

【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17年2月3日(2005.2.3)

【公表番号】特表2004-501615(P2004-501615A)

【公表日】平成16年1月22日(2004.1.22)

【年通号数】公開・登録公報2004-003

【出願番号】特願2001-576947(P2001-576947)

【国際特許分類第7版】

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 N 15/09

【F I】

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成15年1月6日(2003.1.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の標的核酸配列を検出するための方法であって、

(i) 配列特異的ハイブリダイゼーションの条件下で試料を一对のプローブと合し、ここで、各プローブは、いずれかの末端にある、他方のプローブとの相互作用を介してプローブ-プローブ分枝を形成できるが該標的核酸配列に相補的でないプローブ-プローブ分枝形成領域を含んで成り、一方のプローブのプローブ-プローブ分枝形成領域内に少なくとも1個の架橋化合物が位置し、これは、該標的核酸配列と該プローブとの塩基対合の後、該プローブ対のうち他方のプローブのプローブ-プローブ分枝形成領域内に位置する架橋化合物反応体と共有結合による架橋を形成し、そして、プローブの少なくとも一方に少なくとも1個の検出可能成分が結合しており；

(ii) この試料を光照射して、隣接するプローブ対のプローブ-プローブ分枝形成領域を架橋し；

(iii) プローブの架橋されたプローブ-プローブ分枝形成領域を標的相補性領域から分離し；そして、

(iv) 該試料中に該標的核酸配列が存在することを示す、少なくとも1個の分離され架橋されたプローブ-プローブ分枝の存在を検出する；

ことを含む方法。

【請求項2】

前記架橋化合物が、クマリン、クマリン誘導体、3-(7-クマリニル)グリセロール；ソラレン、ソラレン誘導体、8-メトキシソラレン、5-メトキシソラレン；cis-ベンゾジピロン、cis-ベンゾジピロン誘導体；trans-ベンゾジピロン、trans-ベンゾジピロン誘導体；および融合クマリン-シノリン環系を含む化合物、より成る群から選ばれる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記架橋化合物反応体がピリミジンおよびピリミジン誘導体より成る群から選ばれる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

試料中の標的核酸配列を検出するための方法であって、

(i) 配列特異的ハイブリダイゼーションの条件下で試料を一对のプローブと合し、ここで、各プローブは、いずれかの末端にある、他方のプローブとの相互作用を介してプローブ - プローブ分枝を形成できるが該標的核酸配列に相補的でないプローブ - プローブ分枝形成領域を含んで成り、プローブ対のうち第一のプローブのプローブ - プローブ分枝形成領域内に第一の架橋化合物が位置し、プローブ対のうち第二のプローブのプローブ - プローブ分枝形成領域内に第二の架橋化合物が位置し、そして、プローブの少なくとも一方に少なくとも 1 個の検出可能成分が結合しており；

(i i) この試料を光照射して、隣接するプローブ対のプローブ - プローブ分枝形成領域を架橋し；

(i i i) プローブの架橋されプローブ - プローブ分枝形成領域を標的相補性領域から分離し；そして、

(i v) 該試料中に該標的核酸配列が存在することを示す、少なくとも 1 個の分離され架橋されたプローブ - プローブ分枝の存在を検出する；

ことを含む方法。

【請求項 5】

前記架橋化合物がアリールオレフィンおよびアリールオレフィン誘導体より成る群から選ばれる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記検出可能成分が、フルオレセイン、発蛍光団、ラジオアイソトープ、抗原および酵素より成る群から選ばれる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記プローブ対の各プローブのプローブ - プローブ分枝形成領域が、塩基対を形成する少なくとも 2 個のヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記プローブ対の各プローブのプローブ - プローブ分枝形成領域が、塩基対を形成する約 2 ないし約 8 個のヌクレオチドを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

標的相補性領域からの、前記プローブの架橋されたプローブ - プローブ分枝の分離を、化学的または酵素的分解によって達成する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記標的核酸配列が、プローブの対に相補的な配列の間に約 2 ヌクレオチドを越えないギャップを持っている、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記プローブの対が、一方のプローブに結合した少なくとも 1 個のシグナルレポーター基および他方のプローブに結合した少なくとも 1 個の捕捉基を含んで成る、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記捕捉基が、ビオチン、抗原および受容体基質から成る群から選ばれる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

核酸プローブであって、

(i) 標的配列の或る領域と塩基対合する、標的相補性領域；

(i i) 該標的配列とハイブリダイズしないプローブ - プローブ分枝形成領域；

(i i i) 該プローブと標的配列との塩基対合後に、第二のプローブのプローブ - プローブ分枝形成領域内に位置する第二の架橋化合物または架橋化合物反応体との反応に際し共有結合による架橋を形成できる、上記 (i i) のプローブ - プローブ分枝形成領域内に位置する第一の架橋化合物；

(i v) 少なくとも 1 個のプローブのプローブ - プローブ分枝形成領域に結合した、少

なくとも 1 個の検出可能成分；および、

(v) 標的相補性領域とプローブ - プローブ分枝形成領域の間の分解部位、を含む核酸プローブ。

【請求項 14】

核酸プローブ対であって、

(i) 標的配列の或る領域と塩基対合する、各プローブ中の標的相補性領域；

(ii) 該標的配列とハイブリダイズしない、各プローブ中のプローブ - プローブ分枝形成領域；

(iii) 該プローブと標的配列の塩基対合後に、該核酸プローブ対の他方のプローブのプローブ - プローブ分枝形成領域内部に位置する第二の架橋化合物または架橋化合物反応体との反応に際し共有結合による架橋を形成できる、上記(ii)のプローブ - プローブ分枝形成領域内部に位置する第一の架橋化合物；

(iv) 該核酸プローブ対の少なくとも一方のプローブのプローブ - プローブ分枝形成領域に結合した、少なくとも 1 個の検出可能成分；および、

(v) 標的相補性領域とプローブ - プローブ分枝形成領域の間の分解部位、を含む核酸プローブ対。

【請求項 15】

前記核酸プローブ対のうち一方のプローブのプローブ - プローブ分枝形成領域に結合した少なくとも 1 個のシグナルリポーター基、および、該核酸プローブ対の他方のプローブのプローブ - プローブ分枝形成領域に結合した少なくとも 1 個の捕捉基を含んで成る、請求項 14 に記載のプローブ対。

【請求項 16】

以下のプローブ - プローブ分枝：

【化 1】

$$\begin{array}{c} L \quad L' \\ \backslash \quad / \\ N(a) \quad N(a) \\ X = Y \end{array}$$

\ /

N(a) N(a)

X = Y

N(b) N(b)

[式中、(i) L および L' の少なくとも一方が存在し、それは標識であり；

(ii) N は核酸であり；

(iii) a および b は N の個数を表す独立した整数であり；

(iv) X は第一の架橋化合物であり；

(v) Y は第二の架橋化合物または架橋化合物反応体であり；そして、

(vi) 第一の架橋化合物は第二の架橋化合物または架橋化合物反応体と共有結合して、該プローブ - プローブ分枝を永続的に連結する]

を含む核酸プローブ対。

【請求項 17】

L がシグナルリポーター基であり、L' が捕捉基である、請求項 15 に記載の核酸プローブ対。

【請求項 18】

前記シグナルリポーター基が、フルオレセイン、発蛍光団、ラジオアイソトープ、抗原および酵素より成る群から選ばれる、請求項 17 に記載の核酸プローブ対。

【請求項 19】

前記捕捉基が、ビオチン、抗原およびレセプター基質より成る群から選ばれる、請求項 17 または 18 に記載の核酸プローブ対。

【請求項 20】

前記プローブ対の各プローブが、a = 0 ~ 20 であり且つ b = 0 ~ 80 である配列長を有

する、請求項 16 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の核酸プローブ対。

【請求項 21】

前記架橋化合物が、クマリン、クマリン誘導体、3 - (7 - クマリニル)グリセロール；ソラレン、ソラレン誘導体、8 - メトキシソラレン、5 - メトキシソラレン；*c i s* - ベンゾジピロン、*c i s* - ベンゾジピロン誘導体；*t r a n s* - ベンゾジピロン、*t r a n s* - ベンゾジピロン誘導体；融合クマリン - シノリン環系を含む化合物；アリアルオレフィン、およびアリアルオレフィン誘導体、より成る群から選ばれる、請求項 14 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の核酸プローブ対。

【請求項 22】

前記架橋化合物反応体がピリミジン、ピリミジン誘導体、プリン、およびプリン誘導体より成る群から選ばれる、請求項 14 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の核酸プローブ対。