

【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】平成29年9月28日(2017.9.28)

【公表番号】特表2016-533187(P2016-533187A)

【公表日】平成28年10月27日(2016.10.27)

【年通号数】公開・登録公報2016-061

【出願番号】特願2016-537867(P2016-537867)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/68 (2006.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 M 1/00 (2006.01)

C 12 M 1/34 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/68 Z N A A

C 12 N 15/00 A

C 12 M 1/00 A

C 12 M 1/34 Z

【手続補正書】

【提出日】平成29年8月16日(2017.8.16)

【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】

单一のビーズと、単一の細胞とを会合させるステップを含む方法であって、

前記単一のビーズは、複数のオリゴヌクレオチドを含み、

前記複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれは、同一の細胞性標識配列と、分子標識配列と、標的結合領域とを含み、そして、

前記複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも100個が、異なる分子標識配列を含む、方法。

【請求項2】

前記単一の細胞が、稀な細胞、腫瘍細胞、ヒト由来の細胞、組織由来の細胞、腫瘍由来の細胞およびウイルスポリヌクレオチドに感染した細胞ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記単一のビーズと前記単一の細胞との会合の後または前に、前記単一の細胞を溶解させるステップをさらに含む、請求項1～2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項4】

前記単一のビーズが磁性である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記複数のオリゴヌクレオチドが、少なくとも100,000個のオリゴヌクレオチドを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれが、ユニバーサル標識配列を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記標的結合領域が、オリゴdT配列、遺伝子特異的配列およびランダムマルチマー配列からなる群より選択される配列を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記単一の細胞由来の標的核酸分子を確率論的に標識するステップをさらに含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記標識するステップが、前記標的核酸分子を、前記単一のビーズ上の前記複数のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせることを含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記標的核酸分子が、mRNA分子を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記標的核酸分子を逆転写し、それにより、標識された標的cDNAを生成するステップをさらに含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記逆転写が、前記複数のオリゴヌクレオチドが前記単一のビーズ上にある間になされる、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記標識された標的cDNA上で第2鎖の合成を行い、それにより、二本鎖の標識された標的ポリヌクレオチドを生成するステップをさらに含む、請求項11～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記二本鎖の標識された標的ポリヌクレオチドを増幅し、それにより、標識された標的アンプリコンを生成するステップをさらに含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記増幅が、ユニバーサルプライマーおよびランダムマルチマープライマーによって行われる、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記増幅が、ユニバーサルプライマーまたは遺伝子特異的プライマーによって行われる、請求項14～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記増幅が、ネステッドPCR反応を実行することを含む、請求項14～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

前記増幅が、前記単一の細胞の全トランスクリプトームを増幅することを含む、請求項14～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記標的核酸分子の数を推定するステップをさらに含む、請求項14～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記推定が、二本鎖の前記標識された標的アンプリコンの少なくとも一部の配列を決定することを含む、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記推定が、二本鎖の前記標識された標的アンプリコンの少なくとも一部および前記オリゴヌクレオチドの少なくとも一部の配列を決定することを含む、請求項19～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記推定が、前記単一の細胞の明確に異なる標的ポリヌクレオチドと会合した特有のオリゴヌクレオチドの数を計数することを含む、請求項19～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

前記複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも1,000個が、異なる分子標識配列を含む、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

前記複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも10,000個が、異なる分子標識配列を含む、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

前記単一のビーズおよび前記単一の細胞が、同一のウェルまたは同一の液滴中にある、請求項1～24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

前記単一のビーズが、シリカゲル、制御されたポアガラス、Dynabead、Wang樹脂、Merrifield樹脂、セファデックス／セファロースビーズ、セルロースビーズ、ポリスチレンビーズ、またはこれらの任意の組み合わせを含む、請求項1～25のいずれか一項に記載の方法。