

【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】令和 2 年 1 月 16 日 (2020.1.16)

【公表番号】特表 2019-502374 (P2019-502374A)

【公表日】平成 31 年 1 月 31 日 (2019.1.31)

【年通号数】公開・登録公報 2019-004

【出願番号】特願 2018-529612 (P2018-529612)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6818 (2018.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6844 Z

C 1 2 Q 1/6818 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 11 月 26 日 (2019.11.26)

【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】

断片化核酸を連結するための均一な方法であって、以下のステップ：

断片化された標的核酸を含む可能性があるサンプルを、

何れかの標的核酸が前記サンプル中に存在する場合、第 1 のセンス鎖及び第 1 のアンチセンス鎖を含む第 1 の増幅産物を産生するための第 1 の塩基配列及び第 2 の塩基配列を含む一対の外部プライマーと、

第 3 の塩基配列及び第 4 の塩基配列を含む互いに相補的な一対の内部プライマーであって、前記第 3 の塩基配列が、前記第 1 の増幅産物の前記第 1 のアンチセンス鎖にハイブリダイズして、第 2 の増幅産物の第 2 のセンス鎖を生じるように構成されており、前記第 4 の塩基配列が、前記第 1 の増幅産物の前記第 1 のセンス鎖にハイブリダイズして前記第 2 の増幅産物の第 2 のアンチセンス鎖を生じるように構成されている前記一対の内部プライマーに、

接触させることを含む、増幅ステップを行うこと；と、

前記第 1 のセンス鎖の第 1 の 3' 末端領域を前記第 1 のアンチセンス鎖の第 2 の 3' 末端領域とアニーリングすること、ここで、前記第 1 のセンス鎖の前記第 1 の 3' 末端領域が、前記第 1 のアンチセンス鎖上の第 1 のセンス鎖の伸長をプライミングし、前記第 1 のアンチセンス鎖の前記第 2 の 3' 末端領域が、前記第 1 のセンス鎖上の前記第 1 のアンチセンス鎖の伸長をプライミングする、と、

前記第 2 のセンス鎖の第 3 の 3' 末端領域を前記第 2 のアンチセンス鎖の第 4 の 3' 末端領域とアニーリングすること、ここで、前記第 2 のセンス鎖の前記第 3 の 3' 末端領域が、前記第 2 のアンチセンス鎖上の前記第 2 のセンス鎖の伸長をプライミングし、前記第 2 のアンチセンス鎖の前記第 4 の 3' 末端領域が、前記第 2 のセンス鎖上の前記第 2 のアンチセンス鎖の伸長をプライミングする、により、

完全長標的核酸を得ること；とを含み、

全てのステップが均一な様式で実施される、前記方法。

【請求項 2】

完全長増幅産物を1 つまたは複数の検出可能なプローブと接触させることを含むハイブ

リダイズステップを行うこと；と、

完全長増幅産物の存在又は非存在を検出すること、ここで、前記完全長増幅産物の存在が、前記サンプル中の前記標的核酸の存在を示し、前記完全長増幅産物の非存在が、前記サンプル中の前記標的核酸の非存在を示す；とをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ハイブリダイズステップが、前記完全長増幅産物を、ドナー蛍光部分及び対応するアクセプター部分で標識された第 5 の塩基配列を含む前記 1 つまたは複数の検出可能プローブのうちの 1 つと接触させることを含み、

前記検出ステップが、プローブのドナー蛍光部分とアクセプター部分との間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の存在又は非存在を検出すること、ここで、蛍光の存在又は非存在が、前記サンプル中の前記標的核酸の存在又は非存在を示す、を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記増幅ステップが、5' から 3' のヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ酵素を使用する、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記ドナー蛍光部分及び前記対応するアクセプター部分が、前記プローブ上で互いに 8 ヌクレオチド以内である、請求項 2 から 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記アクセプター部分がクエンチャーである、請求項 3 から 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ハイブリダイズステップが、前記完全長増幅産物の二本鎖核酸との相互作用の際に蛍光シグナルを発する二本鎖 DNA 結合色素を含む分子プローブを含む前記 1 つまたは複数の検出可能プローブのうちの 1 つと前記完全長増幅産物とを接触させることを含み、

前記検出ステップが、融解曲線分析により蛍光共鳴の存在又は非存在を検出することであって、蛍光の存在又は非存在が、前記サンプル中の前記標的核酸の存在又は非存在を示すこと含む、

請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

互いに相補的な前記一対の内部プライマーの相対濃度が、前記一対の外部プライマーの濃度以下である、請求項 1 から 7 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記増幅ステップが、断片化された標的核酸を含む可能性がある前記サンプルを、互いに相補的な内部プライマーの第 2 の対と接触させることをさらに含む、請求項 1 から 8 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 10】

断片化核酸を連結するためのキットであって、

標的核酸の何れかがサンプル中に存在する場合、第 1 のセンス鎖及び第 1 のアンチセンス鎖を含む第 1 の増幅産物を産生するための第 1 の塩基配列及び第 2 の塩基配列を含む一対の外部プライマー；と、

第 3 の塩基配列及び第 4 の塩基配列を含む一対の自己相補的内部プライマーであって、前記第 3 の塩基配列が、前記第 1 の増幅産物の前記第 1 のアンチセンス鎖にハイブリダイズして、第 2 の増幅産物の第 2 のセンス鎖を生じるように構成されており、前記第 4 の塩基配列が、前記第 1 の増幅産物の前記第 1 のセンス鎖にハイブリダイズして前記第 2 の増幅産物の第 2 のアンチセンス鎖を生じるように構成されている前記一対の自己相補的内部プライマー；と、

を含む前記キット。

【請求項 11】

ドナー蛍光部分及び対応するアクセプター部分を含む第 5 の検出可能に標識された塩基

配列をさらに含む、請求項 10 に記載のキット。

【請求項 12】

前記第 1、第 2、第 3、第 4、及び第 5 のオリゴヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つが少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチドを含む、請求項 10 から 11 の何れか一項に記載のキット。

【請求項 13】

前記一対の自己相補的內部プライマーの相対濃度が、前記一対の外部プライマーの濃度以下である、請求項 10 から 12 の何れか一項に記載のキット。