

【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26年1月23日(2014.1.23)

【公表番号】特表2013-515458(P2013-515458A)

【公表日】平成25年5月9日(2013.5.9)

【年通号数】公開・登録公報2013-022

【出願番号】特願2012-537100(P2012-537100)

【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25年11月26日(2013.11.26)

【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】

細胞培養培地中のマイコプラズマを検出する方法であって、  
細胞培養培地のアリコートを得るステップと、  
前記アリコート中のマイコプラズマ核酸を、存在する場合に増幅するために熱安定性 D N A ポリメラーゼを用いてリアルタイム核酸増幅反応を実施するステップであって、  
前記アリコート中の核酸がさらに精製されることがなく、  
前記増幅反応が、二本鎖 D N A の存在下で蛍光シグナルを生成する、インターカレートする蛍光色素を含むステップと、  
前記増幅反応の増幅産物の融解温度を検出するステップであって、前記増幅産物の存在が、前記細胞培養中のマイコプラズマの存在を示すステップと  
を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、前記実施ステップが、以下の縮重プライマー：  
G A A G A W A T G C C W T A T T T A G A A G A T G G (配列番号 1)、および  
C C R T T T T G A C T Y T T W C C A C C M A G T G G T T G T T G (配列番号 2)  
、  
を用いて、前記部分を増幅することを含み、  
ここで、W は A または T を表し、Y は C または T を表し、R は A または G を表し、M は A または C を表わすことを特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法において、前記反応が、1 つの順方向プライマーおよび 1 つの逆方向プライマー以外のプライマーを含有しないことを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法において、前記増幅反応がマイコプラズマ・アルギニニ (M y c o p l a s m a a r g i n i n i)、M . ピルム (M . p i r u m)、M . ホミニス (M . h o m i n i s)、M . ファーメンタンス (M . f e r m e n t a n s)、M . サルバリウム (M . s a l i v a r i u m)、M . オラーレ (M . o r a l e)、M . ヒオリ

ニス ( *M. hyorhina* )、およびアコレプラズマ・ライドラウィー ( *Acholeplasma laidlawii* ) のいずれでも、前記アリコート中に存在する場合に増幅することができることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の方法において、前記マイコプラズマ核酸が、少なくとも 50 ヌクレオチドの *rpoB* 遺伝子部分を含むことを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の方法において、前記検出ステップが、前記増幅産物をヌクレオチドシークエンシングするステップと、決定したヌクレオチド配列を様々なマイコプラズマ種のヌクレオチド配列と関連づけることにより、前記マイコプラズマを同定するステップとをさらに含むことを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の方法において、前記増幅反応が、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドを含まないことを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の方法において、前記ポリメラーゼが、配列非特異的 DNA 結合ドメインに連結されることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法において、前記配列非特異的 DNA 結合ドメインが、 *Sso7D* DNA 結合ドメインであることを特徴とする方法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の方法において、前記アリコートが、*Taq* ポリメラーゼの活性を少なくとも 10 % 阻害するために十分量の増幅阻害物質を含むことを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法において、前記阻害物質が、細胞片、細胞老廃物 (例えば多糖またはタンパク質)、およびウシ胎児血清またはその増幅阻害物質成分からなる群から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法において、前記増幅反応が、前記増幅反応の効率を改善するために十分量のオスモライトおよび / またはヘパリンを含むことを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法において、前記オスモライトが、サルコシン、トリメチルアミン N - オキシド ( *TMAO* )、ジメチルスルホニオプロピオナート、およびトリメチルグリシンからなる群から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 14】

細胞培養培地中のマイコプラズマを検出する方法であって、  
細胞培養培地のアリコートを得るステップと、  
前記アリコート中のマイコプラズマ核酸を、存在する場合に増幅するために DNA ポリメラーゼを用いて核酸増幅反応を実施するステップであって、

( a ) 前記実施ステップが第 1 および第 2 のプライマーを用いて前記部分を増幅することを含み、前記第 1 のプライマーが次の縮重配列：

G A A G A W A T G C C W T A T T T A G A A G A T G G ( 配列番号 1 )

を含み、かつ前記第 2 のプライマーが次の縮重配列：

C C R T T T T G A C T Y T T W C C A C C M A G T G G T T G T T G ( 配列番号 2 )

を含み、

ここで、W は A または T を表し、Y は C または T を表し、R は A または G を表し、M は A または C を表し、

( b ) 前記増幅反応の増幅産物の有無を検出し、増幅産物の存在が細胞培養物中のマイコプラズマの存在を示すステップと

を含むことを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の方法において、前記増幅反応が、リアルタイムでモニターされることを特徴とする方法。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の方法において、前記増幅反応が、二本鎖 DNA の存在下で、一本鎖 DNA のみの存在下で生成する蛍光シグナルの少なくとも 2 倍の蛍光シグナルを生成するインターカレートする蛍光色素を含むことを特徴とする方法。

【請求項 17】

請求項 14 に記載の方法において、前記第 1 および第 2 のプライマーが、それぞれ以下の縮重配列：

G A A G A W A T G C C W T A T T T A G A A G A T G G ( 配列番号 1 )、および

C C R T T T T G A C T Y T T W C C A C C M A G T G G T T G T T G ( 配列番号 2 )

からなることを特徴とする方法。

【請求項 18】

請求項 14 に記載の方法において、前記アリコート中の核酸がさらに精製されないことを特徴とする方法。

【請求項 19】

請求項 14 に記載の方法において、前記反応が、r p o B 遺伝子にハイブリダイズするように設計された、1つの順方向プライマーおよび1つの逆方向プライマー以外のプライマーを含有しないことを特徴とする方法。

【請求項 20】

請求項 14 に記載の方法において、前記検出ステップが、前記増幅産物をヌクレオチドシーケンシングするステップと、決定したヌクレオチド配列を様々なマイコプラズマ種のヌクレオチド配列と関連づけることにより、前記マイコプラズマを同定するステップとをさらに含むことを特徴とする方法。

【請求項 21】

請求項 14 に記載の方法において、前記増幅反応が、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドを含まないことを特徴とする方法。

【請求項 22】

請求項 14 に記載の方法において、前記ポリメラーゼが、配列非特異的 DNA 結合ドメインに連結されることを特徴とする方法。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の方法において、配列非特異的 DNA 結合ドメインが、S s o 7 DNA 結合ドメインであることを特徴とする方法。

【請求項 24】

請求項 14 に記載の方法において、前記増幅反応が、前記増幅反応の効率を改善するために十分量のオスモライトおよび/またはヘパリンを含むことを特徴とする方法。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の方法において、前記オスモライトが、サルコシン、トリメチルアミン N - オキシド ( T M A O )、ジメチルスルホニオプロピオナート、およびトリメチルグリシンからなる群から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 26】

細胞培養培地からのマイコプラズマ DNA を、存在する場合に増幅するためのキットであって、

G A A G A W A T G C C W T A T T T A G A A G A T G G ( 配列番号 1 ) を含む第 1 の縮重プライマー、および

C C R T T T T G A C T Y T T W C C A C C M A G T G G T T G T T G ( 配列番号 2 ) を含む第 2 の縮重プライマー

を含み、

ここで、WはAまたはTを表し、YはCまたはTを表し、RはAまたはGを表し、MはAまたはCを表す  
ことを特徴とするキット。

【請求項 27】

請求項 26 に記載のキットにおいて、前記第 1 のプライマーが、  
G A A G A W A T G C C W T A T T T A G A A G A T G G ( 配列番号 1 ) からなり、  
前記第 2 のプライマーが、  
C C R T T T T G A C T Y T T W C C A C C M A G T G G T T G T T G ( 配列番号 2 )  
からなることを特徴とするキット。

【請求項 28】

請求項 26 に記載のキットにおいて、  
ポリメラーゼ；  
インターカレートする蛍光色素；  
配列番号 1 または配列番号 2 によりプライムされる、ポリメラーゼにより増幅可能なポ  
リヌクレオチドを含む陽性対照ポリヌクレオチド  
の少なくとも 1 つまたは複数をさらに含むことを特徴とするキット。

【請求項 29】

請求項 26 ～ 28 のいずれか 1 項に記載のキットにおいて、前記キットが、マイコプラ  
ズマ r p o B 遺伝子の少なくとも 50 の連続したヌクレオチドを含む核酸を含む陽性対照  
試料をさらに含むことを特徴とするキット。

【請求項 30】

請求項 26 に記載のキットにおいて、オスモライトおよび / またはヘパリンをさらに含  
むことを特徴とするキット。

【請求項 31】

請求項 30 に記載のキットにおいて、前記オスモライトが、サルコシン、トリメチルア  
ミン N - オキシド ( T M A O )、ジメチルスルホニオプロピオナート、およびトリメチル  
グリシンからなる群から選択されることを特徴とするキット。

【請求項 32】

請求項 28 に記載のキットにおいて、前記ポリメラーゼが、配列非特異的 D N A 結合ド  
メインに連結されることを特徴とするキット。

【請求項 33】

請求項 32 に記載のキットにおいて、前記配列非特異的 D N A 結合ドメインが、S s o  
7 D N A 結合ドメインであることを特徴とするキット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

「耐熱性」ポリメラーゼは、当技術分野で一般に使用されるように使用され、例えば複  
数サイクルの P C R 反応で使用するのに有効となるように、高温（例えば 90 ）で活性  
を実質的に保持するポリメラーゼを指す。

[本発明1001]

細胞培養培地中のマイコプラズマを検出する方法であって、  
細胞培養培地のアリコートを得るステップと、  
前記アリコート中のマイコプラズマ核酸を、存在する場合に増幅するために熱安定性 D  
N A ポリメラーゼを用いてリアルタイム核酸増幅反応を実施するステップであって、  
前記アリコート中の核酸がさらに精製されることがなく、  
前記増幅反応が、二本鎖 D N A の存在下で蛍光シグナルを生成する、  
インターカレートする蛍光色素を含むステップと、

前記増幅反応の増幅産物の融解温度を検出するステップであって、前記増幅産物の存在が、前記細胞培養中のマイコプラズマの存在を示すステップとを含むことを特徴とする方法。

[本発明1002]

本発明1001の方法において、前記増幅反応がマイコプラズマ・アルギニニ (*Mycoplasma arginini*)、*M.ピルム* (*M. pirum*)、*M.ホミニス* (*M. hominis*)、*M.ファーマンタンス* (*M. fermentans*)、*M.サルバリウム* (*M. salivarium*)、*M.オラーレ* (*M. orale*)、*M.ヒオリニス* (*M. hyorhinitis*)、およびアコレプラズマ・ライドラウィー (*Acholeplasma laidlawii*)のいずれでも、前記アリコート中に存在する場合に増幅することができることを特徴とする方法。

[本発明1003]

本発明1001の方法において、前記マイコプラズマ核酸が、少なくとも50ヌクレオチドのrpoB遺伝子部分を含むことを特徴とする方法。

[本発明1004]

本発明1001の方法において、前記実施ステップが、以下の縮重プライマー：  
G A A G A W A T G C C W T A T T T A G A A G A T G G (配列番号1)、および  
C C R T T T T G A C T Y T T W C C A C C M A G T G G T T G T T G (配列番号2)

を用いて、前記部分を増幅することを含み、

ここで、WはAまたはTを表し、YはCまたはTを表し、RはAまたはGを表し、MはAまたはCを表わすことを特徴とする方法。

[本発明1005]

本発明1004の方法において、前記反応が、1つの順方向プライマーおよび1つの逆方向プライマー以外のプライマーを含有しないことを特徴とする方法。

[本発明1006]

本発明1001の方法において、前記検出ステップが、前記増幅産物をヌクレオチドシーケンシングするステップと、決定したヌクレオチド配列を様々なマイコプラズマ種のヌクレオチド配列と関連づけることにより、前記マイコプラズマを同定するステップとをさらに含むことを特徴とする方法。

[本発明1007]

本発明1001の方法において、前記増幅反応が、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドを含まないことを特徴とする方法。

[本発明1008]

本発明1001の方法において、前記ポリメラーゼが、配列非特異的DNA結合ドメインに連結されることを特徴とする方法。

[本発明1009]

本発明1008の方法において、前記配列非特異的DNA結合ドメインが、Sso7DNA結合ドメインであることを特徴とする方法。

[本発明1010]

本発明1001の方法において、前記アリコートが、Taqポリメラーゼの活性を少なくとも10%阻害するために十分量の増幅阻害物質を含むことを特徴とする方法。

[本発明1011]

本発明1010の方法において、前記阻害物質が、細胞片、細胞老廃物(例えば多糖またはタンパク質)、およびウシ胎児血清またはその増幅阻害物質成分からなる群から選択されることを特徴とする方法。

[本発明1012]

本発明1001の方法において、前記増幅反応が、前記増幅反応の効率を改善するために十分量のオスモライトおよび/またはヘパリンを含むことを特徴とする方法。

[本発明1013]

本発明1012の方法において、前記オスモライトが、サルコシン、トリメチルアミンN - オキシド ( T M A O )、ジメチルスルホニオプロピオナート、およびトリメチルグリシンからなる群から選択されることを特徴とする方法。

[本発明1014]

細胞培養培地中のマイコプラズマを検出する方法であって、  
細胞培養培地のアリコートを得るステップと、  
前記アリコート中のマイコプラズマ核酸を、存在する場合に増幅するためにDNAポリメラーゼを用いて核酸増幅反応を実施するステップであって、

( a ) 前記実施ステップが第1および第2のプライマーを用いて前記部分を増幅することを含み、前記第1のプライマーが次の縮重配列：

G A A G A W A T G C C W T A T T T A G A A G A T G G ( 配列番号1 )

を含み、かつ前記第2のプライマーが次の縮重配列：

C C R T T T T G A C T Y T T W C C A C C M A G T G G T T G T T G ( 配列番号2

)

を含み、

ここで、WはAまたはTを表し、YはCまたはTを表し、RはAまたはGを表し、MはAまたはCを表し、

( b ) 前記増幅反応の増幅産物の有無を検出し、増幅産物の存在が細胞培養物中のマイコプラズマの存在を示すステップと  
を含むことを特徴とする方法。

[本発明1015]

本発明1014の方法において、前記増幅反応が、リアルタイムでモニターされることを特徴とする方法。

[本発明1016]

本発明1015の方法において、前記増幅反応が、二本鎖DNAの存在下で、一本鎖DNAのみの存在下で生成する蛍光シグナルの少なくとも2倍の蛍光シグナルを生成するインターカレートする蛍光色素を含むことを特徴とする方法。

[本発明1017]

本発明1014の方法において、前記第1および第2のプライマーが、それぞれ以下の縮重配列：

G A A G A W A T G C C W T A T T T A G A A G A T G G ( 配列番号1 )、および

C C R T T T T G A C T Y T T W C C A C C M A G T G G T T G T T G ( 配列番号2 )

からなることを特徴とする方法。

[本発明1018]

本発明1014の方法において、前記アリコート中の核酸がさらに精製されないことを特徴とする方法。

[本発明1019]

本発明1014の方法において、前記反応が、r p o B遺伝子にハイブリダイズするように設計された、1つの順方向プライマーおよび1つの逆方向プライマー以外のプライマーを含有しないことを特徴とする方法。

[本発明1020]

本発明1014の方法において、前記検出ステップが、前記増幅産物をヌクレオチドシーケンシングするステップと、決定したヌクレオチド配列を様々なマイコプラズマ種のヌクレオチド配列と関連づけることにより、前記マイコプラズマを同定するステップとをさらに含むことを特徴とする方法。

[本発明1021]

本発明1014の方法において、前記増幅反応が、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドを含まないことを特徴とする方法。

[本発明1022]

本発明1014の方法において、前記ポリメラーゼが、配列非特異的DNA結合ドメインに連結されることを特徴とする方法。

[本発明1023]

本発明1022の方法において、配列非特異的DNA結合ドメインが、SSODNA結合ドメインであることを特徴とする方法。

[本発明1024]

本発明1014の方法において、前記増幅反応が、前記増幅反応の効率を改善するために十分量のオスモライトおよび/またはヘパリンを含むことを特徴とする方法。

[本発明1025]

本発明1024の方法において、前記オスモライトが、サルコシン、トリメチルアミンN-オキシド(TMAO)、ジメチルスルホニオプロピオナート、およびトリメチルグリシンからなる群から選択されることを特徴とする方法。

[本発明1026]

細胞培養培地からのマイコプラズマDNAを、存在する場合に増幅するためのキットであって、

G A A G A W A T G C C W T A T T T A G A A G A T G G (配列番号1)を含む第1の縮重プライマー、および

C C R T T T T G A C T Y T T W C C A C C M A G T G G T T G T T G (配列番号2)  
を含む第2の縮重プライマー

を含み、

ここで、WはAまたはTを表し、YはCまたはTを表し、RはAまたはGを表し、MはAまたはCを表す

ことを特徴とするキット。

[本発明1027]

本発明1026のキットにおいて、前記第1のプライマーが、

G A A G A W A T G C C W T A T T T A G A A G A T G G (配列番号1)からなり、

前記第2のプライマーが、

C C R T T T T G A C T Y T T W C C A C C M A G T G G T T G T T G (配列番号2)

からなることを特徴とするキット。

[本発明1028]

本発明1026のキットにおいて、

ポリメラーゼ；

インターカレートする蛍光色素；

配列番号1または配列番号2によりプライムされる、ポリメラーゼにより増幅可能なポリヌクレオチドを含む陽性対照ポリヌクレオチド

の少なくとも1つまたは複数をさらに含むことを特徴とするキット。

[本発明1029]

本発明1026~1028のいずれかのキットにおいて、前記キットが、マイコプラズマ r p o B 遺伝子の少なくとも50の連続したヌクレオチドを含む核酸を含む陽性対照試料をさらに含むことを特徴とするキット。

[本発明1030]

本発明1026のキットにおいて、オスモライトおよび/またはヘパリンをさらに含むことを特徴とするキット。

[本発明1031]

本発明1030のキットにおいて、前記オスモライトが、サルコシン、トリメチルアミンN-オキシド(TMAO)、ジメチルスルホニオプロピオナート、およびトリメチルグリシンからなる群から選択されることを特徴とするキット。

[本発明1032]

本発明1028のキットにおいて、前記ポリメラーゼが、配列非特異的DNA結合ドメインに連結されることを特徴とするキット。

[本発明1033]

本発明1032のキットにおいて、前記配列非特異的DNA結合ドメインが、Sso7DNA結合ドメインであることを特徴とするキット。