

【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28年5月12日 (2016.5.12)

【公表番号】特表2015-510766(P2015-510766A)

【公表日】平成27年4月13日 (2015.4.13)

【年通号数】公開・登録公報2015-024

【出願番号】特願2015-500582(P2015-500582)

【国際特許分類】

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 9/12

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 15/00 Z N A

【手続補正書】

【提出日】平成28年3月11日 (2016.3.11)

【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】

テンプレート非依存核酸ポリメラーゼと、アテニュエーター - アダプター分子と、アテニュエーター配列に相補的であるヌクレオチドと、リガーゼと、を含む、組成物。

【請求項 2】

前記核酸ポリメラーゼが、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (T d T)である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記核酸ポリメラーゼが、ポリ (A) ポリメラーゼおよびポリ (U) ポリメラーゼからなる群から選択される RNA 特異的ヌクレオチジルトランスフェラーゼである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記アテニュエーター分子が、2' - デオキシチミジン 5' - 1リン酸 (dTMP)、2' - デオキシグアノシン 5' - 1リン酸 (dGMP)、2' - デオキシアデノシン 5' - 1リン酸 (dAMP)、2' - デオキシシチジン 5' - 1リン酸 (dCMP)、2' - デオキシウリジン 5' - 1リン酸 (dUMP)、チミジン 1リン酸 (TMP)、グアノシン 1リン酸 (GMP)、アデノシン 1リン酸 (AMP)、シチジン 1リン酸 (CMP)、ウリジン 1リン酸 (UMP)、塩基類似体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるヌクレオチドを含むポリヌクレオチドである、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5】

前記アテニュエーター分子が、10個のヌクレオチド、20個のヌクレオチド、30個のヌクレオチド、50個のヌクレオチドまたは100個のヌクレオチドを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 6】

前記アテニュエーター分子が、少なくとも1つのリボヌクレオチド、少なくとも1つの

デオキシヌクレオチド、C 3 スペース、リン酸塩、ジデオキシヌクレオチド、アミノ基、および逆位デオキシチミジンからなる群から選択される 3' 保護基を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 7】

前記アテニューエーター分子が、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、多糖、環状分子、ペプチド核酸、シゾフィラン多糖、ロックド核酸、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記アテニューエーター分子が、分解性であるかまたは置換可能である、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 9】

前記アテニューエーター - アダプター分子が、1 本鎖アテニューエーター配列を含み、前記アテニューエーター配列の 5' に位置する部分的に 2 本鎖のアダプター配列 W をさらに含み、かつ配列 X に相補的であり、任意に、前記アダプターは 5' リン酸塩を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記リガーゼが、DNA リガーゼまたは RNA リガーゼである、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 11】

プライマーと、ポリメラーゼと、配列 V に相補的である配列 Y を含むアダプター分子とをさらに含む、請求項 10 に記載の組成物であって、配列 V が、Y と同じ長さであるか、または配列 Y と同じ長さ未満であり、前記アダプター分子が、前記アテニューエーター - アダプター分子とは別の分子である、組成物。

【請求項 12】

前記アテニューエーター - アダプター分子が、固定化される、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記アテニューエーター - アダプター分子のアテニューエーター部分が、(1) ポリ (d A)、ポリ (d T)、ポリ (d C)、ポリ (d G)、ポリ (d U)、ポリ (r A)、ポリ (U)、ポリ (r C)、ポリ (r G) からなる群から選択されるホモポリマー配列、あるいは (2)

- (i) d A および r A 塩基、
- (i i) d T、d U、および U 塩基、
- (i i i) d C および r C 塩基、または
- (i v) d G および r G 塩基

の組み合わせを含むヘテロポリマー配列を含むか、または前記アテニューエーター分子が、以下のジヌクレオチドの組み合わせ (i) d G および d C ; (i i) d A および d T ; (i i i) d G および d T ; (i v) d G および d A ; (v) d A および d C ; または (v i) d C および d T から構成される複数のランダム配列を含むジヌクレオチド配列を含むか、または前記アテニューエーター分子が、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドの混合物を含むジヌクレオチド配列を含む、

請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 14】

(i) 前記アテニューエーター分子が、d U 塩基を含み、d U - グリコシラーゼとのインキュベーションが前記アテニューエーター分子を不安定化するか、または d U - グリコシラーゼとのインキュベーション、および後続の 80 °C を上回る温度でのインキュベーションが前記アテニューエーター分子を分解するか、あるいは前記アテニューエーター分子が d U - グリコシラーゼと脱プリン / 脱ピリミジンエンドヌクレアーゼの混合物とインキュベートされる、

(i i) 前記アテニューエーター分子が、リボヌクレオチドを含み、リボヌクレアーゼ活性に十分な条件下でリボヌクレアーゼにより分解性であり、前記リボヌクレアーゼが、R

N a s e H、R N a s e H I I、R N a s e A、およびR N a s e T 1 からなる群から選択される、かつ / または

(i i i) 前記アテニュエーター分子が、デオキシリボヌクレオチドを含み、DNA 特異的ヌクレアーゼにより分解性であり、任意に、前記DNA 特異的ヌクレアーゼが、D N a s e I である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

基質ポリヌクレオチドの減弱されたテーリングおよび同時アダプター連結の方法であって、

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の組成物を、前記基質ポリヌクレオチド、および前記アテニュエーター分子に相補的であるヌクレオチドと混合すること、ならびに

前記基質ポリヌクレオチドの 3 ' 端への、尾配列の付加を可能にするのに十分な条件下で、前記混合物をインキュベートすることを含み、前記尾配列の付加が前記尾配列と前記アテニュエーター分子との間の会合およびアダプター配列の前記基質ポリヌクレオチドへの連結を可能にし、複合体を形成する、方法。

【請求項 1 6】

前記基質ポリヌクレオチドが、

(i) 1 本鎖基質ポリヌクレオチド、

(i i) 2 本鎖基質ポリヌクレオチド、

(i i i) 部分的に 2 本鎖であり、部分的に 1 本鎖の基質ポリヌクレオチドであって、前記 2 本鎖の基質ポリヌクレオチドが 3 ' 突出端を有する基質ポリヌクレオチド、

(i v) 亜硫酸水素塩処理された基質ポリヌクレオチド、または

(v) プライマー伸長反応の生成物

である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記基質ポリヌクレオチドが、遊離 3 ' ヒドロキシル基を含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記アテニュエーター - アダプター分子のアテニュエーター部分が、前記尾配列を付加する過程に前記尾配列と会合し、前記アテニュエーター分子の前記尾配列への会合が、ヌクレオチドの前記基質ポリヌクレオチドへの付加を調節する、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記尾配列の前記基質ポリヌクレオチドへの付加が、温度感受性であり、前記温度が、約 4 、約 5 、約 6 、約 7 、約 8 、約 9 、約 1 0 、約 1 1 、約 1 2 、約 1 3 、約 1 4 、約 1 5 、約 1 6 、約 1 7 、約 1 8 、約 1 9 、約 2 0 、約 2 1 、約 2 2 、約 2 3 、約 2 4 、約 2 5 、約 2 6 、約 2 7 、約 2 8 、約 2 9 、約 3 0 、約 3 1 、約 3 2 、約 3 3 、約 3 4 、約 3 5 、約 3 6 、約 3 7 、約 3 8 、約 3 9 、約 4 0 、約 4 1 、約 4 2 、約 4 3 、約 4 4 、約 4 5 、約 4 6 、約 4 7 、約 4 8 、約 4 9 または約 5 0 である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記基質ポリヌクレオチドが、DNA であるか、または前記基質ポリヌクレオチドが、RNA である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 2 1】

少なくとも 3 個のヌクレオチド、少なくとも 1 0 個のヌクレオチド、少なくとも 2 0 個のヌクレオチド、少なくとも 3 0 個のヌクレオチド、少なくとも 5 0 個のヌクレオチドまたは少なくとも 1 0 0 個のヌクレオチドが、前記基質ポリヌクレオチドに付加される、請求項 1 5 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記DNA 基質ポリヌクレオチドが、前記減弱されたテーリングおよび同時連結反応の

後に固定化される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む、キット。

【請求項 24】

基質ポリヌクレオチドの減弱されたテーリングおよび同時アダプター連結の方法であって、

(1) 前記基質ポリヌクレオチドを含む混合物を、前記基質ポリヌクレオチドの伸長が前記基質に尾を付けることを可能にする条件下で、(i) ポリメラーゼ酵素、(ii) アテニューエーター配列を含み、かつ前記アテニューエーター配列に隣接して位置付けられ、アダプター配列 X に相補的である配列 W をさらに含むアテニューエーター分子を含む組成物であって、前記組成物が、配列 V に相補的である配列 Y を含むアダプター分子をさらに含み、配列 V が、Y と同じ長さであるか、または配列 Y と同じ長さ未満であり、前記アダプター分子が、前記アテニューエーター - アダプター分子とは別の分子である組成物、および (iii) 前記アテニューエーター分子のアテニューエーター配列に相補的であるデオキシヌクレオチドとインキュベートすることと、

(2) 前記アダプター配列 X を前記基質ポリヌクレオチドに連結し、前記アテニューエーター分子を別のポリヌクレオチドから解離することと、

(3) 前記基質ポリヌクレオチドの配列に相補的なプライマーを、前記プライマーが前記基質ポリヌクレオチドとハイブリダイズする条件下で添加することと、

(4) 前記プライマーからポリメラーゼ伸長を実施するために、ポリメラーゼおよびデオキシヌクレオチドを添加して、前記基質ポリヌクレオチドに相補的な第 2 鎖ポリヌクレオチドを生成し、2 本鎖基質分子を作製することと、

(5) 前記アダプター分子を前記 2 本鎖基質分子に連結することと、

(6) 任意に、前記第 2 鎖ポリヌクレオチドを分解することと、を含む、方法。

【請求項 25】

前記プライマーが、適切な条件下で配列 X とハイブリダイズするのに前記基質ポリヌクレオチドの配列に十分に相補的である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記プライマーが、適切な条件下で配列 X 以外の前記基質分子の配列とハイブリダイズするのに十分に相補的である標的特異的プライマーである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

前記基質ポリヌクレオチドが、1 本鎖 DNA ポリヌクレオチドまたはリボ核酸 (RNA) である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 28】

配列 X が別のポリヌクレオチド上にある、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 29】

配列 X が別のポリヌクレオチド上にある、請求項 24 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】0069

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0069】

本明細書に開示される組成物のいずれかを含むキットも提供される。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

核酸ポリメラーゼと、アテニューエーター分子と、を含む、組成物。

(項目 2)

前記核酸ポリメラーゼが、DNA ポリメラーゼである、項目 1 に記載の組成物。

(項目 3)

前記 DNA ポリメラーゼが、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (T d T) である、項目 2 に記載の組成物。

(項目 4)

前記核酸ポリメラーゼが、RNA ポリメラーゼである、項目 1 に記載の組成物。

(項目 5)

前記 RNA ポリメラーゼが、RNA 特異的ヌクレオチジルトランスフェラーゼである、項目 4 に記載の組成物。

(項目 6)

前記 RNA 特異的ヌクレオチジルトランスフェラーゼが、ポリ (A) ポリメラーゼおよびポリ (U) ポリメラーゼからなる群から選択される、項目 5 に記載の組成物。

(項目 7)

前記アテニュエーター分子が、2' - デオキシチミジン 5' - 1 リン酸 (d T M P) 、 2' - デオキシグアノシン 5' - 1 リン酸 (d G M P) 、 2' - デオキシアデノシン 5' - 1 リン酸 (d A M P) 、 2' - デオキシシチジン 5' - 1 リン酸 (d C M P) 、 2' - デオキシウリジン 5' - 1 リン酸 (d U M P) 、チミジン 1 リン酸 (T M P) 、グアノシン 1 リン酸 (G M P) 、アデノシン 1 リン酸 (A M P) 、シチジン 1 リン酸 (C M P) 、ウリジン 1 リン酸 (U M P) 、塩基類似体、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるヌクレオチドを含む、項目 1 ~ 6 のいずれかに記載の組成物。

(項目 8)

前記アテニュエーター分子が、10 個のヌクレオチドを含む、項目 1 ~ 7 のいずれかに記載の組成物。

(項目 9)

前記アテニュエーター分子が、20 個のヌクレオチドを含む、項目 1 ~ 8 のいずれかに記載の組成物。

(項目 10)

前記アテニュエーター分子が、30 個のヌクレオチドを含む、項目 1 ~ 9 のいずれかに記載の組成物。

(項目 11)

前記アテニュエーター分子が、50 個のヌクレオチドを含む、項目 1 ~ 10 のいずれかに記載の組成物。

(項目 12)

前記アテニュエーター分子が、100 個のヌクレオチドを含む、項目 1 ~ 11 のいずれかに記載の組成物。

(項目 13)

前記アテニュエーター分子が、3' 保護基を含む、項目 1 ~ 12 のいずれかに記載の組成物。

(項目 14)

前記保護基が、少なくとも 1 つのリボヌクレオチド、少なくとも 1 つのデオキシヌクレオチド、C3 スペーサー、リン酸塩、ジデオキシヌクレオチド、アミノ基、および逆位デオキシチミジンからなる群から選択される、項目 13 に記載の組成物。

(項目 15)

前記アテニュエーター分子が、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、多糖、環状分子、ペプチド核酸、シゾフィラン多糖、ロックド核酸、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、項目 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 16)

前記アテニュエーター分子が、分解性である、項目 1 ~ 15 のいずれかに記載の組成物。

(項目 17)

前記アテニュエーター分子が、ホモポリマー配列の 5' に位置するアダプター配列、識

別タグ配列、またはそれらの両方をさらに含む、項目 1 ~ 16 のいずれかに記載の組成物。

。

(項目 18)

リガーゼが、存在する、項目 1 ~ 17 のいずれかに記載の組成物。

(項目 19)

前記アテニューエーター分子が、アテニューエーター配列を含み、かつ前記アテニューエーター配列に隣接して位置付けられ、別のポリヌクレオチド上の配列 X に相補的である配列 W をさらに含むアテニューエーター - アダプター分子であり、

前記組成物が、配列 V に相補的である配列 Y を含むアダプター分子をさらに含み、配列 V が、Y と同じ長さであるか、または配列 Y と同じ長さ未満であり、前記アダプター分子が、前記アテニューエーター - アダプター分子とは別の分子である、項目 18 に記載の組成物。

(項目 20)

前記アテニューエーター分子が、固定化される、項目 17 に記載の組成物。

(項目 21)

前記アテニューエーター分子が、1 本鎖である、項目 1 ~ 20 のいずれかに記載の組成物。

。

(項目 22)

前記アテニューエーター分子が、少なくとも部分的に 2 本鎖である、項目 17 ~ 21 のいずれかに記載の組成物。

(項目 23)

前記少なくとも部分的に 2 本鎖のアテニューエーター分子が、前記アダプター配列を含むアダプター分子に前記アテニューエーター分子をアニールすることにより生成される、項目 21 または 22 のいずれかに記載の組成物。

(項目 24)

前記アテニューエーター分子が、ポリ(dA)、ポリ(dT)、ポリ(dC)、ポリ(dG)、ポリ(dU)、ポリ(rA)、ポリ(U)、ポリ(rC)、ポリ(rG)、ならびに

(i) dA および rA 塩基、

(ii) dT、dU、および U 塩基、

(iii) dC および rC 塩基、または

(iv) dG および rG 塩基の組み合わせを含むヘテロポリマー配列からなる群から選択されるホモポリマー配列を含む、項目 1 ~ 23 のいずれかに記載の組成物。

(項目 25)

前記アテニューエーター分子が、dU 塩基を含み、dU - グリコシラーゼとのインキュベーションが前記アテニューエーター分子を不安定化するか、または dU - グリコシラーゼとのインキュベーション、および後続の 80 °C を上回る温度でのインキュベーションが前記アテニューエーター分子を分解するか、あるいは前記アテニューエーター分子が dU - グリコシラーゼと脱プリン / 脱ピリミジンエンドヌクレアーゼの混合物とインキュベートされる、項目 16 に記載の組成物。

(項目 26)

前記アテニューエーター分子が、リボヌクレオチドを含み、リボヌクレアーゼ活性に十分な条件下でリボヌクレアーゼにより分解性である、項目 16 に記載の組成物。

(項目 27)

前記リボヌクレアーゼが、RNase H、RNase HI、RNase A、および RNase T1 からなる群から選択される、項目 26 に記載の組成物。

(項目 28)

前記アテニューエーター分子が、デオキシリボヌクレオチドを含み、DNA 特異的ヌクレアーゼにより分解性である、項目 16 に記載の組成物。

(項目 29)

前記DNA特異的ヌクレアーゼが、DNAse Iである、項目28に記載の組成物。

(項目30)

基質ポリヌクレオチドを伸長する方法であって、

前記基質ポリヌクレオチドの3'端への、尾配列の付加を可能にするのに十分な条件下で、前記基質ポリヌクレオチドを項目1~29のいずれかに記載の組成物とインキュベートすることを含み、前記尾配列の付加が前記尾配列と前記アテニューエーター分子との間の会合を可能にし、複合体を形成する、方法。

(項目31)

前記基質ポリヌクレオチドの伸長後、前記アテニューエーター分子を分解することをさらに含む、項目30に記載の方法。

(項目32)

前記基質ポリヌクレオチドの伸長後、前記アテニューエーター分子を不安定化することをさらに含む、項目30に記載の方法。

(項目33)

前記伸長した基質ポリヌクレオチドを単離することをさらに含む、項目30~33のいずれか1項に記載の方法。

(項目34)

項目1~27のいずれか1項に記載の組成物を、前記基質ポリヌクレオチド、および前記アテニューエーター分子の前記ホモポリマー部分に相補的であるヌクレオチドと混合することをさらに含む、項目30~33のいずれか1項に記載の方法。

(項目35)

基質ポリヌクレオチドが、1本鎖基質ポリヌクレオチドである、項目30~34のいずれか1項に記載の方法。

(項目36)

前記基質ポリヌクレオチドが、2本鎖基質ポリヌクレオチドである、項目30~34のいずれか1項に記載の方法。

(項目37)

前記基質ポリヌクレオチドが、部分的に2本鎖であり、部分的に1本鎖の基質ポリヌクレオチドである、項目30~34のいずれか1項に記載の方法。

(項目38)

前記2本鎖基質ポリヌクレオチドが、3'突出端を有する、項目36または項目37に記載の方法。

(項目39)

前記基質ポリヌクレオチドが、遊離3'ヒドロキシル基を含む、項目35~37のいずれか1項に記載の方法。

(項目40)

多数のヌクレオチドが、前記基質ポリヌクレオチドに付加される、項目30~39のいずれか1項に記載の方法。

(項目41)

前記アテニューエーター分子が、前記アテニューエーター分子の長さ全てまたは一部にわたって前記尾配列と会合する、項目40に記載の方法。

(項目42)

前記アテニューエーター分子が、前記尾配列を付加する過程に前記尾配列と会合する、項目40または項目41に記載の方法。

(項目43)

前記アテニューエーター分子の前記尾配列への会合が、ヌクレオチドの前記基質ポリヌクレオチドへの付加を調節する、項目40~42のいずれか1項に記載の方法。

(項目44)

前記条件が、前記尾配列の前記基質ポリヌクレオチドへの付加を調節する、項目30~43のいずれかに記載の方法。

(項目 4 5)

前記尾配列の前記基質ポリヌクレオチドへの付加が、温度感受性である、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 6)

約 4 ~ 約 5 0 の温度範囲で実施される、項目 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

前記温度が、約 5 、約 6 、約 7 、約 8 、約 9 、約 1 0 、約 1 1 、約 1 2 、約 1 3 、約 1 4 、約 1 5 、約 1 6 、約 1 7 、約 1 8 、約 1 9 、約 2 0 、約 2 1 、約 2 2 、約 2 3 、約 2 4 、約 2 5 、約 2 6 、約 2 7 、約 2 8 、約 2 9 、約 3 0 、約 3 1 、約 3 2 、約 3 3 、約 3 4 、約 3 5 、約 3 6 、約 3 7 、約 3 8 、約 3 9 、約 4 0 、約 4 1 、約 4 2 、約 4 3 、約 4 4 、約 4 5 、約 4 6 、約 4 7 、約 4 8 、約 4 9 、約 5 0 である、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記尾配列の前記基質ポリヌクレオチドへの付加が、時間感受性である、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記インキュベーションステップが、約 0 . 5 分 ~ 約 1 2 0 分の範囲の時間の長さにならって進行する、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記インキュベーションステップが進行する前記時間の長さが、約 1 分、約 2 分、約 3 分、約 4 分、約 5 分、約 6 分、約 7 分、約 8 分、約 9 分、約 1 0 分、約 1 1 分、約 1 2 分、約 1 3 分、約 1 4 分、約 1 5 分、約 1 6 分、約 1 7 分、約 1 8 分、約 1 9 分、約 2 0 分、約 2 1 分、約 2 2 分、約 2 3 分、約 2 4 分、約 2 5 分、約 2 6 分、約 2 7 分、約 2 8 分、約 2 9 分、約 3 0 分、約 3 1 分、約 3 2 分、約 3 3 分、約 3 4 分、約 3 5 分、約 3 6 分、約 3 7 分、約 3 8 分、約 3 9 分、約 4 0 分、約 4 1 分、約 4 2 分、約 4 3 分、約 4 4 分、約 4 5 分、約 4 6 分、約 4 7 分、約 4 8 分、約 4 9 分、約 5 0 分、約 5 1 分、約 5 2 分、約 5 3 分、約 5 4 分、約 5 5 分、約 5 6 分、約 5 7 分、約 5 8 分、約 5 9 分、約 6 0 分、約 6 1 分、約 6 2 分、約 6 3 分、約 6 4 分、約 6 5 分、約 6 6 分、約 6 7 分、約 6 8 分、約 6 9 分、約 7 0 分、約 7 1 分、約 7 2 分、約 7 3 分、約 7 4 分、約 7 5 分、約 7 6 分、約 7 7 分、約 7 8 分、約 7 9 分、約 8 0 分、約 8 1 分、約 8 2 分、約 8 3 分、約 8 4 分、約 8 5 分、約 8 6 分、約 8 7 分、約 8 8 分、約 8 9 分、約 9 0 分、約 9 1 分、約 9 2 分、約 9 3 分、約 9 4 分、約 9 5 分、約 9 6 分、約 9 7 分、約 9 8 分、約 9 9 分、約 1 0 0 分、約 1 0 1 分、約 1 0 2 分、約 1 0 3 分、約 1 0 4 分、約 1 0 5 分、約 1 0 6 分、約 1 0 7 分、約 1 0 8 分、約 1 0 9 分、約 1 1 0 分、約 1 1 1 分、約 1 1 2 分、約 1 1 3 分、約 1 1 4 分、約 1 1 5 分、約 1 1 6 分、約 1 1 7 分、約 1 1 8 分、約 1 1 9 分、または約 1 2 0 分である、項目 4 8 または項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記尾配列の前記基質ポリヌクレオチドへの付加が、pH 感受性である、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記尾配列の前記基質ポリヌクレオチドへの付加が、pH が約 pH 5 . 0 ~ 約 pH 9 . 0 の範囲である条件下で実施される、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 3)

前記尾配列の前記基質ポリヌクレオチドへの付加が、pH が約 pH 5 . 1、約 pH 5 . 2、約 pH 5 . 3、約 pH 5 . 4、約 pH 5 . 5、約 pH 5 . 6、約 pH 5 . 7、約 pH 5 . 8、約 pH 5 . 9、約 pH 6 . 0、約 pH 6 . 1、約 pH 6 . 2、約 pH 6 . 3、約 pH 6 . 4、約 pH 6 . 5、約 pH 6 . 6、約 pH 6 . 7、約 pH 6 . 8、約 pH 6 . 9、約 pH 7 . 0、約 pH 7 . 1、約 pH 7 . 2、約 pH 7 . 3、約 pH 7 . 4、約 pH 7 . 5、約 pH 7 . 6、約 pH 7 . 7、約 pH 7 . 8、約 pH 7 . 9、約 pH 8 . 0、約 p

H 8 . 1、約 p H 8 . 2、約 p H 8 . 3、約 p H 8 . 4、約 p H 8 . 5、約 p H 8 . 6、約 p H 8 . 7、約 p H 8 . 8、約 p H 8 . 9、または約 p H 9 . 0である条件下で実施される、項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記基質ポリヌクレオチドが、DNAである、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記基質ポリヌクレオチドが、RNAである、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 5 6)

少なくとも 3 個のヌクレオチドが、前記基質ポリヌクレオチドに付加される、項目 3 0 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 7)

少なくとも 1 0 個のヌクレオチドが、前記基質ポリヌクレオチドに付加される、項目 3 0 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 8)

少なくとも 2 0 個のヌクレオチドが、前記基質ポリヌクレオチドに付加される、項目 3 0 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 9)

少なくとも 3 0 個のヌクレオチドが、前記基質ポリヌクレオチドに付加される、項目 3 0 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 0)

少なくとも 5 0 個のヌクレオチドが、前記基質ポリヌクレオチドに付加される、項目 3 0 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 1)

少なくとも 1 0 0 個のヌクレオチドが、前記基質ポリヌクレオチドに付加される、項目 3 0 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 2)

前記アダプター分子が、ヌクレオチドの前記基質ポリヌクレオチドへの付加中に、リガーゼ酵素によって前記基質ポリヌクレオチドに連結され、前記基質ポリヌクレオチドの固定化をもたらす、項目 3 0 ~ 6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 3)

前記リガーゼが、DNAリガーゼまたはRNAリガーゼである、項目 6 2 に記載の方法。

(項目 6 4)

前記アダプター分子が、ヌクレオチドの前記基質ポリヌクレオチドへの付加後に、リガーゼ酵素によって前記基質ポリヌクレオチドに連結される、項目 3 0 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 5)

前記固定化されたアテニューエーター - アダプター分子が、尾配列の前記基質ポリヌクレオチドへの付加中に、DNAまたはRNAリガーゼによって基質ポリヌクレオチドに連結される、項目 3 0 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 6)

前記固定化されたアテニューエーター - アダプター分子が、尾配列の前記基質ポリヌクレオチドへの付加後に、DNAまたはRNAリガーゼによって基質ポリヌクレオチドに連結される、項目 3 0 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 7)

反応物に添加される前記リガーゼ酵素の量が、約 0 . 1 ~ 約 1 0 0 0 単位 (U) である、項目 6 2 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6 8)

DNA基質ポリヌクレオチドを伸長する方法であって、
前記DNA基質ポリヌクレオチドを、TdT酵素、3'リン酸塩を含む分解性アテニュー

エーターポリヌクレオチド、および前記アテニュエーターポリヌクレオチドの前記ホモポリマー部分に相補的であるヌクレオチドと混合することと、

前記混合物を、約 30 ～ 約 37 で約 30 分間インキュベートし、続いて 70 で約 10 分間さらにインキュベートすることと、

DNA グリコシラーゼを添加することにより、前記アテニュエーター分子を不安定化することと、

前記混合物を、37 で約 5 分間インキュベートするか、または前記混合物を、80 を上回る温度でインキュベートすることにより、前記アテニュエーター分子を分解することと、

任意に、前記伸長した DNA 基質ポリヌクレオチドを単離することと、を含む、方法。
(項目 69)

DNA 基質ポリヌクレオチドを伸長する方法であって、

前記 DNA 基質ポリヌクレオチドを、TdT 酵素、少なくとも 2 つのリボヌクレオチドを任意に含む保護基を含むアテニュエーターポリヌクレオチド、および前記アテニュエーターポリヌクレオチドの前記ホモポリマー部分に相補的であるデオキシヌクレオチドと混合することと、

前記混合物を、約 30 ～ 約 37 で約 30 分間インキュベートし、続いて TdT 酵素を不活性化するために、70 で約 10 分間さらにインキュベートすることと、

任意に、前記伸長した DNA 基質ポリヌクレオチドを単離することと、を含む、方法。
(項目 70)

基質 RNA ポリヌクレオチドを伸長する方法であって、

基質 RNA ポリヌクレオチドを、RNA ポリメラーゼ、分解性アテニュエーターポリヌクレオチド、および前記アテニュエーターポリヌクレオチドの前記ホモポリマー部分に相補的であるリボヌクレオチドと混合することと、

前記混合物を、約 30 ～ 約 37 で約 30 分間インキュベートし、続いて 95 で約 10 分間さらにインキュベートすることと、

DNA グリコシラーゼを添加することによって前記アテニュエーター分子を不安定化し、前記混合物を 37 で約 10 分間インキュベートするか、または DNA グリコシラーゼを添加し、前記化合物を 37 で約 10 分間インキュベートし、続いて 80 を上回る温度でインキュベートすることにより、前記アテニュエーター分子を分解することと、

任意に、前記伸長した基質ポリヌクレオチドを単離することと、を含む、方法。

(項目 71)

前記 RNA ポリメラーゼが、ポリ(A)ポリメラーゼである、項目 70 に記載の方法。

(項目 72)

前記 RNA ポリメラーゼが、ポリ(U)ポリメラーゼである、項目 70 に記載の方法。

(項目 73)

DNA 基質ポリヌクレオチドを伸長する方法であって、

アテニュエーター分子とアダプター分子の混合物を、適切な緩衝液中で約 100 に加熱し、その後約 25 に冷却することによって、前記アテニュエーター分子および相互に少なくとも部分的に相補的である前記アダプター分子をアニールすることであって、前記アニールが、部分的に 2 本鎖のアテニュエーター - アダプター分子をもたらすことと、

前記 DNA 基質ポリヌクレオチドを、TdT 酵素、リガーゼ酵素、前記部分的に 2 本鎖のアテニュエーター - アダプター分子、および前記アテニュエーター - アダプター分子の前記ホモポリマー部分に相補的であるヌクレオチドと混合することと、

約 30 ～ 約 37 で約 15 分～約 30 分間インキュベートすることと、

任意に、前記アテニュエーター - アダプター分子に連結された前記伸長した DNA 基質ポリヌクレオチドを単離することと、を含む、方法。

(項目 74)

DNA 基質ポリヌクレオチドを伸長する方法であって、

アテニューエーター分子とビオチン化アダプター分子の混合物を、適切な緩衝液中で約 100 に加熱し、その後約 25 に冷却することによって、相互に少なくとも部分的に相補的である前記前記ビオチン化アダプター分子にアテニューエーター分子をアニールすることであって、前記アニリングが、部分的に 2 本鎖のビオチン化アテニューエーター - アダプター分子をもたらすことと、

前記部分的に 2 本鎖のビオチン化アテニューエーター - アダプター分子を、約 25 で約 2 時間、ストレプトアビジンコーティングされた磁気ビーズを含む溶液と混合することにより、前記部分的に 2 本鎖のビオチン化アテニューエーター - アダプター分子を固定化し、前記部分的に 2 本鎖のビオチン化アテニューエーター - アダプター分子の前記ストレプトアビジンコーティングされた磁気ビーズへの固定化をもたらすことと、

前記ストレプトアビジンコーティングされた磁気ビーズに結合された前記固定化された部分的に 2 本鎖のビオチン化アテニューエーター - アダプター分子を、約 30 ~ 約 37 で約 15 分 ~ 30 分間、前記 DNA 基質ポリヌクレオチド、TdT 酵素、リガーゼ酵素、および前記部分的に 2 本鎖のアテニューエーター分子の 1 本鎖ホモポリマー部分に相補的であるヌクレオチドとインキュベートすることと、

前記溶液を NaOH で洗浄し、前記ビーズから前記非ビオチン化 1 本鎖 DNA を除去することと、

任意に、前記 2 本鎖のビオチン化アテニューエーター - アダプター分子に連結された伸長した DNA 基質ポリヌクレオチドを単離することと、を含む、方法。

(項目 75)

RNA 基質ポリヌクレオチドを伸長する方法であって、

アテニューエーター分子とアダプター分子の混合物を、適切な緩衝液中で、約 100 に加熱し、その後約 25 に冷却することによって、前記アテニューエーター分子および相互に少なくとも部分的に相補的である前記アダプター分子をアニールすることであって、前記アニリングが、部分的に 2 本鎖のアテニューエーター - アダプター分子をもたらすことと、

RNA 基質ポリヌクレオチドを、ポリ(A)またはポリ(U)酵素、リガーゼ酵素、前記部分的に 2 本鎖のアテニューエーター - アダプター分子、および前記部分的に 2 本鎖のアテニューエーター - アダプター分子の前記 1 本鎖ホモポリマー部分に相補的であるリボヌクレオチドと混合することと、

前記 RNA 基質ポリヌクレオチドを、約 30 ~ 約 37 で約 15 ~ 約 30 分間、ポリ(A)またはポリ(U)酵素、リガーゼ酵素、前記部分的に 2 本鎖のアテニューエーター - アダプター分子、および前記部分的に 2 本鎖のアテニューエーター - アダプター分子の前記 1 本鎖ホモポリマー部分に相補的であるリボヌクレオチドとインキュベートすることと、

任意に、前記アテニューエーター - アダプター分子に連結された前記伸長した RNA 基質ポリヌクレオチドを単離することと、を含む、方法。

(項目 76)

RNA 基質ポリヌクレオチドを伸長し、固定する方法であって、

2 つの分子の混合物を、適切な緩衝液中で、約 100 に加熱し、その後約 25 に冷却することによって、相互に少なくとも部分的に相補的である前記ビオチン化アダプター分子に前記アテニューエーター分子をアニールすることであって、前記アニリングが、部分的に 2 本鎖のビオチン化アテニューエーター - アダプター分子をもたらすことと、

前記部分的に 2 本鎖のビオチン化アテニューエーター - アダプター分子を、約 25 で約 2 時間、ストレプトアビジンコーティングされた磁気ビーズを含む溶液と混合することにより、前記部分的に 2 本鎖のビオチン化アテニューエーター - アダプター分子を固定化し、前記部分的に 2 本鎖のビオチン化アテニューエーター - アダプター分子の前記ストレプトアビジンコーティングされた磁気ビーズへの固定化をもたらすことと、

前記ストレプトアビジンコーティングされた磁気ビーズに結合された前記固定化された部分的に 2 本鎖のビオチン化アテニューエーター - アダプター分子を、約 30 ~ 約 37 で約 15 ~ 30 分、前記 RNA 基質ポリヌクレオチド、ポリ(A)またはポリ(U)ポリメ

ラーゼ、リガーゼ酵素、および前記部分的に 2 本鎖のアテニューエーター分子の 1 本鎖ホモポリマー部分に相補的であるリボヌクレオチドとインキュベートすることと、

前記溶液を NaOH で洗浄し、前記ビーズから前記非ビオチン化 1 本鎖ポリヌクレオチドを除去することと、

任意に、前記 2 本鎖のビオチン化アテニューエーター - アダプター分子に連結された伸長し、かつ固定化された RNA 基質ポリヌクレオチドを単離することと、を含む、方法。

(項目 7 7)

項目 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む、キット。

(項目 7 8)

基質ポリヌクレオチドを伸長する方法であって、

(1) 前記基質ポリヌクレオチドを含む混合物を、前記基質ポリヌクレオチドの伸長が前記基質に尾を付けることを可能にする条件下で、(i) ポリメラーゼ酵素、(i i) アテニューエーター配列を含み、かつ前記アテニューエーター配列に隣接して位置付けられ、別のポリヌクレオチド上のアダプター配列 X に相補的である配列 W をさらに含むアテニューエーター分子を含み、前記組成物が、配列 V に相補的である配列 Y を含むアダプター分子をさらに含み、配列 V が、Y と同じ長さであるか、または配列 Y と同じ長さ未満であり、前記アダプター分子が、前記アテニューエーター - アダプター分子とは別の分子である組成物、および (i i i) 前記アテニューエーター分子のアテニューエーター配列に相補的であるデオキシヌクレオチドとインキュベートすることと、

(2) 前記アダプター配列 X を前記基質ポリヌクレオチドに連結し、前記アテニューエーター分子を前記別のポリヌクレオチドから解離することと、

(3) 前記基質ポリヌクレオチドの配列に相補的なプライマーを、前記プライマーを前記基質ポリヌクレオチドとハイブリダイズする条件下で添加することと、

(4) 前記プライマーからポリメラーゼ伸長を実施するために、ポリメラーゼおよびデオキシヌクレオチドを添加して、前記基質ポリヌクレオチドに相補的な 2 本鎖ポリヌクレオチドを生成し、2 本鎖基質分子を作製することと、

(5) 前記アダプター分子を前記 2 本鎖基質分子に連結することと、

(6) 任意に、前記 2 本鎖ポリヌクレオチドを分解することと、を含む、方法。

(項目 7 9)

前記プライマーが、適切な条件下で配列 X とハイブリダイズするのに前記基質ポリヌクレオチドの配列に十分に相補的である、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 0)

前記プライマーが、適切な条件下で配列 X 以外の前記基質分子の配列とハイブリダイズするのに十分に相補的である標的特異的プライマーである、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 1)

前記基質ポリヌクレオチドが、1 本鎖 DNA ポリヌクレオチドである、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 2)

前記基質ポリヌクレオチドが、リボ核酸 (RNA) である、項目 7 8 に記載の方法。