

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成20年9月11日(2008.9.11)

【公表番号】特表2008-510455(P2008-510455A)

【公表日】平成20年4月10日(2008.4.10)

【年通号数】公開・登録公報2008-014

【出願番号】特願2007-523157(P2007-523157)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/48 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

G 0 1 N 21/78 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 Q 1/48 Z

C 1 2 N 15/00 A

G 0 1 N 21/78 C

【手続補正書】

【提出日】平成20年7月28日(2008.7.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中に存在するテンプレート核酸の量を決定するための方法であって、以下のステップを含む方法：

i) 試料を、以下を含む、核酸増幅に必要な全ての成分および核酸増幅の生物発光アクセイに必要な全ての成分と接触させるステップ；

a) 核酸ポリメラーゼ、

b) 核酸ポリメラーゼの基質、

c) 少なくとも二つのプライマー、

d) 耐熱性ルシフェラーゼ、

e) ルシフェリン、

f) PPiをATPに変換する酵素であって、ATPスルフィラーゼではないもの、および

g) 項目f)の酵素の、他の必要な基質または補因子

そして次に、

ii) テンプレート核酸の核酸増幅反応を実行するステップであって、ここで生じた核酸コピーそれ自体がさらにコピーされるステップ、

iii) 生物発光反応からの光出力の強さをモニターするステップ、および

iv) 試料中に存在するテンプレート核酸の量を決定するステップ。

【請求項2】

少なくともステップii)およびステップiii)が密封された容器内で行なわれる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

ステップiii)において、光出力の強さが核酸増幅反応中にモニターされる、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ iii) が、時間の関数としての光出力の強さのデータセットを生成させることをさらに含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ ii) の核酸増幅反応の開始時に試料中に存在するテンプレート核酸の量を決定するための、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ ii) の核酸増幅反応の結果として試料中に存在するテンプレート核酸の量を決定するための、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

存在するテンプレート核酸の量が、光出力の強さの変化率が有意に変化する点に到達するのに要する時間をデータセットから測定することによって決定される、請求項4~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

存在するテンプレート核酸の量が、光出力の強さが増加し始める点に到達するのに要する時間をデータセットから測定することによって決定される、請求項5~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

存在するテンプレート核酸の量が、光出力の強さが最大である点に到達するのに要する時間をデータセットから測定することによって決定される、請求項5~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

存在するテンプレート核酸の量が、光出力の強さの減少率が増加する点に到達するのに要する時間をデータセットから測定することによって決定される、請求項5~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

存在するテンプレート核酸の量が、光出力の強さの減少率が減少する点に到達するのに要する時間をデータセットから測定することによって決定される、請求項5~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

存在するテンプレート核酸の量が、光出力の強さが所定のレベルに到達する点または所定のレベルを横切る点に到達するのに要する時間をデータセットから測定することによって決定される、請求項5~7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

ステップ iv) が、光出力の強さを、試料が既知量のテンプレート核酸を含む対照からの光出力の強さと比較することをさらに含む、請求項1~12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

テンプレート核酸が試料中に存在するかどうかを決定するための、請求項1~13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

テンプレート核酸が試料中に存在しないかどうかを決定するための、請求項1~13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

テンプレート核酸が試料中に存在するかどうか、または存在しないかどうかが、光出力の強さが所定のレベルに到達するかどうかまたは所定のレベルを横切るかどうかをデータセットから測定することによって決定される、請求項14または15に記載の方法。

【請求項 17】

所定のレベルと比較した光出力の強さの増加が、試料中にテンプレート核酸が存在することを示す、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

所定のレベルと比較した光出力の強さの減少が、試料中にテンプレート核酸が存在することを示す、請求項16に記載の方法。

【請求項19】

テンプレート核酸が試料中に存在するかどうか、または存在しないかが、光出力の強さが、ステップii)の増幅反応の開始後、所定の時間内に、所定のレベルに到達するかどうかまたは所定のレベルを横切るかどうかを、データセットから測定することによって決定される、請求項16~18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

ステップiv)が、光出力の強さを、増幅が起こっていない対照からの光出力の強さと比較することをさらに含む、請求項1~19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

増幅が起こっていない対照反応と比較した光出力の強さの減少が、試料中にテンプレート核酸が存在することを示す、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

ステップii)の核酸増幅反応が、サイクリング温度範囲が75 を超えない低温サーモサイクリング増幅法である、請求項1~21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

ステップii)の核酸増幅反応が等温的に行なわれる、請求項1~21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

ステップii)の核酸増幅反応が、75 を超えない温度範囲内で行なわれる、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

ステップii)の核酸増幅反応が、増幅反応および生物発光アッセイの成分が安定であるような一定温度で行なわれる、請求項23または請求項24に記載の方法。

【請求項26】

ステップii)の核酸増幅反応が、増幅反応および生物発光アッセイの成分が安定であるような温度範囲内の二以上の温度で行なわれる、請求項23または請求項24に記載の方法。

【請求項27】

ステップii)の核酸増幅反応が高温で開始された後、低温に下げられる、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

医学的診断に使用するための、請求項1~27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

病原体が試料中に存在するかどうかの決定に使用するための、請求項1~28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

ある特定核酸配列が、ある生物の遺伝暗号中に存在するかどうかを決定するための、請求項1~29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

テンプレート核酸が由来する核酸が遺伝子改変されているかどうかを決定するための、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

ある生物が試料中に存在するかどうかを決定するための、請求項1~27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】

イムノ核酸増幅技術で使用するための、請求項1~27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

核酸ポリメラーゼ、核酸ポリメラーゼの基質、少なくとも二つのプライマー、耐熱性ルシフェラーゼ、ルシフェリン、PPiをATPに変換する酵素であってATPスルフィラーゼでは

ないもの、該酵素の、他の必要な基質または補因子、および適切な緩衝液を含む、請求項1~33のいずれか一項に記載の方法で使用するためのキット。

【請求項35】

a) 核酸ポリメラーゼ、 Mg^{2+} 源およびdNTP類の緩衝混合物、ならびに
b) ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびPPiをATPに変換する酵素であってATPスルフィラーゼではないものをそれぞれ含有する容器を含む、請求項1~33のいずれか一項に記載の方法で使用するためのキット。

【請求項36】

キットの成分の少なくとも一つがキットでの貯蔵に適した形態をとっている、請求項34または請求項35に記載のキット。

【請求項37】

請求項34~36のいずれか一項に記載のキット中に存在する成分を組み込んだ、請求項1~33のいずれか一項に記載の方法を実行するための装置。

【請求項38】

トラコマクラミジアが試料中に存在するかどうかを決定するための、請求項32に記載の方法。

【請求項39】

PPiをATPに変換する酵素がピルビン酸オルトリン酸ジキナーゼ（PPDK）であり、酵素の基質がホスホエノールピルビン酸およびAMPである、請求項1~33および38のいずれか一項に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

本発明は、試料中に存在するテンプレート核酸の量を決定するための方法であって、

i) 試料を、

- a) 核酸ポリメラーゼ、
- b) 核酸ポリメラーゼの基質、
- c) 少なくとも二つのプライマー、
- d) 耐熱性ルシフェラーゼ、
- e) ルシフェリン、

f) PPiをATPに変換する酵素であって、ATPスルフィラーゼではないもの、および

g) 項目f)の酵素の、他の任意の必要な基質または補因子

を含む、核酸増幅に必要な成分の全ておよび核酸増幅の生物発光アッセイに必要な成分の全てと接触させるステップ、そして次に、

ii) テンプレート核酸の核酸増幅反応を実行するステップであって、ここで生じた核酸コピーそれ自体がさらにコピーされるステップ、

iii) 生物発光アッセイからの光出力の強さをモニターするステップ、および

iv) 試料中に存在するテンプレート核酸の量を決定するステップ

を含む方法を提供する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0087

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0087】

本発明方法のさらにもう一つの用途は、ある特定の核酸配列が、ある生物の遺伝暗号中

に存在するかどうかを決定することである。例えば、テンプレート核酸が由来する核酸が遺伝子改変されているかどうかを決定するために、または特定の非遺伝子改変植物品種もしくは遺伝子改変植物に関連するDNAを検出するために、または動物の血統に関連するDNAを検出するために、または遺伝子検査もしくは法医学などの医学的もしくは獣医学的診断用途のために、使用することができるだろう。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0132

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0132】

結果

この温度変化法から得られた生データを図10に示す。図10に示すデータは、この温度変化法が、温度を低下させたときに実際に光放射強度の増加をもたらすことを示している。さらに、ピーク光放射までの時間が依然として出発テンプレートDNA量の関数であるという点で、LAMPはその定量性を保っている。図10を、等価な量の標的テンプレートをLAMPで、ただし55の単一温度で試験する図5と比較すると、テンプレート量が最も多い試料（合計0.4ng/20pg/ μ l）とテンプレート量が最も少ない試料（合計0.4pg/0.02pg/ μ l）の間の時間差が約8分であるのに対して、図10に示す温度変化法では、時間差が約14分であることがわかる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0140

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0140】

dATPによって刺激された生物発光に起因する光を除去するためのフィルターの使用

ピロリン酸アッセイ緩衝液（PAB）を以下のように調合した：

【表4】

0.1M	トリス-酢酸塩 (pH7.75)	Sigma
2mM	EDTA	"
10mM	酢酸マグネシウム	"
0.1%	ウシ血清アルブミン	"
5 μ M	アデノシン5'ホスホ硫酸	"
0.4mg/ml	ポリビニルピロリドン (360,000)	"
0.3U/ml	ATPスルホリラーゼ	"
100mg/ml	D-ルシフェリン	Europa
5.5 \times 10 ⁸ ライトユニット	北アメリカホタル・ルシフェラーゼ	Promega
1mM	ジチオスレイトール	Melford