【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5月25日(2006.5.25)

【公表番号】特表2006-511191(P2006-511191A)
【公表日】平成18年4月6日(2006.4.6)
【年通号数】公開・登録公報2006-014
【出願番号】特願2003-562312(P2003-562312)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｑ　1/68　(2006.01)
Ｃ０９Ｋ　11/06　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)
Ｇ０１Ｎ　33/58　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｑ　1/68　Ａ
Ｃ０９Ｋ　11/06
Ｃ１２Ｎ　15/00　Ａ
Ｇ０１Ｎ　33/58　ＺＮＡＡ

【手続補正書】
【提出日】平成17年12月26日(2005.12.26)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２４】
図面の簡単な説明
図1は、a)5'-MGB-Q-ODN-Fl複合体(配列番号１)の構造およびb)5'-MGB-Q-ODN-F1プローブによるDNA標的の検出を示す。ここで、該プローブは消化されていない。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００２７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００２７】
図4は、CYP2D6遺伝子のプローブを含むスーパーGを伴うC/T多形のリアルタイム検出を示す。「C」プローブ(配列番号２)はFAMで標識されている;「T」プローブ(配列番号３)はYakima Yellow(商標)で標識されている。左の曲線は陽性曲線の「C」DNAおよび陰性曲線の「T」DNA(平らなまま)を伴う「FAM」チャンネルである。右の曲線は陽性曲線の「T」DNAおよび陰性曲線の「C」DNAを伴う「Yakima Yellow」チャンネルである。また、陰性は両チャンネルにおいて鋳型なしの対照である。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３０】
図7は、融解曲線分析による野生型、変異およびヘテロ接合のMTHFR対立遺伝子の検出を示す。それぞれのチューブは、プローブ(配列番号４および５)およびヒトゲノムDNA 10ng

の両方を含む。融解曲線はPCR増幅後、適当な放射チャンネルのそれぞれのプローブで得られた。
【手続補正４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００３３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００３３】
図10は好ましいMGB-Eclipse(商標)プローブ(配列番号６)および関連のMGBTaqMan(登録商標)プローブ(配列番号７)の構造を提供する。Flは、以下でより詳細に記載するような市場で入手可能なフルオロフォアであって、ホスホアミダイト結合法を使用し結合し得るものを示す。
【手続補正５】
【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】
1.2 オリゴヌクレオチド
使用するオリゴヌクレオチドの配列を表2に示す。標準的なホスホアミダイト化合物を用い合成した。5'-MGB-Q Eclipse(商標)プローブは、5'-3'方向にオリゴヌクレオチドセグメントを合成する用に設計した、MGB-Q-修飾ガラス支持体(調製におけるマニュスクリプト)上で5'-β-シアノエチルホスホアミダイト(Glen Research, VA)を用いる自動DNA合成を行うことにより調製した。オリゴヌクレオチド合成は、ABI 394合成装置で、製造者により供されるプロトコールに従って、0.02M ヨード液を用いて行った。PPGホスホアミダイトは文献の方法に基づき合成したが、Glen Research, Sterling, VAから購入することもできる。6-カルボキシフルオレセイン(FAM)、Yakima Yellow(登録商標)(YY、Epoch Biosciences, Inc., Bothell, WAから入手)および6-カルボキシ-4,7,2',7'-テトラクロロフルオレセイン(TET)のレポーティング色素を、対応するホスホアミダイト(Glen Research, Sterling, VA)を用い、合成の最後のステップで導入した。RRM1対立遺伝子1SNPに対応する3'-MGB-QTaqMan(登録商標)プローブは、MGB Eclipse(登録商標)プローブの調製の用に、既述のように合成した。この場合、標準の5'-DMTホスホアミダイトを使用した。オリゴヌクレオチドはすべて逆相HPLCで精製した。

【表４】

表２．プライマーおよび蛍光発生性プローブの配列

	5'-末端	配列	3'-末端	配列番号
RRM1 (120 bp アンプリコン)		受入番号XM_006065		
プライマー 1 (センス)		ATG GCC TTG TAC CGA TGC TGA		8
プライマー 2 (アンチセンス)		GTA CTT TCA ATT CAT GGA GC A TAC CT		9
Eclipse™ プローブ対立遺伝子 1 (センス)	MGB-Q	ATA TCT AGC TGT GTT GA**	FAM	10
Eclipse™ プローブ対立遺伝子 2 (センス)	MGB-Q	ATA TCG AGC TGT GTT GA	TET	11
MGB-TaqMan 対立遺伝子 1 (センス)	FAM	ATA TCT AGC TGT GTT G	MGB-Q	12
CYP2D6*4 (127 bp アンプリコン)		受入番号M33388		
プライマー 1 (センス)		TGA TGG GCA GAA GGG CAC AA		13
プライマー 2 (アンチセンス)		ATC ACG TTG CTC ACG GCT TT G TC		14
Eclipse™ プローブ対立遺伝子 1 (WT)	MGB-Q	CGT CCT GgG gGT G	FAM	2
Eclipse™ プローブ対立遺伝子 1 (変異体)	MGB-Q	GGC GTC TTG gGg GT	YY	3
ヒトヘルペスウィルス 1,2 (142 bp アンプリコン)		受入番号AF333383		
プライマー 1 (センス)		ATC CGA ACG CAG CCC CGC TG		15
プライマー 2 (アンチセンス)		TCT CCG TCC AGT CGT TTA TC T TC		16
Eclipse™ プローブ (アンチセンス)	MGB-Q	CCC AGG TTA TCC TCG CT	FAM	17

gはPPGである。**イタリック文字は、グアニンによるFAM蛍光の消光をさけるべく導入した不対塩基を示す。アンダーラインを引いた太字はSNPを示す。

【手続補正６】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１５１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１５１】
MGB Eclipse(登録商標) Design Softwareによるプローブおよびプライマーの設計の最初のステップは、目的の標的配列をインポートすることである。CYPD6*4遺伝子の一部を以下に示す(配列番号１８)。この配列をGenebank Accession number M33388からインポートする。

【化２０】

3001 gggtcttccc tgagtgcaaa ggcggtcagg gtgggcagag acgaggtggg gcaaagcctg

3061 ccccagccaa gggagcaagg tggatgcaca aagagtgggc cctgtgacca gctggacaga

3121 gccagggact gcgggagacc agggggagca tagggttgga gtgggtggtg gatggtgggg

3181 ctaatgcctt catggccacg cgcacgtgcc cgtcccaccc ccaggggtgt tcctggcgcg

3241 ctatgggccc gcgtggcgcg agcagaggcg cttctccgtg tccaccttgc gcaacttggg

3301 cctgggcaag aagtcgctgg agcagtgggt gaccgaggag gccgcctgcc tttgtgccgc

3361 cttcgccaac cactccggtg ggtgatgggc agaagggcac aaagcgggaa ctgggaaggc

3421 gggggacggg gaaggcgacc ccttacccgc atctcccacc ccca[g/a]gacgc ccctttcgcc

3481 ccaacggtct cttggacaaa gccgtgagca acgtgatcgc ctccctcacc tgcgggcgcc

3541 gcttcgagta cgacgaccct cgcttcctca ggctgctgga cctagctcag gagggactga

3601 aggaggagtc gggctttctg cgcgaggtgc ggagcgagag accgaggagt ctctgcaggg

3661 cgagctcccg agaggtgccg gggctggact ggggcctcgg aagagcagga tttgcataga

【化２１】

3721 tgggtttggg aaaggacatt ccaggagacc ccactgtaag aagggcctgg aggaggaggg

3781 gacatctcag acatggtcgt gggagaggtg tgcccgggtc agggggcacc aggagaggcc

3841 aaggactctg tacctcctat ccacgtcaga gatttcgatt ttaggtttct cctctgggca

【手続補正７】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１５３
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１５３】
該ソフトウェアは、関連するプライマーにより対立遺伝子特異的プローブを多数決定する。プローブ、プライマーおよびアンプリコンは全て、パラメーターの最少および最大の限界点(constraint)について評価する。該プローブ、プライマーまたはアンプリコンが限界内に収まらない場合、該評価プロセスは終了する。最適のパラメーター限界が最も適合するか否かにより、該プローブおよびプライマーをランク付けする(MGB Eclipse(登録商標) Design Software Manual, Epoch Bioscience, Bothell, WA.)。表3では、該ソフトウェアにより測定される、プライマーおよびプローブを3セット列挙する。列挙した該プローブおよびプライマーの並びは、理想のパラメーター限界にどれだけ近いかによって決まっている。該3つのプローブおよびプライマーのセットの構成(design)は似ており、第一の構成セットが合成され、図4に示すように、野生型と変異体との識別に使用された。

表 3
MGB Eclipse^{TM} Design Softwareにより設計したプローブおよびプライマー
ここで C および T はミスマッチを示しg=PPGである

【表５】

ODN	T_m	GC%	長さ	配列	配列番号
WT	67.3	77	13	CGTCCTGgGgGTG	19
変異体	67.8	71	14	GGCGTGTTGgGgGT	20
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1	68.6	55	20	TGATGGGCAGAAGGGCACAA	13
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 2	67.9	52	23	ATCACGTTGCTCACGGCTTTGTC	14
WT	67.3	77	13	CGTCCTGGgGgTG	21
変異体	67.8	71	14	GGCGTGTTGgGgGT	20
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1	68.6	55	20	TGATGGGCAGAAGGGCACAA	13
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 2	67.8	55	22	TCACGTTGCTCACGGCTTTGTC	22
WT	67.3	77	13	CGTCCTGgGgGTG	19
変異体	67.8	71	14	GGCGTGTTGgGgGT	20
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1	68.7	52	21	TGATGGGCAGAAGGGCACAAA	23
ﾌﾟﾗｲﾏｰ 2	67.9	52	23	ATCACGTTGCTCACGGCTTTGTC	14

2つのPPGを含むプローブは、その対応の標的を特異的に検出する。対照的に、すべて天然の塩基であるプローブは、その標的を検出することができない。

【手続補正８】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１５５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１５５】
1.8 問題のプライマーの設計

増幅反応にあまり関与しないGC-リッチプライマーもある。4を超える連続のGを含むプライマーのパフォーマンスは低く、その低いパフォーマンスはGがPPGで適当に置換されることによって避けられ得る。4連続のGを含む、MGB Eclipse(登録商標) Design Softwareにより設計されたプライマーの例を、β-アクチン遺伝子発現アッセイに関して図４で示し、ここで、１つのGはPPGで置換される。増幅および検出が、表4に列挙するプライマーおよび検出プローブを用い、成功した(データ示さず)。

【表６】

表４

β－アクチン遺伝子検出のためのプライマーおよびプローブ

ﾌﾟﾗｲﾏｰ 1: GCG TGA TGG TGG GCA T センス（配列番号２４）

ﾌﾟﾗｲﾏｰ 2: GAT GgG GTA CTT CAG GGT アンチセンス（配列番号２５）

ﾌﾟﾛｰﾌﾞ: MGB-Q- GGA TTC CTA TGT GGG CGA -FAM センス（配列番号２６）

【手続補正９】
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０１６６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１６６】
表5は、この実施例で使用し、図2で示した、プライマーおよび蛍光発生プローブの配列を示す。
【表７】

表５プライマーおよび蛍光発生性プローブの配列

	5'-末端	配列	3'-末端	配列番号
RRM1 T1037G変異; 受け入れ番号XM 006065				
ﾌﾟﾗｲﾏｰ1（ｾﾝｽ）		ATG GCC TTG TAC CGA TGC TGA		8
ﾌﾟﾗｲﾏｰ2（ｱﾝﾁｾﾝｽ）		GTA CTT TCA ATT CAT GGA GCA TAC CT		9
MGB Eclipse™ﾌﾟﾛｰﾌﾞ対立遺伝子1（ｾﾝｽ）	MGB-Q	ATA TCT AGC TGT GTT GA**	FAM	10
MGB Eclipse™ﾌﾟﾛｰﾌﾞ対立遺伝子2（ｾﾝｽ）	MGB-Q	ATA TCG AGC TGT GTT GA	TET	11
Molecular beacon対立遺伝子1（ｾﾝｽ）	FAM	cca acc AT CCA CAT ATC TAG CTG TGT TG ggt tgg*	Dabcyl	27
TaqMan®MGB対立遺伝子1（ｾﾝｽ）	FAM	ATA TCT AGC TGT GTT G	MGB-Q	12

【手続補正１０】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１７１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１７１】
種々のクエンチャーを有するFAM-標識したオリゴヌクレオチドのバックグラウンド蛍光は、Applied Biosystems LS50-Bスペクトロフォトメーターを用い、1XPCR緩衝液(20mM Tris-HCl pH 8.7、50mM NaCl、5mM $MgCl_2$)中、濃度0.2μMで3回測定した。励起波長488 nmでスリット孔2.5であった。放射波長522 nmでスリット孔5.5であった。プローブは、Eclipse(商標) クエンチャー(同時係属出願09/457,616参照)、Dabcyl、またはMGB-クエンチャーを用いる自動化DNA合成により調製した。該プローブ配列は5'-tcctgattttac(配列番号２８)であった。
【手続補正１１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１７４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１７４】
MTHFR遺伝子の場合、野生型対立遺伝子の該プローブ配列はMGB-Q-ATC GGC TCC CGC-FAM(配列番号４)であり、変異体対立遺伝子の該プローブ配列MGB-Q-AAT CGA CTC CCG C-YY(Yakima Yellow(商標))(配列番号５)である。野生型、変異体およびヘテロ接合体のサンプルの融解曲線は図7A(FAMチャンネル)および図7B(YYチャンネル)のようにコンパイルされる。
【手続補正１２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１７６
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１７６】
以下、目的のAT-リッチ配列(配列番号２９)を示す。プライマーおよびプローブの両方が、スーパーAおよびスーパーT修飾塩基(市場でEpoch Biosciences, Inc., Bothell, WAから入手可能)により多くが置換される必要があり、これによりポリメラーゼ増幅に必要な安定性が得られる。より長いオリゴヌクレオチドにより、PCR効率を低下する二次構造およびプライマーダイマーの形成が増大する。必然的に要求される安定性のため、Aおよ

びTをスーパーAおよびスーパーTに自動的に置換するMGB Eclipse(商標) Software 2.0によりプローブおよびプライマーを設計した。プローブ配列はアンダーラインを引いた太字で示し、プライマー配列は太字のみで示す。

【化２２】

TTAACAAAAGTATTAGTAATCATATTACTTTTCTTAATCTGTGTGGTGAGTACGTA
AGTGTTCATTTCCATTCCATTAGTATTATATTTGAAAACTAAAAACTCCTGCGTA
AGTCTCAATATAACTGCTTATGTCCATGTTCTATTTAATACACCTTATAACCCAT
GTGTAGTGTGAACCAATAGCTGTGTTTTAATATT**TTTG[C/T]TAAATAT**ATTATAC
ATT**CACTATAACCTCTACAG**TTTTAAAGAATGTTAAAATGAACCTGAATACCTA
GTTTCCTCTACCCACACCCTTCTCCCCCATACCAATCTTTACTTCACAATTCTGTC
AATTACAGCTTAGGAAGGTACT

【手続補正１３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１７７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１７７】
プローブおよびプライマー配列を以下に示す。ここで、「a」はスーパーAであり、「t」はスーパーTである。修飾塩基の使用によって、図8に示すようにミスマッチ識別が向上したより短いプローブおよびプライマーの設計が可能となる。

【化２３】

センスプライマー1: CCt GCG tAt GtC tCa ATA T （配列番号３０）

アンチセンスプライマー2: CtG tAG aGG TTA TAG TG（配列番号３１）

【化２４】

プローブ“T” MGB-Q-TtG tTa AaT aTa TTa t-TET（配列番号３２）

プローブ“C” MGB-Q-ttG CTa AaT aTa TTa T-FAM（配列番号３３）

【手続補正１４】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１８１
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１８１】
１つの実施態様では、a)標的の増幅に使用されるプライマーセットとは異なるプライマーのセット、b)内部対照プライマーの合計よりも長い内部対照標的、およびc)内部対照プローブを含む内部対照システムを使用し、ここで、該内部対照プライマーおよび内部対照プローブの配列は既知配列のものとは実質的に異なる。

【化２５】

試験に使用した内部対照鋳型 *(IC)* 配列

ユニバーサルIC (スクランブルした *C.elegans* 配列)

CTCAGGTGTCCGTGTGTTCCATCTGTTCTAGGCAAAGTCCCATCGTT

TCCACCAGTTACTTTACGGACCAC (配列番号３４)

フォワードユニバーサル ICプライマー CTCAGGTGTCCGTGTGTTCCAT (配列番号３５)

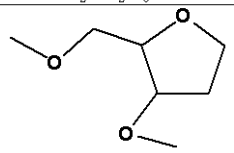
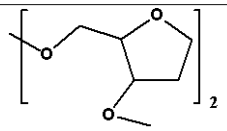
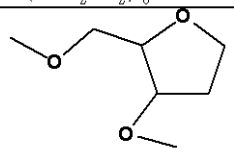
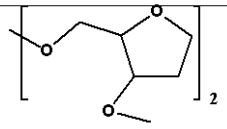
フォワードユニバーサル ICプライマー GTGGTCCGTAAAGTAACTGGT (配列番号３６)

Probe MGB-Q-GGCAAAGTCCCATCGTT-Yakima Yellow **色素** (配列番号３７)

【手続補正１５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１８４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１８４】
プローブは上記の方法で構成し、表6に示す配列を有していた。特定リンカーで見られる蛍光増加は、プローブと関連し、ここで、該フルオロフォアは直接オリゴヌクレオチド部分に結合している(例えば、Kは式Iで結合である)。それぞれのプローブでKが結合である場合、増加を測定する対照として、蛍光を0%に設定する。

表 6
リアルタイムPCRにおけるプローブのパフォーマンスへのリンカーKの影響
W=-O-$(CH_2)_3$-N-$(CH_2)_2$-C(=O)-

【表８】

#	配列、Eclipse ﾌﾟﾛｰﾌﾞの5'から3'	K	ｵﾘｺﾞﾏｰ	% 蛍光増加
1	MGB W-(Q)-CGT CAC ACC CGA AGG AAT-K-FAM (配列番号38)	なし	18-mer	0%
2	同じ	-$(OCH_2CH_2)_3$-O-	18-mer	15%
3	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	18-mer	20%
4	同じ		18-mer	0%
5	同じ		18-mer	10%
6	同じ	-O-$(CH_2)_{12}$-O-	18-mer	-20%
7	同じ	-[O-$(CH_2)_{12}$]$_2$-O-	18-mer	-50%
8	MGB W-(Q)-CTC GGT CCT TGC CCT-K-F1 (配列番号39)	-なし	15-mer	0%
9	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	15-mer	50%
10	MGB W-(Q)-CGA CTC GGC CCT TG-K-F1 (配列番号40)	-	14-mer	0%
11	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	14-mer	100%
12	MGB W-(Q)-AGG CGA GGA ATA C-K-F1 (配列番号41)	-	13-mer	0%
13	同じ	-$(OCH_2CH_2)_3$-O-	13-mer	70%
14	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	13-mer	150%
15	同じ		13-mer	10%
16	同じ		13-mer	70%
17	同じ	-O-$(CH_2)_{12}$-O-	13-mer	20%
18	同じ	-[O-$(CH_2)_{12}$]$_2$-O-	13-mer	-20%
19	MGB W-(Q)-AAT CGA CTC CCG C –K-F1 (配列番号42)	なし	13-mer	0%
20	同じ	-$(OCH_2CH_2)_3$-O-	13-mer	70%
21	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	13-mer	130%
22	MGB W-(Q)-ATC GGC TCC CGC-K-F1 (配列番号43)	なし	12-mer	0%
23	同じ	-$(OCH_2CH_2)_3$-O-	12-mer	70%
24	同じ	-$(OCH_2CH_2)_6$-O-	12-mer	115%