

【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31年1月24日(2019.1.24)

【公開番号】特開2018-161129(P2018-161129A)

【公開日】平成30年10月18日(2018.10.18)

【年通号数】公開・登録公報2018-040

【出願番号】特願2018-95268(P2018-95268)

【国際特許分類】

C 1 2 Q	1/6848	(2018.01)
C 1 2 Q	1/686	(2018.01)
C 1 2 N	9/12	(2006.01)
C 1 2 N	15/10	(2006.01)
C 1 2 N	15/11	(2006.01)
C 0 7 K	14/195	(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q	1/6848	Z N A Z
C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 N	9/12	
C 1 2 N	15/10	2 3 0 Z
C 1 2 N	15/11	Z
C 0 7 K	14/195	

【手続補正書】

【提出日】平成30年12月3日(2018.12.3)

【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】

以下の(a)および(b)を反応組成に含む、塩基類似体を含む反応組成中における核酸増幅方法。

(a) 減少した塩基類似体検出活性を有するファミリーBに属するDNAポリメラーゼ変異体であって、配列番号1または配列番号2で示されるアミノ酸配列において、以下の(a1)から(a3)のいずれかで示される変異体であるポリペプチド：

(a1) 配列番号1または配列番号2で示されるアミノ酸配列の7、36、37、90～97および112～119番目のうち、少なくとも1つのアミノ酸の改変を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド

(a2) (a1)で示されるDNAポリメラーゼ変異体において、さらに、7、36、37、90～97および112～119番目以外の部位において少なくとも1つのアミノ酸が改変されており、そのアミノ酸配列と配列番号1との同一性が98%以上またはそのアミノ酸配列と配列番号2との同一性が98%以上であり、かつ、減少した塩基類似体検出活性を有するポリペプチド

(a3) (a1)で示されるDNAポリメラーゼ変異体において、さらに、7、36、37、90～97および112～119番目以外の部位において1～5個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されており、かつ、減少した塩基類似体検出活性を有するポリペプチド

(b) PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

g e n) の変異体であって、配列番号 1 1 または配列番号 1 2 で示されるアミノ酸配列において、下記 (x) および (y) で示される群の位置に存在するアミノ酸残基のうち少なくとも一つの改変を有し、かつ、増幅増強活性を示すポリペプチド。

(x) 8 2 、 8 4 および 1 0 9 番目のアミノ酸残基群

(y) 1 3 9 、 1 4 3 および 1 4 7 番目のアミノ酸残基群

【請求項 2】

ファミリー B に属する DNA ポリメラーゼの変異体が、配列番号 1 または配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の 7 、 3 6 、 9 3 番目に相当するアミノ酸のうち少なくとも 1 つのアミノ酸の改変を有する変異体である、請求項 1 に記載の核酸増幅方法。

【請求項 3】

ファミリー B に属する DNA ポリメラーゼの変異体が、配列番号 1 または配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の 7 、 3 6 、 9 3 番目に相当するアミノ酸のうち少なくとも 1 つのアミノ酸の改変を有する変異体であり、該改変が (i) ~ (i i i) に示すものである、請求項 1 又は 2 に記載の核酸増幅方法。

(i) 7 番目に相当するアミノ酸の改変が、 Y 7 A 、 Y 7 G 、 Y 7 V 、 Y 7 L 、又は Y 7 I のアミノ酸置換である。

(i i) 3 6 番目に相当するアミノ酸の改変が P 3 6 H 、 P 3 6 K 、又は P 3 6 R のアミノ酸置換である。

(i i i) 9 3 番目に相当するアミノ酸の改変が V 9 3 H 、 V 9 3 K 、又は V 9 3 R のアミノ酸置換である。

【請求項 4】

ファミリー B に属する DNA ポリメラーゼがさらに 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性領域を構成するアミノ酸のいずれかに、少なくとも 1 つのアミノ酸の改変を有する変異体である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の核酸増幅方法。

【請求項 5】

ファミリー B に属する DNA ポリメラーゼの 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性領域への改変が、配列番号 1 または配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の D 1 4 1 、 I 1 4 2 、 E 1 4 3 、 H 1 4 7 、 N 2 1 0 及び Y 3 1 1 に相当するアミノ酸のいずれかにおける少なくとも 1 つのアミノ酸の改変である、請求項 4 に記載の核酸増幅方法。

【請求項 6】

ファミリー B に属する DNA ポリメラーゼが、古細菌 (A r c h e a) 由来の DNA ポリメラーゼである請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の核酸増幅方法。

【請求項 7】

ファミリー B に属する DNA ポリメラーゼが、パイロコッカス (P y r o c o c c u s) 属またはサーモコッカス (T h e r m o c o c c u s) 属の細菌から単離される DNA ポリメラーゼである請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の核酸増幅方法。

【請求項 8】

P C N A 変異体が、配列番号 1 1 または配列番号 1 2 で示されるアミノ酸配列において、以下の (b 1) から (b 4) のいずれかの変異体である、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の核酸増幅方法。

(b 1) 1 4 3 番目に相当するアミノ酸を塩基性アミノ酸に置換された変異体

(b 2) 8 2 番目と 1 4 3 番目を共に中性アミノ酸に置換された変異体

(b 3) 1 4 7 番目を中性アミノ酸に置換された変異体

(b 4) 1 0 9 番目と 1 4 3 番目を共に中性アミノ酸に置換された変異体

【請求項 9】

P C N A 変異体が、配列番号 1 1 または配列番号 1 2 で示されるアミノ酸配列において、以下の (b 1) または (b 2) のいずれかのアミノ酸に置換された変異体である請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の核酸増幅方法。

(b 1) 1 4 3 番目のアミノ酸がアラニンまたはアルギニンに置換された変異体

(b 2) 1 4 7 番目のアミノ酸がアラニンまたはアルギニンに置換された変異体

【請求項 10】

反応組成中におけるdUTP濃度が0.5 μMから200 μMである、請求項1～9のいずれかに記載の核酸増幅方法。

【請求項 11】

精製工程を経ていない生体試料を核酸増幅反応液に添加し、生体試料中の標的核酸を増幅する、請求項1～10のいずれかに記載の核酸増幅方法。

【請求項 12】

生体試料が、動植物組織、体液、排泄物、細胞、細菌およびウイルスよりなる群から選択されるいずれかである、請求項11に記載の核酸増幅方法。

【請求項 13】

以下の(a)から(e)を含む、核酸増幅反応試薬。

(a)配列番号1または配列番号2で示されるアミノ酸配列において、以下の(a1)から(a3)のいずれかで示される変異体であるポリペプチド：

(a1)配列番号1または配列番号2で示されるアミノ酸配列の7、36、37、90～97および112～119番目のうち、少なくとも1つのアミノ酸の改変を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド

(a2)(a1)で示されるDNAポリメラーゼ変異体において、さらに、7、36、37、90～97および112～119番目以外の部位において少なくとも1つのアミノ酸が改変されており、そのアミノ酸配列と配列番号1との同一性が98%以上またはそのアミノ酸配列と配列番号2との同一性が98%以上であり、かつ、減少した塩基類似体検出活性を有するポリペプチド

(a3)(a1)で示されるDNAポリメラーゼ変異体において、さらに、7、36、37、90～97および112～119番目以外の部位において1～5個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されており、かつ、減少した塩基類似体検出活性を有するポリペプチド

(b)配列番号11または配列番号12で示されるアミノ酸配列において、下記(x)および(y)で示される群の位置に存在するアミノ酸残基のうち少なくとも一つの改変を有し、かつ、増幅増強活性を示すPCNA変異体。

(x)82、84および109番目のアミノ酸残基群

(y)139、143および147番目のアミノ酸残基群

(c)プライマー対

(d)デオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)

(e)マグネシウムイオンを含むバッファー溶液

【請求項 14】

請求項13に記載の核酸増幅反応試薬を含むキット。