(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-507270
(P2025-507270A)
(43)公表日　令和7年3月18日(2025.3.18)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ	*1/6844(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6844	Ｚ ＺＮＡ	４Ｂ０６３
Ｃ１２Ｎ	*15/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/10	１００Ｚ	
Ｃ１２Ｑ	*1/6851(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6851	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ	*1/689(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/689	Ｚ	
Ｃ１２Ｑ	*1/6893(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6893	Ｚ	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全80頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-544967(P2024-544967)
(86)(22)出願日　令和5年2月3日(2023.2.3)
(85)翻訳文提出日　令和6年7月29日(2024.7.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/061978
(87)国際公開番号　WO2023/150708
(87)国際公開日　令和5年8月10日(2023.8.10)
(31)優先権主張番号　63/307,085
(32)優先日　令和4年2月5日(2022.2.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,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
最終頁に続く

(71)出願人　595117091
ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
ＢＥＣＴＯＮ，ＤＩＣＫＩＮＳＯＮ ＡＮＤ ＣＯＭＰＡＮＹ
アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー ０７４１７－１８８０ フランクリン・レイクス ベクトン・ドライブ １
(74)代理人　100103610
弁理士　▲吉▼田 和彦
(74)代理人　100109070
弁理士　須田 洋之
(74)代理人　100119013
弁理士　山崎 一夫
(74)代理人　100123777
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　短い核酸標的の増幅のためにゲノムＤＮＡを分離するための方法

(57)【要約】
本明細書に開示されるものには、試料中の標的核酸配列の検出に使用するための方法、組成物、及びキットが含まれる。提供されるものには、ｄｓＤＮＡを分離するための酸性組成物が含まれる。一部の実施形態では、酸性組成物は、一価塩及び／又は二価塩、１種又は複数種の界面活性剤、並びに酸性薬剤を含む。一部の実施形態では、酸性組成物のｐＨは、４未満である。緩衝剤及び１種又は複数種の増幅剤を含む試薬組成物もまた、本明細書に提供される。

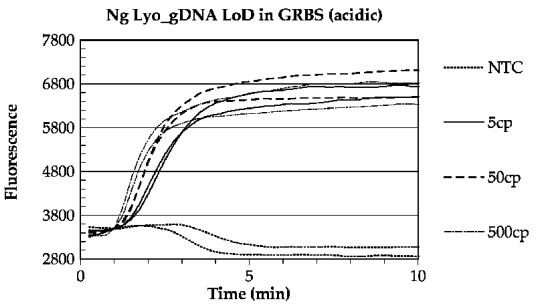

FIG. 4B

【特許請求の範囲】
【請求項１】
試料中の標的核酸配列を増幅するための方法であって、
（ａ）生物学的実体を含む試料を酸性組成物と接触させて、酸性混合物を生成するステップ、
ここで、前記酸性組成物は、前記生物学的実体を溶解して、それらの中に含まれる試料核酸を放出させることが可能であり、前記試料核酸は、標的核酸配列を含むことが疑われる二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）を含み、前記標的核酸配列が、１００ヌクレオチド以下の長さであり、
前記酸性組成物は、４未満のｐＨを有し、（ｉ）一価塩及び／又は二価塩、（ｉｉ）１種又は複数種の界面活性剤、並びに（ｉｉｉ）酸性薬剤を含み、これにより前記ｄｓＤＮＡを変性させて、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）を生成する；
（ｂ）緩衝剤を含む試薬組成物を前記酸性混合物と接触させて、中性混合物を生成するステップ、ここで、前記中性混合物は、前記ｓｓＤＮＡを含み、前記試薬組成物は、１種又は複数種の増幅試薬を含む；並びに
（ｃ）前記中性混合物中の前記標的核酸配列を増幅し、それにより核酸増幅産物を生成するステップ、ここで、任意に、前記試薬組成物は、乾燥組成物又は湿潤組成物である
を含む方法。
【請求項２】
前記標的核酸配列を増幅するステップは、約２０分間以内に検出可能レベルで前記核酸増幅産物を生成することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記酸性組成物は、約１～約６．９のｐＨ、任意に、約１～約３．９のｐＨ、さらに任意に、約２．２のｐＨを有する、請求項１～２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４】
前記中性混合物は、約７～約９のｐＨを有し、任意に、前記中性混合物は、約８．８のｐＨを有する、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
前記方法は、前記試料中の前記標的核酸配列を検出するステップをさらに含み、前記試料中の前記標的核酸配列を検出するステップは、
（ｄ）前記核酸増幅産物を検出するステップ、ここで、前記検出するステップは、前記試薬組成物が前記酸性混合物と接触した時点から約２０分未満、約１５分未満、約１０分未満又は約５分未満に実施される
を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
前記試薬組成物を前記酸性混合物と接触させるステップは、前記酸性混合物中に前記試薬組成物を溶解させることを含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記１種又は複数種の増幅試薬は、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、第１のプライマー、第２のプライマー及びｄＮＴＰの１種又は複数種を含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
前記試薬組成物は、凍結乾燥及び／又は加熱乾燥されており、且つ、１種又は複数種の添加剤を含み、ここで、前記前記１種又は複数種の添加剤は、
アミノ酸；
糖若しくは糖アルコール、ここで、任意に、前記糖若しくは糖アルコールは、スクロース、ラクトース、トレハロース、デキストラン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、若しくはそれらのあらゆる組合せを含む；及び／又は
ポリマー、ここで、任意に、前記ポリマーは、ポリエチレングリコール、デキストラン

、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルセルロース、フィコール、アルブミン、ポリペプチド、コラーゲンペプチド、若しくはそれらのあらゆる組合せを含む
を含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
前記標的核酸配列を含むことが疑われる前記ｄｓＤＮＡは、互いに相補的な第１の鎖及び第２の鎖を含む、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
前記標的核酸配列を増幅するステップは、
等温増幅条件下で前記標的核酸配列を増幅すること、ここで、前記増幅することは、前記ｓｓＤＮＡを、下記（ｉ）及び（ｉｉ）：
ｉ）第１のプライマー及び第２のプライマー、ここで前記第１のプライマーは、前記標的核酸配列の前記第１の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能であり、前記第２のプライマーは、前記標的核酸配列の前記第２の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能である；並びに
ｉｉ）超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素であって、それにより核酸増幅産物を生成する、前記酵素、ここで、前記核酸増幅産物は、下記
（１）前記第１のプライマーの配列及びその逆相補体、
（２）前記第２のプライマーの配列及びその逆相補体、並びに
（３）（１）前記第１のプライマーの配列及びその逆相補体並びに（２）前記第２のプライマーの配列及びその逆相補体によりフランキングされているスペーサー配列、ここで、前記スペーサー配列は、１～１０塩基長である、を含む
と接触させることを含む
を含む、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
前記超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列又はその機能的断片と少なくとも約９０％同一であるアミノ酸配列を有しており、任意に、前記超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも約９５％同一であるアミノ酸配列を有し、さらに任意に、前記超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列を含むポリメラーゼである、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
前記超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、エキソヌクレアーゼ活性が低いか又はエキソヌクレアーゼ活性を有さない、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記第１のプライマー及び／又は前記第２のプライマーは、約８～１６塩基長であり、任意に、前記第１のプライマー及び／又は前記第２のプライマーは、ＤＮＡ塩基、修飾ＤＮＡ塩基、又はそれらの組合せの１種又は複数種を含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記核酸増幅産物は、約２０～４０塩基長である、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
前記スペーサー配列は、前記標的核酸配列の一部を含み、任意に、前記スペーサー配列は、１～１０塩基長である、請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記ｄｓＤＮＡは、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）、プラスミドＤＮＡ又はその両方を含む、請求項１～１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
前記生物学的実体は、原核細胞、真核細胞、ウイルス粒子、エキソソーム、プロトプラ

スト、及び微小胞の１種若しくは複数種を含む；並びに／又は
　前記生物学的実体は、ウイルス、細菌、真菌、原生動物、それらの一部、若しくはそれらのあらゆる組合せを含む、
請求項１～１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
　前記標的核酸配列は、ウイルス、細菌、真菌、又は原生動物（protozoa）の核酸配列であり、任意に、前記試料核酸は、ウイルス、細菌、真菌、又は原生動物に由来する、請求項１～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
　前記ウイルスは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、ヒト免疫不全ウイルス１型（ＨＩＶ－１）、ヒトＴ細胞リンパ球指向性ウイルス１型（ＨＴＬＶ－１）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、単純ヘルペス、ヘルペスウイルス６、ヘルペスウイルス７、エプスタインバーウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、サイトメガロウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ＪＣウイルス、パルボウイルスＢ１９、Ａ型インフルエンザ、Ｂ型インフルエンザ、Ｃ型インフルエンザ、ロタウイルス、ヒトアデノウイルス、風疹ウイルス、ヒトエンテロウイルス、生殖器ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、及びハンタウイルスであり；
　前記細菌は、マイコバクテリア・ツベルクローシス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉａ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、リケッチア・リケッチイ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｒｉｃｋｅｔｔｓｉｉ）、エールリッヒア・シャフェンシス（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ ｃｈａｆｆｅｅｎｓｉｓ）、ボレリア・ブルグドルフェリ（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）、エルシニア・ペスチス（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｐｅｓｔｉｓ）、梅毒トレポネーマ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐａｌｌｉｄｕｍ）、クラミジア・トラコマティス（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）、クラミジア・ニューモニエ（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、マイコプラズマ・ニューモニエ（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、マイコプラズマ種（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｓｐ．）、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）、レジオネラ・ドゥモフィ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｄｕｍｏｆｆｉｉ）、マイコプラズマ・フェルメンタンス（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ）、エーリキア種（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ ｓｐ．）、ヘモフィルス・インフルエンザエ（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）、ナイセリア・メニンギティディス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、ナイセリア・ゴノレア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、ストレプトコッカス・ニューモニア（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａ）、Ｓ．アガラクチア（Ｓ．ａｇａｌａｃｔｉａｅ）、及びリステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）の１種若しくは複数種を含み、
　前記真菌は、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）、ニューモシスチス・カリニ（Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｃａｒｉｎｉｉ）、ヒストプラズマ・カプスラーツム（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｓｕｌａｔｕｍ）、ブラストミセス・デルマティティディス（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ ｄｅｒｍａｔｉｔｉｄｉｓ）、コクシジオイデス・イミチス（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｉｍｍｉｔｉｓ）、及びトリコフィトン・ルブルム（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍ）の１種若しくは複数種を含み、並びに／又は
　前記原生動物は、トリパノソーマ・クルージ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ）、リーシュマニア種（Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ ｓｐ．）、プラスモジウム（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）、赤痢アメーバ（Ｅｎｔａｍｏｅｂａ ｈｉｓｔｏｌｙｔｉｃａ）、バベシア・ミクロチ（Ｂａｂｅｓｉａ ｍｉｃｒｏｔｉ）、ランブル鞭毛虫（Ｇｉａｒｄｉａ ｌａｍｂｌｉａ）、シクロスポラ種（Ｃｙｃｌｏｓｐｏｒａ ｓｐ．）、及びエイメリア種（Ｅｉｍｅｒｉａ ｓｐ．）の１種若しくは複数種を含む、
請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】

前記試料は、生物学的試料又は環境的試料であり、
前記環境的試料が、食物試料、飲料試料、紙表面、織物表面、金属表面、木材表面、プラスチック表面、土壌試料、淡水試料、廃水試料、塩水試料、大気若しくは他の気体への曝露の試料、それらの培養物、若しくはそれらのあらゆる組合せであるか若しくはそれから得られる；及び／又は
前記生物学的試料が、組織試料、唾液、血液、血漿、血清、糞便、尿、喀痰、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、腹水、胸水、血清腫、膿汁、皮膚若しくは粘膜表面のスワブ、それらの培養物、若しくはそれらのあらゆる組合せであるか若しくはそれから得られる、請求項１～１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１】
前記酸性薬剤は、有機酸、無機酸、又はその両方を含む、請求項１～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
前記酸性薬剤は、塩酸、塩酸グリシン、硫酸、酢酸、クエン酸及びリン酸からなる群から選択される、請求項１～２１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３】
前記酸性薬剤は、約１００ｍＭ未満の、任意に、約１ｍＭ～約１００ｍＭの範囲内の濃度で、さらに任意に、約１０ｍＭの濃度で前記酸性組成物中に存在する、請求項１～２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２４】
前記一価塩及び／又は前記二価塩は、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、又はそれらのあらゆる組合せを含む、請求項１～２３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２５】
前記一価塩は、硫酸アンモニウム、フッ化ナトリウム、塩化ナトリウム、臭化ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、フッ化カリウム、塩化カリウム、臭化カリウム及びヨウ化カリウムからなる群から選択される、請求項１～２４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２６】
前記二価塩は、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化銅（ＩＩ）、塩化亜鉛、酸化カルシウム、酸化マグネシウム、酸化バリウム、硫酸ナトリウム、硫酸カルシウム、硫酸銅（ＩＩ）、炭酸カリウム及び炭酸ナトリウムからなる群から選択される、請求項１～２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２７】
前記一価塩及び／又は前記二価塩は、約１ｍＭ～約１４ｍＭの範囲内の濃度で、任意に、約５ｍＭ又は約４ｍＭの濃度で前記酸性組成物中に存在する、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２８】
前記１種又は複数種の界面活性剤は、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤及び両性界面活性剤の１種又は複数種を含む、請求項１～２７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２９】
前記１種又は複数種の界面活性剤は、前記酸性組成物の約０．０１％～約２％の容積に対する質量（％質量／容積）の範囲内の濃度で前記酸性組成物中に存在し、任意に、前記１種又は複数種の界面活性剤が、前記酸性組成物の約０．１％の容積に対する質量（％質量／容積）の濃度で前記酸性組成物中に存在する、請求項１～２８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３０】
前記酸性組成物は、キレート剤をさらに含み、任意に、前記キレート剤が、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、エチレングリコールビス（アミノエチル）Ｎ，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）及びトリスからなる群から選択される、請求項

１～２９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３１】
前記キレート剤は、約０．１ｍＭ～約１４ｍＭの範囲内の濃度で前記酸性組成物中に存在する、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記試料を前記酸性組成物と接触させるステップは、約１８℃～約９９℃の範囲内の温度で実施され、任意に、前記試料を前記酸性組成物と接触させるステップが、約７８℃の温度で実施される、請求項１～３１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３３】
前記試料を前記酸性組成物と接触させるステップは、約１８℃～約２５℃の範囲内の温度で実施される、請求項１～３１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３４】
前記試料を前記酸性組成物と接触させるステップは、約５秒間～約６０分間の期間にわたり実施される、請求項１～３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３５】
前記緩衝剤は、ＭＥＳ、ＭＯＰＳ、ＭＯＰＳＯ、トリス、ＨＥＰＥＳ、リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、アンモニウム緩衝液、又はそれらのあらゆる組合せを含む、請求項１～３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３６】
前記中性混合物は、約７～約９の範囲内のｐＨを有し、任意に、前記中性混合物が、約８．８のｐＨを有する、請求項１～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
前記標的核酸配列は、約９０ヌクレオチド以下の長さを含み、任意に、前記標的核酸配列が、約３０ヌクレオチドの長さを含む、請求項１～３６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３８】
前記増幅するステップは、等温増幅条件で実施され、任意に、前記等温増幅条件が、約３０℃～約７２℃の一定温度を含み、さらに任意に、前記等温増幅条件が、約６７℃の一定温度を含む、請求項１～３７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３９】
前記増幅するステップは、約５分間、約６分間、約７分間、約８分間、約９分間、約１０分間、約２０分間、約３０分間、約４０分間、約５０分間又は約６０分間の期間にわたり実施され、任意に、前記増幅するステップが、約１５分間の期間にわたり実施される、請求項１～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４０】
前記増幅するステップは、無ヘリカーゼ、無一本鎖結合タンパク質、無切断剤及び無リコンビナーゼ等温増幅条件で実施される、請求項１～３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
ステップ（ｄ）は、前記試料中の前記標的核酸配列を含む前記ｄｓＤＮＡの量を決定することをさらに含む、請求項１～４０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４２】
前記核酸増幅産物を検出するステップは、リアルタイム検出方法の使用を含む、請求項１～４１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４３】
前記核酸増幅産物を検出するステップは、前記核酸増幅産物を、前記核酸増幅産物にハイブリダイズすることが可能なシグナル発生オリゴヌクレオチドと接触させることを含み、前記シグナル発生オリゴヌクレオチドは、フルオロフォア、クエンチャー又はその両方を含む、請求項１～４２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４４】
前記核酸増幅産物を検出するステップは、蛍光シグナルを検出することを含み、任意に、前記蛍光シグナルは、分子ビーコンからのものである、請求項１～４３のいずれか１項

に記載の方法。
【請求項４５】
単一の反応ベッセルにおいて実施される、請求項１～４４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４６】
前記増幅するステップは、２種又はそれよりも多くの標的核酸配列のマルチプレックス増幅を含み、前記検出するステップは、前記２種又はそれよりも多くの標的核酸配列に由来する２種又はそれよりも多くの核酸増幅産物のマルチプレックス検出を含み、任意に、前記２種又はそれよりも多くの標的核酸配列が、２種又はそれよりも多くの異なる生物に特異的である、請求項１～４５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４７】
前記増幅するステップは、前記超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素以外のいかなる酵素の使用も含まない、請求項１～４６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４８】
前記増幅するステップは、以下のもの：古細菌ポリメラーゼ増幅（ＡＰＡ）、ループ媒介性等温増幅（ＬＡＭＰ）、ヘリカーゼ依存性増幅（ＨＤＡ）、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）、鎖置換増幅（ＳＤＡ）、核酸配列ベース増幅（ＮＡＳＢＡ）、転写媒介性増幅（ＴＭＡ）、ニッキング酵素増幅反応（ＮＥＡＲ）、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）、多置換増幅（ＭＤＡ）、ラミフィケーション（ＲＡＭ）、環状ヘリカーゼ依存性増幅（ｃＨＤＡ）、単一プライマー等温増幅（ＳＰＩＡ）、シグナル媒介性ＲＮＡ増幅技術（ＳＭＡＲＴ）、自家持続配列複製（３ＳＲ）、ゲノム指数関数的増幅反応（ＧＥＡＲ）及び等温多置換増幅（ＩＭＤＡ）の１種又は複数種を含む、請求項１～４７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４９】
前記増幅するステップは、以下のもの：古細菌ポリメラーゼ増幅（ＡＰＡ）、ＬＡＭＰ、ＨＤＡ、ＲＰＡ、ＳＤＡ、ＮＡＳＢＡ、ＴＭＡ、ＮＥＡＲ、ＲＣＡ、ＭＤＡ、ＲＡＭ、ｃＨＤＡ、ＳＰＩＡ、ＳＭＡＲＴ、３ＳＲ、ＧＥＡＲ及びＩＭＤＡの１種又は複数種を含まず、任意に、前記増幅するステップは、ＬＡＭＰを含まない、請求項１～４８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５０】
（ｉ）前記酸性混合物を希釈すること；（ｉｉ）前記中性混合物を希釈すること；（ｉｉｉ）前記酸性混合物を熱変性させること；（ｉｖ）前記酸性混合物を超音波処理すること；（ｖ）前記中性混合物を超音波処理すること；（ｖｉ）リボヌクレアーゼ阻害剤を前記酸性混合物に添加すること；（ｖｉｉ）リボヌクレアーゼ阻害剤を前記中性混合物に添加すること；（ｖｉｉｉ）前記試料を精製すること；（ｉｘ）前記試料核酸を精製すること；（ｘ）前記核酸増幅産物を精製すること；（ｘｉ）前記酸性混合物又は前記中性混合物から前記１種又は複数種の界面活性剤を除去すること；（ｘｉｉ）増幅前及び／又は増幅中に前記試料核酸を熱変性及び／又は酵素変性させること；（ｘｉｉｉ）リボヌクレアーゼＨを前記酸性混合物又は前記中性混合物に添加すること；（ｘｉｖ）前記試料、前記酸性混合物又は前記中性混合物をヘリカーゼ、一本鎖結合タンパク質、ニッキング酵素、制限酵素又はリコンビナーゼと接触させること；（ｘｖ）前記試料、前記酸性混合物又は前記中性混合物をグリセロール、ホルムアミド又は尿素と接触させること；（ｘｖｉ）前記酸性混合物又は前記中性混合物から前記ｓｓＤＮＡを精製すること；（ｘｖｉｉ）熱変性ステップ；並びに（ｘｖｉｉｉ）前記ｄｓＤＮＡを富化、精製及び／又は単離することの１つ又は複数を含まない、請求項１～４９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５１】
前記酸性組成物及び／又は前記試薬組成物は、還元剤、キレート剤又はその両方を含まない、請求項１～５０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５２】
前記キレート剤は、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、エチレングリコールビス（

アミノエチル）Ｎ，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）、トリス、若しくはそれらのあらゆる組合せを含む群から選択される；並びに／又は
前記還元剤は、２－メルカプトエタノール、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、ジチオエリトリトール（ＤＴＥ）、還元型グルタチオン、システアミン、トリ－ｎ－ブチルホスフィン（ＴＢＰ）、ジチオエリトリオール、トリス（３－ヒドロキシプロピル）ホスフィン（ＴＨＰＰ）、２－メルカプトエチルアミン－ＨＣｌ、ジチオブチルアミン（ＤＴＢＡ）、システイン、システイン－チオグリコレート、亜硫酸の塩、チオグリコール酸及びヒドロキシエチルジスルフィド（ＨＥＤ）、若しくはそれらのあらゆる組合せの群から選択される、
請求項５１に記載の方法。

【請求項５３】
前記酸性組成物は、アニオン性界面活性剤及びカチオン性界面活性剤の両方を含まない、請求項１～５２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５４】
前記酸性組成物は、ｔｗｅｅｎ界面活性剤をさらに含み、任意に、前記ｔｗｅｅｎ界面活性剤は、Ｔｗｅｅｎ２０、Ｔｗｅｅｎ４０、Ｔｗｅｅｎ４５、Ｔｗｅｅｎ６０、Ｔｗｅｅｎ６５、Ｔｗｅｅｎ８０、Ｔｗｅｅｎ８１及びＴｗｅｅｎ８５からなる群から選択され、さらに任意に、前記ｔｗｅｅｎ界面活性剤は、前記酸性組成物の約０．０１％（質量／容積）を構成する、請求項１～５３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５５】
生物学的実体を溶解し、それらの中に含まれる二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）を変性させるための酸性組成物であって、
前記酸性組成物中の３０ｍＭ未満の濃度の一価塩及び／又は前記酸性組成物中の１５ｍＭ未満の濃度の二価塩；
１種又は複数種の界面活性剤；並びに
１００ｍＭ未満の濃度で前記酸性組成物中に存在する酸性薬剤
を含み、４未満のｐＨを有する、酸性組成物。

【請求項５６】
還元剤、キレート剤又はその両方を含まない、請求項５５に記載の酸性組成物。

【請求項５７】
前記キレート剤は、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、エチレングリコールビス（アミノエチル）Ｎ，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）、トリス、若しくはそれらのあらゆる組合せを含む群から選択される；並びに／又は
前記還元剤は、２－メルカプトエタノール、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、ジチオエリトリトール（ＤＴＥ）、還元型グルタチオン、システアミン、トリ－ｎ－ブチルホスフィン（ＴＢＰ）、ジチオエリトリオール、トリス（３－ヒドロキシプロピル）ホスフィン（ＴＨＰＰ）、２－メルカプトエチルアミン－ＨＣｌ、ジチオブチルアミン（ＤＴＢＡ）、システイン、システイン－チオグリコレート、亜硫酸の塩、チオグリコール酸及びヒドロキシエチルジスルフィド（ＨＥＤ）、若しくはそれらのあらゆる組合せの群から選択される、
請求項５６に記載の酸性組成物。

【請求項５８】
アニオン性界面活性剤及びカチオン性界面活性剤の両方を含まない、請求項５５～５７のいずれか１項に記載の酸性組成物。

【請求項５９】
グリセロール、ホルムアミド又は尿素を含まない、請求項５５～５８のいずれか１項に記載の酸性組成物。

【請求項６０】
約１～約３．９の範囲内のｐＨを有し、任意に、約２のｐＨを有する、請求項５５～５９のいずれか１項に記載の酸性組成物。

【請求項６１】
前記酸性薬剤は、有機酸及び／又は無機酸を含む、請求項５５～６０のいずれか１項に記載の酸性組成物。
【請求項６２】
前記酸性薬剤は、塩酸、塩酸グリシン、酢酸、クエン酸及びリン酸からなる群から選択される、請求項５５～６１のいずれか１項に記載の酸性組成物。
【請求項６３】
前記酸性薬剤は、約１ｍＭ～約１００ｍＭの範囲内の濃度で前記酸性組成物中に存在し、任意に、前記酸性薬剤は、約１０ｍＭの濃度で前記酸性組成物中に存在する、請求項５５～６２のいずれか１項に記載の酸性組成物。
【請求項６４】
前記一価塩及び／又は前記二価塩は、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、又はそれらのあらゆる組合せを含む、請求項５５～６３のいずれか１項に記載の酸性組成物。
【請求項６５】
前記一価塩は、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、フッ化ナトリウム、塩化ナトリウム、臭化ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、フッ化カリウム、塩化カリウム、臭化カリウム及びヨウ化カリウムからなる群から選択される、請求項５５～６４のいずれか１項に記載の酸性組成物。
【請求項６６】
前記二価塩は、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化銅（ＩＩ）、塩化亜鉛、酸化カルシウム、酸化マグネシウム、酸化バリウム、硫酸ナトリウム、硫酸カルシウム、硫酸銅（ＩＩ）、炭酸カリウム及び炭酸ナトリウムからなる群から選択される、請求項５５～６５のいずれか１項に記載の酸性組成物。
【請求項６７】
前記一価塩及び／又は前記二価塩は、約１ｍＭ～約１４ｍＭの範囲内の濃度で前記酸性組成物中に存在し、任意に、前記一価塩及び／又は前記二価塩は、約５ｍＭ又は約４ｍＭの濃度で前記酸性組成物中に存在する、請求項５５～６６のいずれか１項に記載の酸性組成物。
【請求項６８】
前記１種又は複数種の界面活性剤は、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤及び両性界面活性剤の１種又は複数種を含む、請求項５５～６７のいずれか１項に記載の酸性組成物。
【請求項６９】
前記１種又は複数種の界面活性剤は、前記酸性組成物の約０．０１％～約２％の容積に対する質量（％質量／容積）の範囲内の濃度で前記酸性組成物中に存在し、任意に、前記１種又は複数種の界面活性剤は、前記酸性組成物の約０．１％の容積に対する質量（％質量／容積）の濃度で前記酸性組成物中に存在する、請求項５５～６８のいずれか１項に記載の酸性組成物。
【請求項７０】
前記酸性組成物は、ｔｗｅｅｎ界面活性剤をさらに含み、任意に、前記ｔｗｅｅｎ界面活性剤は、Ｔｗｅｅｎ２０、Ｔｗｅｅｎ４０、Ｔｗｅｅｎ４５、Ｔｗｅｅｎ６０、Ｔｗｅｅｎ６５、Ｔｗｅｅｎ８０、Ｔｗｅｅｎ８１及びＴｗｅｅｎ８５からなる群から選択され、さらに任意に、前記ｔｗｅｅｎ界面活性剤は、前記酸性組成物の約０．０１％～約１％（質量／容積）を構成する、請求項５５～６９のいずれか１項に記載の酸性組成物。
【請求項７１】
前記酸性組成物は、キレート剤をさらに含み、任意に、前記キレート剤は、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、エチレングリコールビス（アミノエチル）Ｎ，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）、トリス、又はそれらのあらゆる組合せを含む群から選択され、さらに任意に、前記キレート剤は、約０．１ｍＭ～約１４ｍＭの範囲内

の濃度で前記酸性組成物中に存在する、請求項５５～７０のいずれか１項に記載の酸性組成物。
【請求項７２】
試料中の標的核酸配列を検出するためのキットであって、
（ａ）請求項５５～７１のいずれか１項に記載の酸性組成物であって、前記酸性組成物が、生物学的実体を溶解して、それらの中に含まれる試料核酸を放出させることが可能であり、前記試料核酸は、標的核酸配列を含むことが疑われる二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）を含み、前記標的核酸配列は、１００ヌクレオチド以下の長さである、酸性組成物；並びに
（ｂ）緩衝剤、及び等温増幅条件下で前記標的核酸配列を増幅するための１種又は複数種の増幅試薬を含む試薬組成物、ここで、前記１種又は複数種の増幅試薬は、以下の（ｉ）及び（ｉｉ）：
（ｉ）第１のプライマー及び第２のプライマー、ここで、前記第１のプライマーは、前記標的核酸配列の第１の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能であり、前記第２のプライマーは、前記標的核酸配列の第２の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能である；並びに
（ｉｉ）核酸増幅産物を生成することが可能な超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素
を含み、任意に、前記試薬組成物が、乾燥組成物又は湿潤組成物である、試薬組成物
を含むキット。
【請求項７３】
前記緩衝剤は、ＭＥＳ、ＭＯＰＳ、ＭＯＰＳＯ、トリス、ＨＥＰＥＳ、リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、アンモニウム緩衝液、又はそれらのあらゆる組合せを含む群から選択される、請求項７２に記載のキット。
【請求項７４】
核酸増幅産物のリアルタイム検出活性を提供する少なくとも１種の成分をさらに含み、任意に、前記リアルタイム検出活性は、分子ビーコンにより提供される、請求項７２～７３のいずれか１項に記載のキット。
【請求項７５】
前記超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列又はその機能的断片と少なくとも約９０％同一であるアミノ酸配列を有しており、任意に、前記超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列と少なくとも約９５％同一であるアミノ酸配列を有し、さらに任意に、前記超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列を含むポリメラーゼである、請求項７２～７４のいずれか１項に記載のキット。
【請求項７６】
前記核酸増幅産物は約２０～４０塩基長であり、且つ、前記核酸増幅産物は、
（１）第１のプライマーの配列及びその逆相補体、
（２）第２のプライマーの配列及びその逆相補体、並びに
（３）（１）第１のプライマーの配列及びその逆相補体並びに（２）第２のプライマーの配列及びその逆相補体によりフランキングされているスペーサー配列、ここで、前記スペーサー配列は１～１０塩基長である
を含む、請求項７２～７５のいずれか１項に記載のキット。
【請求項７７】
前記生物学的実体は、原核細胞、真核細胞、ウイルス粒子、エキソソーム、プロトプラスト、及び微小胞の１種若しくは複数種を含み、任意に、前記生物学的実体は、ウイルス、細菌、真菌、原生動物（protozoa）、それらの一部、若しくはそれらのあらゆる組合せを含む、請求項７２～７６のいずれか１項に記載のキット。
【請求項７８】
標的核酸配列は、ウイルス、細菌、真菌、若しくは原生動物の核酸配列であり、任意に

、前記試料核酸は、ウイルス、細菌、真菌、若しくは原生動物に由来する、
請求項７２～７７のいずれか１項に記載のキット。
【請求項７９】
前記ウイルスは、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、ヒト免疫不全ウイルス１型（ＨＩＶ－１）、ヒトＴ細胞リンパ球指向性ウイルス１型（ＨＴＬＶ－１）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、単純ヘルペス、ヘルペスウイルス６、ヘルペスウイルス７、エプスタインバーウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、サイトメガロウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ＪＣウイルス、パルボウイルスＢ１９、Ａ型インフルエンザ、Ｂ型インフルエンザ、Ｃ型インフルエンザ、ロタウイルス、ヒトアデノウイルス、風疹ウイルス、ヒトエンテロウイルス、生殖器ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）、及びハンタウイルスであり；
前記細菌は、マイコバクテリア・ツベルクローシス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉａ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、リケッチア・リケッチイ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｒｉｃｋｅｔｔｓｉｉ）、エールリッヒア・シャフェンシス（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ ｃｈａｆｆｅｅｎｓｉｓ）、ボレリア・ブルグドルフェリ（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）、エルシニア・ペスチス（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｐｅｓｔｉｓ）、梅毒トレポネーマ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐａｌｌｉｄｕｍ）、クラミジア・トラコマティス（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）、クラミジア・ニューモニエ（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、マイコプラズマ・ニューモニエ（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、マイコプラズマ種（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｓｐ．）、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）、レジオネラ・ドゥモフィ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｄｕｍｏｆｆｉｉ）、マイコプラズマ・フェルメンタンス（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ）、エーリキア種（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ ｓｐ．）、ヘモフィルス・インフルエンザエ（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）、ナイセリア・メニンギティディス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、ナイセリア・ゴノレア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、ストレプトコッカス・ニューモニア（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａ）、Ｓ．アガラクチア（Ｓ．ａｇａｌａｃｔｉａｅ）、及びリステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）の１種若しくは複数種を含み、
前記真菌は、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）、ニューモシスチス・カリニ（Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｃａｒｉｎｉｉ）、ヒストプラズマ・カプスラーツム（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｓｕｌａｔｕｍ）、ブラストミセス・デルマティティディス（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ ｄｅｒｍａｔｉｔｉｄｉｓ）、コクシジオイデス・イミチス（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｉｍｍｉｔｉｓ）、及びトリコフィトン・ルブルム（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍ）の１種若しくは複数種を含み、並びに／又は
前記原生動物は、トリパノソーマ・クルージ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ）、リーシュマニア種（Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ ｓｐ．）、プラスモジウム（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）、赤痢アメーバ（Ｅｎｔａｍｏｅｂａ ｈｉｓｔｏｌｙｔｉｃａ）、バベシア・ミクロチ（Ｂａｂｅｓｉａ ｍｉｃｒｏｔｉ）、ランブル鞭毛虫（Ｇｉａｒｄｉａ ｌａｍｂｌｉａ）、シクロスポラ種（Ｃｙｃｌｏｓｐｏｒａ ｓｐ．）、及びエイメリア種（Ｅｉｍｅｒｉａ ｓｐ．）の１種若しくは複数種を含む、
請求項７８に記載のキット。
【請求項８０】
前記第１のプライマー及び／又は前記第２のプライマーは、約８～１６塩基長であり、任意に、前記第１のプライマー及び／又は前記第２のプライマーは、ＤＮＡ塩基、修飾ＤＮＡ塩基、又はそれらの組合せの１種又は複数種を含む、請求項７２～７９のいずれか１項に記載のキット。
【請求項８１】
前記試薬組成物は、凍結乾燥及び／又は加熱乾燥されており、且つ、１種又は複数種の

添加剤を含み、ここで、前記１種又は複数種の添加剤は、
アミノ酸；
糖若しくは糖アルコール、ここで、任意に、前記糖若しくは糖アルコールは、スクロース、ラクトース、トレハロース、デキストラン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、若しくはそれらのあらゆる組合せを含む；及び／又は
ポリマー、ここで、任意に、前記ポリマーは、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルセルロース、フィコール、アルブミン、ポリペプチド、コラーゲンペプチド、若しくはそれらのあらゆる組合せを含む、
を含む、請求項７２～８０のいずれか１項に記載のキット。
【請求項８２】
前記酸性組成物及び前記試薬組成物の混合物は、約７～約９のｐＨ、任意に、約８．８のｐＨを有する、請求項７２～８１のいずれか１項に記載のキット。
【請求項８３】
前記試料、前記酸性組成物及び前記試薬組成物の混合物は、約７～約９のｐＨ、任意に、約８．８のｐＨを有する、請求項７２～８２のいずれか１項に記載のキット。
【請求項８４】
前記緩衝剤は、トリスを含み、前記試料、前記酸性組成物及び前記試薬組成物の混合物は、約３０ｍＭトリス～約５０ｍＭトリスの範囲内の濃度でトリスを含む、請求項７２～８３のいずれか１項に記載のキット。
【請求項８５】
前記酸性組成物及び前記試薬組成物を収容する無菌容器を含む、請求項７２～８４のいずれか１項に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、米国特許法１１９条（ｅ）の下、２０２２年２月５日に出願された米国仮特許出願第６３／３０７，０８５号の利益を主張するものであり、この関連出願の内容は、その全体があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。
配列表の参照
本出願は、電子形式の配列表と共に出願されている。配列表は、２０２３年２月２日に作成された、６８ＥＢ－３１７３３３－ＷＯという名称のファイルとして提供され、サイズは８．０キロバイトである。配列表の電子形式での情報は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
本開示は、概して、核酸を増幅（例えば、等温増幅）するための方法及び組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
核酸に基づく診断は、感染症、疾患、及び／又は遺伝的変異の迅速な検出に有用であり得る。例えば、試料中の細菌核酸又はウイルス核酸の識別は、特定のタイプの感染症を診断するのに有用であり得る。他の例としては、疾病管理又は法医学のための一塩基多型の識別、及び遺伝子改変食品であること示す遺伝的変異の識別が挙げられる。多くの場合、核酸に基づく診断アッセイでは、試料中の核酸の特定部分を増幅することが必要である。核酸増幅の一般的な技法は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）である。この技法では、典型的には、変性（例えば、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）複合体の鎖の分離）、オリゴヌクレオチドプライマー（相補的なＤＮＡ配列の短い鎖）のアニーリング、及びポリメラーゼによる相補的標的に沿ったプライマーの伸長というステップを進行させるために温度サイクル（つまり、熱サイクル）が必要である。このような熱サイクルは、一般的に特殊な機

械を必要とする時間のかかるプロセスであり得る。したがって、熱サイクルをせずに実施することができる、より速い核酸増幅法に対する必要性が存在する。そのような方法は、例えば、オンサイト検査及びポイントオブケア診断に有用であり得る。

大部分の等温増幅方法は、ゲノムＤＮＡ鎖の分離のために、別個の熱変性ステップ、又はヘリカーゼ、一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ）若しくはニッキング酵素の存在のいずれかを必要とする。これらの要件は典型的に、余分なステップ、又は機器及び／若しくは消耗品に対する相当な出費のいずれかを加えるため、このような方法は、純粋に化学的なアプローチほど望ましくない。下流適用における使用のためにＤＮＡの鎖を分離するために、アルカリ処理、ホルムアミド、グリセロール及びＤＭＳＯを含む多数の化学的方法が以前に同定された。しかし、尿素及びホルムアミドなどの変性剤は、あらゆる増幅に先立ち溶液から除去されなければならず、これは、時間及びコストのかかるステップとなり得る。アルカリ性溶液のｐＨは、化学的精製なしで容易に調整され得るが、その適用は、ＤＮＡ鎖の分離を支持するために十分にアルカリ性である水性溶液中で、マグネシウムイオンが容易に可溶性とならないという事実によって限定される。化学的変性が、ＤＮＡの単純且つ迅速な変性をもたらし（試料分離、精製又は抽出ステップに対する必要性がない）、下流増幅及び検出ステップと適合性である、核酸検出の組成物及び方法に対する必要性が存在する。

【発明の概要】

【０００３】

本明細書に開示されるものには、試料中の標的核酸配列を増幅するための方法が含まれる。一部の実施形態では、この方法は、（ａ）生物学的実体を含む試料を酸性組成物と接触させて、酸性混合物を生成するステップであって、酸性組成物が、生物学的実体を溶解して、それらの中に含まれる試料核酸を放出させることが可能であり、試料核酸が、標的核酸配列を含むことが疑われる二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）を含み、標的核酸配列が、１００ヌクレオチド以下の長さであり、酸性組成物が、（ｉ）一価塩及び／又は二価塩、（ｉｉ）１種又は複数種の界面活性剤、（ｉｉｉ）１種又は複数種のキレート剤、並びに（ｉｖ）酸性薬剤を含み、酸性組成物が、４未満のｐＨを有し、これによりｄｓＤＮＡを変性させて、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）を生成する、ステップ；（ｂ）緩衝剤を含む試薬組成物（例えば、乾燥組成物、湿潤組成物）を酸性混合物と接触させて、中性混合物を生成するステップであって、中性混合物が、ｓｓＤＮＡを含み、試薬組成物が、１種又は複数種の増幅試薬を含む、ステップ；並びに（ｃ）中性混合物中の標的核酸配列を増幅し、それにより核酸増幅産物を生成するステップを含む。一部の実施形態では、標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡは、１００塩基対以下の長さである。一部の実施形態では、試料核酸の１種又は複数種は、１００塩基対以下の長さである。

【０００４】

標的核酸配列を増幅するステップは、約２０分間、約１５分間、約１０分間又は約５分間以内に検出可能レベルで核酸増幅産物を生成することを含んでいてもよい。一部の実施形態では、酸性組成物は、約１～約６．９のｐＨ、例えば、約１～約３．９のｐＨ又は約２のｐＨを有する。一部の実施形態では、中性混合物は、約７～約９のｐＨ、例えば、約８．８のｐＨを有する。この方法は、試料中の標的核酸配列を検出するステップを含んでいてもよく、試料中の標的核酸配列を検出するステップは、（ｄ）核酸増幅産物を検出するステップを含み、検出するステップは、試薬組成物が酸性混合物と接触した時点から約２０分未満、約１５分未満、約１０分未満又は約５分未満に実施される。

【０００５】

試薬組成物（例えば、乾燥組成物、湿潤組成物）を酸性混合物と接触させるステップは、酸性混合物中の試薬組成物を溶解させることを含んでいてよい。試薬組成物は、湿潤組成物又は乾燥組成物となり得る。一部の実施形態では、１種又は複数種の増幅試薬は、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、第１のプライマー、第２のプライマー及びｄＮＴＰの１種又は複数種を含む。一部の実施形態では、試薬組成物は、湿潤組成物（例えば、液体培地中に懸濁された形態の水性組成物）である。一部の実施形態では、試薬組成物は

、凍結乾燥及び／又は加熱乾燥されており（例えば、乾燥組成物）、１種又は複数種の添加剤を含み、１種又は複数種の添加剤は、アミノ酸；糖又は糖アルコールを含む。一部の実施形態では、糖又は糖アルコールは、スクロース、ラクトース、トレハロース、デキストラン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、又はそれらのあらゆる組合せを含む。一部の実施形態では、１種又は複数種の添加剤は、ポリマーを含む。一部の実施形態では、ポリマーは、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルセルロース、フィコール、アルブミン、ポリペプチド、コラーゲンペプチド、又はそれらのあらゆる組合せを含む。

【０００６】

一部の実施形態では、標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡは、互いに相補的な第１の鎖及び第２の鎖を含む。一部の実施形態では、標的核酸配列を増幅するステップは、等温増幅条件下で標的核酸配列を増幅することを含み、増幅することは、ｓｓＤＮＡを、ｉ）第１のプライマー及び第２のプライマーであって、第１のプライマーが、標的核酸配列の第１の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能であり、第２のプライマーが、標的核酸配列の第２の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能である、第１のプライマー及び第２のプライマー；並びにｉｉ）超好熱菌ポリメラーゼ活性を有し、それにより核酸増幅産物を生成する酵素であって、核酸増幅産物が、（１）第１のプライマーの配列及びその逆相補体、（２）第２のプライマーの配列及びその逆相補体、並びに（３）（１）第１のプライマーの配列及びその逆相補体並びに（２）第２のプライマーの配列及びその逆相補体によりフランキングされているスペーサー配列を含み、スペーサー配列が、１～１０塩基長である、酵素と接触させることを含む。

超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列又はその機能的断片と少なくとも約９０％同一又は少なくとも約９５％同一であるアミノ酸配列を有することができる。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列を含むポリメラーゼである。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、エキソヌクレアーゼ活性が低いか又はエキソヌクレアーゼ活性を有さない。

【０００７】

一部の実施形態では、第１のプライマー及び／又は第２のプライマーは、約８～１６塩基長である。一部の実施形態では、第１のプライマー及び／又は第２のプライマーは、ＤＮＡ塩基、修飾ＤＮＡ塩基又はそれらの組合せの１種又は複数種を含む。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、約２０～４０塩基長である。一部の実施形態では、スペーサー配列は、標的核酸配列の一部を含む。一部の実施形態では、スペーサー配列は１～１０塩基長である。ｄｓＤＮＡは、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）、プラスミドＤＮＡ又はその両方を含むことができる。

試料は、例えば、生物学的試料又は環境的試料となり得る。一部の実施形態では、環境的試料は、食物試料、飲料試料、紙表面、織物表面、金属表面、木材表面、プラスチック表面、土壌試料、淡水（ｆｒｅｓｈ　ｗａｔｅｒ）試料、廃水試料、塩水試料、大気若しくは他の気体への曝露の試料、それらの培養物、又はそれらのあらゆる組合せであるか又はそれから得られる。一部の実施形態では、生物学的試料は、組織試料、唾液、血液、血漿、血清、糞便、尿、喀痰、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、腹水、胸水、血清腫、膿汁、皮膚若しくは粘膜表面のスワブ、それらの培養物、又はそれらのあらゆる組合せであるか又はそれから得られる。

【０００８】

一部の実施形態では、酸性薬剤は、有機酸、無機酸、又はその両方を含む。一部の実施形態では、酸性薬剤は、塩酸、塩酸グリシン、酢酸、クエン酸及びリン酸から選択される。一部の実施形態では、酸性薬剤は、約２０ｍＭ未満の濃度で酸性組成物中に存在する。例えば、酸性薬剤は、約１ｍＭ～約１００ｍＭの範囲内の濃度で、例えば、約１０ｍＭの濃度で酸性組成物中に存在し得る。

一価塩及び／又は二価塩は、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、又はそれらのあらゆる組合せを含むことができる。一部の実施形態では、一価塩は、硫酸アンモニウム、フッ化ナトリウム、塩化ナトリウム、臭化ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、フッ化カリウム、塩化カリウム、臭化カリウム及びヨウ化カリウムから選択される。一部の実施形態では、二価塩は、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化銅（ＩＩ）、塩化亜鉛、酸化カルシウム、酸化マグネシウム、酸化バリウム、硫酸ナトリウム、硫酸カルシウム、硫酸銅（ＩＩ）、炭酸カリウム及び炭酸ナトリウムからなる群から選択される。一部の実施形態では、一価塩及び／又は二価塩は、約１ｍＭ～約１４ｍＭの範囲内の濃度、例えば、約５ｍＭ又は約４ｍＭの濃度で酸性組成物中に存在する。

【０００９】

１種又は複数種の界面活性剤は、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤及び両性界面活性剤の１種又は複数種を含むことができる。一部の実施形態では、１種又は複数種の界面活性剤は、酸性組成物の約０．０１％～約２％の容積に対する質量（％質量／容積）の範囲内の濃度で酸性組成物中に存在する。一部の実施形態では、１種又は複数種の界面活性剤は、酸性組成物の約０．１％の容積に対する質量（％質量／容積）の濃度で酸性組成物中に存在する。一部の実施形態では、酸性組成物は、キレート剤をさらに含む。一部の実施形態では、キレート剤は、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、エチレングリコールビス（アミノエチル）Ｎ，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）及びトリスから選択される。一部の実施形態では、キレート剤は、約０．１ｍＭ～約１４ｍＭの範囲内の濃度で酸性組成物中に存在する。

一部の実施形態では、試料を酸性組成物と接触させるステップは、約１８℃～約９９℃の範囲内の温度で、例えば、約７８℃の温度で実施される。一部の実施形態では、試料を酸性組成物と接触させるステップは、約１８℃～約２５℃の範囲内の温度で実施される。一部の実施形態では、試料を酸性組成物と接触させるステップは、約５秒間、約１０秒間、約２０秒間、約３０秒間、約４０秒間、約５０秒間、約１分間、約２分間、約３分間、約４分間、約５分間、約６分間、約７分間、約８分間、約９分間、約１０分間、約２０分間、約３０分間、約４０分間、約５０分間又は約６０分間の期間にわたり実施される。一部の実施形態では、緩衝剤は、ＭＥＳ、ＭＯＰＳ、ＭＯＰＳＯ、トリス、ＨＥＰＥＳ、リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、アンモニウム緩衝液、又はそれらのあらゆる組合せを含む。一部の実施形態では、中性混合物は、約７～約９の範囲内のｐＨ、例えば、約８．８のｐＨを有する。

【００１０】

一部の実施形態では、標的核酸配列は、約２０ヌクレオチド以下、約３０ヌクレオチド以下、約４０ヌクレオチド以下、約５０ヌクレオチド以下、約６０ヌクレオチド以下、又は約９０ヌクレオチド以下の長さを含む。一部の実施形態では、標的核酸配列は、約３０ヌクレオチドの長さを含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、等温増幅条件で実施される。一部の実施形態では、等温増幅条件は、約３０℃～約７２℃の一定温度、例えば、約６７℃の一定温度を含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、約５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０又は６０分間の期間、例えば、約１５分間の期間にわたり実施される。

【００１１】

増幅するステップは、無ヘリカーゼ、無一本鎖結合タンパク質、無切断剤及び無リコンビナーゼ、等温増幅条件で実施され得る。一部の実施形態では、ステップ（ｄ）は、試料中の標的核酸配列を含むｄｓＤＮＡの量を決定することをさらに含む。一部の実施形態では、核酸増幅産物を検出するステップは、リアルタイム検出方法の使用を含む。一部の実施形態では、核酸増幅産物を検出するステップは、核酸増幅産物を、核酸増幅産物にハイブリダイズすることが可能なシグナル発生オリゴヌクレオチドと接触させることを含み、シグナル（ｓｉｎｇｌｅ）発生オリゴヌクレオチドは、フルオロフォア、クエンチャー又はその両方を含む。一部の実施形態では、核酸増幅産物の検出は、蛍光シグナルを検出す

ることを含む。一部の実施形態では、蛍光シグナルは、分子ビーコンからのものである。一部の実施形態では、この方法は、単一の反応ベッセル内で実施される。一部の実施形態では、増幅するステップは、２種又はそれよりも多くの標的核酸配列のマルチプレックス増幅を含む。一部の実施形態では、検出するステップは、前記２種又はそれよりも多くの標的核酸配列に由来する２種又はそれよりも多くの核酸増幅産物のマルチプレックス検出を含む。一部の実施形態では、２種又はそれよりも多くの標的核酸配列は、２種又はそれよりも多くの異なる生物に特異的である。

【００１２】

一部の実施形態では、増幅するステップは、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素以外のいかなる酵素の使用も含まない。一部の実施形態では、増幅するステップは、以下のもの：古細菌ポリメラーゼ増幅（ＡＰＡ）、ループ媒介性等温増幅（ＬＡＭＰ）、ヘリカーゼ依存性増幅（ＨＤＡ）、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）、鎖置換増幅（ＳＤＡ）、核酸配列ベース増幅（ＮＡＳＢＡ）、転写媒介性増幅（ＴＭＡ）、ニッキング酵素増幅反応（ＮＥＡＲ）、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）、多置換増幅（ＭＤＡ）、ラミフィケーション（ＲＡＭ）、環状ヘリカーゼ依存性増幅（ｃＨＤＡ）、単一プライマー等温増幅（ＳＰＩＡ）、シグナル媒介性ＲＮＡ増幅技術（ＳＭＡＲＴ）、自家持続配列複製（３ＳＲ）、ゲノム指数関数的増幅反応（ＧＥＡＲ）及び等温多置換増幅（ＩＭＤＡ）の１種又は複数種を含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、以下のもの：古細菌ポリメラーゼ増幅（ＡＰＡ）、ＬＡＭＰ、ＨＤＡ、ＲＰＡ、ＳＤＡ、ＮＡＳＢＡ、ＴＭＡ、ＮＥＡＲ、ＲＣＡ、ＭＤＡ、ＲＡＭ、ｃＨＤＡ、ＳＰＩＡ、ＳＭＡＲＴ、３ＳＲ、ＧＥＡＲ及びＩＭＤＡの１種又は複数種を含まない。一部の実施形態では、増幅するステップは、ＬＡＭＰを含まない。

【００１３】

一部の実施形態では、この方法は、以下の１種又は複数種を含まない：（ｉ）酸性混合物を希釈すること；（ｉｉ）中性混合物を希釈すること；（ｉｉｉ）酸性混合物を熱変性させること；（ｉｖ）酸性混合物を超音波処理すること；（ｖ）中性混合物を超音波処理すること；（ｖｉ）リボヌクレアーゼ阻害剤を酸性混合物に添加すること；（ｖｉｉ）リボヌクレアーゼ阻害剤を中性混合物に添加すること；（ｖｉｉｉ）試料を精製すること；（ｉｘ）試料核酸を精製すること；（ｘ）核酸増幅産物を精製すること；（ｘｉ）酸性混合物又は中性混合物から１種又は複数種の界面活性剤を除去すること；（ｘｉｉ）増幅前及び／又は増幅中に試料核酸を熱変性及び／又は酵素変性させること；（ｘｉｉｉ）リボヌクレアーゼＨを酸性混合物又は中性混合物に添加すること；（ｘｉｖ）試料、酸性混合物又は中性混合物をヘリカーゼ、一本鎖結合タンパク質、ニッキング酵素、制限酵素又はリコンビナーゼと接触させること；（ｘｖ）試料、酸性混合物又は中性混合物をグリセロール、ホルムアミド又は尿素と接触させること；（ｘｖｉ）酸性混合物又は中性混合物からｓｓＤＮＡを精製すること；（ｘｖｉｉ）熱変性ステップ；並びに（ｘｖｉｉｉ）ｄｓＤＮＡを富化、精製及び／又は単離すること。

【００１４】

一部の実施形態では、酸性組成物及び／又は試薬組成物は、還元剤、キレート剤又はその両方を含む。一部の実施形態では、酸性組成物は、還元剤、キレート剤又はその両方を含まない。一部の実施形態では、キレート剤は、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、エチレングリコールビス（アミノエチル）Ｎ，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）、トリス、又はそれらのあらゆる組合せである。一部の実施形態では、還元剤は、２－メルカプトエタノール、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、ジチオエリトリトール（ＤＴＥ）、還元型グルタチオン、システアミン、トリ－ｎ－ブチルホスフィン（ＴＢＰ）、ジチオエリトリトール、トリス（３－ヒドロキシプロピル）ホスフィン（ＴＨＰＰ）、２－メルカプトエチルアミン－ＨＣｌ、ジチオブチルアミン（ＤＴＢＡ）、システイン、システイン－チオグリコレート、亜硫酸の塩、チオグリコール酸、ヒドロキシエチルジスルフィド（ＨＥＤ）、又はそれらのあらゆる組合せである。一部の実施形態では、酸性組成物は、アニオン性界面

活性剤及びカチオン性界面活性剤の両方を含まない。一部の実施形態では、酸性組成物は、Ｔｗｅｅｎ２０、Ｔｗｅｅｎ４０、Ｔｗｅｅｎ４５、Ｔｗｅｅｎ６０、Ｔｗｅｅｎ６５、Ｔｗｅｅｎ８０、Ｔｗｅｅｎ８１及びＴｗｅｅｎ８５を含むがこれらに限定されない、ｔｗｅｅｎ界面活性剤をさらに含む。一部の実施形態では、ｔｗｅｅｎ界面活性剤は、酸性組成物の約０．０１％（質量／容積）を構成する。

【００１５】

本明細書に開示されるものには、生物学的実体を溶解し、それらの中に含まれるｄｓＤＮＡを変性させるための酸性組成物が含まれる。一部の実施形態では、この酸性組成物は、一価塩及び／又は二価塩；１種又は複数種の界面活性剤；並びに酸性薬剤を含み、酸性薬剤は、１００ｍＭ未満の濃度で酸性組成物中に存在し、酸性組成物は、４未満のｐＨを有する。一価塩は、３０ｍＭ未満の濃度で酸性組成物中に存在し得る。二価塩は、１５ｍＭ未満の濃度で酸性組成物中に存在し得る。

一部の実施形態では、酸性組成物は、還元剤、キレート剤又はその両方を含まない。一部の実施形態では、キレート剤は、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡ、ＮＴＡ、トリス、又はそれらのあらゆる組合せである。一部の実施形態では、還元剤は、２－メルカプトエタノール、ＤＴＴ、ＴＣＥＰ、ＤＴＥ、還元型グルタチオン、システアミン、ＴＢＰ、ＴＨＰＰ、２－メルカプトエチルアミン－ＨＣｌ、ＤＴＢＡ、システイン、システイン－チオグリコレート、亜硫酸の塩、チオグリコール酸、ＨＥＤ、又はそれらのあらゆる組合せから選択される。一部の実施形態では、酸性組成物は、アニオン性界面活性剤又はカチオン性界面活性剤のいずれも含まない。一部の実施形態では、酸性組成物は、グリセロール、ホルムアミド又は尿素を含まない。

【００１６】

一部の実施形態では、酸性組成物は、約１～約３．９の範囲内のｐＨ、例えば、約２のｐＨを有する。一部の実施形態では、酸性薬剤は、有機酸及び／又は無機酸を含む。一部の実施形態では、酸性薬剤は、塩酸、塩酸グリシン、酢酸、クエン酸、硫酸及びリン酸から選択される。一部の実施形態では、酸性薬剤は、約１ｍＭ～約１００ｍＭの範囲内の濃度で、例えば、約１０ｍＭの濃度で酸性組成物中に存在する。一部の実施形態では、一価塩及び／又は二価塩は、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、又はそれらのあらゆる組合せを含む。一部の実施形態では、一価塩は、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、フッ化ナトリウム、塩化ナトリウム、臭化ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、フッ化カリウム、塩化カリウム、臭化カリウム及びヨウ化カリウムから選択される。一部の実施形態では、二価塩は、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化銅（ＩＩ）、塩化亜鉛、酸化カルシウム、酸化マグネシウム、酸化バリウム、硫酸ナトリウム、硫酸カルシウム、硫酸銅（ＩＩ）、炭酸カリウム及び炭酸ナトリウムから選択される。一部の実施形態では、一価塩及び／又は二価塩は、約１ｍＭ～約１４ｍＭの範囲内、例えば、約５ｍＭ又は約４ｍＭの濃度で酸性組成物中に存在する。一部の実施形態では、１種又は複数種の界面活性剤は、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤及び両性界面活性剤の１種又は複数種を含む。一部の実施形態では、１種又は複数種の界面活性剤は、酸性組成物の約０．０１％～約２％の容積に対する質量（％質量／容積）の範囲内の濃度、例えば、酸性組成物の約０．１％の容積に対する質量（％質量／容積）の濃度で酸性組成物中に存在する。一部の実施形態では、酸性組成物は、ｔｗｅｅｎ界面活性剤をさらに含む。一部の実施形態では、ｔｗｅｅｎ界面活性剤は、Ｔｗｅｅｎ２０、Ｔｗｅｅｎ４０、Ｔｗｅｅｎ４５、Ｔｗｅｅｎ６０、Ｔｗｅｅｎ６５、Ｔｗｅｅｎ８０、Ｔｗｅｅｎ８１及びＴｗｅｅｎ８５から選択される。一部の実施形態では、ｔｗｅｅｎ界面活性剤は、酸性組成物の約０．０１％～約１％（質量／容積）を構成する。一部の実施形態では、酸性組成物は、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、エチレングリコールビス（アミノエチル）Ｎ，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）、トリス、及びそれらのあらゆる組合せから選択されるキレート剤をさらに含む。一部の実施形態では、キレート剤は、約０．１ｍＭ～約１４ｍＭの範囲内の濃度で酸性組成物中に存在する。

【００１７】
本明細書に開示されるものには、試料中の標的核酸配列を検出するためのキットが含まれる。一部の実施形態では、このキットは、（ａ）本明細書に提供される酸性組成物であって、酸性組成物が、生物学的実体を溶解して、それらの中に含まれる試料核酸を放出させることが可能であり、試料核酸が、標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡを含み、標的核酸配列が、１００ヌクレオチド以下の長さである、酸性組成物；並びに（ｂ）緩衝剤、及び等温増幅条件下で標的核酸配列を増幅するための１種又は複数種の増幅試薬を含む試薬組成物であって、前記１種又は複数種の増幅試薬が、（ｉ）第１のプライマー及び第２のプライマーであって、第１のプライマーが、標的核酸配列の第１の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能であり、第２のプライマーが、標的核酸配列の第２の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能である、第１のプライマー及び第２のプライマー；並びに（ｉｉ）核酸増幅産物を生成することが可能な超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素を含む、試薬組成物を含む。一部の実施形態では、標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡは、１００塩基対以下の長さである。一部の実施形態では、試料核酸の１種又は複数種は、１００塩基対以下の長さである。

【００１８】
一部の実施形態では、緩衝剤は、ＭＥＳ、ＭＯＰＳ、ＭＯＰＳＯ、トリス、ＨＥＰＥＳ、リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、アンモニウム緩衝液、及びそれらのあらゆる組合せから選択される。キットは、核酸増幅産物のリアルタイム検出活性を提供する少なくとも１種の成分を含んでいてもよい。一部の実施形態では、リアルタイム検出活性は、分子ビーコンにより提供される。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列又はその機能的断片と少なくとも約９０％同一であるか又は少なくとも約９５％同一であるアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列を含むポリメラーゼである。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、約２０～４０塩基長である。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、（１）第１のプライマーの配列及びその逆相補体、（２）第２のプライマーの配列及びその逆相補体、並びに（３）（１）第１のプライマーの配列及びその逆相補体並びに（２）第２のプライマーの配列及びその逆相補体によりフランキングされているスペーサー配列であって、１～１０塩基長であるスペーサー配列を含む。

【００１９】
一部の実施形態では、第１のプライマー及び／又は第２のプライマーは、約８～１６塩基長である。一部の実施形態では、第１のプライマー及び／又は第２のプライマーは、ＤＮＡ塩基、修飾ＤＮＡ塩基又はそれらの組合せの１種又は複数種を含む。一部の実施形態では、試薬組成物は、凍結乾燥及び／又は加熱乾燥されており（例えば、乾燥組成物）、１種又は複数種の添加剤を含む。１種又は複数種の添加剤は、アミノ酸；糖又は糖アルコールを含むことができる。糖又は糖アルコールは、スクロース、ラクトース、トレハロース、デキストラン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、又はそれらのあらゆる組合せを含んでいてもよい。一部の実施形態では、１種又は複数種の添加剤は、ポリマーを含む。ポリマーは、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルセルロース、フィコール、アルブミン、ポリペプチド、コラーゲンペプチド、又はそれらのあらゆる組合せを含んでいてもよい。

【００２０】
一部の実施形態では、酸性組成物及び試薬組成物の混合物は、約７～約９のｐＨ、例えば、約８．８のｐＨを有する。一部の実施形態では、試料、酸性組成物及び試薬組成物の混合物は、約７～約９のｐＨ、例えば、約８．８のｐＨを有する。一部の実施形態では、緩衝剤は、トリスを含む。一部の実施形態では、試料、酸性組成物及び試薬組成物の混合物は、約３０ｍＭトリス～約５０ｍＭトリスの範囲内の濃度でトリスを含む。一部の実施形態では、このキットは、酸性組成物及び試薬組成物を収容する無菌容器を含む。

【００２１】
本明細書に開示される方法、組成物、キット及びシステムにおいて、生物学的実体は、原核細胞、真核細胞、ウイルス粒子、エキソソーム、プロトプラスト及び微小胞の１種又は複数種を含むことができる。一部の実施形態では、生物学的実体は、ウイルス、細菌、真菌、原生動物（protozoa）、それらの一部、又はそれらのあらゆる組合せを含む。一部の実施形態では、標的核酸配列は、ウイルス、細菌、真菌、又は原生動物の核酸配列である。一部の実施形態では、試料核酸は、ウイルス、細菌、真菌、又は原生動物に由来する。ウイルスの非限定的な例としては、Ｂ型肝炎ウイルス、単純ヘルペス、ヘルペスウイルス６、ヘルペスウイルス７、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ＪＣウイルス、パルボウイルスＢ１９、ロタウイルス、ヒトアデノウイルス及び生殖器ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）が挙げられる。細菌の非限定的な例としては、サルモネラ・エンテリカ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｃａ）、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、クロストリジウム・ディフィシル（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ）、ストレプトコッカス・アガラクチア（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ）、マイコバクテリア・ツベルクローシス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉａ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、リケッチア・リケッチイ（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｒｉｃｋｅｔｔｓｉｉ）、エールリッヒア・シャフェンシス（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ ｃｈａｆｆｅｅｎｓｉｓ）、ボレリア・ブルグドルフェリ（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）、エルシニア・ペスチス（Ｙｅｒｓｉｎｉａ ｐｅｓｔｉｓ）、梅毒トレポネーマ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐａｌｌｉｄｕｍ）、クラミジア・トラコマティス（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）、クラミジア・ニューモニエ（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、マイコプラズマ・ニューモニエ（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、マイコプラズマ種（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｓｐ．）、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ）、レジオネラ・ドゥモフィ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｄｕｍｏｆｆｉｉ）、マイコプラズマ・フェルメンタンス（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ ｆｅｒｍｅｎｔａｎｓ）、エーリキア種（Ｅｈｒｌｉｃｈｉａ ｓｐ．）、ヘモフィルス・インフルエンザエ（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）、ナイセリア・メニンギティディス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、ナイセリア・ゴノレア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、ストレプトコッカス・ニューモニア（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａ）、Ｓ．アガラクチア（Ｓ．ａｇａｌａｃｔｉａｅ）又はリステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）が挙げられる。一部の実施形態では、真菌は、コクシジオイデス・ポサダシ（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｐｏｓａｄａｓｉｉ）、クリプトコッカス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）、ニューモシスチス・カリニ（Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｃａｒｉｎｉｉ）、ヒストプラズマ・カプスラーツム（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｓｕｌａｔｕｍ）、ブラストミセス・デルマティティディス（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ ｄｅｒｍａｔｉｔｉｄｉｓ）、コクシジオイデス・イミチス（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｉｍｍｉｔｉｓ）又はトリコフィトン・ルブルム（Ｔｒｉｃｈｏｐｈｙｔｏｎ ｒｕｂｒｕｍ）である。一部の実施形態では、原生動物は、腟トリコモナス（Ｔｒｉｃｈｏｍｏｎａｓ ｖａｇｉｎａｌｉｓ）、トリパノソーマ・クルージ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ）、リーシュマニア種（Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ ｓｐ．）、プラスモジウム（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）、赤痢アメーバ（Ｅｎｔａｍｏｅｂａ ｈｉｓｔｏｌｙｔｉｃａ）、バベシア・ミクロチ（Ｂａｂｅｓｉａ ｍｉｃｒｏｔｉ）、ランブル鞭毛虫（Ｇｉａｒｄｉａ ｌａｍｂｌｉａ）、シクロスポラ種（Ｃｙｃｌｏｓｐｏｒａ ｓｐ．）及びエイメリア種（Ｅｉｍｅｒｉａ ｓｐ．）である。

【図面の簡単な説明】

【００２２】
【図１Ａ－１Ｂ】非酸性対照（ＴＥ溶液；図１Ａ）と比較した、古細菌ポリメラーゼ増幅

（ＡＰＡ）のためのｇＤＮＡの解離に対する低ｐＨ溶液（ＡＲＢＴ溶液；図１Ｂ）の効果に関する非限定的で例示的なデータを示す図である。レジェンドは、試料中の標的配列コピーの数を示す。ＮＴＣ、標的なし対照。ＬＯＤ、検出限界。

【図２】ｇＤＮＡ解離に対するプレインキュベーション温度の効果に関する非限定的で例示的なデータを示す図である。レジェンドは、試料中の標的配列コピーの数及びプレインキュベーション温度を示す。ＮＴＣ、標的なし対照。ＬＯＤ、検出限界。

【図３Ａ－３Ｂ】非酸性対照溶出緩衝液（図３Ａ）と比較した酸性溶出緩衝液（図３Ｂ）による、Ｎ．ゴノレア（Ｎ．ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）（Ｎｇ）ｇＤＮＡ検出（湿潤反応における）に対する溶出緩衝液ｐＨの効果に関する非限定的で例示的なデータを示す図である。レジェンドは、試料中の標的配列コピーの数を示す。ＮＴＣ、標的なし対照。ＬＯＤ、検出限界。

【図４Ａ－４Ｂ】非酸性対照溶出緩衝液（図４Ａ）と比較した酸性溶出緩衝液（図４Ｂ）による、Ｎ．ゴノレア（Ｎｇ）ｇＤＮＡ検出（乾燥させた凍結乾燥ペレットを使用した反応における）に対する溶出緩衝液ｐＨ（図４Ｂ）の効果に関する非限定的で例示的なデータを示す図である。レジェンドは、試料中の標的配列コピーの数を示す。ＮＴＣ、標的なし対照。ＬＯＤ、検出限界。

【図５Ａ－５Ｂ】増幅成分と混合する前に室温（ＲＴ；図５Ａ）又は７８℃（図５Ｂ）で実施されたインキュベーションによる、Ｎ．ゴノレア（Ｎｇ）ｇＤＮＡ安定性に対する温度及びｐＨの効果に関する非限定的で例示的なデータを示す図である。レジェンドは、示されているインキュベーション時間及び温度による酸性（ＡＲＢＴ）又は非酸性（ＴＥ）条件下でのインキュベーションを示す。

【図６Ａ－６Ｂ】増幅成分と混合する前に室温（ＲＴ；図６Ｂ）又は７８℃（図６Ａ）で実施されたインキュベーションによる、１０％尿マトリックスにおけるＮ．ゴノレア（Ｎｇ）ｇＤＮＡ安定性に対する温度及びｐＨの効果に関する非限定的で例示的なデータを示す図である。レジェンドは、示されているインキュベーション時間及び温度による酸性（ＡＲＢＴ）又は非酸性（ＴＥ）条件下でのインキュベーションを示す。ＮＴＣ、標的なし対照。

【図７】Ｎ．ゴノレア（Ｎｇ）ｇＤＮＡ安定性（乾燥反応フォーマットにおける）に対する温度及びｐＨの効果に関する非限定的で例示的なデータを示す図である。レジェンドは、インキュベーション時間及び温度を示す。ＮＴＣ、標的なし対照。

【図８】ｐＨの関数としてのλＤＮＡの非限定的で例示的な融解曲線を示す図である（Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｊ．２００１ Ｆｅｂ; ８０(２): ８７４-８８１．Ｅｆｆｅｃｔ ｏｆ ｐＨ ｏｎ ｔｈｅ ｏｖｅｒｓｔｒｅｔｃｈｉｎｇ ｔｒａｎｓｉｔｉｏｎ ｏｆ ｄｏｕｂｌｅ-ｓｔｒａｎｄｅｄ ＤＮＡ: ｅｖｉｄｅｎｃｅ ｏｆ ｆｏｒｃｅ-ｉｎｄｕｃｅｄ ＤＮＡ ｍｅｌｔｉｎｇから適応）。

【発明を実施するための形態】

【００２３】

以下の詳細な説明では、本明細書の一部を形成する添付の図面が参照される。図面では、状況が別様に指示しない限り、類似の記号は典型的には類似の成分を識別する。詳細な説明、図面、及び特許請求の範囲に記載の例示的な実施形態は、限定を意味するものではない。本明細書に提示される主題の趣旨又は範囲から逸脱することなく、他の実施形態を使用することができ、他の変更をなすことができる。本明細書で一般的に説明され、図に例示されている本開示の態様は、幅広く様々な異なる構成で配置、置換、組合せ、分離、及び設計することができ、それらのすべては、本明細書において明示的に企図されており、本明細書の開示の一部をなすことが容易に理解されるだろう。

本明細書で参照されているすべての特許、公開特許出願、他の出版物、及びＧｅｎＢａｎｋの配列、及び他のデータベースは、関連技術に関してそれらの全体が参照により組み込まれる。

【００２４】

本明細書に開示されるものには、１種又は複数種の標的ヌクレオチド配列を増幅及び検出するために、生物学的実体を溶解し、それらの中に含まれる二本鎖ポリヌクレオチドを

分離するための方法、組成物及びキットが含まれる。

本明細書に開示されるものには、試料中の標的核酸配列を増幅するための方法が含まれる。一部の実施形態では、この方法は、（ａ）生物学的実体を含む試料を酸性組成物と接触させて、酸性混合物を生成するステップであって、酸性組成物が、生物学的実体を溶解して、それらの中に含まれる試料核酸を放出させることが可能であり、試料核酸が、標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡを含み、標的核酸配列が、１００ヌクレオチド以下の長さであり、酸性組成物が、（ｉ）一価塩及び／又は二価塩、（ｉｉ）１種又は複数種の界面活性剤、並びに（ｉｉｉ）酸性薬剤を含み、酸性組成物が、４未満のｐＨを有し、これによりｄｓＤＮＡを変性させて、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）を生成する、ステップ；（ｂ）緩衝剤を含む試薬組成物（例えば、乾燥組成物、湿潤組成物）を酸性混合物と接触させて、中性混合物を生成するステップであって、中性混合物が、ｓｓＤＮＡを含み、試薬組成物が、１種又は複数種の増幅試薬を含む、ステップ；並びに（ｃ）中性混合物中の標的核酸配列を増幅し、それにより核酸増幅産物を生成するステップを含む。

【００２５】

本明細書に開示されるものには、生物学的実体を溶解し、それらの中に含まれるｄｓＤＮＡを変性させるための酸性組成物が含まれる。一部の実施形態では、この酸性組成物は、一価塩及び／又は二価塩；１種又は複数種の界面活性剤；並びに酸性薬剤を含み、酸性薬剤は、１００ｍＭ未満の濃度で酸性組成物中に存在し、酸性組成物は、４未満のｐＨを有する。一価塩は、３０ｍＭ未満の濃度で酸性組成物中に存在し得る。二価塩は、１５ｍＭ未満の濃度で酸性組成物中に存在し得る。

本明細書に開示されるものには、試料中の標的核酸配列を検出するためのキットが含まれる。一部の実施形態では、このキットは、（ａ）本明細書に提供される酸性組成物であって、酸性組成物が、生物学的実体を溶解して、それらの中に含まれる試料核酸を放出させることが可能であり、試料核酸が、標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡを含み、標的核酸配列が、１００ヌクレオチド以下の長さである、酸性組成物；並びに（ｂ）緩衝剤、及び等温増幅条件下で標的核酸配列を増幅するための１種又は複数種の増幅試薬を含む、試薬組成物（例えば、乾燥組成物、湿潤組成物）であって、前記１種又は複数種の増幅試薬が、（ｉ）第１のプライマー及び第２のプライマーであって、第１のプライマーが、標的核酸配列の第１の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能であり、第２のプライマーが、標的核酸配列の第２の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能である、第１のプライマー及び第２のプライマー；並びに（ｉｉ）核酸増幅産物を生成することが可能な超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素を含む、試薬組成物を含む。一部の実施形態では、標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡは、１００塩基対以下の長さである。

【００２６】

定義

別様の定義がない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。例えば、Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994)；Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY 1989)を参照。本開示の目的のために、以下の用語を下記に定義する。

本明細書で使用される場合、用語「酸」は、その通常の意義が与えられるものとし、一部の実施形態では、「酸」は、アレニウス酸（Ａｒｒｈｅｎｉｕｓ　ａｃｉｄ）、ブレンステッド・ローリー酸又はルイス酸のいずれかとなり得る。アレニウス酸は、溶液中のヒドロニウムイオン（H_3O^+）の濃度を増加させる物質又は流体である。ブレンステッド・ローリー酸は、プロトン供与体として作用し得る物質である。ルイス酸は、電子対受容体である。本明細書で使用される場合、用語「塩基」は、水素カチオン（プロトン）を受容することができる物質か、又はより一般的には、１対の価電子を供与することができる物質のどちらかを指す。可溶性塩基は、定量的に水酸化物イオン（OH^-）を含有及び放

出する場合、アルカリと称される。ブレンステッド・ローリー理論は、塩基をプロトン（水素イオン）受容体として定義し、一方、より一般的なルイス理論は、塩基を電子対供与体として定義し、プロトン以外のルイス酸が含まれることを可能にする。

【００２７】

本明細書で使用される場合、用語「緩衝液」は、その通常の意義が与えられるものとし、また、酸又は塩基が溶液又は組成物に添加されたときにｐＨの変化に抵抗する水性溶液又は組成物を指すものとする。ｐＨ変化に対するこの抵抗性は、そのような溶液の緩衝特性による。よって、緩衝活性を示す溶液又は組成物は、緩衝液又は緩衝溶液と称される。緩衝液は一般に、溶液又は組成物のｐＨを維持する無制限の能力を有さない。むしろ、緩衝液は典型的に、ある一定の範囲内に、例えば、ｐＨ７～ｐＨ９の間にｐＨを維持することができる。典型的に、緩衝液は、そのｐＫａの上下１対数以内にｐＨを維持することができる。緩衝液及び緩衝溶液は典型的に、緩衝塩から、又はトリス及びＨＥＰＥＳのような非イオン性緩衝液成分から作製される。緩衝液の非限定的な例としては、ＭＥＳ、ＭＯＰＳ、ＭＯＰＳＯ、トリス、ＨＥＰＥＳ、リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩及びアンモニウム緩衝液、並びにこれらの組合せが挙げられる。

【００２８】

本明細書では、核酸を増幅するための方法及び組成物が提供される。従来の核酸増幅法は、典型的には、熱サイクルプロセス、核酸変性、鎖解巻、鎖分離、及び／若しくは鎖交換を促進するタンパク質（例えば、酵素）（例えば、ヘリカーゼ、リコンビナーゼ）、並びに／又はエンドヌクレアーゼ剤（例えば、制限酵素、ニッキング酵素）を必要とし、最低でも２０～３０分間の反応時間を必要とすることが多い。本明細書で提供される核酸増幅法は、熱サイクルをせずに、試料核酸の熱変性及び／又は酵素変性をせずに、鎖解巻、鎖分離、及び／又は鎖交換を促進するタンパク質（例えば、酵素）を添加せずに、エンドヌクレアーゼ剤を用いずに、並びに約１０～１５分以内の反応時間で実施することができる。

【００２９】

短い核酸標的の増幅のためのＤＮＡのゲノム鎖の分離のための化学的方法

本明細書で提供されるものには、古細菌ポリメラーゼを使用する等温増幅及び核酸のリアルタイム検出を可能にする、臨床試料中での直接病原体溶解のための方法及び組成物が含まれる。試料精製を必要としない迅速なポイントオブケア（ＰＯＣ）診断を開発することができる。ウイルス粒子、細菌細胞、又は他の病原体は、それらのＤＮＡ及び／又はＲＮＡが細胞から放出され、増幅反応に利用可能になり得るように溶解する必要が依然としてある。従来の化学的溶解法（例えば、強塩基、イオン性デタージェント、及びカオトロピック剤を使用する）は、ＤＮＡポリメラーゼ又は他の酵素も不活化することになるため、酵素機能と適合性がない。したがって、酵素機能と適合性であり、溶解試薬を除去するための核酸精製ステップを一切必要としない、効果的な化学的溶解法には著しい価値がある。

【００３０】

本明細書に提供されるものには、例えば、増幅反応における短い配列ストレッチのその後の標的化のためにｄｓＤＮＡ（例えば、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ））の相補鎖を分離するための高速且つ単純な方法が含まれる。一部の実施形態では、鎖の分離は、ＨＣｌなどの酸性薬剤（例えば、無機酸）の使用により達成され、試料溶解と同時的に実施され得る。いかなる特定の理論に制約されることもないが、溶解によりｄｓＤＮＡが放出されると、相補塩基間の水素結合のプロトン化及び自発的喪失は、溶解溶液（例えば、酸性組成物）中のＤＮＡ鎖の解離を可能にする。一部の実施形態では、変性されたＤＮＡ試料は、いかなる分離又は精製ステップも用いずに、一定温度でその後の増幅のための反応成分（例えば、試薬組成物）と混合される。一部の実施形態では、増幅反応成分は、酸を中和し、迅速な増幅に必要とされるｐＨまでｐＨを上げる十分な能力を有する増幅緩衝液（例えば、試薬組成物）を含む。一部の実施形態では、増幅反応は、標的ｇＤＮＡに相補的なプライマーを高濃度で含有して、ｇＤＮＡ－プライマー複合体の形成が、本来の二本鎖ｇＤＮ

Ａの自発的再形成よりも迅速且つ高頻度で起こることを確実にする。一部の実施形態では、増幅は、１種又は複数種のＤＮＡポリメラーゼによるヌクレオチドの取込みによりｇＤＮＡ標的上で伸長するプライマーによって開始され得る。

【００３１】

本明細書に開示されるものには、古細菌ポリメラーゼ増幅における初期ステップとしての低ｐＨ溶液へのゲノムＤＮＡの曝露が、一般に信じられているように増幅に有害な影響を与えることがないという驚くべき知見が含まれる。その代わりに、実施例に示される通り、このアプローチは、等温増幅のスピードを増加させることができると共に、最大１００倍までゲノムＤＮＡ検出の感度の改善を生じる。本明細書に提供される方法、組成物及びキットは、臨床試料中の病原体（例えば、ＤＮＡ病原体）のためのポイントオブケア分子診断法を有利に提供することができる。病原体溶解後に、ゲノムＤＮＡ鎖は、一部の実施形態では、別々の熱的又は酵素的ステップに対する必要性がなく、分離される。

一部の実施形態では、古細菌ポリメラーゼ増幅（ＡＰＡ）のために酸解離を用いる試料調製方法が提供される。いかなる特定の理論に制約されることもないが、一部の実施形態では、酸性条件は、等温ＡＰＡ増幅を容易にするために、ゲノムＤＮＡ材料を変性又は解離させるように機能する。一部の実施形態では、本明細書に開示される酸性組成物（例えば、再懸濁緩衝液、溶出緩衝液、溶解緩衝液）における酸性薬剤の存在は、生物学的実体溶解効率（例えば、細胞溶解効率）を改善することもできる。開示されている酸解離アプローチは、増幅効率の改善のためにゲノムＤＮＡにおける開始を改善するために、ＬＡＭＰ、ＮＥＡＲ、ＲＣＡ、ＭＤＡ及びＲＰＡを含む等温増幅方法などの種々の（ｖａｒｉｅｔｙ　ｉｎ）核酸検出方法におけるＤＮＡの変性に用いることができる。本明細書に提供される方法、組成物及びキットは、等温増幅方法に限定されず、法医学的解析などの一本鎖ＤＮＡ又はＤＮＡの解離を必要とする適用に適用することができる。

【００３２】

現在利用できる方法は、直接的ＤＮＡ増幅のためのＤＮＡ解離又は病原体溶解のために試料調製プロセスにおいて酸性条件を用いない。大部分の等温増幅方法は、事前の熱変性ステップ、化学的変性又はゲノムＤＮＡを巻き戻す酵素を必要とする。これらは、ポイントオブケア設定にあまり適していない。したがって、本明細書に提供される組成物及び方法が取り組む、単純且つ迅速な変性方法に対する必要性が存在する。

ｄｓＤＮＡは、酸性溶液中で自発的に分離することが知られているが、その使用は、加水分解性脱プリン化から生じる弊害をもたらす効果が原因で、ＤＮＡのその後の増幅と不適合性であると広く考慮されている。Ｔｈｏｍａｓ　Ｌｉｎｄａｈｌが２０１５年にノーベル化学賞を授賞することになった発見の１種である脱プリン化は、生理的条件下で天然に存在するプロセスである。これは、プリン塩基グアニン又はアデニン及びデオキシリボース部分の間のβ－Ｎ－グリコシド結合が加水分解により切断される、プリンデオキシリボヌクレオシドの化学反応である。塩基－糖結合の切断は、ＤＮＡにおける遺伝情報の喪失及び脱塩基部位の形成、並びにＤＮＡ構造の変更をもたらす。鋳型内の単一のＤＮＡ病変は、ＰＣＲ酵素（例えば、ＤＮＡポリメラーゼ）を止めるのに十分であるため、脱プリン化によるＤＮＡ損傷は、ＰＣＲ産物の増幅に対して問題になることが示されてきた。

【００３３】

本明細書に開示される方法、組成物及びキットは、酸性分離の使用を短いＤＮＡ配列（例えば、約３０ヌクレオチドの長さ）の増幅とペアリングすることにより、上述の必要性を解決し、酸触媒されたＤＮＡ損傷によって提示される課題を克服する。一部の実施形態では、酸性薬剤は、生物学的実体の溶解（例えば、病原体細胞壁の溶解）後にゲノムＤＮＡを解離する溶出／溶解溶液中に含まれる。増幅ステップにおける本明細書に提供される高い能力の（ｈｉｇｈ－ｃａｐａｃｉｔｙ）緩衝液の包含は、酸が中和され、最適なｐＨ条件が維持されることを確実にすることができる。酸性組成物（例えば、再懸濁緩衝液、溶出溶液、溶解溶液）は、一部の実施形態では、おそらく、いかなる特定の理論に制約されることもないが、ＤＮＡ骨格上のリン酸基上の負電荷を中和することにより、脱プリン化を抑制することが報告された、低濃度の一価塩及び／又は二価マグネシウムも含有する

。マグネシウムが高ｐＨで不溶性であるアルカリ処理とは異なり、マグネシウムは、酸性ｐＨで容易に可溶化される。

【００３４】

本明細書に開示されるものには、試料中の標的核酸配列を増幅するための方法が含まれる。一部の実施形態では、この方法は、（ａ）生物学的実体を含む試料を酸性組成物と接触させて、酸性混合物を生成するステップであって、酸性組成物が、生物学的実体を溶解して、それらの中に含まれる試料核酸を放出させることが可能であり、試料核酸が、標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡを含み、標的核酸配列が、１００ヌクレオチド以下の長さであり、酸性組成物が、（ｉ）一価塩及び／又は二価塩、（ｉｉ）１種又は複数種の界面活性剤、並びに（ｉｉｉ）酸性薬剤を含み、酸性組成物が、４未満のｐＨを有し、これによりｄｓＤＮＡを変性させて、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）を生成する、ステップ；（ｂ）緩衝剤を含む試薬組成物（例えば、乾燥組成物、湿潤組成物）を酸性混合物と接触させて、中性混合物を生成するステップであって、中性混合物が、ｓｓＤＮＡを含み、試薬組成物が、１種又は複数種の増幅試薬を含む、ステップ；並びに（ｃ）中性混合物中の標的核酸配列を増幅し、これにより核酸増幅産物を生成するステップを含む。一部の実施形態では、標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡは、１００塩基対以下の長さである。一部の実施形態では、試料核酸の１種又は複数種は、１００塩基対以下の長さである。一部の実施形態では、標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡは、１００塩基対の長さよりも長い。一部の実施形態では、試料核酸の１種又は複数種は、１００塩基対の長さよりも長い。試料核酸及び／又は標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡは、約１００ｎｔ、５００ｎｔ、１ｋｂ、５ｋｂ、１０ｋｂ、５０ｋｂ、１００ｋｂ、２００ｋｂ、３００ｋｂ、４００ｋｂ、５００ｋｂ、６００ｋｂ、７００ｋｂ、８００ｋｂ、９００ｋｂ、１Ｍｂ、２Ｍｂ、３Ｍｂ、４Ｍｂ、５Ｍｂ、６Ｍｂ、７Ｍｂ、８Ｍｂ、９Ｍｂ、１０Ｍｂ、２０Ｍｂ、３０Ｍｂ、４０Ｍｂ、５０Ｍｂ、６０Ｍｂ、７０Ｍｂ、８０Ｍｂ、９０Ｍｂ若しくは１００Ｍｂ、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲の、ヌクレオチドの長さとなり得る。試料核酸及び／又は標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡは、酸性組成物との接触後に完全に変性されてよい。一部の実施形態では、試料核酸分子及び／又は標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡ分子の一部分は、酸性組成物との接触後に変性される（例えば、局所的変性）。一部の実施形態では、試料核酸分子及び／又は標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡ分子の一部分は、酸性混合物中で変性され（例えば、局所的変性）、前記分子の一部分は、二本鎖形態のままである。

【００３５】

標的核酸配列を増幅するステップは、約２０分間、１５分間又は約１０分間以内に（例えば、約２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、１分間、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲、以内に）検出可能レベルで核酸増幅産物を生成することを含んでいてよい。一部の実施形態では、ステップ（ｂ）及び（ｃ）は、同時的に実施される（例えば、増幅は、試薬組成物及び酸性混合物の接触が起こったら始まる）。一部の実施形態では、試薬組成物は、２種若しくはそれよりも多くの乾燥組成物（同じ又は異なる成分を含む）又は２種若しくはそれよりも多くの湿潤組成物（同じ又は異なる成分を含む）を含む。一部の実施形態では、酸性組成物は、２種又はそれよりも多くの酸性薬剤（同じ又は異なる成分を含む）を含む。

【００３６】

酸性組成物は、約１～約６．９（例えば、約１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３．０、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５．０、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６．０、６．１、６．２、６．３、６．４

、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲）のｐＨを有することができる。一部の実施形態では、酸性組成物は、約１～約３．９のｐＨ、例えば、約２のｐＨ、又は約２、約２．１、約２．２、約２．３、約２．４及び約２．５のｐＨを有する。一部の実施形態では、酸性組成物は、約２．２のｐＨを有する。一部の実施形態では、中性混合物は、約７～約９（例えば、約７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５、８．６、８．７、８．８、８．９、９．０、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲）のｐＨを有する。一部の実施形態では、中性混合物は、約８．８のｐＨを有する。

【００３７】

この方法は、試料中の標的核酸配列を検出するステップを含んでいてもよく、試料中の標的核酸配列を検出するステップは、（ｄ）核酸増幅産物を検出することを含み、検出することは、試薬組成物が酸性混合物と接触した時点から約２０分未満、約１５分未満又は約１０分未満（例えば、約２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、１分間、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲）に実施される。

試薬組成物（例えば、乾燥組成物、湿潤組成物）を酸性混合物と接触させるステップは、酸性混合物中の試薬組成物を溶解させることを含んでいてよい。１種又は複数種の増幅試薬は、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、第１のプライマー、第２のプライマー及びｄＮＴＰの１種又は複数種を含むことができる。

一部の実施形態では、試薬組成物（例えば、乾燥組成物）は、凍結乾燥及び／又は加熱乾燥されており、１種又は複数種の添加剤を含み、１種又は複数種の添加剤は、アミノ酸；糖又は糖アルコールを含む。一部の実施形態では、糖又は糖アルコールは、スクロース、ラクトース、トレハロース、デキストラン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、又はそれらのあらゆる組合せを含む。一部の実施形態では、１種又は複数種の添加剤は、ポリマーを含む。一部の実施形態では、ポリマーは、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルセルロース、フィコール、アルブミン、ポリペプチド、コラーゲンペプチド、又はそれらのあらゆる組合せを含む。

【００３８】

標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡは、互いに相補的な第１の鎖及び第２の鎖を含むことができる。一部の実施形態では、標的核酸配列を増幅するステップは、等温増幅条件下で標的核酸配列を増幅することを含み、増幅することは、ｓｓＤＮＡを、ｉ）第１のプライマー及び第２のプライマーであって、第１のプライマーは、標的核酸配列の第１の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能であり、第２のプライマーは、標的核酸配列の第２の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能である、第１のプライマー及び第２のプライマー；並びにｉｉ）超好熱菌ポリメラーゼ活性を有し、それにより核酸増幅産物を生成する酵素であって、核酸増幅産物は、（１）第１のプライマーの配列及びその逆相補体、（２）第２のプライマーの配列及びその逆相補体、並びに（３）（１）第１のプライマーの配列及びその逆相補体並びに（２）第２のプライマーの配列及びその逆相補体によりフランキングされているスペーサー配列を含み、スペーサー配列が、１～１０塩基長である、酵素と接触させることを含む。

【００３９】

超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１の配列又はその機能的断片と少なくとも約９０％又は９５％同一であるアミノ酸配列を有することができ、例えば、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列を含むポリメラーゼとなり得る。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、エキソヌクレアーゼ活性が低いか又はエキソヌクレアーゼ活性を有さない。

第１のプライマー及び／又は第２のプライマーは、約８～１６塩基長となり得る。第１

のプライマー及び／又は第２のプライマーは、ＤＮＡ塩基、修飾ＤＮＡ塩基又はそれらの組合せの１種又は複数種を含むことができる。核酸増幅産物は、約２０～４０塩基長（例えば、約２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９又は４０塩基長）であってもよい。スペーサー配列は、標的核酸配列の一部を含んでいてもよい。スペーサー配列は１～１０塩基長であってもよい。ｄｓＤＮＡは、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）、プラスミドＤＮＡ又はその両方を含むことができる。

【００４０】

生物学的実体は、原核細胞、真核細胞、ウイルス粒子、エキソソーム、プロトプラスト及び微小胞の１種又は複数種を含んでいてもよい。一部の実施形態では、生物学的実体は、ウイルス、細菌、真菌、原生動物、それらの一部、又はそれらのあらゆる組合せを含む。標的核酸配列は、ウイルス、細菌、真菌又は原生動物の核酸配列となり得る。一部の実施形態では、試料核酸は、ウイルス、細菌、真菌又は原生動物に由来する。ウイルスは、Ｂ型肝炎ウイルス、単純ヘルペス、ヘルペスウイルス６、ヘルペスウイルス７、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ＪＣウイルス、パルボウイルスＢ１９、ロタウイルス、ヒトアデノウイルス又は生殖器ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）となり得る。細菌は、サルモネラ・エンテリカ、ストレプトコッカス・ピオゲネス、クロストリジウム・ディフィシル、ストレプトコッカス・アガラクチア、マイコバクテリア・ツベルクローシス、リケッチア・リケッチイ、エールリッヒア・シャフェンシス、ボレリア・ブルグドルフェリ、エルシニア・ペスチス、梅毒トレポネーマ、クラミジア・トラコマティス、クラミジア・ニューモニエ、マイコプラズマ・ニューモニエ、マイコプラズマ種、レジオネラ・ニューモフィラ、レジオネラ・ドゥモフィ、マイコプラズマ・フェルメンタンス、エーリキア種、ヘモフィルス・インフルエンザエ、ナイセリア・メニンギティディス、ナイセリア・ゴノレア、ストレプトコッカス・ニューモニア、Ｓ．アガラクチア又はリステリア・モノサイトゲネスとなり得る。真菌は、コクシジオイデス・ポサダシ、クリプトコッカス・ネオフォルマンス、ニューモシスチス・カリニ、ヒストプラズマ・カプスラーツム、ブラストミセス・デルマティティディス、コクシジオイデス・イミチス又はトリコフィトン・ルブルムとなり得る。原生動物は、膣トリコモナス、トリパノソーマ・クルージ、リーシュマニア種、プラスモジウム、赤痢アメーバ、バベシア・ミクロチ、ランブル鞭毛虫、シクロスポラ種又はエイメリア種となり得る。

【００４１】

試料は、生物学的試料又は環境的試料となり得る。環境的試料は、食物試料、飲料試料、紙表面、織物表面、金属表面、木材表面、プラスチック表面、土壌試料、淡水試料、廃水試料、塩水試料、大気若しくは他の気体への曝露の試料、それらの培養物、又はそれらのあらゆる組合せとなり得るか又はそれから得られてよい。生物学的試料は、組織試料、唾液、血液、血漿、血清、糞便、尿、喀痰、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、腹水、胸水、血清腫、膿汁、皮膚若しくは粘膜表面のスワブ、それらの培養物、又はそれらのあらゆる組合せとなり得るか又はそれから得られてよい。

【００４２】

試料を酸性組成物と接触させるステップは、約１８℃、１９℃、２０℃、２１℃、２２℃、２３℃、２４℃、２５℃、２６℃、２７℃、２８℃、２９℃、３０℃、３１℃、３２℃、３３℃、３４℃、３５℃、３６℃、３７℃、３８℃、３９℃、４０℃、４１℃、４２℃、４３℃、４４℃、４５℃、４６℃、４７℃、４８℃、４９℃、５０℃、５１℃、５２℃、５３℃、５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、５８℃、５９℃、６０℃、６１℃、６２℃、６３℃、６４℃、６５℃、６６℃、６７℃、６８℃、６９℃、７０℃、７１℃、７２℃、７３℃、７４℃、７５℃、７６℃、７７℃、７８℃、７９℃、８０℃、８１℃、８１．５℃、８２℃、８３℃、８４℃、８５℃、８６℃、８７℃、８８℃、８９℃、９０℃、９１℃、９２℃、９３℃、９４℃、９５℃、９６℃、９７℃、９８℃、９９℃、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲の温度で実施され得る。試料を酸性組成物と接触させるステップは、約７８℃の温度で実施され得る。試料を酸性組成物と接触させる

ステップは、約１８℃～約２５℃の範囲内の温度（例えば、室温）で実施され得る。試料を酸性組成物と接触させるステップは、約５秒間、１０秒間、２０秒間、３０秒間、４０秒間、５０秒間、１分間、２分間、３分間、４分間、５分間、６分間、７分間、８分間、９分間、１０分間、２０分間、３０分間、４０分間、５０分間若しくは約６０分間、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲の期間にわたり実施され得る。

【００４３】

緩衝剤は、ＭＥＳ、ＭＯＰＳ、ＭＯＰＳＯ、トリス、ＨＥＰＥＳ、リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、アンモニウム緩衝液、又はそれらのあらゆる組合せを含むことができる。一部の実施形態では、中性混合物は、約７～約９の範囲内（例えば、約７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１、８．２、８．３、８．４、８．５、８．６、８．７、８．８、８．９、約９．０、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲）のｐＨを有する。一部の実施形態では、中性混合物は、約８．８のｐＨを有する。緩衝剤は、約０．１ｍＭ、０．２ｍＭ、０．３ｍＭ、０．４ｍＭ、０．５ｍＭ、０．６ｍＭ、０．７ｍＭ、０．８ｍＭ、０．９ｍＭ、１ｍＭ、２ｍＭ、３ｍＭ、４ｍＭ、５ｍＭ、６ｍＭ、７ｍＭ、８ｍＭ、９ｍＭ、１０ｍＭ、１１ｍＭ、１２ｍＭ、１３ｍＭ、１４ｍＭ、１５ｍＭ、１６ｍＭ、１７ｍＭ、１８ｍＭ、１９ｍＭ、２０ｍＭ、２１ｍＭ、２２ｍＭ、２３ｍＭ、２４ｍＭ、２５ｍＭ、２６ｍＭ、２７ｍＭ、２８ｍＭ、２９ｍＭ、３０ｍＭ、３１ｍＭ、３２ｍＭ、３３ｍＭ、３４ｍＭ、３５ｍＭ、３６ｍＭ、３７ｍＭ、３８ｍＭ、３９ｍＭ、４０ｍＭ、４１ｍＭ、４２ｍＭ、４３ｍＭ、４４ｍＭ、４５ｍＭ、４６ｍＭ、４７ｍＭ、４８ｍＭ、４９ｍＭ、５０ｍＭ、５１ｍＭ、５２ｍＭ、５３ｍＭ、５４ｍＭ、５５ｍＭ、５６ｍＭ、５７ｍＭ、５８ｍＭ、５９ｍＭ、６０ｍＭ、６１ｍＭ、６２ｍＭ、６３ｍＭ、６４ｍＭ、６５ｍＭ、６６ｍＭ、６７ｍＭ、６８ｍＭ、６９ｍＭ、７０ｍＭ、７１ｍＭ、７２ｍＭ、７３ｍＭ、７４ｍＭ、７５ｍＭ、７６ｍＭ、７７ｍＭ、７８ｍＭ、７９ｍＭ、８０ｍＭ、８１ｍＭ、８２ｍＭ、８３ｍＭ、８４ｍＭ、８５ｍＭ、８６ｍＭ、８７ｍＭ、８８ｍＭ、８９ｍＭ、９０ｍＭ、９１ｍＭ、９２ｍＭ、９３ｍＭ、９４ｍＭ、９５ｍＭ、９６ｍＭ、９７ｍＭ、９８ｍＭ、９９ｍＭ、１００ｍＭ、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲の濃度で中性混合物中に存在することができる。本明細書に提供される試薬組成物（例えば、乾燥組成物、湿潤組成物）及び中性混合物中に存在する緩衝剤は、変動することができ、例えば、クエン酸塩緩衝液、マレイン酸塩、リン酸塩、グリシン、グリシルグリシン、炭酸塩、エタノールアミン、ＡＤＡ、イミダゾール、ヒドラジン、ＨＥＰＢＳ、ＴＡＢＳ、ホウ酸塩、Ｎ－（２－アセトアミド）－アミノエタンスルホン酸（ＡＣＥＳ）、酢酸の塩（酢酸塩）、Ｎ－（２－アセトアミド）－イミノ二酢酸（ＡＤＡ）、２－アミノエタンスルホン酸、タウリン（ＡＥＳ）、アンモニア、２－アミノ－２－メチル－１－プロパノール（ＡＭＰ）、２－アミノ－２－メチル－１，３－プロパンジオール（アメジオール（Ａｍｍｅｄｉｏｌ）又はＡＭＰＤ）、Ｎ－（１，１－ジメチル－２－ヒドロキシエチル）－３－アミノ－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸（ＡＭＰＳＯ）、Ｎ，Ｎ－ビス－（２－ヒドロキシエチル）－２－アミノエタンスルホン酸（ＢＥＳ）、炭酸水素ナトリウム、Ｎ，Ｎ’－ビス（２－ヒドロキシエチル）－グリシン（ビシン（Ｂｉｃｉｎｅ））、［ビス－（２－ヒドロキシエチル）－イミノ］－トリス－（ヒドロキシメチルメタン）（ビス－トリス）、１，３－ビス［トリス（ヒドロキシメチル）－メチルアミノ］プロパン）（ビス－トリス－プロパン）、ホウ酸、ジメチルヒ酸（Ｄｉｍｅｔｈｙｌａｒｓｉｎｉｃ ａｃｉｄ）（カコジル酸塩（Ｃａｃｏｄｙｌａｔｅ））、３－（シクロヘキシルアミノ）－プロパンスルホン酸（ＣＡＰＳ）、３－（シクロヘキシルアミノ）－２－ヒドロキシ－１－プロパンスルホン酸（ＣＡＰＳＯ）、炭酸ナトリウム、シクロヘキシルアミノエタンスルホン酸（ＣＨＥＳ）、クエン酸の塩（クエン酸塩）、３－［Ｎ－ビス（ヒドロキシエチル）アミノ］－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸（ＤＩＰＳＯ）、ギ酸塩（Ｆｏｒｍａｔｅ Ｓａｌｔ ｏｆ ｆｏｒｍｉｃ ａｃｉｄ）、グリシン、グリシルグリシン、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）－ピペラジン－Ｎ’－エタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）－ピペラジン－Ｎ’－３－プロパンスルホン酸（ＨＥＰＰＳ、ＥＰＰＳ）、Ｎ－（２

－ヒドロキシエチル）－ピペラジン－Ｎ’－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸（ＨＥＰＰＳＯ）、リンゴ酸の塩（リンゴ酸塩）、マレイン酸塩（maleate salt of maleic acidマレイン酸の塩）、２－（Ｎ－モルホリノ）－エタンスルホン酸（ＭＥＳ）、３－（Ｎ－モルホリノ）－プロパンスルホン酸（ＭＯＰＳ）、３－（Ｎ－モルホリノ）－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸（ＭＯＰＳＯ）、リン酸の塩（リン酸塩）、ピペラジン－Ｎ，Ｎ’－ビス（２－エタンスルホン酸）（ＰＩＰＥＳ）、ピペラジン－Ｎ，Ｎ’－ビス（２－ヒドロキシプロパンスルホン酸）（ＰＯＰＳＯ）、ピリジン、コハク酸の塩（コハク酸塩）、３－｛［トリス（ヒドロキシメチル）－メチル］－アミノ｝－プロパンスルホン酸（ＴＡＰＳ）、３－［Ｎ－トリス（ヒドロキシメチル）－メチルアミノ］－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸（ＴＡＰＳＯ）、トリエタノールアミン（ＴＥＡ）、２－［トリス（ヒドロキシメチル）－メチルアミノ］－エタンスルホン酸（ＴＥＳ）、Ｎ－［トリス（ヒドロキシメチル）－メチル］－グリシン（トリシン）及びトリス（ヒドロキシメチル）－アミノメタン（トリス）、又はそれらのあらゆる組合せを含むことができる。

【００４４】

本明細書に開示される方法、組成物及びキットは、酸性分離の使用を短い標的核酸配列（例えば、約３０ヌクレオチドの長さ）の増幅とペアリングすることができる。標的核酸配列は、約２０ヌクレオチド以下、約３０ヌクレオチド以下、約４０ヌクレオチド以下、約５０ヌクレオチド以下、約６０ヌクレオチド以下又は約１００ヌクレオチド以下（例えば、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００ヌクレオチド）の長さを有することができる。標的核酸配列は、約３０ヌクレオチドの長さを有することができる。

増幅するステップは、等温増幅条件で実施され得る。等温増幅条件は、約３０℃～約７２℃の一定温度を含むことができる。等温増幅条件は、約６７℃の一定温度を含むことができる。増幅するステップは、約５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０若しくは約６０分間、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲の期間にわたり実施され得る。増幅するステップは、約１５分間の期間にわたり実施され得る。増幅するステップは、無ヘリカーゼ、無一本鎖結合タンパク質、無切断剤及び無リコンビナーゼ、等温増幅条件で実施され得る。

【００４５】

一部の実施形態では、ステップ（ｄ）は、試料中の標的核酸配列を含むｄｓＤＮＡの量を決定することをさらに含む。核酸増幅産物を検出するステップは、リアルタイム検出方法の使用を含んでいてよい。核酸増幅産物を検出するステップは、核酸増幅産物を、核酸増幅産物にハイブリダイズすることが可能なシグナル発生オリゴヌクレオチドと接触させることを含んでいてよく、シグナル発生オリゴヌクレオチドは、フルオロフォア、クエンチャー又はその両方を含む。核酸増幅産物を検出するステップは、蛍光シグナルを検出することを含んでいてよい。蛍光シグナルは、分子ビーコンからのものであり得る。方法は、単一の反応ベッセルにおいて実施され得る。

増幅するステップは、２種又はそれよりも多くの標的核酸配列のマルチプレックス増幅を含むことができる。検出するステップは、前記２種又はそれよりも多くの標的核酸配列に由来する２種又はそれよりも多くの核酸増幅産物のマルチプレックス検出を含むことができる。一部の実施形態では、２種又はそれよりも多くの標的核酸配列は、２種又はそれよりも多くの異なる生物に特異的である。一部の実施形態では、２種又はそれよりも多くの異なる生物は、クラミジア・トラコマティス及びナイセリア・ゴノレアを含む。

【００４６】

本明細書に記載されている方法の一部の実施形態では、増幅するステップ／増幅は、超

好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素以外のいかなる酵素の使用を含まない。増幅するステップは、以下のもの：古細菌ポリメラーゼ増幅（ＡＰＡ）、ループ媒介性等温増幅（ＬＡＭＰ）、ヘリカーゼ依存性増幅（ＨＤＡ）、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（ＲＰＡ）、鎖置換増幅（ＳＤＡ）、核酸配列ベース増幅（ＮＡＳＢＡ）、転写媒介性増幅（ＴＭＡ）、ニッキング酵素増幅反応（ＮＥＡＲ）、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）、多置換増幅（ＭＤＡ）、ラミフィケーション（ＲＡＭ）、環状ヘリカーゼ依存性増幅（ｃＨＤＡ）、単一プライマー等温増幅（ＳＰＩＡ）、シグナル媒介性ＲＮＡ増幅技術（ＳＭＡＲＴ）、自家持続配列複製（３ＳＲ）、ゲノム指数関数的増幅反応（ＧＥＡＲ）及び等温多置換増幅（ＩＭＤＡ）の１種又は複数種を含むことができる。一部の実施形態では、増幅するステップは、以下のもの：古細菌ポリメラーゼ増幅（ＡＰＡ）、ＬＡＭＰ、ＨＤＡ、ＲＰＡ、ＳＤＡ、ＮＡＳＢＡ、ＴＭＡ、ＮＥＡＲ、ＲＣＡ、ＭＤＡ、ＲＡＭ、ｃＨＤＡ、ＳＰＩＡ、ＳＭＡＲＴ、３ＳＲ、ＧＥＡＲ及びＩＭＤＡの１種又は複数種を含まない。

【００４７】

一部の実施形態では、この方法は、以下の１種又は複数種を含まない：（ｉ）酸性混合物（例えば、処理試料）を希釈すること；（ｉｉ）中性混合物（例えば、増幅反応混合物）を希釈すること；（ｉｉｉ）酸性混合物を熱変性させること；（ｉｖ）酸性混合物を超音波処理すること；（ｖ）中性混合物を超音波処理すること；（ｖｉ）リボヌクレアーゼ阻害剤を酸性混合物に添加すること；（ｖｉｉ）リボヌクレアーゼ阻害剤を中性混合物に添加すること；（ｖｉｉｉ）試料を精製すること；（ｉｘ）試料核酸を精製すること；（ｘ）核酸増幅産物を精製すること；（ｘｉ）酸性混合物又は中性混合物から１種又は複数種の界面活性剤を除去すること；（ｘｉｉ）増幅前及び／又は増幅中に試料核酸を熱変性及び／又は酵素変性させること；（ｘｉｉｉ）リボヌクレアーゼＨを酸性混合物又は中性混合物に添加すること；（ｘｉｖ）試料、酸性混合物又は中性混合物をヘリカーゼ、一本鎖結合タンパク質、ニッキング酵素、制限酵素又はリコンビナーゼと接触させること；（ｘｖ）試料、酸性混合物又は中性混合物をグリセロール、ホルムアミド又は尿素と接触させること；（ｘｖｉ）酸性混合物又は中性混合物からｓｓＤＮＡを精製すること；（ｘｖｉｉ）熱変性ステップ；並びに（ｘｖｉｉｉ）ｄｓＤＮＡを富化、精製及び／又は単離すること。

【００４８】

核酸検出のための組成物、キット及び方法であって、生物学的実体（例えば、ウイルス粒子、細菌）を溶解するために使用される溶解剤が、増幅試薬（例えば、ポリメラーゼ）を不活化することを防止し、リボヌクレアーゼの有害活性が、一部又はすべての段階で阻害されている、組成物、キット及び方法は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるＰＣＴ特許出願公開番号ＷＯ２０２２１９８０８６に記載されている。一部の実施形態では、本明細書に提供される酸性組成物（例えば、溶解緩衝液）は、当該文献に記載されている１種若しくは複数種の還元剤（例えば、ＤＴＴ）を含む、及び／又は本明細書に提供される試薬組成物は、当該文献に記載されている１種若しくは複数種の保護剤（例えば、シクロデキストリン化合物）を含む。一部の実施形態では、本開示の方法及び組成物は、臨床試料中の直接病原体溶解のために、ポイントオブケア分子診断のための試料を分離又は精製することを必要としない核酸の等温増幅及びリアルタイム検出を可能にする。一部の実施形態では、臨床試料中の病原体を溶解するために使用され得る強力なイオン性デタージェントを含有する酸性組成物（例えば、溶解緩衝液）が提供される。一部の実施形態では、酸性組成物（例えば、溶解緩衝液）は、キレート剤を含むことができる。増幅試薬は、溶解試薬に対する保護剤を含んでいてもよく、乾燥されていてもよく（例えば、凍結乾燥、加熱乾燥）、放出された核酸を増幅するためにポイントオブケア設定において使用することができる。

【００４９】

本明細書で提供される方法及び組成物は、精製又は分離を行わずに試料を調製する他の増幅法、例えば、ＰＣＲ、ＲＴ－ＰＣＲ、又は他の等温増幅法に適用することができる。本明細書で提供される方法及び組成物は、試料調製ステップを必要とするゲノムシーケン

シング法又はあらゆる核酸（ＤＮＡ又はＲＮＡ）増幅若しくは検出法にも適用することができる。本明細書で提供される方法及び組成物は、遺伝子型決定、診断、及び法医学においても使用を見出すことができる。本開示の方法及び組成物は、等温増幅法に限定されず、むしろ他の増幅／検出法、例えば、ＲＴ－ＰＣＲ、ＷＧＳシーケンシングに適用することができ、分離を行わないＲＮＡ精製／抽出にも適用することができる。

【００５０】

本明細書に開示されるものには、試料中の標的核酸配列を検出するための方法が挙げられる。一部の実施形態では、この方法は、（ａ）生物学的実体を含む試料を本明細書に提供される溶解緩衝液（例えば、酸性組成物）と接触させて、酸性混合物（例えば、処理試料）を生成するステップであって、溶解緩衝液が、生物学的実体を溶解して、それらの中に含まれる試料核酸を放出させることが可能であり、試料核酸が、標的核酸配列を含むことが疑われる、ステップを含む。この方法は、（ｂ）試薬組成物（例えば、乾燥組成物、湿潤組成物）を酸性混合物と接触させて、中性混合物（例えば、増幅反応混合物）を生成するステップであって、試薬組成物が、１種又は複数種の増幅試薬を含む、ステップを含んでいてもよい。この方法は、（ｃ）中性混合物中で標的核酸配列を増幅し、それにより核酸増幅産物を生成するステップを含んでいてもよい。この方法は、（ｄ）核酸増幅産物を検出するステップであって、検出するステップが、試薬組成物が酸性混合物と接触した時点から２０分間未満に又は約２０分未満に（例えば、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、１分、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲未満に、又は約２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、１分、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲未満に）実施される、ステップを含んでいてもよい。一部の実施形態では、ステップ（ｂ）及び（ｃ）は、同時に実施される（例えば、試薬組成物及び酸性混合物の接触が生じると増幅が始まる）。一部の実施形態では、試薬組成物は、２種若しくはそれよりも多くの乾燥組成物（同じ又は異なる成分を含む）又は２種若しくはそれよりも多くの湿潤組成物（同じ又は異なる成分を含む）を含む。一部の実施形態では、溶解緩衝液は、２種又はそれよりも多くの溶解緩衝液（同じ又は異なる成分を含む）を含む。

【００５１】

試料核酸は、試料リボ核酸及び／又は試料デオキシリボ核酸を含んでいてもよい。試料リボ核酸は、細胞ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、細菌ＲＮＡ、ウイルスＲＮＡ、又はそれらのあらゆる組合せを含んでいてもよい。１種又は複数種の増幅試薬は、逆転写酵素及び／又は超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素を含んでいてもよい。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、逆転写酵素活性を有する。試薬組成物（例えば、乾燥組成物、湿潤組成物）を酸性混合物（例えば、処理試料）と接触させるステップは、酸性混合物中の試薬組成物を溶解させることを含むことができる。試薬組成物は、逆転写酵素、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、第１のプライマー、第２のプライマー、及び逆転写プライマーの１種又は複数種を含んでいてもよい。増幅は、等温増幅条件で実施することができる。核酸増幅産物の検出は、リアルタイム検出法の使用を含んでいてもよい。試料核酸は、標的核酸配列を含む核酸を含んでいてもよい。標的核酸配列は、互いに相補的な第１の鎖及び第２の鎖を含んでいてもよい。

【００５２】

標的核酸配列の増幅は、互いに相補的な第１の鎖及び第２の鎖を含む標的核酸配列を等温増幅条件で増幅することを含んでいてもよく、増幅は、標的核酸配列を含む核酸を、ｉ）第１のプライマー及び第２のプライマーであって、第１のプライマーは、標的核酸配列の第１の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能であり、第２のプライマーは、標的核酸配列の第２の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能である、第１のプライマー及び第２のプライマー；並びにｉｉ）超好熱菌ポリメラーゼ活性を有し、それにより核酸増幅産物を生成する酵素であって、核酸増幅産物は、（１）第１のプライマーの配列及びその逆相補体、（２）第２のプライマーの配列及びその逆相補体、並びに（３）（１）第１の

プライマーの配列及びその逆相補体並びに（２）第２のプライマーの配列及びその逆相補体によりフランキングされているスペーサー配列であって、１～１０塩基長であるスペーサー配列を含む、酵素と接触させることを含む。

一部の実施形態では、増幅は、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素以外の酵素を使用することを含まず、増幅ステップは、核酸を変性させることを含まない。一部の実施形態では、この方法は、ステップ（ｃ）の前又はステップ（ｃ）中に、核酸を一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質と接触させることを含まない。一部の実施形態では、この方法は、試料核酸の熱変性も酵素変性も含まない。

【００５３】

核酸は、ｄｓＤＮＡであってもよい。核酸は、逆転写反応の産物であってもよい。核酸は、試料リボ核酸から生成される逆転写反応の産物であってもよい。ステップ（ｃ）は、逆転写反応により核酸を生成することを含んでいてもよい。

試料核酸は、試料リボ核酸を含んでいてもよい。この方法は、試料リボ核酸を逆転写酵素及び／又は逆転写プライマーと接触させて、ｃＤＮＡを生成することを含んでいてもよい。標的核酸配列の増幅は、（ｃ１）試料リボ核酸を逆転写酵素及び／又は逆転写プライマーと接触させてｃＤＮＡを生成するステップ；（ｃ２）ｃＤＮＡを超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素と接触させてｄｓＤＮＡを生成するステップであって、ｄｓＤＮＡは標的核酸配列を含み、標的核酸配列は、互いに相補的である第１の鎖及び第２の鎖を含む、ステップ；（ｃ３）標的核酸配列を等温増幅条件下で増幅するステップであって、増幅は、ｄｓＤＮＡを、（ｉ）第１のプライマー及び第２のプライマーであり、第１のプライマーは、標的核酸配列の第１の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能であり、第２のプライマーは、標的核酸配列の第２の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能である、第１のプライマー及び第２のプライマー；並びに（ｉｉ）超好熱菌ポリメラーゼ活性を有し、それにより核酸増幅産物を生成する酵素であり、核酸増幅産物は、（１）第１のプライマーの配列及びその逆相補体、（２）第２のプライマーの配列及びその逆相補体、並びに（３）（１）第１のプライマーの配列及びその逆相補体並びに（２）第２のプライマーの配列及びその逆相補体によりフランキングされているスペーサー配列であり、１～１０塩基長であるスペーサー配列を含む、酵素と接触させることを含む、ステップを含んでいてもよい。

【００５４】

一部の実施形態では、この方法は、逆転写酵素及び超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素以外の酵素の使用を含まない。ステップ（ｄ）は、試料中の、標的核酸配列を含むｄｓＤＮＡ及び／又は核酸の量を決定することをさらに含んでいてもよい。超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列又はその機能的断片と少なくとも約９０％又は少なくとも約９５％同一であるアミノ酸配列を有することができる。超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列を含むか又はそれからなるポリメラーゼであってもよい。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、エキソヌクレアーゼ活性が低いか又は全くない。

標的核酸配列の増幅は、約５５℃～約７５℃、例えば約６５℃の一定の温度で実施することができる。第１のプライマー、第２のプライマー、又はその両方は、約８～１６塩基長であってもよい。第１のプライマー、第２のプライマー、又はその両方は、ＤＮＡ塩基、修飾ＤＮＡ塩基、又はそれらの組合せの１種又は複数種を含んでいてもよい。核酸増幅産物は、約２０～４０塩基長であってもよい。スペーサー配列は、標的核酸配列の一部を含んでいてもよい。スペーサー配列は１～１０塩基長であってもよい。

【００５５】

一部の実施形態では、この方法は、核酸増幅産物を、増幅産物にハイブリダイズすることが可能なシグナル発生オリゴヌクレオチドと接触させることを含む。シグナル発生オリゴヌクレオチドは、フルオロフォア、クエンチャー、又はその両方を含んでいてもよい。核酸増幅産物の検出は、蛍光シグナルを検出することを含んでいてもよい。蛍光シグナルは分子ビーコンからのものであってもよい。この方法は、単一の反応ベッセル内で実施す

ることができる。試料リボ核酸を、逆転写酵素及び超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素と同時に接触させてもよい。試料リボ核酸を、逆転写酵素、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、並びに第１の及び第２のプライマーと同時に接触させてもよい。一部の実施形態では、試料リボ核酸を、逆転写酵素、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素、第１のプライマー、第２のプライマー、及び逆転写プライマーと同時に接触させる。試料リボ核酸の逆転写は、逆転写プライマーの添加により生じさせることができる。一部の実施形態では、逆転写プライマーは、オリゴ（ｄＴ）プライマー、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー、又は標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーである。一部の実施形態では、オリゴ（ｄＴ）プライマーは、１２～１８ヌクレオチド長であり、ｍＲＮＡの３’末端の内在性ポリ（Ａ）＋テイルに結合する。ランダムヘキサヌクレオチドプライマーは、試料リボ核酸の様々な相補的部位に結合することができる。標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には、目的の試料リボ核酸を選択的にプライミングする。一部の実施形態では、第１のプライマー及び／又は第２のプライマーは、逆転写プライマーである。

【００５６】

増幅ステップは、２種又はそれよりも多くの標的核酸配列のマルチプレックス増幅を含んでいてもよい。検出ステップは、前記２種又はそれよりも多くの標的核酸配列に由来する２種又はそれよりも多くの核酸増幅産物のマルチプレックス検出を含んでいてもよい。２種又はそれよりも多くの標的核酸配列は、２種又はそれよりも多くの異なる生物に特異的であってもよい。本明細書に提供される溶解緩衝液（例えば、酸性組成物）は、例えば、等温増幅反応などの種々の増幅反応の上流で用いられてよい。

一部の実施形態では、この方法は、以下の１種若しくは複数を含まないか又はいずれも含まない：（ｉ）酸性混合物（例えば、処理試料）を希釈すること；（ｉｉ）中性混合物（例えば、増幅反応混合物）を希釈すること；（ｉｉｉ）酸性混合物を熱変性させること；（ｉｖ）酸性混合物を超音波処理すること；（ｖ）中性混合物を超音波処理すること；（ｖｉ）リボヌクレアーゼ阻害剤を酸性混合物に添加すること；（ｖｉｉ）リボヌクレアーゼ阻害剤を中性混合物に添加すること；（ｖｉｉｉ）試料を精製すること；（ｉｘ）試料核酸を精製すること；（ｘ）核酸増幅産物を精製すること；（ｘｉ）酸性混合物又は中性混合物から１種又は複数種の溶解剤（例えば、１種又は複数種の界面活性剤）を除去すること；（ｘｉｉ）増幅前又は増幅中に試料核酸を熱及び／又は酵素変性させること；並びに（ｘｉｉｉ）リボヌクレアーゼＨを酸性混合物又は中性混合物に添加すること。一部の実施形態では、試料は、増幅温度（例えば、６７℃）で保持される。一部の実施形態では、試料（例えば、ＲＮＡを含む試料）は、逆転写反応を容易にするために、増幅反応の前に１～２分間にわたり室温及び反応温度の間の温度で保持される。

【００５７】

一部の実施形態では、ステップ（ａ）、ステップ（ｂ）、ステップ（ｃ）及び／又はステップ（ｄ）は、約２０分間、１５分間、１０分間、５分間、２．５分間又は約１分間の期間にわたり実施される。一部の実施形態では、ステップ（ａ）、ステップ（ｂ）、ステップ（ｃ）、及び／又はステップ（ｄ）は、超音波処理、浸透圧ショック、化学処理、加熱、又はそれらのあらゆる組合せを含む。

「等温増幅反応」という用語には、その通常の意味が与えられるものとし、反応中に温度が著しく変化しない反応も含むものとする。一部の実施形態では、等温増幅反応の温度は、増幅が起こる主要酵素反応ステップ中に、１０℃よりも大きく逸脱せず、例えば、５℃以下、及び２℃以下しか逸脱しない。核酸の等温増幅の方法に応じて、異なる酵素を増幅に使用することができる。例示的な等温増幅組成物及び方法は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるＷＯ２０１７１７６４０４に記載されている。

【００５８】

本明細書に開示されるものには、核酸を増幅するための方法が含まれる。一部の実施形態では、この方法は、試料核酸を、等温増幅条件下で、ａ）試料核酸中の標的配列に相補的なポリヌクレオチドを含む少なくとも１種のオリゴヌクレオチド、及びｂ）超好熱菌ポ

リメラーゼ活性を提供する少なくとも１種の成分と接触させ、それにより核酸増幅産物を生成することを含む。一部の実施形態では、この方法は、試料核酸を等温増幅条件下で、ａ）少なくとも１種のオリゴヌクレオチドを含む非酵素成分であって、この少なくとも１種のオリゴヌクレオチドが、試料核酸中の標的配列に相補的なポリヌクレオチドを含む、非酵素成分、及びｂ）超好熱菌ポリメラーゼ、又は超好熱菌ポリメラーゼと少なくとも約９０％同一若しくは少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含むポリメラーゼからなる酵素成分と接触させ、これにより核酸増幅産物を生成するステップを含む。一部の実施形態では、この方法は、試料核酸を等温増幅条件下で、ａ）少なくとも１種のオリゴヌクレオチドを含む非酵素成分であって、この少なくとも１種のオリゴヌクレオチドが、試料核酸中の標的配列に相補的なポリヌクレオチドを含む、非酵素成分、並びにｂ）ｉ）超好熱菌ポリメラーゼ活性及び任意にｉｉ）逆転写酵素活性からなる酵素活性と接触させ、それにより核酸増幅産物を生成するステップを含む。

【００５９】

本明細書に開示されるものには、核酸を処理するための方法が含まれる。一部の実施形態では、この方法は、核酸を増幅するステップを含み、増幅するステップは、試料核酸を等温増幅条件下で、ａ）試料核酸中の標的配列に相補的なポリヌクレオチドを含む少なくとも１種のオリゴヌクレオチド、及びｂ）超好熱菌ポリメラーゼ活性を提供する少なくとも１種の成分と接触させ、それにより核酸増幅産物を生成することを含む。一部の実施形態では、核酸を処理するための方法は、核酸を増幅するステップを含み、増幅するステップは、試料核酸を等温増幅条件下で、ａ）試料核酸中の標的配列に相補的なポリヌクレオチドを含む少なくとも１種のオリゴヌクレオチドを含む非酵素成分、及びｂ）超好熱菌ポリメラーゼ、又は超好熱菌ポリメラーゼと少なくとも約９０％同一若しくは少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列を含むポリメラーゼからなる酵素成分と接触させ、それにより核酸増幅産物を生成することを含む。一部の実施形態では、核酸を処理するための方法は、核酸を増幅するステップを含み、増幅するステップは、試料核酸を等温増幅条件下で、ａ）試料核酸中の標的配列に相補的なポリヌクレオチドを含む少なくとも１種のオリゴヌクレオチドを含む非酵素成分、並びにｂ）ｉ）超好熱菌ポリメラーゼ活性及び任意にｉｉ）逆転写酵素活性からなる酵素活性と接触させ、それにより核酸増幅産物を生成することを含む。一部の実施形態では、酵素活性は、ｉ）超好熱菌ポリメラーゼ活性及びｉｉ）逆転写酵素活性からなる。

【００６０】

本明細書に開示されるものには、試料核酸中の標的配列の存在、非存在又は量を決定するための方法が含まれる。一部の実施形態では、この方法は、ａ）試料核酸中の標的配列を増幅するステップであり、標的配列は第１の鎖及び第２の鎖を含み、第１鎖及び第２鎖は互いに相補的であり、増幅は、試料核酸を、無ヘリカーゼ等温増幅条件下で、ｉ）第１のオリゴヌクレオチド及び第２のオリゴヌクレオチドであり、第１のオリゴヌクレオチドは、第１の鎖の配列に連続的に相補的な第１のポリヌクレオチドを含むか又はからなり、第２のオリゴヌクレオチドは、第２の鎖の配列に連続的に相補的な第２のポリヌクレオチドを含むか又はからなる、第１のオリゴヌクレオチド及び第２のオリゴヌクレオチド；並びにｉｉ）超好熱菌ポリメラーゼ活性を提供し、それにより核酸増幅産物を生成する少なくとも１種の成分であり、核酸増幅産物は、１）第１のオリゴヌクレオチドの第１のポリヌクレオチドと連続的に相補的又は実質的に同一である第１のヌクレオチド配列、２）第２のオリゴヌクレオチドの第２のポリヌクレオチドと連続的に相補的又は実質的に同一である第２のヌクレオチド配列、並びに３）第１のヌクレオチド配列及び第２のヌクレオチド配列によりフランキングされている１～１０塩基を含むスペーサー配列を含むか又はからなる、少なくとも１種の成分と接触させることを含む、ステップ；並びにｂ）核酸増幅産物を検出するステップであり、核酸増幅産物の検出は、リアルタイム検出法の使用を含み、試料核酸を（ａ）（ｉ）及び（ａ）（ｉｉ）と接触させた時点から１０分又はそれよりも短い時間で実施され、それにより試料核酸中の標的配列の存在、非存在、又は量が決定される、ステップを含む。

【００６１】
本明細書に開示されるものには、試料核酸中の標的配列の存在、非存在又は量を決定するためのキットが含まれる。一部の実施形態では、このキットは、ａ）無ヘリカーゼ等温増幅条件下で試料核酸中の標的配列を増幅するための成分であって、この成分が、ｉ）第１のオリゴヌクレオチド及び第２のオリゴヌクレオチドであって、第１のオリゴヌクレオチドが、標的配列の第１の鎖における配列に連続的に相補的である第１のポリヌクレオチドを含むか又はそれからなり、第２のオリゴヌクレオチドが、標的配列の第２の鎖における配列に連続的に相補的である第２のポリヌクレオチドを含むか又はそれからなり、標的配列のこの第１の鎖及び第２の鎖が、互いに相補的である、第１のオリゴヌクレオチド及び第２のオリゴヌクレオチド；並びにｉｉ）超好熱菌ポリメラーゼ活性を提供する少なくとも１種の成分を含む、成分；並びにｂ）核酸増幅産物のリアルタイム検出活性を提供する少なくとも１種の成分を含む。

【００６２】
酵素活性は、ｉ）超好熱菌ポリメラーゼ活性及びｉｉ）逆転写酵素活性を含むか又はそれからなることができる。一部の実施形態では、この方法は、増幅前又は増幅中に試料核酸の酵素変性及び／又は熱変性を含まない。一部の実施形態では、試料核酸は、増幅前又は増幅中にエンドヌクレアーゼと接触されない。一部の実施形態では、試料核酸は、増幅前又は増幅中に巻き戻し剤と接触されない。一部の実施形態では、試料核酸は、増幅前又は増幅中にヘリカーゼと接触されない。一部の実施形態では、試料核酸は、増幅前又は増幅中にリコンビナーゼと接触されない。一部の実施形態では、試料核酸は、増幅前又は増幅中に一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質と接触されない。一部の実施形態では、試料核酸は、増幅前に修飾されていない。一部の実施形態では、修飾されていない試料核酸は、破壊された細胞に由来する。一部の実施形態では、試料核酸は、ＤＮＡを含む。一部の実施形態では、試料核酸は、ゲノムＤＮＡを含む。一部の実施形態では、試料核酸は、ＲＮＡを含む。一部の実施形態では、試料核酸は、ウイルスＲＮＡを含む。一部の実施形態では、試料核酸は、細菌ＲＮＡを含む。試料核酸は、一本鎖核酸、二本鎖核酸又はその両方を含むことができる。例えば、二本鎖核酸は、第１の鎖及び第２の鎖を含むことができる。一部の実施形態では、少なくとも１種のオリゴヌクレオチドは、第１のオリゴヌクレオチド及び第２のオリゴヌクレオチドを含むか又はそれからなる。一部の実施形態では、第１のオリゴヌクレオチド及び第２のオリゴヌクレオチドはそれぞれ、８～１６塩基を含む。一部の実施形態では、第１のオリゴヌクレオチドは、試料核酸の第１の鎖における標的配列に相補的である第１のポリヌクレオチドを含むか又はそれからなり、第２のオリゴヌクレオチドは、試料核酸の第２の鎖における標的配列に相補的な第２のポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、試料核酸は、増幅前に対象から得られる。一部の実施形態では、精製されていない試料核酸が増幅される。一部の実施形態では、精製された試料核酸が増幅される。一部の実施形態では、この方法は、増幅前に試料核酸を精製するステップをさらに含む。

【００６３】
一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性は、超好熱菌ポリメラーゼ又はその機能的断片によって提供される。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性は、超好熱菌ポリメラーゼ又はその機能的断片と少なくとも約９０％同一であるアミノ酸配列を含むポリメラーゼによって提供される。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性は、古細菌超好熱菌ポリメラーゼ又はその機能的断片によって提供される。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性は、配列番号１のアミノ酸配列若しくはその機能的断片を含むポリメラーゼ、又は配列番号１のアミノ酸配列若しくはその機能的断片と少なくとも約９０％同一であるアミノ酸配列を含むポリメラーゼによって提供される。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性は、エキソヌクレアーゼ活性が低いか又はエキソヌクレアーゼ活性を有さないポリメラーゼによって提供される。一部の実施形態では、増幅は、約５５℃～約７５℃の一定温度、例えば、約５５℃～約６５℃又は約６５℃又は約６０℃の一定温度で実施される。

【００６４】
一部の実施形態では、核酸増幅産物は、２０、１５、１４、１３、１２、１１若しくは１０分間又はそれ未満で検出可能である。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、試料核酸中の標的配列に連続的に相補的であるか又はそれと実質的に同一であるポリヌクレオチドを含むか又はそれからなる。核酸増幅産物は、約２０～４０塩基長であってもよい。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、ｉ）第１のオリゴヌクレオチドの第１のポリヌクレオチドと連続的に相補的又は実質的に同一である第１のヌクレオチド配列、ｉｉ）第２のオリゴヌクレオチドの第２のポリヌクレオチドと連続的に相補的又は実質的に同一である第２のヌクレオチド配列、並びにｉｉｉ）スペーサー配列であって、第１のヌクレオチド配列及び第２のヌクレオチド配列によりフランキングされたスペーサー配列を含むか又はそれからなる。一部の実施形態では、スペーサー配列は、１～１０塩基、例えば、１～５塩基を含む。一部の実施形態では、スペーサー配列は、第１のオリゴヌクレオチドの第１のポリヌクレオチドと相補的でも同一でもなく、第２のオリゴヌクレオチドの第２のポリヌクレオチドと相補的でも同一でもない。一部の実施形態では、スペーサー配列は、試料核酸中の標的配列の一部と連続的に相補的であるか又はそれと実質的に同一である。

【００６５】
一部の実施形態では、この方法は、核酸増幅産物を検出するステップをさらに含む。一部の実施形態では、核酸増幅産物を検出するステップは、試料核酸が超好熱菌ポリメラーゼ活性を提供する成分及び少なくとも１種のオリゴヌクレオチドと接触した時点から１０分間又はそれ未満で実施される。一部の実施形態では、核酸増幅産物を検出するステップは、リアルタイム検出方法の使用を含む。一部の実施形態では、核酸増幅産物を検出するステップは、蛍光シグナルの検出を含む。一部の実施形態では、蛍光シグナルは、分子ビーコンからのものである。一部の実施形態では、この方法は、核酸増幅産物を、ｉ）増幅産物中の配列に相補的なポリヌクレオチド、並びにｉｉ）フルオロフォア及びクエンチャーを含むシグナル発生オリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、少なくとも１種のオリゴヌクレオチドの１種又は複数種は、シグナル発生オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする試料核酸中の配列に相補的ではないポリヌクレオチドを含み、この方法は、増幅産物を、フルオロフォア及びクエンチャーを含むシグナル発生オリゴヌクレオチドと接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、この方法は、単一の反応容積で実施される。一部の実施形態では、この方法は、単一の反応ベッセルで実施される。一部の実施形態では、この方法は、マルチプレックス増幅を含む。
一部の実施形態では、酵素活性は、ｉ）超好熱菌ポリメラーゼ活性及びｉｉ）逆転写酵素活性からなる。一部の実施形態では、第１のオリゴヌクレオチドは、試料核酸の第１の鎖における標的配列に相補的である第１のポリヌクレオチドを含むか又はそれからなり、第２のオリゴヌクレオチドは、試料核酸の第２の鎖における標的配列に相補的である第２のポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第１のオリゴヌクレオチドは、試料核酸の第１の鎖における標的配列に連続的に相補的である第１のポリヌクレオチドを含むか又はそれからなり、第２のオリゴヌクレオチドは、試料核酸の第２の鎖における標的配列に連続的に相補的である第２のポリヌクレオチドを含む。

【００６６】
一部の実施形態では、増幅するステップは、無ヘリカーゼ及び無リコンビナーゼ等温増幅条件下で試料核酸を接触させることを含む。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を提供する少なくとも１種の成分は、超好熱菌ポリメラーゼ若しくはその機能的断片、又は超好熱菌ポリメラーゼ若しくはその機能的断片と少なくとも約９０％同一であるアミノ酸配列を含むか若しくはそれからなるポリメラーゼを含むか又はそれからなる。一部の実施形態では、パート（ａ）（ｉｉ）は、逆転写酵素活性を提供する少なくとも１種の成分をさらに含む。一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を提供する少なくとも１種の成分は、逆転写酵素活性をさらに提供する。一部の実施形態では、試料核酸は、無ヘリカーゼ及び無リコンビナーゼ等温増幅条件下で増幅される。一部の実施形態では、リアルタイム検出活性は、分子ビーコンにより提供される。一部の実施形態では、キッ

トは、試料核酸中の標的配列の存在、非存在又は量を決定するための本明細書に提供される方法を実行するための説明書をさらに含む。

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法及び成分は、保管安定溶解緩衝液を含む。一部の実施形態では、溶解緩衝液は、保管条件下で一定期間にわたって沈殿物の形成に対して耐性である（例えば、保管安定溶解緩衝液）。溶解緩衝液が沈殿に抵抗する、組成物、キット及び方法は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、２０２２年２月５日に出願された表題「ＮＯＮ－ＯＰＡＱＵＥ　ＬＹＴＩＣ　ＢＵＦＦＥＲ　ＣＯＭＰＯＳＩＴＩＯＮ　ＦＯＲＭＵＬＡＴＩＯＮＳ」の米国特許出願第６３／３０７，０９２号に記載されている。

【００６７】

核酸、対象、試料、及び核酸処理

本明細書には、核酸を増幅するための方法及び組成物が提供される。「核酸」及び「核酸分子」という用語は、本明細書では同義的に使用することができる。この用語は、ＤＮＡ（例えば、相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）及びゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）など）、ＲＮＡ（例えば、メッセージＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、短鎖阻害性ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、ｔＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、及び／又はＤＮＡ若しくはＲＮＡ類似体（例えば、塩基類似体、糖類似体、及び／又は非天然骨格などを含む）、ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッド、及びポリアミド核酸（ＰＮＡ）などのあらゆる組成の核酸を指し、これらはすべて、一本鎖の形態であってもよく又は二本鎖の形態であってもよく、別様の限定がない限り、天然に存在するヌクレオチドと同様の様式で機能することができる天然ヌクレオチドの既知類似体を包含することができる。核酸は、プラスミド、ファージ、自律複製配列（ＡＲＳ）、セントロメア、人工染色体、染色体、或いはｉｎ　ｖｉｔｒｏ又は宿主細胞、細胞、細胞核、ミトコンドリア、若しくは細胞の細胞質にて複製し得るか又は複製され得る他の核酸であってもよく又はそれらに由来してもよい。特に限定のない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと同様の様式で代謝される天然ヌクレオチドの既知類似体を含む核酸を包含する。別様に示されていない限り、特定の核酸配列は、明示的に示されている配列だけでなく、その保存的修飾バリアント（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、一塩基多型（ＳＮＰ）、及び相補配列も暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、１つ又は複数の選択された（又はすべての）コドンの３番目の位置が混合塩基及び／又はデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することにより達成することができる。核酸という用語は、遺伝子座、遺伝子、ｃＤＮＡ、及び遺伝子によりコードされるｍＲＮＡと同義的に使用することができる。この用語は、ヌクレオチド類似体、一本鎖ポリヌクレオチド（「センス」又は「アンチセンス」、「プラス」鎖又は「マイナス」鎖、「フォワード」リーディングフレーム又は「リバース」リーディングフレーム、「フォワード」鎖又は「リバース」鎖）及び二本鎖ポリヌクレオチドから合成されるＲＮＡ又はＤＮＡの等価物、誘導体、バリアント、及び類似体も含むことができる。「遺伝子」という用語は、ポリペプチド鎖の産生に関与するＤＮＡのセグメントを意味し、一般に、遺伝子産物の転写／翻訳及び転写／翻訳の調節に関与するコード領域（リーダー及びトレーラー）の前後の領域、並びに個々のコードセグメント（エクソン）間の介在配列（イントロン）を含む。ヌクレオチド又は塩基は、一般に、核酸のプリン分子単位及びピリミジン分子単位を指す（例えば、アデニン（Ａ）、チミン（Ｔ）、グアニン（Ｇ）、及びシトシン（Ｃ））。ＲＮＡの場合、塩基チミンはウラシルに置き換えられる。核酸の長さ又はサイズは、塩基の数として表すことができる。

【００６８】

本明細書で提供される方法の一部の実施形態では、１種又は複数種の核酸標的が増幅される。標的核酸は、標的配列、標的ポリヌクレオチド、及び／又は標的ポリヌクレオチド配列と呼ばれる場合があり、二本鎖核酸分子及び一本鎖核酸分子を含むことができる。標的核酸は、例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡであってもよい。標的核酸がＲＮＡ分子である場合、分子は、例えば、二本鎖、一本鎖であってもよく、又はＲＮＡ分子は、一本鎖である標

的配列を含んでもよい。標的核酸が二本鎖である場合、標的核酸は、一般に、第１の鎖及び第２の鎖を含む。第１の鎖及び第２の鎖は、フォワード鎖及びリバース鎖と呼ばれる場合があり、一般に、互いに相補的である。標的核酸が一本鎖である場合、例えば、重合及び／又は逆転写により相補鎖を生成して、標的核酸を二本鎖にして、第１の／フォワード鎖及び第２の／リバース鎖を有することができる。

【００６９】

標的配列は、核酸配列のセンス鎖又はアンチセンス鎖のいずれを指してもよく、標的核酸に存在する配列、元の標的配列の増幅コピー又は増幅産物を指すこともできる。標的配列は、より大きなポリヌクレオチド内の部分配列であってもよい。例えば、標的配列は、増幅の標的とされる核酸断片、染色体、プラスミド内の短い配列（例えば、２０～５０塩基）であってもよい。一部の実施形態では、標的配列は、核酸を増幅するために使用されるオリゴヌクレオチド（例えば、プライマー）に相補的である標的核酸内の配列を指すことができる。したがって、標的配列は、増幅の標的とされる配列全体を指してもよく、又はオリゴヌクレオチドが結合する標的核酸内の部分配列を指してもよい。増幅産物は、標的配列、並びに少なくとも１つの他の配列、又は他のヌクレオチドを含むより大きな分子であってもよい。増幅産物は、標的配列とほぼ同じ長さ、例えば、標的配列と正確に同じ長さであってもよい。増幅産物は、標的配列を含むか又はからなってもよい。

標的配列長及び／又はグアノシンシトシン（ＧＣ）濃度（パーセント）は、部分的には、増幅反応が実行される温度に依存する可能性があり、この温度は、部分的には、反応に使用されるポリメラーゼの安定性に依存する可能性がある。１セットの反応条件について適切な標的配列長及びＧＣ濃度を決定するために、試行アッセイを実施してもよい。例えば、ポリメラーゼが６０℃～６５℃まで安定である場合、標的配列は、例えば、１９～５０ヌクレオチド長、又は例えば約４０～５０、２０～４５、２０～４０、又は２０～３０ヌクレオチド長であってもよい。こうした条件下でのＧＣ濃度は、例えば、６０％未満、５５％未満、５０％未満、又は４５％未満であってもよい。

【００７０】

標的核酸は、例えば、ゲノム核酸、プラスミド核酸、ミトコンドリア核酸、細胞核酸、細胞外核酸、細菌核酸、及びウイルス核酸を含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的核酸は、ゲノムＤＮＡ、染色体ＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、遺伝子、あらゆるタイプの細胞ＲＮＡ、メッセンジャーＲＮＡ、細菌ＲＮＡ、ウイルスＲＮＡ、又は合成オリゴヌクレオチドを含んでいてもよい。ゲノム核酸は、あらゆるゲノム、例えば、動物ゲノム、植物ゲノム、昆虫ゲノム、ウイルスゲノム、及び細菌ゲノム（例えば、胞子に存在するゲノム）に由来するあらゆる核酸を含んでいてもよい。一部の実施形態では、ゲノム標的核酸は、特定のゲノム遺伝子座又は複数のゲノム遺伝子座内に存在する。ゲノム遺伝子座は、オープンリーディングフレームＤＮＡ、非転写ＤＮＡ、イントロン配列、エクソン（ｅｘｔｒｏｎｉｃ）配列、プロモーター配列、エンハンサー配列、フランキング配列、又は所与のゲノム遺伝子座に関連すると考えられるあらゆる配列のいずれか又は組合せを含んでいてもよい。

【００７１】

標的配列は、１種又は複数種の反復エレメント（例えば、多重反復配列、逆位反復配列、回文配列、タンデムリピート、マイクロサテライト、及びミニサテライトなど）を含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的配列は、反復エレメント（例えば、多重反復配列、逆位反復配列、回文配列、タンデムリピート、マイクロサテライトリピート、及びミニサテライトリピートなど）として試料核酸内（例えば、核酸断片内、染色体内、ゲノム内、プラスミド内）に存在する。例えば、標的配列は、反復エレメントとして複数回出現してもよく、反復エレメント内の標的配列の１つ、一部、又はすべての出現を、本明細書に記載の方法を使用して（例えば、単一対のプライマーを使用して）増幅することができる。一部の実施形態では、標的配列は、複製物及び／又はパラログとして試料核酸内（例えば、核酸断片内、染色体内、ゲノム内、プラスミド内）に存在する。

標的核酸は、マイクロＲＮＡを含んでいてもよい。マイクロＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、又は

小分子ＲＮＡ（ｓｔＲＮＡ、ｓｍａｌｌ　ｔｅｍｐｏｒａｌ　ＲＮＡ）は短く（例えば、約２１～２３ヌクレオチド長）、遺伝子調節に関与する一本鎖ＲＮＡ配列である。マイクロＲＮＡは、メッセンジャーＲＮＡの翻訳を妨げる可能性があり、メッセンジャーＲＮＡと部分的に相補的である。標的核酸は、一次転写物（ｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ）及びさらにプロセシングされてｍｉＲＮＡになるｐｒｅ－ｍｉＲＮＡステムループ構造ＲＮＡなどのマイクロＲＮＡ前駆体を含んでいてもよい。標的核酸は、短く（例えば、約２０～２５ヌクレオチド長）、ＲＮＡ干渉（例えば、ウイルス複製又は遺伝子発現の下方制御）に関与する少なくとも部分的に二本鎖のＲＮＡ分子である小分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）を含んでいてもよい。

【００７２】

本明細書に記載の方法で使用される核酸は、あらゆる好適な生物学的検体又は試料から得ることができ、例えば、対象から得られた試料から単離することができる。対象は、ヒト、非ヒト動物、植物、細菌、真菌、ウイルス、又は原生生物を含むがこれらに限定されない、あらゆる生体又は非生体生物であってもよい。哺乳類、爬虫類、鳥類、両生類、魚類、有蹄動物、反芻動物、ウシ亜科動物（例えば、ウシ）、ウマ科動物（例えばウマ）、ヤギ様及びヒツジ様動物（例えば、ヒツジ、ヤギ）、イノシシ科動物（例えばブタ）、ラクダ科動物（例えば、ラクダ、ラマ、アルパカ）、サル、類人猿（例えば、ゴリラ、チンパンジー）、クマ科動物（例えば、クマ）、家禽、イヌ、ネコ、マウス、ラット、魚類、イルカ、クジラ、及びサメを含むがそれらに限定されない、あらゆるヒト又は非ヒト動物を選択することができる。対象は、雄であってもよく又は雌であってもよく、対象は、あらゆる年齢（例えば、胎芽、胎仔、幼仔、仔供、成体）であってもよい。

【００７３】

試料又は試験試料は、対象又はその一部から単離されるか又は得られるあらゆる検体であってもよい。検体の非限定的な例としては、限定ではないが、以下のものを含む、対象に由来する流体又は組織が挙げられる：血液又は血液産物（例えば、血清又は血漿など）、臍帯血、骨髄、絨毛膜絨毛、羊水、脳脊髄液、脊髄液、洗浄液（例えば、気管支肺胞、胃、腹膜、管、耳、関節鏡（ａｒｔｈｒｏｓｃｏｐｉｃ））、血清、血漿、尿、吸引液、生検試料、腸穿刺試料、細胞（例えば、血液細胞）又はその一部（例えば、ミトコンドリア、核、又は抽出物など）、雌生殖管の洗浄液、尿、糞便、喀痰、唾液、鼻粘膜、前立腺液、洗浄物、精液、リンパ液、胆汁、涙、汗、母乳、乳房液、硬組織（例えば、肝臓、脾臓、腎臓、肺、又は卵巣）など、又はそれらの組合せ。血液という用語は、従来定義されているように、全血、血液産物、又は血清、血漿、若しくは軟膜などの血液のあらゆる画分を包含する。血漿とは、抗凝固剤で処理された血液の遠心分離から得られる全血の画分を指す。血清とは、血液試料が凝固した後に残る流体の水様部分を指す。流体試料又は組織試料は、病院又は診療所が一般に従う標準的プロトコールに準じて収集されることが多い。血液の場合、適切な量の末梢血（例えば、３～４０ミリリットル）が収集されることが多く、調製前又は調製後に標準的手順に従って保管することができる。

【００７４】

試料又は検査試料は、胞子、ウイルス、細胞、原核生物若しくは真核生物由来の核酸、又はいずれかの遊離核酸を含有する試料を含むことができる。例えば、本明細書に記載の方法は、胞子の外側にある核酸を検出するために使用することができる（例えば、溶解を必要とせずに）。試料は、上記に記載の対象に由来するものなど、標的配列を含むと疑われるあらゆる物質から単離することができる。一部の実施形態では、標的配列は、空気、植物、土壌、又は生物有機体を含むと疑われる他の物質に存在する。

核酸は、当技術分野で公知の方法により、１種又は複数種の供給源から導出（例えば、単離、抽出、精製）することができる。当技術分野におけるＤＮＡ調製方法、並びにＱｉａｇｅｎ社のＱＩＡａｍｐ　Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄキット、ＱｉａＡｍｐ　ＤＮＡミニキット若しくはＱｉａＡｍｐ　ＤＮＡ血液ミニキット（Ｑｉａｇｅｎ、ヒルデン、ドイツ）、ＧｅｎｏｍｉｃＰｒｅｐ（商標）血液ＤＮＡ単離キット（Ｐｒｏｍｅｇａ、マディソン、ウィスコンシン州）、及びＧＦＸ（商標）ゲノム血液Ｄ

ＮＡ精製キット（Ａｍｅｒｓｈａｍ、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）など又はそれらの組合せなどの種々の市販試薬又はキットを含む、生物学的試料から核酸を単離、抽出、及び／又は精製するためのあらゆる好適な方法を使用することができる。米国特許第７，８８８，００６号には、ＤＮＡ精製方法が提供されているが、本明細書で提供される組成物（例えば、溶解緩衝液、保護剤）及び方法は開示されていない。

【００７５】

一部の実施形態では、細胞溶解手順が実施される。細胞溶解は、本明細書に記載の増幅反応を開始する前に実施してもよい（例えば、増幅のために細胞からＤＮＡ及び／又はＲＮＡを放出させるために）。細胞溶解手順及び試薬は当技術分野で公知であり、化学的方法（例えば、デタージェント、低張溶液、及び酵素的手順など、又はそれらの組合せ）、物理的方法（例えば、フレンチプレス及び超音波処理など）、又は電解溶解法により実施することができる。例えば、化学的方法では、一般に、溶解剤を使用して細胞を破壊し、核酸を細胞から抽出し、続いてカオトロピック塩で処理する。一部の実施形態では、細胞溶解は、デタージェント（例えば、イオン性、非イオン性、アニオン性、双性イオン性）の使用を含む。一部の実施形態では、細胞溶解は、イオン性デタージェント（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、ラウリル硫酸ナトリウム（ＳＬＳ）、デオキシコレート、コレート、サルコシル）の使用を含む。凍結／解凍後の粉砕及びセルプレスの使用などの物理的方法も有用であり得る。高塩溶解手順も使用することができる。例えば、アルカリ溶解手順を使用することができる。後者の手順には、伝統的にフェノール－クロロホルム溶液の使用が組み込まれており、３種の溶液を含む代替的な無フェノール－クロロホルム手順を使用することもできる。後者の手順では、例えば、１つの溶液は、１５ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ８．０）、１０ｍＭ　ＥＤＴＡ、及び１００μｇ／ｍｌＲＮａｓｅＡを含んでいてもよく、第２の溶液は、０．２Ｎ　ＮａＯＨ及び１％ＳＤＳを含んでいてもよく、第３の溶液は、３Ｍ　ＫＯＡｃ、ｐＨ５．５を含んでいてもよい。一部の実施形態では、細胞溶解緩衝液が、本明細書に記載の方法及び成分と併せて使用される。

【００７６】

核酸を含む試料を処理することなく本明細書に記載の方法を実施するための核酸を提供することができる。例えば、事前の核酸精製を行わずに本明細書に記載の増幅方法を実施するための核酸を提供することができる。一部の実施形態では、標的配列は試料から直接増幅される（例えば、核酸抽出、単離、精製、及び／又は部分精製ステップを一切実施せずに）。一部の実施形態では、核酸を含む試料を処理した後で本明細書に記載の方法を実施するための核酸が提供される。例えば、核酸は、試料から抽出、単離、精製、又は部分的に精製することができる。「単離された」という用語は、一般に、その元の環境（例えば、天然に存在する場合は自然環境、又は外因的に発現された場合は宿主細胞）から取り出された核酸を指し、したがって、人間の介入により（例えば、「人の手により」）その元の環境から変更されている。「単離された核酸」という用語は、対象（例えば、ヒト対象）から取り出された核酸を指すことができる。供給源試料に存在する成分の量よりも少ない非核酸成分（例えば、タンパク質、脂質、炭水化物）を有する単離された核酸を提供することができる。単離された核酸を含む組成物には、非核酸成分の約５０％～９９％よりも多くが含まれていなくともよい。単離された核酸を含む組成物は、非核酸成分の約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は９９％よりも多くが含まれていなくてもよい。「精製された」という用語は、一般に、核酸を精製手順に供する前に存在する非核酸成分の量よりも少ない非核酸成分（例えば、タンパク質、脂質、炭水化物）を含む場合の核酸を指す。精製された核酸を含む組成物は、他の非核酸成分の約８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は９９％よりも多くを含んでいなくてもよい。

【００７７】

核酸を修飾することなく本明細書に記載の方法を実施するための核酸を提供することができる。修飾としては、例えば、変性、消化、ニッキング、解巻、異種性配列の組込み及

び／若しくはライゲーション、エピジェネティック修飾の付加、標識の追加（例えば、^{32}Ｐ、^{33}Ｐ、^{125}Ｉ、又は^{35}Ｓなどの放射性標識；アルカリホスファターゼなどの酵素標識；フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）などの蛍光標識；又はビオチン、アビジン、ジゴキシゲニン、抗原、ハプテン、及び蛍光色素などの他の標識）などを挙げることができる。したがって、一部の実施形態では、未修飾核酸が増幅される。

【００７８】

試料中の標的核酸配列（一本鎖又はｄｓＤＮＡ及び／又はＲＮＡ）を検出するための本明細書に開示の方法は、標的核酸配列（例えばＤＮＡ又はＲＮＡ）を高感度で検出することができる。一部の実施形態では、この方法は、複数のＲＮＡ／ＤＮＡ（標的ＲＮＡ／ＤＮＡ及び複数の非標的ＲＮＡ／ＤＮＡを含む）を含む試料に存在する標的ＤＮＡ／ＲＮＡを検出するために使用することができ、標的ＲＮＡ／ＤＮＡは、１０、２０、２５、５０、１００、５００、10^3、5×10^3、10^4、5×10^4、10^5、5×10^5、10^6、又は10^7個の非標的ＤＮＡ／ＲＮＡ当たり１つ又は複数のコピーで存在する。本明細書で使用される場合、「ＲＮＡ／ＤＮＡ」及び「ＲＮＡ（複数）／ＤＮＡ（複数）」という用語にはそれらの通常の意味が与えられるものとし、また、ＤＮＡ、又はＲＮＡ、又はＤＮＡ及びＲＮＡの組合せを指すものとする。

【００７９】

試料中の標的ＲＮＡ／ＤＮＡを検出するための方法の検出閾値は、例えば１０ｎＭ又はそれよりも低い濃度であり得る。「検出閾値」という用語にはその通常の意味が与えられるものとし、また、検出が生じるために試料に存在しなければならない標的ＲＮＡ／ＤＮＡの最小量を記述するものとする。説明のための例として、検出閾値が１０ｎＭである場合、標的ＲＮＡ／ＤＮＡが試料中に１０ｎＭ又はそれよりも高い濃度で存在するとシグナルを検出することができる。一部の実施形態では、本開示の方法は、５ｎＭ若しくはそれよりも低いか、１ｎＭ若しくはそれよりも低いか、０．５ｎＭ若しくはそれよりも低いか、０．１ｎＭ若しくはそれよりも低いか、０．０５ｎＭ若しくはそれよりも低いか、０．０１ｎＭ若しくはそれよりも低いか、０．００５ｎＭ若しくはそれよりも低いか、０．００１ｎＭ若しくはそれよりも低いか、０．０００５ｎＭ若しくはそれよりも低いか、０．０００１ｎＭ若しくはそれよりも低いか、０．００００５ｎＭ若しくはそれよりも低いか、０．００００１ｎＭ若しくはそれよりも低いか、１０ｐＭ若しくはそれよりも低いか、１ｐＭ若しくはそれよりも低いか、５００ｆＭ若しくはそれよりも低いか、２５０ｆＭ若しくはそれよりも低いか、１００ｆＭ若しくはそれよりも低いか、５０ｆＭ若しくはそれよりも低いか、５００ａＭ（アトモル濃度）若しくはそれよりも低いか、２５０ａＭ若しくはそれよりも低いか、１００ａＭ若しくはそれよりも低いか、５０ａＭ若しくはそれよりも低いか、１０ａＭ若しくはそれよりも低いか、又は１ａＭ若しくはそれよりも低い検出閾値を有する。本明細書に開示される組成物又は方法は、アトモル濃度（ａＭ）検出感度、フェムトモル濃度（ｆＭ）検出感度、ピコモル濃度（ｐＭ）検出感度又はナノモル濃度（ｎＭ）検出感度を有することができる。

【００８０】

試料は、試料核酸（例えば、複数種の試料核酸）を含んでいてもよい。「複数種」という用語は、本明細書では２種又はそれよりも多くを意味するために使用される。したがって、一部の実施形態では、試料は、２種若しくはそれよりも多くの（例えば、３種若しくはそれよりも多くの、５種若しくはそれよりも多くの、１０種若しくはそれよりも多くの、２０種若しくはそれよりも多くの、５０種若しくはそれよりも多くの、１００種若しくはそれよりも多くの、５００種若しくはそれよりも多くの、１，０００種若しくはそれよりも多くの、又は５，０００種若しくはそれよりも多くの）試料核酸（例えば、ＤＮＡ／ＲＮＡ）を含む。本開示の方法は、試料に（例えば、ＤＮＡ／ＲＮＡなどの核酸の複雑な混合物に）存在する標的核酸を検出するための非常に高感度な方法として使用することができる。一部の実施形態では、試料は、５種、１０種、２０種、２５種、５０種、１００種、５００種、10^3種、5×10^3種、10^4種、5×10^4種、10^5種、5×10^5種、10^6種、又は10^7種、５０種、又はそれよりも多くの、配列が互いに異なるＤＮＡ

／ＲＮＡを含む。一部の実施形態では、試料は、細胞（例えば、真核細胞、哺乳動物細胞、又はヒト細胞）又は細胞ライセート（例えば、真核細胞ライセート、哺乳類細胞ライセート、ヒト細胞ライセート、原核細胞ライセート、又は植物細胞ライセートなど）に由来するＤＮＡ／ＲＮＡを含む。

【００８１】

ここで使用される「試料」という用語には、その通常の意味が与えられるものとし、ＲＮＡ及び／又はＤＮＡを含むあらゆる試料を含むものとする（例えば、標的ＤＮＡ及び／又は標的ＲＮＡがＲＮＡ及び／又はＤＮＡ集団中に存在するか否かを決定するための）。試料は、いかなる供給源に由来してもよく、例えば、試料は、精製されたＤＮＡ及び／又はＲＮＡの合成的組合せであってもよい。試料は、細胞ライセート、ＤＮＡ／ＲＮＡ富化細胞ライセート、又は細胞ライセートから単離及び／若しくは精製されたＤＮＡ／ＲＮＡであってもよい。試料は患者に由来してもよい（例えば、診断目的の場合）。試料は、透過化細胞、架橋細胞、組織切片、又はそれらの組合せに由来してもよい。試料は、架橋し続いて脱脂し、屈折率が均一になるように調整することにより調製された組織に由来してもよい。試料は、標的核酸（例えば、標的ＤＮＡ／ＲＮＡ）及び複数種の非標的ＤＮＡ／ＲＮＡを含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的ＤＮＡ／ＲＮＡは、１０、２０、２５、５０、１００、５００、10^3、5×10^3、10^4、5×10^4、10^5、5×10^5、10^6、又は10^7個の非標的ＤＮＡ／ＲＮＡ当たり１コピーで試料中に存在する。

【００８２】

患者に関連する試料は、血液及び生物学的起源の他の液体試料、生検検体又は組織培養物又はそれらに由来する細胞及びそれらの子孫などの固体組織試料、並びに調達後に何らかの方法（試薬による処理など）で操作されているか；洗浄されているか；又はある特定の細胞集団（例えば、がん細胞）若しくは特定タイプの分子（例えば、ＲＮＡ）が富化された試料を包含する。試料は、血液、血漿、血清、吸引液、脳脊髄液（ＣＳＦ）などの臨床試料を含むがそれらに限定されない生物学的試料を含んでいてもよく、また、であってもよく、外科的切除により得られる組織、生検により得られる組織、培養物中の細胞、細胞上清、細胞ライセート、組織試料、器官、及び骨髄なども含む。生物学的試料は、それら（例えば、がん性細胞、感染細胞など）に由来する生物学的流体、例えば、そのような細胞から得られるＲＮＡを含む試料（例えば、ＲＮＡを含む細胞ライセート又は他の細胞抽出物）を含んでいてもよい。

【００８３】

試料の供給源は、罹患した（又は罹患が疑われる）細胞、流体、組織、若しくは器官であってもよく、又は正常な（非罹患の）細胞、流体、組織、若しくは器官であってもよい。一部の実施形態では、試料の供給源は、病原体に感染した（又は感染が疑われる）細胞、組織、又は器官である。例えば、試料の供給源は、感染していてもよく又はしていなくてもよい個体であってもよく、試料は、その個体から収集されるいかなる生物学的試料（例えば、血液、唾液、生検、血漿、血清、気管支肺胞洗浄液、喀痰、糞便試料、脳脊髄液、細針吸引物、スワブ試料（例えば、頬側スワブ、子宮頸部スワブ、鼻腔スワブ）、間質液、滑液、鼻汁、涙、軟膜、粘膜試料、上皮細胞試料（例えば、上皮細胞擦過物）など）であってもよい。試料は、無細胞液体試料であってもよく、又は細胞を含む液体試料であってもよい。病原体は、ウイルス、真菌、蠕虫、原生動物、マラリア寄生虫、プラスモジウム（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ）寄生虫、トキソプラズマ（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ）寄生虫、及びシストソーマ（Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ）寄生虫などであってもよい。「蠕虫」としては、回虫、糸状虫、及び植物食性線虫（線虫類）、吸虫（吸虫類（Ｔｅｍａｔｏｄａ））、鉤頭虫類、及び条虫（条虫類）が挙げられる。原生動物感染症としては、ジアルジア種（Ｇｉａｒｄｉａ　ｓｐｐ．）、トリコモナス種（Ｔｒｉｃｈｏｍｏｎａｓ　ｓｐｐ．）による感染症、アフリカトリパノソーマ症、アメーバ赤痢、バベシア症、バランチジウム症、シャーガス病、コクシジウム症、マラリア、及びトキソプラズマ症が挙げられる。寄生虫／原生動物病原体などの病原体の例としては、熱帯熱マラリア原虫（Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ　ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ）、プラスモディウム・ビバックス（Ｐｌａｓｍｏｄ

ｉｕｍ ｖｉｖａｘ）、トリパノソーマ・クルージ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ）、及びトキソプラズマ・ゴンディ（Ｔｏｘｏｐｌａｓｍａ ｇｏｎｄｉｉ）が挙げられるが、これらに限定されない。真菌病原体としては、クリプトコッカス・ネオフォルマンス、ヒストプラズマ・カプスラーツム、コクシジオイデス・イミチス、ブラストミセス・デルマティティディス、クラミジア・トラコマティス、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）が挙げられるが、これらに限定されない。病原性ウイルスとしては、例えば、免疫不全ウイルス（例えば、ＨＩＶ）、インフルエンザウイルス、デング熱、ウエストナイルウイルス、ヘルペスウイルス、黄熱病ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、Ａ型肝炎ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、及びパピローマウイルスなどが挙げられる。病原性ウイルスとしては、パポバウイルス（例えば、ＨＰＶ、ポリオーマウイルス）；ヘパドナウイルス；ヘルペスウイルス（例えば、ＨＳＶ（例えば、ＨＳＶ Ｉ、ＨＳＶ ＩＩ）、水痘帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ）、エプスタインバーウイルス（ＥＢＶ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ヘルペスリンパ向性ウイルス、バラ色粃糖疹（Ｐｉｔｙｒｉａｓｉｓ Ｒｏｓｅａ）、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス）；アデノウイルス（例えば、アタデノウイルス、アビアデノウイルス、イクタデノウイルス（ｉｃｈｔａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ）、マストアデノウイルス、シアデノウイルス）；ポックスウイルス（例えば、天然痘、ワクシニアウイルス、牛痘ウイルス、サル痘ウイルス、オルフウイルス、偽牛痘、ウシ丘疹性口内炎ウイルス；タナ痘ウイルス、ヤバサル腫瘍ウイルス；伝染性軟属腫ウイルス（ＭＣＶ））；パルボウイルス（例えば、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、パルボウイルスＢ１９、ヒトボカウイルス、ブファウイルス（ｂｕｆａｖｉｒｕｓ）、ヒトｐａｒｖ４ Ｇ１）；ジェミニウイルス科；ナノウイルス科；及びフィコドナウイルス科などのＤＮＡウイルスを挙げることができる。病原体の非限定的な例としては、マイコバクテリウム・ツベルクローシス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）及びストレプトコッカス・アガラクチア（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ）、メチシリン耐性スタフィロコッカス・アウレウス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）、レジオネラ・ニューモフィラ、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、ナイセリア・ゴノレア、ナイセリア・メニンギティディス、肺炎球菌（Ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃｕｓ）、クリプトコッカス・ネオフォルマンス、ヒストプラズマ・カプスラーツム、Ｂ型インフルエンザ菌（Ｈｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ Ｂ）、梅毒トレポネーマ、ライム病スピロヘータ、シュードモナス・エルギノーサ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、マイコバクテリウム・レプレ（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｅｐｒａｅ）、ブルセラ・アボルタス（Ｂｒｕｃｅｌｌａ ａｂｏｒｔｕｓ）、狂犬病ウイルス、ヒト血清バルボ様ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、麻疹ウイルス、アデノウイルス、ヒトＴ細胞白血球ウイルス、マウス白血病ウイルス、おたふくかぜウイルス、水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス、イボウイルス、ブルータングウイルス、センダイウイルス、ネコ白血病ウイルス、レオウイルス、ポリオウイルス、シミアンウイルス４０、マウス乳がんウイルス、デング熱ウイルス、風疹ウイルス、トキソプラズマ・ゴンディ、ランゲルトリパノソーマ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｒａｎｇｅｌｉ）、トリパノソーマ・クルージ、ローデシアトリパノソーマ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｒｈｏｄｅｓｉｅｎｓｅ）、トリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｂｒｕｃｅｉ）、マンソン住血吸虫（Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ ｍａｎｓｏｎｉ）、日本住血吸虫（Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ ｊａｐｏｎｉｃｕｍ）、バベシア・ボビス（Ｂａｂｅｓｉａ ｂｏｖｉｓ）、アイメリア・テネラ（Ｅｉｍｅｒｉａ ｔｅｎｅｌｌａ）、回旋糸状虫（Ｏｎｃｈｏｃｅｒｃａ ｖｏｌｖｕｌｕｓ）、熱帯リーシュマニア（Ｌｅｉｓｈｍａｎｉａ ｔｒｏｐｉｃａ）、旋毛虫（Ｔｒｉｃｈｉｎｅｌｌａ ｓｐｉｒａｌｉｓ）、タイレリア・パルバ（Ｔｈｅｉｌｅｒｉａ ｐａｒｖａ）、胞状条虫（Ｔａｅｎｉａ ｈｙｄａｔｉｇｅｎａ）、ヒツジ条虫（Ｔａｅｎｉａ ｏｖｉｓ）、無鉤条虫（Ｔａｅｎｉａ ｓａｇｉｎａｔａ）、単包条虫（Ｅｃｈｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｇｒａｎｕｌｏｓｕｓ）、メソセストイド・コルティ（Ｍｅｓｏｃｅｓ

ｔｏｉｄｅｓ　ｃｏｒｔｉ）、マイコプラズマ・アルスリチジス（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ　ａｒｔｈｒｉｔｉｄｉｓ）、Ｍ．ハイオリニス（Ｍ．ｈｙｏｒｈｉｎｉｓ）、Ｍ．オラーレ（Ｍ．ｏｒａｌｅ）、Ｍ．アルギニニ（Ｍ．ａｒｇｉｎｉｎｉ）、アコレプラズマ・レイドロウイ（Ａｃｈｏｌｅｐｌａｓｍａ　ｌａｉｄｌａｗｉｉ）、Ｍ．サリバリウム（Ｍ．ｓａｌｉｖａｒｉｕｍ）、及びＭ．ニューモニエ（Ｍ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）が挙げられる。

【００８４】

増幅

本明細書に提供されるものには、核酸を増幅するための方法が含まれる。一部の実施形態では、核酸は、好適な増幅プロセスを使用して増幅される。核酸増幅は、増幅されているヌクレオチド配列に相補的な配列を含む核酸アンプリコン（コピー）の酵素的合成を含む。増幅は、単一のベッセル、単一のチャンバー、及び／又は単一の容積（つまり、連続容積）において実施され得る。一部の実施形態では、増幅及び検出（例えば、本明細書に記載の検出法）は、単一のベッセル、単一のチャンバー、及び／又は単一の容積（つまり、連続容積）で実施される。

【００８５】

「増幅する」、「増幅」、「増幅反応」、又は「増幅すること」という用語は、標的核酸のコピーを増殖させるためのあらゆるｉｎ　ｖｉｔｒｏプロセスを指す。増幅は、標的核酸の「指数関数的」増加を指すこともある。「増幅すること」は、標的核酸の数の線形増加を指すこともできるが、１回限りの単一プライマー伸長ステップとは異なる。一部の実施形態では、前増幅としても知られている限定的増幅反応を実施することができる。前増幅とは、少数回のサイクル、例えば１０サイクルが実施されるため、限定的な量の増幅が生じる方法である。前増幅は、ある程度の増幅を可能にするが、指数関数期の前に増幅を停止させ、典型的には、所望のヌクレオチド配列の約５００コピーを産生させる。前増幅を使用すると、ある特定の増幅反応における反応物の枯渇に関連する不正確性を制限することでき、標的のヌクレオチド配列又は種存在量による増幅の偏りを低減させることもできる。一部の実施形態では、１回限りのプライマー伸長は、線形増幅又は指数関数的増幅の前段階として実施してもよい。

【００８６】

増幅プロセスの一般的説明を本明細書に提示する。例えば、プライマー（例えば、本明細書に記載のオリゴヌクレオチド）及び標的核酸を接触させると、相補的配列は互いにアニーリング又はハイブリダイズする。プライマーは、目的の配列又はその付近（例えば、隣接する、当接するなど）の標的核酸にアニーリングすることができる。標的にアニーリングしたプライマーは、プライマー－標的ハイブリッド、ハイブリダイズしたプライマー－標的、又はプライマー－標的二重鎖と呼ばれる場合がある。目的のヌクレオチド配列を参照する場合の「付近」又は「隣接」という用語は、プライマーの末端と標的の１つ又は複数のヌクレオチド（例えば、ヌクレオチド配列）との間の距離（例えば、塩基数）又は領域を指す。一般に、隣接とは、目的のヌクレオチド又はヌクレオチド配列から約１ヌクレオチド～約５０ヌクレオチドの範囲（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、又は５０ヌクレオチド）である。一部の実施形態では、１セットのプライマー（例えば、１対のプライマー、フォワードプライマー及びリバースプライマー、第１のオリゴヌクレオチド及び第２のオリゴヌクレオチド）は、目的のヌクレオチド又はヌクレオチド配列から約１～２０ヌクレオチド以内にアニーリングし、増幅産物を産生させる。一部の実施形態では、プライマーは、目的のヌクレオチド又はヌクレオチド配列内にアニーリングする。アニーリングした後、各プライマーは、ポリメラーゼにより標的（つまり、鋳型鎖）に沿って伸長され、相補鎖が生成される。例えば、検出可能な量の増幅産物が生成されるまで、プライマーアニーリング及び伸長の数回のサイクルを実施することができる。一部の実施形態では、標的核酸がＲＮＡである場合、標的ＲＮＡのＤＮＡコピー（ｃＤＮＡ）は、逆転写により、増幅ステップの前又は増幅ステップ中に合成される。

【００８７】
増幅反応の成分（例えば、１種又は複数種の増幅試薬）としては、例えば、１種又は複数種のプライマー（例えば、個々のプライマー、プライマー対、プライマーセット、オリゴヌクレオチド、及びマルチプレックス増幅のための複数種のプライマーセットなど）、核酸標的（例えば、試料に由来する標的核酸）、１種又は複数種のポリメラーゼ、ヌクレオチド（例えば、ｄＮＴＰなど）、及び好適な緩衝液（例えば、デタージェント、還元剤、一価イオン、及び二価イオンを含む緩衝液）を挙げることができる。増幅反応は、逆転写酵素、逆転写プライマー、及び１種又は複数種の検出剤の１種又は複数種をさらに含んでいてもよい。
核酸増幅は、天然ヌクレオチド、例えば、ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸（ｄＮＴＰ）及び／又は誘導体化ヌクレオチドの存在下で実施することができる。天然ヌクレオチドは、一般に、アデニル酸、グアニル酸、シチジル酸、チミジル酸、又はウリジル酸を指す。誘導体化ヌクレオチドは、一般に、天然ヌクレオチド以外のヌクレオチドである。リボヌクレオシド三リン酸は、ＮＴＰ又はｒＮＴＰと呼ばれ、Ｎは、Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｕであってもよい。デオキシヌクレオシド三リン酸基質はｄＮＴＰと呼ばれ、ＮはＡ、Ｇ、Ｃ、Ｔ、又はＵであってもよい。単量体ヌクレオチドサブユニットは、本明細書では、ＤＮＡ又はＲＮＡに特に言及することなく、Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｔ、又はＵとして表記される場合がある。一部の実施形態では、検出可能な標識（例えば、蛍光標識又は比色標識）を含む類似体などの、天然に存在しないヌクレオチド又はヌクレオチド類似体を使用することができる。例えば、核酸増幅は、標識ｄＮＴＰ、例えば、^{32}Ｐ、^{33}Ｐ、^{125}Ｉ、又は^{35}Ｓなどの放射性標識；アルカリホスファターゼなどの酵素標識；フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）などの蛍光標識；又はビオチン、アビジン、ジゴキシゲニン、抗原、ハプテン、若しくは蛍光色素などの他の標識の存在下で実施することができる。一部の実施形態では、核酸増幅は、修飾ｄＮＴＰ、例えば、熱活性化ｄＮＴＰ（例えば、ＴｒｉＬｉｎｋ社のＣｌｅａｎＡｍｐ（商標）ｄＮＴＰ）の存在下で実施してもよい。
【００８８】
１種又は複数種の増幅試薬は、非酵素成分及び酵素成分を含んでいてもよい。非酵素成分としては、例えば、プライマー、ヌクレオチド、緩衝液、塩、還元剤、デタージェント、及びイオンを挙げることができる。一部の実施形態では、非酵素成分は、タンパク質（例えば、核酸結合タンパク質）、酵素、又は酵素活性を有するタンパク質、例えば、ポリメラーゼ、逆転写酵素、ヘリカーゼ、トポイソメラーゼ、リガーゼ、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、ニッキング酵素、及びリコンビナーゼなどを含まない。一部の実施形態では、酵素成分は、ポリメラーゼからなるか、又はポリメラーゼ及び逆転写酵素からなる。したがって、そのような酵素成分は、他のタンパク質（例えば、核酸結合タンパク質及び／又は酵素活性を有するタンパク質）、例えば、ヘリカーゼ、トポイソメラーゼ、リガーゼ、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、ニッキング酵素、及びリコンビナーゼなどを除外することになる。
【００８９】
一部の実施形態では、増幅条件は、酵素活性（例えば、ポリメラーゼにより提供される酵素活性、又はポリメラーゼ及び逆転写酵素により提供される酵素活性）を含む。一部の実施形態では、酵素活性は、ポリメラーゼ及び／又は逆転写酵素以外の酵素、例えば、ヘリカーゼ、トポイソメラーゼ、リガーゼ、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、ニッキング酵素、及びリコンビナーゼなどにより提供される酵素活性を含まない。ポリメラーゼ活性及び逆転写酵素活性は、別々の酵素又は別々の酵素タイプ（例えば、ポリメラーゼ及び逆転写酵素）により提供してもよく、又は単一の酵素又は酵素タイプ（例えば、ポリメラーゼ）により提供してもよい。
核酸の増幅は、非熱サイクルタイプのＰＣＲを含んでいてもよい。一部の実施形態では、核酸の増幅は、等温増幅プロセス、例えば等温ポリメラーゼ連鎖反応（ｉＰＣＲ）を含む。等温増幅は、一般に、一定の温度で実施される増幅プロセスである。等温条件、等温的に、及び一定の温度などの用語は、一般に、増幅反応の過程において反応温度が本質的

に一定に保たれる反応条件を指す。等温増幅条件は、一般に、増幅プロセスに熱サイクル（つまり、上限温度と下限温度との間のサイクル）成分を含まない。等温条件下で増幅する場合、反応は、本質的に一定の温度に保つことができ、これは、温度が正確に１つの温度に維持されなくともよいことを意味する。例えば、等温増幅プロセスでは、環境又は装置ベース変数などのため、温度の小さな変動（例えば、±１～５℃など）が生じる場合がある。多くの場合、反応容積全体は本質的に一定の温度に保たれ、本明細書での等温反応には、一般に、反応ベッセル内で生成される温度勾配及び／又は対流に基づく温度サイクルに依存する増幅条件は含まれない。

【００９０】

本明細書での等温増幅反応は、本質的に一定の温度で実施することができる。一部の実施形態では、本明細書での等温増幅反応は、約５５℃の温度～約７５℃の温度、例えば、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、若しくは７５℃の温度若しくはこれらの値のおよその温度、又はこうした値のいずれか２つの間の数値又は範囲の温度で実施される。一部の実施形態では、温度要素（例えば、熱源）は、本質的に一定の温度、例えば、約７５℃若しくはそれを下まわる、約７０℃若しくはそれを下まわる、約６５℃若しくはそれを下まわる、又は約６０℃若しくはそれを下まわる、本質的に一定の温度に維持される。

【００９１】

本明細書での増幅プロセスは、例えば、検出可能な核酸増幅産物が生成されるまで、ある特定の期間にわたって実施することができる。核酸増幅産物は、あらゆる好適な検出プロセス及び／又は本明細書に記載の検出プロセスにより検出することができる。増幅プロセスは、約２０分間以内若しくはそれよりも短い時間で、又は約１０分間以内若しくはそれよりも短い時間で実施することができる。例えば、増幅プロセスは、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、若しくは２０分間以内に、又はこうした値のいずれか２つの間の数値若しくは範囲以内で実施することができる。

一部の実施形態では、核酸標的は、核酸を変性させる作用剤又は条件に曝露させずに増幅することができる。一部の実施形態では、核酸標的は、増幅ステップ（及び／又は他のステップ）中に鎖分離を促進する作用剤又は条件に曝露させずに増幅することができる。一部の実施形態では、増幅ステップ（及び／又は他のステップ）中に解巻を促進する作用剤又は条件に曝露させずに核酸標的を増幅することができる。核酸を変性させ、及び／又は鎖分離を促進し、及び／又は解巻を促進する作用剤又は条件としては、例えば、熱条件（例えば、高温）、ｐＨ条件（例えば、高ｐＨ又は低ｐＨ）、化学剤、及びタンパク質（例えば、酵素剤）などを挙げることができる。

【００９２】

一部の実施形態では、本明細書で開示の方法は、熱変性（例えば、核酸を含む溶液を、例えば７５℃、８０℃、９０℃、又は９５℃、又はそれよりも高い温度などの高温に加熱すること）も、タンパク質に基づく（例えば、酵素的な）核酸の変性も含まない。タンパク質に基づく（例えば、酵素的な）変性は、核酸を、ヘリカーゼ、トポイソメラーゼ、リガーゼ、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、ニッキング酵素、リコンビナーゼ、ＲＮＡレプリカーゼ、及び核酸結合タンパク質（例えば、一本鎖結合タンパク質）の１種又は複数種と接触させることを含んでいてもよい。一部の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、ヘリカーゼ、トポイソメラーゼ、リガーゼ、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、ニッキング酵素、リコンビナーゼ、ＲＮＡレプリカーゼ、及び／又は核酸結合タンパク質（例えば、一本鎖結合タンパク質）を含まない。一部の実施形態では、本明細書で提供される組成物及び方法は、挿入剤、アルキル化剤、及び／又はホルムアミド、グリセロール、尿素、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、若しくはＮ，Ｎ，Ｎ－トリメチルグリシン（ベタイン）などの化学薬品を含まない。一部の実施形態では、本開示の方法は、核酸を変性作用剤（例えば、ホルムアミド）と接触させることを含まない。一部の実施形態では、増幅ステップは、核酸を変性させる（例えば、

鎖分離を促進し、及び／又は解巻を促進する）作用剤及び／又は条件を含まない。一部の実施形態では、増幅ステップ（例えば、ステップ（ｃ））は、ポリメラーゼ（例えば、超好熱菌ポリメラーゼ）以外の、核酸を変性させる（例えば、鎖分離を促進する、及び／又は解巻を促進する）作用剤及び／又は条件を含まない。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法及び組成物は、ポリメラーゼ（例えば、超好熱菌ポリメラーゼ）及び／又は低ｐＨ条件（例えば、酸との接触）以外に、核酸を変性させる（例えば、鎖分離を促進する、及び／又は解巻を促進する）作用剤及び／又は条件を含まない。

【００９３】

核酸標的は、鎖分離及び／又は解巻を促進する作用剤又は条件、例えば、ヘリカーゼ、トポイソメラーゼ、リガーゼ、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、ニッキング酵素、リコンビナーゼ、ＲＮＡレプリカーゼ、核酸結合タンパク質（例えば、一本鎖結合タンパク質）、又はそれらのあらゆる組合せに曝露させずに増幅することができる。例えば、核酸標的は、ＤＮＡヘリカーゼ及びＲＮＡヘリカーゼを含むがこれらに限定されないヘリカーゼに曝露させずに増幅することができる。ヘリカーゼの使用を含まない増幅条件は、無ヘリカーゼ増幅条件である。

【００９４】

核酸標的は、Ｃｒｅリコンビナーゼ、Ｈｉｎリコンビナーゼ、Ｔｒｅリコンビナーゼ、ＦＬＰリコンビナーゼ、ＲｅｃＡ、ＲＡＤ５１、ＲａｄＡ、Ｔ４　ｕｖｓＸを含むがこれらに限定されないリコンビナーゼに曝露させずに増幅することができる。一部の実施形態では、核酸標的は、リコンビナーゼアクセサリータンパク質、例えば、リコンビナーゼ負荷因子（ｒｅｃｏｍｂｉｎａｓｅ　ｌｏａｄｉｎｇ　ｆａｃｔｏｒ）（例えば、Ｔ４　ｕｖｓＹ）に曝露させずに増幅される。核酸標的は、核酸結合タンパク質（例えば、一本鎖結合タンパク質又は一本鎖ＤＮＡ結合タンパク質（ＳＳＢ））、例えばＴ４　ｇｐ３２に曝露させずに増幅することができる。一部の実施形態では、核酸標的は、トポイソメラーゼに曝露させずに増幅される。核酸標的は、核酸を不安定化する作用剤又は条件に曝露させて又は曝露させずに増幅することができる。本明細書で使用される場合、「不安定化」という用語には、その通常の意味が与えられるものとし、また、傾斜、回転、捻れ、スリップ、及びフリップ効果の１種又は複数種による、核酸分子の全体的な組織性及び幾何学的配向性（例えば、二重らせん構造）の破壊を指すものとする（例えば、Lenglet et al., (2010) Journal of Nucleic Acids Volume 2010, Article ID 290935, 17 pagesの記載の通り）。不安定化は、一般に、核酸鎖の融解又は分離（例えば、変性）を指すものではない。核酸不安定化は、例えば、挿入剤若しくはアルキル化剤などの作用剤、及び／又はホルムアミド、尿素、ＤＭＳＯ、若しくはベタインなどの化学薬品に曝露させることにより達成することができる。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法は、１種又は複数種の不安定化剤の使用を含む。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法は、不安定化剤の使用を除外する。一部の実施形態では、核酸標的は、リガーゼ及び／又はＲＮＡレプリカーゼに曝露させずに増幅される。

【００９５】

一部の実施形態では、核酸標的は、切断又は消化せずに増幅することができる。例えば、核酸標的は、１種又は複数種の切断剤に事前に曝露させずに増幅することができ、インタクト核酸が増幅される。一部の実施形態では、核酸標的は、増幅中に１種又は複数種の切断剤に曝露させずに増幅される。一部の実施形態では、核酸標的は、増幅後に１種又は複数種の切断剤に曝露させずに増幅される。切断剤の使用を含まない増幅条件は、本明細書では、無切断剤増幅条件と呼ばれる場合がある。「切断剤」という用語は、一般に、１種又は複数種の特異的又は非特異的部位で核酸を切断することができる作用剤、場合によっては化学薬品又は酵素を指す。特異的切断剤は、多くの場合、特定のヌクレオチド配列に従って特定の部位を特異的に切断する。切断剤としては、エンドヌクレアーゼ（例えば、制限酵素及びニッキング酵素など）；エキソヌクレアーゼ（ＤＮＡｓｅ、ＲＮＡｓｅ（例えば、ＲＮＡｓｅＨ）、５’－３’エキソヌクレアーゼ（例えば、エキソヌクレアーゼＩＩ）、３’－５’エキソヌクレアーゼ（例えば、エキソヌクレアーゼＩ）、及びポリ（Ａ）

特異的３’－５’エキソヌクレアーゼ）；並びに化学的切断剤を挙げることができる。

【００９６】

核酸標的は、制限酵素及び／又はニッキング酵素を使用せずに増幅することができる。一部の実施形態では、核酸は、制限酵素及び／又はニッキング酵素に事前に曝露させずに増幅される。一部の実施形態では、核酸は、増幅中に制限酵素及び／又はニッキング酵素に曝露させずに増幅される。一部の実施形態では、核酸は、増幅後に制限酵素及び／又はニッキング酵素に曝露させずに増幅される。核酸標的は、エキソヌクレアーゼ処理をせずに増幅することができる。エキソヌクレアーゼとしては、例えば、ＤＮＡｓｅ、ＲＮＡｓｅ（例えば、ＲＮＡｓｅＨ）、５’－３’エキソヌクレアーゼ（例えば、エキソヌクレアーゼＩＩ）、３’－５’エキソヌクレアーゼ（例えば、エキソヌクレアーゼＩ）、及びポリ（Ａ）特異的３’－５’エキソヌクレアーゼが挙げられる。一部の実施形態では、核酸は、増幅前、増幅中、及び／又は増幅後にエキソヌクレアーゼ処理をせずに増幅される。エキソヌクレアーゼの使用を含まない増幅条件は、無エキソヌクレアーゼ増幅条件である。一部の実施形態では、核酸は、ＤＮＡｓｅ処理及び／又はＲＮＡｓｅ処理をせずに増幅される。

【００９７】

増幅された核酸は、本明細書では、核酸増幅産物又はアンプリコンと呼ばれる場合がある。一部の実施形態では、増幅産物は、天然に存在するヌクレオチド、天然に存在しないヌクレオチド、及びヌクレオチド類似体など、並びに前述のものの組合せを含む。増幅産物は、典型的には、試料核酸の配列（例えば、標的配列）又はその相補体と同一又は実質的に同一であるヌクレオチド配列を有する。増幅産物中の「実質的に同一の」ヌクレオチド配列は、一般に、増幅されているヌクレオチド配列又はその相補体に対して高度の配列同一性（例えば、約７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は９９％よりも高い配列同一性）を有することになり、変動は、ポリメラーゼフィデリティー不良又は他の変数の結果であることがある。

【００９８】

一部の実施形態では、核酸増幅産物は、試料核酸中の標的配列と連続的に相補的であるか又は実質的に同一であるポリヌクレオチドを含む。連続的に相補的とは、一般に、例えば、各塩基が順番に（例えば、５’から３’へと読んで）第２の鎖の対応する順番の塩基と対合する第１の鎖のヌクレオチド配列を指し、連続的に相補的であるとみなされる配列内には、ギャップも、追加の配列も、非対合塩基も存在しない。別の言い方をすれば、連続的に相補的とは、一般に、第１の鎖のヌクレオチド配列のすべての連続塩基が、第２の鎖のヌクレオチド配列の対応する連続塩基と相補的であることを指す。例えば、配列５’－ＡＴＧＣＡＴＧＣＡＴＧＣ－３’（配列番号３）を有する第１の鎖は、配列５’－ＧＣＡＴＧＣＡＴＧＣＡＴ－３’（配列番号４）を有する第２の鎖と連続的に相補的であるとみなされることになり、第１の鎖のすべての連続塩基は、第２の鎖の対応するすべての連続塩基と相補的である。しかしながら、配列５’－ＡＴＧＣＡＴＡＡＡＡＡＡＧＣＡＴＧＣ－３’（配列番号５）を有する第１の鎖は、配列５’－ＧＣＡＴＧＣＡＴＧＣＡＴ－３’（配列番号４）を有する第２の鎖と連続的に相補的であるとはみなされないだろう。なぜならば、第１の鎖の中央にある６つのアデニン（６つのＡ）の配列は、第２の鎖の塩基と対合しないことになるからである。連続的に相補的な配列は、場合によっては、約５～約２５連続塩基長、例えば、約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、又はこうした値のいずれか２つの間の範囲の連続塩基長である。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、試料核酸中の標的配列と連続的に相補的であるか又は実質的に同一であるポリヌクレオチドからなる。したがって、一部の実施形態では、核酸増幅産物は、標的配列と連続的に相補的でないか若しくは実質的に同一ではないあらゆる追加の配列（例えば、５’末端及び／若しくは３’末端に、又は産物内に）、例えばテイルプライマー若しくはライゲーションにより

増幅産物に組み込まれた追加の配列、及び／又は切断剤認識部位（例えば、ニッキング酵素認識部位）を提供する追加の配列を含まない。一般に、標的配列がタンデムリピートを含まない限り、増幅産物はタンデムリピートの形態の産物を含まない。

【００９９】

核酸増幅産物は、増幅反応において使用される１種又は複数種のプライマーに相補的であるか又はそれと実質的に同一である配列を含むことができる。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、第１のプライマー配列に連続的に相補的であるか又はそれと同一である第１のヌクレオチド配列、及び第２のプライマー配列に連続的に相補的であるか又はそれと同一である第２のヌクレオチド配列を含む。

核酸増幅産物は、スペーサー配列を含むことができる。本明細書に記載されている通り、増幅産物中のスペーサー配列は、試料核酸中の標的配列の一部と連続的に相補的であるか又はそれと実質的に同一である配列（１個又は複数個の塩基）であり、増幅反応において使用される１種又は複数種のプライマーに相補的であるか又はそれと実質的に同一である増幅産物中の配列によってフランキングされる。増幅産物中の配列によりフランキングされたスペーサー配列は、一般に、第１の配列（第１のプライマーと相補的な又は実質的に同一な）と第２の配列（第２のプライマーと相補的な又は実質的に同一な）との間に位置する。したがって、増幅産物は、典型的には、第１の配列、続いてスペーサー配列、続いて第２の配列を含む。スペーサー配列は、一般に、プライマーの配列と相補的でもなく、実質的に同一でもない。スペーサー配列は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０塩基を含む、約１～１０塩基であってもよく又は含んでいてもよい。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、第１のプライマー配列と連続的に相補的であるか又は同一である第１のヌクレオチド配列、第２のプライマー配列と連続的に相補的であるか又は同一である第２のヌクレオチド配列、及びスペーサー配列からなるか又はから本質的になる。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、第１のプライマー配列及び第２のプライマー配列と連続的に相補的でも同一でもないあらゆる追加の配列を含まず（例えば、５’末端及び／若しくは３’末端に、又は産物内に）、スペーサー配列、例えば、テイル又はループプライマー、ライゲーション、又は他の機序により増幅産物に組み込まれた追加の配列の一部ではない。一部の実施形態では、核酸増幅産物は、一般に、第１のプライマー配列及び第２のプライマー配列と連続的に相補的でも同一でもない追加の配列を含まず（例えば、５’末端及び／若しくは３’末端に、又は産物内に）、スペーサー配列、例えば、テイル又はループプライマー、ライゲーション、又は他の機序により増幅産物に組み込まれた追加の配列の一部ではない。しかしながら、そのような実施形態では、核酸増幅産物は、例えば、増幅プロセスにおけるエラー又は乱雑性により産物に導入された幾つかのミスマッチ（つまり、非相補的な）塩基又はもう１つの余分な塩基を含んでいてもよい（例えば、５’末端及び／若しくは３’末端に、又は産物内に）。

【０１００】

核酸増幅産物は、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、又はこうした値のいずれか２つの間の数値若しくは範囲の塩基長を含む、最大で５０塩基長であってもよい。一部の実施形態では、所与の標的配列の核酸増幅産物は、同じ長さ又は実質的に同じ長さを有する（例えば、１～１０塩基以内）。したがって、所与の標的配列の核酸増幅産物は、単一のシグナル（例えば、電気泳動ゲルのバンド）を生成することができ、一般に、複数の長さを示す複数のシグナル（例えば、電気泳動ゲルのラダー又はスメア）を生成しない。マルチプレックス反応では、異なる標的配列の核酸増幅産物は異なる長さを有してもよい。

【０１０１】

本明細書に記載の方法及び成分は、一般に、１種よりも多くの目的の核酸の増幅（例えば、１種よりも多くの標的配列の増幅）を指すマルチプレックス増幅のために使用することができる。例えば、マルチプレックス増幅は、同じ試料から複数種の配列を増幅すること、又は試料中の幾つかの配列の１種を増幅することを指すことができる。マルチプレックス増幅は、複数の試料に存在する１種又は複数種の配列を同時に又は段階的に増幅する

ことを指すこともできる。例えば、マルチプレックス増幅は、増幅可能な少なくとも２種の標的配列を増幅するために使用することができる（例えば、増幅反応は、少なくとも２種の標的配列を増幅するために適切なプライマー及び酵素を含む）。一部の実施形態では、増幅反応は、少なくとも２種の標的配列を検出するように準備されるが、試験されている試料には標的配列の１種のみが存在し、そのため両方の配列が増幅可能であるが、１種の配列のみが増幅される。一部の実施形態では、２種の標的配列が存在する場合、増幅反応は、両方の標的配列の増幅をもたらす。適切なプライマー及び酵素を含むマルチプレックス増幅反応は、標的配列の１種、一部、又はすべての増幅をもたらすことができる。一部の実施形態では、増幅反応は、１対のプライマーを用いて２種の配列を検出するように準備され、一方の配列は標的配列であり、一方の配列は対照配列（例えば、標的配列と同じプライマーにより増幅可能であり、標的とは異なるスペーサー塩基又は配列を有する合成配列）である。一部の実施形態では、増幅反応は、対応するプライマー対を用いて複数セットの配列を検出するように準備されており、各セットは標的配列及び対照配列を含む。

【０１０２】

プライマー

核酸増幅は、一般に、１種又は複数種のプライマーの存在下で実施される。プライマーは、一般に、特定の目的の領域（つまり、標的配列）で又はその付近で（例えば、隣接して）標的核酸にハイブリダイズ又はアニーリングすることが可能なヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドであると特徴付けられる。プライマーは、例えば、標的核酸のヌクレオチド配列の特異的決定、又は標的核酸若しくはその特徴の検出（例えば、配列の存在又は非存在）を可能にすることができる。プライマーは天然に存在してもよく又は合成であってもよい。特異的又は特異性という用語は、一般に、標的ポリヌクレオチドに対するプライマーなど、１つの分子と別の分子との結合又はハイブリダイゼーションを指す。つまり、特異的又は特異性という用語は、そうした２つの分子のいずれかと他の分子との実質的により低い認識、接触、又は複合体形成と比較した、２つの分子間の安定複合体の認識、接触、及び形成を指す。アニーリング又はハイブリダイズという用語は、一般に、２つの分子間の安定複合体形成を指す。プライマー、オリゴ、又はオリゴヌクレオチドという用語は、プライマーを参照する場合、本明細書では同義的に使用することができる。

【０１０３】

プライマーは、好適なプロセスを使用して設計及び合成することができ、標的配列にハイブリダイズし、本明細書に記載の増幅プロセスを実施するのに好適なあらゆる長さのものであってもよい。プライマーは、多くの場合、標的核酸の配列に応じて設計される。一部の実施形態では、プライマーは、約５～約３０塩基長、例えば、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、又は３０塩基長であってもよい。プライマーは、天然に存在するヌクレオチド及び／若しくは天然に存在しないヌクレオチド（例えば、修飾ヌクレオチド、標識ヌクレオチド）又はそれらの混合物で構成されていてもよい。修飾及び修飾塩基としては、例えば、リン酸化（例えば、３’リン酸化、５’リン酸化）；付着化学又はリンカー修飾（例えば、Ａｃｒｙｄｉｔｅ（商標）、アデニル化、アジド（ＮＨＳエステル）、ジゴキシゲニン（ＮＨＳエステル）、コレステリル－ＴＥＧ、Ｉ－Ｌｉｎｋｅｒ（商標）、アミノ修飾因子（例えば、アミノ修飾因子Ｃ６、アミノ修飾因子Ｃ１２、アミノ修飾因子Ｃ６ｄＴ、Ｕｎｉ－Ｌｉｎｋ（商標）アミノ修飾因子）、アルキン（例えば、５’ヘキシニル、５－オクタジイニルｄＵ）、ビオチン化（例えば、ビオチン、ビオチン（アジド）、ビオチンｄＴ、ビオチン－ＴＥＧ、デュアルビオチン、ＰＣビオチン、デスチオビオチン－ＴＥＧ）、チオール修飾（例えば、チオール修飾因子Ｃ３Ｓ－Ｓ、ジチオール、チオール修飾因子Ｃ６Ｓ－Ｓ））；フルオロフォア（例えば、Ｆｒｅｅｄｏｍ（商標）色素、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）色素、ＬＩ－ＣＯＲ　ＩＲＤｙｅｓ（登録商標）、ＡＴＴＯ（商標）色素、ローダミン色素、ＷｅｌｌＲＥＤ色素、６－ＦＡＭ（アジド）、Ｔｅｘａｓ　Ｒｅｄ（登録商標）－Ｘ（ＮＨＳエステル）、Ｌｉｇ

ｈｔｃｙｃｌｅｒ（登録商標）６４０（ＮＨＳエステル）、Ｄｙ７５０（ＮＨＳエステル））；Ｉｏｗａ　Ｂｌａｃｋ（登録商標）ダーククエンチャー修飾（例えば、Ｉｏｗａ　Ｂｌａｃｋ（登録商標）ＦＱ、Ｉｏｗａ　Ｂｌａｃｋ（登録商標）ＲＱ）；ダーククエンチャー修飾（例えば、Ｂｌａｃｋ　Ｈｏｌｅ　Ｑｕｅｎｃｈｅｒ（登録商標）－１、Ｂｌａｃｋ　Ｈｏｌｅ　Ｑｕｅｎｃｈｅｒ（登録商標）－２、Ｄａｂｃｙｌ）；スペーサー（Ｃ３スペーサー、ＰＣスペーサー、ヘキサンジオール、スペーサー９、スペーサー１８、１’，２’－ジデオキシリボース（ｄＳｐａｃｅｒ）；修飾塩基（例えば、２－アミノプリン、２，６－ジアミノプリン（２－アミノ－ｄＡ）、５－ブロモｄＵ、デオキシウリジン、逆位ｄＴ、逆位ジデオキシ－Ｔ、ジデオキシ－Ｃ、５－メチルｄＣ、デオキシイノシン、ＳｕｐｅｒＴ（登録商標）、ＳｕｐｅｒＧ（登録商標）、ロックド核酸（ＬＮＡ）、５－ニトロインドール、２’－Ｏ－メチルＲＮＡ塩基、ヒドロキシメチルｄＣ、ＵＮＡアンロックド核酸（例えば、ＵＮＡ－Ａ、ＵＮＡ－Ｕ、ＵＮＡ－Ｃ、ＵＮＡ－Ｇ）、Ｉｓｏ－ｄＣ、Ｉｓｏ－ｄＧ、フルオロＣ、フルオロＵ、フルオロＡ、フルオロＧ）；ホスホロチオエート結合修飾（例えば、ホスホロチオエート化ＤＮＡ塩基、ホスホロチオエート化ＲＮＡ塩基、ホスホロチオエート化２’Ｏ－メチル塩基、ホスホロチオエート化ＬＮＡ塩基）；及びクリック化学修飾を挙げることができる。一部の実施形態では、修飾及び修飾塩基は、ウラシル塩基、リボヌクレオチド塩基、Ｏ－メチルＲＮＡ塩基、ホスホロチオエート連結、３’リン酸基、スペーサー塩基（Ｃ３スペーサー又は他のスペーサー塩基など）を含む。例えば、プライマーは、１つ又は複数のＯ－メチルＲＮＡ塩基（例えば、２’－Ｏ－メチルＲＮＡ塩基）を含んでいてもよい。２’－Ｏ－メチルＲＮＡは、一般に、ｔＲＮＡ及び他の低分子ＲＮＡに見出されるＲＮＡの転写後修飾である。２’－Ｏ－メチルＲＮＡ塩基を含むプライマーを直接合成することができる。この修飾は、例えば、ＲＮＡ：ＲＮＡ二重鎖のＴｍを増加させ、一本鎖リボヌクレアーゼ及びＤＮａｓｅの存在下での安定性を提供することができる。２’－Ｏ－メチルＲＮＡ塩基をプライマーに含めて、例えば、安定性及び標的配列との結合親和性を増加させることができる。一部の実施形態では、プライマーは、１つ又は複数のホスホロチオエート連結（例えば、ホスホロチオエート結合修飾）を含んでいてもよい。ホスホロチオエート（ＰＳ）結合は、プライマーのリン酸骨格の非架橋酸素を硫黄原子に置換する。この修飾は、典型的には、ヌクレオチド間結合をヌクレアーゼ分解に対して耐性にする。ホスホロチオエート結合を、プライマーの５’末端又は３’末端の最後の約３～５ヌクレオチドの間に導入して、例えば、エキソヌクレアーゼ分解を阻害することができる。一部の実施形態では、プライマー全体にわたって含まれるホスホロチオエート結合は、エンドヌクレアーゼによる攻撃の低減を支援することができる。プライマーは、例えば、３’リン酸基を含んでいてもよい。３’リン酸化は、ある特定の３’－エキソヌクレアーゼによる分解を阻害することができ、ある特定の場合では、ＤＮＡポリメラーゼによる伸長を阻止するために使用することができる。一部の実施形態では、プライマーは、１つ又は複数のスペーサー塩基（例えば、１つ又は複数のＣ３スペーサー）を含む。Ｃ３スペーサーホスホラミダイトを、プライマーの内部又は５’末端に組み込むことができる。複数のＣ３スペーサーをプライマーのいずれかの末端に付加して、例えば、フルオロフォア又は他のペンダント基を付着させための長鎖親水性スペーサーアームを導入することができる。

【０１０４】

プライマーは、ＤＮＡ塩基、ＲＮＡ塩基、又はその両方を含んでいてもよく、ＤＮＡ塩基及びＲＮＡ塩基の１つ又は複数は、修飾されているか又は修飾されていない。例えば、プライマーは、ＤＮＡ塩基及びＲＮＡ塩基の混合物であってもよい。プライマーは、ＤＮＡ塩基（例えば、修飾ＤＮＡ塩基及び／又は未修飾ＤＮＡ塩基）からなっていてもよい。一部の実施形態では、プライマーは未修飾ＤＮＡ塩基からなる。一部の実施形態では、プライマーは修飾ＤＮＡ塩基からなる。プライマーは、ＲＮＡ塩基（例えば、修飾ＲＮＡ塩基及び／又は未修飾ＲＮＡ塩基）からなっていてもよい。一部の実施形態では、プライマーは未修飾ＲＮＡ塩基からなる。一部の実施形態では、プライマーは修飾ＲＮＡ塩基からなる。一部の実施形態では、プライマーはＲＮＡ塩基を含まない。一部の実施形態では、

プライマーはＤＮＡ塩基を含まない。一部の実施形態では、プライマーは、切断剤認識部位を含まない（例えば、ニッキング酵素認識部位を含まない）。一部の実施形態では、プライマーはテイルを含まない（例えば、ニッキング酵素認識部位を含むテイルを含まない）。

【０１０５】

一部の実施形態では、プライマー配列の全部又は一部は、標的核酸と相補的であってもよく又は実質的に相補的であってもよい。配列に関連して実質的に相補的であるとは、一般に、互いにハイブリダイズすることになるヌクレオチド配列を指す。ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを変更して、様々な量の配列ミスマッチを許容することができる。標的配列及びプライマー配列は、例えば、互いに７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％相補的であることを含む、互いに少なくとも７５％相補的であってもよい。標的核酸配列と実質的に相補的であるプライマーは、典型的には、標的核酸配列の相補体（つまり、標的核酸のアンチセンス鎖の配列）とも実質的に同一である。プライマー及び標的核酸のアンチセンス鎖は、配列が少なくとも７５％同一であってもよく、例えば、互いに７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％同一であってもよい。

【０１０６】

一部の実施形態ではプライマーは、１対のプライマーを含む。１対のプライマーは、フォワードプライマー及びリバースプライマー（例えば、標的核酸のセンス鎖及びアンチセンス鎖に結合するプライマー）を含んでいてもよい。一部の実施形態では、プライマーは、１対のプライマー（つまり、フォワードプライマー及びリバースプライマー）からなる。したがって、一部の実施形態では、標的配列の増幅は、１対のプライマーを使用して実施され、標的配列の増幅には追加のプライマー又はオリゴヌクレオチドは含まれていない（例えば、増幅反応成分は、所与の標的配列に対する追加のプライマー対、ネステッドプライマー、バンパープライマー（ｂｕｍｐｅｒ　ｐｒｉｍｅｒ）、プライマー以外のオリゴヌクレオチド、及びプローブなどを含まない）。一部の実施形態では、プライマーは、１対のプライマーからなる。一部の実施形態では、増幅反応は、マルチプレックス増幅などにおいて、異なる標的配列を増幅するための追加のプライマー対を含んでいてもよい。一部の実施形態では、プライマーは１対のプライマーからなるが、一部の実施形態では、増幅反応は、増幅の一部とはみなされない検出プロセスのための追加のプライマー、オリゴヌクレオチド、又はプローブを含んでいてもよい。一部の実施形態では、プライマーはセットで使用される。増幅プライマーセットは、所与の標的配列に対する１対のフォワードプライマー及びリバースプライマーを含んでいてもよい。マルチプレックス増幅の場合、第１の標的配列を増幅するプライマーはプライマーセットであるとみなされ、第２の標的配列を増幅するプライマーは異なるプライマーセットであるとみなされる。

【０１０７】

増幅反応成分は、試料核酸の第１の鎖（例えば、センス鎖、フォワード鎖）の標的配列に相補的な第１のプライマー（第１のオリゴヌクレオチド）、及び試料核酸の第２の鎖（例えば、アンチセンス鎖、リバース鎖）の標的配列に相補的である第２のプライマー（第２のオリゴヌクレオチド）を含むか又はからなっていてもよい。一部の実施形態では、第１のプライマー（第１のオリゴヌクレオチド）は、試料核酸の第１の鎖の標的配列と連続的に相補的な第１のポリヌクレオチドを含み、第２のプライマー（第２のオリゴヌクレオチド）は、試料核酸の第２の鎖の標的配列と連続的に相補的な第２のポリヌクレオチドを含む。プライマー－標的に関して連続的に相補的であるとは、一般に、各塩基が標的配列内の対応する順番の塩基と順番に対合し、連続的に相補的であるとみなされる配列内にはギャップも、追加の配列も、非対合塩基も存在しない、プライマーのヌクレオチド配列を

指す。一部の実施形態では、プライマーは、標的配列と連続的に相補的でないあらゆる追加の配列（例えば、５’末端及び／若しくは３’末端に、又はプライマー内に）、例えば、テイルプライマー若しくはループプライマーに存在する追加の配列、及び／又は切断剤認識部位（例えば、ニッキング酵素認識部位）を提供する追加の配列を含まない。一部の実施形態では、増幅反応成分は、追加の配列（つまり、標的配列と連続的に相補的である配列以外の配列）を含むプライマー、例えば、テイルプライマー、ループプライマー、ステップループ構造（ｓｔｅｐ－ｌｏｏｐ　ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ）、ヘアピン構造を形成することが可能なプライマー、及び／又は切断剤認識部位（例えば、ニッキング酵素認識部位）を提供する追加の配列などを含まない。

【０１０８】

一部の実施形態では、プライマーは、１つ又は複数のイノシン、脱塩基部位、ロックド核酸、副溝結合剤、二重鎖安定剤（例えば、アクリジン、スペルミジン）、Ｔｍ修飾因子、又はプライマーの結合特性を変化させるあらゆる修飾因子などの修飾を含んでいてもよい。一部の実施形態では、プライマーは、検出可能な分子又は実体（例えば、フルオロフォア、放射性同位元素、比色試薬、粒子、及び酵素など）を含んでいてもよい。

【０１０９】

ポリメラーゼ

一部の実施形態では、増幅反応成分（例えば、１種又は複数種の増幅試薬）は、１種又は複数種のポリメラーゼを含む。ポリメラーゼは、核酸標的配列（例えば、プライマーがアニーリングするもの）に対するプライマー分子、例えば本明細書に記載の増幅プライマーの３’ヒドロキシル末端を伸長するヌクレオチドの特異的組込みを触媒することが可能なタンパク質である。ポリメラーゼの非限定的な例としては、高温反応温度（例えば、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は１００℃を上まわる）で活性を示すことができる好熱性又は超好熱性ポリメラーゼが挙げられる。超好熱性ポリメラーゼは、超好熱菌ポリメラーゼと呼ばれる場合がある。ポリメラーゼは、鎖置換能力を有していてもよく又は有していなくてもよい。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、単一の合成で約１～約５０ヌクレオチド、例えば、約１、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、若しくは５０ヌクレオチド、又は単一の合成でこうした値のいずれか２つの間の数値若しくは範囲のヌクレオチドを組み込むことができる。

【０１１０】

増幅反応成分は、以下のものから選択される１種又は複数種のＤＮＡポリメラーゼを含んでいてもよい：９°Ｎ　ＤＮＡポリメラーゼ；９°Ｎｍ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ；Ｔｈｅｒｍｉｎａｔｏｒ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ；Ｔｈｅｒｍｉｎａｔｏｒ（商標）ＩＩ　ＤＮＡポリメラーゼ；Ｔｈｅｒｍｉｎａｔｏｒ（商標）ＩＩＩ　ＤＮＡポリメラーゼ；Ｔｈｅｒｍｉｎａｔｏｒ（商標）γ　ＤＮＡポリメラーゼ；Ｂｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ；Ｂｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ（大型断片）；Ｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼ、ＤＮＡポリメラーゼＩ（大腸菌）、ＤＮＡポリメラーゼＩ、大型（クレノウ）断片；クレノウ断片（３’－５’ｅｘｏ－）；Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼ；Ｔ７　ＤＮＡポリメラーゼ；Ｄｅｅｐ　ＶｅｎｔＲ（商標）（ｅｘｏ－）ＤＮＡポリメラーゼ；Ｄｅｅｐ　ＶｅｎｔＲ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ；ＤｙＮＡｚｙｍｅ（商標）ＥＸＴ　ＤＮＡ；ＤｙＮＡｚｙｍｅ（商標）ＩＩ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＤＮＡポリメラーゼ；Ｐｈｕｓｉｏｎ（商標）高フィデリティーＤＮＡポリメラーゼ；ＶｅｎｔＲ（登録商標）ＤＮＡポリメラーゼ；ＶｅｎｔＲ（登録商標）（ｅｘｏ－）ＤＮＡポリメラーゼ；ＲｅｐｌｉＰＨＩ（商標）Ｐｈｉ２９　ＤＮＡポリメラーゼ；ｒＢｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ、大型断片（ＩｓｏＴｈｅｒｍ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ）；ＭａｓｔｅｒＡｍｐ（商標）ＡｍｐｌｉＴｈｅｒｍ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ；Ｔａｇ　ＤＮＡポリメラーゼ；Ｔｔｈ　ＤＮＡポリメラーゼ；Ｔｆｌ　ＤＮＡポリメラーゼ；Ｔｇｏ　ＤＮＡポリメラーゼ；ＳＰ６　ＤＮＡポリメラーゼ；Ｔｂｒ　ＤＮＡポリメラーゼ；ＤＮＡポリメラーゼベータ；及びＴｈｅｒｍｏＰｈｉ　ＤＮＡポリメラーゼ。

【０１１１】

一部の実施形態では、増幅反応成分は、１種又は複数種の超好熱菌ＤＮＡポリメラーゼ（例えば、高温で熱安定性である超好熱菌ＤＮＡポリメラーゼ）を含む。超好熱菌ＤＮＡポリメラーゼの半減期は、９５℃では約５～１０時間であってもよく、１００℃で約１～３時間であってもよい。例えば、増幅反応成分は、古細菌由来の１種又は複数種の超好熱菌ＤＮＡポリメラーゼ（例えば、サーモコッカス（Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃｕｓ）由来の超好熱菌ＤＮＡポリメラーゼ、又はサーモコッカセアエン・アルカエアン（Ｔｈｅｒｍｏｃｏｃｃａｃｅａｅｎ　ａｒｃｈａｅａｎ）由来の超好熱菌ＤＮＡポリメラーゼ）を含んでいてもよい。一部の実施形態では、増幅反応成分は、パイロコッカス属（Ｐｙｒｏｃｏｃｃｕｓ）、メタノコッカス科（Ｍｅｔｈａｎｏｃｏｃｃａｃｅａｅ）、メタノコッカス属（Ｍｅｔｈａｎｏｃｏｃｃｕｓ）、又はサーマス属（Ｔｈｅｒｍｕｓ）由来の１種又は複数種の超好熱菌ＤＮＡポリメラーゼを含む。一部の実施形態では、増幅反応成分は、サーマス・サーモフィルス（Ｔｈｅｒｍｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｅｓ）由来の１種又は複数種の超好熱菌ＤＮＡポリメラーゼを含む。

【０１１２】

一部の実施形態では、増幅反応成分は、超好熱菌ＤＮＡポリメラーゼ又はその機能的断片を含む。機能的断片は、一般に、全長ポリメラーゼの１つ又は複数の機能、例えば、ＤＮＡを重合する能力（例えば、増幅反応における）を保持する。一部の場合では、機能的断片は、機能（例えば、増幅反応におけるＤＮＡの重合）を、全長ポリメラーゼの機能レベルの少なくとも約５０％、少なくとも約７５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％のレベルで実施する。ポリメラーゼ活性のレベルは、例えば、本明細書に記載されている検出可能な核酸増幅方法などの検出可能な核酸増幅方法を使用して評価され得る。一部の実施形態では、増幅反応成分は、配列番号１若しくは配列番号２のアミノ酸配列、又は配列番号１若しくは配列番号２の機能的断片を含む超好熱菌ＤＮＡポリメラーゼを含む。

一部の実施形態では、増幅反応成分（例えば、１種又は複数種の増幅試薬）は、超好熱菌ポリメラーゼ又はその機能的断片と少なくとも約９０％同一であるアミノ酸配列を含むポリメラーゼを含む。一部の実施形態では、増幅反応成分は、配列番号１若しくは配列番号２のアミノ酸配列又はそれらの機能的断片と少なくとも約９０％、９５％、又は９９％同一であるアミノ酸配列を含むポリメラーゼを含む。

【０１１３】

ポリメラーゼは、逆転写能力を有してもよい。そのような実施形態では、増幅反応は、例えば、別々の逆転写酵素を使用せず、単一ステップでＲＮＡ標的を増幅することができる。逆転写酵素能力を有するポリメラーゼの非限定的な例としては、Ｂｓｔ（大型断片）、９°Ｎ　ＤＮＡポリメラーゼ、９°Ｎｍ（商標）ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｉｎａｔｏｒ（商標）、及びＴｈｅｒｍｉｎａｔｏｒ（商標）ＩＩなどが挙げられる。一部の実施形態では、増幅反応成分は、１種又は複数種の別々の逆転写酵素を含む。一部の実施形態では、１種よりも多くのポリメラーゼが増幅反応に含まれている。例えば、増幅反応は、逆転写酵素活性を有するポリメラーゼ、及び逆転写酵素活性を有さない第２のポリメラーゼを含んでいてもよい。

一部の実施形態では、エキソヌクレアーゼ活性を有する１種又は複数種のポリメラーゼが増幅中に使用される。一部の実施形態では、エキソヌクレアーゼ活性を有しないか又は低い１種又は複数種のポリメラーゼが増幅中に使用される。一部の実施形態では、エキソヌクレアーゼ活性を有しないか又は低いポリメラーゼは、ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性を低減又は排除する１つ又は複数の修飾（例えば、アミノ酸置換）を含む。例えば、エキソヌクレアーゼ活性が低い修飾ポリメラーゼは、非修飾ポリメラーゼと比較して１０％又はそれよりも低い、例えば、非修飾ポリメラーゼと比較して約１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、又は１％未満のエキソヌクレアーゼ活性を有してもよい。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、５’－３’エキソヌクレアーゼ活性を有しないか若しくは低く、及び／又は３’－５’エキソヌクレアーゼ活性を有しないか若しくは低い。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、一本鎖依存性エキソヌクレアーゼ活性

を有しないか若しくは低く、及び／又は二本鎖依存性エキソヌクレアーゼ活性を有しないか若しくは低い。ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性を低減又は排除することができる修飾の非限定的な例としては、配列番号１の１４１位及び／若しくは１４３位及び／若しくは４５８位における、又は配列番号１の１４１位及び／若しくは１４３位及び／若しくは４５８位に対応する位置における１つ若しくは複数のアミノ酸置換（例えば、Ｄ１４１Ａ、Ｅ１４３Ａ、Ｅ１４３Ｄ、及びＡ４８５Ｌ）を含む。

【０１１４】

検出及び定量化

本明細書に記載の方法は、核酸増幅産物を検出及び／又は定量化することを含んでいてもよい。増幅産物は、例えば、本明細書に記載のあらゆる好適な検出法及び／又は定量化法により検出及び／又は定量化することができる。検出法及び／又は定量化法の非限定的な例としては、以下のものが挙げられる：分子ビーコン（例えば、リアルタイム、エンドポイント）、側方流動、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）、蛍光偏光（ＦＰ）、表面捕捉、５’－３’エキソヌクレアーゼ加水分解プローブ（例えば、ＴＡＱＭＡＮ）、挿入／結合色素、吸光度法（例えば、比色分析、濁度）、電気泳動（例えば、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動）、質量分析、核酸シーケンシング、デジタル増幅、プライマー伸長法（例えば、ｉＰＬＥＸ（商標））、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ社の分子反転プローブ（ＭＩＰ）技術、制限断片長多型（ＲＦＬＰ解析）、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド（ＡＳＯ）分析、メチル化特異的ＰＣＲ（ＭＳＰＣＲ）、パイロシーケンス分析、アシクロプライム分析、リバースドットブロット、ＧｅｎｅＣｈｉｐマイクロアレイ、ダイナミックアレル特異的ハイブリダイゼーション（ＤＡＳＨ）、ペプチド核酸（ＰＮＡ）及びロックド核酸（ＬＮＡ）プローブ、ＡｌｐｈａＳｃｒｅｅｎ、ＳＮＰｓｔｒｅａｍ、遺伝子ビット分析（ＧＢＡ）、マルチプレックスミニシーケンシング、ＳＮａＰｓｈｏｔ、ＧＯＯＤアッセイ、マイクロアレイｍｉｎｉｓｅｑ、アレイプライマーエクステンション（ＡＰＥＸ）、マイクロアレイプライマーエクステンション、Ｔａｇアレイ、コードマイクロスフェア、鋳型指向性組込み（ＴＤＩ、Ｔｅｍｐｌａｔｅ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）、比色オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ（ＯＬＡ）、配列コードＯＬＡ、マイクロアレイライゲーション、リガーゼ連鎖反応、パッドロックプローブ、インベーダーアッセイ、少なくとも１種のプローブを使用したハイブリダイゼーション、少なくとも１種の蛍光標識プローブを使用するハイブリダイゼーション、クローニング及びシーケンシング、ハイブリダイゼーションプローブ及び定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（ＱＲＴ－ＰＣＲ）の使用、ナノポアシークエンシング、チップ、及びそれらの組合せ。一部の実施形態では、核酸増幅産物の検出は、リアルタイム検出法の使用を含む（つまり、産物は、増幅プロセス中に検出及び／又は継続的にモニターされる）。一部の実施形態では、核酸増幅産物の検出は、エンドポイント検出法の使用を含む（つまり、産物は、増幅プロセスの完了又は停止後に検出される）。核酸検出法は、標的配列に直接組み込まれているか、又は標的に対する相補的配列を含むプローブに組み込まれている標識ヌクレオチドの使用を採用することもできる。このような標識は、性質が放射性及び／又は蛍光性であってもよく、本明細書で考察されている様式のいずれかで解像することができる。一部の実施形態では、核酸増幅産物の定量化は、下記に記載の１つ又は複数の検出法を使用して達成することができる。一部の実施形態では、検出法は、シグナル強度の測定、並びに／又は核酸増幅産物の定量化のための標準曲線及び／若しくはルックアップテーブルの作成（又は参照）と併せて使用することができる。

【０１１５】

核酸増幅産物の検出は、分子ビーコン技術の使用を含んでいてもよい。分子ビーコンという用語は、一般に、検出可能な分子であって、その分子の検出可能な特性は、ある特定の条件下で検出可能であり、それにより分子が特定の有益なシグナルとして機能することが可能になる。検出可能な特性の非限定的な例としては、光学的特性（例えば、蛍光）、電気的特性、磁気的特性、化学的特性、及び既知サイズの開口部を通過する時間又は速度が挙げられる。核酸分子を検出するための分子ビーコンは、例えば、一方の末端にフルオ

ロフォアを、反対側の末端にクエンチング色素を含むヘアピン形状のオリゴヌクレオチドであってもよい。ヘアピンのループは、標的配列に相補的なプローブ配列を含んでいてもよく、ステムは、プローブ配列の両側に位置する相補的なアーム配列のアニーリングにより形成される。フルオロフォア及びクエンチング分子は、各アームの反対側の末端に共有結合で連結されていてもよい。オリゴヌクレオチドがその相補的標的にハイブリダイズすることを防止する条件下では、又は分子ビーコンが溶液中で遊離している場合は、蛍光分子及びクエンチング分子は互いに近接してＦＲＥＴを防止する。分子ビーコンが標的分子（例えば、核酸増幅産物）に遭遇すると、ハイブリダイゼーションが生じる可能性があり、ループ構造が、安定でより剛性の立体構造へと変換され、フルオロフォア分子及びクエンチャー分子の分離が引き起こされ、蛍光がもたらされる。プローブが特異的であるため、蛍光の発生は、一般に、意図されている増幅産物の合成のみによるものである。一部の場合では、分子ビーコンプローブ配列は、標的核酸中の配列と同一であるか又は相補的である、増幅産物中の配列にハイブリダイズする。一部の場合では、分子ビーコンプローブ配列は、標的核酸中の配列と同一でも相補的でもない、増幅産物中の配列にハイブリダイズする（例えば、テイル増幅プライマー又はライゲーションにより増幅産物に付加された配列にハイブリダイズする）。分子ビーコンは特異性が高く、一塩基多型を見分けることができる。分子ビーコンは、異なる色のフルオロフォア及び異なる標的配列を用いて合成することもできるため、同じ反応で（例えば、マルチプレックス反応で）幾つかの産物を同時に検出することができる。定量的増幅プロセスの場合、分子ビーコンは、増幅の各サイクル後に増幅標的と特異的に結合することができ、ハイブリダイズしていない分子ビーコンは暗色であるため、増幅産物の量を定量的に決定するためにプローブ－標的ハイブリッドを単離する必要はない。得られるシグナルは増幅産物の量に比例する。分子ビーコンを使用した検出は、リアルタイムで行ってもよく、又はエンドポイント検出法として行ってもよい。

【０１１６】

核酸増幅産物の検出は、側方流動の使用を含んでいてもよい。側方流動の使用は、典型的には、ディップスティックアッセイ及び種々の適切なコーティングを施した薄層クロマトグラフィープレートを含むがこれらに限定されない側方流動デバイスの使用を含む。流路には、試料に対する種々の結合試薬、試料に対する結合パートナー又は結合パートナーを含むコンジュゲート、及びシグナル発生系が固定化されている。検出は、例えば、酵素検出、ナノ粒子検出、比色検出及び蛍光検出によって達成され得る。核酸は、例えば、抗体依存性及び／又は抗体非依存性方法によって、側方流動デバイスにおいて捕捉され得る。抗体依存性捕捉は、抗体捕捉ライン（ｌｉｎｅ）及び標的に対する相補的配列の標識されたプローブを含む。抗体非依存性捕捉は、２種の結合パートナーの間の非共有結合性相互作用、例えば、ビオチン化プローブ及びストレプトアビジンラインの間の高い親和性且つ不可逆的な連結を使用する。捕捉プローブは、側方流動膜に直接的に固定化され得る。抗体依存性及び抗体非依存性方法の両方を、例えば、マルチプレックス反応において生成された増幅産物を検出するために使用することができる。

【０１１７】

核酸増幅産物の検出は、２種の発色団：ドナー分子及びアクセプター分子の間のエネルギー移動機序であるＦＲＥＴの使用を含んでいてもよい。手短に言えば、ドナーフルオロフォア分子が特定の励起波長で励起される。ドナー分子がその基底状態へと戻る際のその後のドナー分子の発光は、長距離双極子間相互作用により励起エネルギーをアクセプター分子へと移動させることができる。アクセプター分子の発光強度をモニターすることができ、発光強度は、ドナーとアクセプターとの間の距離、ドナー発光スペクトルとアクセプター吸収スペクトルとの重複、及びドナー発光双極子モーメント及びアクセプター吸収双極子モーメントの向きの関数である。ＦＲＥＴは、分子ビーコンについて記載したように、例えば、ＤＮＡ－ＤＮＡ相互作用の分子動力学の定量化に有用であり得る。特定の産物の産生をモニターするために、プローブの一方の末端をドナー分子で標識し、他方の末端をアクセプター分子で標識することができる。プローブ－標的ハイブリダイゼーションに

より、ドナーとアクセプターとの距離又は向きが変化し、ＦＲＥＴ変化が観察される。
【０１１８】
核酸増幅産物の検出は、蛍光偏光（ＦＰ）の使用を含んでいてもよい。ＦＰ技法は、蛍光標識化合物が直線偏光で励起されると、その回転速度に反比例した偏光度を有する蛍光を発することになるという原理に基づく。したがって、例えば蛍光標識を有するトレーサー－核酸コンジュゲートなどの分子が直線偏光で励起されると、光が吸収されてから発光するまでの間はフルオロフォアの回転が拘束されるため、発光は高度に偏光したままである。遊離トレーサー化合物（つまり、核酸に結合していない）が直線偏光で励起されると、その回転は、対応するトレーサー－核酸コンジュゲートよりもはるかに速く、分子の向きはよりランダムになるため、放射光の偏光は解消される。したがって、蛍光偏光は、増幅反応で産生されたトレーサー－核酸コンジュゲートの量を測定するための定量的手段を提供する。
【０１１９】
核酸増幅産物の検出は、例えば、特定のオリゴヌクレオチドを表面に固定化して感度及び選択性が両方とも高いバイオセンサーを製作することにより達成される表面捕捉の使用を含んでいてもよい。使用され得る表面の例としては、金及び炭素が挙げられ、表面捕捉方法は、プローブを表面に取り付けるための多数の共有結合性又は非共有結合性カップリング方法を使用することができる。核酸増幅産物の検出は、５’－３’エキソヌクレアーゼ加水分解プローブ（例えば、ＴＡＱＭＡＮ）の使用を含んでいてもよい。例えば、ＴＡＱＭＡＮプローブは、定量的増幅法（例えば、定量的ＰＣＲ）の特異性を増加させることができる加水分解プローブである。ＴＡＱＭＡＮプローブの原理は、１）相補的標的配列へのハイブリダイゼーション中に二重標識プローブを切断するＴａｑポリメラーゼの５’－３’エキソヌクレアーゼ活性、及び２）フルオロフォアに基づく検出に依存する。得られる蛍光シグナルは、増幅の指数関数的段階中の増幅産物の蓄積の定量的測定を可能にし、ＴＡＱＭＡＮプローブは、検出の特異性を著しく増加させることができる。
【０１２０】
核酸増幅産物の検出は、挿入色素及び／又は結合色素、例えば、核酸を特異的に染色する色素の使用を含んでいてもよい（例えば、挿入色素は、ＤＮＡ又はＲＮＡに結合すると蛍光の増強を呈する）。色素としては、ＳＹＴＯ（登録商標）８２、アクリジンオレンジ、臭化エチジウム、Ｈｏｅｃｈｓｔ色素、ＰｉｃｏＧｒｅｅｎ（登録商標）、ヨウ化プロピジウム、ＳＹＢＲ（登録商標）Ｉ（非対称性シアニン色素）、ＳＹＢＲ（登録商標）ＩＩ、ＴＯＴＯ（チアゾールオレンジ二量体）、及びＹＯＹＯ（オキサゾールイエロー二量体）を含むがそれらに限定されない、ＤＮＡ又はＲＮＡ挿入フルオロフォアを挙げることができる。核酸増幅産物の検出は、吸光度法（例えば、比色分析、濁度）の使用を含んでいてもよい。一部の実施形態では、核酸の検出及び／又は定量化は、吸光度（例えば、２６０ｎｍのＵＶ吸光度測定）を濃度へと直接変換することにより達成することができる。核酸の直接測定は、測定の経路長及び吸光係数を使用して吸光度を濃度に関係付けるランベルトベールの法則を使用して濃度へと変換することができる。核酸増幅産物の検出は、電気泳動（例えば、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動）の使用及び／又は質量分析の使用を含んでいてもよい。質量分析は、核酸の構造及び量を決定するために使用することができる分析技法であり、複雑な混合物の迅速な分析を提供するために使用することができる。増幅後、試料をイオン化し、得られたイオンを、電場及び／又は磁場において質量対電荷比に従って分離することができ、イオンの質量対電荷比は検出器により測定される。質量分析法としては、例えば、ＭＡＬＤＩ、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ、及びエレクトロスプレーが挙げられる。こうした方法は、ガスクロマトグラフィー（ＧＣ／ＭＳ）及び液体クロマトグラフィー（ＬＣ／ＭＳ）と組み合わせることができる。質量分析法（例えば、マトリックス支援レーザー脱離／イオン化質量分析法（ＭＡＬＤＩ　ＭＳ））は、固体表面からの高速シグナル取得及び自動分析により、ハイスループットを実現することができる。
【０１２１】

核酸増幅産物の検出は、核酸シーケンシングの使用を含んでいてもよい。増幅産物の配列全体又は部分配列を決定することができ、決定されたヌクレオチド配列はリードと呼ばれる場合がある。例えば、線形増幅産物は、さらなる増幅を行わずに（例えば、単一分子シーケンシング法を使用することにより）直接分析することができる。一部の実施形態では、線形増幅産物をさらなる増幅に供し、次いで分析する（例えば、ライゲーション又はパイロシーケンシング法によるシーケンシングを使用して）。配列決定法の非限定的な例としては、シングルエンドシーケンシング、ペアエンドシーケンシング、可逆的ターミネーターに基づく配列決定、ライゲーションによる配列決定、パイロシーケンシング、合成による配列決定、単一分子配列決定、マルチプレックス配列決定、固相単一ヌクレオチド配列決定、及びナノポア配列決定が挙げられる。核酸増幅産物の検出は、デジタル増幅（例えば、デジタルＰＣＲ）の使用を含んでいてもよい。核酸のデジタル増幅及び分析用のシステムが利用可能である（例えば、Ｆｌｕｉｄｉｇｍ（登録商標）Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）。

【０１２２】

酸性組成物

本明細書に開示されるｄｓＤＮＡの解離のための酸性組成物（例えば、溶解緩衝液、溶出緩衝液、再懸濁緩衝液）は、１０～２０ｍＭ　ＨＣｌなどの低濃度の酸性薬剤により作製され得る。当技術分野で知られている他の無機酸又は有機酸を使用することもできる。ｐＨの中和のために使用される増幅反応緩衝液は、３０～５０ｍＭトリスｐＨ８．８緩衝液となり得る。一部の実施形態では、酸性組成物は、酸性緩衝能力を増加させ、臨床試料（例えば、尿又は鼻スワブ）に見出されるｐＨ可変性を代償するために、グリシン／－ＨＣｌなどの酸性緩衝液を含有することができる。いかなる特定の理論に制約されることもないが、一部の実施形態では、低ｐＨにおいて、高濃度の正に荷電した水素イオンは、非共有結合性水素結合及び疎水性相互作用を崩壊させ、二重らせん構造を不安定化し、鎖を分離させることにより、核酸の二次構造を破壊する。

【０１２３】

本明細書に開示されるものには、生物学的実体を溶解し、それらの中に含まれるｄｓＤＮＡを変性させるための酸性組成物が含まれる。一部の実施形態では、酸性組成物は、一価塩及び／又は二価塩；１種又は複数種の界面活性剤；並びに酸性薬剤を含み、酸性薬剤は、１００ｍＭ未満の濃度で酸性組成物中に存在し、酸性組成物は、４未満のｐＨを有する。一価塩は、３０ｍＭ未満の濃度で酸性組成物中に存在し得る。二価塩は、１５ｍＭ未満の濃度で酸性組成物中に存在し得る。

一部の実施形態では、酸性組成物は、約１～約３．９（例えば、約１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３．０、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲）の範囲内のｐＨを有する。一部の実施形態では、酸性組成物は、約２のｐＨを有する。一部の実施形態では、酸性組成物は、約２、約２．１、約２．２、約２．３、約２．４及び約２．５のｐＨを有する。本明細書で使用される場合のｐＨは、水性溶液のｐＨを計算又は測定するいずれかの知られている方法によって決定され得る。一部の実施形態では、酸性組成物は、グリセロール、ホルムアミド又は尿素を含まない。

【０１２４】

一部の実施形態では、本明細書に開示される酸性組成物成分のパーセンテージは、％質量／質量、％モル数（ｍ）／容積、％容積／容積、％モル数／質量、％質量／容積、又はそれらの変種として提供される。一部の実施形態では、酸性組成物内の本明細書に開示される酸性組成物成分（例えば、１種又は複数種の界面活性剤）のパーセンテージ（％質量／質量、％モル数／容積、％容積／容積、％モル数／質量、％質量／容積、又はそれらの変種）は、約０．０００００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１

％、０．０２％、０．０３％、０．０４％、０．０５％、０．０６％、０．０７％、０．０８％、０．０９％、０．１０％、０．１１％、０．１２％、０．１３％、０．１４％、０．１５％、０．１６％、０．１７％、０．１８％、０．１９％、０．２０％、０．２１％、０．２２％、０．２３％、０．２４％、０．２５％、０．２６％、０．２７％、０．２８％、０．２９％、０．３０％、０．３１％、０．３２％、０．３３％、０．３４％、０．３５％、０．３６％、０．３７％、０．３８％、０．３９％、０．４０％、０．４１％、０．４２％、０．４３％、０．４４％、０．４５％、０．４６％、０．４７％、０．４８％、０．４９％、０．５０％、０．５１％、０．５２％、０．５３％、０．５４％、０．５５％、０．５６％、０．５７％、０．５８％、０．５９％、０．６０％、０．６１％、０．６２％、０．６３％、０．６４％、０．６５％、０．６６％、０．６７％、０．６８％、０．６９％、０．７０％、０．７１％、０．７２％、０．７３％、０．７４％、０．７５％、０．７６％、０．７７％、０．７８％、０．７９％、０．８０％、０．８１％、０．８２％、０．８３％、０．８４％、０．８５％、０．８６％、０．８７％、０．８８％、０．８９％、０．９０％、０．９１％、０．９２％、０．９３％、０．９４％、０．９５％、０．９６％、０．９７％、０．９８％、０．９９％、１．０％、１．０１％、１．０２％、１．０３％、１．０４％、１．０５％、１．０６％、１．０７％、１．０８％、１．０９％、１．１０％、１．１１％、１．１２％、１．１３％、１．１４％、１．１５％、１．１６％、１．１７％、１．１８％、１．１９％、１．２０％、１．２１％、１．２２％、１．２３％、１．２４％、１．２５％、１．２６％、１．２７％、１．２８％、１．２９％、１．３０％、１．３１％、１．３２％、１．３３％、１．３４％、１．３５％、１．３６％、１．３７％、１．３８％、１．３９％、１．４０％、１．４１％、１．４２％、１．４３％、１．４４％、１．４５％、１．４６％、１．４７％、１．４８％、１．４９％、１．５０％、１．５１％、１．５２％、１．５３％、１．５４％、１．５５％、１．５６％、１．５７％、１．５８％、１．５９％、１．６０％、１．６１％、１．６２％、１．６３％、１．６４％、１．６５％、１．６６％、１．６７％、１．６８％、１．６９％、１．７０％、１．７１％、１．７２％、１．７３％、１．７４％、１．７５％、１．７６％、１．７７％、１．７８％、１．７９％、１．８０％、１．８１％、１．８２％、１．８３％、１．８４％、１．８５％、１．８６％、１．８７％、１．８８％、１．８９％、１．９０％、１．９１％、１．９２％、１．９３％、１．９４％、１．９５％、１．９６％、１．９７％、１．９８％、１．９９％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲となり得る又はそうである。一部の実施形態では、本明細書に開示される酸性組成物成分のパーセンテージは、酸性組成物が生物学的実体を含む試料と接触されたときのそれらの最終濃度に関して記載されている。その上、一部の実施形態では、本明細書に開示される酸性組成物成分は、酸性組成物の作業濃度（例えば、１×）に関して記載されるが、本開示は、開示されている酸性組成物の濃縮バージョン（例えば、２×酸性組成物）も考慮する。

【０１２５】

酸性薬剤

本明細書に開示される組成物（例えば、酸性組成物）は、１種又は複数種の酸性薬剤を含むことができる。酸性薬剤は、有機酸、無機酸、又はその両方を含むことができる。酸性薬剤は、塩酸、塩酸グリシン、酢酸、クエン酸、リン酸、又はそれらの組合せとなり得

る。

【０１２６】

酸性薬剤は、実施形態に応じて変動し得る。無機酸は、塩酸（ＨＣｌ）となり得る。無機酸は、フッ化水素酸、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、亜硝酸、リン酸、ホスフィン酸、ホスホン酸、スルホン酸、硫酸、亜硫酸、二硫酸（ｄｉｓｕｌｆｕｒｉｃ ａｃｉｄ）、炭酸及びホウ酸の１種又は複数種を含むことができる。有機酸は、酢酸、C_2H_5COOH、C_3H_7COOH、C_4H_9COOH、$(COOH)_2$、$CH_2(COOH)_2$、$C_2H_4(COOH)_2$、$C_3H_6(COOH)_2$、$C_4H_8(COOH)_2$、$C_5H_{10}(COOH)_2$、フマル酸、マレイン酸、マロン酸、乳酸、クエン酸、酒石酸、シュウ酸、アスコルビン酸、安息香酸、サリチル酸、フタル酸、ピルビン酸、Ｌ－アスパラギン酸、Ｄ－アスパラギン酸、炭酸、ギ酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、グルコサミン硫酸塩、Ｌ－トレオン酸、ショウノウ酸、グルコン酸、Ｌ－グルタミン酸、Ｄ－グルタミン酸、トリフルオロ酢酸又はラネル酸の１種又は複数種を含むことができる。

【０１２７】

一部の実施形態では、酸性薬剤は、酸性緩衝液（例えば、酸性緩衝溶液）である。酸性緩衝溶液は、７未満のｐＨを有する溶液となることができる。酸性緩衝溶液は、弱酸及びその塩の１種（例えば、ナトリウム塩）から作製されてよい、又は商業的供給源から得られてよい。一例は、溶液中のエタン酸及びエタン酸ナトリウム（ｓｏｄｉｕｍ ｅｔｈａｎｏａｔｅ）の混合物である。この場合、溶液は、等モル濃度の酸及び塩の両方を含有する場合、４．７６のｐＨを有するであろう。よって、本明細書で使用される場合、用語「酸性緩衝液」は、その通常の意義が与えられるものとし、水性溶液に添加されたときにｐＨを低減させ、その結果生じる溶液を、溶液がより低い又は高いｐＨの溶液と混合されたときにｐＨの変化に抵抗させる、化合物も指すものとする。酸性緩衝液は、約７を下回るｐＫａを有することができる。酸性緩衝液は、約７を下回る、約６を下回る、約５を下回る、約４を下回る及び約３を下回るｐＫａを有することができる。約７を下回るあらゆる個々の値及び範囲のｐＫａを有する酸性緩衝液が本開示に含まれる。本明細書に記載されている酸性組成物に好適な酸性緩衝液の例は、リン酸塩、クエン酸塩、イソクエン酸塩、酢酸塩、コハク酸塩、アスコルビン酸、ギ酸、乳酸、硫酸、塩酸、硝酸、安息香酸、ホウ酸、酪酸、カプリン酸、カプリル酸（ｃａｐｒｉｌｉｃ）、炭酸、カルボン酸、シュウ酸、ピルビン酸、フタル酸、アジピン酸、シトラマル酸、フマル酸、グリコール酸、酒石酸、イソ酒石酸（ｉｓｏｔａｒｔａｒｉｃ）、ラウリン酸、マレイン酸、イソリンゴ酸（ｉｓｏｍａｌｉｃ）、マロン酸、オロト酸、プロピオン酸、メチルプロピオン酸、ポリアクリル酸、コハク酸、サリチル酸、５－スルホサリチル酸、吉草酸、イソ吉草酸、尿酸、及びこれらの組合せ、例えば、約２．２のｐＨを有する塩酸及びグリシンの組合せ、並びに当技術分野で知られている他の好適な酸及び塩基を含むがこれらに限定されない。他の好適な酸性緩衝液は、酸及び１種又は複数種の塩又は緩衝剤の混合物である。例えば、本明細書における使用に好適な酸性緩衝液は、適切な濃度の塩酸と組み合わせたグリシンを使用して調製され得る。酸性緩衝液は、グリシン－ＨＣｌを含むことができる。酸性緩衝液は、１０．０ｍＭグリシン、８．８ｍＭ ＨＣｌ又はその両方を含むことができる。酸性緩衝液のｐＨは、約１．０～約６．０（例えば、２．２）となり得る。

【０１２８】

酸性組成物中に存在する酸性薬剤の濃度は変動し得る。酸性薬剤は、約０．１ｍＭ、０．２ｍＭ、０．３ｍＭ、０．４ｍＭ、０．５ｍＭ、０．６ｍＭ、０．７ｍＭ、０．８ｍＭ、０．９ｍＭ、１ｍＭ、２ｍＭ、３ｍＭ、４ｍＭ、５ｍＭ、６ｍＭ、７ｍＭ、８ｍＭ、９ｍＭ、１０ｍＭ、１１ｍＭ、１２ｍＭ、１３ｍＭ、１４ｍＭ、１５ｍＭ、１６ｍＭ、１７ｍＭ、１８ｍＭ、１９ｍＭ、２０ｍＭ、２１ｍＭ、２２ｍＭ、２３ｍＭ、２４ｍＭ、２５ｍＭ、２６ｍＭ、２７ｍＭ、２８ｍＭ、２９ｍＭ、３０ｍＭ、３１ｍＭ、３２ｍＭ、３３ｍＭ、３４ｍＭ、３５ｍＭ、３６ｍＭ、３７ｍＭ、３８ｍＭ、３９ｍＭ、４０ｍＭ、４１ｍＭ、４２ｍＭ、４３ｍＭ、４４ｍＭ、４５ｍＭ、４６ｍＭ、４７ｍＭ、４８ｍＭ、４９

ｍＭ、５０ｍＭ、５１ｍＭ、５２ｍＭ、５３ｍＭ、５４ｍＭ、５５ｍＭ、５６ｍＭ、５７ｍＭ、５８ｍＭ、５９ｍＭ、６０ｍＭ、６１ｍＭ、６２ｍＭ、６３ｍＭ、６４ｍＭ、６５ｍＭ、６６ｍＭ、６７ｍＭ、６８ｍＭ、６９ｍＭ、７０ｍＭ、７１ｍＭ、７２ｍＭ、７３ｍＭ、７４ｍＭ、７５ｍＭ、７６ｍＭ、７７ｍＭ、７８ｍＭ、７９ｍＭ、８０ｍＭ、８１ｍＭ、８２ｍＭ、８３ｍＭ、８４ｍＭ、８５ｍＭ、８６ｍＭ、８７ｍＭ、８８ｍＭ、８９ｍＭ、９０ｍＭ、９１ｍＭ、９２ｍＭ、９３ｍＭ、９４ｍＭ、９５ｍＭ、９６ｍＭ、９７ｍＭ、９８ｍＭ、９９ｍＭ、１００ｍＭ、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲未満の濃度で酸性組成物中に存在し得る。酸性薬剤は、約１ｍＭ～約１００ｍＭの範囲内、例えば、約１０ｍＭ又は約８．８ｍＭの濃度で酸性組成物中に存在し得る。

【０１２９】

塩

酸性組成物（例えば、溶解緩衝液）は、いかなる特定の理論に制約されることもないが、一部の実施形態では、脱プリン化を抑制し得る、一価塩及び／又は二価塩（例えば、マグネシウム）を含むことができる。一部の実施形態では、酸性組成物は、低濃度の一価塩及び／又は二価塩を含む。いかなる特定の理論に制約されることもないが、これは、ＤＮＡ骨格上のリン酸基上の負電荷の中和によるものである可能性がある。

本明細書に提供される酸性組成物（例えば、溶解緩衝液）の一価塩及び／又は二価塩は、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、又はそれらのあらゆる組合せを含むことができる。一価塩は、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、フッ化ナトリウム、塩化ナトリウム、臭化ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、フッ化カリウム、塩化カリウム、臭化カリウム及びヨウ化カリウムからなる群から選択され得る。二価塩は、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化銅（ＩＩ）、塩化亜鉛、酸化カルシウム、酸化マグネシウム、酸化バリウム、硫酸ナトリウム、硫酸カルシウム、硫酸銅（ＩＩ）、炭酸カリウム及び炭酸ナトリウムからなる群から選択され得る。一部の実施形態では、一価塩は、硫酸アンモニウムである。一部の実施形態では、二価塩は、硫酸マグネシウムである。

【０１３０】

一部の実施形態では、一価塩及び／又は二価塩は、１５ｍＭ、例えば、約０．１ｍＭ、０．２ｍＭ、０．３ｍＭ、０．４ｍＭ、０．５ｍＭ、０．６ｍＭ、０．７ｍＭ、０．８ｍＭ、０．９ｍＭ、１ｍＭ、２ｍＭ、３ｍＭ、４ｍＭ、５ｍＭ、６ｍＭ、７ｍＭ、８ｍＭ、９ｍＭ、１０ｍＭ、１１ｍＭ、１２ｍＭ、１３ｍＭ、１４ｍＭ、１５ｍＭ、１６ｍＭ、１７ｍＭ、１８ｍＭ、１９ｍＭ、２０ｍＭ、２１ｍＭ、２２ｍＭ、２３ｍＭ、２４ｍＭ、２５ｍＭ、２６ｍＭ、２７ｍＭ、２８ｍＭ、２９ｍＭ、２９．９ｍＭ、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲未満の濃度で酸性組成物中に存在する。一価塩及び／又は二価塩は、約１ｍＭ～約１４ｍＭの範囲内の濃度、例えば、約５ｍＭ又は約４ｍＭの濃度で酸性組成物中に存在し得る。

【０１３１】

界面活性剤

本明細書に提供される酸組成物（例えば、溶解緩衝液）は、１種又は複数種の溶解薬剤（例えば、界面活性剤、デタージェント）、例えば、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤及び両性界面活性剤を含むことができる。アニオン性界面活性剤は、対イオンとしてNH_4^+、K^+、Na^+、又はLi^+を含んでいてもよい。カチオン性界面活性剤は、対イオンとしてI^-、Br^-、又はCl^-を含んでいてもよい。

アニオン性界面活性剤は、ラウリン酸カリウム、ステアリン酸トリエタノールアミン、ラウリル硫酸アンモニウム、ドデシル硫酸リチウム、ラウリル硫酸ナトリウム、アルキル硫酸ナトリウム（Ｃ８－１６）、ＳＤＳ、アルキルポリオキシエチレン硫酸塩（ａｌｋｙｌ ｐｏｌｙｏｘｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｓｕｌｆａｔｅ）、アルギン酸ナトリウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウム、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸及びその塩、グリセリルエステル、カルボキシメチルセルロースナトリウム、胆汁酸及び酸、アルキルスルホン酸塩、アリール

スルホン酸塩、アルキルリン酸塩、アルキルスルホン酸塩、ステアリン酸及びその塩、ステアリン酸カルシウム、ホスフェート、カルボキシメチルセルロースナトリウム、スルホコハク酸ジオクチル、スルホコハク酸ナトリウム（ｓｏｄｉｕｍ　ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｃ　ａｃｉｄ）のジアルキルエステル、リン脂質並びにカルボキシメチルセルロースカルシウムからなる群から選択され得る。

【０１３２】

カチオン性界面活性剤は、例えば、以下のものであってもよい：第四級アンモニウム化合物、塩化ベンザルコニウム、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、キトン酸、ラウリルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、アシルカルニチン塩酸塩、アルキルピリジニウムハライド、塩化セチルピリジニウム、カチオン性脂質、ポリメチルメタクリレートトリメチルアンモニウムブロミド、スルホニウム化合物、ポリビニルピロリドン－２－ジメチルアミノエチルメタクリレートジメチルスルフェート、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ホスホニウム化合物、第四級アンモニウム化合物、ベンジル－ジ（２－クロロエチル）エチルアンモニウムブロミド、ココナッツトリメチルアンモニウムクロリド、ココナッツトリメチルアンモニウムブロミド、ココナッツメチルジヒドロキシエチルアンモニウムクロリド、ココナッツメチルジヒドロキシエチルアンモニウムブロミド、デシルトリエチルアンモニウムクロリド、デシルジメチルヒドロキシエチルアンモニウムクロリド、デシルジメチルヒドロキシエチルアンモニウムクロリドブロミド、Ｃ１２－１５－ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムクロリド、Ｃ１２－１５－ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムクロリドブロミド、ココナッツジメチルヒドロキシエチルアンモニウムクロリド、ココナッツジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド、ミリスチルトリメチルアンモニウムメチルスルフェート、ラウリルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ラウリルジメチルベンジルアンモニウムブロミド、ラウリルジメチル（エテノキシ）４アンモニウムクロリド、ラウリルジメチル（エテノキシ）４アンモニウムブロミド、Ｎ－アルキル（Ｃ１２－１８）ジメチルベンジルアンモニウムクロリド、Ｎ－アルキル（Ｃ１４－１８）ジメチル－ベンジルアンモニウムクロリド、Ｎ－テトラデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド一水和物、ジメチルジデシルアンモニウムクロリド、Ｎ－アルキル（Ｃ１２－１４）ジメチル１－ナフチルメチルアンモニウムクロリド、トリメチルアンモニウムハライドアルキル－トリメチルアンモニウム塩、ジアルキル－ジメチルアンモニウム塩、ラウリルトリメチルアンモニウムクロリド、エトキシル化アルキアミドアルキルジアルキルアンモニウム塩、エトキシル化トリアルキルアンモニウム塩、ジアルキルベンゼンジアルキルアンモニウムクロリド、Ｎ－ジデシルジメチルアンモニウムクロリド、Ｎ－テトラデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド一水和物、Ｎ－アルキル（Ｃ１２－１４）ジメチル１－ナフチルメチルアンモニウムクロリド、ドデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ジアルキルベンゼンアルキルアンモニウムクロリド、ラウリルトリメチルアンモニウムクロリド、アルキルベンジルメチルアンモニウムクロリド、アルキルベンジルジメチルアンモニウムブロミド、Ｃ８－１６トリメチルアンモニウムブロミド、Ｃ８－１６トリメチルアンモニウムクロリド、Ｃ１５トリメチルアンモニウムブロミド、Ｃ１７トリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルベンジルトリエチルアンモニウムクロリド、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロリド、ジメチルアンモニウムクロリド、アルキルジメチルアンモニウムハロゲン化物、トリセチルメチルアンモニウムクロリド、デシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリエチルアンモニウムブロミド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド、メチルトリオクチルアンモニウムクロリド、ＰＯＬＹＱＵＡＴ１０、テトラブチルアンモニウムブロミド、ベンジルトリメチルアンモニウムブロミド、コリンエステル、塩化ベンザルコニウム、ステアラルコニウムクロリド、臭化セチルピリジニウム、塩化セチルピリジニウム、第四級化ポリオキシエチルアルキルアミンのハロゲン化物塩、ＭＩＲＡＰＯＬ　Ａｌｋａｑｕａｔ、アルキルピリジニウム塩、アミン、アミン塩、イミドアゾリニウム塩、プロトン化第四級アクリルアミド、メチル化第四級ポリマー、カチオン性グアーガム、塩化ベンザルコニウム、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、トリエタノールアミン、又はポロキサミン。

【０１３３】
非イオン性界面活性剤は、例えば、以下のものであってもよい：ポリオキシエチレン脂肪アルコールエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ソルビタンエステル、グリセリルエステル、モノステアリン酸グリセロール、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリプロピレングリコールエステル、セチルアルコール、セトステアリルアルコール、ステアリルアルコール、アリールアルキルポリエーテルアルコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンコポリマー、ポロキサマー、ポロキサミン、メチルセルロース、ヒドロキシセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、非結晶性セルロース、ポリサッカリド、デンプン、デンプン誘導体、ヒドロキシエチルデンプン、ポリビニルアルコール、ステアリン酸トリエタノールアミン、アミンオキシド、デキストラン、グリセロール、アカシアゴム、コレステロール、トラガント、ポリビニルピロリドン、アルキル硫酸塩、アルキルスルホン酸塩、脂肪酸石鹸、ヒドロキシ脂肪酸、ヒドロペルオキシ脂肪酸、ポリヒドロキシ脂肪酸、エポキシ脂肪酸の塩、モノカルボン酸及びポリカルボン酸の塩、プロスタン酸及びプロスタグランジン、ロイコトリエン及びリポキシン、アルキルリン酸塩、アルキルホスホン酸塩、ジアルキルスルホコハク酸ナトリウム、ｎ－アルキルエトキシル化硫酸塩、胆汁酸塩のコール酸塩及びデオキシコール酸塩、ペルフルオロカルボン酸、フルオロ脂肪族ホスホン酸塩（ｆｌｕｏｒｏａｃｌｉｐｈａｔｉｃ　ｐｈｏｓｐｈｏｎａｔｅ）、又はフルオロ脂肪族硫酸塩。

【０１３４】
本明細書で提供される溶解剤は、変性作用剤として作用することが可能であってもよい。本明細書で使用される場合、「変性作用剤」又は「変性剤」には、その通常の意味が与えられるものとし、タンパク質の可逆的アンフォールディングを引き起こすことになるあらゆる化合物又は物質を含む。変性作用剤又は変性剤の強度は、特定の変性作用剤又は変性剤の特性及び濃度の両方により決定されることになる。好適な変性作用剤又は変性剤は、カオトロープ、デタージェント、有機溶媒、水混和性溶媒、リン脂質、又は２種若しくはそれよりも多くのそのような作用剤の組合せとなり得る。好適なカオトロープは、尿素、グアニジン及びチオシアン酸ナトリウムを含むがこれらに限定されない。有用なデタージェントとしては、ＳＤＳ又はポリオキシエチレンエーテル（例えば、Ｔｗｅｅｎ又はＴｒｉｔｏｎデタージェント）、サルコシルなどの強力なデタージェント、穏やかな非イオン性デタージェント（例えば、ジギトニン）、穏やかなカチオン性デタージェント、例えば、Ｎ－＞２，３－（ジオレイオキシ（Ｄｉｏｌｅｙｏｘｙ））－プロピル－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウム、穏やかなイオン性デタージェント（例えば、コール酸ナトリウム又はデオキシコール酸ナトリウム）、又はスルホベタイン（Ｚｗｉｔｔｅｒｇｅｎｔ）、３－（３－クロラミド（ｃｈｌｏｌａｍｉｄｏ）プロピル）ジメチルアンモニオ－１－プロパン硫酸塩（ＣＨＡＰＳ）及び３－（３－クロラミドプロピル）ジメチルアンモニオ－２－ヒドロキシ－１－プロパンスルホン酸塩（ＣＨＡＰＳＯ）を含むが、これらに限定されない双性イオン性デタージェント。アセトニトリル、低級アルカノール（特に、エタノール又はイソプロパノールなどのＣ２－Ｃ４アルカノール）、又は低級アルカンジオール（特に、エチレン－グリコールなどのＣ２－Ｃ４アルカンジオール）などの有機水混和性溶媒を変性剤として使用することができる。リン脂質は、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、及びホスファチジルイノシトールなどの天然に存在するリン脂質、又はジヘキサノイルホスファチジルコリン若しくはジヘプタノイルホスファチジルコリンなどの合成リン脂質誘導体若しくはバリアントであってもよい。

【０１３５】
１種又は複数種の界面活性剤は、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤及び両性界面活性剤の１種又は複数種を含むことができる。一部の実施

形態では、酸性組成物は、アニオン性界面％モル数活性剤及びカチオン性界面活性剤の両方を含まない。１種又は複数種の界面活性剤は、酸性組成物の約０．０１％～約２％の容積に対する質量（％質量／容積）の範囲内の濃度で酸性組成物中に存在し得る。１種又は複数種の界面活性剤は、酸性組成物の約０．１％の容積に対する質量（％質量／容積）の濃度で酸性組成物中に存在し得る。一部の実施形態では、酸性組成物は、ｔｗｅｅｎ界面活性剤、例えば、Ｔｗｅｅｎ２０、Ｔｗｅｅｎ４０、Ｔｗｅｅｎ４５、Ｔｗｅｅｎ６０、Ｔｗｅｅｎ６５、Ｔｗｅｅｎ８０、Ｔｗｅｅｎ８１及びＴｗｅｅｎ８５から選択されるｔｗｅｅｎ界面活性剤をさらに含む。ｔｗｅｅｎ界面活性剤は、酸性組成物の約０．０１％（質量／容積）を構成することができる。

本明細書において有用なアニオン性界面活性剤としては、アルキルラジカルに１０～１８個の炭素原子を有するアルキルスルフェート及びアルキルエーテルスルフェートの水溶性塩、及び１０～１８個の炭素原子を有する脂肪酸のスルホン化モノグリセリドの水溶性塩が挙げられる。ラウリル硫酸ナトリウム及びココナッツモノグリセリドスルホン酸ナトリウムは、このタイプのアニオン性界面活性剤の例である。

【０１３６】

好適なカチオン性界面活性剤は、ラウリルトリメチルアンモニウムクロリド；塩化セチルピリジニウム；塩化ベンザルコニウム；ＣＴＡＢ；ジイソブチルフェノキシエチル－ジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ココナッツアルキルトリメチル－アンモニウム亜硝酸塩；フッ化セチルピリジニウムなど、約８～１８個の炭素原子を含む１つの長いアルキル鎖を有する脂肪族第四級アンモニウム化合物の誘導体として広義に規定することができる。ある特定のカチオン性界面活性剤は、本明細書に開示の組成物では殺菌剤として作用することもできる。

本開示の組成物、方法、及びキットに使用することができる好適な非イオン性界面活性剤は、アルキレンオキシド基（性質が親水性）と、性質が脂肪族及び／又は芳香族であってもよい有機疎水性化合物との縮合により生成される化合物であると広義に規定することができる。好適な非イオン性界面活性剤の例としては、以下のものが挙げられる：ポロキサマー；ジイソステアリン酸ソルビタンなどのソルビタン誘導体；ＰＥＧ－３０硬化ヒマシ油などの硬化ヒマシ油のエチレンオキシド縮合物；脂肪族アルコール又はアルキルフェノールのエチレンオキシド縮合物；エチレンオキシドとプロピレンオキシド及びエチレンジアミンの反応産物との縮合から導出される産物；長鎖第三級アミンオキシド；長鎖第三級ホスフィンオキシド；長鎖ジアルキルスルホキシド；及びそのような物質の混合物。こうした物質は、消費者製品組成物の過剰な粘度上昇に寄与することなく気泡を安定化するのに有用である。

【０１３７】

双性イオン性界面活性剤は、脂肪族第四級アンモニウム、ホスホニウム、及びスルホニウム化合物の誘導体であると広義に記述することができ、脂肪族ラジカルは、直鎖であってもよく又は分枝鎖であってもよく、脂肪族置換基の１つは、約８～１８個の炭素原子を含み、１つは、アニオン性水可溶化基、例えば、カルボキシ、スルホネート、サルフェート、ホスフェート、又はホスホネートを含む。

アニオン性単鎖界面活性剤の例としては、アルキル硫酸塩、アルキルスルホン酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、飽和又は不飽和脂肪酸、及びそれらの塩が挙げられる。カチオン性界面活性剤中の極性頭部基を含む部分としては、例えば、第四級アンモニウム、ピリジニウム、スルホニウム、及び／又はホスホニウム基を挙げることができる。例えば、極性頭部基は、トリメチルアンモニウムを含むことができる。例示的なカチオン性単鎖界面活性剤としては、アルキルトリメチルアンモニウムハライド、アルキルトリメチルアンモニウムトシレート、及びＮ－アルキルピリジニウムハライドが挙げられる。

【０１３８】

アルキル硫酸塩としては、オクチル硫酸ナトリウム、ＳＤｅＳ、ＳＤＳ、及びテトラ－デシル硫酸ナトリウムを挙げることができる。アルキルスルホン酸塩としては、オクチルスルホン酸ナトリウム、デシルスルホン酸ナトリウム、及びドデシルスルホン酸ナトリウ

ムを挙げることができる。アルキルベンゼンスルホン酸塩としては、オクチルベンゼンスルホン酸ナトリウム、デシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、及びドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを挙げることができる。脂肪酸塩としては、オクタン酸ナトリウム、デカン酸ナトリウム、ドデカン酸ナトリウム、及びオレイン酸のナトリウム塩を挙げることができる。

アルキルトリメチルアンモニウムハライドとしては、オクチルトリメチルアンモニウムブロミド、デシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ミリスチルトリメチルアンモニウムブロミド、及びＣＴＡＢを挙げることができる。アルキルトリメチルアンモニウムトシレートとしては、オクチルトリメチルアンモニウムトシレート、デシルトリメチルアンモニウムトシレート、ドデシルトリメチルアンモニウムトシレート、ミリスチルトリメチルアンモニウムトシレート、及びセチルトリメチルアンモニウムトシレートを挙げることができる。例えば、Ｎ－アルキルピリジニウムハライドとしては、塩化デシルピリジニウム、塩化ドデシルピリジニウム、塩化セチルピリジニウム、臭化デシルピリジニウム、臭化ドデシルピリジニウム、臭化セチルピリジニウム、ヨウ化デシルピリジニウム、ヨウ化ドデシルピリジニウム、ヨウ化セチルピリジニウムを挙げることができる。

【０１３９】

カチオン性界面活性剤は、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、セチルジメチルエチルアンモニウムブロミド、（Ｃ１－Ｃ３０アルキル）－トリメチルアンモニウムブロミド、（Ｃ１－Ｃ３０アルキル）アミン、（Ｃ１－Ｃ３０アルキル）イミダゾリン、エトキシル化アミン、第四級化合物、第四級エステル、（Ｃ１－Ｃ３０アルキル）アミンオキシド、ラウラミン（ｌａｕｒａｍｉｎｅ）オキシド、塩化ジセチルジモニウム、塩化セトリモニウム、第一級ポリエトキシル化脂肪族アミン塩、第二級ポリエトキシル化脂肪族アミン塩、第三級ポリエトキシル化脂肪族アミン塩、第四級アンモニウム塩、テトラ（Ｃ１－Ｃ３０アルキル）アンモニウムハライド、（Ｃ１－Ｃ３０アルキル）アミド－（Ｃ１－Ｃ３０アルキル）アンモニウムハライド、トリ（Ｃ１－Ｃ３０アルキル）ベンジルアンモニウムハライド、トリ（Ｃ１－Ｃ３０アルキル）ヒドロキシ－（Ｃ１－Ｃ３０アルキル）アンモニウムハライド、（Ｃ１－Ｃ３０アルキル）ピリジニウムクロリド、（Ｃ１－Ｃ３０アルキル）ピリジニウムブロミド、アミンオキシド、又はそれらの組合せを含むことができる。

【０１４０】

アニオン性界面活性剤は、以下のものを含むことができる：ＳＤＳ、（Ｃ６－Ｃ３０アルキル）ベンゼンスルホン酸塩、Ｃ６－Ｃ３０アルファオレフィンスルホン酸塩、パラフィンスルホン酸塩、（Ｃ６－Ｃ３０アルキル）エステルスルホン酸塩、（Ｃ６－Ｃ３０アルキル）硫酸塩、（Ｃ６－Ｃ３０アルキルアルコキシ）硫酸塩、（Ｃ６－Ｃ３０アルキル）スルホン酸塩、（Ｃ６－Ｃ３０アルキルアルコキシ）カルボン酸塩、（Ｃ６－Ｃ３０アルキルアルコキシル化）硫酸塩、モノ（Ｃ１－Ｃ３０アルキル）（エーテル）リン酸塩、ジ（Ｃ６－Ｃ３０アルキル）（エーテル）リン酸塩、（Ｃ６－Ｃ３０アルキル）サルコシン酸塩、スルホコハク酸塩、ビス（２－エチルヘキシル）スルホコハク酸ナトリウム、エトキシレート４－ノニルフェニルエーテルグリコール酸、（Ｃ１－Ｃ３０アルキル）イセチオン酸塩、タウリン酸塩、ラウリル硫酸アンモニウム、ラウレス硫酸アンモニウム、ラウリル硫酸トリエチルアミン、ラウレス硫酸トリエチルアミン、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、ラウレス硫酸トリエタノールアミン、ラウリル硫酸モノエタノールアミン、ラウレス硫酸モノエタノールアミン、ラウリル硫酸ジエタノールアミン、ラウレス硫酸ジエタノールアミン、ラウリン酸モノグリセリド硫酸ナトリウム（ｌａｕｒｉｃ ｍｏｎｏｇｌｙｃｅｒｉｄｅ ｓｏｄｉｕｍ ｓｕｌｆａｔｅ）、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウレス硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸カリウム、ラウレス硫酸カリウム、ラウリルリン酸ナトリウム、トリデシルリン酸ナトリウム、ベヘニルリン酸ナトリウム、ラウレス－２リン酸ナトリウム、セテス－３リン酸ナトリウム、トリデセス－４リン酸ナトリウム、ジラウ

リルリン酸ナトリウム、ジトリデシルリン酸ナトリウム、ジトリデセス－６リン酸ナトリウム、ラウロイルサルコシン酸ナトリウム、ラウロイルサルコシン、ココイルサルコシン、ココイル硫酸アンモニウム、ココイル硫酸ナトリウム、トリデセス硫酸ナトリウム、トリデシル硫酸ナトリウム、トリデセス硫酸アンモニウム、トリデシル硫酸アンモニウム、ココイルイセチオン酸ナトリウム、ラウレススルホコハク酸二ナトリウム、オレオイルメチルタウリンナトリウム、ラウレスカルボン酸ナトリウム、トリデセスカルボン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ココイル硫酸カリウム、ラウリル硫酸カリウム、ココイル硫酸モノエタノールアミン、トリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、又はそれらの組合せ。

【０１４１】

非イオン性界面活性剤は、例えば、以下のものを含んでいてもよい：Ｃ６－Ｃ１８アルキルアルコール、（Ｃ６－Ｃ１８アルキル）フェノール、（Ｃ６－Ｃ１８アルキル）エトキシレート、（Ｃ６－Ｃ１８アルキル）フェノール（Ｃ１－Ｃ３アルコキシレート）、Ｃ６－Ｃ１８アルキルフェノールのブロックオキシ（Ｃ１－Ｃ３アルキレン）縮合物、アルカノールのオキシ（Ｃ１－Ｃ３アルキレン）縮合物、オキシエチレン／オキシプロピレンブロックコポリマー、アミンオキシド、ホスフィンオキシド、８～５０個の炭素原子を有するアルキルアミンオキシド、モノ又はジ（Ｃ８－Ｃ３０）アルキルアルカノールアミド、（Ｃ６－Ｃ３０アルキル）ポリサッカリド、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビトールエステル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン酸、ポリオキシエチレンアルコール、ココモノエタノールアミド、ココジエタノールアミド、ココジグリコシド、（Ｃ８－Ｃ３０アルキル）ポリグリコシド、コカミドプロピル、ラウラミンオキシド、ポリオキシエチレン（２０）ソルビタンモノラウレート、エトキシル化直鎖Ｃ８－Ｃ３０アルコール、セテアリルアルコール、ラノリンアルコール、ステアリン酸、ステアリン酸グリセリル、ステアリン酸ポリエチレングリコール１００、４－（１，１，３，３－テトラメチルブチル）フェニルポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン（１０）セチルエーテル、エイコサエチレングリコールオクタデシルエーテル、及び$HO(CH_2CH_2O)_{20}(CH_2CH(CH_3)O)_{70}(CH_2CH_2O)_{20}H$。

【０１４２】

１種又は複数種の界面活性剤は、酸性組成物（例えば、溶解緩衝液）の約０．００１％（質量／容積）～約２．０％（質量／容積）を構成することができる。１種又は複数種の界面活性剤は、生物学的実体を溶解して、それらの中に含まれる試料核酸を放出させることが可能となり得る。１種又は複数種の界面活性剤は、酸性組成物の約０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲（質量／容積）を構成することができる。本明細書に開示される１種又は複数種の界面活性剤は、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤及び両性界面活性剤の１種又は複数種を含むことができる。酸性組成物はさらに、ｔｗｅｅｎ界面活性剤を含むことができる。ｔｗｅｅｎ界面活性剤は、Ｔｗｅｅｎ２０、Ｔｗｅｅｎ４０、Ｔｗｅｅｎ４５、Ｔｗｅｅｎ６０、Ｔｗｅｅｎ６５、Ｔｗｅｅｎ８０、Ｔｗｅｅｎ８１及びＴｗｅｅｎ８５から選択され得る。ｔｗｅｅｎ界面活性剤は、酸性組成物の約０．０１％（質量／容積）～約１．０％（質量／容積）を構成することができる。一部の実施形態では、酸性組成物は、約０．２％（質量／容積）ＳＤＳを含み、$(NH_4)_2SO_4$は、約５ｍＭ未満の濃度である。一部の実施形態では、酸性組成物は、$MgSO_4$をさらに含む。

１種又は複数種の界面活性剤は、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含むことができる。Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００界面活性剤は、酸性組成物の約０．０１％（質量／容積）～約１．０％（質量／容積）を構成することができる。一部の実施形態では、酸性組成物は、約０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含む。一部の実施形態では、酸性組成物は、約０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００及び約５ｍＭ未満の硫酸アンモニウム（$(NH_4)_2SO_4$）及び／又は硫酸マグネシウム（$MgSO_4$）を含む。一部の実施形態では、酸性組成物は

、約０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、約５ｍＭ硫酸アンモニウム（$(NH_4)_2SO_4$）及び約４ｍＭ硫酸マグネシウム（$MgSO_4$）を含む。

【０１４３】

キレーター及び還元剤

一部の実施形態では、酸性組成物は、キレート剤、還元剤又はその両方を含む。一部の実施形態では、酸性組成物は、還元剤、キレート剤又はその両方を含まない。キレート剤は、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、エチレングリコールビス（アミノエチル）Ｎ，Ｎ’－四酢酸（ＥＧＴＡ）、ニトリロ三酢酸（ＮＴＡ）、トリス、又はそれらの組合せとなり得る。二価イオン（例えば、マグネシウムイオン）－キレート剤の例は、１，２－ビス（２－アミノフェノキシ）エタン－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸、ＥＤＴＡ、エチレングリコール－ビス（２－アミノエチルエーテル）－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸、ＥＧＴＡ、１，２－ビス（ｏ－アミノフェノキシ）エタン－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－四酢酸（ＢＡＰＴＡ）、クエン酸塩を含有する緩衝液、Ｎ，Ｎ－ビス（２－（ビス－（カルボキシメチル）アミノ）エチル）－グリシン（ＤＴＰＡ）、ＮＴＡ、試料からカルシウムイオンを沈殿させる緩衝液（例えば、リン酸塩緩衝液、炭酸塩緩衝液及び炭酸水素塩緩衝液）、クエン酸及びその塩、グルコン酸及びその塩、アルカリ金属ピロリン酸塩、アルカリ金属ポリリン酸塩、ヘキサメタリン酸ナトリウム、トリエチレンテトラミン、ジエチレントリアミン、ｏ－フェナントロリン、シュウ酸、又はそれらのあらゆる組合せを含むがこれらに限定されない。還元剤は、２－メルカプトエタノール、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、ジチオエリトリトール（ＤＴＥ）、還元型グルタチオン、システアミン、トリ－ｎ－ブチルホスフィン（ＴＢＰ）、ジチオエリトリオール、トリス（３－ヒドロキシプロピル）ホスフィン（ＴＨＰＰ）、２－メルカプトエチルアミン－ＨＣｌ、ジチオブチルアミン（ＤＴＢＡ）、システイン、システイン－チオグリコレート、亜硫酸の塩、チオグリコール酸及びヒドロキシエチルジスルフィド（ＨＥＤ）、又はそれらのあらゆる組合せとなり得る。

【０１４４】

キレート剤及び／又は還元剤は、約０．１ｍＭ～約１４ｍＭの範囲内、例えば、約０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３若しくは１４ｍＭ、又はこれらの値のいずれか２種の間の数若しくは範囲の濃度で酸性組成物中に存在し得る。

【０１４５】

試薬組成物

本明細書に記載の試薬組成物（例えば、乾燥組成物）は、「乾燥形態」で、又は液体媒体に懸濁していない形態で提供することができる。組成物の「乾燥形態」としては、乾燥粉末、凍結乾燥組成物、噴霧乾燥組成物、又は沈殿組成物を挙げることができる。「乾燥形態」組成物としては、スクロース、ラクトース、トレハロース、デキストラン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、及びマンニトールなどの糖及びそれらの対応する糖アルコール；アルギニン及びヒスチジンなどのアミノ酸；$MgSO_4$などのリオトロピック塩；プロピレングリコール、グリセロール、ポリ（エチレングリコール）、又はポリプロピレングリコールなどのポリオール；及びそれらの組合せなどの１種又は複数種の凍結乾燥保護剤を挙げることができる。追加の例示的な凍結乾燥保護剤としては、ゼラチン、デキストリン、加工デンプン、及びカルボキシメチルセルロースが挙げられる。本明細書で使用される場合、「凍結乾燥」、「凍結乾燥された」、及び「フリーズドライ」という用語は、乾燥しようとする物質をまず凍結させ、次いで氷又は凍結溶媒を真空環境での昇華により除去するプロセスを指す。「凍結乾燥物」は、凍結乾燥された物質を指す。本明細書に開示される通り、乾燥組成物は、１種又は複数種の添加剤及び１種又は複数種の増幅試薬を含むことができる。本明細書に記載されている組成物（例えば、湿潤組成物）は、「湿潤形態」又は液体培地中に懸濁された形態で提供され得る。

【０１４６】

乾燥組成物は、凍結、凍結乾燥、又は噴霧乾燥されていてもよい。乾燥組成物は、加熱

乾燥されていてもよい。乾燥組成物は、１種又は複数種の添加剤（例えば、ポリマー、糖又は糖アルコール）を含んでいてもよい。糖又は糖アルコールは、スクロース、ラクトース、トレハロース、デキストラン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、又はそれらのあらゆる組合せを含んでいてもよい。ポリマーは、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルセルロース、フィコール、アルブミン、ポリペプチド、コラーゲンペプチド、又はそれらのあらゆる組合せを含んでいてもよい。１種又は複数種の添加剤は、１種又は複数種のアミノ酸を含むことができる。１種又は複数種の添加剤は、Ｔｗｅｅｎ８０、Ｔｗｅｅｎ２０及び／又はＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含むことができる。一部の実施形態では、１種又は複数種の添加剤は、反応組成物の凍結乾燥及び／又は乾燥ペレットの溶解を支援する。１種又は複数種の添加剤は、乾燥組成物（例えば、乾燥ペレット）中に約０．０１％の濃度で非イオン性デタージェントを含むことができる。

凍結若しくは凍結乾燥若しくは噴霧乾燥若しくは加熱乾燥された組成物、又は凍結若しくは凍結乾燥若しくは噴霧乾燥された組成物を調製するための水性組成物は、以下のものの１種又は複数種を含んでもよい：（ｉ）エチレングリコール、グリセロール、ジメチルスルホキシド、及びジメチルホルムアミドなどの非水性溶媒。（ｉｉ）Ｔｗｅｅｎ８０、Ｂｒｉｊ３５、Ｂｒｉｊ３０、Ｌｕｂｒｏｌ－ｐｘ、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１０；ポロキサマーとしても知られているＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ１２７（ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンコポリマー）、ポロキサミン、及びＳＤＳなどの界面活性剤。（ｉｉｉ）トレハロース、スクロース、ラクトース、及びマルトースなどのジサッカリド。（ｉｖ）ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルセルロース、フィコール、及びアルブミンなどのポリマー（異なるＭＷを有してもよい）。（ｖ）グリシン、プロリン、４－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、グルタミン酸、アラニン、リジン、サルコシン、ガンマ－アミノ酪酸などのアミノ酸。

【０１４７】

試薬組成物（例えば、乾燥組成物、湿潤組成物）は、１種又は複数種の増幅試薬を含むことができる。一部の実施形態では、試薬組成物は、還元剤、キレート剤又はその両方を含むことができる。一部の実施形態では、試薬組成物は、還元剤、キレート剤又はその両方を含まない。キレート剤は、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡ、ＮＴＡ、トリス、又はそれらのあらゆる組合せとなり得る。還元剤は、ＤＴＴ、ＴＣＥＰ、ＤＴＥ、還元型グルタチオン、システアミン、ＴＢＰ、ジチオエリトリオール、ＴＨＰＰ、２－メルカプトエチルアミン－ＨＣｌ、ＤＴＢＡ、システイン、システイン－チオグリコレート、亜硫酸の塩、チオグリコール酸、ＨＥＤ、又はそれらのあらゆる組合せとなり得る。

【０１４８】

キット

生物学的試料中のゲノムＤＮＡの等温増幅及び検出のためのキットが本明細書に提供される。一部の実施形態では、キットは、溶解性試薬、マグネシウム、及び酸又は例えば、ｐＨ２．２のグリシン／ＨＣｌなどの低ｐＨ緩衝液のいずれかを含む、酸性組成物（例えば、溶出／溶解溶液）を含有する。一部の実施形態では、キットは、プライマー、酵素、ｄＮＴＰ、検出プローブ、及び酸性組成物（例えば、溶出／溶解溶液）と混合した後に増幅に最適なｐＨを維持するのに十分な能力を有する緩衝液を含む、試薬反応成分も含む。

本明細書に開示されるものには、試料中の標的核酸配列を検出するためのキットが含まれる。一部の実施形態では、このキットは、（ａ）本明細書に提供される酸性組成物であって、酸性組成物が、生物学的実体を溶解して、それらの中に含まれる試料核酸を放出させることが可能であり、試料核酸が、標的核酸配列を含むことが疑われるｄｓＤＮＡを含み、標的核酸配列が、１００ヌクレオチド以下の長さである、酸性組成物を含む。一部の実施形態では、このキットは、（ｂ）緩衝剤、及び等温増幅条件下で標的核酸配列を増幅するための１種又は複数種の増幅試薬を含む、試薬組成物（例えば、乾燥組成物、湿潤組

成物）であって、前記１種又は複数種の増幅試薬が、（ｉ）第１のプライマー及び第２のプライマーであって、第１のプライマーが、標的核酸配列の第１の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能であり、第２のプライマーが、標的核酸配列の第２の鎖の配列にハイブリダイズすることが可能である、第１のプライマー及び第２のプライマー；並びに（ｉｉ）核酸増幅産物を生成することが可能な超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素を含む、試薬組成物を含む。

【０１４９】

緩衝剤は、ＭＥＳ、ＭＯＰＳ、ＭＯＰＳＯ、トリス、ＨＥＰＥＳ、リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、アンモニウム緩衝液、又はそれらのあらゆる組合せとなり得る。キットは、核酸増幅産物のリアルタイム検出活性を提供する少なくとも１種の成分を含んでいてもよい。リアルタイム検出活性は、分子ビーコンにより提供することができる。キットには、対照ポリヌクレオチドが含まれていてもよく、複数種の標的配列を増幅する場合、複数種の対照ポリヌクレオチドがキットに含まれていてもよい。

一部の実施形態では、超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列又はその機能的断片と少なくとも約９０％又は９５％同一であるアミノ酸配列を有する。超好熱菌ポリメラーゼ活性を有する酵素は、配列番号１のアミノ酸配列を含むポリメラーゼとなり得る。

【０１５０】

核酸増幅産物は、約２０～４０塩基長であってもよい。核酸増幅産物は、（１）第１のプライマーの配列及びその逆相補体、（２）第２のプライマーの配列及びその逆相補体、並びに（３）（１）第１のプライマーの配列及びその逆相補体及び（２）第２のプライマーの配列及びその逆相補体によりフランキングされているスペーサー配列であって、１～１０塩基長であるスペーサー配列を含んでいてもよい。

生物学的実体は、原核細胞、真核細胞、ウイルス粒子、エキソソーム、プロトプラスト、及び微小胞の１種又は複数種を含んでいてもよい。生物学的実体は、ウイルス、細菌、真菌、原生動物、それらの一部、又はそれらのあらゆる組合せを含んでいてもよい。標的核酸配列は、ウイルス、細菌、真菌、又は原生動物の核酸配列であってもよい。試料核酸は、本明細書に開示されるウイルス、細菌、真菌又は原生動物に由来し得る。

第１のプライマー及び／又は第２のプライマーは、約８～１６塩基長となり得る。第１のプライマー及び／又は第２のプライマーは、ＤＮＡ塩基、修飾ＤＮＡ塩基、又はそれらの組合せの１種又は複数種を含むことができる。

【０１５１】

試薬組成物（例えば、乾燥組成物）は、凍結乾燥及び／又は加熱乾燥されていてよく、１種又は複数種の添加剤を含むことができる。１種又は複数種の添加剤は、アミノ酸；糖又は糖アルコールを含む。糖又は糖アルコールは、スクロース、ラクトース、トレハロース、デキストラン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、又はそれらのあらゆる組合せを含んでいてもよい。１種又は複数種の添加剤は、ポリマーを含むことができる。ポリマーは、ポリエチレングリコール、デキストラン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルセルロース、フィコール、アルブミン、ポリペプチド、コラーゲンペプチド、又はそれらのあらゆる組合せを含んでいてもよい。

酸性組成物及び試薬組成物の混合物は、約７～約９のｐＨ、例えば、約８．８のｐＨを有することができる。一部の実施形態では、試料、酸性組成物及び試薬組成物の混合物は、約７～約９のｐＨ、例えば、約８．８のｐＨを有する。緩衝剤は、トリスを含むことができる。試料、酸性組成物及び試薬組成物の混合物は、約３０ｍＭトリス～約５０ｍＭトリスの範囲内の濃度でトリスを含むことができる。キットは、酸性組成物及び試薬組成物を収容する無菌容器を含むことができる。

【０１５２】

また、キットは、あらゆる数の別々のベッセル、チャンバー、容器、パケット、チューブ、バイアル、及びマイクロタイタープレートなど中に成分の１種又は複数種を含んでい

てもよく、又は成分をそのような容器中で種々の組合せで一緒にしてもよい。キットの成分は、例えば、１つ又は複数の容器に存在してもよい。一部の実施形態では、成分のすべてが１つの容器に提供されている。一部の実施形態では、酵素（例えば、ポリメラーゼ及び／又は逆転写酵素）は、プライマーとは別々の容器に提供されていてもよい。成分は、例えば、凍結乾燥されていてもよく、加熱乾燥されていてもよく、フリーズドライされていてもよく、又は安定緩衝液中に存在してもよい。一部の実施形態では、ポリメラーゼ及び／又は逆転写酵素は、単一の容器中に凍結乾燥形態又は加熱乾燥形態で存在し、プライマーは、異なる容器において、凍結乾燥されているか、加熱乾燥されているか、フリーズドライされているか、又は緩衝液中に存在するかのいずれかである。一部の実施形態では、ポリメラーゼ及び／又は逆転写酵素並びにプライマーは、単一の容器中に凍結乾燥形態又は加熱乾燥形態で存在する。

【０１５３】

キットは、反応に使用されるｄＮＴＰ、又は反応に使用される修飾ヌクレオチド、ベッセル、キュベット、若しくは他の容器、又は凍結乾燥若しくは加熱乾燥された成分を再水和するための水若しくは緩衝液のバイアルをさらに含んでいてもよい。使用される緩衝液は、例えば、ポリメラーゼ活性及びプライマーアニーリング活性の両方に適したものであってもよい。

また、キットは、本明細書に記載の１つ若しくは複数の方法を実施するための使用指示書、及び／又は本明細書に記載の１種若しくは複数種の成分の説明書を含んでいてもよい。使用指示書及び／又は説明書は印刷物の形態であってもよく、キット添付文書に含まれていてもよい。また、キットは、そのような使用指示書又は説明書を提供するインターネット上の場所の書面による記載を含んでいてもよい。

キットは、検出法に使用される試薬、例えば、ＦＲＥＴ、側方流動デバイス、ディップスティック、蛍光色素、コロイド金粒子、ラテックス粒子、分子ビーコン、又はポリスチレンビーズに使用される試薬をさらに含んでいてもよい。

【実施例】

【０１５４】

上記で考察されている実施形態の一部の態様を、以下の実施例においてさらに詳細に開示するが、これらはいかなる点でも本開示の範囲を限定することを意図するものではない。

（実施例１）

酸性溶液におけるＤＮＡ解離の研究

この実施例は、本明細書に開示される増幅及び検出方法による使用のための、本明細書に提供される酸性組成物におけるｄｓＤＮＡ分離を実証する。

ＡＰＡ増幅のためのｇＤＮＡの解離のための低ｐＨ溶液の使用を調査した。図１Ａは、標的ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）が、２分間７８℃においてＴＥ溶液（１０ｍＭトリス、ｐＨ８．０、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ）中でプレインキュベートされ、次いで冷却され、マスターミックスに添加された、実験の結果を示す。酸性成分の非存在下では、５／６個の曲線のみが、２００コピー（ｃｐｓ）／反応の標的インプットで増幅を示し、２／６個の曲線のみが、反応当たり５０コピーについて増幅を得た。図１Ｂは、標的ｇＤＮＡが、２分間７８℃において酸性溶液（５ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、４ｍＭ　$MgSO_4$、０．１％Ｔｘ－１００及び１０ｍＭ　ＨＣｌ）中でプレインキュベートされ、次いで冷まされ、マスターミックスに添加された、実験の結果を示す。この方法は、５コピーに至るまで優れた検出を生じることが見出された。

【０１５５】

Ｎ．ゴノレア（Ｎｇ）ｇＤＮＡ検出に対するプレインキュベーション温度の効果を調査した（図２）。検査は、増幅前の２分間にわたる酸性溶液（５ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、４ｍＭ　$MgSO_4$、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００及び１０ｍＭ　ＨＣｌ）中での５０コピーのＮｇ　ｇＤＮＡのインキュベートについて加熱ありｖｓ．加熱なしを比較した。結果は、初期予熱が、酸性溶液におけるＤＮＡ解離に必要でないことを示す。実際に

、単なる室温でのｇＤＮＡのプレインキュベートは、効果を知るのに十分であることが見出された。

次に、湿潤反応における（図３Ａ～図３Ｂ）、また、乾燥反応成分との混合前の（図４Ａ～図４Ｂ）、Ｎ．ゴノレア（Ｎｇ）ｇＤＮＡ検出に対する溶出緩衝液ｐＨの効果を調査した。Ｎ．ゴノレア（Ｎｇ）ｇＤＮＡを、１０分間６８℃の湿潤反応における古細菌ポリメラーゼ増幅（ＡＰＡ）前に、酸性溶液（５ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、４ｍＭ　$MgSO_4$、０．１％Ｔｘ－１００及び１０ｍＭ　ＨＣｌ；図３Ｂ）又は対照溶液（ＴＥ；ｐＨ８；１０ｍＭトリス、ｐＨ８．０、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ；図３Ａ）のいずれかに希釈した。Ｎ．ゴノレア（Ｎｇ）ｇＤＮＡを、１０分間にわたる６８℃における増幅のためにｐＨ８．８のトリス緩衝液を含有する乾燥反応成分と混合する前に、室温で中性ｐＨ溶出緩衝液（５ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、４ｍＭ　$MgSO_4$及び０．２％ＳＤＳ；図４Ａ）又は酸性溶出緩衝液（５ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、４ｍＭ　$MgSO_4$、１０ｍＭグリシン／８．８ｍＭ　ＨＣｌ（グリシン／ＨＣｌ緩衝液）及び０．２％ＳＤＳ；図４Ｂ）に希釈した。

【０１５６】

Ｎ．ゴノレア（Ｎｇ）ｇＤＮＡ安定性に対する温度及びｐＨの効果も調査した。反応当たり５０００ｃｐｓのＮｇ　ｇＤＮＡを、１５分間にわたる６８℃における増幅のためにｐＨ８．８のトリス緩衝液を含有する増幅成分と混合する前に、７８℃（図５Ｂ）又は室温（図５Ａ）で２分間ｖｓ．１時間、酸性溶液（５ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、４ｍＭ　$MgSO_4$、０．１％Ｔｘ－１００及び１０ｍＭ　ＨＣｌ）又はＴＥ溶液（ｐＨ８；１０ｍＭトリス、ｐＨ８．０、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ）中でインキュベートした。

次に、１０％尿マトリックスにおけるＮ．ゴノレア（Ｎｇ）ｇＤＮＡ安定性に対する温度及びｐＨの効果を調査した。反応当たり５０００コピーのＮｇ　ｇＤＮＡを、１５分間にわたる６８℃における増幅のためにトリス緩衝液（ｐＨ８．８）を含有する増幅成分と混合する前に、７８℃（図６Ａ）又は室温（ＲＴ；図６Ｂ）で２分間又は１時間、１０％尿を含有する酸性溶液（５ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、４ｍＭ　$MgSO_4$、０．１％Ｔｘ－１００及び８．８ｍＭ　ＨＣｌ）又はＴＥ溶液（１０ｍＭトリス、ｐＨ８．０、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ）中でインキュベートした。

【０１５７】

乾燥反応フォーマットにおけるＮ．ゴノレア（Ｎｇ）ｇＤＮＡ安定性に対する温度及びｐＨの効果も調査した（図７）。反応当たり５０００コピーのＮｇ　ｇＤＮＡを、１５分間にわたる６８℃における増幅のために乾燥反応成分と混合する前に、７８℃又は室温で２分間ｖｓ．１時間、酸性溶液（５ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、４ｍＭ　$MgSO_4$、１０ｍＭグリシン／８．８ｍＭ　ＨＣｌ（グリシン／ＨＣｌ緩衝液）及び０．２％ＳＤＳ）中でインキュベートした。凍結乾燥（ｌｙｏ）ペレットは、ｐＨ８．８のトリス緩衝液を含有した。

まとめると、これらの結果は、古細菌ポリメラーゼ増幅における初期ステップとしての低ｐＨ溶液へのゲノムＤＮＡの曝露が、一般に信じられているように増幅に有害な影響を与えることがないという驚くべき知見を生じる。したがって、本明細書に提供される方法、組成物及びキットは、臨床試料におけるＤＮＡ病原体についてのポイントオブケア分子診断法を有利に提供することができる。病原体溶解後に、ゲノムＤＮＡ鎖は、別々の熱的又は酵素的ステップに対する必要性がなく分離され得る。

【０１５８】

（実施例２）

ｇＤＮＡ検出のためのアッセイＬＯＤにおける改善

この実施例は、開示されている方法及び組成物を使用して、ｇＤＮＡの検出のためのアッセイの検出限界（ＬＯＤ）を改善するためのアプローチを提供する。

一部の実施形態では、乾燥フォーマットにおける現在の検出限界（ＬＯＤ）は、標準ｄＮＴＰと共に凍結乾燥されたＣ．トラコマティス（Ｃ．ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）／Ｎ．ゴノレア（Ｃｔ／Ｎｇ）について＞５０コピーのｇＤＮＡである。いかなる特定の理論に制約されることもないが、低ＬＯＤの達成は、再懸濁緩衝液におけるｇＤＮＡの不安定化

を含むことができ、実施形態は、Mg^{2+}及び一価塩の効果の限定、並びに＞９．５へのｐＨの増加又は＜４へのｐＨの減少が関与し得る。本明細書に提供される方法及び組成物の一部の実施形態は、再懸濁緩衝液安定性、高ｐＨ溶液中の場合はＭｇ２＋沈殿、及び再懸濁緩衝液（例えば、５ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、４ｍＭ　$MgSO_4$、０．２％ＳＤＳ（７ｍＭ　Na^+、７ｍＭ　DS^-））中に既に低塩が存在し得るという事実など、様々な問題点を克服することができる。

ＤＮＡ二重鎖安定性に影響を与えると同定された因子は、一部の実施形態では、％ＧＣ、ｄｓＤＮＡの長さ、配列依存、マグネシウム及び一価カチオンの効果（例えば、典型的なＰＣＲ条件下でのＴｍにおける一価カチオンを上回るMg^{2+}優占、１Ｍ　Na^+に等しい１０ｍＭ　Mg^{2+}、５ｍＭ　Na^+に等しい１０ｍＭトリス）、極端なｐＨ、並びに添加剤を含む。

【０１５９】

ｐＨの関数としてのλＤＮＡ（４８５０２ｂｐ）の非限定的で例示的な融解曲線を示す図８（Biophys J. 2001 Feb; 80(2): 874-881. Effect of pH on the overstretching transition of double-stranded DNA: evidence of force-induced DNA meltingから適応）から分かる通り、極端なｐＨ（＞ｐＨ９．７及び＜ｐＨ３．９）における有意なＴｍ減少が観察される。本明細書に提供される一部の実施形態では、低ｐＨは、λＤＮＡ融解について高ｐＨよりも有効である。一部の実施形態では、ＬＯＤは、低ｐＨ　ＲＢＳ（ＲＢＳ／１０ｍＭ　ＨＣｌ、ｐＨ２～３）と比較して、再懸濁緩衝液、例えば、再懸濁緩衝液ＲＢＳ（５ｍＭ　$(NH_4)_2SO_4$、４ｍＭ　$MgSO_4$、０．２％ＳＤＳ、ｐＨほぼ７）におけるｐＨを低減させることにより改善され得る。ＲＢＳ／１０ｍＭ　ＨＣｌの見かけ上の沈殿は、室温で３日間にわたり観察されなかった。本明細書に提供される組成物及び方法の実施形態は、プロトン及びMg^{2+}間の競合（例えば、低ｐＨ溶液においてＤＮＡ解離を阻害するMg^{2+}）並びに低ｐＨ溶液におけるＤＮＡ脱プリン化のスピード及び程度などの生じ得る問題点に取り組むように最適化され得る。

【０１６０】

前述の実施形態の少なくとも一部では、ある実施形態で使用された１種又は複数種の要素は、そのような置き換えが技術的に実行不可能でない限り、別の実施形態で互換的に使用することができる。当業者であれば、特許請求されている主題の範囲から逸脱することなく、上記に記載の方法及び構造に対して、種々の他の省略、追加、及び改変をなすことができることを理解するだろう。そのような改変及び変更はすべて、添付の特許請求の範囲により規定される主題の範囲内に入ることが意図されている。

本明細書における実質的にあらゆる複数及び／又は単数の用語の使用に関して、当業者であれば、状況及び／又は応用に応じて、複数から単数へと及び／又は単数から複数へと言い換えることができる。明確性のため、種々の単数／複数の入れ替えは、本明細書では明示的に記載されている場合がある。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、状況が明らかに別様に指示しない限り、複数の参照を含む。本明細書における「又は」へのあらゆる言及は、別様の記載のない限り、「及び／又は」を包含することが意図されている。

【０１６１】

当業者であれば、一般に、本明細書及び特に添付の特許請求の範囲（例えば、添付の特許請求の範囲の本文）で使用されている用語は、一般に「オープン」用語（例えば、「含むこと（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」という用語は「含むが、それに限定されない」と解釈されるべきであり、「有すること（ｈａｖｉｎｇ）」という用語は「少なくとも有する」と解釈されるべきであり、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」という用語は「含むが、それに限定されない」と解釈されるべきである、など）であることが意図されていることを理解するだろう。さらに、当業者であれば、導入された請求項記載において特定の数が意図されている場合、そのような意図は請求項に明示的に記載されることになり、そのような記載がない場合にはそのような意図は存在しないことが理解されるであろう。例えば、理解を助けるために、以下の添付の特許請求の範囲には、請求項記載を導入するために「少なく

とも１つ」及び「１つ又は複数」という導入語句の使用を含む場合がある。しかしながら、そのような語句の使用は、同じ請求項が、「１つ又は複数」又は「少なくとも１つ」という導入語句、及び「ａ」又は「ａｎ」などの不定冠詞を含む（例えば、「ａ」及び／又は「ａｎ」は「少なくとも１つ」又は「１つ又は複数」を意味すると解釈されるべきである）場合であっても、不定冠詞「ａ」又は「ａｎ」による請求項記載の導入が、そのような導入された請求項記載を含むあらゆる特定の請求項を、１つのみのそのような記載を含む実施形態に限定することを意味するものであると解釈されるべきではない。請求項記載を導入するために使用される定冠詞の使用にも同じことが当てはまる。加えて、導入された請求項記載において特定の数が明示的に記載されている場合であっても、当業者であれば、そのような記載は、少なくとも記載された数を意味すると解釈されるべきであることを認識するであろう（例えば、「２つの記載」の基本記載は、他の修飾語がない場合、少なくとも２つの記載、又は２つ若しくはそれよりも多くの記載を意味する）。さらに、「Ａ、Ｂ、及びＣなどの少なくとも１つ」と類似する慣例が使用される場合、一般に、そのような構成は、当業者であればその慣例を理解するだろうという意味で意図されている（例えば、「Ａ、Ｂ、及びＣの少なくとも１つを有する系」は、Ａのみ、Ｂのみ、Ｃのみ、Ａ及びＢを共に、Ａ及びＣを共に、Ｂ及びＣを共に、並びに／又はＡ、Ｂ、及びＣを共に有する系などを含むが、それらに限定されないだろう）。「Ａ、Ｂ、又はＣなどの少なくとも１つ」と類似する慣例が使用される場合では、一般に、そのような構成は、当業者であればその慣例を理解するだろうという意味で意図されている（例えば、「Ａ、Ｂ、又はＣの少なくとも１つを有する系」は、Ａのみ、Ｂのみ、Ｃのみ、Ａ及びＢを共に、Ａ及びＣを共に、Ｂ及びＣを共に、並びに／又はＡ、Ｂ、及びＣを共に有する系などを含むが、それらに限定されないだろう）。さらに、当業者であれば、明細書、特許請求の範囲、又は図面のいずれにおいても、２つ又はそれよりも多くの代替用語を提示する事実上あらゆる選言的な単語及び／又は語句は、そうした用語、そうした用語のいずれか、又は両用語の１つを含む可能性を企図すると理解されるべきであることを理解するだろう。

【０１６２】

加えて、本開示の特徴又は態様がマーカッシュ群の観点で記載されている場合、当業者であれば、それにより本開示が、マーカッシュ群のあらゆる個々のメンバー又はメンバーの部分群の観点でも記載されていることを認識するだろう。

当業者であれば理解することになるように、書面による説明を提供するという観点など、ありとあらゆる目的のために、本明細書に開示のすべての範囲は、ありとあらゆる考え得る部分範囲及びそれらの部分範囲の組合せも包含する。列挙されている範囲はいずれも、十分に説明されているように、同じ範囲を少なくとも二等分、三等分、四等分、五等分、十等分などに分割することができるものであると容易に認識することができる。非限定的な例として、本明細書で考察されている各範囲は、下位三分の一、中位三分の一、及び上位三分の一などに容易に分割することができる。また、当業者であれば理解することになるように、「～まで」、「少なくとも」、「よりも大きい」、及び「未満」などのすべての文言は、記載されている数値を含み、上記で考察されているように後に部分範囲へと分割することができる範囲を指す。最後に、当業者であれば理解することになるように、範囲は、各々個々のメンバーを含む。したがって、例えば、１～３つの項目を含む群は、１、２、又は３つの項目を含む群を指す。同様に、１～５つの項目を含む群は、１、２、３、４、又は５つの項目を含む群を指す、などである。

【０１６３】

種々の態様及び実施形態が本明細書に開示されているが、当業者であれば、他の態様及び実施形態は明らかであろう。本明細書で開示される種々の態様及び実施形態は、例示を目的とするものであり、限定を意図するものではなく、真の範囲及び趣旨は以下の特許請求の範囲により示される。

【図面】

【図１Ａ】

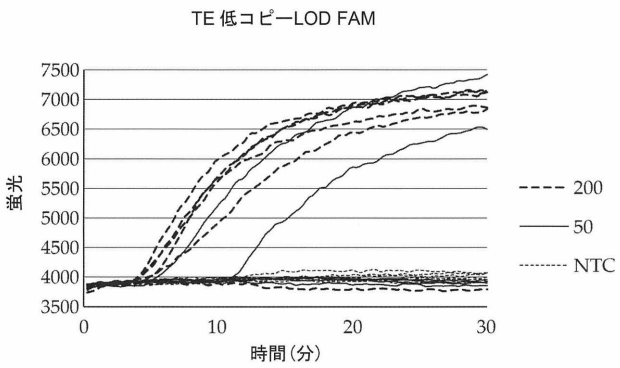

FIG. 1A

【図１Ｂ】

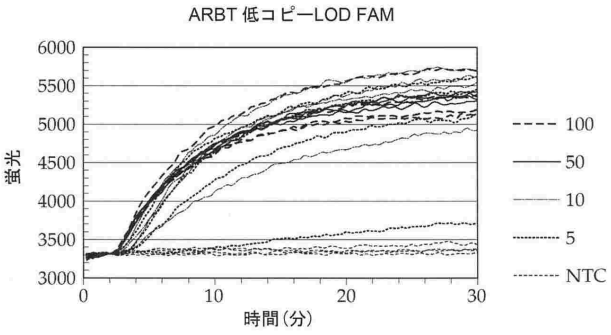

FIG. 1B

【図２】

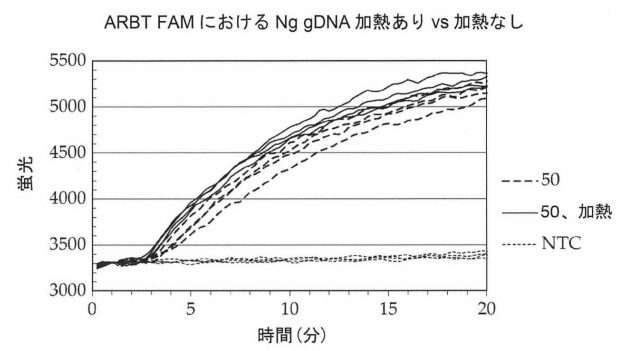

FIG. 2

【図３Ａ】

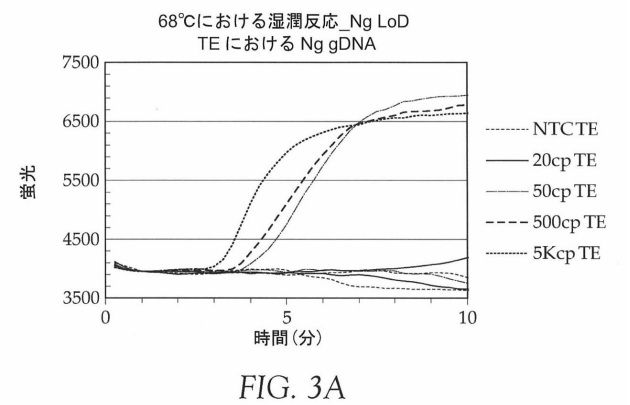

FIG. 3A

【図３Ｂ】

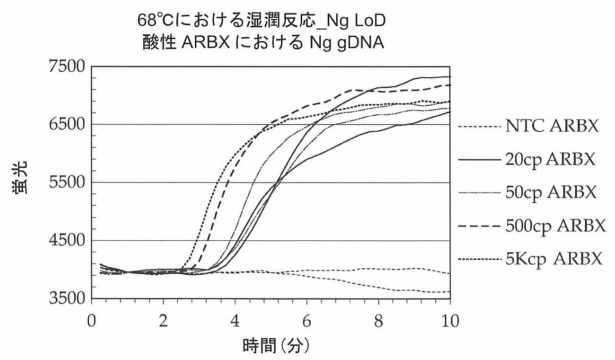

FIG. 3B

【図４Ａ】

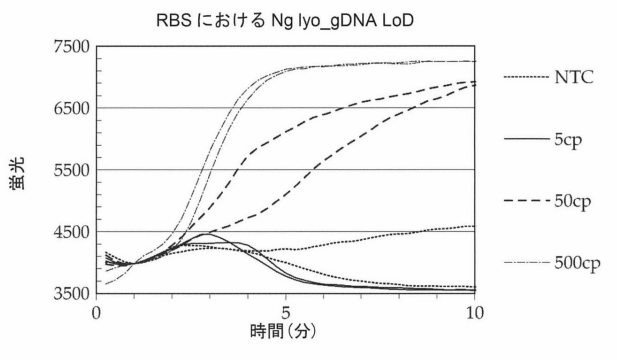

FIG. 4A

【図４Ｂ】

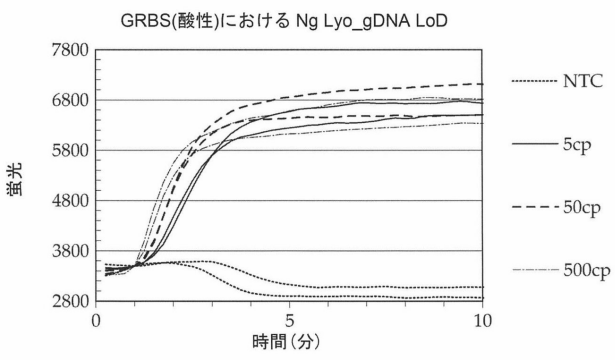

FIG. 4B

【図５Ａ】

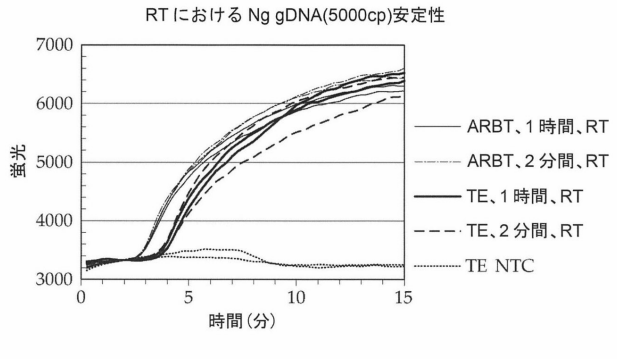

FIG. 5A

【図５Ｂ】

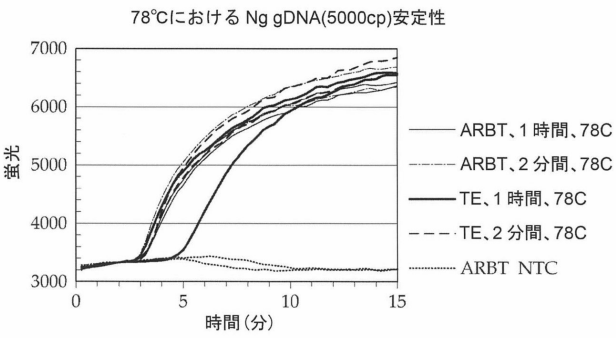

FIG. 5B

【図６Ａ】

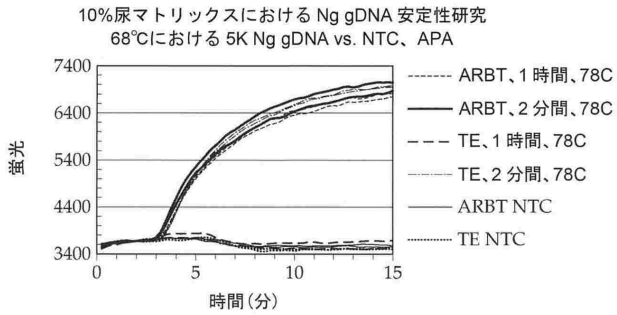

FIG. 6A

【図６Ｂ】

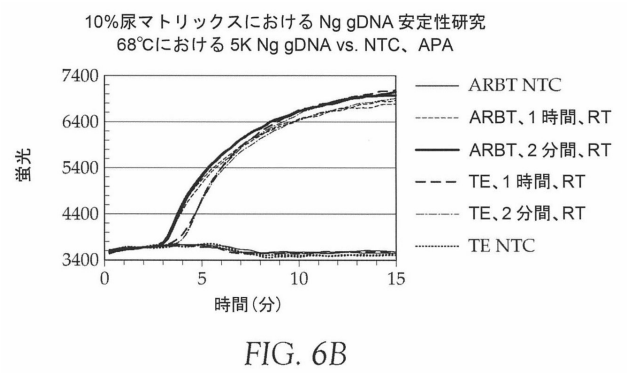

FIG. 6B

【図７】

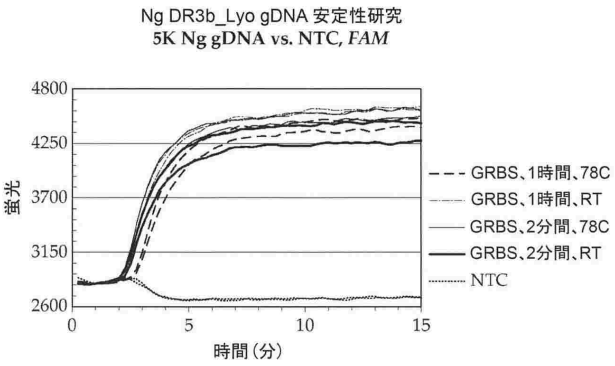

FIG. 7

【図８】

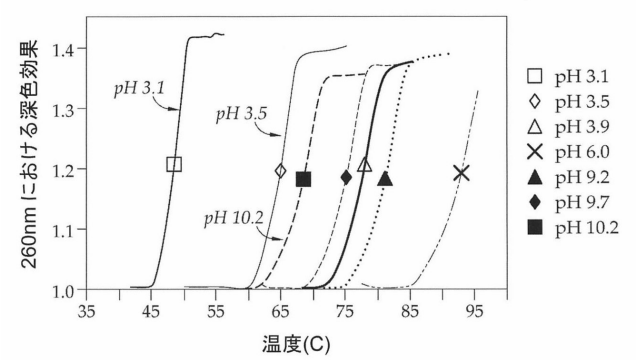

FIG. 8

【配列表】

<u>２０２５０７２７０００００１．ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/061978

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6806 C12Q1/6844
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, Sequence Search, 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.
Y	WO 2011/098085 A1 (CHEMOMETEC AS [DK]; KJAERULFF SOEREN [DK]; GLENSBJERG MARTIN [DK]) 18 August 2011 (2011-08-18) the whole document	1-85
Y	WO 2005/093065 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH] ET AL.) 6 October 2005 (2005-10-06) the whole document	1-85
Y	WO 2010/015835 A1 (DIAGNOSTICS FOR THE REAL WORLD [US]; CHUA YII LENG [GB] ET AL.) 11 February 2010 (2010-02-11) the whole document	1-85
Y	US 2020/255885 A1 (MILLER ANDREW P [US] ET AL) 13 August 2020 (2020-08-13) the whole document	1-85

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] 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	Date of mailing of the international search report
11 May 2023	23/05/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Botz, Jürgen

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/061978

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2022/198086 A1 (BECTON DICKINSON CO [US]) 22 September 2022 (2022-09-22) the whole document	1-85
A	US 2008/128298 A1 (BORNARTH CAROLE [US] ET AL) 5 June 2008 (2008-06-05) the whole document	1-85
Y	CN 106 867 998 A (AUTOBIO DIAGNOSTICS CO LTD) 20 June 2017 (2017-06-20) the whole document	1-85
X	DATABASE ChemoMetec A/S [Online] ChemoMetec A/S; 26 January 2021 (2021-01-26), Chemometec A/s: "910-0010 Lysis 1 - Acidic Lysis buffer 100 ml Contents", XP93045327, Database accession no. Doc.No: 992-0041 v1.1 the whole document	55-62
T	TOM KILLELEA ET AL: "PCR performance of a thermostable heterodimeric archaeal DNA polymerase", FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, vol. 5, 7 May 2014 (2014-05-07), XP055468461, DOI: 10.3389/fmicb.2014.00195 the whole document	1-85
T	COOPER CHRISTOPHER D.O.: "Archaeal DNA polymerases: new frontiers in DNA replication and repair", EMERGING TOPICS IN LIFE SCIENCES, [Online] vol. 2, no. 4, 14 November 2018 (2018-11-14), pages 503-516, XP93044995, ISSN: 2397-8554, DOI: 10.1042/ETLS20180015 Retrieved from the Internet: URL:https://portlandpress.com/emergtoplifesci/article-pdf/2/4/503/484023/etls-2018-0015c.pdf> the whole document	1-85
A	WO 2021/204701 A1 (BAYER AG [DE]) 14 October 2021 (2021-10-14) the whole document	1-85
X	WO 2021/021522 A1 (BECTON DICKINSON CO [US]) 4 February 2021 (2021-02-04) the whole document	55-62

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/061978

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. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/061978

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011098085 A1	18-08-2011	CN 102971617 A	13-03-2013
		EP 2534463 A1	19-12-2012
		US 2013045485 A1	21-02-2013
		WO 2011098085 A1	18-08-2011
WO 2005093065 A1	06-10-2005	NONE	
WO 2010015835 A1	11-02-2010	AU 2009278915 A1	11-02-2010
		AU 2016203697 A1	23-06-2016
		EP 2329019 A1	08-06-2011
		ES 2469816 T3	20-06-2014
		JP 6125752 B2	10-05-2017
		JP 6571544 B2	04-09-2019
		JP 2011530278 A	22-12-2011
		JP 2016082980 A	19-05-2016
		JP 2018042565 A	22-03-2018
		US 2011257386 A1	20-10-2011
		US 2017037394 A1	09-02-2017
		WO 2010015835 A1	11-02-2010
US 2020255885 A1	13-08-2020	US 2020255885 A1	13-08-2020
		US 2020332340 A1	22-10-2020
WO 2022198086 A1	22-09-2022	NONE	
US 2008128298 A1	05-06-2008	US 2003228613 A1	11-12-2003
		US 2008128298 A1	05-06-2008
CN 106867998 A	20-06-2017	NONE	
WO 2021204701 A1	14-10-2021	CA 3179525 A1	14-10-2021
		CN 115605609 A	13-01-2023
		EP 4133101 A1	15-02-2023
		KR 20220164716 A	13-12-2022
		WO 2021204701 A1	14-10-2021
WO 2021021522 A1	04-02-2021	AU 2020323881 A1	03-03-2022
		CA 3148761 A1	04-02-2021
		CN 114341352 A	12-04-2022
		EP 4004203 A1	01-06-2022
		JP 2022543209 A	11-10-2022
		KR 20220037475 A	24-03-2022
		US 2022145373 A1	12-05-2022
		WO 2021021522 A1	04-02-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12Q	*1/6888(2018.01)*	C12Q	1/6888	Z	
C12Q	*1/6895(2018.01)*	C12Q	1/6895	Z	
G01N	*33/53 (2006.01)*	G01N	33/53	M	
C12N	*9/12 (2006.01)*	C12N	9/12		
C12N	*15/11 (2006.01)*	C12N	15/11	Z	

,MC,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

２．ＴＲＩＴＯＮ

３．ＢＲＩＪ

４．ＰＬＵＲＯＮＩＣ

弁理士　市川 さつき

(74)代理人　100111796

弁理士　服部 博信

(74)代理人　100123766

弁理士　松田 七重

(72)発明者　チャン ホンファ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２１ サン ディエゴ トレヤナ ロード １１０１１

(72)発明者　コスロヴァー ダニエル ジェイコブ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２１ サン ディエゴ トレヤナ ロード １１０１１

Ｆターム（参考）　4B063　QA20 QQ03 QQ06 QQ07 QQ10 QQ42 QQ53 QR08 QR50 QR52 QR54 QR55 QR62 QR90 QS25 QS26 QS34 QS36 QX02