

【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】令和3年2月25日(2021.2.25)

【公開番号】特開2020-182453(P2020-182453A)  
 【公開日】令和2年11月12日(2020.11.12)  
 【年通号数】公開・登録公報2020-046  
 【出願番号】特願2020-76547(P2020-76547)  
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)  
 C 1 2 N 15/10 (2006.01)  
 C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)  
 C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6806 Z  
 C 1 2 N 15/10 Z N A Z  
 C 1 2 Q 1/6869 Z  
 C 1 2 Q 1/04

【手続補正書】

【提出日】令和3年1月7日(2021.1.7)

【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】

既知の標的ヌクレオチド配列に隣接するヌクレオチド配列を決定する方法であって、

(a) 既知の標的ヌクレオチド配列を含む標的核酸分子を初期標的的特異的プライマーとハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程であって、該標的核酸分子が試料に由来するかまたは試料中に提供され、任意で、試料が生物学的試料である工程；

(b) ハイブリダイズした初期標的的特異的プライマーによってプライミングされ、テンプレートとして標的核酸分子を使用する、テンプレート依存性伸長反応を行う工程；

(c) 工程(b)の産物をテール付ランダムプライマーの集団とハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；

(d) ハイブリダイズしたテール付ランダムプライマーによってプライミングされ、ハイブリダイゼーション部位の下流にある標的核酸分子の一部をテンプレートとして使用する、テンプレート依存性伸長反応を行う工程；

(e) 第1のテールプライマーおよび第1の標的的特異的プライマーを用いて、標的核酸分子の一部およびテール付ランダムプライマー配列を増幅する工程；

(f) 第2のテールプライマーおよび第2の標的的特異的プライマーを用いて、工程(e)に起因するアンプリコンの一部を増幅する工程；

(g) 第1の配列決定プライマーおよび第2の配列決定プライマーを用いて、工程(f)からの増幅された部分を配列決定する工程

を含み、

テール付ランダムプライマーの集団が、第1の配列決定プライマーと同一の5'核酸配列および約6～約12ランダムヌクレオチドを含む3'核酸配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチド分子を含み、

第1の標的的特異的プライマーが、標的核酸の既知の標的ヌクレオチド配列と一つのアニ

ーリング温度で特異的にアニールすることができる核酸配列を含み、

第2の標的特異的プライマーが、工程(e)に起因するアンプリコンに含まれる既知の標的ヌクレオチド配列の一部と特異的にアニールすることができる核酸配列を含む3'部分、および第2の配列決定プライマーと同一の核酸配列を含む5'部分を含み、第2の標的特異的プライマーが第1の標的特異的プライマーに対して入れ子構造にあり、

第1のテールプライマーが、テール付ランダムプライマーと同一の核酸配列を含み、かつ

第2のテールプライマーが、第1の配列決定プライマーの一部と同一の核酸配列を含み、第1のテールプライマーに対して入れ子構造にある、方法。

【請求項2】

既知の標的ヌクレオチド配列に隣接するヌクレオチド配列を決定する方法であって、

(a)既知の標的ヌクレオチド配列を含む標的核酸分子をテール付ランダムプライマーの集団とハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程であって、該標的核酸分子が試料に由来するかまたは試料中に提供され、任意で、試料が生物学的試料である工程；

(b)ハイブリダイズしたテール付ランダムプライマーによってプライミングされ、ハイブリダイゼーション部位の下流にある標的核酸分子の一部をテンプレートとして使用する、テンプレート依存性伸長反応を行う工程；

(c)工程(b)の産物を初期標的特異的プライマーとハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；

(d)ハイブリダイズした初期標的特異的プライマーによってプライミングされ、テンプレートとして標的核酸分子を使用する、テンプレート依存性伸長反応を行う工程；

(e)第1のテールプライマーおよび第1の標的特異的プライマーを用いて、標的核酸分子の一部およびテール付ランダムプライマー配列を増幅する工程；

(f)第2のテールプライマーおよび第2の標的特異的プライマーを用いて、工程(e)に起因するアンプリコンの一部を増幅する工程；

(g)第1の配列決定プライマーおよび第2の配列決定プライマーを用いて、工程(f)からの増幅された部分を配列決定する工程

を含み、

テール付ランダムプライマーの集団が、第1の配列決定プライマーと同一の5'核酸配列および約6～約12ランダムヌクレオチドを含む3'核酸配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチド分子を含み、

第1の標的特異的プライマーが、標的核酸の既知の標的ヌクレオチド配列と一つのアニール温度で特異的にアニールすることができる核酸配列を含み、

第2の標的特異的プライマーが、工程(c)に起因するアンプリコンに含まれる既知の標的ヌクレオチド配列の一部と特異的にアニールすることができる核酸配列を含む3'部分、および第2の配列決定プライマーと同一の核酸配列を含む5'部分を含み、第2の標的特異的プライマーが第1の標的特異的プライマーに対して入れ子構造にあり、

第1のテールプライマーが、テール付ランダムプライマーと同一の核酸配列を含み、かつ

第2のテールプライマーが、第1の配列決定プライマーの一部と同一の核酸配列を含み、第1のテールプライマーに対して入れ子構造にある、方法。

【請求項3】

既知の標的ヌクレオチド配列に隣接するヌクレオチド配列を決定する方法であって、

(a)既知の標的ヌクレオチド配列を含む標的核酸分子をテール付ランダムプライマーの集団とハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程であって、該標的核酸分子が試料に由来するかまたは試料中に提供され、任意で、試料が生物学的試料である工程；

(b)ハイブリダイズしたテール付ランダムプライマーによってプライミングされ、ハイブリダイゼーション部位の下流にある標的核酸分子の一部をテンプレートとして使用する、テンプレート依存性伸長反応を行う工程；

(c)第1のテールプライマーおよび第1の標的特異的プライマーを用いて、標的核酸分子

の一部およびテール付ランダムプライマー配列を増幅する工程；

(d)第2のテールプライマーおよび第2の標的特異的プライマーを用いて、工程(c)に起因するアンプリコンの一部を増幅する工程；

(e)第1の配列決定プライマーおよび第2の配列決定プライマーを用いて、工程(d)からの増幅された部分を配列決定する工程を含み、

テール付ランダムプライマーの集団が、第1の配列決定プライマーと同一の5'核酸配列、中央のバーコード部分、および約6～約12ランダムヌクレオチドを含む3'核酸配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチド分子を含み、

第1の標的特異的プライマーが、一つのアニーリング温度で標的核酸の既知の標的ヌクレオチド配列と特異的にアニールすることができる核酸配列を含み、

第2の標的特異的プライマーが、工程(c)に起因するアンプリコンに含まれる既知の標的ヌクレオチド配列の一部と特異的にアニールすることができる核酸配列を含む3'部分、および第2の配列決定プライマーと同一の核酸配列を含む5'部分を含み、第2の標的特異的プライマーが第1の標的特異的プライマーに対して入れ子構造にあり、

第1のテールプライマーが、テール付ランダムプライマーと同一の核酸配列を含み、か

つ第2のテールプライマーが、第1の配列決定プライマーの一部と同一の核酸配列を含み、第1のテールプライマーに対して入れ子構造になっている、方法。

【請求項4】

テール付ランダムプライマーがヘアピンループ構造を含む、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】

テール付ランダムプライマーが、第1の配列決定プライマーと同一の5'核酸配列と、6～12ランダムヌクレオチドを含む3'核酸配列との間に6～12ランダムヌクレオチドを含むバーコード部分をさらに含む、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

それぞれのテール付ランダムプライマーが、第1の配列決定プライマーと同一の5'核酸配列と、約6～約12ランダムヌクレオチドを含む3'核酸配列との間にあるスペーサー核酸配列をさらに含む、請求項5記載の方法。

【請求項7】

ハイブリダイズしなかったプライマーが伸長工程後に反応から取り除かれる、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

第2のテールプライマーが、少なくとも3ヌクレオチド分だけ第1のテールプライマーに対して入れ子構造になっている、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

第1の標的特異的プライマーが、どのプライマーの他のどの部分とも実質的に相補的でもなく実質的に同一でもない、高GC含有量の核酸配列を含む5'タグ配列部分をさらに含む、請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

第2のテールプライマーが完全長の第1の配列決定プライマーと同一である、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項11】

遺伝子再編成が、既知の標的ヌクレオチド配列を含む、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

遺伝子再編成が、ゲノムDNA、RNA、およびcDNAからなる群より選択される核酸に存在する、請求項11記載の方法。

【請求項13】

遺伝子再編成が癌遺伝子を含む、請求項11または請求項12記載の方法。

【請求項14】

試料がゲノムDNAを含むか、または試料がRNAを含み、方法が、試料を逆転写酵素レジメンに供する第1の工程をさらに含む、請求項1~13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

テール付ランダムプライマーの集団中のそれぞれのテール付ランダムプライマーが、同一の試料バーコード部分をさらに含む、請求項1~14のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

複数の試料がそれぞれ、試料バーコード部分を有するテール付ランダムプライマーの別々の集団と接触され、テール付ランダムプライマーの集団がそれぞれ別個の試料バーコード部分を有し、試料が工程(b)後にプールされる、請求項15記載の方法。

【請求項17】

(i) 試料または試料の別々の部分を、複数のセットの第1の標的特異的プライマーおよび第2の標的特異的プライマーと接触させる工程、または(ii) 試料を含む単一の反応混合物を、複数のセットの第1の標的特異的プライマーおよび第2の標的特異的プライマーと接触させる工程を含む、請求項1~16のいずれか一項記載の方法。

【請求項18】

複数のセットの第1の標的特異的プライマーおよび第2の標的特異的プライマーが、別々の遺伝子に含まれる既知の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする、請求項17記載の方法。

【請求項19】

少なくとも2セットの第1の標的特異的プライマーおよび第2の標的特異的プライマーが、既知の標的ヌクレオチド配列を含む単一の遺伝子の異なる部分に特異的にアニールする、請求項17または請求項18記載の方法。

【請求項20】

複数種の第1の標的特異的プライマーが、同一の5'タグ配列部分を含む、請求項17~19のいずれか一項記載の方法。