

【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24年11月29日 (2012.11.29)

【公表番号】特表2010-514450(P2010-514450A)

【公表日】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2009-544281(P2009-544281)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成24年10月8日 (2012.10.8)

【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】

標的核酸の少なくとも一部にハイブリダイズするプライマー、  
第一領域及び第二領域を含むハイブリダイゼーションプローブ（ここで、該第一領域は該  
標的核酸の少なくとも一部とハイブリダイズし、第二領域は該標的核酸とハイブリダイズ  
せずに検出可能標識を有する）、及び

ポリメラーゼ及びエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素（ここで、ポリメラーゼはハイブ  
リダイズした該プライマーをハイブリダイズした該プローブ方向に伸長させ、該酵素のエ  
キソヌクレアーゼ活性によってハイブリダイズした該プローブを開裂させ、それによって  
該プローブの第二領域及び該検出可能標識を含むプローブ断片を遊離させる）を含む試料  
を第一の温度まで加熱することによって該試料を融解させ（ここで、第一の温度は該プ  
ライマー及び該試料中に存在する二重鎖核酸のTmより高い）；

次に、温度を第一の温度より低い第二の温度まで低下させることによって該試料をアニー  
リングさせ、該プライマーと該ハイブリダイゼーションプローブの夫々を該試料中の標的  
核酸の一本鎖部分とハイブリダイズせしめ；

次に、第三の温度にて、該標的核酸にハイブリダイズした該プライマーをポリメラーゼに  
よって延長させることによって該プライマーを伸長し；

次に、該酵素のエキソヌクレアーゼ活性によって該ハイブリダイゼーションプローブを開  
裂してプローブ断片を遊離させ；

適宜、融解、アニーリング、及び伸長を少なくとも一回繰り返す；

該試料を、該プローブ断片の第二領域の少なくとも一部分とハイブリダイズする一つ又は  
それ以上の捕捉プローブを有する固体支持体の表面と接触させ；

該捕捉プローブを、第二及び第三の温度より低い第四の温度にて、該試料中に存在する該  
プローブ断片の少なくとも一部とハイブリダイズさせ；及び

該固体支持体表面の標識を検出することから成る、試料中の標的核酸の検出方法であって、

該ハイブリダイゼーションプローブの少なくとも一部分は該ハイブリダイゼーションプロ  
ーブの別の部分とハイブリダイズし、それによって折り畳み構造を形成し、該折り畳み構

造の融解温度 ( $T_m$ ) は第三の温度より低くて第四の温度より高い、前記方法。

【請求項 2】

ポリメラーゼ及びエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素が同じ分子である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

折り畳み構造の融解温度 ( $T_m$ ) が 41 と 66 の間である、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

折り畳み構造の融解温度 ( $T_m$ ) が 58 と 63 の間である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

捕捉プローブがハイブリダイズするプローブ断片の第二領域が、対応する折り畳み構造において捕捉プローブに実質的に接近できない、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

第三の温度が第二の温度に等しいか又はそれより高く、且つ、第一の温度より低い、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

第二の温度と第三の温度が等しい、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

ハイブリダイゼーションプローブが更に、第一領域に隣接し、第二領域の反対側に第三領域を有し、該第三領域は標的核酸とハイブリダイズしない、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

ハイブリダイゼーションプローブの第二領域及び第三領域の両方の少なくとも一部が該ハイブリダイゼーションプローブの別の部分とハイブリダイズして折り畳み構造を形成する、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

第三領域の少なくとも一部が第二領域の少なくとも一部とハイブリダイズして折り畳み構造を形成する、請求項 8 又は 9 記載の方法。

【請求項 11】

ハイブリダイゼーションプローブの第二領域の少なくとも一部が該ハイブリダイゼーションプローブの別の部分とハイブリダイズして折り畳み構造を形成する、請求項 5 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

ポリメラーゼが熱安定性酵素である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

熱安定性酵素が Taq ポリメラーゼである、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

固体支持表面に電極があり、検出可能標識が電子を該電極から又は該電極に移動することが出来る、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

検出可能標識がフェロセン基である、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

固体支持表面に金がある、請求項 14 又は 15 記載の方法。

【請求項 17】

固体支持表面がフローチャンネルを形成する複数の相互嵌合プレートを有し、該プレート表面の少なくともある部分に捕捉プローブがあり、該試料と該固体支持表面との接触により該試料が該フローチャンネルを流れる、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

プレート表面に電極がある、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

交互のプレート表面に捕捉プローブがある、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

折り畳み構造が分子内三重鎖構造である、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

一連のサイクルにおいて、融解、アニーリング、及び伸長が複数行なわれる、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

最後の融解、アニーリング、及び伸長サイクルの後に、固体支持表面の標識を検出する、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

融解、アニーリング、及び伸長の間、該試料が該固体支持表面と接触しており、該方法の間、及び/又は、最後の融解、アニーリング、及び伸長サイクルの後に、複数回の検出が行なわれる、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

標的核酸の少なくとも一部とハイブリダイズする第一領域及び検出可能標識を有する第二領域を含むハイブリダイゼーションプローブ（ここで、該第二領域は該標的核酸とハイブリダイズせず、エキソヌクレアーゼ酵素が該標的核酸にハイブリダイズしたハイブリダイゼーションプローブを開裂することが出来、それによって該プローブの第二領域及び該検出可能標識を含むプローブ断片を生じさせる）；

該プローブ断片の第二領域とハイブリダイズする捕捉プローブをその表面に有する固体支持体；

任意に、該標的核酸の少なくとも一部にハイブリダイズするプライマー；及び、

任意に、ポリメラーゼ及びエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素（ここで、ポリメラーゼはハイブリダイズした該プライマーをハイブリダイズした該プローブ方向に伸長させ、該酵素のエキソヌクレアーゼ活性によってハイブリダイズした該プローブを開裂させ、それによって該プローブの第二領域及び該検出可能標識を含むプローブ断片を遊離させる）

を含む試料中の標的核酸の検出用キットであって、

該ハイブリダイゼーションプローブの少なくとも一部分は該ハイブリダイゼーションプローブの別の部分とハイブリダイズし、それによって折り畳み構造を形成し、該折り畳み構造の融解温度（ $T_m$ ）は該ハイブリダイゼーションプローブが該標的核酸とハイブリダイズしたときに形成される二重鎖の融解温度より低く、該プローブ断片が該捕捉プローブとハイブリダイズしたときに形成される二重鎖の融解温度より高い、前記キット。

【請求項 25】

固体支持体表面に電極があり、検出可能標識が電子を該電極から又は該電極に移動することが出来る、請求項 24 記載のキット。

【請求項 26】

検出可能標識が電気的活性なフェロセン基である、請求項 25 記載のキット。

【請求項 27】

固体支持表面に金がある、請求項 25 記載のキット。

【請求項 28】

ポリメラーゼ及びエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を含む、請求項 24 記載のキット。

【請求項 29】

ポリメラーゼ及びエキソヌクレアーゼ活性を有する酵素が同じ分子である、請求項 25 記載のキット。

【請求項 30】

ポリメラーゼが熱安定性酵素である、請求項 2 記載の方法。