

【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 2004-535162(P2004-535162A)

【公表日】平成 16 年 11 月 25 日 (2004.11.25)

【年通号数】公開・登録公報 2004-046

【出願番号】特願 2002-571828(P2002-571828)

【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 17 年 3 月 14 日 (2005.3.14)

【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】

目的の R N A 配列に相補的な ポリヌクレオチド配列の多数のコピー を生成する方法であって、該方法は、以下の工程：

( a ) 標的 R N A にハイブリダイズした第 1 のプライマーを、R N A 依存性 D N A ポリメラーゼで伸長し、それにより、第 1 のプライマー伸長産物と該標的 R N A とを含む複合体が生成される、工程であって、該第 1 のプライマーは、R N A 部分および 3 ' D N A 部分を 包含する複合プライマー である、工程；

( b ) 工程 ( a ) の複合体中の R N A を、R N A / D N A ハイブリッドから R N A を切断する酵素で切断する工程；

( c ) 該第 1 のプライマー伸長産物にハイブリダイズした第 2 のプライマーを、D N A 依存性 D N A ポリメラーゼ および R N A 依存性 D N A ポリメラーゼ で伸長し、それにより、第 2 のプライマー伸長産物が生成されて、第 1 および第 2 のプライマー伸長産物の複合体を形成する工程；

( d ) 該第 1 および第 2 のプライマー伸長産物の複合体における 該第 1 のプライマー から、R N A を、R N A / D N A ハイブリッドから R N A を切断する酵素で切断する工程であって、その結果、複合 増幅プライマー が第 2 のプライマー伸長産物にハイブリダイズし、該複合 増幅プライマー が R N A 部分と 3 ' D N A 部分とを包含する、工程；

( e ) 該複合 増幅プライマー を、D N A 依存性 D N A ポリメラーゼで伸長する工程、を包含し、これにより、該第 1 のプライマー伸長産物が置換され、R N A が該複合増幅プライマーから切断され、そして別の複合増幅プライマーがハイブリダイズし、その結果、プライマー伸長および鎖置換が繰り返され、そしてそれにより該目的の R N A 配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピー が生成される、方法。

【請求項 2】

目的の R N A 配列の 多数のコピー を生成する方法であって、該方法が、以下の工程：

( a ) R N A 依存性 D N A ポリメラーゼで標的 R N A にハイブリダイズした第 1 のプライマーを伸長し、それにより、第 1 のプライマー伸長産物と該標的 R N A とを包含する複

合体が生成される、工程であって、該第 1 のプライマーが、RNA 部分と 3' DNA 部分とを包含する複合プライマーである、工程；

(b) RNA/DNA ハイブリッドから RNA を切断する物質で工程 (a) の複合体中の RNA を切断する工程；

(c) 該第 1 のプライマー伸長産物にハイブリダイズした第 2 のプライマーを、DNA 依存性 DNA ポリメラーゼおよび RNA 依存性 DNA ポリメラーゼで伸長し、それにより、第 2 のプライマー伸長産物が生成されて、第 1 および第 2 のプライマー伸長産物の複合体が形成される、工程；

(d) 該第 1 および第 2 のプライマー伸長産物の複合体中の該第 1 のプライマーから RNA を、RNA/DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素で切断する工程であって、その結果、複合増幅プライマーが第 2 のプライマー伸長産物にハイブリダイズし、ここで、該複合増幅プライマーが、RNA 部分と 3' DNA 部分とを含む、工程；

(e) 該第 2 のプライマー伸長産物にハイブリダイズした該複合増幅プライマーを、DNA 依存性 DNA ポリメラーゼで伸長する工程であって、それにより、該第 1 のプライマー伸長産物が置換され、RNA が該複合増幅プライマーから切断され、そして別の複合増幅プライマーがハイブリダイズし、その結果、このプライマー伸長および鎖置換が繰り返される、工程；

(f) 該置換された第 1 のプライマー伸長産物を、プロモーターと、該置換された第 1 のプライマー伸長産物に RNA ポリメラーゼによる転写が生じる条件下でハイブリダイズし得る領域と、を含むポリヌクレオチドに、その結果、該置換された第 1 のプライマー伸長産物に相補的な配列を含む RNA 転写物が生成されるようにハイブリダイズさせる工程、  
を包含し、それにより、該目的の RNA 配列の多数のコピーが生成される、方法。

【請求項 3】

前記プロモーター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、それによって、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、転写が起こる二本鎖プロモーターを生じる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記プロモーター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、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

標識された rNTP を使用し、それにより、標識された産物が生成される工程をさらに包含する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 2 のプライマーは、前記伸長産物にハイブリダイズする前記標的 RNA のフラグメントを含み、該フラグメントが、工程 (a) の前記複合体を RNA/DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素で切断することによって生成される、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記第 2 のプライマーは、DNA を包含する、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記標的 RNA が mRNA であり、そして前記第 1 のプライマーがポリ dT 配列を包含し、さらに該第 1 のプライマーは尾部が付いたプライマーであり、該第 1 のプライマーは、該標的 mRNA にハイブリダイズする条件下で該標的 mRNA にハイブリダイズ可能ではない 5' 部分を包含する、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

複数の異なる第 1 のプライマーが、前記標的 RNA にハイブリダイズするために用いられる、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 0】

前記第 2 のプライマーがランダムプライマーである、請求項 1 ~ 5 または 7 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 1】

前記第 2 のプライマーは、尾部が付いたプライマーであり、該第 2 のプライマーは、該第 2 のプライマーが前記第 1 のプライマー伸長産物にハイブリダイズする条件下で該第 1 のプライマー伸長産物にハイブリダイズ可能ではない 5' 部分を包含する、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 2】

前記 RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する物質が、酵素である、請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 3】

前記 RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素が、RNAse H である、請求項 1 2 に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

前記 RNA 依存性 DNA ポリメラーゼと前記 DNA 依存性 DNA ポリメラーゼとが、同じ酵素である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 5】

前記 RNA 依存性 DNA ポリメラーゼと、前記 RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素とが、同じ酵素である、請求項 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 6】

前記 DNA 依存性 DNA ポリメラーゼと、前記 RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素とが、同じ酵素である、請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 7】

前記 DNA 依存性 DNA ポリメラーゼ、前記 RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ、および前記 RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素とが、同じ酵素である、請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 8】

標識された d N T P を使用し、それにより、標識された産物が生成される工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 9】

前記第 1 のプライマーと、前記複合増幅プライマーとが、同じである、請求項 1 ~ 1 8 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 2 0】

前記第 1 のプライマーと、前記複合増幅プライマーとが、異なる、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 2 1】

前記方法が、目的の 2 つ以上の異なる配列の多数のコピーを生成する工程を包含する、請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 2 2】

前記方法が、少なくとも 2 つの異なる第 1 のプライマーを包含する、請求項 2 1 に記載の方法。

## 【請求項 2 3】

各第 1 のプライマーが、ポリ d T 部分またはランダムプライマー配列を包含する、請求項 2 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

前記複合プライマーの前記 RNA 部分が、以下のリボヌクレオチド配列：

5' - G A C G G A U G C G G U C U - 3' (配列番号 2 5)

を包含する、請求項 1 ~ 2 3 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 2 5】

異なる酵素が、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性とDNA依存性DNAポリメラーゼ活性とを有する、請求項1～13および18～24のいずれかに記載の方法。

【請求項26】

異なる酵素が、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有し、RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する、請求項1～13および18～25のいずれかに記載の方法。

【請求項27】

異なる酵素が、DNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有し、RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する、請求項1～13および18～26のいずれかに記載の方法。

【請求項28】

異なる酵素が、DNA依存性DNAポリメラーゼ活性、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有し、RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する、請求項1～13および18～27のいずれかに記載の方法。

【請求項29】

目的のRNA配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーを生成する方法であって、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) 第1のプライマー伸長産物と第2のプライマー伸長産物との複合体であって、ここで、該第1のプライマー伸長産物は該第2のプライマー伸長産物にハイブリダイズされ、そしてこのとき、該第2のプライマー伸長産物が3'一本鎖部分を含み、ここで、該3'一本鎖部分は、第1のプライマーの一部分の相補体を含み、ここで、該第1のプライマーは、RNA部分と3'DNA部分とを包含する複合プライマーであり、かつ該第1のプライマーは、尾部が付いたプライマーであり、該第1のプライマーは、前記標的RNAにハイブリダイズ可能ではない5'部分を包含し、ここで、該第1のプライマー伸長産物と該第2のプライマー伸長産物との部分的に二本鎖の複合体は、標的RNAにハイブリダイズした該第1のプライマーをRNA依存性DNAポリメラーゼによって伸長する工程、およびRNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素によって該第1のプライマー伸長産物と該第2のプライマー伸長産物との複合体由来の該第1のプライマーからRNAを切断する工程を包含する方法によって生成される、第1のプライマー伸長産物と第2のプライマー伸長産物との複合体；

(b) 3'一本鎖部分にハイブリダイズ可能な複合増幅プライマーであって、該複合増幅プライマーは、RNA部分と3'DNA部分とを包含する、複合増幅プライマー；

(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、そして別の複合増幅プライマーが該3'一本鎖部分にハイブリダイズする場合にプライマー伸長および鎖置換が繰り返されるような該第1のプライマー伸長産物の置換を可能にする条件下であり、それによって、該目的のRNA配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーが生成される、方法。

【請求項30】

目的のRNA配列の多数のコピーを生成する方法であって、該方法は、反応混合物をインキュベーションする工程を包含し、該反応混合物は、以下；

(a) 第1のプライマー伸長産物と第2のプライマー伸長産物との複合体であって、ここで、該第1のプライマー伸長産物は該第2のプライマー伸長産物にハイブリダイズされ、そしてこのとき、該第2のプライマー伸長産物は、3'一本鎖部分を含み、ここで、該3'一本鎖部分は、第1のプライマーの一部分の相補体を含み、ここで、該第1のプライマーは、RNA部分と3'DNA部分とを包含する複合プライマーであり、ここで、該第1のプライマーは、尾部が付いたプライマーであり、該第1のプライマーは、標的RNAにハイブリダイズ可能ではない5'部分を包含し、そしてここで、部分的に二本鎖のポリヌクレオチドが、標的RNAにハイブリダイズした該第1のプライマーをRNA依存性DNAポリメラーゼによって伸長する工程を包含する方法によって生成される、第1のプライマー伸長産物と第2のプライマー伸長産物との複合体；

(b) 3'一本鎖部分にハイブリダイズ可能な複合増幅プライマーであって、該複合増幅プライマーは、RNA部分と3'DNA部分とを包含する、複合増幅プライマー；

(c) DNA依存性DNAポリメラーゼ；

(d) RNAポリメラーゼ；

(e) プロプロモーターおよび第1のプライマー伸長産物にハイブリダイズする領域を含む、プロプロモーターポリヌクレオチド；ならびに

(f) 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、および別の複合増幅プライマーが該3'一本鎖部分にハイブリダイズする場合にプライマー伸長および鎖置換が繰り返されるような該第1のプライマー伸長産物の置換、該プロプロモーターポリヌクレオチドが前記置換された第1のプライマー伸長産物にハイブリダイズして、該置換されたプライマー伸長産物と該プロプロモーターポリヌクレオチドとを含む第2の複合体を形成すること、ならびに該第2の複合体からのRNA転写を可能にする条件下であり、それによって、該目的のRNA配列の多数のコピーが生成される、方法。

#### 【請求項31】

前記RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素が、RNase Hである、請求項29または30に記載の方法。

#### 【請求項32】

前記プロプロモーター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し、それによって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、転写が起こる二本鎖プロモーターを生じる領域を3'末端に含む、請求項30に記載の方法。

#### 【請求項33】

前記反応混合物が、標識されたrNTPをさらに含み、それにより、標識された産物が生成される、請求項30または32に記載の方法。

#### 【請求項34】

前記反応混合物が、標識されたdNTPをさらに含み、それにより、標識された産物が生成される、請求項29に記載の方法。

#### 【請求項35】

前記第2のプライマーは、尾部が付いたプライマーであり、該第2のプライマーは、該第2のプライマーが前記第1のプライマー伸長産物にハイブリダイズする条件下で該第1のプライマー伸長産物にハイブリダイズ可能ではない5'部分を包含する、請求項29～34に記載の方法。

#### 【請求項36】

目的のRNA配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーを生成する方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 反応混合物をインキュベートする工程であって、該反応混合物が、以下：

(i) 標的RNA；

(ii) 標的RNAにハイブリダイズ可能である第1のプライマーであって、ここで、該第1のプライマーが、RNA部分および3'DNA部分を含む複合プライマーである、第1のプライマー；

(iii) RNA依存性DNAポリメラーゼ；

を含み、ここで、該インキュベーションが、プライマーハイブリダイゼーション、ならびに第1のプライマー伸長産物および該標的RNAを含む複合体の形成を可能にする条件下である、工程；

(b) 反応混合物をインキュベートする工程であって、該反応混合物は、以下：

(i) 該第1のプライマー伸長産物；

(ii) DNA依存性DNAポリメラーゼ；

(iii) RNA依存性DNAポリメラーゼ；および

( i v ) 必要に応じて、RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断し得る酵素；  
を含み、ここで、該インキュベーションが、該第1のプライマー伸長産物および第2のプライマー伸長産物を含む複合体の形成を可能にする条件下である、工程；ならびに

( c ) 反応混合物をインキュベートする工程であって、該反応混合物は、以下：

( i ) 該第1のプライマー伸長産物および第2のプライマー伸長産物を含む該複合体；

( i i ) RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断し得る酵素

( i i i ) 複合増幅プライマーであって、該複合増幅プライマーは、RNA部分および3' DNA部分を含む、複合増幅プライマー；および

( i v ) DNA依存性DNAポリメラーゼ

を含み、ここで、該インキュベーションは、RNAの切断、複合プライマーハイブリダイゼーション、および該第1のプライマー伸長産物と第2のプライマー伸長産物とを含む複合体からの該第1のプライマー伸長産物の置換を可能にする条件下であり、それによって、別の複合増幅プライマーがハイブリダイズし、そしてプライマー伸長と鎖置換とが繰り返される、工程；

を包含し、これによって、該目的のRNA配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーが生成される、方法。

【請求項 3 7】

工程 ( b ) の前記反応混合物が、( v ) 第2のプライマーをさらに含み、ここで、前記インキュベーションが、該第2のプライマーのハイブリダイゼーションを可能にする条件下である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記第2のプライマーが、DNAを含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

複数の第1のプライマーが、前記標的RNAにハイブリダイズするために用いられる、請求項 3 6 ~ 3 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 0】

前記第2のプライマーが、ランダムプライマーである、請求項 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 1】

前記第2のプライマーは、尾部が付いたプライマーであり、該第2のプライマーは、該第2のプライマーが前記第1のプライマー伸長産物にハイブリダイズする条件下で、該第1のプライマー伸長産物にハイブリダイズ可能ではない5'部分を含む、請求項 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 2】

工程 ( c ) の前記反応混合物中の、前記RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素が、RNase Hである、請求項 3 6 ~ 4 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 3】

前記RNA依存性DNAポリメラーゼおよび前記DNA依存性DNAポリメラーゼが、同じ酵素である、請求項 3 6 ~ 4 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 4】

前記RNA依存性DNAポリメラーゼおよび前記RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素が、同じ酵素である、請求項 3 6 ~ 4 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 5】

前記DNA依存性DNAポリメラーゼおよび前記RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素とが、同じ酵素である、請求項 3 6 ~ 4 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 6】

前記DNA依存性DNAポリメラーゼ、前記RNA依存性DNAポリメラーゼ、および前記RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素とが、同じ酵素である、請求項 3 6 ~ 4 5 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 4 7】**

工程 ( c ) の前記反応混合物が、標識された d N T P をさらに含み、それにより、標識された産物が生成される、請求項 3 6 ~ 4 6 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 4 8】**

前記方法が、2 以上の異なる目的配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーを生成する工程を包含する、請求項 3 6 ~ 4 7 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 4 9】**

前記方法が、少なくとも 2 つの異なる第 1 のプライマーを含む、請求項 4 8 に記載の方法。

**【請求項 5 0】**

前記複合プライマーの前記 R N A 部分が、以下のリボヌクレオチド配列：

5 ' - G A C G G A U G C G G U C U - 3 ' ( 配列番号 2 5 )

を包含する、請求項 3 6 ~ 4 9 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 5 1】**

異なる酵素が、R N A 依存性 D N A ポリメラーゼ活性と D N A 依存性 D N A ポリメラーゼ活性とを有する、請求項 3 6 ~ 4 2 または 4 7 ~ 5 0 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 5 2】**

異なる酵素が、R N A 依存性 D N A ポリメラーゼ活性を有し、R N A / D N A ハイブリッドから R N A を切断する、請求項 3 6 ~ 4 2 または 4 7 ~ 5 1 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 5 3】**

異なる酵素が、D N A 依存性 D N A ポリメラーゼ活性を有し、R N A / D N A ハイブリッドから R N A を切断する、請求項 3 6 ~ 4 2 または 4 7 ~ 5 2 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 5 4】**

異なる酵素が、D N A 依存性 D N A ポリメラーゼ活性、R N A 依存性 D N A ポリメラーゼ活性を有し、R N A / D N A ハイブリッドから R N A を切断する、請求項 3 6 ~ 4 2 または 4 7 ~ 5 3 に記載の方法。

**【請求項 5 5】**

目的の R N A 配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーを生成する方法であって、該方法は、以下の工程：

( a ) R N A / D N A ハイブリッドから R N A を切断する酵素を用いて、第 1 のプライマー伸長産物および第 2 のプライマー伸長産物の複合体から R N A を切断する工程であって、ここで、該第 1 のプライマー伸長産物は、標的 R N A にハイブリダイズした第 1 のプライマーを R N A 依存性 D N A ポリメラーゼで伸長することによって生成され、ここで、該第 1 のプライマーは、R N A 部分と 3 ' D N A 部分とを包含する複合プライマーであり、そしてこのとき、該第 2 のプライマー伸長産物は、該第 1 のプライマー伸長産物にハイブリダイズした第 2 のプライマーの伸長によって生成される、工程；

( b ) 該第 2 のプライマー伸長産物に複合増幅プライマーをハイブリダイズさせ、そして D N A 依存性 D N A ポリメラーゼを用いて該複合増幅プライマーを伸長させる工程であって、ここで、該複合増幅プライマーは、R N A 部分と 3 ' D N A 部分とを包含する複合プライマーである、工程；

を包含し、それによって、該第 1 のプライマー伸長産物が置換され、該複合増幅プライマーから R N A が切断され、そして別の複合増幅プライマーがハイブリダイズし、その結果、プライマー伸長と鎖置換とが繰り返され；そしてそれによって、該目的の R N A 配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーが生成される、方法。

**【請求項 5 6】**

目的の R N A 配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーを生成する方法であって、該方法は、複合体中の複合増幅プライマーを伸長する工程を包含し、該複合体が、以下：

( i ) 第 1 のプライマー伸長産物および第 2 のプライマー伸長産物の複合体であって、該第 1 のプライマー伸長産物は、R N A 依存性 D N A ポリメラーゼを用いた、標的 R N A

にハイブリダイズした第 1 のプライマーの伸長によって產生され、ここで、該第 1 のプライマーは、RNA 部分および 3' DNA 部分を含む複合プライマーであり、該第 2 のプライマー伸長産物は、該第 1 のプライマー伸長産物にハイブリダイズした第 2 のプライマーの伸長によって作製され、ここで、該第 1 および第 2 のプライマー伸長産物の複合体由来の RNA は、RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素を用いて切断される、複合体；ならびに

( i i ) 複合増幅プライマーであって、該複合増幅プライマーは、RNA 部分および 3' DNA 部分を含み、ここで、該複合増幅プライマーは、該第 2 のプライマー伸長産物にハイブリダイズする、複合増幅プライマー；

を含み、

それによって、該第 1 のプライマー伸長産物が置換され、複合増幅プライマーから RNA が切断され、そして別の複合増幅プライマーがハイブリダイズし、その結果、プライマー伸長と鎖置換とが繰り返され；そしてそれによって、該目的の RNA 配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーが生成される、方法。

【請求項 5 7】

前記第 2 のプライマーが、DNA を含む、請求項 5 5 また 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記第 2 のプライマーは、尾部が付いたプライマーであり、該第 2 のプライマーは、該第 2 のプライマーが前記第 1 のプライマー伸長産物にハイブリダイズする条件下で、該第 1 のプライマー伸長産物にハイブリダイズ可能ではない 5' 部分を包含する、請求項 5 5 ~ 5 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 9】

目的の RNA 配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーを生成する方法であって、該方法は、以下の工程：

( a ) 標的 RNA にハイブリダイズした第 1 のプライマーを伸長することによってポリヌクレオチド鎖を合成し、それによって該第 1 のポリヌクレオチド鎖と該標的 RNA とを含む複合体が生成される工程であって、ここで、該第 1 のプライマーは、RNA 部分と 3' DNA 部分とを包含する複合プライマーである、工程；

( b ) 該第 1 のポリヌクレオチド鎖に相補的な第 2 のポリヌクレオチド鎖を合成し、それによって該第 2 のポリヌクレオチド鎖が該第 1 のポリヌクレオチド鎖と共に複合体を形成する工程；

( c ) 複合増幅プライマーが該第 2 のポリヌクレオチド鎖にハイブリダイズするように、該第 1 のポリヌクレオチド鎖と該第 2 のポリヌクレオチド鎖との複合体中の該第 1 の複合プライマーから RNA を切断する工程であって、ここで、該複合増幅プライマーは、RNA 部分と 3' DNA 部分とを包含する、工程；

( d ) 該第 1 のポリヌクレオチド鎖が置換され、該複合増幅プライマーから RNA が切断され、そして別の複合増幅プライマーがハイブリダイズし、その結果、プライマー伸長と鎖置換とが繰り返されるように、該第 2 のポリヌクレオチド鎖にハイブリダイズした該複合増幅プライマーを伸長する工程、  
を包含し、それによって、該目的の RNA 配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーが生成される、方法。

【請求項 6 0】

前記第 2 のポリヌクレオチド鎖の合成が、前記第 1 のポリヌクレオチド産物にハイブリダイズした前記標的 RNA のフラグメントを包含する第 2 のプライマーによって初回刺激され、該フラグメントは、工程 ( a ) の前記複合体中の該標的 RNA を RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する物質で切断することによって生成される、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記物質が酵素である、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】



前記酵素が R N a s e H である、請求項 6 0 また 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記第 1 のプライマーと、前記複合増幅プライマーとが、同じである、請求項 3 6 ~ 4 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 4】

前記第 1 のプライマーの前記 R N A 部分が、該第 1 のプライマーの前記 3 ' D N A 部分に関して 5 ' である、請求項 1、2、2 9、3 0、3 6、5 5、5 6、5 9、およびこれらに従属する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 5】

前記第 1 のプライマーの前記 5 ' R N A 部分が、該第 1 のプライマーの前記 3 ' D N A 部分に隣接する、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記複合増幅プライマーの前記 R N A 部分が、該複合増幅プライマーの前記 3 ' D N A 部分に関して 5 ' である、請求項 1、2、2 9、3 0、3 6、5 5、5 6、5 9、6 4、およびこれらに従属する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 7】

前記複合増幅プライマーの前記 R N A 部分が、該複合増幅プライマーの前記 3 ' D N A 部分に隣接する、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記第 1 のプライマーは、尾部が付いたプライマーであり、該第 1 のプライマーは、該第 1 のプライマーが前記標的 R N A にハイブリダイズする条件下で該標的 R N A にハイブリダイズ可能ではない 5 ' 部分を包含する、請求項 1、2、2 9、3 0、3 6、5 5、5 6、5 9、6 4 ~ 6 7、およびこれらに従属する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 9】

前記第 1 のプライマーは、ポリ d T 配列を包含する、請求項 1、2、2 9、3 0、3 6、5 5、5 6、5 9、6 4 ~ 6 8、およびこれらに従属する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 0】

前記第 1 のプライマーが、少なくとも 1 つのランダムヌクレオチドを 3 ' 末端にさらに包含する、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記標的 R N A が m R N A である、請求項 1、2、3 6、5 5、5 6、5 9、6 4 ~ 7 0、およびこれらに従属する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 2】

前記第 1 のプライマーが、ランダムプライマー配列を包含する、請求項 1、2、3 6、5 5、5 6、5 9、6 4 ~ 7 1、およびこれらに従属する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 3】

前記第 2 のポリヌクレオチド鎖を合成する工程は、D N A 依存性 D N A ポリメラーゼ活性および R N A 依存性 D N A ポリメラーゼ活性、そして必要に応じて R N A / D N A ハイブリッドから R N A を切断する活性を有する酵素を使用する、請求項 5 9、6 4 ~ 7 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 4】

前記第 1 のポリヌクレオチド鎖と前記第 2 のポリヌクレオチド鎖との複合体中の前記第 1 の複合プライマーから R N A を切断する工程は、R N A / D N A ハイブリッドから R N A を切断する活性を有する酵素を使用する、請求項 5 9 ~ 7 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 5】

プライマー伸長が、少なくとも 1 つの標識された d N T P の存在下で実行され、それによって、標識された産物が生成される、請求項 5 9 ~ 7 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 6】

前記方法が、2 つ以上の異なる目的の標的 R N A 配列を使用する工程、および該 2 つ以上

の異なる目的の標的RNA配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーを生成する工程を包含する、請求項59～75のいずれかに記載の方法。

【請求項77】

前記方法は、標的RNAにハイブリダイズする少なくとも2つの異なる第1の複合プライマーを含み、ここで、各プライマーは、ランダムプライマー配列を含む3'部分を包含する、請求項59～76のいずれかに記載の方法。

【請求項78】

前記方法は、標的RNAにハイブリダイズする少なくとも2つの異なる第1の複合プライマーを含み、ここで、各プライマーは、ポリdT配列を含む3'DNA部分を包含する、請求項59～76のいずれかに記載の方法。

【請求項79】

前記第2のポリヌクレオチド鎖の合成は、第2のプライマーによって初回刺激され、ここで、該第2のプライマーは、尾部が付いたプライマーであり、該第2のプライマーは、該第2のプライマーが前記第1のプライマー伸長産物にハイブリダイズする条件下で該第1のプライマー伸長産物にハイブリダイズ可能ではない5'部分を包含する、請求項59または61～78のいずれかに記載の方法。

【請求項80】

前記第1のプライマーと、前記複合増幅プライマーとが、異なる、請求項36～47のいずれかに記載の方法。

【請求項81】

目的のRNA配列を配列決定する方法であって、該方法は、増幅産物を分析して配列を決定する工程を包含し、該増幅産物は、プライマー伸長がdNTPアナログの取り込みの際に終了するように、dNTPとdNTPアナログとの混合物の存在下で、請求項1、18、29、34、36～80のいずれか1項に記載の方法によって生成される、方法。

【請求項82】

目的のRNA配列を配列決定する方法であって、該方法は、増幅産物を分析して配列を決定する工程を包含し、該増幅産物は、プライマー伸長がrNTPアナログの取り込みの際に終了するように、rNTPとrNTPアナログとの混合物の存在下で、請求項2、5、30、32、または33のいずれかに記載の方法によって生成される、方法。

【請求項83】

一本鎖コンホメーション多型によって標的RNA中の変異を検出する方法であって、該方法は、一本鎖コンホメーションについて増幅産物を分析する工程を包含し、ここで、参照一本鎖ポリヌクレオチドと比較した場合のコンホメーションにおける差異が、該標的ポリヌクレオチドにおける変異を示し、該増幅産物は、請求項1～80のいずれかに記載の方法によって生成される、方法。

【請求項84】

標的RNA中の目的の配列の存在または非存在を決定する方法であって、該方法は、以下：

(i) 該標的RNAを増幅する工程であって、該増幅する工程が、該目的の配列に対応する3'一本鎖領域を含む該標的RNAから生成されたポリヌクレオチド複合体にハイブリダイズした複合増幅プライマーを伸長する工程を包含し、ここで、該複合増幅プライマーのRNA部分は、該目的の配列を含む参照配列にハイブリダイズすることが公知であり、そしてここで、該ポリヌクレオチド複合体が、以下の工程：

(a) 標的RNAにハイブリダイズした第1のプライマーを伸長し、それによって第1のプライマー伸長産物と該標的RNAとを含む複合体が生成される工程であって、該第1のプライマーが、RNA部分と3'DNA部分とを包含する、工程；

(b) 該第1のプライマー伸長産物にハイブリダイズした第2のプライマーを伸長し、それによって、第2のプライマー伸長産物が生成されて、第1および第2のプライマー伸長産物が形成される、工程；および

(c) 該第1のプライマー伸長産物と第2のプライマー伸長産物との複合体中のRNA

Aを切断し、それによって、前記3'一本鎖領域を含むポリヌクレオチド複合体が生成される、工程；

を包含する方法によって生成される、工程；ならびに

( i i ) 存在する場合、工程 ( i ) 由来の該増幅産物を、該参照配列を含む該3'一本鎖領域を含む参照テンプレートから生成されたポリヌクレオチド複合体由来の増幅産物の量と比較する工程であって、ここで、該参照テンプレートの該ポリヌクレオチド複合体の該3'一本鎖領域が、該目的の配列に対応する、工程、

を包含する方法によって生成され、ここで、該参照テンプレート由来の該ポリヌクレオチド複合体からの増幅産物の量と比較した場合に、該標的RNA由来の該ポリヌクレオチド複合体から検出可能に少ない増幅産物の生成は、該目的の配列が、該標的RNAに存在せず、該標的RNAが前記複合増幅プライマーの前記RNA部分にハイブリダイズ可能な配列に関する配列改変体を含み得ることを示す、方法。

【請求項85】

基材に固定された核酸を生成する方法であって、該方法は、増幅産物を基材上に固定する工程を包含し、該増幅産物が、請求項1～80のいずれかに記載の方法によって生成される、方法。

【請求項86】

前記基材がマイクロアレイである、請求項85に記載の方法。

【請求項87】

目的のRNA配列を特徴付ける方法であって、該方法は、DNA増幅産物を分析する工程を包含し、該増幅産物が、請求項1、18、29、34、または36～80のいずれかに記載の方法により標的RNAを増幅することによって生成される、方法。

【請求項88】

前記DNA産物が標識されている、請求項87に記載の方法。

【請求項89】

前記DNA増幅産物を分析する工程が、該産物の量を決定する工程を包含し、これにより、サンプル中に存在する前記目的のRNA配列が定量される、請求項87または88に記載の方法。

【請求項90】

前記DNA増幅産物を分析する工程が、少なくとも1つのプローブと該DNA増幅産物を接触させる工程を包含する、請求項87～89のいずれかに記載の方法。

【請求項91】

前記DNA増幅産物が標識され、そして前記少なくとも1つのプローブがマイクロアレイとして提供される、請求項90に記載の方法。

【請求項92】

請求項91に記載の方法であって、前記マイクロアレイが、紙、ガラス、セラミック、プラスチック、ポリプロピレン、ポリスチレン、ナイロン、ポリアクリルアミド、ニトロセルロース、シリコン、および光ファイバーからなる群より選択される材料から作製された基材上に固定された少なくとも1つのプローブを含む、方法。

【請求項93】

請求項91に記載の方法であって、前記プローブが、ピン、ロッド、ファイバー、テープ、糸、ビーズ、粒子、マイクロタイターウェル、キャピラリー、およびシリンダーを含む二次元的構造または三次元的構造で前記基材上に固定される、方法。

【請求項94】

目的のRNA配列を特徴付ける方法であって、該方法は、RNA増幅産物を分析する工程を包含し、該RNA増幅産物は、請求項2、5、30、32、または33のいずれかに記載の方法によって生成される、方法。

【請求項95】

前記RNA産物が標識される、請求項94に記載の方法。

【請求項96】

前記 R N A 増幅産物を分析する工程は、該産物の量を決定する工程を包含し、これにより、サンプル中に存在する前記目的の R N A 配列の量が定量される、請求項 9 4 または 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記 R N A 増幅産物を分析する工程が、前記標識された R N A 産物を少なくとも 1 つのプロープと接触させる工程を包含する、請求項 9 5 または 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記 R N A 増幅産物が標識され、そして前記少なくとも 1 つのプロープがマイクロアレイとして提供される、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 9】

請求項 9 8 に記載の方法であって、前記マイクロアレイが、紙、ガラス、セラミック、プラスチック、ポリプロピレン、ポリスチレン、ナイロン、ポリアクリルアミド、ニトロセルロース、シリコン、および光ファイバーからなる群より選択される材料から作製された基材上に固定された少なくとも 1 つのプロープを含む、方法。

【請求項 1 0 0】

請求項 9 9 に記載の方法であって、前記プロープが、ピン、ロッド、ファイバー、テープ、糸、ビーズ、粒子、マイクロタイターウェル、キャピラリー、およびシリンダーを含む二次元的構造または三次元的構造で基材上に固定される、方法。

【請求項 1 0 1】

サンプル中の遺伝子発現プロフィールを決定する方法であって、該方法は、以下の工程：少なくとも 1 つの目的の R N A 配列の増幅産物の量を決定し、これにより、該サンプル中の該遺伝子発現プロフィールを決定する工程を包含し、ここで、該増幅産物は、請求項 1 ~ 8 0 のいずれかに記載の方法を使用して、該サンプル中の少なくとも 1 つの目的の R N A 配列を増幅することによって生成され、各該量が、該サンプル中の目的の各 R N A 配列の量を示す、方法。

【請求項 1 0 2】

各標的 R N A が m R N A である、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

ライブラリーを調製する方法であって、該方法は、以下：

請求項 1 ~ 8 0 のいずれかに記載の方法を使用して、複数の目的の R N A 配列を増幅する工程、  
を包含する、方法。

【請求項 1 0 4】

前記第 1 のプライマーが、ランダムプライマー配列を包含する、請求項 1 0 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記標的 R N A にハイブリダイズする第 1 のプライマーが、ポリ d T 配列を含む、請求項 1 0 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

減算的ハイブリダイゼーションプロープを調製する方法であって、該方法は、請求項 1、1 8、2 9、3 4、3 6 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の方法を使用して、第 1 の R N A 集団から少なくとも 1 つの目的の R N A 配列の相補体の多数のポリヌクレオチドコピーを作製する工程を包含する、方法。

【請求項 1 0 7】

減算的ハイブリダイゼーションを実行する方法であって、該方法において少なくとも第 1 と第 2 の標的 R N A 集団とが比較され、該方法は、以下：

( a ) 請求項 1、1 8、2 9、3 4、3 6 ~ 8 0 のいずれかに記載の方法を使用して、第 1 の R N A 集団から少なくとも 1 つの目的の R N A 配列の相補体の多数のポリヌクレオチドコピーをハイブリダイズさせる工程；ならびに

( b ) 該多数のコピーを第 2 の m R N A 集団にハイブリダイズさせる工程であって、こ

れにより、該第2の集団の部分集団が、ポリヌクレオチドコピーと複合体を形成する、工程、  
を包含する、方法。

【請求項108】

1つ以上の目的のRNA配列にハイブリダイズしないRNAの示差的な増幅のための方法であって、該方法は、以下：

(a) 請求項1、18、29、34、36～80のいずれか1項に記載の方法を使用して調製された少なくとも1つの目的のRNA配列の相補体の多数のポリヌクレオチドコピーをRNA集団にハイブリダイズする工程であって、これにより、該RNA集団の部分集団が、該ポリヌクレオチドコピーとハイブリダイズして、複合体を形成する、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、工程(a)の該複合体中のRNAを切断する工程；ならびに

(c) 該RNA集団のハイブリダイズしていない部分集団を増幅する工程であって、これにより、該RNA集団の該ハイブリダイズしていない部分集団に相補的な多数のコピーの一本鎖DNAが作製される、工程、  
を包含する、方法。

【請求項109】

ライブラリーを調製する方法であって、該方法は、以下：

請求項108に従って調製された前記RNA集団の前記ハイブリダイズしていない部分集団に相補的な多数のコピーを調製する工程、  
を包含する、方法。

【請求項110】

目的のRNA配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーを生成する方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 複合体を提供する工程であって、該複合体は、以下：

(i) 第1のプライマー伸長産物と第2のプライマー伸長産物との複合体であって、該第1のプライマー伸長産物は、標的RNAにハイブリダイズした第1のプライマーをRNA依存性DNAポリメラーゼで伸長することによって生成され、ここで、該第1のプライマーは、RNA部分と3' DNA部分とを包含する複合プライマーであり、ここで、該第2のプライマー伸長産物は、該第1のプライマー伸長産物にハイブリダイズした第2のプライマーを伸長することによって生成され、そしてここで、該第1のプライマー伸長産物および第2のプライマー伸長産物との複合体由来のRNAは、RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素で切断される、工程；および

(ii) 複合プライマーであって、該複合プライマーは、RNA部分と3' DNA部分とを含み、ここで、該複合プライマーが該第2のプライマー伸長産物にハイブリダイズされる、工程、  
を包含する、工程；ならびに

(b) (ii)の該複合プライマーを伸長する工程であって、これにより、該第1のプライマー伸長産物が置換され、そしてこれにより、該目的のRNA配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーが生成される、方法。

【請求項111】

請求項110に記載の方法であって、該方法は、以下の最初の工程：

(a) RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素を用いて、第1のプライマー伸長産物と第2のプライマー伸長産物との複合体からRNAを切断し、その結果、複合プライマーを該第2のプライマー伸長産物にハイブリダイズさせる工程であって、ここで、該複合プライマーは、RNA部分と3' DNA部分とを含み、ここで、該第1のプライマー伸長産物は、標的RNAにハイブリダイズした第1のプライマーをRNA依存性DNAポリメラーゼで伸長することによって生成され、ここで、該第1のプライマーは、RNA部分と3' DNA部分とを包含する複合プライマーである、工程；および

(b) 複合プライマーを該第2のプライマー伸長産物にハイブリダイズさせる工程であ

って、ここで該複合プライマーは、RNA部分と3' DNA部分とを包含する、工程、  
をさらに包含し、そしてここで、該複合プライマーは、DNA依存性ポリメラーゼで伸長  
される、方法。

【請求項 1 1 2】

請求項 1 1 1 に記載の方法であって、該方法は、以下の最初の工程：

(a) 標的 RNA にハイブリダイズした第 1 のプライマーを RNA 依存性 DNA ポリメ  
ラーゼで伸長する工程であって、これにより、第 1 のプライマー伸長産物と該標的 RNA  
とを含む複合体が生成され、ここで、該第 1 のプライマーは、RNA 部分と 3' DNA 部  
分とを包含する複合プライマーである、工程；

(b) 工程 (a) の該複合体中の RNA を切断する工程；

(c) 該第 1 のプライマー伸長産物にハイブリダイズした第 2 のプライマーを、DNA  
依存性 DNA ポリメラーゼおよび RNA 依存性 DNA ポリメラーゼで伸長する工程であ  
って、これにより、第 2 のプライマー伸長産物が生成されて、第 1 のプライマー伸長産物と  
第 2 のプライマー伸長産物との複合体が形成される、工程、  
をさらに包含する、方法。

【請求項 1 1 3】

前記第 2 のプライマーが、前記プライマー伸長産物にハイブリダイズする前記標的 RNA  
のフラグメントを含み、該フラグメントが、前記第 1 のプライマー伸長産物と標的 RNA  
との複合体中の RNA を切断することによって生成される、請求項 1 1 0 ~ 1 1 2 に記載  
の方法。

【請求項 1 1 4】

前記第 2 のプライマーが、DNA を包含する、請求項 1 1 0 ~ 1 1 2 のいずれかに記載の  
方法。

【請求項 1 1 5】

前記第 2 のプライマーが、複合プライマーを包含する、請求項 1 1 0 ~ 1 1 2 のいずれか  
に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

前記第 2 のプライマーが、ランダムプライマーを包含する、請求項 1 1 0 ~ 1 1 2 のい  
ずれかに記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記第 2 のプライマーは、該第 2 のプライマーが前記第 1 のプライマー伸長産物にハイ  
ブリダイズする条件下で該第 1 のプライマー伸長産物にハイブリダイズ可能ではない 5' 部  
分を包含する、請求項 1 1 0 ~ 1 1 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1 8】

標的 RNA にハイブリダイズする前記第 1 のプライマー中の前記 RNA 部分が、少なく  
とも約 5 ヌクレオチドである、請求項 1 1 0 ~ 1 1 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記 RNA 部分が、約 5 ヌクレオチド ~ 約 50 ヌクレオチドである、請求項 1 1 8 に記載  
の方法。

【請求項 1 2 0】

標的 RNA にハイブリダイズする前記第 1 のプライマー中の前記 3' DNA 部分が、少  
なくとも約 5 ヌクレオチドである、請求項 1 1 0 ~ 1 1 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記 3' DNA 部分が、約 5 ヌクレオチド ~ 約 50 ヌクレオチドである、請求項 1 2 0 に  
記載の方法。

【請求項 1 2 2】

標的 RNA にハイブリダイズする前記第 1 のプライマーの前記 RNA 部分が、前記 3' D  
NA 部分に関して 5' である、請求項 1 1 0 ~ 1 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記 5' RNA 部分が、前記 3' DNA 部分に隣接する、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記 5' RNA 部分が、少なくとも約 10 ヌクレオチドである、請求項 1 2 2 または 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記 5' RNA 部分が、約 10 ヌクレオチド～約 50 ヌクレオチドである、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

標的 RNA にハイブリダイズする前記第 1 のプライマーは、該第 1 のプライマーが該標的 RNA に結合する条件下で該標的 RNA にハイブリダイズ可能ではない 5' 部分を包含する、請求項 1 1 0 ～ 1 2 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 7】

標的 RNA にハイブリダイズする前記第 1 のプライマーが、ポリ d T 配列を包含する、請求項 1 1 0 ～ 1 2 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記第 2 のプライマー伸長産物にハイブリダイズする前記複合プライマーの前記 RNA 部分が、少なくとも約 5 ヌクレオチドである、請求項 1 1 0 ～ 1 2 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記 RNA 部分が、約 5 ヌクレオチド～約 50 ヌクレオチドである、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記第 2 のプライマー伸長産物にハイブリダイズする前記複合プライマーの前記 3' DNA 部分が、少なくとも 1 ヌクレオチドである、請求項 1 1 0 ～ 1 2 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記 3' DNA 部分が、約 1 ～約 20 ヌクレオチドである、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記第 2 のプライマー伸長産物にハイブリダイズする前記複合プライマーの前記 RNA 部分が、前記 3' DNA 部分に関して 5' である、請求項 1 1 0 ～ 1 3 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記 5' RNA 部分が、前記 3' DNA 部分に隣接する、請求項 1 3 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記標的 RNA が mRNA である、請求項 1 1 0 ～ 1 3 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 5】

標的 RNA にハイブリダイズする前記第 1 のプライマーが、ランダム配列を包含する、請求項 1 1 0 ～ 1 3 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記標的 RNA が mRNA であり、そして標的 RNA にハイブリダイズする前記第 1 のプライマーがポリ d T 配列を含み、そしてさらに該第 1 のプライマーが該標的 mRNA にハイブリダイズする条件下で該標的 mRNA にハイブリダイズ可能ではない 5' 部分を包含する、請求項 1 1 0 ～ 1 3 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 7】

複数の異なる第 1 のプライマーが、前記標的 RNA にハイブリダイズするために使用される、請求項 1 1 0 ～ 1 3 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 8】

前記 RNA / DNA ハイブリッドから RNA を切断する酵素が、RNase H である、請求項 1 1 0 ～ 1 3 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 9】

前記 RNA 依存性 DNA ポリメラーゼと前記 DNA 依存性 DNA ポリメラーゼとが、同じ

酵素であるかまたは異なる酵素であるか、該RNA依存性DNAポリメラーゼと該RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素とが、同じ酵素であるかまたは異なる酵素であるか、該DNA依存性DNAポリメラーゼと該RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素とが、同じ酵素であるかまたは異なる酵素であるか、あるいは該DNA依存性DNAポリメラーゼ、該RNA依存性DNAポリメラーゼおよび該RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する酵素とが、同じ酵素であるかまたは異なる酵素である、請求項110～138のいずれかに記載の方法。

【請求項140】

前記方法が、少なくとも1つの標識されたdNTPの存在下で実行され、これにより、標識された産物が生成される、請求項110～139のいずれかに記載の方法。

【請求項141】

標的RNAにハイブリダイズする前記第1のプライマーが、前記第2のプライマー伸長産物にハイブリダイズする前記複合プライマーのいくつかの配列またはすべての配列を包含する、請求項110～140のいずれかに記載の方法。

【請求項142】

前記方法が、2つ以上の異なる目的の配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーを生成する工程を包含する、請求項110～141のいずれかに記載の方法。

【請求項143】

前記方法が、標的RNAにハイブリダイズする少なくとも2つの異なる複合プライマーを包含する、請求項142に記載の方法。

【請求項144】

前記第1のプライマーの前記RNA部分が、少なくとも約5ヌクレオチドであり、該第1のプライマーの前記DNA部分が、少なくとも約5ヌクレオチドである、請求項1、2、29、30、36、55、56、およびこれらに従属する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項145】

前記第1のプライマーの前記RNA部分が、約5ヌクレオチド～約50ヌクレオチドからなり、該第1のプライマーの前記DNA部分が、少なくとも約5ヌクレオチド～約20ヌクレオチドからなる、請求項144に記載の方法。

【請求項146】

前記複合増幅プライマーの前記RNA部分が、少なくとも約5ヌクレオチドであり、該複合増幅プライマーの前記DNA部分が、少なくとも約1ヌクレオチドである、請求項1、2、29、30、36、55、56、およびこれらに従属する請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項147】

前記複合増幅プライマーの前記RNA部分が、約5ヌクレオチド～約50ヌクレオチドからなり、該複合増幅プライマーの前記DNA部分が、少なくとも約1ヌクレオチド～約20ヌクレオチドからなる、請求項146に記載の方法。

【請求項148】

第1の複合プライマーと第2の複合プライマーとを含む組成物であって、ここで、該第1の複合プライマーは、RNA部分と3' DNA部分とを含み、該第2の複合プライマーは、RNA部分と3' DNA部分とを含み、そして該第2の複合プライマーは、該第1の複合プライマーの相補体を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズされる配列を含む、組成物。

【請求項149】

前記第1の複合プライマーの前記RNA部分が、該第1の複合プライマーの前記3' DNA部分に関して5'であり、前記第2の複合プライマーの前記RNA部分が、該第2の複合プライマーの前記3' DNA部分に関して5'である、請求項148に記載の組成物。

【請求項150】

前記第1の複合プライマーの前記5' RNA部分が、該第1の複合プライマーの前記3'



D N A 部分に隣接し、前記第 2 の複合プライマーの前記 5 ' R N A 部分が、該第 2 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分に隣接する、請求項 1 4 9 に記載の組成物。

【請求項 1 5 1】

前記第 1 の複合プライマーが、前記 5 ' R N A 部分および前記 3 ' D N A からなり、前期第 2 の複合プライマーが、前記 5 ' R N A 部分および前記 3 ' D N A からなる、請求項 1 5 0 に記載の組成物。

【請求項 1 5 2】

前記第 1 の複合プライマーは、尾部が付いたプライマーであり、該第 1 の複合プライマーは、該第 1 の複合プライマーが標的 R N A にハイブリダイズする条件下で該標的 R N A にハイブリダイズ可能ではない 5 ' 部分を包含する、請求項 1 4 8 ~ 1 5 1 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 5 3】

前記第 1 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分が、ランダムプライマー配列を包含する、請求項 1 4 8 ~ 1 5 2 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 5 4】

前記第 1 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分が、ポリ d T 配列を包含する、請求項 1 4 8 ~ 1 5 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 5 5】

前記第 1 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分が、少なくとも 1 つのランダムヌクレオチドを 3 ' 末端に含む、請求項 1 5 4 に記載の組成物。

【請求項 1 5 6】

前記第 1 の複合プライマーの前記 R N A 部分が、少なくとも約 5 ヌクレオチドを含み、該第 1 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分が、少なくとも約 5 ヌクレオチドを含み、そして前記第 2 の複合プライマーの前記 R N A 部分が、少なくとも約 5 ヌクレオチドを含み、該第 1 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分が、少なくとも約 1 ヌクレオチドを含む、請求項 1 4 8 ~ 1 5 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 5 7】

前記第 1 の複合プライマーの前記 R N A 部分が、約 5 ヌクレオチド ~ 約 5 0 ヌクレオチドからなり、該第 1 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分が、約 5 ヌクレオチド ~ 約 2 0 ヌクレオチドからなり、そして前記第 2 の複合プライマーの前記 R N A 部分が、約 5 ヌクレオチド ~ 約 5 0 ヌクレオチドからなり、該第 2 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分が、約 1 ヌクレオチド ~ 約 2 0 ヌクレオチドからなる、請求項 1 5 6 に記載の組成物。

【請求項 1 5 8】

組成物であって、以下：

( a ) 第 1 のプライマー伸長産物と第 2 のプライマー伸長産物とを含む複合体であって、該第 1 のプライマー伸長産物は、R N A 依存性 D N A ポリメラーゼ活性を有する少なくとも 1 つの酵素を用いて、標的 R N A にハイブリダイズした第 1 のプライマーを伸長することによって生成され、該第 1 のプライマーは、R N A 部分と 3 ' D N A 部分とを包含するプライマーであり、そして該第 2 のプライマー伸長産物は、該第 1 のプライマー伸長産物にハイブリダイズした第 2 のプライマーを伸長することによって生成される、複合体；および

( b ) 複合増幅プライマーであって、該複合増幅プライマーは、R N A 部分と 3 ' D N A 部分とを含み、かつ該複合増幅プライマーは、該第 1 のプライマーの相補体を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能な配列を含む、複合増幅プライマー、を含む、組成物。

【請求項 1 5 9】

前記第 1 の複合プライマーの前記 R N A 部分が、該第 1 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分に関して 5 ' であり、前記複合増幅プライマーの前記 R N A 部分が、該複合増幅プライマーの前記 3 ' D N A 部分に関して 5 ' である、請求項 1 5 8 に記載の組成物。

【請求項 1 6 0】

前記第 1 の複合プライマーの前記 5' RNA 部分が、該第 1 の複合プライマーの前記 3' DNA 部分に隣接し、前記複合増幅プライマーの前記 5' RNA 部分が、該複合増幅プライマーの前記 3' DNA 部分に隣接する、請求項 159 に記載の組成物。

【請求項 161】

前記第 1 の複合プライマーが、前記 5' RNA 部分および前記 3' DNA からなり、前期複合増幅プライマーが、前記 5' RNA 部分および前記 3' DNA からなる、請求項 160 に記載の組成物。

【請求項 162】

前記第 1 の複合プライマーは、尾部が付いたプライマーであり、該第 1 の複合プライマーは、該第 1 の複合プライマーが標的 RNA にハイブリダイズする条件下で該標的 RNA にハイブリダイズ可能ではない 5' 部分を包含する、請求項 158 ~ 161 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 163】

前記第 1 の複合プライマーの前記 3' DNA 部分が、ランダムプライマー配列を包含する、請求項 158 ~ 162 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 164】

前記第 1 の複合プライマーの前記 3' DNA 部分が、ポリ dT 配列を包含する、請求項 158 ~ 163 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 165】

前記第 1 の複合プライマーの前記 3' DNA 部分が、少なくとも 1 つのランダムヌクレオチドを 3' 末端に含む、請求項 164 に記載の組成物。

【請求項 166】

前記第 1 の複合プライマーの前記 RNA 部分が、少なくとも約 5 ヌクレオチドを含み、該第 1 の複合プライマーの前記 3' DNA 部分が、少なくとも約 5 ヌクレオチドを含み、そして前記複合増幅プライマーの前記 RNA 部分が、少なくとも約 5 ヌクレオチドを含み、該複合増幅プライマーの前記 3' DNA 部分が、少なくとも約 1 ヌクレオチドを含む、請求項 158 ~ 165 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 167】

前記第 1 の複合プライマーの前記 RNA 部分が、約 5 ヌクレオチド ~ 約 50 ヌクレオチドからなり、該第 1 の複合プライマーの前記 3' DNA 部分が、約 5 ヌクレオチド ~ 約 20 ヌクレオチドからなり、そして前記複合増幅プライマーの前記 RNA 部分が、約 5 ヌクレオチド ~ 約 50 ヌクレオチドからなり、該複合増幅プライマーの前記 3' DNA 部分が約 1 ヌクレオチド ~ 約 20 ヌクレオチドからなる、請求項 166 に記載の組成物。

【請求項 168】

前記複合増幅プライマーが、前記第 2 のプライマー伸長産物にハイブリダイズされる、請求項 158 ~ 167 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 169】

前記第 2 のプライマーが、前記第 1 のプライマー伸長産物にハイブリダイズする前記標的 RNA のフラグメントを含む、請求項 158 ~ 168 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 170】

標的 RNA を増幅するためのキットであって、該キットは、第 1 の複合プライマーと第 2 の複合プライマーとを備え、該第 1 の複合プライマーは、RNA 部分と 3' DNA 部分とを含み、該第 2 の複合プライマーは、RNA 部分と 3' DNA 部分とを含み、そして該第 2 の複合プライマーは、該第 1 の複合プライマーの相補体を含むポリヌクレオチドにハイブリダイズする配列を含む、キット。

【請求項 171】

前記第 1 の複合プライマーの前記 RNA 部分が、該第 1 の複合プライマーの前記 3' DNA 部分に関して 5' であり、前記第 2 の複合プライマーの前記 RNA 部分が、該第 2 の複合プライマーの前記 3' DNA 部分に関して 5' である、請求項 170 に記載の組成物。

【請求項 172】

前記第 1 の複合プライマーの前記 5 ' R N A 部分が、該第 1 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分に隣接し、前記第 2 の複合プライマーの前記 5 ' R N A 部分が、該第 2 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分に隣接する、請求項 1 7 1 に記載のキット。

【請求項 1 7 3】

前記第 1 の複合プライマーが、前記 5 ' R N A 部分および前記 3 ' D N A からなり、前期第 2 の複合プライマーが、前記 5 ' R N A 部分および前記 3 ' D N A からなる、請求項 1 7 2 に記載のキット。

【請求項 1 7 4】

前記第 1 の複合プライマーは、尾部が付いたプライマーであり、該第 1 の複合プライマーは、該第 1 の複合プライマーが標的 R N A にハイブリダイズする条件下で該標的 R N A にハイブリダイズ可能ではない 5 ' 部分を包含する、請求項 1 7 0 ~ 1 7 3 のいずれかに記載のキット。

【請求項 1 7 5】

前記第 1 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分が、ランダムプライマー配列を包含する、請求項 1 7 0 ~ 1 7 4 のいずれかに記載のキット。

【請求項 1 7 6】

前記第 1 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分が、ポリ d T 配列を包含する、請求項 1 7 0 ~ 1 7 5 のいずれかに記載のキット。

【請求項 1 7 7】

前記第 1 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分が、ポリ d T 配列を含み、そして該第 1 の複合プライマーの前記 3 ' D N A 部分が、少なくとも 1 つのランダムヌクレオチドを 3 ' 末端に含む、請求項 1 7 0 ~ 1 7 5 のいずれかに記載のキット。

【請求項 1 7 8】

前記第 1 の複合プライマーは、尾部が付いたプライマーであり、該第 1 の複合プライマーは、該第 1 の複合プライマーが標的 R N A にハイブリダイズする条件下で該標的 R N A にハイブリダイズ可能ではない 5 ' 部分を包含し、該第 1 の複合プライマーが、ランダムプライマー配列をさらに包含する、請求項 1 7 0 ~ 1 7 7 のいずれかに記載のキット。

【請求項 1 7 9】

前記第 1 の複合プライマーは、尾部が付いたプライマーであり、該第 1 の複合プライマーは、該第 1 の複合プライマーが標的 R N A にハイブリダイズする条件下で該標的 R N A にハイブリダイズ可能ではない 5 ' 部分を包含し、該第 1 の複合プライマーが、ポリ d T 配列をさらに包含する、請求項 1 7 0 ~ 1 7 7 のいずれかに記載のキット。

【請求項 1 8 0】

前記第 1 の複合プライマーは、尾部が付いたプライマーであり、該第 1 の複合プライマーは、該第 1 の複合プライマーが標的 R N A にハイブリダイズする条件下で該標的 R N A にハイブリダイズ可能ではない 5 ' 部分を包含し、該第 1 の複合プライマーが、ポリ d T 配列をさらに含み、そして該第 1 の複合プライマーが、少なくとも 1 つのランダムヌクレオチドを 3 ' 末端に含む、請求項 1 7 0 ~ 1 7 7 に記載のキット。

【請求項 1 8 1】

前記第 1 の複合プライマーの前記 R N A 部分が、少なくとも約 5 ヌクレオチドを含み、該第 1 の複合プライマーの前記 D N A 部分が、少なくとも約 5 ヌクレオチドを含む、請求項 1 7 0 ~ 1 8 0 のいずれかに記載のキット。

【請求項 1 8 2】

前記第 1 の複合プライマーの前記 R N A 部分が、約 5 ヌクレオチド ~ 約 5 0 ヌクレオチドからなり、該第 1 の複合プライマーの前記 D N A 部分が、約 5 ヌクレオチド ~ 約 2 0 ヌクレオチドからなる、請求項 1 8 1 に記載のキット。

【請求項 1 8 3】

前記第 2 の複合プライマーの前記 R N A 部分が、少なくとも約 5 ヌクレオチドを含み、該第 2 の複合プライマーの前記 D N A 部分が、少なくとも約 1 ヌクレオチドを含む、請求項 1 7 0 ~ 1 8 2 のいずれかに記載のキット。

**【請求項 184】**

前記第2の複合プライマーの前記RNA部分が、約5ヌクレオチド～約50ヌクレオチドからなり、該第2の複合プライマーの前記DNA部分が、約1ヌクレオチド～約20ヌクレオチドからなる、請求項183に記載のキット。

**【請求項 185】**

RNA/DNAハイブリッドからRNA切断する酵素をさらに備える、請求項170～184のいずれかに記載のキット。

**【請求項 186】**

前記RNA/DNAハイブリッドからRNA切断する酵素が、RNase Hである、請求項185に記載のキット。

**【請求項 187】**

RNA依存性DNAポリメラーゼをさらに備える、請求項170～186のいずれかに記載のキット。

**【請求項 188】**

標識されたdNTPをさらに備える、請求項170～187のいずれかに記載のキット。

**【請求項 189】**

以下の工程：

(a) 標的RNAにハイブリダイズした前記第1の複合プライマーをRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する酵素で伸長することによって第1のプライマー伸長産物を生成する工程；

(b) 該第1のプライマー伸長産物にハイブリダイズした第2のプライマーの伸長によって第2のプライマー伸長産物を生成する工程；

(c) RNA/DNAハイブリッドからRNAを切断する少なくとも1つの酵素を用いて、第1のプライマー伸長産物と第2のプライマー伸長産物との複合体からRNAを切断する工程；

(d) 第2の複合プライマーを該第2のプライマー伸長産物にハイブリダイズさせ、DNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する少なくとも1つの酵素を用いて該第2の複合プライマーを伸長する工程、

を包含する方法を実行するための指示書のセットをさらに備え、これにより、該第1のプライマー伸長産物が置換され、該第2のプライマー伸長産物からRNAが切断され、そして別の第2の複合プライマーがハイブリダイズし、その結果、プライマー伸長と鎖置換とが繰り返され；そしてこれにより、該目的のRNA配列に相補的なポリヌクレオチド配列の多数のコピーが生成される、請求項170～188のいずれかに記載のキット。

**【請求項 190】**

第3のプライマーをさらに備える、請求項170～189のいずれかに記載のキット。