

【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30年6月7日(2018.6.7)

【公表番号】特表2017-514478(P2017-514478A)

【公表日】平成29年6月8日(2017.6.8)

【年通号数】公開・登録公報2017-021

【出願番号】特願2016-564984(P2016-564984)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

C 1 2 P 19/34 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 4 0 B 40/06

C 1 2 P 19/34 A

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成30年4月17日(2018.4.17)

【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】

タグ付き核酸配列を形成する方法であって、

(i) 標的ポリヌクレオチドを固体支持体に固定することにより、固定化標的ポリヌクレオチドを形成するステップと；

(i i) 前記固定化標的ポリヌクレオチドに認識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより、認識オリゴヌクレオチド - 標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成するステップと；

(i i i) 前記認識オリゴヌクレオチド - 標的ポリヌクレオチドハイブリッドを切断剤で切断することにより、切断済み標的ポリヌクレオチドを含む、切断済み認識オリゴヌクレオチド - 切断済み標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成するステップと；

(i v) 前記切断済み標的ポリヌクレオチドにアダプター核酸配列をライゲーションすることにより、タグ付き核酸配列を形成するステップと；
を含む、方法。

【請求項 2】

前記ステップ (i) の固定化は、

(a) 固体支持体に R N A 分子を捕捉することにより捕捉 R N A を形成するステップと；

(b) 前記捕捉 R N A を逆転写することにより、前記固体支持体に固定された標的ポリヌクレオチドを形成するステップと；
を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記標的ポリヌクレオチドは一本鎖 c D N A である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記固体支持体はビーズ構造を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記アダプター核酸配列は第 1 増幅核酸配列相補体を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1 増幅核酸配列相補体を、PCR 増幅を可能とする条件下で前記第 1 増幅核酸配列にハイブリダイズすることにより、前記タグ付き核酸配列を増幅するステップを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ステップ (i v) のライゲーションの後、前記タグ付き核酸配列を、PCR 増幅を可能とする条件下で第 1 増幅核酸配列に接触させるステップをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

複数の不均一なタグ付きポリヌクレオチドを形成する方法であって、

(i) 複数の不均一な標的ポリヌクレオチドを固体支持体に固定することにより、複数の不均一な固定化標的ポリヌクレオチドを形成するステップと；

(i i) 前記不均一な固定化標的ポリヌクレオチドに複数の不均一な認識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより、複数の認識オリゴヌクレオチド - 標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成するステップと；

(i i i) 前記認識オリゴヌクレオチド - 標的ポリヌクレオチドハイブリッドを切断剤で切断することにより、複数の切断済み認識オリゴヌクレオチド - 切断済み標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成するステップと；

(i v) 前記複数の切断済み標的ポリヌクレオチドにアダプター核酸配列をライゲーションすることにより、複数の不均一なタグ付きポリヌクレオチドを形成するステップと；を含む、方法。

【請求項 9】

タグ付き一本鎖 cDNA を形成する方法であって、

(i) 標的 cDNA を固体支持体に固定することにより、固定化標的 cDNA を形成するステップと；

(i i) 前記固定化標的 cDNA に認識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより、認識オリゴヌクレオチド - cDNA ハイブリッドを形成するステップと；

(i i i) 前記認識オリゴヌクレオチド - cDNA ハイブリッドを切断剤で切断することにより、切断済み認識オリゴヌクレオチド - 切断済み cDNA ハイブリッドを形成するステップと；

(i v) 前記切断済み cDNA にアダプター核酸をライゲーションすることにより、タグ付き一本鎖 cDNA を形成するステップと；を含む、方法。

【請求項 10】

タグ付き核酸配列を形成する方法であって、

(i) 標的リボ核酸を固体支持体に固定することにより、固定化標的リボ核酸 (RNA) を形成するステップと；

(i i) 相補的 DNA (cDNA) を合成することにより、RNA : cDNA ハイブリッドを形成するステップと；

(i i i) 前記 RNA : cDNA ハイブリッドを RNA : cDNA 切断剤で切断して切断済み RNA : cDNA ハイブリッドを生成するステップであって、該 cDNA はライゲーション可能な末端を含む、ステップと；

(i v) 前記ライゲーション可能な末端にアダプターオリゴヌクレオチドをライゲーションするステップと；

(v) 前記リボ核酸配列を前記 RNA : cDNA ハイブリッドから取り除くことにより、タグ付き核酸配列を形成するステップと；

を含む、方法。

【請求項 1 1】

複数の不均一なタグ付き核酸配列を形成する方法であって、

(i) 複数の不均一な標的リボ核酸配列を固体支持体に固定することにより、複数の不均一な固定化標的リボ核酸配列を形成するステップと；

(i i) 前記不均一な固定化標的リボ核酸配列を逆転写することにより、複数の不均一な RNA : DNA ハイブリッドを形成するステップと；

(i i i) 前記複数の不均一な RNA : DNA ハイブリッドを RNA : DNA 切断剤で切断することにより、複数の切断済み RNA : DNA ハイブリッドを形成するステップと；

(i v) 前記複数の切断済み RNA : DNA ハイブリッドにアダプター核酸配列をライゲーションするステップと；

(v) 前記リボ核酸配列を前記切断済み RNA : DNA ハイブリッドから取り除くことにより、複数の不均一なタグ付き核酸配列を形成するステップと；

を含む、方法。

【請求項 1 2】

複数の不均一な認識オリゴヌクレオチドを含む認識オリゴヌクレオチドのライブラリであって、該不均一な認識オリゴヌクレオチドはそれぞれ、縮重核酸配列が隣接する制限酵素認識配列を含む、ライブラリ。

【請求項 1 3】

c DNA 配列を増幅する方法であって、

(i) 単離細胞から抽出した RNA 分子を固体支持体に固定することにより、固定化リボ核酸配列を形成するステップと；

(i i) 前記固定化リボ核酸配列を逆転写することにより、固定化 RNA : DNA ハイブリッドを形成するステップと；

(i i i) 前記リボ核酸配列を前記 RNA : DNA ハイブリッドから取り除くことにより、固定化 c DNA 配列を形成するステップと；

(i v) 前記固定化 c DNA 配列に認識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより、認識オリゴヌクレオチド : DNA ハイブリッドを形成するステップと；

(v) 前記認識オリゴヌクレオチド : c DNA ハイブリッドを切断剤で切断することにより、切断済み認識オリゴヌクレオチド : 切断済み c DNA ハイブリッドを形成するステップと；

(v i) 前記切断済み c DNA にアダプター核酸配列をライゲーションすることにより、タグ付き c DNA 配列を形成するステップと；

(v i i) 前記タグ付き c DNA 配列を、PCR 増幅を可能とする条件下で増幅核酸配列にハイブリダイズすることにより、c DNA 配列を増幅するステップと；

を含む、方法。

【請求項 1 4】

c DNA 配列を増幅する方法であって、

(i) 単離細胞から抽出した RNA 分子を固体支持体に固定することにより、固定化リボ核酸配列を形成するステップと；

(i i) 前記固定化リボ核酸配列を逆転写することにより、固定化 RNA : DNA ハイブリッドを形成するステップと；

(i i i) 前記 RNA : DNA ハイブリッドを RNA : DNA 切断剤で切断することにより、切断済み RNA : DNA ハイブリッドを形成するステップと；

(i v) 前記切断済み RNA : DNA ハイブリッドにアダプター核酸配列をライゲーションするステップと；

(v) 前記リボ核酸を前記切断済み RNA : DNA ハイブリッドから取り除くことにより、タグ付き c DNA 配列を形成するステップと；

(v i) 前記タグ付き c DNA 配列を、PCR 増幅を可能とする条件下で増幅核酸配列

に接触させることにより、前記 c D N A 配列を増幅するステップと；
を含む、方法。