

【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12月10日 (2015.12.10)

【公表番号】特表2014-533111(P2014-533111A)

【公表日】平成26年12月11日 (2014.12.11)

【年通号数】公開・登録公報2014-068

【出願番号】特願2014-541169(P2014-541169)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成27年10月19日 (2015.10.19)

【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】

試料中のサルモネラ属 (S a l m o n e l l a) の存在を検出する方法であって、前記試料は核酸を含み、

(a) 少なくとも 1 つのプライマーおよびプローブを含む反応混合物を提供するステップであって、前記プライマーは少なくとも 11 ヌクレオチド長であり、前記プローブは少なくとも 14 ヌクレオチド長であり、

(i) 前記プライマーは、配列番号 1 の配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含み、前記プローブは、配列番号 2 の配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含む；または

(i i) 前記プライマーは、配列番号 3 の核酸配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含み、前記プローブは、配列番号 4 の配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含む、
前記ステップと；

(b) ステップ (a) の反応混合物を使用して前記試料の前記核酸の P C R 増幅を実施するステップと；

(c) ステップ (b) の増幅を検出するステップと
を含む前記方法。

【請求項 2】

配列番号 6 ～ 1 1 1 からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含む ポリヌクレオチド。

【請求項 3】

プライマー-プローブ複合体を含む ポリヌクレオチド であって、前記プライマー-プローブ複合体が核酸プライマー部分および核酸プローブ部分を含み、前記プライマー部分は少なくとも 11 ヌクレオチド長であり、前記プローブ部分は少なくとも 14 ヌクレオチド長であり、前記プローブ部分の 3' 末端は前記プライマー部分の 5' 末端に直接または間

接的に結合しており、

(i) 前記プライマー部分は配列番号1の配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含み、前記プローブ部分は配列番号2の配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含むか；または

(ii) 前記プライマー部分は配列番号3の核酸配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含み、前記プローブ部分は配列番号4の配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含む、
前記ポリヌクレオチド。

【請求項4】

請求項3に記載のポリヌクレオチドを含む、試料中のサルモネラ属 (*Salmonella*) の検出のためのキット。

【請求項5】

請求項3に記載のポリヌクレオチドを含む試薬錠剤。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0049

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0049】

好ましい対照配列には、例えば、SV40 DNA に対する対照プライマーおよびプローブが含まれる。

対照反応は増幅反応の確認に有用である。対照 DNA の増幅は試験される試料と同一の反応管内で起こり、したがって試料が標的陰性である場合、すなわち、標的増幅産物が産生されない場合に良好な増幅反応の指標となる。増幅反応の有意な確認を達成するため、対照 DNA 鋳型の好適な数のコピーをそれぞれの増幅反応に含めなければならない。

一部の例において、追加の陰性対照複製組成物を含めることが有用であり得る。陰性対照複製組成物は複製組成物と同一の試薬を含有するが、ポリメラーゼを含まない。このような対照の主な機能は、本方法が蛍光検出手段を用いる場合に均質形式での擬似バックグラウンド蛍光をモニタリングすることである。

複製組成物は、それらが標的 DNA または対照 DNA を増幅するために使用されるように設計されるかどうかに応じて変更することができる。標的 DNA を増幅する複製組成物（試験複製組成物）は、(i) ポリメラーゼ（一般に耐熱性）、(ii) 標的 DNA にハイブリダイズし得るプライマーペアおよび (iii) 増幅反応の進行に必要な緩衝液を含み得る。対照 DNA を増幅する複製組成物（陽性対照または陽性複製組成物）は、(i) ポリメラーゼ（一般に耐熱性）；(ii) 対照 DNA ；(iii) 対照 DNA にハイブリダイズし得る少なくとも1つのプライマー；および (iv) 増幅反応の進行に必要な緩衝液を含み得る。さらに、標的 DNA または対照 DNA 増幅のいずれかのための複製組成物は、好ましくは検出可能な標識を有する核酸プローブを含有し得る。

以下に本発明の具体的実施態様をいくつか例示的に列挙する。

(1) 試料中のサルモネラ属 (*Salmonella*) の存在を検出する方法であって、前記試料は核酸を含み、

(a) 少なくとも1つのプライマーおよびプローブを含む反応混合物を提供するステップであって、前記プライマーは少なくとも11ヌクレオチド長であり、前記プローブは少なくとも14ヌクレオチド長であり、

(i) 前記プライマーは、配列番号1の配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含み、前記プローブは、配列番号2の配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含む；または

(i i) 前記プライマーは、配列番号3の核酸配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含み、前記プローブは、配列番号4の配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含む、
前記ステップと；

(b) ステップ(a)の反応混合物を使用して前記試料の前記核酸のPCR増幅を実施するステップと；

(c) ステップ(b)の増幅を検出するステップと
を含む前記方法。

(2) 反応混合物が、(i)のプライマーおよびプローブならびに(i i)のプライマーおよびプローブの両方を含む、(1)に記載の方法。

(3) プライマーおよびプローブがそれぞれ、3'末端および5'末端を有し、前記プローブの3'末端が前記プライマーの5'末端に直接または間接的に結合しており、それによりプライマー-プローブ複合体を形成している、(1)に記載の方法。

(4) プライマー-プローブ複合体が検出可能な標識を含む、(3)に記載の方法。

(5) 配列番号1に選択的にハイブリダイズし得るプライマーが配列番号40～54からなる群から選択される核酸配列を含み、配列番号2に選択的にハイブリダイズし得るプローブが配列番号6～39からなる群から選択される核酸配列を含む、(1)または(3)に記載の方法。

(6) 配列番号3に選択的にハイブリダイズし得るプライマーが配列番号95～111からなる群から選択される核酸配列を含み、配列番号4に選択的にハイブリダイズし得るプローブが配列番号55～94からなる群から選択される核酸配列を含む、(1)または(3)に記載の方法。

(7) プライマー-プローブ複合体が5'ステム配列および3'ステム配列をさらに含み、前記5'ステム配列の3'末端が前記プローブの5'末端に直接または間接的に結合しており、前記3'ステム配列の5'末端が前記プローブの3'末端に直接または間接的に結合しており、前記3'ステム配列の3'末端が前記プライマーの5'末端に直接または間接的に結合している、(3)に記載の方法。

(8) 5'ステム配列が配列番号112～119からなる群から選択される核酸配列を含み、3'ステム配列が配列番号120～130からなる群から選択される核酸配列を含む、(7)に記載の方法。

(9) 反応混合物がプローブにストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得るクエンチャーオリゴヌクレオチドをさらに含む、(1)または(3)に記載の方法。

(10) 配列番号6～111からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

(11) プライマー-プローブ複合体を含む単離されたポリヌクレオチドであって、前記プライマー-プローブ複合体が核酸プライマー部分および核酸プローブ部分を含み、前記プライマー部分は少なくとも11ヌクレオチド長であり、前記プローブ部分は少なくとも14ヌクレオチド長であり、前記プローブ部分の3'末端は前記プライマー部分の5'末端に直接または間接的に結合しており、

(i) 前記プライマー部分は配列番号1の配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含み、前記プローブ部分は配列番号2の配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含むか；または

(i i) 前記プライマー部分は配列番号3の核酸配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含み、前記プローブ部分は配列番号4の配列またはそれと相補的な配列にストリンジェントな条件下で選択的にハイブリダイズし得る核酸配列を含む、
前記ポリヌクレオチド。

(12) プライマー部分が配列番号40～54からなる群から選択される核酸配列を含み

、プローブ部分が配列番号 6 ～ 39 からなる群から選択される核酸配列を含む、(11) に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(13) プライマー部分が配列番号 95 ～ 111 からなる群から選択される核酸配列を含み、プローブ部分が配列番号 55 ～ 94 からなる群から選択される核酸配列を含む、(11) に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(14) プライマー-プローブ複合体が 5' ステム配列および 3' ステム配列をさらに含み、前記 5' ステム配列の 3' 末端が前記プローブ部分の 5' 末端に直接または間接的に結合しており、前記 3' ステム配列の 5' 末端が前記プローブ部分の 3' 末端に直接または間接的に結合しており、前記 3' ステム配列の 3' 末端が前記プライマー部分の 5' 末端に直接または間接的に結合している、(11) に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(15) 5' ステム配列が配列番号 112 ～ 119 からなる群から選択される核酸配列を含み、3' ステム配列が配列番号 120 ～ 130 からなる群から選択される核酸配列を含む、(14) に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(16) (11) に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、試料中のサルモネラ属 (*Salmonella*) の検出のためのキット。

(17) (11) に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む試薬錠剤。