

【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30年4月19日(2018.4.19)

【公表番号】特表2017-508474(P2017-508474A)

【公表日】平成29年3月30日(2017.3.30)

【年通号数】公開・登録公報2017-013

【出願番号】特願2016-559274(P2016-559274)

【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30年3月9日(2018.3.9)

【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】

a) 標的核酸鋳型を用意するステップと；

b) 前記標的核酸鋳型を、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼと、デオキシリボヌクレオシド三リン酸(dNTP)混合物と、3'末端および5'末端を有するプライマーと、分子クラウディング試薬と、緩衝液とを含む反応混合物と接触させるステップであって、前記緩衝液は1~75mMの間の前記反応混合物の塩濃度を維持するステップと；

c) 前記標的核酸鋳型を等温増幅条件下一定反応温度で増幅するステップと

を含む、核酸を増幅する方法であって、

前記塩濃度が前記反応温度より少なくとも10 低い前記プライマーの融解温度( $T_m$ )をもたらず、方法。

【請求項2】

前記プライマーが5ヌクレオチド~9ヌクレオチドの間の長さであり、前記塩濃度が1~35mMの間で維持される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記反応混合物の前記塩濃度が10~30mMの間で維持される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記反応混合物の前記塩濃度が約20mMで維持される、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

前記標的核酸鋳型の投入量が少なくとも約5フェムトグラムである、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

細菌源からの前記標的核酸鋳型の前記投入量が少なくとも約5フェムトグラムである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

ヒト源からの前記標的核酸の前記投入量が少なくとも約5ピコグラムである、請求項5に記載の方法。

【請求項8】

前記分子クラウディング試薬が、ポリエチレングリコール、Ficoll、トレハロ-

スおよびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記分子クラウディング試薬が、PEG 400、PEG 2000、PEG 6000、PEG 8000 またはこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記核酸鋳型を増幅させるステップがローリングサークル増幅 (RCA) または多置換増幅 (MDA) を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記核酸鋳型を増幅するステップが高ストリンジェンシー条件下で行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 DNA ポリメラーゼが phi 29 DNA ポリメラーゼである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記反応温度が 25 ~ 35 の範囲にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記プライマーがランダムプライマーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記プライマーがチオ化されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記プライマーがヌクレオチド類似体を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記プライマーが 3' 末端ヌクレオチドと、前記 3' 末端ヌクレオチドに隣接するヌクレオチドとの間のホスホロチオエート結合を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記プライマーがヌクレオチド塩基の前にあるロックド核酸 (LNA) を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記プライマーの前記ヌクレオチド類似体が 2 - アミノ - デオキシアデノシン (2 - アミノ - dA) である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記プライマーが、プライマーダイマー形成を防ぐためのヌクレオチド類似体 2 - チオ - デオキシチミジン (2 - チオ - dT) をさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記プライマーがヘキサマーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

前記プライマーが NNNN<sup>\*</sup>N<sup>\*</sup>N の配列を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記ヘキサマーが (atN)(atN)(atN)(atN)(atN)<sup>\*</sup>N (式中、(atN) は前記ヘキサマーの 5' 末端ヌクレオチドであり、<sup>\*</sup>N は前記ヘキサマーの 3' 末端ヌクレオチドであり、「N」はデオキシアデノシン (dA)、デオキシチミジン (dC)、デオキシグアノシン (dG) またはデオキシチミジン (dT) を表し、(atN) は 2 - アミノ - dA、dC、dG および 2 - チオ - dT のランダム混合物を表し、「<sup>\*</sup>」はホスホロチオエート結合を表す) の一般構造を有する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

a) 標的核酸鋳型を用意するステップと;

b) 前記標的核酸鋳型を、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼと、デオキシリボヌクレオシド三リン酸 (dNTP) 混合物と、3' 末端および 5' 末端を有するヘキサマープライマーと、分子クラウディング試薬としてのポリエチレングリコールと、緩衝液とを

含む反応混合物と接触させるステップであって、前記緩衝液は 15 mM の前記反応混合物の塩濃度を維持するステップと；

c) 前記標的核酸鋳型を等温条件下 30 の一定温度で増幅するステップとを含む、核酸を増幅する方法であって、前記塩濃度が前記反応温度より少なくとも 10 低い前記プライマーの融解温度 ( $T_m$ ) をもたらず、方法。