

【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30年4月5日(2018.4.5)

【公表番号】特表2017-506914(P2017-506914A)

【公表日】平成29年3月16日(2017.3.16)

【年通号数】公開・登録公報2017-011

【出願番号】特願2016-570186(P2016-570186)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/68 (2018.01)

G 01 N 33/542 (2006.01)

G 01 N 33/53 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/68 Z N A A

G 01 N 33/542 A

G 01 N 33/53 M

【手続補正書】

【提出日】平成30年2月20日(2018.2.20)

【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】

サンプル中の核酸の存在及び／又は量を決定する方法であって、

(a) 所定量の第1の核酸；

所定量の第2の核酸；

前記第1の核酸と複合体を形成することができる所定量のFRET化合物、ここで、前記FRET化合物は、複合体を形成していない状態では第1の検出可能な特徴を有し、複合体を形成した状態では第2の検出可能な特徴を有する第1の検出可能な標識と、前記第1の核酸の領域に特異的な結合部分とを含む；

前記第2の核酸と複合体を形成することができる所定量のレポーター化合物、ここで、各レポーター化合物は、前記第2の核酸の領域に特異的な結合部分と、第2の検出可能な標識とを含み、ここで、第1の検出可能な標識と前記第2の検出可能な標識の両者は同一である、

を反応チャンバーに導入すること、

ここで、前記反応チャンバーは、レポーター化合物を捕捉することができる結合部材と、前記反応チャンバーが緩和された状態の内容積と圧縮された状態の内容積を有するように、少なくとも部分的に変形可能なように構成されたカバー要素とを備え、前記結合部材は、前記カバー要素の上に配置されるか又は前記カバー要素と対抗する表面に配置され、

ここで、前記第2の核酸と前記レポーター化合物との複合体の形成により、前記結合部材による前記レポーター化合物の捕捉が阻害される、

(b) 前記第1の核酸及び／又は前記第2の核酸を増幅させ、任意選択的に、前記第1の核酸及び／又は前記第2の核酸を増幅の前に逆転写されること、

(c) 第1の核酸及びFRET化合物をそれぞれ含む複合体を形成すること、

(d) 所定量のレポーター化合物の一部と第2の核酸との複合体を形成すること、

(e) 前記所定量のレポーター化合物のうち、第2の核酸と複合体になっていない残りの部分を前記結合部材に捕捉すること、

(f) 緩和された状態の内容積を有する前記反応チャンバー内の溶液中におけるFRET化合物と複合した第1の核酸の存在及び／又は量の指標となる値を決定すること、及び

(g) 圧縮された状態の内容積を有する前記反応チャンバー内の前記結合部材に捕捉されたレポーター化合物の存在及び／又は量の指標となる値を決定することを含む、方法。

#### 【請求項2】

結合部材に捕捉されたレポーター化合物の存在及び／又は量の指標となる値を基準として、第2の核酸の存在及び／又は量の指標となる値を決定することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

#### 【請求項3】

第1の検出可能な標識及び第2の検出可能な標識が両方とも蛍光標識であり、任意選択的に、第1の検出可能な標識及び第2の検出可能な標識が両方とも、300nm～850nmの範囲の波長で発光する、請求項1又は2に記載の方法。

#### 【請求項4】

FRET化合物によって捕捉された第1の核酸の存在及び／又は量の指標となる値が、複合体を形成した状態のFRET化合物で決定される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

#### 【請求項5】

第1の核酸が検体であり、及び／又は

第2の核酸が、第2の検体及びコントロール核酸からなる群から選択され、及び／又は

第1の核酸が、サンプルあたり100コピー数に満たない量で存在し、及び／又は

第2の核酸が、サンプルあたり100コピー数以上の量で存在する、

請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

#### 【請求項6】

(c) 第1の核酸及びFRET化合物をそれぞれ含む複合体を形成する工程、(d) 所定量のレポーター化合物の一部と、所定量の第2の核酸の少なくとも一部との複合体を形成する工程、及び(e) 所定量のレポーター化合物のうち、第2の核酸と複合体になつていな残りの部分を結合部材に捕捉する工程が、同時に行われ、ここで、任意選択的に、前記第1の核酸及び前記第2の核酸の増幅が、工程(d)の前に開始されるか、又は工程(c)、(d)及び(e)と同時に行われる、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

#### 【請求項7】

第2の核酸が、陽性増幅コントロール及び陰性増幅コントロールからなる群から選択される、請求項6に記載の方法。

#### 【請求項8】

結合部材は、レポーター化合物を結合部材に捕捉することができる、1つ以上の異なるレポーターに特異的な捕捉化合物を含み、任意選択的に、

レポーターに特異的な捕捉化合物が、オリゴヌクレオチドであり、及び／又は

異なるレポーターに特異的な捕捉化合物が、結合部材に対して異なる位置に配置されており、及び／又は

レポーターに特異的な捕捉化合物との複合体を形成することによって、レポーター化合物が結合部材に捕捉され、及び／又は

第2の核酸と複合体を形成することができるレポーター化合物の相互作用部位の少なくとも一部が、レポーターに特異的な捕捉化合物との複合体を形成することもでき、及び／又は

レポーターに特異的な捕捉化合物と第2の核酸が、レポーター化合物との複合体の形成について競合する、

請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

#### 【請求項9】

FRET化合物によって捕捉された第1の核酸の存在及び／又は量の指標となる値と、

結合部材に捕捉されたレポーター化合物の存在及び／又は量の指標となる値とが、連続して、又は同時に決定される、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

レポーター化合物がオリゴヌクレオチドである、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

増幅が、二本鎖の核酸を変性する工程を含み、ここで、前記二本鎖の核酸は、レポーター化合物と第2の核酸との複合体、レポーター化合物とレポーターに特異的な捕捉化合物との複合体、レポーター化合物の二本鎖及び第1の核酸及び／又は第2の核酸の二本鎖を含み、及び／又は、増幅は、プライマー化合物を第1の核酸及び／又は第2の核酸にアニーリングする工程を含み、任意選択により、アニーリングする工程は、所定量のレポーター化合物の一部と、第2の核酸の少なくとも一部との複合体を形成する工程、及び／又は所定量のレポーター化合物のうち、第2の核酸と複合体になっていない残りの部分を結合部材に捕捉する工程と同時に行われる、請求項6～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

増幅は、等温増幅法であり、ここで、前記等温増幅法は、任意選択により、等温N E A Rであり、又は、前記増幅は、周期的な増幅であり、前記周期的な増幅は、任意選択により、P C Rであり、P C Rを行うことは、任意選択により、エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼを用いることを含み、任意選択により、結合部材に捕捉されたレポーター化合物の存在及び／又は量の指標となる値は、周期的な増幅の少なくとも1つの周期の後に、任意選択により、周期的な増幅のそれぞれの周期の後に決定され、任意選択により、第1の核酸及び／又は第2の核酸の存在及び／又は量の指標となる値が、結合部材に捕捉されたレポーター化合物の存在及び／又は量の指標となる値を決定した後に、それぞれの時間で決定される、請求項6～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

第2の核酸の存在及び／又は量の指標となる値が、レポーター化合物の存在及び／又は量の指標となる値と、第2の核酸の存在及び／又は量の指標となる値との相関関係を示す検量曲線に基づいて決定される、請求項2～12のいずれか1項に記載の方法。