

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和2年7月9日(2020.7.9)

【公表番号】特表2019-510501(P2019-510501A)

【公表日】平成31年4月18日(2019.4.18)

【年通号数】公開・登録公報2019-015

【出願番号】特願2018-552172(P2018-552172)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/6883 (2018.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/6883 Z N A

C 12 N 15/09

【手続補正書】

【提出日】令和2年3月31日(2020.3.31)

【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】

10,000コピーの関連野生型DNA標的配列の存在下で少なくとも2つの異なる目的とする類縁希少突然変異体DNA標的配列のそれぞれの僅か10コピーを試料中で増幅および検出可能である多重アッセイ法において、前記突然変異体DNA標的配列が、僅か一塩基多型により、互いに、および前記野生型DNA標的配列とは異なり、

(a) 非対称プライマー依存的増幅反応混合物を調製することであって、当該混合物が、前記試料と、DNAポリメラーゼと、デオキシリボヌクレオシド三リン酸と、増幅に必要とされる他の試薬と、塩化テトラメチルアンモニウム(TMAC)または別のホフマイスター塩と、各希少突然変異体DNA標的配列の増幅産物に特異的である識別可能に標識される均一な蛍光検出プローブと、前記類縁希少突然変異体標的配列に対する過剰濃度のリバースプライマーと、

前記DNA標的配列と相補的ではない少なくとも1つのユニークなDNA配列を保有する、各目的とする希少突然変異体標的配列に対する限定濃度のユニークなマルチパートプライマーと、を含み、前記リバースプライマーにより開始されるアンブリコン鎖における前記ユニークな配列のうちの1つの相補体が、前記プローブの標的であり、個別に同定しようとする各標的配列または標的配列群にユニークであり、各マルチパートプライマーの配列が、5'から3'方向に、前記リバースプライマーの伸長によりコピーされる次の3つの近接DNA配列：

プライマーアニーリング中に、前記類縁突然変異体DNA標的配列および前記関連野生型DNA標的配列とハイブリッド形成可能であるように十分に長いアンカ-DNA配列と；

プライマーアニーリング中に前記ユニークなマルチパートプライマーの目的とするDNA標的配列と、何らかの他の類縁突然変異体標的DNA配列と、またはプライマーアニーリング中に前記関連野生型DNA標的配列とハイブリッド形成しない、少なくとも6ヌクレオチド長のユニークなブリッジDNA配列と；

7～14ヌクレオチド長であり、前記目的とするDNA標的配列と完全に相補的であるが、他の各突然変異体DNA標的配列および前記関連野生型DNA配列と1個以上のヌク

レオチドにより互いにミスマッチがあり、これらのうち少なくとも 1 個が 3' 末端ヌクレオチドまたは前記 3' 末端の最後から 2 番目のヌクレオチドである、ユニークなフット DNA 配列と；

を含み、

(i) 前記マルチパートプライマーのアンカー DNA 配列およびフット DNA 配列が両方ともその目的とする標的 DNA 配列とハイブリッド形成し、それによってプライマー標的ハイブリッドを生成させる場合、前記プライマー標的ハイブリッドが、前記マルチパートプライマーの 5' から 3' 方向に：アンカー標的ハイブリッド、バブルおよびフット標的ハイブリッドを含み、前記バブルが、24 ~ 40 ヌクレオチドの周縁を有し、少なくとも 8 ヌクレオチド長でありプライマーアニーリング中に前記ブリッジ DNA 配列とハイブリッド形成しない、前記標的 DNA 配列中の介在 DNA 配列により形成され、

(i i) 前記バブルが、前記アンカー標的ハイブリッドから前記フット標的ハイブリッドを分離し、分離されたフット標的ハイブリッドが、15 ~ 40 ヌクレオチド長でありプライマーアニーリング条件下でハイブリッドを形成する従来のプライマーを使用して生じる閾値 (C_T) と比較した場合の C_T における少なくとも 5 サイクルの遅延により明らかにされるように、前記目的とする標的 DNA 配列のコピーの可能性を低下させる弱いハイブリッドであり；

(i i i) PCR 増幅中にその目的とする標的 DNA 配列に対する前記マルチパートプライマーが何らかの類縁突然変異体標的 DNA 配列または前記関連する野生型標的 DNA 配列のコピーを開始する可能性が、少なくとも 10 回の熱サイクルの閾値の差 (C_T) により明らかなるように、その目的とする標的配列のコピーを開始する可能性よりも少なくとも 1,000 倍低く；

(i v) アンプリコン鎖を生じさせたマルチパートプライマーが、前記アンプリコン鎖の相補鎖と完全に相補的であるブリッジおよびフット DNA 配列を有し；

(v) その目的とする標的 DNA 配列の介在 DNA 配列の長さと一緒に、各マルチパートプライマーのブリッジ DNA 配列の長さおよび配列によって、60 サイクルの指數関数的増幅内で生じ、コピーを含有しない試料から観察される C_T とは識別可能である、僅か 10 コピーのその目的とする標的 DNA 配列を含有する試料に対する閾値 (C_T) が観察される、

非対称プライマー依存的増幅反応混合物を調製することと；

(b) 前記試料中に存在する前記類縁希少突然変異体標的 DNA 配列を増幅させるために、前記反応混合物を反復してサイクル化し、リアルタイムまたはエンドポイント検出により各識別可能に標識されるプローブからの蛍光強度を測定することによって、これらの DNA 配列の存在を検出することと、

を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、サイクル化が、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法での温度サイクル化であることを特徴とする、方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法において、目的とする少なくとも 1 つの希少標的配列について、前記マルチパートプライマーが、何れの標的配列とも相補的ではなく、個別に同定しようとする各標的配列または標的配列グループにユニークな 5' タグ配列を含み、前記リバースプライマーによって開始されたアンプリコン鎖の相補体が前記プローブの標的であることを特徴とする、方法。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載の方法において、目的とする少なくとも 1 つの希少標的配列について、前記プローブの標的が、前記リバースプライマーにより開始されるアンプリコン鎖における前記ブリッジ配列の相補体であることを特徴とする、方法。

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 の何れか一項に記載の方法において、前記フット DNA 配列が、1 つ以

上のヌクレオチドにより前記類縁野生型DNA配列とミスマッチがあり、これらのうちの少なくとも1つが3'末端ヌクレオチドであることを特徴とする、方法。

【請求項6】

請求項1乃至5の何れか一項に記載の方法において、前記フット配列が、8-10ヌクレオチドの長さであることを特徴とする、方法。

【請求項7】

請求項1乃至6の何れか一項に記載の方法において、前記ブリッジ配列および前記介在配列の長さが同じでなく、前記バブルが非対称であることを特徴とする、方法。

【請求項8】

請求項2に記載の方法において、ある標的DNA配列に対する C_T 値が、何らかの他の標的DNA配列に対する場合と同じ出発錆型数に相当することを特徴とする、方法。

【請求項9】

請求項1に記載の方法において、前記少なくとも2つの類縁突然変異体標的DNA配列と類縁ではない参照野生型DNA配列を増幅し、検出することを含み、前記プライマー依存的増幅反応混合物が、前記参照DNA配列に対する、限定マルチパートプライマーと、過剰なリバースプライマーと、均一な蛍光検出プローブと、を含み、前記参照DNA配列に対する前記マルチパートプライマーが、請求項1に記載の構造および機能的な制限を有し、前記参照DNA配列に対する前記マルチパートプライマーのブリッジDNA配列の長さおよびヌクレオチド配列が前記突然変異体標的DNA配列に対する前記マルチパートプライマーの配列と調和しており、各突然変異体標的DNA配列に対して得られる C_T 値と前記参照野生型DNA配列に対して得られる C_T 値との間の差が、前記試料中に存在するDNA量に関わりなく、前記参照野生型DNA配列の存在量に対するその突然変異体標的DNA配列の存在量を反映するようになることを特徴とする、方法。

【請求項10】

請求項1乃至9の何れか一項に記載の方法において、前記反応混合物のサイクル化が機器により行われ、標的DNA配列の数が、前記機器が個別に検出し得る色の数を超え、複数の異なるプローブが、同じフルオロフォアを有するが異なる融解温度を有する温度特異的ハイブリッド形成プローブであることを特徴とする、方法。

【請求項11】

請求項1乃至10の何れか一項に記載の高度多重アッセイ法において、増幅および検出がデジタルPCR法であり、前記プローブが、色分けされた分子ビーコンプローブであることを特徴とする、高度多重アッセイ法。

【請求項12】

請求項1乃至10の何れか一項に記載の高度多重スクリーニングアッセイ法において、増幅および検出が分光蛍光分析サーマルサイクラーにおいて行われ、前記プローブが色分けされた分子ビーコンプローブであることを特徴とする、高度多重スクリーニングアッセイ法。

【請求項13】

前記少なくとも2つの類縁希少突然変異体標的DNA配列のうち何れかの10コピー未満を増幅および検出可能である請求項1乃至12の何れか一項に記載の方法において、前記マルチパートプライマー・アンカーDNA配列および前記突然変異体標的DNA配列により形成されるハイブリッドが、前記リバースプライマーおよび前記突然変異体標的DNA配列により形成されるハイブリッドのTmよりも低い融解温度(Tm)を有し、段階(b)の前に、前記リバースプライマーを利用した直線的増幅の多重サイクルが、前記リバースプライマーはハイブリッド形成するが、前記マルチパートプライマーのハイブリッド形成の可能性が非常に低いプライマーアニーリング温度を使用して行われ、段階(b)が、前記マルチパートプライマーおよび前記リバースプライマーがハイブリッド形成する温度より低いプライマーアニーリング温度を使用して行われることを特徴とする、方法。

【請求項14】

請求項1乃至13の何れか一項に記載の増幅および検出を行うのに十分な試薬を含む試

薬キットであって、前記DNAポリメラーゼ、前記デオキシリボヌクレオシド三リン酸、増幅に必要な前記他の試薬、TMAcまたは別のホフマイスター塩、前記識別可能に標識される均一な蛍光検出プローブ、前記リバースプライマー、および前記ユニークなマルチパートプライマーを含むことを特徴とする試薬キット。