

【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 27 年 3 月 12 日 (2015.3.12)

【公表番号】特表 2014-504880 (P2014-504880A)

【公表日】平成 26 年 2 月 27 日 (2014.2.27)

【年通号数】公開・登録公報 2014-011

【出願番号】特願 2013-550902 (P2013-550902)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/536 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 N 15/00 A

G 0 1 N 33/53 D

G 0 1 N 33/536 E

【手続補正書】

【提出日】平成 27 年 1 月 20 日 (2015.1.20)

【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】

試料中の検体を検出するための方法であって、

(a) それぞれが検体結合ドメインと核酸ドメインとを含み、前記検体に同時に結合することが可能な少なくとも第 1 および第 2 の近接プローブの少なくとも 1 セットに前記試料を接触させる工程と、

(b) 前記近接プローブが前記検体に結合する際に、前記近接プローブの核酸ドメインを相互作用させる工程であって、前記相互作用はデュプレックスの形成を含む工程と、

(c) 前記試料を、3' エキソヌクレアーゼ活性を含む成分に接触させる工程と、

(d) 前記デュプレックスの少なくとも 1 つの核酸ドメインの 3' 末端を伸長して伸長生成物を生成する工程であって、前記工程 (c) と同時にまたはその後に起こり得る工程と、

(e) 前記伸長生成物を増幅および検出する工程、とを含む方法。

【請求項 2】

前記検体は、完全にまたは部分的にタンパク様分子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも第 1 および第 2 の近接プローブの少なくとも一方の検体結合ドメインは、抗体、その結合断片、またはその誘導体である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記工程 (d) は、3' エキソヌクレアーゼ活性をさらに含む核酸ポリメラーゼによって行われ、前記核酸ポリメラーゼは工程 (c) の 3' エキソヌクレアーゼ活性を含む成分を提供する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記 3' エキソヌクレアーゼ活性を含む成分は、T4 DNA ポリメラーゼ、T7 DNA ポリメラーゼ、ファイ 29 ( 29 ) DNA ポリメラーゼ、DNA ポリメラーゼ I、DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片、ピュロコックス・フリオス ( Pfu ) DNA ポリメラーゼ、および / またはピュロコックス・ヴェッセイ ( Pwo ) DNA ポリメラーゼからなる群の 1 つ以上から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記工程 ( d ) は、3' エキソヌクレアーゼ活性を最小限含むかまたは全く含まない核酸ポリメラーゼによって行われ、前記ポリメラーゼは、前記 3' エキソヌクレアーゼ活性を含む成分の後に加えられ、前記伸長生成物が生成されるように前記試料がさらにインキュベートされる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記核酸ポリメラーゼは、DNA ポリメラーゼ III の サブユニット、DNA ポリメラーゼ I のクレノウ exo ( - ) 断片、Taq ポリメラーゼ、Pfu ( exo<sup>-</sup> ) DNA ポリメラーゼ、および / または Pwo ( exo<sup>-</sup> ) DNA ポリメラーゼから選択される、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記 3' エキソヌクレアーゼ活性を含む成分は、エキソヌクレアーゼ I である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記 3' エキソヌクレアーゼ活性を含む成分が、前記伸長生成物を増幅する工程の前に不活化される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記 3' エキソヌクレアーゼ活性が、熱変性によって不活化される、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記熱不活化は、前記工程 ( e ) の増幅反応の第 1 の工程である、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記試料を前記 3' エキソヌクレアーゼ活性を含む成分に接触させる前に、前記工程 ( e ) の増幅反応のための試薬の一部または全てを前記試料に加えるか、または前記試薬の一部または全てを、前記 3' エキソヌクレアーゼ活性を含む成分と同時に前記試料に接触させる、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記試薬を前記工程 ( b ) および ( c ) の間に加える、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記工程 ( e ) は、前記伸長生成物の伸長部位の一部分を増幅することを含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記伸長生成物の伸長部位の一部分の増幅は、前記伸長生成物の伸長部位の一部分のいずれかの側に配置されるプライマーを用い、前記一部分を増幅することにより実現される、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記伸長生成物の伸長部位の前記一部分は、オリゴヌクレオチドのライゲーションを鋳型して環状オリゴヌクレオチドを生成し、前記環状オリゴヌクレオチドは、ローリングサークル増幅の鋳型として作用する、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記伸長生成物の伸長部位の前記一部分は、環状オリゴヌクレオチドのローリングサークル増幅のためのプライマーとして作用する、請求項 14 または 16 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記工程 ( e ) は、ポリメラーゼ連鎖反応または定量ポリメラーゼ連鎖反応を含み、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記工程 ( e ) は、定量ポリメラーゼ連鎖反応を含み、前記定量ポリメラーゼ連鎖反応は、核酸分子とインターカレートして検出可能な信号、好ましくは蛍光信号を提供する色素を用いる、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記ポリメラーゼ連鎖反応で用いられる前記プライマーは、3' エキソヌクレアーゼ活性に対する耐性を持つように修飾された形で提供され、前記プライマーは、その 3' 末端に少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む、請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記修飾ヌクレオチドは、チオホスフェイト修飾ヌクレオチド、ロックド核酸ヌクレオチド、2'-OMe-CEホスホロアミダイト修飾ヌクレオチド、および/またはペプチド核酸ヌクレオチドからなる一覧の 1 つ以上から選択される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記プライマーは、ホットスタートプライマー、および/または、前記ポリメラーゼは、熱安定性ポリメラーゼである、請求項 18 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記第 1 および第 2 の近接プローブの核酸ドメインの一方または双方が、前記工程 ( d ) で伸長される、請求項 1 ~ 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記核酸ドメインの少なくとも 1 つは、部分的に二本鎖である、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記部分的に二本鎖の核酸ドメインは、スプリントオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた一本鎖核酸ドメインを含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記スプリントオリゴヌクレオチドが、  
( i ) 前記工程 ( a ) の前に、前記近接プローブの一方の核酸ドメインにプレハイブリダイズされる、または  
( i i ) フリーな核酸分子として別で提供される、または  
( i i i ) 前記近接プローブよりも先に、同時に、または後で前記試料に加えられる、または  
( i v ) 第 3 の近接プローブの核酸ドメインとして提供される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記スプリントオリゴヌクレオチドを前記工程 ( d ) で伸長して伸長生成物を形成する、請求項 25 または 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記伸長生成物を環状化してローリングサークル増幅のための鋳型を提供し、前記伸長生成物の 3' 末端は、鋳型ライゲーションによって伸長生成物オリゴヌクレオチドの 5' 末端にライゲーションされている、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記伸長核酸ドメインは互いにライゲーションされており、前記ライゲーション反応は、請求項 25 ~ 28 のいずれか 1 項に規定のスプリントオリゴヌクレオチドを介したものである、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

少なくとも第 1 および第 2 の近接プローブを複数セット用いる複合解析を含み、それぞれのセットが独自の伸長生成物を生成する、請求項 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 3 1】**

前記工程 ( a ) および / または ( b ) にクラウディング剤が含まれる、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 3 2】**

試料中の検体を検出するための方法に用いるキットであって、

( a ) それぞれが検体結合ドメインと核酸ドメインとを含み、前記検体に同時に結合することが可能な少なくとも第 1 および第 2 の近接プローブを少なくとも 1 セットと、

( b ) 3 ' エキソヌクレアーゼ活性を含む成分と、

( c ) 任意で、前記第 1 および第 2 の近接プローブの少なくとも一方の核酸ドメインを伸長して伸長生成物を生成するための手段と、

( d ) 任意で、前記伸長生成物を増幅および検出するための手段と、

( e ) 任意で、前記第 1 および第 2 のプローブのためのスプリントオリゴヌクレオチドおよび / またはブロックオリゴヌクレオチドと、および

( f ) 任意で、前記検体のための固定化捕捉プローブまたは固定化手段を備えた捕捉プローブ、を含むキット。

**【請求項 3 3】**

前記 3 ' エキソヌクレアーゼ活性を含む成分は請求項 5 または 8 に規定のものである、請求項 3 2 に記載のキット。