

【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24年2月9日 (2012.2.9)

【公表番号】特表2011-530296(P2011-530296A)

【公表日】平成23年12月22日 (2011.12.22)

【年通号数】公開・登録公報2011-051

【出願番号】特願2011-522302(P2011-522302)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/542 (2006.01)

G 0 1 N 21/78 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 A

G 0 1 N 33/53 Z N A M

G 0 1 N 33/542 A

G 0 1 N 21/78 C

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成23年12月14日 (2011.12.14)

【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】

標識核酸プローブとその標的核酸とのハイブリダイゼーションを検出するための方法であって、

(a) 標的核酸を含有するのではないかと疑われる試料と、前記標的核酸とハイブリダイズする標識核酸プローブとを接触させるステップと、

(b) 第 1 の温度及び第 2 の温度で標識強度を測定するステップであって、前記第 1 の温度が前記第 2 の温度より低いステップと、

(c) (i) 前記第 1 の温度における標識強度の、(ii) 前記第 2 の温度における標識強度に対する比率を計算するステップであって、0.8 以上の比率が前記標的核酸の存在を示すステップと

を含む方法。

【請求項 2】

第 1 の温度が標識核酸プローブの T_m より低く、第 2 の温度が前記標識核酸プローブの T_m より高い、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

第 1 の温度が 50 であり、第 2 の温度が 95 である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ (b) 及び (c) が少なくとも 2 回繰り返される、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

繰り返される測定に基づいて平均比率が計算される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

標識核酸プローブとその標的核酸とのハイブリダイゼーションを検出するための方法であって、

(a) 標的核酸を含有するのではないかと疑われる試料と、前記標的核酸とハイブリダイズする標識核酸プローブとを接触させるステップと、

(b) 異なる少なくとも 2 時点において標識強度を測定するステップと、

(c) 前記異なる少なくとも 2 時点における前記標識強度を用い、時間の関数としての前記標識強度の傾きを計算するステップと

を含み、標的核酸に結合しているときの標識核酸プローブによって生じるシグナルの強度が、前記標的核酸に結合していないときの前記標識核酸プローブによって生じるシグナルの強度と比較して大きい場合、正の傾きが前記標的核酸の存在を示す、方法。

【請求項 7】

標的核酸が DNA 又は RNA を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

標識核酸プローブが、蛍光標識を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

クエンチャー分子と蛍光標識が近接している場合に、前記蛍光標識の蛍光発光が検出できないか、又はクエンチャー分子と蛍光標識が近接していない場合よりも、前記蛍光標識の蛍光発光が少なくとも低く検出されるように、標識核酸プローブが、前記蛍光標識の前記発光を吸収する前記クエンチャー分子をさらに含む、請求項 1 ~ 5 に従属する請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

標識核酸プローブが分子ビーコン又は直鎖状プローブである、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

測定ステップが等温条件の間に行われる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 12】

測定ステップが PCR 反応後に行われる、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 13】

測定ステップが、PCR 反応の完了後 1 分 ~ 10 分間の時間内に完了する、請求項 6 に従属する請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

PCR 反応が、

(i) プライマー、少なくとも 1 つの酵素、少なくとも 1 つの基質、及び少なくとも 1 つの緩衝剤を含む溶液において、標的核酸を含有するのではないかと疑われる試料を標識核酸プローブと接触させて反応混合物を調製するステップと、

(ii) 前記反応混合物を、変性温度、アニーリング温度、及び伸長温度のサイクルにかけ、前記標的核酸を増幅するステップと

を含む、請求項 12 又は 13 に記載の方法。

【請求項 15】

傾きの計算が、標識強度の一次導関数を時間の関数としてとることを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 16】

時間の関数としての標識強度が、時間の関数として標識強度測定値をフィッティングする最小二乗法によって計算される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

傾きが、時間の関数として標識強度データを以下の方程式にフィッティングすることによって計算される、請求項 6 に記載の方法：

$$y = m \times x + b$$

(式中、 y は標識強度であり、 x は時間であり、 m は傾きである。)

【請求項 18】

線の傾きが以下の式を用いて計算される、請求項6に記載の方法：

【数 1】

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

(式中、 m は線の傾きであり、 (x_1, y_1) 及び (x_2, y_2) は異なる少なくとも 2 時点であり、 $x_1 < x_2$ である。)

【請求項 19】

傾きに基づいた標識核酸プローブと標的核酸のハイブリダイゼーション速度を計算するステップをさらに含む、請求項6に記載の方法。

【請求項 20】

それぞれが異なる標的核酸とハイブリダイズする少なくとも 2 つの標識核酸プローブを含み、各プローブが異なる温度でハイブリダイズする、請求項6に記載の方法。