

【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20年6月19日(2008.6.19)

【公表番号】特表2008-500034(P2008-500034A)

【公表日】平成20年1月10日(2008.1.10)

【年通号数】公開・登録公報2008-001

【出願番号】特願2007-513986(P2007-513986)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/44 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 Q 1/44

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成20年4月21日(2008.4.21)

【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】

細胞又は組織のサンプルに存在する mRNA 転写産物の相対量について、定量および比較評価の少なくとも一方を行うための方法であって、

(a) 複数の遺伝子に対する配列修飾プライマーを用いて、サンプルに含まれる mRNA の逆転写を 1 回の反応で行い、配列修飾 cDNA 分子のプールを得、

(b) 逆転写反応の終了後に、余った配列修飾プライマーを除去又は不活化し、

(c) 分析対象としたそれぞれの遺伝子について個別に増幅反応を行うが、各反応においては、遺伝子特異的プライマーを用いて配列修飾 cDNA からなるテンプレートと参照 DNA テンプレートを共増幅して、測定可能な量の増幅産物を生成し、

(d) 配列修飾 cDNA テンプレートから誘導した増幅産物と参照 DNA テンプレートから誘導した増幅産物のそれぞれの量を測定し、相対レベルを決定して、個別に行った増幅反応における、DNA に対する遺伝子特異的 cDNA の比を得、そして

(e) 個別に行った増幅反応から得られた、DNA に対する遺伝子特異的 cDNA の比を組み合わせて、サンプルに元々存在する mRNA 転写産物の相対量を反映する、該比のサンプル特異的プロファイルを得る

ことを包含する方法。

【請求項 2】

サンプルが、細胞又は組織の溶解物又はホモジェネートを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

逆転写反応の前に、サンプルから RNA、又は RNA と DNA を単離することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

逆転写反応を、サンプルに含まれる DNA が二本鎖の状態を維持する条件下で行うことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

配列修飾プライマーが、次の 3 つの機能的セグメント ( a )、( b ) 及び ( c ) を含有するオリゴヌクレオチドであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

( a ) 特定の遺伝子のセンス鎖 DNA 配列のみならず mRNA 配列に相補的なヌクレオチド配列であって、続いて行う増幅反応に用いる下流側のプライマーのための結合部位に対する相補的なヌクレオチド配列を含有するヌクレオチド配列を含む、5' - 末端セグメント

( b ) 該遺伝子のセンス鎖 DNA 配列のみならず mRNA 配列に非相補的である 1 つ又は複数のヌクレオチドを含むヌクレオチド配列からなる、中央セグメント、及び

( c ) 該遺伝子のセンス鎖 DNA 配列のみならず mRNA 配列に相補的なヌクレオチド配列を含む、3' - 末端セグメント。

**【請求項 6】**

逆転写反応の終了後に行う余った配列修飾プライマーの除去又は不活性化を、酵素分解によって行うことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 7】**

酵素分解を、一本鎖 DNA 特異的エキソヌクレアーゼを用いて行うことを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

個々の増幅反応をそれぞれ物理的に隔離された反応容器において行うことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

参照 DNA テンプレートが、サンプルに存在しているか又は別の原料から単離したゲノム DNA を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 10】**

参照 DNA テンプレートが、クローニング又は合成した DNA オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 11】**

個別の増幅反応における cDNA テンプレートと参照 DNA テンプレートの共増幅を、同じプライマーを用いて競合的に行うことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 12】**

逆転写反応によって生成される cDNA 分子のヌクレオチド配列を修飾し、cDNA 由来の増幅産物を、同じ増幅反応によって得られる参照 DNA テンプレート由来の増幅産物から区別するために、該配列の修飾を用いることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 13】**

増幅産物の定量を、増幅反応の間に行うことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 14】**

増幅産物の定量を、増幅反応の終了後に行うことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 15】**

個別の遺伝子特異的増幅反応において、配列修飾 cDNA テンプレートと参照 DNA テンプレートから誘導する増幅産物の相対レベルが、増幅反応を実施する前の増幅反応系に元々存在した配列修飾 cDNA テンプレートと参照 DNA テンプレートの相対量を反映することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 16】**

cDNA テンプレートと参照 DNA テンプレートを増幅するために、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応又は転写媒介性増幅を用いることを特徴とする、請求項 1 又は 11 に記載の方法。

**【請求項 17】**

増幅産物の定量に、解離曲線解析、差別化部位におけるプライマー伸長法、配列特異的なハイブリダイゼーションプローブ、質量分析法、又は直接的又は間接的な蛍光共鳴エネ

ルギー移動に基づく解析を用いることを特徴とする、請求項 1 又は 1 2 に記載の方法。

**【請求項 1 8】**

差別化部位におけるプライマー伸長法が、ミニシーケンシング法、サイクリックミニシーケンシング法、ピロシーケンシング法（登録商標）及び対立遺伝子特異的プライマー伸長法からなる群より選ばれることを特徴とする、請求項 1 7 に記載の方法。

**【請求項 1 9】**

配列特異的なハイブリダイゼーションプローブが、二重に標識した加水分解プローブ及びモレキュラービーコン（登録商標）プローブからなる群より選ばれることを特徴とする、請求項 1 7 に記載の方法。

**【請求項 2 0】**

細胞又は組織のサンプルに存在する m R N A 転写産物の相対量について定量および比較評価の少なくとも一方を行うためのキットであって、請求項 5 に記載の配列修飾プライマーを含むことを特徴とするキット。