

【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 18 年 1 月 5 日 (2006.1.5)

【公表番号】特表 2005-511004 (P2005-511004A)

【公表日】平成 17 年 4 月 28 日 (2005.4.28)

【年通号数】公開・登録公報 2005-017

【出願番号】特願 2003-508717 (P2003-508717)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

G 0 1 N 33/569 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

G 0 1 N 33/569 L

【手続補正書】

【提出日】平成 17 年 6 月 3 日 (2005.6.3)

【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】

生物学的サンプルにおけるヒトパルボウイルス B 1 9 を検出する方法であって、該方法は、以下の工程：

ヒトパルボウイルスと関連する捕捉核酸を含む固体支持体と、該生物学的サンプルとを、標的核酸鎖が、該生物学的サンプル中に存在する場合に、該捕捉核酸とハイブリダイズする条件下で接触させることにより、ヒトパルボウイルスを含むと疑われる生物学的サンプルから核酸を単離し、そして該固体支持体を該サンプルから分離する、工程；

該単離された核酸を、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーを使用して増幅する工程であって、該プライマーの各々は、長さが 60 ヌクレオチド以下であり、それぞれ、標的核酸のセンス鎖およびアンチセンス鎖の一部に十分に相補的であって、該プライマーの各々とハイブリダイズする、工程；ならびに

該増幅された核酸の存在を、該サンプル中のヒトパルボウイルス B 1 9 の存在の指標として検出する工程、
を包含する、方法。

【請求項 2】

前記固体支持体がビーズを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ビーズが磁性ビーズである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記捕捉核酸は、前記固体支持体に該捕捉核酸を連結するためのホモポリマー鎖をさらに含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記ホモポリマー鎖が、ポリ A 鎖である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記捕捉核酸は、以下：

配列 T C C T T A A C A G C A A T T T C T G A T A を有するオリゴヌクレオチド、
 配列 C G C C C T G T A G T G C T G T C A G を有するオリゴヌクレオチド、
 配列 T A T A C C C A A A T A G G A A G T T C T G を有するオリゴヌクレオチド、
 配列 T G C T G A T T C T T C A C T T G C を有するオリゴヌクレオチド、
 配列 T G C T G T A C C T C C T G T A C C T A を有するオリゴヌクレオチド、
 配列 G C C C T C T A A A T T T T C T G G G を有するオリゴヌクレオチド、
 配列 C T C C T A A T G T G T C A G G A A C C を有するオリゴヌクレオチド、
 配列 T C C T T A A C A G C A A T T T C T G A T A を有するオリゴヌクレオチドに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド、
 配列 C G C C C T G T A G T G C T G T C A G を有するオリゴヌクレオチドに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド、
 配列 T A T A C C C A A A T A G G A A G T T C T G を有するオリゴヌクレオチドに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド、
 配列 T G C T G A T T C T T C A C T T G C を有するオリゴヌクレオチドに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド、
 配列 T G C T G T A C C T C C T G T A C C T A を有するオリゴヌクレオチドに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド、
 配列 G C C C T C T A A A T T T T C T G G G を有するオリゴヌクレオチドに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド、および
 配列 C T C C T A A T G T G T C A G G A A C C を有するオリゴヌクレオチドに対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド、
 からなる群より選択される、1 以上のオリゴヌクレオチドを含む、方法。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記捕捉核酸は、以下：

配列番号 49 を有するオリゴヌクレオチド、
 配列番号 50 を有するオリゴヌクレオチド、
 配列番号 51 を有するオリゴヌクレオチド、
 配列番号 52 を有するオリゴヌクレオチド、
 配列番号 53 を有するオリゴヌクレオチド、
 配列番号 54 を有するオリゴヌクレオチド、
 配列番号 55 を有するオリゴヌクレオチド、
 配列番号 49 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド、
 配列番号 50 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド、
 配列番号 51 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド、
 配列番号 52 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド、
 配列番号 53 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド、
 配列番号 54 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド、および
 配列番号 55 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するオリゴヌクレオチド、
 からなる群より選択される、1 以上のオリゴヌクレオチドを含む、
 方法。

【請求項 8】

請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法であって、

(a) 前記センスプライマーは、(i) 配列番号 60 もしくは配列番号 60 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または (i i) 配列番号 88 もしくは配列番号 88 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み；そして
 (b) アンチセンスプライマーは、(i) 該センスプライマーが配列番号 60 もしくは配列番号 60 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む場合に、配列番号 59 もしくは配列番号 59 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有する

ヌクレオチド配列、または (i i) 該センスプライマーが配列番号 88 もしくは配列番号 88 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む場合に、配列番号 89 もしくは配列番号 89 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するヌクレオチド、を含む、方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記増幅する工程は、R T - P C R、転写媒介増幅、蛍光発生的 5'ヌクレアーゼアッセイ、またはこれらの組み合わせを包含する、方法。

【請求項 10】

前記増幅する工程は、前記センスプライマーおよび前記アンチセンスプライマーを使用する蛍光発生的 5'ヌクレアーゼアッセイを包含し、前記検出する工程は、検出可能な標識を含む少なくとも 1 つのプローブを使用して行われる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法であって、前記検出可能な標識は、6 - カルボキシフルオレsein (6 - F A M)、テトラメチルローダミン (T A M R A)、および 2' , 4' , 5' , 7' - テトラクロロ - 4 , 7 - ジクロロフルオレsein (T E T) からなる群より選択される、蛍光標識である、方法。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の方法であって、前記プローブは、5'末端および3'末端に検出可能な標識をさらに含む、方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法であって、前記少なくとも 1 つのプローブは、長さが 50 ヌクレオチド以下であり、かつ (i) 前記センスプライマーが配列番号 60 もしくは配列番号 60 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む場合に、配列番号 61 のヌクレオチド配列、または (i i) 前記センスプライマーが配列番号 88 もしくは配列番号 88 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む場合に、配列番号 93 のヌクレオチド配列、を含む、方法。

。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法であって、内部コントロール配列が存在する、方法。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の方法であって、前記内部コントロール配列が、配列番号 92 のヌクレオチド配列に由来する、方法。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の方法であって、前記内部コントロール配列についての検出可能に標識されたプローブ配列をさらに含む、方法。

【請求項 17】

蛍光発生的 5'ヌクレアーゼアッセイを使用して、生物学的サンプルにおけるヒトパルボウイルス B 19 を検出する方法であって、

該方法は、

(a) ヒトパルボウイルス B 19 と関連する、配列番号 49 ~ 55 からなる群より選択される 1 以上のオリゴヌクレオチドを含む捕捉核酸を含む磁性ビーズと、該生物学的サンプルとを、標的核酸鎖が、該生物学的サンプル中に存在する場合に、該捕捉核酸とハイブリダイズする条件下で接触させることにより、ヒトパルボウイルス B 19 を含むと疑われる生物学的サンプルから核酸を単離し、そして該サンプルから該磁性ビーズを分離する、工程；

(b) 該核酸を、センスプライマーおよびアンチセンスプライマーを使用して増幅する工程であって、該プライマーの各々は、長さが 60 ヌクレオチド以下であり、それぞれ、該単離された核酸のセンス鎖およびアンチセンス鎖の一部に十分に相補的であって、該プ

ライマーの各々とハイブリダイズし、ここで (i) 該センスプライマーは、配列番号 6 0 を含み、該アンチセンスプライマーは、配列番号 5 9 を含むか、または (i i) 該センスプライマーは、配列番号 8 8 を含み、該アンチセンスプライマーは、配列番号 8 9 を含む、工程；ならびに

(c) 該増幅された核酸の存在を、長さが 5 0 ヌクレオチド以下であって、かつ (i) 該センスプライマーが配列番号 6 0 を含む場合に、配列番号 6 1 のヌクレオチド配列、または (i i) 該センスプライマーが配列番号 8 8 を含む場合に、配列番号 9 3 のヌクレオチド配列、を含むプローブを使用して、該サンプル中のヒトパルボウイルス B 1 9 の存在の指標として検出する工程、

を包含する、方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 に記載の方法であって、内部コントロール配列が存在する、方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 に記載の方法であって、前記内部コントロール配列が、配列番号 9 2 のヌクレオチド配列に由来する、方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載の方法であって、前記内部コントロール配列についての検出可能に標識されたプローブ配列をさらに含む、方法。

【請求項 2 1】

生物学的サンプルにおけるヒトパルボウイルス B 1 9 を検出するためのキットであって、該キットは、以下：

配列番号 4 9 ~ 5 5 からなる群より選択される 1 以上のオリゴヌクレオチドを含む捕捉核酸分子；

一対のプライマーオリゴヌクレオチドであって、該プライマーオリゴヌクレオチドの各々は、長さが 6 0 ヌクレオチド以下であり、そして (i) 該プライマーオリゴヌクレオチドの一方は、配列番号 6 0 を含み、他方のプライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号 5 9 を含むか、または (i i) 該プライマーオリゴヌクレオチドの一方は、配列番号 8 8 を含み、他方のプライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号 8 9 を含む、一対のプライマー；および

ヒトパルボウイルス B 1 9 の存在を同定するための説明書、

を含む、キット。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載のキットであって、ポリメラーゼおよび緩衝液をさらに含む、キット。

【請求項 2 3】

請求項 2 1 に記載のキットであって、検出可能な標識を含む少なくとも 1 つのプローブオリゴヌクレオチドをさらに含む、キット。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載のキットであって、前記検出可能な標識は、6 - カルボキシフルオレセイン (6 - F A M)、テトラメチルローダミン (T A M R A)、および 2 ' , 4 ' , 5 ' , 7 ' - テトラクロロ - 4 , 7 - ジクロロフルオレセイン (T E T) からなる群より選択される蛍光標識である、キット。

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載のキットであって、前記プローブは、その 5 ' 末端および 3 ' 末端に検出可能な標識をさらに含む、キット。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載のキットであって、前記少なくとも 1 つのプローブは、長さが 5 0 ヌクレオチド以下であり、かつ (i) 該プライマーオリゴヌクレオチドの一方が配列番号 6 0 を含む場合に、配列番号 6 1 のヌクレオチド配列、または (i i) 該プライマーオリゴヌクレオチドの一方が配列番号 8 8 を含む場合に、配列番号 9 3 のヌクレオチド配列、を

含む、キット。

【請求項 27】

請求項 21 に記載のキットであって、配列番号 92 のヌクレオチド配列に由来する内部コントロールをさらに含む、キット。

【請求項 28】

図 3A ~ 3C または図 4A ~ 4C に示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つを含むヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 29】

請求項 28 に記載のポリヌクレオチドであって、前記ヌクレオチド配列は、図 3A ~ 3C または図 4A ~ 4C に示されるヌクレオチド配列からなる、ポリヌクレオチド。

【請求項 30】

図 2A ~ 2U または図 11A ~ 11Z に示されるヌクレオチド配列のうちのいずれか 1 つを含むヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0143

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0143】

TaqManTM アッセイの感度、PCR プライマーの適合性および至適反応条件を、上に記載した 4.7 kb フラグメントを含むプラスミド DNA を使用して確立した。このフラグメントは、VP1 領域、ならびに NS1 領域および VP2 領域を含む（図 1 を参照のこと）。VP1 領域に由来する PCR 増幅プライマー（下に詳述する）を使用した。番号付けは、Shade ら、J. Virol. (1986) 58: 921 ~ 936 に対応する。X は、5' - フルオレセインホスホルアミダイトを示し、Z は、DABCYL - dT を示す。両方を、Glen Research Corporation, Sterling, VA から得た。配列の右に示した数字は、パルボウイルス B19 配列からのプライマーのヌクレオチドをいう。

VSP1 - GGAGGCAAGGTTTGCA (センスプライマー - ヌクレオチド 3334 - 3350) (配列番号 60)

VSP2 - GTGCTGAACCTCTAAAGGT (アンチセンスプライマー - ヌクレオチド 3424 - 3442) (配列番号 59)

VSPPR1 - XCCCATGGAGATATTTAGATTZ (プローブ - ヌクレオチド 3379 - 3398) (配列番号 61)

Vpara8: TCCATATGACCCAGAGCACCA (ヌクレオチド 3262 - 3282) (配列番号 88)

Vpara9: TTTCCACTGGCATTTGTGGC (アンチセンスプライマー - ヌクレオチド 3315 - 3333) (配列番号 89)

Vpara10: XTAAGGTGTTTTCTCCCGCAGCGAGTZ、ここで X は、Fam であり、そして Z は、Tamra である。(ヌクレオチド 3286 - 3310) (配列番号 93)

プラスミド DNA 濃度を、分光光度法で概算し、そして段階希釈を実施して 5,000 ~ 10 コピー / 20 µl を得た。最終容量 50 µl 中の反応ミックスは、20 µl のサンプル、3.2 mM MgCl₂ を含む 1X Gold Taq 増幅緩衝液 (Perkin Elmer)、300 µM の各 dNTP、1 pmol の各増幅プライマー、0.4 pmol のプローブ、および 1 単位の AmpliTaq 酵素を含有した。反応条件は、以下を含んだ: ABI 7700 Sequence Detector において、酵素を活性化するための 95 °C 10 分間、次いで 45 サイクルの、60 °C と交互の 95 °C 30 秒間。