

【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 (a 1) から (a 3) のいずれかで示される変異体であるポリペプチド：

(a 1) 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

(a 2) (a 1) 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

(a 3) (a 1) 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 Anti

gen)の変異体であって、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ポリペプチド。

(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

【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、36、93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、36、93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)~(iii)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、Y7A、Y7G、Y7V、Y7L、又はY7Iのアミノ酸置換である。

(ii) 36番目に相当するアミノ酸の改変がP36H、P36K、又はP36Rのアミノ酸置換である。

(iii) 93番目に相当するアミノ酸の改変がV93H、V93K、又はV93R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D141、I142、E143、H147、N210及びY311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(Archaea)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(Pyrococcus)属またはサーモコッカス(Thermococcus)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】

PCNA変異体が、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、以下の(b1)から(b4)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。

(b1) 143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

(b2) 82番目と143番目を共に中性アミノ酸に置換された変異体

(b3) 147番目を中性アミノ酸に置換された変異体

(b4) 109番目と143番目を共に中性アミノ酸に置換された変異体

【請求項9】

PCNA変異体が、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、以下の(b1)または(b2)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。

(b1) 143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

(b2) 147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 d U T P 濃度が 0 . 5  $\mu$  M から 2 0 0  $\mu$  M 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 ( a 1 ) から ( a 3 ) のいずれかで示される変異体であるポリペプチド：

( a 1 ) 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

( a 2 ) ( a 1 ) 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

( a 3 ) ( a 1 ) 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 ( d N T P )

( 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。