

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-514450

(P2010-514450A)

(43) 公表日 平成22年5月6日(2010.5.6)

(51) Int.Cl.

C 12Q 1/68  
C 12N 15/09  
(2006.01)  
(2006.01)

F 1

C 12Q 1/68  
C 12N 15/00Z N A A  
A

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4  
4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2009-544281 (P2009-544281)  
 (86) (22) 出願日 平成19年12月28日 (2007.12.28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年8月25日 (2009.8.25)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2007/089007  
 (87) 國際公開番号 WO2008/083259  
 (87) 國際公開日 平成20年7月10日 (2008.7.10)  
 (31) 優先権主張番号 60/877,611  
 (32) 優先日 平成18年12月29日 (2006.12.29)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 500069057  
 アプライドバイオシステムズ インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92008, カールスバッド, バンアレン  
 ウェイ 5791  
 (74) 代理人 100100181  
 弁理士 阿部 正博  
 (72) 発明者 アイヴァザクヴィル・ヴィサリオン  
 アメリカ合衆国 94618 カリフォルニア州、オークランド、#308、カルデコット・エルエヌ 240

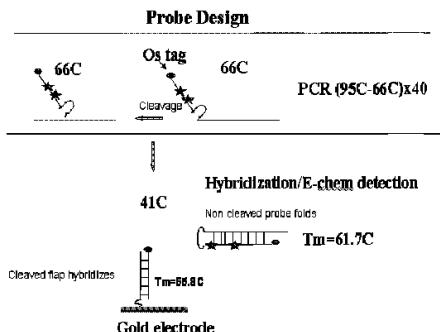
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】核酸検出方法及びシステム

## (57) 【要約】

試料中の核酸を検出する為の方法及びキット。分析される試料には、該標的核酸の少なくとも一部にハイブリダイズするプライマー、標的核酸の少なくとも一部とハイブリダイズする第一領域及び検出可能標識を有する第二領域を含むハイブリダイゼーションプローブ、ハイブリダイズしたプライマーを伸長させるポリメラーゼ、及び、ハイブリダイズしたプローブを開裂させ、それによって該プローブの第二領域及び標識を含むプローブ断片を生成させるエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を含むことが出来る。

該ハイブリダイゼーションプローブの少なくとも一部分は該ハイブリダイゼーションプローブの別の部分とハイブリダイズし、それによって折り畳み構造を形成する。方法は、試料を融解させ、該試料の温度を低下させてプライマーとハイブリダイゼーションプローブの夫々を該試料中の標的核酸の一本鎖の少なくとも一部とハイブリダイズせしめ、プライマーを伸長し、標識プローブ断片を遊離させることを含む。該試料は該標識プローブ断片



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

標的核酸の少なくとも一部にハイブリダイズするプライマー、  
 第一領域及び第二領域を含むハイブリダイゼーションプローブ（ここで、該第一領域は該標的核酸の少なくとも一部とハイブリダイズし、第二領域は該標的核酸とハイブリダイズせずに検出可能標識を有する）、及び  
 ポリメラーゼ及びエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素（ここで、ポリメラーゼはハイブリダイズした該プライマーをハイブリダイズした該プローブ方向に伸長させ、該酵素のエキソヌクレアーゼ活性によってハイブリダイズした該プローブを開裂させ、それによって該プローブの第二領域及び該検出可能標識を含むプローブ断片を遊離させる）を含む試料を第一の温度まで加熱することによって該試料を融解させ（ここで、第一の温度は該プライマー及び該試料中に存在する二重鎖核酸のTmより高い）；  
 次に、温度を第一の温度より低い第二の温度まで低下させることによって該試料をアニーリングさせ、該プライマーと該ハイブリダイゼーションプローブの夫々を該試料中の標的核酸の一本鎖部分とハイブリダイズせしめ；  
 次に、第三の温度にて、該標的核酸にハイブリダイズした該プライマーをポリメラーゼによって延長させることによって該プライマーを伸長し；  
 次に、該酵素のエキソヌクレアーゼ活性によって該ハイブリダイゼーションプローブを開裂してプローブ断片を遊離させ；  
 適宜、融解、アニーリング、及び伸長を少なくとも一回繰り返し；  
 該試料を、該プローブ断片の第二領域の少なくとも一部分とハイブリダイズする一つ又はそれ以上の捕捉プローブを有する固体支持体の表面と接触させ；  
 該捕捉プローブを、第二及び第三の温度より低い第四の温度にて、該試料中に存在する該プローブ断片の少なくとも一部とハイブリダイズさせ；及び  
 該固体支持体表面の標識を検出することから成る、試料中の標的核酸の検出方法であつて、  
 該ハイブリダイゼーションプローブの少なくとも一部分は該ハイブリダイゼーションプローブの別の部分とハイブリダイズし、それによって折り畳み構造を形成し、該折り畳み構造の融解温度（Tm）は第三の温度より低くて第四の温度より高い、前記方法。

## 【請求項 2】

ポリメラーゼ及びエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素が同じ分子である、請求項1記載の方法。

## 【請求項 3】

折り畳み構造の融解温度（Tm）が41と66の間である、請求項1記載の方法。

## 【請求項 4】

折り畳み構造の融解温度（Tm）が58と63の間である、請求項1記載の方法。

## 【請求項 5】

捕捉プローブがハイブリダイズするプローブ断片の第二領域が、対応する折り畳み構造において捕捉プローブに実質的に接近できない、請求1記載の方法。

## 【請求項 6】

第三の温度が第二の温度に等しいか又はそれより高く、且つ、第一の温度より低い、請求項1記載の方法。

## 【請求項 7】

第二の温度と第三の温度が等しい、請求項1記載の方法。

## 【請求項 8】

ハイブリダイゼーションプローブが更に、第一領域に隣接し、第二領域の反対側に第三領域を有し、該第三領域は標的核酸とハイブリダイズしない、請求項1記載の方法。

## 【請求項 9】

ハイブリダイゼーションプローブの第二領域及び第三領域の両方の少なくとも一部が該ハイブリダイゼーションプローブの別の部分とハイブリダイズして折り畳み構造を形成する

10

20

30

40

50

、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

第三領域の少なくとも一部が第二領域の少なくとも一部とハイブリダイズして折り畳み構造を形成する、請求項 8 記載の方法。

【請求項 11】

ハイブリダイゼーションプローブの第二領域の少なくとも一部が該ハイブリダイゼーションプローブの別の部分とハイブリダイズして折り畳み構造を形成する、請求項 5 記載の方法。

【請求項 12】

ポリメラーゼが熱安定性酵素である、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 13】

熱安定性酵素がTaqポリメラーゼである、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

固体支持表面に電極があり、検出可能標識が電子を該電極から又は該電極に移動することが出来る、請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】

検出可能標識がフェロセン基である、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

固体支持表面に金がある、請求項 14 記載の方法。

20

【請求項 17】

固体支持表面がフローチャンネルを形成する複数の相互嵌合プレートを有し、該プレート表面の少なくともある部分に捕捉プローブがあり、該試料と該固体支持表面との接触により該試料が該フローチャンネルを流れる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 18】

プレート表面に電極がある、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

交互のプレート表面に捕捉プローブがある、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

折り畳み構造が分子内三重鎖構造である、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 21】

一連のサイクルにおいて、融解、アニーリング、及び伸長が複数行なわれる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 22】

最後の融解、アニーリング、及び伸長サイクルの後に、固体支持表面の標識を検出する、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

融解、アニーリング、及び伸長の間、該試料が該固体支持表面と接触しており、該方法の間、及び/又は、最後の融解、アニーリング、及び伸長サイクルの後に、複数回の検出が行なわれる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 24】

標的核酸の少なくとも一部とハイブリダイズする第一領域及び検出可能標識を有する第二領域を含むハイブリダイゼーションプローブ（ここで、該第二領域は該標的核酸とハイブリダイズせず、エキソヌクレアーゼ酵素が該標的核酸にハイブリダイズしたハイブリダイゼーションプローブを開裂することが出来、それによって該プローブの第二領域及び該検出可能標識を含むプローブ断片を生じさせる）；

該プローブ断片の第二領域とハイブリダイズする捕捉プローブをその表面に有する固体支持体；

任意に、該標的核酸の少なくとも一部にハイブリダイズするプライマー；及び、

任意に、ポリメラーゼ及びエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素（ここで、ポリメラーゼはハイブリダイズした該プライマーをハイブリダイズした該プローブ方向に伸長させ、該

50

酵素のエキソヌクレアーゼ活性によってハイブリダイズした該プローブを開裂させ、それによって該プローブの第二領域及び該検出可能標識を含むプローブ断片を遊離させる)を含む試料中の標的核酸の検出用キットであって、

該ハイブリダイゼーションプローブの少なくとも一部分は該ハイブリダイゼーションプローブの別の部分とハイブリダイズし、それによって折り畳み構造を形成し、該折り畳み構造の融解温度( $T_m$ )は該ハイブリダイゼーションプローブが該標的核酸とハイブリダイズしたときに形成される二重鎖の融解温度より低く、該プローブ断片が該捕捉プローブとハイブリダイズしたときに形成される二重鎖の融解温度より高い、前記キット。

【請求項 25】

固体支持体表面に電極があり、検出可能標識が電子を該電極から又は該電極に移動することができる、請求項 24 記載のキット。 10

【請求項 26】

検出可能標識が電気的活性なフェロセン基である、請求項 25 記載のキット。

【請求項 27】

固体支持表面に金がある、請求項 25 記載のキット。

【請求項 28】

ポリメラーゼ及びエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を含む、請求項 24 記載のキット。 20

【請求項 29】

ポリメラーゼ及びエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素が同じ分子である、請求項 25 記載のキット。

【請求項 30】

ポリメラーゼが熱安定性酵素である、請求項 2 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、2006年12月29日出願の米国仮出願第60/877,611に基づく優先権を主張するものであり、その全内容は本明細書に含まれる。本発明は、一般的に、生体分子の検出方法及びシステムに関し、試料中の核酸の検出方法及びシステムに関する。 30

【背景技術】

【0002】

様々なアッセイに関連して核酸の增幅が行なわれる。このようなアッセイは、例えば、生物試料を評価するために用いられるときは定性的であり得る。しかしながら、煩わしいプロット技術を必要とすることなく、又は、典型的には光学的方法に必要とされる高価で複雑な装置を必要とせずに、標的核酸の増幅を検出することが可能であれば、広範囲な生物学的用途が改良されることになる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

従って、試料中の核酸を検出する為の改良方法に対する要請が依然として存在する。 40

【課題を解決するための手段】

【0004】

即ち、本発明の第一の態様によれば、

標的核酸の少なくとも一部にハイブリダイズするプライマー、

第一領域及び第二領域を含むハイブリダイゼーションプローブ(ここで、該第一領域は該標的核酸の少なくとも一部とハイブリダイズし、第二領域は該標的核酸とハイブリダイズせずに検出可能標識を有する)、及び

ポリメラーゼ及びエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素(ここで、ポリメラーゼはハイブリダイズしたプライマーをハイブリダイズしたプローブ方向に伸長させ、該酵素のエキソヌクレアーゼ活性によってハイブリダイズしたプローブを開裂させ、それによって該プロ

ープの第二領域及び該検出可能標識を含むプローブ断片を遊離させる)を含む試料を第一の温度まで加熱することによって該試料を融解させ(ここで、第一の温度は該プライマー及び該試料中に存在する二重鎖核酸のTmより高い);

次に、温度を第一の温度より低い第二の温度まで低下させることによって該試料をアニーリングさせ、プライマーとハイブリダイゼーションプローブの夫々を該試料中の標的核酸の一本鎖部分とハイブリダイズせしめ;

次に、第三の温度にて、該標的核酸にハイブリダイズしたプライマーをポリメラーゼによって延長させることによって該プライマーを伸長し;

次に、該酵素のエキソヌクレアーゼ活性によって該ハイブリダイゼーションプローブを開裂してプローブ断片を遊離させ;

適宜、融解、アニーリング、及び伸長を少なくとも一回繰り返し;

該試料を、該プローブ断片の第二領域の少なくとも一部分とハイブリダイズする一つ又はそれ以上の捕捉プローブを有する固体支持体の表面と接触させ;

該捕捉プローブを、第二及び第三の温度より低い第四の温度にて、該試料中に存在する該プローブ断片の少なくとも一部とハイブリダイズさせ;及び

該固体支持体表面の標識を検出することから成る、試料中の標的核酸の検出方法であって、

該ハイブリダイゼーションプローブの少なくとも一部分は該ハイブリダイゼーションプローブの別の部分とハイブリダイズし、それによって折り畳み構造を形成し、該折り畳み構造の融解温度(Tm)は第三の温度より低くて第四の温度より高い、前記方法が提供される。

#### 【0005】

即ち、本発明の第二の態様によれば、

標的核酸の少なくとも一部とハイブリダイズする第一領域及び検出可能標識を有する第二領域を含むハイブリダイゼーションプローブ(ここで、該第二領域は該標的核酸とハイブリダイズせず、エキソヌクレアーゼ酵素が該標的核酸にハイブリダイズしたハイブリダイゼーションプローブを開裂することが出来、それによって該プローブの第二領域及び該検出可能標識を含むプローブ断片を生じさせる);

該プローブ断片の第二領域とハイブリダイズする捕捉プローブをその表面に有する固体支持体;

任意に、該標的核酸の少なくとも一部にハイブリダイズするプライマー;及び、

任意に、ポリメラーゼ及びエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素(ここで、ポリメラーゼはハイブリダイズしたプライマーをハイブリダイズしたプローブ方向に伸長させ、該酵素のエキソヌクレアーゼ活性によってハイブリダイズしたプローブを開裂させ、それによって該プローブの第二領域及び該検出可能標識を含むプローブ断片を遊離させる)を含む試料中の標的核酸の検出用キットであって、

該ハイブリダイゼーションプローブの少なくとも一部分は該ハイブリダイゼーションプローブの別の部分とハイブリダイズし、それによって折り畳み構造を形成し、該折り畳み構造の融解温度(Tm)は該ハイブリダイゼーションプローブが該標的核酸とハイブリダイズしたときに形成される二重鎖の融解温度より低く、該プローブ断片が捕捉プローブとハイブリダイズしたときに形成される二重鎖の融解温度より高い、前記キットが提供される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0006】

当業者は、以下の図面は説明の為だけの目的であることが理解されよう。これら図面は本発明の範囲を如何なる意味でも限定するものではない。

#### 【0007】

【図1A】折り畳み構造を形成可能なハイブリダイゼーションプローブを用いるアッセイの工程及び構成成分の設計を模式的に示す。ハイブリダイゼーションプローブは標的核酸にハイブリダイズし、ハイブリダイズしたプローブの一部が開裂されて標識プローブ断片を形成し、該標識プローブ断片は表面で捕捉され検出される(例えば、電極表面を使用す

10

20

30

40

50

る)。

【図1B】推定Tmが61.7のハイブリダイゼーションプローブの推定折り畳み構造を示す説明図である。

【図2】図1Bに示したヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブにより、様々な時間及び温度でのポリメラーゼ鎖反応(PCR)の40回のサイクル後に生成された電気化学的シグナルを示す棒グラフである。

【図3A】推定Tmが43.9のハイブリダイゼーションプローブの推定折り畳み構造を示す説明図である。

【図3B】図3Aで説明されたヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブによって生成された電気化学的シグナルを示す棒グラフである。 10

【図4】推定Tmが34.2のハイブリダイゼーションプローブの推定折り畳み構造を示す説明図である。このハイブリダイゼーションプローブは図3Aで説明されたハイブリダイゼーションプローブから6個の3'ヌクレオチドが除去されている点が異なる。

【図5A】図3Aで説明されたヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブによって生成された電気化学的シグナルを示す棒グラフである。

【図5B】図4で説明されたヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブによって生成された電気化学的シグナルを示す棒グラフである。

【図6A】推定Tmが53.1のハイブリダイゼーションプローブの推定折り畳み構造を示す説明図である。このハイブリダイゼーションプローブは、図3Aで説明されたハイブリダイゼーションプローブが3'の6個の塩基から成る推定二重鎖とは対照的に、3'の9個の塩基から成る推定二重鎖を有している。 20

【図6B】図3Aで説明されたヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブによって生成された電気化学的シグナルを示す棒グラフである。

【図6C】図6Aで説明されたヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブによって生成された電気化学的シグナルを示す棒グラフである。

【図7A】以下の配列番号5のヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブによって生成された電気化学的シグナルを示す棒グラフであり、標的核酸の標的配列に非相補的な19個のヌクレオチド配列を有する。

【0008】

GTTACTTCGTTCGATTGTC▼TGGACTTATAATGCTGAACCTCTGGT 30

(SEQ ID NO: 5)

【0009】

【図7B】以下の配列番号6のヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブによって生成された電気化学的シグナルを示す棒グラフであり、標的核酸の標的配列に非相補的な15個のヌクレオチド配列を有する。

【0010】

CTTCGTTCGATTGTC▼TGGACTTATAATGCTGAACCTCTGGT 40

(SEQ ID NO: 6)

【0011】

【図7C】以下の配列番号7のヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブによって生成された電気化学的シグナルを示す棒グラフであり、標的核酸の標的配列に非相補的な13個のヌクレオチド配列を有する。

【0012】

**TCGTTCGATTGTC▼TGGACTTATAATGCTGAACTCTGGT**

(SEQ ID NO: 7)

【0013】

【図8A】推定Tmが44.0の鳥インフルエンザ用のハイブリダイゼーションプローブの推定折り畳み構造を示す説明図である。

【図8B】図8Aで説明されたヌクレオチド配列を有する鳥インフルエンザDNAハイブリダイゼーションプローブによって生成され、PCR後の電気化学的シグナルを示す棒グラフである。  
10

【図9A】推定Tmが45.3の鳥インフルエンザ用のハイブリダイゼーションプローブの推定折り畳み構造を示す説明図である。

【図9B】図9Aで説明されたヌクレオチド配列を有する鳥インフルエンザDNAハイブリダイゼーションプローブによって生成され、PCR後の電気化学的シグナルを示す棒グラフである。

【図10】折り畳み構造が分子内三重鎖である、ハイブリダイゼーションプローブを模式的に示す。

【図11A】三重鎖がプロトン化シトシン(C+)核酸塩基と形成されるときに生じる塩基対の構造を示す。  
20

【図11B】プロトン化シトシン(C+)の代わりに疑似シトシン(「J」または「J塩基」と称する)と三重鎖が形成されるときに生じる塩基対の構造を示す。

【図12】昇温測定に使用することが出来る密封電気化学的チャンバーの模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本明細書の解釈の目的で、以下の定義は適用され、適当なときにはいつでも、単数形は複数形も意味し、その逆も然りである。以下のいずれかの定義が他の如何なる文書、例えば、参照文献として本明細書中で引用している文献、におけるその用語の用法と異なる場合には、以下の定義が本明細書の解釈の目的では常に優先し、他の意味が明確に意図されている(例えば、当該用語が元々使用されている文献を理解する為)場合以外は、以下の定義が請求項に関連する。他に説明がない限り、又は、「及び/又は」が明らかに不適切である場合以外は、「又は」は「及び/又は」を意味する。「～を含む」及び「～を含んでいる」等の使用は限定的ではないことを意図している。更に、一つ又はそれ以上の態様で「含む」等が使用されている場合には、当業者においては、幾つかの具体例では、代わりに、「～から実質的に成る」及び/又は「～から成る」と記載できることが理解されよう。  
30

【0015】

本明細書において、「捕捉プローブ」とは、表面に結合する核酸塩基(ヌクレオ塩基)を意味する。捕捉プローブは核酸(例えば、DNA又はRNA)、核酸アナログ(例えば、ロツクド核酸(LNA)、核酸ミミック(例えば、ペプチド核酸(PNA))又はキメラであり得る。

【0016】

本明細書において「キメラ」とは、異なるサブユニットのクラスから選択された2つ以上の結合されたサブユニットを含む核酸塩基ポリマーのことである。例えば、PNA/DNAキメラは少なくとも一つの2'デオキシリボ核酸サブユニットに結合した少なくとも一つのPNAサブユニットを含む(例えば、PNA/DNAキメラ調製に関する方法及び組成物はWO96/40709を参照)。キメラの構成成分サブユニットの例は、PNAサブユニット、天然アミノ酸サブユニット、DNAサブユニット、RNAサブユニット、LNAサブユニット、及び、他の核酸アナログ又はミミックのサブユニットからなる群から選択される。

【0017】

10

20

30

40

50

本明細書において「フランプ」とは、ハイブリダイゼーションプローブがそれを検出すべく設計された標的核酸に非相補的な該プローブの一部のことである。

【0018】

本明細書において「ハイブリダイゼーションプローブ」とは、該プローブが相補鎖にハイブリダイズした部位においてエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素によって開裂させることが出来、試料中の目的とする標的核酸の少なくとも一部と相補的であるヌクレオチド配列を含むものと指す。該ハイブリダイゼーションプローブは、エキソヌクレアーゼ活性によって開裂させることが出来る限り、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドアナログ、又はキメラであっても良い。幾つかの態様においては、核酸塩基ポリマーは一つのLNAサブユニット以外の全てのDNAサブユニットを含むキメラであり得る。幾つかの態様においては、核酸塩基ポリマーは、標的核酸にハイブリダイズすべく設計されたハイブリダイゼーションプローブのその部分の5'末端から(3'末端方向へ)一つのサブユニット離れた単独のLNAを含むものである。

10

【0019】

本明細書において「核酸(ヌクレオ)塩基」とは、サブユニットを含む一連の核酸塩基が連結したポリマーを指す。このようなポリマーの非限定的例には、オリゴデオキシヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、ペプチド核酸、核酸アナログ、核酸ミミック、及びキメラがある。

【0020】

本明細書において「ペプチド核酸」または「PNA」とは、2つ以上のPNAサブユニットを含むポリ核酸塩基鎖又はそのセグメントを指し、非限定的に、米国特許第5,539,082; 5,527,675; 5,623,049; 5,714,331; 5,718,262; 5,736,336; 5,773,571; 5,766,855; 5,786,461; 5,837,459; 5,891,625; 5,972,610; 5,986,053, 6,107,470 及び6,357,163にペプチド核酸として記載又はクレームされている、ポリ核酸鎖又はそのセグメントを挙げることが出来る。疑いを避ける為に、PNAは核酸ミミックであり、核酸又は核酸アナログではない。PNAはヌクレオチドから形成されるのではないので、核酸ではない。疑いを避ける為に、PNAオリゴマーは骨格に結合した一つ又はそれ以上のアミノ酸側鎖を含むポリマーを含むものである。

20

【0021】

本明細書において「支持体」、「固体支持体」、又は「固体キャリア」は任意の固相物質を意味する。固体支持体には、「樹脂」、「合成支持体」、「固相」、「表面」、「膜」、及び/又は「支持体」が含まれる。固体支持体は、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリフルオロエチレン、ポリエチレンオキシ、及び、ポリアクリルアミドのような有機ポリマー、及び、コポリマー並びにそれらのグラフトから構成され得る。固体支持体は、又、ガラス、シリカ、調節孔ガラス(CPG)、又は逆相シリカのような無機物質でも良い。固体支持体の形態は、ビーズ、球体、粒子、顆粒、ゲル、膜、又は表面であり得る。表面は平面、実質的な平面、又は、非平面であり得る。固体支持体は多孔質、非多孔質であり、膨張性又は非膨張性である。固体支持体は、ウェル、凹部、管、チャンネル、シリンドラー若しくは他の容器、ベッセル、機構、又は、特性の形態をとり得る。

30

【0022】

本明細書において「標的核酸」とは、目的の核酸分子を指す。試料には一種類以上の標的核酸分子が含まれていても良い。

40

【0023】

PCR産物の電気化学的アッセイは、本願と同日に出願(代理人整理番号No.70043.0036US P1)された米国仮出願No.60/877,610に開示されている。このアッセイは、例えば、標的核酸には非相補的だが電極に限定された捕捉プローブには相補的である15マー5'フランプを有するハイブリダイゼーションプローブから成る。この5'フランプは電気化学的標識を含む。PCRプロセスの間、該5'フランプを含むプローブ断片は、Taqポリメラーゼのようなエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素によって開裂される。その後、該プローブ断片は電極に限定された捕捉プローブにハイブリダイズし、信号(シグナル)を発生する

50

ことが出来る。元（未開裂）のハイブリダイゼーションプローブはプローブ断片のように効率的には捕捉プローブにハイブリダイズすることはなかった。この現象によって、プローブ断片を元（未開裂）のハイブリダイゼーションプローブから分離することなく、一回（one pot）のアッセイでPCRをモニターすることが可能となる。

#### 【0024】

上記のアッセイにおいて、元（未開裂）のハイブリダイゼーションプローブは、該元のハイブリダイゼーションプローブが標的核酸とハイブリダイズしたときに形成される二重鎖の融解温度より低く、且つ、該プローブ断片が捕捉プローブとハイブリダイズしたときに形成される二重鎖の融解温度より高いような溶解温度（Tm）を有する折り畳み構造を形成することが出来る。如何なる理論にも拘束されるものではないが、プローブ断片が捕捉プローブとハイブリダイズできるような温度以下において、折り畳み構造によって該元のハイブリダイゼーションプローブが電極上の捕捉プローブとハイブリダイズするのが妨げられ、それによってアッセイの信号/雑音比が向上するものと考えられる。

10

#### 【0025】

##### 1.5' フラップを有するハイブリダイゼーションプローブによるPCRアッセイ

図1Aは、折り畳み構造を形成可能なハイブリダイゼーションプローブを用いるアッセイの工程及び構成成分の設計を模式的に示す。ハイブリダイゼーションプローブは標的核酸にハイブリダイズし、ハイブリダイズしたプローブの一部が開裂されて標識プローブ断片を形成し、該標識プローブ断片は表面で捕捉され検出される（例えば、電極表面を使用する）。このアッセイ様式を念頭において、様々な推定Tm値（例えば、83.5、61.7、54.3、又は46）を有する折り畳み構造用のプローブが設計され評価された。最高Tm値（83.5）を有するハイブリダイゼーションプローブは該プローブの5' フラップの15マー領域とそれ以外の領域との完全な対合（マッチ）に対応する。その他のプローブにはミスマッチがあり、その結果、より低いTm値となる。2006年7月17日出願の米国特許出願No.11/488,439に記載のように、PCRにおけるこれらプローブの開裂の効率を開裂及び元のプローブをHPLCにより分離することによって評価した。Waters Corp. 製のHPLCカラムXTerroMSC18(2.5mm x 50mm)を7% ACN+93% TEAAで7分間平衡化した。勾配溶出(0.3 ml/min, 60)を以下の3段階、段階1：7% ACN+93% TEAA, 7 min.；段階2：10% ACN+90% TEAA, 10 min.；段階3：35% ACN+65% TEAA, 10 min. (ACN-アクリロニトリル、TEAA-0.1Mトリエタノールアミン-酢酸、pH6.8)で実施した。折り畳み構造に対するTm値（61.7）を有するハイブリダイゼーションプローブは30%の開裂効率を示し、PCRの電気化学的検出用に選択した。

20

#### 【0026】

図1Bは、推定Tmが61.7のハイブリダイゼーションプローブの推定折り畳み構造を示す説明図である。このハイブリダイゼーションプローブは、図1Aで説明したアッセイによって、Listeria monocytogenes hlyA遺伝子を測定するのに適している。図1Bに示されたハイブリダイゼーションプローブは以下の配列番号1の配列を有している：

30

#### 【0027】

TAGGACTACCAGGGGTTTC<sup>▼</sup>GCCTGCAAGTCCTAACGACGCCA

40

(SEQ ID NO. 1)

-

#### 【0028】

太字で示された核酸塩基は5' フラップを表し、記号「▼」はエキソヌクレアーゼ活性による開裂が優勢となる部位を示す。

#### 【0029】

図1Aで説明したアッセイにおいてオスミウム電気化学的タグを5' に有するハイブリダイゼーションプローブを用いて、Listeria monocytogenes hlyA遺伝子（標的核酸）のPCRを実施した。PCR反応は、95℃で10分間の後、6 mMのMgCl<sub>2</sub>添加のPCR緩衝液A（App

50

ied Biosystems, Catalog No.N808-0228) 中で(95で15秒間、63で1分間)  
 ×40サイクルであった。プライマー及びプローブの濃度は、夫々、200 nM及び400nMであった。このハイブリダイゼーションプローブは、該プローブの内部と部分的に相補的な19マーの5'フラップを有する(図1B)。PCRのアニーリング-伸長温度(即ち、66)においては、アッセイ温度が折り畳み構造の推定Tmより高いので、ハイブリダイゼーションプローブは実質的に折り畳まれていない。これによって、該ハイブリダイゼーションプローブが標的核酸とハイブリダイズすることが可能となる。一旦、ハイブリダイズしたら、エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素が該ハイブリダイゼーションプローブを開裂してPCR反応においてプローブ断片が生じる。PCR完了後に、試料の温度を41に低下させ、プローブ断片を捕捉プローブとハイブリダイズさせる。このような条件下で、未だ試料中に残っている元(未開裂)のハイブリダイゼーションプローブは、図1Bに示される5'フラップが表面に結合した捕捉プローブに実質的に接近できないような推定折り畳み構造を形成する。

10

20

30

## 【0030】

このアッセイの電気化学的測定の結果を図2Aに示す。40回のPCRサイクル後、陽性(pos)及び鑄型なし対照(ntc)の両方の反応混合物を二つの加熱板に挟まれた電気化学的セル内に入れた。本実験に使用した電気化学的セルは12に示す。図12が示すように、このセルは直径2mmの作用電極(WE)及び対極(CE)を有する。白金対極(CE)はCr接着層を有するシリコンウェハー上に2000オングストローム厚の白金層をスパッターコーティングして作製された。金対極(CE)はCr接着層を有するシリコンウェハー上に2000オングストローム厚の金層をスパッターコーティングして作製された。参照電極は0.5mm直径のAg/AgClワイヤーであった。図2の結果が示すように、元のハイブリダイゼーションプローブは開裂したプローブ断片の20~30分の一の効率でしかハイブリダイズしなかった。

## 【0031】

2. 元の5'及び3'フラップを有するハイブリダイゼーションプローブによるPCRアッセイ

鳥インフルエンザウイルスRNAの測定に使用できる、相補的な5'及び3'フラップを有するハイブリダイゼーションプローブは以下の配列番号2を有する:

## 【0032】

40

**CTTCGTTCGATTGTC<sup>▼</sup>TGGACTTATAATGCTGAACCTCTGGTCAATCG**

(SEQ ID NO: 2)

## 【0033】

ここで、太字で示された核酸塩基は5'及び3'フラップを表し、記号「▼」はエキソヌクレアーゼ活性による開裂が優勢となる部位を示す。本プローブの折り畳み構造の推定Tmは43.9である。図3Aはこのハイブリダイゼーションプローブの折り畳み構造を示す。

50

## 【0034】

このハイブリダイゼーションプローブを用いて、PCRアッセイを実施した。環境マスター ミックスにおける40サイクルのPCR(伸長及びアニーリング温度60)の後、温度を28にシフトした。環境マスターミックスは100mM KCl, 100mM Tris pH8, 8mM MgCl<sub>2</sub>, 100μM dNTPs 及び0.3 units/μL ampliaqを含んでいた。この温度で、ハイブリダイズしたハイブリダイゼーションプローブに対するエキソヌクレアーゼ活性により生じたプローブ断片が表面に結合した捕捉プローブにアニーリングする(Tm = 32)ことができる。このような条件下で、未だ試料中に残っている元(未開裂)のハイブリダイゼーションプローブは、図3Aに示される5'フラップが表面に結合した捕捉プローブに実質的に接近できないような推定折り畳み構造(Tm = 43.9)を形成する。

50

## 【 0 0 3 5 】

図3Bは、図3Aで説明したようなハイブリダイゼーションプローブに対するPCR後の様々な時間において電極表面に生じた電気化学的シグナルを示す棒グラフである。PCRは標的核酸の10000コピーの存在下、又は、標的核酸の非存在下（非標的核酸対照、NTC）で実施した。図3Bに示される電気化学的データによれば、これら2つのアッセイのハイブリダイゼーション効率には約100倍の相違がみられた。

## 【 0 0 3 6 】

このアッセイを以下の核酸塩基配列（配列番号3）を有する別のもう一つのプローブを用いて繰り返した：

## 【 0 0 3 7 】

10

CTTCGTTCGATTGTC<sup>▼</sup>TGGACTTATAATGCTGAACCTCTGGT

(SEQ ID NO: 3)

-

## 【 0 0 3 8 】

ここで、太字で示された核酸塩基は5'フラップを表し、記号「▼」はエキソヌクレアーゼ活性による開裂が優勢となる部位を示す。図4はこのハイブリダイゼーションプローブの折り畳み構造を示す。本プローブの折り畳み構造の推定Tmは34.2である。全てのTm及びmFold分析は、環境マスター・ミックスのイオン強度に相当する5mM MgCl<sub>2</sub>媒体に対して実施した。

20

## 【 0 0 3 9 】

PCRを実施し、図3Aに示されたハイブリダイゼーションプローブを使用した電気化学的検出の効率を、図4で示されたハイブリダイゼーションプローブを使用した検出の効率を比較した。図5Aは、図3Aで説明されたヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブを使用したPCRアッセイにおける電気化学的シグナルを示す棒グラフである。図5Bは図4で説明されたヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブを使用したPCRアッセイにおける電気化学的シグナルを示す棒グラフである。図5Aにおける結果は、図4に示したハイブリダイゼーションプローブと比較して、図3Aに示されたハイブリダイゼーションプローブが約2~3倍良い相違を示す。

30

## 【 0 0 4 0 】

## 3.3' フラップ長の影響

3' フラップ長が折り畳み構造に与える影響を評価するために追加実験を行なった。この実験に使用したハイブリダイゼーションプローブは図3に示した、6つの核酸塩基の3' フラップを有するプローブ及び同様に9つの核酸塩基の3' フラップを有するハイブリダイゼーションプローブである。9つの核酸塩基の3' フラップを有するプローブは以下の配列番号4で示す構造を有する：

## 【 0 0 4 1 】

30

CTTCGTTCGATTGTC<sup>▼</sup>TGGACTTATAATGCTGAACCTCTGGTCAATCGAAC

40

(SEQ ID NO: 4)

## 【 0 0 4 2 】

このハイブリダイゼーションプローブは図6Aに示される推定折り畳み構造を有し、その推定Tmは53.1である。ここで、太字で示された核酸塩基は5'及び3' フラップを表し、記号「▼」はエキソヌクレアーゼ活性による開裂が優勢となる部位を示す。このハイブリダイゼーションプローブにおいて、開裂部位に隣接する下線が付されたC核酸塩基はLNAサブユニットである。ハイブリダイゼーションプローブの他の全てのサブユニットはDNAである。

50

## 【0043】

9つの核酸塩基の3'フラップを有するハイブリダイゼーションプローブの推定T<sub>m</sub>は53.1であり、一方、6つの核酸塩基の3'フラップを有するハイブリダイゼーションプローブの推定T<sub>m</sub>は43.9である。PCRアッセイ後の図3A及び図6Aに示されるハイブリダイゼーションプローブを用いた電気化学的検出の結果を、夫々、図6B及び図6Cに示す。PCRハイブリダイゼーション後の電気化学的分析は金表面上で32で実施した。3'フラップ長が増大することによって、9つの核酸塩基の3'フラップを有するハイブリダイゼーションプローブはより安定した構造（即ち、より高い折り畳みT<sub>m</sub>）を有し、その結果、より良好な識別能力が得られた。

## 【0044】

## 4.5'フラップ長の影響

5'フラップ長が折り畳み構造に与える影響を評価するために追加実験を行なった。この実験の為に、鳥インフルエンザウイルス用の19マー、15マー、及び13マーの5'フラップを有するプローブを評価した。これらのプローブは3'フラップを含まない。これらプローブは以下の配列番号5, 6及び7で示す構造を有する：

## 【0045】

**GTTACTTCGTTCGATTGTC▼TGGACTTATAATGCTGAACCTCTGGT**

(SEQ ID NO: 5)

10

20

## 【0046】

**CTTCGTTCGATTGTC▼TGGACTTATAATGCTGAACCTCTGGT**

(SEQ ID NO: 6)

## 【0047】

**TCGTTCGATTGTC▼TGGACTTATAATGCTGAACCTCTGGT**

(SEQ ID NO: 7)

30

## 【0048】

ここで、太字で示された核酸塩基は5'フラップを表し、記号「  」はエキソヌクレアーゼ活性による開裂が優勢となる部位を示す。このハイブリダイゼーションプローブにおいて、開裂部位に隣接する下線が付されたC核酸塩基はLNAサブユニットである。ハイブリダイゼーションプローブの他の全てのサブユニットはDNAである。

## 【0049】

PCRアッセイ後のこれらの19マー、15マー、及び13マーの5'フラップを有するハイブリダイゼーションプローブを用いた電気化学的検出の結果を、夫々、図7A、図7B及び図7Cに示す。PCRアッセイ後のミックスは金電極上で、19マー、15マー、及び13マーの5'フラップに対して、夫々、41、35、及び31で（即ち、各推定折り畳み構造の推定T<sub>m</sub>より8低い温度でハイブリダイズした。これらの結果が示すように、13マーの5'フラップを有するハイブリダイゼーションプローブは19マー及び15マーの5'フラップに較べて優れたアッセイ性能を示した。

40

## 【0050】

## 5.追加の鳥インフルエンザPCRアッセイ

鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン遺伝子の異なる二つの領域に関する、追加の2つの鳥インフルエンザPCRアッセイを実施した。折り畳み構造の推定T<sub>m</sub>が約44-

50

45 であるような3' フラップを有するハイブリダイゼーションプローブを設計した。これら2つのプローブの推定折り畳み構造を図8A及び図9Aに示す。これらアッセイにおける標的核酸の鑄型としては、約100塩基長の合成DNAを使用した。PCR後のハイブリダイゼーション/検出は、プローブ断片/捕捉プローブハイブリッドの推定Tmより10~14低い温度で、環境マスター・ミックスを用いて金電極上で実施した。

## 【0051】

これらの実験に使用した第一のハイブリダイゼーションプローブの核酸配列(配列番号8)は以下の通りである:

## 【0052】

CATGCTACTAACAC<sup>V</sup>AGTTACCATATTCCAATTCACTTTCATAATTGCT

10

GGTTGAGTA

(SEQ ID NO: 8)

## 【0053】

このハイブリダイゼーションプローブは折り畳み構造に対する推定Tmは44.0であった。推定折り畳み構造は図8Aに示す。このプローブとともに使用した捕捉プローブは以下の構造(配列番号9)を有する15マーオリゴマーである:

20

## 【0054】

GTGTTGAGTAGCATG

(SEQ ID NO: 9)

特

## 【0055】

これらの実験に使用した第二のハイブリダイゼーションプローブの核酸配列(配列番号10)は以下の通りである:

## 【0056】

ACACGTGTACCTTAC<sup>V</sup>TGCAGACAAAGAATCCACTAAAAGGCAATGGTA

30

CAC

(SEQ ID NO: 10)

## 【0057】

このハイブリダイゼーションプローブは折り畳み構造に対する推定Tmは45.2であった。推定折り畳み構造は図9Aに示す。このプローブとともに使用した捕捉プローブは以下の構造(配列番号11)を有する:

## 【0058】

GTAAGGTACACGTGT

(SEQ ID NO: 11)

40

## 【0059】

これらのハイブリダイゼーションプローブにおいて、太字で示された核酸塩基は5'及び3' フラップを表し、記号「」はエキソヌクレアーゼ活性による開裂が優勢となる部位を示す。このハイブリダイゼーションプローブにおいて、開裂部位に隣接する下線が付されたA核酸塩基(第一プローブ)及びT核酸塩基(第二プローブ)はLNAサブユニットである。ハイブリダイゼーションプローブの他の全てのサブユニットはDNAである。

## 【0060】

これらのハイブリダイゼーションプローブ及び捕捉プローブは以下に説明するPCRアッ

50

セイで使用した。PCRアッセイ後の第一のハイブリダイゼーションプローブを用いた鳥インフルエンザDNAの電気化学的検出の結果を図8Bに示す。PCRアッセイ後の第二のハイブリダイゼーションプローブを用いた鳥インフルエンザDNAの電気化学的検出の結果を図9Bに示す。

【0061】

ステムループ型の形態を採るハイブリダイゼーションプローブは上記に開示したが、他の形態を採るハイブリダイゼーションプローブも使用することが出来る。このような形態（構造）には、ヘアピン、内部ループ、ブルジ、分岐、クローバーリーフ、及びシュードノット（pseudoknot）構造が含まれる。本発明の方法及びキットで使用できる他の折り畳み構造は米国特許第7,118860B2に記載されている。

10

【0062】

6. 三重鎖構造を有するハイブリダイゼーションプローブ

幾つかの実験において、ハイブリダイゼーションプローブは分子内三重鎖構造をとり得る。このような分子内三重鎖構造をとり得るハイブリダイゼーションプローブの例として以下の配列（配列番号12）を挙げる：

【0063】

TTJJTAGATCCTT-[Probe Sequence]-AAGGA

(SEQ ID NO: 12)

20

【0064】

上記の配列において、「J」は疑似（pseudo）イソシトシン核酸塩基であり、[Probe-Sequence]は標的核酸に特異的にハイブリダイズするように設計されたプローブの部分を表す。

【0065】

この一般的な形態のハイブリダイゼーションプローブは、図10に示されるように、折り畳み構造として分子内三重鎖構造をとることが出来る。図10において、「--」はHoogsteen水素結合を示し、「・」はワトソン-クリック塩基対を示し、及び「Loop」は標的核酸とハイブリダイズするプローブの部分（例えば、「プローブ配列」）を含む。この型の三重鎖構造はPetrov et al., “The Triplex-Hairpin Transition in Cytosine-Rich DNA”, Biophysical Journal, Vol.87, 3954-3973 (December 2004)に開示されている。これらの構造には「T・A--T」及び「C・G--C<sup>+</sup>」三重鎖（C<sup>+</sup>はN3位置がプロトン化しているシトシンを示す）の形成が含まれる。図11及びEgholm et al., “Efficient pH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosine-containing bis-PNA, Nucl. Acids Res., Vol.23, No.2, 217-222 (1995)を参照すると、疑似（pseudo）イソシトシンは置換され得、プロトン化されたシトシン核酸（C<sup>+</sup>）は三重鎖を生成するのに必要である。このように三重鎖はpH非依存的に形成される。

30

【0066】

上記配列及び図10に示された構造において、疑似（pseudo）イソシトシンはプロトン化されたシトシン核酸塩基と置換されている。その結果、指示された位置でのC<sup>+</sup>に対するJ塩基の置換により生理的pHにおける三重鎖の形成が可能となる。分子内三重鎖を形成するハイブリダイゼーションプローブは、表面に結合した捕捉プローブとの相互作用を阻止するような安定な折り畳み構造（三重鎖構造）を形成することが期待される。

40

【0067】

7. 標識、プローブ及びプライマー

ハイブリダイゼーションプローブの開裂断片上の標識として、任意の公知の電気化学的部分を使用することが出来る。電気化学的標識の例には、ビス（2,2'-ビピリジル）イミヂゾリルクロロオスミウム（II）[塩]がある。この標識はAg/AgClに対して良好なEo(0.1

50

65) を与え、合成及び精製に際して好適な溶解特性を有している。標識の他の例としては、フェロセン及び2006年7月17日に出願された米国特許出願第11/488,439に開示された標識を挙げることが出来る。更に、電気化学的標識は電極に又は電極から電子を伝達することが出来る任意の部分であり得る。電気化学的標識の例に遷移金属錯体がある。このような遷移金属錯体の例として、ルテニウム<sup>2+</sup>(2,2'-ビピリジン)<sub>3</sub>(Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>)、ルテニウム<sup>2+</sup>(4,4'-ジメチル-2,2'-ビピリジン)<sub>3</sub>(Ru(Me<sub>2</sub>-bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>)、ルテニウム<sup>2+</sup>(5,6-ジメチル-1,10-フェナントロリン)<sub>3</sub>(Ru(Me<sub>2</sub>-phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup>)、鉄<sup>2+</sup>(2,2'-ビピリジン)<sub>3</sub>(Fe(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>)、鉄<sup>2+</sup>(5'-クロロフェンナントロリン)<sub>3</sub>(Fe(5-Cl-phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup>)、オスミウム<sup>+</sup>(5'-クロロフェンナントロリン)<sub>3</sub>(Os(5-Cl-phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup>)、オスミウム<sup>2+</sup>(2,2'-ビピリジン)<sub>2</sub>(イミダゾリル)、ジオキソレニウム<sup>1+</sup>ホスファイン、及び、ジオキソレニウム<sup>1+</sup>ピリジン(ReO<sub>2</sub>(py)<sub>4</sub><sup>1+</sup>)がある。

10

## 【0068】

メディエーターとして有用な陰イオン錯体としては、Ru(bpy)((SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-bpy)<sub>2</sub><sup>2-</sup>及びRu(bpy)((CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-bpy)<sub>2</sub><sup>2-</sup>、及び、メディエーターとして有用なある種の両性イオン錯体は、Ru(bpy)<sub>2</sub>((SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-bpy)及びRu(bpy)<sub>2</sub>((CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-bpy)であり、ここで、(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-bpy<sub>2</sub>は4,4'-ジスルホナト-2,2'-ビピリジンであり、(CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-bpy<sub>2</sub>は4,4'-ジカルボキシ-2,2'-ビピリジンである。ピリジン、ビピリジン及びフェナントロリン群の適當な置換誘導体も任意の上記金属錯体において使用できる。この適當な置換誘導体の非限定的な例として、4-アミノピリジン、4-ジメチルピリジン、4-アセチルピリジン、4-ニトロピリジン、4,4'-ジアミノ-2,2'-ビピリジン、5,5'-ジアミノ-2,2'-ビピリジン、6,6'-ジアミノ-2,2'-ビピリジン、4,4'-ジエチレンジアミン-2,2'-ビピリジン、5,5'-ジエチレンジアミン-2,2'-ビピリジン、6,6'-ジエチレンジアミン-2,2'-ビピリジン、4,4'-ジヒドロキシ-2,2'-ビピリジン、5,5'-ジヒドロキシ-2,2'-ビピリジン、6,6'-ジヒドロキシ-2,2'-ビピリジン、4,4',4'''-トリアミノ-2,2',2'''-ターピリジン、4,4',4'''-トリエチレンジアミン-2,2',2'''-ターピリジン、4,4',4'''-トリヒドロキシ-2,2',2'''-ターピリジン、4,4',4'''-トリフェニル-2,2',2'''-ターピリジン、4,7-ジアミノ-1,10-フェナントロリン、3,8-ジアミノ-1,10-フェナントロリン、4,7-ジエチレンジアミン-1,10-フェナントロリン、3,8-ジエチレンジアミン-1,10-フェナントロリン、4,7-ジヒドロキシ-1,10-フェナントロリン、4,7-ジニトロ-1,10-フェナントロリン、3,8-ジニトロ-1,10-フェナントロリン、4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリン、3,8-ジフェニル-1,10-フェナントロリン、4,7-ジスペルアミン-1,10-フェナントロリン、ジピリド[3,2-a:2',2'-c]フェナジン、及び、6,6'-ジクロロ-2,2'-ビピリジン等がある。

20

## 【0069】

上記には電気化学的検出を例示したが、開示した方法は、蛍光検出のような他の検出技術による核酸の検出に適用することが可能である。更に、ハイブリダイゼーションプローブにおける検出標識は検出及び/又は定量化が出来る任意の部分(moiety)が可能である。標識の例として、電気化学的、発光(蛍光、ルミネッセント、又は、化学発光)及び発色標識が挙げられる。

30

## 【0070】

本発明におけるプライマー及びプローブは任意の種類の長さ及び形態をとることが可能である。例えば、プライマーは18から約30サブユニットの長さ、又は、20から約25サブユニットの長さであり得る。プライマーはDNA又はRNAオリゴヌクレオチドに限定される必要はないが、ポリメラーゼによって伸長可能である必要がある。より長い

40

50

又はより短いプライマーも使用することができる。

【0071】

標的核酸に結合するハイブリダイゼーションプローブの領域の長さは18から約30サブユニットの長さであり、一方、標的核酸に結合しないハイブリダイゼーションプローブの領域（すなわち、5' フラップ）の長さは2から約40サブユニット又は8から約30サブユニットの長さである。これら例示したものより長い又は短い領域を有するハイブリダイゼーションプローブも使用することができる。

【0072】

P C R プライマーは所望の長さ、通常、少なくとも30又は50ヌクレオチドから200, 300, 500, 1000又はそれ以上の長さのヌクレオチドを有する増幅産物を結合・生成すべく設計することができる。プローブ及びプライマーは任意の適当な濃度で供される。例えば、フォワード及びリバースプライマーは、典型的には20nM～500nM, 又は、50nM～500nM、100nM～500nM、50nM～200nMのような500nM以下の濃度で提供される。プローブは、典型的には20nM～500nM, 又は、50nM～500nM、100nM～500nM、50nM～200nMのような1000nM以下の濃度で提供される。N T P s、酵素、プローブ及びプライマーの濃度に関する条件の例は、全内容は本明細書に参照として含まれる米国特許第5,538,848号にも開示されており、或いは、市販の反応成分（例えば、Applied Biosystems, Foster City CAから購入可能な）を用いて達成することができる。

10

【0073】

夫々が特徴的な配列を有する複数の相補的な捕捉プローブをアレイ様式によって使用することができる。例えば、異なるハイブリダイゼーションプローブ断片にハイブリダイズする捕捉オリゴヌクレオチドのアレイを使用して、複数の別個の検出ゾーンにおいて個々のタグ配列を局在化し捕捉することが可能となる。

20

【0074】

本明細書に記載の方法によって標的核酸をリアルタイムで検出することができる。例えば、核酸増幅が生起している溶液と固相支持体を接觸させ、P C R の間プロセスをモニターする（即ち、リアルタイム反応）。或いは、P C R プロセスが完了した後に、固相支持体を上記溶液と接觸させることも出来る（エンドポイント検出）。ある具体例では、P C R の間（リアルタイム）、及びそのプロセスが完了した後（エンドポイント）にP C R アッセイをモニターすることが出来る。P C R アッセイは、通常のP C R フォーマット、ファストP C R フォーマット、非対称P C R フォーマット及び非同期P C R フォーマットを使用して実施することができる。

30

【0075】

本発明方法によって、ハイブリダイゼーションプローブ断片の表面ハイブリダイゼーションの検出が試料中の標的核酸の存在を示すような均一P C R アッセイも行うことができる。

【0076】

上記の明細書は本発明の原理を教示しているが、実施例は説明の目的で示されたので、当業者であれば、本明細書の開示に基づき、本発明の技術的範囲を逸脱せずに、多くの変形及び詳細を実施することが可能であることが理解されよう。

40

【図 1 A】

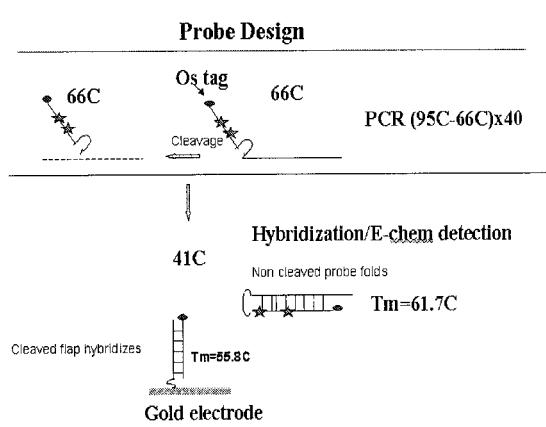


FIG. 1A

【図 1 B】

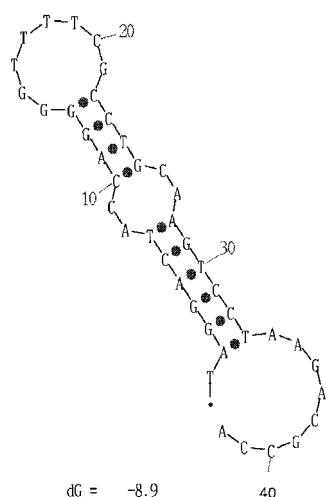


FIG. 1B

【図 2】

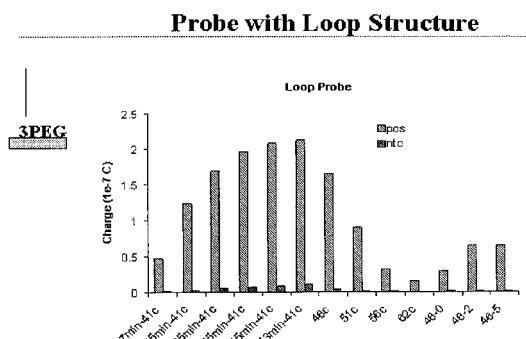


FIG. 2

【図 3 A】

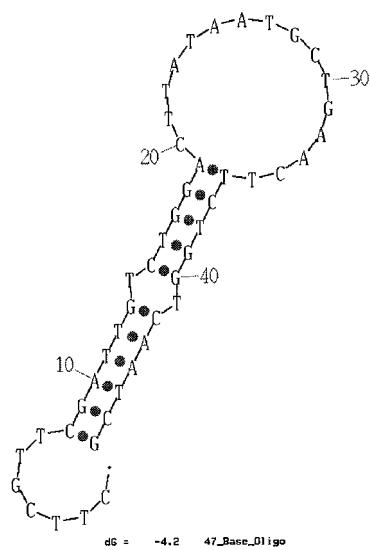


FIG. 3A

【図 3B】

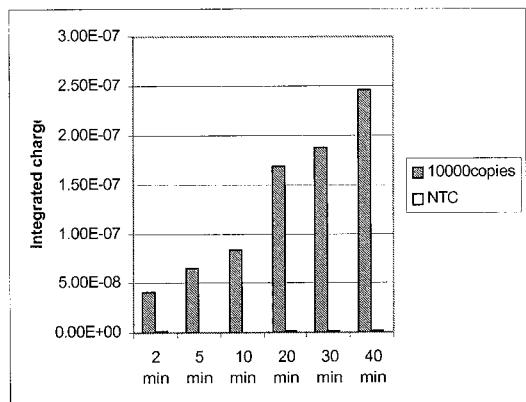


FIG. 3B

【図 4】

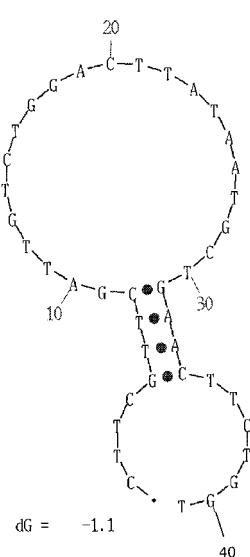


FIG. 4

【図 5A】

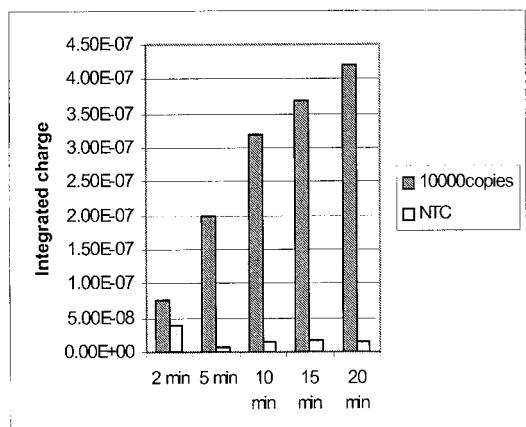


FIG. 5A

【図 5B】

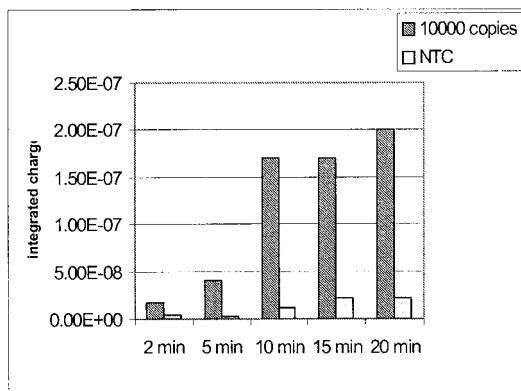


FIG. 5B

【図 6 A】

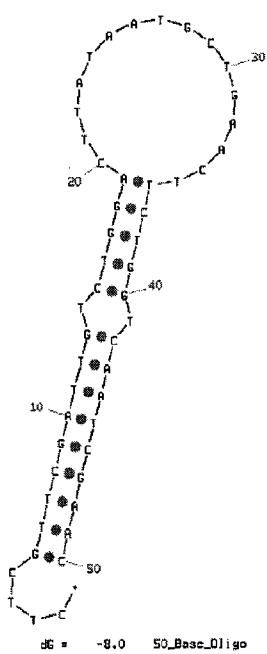


FIG. 6A

【図 6 B】

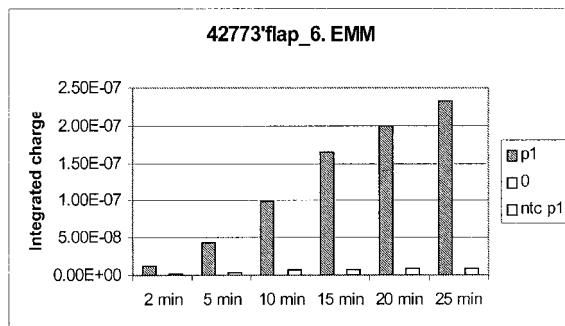


FIG. 6B

【図 6 C】

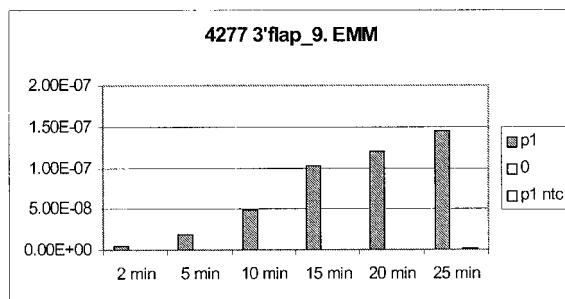


FIG. 6C

【図 7 A】

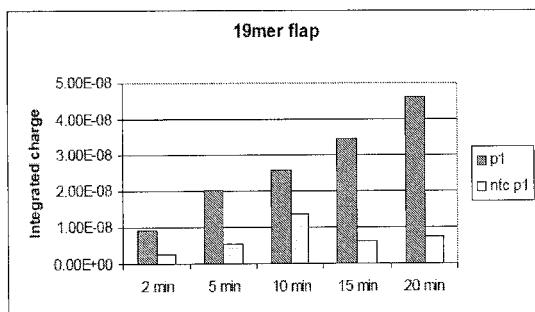


FIG. 7A

【図 7 C】

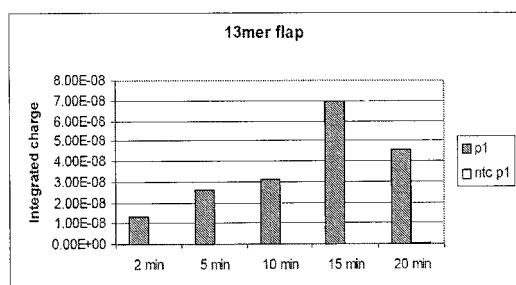


FIG. 7C

【図 7 B】

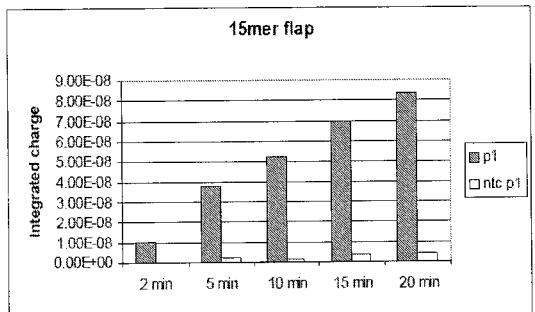


FIG. 7B

【図 8 A】

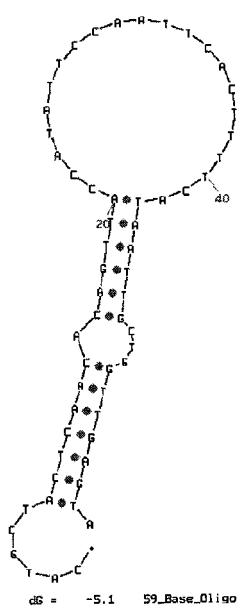


FIG. 8A

【図 8 B】

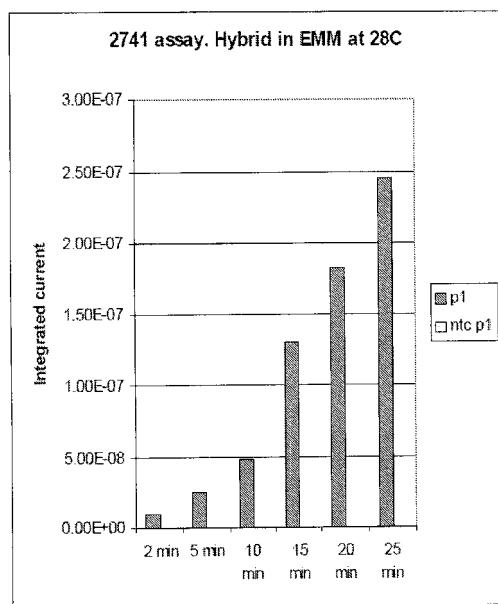


FIG. 8B

【図 9 A】

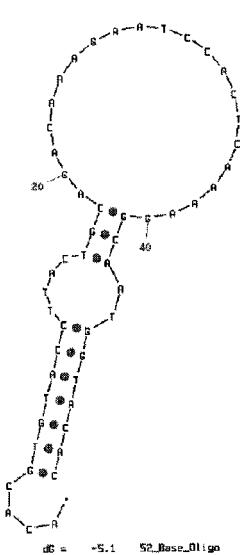


FIG. 9A

【図 9 B】

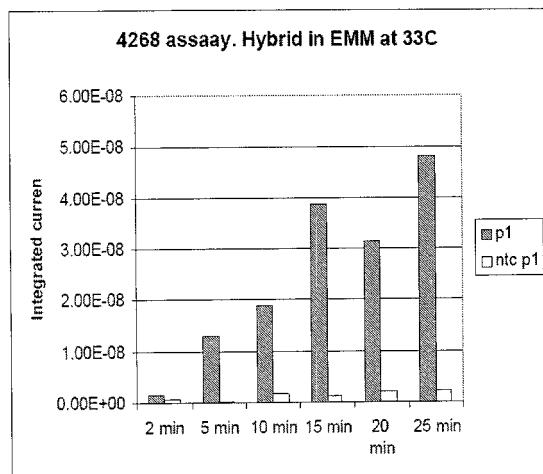


FIG. 9B

【図 10】

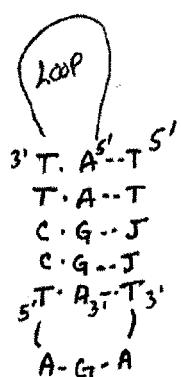


FIG. 10

【図 11A】

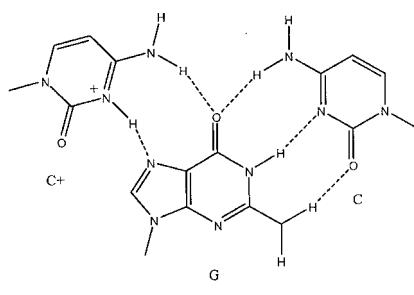


FIG. 11A

【図 11B】

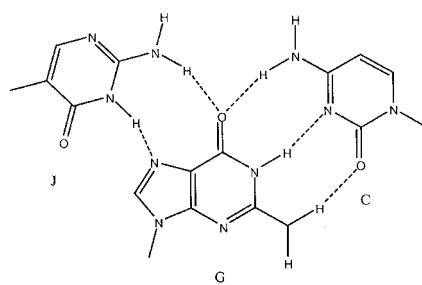


FIG. 11B

【図 12】

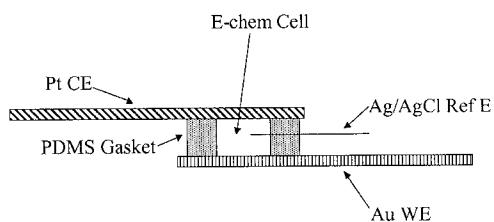


FIG. 12

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2007/089007
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/255512 A1 (SORGE JOSEPH A [US] ET AL) 17 November 2005 (2005-11-17) paragraphs [0022], [0043], [0051] - [0063], [0071], [0075], [0080], [0083], [0101], [0102], [0146] - [0148]; figure 4	1-30
Y	WO 01/06016 A (CLINICAL MICRO SENSORS INC [US]) 25 January 2001 (2001-01-25) page 12, paragraph 2 - page 13, paragraph 1; figure 31	1-30
Y	WO 2005/010199 A (GENEOHM SCIENCES INC [CA]; CROTHERS DONALD M [CA]; EIS PEGGY S [CA]) 3 February 2005 (2005-02-03) paragraphs [0004] - [0007], [0009], [0014]; figures 1-7	1-30
		-/-
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
19 May 2008	30/05/2008	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL- 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 51 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Aguilera, Miguel	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/089007

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ALLAWI HATIM T ET AL: "Invader plus method detects herpes simplex virus in cerebrospinal fluid and simultaneously differentiates types 1 and 2." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY SEP 2006, vol. 44, no. 9, September 2006 (2006-09), pages 3443-3447, XP002480721 ISSN: 0095-1137 abstract	1-30
Y	WO 2005/068660 A (BECKMAN COULTER INC [US]; MATSON ROBERT S [US]; RAMPAL JANG B [US]) 28 July 2005 (2005-07-28) pages 2-11; figure 7	1-30
Y	US 2006/246475 A1 (PETERSON PATRICK [US] ET AL) 2 November 2006 (2006-11-02) paragraphs [0211] - [0218], [0302] - [0317]	1-30
Y	US 5 843 669 A (KAISER MICHAEL W [US] ET AL) 1 December 1998 (1998-12-01) column 27, line 1 - column 29, line 60	1-30
A	US 5 487 972 A (GELFAND DAVID H [US] ET AL) 30 January 1996 (1996-01-30) column 6, line 34 - column 7, line 26	1-30
P,X	WO 2007/011946 A (APPLERA CORP [US]; AIVAZACHVILI VISSARION [US]; SCABOO KRISTIAN M [US]) 25 January 2007 (2007-01-25) the whole document	1-30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2007/089007

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 2005255512	A1	17-11-2005	US	2006094036 A1		04-05-2006
			US	2006246469 A1		02-11-2006
			US	2007161011 A1		12-07-2007
			US	2007099206 A1		03-05-2007
			US	2007134686 A1		14-06-2007
			US	2007105138 A1		10-05-2007
			US	2002137036 A1		26-09-2002
WO 0106016	A	25-01-2001	AU	6360500 A		05-02-2001
			CA	2379693 A1		25-01-2001
			EP	1194593 A2		10-04-2002
			JP	2003530822 T		21-10-2003
WO 2005010199	A	03-02-2005		NONE		
WO 2005068660	A	28-07-2005	AU	2003300271 A1		03-08-2005
US 2006246475	A1	02-11-2006		NONE		
US 5843669	A	01-12-1998	US	5846717 A		08-12-1998
			US	6001567 A		14-12-1999
US 5487972	A	30-01-1996	AT	365812 T		15-07-2007
			AT	198912 T		15-02-2001
			AT	252110 T		15-11-2003
			AU	666837 B2		29-02-1996
			AU	8651091 A		02-03-1992
			CA	2088683 A1		07-02-1992
			DE	69132521 D1		01-03-2001
			DE	69132521 T2		06-09-2001
			DE	69133329 D1		20-11-2003
			DE	69133329 T2		05-08-2004
			DE	69133574 T2		06-03-2008
			DK	1302549 T3		01-10-2007
			DK	543942 T3		18-06-2001
			DK	919565 T3		16-02-2004
			EP	0543942 A1		02-06-1993
			ES	2289190 T3		01-02-2008
			ES	2155058 T3		01-05-2001
			ES	2209033 T3		16-06-2004
			JP	2825976 B2		18-11-1998
			JP	6500021 T		06-01-1994
			WO	9202638 A1		20-02-1992
			US	5210015 A		11-05-1993
WO 2007011946	A	25-01-2007	EP	1907586 A2		09-04-2008

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 スカボー・クリスティアン

アメリカ合衆国 94546 カリフォルニア州、カストロ・バレー、シドニーウェイ 3232

(72)発明者 シュピエール・ユーゲン

アメリカ合衆国 94306 カリフォルニア州、パロ・アルト、マタデロ・アヴェニュー 85  
0

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 CA20 HA14

4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34

【要約の続き】

とハイブリダイズする一つ又はそれ以上の捕捉プローブを有する固体支持体の表面と接触される。そして該標識が検出される。