

【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7月19日 (2018.7.19)

【公表番号】特表2017-516487(P2017-516487A)

【公表日】平成29年6月22日 (2017.6.22)

【年通号数】公開・登録公報2017-023

【出願番号】特願2016-571229(P2016-571229)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 4 0 B 40/08 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

C 1 2 P 19/34 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 4 0 B 40/08

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 P 19/34 A

C 1 2 Q 1/68 Z

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 M 1/34 Z

【手続補正書】

【提出日】平成30年6月5日 (2018.6.5)

【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】

異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物の集団であって、各構築物は、

宿主生物からの元のゲノム DNA の第 1 の一本鎖セグメントと、

前記第 1 の一本鎖セグメントに結合し、前記宿主生物に対して外来性のヌクレオチド配列を含む第 2 の一本鎖合成核酸セグメントであって、前記ヌクレオチド配列は固有の識別子部分を含み、前記固有の識別子部分及び元のゲノム DNA の前記セグメントの両方の前記ヌクレオチド配列は、前記集団中の他の全てのキメラ一本鎖核酸構築物から、前記集団の 1 つのキメラ一本鎖核酸構築物を区別し、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物は環化され、ローリングサークル増幅及び / または配列決定に好適である、前記第 2 の一本鎖合成核酸セグメントとを含む、前記集団。

【請求項 2】

核酸分子の増幅方法であって、

請求項 1 に記載の異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物の集団を提供する工程、

前記異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物の集団を、ポリメラーゼ、並びに 6 ~ 10 ヌクレオチド長でありかつランダム塩基及び / またはヌクレオチド類似体を含む複数の短いプライマーとブレンドする工程であって、前記短いプライマーの 1 つ以上は、前記集団の 1 つ以上の環状キメラ一本鎖核酸構築物の一部に相補的であり、前記ブレンドする工程が増

幅反応混合物を形成する、工程、並びに

前記増幅反応混合物を1つ以上のハイブリダイゼーション及び伸長処理に供する工程であって、前記1つ以上の短いプライマーは前記環状キメラ一本鎖核酸構築物にハイブリダイズし、前記ポリメラーゼは前記ハイブリダイズした短いプライマーを伸長して複数の伸長生成物を生成し、各伸長生成物は2つ以上のタンデム線状配列を含み、各タンデム線状配列は前記集団からのキメラ一本鎖核酸構築物に相補的である、工程を含む、前記方法。

【請求項3】

核酸分子のタンデム線状コピーの生成方法であって、

請求項1に記載の異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物の集団を提供する工程、

前記異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物の集団を、鎖置換活性を有するポリメラーゼ及び1つ以上の一次プライマーとブレンドする工程であって、前記1つ以上の一次プライマーは、前記集団の1つ以上の環状キメラ一本鎖核酸構築物の一部に相補的であり、前記ブレンドする工程がローリングサークル伸長混合物を形成する、工程、

前記ローリングサークル伸長混合物を1つ以上のハイブリダイゼーション及び伸長処理に供する工程であって、前記1つ以上の一次プライマーは、前記環状キメラ一本鎖核酸構築物にハイブリダイズし、前記ポリメラーゼは、前記ハイブリダイズした一次プライマーを伸長して一本鎖伸長生成物を作製し、各一本鎖伸長生成物は2つ以上のタンデム線状配列を含み、各タンデム線状配列は前記集団からのキメラ一本鎖核酸構築物に相補的である、工程、

1つ以上の二次プライマーセットを提供する工程であって、各二次プライマーセットは、(a)前記1つ以上の一次プライマーから形成される一本鎖伸長生成物の第1の部分に相補的なヌクレオチド配列を含む第1の二次プライマーと、(b)一本鎖伸長生成物の第2の部分に相補的なヌクレオチド配列を含む第2の二次プライマーとを含み、前記第2の部分は、前記1つ以上の一次プライマーから形成される前記一本鎖伸長生成物の前記第1の部分とは異なりかつそれから置き換えられている、工程、

前記一本鎖伸長生成物と第1の二次プライマーが互いにハイブリダイズしている場合に両方を切断するエンドヌクレアーゼを提供する工程、

前記一本鎖伸長生成物を、鎖置換活性を欠くポリメラーゼ、リガーゼ、前記エンドヌクレアーゼ、及び前記1つ以上の二次プライマーセットとブレンドして、伸長-ライゲーション-切断反応混合物を形成する工程、

前記伸長-ライゲーション-切断反応混合物をハイブリダイゼーション及び伸長処理に供する工程であって、前記第1及び第2の二次プライマーは前記一本鎖伸長生成物にハイブリダイズし、前記ポリメラーゼは前記ハイブリダイズした二次プライマーを伸長し、前記リガーゼは前記伸長したハイブリダイゼーション二次プライマーをライゲーションして二本鎖伸長生成物を形成し、前記エンドヌクレアーゼは前記二本鎖伸長生成物を、前記第1の二次プライマーが前記一本鎖伸長生成物にハイブリダイズした位置で切断して、二本鎖伸長生成物断片を作製し、前記二本鎖伸長生成物断片は、前記集団からの前記キメラ一本鎖核酸構築物に相補的な2つ以上のタンデム線状配列を含む、工程を含む、前記方法。

【請求項4】

前記二本鎖伸長生成物断片内のタンデム線状配列の数は、前記伸長-ライゲーション-切断反応混合物内の第1及び第2の二次プライマーの比により決定される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記ローリングサークル伸長混合物は、メチル感受性制限エンドヌクレアーゼを更に含み、

前記ローリングサークル伸長混合物を前記1つ以上のハイブリダイゼーション及び伸長処理に供する工程の間に、前記エンドヌクレアーゼは、認識配列が非メチル化である場合に前記認識配列にて二本鎖DNAを切断し、それにより、元のメチル化ゲノムDNAの第

1の一本鎖セグメントを含むキメラ一本鎖核酸構築物からのみ一本鎖伸長生成物を選択的に形成する、  
請求項3に記載の方法。

【請求項6】

前記複数の伸長生成物または二本鎖伸長生成物断片を配列決定する工程を更に含む、請求項2、3、4、または5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

汎用リンカー配列が、前記配列決定の前に、前記伸長生成物もしくはその断片の5'及び3'末端、または前記二本鎖伸長生成物断片の5'及び3'末端に付加されている、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記配列決定は、蛍光プライマーハイブリダイゼーション、分子ビーコンハイブリダイゼーション、プライマー伸長、エキソヌクレアーゼベースの配列決定、リガーゼ検出反応、リガーゼ連鎖反応、パイロシーケンス法、蛍光ベースのSBS (sequencing-by-synthesis)、蛍光ベースのSBL (sequencing-by-ligation)、ナノポアベースの配列決定、イオンベースのSBS、及びイオンベースのSBLからなる群から選択される方法を用いて実施される、請求項6に記載の方法。

【請求項9】

以下を含む、システム：

異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物の集団であって、各構築物は、

宿主生物からの元のゲノムDNAの第1の一本鎖セグメントと、

前記第1の一本鎖セグメントに結合し、前記宿主生物に対して外来性であるヌクレオチド配列を含む第2の一本鎖核酸セグメントであって、前記ヌクレオチド配列は第1の固体支持体プライマー特異的部分、第2の固体支持体プライマー特異的部分、及び患者識別子配列を含み、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物は、環化され、ローリングサークル増幅及び/または配列決定に好適である、前記第2の一本鎖核酸セグメントと

を含む、前記集団、並びに

伸長生成物の集団であって、各伸長生成物は2つ以上のタンデム線状配列を含み、各タンデム線状配列は前記集団からの前記キメラ一本鎖核酸構築物に相補的であり、前記集団中の各伸長生成物は、前記集団の相補環状キメラ一本鎖核酸構築物にハイブリダイズする、前記伸長生成物の集団。

【請求項10】

複数の第1のオリゴヌクレオチドプライマーが固定化された固体支持体であって、各第1のオリゴヌクレオチドプライマーは、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第1の固体支持体プライマー特異的部分の前記ヌクレオチド配列と同一のヌクレオチド配列を含み、前記固体支持体上の前記複数の第1のオリゴヌクレオチドプライマーの1つ以上は、前記伸長生成物の集団の伸長生成物にハイブリダイズする、前記固体支持体を更に含む、請求項9に記載のシステム。

【請求項11】

以下を含む、システム：

異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物の集団であって、各構築物は、

宿主生物からの元のゲノムDNAの第1の一本鎖セグメントと、

前記第1の一本鎖セグメントに結合し、前記宿主生物に対して外来性であるヌクレオチド配列を含む第2の一本鎖核酸セグメントであって、前記ヌクレオチド配列は第1の固体支持体プライマー特異的部分、第2の固体支持体プライマー特異的部分、及び患者識別子配列を含み、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物はローリングサークル増幅及び/または配列決定に好適である、前記第2の一本鎖核酸セグメントと

を含む、前記集団、

1つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマーであって、各増幅プライマーは、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の一部に相補的な第1のヌクレオチド配列を少なくともも

含む、前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマー、並びにローリングサークル増幅に好適なポリメラーゼ。

【請求項 1 2】

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマーは、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第 2 の固体支持体プライマー特異的部分に相補的な第 1 のヌクレオチド配列を含み、前記 1 つ以上の増幅プライマーは固体支持体上に固定化されている、請求項 1 1 に記載のシステム。

【請求項 1 3】

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマーは、( i ) 前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第 1 の固体支持体プライマー特異的部分に相補的な第 1 のヌクレオチド配列、及び ( i i ) 前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第 2 の固体支持体プライマー特異的部分に相補的な第 2 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 1 に記載のシステム。

【請求項 1 4】

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマーは、

( i ) 前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記元のゲノム DNA セグメントに相補的な第 1 のヌクレオチド配列、

( i i ) 切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体と、前記オリゴヌクレオチド増幅プライマーの 3 ' ポリメラーゼ伸長をブロックするブロック基とを含む 3 ' 部分、及び

( i i i ) 切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体と捕捉基とを含み、前記捕捉基は固体支持体上に固定化されることが可能である、5 ' 部分を含む、請求項 1 1 に記載のシステム。

【請求項 1 5】

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマーは、

( a ) ( i ) 前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記元のゲノム DNA セグメントの第 1 の部分に相補的な第 1 のヌクレオチド配列、及び ( i i ) 切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体と、第 1 のオリゴヌクレオチド増幅プライマーの 3 ' ポリメラーゼ伸長をブロックするブロック基とを含む 3 ' 部分を有する、前記第 1 のオリゴヌクレオチド増幅プライマー、並びに

( b ) ( i ) 前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記元のゲノム DNA セグメントの第 2 の部分に相補的な第 1 のヌクレオチド配列、及び ( i i ) 切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体と捕捉基とを含み、前記捕捉基は固体支持体上で固定化されることが可能である、5 ' 部分を有する、第 2 のオリゴヌクレオチド増幅プライマーを含む、請求項 1 1 に記載のシステム。

【請求項 1 6】

前記 1 つ以上の増幅プライマーは、固体支持体に繋がれることが可能な部分を含む、請求項 1 1 に記載のシステム。

【請求項 1 7】

複数の第 1 のオリゴヌクレオチドプライマーが固定化された固体支持体であって、各第 1 のオリゴヌクレオチドプライマーは、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第 1 の固体支持体プライマー特異的部分の前記ヌクレオチド配列と同一のヌクレオチド配列を含む、前記固体支持体を更に含む、請求項 1 1 に記載のシステム。

【請求項 1 8】

複数の核酸分子の配列決定方法であって、

請求項 1 1 に記載のシステムを提供する工程、

前記集団中の前記環状キメラ一本鎖核酸構築物にハイブリダイズした 1 つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマーを前記ポリメラーゼとブレンドして、ローリングサークル増幅反応混合物を形成する工程、

前記ローリングサークル増幅反応混合物を、前記ポリメラーゼが前記1つ以上のハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド増幅プライマーを伸長して複数の一次伸長生成物を作製する伸長処理に供する工程であって、各一次伸長生成物は1つ以上のタンデム線状配列を含み、各タンデム線状配列は前記集団中の環状キメラ一本鎖核酸構築物に相補的である、工程、並びに

前記環状キメラ一本鎖核酸構築物を直接に配列決定するか、またはその前記複数の一次伸長生成物を配列決定する工程を含む、前記方法。

【請求項19】

前記集団の前記環状キメラ一本鎖核酸構築物は、

1つ以上の標的ゲノムDNAセグメントを含有する試料を提供する工程、

1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブを提供する工程であって、各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、(a)5'標的的特異的部分、(b)3'標的的特異的部分、及び(c)更なる部分を含み、前記更なる部分は、(i)前記患者識別子配列、(ii)前記第1の固体支持体プライマー特異的部分、及び(iii)前記第2の固体支持体プライマー特異的部分を含む、工程、

前記試料中に存在する場合、第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記3'標的的特異的部分が塩基特異的な様式で標的ゲノムDNAセグメントの相補3'末端にハイブリダイズするのに効果的な、かつ前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記5'標的的特異的部分が塩基特異的な様式で前記標的ゲノムDNAセグメントの相補5'末端にハイブリダイズするのに効果的な条件下にて、前記試料と前記1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブを接触させる工程、

前記第1のオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズした各標的ゲノムDNAセグメントの前記3'及び5'末端の間でライゲーション能のある接合部を生成する工程、並びに

各標的ゲノムDNAセグメントの前記ライゲーション接合部をライゲーションして、前記集団の異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物を形成する工程を含む方法により調製される、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記集団の前記異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物は、

1つ以上の標的ゲノムDNAセグメントを含有する試料を提供する工程であって、前記標的ゲノムDNAセグメントは、1つ以上の塩基の違いまたは1つ以上のメチル化残基を含有する可能性がある、工程、

リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメントを形成するために、ヌクレオチドリンカーを前記標的ゲノムDNAセグメントの3'及び5'末端に付加させる工程、

1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブを提供する工程であって、各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、(a)前記標的ゲノムDNAセグメントの前記3'ヌクレオチドリンカーに相補的な3'部分、(b)前記標的ゲノムDNAセグメントの前記5'ヌクレオチドリンカーに相補的な5'部分、及び(c)更なる部分を含み、前記更なる部分は、(i)前記患者識別子配列、(ii)前記第1の固体支持体プライマー特異的部分、及び/または(iii)前記第2の固体支持体プライマー特異的部分を含む、工程、

前記試料中に存在する場合、前記リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメントの相補ヌクレオチドリンカー配列に前記第1のオリゴヌクレオチドプローブが塩基特異的な様式でハイブリダイズするのに効果的な条件下にて、前記試料と前記1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブを接触させる工程、

前記第1のオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズした前記標的ゲノムDNAセグメントの前記3'及び5'末端の結合に好適な1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程、並びに

前記1つ以上のライゲーション接合部にて前記標的ゲノムDNAセグメントをライゲーションし、前記集団の異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物を形成する工程

を含む方法により調製される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記集団の前記異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物は、

1 つ以上の標的ゲノム DNA セグメントを含有する試料を提供する工程であって、前記標的ゲノム DNA セグメントは 3' 及び 5' 末端を有する、工程、

リンカー配列を前記標的ゲノム DNA セグメントの前記 3' 及び 5' 末端に付加させる工程であって、前記リンカー配列は、(i) 1 つ以上の患者識別子配列、(ii) 前記第 1 の固体支持体プライマー特異的部分、及び (iii) 前記第 2 の固体支持体プライマー特異的部分を含み、リンカーが付加された標的ゲノム DNA セグメントを形成する、工程、

1 つ以上の第 1 のオリゴヌクレオチドプローブを提供する工程であって、各第 1 のオリゴヌクレオチドプローブは、(a) 前記リンカーが付加された標的ゲノム DNA セグメントの前記 3' リンカー配列に相補的な部分、及び (b) 前記リンカーが付加された標的ゲノム DNA セグメントの前記 5' リンカー配列に相補的な部分を含む、工程、並びに

前記試料中に存在する場合、前記リンカーが付加された標的ゲノム DNA セグメントの相補 3' 及び 5' リンカー配列に前記第 1 のオリゴヌクレオチドプローブが塩基特異的な様式でハイブリダイズするのに効果的な条件下にて、前記試料と前記 1 つ以上の第 1 のオリゴヌクレオチドプローブを接触させる工程、

前記第 1 のオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズした、前記リンカーが付加された標的ゲノム DNA セグメントの 3' 及び 5' 末端の結合に好適な 1 つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程、並びに

前記リンカーが付加された標的ゲノム DNA セグメントを、前記 1 つ以上のライゲーション接合部にてライゲーションし、前記集団の異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物を形成する工程

を含む方法により調製される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

試料内での、互いに結合した異なる第 1 標的領域及び第 2 標的領域を含む可能性がある 1 つ以上の核酸分子の識別方法であって、

互いに結合した異なる第 1 標的領域及び第 2 標的領域を含む 1 つ以上の核酸分子を含む可能性がある試料を提供する工程、

1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブセットを提供する工程であって、各プローブセットは、(i) 5' 第 1 標的的特異的部分と、3' 第 2 標的的特異的部分と、更なる部分とを含む第 1 のオリゴヌクレオチドプローブ、及び、(ii) 5' 第 2 標的的特異的部分と、3' 第 1 標的的特異的部分と、更なる部分とを含む第 2 のオリゴヌクレオチドプローブを含み、プローブセットの前記第 1 または第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの前記更なる部分は、(i) 固有の識別子配列、(ii) 患者識別子配列、(iii) 1 つ以上のプライマー結合配列、または (i)、(ii)、及び (iii) の任意の組み合わせを含む、工程、

前記試料中に存在する場合、プローブセットの第 1 及び第 2 のオリゴヌクレオチドプローブが塩基特異的な様式で前記核酸分子の対応する第 1 及び第 2 標的領域にハイブリダイズするのに効果的な条件下にて、前記試料と前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブセットを接触させる工程、

前記プローブセットが核酸分子の相補第 1 標的領域及び第 2 標的領域にハイブリダイズする場合に、プローブセットの第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの 3' 末端の、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの 5' 末端への結合に好適な、かつプローブセットの第 1 のオリゴヌクレオチドプローブの 5' 末端の、第 2 のオリゴヌクレオチドプローブの 3' 末端への結合に好適な、1 つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程、

前記 1 つ以上のライゲーション能のある接合部にてプローブセットの前記第 1 及び第 2 のオリゴヌクレオチドをライゲーションし、更なる部分に結合した核酸分子の前記第 1 及び第 2 の異なる標的領域に対応するヌクレオチド配列を含む環状ライゲーション生成物を

形成する工程、並びに

前記試料内で前記環状ライゲーション生成物を検出及び区別する工程であって、それにより、存在する場合、前記試料内で互いに結合した異なる第1標的領域及び第2標的領域を含む1つ以上の核酸分子の存在を識別する、工程を含む、前記方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

本発明が重要であるのは、本発明が、ハイスループットの診断モードでの使用に好適な、変異、発現、コピー数、転座、選択的スプライシング、及びメチル化変化の非常に高感度な検出を可能にするための、血液からの、即ち無細胞循環DNA、エクソソーム、マイクロRNA、循環腫瘍細胞、または全血細胞からの、ヒトゲノム及びトランスクリプトームの領域の、非常に特異的な標的指向させた捕捉のための方法を教示するからである。本発明の一本鎖構築物は、次世代配列決定を含む、多数の異なる技術による読出しに好適であり、読出し技術を不可知的なものにするように設計されている。捕捉の感度を最大化するために、本発明はハイブリダイゼーションだけでなく、ポリメラーゼ伸長及びライゲーションも使用して、偽陽性を減少させる。特異性を最大化するために、ライゲーションされていないプローブは、エキソヌクレアーゼによって分解され、環化標的配列を保護する。更なる特異性は、ローリングサークル増幅により作製された、元のゲノム配列のタンデムリピートを配列決定することにより得ることができる。最後に、本発明は、ローリングサークル増幅により表面に作製された、元のゲノム配列から生成されたタンデムリピートを捕捉し、次に、これらをSBS (sequencing-by-synthesis) に供することで、非常に正確な変異検出、メチル化状態、及びトランスクリプトーム計数を可能にする方法を教示する。本方法は特に、癌特異的なマーカーの血液から直接識別、癌のスクリーニング、並びに治療の有効性及び再発の監視に好適である。本方法はまた、母体血液から、コピーの異常及びメンデル遺伝病を直接、出生前に診断するのにも好適である。

[本発明1001]

異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物の集団であって、各構築物は、  
宿主生物からの元のゲノムDNAの第1の一本鎖セグメントと、  
前記第1の一本鎖セグメントに結合し、前記宿主生物に対して外来性のヌクレオチド配列を含む第2の一本鎖合成核酸セグメントであって、前記ヌクレオチド配列は固有の識別子部分を含み、前記固有の識別子部分及び元のゲノムDNAの前記セグメントの両方の前記ヌクレオチド配列は、前記集団中の他の全てのキメラ一本鎖核酸構築物から、前記集団の1つのキメラ一本鎖核酸構築物を区別し、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物は環化され、ローリングサークル増幅及び/または配列決定に好適である、前記第2の一本鎖合成核酸セグメントと  
を含む、前記集団。

[本発明1002]

核酸分子の増幅方法であって、  
本発明1001の異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物の集団を提供する工程、  
前記異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物の集団を、ポリメラーゼ、並びに6~10ヌクレオチド長でありかつランダム塩基及び/またはヌクレオチド類似体を含む複数の短いプライマーとブレンドする工程であって、前記短いプライマーの1つ以上は、前記集団の1つ以上の環状キメラ一本鎖核酸構築物の一部に相補的であり、前記ブレンドする工程が増幅反応混合物を形成する、工程、並びに  
前記増幅反応混合物を1つ以上のハイブリダイゼーション及び伸長処理に供する工程で

あって、前記1つ以上の短いプライマーは前記環状キメラ一本鎖核酸構築物にハイブリダイズし、前記ポリメラーゼは前記ハイブリダイズした短いプライマーを伸長して複数の伸長生成物を生成し、各伸長生成物は2つ以上のタンデム線状配列を含み、各タンデム線状配列は前記集団からのキメラ一本鎖核酸構築物に相補的である、工程を含む、前記方法。

[本発明1003]

核酸分子のタンデム線状コピーの生成方法であって、

本発明1001の異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物の集団を提供する工程、

前記異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物の集団を、鎖置換活性を有するポリメラーゼ及び1つ以上の一次プライマーとブレンドする工程であって、前記1つ以上の一次プライマーは、前記集団の1つ以上の環状キメラ一本鎖核酸構築物の一部に相補的であり、前記ブレンドする工程がローリングサークル伸長混合物を形成する、工程、

前記ローリングサークル伸長混合物を1つ以上のハイブリダイゼーション及び伸長処理に供する工程であって、前記1つ以上の一次プライマーは、前記環状キメラ一本鎖核酸構築物にハイブリダイズし、前記ポリメラーゼは、前記ハイブリダイズした一次プライマーを伸長して一本鎖伸長生成物を作製し、各一本鎖伸長生成物は2つ以上のタンデム線状配列を含み、各タンデム線状配列は前記集団からのキメラ一本鎖核酸構築物に相補的である、工程、

1つ以上の二次プライマーセットを提供する工程であって、各二次プライマーセットは、(a) 前記1つ以上の一次プライマーから形成される一本鎖伸長生成物の第1の部分に相補的なヌクレオチド配列を含む第1の二次プライマーと、(b) 一本鎖伸長生成物の第2の部分に相補的なヌクレオチド配列を含む第2の二次プライマーとを含み、前記第2の部分は、前記1つ以上の一次プライマーから形成される前記一本鎖伸長生成物の前記第1の部分とは異なりかつそれから置き換えられている、工程、

前記一本鎖伸長生成物と第1の二次プライマーが互いにハイブリダイズしている場合に両方を切断するエンドヌクレアーゼを提供する工程、

前記一本鎖伸長生成物を、鎖置換活性を欠くポリメラーゼ、リガーゼ、前記エンドヌクレアーゼ、及び前記1つ以上の二次プライマーセットとブレンドして、伸長・ライゲーション・切断反応混合物を形成する工程、

前記伸長・ライゲーション・切断反応混合物をハイブリダイゼーション及び伸長処理に供する工程であって、前記第1及び第2の二次プライマーは前記一本鎖伸長生成物にハイブリダイズし、前記ポリメラーゼは前記ハイブリダイズした二次プライマーを伸長し、前記リガーゼは前記伸長したハイブリダイゼーション二次プライマーをライゲーションして二本鎖伸長生成物を形成し、前記エンドヌクレアーゼは前記二本鎖伸長生成物を、前記第1の二次プライマーが前記一本鎖伸長生成物にハイブリダイズした位置で切断して、二本鎖伸長生成物断片を作製し、前記二本鎖伸長生成物断片は、前記集団からの前記キメラ一本鎖核酸構築物に相補的な2つ以上のタンデム線状配列を含む、工程を含む、前記方法。

[本発明1004]

前記二本鎖伸長生成物断片内のタンデム線状配列の数は、前記伸長・ライゲーション・切断反応混合物内の第1及び第2の二次プライマーの比により決定される、本発明1003の方法。

[本発明1005]

前記ローリングサークル伸長混合物は、メチル感受性制限エンドヌクレアーゼを更に含む、

前記ローリングサークル伸長混合物を前記1つ以上のハイブリダイゼーション及び伸長処理に供する工程の間に、前記エンドヌクレアーゼは、認識配列が非メチル化である場合に前記認識配列にて二本鎖DNAを切断し、それにより、元のメチル化ゲノムDNAの第1の一本鎖セグメントを含むキメラ一本鎖核酸構築物からのみ一本鎖伸長生成物を選択的に形成する、



本発明1003の方法。

[本発明1006]

前記複数の伸長生成物または二本鎖伸長生成物断片を配列決定する工程を更に含む、本発明1002、1003、1004、または1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

汎用リンカー配列が、前記配列決定の前に、前記伸長生成物もしくはその断片の5'及び3'末端、または前記二本鎖伸長生成物断片の5'及び3'末端に付加されている、本発明1006の方法。

[本発明1008]

前記配列決定は、蛍光プライマーハイブリダイゼーション、分子ビーコンハイブリダイゼーション、プライマー伸長、エキソヌクレアーゼベースの配列決定、リガーゼ検出反応、リガーゼ連鎖反応、パイロシーケンス法、蛍光ベースのSBS (sequencing-by-synthesis)、蛍光ベースのSBL (sequencing-by-ligation)、ナノポアベースの配列決定、イオンベースのSBS、及びイオンベースのSBLからなる群から選択される方法を用いて実施される、本発明1006の方法。

[本発明1009]

以下を含む、システム：

異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物の集団であって、各構築物は、

宿主生物からの元のゲノムDNAの第1の一本鎖セグメントと、

前記第1の一本鎖セグメントに結合し、前記宿主生物に対して外来性であるヌクレオチド配列を含む第2の一本鎖核酸セグメントであって、前記ヌクレオチド配列は第1の固体支持体プライマー特異的部分、第2の固体支持体プライマー特異的部分、及び患者識別子配列を含み、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物は、環化され、ローリングサークル増幅及び/または配列決定に好適である、前記第2の一本鎖核酸セグメントと

を含む、前記集団、並びに

伸長生成物の集団であって、各伸長生成物は2つ以上のタンDEM線状配列を含み、各タンDEM線状配列は前記集団からの前記キメラ一本鎖核酸構築物に相補的であり、前記集団中の各伸長生成物は、前記集団の相補環状キメラ一本鎖核酸構築物にハイブリダイズする、前記伸長生成物の集団。

[本発明1010]

複数の第1のオリゴヌクレオチドプライマーが固定化された固体支持体であって、各第1のオリゴヌクレオチドプライマーは、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第1の固体支持体プライマー特異的部分の前記ヌクレオチド配列と同一のヌクレオチド配列を含み、前記固体支持体上の前記複数の第1のオリゴヌクレオチドプライマーの1つ以上は、前記伸長生成物の集団の伸長生成物にハイブリダイズする、前記固体支持体を更に含む、本発明1009のシステム。

[本発明1011]

架橋オリゴヌクレオチドの集団であって、各架橋オリゴヌクレオチドはヌクレオチド配列の2つ以上の反復を含み、前記ヌクレオチド配列は、前記集団中の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第2の一本鎖核酸セグメントの前記ヌクレオチド配列の一部と同一であり、各架橋オリゴヌクレオチドの前記ヌクレオチド配列反復の1つ以上は、前記伸長生成物の集団の伸長生成物の前記タンDEM線状配列の相補部分にハイブリダイズする、前記集団を更に含む、本発明1009のシステム。

[本発明1012]

複数の第1のオリゴヌクレオチドプライマーが固定化された固体支持体であって、各第1のオリゴヌクレオチドプライマーは、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第1の固体支持体プライマー特異的部分の前記ヌクレオチド配列と同一のヌクレオチド配列を含み、架橋オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記伸長生成物の前記タンDEM線状配列は、前記固体支持体上で1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプライマーにハイブリダイズする、前記固体支持体

を更に含む、本発明1011のシステム。

[本発明1013]

以下を含む、システム：

異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物の集団であって、各構築物は、

宿主生物からの元のゲノムDNAの第1の一本鎖セグメントと、

前記第1の一本鎖セグメントに結合し、前記宿主生物に対して外来性であるヌクレオチド配列を含む第2の一本鎖核酸セグメントであって、前記ヌクレオチド配列は第1の固体支持体プライマー特異的部分、第2の固体支持体プライマー特異的部分、及び患者識別子配列を含み、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物はローリングサークル増幅及び/または配列決定に好適である、前記第2の一本鎖核酸セグメントと

を含む、前記集団、

1つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマーであって、各増幅プライマーは、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の一部に相補的な第1のヌクレオチド配列を少なくとも含む、前記1つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマー、並びに

ローリングサークル増幅に好適なポリメラーゼ。

[本発明1014]

前記1つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマーは、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第2の固体支持体プライマー特異的部分に相補的な第1のヌクレオチド配列を含み、前記1つ以上の増幅プライマーは固体支持体上に固定化されている、本発明1013のシステム。

[本発明1015]

前記1つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマーは、(i)前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第1の固体支持体プライマー特異的部分に相補的な第1のヌクレオチド配列、及び(ii)前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第2の固体支持体プライマー特異的部分に相補的な第2のヌクレオチド配列を含む、本発明1013のシステム。

[本発明1016]

前記1つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマーは、

(i)前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記元のゲノムDNAセグメントに相補的な第1のヌクレオチド配列、

(ii)切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体と、前記オリゴヌクレオチド増幅プライマーの3'ポリメラーゼ伸長をブロックするブロック基とを含む3'部分、及び

(iii)切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体と捕捉基とを含み、前記捕捉基は固体支持体上に固定化されることが可能である、5'部分を含む、本発明1013のシステム。

[本発明1017]

前記1つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマーは、

(a)(i)前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記元のゲノムDNAセグメントの第1の部分に相補的な第1のヌクレオチド配列、及び(ii)切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体と、第1のオリゴヌクレオチド増幅プライマーの3'ポリメラーゼ伸長をブロックするブロック基とを含む3'部分を有する、前記第1のオリゴヌクレオチド増幅プライマー、並びに

(b)(i)前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記元のゲノムDNAセグメントの第2の部分に相補的な第1のヌクレオチド配列、及び(ii)切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体と捕捉基とを含み、前記捕捉基は固体支持体上で固定化されることが可能である、5'部分を有する、第2のオリゴヌクレオチド増幅プライマーを含む、本発明1013のシステム。

[本発明1018]

前記1つ以上の増幅プライマーは、固体支持体に繋がれることが可能な部分を含む、本発明1013のシステム。

[本発明1019]

複数の第1のオリゴヌクレオチドプライマーが固定化された固体支持体であって、各第1のオリゴヌクレオチドプライマーは、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第1の固体支持体プライマー特異的部分の前記ヌクレオチド配列と同一のヌクレオチド配列を含む、前記固体支持体を更に含む、本発明1013のシステム。

[本発明1020]

前記固体支持体は、複数の固定化された第2のオリゴヌクレオチドプライマーであって、各第2のオリゴヌクレオチドプライマーは、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第2の固体支持体プライマー特異的部分の前記ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む、前記第2のオリゴヌクレオチドプライマーを更に含む、本発明1019のシステム。

[本発明1021]

架橋オリゴヌクレオチドの集団であって、各架橋オリゴヌクレオチドはヌクレオチド配列の2つ以上の反復を含み、前記ヌクレオチド配列は、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第2の一本鎖核酸セグメントの前記ヌクレオチド配列の少なくとも一部と同一である、前記集団を更に含む、本発明1013のシステム。

[本発明1022]

前記ポリメラーゼは鎖置換ポリメラーゼである、本発明1013のシステム。

[本発明1023]

複数の核酸分子の配列決定方法であって、  
本発明1013のシステムを提供する工程、  
前記集団中の前記環状キメラ一本鎖核酸構築物にハイブリダイズした1つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマーを前記ポリメラーゼとブレンドして、ローリングサークル増幅反応混合物を形成する工程、  
前記ローリングサークル増幅反応混合物を、前記ポリメラーゼが前記1つ以上のハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド増幅プライマーを伸長して複数の一次伸長生成物を作製する伸長処理に供する工程であって、各一次伸長生成物は1つ以上のタンデム線状配列を含み、各タンデム線状配列は前記集団中の環状キメラ一本鎖核酸構築物に相補的である、工程、並びに  
前記環状キメラ一本鎖核酸構築物を直接に配列決定するか、またはその前記複数の一次伸長生成物を配列決定する工程を含む、前記方法。

[本発明1024]

前記ローリングサークル増幅反応混合物は、メチル感受性制限エンドヌクレアーゼを更に含み、  
前記ローリングサークル増幅反応混合物を前記伸長処理に供する工程の間に、前記エンドヌクレアーゼは、認識配列が非メチル化である場合に前記認識配列にて二本鎖DNAを切断し、それにより、元のメチル化ゲノムDNAの第1の一本鎖セグメントを含むキメラ一本鎖核酸構築物からのみ一次伸長生成物を選択的に形成する、  
本発明1023の方法。

[本発明1025]

複数の第1のオリゴヌクレオチドプライマーが固定化された固体支持体を提供する工程であって、各第1のオリゴヌクレオチドプライマーは、前記集団の前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第1の固体支持体プライマー特異的部分の前記ヌクレオチド配列と同一のヌクレオチド配列を含む、工程、及び  
前記複数の一次伸長生成物を、前記配列決定の前に前記固体支持体上で前記複数の第1のオリゴヌクレオチドプライマーの1つ以上にハイブリダイズさせる工程

を更に含む、本発明1023の方法。

[本発明1026]

前記固体支持体上の2つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプライマーが一次伸長生成物の2つ以上のタンデム線状配列にハイブリダイズし、前記方法は、

ポリメラーゼを用いて、前記2つ以上のハイブリダイズした第1のオリゴヌクレオチドプライマーを伸長して、複数の固定化された二次伸長生成物を形成する工程であって、各二次伸長生成物は、前記ハイブリダイズした一次伸長生成物の1つのタンデム線状配列に相補的なヌクレオチド配列を含む、工程、及び

前記一次伸長生成物を前記固体支持体上の前記第1のオリゴヌクレオチドプライマーから変性させる工程であって、前記配列決定は、前記固定化された二次伸長生成物の配列決定を伴う、工程

を更に含む、本発明1025の方法。

[本発明1027]

前記固体支持体上の2つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプライマーは一次伸長生成物の2つ以上のタンデム線状配列にハイブリダイズし、前記方法は、

配列決定プライマーを前記固体支持体上の前記一次伸長生成物の各タンデム線状配列にハイブリダイズさせる工程であって、前記配列決定プライマーは、前記固体支持体上で前記第1のオリゴヌクレオチドプライマーにハイブリダイズした前記タンデム線状配列の前記領域に対して5'である前記タンデム線状配列の領域にハイブリダイズする、工程、

前記配列決定プライマーを伸長する工程、及び

前記伸長に基づき、前記固体支持体上の前記一次伸長生成物の各タンデム線状配列を配列決定する工程

を更に含む、本発明1025の方法。

[本発明1028]

前記1つ以上の増幅プライマーは、(i)前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第1の固体支持体プライマー特異的部分に相補的な第1のヌクレオチド配列部分、及び(ii)前記キメラ一本鎖核酸構築物の前記第2の固体支持体プライマー特異的部分に相補的な第2のヌクレオチド配列部分を含む、本発明1023の方法。

[本発明1029]

前記1つ以上の増幅プライマーは更なる部分を含み、前記更なる部分は前記固体支持体に繋がれることが可能であり、前記方法は、

前記供する工程の前または間に、前記固体支持体上で前記一次伸長生成物の前記更なる部分を捕捉する工程

を更に含む、本発明1023の方法。

[本発明1030]

前記1つ以上のオリゴヌクレオチド増幅プライマーは、前記集団の前記環状キメラ一本鎖核酸構築物の前記第2の固体支持体プライマー特異的部分に相補的でありかつ前記固体支持体上で固定化されている、第1のヌクレオチド配列部分を含み、それによって、前記供する工程の間に形成される前記複数の一次伸長生成物を前記固体支持体に繋ぐ、本発明1025の方法。

[本発明1031]

前記配列決定は、蛍光プライマーハイブリダイゼーション、分子ビーコンハイブリダイゼーション、プライマー伸長、エキソヌクレアーゼベースの配列決定、リガーゼ検出反応、リガーゼ連鎖反応、パイロシーケンス法、蛍光ベースのSBS、蛍光ベースのSBLナノポアベースの配列決定、イオンベースのSBS、及びイオンベースのSBLからなる群から選択される方法を用いて実施される、本発明1023の方法。

[本発明1032]

架橋オリゴヌクレオチドの集団を提供する工程であって、各架橋オリゴヌクレオチドはヌクレオチド配列の2つ以上の反復を含み、前記ヌクレオチド配列は、前記集団の前記環状キメラ一本鎖核酸構築物の前記第2の一本鎖核酸セグメントの前記ヌクレオチド配列の

少なくとも1部分と同一である、工程、及び

前記集団の架橋オリゴヌクレオチド上で一次伸長生成物の1つ以上のタンデム線状配列を捕捉する工程であって、それにより、前記配列決定の前に前記一次伸長生成物を縮合して密な構造にする、工程  
を更に含む、本発明1023の方法。

[本発明1033]

前記集団の前記環状キメラ一本鎖核酸構築物は、

1つ以上の標的ゲノムDNAセグメントを含有する試料を提供する工程、

1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブを提供する工程であって、各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、(a)5'標的特異的部分、(b)3'標的特異的部分、及び(c)更なる部分を含み、前記更なる部分は、(i)前記患者識別子配列、(ii)前記第1の固体支持体プライマー特異的部分、及び(iii)前記第2の固体支持体プライマー特異的部分を含む、工程、

前記試料中に存在する場合、第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記3'標的特異的部分が塩基特異的な様式で標的ゲノムDNAセグメントの相補3'末端にハイブリダイズするのに効果的な、かつ前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記5'標的特異的部分が塩基特異的な様式で前記標的ゲノムDNAセグメントの相補5'末端にハイブリダイズするのに効果的な条件下にて、前記試料と前記1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブを接触させる工程、

前記第1のオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズした各標的ゲノムDNAセグメントの前記3'及び5'末端の間でライゲーション能のある接合部を生成する工程、並びに

各標的ゲノムDNAセグメントの前記ライゲーション接合部をライゲーションして、前記集団の異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物を形成する工程  
を含む方法により調製される、本発明1023の方法。

[本発明1034]

前記1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程は、

前記標的ゲノムDNAセグメントの前記ハイブリダイズした3'末端をポリメラーゼで伸長して、前記標的ゲノムDNAセグメントの前記ハイブリダイズした5'末端とライゲーション接合部を形成すること  
を含む、本発明1033の方法。

[本発明1035]

前記ポリメラーゼは、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性、または3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を含む、本発明1034の方法。

[本発明1036]

前記1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程は、

前記標的ゲノムDNAセグメント上で、ライゲーションに好適な3'OH及び/または5'ホスフェートを遊離させること  
を含む、本発明1033の方法。

[本発明1037]

前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記更なる部分は切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を含む、本発明1033の方法。

[本発明1038]

前記ライゲーションの後、ライゲーションしていない標的ゲノムDNAセグメント、第1のオリゴヌクレオチドプローブ、及び他の非環化核酸分子を前記試料から取り除く工程  
を更に含む、本発明1033の方法。

[本発明1039]

各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、取り外し可能な3'ブロック基、及び/または、固体支持体上での捕捉に好適な5'捕捉基を更に含む、本発明1033の方法。

[本発明1040]

前記1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程は、

1つ以上の第2のオリゴヌクレオチドプローブを提供することであって、各第2のオリゴヌクレオチドプローブは、前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記更なる部分の少なくとも一部に相補的なヌクレオチド配列を含む、こと、及び

前記第2のオリゴヌクレオチドプローブを、前記接触させる工程の間に前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記更なる部分にハイブリダイズさせることであって、前記ハイブリダイズさせることは、前記標的ゲノムDNAセグメントと前記第2のオリゴヌクレオチドプローブとの間でライゲーション能のある接合部を形成する、ことを含む、本発明1033の方法。

[本発明1041]

ヌクレオチドリンカーを前記標的ゲノムDNAセグメントの一端または両端に付加させる工程であって、前記リンカーの1つ以上は、前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記更なる部分の領域に相補的であり、前記接触させる工程の間、前記1つ以上のヌクレオチドリンカーは塩基特異的な様式で前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記更なる部分の相補領域にハイブリダイズする、工程を更に含む、本発明1033の方法。

[本発明1042]

前記1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記3'及び5'標的特異的部分は、前記標的ゲノムDNAセグメントとの1つ以上のヌクレオチドミスマッチを含有するように設計されており、前記伸長して1つ以上のライゲーション接合部を形成することの後、前記標的ゲノムDNAセグメントは前記ポリメラーゼ伸長部分から区別されることができる、本発明1034の方法。

[本発明1043]

前記集団の前記異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物は、

1つ以上の標的ゲノムDNAセグメントを含有する試料を提供する工程であって、前記標的ゲノムDNAセグメントは、1つ以上の塩基の違いまたは1つ以上のメチル化残基を含有する可能性がある、工程、

リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメントを形成するために、ヌクレオチドリンカーを前記標的ゲノムDNAセグメントの3'及び5'末端に付加させる工程、

1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブを提供する工程であって、各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、(a)前記標的ゲノムDNAセグメントの前記3'ヌクレオチドリンカーに相補的な3'部分、(b)前記標的ゲノムDNAセグメントの前記5'ヌクレオチドリンカーに相補的な5'部分、及び(c)更なる部分を含み、前記更なる部分は、(i)前記患者識別子配列、(ii)前記第1の固体支持体プライマー特異的部分、及び/または(iii)前記第2の固体支持体プライマー特異的部分を含む、工程、

前記試料中に存在する場合、前記リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメントの相補ヌクレオチドリンカー配列に前記第1のオリゴヌクレオチドプローブが塩基特異的な様式でハイブリダイズするのに効果的な条件下にて、前記試料と前記1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブを接触させる工程、

前記第1のオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズした前記標的ゲノムDNAセグメントの前記3'及び5'末端の結合に好適な1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程、並びに

前記1つ以上のライゲーション接合部にて前記標的ゲノムDNAセグメントをライゲーションし、前記集団の異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物を形成する工程を含む方法により調製される、本発明1023の方法。

[本発明1044]

前記第1のオリゴヌクレオチドプローブは、3'標的特異的部分及び/または5'標的特異的部分を更に含む、本発明1043の方法。

[本発明1045]

前記1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程は、

前記標的ゲノムDNAセグメントの前記ハイブリダイズした3'末端をポリメラーゼで伸長し、前記標的ゲノムDNAセグメントの前記ハイブリダイズした5'末端とライゲーション接合部を形成することを含む、本発明1043の方法。

[本発明1046]

前記ポリメラーゼは、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性、または3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を含む、本発明1045の方法。

[本発明1047]

前記1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程は、前記標的ゲノムDNAセグメント上で、ライゲーションに好適な3'OH及び/または5'ホスフェートを遊離させることを含む、本発明1043の方法。

[本発明1048]

前記標的ゲノムDNAセグメントは、ライゲーションまたは伸長に好適な5'及び3'末端を有する二本鎖標的ゲノムDNAセグメントであり、前記ヌクレオチドリンカー配列は第1及び第2のリンカーオリゴヌクレオチドを含み、(i)前記第1のリンカーオリゴヌクレオチドは、5'一本鎖部分、1つ以上の切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体、固有の識別子配列、前記第2のリンカーオリゴヌクレオチドに相補的な3'末端、及び3'OHを含み、並びに(ii)前記第2のリンカーオリゴヌクレオチドは、5'OH末端、前記第1のリンカーオリゴヌクレオチドに相補的な5'部分、及び任意の3'ブロック末端を含み、前記第2のリンカーオリゴヌクレオチドは前記第1のリンカーオリゴヌクレオチドの相補部分にハイブリダイズして複合リンカーを形成し、前記付加させる工程は、

(i)前記複合リンカーの前記第1のリンカーオリゴヌクレオチドの前記3'OHの、前記二本鎖標的ゲノムDNAセグメントの前記5'末端へのライゲーションに好適な、及び(ii)前記複合リンカーの前記第1のリンカーオリゴヌクレオチドの相補コピーを作製するための前記二本鎖標的ゲノムDNAセグメントの前記3'末端のポリメラーゼ伸長に好適な、及び(iii)前記接触させる工程に適した前記リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメントを形成するための前記1つ以上の切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の切断に好適な条件下にて、前記二本鎖標的ゲノムDNAセグメントを前記複合リンカー、リガーゼ、及びポリメラーゼとブレンドすることを含む、本発明1043の方法。

[本発明1049]

前記第1のリンカーオリゴヌクレオチドは更なる部分を含み、前記更なる部分は(i)固体支持体プライマー特異的部分、(ii)患者識別子配列、(iii)1つ以上のプライマー結合配列、または(i)、(ii)、及び(iii)の任意の組み合わせを含む、本発明1048の方法。

[本発明1050]

前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記3'末端がポリメラーゼ伸長またはライゲーションに不適となるように、前記1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブは、切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体とブロック基とを含む3'部分を有し、前記方法は、

前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を前記接触させる工程の間に切断する工程であって、それにより、前記ライゲーションの前に前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの3'OHを遊離させる、工程を更に含む、本発明1043の方法。

[本発明1051]

前記ライゲーションの後、ライゲーションしていない標的ゲノムDNAセグメント、第1のオリゴヌクレオチドプローブ、及び他の非環化核酸分子を前記試料から取り除く工程を更に含む、本発明1043の方法。

[本発明1052]

前記集団の前記異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物は、

1つ以上の標的ゲノムDNAセグメントを含有する試料を提供する工程であって、前記標的ゲノムDNAセグメントは3'及び5'末端を有する、工程、

リンカー配列を前記標的ゲノムDNAセグメントの前記3'及び5'末端に付加せる工程であって、前記リンカー配列は、(i)1つ以上の患者識別子配列、(ii)前記第1の固体支持体プライマー特異的部分、及び(iii)前記第2の固体支持体プライマー特異的部分を含み、リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメントを形成する、工程、

1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブを提供する工程であって、各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、(a)前記リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメントの前記3'リンカー配列に相補的な部分、及び(b)前記リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメントの前記5'リンカー配列に相補的な部分を含む、工程、並びに

前記試料中に存在する場合、前記リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメントの相補3'及び5'リンカー配列に前記第1のオリゴヌクレオチドプローブが塩基特異的な様式でハイブリダイズするのに効果的な条件下にて、前記試料と前記1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブを接触させる工程、

前記第1のオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズした、前記リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメントの3'及び5'末端の結合に好適な1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程、並びに

前記リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメントを、前記1つ以上のライゲーション接合部にてライゲーションし、前記集団の異なる環状キメラ一本鎖核酸構築物を形成する工程

を含む方法により調製される、本発明1023の方法。

[本発明1053]

前記第1のオリゴヌクレオチドプローブは、3'標的ゲノムDNA特異的部分及び/または5'標的ゲノムDNA特異的部分を更に含む、本発明1052の方法。

[本発明1054]

前記1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程は、

前記リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメントの前記3'末端をポリメラーゼにより伸長し、前記リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメントの前記5'末端とライゲーション接合部を形成すること

を含む、本発明1052の方法。

[本発明1055]

前記ポリメラーゼは、5' 3'エキソヌクレアーゼ活性、または3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を含む、本発明1054の方法。

[本発明1056]

前記1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程は、

前記リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメント上の、ライゲーションに好適な3'OH及び/または5'ホスフェートを遊離させること

を含む、本発明1052の方法。

[本発明1057]

前記1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブは、第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記3'末端がポリメラーゼ伸長またはライゲーションに不適となるように、切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体とブロック基とを含む3'部分を有し、前記方法は、

前記接触させる工程の間に前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記切断可能なヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を切断する工程であって、それにより、前記第1のオリゴヌクレオチドプローブ上の3'OHを遊離させる、工程、並びに

前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記3'末端を伸長して5'末端とライゲーション接合部を形成する工程、並びに

前記リンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメントの前記ライゲーションの間に、



前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記3'及び5'末端を前記ライゲーション接合部にてライゲーションする工程  
を更に含む、本発明1056の方法。

[本発明1058]

前記ライゲーションの後、ライゲーションしていないリンカーが付加された標的ゲノムDNAセグメント、第1のオリゴヌクレオチドプローブ、及び他の非環化核酸分子を前記試料から取り除く工程  
を更に含む、本発明1052の方法。

[本発明1059]

前記1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブは1つ以上の切断可能なヌクレオチドを含有し、前記方法は、

前記ライゲーションの後、前記1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記切断可能なヌクレオチドを切断する工程、及び

前記標的ゲノムDNAセグメントに相補的でない、前記切断された1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブの一部を取り除く工程であって、それにより、ローリングサークル増幅に好適な、標的ゲノムDNA特異的オリゴヌクレオチドがハイブリダイズしている環状キメラ一本鎖核酸構築物を形成する、工程  
を更に含む、本発明1057の方法。

[本発明1060]

前記環状キメラ一本鎖核酸構築物にハイブリダイズした前記標的ゲノムDNA特異的オリゴヌクレオチドは捕捉部分を含み、前記方法は、

複数の固定化された捕捉部分結合パートナーを含有する固体支持体を提供する工程、及び

前記捕捉部分が前記固体支持体上で捕捉部分結合パートナーに結合するのに効果的な条件下にて、前記固体支持体を、前記捕捉部分を含有する前記標的ゲノムDNA特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記環状キメラ一本鎖核酸構築物と接触させる工程  
であって、それにより、前記環状キメラ一本鎖核酸構築物を固定化する、工程  
を更に含む、本発明1059の方法。

[本発明1061]

前記標的ゲノムDNAセグメントは、ライゲーションに好適な5'及び3'末端を有する二本鎖標的ゲノムDNAセグメントであり、前記リンカー配列は第1、第2、及び第3のオリゴヌクレオチドを含み、(i)前記第1のオリゴヌクレオチドは、前記第1の固体支持体プライマー特異的部分、1つ以上の第1の患者識別子配列、第1の配列決定プライマー結合部位、及び前記第3のオリゴヌクレオチドに相補的な3'末端を含み、(ii)前記第2のオリゴヌクレオチドは、前記第3のオリゴヌクレオチドの前記5'末端に相補的な領域を含み、並びに、(iii)前記第3のオリゴヌクレオチドは、前記第2のオリゴヌクレオチドに相補的な5'末端、第2の配列決定プライマー結合部位、前記第1のオリゴヌクレオチドの前記3'末端に相補的な部分、第2の患者識別子配列、固有の識別子配列、及び第2の固体支持体プライマー特異的部分を含み、前記第3のオリゴヌクレオチドは前記第1及び第2のオリゴヌクレオチドの相補部分にハイブリダイズして複合リンカーを形成し、前記付加させる工程は、

(i)前記複合リンカーの前記第2及び第3のオリゴヌクレオチドの、前記二本鎖標的ゲノムDNAセグメントのそれぞれ前記5'及び3'末端へのライゲーションに好適な、(ii)5'末端における前記複合リンカーの前記第2のオリゴヌクレオチドとのライゲーション接合部を作製するための前記複合リンカーの前記第1のオリゴヌクレオチドの前記3'末端のポリメラーゼ伸長に好適な、並びに(iii)両方の標的鎖に固有の識別子配列を含み前記接触させる工程に適した、リンカーが付加された二本鎖標的ゲノムDNAを形成するための、前記ライゲーション接合部における前記複合リンカーの前記第1及び第2のオリゴヌクレオチドのライゲーションに好適な条件下にて、前記二本鎖標的ゲノムDNAセグメントを前記複合リンカー、リガーゼ、及びポリメラーゼとブレンドすること

を含む、本発明1052の方法。

[本発明1062]

前記標的ゲノムDNAセグメントは、3'末端シトシンオーバーハングを有する二本鎖標的ゲノムDNAセグメントであり、かつ前記リンカー配列は、(i)前記第1の固体支持体プライマー特異的部分、1つ以上の第1の患者識別子配列、第1の配列決定プライマー結合部位、固有の識別子配列、前記3'末端から2番目及び3番目の位置の2つのリボグアノシン塩基、並びに3'末端のロックド核酸であるグアノシン塩基を含む第1のリンカーオリゴヌクレオチド、並びに(ii)第2の配列決定プライマー結合部位、第2の患者識別子配列、前記第2の固体支持体プライマー特異的部分、及び前記第1のオリゴヌクレオチドに相補的な5'部分を含む第2のリンカーオリゴヌクレオチドを含み、前記付加させる工程は、

前記二本鎖標的ゲノムDNAセグメントを前記リンカー配列、逆転写酵素、及びリガーゼとブレンドし、逆転写-ライゲーション反応混合物を形成すること、

前記逆転写-ライゲーション反応混合物を、(i)前記第1のリンカーオリゴヌクレオチドの前記リボグアノシン及びロックド核酸であるグアノシン塩基の、前記二本鎖標的ゲノムDNAセグメントの3'シトシンオーバーハングへのハイブリダイゼーションに好適な、(iv)前記第1のリンカーオリゴヌクレオチドの前記固有の識別子配列に相補的な配列、及び前記第2のリンカーオリゴヌクレオチドの前記5'末端とのライゲーション接合部を生成するための、前記二本鎖標的ゲノムDNAセグメントの前記ハイブリダイズした3'末端の伸長に好適な、並びに(v)前記二本鎖標的ゲノムDNAセグメントの伸長3'末端の、前記ライゲーション接合部での前記第2のオリゴヌクレオチドの前記5'末端へのライゲーションに好適な条件に供すること、

前記逆転写-ライゲーション反応混合物をRNase、ポリメラーゼ、及びリガーゼとブレンドし、ヌクレアーゼ-ポリメラーゼ-ライゲーション反応混合物を形成すること、

前記ヌクレアーゼ-ポリメラーゼ-ライゲーション伸長反応混合物を、(i)前記第1のリンカーオリゴヌクレオチドのリボグアノシン塩基の取り除きに好適な、(iii)前記二本鎖標的ゲノムDNAの前記5'末端とのライゲーション接合部を形成するための、前記取り除きの後の前記第1のリンカーオリゴヌクレオチドの前記3'末端の伸長に好適な、及び(iii)両方の標的鎖に固有の識別子配列を含み前記接触させる工程に適した、リンカーが付加された二本鎖標的ゲノムDNAを形成するための、前記伸長した第1のリンカーオリゴヌクレオチドの、前記ライゲーション接合部での前記二本鎖標的ゲノムDNAセグメントの前記5'末端へのライゲーションに好適な条件に供すること

を含む、本発明1052の方法。

[本発明1063]

前記標的ゲノムDNAセグメントは一本鎖であり、末端トランスフェラーゼ伸長に好適な3'末端を含み、前記付加させる工程は、

前記一本鎖標的ゲノムDNA、末端トランスフェラーゼ、並びにデオキシ及びリボモノヌクレオチドの混合物をブレンドし、末端トランスフェラーゼ反応混合物を形成すること

前記末端トランスフェラーゼ反応混合物を、デオキシ及びリボモノヌクレオチドを用いて前記標的ゲノムDNAセグメントの前記3'OHを伸長するのに好適な条件に供し、前記標的ゲノムDNAセグメント上にモノヌクレオチド伸長領域を形成すること、

1つ以上のオリゴヌクレオチドセットを提供することであって、各セットは、(i)前記第2の固体支持体プライマー特異的部分と、1つ以上の患者識別子配列と、配列決定プライマー結合部位と、前記標的ゲノムDNAセグメントの前記伸長領域に相補的であり1つ以上の切断可能なヌクレオチドを含むモノヌクレオチド反復領域とを含むプライマーオリゴヌクレオチド、及び(ii)前記第1の固体支持体プライマー特異的部分と、1つ以上の患者識別子配列と、配列決定プライマー結合部位と、2つのリボグアノシン塩基と、3'末端のロックド核酸であるグアノシン塩基とを含む第1のリンカーオリゴヌクレオチドを含む、こと、

前記末端トランスフェラーゼ反応混合物、前記1つ以上のオリゴヌクレオチドセット、

及び逆転写酵素をブレンドして、逆転写反応混合物を形成すること、

前記逆転写反応混合物を、(i)前記プライマーオリゴヌクレオチドの、前記標的ゲノムDNAセグメントの前記伸長領域へのハイブリダイゼーションに好適な、(ii)前記標的ゲノムDNAセグメントの相補体(前記相補体は3'末端にて更に3つのシトシン塩基だけ伸長している)を作製するための前記プライマーオリゴヌクレオチドの伸長に好適な、(iii)rG3-C3塩基対形成による、前記標的ゲノムDNAの前記伸長相補体への前記第1のリンカーオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに好適な、(iv)前記第1のリンカーオリゴヌクレオチドに相補的な配列を生成するための前記標的DNAの前記相補体の伸長に好適な条件に供すること、

前記逆転写反応混合物をRNase、ポリメラーゼ、及びリガーゼとブレンドし、ヌクレアーゼ-ポリメラーゼ-ライゲーション反応混合物を形成すること、

前記ヌクレアーゼ-ポリメラーゼ-ライゲーション伸長反応混合物を、(i)3'OHを遊離させるための前記標的ゲノムDNAセグメントの前記伸長相補体内での1つ以上のリボースモノヌクレオチドの切断に好適な、(ii)前記プライマーオリゴヌクレオチド配列のコピーを作製するための前記遊離3'OHの伸長に好適な、並びに、(iii)前記第1のリンカーオリゴヌクレオチドの前記リボグアノシン塩基の切断に、及び前記標的ゲノムDNAセグメントの前記5'末端とのライゲーション接合部を形成するための前記切断した第1のリンカーオリゴヌクレオチドの前記3'末端の伸長に好適な、並びに(iv)前記接触させる工程に適した、リンカーが付加された二本鎖標的ゲノムDNAセグメントを生成するための前記伸長した第1のリンカーオリゴヌクレオチドの前記標的ゲノムDNAセグメントへのライゲーションに好適な条件に供することを含む、本発明1052の方法。

[本発明1064]

1つ以上の捕捉オリゴヌクレオチドを提供する工程であって、前記捕捉オリゴヌクレオチドは、前記一次伸長生成物の一部に相補的なヌクレオチド配列を含み、かつ捕捉部分を含む、工程、

前記1つ以上の捕捉オリゴヌクレオチドと前記供する工程の間に形成される相補一次伸長生成物との間でのハイブリダイゼーションに好適な条件下にて、前記ローリングサークル増幅反応混合物を前記1つ以上の捕捉オリゴヌクレオチドと接触させる工程、

固体支持体上に固定化された好適な結合パートナーに結合する捕捉部分を介して、ハイブリダイズした捕捉オリゴヌクレオチド-一次伸長生成物複合体を前記固体支持体上で捕捉する工程、

ハイブリダイズしていない捕捉オリゴヌクレオチド及び一次伸長生成物を、前記ローリングサークル増幅反応混合物から取り除く工程、並びに

前記固体支持体に結合した前記捕捉オリゴヌクレオチドから前記一次伸長生成物を遊離させて、濃縮した一次伸長生成物の試料を前記配列決定の前に形成する工程を更に含む、本発明1023の方法。

[本発明1065]

前記遊離は、

前記一次伸長生成物の一部に相補的なヌクレオチド配列を含む1つ以上のプライマーオリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ、及び、前記固体支持体に結合した捕捉オリゴヌクレオチド-一次伸長生成物複合体を、前記プライマーオリゴヌクレオチドが塩基特異的な様式で前記一次伸長生成物の前記相補部分にハイブリダイズするのに好適な、かつ前記ポリメラーゼが前記ハイブリダイズしたプライマーオリゴヌクレオチドを伸長するのに好適な条件下にて、ブレンドすることであって、前記伸長は、前記配列決定の前に前記ハイブリダイズした一次伸長生成物を遊離させる、ことを含む、本発明1064の方法。

[本発明1066]

1つ以上の捕捉オリゴヌクレオチドを提供する工程であって、前記捕捉オリゴヌクレオチドは、前記環状キメラ一本鎖核酸構築物の一部に相補的なヌクレオチド配列を含み、か

つ捕捉部分を含む、工程、

前記1つ以上の捕捉オリゴヌクレオチドと前記集団の相補環状キメラ一本鎖核酸構築物との間のハイブリダイゼーションに好適な条件下にて、前記環状キメラ一本鎖核酸構築物の前記集団を、前記ブレンドの前または間に、前記1つ以上の捕捉オリゴヌクレオチドと接触させる工程、

固体支持体上に固定化された好適な結合パートナーに結合する捕捉部分を介して、ハイブリダイズした捕捉オリゴヌクレオチド - 環状キメラ一本鎖核酸構築物複合体を前記固体支持体上で捕捉する工程、

前記集団から、ハイブリダイズしていない捕捉オリゴヌクレオチド及び環状キメラ一本鎖核酸構築物を取り除く工程、並びに

前記固体支持体に結合した前記捕捉オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記環状キメラ一本鎖核酸構築物を遊離させて、濃縮した環状キメラ一本鎖核酸構築物の試料を前記供する工程の前に形成する工程  
を更に含む、本発明1023の方法。

[本発明1067]

試料内における、前記試料内の他の核酸分子とは1つ以上の塩基が異なる1つ以上の標的リボ核酸分子の識別方法であって、

1つ以上の塩基の違いを含有する可能性がある1つ以上の標的リボ核酸分子を含む試料を提供する工程、

前記試料内に存在する場合、前記試料内で、前記1つ以上の標的リボ核酸分子の c D N A を生成する工程、

1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブを提供する工程であって、各第1のオリゴヌクレオチドプローブは、( a ) 3' c D N A 標的特異的配列部分、( b ) 5' c D N A 標的特異的部分、及び更なる部分を含み、前記更なる部分は、( i ) 固有の識別子配列、( i i ) 患者識別子配列、( i i i ) 1つ以上のプライマー結合配列、または( i )、( i i )、及び( i i i ) の任意の組み合わせを含む、工程、

前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの3' 及び5' 標的特異的部分が塩基特異的な様式で前記 c D N A の相補領域にハイブリダイズするのに効果的な条件下にて、前記試料と前記1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブを接触させる工程、

相補 c D N A にハイブリダイズした第1のオリゴヌクレオチドプローブの3' 及び5' 末端の結合に好適な、1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程、

前記1つ以上のライゲーション接合部にて前記1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブをライゲーションし、前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記更なる部分に結合した前記標的リボ核酸配列のデオキシリボ核酸コピーを含む環状ライゲーション生成物を形成する工程、並びに

前記試料中の他のリボ核酸分子とは1つ以上の塩基が異なる1つ以上の標的リボ核酸分子の存在を識別するために、前記試料内で前記環状ライゲーション生成物を検出及び区別する工程

を含む、前記方法。

[本発明1068]

前記検出の前に、ライゲーションしていない第1のオリゴヌクレオチドプローブ及び他の非環化核酸分子を前記試料から取り除く工程  
を更に含む、本発明1067の方法。

[本発明1069]

前記検出及び区別する工程は、

前記試料内の前記環状ライゲーション生成物を配列決定すること  
を含む、本発明1067の方法。

[本発明1070]

試料内での、互いに結合した異なる第1標的領域及び第2標的領域を含む可能性がある1つ以上の核酸分子の識別方法であって、

互いに結合した異なる第1標的領域及び第2標的領域を含む1つ以上の核酸分子を含む可能性のある試料を提供する工程、

1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブセットを提供する工程であって、各プローブセットは、( i ) 5' 第1標的的特異的部分と、3' 第2標的的特異的部分と、更なる部分とを含む第1のオリゴヌクレオチドプローブ、及び、( i i ) 5' 第2標的的特異的部分と、3' 第1標的的特異的部分と、更なる部分とを含む第2のオリゴヌクレオチドプローブを含み、プローブセットの前記第1または第2のオリゴヌクレオチドプローブの前記更なる部分は、( i ) 固有の識別子配列、( i i ) 患者識別子配列、( i i i ) 1つ以上のプライマー結合配列、または( i )、( i i )、及び( i i i )の任意の組み合わせを含む、工程、

前記試料中に存在する場合、プローブセットの第1及び第2のオリゴヌクレオチドプローブが塩基特異的な様式で前記核酸分子の対応する第1及び第2標的領域にハイブリダイズするのに効果的な条件下にて、前記試料と前記1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブセットを接触させる工程、

前記プローブセットが核酸分子の相補第1標的領域及び第2標的領域にハイブリダイズする場合に、プローブセットの第1のオリゴヌクレオチドプローブの3' 末端の、第2のオリゴヌクレオチドプローブの5' 末端への結合に好適な、かつプローブセットの第1のオリゴヌクレオチドプローブの5' 末端の、第2のオリゴヌクレオチドプローブの3' 末端への結合に好適な、1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程、

前記1つ以上のライゲーション能のある接合部にてプローブセットの前記第1及び第2のオリゴヌクレオチドをライゲーションし、更なる部分に結合した核酸分子の前記第1及び第2の異なる標的領域に対応するヌクレオチド配列を含む環状ライゲーション生成物を形成する工程、並びに

前記試料内で前記環状ライゲーション生成物を検出及び区別する工程であって、それにより、存在する場合、前記試料内で互いに結合した異なる第1標的領域及び第2標的領域を含む1つ以上の核酸分子の存在を識別する、工程を含む、前記方法。

[本発明1071]

前記1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程は、

前記第1及び/または第2のオリゴヌクレオチドプローブの前記3' 末端をポリメラーゼで伸長し、それぞれ前記第2及び/または第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記5' 末端とライゲーション接合部を形成することを含む、本発明1070の方法。

[本発明1072]

前記ポリメラーゼは、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性、または3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を含む、本発明1071の方法。

[本発明1073]

前記1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程は、

ライゲーションに好適な前記第1及び/または第2のオリゴヌクレオチドプローブ上の3' OH及び/または5' ホスフェートを遊離させることを含む、本発明1070の方法。

[本発明1074]

前記検出の前に、ライゲーションしていない第1及び第2のオリゴヌクレオチドプローブ、並びに他の非環化核酸分子を試料から取り除く工程を更に含む、本発明1070の方法。

[本発明1075]

前記検出及び区別する工程は、

前記試料内の前記環状ライゲーション生成物を配列決定することを含む、本発明1070の方法。

[本発明1076]

試料内における、前記試料内の他の核酸分子とは1つ以上の塩基が異なる1つ以上の標的

リボ核酸分子の識別方法であって、

1つ以上の塩基の違いを含有する可能性がある1つ以上の標的リボ核酸分子を含む試料を提供する工程、

ヌクレオチドリンカーを、前記試料内で前記標的リボ核酸分子の3'及び5'末端に付加させる工程、

1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを提供する工程であって、各オリゴヌクレオチドプローブは、(a)前記標的リボ核酸分子の前記3'ヌクレオチドリンカーに相補的な3'部分、(b)前記標的リボ核酸分子の前記5'ヌクレオチドリンカーに相補的な5'部分、及び(c)更なる部分を含み、前記更なる部分は、(i)固有の識別子配列、(ii)患者識別子配列、(iii)1つ以上のプライマー結合配列、または(i)、(ii)、及び(iii)の任意の組み合わせを含む、工程、

前記試料中に存在する場合、前記オリゴヌクレオチドプローブの前記3'及び5'部分が塩基特異的な様式で前記標的リボ核酸分子の相補ヌクレオチドリンカーにハイブリダイズするのに効果的な条件下にて、前記試料と前記1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを接触させる工程、

前記ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブの前記3'末端を伸長して前記1つ以上の標的リボ核酸分子の相補体を生成する工程、

前記オリゴヌクレオチドプローブの前記伸長3'末端を前記オリゴヌクレオチドプローブの5'末端にライゲーションして、前記標的リボ核酸分子の前記3'ヌクレオチドリンカーに相補的な配列と、前記標的リボ核酸分子の前記5'ヌクレオチドリンカーに相補的な配列と、前記1つ以上の標的リボ核酸分子の前記相補体と、前記オリゴヌクレオチドプローブの前記更なる部分とを含む環状ライゲーション生成物を形成する工程、並びに

前記試料中の前記環状ライゲーション生成物を検出及び区別する工程であって、それにより、前記試料中における他の核酸分子とは1つ以上の塩基が異なる1つ以上の標的リボ核酸分子の存在を識別する、工程を含む、前記方法。

[本発明1077]

前記ライゲーションの後に、ライゲーションしていない第1のオリゴヌクレオチドプローブ、及び他の非環化核酸分子を前記試料から取り除く工程を更に含む、本発明1076の方法。

[本発明1078]

前記検出及び区別する工程は、前記試料内の前記環状ライゲーション生成物を配列決定することを含む、本発明1076の方法。

[本発明1079]

試料内における、前記試料内の他の核酸分子とは1つ以上の塩基が異なる1つ以上の標的リボ核酸分子の識別方法であって、

1つ以上の塩基の違いを含有する可能性がある1つ以上の標的リボ核酸分子を含む試料を提供する工程、

前記試料内でヌクレオチドリンカーを前記標的リボ核酸分子の前記3'及び5'末端にライゲーションする工程であって、前記ヌクレオチドリンカーは更なる部分により互いに結合され、前記更なる部分は(i)固有の識別子配列、(ii)患者識別子配列、(iii)1つ以上のプライマー結合配列、または(i)、(ii)、及び(iii)の任意の組み合わせを含み、前記ライゲーションは、前記標的リボ核酸分子と、前記3'及び5'ヌクレオチドリンカー配列と、前記更なる部分とを含む環状ライゲーション生成物を形成する、工程、

前記環状ライゲーション生成物の3'または5'ヌクレオチドリンカー配列に相補的なヌクレオチド配列を含む1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプライマーを提供する工程、

前記1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプライマーを塩基特異的な様式で前記環状ライゲーション生成物にハイブリダイズさせる工程、

前記第1のオリゴヌクレオチドプライマーの前記3'末端を伸長して前記環状ライゲーション生成物の相補体を生成する工程、並びに

前記試料内の前記環状ライゲーション生成物相補体を検出及び区別する工程であって、それにより、前記試料中における他の核酸分子とは1つ以上の塩基が異なる1つ以上の標的リボ核酸分子の存在を識別する、工程を含む、前記方法。

[本発明1080]

前記検出及び区別する工程は、  
前記試料内の前記環状ライゲーション生成物を配列決定することを含む、本発明1077の方法。

[本発明1081]

試料内における、前記試料内の他の核酸分子とは1つ以上の塩基が異なる1つ以上の標的リボ核酸分子の識別方法であって、

1つ以上の塩基の違いを含有する可能性がある1つ以上の標的リボ核酸分子を含む試料を提供する工程、

1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブセットを提供する工程であって、各セットは、  
(a) 5' ステムループ部分と前記標的リボ核酸分子の3' 部分に相補的な3' 部分とを有する第1のオリゴヌクレオチドプローブ、(b) 前記標的リボ核酸分子の5' 末端のコピーに相補的な3' 部分と、前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの5' ステムループ部分に相補的な5' 部分と、(i) 固有の標的識別子配列、(ii) 患者識別子配列、(iii) プライマー結合配列、または(i)、(ii)、及び(iii)の任意の組み合わせを含む更なる部分とを有する第2のオリゴヌクレオチドプローブを含む、工程、

前記試料、プローブセットからの前記1つ以上の第1のオリゴヌクレオチドプローブ、及び逆転写酵素をブレンドして逆転写酵素反応物を形成する工程、

前記試料中に存在する場合、相補標的リボ核酸分子にハイブリダイズした前記第1のオリゴヌクレオチドプローブの前記3'末端を伸長させて、前記標的リボヌクレオチド分子の相補体を生成する工程、

プローブセットの前記1つ以上の第2のオリゴヌクレオチドプローブを、前記標的リボヌクレオチド配列の相補体を含む前記伸長した第1のオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズさせる工程、

伸長した第1のオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズした各第2のオリゴヌクレオチドプローブの3'及び5'末端の間に1つ以上のライゲーション能のある接合部を生成する工程、

各第2のオリゴヌクレオチドプローブの前記3'及び5'末端をライゲーションして、前記第2のオリゴヌクレオチドプローブの前記更なる部分に結合した前記標的リボ核酸配列のデオキシリボ核酸コピーを含む環状ライゲーション生成物を形成する工程、並びに

前記試料中で前記環状ライゲーション生成物を検出及び区別する工程であって、それにより、前記試料中における他の核酸分子とは1つ以上の塩基が異なる1つ以上の標的リボ核酸分子の存在を識別する、工程を含む、前記方法。

[本発明1082]

前記検出及び区別する工程は、  
前記試料内の前記環状ライゲーション生成物配列を配列決定することを含む、本発明1081の方法。