

【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3部門第2区分

【発行日】令和4年4月11日(2022.4.11)

【国際公開番号】WO2019/192489

【公表番号】特表2021-517556(P2021-517556A)

【公表日】令和3年7月26日(2021.7.26)

【出願番号】特願2019-566740(P2019-566740)

【国際特許分類】

C 4 0 B 5 0 / 0 6 ( 2 0 0 6 . 0 1 )

C 1 2 N 1 5 / 1 0 ( 2 0 0 6 . 0 1 )

C 1 2 Q 1 / 6 8 4 4 ( 2 0 1 8 . 0 1 )

C 1 2 Q 1 / 6 8 1 3 ( 2 0 1 8 . 0 1 )

C 1 2 Q 1 / 6 8 6 9 ( 2 0 1 8 . 0 1 )

C 1 2 Q 1 / 6 8 7 6 ( 2 0 1 8 . 0 1 )

10

【F I】

C 4 0 B 5 0 / 0 6                      Z N A

C 1 2 N 1 5 / 1 0                      Z

C 1 2 Q 1 / 6 8 4 4                      Z

C 1 2 Q 1 / 6 8 1 3                      Z

C 1 2 Q 1 / 6 8 6 9                      Z

C 1 2 Q 1 / 6 8 7 6                      Z

20

【手続補正書】

【提出日】令和4年3月31日(2022.3.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0159

【補正方法】変更

【補正の内容】

30

【0159】

本発明の説明を通じて、様々な特許出願及び公開文書が参照とされ、その各々は、その全体が引用により本明細書中に組み込まれている。

本件出願は、以下の態様の発明を提供する。

(態様1)

ポリヌクレオチドライブラリーの作製方法であって、この方法が：

a. 第一のテーリング反応において、第一のテールを、鑄型非依存的重合により、複数の標的ポリヌクレオチドの各々へ追加する工程であって、ここで第一のテーリング反応が、第一のテールにハイブリダイズするオーバーハングを含む第一のアダプターを含む工程；

40

b. 第一のライゲーション反応において、第一のアダプターの鎖を第一のテールヘライゲーションする工程；

c. 第一のアダプターの鎖へハイブリダイズされた第一のプライマーを伸長することにより、第一のアダプターの鎖を含む標的ポリヌクレオチドを増幅する工程；

d. 第二のテーリング反応において、鑄型非依存的重合により、複数の増幅された標的ポリヌクレオチドの各々へ、第二のテールを追加する工程であって、ここで第二のテーリング反応は、第二のテールへハイブリダイズするオーバーハングを含む第二のアダプターを含む工程；並びに

e. 第二のライゲーション反応において、第二のアダプターの鎖を第二のテールヘライゲーションする工程；を含む、前記方法。

50

( 態様 2 )

前記方法が、(a)標的ポリヌクレオチドを作製するための、ポリヌクレオチドの断片化；(b)標的ポリヌクレオチドの一方又は両方の末端の脱リン酸化；並びに、(c)標的ポリヌクレオチドを作製するための、二本鎖ポリヌクレオチドの1本鎖ポリヌクレオチドへの変性；の1以上を含む、態様1記載の方法。

( 態様 3 )

前記複数の標的ポリヌクレオチドが、1本鎖DNAを含む、態様1～2のいずれか一項記載の方法。

( 態様 4 )

前記標的ポリヌクレオチドが、セルフリーポリヌクレオチド、又はそれらの増幅産物を含む、態様1～3のいずれか一項記載の方法。 10

( 態様 5 )

前記標的ポリヌクレオチドが、1本鎖のセルフリーDNA(cfDNA)を含む、態様1～4のいずれか一項記載の方法。

( 態様 6 )

前記第一のテーリング反応における標的ポリヌクレオチドの量が、約0.1～500ng、1～100ng、又は5～50ngである、態様1～5のいずれか一項記載の方法。

( 態様 7 )

前記標的ポリヌクレオチドが、平均長約50～600ヌクレオチドを有する、態様1～6のいずれか一項記載の方法。 20

( 態様 8 )

前記標的ポリヌクレオチドが、工程(b)の前に、メチル化シトシン又は非メチル化シトシンを差次的に修飾するよう処理される、態様1～7のいずれか一項記載の方法。

( 態様 9 )

前記差次的修飾が、標的ポリヌクレオチドを亜硫酸水素塩で処理することを含む、態様8記載の方法。

( 態様 10 )

前記鋳型非依存的重合が、ポリメラーゼにより触媒される、態様1～9のいずれか一項記載の方法。

( 態様 11 )

前記ポリメラーゼが、末端デオキシヌクレオチド転移酵素(TdT)である、態様10記載の方法。 30

( 態様 12 )

前記第一のテールが、第二のテールとは異なる配列を含む、態様1～11のいずれか一項記載の方法。

( 態様 13 )

前記第一のテール及び第二のテールが、同じ配列を含む、態様1～11のいずれか一項記載の方法。

( 態様 14 )

前記第一のテール、第二のテール、又は両方が、1又は2種のヌクレオチドからなる、態様1～13のいずれか一項記載の方法。 40

( 態様 15 )

前記第一のテール、第二のテール、又は両方が、ポリ-A、ポリ-C、及びポリ-C/Tからなる群から選択される、態様1～14のいずれか一項記載の方法。

( 態様 16 )

前記テールの少なくとも1つが、2種のヌクレオチドのプールから重合された2種のヌクレオチドからなり、ここでプール中の2種のヌクレオチドが、同じ又は異なる量で存在する、態様1～15のいずれか一項記載の方法。

( 態様 17 )

前記プール中の2種のヌクレオチドが、約9:1、5:1、3:1、又は1:1の比である、態様 50

16記載の方法。

(態様18)

前記第一のアダプター及び第二のアダプターが、ポリヌクレオチド配列が異なる二本鎖領域を含む、態様1~17のいずれか一項記載の方法。

(態様19)

前記増幅が、直線的増幅を含む、態様1~18のいずれか一項記載の方法。

(態様20)

前記第一及び/又は第二のアダプターのオーバーハングが、3'-オーバーハングである、態様1~19のいずれか一項記載の方法。

(態様21)

前記第一及び/又は第二のアダプターのオーバーハングが、長さ6~12ヌクレオチドである、態様1~20のいずれか一項記載の方法。

(態様22)

(i)第一のテーリング反応及び第一のライゲーション反応が、同じ反応混合物中で起こるか、並びに/又は(ii)第二のテーリング反応及び第二のライゲーション反応が、同じ反応混合物中で起こる、態様1~21のいずれか一項記載の方法。

(態様23)

前記第二のアダプターの鎖にハイブリダイズされた第二のプライマーを伸長することにより、第二のアダプターの鎖を含む標的ポリヌクレオチドを増幅することを更に含む、態様1~22のいずれか一項記載の方法。

(態様24)

前記第一のアダプターの鎖とハイブリダイズする第一のプライマーの配列が、第二のアダプターとハイブリダイズする第二のプライマーの配列とは異なる、態様23記載の方法。

(態様25)

前記第二のアダプターの鎖にハイブリダイズされたプライマーによる増幅が、指数関数的増幅である、態様23又は24記載の方法。

(態様26)

第三のプライマー及び第四のプライマーによる増幅反応を更に含み、ここで(i)第三のプライマーは、第一のプライマーの少なくとも一部の相補体にハイブリダイズし、並びに(ii)第四のプライマーは、第二のプライマーの少なくとも一部の相補体にハイブリダイズする、態様23~25のいずれか一項記載の方法。

(態様27)

前記第三のプライマーのハイブリダイズ可能な配列が、第一のプライマーのハイブリダイズ可能な配列とは異なり、及び/又は第四のプライマーのハイブリダイズ可能な配列が、第二のプライマーのハイブリダイズ可能な配列とは異なる、態様26記載の方法。

(態様28)

前記第三のプライマー及び第四のプライマーの配列が異なる、態様26又は27記載の方法。

(態様29)

前記第三のプライマー、第四のプライマー、又は両方が、標的ポリヌクレオチドの試料給源を同定するインデックス配列を含む、態様26~28のいずれか一項記載の方法。

(態様30)

前記第二のプライマーを含む増幅の増幅産物を配列決定することを更に含む、態様23~25のいずれか一項記載の方法。

(態様31)

前記第三及び第四のプライマーを含む増幅の増幅産物を配列決定することを更に含む、態様26~29のいずれか一項記載の方法。

(態様32)

前記インデックス配列に従い配列決定リードを群別することを更に含む、態様31記載の方法。

10

20

30

40

50

( 態様 3 3 )

前記配列決定が、参照配列に対し、配列バリエーション又はヌクレオチドメチル化の差異を検出することを含み、態様 31 又は 32 記載の方法。

( 態様 3 4 )

態様 1 ~ 33 のいずれか一項記載の方法において使用するための組成物。

( 態様 3 5 )

態様 1 ~ 34 のいずれか一項記載の方法に従い作製された、ポリヌクレオチド。

( 態様 3 6 )

ポリヌクレオチドライブラリーを作製するためのキットであり、このキットが：

a. 鋳型非依存的ポリメラーゼ；

b. 鋳型非依存的ポリメラーゼにより重合され得るヌクレオチドの第一プール；

c. 鋳型非依存的ポリメラーゼにより重合され得るヌクレオチドの第二プール；

d. ポリヌクレオチドの第一プールを重合することにより形成されるテールにハイブリダイズ可能であるオーバーハングを含む第一のアダプター；並びに

e. ポリヌクレオチドの第二プールを重合することにより形成されるテールにハイブリダイズ可能であるオーバーハングを含む第二のアダプターであって、ここで第二のアダプターが、第一のアダプターとは異なる配列を含むもの；を含む、前記キット。

( 態様 3 7 )

前記鋳型非依存的ポリメラーゼが、末端デオキシヌクレオチド転移酵素(TdT)である、態様 36 記載のキット。

( 態様 3 8 )

前記第一のプール及び第二のプールの少なくとも一方が、他方のプールには存在しない少なくとも1種のヌクレオチドを含む、態様 36 又は 37 記載のキット。

( 態様 3 9 )

前記第一のプール及び第二のプールが、同じ1種以上のヌクレオチドを含む、態様 36 又は 37 記載のキット。

( 態様 4 0 )

前記第一のプール、第二のプール、又は両方が、1又は2種のヌクレオチドからなる、態様 36 ~ 38 のいずれか一項記載のキット。

( 態様 4 1 )

前記第一のプール、第二のプール、又は両方が、(i)dATPのプール、(ii)dCTPのプール、並びに(iii)dCTP及びdTTPのプールからなる群から選択される、態様 36 ~ 40 のいずれか一項記載のキット。

( 態様 4 2 )

前記第一のプール及び第二のプールの少なくとも一方が、同じ又は異なる量で存在する2種のヌクレオチドからなる、態様 36 ~ 41 のいずれか一項記載のキット。

( 態様 4 3 )

前記プール中の2種のヌクレオチドが、約9:1、5:1、3:1、又は1:1の比である、態様 42 記載のキット。

( 態様 4 4 )

前記第一のアダプター及び第二のアダプターが、ポリヌクレオチド配列が異なる二本鎖領域を含む、態様 36 ~ 43 のいずれか一項記載のキット。

( 態様 4 5 )

前記第一及び/又は第二のアダプターのオーバーハングが、3'-オーバーハングである、態様 36 ~ 44 のいずれか一項記載のキット。

( 態様 4 6 )

前記第一及び/又は第二のアダプターのオーバーハングが、長さ6~12のヌクレオチドである、態様 36 ~ 45 のいずれか一項記載のキット。

( 態様 4 7 )

プライマー伸長反応の条件下で、第一のアダプターの鎖にハイブリダイズ可能である第

10

20

30

40

50

一のプライマーを更に含む、態様36～46のいずれか一項記載のキット。

(態様48)

プライマー伸長反応の条件下で、第二のアダプターの鎖にハイブリダイズ可能である第二のプライマーを更に含む、態様36～47のいずれか一項記載のキット。

(態様49)

前記第一のアダプターの鎖にハイブリダイズ可能である第一のプライマーの配列が、第二のアダプターにハイブリダイズ可能である第二のプライマーの配列とは異なる、態様48記載のキット。

(態様50)

第三のプライマー及び第四のプライマーを更に含み、ここで(i)第三のプライマーは、  
プライマー伸長反応の条件下で、第一のプライマーの少なくとも一部の相補体にハイブリ  
ダイズ可能であり、並びに、(ii)第四のプライマーは、プライマー伸長反応の条件下で、  
第二のプライマーの少なくとも一部の相補体にハイブリダイズ可能である、態様48又は  
49記載のキット。

(態様51)

前記第三のプライマーのハイブリダイズ可能な配列が、第一のプライマーのハイブリ  
ダイズ可能な配列とは異なり、及び/又は第四のプライマーのハイブリダイズ可能な配列が  
、第二のプライマーのハイブリダイズ可能な配列とは異なる、態様50記載のキット。

(態様52)

前記第三のプライマーのハイブリダイズ可能な配列が、第一のプライマーのハイブリ  
ダイズ可能な配列に関して5'側にハイブリダイズし、及び/又は第四のプライマーのハイ  
ブリダイズ可能な配列が、第二のプライマーのハイブリダイズ可能な配列に関して5'側  
にハイブリダイズする、態様50又は51記載のキット。

(態様53)

前記第三のプライマー及び第四のプライマーの配列が異なる、態様50～52のいずれか  
一項記載のキット。

(態様54)

前記第三のプライマー、第四のプライマー、又は両方が、標的ポリヌクレオチドの試料  
給源を同定するインデックス配列を含む、態様50～53のいずれか一項記載のキット。

(態様55)

ポリヌクレオチドライブラリーの作製方法であって、この方法が：

a. 第一のテーリング反応において、第一のテールを、鋳型非依存的重合により、複数  
の標的ポリヌクレオチドの各々へ追加する工程であって、ここで第一のテーリング反応が  
、第一のテールにハイブリダイズするオーバーハングを含む第一のアダプターを含む工程  
；

b. 第一のライゲーション反応において、第一のアダプターの鎖を第一のテールヘライ  
ゲーションする工程；

c. 第一のアダプターの鎖へハイブリダイズされた第一のプライマーを伸長することによ  
り、第一のアダプターの鎖を含む標的ポリヌクレオチドを増幅する工程；並びに

d. 第二のライゲーション反応において、第二のアダプターの鎖を、増幅された標的ポ  
リヌクレオチドヘライゲーションする工程；を含む、前記方法。

(態様56)

前記第二のライゲーション反応が、第二のテーリング反応において、第二のテールを鋳  
型非依存的重合により複数の増幅された標的ポリヌクレオチドの各々へ追加することを含  
む、態様55記載の方法。

(態様57)

前記第二のテーリング反応が、第二のテールへハイブリダイズするオーバーハングを含  
む第二のアダプターを含む、態様56記載の方法。

(態様58)

前記第二のライゲーション反応において、第二のアダプターの鎖を第二のテールヘライ

10

20

30

40

50

ゲーシオンする、態様57記載の方法。

(態様59)

前記第二のライゲーシオン反応が、増幅された標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズするオーバーハングを含む第二のアダプターを含む、態様55記載の方法。

(態様60)

前記方法が、(a)標的ポリヌクレオチドを作製するための、ポリヌクレオチドの断片化；(b)標的ポリヌクレオチドの一方又は両方の末端の脱リン酸化；並びに、(c)標的ポリヌクレオチドを作製するための、二本鎖ポリヌクレオチドの1本鎖ポリヌクレオチドへの変性；の1以上を含む、態様55～59のいずれか一項記載の方法。

(態様61)

前記複数の標的ポリヌクレオチドが、1本鎖DNAを含む、態様55～60のいずれか一項記載の方法。

(態様62)

前記標的ポリヌクレオチドが、セルフリーポリヌクレオチド、又はそれらの増幅産物を含む、態様55～61のいずれか一項記載の方法。

(態様63)

前記標的ポリヌクレオチドが、1本鎖のセルフリーDNA(cfDNA)を含む、態様55～62のいずれか一項記載の方法。

(態様64)

前記第一のテーリング反応における標的ポリヌクレオチドの量が、約0.1～500ng、1～100ng、又は5～50ngである、態様55～63のいずれか一項記載の方法。

(態様65)

前記標的ポリヌクレオチドが、平均長約50～600ヌクレオチドを有する、態様55～69のいずれか一項記載の方法。

(態様66)

前記標的ポリヌクレオチドが、工程(b)の前に、メチル化シトシン又は非メチル化シトシンを差次的に修飾するよう処理される、態様55～65のいずれか一項記載の方法。

(態様67)

前記差次的修飾が、標的ポリヌクレオチドを亜硫酸水素塩で処理することを含む、態様66記載の方法。

(態様68)

前記鋳型非依存的重合が、ポリメラーゼにより触媒される、態様55～67のいずれか一項記載の方法。

(態様69)

前記ポリメラーゼが、末端デオキシヌクレオチド転移酵素(TdT)である、態様68記載の方法。

(態様70)

前記第一のテールが、第二のテールとは異なる配列を含む、態様55～69のいずれか一項記載の方法。

(態様71)

前記第一のテール及び第二のテールが、同じ配列を含む、態様55～69のいずれか一項記載の方法。

(態様72)

前記第一のテール、第二のテール、又は両方が、1又は2種のヌクレオチドからなる、態様55～71のいずれか一項記載の方法。

(態様73)

前記第一のテール、第二のテール、又は両方が、ポリ-A、ポリ-C、及びポリ-C/Tからなる群から選択される、態様55～72のいずれか一項記載の方法。

(態様74)

前記テールの少なくとも1つが、2種のヌクレオチドのプールから重合された2種のヌク

10

20

30

40

50

レオチドからなり、ここでプール中の2種のヌクレオチドが、同じ又は異なる量で存在する、態様55~73のいずれか一項記載の方法。

(態様75)

前記プール中の2種のヌクレオチドが、約9:1、7:1、5:1、3:1、又は1:1の比である、態様74記載の方法。

(態様76)

前記第二のテーリング反応が省略される、態様55~75のいずれか一項記載の方法。

(態様77)

前記第一のアダプター及び第二のアダプターが、ポリヌクレオチド配列が異なる二本鎖領域を含む、態様55~76のいずれか一項記載の方法。

(態様78)

前記増幅が、直線的増幅を含む、態様55~77のいずれか一項記載の方法。

(態様79)

前記第一及び/又は第二のアダプターのオーバーハングが、3'-オーバーハングである、態様55~78のいずれか一項記載の方法。

(態様80)

前記第一及び/又は第二のアダプターが、3'-オーバーハング及び5'-オーバーハングの両方を有する、態様55~79のいずれか一項記載の方法。

(態様81)

前記第一及び/又は第二のアダプターの3'-オーバーハングが、長さ6~12ヌクレオチドである、態様55~80のいずれか一項記載の方法。

(態様82)

前記第一及び/又は第二のアダプターの5'-オーバーハングが、長さ2~6ヌクレオチドである、態様55~81のいずれか一項記載の方法。

(態様83)

(i)第一のテーリング反応及び第一のライゲーション反応が、同じ反応混合物中で起こるか、並びに/又は(ii)第二のテーリング反応及び第二のライゲーション反応が、同じ反応混合物中で起こる、態様55~82のいずれか一項記載の方法。

(態様84)

前記第二のアダプターの鎖にハイブリダイズされた第二のプライマーを伸長することにより、第二のアダプターの鎖を含む標的ポリヌクレオチドを増幅することを更に含む、態様55~83のいずれか一項記載の方法。

(態様85)

前記第一のアダプターの鎖とハイブリダイズする第一のプライマーの配列が、第二のアダプターとハイブリダイズする第二のプライマーの配列とは異なる、態様84記載の方法。

(態様86)

前記第二のアダプターの鎖にハイブリダイズされたプライマーによる増幅が、指数関数的増幅である、態様84又は85記載の方法。

(態様87)

第三のプライマー及び第四のプライマーによる増幅反応を更に含み、ここで(i)第三のプライマーは、第一のプライマーの少なくとも一部の相補体にハイブリダイズし、並びに(ii)第四のプライマーは、第二のプライマーの少なくとも一部の相補体にハイブリダイズする、態様84~86のいずれか一項記載の方法。

(態様88)

前記第三のプライマーのハイブリダイズ可能な配列が、第一のプライマーのハイブリダイズ可能な配列とは異なり、及び/又は第四のプライマーのハイブリダイズ可能な配列が、第二のプライマーのハイブリダイズ可能な配列とは異なる、態様87記載の方法。

(態様89)

前記第三のプライマー及び第四のプライマーの配列が異なる、態様87又は88記載の方法。

10

20

30

40

50

( 態様 9 0 )

前記第三のプライマー、第四のプライマー、又は両方が、標的ポリヌクレオチドの試料給源を同定するインデックス配列を含む、態様 87 ~ 89 のいずれか一項記載の方法。

( 態様 9 1 )

前記第二のプライマーを含む増幅の増幅産物を配列決定することを更に含む、態様 84 ~ 86 のいずれか一項記載の方法。

( 態様 9 2 )

前記第三及び第四のプライマーを含む増幅の増幅産物を配列決定することを更に含む、態様 87 ~ 90 のいずれか一項記載の方法。

( 態様 9 3 )

前記インデックス配列に従い配列決定リードを群別することを更に含む、態様 92 記載の方法。

( 態様 9 4 )

態様 55 ~ 93 のいずれか一項記載の方法において使用するための組成物。

( 態様 9 5 )

態様 55 ~ 93 のいずれか一項記載の方法に従い作製された、ポリヌクレオチド。

( 態様 9 6 )

ポリヌクレオチドライブラリーを作製するためのキットであり、このキットが：

- a. 鋳型非依存的ポリメラーゼ；
- b. 鋳型非依存的ポリメラーゼにより重合され得るヌクレオチドの第一プール；
- c. 鋳型非依存的ポリメラーゼにより重合され得るヌクレオチドの第二プール；
- d. ポリヌクレオチドの第一プールを重合することにより形成されるテールにハイブリダイズ可能であるオーバーハングを含む第一のアダプター；並びに
- e. 増幅された標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズ可能なオーバーハングを含む第二のアダプター；を含む、前記キット。

( 態様 9 7 )

前記鋳型非依存的ポリメラーゼが、末端デオキシヌクレオチド転移酵素(TdT)である、態様 96 記載のキット。

( 態様 9 8 )

前記第一のプール及び第二のプールの少なくとも一方が、他方のプールには存在しない少なくとも1種のヌクレオチドを含む、態様 96 又は 97 記載のキット。

( 態様 9 9 )

前記第一のプール及び第二のプールが、同じ1種以上のヌクレオチドを含む、態様 96 又は 97 記載のキット。

( 態様 1 0 0 )

前記第一のプール、第二のプール、又は両方が、1又は2種のヌクレオチドからなる、態様 96 ~ 98 のいずれか一項記載のキット。

( 態様 1 0 1 )

前記第一のプール、第二のプール、又は両方が、(i) dATP のプール、(ii) dCTP のプール、並びに(iii) dCTP 及び dTTP のプールからなる群から選択される、態様 96 ~ 100 のいずれか一項記載のキット。

( 態様 1 0 2 )

前記第一のプール及び第二のプールの少なくとも一方が、同じ又は異なる量で存在する2種のヌクレオチドからなる、態様 96 ~ 101 のいずれか一項記載のキット。

( 態様 1 0 3 )

前記プール中の2種のヌクレオチドが、約 9:1、7:1、5:1、3:1、又は 1:1 の比である、態様 102 記載のキット。

( 態様 1 0 4 )

前記第一のアダプター及び第二のアダプターが、ポリヌクレオチド配列が異なる二本鎖領域を含む、態様 96 ~ 103 のいずれか一項記載のキット。

10

20

30

40

50

( 態 様 1 0 5 )

前記第一及び/又は第二のアダプターのオーバーハングが、3'-オーバーハングである、態様96~104のいずれか一項記載のキット。

( 態 様 1 0 6 )

前記第一及び/又は第二のアダプターが、3'-オーバーハング及び5'-オーバーハングの両方を有する、態様96~104のいずれか一項記載のキット。

( 態 様 1 0 7 )

前記第一及び/又は第二のアダプターの3'-オーバーハングが、長さ6~12のヌクレオチドである、態様96~105のいずれか一項記載のキット。

( 態 様 1 0 8 )

前記第一及び/又は第二のアダプターの5'-オーバーハングが、長さ2~6のヌクレオチドである、態様96~106のいずれか一項記載のキット。

( 態 様 1 0 9 )

プライマー伸長反応の条件下で、第一のアダプターの鎖にハイブリダイズ可能である第一のプライマーを更に含む、態様96~107のいずれか一項記載のキット。

( 態 様 1 1 0 )

プライマー伸長反応の条件下で、第二のアダプターの鎖にハイブリダイズ可能である第二のプライマーを更に含む、態様96~109のいずれか一項記載のキット。

( 態 様 1 1 1 )

前記第一のアダプターの鎖にハイブリダイズ可能である第一のプライマーの配列が、第二のアダプターにハイブリダイズ可能である第二のプライマーの配列とは異なる、態様110記載のキット。

( 態 様 1 1 2 )

第三のプライマー及び第四のプライマーを更に含み、ここで(i)第三のプライマーは、プライマー伸長反応の条件下で、第一のプライマーの少なくとも一部の相補体にハイブリダイズ可能であり、並びに、(ii)第四のプライマーは、プライマー伸長反応の条件下で、第二のプライマーの少なくとも一部の相補体にハイブリダイズ可能である、態様110又は111記載のキット。

( 態 様 1 1 3 )

前記第三のプライマーのハイブリダイズ可能な配列が、第一のプライマーのハイブリダイズ可能な配列とは異なり、及び/又は第四のプライマーのハイブリダイズ可能な配列が、第二のプライマーのハイブリダイズ可能な配列とは異なる、態様112記載のキット。

( 態 様 1 1 4 )

前記第三のプライマーのハイブリダイズ可能な配列が、第一のプライマーのハイブリダイズ可能な配列に関して5'側にハイブリダイズし、及び/又は第四のプライマーのハイブリダイズ可能な配列が、第二のプライマーのハイブリダイズ可能な配列に関して5'側にハイブリダイズする、態様112又は113記載のキット。

( 態 様 1 1 5 )

前記第三のプライマー及び第四のプライマーの配列が異なる、態様112~114のいずれか一項記載のキット。

( 態 様 1 1 6 )

前記第三のプライマー、第四のプライマー、又は両方が、標的ポリヌクレオチドの試料給源を同定するインデックス配列を含む、態様112~115のいずれか一項記載のキット。

10

20

30

40

50