

【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22年9月16日(2010.9.16)

【公表番号】特表2010-506573(P2010-506573A)

【公表日】平成22年3月4日(2010.3.4)

【年通号数】公開・登録公報2010-009

【出願番号】特願2009-532720(P2009-532720)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 0 7 H 21/04 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 H 21/04 B

【手続補正書】

【提出日】平成22年7月29日(2010.7.29)

【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】

2' - 終止ヌクレオチドを含んでなる少なくとも 1 のオリゴヌクレオチドを含んでなる反応混合物であって、ヌクレオチド除去活性を含んでなる第 1 生体触媒、ヌクレオチド導入活性を含んでなる第 2 生体触媒、前記オリゴヌクレオチドに対して少なくとも部分的に相補的である少なくとも 1 の部分配列を含んでなる標的核酸、アンプリコン、プライマー核酸、プローブ核酸、追加のヌクレオチド、追加のオリゴヌクレオチド、可溶性発光修飾因子、共溶媒、インターカレート剤、臨床検体、試料、緩衝液、塩、金属イオン、ピロリン酸、グリセロール、ジメチルスルホキシド及びポリ r A からなる群から選択される 1 又は 2 以上の追加の試薬を含んでなるとともに、緩衝液を含んでなり、前記緩衝液が、少なくとも 90 mM の濃度の N - [トリス (ヒドロキシメチル) メチル] グリシンを含んでなる反応混合物。

【請求項 2】

オリゴヌクレオチドからのヌクレオチドを除去する方法であって、少なくとも 1 の標的核酸を、ヌクレオチド除去活性を含んでなる少なくとも第 1 生体触媒、及び前記標的核酸の少なくとも第 1 配列に対して少なくとも部分的に相補的である、2' - 終止ヌクレオチドを含んでなる少なくとも 1 のオリゴヌクレオチドとともに、前記第 1 生体触媒が前記オリゴヌクレオチドから少なくとも前記 2' - 終止ヌクレオチドを除去し、除去された 2' - 終止ヌクレオチド及び短縮オリゴヌクレオチドを生成するような条件下でインキュベートすることにより、前記オリゴヌクレオチドからヌクレオチドを除去することを含んでなる方法。

【請求項 3】

オリゴヌクレオチドが 2' - 終止ヌクレオチドを 3' 末端に有する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

2' - 終止ヌクレオチドが、G 4 6 E E 6 7 8 G C S 5 DNA ポリメラーゼ、G 4 6 E L 3 2 9 A E 6 7 8 G C S 5 DNA ポリメラーゼ、G 4 6 E L 3 2 9 A D 6 4

0 G S 6 7 1 F C S 5 DNAポリメラーゼ、G 4 6 E L 3 2 9 A D 6 4 0 G S 6 7
 1 F E 6 7 8 G C S 5 DNAポリメラーゼ、G 4 6 E E 6 7 8 G C S 6 DNAポリ
 メラーゼ、Z O 5 Rポリメラーゼ、E 6 1 5 G T a q DNAポリメラーゼ、サーマス
 ・フラバス (Thermus flavus) ポリメラーゼ、T M A - 2 5 ポリメラーゼ、E 6 7 8 G
 T M A - 2 5 ポリメラーゼ、T M A - 3 0 ポリメラーゼ、E 6 7 8 G T M A - 3 0 ポリ
 メラーゼ、T t h DNAポリメラーゼ、サーマス種 S P S - 1 7 ポリメラーゼ、E 6 1
 5 G T a q ポリメラーゼ、サーマス Z O 5 R ポリメラーゼ、T 7 DNAポリメラーゼ、
 コーンバーグ (Kornberg) DNAポリメラーゼ I、クレノウ DNAポリメラーゼ、T
 a q DNAポリメラーゼ、ミクロコッカス (Micrococcal) DNAポリメラーゼ、D
 NAポリメラーゼ、逆転写酵素、A M V 逆転写酵素、M - M u L V 逆転写酵素、DNAポリ
 メラーゼ、RNAポリメラーゼ、E . コリRNAポリメラーゼ、S P 6 RNAポリメ
 ラーゼ、T 3 RNAポリメラーゼ、T 4 DNAポリメラーゼ、T 7 RNAポリメラー
 ゼ、RNAポリメラーゼII、末端トランスフェラーゼ、ポリヌクレオチドホスホリラーゼ
 、リボヌクレオチド類似体 - 導入DNAポリメラーゼ、リボヌクレオチド導入DNAポリ
 メラーゼ等から選択される1又は2以上のヌクレオチド導入生体触媒により伸長不能とさ
 れる、請求項2記載の方法。

【請求項5】

第1生体触媒がヌクレオチド導入活性を含んでなり、
 前記方法が、標的核酸を、第1生体触媒、短縮オリゴヌクレオチド及び少なくとも1の追
 加のヌクレオチドと共に、前記第1生体触媒が短縮オリゴヌクレオチド末端に追加のヌク
 レオチドを組み込み、伸長されたオリゴヌクレオチドを生成する条件下でインキュベートす
 ることを含んでなり、或いは、
 前記方法が、標的核酸を、ヌクレオチド導入活性を含んでなる第2生体触媒、短縮オリゴ
 ヌクレオチド、及び少なくとも1の追加のヌクレオチドと共に、第2生体触媒が短縮オリ
 ゴヌクレオチド末端に追加のヌクレオチドを組み込み、伸長されたオリゴヌクレオチドを生
 成する条件下でインキュベートすることを含んでなる、請求項2記載の方法。

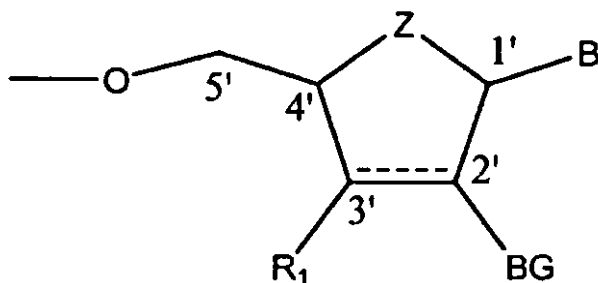
【請求項6】

第1及び/又は第2生体触媒が、ポリメラーゼ及び逆転写酵素からなる群より選択され
 る、請求項5記載の方法。

【請求項7】

2' - 終止ヌクレオチドが、下記式：

【化1】



[式中、

ZはO又はCH₂であり；

Bは、少なくとも1の単素環式環、少なくとも1の複素環式環、少なくとも1のアリール
 基又はそれらの組合せであり；

BGは、ブロッキング基であり；

R₁は、OHであり；

【化 1 a】

=====

は、単又は二重結合を表し、

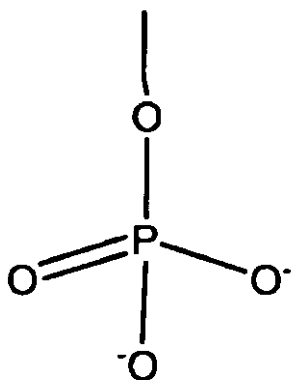
B G は、C N、N O₂、リン酸基、アルデヒド基、又はそれらの組合せからなる群より選
択される]

で表される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 8】

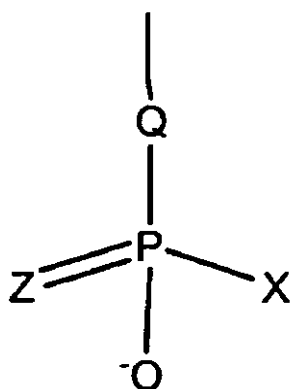
B G が、下記式：

【化 2】



又は下記式：

【化 3】



[式中、

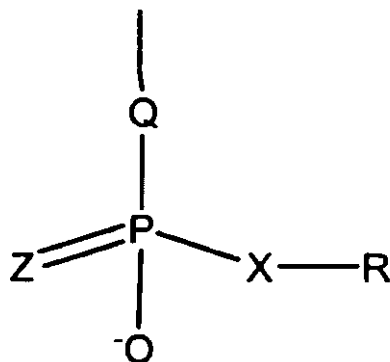
Q は、O、S 又は NH であり；

X は、H、OH、CH₃、BH₃、F 又は SeH であり；

Z は、O、S 又は Se である]

又は下記式：

【化 4】



[式中、

Q は、O、S 又は NH であり；

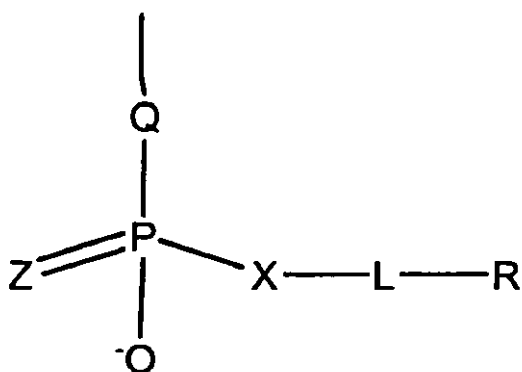
X は、O、S 又は NH であり；

Z は、O、S 又は Se であり；

R は、アルキル基、アルケニル基又はアルキニル基である]

又は下記式：

【化 5】



[式中、

Q は、O、S 又は NH であり；

X は、O、S 又は NH であり；

Z は、O、S 又は Se であり；

L は、 $-CONH(CH_2)_nNH-$ 、 $-CO(CH_2)_nNH-$ 又は $-CONH(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2NH-$ であり；

n は、0 よりも大きい整数であり；

R は、 NH_2 、SH、COOH、消光剤成分、レポーター成分、ビオチン又は親和性成分である]

で表される、請求項 7 記載の方法。