

【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 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 Q 1/68 (2006.01)

G 01 N 33/569 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 Q 1/68 A

G 01 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B19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B19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 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 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 4 9 を有するオリゴヌクレオチド、
配列番号 5 0 を有するオリゴヌクレオチド、
配列番号 5 1 を有するオリゴヌクレオチド、
配列番号 5 2 を有するオリゴヌクレオチド、
配列番号 5 3 を有するオリゴヌクレオチド、
配列番号 5 4 を有するオリゴヌクレオチド、
配列番号 5 5 を有するオリゴヌクレオチド、
配列番号 4 9 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 5 0 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 5 1 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 5 2 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 5 3 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 5 4 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 5 5 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 6 0 もしくは配列番号 6 0 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(ii) 配列番号 8 8 もしくは配列番号 8 8 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 6 0 もしくは配列番号 6 0 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 5 9 もしくは配列番号 5 9 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 8 8 もしくは配列番号 8 8 に対して少なくとも 9 0 % 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 8 9 もしくは配列番号 8 9 に対して少なくとも 9 0 % 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、前記增幅する工程は、 R T - P C R 、転写媒介增幅、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】

前記增幅する工程は、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、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 5 0 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 6 0 もしくは配列番号 6 0 に対して少なくとも 9 0 % 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 6 1 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 8 8 もしくは配列番号 8 8 に対して少なくとも 9 0 % 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 9 3 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 9 2 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 1 9 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 1 9 と関連する、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 1 9 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 6 0 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、該ブ

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4.7kb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.Virology(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-GGAGGGCAAAAGTTTGCA(センスプライマー-ヌクレオチド3334-3350)(配列番号60)

VSP2-GTGCCTGAAACTCTAAAGGT(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-XCCCCATGGAGATATTAGATTZ(プローブ-ヌクレオチド3379-3398)(配列番号61)

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

Vpara9:TTTCCCAC TG G C ATT GT GG C(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:XTAAAGGTGTTTCTCCCCGCAGCGAGTZ、ここでXは、Famであり、そしてZは、Tmra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/20μlを得た。最終容量50μl中の反応ミックスは、20μlのサンプル、3.2mM MgCl₂を含む1XGoldTaq増幅緩衝液(PerkinElmer)、300μMの各dNTP、1pmolの各増幅プライマー、0.4pmol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℃10分間、次いで45サイクルの、60℃と交互の95℃30秒間。