

【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12月20日 (2018.12.20)

【公表番号】特表2017-533710(P2017-533710A)

【公表日】平成29年11月16日 (2017.11.16)

【年通号数】公開・登録公報2017-044

【出願番号】特願2017-524429(P2017-524429)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 M 1/34 B

【手続補正書】

【提出日】平成30年11月9日 (2018.11.9)

【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】

以下の：

a) 少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面を含む基材；

b) 少なくとも部分的に内側ウェル表面を覆い、および少なくとも一の第一キャプチャープライマー対を含む第一層；および

c) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層

が含まれ、前記第二層が備わった後、前記第一層中の前記第一キャプチャープライマーが存在し、かつアクセス可能である、マイクロアレイ。

【請求項 2】

第一層はウェルの周りの表面を覆っていない、または前記第一層は少なくとも部分的に内側ウェル表面を覆う、請求項 1 のマイクロアレイ。

【請求項 3】

少なくとも一のウェルは複数のウェルであり、必要により、前記複数のウェルは約 7 0 0 n m のピッチで間隔を置かれ、必要により、前記各ウェルの直径は約 1 0 0 n m および 4 0 0 n m の間である、請求項 1 ないし 2 のマイクロアレイ。

【請求項 4】

第一層には、重合体被覆が含まれ、必要により、前記重合体被覆には、ポリ (N - (5 - アジドアセトアミジルペンチル) アクリルアミド - c o - アクリルアミド (P A Z A M) が含まれる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のマイクロアレイ。

【請求項 5】

第二層には、重合体被覆が含まれ、必要により、前記重合体被覆には、P A Z A M またはシランフリーアクリルアミド (S F A) が含まれる、上記いずれかの請求項に記載のマイクロアレイ。

【請求項 6】

少なくとも一の第一キャプチャープライマー対は複数の第一キャプチャープライマー対である、上記いずれかの請求項に記載のマイクロアレイ。

【請求項 7】

少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる、上記いずれかの請求項に記載のマイクロアレイ。

【請求項 8】

第二層には、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対が含まれ、必要により、前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は複数の第二キャプチャープライマー対である、上記いずれかの請求項に記載のマイクロアレイ。

【請求項 9】

少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーは 3' 端にてブロックされ、必要により、前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーは 3' リン酸の末端をなし、必要により、前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対の 3' リン酸末端化プライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる、請求項 8 のマイクロアレイ。

【請求項 10】

少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーは、3' 端にてブロックされなく、必要により、前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる、請求項 8 のマイクロアレイ。

【請求項 11】

複数の第一キャプチャープライマー対の複数のキャプチャープライマー対は各々標的ポリヌクレオチドに付着され、必要により、前記複数の標的ポリヌクレオチドは、少なくとも一のウェルにおいて標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を形成し、必要により、前記少なくとも一のウェルには、複数のウェルが含まれ、およびそこでは、複数のウェルの二以上のウェルには、標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団が含まれる、請求項 6 のマイクロアレイ。

【請求項 12】

少なくとも一の第一キャプチャープライマー対は複数の第一キャプチャープライマー対であり、および少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は複数の第二キャプチャープライマー対であり、およびそこでは、複数の第一キャプチャープライマー対および複数の第二キャプチャープライマー対の複数のプライマーは、複数の標的ポリヌクレオチドに付着される、請求項 8 のマイクロアレイ。

【請求項 13】

以下の：

- a) 少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面を含む基材；および
- b) 内側ウェル表面を覆い、および少なくとも一の第一キャプチャープライマー対および少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を含む層が含まれる、マイクロアレイ。

【請求項 14】

核酸を増幅するにあたり、次の：

- a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、基材には、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および少なくとも部分的に内側ウェル表面が含まれ、そこでは、第一層は内側ウェル表面を覆い；
- b) 少なくとも一の第一キャプチャープライマー対を第一層において堆積すること；
- c) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層を基材上に生成し、前記第二層が備わった後、前記第一層中の前記第一キャプチャープライマーが存在し、かつアクセス可能であること、；
- d) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、標的ポリヌクレオチドについて少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のキャプチャープライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させること；および
- e) ウェルの内側で標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのクローナル集団を生成するために、第一の運動排除アッセイ (KEA) を実行することであり、それによって標的ポリヌクレオチドが増幅されることが含まれる、方法。

【請求項 15】

複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のキャプチャープライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させる、請求項 14 の方法。

【請求項 16】

第一 K E A はキャプチャープライマーとハイブリダイゼーションした単一標的ポリヌクレオチドから少なくとも一のウェルにおいてアンプリコンのモノクローナル集団を生成する、請求項 14 または 15 の方法。

【請求項 17】

少なくとも一のウェルは複数のウェルであり、およびそこでは、アンプリコンのモノクローナル集団が単一標的ポリヌクレオチドから複数のウェルの二以上のウェルにおいて生成される、請求項 16 の方法。

【請求項 18】

第一層はウェルの周りの表面を覆わない、請求項 14 の方法。

【請求項 19】

第一層には、重合体被覆が含まれ、必要により、前記重合体被覆には、ポリ(N-(5-アジドアセトアミジルペンチル)アクリルアミド-co-アクリルアミド(PAZAM))が含まれる、請求項 14 の方法。

【請求項 20】

第二層には、重合体被覆が含まれ、必要により、前記重合体被覆には、PAZAM または SFAが含まれ、必要により、前記重合体被覆には、PAZAM または SFAが含まれる、請求項 14 の方法。

【請求項 21】

少なくとも一の第一キャプチャープライマー対は複数の第一キャプチャープライマー対である、請求項 14 の方法。

【請求項 22】

少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を第二層において堆積することがさらに含まれ、必要により、前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は複数の第二キャプチャープライマー対である、請求項 14 の方法。

【請求項 23】

少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる、請求項 14 の方法。

【請求項 24】

少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーは 3' 端にてブロックされ、必要により、前記 3' ブロック化プライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる、請求項 22 の方法。

【請求項 25】

少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーを第一 K E A の実行後デブロック化することがさらに含まれる、請求項 24 の方法。

【請求項 26】

標的ポリヌクレオチドアンプリコンのクローナル集団を増大させるために、ブリッジ増幅または第二 K E A を実行することがさらに含まれ、必要により、前記第一キャプチャープライマー対のプライマーには、SBSがさらに含まれる、請求項 14 の方法。

【請求項 27】

少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーは 3' 端にてアンブロック化され、必要により、前記少なくとも一の第二プライマー対のプライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる、請求項 22 の方法。

【請求項 28】

少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は第一 K E A の実行後に堆積され、必要

により、前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対および前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる、請求項 22 の方法。

【請求項 29】

核酸を増幅するにあたり、次の：

a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、基材には、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面が含まれ、そこでは、第一層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；

b) 少なくとも一の第一キャプチャープライマー対を第一層において堆積することであり、そこでは、第一キャプチャープライマー対には、Illumina (R) P5 プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよび Illumina (R) P7 プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第二キャプチャープライマーが含まれ；

c) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層を基材にて生成すること；

d) 少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を第二層において堆積することであり、そこでは、第二キャプチャープライマー対は、3' リン酸の末端をなし、および Illumina (R) P5 プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよび Illumina (R) P7 プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第二キャプチャープライマーが含まれ；

e) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させることであり、そこでは、標的ポリヌクレオチドは、相補的な Illumina (R) P5' プライマーヌクレオチドシーケンスまたは相補的な Illumina (R) P7' プライマーヌクレオチドシーケンスを各々含む相補的なユニバーサルプライマー領域によって隣接され；

f) 少なくとも一のウェルの内側で単一標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクロノナル集団を生成するために、第一 KEA を実行することであり、それによって標的ポリヌクレオチドが増幅され；

g) 第二プライマー対のプライマーをデブロック化するために、基材を T4 キナーゼと接触させること；および

h) ウェルを超えて単一標的ポリヌクレオチドのアンプリコンのモノクロノナル集団を増大させるために、ブリッジ増幅または第二 KEA が実行されることが含まれる、方法。

【請求項 30】

核酸を増幅するにあたり、以下の：

a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、基材には、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面が含まれ、そこでは、第一層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；

b) 少なくとも一の第一キャプチャープライマー対を第一層において堆積することであり、そこでは、第一キャプチャープライマー対には、Illumina (R) P5 プライマーヌクレオチドシーケンスおよび Illumina (R) SBS3 プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の少なくとも一の第一キャプチャープライマーおよび Illumina (R) P7 プライマーヌクレオチドシーケンスおよび Illumina (R) SBS8 プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の少なくとも一の第二キャプチャープライマーが含まれ；

c) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層を基材にて生成すること；

d) 少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を第二層において堆積することであり、そこでは、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対には、Illumina (R) P5 プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよび Illumina (R) P7 ヌクレオチドシーケンスが含まれる

3' 部分を含む複数の第二キャプチャープライマーが含まれ；

e) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させることであり、そこでは、複数の標的ポリヌクレオチドは、相補的な *Illumina (R) SBS 3'* プライマーヌクレオチドシーケンスまたは相補的な *Illumina (R) SBS 8'* ヌクレオチドシーケンスを各々含む相補的な *SBS* によって隣接され；および

f) 少なくとも一のウェルの内側および外側で単一標的ポリヌクレオチドからアンブリコンのモノクローナル集団を生成するために、*KEA* を延長された時間の間実行することであり、それによって単一標的ポリヌクレオチドがウェルの内側で増幅され、および標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団が少なくとも一のウェルを超えて増大することが含まれる、方法。

【請求項 31】

核酸を増幅するにあたり、次の：

a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、基材には、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面、および内側ウェル表面が含まれ、そこでは、第一層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；

b) 少なくとも一の第一キャプチャープライマー対を第一層において堆積することであり、そこでは、第一プライマー対には、*Illumina (R) P5* プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよび *Illumina (R) P7* プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第二キャプチャープライマーが含まれ；

c) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層を基材にて生成すること；

d) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させることであり、そこでは、複数のポリヌクレオチドは、相補的な *Illumina (R) P5'* プライマーヌクレオチドシーケンスまたは相補的な *Illumina (R) P7'* プライマーヌクレオチドシーケンスを各々含む相補的なユニバーサルプライマー領域によって隣接され；

e) 少なくとも一のウェルの内側で単一標的ポリヌクレオチドからアンブリコンのモノクローナル集団を生成するために、第一 *KEA* を実行することであり、それによって標的ポリヌクレオチドが増幅され；

f) 少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を第二層において堆積することであり、そこでは、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対には、*Illumina (R) P5* プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよび *Illumina (R) P7* プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第二キャプチャープライマーが含まれ；および

g) 単一標的ポリヌクレオチドのアンブリコンのモノクローナル集団を増大させるために、ブリッジ増幅または第二 *KEA* を実行することが含まれる、方法。

【請求項 32】

核酸を増幅するにあたり、次の：

a) 基材にて層を生成することであり、そこでは、基材には、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面が含まれ、そこでは、ウェルは約 1 μm 以上の直径をもち、およびそこでは、層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；

b) 少なくとも一の第一キャプチャープライマー対および少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を層において堆積することであり、そこでは、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマー密度は少なくとも第二プライマー対のプライマー密度よりも高く；

c) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり第二プライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させること；

d) ウェルの内側で第二プライマーにハイブリダイゼーションした単一標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクローナル集団を生成するために、K E Aを実行することであり、それによって単一標的ポリヌクレオチドが増幅されることが含まれる、方法。

【請求項 3 3】

固定化キャプチャープライマーを修飾するにあたり、次の：

a) 複数の固定化キャプチャープライマーが含まれる基材を、一以上の固定化鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションについて十分な条件下に複数の鋳型核酸と接触させることであり、

そこでは、複数の固定化キャプチャープライマーには、5'末端ユニバーサルキャプチャー領域 Y が含まれる第一の複数のプライマーおよび 3'末端ユニバーサルキャプチャー領域 Z が含まれる第二の複数のプライマーが含まれ、および

そこでは、各鋳型核酸は、5'末端および 3'末端ユニバーサルキャプチャー領域 Y または Z によって隣接され、および一以上の制限部位および 5'末端ユニバーサルキャプチャー領域および一以上の制限部位の間、または 3'末端ユニバーサルキャプチャー領域および一以上の制限部位の間で標的的特異的キャプチャー領域を含み、および

b) 一以上の鋳型核酸に相補的な一以上の固定化伸長生成物を生成するために、一以上の固定化キャプチャープライマーを伸長することが含まれる、方法。

【請求項 3 4】

固定化キャプチャープライマーを修飾するにあたり、次の：

a) 複数の固定化キャプチャープライマーが含まれる基材を、複数の異なる固定化シード核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションについて十分な条件下に、複数の異なるシード核酸と接触させること；

b) 二以上の固定化キャプチャープライマーを、複数の異なる固定化シード核酸の二以上に相補的な複数の異なる固定化伸長生成物を生成するために、伸長させること；

c) 複数の異なる固定化伸長生成物の一の固定化伸長生成物を、活性化キャプチャープライマーを形成するために、活性化すること、および

d) 随意に、活性化キャプチャープライマーを、固定化修飾キャプチャープライマーのモノクローナルクラスターを生成するために、増幅することが含まれる、方法。