

【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26年2月13日(2014.2.13)

【公表番号】特表2013-507971(P2013-507971A)

【公表日】平成25年3月7日(2013.3.7)

【年通号数】公開・登録公報2013-012

【出願番号】特願2012-535419(P2012-535419)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成25年12月18日(2013.12.18)

【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】

核酸試料を、増幅条件下で、

(a) 鑄型配列に相補的な4~10ヌクレオチドの3'セグメント；

(b) K、X、H、J、M、N、イソCおよびイソGからなる群より独立に選択される少なくとも2個の連続する非標準塩基を含み、かつ少なくとも一つのプライマーの3'セグメントについてのアニーリングを制限する、3'セグメントの5'末端にあるイソ領域；

(c) 鑄型配列に相補的な6~60ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む、イソ領域の5'末端にある5'セグメントであって、少なくとも一つのプライマーが3'セグメントのみを有するプライマーと比較して増加した鑄型配列に対するアニーリング特異性を有する、5'セグメント

を含む少なくとも一つのプライマーと接触させる工程

を含む、増幅反応のアニーリング特異性を増加させるための方法。

【請求項2】

前記少なくとも一つのプライマーが35~50ヌクレオチド長である、請求項1記載の方法。

。

【請求項3】

前記イソ領域が少なくとも3個の非標準塩基を含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】

増幅反応が、

PCR；逆転写酵素PCR；リアルタイムPCR；ディファレンシャルディスプレイPCR；PCRに基づくゲノム分析；AP(Arbitrary Primed)-PCR；多重PCR；ロングレンジ(long-range)PCR；直線的(linear)PCR；逆PCR；定量的PCR；タッチダウンPCR；インサイチューPCR；ベクトレット(vectorette)PCR；TAIL(thermal asymmetric interlaced)PCR；MOPAC(mixed oligonucleotide-primed amplification of cDNA)；3'-RACE；5'-RACE、高分解能融解分析、およびプライマー伸長反応

からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項5】

アニーリング工程が、3'セグメントのみを有するプライマーと比較して、前記少なくとも一つのプライマーのアニーリング特異性を増加させるために十分な温度で実施される、請求項1記載の方法。

#### 【請求項6】

(a) 鑄型配列の変性、少なくとも一つのプライマーのアニーリング、および少なくとも一つのプライマーの伸長を少なくとも2サイクル含む、第一增幅産物を形成させるために第一のアニーリング温度で鑄型配列の第一段階增幅を実施する工程であって、少なくとも一つのプライマーが、

- (i) 鑄型配列に相補的な4~10ヌクレオチドの3'セグメント；
  - (ii) K、X、H、J、M、N、イソCおよびイソGからなる群より独立に選択される少なくとも2個の連続する非標準塩基を含み、かつ少なくとも一つのプライマーの3'セグメントについてのアニーリングを制限する、3'セグメントの5'末端にあるイソ領域；ならびに
  - (iii) 鑄型配列に相補的な6~60ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む、イソ領域の5'末端にある5'セグメント
- を含む、工程と、

(b) 第二のアニーリング温度で、

(i) 工程(a)から生成された增幅産物の変性、少なくとも一つのプライマーのアニーリング、および少なくとも一つのプライマーの伸長；または

(ii) 工程(a)から生成された增幅産物の変性、ならびに少なくとも一つのプライマーの5'セグメントに対応する配列を含むプライマーのアニーリングおよび伸長を少なくとも1サイクル含む、第一增幅産物の第二段階增幅を実施する工程とを含む、二段階反応において標的核酸を増幅するための方法。

#### 【請求項7】

標的核酸が、

(a) オリゴヌクレオチドdTプライマーもしくはアンカード(anchored)オリゴヌクレオチドdTプライマーを標的mRNAのポリAテール領域にハイブリダイズさせるか、または六量体、七量体、およびノもしくは八量体のランダムオリゴヌクレオチドを標的mRNAにハイブリダイズさせること；ならびに(b)cDNAを作製するために標的mRNAを逆転写することにより形成されたcDNAである、請求項6記載の方法。

#### 【請求項8】

二段階増幅手順が、

PCR；多重DNA増幅；差次的に発現された遺伝子の同定；3'-RACE；プライマー伸長反応；5'-RACE；全長cDNAの増幅；5'濃縮(enriched)cDNAの増幅；DNAフィンガープリント；RNAフィンガープリント；多重遺伝子ファミリーにおける保存されたホモロジーセグメントの同定；ヌクレオチド配列変動の同定；プレmiRNA増幅；rRNA増幅；PCR後の高分解能融解分析；および変異誘発

の群を含む方法に適用される、請求項6記載の方法。

#### 【請求項9】

(a) 3'セグメントが4~10ヌクレオチドでありかつ鑄型配列に相補的である少なくとも一つのプライマーを合成する工程；

(b) K、X、H、J、M、N、イソCおよびイソGからなる群より独立に選択される少なくとも2個の連続する非標準塩基を含むイソ領域を、3'セグメントの5'末端に組み入れる工程であって、該イソ領域が、少なくとも一つのプライマーの3'セグメントについてのアニーリングを制限し、それにより、3'セグメントのみを有するプライマーと比較して、3'セグメントのアニーリング特異性を増加させる、工程；

(c) 鑄型配列を含有している鑄型の任意の領域に相補的な6~60ヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む5'セグメントを、イソ領域の5'末端に組み入れる工程であって、それによって少なくとも一つのプライマーが、3'セグメントのみを有するプライマーと比較して増加した鑄型配列に対するアニーリング特異性を有する、工程

を含む、少なくとも一つのプライマーのアニーリング特異性を増加させるための方法。

**【請求項 10】**

前記合成する工程が、固相合成；DNA複製；逆転写；制限消化；ランオフ（run-off）転写；PCR；PCRに基づく方法；プライマー伸長反応；およびライゲーションからなる群より選択される方法を含む、請求項9記載の方法。

**【請求項 11】**

前記少なくとも一つのプライマー配列が35～50デオキシリボヌクレオチド長または35～50リボヌクレオチド長である、請求項9記載の方法。

**【請求項 12】**

前記イソ領域が少なくとも3個の非標準塩基を含む、請求項11記載の方法。

**【請求項 13】**

前記少なくとも一つのプライマーが増幅反応または二段階増幅反応において使用される、請求項9記載の方法。