

【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 7 月 14 日 (2005.7.14)

【公開番号】特開 2004-298200 (P2004-298200A)  
 【公開日】平成 16 年 10 月 28 日 (2004.10.28)  
 【年通号数】公開・登録公報 2004-042  
 【出願番号】特願 2004-221749 (P2004-221749)  
 【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 1 月 18 日 (2005.1.18)

【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】

標的核酸上の特定の塩基における塩基置換の有無を検出する方法であって、

(1) 標的核酸を含有する試料とヌクレオチドとを混合する工程：ここで当該ヌクレオチドは、

A) その 3' 末端が当該末端からの DNA ポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されており、

B) 標的核酸上の前記特定の塩基を含有する領域にアニーリングしうる塩基配列を有しており、

C) 当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合にはヌクレオチドはヌクレアーゼによる切断を受けず、かつ、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在する場合にはヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて新たな 3' 末端を生じるような配列を含有しており、

(2) 前記混合物をヌクレアーゼ、および DNA ポリメラーゼで処理する工程：および

(3) ヌクレアーゼによるヌクレオチドの切断の有無を検出する工程、  
 を包含することを特徴とする塩基置換の検出方法。

【請求項 2】

ヌクレアーゼとしてミスマッチ特異的ヌクレアーゼが使用される請求項 1 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 3】

DNA ポリメラーゼの作用によって生成する伸長産物の有無によってヌクレオチドの切断が検出される請求項 1 又は 2 記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 4】

ヌクレアーゼの作用によって生成する遊離したヌクレオチドの 3' 側断片の有無によってヌクレオチドの切断が検出される請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 5】

ヌクレオチドに標識化合物が付加されており、該標識を用いてヌクレオチドの切断が検出される請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 6】

DNA ポリメラーゼの作用によって生成する伸長産物を鋳型とした核酸増幅の工程をさらに包含する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の塩基置換の検出方法。

【請求項 7】

請求項 1 記載の塩基置換の検出方法に使用されるヌクレオチドであって、

A) その 3' 末端が当該末端からの DNA ポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されており、

B) 標的核酸上の前記特定の塩基を含有する領域にアニーリングしうる塩基配列を有しており、

C) 当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合にはヌクレオチドはヌクレアーゼによる切断を受けず、かつ、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在する場合にはヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて新たな 3' 末端を生じるような配列を含有する、ことを特徴とするヌクレオチド。

【請求項 8】

請求項 1 記載の塩基置換の検出方法に使用されるキットであって、下記 A) ~ C) 記載のヌクレオチドを含有することを特徴とするキット：

A) その 3' 末端が当該末端からの DNA ポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されており、

B) 標的核酸上の前記特定の塩基を含有する領域にアニーリングしうる塩基配列を有しており、

C) 当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合にはヌクレオチドはヌクレアーゼによる切断を受けず、かつ、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在する場合にはヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて新たな 3' 末端を生じるような配列を含有する。

【請求項 9】

請求項 1 記載の塩基置換の検出方法に使用される反応液であって、下記 A) ~ C) 記載のヌクレオチドを含有することを特徴とする反応液：

A) その 3' 末端が当該末端からの DNA ポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されており、

B) 標的核酸上の前記特定の塩基を含有する領域にアニーリングしうる塩基配列を有しており、

C) 当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合にはヌクレオチドはヌクレアーゼによる切断を受けず、かつ、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在する場合にはヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて新たな 3' 末端を生じるような配列を含有する。

【請求項 10】

標的核酸上の特定の塩基における塩基置換の有無を検出する方法に使用されるヌクレオチドであって、該方法は以下の工程：

(1) 標的核酸を含有する試料とヌクレオチドとを混合する工程：ここで当該ヌクレオチドは、

A) その 3' 末端が当該末端からの DNA ポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されており、

B) 標的核酸上の前記特定の塩基を含有する領域にアニーリングしうる塩基配列を有しており、

C) 当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在する場合にはヌクレオチドはヌクレアーゼによる切断を受けず、かつ、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合にはヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて新たな3'末端を生じるような配列を含有しており、

(2) 前記混合物をヌクレアーゼ、およびDNAポリメラーゼで処理する工程：および

(3) ヌクレアーゼによるヌクレオチドの切断の有無を検出する工程、

を包含し、ここでヌクレアーゼは制限酵素であり、該ヌクレオチドは前記A)～C)の特徴を有し、かつ前記特定の塩基に対応する塩基を含有する領域に制限酵素の認識配列を含有することを特徴とするヌクレオチド。