

【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27年3月26日 (2015.3.26)

【公表番号】特表2012-518430(P2012-518430A)

【公表日】平成24年8月16日 (2012.8.16)

【年通号数】公開・登録公報2012-032

【出願番号】特願2011-551544(P2011-551544)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/68 A

【誤訳訂正書】

【提出日】平成27年2月5日 (2015.2.5)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 2 0

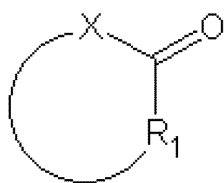
【訂正方法】変更

【訂正の内容】

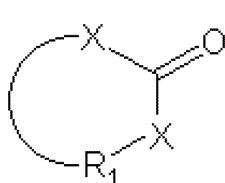
【0 0 2 0】

本発明の一態様によれば、本発明において使用される適切な極性非プロトン溶媒は環状化合物である。環状化合物は環状基本構造を有する。例にはここに開示された環状化合物を含む。他の実施態様では、極性非プロトン溶媒は以下の式 1 - 4 から選択されうる：

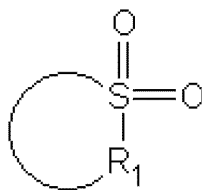
式 1



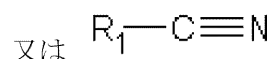
式 2



式 3



式 4



ここで、X は O であり、R 1 はアルキルジイルである。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸配列をハイブリダイズさせるインサイツの方法において、

- 二本鎖ヌクレオチド配列を変性させるのに有効な量の少なくとも一種の極性非プロトン溶媒を含有する第一の水性組成物中で第一の核酸配列を含む第一の二本鎖核酸配列を変性させ、
- 二本鎖ヌクレオチド配列を変性させるのに有効な量の少なくとも変性剤を含有する第二の水性組成物中で第二の核酸配列を含む第二の二本鎖核酸配列を変性させ、

- 第一及び第二の核酸配列をハイブリダイズさせるために 8 時間未満、第一及び第二の水性組成物を組み合わせることを含み、

ここで極性非プロトン溶媒は、環状基本構造を有し、ラクトン、スルホン、ニトリル、サルファイト、及び / 又はカーボネートであるインサイツの方法。

【請求項 2】

第二の水性組成物中の変性剤が極性非プロトン溶媒である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第一及び / 又は前記第二の核酸を変性させる時間が 1 分、2 分、3 分、4 分、5 分、10 分、15 分、又は 30 分である請求項 1 及び請求項 2 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 4】

ハイブリダイジングの工程が、組成物を加熱及び冷却する工程を含む、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 5】

ハイブリダイジングの工程が、1 時間未満、30 分未満、15 分未満、又は 5 分未満を要する請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6】

第一及び第二の水性組成物中の極性非プロトン溶媒の濃度が 1 % から 95 % (v/v)、5 % から 10 % (v/v)、10 % から 20 % (v/v)、又は 20 % から 30 % (v/v) である請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7】

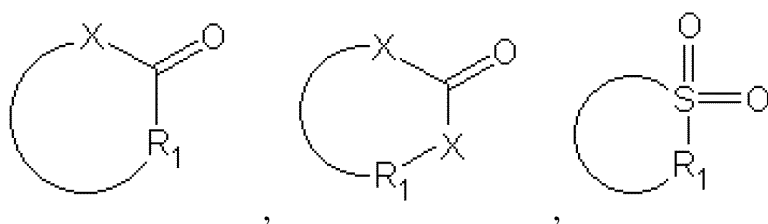
第一及び第二の水性組成物中の極性非プロトン溶媒が無毒性である請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8】

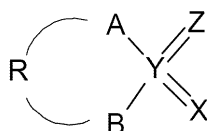
第一及び第二の水性組成物中の極性非プロトン溶媒が、 17.7 から $22.0 \text{ MPa}^{1/2}$ の範囲の分散溶解度パラメータ、 13 から $23 \text{ MPa}^{1/2}$ の範囲の極性溶解度パラメータ、及び 3 から $13 \text{ MPa}^{1/2}$ の範囲の水素結合溶解度パラメータを有する請求項 1 から 7 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 9】

第一及び第二の水性組成物中の極性非プロトン溶媒が



(ここで、X が O であり、R1 がアルキルジイルである)、及び



(ここで、X は任意であり、存在する場合は、O 又は S から選択され、

Z は任意であり、存在する場合は、O 又は S から選択され、

A 及び B は独立して O 又は N 又は S 又はアルキルジイルの一部又は第 1 級アミンであり、

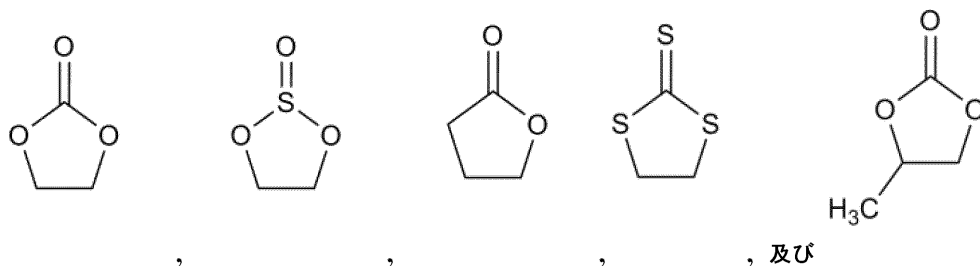
R はアルキルジイルであり、

Y は O 又は S 又は C である)

からなる群から選択される請求項 1 から 8 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 10】

第一及び第二の水性組成物中の極性非プロトン溶媒が、



からなる群から選択される請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 11】

第一及び第二の水性組成物が、緩衝剤、塩、促進剤、キレート剤、洗浄剤、及びブロッキング剤からなる群から選択される少なくとも一種の更なる成分を更に含む請求項 1 から 10 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 12】

促進剤がデキストラン硫酸であり、塩が NaCl 及び / 又はホスフェートバッファーである請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

デキストラン硫酸が 5 % から 40 % の濃度で存在し、NaCl が 0 mM から 1200 mM の濃度で存在し、及び / 又はホスフェートバッファーが 0 mM から 50 mM の濃度で存在する請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

デキストラン硫酸が 10 % から 30 % の濃度で存在し、NaCl が 300 mM から 600 mM の濃度で存在し、及び / 又はホスフェートバッファーが 5 mM から 20 mM の濃度で存在する請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

促進剤が、ホルムアミド、DMSO、グリセロール、プロピレングリコール、1,2-プロパンジオール、ジエチレングリコール、エチレングリコール、グリコール、及び 1,3-プロパンジオールからなる群から選択され、緩衝剤がクエン酸バッファーである請求項 11 に記載の方法。

【請求項 16】

ホルムアミドが 0.1 - 5 % の濃度で存在し、DMSO が 0.01 % から 10 % の濃度で存在し、グリセロール、プロピレングリコール、1,2-プロパンジオール、ジエチレングリコール、エチレングリコール、グリコール、及び 1,3-プロパンジオールが 0.1 % から 10 % の濃度で存在し、クエン酸バッファーが 1 mM から 50 mM の濃度で存在する請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

第一及び第二の水性組成物が 40 % の少なくとも一種の極性非プロトン溶媒、10 % のデキストラン硫酸、300 mM の NaCl、及び / 又は 5 mM のホスフェートバッファーを含有する請求項 11 に記載の方法。

【請求項 18】

第一及び第二の水性組成物が 15 % の少なくとも一種の極性非プロトン溶媒、20 % のデキストラン硫酸、600 mM の NaCl、及び 10 mM のクエン酸バッファー pH 6.2 を含有する請求項 11 に記載の方法。

【請求項 19】

インサイツハイブリダイゼーション用途における標的の別々の変性を実施するための、環状基本構造を有し、ラクトン、スルホン、ニトリル、サルファイト、及び / 又はカーボ

ネットである少なくとも一種の極性非プロトン溶媒を 1 % から 95 % (v / v) 含有する組成物の使用。

【請求項 20】

極性非プロトン溶媒の濃度が請求項 6 に記載される、請求項 19 に記載の組成物の使用。

【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0193

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0193】

更なる実施態様

実施態様 1 . 核酸配列をハイブリダイズさせる方法において、

- 第一の核酸配列を、二本鎖ヌクレオチド配列を変性させるのに有効な量の少なくとも一種の極性非プロトン溶媒を含有する第一の水性組成物と組み合わせ、
- 第二の核酸配列を、二本鎖ヌクレオチド配列を変性させるのに有効な量の少なくとも変性剤を含有する第二の水性組成物と組み合わせ、
- 第一及び第二の核酸配列を第一及び第二の核酸配列をハイブリダイズさせるのに少なくとも十分な時間の間組み合わせる

ことを含み、ここで極性非プロトン溶媒はジメチルスルホキシド (DMSO) では無い方法。

実施態様 2 . 核酸配列をハイブリダイズさせる方法において、

- 第一の核酸配列を、二本鎖ヌクレオチド配列を変性させるのに有効な量の少なくとも一種の極性非プロトン溶媒を含有する第一の水性組成物と組み合わせ、
- 上記第一の核酸配列を、第二の核酸配列と二本鎖ヌクレオチド配列を変性させるのに効果的な量の少なくとも一種の変性剤を含有する第二の水性組成物と、第一及び第二の核酸配列をハイブリダイズさせるのに少なくとも十分な時間の間、組み合わせる

ことを含み、ここで極性非プロトン溶媒はジメチルスルホキシド (DMSO) では無い方法。

実施態様 3 . 核酸配列をハイブリダイズさせる方法において、

- 第一の核酸配列を、二本鎖ヌクレオチド配列を変性させるのに有効な量で少なくとも一種の極性非プロトン溶媒を含有する第一の水性組成物と組み合わせ、
- 上記第一の核酸配列を、第一及び第二核酸配列をハイブリダイズさせるのに少なくとも十分な時間の間、第二の核酸配列と組み合わせる

ことを含み、ここで極性非プロトン溶媒はジメチルスルホキシド (DMSO) では無い方法。

実施態様 4 . 第二の水性組成物中の変性剤が極性非プロトン溶媒である実施態様 1 又は 2 に記載の方法。

実施態様 5 . 第一の核酸配列が生物学的試料中にある実施態様 1 から 4 のいずれか一つに記載の方法。

実施態様 6 . 生物学的試料は細胞学又は組織学の試料である実施態様 5 に記載の方法。

実施態様 7 . 第一の核酸配列が一本鎖配列であり及び第二の核酸配列が二本鎖配列である実施態様 1 - 6 のいずれかに記載の方法。

実施態様 8 . 第一の核酸配列が二本鎖配列であり及び第二の核酸配列が一本鎖配列である実施態様 1 - 6 のいずれかに記載の方法。

実施態様 9 . 第一及び第二の核酸配列が二本鎖配列である実施態様 1 - 6 のいずれかに記載の方法。

実施態様 10 . 第一及び第二の核酸配列が一本鎖配列である実施態様 1 - 6 のいずれかに記載の方法。

実施態様 11 . 第一及び第二の核酸配列を変性させるのに十分な量のエネルギーが提供

される実施態様 1 - 10 のいずれかに記載の方法。

実施態様 12 . 第一の核酸配列を変性させるのに十分な量のエネルギーが提供される実施態様 1 - 11 のいずれかに記載の方法。

実施態様 13 . 第二の核酸配列を変性させるのに十分な量のエネルギーが提供される実施態様 1 - 12 のいずれかに記載の方法。

実施態様 14 . エネルギーが組成物を加熱することで提供される実施態様 11 - 13 に記載の方法。

実施態様 15 . 加熱工程が、マイクロ波、温浴、熱板、熱線、ペルチェ素子、誘導加熱又は加熱ランプの使用によって実施される実施態様 14 に記載の方法。

実施態様 16 . 第一の核酸を変性させる温度が 70 から 85 である実施態様 12 - 15 のいずれか一項に記載の方法。

実施態様 17 . 第二の核酸を変性させる温度が 70 から 85 である実施態様 12 - 16 のいずれか一項に記載の方法。

実施態様 18 . 第一の核酸を変性させる温度が 60 から 75 である実施態様 12 - 15 のいずれか一項に記載の方法。

実施態様 19 . 第二の核酸を変性させる温度が 60 から 75 である実施態様 12 - 15 又は 18 のいずれか一項に記載の方法。

実施態様 20 . 第一の核酸を変性させる温度が 62 、 67 、 72 又は 82 である実施態様 12 - 15 のいずれか一項に記載の方法。

実施態様 21 . 第二の核酸を変性させる温度が 62 、 67 、 72 又は 82 である実施態様 12 - 15 又は 20 のいずれか一項に記載の方法。

実施態様 22 . 第一の核酸を変性させるのに十分な時間が提供される実施態様 1 - 21 のいずれか一項に記載の方法。

実施態様 23 . 第二の核酸を変性させるのに十分な時間が提供される実施態様 1 - 22 のいずれか一項に記載の方法。

実施態様 24 . 時間は 1 分、 2 分、 3 分、 4 分、 5 分、 10 分、 15 分、又は 30 分である実施態様 22 又は 23 に記載の方法。

実施態様 25 . ハイブリダイジング工程が組成物を加熱し冷却する工程を含む実施態様 1 - 24 のいずれか一項に記載の方法。

実施態様 26 . ハイブリダイゼーション工程が 8 時間未満を要する実施態様 1 - 25 のいずれか一項に記載の方法。

実施態様 27 . ハイブリダイゼーション工程が 1 時間未満を要する実施態様 26 に記載の方法。

実施態様 28 . ハイブリダイゼーション工程が 30 分未満を要する実施態様 27 に記載の方法。

実施態様 29 . ハイブリダイゼーション工程が 15 分未満を要する実施態様 28 に記載の方法。

実施態様 30 . ハイブリダイゼーション工程が 5 分未満を要する実施態様 29 に記載の方法。

実施態様 31 . ブロッキング工程を更に含む実施態様 1 - 30 のいずれか一項に記載の方法。

実施態様 32 . 水性組成物中の極性非プロトン溶媒の濃度が約 1 % から 95 % (v v) である実施態様 1 - 31 の何れか一に記載の方法。

実施態様 33 . 極性非プロトン溶媒の濃度が 5 % から 10 % (v v) である実施態様 32 に記載の方法。

実施態様 34 . 極性非プロトン溶媒の濃度が 10 % から 20 % (v v) である実施態様 32 に記載の方法。

実施態様 35 . 極性非プロトン溶媒の濃度が 20 % から 30 % (v v) である実施態様 32 に記載の方法。

実施態様 36 . 水性組成物中の極性非プロトン溶媒が無毒性である実施態様 1 - 35 の

何れかーに記載の方法。

実施態様 37 . 但し、水性組成物中の極性非プロトン溶媒はホルムアミドを含有しない実施態様 1 - 36 の何れかーに記載の方法。

実施態様 38 . 但し、水性組成物中の極性非プロトン溶媒は 10 % 未満のホルムアミドを含有する実施態様 1 - 36 の何れかーに記載の方法。

実施態様 39 . 但し、水性組成物は 2 % 未満のホルムアミドを含有する実施態様 38 に記載の方法。

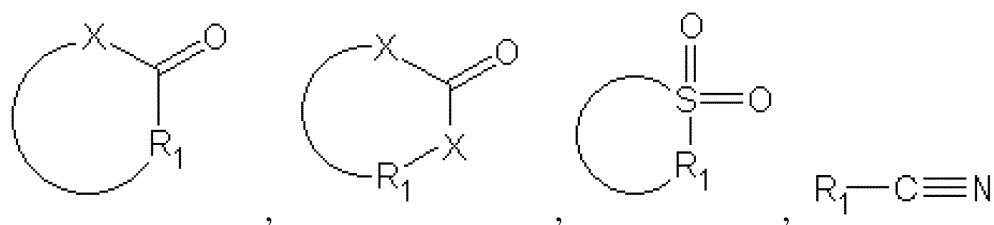
実施態様 40 . 但し、水性組成物は 1 % 未満のホルムアミドを含有する実施態様 39 に記載の方法。

実施態様 41 . 水性組成物中の極性非プロトン溶媒は、ラクトン、スルホン、ニトリル、サルファイト、及び / 又はカーボネートの官能性を有する実施態様 1 - 40 の何れかーに記載の方法。

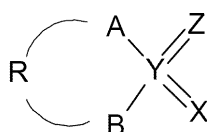
実施態様 42 . 水性組成物中の極性非プロトン溶媒が、 17.7 から $22.0 \text{ MPa}^{1/2}$ の範囲の分散溶解度パラメータ、 13 から $23 \text{ MPa}^{1/2}$ の範囲の極性溶解度パラメータ、及び 3 から $13 \text{ MPa}^{1/2}$ の範囲の水素結合溶解度パラメータを有する実施態様 1 - 41 の何れかーに記載の方法。

実施態様 43 . 水性組成物中の極性非プロトン溶媒が環状塩基構造を有する実施態様 1 - 42 の何れかーに記載の方法。

実施態様 44 . 水性組成物中の極性非プロトン溶媒が



(ここで、X が O であり、R1 がアルキルジイルである)、及び



(ここで、X は任意であり、存在する場合は、O 又は S から選択され、

Z は任意であり、存在する場合は、O 又は S から選択され、

A 及び B は独立して O 又は N 又は S 又はアルキルジイルの一部又は第 1 級アミンであり、

R はアルキルジイルであり、

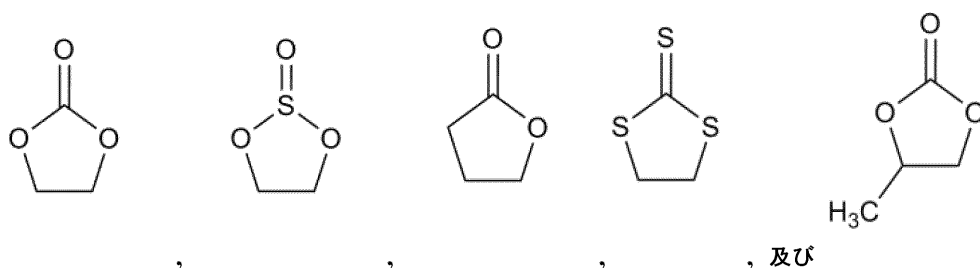
Y は O 又は S 又は C である)

からなる群から選択される実施態様 1 - 43 の何れかーに記載の方法。

実施態様 45 . 水性組成物中の極性非プロトン溶媒が、アセトアニリド、アセトニトリル、N - アセチルピロリドン、4 - アミノピリジン、ベンズアミド、ベンズイミダゾール、1, 2, 3 - ベンゾトリアゾール、ブタジエンジオキシド、2, 3 - ブチレンカーボネート、- ブチロラクトン、カプロラクトン (イブシロン)、クロロ無水マレイン酸、2 - クロロシクロヘキサノン、クロロエチレンカーボネート、クロロニトロメタン、無水シトラコン酸、クロトンラクトン、5 - シアノ - 2 - チオウラシル、シクロプロピルニトリル、硫酸ジメチル、ジメチルスルホン、1, 3 - ジメチル - 5 - テトラゾール、1, 5 - ジメチルテトラゾール、1, 2 - ジニトロベンゼン、2, 4 - ジニトロトルエン、ジフェ

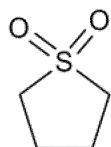
イニルスルホン、1, 2 - ジニトロベンゼン、2, 4 - ジニトロトルエン、ジフェイニル
 スルホン、イブシロン - カプロラクタム、エタンスルホニルクロリド、エチルエチルホス
 フィネート、N - エチルテトラゾール、エチレンカーボネート、エチレントリチオカーボ
 ネート、エチレングリコールサルフェート、グリコールサルファイト、フルフラール、2
 - フロニトリル、2 - イミダゾール、イサチン、イソキサゾール、マロノニトリル、4 -
 メトキシベンゾニトリル、1 - メトキシ - 2 - ニトロベンゼン、メチル プロモテトロネ
 ート、1 - メチルイミダゾール、N - メチルイミダゾール、3 - メチルイソキサゾール、
 N - メチルモルホリン - N - オキシド、メチルフェニルスルホン、N - メチルピロリジノ
 ン、メチルスルホラン、メチル - 4 - トルエンスルホネート、3 - ニトロアニリン、ニト
 ロベンズイミダゾール、2 - ニトロフラン、1 - ニトロソ - 2 - ピロリジノン、2 - ニト
 ロチオフェン、2 - オキサゾリジノン、9, 10 - フェナントレンキノン、N - フェニル
 シドノン、無水フタル酸、ピコリノニトリル (2 - シアノピリジン)、1, 3 - プロパン
 スルトン、
 - プロピオラクトン、プロピレンカーボネート、4 H - ピラン - 4 - チオン
 、4 H - ピラン - 4 - オン (- ピロン)、ピリダジン、2 - ピロリドン、サッカリン、
 スクシノニトリル、スルファニルアミド、スルホラン、2, 2, 6, 6 - テトラクロロシ
 クロヘキサノン、テトラヒドロチアピランオキシド、テトラメチレンスルホン (スルホラ
 ン)、チアゾール、2 - チオウラシル、3, 3, 3 - トリクロロプロペン、1, 1, 2 -
 トリクロロプロペン、1, 2, 3 - トリクロロプロペン、トリメチレンスルフィド - ジオ
 キシド、及びトリメチレンサルファイトからなる群から選択される実施態様 1 - 44 の何
 れかーに記載の方法。

実施態様 46 . 水性組成物中の極性非プロトン溶媒が、



からなる群から選択される実施態様 1 - 44 の何れかーに記載の方法。

実施態様 47 . 水性組成物中の極性非プロトン溶媒が、



である実施態様 1 - 44 の何れかーに記載の方法。

実施態様 48 . 水性組成物が、緩衝剤、塩、促進剤、キレート剤、洗浄剤、及びブロッ
 キング剤からなる群から選択される少なくとも一種の更なる成分を更に含む実施態様 1 -
 47 に記載の方法。

実施態様 49 . 促進剤がデキストラン硫酸であり、塩が NaCl 及び / 又はホスフェー
 トバッファーである実施態様 48 に記載の方法。

実施態様 50 . デキストラン硫酸が 5 % から 40 % の濃度で存在し、NaCl が 0 mM
 から 1200 mM の濃度で存在し、及び / 又はホスフェートバッファーが 0 mM から 50
 mM の濃度で存在する実施態様 49 に記載の方法。

実施態様 51 . デキストラン硫酸が 10 % から 30 % の濃度で存在し、NaCl が 30
 0 mM から 600 mM の濃度で存在し、及び / 又はホスフェートバッファーが 5 mM から
 20 mM の濃度で存在する実施態様 50 に記載の方法。

実施態様 52 . 促進剤が、ホルムアミド、DMSO、グリセロール、プロピレングリコール、1,2-プロパンジオール、ジエチレングリコール、エチレングリコール、グリコール、及び1,3-プロパンジオールからなる群から選択され、緩衝剤がクエン酸バッファーである実施態様 48 に記載の方法。

実施態様 53 . ホルムアミドが 0.1 - 5 % の濃度で存在し、DMSO が 0.01 % ~ 10 % の濃度で存在し、グリセロール、プロピレングリコール、1,2-プロパンジオール、ジエチレングリコール、エチレングリコール、グリコール、及び1,3-プロパンジオールが 0.1 % から 10 % の濃度で存在し、クエン酸バッファーが 1 mM から 50 mM の濃度で存在する実施態様 52 に記載の方法。

実施態様 54 . ブロッキング剤が、全ヒトDNA、ニシン精液DNA、サケ精液DNA、及びウシ胸腺DNA からなる群から選択される実施態様 48 に記載の方法。

実施態様 55 . 全ヒトDNA、ニシン精液DNA、サケ精液DNA、及びウシ胸腺DNA が 0.01 から 10 µg / µL の濃度で存在する実施態様 54 に記載の方法。

実施態様 56 . 水性組成物が 40 % の少なくとも一種の極性非プロトン溶媒、10 % のデキストラン硫酸、300 mM の NaCl、及び / 又は 5 mM のホスフェートバッファーを含有する実施態様 48 に記載の方法。

実施態様 57 . 水性組成物が 15 % の少なくとも一種の極性非プロトン溶媒、20 % のデキストラン硫酸、600 mM の NaCl、及び / 又は 10 mM のホスフェートバッファー含有する実施態様 48 に記載の方法。

実施態様 58 . 水性組成物が 15 % の少なくとも一種の極性非プロトン溶媒、20 % のデキストラン硫酸、600 mM の NaCl、及び 10 mM のクエン酸バッファー pH 6.2 を含有する実施態様 48 に記載の方法。

実施態様 59 . 水性組成物が室温で一相を含む実施態様 1 - 58 の何れかーに記載の方法。

実施態様 60 . 水性組成物が室温で複数相を含む実施態様 1 - 58 の何れかーに記載の方法。

実施態様 61 . 水性組成物が室温で二相を含む実施態様 60 に記載の方法。

実施態様 62 . 水性組成物の相が混合される実施態様 60 又は 61 に記載の方法。

実施態様 63 . ハイブリダイゼーション用途における標的の別々の変性を実施するための水性組成物において、2本鎖ヌクレオチド配列を変性させるのに有効な量の少なくとも一種の極性非プロトン溶媒を含有し、該極性非プロトン溶媒がジメチルスルホキサイド (DMSO) ではない組成物。

実施態様 64 . 極性非プロトン溶媒の濃度が実施態様 32 から 35 の何れかーに記載の通りに定義される実施態様 63 の水性組成物。

実施態様 65 . 極性非プロトン溶媒が実施態様 36、又は 41 から 47 の何れかーに記載の通りに定義される実施態様 63 又は 64 の水性組成物。

実施態様 66 . 水性組成物が実施態様 37 から 40 又は 48 から 62 の何れかーに記載の通りに定義される実施態様 61 から 65 の何れかーの水性組成物。

実施態様 67 . ハイブリダイゼーション用途における標的の別々の変性を実施するための、少なくとも一種の極性非プロトン溶媒を 1 % から 95 % (v/v) 含有する組成物の使用。

実施態様 68 . 極性非プロトン溶媒の濃度が実施態様 32 から 35 の何れかーに記載の通りに定義される実施態様 67 に記載の組成物の使用。

実施態様 69 . 極性非プロトン溶媒が実施態様 36 又は 41 から 47 の何れかーに記載の通りに定義される実施態様 67 又は 68 に記載の組成物の使用。

実施態様 70 . 水性組成物が実施態様 37 から 40 又は 48 から 62 の何れかーに記載の通りに定義される実施態様 67 から 69 の何れかーに記載の組成物の使用。

実施態様 71 . ハイブリダイゼーションアッセイを実施するためのキットにおいて、
- 実施態様 63 - 66 の何れかーに記載の第一の水性組成物と、
- 少なくとも一の核酸配列を含んでなる第二の水性組成物

を含むキット。

実施態様 7 2 . 第二の水性組成物が、二本鎖ヌクレオチド配列を変性させるのに有効な量の少なくとも一種の変性剤を更に含有する実施態様 7 1 に記載のキット。

実施態様 7 3 . 第二の水性組成物中の変性剤が極性非プロトン溶媒である実施態様 7 2 のキット。

実施態様 7 4 . 第二の水性組成物中の極性非プロトン溶媒の濃度が実施態様 3 2 から 3 5 の何れかーに記載の通りに定義される実施態様 7 3 のキット。

実施態様 7 5 . 第二の水性組成物中の極性非プロトン溶媒が実施態様 3 6 又は 4 1 から 4 7 の何れかーに記載の通りに定義される実施態様 7 3 又は 7 4 のキット。

実施態様 7 6 . 第二の水性組成物が実施態様 3 7 から 4 0 又は 4 8 から 6 2 の何れかーに記載の通りに定義される実施態様 7 1 から 7 5 の何れかーのキット。

実施態様 2 - 1 .

核酸配列をハイブリダイズさせるインサイツの方法において、

- 二本鎖ヌクレオチド配列を変性させるのに有効な量の少なくとも一種の極性非プロトン溶媒を含有する第一の水性組成物中で第一の核酸配列を含む第一の二本鎖核酸配列を変性させ、

- 二本鎖ヌクレオチド配列を変性させるのに有効な量の少なくとも変性剤を含有する第二の水性組成物中で第二の核酸配列を含む第二の二本鎖核酸配列を変性させ、

- 第一及び第二の核酸配列を、第一及び第二の核酸配列をハイブリダイズさせるために 8 時間未満少なくとも一の極性非プロトン溶媒を含有する水性組成物中で組み合わせることを含み、

ここで極性非プロトン溶媒はジメチルスルホキシド (D M S O) では無いインサイツの方法。

実施態様 2 - 2 .

第二の水性組成物中の変性剤が極性非プロトン溶媒である実施態様 2 - 1 に記載の方法。

実施態様 2 - 3 .

例えば前記第一及び / 又は前記第二の核酸を変性させる時間が 1 分、 2 分、 3 分、 4 分、 5 分、 1 0 分、 1 5 分、又は 3 0 分である実施態様 2 - 1 及び実施態様 2 - 2 の何れかーに記載の方法。

実施態様 2 - 4 .

ハイブリダイジングの工程が、組成物を加熱及び / 又は冷却する工程を含み、例えばハイブリダイゼーションの工程が 1 時間未満、例えば 3 0 分未満、例えば 1 5 分未満、例えば 5 分未満を要する実施態様 1 - 2 から 2 - 3 の何れかーに記載の方法。

実施態様 2 - 5 .

水性組成物中の極性非プロトン溶媒の濃度が約 1 % から 9 5 % (v / v)、例えば 5 % から 1 0 % (v / v)、例えば 1 0 % から 2 0 % (v / v)、例えば 2 0 % から 3 0 % (v / v) である実施態様 2 - 1 から 2 - 4 の何れかーに記載の方法。

実施態様 2 - 6 .

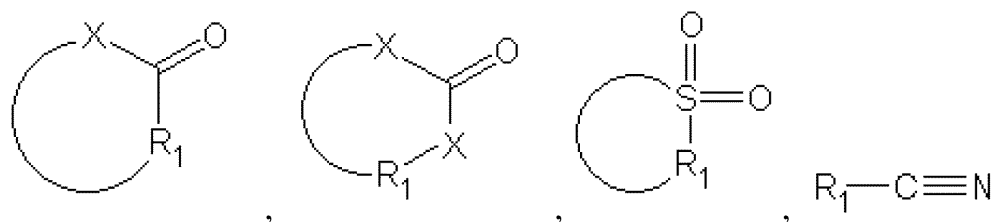
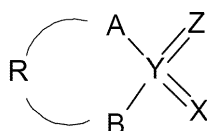
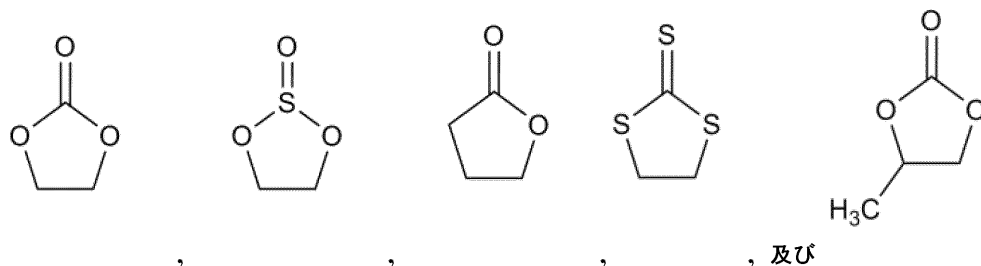
水性組成物中の極性非プロトン溶媒が無毒性である実施態様 2 - 1 から 2 - 5 の何れかーに記載の方法。

実施態様 2 - 7 .

水性組成物中の極性非プロトン溶媒が、ラクトン、スルホン、ニトリル、サルファイト、及び / 又はカーボネートの官能性を有する実施態様 2 - 1 から 2 - 6 の何れかーに記載の方法。

実施態様 2 - 8 .

水性組成物中の極性非プロトン溶媒が、 1 7 . 7 から 2 2 . 0 M P a 1 / 2 の範囲の分散溶解度パラメータ、 1 3 から 2 3 M P a 1 / 2 の範囲の極性溶解度パラメータ、及び 3 から 1 3 M P a 1 / 2 の範囲の水素結合溶解度パラメータを有する実施態様 2 - 1 から 2 - 7 の何れかーに記載の方法。

実施態様 2 - 9 .水性組成物中の極性非プロトン溶媒が(ここで、X が O であり、R 1 がアルキルジイルである)、及び(ここで、X は任意であり、存在する場合は、O 又は S から選択され、Z は任意であり、存在する場合は、O 又は S から選択され、A 及び B は独立して O 又は N 又は S 又はアルキルジイルの一部又は第 1 級アミンであり、R はアルキルジイルであり、Y は O 又は S 又は C である)からなる群から選択される実施態様 2 - 1 から 2 - 8 の何れかーに記載の方法。実施態様 2 - 10 .水性組成物中の極性非プロトン溶媒が、からなる群から選択される実施態様 2 - 1 から 2 - 9 の何れかーに記載の方法。実施態様 2 - 11 .水性組成物が、緩衝剤、塩、促進剤、キレート剤、洗浄剤、及びブロッキング剤からなる群から選択される少なくとも一種の更なる成分を更に含む実施態様 2 - 1 から 2 - 10 の何れかーに記載の方法。実施態様 2 - 12 .促進剤がデキストラン硫酸であり、塩が NaCl 及び / 又はホスフェートバッファーである実施態様 2 - 11 に記載の方法。実施態様 2 - 13 .デキストラン硫酸が 5 % から 40 % の濃度で存在し、NaCl が 0 mM から 1200 mM の濃度で存在し、及び / 又はホスフェートバッファーが 0 mM から 50 mM の濃度で存在し、例えば、デキストラン硫酸が 10 % から 30 % の濃度で存在し、NaCl が 300 mM から 600 mM の濃度で存在し、及び / 又はホスフェートバッファーが 5 mM から 20 mM の濃度で存在する実施態様 2 - 12 に記載の方法。

実施態様 2 - 1 4 .

促進剤が、ホルムアミド、DMSO、グリセロール、プロピレングリコール、1, 2 - プロパンジオール、ジエチレングリコール、エチレングリコール、グリコール、及び1, 3 プロパンジオールからなる群から選択され、緩衝剤がクエン酸バッファーである実施態様 2 - 1 1 に記載の方法。

実施態様 2 - 1 5 .

ホルムアミドが0.1 - 5 %の濃度で存在し、DMSOが0.01 %から10 %の濃度で存在し、グリセロール、プロピレングリコール、1, 2 - プロパンジオール、ジエチレングリコール、エチレングリコール、グリコール、及び1, 3 プロパンジオールが0.1 %から10 %の濃度で存在し、クエン酸バッファーが1 mMから50 mMの濃度で存在する実施態様 2 - 1 4 に記載の方法。

実施態様 2 - 1 6 .

水性組成物が40 %の少なくとも一種の極性非プロトン溶媒、10 %のデキストラン硫酸、300 mMのNaCl、及び/又は5 mMのホスフェートバッファーを含有する実施態様 2 - 1 1 に記載の方法。

実施態様 2 - 1 7 .

水性組成物が15 %の少なくとも一種の極性非プロトン溶媒、20 %のデキストラン硫酸、600 mMのNaCl、及び10 mMのクエン酸バッファーpH 6.2を含有する実施態様 2 - 1 1 に記載の方法。

実施態様 2 - 1 8 .

インサイツハイブリダイゼーション用途における標的の別々の変性を実施するための、少なくとも一種の極性非プロトン溶媒を1 %から95 % (v/v) 含有する組成物の使用。

実施態様 2 - 1 9 .

極性非プロトン溶媒の濃度が実施態様 2 - 5 又は2 - 6 又は2 - 7 から2 - 10 に記載される、実施態様 2 - 1 8 に記載の組成物の使用。