

【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29年2月23日(2017.2.23)

【公表番号】特表2016-508715(P2016-508715A)

【公表日】平成28年3月24日(2016.3.24)

【年通号数】公開・登録公報2016-018

【出願番号】特願2015-551238(P2015-551238)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成29年1月10日(2017.1.10)

【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DNAフラグメントの固定化ライブラリーを調製する方法であって、

(a) 固形支持体で、それに固定化されたトランスポソーム複合体を有するものを用意することであり、前記トランスポソーム複合体の各々には、第一および第二ポリヌクレオチドが含まれる二重鎖核酸の第一ポリヌクレオチドに非共有結合的に結合するトランスポサナーゼが含まれ、前記第一ポリヌクレオチドは前記固形支持体に固定化され、および前記第一ポリヌクレオチドには、

(i) トランスポゾン端部配列を含む3'部分、および

(ii) 第一タグドメインを含む第一タグ

が含まれ、

および前記第二ポリヌクレオチドには、前記トランスポゾン端部配列に相補的な領域が含まれること、

(b) 標的DNAがトランスポソーム複合体によってフラグメント化され、および第一ポリヌクレオチドの3'トランスポゾン端部配列がフラグメントの少なくとも一方のストランドの5'端に移されるところの条件下に、標的二重鎖DNAを固形支持体に適用することであり、それによって、少なくとも一つのストランドが第一タグで5'タグ付けされる二重鎖フラグメントの固定化されたライブラリーが生成されることを含む、方法。

【請求項2】

第一ポリヌクレオチドの3'トランスポゾン端部配列は、フラグメント化標的二重鎖DNAの双方のストランドの5'端に移される、請求項1の方法。

【請求項3】

さらに、任意の未結合核酸を除去するために固形支持体を洗浄することが含まれる、請求項1または2の方法。

【請求項4】

トランスポソーム複合体は、 $\text{mm}^2$ あたり少なくとも $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ の複合体の密度で固形支持体に存在するか、または前記トランスポソーム複合体には、機能亢進性Tn5ト

ランスポサーゼが含まれる、請求項1-3のいずれか一項の方法。

【請求項5】

前記固定化されたライブラリーにおいて二重鎖フラグメントの長さは、前記固形支持体に存在するランスポソーム複合体の密度を増加または減少させることによって調整される、請求項1-4のいずれか一項の方法。

【請求項6】

前記固形支持体に存在するタグの少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%には、同じタグドメインが含まれる、請求項1-5のいずれか一項の方法。

【請求項7】

さらに、

(c) 溶液においてランスポソーム複合体を用意すること、および標的DNAがランスポソーム複合体溶液によってさらにフラグメント化されるところの条件下で前記ランスポソーム複合体を固定化されたフラグメントと溶液において接触させることであり、それによって一端部を有する固定化された核酸フラグメントが溶液において得られることが含まれる、請求項1-6のいずれか一項の方法。

【請求項8】

溶液においてランスポソーム複合体には、第二タグが含まれ、それによって第二タグを有する固定化された核酸フラグメントが溶液において生成する、請求項7の方法。

【請求項9】

第一および第二タグは異なる、請求項8の方法。

【請求項10】

溶液において前記ランスポソーム複合体の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%には、第二タグドメインを含む第二タグが含まれる、請求項7-9のいずれか一項の方法。

【請求項11】

さらに、ポリメラーゼおよび第一ポリヌクレオチドの一部に対応する増幅プライマーを提供することによって固形表面でフラグメントを増幅することが含まれる、請求項7の方法。

【請求項12】

前記タグドメインには、クラスター増幅のための領域、または配列決定反応をプライミングするための領域が含まれる、請求項1の方法。

【請求項13】

固形支持体には、微粒子、またはパターン化された表面、またはウェルが含まれる、請求項1の方法。

【請求項14】

請求項1-13のいずれか一項の方法に従って調製される固定化されたタグ付DNAフラグメントのライブラリーを有する固形支持体。

【請求項15】

固形支持体であって、それに固定化されたランスポソーム複合体を有するものであり、各ランスポソーム複合体には、第一および第二ポリヌクレオチドが含まれる二重鎖核酸の第一ポリヌクレオチドに非共有結合的に結合するランスポサーゼが含まれ、前記第一ポリヌクレオチドは前記固形支持体に固定化され、および前記第一ポリヌクレオチドには、

(i) ランスポゾン端部配列を含む3'部分、および

(ii) 第一タグドメインを含む第一タグ

が含まれ、

および前記第二ポリヌクレオチドには、前記ランスポゾン端部配列に相補的な領域が含まれる、固形支持体。