

【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1月26日(2006.1.26)

【公表番号】特表2005-512577(P2005-512577A)

【公表日】平成17年5月12日(2005.5.12)

【年通号数】公開・登録公報2005-018

【出願番号】特願2003-554933(P2003-554933)

【国際特許分類】

<b>C 12 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>
<b>C 12 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>
<b>G 01 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>
<b>G 01 N</b>	<b>33/566</b>	<b>(2006.01)</b>
<b>G 01 N</b>	<b>1/28</b>	<b>(2006.01)</b>

【F I】

C 12 N	15/00	Z N A A
C 12 Q	1/68	A
G 01 N	33/53	M
G 01 N	33/566	
G 01 N	1/28	K
G 01 N	1/28	J

【手続補正書】

【提出日】平成17年12月1日(2005.12.1)

【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】

デオキシリボ核酸(DNA)増幅標的配列、1対のPCRプライマー、dNTP、および耐熱性ポリメラーゼを含有するPCR反応混合物を、鎖融解、プライマーアニーリングおよびプライマー伸長のPCR段階からなる熱サイクルに繰り返し供することを含んでなる非対称ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅方法であって、増幅の開始時に、(a)前記反応混合物が最大1,000,000コピーまでの増幅標的配列を含有すること、(b)PCRプライマー対が制限プライマーと余剰プライマーを含み、その際制限プライマーは最大200nMまでの濃度で存在し、余剰プライマーは制限プライマーより少なくとも5倍高い濃度で存在すること、(c)制限プライマーの初期の濃度調整融解温度が、余剰プライマーの初期の濃度調整融解温度に等しいか、またはそれより高いこと、(d)制限プライマーが前記標的配列に対し完全には相補的でない場合は、前記標的配列とハイブリダイズする制限プライマーの部分の濃度調整融解温度が、余剰プライマーの濃度調整融解温度より5℃以下低いこと、(e)余剰プライマーの伸長により生成されたアンプリコンの融解温度が、余剰プライマーの初期の濃度調整融解温度を18℃以下上回ること、(f)制限プライマーの消耗後に、余剰プライマーを用いる線形増幅の複数サイクルを含めるのに十分な回数、熱サイクルを繰り返すこと、を特徴とする方法。

【請求項2】

少なくとも2つの標的配列のための請求項1に記載の方法であって、前記反応混合物が各標的に対し1対のPCRプライマーを含有すること、全ての制限プライマーの初期の濃度調整融解温度が、全ての余剰プライマーの初期の濃度調整融解温度に等しいか、またはそれよ

り高いことを特徴とする方法。

【請求項3】

制限プライマーの初期の濃度調整融解温度が、余剰プライマーの初期の濃度調整融解温度より少なくとも3 高い、請求項1~2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項4】

前記反応混合物が10,000コピーまでの増幅標的配列を含有する、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

プライマーアニーリング段階の持続時間が30秒より長くならない、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

非対称ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅を用いて少なくとも1つのDNA増幅標的配列を検出するための均一アッセイ法であって、(a) 少なくとも1つの増幅標的配列、耐熱性DNAポリメラーゼ、dNTP、前記増幅標的配列を増幅するための各増幅標的配列に対し1対のPCRプライマー、および前記プライマーにより生成されたアンプリコンにハイブリダイズする少なくとも1つの標識ハイブリダイゼーションプローブを増幅の開始時に含有するPCR反応混合物を、鎖融解、プライマーアニーリングおよびプライマー伸長のPCR段階からなる熱サイクルに複数回供すること、(b) 少なくとも1つの前記増幅標的配列の存在を示すものとして少なくとも1つの前記プローブにより生じたシグナルを検出することを含んでなり、その際、(i)各PCRプライマー対は制限プライマーと余剰プライマーを含み、(ii)制限プライマーは最大200nMまでの濃度で存在し、各プライマー対において、余剰プライマーは制限プライマーの濃度より少なくとも5倍高い濃度で存在し、(iii)全ての制限プライマーの初期の濃度調整融解温度は、全ての余剰プライマーの初期の濃度調整融解温度に少なくとも等しく、(iv)各プライマー対において、アンプリコンの融解温度は余剰プライマーの初期の濃度調整融解温度を25 以下上回り、(v)制限プライマーの消耗後に、余剰プライマーを用いる線形増幅の複数サイクルを含めるのに十分な回数、熱サイクルを繰り返し、(vi)前記少なくとも1つのプローブは、余剰プライマーの伸長により生じた産物鎖の生成を示すシグナルを発する、ことを特徴とするアッセイ法。

【請求項7】

少なくとも1つの前記ハイブリダイゼーションプローブが、制限プライマーの伸長産物とハイブリダイズしつつ余剰プライマーの伸長の間にポリメラーゼによって加水分解され検出可能なシグナルを発する二重標識蛍光プローブである、請求項6に記載のアッセイ法。

【請求項8】

少なくとも1つのプローブが余剰プライマーの伸長産物にハイブリダイズし、かつハイブリダイゼーションの際にシグナルを発し、PCR増幅が線形増幅の少なくとも数サイクルの間、プライマー伸長後に追加の検出段階を含み、前記検出段階は前記少なくとも1つのプローブがハイブリダイズしてシグナルを発するのに十分低温で、かつ十分な時間にわたり行われ、プライマーアニーリングのPCR段階は前記少なくとも1つのプローブがハイブリダイズしてシグナルを発するほど低温でなく、かつ十分な時間にわたるものでもない、請求項6に記載のアッセイ法。

【請求項9】

前記少なくとも1つのプローブの初期の濃度調整融解温度が、指数期の増幅反応のアニーリング段階の平均温度より少なくとも5 低い、請求項8に記載のアッセイ法。

【請求項10】

検出段階が、反応の閾値サイクルの数サイクル前に開始される、請求項8または9に記載のアッセイ法。

【請求項11】

低温検出段階が30秒以内にわたるものである、請求項8~10のいずれか1項に記載のアッセイ法。

**【請求項 1 2】**

プライマーアニーリング段階の持続時間が30秒より長くない、請求項6～11のいずれか1項に記載のアッセイ法。

**【請求項 1 3】**

各プライマー対において、アンブリコンの融解温度が余剰プライマーの初期の濃度調整融解温度を18℃以下上回る、請求項6～12のいずれか1項に記載のアッセイ法。

**【請求項 1 4】**

各プライマー対において、制限プライマーの初期の濃度調整融解温度が余剰プライマーの初期の濃度調整融解温度より少なくとも3℃高い、請求項6～13のいずれか1項に記載のアッセイ法。

**【請求項 1 5】**

前記反応混合物が最大50,000コピーまでの少なくとも1つの増幅標的配列を含有する、請求項6～14のいずれか1項に記載のアッセイ法。

**【請求項 1 6】**

少なくとも1つの前記ハイブリダイゼーションプローブが、1つの対立遺伝子変異体のための第1のプローブおよび別の対立遺伝子変異体のための第2のプローブを含む、請求項6～15のいずれか1項に記載のアッセイ法。

**【請求項 1 7】**

検出段階がエンドポイント検出である、請求項6～16のいずれか1項に記載のアッセイ法。

**【請求項 1 8】**

検出段階がリアルタイム検出である、請求項6～16のいずれか1項に記載のアッセイ法。

**【請求項 1 9】**

所定のDNA配列の非対称ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅による均一アッセイ法のためのオリゴヌクレオチドセットであって、200nMを超えない濃度で使用することを意図した第1の量の制限プライマー、制限プライマーの濃度より少なくとも5倍高い濃度で使用することを意図した、第1の量より少なくとも5倍多い第2の量の余剰プライマー、および余剰プライマーの伸長により生じた産物鎖の生成を示すシグナルを発する標識ハイブリダイゼーションプローブを含んでなり、制限プライマーの意図した濃度調整融解温度が、余剰プライマーの意図した濃度調整融解温度に少なくとも等しいこと、アンブリコンの融解温度が、余剰プライマーの意図した濃度調整融解温度を25℃以下上回ること、を特徴とするオリゴヌクレオチドセット。

**【請求項 2 0】**

前記アンブリコンの融解温度が、余剰プライマーの意図した濃度調整融解温度を18℃以下上回る、請求項19に記載のオリゴヌクレオチドセット。

**【請求項 2 1】**

制限プライマーの意図した濃度調整融解温度が、余剰プライマーの意図した濃度調整融解温度を少なくとも3℃上回る、請求項19または20に記載のオリゴヌクレオチドセット。

**【請求項 2 2】**

第2の量が第1の量より少なくとも10倍多く、余剰プライマーが制限プライマーの濃度よりも少なくとも10倍高い濃度で使用されることが意図されている、請求項19～21のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドセット。

**【請求項 2 3】**

前記プローブが余剰プライマーの伸長により生じる伸長産物鎖とハイブリダイズし、かつハイブリダイゼーションの際にシグナルを発する、請求項19～22のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドセット。

**【請求項 2 4】**

前記プローブが第1の対立遺伝子に特異的な第1のハイブリダイゼーションプローブと第2の対立遺伝子に特異的な第2のハイブリダイゼーションプローブを含む、請求項19～23のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドセット。

**【請求項 25】**

前記プローブが意図したプローブ濃度で使用され、前記プローブの意図したプローブ濃度調整融解温度が、制限プライマーの意図した濃度調整融解温度より少なくとも5 低い、請求項19～24のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドセット。

**【請求項 26】**

少なくとも1つの予め選択したDNA增幅標的配列について均一ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)アッセイを行うための試薬キットであって、耐熱性DNAポリメラーゼ、dNTP、各標的配列に対し、最大200nMまでの濃度で使用される第1の量の制限プライマー、制限プライマーの濃度より少なくとも5倍高い濃度で使用される、第1の量より少なくとも5倍多い第2の量の余剰プライマー、および余剰プライマーの伸長により生じる産物の生成を示すシグナルを発する標識ハイブリダイゼーションプローブを含んでなり、ここにおいて、制限プライマーの初期の濃度調整融解温度が、余剰プライマーの初期の濃度調整融解温度に少なくとも等しいこと、アンプリコンの融解温度が余剰プライマーの初期の濃度調整融解温度を25以下上回ること、を特徴とするキット。

**【請求項 27】**

少なくとも2つの標的配列について多重アッセイを行うためのキットであり、全ての制限プライマーの初期の濃度調整融解温度が、全ての余剰プライマーの初期の濃度調整融解温度に少なくとも等しい、請求項26に記載のキット。

**【請求項 28】**

制限プライマーの初期の濃度調整融解温度が、余剰プライマーの初期の濃度調整融解温度より少なくとも3 高い、請求項26または27に記載のキット。

**【請求項 29】**

前記プローブが余剰プライマーの伸長産物とハイブリダイズし、ハイブリダイゼーションの際にシグナルを発する、請求項26～28のいずれか1項に記載のキット。

**【請求項 30】**

少なくとも1つの標的のための前記プローブが、1つの対立遺伝子変異体のための第1のプローブと第2の対立遺伝子変異体のための第2のプローブとを含む、請求項26～29のいずれか1項に記載のキット。

**【請求項 31】**

前記プローブの初期の濃度調整融解温度が、制限プライマーの初期の濃度調整融解温度より少なくとも10 低い、請求項26～30のいずれか1項に記載のキット。