【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3年7月26日(2021.7.26)

【公表番号】特表2020-523011(P2020-523011A)
【公表日】令和2年8月6日(2020.8.6)
【年通号数】公開・登録公報2020-031
【出願番号】特願2019-567559(P2019-567559)
【国際特許分類】
Ｃ１２Ｑ　1/6806　(2018.01)
Ｃ１２Ｑ　1/686　(2018.01)
Ｃ４０Ｂ　40/06　(2006.01)
Ｃ１２Ｎ　15/11　(2006.01)
【ＦＩ】
Ｃ１２Ｑ　1/6806　ＺＮＡＺ
Ｃ１２Ｑ　1/686　Ｚ
Ｃ４０Ｂ　40/06
Ｃ１２Ｎ　15/11　Ｚ

【手続補正書】
【提出日】令和3年6月2日(2021.6.2)
【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】
複数の単一細胞由来の核酸のメチル化状態を決定するための配列決定ライブラリーの調製方法であって、前記方法は：
（ａ）複数の細胞由来の単離された核を提供することと；
（ｂ）前記単離された核を化学処理に供して、前記単離された核の完全性を維持しながら、ヌクレオソーム枯渇核を生成することと；
（ｃ）前記ヌクレオソーム枯渇核のサブセットを、トランスポソーム複合体を含む第１の複数の区画内に分配することであって、各区画内の前記トランスポソーム複合体は、他の区画内の第１のインデックス配列とは異なる第１のインデックス配列を含む、分配することと；
（ｄ）ヌクレオソーム枯渇核の前記サブセットにおける核酸を複数の核酸断片に断片化し、前記第１のインデックス配列を前記核酸断片の少なくとも１つの鎖に組み込んでインデックス付加された核を生成することと；
（ｅ）前記インデックス付加核を組み合わせて、プールされたインデックス付加核を生成することと；
（ｆ）前記プールされたインデックス付加核のサブセットを第２の複数の区画内に分配し、前記インデックス付加核を亜硫酸水素処理に供して亜硫酸水素処理された核酸断片を生成することと；
（ｇ）各区画内の前記亜硫酸水素処理された核酸断片を、５’末端に汎用ヌクレオチド配列及び３’末端に無作為ヌクレオチド配列を含む複数のプライマーを用いた線形増幅により増幅して、増幅された断片－アダプター分子を生成することと；
（ｈ）第２のインデックス配列を前記増幅された断片－アダプター分子に組み込んで、デュアル－インデックス断片－アダプター分子を生成することであって、各区画内の前記

第２のインデックス配列は、他の区画内の第２のインデックス配列とは異なる、生成することと；
（ｉ）前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子を組み合わせることにより、前記複数の単一細胞由来の核酸の前記メチル化状態を決定するための配列決定ライブラリーを生成することと、
を含む、方法。
【請求項２】
複数の単一細胞由来の核酸のメチル化状態を決定するための配列決定ライブラリーの調製方法であって、前記方法は：
（ａ）複数の細胞由来の単離された核を提供することと；
（ｂ）前記単離された核を化学処理に供して、前記単離された核の完全性を維持しながら、ヌクレオソーム枯渇核を生成することと；
（ｃ）前記ヌクレオソーム枯渇核のサブセットを、トランスポソーム複合体を含む第１の複数の区画内に分配することであって、各区画内の前記トランスポソーム複合体は、他の区画内の第１のインデックス配列とは異なる第１のインデックス配列を含む、分配することと；
（ｄ）ヌクレオソーム枯渇核の前記サブセットにおける核酸を複数の核酸断片に断片化し、前記第１のインデックス配列を前記核酸断片の少なくとも１つの鎖に組み込んでインデックス付加された核を生成することと；
（ｅ）前記インデックス付加核を組み合わせて、プールされたインデックス付加核を生成することと；
（ｆ）前記プールされたインデックス付加核のサブセットを第２の複数の区画内に分配し、前記インデックス付加核を亜硫酸水素処理に供して亜硫酸水素処理された核酸断片を生成することと；
（ｇ）各区画内の前記亜硫酸水素処理された核酸断片を汎用アダプターに連結して、連結された断片－アダプター分子を生成することと；
（ｈ）第２のインデックス配列を前記連結された断片－アダプター分子に組み込んで、デュアル－インデックス断片－アダプター分子を生成することであって、各区画内の前記第２のインデックス配列は、他の区画内の第２のインデックス配列とは異なる、生成することと；
（ｉ）前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子を組み合わせることにより、前記複数の単一細胞由来の核酸の前記メチル化状態を決定するための配列決定ライブラリーを生成することと、
を含む、方法。
【請求項３】
前記化学処理が、核酸－タンパク質相互作用を破壊することができるカオトロピック剤による処理を含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記カオトロピック剤がジヨードサリチル酸リチウムを含む、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記化学処理が、核酸－タンパク質相互作用を破壊することができる洗剤による処理を含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項６】
前記洗剤がドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）を含む、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記細胞が、工程（ａ）の前に架橋剤で処理される、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記架橋剤がホルムアルデヒドである、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
工程（ｃ）及び（ｆ）における前記分配が、蛍光活性化核選別により行われる、請求項

１又は２に記載の方法。
【請求項１０】
前記ヌクレオソーム枯渇核の前記サブセットが、ほぼ等しい数の核を含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項１１】
前記ヌクレオソーム枯渇核の前記サブセットが、１～約２０００個の核を含む、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記第１の複数の区画がマルチウェルプレートである、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項１３】
前記マルチウェルプレートが９６ウェルプレート又は３８４ウェルプレートである、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記プールされたインデックス付加核の前記サブセットが、ほぼ等しい数の核を含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項１５】
前記プールされたインデックス付加核の前記サブセットが、１～約２５個の核を含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記プールされたインデックス付加核の前記サブセットが、前記ヌクレオソーム枯渇核の前記サブセットよりも少なくとも１０倍少ない核を含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項１７】
前記プールされたインデックス付加核の前記サブセットが、前記ヌクレオソーム枯渇核の前記サブセットよりも少なくとも１００倍少ない核を含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項１８】
前記第２の複数の区画がマルチウェルプレートである、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項１９】
前記マルチウェルプレートが９６ウェルプレート又は３８４ウェルプレートである、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記トランスポソーム複合体の各々が、トランスポザーゼ及びトランスポゾンを含み、前記トランスポゾンの各々が移送鎖を含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項２１】
前記移送鎖が、シトシン残基を含まない、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
前記移送鎖が、前記第１のインデックス配列を含む、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記移送鎖が、第１の汎用配列及び第１の配列決定プライマー配列をさらに含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記亜硫酸水素処理が、ＣｐＧジヌクレオチドの非メチル化シトシン残基をウラシル残基に変換し、５－メチルシトシン残基を変化させずに残す、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項２５】
前記亜硫酸水素処理された核酸断片の前記線形増幅が、１～１０サイクルを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２６】
工程（ｇ）における前記プライマーの前記５’末端における前記汎用ヌクレオチド配列

が、第２の配列決定プライマー配列を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２７】
工程（ｇ）における前記プライマーの前記３’末端における前記無作為ヌクレオチド配列が、９個の無作為ヌクレオチドからなる、請求項１に記載の方法。
【請求項２８】
工程（ｈ）における前記第２のインデックス配列の組み込みが、各区画内の前記増幅された断片－アダプター分子を、各々がインデックス配列を含む第１の汎用プライマー及び第２の汎用プライマーと接触させることと、指数増幅反応を実施することとを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２９】
前記第１の汎用プライマーの前記インデックス配列が、前記第２の汎用プライマーの前記インデックス配列の逆相補体である、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記第１の汎用プライマーの前記インデックス配列が、前記第２の汎用プライマーの前記インデックス配列の逆相補体とは異なる、請求項２８に記載の方法。
【請求項３１】
前記第１の汎用プライマーが、第１の捕捉配列及び前記増幅された断片－アダプター分子の前記３’末端における汎用配列に相補的な第１のアンカー配列をさらに含む、請求項２８に記載の方法。
【請求項３２】
前記第１の捕捉配列が前記Ｐ５プライマー配列を含む、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記第２の汎用プライマーが、第２の捕捉配列及び前記増幅された断片－アダプター分子の前記５’末端における汎用配列に相補的な第２のアンカー配列をさらに含む、請求項２８に記載の方法。
【請求項３４】
前記第２の捕捉配列が、前記Ｐ７プライマー配列の前記逆相補体を含む、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
前記指数増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を含む、請求項２８に記載の方法。
【請求項３６】
前記ＰＣＲが１５～３０サイクルを含む、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
前記標的核酸に対して特異性を有する複数の捕捉オリゴヌクレオチドを使用した標的核酸の濃縮をさらに含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項３８】
前記捕捉オリゴヌクレオチドが、固体基質の表面上に固定化されている、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記捕捉オリゴヌクレオチドが汎用結合対の第１のメンバーを含み、前記結合対の第２のメンバーは、固体基質の表面上に固定化されている、請求項３７に記載の方法。
【請求項４０】
所定のサイズ範囲内に含まれる前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子の選択をさらに含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４１】
前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子を配列決定して、前記複数の単一細胞由来の核酸の前記メチル化状態を決定することをさらに含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４２】

前記汎用アダプターの前記連結の前に、前記亜硫酸水素処理された核酸断片の前記３’末端に１つ以上のヌクレオチドを付加して、３’突出を作製することをさらに含む、請求項２に記載の方法。
【請求項４３】
１つ以上のヌクレオチドの前記付加が、ターミナルトランスフェラーゼを使用して行われる、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記汎用アダプターが、前記亜硫酸水素処理された核酸断片における前記３’突出に逆相補的な突出を含む、請求項４２に記載の方法。
【請求項４５】
工程（ｈ）における前記第２のインデックス配列の組み込みが、各区画内の前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子を、各々がインデックス配列を含む第１の汎用プライマー及び第２の汎用プライマーと接触させることと、指数増幅反応を実施することとを含む、請求項２に記載の方法。
【請求項４６】
前記第１の汎用プライマーの前記インデックス配列が、前記第２の汎用プライマーの前記インデックス配列の前記逆相補体である、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記第１の汎用プライマーの前記インデックス配列が、前記第２の汎用プライマーの前記インデックス配列の前記逆相補体とは異なる、請求項４５に記載の方法。
【請求項４８】
前記第１の汎用プライマーが、第１の捕捉配列及び前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子の前記３’末端における汎用配列に相補的な第１のアンカー配列をさらに含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項４９】
前記第１の捕捉配列が、前記Ｐ５プライマー配列を含む、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記第２の汎用プライマーが、第２の捕捉配列及び前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子の前記５’末端における汎用配列に相補的な第２のアンカー配列をさらに含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項５１】
前記第２の捕捉配列が、前記Ｐ７プライマー配列の前記逆相補体を含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記指数増幅反応が、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項５３】
前記ＰＣＲが１５～３０サイクルを含む、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
複数の増幅部位を含む表面を提供することであって、
前記増幅部位は、遊離３’末端を有する付着した一本鎖核酸の少なくとも２つの集団を含む、提供することと、
増幅部位を含む前記表面を、個々のデュアル－インデックス断片－アダプター分子からのアンプリコンのクローン集団を各々含む複数の増幅部位を産生するのに適した条件下で、前記配列決定ライブラリーと接触させることと、
をさらに含む、請求項４１に記載の方法。
【請求項５５】
前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子の数が増幅部位の数を超え、前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子が前記増幅部位への流体アクセスを有し、前記増幅部位の各々が、前記配列決定ライブラリーにおけるいくつかのデュアル－インデッ

クス断片－アダプター分子のための容量を含む、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記接触させることが、（ｉ）前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子を平均輸送速度で前記増幅部位に輸送すること、及び（ｉｉ）前記増幅部位にある前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子を平均増幅速度で増幅することを同時に含み、前記平均増幅速度が前記平均輸送速度を超える、請求項５４に記載の方法。
【請求項５７】
複数の増幅部位を含む表面を提供することであって、
前記増幅部位は、遊離３’末端を有する付着した一本鎖核酸の少なくとも２つの集団を含む、提供することと、
増幅部位を含む前記表面を、個々のデュアル－インデックス断片－アダプター分子からのアンプリコンのクローン集団を各々含む複数の増幅部位を産生するのに適した条件下で、前記配列決定ライブラリーと接触させることと、
をさらに含む、請求項４１に記載の方法。
【請求項５８】
前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子の数が増幅部位の数を超え、前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子が前記増幅部位への流体アクセスを有し、前記増幅部位の各々が、前記配列決定ライブラリーにおけるいくつかのデュアル－インデックス断片－アダプター分子のための容量を含む、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記接触させることが、（ｉ）前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子を平均輸送速度で前記増幅部位に輸送すること、及び（ｉｉ）前記増幅部位にある前記デュアル－インデックス断片－アダプター分子を平均増幅速度で増幅することを同時に含み、前記平均増幅速度が前記平均輸送速度を超える、請求項５７に記載の方法。