

【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 10 月 17 日 (2019.10.17)

【公表番号】特表 2018-530998 (P2018-530998A)

【公表日】平成 30 年 10 月 25 日 (2018.10.25)

【年通号数】公開・登録公報 2018-041

【出願番号】特願 2018-512152 (P2018-512152)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 4 0 B 50/06 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/10 1 1 0 Z

C 4 0 B 50/06

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 9 月 9 日 (2019.9.9)

【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】

結合部分を含む複数の第 1 のオリゴヌクレオチドを、少なくとも 1 つの高存在種を含む第 1 の複数の核酸分子とハイブリダイズさせること、

前記複数の第 1 のオリゴヌクレオチドを伸長して結合部分を含む、前記第 1 の複数の核酸分子に対する複数の相補鎖を生成すること、

前記第 1 の複数の核酸分子に対する前記複数の相補鎖を含む、複数の二本鎖核酸分子を変性させること、

前記第 1 の複数の核酸分子に対する前記複数の相補鎖を部分的に再アニールすること、および

1 つ以上の固体担体上に固定された、前記結合部分に特異的に結合する捕捉分子によって、前記第 1 の複数の核酸分子に対する前記再アニールされた相補鎖を除去して第 2 の複数の核酸分子を生成すること、を含み、

第 2 の複数の核酸分子中の少なくとも 1 つの高存在種の含有量は、第 1 の複数の核酸分子中の少なくとも 1 つの高存在種の含有量と比較して減少されている、
複数の核酸分子から高存在種を除去する方法。

【請求項 2】

請求項 1 の方法であって、

(a) 前記結合部分が、ビオチン、ストレプトアビジン、ヘパリン、アプタマー、クリックケミストリー部分、ジゴキシゲニン、第 1 級アミン、カルボキシル、ヒドロキシル、アルデヒド、ケトン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される官能基であり、ここで、前記結合部分がビオチンであってもよく、前記捕捉分子がストレプトアビジンであってもよく、及び／又は

(b) 前記第 1 の複数の核酸分子に対する複数の相補鎖の少なくとも 1 つにつき第 2 の鎖を合成して、前記第 1 の複数の核酸分子に対する複数の相補鎖を含む、1 つ以上の前記複数の二本鎖核酸分子を生成することをさらに含み、ここで、前記合成が、複数の第 2 のオリゴヌクレオチドを前記第 1 の複数の核酸分子に対する複数の相補鎖にハイブリダイズさせ、前記複数の第 2 のオリゴヌクレオチドを伸長させることを含んでいてもよく、前記複

数の第 1 のオリゴヌクレオチドまたは前記複数の第 2 のオリゴヌクレオチドがユニバーサルプライマー結合部位を含んでいてもよく、及び／又は

(c) 前記方法が、前記複数の二本鎖核酸分子を増幅することをさらに含む、
前記方法。

【請求項 3】

(a) 前記第 1 の複数の核酸分子が、複数の高存在種を含む、及び／又は

(b) 前記少なくとも 1 つの高存在種が、前記第 1 の複数の核酸分子の少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、又は少なくとも 70 %に相当する、及び／又は

(c) 前記少なくとも 1 つの高存在種の量の減少が、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、又は少なくとも 99 %である、及び／又は

(d) 前記第 1 の複数の核酸分子が、mRNAを含む、
請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 2 の複数の核酸分子が、前記複数の高存在種を含み、ここで、前記第 2 の複数の核酸分子中の前記複数の高存在種が、前記第 2 の複数の核酸分子の 50 %未満、40 %未満、又は 30 %未満に相当してもよい、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 の複数の核酸分子が、複数の低存在種を含み、ここで、

前記複数の低存在種が、前記第 1 の複数の核酸分子の 10 %未満、5 %未満、又は 1 %未満に相当してもよく、

前記第 2 の複数の核酸分子が、前記複数の低存在種を含んでいてもよく、ここで、前記第 2 の複数の核酸分子中の前記複数の低存在種が、前記第 2 の複数の核酸分子の少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、又は少なくとも 20 %に相当してもよい、
請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

(a) 前記第 1 の複数の核酸分子のそれぞれまたは前記第 2 の複数の核酸分子のそれぞれが、確率バーコードを含む、及び／又は

(b) 前記方法が、前記第 2 の複数の核酸分子をシーケンシングして複数のシーケンシングリードを生成することをさらに含み、ここで、前記複数の高存在種の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの 50 %未満、40 %未満、又は 30 %未満であってよく、前記複数の低存在種の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、又は少なくとも 20 %であってもよく、及び／又は

(c) 前記方法が、前記部分的な再アニーリング工程中に複数のブロッカーを追加することをさらに含み、ここで、前記複数のブロッカーが、前記第 1 のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位または前記第 2 のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位にハイブリダイズしてもよく、前記複数のブロッカーが、前記第 1 のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位または前記第 2 のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位とその相補配列との間のハイブリダイゼーションを妨げてよい、

請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

結合部分を含む複数の第 1 のオリゴヌクレオチドを、複数の標的核酸とハイブリダイズさせること、

前記複数の第 1 のオリゴヌクレオチドを伸長させて、前記結合部分を含む、前記複数の標的核酸に対する複数の相補鎖を生成すること、

前記複数の標的核酸に対する前記複数の相補鎖を含む、複数の二本鎖核酸分子を変性させること、

前記複数の標的核酸に対する前記複数の相補鎖を部分的に再アニールすること、および
1 つ以上の固体担体上に固定された、前記結合部分に特異的に結合する捕捉分子によ

て、前記複数の標的核酸に対する前記再アニールされた相補鎖を除去すること、を含み、
前記複数の標的核酸の正規化核酸ライブラリーが生成される、
正規化核酸ライブラリーの生成方法。

【請求項 8】

(a) 前記結合部分が、ビオチン、ストレプトアビジン、ヘパリン、アプタマー、クリックケミストリー部分、ジゴキシゲニン、第 1 級アミン、カルボキシル、ヒドロキシル、アルデヒド、ケトン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される官能基であり、ここで、前記結合部分がビオチンであってもよく、前記捕捉分子がストレプトアビジンであってもよく、及び／又は

(b) 前記方法が、前記複数の標的核酸に対する前記複数の相補鎖の 1 つ以上につき第 2 の鎖を合成して、前記複数の標的核酸に対する前記複数の相補鎖を含む、1 つ以上の前記複数の二本鎖核酸分子を生成することをさらに含み、ここで、前記合成が、複数の第 2 のオリゴヌクレオチドを前記複数の標的核酸に対する前記複数の相補鎖にハイブリダイズさせ、前記複数の第 2 のオリゴヌクレオチドを伸長させることを含んでもよく、前記複数の第 1 のオリゴヌクレオチドまたは前記複数の第 2 のオリゴヌクレオチドがユニバーサルプライマー結合部位を含んでもよく、及び／又は

(c) 前記方法が、前記複数の二本鎖核酸分子を増幅することをさらに含む、
請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

(a) 前記複数の標的核酸が、複数の低存在標的核酸を含み、ここで、前記複数の低存在標的核酸が、前記複数の標的核酸の 10 % 未満、5 % 未満又は 1 % 未満に相当してもよく、及び／又は

(b) 前記複数の標的核酸の前記正規化核酸ライブラリーが、前記複数の低存在標的核酸を含み、ここで、前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の低存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の標的核酸の少なくとも 5 %、少なくとも 10 % 又は少なくとも 20 % に相当してもよい、
請求項 7 又は 8 に記載の方法。

【請求項 10】

(a) 前記複数の標的核酸が、複数の高存在標的核酸を含み、ここで、前記複数の高存在標的核酸が、前記複数の標的核酸の少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、又は少なくとも 70 % に相当してもよく、

(b) 前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の高存在種の含有量が、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % 又は少なくとも 99 % 減少されており、及び／又は

(c) 前記複数の標的核酸の前記正規化核酸ライブラリーが、前記複数の高存在標的核酸を含み、ここで、前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の高存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の標的核酸の 50 % 未満、40 % 未満、又は 30 % 未満に相当してもよく、及び／又は

(d) 前記複数の第 1 のオリゴヌクレオチドのそれぞれまたは前記複数の第 2 のオリゴヌクレオチドのそれぞれが、確率バーコードを含む
請求項 7 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

(a) 前記方法が、前記正規化核酸ライブラリーをシーケンシングして複数のシーケンシングリードを生成することをさらに含み、ここで、前記複数の高存在標的核酸の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの 50 % 未満、40 % 未満、又は 30 % 未満であってもよく、及び／又は

(b) 前記複数の低存在標的核酸の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、又は少なくとも 20 % である
請求項 7 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

(a) 前記方法が、前記部分的な再アニーリング工程中に複数のブロッカーを追加することをさらに含み、ここで、前記複数のブロッカーが、前記第1のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位または前記第2のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位にハイブリダイズしてもよく、前記複数のブロッカーが、前記第1のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位または前記第2のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位とその相補配列との間のハイブリダイゼーションを妨げててもよく、及び／又は

(b) 前記複数の標的核酸が、mRNA又はミトコンドリアmRNA又はリボソームタンパク質mRNAを含み、ここで、前記低存在標的核酸が、転写物の数が最も少ない7,000個の遺伝子、最も少ない4,000個の遺伝子、又は最も少ない2,000個の遺伝子を含んでいてもよく、及び／又は

(c) 前記複数の第1のオリゴヌクレオチドが、標的特定のプライマー又は標的非特定のプライマーを含む、及び／又は

(d) 前記複数の標的核酸が単一細胞由来である、
請求項7～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記複数の標的核酸が、cDNA又はゲノムDNAを含み、ここで、前記複数の標的核酸がゲノムDNAであってもよく、前記高存在標的核酸が、短いタンDEM反復配列、テロメア配列、又はセントロメア配列を含んでいてもよく、及び／又は

前記複数の標的核酸が単一細胞由来である、
請求項7～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

非正規化核酸ライブラリーにおいて、結合部分を含む複数の第1のオリゴヌクレオチドを複数の標的核酸とハイブリダイズさせること、

前記複数の第1のオリゴヌクレオチドを伸長させて、前記結合部分を含む、前記複数の標的核酸に対する複数の相補鎖を生成すること、

前記複数の標的核酸に対する前記複数の相補鎖を含む、複数の二本鎖核酸分子を変性させること、

前記複数の標的核酸に対する前記複数の相補鎖を部分的に再アニーリングすること、および
前記複数の標的核酸に対する前記再アニーリングされた相補鎖を除去すること、を含み、

前記複数の標的核酸の正規化核酸ライブラリーが生成される、

正規化核酸ライブラリーの生成方法。

【請求項15】

(a) 前記非正規化核酸ライブラリーが、1つ以上の高存在標的核酸および1つ以上の低存在標的核酸を含み、ここで、前記1つ以上の高存在標的核酸が、前記非正規化核酸ライブラリーの少なくとも50%、少なくとも60%、又は少なくとも70%に相当してもよく、

(b) 前記正規化核酸ライブラリー中の前記1つ以上の高存在標的核酸の含有量が、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも99%減少されている、及び／又は

(c) 前記1つ以上の低存在標的核酸が、前記非正規化核酸ライブラリーの10%未満、5%未満、又は1%未満に相当する、及び／又は

(d) 前記1つ以上の低存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリーの少なくとも5%、少なくとも10%、又は少なくとも20%に相当する、及び／又は

(e) 前記1つ以上の高存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリーの50%未満、40%未満、又は30%未満に相当する、

請求項14に記載の方法。

【請求項16】

(a) 前記非正規化核酸ライブラリーがcDNAライブラリー又はゲノムライブラリーである、及び／又は

(b) 前記非正規化核酸ライブラリーが単一細胞核酸ライブラリーである、及び／又は
(c) 前記非正規化核酸ライブラリーがmRNAを含む、
請求項14又は15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】0189

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0189】

当業者であれば理解されるであろうが、あらゆる目的で、たとえば、明細書の提供に関して、本明細書に開示された範囲はすべて、あらゆる可能なサブ範囲およびそのサブ範囲の組合せをも包含する。いずれの列挙された範囲も、十分に記述されたものとしてかつその範囲が少なくとも2等分、3等分、4等分、5等分、10等分などされうるものとして容易に認識可能である。たとえば、限定されるものではないが、本明細書で考察した各範囲は、下3分の1、中3分の1、上3分の1に容易に分解可能である。同様に、当業者であれば理解されるであろうが、「～まで」、「少なくとも～」、「～超」、「～未満」などの表現はすべて、リサイトされた数を含み、以上で考察したように後続的にサブ範囲に分解可能な範囲を意味する。最終的に、当業者であれば理解されるであろうが、範囲は各個別のメンバーを含む。したがって、たとえば、1～3個の物品を有するグループは、1、2、または3個の物品を有するグループを意味する。同様に、1～5個の物品を有するグループは、1、2、3、4、または5個の物品を有するグループを意味し、他も同様である。

なお、本発明としては、以下の態様も好ましい。

〔1〕

結合部分を含む複数の第1のオリゴヌクレオチドを、少なくとも1つの高存在種を含む第1の複数の核酸分子とハイブリダイズさせること、

前記複数の第1のオリゴヌクレオチドを伸長して結合部分を含む、前記第1の複数の核酸分子に対する複数の相補鎖を生成すること、

前記第1の複数の核酸分子に対する前記複数の相補鎖を含む、複数の二本鎖核酸分子を変性させること、

前記第1の複数の核酸分子に対する前記複数の相補鎖を部分的に再アニールすること、および

1つ以上の固体担体上に固定された、前記結合部分に特異的に結合する捕捉分子によって、前記第1の複数の核酸分子に対する前記再アニールされた相補鎖を除去して第2の複数の核酸分子を生成すること、を含み、

第2の複数の核酸分子中の少なくとも1つの高存在種の含有量は、第1の複数の核酸分子中の少なくとも1つの高存在種の含有量と比較して減少する、
複数の核酸分子から高存在種を除去する方法。

〔2〕

前記結合部分が、ビオチン、ストレプトアビジン、ヘパリン、アプタマー、クリックケミストリー部分、ジゴキシゲニン、第1級アミン、カルボキシル、ヒドロキシル、アルデヒド、ケトン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される官能基である、
〔1〕に記載の方法。

〔3〕

前記結合部分がビオチンである、〔2〕に記載の方法。

〔4〕

前記捕捉分子がストレプトアビジンである、〔3〕に記載の方法。

〔5〕

前記第1の複数の核酸分子に対する複数の相補鎖の少なくとも1つにつき第2の鎖を合成して、前記第1の複数の核酸分子に対する複数の相補鎖を含む、1つ以上の前記複数の

二本鎖核酸分子を生成することをさらに含む、〔１〕～〔４〕のいずれか一項に記載の方法。

〔６〕

前記合成が、複数の第２のオリゴヌクレオチドを前記第１の複数の核酸分子に対する複数の相補鎖にハイブリダイズさせ、前記複数の第２のオリゴヌクレオチドを伸長させることを含む、〔５〕に記載の方法。

〔７〕

前記複数の第１のオリゴヌクレオチドまたは前記複数の第２のオリゴヌクレオチドがユニバーサルプライマー結合部位を含む、〔６〕に記載の方法。

〔８〕

前記複数の二本鎖核酸分子を増幅することをさらに含む、〔１〕～〔７〕のいずれか一項に記載の方法。

〔９〕

前記第１の複数の核酸分子が、複数の高存在種を含む、〔１〕～〔８〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１０〕

前記少なくとも１つの高存在種が、前記第１の複数の核酸分子の少なくとも５０％に相当する、〔１〕～〔９〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１１〕

前記少なくとも１つの高存在種が、前記第１の複数の核酸分子の少なくとも６０％に相当する、〔１〕～〔９〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１２〕

前記少なくとも１つの高存在種が、前記第１の複数の核酸分子の少なくとも７０％に相当する、〔１〕～〔９〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１３〕

前記少なくとも１つの高存在種の含有量の減少が、少なくとも８０％である、〔１〕～〔１２〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１４〕

前記少なくとも１つの高存在種の含有量の減少が、少なくとも９０％である、〔１〕～〔１２〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１５〕

前記少なくとも１つの高存在種の含有量の減少が、少なくとも９５％である、〔１〕～〔１２〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１６〕

前記少なくとも１つの高存在種の含有量の減少が、少なくとも９９％である、〔１〕～〔１２〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１７〕

前記第２の複数の核酸分子が、前記複数の高存在種を含む、〔９〕～〔１６〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１８〕

前記第２の複数の核酸分子中の前記複数の高存在種が、前記第２の複数の核酸分子の５０％未満に相当する、〔１７〕に記載の方法。

〔１９〕

前記第２の複数の核酸分子中の前記複数の高存在種が、前記第２の複数の核酸分子の４０％未満に相当する、〔１７〕に記載の方法。

〔２０〕

前記第２の複数の核酸分子中の前記複数の高存在種が、前記第２の複数の核酸分子の３０％未満に相当する、〔１７〕に記載の方法。

〔２１〕

前記第１の複数の核酸分子が、複数の低存在種を含む、〔１〕～〔２０〕のいずれか一

項に記載の方法。

〔 2 2 〕

前記複数の低存在種が、前記第 1 の複数の核酸分子の 1 0 % 未満に相当する、〔 2 1 〕に記載の方法。

〔 2 3 〕

前記複数の低存在種が、前記第 1 の複数の核酸分子の 5 % 未満に相当する、〔 2 1 〕に記載の方法。

〔 2 4 〕

前記複数の低存在種が、前記第 1 の複数の核酸分子の 1 % 未満に相当する、〔 2 1 〕に記載の方法。

〔 2 5 〕

前記第 2 の複数の核酸分子が、前記複数の低存在種を含む、〔 2 1 〕～〔 2 4 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 2 6 〕

前記第 2 の複数の核酸分子中の前記複数の低存在種が、前記第 2 の複数の核酸分子の少なくとも 5 % に相当する、〔 2 5 〕に記載の方法。

〔 2 7 〕

前記第 2 の複数の核酸分子中の前記複数の低存在種が、前記第 2 の複数の核酸分子の少なくとも 1 0 % に相当する、〔 2 5 〕に記載の方法。

〔 2 8 〕

前記第 2 の複数の核酸分子中の前記複数の低存在種が、前記第 2 の複数の核酸分子の少なくとも 2 0 % に相当する、〔 2 5 〕に記載の方法。

〔 2 9 〕

前記第 1 の複数の核酸分子のそれぞれまたは前記第 2 の複数の核酸分子のそれぞれが、確率バーコードを含む、〔 1 〕～〔 2 8 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 3 0 〕

前記第 2 の複数の核酸分子をシーケンシングして複数のシーケンシングリードを生成することをさらに含む、〔 1 〕～〔 2 9 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 3 1 〕

前記複数の高存在種の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの 5 0 % 未満である、〔 3 0 〕に記載の方法。

〔 3 2 〕

前記複数の高存在種の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの 4 0 % 未満である、〔 3 0 〕に記載の方法。

〔 3 3 〕

前記複数の高存在種の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの 3 0 % 未満である、〔 3 0 〕に記載の方法。

〔 3 4 〕

前記複数の低存在種の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの少なくとも 5 % である、〔 3 0 〕～〔 3 3 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 3 5 〕

前記複数の低存在種の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの少なくとも 1 0 % である、〔 3 0 〕～〔 3 3 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 3 6 〕

前記複数の低存在種の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの少なくとも 2 0 % である、〔 3 0 〕～〔 3 3 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 3 7 〕

前記部分的な再アニーリング工程中に複数のブロッカーを追加することをさらに含む、〔 1 〕～〔 3 6 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 3 8 〕

前記複数のブロッカーが、前記第1のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位または前記第2のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位にハイブリダイズする、〔37〕に記載の方法。

〔39〕

前記複数のブロッカーが、前記第1のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位または前記第2のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位とその相補配列との間のハイブリダイゼーションを妨げる、〔38〕に記載の方法。

〔40〕

結合部分を含む複数の第1のオリゴヌクレオチドを、複数の標的核酸とハイブリダイズさせること、

前記複数の第1のオリゴヌクレオチドを伸長させて、前記結合部分を含む、前記複数の標的核酸に対する複数の相補鎖を生成すること、

前記複数の標的核酸に対する前記複数の相補鎖を含む、複数の二本鎖核酸分子を変性させること、

前記複数の標的核酸に対する前記複数の相補鎖を部分的に再アニールすること、および

1つ以上の固体担体上に固定された、前記結合部分に特異的に結合する捕捉分子によって、前記複数の標的核酸に対する前記再アニールされた相補鎖を除去すること、を含み、

前記複数の標的核酸の正規化核酸ライブラリーが生成される、

正規化核酸ライブラリーの生成方法。

〔41〕

前記結合部分が、ビオチン、ストレプトアビジン、ヘパリン、アプタマー、クリックケミストリー部分、ジゴキシゲニン、第1級アミン、カルボキシル、ヒドロキシル、アルデヒド、ケトン、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される官能基である、〔40〕に記載の方法。

〔42〕

前記結合部分がビオチンである、〔41〕に記載の方法。

〔43〕

前記捕捉分子がストレプトアビジンである、〔42〕に記載の方法。

〔44〕

前記複数の標的核酸に対する前記複数の相補鎖の1つ以上につき第2の鎖を合成して、前記複数の標的核酸に対する前記複数の相補鎖を含む、1つ以上の前記複数の二本鎖核酸分子を生成することをさらに含む、〔40〕～〔43〕のいずれか一項に記載の方法。

〔45〕

前記合成が、複数の第2のオリゴヌクレオチドを前記複数の標的核酸の前記複数の相補鎖にハイブリダイズさせ、前記複数の第2のオリゴヌクレオチドを伸長させることを含む、〔44〕に記載の方法。

〔46〕

前記複数の第1のオリゴヌクレオチドまたは前記複数の第2のオリゴヌクレオチドがユニバーサルプライマー結合部位を含む、〔45〕に記載の方法。

〔47〕

前記複数の二本鎖核酸分子を増幅することをさらに含む、〔44〕～〔46〕のいずれか一項に記載の方法。

〔48〕

前記複数の標的核酸が、複数の低存在標的核酸を含む、〔40〕～〔47〕のいずれか一項に記載の方法。

〔49〕

前記複数の低存在標的核酸が、前記複数の標的核酸の10%未満に相当する、〔48〕に記載の方法。

〔50〕

前記複数の低存在標的核酸が、前記複数の標的核酸の5%未満に相当する、〔48〕に

記載の方法。

〔 5 1 〕

前記複数の低存在標的核酸が、前記複数の標的核酸の 1 % 未満に相当する、〔 4 8 〕に記載の方法。

〔 5 2 〕

前記複数の標的核酸の前記正規化核酸ライブラリーが、前記複数の低存在標的核酸を含む、〔 4 8 〕～〔 5 1 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 5 3 〕

前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の低存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の標的核酸の少なくとも 5 % に相当する、〔 5 2 〕に記載の方法。

〔 5 4 〕

前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の低存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の標的核酸の少なくとも 1 0 % に相当する、〔 5 2 〕に記載の方法。

〔 5 5 〕

前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の低存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の標的核酸の少なくとも 2 0 % に相当する、〔 5 2 〕に記載の方法。

〔 5 6 〕

前記複数の標的核酸が、複数の高存在標的核酸を含む、〔 4 0 〕～〔 5 5 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 5 7 〕

前記複数の高存在標的核酸が、前記複数の標的核酸の少なくとも 5 0 % に相当する、〔 5 6 〕に記載の方法。

〔 5 8 〕

前記複数の高存在標的核酸が、前記複数の標的核酸の少なくとも 6 0 % に相当する、〔 5 6 〕に記載の方法。

〔 5 9 〕

前記複数の高存在標的核酸が、前記複数の標的核酸の少なくとも 7 0 % に相当する、〔 5 6 〕に記載の方法。

〔 6 0 〕

前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の高存在種の含有量が、少なくとも 8 0 % 減少する、〔 5 6 〕～〔 5 9 〕に記載の方法。

〔 6 1 〕

前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の高存在種の含有量が、少なくとも 9 0 % 減少する、〔 5 6 〕～〔 5 9 〕に記載の方法。

〔 6 2 〕

前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の高存在種の含有量が、少なくとも 9 5 % 減少する、〔 5 6 〕～〔 5 9 〕に記載の方法。

〔 6 3 〕

前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の高存在種の含有量が、少なくとも 9 9 % 減少する、〔 5 6 〕～〔 5 9 〕に記載の方法。

〔 6 4 〕

前記複数の標的核酸の前記正規化核酸ライブラリーが、前記複数の高存在標的核酸を含む、〔 5 6 〕～〔 6 3 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 6 5 〕

前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の高存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の標的核酸の 5 0 % 未満に相当する、〔 6 4 〕に記載の方法。

〔 6 6 〕

前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の高存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の標的核酸の 4 0 % 未満に相当する、〔 6 4 〕に記載の方法。

〔 6 7 〕

前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の高存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリー中の前記複数の標的核酸の30%未満に相当する、〔64〕に記載の方法。

〔68〕

前記複数の第1のオリゴヌクレオチドのそれぞれまたは前記複数の第2のオリゴヌクレオチドのそれぞれが、確率バーコードを含む、〔40〕～〔67〕に記載の方法。

〔69〕

前記正規化核酸ライブラリーをシーケンシングして複数のシーケンシングリードを生成することをさらに含む、〔40〕～〔68〕のいずれか一項に記載の方法。

〔70〕

前記複数の高存在標的核酸の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの50%未満である、〔69〕に記載の方法。

〔71〕

前記複数の高存在標的核酸の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの40%未満である、〔69〕に記載の方法。

〔72〕

前記複数の高存在標的核酸の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの30%未満である、〔69〕に記載の方法。

〔73〕

前記複数の低存在標的核酸の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの少なくとも5%である、〔69〕～〔72〕のいずれか一項に記載の方法。

〔74〕

前記複数の低存在標的核酸の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの少なくとも10%である、〔69〕～〔72〕のいずれか一項に記載の方法。

〔75〕

前記複数の低存在標的核酸の前記シーケンシングリードが、全シーケンシングリードの少なくとも20%である、〔69〕～〔72〕のいずれか一項に記載の方法。

〔76〕

前記部分的な再アニーリング工程中に複数のブロッカーを追加することをさらに含む、〔40〕～〔75〕のいずれか一項に記載の方法。

〔77〕

前記複数のブロッカーが、前記第1のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位または前記第2のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位にハイブリダイズする、〔76〕に記載の方法。

〔78〕

前記複数のブロッカーが、前記第1のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位または前記第2のオリゴヌクレオチドのユニバーサルプライマー結合部位とその相補配列との間のハイブリダイゼーションを妨げる、〔77〕に記載の方法。

〔79〕

前記複数の標的核酸が、mRNAを含む、〔40〕～〔78〕のいずれか一項に記載の方法。

〔80〕

前記複数の標的核酸が、ミトコンドリアmRNAを含む、〔79〕に記載の方法。

〔81〕

前記複数の標的核酸が、リボソームタンパク質mRNAを含む、〔79〕に記載の方法。

〔82〕

前記低存在標的核酸が、転写物の数が最も少ない7,000個の遺伝子を含む、〔79〕～〔81〕のいずれか一項に記載の方法。

〔83〕

前記低存在標的核酸が、転写物の数が最も少ない4,000個の遺伝子を含む、〔79〕

〕～〔 8 1 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 8 4 〕

前記低存在標的核酸が、転写物の数が最も少ない 2, 0 0 0 個の遺伝子を含む、〔 7 9 〕～〔 8 1 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 8 5 〕

前記複数の第 1 のオリゴヌクレオチドが、標的特異的プライマーを含む、〔 4 0 〕～〔 8 4 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 8 6 〕

前記複数の第 1 のオリゴヌクレオチドが、標的非特異的プライマーを含む、〔 4 0 〕～〔 8 4 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 8 7 〕

前記複数の標的核酸が、c D N Aを含む、〔 4 0 〕～〔 7 8 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 8 8 〕

前記複数の標的核酸が、ゲノム D N Aを含む、〔 4 0 〕～〔 7 8 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 8 9 〕

前記高存在標的核酸が、短いタンデム反復配列を含む、〔 8 8 〕に記載の方法。

〔 9 0 〕

前記高存在標的核酸が、テロメア配列を含む、〔 8 8 〕に記載の方法。

〔 9 1 〕

前記高存在標的核酸が、セントロメア配列を含む、〔 8 8 〕に記載の方法。

〔 9 2 〕

前記複数の標的核酸が、単一細胞由来である、〔 4 0 〕～〔 9 1 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 9 3 〕

非正規化核酸ライブラリーにおいて、結合部分を含む複数の第 1 のオリゴヌクレオチドを複数の標的核酸とハイブリダイズさせること、

前記複数の第 1 のオリゴヌクレオチドを伸長させて、前記結合部分を含む、前記複数の標的核酸に対する複数の相補鎖を生成すること、

前記複数の標的核酸に対する前記複数の相補鎖を含む、複数の二本鎖核酸分子を変性させること、

前記複数の標的核酸に対する前記複数の相補鎖を部分的に再アニールすること、および前記複数の標的核酸に対する前記再アニールされた相補鎖を除去すること、を含み、

前記複数の標的核酸の正規化核酸ライブラリーが生成される、
正規化核酸ライブラリーの生成方法。

〔 9 4 〕

前記非正規化核酸ライブラリーが、1 つ以上の高存在標的核酸および 1 つ以上の低存在標的核酸を含む、〔 9 3 〕に記載の方法。

〔 9 5 〕

前記 1 つ以上の高存在標的核酸が、前記非正規化核酸ライブラリーの少なくとも 5 0 % に相当する、〔 9 4 〕に記載の方法。

〔 9 6 〕

前記 1 つ以上の高存在標的核酸が、前記非正規化核酸ライブラリーの少なくとも 6 0 % に相当する、〔 9 4 〕に記載の方法。

〔 9 7 〕

前記 1 つ以上の高存在標的核酸が、前記非正規化核酸ライブラリーの少なくとも 7 0 % に相当する、〔 9 4 〕に記載の方法。

〔 9 8 〕

前記正規化核酸ライブラリー中の前記 1 つ以上の高存在標的核酸の含有量が、少なくと

も 80 % 減少する、〔94〕～〔97〕のいずれか一項に記載の方法。

〔99〕

前記正規化核酸ライブラリー中の前記1つ以上の高存在標的核酸の含有量が、少なくとも90 % 減少する、〔94〕～〔97〕のいずれか一項に記載の方法。

〔100〕

前記正規化核酸ライブラリー中の前記1つ以上の高存在標的核酸の含有量が、少なくとも95 % 減少する、〔94〕～〔97〕のいずれか一項に記載の方法。

〔101〕

前記正規化核酸ライブラリー中の前記1つ以上の高存在標的核酸の含有量が、少なくとも99 % 減少する、〔94〕～〔97〕のいずれか一項に記載の方法。

〔102〕

前記1つ以上の低存在標的核酸が、前記非正規化核酸ライブラリーの10 % 未満に相当する、〔94〕～〔101〕のいずれか一項に記載の方法。

〔103〕

前記1つ以上の低存在標的核酸が、前記非正規化核酸ライブラリーの5 % 未満に相当する、〔94〕～〔101〕のいずれか一項に記載の方法。

〔104〕

前記1つ以上の低存在標的核酸が、前記非正規化核酸ライブラリーの1 % 未満に相当する、〔94〕～〔101〕のいずれか一項に記載の方法。

〔105〕

前記1つ以上の低存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリーの少なくとも5 % に相当する、〔94〕～〔104〕のいずれか一項に記載の方法。

〔106〕

前記1つ以上の低存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリーの少なくとも10 % に相当する、〔94〕～〔104〕のいずれか一項に記載の方法。

〔107〕

前記1つ以上の低存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリーの少なくとも20 % に相当する、〔94〕～〔104〕のいずれか一項に記載の方法。

〔108〕

前記1つ以上の高存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリーの50 % 未満に相当する、〔94〕～〔107〕のいずれか一項に記載の方法。

〔109〕

前記1つ以上の高存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリーの40 % 未満に相当する、〔94〕～〔107〕のいずれか一項に記載の方法。

〔110〕

前記1つ以上の高存在標的核酸が、前記正規化核酸ライブラリーの30 % 未満に相当する、〔94〕～〔107〕のいずれか一項に記載の方法。

〔111〕

前記非正規化核酸ライブラリーがcDNAライブラリーである、〔93〕～〔110〕のいずれか一項に記載の方法。

〔112〕

前記非正規化核酸ライブラリーがゲノムライブラリーである、〔93〕～〔110〕のいずれか一項に記載の方法。

〔113〕

前記非正規化核酸ライブラリーが単一細胞核酸ライブラリーである、〔93〕～〔112〕のいずれか一項に記載の方法。