

【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22年9月30日(2010.9.30)

【公開番号】特開2010-99090(P2010-99090A)

【公開日】平成22年5月6日(2010.5.6)

【年通号数】公開・登録公報2010-018

【出願番号】特願2010-15946(P2010-15946)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/37 (2006.01)

C 1 2 Q 1/48 (2006.01)

C 1 2 Q 1/42 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/533 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 Q 1/37

C 1 2 Q 1/48

C 1 2 Q 1/42

C 1 2 N 15/00 A

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 33/533

【手続補正書】

【提出日】平成22年8月17日(2010.8.17)

【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】

a)それぞれ独立して3～150個のヌクレオチドを有し、相互に実質的に相補的であることから第1ハイブリダイズした二重鎖(first hybridized duplex)を形成する第1対象配列及び第1相補配列からなる第1核酸配列対；

b)前記第1対象配列と前記第1相補配列のうち少なくとも一つに接合されており、少なくとも一つの標的因子と特異的に相互作用する少なくとも一つの認識要素；及び

c)前記第1ハイブリダイズした二重鎖の量の関数としてその大きさが示される特徴的シグナルを発生する少なくとも一つの検出可能なラベル；からなる構成成分のうち少なくとも一つ、好ましくは全部を作動可能に連結された状態に含むプローブであって、前記標的因子が存在するときに、前記標的因子と前記認識要素との前記相互作用により前記第1ハイブリダイズした二重鎖の量が、前記標的因子が存在しないときの量に比べて変化することによって前記特徴的シグナルが変化すること、

前記認識要素は、不安定化因子と少なくとも一つの切断部位とを含むプローブ基質であり、前記標的因子は、切断部位を特異的に切断しうる反応誘発因子であり、前記切断部位の第1末端は、前記不安定化因子に接合されており、前記切断部位の第2末端は、前記第1対象配列または第1相補配列に少なくとも一つの連結要素により共有結合で連結されていることを特徴とするプローブ。

【請求項 2】

前記第 1 ハイブリダイズした二重鎖の融解温度が、前記切断部位が前記反応誘発因子により切断されることによって少なくとも 1℃増加する請求項 1 に記載のプロープ。

【請求項 3】

前記連結要素が、化学結合、二価原子、二価の化学部分、及び多価の化学部分からなる群より選ばれる請求項 1 に記載のプロープ。

【請求項 4】

前記不安定化因子が、前記切断部位の前記第 1 末端とリンカーにより共有結合または非共有結合的に連結されている請求項 1 に記載のプロープ。

【請求項 5】

前記不安定化因子が、ビオチン(biotin)に結合するストレプトアビジン(streptavidin)またはその誘導体であり、前記ビオチンは、前記切断部位の第 1 末端にリンカーにより共有結合で連結されている請求項 4 に記載のプロープ。

【請求項 6】

前記リンカーが、化学結合、二価原子、二価の化学部分、及び多価の化学部分からなる群より選ばれる請求項 4 に記載のプロープ。

【請求項 7】

前記切断部位が、プロテアーゼ(protease)、エンドヌクレアーゼ(endonuclease)、リパーゼ(lipase)、またはグリコシダーゼ(glycosidase)によって特異的に切断される請求項 1 に記載のプロープ。

【請求項 8】

前記切断部位が、哺乳類またはウイルスのプロテアーゼによって特異的に切断される請求項 7 に記載のプロープ。

【請求項 9】

前記切断部位が、ヒト病原体(human pathogen)と関連するプロテアーゼによって特異的に切断される請求項 7 に記載のプロープ。

【請求項 10】

前記プロテアーゼが、サイトメガロウイルス(cytomegalovirus:CMV)、単純ヘルペスウイルス(herpes simplex virus:HSV)、肝炎ウイルス(hepatitis virus)、マラリア原虫(plasmodium)、ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus:HIV)、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス(Kaposi's sarcoma-associated herpes virus:KSHV)、黄熱ウイルス(yellow fever virus)、フラビウイルス(flavivirus)、またはライノウイルス(rhinovirus)から発現するプロテアーゼである請求項 9 に記載のプロープ。

【請求項 11】

前記プロテアーゼが、セリン型(serine-type)、システイン型(cystein-type)、またはアスパラギン酸型(aspartate-type)プロテアーゼである請求項 7 に記載のプロープ。

【請求項 12】

前記ヒト病原体が酵母(yeast)、細菌(bacterium)、真菌類(fungi)、線虫(nematode)、ウイルス(virus)、または原生動物(protozoa)である請求項 10 に記載のプロープ。

【請求項 13】

前記切断部位が、血液凝固(blood coagulation)、アポトーシス(apoptosis)、アルツハイマー病(Alzheimer's disease)、または細胞外マトリックス(extracellular matrix)と関連している哺乳類のプロテアーゼによって特異的に切断される請求項 8 に記載のプロープ。

【請求項 14】

前記プロープは、第 2 対象配列と第 2 相補配列とからなる競争する核酸配列である第 2 核酸配列対をさらに含むプロープであって、

前記第 2 対象配列と前記第 2 相補配列はそれぞれ独立して 3～150 個のヌクレオチドを有し、相互に実質的に相補的であることから第 2 ハイブリダイズした二重鎖(second hybridized duplex)を形成し；

前記第 1 対象配列と前記第 2 対象配列は、一つの対象配列内に含まれていながら、少なくとも一つのヌクレオチドからなる重複領域を有し、

前記標的因子が存在するときに、前記標的因子と前記認識要素との前記相互作用により、前記標的因子が存在しないときに比べて前記第 1 ハイブリダイズした二重鎖及び前記第 2 ハイブリダイズした二重鎖のいずれか一つの量は減少し、残り一つの量は増加することによって、前記特徴的シグナルが変化する請求項 1 に記載のプロープ。

【請求項 15】

前記認識要素が、前記重複領域を除いた前記第 1 対象配列、または前記第 1 相補配列に接合されている請求項 14 に記載のプロープ。

【請求項 16】

前記対象配列及び前記相補配列が、DNA、RNA、PNA、及び DNA と RNA との混合物からなる群より選ばれる請求項 1 及び 14 のいずれか一項に記載のプロープ。

【請求項 17】

前記標的因子が存在しないときに、前記第 2 ハイブリダイズした二重鎖が、前記第 1 ハイブリダイズした二重鎖に比べて優先的に形成される請求項 14 に記載のプロープ。

【請求項 18】

前記標的因子が過量存在するときに、前記第 1 ハイブリダイズした二重鎖が、前記第 2 ハイブリダイズした二重鎖に比べて優先的に形成される請求項 17 に記載のプロープ。

【請求項 19】

前記検出可能なラベルが、蛍光体、発光体、放射線同位元素、酵素、抗体、抗原、電気化学的ラベルからなる群より選ばれる非相互作用性ラベルである請求項 1 に記載のプロープ。

【請求項 20】

前記プロープは、前記第 1 対象配列を含む第 1 分子及び前記第 1 相補配列を含む第 2 分子からなる二分子プロープであって、前記少なくとも一つの検出可能なラベルが、前記第 1 及び第 2 分子のうち少なくとも一つに共有結合で連結されている請求項 19 に記載のプロープ。

【請求項 21】

前記第 1 分子が支持体に固定化されており、前記少なくとも一つの検出可能なラベルが、前記第 2 分子に共有結合で連結されている請求項 20 に記載のプロープ。

【請求項 22】

前記第 2 分子が支持体に固定化されており、前記少なくとも一つの検出可能なラベルが、前記第 1 分子に共有結合で連結されている請求項 20 に記載のプロープ。

【請求項 23】

前記検出可能なラベルが、二本鎖核酸に優先的に結合しうるインターカレート染色剤 (intercalating dye) である請求項 1 に記載のプロープ。

【請求項 24】

前記少なくとも一つの検出可能なラベルが、前記第 1 対象配列に接合されている第 1 ラベル部分と、前記第 1 相補配列に接合されている第 2 ラベル部分とを含む相互作用性ラベル対を含み、前記第 1 ハイブリダイズした二重鎖が形成されるときに、前記第 1 及び第 2 ラベル部分が相互作用する請求項 1 に記載のプロープ。

【請求項 25】

前記相互作用性ラベル対が、蛍光体と消光体からなり、前記相互作用性ラベル対の相互作用により前記プロープの蛍光の変化が起こり、該蛍光の変化が、強度の減少、寿命の減少、偏光の変化、波長の変化からなる群より選ばれる請求項 24 に記載のプロープ。

【請求項 26】

前記プロープが、前記第 1 ラベル部分を含んでいる前記第 1 対象配列を含む第 1 分子と、前記第 2 ラベル部分を含んでいる前記第 1 相補配列を含む第 2 分子とからなる二分子プロープである請求項 24 に記載のプロープ。

【請求項 27】

前記第 1 または第 2 分子が支持体に固定化されている請求項 26 に記載のプロープ。

【請求項 28】

前記プロープが、前記第 1 対象配列及び前記第 1 相補配列がループ部分により共有結合で連結されている単分子プロープである請求項 24 に記載のプロープ。

【請求項 29】

前記ループ部分が、前記第 1 対象配列の 5' または 3' 末端のいずれかを前記第 1 相補配列の 5' または 3' 末端のいずれかに連結する請求項 28 に記載のプロープ。

【請求項 30】

前記ループ部分が、4～100 個のヌクレオチドを有する核酸配列である請求項 28 に記載のプロープ。

【請求項 31】

前記第 1 対象配列、前記ループ部分、及び前記第 1 相補配列が、5' から 3' 方向または 3' から 5' 方向に順次に共有結合で連結されている請求項 30 に記載のプロープ。

【請求項 32】

支持体に固定化されている請求項 28 に記載のプロープ。

【請求項 33】

前記プロープは単分子プロープであって、前記第 1 対象配列と前記第 1 相補配列とがループ部分により共有結合で連結されており、前記少なくとも一つの検出可能なラベルが、前記単分子プロープの相異なる位置に接合されている第 1 及び第 2 ラベル部分を含む相互作用性ラベル対を含み、前記第 1 ハイブリダイズした二重鎖が形成されるときに、前記第 1 及び第 2 ラベル部分が相互作用する請求項 1 に記載のプロープ。

【請求項 34】

前記相互作用性ラベル対が、蛍光体と消光体からなり、前記相互作用性ラベル対の相互作用により前記プロープの蛍光の変化が起こり、該蛍光の変化が、強度の減少、寿命の減少、偏光の変化、波長の変化からなる群より選ばれる請求項 33 に記載のプロープ。

【請求項 35】

前記第 1 及び第 2 ラベル部分のうち少なくとも一つが、前記ループ部分に共有結合で連結されている請求項 33 に記載のプロープ。

【請求項 36】

支持体に固定化されている請求項 33 に記載のプロープ。

【請求項 37】

前記プロープは、前記第 1 対象配列の 5' 末端に共有結合で連結された 5' アーム配列 (5' arm sequence) と、前記第 1 対象配列の 3' 末端に共有結合で連結された 3' アーム配列 (3' arm sequence) とからなる核酸アーム配列対をさらに含むプロープであって、前記第 1 対象配列が前記第 1 相補配列にハイブリダイズしていないときに、前記アーム配列対は、3～35 個の相補的な塩基対を有するステム二重鎖 (stem duplex) を形成し；前記検出可能なラベルは、前記 5' アーム配列に接合された第 1 ラベル部分と前記 3' アーム配列に接合された第 2 ラベル部分とからなる相互作用性ラベル対を含み、前記ステム二重鎖が形成されるときに、前記第 1 及び第 2 ラベル部分が相互作用する請求項 1 に記載のプロープ。

【請求項 38】

前記プロープは、前記第 1 相補配列の 5' 末端に共有結合で連結された 5' アーム配列 (5' arm sequence) と、前記第 1 相補配列の 3' 末端に共有結合で連結された 3' アーム配列 (3' arm sequence) とからなる核酸アーム配列対をさらに含むプロープであって、前記第 1 対象配列が前記第 1 相補配列にハイブリダイズしていないときに、前記アーム配列対は、3～35 個の相補的な塩基対を有するステム二重鎖 (stem duplex) を形成し；前記検出可能なラベルは、前記 5' アーム配列に接合された第 1 ラベル部分と、前記 3' アーム配列に接合された第 2 ラベル部分とからなる相互作用性ラベル対を含み、前記ステム二重鎖が形成されるときに、前記第 1 及び第 2 ラベル部分が相互作用する請求項 1 に記載のプロープ。

【請求項 39】

前記プローブは、前記第1対象配列の5'末端に共有結合で連結された第1の5'アーム配列(first 5'arm sequence)と前記第1対象配列の3'末端に共有結合で連結された第1の3'アーム配列(first 3'arm sequence)とからなる第1アーム配列対と、前記第1相補配列の5'末端に共有結合で連結された第2の5'アーム配列(second 5'arm sequence)と前記第1相補配列の3'末端に共有結合で連結された第2の3'アーム配列(second 3'arm sequence)とからなる第2アーム配列対と、からなる2対の核酸アーム配列対をさらに含むプローブであって、

前記第1対象配列が前記第1相補配列にハイブリダイズしていないときに、前記第1アーム配列対は、3～35個の相補的な塩基対を有する第1ステム二重鎖(first stem duplex)を形成し、前記第2アーム配列対は、3～35個の相補的な塩基対を有する第2ステム二重鎖(second stem duplex)を形成し；

前記検出可能なラベルは、前記第1の5'アーム配列に接合された第1ラベル部分と前記第1の3'アーム配列に接合された第2ラベル部分とからなる第1ラベル対と、前記第2の5'アーム配列に接合された第3ラベル部分と前記第2の3'アーム配列に接合された第4ラベル部分とからなる第2ラベル対と、からなる2対の相互作用性ラベル対を含み、前記第1ステム二重鎖が形成されるときに前記第1ラベル対が相互作用し、前記第2ステム二重鎖が形成されるときに前記第2ラベル対が相互作用する請求項1に記載のプローブ。

【請求項 40】

前記相互作用性ラベル対が、蛍光体と消光体からなり、前記相互作用性ラベル対の相互作用により前記プローブの蛍光の変化が起こり、該蛍光の変化が、強度の減少、寿命の減少、偏光の変化、波長の変化からなる群より選ばれる請求項37ないし39のいずれか一項に記載のプローブ。

【請求項 41】

前記プローブは、前記第1対象配列を含む第1分子及び前記第1相補配列を含む第2分子からなる二分子プローブである請求項37ないし39のいずれか一項に記載のプローブ。

【請求項 42】

前記第1または第2分子が支持体に固定化されている請求項41に記載のプローブ。

【請求項 43】

前記プローブは、少なくとも前記第1対象配列を含む第1構成要素及び少なくとも前記第1相補配列を含む第2構成要素がループ部分により共有結合で連結されている単分子プローブである請求項37ないし39のいずれか一項に記載のプローブ。

【請求項 44】

支持体に固定化されている請求項43に記載のプローブ。

【請求項 45】

前記検出可能なラベルが、蛍光体、発光体、放射線同位元素、酵素、抗体、抗原、電気化学的ラベルからなる群より選ばれる非相互作用性ラベルである請求項14に記載のプローブ。

【請求項 46】

前記プローブは、前記対象配列を含む第1分子、前記第1相補配列を含む第2分子、及び前記第2相補配列を含む第3分子からなる三分子プローブであって、前記少なくとも一つの検出可能なラベルが、前記第1、第2及び第3分子のうち少なくとも一つに共有結合で連結されている請求項45に記載のプローブ。

【請求項 47】

前記少なくとも一つの検出可能なラベルが、前記第2及び第3分子のうち少なくとも一つに共有結合で連結されており、仮に、両分子ともラベルされているなら、各分子が異なるラベルを有する請求項46に記載のプローブ。

【請求項 48】

前記第1分子が支持体に固定化されている請求項47に記載のプローブ。

【請求項 49】

前記第 2 または第 3 分子のいずれかが支持体に固定化されており、前記少なくとも一つの検出可能なラベルが前記第 1 分子に共有結合で連結されている請求項 45 に記載のプロープ。

【請求項 50】

前記プロープは、前記第 1 及び第 2 相補配列のうち一つと前記対象配列とを含む第 1 分子と、残りの配列を含む第 2 分子とからなる二分子プロープであって、前記第 1 分子に含まれた前記二つの配列が、ループ部分により共有結合で連結されており、前記少なくとも一つの検出可能なラベルが、前記第 1 及び第 2 分子のうち少なくとも一つに共有結合で連結されている請求項 45 に記載のプロープ。

【請求項 51】

前記第 1 分子が支持体に固定化されており、前記少なくとも一つの検出可能なラベルが前記第 2 分子に共有結合で連結されている請求項 50 に記載のプロープ。

【請求項 52】

前記第 2 分子が支持体に固定化されており、前記少なくとも一つの検出可能なラベルが前記第 1 分子に共有結合で連結されている請求項 50 に記載のプロープ。

【請求項 53】

前記検出可能なラベルが、二本鎖核酸に優先的に結合しうるインターカレート染色剤 (intercalating dye) である請求項 14 に記載のプロープ。

【請求項 54】

前記少なくとも一つの検出可能なラベルが、前記第 1 対象配列に接合されている第 1 ラベル部分と、前記第 1 相補配列に接合されている第 2 ラベル部分とを含む相互作用性ラベル対を含み、前記第 1 ハイブリダイズした二重鎖が形成されるときに、前記第 1 及び第 2 ラベル部分が相互作用する請求項 14 に記載のプロープ。

【請求項 55】

前記少なくとも一つの検出可能なラベルが、前記第 2 対象配列に接合されている第 1 ラベル部分と、前記第 2 相補配列に接合されている第 2 ラベル部分とを含む相互作用性ラベル対を含み、前記第 2 ハイブリダイズした二重鎖が形成されるときに、前記第 1 及び第 2 ラベル部分が相互作用する請求項 14 に記載のプロープ。

【請求項 56】

前記少なくとも一つの検出可能なラベルが、第 1 ラベル対と第 2 ラベル対とからなる 2 対の相異なる相互作用性ラベル対を含むプロープであって、前記第 1 ラベル対は、前記第 1 対象配列に接合されている第 1 ラベル部分と前記第 1 相補配列に接合されている第 2 ラベル部分とを含み、前記第 2 ラベル対は、前記第 2 対象配列に接合されている第 3 ラベル部分と前記第 2 相補配列に接合されている第 4 ラベル部分とを含み、前記第 1 ハイブリダイズした二重鎖が形成されるときに前記第 1 及び第 2 ラベル部分が相互作用し、前記第 2 ハイブリダイズした二重鎖が形成されるときに前記第 3 及び第 4 ラベル部分が相互作用する請求項 14 に記載のプロープ。

【請求項 57】

前記第 1 及び第 3 ラベル部分が同じ部分である請求項 56 に記載のプロープ。

【請求項 58】

前記相互作用性ラベル対が蛍光体と消光体からなり、前記相互作用性ラベル対の相互作用により前記プロープの蛍光の変化が起こり、該蛍光の変化が、強度の減少、寿命の減少、偏光の変化、波長の変化からなる群より選ばれる請求項 54 ないし 56 のいずれか一項に記載のプロープ。

【請求項 59】

前記プロープは、前記対象配列を含む第 1 分子、前記第 1 相補配列を含む第 2 分子、及び前記第 2 相補配列を含む第 3 分子からなる三分子プロープである請求項 54 ないし 56 のいずれか一項に記載のプロープ。

【請求項 60】

前記第 1、第 2 及び第 3 分子のうち一つが、支持体に固定化されている請求項 59 に記載のプロープ。

【請求項 61】

前記プロープは、前記対象配列、前記第 1 相補配列及び前記第 2 相補配列のうち二つを含む第 1 分子と、残りの配列を含む第 2 分子とからなる二分子プロープであって、前記第 1 分子に含まれた前記二つの配列が、ループ部分により共有結合で連結されている請求項 54 ないし 56 のいずれか一項に記載のプロープ。

【請求項 62】

前記第 1 または第 2 分子が、支持体に固定化されている請求項 61 に記載のプロープ。

【請求項 63】

前記プロープは、単分子プロープであって、前記対象配列、前記第 1 相補配列及び前記第 2 相補配列が少なくとも一つのループ部分により共有結合で連結されている請求項 54 ないし 56 のいずれか一項に記載のプロープ。

【請求項 64】

前記ループ部分が、4～100 個のヌクレオチドを有する核酸配列である請求項 63 に記載のプロープ。

【請求項 65】

前記第 1 相補配列、第 1 ループ部分、前記対象配列、第 2 ループ部分及び前記第 2 相補配列が、5' から 3' 方向または 3' から 5' 方向に順次に共有結合で連結されている請求項 64 に記載のプロープ。

【請求項 66】

前記対象配列、第 1 ループ部分、前記第 1 相補配列、第 2 ループ部分及び前記第 2 相補配列が、5' から 3' 方向または 3' から 5' 方向に順次に共有結合で連結されている請求項 64 に記載のプロープ。

【請求項 67】

前記対象配列、第 1 ループ部分、前記第 2 相補配列、第 2 ループ部分及び前記第 1 相補配列が、5' から 3' 方向または 3' から 5' 方向に順次に共有結合で連結されている請求項 64 に記載のプロープ。

【請求項 68】

支持体に固定化されている請求項 63 に記載のプロープ。

【請求項 69】

前記プロープは、単分子プロープであって、前記対象配列、前記第 1 相補配列、及び前記第 2 相補配列が少なくとも一つのループ部分により共有結合で連結されており、前記少なくとも一つの検出可能なラベルが少なくとも一つの相互作用性ラベル対を含み、各ラベル対は、前記単分子プロープの相異なる位置に接合されている第 1 及び第 2 ラベル部分を含み、前記第 1 または第 2 ハイブリダイズした二重鎖が形成されるときに、前記第 1 及び第 2 ラベル部分が相互作用する請求項 14 に記載のプロープ。

【請求項 70】

前記第 1 及び第 2 ラベル部分のうち少なくとも一つが、前記ループ部分に共有結合で連結されている請求項 69 に記載のプロープ。

【請求項 71】

前記相互作用性ラベル対が蛍光体と消光体からなり、前記相互作用性ラベル対の相互作用により前記プロープの蛍光の変化が起こり、該蛍光の変化が強度の減少、寿命の減少、偏光の変化、波長の変化からなる群より選ばれる請求項 69 に記載のプロープ。

【請求項 72】

支持体に固定化されている請求項 69 に記載のプロープ。

【請求項 73】

前記プロープは、前記対象配列、前記第 1 相補配列及び前記第 2 相補配列のうち二つを含む第 1 分子と、残りの配列を含む第 2 分子とからなる二分子プロープであって、前記第 1 分子に含まれた前記二つの配列がループ部分により共有結合で連結されており、前記少な

くとも一つの検出可能なラベルは、少なくとも一つの相互作用性ラベル対を含み、各ラベル対は、前記単分子プローブの相異なる位置に接合されている第1及び第2ラベル部分を含み、前記第1または第2ハイブリダイズした二重鎖が形成されるときに、前記第1及び第2ラベル部分が相互作用する請求項14に記載のプローブ。

【請求項74】

前記第1及び第2ラベル部分のうち少なくとも一つが、前記ループ部分に共有結合で連結されている請求項73に記載のプローブ。

【請求項75】

前記相互作用性ラベル対が蛍光体と消光体からなり、前記相互作用性ラベル対の相互作用により前記プローブの蛍光の変化が起こり、該蛍光の変化が、強度の減少、寿命の減少、偏光の変化、波長の変化からなる群より選ばれる請求項73に記載のプローブ。

【請求項76】

前記第1または第2分子が支持体に固定化されている請求項73に記載のプローブ。

【請求項77】

前記プローブは、前記第1相補配列の5'末端に共有結合で連結された5'アーム配列(5' arm sequence)と、前記第1相補配列の3'末端に共有結合で連結された3'アーム配列(3' arm sequence)とからなる核酸アーム配列対をさらに含むプローブであって、前記第1相補配列が前記第1対象配列にハイブリダイズしていないときに、前記アーム配列対は3〜35個の相補的な塩基対を有するステム二重鎖(stem duplex)を形成し；前記検出可能なラベルは、前記5'アーム配列に接合された第1ラベル部分と、前記3'アーム配列に接合された第2ラベル部分とからなる相互作用性ラベル対を含み、前記ステム二重鎖が形成されるときに、前記第1及び第2ラベル部分が相互作用する請求項14に記載のプローブ。

【請求項78】

前記プローブは、前記第2相補配列の5'末端に共有結合で連結された5'アーム配列(5' arm sequence)と、前記第2相補配列の3'末端に共有結合で連結された3'アーム配列(3' arm sequence)とからなる核酸アーム配列対をさらに含むプローブであって、前記第2相補配列が前記第2対象配列にハイブリダイズしていないときに、前記アーム配列対は3〜35個の相補的な塩基対を有するステム二重鎖(stem duplex)を形成し；前記検出可能なラベルは、前記5'アーム配列に接合された第1ラベル部分と、前記3'アーム配列に接合された第2ラベル部分とからなる相互作用性ラベル対を含み、前記ステム二重鎖が形成されるときに、前記第1及び第2ラベル部分が相互作用する請求項14に記載のプローブ。

【請求項79】

前記プローブは、前記第1相補配列の5'末端に共有結合で連結された第1の5'アーム配列(first 5' arm sequence)と前記第1相補配列の3'末端に共有結合で連結された第1の3'アーム配列(first 3' arm sequence)とからなる第1アーム配列対と、前記第2相補配列の5'末端に共有結合で連結された第2の5'アーム配列(second 5' arm sequence)と前記第2相補配列の3'末端に共有結合で連結された第2の3'アーム配列(second 3' arm sequence)とからなる第2アーム配列対と、からなる2対の核酸アーム配列対をさらに含むプローブであって、前記第1相補配列が前記第1対象配列にハイブリダイズしていないときに、前記第1アーム配列対は、3〜35個の相補的な塩基対を有する第1ステム二重鎖(first stem duplex)を形成し、前記第2相補配列が前記第2対象配列にハイブリダイズしていないときに、前記第2アーム配列対は、3〜35個の相補的な塩基対を有する第2ステム二重鎖(second stem duplex)を形成し；前記検出可能なラベルは、前記第1の5'アーム配列に接合された第1ラベル部分と前記第1の3'アーム配列に接合された第2ラベル部分とからなる第1ラベル対と、前記第2の5'アーム配列に接合された第3ラベル部分と前記第2の3'アーム配列に接合された第4ラベル部分とからなる第2ラベル対と、からなる2対の相互作用性ラベル対を含み、

前記第 1 ステム二重鎖が形成されるときに前記第 1 ラベル対が相互作用し、前記第 2 ステム二重鎖が形成されるときに前記第 2 ラベル対が相互作用する請求項 1 4 に記載のプロープ。

【請求項 8 0】

前記相互作用性ラベル対が蛍光体と消光体からなり、前記相互作用性ラベル対の相互作用により前記プロープの蛍光の変化が起こり、該蛍光の変化が、強度の減少、寿命の減少、偏光の変化、波長の変化からなる群より選ばれる請求項 7 7 ないし 7 9 のいずれか一項に記載のプロープ。

【請求項 8 1】

前記プロープは、前記対象配列を含む第 1 分子、前記第 1 相補配列を含む第 2 分子、及び前記第 2 相補配列を含む第 3 分子からなる三分子プロープである請求項 7 7 ないし 7 9 のいずれか一項に記載のプロープ。

【請求項 8 2】

前記第 1、第 2 及び第 3 分子のうち一つが、支持体に固定化されている請求項 8 1 に記載のプロープ。

【請求項 8 3】

前記プロープは、前記対象配列、前記第 1 相補配列及び前記第 2 相補配列のうち二つを含む第 1 分子と、残りの配列を含む第 2 分子とからなる二分子プロープであって、前記第 1 分子に含まれた前記二つの配列が、ループ部分により共有結合で連結されている請求項 7 7 ないし 7 9 のいずれか一項に記載のプロープ。

【請求項 8 4】

前記第 1 及び第 2 分子のうち一つが、支持体に固定化されている請求項 8 3 に記載のプロープ。

【請求項 8 5】

前記プロープは単分子プロープであって、前記対象配列を含む第 1 分子、前記第 1 相補配列を含む第 2 分子、及び前記第 2 相補配列を含む第 3 分子が、少なくとも一つのループ部分により共有結合で連結されている請求項 7 7 ないし 7 9 のいずれか一項に記載のプロープ。

【請求項 8 6】

支持体に固定化されている請求項 8 5 に記載のプロープ。

【請求項 8 7】

切断部位を特異的に切断しうる少なくとも一つの標的反応誘発因子の試料中における存在有無を、検出温度を含む条件下で検出するためのアッセイにおいて、

- a) 前記試料を、請求項 1 によるプロープと接触させる段階；及び
 - b) 前記検出温度において前記標的反応誘発因子がない時と比べて特徴的シグナルの大きさに変化があるか確認する段階；
- を含むアッセイ。

【請求項 8 8】

切断部位を特異的に切断しうる反応誘発因子に対する阻害剤または増強剤を、検出温度を含む条件下で検出するためのアッセイにおいて、

- a) 標的化合物を、前記反応誘発因子の存在下で請求項 1 によるプロープと接触させる段階；及び
 - b) 前記検出温度において前記標的化合物がない時と比べて前記特徴的シグナルの大きさに変化があるか確認する段階；
- を含むアッセイ。

【請求項 8 9】

前記確認する段階が、前記特徴的シグナルの大きさを測定することを含む請求項 8 7 及び 8 8 のいずれか一項に記載のアッセイ。

【請求項 9 0】

前記確認する段階が、前記特徴的シグナルの大きさを時間の関数として測定することを含

む請求項 8 9 に記載のアッセイ。

【請求項 9 1】

前記検出温度が、前記反応誘発因子が存在しない時の前記第 1 ハイブリダイズした二重鎖の融解温度よりも少なくとも 5℃高い請求項 8 7 及び 8 8 のいずれか一項に記載のアッセイ。

【請求項 9 2】

前記プローブが、少なくとも一つの非相互作用性ラベルを有する二分子プローブまたは三分子プローブである請求項 8 7 及び 8 8 のいずれか一項に記載のアッセイ。

【請求項 9 3】

前記プローブは固定化したプローブでなく、前記確認する段階が、ハイブリダイズした種とハイブリダイズしていない種を分離することを含む請求項 9 2 に記載のアッセイ。

【請求項 9 4】

前記プローブは固定化したプローブであり、前記確認する段階が、非結合の種を洗浄することを含む請求項 9 2 に記載のアッセイ。

【請求項 9 5】

前記検出可能なラベルが、インターカレート染色剤(intercalating dye)である請求項 8 7 及び 8 8 のいずれか一項に記載のアッセイ。

【請求項 9 6】

前記プローブは固定化したプローブでなく、前記確認する段階が、ハイブリダイズした種とハイブリダイズしていない種を分離することを含む請求項 9 5 に記載のアッセイ。

【請求項 9 7】

前記プローブは固定化したプローブであり、前記確認する段階が、非結合の種を洗浄することを含む請求項 9 5 に記載のアッセイ。

【請求項 9 8】

前記プローブが、少なくとも一つの相互作用性ラベル対を含むプローブである請求項 8 7 及び 8 8 のいずれか一項に記載のアッセイ。

【請求項 9 9】

前記相互作用性ラベル対が、蛍光体と消光体の対または発光体と消光体の対である請求項 9 8 に記載のアッセイ。

【請求項 1 0 0】

前記プローブが単分子プローブである請求項 9 8 に記載のアッセイ。

【請求項 1 0 1】

前記プローブが二分子プローブである請求項 9 8 に記載のアッセイ。

【請求項 1 0 2】

前記プローブが三分子プローブである請求項 9 8 に記載のアッセイ。

【請求項 1 0 3】

前記プローブが固定化したプローブである請求項 9 8 に記載のアッセイ。

【請求項 1 0 4】

前記プローブが、蛍光体及び消光体、または発光体及び消光体からなる少なくとも一つの相互作用性ラベル対を含む単分子プローブである請求項 8 7 に記載のアッセイ。

【請求項 1 0 5】

前記試料が細胞または組織であり、前記接触させる段階が、前記プローブを細胞、または組織の内部もしくは外部に導入させることを含む請求項 1 0 4 に記載のアッセイ。

【請求項 1 0 6】

前記プローブが、蛍光体及び消光体、または発光体及び消光体からなる少なくとも一つの相互作用性ラベル対を含む単分子プローブである請求項 8 8 に記載のアッセイ。

【請求項 1 0 7】

前記試料が細胞または組織であり、前記接触させる段階が、前記プローブと前記標的化合物を前記細胞または組織の内部もしくは外部に導入させることを含む請求項 1 0 6 に記載のアッセイ。

【請求項 108】

前記反応誘発因子が、前記細胞または組織の内部もしくは外部に存在する酵素である請求項 107 に記載のアッセイ。

【請求項 109】

前記反応誘発因子が、酵素をコードするベクトルを導入することによって、前記細胞または組織の内部で組み換え的に発現される酵素である請求項 108 に記載のアッセイ。

【請求項 110】

切断部位を特異的に切断しうる少なくとも一つの標的反応誘発因子の試料中における存在有無を、検出温度を含む条件下で検出するためのアッセイにおいて、

c) 前記試料を、請求項 17 によるプローブと接触させる段階；及び

d) 前記検出温度において前記標的反応誘発因子がない時と比べて前記特徴的シグナルの大きさに変化があるか確認する段階；

を含むアッセイ。

【請求項 111】

切断部位を特異的に切断しうる反応誘発因子に対する阻害剤または増強剤を、検出温度を含む条件下で検出するためのアッセイにおいて、

a) 標的化合物を、前記反応誘発因子の存在下で請求項 17 によるプローブと接触させる段階；及び

b) 前記検出温度において前記標的化合物がない時と比べて前記特徴的シグナルの大きさに変化があるか確認する段階；

を含むアッセイ。

【請求項 112】

請求項 1 及び 14 のいずれか一項による少なくとも一つのプローブと、少なくとも一つの標的因子または標的リガンドを検出するか、または、前記標的因子及び前記認識要素の相互作用を阻害または増強させる阻害剤または増強剤を検出するためのアッセイを行うための説明書と、を含むキット。

【請求項 113】

塩、緩衝溶液、ヌクレアーゼ(nuclease)阻害剤、酵素または酵素結合ラベルの基質、受容体因子、反応誘発因子、標的因子として作用する受容体タンパク質または酵素をコードするベクトル、及び連結試薬からなる群より選ばれる一つ以上の試薬をさらに含む請求項 112 に記載のキット。

【請求項 114】

in vivoまたはin situアッセイを実行するのに適している一つ以上の成分をさらに含むキットであって、前記成分は、透過誘導因子(permeabilizing agent)及びリボゾーム前駆体(liposome precursor)からなる群より選ばれ、前記プローブを細胞内に導入するために必要な成分である請求項 112 に記載のキット。

【請求項 115】

前記プローブが固定化したプローブである請求項 112 に記載のキット。

【請求項 116】

異なる標的因子を有し、同一支持体の予め定められた位置に固定化されている、本発明による少なくとも一つの追加的な固定化したプローブを含む請求項 115 に記載のキット。

【請求項 117】

同一の標的因子を有し、同一の支持体の予め定められた異なる位置に固定化されている、本発明による少なくとも一つの追加的な固定化したプローブを含む請求項 115 に記載のキット。

【請求項 118】

請求項 1 または 14 による少なくとも一つのプローブを含む標的検出システム。