

【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29年4月20日 (2017.4.20)

【公表番号】特表2016-517275(P2016-517275A)

【公表日】平成28年6月16日 (2016.6.16)

【年通号数】公開・登録公報2016-036

【出願番号】特願2016-502813(P2016-502813)

【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 27/00 (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 27/00 Z

【手続補正書】

【提出日】平成29年3月13日 (2017.3.13)

【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】

少なくとも、1つの第一のプローブ分子及び1つの第二のプローブ分子を含んでいるプローブ分子のセットであって、その際、少なくとも2つのプローブ分子は、

a) 標的核酸に対して相補性を有する配列を含むキャプチャ領域、

b) キャプチャ領域の 5' 末端、3' 末端又は 5' 末端と 3' 末端との両方に共有結合する末端伸長部、及び

c) 少なくとも1つの末端伸長部に付着している少なくとも1つのポリマーラベルを含み、

その際、第一のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第一の標的核酸に対して相補性を有する配列を含み、第二のプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第二の標的核酸に対して相補性を有する配列を含み、

その際、第一のプローブ分子のポリマーラベルは、第二のプローブ分子のポリマーラベルとは異なり、ナノポア系において第一及び第二の標的核酸の独立した検出を提供する、前記プローブ分子のセット。

【請求項 2】

第一及び第二のプローブ分子のポリマーラベルは、それらの個々の標的とハイブリダイズし、かつナノポア系において印加電圧をかけた際に別個のシグネチャコンダクタンス遮断を提供する、請求項 1 に記載のプローブセット。

【請求項 3】

ポリマーラベルは、親水性ホモポリマー又は親水性ヘテロポリマーである、請求項 1 又は請求項 2 に記載のプローブセット。

【請求項 4】

キャプチャ領域と末端伸長部は、核酸及びペプチド核酸から成る群から独立に選択され

る、請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載のプローブセット。

【請求項 5】

プローブセットは、少なくとも 1 つの付加的なプローブ分子を含み、該付加的なプローブ分子は、

- a) 標的核酸に対して相補性を有する配列を含むキャプチャ領域、
- b) キャプチャ領域の 5' 末端又は 3' 末端に共有結合する末端伸長部、及び
- c) 少なくとも 1 つの末端伸長部に付着している少なくとも 1 つのポリマーラベル

を含み、その際、付加的なプローブ分子の核酸キャプチャ領域は、第一及び第二の標的核酸とは別個の標的核酸に対して相補性を有する配列を含み、またその際、付加的なプローブ分子各々のポリマーラベルは、第一のプローブ分子、第二のプローブ分子及び他の付加的なプローブ分子のいずれかのポリマーラベルとは異なっていて、かつナノポア系において第一、第二及び付加的な標的核酸の独立した検出を提供する、請求項 1 から請求項 4 のいずれか 1 項に記載のプローブセット。

【請求項 6】

プローブセットは、3、4、6 又は 8 個のプローブ分子を含み、その際、前記プローブ分子の各々のキャプチャ領域は、別個の標的核酸に対して相補性を有する別個の配列を含み、またその際、前記プローブ分子の各々のポリマーラベルは、他のプローブ分子のポリマーラベルとは異なり、かつナノポア系において各プローブに相補性を有する各標的核酸の独立した検出を提供する、請求項 5 に記載のプローブセット。

【請求項 7】

プローブ分子の核酸キャプチャ領域は、約 15 ヌクレオチドから約 30 ヌクレオチドの長さである、請求項 1 から請求項 6 のいずれか 1 項に記載のプローブセット。

【請求項 8】

第一のプローブ分子又は第二のプローブ分子の少なくとも 1 つの核酸キャプチャ領域は、その相補的標的核酸の全配列と相補的な配列を含む、請求項 1 から請求項 7 のいずれか 1 項に記載のプローブセット。

【請求項 9】

第一のプローブ分子の末端伸長部に付着しているポリマーラベルと第二のプローブ分子の末端伸長部に付着しているポリマーラベルは、それらの重合の量の点で異なる、請求項 1 から請求項 8 のいずれか 1 項に記載のプローブセット。

【請求項 10】

第一のプローブ分子の末端伸長部に付着しているラベルは、特定の長さのポリエチレングリコールであり、かつ第二のプローブ分子の伸長部に付着しているラベルは、第一のプローブ分子に付着しているポリエチレングリコールとは異なる長さのポリエチレングリコールである、請求項 1 から請求項 9 のいずれか 1 項に記載のプローブセット。

【請求項 11】

付加的な別個の標的核酸に対して相補性を有する配列を含んでいるキャプチャ領域と、場合により末端領域とを有するプローブを更に含み、その際、前記プローブはポリマーラベルを欠如しており、かつ付加的な別個の標的核酸の独立した検出を提供する、請求項 1 から請求項 10 のいずれか 1 項に記載のプローブセット。

【請求項 12】

ポリマーラベルは、キャプチャ領域への末端伸長部の 5' 又は 3' 共有結合の 9 残基以内に位置する末端伸長部の残基に付着している、請求項 1 から請求項 11 のいずれか 1 項に記載のプローブセット。

【請求項 13】

ナノポア系を用いてサンプル中の少なくとも 2 つの別個の一本鎖標的核酸を検出する方法において、該方法は、

a) サンプルと請求項 1 から請求項 12 のいずれか 1 項に記載のプローブセットとを接触させ、かつプローブ分子をサンプル中に存在するいずれかの標的核酸とハイブリダイズさせて、ハイブリダイズされたサンプルを形成すること、その際、プローブ分子のセット

は少なくとも、1つの第一のプローブ分子及び1つの第二のプローブ分子を含む；

b) デュアルチャンバーナノポア系のシスコンパートメント中で、前記ハイブリダイズされたサンプル混合物に、ハイブリダイズされたプローブ/標的核酸複合体をナノポア中で捕捉し、かつ前記ハイブリダイズされたプローブと標的核酸との、アンジッピング・プロセスによる前記系のナノポアを通る移行を促進するのに十分な電圧をかけること、及び

c) 経時的に前記ナノポア系中の電流パターンを分析すること、その際、サンプル中の前記別個の一本鎖標的核酸の存在が、ナノポア中のそれぞれ別個にハイブリダイズされたプローブと標的核酸との捕捉に相応する2個の別個のシグネチャ電流遮断の発生により示される

を含む前記方法。

【請求項14】

サンプル中の第一の標的核酸の存在と第二の標的核酸の存在は、別個のシグネチャコンダクタンス遮断である別個のシグネチャ電流遮断を生じる、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

第一の標的核酸の存在と第二の標的核酸の存在は別々に検出される、請求項13又は請求項14に記載の方法。

【請求項16】

(i) 標的核酸に対して相補性を有する配列を含むキャプチャ領域、

(ii) キャプチャ領域の5'末端、3'末端、又は5'末端と3'末端との両方に共有結合する末端伸長部、及び

(iii) 少なくとも1つの末端伸長部に付着している少なくとも1つのポリマーラベル

を含んでいるプローブ分子であって、その際、前記プローブ分子はナノポア系における標的核酸の検出を提供する前記プローブ分子。

【請求項17】

a) 核酸キャプチャ領域は、i) 標的核酸とハイブリダイズできる、又はii) 標的核酸とハイブリダイズでき、かつ標的核酸の配列と相補的な配列を含む；

b) 末端伸長部は、核酸キャプチャ領域の3'末端に共有結合されるポリ(dC)<sub>(27-33)</sub>である、及び

c) ポリマーラベルは、ポリ(dC)末端伸長部に付着している、

請求項16に記載のプローブ分子。

【請求項18】

核酸キャプチャ領域は、約15ヌクレオチドから約30ヌクレオチドの長さである、請求項16又は請求項17に記載のプローブ分子。

【請求項19】

ポリマーラベルは、ポリグリコール、ポリアミン、ペプチド、オリゴヌクレオチド及びオリゴ糖から成る群から選択される、請求項16から請求項18のいずれか1項に記載のプローブ分子。

【請求項20】

ポリマーラベルは、キャプチャ領域への末端伸長部の5'又は3'共有結合の9残基以内に位置する末端伸長部の残基に付着している、請求項16から請求項19のいずれか1項に記載のプローブ分子。

【請求項21】

ナノポア系を用いてサンプル中の少なくとも1つの別個の一本鎖標的核酸を検出する方法において、該方法は、

a) サンプルと、請求項16から請求項20のいずれか1項に記載の少なくとも1つのプローブ分子のセットとを接触させ、プローブ分子をサンプル中に存在するいずれかの標的核酸とハイブリダイズさせ、ハイブリダイズされたサンプルを形成すること、その際、プローブ分子のセットは少なくとも、1つの第一のプローブ分子及び1つの第二のプローブ分子を含む、

b) デュアルチャンバーナノポア系のシスコンパートメント中の前記ハイブリダイズされたサンプル混合物に、ハイブリダイズされたプローブ/標的核酸複合体をナノポア中で捕捉し、かつ前記ハイブリダイズされたプローブと標的核酸とのアンジッピング・プロセスによる前記系のナノポアを通る移行を促進するのに十分な電圧をかけること、及び

c) 経時的に前記ナノポア系中の電流パターンを分析すること、その際、サンプル中の前記別個の一本鎖標的核酸の存在が、前記ハイブリダイズされたプローブと標的核酸とのナノポアを通る移行に相応する別個のシグネチャ電流遮断の発生により示される、を含む前記方法。