

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年11月1日(01.11.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/198598 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/10 (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/010970
- (22) 国際出願日: 2018年3月20日(20.03.2018)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2017-087235 2017年4月26日(26.04.2017) JP
- (71) 出願人: 株式会社エンプラス (ENPLAS CORPORATION) [JP/JP]; 〒3320034 埼玉県川口市並木2丁目30番1号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 砂 永 伸 也 (SUNAGA Nobuya); 〒3320034 埼玉県川口市並木2丁目30番1号 株式会社エンプラス内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 辻丸 光一郎, 外(TSUJIMARU Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町134 京都リサーチパーク1号館301号室 Kyoto (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: ISOLATION METHOD OF DROPLETS FOR GENOME ANALYSIS, AND GENOME ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: ゲノム解析用液滴の単離方法、およびゲノム解析方法

(57) Abstract: A method of isolating droplets to be provided for genome analysis without affecting the subsequent genome analysis, and a genome analysis method are provided. This isolation method of droplets for genome analysis is characterized by involving an emulsion forming step, a nucleic acid amplification step, a detection step, and a sorting step. In the emulsion forming step, a sample that contains cells and an emulsion forming solvent are brought into contact to form multiple droplets that contain the cells in the sample in the emulsion forming solvent. In the nucleic acid amplification step, the target genome contained in the target cells is amplified in the droplets. In the detection step, it is detected whether or not the target genome in the droplets has been amplified. In the sorting step, the droplets in which amplification of the target genome has been detected are sorted as droplets for genome analysis containing an amplification product derived from the target genome in the target cells.

(57) 要約: 後のゲノム解析に影響を与えることなく、ゲノム解析に供する液滴を単離する方法、およびゲノム解析方法を提供する。本発明は、ゲノム解析用液滴の単離方法であり、エマルション形成工程と、核酸増幅工程と、検出工程と、分取工程とを含み、前記エマルション形成工程は、細胞を含む試料と、エマルション形成溶媒とを接触させて、前記エマルション形成溶媒中に、前記試料中の細胞を含む複数の液滴を形成する工程であり、前記核酸増幅工程は、前記液滴について、ターゲット細胞に含まれるターゲットゲノムの増幅を行う工程であり、前記検出工程は、前記液滴における前記ターゲットゲノムの増幅の有無を検出する工程であり、前記分取工程は、前記ターゲットゲノムの増幅が検出された液滴を、前記ターゲット細胞のターゲットゲノム由来の増幅産物を含むゲノム解析用液滴として分取する工程であることを特徴とする。

添付公開書類：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称：

ゲノム解析用液滴の単離方法、およびゲノム解析方法

技術分野

[0001] 本発明は、ゲノム解析用液滴の単離方法、およびゲノム解析方法に関する。

背景技術

[0002] 様々な細胞を含む試料から、ターゲット細胞を単離して、ターゲットゲノムについての解析を行う場合、ターゲット細胞の単離方法として、近年、セルソーティングが一般的になっている。中でも、エマルション化により細胞を含む液滴（ドロップレット）を形成する方法では、核酸増幅を利用して、ターゲット細胞を含む液滴の分取（ソーティング）が行われている。

[0003] セルソーティングの具体的な方法としては、例えば、まず、細胞を含む試料についてエマルション化を行い、前記エマルション中に液滴を形成する。そして、前記エマルション中の液滴について、PCR等の核酸増幅法により、ターゲット細胞に由来する短鎖の配列を増幅させ、プローブ等を用いて、前記増幅の有無を検出する。そして、増幅が確認された液滴を、ターゲット細胞を含む液滴として分取し、これを、ゲノム解析等の試料とする（非特許文献1）。ゲノム解析においては、例えば、前記液滴について、さらに、前記ターゲット細胞のターゲットゲノムの核酸増幅を行い、得られたターゲットゲノムの増幅産物を次世代シーケンシング（NGS）に供し、アセンブリングすることで、前記ターゲット細胞のターゲットゲノムを解析できる（非特許文献2）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Dennis J. Eastburn, et al., 「Identification and genetic analysis of cancer cells with PCR-activated cell sorting」 Nucleic A

cids Research, 2014, Vol. 42, No. 16 e128

非特許文献2: Yong Hou, et al., 「Comparison of variations detection between whole-genome amplification methods used in single-cell resequencing」 GIGA Science, 2015, 4:37

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 前記セルソーティングにおける核酸増幅は、前記液滴中の細胞の有無の確認を目的とするため、前述のように、例えば、ゲノムにおける短い領域（例えば、80～300bp程度）を設定して、増幅が行われる。しかしながら、増幅の検出により分取された液滴には、セルソーティングでの短鎖の増幅産物が大量に混入されており、その量は、液滴中に含まれる細胞由来のゲノムと比較して非常に多い。このため、ゲノム解析のために、前記分取した液滴について、さらに、ターゲットゲノムの核酸増幅を行っても、ゲノム解析に供する試料には、ターゲットゲノム由来の増幅産物の他に、解析対象ではない大量の短鎖の増幅産物が混入されたままで、これらの短鎖の増幅産物がシーケンシングされ、ターゲット細胞のターゲットゲノムの解析結果に影響を与えるという問題がある。

[0006] そこで、本発明は、後のゲノム解析に影響を与えることなく、ゲノム解析に供することができる液滴を単離する方法、およびゲノム解析方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 前記目的を達成するために、本発明は、ゲノム解析用液滴の単離方法であり、

エマルション形成工程と、核酸増幅工程と、検出工程と、分取工程とを含み、

前記エマルション形成工程は、

細胞を含む試料と、エマルション形成溶媒とを接触させて、前記エマルション形成溶媒中に、前記試料中の細胞を含む複数の液滴を形成する工程であ

り、

前記核酸増幅工程は、

前記液滴について、ターゲット細胞に含まれるターゲットゲノムの増幅を行う工程であり、

前記検出工程は、

前記液滴における前記ターゲットゲノムの増幅の有無を検出する工程であり、

前記分取工程は、

前記ターゲットゲノムの増幅が検出された液滴を、前記ターゲットゲノム由来の増幅産物を含むゲノム解析用液滴として分取する工程であることを特徴とする。

[0008] 本発明は、ターゲット細胞由来のゲノム解析方法であり、

ターゲットゲノム由来の増幅産物を含むゲノム解析用液滴の単離工程と、解析工程とを含み、

前記単離工程は、

細胞を含む試料から、前記本発明の単離方法により、ターゲット細胞のターゲットゲノム由来の増幅産物を含むゲノム解析用液滴を単離する工程であり、

前記解析工程は、

前記単離されたゲノム解析用液滴に含まれる前記増幅産物について、ゲノム解析を行う工程であることを特徴とする。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、ゲノム解析用液滴の単離において、液滴中の細胞の有無を確認するにあたって、後の解析対象となるターゲットゲノムを増幅するため、例えば、前述のように、ターゲットゲノムの解析対象ではない短鎖の増幅産物は含まれない。このため、本発明の単離方法により得られたゲノム解析用液滴を用いれば、例えば、前記短鎖の増幅産物の影響を回避して、そのまま、シーケンシングとアッセムブリングとにより、ゲノム解析を行うこと

ができる。

発明を実施するための形態

- [0010] 本発明のゲノム解析用液滴の単離方法は、例えば、前記エマルション形成工程において、前記ターゲットゲノムの増幅用試薬の存在下、液滴を形成し、前記核酸増幅工程において、前記液滴に含まれる前記増幅用試薬を用いて、前記ターゲットゲノムの増幅を行う。
- [0011] 本発明のゲノム解析用液滴の単離方法は、例えば、前記エマルション形成工程において、前記ターゲットゲノムの増幅用試薬の非存在下、液滴を形成し、前記核酸増幅工程において、前記増幅用試薬を添加し、前記ターゲットゲノムの増幅を行う。
- [0012] 本発明のゲノム解析用液滴の単離方法は、例えば、前記増幅用試薬に、前記増幅の検出のための検出試薬を共存させ、前記増幅用試薬が、前記ターゲットゲノムを増幅するためのプライマーを含み、前記検出試薬が、インターカレータまたはプローブを含む。
- [0013] 本発明のゲノム解析用液滴の単離方法は、例えば、さらに、解析工程を含み、前記解析工程は、前記解析用液滴に含まれるターゲットゲノム由来の増幅産物について、解析を行う。
- [0014] 本発明のゲノム解析用液滴の単離方法は、例えば、前記エマルション形成工程において、前記エマルション形成溶媒は、非水溶性溶媒を含み、前記非水溶性溶媒中に、前記複数の液滴が形成され、前記複数の液滴は、前記試料を含む水溶性の液滴である。
- [0015] 本発明のゲノム解析用液滴の単離方法は、例えば、流路を有するデバイスを使用し、前記流路内で、前記エマルション形成工程、前記増幅工程および前記検出工程を行う。
- [0016] 本発明のゲノム解析用液滴の単離方法は、例えば、前記流路内で、さらに、前記分取工程を行う。
- [0017] 本発明の単離方法および解析方法は、ゲノム解析用液滴の分取のための核酸増幅として、ゲノム解析の対象となるターゲットゲノムの増幅を行うこと

がポイントであり、その他の工程や条件は、特に制限されない。

[0018] 以下、本発明の単離方法および解析方法の実施形態について、例をあげて説明する。本発明の単離方法および解析方法は、下記の実施形態によって何ら限定および制限されない。また、各実施形態の記載は、それぞれ互いに援用できる。

[0019] (ゲノム解析用液滴の単離方法)

本発明の単離方法は、前述のように、ゲノム解析用液滴の単離方法であり、

エマルション形成工程と、核酸増幅工程と、検出工程と、分取工程とを含み、

前記エマルション形成工程は、

細胞を含む試料と、エマルション形成溶媒とを接触させて、前記エマルション形成溶媒中に、前記試料中の細胞を含む複数の液滴を形成する工程であり、

前記核酸増幅工程は、

前記液滴について、ターゲット細胞に含まれるターゲットゲノムの増幅を行う工程であり、

前記検出工程は、

前記液滴における前記ターゲットゲノムの増幅の有無を検出する工程であり、

前記分取工程は、

前記ターゲットゲノムの増幅が検出された液滴を、前記ターゲットゲノム由来の増幅産物を含むゲノム解析用液滴として分取する工程であることを特徴とする。

[0020] 前記エマルション形成工程は、前述のように、細胞を含む試料と、エマルション形成溶媒とを接触させて、前記エマルション形成溶媒中に、前記試料中の細胞を含む複数の液滴を形成する工程である。前記エマルション形成溶媒中における前記液滴の形成によって、前記試料を、複数の液滴に分割して

区画することができる。そして、前記液滴のそれぞれに、前記試料中の様々な細胞が、分配されることになる。

[0021] 前記試料の種類は、何ら制限されず、細胞が存在すると考えられる試料があげられる。前記試料は、例えば、生体試料があげられ、具体例としては、血液、リンパ液、脳脊髄液、精液、尿、鼻水、鼻腔ぬぐい液（スワブ）等である。前記生体の種は、特に制限されず、例えば、ヒト；ウシ、ブタ、ヒツジ、マウス、ラット、ウサギおよびウマ等の非ヒト哺乳類；鳥類；魚類等の動物があげられる。

[0022] 前記エマルション形成溶媒は、特に制限されず、その中に、前記試料を含む液滴を形成できるものであればよい。前記エマルション形成溶媒は、例えば、非水溶性溶媒であり、前記非水溶性溶媒中に、前記試料を含む水溶性の液滴が形成できる。

[0023] 前記非水溶性溶媒は、例えば、油、ミネラルオイル、クロロホルム、芳香族化合物等があげられる。前記非水溶性溶媒は、例えば、一種類を単独で使用してもよいし、二種類以上を併用してもよい。

[0024] 前記液滴の形成においては、例えば、さらに、水溶性溶媒を共存させてもよい。前記水溶性溶媒は、例えば、水、緩衝液、水溶性高分子溶液等があげられる。前記水溶性溶媒は、例えば、一種類を単独で使用してもよいし、二種類以上を併用してもよい。

[0025] 前記液滴の形成においては、例えば、後述する増幅工程において使用する試薬を共存させてもよい。これにより、前記試薬を含有する液滴が形成されるため、例えば、後述する増幅工程において、新たに試薬を添加することなく、増幅工程における増幅反応を行うことができる。前記試薬に関しては、後述する。

[0026] 前記形成する液滴の大きさは、特に制限されず、その平均体積は、下限が、例えば、4 pL 以上であり、上限が、例えば、10 nL 以下である。

[0027] 前記液滴に含まれる細胞の個数は、特に制限されない。前記液滴1個に含まれる細胞数は、例えば、5個以下、2個以下、好ましくは1個である。

[0028] 前記エマルション形成溶媒中における液滴の形成方法は、特に制限されず、前記エマルション形成溶媒と、前記試料とを接触させることで、前記エマルション形成溶媒中に、複数の液滴を形成できる。前記接触は、例えば、前記エマルション形成溶媒に、前記試料を接触させてもよいし、前記試料に、前記エマルション形成溶媒を接触させてもよい。前記液滴の形成方法は、例えば、公知のドロップレット作製方法が適用できる。

[0029] 前記液滴の形成には、例えば、マイクロ流路を有するエマルション化デバイスを使用できる。前記デバイスは、前記マイクロ流路として、例えば、サンプル用流路と、エマルション形成溶媒用流路と、これらの連結部と、前記連結部から導出される導出流路とを含む。このデバイスを用いた場合、例えば、以下のように液滴が形成される。まず、前記連結部には、前記エマルション形成溶媒用流路から、前記エマルション形成溶媒が導入され、つぎに、前記エマルション形成溶媒が導入された前記連結部に向かって、前記サンプル用流路から、前記試料（例えば、任意で前記水溶性溶媒を含む）が導入される。そして、前記連結部において、前記エマルション形成溶媒と前記試料とが接触し、エマルション化され、前記連結部から前記導出流路に、エマルション（前記エマルション形成溶媒中に液滴が分散された状態）として導出される。なお、前記試料と前記水溶性溶媒とは、例えば、前述のように、予め混合した混合液として、前記デバイスの流路に導入してもよいし、別々に流路に導入してもよい。後者の場合、前記連結部の上流において、前記サンプル用流路と試薬用流路とを有し、前記連結部に向かって、前記サンプル用流路から前記試料が導入され、前記試薬用流路から前記水溶性溶媒や任意で前記試薬等が導入されてもよい。

[0030] 前記増幅工程は、前述のように、前記エマルション形成工程で形成された液滴について、ターゲット細胞に含まれるターゲットゲノムの増幅を行う工程である。

[0031] 前記増幅工程において、増幅する対象のターゲットゲノムは、特に制限されず、ゲノム解析の目的に応じて適宜決定できる。本発明は、従来のように

、ゲノム解析の目的とは別に、前記液滴中の細胞の有無を検出することのみを目的として、短鎖の配列を増幅するのではなく、後にゲノム解析する対象のゲノムを増幅することがポイントである。このため、前記増幅工程において、増幅させるゲノムは、後の解析対象のターゲットゲノムであり、また、前記ターゲットゲノムにおける増幅させる領域は、いわゆるゲノム解析に必要な領域である。ゲノム解析は、一般的に、ターゲットゲノムの一部が重複する複数の領域を増幅させ、配列を解読し、解読した配列結果をアセンブリして、ターゲットゲノム全体を解析する。したがって、本発明の単離方法も、前記増幅工程におけるターゲットゲノムの増幅は、ゲノム解析に必要な複数の領域の増幅であることが好ましい。この場合、ターゲットゲノムにおいて、増幅させる各領域の長さは、例えば、400bp～60kbpであり、解析する全体の長さは、例えば、246bp～1.5×107bpである。本発明におけるゲノム解析は、例えば、ホールゲノム解析があげられる。この場合、例えば、複数の遺伝子座を含む複数の領域を増幅させてもよいし、全遺伝子について、各遺伝子の全長または部分領域を増幅させてもよい。

[0032] 前記増幅工程において、前記核酸増幅の方法は、特に制限されず、PCR法等の公知の手法が採用できる。前記増幅用試薬は、特に制限されず、例えば、ポリメラーゼ、プライマー、dNTP等があげられる。

[0033] 前記増幅工程で使用する前記増幅用試薬は、例えば、予め前記液滴に含有させてもよいし、前記増幅工程時に前記液滴に添加してもよく、操作が容易であることから、前者が好ましい。前者の場合、例えば、前記エマルション形成工程において、前記増幅用試薬の存在下、液滴を形成し、前記核酸増幅工程において、前記液滴に含まれる前記増幅用試薬を用いて、前記ターゲットゲノムの増幅を行えばよい。また、後者の場合、例えば、前記エマルション形成工程において、前記増幅用試薬の非存在下、液滴を形成し、前記核酸増幅工程において、前記増幅用試薬を添加し、前記ターゲットゲノムの増幅を行えばよい。

- [0034] 前述のように、前記エマルション形成工程は、マイクロ流路を有するデバイスを用いて行えることから、前記増幅工程も、同様に、前記デバイスのマイクロ流路内で行うことが好ましい。この場合、前記デバイスは、例えば、前記導出流路の下流に連結された増幅流路を有し、前記増幅流路内で前記増幅を行うことができる。
- [0035] 前記検出工程は、前述のように、前記液滴における前記ターゲットゲノムの増幅の有無を検出する工程である。前記増幅の有無を検出する方法は、特に制限されず、例えば、前記増幅方法、使用した前記増幅用試薬の種類等に応じて、適宜設定できる。前記検出工程において、前記増幅の有無の検出は、例えば、前記液滴ごとに行う。
- [0036] 前記増幅の有無を検出する方法は、特に制限されず、例えば、一般的な、インターカレータ法、プローブ法等があげられる。前記検出には、例えば、前記検出方法に応じて、インターカレータ、プローブ等の検出用試薬が使用できる。前記プローブの種類は、特に制限されず、例えば、TaqMan（登録商標）プローブ等が使用できる。前記検出用試薬は、例えば、前記増幅用試薬と共存させてもよい。
- [0037] 前記検出工程で使用する前記検出用試薬は、例えば、予め前記液滴に含有させてもよいし、前記検出工程時に前記液滴に添加してもよく、操作が容易であることから、前者が好ましい。前者の場合、例えば、前記エマルション形成工程において、前記増幅用試薬および前記検出用試薬の存在下、液滴を形成し、前記核酸増幅工程において、前記液滴に含まれる前記増幅用試薬を用いて、前記ターゲットゲノムの増幅を行い、前記検出工程において、前記液滴に含まれる前記検出用試薬を用いて、前記増幅の有無を検出すればよい。また、後者の場合、例えば、前記エマルション形成工程において、前記増幅用試薬および前記検出用試薬の非存在下、液滴を形成し、前記核酸増幅工程において、前記増幅用試薬を添加し、前記ターゲットゲノムの増幅を行い、前記検出工程において、前記検出用試薬を滴下し、前記増幅の有無を検出すればよい。

- [0038] 前述のように、前記エマルション形成工程および前記増幅工程は、マイクロ流路を有するデバイスを用いて行えることから、前記検出工程も、同様に、前記デバイスのマイクロ流路内で行うことが好ましい。この場合、前記デバイスは、例えば、前記増幅流路の下流に検出流路を有し、前記検出流路内で前記増幅を行うことができる。
- [0039] 本発明において、前記増幅工程と前記検出工程は、例えば、順番に行ってもよいが、同時に行うこともできる。後者の場合、例えば、前記増幅用試薬と前記検出用試薬の共存下で、前記増幅工程と前記検出工程とを行えばよい。また、前記マイクロ流路を有するデバイスを用いる場合、前記デバイスは、例えば、前記導出流路の下流に連結された増幅流路を有し、前記増幅流路内で前記増幅と前記検出とを行うことができる。
- [0040] 前記分取工程は、前述のように、前記ターゲットゲノムの増幅が検出された液滴を、前記ターゲット細胞のターゲットゲノム由来の増幅産物を含むゲノム解析用液滴として分取する工程である。前記核酸増幅後の液滴から、増幅が検出された液滴を選択して分取することにより、例えば、後述するように、これを用いて、ゲノム解析を行うことができる。
- [0041] 前述のように、前記デバイスを用いて前記検出工程までを行った場合には、例えば、前記デバイスから、前記液滴を導出させ、別の容器（マイクロチューブ等）に回収することで単離できる。
- [0042] 本発明は、例えば、前記エマルション形成工程の後、前記核酸増幅工程の前、または前記核酸増幅工程と同時に、前記エマルション内の前記液滴に含まれる細胞について、核酸等の細胞内成分を放出する処理を行う。前記細胞内成分の放出は、特に制限されず、例えば、一般的な細胞溶解試薬を用いることができる。前記細胞溶解試薬は、例えば、前記エマルション形成工程の後、前記エマルション内の前記液滴に添加してもよいし、前記エマルション形成工程において、前記試料と前記エマルション形成溶媒とに接触させることで、前記エマルション形成溶媒中の液滴に含有させてもよい。前記試薬としては、例えば、界面活性剤と、塩と、溶媒とを含む溶液があげられる。前

記界面活性剤としては、例えば、デオキシコール酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム等の陰イオン界面活性剤等があげられ、前記塩としては、例えば、塩化ナトリウム等があげられ、前記溶媒としては、各種緩衝液があげられる。前記試薬の組成の具体例としては、例えば、50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、0.5 w/v %デオキシコール酸ナトリウム、0.1 w/v %ラウリル硫酸ナトリウム、および1.0 w/v % NIP-40等が例示できる。前記細胞溶解試薬を前記液滴に含有させることによって、例えば、前記液滴中で、前記細胞から、核酸等の細胞内成分を放出させることができる。前記液滴中で前記細胞から前記細胞内成分を放出させる際、その処理条件は、特に制限されない。

[0043] 本発明は、さらに、解析工程を含んでもよい。前記解析工程は、例えば、前記解析用液滴に含まれるターゲットゲノム由来の増幅産物について、解析を行う工程である。前記解析については、後述する。

[0044] (ターゲット細胞由来のゲノム解析方法)

本発明の解析方法は、前述のように、ターゲット細胞由来のゲノム解析方法であり、

ターゲットゲノム由来の増幅産物を含むゲノム解析用液滴の単離工程と、解析工程とを含み、

前記単離工程は、

細胞を含む試料から、前記本発明の単離方法により、ターゲット細胞のターゲットゲノム由来の増幅産物を含むゲノム解析用液滴を単離する工程であり、

前記解析工程は、

前記単離されたゲノム解析用液滴に含まれる前記増幅産物について、ゲノム解析を行う工程であることを特徴とする。

[0045] 本発明の解析方法は、本発明の単離方法によってゲノム解析用液滴を単離することがポイントであり、その他の工程や条件は、特に制限されない。本発明の解析方法において、前記単離工程の単離方法は、前記本発明のゲノム

解析用液滴の単離方法の記載を援用できる。

[0046] 本発明の解析方法は、前記単離工程において、解析目的のターゲットゲノムの増幅を行っており、単離した前記ゲノム解析用液滴については、さらに増幅処理を行うことなく、例えば、シーケンシング等の解析を行うことができる。そして、前記単離工程において、解析の対象ではない配列の増幅を行っていないことから、従来のように、短鎖の増幅産物の影響を回避して、目的のゲノム解析を行うことができる。

[0047] 前記解析工程は、前述のように、前記単離されたゲノム解析用液滴に含まれる前記増幅産物について、ゲノム解析を行う工程である。前記ゲノム解析は、例えば、公知の方法があげられ、具体例としては、*F l u o r e s c e n c e I n S i t u H y b r i d i z a t i o n (F I S H)*、*G - B a n d*、*N e x t - G e n e r a t i o n S e q u e n c i n g (N G S)* 等である。

[0048] 以上、実施形態および実施例を参照して、本発明を説明したが、本発明は、上記発明の範囲内で当業者が理解し得る様々な変更をすることができる。また、本明細書で引用する特許文献および学術文献等の文献に記載の内容は、全て引用により本明細書に取り込むものとする。

[0049] この出願は、2017年4月26日に提出された日本出願特願2017-087235を基礎とする優先権を主張し、その開示のすべてをここに取り込む。

産業上の利用可能性

[0050] 本発明によれば、ゲノム解析用液滴の単離において、液滴中の細胞の有無を確認するにあたって、後の解析対象となるターゲットゲノムの増幅を行うため、例えば、前述のように、ターゲットゲノムの解析対象ではない短鎖の増幅産物が含まれない。このため、本発明の単離方法により得られたゲノム解析用液滴を用いれば、例えば、前記短鎖の増幅産物の影響を回避して、そのまま、シーケンシングとアセンブリングとにより、ゲノム解析を行うことができる。

請求の範囲

- [請求項1] エマルション形成工程と、核酸増幅工程と、検出工程と、分取工程とを含み、
前記エマルション形成工程は、
細胞を含む試料と、エマルション形成溶媒とを接触させて、前記エマルション形成溶媒中に、前記試料中の細胞を含む複数の液滴を形成する工程であり、
前記核酸増幅工程は、
前記液滴について、ターゲット細胞に含まれるターゲットゲノムの増幅を行う工程であり、
前記検出工程は、
前記液滴における前記ターゲットゲノムの増幅の有無を検出する工程であり、
前記分取工程は、
前記ターゲットゲノムの増幅が検出された液滴を、前記ターゲットゲノム由来の増幅産物を含むゲノム解析用液滴として分取する工程であることを特徴とするゲノム解析用液滴の単離方法。
- [請求項2] 前記エマルション形成工程において、前記ターゲットゲノムの増幅用試薬の存在下、液滴を形成し、
前記核酸増幅工程において、前記液滴に含まれる前記増幅用試薬を用いて、前記ターゲットゲノムの増幅を行う、請求項1記載のゲノム解析用液滴の単離方法。
- [請求項3] 前記エマルション形成工程において、前記ターゲットゲノムの増幅用試薬の非存在下、液滴を形成し、
前記核酸増幅工程において、前記増幅用試薬を添加し、前記ターゲットゲノムの増幅を行う、請求項1記載のゲノム解析用液滴の単離方法。
- [請求項4] 前記増幅用試薬に、前記増幅の検出のための検出試薬を共存させ、

前記増幅用試薬が、前記ターゲットゲノムを増幅するためのプライマーを含み、

前記検出試薬が、インターカレータまたはプローブを含む、請求項2または3記載のゲノム解析用液滴の単離方法。

[請求項5]

さらに、解析工程を含み、

前記解析工程は、前記解析用液滴に含まれるターゲットゲノム由来の増幅産物について、解析を行う、請求項1から4のいずれか一項に記載のゲノム解析用液滴の単離方法。

[請求項6]

前記エマルション形成工程において、

前記エマルション形成溶媒は、非水溶性溶媒を含み、

前記非水溶性溶媒中に、前記複数の液滴が形成され、

前記複数の液滴は、前記試料を含む水溶性の液滴である、請求項1から5のいずれか一項に記載のゲノム解析用液滴の単離方法。

[請求項7]

流路を有するデバイスを使用し、

前記流路内で、前記エマルション形成工程、前記増幅工程および前記検出工程を行う、請求項1から6のいずれか一項に記載のゲノム解析用液滴の単離方法。

[請求項8]

前記流路内で、さらに、前記分取工程を行う、請求項7記載のゲノム解析用液滴の単離方法。

[請求項9]

ターゲットゲノム由来の増幅産物を含むゲノム解析用液滴の単離工程と、解析工程とを含み、

前記単離工程は、

細胞を含む試料から、請求項1から8のいずれか一項に記載の単離方法により、ターゲット細胞のターゲットゲノム由来の増幅産物を含むゲノム解析用液滴を単離する工程であり、

前記解析工程は、

前記単離されたゲノム解析用液滴に含まれる前記増幅産物について、ゲノム解析を行う工程であることを特徴とするターゲット細胞由来

のゲノム解析方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/010970

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N15/10 (2006.01) i, C12Q1/6806 (2018.01) i, C12M1/00 (2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12N15/10, C12Q1/6806, C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), DWPI (Derwent Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2016/182034 A1 (ON-CHIP BIOTECHNOLOGIES CO., LTD.) 17 November 2016, claims 22-26, paragraphs [0038]-[0042] & CN 107532990 A	1-2, 4-9 3-9
Y	EASTBURN, D. J. et al., Identification and genetic analysis of cancer cells with PCR-activated cell sorting, Nucleic Acids Research, 2014, vol. 42, no. 16, e128 (pp. 1-10), ISSN 0305-1048, entire text	3-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.	☐ See patent family annex.
---	---

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 08.06.2018	Date of mailing of the international search report 19.06.2018
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/10(2006.01)i, C12Q1/6806(2018.01)i, C12M1/00(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/10, C12Q1/6806, C12M1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), DWPI (Derwent Innovation)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WO 2016/182034 A1 (株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ) 2016.11.17, 請求項 22-26、段落[0038]-[0042] & CN 107532990 A	1-2, 4-9 3-9
Y	EASTBURN D.J. et al., Identification and genetic analysis of cancer cells with PCR-activated cell sorting, Nucleic Acids Research, 2014, Vol. 42, No. 16, e128 (page 1-10), ISSN 0305-1048, 全文参照	3-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.06.2018

国際調査報告の発送日

19.06.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小林 薫

4 N

6 1 1 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3488