【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21年6月4日(2009.6.4)

【公表番号】特表2008-536518(P2008-536518A)
【公表日】平成20年9月11日(2008.9.11)
【年通号数】公開・登録公報2008-036
【出願番号】特願2008-507804(P2008-507804)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｑ　1/68　(2006.01)
Ｃ１２Ｑ　1/44　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｑ　1/68　Ａ
Ｃ１２Ｑ　1/44

【手続補正書】
【提出日】平成21年4月17日(2009.4.17)
【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】
試料における目的の生物の存否を検出するための試料の分析方法であって、
（ａ）試料を得る工程；
（ｂ）前記試料を前記試料中に存在する任意の核酸配列を分画するのに十分な破壊処理に供する工程；および
（ｃ）前記試料における目的の生物の存否を検出する工程
を含んでなる、方法。
【請求項２】
試料を前記試料中の目的の生物の存否を検出するために分析する方法であって、
（ａ）試料を得る工程；
（ｂ）前記試料を濃縮する工程；
（ｃ）工程（ｂ）の前記濃縮試料を前記試料中に存在する任意の核酸配列を分画するのに十分な破壊処理に供する工程；および
（ｄ）前記試料における目的の生物の存否を検出する工程を含んでなり、前記検出工程が：
（ｉ）前記目的の生物のゲノムの代表的核酸配列領域内に位置する標的配列を増幅するよう設計された増幅プライマー対セットを少なくとも１種類得る工程；
（ii）前記少なくとも１種類の増幅プライマー対セットを用いて、前記試料のプライマー依存型増幅を行い、増幅結果を生成する工程；および
（iii）前記工程（ｄ）(ii)の前記増幅結果を分析して、前記標的配列の増幅産物の存否を検出する工程を含んでなり、前記増幅産物の存否が、前記試料における目的の生物の存否の指標である、方法。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００７８
【補正方法】変更
【補正の内容】

【００７８】
ＤＧＧＥにおいて用いられる原理は、化学的変性剤勾配の代わりに温度勾配を用いる第２の方法にも適用され得る。この方法は、温度勾配ゲル電気泳動（ＴＧＧＥ）として知られている。この方法は、ｄｓＤＮＡからｓｓＤＮＡへの構造変化を誘導し、異なる配列を有する等しい大きさのフラグメントを分離するために温度勾配を使用する。ＤＧＧＥでのように、異なるヌクレオチド配列を有するＤＮＡフラグメントは、ゲルの異なる位置で固定される。プライマーデザインにおけるバリエーションは、ＰＣＲ産物の特徴決定および同定のためのＤＧＧＥの有用性を増大させる際に有利となるため用いられ得る。プライマーデザインのバリエーションを用いるこれらの方法および原理は、「ＰＣＲテクノロジー原理および適用（ＰＣＲ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ）」、ヘンリー（Ｈｅｎｒｙ）Ａ．エールリッヒ（Ｅｒｌｉｃｈ）編、Ｍ．ストックトン出版（Ｓｔｏｃｋｔｏｎ　Ｐｒｅｓｓ）、ニューヨーク州（ＮＹ）、７１～８８頁（１９８８年）に記載されている。
以上、本発明を要約すると下記のとおりである。
１．試料における目的の生物の存否を検出するための試料の分析方法であって、
（ａ）試料を得る工程；
（ｂ）前記試料を前記試料中に存在する任意の核酸配列を分画するのに十分な破壊処理に供する工程；および
（ｃ）前記試料における目的の生物の存否を検出する工程
を含んでなる、方法。
２．前記工程（ｂ）において、前記破壊処理が、物理的対象物を前記試料に添加する工程、および前記物理的対象物を含有する前記試料を攪拌する工程を含んでなる、前記１に記載の方法。
３．前記物理的対象物がビーズを含んでなる、前記２に記載の方法。
４．前記ビーズがシリコンまたはジルコニウムを含んでなる、前記３に記載の方法。
５．前記工程（ｂ）において、前記破壊処理が、物理的、化学的、または酵素的破壊処理を含む、前記１に記載の方法。
６．前記工程（ｃ）に先立ち、前記試料において以下のプロセス：（１）濃縮、（２）前記試料からの細胞の分離、（３）細胞溶解、および（４）全ＤＮＡ抽出の少なくとも１つを行うことにより、前記試料を調製する工程をさらに含んでなる、前記１に記載の方法。
７．前記調製工程が、前記工程（ｂ）に先立ち、細菌の濃縮および前記試料からの細胞の分離を行う工程を含んでなる、前記６に記載の方法。
８．前記調製工程が、前記工程（ｂ）に先立ち、細菌の濃縮、前記試料からの細胞の分離、および細胞溶解を行う工程を含んでなる、前記６に記載の方法。
９．前記調製工程において、前記細胞溶解が、前記工程（ｂ）と同時あるいは後に行われる、前記６に記載の方法。
１０．前記検出工程（ｃ）が、プライマー依存型増幅を前記試料において行い、増幅結果を生成する工程、および前記増幅結果を増幅産物について分析する工程を含んでなり、前記増幅産物の存否が、前記試料における目的の生物の存否の指標である、前記１に記載の方法。
１１．前記検出工程（ｃ）が、
（ｉ）目的の生物のゲノムの代表的核酸配列領域内に位置する標的配列を増幅するよう設計された増幅プライマー対セットを少なくとも１種類得る工程；
（ii）前記少なくとも１種類の増幅プライマー対セットを用いて、前記試料のプライマー依存型増幅を行い、増幅結果を生成する工程；および
（iii）前記工程（ｃ）（ii）の前記増幅結果を分析し、前記標的核酸の増幅産物の存否を検出する工程を含んでなり、前記増幅産物の存否が、前記試料における目的の生物の存否の指標である、
前記１に記載の方法。
１２．前記工程（ｃ）において、前記プライマー依存型増幅がポリメラーゼ連鎖反応であ

る、前記１１に記載の方法。
１３．前記増幅結果の分析が、前記ポリメラーゼ連鎖反応の実施と同時に行われる、前記１２に記載の方法。
１４．前記工程（ｃ）において、前記増幅結果の分析が、５’－ヌクレアーゼ検出法を利用する、前記１２に記載の方法。
１５．前記工程（ｃ）が、前記工程（ｂ）を行わない検出と比較して、前記目的の生物についての検出における感度の少なくとも１０倍の増大を有する、前記１１に記載の方法。
１６．試料を前記試料中の目的の生物の存否を検出するために分析する方法であって、
（ａ）試料を得る工程；
（ｂ）前記試料を濃縮する工程；
（ｃ）工程（ｂ）の前記濃縮試料を前記試料中に存在する任意の核酸配列を分画するのに十分な破壊処理に供する工程；および
（ｄ）前記試料における目的の生物の存否を検出する工程を含んでなり、前記検出工程が：
（ｉ）前記目的の生物のゲノムの代表的核酸配列領域内に位置する標的配列を増幅するよう設計された増幅プライマー対セットを少なくとも１種類得る工程；
（ii）前記少なくとも１種類の増幅プライマー対セットを用いて、前記試料のプライマー依存型増幅を行い、増幅結果を生成する工程；および
（iii）前記工程（ｄ）(ii)の前記増幅結果を分析して、前記標的配列の増幅産物の存否を検出する工程を含んでなり、前記増幅産物の存否が、前記試料における目的の生物の存否の指標である、方法。
１７．前記工程（ｂ）が、前記試料を容器中で濃縮する工程を含み、前記工程（ｃ）が、前記工程（ｂ）の前記濃縮試料を、工程（ｂ）と同じ容器内で、前記濃縮試料をそこから除去することなく前記破壊処理に供する工程を含んでなる、前記１６に記載の方法。