

【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 24 年 7 月 26 日 (2012.7.26)

【公表番号】特表 2009-536525 (P2009-536525A)

【公表日】平成 21 年 10 月 15 日 (2009.10.15)

【年通号数】公開・登録公報 2009-041

【出願番号】特願 2009-509885 (P2009-509885)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

【手続補正書】

【提出日】平成 24 年 6 月 7 日 (2012.6.7)

【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】

以下のステップを含む方法：

- a) i) 第 1 の標的ドメインおよび第 2 の標的ドメインを含む標的配列；
 - i i) 1) 前記第 1 の標的ドメインに実質的に相補的な第 1 のプローブドメイン；
 および
 - 2) 5' - ライゲーション部分；
 を含む第 1 のライゲーションプローブ；ならびに
 - i i i) 1) 前記第 2 の標的ドメインに実質的に相補的な第 2 のプローブドメイン；
 - 2) 3' ライゲーション部分；
 を含む第 2 のライゲーションプローブ；
- を含むライゲーション基質を提供するステップであって、
- 前記第 1 および前記第 2 のライゲーションプローブの少なくとも 1 つは、アンカー配列を含むステップ；
- b) リガーゼ酵素の非存在下で前記第 1 および前記第 2 のライゲーションプローブをライゲーションし、ライゲーション産物を形成するステップ；
- c) 前記アンカー配列に実質的に相補的な捕捉プローブを含む基板上で前記ライゲーションされた産物を捕捉するステップ；ならびに
- d) 前記ライゲーションされた産物の存在を検出するステップ。

【請求項 2】

以下のステップを含む方法：

- a) i) 第 1 の標的ドメインおよび第 2 の標的ドメインを含む標的配列；
 - i i) 1) 前記第 1 の標的ドメインに実質的に相補的な第 1 のプローブドメイン；
 および
 - 2) チオエステルを含む 5' - ライゲーション部分；
 を含む第 1 のライゲーションプローブ；ならびに
 - i i i) 1) 前記第 2 の標的ドメインに実質的に相補的な第 2 のプローブドメイン；
 および

2) 求核部を含む3'ライゲーション部分；

を含む第2のライゲーションプローブ；

を含むライゲーション基質を提供するステップであって、

前記標的ドメインの少なくとも1つは、PNAを含まないステップ；ならびに

b) リガーゼ酵素の非存在下で前記第1および前記第2のライゲーションプローブをライゲーションし、ライゲーション産物を形成するステップ。

【請求項3】

前記第1および第2のライゲーションプローブの少なくとも1つが、アンカープローブをさらに含む、請求項2に記載の方法であって、

a) 前記アンカー配列に実質的に相補的な捕捉プローブを含む基板上で前記ライゲーションされた産物を捕捉するステップ；および

b) 前記ライゲーションされた産物の存在を検出するステップ；
をさらに含む方法。

【請求項4】

以下のステップを含む化学ライゲーションの方法：

a) i) 第1の標的ドメインおよび第2の標的ドメインを含む標的配列；

i i) 1) 前記第1の標的ドメインに実質的に相補的な第1のプローブドメイン；
および

2) 5' - ライゲーション部分；

を含む第1のライゲーションプローブ；ならびに

i i i) 1) 前記第2の標的ドメインに実質的に相補的な第2のプローブドメイン；
および

2) 3' ライゲーション部分；

を含む第2のライゲーションプローブ；

を含むライゲーション基質を提供するステップであって、

前記第1および前記第2のライゲーションプローブの少なくとも1つは、プローブドメインと前記ライゲーション部分との間に少なくとも第1のリンカーを含むステップ；ならびに

b) リガーゼ酵素の非存在下で前記第1および前記第2のライゲーションプローブをライゲーションするステップ。

【請求項5】

前記第1の標的ドメインおよび前記第2の標的ドメインが、少なくとも1つのヌクレオチドによって分離されるか、または互いに隣接する、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記第1および前記第2のライゲーションプローブの少なくとも1つ又は両方がヌクレオチド類似体を含み、前記第1および前記第2のライゲーションプローブの両方がヌクレオチド類似体を含む場合、前記第1のライゲーションプローブは前記第2のライゲーションプローブと異なるヌクレオチド類似体を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記第1および前記第2のライゲーションプローブの少なくとも1つは酵素反応のためのプライマー部位をさらに含み、前記酵素反応が増幅反応であり、そして前記捕捉するステップc)より前に行われ、前記ライゲーション産物が増幅されてもよく、ここで前記増幅反応はPCRであってもよい、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記プライマー部位および前記アンカー配列が、同一のライゲーションプローブ上にあ
る、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

以下のステップを含む方法：

a) 第1の標的ドメインおよび第2の標的ドメインを含む標的配列を提供するステップ；

b) i) 前記第1の標的ドメインに実質的に相補的な第1のプローブドメイン；

i i) 第 1 のライゲーション部分 ; および

i i i) 標識 ;

を含む第 1 のライゲーションプロンプターを提供するステップ ;

c) i) 前記第 2 の標的ドメインに実質的に相補的な第 2 のプロンプタードメイン ;

i i) 第 2 のライゲーション部分 ; および

i i i) アンカー配列 ;

を含む第 2 のライゲーションプロンプターを提供するステップ ;

d) リガーゼ酵素の非存在下で前記第 1 および前記第 2 のライゲーションプロンプターをライゲーションし、ライゲーション産物を形成するステップであって、前記ライゲーションするステップが、前記アンカー配列が前記第 1 のライゲーションプロンプターに移動するか若しくは前記標識が前記第 2 のライゲーションプロンプターに移動する移動反応を含むステップ ;
ならびに

e) 前記ライゲーション産物を検出するステップ。

【請求項 10】

前記ライゲーション産物が 2 次ライゲーション反応の基質の役割を果たす、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

以下のステップを含む方法 :

a) i) 第 1 の標的ドメインおよび第 2 の標的ドメインを含む標的配列 ;

i i) 1) 前記第 1 の標的ドメインに実質的に相補的な第 1 のプロンプタードメイン ;
および

2) 5' - ライゲーション部分 ;

を含む第 1 のライゲーションプロンプター ; ならびに

i i i) 1) 前記第 2 の標的ドメインに実質的に相補的な第 2 のプロンプタードメイン ;
および

2) 3' ライゲーション部分 ;

を含む第 2 のライゲーションプロンプター ;

を含む細胞を提供するステップ ;

b) リガーゼ酵素の非存在下で前記第 1 および前記第 2 のライゲーションプロンプターをライゲーションし、ライゲーション産物を形成するステップ ; ならびに

c) 前記ライゲーション産物を検出するステップ。

【請求項 12】

前記第 1 のライゲーションプロンプターがアンカー配列をさらに含み、前記第 2 のライゲーションプロンプターが標識をさらに含み、前記ライゲーションするステップが、前記標識が前記第 1 のライゲーションプロンプターに移動するか若しくは前記アンカー配列が前記第 2 のライゲーションプロンプターに移動する移動反応を含み、そして、前記第 1 および第 2 のライゲーションプロンプターの少なくとも 1 つは酵素反応のためのプライマー部位をさらに含んでもよく、前記酵素反応が増幅反応であってもよく、前記増幅反応が PCR であってもよい、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記標的配列が、cDNA、mRNA またはマイクロRNA を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記第 1 および前記第 2 のライゲーションプロンプターの少なくとも 1 つが安定化部分をさらに含み、前記ライゲーションするステップ (b) に続いて若しくは同時に、前記安定化部分が放出され、前記安定化部分はマイナーグループ結合分子または核酸であってもよい、請求項 1 または 11 に記載の方法。

【請求項 15】

以下のステップを含む方法 :

a) 第 1 の標的ドメインおよび第 2 の標的ドメインを含む標的配列を提供するステップ ;

- b) 1) 前記第 1 の標的ドメインに実質的に相補的な第 1 のプローブドメイン ; および
2) 5' - ライゲーション部分 ;
を含む第 1 のライゲーションプローブを提供するステップ ;
- c) 1) 前記第 2 の標的ドメインに実質的に相補的な第 2 のプローブドメイン ;
2) 3' ライゲーション部分 ;
を含む第 2 のライゲーションプローブを提供するステップ ;
- d) リガーゼ酵素の非存在下で前記第 1 および前記第 2 のライゲーションプローブをライゲーションし、ライゲーション産物を形成するステップであって、前記ライゲーション産物が前記ライゲーション産物の結合活性を減少させる環化反応を受けるステップ ; ならびに
- e) 前記ライゲーション産物を検出するステップ。

【請求項 16】

前記基板がビーズである、請求項 1 に記載の方法。
