

【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26年12月4日(2014.12.4)

【公表番号】特表2014-513534(P2014-513534A)

【公表日】平成26年6月5日(2014.6.5)

【年通号数】公開・登録公報2014-029

【出願番号】特願2014-506607(P2014-506607)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

【手続補正書】

【提出日】平成26年9月26日(2014.9.26)

【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】

試料中に含有される核酸標的配列の鑄型を増幅するための方法であつて、

前記核酸標的配列の鑄型に相補的なプライマーを含有する増幅反応混合物と前記試料を接觸させることと、

反応の温度を上位温度と下位温度との間で周期的に変動させ、温度の変化を、複数回の温度サイクル中、20以下とすることと、

前記核酸標的配列の鑄型を増幅することと、

を含む、方法。

【請求項2】

前記温度の変化が、複数回の温度サイクル中、15以下である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記温度の変化が、複数回の温度サイクル中、10以下である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記温度の変化が、複数回の温度サイクル中、5以下である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記上位温度または前記下位温度に到達した後、前記反応の温度が、設定期間にわたり温度のゆらぎ内に維持される、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記温度範囲内で上位または下位温度に到達した後、前記反応の温度が他の温度に変化させられる、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記下位温度が50以上である、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記上位温度が85以下である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記核酸標的配列の鑄型が1本鎖DNAまたはRNAである、請求項1に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記核酸標的配列の鋳型が 2 本鎖 D N A または R N A である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記核酸標的配列の鋳型が R N A である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記核酸標的配列の鋳型が D N A である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記標的核酸の長さが 1 0 0 0 b p 未満であり得る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記標的核酸の長さが 2 5 0 b p 未満であり得る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記標的核酸の長さが 1 5 0 b p 未満であり得る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記標的核酸の長さが 1 0 0 b p 未満であり得る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記增幅反応混合物が、前記核酸の鋳型の逆鎖に結合するプライマー対を含む、請求項 1 から請求項 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記プライマー対が、その溶融温度が 6 5 以上となるような長さおよび G C 含量を有する、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記プライマー対が、その溶融温度が 7 0 以上となるような長さおよび G C 含量を有する、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記プライマー対が、3 5 から 7 0 塩基対の間の長さを有する、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記プライマー対の各プライマーの溶融温度が、7 0 から 8 0 の間である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記プライマー対が、それぞれ 4 0 から 4 7 塩基対の間の長さを有するフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 3】

試料中に含有される核酸標的配列の鋳型を増幅させるための方法であって、

前記試料を、

3 5 から 7 0 塩基対の長さを有し、前記核酸標的配列の鋳型に対して相補的であるプライマーまたはプライマー対であって、前記プライマー対の各プライマーの溶融温度が 7 0 から 8 0 の間である、プライマーまたはプライマー対と、

D M S O と、

一価陽イオンと、

二価陽イオンと、

d N T P と、

D N A ポリメラーゼと、

を含む增幅反応混合物と、を接触させることと、

反応の温度を上位温度と下位温度との間で周期的に変動させ、前記温度の変化を、複数回の温度サイクル中、約 2 0 以下とすることと、

前記核酸標的配列の鋳型を増幅することと、

を含む、方法。

【請求項 2 4】

前記二価陽イオンが、マグネシウム、マンガン、銅、亜鉛またはそれらの任意の組み合

わせからなる群から選択される塩である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記一価陽イオンが、ナトリウム、カリウム、リチウム、ルビジウム、セシウム、アンモニウム、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される塩である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記増幅反応混合物が核酸不安定化剤を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記増幅反応が、DNA ポリメラーゼを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記 DNA ポリメラーゼが、耐熱性 DNA ポリメラーゼである、請求項 2 3 または 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記 DNA ポリメラーゼが、T A Q DNA ポリメラーゼ、V e n t R DNA ポリメラーゼおよび、Deep V e n t R DNA ポリメラーゼからなる群から選択される、請求項 2 3 または 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記 DNA ポリメラーゼが、鎖置換活性を含む、請求項 2 3 または 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記 DNA ポリメラーゼが、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有さない、請求項 2 3 または 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記増幅反応混合物が、逆転写酵素および DNA ポリメラーゼを含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記逆転写酵素が耐熱性逆転写酵素である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記逆転写酵素が、AMV - RT、Superscript II 逆転写酵素、Superscript III 逆転写酵素または MMLV - RT から選択される、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記増幅反応混合物が、1本鎖結合タンパク質を含む、請求項 1 または 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記1本鎖結合タンパク質が、耐熱性の1本鎖結合タンパク質である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記1本鎖結合タンパク質が、非耐熱性の1本鎖結合タンパク質である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記不安定化剤がジメチルスルホキシド(DMSO)またはホルムアミドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記試料がアルコール不含ではない、請求項 1 または 2 3 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記試料が塩不含ではない、請求項 1 または 2 3 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記増幅反応混合物が、増幅反応混合緩衝液を含み、該増幅反応混合緩衝液は、
1本鎖または2本鎖核酸不安定化剤と、
一価陽イオンと、

二価陽イオンと、

d N T P と、

活性を支えるためにpHで緩衝化されているDNAポリメラーゼと、
を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項42】

1本鎖結合タンパク質をさらに含む、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記不安定化剤がジメチルスルホキシド(DMSO)またはホルムアミドである、請求項41に記載の方法。

【請求項44】

前記二価陽イオンが、マグネシウム、マンガン、銅、亜鉛またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される塩である、請求項41に記載の方法。

【請求項45】

前記一価陽イオンが、ナトリウム、カリウム、リチウム、ルビジウム、セシウム、アンモニウムまたはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される塩である、請求項41に記載の方法。

【請求項46】

前記DNAポリメラーゼが、耐熱性DNAポリメラーゼである、請求項41に記載の方法。

【請求項47】

前記DNAポリメラーゼが、Taq DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼおよびDeep Vent DNAポリメラーゼからなる群から選択される、請求項41に記載の方法。

【請求項48】

前記DNAポリメラーゼが、鎖置換活性を含む、請求項41に記載の方法。

【請求項49】

前記DNAポリメラーゼが、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有さない、請求項41に記載の方法。