

【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 12 Q 1/68 (2018.01)

C 40 B 40/06 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/68 A

C 40 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システムを形成するシステム・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。