

【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30年11月1日(2018.11.1)

【公表番号】特表2017-532030(P2017-532030A)

【公表日】平成29年11月2日(2017.11.2)

【年通号数】公開・登録公報2017-042

【出願番号】特願2017-514803(P2017-514803)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A Z

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成30年9月14日(2018.9.14)

【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】

明細書に記載の発明。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 6】

実施形態では、本明細書において提供されるものは、本明細書に記載される反応混合物の任意の 1 つ以上の構成要素をその中に含むキットである。随意的に、キットを含む本明細書において提供される実施形態では、キットの構成要素は、少なくとも 2 つの別々の流体的に分離されたコンテナの間に分配される。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

共通の二本鎖の核酸分子上の第一の遺伝学的要素及び第二の遺伝学的要素を検出するための方法であって、以下を含む方法：

第一の増幅反応混合物中で第一の増幅反応を遂行することであって、前記第一の増幅反応混合物は：i) 前記共通の二本鎖の核酸分子を含み、前記共通の二本鎖の核酸分子は第一の鎖及び第二の鎖、及び前記第一の遺伝学的要素及び前記第二の遺伝学的要素も含み、前記第一の遺伝学的要素は、第一の遺伝学的要素の第一の相補的配列、及び第一の遺伝学的要素の第二の相補的配列を含み、前記第二の遺伝学的要素は、第二の遺伝学的要素の第一の相補的配列、及び第二の遺伝学的要素の第二の相補的配列を含み、前記第一の遺伝学的要素の第一の相補的配列、及び前記第二の遺伝学的要素の第一の相補的配列は、前記第一の鎖の一部であり、及び前記第一の遺伝学的要素の第二の相補的配列、及び前記第二の遺伝学的要素の第二の相補的配列は、前記第二の鎖の一部であり；ii) 第一の増幅反応の第一のプライマーであって、前記第一の増幅反応の第一のプライマーは、前記第一の遺伝

学的要素の第一の相補的配列に相補的なヌクレオチド配列を有し；及び i i i) 第一の増幅反応の第二のプライマーであって、前記第一の増幅反応の第二のプライマーは、前記第二の遺伝学的要素の第二の相補的配列に相補的なヌクレオチド配列を有し、及び第一の増幅反応生成物が、前記第一の増幅反応混合物中に生成され、前記第一の増幅反応生成物は、前記第一の遺伝学的要素の少なくとも一部分及び前記第二の遺伝学的要素の少なくとも一部分を含み、及び前記第一の増幅反応生成物は、二本鎖の、直線状形態を有し；連結反応混合物中で連結反応を遂行することであって、この連結反応混合物は： i) 前記第一の増幅反応生成物；及び i i) リガーゼ酵素を含み、及び連結反応混合物中には、前記第一の増幅反応生成物から環状連結生成物が形成され、前記環状連結生成物は二本鎖であり、及び環状連結生成物の第一の鎖及び環状連結生成物の第二の鎖を含み、及び前記環状連結生成物の第一の鎖は、前記第一の増幅反応生成物の第一の鎖のヌクレオチドを含み、及び前記環状連結生成物の第二の鎖は、前記第一の増幅反応生成物の第二の鎖のヌクレオチドを含み；及び第二の増幅反応を第二の増幅反応混合物で遂行することであって、前記第二の増幅反応混合物は： i) 前記環状連結生成物； i i) 第二の増幅反応の第一のプライマーを含み、前記第二の増幅反応の第一のプライマーは、前記第一の遺伝学的要素の第二の相補的配列に相補的なヌクレオチド配列を有し；及び i i i) 第二の増幅反応の第二のプライマーを含み、前記第二の増幅反応の第二のプライマーは、前記第二の遺伝学的要素の第一の相補的配列に相補的なヌクレオチド配列を有し、及び第二の増幅反応生成物が、前記第二の増幅反応混合物に生成され、前記第二の増幅反応生成物は、前記第一の遺伝学的要素の少なくとも一部分及び前記第二の遺伝学的要素の少なくとも一部分を含み；及び前記第二の増幅反応生成物を検出すること。

(項目 2)

前記第一の遺伝学的要素、及び前記第二の遺伝学的要素が、前記二本鎖の核酸分子上で、互いに少なくとも 2 0 0 0 及び 5 0 0 0 0 以下のヌクレオチドにより隔てられている、項目 1 の方法。

(項目 3)

前記第一の遺伝学的要素、及び前記第二の遺伝学的要素が、前記二本鎖の核酸分子上で、互いに少なくとも 4 0 0 0 及び 5 0 0 0 0 以下のヌクレオチドにより隔てられている、項目 1 の方法。

(項目 4)

前記第一の増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 増幅反応である、項目 1 ~ 3 のいずれかの反応。

(項目 5)

前記第一の増幅反応の第一のプライマー、及び前記第一の増幅反応の第二のプライマーが、それぞれ、長さにおいて、少なくとも 6 ヌクレオチドから 5 0 以下のヌクレオチドである、項目 1 ~ 4 のいずれかの反応。

(項目 6)

前記第一の増幅反応混合物中で、前記第一の増幅反応の第一のプライマー、及び前記第一の増幅反応の第二のプライマーの少なくとも 1 つが、プライマーの 5 ' 末端において、リン酸化される、項目 1 ~ 5 のいずれかの反応。

(項目 7)

前記第一の増幅反応混合物中で前記第一の増幅反応の第一のプライマー、及び前記第一の増幅反応の第二のプライマーの両方が、プライマーの 5 ' 末端において、リン酸化される、項目 1 ~ 6 のいずれかの反応。

(項目 8)

前記連結反応を遂行する前に、前記第一の増幅反応生成物をキナーゼ酵素とインキュベートする、項目 1 ~ 5 のいずれかの方法。

(項目 9)

前記キナーゼ酵素が T 4 ポリヌクレオチドキナーゼである、項目 8 の方法。

(項目 10)

前記リガーゼ酵素が T 4 D N A リガーゼである、項目 1 ~ 9 のいずれかの方法。

(項目 1 1)

前記第二の増幅反応の第一のプライマー、及び前記第二の増幅反応の第二のプライマーが、それぞれ長さにおいて、少なくとも 6 ヌクレオチドから 6 0 ヌクレオチド以下である、項目 1 ~ 1 0 のいずれかの方法。

(項目 1 2)

前記第二の増幅反応が P C R である、項目 1 ~ 1 1 のいずれかの方法。

(項目 1 3)

前記第二の増幅反応が熱サイクリングなしで遂行される、項目 1 ~ 1 1 のいずれかの方法。

(項目 1 4)

前記第二の増幅反応の第一のプライマーは、第一の領域及び第二の領域を含み、前記第二の増幅反応の第一のプライマーの第二の領域は、前記第二の遺伝学的要素の第一の相補的配列に相補的であり、及び前記第二の増幅反応の第二のプライマーは、第一の領域及び第二の領域を含み、前記第二の増幅反応の第二のプライマーの第二の領域は、前記第一の遺伝学的要素の第二の相補的配列に相補的であり、及び前記第二の増幅反応の第二のプライマーの第一の領域は、前記第二の増幅反応の第一のプライマーの第一の領域に相補的である、項目 1 3 の方法。

(項目 1 5)

前記第二の増幅反応の第二のプライマーの第一の領域が、前記環状連結生成物の第一の鎖の少なくとも一部分にも相補的である、項目 1 4 の方法。

(項目 1 6)

前記第二の増幅反応生成物が生成されると、リアルタイムで検出される、項目 1 ~ 1 5 のいずれかの方法。

(項目 1 7)

前記第一の遺伝学的要素が、抗生物質耐性遺伝子である、項目 1 ~ 1 6 のいずれかの方法。

(項目 1 8)

前記第二の遺伝学的要素が、病原体遺伝子である、項目 1 ~ 1 7 のいずれかの方法。

(項目 1 9)

前記第一の遺伝学的要素が m e c A 遺伝子である、項目 1 ~ 1 8 のいずれかの方法。

(項目 2 0)

前記第二の遺伝学的要素が黄色ブドウ球菌からの遺伝子である、項目 1 ~ 1 9 のいずれかの方法。

(項目 2 1)

生物学的サンプルを被験者から得ることを更に含み、前記被験者からの生物学的サンプルが、前記共通の二本鎖の核酸分子を含む、項目 1 ~ 2 0 のいずれかの方法。

(項目 2 2)

前記被験者からの前記共通の二本鎖の核酸分子を含む生物学的サンプルが、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌生命体中の共通の二本鎖の核酸分子を含む、項目 2 1 の方法。

(項目 2 3)

前記第一の増幅反応、前記連結反応、及び前記第二の増幅反応のすべてが、同じ容器内で生じる、項目 1 ~ 2 2 のいずれかの方法。

(項目 2 4)

前記第一の増幅反応、前記連結反応、及び前記第二の増幅反応のすべてが、異なる容器内で生じる、項目 1 ~ 2 2 のいずれかの方法。

(項目 2 5)

ポリヌクレオチドテンプレート中のヌクレオチド配列中の、目的の位置のヌクレオチドの身元を評価する方法で会って、以下を含む方法：

A) ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 増幅反応混合物中に、ポリヌクレオチドテンプレ-

トの複数のコピーを生成することであって、前記PCR増幅反応混合物は、PCR増幅反応の第一のプライマー及びPCR増幅反応の第二のプライマーを含み、前記PCR増幅反応混合物中では、前記PCR増幅反応の第一のプライマーが、前記ポリヌクレオチドテンプレートにアニールし、及び前記PCRの第二のプライマーは、前記ポリヌクレオチドテンプレートに相補的なポリヌクレオチドにアニールし、前記PCR増幅反応混合物では、PCR増幅反応生成物の複数のコピーが形成され、前記PCR増幅反応生成物は、第一の鎖及び第二の鎖を含む二本鎖の核酸分子であり、及び前記PCR増幅反応生成物の第一の鎖は、前記ポリヌクレオチドテンプレートのコピーであり；

B) ステップA) で生成された前記PCR増幅反応生成物のコピーを、少なくとも非熱サイクリングの第一の反応混合物、及び非熱サイクリングの第二の反応混合物のそれぞれに提供することであって：前記ポリヌクレオチドテンプレートは、第一の部分、第二の部分、及び第三の部分を含み、前記第三の部分は、前記ポリヌクレオチドテンプレートの中で、前記第一の部分及び前記第二の部分の間に位置し、及び目的の部分は、前記第三の部分の中にあり；前記非熱サイクリングの第一の反応混合物は、前記ポリヌクレオチドテンプレートのコピー、非熱サイクリングの第一のプライマー、及び非熱サイクリングの第二のプライマーを含み；前記非熱サイクリングの第一のプライマーは、第一の領域及び第二の領域を含み、前記第一の領域は前記プライマーの5'末端を含み、前記第二の領域は、前記プライマーの3'末端を含み、及び前記第二の領域は、前記ポリヌクレオチドテンプレートの第一の部分に相補的であり；前記非熱サイクリングの第二のプライマーは、第一の領域及び第二の領域を含み、前記第一の領域は前記プライマーの5'末端を含み、前記第二の領域は前記プライマーの3'末端を含み、及び前記第二の領域は、前記ポリヌクレオチドテンプレートの第二の部分に相補的な配列に相補的であり；前記非熱サイクリングの第一のプライマーの第一の領域は、前記非熱サイクリングの第二のプライマーの第一の領域に相補的であり；及び前記非熱サイクリングの第二のプライマーの第一の領域は、前記ポリヌクレオチドテンプレートの第三の部分に相補的であり；前記第二の反応混合物は、前記ポリヌクレオチドテンプレートのコピー、非熱サイクリングの第三のプライマー、及び非熱サイクリングの第四のプライマーを含み；前記非熱サイクリングの第三のプライマーは、第一の領域及び第二の領域を含み、前記第一の領域は前記プライマーの5'末端を含み、前記第二の領域は、前記プライマーの3'末端を含み、及び前記第二の領域は、前記ポリヌクレオチドテンプレートの第一の部分に相補的であり；前記非熱サイクリングの第四のプライマーは、第一の領域及び第二の領域を含み、前記第一の領域は前記プライマーの5'末端を含み、前記第二の領域は前記プライマーの3'末端を含み、及び前記第二の領域は、前記ポリヌクレオチドテンプレートの第二の部分に相補的である配列に相補的であり；前記非熱サイクリングの第三のプライマーの第一の領域は、前記非熱サイクリングの第四のプライマーの第一の領域に相補的であり；及び前記非熱サイクリングの第四のプライマーの第一の領域は、前記ポリヌクレオチドテンプレートの第三の部分に相補的であり；及び前記非熱サイクリングの第二のプライマーの第一の領域のヌクレオチド配列は、前記非熱サイクリングの第四のプライマーの第一の領域のヌクレオチド配列とは、1つのヌクレオチド分だけ異なり、前記非熱サイクリングの第二の、及び非熱サイクリングの第四のプライマー中の、異なるヌクレオチドの位置は、前記非熱サイクリングの第二のプライマーの第一の領域のヌクレオチド配列、又は非熱サイクリングの第四のプライマーが、前記ポリヌクレオチドテンプレートの第三の部分のヌクレオチド配列に、配列の最大の相補性のために配向する場合に、前記ポリヌクレオチドテンプレート中の目的のヌクレオチドの位置に対応し；

C) 前記非熱サイクリングの第一の反応混合物、及び非熱サイクリングの第二の反応混合物を、熱サイクリングのない条件下でインキュベートすること；及び

D) 前記非熱サイクリングの第一の反応混合物中の、ポリヌクレオチドテンプレートの増幅の速度及び量を、前記非熱サイクリングの第二の反応混合物中の、ポリヌクレオチドテンプレートの増幅の速度及び量と、比較することであって、前記ポリヌクレオチドテンプレートの増幅の速度及び量は、前記非熱サイクリングの第二のプライマー、又は非熱サイ

クリングの第四のプライマーの第一の領域、及び前記ポリヌクレオチドテンプレートの第三の部分のヌクレオチド配列の間の相補性の程度を示す。

(項目 2 6)

前記 P C R 増幅反応の第一のプライマーが、長さにおいて、少なくとも 1 0 から 8 0 以下のヌクレオチドであり、及び前記 P C R 増幅反応の第一のプライマーが、前記ポリヌクレオチドテンプレートにアニールされるときに、前記 P C R 増幅反応の第一のプライマーの少なくとも 3 ヌクレオチドが、ワトソン・クリックの塩基対規則に従い、前記ポリヌクレオチドテンプレート上の対応するヌクレオチドに不一致である、項目 2 5 の方法。

(項目 2 7)

前記 P C R 増幅反応の第一のプライマーが、長さにおいて、少なくとも 1 0 から 8 0 以下のヌクレオチドであり、及び前記 P C R 増幅反応の第一のプライマーが、前記ポリヌクレオチドテンプレートにアニールされるときに、前記 P C R 増幅反応の第一のプライマーの少なくとも 5 ヌクレオチドが、ワトソン・クリックの塩基対規則に従い、前記ポリヌクレオチドテンプレート上の対応するヌクレオチドに不一致である、項目 2 5 ~ 2 6 のいずれかの方法。

(項目 2 8)

前記 P C R 増幅反応の第一のプライマーが、長さにおいて、少なくとも 1 0 から 8 0 以下のヌクレオチドであり、及び前記 P C R 増幅反応の第一のプライマーが、前記ポリヌクレオチドテンプレートにアニールされるときに、前記 P C R 増幅反応の第一のプライマーの少なくとも 3 ヌクレオチドが、ワトソン・クリックの塩基対規則に従い、前記ポリヌクレオチドテンプレートに相補的な前記ポリヌクレオチド上の対応するヌクレオチドに不一致である、項目 2 5 ~ 2 7 のいずれかの方法。

(項目 2 9)

前記 P C R 増幅反応の第一のプライマーが、長さにおいて、少なくとも 1 0 から 8 0 以下のヌクレオチドであり、及び前記 P C R 増幅反応の第一のプライマーが、前記ポリヌクレオチドテンプレートにアニールされるときに、前記 P C R 増幅反応の第一のプライマーの少なくとも 5 ヌクレオチドが、ワトソン・クリックの塩基対規則に従い、前記ポリヌクレオチドテンプレートに相補的な前記ポリヌクレオチド上の対応するヌクレオチドに不一致である、項目 2 5 ~ 2 8 のいずれかの方法。

(項目 3 0)

前記ポリヌクレオチドテンプレート中のヌクレオチド配列中の目的の部分が S N P である、項目 2 5 ~ 2 9 のいずれかの方法。

(項目 3 1)

前記ポリヌクレオチドテンプレートが、C 型肝炎ウイルスからのものである、項目 2 5 ~ 3 0 のいずれかの方法。

(項目 3 2)

前記ポリヌクレオチドテンプレートが、C 型肝炎 N S 3 遺伝子からのものである、項目 3 1 の方法。

(項目 3 3)

前記ポリヌクレオチドテンプレート中のヌクレオチド配列中の目的の部分が、N S 3 遺伝子の 8 0 番目のアミノ酸をエンコードするコドン中にある、項目 3 2 の方法。

(項目 3 4)

ポリヌクレオチドテンプレートを増幅する方法であって、以下を含む方法：

(A) ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 増幅反応混合物中で、ポリヌクレオチドテンプレートの複数のコピーを生成することであって：前記 P C R 増幅反応混合物では、P C R 増幅反応の第一のプライマーが、前記ポリヌクレオチドテンプレートにアニールし、及び前記 P C R の第二のプライマーは、前記ポリヌクレオチドテンプレートに相補的なポリヌクレオチドにアニールし、前記 P C R 増幅反応混合物では、P C R 増幅反応生成物の複数のコピーが形成され、前記 P C R 増幅反応生成物は、第一の鎖及び第二の鎖を含む二本鎖の核酸分子であり、及び前記 P C R 増幅反応生成物の第一の鎖は、前記ポリヌクレオチドテ

ンプレートのコピーであり；

B) 前記ポリヌクレオチドテンプレートのコピーを、非熱サイクリング反応の第一のプライマー、及び非熱サイクリング反応の第二のプライマーを含む非熱サイクリング反応混合物で、インキュベートすることであって：前記ポリヌクレオチドテンプレートは、第一の部分、第二の部分、及び第三の部分を含み、前記第三の部分は、前記ポリヌクレオチドテンプレートの中で、前記第一の部分、及び前記第二の部分の間に位置し、及び目的の部分は、前記第三の部分の中にあり；前記第一のプライマーは第一の領域、及び第二の領域を含み、前記第一のプライマーの第二の領域は、前記ポリヌクレオチドテンプレートの第一の部分に相補的であり；及び前記第二のプライマーは、第一の領域及び第二の領域を含み、前記第二のプライマーの第二の領域は、前記ポリヌクレオチドテンプレートの第二の部分に相補的である、前記 PCR 増幅反応生成物の第二の鎖の中の配列に相補的であり、前記第二のプライマーの第一の領域は前記第一のプライマーの第一の領域に相補的であり、及び前記第二のプライマーの第一の領域は、前記ポリヌクレオチドテンプレートの第三の部分に相補的である。

(項目 3 5)

前記ポリヌクレオチドテンプレートの第一の部分、及び第二の部分のそれぞれが、長さにおいて、6 ～ 30 ヌクレオチドである、項目 2 5 ～ 3 4 のいずれかの方法。

(項目 3 6)

前記ポリヌクレオチドテンプレートの第三の部分が、長さにおいて、4 ～ 14 ヌクレオチドである、項目 2 5 ～ 3 5 のいずれかの方法。

(項目 3 7)

前記非熱サイクリング反応混合物中の、前記ポリヌクレオチドテンプレートのコピーが、前記方法の開始から 60 分以内で、少なくとも 10 倍に増加する、項目 2 5 ～ 3 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 8)

前記ポリヌクレオチドテンプレートの少なくとも 3 つのコピーを含むコンカテマー鎖が、前記非熱サイクリング反応混合物のインキュベーションの間に生成される、項目 2 5 ～ 3 7 のいずれかの方法。

(項目 3 9)

項目 1 ～ 3 8 の、いずれかにおいて提供される反応混合物の、いずれかの 1 つ以上の構成要素を、その中に含む容器。

(項目 4 0)

項目 1 ～ 3 8 の、いずれかにおいて提供される反応混合物の、いずれかの 1 つ以上の構成要素を、その中に含むキット。