

【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 4 年 11 月 10 日(2022.11.10)

【国際公開番号】WO2020/114918
 【公表番号】特表 2022-511207(P2022-511207A)
 【公表日】令和 4 年 1 月 31 日(2022.1.31)
 【年通号数】公開公報(特許)2022-017
 【出願番号】特願 2020-572458(P2020-572458)
 【国際特許分類】

10

C 1 2 N 9/16(2006.01)
 C 1 2 N 9/24(2006.01)
 C 1 2 Q 1/6806(2018.01)
 C 1 2 Q 1/6869(2018.01)
 C 1 2 Q 1/6844(2018.01)

【F I】

C 1 2 N 9/16
 C 1 2 N 9/24
 C 1 2 Q 1/6806 Z
 C 1 2 Q 1/6869 Z
 C 1 2 Q 1/6844 Z

20

【手続補正書】
 【提出日】令和 4 年 11 月 1 日(2022.11.1)
 【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】

30

【請求項 1】

以下を含む組成物：
 ウラシル DNA グリコシラーゼと、
 エンドヌクレアーゼと、
 3' - 5' - 一本鎖 DNA エキソヌクレアーゼ活性を含むエキソヌクレアーゼ。

【請求項 2】

前記エキソヌクレアーゼが、エキソヌクレアーゼ I である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記エンドヌクレアーゼが、DNA グリコシラーゼリアーゼエンドヌクレアーゼ V I I
 I である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

40

【請求項 4】

i) ウラシル切断部位を含む二本鎖 DNA 基質；および / または

i i) 脱塩基部位を含む二本鎖 DNA 基質

をさらに含み；

任意で、前記二本鎖 DNA 基質が、一本鎖領域を含み、前記ウラシル切断部位および前記
脱塩基部位が、二本鎖領域に存在する、

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

複数の増幅部位を含むアレイをさらに含み、各増幅部位が、前記増幅部位に付着した複
 数の前記二本鎖 DNA 基質を含む、請求項 4 に記載の組成物。

50

【請求項 6】

以下の工程を含む、配列決定反応のための核酸を調製する方法：

(a) 複数の増幅部位を含むアレイを用意する工程であって、前記増幅部位が、

(i) 前記増幅部位に付着した複数の捕捉核酸であって、

その第 1 集団が切断部位を含む捕捉核酸と、

(i i) 複数のクローン二本鎖修飾標的核酸であって、

各二本鎖標的核酸の両鎖がそれらの 5' 末端で捕捉核酸に付着しており、

一方の鎖が前記切断部位を含む捕捉核酸に付着しており、

前記切断部位が各二本鎖分子の二本鎖領域に位置するクローン二本鎖修飾標的核酸とを含む、工程；

10

(b) 前記切断部位に脱塩基部位を作り出すための少なくとも 1 つの酵素と、3' 5' 一本鎖 DNA エキソヌクレアーゼ活性を含むエキソヌクレアーゼとを含む組成物を前記アレイに接触させる工程であって、

切断が前記切断部位で起こり、

切断が、二本鎖標的核酸の一方の鎖を、前記増幅部位に付着している第 1 鎖と、前記増幅部位に付着していない第 2 鎖とに変え；

遊離 3' 末端を含む一本鎖捕捉核酸の長さがエキソヌクレアーゼによって短縮している、工程。

【請求項 7】

i) 前記切断部位に脱塩基部位を作り出すための少なくとも 1 つの酵素が、ウラシル DNA

20

A グリコシラーゼとエンドヌクレアーゼとを含み；および / または

i i) 前記エンドヌクレアーゼが DNA グリコシラーゼリアーゼエンドヌクレアーゼ V I

I I である、

請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記切断部位に脱塩基部位を作り出すための少なくとも 1 つの酵素と、前記エキソヌクレアーゼとを前記アレイから除去する工程をさらに含む、請求項 6 または 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記切断された二本鎖標的核酸を、前記増幅部位に付着していない第 2 鎖を除去する条件にさらす工程をさらに含む；

30

任意で、前記第 2 鎖を除去する条件が、変性剤を含み、前記変性剤が、捕捉核酸の第 2 集団に共有結合している標的核酸を含む固定化された一本鎖核酸をもたらし、前記捕捉核酸の第 2 集団が前記増幅部位に付着し、

任意で、前記変性剤が、ホルムアミドを含む、

請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記固定化された一本鎖核酸を捕捉核酸の第 1 集団のメンバーに再アニーリングし、固定化された部分的に一本鎖の核酸を生成する工程をさらに含む、請求項 8 または 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

i) 前記切断部位が、各二本鎖標的核酸の二本鎖領域の捕捉核酸領域に位置し；および / または

i i) 前記切断部位が、ウラシルを含み、前記ウラシル DNA グリコシラーゼにより脱塩基部位が生成され、前記脱塩基部位が前記エンドヌクレアーゼにより切断される、

請求項 6 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記エキソヌクレアーゼが、エキソヌクレアーゼ I である、請求項 6 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

50

請求項 9 に記載の固定化された一本鎖核酸または請求項 10 に記載の固定化された部分的に一本鎖の核酸の一本鎖領域にシーケンシングプライマーをハイブリダイズさせる工程をさらに含み、それにより配列決定反応のための一本鎖核酸を調製し；
任意で、前記方法が、配列決定反応を行い、前記固定化された一本鎖核酸または前記固定化された部分的に一本鎖の核酸の少なくとも 1 つの領域の配列を決定する工程をさらに含む、

請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記配列決定反応が、合成による配列決定を含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記捕捉核酸を増幅プライマーとして使用し、複数の標的核酸を増幅することにより前記アレイが作製され；

任意で、増幅することが、排除増幅を含む、

請求項 6 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50