

【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20年10月9日(2008.10.9)

【公表番号】特表2004-506431(P2004-506431A)

【公表日】平成16年3月4日(2004.3.4)

【年通号数】公開・登録公報2004-009

【出願番号】特願2002-519680(P2002-519680)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/566 (2006.01)

G 0 1 N 33/58 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

G 0 1 N 21/64 F

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/58 A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成20年8月11日(2008.8.11)

【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】

標的核酸を分析するための蛍光プローブシステムであって、

前記核酸の座位に対してほぼ相補的な配列、および、塩基アナログである前記プローブのヌクレオチドに付着する蛍光ラベルを含む単一ラベルポリヌクレオチドから事実上成る標的核酸を分析するための蛍光プローブシステムであって、

前記単一ラベルポリヌクレオチドの前記核酸の座位へのハイブリダイゼーション時に、前記蛍光ラベルは、標的核酸の一残基の近くに配され、前記蛍光ラベルの蛍光強度が増加することを特徴とする蛍光プローブシステム。

【請求項 2】

前記塩基アナログは、5 - ニトロインドール、4 - ニトロインドール、6 - ニトロインドール、3 - ニトロピロール、5 - イオド - シチジン、イノシン、および、ヌブラリン・デオキシヌクレオチド類から成るグループから選ばれることを特徴とする請求項 1 のプローブシステム。

【請求項 3】

前記標的核酸は、一つの相補的位置に C 残基を有することを特徴とする請求項 1 のプローブシステム。

【請求項 4】

標的核酸を分析するためのプローブであって、

前記標的核酸の座位に対してほぼ相補的な配列を有する単一ラベルオリゴヌクレオチド

、および、前記オリゴヌクレオチドの塩基アナログである内部残基に結合する蛍光ラベルから事実上成る蛍光検出体を含む標的核酸を分析し、

前記プローブのオリゴヌクレオチド配列は、同プローブの前記標的核酸の座位へのハイブリダイゼーション時に、前記蛍光ラベルからの蛍光発光量が、プローブの標的核酸に対するハイブリダイゼーションによって変化するように選択されることを特徴とするプローブ。

【請求項 5】

生物サンプルにおける標的核酸の有無を確定するための方法であって、

単一ラベルオリゴヌクレオチド・プローブをサンプルと混合する工程であって、

前記プローブは、前記標的核酸の座位とほぼ相補的なオリゴヌクレオチド配列と、前記オリゴヌクレオチド配列の G 残基と結合する蛍光ラベルとを有し、

前記蛍光ラベルはハイブリダイゼーション依存性蛍光発光を呈するものであって、その蛍光発光においては、前記オリゴヌクレオチド・プローブが前記標的核酸とハイブリダイズすると、蛍光ラベルと G 残基との相互作用を変化させ、それによってラベルからの蛍光発光が増加することになることを特徴とする工程と；

生物サンプルを照射する工程と；

ハイブリダイゼーション依存性蛍光発光をサンプル温度の関数としてモニターする工程と；

を含む方法。

【請求項 6】

前記 G 残基が前記オリゴヌクレオチド配列の末端残基を含むことを特徴とする請求項 5 の方法。

【請求項 7】

前記標的核酸の座位が、前記 G 残基に対する相補位置に C 残基を有することを特徴とする請求項 6 の方法。

【請求項 8】

前記オリゴヌクレオチド配列の前記標的核酸に対するハイブリダイゼーションによって、突き出し部が前記標的核酸の前記 C 残基に隣接して形成されることを特徴とする請求項 7 の方法。

【請求項 9】

ポジション - 1、+ 1 および + 2 に G 以外の残基が配されることを特徴とする請求項 8 の方法。

【請求項 10】

前記標的核酸のポジション - 1 と + 1 にグアニン残基が存在しないことを特徴とする、請求項 6 の方法。

【請求項 11】

前記プローブとサンプルは、 $pH > 8.0$ の液の中で混合されることを特徴とする、請求項 5 の方法。

【請求項 12】

前記溶液は、約 200 mM のトリス濃度を有することを特徴とする、請求項 11 の方法。

【請求項 13】

前記蛍光ラベルは、フルオレセン、フルオレセン誘導体、および、フルオレセン - シアニン接合体から成るグループから選ばれ、かつ、陽イオン濃度が約 50 - 200 mM であることを特徴とする、請求項 11 の方法。

【請求項 14】

前記溶液は、トリス +、トリシン +、2 - アミノ - 2 - メチル - 1 - プロパノール、および、2 - アミノ - 2 - メチル - 1, 3 - プロペンジオールから成るグループから選ばれるバッファーをさらに含むことを特徴とする、請求項 11 の方法。

【請求項 15】

前記ハイブリダイゼーション依存性蛍光発光が非対称PCR実行時においてモニターされていることを特徴とする、請求項5の方法。

【請求項16】

約45PCRサイクルが実行され、かつ、一对のPCRプライマーが1：4比で与えられることを特徴とする、請求項15の方法。

【請求項17】

約60PCRサイクルが実行され、かつ、一对のPCRプライマーが1：8比で与えられることを特徴とする、請求項15の方法。

【請求項18】

生物サンプルにおける標的核酸の有無を確定するための方法であって、

前記生物サンプルを、前記標的核酸の選択された分節を増幅するように構成される一对のプライマー、および、単一ラベルオリゴヌクレオチド・プローブから事実上成る蛍光検出体と混合する工程であって、

前記単一ラベルプローブは、前記標的核酸の選択された分節の座位に対して相補的な配列、及び、蛍光ラベルを有するオリゴヌクレオチドを含み、そこでプローブが前記座位にハイブリダイズすると、ハイブリダイゼーション依存性蛍光ラベルの発光が生じる工程と；

ポリメラーゼを添加し、複数の増幅サイクルを通じて前記核酸配列の前記選択された分節を増幅する工程と；

前記生物サンプルを照射する工程と；

前記ハイブリダイゼーション依存性蛍光発光をモニターする工程と；

を含むことを特徴とする方法。

【請求項19】

前記プローブが前記標的核酸から解離する際に、 $-dF/dT$ 最大値を確定する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項18の方法。

【請求項20】

前記蛍光ラベルが、前記オリゴヌクレオチド・プローブの塩基と結合し、かつ、前記塩基が、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、6-ニトロインドール、および、3-ニトロピロール・デオキシヌクレオシド類から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項18の方法。

【請求項21】

前記蛍光ラベルが、前記オリゴヌクレオチド・プローブの塩基と結合し、かつ、前記塩基が、イノシン、5-イオド-シチジン、および、ネブラリン・デオキシヌクレオシド類から成るグループから選ばれる請求項18の方法であって、

グアニン以外の残基が、標的核酸上においてラベル位置に対してポジション+1に配されることを特徴とする方法。

【請求項22】

前記蛍光ラベルはグアニン残基に付着し、かつ、前記モニター工程は、前記プローブが前記標的核酸にハイブリダイズする際に生じる、蛍光ラベルからの蛍光発光の増加をモニターすることを含むことを特徴とする、請求項18の方法。

【請求項23】

前記蛍光ラベルが、シアニン染料およびLCRed 705から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項18の方法。

【請求項24】

前記蛍光検出体が表面に固定化されており、前記混合工程が、サンプルを前記表面に接触させることを含むことを特徴とする、請求項18の方法。

【請求項25】

請求項18の方法であって、

第2の単一ラベルオリゴヌクレオチド・プローブから事実上成る第2の蛍光検出実体を提供する工程であって、

前記第2の単一ラベルオリゴヌクレオチド・プローブは、前記標的核酸の第2の選択された分節に対してほぼ相補的であり、かつ、その配列の末端に結合される第2の蛍光ラベルを有する第2のオリゴヌクレオチド配列を含み、

第2の蛍光ラベルは、第1のプローブの蛍光発光とは異なる波長の、ハイブリダイゼーション依存性蛍光発光を呈し、第2のオリゴヌクレオチド・プローブの第2選択分節に対するハイブリダイゼーションは、第2のラベルからの蛍光発光に変化をもたらし、かつ、この蛍光シグナル変化は、第1の蛍光検出体の蛍光発光とは独立している工程と；

第2のプローブの前記ハイブリダイゼーション依存性蛍光発光をモニターする工程と；
をさらに含むことを特徴とする方法。

【請求項26】

生物サンプルにおける標的核酸の有無を確定するための方法であって、

前記生物サンプルを、単一ラベルオリゴヌクレオチド・プローブから事実上成る蛍光検出体と混合する工程であって、

前記単一ラベルプローブは、前記標的核酸の一つの座位に対して相補的な配列、および、その5'末端ヌクレオチドに蛍光ラベルを付着させ、かつ、ハイブリダイゼーション依存性発光を示すオリゴヌクレオチドを含み、前記プローブの前記座位に対するハイブリダイゼーションは前記蛍光ラベルからの蛍光発光を増加させる工程と；

前記生物サンプルとプローブを、第2のオリゴヌクレオチドとポリメラーゼと混合する工程であって、

プローブと第2のオリゴヌクレオチドは増幅において一対のプライマーとして作動する工程と；

前記標的核酸を増幅する工程と；

前記生物サンプルを照明する工程と；

ハイブリダイゼーション依存性蛍光発光をモニターする工程と；

を含むことを特徴とする方法。

【請求項27】

前記5'末端ヌクレオチドはAまたはT残基であることを特徴とする、請求項26の方法。

【請求項28】

核酸配列を含む生物サンプル分析用キットであって、

a. オリゴヌクレオチドの末端ヌクレオチドに蛍光ラベルを結合させた単一ラベルオリゴヌクレオチド・プローブから事実上成る蛍光検出体であって、

前記末端ヌクレオチドは塩基アナログであり、前記プローブは、前記分節の一本鎖座位にハイブリダイズすると、プローブの座位に対するハイブリダイゼーションによって前記蛍光ラベルの蛍光強度が増加するように構成されている蛍光検出体と、

b. 前記核酸配列増幅用成分と、

を含むキット。

【請求項29】

前記成分は、前記核酸配列の一分節を増幅するように構成される一対のオリゴヌクレオチド・ペア、および、熱安定性DNAポリメラーゼを含むことを特徴とする、請求項28のキット。

【請求項30】

請求項28のキットであって、

第2の一本鎖部位を含む、前記核酸配列の第2分節を増幅するように構成される第2プライマー・ペアと；

第2の蛍光ラベルに結合する第2のオリゴヌクレオチドを有する第2の単一ラベルオリゴヌクレオチド・プローブから事実上成る第2の蛍光検出体であって、

前記第2のプローブは、前記第2の座位にハイブリダイズすると、この第2のプローブの標的核酸に対するハイブリダイゼーションによって第2の蛍光ラベルの蛍光強度が増加または減少するように構成されていることを特徴とする第2の蛍光検出体と；

をさらに含むキット。

【請求項 3 1】

ヌクレオチドが内部ヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 に記載のプローブシステム。

【請求項 3 2】

ヌクレオチドが末端ヌクレオチドであることを特徴とする請求項 1 に記載のプローブシステム。