【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4年2月24日(2022.2.24)

【国際公開番号】WO2019/144107
【公表番号】特表2021-511056(P2021-511056A)
【公表日】令和3年5月6日(2021.5.6)
【出願番号】特願2020-540385(P2020-540385)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｑ　1/6825(2018.01)
Ｃ１２Ｑ　1/6818(2018.01)
Ｃ１２Ｑ　1/6813(2018.01)
Ｃ１２Ｎ 15/11(2006.01)
Ｃ１２Ｑ　1/6823(2018.01)
Ｇ０１Ｎ 21/64(2006.01)
Ｃ１２Ｑ　1/686(2018.01)
Ｃ１２Ｍ　1/00(2006.01)
Ｃ１２Ｍ　1/34(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｑ　1/6825　　Ｚ
Ｃ１２Ｑ　1/6818　　ＺＺＮＡ
Ｃ１２Ｑ　1/6813　　Ｚ
Ｃ１２Ｎ 15/11　　Ｚ
Ｃ１２Ｑ　1/6823　　Ｚ
Ｇ０１Ｎ 21/64　　Ｆ
Ｇ０１Ｎ 21/64　　Ｃ
Ｃ１２Ｑ　1/686　　Ｚ
Ｃ１２Ｍ　1/00　　Ａ
Ｃ１２Ｍ　1/34　　Ｚ

【手続補正書】
【提出日】令和4年1月17日(2022.1.17)
【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】
以下の段階を含む、反応混合物中の標識付加二重鎖核酸について融解分析を行う方法であって、標識付加二重鎖核酸は所定Ｔｍを有する、前記方法：
(a) 標識付加二重鎖核酸の所定Ｔｍよりも低い第1温度において、標識付加二重鎖核酸からの第1シグナルを測定する段階；
(b) 標識付加二重鎖核酸の所定Ｔｍにおいてシグナルを測定せずに、該所定Ｔｍよりも高い第2温度において、標識付加二重鎖核酸からの第2シグナルを測定する段階；および
(c) 第1シグナルと第2シグナルを比較し、第1シグナルと第2シグナルとの間に所定の閾値を超える変化がある場合に、標識付加二重鎖核酸が反応混合物中での標的特異的プローブの標的配列への特異的ハイブリダイゼーションの結果であると判定する段階。
【請求項２】
標的特異的プローブが、標的特異的プローブの標的配列への特異的ハイブリダイゼーショ

ンの際に切断される切断可能なプローブである、請求項1記載の方法。
【請求項３】
シグナルが、標識付加二重鎖核酸の所定Ｔｍから2セルシウス度の範囲内では測定されない、任意で、シグナルが、標識付加二重鎖核酸の所定Ｔｍから5セルシウス度の範囲内では測定されない、請求項1または2記載の方法。
【請求項４】
第1温度と第2温度との差が、2セルシウス度よりも大きい、5セルシウス度よりも大きい、または8セルシウス度よりも大きい、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。
【請求項５】
反応混合物中のすべての標識付加二重鎖核酸が変性する第3温度において第3シグナルを測定する段階、ならびに第1および第2シグナルを第3シグナルに対して正規化する段階をさらに含む、任意で、（ｉ）第1および第2シグナルが、第1および第2シグナルから第3シグナルを減算することにより、第3シグナルに対して正規化される、または（ii）第1および第2シグナルが、第1および第2シグナルを第3シグナルで割ることにより、第3シグナルに対して正規化される、
請求項1～4のいずれか1項記載の方法。
【請求項６】
反応混合物が、それぞれが特有の所定Ｔｍを有する少なくとも2種類の異なる二重鎖核酸を含有し、それぞれの異なる二重鎖核酸が、同じシグナル発生標識を有する、請求項1～5のいずれか1項記載の方法であって、
(d) 標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍよりも低い温度および標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍよりも高い温度において、それぞれの異なる標識付加二重鎖核酸からのシグナルを測定する段階であって、
ここで、それぞれの異なる標識付加二重鎖核酸について、特有の所定Ｔｍよりも低い温度で測定されたシグナルおよび特有の所定Ｔｍよりも高い温度で測定されたシグナルにおける変化は、標識付加二重鎖核酸が標的特異的プローブのその標的への特異的ハイブリダイゼーションの結果であることを示す、段階
をさらに含み、任意で、シグナルが、ｎ＋１種類以下の異なる温度において測定され、ｎは、反応混合物中の異なる標的特異的プローブの数である、方法。
【請求項７】
(a) 標的核酸配列が存在する場合にそれに特異的にハイブリダイズし得る少なくとも1種の切断可能なプローブに、サンプルを接触させる段階であって、切断可能なプローブはシグナル発生標識を含む、段階；
(b) 標的核酸配列に特異的にハイブリダイズしたプローブを切断して、切断型プローブを形成させる段階；
(c) 切断型プローブと相補的である配列を含む捕捉配列に切断型プローブをハイブリダイズさせる条件を提供する段階；
(d) 捕捉配列を鋳型として用いて切断型プローブを伸長させて、所定Ｔｍを有する二本鎖プローブを形成させる段階；
(e) 所定Ｔｍにおいてシグナルを測定せずに、所定Ｔｍよりも低い第1温度においてシグナル発生標識からの第1シグナルを測定し、所定Ｔｍよりも高い第2温度において第2シグナルを測定する段階、ならびに
(f) 第1温度と第2温度において測定されたシグナルの変化を検出することにより、標的核酸配列の存在を決定する段階
を含む、サンプル中の少なくとも1種の標的核酸配列の存在または非存在を検出するための方法。
【請求項８】
捕捉配列と切断型プローブが単分子である、または捕捉配列と切断型プローブが二分子である、請求項7記載の方法。
【請求項９】

単一の反応コンパートメント中で、２種類またはそれ以上の異なる切断可能なプローブにサンプルを接触させ、任意で、シグナルが、ｎ＋１種類以下の異なる温度において測定され、ｎは、反応コンパートメント中の異なる切断可能なプローブの数である、請求項７または８記載の方法。
【請求項１０】
第１シグナルと第２シグナルとの間の比が所定の閾値を超える場合に、標的核酸が存在すると判定される、請求項７～９のいずれか１項記載の方法。
【請求項１１】
シグナルが、所定Ｔｍから２セルシウス度の範囲内の温度では測定されない、任意で、シグナルが、所定Ｔｍから５セルシウス度の範囲内の温度では測定されない、請求項７～１０のいずれか１項記載の方法。
【請求項１２】
シグナル発生標識が、レポーター-クエンチャー対の第１メンバーであり、二本鎖プローブが、レポーター-クエンチャー対の第１メンバーと相互作用するレポーター-クエンチャー対の第２メンバーを含み、任意で、
（ｉ）切断可能なプローブが、シグナル発生標識が付着している第１非天然ヌクレオチドを含み、二重鎖核酸が、第１非天然ヌクレオチドにハイブリダイズする第２非天然ヌクレオチドを含み、レポーター-クエンチャー対の第２メンバーが、第２非天然ヌクレオチドに付着している、任意で、第１および第２非天然ヌクレオチドが、iso-Cおよびiso-Gのうちの１つである、かつ／または
（ii）レポーター-クエンチャー対の第１メンバーが、蛍光実体であり、レポーター-クエンチャー対の第２メンバーが、蛍光実体の蛍光を消光するクエンチャーである、
請求項７～１１のいずれか１項記載の方法。
【請求項１３】
反応混合物中のすべての二重鎖核酸が変性する第３温度において第３シグナルを測定する段階、ならびに第１および第２シグナルを第３シグナルに対して正規化する段階をさらに含み、任意で、（ｉ）第１および第２シグナルが、第１および第２シグナルから第３シグナルを減算することにより、第３シグナルに対して正規化される、または（ii）第１および第２シグナルが、第１および第２シグナルを第３シグナルで割ることにより、第３シグナルに対して正規化される、請求項７～１２のいずれか１項記載の方法。
【請求項１４】
(a) 少なくとも第１、第２、および第３標識付加二重鎖核酸を提供する段階であって、
ここで、第１、第２、および第３標識付加二重鎖核酸のそれぞれは特有の所定Ｔｍを有し、
第２標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍは、第１標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍよりも高く、
第３標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍは、第２標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍよりも高く、
ここで、第１、第２、および第３標識付加二重鎖核酸は同じ標識で標識付加されている、段階；
(b) 第１標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍよりも低い第１温度において、第１、第２、および第３標識付加二重鎖核酸からの第１シグナルを検出する段階；
(c) 第１標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍと第２標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍとの間の第２温度において、第１、第２、および第３標識付加二重鎖核酸からの第２シグナルを検出する段階；
(d) 第２標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍと第３標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍとの間の第３温度において、第１、第２、および第３標識付加二重鎖核酸からの第３シグナルを検出する段階；
(e) 第３標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍよりも高い第４温度において、第１、第２、および第３標識付加二重鎖核酸からの第４シグナルを検出する段階；ならびに
(f) 第１、第２、第３、および第４シグナルを比較することにより、第１、第２、および第３

標識付加二重鎖核酸のうちの1つまたは複数が標的特異的プローブの切断の結果であるかどうかを判定する段階であって、
ここで、第1シグナルと第2シグナルとの間の変化は、第1標識付加二重鎖核酸が第1標的特異的プローブの切断の結果であることを示し、第2シグナルと第3シグナルとの間の変化は、第2標識付加二重鎖核酸が第2標的特異的プローブの切断の結果であることを示し、第3シグナルと第4シグナルとの間の変化は、第3標識付加二重鎖核酸が第3標的特異的プローブの切断の結果であることを示す、
段階
を含む、複数の標識付加核酸二重鎖について融解分析を行う方法。
【請求項１５】
シグナルが、第1、第2、および第3標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍにおいて検出されない、かつ／または第1温度と第2温度との間の差が2セルシウス度よりも大きく、第2温度と第3温度との間の差が2セルシウス度よりも大きく、第3温度と第4温度との間の差が2セルシウス度よりも大きい、請求項14記載の方法。
【請求項１６】
前記段階がｄＰＣＲ反応における複数の区画において行われる、請求項1～15のいずれか1項記載の方法。
【請求項１７】
前記段階がｄＰＣＲ反応における複数の区画にわたって行われる、請求項7～13のいずれか1項記載の方法であって、以下の段階をさらに含む、前記方法：
切断の前に、複数の区画における切断可能なプローブの標識からのシグナルを測定する段階、および、切断の前に測定されたシグナルを用いて、標的核酸を含む区画と標的核酸を含まない区画を区別するための閾値を設定する段階。
【請求項１８】
前記段階がｄＰＣＲ反応における複数の区画にわたって行われる、請求項1～17のいずれか1項記載の方法であって、以下の段階をさらに含む、前記方法：
標的核酸の存在を決定する段階の前に、第1シグナルと第2シグナルとの間に変化がない区画を標的陰性区画として同定する段階、ならびに、標的陰性区画から測定されたシグナルを用いて、各区画において測定された第1および第2シグナルにおける光および温度依存的変化を正規化する段階。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２５】
[本発明1001]
以下の段階を含む、反応混合物中の標識付加二重鎖核酸について融解分析を行う方法であって、標識付加二重鎖核酸は所定Ｔｍを有する、前記方法：
(a)標識付加二重鎖核酸の所定Ｔｍよりも低い第1温度において、標識付加二重鎖核酸からの第1シグナルを測定する段階；
(b)標識付加二重鎖核酸の所定Ｔｍにおいてシグナルを測定せずに、該所定Ｔｍよりも高い第2温度において、標識付加二重鎖核酸からの第2シグナルを測定する段階；および
(c)第1シグナルと第2シグナルを比較し、第1シグナルと第2シグナルとの間に変化がある場合に、標識付加二重鎖核酸が反応混合物中での標的特異的プローブの標的配列への特異的ハイブリダイゼーションの結果であると判定する段階。
[本発明1002]
標的特異的プローブが、標的特異的プローブの標的配列への特異的ハイブリダイゼーションの際に切断される切断可能なプローブである、本発明1001の方法。
[本発明1003]

シグナルが、標識付加二重鎖核酸の所定Ｔｍから２セルシウス度の範囲内では測定されない、本発明１００１または１００２の方法。

[本発明１００４]

シグナルが、標識付加二重鎖核酸の所定Ｔｍから５セルシウス度の範囲内では測定されない、本発明１００１または１００２の方法。

[本発明１００５]

第１温度と第２温度との差が２セルシウス度よりも大きい、本発明１００１または１００２の方法。

[本発明１００６]

第１温度と第２温度との差が５セルシウス度よりも大きい、本発明１００１または１００２の方法。

[本発明１００７]

第１温度と第２温度との差が８セルシウス度よりも大きい、本発明１００１または１００２の方法。

[本発明１００８]

反応混合物中のすべての標識付加二重鎖核酸が変性する第３温度において第３シグナルを測定する段階、ならびに第１および第２シグナルを第３シグナルに対して正規化する段階をさらに含む、本発明１００１または１００２の方法。

[本発明１００９]

反応混合物が、それぞれが特有の所定Ｔｍを有する少なくとも２種類の異なる二重鎖核酸を含有し、それぞれの異なる二重鎖核酸が、同じシグナル発生標識を有する、本発明１００１の方法であって、以下の段階をさらに含む、前記方法：

(ｄ) 標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍよりも低い温度および標識付加二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍよりも高い温度において、それぞれの異なる標識付加二重鎖核酸からのシグナルを測定する段階であって、

ここで、それぞれの異なる標識付加二重鎖核酸について、特有の所定Ｔｍよりも低い温度で測定されたシグナルおよび特有の所定Ｔｍよりも高い温度で測定されたシグナルにおける変化は、標識付加二重鎖核酸が標的特異的プローブのその標的への特異的ハイブリダイゼーションの結果であることを示す、

段階。

[本発明１０１０]

シグナルが、ｎ ＋ １種類以下の異なる温度において測定され、ｎは、反応混合物中の異なる標的特異的プローブの数である、本発明１００９の方法。

[本発明１０１１]

第１シグナルと第２シグナルとの間の変化が所定の閾値を超える、本発明１００１または１００２の方法。

[本発明１０１２]

(ａ) 反応混合物中に標的核酸配列が存在する場合にそれに特異的にハイブリダイズし得る少なくとも１種の切断可能な標的特異的プローブに、ハイブリダイゼーション条件下でサンプルを接触させる段階、

(ｂ) 標的核酸配列に特異的にハイブリダイズしたプローブを切断して、切断型プローブを形成させる段階；

(ｃ) 切断型プローブを捕捉配列にハイブリダイズさせる条件を提供する段階；

(ｄ) 切断型プローブを伸長させて、所定Ｔｍおよびシグナル発生標識を有する二重鎖核酸を形成させる段階；

(ｅ) 所定Ｔｍにおいてシグナルを測定せずに、所定Ｔｍよりも低い温度において第１シグナルを測定し、所定Ｔｍよりも高い温度において第２シグナルを測定する段階、ならびに

(ｆ) 第１シグナルと第２シグナルとの間の変化を検出することにより、標的核酸配列の存在を決定する段階

を含む、サンプル中の少なくとも１種の標的核酸配列の存在を決定するための方法。

[本発明１０１３]
サンプルが、それぞれが異なる標的核酸配列に特異的である少なくとも２種類の異なる切断可能なプローブに接触され、その特異的標的核酸配列の存在下で、それぞれの異なる切断可能なプローブが、特有の所定Ｔｍを有する二重鎖核酸を形成し、特有の所定Ｔｍを有する二重鎖核酸がすべて、同じシグナル発生標識を有する、本発明１０１２の方法であって、以下の段階をさらに含む、前記方法：
特有の所定Ｔｍを有するそれぞれの二重鎖核酸について、所定Ｔｍよりも低い温度において第１シグナルを測定し、所定Ｔｍよりも高い温度において第２シグナルを測定する段階、ならびに
第１シグナルと第２シグナルとの間の変化を検出することにより、標的核酸配列の存在を決定する段階。
[本発明１０１４]
シグナルが、ｎ＋１種類以下の異なる温度において測定され、ｎは、反応混合物中の異なる切断可能なプローブの数である、本発明１０１３の方法。
[本発明１０１５]
異なる二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍが少なくとも２セルシウス度異なる、本発明１０１３の方法。
[本発明１０１６]
異なる二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍが少なくとも５セルシウス度異なる、本発明１０１３の方法。
[本発明１０１７]
異なる二重鎖核酸の特有の所定Ｔｍが少なくとも１０セルシウス度異なる、本発明１０１３の方法。
[本発明１０１８]
捕捉配列と切断型プローブが単分子である、本発明１０１２の方法。
[本発明１０１９]
捕捉配列と切断型プローブが二分子である、本発明１０１２の方法。
[本発明１０２０]
第１シグナルと第２シグナルとの間の比が所定の閾値を超える場合に、標的核酸が存在すると判定される、本発明１０１２の方法。
[本発明１０２１]
シグナルが、所定Ｔｍから２セルシウス度の範囲内の温度では測定されない、本発明１０１２の方法。
[本発明１０２２]
シグナルが、所定Ｔｍから５セルシウス度の範囲内の温度では測定されない、本発明１０１２の方法。
[本発明１０２３]
少なくとも１種の切断可能なプローブが、レポーター-クエンチャー対の第１メンバーで標識され、少なくとも１種の切断可能なプローブは、その標的核酸配列にハイブリダイズした場合に第１立体構造をとる、本発明１０１２の方法。
[本発明１０２４]
少なくとも１種の切断可能なプローブがその標的配列に特異的にハイブリダイズすると、切断部位においてプローブが切断され、切断型プローブが標的核酸配列から放出されて第２立体構造をとり、切断部位から鎖伸長が起こる、本発明１０２３の方法。
[本発明１０２５]
鎖伸長が、レポーター-クエンチャー対の第１メンバーと相互作用するレポーター-クエンチャー対の第２メンバーを取り込むことを含む、本発明１０２４の方法。
[本発明１０２６]
第１立体構造が直鎖状立体構造であり、第２立体構造がヘアピン立体構造である、本発明１０２４の方法。

[本発明１０２７]
（ａ）標識付加二重鎖核酸が第１立体構造にある第１温度において、標識付加二重鎖核酸からの第１シグナルを測定する段階；
（ｂ）標識付加二重鎖核酸が第２立体構造にある第２温度において、標識付加二重鎖核酸からの第２シグナルを測定する段階であって、シグナルは第１温度と第２温度の中間にある温度において測定されない、段階；および
（ｃ）第１シグナルと第２シグナルを比較することにより、標識付加二重鎖核酸が標的特異的プローブの標的配列への特異的ハイブリダイゼーションの結果であるかどうかを判定する段階であって、第１シグナルと第２シグナルとの間の変化は、標識付加二重鎖核酸が標的特異的プローブの標的配列への特異的ハイブリダイゼーションの結果であることを示す、段階
を含む、反応混合物中の標識付加二重鎖核酸の融解分析を行う方法。
[本発明１０２８]
反応混合物が、少なくとも２種類の異なる標識付加二重鎖核酸を含有し、それぞれの異なる標識付加二重鎖核酸が、特有の温度において第２立体構造をとることができ、それぞれの異なる標識付加核酸が、同じシグナル発生標識を有する、本発明１０２７の方法であって、以下の段階をさらに含む、前記方法：
それぞれの標識付加二重鎖核酸について、標識付加二重鎖核酸が主に第１立体構造にある温度において第１シグナルを測定する段階、および標識付加二重鎖核酸が主に第２立体構造にある温度において第２シグナルを測定する段階、ならびに第１シグナルと第２シグナルを比較する段階。
[本発明１０２９]
シグナルが、ｎ＋１種類以下の異なる温度において測定され、ｎは、反応混合物中の異なる二重鎖核酸の数である、本発明１０２８の方法。
[本発明１０３０]
第１立体構造がヘアピン立体構造であり、第２立体構造が直鎖状立体構造である、本発明１０２７の方法。
[本発明１０３１]
標的特異的プローブが、レポーター-クエンチャー対の第１メンバーで標識された切断可能なプローブである、本発明１０２７の方法。
[本発明１０３２]
標的特異的プローブがその標的配列に特異的にハイブリダイズすると、切断部位においてプローブが切断されて切断型プローブを形成し、該切断型プローブが標的核酸配列から放出されてヘアピンプローブを形成し、該切断部位から鎖伸長が起こる、本発明１０３１の方法。
[本発明１０３３]
鎖伸長が、レポーター-クエンチャー対の第１メンバーと相互作用するレポーター-クエンチャー対の第２メンバーを取り込んで、シグナルの変化を生じることを含む、本発明１０３２の方法。
[本発明１０３４]
（ａ）標的核酸配列が存在する場合にそれに特異的にハイブリダイズし得る少なくとも１種の切断可能なプローブに、サンプルを接触させる段階であって、切断可能なプローブはシグナル発生標識を含む、段階；
（ｂ）標的核酸配列に特異的にハイブリダイズしたプローブを切断して、切断型プローブを形成させる段階；
（ｃ）切断型プローブと相補的である配列を含む捕捉配列に切断型プローブをハイブリダイズさせる条件を提供する段階；
（ｄ）捕捉配列を鋳型として用いて切断型プローブを伸長させて、所定Ｔｍを有する二本鎖プローブを形成させる段階；
（ｅ）所定Ｔｍにおいてシグナルを測定せずに、所定Ｔｍよりも低い第１温度においてシグ

ナル発生標識からの第1シグナルを測定し、所定Tmよりも高い第2温度において第2シグナルを測定する段階、ならびに
(f) 第1温度と第2温度において測定されたシグナルの変化を検出することにより、標的核酸配列の存在を決定する段階
を含む、サンプル中の少なくとも1種の標的核酸配列の存在または非存在を検出するための方法。
[本発明1035]
それぞれが異なる標的核酸に特異的であり、かつそれぞれがその各々の標的核酸の存在下で、特有の所定Tmを有する二本鎖プローブを形成し得る、2種類またはそれ以上の異なる切断可能なプローブに、サンプルを接触させ、それぞれの異なる二本鎖プローブが、同じレポーター-クエンチャー対を含む、本発明1034の方法であって、以下の段階をさらに含む、前記方法：
それぞれの異なる二本鎖プローブについて、所定Tmよりも低い第1温度において第1シグナルを測定し、所定Tmよりも高い第2温度において第2シグナルを測定する段階、ならびにそれぞれの異なる二本鎖プローブについて測定された第1シグナルと第2シグナルを比較する段階。
[本発明1036]
捕捉配列と切断型プローブが単分子である、本発明1034の方法。
[本発明1037]
捕捉配列と切断型プローブが二分子である、本発明1034の方法。
[本発明1038]
単一の反応コンパートメント中で、2種類またはそれ以上の異なる切断可能なプローブにサンプルを接触させる、本発明1035の方法。
[本発明1039]
シグナルが、n + 1種類以下の異なる温度において測定され、nは、反応コンパートメント中の異なる切断可能なプローブの数である、本発明1038の方法。
[本発明1040]
異なる二本鎖プローブの特有の所定Tmが少なくとも2セルシウス度異なる、本発明1035の方法。
[本発明1041]
異なる二本鎖プローブの特有の所定Tmが少なくとも5セルシウス度異なる、本発明1035の方法。
[本発明1042]
異なる二本鎖プローブの特有の所定Tmが少なくとも8セルシウス度異なる、本発明1035の方法。
[本発明1043]
第1シグナルと第2シグナルとの間の比が所定の閾値を超える場合に、標的核酸が存在すると判定される、本発明1034の方法。
[本発明1044]
シグナルが、所定Tmから2セルシウス度の範囲内の温度では測定されない、本発明1034の方法。
[本発明1045]
シグナルが、所定Tmから5セルシウス度の範囲内の温度では測定されない、本発明1034の方法。
[本発明1046]
シグナル発生標識が、レポーター-クエンチャー対の第1メンバーであり、二本鎖プローブが、レポーター-クエンチャー対の第1メンバーと相互作用するレポーター-クエンチャー対の第2メンバーを含む、本発明1034の方法。
[本発明1047]
切断可能なプローブが、シグナル発生標識が付着している第1非天然ヌクレオチドを含

み、二重鎖核酸が、第1非天然ヌクレオチドにハイブリダイズする第2非天然ヌクレオチドを含み、レポーター-クエンチャー対の第2メンバーが、第2非天然ヌクレオチドに付着している、本発明1046の方法。

[本発明1048]

レポーター-クエンチャー対の第1メンバーが、蛍光実体であり、レポーター-クエンチャー対の第2メンバーが、蛍光実体の蛍光を消光するクエンチャーである、本発明1046および1047のいずれかの方法。

[本発明1049]

第1および第2非天然ヌクレオチドが、iso-CおよびiSo-Gのうちの1つである、本発明1047の方法。

[本発明1050]

(a)少なくとも第1、第2、および第3標識付加二重鎖核酸を提供する段階であって、

ここで、第1、第2、および第3標識付加二重鎖核酸のそれぞれは特有の所定Tmを有し、

第2標識付加二重鎖核酸の特有の所定Tmは、第1標識付加二重鎖核酸の特有の所定Tmよりも高く、

第3標識付加二重鎖核酸の特有の所定Tmは、第2標識付加二重鎖核酸の特有の所定Tmよりも高く、

ここで、第1、第2、および第3標識付加二重鎖核酸は同じ標識で標識付加されている、段階;

(b)第1標識付加二重鎖核酸の特有の所定Tmよりも低い第1温度において、第1、第2、および第3標識付加二重鎖核酸からの第1シグナルを検出する段階;

(c)第1標識付加二重鎖核酸の特有の所定Tmと第2標識付加二重鎖核酸の特有の所定Tmとの間の第2温度において、第1、第2、および第3標識付加二重鎖核酸からの第2シグナルを検出する段階;

(d)第2標識付加二重鎖核酸の特有の所定Tmと第3標識付加二重鎖核酸の特有の所定Tmとの間の第3温度において、第1、第2、および第3標識付加二重鎖核酸からの第3シグナルを検出する段階;

(e)第3標識付加二重鎖核酸の特有の所定Tmよりも高い第4温度において、第1、第2、および第3標識付加二重鎖核酸からの第4シグナルを検出する段階;ならびに

(f)第1、第2、第3、および第4シグナルを比較することにより、第1、第2、および第3標識付加二重鎖核酸のうちの1つまたは複数が標的特異的プローブの切断の結果であるかどうかを判定する段階であって、

ここで、第1シグナルと第2シグナルとの間の変化は、第1標識付加二重鎖核酸が第1標的特異的プローブの切断の結果であることを示し、第2シグナルと第3シグナルとの間の変化は、第2標識付加二重鎖核酸が第2標的特異的プローブの切断の結果であることを示し、第3シグナルと第4シグナルとの間の変化は、第3標識付加二重鎖核酸が第3標的特異的プローブの切断の結果であることを示す、

段階

を含む、複数の標識付加核酸二重鎖について融解分析を行う方法。

[本発明1051]

シグナルが、第1、第2、および第3標識付加二重鎖核酸の特有の所定Tmにおいて検出されない、本発明1050の方法。

[本発明1052]

第1温度と第2温度との間の差が2セルシウス度よりも大きく、第2温度と第3温度との間の差が2セルシウス度よりも大きく、第3温度と第4温度との間の差が2セルシウス度よりも大きい、本発明1050の方法。

[本発明1053]

反応混合物中のすべての二重鎖核酸が変性する第3温度において第3シグナルを測定する段階、ならびに第1および第2シグナルを第3シグナルに対して正規化する段階をさらに含む、本発明1012、1027、または1034の方法。

[本発明１０５４]
前記段階がｄＰＣＲ反応における複数の区画において行われる、本発明１００１、１０１２、１０２７、１０３４、または１０５０の方法。
[本発明１０５５]
第１および第２シグナルが、第１および第２シグナルから第３シグナルを減算することにより、第３シグナルに対して正規化される、本発明１００８または１０５３の方法。
[本発明１０５６]
第１および第２シグナルが、第１および第２シグナルを第３シグナルで割ることにより、第３シグナルに対して正規化される、本発明１００８または１０５３の方法。
[本発明１０５７]
前記段階がｄＰＣＲ反応における複数の区画にわたって行われる、本発明１０１２または１０３４の方法であって、以下の段階をさらに含む、前記方法：
切断の前に、複数の区画における切断可能なプローブの標識からのシグナルを測定する段階、および、切断の前に測定されたシグナルを用いて、標的核酸を含む区画と標的核酸を含まない区画を区別するための閾値を設定する段階。
[本発明１０５８]
前記段階がｄＰＣＲ反応における複数の区画にわたって行われる、本発明１０１２または１０３４の方法であって、以下の段階をさらに含む、前記方法：
切断の前に、ある範囲の温度において複数のシグナルを測定する段階、ならびに、測定されたシグナルを用いて、融解分析中に測定されたシグナルにおける光および温度依存的変化を補正する段階。
[本発明１０５９]
前記段階がｄＰＣＲ反応における複数の区画にわたって行われる、本発明１００１、１０１２、１０２７、または１０３４の方法であって、以下の段階をさらに含む、前記方法：
標的核酸の存在を決定する段階の前に、第１シグナルと第２シグナルとの間に変化がない区画を標的陰性区画として同定する段階、ならびに、標的陰性区画から測定されたシグナルを用いて、各区画において測定された第１および第２シグナルにおける光および温度依存的変化を正規化する段階。
[本発明１０６０]
（ａ）サンプルとシグナル発生標的特異的プローブとを含む反応混合物を提供する段階であって、標的特異的プローブは、第１一本鎖立体構造にある場合に第１シグナルを生じる、段階；
（ｂ）反応混合物中の標的特異的プローブからの第１シグナルを測定する段階；
（ｃ）標的核酸が存在する場合にそれに標的特異的プローブがハイブリダイズして第２立体構造をとるための条件を提供する段階であって、第２立体構造が、所定Ｔｍを有しかつ所定Ｔｍよりも低い温度において第２シグナルを生じ得る二重鎖核酸である、段階；
（ｄ）所定Ｔｍにおいてシグナルを測定せずに、所定Ｔｍよりも低い温度において二重鎖核酸からの第２シグナルを測定する段階；
（ｅ）第１シグナルと第２シグナルとの間に差がある場合に、標的核酸の存在を決定する段階
を含む、サンプル中の標的核酸の存在を決定するための方法。
[本発明１０６１]
標的特異的プローブが、標的核酸へのハイブリダイゼーションの際に切断されて切断型プローブを形成する、切断可能なプローブである、本発明１０６０の方法。
[本発明１０６２]
切断型プローブが、捕捉配列に結合し、伸長されて二重鎖核酸を形成する、本発明１０６１の方法。
[本発明１０６３]
第１および第２シグナルが蛍光シグナルである、本発明１０６０の方法。
[本発明１０６４]

第1シグナルが、標的特異的プローブの標的核酸へのハイブリダイゼーションの前に検出される、本発明1060の方法。

[本発明1065]

第1シグナルが、標的特異的プローブが第1立体構造にある条件下で、切断および伸長の後に検出される、本発明1062の方法。

[本発明1066]

切断可能なプローブが、レポーター-クエンチャー対の第1メンバーで標識された第1非天然ヌクレオチドを含み、二重鎖核酸が、第1非天然ヌクレオチドと塩基対合することができかつレポーター-クエンチャー対の第2メンバーで標識された第2非天然ヌクレオチドを含む、本発明1061の方法。

[本発明1067]

第1および第2非天然ヌクレオチドが、iso-Cおよびiso-Gのうちの1つである、本発明1066の方法。

[本発明1068]

標的特異的プローブが、捕捉配列への結合前にフルオロフォアで標識され、クエンチャーが、フルオロフォアの消光をもたらす位置において二重鎖核酸中に取り込まれる、本発明1062の方法。

[本発明1069]

反応混合物が、段階（b）の後に標的核酸の増幅のための条件に供される、本発明1060の方法。

[本発明1070]

捕捉配列と切断型プローブが単分子であり、ハイブリダイズしてヘアピンプローブを形成する、本発明1062の方法。

[本発明1071]

捕捉配列と切断型プローブが二分子である、本発明1062の方法。

[本発明1072]

（a）サンプルと、反応混合物中に標的核酸配列が存在する場合にそれに特異的にハイブリダイズし得る少なくとも1種の標識付加された切断可能な標的特異的プローブとを含む反応混合物を提供する段階であって、標識がレポーター-クエンチャー対の第1メンバーである、段階；

（b）反応混合物中の標識付加標的特異的プローブからの第1シグナルを測定する段階；

（c）反応混合物中に標的核酸配列が存在する場合にそれに標識付加切断可能標的特異的プローブをハイブリダイズさせる条件を提供する段階；

（d）標的核酸配列に特異的にハイブリダイズしたプローブを切断して、切断型プローブを形成させる段階；

（e）切断型プローブを捕捉配列にハイブリダイズさせる条件を提供する段階；

（f）切断型プローブを伸長させて、レポーター-クエンチャー対の第2メンバーと所定Tmとを有する二重鎖核酸を形成させる段階；

（g）所定Tmよりも低い温度において第2シグナルを測定する段階；ならびに

（h）第1シグナルと第2シグナルとの間に所定の閾値を超える差がある場合に、標的核酸の存在を検出する段階

を含む、サンプル中の標的核酸の存在を検出するための方法。

[本発明1073]

捕捉配列と切断型プローブが単分子であり、ハイブリダイズしてヘアピンプローブを形成する、本発明1072の方法。

[本発明1074]

捕捉配列と切断型プローブが二分子である、本発明1072の方法。

[本発明1075]

標的特異的プローブが、レポーター-クエンチャー対の第1メンバーが付着している第1非天然ヌクレオチドを含み、二重鎖核酸が、レポーター-クエンチャー対の第2メンバー

が付着している第2非天然ヌクレオチドを含み、第1非天然ヌクレオチドと第2非天然ヌクレオチドが互いに塩基対合し得る、本発明1072の方法。

[本発明1076]

第1および第2非天然ヌクレオチドが、isoCおよびisoGの一方または他方である、本発明1075の方法。

[本発明1077]

レポーター-クエンチャー対の第1メンバーがフルオロフォアであり、レポーター-クエンチャー対の第2メンバーがクエンチャーである、本発明1072の方法。

[本発明1078]

(a) サンプルとシグナル発生標的特異的プローブとを含む反応混合物を提供する段階であって、標的特異的プローブは、第1一本鎖立体構造にある場合に第1シグナルを生じる、段階；

(b) 反応混合物中の標的特異的プローブからの第1シグナルを測定する段階；

(c) 反応混合物を標的核酸の増幅のための条件に供する段階であって、増幅中に、標的特異的プローブは修飾されて、所定Tmを有しかつ所定Tmよりも低い温度において第2シグナルを生じ得る二重鎖核酸を含む修飾型標的特異的プローブを形成する、段階；

(d) 所定Tmにおいてシグナルを測定せずに、所定Tmよりも低い温度において第2シグナルを測定する段階；

(e) 第1シグナルと第2シグナルとの間に所定の閾値を超える差がある場合に、標的核酸の存在を決定する段階

を含む、サンプル中の標的核酸の存在を決定するための方法。

[本発明1079]

標的特異的プローブが、標的核酸へのハイブリダイゼーションの際に切断され、捕捉配列に結合しかつ伸長されて二重鎖核酸を形成する切断型プローブを形成することによって、修飾される、本発明1078の方法。

[本発明1080]

第1および第2シグナルが蛍光シグナルである、本発明1078の方法。

[本発明1081]

第1シグナルが、標的特異的プローブの標的核酸へのハイブリダイゼーションの前に検出される、本発明1079の方法。

[本発明1082]

第1シグナルが、修飾型標的特異的プローブが一本鎖立体構造にある条件下で、切断および伸長の後に検出される、本発明1079の方法。

[本発明1083]

標的特異的プローブが、レポーター-クエンチャー対の第1メンバーで標識された第1非天然ヌクレオチドを含み、修飾型標的特異的プローブが、第1非天然ヌクレオチドと塩基対合することができかつレポーター-クエンチャー対の第2メンバーで標識された第2非天然ヌクレオチドを含む、本発明1078の方法。

[本発明1084]

第1および第2非天然ヌクレオチドが、iso-Cおよびiso-Gのうちの1つである、本発明1083の方法。

[本発明1085]

標的特異的プローブが、捕捉配列への結合前にフルオロフォアで標識され、クエンチャーが、フルオロフォアの消光をもたらす位置において伸長中に二重鎖核酸中に取り込まれる、本発明1079の方法。

[本発明1086]

(a) 第1および第2蛍光シグナル発生標的特異的プローブと第1および第2標的核酸を含有する可能性のあるサンプルとを含む増幅反応混合物を形成する段階；

(b) 各区画が平均して0個または1個の第1および／または第2標的核酸を含むように、反応混合物を区画化する段階；

（ｃ）予め選択された温度Ｔ１、Ｔ２、およびＴ３において、区画の少なくとも１つのサブセットの画像から第１、第２、および第３セットの蛍光強度値を取得し、区画の該サブセット中の各区画について、予め選択された温度Ｔ１における第１蛍光強度値、予め選択された温度Ｔ２における第２蛍光強度値、および予め選択された温度Ｔ３における第３蛍光強度値を決定する段階；
（ｄ）第１および第２標的核酸を増幅するための、ならびにその標的核酸の存在下で第１シグナル発生プローブを修飾して第１所定Ｔｍを有する第１二重鎖核酸を形成するための、ならびにその標的核酸の存在下で第２シグナル発生プローブを修飾して第２所定Ｔｍを有する第２二重鎖核酸を形成するための条件に、増幅反応混合物を含む区画を供する段階；
（ｅ）第１所定Ｔｍよりも低い温度Ｔ１において、区画の該サブセットの画像から第４セットの蛍光強度値を取得し、各区画について第４強度値を算出する段階；
（ｆ）第１所定Ｔｍよりも高いが、第２所定Ｔｍよりも低い温度Ｔ２において、区画の該サブセットの画像から第５セットの蛍光強度値を取得し、各区画について第５強度値を算出する段階；
（ｇ）第２所定Ｔｍよりも高い温度Ｔ３において、区画の該サブセットの画像から第６セットの蛍光強度値を取得し、各区画について第６強度値を算出する段階；
（ｈ）各区画について、第４強度値を第１強度値で割って、Ｔ１に関連する第７強度値を得る段階；
（ｉ）各区画について、第５強度値を第２強度値で割って、Ｔ２に関連する第８強度値を得る段階；
（ｊ）各区画について、第６強度値を第３強度値で割って、Ｔ３に関連する第９強度値を得る段階；
（ｋ）各区画について、第８強度値と第７強度値との間の変化を検出して、第１標的核酸の存在を決定する段階；ならびに
（ｌ）各区画について、第９平均強度値と第８平均強度値との間の変化を検出して、第２標的核酸の存在を決定する段階
を含む、サンプル中の第１および第２標的核酸の存在を検出する方法。
[本発明１０８７]
第１および第２蛍光シグナル発生プローブが、同じシグナル発生標識を有する、本発明１０８６の方法。
[本発明１０８８]
シグナル発生標識がレポーター-クエンチャー対の第１メンバーであり、第１および第２二重鎖核酸がレポーター-クエンチャー対の第２メンバーを含む、本発明１０８７の方法。
[本発明１０８９]
第１および第２シグナル発生プローブが、レポーター-クエンチャー対の第１メンバーが付着している第１非天然ヌクレオチドを含み、第１および第２二重鎖核酸が、レポーター-クエンチャー対の第２メンバーが付着している第２非天然ヌクレオチドを含み、第１非天然ヌクレオチドと第２非天然ヌクレオチドが互いに塩基対合し得る、本発明１０８８の方法。
[本発明１０９０]
非天然ヌクレオチドがiso-Cまたはiso-Gのうちの１つである、本発明１０８９の方法。
[本発明１０９１]
第１および第２シグナル発生プローブが、増幅中に切断される切断可能なプローブである、本発明１０８６の方法。
[本発明１０９２]
第８強度値と第７強度値との間の変化が所定の閾値を超え、第９強度値と第８強度値との間の変化が所定の閾値を超える、本発明１０８６の方法。
[本発明１０９３]
（ａ）蛍光シグナル発生標的特異的プローブと標的核酸を含有するサンプルとを含む増幅反応混合物を形成する段階；

（ｂ）各区画が平均して０個または１個の標的核酸を含むように、反応混合物を区画化する段階；
（ｃ）予め選択された温度Ｔ１およびＴ２において、区画の少なくとも１つのサブセットの画像から第１および第２セットの蛍光強度値を取得し、区画の該サブセット中の各区画について、予め選択された温度Ｔ１における第１蛍光強度値および予め選択された温度Ｔ２における第２蛍光強度値を決定する段階；
（ｄ）標的核酸を増幅するための、およびその標的核酸の存在下でシグナル発生プローブを修飾して所定Ｔｍを有する二重鎖核酸を形成するための条件に、増幅反応混合物を含む区画を供する段階；
（ｅ）所定Ｔｍよりも低い温度Ｔ１において、区画の該サブセットの画像から第３セットの蛍光強度値を取得し、各区画について第３強度値を算出する段階；
（ｆ）所定Ｔｍよりも高い温度Ｔ２において、区画の該サブセットの画像から第４セットの蛍光強度値を取得し、各区画について第４強度値を算出する段階；
（ｇ）各区画について、第３強度値を第１強度値で割って、Ｔ１に関連する第５強度値を得る段階；
（ｈ）各区画について、第４強度値を第２強度値で割って、Ｔ２に関連する第６強度値を得る段階；
（ｉ）各区画について、第６強度値と第５強度値との間の変化を検出して、標的核酸の存在を決定する段階
を含む、サンプル中の標的核酸の存在を検出する方法。
[本発明１０９４]
標的核酸が第１標的核酸であり、シグナル発生標的特異的プローブが第１蛍光シグナル発生標的特異的プローブであり、所定Ｔｍが第１所定Ｔｍである、本発明１０９３の方法であって、
第２標的核酸の存在を検出する段階であって、反応混合物が第２蛍光シグナル発生標的特異的プローブをさらに含む、段階
をさらに含み、
（ｊ）段階（ｂ）において、各区画が平均して０個または１個の第１および／または第２標的核酸を含むように、反応混合物を区画化する段階；
（ｋ）段階（ｃ）において、予め選択された温度Ｔ３において、区画の少なくとも１つのサブセットの画像から第５セットの蛍光強度値を取得し、区画の該サブセット中の各区画について、予め選択された温度Ｔ３における第７蛍光強度値を決定する段階；
（ｌ）段階（ｄ）において、標的核酸を増幅するための、およびその標的核酸の存在下で第２シグナル発生プローブを修飾して第２所定Ｔｍを有する第２二重鎖核酸を形成するための条件に、増幅反応混合物を含む区画を供する段階；
（ｍ）第２所定Ｔｍよりも高い温度Ｔ３において、区画の該サブセットの画像から第６セットの蛍光強度値を取得し、各区画について第８強度値を算出する段階；
（ｎ）各区画について、第８強度値を第７強度値で割って、Ｔ３に関連する第９強度値を得る段階；
（ｏ）各区画について、第９強度値と第６強度値との間の変化を検出して、第２標的核酸の存在を決定する段階
をさらに含む、前記方法。
[本発明１０９５]
第６強度値と第５強度値との間の変化および第９強度値と第６強度値との間の変化が、所定の閾値を超える、本発明１０９３または１０９４の方法。
[本発明１０９６]
第１および第２蛍光シグナル発生プローブが、同じシグナル発生標識を有する、本発明１０９４の方法。
[本発明１０９７]
シグナル発生標識がレポーター-クエンチャー対の第１メンバーであり、第１および第２

二重鎖核酸がレポーター-クエンチャー対の第2メンバーを含む、本発明1094の方法。
[本発明1098]
第1および第2シグナル発生プローブが、レポーター-クエンチャー対の第1メンバーが付着している第1非天然ヌクレオチドを含み、第1および第2二重鎖核酸が、レポーター-クエンチャー対の第2メンバーが付着している第2非天然ヌクレオチドを含み、第1非天然ヌクレオチドと第2非天然ヌクレオチドが互いに塩基対合し得る、本発明1094の方法。
[本発明1099]
非天然ヌクレオチドがiso-Cまたはiso-Gのうちの1つである、本発明1098の方法。
[本発明1100]
第1および第2シグナル発生プローブが、増幅中に切断される切断可能なプローブである、本発明1094の方法。
本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、詳細な説明および具体的な例は、本発明の特定の態様を示すものの、単なる例示として提供されることを理解すべきである。というのは、本発明の精神および範囲内のさまざまな変更および修飾が、この詳細な説明から当業者には明らかになるからである。