

【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20年3月27日(2008.3.27)

【公表番号】特表2005-518215(P2005-518215A)

【公表日】平成17年6月23日(2005.6.23)

【年通号数】公開・登録公報2005-024

【出願番号】特願2003-571485(P2003-571485)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成20年2月8日(2008.2.8)

【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】

二本鎖標的配列の DNA 増幅の R P A プロセスであって、該標的配列は、DNA の第一鎖および第二鎖を含み、該プロセスは、以下の工程：

( a ) 第一の核酸プライマーおよび第二の核酸プライマーとリコンビナーゼ因子とを接触させて、第一の核タンパク質プライマーおよび第二の核タンパク質プライマーを形成する工程；

( b ) 該第一の核タンパク質プライマーおよび第二の核タンパク質プライマーを、該二本鎖標的配列に接触させ、それによって、該第一鎖の第一の部分において第一の二本鎖構造を形成し、そして該第二鎖の第二の部分にて第二の二本鎖構造を形成し、その結果、該第一の核酸プライマーおよび第二の核酸プライマーの 3 ' 末端は、同じテンプレート核酸分子上で互いに向かい合う、工程；

( c ) 該第一の核タンパク質プライマーおよび第二の核タンパク質プライマーの 3 ' 末端を、1 つ以上のポリメラーゼおよび d N T P を用いて伸長させて、第一の二本鎖核酸および第二の二本鎖核酸、ならびに第一の核酸置換鎖および第二の核酸置換鎖を生成する、工程、

( d ) 所望の程度の増幅が達成されるまで、( b ) および ( c ) を繰り返して、該反応を継続する工程、

を包含する、プロセス。

【請求項 2】

前記工程 ( C ) において、前記核酸の置換鎖は、同時 R P A 反応によって増幅される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記核酸の置換鎖が、以下：

( a ) 前記第一の核タンパク質プライマーまたは第二の核タンパク質プライマーを、該置換鎖と接触させる工程；および

( b ) 該第一の核タンパク質プライマーまたは第二の核タンパク質プライマーを、ポリメラーゼおよび d N T P を用いて伸長させる工程、

によって増幅される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第一の置換鎖および第二の置換鎖が、互いに対して少なくとも部分的に相補的であり、かつハイブリダイズして、娘二本鎖核酸を形成し得、該娘二本鎖核酸は、引き続く工程（b）および（c）において、二本鎖テンプレート核酸として作用し得る、請求項１に記載のプロセス。

【請求項５】

前記第一の置換鎖および第二の置換鎖が、前記第一のプライマーまたは第二のプライマーに対して少なくとも部分的に相補的であり、かつ該第一のプライマーまたは第二のプライマーにハイブリダイズし得る、請求項１に記載のプロセス。

【請求項６】

前記核酸プライマーが、DNA、RNA、PNAまたはそれらの組み合わせである、請求項１に記載のプロセス。

【請求項７】

前記核酸プライマーの各々が、少なくとも１つの一本鎖３'領域を有する、請求項１に記載のプロセス。

【請求項８】

少なくとも１つのプライマーが、部分的に一本鎖かつ部分的に二本鎖であり、ここで、該プライマーは、特異的３'プライマー配列を有するより長い侵入鎖、および該より長い侵入鎖の５'末端に相補的なより短い非侵入鎖から構成される、請求項１に記載のプロセス。

【請求項９】

前記第一の核酸プライマーが、第一の非侵入鎖を含み、そして前記第二の核酸プライマーが、第二の非侵入鎖を含み、そして該第一の非侵入鎖および第二の非侵入鎖が、互いに相補的である、請求項８に記載のプロセス。

【請求項１０】

前記侵入鎖、前記非侵入鎖、または該侵入鎖および該非侵入鎖の両方が、検出可能な部分で標識されている、請求項９に記載のプロセス。

【請求項１１】

前記検出可能な部分が、蛍光色素、酵素、蛍光クエンチャー、酵素インヒビター、放射性標識およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項１０に記載のプロセス。

【請求項１２】

前記侵入鎖および前記非侵入鎖の両方が標識され、該侵入鎖は、第一の蛍光色素または第一の酵素で標識されており、そして該非侵入鎖は、第二の蛍光色素、第二の酵素、蛍光クエンチャーまたは酵素インヒビターで標識されている、請求項１０に記載のプロセス。

【請求項１３】

前記侵入鎖および前記非侵入鎖の両方が標識され、該非侵入鎖は、第一の蛍光色素または第一の酵素で標識されており、そして該侵入鎖は、第二の蛍光色素、第二の酵素、蛍光クエンチャーまたは酵素インヒビターで標識されている、請求項１０に記載のプロセス。

【請求項１４】

前記核酸プライマーの一方または両方が、一本鎖プライマーである、請求項１に記載のプロセス。

【請求項１５】

前記一本鎖プライマーが、蛍光色素、酵素、蛍光クエンチャー、酵素インヒビター、放射性標識およびこれらの組み合わせからなる群より選択される検出可能な部分で標識されている、請求項１４に記載のプロセス。

【請求項１６】

工程（d）が、前記非侵入鎖の置換を引き起こす、請求項１に記載のプロセス。

【請求項１７】

前記侵入鎖および前記非侵入鎖が標識され、該侵入鎖と該非侵入鎖との分離が検出される、請求項９に記載のプロセス。

## 【請求項 18】

部分的に二本鎖の侵入オリゴヌクレオチドの一方の放出された鎖が、他方の二本鎖侵入オリゴヌクレオチドの放出された鎖に対して相補的な配列である、請求項 1 に記載のプロセス。

## 【請求項 19】

前記放出されたオリゴヌクレオチドが、一本鎖標的テンプレートに対して相補的であり、かつ該一本鎖標的テンプレートにハイブリダイズし、そして該一本鎖標的テンプレートの 3' 末端からの DNA 合成を開始する、請求項 18 に記載のプロセス。

## 【請求項 20】

前記リコンビナーゼ因子が、RecA、RadA、RadB、Rad51、そのホモログ、その機能的アナログおよびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 1 に記載のプロセス。

## 【請求項 21】

前記ホモログが、E. coli RecA の 193 ~ 212 残基である、請求項 20 に記載のプロセス。

## 【請求項 22】

前記ホモログが、RecA、RadA または RadB の古細菌ホモログである、請求項 20 に記載のプロセス。

## 【請求項 23】

前記リコンビナーゼ因子が、温度感受性であり、ここで、該温度感受性リコンビナーゼ因子は、許容温度で鎖侵入活性を有し、そして非許容温度で鎖侵入活性を有さない、請求項 1 に記載のプロセス。

## 【請求項 24】

前記 RPA プロセスが、ATP または ATP アナログの存在下で実施される、請求項 1 に記載のプロセス。

## 【請求項 25】

RecO、RecR および RecF の存在下で実施される、請求項 25 に記載のプロセス。

## 【請求項 26】

前記 ATP アナログが、dATP、ddATP、ATP-S およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 25 に記載のプロセス。

## 【請求項 27】

前記 1 つ以上のポリメラーゼが、原核生物ポリメラーゼまたは真核生物ポリメラーゼである、請求項 1 に記載の RPA プロセス。

## 【請求項 28】

前記原核生物ポリメラーゼが、E. coli pol I、E. coli pol II、E. coli pol III、E. coli pol IV、E. coli pol V またはこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 27 に記載の RPA プロセス。

## 【請求項 29】

前記真核生物ポリメラーゼが、pol-、pol-、pol-、pol- およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、真核生物の多タンパク質ポリメラーゼ複合体である、請求項 27 に記載の RPA プロセス。

## 【請求項 30】

前記所望の程度の増幅が、少なくとも 10 倍、少なくとも 100 倍、少なくとも 1000 倍、または少なくとも 1,000,000 倍である、請求項 1 に記載の RPA プロセス。

## 【請求項 31】

前記第一の部分および第二の部分が、間に入る標的 DNA 配列にわたる、請求項 1 に記載の RPA プロセス。

## 【請求項 32】

前記間に入る標的DNA配列が、少なくとも1メガベースである、請求項31に記載のRPAプロセス。

【請求項33】

1つ以上の補助成分の存在下で実施される、請求項1に記載のRPAプロセス。

【請求項34】

前記1つ以上の補助成分が、E. coli由来である、請求項33に記載のRPAプロセス。

【請求項35】

前記補助成分が、一本鎖結合タンパク質、ヘリカーゼ、レソルバーゼおよびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項34に記載のRPAプロセス。

【請求項36】

前記補助成分が、RecF、RecO、RecR、一本鎖結合タンパク質、RuvA、RuvB、RuvC、RecG、PriA、PriB、DnaT、DnaB、DnaC、DnaG、E. coli - ダイマースライディングクランプ、DnaXクランプローダー、ポリメラーゼコア複合体、DNAリガーゼである、請求項34に記載のRPAプロセス。

【請求項37】

前記補助成分が、E. coli - ダイマースライディングクランプ、真核生物PCNAスライディングクランプ、T4スライディングクランプ (gp45) およびこれらの組み合わせからなる群より選択されるスライディングクランプである、請求項34に記載のRPAプロセス。

【請求項38】

前記補助成分が、 - クランプ、DnaXクランプローダーおよびポリメラーゼコア複合体からなる、DNAポリメラーゼIIIホロ酵素複合体である、請求項34に記載のプロセス。

【請求項39】

前記補助成分が、一本鎖結合 (SSB) タンパク質、スライディングクランプ、ヘリカーゼ、レソルバーゼおよびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項34に記載のプロセス。

【請求項40】

前記一本鎖結合 (SSB) タンパク質が、E. coli由来である、請求項39に記載のプロセス。

【請求項41】

前記スライディングクランプが、E. coli - ダイマースライディングクランプ、真核生物PCNAスライディングクランプまたはT4スライディングクランプ (gp45) である、請求項40に記載のプロセス。

【請求項42】

前記補助成分が、RuvA、RuvB、RuvCおよびRecGである、請求項34に記載のプロセス。

【請求項43】

前記プロセスが、RecA/ssDNA核タンパク質フィラメントを安定化する因子の存在下で実施される、請求項1に記載のプロセス。

【請求項44】

前記因子が、RecR、RecO、RecFまたはこれらの組み合わせである、請求項43に記載のプロセス。

【請求項45】

前記補助成分が、PriA、PriB、DnaT、DnaB、DnaCおよびDnaGからなるプライモソーム複合体である、請求項34に記載のプロセス。

【請求項46】

前記プロセスが、20 と50 との間で実施される、請求項1に記載のRPAプロセス

。

【請求項 47】

前記プロセスが、20 と 40 との間で実施される、請求項 1 に記載の RPA プロセス

。

【請求項 48】

前記プロセスが、20 と 30 との間で実施される、請求項 1 に記載の RPA プロセス

。

【請求項 49】

前記プロセスが、前記テンプレート核酸の温度誘導性の溶融なしに実施される、請求項 1 に記載の RPA プロセス。

【請求項 50】

前記 2 つの核タンパク質プライマーが、各々、少なくとも 1000 : 1 のプライマー : 二本鎖核酸標的のモル比で存在する、請求項 1 に記載の RPA プロセス。

【請求項 51】

前記工程 (b) および (c) が、少なくとも 1 回繰り返される、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 52】

前記工程 (b) および (c) が、少なくとも 5 回繰り返される、請求項 1 に記載のプロセス。

【請求項 53】

少なくとも 1 つのプライマーが、増幅されるべき特異的配列と相補的でない 1 つ以上のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の RPA プロセス。

【請求項 54】

少なくとも 1 つのプライマーが、その 5' 末端で前記標的配列と相補的でない 1 つ以上のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の RPA プロセス。

【請求項 55】

前記少なくとも 1 つのヌクレオチドが、制限エンドヌクレアーゼ認識部位の配列を含むオリゴヌクレオチドである、請求項 54 に記載の RPA プロセス。

【請求項 56】

前記増幅された核酸が、遺伝病に関連する少なくとも 1 つの特異的変異を含む、請求項 1 に記載の RPA プロセス。

【請求項 57】

前記増幅された核酸配列が、病原生生物、癌遺伝子、活性化癌遺伝子または抑制された癌遺伝子中に含まれる、請求項 1 に記載の RPA プロセス。

【請求項 58】

少なくとも 1 つのプライマーが、遺伝病に関連する配列に対して相補的である、請求項 1 に記載の RPA プロセス。

【請求項 59】

少なくとも 1 つのプライマーが、病原生生物、癌遺伝子、活性化癌遺伝子または抑制された癌遺伝子中の核酸配列に対して相補的である、請求項 1 に記載の RPA プロセス。

【請求項 60】

ネスティド RPA 増幅のプロセスであって、該プロセスは、以下の工程：

(a) 第一のプライマーおよび第二のプライマーを用いて請求項 1 に記載の RPA プロセスを使用して DNA の領域を増幅して、第一の増幅産物を生成する工程；

(b) 第三および第四のプライマーを用いて請求項 1 に記載の RPA プロセスを使用して該増幅産物を増幅して、第二の増幅産物を生成する工程であって、ここで、該第二の増幅産物は、該第一の増幅産物内に含まれる、より小さい配列である、工程、を包含する、プロセス。

【請求項 61】

前記第一のプライマー、前記第二のプライマー、前記第三のプライマーおよび前記第四の

プライマーが、各々異なる、請求項 60 に記載のプロセス。

【請求項 62】

前記第一のプライマーおよび前記第二のプライマーの一方が、前記第三のプライマーおよび第四のプライマーの一方と同一である、請求項 60 に記載のプロセス。

【請求項 63】

二本鎖標的分子の DNA 増幅の RPA プロセスであって、該プロセスは、以下の工程：

(a) リコンビナーゼ因子を、第一の核酸プライマーおよび第二の核酸プライマーと接触させて、第一の核タンパク質プライマーおよび第二の核タンパク質プライマーを形成する工程；

(b) 該第一の核タンパク質プライマーおよび第二の核タンパク質プライマーを、該二本鎖標的配列に接触させ、それによって、該標的分子の第一の部分において第一の二本鎖構造を形成し、そして該標的分子の第二の部分にて第二の二本鎖構造を形成し、その結果、該第一の核酸プライマーおよび第二の核酸プライマーの 3' 末端は、同じテンプレート核酸分子上で互いに向かい合う、工程；

(c) 該標的配列を、プライモソーム構築タンパク質およびクランプローダー/ポリメラーゼ III ホロ酵素複合体と接触させて、該標的分子の第一の部分にて複製フォークを形成し、そして該標的分子の第二の部分にて第二の複製フォークを形成する、工程；

(d) 該標的分子を、DNA ポリメラーゼ III コア、DNA ポリメラーゼ I、プライマーゼ、ヘリカーゼおよびリガーゼに接触させて、リーディング鎖とラギング鎖の DNA 合成を組み合わせ、そして該複製フォークを互いに対して移動させる、工程；

(f) 所望の程度の増幅が達成されるまで、工程 (b)、(c) および (d) の繰り返しによって該反応を継続する、工程、

を包含する、プロセス。

【請求項 64】

dNTP および rNTP の存在下で実施される、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

一本鎖 DNA 結合タンパク質の存在下で実施される、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 66】

前記リコンビナーゼ因子が、RecA またはその機能的ホモログである、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 67】

前記プライモソーム構築タンパク質が、PriA、PriB、PriC、DnaT、DnaC、DnaB、DnaG、Pol III ホロ酵素およびこれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 68】

前記クランプローダーが、DnaX クランプローダー複合体である、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 69】

前記 DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素が、E. coli ポリメラーゼ III である、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 70】

前記 DNA ポリメラーゼ I が、E. coli ポリメラーゼ I である、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 71】

前記プライマーゼが、E. coli DnaG プライマーゼである、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 72】

前記ヘリカーゼが、E. coli DnaB ヘリカーゼである、請求項 68 に記載の方法。