

【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22年9月16日(2010.9.16)

【公表番号】特表2010-501178(P2010-501178A)

【公表日】平成22年1月21日(2010.1.21)

【年通号数】公開・登録公報2010-003

【出願番号】特願2009-525578(P2009-525578)

【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 A

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成22年7月30日(2010.7.30)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 5】

表 7 に要約される結果は、然るべき I H H N V 鋳型が存在するとき、各プライマー / プロブセットについて然るべきサイズのアンプリコン産物が産生されたことを実証している。鋳型の最小検出レベルは、使用されるプライマー及びプロブに応じて 50 コピー / rxn であった。鋳型を含まない試料は、検出可能な産物を産生しなかった。

増幅 (C T) 及びアンプリコン産物の形成は、鋳型の出発濃度の対数にそれぞれ反比例及び正比例した。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 6】

【表 9】

表 7

合成標的を用いた PCR 増幅の結果

フォワード プライマー、 配列番号	リバース プライマー、 配列番号	鋳型の 配列番号	プロブの 配列番号	産物 サイズ (bp)	最小検出鋳型 (コピー / rxn)
7	8	12	18	116	50

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 7

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0127】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

- 1．配列番号1に記載の単離されたIHHNV診断用プライマー配列又は配列番号1と完全に相補的な単離核酸分子。
- 2．配列番号2に記載の単離されたIHHNV診断用プライマー配列又は配列番号2と完全に相補的な単離核酸分子。
- 3．配列番号3に記載の単離されたIHHNV診断用プライマー配列又は配列番号3と完全に相補的な単離核酸分子。
- 4．配列番号4に記載の単離されたIHHNV診断用プライマー配列又は配列番号4と完全に相補的な単離核酸分子。
- 5．配列番号5に記載の単離されたIHHNV診断用プライマー配列又は配列番号5と完全に相補的な単離核酸分子。
- 6．配列番号6に記載の単離されたIHHNV診断用プライマー配列又は配列番号6と完全に相補的な単離核酸分子。
- 7．配列番号7に記載の単離されたIHHNV診断用プライマー配列又は配列番号7と完全に相補的な単離核酸分子。
- 8．配列番号8に記載の単離されたIHHNV診断用プライマー配列又は配列番号8と完全に相補的な単離核酸分子。
- 9．IHHNVゲノム内の核酸の領域を増幅する核酸増幅反応をプライムする能力を有する、上記1～8のいずれかに記載の2つの異なるIHHNV診断用プライマー配列の対。
- 10．配列番号1及び2、配列番号3及び4、配列番号5及び6、配列番号7及び8、並びに配列番号1及び4からなる群から選択される、上記9に記載の2つの異なるIHHNV診断用プライマー配列の対。
- 11．上記9に記載のIHHNV診断用プライマー配列の少なくとも1つの対を含むIHHNVの検出用キット。
- 12．耐熱性ポリメラーゼ、4つの異なるデオキシヌクレオチド三リン酸の混合物、核酸結合性蛍光分子、試料内部対照プライマーの少なくとも1つの対、少なくとも1つの鋳型内部対照及び鋳型内部対照プライマーの少なくとも1つの対、並びにIHHNV診断用プライマー配列の少なくとも1つの対により増幅可能なIHHNVゲノム内の核酸の少なくとも1つの領域の一部分と相補的な配列を含むプローブからなる群から選択された少なくとも1つの試薬をさらに含む、上記10に記載のIHHNVの検出用キット。
- 13．試料中のIHHNVの存在を検出するための方法であって、
  - (i) IHHNVを含むことが疑われる試料からDNAを提供する工程、及び
  - (ii) 好適なハイブリダイゼーション条件下で、上記1～8のいずれかに記載の単離されたIHHNV診断用プライマー配列に由来するプローブにより上記DNAを探索する工程、を含み、ハイブリダイズ可能な核酸断片が同定されると、それがIHHNVの存在の確証となる、上記方法。
- 14．単離されたIHHNV診断用プライマー配列に由来するプローブが、配列番号1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、及びそれらの完全相補配列からなる群から選択される、上記13に記載の試料中のIHHNVの存在を検出するための方法。
- 15．プローブが3'末端に複製阻害部分を含む、上記13に記載の方法。
- 16．複製阻害部分が、ジデオキシヌクレオチド、3'デオキシヌクレオチド、ミスマッチヌクレオチド又はヌクレオチドの配列、3'リン酸基及び化学剤からなる群から選択される、上記15に記載の方法。
- 17．3'デオキシヌクレオチドがコルジセピンである、上記16に記載の方法。
- 18．試料中のIHHNVの存在を検出するための方法であって、

( i ) I H H N V を含むことが疑われる試料から D N A を提供する工程、及び

( ii ) 増幅産物が生成されるよう、上記 9 に記載の I H H N V 診断用プライマー配列の少なくとも 1 つの対により上記 D N A を増幅する工程、

を含み、増幅産物が存在すると、それが I H H N V の存在の確証となる上記方法。

19 . ( ii ) の増幅工程がポリメラーゼ連鎖反応を用いて行われる、上記 18 に記載の試料中の I H H N V の存在を検出するための方法。

20 . ( ii ) の増幅工程が核酸結合性蛍光剤又は蛍光標識プローブの存在下で行われ、増幅産物の存在が蛍光検出を用いて確認される、上記 18 に記載の試料中の I H H N V の存在を検出するための方法。

21 . 蛍光標識プローブが、配列番号 17 及び配列番号 18 からなる群から選択される、上記 20 に記載の方法。

22 . 試料内部対照プライマーの少なくとも 1 つの対が ( ii ) の増幅工程に含まれることにより試料内部対照産物が産生される、上記 18 に記載の方法。

23 . 試料内部対照プライマーの少なくとも 1 つの対が、配列番号 13、14 及び配列番号 15、16 からなる群から選択される、上記 22 に記載の方法。

24 . 鋳型内部対照プライマーの少なくとも 1 つの対及び少なくとも 1 つの鋳型内部対照が、( ii ) の増幅工程に含まれることにより鋳型内部対照産物が産生される、上記 18 に記載の方法。

25 . 試料中の I H H N V の量を定量するための方法であって、

( i ) I H H N V を含むことが疑われる試料から D N A を提供する工程、

( ii ) 核酸結合性蛍光剤又は蛍光標識プローブの存在下での少なくとも変性温度と伸長温度との間の熱サイクリングによって、上記 9 に記載の I H H N V 診断用プライマー配列の少なくとも 1 つの対により上記 D N A を増幅する工程、

( iii ) 上記熱サイクリング中に上記核酸結合性蛍光剤又は上記蛍光標識プローブにより生成される蛍光量を測定する工程、

( iv ) 上記核酸結合性蛍光剤又は上記蛍光標識プローブにより生成された蛍光量が基礎値を上回る固定閾値に達するときの閾値サイクル数を決定する工程、及び

( v ) 上記試料中の I H H N V について決定された上記閾値サイクル数を、既知の濃度の標準溶液を用いて決定された鋳型濃度の対数に対する閾値サイクル数の標準曲線と比較することにより、該試料中の I H H N V の量を計算する工程、

を含む、上記方法。

26 . 蛍光標識プローブが、配列番号 17 及び配列番号 18 からなる群から選択される、上記 25 に記載の方法。

27 . D N A 損傷又は I H H N V 不活化の評価に用いられる、上記 13、18、又は 25 のいずれかに記載の方法。

28 . エビの健康及び発育を向上させるために化学的処置と組み合わせて用いられる、上記 13、18、又は 25 のいずれかに記載の方法。

#### 【手続補正 4】

【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】

配列番号 1 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 1 と完全に相補的な単離核酸分子。

【請求項 2】

配列番号 2 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 2 と完全に相補的な単離核酸分子。

【請求項 3】

配列番号 3 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 3 と完全に相補的な単離核酸分子。

【請求項 4】

配列番号 4 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 4 と完全に相補的な単離核酸分子。

【請求項 5】

配列番号 5 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 5 と完全に相補的な単離核酸分子。

【請求項 6】

配列番号 6 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 6 と完全に相補的な単離核酸分子。

【請求項 7】

配列番号 7 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 7 と完全に相補的な単離核酸分子。

【請求項 8】

配列番号 8 に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列又は配列番号 8 と完全に相補的な単離核酸分子。

【請求項 9】

I H H N V ゲノム内の核酸の領域を増幅する核酸増幅反応をプライムする能力を有する、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の 2 つの異なる I H H N V 診断用プライマー配列の対。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の I H H N V 診断用プライマー配列の少なくとも 1 つの対を含む I H H N V の検出用キット。

【請求項 11】

試料中の I H H N V の存在を検出するための方法であって、

( i ) I H H N V を含むことが疑われる試料から D N A を提供する工程、及び

( ii ) 好適なハイブリダイゼーション条件下で、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の単離された I H H N V 診断用プライマー配列に由来するプローブにより上記 D N A を探索する工程、

を含み、ハイブリダイズ可能な核酸断片が同定されると、それが I H H N V の存在の確証となる、上記方法。

【請求項 12】

試料中の I H H N V の存在を検出するための方法であって、

( i ) I H H N V を含むことが疑われる試料から D N A を提供する工程、及び

( ii ) 増幅産物が生成されるよう、請求項 9 に記載の I H H N V 診断用プライマー配列の少なくとも 1 つの対により上記 D N A を増幅する工程、

を含み、増幅産物が存在すると、それが I H H N V の存在の確証となる上記方法。

【請求項 13】

試料中の I H H N V の量を定量するための方法であって、

( i ) I H H N V を含むことが疑われる試料から D N A を提供する工程、

( ii ) 核酸結合性蛍光剤又は蛍光標識プローブの存在下での少なくとも変性温度と伸長温度との間の熱サイクリングによって、請求項 9 に記載の I H H N V 診断用プライマー配列の少なくとも 1 つの対により上記 D N A を増幅する工程、

( iii ) 上記熱サイクリング中に上記核酸結合性蛍光剤又は上記蛍光標識プローブにより生成される蛍光量を測定する工程、

( iv ) 上記核酸結合性蛍光剤又は上記蛍光標識プローブにより生成された蛍光量が基礎値を上回る固定閾値に達するときの閾値サイクル数を決定する工程、及び

( v ) 上記試料中の I H H N V について決定された上記閾値サイクル数を、既知の濃度の標準溶液を用いて決定された鋳型濃度の対数に対する閾値サイクル数の標準曲線と比較

することにより、該試料中の I H H N V の量を計算する工程、  
を含む、上記方法。