

【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1年7月18日(2019.7.18)

【公表番号】特表2018-518968(P2018-518968A)

【公表日】平成30年7月19日(2018.7.19)

【年通号数】公開・登録公報2018-027

【出願番号】特願2017-566728(P2017-566728)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/6844 (2018.01)

C 12 Q 1/686 (2018.01)

C 12 N 15/11 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/6844 Z N A Z

C 12 Q 1/686 Z

C 12 N 15/11 Z

【手続補正書】

【提出日】令和1年6月17日(2019.6.17)

【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】

混合DNA分子の試料からの1つ又はそれ以上の標的DNA分子を富化するためのin vitro方法であって、

a) 1つ又はそれ以上の標的特異的DNA分子を含む混合DNA分子の液体試料及び少なくとも1つの前記標的DNA分子(501)の特異的検出用試薬を提供し、

b) 前記液体試料(502)からの複数の液滴の形成し、

c) 少なくとも1つの前記標的DNA分子(504)を含む液滴の特異的検出、ここで、各液滴は、平均して1つ又はそれ以上の前記標的DNA分子(504)の1つの0.5未満、好ましくは0.25未満又はより好ましくは0.1未満を含み、及び

d) 少なくとも1つの前記標的DNA分子(505)を含む液滴を物理的に選択し、

e) 工程d)から合体し選択された液滴におけるDNA分子の一般的な増幅、ここで、前記DNA分子は総量が300fg未満であり、一般的な増幅反応混合物(507)を形成するために一般的な増幅試薬を、合体し選択された液滴に加え、及び各反応混合物(508)5μl当たり少なくとも $1.2 \times 10^6$ から最大 $1.2 \times 10^9$ の液滴が形成される、工程を含む方法。

【請求項2】

混合DNA分子の試料からの1つ又はそれ以上の標的DNA分子を富化するためのin vitro方法であって、

a) 1つ又はそれ以上の標的特異的DNA分子を含む混合DNA分子の液体試料及び少なくとも1つの前記標的DNA分子(501)の特異的検出用試薬を提供し、

b) 前記液体試料(502)からの混合DNA分子をそれぞれ含む複数の液滴の形成し、

c) 少なくとも1つの前記標的DNA分子(504)を含む液滴の特異的検出、ここで、各液滴は、平均して1つ又はそれ以上の前記標的DNA分子(504)の1つの0.5未満、好ましくは0.25未満又はより好ましくは0.1未満を含み、及び

d) 少なくとも1つの前記標的DNA分子(505)を含む液滴を物理的に選択し、ここで、

工程(a)における混合DNA分子の試料におけるその頻度と比較した標的DNA分子の頻度は

、 $0.01 \times (\text{DNA分子を含む液滴の総数}) \times (\text{標的DNAを有する液滴の数})^{-1}$ と $100 \times (\text{DNA分子を含む液滴の総数}) \times (\text{標的DNAを有する液滴の数})^{-1}$ との間で増加し、

e) 工程d)から合体し選択された液滴における混合DNA分子の一般的な増幅、ここで、混合DNA分子は総量が300fg未満であり、一般的な増幅反応混合物(507)を形成するために一般的な増幅試薬を、合体し選択された液滴に加え、及び各反応混合物(508)5μl当たり少なくとも $1.2 \times 10^6$ から最大 $1.2 \times 10^9$ の液滴が形成される、工程を含む方法。

【請求項3】

工程b)における液滴の総数が少なくとも $5 \times 10^5$ である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記試薬がPCR試薬(501)であり、1つ又はそれ以上の前記標的DNA分子の特異的検出が、PCR(504)によって行われる、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項5】

前記標的DNA分子が、1つ又はそれ以上の少なくとも40ヌクレオチドの特有な連続配列を含む、請求項1~4の何れか1項に記載の方法。

【請求項6】

工程(e)におけるDNAの一般的な増幅が、多置換増幅によって行われる、請求項1~5の何れか1項に記載の方法。

【請求項7】

特異的検出のための前記試薬が、dUTPを含む、請求項1~6の何れか1項に記載の方法。

【請求項8】

工程(d)が、1つ又はそれ以上の前記標的DNA分子の特異的検出のために產生されたDNA分子を不活性化、分解又は除去する工程をさらに含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記不活性化の工程が、ウラシル-DNA N-グリコシラーゼを用いて行われる、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

工程(a)~(e)の反復工程(f)をさらに含み、ここで、前記反復工程(a)の液体試料中のDNA分子が、工程(e)で選択された合体液滴中のDNA分子から生成された一般的な増幅産物に由来する、請求項1~9の何れか1項に記載の方法。

【請求項11】

工程b)において形成された各液滴が、 $2 \sim 20 \mu\text{m}$ の平均直径を有する、請求項1~10の何れか1項に記載の方法。

【請求項12】

工程b)で形成された液滴が、液滴当たり平均して少なくとも $10^{-7}$ の標的DNA分子、好ましくは液滴当たり少なくとも $10^{-6}$ の標的DNA分子、又はさらに好ましくは液滴当たり $10^{-4} \sim 10^{-5}$ の標的分子を含む、請求項1~11の何れか1項に記載の方法。

【請求項13】

工程a)の1つ又はそれ以上の前記標的DNA分子のそれぞれが、 $1,000 \sim 10^8$ の核酸塩基対、好ましくは $2,000 \sim 200,000$ の核酸塩基対、より好ましくは $10,000 \sim 100,000$ の核酸塩基対を含む、請求項1~12の何れか1項に記載の方法。

【請求項14】

工程e)において生成される一般的な増幅産物が、より増幅された標的DNA分子の1つを含み、増幅された標的DNA分子のそれぞれは、 $500 \sim 150,000$ 核酸塩基対、好ましくは $2,000 \sim 80,000$ 核酸塩基対、より好ましくは $5,000 \sim 50,000$ 核酸塩基対を含む、請求項1~13の何れか1項に記載の方法。

【請求項15】

前記標的DNA分子が、細胞のゲノムに由来する、請求項1~14の何れか1項に記載の方法。