

【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4年12月6日(2022.12.6)

【国際公開番号】WO2021/193853

【出願番号】特願2022-510682(P2022-510682)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

C 1 2 Q 1/6888(2018.01)

C 1 2 N 15/11(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 Q 1/686 Z Z N A

C 1 2 Q 1/6888 Z

C 1 2 N 15/11

【手続補正書】

【提出日】令和4年9月27日(2022.9.27)

【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

20

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験者から採取した検体試料、および/または前記検体試料と培地との検体混合液と、水酸化ナトリウムを主成分とする検体処理液とを混合し、混合液を得る工程、

上記混合液を、インキュベーションする工程、

上記インキュベーション後の混合液に、反応液、内部標準物質、プライマー、プローブ、逆転写酵素およびPCR酵素を含むマスターミックスを添加し、最終混合液を得る工程、

30

上記最終混合液を逆転写反応処理する工程、および

上記逆転写反応処理によって生成したDNAを鋳型にPCRによって増幅されたDNAを前記プローブで検出する工程、

を有し、

前記マスターミックスの量が14 μLから16 μLである、新型コロナウイルスの検査方法。

【請求項2】

前記最終混合液が24 μLから26 μLである、請求項1に記載の新型コロナウイルスの検査方法。

【請求項3】

40

前記インキュベーションを常温から95 で、3分間から5分間行う、請求項1または2に記載の新型コロナウイルスの検査方法。

【請求項4】

前記検体処理液が、さらにグリコールエーテルジアミン四酢酸とジチオスレイトールの少なくともいずれか一つを含む、請求項1から3のいずれか1項に記載の新型コロナウイルスの検査方法。

【請求項5】

前記検体処理液または前記反応液が、dATP、dGTP、dCTPおよびdTTPを含む、請求項1から4のいずれか1項に記載の新型コロナウイルスの検査方法。

【請求項6】

50

前記検体処理液が、d A T P、d G T P、d C T Pおよびd U T Pを含む、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の新型コロナウイルスの検査方法。

【請求項 7】

水酸化ナトリウムを主成分とする検体処理液、反応液、内部標準物質、プライマー、プローブ、逆転写酵素および P C R 酵素を有する新型コロナウイルスの検査用キット。

【請求項 8】

前記検体処理液、前記反応液、前記内部標準物質、前記プライマー、前記プローブ、前記逆転写酵素および前記 P C R 酵素が、2 ~ 4 個の容器に収容されている、請求項 7 に記載の新型コロナウイルスの検査用キット。

【請求項 9】

前記検体処理液、前記反応液および前記内部標準物質、前記プライマーおよび前記プローブ、ならびに前記逆転写酵素および前記 P C R 酵素が、それぞれ独立して 4 つの容器に収容されている、請求項 8 に記載の新型コロナウイルスの検査用キット。

【請求項 10】

前記検体処理液または前記反応液が、d A T P、d G T P、d C T Pおよびd T T Pを含む、請求項 7 から 9 のいずれか 1 項に記載の新型コロナウイルスの検査用キット。

【請求項 11】

前記検体処理液が、d A T P、d G T P、d C T Pおよびd U T Pを含む、請求項 7 から 9 のいずれか 1 項に記載の新型コロナウイルスの検査用キット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

すなわち、本発明は、

被験者から採取した検体試料、若しくは前記検体試料と培地との検体混合液と、水酸化ナトリウムを主成分とする検体処理液とを混合し混合液を得る工程、

上記混合液を、インキュベーションする工程、

上記インキュベーション後の混合液に、反応液、内部標準物質、プライマー、プローブ、逆転写酵素、および P C R 酵素を含むマスターミックスを添加し最終混合液を得る工程、

上記最終混合液を逆転写反応処理する工程、および

上記逆転写反応処理によって生成した D N A を鋳型に P C R によって増幅された D N A を前記プローブで検出する工程、

を有する新型コロナウイルスの検査方法に関する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

上記インキュベーションの工程を経た混合液に、反応液、内部標準物質、P C R プライマー対、プローブ、逆転写酵素および P C R 酵素を含むマスターミックスを添加し、最終混合液を得る。反応液は界面活性剤を含む P C R 緩衝液を含有する。界面活性剤は、陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤および非イオン界面活性剤から選択することができる。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

10

20

30

40

50

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

本発明において、目的遺伝子を増幅するPCRプライマー対（フォワードおよびリバース）は、SARS-CoV-2のRNA由来の核酸の配列に特異的なプライマーを使用することができ、例えば、SARS-CoV-2 RNAから逆転写反応により生成したcDNAの配列に特異的なプライマーを使用することができる。プライマーとしては、表1に記載のプライマー対および表2に記載のプライマー対が例示される。例示されたPCRプライマー対の検出対象は、N（Nucleocapsid）遺伝子の2領域である。国立感染症研究所の方法では、NセットのN_Sarbeco_F1（フォワード、配列番号1）およびN_Sarbeco_R1（リバース、配列番号2）ならびにNセット No.2のNIID_2019-nCOV_N_F2（フォワード、配列番号3）およびNIID_2019-nCOV_N_R2（リバース、配列番号4）、またアメリカ疾病対策予防センターの方法では、N1 Forward Primer（配列番号5）およびN1 Reverse Primer（配列番号6）、ならびにN2 Forward Primer（配列番号7）およびN2 Reverse Primer（配列番号8）が例示される。内部標準核酸を増幅するPCRプライマー対は、内部標準核酸にストリンジェントな条件でハイブリダイズするプライマーであって、前記SARS-CoV-2由来の核酸にはハイブリダイズしないPCRプライマー対が好ましい。前記ストリンジェントな条件とは、鋳型核酸にプライマーが結合するステップであるPCRにおけるアニーリングにおいて、鋳型核酸とプライマーとの結合が特異的である条件をいう。

10

20

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0057

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0057】

本発明の新型コロナウイルスの検査方法および検査用キットを用いることにより、SARS-CoV-2の感染の有無を、偽陰性の発生を防止しつつ、迅速かつ簡便に検査することができる。RT-PCR検査は、免疫クロマトグラフィに比べて検出感度が高いため、高熱および咳などについて無症状であるが、SARS-CoV-2感染者である場合についても、短時間で精度よく判定できる新型コロナウイルスの検査を提供することができる。

30

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0059

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0059】

[実施例1]

〔混合液の調製〕

新型コロナウイルスのゲノムRNAの一部を合成した人工合成RNA（10,000コピー）を用いて以下のRT-PCRを行った。PCRチューブにおいて、UTM培地（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製）ならびに上記人工合成RNAおよび咽頭ぬぐい液を含む試料液の1、3、5または7μLに対して、水酸化ナトリウムを含む検体処理液をそれぞれ9、7、5または3μL添加して、合計量を10μLとした。

40

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0064

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0064】

50

リアルタイムRT-PCRの増幅曲線をサイクル数に対してプロットした結果が図1である。試料液の量が3および5 μ Lでは、培地を添加しない場合と比較して増幅曲線の立ち上がりにより差が見られなかった。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0082

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0082】

[1] 被験者から採取した検体試料、若しくは前記検体試料と培地との検体混合液と、水酸化ナトリウムを主成分とする検体処理液とを混合し、混合液を得る工程、

上記混合液をインキュベーションする工程、

上記インキュベーション後の混合液に、反応液、内部標準物質、プライマー、プローブ、逆転写酵素およびPCR酵素を含むマスターミックスを添加し、最終混合液を得る工程、

上記最終混合液を逆転写反応処理する工程、および

上記逆転写反応処理によって生成したDNAを鋳型にPCRによって増幅されたDNAを前記プローブで検出する工程、

を有する新型コロナウイルスの検査方法。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0083

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0083】

上記[1]の発明によれば、SARS-CoV-2の感染の有無を迅速かつ安価に検査する方法を提供することができる。またRT-PCR検査は、イムノクロマトグラフィに比べて検出感度が高いため、感染しているが高熱および咳などの症状の出していない方の場合にも、短時間で高感度な新型コロナウイルスの検査を提供できる。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0095

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0095】

上記[8]から[12]の発明によれば、SARS-CoV-2の感染の有無を検査する方法を迅速に行うことができる。またRT-PCR検査は、イムノクロマトグラフィに比べて検出感度が高いため、感染しているが高熱および咳などの症状の出していない方の場合にも、短時間で高感度な新型コロナウイルスの検査を行うことができる。

10

20

30

40

50