

【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 8 月 4 日 (2005.8.4)

【公表番号】特表 2003-509068 (P2003-509068A)  
 【公表日】平成 15 年 3 月 11 日 (2003.3.11)  
 【出願番号】特願 2001-523804 (P2001-523804)  
 【国際特許分類第 7 版】

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 F

【手続補正書】  
 【提出日】平成 15 年 11 月 11 日 (2003.11.11)  
 【手続補正 1】  
 【補正対象書類名】明細書  
 【補正対象項目名】特許請求の範囲  
 【補正方法】変更  
 【補正の内容】  
 【特許請求の範囲】  
 【請求項 1】

標的ポリヌクレオチド配列と相補的なポリヌクレオチド配列を増幅するための方法であって、以下：

( a ) 該標的配列を含む一本鎖 DNA テンプレートを複合プライマーとハイブリダイズさせる工程であって、該複合プライマーが RNA 部分および 3' DNA 部分を含む、工程；

— ( c ) DNA ポリメラーゼを用いて該複合プライマーを伸長させる工程；

( d ) RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素を用いて、該アニールした複合プライマーの RNA 部分を切断して、別の複合プライマーが該テンプレートにハイブリダイズしかつ鎖置換によりプライマー伸長を反復するようにする工程であって、

それにより該標的配列の相補的配列の複数のコピーが生成される、工程、を包含する、方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、( b ) 終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを、前記テンプレートへの前記複合プライマーのハイブリダイゼーションに対して 5' 側にある該テンプレートの領域にハイブリダイズさせる工程、をさらに包含する、方法。

【請求項 3】

標的ポリヌクレオチド配列を増幅するための方法であって、以下：

( a ) 該標的配列を含む一本鎖 DNA テンプレートを、複合プライマーとハイブリダイズさせる工程であって、該複合プライマーが RNA 部分および 3' DNA 部分を含む、工程；

— ( c ) 該複合プライマーを DNA ポリメラーゼを用いて伸長させる工程；

( d ) RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素を用いて、該アニールした複合プライマーの RNA 部分を切断して、別の複合プライマーが該テンプレートにハイブリダイズしかつ鎖置換によりプライマー伸長を反復して置換されたプライマー伸長産物を生成するようにする工程；

( e ) プロプロモーターと該置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域とを含むポリヌクレオチドを、RNAポリメラーゼにより転写が生じるのを可能にする条件下でハイブリダイズさせ、該置換されたプライマー伸長産物と相補的な配列を含むRNA転写物が生成されるようにする工程であって、

それにより該標的配列の複数のコピーが生成される、工程、  
を包含する、方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法であって、( b ) 終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを、前記テンプレートへの前記複合プライマーのハイブリダイゼーションに対して 5 ' 側にある該テンプレートの領域にハイブリダイズさせる工程、をさらに包含する、方法

。

【請求項 5】

請求項 1、2、3 または 4 に記載の方法であって、前記複合プライマーの RNA 部分が、前記 3 ' DNA 部分に対して 5 ' 側にある、方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法であって、前記 5 ' RNA 部分が前記 3 ' DNA 部分に隣接する、方法。

【請求項 7】

請求項 1、2、3 または 4 に記載の方法であって、複数の複合プライマーが使用される、方法。

【請求項 8】

請求項 2 または 4 に記載の方法であって、前記終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが、テンプレートスイッチオリゴヌクレオチド ( TSO ) である、方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法であって、前記 TSO が、前記テンプレートにハイブリダイズする領域において改変を含み、所定のセットの条件下で、該 TSO が、該改変を含まない TSO と比較した場合に、より緊密に該領域に結合する、方法。

【請求項 10】

請求項 2 または 4 に記載の方法であって、前記終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが、ブロック配列である、方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法であって、前記ブロック配列が、前記テンプレートにハイブリダイズする領域において改変を含み、所定のセットの条件下で、該ブロック配列が、該改変を含まないブロック配列と比較した場合に、より緊密に該領域に結合する、方法。

【請求項 12】

請求項 1、2、3 または 4 に記載の方法であって、前記 RNA を切断する酵素が、RNAアーゼ H である、方法。

【請求項 13】

請求項 3 または 4 に記載の方法であって、前記プロプロモーターと前記置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域とを含むポリヌクレオチドが、テンプレートスイッチオリゴヌクレオチド ( TSO ) である、方法。

【請求項 14】

請求項 3 または 4 に記載の方法であって、前記プロプロモーターを含むポリヌクレオチドが、前記置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域を 3 ' 末端に含み、それにより置換されたプライマー伸長産物の DNA ポリメラーゼ伸長が、二本鎖プロモーターを生成し、該二本鎖プロモーターから転写が行われる、方法。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の方法であって、前記プロプロモーターを含むポリヌクレオチドが、プロプロモーターテンプレートオリゴヌクレオチド ( PTO ) である、方法。

## 【請求項 16】

請求項 2 または 4 に記載の方法であって、工程 (a) および (b) がどちらの順序でも実施される、方法。

## 【請求項 17】

請求項 2 または 4 に記載の方法であって、工程 (a) および (b) が同時に実施される、方法。

## 【請求項 18】

請求項 1、2、3 または 4 に記載の方法であって、工程 (a) および (c) が同時に実施される、方法。

## 【請求項 19】

請求項 1、2、3 または 4 に記載の方法であって、工程 (a) が工程 (c) の前に実施される、方法。

## 【請求項 20】

請求項 2 または 4 に記載の方法であって、工程 (a)、(b) および (c) が同時に実施される、方法。

## 【請求項 21】

請求項 2 または 4 に記載の方法であって、工程 (a) および (b) が工程 (c) の前に実施される、方法。

## 【請求項 22】

請求項 1、2、3 または 4 に記載の方法であって、工程すべてが同時に実施される、方法。

## 【請求項 23】

標的ヌクレオチド配列を配列決定する方法であって、以下：

(a) 該標的配列を含む一本鎖 DNA テンプレートを複合プライマーとハイブリダイズさせる工程であって、該複合プライマーが、RNA 部分および 3' DNA 部分を含む、工程；

— (c) DNA ポリメラーゼならびに dNTP と dNTP アナログとの混合物を用いて、該複合プライマーを伸長させて、プライマー伸長が dNTP アナログの取り込みの際に終結するようにする、工程；

(d) RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素を用いて、該アニールした複合プライマーの RNA 部分を切断して、別の複合プライマーが該テンプレートにハイブリダイズしかつ鎖置換によりプライマー伸長を反復するようにする工程であって、それにより該標的配列の相補的配列の種々の長さの複数のコピーが生成される、工程；

(e) 工程 (a) ~ (d) の産物を分析して配列を決定する工程、を包含する、方法。

## 【請求項 24】

請求項 23 に記載の方法であって、(b) 必要に応じて、終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを、前記テンプレートへの前記複合プライマーのハイブリダイゼーションに対して 5' 側にある該テンプレートの領域にハイブリダイズさせる工程、をさらに包含する、方法。

## 【請求項 25】

標的ヌクレオチド配列を配列決定する方法であって、以下：

(a) 該標的配列を含む一本鎖 DNA テンプレートを複合プライマーとハイブリダイズさせる工程であって、該複合プライマーが、RNA 部分および 3' DNA 部分を含む、工程；

— (c) DNA ポリメラーゼを用いて該複合プライマーを伸長させる工程；

(d) RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素を用いて、該アニールした複合プライマーの RNA 部分を切断して、別の複合プライマーが該テンプレートにハイブリダイズしかつ鎖置換によりプライマー伸長を反復して置換されたプライマー伸長産物を生成するようにする工程；

(e) プロブプロモーターと該置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域とを含むポリヌクレオチドを、rNTPとrNTPアナログとの混合物を使用して、RNAポリメラーゼにより該伸長産物から転写が生じるような条件下で、ハイブリダイズさせ、該置換されたプライマー伸長産物と相補的な配列を含むRNA転写物が生成されるようにし、そして転写がrNTPアナログの取り込みの際に終結するようにする工程であって、それにより該標的配列の種々の長さの複数のコピーが生成される、工程；

(f) 工程(a)～(e)の産物を分析して配列を決定する工程、  
を包含する、方法。

【請求項26】

請求項25に記載の方法であって、(b)終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを、前記テンプレートへの前記複合プライマーのハイブリダイゼーションに対して5'側にある該テンプレートの領域にハイブリダイズさせる工程、をさらに包含する、方法。

【請求項27】

前記複合プライマーのRNA部分が前記3'DNA部分に対して5'側にある、請求項23、24、25、または26に記載の方法。

【請求項28】

前記5'RNA部分が前記3'DNA部分に隣接している、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

標的ポリヌクレオチド中の目的の配列を特徴付ける方法であって、該方法は、

(i) 請求項1、2、3または4に記載の方法により目的の配列を含むテンプレートポリヌクレオチド配列を増幅する工程であって、前記複合プライマーのRNA部分の配列が既知である、工程、および

(ii) 存在するのであれば、工程(i)からの増幅産物と、参照テンプレートからの増幅産物の量とを比較する工程  
を包含し、ここで、

(1) 該複合プライマーのRNA部分と相補的な領域を含む該参照テンプレートからの増幅産物の量と比較して検出可能に少ない、前記テンプレートからの増幅産物の生成は、該標的ポリヌクレオチドが、該複合プライマーのRNA部分と相補的な配列を含まずかつ該複合プライマーのRNA部分と相補的な配列に対する配列改変体であることを示すか；または

(2) 該複合プライマーのRNA部分と相補的な領域を含まない該参照テンプレートからの増幅産物の量と比較して検出可能に多い、該テンプレートからの増幅産物の生成は、該標的ポリヌクレオチドが、該複合プライマーのRNA部分と相補的な配列を含みかつ該複合プライマーのRNA部分と相補的な配列に対する配列改変体ではないことを示す、方法。

【請求項30】

請求項29に記載の方法であって、前記複合プライマーのRNA部分の配列が野生型配列と相補的な配列を含み、そして前記目的の配列が、該野生型配列の存在または非存在を決定することにおいて特徴付けられる、方法。

【請求項31】

請求項29に記載の方法であって、前記複合プライマーのRNA部分の配列が変異配列と相補的な配列を含み、そして前記目的の配列が、該変異配列の存在または非存在を決定することにおいて特徴付けられる、方法。

【請求項32】

請求項29に記載の方法であって、前記複合プライマーのRNA部分の配列が対立遺伝子配列と相補的な配列を含み、そして前記目的の配列が、該対立遺伝子配列の存在または非存在を決定することにおいて特徴付けられる、方法。

【請求項33】

一本鎖高次構造多型により標的ポリヌクレオチドにおける変異を検出する方法であって

、( i ) 請求項 1、2、3 または 4 に記載の方法により該標的ポリヌクレオチドを増幅する工程；および( i i ) 一本鎖高次構造について該増幅産物を分析する工程、を包含し、参照一本鎖ポリヌクレオチドと比較した場合の高次構造における差異が、該標的ポリヌクレオチドにおける変異を示す、方法。

【請求項 3 4】

請求項 2 9 に記載の方法であって、前記複合プライマーの RNA 部分が前記 3 ' DNA 部分に対して 5 ' 側にある、方法。

【請求項 3 5】

請求項 3 4 に記載の方法であって、前記 5 ' RNA 部分が、前記 3 ' DNA 部分に隣接している、方法。

【請求項 3 6】

マイクロアレイを作製する方法であって、( i ) 請求項 1、2、3 または 4 に記載の方法によりポリヌクレオチド配列を増幅する工程；および( i i ) 該増幅産物のマイクロアレイを作製するために固体基材上に該増幅産物を付着させる工程、を包含する、方法。

【請求項 3 7】

複合プライマーおよび( b ) 終結ポリヌクレオチド配列を含むオリゴヌクレオチド、を含む組成物であって、該複合プライマーが 3 ' DNA 部分および 5 ' RNA 部分を含み、該終結ポリヌクレオチド配列は、テンプレートスイッチオリゴヌクレオチド( T S O )を含み、ここで該終結ポリヌクレオチド配列が、DNA ポリメラーゼによるテンプレートの DNA 複製の停止をもたらす、組成物。

【請求項 3 8】

請求項 3 7 に記載の組成物であって、前記 5 ' RNA 部分が前記 3 ' DNA 部分に隣接している、組成物。

【請求項 3 9】

請求項 3 7 に記載の組成物であって、前記 5 ' RNA 部分が 5 ~ 2 0 ヌクレオチドであり、そして前記 3 ' DNA 部分が 5 ~ 1 5 ヌクレオチドである、組成物。

【請求項 4 0】

請求項 3 7 に記載の組成物であって、前記 T S O は、前記テンプレートにハイブリダイズする領域において改変を含み、所定のセットの条件下で、該 T S O は、該改変を含まない T S O と比較した場合、より緊密に該領域に結合する、組成物。

【請求項 4 1】

請求項 3 7 に記載の組成物であって、プロモーターテンプレートオリゴヌクレオチド( P T O )をさらに含む、組成物。

【請求項 4 2】

( a ) テンプレート鎖と；( b ) 複合プライマーであって、該複合プライマーが 3 ' DNA 部分および RNA 部分を含む、複合プライマーと；( c ) 終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、該終結ポリヌクレオチドがテンプレートスイッチオリゴヌクレオチド( T S O )を含む、ポリヌクレオチドとの複合体を含み、ここで該終結ポリヌクレオチド配列が、DNA ポリメラーゼによるテンプレートの DNA 複製の停止をもたらす、組成物。

【請求項 4 3】

請求項 4 2 に記載の組成物であって、前記 RNA 部分が、前記 3 ' DNA 部分の 5 ' 側にありかつ隣接している、組成物。

【請求項 4 4】

反応混合物であって、( a ) ポリヌクレオチドテンプレート；( b ) 3 ' DNA 部分と RNA 部分とを含む、複合プライマー；( c ) DNA ポリメラーゼ；ならびに( d ) 終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、該終結ポリヌクレオチドがテンプレートスイッチオリゴヌクレオチド( T S O )を含む、ポリヌクレオチド、を含み、ここで該終結ポリヌクレオチド配列が、DNA ポリメラーゼによるテンプレートの DNA 複製の停止をもたらす、反応混合物。

## 【請求項 45】

前記複合プライマーが、前記 3' DNA 部分に隣接する 5' RNA 部分を含む、請求項 44 に記載の反応混合物。

## 【請求項 46】

請求項 45 に記載の反応混合物であって、RNA/DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素をさらに含む、反応混合物。

## 【請求項 47】

請求項 46 に記載の反応混合物であって、前記酵素が RNアーゼ H である、反応混合物。

## 【請求項 48】

請求項 44 に記載の反応混合物であって、プロプロモーターを含むポリヌクレオチドをさらに含む、反応混合物。

## 【請求項 49】

請求項 48 に記載の反応混合物であって、前記プロプロモーターを含むポリヌクレオチドが TSO である、反応混合物。

## 【請求項 50】

請求項 48 に記載の反応混合物であって、前記プロプロモーターを含むポリヌクレオチドが、プロプロモーターテンプレートオリゴヌクレオチド (PTO) である、反応混合物。

## 【請求項 51】

標的ポリヌクレオチド配列の増幅のためのキットであって、(a) 3' DNA 部分と RNA 部分とを含む、複合プライマー、および (b) 終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、該終結ポリヌクレオチド配列が、テンプレートスイッチオリゴヌクレオチド (TSO) を含む、ポリヌクレオチドを備え、ここで該終結ポリヌクレオチド配列が、DNA ポリメラーゼによるテンプレートの DNA 複製の停止をもたらす、キット

## 【請求項 52】

請求項 51 に記載のキットであって、前記 RNA 部分が、前記 3' DNA 部分に対して 5' 側にある、キット。

## 【請求項 53】

請求項 52 に記載のキットであって、前記 5' RNA 部分が前記 3' DNA 部分に隣接している、キット。

## 【請求項 54】

請求項 51 に記載のキットであって、プロプロモーターを含むポリヌクレオチドをさらに備える、キット。

## 【請求項 55】

請求項 54 に記載のキットであって、前記プロプロモーターを含むポリヌクレオチドが TSO である、キット。

## 【請求項 56】

請求項 54 に記載のキットであって、前記プロプロモーターを含むポリヌクレオチドが PTO である、キット。

## 【請求項 57】

請求項 51 に記載のキットであって、RNA/DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素をさらに備える、キット。

## 【請求項 58】

請求項 57 に記載のキットであって、前記酵素が RNアーゼ H である、キット。

## 【請求項 59】

請求項 24 または 26 に記載の方法であって、前記終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが、テンプレートスイッチオリゴヌクレオチド (TSO) である、方法。

## 【請求項 60】

請求項 59 に記載の方法であって、前記 T S O が、前記テンプレートにハイブリダイズする領域における改変を含み、所定のセットの条件下で、該 T S O が、該改変を含まない T S O と比較した場合に、より緊密に該領域に結合する、方法。

【請求項 61】

請求項 24 または 26 に記載の方法であって、前記終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドは、ブロッキング配列である、方法。

【請求項 62】

請求項 61 に記載の方法であって、前記ブロッキング配列は、前記テンプレートにハイブリダイズする領域において改変を含み、所定のセットの条件下で、該ブロッキング配列が、該改変を含まないブロッキング配列と比較した場合に、より緊密に該領域に結合する、方法。

【請求項 63】

請求項 23、24、25 または 26 に記載の方法であって、前記 R N A を切断する酵素は、R N アーゼ H である、方法。

【請求項 64】

請求項 25 または 26 に記載の方法であって、前記プロモーター配列および置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域を含むポリヌクレオチドは、テンプレートスイッチオリゴヌクレオチド ( T S O ) である、方法。

【請求項 65】

請求項 25 または 26 に記載の方法であって、前記プロモーターを含むポリヌクレオチドが、前記置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域を 3' 末端に含み、それにより置換されたプライマー伸長産物の D N A ポリメラーゼ伸長が、二本鎖プロモーターを生成し、該二本鎖プロモーターから転写が行われる、方法。

【請求項 66】

請求項 65 に記載の方法であって、前記プロモーターを含むポリヌクレオチドが、プロモーターテンプレートオリゴヌクレオチド ( P T O ) である、方法。

【請求項 67】

請求項 24 または 26 に記載の方法であって、工程 ( a ) および ( b ) がどちらの順序でも実施される、方法。

【請求項 68】

請求項 24 または 26 に記載の方法であって、工程 ( a ) および ( b ) が同時に実施される、方法。

【請求項 69】

請求項 23、24、25 または 26 に記載の方法であって、工程 ( a ) および ( c ) が同時に実施される、方法。

【請求項 70】

請求項 23、24、25 または 26 に記載の方法であって、工程 ( a ) が工程 ( c ) の前に実施される、方法。

【請求項 71】

請求項 24 または 26 に記載の方法であって、工程 ( a )、( b ) および ( c ) が同時に実施される、方法。

【請求項 72】

請求項 24 または 26 に記載の方法であって、工程 ( a ) および ( b ) が工程 ( c ) の前に実施される、方法。

【請求項 73】

請求項 23、24、25 または 26 に記載の方法であって、前記産物を分析する工程を除く全ての工程が、同時に実施される、方法。

【請求項 74】

請求項 29 に記載の方法であって、前記複合プライマーの R N A 部分が、前記 3' D N A 部分に対して 5' 側にある、方法。

**【請求項 75】**

請求項 74 に記載の方法であって、前記 5' RNA 部分が、3' DNA 部分に隣接している、方法。

**【請求項 76】**

請求項 2 または 4 に従属する場合の請求項 29 に記載の方法であって、ここで、該終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが、テンプレートスイッチオリゴヌクレオチド (TSO) である、方法。

**【請求項 77】**

請求項 76 に記載の方法であって、前記 TSO が、前記テンプレートにハイブリダイズする領域において改変を含み、所定のセットの条件下で、該 TSO が、該改変を含まない TSO と比較した場合に、より緊密に該領域に結合する、方法。

**【請求項 78】**

請求項 2 または 4 に従属する場合の請求項 29 に記載の方法であって、ここで、該終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが、ブロッキング配列である、方法。

**【請求項 79】**

請求項 78 に記載の方法であって、前記ブロッキング配列が、前記テンプレートにハイブリダイズする領域において改変を含み、所定のセットの条件下で、該ブロッキング配列が、該改変を含まないブロッキング配列と比較した場合に、より緊密に該領域に結合する、方法。

**【請求項 80】**

請求項 29 に記載の方法であって、前記 RNA を切断する酵素が、RNAアーゼ H である、方法。

**【請求項 81】**

請求項 3 または 4 に従属する場合の請求項 29 に記載の方法であって、ここで、該プロモーターおよび前記置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域を含むポリヌクレオチドが、テンプレートスイッチオリゴヌクレオチド (TSO) である、方法。

**【請求項 82】**

請求項 3 または 4 に従属する場合の請求項 29 に記載の方法であって、ここで、該プロモーターを含むポリヌクレオチドが、前記置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域を 3' 末端に含み、それにより置換されたプライマー伸長産物の DNA ポリメラーゼ伸長が、二本鎖プロモーターを生成し、該二本鎖プロモーターから転写が行われる、方法。

**【請求項 83】**

請求項 82 に記載の方法であって、前記プロプロモーターを含むポリヌクレオチドが、プロプロモーターテンプレートオリゴヌクレオチド (PTO) である、方法。

**【請求項 84】**

請求項 2 または 4 に従属する場合の請求項 29 に記載の方法であって、ここで、工程 (a) および (b) がどちらの順序でも実施される、方法。

**【請求項 85】**

請求項 2 または 4 に従属する場合の請求項 29 に記載の方法であって、ここで、工程 (a) および (b) が同時に実施される、方法。

**【請求項 86】**

請求項 29 に記載の方法であって、工程 (a) および (c) が同時に実施される、方法。

**【請求項 87】**

請求項 29 に記載の方法であって、工程 (a) が、工程 (c) の前に実施される、方法。

**【請求項 88】**

請求項 2 または 4 に従属する場合の請求項 29 に記載の方法であって、ここで、工程 (



a)、(b)および(c)が同時に実施される、方法。

【請求項89】

請求項2または4に従属する場合の請求項29に記載の方法であって、ここで、工程(a)および(b)が、工程(c)の前に実施される、方法。

【請求項90】

請求項29に記載の方法であって、前記増幅産物を比較する工程を除く全ての工程が、同時に実施される、方法。

【請求項91】

請求項2または4に従属する場合の請求項33に記載の方法であって、ここで、前記終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが、テンプレートスイッチオリゴヌクレオチド(TSO)である、方法。

【請求項92】

請求項91に記載の方法であって、前記TSOが、前記テンプレートにハイブリダイズする領域において改変を含み、所定のセットの条件下で、該TSOが、該改変を含まないTSOと比較した場合に、より緊密に該領域に結合する、方法。

【請求項93】

請求項2または4に従属する場合の請求項33に記載の方法であって、ここで、前記終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが、ブロッキング配列である、方法。

【請求項94】

請求項93に記載の方法であって、前記ブロッキング配列が、前記テンプレートにハイブリダイズする領域において改変を含み、所定のセットの条件下で、該ブロッキング配列が、該改変を含まないブロッキング配列と比較した場合に、より緊密に該領域に結合する、方法。

【請求項95】

請求項33に記載の方法であって、前記RNAを切断する酵素が、RNAアーゼHである、方法。

【請求項96】

請求項3または4に従属する場合の請求項33に記載の方法であって、ここで、前記プロモーターおよび前記置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域を含むポリヌクレオチドが、テンプレートスイッチオリゴヌクレオチド(TSO)である、方法。

【請求項97】

請求項3または4に従属する場合の請求項33に記載の方法であって、ここで、前記プロモーターを含むポリヌクレオチドが、前記置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域を3'末端に含み、それにより置換されたプライマー伸長産物のDNAポリメラーゼ伸長が、二本鎖プロモーターを生成し、該二本鎖プロモーターから転写が行われる、方法。

【請求項98】

請求項97に記載の方法であって、前記プロモーターを含むポリヌクレオチドが、プロモーターテンプレートオリゴヌクレオチド(PTO)である、方法。

【請求項99】

請求項2または4に従属する場合の請求項33に記載の方法であって、ここで、工程(a)および(b)がどちらの順序でも実施される、方法。

【請求項100】

請求項2または4に従属する場合の請求項33に記載の方法であって、ここで、工程(a)および(b)が同時に実施される、方法。

【請求項101】

請求項33に記載の方法であって、工程(a)および(c)が同時に実施される、方法。

【請求項102】

請求項 3 3 に記載の方法であって、工程 ( a ) が、工程 ( c ) の前に実施される、方法。

【請求項 1 0 3】

請求項 2 または 4 に従属する場合の請求項 3 3 に記載の方法であって、ここで、工程 ( a )、( b ) および ( c ) が同時に実施される、方法。

【請求項 1 0 4】

請求項 2 または 4 に従属する場合の請求項 3 3 に記載の方法であって、ここで、工程 ( a ) および ( b ) が、工程 ( c ) の前に実施される、方法。

【請求項 1 0 5】

請求項 3 3 に記載の方法であって、前記増幅産物を分析する工程を除く全ての工程が、同時に実施される、方法。

【請求項 1 0 6】

請求項 3 3 に記載の方法であって、前記変異が、塩基置換、塩基挿入、塩基欠失、および単一ヌクレオチド多型からなる群より選択される、方法。

【請求項 1 0 7】

請求項 3 3 に記載の方法であって、前記増幅産物を分析する工程が、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、および配列依存性二次構造を認識するヌクレアーゼを使用する増幅産物の切断からなる群より選択される方法を含む、方法。

【請求項 1 0 8】

請求項 2 または 4 に従属する場合の請求項 3 6 に記載の方法であって、ここで、前記終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが、テンプレートスイッチオリゴヌクレオチド ( T S O ) である、方法。

【請求項 1 0 9】

請求項 1 0 8 に記載の方法であって、前記 T S O が、前記テンプレートにハイブリダイズする領域において改変を含み、所定のセットの条件下で、該 T S O が、該改変を含まない T S O と比較した場合に、より緊密に該領域に結合する、方法。

【請求項 1 1 0】

請求項 2 または 4 に従属する場合の請求項 3 6 に記載の方法であって、ここで、前記終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが、ブロッキング配列である、方法。

【請求項 1 1 1】

請求項 1 1 0 に記載の方法であって、前記ブロッキング配列が、前記テンプレートにハイブリダイズする領域において改変を含み、所定のセットの条件下で、該ブロッキング配列が、該改変を含まないブロッキング配列と比較した場合に、より緊密に該領域に結合する、方法。

【請求項 1 1 2】

請求項 3 6 に記載の方法であって、前記 R N A を切断する酵素が、R N アーゼ H である、方法。

【請求項 1 1 3】

請求項 3 または 4 に従属する場合の請求項 3 6 に記載の方法であって、ここで、前記プロモーターおよび前記置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域を含むポリヌクレオチドが、テンプレートスイッチオリゴヌクレオチド ( T S O ) である、方法。

【請求項 1 1 4】

請求項 3 または 4 に従属する場合の請求項 3 6 に記載の方法であって、ここで、前記プロモーターを含むポリヌクレオチドが、前記置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域を 3 ' 末端に含み、それにより置換されたプライマー伸長産物の D N A ポリメラーゼ伸長が、二本鎖プロモーターを生成し、該二本鎖プロモーターから転写が行われる、方法。

【請求項 1 1 5】

請求項 1 1 4 に記載の方法であって、前記プロモーターを含むポリヌクレオチドが

、プロプロモーターテンプレートオリゴヌクレオチド（PTO）である、方法。

【請求項 1 1 6】

請求項 2 または 4 に従属する場合の請求項 3 6 に記載の方法であって、ここで、工程（a）および（b）がどちらの順序でも実施される、方法。

【請求項 1 1 7】

請求項 2 または 4 に従属する場合の請求項 3 6 に記載の方法であって、ここで、工程（a）および（b）が同時に実施される、方法。

【請求項 1 1 8】

請求項 3 6 に記載の方法であって、工程（a）および（c）が同時に実施される、方法。

【請求項 1 1 9】

請求項 3 6 に記載の方法であって、工程（a）が、工程（c）の前に実施される、方法。

【請求項 1 2 0】

請求項 2 または 4 に従属する場合の請求項 3 6 に記載の方法であって、ここで、工程（a）、（b）および（c）が同時に実施される、方法。

【請求項 1 2 1】

請求項 2 または 4 に従属する場合の請求項 3 6 に記載の方法であって、ここで、工程（a）および（b）が、工程（c）の前に実施される、方法。

【請求項 1 2 2】

請求項 3 6 に記載の方法であって、前記増幅産物を付着する工程を除く全ての工程が、同時に行われる、方法。

【請求項 1 2 3】

請求項 1 ～ 4、2 3 ～ 2 6、2 9、3 3 および 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記複合プライマーの RNA 部分は、7 ～ 2 0 ヌクレオチドからなり、該複合プライマーの DNA 部分は、5 ～ 2 0 ヌクレオチドからなる、方法。

【請求項 1 2 4】

請求項 1 2 3 に記載の方法であって、前記複合プライマーの RNA 部分は、1 0 ～ 2 0 ヌクレオチドからなり、該複合プライマーの DNA 部分は、7 ～ 2 0 ヌクレオチドからなる、方法。

【請求項 1 2 5】

請求項 3 7 または 4 2 に記載の組成物であって、前記複合プライマーの RNA 部分は、7 ～ 2 0 ヌクレオチドからなり、該複合プライマーの DNA 部分は、5 ～ 2 0 ヌクレオチドからなる、組成物。

【請求項 1 2 6】

請求項 1 2 5 に記載の組成物であって、前記複合プライマーの RNA 部分は、1 0 ～ 2 0 ヌクレオチドからなり、該複合プライマーの DNA 部分は、7 ～ 2 0 ヌクレオチドからなる、組成物。

【請求項 1 2 7】

請求項 4 4 に記載の反応混合物であって、前記複合プライマーの RNA 部分は、7 ～ 2 0 ヌクレオチドからなり、該複合プライマーの DNA 部分は、5 ～ 2 0 ヌクレオチドからなる、反応混合物。

【請求項 1 2 8】

請求項 1 2 7 に記載の反応混合物であって、前記複合プライマーの RNA 部分は、1 0 ～ 2 0 ヌクレオチドからなり、該複合プライマーの DNA 部分は、7 ～ 2 0 ヌクレオチドからなる、反応混合物。

【請求項 1 2 9】

請求項 5 1 に記載のキットであって、前記複合プライマーの RNA 部分は、7 ～ 2 0 ヌクレオチドからなり、該複合プライマーの DNA 部分は、5 ～ 2 0 ヌクレオチドからなる、キット。

## 【請求項 130】

請求項 129 に記載のキットであって、前記複合プライマーの RNA 部分は、10 ~ 20ヌクレオチドからなり、該複合プライマーの DNA 部分は、7 ~ 20ヌクレオチドからなる、キット。

## 【請求項 131】

標的ポリヌクレオチド配列と相補的なポリヌクレオチド配列を増幅するための方法であって、該方法は、

(a) 以下の (i) および (ii) を含む複合体：

(i) 該標的配列を含む DNA テンプレート；

(ii) DNA ポリメラーゼを用いて、RNA 部分および 3' DNA 部分を含む複合プライマーを伸長することにより生成した、複合プライマー伸長産物であって、ここで、該複合プライマー伸長産物は、該 DNA テンプレートにハイブリダイズする、複合プライマー伸長産物、  
を提供する工程；

(b) RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素を用いて、該複合プライマー伸長産物の RNA 部分を切断して、別の複合プライマーが該 DNA テンプレートにハイブリダイズするようにする工程；

(c) DNA ポリメラーゼを用いて、鎖置換によるプライマー伸長を反復する工程；

(d) 工程 (b) および (c) を繰り返して、それにより該標的配列の相補的配列の複数のコピーが生成される工程、  
を包含する、方法。

## 【請求項 132】

請求項 131 に記載の方法であって、前記複合体が、前記テンプレートの領域にハイブリダイズした終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドをさらに含み、該テンプレートは、該複合プライマーの該テンプレートへのハイブリダイゼーションに対して 5' 側にある、方法。

## 【請求項 133】

標的ポリヌクレオチド配列を増幅するための方法であって、該方法は、請求項 132 に記載の方法を実施する工程を包含し、さらに

(e) プロプロモーターおよび前記置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域を含むポリヌクレオチドを、RNA ポリメラーゼにより転写が生じる条件下で、前記置換されたプライマー伸長産物とハイブリダイズさせて、該置換されたプライマー伸長産物と相補的な配列を含む RNA 転写物が生成されるようにし、それにより該標的配列の複数のコピーが生成される、工程、  
をさらに包含する、方法。

## 【請求項 134】

標的ポリヌクレオチド配列を配列決定する方法であって、該方法は、請求項 131 または 132 に記載の方法を実施する工程を包含し、前記プライマー伸長は、DNA ポリメラーゼおよび dNTP と dNTP アナログとの混合物を用いて、終結部位へと該複合プライマーを伸長させて、プライマー伸長が dNTP アナログの取り込みの際に終結するようにする工程であって、それにより該標的配列の相補的配列の種々の長さの複数のコピーが生成される、工程；

該方法の産物を分析して、配列を決定する工程、  
を包含する、方法。

## 【請求項 135】

標的ヌクレオチド配列を配列決定する方法であって、該方法は、請求項 132 に記載の方法を実施する工程を包含し、さらに

(e) プロプロモーターと前記置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域とを含むポリヌクレオチドを、rNTP と rNTP アナログとの混合物を使用して、RNA ポリメラーゼにより伸長産物から転写が生じるような条件下で、該置換されたプライ

マー伸長産物とハイブリダイズさせ、該置換されたプライマー伸長産物と相補的な配列を含むRNA転写物が生成されるようにし、該転写がrNTPアナログの取り込みの際に終結するようにする工程であって、それにより該標的配列の種々の長さの複数のコピーが生成される、工程；

(f) 工程(a)～(e)の産物を分析して、配列を決定する工程、を包含する、方法。

【請求項136】

請求項131～135のいずれかに記載の方法であって、前記複合プライマーが、3' DNA部分に隣接した5' RNA部分を含む、方法。

【請求項137】

請求項131～136のいずれかに記載の方法であって、複数の複合プライマーが使用される、方法。

【請求項138】

請求項132～137のいずれかに記載の方法であって、前記終結ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが、テンプレートスイッチオリゴヌクレオチド(TSO)またはブロッキング配列である、方法。

【請求項139】

請求項138に記載の方法であって、前記TSOまたはブロッキング配列が、前記テンプレートにハイブリダイズする領域において改変を含み、所定のセットの条件下で、該TSOまたは該ブロッキング配列が、該改変を含まないTSOまたはブロッキング配列にそれぞれ比較した場合に、該領域により緊密に結合する、方法。

【請求項140】

請求項131～139のいずれかに記載の方法であって、前記RNAを切断する酵素が、RNAアーゼHである、方法。

【請求項141】

請求項133または135～140のいずれかに記載の方法であって、プロモーターおよび前記置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域を含むポリヌクレオチドが、テンプレートスイッチオリゴヌクレオチド(TSO)である、方法。

【請求項142】

請求項133または135～141のいずれかに記載の方法であって、前記プロモーターを含むポリヌクレオチドが、前記置換されたプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域を3'末端に含み、それにより置換されたプライマー伸長産物のDNAポリメラーゼ伸長が、転写が生じる二本鎖プロモーターを生成する、方法。

【請求項143】

請求項131～142のいずれかに記載の方法であって、複合プライマーが、5'～20ヌクレオチドの5' RNA部分および5'～15ヌクレオチドの3' DNA部分を含む、方法。

【請求項144】

請求項143に記載の方法であって、前記5' RNA部分が10～15ヌクレオチドであり、そして前記3' DNA部分が7～12ヌクレオチドである、方法。

【請求項145】

標的配列中の目的に配列を特徴付ける方法であって、該方法は、

(i) 請求項131～133、136～140、143または144のいずれかに記載の方法により、目的の配列を含むテンプレートポリヌクレオチドを増幅する工程であって、該複合プライマーのRNA部分の配列が既知である、工程；ならびに

(ii) 存在するのであれば、工程(i)からの増幅産物を、参照テンプレートからの増幅産物の量と比較する工程であって、

(a) 該複合プライマーのRNA部分と相補的な領域を含む該参照テンプレートからの増幅産物の量と比較して検出可能に少ない、前記テンプレートからの増幅産物の生成は、該標的ポリヌクレオチドが、該複合プライマーのRNA部分と相補的な配列を含ま

ず、かつ該複合プライマーのRNA部分と相補的な配列に対する配列改変体であることを示すか；または

(b) 該複合プライマーのRNA部分と相補的な領域を含まない該参照テンプレートからの増幅産物の量と比較して検出可能に多い、該テンプレートからの増幅産物の生成は、該標的ポリヌクレオチドが、該複合プライマーのRNA部分と相補的な配列を含み、かつ該複合プライマーのRNA部分と相補的な配列に対する配列改変体ではないことを示す、工程、  
を包含する、方法。

【請求項146】

請求項145に記載の方法であって、前記複合プライマーのRNA部分の配列が、野生型配列と相補的な配列を含み、前記目的の配列が野生型の存在もしくは非存在を決定することにおいて特徴付けられるか；または複合プライマーのRNA部分の配列が変異配列と相補的な配列を含み、前記目的の配列が該変異配列の存在もしくは非存在を決定することにおいて特徴付けられるか；または前記複合プライマーのRNA部分の配列が、対立遺伝子配列と相補的な配列を含み、前記目的の配列が該対立遺伝子配列の存在もしくは非存在を決定することにおいて特徴付けられる、方法。

【請求項147】

一本鎖高次構造多型により標的ポリヌクレオチドにおける変異を検出する方法であって、該方法は、(a) 請求項131～133、請求項136～140、または請求項143もしくは144のいずれか1項に記載の方法を行う工程；および(b) 一本鎖高次構造について、該方法の増幅産物を分析する工程を包含し、参照一本鎖ポリヌクレオチドと比較した場合の高次構造における差異が、該標的ポリヌクレオチドにおける変異を示す、方法。

【請求項148】

マイクロアレイを作製する方法であって、該方法は、(a) 請求項131～133、請求項136～140、または請求項143もしくは144のいずれか1項に記載の増幅方法を行う工程；および(b) 該増幅産物のマイクロアレイを作製するために固体基材上に該増幅産物を付着させる工程、を包含する、方法。

【請求項149】

請求項36に記載の方法であって、前記複合プライマーのRNA部分は、3' DNA部分に対して5' 側にある、方法。

【請求項150】

請求項149に記載の方法であって、前記5' RNA部分は、3' DNA部分に隣接している、方法。

【請求項151】

標的ポリヌクレオチド配列と相補的なポリヌクレオチド配列を増幅する方法であって、該方法は、反応混合物をインキュベートする工程を包含し、該反応混合物は、以下：

(a) DNAテンプレート鎖；

(b) 該一本鎖DNAテンプレートにハイブリダイズ可能な複合プライマーであって、該複合プライマーは、RNA部分および3' DNA部分を含む、複合プライマー；

(c) DNA依存性DNAポリメラーゼ；ならびに

(d) RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素、  
を含み、

ここで、該インキュベーションは、プライマーハイブリダイゼーション、プライマー伸長、RNA切断、および該RNAが切断され、複合プライマーが一本鎖DNAテンプレートに結合して、伸長した場合に、該プライマー伸長産物の該一本鎖DNAテンプレートからの置換を可能にする条件下で行われ、それにより該標的ポリヌクレオチド配列と相補的なポリヌクレオチド配列の複数のコピーが生成される、  
方法。

【請求項152】

標的ポリヌクレオチド配列と相補的なポリヌクレオチド配列を増幅するための方法であって、該方法は、反応混合物をインキュベートする工程を包含し、該反応混合物は、以下：

( a ) 以下の ( i ) および ( i i ) を含む複合体：

( i ) DNA テンプレート鎖、

( i i ) 該 DNA テンプレート鎖にハイブリダイズ可能な複合プライマーであって、該複合プライマーは、RNA 部分および 3 ' DNA 部分を含む、複合プライマー；

( b ) DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ；および

( c ) RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素、  
を含み、

ここで、該インキュベーションは、プライマーハイブリダイゼーション、プライマー伸長、RNA 切断、および該 RNA が切断され、複合プライマーが DNA テンプレートに結合して、伸長した場合に、該プライマー伸長産物の該 DNA テンプレート鎖からの置換が可能にする条件下で行われ、それにより該標的ポリヌクレオチド配列と相補的なポリヌクレオチド配列の複数のコピーが生成される、  
方法。

**【請求項 153】**

請求項 151 または 152 に記載の方法であって、前記複合プライマーの RNA 部分が、前記 3 ' DNA 部分の 5 ' 側にある、方法。

**【請求項 154】**

請求項 153 に記載の方法であって、前記 5 ' RNA 部分が、3 ' DNA 部分に隣接している、方法。

**【請求項 155】**

請求項 151 ~ 154 のいずれかに記載の方法であって、複数の複合プライマーが使用される、方法。

**【請求項 156】**

請求項 151 ~ 155 のいずれかに記載の方法であって、前記 RNA を切断する酵素が、RNA ーゼ H である、方法。

**【請求項 157】**

請求項 151 ~ 156 のいずれかに記載の方法であって、前記複合プライマーの RNA 部分は、7 ~ 20 ヌクレオチドからなり、該複合プライマーの DNA 部分は、5 ~ 20 ヌクレオチドからなる、方法。

**【請求項 158】**

請求項 151 ~ 156 のいずれかに記載の方法であって、前記複合プライマーの RNA 部分は、10 ~ 20 ヌクレオチドからなり、該複合プライマーの DNA 部分は、7 ~ 20 ヌクレオチドからなる、方法。

**【請求項 159】**

ポリヌクレオチド配列を増幅するためのキットであって、該キットは、複合プライマーを含み、ここで、該複合プライマーは、RNA 部分および 3 ' DNA 部分を含み、該複合プライマーの RNA 部分は、該 3 ' DNA 部分に対して 5 ' 側にあり、該 5 ' RNA 部分は、該 3 ' DNA 部分に隣接し、そして、該複合プライマーの RNA 部分が、5 ~ 20 ヌクレオチドからなり、そして該複合プライマーの DNA 部分が、3 ~ 12 ヌクレオチドからなる、キット。

**【請求項 160】**

請求項 159 に記載のキットであって、前記複合プライマーの RNA 部分が、7 ~ 20 ヌクレオチドからなる、キット。

**【請求項 161】**

請求項 159 に記載のキットであって、前記複合プライマーの RNA 部分が、7 ~ 18 ヌクレオチドからなる、キット。

**【請求項 162】**

請求項 1 5 9 ~ 1 6 1 のいずれかに記載のキットであって、前記複合プライマーの D N A 部分が、5 ~ 1 2 ヌクレオチドからなる、キット。

【請求項 1 6 3】

請求項 1 5 9 ~ 1 6 1 のいずれかに記載のキットであって、前記複合プライマーの D N A 部分が、7 ~ 1 2 ヌクレオチドからなる、キット。

【請求項 1 6 4】

請求項 1 5 9 に記載のキットであって、R N A / D N A ハイブリッドから R N A を切断する酵素をさらに含む、キット。

【請求項 1 6 5】

請求項 1 6 4 に記載のキットであって、R N A / D N A ハイブリッドから R N A を切断する前記酵素が、R N アーゼ H である、キット。

【請求項 1 6 6】

請求項 1 6 5 に記載のキットであって、D N A ポリメラーゼをさらに含む、キット。

【請求項 1 6 7】

ポリヌクレオチド配列を増幅するためのキットであって、該キットは、複合プライマーを含み、ここで、該複合プライマーは、R N A 部分および 3 ' D N A 部分を含み、そして、該複合プライマーの R N A 部分は、5 ~ 3 0 ヌクレオチドからなり、そして該複合プライマーの D N A 部分は、3 ~ 1 2 ヌクレオチドからなる、キット。

【請求項 1 6 8】

ポリヌクレオチド配列を増幅するためのキットであって、該キットは、複合プライマーを含み、ここで、該複合プライマーが、5 ' R N A 部分および 3 ' D N A 部分を含み、そしてここで、該複合プライマーの R N A 部分が、3 ~ 2 5 ヌクレオチドからなり、そして該複合プライマーの D N A 部分が、3 ~ 1 2 ヌクレオチドからなる、キット。

【請求項 1 6 9】

請求項 1 6 8 に記載のキットであって、前記 5 ' R N A 分が、前記 3 ' D N A 部分に隣接する、キット。

【請求項 1 7 0】

請求項 1 6 8 に記載のキットであって、前記複合プライマーが、前記 5 ' R N A 部分および前記 3 ' D N A 部分からなる、キット。

【請求項 1 7 1】

請求項 1 6 8 に記載のキットであって、前記複合プライマーの R N A 部分が、7 ~ 2 0 ヌクレオチドからなる、キット。

【請求項 1 7 2】

請求項 1 6 8 に記載のキットであって、前記複合プライマーの R N A 部分が、7 ~ 1 8 ヌクレオチドからなる、キット。

【請求項 1 7 3】

請求項 1 7 2 に記載のキットであって、前記複合プライマーが、前記 5 ' R N A 部分および前記 3 ' D N A 部分からなる、キット。

【請求項 1 7 4】

請求項 1 6 8 に記載のキットであって、前記複合プライマーの R N A 部分が、1 0 ~ 2 0 ヌクレオチドからなる、キット。

【請求項 1 7 5】

請求項 1 7 4 に記載のキットであって、前記 5 ' R N A 分が、前記 3 ' D N A 部分に隣接する、キット。

【請求項 1 7 6】

請求項 1 6 8 ~ 1 7 5 のいずれかに記載のキットであって、前記複合プライマーの D N A 部分が、5 ~ 1 2 ヌクレオチドからなる、キット。

【請求項 1 7 7】

請求項 1 6 8 ~ 1 7 5 のいずれかに記載のキットであって、前記複合プライマーの D N A 部分が、7 ~ 1 2 ヌクレオチドからなる、キット。



【請求項 178】

請求項 168 に記載のキットであって、RNA/DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素をさらに含む、キット。

【請求項 179】

請求項 178 に記載のキットであって、RNA/DNA ハイブリッドから RNA を切断する前記酵素が、RNAアーゼ H である、キット。

【請求項 180】

請求項 178 に記載のキットであって、DNA ポリメラーゼをさらに含む、キット。

【請求項 181】

ポリヌクレオチド配列を増幅するためのキットであって、該キットは、複合プライマーと、DNA ポリメラーゼと、RNA/DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素とを含み、ここで、該複合プライマーが、5' RNA 部分および 3' DNA 部分を含み、ここで、該複合プライマーの RNA 部分が、10 ~ 20 ヌクレオチドからなり、そして該複合プライマーの DNA 部分が、7 ~ 12 ヌクレオチドからなる、キット。

【請求項 182】

請求項 181 に記載のキットであって、前記 5' RNA 分が、前記 3' DNA 部分に隣接する、キット。

【請求項 183】

請求項 181 に記載のキットであって、前記複合プライマーが、前記 5' RNA 部分および前記 3' DNA 部分からなる、キット。

【請求項 184】

請求項 182 に記載のキットであって、前記複合プライマーが、前記 5' RNA 部分および前記 3' DNA 部分からなる、キット。

【請求項 185】

請求項 181 に記載のキットであって、RNA/DNA ハイブリッドから RNA を切断する前記酵素が、RNAアーゼ H である、キット。

【請求項 186】

請求項 159 に記載のキットであって、前記複合プライマーが、前記 5' RNA 部分および前記 3' DNA 部分からなる、キット。

【請求項 187】

請求項 159 に記載のキットであって、反応混合物をインキュベートする工程を包含する方法を実行するための一組の指示書をさらに含み、該反応混合物が、以下：

(a) 以下の (i) と (ii) とを含む複合体：

(i) DNA テンプレート鎖、

(ii) 該 DNA テンプレート鎖にハイブリダイズ可能な複合プライマーであって、該複合プライマーは、5' RNA 部分および 3' DNA 部分を含む、複合プライマー；

(b) DNA ポリメラーゼ；および

(c) RNA/DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素、  
を含み、

ここで、該インキュベーションは、プライマーハイブリダイゼーション、プライマー伸長、RNA 切断、および RNA が該プライマー伸長産物から切断された場合の該プライマー伸長産物の該テンプレートからの置換を可能にする条件下で行われ、それにより別の複合プライマーがハイブリダイズし、そして鎖置換によるプライマー伸長を繰り返す、  
キット。

【請求項 188】

請求項 167 に記載のキットであって、反応混合物をインキュベートする工程を包含する方法を実行するための一組の指示書をさらに含み、該反応混合物が、以下：

(a) 以下の (i) と (ii) とを含む複合体：

(i) DNA テンプレート鎖、

( i i ) 該 DNA テンプレート鎖にハイブリダイズ可能な複合プライマーであって、該複合プライマーは、5' RNA 部分および 3' DNA 部分を含む、複合プライマー  
;

( b ) DNA ポリメラーゼ ; および

( c ) RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素、  
を含み、

ここで、該インキュベーションは、プライマーハイブリダイゼーション、プライマー伸長、RNA 切断、および RNA が該プライマー伸長産物から切断された場合の該プライマー伸長産物の該テンプレートからの置換を可能にする条件下で行われ、それにより別の複合プライマーがハイブリダイズし、そして鎖置換によるプライマー伸長を繰り返す、  
キット。

**【請求項 189】**

請求項 168 に記載のキットであって、反応混合物をインキュベートする工程を包含する方法を実行するための一組の指示書をさらに含み、該反応混合物が、以下：

( a ) 以下の ( i ) と ( i i ) とを含む複合体：

( i ) DNA テンプレート鎖、

( i i ) 該 DNA テンプレート鎖にハイブリダイズ可能な複合プライマーであって、該複合プライマーは、5' RNA 部分および 3' DNA 部分を含む、複合プライマー  
;

( b ) DNA ポリメラーゼ ; および

( c ) RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素、  
を含み、

ここで、該インキュベーションは、プライマーハイブリダイゼーション、プライマー伸長、RNA 切断、および RNA が該プライマー伸長産物から切断された場合の該プライマー伸長産物の該テンプレートからの置換を可能にする条件下で行われ、それにより別の複合プライマーがハイブリダイズし、そして鎖置換によるプライマー伸長を繰り返す、  
キット。

**【請求項 190】**

請求項 169 に記載のキットであって、反応混合物をインキュベートする工程を包含する方法を実行するための一組の指示書をさらに含み、該反応混合物が、以下：

( a ) 以下の ( i ) と ( i i ) とを含む複合体：

( i ) DNA テンプレート鎖、

( i i ) 該 DNA テンプレート鎖にハイブリダイズ可能な複合プライマーであって、該複合プライマーは、5' RNA 部分および 3' DNA 部分を含む、複合プライマー  
;

( b ) DNA ポリメラーゼ ; および

( c ) RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素、  
を含み、

ここで、該インキュベーションは、プライマーハイブリダイゼーション、プライマー伸長、RNA 切断、および RNA が該プライマー伸長産物から切断された場合の該プライマー伸長産物の該テンプレートからの置換を可能にする条件下で行われ、それにより別の複合プライマーがハイブリダイズし、そして鎖置換によるプライマー伸長を繰り返す、  
キット。

**【請求項 191】**

請求項 181 に記載のキットであって、反応混合物をインキュベートする工程を包含する方法を実行するための一組の指示書をさらに含み、該反応混合物が、以下：

( a ) 以下の ( i ) と ( i i ) とを含む複合体：

( i ) DNA テンプレート鎖、

( i i ) 該 DNA テンプレート鎖にハイブリダイズ可能な複合プライマーであって、該複合プライマーは、5' RNA 部分および 3' DNA 部分を含む、複合プライマー

i.

(b) DNAポリメラーゼ；および

(c) RNA / DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素、  
を含み、

ここで、該インキュベーションは、プライマーハイブリダイゼーション、プライマー伸長、RNA切断、およびRNAが該プライマー伸長産物から切断された場合の該プライマー伸長産物の該テンプレートからの置換を可能にする条件下で行われ、それにより別の複合プライマーがハイブリダイズし、そして鎖置換によるプライマー伸長を繰り返す、キット。

【請求項192】

請求項182に記載のキットであって、反応混合物をインキュベートする工程を包含する方法を実行するための一組の指示書をさらに含み、該反応混合物が、以下：

(a) 以下の(i)と(ii)とを含む複合体：

(i) DNAテンプレート鎖、

(ii) 該DNAテンプレート鎖にハイブリダイズ可能な複合プライマーであって、該複合プライマーは、5' RNA部分および3' DNA部分を含む、複合プライマー；

i.

(b) DNAポリメラーゼ；および

(c) RNA / DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素、  
を含み、

ここで、該インキュベーションは、プライマーハイブリダイゼーション、プライマー伸長、RNA切断、およびRNAが該プライマー伸長産物から切断された場合の該プライマー伸長産物の該テンプレートからの置換を可能にする条件下で行われ、それにより別の複合プライマーがハイブリダイズし、そして鎖置換によるプライマー伸長を繰り返す、キット。

【請求項193】

請求項1、3、5、6、23、25、27～29、33～36、131、133、134、136、または145～154のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、前記複合プライマーのRNA部分が、3～25ヌクレオチドからなり、そして該複合プライマーのDNA部分が、3～15ヌクレオチドからなる、方法。

【請求項194】

ポリヌクレオチド配列を増幅するためのキットであって、該キットは、RNA部分および3' DNA部分を含む複合プライマーと、反応混合物をインキュベートする工程を包含する方法を実行するための一組の指示書とを含み、該反応混合物は、以下：

(a) 以下の(i)と(ii)とを含む複合体：

(i) DNAテンプレート鎖、

(ii) 該DNAテンプレート鎖にハイブリダイズ可能な複合プライマーであって、該複合プライマーは、RNA部分および3' DNA部分を含む、複合プライマー；

(b) DNAポリメラーゼ；および

(c) RNA / DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素、  
を含み、

ここで、該インキュベーションは、プライマーハイブリダイゼーション、プライマー伸長、RNA切断、およびRNAが該プライマー伸長産物から切断された場合の該プライマー伸長産物の該テンプレートからの置換を可能にする条件下で行われ、それにより別の複合プライマーがハイブリダイズし、そして鎖置換によるプライマー伸長を繰り返す、キット。

【請求項195】

請求項194に記載のキットであって、ここで、前記複合プライマーのRNA部分が、前記3' DNA部分に対して5'側にある、キット。

【請求項196】

請求項 1 9 5 に記載のキットであって、前記 5 ' R N A 部分が前記 3 ' D N A 部分に隣接する、キット。