

【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 6 月 15 日 (2006.6.15)

【公表番号】特表 2005-523027 (P2005-523027A)

【公表日】平成 17 年 8 月 4 日 (2005.8.4)

【年通号数】公開・登録公報 2005-030

【出願番号】特願 2003-586590 (P2003-586590)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

B 2 2 F 1/02 (2006.01)

C 0 7 H 21/04 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

G 0 1 N 33/547 (2006.01)

G 0 1 N 33/553 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/02 Z N A

B 2 2 F 1/02 B

B 2 2 F 1/02 C

B 2 2 F 1/02 D

B 2 2 F 1/02 E

C 0 7 H 21/04 B

C 1 2 Q 1/68 A

G 0 1 N 33/547

G 0 1 N 33/553

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成 18 年 4 月 20 日 (2006.4.20)

【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】

第一の端と、第二の端と、第一の部分と第二の部分を備えた配列と、を有する標的核酸を準備するステップ (a)

結合した端と結合していない端を有する捕捉オリゴヌクレオチドが固定された担体の表面を準備するステップであって、前記オリゴヌクレオチドは、前記標的核酸の配列の前記第一の部分に相補的でない前記結合した端に最も近接した第一の配列と、前記標的核酸の配列の前記第一の部分に相補的な前記結合していない端に最も近接した第二の配列とからなるステップ (b)

前記捕捉オリゴヌクレオチドの前記第二の配列が前記標的核酸の前記第一の部分とハイブリダイゼーション可能な条件下で、前記固定化した捕捉オリゴヌクレオチドを前記標的核酸と接触させ、それによって前記標的核酸の一端を捕捉するステップ (c)

コアとシリカ表面とからなる機能化されたナノ粒子を準備するステップであって、前記シリカ表面は、前記シリカ表面に結合した第一の端と結合していない第二の端を有するプローブオリゴヌクレオチドからなる少なくとも一つの官能基と結合しており、前記結合し

ていない端の配列の少なくとも一つの部分は、前記標的核酸の前記第二の部分と相補的であるステップ (d)

捕捉された前記標的核酸の前記結合していない端が前記機能化されたナノ粒子へ結合した前記オリゴヌクレオチドの前記結合していない端とハイブリダイゼーション可能な条件下で、前記機能化されたナノ粒子と、ステップ (d) の捕捉された標的核酸分子とを接触させるステップ (e)

前記機能化されたナノ粒子の前記標的核酸への結合を検出し、それによって前記標的核酸の配列の存在を検出するステップ (f)

を備えたことを特徴とする核酸分子の検出方法。

【請求項 2】

前記コアは、染料からなることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記染料は、有機染料であることを特徴とする請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記染料は、無機染料であることを特徴とする請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】

前記染料は、 $Ru^{II}/2, 2', \text{ジピリジル}$ 、 $Eu^{3+}/2, 2', \text{ジピリジル}$ 、ローダミン 6 G、テトラメチルローダミン、及びフルオレセインからなるグループから選ばれることを特徴とする請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】

前記標的核酸は、RNAであることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

前記標的核酸は、DNAであることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

前記ナノ粒子の前記標的分子への結合は、前記ナノ粒子の特性の変化を観察することによって、検出されることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

前記特性が発光信号の放射であることを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

前記担体の表面に結合した標的核酸濃度は、標的核酸濃度と発光信号の強度の間の直線関係として検出されることを特徴とする請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

DNA は、 $3 \times 10^{-12} \text{ M}$ から $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ までの濃度の範囲で検出可能であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

検出の感度は、約 30 ヌクレオチドの直線 DNA からなる二つのオリゴヌクレオチドの間の一つの塩基のミスマッチを区別するために十分であることを特徴とする請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

コアとシリカ表面とからなり、前記シリカ表面は、分子標識の形態のオリゴヌクレオチドからなる少なくとも一つの官能基と結合しており、前記オリゴヌクレオチドの配列は、所定の配列からなる一本鎖ループ構造と、所定の配列の両側のステム形成アーム構造とからなり、二つの前記ステム形成アーム構造は、相互に相補的であって相互にハイブリダイゼーションしたときにステムを形成する塩基からなり、前記オリゴヌクレオチドは、さらに前記配列の一端に結合した蛍光剤と、前記配列の他端と結合した消光剤とからなり、前記蛍光剤の蛍光発光は、前記ステム形成構造が所定の配列の相補体の非存在下で相互にハイブリダイゼーションされたときに、前記消光剤によって阻害されることを特徴とする機能化されたナノ粒子。

【請求項 14】

前記コアは、金属からなることを特徴とする請求項 13 記載の機能化されたナノ粒子。

【請求項 15】

前記金属は、磁性であることを特徴とする請求項 14 記載の機能化されたナノ粒子。

【請求項 16】

前記分子標識は、ビオチン - アビジン結合を介して前記シリカ表面へ結合していることを特徴とする請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項記載の機能化されたナノ粒子。

【請求項 17】

標的核酸分子と、標的とされていない配列を有するほかの核酸と、タンパク質などの任意のほかの分子とからなる液体の混合物を準備するステップ (a)

請求項 13 記載の機能化されたナノ粒子を準備するステップ (b)

前記標的核酸の配列がその配列と相補的な前記分子標識の所定の配列とハイブリダイゼーション可能な条件下で、ステップ (a) の混合物をステップ (b) のナノ粒子と接触させ、前記蛍光剤と前記消光剤を分離させて前記蛍光剤による光を放射させるステップ (c)

前記蛍光剤による光の放射を検出し、それによって前記混合物中の前記標的核酸の存在を検出するステップ (d)

を備えたことを特徴とする混合物中の標的核酸分子の検出方法。

【請求項 18】

第一の端と、第二の端と、第一の部分と第二の部分を備えた配列と、を有する標的核酸を準備するステップ (a)

結合した端と結合していない端を有する捕捉オリゴヌクレオチドが固定された担体の表面を準備するステップであって、前記オリゴヌクレオチドは、前記標的核酸の配列の前記第一の部分に相補的でない前記結合した端に最も近接した第一の配列からなるステップ (b)

前記捕捉オリゴヌクレオチドの前記第二の配列が前記標的核酸の前記第一の部分とハイブリダイゼーション可能な条件下で、前記固定化した捕捉オリゴヌクレオチドを前記標的核酸と接触させ、それによって前記標的核酸の一端を捕捉するステップ (c)

請求項 13 記載の機能化されたナノ粒子を準備するステップ (d)

捕捉された前記標的核酸の前記結合していない端が前記機能化されたナノ粒子へ結合した前記オリゴヌクレオチドの相補的な配列とハイブリダイゼーション可能な条件下で、前記機能化されたナノ粒子と、ステップ (d) の捕捉された標的核酸分子とを接触させるステップ (e)

前記機能化されたナノ粒子の前記標的核酸への結合を検出し、それによって前記標的核酸の配列の存在を検出するステップ (f)

を備えたことを特徴とする核酸分子の検出方法。

【請求項 19】

標的核酸分子と、標的とされていない配列を有するほかの核酸と、タンパク質などの任意のほかの分子とからなる液体の混合物を準備するステップ (a)

請求項 15 又は 16 記載の機能化されたナノ粒子を準備するステップ (b)

前記標的核酸の配列がその配列と相補的な前記分子標識の所定の配列とハイブリダイゼーション可能な条件下で、ステップ (a) の混合物をステップ (b) のナノ粒子と接触させ、前記蛍光剤と前記消光剤を分離させて前記蛍光剤による光を放射させるステップ (c)

前記ナノ粒子を磁場におくことによって前記混合物から前記ナノ粒子を分離するステップ (d)

前記蛍光剤による光の放射を検出し、それによって前記標的核酸の存在を検出するステップ (e)

を備えたことを特徴とする混合物からの標的核酸分子の分離方法。

【請求項 20】

さらに前記標的核酸を前記ナノ粒子から分離するステップを備えたことを特徴とする請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

さらに一つの塩基だけが前記標的の配列と異なっている標的とされていない核酸の配列を前記ナノ粒子から除去するために、前記液体の温度を上昇させることを備えたことを特徴とする請求項 20 記載の方法。