

【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31年1月31日(2019.1.31)

【公表番号】特表2018-500936(P2018-500936A)
 【公表日】平成30年1月18日(2018.1.18)
 【年通号数】公開・登録公報2018-002
 【出願番号】特願2017-551376(P2017-551376)
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 A

C 4 0 B 40/06

【手続補正書】
 【提出日】平成30年12月17日(2018.12.17)
 【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】

開始のテンプレートポリヌクレオチドからポリヌクレオチドフラグメントを生成およびシーケンスするための方法であって、

a) 第 1 のプライマー対を使用して、開始のテンプレートから関心領域を増幅して、該関心領域を取り込んだアンプリコンを形成すること、

b) 第 2 のプライマーを用いた核酸増幅反応を使用して、工程 a) で生成された第 1 のアンプリコンから該関心領域を増幅して、第 2 のプライマーを取り込んだアンプリコンを形成すること、

ここで、第 2 のプライマーは、該開始のテンプレートの第 1 の部分に相補的な第 1 の部分、該開始のテンプレートに相補的ではない第 2 の部分、および該開始のテンプレートの第 2 の部分に相補的な第 3 の部分を有する核酸配列を含み；

該開始のテンプレートの第 1 および第 2 の部分は、隣接しているかまたは互いに近接しており；

第 2 のプライマーの第 1、第 2、および第 3 の部分は、該開始のテンプレートへのハイブリダイゼーションにおいて、該プライマーの第 2 の部分がハイブリダイズしないままであり、第 1 の部分と第 3 の部分との間にループを形成するように、5' から 3' の順番で並べられ；

それによって第 2 のプライマーの配列を端部に有する関心領域を含む増幅産物が生成され、第 2 のプライマーの第 2 の部分は汎用の配列を含む、そして、

c) 該第 2 のプライマーの第 2 の部分の汎用の配列の相補物にハイブリダイズするシーケンシングプライマーを用いて、生成された増幅産物をシーケンシングすることを含む、上記方法。

【請求項 2】

第 2 のプライマーまたはその各々の第 1 の部分の少なくとも一部が、分解されやすく、該プライマーの少なくとも第 3 の部分および第 2 の部分の少なくとも一部が、分解されにくく、前記方法は、

c) 該アンプリコンからの該プライマーまたはその各々の分解されやすい部分を分解す

る工程

をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

d) 第 3 のプライマー対を用いて b) の産物および / または c) の産物を増幅する工程であって、各プライマーは、第 2 のプライマーまたはその各々の第 2 の部分の少なくとも一部に実質的に同一な核酸配列を含む、工程

をさらに含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

b) の産物および / または c) の産物が増幅され、第 3 のプライマーの核酸配列の少なくとも一部が、第 2 のプライマーまたはその各々の第 2 の部分の前記汎用の配列に実質的に同一である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記テンプレートの第 1 の部分と第 2 の部分とが、0 ~ 20 個のヌクレオチド、好ましくは 1 ~ 10、より好ましくは 1 ~ 6、最も好ましくは 1、2、3、4、5、または 6 個のヌクレオチドによって隔てられている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

第 2 のプライマーの第 1 の部分が、最大 15、20、25、30、35、50 個のヌクレオチドの長さであり、好ましくは 20 ~ 35 個のヌクレオチド、より好ましくは 25 個のヌクレオチドの長さである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

第 2 のプライマーの第 2 の部分が、自己相補的な領域を含み、それによりハイブリダイゼーションで形成されたループは、該自己相補的な領域がステムを形成するステム - ループ構造をとる、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

第 2 のプライマーの第 3 の部分が、2、4、5、6、7、8、9、または 10 個以下のヌクレオチドの長さであり、好ましくは 4 ~ 6 個、最も好ましくは 6 個のヌクレオチドの長さである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

工程 d) における第 3 のプライマー対が、5' 末端に追加の非テンプレート配列をさらに含む、請求項 3 に記載の方法。