

【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22年9月2日(2010.9.2)

【公表番号】特表2009-509527(P2009-509527A)
 【公表日】平成21年3月12日(2009.3.12)
 【年通号数】公開・登録公報2009-010
 【出願番号】特願2008-533267(P2008-533267)
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 15/00 F

【手続補正書】

【提出日】平成22年7月13日(2010.7.13)

【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】

変異させた集団のメンバーにおける標的配列中の変異の検出のための方法であって、

(a) 前記変異させた集団の各々のメンバーのゲノムDNAを単離して、各々の集団メンバーのDNAサンプルを提供する工程と、

(b) 工程(a)で得られた前記DNAをプールする工程と、

(c) 前記DNAプールからの1組のプライマーにより前記標的配列を増幅する工程と

、
 (d) 工程(c)の前記増幅産物をプールして増幅産物のライブラリーを作成する工程と、

(e) ハイスループットシーケンシングを使用して、前記増幅産物又は断片の前記ヌクレオチド配列を決定する工程と、

(f) 前記断片の前記配列をクラスタリング/アライメントすることによって変異を同定する工程と、

(g) 前記標的配列の修飾された機能について前記同定された変異をスクリーニングする工程と、

(h) 前記同定された変異に対してハイブリダイズするようなプライマーを設計する工程と、

(i) 工程(h)の前記プライマー、及び工程(c)の前記プライマーのうちの1つについて工程(d)の前記ライブラリーを増幅する工程と、

(j) 前記変異を保有する前記集団メンバーを同定する工程と、

を含む変異させた集団のメンバーにおける標的配列中の変異の検出のための方法。

【請求項2】

変異させた集団のメンバーにおける標的配列中の変異の検出のための方法であって、

(a) 前記変異させた集団の各々のメンバーのゲノムDNAを単離して、各々の集団メンバーのDNAサンプルを提供する工程と、

(b) 工程(a)で得られた前記DNAをプールする工程と、

(c) 前記DNAプールからの1組のプライマーにより標的配列部分を増幅すると共に、該プライマーのうち少なくとも1つに、好ましくは遺伝子特異的な部位、タグ及びシーケンスプライマー結合部位が含まれるようにする工程と、

(d) ハイスループットシーケンシングを使用して、前記増幅産物の前記ヌクレオチド配列を決定する工程と、

(e) 前記断片の前記配列をクラスタリング/アライメントさせることによって変異を同定する工程と、

(f) 前記変異を保有する前記メンバーを同定する工程と、

を含む変異させた集団のメンバーにおける標的配列中の変異の検出のための方法。

【請求項3】

前記プライマーは、標識を付けられていることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記工程(d)の前記ライブラリー中の前記増幅産物は断片化されていることを特徴とする請求項1、2、又は3に記載の方法。

【請求項5】

前記変異は、前記工程(c)のプライマーを使用して、前記工程(j)のメンバーの前記標的配列を増幅すると共に、前記増幅産物の前記配列を決定することによって確認されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記変異させた集団が、変異を誘導する化学物質、電離放射線、標的化ヌクレオチド交換又は領域標的化変異誘発から成る群から選択された1つ又は複数による前記ゲノムの処理によって得られる、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記集団が、変異していないが、天然に存在する変異を含む亜集団を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記プールする工程が、3Dプーリングストラテジーによるものである、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記ハイスループットシーケンシングが、合成、好ましくはピロシーケンシングによって実行される、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

シーケンシングは、ビーズのような固体支持体上で実施される、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記シーケンシングが、ハイスループットシーケンシング、好ましくは合成によるシーケンシング(Sequencing-by-Synthesis)に基づく、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記シーケンシングが、合成によるシーケンシング、好ましくはピロシーケンシングによって実行される、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

シーケンシングが、

(i) シーケンシングアダプターを、前記断片にライゲーションさせる工程と、

(ii) 前記アダプターライゲーションされた断片をビーズヘアニーリングさせる工程(各ビーズは、単一の断片とアニーリングする)と、

(iii) 各マイクロリアクターは、単一のビーズを含むように油中水型マイクロリアクター中で前記ビーズを乳化させる工程と、

(iv) エマルジョンPCRを実行して、前記ビーズの表面上でアダプターライゲーション

ョンされた断片を増幅させる工程と、

(v) 前記増幅されたアダプターライゲーションされた断片が付着しているビーズを選別/濃縮する工程と、

(vi) 各ウェルが単一のビーズを含むようにウェル中に前記ビーズを配置する工程と、

(vii) ピロリン酸シグナルを生成する工程と

を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項14】

工程(c)及び/又は工程(i)中の前記プライマーが、改良された結合親和性を有するヌクレオチドを含む、請求項1~13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

工程(c)において増幅される前記標的配列の部分が、約80bp~約400bpである、請求項2~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

工程(c)において増幅される前記標的配列の部分が、約90bp~約300bpである、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

工程(c)において増幅される前記標的配列の部分が、100bp~約200bpである、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

特定の遺伝子又は形質のための1つ又は複数の(標識された)プライマーを含むキット。

【請求項19】

変異特異的なプライマー又は対立遺伝子特異的プライマーをさらに含む、請求項18に記載のキット。

【請求項20】

ビーズ及び/又はシーケンシングプライマーをさらに含む、請求項18に記載のキット。