a) 前記核酸構築物、前記鑄型核酸分子、ポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、前記核酸構築物が、少なくとも前記第 1 の配列を含む、ステップと、
 - b) 前記反応混合物を、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供し、それによって、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行するステップと、
 - c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を停止させるステップと
- を含む、方法。

(項目 9 2)

c) において、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む、項目 9 1 に記載の方法。

(項目 9 3)

c) において、前記照射するステップの後に、前記核酸分子を形成するステップをさらに含み、前記核酸分子が、前記鑄型核酸分子から解離する、項目 9 1 または項目 9 2 に記載の方法。

(項目 9 4)

前記核酸分子が、ヘアピン構造を形成し、前記ヘアピン構造が、前記第 1 の配列の少なくとも一部を含む、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 5)

前記核酸分子が、前記第 1 の配列を含む、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 6)

光作動型ネステッドポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行う方法であって、

- a) 第 1 のプライマー対、第 2 のプライマー対、内部核酸配列を含む鑄型核酸分子、およびポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、前記第 1 のプライマー対の各メンバーが、独立して、項目 7 8 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物であり、前記第 2 のプライマー対の各メンバーが、独立して、項目 5 5 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物であり、前記内部核酸配列が、前記鑄型核酸分子内で入れ子になっている、ステップと、
- b) 前記反応混合物を、前記第 1 のプライマー対を使用して第 1 の鎖伸長の条件に供して、前記鑄型核酸分子を増幅させ、それによって、前記鑄型核酸または前記鑄型核酸分子の相補的配列のアンプリコンを形成するステップと、
- c) 前記反応混合物に光の光子を照射し、それによって、前記第 1 のプライマー対を非活性化させ、前記第 1 の伸長を停止させ、前記第 2 のプライマー対を活性化し、前記活性化された第 2 のプライマー対を使用して第 2 の鎖伸長を開始させ、前記内部核酸配列または前記内部核酸配列の相補的配列のアンプリコンを形成するステップと

10

20

30

40

50

を含み、

a) ~ c) が、密閉チューブ様式で行われる、
方法。

(項目 9 7)

前記光作動型 P C R が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - P C R) であり、前記方法が、

1) 前記第 1 のプライマー対および第 2 のプライマー対の存在下において、2 つまたはそれを上回るヌクレオチド配列に、前記光作動型 P C R を実行して、流体中に 2 つまたはそれを上回るアンプリコンを産生させるステップと、

2) 独立して処理可能な位置に複数の核酸プローブを有する固体表面を含むアレイを用意するステップであって、前記アレイが、前記流体と接触するように構成される、ステップと、

3) 前記流体が前記アレイと接触している間に、前記 2 つまたはそれを上回るアンプリコンの、前記複数の核酸プローブのうちの 2 つまたはそれを上回る核酸プローブへのハイブリダイゼーションを測定して、アンプリコンハイブリダイゼーション測定値を得るステップであって、前記アンプリコンが、クエンチャーを含む、ステップと

をさらに含む、項目 9 6 に記載の方法。

(項目 9 8)

前記光作動型 P C R が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - P C R) であり、前記方法が、

1) 表面および複数の異なるプローブを有する固体支持体を含むアレイを用意するステップであって、前記複数の異なるプローブが、異なる処理可能な位置で前記表面に固定されており、各処理可能な位置が、蛍光部分を含む、ステップと、

2) 複数のヌクレオチド配列を含む試料に P C R 増幅を実行するステップであって、前記 P C R 増幅が、流体中で実行され、(i) 各核酸配列の前記第 1 のプライマー対および前記第 2 のプライマー対のそれぞれが、クエンチャーを含み、(i i) 前記流体が、前記複数の異なるプローブと接触しており、前記 P C R 増幅において産生されたアンプリコンが、前記複数のプローブとハイブリダイズし、それによって、前記蛍光部分からのシグナルをクエンチする、ステップと、

3) 前記処理可能な位置のそれぞれにおいて前記蛍光部分からの前記シグナルを経時的に検出するステップと、

4) 経時的に検出された前記シグナルを使用し、前記流体中の前記アンプリコンの量を決定するステップと、

5) 前記流体中の前記アンプリコンの前記量を使用して、前記試料中の前記ヌクレオチド配列の量を決定するステップと

をさらに含む、項目 9 6 に記載の方法。

(項目 9 9)

前記光作動型 P C R が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - P C R) であり、前記方法が、

1) 少なくとも 1 つの鑄型核酸分子を含有する核酸試料、プライマー対、およびポリメラーゼを含む、前記反応混合物を用意するステップであって、前記プライマー対が、前記鑄型核酸分子との配列相補性を有し、前記プライマー対が、限定プライマーおよび過剰プライマーを含み、前記限定プライマーおよび前記過剰プライマーのうちの少なくとも 1 つが、項目 5 5 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物である、ステップと、

2) 前記反応混合物を、前記鑄型核酸分子および前記限定プライマーの増幅産物として少なくとも 1 つの標的核酸分子を得るのに十分な条件下において、前記 Q - P C R に供するステップであって、少なくとも 1 つの標的核酸分子が、前記限定プライマーを含む、ステップと、

3) 前記反応混合物を、(i) 異なる個別に処理可能な位置で基板の表面に固定された複数のプローブを含む前記基板であって、前記プローブが、前記限定プライマーとの配列相

10

20

30

40

50

補性を有し、前記限定プライマーを捕捉することができる、基板と、(i i) 前記処理可能な位置からの少なくとも1つのシグナルを検出するように構成される検出器アレイであって、前記少なくとも1つのシグナルが、前記限定プライマーが前記複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを有するセンサーアレイと接触させるステップと、

4) 前記検出器アレイを使用して、前記核酸増幅反応中の複数の時点で、1つまたは複数の前記処理可能な位置からの前記少なくとも1つのシグナルを検出するステップと、

5) 前記限定プライマーが前記複数のプローブの前記個々のプローブと結合していることを示す前記少なくとも1つのシグナルに基づいて、前記標的核酸分子を検出するステップと

10

をさらに含む、項目96に記載の方法。

(項目 1 0 0)

a) 複数のヌクレオチドと、

b) 1つまたは複数の光切断性部分と

を含む核酸構築物であって、

前記1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、

a) 前記核酸構築物の3'末端と前記核酸構築物の5'末端との間に位置するか、

b) 核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、

c) リボース上もしくはそれに接続して位置するか、

d) 前記複数のヌクレオチドの2つの連続したメンバーの間にそれらに接続して位置するか、または

20

e) それらの組合せである、核酸構築物。

(項目 1 0 1)

プローブであり、標的核酸分子とのハイブリダイゼーションにおいて不活性であるように構成される、項目100に記載の核酸構築物。

(項目 1 0 2)

前記核酸構築物が、前記1つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記標的核酸分子との前記ハイブリダイゼーションにおいて活性であるように構成される、項目100または項目101に記載の核酸構築物。

30

(項目 1 0 3)

1つの遊離末端を含む、項目100～102のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 1 0 4)

固定末端またはポリメラーゼに触媒される鎖伸長において非伸長性である末端を含む、項目100～103のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 1 0 5)

前記1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記3'末端と前記5'末端との間および選択された核酸塩基上に位置し、前記選択された核酸塩基が、前記1つまたは複数の光切断性部分の非存在下において、前記標的核酸分子とハイブリダイズするように構成される、項目102～104のいずれか一項に記載の核酸構築物。

40

(項目 1 0 6)

前記1つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記3'末端と前記5'末端との間および前記複数のヌクレオチドの前記2つの連続したメンバーの間に位置する、項目102～104のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 1 0 7)

第1の核酸セクションおよび前記第1の核酸セクションに相補的な第2の核酸セクションを含み、ヘアピン構造を形成するように構成される、項目106に記載の核酸構築物。

(項目 1 0 8)

前記第1の核酸セクションおよび前記第2の核酸セクションが、前記1つまたは複数の光切断性部分を含まない、項目107に記載の核酸構築物。

50

(項目 1 0 9)

項目 1 0 0 ~ 1 0 8 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物を使用して、前記ハイブリダイゼーションを行う方法であって、

a) 前記核酸構築物および前記標的核酸分子を含む反応混合物を用意するステップと、

b) 前記反応混合物を、前記ハイブリダイゼーションの条件に供するステップと、

c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、前記ハイブリダイゼーションを実行するステップと

を含む、方法。

(項目 1 1 0)

前記 b) の供するステップが、前記 c) の実行するステップを作動させない、項目 1 0 9 に記載の方法。

(項目 1 1 1)

前記核酸構築物が、前記 c) の照射するステップの前に、前記反応混合物中でインタクトなままである、項目 1 0 9 または項目 1 1 0 に記載の方法。

(項目 1 1 2)

c) において、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む、項目 1 0 9 ~ 1 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1 3)

c) において、前記核酸分子を形成するステップをさらに含む、項目 1 0 9 ~ 1 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 1 4)

前記照射するステップが、前記核酸構築物の前記ヘアピン構造を破断させ、前記核酸分子を形成する、項目 1 1 3 に記載の方法。

(項目 1 1 5)

a) 複数のヌクレオチドと、

b) 1 つまたは複数の光切断性部分と

を含む核酸構築物であって、

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、

a) 前記核酸構築物の 3' 末端と前記核酸構築物の 5' 末端との間に位置するか、

b) 核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、

c) リボース上もしくはそれに接続して位置するか、

d) 前記複数のヌクレオチドの 2 つの連続したメンバーの間にそれらに接続して位置するか、または

e) それらの組合せである、核酸構築物。

(項目 1 1 6)

プローブであり、標的核酸分子とのハイブリダイゼーションにおいて活性であるように構成される、項目 1 1 5 に記載の核酸構築物。

(項目 1 1 7)

前記核酸構築物が、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記標的核酸分子との前記ハイブリダイゼーションにおいて不活性であるように構成される、項目 1 1 5 または項目 1 1 6 に記載の核酸構築物。

(項目 1 1 8)

1 つの遊離末端を含む、項目 1 1 5 ~ 1 1 7 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 1 1 9)

固定末端またはポリメラーゼに触媒される鎖伸長において非伸長性である末端を含む、項目 1 1 5 ~ 1 1 8 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 1 2 0)

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記 3' 末端と前記 5' 末端との間および前記複数のヌクレオチドの前記 2 つの連続したメンバーの間に位置する、

10

20

30

40

50

項目 1 1 5 ~ 1 1 9 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 1 2 1)

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、前記 3' 末端と前記 5' 末端との間および選択された核酸塩基上に位置し、前記選択された核酸塩基が、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の非存在下において、前記核酸構築物の別の核酸塩基とハイブリダイズするように構成される、項目 1 1 5 ~ 1 1 9 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

(項目 1 2 2)

第 1 の核酸セクションおよび前記第 1 の核酸セクションに相補的な第 2 の核酸セクションを含み、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の非存在下において、ヘアピン構造を形成するように構成される、項目 1 1 5 ~ 1 1 9 および項目 1 1 2 のいずれか一項に記載の核酸構築物。

10

(項目 1 2 3)

前記第 1 の核酸セクションまたは前記第 2 の核酸セクションが、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を含む、項目 1 2 2 に記載の核酸構築物。

(項目 1 2 4)

項目 1 1 5 ~ 1 2 3 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物を使用して、前記ハイブリダイゼーションを行う方法であって、

a) 前記核酸構築物および前記標的核酸分子を含む反応混合物を用意するステップと、

b) 前記反応混合物を、前記ハイブリダイゼーションの条件に供するステップと、

c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、前記ハイブリダイゼーションを停止させるステップと

20

を含む、方法。

(項目 1 2 5)

c) において、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む、項目 1 2 4 に記載の方法。

(項目 1 2 6)

c) において、前記核酸分子を形成するステップをさらに含む、項目 1 2 4 または項目 1 2 5 に記載の方法。

(項目 1 2 7)

c) において、前記核酸分子に前記ヘアピン構造を形成するステップをさらに含む、項目 1 2 6 に記載の方法。

30

(項目 1 2 8)

ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行うステップをさらに含む、

1) 前記反応混合物が、ポリメラーゼおよびプライマーをさらに含み、b) において、前記核酸構築物が、b) において前記標的核酸分子とハイブリダイズし、

2) b) において、前記反応混合物を、前記プライマーを使用して、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供し、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、前記核酸構築物が前記標的核酸分子と二重鎖を形成する位置またはその近傍で停止し、

3) 前記 c) の照射するステップの後に、前記二重鎖を除去し、前記核酸構築物と以前にハイブリダイズしていた一本鎖配列を露出させ、それによって、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が継続され、前記一本鎖配列を通じて伸長することが可能となる、項目 1 2 4 ~ 1 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 1 2 9)

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q - P C R) であり、前記方法が、

1) 項目 1 1 5 ~ 1 2 3 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物の存在下において、項目 1 2 8 に従って、前記標的核酸分子を含む 2 つまたはそれを上回るヌクレオチド配列に、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行し、それによって、流体中に 2 つまたはそれを上回るアンプリコンを産生させるステップと、

2) 独立して処理可能な位置に複数の核酸プローブを有する固体表面を含むアレイを用意

50

するステップであって、前記アレイが、前記流体と接触するように構成される、ステップと、

3) 前記流体が前記アレイと接触している間に、前記2つまたはそれを上回るアンプリコンの、前記複数の核酸プローブのうちの2つまたはそれを上回る核酸プローブへのハイブリダイゼーションを測定して、アンプリコンハイブリダイゼーション測定値を得るステップであって、前記アンプリコンが、クエンチャーを含む、ステップと、

をさらに含む、項目128に記載の方法。

(項目130)

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)であり、前記方法が、

1) 表面および複数の異なるプローブを有する固体支持体を含むアレイを用意するステップであって、前記複数の異なるプローブが、異なる処理可能な位置で前記表面に固定されており、各処理可能な位置が、蛍光部分を含む、ステップと、

2) 前記標的核酸分子を含む複数のヌクレオチド配列を含む試料にPCR増幅を実行するステップであって、前記PCR増幅が、項目115~123のいずれか一項に記載の前記核酸構築物を含む流体中で行われ、(i)各核酸配列のPCRプライマーが、クエンチャーを含み、(ii)前記流体が、前記複数の異なるプローブと接触しており、前記PCR増幅において産生されたアンプリコンが、前記複数のプローブとハイブリダイズし、それによって、前記蛍光部分からのシグナルをクエンチし、前記照射するステップが、前記PCR中に行われる、ステップと、

3) 前記処理可能な位置のそれぞれにおいて前記蛍光部分からの前記シグナルを経時的に検出するステップと、

4) 経時的に検出された前記シグナルを使用し、前記流体中の前記アンプリコンの量を決定するステップと、

5) 前記流体中の前記アンプリコンの前記量を使用して、前記試料中の前記ヌクレオチド配列の量を決定するステップと、

をさらに含む、項目128に記載の方法。

(項目131)

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、定量的ポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)であり、前記方法が、

6) 前記標的核酸分子を含む少なくとも1つの鋳型核酸分子を含有する核酸試料、プライマー対、およびポリメラーゼを含む、前記反応混合物を用意するステップであって、前記プライマー対が、前記少なくとも1つの鋳型核酸分子との配列相補性を有し、前記プライマー対が、限定プライマーおよび過剰プライマーを含み、前記反応混合物が、項目115~123のいずれか一項に記載の前記核酸構築物のうちの少なくとも1つをさらに含む、ステップと、

7) 前記反応混合物を、前記鋳型核酸分子および前記限定プライマーの増幅産物を得るのに十分な条件下において、前記Q-PCRに供するステップであって、アンプリコンが、前記限定プライマーを含む、ステップと、

8) 前記反応混合物を、(i)異なる個別に処理可能な位置で基板の表面に固定された複数のプローブを含む前記基板であって、前記プローブが、前記限定プライマーとの配列相補性を有し、前記限定プライマーを捕捉することができる、基板と、(ii)前記処理可能な位置からの少なくとも1つのシグナルを検出するように構成されるであって、前記少なくとも1つのシグナルが、前記限定プライマーが前記複数のプローブの個々のプローブと結合していることを示す、検出器アレイとを有するセンサーアレイと接触させるステップと、

9) 前記検出器アレイを使用して、前記核酸増幅反応中の複数の時点で、1つまたは複数の前記処理可能な位置からの前記少なくとも1つのシグナルを検出するステップと、

10) 前記限定プライマーが前記複数のプローブの前記個々のプローブと結合していることを示す前記少なくとも1つのシグナルに基づいて、前記標的核酸分子を検出するステッ

10

20

30

40

50

ブと

をさらに含む、項目 1 2 8 に記載の方法。

(項目 1 3 2)

a) 複数のヌクレオチドと、

b) 前記核酸構築物の 5 ' 末端における 1 つまたは複数の光切断性部分であって、前記核酸構築物の前記 5 ' 末端が、エクソヌクレアーゼによる切断に耐性であるように構成される、光切断性部分と

を含む核酸構築物であって、

前記 1 つまたは複数の光切断性部分のそれぞれが、独立して、

a) 核酸塩基上もしくはそれに接続して位置するか、

b) リボース上もしくはそれに接続して位置するか、または

c) それらの組合せである、核酸構築物。

(項目 1 3 3)

前記核酸構築物が、前記 1 つまたは複数の光切断性部分の光切断の後に、核酸分子を形成するように構成され、前記核酸分子が、前記エクソヌクレアーゼによる前記切断に耐性ではない、項目 1 3 2 に記載の核酸構築物。

(項目 1 3 4)

標的核酸分子にハイブリダイズし、前記エクソヌクレアーゼによる前記切断に耐性なままであるように構成される、項目 1 3 2 または項目 1 3 3 に記載の核酸構築物。

(項目 1 3 5)

ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、

a) 項目 1 3 2 ~ 1 3 4 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物、前記標的核酸分子、プライマー、ポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、前記標的核酸分子が、前記核酸構築物に相補的な核酸配列を含む、ステップと、

b) 前記反応混合物を、前記標的核酸分子を鋳型として使用して、前記プライマーの前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供するステップと、

c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、前記核酸配列を通じた前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行するステップと

を含む、方法。

(項目 1 3 6)

前記 b) の供するステップが、前記 c) の実行するステップを作動させない、項目 1 3 5 に記載の方法。

(項目 1 3 7)

前記核酸構築物が、前記 c) の照射するステップの前に、前記反応混合物中でインタクトなままである、項目 1 3 5 または項目 1 3 6 に記載の方法。

(項目 1 3 8)

c) において、前記 1 つまたは複数の光切断性部分を切断するステップをさらに含む、項目 1 3 5 ~ 1 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 3 9)

c) において、前記核酸分子を形成するステップをさらに含む、項目 1 3 5 ~ 1 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 4 0)

前記 c) の実行するステップが、c) において前記照射するステップの後に形成される前記核酸分子を、前記エクソヌクレアーゼによって消化させるステップを含み、前記ポリメラーゼが、前記エクソヌクレアーゼである、項目 1 3 5 ~ 1 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 4 1)

前記 c) の実行するステップが、前記照射するステップの後および / または前記消化するステップの後に、前記プライマーを、前記核酸配列を通じて伸長させるステップを含む、項目 1 3 5 ~ 1 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 1 4 2)

項目 7 8、7 9、8 1、8 2、および 8 5 ~ 8 8 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物を使用して、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、

a) 前記核酸構築物、前記鋳型核酸分子、ポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップであって、前記核酸構築物が、少なくとも、前記 3' 末端またはその近傍に位置する前記第 1 の配列および前記 5' 末端またはその近傍に位置する前記第 2 の配列を含み、前記第 1 の配列が、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長において活性である、ステップと、

b) 前記反応混合物を、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供し、それによって、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行し、前記第 1 の配列および前記第 2 の配列の両方の配列、または前記第 1 の配列および前記第 2 の配列の両方に相補的な配列を含む、複数の第 1 のアンプリコンを産生させるステップと、

c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、前記核酸構築物を切断し、前記第 1 の配列または前記第 1 の配列に相補的な配列を含む複数の第 2 のアンプリコンを産生させるステップであって、前記複数の第 2 のアンプリコンのそれぞれが、前記第 2 の配列も前記第 2 の配列に相補的な配列も含有しないことを条件とする、ステップと

を含む、方法。

(項目 1 4 3)

項目 5 5 ~ 6 4、7 8 ~ 9 0、1 0 0 ~ 1 0 8、および 1 1 5 ~ 1 2 3 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物のうちの少なくとも 1 つを使用して、ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を行う方法であって、

a) 前記核酸構築物、前記鋳型核酸分子、ポリメラーゼを含む、反応混合物を用意するステップと、

b) 前記反応混合物を、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長の条件に供するステップと、

c) 前記反応混合物または前記核酸構築物に光の光子を照射し、それによって、前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長を実行するステップとを含む、

前記ポリメラーゼに触媒される鎖伸長が、PCR、RT-PCR、QPCR、または qRT-PCR である、方法。

(項目 1 4 4)

前記核酸構築物のうちの前記少なくとも 1 つが、独立して、

a) 前記 PCR、RT-PCR、QPCR、もしくは qRT-PCR のプライマー、

b) 前記 PCR、RT-PCR、QPCR、もしくは qRT-PCR の溶液相プローブ、または

c) 前記 PCR、RT-PCR、QPCR、もしくは qRT-PCR の固定プローブである、項目 1 4 3 に記載の方法。

(項目 1 4 5)

マイクロアレイデータを定量する自動化マイクロアレイシステムであって、

a) 表面および複数の異なるプローブを有する固体支持体であって、前記複数の異なるプローブが、前記表面に固定されている、固体支持体と、

b) 検体を含む流体体積であって、前記流体体積が、前記固体支持体と接触しており、前記複数の異なるプローブのうちの少なくとも 1 つおよび前記検体が、項目 5 5 ~ 6 4、7 8 ~ 9 0、1 0 0 ~ 1 0 8、および 1 1 5 ~ 1 2 3 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物のうちの少なくとも 1 つを含む、流体体積と、

c) 前記流体体積が前記固体支持体と接触している間に、前記固体支持体上の複数のスポットのそれぞれから複数の時点で測定されるシグナルを検出するように構成される、検出器または検出アセンブリーであって、前記シグナルが、光学シグナルまたは電気化学シグナルである、検出器または検出アセンブリーと、

10

20

30

40

50

d) シグナルをマイクロアレイデータに変換するように構成されるコンピューターであって、前記マイクロアレイデータを、処理方法に従って、前記コンピューターによって処理させるように構成される命令をさらに含み、前記処理方法は、

1) (i) 分析表示、および (i i) 前記固体支持体に少なくとも1つの標準的なプローブを使用した前記マイクロアレイのキャリブレーションによるものを含む、前記複数の異なるプローブと前記検体との間の相互作用の推定値を決定するステップと、

2) ハイブリダイゼーション、交差ハイブリダイゼーション、および状態間での非束縛遷移確率をモデリングすることを含むマルコフ連鎖モデルでの推定値を利用する、確率行列を生成するステップと、

3) 前記検出器または前記検出器アセンブリーを使用して、親和性に基づくアレイデータを得るステップと、

4) 前記親和性に基づくアレイデータを、前記確率行列に適用するステップと、

5) 非特異的相互作用をノイズではなく干渉と考えることによって、前記非特異的相互作用を利用しそれを抑制しない、最大尤度推定アルゴリズム、最大事後確率基準、制約付き最小二乗計算法、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、最適化アルゴリズムを適用するステップと、

6) 最適化された親和性に基づくアレイデータを、ユーザーに出力するステップであって、前記最適化された親和性に基づくアレイデータが、前記検出器または前記検出器アセンブリーを使用することによって得られる前記親和性に基づくアレイデータと比較して、改善されたシグナル対ノイズ比を有する、ステップと

を含む、コンピューターと
を備える、システム。

(項目 1 4 6)

順に、

項目 5 5 ~ 6 4、7 8 ~ 9 0、1 0 0 ~ 1 0 8、および 1 1 5 ~ 1 2 3 のいずれか一項に記載の前記核酸構築物のうちの少なくとも1つを含む、分子認識層と、

光学層と、

サンドイッチ構成で組み込まれるセンサー層と

を備える一体型バイオセンサーアレイであって、

a) 前記分子認識層が、異なる独立して処理可能な位置に付着した複数の異なるプローブを含み、前記独立して処理可能な位置のそれぞれが、前記分子認識層の単一の側面に位置する単一の源から直接的に励起光子束を受容するように構成され、前記分子認識層が、前記光学層に光を伝達し、前記複数の異なるプローブのうちの1つが、前記核酸構築物のうちの前記少なくとも1つを含み、

b) 前記光学層が、光学フィルター層を含み、前記光学層が、前記分子認識層から前記センサー層へ光を伝達し、それによって、前記伝達された光がフィルタリングされ、

c) 前記センサー層が、前記光学層から伝達された前記フィルタリングされた光を検出する光学センサーアレイを含み、前記センサー層が、CMOS製造プロセスを使用して製造されたセンサー素子を含み、前記分子認識層、前記光学層、および前記センサー層が、前記分子層が前記光学層と接触し、前記光学層が前記センサー層と接触する一体型構造を構成する、一体型バイオセンサーアレイ。

10

20

30

40