

【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2年11月12日(2020.11.12)

【公開番号】特開2019-103415(P2019-103415A)
 【公開日】令和1年6月27日(2019.6.27)
 【年通号数】公開・登録公報2019-025
 【出願番号】特願2017-236839(P2017-236839)
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 C 1 2 M 1/00 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A A
 C 1 2 N 15/00 A
 C 1 2 N 15/00 F
 C 1 2 M 1/00 A

【手続補正書】

【提出日】令和2年9月23日(2020.9.23)

【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】

複数の微小反応槽を有するデバイスを用いて細胞の遺伝子発現を解析する方法であって

、
 該微小反応槽の中には、増幅用プライマー配列、細胞識別配列、分子識別配列、およびオリゴ(dT)配列を含むプローブが固定された固相担体が1個以上充填されており、

前記方法が、

前記微小反応槽1つ当たり単一の細胞が対応するように、複数の細胞を前記微小反応槽へ導入する工程と、

前記単一細胞由来のmRNAを前記プローブに捕捉する工程と、

前記捕捉されたmRNAの逆転写反応により1st cDNAを合成し、単一細胞由来の1st cDNAライブラリを前記固相担体上で作製する工程と、

前記固相担体を洗浄する工程と、

前記1st cDNAライブラリから2nd cDNAを合成する工程と、

前記1st cDNAと前記2nd cDNAとからなる2本鎖DNAの断片化およびタグ配列の付加を行う工程と、

前記固相担体を洗浄液で洗浄して、固定化された2本鎖DNA断片以外の成分を除去する工程と、

前記2本鎖DNA断片について、前記増幅用プライマー配列および前記タグ配列の少なくとも一部の配列または少なくとも一部に相補的な配列を有するプライマーを用いて増幅を行い、前記mRNAの3'末端配列に由来する配列のみを増幅する工程と、

増幅された配列について、前記細胞識別配列および前記分子識別配列を用いて前記単一細胞毎に遺伝子発現解析を行う工程と

を含む方法。

【請求項2】

前記タグ配列が特異的配列部分および共通配列部分を含み、前記増幅工程において、前記タグ配列のうち該共通配列または該共通配列に相補的な配列を増幅することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記固相担体を洗浄する工程の前または後に、前記単一細胞由来1st cDNAライブラリが固定化された固相担体を、複数の細胞分プールする工程をさらに含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記単一細胞由来1st cDNAライブラリが固定化された固相担体を、10～100000個の細胞分をプールすることを特徴とする、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記固相担体が径10nm～100 μmのサイズであることを特徴とする、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 6】

前記固相担体が磁性ビーズであることを特徴とする、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 7】

前記逆転写反応をテンプレートスイッチ (Template switch) 機能を有する逆転写酵素を用いて行うことを特徴とする、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 8】

前記2nd cDNA合成工程において、ランダムプライマーおよび鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼを用いた相補鎖伸長反応により2nd cDNAを合成することを特徴とする、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 9】

前記2nd cDNA合成工程において、テンプレートスイッチ機能を有する逆転写酵素により付加された特異的配列に相補的な配列を含むプライマーを用いた相補鎖伸長反応により2nd cDNAを合成することを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記2nd cDNA合成工程において、1本鎖DNAリガーゼを用いて既知配列を前記1st cDNAの3'末端へ付加し、該既知配列に相補的な配列を含むプライマーを用いた相補鎖伸長反応により2nd cDNAを合成することを特徴とする、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 11】

前記2nd cDNA合成工程において、ターミナルトランスフェラーゼ (TdT) により1st cDNAの3'末端へポリT、A、GまたはCのポリ塩基配列を付加し、該ポリ塩基配列に相補的な配列を含むプライマーを用いた相補鎖伸長反応により2nd cDNAを合成することを特徴とする、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 12】

前記固相担体に、増幅用プライマー配列、細胞識別配列、分子識別配列、およびオリゴ (dT) 配列を含むプローブと、ランダム配列を含むプライマーとが固定されており、前記2nd cDNA合成工程において、前記固相担体に固定されたランダムプライマーおよび鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼを用いた相補鎖伸長反応により2nd cDNAを合成し、cDNA増幅することを特徴とする、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 13】

前記微小反応槽の各々に直径10 μm以下の貫通孔が形成されており、前記細胞導入工程において、該貫通孔に単一細胞が捕捉されることを特徴とする、請求項 1 ～ 12 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 14】

2本鎖DNAの断片化およびタグ配列の付加を行う工程を、2本鎖DNAに対するタグメンテーション反応により行うことを特徴とする、請求項 1 ～ 13 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 15】

前記洗浄液が、前記タグメンテーション反応に使用する酵素に対する阻害作用を有するものである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記洗浄液が高濃度塩を含有する、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。