

【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の増幅産物を產生するための第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の増幅産物を產生するための第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 1_1 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 10 から 1_2 の何れか一項に記載のキット。