

【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12月22日(2005.12.22)

【公表番号】特表2004-526442(P2004-526442A)

【公表日】平成16年9月2日(2004.9.2)

【年通号数】公開・登録公報2004-034

【出願番号】特願2002-568777(P2002-568777)

【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

【手続補正書】

【提出日】平成17年2月17日(2005.2.17)

【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】

(a) 反応混合物を形成するために閉環状南京錠プロブ分子；標的核酸分子；フォワードプライマー；リバースプライマー；dNTPs；および第一のDNAポリメラーゼを与えること；

(b) 多数の尾部の付いた(multi-tailed)複合体を生成せしめること；

(c) 第二のDNAポリメラーゼを活性化すること、ここで、該第二のDNAポリメラーゼは熱安定性である；ならびに

(d) 該多数の尾部の付いた複合体を熱循環させること(thermocycling)

、  
を含んでなる核酸増幅方法。

【請求項2】

該第一のDNAポリメラーゼがBstLFである請求項1の方法。

【請求項3】

該第二のDNAポリメラーゼが、サーマス・アクアティカス(Thermus aquaticus)、パイロコッカス種(Pyrococcus species)、サーモコッカス・リトラリス(Thermococcus litoralis)もしくはパイロコッカス・フリオサス(Pyrococcus furiosus)から得られるポリメラーゼ酵素である請求項1の方法。

【請求項4】

該第二のDNAポリメラーゼが組換え熱安定性ポリメラーゼである請求項1の方法。

【請求項5】

組換え熱安定性ポリメラーゼが抗体不活性化ポリメラーゼもしくは化学的不活性化ポリメラーゼである請求項4の方法。

【請求項6】

反応混合物がさらに鎖置換因子を含有する請求項1の方法。

【請求項7】

熱循環させる前に反応混合物を約50～約70 で約1～約30分間インキュベーション

ンする請求項 1 の方法。

【請求項 8】

熱循環させる前に反応混合物を約 50 ~ 約 70 で約 3 ~ 約 20 分間インキュベーションする請求項 1 の方法。

【請求項 9】

方法が：

(e) 該第一の DNA ポリメラーゼを変性させること、  
をさらに含んでなる請求項 1 の方法。

【請求項 10】

該標的核酸分子が一本鎖 DNA 分子もしくは二本鎖 DNA 分子である請求項 1 の方法。

【請求項 11】

該標的核酸分子が一本鎖 RNA 分子もしくは二本鎖 RNA 分子である請求項 1 の方法。

【請求項 12】

該標的核酸がプラスミドもしくはそのフラグメント、ゲノム DNA もしくはそのフラグメント、ウイルス DNA もしくはそのフラグメント、ウイルス RNA もしくはそのフラグメント、mRNA、ミトコンドリア DNA もしくはそのフラグメント、または染色体 DNA もしくはそのフラグメントである請求項 1 の方法。

【請求項 13】

該フォワードもしくはリバースプライマーの 5' 末端領域が、尾部の付いた (tailed) プライマー分子である請求項 1 の方法。

【請求項 14】

フォワードプライマーもしくはリバースプライマーの少なくとも一つがヘアピンプライマーである請求項 1 の方法。

【請求項 15】

ヘアピンプライマーが、制限エンドヌクレアーゼ切断部位を含有するループ領域を有する請求項 14 の方法。

【請求項 16】

該フォワードプライマーもしくはリバースプライマーの少なくとも一つを検出可能に標識する請求項 1 の方法。

【請求項 17】

検出可能に標識するプライマーが分子エネルギー転移機構を含有する請求項 16 の方法。

【請求項 18】

該フォワードプライマーもしくはリバースプライマーの少なくとも一つが少なくとも一つの非情動的 (non-informative) 塩基類似体を含有する請求項 1 の方法。

【請求項 19】

該非情動的塩基類似体がニトロピロールもしくはニトロインドールである請求項 18 の方法。

【請求項 20】

該フォワードプライマーもしくはリバースプライマーの少なくとも一つが少なくとも一つの極性スイッチを含有する請求項 1 の方法。

【請求項 21】

(a) フォワードプライマーおよびリバースプライマー；  
(b) リガーゼ酵素；  
(c) 第一のポリメラーゼ酵素；  
(d) 線状南京錠プローブ分子、ここで、南京錠プローブは 3' 末端領域、5' 末端領域、およびスペーサー領域を含んでなり、ここで、スペーサー領域はフォワードプライマーおよびリバースプライマーの結合部位を含有する；ならびに  
(e) 第二のポリメラーゼ酵素、ここで、第二のポリメラーゼ酵素は熱安定性酵素であり

、そしてここで、第二のポリメラーゼ酵素は第一のポリメラーゼ酵素と同じ酵素ではない、  
を含んでなる核酸分子増幅キット。

【請求項 2 2】

( a ) 標的核酸分子、線状南京錠プローブ分子、リガーゼ酵素、フォワードプライマー、リバースプライマー、d N T P s、および第一の D N A ポリメラーゼを与えること；  
( b ) 閉環状南京錠プローブ分子を生成せしめること；  
( c ) 該閉環状南京錠プローブ分子から多数の尾部の付いた複合体を生成せしめること；  
( d ) 第二の D N A ポリメラーゼを活性化すること；  
( e ) 該第二の D N A ポリメラーゼと共に該多数の尾部の付いた複合体を熱循環させること；ならびに  
( f ) 該多数の尾部の付いた複合体の増幅生成物を検出すること、  
を含んでなるサンプルにおける標的核酸分子を検出する方法。

【請求項 2 3】

( a ) 標的核酸分子、該標的核酸分子にトポロジカルに連結される閉環状南京錠プローブ分子、フォワードプライマー、リバースプライマー、d N T P s、および第一の D N A ポリメラーゼを与えること；  
( b ) 該閉環状南京錠プローブ分子から多数の尾部の付いた複合体を生成せしめること；  
( c ) 第二の D N A ポリメラーゼを活性化すること；  
( d ) 該第二の D N A ポリメラーゼと共に該多数の尾部の付いた複合体を熱循環させること；ならびに  
( e ) 該多数の尾部の付いた複合体の増幅生成物を検出すること、  
を含んでなるサンプルにおける標的核酸分子を検出する方法。

【請求項 2 4】

( a ) 複数の標的核酸分子、複数の別個の標的核酸分子にアニールすることができる複数の線状南京錠プローブ分子、リガーゼ酵素、d N T P s、および第一の D N A ポリメラーゼを与えること；  
( b ) 少なくとも二つの閉環状核酸分子を生成せしめること、ここで、該閉環状核酸分子の各々は別個の標的核酸分子にトポロジカルに連結される；  
( c ) 該少なくとも二つの閉環状核酸分子の各メンバーに、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを与えること；  
( d ) 該別個の標的核酸分子の各々の多数の尾部の付いた複合体を生成せしめること；  
( e ) 第二の D N A ポリメラーゼを活性化すること；  
( f ) 該第二の D N A ポリメラーゼと共に該少なくとも二つの別個の多数の尾部の付いた複合体を熱循環させること；ならびに  
( g ) 該少なくとも二つの別個の多数の尾部の付いた複合体の増幅生成物を検出すること、  
を含んでなるサンプルにおける複数の標的核酸分子を検出する方法。

【請求項 2 5】

( a ) 反応チューブに標的核酸分子、リガーゼ酵素；フォワードプライマー；リバースプライマー；d N T P s；および第一の D N A ポリメラーゼを与えること；  
( b ) 該反応チューブを密閉すること；  
( c ) 閉環状南京錠プローブ分子を生成せしめること；  
( d ) 該閉環状南京錠プローブ分子から多数の尾部の付いた複合体を生成せしめること；  
( e ) 第二の D N A ポリメラーゼを活性化すること、ここで、該第二の D N A ポリメラーゼは熱安定性 D N A ポリメラーゼである；ならびに  
( f ) 該多数の尾部の付いた複合体を熱循環させること、  
を含んでなる閉管核酸分子増幅方法。

【請求項 2 6】

プライマーに含まれる少なくとも一つのヌクレオチド塩基が非情報の塩基類似体である

、以下の配列：

5' - a c t a g a g c t g a g a c a - 3' ;  
5' - a c t a g a g t t c a g a c a - 3' ;  
5' - a c t a g a g c t g a g a c a t g a c g a - 3' ;  
5' - a c t a g a g t t c a g a c a t g a c g a - 3' ;  
5' - a c t a g a g c t g a g a c a t g a c g a g t c - 3' ;  
5' - a c t a g a g t t c a g a c a t g a c g a g t c - 3' ;  
5' - a c t a g a g c t g a g a c a t g a c g a g t c g c a - 3' ; もしくは  
5' - a c t a g a g t t c a g a c a t g a c g a g t c g c a - 3' ;  
のいずれかを含んでなる南京錠プローブ増幅プライマー。