

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-534722

(P2016-534722A)

(43) 公表日 平成28年11月10日 (2016. 11. 10)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2016-526138 (P2016-526138) (86) (22) 出願日 平成26年10月30日 (2014. 10. 30) (85) 翻訳文提出日 平成28年4月21日 (2016. 4. 21) (86) 国際出願番号 PCT/GB2014/053238 (87) 国際公開番号 W02015/063498 (87) 国際公開日 平成27年5月7日 (2015. 5. 7) (31) 優先権主張番号 1319180.4 (32) 優先日 平成25年10月30日 (2013. 10. 30) (33) 優先権主張国 英国 (GB)	(71) 出願人 516120722 マスト グループ リミティド 英国 L 2 O 1 E A マーजीサイド リバプール ブートル ダービーロード マストハウス P O B o x (74) 代理人 100112874 弁理士 渡邊 薫 (72) 発明者 スワラ、モニカ イウォナ 英国 L 2 2 1 S W マーजीサイド ウォータールー メルローズ パーク フ ラット 6 (72) 発明者 ジェーブド、サジド 英国 S K 1 O 2 B L チェシャー マ ックルズフィールド ローワン ウェイ 4 最終頁に続く
---	--

(54) 【発明の名称】 核酸プローブ

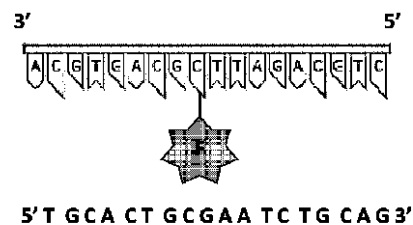
(57) 【要約】

本発明は、LAMP検出方法における使用の為の新規プローブを提供する。該プローブは、患者におけるchlamydia及びgonorrheaの感染の検出に特に有用である。

【選択図】 なし

FIG1

Schematic of MAST DNA probe



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的核酸配列の領域に相補的なオリゴヌクレオチドプローブ配列を含む等温核酸増幅の為のプローブであって、該オリゴヌクレオチドプローブ配列がただ 1 つの蛍光体標識を有し、且つ、該標識が内部シトシン塩基に結合されており、且つ、該オリゴヌクレオチドプローブ配列が 3' 末端ターミネーターを有さない前記プローブ。

【請求項 2】

該シトシン塩基が、オリゴヌクレオチドの長さ方向において、3' 末端の 1～3 位及び 5' 末端の 1 位以外で、実質的に中央に配置されている、請求項 1 に記載のプローブ。

【請求項 3】

該オリゴヌクレオチドプローブ配列が DNA 配列であり、且つ、該標的核酸配列が DNA 配列である、請求項 1 又は 2 に記載のプローブ。

【請求項 4】

前記蛍光体が FAM、JOE、TET、HEX、TAMRA、ROX、ALEXA、及び ATTO から選ばれる 1 またはそれより多くを含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のプローブ。

【請求項 5】

前記蛍光体が FAM、Joe、又は Alexa546 である、請求項 4 に記載のプローブ。

【請求項 6】

以下の配列を含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のプローブ、

5' X_n C * X_m 3' (配列 ID NO. 1)

ここで、n は > 1、m > 3、X はヌクレオチド塩基であり、且つ * は蛍光体である。

【請求項 7】

該ヌクレオチド塩基が、A、T、C、及び G から選ばれるものであり、n は 1 超～20 以下であり、より好ましくは 1 超～10 以下であり、m は 3 超～20 以下であり、好ましくは 3 超～10 以下である、請求項 6 に記載のプローブ。

【請求項 8】

以下の配列の 1 又はそれより多くを含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載のプローブ。

配列 ID NO. 3: TAAGATAAC[C-FAM]CCGCACGTG (CT PB1-FAM 内部)

配列 ID NO. 5: GCGAACATA [C-ALEXA546] CAGCTATGATCAA (GC porA7-joe loopF) 又は

配列 ID NO. 6: ATGTTCA [C-JOE] CATGGCGGAG (GC glnA7-ALEXA546 loopB)

【請求項 9】

該標的核酸が、微生物、菌類、酵母又はウィルス由来のものである、請求項 1～8 のいずれか一項に記載のプローブ。

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載のループ媒介等温増幅プローブ。

【請求項 11】

試料中の標的核酸配列を検出する方法であって、

該試料中の標的核酸を増幅して、増幅された核酸を用意すること、

請求項 1～10 のいずれか一項に記載のプローブで該増幅された核酸をプローブすること、及び、

該標的核酸の存在を検出すること

を含み、該プローブの蛍光の増加が該試料中の該標的核酸の存在を示す、前記方法。

【請求項 12】

該標的核酸が、微生物、菌類、酵母、又はウィルス由来のものである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

該標的核酸が、Chlamydia trachomatis又はNeisseria gonorrhoeae由来のものである、請求項 1 1 又は 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

患者におけるChlamydia及び／又はGonorrheaの感染を診断する方法であって、

該患者から得られた試料を用意すること、

該試料に請求項 1 ～ 1 0 の 1 またはそれより多くのプローブを添加すること、及び

Chlamydia trachomatis及び／又はNeisseria gonorrhoeaeから得られた核酸の存在を検出すること

10

を含み、ここで該プローブの蛍光の増加が、Chlamydia trachomatis及び／又はNeisseria gonorrhoeaeの感染の存在を示す、前記方法。

【請求項 1 5】

Chlamydia trachomatis又はNeisseria gonorrhoeae由来の核酸に特異的な 1 種類のプローブが該試料に添加される、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

少なくとも 2 つの異なるプローブが該試料に添加され、ここで第 1 のプローブが第 1 の蛍光標識により標識されており且つChlamydia trachomatis核酸をプローブする為に特異的であり、且つ、第 2 のプローブが該第 1 のプローブと異なる蛍光標識により標識されており且つNeisseria gonorrhoeae核酸をプローブする為に特異的である、請求項 1 4 に記載の方法。

20

【請求項 1 7】

該プローブが、dNTPを1～10mMの濃度で、1 またはそれより多くの塩を各塩について2～20 mMの濃度で、Tris pH8.8を10～100mMの濃度で、トレハロースを10～100mMの濃度で、BSTポリメラーゼを1U～12Uの量で、及び0.01%～1%の1,2プロパンジオールを含むバッファー系中に用意される、請求項 1 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 1 またはそれより多くの塩が、KCl、(NH₄)₂SO₄、及びMgSO₄からなる群から選ばれるものである、請求項 1 7 に記載の方法。

30

【請求項 1 9】

請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載のプローブ、ループ媒介等温増幅試薬バッファー、酵素、dNTP及び 1 またはそれより多くのループ媒介等温増幅プライマーを含む、標的核酸を検出する為のキット。

【請求項 2 0】

陽性対照及び陰性対照をさらに含む、請求項 1 9 に記載のキット。

【請求項 2 1】

該試薬バッファーが、dNTPを1～10mMの濃度で、1 またはそれより多くの塩を2～20mMの濃度で、Tris pH8.8を10～100mMの濃度で、トレハロースを10～100mMの濃度で、BSTポリメラーゼを1U～12Uの量で、及び、0.01%～1%の 1,2プロパンジオールを含む、請求項 1 9 又は 2 0 に記載のキット。

40

【請求項 2 2】

前記 1 またはそれより多くの塩が、KCl、(NH₄)₂SO₄及びMgSO₄からなる群から選ばれる、請求項 2 1 に記載のキット。

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸の検出の為のプロープに関し、該プロープを使用する方法及びパーツキット (kit of parts) に関する。好ましくは、本発明のプロープは、Chlamydia trachomatis及び／又はNeisseria gonorrhoeaeから得られた核酸の検出の為の方法において有用であり、及び、Chlamydia及び／又はGonorrhoeaの感染の診断において用いられうる。

【背景技術】

【0002】

核酸増幅は、臨床医学などの適用志向性の分野を含むライフサイエンス分野において最も価値あるツールの一つであり、これにおいて感染症、遺伝子疾患及び遺伝形質の診断が特に利益を受ける。広く用いられるPCRに基づく検出 (Saiki R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Science, 230, 1350-1354) に加えて、いくつかの増幅方法が発明されてきた。例は、核酸配列に基づく増幅 (NASBA)、自家持続配列複製 (3SR)、及びループ媒介等温増幅 (loop-mediated isothermal amplification) を包含する。PCRは、二本鎖DNA産物の熱変性を用いて、次の回のDNA合成を促進する。3SR及びNASBAは、転写反応及び逆転写反応のセットを用いて標的配列を増幅することにより熱変性を省く。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Saiki R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Science, 230, 1350-1354

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

これらの方法は、同様の程度で標的核酸を増幅することができ、全て10コピー未満の検出限界を有し及び1時間以内程度である。それらは、標的配列選択の乏しい特異性の故に、増幅の為の精密な機器又は増幅産物の検出の為の複雑な方法を必要とする。その単純性及び得られる増幅程度にもかかわらず、PCRにおける高く精密なサーマルサイクラーについての要求が、この強力な方法が例えば民間の病院における通常の診断ツールなどとして広く使用されることを阻害する。対照的に、LAMPは、数コピーのDNAを100超へと、1時間未満で、等温条件下で且つより大きな特異性ととも増幅することができる方法である。

【0005】

上記で示された、分子プロープに基づく他の技術を用いたときと同様に、ループ媒介等温増幅 (LAMP) アッセイは、試料中の特定の微生物の存在を検出する為に用いられうる。しかしながら、その検出方法は、直接的な視覚的検出、濁度、又は非特異的なDNAインターカレート染料を介することに基づく。直接的な視覚的測定は、エンドポイント測定であり及びリアルタイム分析を提供することができない。濁度及び非特異的インターカレート染料は、起こる増幅のリアルタイム分析を提供するが、これは非特異的であり、すなわち、全ての増幅が、これが真の陽性増幅であるか又は誤ったプライミング、クロス特異性に起因する偽の増幅であるかにかかわらず検出される。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の第一の局面に従い、標的核酸配列の領域に相補的なオリゴヌクレオチドプロープ配列を含む、等温核酸増幅の為のプロープが提供され、ここで該オリゴヌクレオチドプロープ配列は、一つだけ蛍光体リガンドを有し且つ該リガンドが内部シトシン塩基に結合されており且つ該オリゴヌクレオチドプロープ配列は3'末端ターミネーターを有さない。

【0007】

好ましい実施態様において、オリゴヌクレオチドプロープ配列はDNA配列であり且つ該

10

20

30

40

50

標的核酸配列はDNA配列である。

【0008】

好ましくは、蛍光が増加して、試料中の該標的核酸の存在を示す。

【発明の効果】

【0009】

該シトシン塩基は好ましくは、該オリゴヌクレオチドの長さ方向において実質的に中央に配置される。プローブを内部にシトシン塩基において標識することに関連付けられる特定の利益がある。等温反応において増幅されたDNA産物の特異性は、融解曲線分析を用いて確認されうる。しかしながら、この反応において生成された多数の産物変異体及び融解曲線分析の低い解像度の故に、V13のようなインターカレート染料を用いた場合、等温条件下で生成された特異的DNA産物と非特異的DNA産物とを区別することは非常に困難である。TaqMan（商標）プローブなどの一般に用いられるプローブは、BSTポリメラーゼの鎖置換活性（strand displacement activity）の故に、LAMP技術に適合しない。本発明のプローブは伸長され及び等温増幅の間にDNA産物内に組み込まれ、これが、生成産物に対して融解曲線分析を行うことを許す。本発明のプローブにおいて、該蛍光体は、アンチセンス鎖中のグアニンに相補的な内部シトシンに結合される。グアニンは、多くの蛍光体の励起状態に影響し、独特の融解曲線の特徴の形成を結果し、及び、等温条件下で生成された特異的産物及び非特異的産物とを区別することを許す。

10

【図面の簡単な説明】

【0010】

20

【図1】本発明のDNAプローブの模式図である。

【図2A】V6. 21バッファー中でCT PB1プライマーを用いて生成された増幅プロットを示す図である。

【図2B】V6. 21バッファー中でGC glnA7プライマーを用いて生成された増幅プロットを示す図である。

【図2C】V6. 21バッファー中でGC porA7プライマーを用いて生成された増幅プロットを示す図である。

【図2D】V6. 21pバッファー中でCT PB1プライマーを用いて生成された増幅プロットを示す図である。

【図2E】V6. 21pバッファー中でGC glnA7プライマーを用いて生成された増幅プロットを示す図である。

30

【図2F】V6. 21pバッファー中でGC porA7プライマーを用いて生成された増幅プロットを示す図である。

【図3A】FAMを結合したCT PB1内部プローブの存在下においてCT PB1により生成されたLAMP産物の融解曲線分析を示す図である。

【図3B】FAMを結合したCT PB1内部プローブの存在下においてCT PB1により生成されたLAMP産物の融解曲線分析を示す図である。

【図4A】JOEを結合したGC glnA7ループプローブの存在下においてGC glnA7プライマーを用いて生成されたLAMP産物の融解曲線分析を示す図である。

【図4B】JOEを結合したGC glnA7ループプローブの存在下においてGC glnA7プライマーを用いて生成されたLAMP産物の融解曲線分析を示す図である。

40

【図5A】ALEXA546を結合したGC porA7ループプローブの存在下におけるGC porA7プライマーを用いて生成されたLAMP産物の融解曲線分析を示す図である。

【図5B】ALEXA546を結合したGC porA7ループプローブの存在下におけるGC porA7プライマーを用いて生成されたLAMP産物の融解曲線分析を示す図である。

【図6A】ループ媒介等温増幅において本発明のプローブによりDNA産物特異性を確認する為の試験の結果を示す図である。

【図6B】ループ媒介等温増幅において本発明のプローブによりDNA産物特異性を確認する為の試験の結果を示す図である。

【図6C】ループ媒介等温増幅において本発明のプローブによりDNA産物特異性を確認

50

する為の試験の結果を示す図である。

【図 6 D】ループ媒介等温増幅において本発明のプロープにより DNA 産物特異性を確認する為の試験の結果を示す図である。

【図 7】CT PB1プライマーにより、V13を含むV6.21pバッファーにおいて又はV13染料を有さないV6.21pバッファーにおいて、FAMを結合した内部C及び3'ターミネーターを有するCT PB1末端プロープ（ループ領域に相補的である）の存在下において生成された増幅プロットを示す図である。

【図 8 A】CT PB1プライマー及びFAMを結合した内部シトシンを有するCT PB1末端プロープの存在下において、ROX含有V6.21pバッファーにおいて生成された増幅プロットを示す図である。

10

【図 8 B】ユニバーサルプライマー及びFAMを結合した内部シトシンを有する3'UPプロープの存在下において、ROX含有V6.21pバッファーにおいて生成された増幅プロットを示す図である。

【図 9 A】CT PB1プライマーを用いて、V13無しのV6.21pにおいて、FAMを結合した内部Cを有するCT PB1内部プロープ及び参照染料(ROX)の存在下において生成された増幅プロットを示す図である。

【図 9 B】CT PB1プライマーを用いて、V13無しのV6.21pにおいて、FAMを結合した内部Cを有するCT PB1内部プロープ及び参照染料(ROX)の存在下において生成された増幅プロットを示す図である。

【図 9 C】CT PB1プライマーを用いて、V13無しのV6.21pにおいて、FAMを結合した内部Cを有するCT PB1内部プロープ及び参照染料(ROX)の存在下において生成された増幅プロットを示す図である。

20

【図 10 A】CT PB1-FAMプロープ特異性の確認を示す図である。

【図 10 B】CT PB1-FAMプロープ特異性の確認を示す図である。

【図 10 C】CT PB1-FAMプロープ特異性の確認を示す図である。

【図 11 A】APTIMA CTアッセイに対するCT PB1-FAMプロープの確認を示す図である。

【図 11 B】APTIMA CTアッセイに対するCT PB1-FAMプロープの確認を示す図である。

【図 12 A】CT/GCマルチプレックスにおいてCT PB1-FAM + GC porA7-Alexa546プロープを用いて生成された増幅プロットを示す図である。

【図 12 B】CT/GCマルチプレックスにおいてCT PB1-FAM + GC porA7-Alexa546プロープを用いて生成された増幅プロットを示す図である。

30

【発明を実施するための形態】

【0011】

該オリゴヌクレオチドは、3'末端にddNTPを含まず、これが標識されたオリゴヌクレオチドのアンプリコン内への組み込みを可能とする。すなわち、該プロープの3'末端が「ブロック」されない。

【0012】

該蛍光体は、以下から選ばれるいずれか一つ又はそれより多くを含みうる：FAM, JOE, TE T, HEX, TAMRA, ROX, ALEXA及びATTO。

【0013】

該プロープは以下の配列を含みうる：

5' Xn C* Xm 3' (配列ID NO. 1)

ここでnは>1であり、mは>3であり、Xはヌクレオチド塩基であり；且つ*は蛍光体である。

好ましくは該ヌクレオチド塩基は、A、T、C、及びGから選ばれる。好ましくは、nは1超～20又はそれより少なく、より好ましくは1超～10又はそれより少ない。好ましくは、mは3超～20又はそれより少なく、より好ましくは3超～10又はそれより少ない。先の範囲によってn又はmがとりうる可能なヌクレオチド数によりカバーされるプロープの長さの全ての組合せが開示されることが意図される。

【0014】

好ましくは、該プロープは、以下の配列のいずれか一つから選択される配列を含みうる：

50

配列 ID NO. 3: TAAGATAAC[C-FAM]CCGCACGTG (CT PB1-FAM 内部)

配列 ID NO. 5: GCGAACATA [C-ALEXA546] CAGCTATGATCAA (GC porA7-joe ループ F) 又は

配列 ID NO. 6: ATGTTCA [C-JOE] CATGGCGGAG (GC glnA7-ALEXA546 ループ B).

【0015】

該蛍光は好ましくは、該オリゴヌクレオチドが該標的核酸配列内に組み込まれたときに増加され、これが該アンプリコン-プローブ複合体の構成における変化を結果し、蛍光体励起状態の変化をもたらす。

10

【0016】

該蛍光体リガンドに結合した該シトシンは、5'若しくは3'末端に配置されず又は5'若しくは3'末端に隣接しない。より好ましくは、該シトシンは、5'又は3'末端のいずれかから最初の3つの塩基内に配置されない。好ましくは、該蛍光体に結合した該シトシンは、該プローブの中央の塩基に配置される。

【0017】

本発明のさらなる局面に従い、本明細書内上記に記載されたとおりの等温核酸増幅プローブが提供される。

20

【0018】

本発明のさらなる局面に従い、本明細書内上記に記載されたとおりのループ媒介等温増幅プローブが提供される。

【0019】

核酸の混合物中の少なくとも一つの標的核酸を決定する為の方法及び組成物は一般にプローブ、ハイブリダイズ試薬、及び、核酸鎖を形成するためのいずれかの必要なヌクレオチドトリホスフェートに関連した1又はそれより多くのリン酸結合形成性酵素を用いる。

【0020】

これらの方法は通常は増幅を含み、例えばRNAポリメラーゼとの併用におけるプロモーター、一つの鎖だけが開裂されそして次にDNAポリメラーゼによる伸長によって置換される制限部位、又は、環状ハイブリダイズ試薬の使用を含み、連結した繰り返しが生成される。増幅された核酸の検出は、多くの形をとりうるが、好ましくは蛍光体による。

30

【0021】

本発明のさらなる局面に従い、試料中の標的核酸を検出する方法が提供され、前記方法は、

- 該試料中の標的核酸を増幅して、増幅された核酸を提供すること；
- 本明細書内上記に記載されたとおりのプローブにより該増幅された核酸をプローブすること；及び
- 一つ又は複数の標的核酸の存在を検出することを含む。

40

【0022】

該標的核酸は、微生物、菌類、酵母、ウィルス、ヒト、動物、植物等に由来するものである。LAMPの為の該標的核酸はLAMPプライマー及び適切な特異的なプローブが合成されることを可能にすると知られている。すなわち、該微生物、菌類、酵母、ウィルス、ヒト、動物又は植物の試料中における存在又は不在が決定されることができる。好ましくは、該標的核酸は、*Chlamydia trachomatis*又は*Neisseria gonorrhoeae*由来のものである。

【0023】

好ましくは、蛍光が増加して、試料中の該標的核酸の存在を示す。

【0024】

50

該方法は等温的であり、且つ、一つの容器内での一段階又は逐次段階の増幅を許し、試薬の全てが適合的である。

【0025】

さらなる局面において、本発明は、患者におけるChlamydia及び／又はGonorrheaを診断する方法であって、

該患者に由来する試料を用意すること；

本発明の1又はそれより多くのプローブを該試料に添加すること；及び

Chlamydia trachomatis及び／又はNeisseria gonorrhoeaeに由来する核酸の存在を検出すること、ここで該プローブの蛍光の増加がChlamydia trachomatis及び／又はNeisseria gonorrhoeaeの感染の存在を示す、

10

前記方法を提供する。

【0026】

該試料は、該プローブが該試料中に存在する任意の標的ヌクレオチドに結合することを可能にするための通常の方法により処理されうる。そのような処理は、該試料を遠心すること及びに該試料を溶解して該感染性微生物から任意の標的核酸を放出させることを含むうる。

【0027】

一つの実施態様において、Chlamydia trachomatis又はNeisseria gonorrhoeaeのいずれかからの核酸に特異的な種類のプローブが、該方法において、Chlamydia trachomatisだけ又はNeisseria gonorrhoeaeだけが該試料において検出されるように用いられる。

20

【0028】

好ましい実施態様において、少なくとも2つの異なるプローブが該試料に添加され、ここで第一のプローブは第一の蛍光ラベルにより標識されており且つChlamydia trachomatis核酸をプローブするために特異的であり、且つ、第二のプローブは該第一のプローブと異なる蛍光ラベルにより標識されており且つNeisseria gonorrhoeae核酸をプローブする為に特異的である。この実施態様において、患者に由来する一つの試料においてChlamydia及びGonorrhea感染を同時に検出することが可能である。

【0029】

本発明の方法の一つの局面において、該患者からの該試料は、血液試料、尿試料、血清試料、又は唾液試料でありうる。

30

【0030】

本発明のさらなる局面に従い、本明細書内上記で記載されたとおりのプローブ、ポリメラーゼ酵素を含むLAMP反応バッファー、dNTP、及び該標的についてのLAMPプライマーを含むキットが提供される。

【0031】

一つの実施態様において、陽性及び陰性の対照が、該キットに含まれうる。該試薬は、湿った試薬として又は凍結乾燥された形で提供されうる。

【0032】

本発明の方法又はキットにおいて用いられるバッファーは、dNTPを1~10mMの濃度で、1又はそれより多くの塩を2~20mMの濃度で、Tris pH8.8を10~100mMの濃度で、トレハロースを10~100mMの濃度で、BSTポリメラーゼを1U~12Uの量で、及び0.01%~1%の1,2プロパンジオールを含む。

40

【0033】

略語

CT - Chlamydia trachomatis

GC - Neisseria gonorrhoeae

GlnA7 - グルタミン合成酵素

PorA7 - ポリタンパク質A7

LAMP - ループ媒介等温増幅

PCR - ポリメラーゼ連鎖反応

50

【0034】

本発明が、以下の実施例及び図面を参照して、例示としてのみ説明される。

【0035】

LAMP反応

LAMPにより標的CT及びGT DNAのV13に基づく検出が、本出願人により開発されたLAMP V6.21反応バッファーを用いて行われた。該標的DNAのプロープに基づく検出が、V6.21p (V13無し)において行われた。LAMPプライマーの濃度は以下のとおりであった：CT PB1-0.8 μMのFIP及びBIPプライマー、0.2 μMのF3及びB3プライマー及び0.4 μMのループプライマー、GC porA7及びGC glnA7-2 μMのFIP及びBIP プライマー、0.25 μMのF3及びB3並びに0.5 μMのループプライマー。全てのプロープが、0.625 μMの最終濃度で用いられた。LAMP反応は、60分間、63℃の一定温度でABI7500リアルタイムPCR装置を用いて行われた。蛍光シグナルの測定値は、SybrGreen/FAM, Joe又はCy3チャンネルにおいて適宜得られた。

10

【0036】

プロープ配列

配列 ID NO. 2: GTGCACGC[C-FAM]CCAATAGAAT

配列 ID NO. 3: TAAGATAAC[C-FAM]CCGCACGTG (CT PB1-FAM 内部)

20

配列 ID NO. 4: TCGAGCAA[C-FAM]CGCTGTGAC[ddC] (CT PB1-FAM 末端)

配列 ID NO. 5: GCGAACATA [C-ALEXA546] CAGCTATGATCAA (GC porA7-joe ループF)

配列 ID NO. 6: ATGTTCA [C-JOE] CATGGCGGAG (GC glnA7-ALEXA546 ループB) 又は

配列 ID NO. 7: CCA GGG TAT CTA ATC CTG TTT G [C-FAM].

30

【0037】

標的配列

実施例において用いられた標的DNA配列は以下である。

【0038】

配列ID No.8: Chlamydia trachomatis G/SotonG1 plasmid pSotonG1 complete sequence (GenBank: HE603235.1)

1 tttgcaactc ttggtggtag actttgcaac tcttggtggt agactttgca actccttggtg
 61 gtagacttggt tcataatgga cttttgttaa aaaatttctt aaaatcttag agctccgatt
 121 ttgaatagct ttggttaaga aaatgggctc gatggctttc cataaaagta gattgttctt
 181 aacttttggg gacgcgtcgg aaatttggtt atctacttta tctcatctaa ctagaaaaaa
 241 ttatgcgtct gggattaact ttcttgtttc tttagagatt ctggatttat cggaaacctt
 301 gataaaggct atttctcttg accacagcga atctttgttt aaaatcaagt ctctagatgt
 361 ttttaatgga aaagtcgttt cagaggcctc taaacaggct agagcggcat gctacatatc
 421 tttcacaaag tttttgtata gattgaccaa gggatatatt aaaccgcgta ttccattgaa
 481 agattttgga aacactacat tttttaaaat ccgagacaaa atcaaaacag aatcgatttc
 541 taagcaggaa tggacagttt tttttgaagc gctccggata gtgaattata gagactatth
 601 aatcggtaaa ttgattgtac aagggatccg taagtttagac gaaattttgt ctttgccgac
 661 agacgatcta ttttttgcat ccaatcagat ttcctttcgc attaaaaaaa gacagaataa
 721 agaaacaaaa attctaatac catttcctat cagcttaatg gaagagttgc aaaaatacac
 781 ttgtgggaga aatgggagag tatttgtttc taaaataggg attcctgtaa caacaagtca
 841 ggttgcgcat aatttttaggc ttgcagagtt ccatagtgtc atgaaaataa aaattactcc
 901 cagagtactt cgtgcaagcg ctttgattca tttaaagcaa ataggattaa aagatgagga
 961 aatcatgcgt atttcctgtc tctcatcgag acaaagtgtg tgttcttatt gttctgggga
 1021 agaggttaagt cctctagtac aaacacccac aatattgtga tataattaaa atttatattca
 1081 tattctgttg ccagaaaaaa caccttttagg ctatattaga gccatcttct ttgaagcggt
 1141 gtcttctcga gaggatttat cgtacgcaaa tatcatcttt gcggttgctg gtcccgtagc
 1201 cttcattatg tcggagtcgt agcacccctag gcgtttgtac tccgtcacag cgtttgctcg
 1261 aagcacgtgc ggggttatct taaaagggat tgcagcttgt agtcctgctt gagagaacgt
 1321 gcgggcgatt tgccttaacc ccaccatttt tccggagcga gttacgaaga caaaacctct
 1381 tcgttgaccg atgtactctt gtagaaagtg cataaaactc tgaggataag ttataataat
 1441 cctcttttct gtctgacggt tcttaagctg ggagaaagaa atggtagctt gttggaaaca
 1501 aatctgacta atctccaagc ttaagacttc agaggagcgt ttacctcctt ggagcattgt
 1561 ctgggcgatc aaccaatccc gggcgttgat tttttttagc tcttttagga aggatgctgt
 1621 ttgcaaatcg ttcacgcat ccgtttttac tatttcctg gttttaaaaa atgttcgact
 1681 attttcttgt ttagaagggt gcgctatagc gactattcct tgagtcatcc tgtttaggaa
 1741 tcttgtttaag gaaatatagc ttgctgctcg aacttgttta gtaccttcg tccaagaagt
 1801 cttggcagag gaaacttttt taatcgcatc taggattaga ttatgattta aaagggaaaa
 1861 ctcttgacga ttcatatcca aagacaatag accaatcttt tctaaagaca aaaaagatcc
 1921 tcgatatgat ctacaagtat gtttggtgag tgatgcggtc caatgcataa taacttcgaa
 1981 taaggagaag cttttcatgc gtttccaata ggattccttg cgaattttta aaacttcctg
 2041 ataagacttt tcgctatatt ctaacgacat ttcttgctgc aaagataaaa tccctttacc
 2101 catgaaatcc ctcgtgatat aacctatccg caaaatgtcc tgattagtga aataatcagg
 2161 ttgttaacag gatagcacgc tcggtathtt tttatataaa catgaaaact cgttccgaaa
 2221 tagaaaatcg catgcaagat atcgagtatg cgttggttagg taaagctctg atatttgaag
 2281 actctactga gtatattctg aggcagcttg ctaattatga gtttaagtgt tcccatcata
 2341 aaaacatatt catagtatth aaatacttaa aagacaatgg attacctata actgtagact
 2401 cggcttgagg agagcttttg cggcgtcgta tcaaagatat ggacaaatcg tatctcgggt

10

20

30

40

2461 taatgttgca tgatgcttta tcaaatgaca agcttagatc cgtttctcat acggttttcc
 2521 tcgatgattt gagcgtgtgt agcgtgaag aaaatttgag caatttcatt ttccgctcgt
 2581 ttaatgagta caatgaaaat ccattgcgta gatctccgtt tctattgctt gagcgtataa
 2641 aggggaaggct tgatagtgtc atagcaaaga ctttttctat tcgcagcgtc agaggccggt
 2701 ctatttatga tatattctca cagtcagaaa ttggagtgtc ggctcgtata aaaaaagac
 2761 gagcagcgtt ctctgagaat caaaattctt tctttgatgg cttcccaaca ggatacaagg
 2821 atattgatga taaaggagt atcttagcta aaggtaattt cgtgattata gcagctaggc
 2881 catctatagg gaaaacagct ttagctatag acatggcgat aaatcttgcg gttactcaac
 2941 agcgtagagt tggtttctta tctctagaaa tgagcgcagg tcaaattgtt gagcggattg
 3001 ttgctaattt aacaggaata tctggtgaaa aattacaaag aggggatctc tctaaagaag
 3061 aattattccg agtgaagaa gctggagaaa cagttagaga atcacatttt tatatctgca
 3121 gtgatagtca gtataagctt aatttaatcg cgaatcagat ccggttgctg agaaaagaag
 3181 atcgagtaga cgtaatatat atcgattact tgcagttgat caactcatcg gttggagaaa
 3241 atcgtcaaaa tgaaatagca gatatatcta gaaccttaag aggttttagcc tcagagctaa
 3301 acattcctat agtttggtta tcccaactat ctgaaaaagt tgaggataga gcaaataaag
 3361 ttcccatgct tttagatttg cgagacagcg gtcaaataga gcaagacgca gatgtgattt
 3421 tgtttatcaa taggaaggaa tcgtcttcta attgtgagat aactgttggg aaaaatagac
 3481 atggatcggg tttctcttcg gtattacatt tcgatccaaa aattagtaaa ttctccgcta
 3541 ttaaaaaagt atggtaaatt atagtaactg ccacttcac taaaagtccta tccacctga
 3601 aaatcagaag tttggaagaa gacctggtca atctattaag atatctcca aattggctca
 3661 aaatgggatg gtagaagtta taggtcttga ttttcttca tctcattacc atgcattagc
 3721 agctatccaa agattactga ccgcaacgaa ttacaagggg aacacaaaag gggttgtttt
 3781 atccagagaa tcaaatagtt ttcaatttga aggatggata ccaagaatcc gttttacaaa
 3841 aactgaattc ttagaggctt atggagttaa gcggtataaa acatccagaa ataagtatga
 3901 gtttagtgga aaagaagctg aaactgcttt agaagccttg taccatttag gacatcaacc
 3961 gtttttaata gtggcaacta gaactcgatg gactaatgga acacaaatag tagaccgtta
 4021 ccaaactctt tctccgatca ttaggattta cgaaggatgg gaaggtttaa ctgacgaaga
 4081 aaatatagat atagacttaa caccttttaa ttcacatct acacggaaac ataaaggatt
 4141 cgttgtagag ccattgtccta tcttggtaga tcaaatagaa tcctactttg taatcaagcc
 4201 tgcaaatgta taccaagaaa taaaaatgcg tttcccaaac gcatcaaagt atgcttacac
 4261 atttatcgac tgggtgatta cagcagctgc gaaaaagaga cgaaaattaa ctaaggataa
 4321 ttcttgcca gaaaacttgt tattaacgt taacgttaaa agtcttgcat atattttaag
 4381 gatgaatcgg tacatctgta caaggaactg gaaaaaatc gagttagcta tcgataaatg
 4441 tatagaaatc gccattcagc ttggctgggt atctagaaga aaacgcattg aatttctgga
 4501 ttcttctaaa ctctctaaaa aagaaattct atatctaaat aaagagcgtt ttgaagaaat
 4561 aactaagaaa tctaaagaac aaatggaaca agaattctatt aattaatagc aggcttgaaa
 4621 ctaaaaacct aattttattt aagctcaaaa taaaaagag ttttaaaatg ggaaattctg
 4681 gtttttattt gtataacact gaaaactgcg tctttgctga taatatcaaa gttgggcaaa
 4741 tgacagagcc gctcaaggac cagcaaataa tccttgggac aaaatcaaca cctgtcgcag
 4801 ccaaaatgac agcttctgat ggaatatctt taacagtctc caataattca tcaaccaatg
 4861 cttctattac aattggtttg gatgcggaag aagcttacca gcttattcta gaaaagttgg
 4921 gaaatcaaat tcttgatgga attgctgata ctattgttga tagtacagtc caagatattt
 4981 tagacaaaat cacaacagac ccttctctag gtttggtgaa agcttttaac aactttccaa

10

20

30

40

5041 tcactaataa aattcaatgc aacgggttat tcactcccag taacattgaa actttattag
 5101 gaggaactga aataggaaaa ttcacagtca caccctaaaag ctctgggagc atgttcttag
 5161 tctcagcaga tattattgca tcaagaatgg aaggcggcgt tgttctagct ttggtacgag
 5221 aaggtgattc taagccctgc gcgattagtt atggatactc atcaggcggt cctaatttat
 5281 gtagtctaag aaccagcatt actaatacag gattgactcc aacaacgtat tcattacgtg
 5341 taggcgggtt agaaagcggg gtggtatggg ttaatgccct ttctaattggc aatgatattt
 5401 taggaataac aaatacttct aatgtatctt ttttggaagt aatacctcaa acaaacgctt
 5461 aaacaatttt tattggattt ttcttatagg ttttatattt agagaaaaca gttcgaatta
 5521 cgggggttgt tatgcaaaat aaaagaaaag tgagggacga ttttattaaa attgttaaag 10
 5581 atgtgaaaaa agatttcccc gaattagacc taaaaatagc agtaaacaag gaaaaagtaa
 5641 ctttcttaaa ttctccctta gaactctacc ataaaagtgt ctactaatt ctaggactgc
 5701 ttcaacaaat agaaaactct ttaggattat tcccagactc tcctgttctt gaaaaattag
 5761 aggataacag tttaaagcta aaaaaggctt tgattatgct tatcttgtct agaaaagaca
 5821 tgttttccaa ggctgaatag acaacttact ctaacgttgg agttgatttg cacaccttag
 5881 ttttttgcct ttttaaggga ggaactggaa aaacaacact ttctctaaac gtgggatgca
 5941 acttggccca atttttaggg aaaaaagtgt tacttgctga cctagaccgc caatccaatt
 6001 tatcttcttg attgggggct agtgtcagaa ataaccaaaa aggcttgcac gacatagtat
 6061 acaaatcaaa cgatttaaaa tcaatcattt gcgaaacaaa aaaagatagt gtggacctaa
 6121 ttcttgcctc atttttatcc gaacagttaa gagaattgga tattcataga ggacctagta 20
 6181 acaacttaaa gttatttctg aatgagtact gcgctccttt ttatgacatc tgcataatag
 6241 aactccacc tagcctagga gggttaacga aagaagcttt tgttgaggga gacaaattaa
 6301 ttgcttggtt aactccagaa cttttttcta ttctaggggt acaaaagata cgtgaattct
 6361 taagtccggt cggaacacct gaagaagaac acattcttgg aatagcttgg tctttttggg
 6421 atgatcgtaa ctgcactaac caaatgtata tagacattat cgagtctatt tacaaaaaca
 6481 agcttttttc acaaaaaatt cgtcgagata tttctctcag ccgttctctt cttaaagaag
 6541 attctgtagc taatgtctat ccaaattcta gggccgcaga agatattctg aagttaacgc
 6601 atgaaatagc aaatattttg catatcgaat atgaacgaga ttactctcag aggacaacgt
 6661 gaacaaacta aaaaaagaag cggatgtctt ttttaaaaaa aatcaaaactg ccgcttctct
 6721 agatttttaag aagacacttc cttccattga actattctca gcaactttga attctgagga 30
 6781 aagtcagagt ttggatcgat tattttttatc agagtcccaa aactattcgg atgaagaatt
 6841 ttatcaagaa gacatcctag cggtaaaaact gcttactggg cagataaaat ccatacagaa
 6901 gcaacacgta cttcttttag gagaaaaaat ctataatgct agaaaaatcc tgagtaagga
 6961 tcactttctc tcaacaactt ttcatcttg gatagagtta gtttttagaa ctaagtcttc
 7021 tgcttacaat gctcttgcac attacgagct ttttataaac ctccccaacc aaactctaca
 7081 aaaagagttt caatcgatcc cctataaatc cgcataatatt ttggccgcta gaaaaggcga
 7141 ttttaaaacc aaggtcgatg tgataggga agtatgtgga atgtcgaaat catcggcgat
 7201 aagggtgttg gatcaatttc ttccttcac tagaaacaaa gacgttagag aaacgataga
 7261 taagtctgat ttagagaaga atcgccaatt atctgatttc ttaatagaga tacttcgcat
 7321 catatgttcc ggagtttctt tgcctccta taacgaaaat cttctacaac agctttttga 40
 7381 acttttttaag caaaagagct gatcctccgt cagctcatat atatatttat tatatatata
 7441 tttatttagg gatttgattt tacgagagag a

【 0 0 3 9 】

配列ID No.9: *Neisseria gonorrhoeae* partial *porA* gene for class 1 outer membrane protein, isolate GC3 (GenBank: HE681886.1)

1 gccggcgggcg gcgcgacccg ttggggcaat agggaaatcct ttgtcggctt ggcaggcgaa
 61 ttcggcacgc tgcgcgccgg ccgcgttgcg aatcagtttg acgatgccag ccaagccatt
 121 gatccttggg acagcaacaa tgatgtggct tcgcaattgg gtattttcaa acgccacgac
 181 gatatgccgg ttccgtacg ctacgactcc ccggactttt ccggtttcag cggcagcgtc
 241 caattcgttc cggctcaaaa cagcaagtcc gcctatacgc cggctcattg gactactgtg
 301 tataacacta acggtactac tactactttc gttccggctg ttgtcggcaa gcccgatcg
 361 gatgtgtatt atgccggtct gaattacaaa aatggcggtt ttgccgggaa ctatgccttt
 421 aaatatgcga gacacgcaa tgtcggacgt aatgcttttg agttgttctt gctcggcagt
 481 gggagtgatg aagccaaagg taccgatccc ttgaaaaacc atcaggtaca ccgcctgacg
 541 ggcggtatg gggaaggcgg cttgaatctc gccttgccgg ctcagttgga tttgtctgaa
 601 aatgccgaca aaacccaaaa cagtacgacc gaaattgccg ccactgcttc ctaccgcttc
 661 ggtaatacag tcccgcgcat cagctatgcc catggtttcg actttgtcga acgcagtcag
 721 aaacgcgaac ataccagcta tga

10

【0040】

配列ID No.10: *Neisseria gonorrhoeae* glutamine synthetase (glnA) gene, gln
 A-14 allele, partial cds (GenBank: AF520262.1)

1 cccgctttgt cgatttgccg ttcaccgata ccaaaggcaa gcagcaccac ttaccgctgc
 61 ctgcgcgcat cgtgttgga gacccgaag agtggtttga aaacggaccg gcgtttgacg
 121 gtcgtccat cgcgcgctgg aaaggcattg aggcttccga tatgcagctg cgtcccgatg
 181 cgtccacagc cttcgtcgat cctttttatg atgatgttac cgtcgtcatt acctgcgacg
 241 tcatcgaccc tgcgcgaggt cagggttacg accgcgaccc gcgctccatc gcacgcgcg
 301 ccgaagccta tttgaaatct tccggtatcg gcgacaccgc ctatttcggc cccgaacccg
 361 aattcttcgt cttcgacggc gtagaatttg aaaccgacat gcacaaaaac cgttacgaaa
 421 tcacgtccga aagcggcgcg tgggcaagcg gcctgcatat ggacgggtcaa aacaccggcc
 481 accgccccgc cgtcaaaggc ggctacgcgc ccgtcgcgcc gattgactgc ggtcaagatt
 541 tgcgctccgc catggtgaac attttggaag gactcggcat cgaagtogaa gtccaccaca
 601 gcgaagtcgg taccggcagc caaatggaaa tcggcaccgc tttcgccact ttggtcaaac
 661 gcgcgacca aacccaagat atgaaatacg tcatccaaaa cgttgccac aatttcggca
 721 aaaccgccac ctttatgcc aaaccgatta tgggcgacaa cggcagcggg atgcacgtcc
 781 accaatccat ttggaaagac ggtcaaaacc tgttcgcagg cgacggctat gccggtttgt
 841 ccgataccgc gctctactac atcggcggca tcatcaaaac cgccaaagcc ctgaacgcga
 901 ttaccaatcc gtccaccaac tcctacaaac gcctcgtgcc gcactttgaa gcaccgacca
 961 aattggccta ttccgcaaaa aaccgttcg cttccatccg tatcccgctt gtgaacagca
 1021 gcaaggcgcg ccgcacgaa gcgcgtttcc ccgaccgac cgccaacccg tatttggcat
 1081 ttgccgccct gctgatggcc ggtttggacg gcattcaaaa caaatccat ccgggcgacc
 1141 ctgccgataa aaacctgtac gacctgccgc cggaagaaga cgcgctcgtc ccgaccgtct
 1201 gcgcttcttt ggaagaagca cttgccgcc tcaaggtcga ccacgaattc ctgctgcgcg
 1261 gcggcggtgt cagcaaagac tggatcgaca gctacatcgc ctttaaagag gaagatgtcc
 1321 gccgcatccg tatggcgccg caccgcgtgg aatttg

20

30

40

【0041】

LAMP反応において用いられたプライマーは以下の通りである。

【0042】

CTプラスミド

F3 TCTACAAGAGTACATCGGTCA (配列 ID No. 11)
B3 TGAAGCGTTGTCTTCTCG (配列 ID No. 12)
FIP GCAGCTTGTAGTCCTGCTTGAGTCTTCGTAACTCGCTCC (配列 ID No.
13)
BIP TCGAGCAACCGCTGTGACCCTTCATTATGTCTGGAGTCTG (配列 ID
No. 14)
LF1 CGGGCGATTTGCCTTAAC (配列 ID No. 15)
LB1 TACAAACGCCTAGGGTGC (配列 ID No. 16)

10

【 0 0 4 3 】

G C p o r A 7

F3 ACCAAAAACAGTACGACCGA (配列 ID No. 17)
B3 AAGTGCGCTTGGAAAAATCG (配列 ID No. 18)
FIPATGGGCATAGCTGATGCGCGAATTGCCGCCACTGCTTC (配列 ID
No. 19)
BIP TCGACTTTGTGGAACGCGAGTCAAATCGACACCGGCGATGA (配列 ID
No. 20)
LoopF1 GCGAACATACCAGCTATGATCAA (配列 ID No. 21)

20

30

【 0 0 4 4 】

G C g l n A 7

F3 TCATATCTTGGGTTTGGTCTG (配列 ID No. 22)
B3 CTGCATATGGACGGTCAAA (配列 ID No. 23)

40

CGAAGTCCACCACAGCGAATTTGACCAAAGTGGCGAA (配列 ID No.

FiP 24)

CTTCGATGCCGAGTCCTTCCGATTGACTGCGGTCAAGAT (配列 ID

BiP No. 25)

LF CAAATGGAAATCGGCACCC (配列 ID No. 26)

LB ATGTTACCATGGCGGAG (配列 ID No. 27)

10

【 0 0 4 5 】

バッファー

本出願人は、本発明のプローブとの使用のためのバッファー系を開発し、以下の実施例においてV6.21 (又は存在するV13染料無しのV6.21p)と称される。該バッファー成分の濃度はバッファー再構成後である。

【 0 0 4 6 】

V6.21

4~10mMのdNTP'、10mMの塩、30mMのTris pH8.8、30mMのトレハロース、1~8UのBstポリメラーゼ、染料及び0.05%プロパンジオール。

20

【 0 0 4 7 】

V6.21p

4~10mMのdNTP'、10mMの塩、30mMのTris pH8.8、30mMのトレハロース、1~8UのBstポリメラーゼ、及び0.05%のプロパンジオール。

【 0 0 4 8 】

PCR

リアルタイムPCRによる臨床試料のCT/GC検出が、APTIMA CT/GCマルチプレックス (Gen-Probe)を用いて製造者の指示に従い行われた。

【 0 0 4 9 】

アガロースゲル電気泳動

DNA電気泳動が、1%アガロースゲル1xTAEバッファーにおいて100Vで行われた。LAMP DNA産物が、GelRed (Invitrogen)を用いてトランスイルミネーターにより活性化された。

30

【 0 0 5 0 】

V6.21及びV6.21pバッファーが、本出願人により開発された。LAMPプライマーが、Eurofinsから入手された。蛍光体により標識されたオリゴヌクレオチドが、Integrated DNA Technologies社から購入された。Trisバッファー、アガロースゲル及びPCRグレードの水が、Sigmaから購入された。CT及びGC DNAの標準品が、ATCCから入手された。

【 0 0 5 1 】

図面

図1は、本発明のDNAプローブの模式図である。該プローブは、既定の蛍光体を結合した内部シトシンを有するオリゴヌクレオチドからなる。該プローブは、Fip及びBipプライマーの横についたアンプリコンの内部領域に相補的であってよく、又は、蛍光体を内部に標識された、修飾されたループF又はループBプライマーでありうる。

40

【 0 0 5 2 】

実施例1

図2A~2Fは、V13を含有するV6.21バッファー中 (図2A、2B及び2C)又はV13染料無しのV6.21pバッファー中 (図2D、2E及び2F)において、CT PB1 (図2A及び図2D)、GC glnA7 (図2B及び図2E)及びGC porA7 (図2C及び図2F)プライマーを用いて生成された増幅プロットを示す。標的配列は、配列ID NO8~10に示され、夫々FAM

50

を結合したCT PB1内部プローブ、Joe を結合したGC glnA7ループプローブ及びAlexa546を結合したGC porA7ループプローブによる。全ての反応は、ABI7500装置を用いて60分間、63℃の一定温度で行われた。

【0053】

実施例 2

図 3 A 及び 3 B は、FAMを結合したCT PB1内部プローブの存在下におけるCT PB1プライマーにより生成された LAMP産物の融解曲線分析である。反応当たり100pgのATTC CT DNA標準品が、陽性対照として用いられた。A－ノーマライズ済みレポータープロット (normalized reporter plot)、B－微分レポータープロット (derivative reporter plot)。融解曲線プロットは、ABI7500装置によるFAMチャンネルにおける読み取り値に基づき生成された。

10

【0054】

実施例 3

図 4 A 及び B は、JOEを結合したGC glnA7ループプローブの存在下においてGC glnA7プライマーを用いて生成された LAMP産物の融解曲線分析である。反応当たり100pgのATTC GC DNA標準が陽性対照として用いられた。図 4 A はノーマライズ済みレポータープロットを示し、及び、図 4 B は微分レポータープロットを示す。融解曲線プロットは、ABI7500によるJOEチャンネルにおける読み取り値に基づき生成された。

【0055】

実施例 4

図 5 A 及び 5 B は、ALEXA546を結合したGC porA7ループプローブの存在下におけるGC porA7プライマーを用いて生成された LAMP産物の融解曲線分析である。反応当たり100pgのATTC GC DNA標準品が陽性対照として用いられた。図 5 A はノーマライズ済みレポータープロットを示し、図 5 B は微分レポータープロットを示す。融解曲線プロットは、ABI7500装置によるCy3チャンネルにおける読み取り値に基づき生成された。

20

【0056】

実施例 5

図 6 A～6 D は、ループ媒介等温増幅において本発明のプローブによるDNA産物特異性を確認する為の試験の結果を示す。偽陽性の後期増幅時間 (LAMP反応において検出可能な標的DNA最低濃度(100fg GC DNA) 後30分超) は、非特異的な増幅がプライマーダイマー形成の結果でありうることを示す。標準の融解曲線分析は、このLAMP反応における特異的及び非特異的な産物の間で区別することを許さないが、非特異的な産物は、本発明のプローブを用いて認識されうる。GC DNAは、GC porA7プライマーを用いて増幅され、V13染料又はGC porA7-ALEXA546プローブにより適宜可視化された。

30

【0057】

実施例 6

図 7 は、CT PB1プライマーにより、V13を含むV6.21バッファーにおいて又はV13染料を有さないV6.21pバッファーにおいて、FAMを結合した内部C及び3'ターミネーターを有するCT PB1末端プローブ (ループ領域に相補的である) の存在下において生成された増幅プロットを示す。対照反応におけるV13染料の励起により確認された標的DNAの成功裏の増幅にもかかわらず、3'ターミネーターを有するCT PB1プローブは陽性シグナルを生成しなかった。

40

【0058】

実施例 7

図 8 A 及び 8 B は、CT PB1プライマー及びFAM を結合した内部シトシンを有するCT PB1ターミナルプローブの存在下において (図 8 A)、及び、ユニバーサルプライマー及びFAMを結合した3'末端シトシンを有する3'UPプローブの存在下において (図 8 B)、ROX含有V6.21pバッファーにおいて生成された増幅プロットを示す。第一の線は、ROXにより生成されたシグナルを表し、及び、第二の線は、FAMチャンネルにおいて生成されたシグナルに対応する。該標的DNAへの内部標識されたCを有するプローブの結合は、FAM励起

50

を結果する。標識された3'末端Cを有するプローブの該標的への結合は、FAM励起状態を変えない。

【0059】

実施例 8

図9A～9Cは、CT PB1プライマーを用いて、V13無しのV6.21pにおいて、FAMを結合した内部Cを有するCT PB1内部プローブ及び参照染料(ROX)の存在下において生成された増幅プロットを示す。図9Aは生のデータを示し、FAMチャンネルからの読み取り値が第一の線にあり、及びROXチャンネルからの読み取り値が第二の線にある。図9Bは、ROXに対してノーマライズ済みの増幅プロット（FAMチャンネルにおいて生成された）を示す。図9Cは、微分レポーター融解曲線プロットを示す。

10

【0060】

実施例 9

図10A～10Cは、CT PB1-FAMプローブ特異性の確認を示す。図10Aは、CT DNA及びCTプライマーの存在下において、CT PB1-FAMプローブを用いて生成された増幅プロットを示す。対照として、2セットの反応が行われ、そこでは非特異的遺伝子、GC glnA7及びGC porA7が、対応するLAM Pプライマーを用いて、CT PB1-FAMプローブの存在下において増幅された。V6.21pバッファーにおいて、FAMチャンネルにおけるCT PB1プローブの存在下における増幅プロットが、CT DNAが反応において存在する場合にだけ生成され、及び、非特異的遺伝子（GC glnA7及びGC porA7）が増幅された場合にシグナルは生成されなかった。CT DNAがCTプライマーにより増幅されるところの反応において非特異的プローブが用いられた場合にもシグナルは生成されなかった。図10Cは、類似の実験において得られたが、インターカレート染料V31を含むV6.21バッファー中において行われたデータを示す。図10Cは、図10Aにおいて記載された実験において生成されたDNA産物を示す。

20

【0061】

実施例 10

図11A及び11Bは、APTIMA CTアッセイに対するCT PB1-FAMプローブの確認を示す。CTについて陽性(n=29)（図11A）又は陰性(n=21)（図11B）と確認された50の臨床試料が、V6.21pバッファー中において、CT PB1-FAMプローブを用いて試験された。50の試料のうち、CTについてCT PB1-FAMプローブにより、24が陰性と試験され（図11A）、及び、26が陽性と試験された（図11B）。Aptima試験及びCT PB-FAM試験の間で86%の一致があった。

30

【0062】

実施例 11

図12A及び12Bは、CT/GCマルチプレックスにおいてCT PB1-FAM + GC porA7-Alexa 546プローブを用いて生成された増幅プロットを示す。CT及びGCのDNAが、別々の反応において又は一緒に（in conjugation）、V6.21pバッファー中でCT PB1-FAM及びGC porA7-Alexa546プローブの存在下において増幅された。読み取り値は、Cy3（図12A）及びFAM（図12B）チャンネルにおいてとられた。実験は、FAM及びAlexa546標識されたプローブを用いた同時の反応において、2つのDNA標的が増幅され及び検出されうることを、及び、CT PB1及びGC porA7プライマー及びプローブの間での交差反応性が無いことを示した。

40

【0063】

実施例 12

表1は、CT及びGCについてのV13 LAMP、CT/GC Aptima及びCT/GCマルチプレックス(CT PB1-FAM + GC porA7-Alexa546)の間の比較を示す。136の臨床試料から抽出されたDNAが、CT/GC Aptimaマルチプレックス、CT PB1及びGC porA7プライマーを用いて、V13含有V6.21バッファーにおいて、又は、v6.21pにおけるマルチプレックス反応において、CT PB1及びGC porA7プライマー並びにCT PB1-FAM及びGC porA7-Alexa546プローブの存在下において試験された。対照実験において、試料はまた、GC glnA7-joeプローブに

50

より単一の反応において試験された。該表は試験間の一致スコアを示す。

【 0 0 6 4 】

【表 1】

表 1

CT及びGCについてのV13に基づく LAMP、CT/GC Aptimaマルチプレックス
及びCT/GC MASTマルチプレックスの間の比較(CT PB1-FAM + GC porA7-Alexa546)

10

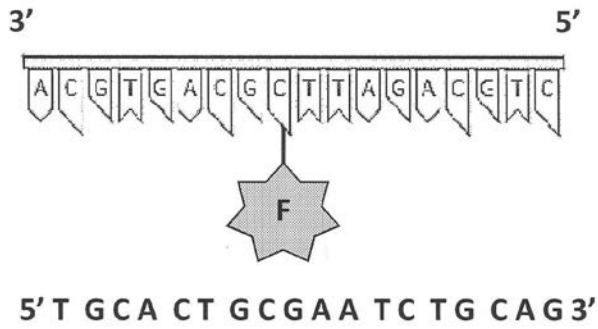
136の臨床試料についての試験

比較された試験	一致スコア
CT LAMP対マルチプレックスにおけるCT PB1-FAM	92%
GC LAMP対マルチプレックスにおけるGC porA7-Alexa546	94%
マルチプレックスにおけるCT対CT Aptima	83%
マルチプレックスにおけるGC対GC Aptima	86%

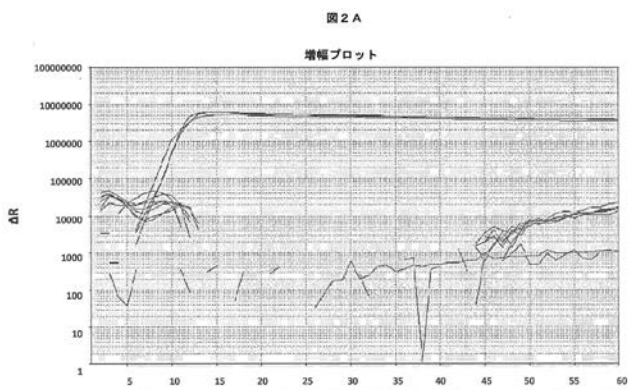
20

【図 1】

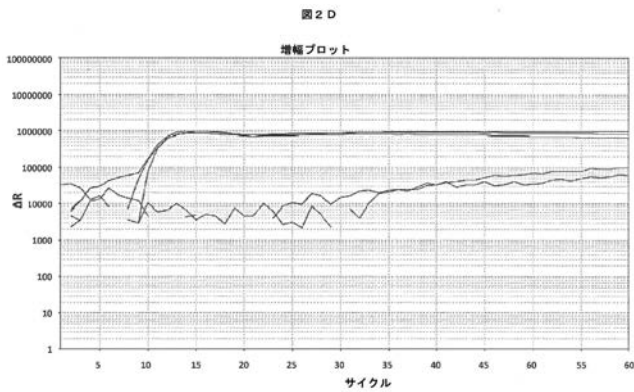
図 1
MASTDNAプローブの模式図



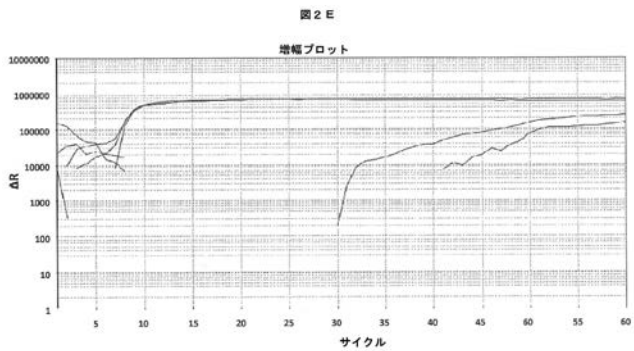
【図 2 A】



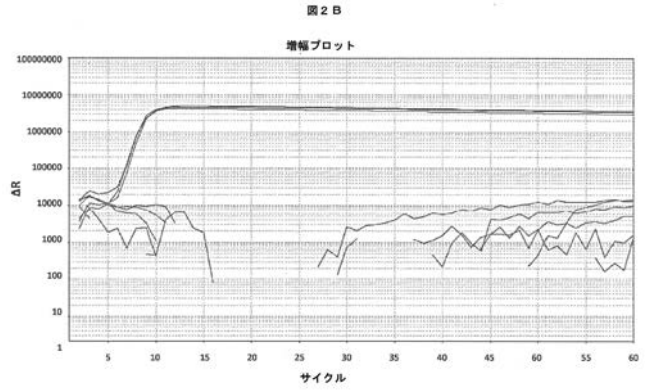
【図 2 D】



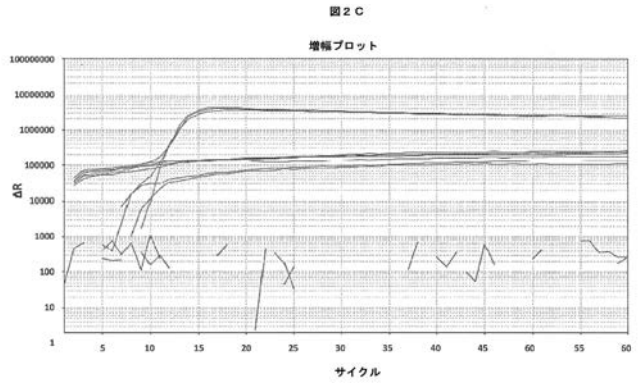
【図 2 E】



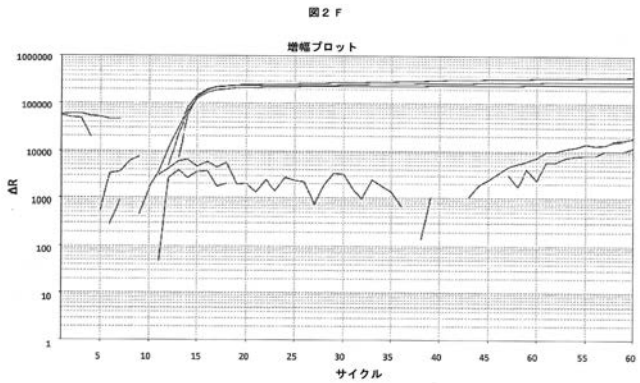
【図 2 B】



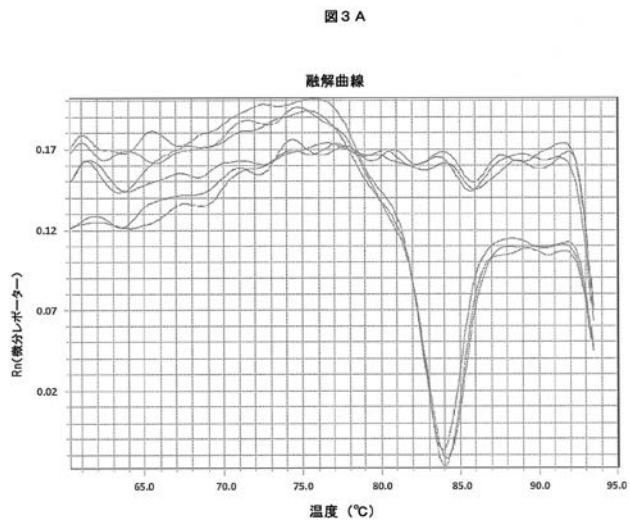
【図 2 C】



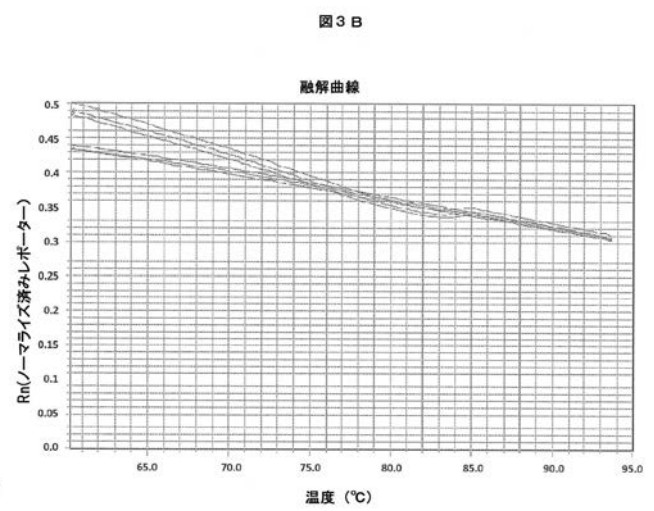
【図 2 F】



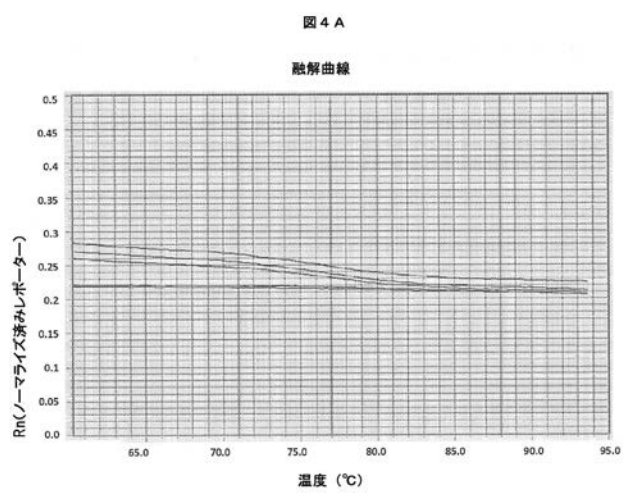
【図 3 A】



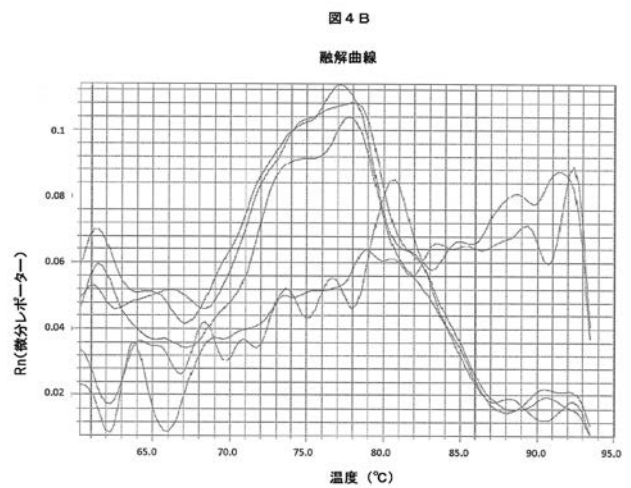
【図 3 B】



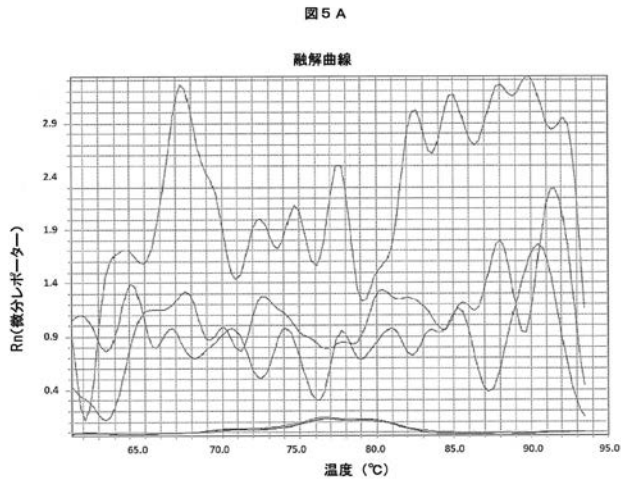
【図 4 A】



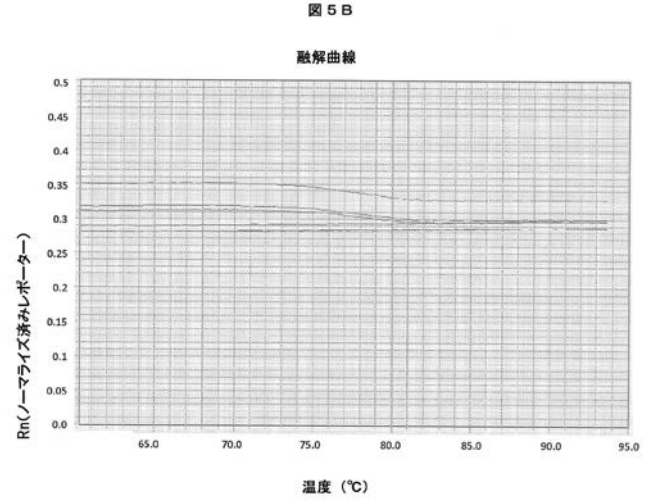
【図 4 B】



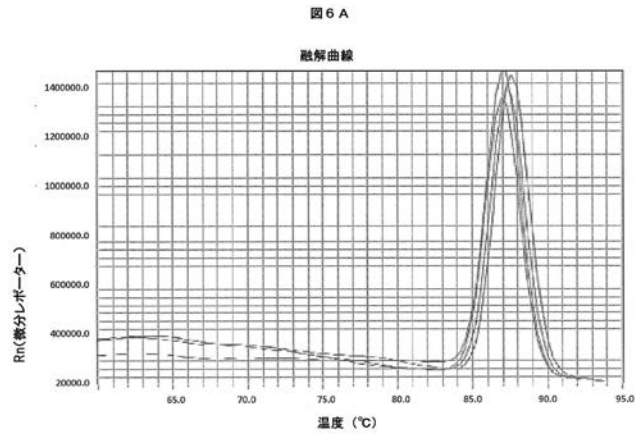
【図 5 A】



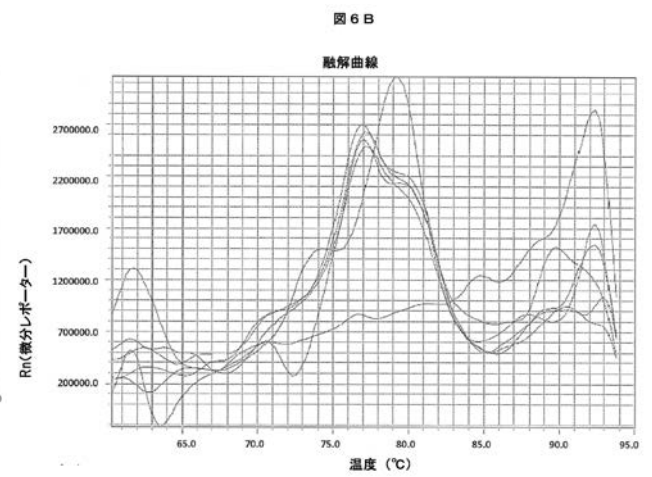
【図 5 B】



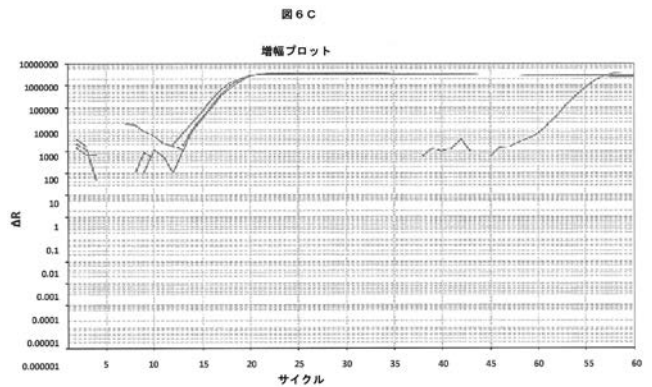
【図 6 A】



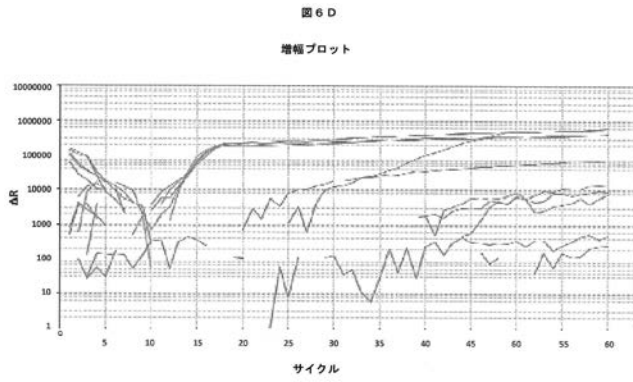
【図 6 B】



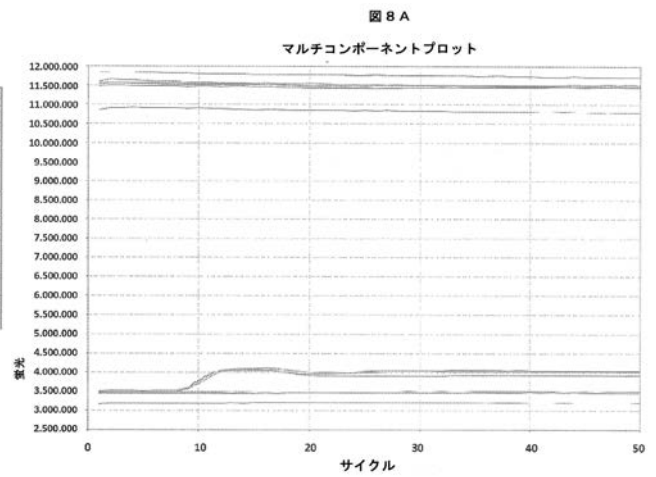
【図 6 C】



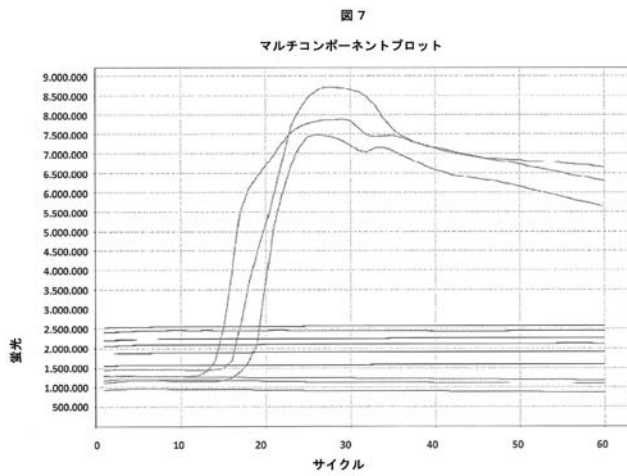
【図 6 D】



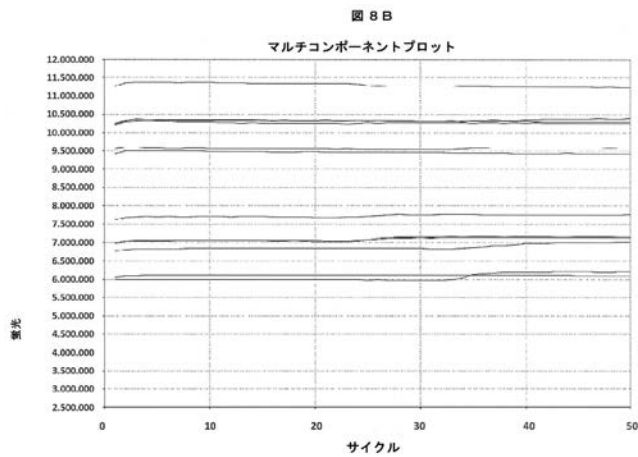
【図 8 A】



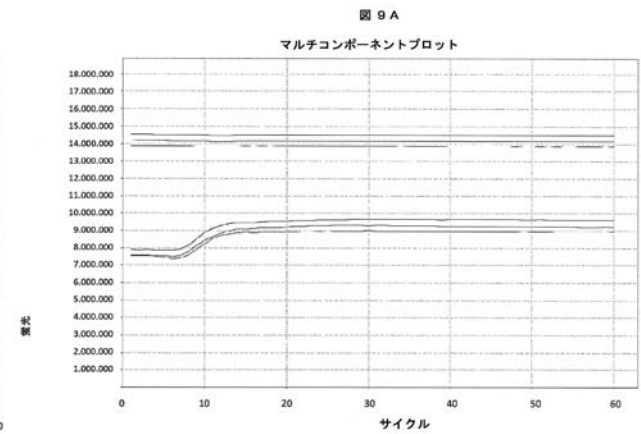
【図 7】



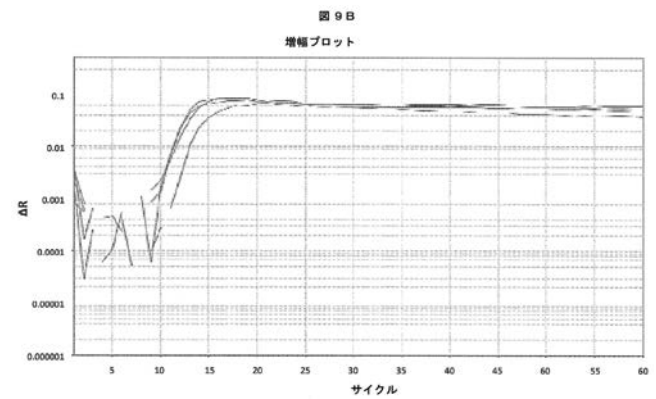
【図 8 B】



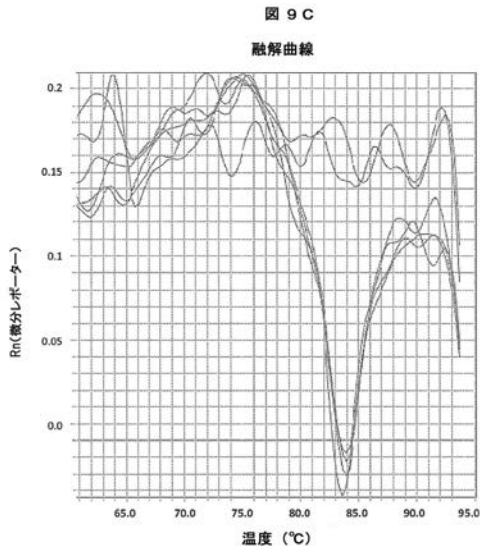
【図 9 A】



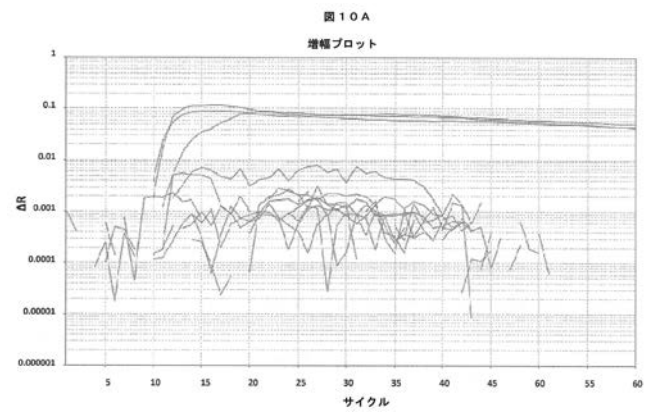
【図 9 B】



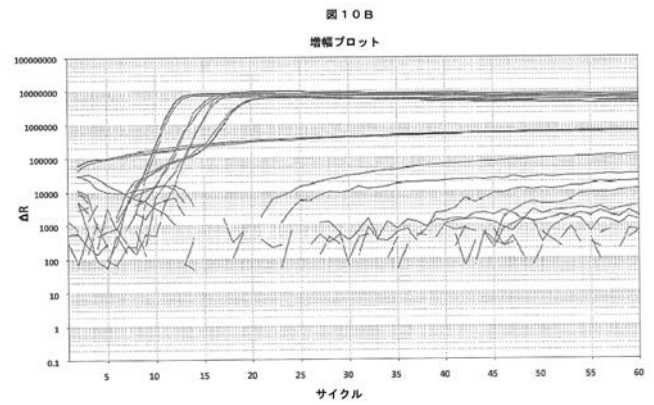
【図 9 C】



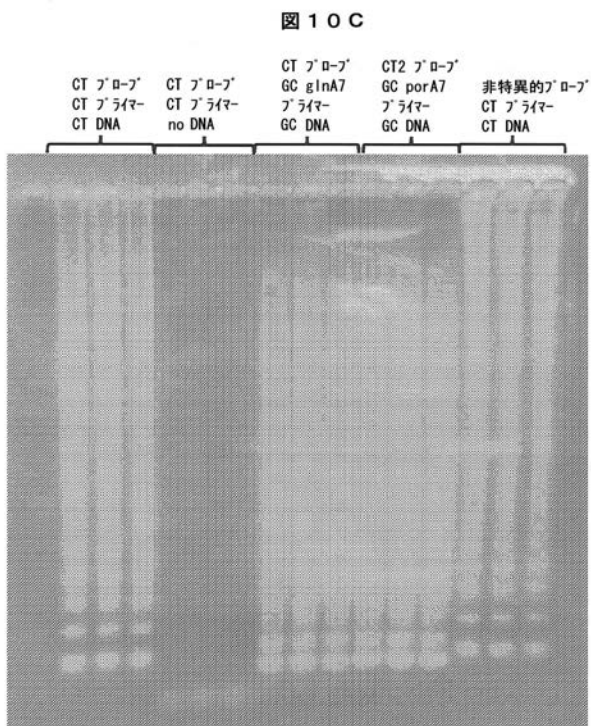
【図 10 A】



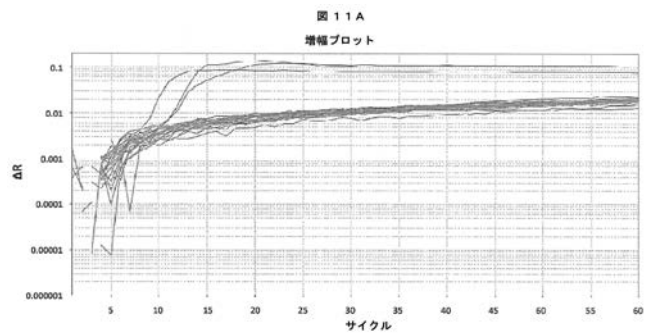
【図 10 B】



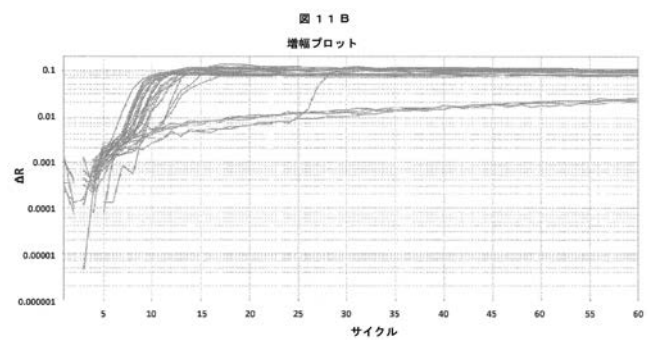
【図 10 C】



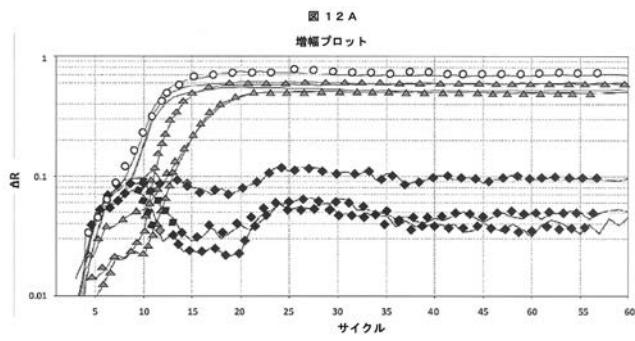
【図 11 A】



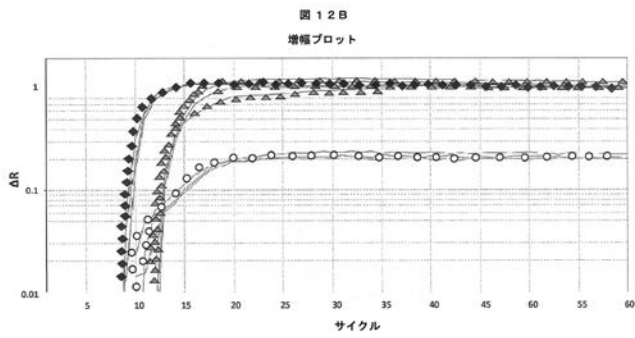
【図 11 B】



【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【配列表】

2016534722000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2014/053238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 515 194 A2 (SYNTEX INC [US] SYNTEX INC [SE] DADE BEHRING MARBURG GMBH [DE])	1-6,8,9
Y	25 November 1992 (1992-11-25) example 5 ----- -/--	1-15,18, 19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 May 2015

Date of mailing of the international search report

03/06/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Knudsen, Henrik

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2014/053238

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IKEDA S ET AL: "Doubly thiazole orange-labeled cytidine for functional expansion of a hybridization-sensitive probe", TETRAHEDRON LETTERS, PERGAMON, GB, vol. 50, no. 51, 23 December 2009 (2009-12-23), pages 7191-7195, XP026738120, ISSN: 0040-4039, DOI: 10.1016/J.TETLET.2009.10.037 [retrieved on 2009-10-13]	1-3,5,6, 9
Y	the whole document	1-15,18, 19
X	----- EP 2 653 560 A1 (ARKRAY INC [JP]) 23 October 2013 (2013-10-23)	1,3,4,9, 10
Y	paragraphs [0035], [0036], [0040]; tables 1-2; sequence 10	1-15,18, 19
X	----- EP 2 574 680 A1 (ARKRAY INC [JP]) 3 April 2013 (2013-04-03)	1-6,9,10
Y	paragraph [0094]; sequence 22	1-15,18, 19
Y	----- EP 2 218 780 A1 (EIKEN CHEMICAL [JP]) 18 August 2010 (2010-08-18)	1-15,18, 19
A	claim 12; examples 1,6; sequence 15	16,17, 20,21
A	----- CN 102 703 433 A (YELLOW SEA FISHERIES RES INST) 3 October 2012 (2012-10-03) pages 15-16 of enclosed English translation	16,17, 20,21
A	----- WO 02/14555 A2 (UNIV UTAH RES FOUND [US]; IDAHO TECHNOLOGY INC [US]) 21 February 2002 (2002-02-21) page 10, last paragraph - page 11, paragraph 1; claim 7	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2014/053238

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2014/053238

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0515194	A2	25-11-1992	AT 208039 T 15-11-2001
			AT 246360 T 15-08-2003
			AT 350665 T 15-01-2007
			AU 657134 B2 02-03-1995
			AU 1706892 A 26-11-1992
			CA 2069145 A1 23-11-1992
			DE 69232161 D1 06-12-2001
			DE 69232161 T2 16-05-2002
			DE 69233146 D1 04-09-2003
			DE 69233146 T2 29-04-2004
			DE 69233674 T2 18-10-2007
			DK 0984282 T3 17-11-2003
			EP 0515194 A2 25-11-1992
			EP 0984281 A2 08-03-2000
			EP 0984282 A2 08-03-2000
			EP 1418430 A2 12-05-2004
			ES 2168092 T3 01-06-2002
			ES 2204050 T3 16-04-2004
			ES 2280110 T3 01-09-2007
			IL 101945 A 08-02-1998
			JP 3892912 B2 14-03-2007
			JP H05180773 A 23-07-1993
			PT 984282 E 31-12-2003
EP 2653560	A1	23-10-2013	AU 2013204483 A1 07-11-2013
			EP 2653560 A1 23-10-2013
			JP 2013236625 A 28-11-2013
			US 2013280711 A1 24-10-2013
EP 2574680	A1	03-04-2013	CN 103014147 A 03-04-2013
			EP 2574680 A1 03-04-2013
			JP 2013081450 A 09-05-2013
			KR 20130033976 A 04-04-2013
			US 2013078631 A1 28-03-2013
EP 2218780	A1	18-08-2010	CN 101903520 A 01-12-2010
			EP 2218780 A1 18-08-2010
			ES 2433667 T3 12-12-2013
			HK 1146086 A1 14-03-2014
			JP 5313157 B2 09-10-2013
			JP 2013135696 A 11-07-2013
			US 2010233715 A1 16-09-2010
			US 2014308663 A1 16-10-2014
CN 102703433	A	03-10-2012	WO 2009051214 A1 23-04-2009
			NONE
WO 0214555	A2	21-02-2002	AT 332398 T 15-07-2006
			CA 2417986 A1 21-02-2002
			DE 60121342 T2 28-06-2007
			EP 1307592 A2 07-05-2003
			ES 2267803 T3 16-03-2007
			JP 5213297 B2 19-06-2013
			JP 2004506431 A 04-03-2004
			US 2003022177 A1 30-01-2003
			WO 0214555 A2 21-02-2002

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ギリース、エリザベス アン

英国 B L 6 5 R W ボルトン ホーウィック ブルックランド 4 1

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62
QS16 QS25 QS32 QX02