【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17年12月22日(2005.12.22)

【公表番号】特表2004-528029(P2004-528029A)
【公表日】平成16年9月16日(2004.9.16)
【年通号数】公開・登録公報2004-036
【出願番号】特願2002-570773(P2002-570773)
【国際特許分類第７版】
　Ｃ１２Ｎ　15/09
　Ｃ１２Ｎ　15/00
　Ｃ１２Ｑ　 1/02
　Ｃ１２Ｑ　 1/68
　Ｇ０１Ｎ　33/53
【ＦＩ】
　Ｃ１２Ｎ　15/00　　ＺＮＡＡ
　Ｃ１２Ｑ　 1/02
　Ｃ１２Ｑ　 1/68　　Ａ
　Ｇ０１Ｎ　33/53　　Ｍ
　Ｃ１２Ｎ　15/00　　Ｚ

【手続補正書】
【提出日】平成17年3月4日(2005.3.4)
【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】
PCR反応混合物中で、DNA試料に対してPCR増幅を行う工程を含むマルチプレックスPCR法であって、ここで、該PCR増幅を第一の増幅段階および第二の増幅段階で行い、各増幅段階が1以上のPCRサイクルを含み、そして各PCRサイクルが変性工程、アニーリング工程、およびアニーリング工程と同一温度で実行可能な伸長工程を含み、ここで、第二の増幅段階のPCR増幅を、第一の増幅段階のPCR増幅と異なる反応条件下で行って、第一の増幅段階および第二の増幅段階中、第一のプライマーセットによる第一のアンプリコン（amplicon）産生および第二のプライマーセットによる第二のアンプリコン産生の相対率を変調する、前記方法。
【請求項２】
第二の増幅段階開始時に、第二のプライマーセットを反応混合物に添加する、請求項1の方法。
【請求項３】
第一のPCRプライマーセットおよび第二のPCRプライマーセットの1つが、β-GUS特異的アンプリコン、18S rRNA特異的アンプリコン、CEA特異的アンプリコンおよびチロシナーゼ特異的アンプリコンの1つを生じる、請求項1の方法。
【請求項４】
第一のPCRプライマーセットおよび第二のPCRプライマーセットの1つが、SEQ ID NO: 3、4、6、7、11、12、13、14、16、17、19および20の1つの配列を含むプライマー、またはその誘導体を含む、請求項3の方法。
【請求項５】

第一のPCRプライマーセットおよび第二のPCRプライマーセットの1つが、SEQ ID NO: 3、4、6、7、11、12、13、14、16、17、19および20の1つからなるプライマー、またはその誘導体を含む、請求項3の方法。
【請求項６】
第一のPCRプライマーセットおよび第二のPCRプライマーセットの1つが、SEQ ID NO: 3、4、6、7、11、12、13、14、16、17、19および20の1つからなるプライマーを含む、請求項3の方法。
【請求項７】
反応混合物がDNA試料、第一の有効なTmを有する第一のプライマーセット、および第一の有効なTmと異なる第二の有効なTmを有する第二のプライマーセットを含み、ここで、第一の増幅段階のアニーリング工程を、第二の増幅段階のアニーリング工程と異なる温度で行う、請求項1の方法。
【請求項８】
第一の増幅段階および第二の増幅段階の少なくとも1つのPCRサイクルにおいて、アニーリング工程および伸長工程を同一温度で行う、請求項7の方法。
【請求項９】
第一の増幅段階および第二の増幅段階の少なくとも1つのPCRサイクルにおいて、アニーリング工程および伸長工程を異なる温度で行う、請求項7の方法。
【請求項１０】
第一のプライマーセットがβ-GUS特異的アンプリコンを生じ、そして第二のプライマーセットがCEA特異的アンプリコンを生じ、第一のプライマーセットのTmが、第二のプライマーセットのTmより約10℃低く、そして第一の増幅段階のPCR増幅のためのアニーリング温度が、第二の増幅段階のPCR増幅のためのアニーリング温度より約10℃低い、請求項7の方法。
【請求項１１】
第一のPCRプライマーセットがSEQ ID NO: 16および17からなり、そして第二のPCRプライマーセットがSEQ ID NO: 6および7からなり、400 nM／Lの両PCRプライマーセットの最初のプライマー濃度、並びに第一のPCRプライマーセットに有効な約50℃のTmおよび第二のPCRプライマーセットに有効な約60℃のTmに基づいて、第一の増幅段階のPCR増幅のためのアニーリング温度が約53℃と同等であり、そして第二の増幅段階のPCR増幅のためのアニーリング温度が約64℃と同等である、請求項10の方法。
【請求項１２】
各サイクルの変性工程が約1秒間である、請求項1の方法。
【請求項１３】
各サイクルの変性工程が約1秒間未満である、請求項1の方法。
【請求項１４】
第一の増幅段階の前に、そしてPCRプライマーを反応混合物に添加する前に、RNA試料に対して逆転写反応を行って、反応混合物のDNA試料のDNAを生じる工程をさらに含む、請求項1の方法。
【請求項１５】
逆転写反応を約10分間未満行う、請求項14の方法。
【請求項１６】
逆転写反応を約2分間行う、請求項14の方法。
【請求項１７】
内部陽性対照（Internal Positive Control）RNAおよび内部陽性対照DNAの一方または両方を逆転写反応に添加する、請求項14の方法。
【請求項１８】
内部陽性対照DNAをPCR反応混合物に添加する、請求項1の方法。
【請求項１９】
内部陽性対照DNAが、SEQ ID NO: 23～25の1つの配列、またはその誘導体を含む、請求項1

8の方法。
【請求項２０】
内部陽性対照DNAが1以上のウラシル残基を含有する、請求項18の方法。
【請求項２１】
増幅段階が、特定のアンプリコン蓄積を示す蛍光レポーターを用いた定量的PCR反応を含む、請求項1の方法。
【請求項２２】
定量的PCR反応が蛍光5'ヌクレアーゼアッセイである、請求項21の方法。
【請求項２３】
蛍光レポーターが分子ビーコンである、請求項21の方法。
【請求項２４】
反応混合物用の1以上の試薬を、自動化した系で使用するよう適切に形成したカートリッジ中、反応混合物において使用するために提供する、請求項1の方法。
【請求項２５】
カートリッジが単回使用後に使い捨て可能である、請求項24の方法。
【請求項２６】
カートリッジが、反応混合物用の試薬と別個にまたは共に、区画化された、さらなる試薬または機械的構成要素を含有し、さらなる試薬または機械的構成要素が、細胞溶解または組織溶解、RNA精製および逆転写の1つに適応している、請求項24の方法。
【請求項２７】
増幅段階が、特定のアンプリコン蓄積を示す蛍光レポーターを用いた定量的PCR反応を含み、そして反応混合物において蛍光レポーターが閾値レベルまで集積した際、自動化した系が、PCR反応を第一の増幅段階から第二の増幅段階に自動的にシフトする、請求項24の方法。
【請求項２８】
第一の段階および第二の段階を、同一反応容器中で連続して行う、請求項1の方法。
【請求項２９】
DNA試料において、第一のプライマーセットおよび第二のプライマーセットの標的配列数に、少なくとも約30～100倍の相違があると予期される、請求項1の方法。
【請求項３０】
第一の段階および第二の段階で、PCR反応混合物に対してPCR増幅を行う工程を含む、マルチプレックスPCR法であって、反応混合物がDNA試料、第一の有効なTmを有する第一のプライマーセット、および第一の有効なTmと異なる第二の有効なTmを有する第二のプライマーセットを含み、各増幅段階が1以上のPCRサイクルを含み、各PCRサイクルが変性工程、アニーリング工程、およびアニーリング工程と同一温度で実行可能な伸長工程を含み、ここで、第一の増幅段階のアニーリング工程を、第二の増幅段階のアニーリング工程と異なる温度で行って、第一の増幅段階および第二の増幅段階中、第一のプライマーセットによる第一のアンプリコン産生および第二のプライマーセットによる第二のアンプリコン産生の相対率を変調する、前記方法。
【請求項３１】
第一の増幅段階および第二の増幅段階の少なくとも1つのPCRサイクルにおいて、アニーリング工程および伸長工程を同一温度で行う、請求項30の方法。
【請求項３２】
第一の増幅段階および第二の増幅段階の少なくとも1つのPCRサイクルにおいて、アニーリング工程および伸長工程を異なる温度で行う、請求項30の方法。
【請求項３３】
第一のプライマーセットの有効なTmおよび第二のプライマーセットの有効なTmが、少なくとも約5℃異なる、請求項30の方法。
【請求項３４】
第一のPCRプライマーセットおよび第二のPCRプライマーセットの1つが、β-GUS特異的ア

ンプリコン、18S rRNA特異的アンプリコン、CEA特異的アンプリコンおよびチロシナーゼ特異的アンプリコンの1つを生じる、請求項30の方法。
【請求項３５】
第一のPCRプライマーセットおよび第二のPCRプライマーセットの1つが、SEQ ID NO: 3、4、6、7、11、12、13、14、16、17、19および20の1つの配列を含むプライマー、またはその誘導体を含む、請求項34の方法。
【請求項３６】
第一のPCRプライマーセットおよび第二のPCRプライマーセットの1つが、SEQ ID NO: 3、4、6、7、11、12、13、14、16、17、19および20の1つからなるプライマー、またはその誘導体を含む、請求項34の方法。
【請求項３７】
第一のPCRプライマーセットおよび第二のPCRプライマーセットの1つが、SEQ ID NO: 3、4、6、7、11、12、13、14、16、17、19および20の1つからなるプライマーを含む、請求項34の方法。
【請求項３８】
第一の増幅段階のアニーリング工程を、第二の増幅段階のアニーリング工程より高い温度で行う、請求項30の方法。
【請求項３９】
第一のプライマーセットおよび第二のプライマーセットの1つが、β-GUS特異的アンプリコン、CEA特異的アンプリコン、18S rRNAアンプリコンおよびチロシナーゼアンプリコンの1つを生じる、請求項38の方法。
【請求項４０】
第一のプライマーセットがβ-GUS特異的アンプリコンを生じ、そして第二のプライマーセットがCEA特異的アンプリコンを生じる、請求項38の方法。
【請求項４１】
第一の増幅段階のアニーリング工程を、第二の増幅段階のアニーリング工程より低い温度で行う、請求項30の方法。
【請求項４２】
第一の増幅段階の前に、そしてPCRプライマーの1つおよび熱安定性DNAポリメラーゼを反応混合物に添加する前に、RNA試料に対して逆転写反応を行って、反応混合物のDNA試料中のDNAを生じる工程をさらに含む、請求項30の方法。
【請求項４３】
逆転写反応を約10分間未満行う、請求項42の方法。
【請求項４４】
逆転写反応を約2分間行う、請求項42の方法。
【請求項４５】
内部陽性対照RNAおよび内部陽性対照DNAの一方または両方を逆転写反応に添加する、請求項42の方法。
【請求項４６】
内部陽性対照DNAをPCR反応混合物に添加する、請求項30の方法。
【請求項４７】
内部陽性対照RNAが、SEQ ID NO: 23～25の1つの配列を含む、請求項46の方法。
【請求項４８】
反応混合物用の1以上の試薬を、自動化した系で使用するよう適切に形成したカートリッジ中、反応混合物において使用するために提供する、請求項30の方法。
【請求項４９】
カートリッジが単回使用後に使い捨て可能である、請求項48の方法。
【請求項５０】
カートリッジが、反応混合物用の試薬と別個にまたは共に、区画化された、さらなる試薬または機械的構成要素を含有し、さらなる試薬または機械的構成要素が、細胞または組織

溶解、RNA精製および逆転写の1つに適応している、請求項48の方法。
【請求項５１】
増幅段階が、特定のアンプリコン蓄積を示す蛍光レポーターを用いた定量的PCR反応を含む、請求項30の方法。
【請求項５２】
定量的PCR反応が蛍光5'ヌクレアーゼアッセイである、請求項51の方法。
【請求項５３】
蛍光レポーターが分子ビーコンである、請求項51の方法。
【請求項５４】
RT-PCR法であって：
（a）反応混合物において、RNA試料に対して、約10分間未満、逆転写反応を行って、DNA試料を生じ；
（b）反応混合物に、第一の有効なTmを有する第一のプライマーセット、第一の有効なTmと異なる第二の有効なTmを有する第二のプライマーセット、および熱安定性DNAポリメラーゼを添加し；そして
（c）第一の増幅段階および第二の増幅段階で、反応混合物に対してPCR増幅を行い、各増幅段階が1以上のPCRサイクルを含み、そして各PCRサイクルが約1秒間以下の変性工程、約10秒間未満のアニーリング工程、およびアニーリング工程と同一温度で実行可能な約10秒間未満の伸長工程を含み、ここで、第一の増幅段階のアニーリング工程を、第二の増幅段階のアニーリング工程より低い温度で行って、第一の増幅段階および第二の増幅段階中、第一のプライマーセットによる第一の標的配列増幅および第二のプライマーセットによる第二の標的配列増幅の相対率を変調し；
ここで、DNA試料において、第一の標的配列が、第二の標的配列より、少なくとも約30倍優勢であると予期される
工程を含む、前記方法。
【請求項５５】
一試験管RT-PCR法の感度および特異性を増加させる方法であって：
（a）反応混合物において、RNA試料に対して逆転写反応を行って、DNA試料を生じ；
（b）反応混合物に、PCRプライマーセットおよび熱安定性DNAポリメラーゼを含有するPCR試薬組成物を添加し；そして
（c）反応混合物に対して、PCR増幅を行う
工程を含む、前記方法。
【請求項５６】
PCR増幅前に、PCR反応の第一のサイクル前または該サイクル中に除去される物理的バリアによって、反応容器中の反応混合物からPCR試薬組成物を分離し、それによってPCR試薬組成物を反応混合物に添加する、請求項55の方法。
【請求項５７】
逆転写反応を約10分間未満行う、請求項55の方法。
【請求項５８】
逆転写反応を約2分間行う、請求項55の方法。
【請求項５９】
自動化した系でRT-PCR法を行い、そしてRT-PCR法で使用する前に試薬を保管しておく複数の区画を有するカートリッジ中に、RT-PCR法の試薬を保管して、ここで、自動化した系が、プログラムされた順序にしたがって、カートリッジから反応容器に試薬を添加する、請求項55の方法。
【請求項６０】
RT-PCR法であって：
（a）反応混合物において、RNA試料に対して、約10分間未満、逆転写反応を行い；そして
（b）反応混合物に対して、PCR反応を行う

工程を含んでなる、前記方法。
【請求項６１】
逆転写反応を約2分間行う、請求項60の方法。
【請求項６２】
PCR反応が、PCR反応混合物中で、DNA試料に対してPCR増幅を行う工程を含むマルチプレックスPCR法であり、ここで、PCR増幅を第一の増幅段階および第二の増幅段階で行い、各増幅段階が1以上のPCRサイクルを含み、そして各PCRサイクルが、変性工程、アニーリング工程、およびアニーリング工程と同一温度で実行可能な伸長工程を含み、ここで、第二の増幅段階のPCR増幅を、第一の増幅段階のPCR増幅とは異なる反応条件下で行って、第一の増幅段階および第二の増幅段階中、第一のプライマーセットによる第一のアンプリコンの産生および第二のプライマーセットによる第二のアンプリコンの産生の相対率を変調する、請求項60に記載の方法。
【請求項６３】
SEQ ID NO: 6、7、13、14、16、17、19、20および23～35の1つからなるオリゴヌクレオチド、並びにその誘導体。
【請求項６４】
食道の転移化腺癌を迅速に検出する方法であって：
（a）前哨（sentinel）リンパ節から得られたRNAに対して、CEAに特異的な定量的RT-PCR法を行って；そして
（b）CEA発現が閾値レベルを超えているかどうかを決定する
工程を含む、前記方法。
【請求項６５】
手術中PCR診断法であって：
手術中に、患者から得られた組織試料に由来する核酸試料に対して、指標転写物発現が閾値レベルを超えているかどうかを、手術中に行われるPCR法により決定する；工程を含む、前記方法。
【請求項６６】
決定工程の結果によって指示される方式で、手術を続ける
工程をさらに含む、請求項65の方法。
【請求項６７】
組織試料が腫瘍バイオプシーであり、そしてPCR法が、過剰発現している場合に悪性度の指標となる指標転写物に特異的である、請求項65の方法。
【請求項６８】
指標転写物がCEA転写物である、請求項67の方法。
【請求項６９】
PCR法が、PCR反応混合物中で、DNA試料に対してPCR増幅を行う工程を含むマルチプレックスPCR法であり、ここで、PCR増幅を第一の増幅段階および第二の増幅段階で行い、各増幅段階が1以上のPCRサイクルを含み、そして各PCRサイクルが性工程、アニーリング工程、およびアニーリング工程と同一温度で実行可能な伸長工程を含み、ここで、第二の増幅段階のPCR増幅を、第一の増幅段階のPCR増幅とは異なる反応条件下で行って、第一の増幅段階および第二の増幅段階中、第一のプライマーセットによる第一のアンプリコンの産生および第二のプライマーセットによる第二のアンプリコンの産生の相対率を変調する、請求項65の方法。
【請求項７０】
PCR反応が、第一段階および第二段階で、PCR反応混合物に対してPCR増幅を行う工程を含むマルチプレックスPCR法であり、前記反応混合物は、DNA試料、第一の有効なTmを有する第一のプライマーセットおよび第一の有効なTmと異なる第二の有効なTmを有する第二のプライマーセットを含み、各増幅段階が1以上のPCRサイクルを含み、各PCRサイクルが変性工程、アニーリング工程、およびアニーリング工程と同一温度で実行可能な伸長工程を含み、第一の増幅段階のアニーリング工程を、第二の増幅段階のアニーリング工程とは異な

る温度で行って、第一の増幅段階および第二の増幅段階中、第一のプライマーセットによる第一のアンプリコンの産生および第二のプライマーセットによる第二のアンプリコンの産生の相対率を変調する、、請求項65の方法。

【請求項７１】

PCR法が、複数のPCRサイクルを含むPCR増幅を、核酸試料、各プライマー濃度が少なくとも約400 nMであるプライマーセット、を含むPCR反応混合物に対して行う工程を含むPCR法であり、各PCRサイクルが変性工程、アニーリング工程、およびアニーリング工程と同一温度で実行可能な伸長工程を含み、PCR増幅がβ-GUS特異的アンプリコン、18S rRNA特異的アンプリコン、チロシナーゼ特異的アンプリコンおよびCEA特異的アンプリコンの1つを生じる、請求項65の方法。

【請求項７２】

PCR法がRT-PCR法であって：

（a）反応混合物において、RNA試料に対して、約10分間未満、逆転写反応を行って、DNA試料を生じ；

（b）反応混合物に、第一の有効なTmを有する第一のプライマーセット、第一の有効なTmと異なる第二の有効なTmを有する第二のプライマーセット、および熱安定性DNAポリメラーゼを添加し；そして

（c）第一の増幅段階および第二の増幅段階で、反応混合物に対してPCR増幅を行い、各増幅段階が1以上のPCRサイクルを含み、そして各PCRサイクルが約1秒間以下の変性工程、約10秒間未満のアニーリング工程、およびアニーリング工程と同一温度で実行可能な約10秒間未満の伸長工程を含み、ここで、第一の増幅段階のアニーリング工程を、第二の増幅段階のアニーリング工程より低い温度で行って、第一の増幅段階および第二の増幅段階中、第一のプライマーセットによる第一の標的配列増幅および第二のプライマーセットによる第二の標的配列増幅の相対率を変調する

ここで、DNA試料において、第一の標的配列が、第二の標的配列より、少なくとも約30倍優勢であると予期される

工程を含む、請求項65の方法。

【請求項７３】

PCR法がRT-PCR法であって：

（a）反応混合物において、RNA試料に対して、約10分間未満、逆転写反応を行い；

（b）反応混合物に対してPCR増幅を行う

工程を含む、請求項65の方法。

【請求項７４】

第一の有効なTmを有する第一のPCRプライマーセットおよび第一の有効なTmと異なる第二の有効なTmを有する第二のプライマーセットを含む試薬キット。

【請求項７５】

第一のプライマーセットの有効なTmおよび第二のプライマーセットの有効なTmが、少なくとも約5℃異なる、請求項74の試薬キット。

【請求項７６】

第一のプライマーセットおよび第二のプライマーセットが、β-GUS特異的アンプリコン、18S rRNA特異的アンプリコン、CEA特異的アンプリコンおよびチロシナーゼ特異的アンプリコンの1つを生じる、請求項74の試薬キット。

【請求項７７】

第一のPCRプライマーセットがβ-GUS特異的アンプリコンを生じ、そして第二のPCRプライマーセットがCEA特異的アンプリコンを生ずる、請求項76の試薬キット。

【請求項７８】

第一のPCRプライマーセットおよび第二のPCRプライマーセットの1つが、SEQ ID NO: 3、4、6、7、11、12、13、14、16、17、19および20の1つの配列を含むプライマー、またはその誘導体を含む、請求項74の試薬キット。

【請求項７９】

第一のPCRプライマーセットおよび第二のPCRプライマーセットの1つが、SEQ ID NO: 3、4、6、7、11、12、13、14、16、17、19および20の1つからなるプライマー、またはその誘導体からなる、請求項74の試薬キット。
【請求項８０】
第一のPCRプライマーセットおよび第二のPCRプライマーセットの1つが、SEQ ID NO: 3、4、6、7、11、12、13、14、16、17、19および20の1つからなるプライマーを含む、請求項74の試薬キット。
【請求項８１】
内部陽性対照DNAをさらに含む、請求項74の試薬キット。
【請求項８２】
逆転写酵素および逆転写酵素プライマーをさらに含む、請求項74の試薬キット。
【請求項８３】
内部陽性対照RNAをさらに含む、請求項74の試薬キット。
【請求項８４】
内部陽性対照DNAをさらに含む、請求項83の試薬キット。
【請求項８５】
内部陽性対照RNAが、SEQ ID NO: 23～25の1つの配列を含む、請求項83の試薬キット。
【請求項８６】
定量的PCR反応において特定のアンプリコン蓄積を示す蛍光レポーターをさらに含む、請求項74の試薬キット。
【請求項８７】
蛍光レポーターが蛍光5'ヌクレアーゼアッセイのレポーターである、請求項86の試薬キット。
【請求項８８】
蛍光レポーターが分子ビーコンである、請求項86の試薬キット。
【請求項８９】
プライマーセットが自動化PCRシステムにおいて使用するためのカートリッジ中に含有される、請求項74の試薬キット。
【請求項９０】
共通の通路に流体的に連結された複数の区画および区画から共通の通路への試薬の流れを制御する様に形成したバルブを含む、自動化したPCR系において使用するためのカートリッジであって、第一の有効なTmを有する第一のPCRプライマーセットおよび第一の有効なTmと異なる第二の有効なTmを有する第二のPCRプライマーセットを含有する1以上の区画を含む、前記カートリッジ。
【請求項９１】
逆転写試薬、細胞溶解試薬およびRNA精製試薬の1つを含む第三の区画をさらに含む、請求項90のカートリッジ。