

【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22年1月21日(2010.1.21)

【公表番号】特表2006-506953(P2006-506953A)

【公表日】平成18年3月2日(2006.3.2)

【年通号数】公開・登録公報2006-009

【出願番号】特願2003-587952(P2003-587952)

【国際特許分類】

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 12 N 15/00 Z N A A

C 12 Q 1/68 A

【誤訳訂正書】

【提出日】平成21年11月25日(2009.11.25)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

供給源核酸集団から同一長のシグネチャー配列のライブラリーを調製する方法であって、該方法は、以下：

(a) ポリヌクレオチドの集団の各々の末端に、第1の制限エンドヌクレアーゼ( $r^1$ )の認識部位を含む第1のアダプタを付着する工程であって、その結果、該エンドヌクレアーゼの切断部位が該ポリヌクレオチド内にあり、

ここで、該第1の制限エンドヌクレアーゼは、その認識部位から少なくとも16ヌクレオチドにおいて切断部位を有するIIS型制限エンドヌクレアーゼであり、

該アダプタが付着する末端は、該集団の各ポリヌクレオチドについて同一であり、そして、(i)全長cDNA転写物の5'末端、(ii)ポリA／ポリT領域が除去されたcDNA転写物の3'末端、(iii)cDNAを制限エンドヌクレアーゼで切断することによって生成されたcDNAフラグメントの5'末端、および(iv)cDNAを制限エンドヌクレアーゼで切断することによって生成されたcDNAフラグメントの3'末端、から選択される、工程；

(b) 該ポリヌクレオチドを該第1の制限エンドヌクレアーゼで切断して、アダプタ-シグネチャー結合体の集団を產生する工程であって、ここで該アダプタ-シグネチャー結合体の各々は、少なくとも6塩基対長であり、新規の切断末端を有する、供給源核酸の同一長のシグネチャー配列を含む、工程；ならびに

(c) 前記アダプタ-シグネチャー結合体中のシグネチャーの新規の切断末端を、第2の制限エンドヌクレアーゼの認識部位および切断部位を含む第2のアダプタと連結して、アダプタ-シグネチャー-アダプタ構築物のライブラリーを产生する工程、を包含する方法。

【請求項2】

請求項1に記載の方法であって、さらに、(d)前記構築物を前記第2の制限エンドヌクレアーゼと前記第1のアダプタを切断するのに有効な制限エンドヌクレアーゼとを用いて消化して、クローニング部位に隣接する同一長のシグネチャーフラグメントのライブラリーを产生する工程を包含する、方法。

**【請求項 3】**

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、付着工程 ( a ) が、液相中で行われる、方法。  
。

**【請求項 4】**

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、前記第 1 のアダプタが付着する末端が： ( i ) 全長 c D N A の 5' 末端、および ( i i ) ポリ A 領域が除去された全長 c D N A の 3' 末端から選択される、方法。

**【請求項 5】**

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、前記第 1 のアダプタが付着する末端が、 ( i i i ) 制限エンドヌクレアーゼを用いた c D N A の切断によって產生された c D N A フラグメントの 5' 末端、および ( i v ) 制限エンドヌクレアーゼを用いた c D N A の切断によって產生された c D N A フラグメントの 3' 末端から選択される、方法。

**【請求項 6】**

請求項 5 に記載の方法であって、ここで、前記 ( i i i ) の c D N A フラグメントの部分が、前記供給源核酸集団の 3' 領域由来であり、そして、前記 ( i v ) の c D N A フラグメントの部分が、前記供給源核酸集団の 5' 領域由来である、方法。

**【請求項 7】**

請求項 6 に記載の方法であって、ここで、前記供給源核酸集団の 3' 領域または 5' 領域を表すフラグメントが、前記付着の後に他の c D N A フラグメントから単離される、方法。

**【請求項 8】**

請求項 2 に記載の方法であって、ここで、少なくとも 1 つのアダプタが、プライマーの結合部位またはポリメラーゼの結合部位を含み、そしてさらに、工程 ( c ) の後であって、工程 ( d ) の前に：

各アダプタ - シグネチャー構築物の底部鎖を除去する工程；および  
該底部鎖を、逆転写、プライマー伸長、または P C R 増幅によって再生する工程、  
を包含する、方法。

**【請求項 9】**

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、 r<sup>1</sup> は、 B p m I 、 M m e I 、 G s u I 、 およびそれらのイソシゾマーから選択される、方法。

**【請求項 10】**

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、前記シグネチャーは、少なくとも 10 塩基対長である、方法。

**【請求項 11】**

請求項 2 に記載の方法であって、さらに、以下：

オリゴヌクレオチドタグを、各シグネチャーフラグメントに付着する工程であって、その結果、実質的に全ての異なるシグネチャーフラグメントは、付着した異なるオリゴヌクレオチドタグを有し、タグ - シグネチャー結合体を形成する、工程；

該タグ - シグネチャー結合体を、タグ相補物のライプラリーと接触させ、ここで、該タグ相補物の各々は別個の固相支持体上にあり、そして該タグをその対応する相補物とハイブリダイズし、シグネチャー配列の固相支持されたクローン性の部分集団を形成する工程、ならびに

複数の該固相支持されたシグネチャー配列を配列決定する工程、  
を包含する、方法。

**【請求項 12】**

請求項 11 に記載の方法であって、ここで、前記タグの付着工程が：

前記シグネチャーフラグメントをオリゴヌクレオチドタグ - ベクターのライプラリーに連結することであって、ここで、各タグ - ベクターは：左側制限切断部位、オリゴヌクレオチドタグ、該シグネチャーフラグメントの挿入のためのクローニング部位、および右側制限切断部位を含み、タグ - シグネチャー結合体のベクターライプラリーを形成する、工

程；ならびに

該ベクターライブラーを宿主生物中で複製する工程、  
を包含する、方法。

【請求項 1 3】

請求項1 2に記載の方法であって、ここで、前記タグ - ベクターライブラー中の異なるオリゴヌクレオチドタグの数は、異なるフラグメントの数よりも少なくとも 100 倍多く、該方法は、さらに、該ベクターライブラーからサンプルを取り、その結果、該サンプル内の実質的に全ての異なるポリヌクレオチドフラグメントが、付着した異なるタグを有する工程を包含する、方法。

【請求項 1 4】

請求項1 2に記載の方法であって、さらに、以下：

前記タグ - シグネチャー結合体を前記ベクターライブラーから切断する工程；

タグ - シグネチャー結合体のタグ成分の底部鎖を除去する工程；

該タグ - シグネチャー結合体を、タグ相補物のライブラーと接触させる工程であって、ここで、該タグ相補物の各々は別個の固相支持体上にあり、それによって、前記一本鎖タグをその対応する相補物にハイブリダイズさせる、工程；ならびに

該シグネチャーフラグメントの底部鎖を、該タグ相補物に連結する工程、を包含し、

それによって、前記供給源ポリヌクレオチド集団からの各シグネチャー配列の、固相支持されたクローン性の部分集団を含むライブラーを形成する、方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、前記第 2 のアダプタはプライマー結合部位を含む、方法。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0 0 1 9

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0 0 1 9】

増幅したタグ - シグネチャー構築物のさらなる処理を、以下のように、構築物を固相支持体上にロードすることによって行い得る：好ましくは蛍光標識したプライマーおよびビオチン化したプライマーを使用して、構築物のサンプルを PCR により増幅し、そしてストレプトアビジン捕捉により増幅物を精製する；タグ - シグネチャー結合体をベクターから切断する；タグ - シグネチャー結合体のタグ成分の底部鎖を除去する；タグ - シグネチャー結合体とタグ相補物のライブラーとを接触させ（ここで、タグ相補物の各々は別個の固相支持体上にある）、これによって、一本鎖タグをその対応する相補物にハイブリダイズする；および、シグネチャーフラグメントの底部鎖をタグ相補物に連結する；それによって、供給源ポリヌクレオチド集団からの各同一長シグネチャー配列の、固相に支持されたクローン性の部分集団を含むライブラーを形成する。