(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116888275 A
(43)申请公布日 2023.10.13

(21)申请号 202280011960.0
(22)申请日 2022.01.21
(30)优先权数据
2021-012402 2021.01.28 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.07.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2022/002103 2022.01.21
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/163507 JA 2022.08.04
(71)申请人 日油株式会社
地址 日本东京都
(72)发明人 近藤圣奈 铃木裕贵 松田将
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 李志强 梅黎
(51)Int.Cl.
C12Q 1/686(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

(54)发明名称

用于核酸扩增的组合物

(57)摘要

本发明提供一种用于核酸扩增的组合物,其包含含有来自2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元的聚合物。

CN 116888275 A

1.用于核酸扩增的组合物,该组合物包含含有来自2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元的聚合物。

2.根据权利要求1所述的用于核酸扩增的组合物,其中,所述聚合物的浓度为0.0001～10w/v%。

3.根据权利要求1或2所述的用于核酸扩增的组合物,其中,该组合物用于PCR法或RT-PCR法。

4.根据权利要求3所述的用于核酸扩增的组合物,其中,PCR法或RT-PCR法为实时PCR法或实时RT-PCR法。

5.根据权利要求4所述的用于核酸扩增的组合物,其中,实时PCR法或实时RT-PCR法为使用一步RT-实时PCR试剂的实时RT-PCR法。

6.根据权利要求1～5中任一项所述的用于核酸扩增的组合物,其中,核酸为来自RNA病毒的RNA。

7.根据权利要求6所述的用于核酸扩增的组合物,其中,来自RNA病毒的RNA为来自SARS-CoV-2的RNA。

用于核酸扩增的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于核酸扩增的组合物。

背景技术

[0002] 核酸扩增法是扩增目标基因的方法,是在分子生物领域的研究或临床诊断领域、科学刑事侦查等中利用的技术。作为用于扩增目标基因的核酸扩增法,已知有PCR(Polymerase Chain Reaction,聚合酶链反应)法。PCR法可高灵敏度地检测核酸,因此被用于感染症的诊断、病毒的检测等。

[0003] 上述的PCR法被用于新型冠状病毒的检测并受到很大关注。根据非专利文献1,通过基于对新型冠状病毒(2019-nCoV)的2处基因区域即开放读码框1a(ORF1a)和刺突(S)进行特异性检测的两步RT-PCR法、或者使用了TaqMan探针的实时一步RT-PCR法的基因检查,可鉴定新型冠状病毒(2019-nCoV)。

[0004] 由于新型冠状病毒引起的感染症的流行,导致测试标本数量增加,随之要求更快地披露结果。因此,从检查操作性的观点来看,要求减少PCR反应液的调制工序。但是,从保存稳定性的观点来看,需要在即将试验之前调制使用的组合物。作为提高上述组合物的稳定性的稳定剂,已知有牛血清白蛋白(BSA)、明胶和非离子型表面活性剂。

[0005] 现有技术文献

[0006] 非专利文献

[0007] 非专利文献1:国立感染症研究所病原体検出マニュアル2019-nCoV Ver.2.9.1。

发明内容

[0008] 发明所要解决的课题

[0009] 本发明的目的在于提高用于核酸扩增法(例如PCR法)的组合物的保存稳定性。

[0010] 用于解决课题的手段

[0011] 本发明人进行了深入研究,结果发现:如果使用含有来自2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元的聚合物,则可提高用于核酸扩增法(例如PCR法)的组合物的保存稳定性。基于该见解的本发明如下所述。

[0012] [1]用于核酸扩增的组合物,该组合物包含含有来自2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元的聚合物。

[0013] [2]根据上述[1]所述的用于核酸扩增的组合物,其中,上述聚合物的浓度为0.0001～10w/v%。

[0014] [3]根据上述[1]或[2]所述的用于核酸扩增的组合物,其中,该组合物用于PCR法或RT-PCR法。

[0015] [4]根据上述[3]所述的用于核酸扩增的组合物,其中,PCR法或RT-PCR法为实时PCR法或实时RT-PCR法。

[0016] [5]根据上述[4]所述的用于核酸扩增的组合物,其中,实时PCR法或实时RT-PCR法

为使用一步RT-实时PCR试剂的实时RT-PCR法。

[0017] [6]根据上述[1]～[5]中任一项所述的用于核酸扩增的组合物,其中,核酸为来自RNA病毒的RNA。

[0018] [7]根据上述[6]所述的用于核酸扩增的组合物,其中,来自RNA病毒的RNA为来自SARS-CoV-2的RNA。

[0019] [8]根据上述[1]～[7]中任一项所述的用于核酸扩增的组合物,其中,该组合物进一步包含引物。

[0020] [9]根据上述[8]所述的用于核酸扩增的组合物,其中,引物为10～40个碱基长度的寡核苷酸。

[0021] [10]根据上述[8]或[9]所述的用于核酸扩增的组合物,其中,引物的浓度为0.01～10μM。

[0022] [11]核酸扩增法,其包括:将上述[1]～[10]中任一项所述的用于核酸扩增的组合物与含有待扩增的核酸的试样混合,以调制用于核酸扩增的反应液。

[0023] [12]根据上述[11]所述的核酸扩增法,其为PCR法或RT-PCR法。

[0024] [13]根据上述[12]所述的核酸扩增法,其为实时PCR法或实时RT-PCR法。

[0025] [14]根据上述[13]所述的核酸扩增法,其为使用一步RT-实时PCR试剂的实时RT-PCR法。

[0026] [15]根据上述[11]～[14]中任一项所述的核酸扩增法,其中,核酸为来自RNA病毒的RNA。

[0027] [16]根据上述[15]所述的核酸扩增法,其中,来自RNA病毒的RNA为来自SARS-CoV-2的RNA。

[0028] 发明效果

[0029] 根据本发明,可得到保存稳定性优异的用于核酸扩增的组合物。

具体实施方式

[0030] 以下,详细说明本发明。

[0031] 需要说明的是,在本说明书中,在记载有阶段性的数值范围的情况下,各数值范围的下限值和上限值可组合。例如,在记载有“优选10～100、更优选20～90”的情况下,可将“优选的下限值:10”和“更优选的上限值:90”组合(即,“10～90”的数值范围也在本说明书的范围内)。

[0032] [用于核酸扩增的组合物]

[0033] 本发明涉及用于核酸扩增的组合物(以下有时记为“本发明的组合物”),其包含含有来自2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元的聚合物(以下有时记为“本发明的聚合物”)。本发明的聚合物可仅使用一种,也可并用两种以上。需要说明的是,以下有时将“2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱”记为“单体(1)”,有时将“来自单体(1)的结构单元”记为“结构单元(1)”。

[0034] 本说明书中,“2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱”基本上是指“2-丙烯酰氧乙基磷酸胆碱或2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱”。在可存在多个2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的情况下,“2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱”是指“2-丙烯酰氧乙基磷酸胆碱和/或2-甲基

丙烯酰氧乙基磷酸胆碱”。与“2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱”类似的其他术语也是与“(2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱”同样的含义。2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱可使用市售品。

[0035] 本说明书中,“来自2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元”是指具有2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱中所含的(甲基)丙烯酰基的碳-碳双键反应而形成的结构的结构单元。来自其他单体的结构单元也是与上述同样的含义。

[0036] 本说明书中,“用于核酸扩增的组合物”是指用于核酸扩增法的组合物。对核酸扩增法没有特别限定,例如可列举:Polymerase Chain Reaction(PCR,聚合酶链反应)法、Loop mediated isothermal Amplification(LAMP,环介导等温扩增)法、Transcription Mediated Amplification(TMA,转录介导扩增)法、Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids(IICAN,嵌合引物引发的核酸等温扩增)法、Strand Displacement Amplification(SDA,链置换扩增)法、Ligase Chain Reaction(LCR,连接酶链反应)法、Nucleic Acid Seqence-Based Amplification(NASBA,依赖核酸序列的扩增)法等。核酸扩增法优选为PCR法。

[0037] 核酸扩增法优选为PCR法或RT-PCR法(逆转录PCR法)。即,本发明的组合物优选用于PCR法或RT-PCR法。PCR法或RT-PCR法优选为实时PCR法或实时RT-PCR法,更优选为使用一步RT-实时PCR试剂的实时RT-PCR法。这里,一步RT-实时PCR试剂是指用于在一个工序中连续或并行地进行逆转录反应和PCR反应、并随时间测定PCR产物的试剂,例如可列举:含有兼具逆转录酶活性的耐热性DNA聚合酶和荧光DNA染色试剂或荧光探针的PCR试剂等。待扩增的核酸优选为来自RNA病毒的RNA,更优选为来自SARS-CoV-2的RNA。

[0038] 本发明的聚合物可以是由来自2-丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元构成的均聚物、由来自2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元构成的均聚物、或由来自2-丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元和来自2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元构成的共聚物中的任一者。上述共聚物可以是无规共聚物,也可以是嵌段共聚物,还可以是含有无规部分和嵌段部分这两者的共聚物。

[0039] 在本发明的聚合物不包含除结构单元(1)以外的结构单元的情况下,本发明的聚合物优选为由来自2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元构成的均聚物(即,由来自2-丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元构成的均聚物或由来自2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元构成的均聚物),更优选为由来自2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元构成的均聚物。

[0040] 本发明的聚合物可以是除了含有来自2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(单体(1))的结构单元(结构单元(1))以外、还含有来自不同于单体(1)的其他单体的其他结构单元的共聚物。其他单体可仅使用一种,也可并用两种以上。上述共聚物可以是无规共聚物,也可以是嵌段共聚物,还可以是含有无规部分和嵌段部分这两者的共聚物。

[0041] 作为其他结构单元,例如可列举:来自不含羟基的(甲基)丙烯酸烷基酯(以下有时记为“单体(2)”)的结构单元(以下有时记为“结构单元(2)”)。(甲基)丙烯酸烷基酯的烷基可具有羟基以外的取代基。作为上述取代基,例如可列举:卤素原子、环氧基、甲氧基等烷氧基;苯基等芳基;苯氧基等芳氧基;四氢呋喃基等杂环基等。单体(2)可仅使用一种,也可并用两种以上。即,本发明的聚合物可含有一种或更多种的结构单元(2)。

[0042] 作为单体(2),例如可列举:(甲基)丙烯酸甲酯、(甲基)丙烯酸乙酯、(甲基)丙烯酸丙酯、(甲基)丙烯酸丁酯、(甲基)丙烯酸戊酯、(甲基)丙烯酸己酯、(甲基)丙烯酸庚酯、(甲基)丙烯酸辛酯、(甲基)丙烯酸壬酯、(甲基)丙烯酸癸酯、(甲基)丙烯酸十一烷基酯、(甲基)丙烯酸十二烷基酯、(甲基)丙烯酸十三烷基酯、(甲基)丙烯酸十四烷基酯、(甲基)丙烯酸十五烷基酯、(甲基)丙烯酸十六烷基酯、(甲基)丙烯酸十七烷基酯、(甲基)丙烯酸十八烷基酯、(甲基)丙烯酸苄酯、(甲基)丙烯酸苯氧基乙酯、(甲基)丙烯酸四氢糠基酯、(甲基)丙烯酸缩水甘油酯等。这些之中,优选(甲基)丙烯酸丁酯、(甲基)丙烯酸十八烷基酯和(甲基)丙烯酸苄酯,更优选甲基丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸十八烷基酯和甲基丙烯酸苄酯。单体(2)可使用市售品。

[0043] 在本发明的聚合物含有结构单元(1)和结构单元(2)的情况下,从稳定化作用的观点来看,相对于结构单元(1)和结构单元(2)的总计100摩尔(即,聚合中使用的单体(1)和单体(2)的总计100摩尔),结构单元(1)的量(即,聚合中使用的单体(1))优选为5～95摩尔,更优选为20～80摩尔,进一步优选为60～80摩尔,结构单元(2)的量(即,聚合中使用的单体(2))优选为5～95摩尔,更优选为20～80摩尔,进一步优选为20～40摩尔。

[0044] 作为其他结构单元,例如可列举:来自含羟基的(甲基)丙烯酸烷基酯(以下有时记为“单体(3)”)的结构单元(以下有时记为“结构单元(3)”)。另外,单体(3)可仅使用一种,也可并用两种以上。即,本发明的聚合物可含有一种或更多种的结构单元(3)。

[0045] 单体(3)中的羟基的个数优选为2以上,更优选为2～5。作为单体(3),例如可列举:甘油单(甲基)丙烯酸酯、苏糖醇单(甲基)丙烯酸酯、赤藓醇单(甲基)丙烯酸酯、木糖醇单(甲基)丙烯酸酯、阿拉伯糖醇单(甲基)丙烯酸酯、甘露醇单(甲基)丙烯酸酯、半乳糖醇单(甲基)丙烯酸酯、山梨糖醇单(甲基)丙烯酸酯等。这些之中,优选甘油单(甲基)丙烯酸酯,更优选甘油单甲基丙烯酸酯。

[0046] 单体(3)可使用市售品,也可利用已知的方法制造。例如,单体(3)可通过(甲基)丙烯酸或其衍生物(例如酰氯)与具有3个以上羟基的多元醇的酯化反应来制造。酯化反应是已知的,本领域技术人员可适当设定其条件来进行。

[0047] 在本发明的聚合物含有结构单元(1)和结构单元(3)的情况下,从稳定化作用的观点来看,相对于结构单元(1)和结构单元(3)的总计100摩尔(即,聚合中使用的单体(1)和单体(3)的总计100摩尔),结构单元(1)的量(即,聚合中使用的单体(1))优选为5～95摩尔,更优选为20～80摩尔,结构单元(3)的量(即,聚合中使用的单体(3))优选为5～95摩尔,更优选为20～80摩尔。

[0048] 在本发明的聚合物含有结构单元(1)、结构单元(2)和结构单元(3)的情况下,从稳定化作用的观点来看,相对于结构单元(1)、结构单元(2)和结构单元(3)的总计100摩尔(即,聚合中使用的单体(1)、单体(2)和单体(3)的总计100摩尔),结构单元(1)的量(即,聚合中使用的单体(1))优选为5～90摩尔、更优选为10～80摩尔、进一步优选为30～50摩尔,结构单元(2)的量(即,聚合中使用的单体(2))优选为5～90摩尔、更优选为10～80摩尔、进一步优选为30～50摩尔,结构单元(3)的量(即,聚合中使用的单体(3))优选为5～90摩尔、更优选为10～80摩尔、进一步优选为10～40摩尔。

[0049] 本发明的聚合物可含有不同于上述的结构单元(1)、结构单元(2)和结构单元(3)的来自单体(以下有时记为“单体(4)”)的结构单元(以下有时记为“结构单元(4)”)。单体

(4)可仅使用一种,也可并用两种以上。即,本发明的聚合物可含有一种或更多种结构单元(4)。

[0050] 作为单体(4),例如可列举:(甲基)丙烯酸烯丙酯等(甲基)丙烯酸烯基酯;(甲基)丙烯酸环己酯等(甲基)丙烯酸环烷基酯;(甲基)丙烯酸异冰片酯等(甲基)丙烯酸与单萜烯醇的酯;苯乙烯、甲基苯乙烯、氯甲基苯乙烯等苯乙烯系单体;甲基乙烯基醚、丁基乙烯基醚等乙烯基醚系单体;乙酸乙烯酯、丙酸乙烯酯等乙烯基酯系单体等。

[0051] 本发明的聚合物中的结构单元(4)的量相对于全部结构单元优选为40摩尔%以下,更优选为20摩尔%以下。本发明的聚合物更优选不含结构单元(4)。

[0052] 本发明的聚合物优选为选自由一种结构单元(1)构成的均聚物、由结构单元(1)和结构单元(2)构成的共聚物、以及由结构单元(1)、结构单元(2)和结构单元(3)构成的共聚物的至少一种,更优选为由一种结构单元(1)构成的均聚物、由结构单元(1)和结构单元(2)构成的共聚物、或由结构单元(1)、结构单元(2)和结构单元(3)构成的共聚物。需要说明的是,本说明书中,“由一种结构单元(1)构成的均聚物”是指其全部的结构单元(重复单元)由一种结构单元(1)构成的均聚物,“由结构单元(1)和结构单元(2)构成的共聚物”是指其全部的结构单元(重复单元)由结构单元(1)和结构单元(2)构成的共聚物,“由结构单元(1)、结构单元(2)和结构单元(3)构成的共聚物”是指其全部的结构单元(重复单元)由结构单元(1)、结构单元(2)和结构单元(3)构成的共聚物。其他同样的表述也是同样的含义。

[0053] 对本发明的聚合物的重均分子量没有特别限定,但优选为5,000～2,000,000,更优选为10,000～1,500,000。需要说明的是,该重均分子量例如可利用使用了EcoSEC系统(东曹株式会社制造)等的凝胶过滤层析,通过聚乙二醇换算来确定。

[0054] 本发明的共聚物可通过已知的方法(例如国际公开2018/216628号所记载的方法等)制造。

[0055] 从稳定性作用的观点来看,用于核酸扩增的组合物中的本发明的聚合物的浓度优选为0.0001w/v%以上,更优选为0.0005w/v%以上,进一步优选为0.0010w/v%以上,特别优选为0.010w/v%以上,最优选为0.10w/v%以上,并优选为10w/v%以下,更优选为5w/v%以下,进一步优选为1.0w/v%以下。需要说明的是,在使用两种以上本发明的聚合物的情况下,上述浓度是指两种以上本发明的聚合物的浓度的总计。对于以下的其他成分所记载的浓度或量,在使用两种以上的该成分的情况下,上述浓度或量也是指两种以上的该成分的浓度或量的总计。

[0056] <本发明的聚合物的优选例>

[0057] 作为本发明的聚合物的优选例,可列举:以下的本发明的聚合物(I)和本发明的聚合物(II)。

[0058] (本发明的聚合物(I))

[0059] 本发明的聚合物(I)为选自以下的均聚物(I-1)、共聚物(I-2)和共聚物(I-3)的至少一种,优选为以下的均聚物(I-1)、共聚物(I-2)或共聚物(I-3):

[0060] 均聚物(I-1),其由来自2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元(1)构成;

[0061] 共聚物(I-2),其由下述的结构单元构成:

[0062] 来自2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元(1)、以及

[0063] 来自(甲基)丙烯酸丁酯、(甲基)丙烯酸十八烷基酯或(甲基)丙烯酸苄酯的结构单

元(2)，并且，相对于结构单元(1)和结构单元(2)的总计100摩尔，结构单元(1)的量为5～95摩尔，且结构单元(2)的量为5～95摩尔；以及

[0064] 共聚物(I-3)，其由下述的结构单元构成：

[0065] 来自2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元(1)、

[0066] 来自(甲基)丙烯酸丁酯、(甲基)丙烯酸十八烷基酯或(甲基)丙烯酸苄酯的结构单元(2)、以及

[0067] 来自甘油单(甲基)丙烯酸酯的结构单元(3)，并且，相对于结构单元(1)、结构单元(2)和结构单元(3)的总计100摩尔，结构单元(1)的量为5～90摩尔，结构单元(2)的量为5～90摩尔，且结构单元(3)的量为5～90摩尔。

[0068] 在本发明的聚合物(I)中，优选共聚物(I-2)中的结构单元(1)的量为20～80摩尔和结构单元(2)的量为20～80摩尔，以及共聚物(I-3)中的结构单元(1)的量为10～80摩尔、结构单元(2)的量为10～80摩尔和结构单元(3)的量为10～80摩尔。需要说明的是，共聚物(I-2)中的上述结构单元的量的基准为结构单元(1)和结构单元(2)的总计100摩尔，以及共聚物(I-3)中的上述结构单元的量的基准为结构单元(1)、结构单元(2)和结构单元(3)的总计100摩尔。

[0069] 在本发明的聚合物(I)中，更优选共聚物(I-2)中的结构单元(1)的量为60～80摩尔和结构单元(2)的量为20～40摩尔，以及共聚物(I-3)中的结构单元(1)的量为30～50摩尔、结构单元(2)的量为30～50摩尔和结构单元(3)的量为10～40摩尔。需要说明的是，共聚物(I-2)中的上述结构单元的量的基准为结构单元(1)和结构单元(2)的总计100摩尔，以及共聚物(I-3)中的上述结构单元的量的基准为结构单元(1)、结构单元(2)和结构单元(3)的总计100摩尔。

[0070] (本发明的聚合物(II))

[0071] 本发明的聚合物(II)为选自以下的均聚物(II-1)、共聚物(II-2)和共聚物(II-3)的至少一种，优选为以下的均聚物(II-1)、共聚物(II-2)或共聚物(II-3)：

[0072] 均聚物(II-1)，其由来自2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元(1)构成；

[0073] 共聚物(II-2)，其由下述的结构单元构成：

[0074] 来自2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元(1)、以及

[0075] 来自甲基丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸十八烷基酯或甲基丙烯酸苄酯的结构单元(2)，并且，相对于结构单元(1)和结构单元(2)的总计100摩尔，结构单元(1)的量为20～80摩尔，且结构单元(2)的量为20～80摩尔；以及

[0076] 共聚物(II-3)，其由下述的结构单元构成：

[0077] 来自2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元(1)、

[0078] 来自甲基丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸十八烷基酯或甲基丙烯酸苄酯的结构单元(2)、以及

[0079] 来自甘油单甲基丙烯酸酯的结构单元(3)，并且，相对于结构单元(1)、结构单元(2)和结构单元(3)的总计100摩尔，结构单元(1)的量为10～80摩尔，结构单元(2)的量为10～80摩尔，且结构单元(3)的量为10～80摩尔。

[0080] 在本发明的聚合物(II)中，优选共聚物(II-2)中的结构单元(1)的量为60～80摩尔和结构单元(2)的量为20～40摩尔，以及共聚物(II-3)中的结构单元(1)的量为30～50摩

尔、结构单元(2)的量为30～50摩尔和结构单元(3)的量为10～40摩尔。需要说明的是，共聚物(II-2)中的上述结构单元的量的基准为结构单元(1)和结构单元(2)的总计100摩尔，以及共聚物(II-3)中的上述结构单元的量的基准为结构单元(1)、结构单元(2)和结构单元(3)的总计100摩尔。

[0081] <其他成分>

[0082] 本发明的组合物可通过将上述聚合物与根据需要用于核酸扩增的其他成分一起溶解于水等溶剂中来调制。即，本发明的组合物优选为含有上述聚合物和水(以及基于需要的其他成分)的组合物。

[0083] 作为用于核酸扩增的其他成分，可使用用于以PCR为代表的已知的核酸扩增的已知成分。作为这样的成分，例如可列举：pH缓冲液、金属盐、核酸合成酶、引物、双脱氧核苷三磷酸(dNTP)等。其他成分均可仅使用一种，也可并用两种以上。

[0084] 作为pH缓冲液，例如可列举：EDTA(乙二胺四乙酸)溶液、Tris-HCL(三(羟甲基)氨基甲烷-盐酸)溶液、TAE(Tris-乙酸-EDTA)溶液、TE(Tris-EDTA缓冲液)溶液。

[0085] 作为金属盐，例如可列举：氯化镁、乙酸锰(II)、硫酸钠、十二烷基硫酸钠等。

[0086] 作为核酸合成酶，例如可列举：DNA聚合酶、RNA聚合酶、逆转录酶等。

[0087] 作为引物，例如可列举：10～40个碱基长度的寡核苷酸。上述寡核苷酸的长度优选为15～30个碱基，更优选为17～25个碱基。上述寡核苷酸可通过已知的方法设计、调制。上述寡核苷酸可具有由荧光素等形成的发出荧光的基团。

[0088] 引物可仅使用一种，也可将两种引物成对使用，还可使用多个引物以同时扩增多个区域。本发明的组合物中的引物浓度优选为0.01～10μM，更优选为0.05～5.0μM，进一步优选为0.1～3.0μM。

[0089] 作为双脱氧核苷三磷酸(dNTP)，例如可列举：脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)、脱氧胸苷三磷酸(dTTP)、脱氧胞苷三磷酸(dCTP)。

[0090] 作为另外的其他成分，可列举：牛血清白蛋白、二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、甜菜碱、甲酰胺、明胶、甘油、聚乙二醇、亚精胺、T4 Gane 32蛋白、4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯基-聚乙二醇、叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇、聚乙二醇叔辛基苯基醚、脲等。

[0091] [核酸扩增法]

[0092] 本发明还提供核酸扩增法，其包括：将本发明的组合物与含有待扩增的核酸的样品混合以调制用于核酸扩增的反应液。本发明的核酸扩增法中的本发明的聚合物和本发明的组合物的说明如上所述。另外，只要没有特别记载，则核酸扩增法的说明也如上所述。

[0093] 本发明的核酸扩增法中使用的试样含有待扩增的核酸。试样优选为含有水和待扩增的核酸的试样溶液。试样可含有一种核酸，也可含有两种以上核酸。试样中的核酸的浓度可根据核酸扩增的目的适宜确定，在可调整浓度的情况下，优选为1～10^{20}个拷贝/μL，更优选为1～10^{10}个拷贝/μL，进一步优选为1～10^{5}个拷贝/μL，特别优选为1～500个拷贝/μL，最优选为1～100个拷贝/μL。待扩增的核酸优选为来自RNA病毒的RNA，更优选为来自SARS-CoV-2的RNA。

[0094] 在本发明的核酸扩增法中，相对于本发明的组合物的用量1μL，试样的用量优选为痕量～1μL，更优选为0.01～1μL，进一步优选为0.2～0.4μL。

[0095] 本发明的核酸扩增法优选为PCR法或RT-PCR法，更优选为实时PCR法或实时RT-PCR

法,进一步优选为使用一步RT-实时PCR试剂的实时RT-PCR法。

[0096] 实施例

[0097] 以下,通过实施例等更详细地说明本发明,但本发明并不限于这些实施例。

[0098] [聚合物的合成]

[0099] [合成例1]

[0100] 称量40.0g作为单体(1)的2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(以下有时简称为“MPC”)至聚合用玻璃烧瓶中,加入60.0g纯净水溶解单体(1),向所得溶液中加入0.31g作为聚合引发剂的偶氮二异丁腈。对反应容器内部充分进行氮气置换后,在搅拌下、于70℃下加热6小时,从而进行聚合。将得到的反应液用冰冷却,滴加到乙醚中,从而使聚合物沉淀。过滤沉淀物,用乙醚洗涤后,进行真空干燥,得到了白色粉末状的均聚物(以下记为“聚合物1”)。聚合物1的重均分子量通过下述条件下的凝胶过滤层析(以下有时简称为“GPC”)测定,以聚乙二醇换算计为1,030,000。

[0101] [合成例2]

[0102] 向反应容器中装入作为单体(1)的MPC和作为单体(2)的甲基丙烯酸丁酯(以下有时简称为“BMA”),使单体(1)/单体(2)=80/20(摩尔比),除此以外,与合成例1同样地操作,得到了无规共聚物(以下记为“聚合物2”)。聚合物2的重均分子量通过下述条件下的GPC测定,以聚乙二醇换算计为600,000。

[0103] [合成例3]

[0104] 向反应容器中装入作为单体(1)的MPC、作为单体(2)的BMA和作为单体(3)的甘油单甲基丙烯酸酯(以下有时简记为“GLM”),使单体(1)/单体(2)/单体(3)=40/40/20(摩尔比),除此以外与合成例1同样地操作,得到了无规共聚物(以下记为“聚合物3”)。聚合物3的重均分子量通过下述条件下的GPC测定,以聚乙二醇换算计为22,000。

[0105] [合成例4]

[0106] 向反应容器中装入作为单体(1)的MPC和作为单体(2)的甲基丙烯酸十八烷基酯(以下有时简记为“SMA”),使单体(1)/单体(2)=80/20(摩尔比),除此以外,与合成例1同样地操作,得到了无规共聚物(以下记为“聚合物4”)。聚合物4的重均分子量通过下述条件下的GPC测定,以聚乙二醇换算计为43,000。

[0107] [合成例5]

[0108] 向反应容器中装入作为单体(1)的MPC和作为单体(2)的甲基丙烯酸苄酯(以下有时简记为“BNM”),使单体(1)/单体(2)=80/20(摩尔比),除此以外,与合成例1同样地操作,得到了共聚物(以下记为“聚合物5”)。聚合物5的重均分子量通过下述条件下的GPC测定,以聚乙二醇换算计为240,000。

[0109] [GPC测定]

[0110] 合成例1～5中得到的聚合物1～5的GPC测定在以下的条件下实施。

[0111] GPC系统:EcoSEC系统(东曹株式会社制造);

[0112] 柱:串联连接Shodex OHpak SB-802.5HQ(昭和电工株式会社制造)和SB-806HQ(昭和电工株式会社制造);

[0113] 展开溶剂:20mM的磷酸钠缓冲液(pH 7.4);

[0114] 检测器:示差折光检测器;

[0115] 分子量标准:EasiVial PEG/PEO(Agilent Technologies制造);

[0116] 流速:0.5mL/分钟;

[0117] 柱温:40℃;

[0118] 样品:将得到的聚合物用展开溶剂稀释使最终浓度为0.1重量%;

[0119] 注入量:100μL。

[0120] 将合成例1～5中使用的单体及其摩尔比、以及得到的聚合物的重均分子量归纳在下述表1中。

[0121] [表1]

[0122]

	单体(1)	单体(2)	单体(3)	单体的摩尔比	重均分子量
聚合物1	MPC	-	-	100/0/0	1,030,000
聚合物2	MPC	BMA	-	80/20/0	600,000
聚合物3	MPC	BMA	GLM	40/40/20	22,000
聚合物4	MPC	SMA	-	80/20/0	43,000
聚合物5	MPC	BNM	-	80/20/0	240,000

[0123] 单体的摩尔比＝单体(1)/单体(2)/单体(3);

[0124] MPC:2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱;

[0125] BMA:甲基丙烯酸丁酯;

[0126] SMA:甲基丙烯酸十八烷基酯;

[0127] BNM:甲基丙烯酸苄酯;

[0128] GLM:甘油单甲基丙烯酸酯。

[0129] [实施例1～5]

[0130] 使用SARS-CoV-2RT-qPCR检测试剂盒(富士胶片和光纯药株式会社制造),按以下的添加量调制聚合物添加前的溶液(以下记为“溶液A”)。溶液A的构成如下述表2所示。

[0131] [表2]

[0132]

试剂名称	添加量
5×反应缓冲液	4μL
4.2mmol/L的dNTPs	4μL
50mmol/L的乙酸锰(II)	1μL
热启动逆转录DNA聚合酶	0.25μL
蒸馏水(不含核酸酶)(Distilled water,Nuclease-free)	0.55μL
正向引物NI ID_2019-nCOV_N_F2	1μL
反向引物NI ID_2019-nCOV_N_R2	1.4μL
TaqMan Probe NI ID_2019-nCOV_N_P2	0.8μL
总计	13μL

[0133] 试剂:SARS-CoV-2RT-qPCR检测试剂盒(富士胶片和光纯药株式会社制造)的构成物品;

[0134] 添加量:每孔的添加量。

[0135] 在实施例1～5中,将0.5w/v%的聚合物1～5的水溶液分别以2μL/孔添加到表2所示组成的溶液A中,调制了15μL的用于核酸扩增的组合物(组合物中的各聚合物的浓度:

0.067w/v%)。

[0136] 使用上述试剂盒所附的阳性对照RNA,N set No.2(N2),调制了核酸浓度为10个拷贝/μL的试样溶液。将所得到的试样溶液以5μL/孔的量添加到用于核酸扩增的组合物中,调制了PCR反应液(PCR反应液中的各聚合物的浓度:0.050w/v%)。使用qPCR装置StepOnePlus™实时PCR系统(Applied Biosystems制造)进行PCR法,测定PCR反应液的终点的荧光强度。温度程序如下述表3所示。

[0137] [表3]

[0138]

步骤	反应条件	
1	90℃,30秒	
2	60℃,5分钟	
3	95℃,1分钟	
4	95℃,3秒	60个循环
5	60℃,10秒	
6	4℃	

[0139] 将用于核酸扩增的组合物在35℃温育2小时后,将上述试样溶液添加到用于核酸扩增的组合物中,除此以外,与上述同样地操作,测定PCR反应液的终点的荧光强度。

[0140] 使用利用未经温育的用于核酸扩增的组合物得到的荧光强度(测定次数为3次)的平均值(以下记为“温育前的荧光强度的平均值”)和利用经温育的用于核酸扩增的组合物得到的荧光强度(测定次数为3次)的平均值(以下记为“温育后的荧光强度的平均值”),由下式算出荧光强度比。将结果记载于下述表4。

[0141] 荧光强度比=温育后的荧光强度的平均值/温育前的荧光强度的平均值[比较例1]

[0142] 比较例1中,将蒸馏水(不含核酸酶)以2μL/孔添加到表2所示组成的溶液A中,将得到的组合物用作用于核酸扩增的组合物,除此以外,与实施例1～5同样地操作,算出荧光强度比。将结果记载于下述表4。

[0143] [表4]

[0144]

	使用的聚合物	荧光强度比
比较例1	-	0.14
实施例1	聚合物1	0.34
实施例2	聚合物2	0.16
实施例3	聚合物3	0.54
实施例4	聚合物4	0.74
实施例5	聚合物5	0.34

[0145] 如表4所示,使用了聚合物1～5的实施例1～5的荧光强度比高于未使用上述聚合物的比较例1的荧光强度比。由这些结果可知:包含含有来自2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆

碱的结构单元的聚合物的用于核酸扩增的组合物在保存稳定性方面优异。

[0146] [实施例6～8]

[0147] 实施例6～8中，将5w/v％的聚合物1～3的水溶液以2μL/孔添加到表2所示组成的溶液A中，调制了15μL的用于核酸扩增的组合物，除此以外，与实施例1～5同样地操作，算出荧光强度比(组合物中的各聚合物的浓度：0.67w/v％、PCR反应液中的各聚合物的浓度：0.50w/v％)。将结果记载于下述表5。

[0148] [表5]

[0149]

	使用的聚合物	荧光强度比
实施例6	聚合物1	0.38
实施例7	聚合物2	0.87
实施例8	聚合物3	0.76

[0150] 如表4和5所示，使用了聚合物1～3的实施例6～8的荧光强度比高于未使用上述聚合物的比较例1的荧光强度比。由这些结果可知：包含含有来自2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元的聚合物的用于核酸扩增的组合物在保存稳定性方面优异。

[0151] [实施例9]

[0152] 实施例9中，将0.5w/v％的聚合物1的水溶液以2μL/孔添加到表2所示组成的溶液A中，调制了15μL的用于核酸扩增的组合物(组合物中的聚合物1的浓度：0.067w/v％)。将该用于核酸扩增的组合物在4℃下温育1个月和3个月，调制核酸浓度为40个拷贝/μL的试样溶液，与实施例1～5同样地操作，算出温育1个月后的荧光强度比和温育3个月后的荧光强度比(PCR反应液中的聚合物1的浓度：0.050w/v％)。将结果记载于下述表6。

[0153] [比较例2]

[0154] 比较例2中，将蒸馏水(不含核酸酶)以2μL/孔添加到表2所示组成的溶液A中，将所得到的组合物用作用于核酸扩增的组合物，除此以外，与实施例9同样地操作，算出温育1个月后的荧光强度比和温育3个月后的荧光强度比。将结果记载于下述表6。

[0155] [表6]

[0156]

	使用的聚合物	荧光强度比	
		在4℃下温育1个月后	在4℃下温育3个月后
比较例2	-	0.80	0.28
实施例9	聚合物1	1.00	0.78

[0157] 如表6所示，使用了聚合物1的实施例9的荧光强度比高于未使用上述聚合物的比较例2的荧光强度比。由这些结果可知：包含含有来自2-(甲基)丙烯酰氧乙基磷酸胆碱的结构单元的聚合物的用于核酸扩增的组合物在保存稳定性方面优异。

[0158] 产业实用性

[0159] 本发明的组合物的保存稳定性优异。本发明的组合物可适合用于基因检测、微生物检测、病毒检测等的核酸扩增法(特别是PCR法)。

[0160] 本申请以在日本申请的特愿2021-12402号为基础，其内容全部包含在本申请说明书中。