

【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18年9月28日(2006.9.28)

【公表番号】特表2005-536210(P2005-536210A)

【公表日】平成17年12月2日(2005.12.2)

【年通号数】公開・登録公報2005-047

【出願番号】特願2004-529748(P2004-529748)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成18年8月9日(2006.8.9)

【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】

以下の工程を含む、サンプルにおける標的核酸を検出する方法：

- a) サンプルを、少なくとも1つのAP部位プローブおよびAPエンドヌクレアーゼと、AP部位プローブが標的核酸にハイブリダイズして反応混合物を形成するのに十分な条件下で接触させる工程、ここで該AP部位プローブは標的核酸にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドNAおよび検出可能なレポーター基を含む機能性テイルRを含み、該機能性テイルRはNAの3'末端ヌクレオチドにホスフェート基のホスホジエステル結合を介して結合しており、ここでレポーター基は機能性テイルRがNAに結合している場合には検出されない；および、
- b) 該APエンドヌクレアーゼがNAの3'末端ヌクレオチドに機能性テイルRを結合させているホスホジエステル結合を切断するのに十分な反応条件下で反応混合物をインキュベートする工程、ここでAPエンドヌクレアーゼは、NAがハイブリダイズしていないか非相補的な核酸にハイブリダイズしている場合と比較して、NAが相補的な標的核酸配列にハイブリダイズしている場合に、NAにテイルRを結合させているホスホジエステル結合を優先的に切断する；そして、
- c) 切断された機能性テイルR上のレポーター基を検出し、それによって標的核酸を検出する工程。

【請求項2】

さらにサンプルとエンハンサーオリゴヌクレオチドとを接触させる工程を含み、ここで該エンハンサーオリゴヌクレオチドの5'末端が、ハイブリダイズしたAP部位プローブの3'側で標的核酸とハイブリダイズし、エンハンサーオリゴヌクレオチドとAP部位プローブの標的核酸とのハイブリダイゼーション位置の間に0-5の非対塩基のギャップが存在する、請求項1の方法。

【請求項3】

該AP部位プローブの5'末端が該エンハンサーの3'末端に共有結合している請求項2の方法。

【請求項4】

非切断可能リンカーを介して該AP部位プローブのNAの5'末端に結合したクエンチャー

分子をさらに含む、請求項1の方法。

【請求項5】

ホスホジエステル結合の切断の結果、遊離の3'-OHを有するハイブリダイズしたNAが生じる、請求項1の方法。

【請求項6】

さらにサンプルと核酸ポリメラーゼとを接触させる工程を含み、そしてさらに標的核酸を増幅させる工程を含み、ハイブリダイズしたNAをポリメラーゼが鋳型特異的に伸長させるのに十分な反応条件でのサンプルのインキュベーションが該増幅に含まれる、請求項5の方法。

【請求項7】

該増幅が定温増幅である請求項6の方法。

【請求項8】

APエンドヌクレアーゼがAP部位プローブのホスホジエステル結合を切断すると同時にポリメラーゼが切断されたAP部位プローブを鋳型特異的に伸長させることを可能にする反応条件下でサンプルをインキュベーションする、請求項5の方法。

【請求項9】

該AP部位プローブのNAが3-200ヌクレオチドの長さである請求項1の方法。

【請求項10】

機能性テイルRがホスフェート基にヒドロキシプロリノールリンカーを介して結合している請求項1の方法。

【請求項11】

レポーター基がフルオロフォアである請求項1の方法。

【請求項12】

APエンドヌクレアーゼがクラスII APエンドヌクレアーゼである請求項1の方法。

【請求項13】

クラスII APエンドヌクレアーゼが大腸菌エンドヌクレアーゼIVである請求項12の方法。

【請求項14】

標的核酸が固体支持体に結合している請求項1の方法。

【請求項15】

AP部位プローブが固体支持体に結合している請求項1の方法。

【請求項16】

エンハンサーが固体支持体に結合している請求項2の方法。

【請求項17】

該少なくとも1つのAP部位プローブが第一のAP部位プローブと第二のAP部位プローブを含み、ここで該第一のプローブが第二のプローブのNA部分とは異なる少なくとも1つの塩基を含むNA部分を含み、該第一のプローブが該第二のプローブのレポーター基から識別的に検出可能なレポーター基を含む請求項1の方法。

【請求項18】

該第一のプローブおよび該第二のプローブのレポーター基がフルオロフォアを含み、ここで該第一のプローブのフルオロフォアが、該第二のプローブのフルオロフォアと識別的に検出可能な放射波長を含む、請求項17の方法。

【請求項19】

該第一のプローブのNAと該第二のプローブのNAの間の該少なくとも1つの塩基の差が該プローブの3'末端から1、2、3または4位における塩基の差を含む、請求項17の方法。

【請求項20】

該第一のプローブのNAと該第二のプローブのNAの間の該少なくとも1つの塩基の差が該プローブの3'末端から1または2位における塩基の差を含む、請求項17の方法。

【請求項21】

該少なくとも1つのAP部位プローブが複数のAP部位プローブを含み、該プローブのNA部

分がユニバーサルライブラリーのメンバーである、請求項1の方法。

【請求項22】

該AP部位プローブメンバーのNA部分が5-8ヌクレオチドの長さである請求項21の方法。

【請求項23】

該AP部位プローブメンバーがさらに少なくとも1つの修飾塩基を含む請求項9の方法。

【請求項24】

請求項1の方法を実施するためのAP部位プローブを含むキット。

【請求項25】

以下の工程を含むサンプルにおける標的核酸の検出方法：

- a) AP部位プローブが標的核酸にハイブリダイズして反応混合物を形成するのに十分な条件下で、サンプルと少なくとも1つのAP部位プローブおよびAPエンドヌクレアーゼを接触させる工程、ここで該AP部位プローブは、標的核酸にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドNA、クエンチャー分子を含む機能性テイルRおよびNAの5'末端ヌクレオチドに非切断可能リンカーを介して結合したレポーター基を含み、該機能性テイルRはNAの3'末端ヌクレオチドにホスフェート基のホスホジエステル結合を介して結合しており、ここで、レポーター基は機能性テイルRがNAに結合している際には検出されない；および、
- b) 該APエンドヌクレアーゼが、機能性テイルRをNAの3'末端ヌクレオチドに結合させているホスホジエステル結合を切断するのに十分な反応条件下で反応混合物をインキュベートする工程、ここでAPエンドヌクレアーゼは、NAがハイブリダイズしていないか非相補的な核酸にハイブリダイズしている場合と比較して、NAが相補的な標的核酸配列にハイブリダイズしている場合にテイルRとNAを結合させているホスホジエステル結合を優先的に切断する；および、
- c) 機能性テイルRの切断に際してレポーター基を検出することによって、標的核酸を検出する工程。

【請求項26】

以下を含むサンプルにおける標的核酸配列の増幅方法：

- a) フォワードプライマーとリバースプライマーが標的核酸にハイブリダイズして反応混合物を形成するのに十分な条件下で、サンプルを少なくとも1つのフォワードプライマーおよび少なくとも1つのリバースプライマー、APエンドヌクレアーゼ、および核酸ポリメラーゼと接触させる工程、ここでフォワードプライマーとリバースプライマーは独立に配列構造 $(NA_1-L)_m-NA_2$ を有し、ここで NA_1 および NA_2 は標的核酸に相補的な核酸配列であり、LはAPエンドヌクレアーゼ-切断可能リンカーであり、mは0~100であり、ここで該フォワードプライマーとリバースプライマーの少なくとも1つはAPエンドヌクレアーゼ-切断可能リンカー、Lを含む；
- b) APエンドヌクレアーゼがリンカー部位Lにおいて切断して遊離の3'-OHを生じさせると同時にポリメラーゼが鋳型特異的にプライマーを伸長させるのを可能とする反応条件下で反応混合物をインキュベートし、それによって標的核酸配列を増幅する工程。

【請求項27】

該増幅が定温増幅である請求項26の方法。

【請求項28】

該APエンドヌクレアーゼがエンドヌクレアーゼIVである請求項26の方法。

【請求項29】

該標的核酸が増幅反応産物である請求項1の方法。

【請求項30】

該増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応である請求項29の方法。

【請求項31】

該増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応であり該方法が熱安定性エンドヌクレアーゼを用いる請求項29の方法。

【請求項32】

該増幅反応が定温増幅反応である請求項29の方法。