

【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8月14日(2008.8.14)

【公表番号】特表2006-510348(P2006-510348A)

【公表日】平成18年3月30日(2006.3.30)

【年通号数】公開・登録公報2006-013

【出願番号】特願2004-523488(P2004-523488)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/543 (2006.01)

G 0 1 N 33/566 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 33/543 5 7 5

G 0 1 N 33/566

【手続補正書】

【提出日】平成20年6月19日(2008.6.19)

【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】

以下の工程を含む目的RNAの検出方法:

- a) 該目的RNAを含むと疑われる核酸サンプルを提供する工程;
- b) 該目的RNAの少なくとも第一の部分にハイブリダイズする少なくとも第一の核酸プローブを提供する工程、ここで該少なくとも第一の核酸プローブは、蛍光体基および蛍光消光脱離基を含む;
- c) 該第一の部分に隣接する該目的RNAの少なくとも第二の部分にハイブリダイズする少なくとも第二の核酸プローブを提供する工程、ここで、該少なくとも第二の核酸プローブは求核基を含む;
- d) 該少なくとも第一および第二の核酸プローブと該核酸サンプルとのハイブリダイゼーションに好適な条件下で、該核酸サンプルと、該少なくとも第一および第二の核酸プローブとを一緒にして混合物を形成させる工程;および、
- e) 該混合物の蛍光を検出する工程、ここで蛍光の検出は、該核酸サンプルにおける該目的RNAの存在を示し、それによって該目的RNAが検出される。

【請求項2】

以下の工程を含む細胞における目的RNAを検出する方法:

- a) 該目的RNAを含むと疑われる細胞を提供する工程;
- b) 該目的RNAの少なくとも第一の部分にハイブリダイズする少なくとも第一の核酸プローブを提供する工程、ここで、該少なくとも第一の核酸プローブは、蛍光体基および蛍光消光脱離基を含む;
- c) 該少なくとも第一の部分に隣接する該目的RNAの少なくとも第二の部分にハイブリダイ

ズする少なくとも第二の核酸プローブを提供する工程、ここで、該少なくとも第二の核酸プローブは求核基を含む；

d) 該少なくとも第一および第二の核酸プローブの該細胞へのハイブリダイゼーションに好適な条件下で該少なくとも第一および第二の核酸プローブを該細胞に導入して混合物を形成させる工程；および

e) 該混合物の蛍光を検出する工程、ここで蛍光の検出は該細胞における該目的RNAの存在を示し、それによって該細胞における該目的RNAが検出される。

【請求項 3】

該細胞が固定されているか、または固定されていない、請求項 2の方法。

【請求項 4】

該細胞が生細胞である請求項 3の方法。

【請求項 5】

該細胞が細菌細胞またはヒト細胞である請求項2～4のいずれかの方法。

【請求項 6】

該蛍光消光脱離基が該少なくとも第一の核酸プローブの5'末端に共有結合しており、該求核基が該少なくとも第二の核酸プローブの3'末端に共有結合している請求項1～5のいずれかの方法。

【請求項 7】

該蛍光消光脱離基が該少なくとも第一の核酸プローブの3'末端に共有結合しており、該求核基が該少なくとも第二の核酸プローブの5'末端に共有結合している請求項1～5のいずれかの方法。

【請求項 8】

該蛍光消光脱離基が該少なくとも第一の核酸プローブの5'水酸基に結合している請求項1～5のいずれかの方法。

【請求項 9】

該蛍光消光脱離基が該少なくとも第一の核酸プローブの5'水酸基以外の水酸基に結合している請求項1～5のいずれかの方法。

【請求項 10】

該蛍光消光脱離基が該蛍光体基から1ヌクレオチド離れて該少なくとも第一の核酸プローブに共有結合している請求項1～9のいずれかの方法。

【請求項 11】

該蛍光消光脱離基が該蛍光体基から2ヌクレオチド離れて該少なくとも第一の核酸プローブに共有結合している請求項1～9のいずれかの方法。

【請求項 12】

該蛍光消光脱離基が該蛍光体基から3ヌクレオチド離れて該少なくとも第一の核酸プローブに共有結合している請求項1～9のいずれかの方法。

【請求項 13】

該少なくとも第一または第二の核酸プローブが、DNA、RNA、2'-O-メチル-RNA、ホスホロチオエートDNA、ロックされた核酸（「LNA」）、またはPNAである請求項1-12のいずれかの方法。

【請求項 14】

該検出工程が、目視による検出、蛍光顕微鏡による検出、蛍光分光計による検出、フローサイトメーターによる検出または、蛍光マイクロプレートリーダーによる検出を含む、請求項1-13のいずれかの方法。

【請求項 15】

該少なくとも第一の核酸プローブが少なくとも2倍の消光効率を有することを特徴とする請求項1-14のいずれかの方法。

【請求項 16】

該少なくとも第一の核酸プローブが少なくとも100倍の消光効率を有することを特徴とする請求項 15の方法。

【請求項 17】

該少なくとも第一の核酸プローブが少なくとも1000倍の消光効率を有することを特徴とする請求項 16の方法。

【請求項 18】

該求核基がホスホロチオエートまたはホスホロセレノエートである請求項1-17のいずれかの方法。

【請求項 19】

該蛍光体基が、フルオレセイン、TAMRA、Cy3、Cy5、Cy5.5、BODIPY 蛍光体、ROX、JOE、または オレゴングリーンである請求項1-18のいずれかの方法。

【請求項 20】

該蛍光消光脱離基が、ダブシル基、ジマブダブシル基、アゾベンゼン-スルホニル基、アミノベンゼンスルホニル基、ジアルキルアミノベンゼンスルホニル基、ニトロベンゼンスルホニル基、フルオロベンゼンスルホニル基、シアノベンゼンスルホニル基、アレーンスルホニル基、アリールアゾ-置換ダブシル基、または金粒子抱合スルホニル脱離基である、請求項1-19のいずれかの方法。

【請求項 21】

以下の工程を含む、1ヌクレオチドの特異性をもって細胞における目的RNAを検出する方法：

- a) 該細胞を含む第一のサンプルを提供する工程；
- b) 第一の求電子プローブおよび求核プローブを含む第一対のプローブを提供する工程、ここで、該第一の求電子プローブは蛍光体基および蛍光消光脱離基を含み、該目的RNAの第一の部分にハイブリダイズし、該求核プローブは求核基を含み、該第一の部分に隣接する該目的RNAの第二の部分にハイブリダイズする；
- c) 該第一対のプローブの該細胞へのハイブリダイゼーションに好適な条件下で該第一対のプローブを該第一のサンプルに導入して第一の混合物を形成させる工程；
- d) 該第一の混合物の蛍光を検出する工程；
- e) 該細胞を含む第二のサンプルを提供する工程；
- f) 第二の求電子プローブおよび(b)からの該求核プローブを含む第二対のプローブを提供する工程、ここで該第二の求電子プローブは(b)からの該第一の求電子プローブと1ヌクレオチド異っており、異なる色の標識を有する；
- g) 該第二対のプローブの該細胞へのハイブリダイゼーションに好適な条件下で該第二対のプローブを該第二のサンプルに導入して第二の混合物を形成させる工程；
- h) 該第二の混合物の蛍光を検出する工程；
- i) (d)および(h)の結果を比較する工程、ここで該第一または第二の混合物からの蛍光の検出と、該第二または第一の混合物からの蛍光のわずかな存在または非存在の検出が、1ヌクレオチドの特異性での該細胞における該目的RNAの検出を示す。

【請求項 22】

以下を含む目的核酸配列の検出のためのキット：

- a) 該目的の核酸配列の少なくとも第一の部分にハイブリダイズする少なくとも第一の核酸プローブ、ここで該少なくとも第一の核酸プローブは蛍光体基および蛍光消光脱離基を含む；および、
- b) 該少なくとも第一の部分に隣接する該目的の核酸配列の少なくとも第二の部分にハイブリダイズする少なくとも第二の核酸プローブ、ここで該少なくとも第二の核酸プローブは求核基を含む。

【請求項 23】

該蛍光消光脱離基が該少なくとも第一の核酸プローブの5'末端に共有結合しており、該求核基が該少なくとも第二の核酸プローブの3'末端に共有結合している請求項 22のキット。

【請求項 24】

該蛍光消光脱離基が該少なくとも第一の核酸プローブの3'末端に共有結合しており、該

求核基が該少なくとも第二の核酸プローブの5'末端に共有結合している請求項 22のキット。

【請求項 25】

該蛍光消光脱離基が該少なくとも第一の核酸プローブの5' 水酸基に結合している請求項 22のキット。

【請求項 26】

該蛍光消光脱離基が該少なくとも第一の核酸プローブの5' 水酸基以外の水酸基に結合している請求項 22のキット。

【請求項 27】

該蛍光消光脱離基が該蛍光体基から 1ヌクレオチド離れて該少なくとも第一の核酸プローブに共有結合している請求項22～26のいずれかのキット。

【請求項 28】

該蛍光消光脱離基が該蛍光体基から 2ヌクレオチド離れて該少なくとも第一の核酸プローブに共有結合している請求項22～26のいずれかのキット。

【請求項 29】

該蛍光消光脱離基が該蛍光体基から 3ヌクレオチド離れて該少なくとも第一の核酸プローブに共有結合している請求項22～26のいずれかのキット。

【請求項 30】

該少なくとも第一または第二の核酸プローブが、DNA、RNA、2'-O-メチル-RNA、ホスホロチオエートDNA、ロックされた核酸 (「LNA」)、またはPNAである請求項22 -29のいずれかのキット。

【請求項 31】

該少なくとも第一の核酸プローブが少なくとも 2倍の消光効率を有することを特徴とする請求項22-30のいずれかのキット。

【請求項 32】

該少なくとも第一の核酸プローブが少なくとも100倍の消光効率を有することを特徴とする請求項31のキット。

【請求項 33】

該少なくとも第一の核酸プローブが少なくとも1000倍の消光効率を有することを特徴とする請求項 32のキット。

【請求項 34】

該求核基がホスホロチオエートまたはホスホロセレノエートである請求項22- 33のいずれかのキット。

【請求項 35】

該蛍光体基が、フルオレセイン、TAMRA、Cy3、Cy5、Cy5.5、BODIPY 蛍光体、ROX、JOE、または オレゴングリーンである請求項22- 34のいずれかのキット。

【請求項 36】

該蛍光消光脱離基が、ダブシル基、ジマブダブシル基、アゾベンゼン-スルホニル基、アミノベンゼンスルホニル基、ジアルキルアミノベンゼンスルホニル基、ニトロベンゼンスルホニル基、フルオロベンゼンスルホニル基、シアノベンゼンスルホニル基、アレーンスルホニル基、アリールアゾ-置換ダブシル基、または金粒子抱合スルホニル脱離基である、請求項22 - 35のいずれかのキット。

【請求項 37】

細胞集団における特定の突然変異の存在または非存在を検出するための 1または2の核酸分子の使用であって、該 1または2の核酸分子が、蛍光体基、蛍光消光脱離基および求核基を同じ分子内に含むか、または 1つの分子内に蛍光体基および蛍光消光脱離基を含み、もう 1つの分子内に求核基を含む、使用。

【請求項 38】

特定の細胞タイプの存在または非存在を検出するための 1または2の核酸分子の使用であって、該 1または2の核酸分子が蛍光体基、蛍光消光脱離基および求核基を同じ分子内

に含むか、または1つの分子内に蛍光体基および蛍光消光脱離基を含み、もう1つの分子内に求核基を含む、使用。

【請求項39】

該1または2の核酸分子が該特定の細胞タイプに特有の核酸配列に結合し、該特定の細胞タイプが望ましくない細菌またはその他の有害微生物であり、蛍光の検出が該特定の細胞タイプの存在を示す、請求項38の使用。

【請求項40】

該細菌またはその他の有害微生物が、マイコバクテリウム・ツベルキュロシス、マイコバクテリウム・アビウム、マイコバクテリウム・イントラセルラレ、ボルダテラ・ペルツシス、ニッセリア・ゴノレア、ニッセリア・メニンギチジス、大腸菌0157:H7、またはバシラス・アントラシスである請求項38または39の使用。

【請求項41】

複数の核酸配列の検出のための複数の核酸分子の使用であって、該複数の核酸分子が蛍光体基、蛍光消光脱離基および求核基を同じ分子内に含むか、または蛍光体基および蛍光消光脱離基を1つの分子内に含み、求核基を別の分子内に含む、使用。

【請求項42】

正常細胞と疾患細胞とを識別および同定するための複数の核酸分子の使用であって、該複数の核酸分子が、蛍光体基、蛍光消光脱離基および求核基を同じ分子内に含むか、または、蛍光体基および蛍光消光脱離基を1つの分子内に含み、求核基を別の分子内に含む、使用。

【請求項43】

ある時間にわたって、または、薬剤、候補薬剤またはその他の治療薬への曝露に応答しての、細胞における遺伝子発現の変化をモニターするための1または2の核酸分子の使用であって、該1または2の核酸分子が、蛍光体基、蛍光消光脱離基および求核基を同一の分子内に含むか、または、蛍光体基および蛍光消光脱離基を1つの分子内に含み、求核基をもう1つの分子内に含む、使用。