

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-501719

(P2017-501719A)

(43) 公表日 平成29年1月19日(2017.1.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
G O 1 N 33/553 (2006.01)	G O 1 N 33/553	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)

(21) 出願番号 特願2016-542236 (P2016-542236)
 (86) (22) 出願日 平成26年12月23日 (2014.12.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年8月19日 (2016.8.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2014/050443
 (87) 国際公開番号 WO2015/095929
 (87) 国際公開日 平成27年7月2日 (2015.7.2)
 (31) 優先権主張番号 2013905052
 (32) 優先日 平成25年12月23日 (2013.12.23)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 500446937
 ザ ユニバーシティ オブ クイーンズラ
 ンド
 THE UNIVERSITY OF Q
 UEENSLAND
 オーストラリア国 4072 クイーンズ
 ランド州 ブリスベン セント ルシア
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100142907
 弁理士 本田 淳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸検出法およびキット

(57) 【要約】

標的核酸を検出するための方法およびキットであって、増幅されている核酸を常磁性ビーズなどの粒子と組み合わせることにより、目視検査によって検出され得る凝集複合体が形成される、方法およびキットが提供される。検出することができる核酸試料の量は、数マイクロリットルほどの低い量である。この方法は、標的核酸が存在するかどうかを迅速に判断するために、現地または臨床現場での診断に応用することができる。標的核酸のメチル化ステータスも決定することができる。この方法およびキットは、植物および動物における病気の検出、環境試験、ならびに食物および他の食用製品の汚染の試験への一般的な適用可能性を有し得る。

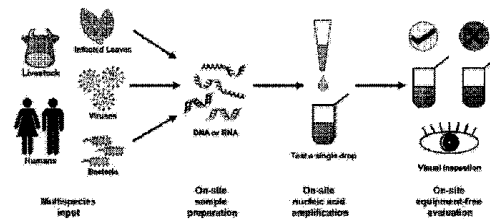


Figure 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

核酸を検出する方法であって、単離核酸と粒子とを組み合わせるステップを含み、前記単離核酸および前記粒子は、目視検査によって検出され得る複合体を形成可能である、方法。

【請求項 2】

核酸を検出するためのキットであって、単離核酸との複合体を形成可能な粒子を含み、前記複合体は目視検査によって検出可能である、キット。

【請求項 3】

核酸配列増幅用の酵素と、核酸配列増幅用の 1 つまたは複数のプライマーと、磁石と、核酸抽出用の 1 つまたは複数の試薬と、フィルタと、1 つまたは複数の反応容器とのうちの 1 つまたは複数をさらに含む、請求項 2 に記載のキット。

10

【請求項 4】

前記複合体は、前記核酸と前記粒子とのフロキュレーションによって形成される、請求項 1 に記載の方法、または請求項 2 または 3 に記載のキット。

【請求項 5】

核酸の存在または相対量は、フロキュレーションが存在しないこと、またはその核酸が存在しない場合、その核酸の量が相対的に少ない場合、もしくはその核酸の濃度が相対的に低い場合において観察されるフロキュレーションと比べ、フロキュレーションが相対的に減少することによって表される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法またはキット。

20

【請求項 6】

前記粒子は常磁性粒子である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法またはキット。

【請求項 7】

前記常磁性粒子は S P R I 粒子である、請求項 6 に記載の方法またはキット。

【請求項 8】

フロキュレーションはフロキュレーション緩衝液中において起こる、請求項 7 に記載の方法またはキット。

【請求項 9】

前記フロキュレーション緩衝液は、(i) p H 7 未満、(i i) 約 p H 3 . 6 ~ 5 . 5 、または (i i i) 約 p H 4 . 4 である、請求項 8 に記載の方法またはキット。

30

【請求項 10】

前記フロキュレーション緩衝液の p H は、フロキュレーション後に半定量のために滴定される、請求項 8 に記載の方法またはキット。

【請求項 11】

核酸 - 粒子複合体の視覚的検出を容易にするか、補助するか、または向上させるための呈色剤をさらに含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法またはキット。

【請求項 12】

前記核酸は、標的核酸の核酸配列増幅によって生成される増幅産物である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法またはキット。

40

【請求項 13】

核酸配列増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によるものである、請求項 12 に記載の方法またはキット。

【請求項 14】

核酸配列増幅は、等温核酸配列増幅によるものである、請求項 12 に記載の方法またはキット。

【請求項 15】

等温核酸配列増幅は、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅 (R P A) またはローリングサークル増幅 (R C A) である、請求項 14 に記載の方法またはキット。

50

【請求項 16】

前記増幅産物は、ステップ (a) 標的核酸を含む核酸試料の重力濾過、ステップ (b) 粒子への前記標的核酸の結合、およびステップ (c) 前記粒子からの前記標的核酸の溶離からなる連続したステップによって得られた前記標的核酸から増幅される、請求項 12 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法またはキット。

【請求項 17】

ステップ (b) およびステップ (c) における標的核酸の量は約 5 ~ 10 μ L である、請求項 16 に記載の方法またはキット。

【請求項 18】

病原性生物または非病原性生物の検出に使用されるための、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法またはキット。

10

【請求項 19】

前記病原性生物は植物の病原体である、請求項 18 に記載の方法またはキット。

【請求項 20】

前記病原性生物はヒトまたは他の動物の病原体である、請求項 18 に記載の方法またはキット。

【請求項 21】

病気または状態に関連する 1 つまたは複数のバイオマーカを検出するために使用される、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法またはキット。

【請求項 22】

前記 1 つまたは複数のバイオマーカは、腫瘍抗原もしくはマーカ、腫瘍サプレッサ遺伝子、またはその両方を含む、請求項 21 に記載の方法またはキット。

20

【請求項 23】

前記 1 つまたは複数のバイオマーカは、ヌクレオチド配列多型を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

前記 1 つまたは複数のバイオマーカは、1 つまたは体細胞突然変異、一塩基多型 (SNP)、またはその両方を含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記 1 つまたは複数のバイオマーカは、エピジェネティックなイベントであるか、または前記エピジェネティックなイベントと関連する、請求項 21 に記載の方法。

30

【請求項 26】

前記エピジェネティックなイベントは、DNAメチル化、DNAヒドロキシメチル化、またはその両方のイベントを含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記病気または前記状態は、がん、腫瘍、リンパ腫、白血病、および他の悪性腫瘍と、感染症と、炎症性疾患と、自己免疫疾患と、呼吸器系疾患と、消化器系疾患と、神経系疾患と、生殖器系疾患と、精神疾患とのうちの 1 つ以上を含む、請求項 21 または 22 に記載の方法またはキット。

【請求項 28】

前記方法は、環境試料または環境ソース中の前記核酸を検出するために使用される、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法またはキット。

40

【請求項 29】

前記環境試料または前記環境ソースは、水と、空気と、土壌試料とのうちの 1 つ以上である、請求項 28 に記載の方法またはキット。

【請求項 30】

前記水の試料は、廃水、廃液、またはその両方である、請求項 29 に記載の方法またはキット。

【請求項 31】

前記廃水または前記廃液は、下水、雨水、鉱業または工業廃水である、請求項 30 に記

50

載の方法またはキット。

【請求項 3 2】

前記水の試料は、飲料水、スイミングプールの水、河、小川、湖、池、または海水である、請求項 2 9 に記載の方法またはキット。

【請求項 3 3】

食物、飲料、または他の消耗品試料中の前記核酸を検出するために使用される、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸の検出に関する。より詳細には、本発明は、比較的少量の核酸試料を使用した核酸の迅速な検出に関し、核酸の検出は目視検査による。

【背景技術】

【0002】

現場または臨床現場 (P O C : p o i n t - o f - c a r e) において最低限の設備により迅速かつ低コストに行うことができる核酸バイオアッセイは、高い需要がある。これを達成することを目的とした多くの試みがあるが、現在のところ実施されているものはない。ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) およびリガーゼ連鎖反応 (L C R) ¹ を含む病気の D N A バイオマーカを検出するための技術および方法が知られている。しかしながら、これらの方法は、迅速な指数的 D N A 増幅を達成するにはサーマルサイクラー上での熱サイクリングを必要とし、したがって現地または現場の用途には適していない。それにもかかわらず、この限界を克服するために様々な等温 D N A 増幅法が現在出現している ^{2、3}。例えば、P O C 用途を可能にするために、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅 (R P A) ⁴ またはヘリカーゼ依存性増幅 (H D A) ⁵ によって増幅される病原体 D N A が、ラテラルフローストリップおよびポータブル蛍光計上での検出に適合されている ^{6 ~ 9}。しかしながら、このような読取り方法は、便利である一方で、依然として比較的精巧な設備の使用に依存しており、依然として世界のオペレータに財務上の障害を提示する場合がある。これに加えて、現地での試料採取、具体的には、下流で使用するために一定量の試料 D N A を最低限の人手による操作と現場のインフラとによって定常的に作製することの検討は、あったとしても、ごくまれである。この些細ではない問題が、任意のアッセイの性能に著しい影響を与える可能性がある。したがって、現場での核酸検出用途のために現地で準備できる包括的アッセイは、依然として達成困難な願望である。

【0003】

低コストの現場アッセイから利益を得ることができる 1 つの領域は、農業である。農業は、世界経済への主要な貢献部門 (年間 1 兆 5 0 0 0 億ドルと推定される) である。しかしながら、作物の病気の発生は、農業に依存している経済圏、特に発展途上国において、推定で年間 2 2 0 0 億ドルの作物の損失を有する主要な問題である ^{1 0}。現在、病気の発生が一定の境界を越えて広がると、損なわれた作物を救済する方法はない。病気の発生を抑制する理想的な方法は、それが広がる前に現地において早期に検出することによる。作物の病気管理の有効性は、その診断法の迅速さ、感度、および特異性に高度に依存する。伝統的に、病気の識別は、病気に冒されている植物組織における病気の表現型の目視検査によって行われる。しかしながら、これは、経験豊かな植物病理学者を必要とし、かつ比較的主観的である ^{1 1}。病気の診断をするために、酵素結合免疫吸着法 (E L I S A : e n z y m e - l i n k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y) ^{1 2、1 3}、イムノプロット法 ^{1 4、1 5}、免疫蛍光試験 ^{1 6}、および P C R に基づくアッセイの様々な反復法 ^{1 7、1 8} など、病気の識別を向上させる多くの高感度な診断法が開発されている。しかしながら、これらのすべての検出法は、費用がかかり、かつ精巧な設備が必要とされ、よく訓練された技術者によって実験室においてのみ行われることができる。これに加えて、現場での迅速な検出の欠如は、病気抑制対策の展開の遅れにつながる可能性があり、それは次には作物のさらなる損失にもつながる。したがって、特別な実験設備にアク

10

20

30

40

50

セスすることを必要とせず、現地において適用可能な新しい病気診断技術を開発することが不可欠である。これに加えて、それらの技術は、安価であり、高感度であり、かつ再現可能であるべきであり、各農家が自らの作物を監視することを可能にするという最終的な目標に対して専門の人材を必要としてはならない。同様に、家畜の病原体の早期の検出は、病気の拡散を回避するために、特に集中生産法を使用する現代の農場において不可欠である。これに加えて、ヒトの病気の早期の診断および検出と、複雑な技術上の要件に依存しないPOC方法が利用可能であることによって、特に、台風、津波、または地震などの自然災害の事態後に、開発途上国だけでなく先進国においても無数の命を救うことができる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明者らは、核酸検出の簡単な、信頼できる、迅速な、かつ高価でない方法に対する必要を満たした。したがって、本発明は、比較的小さい試料サイズで核酸を迅速に検出するための方法およびキットを広く提供し、核酸が存在すること、および/または存在しないことを視覚的に検出することができる。この方法の利点は、この方法が遠心分離機、サーマルサイクラー、および分光光度計などの設備に対する必要（これらのすべてが、商用電源またはバッテリーの形態において電力を利用可能であることを必要とする）を好ましい形態において取り除くことである。特定の実施形態では、この方法またはキットは、植物、ヒト、および非ヒト動物の、1つまたは複数の非病原性または病原性生物を検出するのに有用であり得る。

【課題を解決するための手段】

【0005】

第一の態様において、本発明は、核酸を検出する方法を提供する。前記方法は、単離核酸と粒子とを組み合わせるステップを含み、この単離核酸および粒子は、目視検査によって検出され得る複合体を形成可能である。

【0006】

好適には、核酸の存在または相対量は、視覚的に検出可能な複合体が存在すること、またはその核酸が存在しない場合、その核酸の量が相対的に少ない場合、もしくはその核酸の濃度が相対的に低い場合において観察されるものと比べ、視覚的に検出可能な複合体のレベルが相対的に増加することによって表される。

【0007】

一実施形態では、粒子は常磁性粒子である。好ましい実施形態では、粒子はSPRI粒子である。好適には、この粒子は、単離核酸と $\text{pH} < 7$ において複合体を形成する。好ましい実施形態では、その pH は、約 $3.6 \sim 5.5$ の範囲にあり、またはより好ましくは約 $\text{pH} 4.4$ である。この実施形態によれば、複合体は、核酸-粒子複合体のフロキュレーションによって形成される。

【0008】

さらなる実施形態では、この方法は、核酸-粒子複合体の視覚的検出を容易にするか、補助するか、または向上させるための呈色剤の使用を含むことができる。好適には、呈色剤は核酸に結合し、可視範囲（すなわち約 $390 \text{ nm} \sim 700 \text{ nm}$ ）の波長における光学的サインを与える。この光学的サインには、この可視範囲の波長における光の吸収または放射（燐光および/または蛍光を含む）が含まれ得る。

【0009】

好適には、この単離核酸は、核酸試料中に存在する鋳型核酸の核酸配列増幅によって得られる。一般には、鋳型核酸の核酸配列増幅は、その鋳型核酸に対して少なくとも部分的に特異的な1つまたは複数のプライマーを含む。好ましい形態では、この単離核酸は、等温核酸配列増幅によって得られる。

【0010】

一実施形態において、等温核酸配列増幅は、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA

10

20

30

40

50

)である。

別の実施形態において、等温核酸配列増幅は、ローリングサークル増幅 (RCA: rolling circle amplification) である。

【0011】

好適には、この鑄型核酸は、核酸の任意の生物学的ソースまたは他のソースから得ることができる核酸試料中に存在する。好ましい形態において、その鑄型核酸は、ステップ (a) 標的核酸を含む核酸試料の重力濾過、ステップ (b) 粒子への標的核酸による結合、およびステップ (c) その粒子からの標的核酸の溶離を含む、1つまたは複数のステップによって得られる。

【0012】

一般の実施形態において、ステップ (b) および / またはステップ (c) における標的核酸の量は約 10 μ L である。

別の態様において、本発明は、核酸を検出するためのキットを提供する。このキットは、単離核酸との複合体を形成可能な粒子を含み、その複合体は目視検査によって検出可能である。このキットは、核酸配列増幅用の核酸ポリメラーゼと、核酸配列増幅用の1つまたは複数のプライマーと、磁石と、核酸抽出用の試薬と、フィルタと、呈色剤と、1つまたは複数の反応容器とのうちの1つまたは複数を含む。

【0013】

この方法および / またはキットは、これらに限定されないが、ヒトおよび他の動物と、植物と、原性生物、古細菌、細菌、ウイルス、酵母菌、真菌、寄生虫、および他の無脊椎動物を含む病原性および非病原性生物とを含む、任意の起源の核酸を検出するために使用することができる。

【0014】

特定の実施形態では、方法およびキットは、これらに限定されないが、ヒト、非ヒト動物、および植物の病気および状態と、環境試験と、食物、飲料および他の消耗品の試験と、法医学的分析とに関連する核酸を検出するのに有用であり得る。

【0015】

本明細書全体を通じて別段の指定がない限り、「含む」は、排他的ではなく包含的に使用され、したがって表示された整数または整数群は、1つまたは複数の他の表示されていない整数または整数群を含むことができる。

【0016】

本発明の非限定的実施形態は、後続の図面を参照して本明細書中に記載される。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】一滴ゲノムアッセイの概略図。対象の試料は、簡単な核酸抽出手法によって現場で処理されて狭い濃度範囲にされる。次いで病原体核酸が検出され、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅によって等温的に増幅される。最後にアッセイの結果は、新規なフロキュレーションアッセイによって可視化される。

【図2】精密核酸抽出プロトコル。(A) 抽出プロトコルのグラフィック描写。写真は、抽出に使用される可能性のある試料、使い捨て乳鉢および乳棒を使用する試料の手作業による粉砕、および普通のフィルタピペットチップを使用する溶解液からの細胞デブリの除去を示す。(B) 独立して抽出されている4個のDNA試料のゲル電気泳動。その高い分子量は、抽出DNAの良好な完全性を示唆する。(C) 抽出核酸の分光分析。上段: DNA、下段: RNA。

【図3】フロキュレーションアッセイ。(A) SPR I 粒子のDNA仲介フロキュレーションの概念的描写。(B) 過剰なプライマーはフロキュレーションを仲介しない。(C) 10%以上の増幅のみがフロキュレーションを引き起こす。(D) 増幅されているDNAのカットオフ濃度は、pHに依存する。

【図4】3種類の植物病原体の検出における一滴ゲノム法の性能。(A) キャベツ萎黄病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*)、

10

20

30

40

50

(B) 灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*)、(C) シュードモナス・シリリングエ (*Pseudomonas syringae*)、(D) 三重感染のシミュレート。上段横列：感染の様々なステージ S1 ~ S5 における葉の写真。H：健康試料、Pos：陽性対照、NoT：鑄型なし対照。中段横列：同じ葉に対して行われている対応する RPA 反応のゲル電気泳動画像。下段横列：この RPA 反応に対応するフロキュレーションアッセイの写真。

【図 5】感染の様々なステージにおいて葉から抽出されている 5 ng の DNA 中のキャベツ萎黄病菌 (*F. oxysporum conglutinans* (FOC)) の qPCR による定量。病原体 DNA は、図 4 において RPA に対して用いた同じプライマーを使用してステージ 3 感染以降から検出可能であった。

10

【図 6】様々な界にわたる宿主から複数病原体を検出するための 1 滴ゲノム法。(A) パナナの茎のパナマ病菌 (*F. oxysporum cubense*)。(B) 関係のない陰性対照としてシュードモナス・シリリングエ (*P. syringae*) を使用している、水中の大腸菌 (*Escherichia coli*)。(C) 培養細胞中の HIV プロウイルス DNA。(D) 血液培養物中の熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)。(E) トマトの葉のキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*)。RT：逆転写酵素。(F) チロシンキナーゼ 1、TKI 遺伝子、および糖タンパク質 B 遺伝子を標的にするプライマーを使用している、ウシ細胞中のウシヘルペスウイルス 1 型 (*Bovine Herpesvirus 1*)。(G) CFP10 および ESAT-6 遺伝子を標的にするプライマーを使用している、培養物中の結核性マイコバクテリア (*Tuberculosis mycobacteria*)。大腸菌 (*E. coli*) を陰性対照として使用した。(H) 培地中のインフルエンザウイルス H1N1。上段横列：RPA 反応のゲル電気泳動画像、下段横列：この RPA 反応に対応するフロキュレーションアッセイの写真、Pos：陽性 (感染している) 試料、Neg：陰性 (感染していない) 試料、NoT：鑄型なし対照、RT：逆転写酵素。

20

【図 7】アッセイの概略図。1) ゲノム DNA は、メチル結合ドメイン (MBD: Methyl binding domain) の濃縮に適合するサイズに酵素によって断片化される。2) メチル化 DNA の迅速で厳密性の高い濃縮が氷上 (4) で行われる、3) 対象の領域が等温法により増幅される、4) 長鎖増幅 DNA の存在が架橋フロキュレーションを誘発し、架橋フロキュレーションは対象のメチル化の高度に異なる領域 (HDMR: high differently methylated region) の存在を表す。

30

【図 8】(A) ESR1 プライマーを使用している、RPA 産物のゲル電気泳動画像。これは、室温 (RT: room temperature) で行われるアッセイと比べて性能の減損のない、低温 (4) での MDB 濃縮の厳密性の改良を実証する。M: メチル化対照、U: 非メチル化対照。(B) 上段：メチル化の様々なレベルにおける DNA 投入についての、ESR1 プライマーを使用している RPA 反応のゲル電気泳動画像、下段：10% 程度の低いメチル化試料から起こるフロキュレーションを示す写真。

【図 9】(A) ESR1、(B) GSTP1、および (C) NPY に対する 7 種類のヒトがん細胞系のメチル化プロファイル。非メチル化対照 (U-Control) はアッセイの厳密性を検証するために含まれた。(D) 2 種類の前立腺がん試料 (PC1 および PC2)、および 25 人の女性ドナーからプールした正常血液 (NB: normal blood) DNA 由来の、ESR1、GSTP1、および NPY の全血メチル化プロファイル。上段：RPA 反応のゲル電気泳動画像、下段：メチル化状態の代用となるフロキュレーションを示す写真。

40

【図 10】RT-RPA 後の DuCap RNA アンプリコンの DNA 配列決定。抽出されている DuCap RNA の RT-RPA アンプリコンは、SPRI 磁気ビーズを使用して精製され、標的 TMPRSS2: ERG 領域の増幅を確かめるために配列決定された。

【図 11】患者の尿試料から抽出されている RNA の RT-PCR。10 人の転移性去勢

50

抵抗性前立腺がん患者および1人の健康な患者の尿試料から抽出されているRNAが、TMPRSS2:ERG検出のためにRT-PCRを使用して増幅された。このRT-PCRアンプリコンは、アガロースゲル上で可視化され、同一の患者群で本発明者らのアッセイのスクリーニング結果を検証するために使用された(図11c)。

【図12】全尿および尿沈殿物中のRNA安定性の比較。試料採集の0、2、および12時間後に抽出されている、患者の全尿および尿沈殿物のRNAのRT-RPA。

【図13】5ngの全投入DNAに関して、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)DNA中の様々な割合のシュドモナス・シリंगाエDNA(0%~10%)に対するRCA-SDGの検出限界。NoT: 鑄型なし対照。上段横列: 実施されているRCAの反応に対応するゲル電気泳動画像、下段横列: そのRCAの反応に対応するフロキュレーションアッセイの写真。

【図14】RCAによるシュドモナス・シリंगाエの検出における一滴ゲノム法の性能。上段横列: 感染後の様々な時点S1~S5における葉の写真。H: 健康試料、NoT: 鑄型なし対照。中段横列: 同じ葉に対して行われている対応するRCA反応のゲル電気泳動画像、下段横列: そのRCA反応に対応するフロキュレーションアッセイの写真。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明は、90分未満で迅速に現場においてDNAを検出するための方法およびキットに関する。本発明によれば、10 μ L程度(すなわち1滴)の小さいDNA試料サイズが使用され得る。好ましい形態では、固相可逆固定(SPRI:solid phase reversible immobilization)粒子が、高精度濃度範囲まで精製される核酸の高精度試料採取のために使用されることで、下流プロセスの最適性能を確実にすることに加えて、さらなる定量の必要を回避する。次いで、精製された核酸は任意の適している核酸配列増幅システム、例えば等温核酸配列増幅にかけられ、次いでそのDNAを適切なpH条件下で凝集させるSPRI粒子を使用するDNAフロキュレーション試験により可視化される。本発明者らは、この方法が、感染の様々なステージにあるシロイヌナズナ中の様々な植物病原体を正確に検出できることを実証した。本発明者らはまた、経済的に重要な病原体に感染している市販のバナナ試料において、健康組織と感染組織とを区別することができた。最後に、この手法の汎用性を実証するために、この方法は、感染組織中の植物RNAウイルス、大腸菌を加えられている水試料、HIVに感染している細胞、マラリアに感染している血液、感染細胞中のインフルエンザウイルス、ウシ細胞中のウシヘルペスウイルス1型、およびヒト型結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)細菌を検出するために使用された。したがって、本発明は、最低限の設備によって迅速に任意のソース由来のDNAを検出するために使用することができ、それによってヒトおよび類人猿(non-human humans)、動物、および植物において現れる疾病の新たな発生を検出するための迅速な応答システムを提供することを含め、臨床現場(POC)または他の現場における用途に理想的に適した方法およびキットを提供する。

【0019】

一態様において、本発明は、核酸を検出する方法を提供する。この方法は、単離核酸と粒子とを組み合わせるステップを含み、この単離核酸および粒子は、目視検査によって検出され得る複合体を形成可能である。

【0020】

別の態様において、本発明は、核酸を検出するためのキットを提供する。このキットは、単離核酸との複合体を形成可能な粒子を含み、この複合体は目視検査によって検出可能である。このキットは、核酸配列増幅用の核酸ポリメラーゼと、核酸配列増幅用の1つまたは複数のプライマーと、磁石と、核酸抽出用の試薬と、フィルタと、1つまたは複数の反応容器とのうちの1つまたは複数を含み、さらにも含む。

【0021】

好適には、このキットは前述の方法に従って使用することができる。したがってこのキ

10

20

30

40

50

ットは、1つまたは複数のポリメラーゼ、粒子、緩衝剤、容器、および本明細書中で開示される核酸の調製および視覚的検出を行う他の構成要素を提供することができる。

【0022】

本発明の目的では「単離」とは、その天然の状態から取り出された、または人間による操作を施された物質を意味する。単離物質は、その天然の状態において通常は伴っている成分を実質上または本質的に含まないか、その天然の状態において通常は伴っている成分と共に人為的状态になるように操作されるかであってよい。単離物質は、天然の形態、化学作用による形態、合成形態、または組換え形態であることができる。

【0023】

本明細書中で使用される用語「核酸」とは、これらに限定されないが、cDNA、ゲノムDNA、mRNA、RNA、cRNA、miRNA、tRNAを含む一重鎖および二重鎖のDNAおよびRNAを指す。核酸は、A、G、C、T、またはU塩基を含むヌクレオチドを一般に含むヌクレオチド配列を含む。しかしながら、ヌクレオチド配列は、これらに限定されないが、イノシン、メチルシトシン、ヒドロキシメチルシトシン、メチルイノシン、メチルアデノシン、および/またはチオウリジンなどの他の塩基を含むこともできる。

10

【0024】

本明細書中で使用される「ポリヌクレオチド」は、80個以上の連続的なヌクレオチドを有する核酸であり、一方「オリゴヌクレオチド」は、80個未満の連続的なヌクレオチドを有する。「プローブ」は、例えばノーザンブロット法またはサザンブロット法において相補的配列を検出する目的で好適に標識されている、一重鎖または二重鎖のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであることができる。「プライマー」は、相補的な核酸の「鋳型」にアニール可能であり、Taqポリメラーゼ、RNA依存性DNAポリメラーゼ、またはシーケナーゼ(Sequenase)(商標)などのDNAポリメラーゼの作用によって鋳型依存的に伸長可能な、好ましくは15~50個の連続的なヌクレオチドを有する、一般には一重鎖オリゴヌクレオチドである。「鋳型核酸」は、核酸増幅を施される核酸である。

20

【0025】

本発明によれば、核酸試料は、動物および植物と、動物および植物の細胞、組織、分泌液、および細胞下オルガネラと、細菌と、古細菌と、原性生物と、真菌と、ウイルスと、飲料水、廃水、スイミングプールの水、河川の水、海水などの環境試料と、食物(例えば食用肉、乳製品など)および他の消耗品から得られる試料とを含む任意のソースから得るまたは抽出することができる。これらのソースは、これらに限定されないが、体液(例えば脳脊髄液、血液、血清、血漿、精液、尿、リンパ液など)、腫瘍、組織または器官の生検材料、子宮頸試料、およびPAPスミアを含む病理学試料の形態であることができる。他のソースとしては、検出可能な核酸を含有することが疑われる法医学的試料が含まれる。植物試料は、葉、茎、樹皮、種子、果実、花、または花の構成要素(例えば花弁、葯、花粉、雄しべなど)、根、および他の任意の植物細胞または組織から採取することができる。その植物は、穀物、豆果、サトウキビなどの農作物、花、ナッツ、種子、油、材木または果実用の収穫できる植物、藻、スイッチグラス、麻および亜麻などのバイオマス用に成長させた植物、農学的、美的、生態学的または営利的価値のある任意の他の植物を含む、植物界の任意のメンバーであることができる。動物は、魚類、鳥類、および哺乳動物を含む任意の脊椎および無脊椎動物であることができる。特定の用途では、動物は、ヒト、非ヒト哺乳動物、または営利的価値のある他の動物、例えば家禽、魚、および甲殻類などであることができる。非ヒト哺乳動物としては、これらに限定されないが、家畜(例えばウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ)、飼いならされた愛玩動物(例えばネコおよびイヌ)、および興行動物(performance animal)(例えば競走馬、ラクダ)を含むことができる。細菌、古細菌、原性生物、真菌、およびウイルスは、病原性生物でも非病原性生物でもよい。「病原性」とは、その生物が植物または動物の病気または状態と関連しているか、その原因となることを意味する。病原体の非限定的な例には、RNAウィル

30

40

50

スおよびDNAウイルスを含むウイルスと、原生動物と、真菌と、蠕虫、回虫、および環形動物を含む寄生虫と、グラム陽性およびグラム陰性細菌を含む細菌とを含むことができる。

【0026】

核酸の抽出は、当技術分野で知られている任意の方法によることができる。一般には、核酸の抽出は、非イオン界面活性剤、塩、pH緩衝剤、およびカオトロピック剤を一般に含む抽出緩衝液によって行うことができる。抽出緩衝液の非限定的な例は、以下でより詳細に提供される。こうして得られるまたは抽出される核酸は、本明細書中では「核酸試料」と呼ばれる。一般に、核酸試料は、望ましくない粒状物質またはデブリを除去するためにその抽出された核酸を遠心分離または他の大きいg力(g force)にかけたり、それに非大気圧(例えば真空)を適用したりすることなく、本明細書中で以前に述べたようなソースから抽出することによって得られる。好ましくは、抽出された核酸は、望ましくない粒状物質またはデブリを除去するために重力下でまたは人力で発生させる圧力下で濾過される。特に好ましい実施形態では、核酸試料は、以下でより詳細に述べるように、その核酸試料中の標的核酸に可逆的に結合する粒子を使用して少なくとも部分的に精製される。好適には、この標的核酸は、続いて核酸増幅法によって増幅することができる。

10

【0027】

核酸増幅法は、当業者にはよく知られており、これらに限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、鎖置換増幅(SDA: strand displacement amplification)、ローリングサークル増幅(RCA)、核酸配列ベース増幅(NASBA: nucleic acid sequence-based amplification)、Q-レプリカーゼ増幅、ヘリカーゼ依存性増幅(HAD)、ループ介在等温増幅(LAMP: loop-mediated isothermal amplification)、ニッキング酵素増幅反応(NEAR: nicking enzyme amplification reaction)、およびリコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)が含まれるが、これらに限定されない。本明細書中で一般に使用される「増幅産物」とは、核酸増幅法によって作製される核酸産物を指す。

20

【0028】

多くの核酸増幅法は、増幅の各期の間には様々な温度(例えば変性のために95、プライマーアニーリングのために72、および鋳型伸長のために42)による核酸配列増幅手順を循環し、したがってその技術のためにはサーマルサイクラーを必要とする。しかしながら、幾つかの核酸増幅法、例えばSDA、LAMP、NEAR、HAD、RCA、およびRPAは等温であることができ、それによってサーマルサイクラーの必要を取り除くことができる。したがって、好ましい実施形態では、方法およびキットには等温核酸配列増幅が利用される。等温核酸配列増幅の特定の実施形態は、例えば、これに限定されないが、ツイストDX(TwistDX)(商標)システムによって提供されるRPAである。表1では、RPAによる等温核酸増幅にとって有用なプライマーの非限定的な例を提供する。等温核酸配列増幅の別の特定の実施形態は、RCAであり、これは下記実施例中でより詳細に述べられる。

30

【0029】

しかしながら、それほど好ましくない実施形態では、核酸増幅は、サーマルサイクラーを使用して、または増幅の各期の間には様々な温度による核酸配列増幅の反復循環を含む方法によって行い得ることも理解されるだろう。

40

【0030】

好適には、増幅産物は続いて固定化され、次いで、粒子との複合体を形成することによって可視化される。さらなる実施形態では、呈色剤が、核酸-粒子複合体の視覚的検出を容易にするか、補助するか、または向上させるために使用されてもよい。好適には、呈色剤は核酸に結合し、好ましくは可視範囲内の波長(すなわち約390nm~約700nm)において光学的サインを示す。この光学的サインには、この可視範囲内の波長における光の吸収または放射(燐光および/または蛍光を含む)が含まれることができる。

50

【0031】

この方法およびキットが、DNA、好ましくは二重鎖DNA (dsDNA: double-stranded DNA) などの核酸に結合可能な粒子を利用することが、前述から理解されるだろう。この粒子は、核酸試料の調製後に鋳型核酸に結合可能であり、かつ/または単離核酸との複合体を形成可能であり、その複合体は目視検査により検出することができる。

【0032】

本発明に一般に関連して、「粒子」は、単離核酸と結合可能な任意のマトリックス、ビーズ、または基体であることができる。好ましい形態では、粒子は、100個以上の連続的なヌクレオチドを有する単離核酸に選択的に結合する。この特性は、核酸配列増幅プライマー（一般に100個の連続的なヌクレオチドよりもはるかに短い）および任意のより短い、不完全な、非特異的な、または端を切り取られた増幅産物から、100個以上の連続的なヌクレオチドを有する増幅産物を選択する。好適には、この粒子は、単離核酸との結合または相互に作用する荷電表面を備える。好ましくは、荷電表面は、負に帯電している単離核酸との結合または相互に作用する正電荷を有する。

10

【0033】

幾つかの実施形態では、粒子は、常磁性ビーズであることができる。一般にこの常磁性ビーズは、ポリマーコア（例えばポリスチレン）と、常磁性シェル（例えば、磁鉄鉱、またはモンモリロナイトおよびノントロナイトを含むクレー、黒雲母、菱鉄鋼、黄鉄鋼などの、他の鉄含有常磁性材料）と、適切な条件下で核酸に結合する1つまたは複数の化学的分子部分（例えばカルボキシルを含有する分子部分）を含むコーティングとを含む。非限定的な例には、SPRI粒子およびアンピュアXP (AMPure XP) (商標) 粒子が含まれる。好ましい常磁性粒子は、SPRI粒子である。

20

【0034】

他の実施形態では、粒子には、これらに限定されないが、金（例えばDNAゲル (DNA gel) (商標) ゴールドキャリアパーチクルス (Gold Carrier Particles)) などの金属粒子、ヒドロタルサイト (HT) およびヒドロキシアパタイト (HA) などの金属水酸化物、珪藻土などのケイ酸塩が含まれることができる。

【0035】

核酸試料の調製後に鋳型核酸に結合することに関連して、好適には、その粒子は核酸に可逆的に結合可能である。したがって、好適な条件下において、粒子は核酸に結合し、次いで核酸は、その核酸を溶離または開放する条件下において粒子から溶離または解放されることができる。好ましくは、ある量または濃度の粒子が提供され、それによって定常的な再現可能な量または濃度の核酸が結合し、溶離される。

30

【0036】

鋳型核酸に可逆的に結合可能な粒子の1つの非限定的な例は、本明細書中で以前に述べたSPRI粒子である。

粒子が核酸配列増幅後にdsDNA増幅産物などの核酸に結合することに関連して、好適には、核酸：粒子複合体の形成は、目視検査によって検出、観察、または測定されることができる。これは、ほぼ裸眼の視力を有する人間の観察者が、粒子と核酸との間に形成される複合体が少なくとも存在するかしないかを見ることができることを意味する。視覚的検出により、核酸：粒子複合体の定性的、半定量的、または定量的測定値を与えることができる。目視検査による半定量的または定量的決定または測定により、粒子と核酸との間に形成される複合体の少なくともおおよその量または濃度を与えることができる。一例として、定量は、異なる量または濃度の核酸：粒子複合体を含む滴定済参照標準を参照して決定されることができる。目視検査によって検出することができるdsDNAとの複合体を形成可能な粒子の1つの非限定的な例は、本明細書中で以前に述べたSPRI粒子である。この例によれば、核酸：SPRI粒子複合体は、凝集した複合体として可視化される。一般に、磁石で処理した時の比較的透明または無色の溶液は、凝集した複合体が磁石によって容易に引き付けられる結果として形成される。これは、呈色したまたは濁った溶液

40

50

を生じさせる核酸：S P R I 粒子複合体が存在しないこととは対照的である。相対的に透明であること、または色が欠如していることは、既知の量または濃度の核酸に対して滴定した場合における、核酸の量または濃度の尺度となり得る。好ましい方法は、凝集塊が減少するか、または存在しなくなるまで pH を滴定することであり、その加えられた塩基の量が、核酸の量の近似値または推定値である。

【0037】

しかしながら、この方法が、核酸：粒子複合体の形成の検出、観察、または測定を補助する装置、デバイス、または設備の使用を排除しないこともまた理解されるだろう。装置、デバイス、または設備の非限定的な例としては、これらに限定されないが、比濁計、濁度計、および分光光度計が含まれる。

10

【0038】

幾つかの実施形態では、粒子は、ヌクレオチド配列に特異的でない方法で核酸に結合する。基本的に、粒子は、核酸との物理化学的相互作用によって核酸（例えば核酸増幅産物）に結合する。例として、これには、例えば S P R I 粒子を覆っているカルボキシル含有分子部分によって支援される、負に帯電した核酸と負に帯電した粒子との間の静電的または電荷相互作用が含まれることができる。これに限定されないが、アミン含有分子部分で覆われている粒子などの正に帯電した粒子もまた使用されることができる。

【0039】

他の実施形態では、粒子は、ヌクレオチド配列に特異的な方法で核酸に結合する。例として、その粒子は、核酸配列増幅産物とハイブリッドを形成可能なヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチドプローブと結合することができる。ヌクレオチド配列に特異的なこの検出により、様々な対立遺伝子型 (a l l e l i c f o r m)、S N P、および対象のヌクレオチド配列の他の変異型（例えば、特定の植物または動物の病気と関連するもの）などのヌクレオチド配列多型を区別可能とすることができる。

20

【0040】

前述の全般的な実施形態に関連して、この方法の特定の実施形態は、

(a) 核酸試料を得るステップ、

(b) この核酸試料中に鑄型核酸が存在する場合、この核酸試料を等温核酸配列増幅にかけ、それによって鑄型核酸から核酸配列産物を生成させるステップ、および

(c) その核酸増幅産物と常磁性粒子とを組み合わせるステップ（この単離核酸および粒子は、目視検査によって検出可能な複合体を形成可能である）を含む。

30

【0041】

ステップ (a) において、核酸試料は、望ましくない粒状物質またはデブリを除去するために、その核酸試料を遠心分離にかけるか、または真空または高圧下（試料は、人力で操作されるシリンジによるなどの低圧にかけられてもよい）における他の大きい g 力にかけることなく、本明細書中で以前に述べたようなソースからの抽出によって得られることが好ましい。好適には、この核酸試料は重力下で濾過され、それによって望ましくない粒状物質またはデブリを除去する。幾つかの実施形態において、フィルタは、脱脂綿などの濾過材料によって少なくとも部分的に満たされているマイクロピペットチップまたは他の導管（例えばガラスピペット、カニューレ、または管類）である。続いて、核酸試料は、適している緩衝液中において S P R I 粒子などの常磁性粒子と組み合わせられ、それによって核酸と常磁性粒子との間に複合体が形成される。これには限らないが、一般に緩衝液は、ポリエチレングリコール、塩、および pH 緩衝剤を含む。一般に、常磁性粒子と組み合わせられる核酸試料の量は、ソースからの抽出によって得られる核酸試料の量よりも実質上少ない。常磁性粒子と組み合わせられる核酸試料の量は、ソースからの抽出によって得られる核酸試料の量の 20% 以下、10% 以下、5% 以下、または 4% 以下、3% 以下、2% 以下、もしくは 1% 以下であることができる。好適には、この量は、約 50 μ L 以下、約 40 μ L 以下、約 30 μ L 以下、約 20 μ L 以下、または約 5 ~ 10 μ L 以下（5 μ L、6 μ L、7 μ L、8 μ L、および 9 μ L を含む）であることができる。

40

50

【0042】

好適には、この複合体は、続いて磁石によって固定化され、緩衝液は除去され、核酸が粒子から溶離される。溶離は、水（であるが、これに限定されない）などの溶離液を使用して達成されることができる。好適には、溶離される量はより少ないが、約50 μ L以下、約20 μ L以下、または約5~10 μ L以下（5 μ L、6 μ L、7 μ L、8 μ L、および9 μ Lを含む）であることができる。核酸試料と組み合わせられる常磁性粒子の量、濃度、比、または相対的比率は、所望の量または濃度の核酸が常磁性粒子から溶離されるように最適に決められる。例えば、望ましい収量は、10 μ Lの溶離物中において3~5 ng/ μ Lの高分子量DNAであることができる。

【0043】

ステップ（b）において、等温核酸配列増幅は、好ましくは約37で行われるRPAによることが好ましいが、これには限定されない。ステップ（b）において、核酸試料中の標的核酸に特異性を与えるプライマーが使用され、それによって、核酸試料中に標的核酸が存在する場合、その標的核酸が優先的に増幅される。プライマーの非限定的な例は表1中に示される。

【0044】

ステップ（c）において、ステップ（b）で生成される増幅産物が、SPRI粒子などの常磁性粒子と組み合わせられる。一般には、常磁性粒子と増幅産物との間の、視覚的に検出することができる複合体を形成するフロキュレーション緩衝液中において、その増幅産物は常磁性粒子と組み合わせられる。フロキュレーション緩衝液は、好適には7未満のpHを有する。好ましくは、pHは3~6の範囲内、もしくは、より好ましくはpH3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、および5.4を含む約pH3.6~5.5の範囲内、またはこれらの明記されたpH値の間の任意の範囲内にある。以下で述べるように、非限定的な例はpH4.4である。例として、フロキュレーション緩衝液は、これらに限定されないが、1つまたは複数の酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、またはリン酸二水素塩であることができるか、またはこれらを含むこともできる。以下でより詳細に述べるようにフロキュレーション緩衝液の非限定的な例は酢酸ナトリウム緩衝液（pH4.4）である。

【0045】

いかなる特定の理論にも拘束されることを望むものではないが、核酸：粒子のフロキュレーションは、フロキュレーション緩衝液のpHを増加させることによって可逆であることを提案する。これは、フロキュレーションがコロイドの非共有結合による可逆的な凝集であることと一致する。したがって、高いpHにおいて、DNAなどの核酸はより負に帯電し、そのためにその粒子（例えばSPRI粒子）のカルボン酸で覆われている表面から負に帯電した他の核酸を斥ける可能性がより高い。このpH依存性を利用して、核酸濃度によりこの方法の感度を微調整することができる。フロキュレーション後のpHの滴定もまた、核酸濃度の近似値または推定値として使用することができる。

【0046】

以前に述べたように、呈色剤が、核酸-粒子複合体の視覚的検出を容易にするか、補助するか、向上させるために使用されてもよい。好適には、呈色剤は核酸に結合し、可視範囲（すなわち約390nm~約700nm）の波長において光学的サインを与える。この光学的サインは、この可視範囲の波長における光の吸収または放射（燐光および/または蛍光を含む）を含むことができるか、またはそれから生じることができる。

【0047】

このような呈色剤は、一般に「DNA染料」として知られ、非限定的な例はクリスタルバイオレット、クリスタルバイオレット/メチルオレンジ混合物、メチレンブルー、またはビジュアルバイオレット（Visual Violet）（商標）である。

【0048】

本発明の方法およびキットは、核酸検出の分野において数々の用途を有する可能性のあ

10

20

30

40

50

る「プラットフォーム」技術を提供する。より具体的には、本発明の方法およびキットは、現地または「臨床現場」において核酸を検出するための高感度なかつ費用効果の高い手段を提供する。好ましい形態では、本発明は、サーマルサイクラー、遠心分離機、分光光度計などの設備の必要を少なくとも最低限にするか、完全に取り除く。例として本発明は、これらに限定されないが、植物および動物の病気の病原体の検出、特定の遺伝形質または遺伝病に対する植物および動物の遺伝性素因の検出、真菌または細菌汚染による腐敗を検出するための食物および他の消耗品の分析、水質の監視、法医学試料の分析、着床前遺伝子分析、性決定、およびDNAフィンガープリントにおいて有用である可能性がある。

【0049】

本発明の特定の実施形態は、植物または動物の病気の病原体の検出に関する。

10

これに関連して、この方法の特定の実施形態は、

(I) 植物または動物のソースから核酸試料を得るステップ、

(II) この試料中に鋳型核酸が存在する場合、この核酸試料を等温核酸配列増幅にかけて、鋳型核酸(この鋳型核酸は、植物または動物の病気または状態について、その原因となるか、またはそれと関連する病原体のものであるヌクレオチド配列を含む)から核酸増幅産物を生成させるステップ、および

(III) 核酸増幅産物が存在する場合、その核酸増幅産物を常磁性粒子と組み合わせるステップ(この核酸増幅産物および粒子は、目視検査によって検出され得る複合体を形成可能であり、核酸増幅産物の存在は病原体の存在を表す)を含む。

20

【0050】

したがって、幾つかの実施形態において、本発明は、動物の病気または状態と関連するか、またはその原因となる病原体の不在の存在を判断するために医学的または獣医学的診断に使用することができる。これに関連して、動物としては、これらに限定されないが、ヒトおよび非ヒト哺乳動物(例えば家畜および愛玩動物)、魚類、甲殻類、鳥類(例えば家禽)を含むことができる。病原体としては、RNAウイルスおよびDNAウイルスを含むウイルスと、原生動物と、蠕虫、回虫および環形動物を含む寄生虫と、真菌と、原生動物と、古細菌と、細菌とを含むことができる。実施例中でより詳細に述べられるように、この方法は、HIVおよびインフルエンザなどのウイルス、熱帯熱マラリア原虫などの原生動物、かつ、大腸菌およびヒト型結核菌などの細菌によって引き起こされるヒトの病気の病原体の核酸を検出した。

30

【0051】

真菌性、ウイルス性、および/または細菌性の植物病原体の検出もまた、本発明により意図される。植物としては、これらに限定されないが、単子葉および双子葉植物、農作物、穀類、果実、草、樹木、および蔓草を含むことができる。植物病原体の非限定的な例としては、実施例中でより詳細に述べるような、RNAウイルスであるキュウリモザイクウイルスなどのDNAウイルスおよびRNAウイルスと、シュドモナス・シリंगाエなどの細菌と、キャベツ萎黄病菌(*F. oxysporum f. sp. conglutinans*)および灰色かび病菌などの真菌とを含むことができる。

【0052】

40

しかしながら、本発明は、非病原性生物であろうと、ヒトおよび非ヒト動物または植物の病原体であろうと、任意の生物から得られる核酸試料を使用して広範に実施することができることを理解されるだろう。

【0053】

本発明の1つの特定の用途は、ヒトまたは動物の集団における、または農作物などの植物の集団における新しい病気の発生に関連する。鳥インフルエンザおよび他のインフルエンザと、またSARSとで最近起きたように、遺伝学的に区別できる新しい病原体の菌株または変異株が出現する。このような新しい病原体の菌株または変異株のゲノムを迅速に配列決定することができ、また本発明に従って使用するのに適している核酸配列増幅プライマーを作り出すことができる。これによって、その新しい病原体の菌株または変異株の

50

迅速かつ簡単な検出を実現するために、本発明の方法およびキットは、この核酸配列増幅プライマーを用いた使用に直ちに適合可能である。

【0054】

本発明の他の特定の実施形態は、特定の病気または状態と関連するバイオマーカの検出に関する。

これに関連して、この方法の特定の実施形態は、

(I) ヒトまたは非ヒト動物から核酸試料を得るステップ、

(II) この試料中に鋳型核酸が存在する場合、この核酸試料を等温核酸配列増幅にかけて、鋳型核酸(この鋳型核酸は、病気または状態と関連するバイオマーカであるか、それをコードするヌクレオチド配列を含む)から核酸増幅産物を生成させるステップ、および

(III) 核酸増幅産物が存在する場合、その核酸増幅産物と常磁性粒子とを組み合わせるステップ(この核酸増幅産物および粒子は、目視検査によって検出され得る複合体を形成可能であり、核酸増幅産物の存在はバイオマーカの存在を表す)を含む。

【0055】

このバイオマーカは、これらに限定されないが、がん、腫瘍、リンパ腫、白血病、および他の悪性腫瘍と、感染症と、炎症性疾患と、自己免疫疾患と、呼吸器系疾患と、消化器系疾患と、神経系疾患と、生殖器系疾患と精神状態とを含む、ヒトまたは非ヒト動物の任意の病気または状態と関連していることができる。例えばバイオマーカは、これらに限定されないが、腫瘍抗原、サプレッサ遺伝子もしくはマーカ、ならびに/または、遺伝的もしくはエピジェネティックなヌクレオチド配列の多型、変異、修飾もしくは変化(例えば、体細胞突然変異、一塩基多型(SNP: single nucleotide polymorphism)、および他の遺伝性多型、ヌクレオチド配列の挿入、欠失、再配列、DNAメチル化、および/またはDNAヒドロキシメチル化イベント)であるか、それらを含むことができる。これらの実施例中でより詳細に述べている1つの特定の実施形態では、本明細書中で開示した方法およびキットは、DNAメチル化を検出するのに適している。これらの実施例中でより詳細に述べている別の特定の実施形態では、本明細書中で開示した方法およびキットは、前立腺がんのDNAマーカを検出するのに適している。

【0056】

本発明のさらなる特定の実施形態は、環境試料中の病原体の検出に関する。

これに関連して、この方法の特定の実施形態は、

(1) 環境のソースから核酸試料を得るステップ、

(2) この試料中に鋳型核酸が存在する場合、この核酸試料を等温核酸配列増幅にかけて、鋳型核酸(この鋳型核酸は、病原体のヌクレオチド配列を含む)から核酸増幅産物を生成させるステップ、および

(3) 核酸増幅産物が存在する場合、その核酸増幅産物と常磁性粒子とを組み合わせるステップ(この核酸増幅産物および粒子は、目視検査によって検出され得る複合体を形成可能であり、核酸増幅産物の存在は病原体の存在を表す)を含む。

【0057】

この環境のソースまたは試料は、これらに限定されないが、廃水および廃液(例えば下水、雨水、鉱業および/または工業廃水)と、飲料水と、スイミングプールの水と、河、小川、湖、池、または海水とを含む、水、空気試料、および土壌試料であることができる。

【0058】

本発明が容易に実施され、かつ実用的効果を与えることができるように、下記の非限定的実施例が参照される。

実施例1: 一滴ゲノム法

材料および方法

10

20

30

40

50

植物用途の場合、ゲノムDNAは、最適化した溶解緩衝液（50 mM トリスHCl（pH 8.0）、1.5 M グアニジウム-HCl、2% w/v PVP40、および1% v/v トリトン-X）を使用して1枚の葉（300 mg）から抽出された。DNA用途の場合、400 ng/μLのRNアーゼAがこの溶解緩衝液に加えられたが、RNA用途の場合には加えない。周囲条件で10分間インキュベートした後、溶解液は、普通のフィルタ付きピペットチップで作られた低コストの手作り濾過装置を使用して清澄化された。非植物用途の場合、PVP40なしの溶解緩衝液が使用された。次いで核酸は、修正したSPRIプロトコル¹⁹、²⁰を使用して精製された。手短に言えば、清澄化した溶解液の一滴（10 μL）が、カルボン酸で覆われている磁気ビーズ（サーモ・フィッシャー（Thermo Fisher））（1.8倍量（volume））と共に結合緩衝液（10 mM トリスHCl（pH 8.0）、20% PEG8000、2.5 M NaCl）中において5分間インキュベートされた。DNAに結合したビーズは、次いで、磁石により溶解液から分離され、100% イソプロパノールで2回洗浄され、続いて80% エタノールで2回洗浄され、10 μLの水により溶出させた。

10

20

30

40

50

【0059】

ツイストアンブベーシックRPAキット（TwistAmp Basic RPA Kit）（ツイストDX）が、幾つかの修正と共に製造推奨の通りに使用された。手短に言えば、12.5 μLの反応が、1 μLの核酸抽出物および480~600 nMの各プライマー（表1）を使用して37°Cで30~40分間行われた。RNA用途の場合、50単位のMMuLV逆転写酵素が、そのRPA反応に加えられた。増幅後、増幅を確かめるために5 μLのRPA反応物をゲル上で電気泳動させた。別の5 μLは、1.8倍量の磁性SPRIビーズ溶液と共に5分間インキュベートすることによるフロキュレーションアッセイに使用した。磁石および80% エタノール洗浄によるビーズの分離後、30 μLのフロキュレーション緩衝液（100 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.4）がビーズに加えられた。

【0060】

結果

一滴ゲノム法の考え方

一滴ゲノム法は、最低限の設備による病原性核酸の現場での高感度かつ迅速な検出のための包括的な統合された解決法として着想された。図1は、3つの主要な段階からなるSDGの考え方を手短に示す。第一段階は、DNAおよび/またはRNAを対象のソース、例えば一滴の精製していない葉の抽出物から最低限の設備を使用して狭い濃度範囲で抽出する、高精度試料採取である。第二段階は、RPAを使用する病原性核酸の高感度かつ迅速な等温増幅である。第三かつ最後の段階は、SPRIを使用する増幅DNAの特異的捕集と、それに続く、フロキュレーション誘発緩衝液中でのそのSPRI粒子の事実上設備を使わない目視検査とである。

【0061】

高精度DNA試料採取

現地での試料採取は、あったとしても、ごくまれに検討されるに過ぎない。一定量の試料を定常的に作製するこの些細ではない作業は、任意のアッセイの性能にとって重要である。ここで、本発明者らは、下流のRPAによる増幅に直ちに使用することができる正確な濃度にDNAを定常的に抽出するための、SPRI技術¹⁹と併せて普通のフィルタ付きピペットチップを使用した低コストのDNA精製について述べる（図2A）。磁性SPRIビーズを用いたDNA抽出は、それが事実上設備を使わずに磁石のみを必要とすることから、POCの用途にとって理想的である。これに加えて、DNAの収量は、一定の試料投入量を与えられている状態において、単にSPRI粒子の量を調整することによって正確に制御することができる。この手法の別の利点は、その比較的低いコストである（1回の抽出につきおよそ10オーストラリアセントである）。200 μLの溶解緩衝液中においてプラスチックの乳鉢を用いる1枚の葉（およそ300 mg、すなわち4枚の直径6 mmの円板状）の手作業による粉碎の後、その溶解液を単にフィルタ付きピペットチップ

に通過させることによって植物溶解液から細胞のデブリを除去した。次いでDNAは、SPRIを使用して一滴(10 µL)の溶解液から精製され、10 µLの溶離物において典型的には3~5 ng/µLの収量の高分子量DNAを定常的にもたらした。DNA収量は分光測定評価(ナノドロップ(Nanodrop))の検出限界に近いいため、DNAの収量および完全性は臭化エチジウム染色によって推定され(図1B)、また蛍光(キュービット(Qubit)(登録商標)アッセイ)を使用して検証された。DNA評価は分光測定法では不可能であったが、230 nmの吸光度は基線付近であり、混入物質が最低限の量であることを示している(図2C)。RNA抽出の場合、典型的な収量は10 µLの溶離物において30~40 ng/µLであり、260/280および260/230の比はそれぞれ1.9~2.2および1.8~2.3であり(図2C)、良好な純度を示した。

10

【0062】

DNAフロキュレーションアッセイ

凝集アッセイは、標識を含まずかつ設備を使わないバイオ分子の検出などの幾つかの利点を有し、つい最近金のナノ粒子による実証が行われた^{21~23}。本明細書において、本発明者らの知識の限りでは、本発明者らが初めてカルボン酸で覆われているSPRI磁性粒子をDNA検出用に使用したフロキュレーションアッセイについて実証する(図3A)。磁性SPRI粒子の使用は3つの利点、すなわち(1)RPAにより増幅したDNAに結合すること、(2)過剰のdNTP、プライマー、およびプライマー二量体を除去すること、(3)フロキュレーションのための緩衝剤を変更することを有する。現在のSPRI条件は100 bp未満のDNAを排除する¹⁹ため、600 nM(RPAに推奨されている最高プライマー濃度)までの過剰のプライマーは凝集を引き起こさない(図3B)。しかしながら、凝集(陽性応答)は、増幅されているDNAの存在下でのみ起こった(図3C)。これに加えて、10%ほどの低い増幅効率が、不法な視覚的に明確に区別できる陽性応答のために必要であった。これは、増幅産物の最大量とその反応におけるプライマー(480 nM)の初期量と同じであったと仮定することによって推定された。次いで、フロキュレーションを誘発するために必要な最低限の増幅を決定するように、産物対プライマーの様々な比率が混合された。このアッセイの別の興味深い特徴は、pH変化に対するその感度である(図3D)。pH4.4において、0.5 ng/µL(5 µL量)ほど少量の増幅産物を検出することができる。しかしながら、pH5.4において、凝集のためのカットオフ濃度は50 ng/µL(5 µL量)まで100倍に増加した。したがって、この特徴は、あるレベルの「調整」を提供することができ、所定の用途にとって有益であることがある。これらの観察結果を考慮して、本発明者らは、凝集を引き起こすメカニズムがSPRI粒子のDNA仲介フロキュレーションである可能性が高いと結論を下した²⁴。

20

30

【0063】

一滴ゲノム法を使用した感染の様々なステージにおける植物病原体の検出

時期を失した病気の診断に起因する農作物の損失が大きい問題である¹⁰ため、本発明者らは、植物病原体を検出することによるその実行可能性のSDGを実証する。これに加えて、農業用途のための現地アッセイは現在欠如している。本発明者らの高精度試料採取の手順を使用して、病原体が接種され、その徴候の発現に基づく感染の様々なステージにあるシロイヌナズナから、DNAが収集された。SDGを使用して、シュードモナス・シリングエを接種した植物について、徴候が明らかとなる前であっても感染のステージ1のような早期を検出することができた(図4C)。これに加えて、SDGは、接種された植物中においてキャベツ萎黄病菌(*F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*)および灰色かび病菌を、その始まった徴候が明らかになる感染のステージ2から検出した(図4Aおよび図4B)。本発明者らはまた、qPCRを使用して本発明者らのSDGの結果をキャベツ萎黄病菌について確かめることを試みたが、このRPAの手法と同じ量の出発材料の場合、ステージ3~5が検出できるに過ぎなかった(図5)。三重式検出アッセイを実証するために、異なる病原体を接種した3種類の植物からの葉を、それらの感染のそれぞれのステージにおいて一緒にプールして、三重感染をシミュレートし

40

50

た。SDGは、ステージ1において病原体の存在を検出することができた(図4D)。これらの結果はSDGアッセイの実行可能性だけでなく、植物感染の早期の検出(すなわち表現型の徴候がまさに現れ始める時)における感度をも実証する。

【0064】

SDGがシロイヌナズナ植物モデル系で良好に機能する一方で、本発明者らは、このアッセイが他の宿主植物系に適用可能であり得るかどうかを考えた。この目的において、本発明者らは、バナナ病菌を検出するためにSDGをバナナの茎の切り枝(市販の重要品種からの)に適用した。SDGは、健康な試料と病気の試料を容易に区別することができ、農業用途のための実行可能な現場屋外試験としてのSDGの可能性をさらに裏付けた(図6A)。

10

【0065】

一滴ゲノム法：複数種(multispecies)用途

本発明者らが植物病原体DNAを成功裡に検出した一方で、RNAを検出することもまた、RNAウイルスに対して有用であることができる。この目的において、植物病原体キュウリモザイクウイルス(CMV)についてDNAの代わりにRNAを抽出するように、SDG試料採取プロトコルが修正された。次いで、ウイルスRNAの等温、単一ステップのRT-RPAによる増幅を可能にするために、MMLV逆転写酵素(RT:reverse transcription)がRPAミックスに加えられた²⁵、²⁶。次いで、増幅の成功がフロキュレーションアッセイによって判断され、ゲル電気泳動によって確かめられた。予想されたように、RT酵素がRPA反応に含まれている場合、健康な植物ではなくウイルス感染した試料のみが陽性の結果をもたらした(図6E)。

20

【0066】

他の可能性のある農業用途を実証するために、本発明者らは、その注意を畜産産業に転じた。畜産農場は、地理的に離れた区域に位置する傾向がある。したがってウシヘルペスウイルス1型などのウシの病気の現場診断は、この産業のためになる可能性がある。感染したウシおよび感染していないウシの細胞がSDGにかけられ、本発明者らは、ウイルスのチロシンキナーゼ1および糖タンパク質Bの遺伝子に対するプライマーを使用して、健康な試料と病気の試料を成功裡に区別した(図6F)。

【0067】

次に、水中における大腸菌DNAを検出するためにSDGが使用された。普通の実験用大腸菌株のワンショットマック1(One Shot Mach 1)が、OD=0.5まで培養された。次いで、これは10倍に希釈され、10 μ LがDNA抽出に使用された。次いで、抽出されたDNAのうちの1 μ Lが、uidA遺伝子中の大腸菌特異的配列を標的にするプライマーと共に増幅のステップにおいて使用された²⁷。増幅特異性は、非特異的対照としてのシュドモナス・シリングエのgDNAと、DNA鋳型を欠如している対照(Not)とを使用して証明された。この用途の場合のみ、汚染を回避するために数々の予防処置が取られた後であっても、Not対照中にRPA産物が常に観察された。これに加えて、関係のないDNA鋳型中において同様のレベルの増幅が観察された。したがって、本発明者らは、RPAキットが低レベルの汚染大腸菌DNAを有しており、Not対照における増幅のレベルを基準線とみなすことができると結論を下した。しかしながら、大腸菌陰性試料であってもアンプリコンを生じるため、フロキュレーションアッセイにおいて偽陽性物が生じる場合がある。この欠点を克服するように、本発明者らは、フロキュレーション緩衝液のpHを4.5から5に増加させることによってこのアッセイを「調整」した。この条件下で本発明者らは、バックグラウンド増幅を計算に入れて、対照試料における偽検出なしに大腸菌陽性試料を成功裡に検出することができた(図6B)。

30

40

【0068】

最後に、SDGは、HIV、マラリア、結核、およびインフルエンザなどのヒトの病気を引き起こす病原体にまで拡張された。この目的において、同一のSDGプロトコルを使用して、本発明者らは、HIVに感染している細胞(プロウイルスDNA)を健康な細胞と成功裡に区別した(図6C)。マラリア寄生虫DNAの存在もまた、感染していない対

50

照中ではなく感染している血液試料中において成功裡に検出された(図4D)。培養試料中の結核性マイコバクテリアの存在は、2つの異なる標的遺伝子を使用して明確に検出可能であり、大腸菌と区別することができた(図6G)。最後に、インフルエンザA H1N1ウイルスは感染している培地中で検出された一方で、感染していない培地は何れの陽性シグナルも示さなかった(図6H)。総合すると、SDGは、SDG自体を、試料の実験室での処理または精巧な設備を必要とせず、現地において使用することができる普遍的な包括的手法として実証しており、多くの用途に適合されることができる。

【0069】

考察

現地で準備できるPOCゲノムアッセイは、一定量の核酸の定常的な抽出の試料採取プロトコル、迅速かつ高感度な等温増幅法、および設備を使わない読取りによって特徴づけられることができる。本明細書において、本発明者らは、様々な界にわたる複数の病原性および非病原性の種からDNAおよびRNAを検出するための、普遍的な、事実上設備を使わない、低コストの方法の上記特徴のすべてを統合した一滴ゲノム(図1)アッセイについて述べる。

【0070】

定常的に核酸を一定量で試料採取するための解決策を提供することは、投入材料の量が下流プロセスの性能に著しく影響する可能性があるため、些細な事柄ではない。これを達成するように本発明者らは、グアニジウム-HClなどのカオトロピック塩からなる溶解緩衝液を使用して確立されたプロトコルを修正した。グアニジウム塩は、タンパク質および不活性ヌクレアーゼを変性し、こうして核酸の完全性を保存する。溶解を向上させるために、トリトン-Xなどの界面活性剤と一緒に細胞膜が破壊される。これに続いて、次に不溶性の細胞デブリが除去され、最後に核酸の抽出および精製が行われる。実験室の設定において、細胞デブリは、遠心分離を使用して便利に除去される。残念ながら、遠心分離機は現地では容易に利用できない。最も安価かつ簡単な解決策は、精製していない溶解液を濾過することである。本発明者らは、また、これを最低限の設備で達成することを追求したことから、本発明者らは、精製していない溶解液を清澄化する手段として普通のフィルタ付きピペットチップを使用することを決定した(図2)。

【0071】

次いで核酸は、SPRI技術¹⁹を使用して抽出される。これは、それが事実上設備を使わず、磁石のみを必要とするため、POC用途には最も適している。これに加えて、DNAの収量は、一定の試料投入を仮定すると、単にSPRI粒子の量を調整することによって正確に制御することができる。この手法の別の利点は、これが比較的lowコストであることである。使用するSPRIビーズの量については、本発明者らの手法は、数セントかかるに過ぎず、総アッセイコストに有意には寄与しない。本発明者らの溶解緩衝液とSPRI技術との独特の組合せにより、本発明者らは、植物の葉の組織からDNAについては3~5 ng/μLの収量を、およびRNAについては30~40 ng/μLの収量を定常的に得た(図2Bおよび図2C)。現地の状況において核酸を定量するための簡単で設備を使わない方法がないために、この精度のレベルは重要である。実践上の目的において、このDNAの濃度は、下流のRPAによる増幅にとっても最適であり、その読取りアッセイを妨げなかった。

【0072】

RPAは、比較的新しい等温核酸増幅法である⁴。これはツイストDXによって市販されており、潜在的に単細胞の検出のレベルと、また5重までのRPA反応とを有する。他の等温手法に優先してRPAを選択する別の主要な要因は、そのキットが凍結乾燥されたペレットとして販売されており、室温において安定であることであり、これは地理的に離れた区域での用途にとってきわめて有用な特徴である。本発明者らが開発したこのRPAアッセイは、植物、動物、およびヒトの試料中の病原性または非病原性DNAの高感度かつ迅速(30~40分)な検出用に関与され、設計されている。

【0073】

10

20

30

40

50

R P Aキットの唯一の営利的供給業者であるツイストD Xは、加熱ブロックおよび蛍光計の両方として機能するポータブルな装置を現在市販している。これは可能なP O Cの解決策を提供するが、この装置および特殊な化学的修飾を伴うプライマーを購入するための初期支出は、実際に実施する上で制限を課す可能性がある。これに加えて、現実の現地の状況において使用される任意の種類の設定は、極度の熱さおよび寒さ、湿度、汚れ、雨などを含め、機器の耐用年数を大幅に制限することになる不利な気候条件に対して曝される。これに対処するために、本発明者らは、ほとんどコストをかけず、かつ設備なしでR P Aによる増幅を素早く評価することができる読取り方法を開発した。本発明者らの読取り手法は、S P R Iビーズの高いD N A結合能力を利用するフロキュレーションアッセイである(図3)。本発明者らの知識によると、磁性S P R I粒子の使用が読取り方法として述べられたのは、これが初めてである。フロキュレーションアッセイは、それが簡単であり、かつ精巧な器具類を必要としないために主にP O Cの用途にとって有利であり、また、試験からの単純な不連続(イエス/ノー)の結果が必要とされる用途において有用である。最近、比色バイオセンシングのために金のナノ粒子を使用した様々な実証結果が報告されている^{2 1 ~ 2 3}。きわめて高感度であることが示されている一方で、高濃度で使用しない限りカラーシフトが相対的にわずかであり、多くの群では凝集を確かめるために分光測定が使用される。対照的に、本発明者らのフロキュレーションアッセイは、より良好な視覚コントラストを有する。これは、ナノサイズの金の粒子と比べたその粒子の大きいサイズ(1 μ m)のためである可能性が高い。粒子はD N Aの導入量の増加と共に凝集するため、それらは管の底に素早く沈降する一層大きい塊を形成し、こうして透明な溶液を生じる。他方で、遊離粒子はゆっくり沈降して濁った溶液を生じる。

10

20

【0074】

粒子の凝集はまた、緩衝液のp Hを増加させることによって可逆であることができ(図3D)、したがって、定義によりフロキュレーションはコロイドの可逆的非共有結合の凝集である^{2 4}ため、これはD N A仲介フロキュレーションをさらに裏付けた。p Hが高いとき、D N Aは一層大きく負に帯電し、そのため、その粒子のカルボン酸で覆われた表面から他のD N Aを斥ける可能性がより高い。このp H依存性は、また、D N A濃度に対するこのアッセイの感度を調整するために利用されることもできる。この報告において本発明者らは、外因性大腸菌D N Aと、市販の酵素が大腸菌培養物から組換え技術を使用して生成されることにおそらく起因する、R P A酵素溶液中に存在する混入大腸菌D N Aとを区別するために、この特徴を利用した(図6B)。p Hを調整してフロキュレーションを制御することによって、本発明者らは、増幅のバックグラウンドレベルを計算に入れることができ、またそのために、外因性大腸菌D N Aから生じる追加の増幅を検出することができた。これは簡単な解決策であり得る一方で、この手法の欠点は、感度および視覚コントラストにおける減損である。フロキュレーションの可能性は存在する高分子量D N Aの量に依存するため、過剰な投入D N Aによるアッセイへの過導入は、疑似凝集または偽陽性にもつながる可能性がある。しかしながら、本発明者らの抽出プロトコルの精度のために、本発明者らはこの状況を効果的に回避した(図2)。

30

【0075】

最後に、S D Gの広範囲の用途が、様々な宿主標本から直接に大量の病原体を検出することに成功したことにより実証された(図6)。例えば本発明者らは、植物中の真菌、細菌およびウイルス、ウシ細胞中のヘルペスウイルスD N A、ヒト組織中のH I VプロウイルスD N A、マラリア寄生虫、インフルエンザA H 1 N 1ウイルス、および細菌が加えられている水を検出した。ここに示した複数種の例は、遠隔地での他の現地試験用途のための幅広い可能性および汎用性を実証する。

40

【0076】

結論として、この一滴ゲノムアッセイは、農業、ヒトの健康、および全般的生物学的安全性において多くの用途を有する、包括的な、現地で準備できる、普遍的な、設備を使わない、複数種D N AおよびR N A検出戦略である。その最新の形態におけるS D Gは、現地での評価に利用可能である。

50

【 0 0 7 7 】

【 表 1 】

表1

標的	5'-フォワード-3'	5'-リバーズ-3'
キャベツ萎黄病菌	GCCTTGTATTTAGGTACAACCTCTTT CCCTCGTC (配列番号 :1)	ATATATCTGTATAGGAAATCCCACFG AATTTTC (配列番号 :2)
灰色かび病菌	TTTCCACAGGGTTTGTGTACGAGAT TGGTATTC (配列番号 :3)	TTCTCCGGTGTCCGTTCCGACTGTA GACAATCG (配列番号 :4)
シュードモナス・シリंगाエ	TTTGTCCGAAACGACGTACAGCCAT TTAACCTT (配列番号 :5)	TTCTACGTTCGGGTATTTACTAGCT GGAAAAG (配列番号 :6)
バナナ病菌	ATTGAAGGACTCATAACAAGGTTGCA TCAAAAATA (配列番号 :7)	TTTCTTTTGTCAACTCTACAGAGT GTCTATAA (配列番号 :8)
キュウリモザイクウイルス RNA3コート	AGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGAT TCTAC (配列番号 :9)	GTGCTCGATGTCAACATGAAGTACT AGCTC (配列番号 :10)
ウシHPV TK1	GGAAGATCTGCTCATGCTCGCGCC GCCATGCC (配列番号 :11)	GAGCGCGTAAGCATTGCGCACAGC GACCAGAAA (配列番号 :12)
ウシHPV糖タンパク質B	AAGTGGCGGAGGCGGACGAAAATG CTGCGAGAC (配列番号 :13)	ACGTGCGTGCCTGTGTAGCGTFCGC GGTAGACG (配列番号 :14)
大腸菌uidA遺伝子	CTGTGACGCACAGTTCATAGAGATA ACCTTC (配列番号 :15)	AAAAGCAGTCTTACTTCCATGATTT CTTTAACT (配列番号 :16)
HIV	AAATTAACAATTACACAAGCTTAAT ACACTCC (配列番号 :17)	TATAGAAAGTACAGCAAAAACAT TCTTAAACC (配列番号 :18)
プラスモジウム・ ファルシバルムMSP1	TTGAAGGAAGTAAGAAAACAATTG ATCAAAAATA (配列番号 :19)	CTAAAACGCTTATTAATTTATGTGC TTCTTCTA (配列番号 :20)
結核CFP10	ATTTTGGCGAGGAAGGFAAAGAGA GAAAGTAGT (配列番号 :21)	GAGTTCCTGCTTCTGCTTATTGGCT GCTTCTT (配列番号 :22)
結核ESAT-6	CAATCCAGGGAAATGTCACGTCCAT TCATTC (配列番号 :23)	CCTATGCGAACATCCCAGTGACGTT GCCTTC (配列番号 :24)

10

20

【 0 0 7 8 】

実施例 2 : D N A 仲介架橋フロキュレーションによる遺伝子座特異的 D N A メチル化の迅速かつ少ない資源による評価

病院に D N A メチル化バイオマーカを持ち込むことの課題は、大部分のアッセイが研究目的で開発されているため、簡単な方法が欠如していることである。本明細書中において、本発明者らは、ナノグラム量の投入からの高度にメチル化された遺伝子座特異的領域の迅速かつ厳密性の高い肉眼による二値の評価のための、D N A 仲介フロキュレーションアッセイと一体となっている高度に修正されているメチル-タンパク質ドメイン (M B D) 濃縮プロトコルについて述べる。本発明者らの方法についての少ない資源要件は、病院における D N A メチル化ベースの診断の広範囲に及ぶ採用を可能にし、かつ小規模研究にとっても有用である可能性がある。

30

【 0 0 7 9 】

材料および方法

D N A 試料の調製

全ゲノム増幅 (W G A : W h o l e g e n o m e a m p l i f i e d) D N A が、R E P L I - g ウルトラファストミニキット (R E P L I - g U l t r a F a s t M i n i k i t) (キアゲン (Q i a g e n)) を使用して作製され、D N イージーブラッドアンドティッシュキット (D N e a s y B l o o d a n d T i s s u e k i t) (キアゲン) を使用して精製された。次いで、高度にメチル化されたゲノム D N A を作製するために、W G A D N A の分割量が S s s I メチルトランスフェラーゼによって一晚処理され、精製された。細胞系由来の D N A も、D N イージーブラッドアンドティッシュキットによって精製された。細胞系は、A T C C から購入され、製造推奨に従って培養された。

40

【 0 0 8 0 】

前立腺がん患者由来の全血 D N A が、修正された S P R I プロトコル^{2 8} を使用して精製された。手短に言えば、E D T A で保存した 6 0 μ L の全血が、1 0 μ L のプロテイン

50

ーゼK溶液(ニュー・イングランド・バイオラボ(New England Biolabs)、NEB)、60 μ Lの溶解緩衝液(3MグアニジンHCl、2%トリトンX)、および2 μ LのRNアーゼA溶液(4mg/mL)と共に室温で10分間インキュベートされた。次いで、その溶解血に、10 μ Lのカルボキシルで覆われている磁気ビーズ(サーモ・フィッシャー)および240 μ Lの結合緩衝液(100mMトリスHCl、2.5M NaCl、20%w/v PEG8000、pH8.0)が加えられた。室温において10分間インキュベートした後、DNA結合磁気ビーズが磁石によって収集され、洗浄液(400mMグアニジンHCl、70%エタノール)で1回、70%エタノールで2回洗浄され、最後に30 μ Lの水により溶出させた。両血液試料は、収集して24時間以内に処理された。ヒトの血液試料を使用する認可は、地元の倫理委員会によって与えられた。

10

【0081】

MDB濃縮に適合するDNA断片サイズを作製するために、MseIおよびMluCI制限酵素(NEB)が使用された。手短に言えば、50ngのDNAが、10 μ Lの反応において1単位の各酵素によって37 $^{\circ}$ Cで30分間消化された。消化後、その反応のうちの2 μ LがそれぞれのMBD濃縮用に使用された。

【0082】

MBDの濃縮

エピマークメチル化DNA濃縮キット(EpiMark Methylated DNA Enrichment kit)(NEB)が、推奨されている使用指示に対して大きく変更して使用された。手短に言えば、2 μ gのMDB2a-Fcタンパク質が、10 μ Lのタンパク質A磁気ビーズと共に室温で15分間インキュベートされた。次いで、そのMBD/磁気ビーズミックスのうちの0.5 μ Lが、1 \times MBD緩衝液中における各50 μ Lの濃縮反応に対して使用された。NaClは、濃度300mMに変更した。DNAとMBD/磁気ビーズとを氷上で15分間反応させた。この次に、過剰な、および結合の弱いDNAを除去するために、300mMに変更したNaClを有する1 \times MBD緩衝液において、3回の5分間洗浄が続いた。次いで、濃縮されたDNAが、5 μ Lの2.5M NaCl溶液によって溶離された。最後に、濃縮されたDNAは、アジェンコートアンピュアXP(Agencourt AMPure XP)のSPRI磁気ビーズ(ベックマンコールター(Beckman Coulter))を用いて製造推奨に従って精製され、6 μ Lの水により溶離された。次いで、1 μ Lの精製されたDNAが、各RPA反応のために使用された。

20

30

【0083】

RPAによる増幅

RPA反応が、推奨されているプロトコルに幾つかの修正を伴ってツイストアンブベーシックキット(TwistAmp Basic Kit)(ツイストDX)を使用して行われた。手短に言えば、500nMのプライマーが、7mM MgOAcを追加されている各12.5 μ Lの反応において使用された。迅速な20分のRPAによる増幅の後、3 μ Lをゲル上で電気泳動させて増幅を確かめた。残りは、下流のフロキュレーションアッセイを妨げる可能性のあるRPA反応成分を除去するために行われたSPRIによる浄化にかけられた。次いで、精製されたアンプリコンが、9.5 μ Lの水により溶離された。

40

【0084】

フロキュレーションアッセイ

フロキュレーションアッセイを行うために、3 μ Lの精製されたRPAアンプリコンが、6 μ LのアジェンコートアンピュアXPのSPRI磁気ビーズと共に室温で5分間インキュベートされた。次いで、ビーズが磁石によって捕集され、かつ上清が除去された。次いで、直ちに20 μ Lのフロキュレーション緩衝液(200mM酢酸緩衝液、pH4.4)が加えられ、追加の1分間磁石上でインキュベートされた。次いで、最後に、管が磁石から取り出され、管の側部を静かに叩くことによって攪拌された。陽性試験は、結果としてDNA/ビーズペレットの凝集塊を生じさせ、一方、ビーズは、陰性試験において容易

50

に溶液中に再分散した。

【0085】

DNAにおけるエピジェネティックな変化は、可能性のある病気のバイオマーカである²⁸。DNAのエピジェネティックな変化の一形態は、シトシン/グアニンジヌクレオチド(CpG)中の、具体的には細胞過程を調節するように機能するプロモータ領域のCpG島(CGI:CpG island)中のシトシンのメチル化(5mC)である。しかしながら、大部分の手法は、DNAの重亜硫酸塩変換^{29、30}と、それに続く配列決定の幾つかの形態^{31~34}とを介してDNAメチル化を検出する。重亜硫酸塩変換手法に関連する厄介な問題を回避するために、メチル結合ドメイン(MDB)タンパク質、または5-メチルシトシンに対して産出されている抗体を使用するアフィニティーキャプチャー法が、多くの最近のDNAメチル化の検討^{35、36}において、一般に次世代シーケンシング(NGS:next generation sequencing)と一体となって採用されている。これらの方法は研究用には優れている一方で、日常的な診断のために遺伝子特異的メチル化を検出するより簡単かつ便利な方法は、依然として欠如している。重亜硫酸塩処理を回避すると同時に臨床の必要に対処するために親和性に基づく手法に関して様々な戦略が開発されている^{34~40}が、メチル化が異なる領域(DMR:differently methylated region)を評価するために、すべての手法が依然として光学的読取り方法の幾つかの形態を必要とする。

10

【0086】

MDB濃縮法の有用な特徴は、適切な塩濃度下におけるそれら酵素のほとんど二値の特異性^{35、36}、すなわち、MDBがメチル化DNAを捕集するか否かである。この二値の特徴は、病院における病気の結果の前兆である高度に異なるメチル化の領域(HDMR)など、顕著に変化する状況において有用であり得る。したがって、これらのデジタルなイエス/ノーのバイオマーカを監視する読取り方法が有用であり得る。可能性のある二値の読取り手法は、DNA重合体仲介架橋フロキュレーションアッセイであることができる。フロキュレーションは一般に相間で不意に起こる^{41~47}ため、MDB濃縮アッセイをフロキュレーションに基づく読取りと結びつけることにより、結果としてHDMRを評価するための迅速でかつ少ない資源による方法をもたらすことができる。

20

【0087】

架橋フロキュレーションプロセスの重要な特徴は、長鎖DNA重合体セグメントと短鎖DNA重合体セグメントを区別することであり、これがこのアッセイを可能にする核心部である。架橋フロキュレーションは肉眼によって簡単に見られるため、従来の方法と比較してきわめて魅力的な少ない資源による評価システムであり、低コストの日常的な病院での使用により適している可能性がある。カラーシフトが一般にわずかであり、確認のために分光測定を必要とするナノ粒子に基づく他の手法^{21~24}とは対照的に、フロキュレーションアッセイにおける濁った溶液から透明な溶液へのシフトは、より良好な視覚コントラストを有し、追加の設備なしで肉眼によって簡単に評価することができる。

30

【0088】

結果および考察

本明細書中において、本発明者らは、メチル化DNAを選択的に濃縮するためのMDBと、それに続く、HDMRに特異的なDNA重合体を大量に作製するための安定した等温リコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)⁴とを使用する新規な方法(図7)について述べる。最後に、この増幅されたHDMRの存在が、DNA仲介架橋フロキュレーションアッセイを介して肉眼によって評価される。ナノグラム量の出発ゲノム材料が必要とされたに過ぎず、このアッセイは、現状では10%のメチル化の変化に対して高感度であった。このアッセイは、2時間未満で完了し、かつ最低限の設備、すなわちピペット、加熱ブロック、および磁石を必要とするに過ぎなかった。最後に、このアッセイは、3種類の潜在的ながんに関連するHDMRの存在について試験するために、細胞のパネルおよび全血由来のDNAに適用された。本発明者らは、この方法の速さと、簡単さと、少ない資源要件とが、病院においてDNAメチル化に基づく広い用途を有する可能性があると考えてい

40

50

る。

【0089】

この方法を実現するために(図7)、本発明者らは、まずMBD濃縮用の50ngのゲノムDNA(gDNA:genomic DNA)を酵素で断片化した。本発明者らは、投入DNAの酵素による断片化を選択した。その理由は、これが、時間がかかる可能性があり、特殊な設備を必要とする超音波処理による物理的剪断とは異なり、加熱ブロックのみを必要とする確立されかつ安定した分子技術であるためである。MseIおよびMluCI制限酵素(認識配列はそれぞれTTAAおよびAATT)の組合せが選択された。その理由は、これらが、HDMRが一般に見出されるCGIの過剰な断片化を回避する一方で、高い頻度でヒトゲノムを切断してMBD濃縮に適合する断片(平均で125bp)を作製するためである。次いで、磁気ビーズと結合したMBDがその後、塩が比較的多い緩衝液(300mM)中においてHDMRを選択する³⁶ために、迅速かつ厳密性の高い濃縮を可能にするように氷上(4)で結合および洗浄の両ステップを行いながら導入された。ESR1遺伝子プロモータ(乳がんにおける既知のHDMR²⁷)と関連するCGIに対してプライマーを使用して、本発明者らは、まず、メチル化対照として*in vitro*でメチル化した5ngの全ゲノム増幅(WGA)DNAと対比して、非メチル化対照として5ngのWGA DNAを用いてMBD濃縮ステップを試験した。後続の濃縮DNAのRPAによる増幅によって表されるように、氷上での全MBDアッセイ(結合および洗浄)を行うことにより、結果として、性能の減損が最低限の、メチル化されたDNAのみの高度に特異的な濃縮が約30分のうちに生じた(図8A)。これは、低投入量で高い厳密さを達成するために様々なMD B酵素のカクテルおよび/または4における一晩のインキュベートのいずれかが必要とされた前述のプロトコル³⁶、³⁸を上回る、速さおよび特異性の両方における顕著な改良であった。これに加えて、ここで使用される安定したかつ迅速な等温増幅は、このアッセイをさらに簡略化し、かつ速めた。

10

20

30

40

50

【0090】

肉眼による評価は、MBDが濃縮されたHDMRなどの二値の診断結果に有用である可能性があるため、本発明者らはフロキュレーションアッセイを使用して増幅を評価した。評価には最低限の設備のみが必要とされるため、フロキュレーションアッセイは、少ない資源の設定にも適している場合がある。対象のHDMRに対するRPAによる増幅の後、本発明者らは、概念実証として、DNA精製にカルボキシルで覆われている固相可逆固定化(SPRI)²⁸磁気ビーズを使用してビーズの表面にDNAを沈殿させた。次いで、結合したDNAを溶離する代わりに低pH緩衝液が導入されて、十分な長さを有する多量のRPAアンプリコンが存在する場合(それはさらには、MBDが濃縮されたHDMRの存在を意味する)のみ、凝集塊を生じさせた。増幅が起こらない(メチル化の欠如を表す)場合、その1μLのビーズは容易に溶液中に分散する。本発明者らの知識の限りでは、これはMBD/RPAに基づく手法についての初めての架橋フロキュレーションアッセイである。

【0091】

本発明者らは、ここにHDMRを高い厳密さで迅速に検出することができたと確信し、本発明者らは、その注意を、このアッセイの検出限界、具体的には(1)凝集塊を生じさせるのに十分なRPAアンプリコンを作製するのに必要な最小投入量、および(2)メチル化DNAの最小検出可能量の決定に向けた。この目的において、本発明者らは、メチル化の様々なレベル(100%、50%、10%、および0%)に対し滴定された5ngのgDNAを処理した。本発明者らは、ゲル電気泳動による可視化およびフロキュレーションアッセイの両方においてメチル化されている、全DNA投入量のうちの10%ほどの少ない量からメチル化DNAの存在を確実に検出することができた(図2B)。また、これにより、検出可能なシグナルには最小量の0.5ng(10%メチル化試料)の出発メチル化DNAが必要とされることが示唆された。これらのデータを考慮に入れて、本発明者らは、本発明者らの手法がナノグラムの管理形態において高度メチル化DNAに対して特異的であり、かつ高感度であることを確信した。

【0092】

最近、DNAに誘発される磁気共鳴のシフトを使用するオンチップのMBD/RPA手法¹⁰が報告されている。迅速かつ有用ではある一方で、この手法はRPAアンプリコンの存在を評価するために補助設備を必要とする。対照的に本発明者らの手法では、それらの結果は同様の時間枠内でかつより少量の出発材料を用いて肉眼で簡単に評価される。これに加えて、本発明者らは、本発明者らの方法が、定性的ではあるが低レベル(10%)のメチル化を検出する、およびナノグラム量のDNA投入から検出する能力も実証した。

【0093】

最後に、より複雑な生物学的試料への応用を実証するために、本発明者らは、本発明者らのアッセイを拡張して、ヒトがん細胞系のパネルに対して、ESR1に加えて2種類の追加の潜在的なバイオマーカGSTP1⁴⁹⁻⁵¹およびNPY⁵²⁻⁵⁴のメチル化のステータスを評価した(図9A~図9C)。厳密さを制御するために、非メチル化WGADNAも、この細胞系に由来するDNAと同時にアッセイされた。予想されたように、3種類のすべてのバイオマーカアッセイについて、非メチル化対照中において無視できるRPAによる増幅が検出され、こうしてアッセイの厳密さを検証した。予想されたように、本発明者らは、7種類のすべての細胞系の試料についてESR1、NPY、およびGSTP1のメチル化状態のプロファイリングに成功した。これに加えて、ここに提示したデータは、文献^{55、56}と一致し、したがってこれらは本発明者らの手法の正確さを強調する。最後に、本発明者らは、高度転移性前立腺がんを有する男性から得られている全血由来のgDNAの2種類の試料、および25人の正常な女性のプールされている試料からの1つの試料にこのアッセイを適用した(図3D)。この2種類の前立腺がん試料(PC1およびPC2)については、凝集塊の存在に基づいて高度にメチル化されたGSTP1が検出されたが、ESR1およびNPYについては検出されなかった。プールされた正常なDNA試料(NB)については、フロキュレーションアッセイによって示されるように3種類のすべてのバイオマーカがメチル化された。正常なDNA試料についてのこのメチル化プロファイルは予想外であったが、さらなる調査はこの報告の範囲外である。しかしながら、このデータは、特異的メチル化バイオマーカの適切な試料採取ソースの選択の重要性を強調する。それにもかかわらず、これら結果は、一般に日常的な診断に使用される体液(例えば全血)に対する本発明者らのアッセイの実行可能性を実証する。

【0094】

結論として、本発明者らが初めて、ナノグラム量の投入からのメチル化DNAの厳密な濃縮のための、MBDに基づく迅速な方法について述べた。これをRPAと結びつけて、本発明者らは10%以上メチル化された試料から高感度な検出を達成することができた。次いで、陽性のMBD/RPAの結果が簡単なフロキュレーションアッセイにより肉眼で評価され、またこれはメチル化検出のための伝統的なコロイド化学現象の初めての実証である。この方法は、細胞系および全血からとった試料にも拡張され、診断ツールとしてのその実行可能性を実証した。最後に、陽性のMBD/RPA結果を評価するためのフロキュレーションアッセイの使用は、日常的な診断および小規模のDNAメチル化研究にとって有益である可能性のある、少ない資源での用途のための標識を用いない手法を可能にする。

【0095】

実施例3：前立腺がんにおける尿のTMPRSS2:ERG融合体の検出

前立腺がんの分子のサブタイプでは、TMPRSS2-ERG遺伝子融合体が卓越している。TMPRSS2-ERG融合体が腫瘍の浸潤を仲介することをかなりの証拠が示唆している。これらは、前立腺上皮内新生組織形成(PIN: prostatic intraepithelial neoplasia)、前立腺がんの前兆病変、および前立腺がん自体の間の決定的な組織学的違いと一致する。したがって、本明細書中で開示する「一滴」核酸検出システムが、臨床現場での診断に有用であり得る方法でTMPRSS2-ERG遺伝子融合体を検出できるか否かを判断することは、価値がある。

【0096】

等温リコンビナーゼポリメラーゼ増幅が、表2に示すプライマーを使用して基本的には以前に述べたような条件下で行われた。次いでアンプリコンが、基本的には以前に述べたような条件下でフロキュレーション誘発緩衝液中においてSPRI粒子を使用して検出された。

【0097】

図10に示すように、RT-RPA後にDuCap RNAアンプリコンのDNA配列決定。抽出したDuCap RNAのRT-RPAアンプリコンは、SPRI磁性粒子を使用して精製されて配列決定され、標的TMPRSS2:ERG領域の増幅を確かめた。図11では、10人の転移性去勢抵抗性前立腺がん患者および1人の健康な患者の尿試料から抽出されているRNAのRT-PCRを示す。アガロースゲル電気泳動によって可視化されたこのRT-PCRアンプリコンは、同じ患者群に関するこのフロキュレーションアッセイのスクリーニング結果を検証した(図11c)。図12において、全尿および尿沈降物のRNA安定性の比較は、試料収集の0、2、および12時間後に抽出された、患者の全尿および尿沈降物のRNAのRT-RPAを実証する。

10

【0098】

要約すると、これらのデータは、本明細書中で開示した「一滴ゲノム法」の考え方が、前立腺がん細胞の潜在的な存在の診断指標としてのTMPRSS2-ERG遺伝子融合体を含む核酸の迅速な、かつ効率のよい検出に理想的に適していることを示す。

【0099】

【表2】

20

表2:オリゴヌクレオチド配列

オリゴヌクレオチド	配列 (5' ~ 3')
RT-RPA フォワード、RT-PCR フォワード	CCTGGAGCGCGGCAGGAAGCCTTATCAGTTG (配列番号:25)
RT-RPA リバース	GCTAGGGTTACATTCCATTTTGATGGTGAC (配列番号:26)
RT-PCR リバース	TCCTGCTGAGGGACGCGTGGGCTCATCTTG (配列番号:27)
オリゴヌクレオチドは、インテグレートドDNAテクノロジーズ (Integrated DNA Technologies)から購入した	

30

【0100】

実施例4:一滴ゲノム法のためのアンプリコンのローリングサークル増幅による作製
ローリングサークル増幅(RCA)は、この方法を病気のバイオマーカー検出用に拡張して使用している迅速等温核酸増幅法である⁵⁷⁻⁵⁹。RCAは長鎖(キロ塩基)のDNA重合体を作製するため、適切な長さの十分なDNAを必要とするDNA仲介架橋フロキュレーション読取りに適い得る。DNA仲介架橋フロキュレーション読取りアッセイの利点は、その結果を現場において肉眼によって評価することができることであり、したがって少ない資源の設定の用途に有用であることである。この検討において本発明者らは、農業的に重要な病原体であるシュドモナス・シリंगाエ(PsY)の迅速かつ少ない資源での検出のために、RCAによる増幅を架橋フロキュレーション読取りと組み合わせる実行可能性を実証した。

40

【0101】

材料および方法

サークルプローブの設計

シュドモナス・シリंगाエ(PsY)のゲノム配列は、米国生物学情報センター(

50

NCBI: National Center for Biotechnology Information)のジェンバンク(GenBank)から得られた。生物情報分析が行われ、候補の標的Psyの配列が同定された。候補配列は、他の生物中の相同DNA断片を同定するためにBLASTによる検索にかけられた。そのPsyのゲノム中に存在するが他の生物には存在しない配列を見出すことに、特別な注意が払われた。データベース中の利用できる任意の配列と相同性を示さない断片が選択された。そのユニーク配列に基づいて、CVIPIIニッキング部位が同定され、64ヌクレオチド配列5'-TGGTCTTAA A A A A C T C T T T C G T T G T C A T T G G G A T A G G C G A T T C T A A A T T T C T C A A C G A A A T C T G G - 3' (「ニックPSY」、配列番号28)を有する一重鎖サークルプローブが設計された。

10

【0102】

サーキュラープローブは、1XサークリガーゼII(CircLigase II)反応緩衝液(33mMトリス酢酸(pH7.5)、66mM酢酸カリウム、および0.5mM DTT)、2.5mM MnCl₂、および1Mベタインを含有する20μLの反応により、10pモルの一重鎖サークルプローブを5UのサークリガーゼII(エピセンター(Epicentre))と混合することによって調製された。この反応は、サークリガーゼIIを不活性化するために60℃で16時間、続いて80℃で10分間インキュベートされた。

【0103】

ゲノムDNAの消化

50ngのPsyゲノムDNAおよび植物ゲノムDNAが、1Xカットスマート(CutSmart)緩衝液(50mM酢酸カリウム、20mMトリス酢酸、10mM酢酸マグネシウム、100μg/mLのBSA)を含有する20μLの反応において、5UのCVIPIIニッキング酵素(NEB)により消化された。この消化物は、最初に37℃で90分間インキュベートされ、続いて65℃で20分間の変性ステップにかけられた。

20

【0104】

ローリングサークル増幅(RCA)

100nMのサークルプローブが、ニッキング酵素で消化された250pgのゲノムDNAと、1XPhi29緩衝液(50mMトリスHCl、10mM MgCl₂、10mM(NH₄)₂SO₄、4mM DTT)中に5Uのクレノウ断片(3' 5' exo)(NEB)、5UのPhi29 DNAポリメラーゼ(NEB)、および125nMのそれぞれのdNTPを含有する20μLの反応において混合された。この反応混合物は37℃で30分間インキュベートされた。この産物が、ホウ酸ナトリウム緩衝液において1.5%アガロースゲルを使用するゲル電気泳動によって分析された。線形RCAの性質のために、期待産物サイズは、ゲル電気泳動により表されるように25塩基ほどの短いものから10を超えるものまでの範囲に及んだ。

30

【0105】

フロキュレーションアッセイ

5μLのRCA反応は、10μLのアジェンコートアンピュアXPのSPRIビーズと共に室温で5分間インキュベートされ、RCA産物を磁気ビーズ表面に結合させた。次いで、DNAを載せたビーズは磁石によって単離され、70%エタノールによって1回洗浄され、1分間空気乾燥された。次いで、30μLのフロキュレーション緩衝液(100mM酢酸緩衝液、pH4.4)がビーズに加えられ、もう1分間インキュベートしてから、管の側部を静かに叩くことによって攪拌された。

40

【0106】

結果および考察

この応用法を実現するために、本発明者らは、まずPSYゲノムDNA(gDNA)を宿主植物gDNA(シロイヌナズナ、図13)の5ngのバックグラウンドにスパイクした。予想されたように、ラダリング/スメアリングプロファイルによって表される高分子量産物が、PSYの存在下(1~10%)においてのみ作製されたが、植物DNA(0%

50

）においては作製されず、これはこのRCAアッセイの特異性を表している。これに加えて、DNA介在性の凝集塊はRCAが成功した場合のみ現れ（1～10%のスパイク試料）、したがってRCAによって作製されている産物のフロキュレーション読取りの実行可能性を実証した。

【0107】

最後に、実際の農業用途をシミュレートするために、本発明者らは、様々な感染度（S1～5、図14）における表現型を代表する宿主植物の葉を刈り取った。RCAおよびフロキュレーション読取りを使用して、本発明者らは、発症前の感染のレベルを表すS1ほどの早期にPSYの存在を検出することができた。健康（H）対照および鑄型なし（NOT）対照に関しては増幅も、したがって凝集塊も見られず、これはこの手法の特異性を表す。

10

【0108】

結論として、このDNA仲介架橋フロキュレーション読取りは、RCAによって作製されている産物に適合し、病原体配列の迅速で、高感度な、少ない資源での検出に有用であることができる。RCAによって作製されている産物に対するこのフロキュレーションアッセイの応用は、感染している宿主植物の葉におけるPSYの検出の成功によって実証された。

【0109】

本明細書全体を通じて、その目的は、いずれか1つの実施形態にまたは特徴の特定の集合に本発明を限定することなく、本発明の好ましい実施形態を記載することであった。本発明から逸脱することなく、これら記載および例示した実施形態に対して様々な変更および修正を行うことができる。

20

【0110】

本明細書中で参照される開示の各特許および科学的文献、コンピュータプログラムおよびアルゴリズムは、その全体が参照により援用される。

参考文献

【0111】

【表 3】

- 1 Barany, F. The ligase chain reaction in a PCR world. *PCR Methods Appl* 1, 5-16 (1991).
- 2 Craw, P. & Balachandran, W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab Chip* 12, 2469-2486 (2012).
- 3 Gill, P. & Ghaemi, A. Nucleic acid isothermal amplification technologies - A review. *Nucleos Nucleot Nucl* 27, 224-243 (2008). 10
- 4 Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L. & Armes, N. A. DNA detection using recombination proteins. *Plos Biol* 4, 1115-1121 (2006).
- 5 Vincent, M., Xu, Y. & Kong, H. M. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *Embo Rep* 5, 795-800, doi:DOI 10.1038/sj.embor.7400200 (2004).
- 6 Rohrman, B. A. & Richards-Kortum, R. R. A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA. *Lab Chip* 12, 3082-3088, doi:Doi 10.1039/C2lc40423k (2012). 20
- 7 Lutz, S. *et al.* Microfluidic lab-on-a-foil for nucleic acid analysis based on isothermal recombinase polymerase amplification (RPA). *Lab Chip* 10, 887-893, doi:Doi 10.1039/B921140c (2010).
- 8 Mahalanabis, M., Do, J., AlMuayad, H., Zhang, J. Y. & Klapperich, C. M. An integrated disposable device for DNA extraction and helicase dependent amplification. *Biomed Microdevices* 12, 353-359 (2010). 30
- 9 Chow, W. H. A. *et al.* Application of isothermal helicase-dependent amplification with a disposable detection device in a simple sensitive stool test for toxigenic *Clostridium difficile*. *J Mol Diagn* 10, 452-458 (2008).
- 10 Agrios, G. N. *Plant pathology*. 5th edn, (Elsevier Academic Press, 2005).
- 11 Horsfall, J. G. & Cowling, E. B. *Plant disease : an advanced treatise*. (Academic Press, 1977).
- 12 Kokoskova, B. & Janse, J. D. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection and identification of plant pathogenic bacteria (in particular for *Erwinia amylovora* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*). *Methods in molecular biology* 508, 75-87, doi:10.1007/978-1-59745-062-1_7 (2009). 40

- 13 Wang, Z. H. *et al.* Development of an ID-ELISA for the detection of Rice black-streaked dwarf virus in plants. *Journal of virological methods* 134, 61-65, doi:10.1016/j.jviromet.2005.11.019 (2006).
- 14 Wright, S. F. & Morton, J. B. Detection of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus colonization of roots by using a dot-immunoblot assay. *Applied and environmental microbiology* 55, 761-763 (1989).
- 15 Heiny, D. K. G., D.G. Enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblot detection, and antibody neutralization of *Stemphylium botryosum* phytotoxin. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35, 439 - 451, doi:10.1016/0885-5765(89)90063-5 (1989). 10
- 16 Janse, J. D. & Kokoskova, B. Indirect immunofluorescence microscopy for the detection and identification of plant pathogenic bacteria (in particular for *Ralstonia solanacearum*). *Methods in molecular biology* 508, 89-99 (2009).
- 17 Price, J. A., Smith, J., Simmons, A., Fellers, J. & Rush, C. M. Multiplex real-time RT-PCR for detection of Wheat streak mosaic virus and Triticum mosaic virus. *Journal of virological methods* 165, 198-201, doi:10.1016/j.jviromet.2010.01.019 (2010). 20
- 18 Dai, J., Peng, H., Chen, W., Cheng, J. & Wu, Y. Development of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of three Potyviruses in tobacco plants. *Journal of applied microbiology* 114, 502-508, doi:10.1111/jam.12071 (2013).
- 19 Deangelis, M. M., Wang, D. G. & Hawkins, T. L. Solid-Phase Reversible Immobilization for the Isolation of Pcr Products. *Nucleic Acids Res* 23, 4742-4743 (1995). 30
- 20 Rohland, N. & Reich, D. Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. *Genome research* 22, 939-946, doi:10.1101/gr.128124.111 (2012).
- 21 Xia, F. *et al.* Colorimetric detection of DNA, small molecules, proteins, and ions using unmodified gold nanoparticles and conjugated polyelectrolytes. *P Natl Acad Sci USA* 107, 10837-10841 (2010). 40
- 22 Xu, X. W., Wang, J., Yang, F., Jiao, K. & Yang, X. R. Label-Free Colorimetric Detection of Small Molecules Utilizing DNA Oligonucleotides and Silver Nanoparticles. *Small* 5, 2669-2672 (2009).

- 23 Li, H. X. & Rothberg, L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *P Natl Acad Sci USA* 101, 14036-14039 (2004).
- 24 Hunter, R. J. *Foundations of colloid science*. 2nd edn, (Oxford University Press, 2001).
- 25 Euler, M. *et al.* Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus. *J Clin Virol* 54, 308-312, doi:10.1016/j.jcv.2012.05.006 (2012). 10
- 26 Euler, M. *et al.* Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of biothreat agents. *J Clin Microbiol* 51, 1110-1117, doi:10.1128/JCM.02704-12 (2013).
- 27 Maheux, A. F. *et al.* Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of *Escherichia coli*/*Shigella* in water samples. *Water Res* 43, 3019-3028 (2009). 20
28. Klose, R.J. & Bird, A.P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31, 89-97 (2006).
29. Frommer, M. *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1827-1831 (1992).
30. Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L. & Frommer, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22, 2990-2997 (1994). 30
31. Taylor, K.H. *et al.* Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing. *Cancer Res* 67, 8511-8518 (2007).
32. Gu, H. *et al.* Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nat Protoc* 6, 468-481 (2011).
33. Hirst, M. & Marra, M.A. Next generation sequencing based approaches to epigenomics. *Brief Funct Genomics* 9, 455-465 (2010). 40
34. Zerilli, F. *et al.* Methylation-specific loop-mediated isothermal amplification for detecting hypermethylated DNA in simplex and multiplex formats. *Clinical chemistry* 56, 1287-1296 (2010).
35. Nair, S.S. *et al.* Comparison of methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) and methyl-CpG binding domain (MBD) protein capture for genome-wide DNA

- methylation analysis reveal CpG sequence coverage bias. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* **6**, 34-44 (2011).
36. Warton, K. et al. Methylation-capture and Next-Generation Sequencing of free circulating DNA from human plasma. *BMC genomics* **15**, 476 (2014).
37. Lee, T.Y., Shin, Y. & Park, M.K. A simple, low-cost, and rapid device for a DNA methylation-specific amplification/detection system using a flexible plastic and silicon complex. *Lab on a chip* (2014). 10
38. Oliver, V.F. et al. A novel methyl-binding domain protein enrichment method for identifying genome-wide tissue-specific DNA methylation from nanogram DNA samples. *Epigenetics & chromatin* **6**, 17 (2013).
39. Corrie, S.R. et al. Bisulfite-free analysis of 5MeC-binding proteins and locus-specific methylation density using a microparticle-based flow cytometry assay. *The Analyst* **136**, 688-691 (2011).
40. Wee, E.J. & Trau, M. Measuring whole genome methylation via oxygen channelling chemistry. *Chemical communications* **50**, 10894-10896 (2014). 20
41. Ruehrwein, R.A. & Ward, D.W. Mechanism of Clay Aggregation By Polyelectrolytes. *Soil Science* **73**, 485-492 (1952).
42. La Mer, V.K. Filtration of colloidal dispersions flocculated by anionic and cationic polyelectrolytes. *Discussions of the Faraday Society* **42**, 248-254 (1966).
43. Healy, T.W. & La Mer, V.K. The energetics of flocculation and redispersion by polymers. *Journal of Colloid Science* **19**, 323-332 (1964). 30
44. Smellie Jr, R.H. & La Mer, V.K. Flocculation, subsidence and filtration of phosphate slimes: VI. A quantitative theory of filtration of flocculated suspensions. *Journal of Colloid Science* **13**, 589-599 (1958).
45. Flory, P.J. Thermodynamics of high polymer solutions. *J Chem Phys* **9**, 660-661 (1941).
46. Flory, P.I. Thermodynamics of high polymer solutions. *J Chem Phys* **10**, 51-61 (1942). 40
47. Huggins, M.L. Solutions of long chain compounds. *J Chem Phys* **9**, 440-440 (1941).

48. Widschwendter, M. et al. Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer research* **64**, 3807-3813 (2004).
49. Rand, K.N. et al. Headloop suppression PCR and its application to selective amplification of methylated DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **33**, e127 (2005).
50. Lee, W.H. et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11733-11737 (1994). 10
51. Millar, D.S. et al. Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene* **18**, 1313-1324 (1999).
52. Roperch, J.P. et al. Aberrant methylation of NPY, PENK, and WIF1 as a promising marker for blood-based diagnosis of colorectal cancer. *BMC cancer* **13**, 566 (2013).
53. Bediaga, N.G. et al. DNA methylation epigenotypes in breast cancer molecular subtypes. *Breast cancer research : BCR* **12**, R77 (2010). 20
54. Hill, V.K. et al. Genome-wide DNA methylation profiling of CpG islands in breast cancer identifies novel genes associated with tumorigenicity. *Cancer research* **71**, 2988-2999 (2011).
55. Meissner, A. et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* **454**, 766-770 (2008).
56. Consortium, E.P. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57-74 (2012). 30
57. Lizardi, P.M. et al. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nature genetics* **19**, 225-232 (1998).
58. Schweitzer, B. et al. Immunoassays with rolling circle DNA amplification: a versatile platform for ultrasensitive antigen detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 10113-10119 (2000). 40
59. Schweitzer, B. & Kingsmore, S. Combining nucleic acid amplification and detection. *Current opinion in biotechnology* **12**, 21-27 (2001).

【 図 8 】

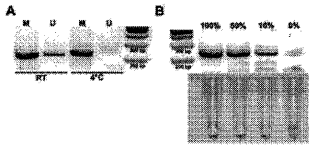


Figure 8

【 図 1 0 】

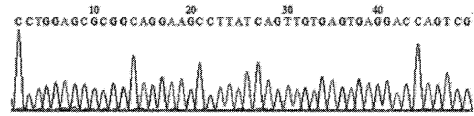


Figure 10

【 図 9 】

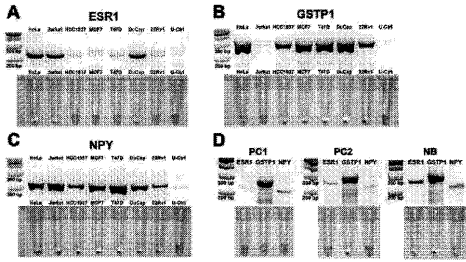


Figure 9

【 図 1 3 】

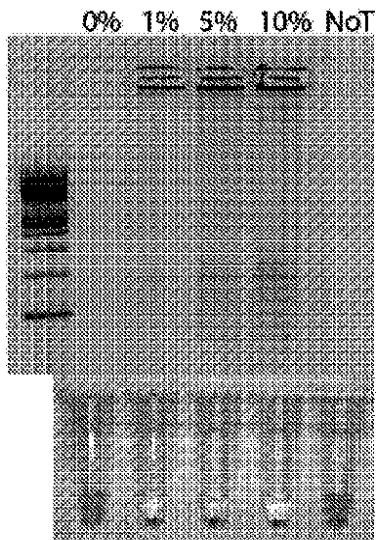


Figure 13

【 図 1 4 】

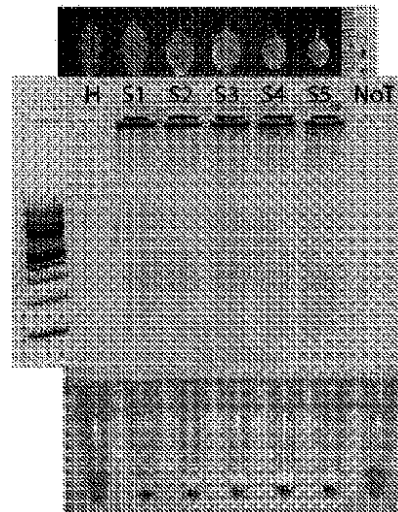
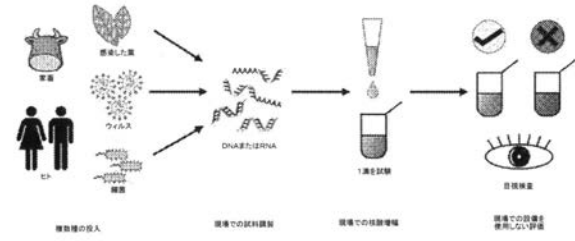
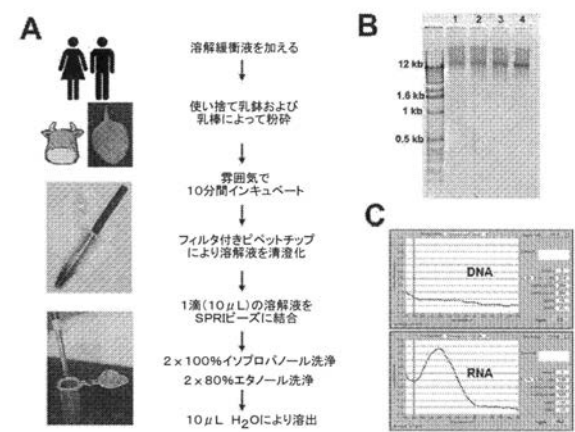


Figure 14

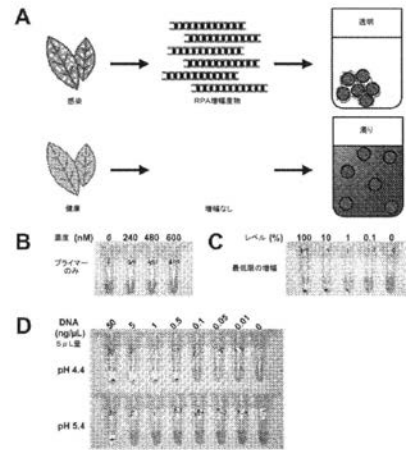
【 図 1 】



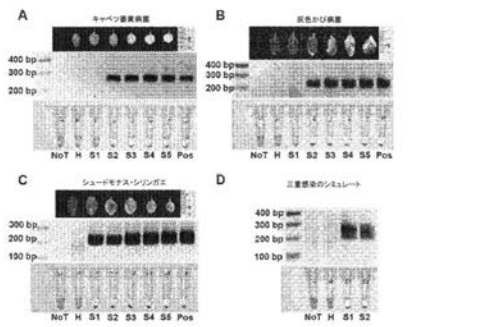
【 図 2 】



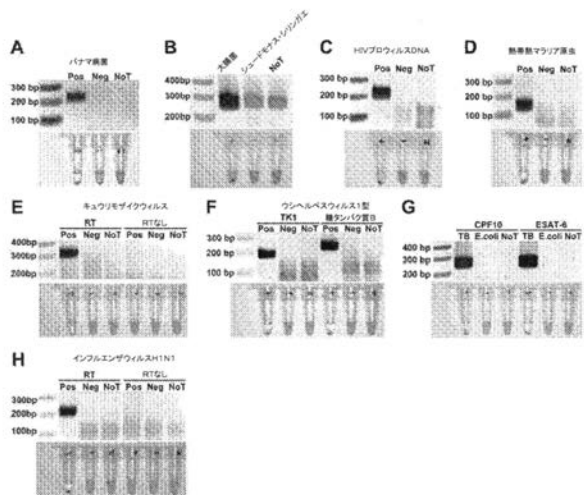
【 図 3 】



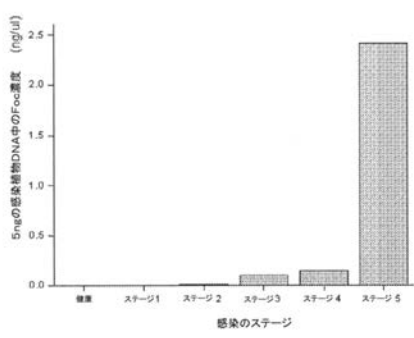
【 図 4 】



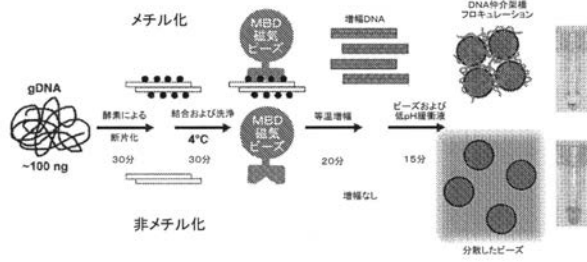
【 図 6 】



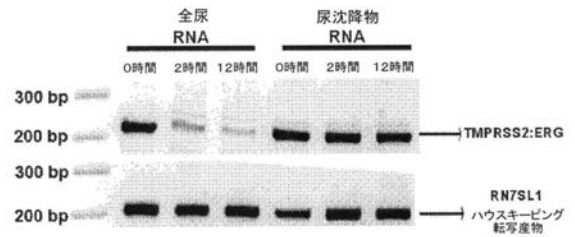
【 図 5 】



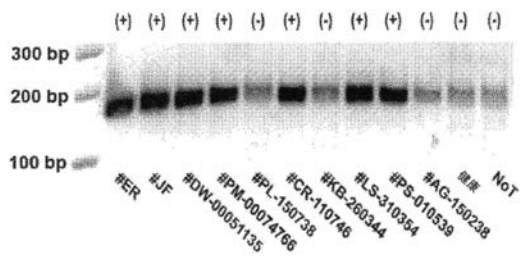
【 図 7 】



【 図 1 2 】



【 図 1 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2014/050443
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPODOC, WPI, Medline, Biosis, HCAPlus searched with keywords: nucleic acid, DNA polynucleotide, particle, bead, microparticle, agglutinate, flocculate, aggregate, complex, assay, detect, measure and like terms. GOOGLE SCHOLAR was searched with keywords: point-of-care, DNA, particle, visual detection, paramagnetic and like terms GOOGLE Patents was searched with keywords: nucleic, detection, particle, aggregation, visual Patent Lens was searched with Applicant names: Matt Trau, Eugene Wee, Jose Botella		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Documents are listed in the continuation of Box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 5 March 2015	Date of mailing of the international search report 05 March 2015	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au	Authorised officer Alan Brownlee AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 02 62832943	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2014/050443
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/151268 A1 (UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION) 08 November 2012 page 2, lines 4-24; page 5, lines 4-14 and lines 20-24; page 8, lines 33-34; page 11, lines 16-24; Example II; Example IV; Fig. 4; claims	1-4, 6-9 and 11-33
X	LESLIE, DC. et al., "New detection modality for label-free quantification of DNA in biological samples via superparamagnetic bead aggregation", J. Am. Chem. Soc. 2012, vol. 134, pages 5689-5696 Abstract; Figs 1, 4, 5	1, 4, 6, 18
X	LIN, C. et al., "Naked-eye detection of nucleic acids through rolling circle amplification and magnetic particle mediated aggregation", Biosens. Bioelectron. 2013, vol. 47, pages 515-519 Abstract; Figs. 1-3; page 519, Section 3.5	1-4, 6-9 and 11-33
X	SMOLENSKY, ED. et al., "Magnetoluminescent light switches - dual modality in DNA detection", J. Am. Chem. Soc. 2013, vol. 135, pages 8966-8972 Abstract; Figs 2, 7, 9, 12, 13; page 8970, col. 1 last para.	1, 4 and 6
X	US 2005/0059042 A1 (ROTHBERG et al.) 17 March 2005 [0018], [0021], [0038], [0039], [0043], [0044], [0065], [0066], [0071]), [0076], claims 66-78; Fig. 5	1, 2, 4, 11-13, 18, 20, 21, 23, 24, 28, 29 and 33
X	WO 03/035829 A2 (NANOSPHERE, INC.) 01 May 2003 Abstract; page 5, lines 1-10; page 13, line 30 ff.; page 31, lines 10-21; page 65, lines 17-24; page 66, lines 14-29; page 67, lines 17-20; page 69, lines 11-21; page 91 Example 14	1-4, 6-9 and 11-33
X	XIA, F. et al., "Colorimetric detection of DNA, small molecules, proteins, and ions using unmodified gold nanoparticles and conjugated polyelectrolytes", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010, vol. 107, pages 10837-10841 Abstract; Fig. 1	1 and 4
X	TAN, E. et al., "Isothermal DNA amplification coupled with DNA nanosphere-based colorimetric detection", Anal. Chem. 2005, vol. 77, pages 7984-7992 Abstract; Figs 2, 6, 7; page 7992, col. 2, last para.	1, 4, 12, 14, 18 and 20
P,X	WO 2014/065753 A1 (DSO NATIONAL LABORATORIES et al.) 01 May 2014 Abstract; Figs; Claims; Summary (page 3); pages 17-21; page 20, lines 20-29; page 22, lines 6-20; page 24, lines 2-12	1-4, 11-33
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2014/050443	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2012/151268 A1	08 November 2012		
US 2005/0059042 A1	17 March 2005	EP 1634050 A2	15 Mar 2006
		EP 1848823 A2	31 Oct 2007
		JP 2007516426 A	21 Jun 2007
		JP 2008527999 A	31 Jul 2008
		US 2006166249 A1	27 Jul 2006
		WO 2004111602 A2	23 Dec 2004
		WO 2006079009 A2	27 Jul 2006
WO 03/035829 A2	01 May 2003	AU 774593 B2	01 Jul 2004
		AU 784040 B2	19 Jan 2006
		AU 3059302 A	18 Jun 2002
		AU 3279501 A	24 Jul 2001
		AU 4043497 A	20 Feb 1998
		AU 5520301 A	08 Oct 2001
		AU 5637800 A	31 Jan 2001
		AU 8124801 A	13 Mar 2002
		AU 2002363062 B2	22 Mar 2007
		AU 2004254367 A1	13 Jan 2005
		AU 2004254367 B2	19 Jun 2008
		AU 2005325273 A1	27 Jul 2006
		AU 2005325273 B2	02 Jul 2009
		AU 2006200261 A1	09 Feb 2006
		AU 2006200274 A1	09 Feb 2006
		AU 2010202492 A1	08 Jul 2010
		CA 2262018 A1	05 Feb 1998
		CA 2376623 A1	04 Jan 2001
		CA 2396113 A1	19 Jul 2001
		CA 2402955 A1	04 Oct 2001
		CA 2418502 A1	07 Mar 2002

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2014/050443	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		CA 2463323 A1	01 May 2003
		CA 2529898 A1	13 Jan 2005
		CA 2565166 A1	27 Jul 2006
		CN 101001960 A	18 Jul 2007
		CN 101198707 A	11 Jun 2008
		EP 0918885 A1	02 Jun 1999
		EP 0918885 B1	11 Apr 2007
		EP 1198591 A1	24 Apr 2002
		EP 1198591 B1	16 Mar 2011
		EP 1294930 A2	26 Mar 2003
		EP 1294930 B1	30 Mar 2011
		EP 1301625 A2	16 Apr 2003
		EP 1301625 B1	03 Nov 2010
		EP 1356109 A2	29 Oct 2003
		EP 1362121 A2	19 Nov 2003
		EP 1379693 A2	14 Jan 2004
		EP 1379693 B1	20 May 2009
		EP 1478774 A2	24 Nov 2004
		EP 1649055 A2	26 Apr 2006
		EP 1649055 B1	20 May 2009
		EP 1747295 A2	31 Jan 2007
		EP 1747295 B1	11 Jan 2012
		EP 1818417 A2	15 Aug 2007
		EP 1818417 B1	12 Feb 2014
		JP 2005514900 A	26 May 2005
		JP 4146239 B2	10 Sep 2008
		JP 2000516460 A	12 Dec 2000
		JP 4245664 B2	25 Mar 2009
		JP 2005525084 A	25 Aug 2005
		JP 4347049 B2	21 Oct 2009
		JP 2003503699 A	28 Jan 2003
		JP 2004194669 A	15 Jul 2004
		JP 2004501340 A	15 Jan 2004
		JP 2004515208 A	27 May 2004
		JP 2004525607 A	26 Aug 2004
		JP 2006288406 A	26 Oct 2006

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2014/050443	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		JP 2007525970 A	13 Sep 2007
		JP 2007537450 A	20 Dec 2007
		JP 2008000143 A	10 Jan 2008
		JP 2008029351 A	14 Feb 2008
		JP 2008067711 A	27 Mar 2008
		US 6361944 B1	26 Mar 2002
		US 6417340 B1	09 Jul 2002
		US 6495324 B1	17 Dec 2002
		US 6506564 B1	14 Jan 2003
		US 2002146720 A1	10 Oct 2002
		US 6582921 B2	24 Jun 2003
		US 2002182611 A1	05 Dec 2002
		US 6610491 B2	26 Aug 2003
		US 2003059777 A1	27 Mar 2003
		US 6645721 B2	11 Nov 2003
		US 2002164605 A1	07 Nov 2002
		US 6673548 B2	06 Jan 2004
		US 2002155459 A1	24 Oct 2002
		US 6677122 B2	13 Jan 2004
		US 2002182613 A1	05 Dec 2002
		US 6682895 B2	27 Jan 2004
		US 2003049631 A1	13 Mar 2003
		US 6709825 B2	23 Mar 2004
		US 2002155462 A1	24 Oct 2002
		US 6720147 B2	13 Apr 2004
		US 2002127574 A1	12 Sep 2002
		US 6720411 B2	13 Apr 2004
		US 2002137072 A1	26 Sep 2002
		US 6730269 B2	04 May 2004
		US 2002155458 A1	24 Oct 2002
		US 6740491 B2	25 May 2004
		US 2003022169 A1	30 Jan 2003
		US 6750016 B2	15 Jun 2004
		US 2003049630 A1	13 Mar 2003
		US 6759199 B2	06 Jul 2004
		US 2002155442 A1	24 Oct 2002

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2014/050443	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		US 6767702 B2	27 Jul 2004
		US 2002137058 A1	26 Sep 2002
		US 6773884 B2	10 Aug 2004
		US 2003044805 A1	06 Mar 2003
		US 6777186 B2	17 Aug 2004
		US 6812334 B1	02 Nov 2004
		US 2003148282 A1	07 Aug 2003
		US 6818753 B2	16 Nov 2004
		US 2003143538 A1	31 Jul 2003
		US 6828432 B2	07 Dec 2004
		US 2002160381 A1	31 Oct 2002
		US 6861221 B2	01 Mar 2005
		US 2002137070 A1	26 Sep 2002
		US 6878814 B2	12 Apr 2005
		US 2004219520 A1	04 Nov 2004
		US 6902895 B2	07 Jun 2005
		US 2003124528 A1	03 Jul 2003
		US 6903207 B2	07 Jun 2005
		US 2003180783 A1	25 Sep 2003
		US 6962786 B2	08 Nov 2005
		US 2002155461 A1	24 Oct 2002
		US 6969761 B2	29 Nov 2005
		US 2002192687 A1	19 Dec 2002
		US 6974669 B2	13 Dec 2005
		US 2003087242 A1	08 May 2003
		US 6984491 B2	10 Jan 2006
		US 2003068622 A1	10 Apr 2003
		US 6986989 B2	17 Jan 2006
		US 7098320 B1	29 Aug 2006
		US 2003207296 A1	06 Nov 2003
		US 7169556 B2	30 Jan 2007
		US 2004072231 A1	15 Apr 2004
		US 7208587 B2	24 Apr 2007
		US 2004110220 A1	10 Jun 2004
		US 7250499 B2	31 Jul 2007
		US 2002137071 A1	26 Sep 2002

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2014/050443	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		US 7259252 B2	21 Aug 2007
		US 2006051798 A1	09 Mar 2006
		US 7323309 B2	29 Jan 2008
		US 2009325812 A1	31 Dec 2009
		US 8323888 B2	04 Dec 2012
		US 2002172953 A1	21 Nov 2002
		US 2003054358 A1	20 Mar 2003
		US 2005037397 A1	17 Feb 2005
		US 2006040286 A1	23 Feb 2006
		US 2006068378 A1	30 Mar 2006
		US 2010081134 A1	01 Apr 2010
		WO 0100876 A1	04 Jan 2001
		WO 0151665 A2	19 Jul 2001
		WO 0173123 A2	04 Oct 2001
		WO 0173123 B1	04 Mar 2004
		WO 0218643 A2	07 Mar 2002
		WO 0246472 A2	13 Jun 2002
		WO 9804740 A1	05 Feb 1998
		WO 02079490 A2	10 Oct 2002
		WO 2005003394 A2	13 Jan 2005
		WO 2006078289 A2	27 Jul 2006
WO 2014/065753 A1	01 May 2014		
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 トラウ、マット

オーストラリア国 4072 クイーンズランド州 ブリスベン セント ルシア ザ ユニバー
シティ オブ クイーンズランド

(72)発明者 ウィー、ユージェーン

オーストラリア国 4072 クイーンズランド州 ブリスベン セント ルシア ザ ユニバー
シティ オブ クイーンズランド

(72)発明者 ボッテラ、ジョゼ ラモン

オーストラリア国 4072 クイーンズランド州 ブリスベン セント ルシア ザ ユニバー
シティ オブ クイーンズランド

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ04 QQ05 QQ08 QQ10 QQ16
QQ18 QQ19 QQ42 QQ52 QQ58 QR08 QR14 QR19 QR62 QR83
QS10 QS14 QS15 QS24 QS34 QS39 QX01

专利名称(译)	核酸检测方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2017501719A	公开(公告)日	2017-01-19
申请号	JP2016542236	申请日	2014-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	昆士兰大学		
申请(专利权)人(译)	昆士兰大学		
[标]发明人	トラウマット ウィーユージーン ポッテラジョセラモン		
发明人	トラウ、マット ウィー、ユージーン ポッテラ、ジョセラモン		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/553 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6844 C12Q2527/119 C12Q2563/143 C12Q2563/149 C12Q2565/113 C12Q1/6851 C12Q1/689 C12Q1/6893 C12Q1/703 C12Q1/708		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M G01N33/553 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ04 4B063/QQ05 4B063 /QQ08 4B063/QQ10 4B063/QQ16 4B063/QQ18 4B063/QQ19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ58 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR19 4B063/QR62 4B063/QR83 4B063/QS10 4B063/QS14 4B063 /QS15 4B063/QS24 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	昂达诚 本田 淳		
优先权	2013905052 2013-12-23 AU		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于检测靶核酸的方法和试剂盒，其中将要扩增的核酸与诸如顺磁珠之类的颗粒组合，以形成可以通过目测检测的聚集复合物。有待完成。可以检测到的核酸样品量低至几微升。该方法可以应用于现场或临床诊断，以快速确定靶核酸的存在与否。还可以确定靶核酸的甲基化状态。该方法和试剂盒可普遍适用于检测动植物疾病，环境测试以及食品和其他可食用产品的污染测试。

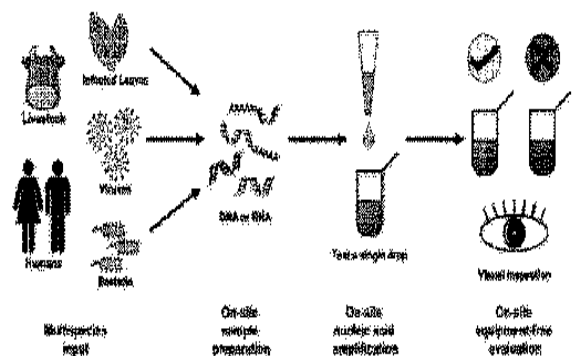


Figure 1