

【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 19 年 1 月 25 日 (2007.1.25)

【公表番号】特表 2002-534986 (P2002-534986A)

【公表日】平成 14 年 10 月 22 日 (2002.10.22)

【出願番号】特願 2000-594952 (P2000-594952)

【国際特許分類】

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

**C 1 2 Q 1/48 (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 1/48 Z

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成 18 年 11 月 16 日 (2006.11.16)

【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】 ポリヌクレオチドの混合物中における標的ポリヌクレオチド配列に沿ったオリゴヌクレオチドプライマーの選択的伸長方法であって、その方法が、

(a) 前記混合物、修飾を有するオリゴヌクレオチドプライマー、およびその修飾に対する結合物質を組合せて用意し、ここで結合物質はオリゴヌクレオチドに結合して標的ポリヌクレオチド配列に沿ったオリゴヌクレオチドの伸長を抑制するものであり、そして

(b) 前記組合せの温度を、結合物質を不可逆的に変性して、特定の標的ポリヌクレオチド配列に沿ってオリゴヌクレオチドプライマーを伸長させるのに十分なレベルに調整することからなる方法。

【請求項 2】 鑄型ポリヌクレオチドに沿ったオリゴヌクレオチドの伸長を制御する方法であって、その方法が、

(a) 媒体中にて (i) 鑄型ポリヌクレオチド、(ii) 少なくとも一部分においてその鑄型ポリヌクレオチドの一部分とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであって、そのオリゴヌクレオチドは修飾部分を含むもの、(iii) 鑄型ポリヌクレオチドに沿ったオリゴヌクレオチドの伸長に必要な全ての試薬、および (iv) 前記修飾部分に対する結合物質であって、結合物質が修飾部分に結合して鑄型ポリヌクレオチドに沿ったオリゴヌクレオチドの伸長を抑制するもの、を組合せて用意し、そして

(b) その組合せの温度を上昇させてオリゴヌクレオチドから結合物質を不可逆的に解離させ、鑄型ポリヌクレオチドに沿ってオリゴヌクレオチドを伸長させることからなる方法。

【請求項 3】 修飾部分が修飾ヌクレオチドである請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 修飾ヌクレオチドが非天然のヌクレオチドであるかまたは非天然の基を含む請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 鑄型ポリヌクレオチドが DNA または RNA である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】 増幅方法の一部である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】 増幅方法が、ポリメラーゼ連鎖反応、単一プライマー増幅または転写

をベースにした核酸増幅からなる群から選択される請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 結合物質がタンパク質である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】 結合物質が抗体である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】 (a) (i) 標的ポリヌクレオチド配列を含有すると推測される媒体、(ii) その標的ポリヌクレオチド配列の増幅を実施するために必要な全ての試薬を組合せて用意し、ここでその試薬はヌクレオチドポリメラーゼ、ヌクレオシド三リン酸および標的ポリヌクレオチド配列に沿って伸長可能な少なくとも 1 つのプライマーを含むものであり、そして

(b) 前記組合せを標的ポリヌクレオチド配列の増幅条件に付することからなり、

前記プライマーが修飾部分を含み、その修飾部分に対する結合物質が前記組合せに含まれ、結合物質が修飾部分に結合して標的ポリヌクレオチド配列に沿ったオリゴヌクレオチドの伸長を抑制しうるものであり、温度サイクル過程における温度上昇により結合物質をプライマーから不可逆的に放出して、これによりプライマーを標的ポリヌクレオチド配列と結合させ、これに沿って伸長させることを特徴とする、標的ポリヌクレオチド配列の増幅方法。

【請求項 11】 修飾部分が修飾ヌクレオチドである請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】 標的ヌクレオチドが非天然のヌクレオチドであるかまたは非天然の基を含む請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】 標的ポリヌクレオチドが DNA または RNA である請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】 唯一つのプライマーを用いて、標的配列がその 5' 末端において、そのプライマーとハイブリダイズする標的配列の 3' 末端の配列とハイブリダイズしうる少なくとも 10 塩基配列を含むことを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】 第 1 および第 2 プライマーを用いて、伸長した第 1 プライマーが第 2 プライマーの鋳型であり、伸長した第 2 プライマーが第 1 プライマーの鋳型であることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】 結合物質がタンパク質である請求項 10 に記載の方法。

【請求項 17】 結合物質が抗体である請求項 10 に記載の方法。

【請求項 18】 標的ポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列（標的配列）の増幅方法であって、その方法が

(a) 第 1 オリゴヌクレオチドプライマー（第 1 プライマー）を標的配列の 3' 末端とハイブリダイズさせ、

(b) ポリメラーゼおよびヌクレオチド三リン酸の存在下にて第 1 プライマーを少なくとも標的配列に沿って伸長させて、伸長した第 1 プライマーを形成させ、ここで第 1 プライマーが (1) 伸長した第 1 プライマーまたは (2) 伸長した第 2 オリゴヌクレオチドプライマー（第 2 プライマー）とハイブリダイズして、これに沿って伸長しうるものであり、伸長した第 2 プライマーが標的配列と相補的なポリヌクレオチド（相補的ポリヌクレオチド）とハイブリダイズしてこれに沿って伸長しうる第 2 プライマーの伸長の結果として生じたものであり、

(c) 伸長した第 1 プライマーを標的配列から解離させ、

(d) 第 1 プライマーまたは第 2 プライマーを伸長した第 1 プライマーの 3' 末端とハイブリダイズさせ、

(e) 第 1 プライマーまたは第 2 プライマーを伸長した第 1 プライマーに沿って伸長させ、

(f) 伸長した第 1 プライマーまたは伸長した第 2 プライマーを伸長した第 1 プライマーから解離させ、

(g) 第 1 プライマーを伸長した第 1 プライマーまたは伸長した第 2 プライマーの 3' 末端とハイブリダイズさせ、そして

(h) 工程 (e) ~ (g) を反復温度サイクルにより繰り返すことからなり、

第 1 プライマーおよび第 2 プライマーの少なくとも 1 つがその一部において標的ポリヌ

クレオチドと結合する修飾ヌクレオチドを含み、その修飾ヌクレオチドに対する抗体を前記組合せ中に包含させ、その抗体は修飾ヌクレオチドに結合して、標的配列に沿って前記プライマーの少なくとも1つが伸長するのを抑制しうるものであり、且つ抗体を前記温度サイクル過程における温度上昇によりプライマーの少なくとも1つから不可逆的に放出させ、これによりプライマーの少なくとも1つを標的ポリヌクレオチド配列と結合させてこれに沿って伸長させることを特徴とする方法。

【請求項19】 修飾ヌクレオチドが非天然のヌクレオチドであるかまたは非天然の基を含む請求項18に記載の方法。

【請求項20】 標的ポリヌクレオチドがDNAまたはRNAである請求項18に記載の方法。

【請求項21】 第1プライマーのみを用いて、標的配列がその5'末端において、そのプライマーとハイブリダイズする標的配列の3'末端の配列とハイブリダイズしうる少なくとも10塩基配列を含むことを特徴とする、請求項18に記載の方法。

【請求項22】 第1プライマーおよび第2プライマーが異なり、伸長した第1プライマーが第2プライマーの鋳型であり、そして伸長した第2プライマーが第1プライマーの鋳型であることを特徴とする請求項18に記載の方法。

【請求項23】 修飾ヌクレオチドがオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端部分にある請求項18に記載の方法。

【請求項24】 標的ポリヌクレオチドの標的配列の検出方法であって、その方法が  
(a)(i) 第1オリゴヌクレオチドプライマー(第1プライマー)を標的配列の3'末端とハイブリダイズさせ、

(ii) ポリメラーゼおよびヌクレオチド三リン酸の存在下にて第1プライマーを少なくとも標的配列に沿って伸長させて、伸長した第1プライマーを形成させ、第1プライマーが(1)伸長した第1プライマーまたは(2)伸長した第2オリゴヌクレオチドプライマー(第2プライマー)とハイブリダイズして、これに沿って伸長しうるものであり、伸長した第2プライマーが標的配列と相補的なポリヌクレオチド(相補的ポリヌクレオチド)とハイブリダイズしてこれに沿って伸長しうる第2プライマーの伸長の結果として生じたものであり、

(iii) 伸長した第1プライマーを標的配列から解離させ、

(iv) 第1プライマーまたは第2プライマーを伸長した第1プライマーの3'末端とハイブリダイズさせ、

(v) 第1プライマーまたは第2プライマーを伸長した第1プライマーに沿って伸長させ、

(vi) その伸長した第1プライマーまたは伸長した第2プライマーを伸長した第1プライマーから解離させ、

(vii) 第1プライマーを伸長した第1プライマーまたは伸長した第2プライマーの3'末端とハイブリダイズさせ、そして

(viii) 工程(v)~(vii)を繰り返すことからなる方法により標的配列を増幅させ、次いで

(b) 伸長した第1プライマーおよび/または伸長した第2プライマーを検出することからなり、

第1プライマーおよび第2プライマーの少なくとも1つがその一部において標的ポリヌクレオチドと結合する修飾ヌクレオチドを含み、その修飾ヌクレオチドに対する抗体を前記組合せ中に包含させ、その抗体は修飾ヌクレオチドに結合して、標的配列に沿って前記プライマーの少なくとも1つが伸長するのを抑制しうるものであり、且つ抗体を前記温度サイクル過程における温度上昇により前記プライマーの少なくとも1つから不可逆的に放出させ、これにより前記プライマーの少なくとも1つを標的ポリヌクレオチド配列と結合させてこれに沿って伸長させることを特徴とする方法。

【請求項25】 工程(v)~(vii)の繰り返しを反復温度サイクルにより実施される請求項24に記載の方法。

【請求項 26】 標的ポリヌクレオチドが DNA または RNA である請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】 第 1 プライマーのみを用いて、標的配列がその 5' 末端において、その第 1 プライマーとハイブリダイズする標的配列の 3' 末端の配列とハイブリダイズする少なくとも 10 塩基配列を含むことを特徴とする、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 28】 第 1 プライマーおよび第 2 プライマーが異なり、伸長した第 1 プライマーが第 2 プライマーの鋳型であり、そして伸長した第 2 プライマーが第 1 プライマーの鋳型であることを特徴とする請求項 24 に記載の方法。