

【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】令和 4 年 3 月 16 日(2022.3.16)

【公開番号】特開 2021-94038(P2021-94038A)

【公開日】令和 3 年 6 月 24 日(2021.6.24)

【年通号数】公開・登録公報 2021-028

【出願番号】特願 2021-53293(P2021-53293)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6806(2018.01)

10

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

C 1 2 Q 1/6844(2018.01)

C 1 2 Q 1/34(2006.01)

C 1 2 N 15/09(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6806 Z Z N A

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 Q 1/6844 Z

C 1 2 Q 1/34

C 1 2 N 15/09 Z

20

【手続補正書】

【提出日】令和 4 年 3 月 7 日(2022.3.7)

【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】

30

分析のための核酸を調製する方法であって、

a) 核酸を破壊して DNA 鋳型配列を含む核酸断片を生成する工程であって、前記 DNA 鋳型配列は標的領域および隣接領域を含み、前記標的領域は前記隣接領域に対して 5' にあるか、または前記標的領域は前記隣接領域に対して 3' にある、工程と、

b) オリゴヌクレオチドアダプターを前記核酸断片にライゲーションして、前記 DNA 鋳型配列を含む核酸鋳型を生成する工程であって、前記オリゴヌクレオチドアダプターは RNA ポリメラーゼプロモーター配列および共通配列を含む、工程と、

c) RNA ポリメラーゼ、逆転写酵素、DNA ポリメラーゼ、および RNase H 活性を有する酵素の存在下で、前記核酸鋳型を等温増幅反応に付す工程であって、前記等温増幅反応は、(i) RNA ポリメラーゼ転写、(ii) cDNA 合成、および(iii) DNA ポリメラーゼ伸長の 2 またはそれ以上のサイクルを含み、それにより、前記 DNA 鋳型配列を指数関数的に増幅する、工程と

40

を含み、各サイクルは、

標的的特異的ハイブリダイゼーション配列を含む第 1 のオリゴヌクレオチドの伸長；および前記共通配列に相補的な配列を含む第 2 のオリゴヌクレオチドの伸長

を含む、方法。

【請求項 2】

(c) の前記指数関数的に増幅された産物から核酸分子またはその一部を配列決定する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

50

前記核酸分子が、前記配列決定反応をプライミングする配列決定プライマーのハイブリダイゼーション部位として働く非鋳型配列を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記核酸分子が、異なる供給源を起源とする異なる核酸分子を含む多重反応において配列決定される、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記異なる供給源が、前記核酸分子が得られたものとは異なる被験体である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記異なる供給源が、前記核酸分子が得られたものとは異なる組織である、請求項 4 に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記異なる核酸分子が、供給源を特定するバーコード配列を含む、請求項 4 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記核酸断片が、遺伝子再構成の一部を含む染色体セグメントである、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記遺伝子再構成が、逆位、欠失、または転座である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記標的領域が前記隣接領域に対して 5' にある、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 11】

前記標的領域が前記隣接領域に対して 3' にある、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記標的的特異的ハイブリダイゼーション配列が、前記標的領域またはその一部と相補的である、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記標的領域が第 1 の遺伝子の配列を含み、前記隣接領域が第 2 の遺伝子の配列を含む、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記第 1 の遺伝子が RET、ROS1、または ALK である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記核酸鋳型が二本鎖 DNA 鋳型である、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 RNA ポリメラーゼプロモーター配列の下流の DNA を転写する RNA ポリメラーゼを介して、合成 RNA が酵素的に生産される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記第 1 または前記第 2 のオリゴヌクレオチドが、追加の非相補的配列を含む、請求項 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 18】

前記追加の非相補的配列が、バーコード配列、インデックス配列、アダプター配列、または配列決定プライマーハイブリダイゼーション配列のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記第 1 または前記第 2 のオリゴヌクレオチドが、前記 RNA ポリメラーゼプロモーター配列を含む、請求項 1 ～ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記第 1 または前記第 2 のオリゴヌクレオチドの伸長が逆転写である、請求項 1 ～ 19

50

のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記逆転写が、合成 RNA に相補的な第 1 の DNA 鎖を合成し、その結果、前記第 1 の DNA 鎖と前記合成 RNA との間に RNA - DNA ハイブリッドが形成される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記等温増幅反応が、RNA - DNA ハイブリッドの RNA 部分の分解を含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記第 1 または前記第 2 のオリゴヌクレオチドの伸長が、前記第 1 の DNA 鎖に相補的な第 2 の DNA 鎖を合成し、その結果、前記第 1 および第 2 の DNA 鎖を含む二本鎖 DNA が形成される、請求項 2 1 または 2 2 に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

前記 RNA ポリメラーゼの転写が、前記第 1 および第 2 の DNA 鎖を含む二本鎖 DNA から合成 RNA を転写する、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

転写された合成 RNA が各サイクル後に精製され、前記精製された合成 RNA が次のサイクルの出発材料として使用される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記等温増幅反応が 3 5 ~ 4 5 の範囲の温度で行われる、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 2 7】

前記隣接領域が未知の DNA 配列を含む、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

40

50