

【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 26 日 (2021.7.26)

【公表番号】特表 2020-525046 (P2020-525046A)

【公表日】令和 2 年 8 月 27 日 (2020.8.27)

【年通号数】公開・登録公報 2020-034

【出願番号】特願 2020-520434 (P2020-520434)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6809 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/31 (2006.01)

C 1 2 Q 1/34 (2006.01)

C 1 2 Q 1/37 (2006.01)

C 1 2 Q 1/686 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6874 (2018.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6809 Z

C 1 2 Q 1/6806 Z N A Z

C 1 2 N 15/09 Z

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 15/31

C 1 2 Q 1/34

C 1 2 Q 1/37

C 1 2 Q 1/686 Z

C 1 2 Q 1/6874 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 6 月 2 日 (2021.6.2)

【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】

標的核酸を含む細胞中の 1 つまたは複数の核酸の存在を決定するための方法であって、細胞中の 1 つまたは複数の核酸と標的核酸との間で近接接合を生成するステップであって、前記細胞が、混合細胞集団を含む試料中に存在する、ステップ；

前記 1 つまたは複数の核酸と前記標的核酸との間での前記近接接合を捕捉するステップであって、前記近接接合を、前記標的核酸に対して相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせることを含み、必要に応じて前記標的核酸に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドが、固体基材に結合される、ステップ；および

前記標的核酸に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記近接接合中の前記 1 つまたは複数の核酸を分析するステップであって、それによって、前記標的核酸を含む前記細胞中の前記 1 つまたは複数の核酸の存在を決定する、ステップを含む、方法。

【請求項 2】

1つまたは複数の核酸と前記標的核酸との間での前記近接接合の生成が、

(i) 前記細胞を含む前記試料を、架橋剤と共にインキュベートするステップであって、前記架橋剤が、前記細胞中においてタンパク質および前記1つまたは複数の核酸を前記標的核酸と架橋させ、それによって、前記1つまたは複数の核酸と前記標的核酸との間で複合体を生成し、必要に応じて前記架橋剤がホルムアルデヒドを含む、ステップ；

(i i) 前記細胞を、1つまたは複数のアニオン性界面活性剤および1つまたは複数の非イオン性界面活性剤の組合せを含む溶解緩衝液中で溶解させるステップ；

(i i i) 前記1つまたは複数の核酸と前記標的核酸との間での前記複合体内の核酸を消化するステップであって、それによって、遊離核酸末端を生成し、必要に応じてエンドヌクレアーゼにより実施され、必要に応じて前記エンドヌクレアーゼが、制限エンドヌクレアーゼ、DNaseまたはMNaseである、ステップ；

(i v) 消化された核酸をライゲーションするステップ；ならびに

(v) 架橋されたタンパク質から、1つまたは複数の近接接合を放出させるステップであって、それによって、前記1つまたは複数の核酸と前記標的核酸との間で前記近接接合を生成し、必要に応じて前記架橋されたタンパク質を、プロテアーゼ、熱またはそれらの組合せから選択される作用因子で処理することによって、架橋を逆転させること、または前記複合体を断片化することを含む、ステップ

を含み、必要に応じて前記複合体を架橋クエンチャーと共にインキュベートするステップをさらに含み、必要に応じて前記架橋クエンチャーがグリシンである、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記標的核酸に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドが、5'末端に付着した部分をさらに含み、必要に応じて前記部分がビオチンである、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記固体基材が、ビーズ、マルチウェルプレート中のウェル、またはスライドの表面から選択され、必要に応じて前記ビーズが磁性ビーズである、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記遊離核酸末端を、ステップ(v)の前にビオチンで標識するステップをさらに含み、それによって、ステップ(v)後に生成される前記近接接合が、ビオチン標識され、必要に応じてビオチン標識された前記近接接合が、前記近接接合を捕捉するステップの前に、精製ステップに供され、前記精製ステップが、ビオチンを、固体基材に付着したアビジンまたはストレプトアビジンと結合させることを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 6】

前記捕捉するステップが、前記標的核酸を富化することをさらに含み、前記富化することが、前記標的核酸に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした前記近接接合にプライマーのセットおよびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)試薬を添加することによって、PCRを実施することを含み、プライマーの前記セット中の各プライマーが、1つまたは複数のさらなる標的核酸に対して相補的な配列を含み、必要に応じて前記オリゴヌクレオチド、およびプライマーの前記セット中の各プライマーが、次世代配列決定(NGS)システムと適合性を有するアダプター配列をさらに含み、前記分析するステップが、前記近接接合中の前記1つまたは複数の核酸を配列決定することを含む、または

前記捕捉するステップが、前記標的核酸を富化することをさらに含み、前記富化することが、前記標的核酸に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした前記近接接合にプライマーのセットおよびPCR試薬を添加することによってPCRを実施することを含み、プライマーの前記セット中の各プライマーが、ランダム配列を含み、必要に応じて前記オリゴヌクレオチド、およびプライマーの前記セット中の各プラ

イマーが、次世代配列決定（NGS）システムと適合性を有するアダプター配列をさらに含み、前記分析するステップが、前記近接接合中の前記 1 つまたは複数の核酸を配列決定することを含む、

または

前記分析するステップが、前記近接接合中に存在する前記 1 つまたは複数の核酸を標識することを含み、必要に応じて前記標識された 1 つまたは複数の核酸が、マイクロアレイにハイブリダイズされる、

または

前記標的核酸が、抗生物質耐性遺伝子である、もしくは前記混合細胞集団を含む前記試料が、個体における感染の部位に由来する、もしくは前記混合細胞集団を含む前記試料が、農業的試料に由来し、必要に応じて前記農業的試料が、ウシルーメンまたは厩肥であり、必要に応じて前記標的核酸および／もしくは前記 1 つまたは複数の核酸の各々が、プラスミド、ウイルスまたはゲノム DNA 中に存在する、

または

前記標的核酸が、癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子であり、必要に応じて前記混合集団を含む前記試料が、腫瘍試料である、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

抗生物質耐性遺伝子と関連する 1 つまたは複数の核酸を検出するための方法であって、細胞中の 1 つまたは複数の核酸と抗生物質耐性遺伝子との間で近接接合を生成するステップであって、前記細胞が、混合細胞集団を含む試料中に存在する、ステップ；

前記 1 つまたは複数の核酸と前記抗生物質耐性遺伝子との間での前記近接接合を捕捉するステップであって、前記近接接合を、前記抗生物質耐性遺伝子に対して相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせることを含む、ステップ；および

前記抗生物質耐性遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記近接接合中の前記 1 つまたは複数の核酸を分析するステップであって、それによって、前記抗生物質耐性遺伝子を含む前記細胞中の前記 1 つまたは複数の核酸の存在を決定する、ステップ

を含み、必要に応じて前記抗生物質耐性遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドが、5' 末端に付着した部分をさらに含み、必要に応じて前記部分がビオチンである、

または

必要に応じて前記分析するステップが、前記近接接合中に存在する前記 1 つまたは複数の核酸を標識することを含み、必要に応じて標識された 1 つまたは複数の核酸が、マイクロアレイにハイブリダイズされる、

または

必要に応じて前記抗生物質耐性遺伝子が、プラスミドまたは前記細胞のゲノム中に存在する、

または

必要に応じて前記 1 つまたは複数の核酸の各々が、プラスミドまたは前記細胞のゲノム中に存在する、

または

必要に応じて前記試料が、個体における感染の部位に由来する、

または

必要に応じて前記試料が、農業的試料に由来し、必要に応じて前記農業的試料が、ウシルーメンまたは厩肥である、方法。

【請求項 8】

1 つまたは複数の核酸と前記抗生物質耐性遺伝子との間での前記近接接合の生成が、

i) 前記細胞を含む前記試料を、架橋剤と共にインキュベートするステップであって、前記架橋剤が、前記細胞中においてタンパク質および前記 1 つまたは複数の核酸を前記抗

生物質耐性遺伝子と架橋させ、それによって、前記1つまたは複数の核酸と前記抗生物質耐性遺伝子との間で複合体を生成し、必要に応じて前記架橋試薬が、ホルムアルデヒドを含む、ステップ；

i i i) 前記細胞を、1つまたは複数のアニオン性界面活性剤および1つまたは複数の非イオン性界面活性剤の組合せを含む溶解緩衝液中で溶解させるステップ；

i i i i) 前記1つまたは複数の核酸と癌遺伝子との間での前記複合体内の核酸を消化するステップであって、それによって、遊離核酸末端を生成し、必要に応じてエンドヌクレアーゼにより実施され、必要に応じて前記エンドヌクレアーゼが、制限エンドヌクレアーゼ、DNaseまたはMNaseである、ステップ；

i v) 消化された核酸をライゲーションするステップ；ならびに

v) 架橋されたタンパク質から、1つまたは複数の近接接合を放出させるステップであって、それによって、前記1つまたは複数の核酸と前記抗生物質耐性遺伝子との間で前記近接接合を生成し、必要に応じて前記架橋されたタンパク質を、プロテアーゼ、熱またはそれらの組合せから選択される作用因子で処理することによって、架橋を逆転させること、または前記複合体を断片化することを含む、ステップを含む、必要に応じて

前記遊離核酸末端を、ステップv)の前にビオチンで標識するステップをさらに含み、それによって、ステップv)後に生成される前記近接接合が、ビオチン標識され、必要に応じてビオチン標識された前記近接接合が、前記近接接合を捕捉するステップの前に、精製ステップに供され、前記精製ステップが、ビオチンを、固体基材に付着したアビジンまたはストレプトアビジンと結合させることを含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記複合体を架橋クエンチャーと共にインキュベートするステップをさらに含み、必要に応じて前記架橋クエンチャーがグリシンである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記抗生物質耐性遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドが、固体基材に結合され、必要に応じて前記固体基材が、ビーズ、マルチウェルプレート中のウェル、またはスライドの表面から選択され、必要に応じて前記ビーズが磁性ビーズである、請求項7から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記捕捉するステップが、前記抗生物質耐性遺伝子を富化することをさらに含み、前記富化することが、前記抗生物質耐性遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした前記近接接合にプライマーのセットおよびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)試薬を添加することによって、PCRを実施することを含み、プライマーの前記セット中の各プライマーが、1つまたは複数のさらなる標的核酸に対して相補的な配列を含み、必要に応じて前記オリゴヌクレオチド、およびプライマーの前記セット中の各プライマーが、次世代配列決定(NGS)システムと適合性を有するアダプター配列をさらに含む、または

前記捕捉するステップが、前記抗生物質耐性遺伝子を富化することをさらに含み、前記富化することが、前記抗生物質耐性遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした前記近接接合にプライマーのセットおよびPCR試薬を添加することによってPCRを実施することを含み、プライマーの前記セット中の各プライマーが、ランダム配列を含み、必要に応じて前記オリゴヌクレオチド、およびプライマーの前記セット中の各プライマーが、次世代配列決定(NGS)システムと適合性を有するアダプター配列をさらに含み、前記分析するステップが、前記近接接合中の前記1つまたは複数の核酸を配列決定することを含む、請求項7に記載の方法。

【請求項12】

癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子と関連する1つまたは複数の核酸を検出するための方法であって、

細胞中の1つまたは複数の核酸と癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子との間で近接接合を生成するステップであって、前記細胞が、個体に由来する混合細胞集団を含む試料中に存在する、ステップ；

前記1つまたは複数の核酸と前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子との間での前記近接接合を捕捉するステップであって、前記近接接合を、前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子に対して相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせることを含む、ステップ；および

前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記近接接合中の前記1つまたは複数の核酸を分析するステップであって、それによって、前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子を含む前記細胞中の前記1つまたは複数の核酸の存在を決定し、必要に応じて前記抗生物質耐性遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドが、5'末端に付着した部分をさらに含み、必要に応じて前記部分がビオチンである、または

必要に応じて前記分析するステップが、前記近接接合中に存在する前記1つまたは複数の核酸を標識することを含み、必要に応じて標識された1つまたは複数の核酸が、マイクロアレイにハイブリダイズされる、ステップ

を含み、

または

前記混合集団を含む前記試料が、腫瘍試料である、方法。

【請求項13】

1つまたは複数の核酸と前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子との間での前記近接接合の生成が、

i) 前記試料を、架橋剤と共にインキュベートするステップであって、前記架橋剤が、前記細胞中においてタンパク質および前記1つまたは複数の核酸と前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子とを架橋させ、それによって、前記1つまたは複数の核酸と前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子との間で複合体を生成し、必要に応じて前記架橋試薬が、ホルムアルデヒドを含む、ステップ；

ii) 前記細胞を、1つまたは複数のアニオン性界面活性剤および1つまたは複数の非イオン性界面活性剤の組合せを含む溶解緩衝液中で溶解させるステップ；

iii) 前記1つまたは複数の核酸と前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子との間での前記複合体内の核酸を消化するステップであって、それによって、遊離核酸末端を生成し、必要に応じてエンドヌクレアーゼにより実施され、必要に応じて前記エンドヌクレアーゼが、制限エンドヌクレアーゼ、DNaseまたはMNaseである、ステップ；

iv) 消化された核酸をライゲーションするステップ；ならびに

v) 架橋されたタンパク質から、1つまたは複数の近接接合を放出させるステップであって、それによって、前記1つまたは複数の核酸と前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子との間で前記近接接合を生成する、ステップ

を含み、必要に応じて前記放出させるステップが、前記架橋されたタンパク質を、プロテアーゼまたは熱から選択される作用因子で処理することによって、架橋を逆転させることを含む、または前記複合体を断片化することを含み、

必要に応じて前記複合体を架橋クエンチャーと共にインキュベートするステップをさらに含み、必要に応じて前記架橋クエンチャーがグリシンである、

または必要に応じて前記遊離核酸末端を、ステップv)の前にビオチンで標識するステップをさらに含み、それによって、ステップv)後に生成される前記近接接合が、ビオチン標識され、必要に応じてビオチン標識された前記近接接合が、前記近接接合を捕捉するステップの前に、精製ステップに供され、前記精製ステップが、ビオチンを、固体基材に付着したアビジンまたはストレプトアビジンと結合させることを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドが、固体基材に結合され、

必要に応じて前記固体基材が、ビーズ、マルチウェルプレート中のウェル、またはスライドの表面から選択され、必要に応じて前記ビーズが磁性ビーズである、請求項 1 2 から 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記捕捉するステップが、前記癌遺伝子を富化することをさらに含み、前記富化することが、前記癌遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした前記近接接合にプライマーのセットおよびポリメラーゼ連鎖反応（PCR）試薬を添加することによって、PCRを実施することを含み、プライマーの前記セット中の各プライマーが、1つまたは複数のさらなる標的核酸に対して相補的な配列を含み、必要に応じて前記オリゴヌクレオチド、およびプライマーの前記セット中の各プライマーが、次世代配列決定（NGS）システムと適合性を有するアダプター配列をさらに含み、前記分析するステップが、前記近接接合中の前記 1つまたは複数の核酸を配列決定することを含む、

または

前記捕捉するステップが、前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子を富化することをさらに含み、前記富化することが、前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした前記近接接合にプライマーのセットおよびPCR試薬を添加することによってPCRを実施することを含み、プライマーの前記セット中の各プライマーが、ランダム配列を含み、必要に応じて前記オリゴヌクレオチド、およびプライマーの前記セット中の各プライマーが、次世代配列決定（NGS）システムと適合性を有するアダプター配列をさらに含み、前記分析するステップが、前記近接接合中の前記 1つまたは複数の核酸を配列決定することを含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0076

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0076】

これらおよび他の変化は、上に詳述した説明に照らして、実施形態に対してなされ得る。一般に、以下の特許請求の範囲において、使用される用語は、本明細書および特許請求の範囲に開示される具体的な実施形態に特許請求の範囲を限定すると解釈すべきではないが、そのような特許請求の範囲が権利を有する等価物の全範囲と共に、全ての可能な実施形態を含むと解釈すべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示によって限定されない。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

（項目 1）

標的核酸を含む細胞中の 1つまたは複数の核酸の存在を決定するための方法であって、細胞中の 1つまたは複数の核酸と標的核酸との間で近接接合を生成するステップであって、前記細胞が、混合細胞集団を含む試料中に存在する、ステップ；

前記 1つまたは複数の核酸と前記標的核酸との間での前記近接接合を捕捉するステップであって、前記近接接合を、前記標的核酸に対して相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせることを含む、ステップ；および

前記標的核酸に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記近接接合中の前記 1つまたは複数の核酸を分析するステップであって、それによって、前記標的核酸を含む前記細胞中の前記 1つまたは複数の核酸の存在を決定する、ステ

ップ

を含む、方法。

(項目 2)

1 つまたは複数の核酸と前記標的核酸との間での前記近接接合の生成が、

i .) 前記細胞を含む前記試料を、架橋剤と共にインキュベートするステップであって、前記架橋剤が、前記細胞中においてタンパク質および前記 1 つまたは複数の核酸を前記標的核酸と架橋させ、それによって、前記 1 つまたは複数の核酸と前記標的核酸との間で複合体を生成する、ステップ；

i i .) 前記細胞を、1 つまたは複数のアニオン性界面活性剤および 1 つまたは複数の非イオン性界面活性剤の組合せを含む溶解緩衝液中で溶解させるステップ；

i i i .) 前記 1 つまたは複数の核酸と前記標的核酸との間での前記複合体内の核酸を消化するステップであって、それによって、遊離核酸末端を生成する、ステップ；

i v .) 消化された核酸をライゲーションするステップ；ならびに

v .) 架橋されたタンパク質から、1 つまたは複数の近接接合を放出させるステップであって、それによって、前記 1 つまたは複数の核酸と前記標的核酸との間で前記近接接合を生成する、ステップ

を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記架橋試薬が、ホルムアルデヒドを含む、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記複合体を架橋クエンチャーと共にインキュベートするステップをさらに含む、項目 2 に記載の方法。

(項目 5)

前記架橋クエンチャーがグリシンである、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

エンドヌクレアーゼが、制限エンドヌクレアーゼである、項目 2 に記載の方法。

(項目 7)

エンドヌクレアーゼが D N a s e である、項目 2 に記載の方法。

(項目 8)

エンドヌクレアーゼが M N a s e である、項目 2 に記載の方法。

(項目 9)

前記放出させるステップが、前記架橋されたタンパク質を、プロテアーゼ、熱またはそれらの組合せから選択される作用因子で処理することによって、架橋を逆転させることを含む、項目 2 に記載の方法。

(項目 10)

前記放出させるステップが、前記複合体を断片化することを含む、項目 2 に記載の方法

。

(項目 11)

前記標的核酸に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドが、5' 末端に付着した部分をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 12)

前記部分がビオチンである、項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

前記標的核酸に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドが、固体基材に結合される、上記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 14)

前記固体基材が、ビーズ、マルチウェルプレート中のウェル、またはスライドの表面から選択される、項目 13 に記載の方法。

(項目 15)

前記ビーズが磁性ビーズである、項目 14 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記遊離核酸末端を、ステップ v.) の前にビオチンで標識するステップをさらに含み、それによって、ステップ v.) 後に生成される前記近接接合が、ビオチン標識される、項目 2 に記載の方法。

(項目 1 7)

ビオチン標識された前記近接接合が、前記近接接合を捕捉するステップの前に、精製ステップに供され、前記精製ステップが、ビオチンを、固体基材に付着したアビジンまたはストレプトアビジンと結合させることを含む、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記捕捉するステップが、前記標的核酸を富化することをさらに含み、前記富化することが、前記標的核酸に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした前記近接接合にプライマーのセットおよびポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 試薬を添加することによって、PCR を実施することを含み、プライマーの前記セット中の各プライマーが、1 つまたは複数のさらなる標的核酸に対して相補的な配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記捕捉するステップが、前記標的核酸を富化することをさらに含み、前記富化することが、前記標的核酸に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした前記近接接合にプライマーのセットおよび PCR 試薬を添加することによって PCR を実施することを含み、プライマーの前記セット中の各プライマーが、ランダム配列を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記オリゴヌクレオチド、およびプライマーの前記セット中の各プライマーが、次世代配列決定 (NGS) システムと適合性を有するアダプター配列をさらに含む、項目 1 8 または 1 9 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記分析するステップが、前記近接接合中の前記 1 つまたは複数の核酸を配列決定することを含む、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記分析するステップが、前記近接接合中に存在する前記 1 つまたは複数の核酸を標識することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

標識された 1 つまたは複数の核酸が、マイクロアレイにハイブリダイズされる、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記標的核酸が、抗生物質耐性遺伝子である、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 5)

前記混合細胞集団を含む前記試料が、個体における感染の部位に由来する、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 6)

前記混合細胞集団を含む前記試料が、農業的試料に由来する、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記農業的試料が、ウシルーメンまたは厩肥である、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記標的核酸が、プラスミド、ウイルスまたはゲノム DNA 中に存在する、項目 2 4 から 2 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 2 9)

前記 1 つまたは複数の核酸の各々が、プラスミド、ウイルスまたはゲノム DNA 中に存在する、項目 2 4 から 2 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 0)

前記標的核酸が、癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子である、項目 1 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記混合集団を含む前記試料が、腫瘍試料である、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

抗生物質耐性遺伝子と関連する 1 つまたは複数の核酸を検出するための方法であって、細胞中の 1 つまたは複数の核酸と抗生物質耐性遺伝子との間で近接接合を生成するステップであって、前記細胞が、混合細胞集団を含む試料中に存在する、ステップ；

前記 1 つまたは複数の核酸と前記抗生物質耐性遺伝子との間での前記近接接合を捕捉するステップであって、前記近接接合を、前記抗生物質耐性遺伝子に対して相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせることを含む、ステップ；および

前記抗生物質耐性遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記近接接合中の前記 1 つまたは複数の核酸を分析するステップであって、それによって、前記抗生物質耐性遺伝子を含む前記細胞中の前記 1 つまたは複数の核酸の存在を決定する、ステップ

を含む、方法。

(項目 3 3)

1 つまたは複数の核酸と前記抗生物質耐性遺伝子との間での前記近接接合の生成が、

i .) 前記細胞を含む前記試料を、架橋剤と共にインキュベートするステップであって、前記架橋剤が、前記細胞中においてタンパク質および前記 1 つまたは複数の核酸を前記抗生物質耐性遺伝子と架橋させ、それによって、前記 1 つまたは複数の核酸と前記抗生物質耐性遺伝子との間で複合体を生成する、ステップ；

i i .) 前記細胞を、1 つまたは複数のアニオン性界面活性剤および 1 つまたは複数の非イオン性界面活性剤の組合せを含む溶解緩衝液中で溶解させるステップ；

i i i .) 前記 1 つまたは複数の核酸と癌遺伝子との間での前記複合体内の核酸を消化するステップであって、それによって、遊離核酸末端を生成する、ステップ；

i v .) 消化された核酸をライゲーションするステップ；ならびに

v .) 架橋されたタンパク質から、1 つまたは複数の近接接合を放出させるステップであって、それによって、前記 1 つまたは複数の核酸と前記抗生物質耐性遺伝子との間で前記近接接合を生成する、ステップ

を含む、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記架橋試薬が、ホルムアルデヒドを含む、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記複合体を架橋クエンチャーと共にインキュベートするステップをさらに含む、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記架橋クエンチャーがグリシンである、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 7)

エンドヌクレアーゼが、制限エンドヌクレアーゼである、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 8)

エンドヌクレアーゼが D N a s e である、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 9)

エンドヌクレアーゼが M N a s e である、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記放出させるステップが、前記架橋されたタンパク質を、プロテアーゼ、熱またはそれらの組合せから選択される作用因子で処理することによって、架橋を逆転させることを含む、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記放出させるステップが、前記複合体を断片化することを含む、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記抗生物質耐性遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドが、5'末端に付着した部分をさらに含む、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記部分がビオチンである、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記抗生物質耐性遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドが、固体基材に結合される、項目 3 2 から 4 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 5)

前記固体基材が、ビーズ、マルチウェルプレート中のウェル、またはスライドの表面から選択される、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記ビーズが磁性ビーズである、項目 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

前記遊離核酸末端を、ステップ v.) の前にビオチンで標識するステップをさらに含み、それによって、ステップ v.) 後に生成される前記近接接合が、ビオチン標識される、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 4 8)

ビオチン標識された前記近接接合が、前記近接接合を捕捉するステップの前に、精製ステップに供され、前記精製ステップが、ビオチンを、固体基材に付着したアビジンまたはストレプトアビジンと結合させることを含む、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記捕捉するステップが、前記抗生物質耐性遺伝子を富化することをさらに含み、前記富化することが、前記抗生物質耐性遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした前記近接接合にプライマーのセットおよびポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 試薬を添加することによって、PCR を実施することを含み、プライマーの前記セット中の各プライマーが、1 つまたは複数のさらなる標的核酸に対して相補的な配列を含む、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記捕捉するステップが、前記抗生物質耐性遺伝子を富化することをさらに含み、前記富化することが、前記抗生物質耐性遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした前記近接接合にプライマーのセットおよび PCR 試薬を添加することによって PCR を実施することを含み、プライマーの前記セット中の各プライマーが、ランダム配列を含む、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記オリゴヌクレオチド、およびプライマーの前記セット中の各プライマーが、次世代配列決定 (NGS) システムと適合性を有するアダプター配列をさらに含む、項目 4 9 または 5 0 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記分析するステップが、前記近接接合中の前記 1 つまたは複数の核酸を配列決定することを含む、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 3)

前記分析するステップが、前記近接接合中に存在する前記 1 つまたは複数の核酸を標識することを含む、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 5 4)

標識された 1 つまたは複数の核酸が、マイクロアレイにハイブリダイズされる、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記抗生物質耐性遺伝子が、プラスミドまたは前記細胞のゲノム中に存在する、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 5 6)

前記 1 つまたは複数の核酸の各々が、プラスミドまたは前記細胞のゲノム中に存在する、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記試料が、個体における感染の部位に由来する、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 5 8)

前記試料が、農業的試料に由来する、項目 3 2 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記農業的試料が、ウシルーメンまたは厩肥である、項目 5 8 に記載の方法。

(項目 6 0)

癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子と関連する 1 つまたは複数の核酸を検出するための方法であって、

細胞中の 1 つまたは複数の核酸と癌遺伝子または腫瘍抑制遺伝子との間で近接接合を生成するステップであって、前記細胞が、個体に由来する混合細胞集団を含む試料中に存在する、ステップ；

前記 1 つまたは複数の核酸と前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子との間での前記近接接合を捕捉するステップであって、前記近接接合を、前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子に対して相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせることを含む、ステップ；および

前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記近接接合中の前記 1 つまたは複数の核酸を分析するステップであって、それによって、前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子を含む前記細胞中の前記 1 つまたは複数の核酸の存在を決定する、ステップを含む、方法。

(項目 6 1)

1 つまたは複数の核酸と前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子との間での前記近接接合の生成が、

i.) 前記試料を、架橋剤と共にインキュベートするステップであって、前記架橋剤が、前記細胞中においてタンパク質および前記 1 つまたは複数の核酸と前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子とを架橋させ、それによって、前記 1 つまたは複数の核酸と前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子との間で複合体を生成する、ステップ；

i i.) 前記細胞を、1 つまたは複数のアニオン性界面活性剤および 1 つまたは複数の非イオン性界面活性剤の組合せを含む溶解緩衝液中で溶解させるステップ；

i i i.) 前記 1 つまたは複数の核酸と前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子との間での前記複合体内の核酸を消化するステップであって、それによって、遊離核酸末端を生成する、ステップ；

i v.) 消化された核酸をライゲーションするステップ；ならびに

v.) 架橋されたタンパク質から、1 つまたは複数の近接接合を放出させるステップであって、それによって、前記 1 つまたは複数の核酸と前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子との間で前記近接接合を生成する、ステップを含む、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記架橋試薬が、ホルムアルデヒドを含む、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記複合体を架橋クエンチャーと共にインキュベートするステップをさらに含む、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 6 4)

前記架橋クエンチャーがグリシンである、項目 6 3 に記載の方法。

(項目 6 5)

エンドヌクレアーゼが、制限エンドヌクレアーゼである、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 6 6)

エンドヌクレアーゼがDNaseである、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 6 7)

エンドヌクレアーゼがMNAseである、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 6 8)

前記放出させるステップが、前記架橋されたタンパク質を、プロテアーゼまたは熱から選択される作用因子で処理することによって、架橋を逆転させることを含む、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 6 9)

前記放出させるステップが、前記複合体を断片化することを含む、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 7 0)

抗生物質耐性遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドが、5'末端に付着した部分をさらに含む、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 7 1)

前記部分がビオチンである、項目 7 0 に記載の方法。

(項目 7 2)

前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドが、固体基材に結合される、項目 6 0 から 7 1 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 3)

前記固体基材が、ビーズ、マルチウェルプレート中のウェル、またはスライドの表面から選択される、項目 7 2 に記載の方法。

(項目 7 4)

前記ビーズが磁性ビーズである、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 7 5)

前記遊離核酸末端を、ステップ v.) の前にビオチンで標識するステップをさらに含み、それによって、ステップ v.) 後に生成される前記近接接合が、ビオチン標識される、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 7 6)

ビオチン標識された前記近接接合が、前記近接接合を捕捉するステップの前に、精製ステップに供され、前記精製ステップが、ビオチンを、固体基材に付着したアビジンまたはストレプトアビジンと結合させることを含む、項目 7 5 に記載の方法。

(項目 7 7)

前記捕捉するステップが、前記癌遺伝子を富化することをさらに含み、前記富化することが、前記癌遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした前記近接接合にプライマーのセットおよびポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 試薬を添加することによって、PCRを実施することを含み、プライマーの前記セット中の各プライマーが、1つまたは複数のさらなる標的核酸に対して相補的な配列を含む、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 7 8)

前記捕捉するステップが、前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子を富化することをさらに含み、前記富化することが、前記癌遺伝子または前記腫瘍抑制遺伝子に対して相補的な配列を含む前記オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした前記近接接合にプライマーのセットおよびPCR試薬を添加することによってPCRを実施することを含み、プライマーの前記セット中の各プライマーが、ランダム配列を含む、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 7 9)

前記オリゴヌクレオチド、およびプライマーの前記セット中の各プライマーが、次世代配列決定 (NGS) システムと適合性を有するアダプター配列をさらに含む、項目 7 7 または 7 8 に記載の方法。

(項目 8 0)

前記分析するステップが、前記近接接合中の前記 1 つまたは複数の核酸を配列決定することを含む、項目 79 に記載の方法。

(項目 81)

前記分析するステップが、前記近接接合中に存在する前記 1 つまたは複数の核酸を標識することを含む、項目 60 に記載の方法。

(項目 82)

標識された 1 つまたは複数の核酸が、マイクロアレイにハイブリダイズされる、項目 81 に記載の方法。

(項目 83)

前記混合集団を含む前記試料が、腫瘍試料である、項目 60 に記載の方法。