

【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27年3月19日 (2015.3.19)

【公開番号】特開2014-198029(P2014-198029A)
 【公開日】平成26年10月23日 (2014.10.23)
 【年通号数】公開・登録公報2014-058
 【出願番号】特願2013-75428(P2013-75428)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 15/00 Z N A F

【手続補正書】

【提出日】平成27年2月3日 (2015.2.3)

【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】

DNA ポリメラーゼとシクロデキストリンとバインダーとを少なくとも含有する固相状の試薬を、核酸を含む液体に溶解させる手順、を含む核酸増幅反应用試料の調製方法。

【請求項 2】

前記溶解させる手順の前に、前記液体をイオン性界面活性剤を含む溶液で希釈する手順、を含む

請求項 1 記載の核酸増幅反应用試料の調製方法。

【請求項 3】

前記イオン性界面活性剤は、陰イオン性界面活性剤である

請求項 2 記載の核酸増幅反应用試料の調製方法。

【請求項 4】

前記陰イオン性界面活性剤は、ドデシル硫酸ナトリウムである

請求項 3 記載の核酸増幅反应用試料の調製方法。

【請求項 5】

前記シクロデキストリンが、前記ドデシル硫酸ナトリウムの濃度の 8 倍以上の濃度で含まれている

請求項 4 記載の核酸増幅反应用試料の調製方法。

【請求項 6】

前記溶解させる手順の前に、前記液体の希釈液を超音波処理する手順を含む

請求項 2 から 5 のいずれか一項に記載の核酸増幅反应用試料の調製方法。

【請求項 7】

前記溶解させる手順の前に、前記液体の希釈液を加熱する手順を含む

請求項 2 から 5 のいずれか一項に記載の核酸増幅反应用試料の調製方法。

【請求項 8】

DNA ポリメラーゼとシクロデキストリンとバインダーとを少なくとも含有する固相状の試薬を、核酸を含む液体に溶解させる手順と、

前記核酸を増幅する手順と、を含む核酸増幅方法。

【請求項 9】

前記核酸の増幅を等温で行う

請求項 8 記載の核酸増幅方法。

【請求項 10】

前記核酸がリボ核酸であり、前記増幅する手順の前に前記リボ核酸を鋳型として逆転写反応を行う手順、を含む

請求項 8 又は 9 記載の核酸増幅方法。

【請求項 11】

DNA ポリメラーゼとシクロデキストリンとバインダーとを少なくとも含有する固相状核酸増幅反応用試薬。

【請求項 12】

前記シクロデキストリンは、ヒドロキシプロピル基を有する

請求項 11 記載の固相状核酸増幅反応用試薬。

【請求項 13】

鋳型核酸鎖とイオン性界面活性剤とを含む液体に混合される

請求項 11 又は 12 記載の固相状核酸増幅反応用試薬。

【請求項 14】

前記シクロデキストリンが、前記イオン性界面活性剤の濃度の 8 倍以上の濃度で含まれている

請求項 13 記載の固相状核酸増幅反応用試薬。

【請求項 15】

リボヌクレアーゼ H を含有する

請求項 11 から 14 のいずれか一項に記載の固相状核酸増幅反応用試薬。

【請求項 16】

DNA ポリメラーゼとシクロデキストリンとバインダーとを少なくとも含有する固相状核酸増幅反応用試薬が備えられたマイクロチップ。

【請求項 17】

前記固相状核酸増幅反応用試薬は、前記マイクロチップに配設された複数の核酸増幅反応の反応場の各々に備えられ、

該反応場は、流路を介して前記マイクロチップ内へ液体を導入する導入部と連通している

請求項 16 記載のマイクロチップ。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

シクロデキストリンとしては、シクロデキストリン（グルコース数：6 個）、シクロデキストリン（グルコース数：7 個）、シクロデキストリン（グルコース数：8 個）や、これらの誘導体が挙げられる。シクロデキストリンの誘導体とは、水酸基の一部が OR 基に置換された分子である。R は、例えば、メチル基、エチル基等の炭化水素基、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシプロピル基等のヒドロキシアルキル基などが挙げられる。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

希釈液を超音波処理する手順では、公知の超音波発生装置を用いることができる。例えばホーン型の超音波ホモジナイザーのような接触型の超音波発生装置を用いてもよい。また、試料と接触しない非接触型の超音波発生装置を用いることもできる。超音波の周波数は、超音波発生装置の性能や液体の性質に合わせ適宜選択できる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0082

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0082】

[材料と方法]

本実験例では、実験例7における核酸増幅反応試薬を、固相状のものに置き換え、LAMP法による核酸増幅反応を行った。本実験例で用いた固相状の核酸増幅反応試薬には、DNAポリメラーゼとして、Bst DNA polymerase Lg Frag (NEW ENGLAND BIOLABS)が含まれている。また、この固相状試薬には、RNase H活性が抑制されている逆転写酵素として、ThermoScript (Life technologies)を含む。RNase Hとして、Hybridase Thermostable RNase H (EPICENTRE)を含む。さらに固相状試薬には、HP CDと実験例1に記載したバインダーを用いた。検体については、実験例7と同様に、6人のインフルエンザウイルス感染患者由来の鼻腔スワブを用いた。鼻腔スワブは、10 mlのサンプル希釈液(20 mM Tris HCl、0.2% SDS)に溶解させ、これを試験例1～6とした。このサンプル溶解液、上記の固相状試薬、プライマーとQプローブを混合させ、RT-LAMP法により核酸増幅反応を行った。なお、本実験例では、固相状試薬を用いたため、試薬液によるサンプル溶解液の希釈を生じさせることなく、RT-LAMP反応を行った。核酸増幅反応の反応条件及び増幅核酸鎖の検出方法は、実験例5と同様である。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0093

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0093】

[結果]

本実験例の結果を表7に示す。表7に示すように、RNase Hが添加された試験群1及び試験群2では、核酸の増幅を確認することができた。一方、RNase Hが添加されていない比較群1では、核酸の増幅を確認することができなかった。以上より、RNase A阻害剤を添加してもRNase H活性は阻害されず、RNase Hの働きにより、RNAを鋳型とする核酸増幅反応がより効率的となることが確認された。