

【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 12 Q 1/68 (2018.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/68 Z N A Z

C 12 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】0036

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0036】

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ーの間に分配される。

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T4DNAリガーゼである、項目1～9のいずれかの方法。

(項目11)

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60ヌクレオチド以下である、項目1～10のいずれかの方法。

(項目12)

前記第二の増幅反応がPCRである、項目1～11のいずれかの方法。

(項目13)

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1～11のいずれかの方法。

(項目14)

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13の方法。

(項目15)

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14の方法。

(項目16)

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1～15のいずれかの方法。

(項目17)

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1～16のいずれかの方法。

(項目18)

前記第二の遺伝学的要素が、病原体遺伝子である、項目1～17のいずれかの方法。

(項目19)

前記第一の遺伝学的要素がmecA遺伝子である、項目1～18のいずれかの方法。

(項目20)

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1～19のいずれかの方法。

(項目21)

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1～20のいずれかの方法。

(項目22)

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21の方法。

(項目23)

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1～22のいずれかの方法。

(項目24)

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1～22のいずれかの方法。

(項目25)

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(PCR)増幅反応混合物中に、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PCR增幅反応混合物は、PCR增幅反応の第一のプライマー及びPCR增幅反応の第二のプライマーを含み、前記PCR增幅反応混合物中では、前記PCR增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增幅反応混合物では、PCR增幅反応生成物の複数のコピーが形成され、前記PCR增幅反応生成物は、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增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增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26)

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10から80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25の方法。

(項目27)

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10から80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25～26のいずれかの方法。

(項目28)

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10から80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25～27のいずれかの方法。

(項目29)

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10から80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25～28のいずれかの方法。

(項目30)

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25～29のいずれかの方法。

(項目31)

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25～30のいずれかの方法。

(項目32)

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31の方法。

(項目33)

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80番目のアミノ酸をエンコードするコドン中にある、項目32の方法。

(項目34)

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增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35)

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25～34のいずれかの方法。

(項目36)

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25～35のいずれかの方法。

(項目37)

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25～36のいずれかに記載の方法。

(項目38)

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25～37のいずれかの方法。

(項目39)

項目1～38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40)

項目1～38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。