

【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3年7月29日(2021.7.29)

【公表番号】特表2020-528741(P2020-528741A)
 【公表日】令和2年10月1日(2020.10.1)
 【年通号数】公開・登録公報2020-040
 【出願番号】特願2019-570956(P2019-570956)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/11 Z

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 4 0 B 40/06

【誤訳訂正書】

【提出日】令和3年6月14日(2021.6.14)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料インデックス付きの、マルチプレックス核酸ライブラリー調製物であって、

第1の試料から調製された第1の核酸ライブラリーであって、前記第1の核酸ライブラリーが第1の複数の核酸断片を含み、前記第1の複数の核酸断片のそれぞれが、互いに全て区別可能であるインデックス配列の第1のセットから選択される少なくとも2つの異なるインデックス配列を含む、前記第1の核酸ライブラリーであって、

前記インデックス配列の第1のセットが、第1の複数の5'インデックス配列及び第1の複数の3'インデックス配列を含み、

前記第1の複数の5'インデックス配列が標的配列の5'に位置して標的配列の3'に位置せず、前記第1の複数の3'インデックス配列が標的配列の3'に位置して標的配列の5'に位置しないように、前記インデックス配列の第1のセットが、前記第1の複数の核酸断片の個々に配置され、

前記インデックス配列の第1のセットが、前記第1のセット内で、シーケンシングにおけるパフォーマンスに基づいて、一緒にグループ化されている、

前記第1の核酸ライブラリー;並びに

第2の試料から調製された第2の核酸ライブラリーであって、前記第2の核酸ライブラリーが第2の複数の核酸断片を含み、前記第2の複数の核酸断片のそれぞれが、互いに、且つ、インデックス配列の前記第1のセットと全て区別可能なインデックス配列の第2のセットから選択される少なくとも2つの異なるインデックス配列を含む、前記第2の核酸ライブラリーであって、

前記インデックス配列の第2のセットが、第2の複数の5'インデックス配列及び第2の複数の3'インデックス配列を含み、

前記第2の複数の5'インデックス配列が標的配列の5'に位置して標的配列の3'に位置せず、前記第2の複数の3'インデックス配列が標的配列の3'に位置して標的配列の5'に位置しないように、前記インデックス配列の第2のセットが、前記第2の複数の核酸断片の

個々に配置され、

前記インデックス配列の第2のセットが、前記第2のセット内で、シーケンシングにおけるパフォーマンスに基づいて、一緒にグループ化されている、

前記第2の核酸ライブラリー

を含む、

ライブラリー調製物。

【請求項2】

(i) 前記第1の複数の核酸断片が、前記第1の複数の核酸断片内の他の個々の核酸断片に対して、インデックス配列の前記第1のセットからの2つの異なるインデックス配列の異なる組合せを有する個々の核酸断片を含み、且つ/又は

(ii) 前記第2の複数の核酸断片が、前記第2の複数の核酸断片内の他の個々の核酸断片に対して、インデックス配列の前記第2のセットからの2つの異なるインデックス配列の異なる組合せを有する個々の核酸断片を含む、請求項1に記載のライブラリー調製物。

【請求項3】

インデックス配列の前記第1のセットの各インデックス配列が、前記第1の複数の核酸断片中に、インデックス配列の前記第1のセット中の他のインデックス配列に対して0.9～1.1の間の比で存在する、請求項1又は請求項2に記載のライブラリー調製物。

【請求項4】

インデックス配列の前記第2のセットの各インデックス配列が、前記第2の複数の核酸断片中に、インデックス配列の前記第2のセット中の他のインデックス配列に対して0.9～1.1の間の比で存在する、請求項1から3のいずれか一項に記載のライブラリー調製物。

【請求項5】

インデックス配列の前記第2のセットからのインデックス配列の部分が、前記第2の複数の核酸断片中の前記標的配列の5'にのみ位置し、前記標的配列の3'には位置しない、請求項1から4のいずれか一項に記載のライブラリー調製物。

【請求項6】

インデックス配列の前記第2のセットからのインデックス配列の別の部分が、前記第2の複数の核酸断片中の前記標的配列の3'にのみ位置し、前記標的配列の5'には位置しない、請求項5に記載のライブラリー調製物。

【請求項7】

前記第1の試料及び前記第2の試料が異なる個体からの核酸試料である、請求項1から6のいずれか一項に記載のライブラリー調製物。

【請求項8】

核酸分子をシーケンシングする方法であって、

試料から生成された複数のデュアルインデックス付き核酸断片を用意する工程であって、前記核酸断片の各個々の核酸断片が、5'アダプター配列、5'インデックス配列、3'アダプター配列、及び3'インデックス配列を含み、前記試料と関連付けられる5'インデックス配列の第1のセットから選択される複数の異なる5'インデックス配列及び前記試料と関連付けられる3'インデックス配列の第2のセットから選択される複数の異なる3'インデックス配列が、前記デュアルインデックス付き核酸断片中に提示され、前記複数の異なる5'インデックス配列及び前記複数の異なる3'インデックス配列が互いに区別可能である、前記用意する工程、

初期画像及び第2の画像を獲得する1チャンネルシーケンシングデバイスを用いて、前記デュアルインデックス付き核酸断片の配列を表すシーケンシングデータを生成する工程であって、前記シーケンシングデータが、検出された単一の標識と、前記初期画像及び前記第2の画像間で検出された標識の変化とに基づいたヌクレオチドの割り当てを含む、前記生成する工程、及び

前記配列のうちの個々の配列が、前記第1のセットから選択される前記5'インデックス配列及び前記第2のセットから選択される前記3'インデックス配列の両方を含む場合にのみ、前記個々の配列を前記試料と関連付ける工程

を含む、方法。

【請求項 9】

前記デュアルインデックス付き核酸断片を、固定化された捕捉分子を含むシーケンシング基板と接触させる工程を含み、前記捕捉分子が、前記核酸断片の前記5'アダプター及び前記3'アダプター配列にハイブリダイズするように構成されている、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記5'インデックス配列又は前記3'インデックス配列のうちの1つのみを含む前記シーケンシングデータ中の個々の配列を除去する工程を含む、請求項8又は請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

第2の試料からのデュアルインデックス付き核酸断片を用意する工程を含み、前記第2の試料からの前記デュアルインデックス付き核酸断片が、前記5'アダプター配列及び前記3'アダプター配列を用いて修飾されており、第2の複数の異なる5'インデックス配列及び第2の複数の異なる3'インデックス配列が、前記第2の試料からの前記デュアルインデックス付き核酸断片中に提示され、前記第2の複数の異なる5'インデックス配列及び第2の複数の異なる3'インデックス配列が、互いにも、前記複数の異なる5'インデックス配列及び前記複数の異なる3'インデックス配列とも区別可能である、請求項8から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記試料及び前記第2の試料からの前記デュアルインデックス付き核酸断片を、固定化された捕捉分子を含むシーケンシング基板と同時に接触させる工程を含み、前記捕捉分子が、前記核酸断片の前記5'アダプター及び前記3'アダプター配列にハイブリダイズするように構成されている、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

複数の核酸断片を含み、各断片が、インデックス配列及びアダプター配列を含む、複数試料ライブラリー調製キットであって、前記複数の核酸断片が、

第1の試料に関連付けられる核酸断片セットであって、前記核酸断片セットが、第1のインデックスセットから選択される前記インデックス配列を有する核酸断片であって、前記アダプター配列が第1のアダプター配列である核酸断片を含み、且つ、第2のインデックスセットから選択される前記インデックス配列を有する核酸断片であって、前記アダプター配列が第2のアダプター配列である核酸断片を含み、前記第1のインデックスセット及び前記第2のインデックスセットの各インデックス配列が、前記第1の試料に関連付けられる核酸断片セット中に提示され、

前記第1のインデックスセットが、前記第1のインデックスセット内で、シーケンシングにおけるインデックス配列のパフォーマンスに基づいて、一緒にグループ化されている

、
前記第1の試料に関連付けられる核酸断片セット、並びに

第2の試料に関連付けられる核酸断片セットであって、前記核酸断片セットが、第3のインデックスセットから選択される前記インデックス配列を有する核酸断片であって、前記アダプター配列が第1のアダプター配列である核酸断片を含み、且つ、第4のインデックスセットから選択される前記インデックス配列を有する核酸断片であって、前記アダプター配列が第2のアダプター配列である核酸断片を含み、前記第3のインデックスセット及び前記第4のインデックスセットの各インデックス配列が、前記第2の試料に関連付けられる核酸断片セット中に提示され、

前記第3のインデックスセットが、前記第3のインデックスセット内で、シーケンシングにおけるインデックス配列のパフォーマンスに基づいて、一緒にグループ化されている

、
前記第2の試料に関連付けられる核酸断片セット
を含み、

前記第1のインデックスセット、前記第2のインデックスセット、前記第3のインデックスセット、及び前記第4のインデックスセットのそれぞれが、互いに区別可能な複数のインデックス配列を含む、
複数試料ライブラリー調製キット。

【請求項 14】

前記第1のインデックスセットが、
CCATACTA、
TGTGCGCT、
CACATTGC、及び
ATCCGGAG

を含む第1の複数のユニークインデックス配列を含み、

前記第1の複数のユニークインデックス配列のそれぞれが、前記第1の試料に関連付けられる核酸断片セット中に提示される、
請求項13に記載の複数試料ライブラリー調製キット。

【請求項 15】

前記第2のインデックスセットが、
TCGCTCTA、
ATTGGAGG、
AACTAGAC、及び
CGGACTAT

を含む第2の複数のユニークインデックス配列を含み、

前記第2の複数のユニークインデックス配列のそれぞれが、前記第1の試料に関連付けられる核酸断片セット中に提示される、
請求項14に記載の複数試料ライブラリー調製キット。

【請求項 16】

前記第1のアダプター配列がp5アダプター配列であり、且つ/又は前記第2のアダプター配列がp7アダプター配列である、請求項13から15のいずれか一項に記載の複数試料ライブラリー調製キット。

【請求項 17】

前記インデックス配列が、各核酸断片において前記アダプター配列とシークエンシングプライマーとの間に位置する、請求項13から16のいずれか一項に記載の複数試料ライブラリー調製キット。

【請求項 18】

(i) 前記第1のインデックスセットが、少なくとも5塩基の長さであり、個々のユニークインデックス配列のうちの少なくとも3つが第1の塩基において異なる塩基を有するように互いに異なる第1の複数のユニークインデックス配列を含み、

(ii) 前記第1のインデックスセットが、少なくとも5塩基の長さであり、複数のユニークインデックス配列の各塩基位置において少なくとも3つの異なるヌクレオチドが前記複数のユニークインデックス配列に提示されるように互いに異なる第1の複数のユニークインデックス配列を含み、且つ/又は

(iii) 前記第1のインデックスセットが、少なくとも5塩基の長さであり、複数のユニークインデックス配列の塩基位置の大部分において少なくとも3つの異なるヌクレオチドが前記複数のユニークインデックス配列に提示されるように互いに異なる第1の複数のユニークインデックス配列を含む、

請求項13から17のいずれか一項に記載の複数試料ライブラリー調製キット。

【請求項 19】

基板上に固定化された複数の核酸捕捉配列を含み、各個々の核酸捕捉配列が、

第1のアダプター配列に相補的な第1の捕捉配列又は第2のアダプター配列に相補的な第2の捕捉配列
を含む、シークエンシング基板であって、

前記複数の核酸捕捉配列の各々の核酸捕捉配列に連結された複数の核酸断片を含み、前記複数の核酸断片の各個々の断片が、前記第1のアダプター配列及び前記第2のアダプター配列を含み、前記複数の核酸断片の各個々の断片が、ユニークインデックス配列の第1のセットの1つのインデックス配列に相補的な第1の配列及びユニークインデックス配列の第2のセットの1つのインデックス配列に相補的な第2の配列を含み、ユニークインデックス配列の前記第1のセット及びユニークインデックス配列の前記第2のセットが、前記複数の核酸断片が由来する1つの試料とのみ関連付けられ、前記第1のセット及び前記第2のセットの各ユニークインデックス配列が、前記複数の核酸断片の少なくとも1つの核酸断片中に存在する、

シーケンシング基板であって、

前記第1のセットの各ユニークインデックス配列が、前記複数の核酸断片中に、前記第1のセット中の別のユニークインデックス配列に対して0.9～1.1の間の比で存在し、

前記第1のセットのユニークインデックス配列が、前記第1のセット内で、シーケンシングにおけるパフォーマンスに基づいて、一緒にグループ化されている、
シーケンシング基板。

【請求項20】

(i) 前記複数の核酸捕捉配列が一本鎖であり、

(ii) 各ユニークインデックス配列が少なくとも6塩基の長さである、

請求項19に記載のシーケンシング基板。

【請求項21】

各々の複数の追加の試料に由来する追加の複数の核酸断片を含み、前記追加の試料の各個々の試料からの前記追加の複数の核酸断片が、ユニークインデックス配列の前記第1のセット及びユニークインデックス配列の前記第2のセットに相補的な配列を含まない、請求項19又は請求項20に記載のシーケンシング基板。

【請求項22】

核酸分子をシーケンシングする方法であって、

試料から生成された複数のデュアルインデックス付き核酸断片を用意する工程であって、前記デュアルインデックス付き核酸断片の各個々の核酸断片が、前記試料に由来する目的の配列、5'アダプター配列、5'インデックス配列、3'アダプター配列、及び3'インデックス配列を含んで、デュアルインデックス付き核酸断片を生成し、前記試料と関連付けられる5'インデックス配列の第1のセットから選択される複数の異なる5'インデックス配列及び前記試料と関連付けられる3'インデックス配列の第2のセットから選択される複数の異なる3'インデックス配列が、前記デュアルインデックス付き核酸断片中に提示され、前記複数の異なる5'インデックス配列及び前記複数の異なる3'インデックス配列が互いに区別可能である、前記用意する工程であって、

前記第1のセットの5'インデックス配列が、前記第1のセット内で、シーケンシングにおけるパフォーマンスに基づいて、一緒にグループ化され、前記第2のセットの3'インデックス配列が、前記第2のセット内で、シーケンシングにおけるパフォーマンスに基づいて、一緒にグループ化されている、前記用意する工程、

前記目的の配列を表すシーケンシングデータを生成する工程、

前記5'インデックス配列及び前記3'インデックス配列を表すシーケンシングデータを生成する工程、並びに

個々の目的の配列が前記第1のセットから選択される前記5'インデックス配列及び前記第2のセットから選択される前記3'インデックス配列の両方と関連付けられる場合にのみ、前記個々の目的の配列を前記試料に割り当てる工程を含む、方法。

【請求項23】

前記個々の目的の配列が、前記目的の配列を表す前記シーケンシングデータとの前記5'インデックス配列及び前記3'インデックス配列を表す前記シーケンシングデータの共通位置に基づいて前記第1のセットから選択される前記5'インデックス配列及び前記第2の

セットから選択される前記3'インデックス配列の両方と関連付けられる、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

別の個々の目的の配列の配列データを、前記個々の目的の配列との相補性に基づいて前記試料に割り当てる工程を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項25】

前記目的の配列を表す前記シーケンシングデータと共に前記5'インデックス配列及び前記3'インデックス配列を表す前記シーケンシングデータが、前記デュアルインデックス付き核酸断片の同じ単鎖から生成される、請求項22から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

前記5'インデックス配列及び前記3'インデックス配列を表す前記シーケンシングデータが、前記デュアルインデックス付き核酸断片の異なる単鎖から生成される、請求項22から25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

目的の配列を表すシーケンシングデータを試料に割り当てるためのコンピューター実装方法であって、

1チャンネルシーケンシングデバイスのシーケンシングデータを受け取る工程であって、

前記シーケンシングデータが、初期画像及び第2の画像を含み、且つ、試料から生成された複数のデュアルインデックス付き核酸断片の5'インデックス配列及び3'インデックス配列のヌクレオチドの割り当てを求めるために、前記シーケンシングデータが、検出された単一の標識と、前記初期画像及び第2の画像間で検出された標識の変化とに基づいたヌクレオチドの割り当てを含んでおり、

前記デュアルインデックス付き核酸断片の各個々の核酸断片が、前記試料に由来する目的の配列、5'アダプター配列、5'インデックス配列、3'アダプター配列、及び3'インデックス配列を含んで、デュアルインデックス付き核酸断片を生成し、前記試料と関連付けられる5'インデックス配列の第1のセットから選択される複数の異なる5'インデックス配列及び前記試料と関連付けられる3'インデックス配列の第2のセットから選択される複数の異なる3'インデックス配列が、前記デュアルインデックス付き核酸断片中に提示され、前記複数の異なる5'インデックス配列及び前記複数の異なる3'インデックス配列が互いに区別可能である、

前記用意する工程、並びに

前記シーケンシングデータを処理して、前記個々の目的の配列が前記第1のセットから選択される前記5'インデックス配列及び前記第2のセットから選択される前記3'インデックス配列の両方と関連付けられる場合にのみ、前記個々の目的の配列を前記試料に割り当てる工程を含む方法。

【請求項28】

前記個々の目的の配列が、前記目的の配列を表す前記シーケンシングデータとの前記5'インデックス配列及び前記3'インデックス配列を表す前記シーケンシングデータの共通位置に基づいて、前記第1のセットから選択される前記5'インデックス配列及び前記第2のセットから選択される前記3'インデックス配列の両方と関連付けられる、請求項27に記載の方法。

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0037

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0037】

更に、ある特定のインデックスは他のものと同様にはよく働かないことがあり、それにより、試料インプットの濃度が同一な場合でさえもある特定の試料が低く提示されることが結果としてもたらされる。各試料に複数のインデックス配列を置くことの利益は、1つのインデックス配列の不良な性能の全体的な影響力が限られることである。この戦略において、高い及び低いパフォーマンスのインデックス配列を一緒にグループ化して、異なる試料にわたる提示の均一性を更に向上させることも可能である。