

【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 3 部門第 2 区分  
 【発行日】平成30年8月2日 (2018.8.2)

【公表番号】特表2017-520580(P2017-520580A)  
 【公表日】平成29年7月27日 (2017.7.27)  
 【年通号数】公開・登録公報2017-028  
 【出願番号】特願2016-575734(P2016-575734)  
 【国際特許分類】

C 4 0 B 50/06 (2006.01)

C 1 2 P 19/34 (2006.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

【F I】

C 4 0 B 50/06

C 1 2 P 19/34

C 4 0 B 40/06

C 1 2 Q 1/68 Z

【手続補正書】

【提出日】平成30年6月22日 (2018.6.22)

【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】

二本鎖標的核酸からシーケンシングライブラリを調製する方法であって、

(a) 複数のトランスポソームを提供するステップであって、各トランスポソームモノマーはトランスポザーゼとトランスポゾン核酸とを含み、前記トランスポソームは前記二本鎖標的核酸の一方の鎖にのみニックを入れるように構成されている、提供ステップと、

(b) 前記標的核酸をトランスポソームに接触させて、その結果、前記標的核酸の複数の部位で前記標的核酸にニックを入れ、少なくとも 1 つの前記ニック入り標的核酸の少なくとも 1 つに単一トランスポゾン核酸を付加して転移核酸を生成することによりシーケンシング用の修飾核酸ライブラリを得る接触ステップと、を含む方法。

【請求項 2】

前記方法は、バーコードを有するシーケンシングライブラリを調製する方法であって、

前記提供ステップでは、(a) 各トランスポソームはトランスポザーゼと、認識配列を含むトランスポゾン核酸とを含み、

前記接触ステップは、(b) 前記トランスポゾン核酸を前記標的核酸の鎖に挿入するステップであって、

(i) 前記標的核酸を前記トランスポソームに接触させ、その結果、複数の部位で前記標的核酸にニックを入れ、前記ニック入り鎖のニック部位の一方の側に単一トランスポゾン核酸を付加して転移核酸を生成し、

(i i) 前記ニック入り鎖のニック部位のもう一方の側に付加した前記単一トランスポゾン核酸をライゲーションすることによりシーケンシング用の修飾核酸ライブラリを得るステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

標的 DNA の近接情報を得るための方法であって、

(a) 複数のトランスポソームを提供するステップであって、各トランスポソームモノマーはトランスポザーゼとトランスポゾン核酸とを含み、前記トランスポソームは二本鎖標的核酸の一方の鎖にのみニックを入れるように構成されている、ステップと、

(b) 前記標的DNAを前記トランスポソームに接触させて、その結果、前記標的核酸の複数の部位で前記標的DNAにニックを入れるステップと、

(c) 前記標的DNA配列に1つまたは複数の認識配列を追加または挿入して処置済み標的DNAを生成するステップと、

(d) 前記処置済み標的DNAをシーケンシングするステップと、

(e) 共通の特性を有する、前記標的DNA配列または認識配列を特定することにより近接情報を得るステップと、を含む方法。

【請求項4】

標的DNAの近接情報を取得するための方法であって、

(a) 複数のトランスポソームを提供するステップであって、各トランスポソームモノマーはトランスポザーゼと、認識配列を含むトランスポゾン核酸とを含み、前記トランスポソームは二本鎖標的核酸の一方の鎖にのみニックを入れるように構成されている、ステップと、

(b) 前記トランスポゾン核酸を前記標的核酸の鎖に挿入するステップであって、

(i) 前記標的核酸を前記トランスポソームに接触させ、その結果、複数の部位で前記標的核酸にニックを入れ、前記ニック入り鎖のニック部位の一方の側に単一トランスポゾン核酸を付加し、

(ii) 前記ニック入り鎖のニック部位のもう一方の側に前記付加した単一トランスポゾン核酸をライゲーションすることにより修飾核酸を得るステップと、

(c) 前記修飾核酸を増幅することにより、挿入した認識配列を含む複数の核酸を得るステップと、

(d) 処置済み前記標的DNAをシーケンシングするステップと、

(e) 共通の特性を有する、前記標的DNA配列または認識配列を特定することにより近接情報を取得するステップと、を含む方法。

【請求項5】

前記認識配列はバーコードであり、少なくとも1つのトランスポゾン核酸の前記バーコードは異なり、

任意に前記認識配列はバーコードであり前記トランスポゾン核酸の前記バーコードは同じではない、請求項3または4に記載の方法。

【請求項6】

修飾核酸を表面上に捕捉するステップをさらに含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記表面は複数の捕捉プローブを含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記捕捉プローブは核酸を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記修飾核酸を前記捕捉プローブにハイブリダイズするステップを含み、

任意に前記修飾核酸および前記捕捉プローブはそれぞれ親和性部を含み、

任意に前記親和性部はビオチン、アビジン、およびストレプトアビジン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】

前記表面は、mm<sup>2</sup>あたり少なくともおよそ100,000の捕捉核酸を含む、請求項6～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

ステップ(b)において標的核酸に接触させたトランスポソームを表面に付加することにより前記修飾核酸を前記表面上に捕捉する、請求項1～10のいずれか一項に記載の方

法。

【請求項 1 2】

表面上の捕捉核酸をシーケンシングするステップを更に含む、請求項6～1 1のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

標的核酸配列の線形表現において2つの捕捉核酸から得た配列情報の近接度は、前記表面上の捕捉核酸の近接度を示す、請求項6～1 2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記表面上で互いの近接度がより高い捕捉核酸は、近接度のより低い捕捉核酸と比較し、前記標的核酸配列の表現における近接度がより高い配列を含む、請求項1 3に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記標的核酸配列の表現はハプロタイプ表現を含む、請求項1 3および1 4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記トランスポソームは、片側トランスポザゼ活性を含む、請求項1～1 5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記トランスポソームはトランスポザゼ活性を欠くモノマーサブユニットを含む、請求項1 6に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記トランスポソームは、共有結合的に連結したモノマーサブユニットを含む、請求項1 6に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記トランスポザゼの四次構造はモノマー状である、請求項1 6～1 8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記トランスポザゼはダイマーを形成する機能を欠く、請求項1 6に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記トランスポザゼは、Mu、Mu E 3 9 2 Q、T n 5、高活性T n 5、T n 5 多様体、V i b h a r、R A G、およびT n 5 5 2 からなる群から選択される、請求項1～2 0のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記1つまたは複数のトランスポゾン核酸は非機能的である、請求項1～2 1のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記非機能的トランスポゾン核酸の3'末端は、ジデオキシ基、スぺーサ基、アミン基、アルキル基、アリール基、ホスフェート基、チオール基、逆ヌクレオチド、アジド基、硫酸基、およびビオチン基からなる群から選択される、請求項2 2に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記複数のトランスポソームは、前記トランスポザゼを、機能的トランスポゾン核酸と非機能的トランスポゾン核酸とに接触させることにより調製する、請求項2 2に記載の方法。

【請求項 2 5】

非機能的トランスポゾン核酸を含むトランスポゾン核酸の、機能的トランスポゾン核酸に対する比率は1：1以上、例えば1 0：1以上である、請求項2 2に記載の方法。

【請求項 2 6】

( i ) 前記ニック入り標的核酸にDNAポリメラーゼを提供するステップと、

( i i ) 前記捕捉鎖を鋳型として用いて前記標的核酸の3'を伸長させるステップと、

( i i i ) 任意に前記伸長した核酸を増幅するステップと、をさらに含む、請求項3に

記載の方法。

【請求項 27】

前記伸長した核酸を増幅するステップは、アンカー部位、シーケンシングプライマー部位、増幅プライマー部位、バーコード、およびレポータータグからなる群から選択される配列を含むテイル化増幅プライマーを用いる、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

捕捉核酸を増幅するステップを含み、  
任意に前記捕捉核酸を増幅するステップはブリッジ増幅を有する、請求項 6 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

表面は複数の捕捉プローブを含み、  
任意に前記捕捉プローブは核酸を含む、請求項 6 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記トランスポゾン核酸は、アンカー部位、バーコード、シーケンシングプライマー部位、増幅プライマー部位、およびレポータータグからなる群から選択される配列を含む、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

少なくとも 1 つのトランスポソームが 2 つのトランスポゾン核酸を含み、  
任意に前記 2 つのトランスポゾン核酸は異なる配列を含む、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記複数のトランスポソームは、少なくとも 2 つの異なるトランスポゾン核酸を含む、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記複数のトランスポソームは、トランスポソームを形成する機能は有するが転移する機能は欠く、少なくとも 1 つのトランスポザーゼを含む、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記標的核酸は、ゲノム DNA、ゲノム DNA 断片、および cDNA からなる群から選択される、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記トランスポソンは第 1 バーコードセットを含み、  
前記第 1 バーコードセットを転移中に前記標的核酸に導入して、第 1 バーコードセットを含む転移標的核酸を生成し、  
前記転移標的核酸をプールして、転移標的核酸の第 1 プールを生成し、  
第 2 バーコードセットを前記転移標的核酸の第 1 プールに導入して、第 1 および第 2 のバーコードセットを含む標的核酸を生成し、  
第 1 および第 2 のバーコードセットを含む標的核酸をプールして転移標的核酸の第 2 プールを生成し、  
任意に追加バーコードを導入するステップと、プールしてバーコード化標的核酸ライブラリを生成するステップを繰り返す、  
組み合わせバーコーディングをさらに含む請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法により調製されるシーケンシングライブラリ。