

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 11 月 17 日(17.11.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/181897 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/48 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/063648
- (22) 国際出願日: 2016 年 5 月 6 日(06.05.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-095535 2015 年 5 月 8 日(08.05.2015) JP
- (71) 出願人: 株式会社カネカ(KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 榎 達也(TSUGA Tatsuya); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 宮本 重彦(MIYAMOTO Shigehiko); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 田中 穂積(TANAKA Hozumi); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: ENZYME REACTION REAGENT HAVING DRIED FORM, AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) 発明の名称: 乾燥形態の酵素反応試薬およびその調製法

(57) Abstract: Provided is an ammonium salt-containing enzyme reaction reagent having a dried form, of which the system is not required to be supplemented with components during a reaction and which can be stored at room temperature stably. The change in a pH value of a buffer, which arises from an ammonium salt contained in the buffer when the buffer is dried, can be prevented by using a Good's buffer.

(57) 要約: 反応時に系中に成分を補完する必要がなく、室温で安定に保存可能な乾燥形態のアンモニウム塩含有酵素反応試薬を提供する。アンモニウム塩に由来する乾燥時の緩衝剤のpH変化を、グッド緩衝剤を用いることにより抑制する。



WO 2016/181897 A1

明 細 書

発明の名称：乾燥形態の酵素反応試薬およびその調製法

技術分野

[0001] 本発明はタンパク質の保存方法およびそのための試薬に関するものである。

背景技術

[0002] 近年、酵素反応の高い特異性を活かした様々な検査方法や診断方法が開発され、その一部は製品として世の中に普及している。一般的に、酵素反応は緩衝液や金属塩、基質、補酵素などから成る複雑な組成をしているため、検査や診断の際に反応溶液を用時調製するのは煩雑な作業である。そこで反応溶液の調製を簡便化するために、反応に必要な試薬類を予め混合しておくという方法がある。液状形態のプレミックス試薬は検体を添加するだけで使用でき、簡便性が高い。しかし酵素は希釈溶液の状態で長期間保存すると失活してしまう場合が多く、低温で1年程度の品質保証期限となっている。一方、乾燥形態のプレミックス試薬は使用時に溶解する必要があるものの、溶解液の種類や分量を任意に選択することができるため、用途展開の幅が広い。また軽量で輸送しやすく、常温で長期間安定に保存することが可能である。

[0003] 酵素反応の中でもよく知られたものの一つに、ポリメラーゼによる配列特異的な核酸合成反応がある。PCRに代表される核酸増幅法はこの反応を利用しており、学術研究の場のみならず、遺伝子検査などにも活用されている。遺伝子検査試薬の中には、検体を添加するだけで反応が開始できるものもあり、乾燥試薬の場合には室温で長期間安定に保存できるものも存在する。

[0004] 核酸増幅反応の中には反応を最適化するためにアンモニウム塩を含むものが少なくない。例えば、等温増幅法であるLAMP法やSmart Amp法に使用されるBst DNAポリメラーゼやAac DNAポリメラーゼなどは一般的に反応溶液中に硫酸アンモニウムを含んでいる（非特許文献1、2）。

[0005] しかし、このようなアンモニウム塩を含む試薬を凍結乾燥すると、乾燥直後であっても再溶解した反応溶液の酵素活性が著しく低下することが以前から知られている。この問題に対し、酵素と緩衝剤またはその成分とアンモニウム塩とを接触させない、ないしは高濃度で接触させない状態で凍結乾燥し、反応時に混合するという手法が提案されている（特許文献1）。しかし製品形態に制約を課す可能性があるため、反応前に分離しておく必要の無い乾燥形態のアンモニウム塩含有酵素反応試薬は知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2006-129727号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Notomi et. al., Nucleic Acids Res., 28, 2000, e63

非特許文献2：Mitani et. al., Nat. Methods, 4, 2007, 257-262

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の課題は、上記従来技術の問題を解消し、反応時に系中に成分を補完する必要がなく、室温で安定に保存可能な乾燥形態のアンモニウム塩含有酵素反応試薬を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、アンモニウム塩を含む試薬を乾燥して再溶解する際に生じる酵素活性の低下を、グッド緩衝剤を用いることで抑制できることを見出し、本方法及び本試薬を発明した。

[0010] すなわち、本発明は以下の構成からなる。

(1) 少なくとも緩衝剤、アンモニウム塩、及び酵素から成る生化学的反応

試薬における、乾燥時の酵素活性低下を抑えるためのグッド緩衝剤の使用。

(2) 乾燥試薬組成物の製造方法であって、

a) 2.5 mMを超える濃度のグッド緩衝剤、アンモニウム塩、乾燥保護剤、及び核酸増幅酵素を含む試薬溶液の調製工程、

b) a)で調製した試薬溶液の乾燥工程を含む、乾燥試薬組成物の製造方法。

(3) 前記グッド緩衝剤の濃度が5 mM以上であることを特徴とする、(2)に記載の製造方法。

(4) 前記グッド緩衝剤が、BES、Bicine、CHES、DIPSO、EPPS、HEPES、HEPPSO、MOPS、POPSO、TAPS、TAPSO、TES、およびTricineからなる群のうち少なくとも1つである、(2)または(3)に記載の製造方法。

(5) 前記グッド緩衝剤が、BES、Bicine、HEPES、HEPPSO、POPSO、およびTricineからなる群のうち少なくとも1つである、(2)～(4)のいずれかに記載の製造方法。

(6) 前記グッド緩衝剤が、BicineまたはTricineである、(2)～(5)のいずれかに記載の製造方法。

(7) 前記アンモニウム塩が硫酸アンモニウムである、(2)～(6)のいずれかに記載の製造方法。

(8) 前記乾燥保護剤が、糖類、界面活性剤、水溶性ポリマー、タンパク質からなる群のうち少なくとも1つである、(2)～(7)のいずれかに記載の製造方法。

(9) (2)～(8)のいずれかに記載の製造方法で得られる核酸増幅反応用乾燥試薬組成物。

[0011] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2015-095535号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0012] 本発明により、反応時に系中に成分を補完する必要がなく、室温で安定に

保存可能な乾燥形態のアンモニウム塩含有酵素反応試薬を提供することができる。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明におけるグッド緩衝剤とは、緩衝剤のなかでも特に、両性イオン構造を分子内に有する化合物を含む緩衝剤を指し、その特徴的性質としては、化学的に安定であり、酸解離平衡がイオン組成の影響を受けにくい、あるいはまた、金属イオンとの錯形成能が小さいこと等が挙げられるが、これらと同様の性質を示すものであれば限定されない。

[0014] 本発明におけるグッド緩衝剤は、好ましくは、BES (N, N-Bis (2-hydroxyethyl) -2-aminoethanesulfonic acid)、Bicine (N, N-Bis (2-hydroxyethyl) glycine)、CHES (N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid)、DIPSO (3-[N, N-Bis (2-hydroxyethyl) amino] -2-hydroxy-1-propanesulfonic acid)、EP-PS (3-[4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperaziny] propanesulfonic acid)、HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperaziny] ethanesulfonic acid)、HEPPSO (2-Hydroxy-3-[4-(2-hydroxyethyl) -1-piperaziny] propanesulfonic acid)、MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid)、POPSO (Piperazine-1, 4-bis (2-hydroxy-3-propanesulfonic acid)、TAPS (N-Tris (hydroxymethyl) methyl-3-aminopropanesulfonic acid)、TAPSO (2-Hydroxy-N-tris (hydroxymethyl) methyl-3-aminopropanesulfonic acid)、TES (N-Tris

(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid), および Tricine (N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine) からなる群のうち少なくとも1つ、より好ましくは、BES、Bicine、HEPES、HEPPSO、POPSO、および Tricine からなる群のうち少なくとも1つであり、さらに好ましくは、Bicine、および Tricine である。本発明においてグッド緩衝剤は水和物、塩等の種々の形態のものを使用することができる。例えば、HEPPSOとして2-Hydroxy-3-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]propanesulfonic acid, monohydrateを使用することができ、POPSOとしてPiperazine-1, 4-bis(2-hydroxy-3-propanesulfonic acid, dihydrate)を使用することができる。

[0015] 本発明で用いられるグッド緩衝剤の濃度は、2.5 mMを超える値となるように設定することが好ましい。より好ましくは、5 mM以上に設定すると良い。そうすることで、酵素活性維持の十分な緩衝効果を得ることができる。一方、この値が2.5 mMを下回ると酵素活性維持の十分な緩衝効果が得られない可能性がある。その場合、酵素活性を回復させるために反応前に試薬を追加する必要性が生じうるが、例えば核酸増幅反応において、このような試薬追加の工程はコンタミネーションのリスクを増大させる危険性が高い。加えて、工程追加は製造コストの増加につながる。

[0016] また本発明で用いられるグッド緩衝剤の濃度は、125 mM以下に設定するのが好ましい。125 mMを超えると、酵素反応が阻害を受ける可能性がある。

[0017] 本発明で用いられるグッド緩衝剤のpHは、用いられる酵素の種類により様々であり、上記の個々の緩衝剤における緩衝域の範囲内であれば特に限定されないが、好ましくはpH 7.0以上、より好ましくはpH 7.5以上、より好ましくはpH 8.0以上であり、好ましくはpH 10.0以下、より

好ましくはpH 9.5以下、より好ましくはpH 9.0以下であり、具体的には、好ましくはpH 7.0～10.0、より好ましくはpH 7.5～9.5、最も好ましくはpH 8.0～9.0である。

[0018] 本発明で用いられるアンモニウム塩は、安息香酸アンモニウム、塩化アンモニウム、ギ酸アンモニウム、クエン酸三アンモニウム、クエン酸水素二アンモニウム、クエン酸二水素アンモニウム、酢酸アンモニウム、臭化アンモニウム、酒石酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、シュウ酸アンモニウム、チオシアン酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸水素二アンモニウム、リン酸二水素アンモニウムなどが好ましく、より好ましくは硫酸アンモニウムである。

[0019] 本発明で用いられるアンモニウム塩の濃度は特に限定されないが、好ましくは1 mM以上、より好ましく2 mM以上、より好ましくは5 mM以上であり、好ましくは50 mM以下、より好ましくは40 mM以下、より好ましくは25 mM以下であり、具体的には、好ましくは1～50 mM、より好ましくは2～40 mM、最も好ましくは5～25 mMである。この数値範囲外になると、酵素活性を向上させる効果が十分に得られなくなる可能性がある。

[0020] 本発明で用いられる酵素は、アンモニウム塩の存在によって乾燥時に酵素活性低下が懸念される酵素であれば特に限定されない。例えば、PCRや等温増幅法といった核酸増幅反応に用いられる核酸増幅酵素もその一種である。具体的には、Aac DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ、Tf1 DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼなどのDNAポリメラーゼがその一例である。なお、これらの核酸増幅酵素は逆転写能を有していても良い。

[0021] 本発明に用いられる酵素の濃度は目的とする反応が進む限りにおいて特に限定されないが、例えば核酸増幅反応においては、0.01 U以上または100 U以下が好ましく、0.1 U以上または50 U以下がさらに好ましく、1 U以上または10 U以下が最も好ましい。

[0022] 本発明における生化学的反応試薬の乾燥していない状態でのグッド緩衝剤の濃度、グッド緩衝剤のpH、アンモニウム塩の濃度、酵素の濃度は、それぞれ、上記の範囲から選択することが好ましい。同様に、本発明における試薬溶液の調製工程により調製される試薬溶液でのグッド緩衝剤の濃度、グッド緩衝剤のpH、アンモニウム塩の濃度、酵素の濃度は、それぞれ、上記の範囲から選択することが好ましい。

[0023] 本発明における生化学的反応試薬とは、ポリメラーゼによる核酸増幅反応、リガーゼによるライゲーション反応、抗体抗原反応、キナーゼによるリン酸化反応、アルキル基転移酵素によるアルキル化反応、ヌクレアーゼによる核酸分解反応、DNA相同組換え反応、プロテアーゼによるタンパク質分解反応を行う試薬が好ましく、より好ましくはポリメラーゼによる核酸増幅反応を行う試薬である。

[0024] 本発明における試薬溶液の調製工程は、グッド緩衝剤、アンモニウム塩、乾燥保護剤、及び核酸増幅酵素などを溶媒に溶解させる工程を意味する。溶媒としては水が好ましく、水としては蒸留水または脱イオン水が好ましく、滅菌蒸留水、滅菌脱イオン水がさらに好ましい。なお、本工程は低温で行うのが一般的であるが、工程の温度を調整してもよいし、工程を行う室内などの空間を低温に調整してもよい。

[0025] 本発明における乾燥工程は、真空乾燥、凍結乾燥、熱風乾燥、または噴霧乾燥などの手段で行うのが好ましく、より好ましい手段は凍結乾燥である。凍結乾燥は一般的な凍結乾燥装置を用いればよく、その条件は一般的な範囲で適宜決定できる。また、必要に応じて予備凍結を行ってもよい。

[0026] 本発明における酵素活性低下とは、乾燥後に溶解した溶液中における酵素の活性が、乾燥前の溶液中における酵素の活性より低下していることを示す。その一因としては、一般的な緩衝剤であるTris-HCl緩衝剤とアンモニウム塩を含む試薬を乾燥を経て再溶解すると、反応溶液のpHが酵素の至適pHから大きく変化することが考えられるが、原因は特に限定されない。

- [0027] また酵素の活性の測定方法は、それぞれの酵素によってさまざまであり、適宜その酵素に見合った測定方法を選択する必要がある。
- [0028] 例えば核酸増幅反応においては、PCRの増幅産物がある量に達したときのサイクル数であるCt (Threshold Cycle) 値や、等温増幅反応の増幅産物がある量に達したときの時間であるTt (Threshold Time) 値を用いることができる。
- [0029] これらの値は、SYBR Greenなどの蛍光性核酸インターカラーヤーや、Taqmanプローブなどの蛍光性核酸プローブを用いて増幅産物をリアルタイムにモニターすることにより得ることができる。
- [0030] 本発明における乾燥組成物は、生化学反応試薬から前記乾燥方法にて水分を除去し、目的の反応を行う際に水分の添加を必要とするものである。このときの水分とは、純水、緩衝液、塩溶液、タンパク質溶液、有機溶媒を含む。
- [0031] 本発明の乾燥組成物は、酵素活性をより強く保持する目的で、乾燥保護剤を含むことが好ましい。ここで用いられる乾燥保護剤としては、糖類や界面活性剤、水溶性ポリマー、タンパク質が挙げられる。
- [0032] 糖類としては、単糖類や二糖類、三糖類、低級オリゴ糖類、多糖類、ならびにこれらの誘導体を使用することができる。具体的には、単糖類であるアラビノース、グルコース、単糖類誘導体であるソルビトール、マンニトール、還元二糖類であるセロビオース、マルトース、ラクトース、非還元二糖類であるスクロース、トレハロース、三糖類であるラフィノース、マルトトリオース、低級オリゴ糖類であるマルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、多糖類であるデキストランが挙げられる。より好ましくは、アラビノース、スクロース、セロビオース、デキストラン、トレハロース、マルトース、マルトトリオース、ラクトース、ラフィノースなどが挙げられる。
- [0033] 界面活性剤としては、NP-40 (Nonidet P-40、(オクチルフェノキシ) ポリエトキシエタノール)、Tween 20 (ポリソルベ-

ト 20、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート)、T r i t o n X-100 (ポリ (オキシエチレン) オクチルフェニルエーテル)、水溶性ポリマーとしてはフィコール、ポリエチレングリコール、タンパク質としては牛血清アルブミンなどが好ましい。乾燥保護剤は任意の種類のを任意の割合で混合することができ、実施例の範囲に限定されることはない。

[0034] 乾燥保護剤の添加量は、乾燥組成物中において、好ましくは1 (w/v) %以上、より好ましくは2.5 (w/v) %以上であり、好ましくは30 (w/v) %以下、より好ましくは20 (w/v) %以下であり、具体的には、1~30 (w/v) %が好ましく、より好ましくは2.5~20 (w/v) %である。この数値範囲以下になると、十分な酵素活性維持の効果が得られない可能性があり、逆にこの数値範囲以上になると、酵素活性が阻害される可能性がある。

実施例

[0035] 以下に実施例を示して本発明を具体的に説明する。但し、本発明は実施例に限定されるものではない。なお、特に注釈しない場合、試薬は和光純薬株式会社から購入したものをを用いた。

(実施例1)

1 mLの脱イオン水に、20 mM グッド緩衝剤、10 mM 塩化カリウム、10 mM 硫酸アンモニウム (ナカライテスク株式会社製)、8 mM 硫酸マグネシウム (関東化学株式会社製)、1.4 mM デオキシヌクレオチド三リン酸 (株式会社ニッポンジーン製)、5% トレハロース (ナカライテスク株式会社製) を含む溶液を調製した。グッド緩衝剤としてはNaOHでpH8.0に調整したBES、Bicine、DIPSO (SIGMA-ALDRICH製)、EPPS、HEPES (GIBCO Laboratories製)、HEPPSO、MOPS、POPSO、TAPS、TAPSO (SIGMA-ALDRICH製)、TES (ナカライテスク株式会社製)、Tricine (ナカライテスク株式会社製) およびpH8.8に調整したCHESを用いた。この溶液を-40℃で1時間予備凍結した後、

10 Pa以下に減圧して−40℃で7時間、−10℃で12時間、10℃で3時間、25℃で1時間かけて凍結乾燥機（FDU-2110型およびDRC-1000型、東京理科器械株式会社製）にて凍結乾燥した。乾燥後、それぞれの乾燥試薬を脱イオン水で溶解し、pHメーターでpHを測定した後、乾燥前の値と比較した。再溶解時の脱イオン水の量は1 mLであった。結果を表1に示す。pH変化値は、乾燥後のpH値から、乾燥前のpHを引いた差を示す。

[0036] [表1]

	BES	Bicine	DISPO	EPPS	HEPES	HEPPSO	MOPS	POPSO
pH 変化値	-0.47	-0.39	-0.42	-0.38	-0.45	-0.39	-0.4	-0.33

	TAPS	TAPSO	TES	Tricine	Tris (8.0)	CHES	Tris (8.8)
pH 変化値	-0.76	-0.48	-0.46	-0.41	-0.85	-0.97	-1.18

[0037] (比較例1)

グッド緩衝剤の代わりにHClでpH8.0あるいはpH8.8に調整したTris緩衝剤（ナカライテスク株式会社製）を用いて、実施例1と同じ条件で凍結乾燥試薬を作製した。これらの乾燥試薬を脱イオン水で溶解し、pHメーターでpHを測定した後、乾燥前の値と比較した。結果を表1に示す。

[0038] 表1より、グッド緩衝剤を用いた場合、Tris緩衝剤を用いた場合と比較して、明らかなpH変化の抑制が見られた。

(実施例2)

25 μ Lの脱イオン水に、20 mM グッド緩衝剤、10 mM 塩化カリウム、10 mM 硫酸アンモニウム（ナカライテスク株式会社製）、8 mM 硫酸マグネシウム（関東化学株式会社製）、1.4 mM デオキシヌクレオチド三リン酸（株式会社ニッポンジーン製）、1.6 μ M プライマー1（配列番号1）、1.6 μ M プライマー2（配列番号2）、0.8 μ M プライマー3（配列番号3）、0.2 μ M プライマー4（配列番号4）、0.2 μ M プライマー5（配列番号5）、4 U Bst DNA ポリメ

ラーゼ（株式会社ニッポンジーン製）、5% トレハロース（ナカライテスク株式会社製）を含む溶液を調製した。グッド緩衝剤としてはNaOHでpH8.0に調整したBicine、HEPES（GIBCO Laboratories製）、HEPPSO、POPSO、TAPS、TAPSO（SIGMA-ALDRICH製）、TES（ナカライテスク株式会社製）、Tricine（ナカライテスク株式会社製）およびpH8.8に調整したCHESを用いた。この溶液を−40℃で1時間予備凍結した後、10Pa以下に減圧して−40℃で7時間、−10℃で12時間、10℃で3時間、25℃で1時間かけて凍結乾燥機（FDU-2110型およびDRC-1000型、東京理科器械株式会社製）にて凍結乾燥した。乾燥後、それぞれの乾燥試薬を脱イオン水で溶解して鋳型（1ng）を添加し、63℃で60分間インキュベートした。再溶解時の脱イオン水の量は25μLであった。反応の追跡をリアルタイム蛍光測定（LightCycler 96、ROCHE製）にて行い、反応速度の尺度となるTt値をLightCycler Softwareにて算出した。このTt値を乾燥前の値と比較した。結果を表2に示す。Tt変化値は、それぞれのグッド緩衝材について、乾燥後のTt値から、乾燥前のTt値を引いた差を示す。

[0039] [表2]

	Bicine	HEPES	HEPPSO	POPSO	TAPS	TAPSO	TES	Tricine
Tt 変化値	3.92	6.49	3.39	3.24	20.14	8.91	8.52	5.69

	Tris (8.0)	CHES	Tris (8.8)
Tt 変化値	24.11	5.25	17.2

[0040] （比較例2）

グッド緩衝剤の代わりにHClでpH8.0あるいはpH8.8に調整したTris緩衝剤（ナカライテスク株式会社製）を用いて、実施例2と同じ条件で凍結乾燥試薬を作製した。これらの乾燥試薬を脱イオン水で溶解して鋳型（1ng）を添加し、63℃で60分間インキュベートした。反応の追跡をリアルタイム蛍光測定（LightCycler 96、ROCHE製）

）にて行い、反応速度の尺度となる T_t 値を *Light Cycler Software* にて算出した。この T_t 値を乾燥前の値と比較した。結果を表 2 に示す。

[0041] 表 2 より、グッド緩衝剤を用いた場合、*Tris* 緩衝剤を用いた場合と比較して、明らかに T_t 値の変化が抑制された。

(実施例 3)

25 μ L の脱イオン水に、5～40 mM *Tricine*-NaOH (pH 8.0、濃度は表中に記載)、10 mM 塩化カリウム、10 mM 硫酸アンモニウム (ナカライテスク株式会社製)、8 mM 硫酸マグネシウム (関東化学株式会社製)、1.4 mM デオキシヌクレオチド三リン酸 (株式会社ニッポンジーン製)、1.6 μ M プライマー 1 (配列番号 1)、1.6 μ M プライマー 2 (配列番号 2)、0.8 μ M プライマー 3 (配列番号 3)、0.2 μ M プライマー 4 (配列番号 4)、0.2 μ M プライマー 5 (配列番号 5)、4 U *Bst* DNA ポリメラーゼ (株式会社ニッポンジーン製)、5% トレハロース (ナカライテスク株式会社製) を含む溶液を調製した。この溶液を -40℃ で 1 時間予備凍結した後、10 Pa 以下に減圧して -40℃ で 7 時間、-10℃ で 12 時間、10℃ で 3 時間、25℃ で 1 時間かけて凍結乾燥機 (FDU-2110 型および DRC-1000 型、東京理科器械株式会社製) にて凍結乾燥した。乾燥後、それぞれの乾燥試薬を脱イオン水で溶解して鋳型 (1 ng) を添加し、63℃ で 60 分間インキュベートした。再溶解時の脱イオン水の量は 25 μ L であった。反応の追跡をリアルタイム蛍光測定 (*Light Cycler* 96、ROCHE 製) にて行い、反応速度の尺度となる T_t 値を *Light Cycler Software* にて算出した。この T_t 値を乾燥前の値と比較した。結果を表 3 に示す。 T_t 変化値は、実施例 2 と同様に算出した。

[0042] [表 3]

	40mM	20mM	10mM	5mM	2.5mM	1mM
T_t 変化値	3.92	5.11	5.37	8.34	20 以上	20 以上

[0043] (比較例3)

2.5 mMあるいは1 mMのTricine-NaOHを用いて、実施例3と同じ条件で凍結乾燥試薬を作製した。これらの乾燥試薬を脱イオン水で溶解して鋳型(1 ng)を添加し、63℃で60分間インキュベートした。反応の追跡をリアルタイム蛍光測定(LightCycler 96、ROCHE製)にて行い、反応速度の尺度となるTt値をLightCycler Softwareにて算出した。このTt値を乾燥前の値と比較した。結果を表3に示す。

[0044] 表3より、2.5 mMを超える濃度の場合に、本発明は酵素活性を維持することが可能であった。

[0045] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 少なくとも緩衝剤、アンモニウム塩、及び酵素から成る生化学的反応試薬における、乾燥時の酵素活性低下を抑えるためのグッド緩衝剤の使用。
- [請求項2] 乾燥試薬組成物の製造方法であって、
a) 2.5 mMを超える濃度のグッド緩衝剤、アンモニウム塩、乾燥保護剤、及び核酸増幅酵素を含む試薬溶液の調製工程、
b) a)で調製した試薬溶液の乾燥工程を含む、乾燥試薬組成物の製造方法。
- [請求項3] 前記グッド緩衝剤の濃度が5 mM以上であることを特徴とする、請求項2に記載の製造方法。
- [請求項4] 前記グッド緩衝剤が、BES、Bicine、CHES、DIPSO、EPPS、HEPES、HEPPSO、MOPS、POPSO、TAPS、TAPSO、TES、およびTricineからなる群のうち少なくとも1つである、請求項2または3に記載の製造方法。
- [請求項5] 前記グッド緩衝剤が、BES、Bicine、HEPES、HEPPSO、POPSO、およびTricineからなる群のうち少なくとも1つである、請求項2～4のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項6] 前記グッド緩衝剤が、BicineまたはTricineである、請求項2～5のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項7] 前記アンモニウム塩が硫酸アンモニウムである、請求項2～6のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項8] 前記乾燥保護剤が、糖類、界面活性剤、水溶性ポリマー、タンパク質からなる群のうち少なくとも1つである、請求項2～7のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項9] 請求項2～8のいずれかに記載の製造方法で得られる核酸増幅反応用乾燥試薬組成物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/063648

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/48(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/48, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	WO 2012/121225 A1 (Kaneka Corp.), 13 September 2012 (13.09.2012), paragraphs [0080], [0121] to [0126], [0177] & US 2014/0058043 A1 paragraphs [0097], [0138] to [0143], [0194]	<u>2-9</u> 1
<u>Y</u> A	JP 10-503383 A (Gen-Probe Inc.), 31 March 1998 (31.03.1998), claim 21; examples 2, 4; page 18, lines 19 to 26 & WO 96/024664 A1 claim 21; examples 2, 4; page 14, line 31 to page 15, line 6	<u>2-9</u> 1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 July 2016 (04.07.16)

Date of mailing of the international search report
19 July 2016 (19.07.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/063648

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>Y</u> <u>A</u>	JP 2014-533934 A (Qiagen GmbH), 18 December 2014 (18.12.2014), claim 8; paragraphs [0041], [0067] & WO 2013/053855 A1 claim 8; page 13, lines 20 to 31; page 20, line 37 to page 21, line 39	<u>2-9</u> <u>1</u>
<u>Y</u> <u>A</u>	PCR, RT-PCR no Seikoritsu o Takameru tameni, [online], 2011.8, [retrieval date 30 June 2016 (30.06.2016)], Internet: <URL: https://www.qiagen.com/jp/resources/resourcedetail?id=86cb37aa-32f5-4989-a2aa-c741fdb853fd&lang=ja-jp >, page 6, fig. 6	<u>2-9</u> <u>1</u>

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12Q1/48(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. C12Q1/48, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>Y</u> A	WO 2012/121225 A1（株式会社カネカ）2012.09.13, 段落[0080], 段落[0121]-[0126], 段落[0177] & US 2014/0058043 A1, 段落[0097], 段落[0138]-[0143], 段落[0194]	<u>2-9</u> 1
<u>Y</u> A	JP 10-503383 A（ジェンープローブ・インコーポレーテッド） 1998.03.31, 請求項 21, 実施例 2, 実施例 4, 第 18 頁第 19-26 行 & WO 96/024664 A1, 請求項 21, 実施例 2, 実施例 4, 第 14 頁第 31 行-第 15 頁第 6 行	<u>2-9</u> 1

☑ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.07.2016

国際調査報告の発送日

19.07.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（ISA/J P）

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

野村 英雄

4 B

5804

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>Y</u> A	JP 2014-533934 A (キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング) 2014. 12. 18, 請求項 8, 段落[0041], 段落[0067] & WO 2013/053855 A1, 請求項 8, 第 13 頁第 20-31 行, 第 20 頁第 37 行-第 21 頁第 39 行	<u>2-9</u> 1
<u>Y</u> A	PCR および RT-PCR の成功率を高めるために, [online], 2011. 8, [検索日 2016. 6. 30], インターネット: <URL: https://www.qiagen.com/jp/resources/resourcedetail?id=86cb37aa-32f5-4989-a2aa-c741fdb853fd&lang=ja-jp >, 第 6 頁図 6	<u>2-9</u> 1