

【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30年10月25日 (2018.10.25)

【公表番号】特表2017-527301(P2017-527301A)

【公表日】平成29年9月21日 (2017.9.21)

【年通号数】公開・登録公報2017-036

【出願番号】特願2017-515830(P2017-515830)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 Q 1/04 Z N A

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成30年9月12日 (2018.9.12)

【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】

対象からの試料中の 1 つまたは複数の特定の微生物種を同定するための方法であって、  
試料から真核生物 DNA を枯渇させること；

試料中の 1 つまたは複数の微生物細胞を溶解すること、ここで 1 つまたは複数の微生物細胞の溶解は、複数の微生物遺伝物質を放出させる；

複数の微生物遺伝物質を単離すること；

複数の微生物遺伝物質を増幅すること；

増幅された微生物遺伝物質を複数の DNA 侵入人工核酸 (D I A N A) と接触させること、  
ここで複数の D I A N A は、配列番号 1 ~ 37 からなる群から選択される配列を含む；

および

微生物のそのそれぞれの単一種または群の微生物遺伝物質への 1 つまたは複数の D I A N A の結合を検出すること、ここで結合の検出は、試料中の 1 つまたは複数の特定の微生物種または微生物の群の存在を示す

を含む方法。

【請求項 2】

試料から真核生物 DNA を枯渇させることが、真核細胞溶解用溶液を試料に添加することを含み、真核細胞溶解用溶液が、微生物細胞に対して真核細胞を選択的に標的としかつ優勢に溶解する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

試料と組み合わせられた真核細胞溶解用溶液が約 0.25% ~ 1% (v/v) の T w e e n 界面活性剤、約 0.2% ~ 0.65% (v/v) の T r i t o n または I G E P A L を含み、約 6 ~ 9 の pH を有する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

複数の微生物遺伝物質を単離することが、微生物遺伝物質を陰イオン性 - 交換微小粒子に結合させ、微生物遺伝物質を結合させた後、陰イオン - 交換微小粒子を洗浄することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

試料中の 1 つまたは複数の微生物細胞を溶解することが、1 つまたは複数の微生物細胞を、DNA インターカレティング色素を含む溶解緩衝液と接触させることを含み、DNA インターカレティング色素が、エチジウムモノアジド (EMA)、プロビジウムモノアジド (PMA)、またはその組合せから選択されてもよい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

微生物遺伝物質を結合させた後、陰イオン - 交換微小粒子を洗浄することが、単離された複数の微生物遺伝物質を、約 3 ~ 7.5 の pH、少なくとも 1 つの一価の塩であって、一価の塩濃度が約 0.75 M ~ 2.75 M である一価の塩、少なくとも 1 つの非イオン性洗浄剤であって、非イオン性洗浄剤濃度が約 0.01 % ~ 1.0 % (v/v) である非イオン性洗浄剤、および少なくとも 1 つの両性イオン性洗浄剤であって、両性イオン性洗浄剤濃度が約 0.1 x ~ 400 x CMC である両性イオン性洗浄剤を含む洗浄緩衝液と接触させることを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

複数の微生物遺伝物質を増幅することが約 400 ~ 2000 bp のアンプリコンを得ることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

DIANA が 1 つまたは複数のリンカーを含み、リンカーが、長さが約 40 ~ 200 原子であってもよい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

DIANA が 1 つまたは複数の結合部分を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

多方向の流れを可能にする複数の相互接続されたチャンバーを含むカートリッジであって：

第 1 のチャンバーが反応チャンバーであり、第 1 のチャンバーが約 10  $\mu$ l ~ 10 ml の試料を受け取るように構成されており；

第 2 のチャンバーが溶解用溶液貯蔵チャンバーであり；

第 3 のチャンバーが溶解終結溶液貯蔵チャンバーであり；

第 4 のチャンバーが陰イオン交換樹脂貯蔵チャンバーであり；

第 5 のチャンバーがアウトプットチャンバーである、カートリッジ；および複数の流れチャンネルを含む流体デバイスであって、

第 1 の流れチャンネルが第 1 のチャンバーを第 2 のチャンバーに連結し、

第 2 の流れチャンネルが第 1 のチャンバーを第 3 のチャンバーに連結し、

第 3 の流れチャンネルが第 1 のチャンバーを第 4 のチャンバーに連結し、

第 4 の流れチャンネルが第 1 のチャンバーを第 5 のチャンバーに連結する、流体デバイスを含むデバイス。

【請求項 11】

1 つまたは複数の DIANA を含む組成物であって、DIANA が、配列番号 1 ~ 37 からなる群から選択される配列を有する、組成物。

【請求項 12】

試料から真核生物 DNA を枯渇させるための方法であって、真核細胞溶解用溶液を試料に添加することを含み、真核細胞溶解用溶液が、請求項 10 に記載のデバイスを使用して、微生物細胞に対して真核細胞を選択的に標的としかつ優勢に溶解する、方法。

【請求項 13】

対象からの試料中の 1 つまたは複数の特定の微生物種を同定するための方法であって、試料から真核生物 DNA を真核細胞の選択的溶解によって枯渇させること；

試料中の 1 つまたは複数の微生物細胞を溶解すること、ここで 1 つまたは複数の微生物細胞

胞の溶解は、複数の長さが2 kb ~ 290 kbである微生物遺伝物質を放出させる；  
陰イオン交換樹脂を用いて複数の微生物遺伝物質を精製すること；  
複数の微生物遺伝物質を増幅して長さが400 ~ 4000 bpであるアンブリコンを生成  
すること；  
増幅された微生物遺伝物質を少なくとも1つのDNA侵入人工核酸(DIANA)と接触  
させること、ここで複数のDIANAは、配列番号1 ~ 37からなる群から選択される；  
および  
微生物のそのそれぞれの単一種または群の微生物遺伝物質への少なくとも1つのDIANA  
Aの結合を検出すること、ここで結合の検出は、試料中の1つまたは複数の特定の微生物  
種または微生物の群の存在を示す  
を含む方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0159

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0159】

他の実施形態が以下の特許請求の範囲において記載される。

次に、本発明の好ましい態様を示す。

1. 対象からの試料中の1つまたは複数の特定の微生物種を同定するための方法であっ  
て、試料から真核生物DNAを枯渇させること；  
試料中の1つまたは複数の微生物細胞を溶解すること、ここで1つまたは複数の微生物細  
胞の溶解は、複数の微生物遺伝物質を放出させる；  
複数の微生物遺伝物質を単離すること；  
複数の微生物遺伝物質を増幅すること；  
増幅された微生物遺伝物質を複数のDNA侵入人工核酸(DIANA)と接触させること  
、ここで複数のDIANAは、配列番号1 ~ 37からなる群から選択される配列を含む；  
および  
微生物のそのそれぞれの単一種または群の微生物遺伝物質への1つまたは複数のDIANA  
Aの結合を検出すること、ここで結合の検出は、試料中の1つまたは複数の特定の微生物  
種または微生物の群の存在を示す  
を含む方法。
2. 単離された複数のゲノム物質が精製される、上記1に記載の方法。
3. 試料から真核生物DNAを枯渇させることが、真核細胞溶解用溶液を試料に添加す  
ることを含み、真核細胞溶解用溶液が、微生物細胞に対して真核細胞を選択的に標的とし  
かつ優勢に溶解する、上記1から2の1項に記載の方法。
4. 試料と組み合わせられた真核細胞溶解用溶液が約0.25% ~ 1%(v/v)のT  
ween界面活性剤、約0.2% ~ 0.65%(v/v)のTritonまたはIGEP  
ALを含み、約6 ~ 9のpHを有する、上記3に記載の方法。
5. 遊離の真核生物DNAが、約0.1M ~ 0.85Mの一価の塩濃度を有する約6 ~  
9のpHの条件下で陰イオン性 - 交換微小粒子を使用して血液反応から除去される、上記  
3に記載の方法。
6. 試料が血液または痰である、上記1に記載の方法。
7. 対象が哺乳動物である、上記1に記載の方法。
8. 哺乳動物がヒトである、上記7に記載の方法。
9. 複数の微生物遺伝物質を単離することが、微生物遺伝物質を陰イオン性 - 交換微小  
粒子に結合させ、微生物遺伝物質を結合させた後、陰イオン - 交換微小粒子を洗浄するこ  
とを含む、上記1に記載の方法。
10. 単離された微生物遺伝物質がRNA、DNA、またはその組合せである、上記1  
に記載の方法。

11. DNAが一本鎖または二本鎖である、上記10に記載の方法。

12. 試料中の1つまたは複数の微生物細胞を溶解することが、1つまたは複数の微生物細胞を、DNAインターカレーティング色素を含む溶解緩衝液と接触させることを含む、上記1に記載の方法。

13. DNAインターカレーティング色素が、エチジウムモノアジド(EMA)、プロピジウムモノアジド(PMA)、またはその組合せから選択される、上記12に記載の方法。

14. 微生物遺伝物質を結合させた後、陰イオン-交換微小粒子を洗浄することが、単離され

た複数の微生物遺伝物質を、約3~7.5のpH、少なくとも1つの一価の塩であって、一価の塩濃度が約0.75M~2.75Mである一価の塩、少なくとも1つの非イオン性洗浄剤であって、非イオン性洗浄剤濃度が約0.01%~1.0%(v/v)である非イオン性洗浄剤、および少なくとも1つの両性イオン性洗浄剤であって、両性イオン性洗浄剤濃度が約0.1x~400xCMCである両性イオン性洗浄剤を含む洗浄緩衝液と接触させることを含む、上記9に記載の方法。

15. 複数の微生物遺伝物質を増幅することが約400~2000bpのアンプリコンを得る

ことを含む、上記1に記載の方法。

16. DIANAが1つまたは複数のリンカーを含む、上記1に記載の方法。

17. リンカーが、長さが約40~200原子である、上記16に記載の方法。

18. DIANAが1つまたは複数の結合部分を含む、上記1に記載の方法。

19. 多方向の流れを可能にする複数の相互接続されたチャンバーを含むカートリッジであっ

て：

第1のチャンバーが反応チャンバーであり、第1のチャンバーが約10μl~10mlの試料を受け取るように構成されており；

第2のチャンバーが溶解用溶液貯蔵チャンバーであり；

第3のチャンバーが溶解終結溶液貯蔵チャンバーであり；

第4のチャンバーが陰イオン交換樹脂貯蔵チャンバーであり；

第5のチャンバーがアウトプットチャンバーである、カートリッジ；および複数の流れチャネルを含む流体デバイスであって、

第1の流れチャネルが第1のチャンバーを第2のチャンバーに連結し、

第2の流れチャネルが第1のチャンバーを第3のチャンバーに連結し、

第3の流れチャネルが第1のチャンバーを第4のチャンバーに連結し、

第4の流れチャネルが第1のチャンバーを第5のチャンバーに連結する、流体デバイスを含むデバイス。

20. 流体デバイスが流れゲートをさらに含み、流れゲートが2つ以上のチャンバーを連結す

る流れチャネル間に配置されている、上記19に記載のデバイス。

21. 流体デバイスが1つまたは複数のニューマチックインターフェースをさらに含み、ニュ

ーマチックインターフェースが少なくとも1つのチャンバーに流体連結されている、請求項19に記載のデバイス。

22. 陰イオン交換樹脂貯蔵チャンバーが陰イオン交換樹脂を含む、上記19に記載のデバ

イス。

23. 陰イオン交換樹脂貯蔵チャンバーが、支持基板にコンジュゲートしている陰イオン交換

樹脂を含む、上記19に記載のデバイス。

24. 溶解用溶液貯蔵チャンバーが真核生物溶解用溶液を含み、試料と組み合わせられ

た真核

生物溶解用溶液が約 0.25% ~ 1% (v/v) の Tween 界面活性剤および約 0.2% ~ 0.65% (v/v) の Triton または IGEPAL を含む、上記 19 に記載のデバイス。

25. Tween 界面活性剤が、Tween - 20、Tween - 40、および Tween - 80 からなる群から選択される、上記 24 に記載のデバイス。

26. Triton が Triton X - 100 または Triton X - 114 である、上記 24 に記載のデバイス。

27. IGEPAL が、IGEPAL CO - 520、IGEPAL CO - 630、および IGEPAL CO - 720 からなる群から選択される、上記 24 に記載のデバイス。

28. 流体攪拌がチャンバーの 1 つまたは複数中への無菌気体の流れによって作製される、上記 19 に記載のデバイス。

29. 独立型デバイスである、上記 19 に記載のデバイス。

30. デバイスが第 2 のデバイス中のモジュールであり、第 2 のデバイスがモジュールの上流および / または下流処理を行う、上記 19 に記載のデバイス。

31. 1 つまたは複数の DIANA を含む組成物であって、DIANA が、配列番号 1 ~ 37 からなる群から選択される配列を有する、組成物。

32. 1 つまたは複数の DIANA が固体支持体に結合している、上記 31 に記載の組成物。

33. 1 つまたは複数の DIANA が検出可能なマーカを含む、上記 31 に記載の組成物。

34. 試料から真核生物 DNA を枯渇させるための方法であって、真核細胞溶解用溶液を試料に添加することを含み、真核細胞溶解用溶液が、上記 19 に記載のデバイスを使用して、微生物細胞に対して真核細胞を選択的に標的としかつ優勢に溶解する、方法。