

【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つて、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、RNA依存性DNA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RNAとを含む複合体が生成される、工程であつて、該第1のプライマーは、RNA部分および3' DNA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；

(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、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つて、その結果、複合增幅プライマーが第2のプライマー伸長産物にハイブリダイズし、該複合增幅プライマーがRNA部分と3' DNA部分とを包含する、工程；

(e) 該複合增幅プライマーを、DNA依存性DNAポリメラーゼで伸長する工程、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、RNAが該複合增幅プライマーから切断され、そして別の複合增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2】

目的のRNA配列の多数のコピーを生成する方法であつて、該方法が、以下の工程：

(a) RNA依存性DNAポリメラーゼで標的RNAにハイブリダイズした第1のプライマーを伸長し、それにより、第1のプライマー伸長産物と該標的RNA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斷する工程であって、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斷され、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】

前記プロプロモーター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、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を切斷する酵素で切斷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 10】

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 11】

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 12】

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1～11のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

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12に記載の方法。

【請求項 14】

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1～13のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

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1～14のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

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1～15のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

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1～16のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

標識されたdNTP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 19】

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1～18のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

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1～19のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

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1～20のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

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21に記載の方法。

【請求項 23】

各第1のプライマーが、ポリdT部分またはランダムプライマー配列を包含する、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

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25)

を包含する、請求項1～23のいずれかに記載の方法。

【請求項 25】

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；

(ii) RNA / DNAハイブリッドからRNAを切断し得る酵素

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

(iv) 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、別の複合增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37】

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36に記載の方法。

【請求項38】

前記第2のプライマーが、DNAを含む、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

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36～38のいずれかに記載の方法。

【請求項40】

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36～39のいずれかに記載の方法。

【請求項41】

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36～39のいずれかに記載の方法。

【請求項42】

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36～41のいずれかに記載の方法。

【請求項43】

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36～42のいずれかに記載の方法。

【請求項44】

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36～43のいずれかに記載の方法。

【請求項45】

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36～44のいずれかに記載の方法。

【請求項46】

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36～45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36～46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36～47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48に記載の方法。

【請求項 5 0】

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25)

を包含する、請求項36～49のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 1】

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36～42または47～50のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 2】

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36～42または47～51のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 3】

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36～42または47～52のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 4】

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36～42または47～53に記載の方法。

【請求項 5 5】

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) 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および第2のプライマー伸長産物の複合体からRNA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、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增幅プライマーをハイブリダイズさせ、そしてDNA依存性DNAポリメラーゼを用いて該複合增幅プライマーを伸長させる工程であって、ここで、該複合增幅プライマーは、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；

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、該複合增幅プライマーからRNAが切断され、そして別の複合增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 6】

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、複合体中の複合增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、RNA依存性DNAポリメラーゼを用いた、標的RNA

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

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、複合增幅プライマーからRNAが切断され、そして別の複合增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 または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つて、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つて、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) 複合增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つて、ここで、該複合增幅プライマーは、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、該複合增幅プライマーからRNAが切断され、そして別の複合增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增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
分に隣接する、請求項 6 4 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、增幅産物を分析して配列を決定する工程を包含し、該增幅産物は、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、增幅産物を分析して配列を決定する工程を包含し、該增幅産物は、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】

一本鎖コンホー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、一本鎖コンホーメーションについて增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ー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、該增幅産物は、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 RN

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)由来の該增幅産物を、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來の增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來の該ポリヌクレオチド複合体からの增幅産物の量と比較した場合に、該標的RNA由來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、增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、およびシリンド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 RNA 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 RNA 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 RNA 增幅産物を分析する工程が、前記標識された RNA 産物を少なくとも 1 つのプローブ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 RNA 增幅産物が標識され、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 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 つのプローブを含む、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、およびシリンド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 RNA 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 RNA 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 RNA 配列の量を示す、方法。

【請求項 1_0_2】

各標的 RNA が m RNA 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 RNA 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 RNA 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ブ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 RNA 集団から少なくとも 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 RNA 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 RNA 集団から少なくとも 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 RNA 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部分とを含む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部分とを含む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 112】

請求項 111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 113】

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 110～112に記載の方法。

【請求項 114】

前記第2のプライマーが、DNAを包含する、請求項 110～112のいずれかに記載の方法。

【請求項 115】

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 110～112のいずれかに記載の方法。

【請求項 116】

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 110～112のいずれかに記載の方法。

【請求項 117】

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 110～112のいずれかに記載の方法。

【請求項 118】

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 110～117のいずれかに記載の方法。

【請求項 119】

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 118に記載の方法。

【請求項 120】

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 110～119のいずれかに記載の方法。

【請求項 121】

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 120に記載の方法。

【請求項 122】

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' DNA部分に関して5'である、請求項 110～121のいずれかに記載の方法。

【請求項 123】

前記5' RNA部分が、前記3' DNA部分に隣接する、請求項 122に記載の方法。

【請求項 124】

前記5' R N A 部分が、少なくとも約10ヌクレオチドである、請求項122または123に記載の方法。

【請求項 125】

前記5' R N A 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124に記載の方法。

【請求項 126】

標的R N A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R N Aに結合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110～125のいずれかに記載の方法。

【請求項 127】

標的R N Aにハイブリダイズする前記第1のプライマーが、ポリdT配列を包含する、請求項110～126のいずれかに記載の方法。

【請求項 128】

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R N A部分が、少なくとも約5ヌクレオチドである、請求項110～127のいずれかに記載の方法。

【請求項 129】

前記R N A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128に記載の方法。

【請求項 130】

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' D N A部分が、少なくとも1ヌクレオチドである、請求項110～129のいずれかに記載の方法。

【請求項 131】

前記3' D N A部分が、約1～約20ヌクレオチドである、請求項130に記載の方法。

【請求項 132】

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R N A部分が、前記3' D N A部分に関して5'である、請求項110～131のいずれかに記載の方法。

【請求項 133】

前記5' R N A部分が、前記3' D N A部分に隣接する、請求項132に記載の方法。

【請求項 134】

前記標的R N Aがm R N Aである、請求項110～133のいずれかに記載の方法。

【請求項 135】

標的R N A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110～134のいずれかに記載の方法。

【請求項 136】

前記標的R N Aがm R N Aであり、そして標的R N Aにハイブリダイズする前記第1のプライマーがポリdT配列を含み、そしてさらに該第1のプライマーが該標的m R N Aにハイブリダイズする条件下で該標的m 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110～135のいずれかに記載の方法。

【請求項 137】

複数の異なる第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ために使用される、請求項110～136のいずれかに記載の方法。

【請求項 138】

前記R N A / D N AハイブリッドからR N Aを切断する酵素が、R N a s e Hである、請求項110～137のいずれかに記載の方法。

【請求項 139】

前記R N A依存性D N Aポリメラーゼと前記D N A依存性D N A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部分について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部分について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149に記載の組成物。

【請求項151】

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150に記載の組成物。

【請求項152】

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148~151のいずれかに記載の組成物。

【請求項153】

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148~152のいずれかに記載の組成物。

【請求項154】

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148~153のいずれかに記載の組成物。

【請求項155】

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154に記載の組成物。

【請求項156】

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148~155のいずれかに記載の組成物。

【請求項157】

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' D N A 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3' D N A 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156に記載の組成物。

【請求項158】

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) 複合增幅プライマーであって、該複合增幅プライマーは、R N A部分と3' D N A部分とを含み、かつ該複合增幅プライマーは、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、複合增幅プライマー、を含む、組成物。

【請求項159】

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 部分について5'であり、前記複合增幅プライマーの前記R N A部分が、該複合增幅プライマーの前記3' D N A部分について5'である、請求項158に記載の組成物。

【請求項160】

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'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、前記第2の複合プライマーの前記5'RNA部分が、該第2の複合プライマーの前記3'DNA部分に隣接する、請求項171に記載のキット。

【請求項173】

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、前期第2の複合プライマーが、前記5'RNA部分および前記3'DNAからなる、請求項172に記載のキット。

【請求項174】

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170~173のいずれかに記載のキット。

【請求項175】

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170~174のいずれかに記載のキット。

【請求項176】

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170~175のいずれかに記載のキット。

【請求項177】

前記第1の複合プライマーの前記3'DNA部分が、ポリdT配列を含み、そして該第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170~175のいずれかに記載のキット。

【請求項178】

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170~177のいずれかに記載のキット。

【請求項179】

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'部分を包含し、該第1の複合プライマーが、ポリdT配列をさらに包含する、請求項170~177のいずれかに記載のキット。

【請求項180】

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'部分を包含し、該第1の複合プライマーが、ポリdT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170~177に記載のキット。

【請求項181】

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DNA部分が、少なくとも約5ヌクレオチドを含む、請求項170~180のいずれかに記載のキット。

【請求項182】

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DNA部分が、約5ヌクレオチド~約20ヌクレオチドからなる、請求項181に記載のキット。

【請求項183】

前記第2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2の複合プライマーの前記DNA部分が、少なくとも約1ヌクレオチドを含む、請求項170~182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。