

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2023年5月19日(19.05.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/085232 A1

(51) 国際特許分類:  
C12N 15/10 (2006.01) C40B 40/06 (2006.01)  
C12Q 1/6806 (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/041394

(22) 国際出願日: 2022年11月7日(07.11.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2021-183612 2021年11月10日(10.11.2021) JP

(71) 出願人: 東洋紡株式会社(Toyobo Co., Ltd.)  
[JP/JP]; 〒5300001 大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号 Osaka (JP). 国立研究開発法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).

(72) 発明者: 山越 奈々 (Yamakoshi, Nana);  
〒9148550 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡株式会社内 Fukui (JP). 武田 貴成(Takeda, Taka-aki); 〒9148550 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡株式会社内 Fukui (JP). 渡辺 聖実(Watanabe, Satomi); 〒9148550 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡株式会社内 Fukui (JP). 林 哲太郎(Hayashi, Tetsutaro); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP). 二階堂 愛(Nikaido, Itoshi); 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人三枝国際特許事務所 (SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜コニシビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: IMPROVED LIBRARY PREPARATION METHOD

(54) 発明の名称: 改良されたライブラリー調製方法

(57) Abstract: Provided is a method for efficiently preparing a library. Disclosed is a library preparation method comprising: (a) a step for synthesizing single strand cDNA from 10 pg or more of template RNA; (b) a step for synthesizing double strand cDNA from the single strand cDNA; and (c) a step for preparing a library by using the double strand cDNA without being purified.

(57) 要約: 効率的にライブラリーを調製する方法が提供される。以下の工程 (a)、(b)、及び (c) を含む、ライブラリーの調製方法が開示される: (a) 10pg以上の鋳型RNAから一本鎖cDNAを合成する工程; (b) 前記一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成する工程; 及び (c) 非精製の前記二本鎖cDNAを用いてライブラリーを調製する工程。



WO 2023/085232 A1

## 明 細 書

発明の名称：改良されたライブラリー調製方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、ライブラリー調製方法に関する。

### 背景技術

[0002] DNAやRNA等の核酸シーケンス解析の中で、短時間で膨大な塩基配列情報を得ることができる次世代シーケンシング（NGS：next-generation sequencing）技術は急速に進歩している。次世代シーケンシングは、複数個体を同時に配列決定できる高度かつ高速な処理が可能であり、臨床診断や薬剤開発等の医療技術、農業技術や基礎研究などの生命科学分野に貢献する強力な解析技術である。

[0003] 次世代シーケンシングにおいては、フローセルへの結合やプライマー結合部位等として機能し得るアダプター配列を末端に付加した核酸断片から構成されるライブラリーの調製が通常必要とされている。

[0004] RNAを鋳型としてライブラリー調製を行う場合、生成された二本鎖cDNA溶液を精製した後にライブラリー調製を行う手法が実施されている。例えばRT-RamDA法は、鋳型RNA、プライマー、DNA鎖特異的RNA：DNAハイブリッド鎖分解酵素、RNase Hマイナス型逆転写酵素、及び基質を含む混合物をインキュベートする工程により、RNAを鋳型としてcDNAを増幅させる増幅逆転写法であるが、ライブラリー化する際は一本鎖cDNAから二本鎖cDNA生成し、溶液を精製した後にライブラリー調製を開始する手法が実施されている（特許文献1、非特許文献1）。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2016/052619号

#### 非特許文献

[0006] 非特許文献1：Hayashi T. et.al., Single-cell full-length total RNA seq

uencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs, Nat. Commun., 2018

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 二本鎖cDNA溶液には細胞由来の夾雑物や逆転写反応に用いられる酵素、プライマー、dNTP、塩類等が含まれており、次工程の反応を阻害し得る。特にこれら溶液中の物質によりライブラリー調製に用いられる酵素反応が著しく阻害され得る。一方で、精製作業は煩雑であり、作業性が悪い。また精製工程があることにより、収量の減少が発生する。これらのことから精製工程を簡略化することが望ましい。本発明の主な目的は、より効率的にライブラリーを調製する方法を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0008] 本発明者等は、上記目的を達成するために鋭意検討した結果、少量の鋳型RNAであっても、生成した二本鎖cDNAを精製することなくそのままライブラリー調製に持ち込むことで十分なライブラリー収量が得られることを見出した。当該知見を基に更に検討を重ねることにより、本発明の完成に至った。

[0009] 本発明は、代表的には以下の態様を包含する。

#### [項1]

以下の工程 (a)、(b)、及び (c) を含むライブラリーの調製方法：

- (a) 10pg以上の鋳型RNAから一本鎖cDNAを合成する工程；
- (b) 前記一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成する工程；及び
- (c) 非精製の前記二本鎖cDNAを用いてライブラリーを調製する工程。

#### [項2]

前記工程 (b) が12mM以下の塩化ナトリウムの存在下で行われる、項1に記載の方法。

#### [項3]

前記工程 (a) が1ng/ $\mu$ L以上の核酸ポリマー及び／又は1U/mL以上のタンパク質分解酵素の存在下で行われる、項1又は2に記載の方法。

## [項4]

前記二本鎖cDNAを80°C以上で10分以上加熱する工程を更に含む、項1～3のいずれかに記載の方法。

## [項5]

前記核酸ポリマーが、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリグアニル酸、ポリアデニル酸、ポリチミジル酸、ポリウリジル酸、ポリデオキシイノシン酸、ポリデオキシシチジル酸、ポリデオキシグアニル酸、ポリデオキシアデニル酸、ポリデオキシチミジル酸、ポリデオキシウリジル酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種のホモポリマーである、項3又は4に記載の方法。

## [項6]

前記核酸ポリマーが、ポリイノシン酸、ポリデオキシイノシン酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種のホモポリマーである、項3～5のいずれかに記載の方法。

## [項7]

前記タンパク質分解酵素がプロテイナーゼK及びサブチリシンのいずれかを含む、項3～6のいずれかに記載の方法。

## [項8]

前記鋳型RNAが1細胞～1000細胞から抽出されたRNAである、項1～7のいずれかに記載の方法。

## [項9]

前記工程(c)の非精製の二本鎖cDNAが1 $\mu$ L以下の溶液の形態である、項1～8のいずれかに記載の方法。

## [項10]

前記工程(a)がRT-RamDA法で行われる、項1～9のいずれかに記載の方法。

## [項11]

前記工程(b)がクレノウフラグメントを用いて行われる、項1～10のいずれかに記載の方法。

## [項12]

前記工程 (c) がトランスポゾン法及びライゲーション法のいずれかで行われる、項1～11のいずれかに記載の方法。

## [項13]

前記工程 (b) が60mM以下の塩化物塩の存在下で行われる、請求項1～12のいずれかに記載の方法。

**発明の効果**

[0010] 本発明によれば、例えば非精製の二本鎖cDNAを用いて効率的にライブラリーを調製する方法が提供される。特に、10pg程度という少量の鋳型RNAからでも生成した二本鎖cDNAを精製することなく十分な収量のライブラリーを調製する方法が提供される。当該方法は、次世代シーケンシングのためのライブラリー調製に有用である。当該方法では、1 $\mu$ L以下という従来のライブラリー調製方法で用いられていた量よりも非常に少ない量の二本鎖cDNA溶液を用いても効率よくライブラリーを調製できる。従って、ライブラリー調製に必要な試薬の量を抑えることができ、コストを抑えることも可能となる。また、鋳型RNAから合成した二本鎖cDNAの溶液の量は1 $\mu$ Lよりも多くなる場合が通例であるが、1 $\mu$ L以下の二本鎖cDNA溶液をライブラリー調製に用いることにより、余剰量の二本鎖cDNA溶液を他の用途やクオリティチェックに使用可能となる。このような他の用途やクオリティチェックが行えると次の工程に進むか判断することができ、時間や労力、資材などの節約にもなるので有益である。

**図面の簡単な説明**

[0011] [図1]図1は実施例5において、MultiNA（島津製作所）にてライブラリーを測定した結果を示す図である。

**発明を実施するための形態**

[0012] 以下、本発明の実施形態を示しつつ、本発明について更に詳説する。

[0013] <ライブラリー調製方法>

一実施形態において、ライブラリーの調製方法は、以下の工程 (a)、 (b)

）、及び(c)を含むことが好ましい：

- (a) 10pg以上の鋳型RNAから一本鎖cDNAを合成する工程；
- (b) 前記一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成する工程；及び
- (c) 非精製の前記二本鎖cDNAを用いてライブラリーを調製する工程。

[0014] 1. 工程 (a)

鋳型RNAとしては、組織や細胞から抽出されたRNA（抽出されたRNAは、更に精製（例えば、エタノール沈殿、カラム精製等の当該分野で公知の任意の精製手段により処理）された精製RNAであってもよい）等の任意のRNAであり得る。鋳型RNAを抽出する細胞の種類は特に制限されず、いかなる種類の細胞であってもよい。鋳型RNA量は10pg以上であることが好ましい。鋳型RNA量の上限は特に制限されないが、10ng以下、5ng以下、1ng以下、500pg以下、又は100pg以下であることが好ましい。本発明では鋳型RNA量が少量（例えば10pg以上1ng以下）であっても得られた二本鎖cDNAから効率的にライブラリーを調製することができる。鋳型RNA量は、例えば、少数（例えば1～1000個、好ましくは1～100個、より好ましくは1～10個、より好ましくは1個）の細胞に含まれる量であってもよい。すなわち、上記の数の細胞から抽出されたRNAを鋳型RNAとして使用することもできる。なお、1細胞に含まれるRNA量は標準的には約10pg程度とも言われている。本発明によれば、少量の鋳型RNAからライブラリー調製できるので、1細胞からでも十分な収量のライブラリーを調製することが可能である。

[0015] 一実施形態において、鋳型RNAは、細胞溶解用組成物を用いて細胞を溶解して抽出したRNAであることが好ましい。

[0016] 細胞溶解用組成物は、少なくとも細胞溶解剤を含む。細胞溶解剤としては、例えば、界面活性剤、カオトロピック剤などが挙げられる。界面活性剤には、アニオン性界面活性剤（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム）、カチオン性界面活性剤（例えば、臭化セチルトリメチルアンモニウム）、ノニオン性界面活性剤（例えば、オクチルフェノールエトキシレート、ポリオキシエチレンラウリルエーテル

、ポリオキシエチレンステアリルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート)、及び両イオン性界面活性剤(例えば、3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸)が含まれる。カオトロピック剤としては、例えば、尿素、過塩素酸リチウム塩などのリチウム塩が挙げられる。細胞溶解剤は、通常、水(好ましくはヌクレアーゼフリー水)に溶解され、水溶液の形態で使用される。細胞溶解剤は1種を単独で又は2種以上を組み合わせて使用してもよい。

[0017] 細胞溶解用組成物は、追加の成分を含んでもよい。追加の成分としては、例えば、タンパク質分解酵素(例えば、プロテイナーゼKやサブチリシン)、核酸ポリマー、RNase阻害剤、これら2種以上の組合せが挙げられる。

[0018] 核酸ポリマーとしては、イノシン酸ポリマー、シチジル酸ポリマー、グアニル酸ポリマー、アデニル酸ポリマー、チミジル酸ポリマー、ウリジル酸ポリマー、デオキシイノシン酸ポリマー、デオキシシチジル酸ポリマー、デオキシグアニル酸ポリマー、デオキシアデニル酸ポリマー、デオキシチミジル酸ポリマー、及びデオキシウリジル酸ポリマーからなる群より選択される少なくとも一種が好ましい。ここで、例えば、イノシン酸ポリマーは、イノシン酸ホモポリマー(ポリイノシン酸)、イノシン酸コポリマー(例えば、イノシン酸由来の構成単位が50モル%超、60モル%以上、70モル%以上、80モル%以上、又は90モル%以上であり、100モル%未満であるコポリマー)、これらの誘導体(例えば、少なくとも一部の塩基部分に、例えば、フッ素原子、臭素原子、ヨウ素原子、アルキル基、アミノ基、メルカプト基などの官能基が導入されたもの、及び/又は、少なくとも一部のリン酸部分がチオリン酸部分に置き換わったもの)、及びこれらの塩(例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩)を包含する意味で用い、ポリイノシン酸とポリシチジル酸とがアニールしたポリ(I:C)等と呼ばれる二本鎖のポリマーも包含する意味で用いる。他のシチジル酸ポリマー等についても同様の意味で用いる。

[0019] 一実施形態において、核酸ポリマーは、イノシン酸ポリマー、シチジル酸

ポリマー、グアニル酸ポリマー、デオキシイノシン酸ポリマー、デオキシシチジル酸ポリマー、及びデオキシグアニル酸ポリマーからなる群より選択される少なくとも一種であることが好ましく、イノシン酸ポリマー及び／又はデオキシイノシン酸ポリマーであることが更に好ましい。

[0020] 一実施形態において、核酸ポリマーは、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリグアニル酸、ポリアデニル酸、ポリチミジル酸、ポリウリジル酸、ポリデオキシイノシン酸、ポリデオキシシチジル酸、ポリデオキシグアニル酸、ポリデオキシアデニル酸、ポリデオキシチミジル酸、ポリデオキシウリジル酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種のホモポリマーであることが好ましく、ポリイノシン酸、ポリデオキシイノシン酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種のホモポリマーであることが更に好ましい。

[0021] 核酸ポリマーは任意の長さであり得るが、一例として全長が30~10000塩基長である核酸ポリマーであり得る。

[0022] 工程 (a) は、タンパク質分解酵素及び／又は核酸ポリマーの存在下で行うことが好ましい。これらの成分の存在下で一本鎖cDNAを合成することによりライブラリー収量を増加させることができる。これは、細胞由来の夾雑物や逆転写反応に使用される逆転写酵素などの物質によるライブラリー調製への阻害をこれらの成分が緩和することが一因と考えられる。

[0023] タンパク質分解酵素及び／又は核酸ポリマーが鋳型RNAの調製に用いられ得る細胞溶解用組成物に含まれる場合、反応溶液には、別途タンパク質分解酵素及び／又は核酸ポリマーを添加しなくてもよい。

[0024] タンパク質分解酵素の濃度は、工程 (a) の合成反応液中において0.001mg/mL以上であることが好ましく、例えば0.001~0.1mg/mL、好ましくは0.001~0.01mg/mL、より好ましくは0.001~0.005mg/mLである。タンパク質分解酵素の濃度は、活性単位でも表わすことができ、工程 (a) の合成反応液中において、1U/mL以上であることが好ましく、例えば1U/mL~100U/mL、好ましくは1U/mL~10U/mL、より好ましくは1U/mL~5U/mLである。

[0025] タンパク質分解酵素の活性は、当該分野で一般的に用いられている定義により決定されるものである。例えば、プロテイナーゼKの活性定義は以下に記載する条件下において275nmでの光学密度が1分あたり1マイクログラムのチロシンに相当する増加を引き起こす酵素活性を1ユニット(1U)とする。なお、サブチリシン等の他のタンパク質分解酵素の活性も同様にして測定することができる。

#### [試薬]

(A)カゼイン溶液(基質溶液) :

2.0% (20.0gのハマーステンミルクカゼイン (Merck) を400mLの0.5%NaOH溶液に懸濁して溶解する。1N HClでpHを7.2に調整し、4mM CaSO<sub>4</sub> (pH 7.2) を含む500mLの20mMホウ酸緩衝液を加えて水にて1000mLにする)

(B)TCAソリューション(TCA溶液) : 20%トリクロロ酢酸 (TCA)

(C)酵素希釈液 : 2mM CaSO<sub>4</sub> (pH 8.0) を含む10mMホウ酸緩衝液

アッセイ混合物中の濃度

ホウ酸緩衝液 10 mM

カゼイン 1.0%

CaSO<sub>4</sub> 2mM

#### [手順]

1. 1.0mLの基質溶液 (A) と0.9mLの酵素希釈液 (C) を試験管にピペットで入れ、35°Cで約5分間平衡化する。

2. 測定対象サンプル 0.1mLを加えて混合する。

3. 35°Cで10分後、2.0mLのTCA溶液 (B) を加えて反応を停止する。

4. 35°Cでさらに30分間インキュベートする。

5. 14000rpmにて遠心し、上清を275nmの吸光度を測定する (OD test) 。

同時に、35°Cで10分間インキュベートした後、最初に基質溶液を2.0mLのTCA溶液 (B) と混合し、続いて測定対象サンプルを添加してブランクを調製し、同じ手順4-5をする (OD blank) 。

活性は、次の式を使用して計算する。

$$\text{Volume activity (U/mL)} = \{0D(OD \text{ test} - OD \text{ blank}) \times V_t \times df\} / \{0.0074 \times 1.0 \times t \times V_s\} = 0D \times 541 \times df$$

$$\text{Weight activity (U / mg)} = (U / \text{ml}) \times 1 / C$$

V<sub>t</sub> : 総量 (4.0mL)

V<sub>s</sub> : サンプル量 (0.1mL)

0.0074 : チロシンの吸光係数 (cm<sup>2</sup>/マイクログラム)

t : 反応時間 (10分)

df : 希釈係数

C : 溶解中の酵素濃度 (mg/mL)

上記方法にてプロメガ社のプロテイナーゼKを測定すると0.001mg/mL溶液は約1U/mL (1.2~1.4U/mL) となる。

[0026] 核酸ポリマーの濃度は、工程 (a) の合成反応液中において1ng/μL以上であることが好ましく、例えば1~10ng/μL、好ましくは1~5ng/μL、より好ましくは1~2ng/μLである。

[0027] 鋳型RNAから一本鎖cDNAを合成する反応は、特に制限されず、従来より公知の各種の方法を採用することができる。

#### [0028] 1-1. 逆転写反応

鋳型RNAから一本鎖cDNAを合成する反応の一例としては、逆転写反応が挙げられる。工程 (a) を逆転写反応で行う場合、典型的には、逆転写酵素等の逆転写活性を有するタンパク質を含む逆転写用組成物 (又は逆転写反应用溶液) をインキュベーションする工程を含む。

[0029] 逆転写用組成物は、例えば、鋳型RNA、タンパク質分解酵素及び/又は核酸ポリマー、プライマー、デオキシリボヌクレオチド、及び逆転写酵素を含む。また、逆転写用組成物は、DNAポリメラーゼ等の他の成分等も任意に含み得る。

[0030] プライマーとしては、例えば、鋳型RNAに対する特異的なプライマー、オリゴdTプライマー、ランダムプライマー、これら2種以上の組合せが挙げられる。本発明は、オリゴdTプライマー及び/又はランダムプライマーを用いる逆

転写反応を行う場合に有益であり、オリゴdTプライマー及びランダムプライマーの組合せを用いて逆転写反応を行う場合に特に有益である。オリゴdTプライマーとランダムプライマーのモル比は、例えば1:5~1:15、好ましくは1:8~1:12である。

[0031] ランダムプライマーとしては、例えば、完全ランダムプライマー、NSR (Not So Random) プライマーが挙げられる。

[0032] 完全ランダムプライマーとは、種々の塩基配列を有するプライマーの混合物であり、各塩基配列は完全にランダムな塩基配列である。完全ランダムプライマーは、rRNA配列と完全に一致する（又は完全に相補的な）配列を含み得る。完全ランダムプライマーとしては、完全ランダムペンタマー、完全ランダムヘキサマー、完全ランダムヘプタマー、完全ランダムオクタマー、これらの組合せなどが例示できる。例えば、完全ランダムヘキサマーは、4種類のヌクレオチド（A、T、C、G）で可能な全ての塩基配列（46種類）の混合物であってもよい。

[0033] NSRプライマーとは、完全ランダムプライマーから、rRNA配列と完全に相補的な配列を有するプライマーを除去したものである。除去するrRNA配列としては、例えば、18S rRNA配列、28S rRNA配列、12S rRNA配列、16S rRNA配列、これらの組合せが挙げられる。

[0034] NSRプライマーとしては、例えば、完全ランダムヘキサマーからrRNA配列と完全に相補的な配列を有するヘキサマーを除外したものが挙げられる。また、完全ランダムペンタマー、完全ランダムヘプタマー、完全ランダムオクタマーなどのプライマーセットからrRNA配列と完全に相補的な配列を有するものを除外したものをNSRプライマーとすることもできる。

[0035] プライマーの長さは、アニーリングの観点から、例えば5塩基以上、好ましくは6塩基以上であり、合成の観点から、例えば30塩基以下、好ましくは25塩基以下、より好ましくは20塩基以下である。

[0036] 逆転写用組成物において、プライマーの濃度は、特に制限されないが、例えば1~10 $\mu$ M、好ましくは2~6 $\mu$ M、より好ましくは3~5 $\mu$ Mである。

- [0037] デオキシリボヌクレオチドとしては、デオキシリボヌクレオシドトリホスフェートが好ましい。デオキシリボヌクレオチドトリホスフェートとしては、例えば、デオキシシチジントリホスフェート (dCTP)、デオキシグアノシントリホスフェート (dGTP)、デオキシアデノシントリホスフェート (dATP)、デオキシチミジントリホスフェート (dTTP)、デオキシウリジントリホスフェート (dUTP)、これらの誘導体、これら2種以上の組合せが挙げられる。これらのうち、dCTP、dGTP、dATP、及びdTTPの混合物、dCTP、dGTP、dATP、及びdUTPの混合物、dCTP、dGTP、dATP、dTTP、及びdUTPの混合物等が好ましい。
- [0038] 逆転写酵素は、逆転写活性 (RNA依存性DNAポリメラーゼ活性) を有する任意のタンパク質 (酵素) をいい、特に制限されないが、逆転写酵素活性を示すポリメラーゼが好ましい。また、逆転写酵素は、RNase H活性が低いか、又はRNase H活性がないものが好ましい。逆転写酵素の例としては、例えば、トリ骨髄芽球ウイルス (Avian Myeloblastosis Virus) 逆転写酵素 (AMV-RT)、モロニーネズミ白血病ウイルス (Moloney Murine Leukemia Virus) 逆転写酵素 (MMLV-RT)、ヒト免疫ウイルス (Human Immunovirus) 逆転写酵素 (HIV-RT)、EIRV-RT、RAV2-RT、*C. ヒドロゲノホルマン* (*C. hydrogenogormans*) DNAポリメラーゼ、rTthDNAポリメラーゼ、スーパースクリプト (SuperScript) I、スーパースクリプト (SuperScript) II、これらの変異体、及びこれらの誘導体が挙げられる。これらのうち、MMLV-RTが好ましい。
- [0039] 逆転写用組成物は、下記のDNAポリメラーゼを含んでいてもよいし、含まなくてもよい: Taq、Tbr、Tfl、Tru、Tth、Tli、Tac、Tne、Tma、Tih、Tfi、Pfu、Pwo、Kod、Bst、Sac、Sso、Poc、Pab、Mth、Pho、ES4、VENT(商標)、DEEP VENT(商標)、これらの変異体。
- [0040] 逆転写用組成物は、RNase阻害剤を含んでいてもよい。RNase阻害剤は、特に制限されず、例えば、ヒト胎盤由来、ラット肺由来、又はブタ肝臓由来のタンパク質が挙げられる。
- [0041] 逆転写用組成物は、添加剤を含んでいてもよい。添加剤としては、例えば

、緩衝剤、塩、これら2種以上の組合せが挙げられる。

[0042] 緩衝剤としては、例えば、トリス(Tris)、トリシン(Tricine)、ビスートリシン(Bis-Tricine)、ヘペス(Hepes)、モプス(Mops)、テス(Tes)、タップス(Taps)、ピペス(Pipes)、キャプス(Caps)、これら2種以上の組合せが挙げられる。緩衝剤は、通常、水（好ましくはヌクレアーゼフリー水）に溶解され、水溶液の形態で使用される。

[0043] 塩としては、例えば、塩化物（例えば、塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化マンガン）、酢酸塩（例えば、酢酸リチウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、酢酸マンガン）、硫酸塩（例えば、硫酸カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン）、これら2種以上の組合せが挙げられる。

[0044] 逆転写用組成物のインキュベーションの条件は、鋳型RNAから一本鎖cDNAが生成される限り特に制限されず、当該分野において知られている、いずれの条件も採用することができる。インキュベーションの温度は、例えば30～65℃、好ましくは35～60℃である。インキュベーションの時間は、例えば5～120分、好ましくは10～60分である。

[0045] 1-2. RNAを鋳型としてcDNAを増幅させる増幅逆転写法（RT-RamDA法とも言う）

RT-RamDA法とは、鋳型RNA、プライマー、DNA鎖特異的RNA : DNAハイブリッド鎖分解酵素、RNase Hマイナス型逆転写酵素、及び基質を含む混合物をインキュベートする工程を含む、核酸の増幅方法である。RT-RamDA法では、RNase Hマイナス型逆転写酵素のRNA依存性DNAポリメラーゼ活性により鋳型RNAの相補鎖DNA (cDNA) を合成し、RNAとcDNAとのハイブリッド鎖のうちのcDNA鎖をDNA鎖特異的RNA : DNAハイブリッド鎖分解酵素により無作為に切断し、前記の切断部位が起点となり、RNase Hマイナス型逆転写酵素の鎖置換活性により3'側のcDNA鎖がRNAから剥がされ、RNase Hマイナス型逆転写酵素により剥がされた部分に新たなcDNA鎖が合成される。RT-RamDA法の詳細については、米国特許出願公開公報2017/0275685（参照することによりその全体が本明細書

に組み込まれる)等に記載されている。

[0046] 工程 (a) をRT-RamDA法で行う場合、DNA鎖特異的RNA : DNAハイブリッド鎖分解酵素を含む前記逆転写用組成物をインキュベーションする工程を含む。DNA鎖特異的RNA : DNAハイブリッド鎖分解酵素は、RNAとDNAとのハイブリッド鎖中のDNA鎖を切断する活性を有する酵素であることが好ましい。当該酵素としては、例えば、二本鎖特異的DNA分解酵素、非特異的DNA分解酵素を使用することができる。本発明ではこれらのうち、非特異的DNA分解酵素が好ましい。

[0047] 二本鎖特異的DNA分解酵素 (二本鎖特異的ヌクレアーゼ ; DSNとも言う) は、原核生物又は真核生物に由来する酵素を使用することができるが、好ましくは、甲殻類由来の二本鎖特異的DNA分解酵素又はその改変体を使用することができる。具体的な例としては、以下のものが挙げられる。

- ・ *Solenocera melantho*(ナミクダヒゲエビ)DNase
- ・ *Penaeus japonicus*(クルマエビ)DNase
- ・ *Paralithodes camtschaticus*(タラバガニ)DSN
- ・ *Pandalus borealis*(ホッコクアカエビ)dsDNase
- ・ *Chionoecetes opilio*(ズワイガニ)DSN
- ・ その他のDSNホモログ

[0048] 二本鎖特異的DNA分解酵素は、好ましくは、60℃未満でもDNA分解活性を有する酵素である。上記の中では、エビ由来の二本鎖特異的DNA分解酵素又はその改変体が好ましい。

[0049] 二本鎖特異的DNA分解酵素としては、市販品を使用することができる。市販品としては、例えば、dsDNase(ArcticZymes社)、HI-dsDNase(ArcticZymes社)、dsDNase(Thermo scientific社)、Shrimp Dnase、Recombinant(affymetrix社)、Atlantis dsDNase(Zymo Research社)、Thermolabile Nuclease(Roche社)などを挙げるることができる。

[0050] 非特異的DNA分解酵素としては、RNAとDNAとのハイブリッド鎖のDNA鎖を切断する活性を有し、RNAとDNAとのハイブリッド鎖のRNA鎖、一本鎖RNAを切断

する活性を実質的に有さず、好ましくは、一本鎖DNAを切断する活性がRNAとDNAとのハイブリッド鎖のDNA鎖を切断する活性に比較して低くなる酵素を挙げることができる。非特異的DNA分解酵素は、好ましくは、60℃未満でもDNA分解活性を有する酵素である。このような非特異的DNA分解酵素としては、市販品を使用することもでき、例えば、DNaseI(Thermo Fisher社製、DNaseI)等を用いることが可能である。

[0051] 非特異的DNA分解酵素は、原核生物又は真核生物に由来する酵素を使用することができるが、好ましくは、ほ乳類由来の非特異的DNA分解酵素又はその改変体、より好ましくはウシ由来の非特異的DNA分解酵素又はその改変体を使用することができる。

[0052] 上記改変体とは、天然由来のアミノ酸配列を改変することによって得られる酵素を意味する。具体的には、天然由来のアミノ酸配列と80%以上（好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上）の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる酵素、並びに天然由来のアミノ酸配列において1又は数個（例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個）のアミノ酸の欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列からなる酵素である。

[0053] 工程（a）をRT-RamDA法で行う場合、前記逆転写用組成物は、一本鎖DNA結合タンパク質を含んでいてもよい。一本鎖DNA結合タンパク質は、通常、DNA鎖特異的RNA：DNAハイブリッド鎖分解酵素とともに使用される。一本鎖DNA結合タンパク質としては、例えば、T4ジーン32プロテイン、RecA、SSB(Single-Stranded DNA Binding Protein)、これら2種以上の組合せが挙げられる。

[0054] 工程（a）をRT-RamDA法で行う場合、前記逆転写用組成物のインキュベーションは、等温条件で行ってもよいし、熱サイクル条件で行ってもよい。

[0055] (1) 等温条件

インキュベーションを等温条件で行う場合、例えば25℃以上50℃未満の間の所定の温度、好ましくは30～45℃の間の所定の温度、より好ましくは35～40℃の間の所定の温度、例えば37℃で所定の時間（例えば5～180分、好ましくは10～150分）行うことができる。

25℃以上50℃未満の間の所定の温度でのインキュベーションは、2以上の段階に分けて行ってもよい。例えば25℃以上30℃未満の間の所定の温度で5～15分、次いで30℃以上35℃未満の間の所定の温度で5～15分、次いで35℃以上50℃未満の間の所定の温度で所定の時間（例えば5～60分）インキュベーションしてもよい。

25℃以上50℃未満の間の所定の温度でのインキュベーションの後、例えば50℃以上100℃未満の間の所定の温度でインキュベーションしてもよい。50℃以上100℃未満の間の所定の温度でのインキュベーションは2以上の段階に分けて行ってもよい。例えば50℃以上80℃未満の間の所定の温度で5～15分、次いで80～100℃の間の所定の温度で5～15分インキュベーションしてもよい。

[0056] (2) 熱サイクル条件

インキュベーションを熱サイクル条件で行う場合、例えば20℃以上30℃未満の間の所定の温度T1（例えば25℃）と30～45℃の間の所定の温度T2（例えば37℃）とを組み合わせ、T1で所定の時間（例えば1～3分、一例として2分）とT2で所定の時間（例えば1～3分、一例として2分）とを1サイクルとして、これを好ましくは10～40サイクル、より好ましくは15～35サイクル繰り返して行ってもよい。なお、上記の熱サイクルに先立って、例えば25℃以上30℃未満の間の所定の温度で所定の時間（例えば5～15分）、次いで30℃以上35℃未満の間の所定の温度で所定の時間（例えば5～15分）、次いで35℃以上50℃未満の間の所定の温度で所定の時間（例えば1～5分）インキュベーションしてもよい。また、上記の熱サイクルの後、例えば50℃以上80℃未満の間の所定の温度で所定の時間（例えば5～15分）、次いで80～90℃の間の所定の温度で所定の時間（例えば5～15分）インキュベーションしてもよい。

[0057] 2. 工程 (b)

工程 (b) は、塩の存在下で行うことが好ましい。塩の存在下で二本鎖cDNAを合成することによりライブラリー収量を増加させることができる。これは、プライマーの鋳型への結合が最適化されたことで生成される二本鎖cDNAが増加したことが一因と考えられる。

[0058] 塩としては、例えば、塩化物塩（例えば、塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム等のアルカリ金属塩化物塩；塩化マグネシウム等のアルカリ土類金属塩化物塩；塩化マンガン等の遷移金属塩化物塩）が挙げられる。中でも、アルカリ金属塩化物塩及び／又はアルカリ土類金属塩化物塩が好ましく、塩化マグネシウム、塩化カリウム、及び塩化ナトリウムからなる群より選択される少なくとも一種が好ましい。塩は1種を単独で又は2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0059] 塩が工程（a）の反応産物に含まれる場合、工程（b）の反応溶液に別途塩を添加しなくてもよいし、又は更に工程（b）の反応溶液に別途塩を添加してもよい。

[0060] 塩の濃度は、工程（b）の合成反応液中において、例えば60mM以下、好ましくは50mM以下、より好ましくは40mM以下である。また、塩の濃度は、工程（b）の合成反応液中において、例えば5~60mM、好ましくは5~50mM、より好ましくは5~40mMである。特定の実施形態では、工程（b）の合成反応液中における塩の濃度は、例えば20mM以下（例：5~20mM）、15mM以下（例：5~15mM）、又は12mM以下（例：5~12mM）などであってもよい。当該塩の濃度は、塩化物塩の濃度であることが好ましい。

工程（b）の合成反応液中の塩のうち、塩化ナトリウムの濃度は少ない方がよく、工程（b）の合成反応液中において、例えば20mM以下、好ましくは15mM以下、より好ましくは12mM以下である。工程（b）の合成反応液は塩化ナトリウムを含まなくてもよいし、工程（b）の合成反応液が塩化ナトリウムを含む場合、その濃度は、工程（b）の合成反応液中において、例えば5~20mM、好ましくは5~15mM、より好ましくは5~12mMである。

工程（b）の合成反応液中の塩のうち、塩化カリウムの濃度は、例えば5mM以上（例：5~50mM）、好ましくは10mM以上（例：10~40mM）、より好ましくは15mM以上（例：15~35mM）である。

工程（b）の合成反応液中の塩のうち、塩化マグネシウムの濃度は、例えば20mM以下（例：1~20mM）、好ましくは15mM以下（例：1~15mM）、より好ま

しくは10mM以下（例：1～10mM）である。

特定の実施形態では、工程（b）の合成反応液中において、塩化物塩の濃度が60mM以下（例えば50mM以下、好ましくは40mM以下）であり、且つ、塩化ナトリウムの濃度が20mM以下であることが好ましく、塩化物塩の濃度が60mM以下（例えば50mM以下、好ましくは40mM以下）であり、塩化ナトリウムの濃度が20mM以下であり、且つ、塩化カリウムの濃度が5mM以上であることがより好ましい。

- [0061] 一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成する反応は、特に制限されず、従来より公知の各種の方法を採用することができる。当該反応は、典型的には、鋳型DNA及びプライマーの存在下で5′→3′方向へのヌクレオチドの重合反応を触媒する酵素（二本鎖cDNA合成酵素）を含む二本鎖cDNA合成用組成物をインキュベーションする工程を含む。
- [0062] 二本鎖cDNA合成用組成物は、例えば、一本鎖cDNA、塩、プライマー、デオキシリボヌクレオチド、及び二本鎖cDNA合成酵素を含む。また、二本鎖合成用組成物は、緩衝剤等の他の成分等も任意に含み得る。
- [0063] 二本鎖cDNA合成酵素は、5′→3′方向へのヌクレオチドの重合反応を触媒する酵素のことをいい、特に制限されない。例えば、クレノウフラグメント、T4 DNAポリメラーゼ、これらの変異体、及びこれらの誘導体が挙げられる。これらのうち、クレノウフラグメントが好ましい。
- [0064] プライマー、デオキシリボヌクレオチド、及び緩衝剤としては、それぞれ、前記逆転写用組成物で例示したものが挙げられる。
- [0065] 二本鎖cDNA合成用組成物のインキュベーションの条件は、一本鎖cDNAから二本鎖cDNAが生成される限り特に制限されず、当該分野において知られている、いずれの条件も採用することができる。例えば10℃以上35℃未満の間の所定の温度で所定の時間（例えば5～90分）インキュベーションしてもよい。
- [0066] 一実施形態において、ライブラリーの調製方法は、前記二本鎖cDNA（例えば工程（b）の反応溶液）を加熱する工程を更に含むことが好ましい。当該工程は、工程（b）の後、次の工程（c）の前に実施することが好ましい。当該

工程は、不活化処理に相当し得る。加熱条件（不活化の条件）は特に限定されず、例えば、70℃以上（好ましくは75℃以上、更に好ましくは80℃以上）の所定の温度で所定の時間（例えば5分以上、好ましくは10分以上）インキュベーションしてもよい。加熱温度（不活化のための温度）は好ましくは80℃以上95℃以下、より好ましくは80℃以上90℃以下、更に好ましくは80℃以上85℃以下である。またインキュベーション時間は、好ましくは5分以上30分以下、より好ましくは10分以上20分以下、更に好ましくは10分以上15分以下である。このような加熱工程を行うことで、工程（c）において、アダプターダイマーの形成をより効果的に抑制できる。理論に束縛されないが、このような温度で加熱することで二本鎖cDNAの高次構造が解かれ、ライブラリー調製における酵素反応効率（例えばトランスポゾン反応）が向上することで、アダプターダイマーの形成をより効果的に抑制できると推測される。

[0067] 3. 工程（c）

ライブラリーは、次世代シーケンシングに必要な配列が付与されている核酸断片であることが好ましい。次世代シーケンシングに必要な配列としてはフローセル結合配列やシーケンシングに必要な配列を含む。

[0068] ここで、次世代シーケンシング（NGS解析、次世代シーケンサー解析等ともいう）とは、典型的には、数百万から数十億もの膨大なシーケンシング反応を同時に実施できる配列決定技術をいう。次世代シーケンシングとしては、例えば、エマルジョンPCRやブリッジPCR等の増幅技術や1分子観察等の高感度検出技術を用いて並列的に配列解析する方法が挙げられる。次世代シーケンシングを行う装置（シーケンサー）としては、特に限定されないが、例えば、MiSeq、HiSeq、NovaSeq（イルミナ社）；Genetic Analyzer V2.0、Ion Proton（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）；MinION、PromethION（ナノポア社）等が挙げられる。次世代シーケンシングについては、例えば米国特許出願公開公報2014/178438（参照することによりその全体が明細書に組み込まれる）等に記載されている。

[0069] ライブラリー調製に用いられる二本鎖cDNAは、例えば5μL以下、好ましく

は4 $\mu$ L以下、より好ましくは3 $\mu$ L以下、さらに好ましくは2 $\mu$ L以下、特に好ましくは1 $\mu$ L以下の溶液の形態である。当該二本鎖cDNAは、例えば0.01 $\mu$ L以上、0.05 $\mu$ L以上、又は0.1 $\mu$ L以上の溶液の形態である。本発明では、少量の二本鎖cDNAであっても精製することなく十分なライブラリー収量を得ることができる。

[0070] ライブラリーの調製方法は、特に制限されない。例えばトランスポゾンを用いて鋳型DNAを断片化及びタグ化し、タグ化されたDNA断片から構成されるライブラリーの核酸増幅を行うことが行われている。例えば2つのトランスポゾン末端配列（アダプターに相当）及びトランスポザゼがトランスポソーム複合体を形成し、トランスポソーム複合体は、溶液中の鋳型DNAをフラグメント化及びタグ化して、PCR等で次世代シーケンシングに必要な配列が付加されるため配列解析を行うことが可能である（これを、「トランスポゾン法」ともいう）。トランスポゾンを使用した市販のキットとしては、例えば、illumina社のNextera XT DNA Library Preparation Kitが挙げられるが、これに限定されない。

[0071] また別の手法としては鋳型DNA（例えば、全長DNA）の断片化、断片化したDNAの末端修復及び／又は断片化DNA若しくは末端修復した断片化DNAの末端のアデニル化（これを、「A付加」ともいう）、末端修復及び／又は末端アデニル化を行ったDNA断片へのアダプター配列をT4 Ligase等にてライゲーションすることで付加し、並びにアダプターを付加したDNA断片から構成されるライブラリーの核酸増幅を行うことが行われている。アダプター配列には次世代シーケンシングに必要な配列が付加されるため配列解析を行うことが可能である（これを、「ライゲーション法」ともいう）。アダプターの配列及び長さは、特に限定されず、例えば、Y字アダプター、ステムループアダプターなどでもよい。ライゲーション法を使用した市販のキットとしては、例えば、東洋紡株式会社のGenNext(R) NGS Library Prep KitやKAPA社のKAPA HyperPrep Kitが挙げられるが、これらに限定されない。

[0072] 一実施形態において、ライブラリー調製方法は、トランスポゾン法である

ことが好ましい。

[0073] 従来、ライブラリー調製を行う前に二本鎖cDNA溶液の精製を行い溶液中のプライマー、アダプター、dNTP、塩類を除去することが一般的である。ここで、「精製」とは、溶液等に含まれる前記のプライマーのような夾雑物質と、二本鎖cDNAとを分離することをいう。精製方法としては磁性ビーズを用いた方法、カラムを用いた方法、フェノール又はフェノール・クロロホルムを用いた方法、タンパク質凝集作用を用いた方法が知られている。本発明は、このような精製工程を経ない非精製の二本鎖cDNAを用いてライブラリーを調製することを特徴としている。なお、前記工程 (b) により合成された二本鎖cDNAの溶液において加熱等の方法により夾雑物質を分解等する行為は、本発明でいう精製には該当しない。本発明において、「非精製の二本鎖cDNA」とは、前記工程 (b) により合成された二本鎖cDNA (二本鎖cDNA溶液の状態の場合を含む) そのもの又は加熱したもの、前記二本鎖cDNAを水、緩衝液等の溶媒で希釈したもの、或いは前記二本鎖cDNA溶液を乾燥させて濃縮したもの等が挙げられるが、精製工程を経なければ、これらに限定されるものではない。本発明では、二本鎖cDNA溶液の精製を省略しても、十分なライブラリー収量を得ることができる。本発明では、ライブラリー濃度を増大することができる、例えば10nM以上、15nM以上、20nM以上、25nM以上、30nM以上、35nM以上、又は40nM以上にすることができる。また、本発明では、ライブラリー中のアダプターダイマーの量を低減することができる、例えば、MultiNA (島津製作所) にてライブラリーを測定したとき、100bp以上150bp未満の領域に存在するアダプターダイマー発生を示す領域のピークの強度を、ライブラリー収量を示す領域 (概ね150bp以上5000bp以下の範囲に存在する領域) の最大強度の90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、又は50%以下にすることができる。

## 実施例

[0074] 以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0075] 実施例1. 塩化ナトリウムの濃度による収量への影響

本実施例では、塩化ナトリウムの濃度によって、ライブラリー収量への影響があるか検討するため、以下の実験を行った。

RNAを希釈し、RT-RamDA法により一本鎖cDNAの合成を行い、クレノウフラグメントを用いて二本鎖cDNAを合成した。その後トランスポゾン法を使用しているNextera XT DNA Library Preparation Kit (illumina社)を用いてライブラリーを調製しMultiNA(島津製作所)にてライブラリー濃度を測定した。手順は取扱い説明書に従った。

本実施例で用いる核酸断片サンプルは、NIH3T3細胞をRNeasy Mini Kit(Qiagen社)を用いて精製したRNA 10pgを用いた。1ng/ $\mu$ LのRNAを表1に示したRNA希釈液にて希釈し10pg/ $\mu$ LのRNA溶液を調製した。

[0076] このRNA溶液1 $\mu$ Lを70°C1分30秒で熱処理を行った。その後、表2に示したRT-RamDA反応液2 $\mu$ Lを添加し、3 $\mu$ Lにて25°C10分、30°C10分、37°C30分、50°C5分、及び98°C5分でRT-RamDA反応を行った。RT-RamDA反応後、表3に示した二本鎖合成反応液2 $\mu$ Lを添加し、5 $\mu$ Lにて16°C60分で二本鎖合成し、80°C15分で加熱（不活化）を実施した。その後、表4に示した非精製プロトコルにてライブラリー調製を実施し、ライブラリー濃度をMultiNAにて測定した結果を表5に示す。

[0077] [表1]

成分	
プロテイナーゼ K (プロメガ社)	0.003mg/mL(3.6~4.2U/mL 相当)
ポリイノシン酸カリウム塩 (ng/ $\mu$ L)	3
NP-40 (%)	0.3
RNase 阻害剤 (東洋紡株式会社製、RNase Inhibitor) (U/ $\mu$ L)	0.6

[0078]

[表2]

濃度	成分
100 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM	塩化マグネシウム
50 mM	塩化カリウム
1 mM	dATP
1 mM	dTTP
1 mM	dGTP
1 mM	dCTP
0.4 $\mu$ M	オリゴ(dT)18プライマー
4 $\mu$ M	NSRプライマー (ヘキサマー)
0.375 U/ $\mu$ L	逆転写酵素 (東洋紡株式会社製、ReverTra Ace)
0.375 U/ $\mu$ L	RNase 阻害剤 (東洋紡株式会社製、RNase Inhibitor)
0.075 U/ $\mu$ L	DNase I (Thermo Fisher 社製、DNase I)
50 ng/ $\mu$ L	T4 ジーン32 プロテイン

[0079] [表3]

条件	1	2	3	4
Tris-HCl (pH 8.0) (mM)	6	6	24	24
塩化マグネシウム (mM)	6	6	24	24
ジチオトレイトール (mM)	0.6	0.6	2.4	2.4
dATP (mM)	0.15	0.15	0.6	0.6
dTTP (mM)	0.15	0.15	0.6	0.6
dGTP (mM)	0.15	0.15	0.6	0.6
dCTP (mM)	0.15	0.15	0.6	0.6
NSRプライマー (ヘキサマー) ( $\mu$ M)	20	20	20	20
クレノウフラグメント (NEB 社) (U/ $\mu$ L)	0.4	0.4	0.4	0.4
塩化ナトリウム濃度 (mM)	30	120	120	30

[0080] なお、NSRプライマー (ヘキサマー) は、Sigma社カスタムオリゴにて合成し、Ozsolak et al., Digital transcriptome profiling from attomole-level RNA samples, Genome Research, Vol. 20, 2010, pp. 519-525に記載されたプライマー組成となるように混合して用いた。

[0081]

[表4]

非精製プロトコル	
①	2本鎖合成溶液 1 $\mu$ l に TD Buffer 2.2 $\mu$ L を添加
②	Amplicon Tagment Mix (ATM) 1 $\mu$ L を添加し 55°C 10 分処理
③	Neutralize Tagment Buffer (NT) 1 $\mu$ L を添加
④	Nextera PCR Master Mix (NPM) 3 $\mu$ L、 index Primer N716 1 $\mu$ L、 及び index Primer S513 1 $\mu$ L を添加
⑤	以下のサイクルにて PCR 反応を行う。 72°C 3min 95°C 30sec 95°C 10sec } $\times 17$ 55°C 30sec } 72°C 30sec } 72°C 5min
⑥	PCR 反応溶液 10.2 $\mu$ L に対して AMPure ビーズ 10 $\mu$ L を添加
⑦	マグネットスタンドにセットし静置
⑧	80%エタノールにてビーズ洗浄
⑨	10mM Tris-HCl pH8.0 20 $\mu$ l にて溶出

TD、ATM、NT、NPM は Nextera XT DNA Library Preparation Kit (イルミナ社) に含まれている。Index Primer は Nextera XT Index Kit v2 SetD (イルミナ社) に含まれている。

[0082] [表5]

条件	1	2	3	4
二本鎖 cDNA を合成時の塩化物塩濃度 (mM)	38.4	74.4	81.6	45.6
二本鎖 cDNA を合成時の塩化ナトリウム濃度 (mM)	12	48	48	12
ライブラリー収量 (nM)	47.6	31.0	26.7	40.3

[0083] 塩化物塩の濃度が50mM以下（特に40mM以下）であって、塩化ナトリウム濃度が特に12mM以下である場合に収量が増加し、十分なライブラリー収量が得られた。

[0084] 実施例2. ポリイノシン酸カリウム塩とプロテイナーゼKの添加量による収量への影響

本実施例では、ポリイノシン酸カリウム塩とプロテイナーゼKの添加量によって、ライブラリー収量への影響があるか検討するため、以下の実験を行った。

RNAを希釈し、RT-RamDA法により一本鎖cDNAの合成を行い、クレノウフラグメントを用いて二本鎖cDNAを合成した。その後Nextera XT DNA Library Prep

aration Kit(illumina社)を用いてライブラリーを調製しMultiNA(島津製作所)にてライブラリー濃度を測定した。手順は取扱い説明書に従った。

本実施例で用いる核酸断片サンプルは、NIH3T3細胞をRNeasy Mini Kit(Qiagen社)を用いて精製したRNA10pgを用いた。1ng/ $\mu$ LのRNAを表6に示したRNA希釈液にて希釈し10pg/ $\mu$ LのRNA溶液を調製した。

このRNA溶液1 $\mu$ Lを70°C1分30秒で熱処理を行った。その後、表7に示したRT-RamDA反応液2 $\mu$ Lを添加し、3 $\mu$ Lにて25°C10分、30°C10分、37°C30分、50°C5分、及び98°C5分でRT-RamDA反応を行った。RT-RamDA反応後、表8に示した二本鎖合成反応液2 $\mu$ Lを添加し、5 $\mu$ Lにて16°C60分で二本鎖合成し、80°C15分での加熱（不活化）を実施した。その後、表9に示した非精製プロトコルにてライブラリー調製を実施し、ライブラリー濃度をMultiNAにて測定した結果を表10に示す。

[0085] [表6]

条件	1	2	3	4	5
プロテイナーゼ K (プロメガ社)	0.0015mg/ mL(1.8~ 2.1U/mL 相当)	0.003mg/ mL(3.6~ 4.2U/mL 相当)	0.006mg/ mL(7.2~ 8.4U/mL 相当)	0.003mg/ mL(3.6~ 4.2U/mL 相当)	0.003mg/ mL(3.6~ 4.2U/mL 相当)
ポリイノシン酸カリウム 塩 (ng/ $\mu$ L)	3	3	3	1.5	6
NP-40 (%)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
RNase 阻害剤 (東洋紡株 式会社製、RNase Inhibitor) (U/ $\mu$ L)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6

[0086]

[表7]

濃度	成分
100 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM	塩化マグネシウム
50 mM	塩化カリウム
1 mM	dATP
1 mM	dTTP
1 mM	dGTP
1 mM	dCTP
0.4 $\mu$ M	オリゴ(dT)18プライマー
4 $\mu$ M	NSRプライマー (ヘキサマー)
0.375 U/ $\mu$ L	逆転写酵素 (東洋紡株式会社製、ReverTra Ace)
0.375 U/ $\mu$ L	RNase 阻害剤 (東洋紡株式会社製、RNase Inhibitor)
0.075 U/ $\mu$ L	DNase I (Thermo Fisher 社製、DNase I)
50 ng/ $\mu$ L	T4 ジーン32 プロテイン

[0087] [表8]

濃度	成分
6 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
30 mM	塩化ナトリウム
6 mM	塩化マグネシウム
0.6 mM	ジチオトレイトール
0.15 mM	dATP
0.15 mM	dTTP
0.15 mM	dGTP
0.15 mM	dCTP
20 $\mu$ M	NSRプライマー (ヘキサマー)
0.4 U/ $\mu$ L	クレノウフラグメント (NEB 社)

[0088]

[表9]

非精製プロトコル
① 2本鎖合成溶液 1 $\mu$ L に TD Buffer 2.2 $\mu$ L を添加
② Amplicon Tagment Mix (ATM) 1 $\mu$ L を添加し 55°C 10分処理
③ Neutralize Tagment Buffer (NT) 1 $\mu$ L を添加
④ Nextera PCR Master Mix (NPM) 3 $\mu$ L、index Primer N716 1 $\mu$ L、及び index Primer S513 1 $\mu$ L を添加
⑤ 以下のサイクルにて PCR 反応を行う。 72°C 3min 95°C 30sec 95°C 10sec } $\times 17$ 55°C 30sec } 72°C 30sec } 72°C 5min
⑥ PCR 反応溶液 10.2 $\mu$ L に対して AMPure ビーズ 10 $\mu$ L を添加
⑦ マグネットスタンドにセットし静置
⑧ 80%エタノールにてビーズ洗浄
⑨ 10mM Tris-HCl pH8.0 20 $\mu$ L にて溶出

[0089] [表10]

条件（一本鎖 cDNA を合成する工程時）	1	2	3	4	5
プロテイナーゼ K 濃度	0.0005mg/mL (0.6~0.7 U/mL 相当)	0.001mg/mL (1.2~1.4 U/mL 相当)	0.002mg/mL (2.4~2.8 U/mL 相当)	0.001mg/mL (1.2~1.4 U/mL 相当)	0.001mg/mL (1.2~1.4 U/mL 相当)
ポリイノシン酸カリウム塩 (ng/ $\mu$ L)	1	1	1	0.5	2
ライブラリー濃度 (nM)	20.9	33.3	28.1	17.5	34.7

[0090] プロテイナーゼK濃度が約1U(1.2~1.4U)/mL(=0.001mg/mL)以上で収量が増加、またポリイノシン酸カリウム塩濃度が1ng/ $\mu$ L以上で収量が増加し十分なライブラリー収量が得られた。

[0091] 実施例3. ポリイノシン酸カリウム塩添加による非精製プロトコルによる収量改善

本実施例では、ポリイノシン酸カリウム塩の添加によって、ライブラリー収量への影響があるか検討するため、以下の実験を行った。

細胞を溶解し、RT-RamDA法により一本鎖cDNAの合成を行い、クレノウフラグメントを用いて二本鎖cDNAを合成した。その後Nextera XT DNA Library Preparation Kit(illumina社)を用いてライブラリーを調製しMultiNA(島津製作所)にてライブラリー濃度を測定した。手順は取扱い説明書に従った。

具体的には、以下の手法により行った。

実施例で用いる細胞サンプルは、以下の組成にて調製を行った。NIH3T3細胞をトリプシン溶液(ナカライテスク社)にて37°C2分反応させ、1細胞へ乖離した。解離後は直ちにPBS(-)へ置換し反応を止めた。FACS Melodyセルソーター(BD社)を用いて死細胞蛍光マーカー色素のPI陰性細胞を生細胞分画とし、この分画から120細胞を3 $\mu$ Lの以下に示す表11に示したLysis Bufferに分取した。分取後は直ちに遠心を行い、-80°Cにて保存した。RT-RamDA反応に使用する際は、融解後に117 $\mu$ LのLysis Bufferを加え、細胞溶解液1 $\mu$ Lを1細胞溶解液として用いた。

この1細胞溶解液1 $\mu$ Lを70°C1分30秒で熱処理を行った。その後、表12に示したRT-RamDA反応液2 $\mu$ Lを添加し、3 $\mu$ Lにて25°C10分、30°C10分、37°C30分、50°C5分、及び98°C5分でRT-RamDA反応を行った。RT-RamDA反応後、表13に示した2本鎖合成反応液2 $\mu$ Lを添加し、5 $\mu$ Lにて16°C60分で二本鎖合成し、80°C15分で加熱(不活化)を実施した。その後、表14に示した精製及び非精製プロトコルにてライブラリー調製を実施し、ライブラリー濃度をMultiNAにて測定した結果を表15に示す。

[0092] [表11]

10%	RealTime ready Cell Lysis Buffer (Roche 社)
0.3%	NP-40 (ThermoScientific 社)
0.6U/ $\mu$ L	RNase 阻害剤 (東洋紡株式会社製、RNase Inhibitor)
0ng/ $\mu$ L (条件 1 及び条件 2) 又は 3ng/ $\mu$ L (条件 3)	ポリイノシン酸カリウム塩 (Sigma 社製、酵素合成品)

[0093]

[表12]

濃度	成分
100 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM	塩化マグネシウム
50 mM	塩化カリウム
1 mM	dATP
1 mM	dTTP
1 mM	dGTP
1 mM	dCTP
0.4 $\mu$ M	オリゴ(dT)18プライマー
4 $\mu$ M	NSRプライマー (ヘキサマー)
0.375 U/ $\mu$ L	逆転写酵素 (東洋紡株式会社製、ReverTra Ace)
0.375 U/ $\mu$ L	RNase 阻害剤 (東洋紡株式会社製、RNase Inhibitor)
0.075 U/ $\mu$ L	DNase I (Thermo Fisher 社製、DNase I)
50 ng/ $\mu$ L	T4 ジーン32 プロテイン

[0094] [表13]

濃度	成分
6 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
30 mM	塩化ナトリウム
6 mM	塩化マグネシウム
0.6 mM	ジチオトレイトール
0.15 mM	dATP
0.15 mM	dTTP
0.15 mM	dGTP
0.15 mM	dCTP
20 $\mu$ M	NSRプライマー (ヘキサマー)
0.4 U/ $\mu$ L	クレノウフラグメント (NEB 社)

[0095]

[表14]

精製プロトコル (条件1)	非精製プロトコル (条件2 及び条件3)
①-1 2本鎖合成溶液 5 $\mu$ L に対して AMPure ビーズ (ベックマンコールター社) 15 $\mu$ L を添加	① 2本鎖合成溶液 1 $\mu$ L に TD Buffer2.2 $\mu$ l を添加
①-2 マグネットスタンドにセットし静置	
①-3 80%エタノールにてビーズ洗浄	
①-4 2/3 希釈した Tagment DNA Buffer (TD) 3 $\mu$ L にて溶出	
② Amplicon Tagment Mix (ATM) 1 $\mu$ L を添加し 55°C10分処理	
③ Neutralize Tagment Buffer (NT) 1 $\mu$ L を添加	
④ Nextera PCR Master Mix (NPM) 3 $\mu$ L、index Primer N716 1 $\mu$ L、及び index Primer S513 1 $\mu$ L を添加	
⑤ 以下のサイクルにて PCR 反応を行う。 72°C 3min 95°C 30sec 95°C 10sec } $\times 17$ 55°C 30sec } 72°C 30sec } 72°C 5min	
⑥ PCR 反応溶液 10.2 $\mu$ L に対して AMPure ビーズ 10 $\mu$ L を添加	
⑦ マグネットスタンドにセットし静置	
⑧ 80%エタノールにてビーズ洗浄	
⑨ 10mM Tris-HCl pH8.0 20 $\mu$ L にて溶出	

[0096] [表15]

条件 (一本鎖 cDNA を合成する工程時)	1	2	3
プロトコル	精製	非精製	非精製
ポリイノシン酸カリウム塩 (ng/ $\mu$ L)	0	0	1
ライブラリー濃度 (nM)	95.3	13.6	44.3

[0097] 非精製プロトコルにおいてポリイノシン酸を添加することで収量が増加し、十分なライブラリー収量が得られた。なお、条件1の精製プロトコルでは5 $\mu$ Lの二本鎖cDNAを使用しているのに対し、条件2及び3の非精製プロトコルでは、その1/5量の1 $\mu$ Lの二本鎖cDNAを使用してライブラリー調製を行っている。しかしながら、特に条件3の場合において、条件1の場合と比較して1/2程度の量までライブラリー収量が高められていた。従って、本発明により効率的なライブラリー調製が可能となることがわかった。

## [0098] 実施例4. 鋳型RNA量の評価

本実施例では、本発明によりライブラリー調製を行う際に必要となる鋳型RNA量について検討するため、以下の実験を行った。

RNAを希釈し、RT-RamDA法又は通常の逆転写方法（RT法）により一本鎖cDNAの合成を行い、クレノウフラグメントを用いて二本鎖cDNAを合成した。その後Nextera XT DNA Library Preparation Kit(illumina社)を用いてライブラリーを調製しMultiNA(島津製作所)にてライブラリー濃度を測定した。手順は取扱い説明書に従った。

本実施例で用いる核酸断片サンプルは、マウスES細胞total RNA(ユニテック株式会社)を用いた。1ng/ $\mu$ Lの前記RNAを表16に示したRNA希釈液にて希釈し10pg/ $\mu$ LのRNA溶液を調製した（RNA鋳型量10pg）。

このRNA溶液1 $\mu$ Lを70 $^{\circ}$ C1分30秒で熱処理を行った。条件1、2は表17に示したRT-RamDA反応液2 $\mu$ Lを添加し、条件3は表18に示したRT反応液2 $\mu$ Lを添加し、3 $\mu$ Lにて25 $^{\circ}$ C10分、30 $^{\circ}$ C10分、37 $^{\circ}$ C30分、50 $^{\circ}$ C5分、及び98 $^{\circ}$ C5分でRT-RamDA反応又はRT反応を行った。RT-RamDA反応またはRT反応後、表19に示した二本鎖合成反応液2 $\mu$ Lを添加し、5 $\mu$ Lにて16 $^{\circ}$ C60分で二本鎖合成し、80 $^{\circ}$ C15分で不活化を実施した。その後、表20に示した非精製プロトコルにてライブラリー調製を実施し、ライブラリー濃度をMultiNAにて測定した結果を表21に示す。

## [0099] [表16]

条件	1	2	3
プロテイナーゼ K (プロメガ社)	0	0.003mg/mL(3.6 ~4.2U/mL 相当)	0.003mg/mL(3.6 ~4.2U/mL 相当)
ポリイノシン酸カリウム塩 (ng/ $\mu$ L)	0	3	3
NP-40 (%)	0.3	0.3	0.3
R N a s e 阻害剤 (U/ $\mu$ L)	0.6	0.6	0.6

## [0100]

[表17]

濃度	成分
1 0 0 m M	T r i s - H C l ( p H 8 . 0 )
1 0 m M	塩化マグネシウム
5 0 m M	塩化カリウム
1 m M	d A T P
1 m M	d T T P
1 m M	d G T P
1 m M	d C T P
0 . 4 μ M	オリゴ(d T) 1 8 プライマー
4 μ M	N S R プライマー (ヘキサマー)
0 . 3 7 5 U / μ L	逆転写酵素 (東洋紡株式会社製、ReverTra Ace)
0 . 3 7 5 U / μ L	RNase 阻害剤 (東洋紡株式会社製、RNase Inhibitor)
0 . 0 7 5 U / μ L	DNase I (Thermo Fisher 社製、DNase I)
5 0 n g / μ L	T 4 ジーン 3 2 プロテイン

[0101] [表18]

濃度	成分
1 0 0 m M	T r i s - H C l ( p H 8 . 0 )
1 0 m M	塩化マグネシウム
5 0 m M	塩化カリウム
1 m M	d A T P
1 m M	d T T P
1 m M	d G T P
1 m M	d C T P
0 . 4 μ M	オリゴ(d T) 1 8 プライマー
4 μ M	N S R プライマー (ヘキサマー)
0 . 3 7 5 U / μ L	逆転写酵素 (東洋紡株式会社製、ReverTra Ace)
0 . 3 7 5 U / μ L	RNase 阻害剤 (東洋紡株式会社製、RNase Inhibitor)

[0102]

[表19]

濃度	成分
6 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
30 mM	塩化ナトリウム
6 mM	塩化マグネシウム
0.6 mM	ジチオトレイトール
0.15 mM	dATP
0.15 mM	dTTP
0.15 mM	dGTP
0.15 mM	dCTP
20 $\mu$ M	NSRプライマー (ヘキサマー)
0.4 U/ $\mu$ L	クレノウフラグメント (NEB社)

[0103] [表20]

非精製プロトコル	
①	2本鎖合成溶液 1 $\mu$ L に TD Buffer 2.2 $\mu$ L を添加
②	Amplicon Tagment Mix (ATM) 1 $\mu$ L を添加し 55°C 10分処理
③	Neutralize Tagment Buffer (NT) 1 $\mu$ L を添加
④	Nextera PCR Master Mix (NPM) 3 $\mu$ L、index Primer N716 1 $\mu$ L、及び index Primer S513 1 $\mu$ L を添加
⑤	以下のサイクルにて PCR 反応を行う。
72°C	3min
95°C	30sec
95°C	10sec
55°C	30sec
72°C	30sec
72°C	5min
	} $\times 17$
⑥	PCR 反応溶液 10.2 $\mu$ L に対して AMPure ビーズ 10 $\mu$ L を添加
⑦	マグネットスタンドにセットし静置
⑧	80%エタノールにてビーズ洗浄
⑨	10mM Tris-HCl pH8.0 20 $\mu$ L にて溶出

[0104] [表21]

条件(一本鎖 cDNA を合成する工程時)	1	2	3
一本鎖 cDNA 合成法	RT-RamDA 法	RT-RamDA 法	RT 法
プロテイナーゼ K 濃度	0	0.001mg/mL(1.2~1.4U/mL 相当)	0.001mg/mL(1.2~1.4U/mL 相当)
ポリイノシン酸カリウム塩 (ng/ $\mu$ L)	0	1	1
ライブラリー濃度 (nM)	27.7	54.3	9.7

[0105] 条件1及び3においてtotal RNA10pgから十分な収量が得られている。また条件1よりも条件2は収量が多くプロテイナーゼKとポリイノシン酸カリウム塩により収量が増加したと考えられる。本実施例の結果から、鋳型RNA量が少なくとも10pg以上あれば、本発明により、精製工程を経ずに十分な量のライブラリー調製が可能であることが分かった。

[0106] 実施例5. 二本鎖合成における不活化温度の比較

本実施例では、二本鎖合成後の不活化温度が収量に与える影響を確認するため、以下の実験を行った。

RNAを希釈し、RT-RamDA法により一本鎖cDNAの合成を行い、クレノウフラグメントを用いて二本鎖cDNAを合成した。その後70°C又は80°Cでの加熱による不活化を行い、続いてNextera XT DNA Library Preparation Kit(illumina社)を用いてライブラリーを調製しMultiNA(島津製作所)にてライブラリー濃度を測定した。手順は取扱い説明書に従った。

本実施例で用いる核酸断片サンプルは、マウスES細胞total RNAを用いた。1ng/ $\mu$ Lの前記RNAを表22に示したRNA希釈液にて希釈し10pg/ $\mu$ LのRNA溶液を調製した (RNA鋳型量10pg)。

このRNA溶液1 $\mu$ Lを70°C1分30秒で熱処理を行った。表23に示したRT-RamDA反応液2 $\mu$ Lを添加し、3 $\mu$ Lにて25°C10分、30°C10分、37°C30分、50°C5分、及び98°C5分でRT-RamDA反応を行った。RT-RamDA反応後、表24に示した二本鎖合成反応液2 $\mu$ Lを添加し、5 $\mu$ Lにて16°C60分で二本鎖合成し、その後70°C10分 (条件1) 又は80°C15分 (条件2) で加熱して不活化を実施した (n=2)。その後、表25に示した非精製プロトコルにてライブラリー調製を実施し、ライブラリー濃度をMultiNAにて測定した結果を表26に示す。また代表的な測定結果を図1に示す (条件1は (1) の結果、条件2は (3) の結果)。

[0107] [表22]

プロテイナーゼK (プロメガ社)	0.003mg/mL(3.6~4.2U/mL 相当)
ポリイノシン酸カリウム塩 (ng/ $\mu$ L)	3
NP-40 (%)	0.3
RNase阻害剤 (U/ $\mu$ L)	0.6

[0108] [表23]

濃度	成分
100 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM	塩化マグネシウム
50 mM	塩化カリウム
1 mM	dATP
1 mM	dTTP
1 mM	dGTP
1 mM	dCTP
0.4 $\mu$ M	オリゴ(dT)18プライマー
4 $\mu$ M	NSRプライマー (ヘキサマー)
0.375 U/ $\mu$ L	逆転写酵素 (東洋紡株式会社製、ReverTra Ace)
0.375 U/ $\mu$ L	RNase 阻害剤 (東洋紡株式会社製、RNase Inhibitor)
0.075 U/ $\mu$ L	DNase I (Thermo Fisher 社製、DNase I)
50 ng/ $\mu$ L	T4 ジーン32 プロテイン

[0109] [表24]

濃度	成分
6 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
30 mM	塩化ナトリウム
6 mM	塩化マグネシウム
0.6 mM	ジチオトレイトール
0.15 mM	dATP
0.15 mM	dTTP
0.15 mM	dGTP
0.15 mM	dCTP
20 $\mu$ M	NSRプライマー (ヘキサマー)
0.4 U/ $\mu$ L	クレノウフラグメント (NEB 社)

[0110]

[表25]

非精製プロトコル
① 2本鎖合成溶液 1 μL に TD Buffer 2.2 μL を添加
② Amplicon Tagment Mix (ATM) 1 μL を添加し 55°C 10分処理
③ Neutralize Tagment Buffer (NT) 1 μL を添加
④ Nextera PCR Master Mix (NPM) 3 μL、index Primer N716 1 μL、及び index Primer S513 1 μL を添加
⑤ 以下のサイクルにて PCR 反応を行う。 72°C 3min 95°C 30sec 95°C 10sec } ×17 55°C 30sec } 72°C 30sec } 72°C 5min
⑥ PCR 反応溶液 10.2 μL に対して AMPure ビーズ 10 μL を添加
⑦ マグネットスタンドにセットし静置
⑧ 80%エタノールにてビーズ洗浄
⑨ 10mM Tris-HCl pH8.0 20 μL にて溶出

[0111] [表26]

2本鎖合成後の不活化条件	条件1 (70°C 10分)		条件2 (80°C 15分)	
	(1)	(2)	(3)	(4)
ライブラリー濃度 (nM)	23.2	19.7	44.0	46.7

[0112] 表26及び図1の結果に示されるように、70°Cで不活化を行った条件1よりも、80°Cで不活化を行った条件2の収量が多い。また、図1に示されるように、80°Cで不活化した条件2ではアダプターダイマーの形成を示すピーク（矢印）が大幅に小さくなり、アダプターダイマーの形成が著しく抑えられた。本実施例の結果から、80°C以上の加熱処理で二本鎖合成後の不活化を行うことでダイマー発生がより効果的に抑制され、ライブラリーの収量が向上することが明らかとなった。

[0113] 実施例6. 工程(b)における塩化物の評価

本実施例では、工程(b)における塩化物の種類等について検討するため、以下の実験を行った。

RNAを希釈し、RT-RamDA法により一本鎖cDNAの合成を行い、クレノウフラグメントを用いて二本鎖cDNAを合成した。その後Nextera XT DNA Library Prep

aration Kit(illumina社)を用いてライブラリーを調製しMultiNA(島津製作所)にてライブラリー濃度を測定した。手順は取扱い説明書に従った。

本実施例で用いる核酸断片サンプルは、ヒトK562細胞からRNeasy mini kit (QIAGEN社)を用いて精製したtotal RNAを用いた。1ng/ $\mu$ Lの前記RNAを実施例1中の表1に示したRNA希釈液にて希釈し10pg/ $\mu$ LのRNA溶液を調製した (RNA 鑄型量10pg)。

このRNA溶液1 $\mu$ Lを70°C1分30秒で熱処理を行った。熱処理後、実施例1中の表2に示したRT-RamDA反応液2 $\mu$ Lを添加し、3 $\mu$ Lにて25°C10分、30°C10分、37°C30分、50°C5分、及び98°C5分でRT-RamDA反応を行った。RT-RamDA反応後、表27に示した二本鎖合成反応液2 $\mu$ Lを添加し、5 $\mu$ Lにて16°C60分で二本鎖合成し、80°C15分で不活化を実施した。その後、実施例1中の表4に示した非精製プロトコルにてライブラリー調製を実施し、ライブラリー濃度をMultiNAにて測定した結果を表28に示す。

[0114] [表27]

条件 1	条件 2
6 mM Tris-HCl (pH8.0)	6 mM Tris-HCl (pH8.0)
30 mM 塩化ナトリウム	30 mM 塩化カリウム
6 mM 塩化マグネシウム	6 mM 塩化マグネシウム
0.6 mM ジチオトレイトール	0.6 mM ジチオトレイトール
0.15 mM dATP	0.15 mM dATP
0.15 mM dTTP	0.15 mM dTTP
0.15 mM dGTP	0.15 mM dGTP
0.15 mM dCTP	0.15 mM dCTP
20 $\mu$ M NSR プライマー (ヘキサマー)	20 $\mu$ M NSR プライマー (ヘキサマー)
0.4 U/ $\mu$ L クレノウフラグメント (NEB 社)	0.4 U/ $\mu$ L クレノウフラグメント (NEB 社)

[0115] [表28]

条件	1	2
一本鎖 cDNA 合成法	RT-RamDA 法	RT-RamDA 法
二本鎖 cDNA を合成時の塩化物塩濃度 (mM)	38.4	38.4
二本鎖 cDNA を合成時の塩化ナトリウム濃度 (mM)	12	0
ライブラリー濃度 (nM)	41.3	43.2

[0116] 条件1および2において、total RNA10pgから十分な収量が得られている。また条件1と条件2では収量にほとんど差はなく、工程(b)において、塩化ナトリウムに替えて塩化カリウムを添加する場合であっても、本発明により十分な量のライブラリー調製が可能であることが分かった。

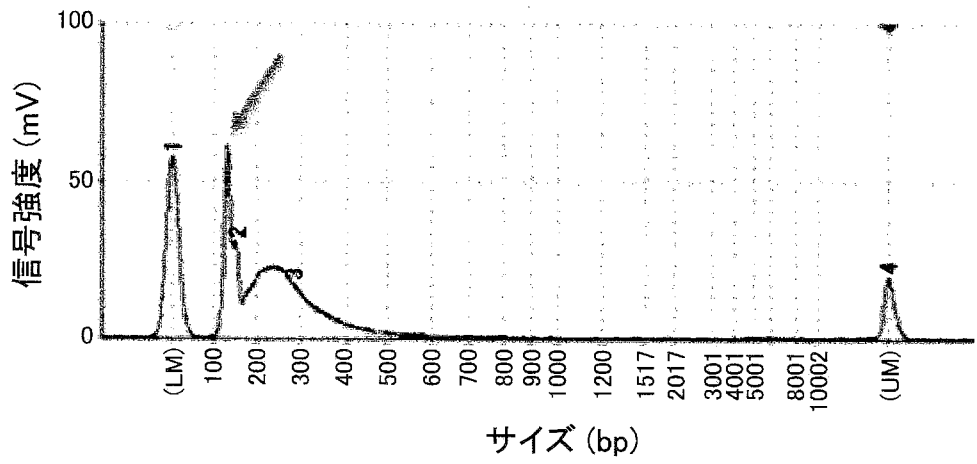
## 請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程 (a)、(b)、及び (c) を含むライブラリーの調製方法  
：  
(a) 10pg以上の鋳型RNAから一本鎖cDNAを合成する工程；  
(b) 前記一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成する工程；及び  
(c) 非精製の前記二本鎖cDNAを用いてライブラリーを調製する工程  
。
- [請求項2] 前記工程 (b) が12mM以下の塩化ナトリウムの存在下で行われる、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記工程 (a) が1ng/ $\mu$ L以上の核酸ポリマー及び／又は1U/mL以上のタンパク質分解酵素の存在下で行われる、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 前記二本鎖cDNAを80°C以上で10分以上加熱する工程を更に含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項5] 前記核酸ポリマーが、ポリイノシン酸、ポリシチジル酸、ポリグアニル酸、ポリアデニル酸、ポリチミジル酸、ポリウリジル酸、ポリデオキシイノシン酸、ポリデオキシシチジル酸、ポリデオキシグアニル酸、ポリデオキシアデニル酸、ポリデオキシチミジル酸、ポリデオキシウリジル酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種のコホモポリマーである、請求項3に記載の方法。
- [請求項6] 前記核酸ポリマーが、ポリイノシン酸、ポリデオキシイノシン酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種のコホモポリマーである、請求項3に記載の方法。
- [請求項7] 前記タンパク質分解酵素がプロテイナーゼK及びサブチリシンのいずれかを含む、請求項3に記載の方法。
- [請求項8] 前記鋳型RNAが1細胞～1000細胞から抽出されたRNAである、請求項1～7のいずれかに記載の方法。
- [請求項9] 前記工程 (c) の非精製の二本鎖cDNAが1 $\mu$ L以下の溶液の形態である、請求項1～7のいずれかに記載の方法。

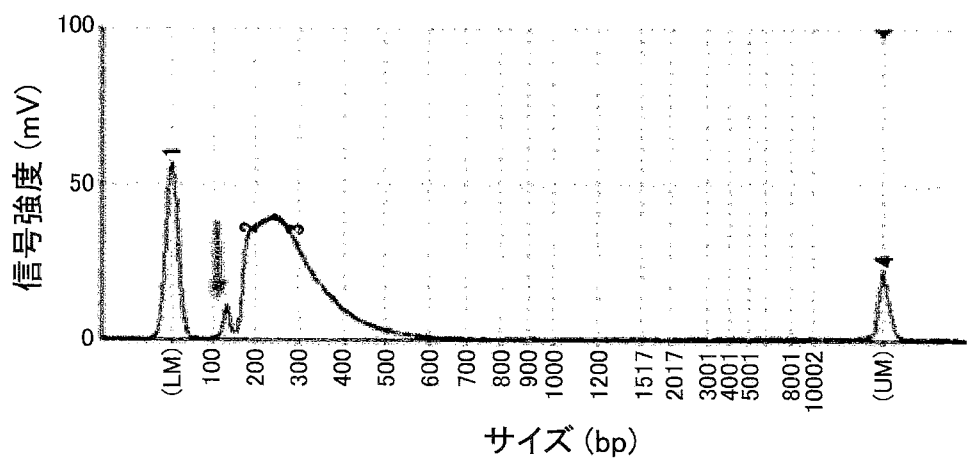
- [請求項10] 前記工程 (a) がRT-RamDA法で行われる、請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。
- [請求項11] 前記工程 (b) がクレノウフラグメントを用いて行われる、請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。
- [請求項12] 前記工程 (c) がトランスポゾン法及びライゲーション法のいずれかで行われる、請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。
- [請求項13] 前記工程 (b) が60mM以下の塩化物塩の存在下で行われる、請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。

[図 1]

条件1  
(1)



条件2  
(3)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/041394

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12N 15/10</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/6806</i> (2018.01)i; <i>C40B 40/06</i> (2006.01)i FI: C12N15/10 Z; C40B40/06; C12Q1/6806 Z		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/10; C12Q1/6806; C40B40/06		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAYASHI, T. et al. Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs. Nat. Commun. 2018, vol. 9, article number: 619, pp. 1-16 in particular, p. 2, right column, p. 12, Sequencing library preparation for C1-RamDA-seq	1-3, 5, 7, 8, 10-13
Y		1-13
Y	WO 2020/184551 A1 (TOYO BOSEKI) 17 September 2020 (2020-09-17) claims, paragraph [0028], examples	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>13 January 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>24 January 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2022/041394**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2020/184551 A1	17 September 2020	US 2022/0154180 A1 claims, paragraphs [0124]- [0130], examples	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/10(2006.01)i; C12Q 1/6806(2018.01)i; C40B 40/06(2006.01)i FI: C12N15/10 Z; C40B40/06; C12Q1/6806 Z		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12N15/10; C12Q1/6806; C40B40/06 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922 - 1996年 日本国公開実用新案公報 1971 - 2023年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2023年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2023年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	HAYASHI, T., et al., Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs, Nat. Commun., 2018, vol.9, Article number:619, p.1-16 特にp.2右欄, p.12:Sequencing library preparation for Cl-RamDA-seq	1-3, 5, 7, 8, 10-13
Y		1-13
Y	WO 2020/184551 A1 (東洋紡株式会社) 17.09.2020 (2020 - 09 - 17) 特許請求の範囲, 段落[0028], 実施例	1-13
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	13.01.2023	国際調査報告の発送日 24.01.2023
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官）  池上 文緒 4U 3765  電話番号 03-3581-1101 内線 3439	

国際調査報告  
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/041394

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2020/184551 A1	17.09.2020	US 2022/0154180 A1 特許請求の範囲, 段落 [0124]-[0130], 実施例	