

【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 3 部門第 2 区分
【発行日】 令和 4 年 9 月 9 日(2022.9.9)

【公開番号】 特開 2022-25140(P2022-25140A)
【公開日】 令和 4 年 2 月 9 日(2022.2.9)
【年通号数】 公開公報(特許)2022-024
【出願番号】 特願 2021-183083(P2021-183083)
【国際特許分類】

C 4 0 B 4 0 / 0 6 (2 0 0 6 . 0 1)

10

C 1 2 N 1 5 / 1 1 (2 0 0 6 . 0 1)

C 1 2 N 1 5 / 1 0 (2 0 0 6 . 0 1)

C 1 2 Q 1 / 6 8 5 1 (2 0 1 8 . 0 1)

C 1 2 Q 1 / 6 8 6 9 (2 0 1 8 . 0 1)

C 1 2 Q 1 / 6 8 1 3 (2 0 1 8 . 0 1)

C 1 2 Q 1 / 6 8 6 (2 0 1 8 . 0 1)

【 F I 】

C 4 0 B 4 0 / 0 6

C 1 2 N 1 5 / 1 1 Z

C 1 2 N 1 5 / 1 0 Z

20

C 1 2 Q 1 / 6 8 5 1 Z

C 1 2 Q 1 / 6 8 6 9 Z

C 1 2 Q 1 / 6 8 1 3 Z

C 1 2 Q 1 / 6 8 6 Z

【手続補正書】

【提出日】 令和 4 年 9 月 1 日(2022.9.1)

【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

30

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タグ付けされた DNA 断片を作製する方法であって、

(a) 断片化されたゲノム DNA を末端修復酵素で処理して、末端修復されたゲノム DNA 断片を作製するステップと；

(b) 末端修復されたゲノム DNA 断片の各末端に多機能性アダプターモジュールをライゲーションして、タグ付けされた DNA 断片を作製するステップであって、前記多機能性アダプターモジュールがランダム核酸タグ配列とユニバーサル増幅配列とを含み、前記ユニバーサル増幅配列が、前記末端修復されたゲノム DNA 断片の両方の末端と同一である、ステップと

40

を含む、方法。

【請求項 2】

タグ付けされたゲノムライブラリーを作製する方法であって、

(a) 断片化されたゲノム DNA を末端修復酵素で処理して、末端修復されたゲノム DNA 断片を作製するステップと；

(b) 末端修復されたゲノム DNA 断片の各末端に多機能性アダプターモジュールをライゲーションするステップであって、前記多機能性アダプターモジュールがランダム核酸タグ配列とユニバーサル増幅配列とを含み、前記ユニバーサル増幅配列が、前記末端修復され

50

たゲノムDNA断片の両方の末端と同一である、ステップと；

（c）前記アダプターがライゲーションされたDNA断片に対してPCR増幅を実行して、前記タグ付けされたゲノムライブラリーを作製するステップとを含む、方法。

【請求項3】

前記末端修復されたゲノムDNA断片が平滑末端を含有する、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記平滑末端が、単一塩基対オーバーハングを含有するようさらに修飾される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記単一塩基対オーバーハングがアデニン（A）またはチミン（T）を含有する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記末端修復されたゲノムDNA断片が5'－オーバーハングまたは3'－オーバーハングを含有する、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記末端修復されたゲノムDNA断片が、鑄型によらない3'－オーバーハングを含有する、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記末端修復されたゲノムDNA断片が、平滑末端またはオーバーハングを含有するようにプロセッシングされる、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記末端修復されたゲノムDNA断片が、3'－オーバーハングを含有するようにターミナルトランスフェラーゼ（TdT）によりプロセッシングされる、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記末端修復されたゲノムDNA断片が、制限酵素によりプロセッシングされる、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

前記ゲノムDNAが、血液、皮膚、毛、毛包、唾液、口腔粘膜、膣粘膜、汗、涙、上皮組織、尿、精液、精子液、精漿、前立腺液、尿道球腺液（カウパー氏腺液）、排泄物、生検、腹水、脳脊髄液、リンパ液および組織抽出物試料または生検試料からなる群から選択される生体試料に由来する、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記断片化されたゲノムDNAが、機械的手段、酵素的手段、または化学的手段により作製される、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記多機能性アダプターモジュールが試料コード配列を含み、前記試料コード配列は、前記タグ付けされたDNAライブラリーの作製の由来となったDNA試料を同定することができる、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記試料コード配列が2～6ヌクレオチドである、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記ランダム核酸タグ配列が2～6ヌクレオチドである、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

ランダムヌクレオチド配列の数が、これと結合した核酸配列のコピー数を示す、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記ランダム核酸タグ配列が、既知の核酸タグ配列のプールから選択される、請求項1～

10

20

30

40

50

16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

ユニバーサル増幅配列が20～30ヌクレオチドである、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記多機能性アダプターモジュールが、ライゲーション鎖と相補鎖を含み、前記相補鎖が、前記ライゲーション鎖の3'末端にハイブリダイズされ、これと部分的な二重鎖を形成する、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記多機能性アダプターモジュールの前記二重鎖領域が、平滑末端化される、請求項19に記載の方法。

10

【請求項21】

前記多機能性アダプターモジュールの前記二重鎖領域が、前記ライゲーション鎖の3'末端にオーバーハングを含み、前記オーバーハングが、これにライゲーションされるDNA断片の3'-オーバーハングと相補的である、請求項19に記載の方法。

【請求項22】

ステップ(b)が、末端修復されたゲノムDNA断片に前記ライゲーション鎖をライゲーションすることを含む、請求項19～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

前記相補鎖が、前記末端修復されたゲノムDNA断片にライゲーションされず、前記部分的な二重鎖から分離する、請求項22に記載の方法。

20

【請求項24】

前記タグ付けされたゲノムライブラリーのタグ付けされたDNA断片を多機能性捕捉プローブモジュールとハイブリダイズさせて、タグ付けされたDNA断片-多機能性捕捉プローブモジュール複合体を形成することを含む、請求項2～23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

前記多機能性捕捉プローブモジュールが、パートナーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることができる領域、ゲノム標的領域とハイブリダイズすることができる領域、および、テイル配列を含む、請求項24に記載の方法。

30

【請求項26】

前記パートナーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることができる領域が、前記テイル配列を含む、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記多機能性捕捉プローブモジュールが、パートナーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることができる第1の領域、ゲノム標的領域とハイブリダイズすることができる第2の領域、および、テイル配列を含む第3の領域を含む、請求項25に記載の方法。

【請求項28】

前記テイル配列が10～50ヌクレオチドの長さである、請求項25～27のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項29】

前記テイル配列が、PCRプライマー結合性部位を含む、請求項25～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

前記テイル配列が、シーケンシングプライマー結合性部位を含む、請求項25～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

前記多機能性捕捉プローブモジュールが、前記タグ付けされたDNA断片-多機能性捕捉プローブモジュール複合体の単離および／または精製を容易にするように構成された結合対の特異的メンバーを含み、結合対の前記特異的メンバーは、ビオチンまたはハプテンで

50

ある、請求項 24～30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記パートナーオリゴヌクレオチドが、前記タグ付けされた DNA 断片－多機能性捕捉プローブモジュール複合体の単離および／または精製を容易にするように構成された結合対の特異的メンバーを含み、結合対の前記特異的メンバーは、ビオチンまたはハプテンである、請求項 25～31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

結合対の前記特異的メンバーがハプテンである、請求項 31～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記ハプテンは、ジニトロフェノール分子またはジゴキシゲニン分子である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記多機能性捕捉プローブモジュールが、前記タグ付けされた DNA 断片－多機能性捕捉プローブモジュール複合体の形成前に、前記パートナーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズされる、請求項 25～34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記タグ付けされた DNA 断片－多機能性捕捉プローブモジュール複合体を単離して、単離された複合体を形成することを含む、請求項 24～35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

3'－5' エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を使用して、前記単離された複合体に対して 3'－5' エキソヌクレアーゼ酵素プロセッシングを実行し、一本鎖の 3' 末端を除去して、酵素によりプロセッシングされた複合体を作製することを含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記単離された複合体の協奏的酵素プロセッシングを実行して、酵素プロセッシングされた複合体を作製することを含み、前記協奏的酵素プロセッシングが、5' FLAP エンドヌクレアーゼ活性、5' から 3' への DNA ポリメラーゼ伸長および DNA リガーゼによるニック閉鎖を含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

前記酵素プロセッシングされた複合体に対して PCR を実行することを含み、前記テイル配列が、ハイブリッド核酸分子を作製するためにコピーされ、前記ハイブリッド核酸分子が、前記多機能性捕捉プローブモジュールとハイブリダイズすることができる前記ゲノム標的領域と、前記テイル配列の相補体とを含む、請求項 37～38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記単離された複合体に対して、前記多機能性捕捉プローブの 5' から 3' への DNA ポリメラーゼ伸長を実行し、ハイブリッド核酸分子を作製するために前記多機能性捕捉プローブの 3' である前記ゲノム標的領域の領域を複製することを含み、前記ハイブリッド核酸分子が、前記多機能性捕捉プローブモジュールと、前記多機能性捕捉プローブモジュールが前記ゲノム標的領域とハイブリダイズする位置から 3' 方向に位置する前記ゲノム標的領域の領域の相補体とを含む、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 41】

前記ハイブリッド核酸分子の PCR 増幅を実行して、増幅されたハイブリッド核酸分子を作製することを含む、請求項 39～40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記増幅されたハイブリッド核酸分子に対して次世代配列解析を実行することを含む、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記ハイブリッド核酸分子に対して標的化遺伝学的解析を実行することを含む、請求項 3

10

20

30

40

50

9 ～ 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記ハイブリッド核酸分子または増幅されたハイブリッド核酸分子に対して配列アラインメントを実行することを含む、請求項 4 2 ～ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

少なくとも 2 種の異なる多機能性捕捉プローブモジュールが前記タグ付けされたゲノムライブラリーにハイブリダイズされる、請求項 2 5 ～ 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

少なくとも 1 種の多機能性捕捉プローブモジュールが前記ゲノム標的領域の下流にハイブリダイズし、少なくとも 1 種の多機能性捕捉プローブモジュールが前記ゲノム標的領域の上流にハイブリダイズする、請求項 4 5 に記載の方法。

10

20

30

40

50