

【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 12 Q 1/6806(2018.01)
 C 12 Q 1/6869(2018.01)
 C 12 Q 1/6844(2018.01)
 C 12 Q 1/34(2006.01)
 C 12 N 15/09(2006.01)

10

【F I】

C 12 Q 1/6806 Z Z N A
 C 12 Q 1/6869 Z
 C 12 Q 1/6844 Z
 C 12 Q 1/34
 C 12 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鑄型配列を含む核酸断片を生成する工程であって、前記DNA鑄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鑄型配列を含む核酸鑄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、前記核酸鑄型を等温增幅反応に付す工程であって、前記等温增幅反応は、(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鑄型配列を指数関数的に増幅する、工程と

を含み、各サイクルは、

標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】

40

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鑄型配列を含む、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 R E T 、 R O S 1 、または A L K である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記核酸鑄型が二本鎖 D N A 鑄型である、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 R N A ポリメラーゼプロモーター配列の下流の D N A を転写する R N A ポリメラーゼを介して、合成 R N A 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 R N A 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】

前記等温增幅反応が、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】

前記等温增幅反応が 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。