

【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18年6月29日(2006.6.29)

【公表番号】特表2006-500028(P2006-500028A)

【公表日】平成18年1月5日(2006.1.5)

【年通号数】公開・登録公報2006-001

【出願番号】特願2004-537832(P2004-537832)

【国際特許分類】

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**

**C 1 2 Q 1/533 (2006.01)**

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/533

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成18年5月10日(2006.5.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0051

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0051】

HDAの別の例において、T7遺伝子4タンパク質をヘリカーゼ調製物中で用いて、標的の核酸を増幅させる。T7遺伝子4タンパク質は、プライマーゼ活性と3'→5'ヘリカーゼ活性の両方を含む6量体の複製ヘリカーゼである(LechnerとRichardson、J. Biol. Chem. 258:11185~11196(1983))。遺伝子4タンパク質のアミノ末端切断型である、T7遺伝子4Bタンパク質(T7 Gp4Bヘリカーゼ)は、DNAヘリカーゼ活性しか含まない。T7 Gp4Bヘリカーゼのクロニングと精製については、BernsteinとRichardson(J. Biol. Chem. 263:14891~14899(1988))によって記載されている。T7遺伝子2.5タンパク質は、一本鎖DNA結合タンパク質であり、T7 DNAポリメラーゼ活性を刺激する(Kimら、J. Biol. Chem. 267:15032~15040(1992))。T7 Gp2.5SSBの調製については、以前に記載されている(Kimら、J. Biol. Chem. 267:15022~15031(1992))。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0132

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0132】

\*3種の異なるヘリカーゼ調製物をHDA反応において用いた。最初のものは、4.5  $\mu$ LのT7 Gp4Bヘリカーゼ(70 ng/ $\mu$ L)と、1.3  $\mu$ LのT7 Gp2.5SSB(5  $\mu$ g/ $\mu$ L)と、1.5  $\mu$ Lの100 mM dTTPと、2  $\mu$ LのH<sub>2</sub>O(図10、レーン1)とを含むT7ヘリカーゼ調製物とした。第2のヘリカーゼ調製物は、複数の2つのヘリカーゼを含むものとし、4.5  $\mu$ LのT7 Gp4Bヘリカーゼ(70 ng/ $\mu$ L)と、0.5  $\mu$ Lの大腸菌UvrDヘリカーゼ(200 ng/ $\mu$ L)と、0.5

$\mu\text{L}$ のMut L (800 ng/ $\mu\text{L}$ )と、1.3  $\mu\text{L}$ のT7 Gp 2.5 SSB (5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )と、1.5  $\mu\text{L}$ の100 mM dTTPと、1  $\mu\text{L}$ の100 mM ATP (図10、レーン2)とを含むものとした。第3のものは、1.3  $\mu\text{L}$ のT7 Gp 2.5 SSB (5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )と、1.5  $\mu\text{L}$ の100 mM dTTPと、6.5  $\mu\text{L}$ の $\text{H}_2\text{O}$ とを含む負のコントロールとした (図10、レーン3)。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0149

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0149】

リアルタイムHAD反応の再現性を調べるために、2つの平行反応を行った (図14、線1と線2)。各反応は、次のように構成した。