

【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12月17日(2020.12.17)

【公表番号】特表2019-537439(P2019-537439A)

【公表日】令和1年12月26日(2019.12.26)

【年通号数】公開・登録公報2019-052

【出願番号】特願2019-522907(P2019-522907)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/13	(2006.01)
C 1 2 P	19/34	(2006.01)
C 1 2 N	15/10	(2006.01)
C 1 2 N	15/12	(2006.01)
C 1 2 Q	1/6869	(2018.01)

【F I】

C 1 2 N	15/13	Z N A
C 1 2 P	19/34	A
C 1 2 N	15/10	1 1 0 Z
C 1 2 N	15/12	
C 1 2 Q	1/6869	Z

【手続補正書】

【提出日】令和2年10月30日(2020.10.30)

【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】

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

(a) 標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする捕捉部分改変プライマーとを、ハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；

(b) ハイブリダイズした捕捉部分改変プライマーによってプライムされかつ該核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応を行う工程；

(c) 該第1鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第2鎖合成反応を行って、捕捉部分を含む2本鎖核酸を生成する工程；

(d) アダプター核酸を該2本鎖核酸にライゲーションして、該捕捉部分を含むライゲーション生成物を生成する工程；

(e) 該ライゲーション生成物と該捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによって、該ライゲーション生成物を捕捉する工程；および

(f) 該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする3'部分を含む標的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該捕捉したライゲーション生成物を增幅する工程であって、ここで該標的特異的プライマーは、該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない5'テール部分を含む工程、

を包含する方法。

【請求項2】

(g) 前記標的特異的プライマーの5'テール部分の相補的配列に特異的にアニールす

る 3' 部分を含むテールプライマーおよび前記アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 2 のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程 (f) の増幅生成物を増幅する工程であって、ここで該テールプライマーは、該標的特異的プライマーの相補的配列に特異的にアニールしない 5' 部分を含む工程、をさらに包含する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 (d) は、前記アダプター核酸、前記 2 本鎖核酸、およびリガーゼを、該リガーゼが該アダプター核酸を該 2 本鎖核酸にライゲーションする条件下で合わせる工程を包含し、ここで該 2 本鎖核酸と合わされた該アダプター核酸は、二重鎖部分およびオーバーハング配列を含み、ここで該オーバーハング配列は、該 2 本鎖核酸の 3' 末端におけるオーバーハング配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む；または

工程 (d) は、前記アダプター核酸、前記 2 本鎖核酸、およびリガーゼを、該リガーゼが該アダプター核酸を該 2 本鎖核酸にライゲーションする条件下で合わせる工程を包含し、ここで該 2 本鎖核酸と合わされた該アダプター核酸は、1 本鎖である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記捕捉部分改変プライマーは、少なくとも 1 つの捕捉部分改変ヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記捕捉部分はビオチン部分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記結合パートナーは、ストレプトアビジンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

工程 (d) において、前記 2 本鎖核酸は、クラウディング剤の存在下で前記アダプター核酸にライゲーションされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 2 鎖合成反応は、前記第 1 鎖合成反応の生成物にハイブリダイズした前記核酸分子のフラグメントによってプライムされる；または

前記第 2 鎖合成は、複数のランダムプライマーを使用してランダムにプライムされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記核酸分子は mRNA を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記核酸分子は、T 細胞、B 細胞、白血球またはこれらの混合物を含むサンプルから得られるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記サンプルは、T 細胞悪性腫瘍または B 細胞悪性腫瘍を有するかまたは有すると疑われる被験体から得られるものである；あるいは

前記サンプルは、移植を受けた被験体または移植を受ける予定の被験体から得られるものである；あるいは

前記サンプルは、処置に対する免疫応答が評価されている最中である被験体から得られるものである；あるいは

前記サンプルは、白血球悪性腫瘍を有するか、または有すると疑われる被験体から得られるものである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記被験体はヒトまたは脊索動物である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記標的ヌクレオチド配列は、T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子または B 細胞レセプター (BCR) 遺伝子の一部に相当するヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記捕捉部分改変プライマーは、免疫レセプター遺伝子または免疫グロブリン遺伝子に相補的であるヌクレオチド配列を含む、請求項 1に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記標的特異的プライマーは、CDR3の下流にある定常領域またはJセグメントに特異的にアニールする；あるいは

前記標的特異的プライマーは、定常領域とJセグメントとの間に形成されるエキソン-エキソン接合部に特異的にアニールし、ここで該エキソン-エキソン接合部は、CDR3の下流にある、請求項 1 4に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記第1のアダプタープライマーおよび前記第2のアダプタープライマーは同じである；または

前記第1のアダプタープライマーおよび前記第2のアダプタープライマーは異なる；または

前記第2のアダプタープライマーは、前記第1のアダプタープライマーに対してネスト化される、請求項 2に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記テールプライマーの5'部分は、サンプルインデックス領域、分子バーコード領域、およびシーケンシングプライマー部位領域のうちの少なくとも1つを含む、請求項 2に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記ビオチン部分は、ビオチン-トリエチレングリコール、ビス-ビオチン、光切断性ビオチン、デスチオビオチン、デスチオビオチン-トリエチレングリコール、またはアジ化ビオチンを含む、請求項 5に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記ストレプトアビシンは、基材に付着している、請求項 6に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記基材は固体表面を含む、請求項 1 9に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記固体表面は、常磁性ビーズを含む、請求項 2 0に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記複数のランダムプライマーは、6塩基長～15塩基長の間である、請求項 8に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記T細胞悪性腫瘍または前記B細胞悪性腫瘍は、リンパ腫、多発性骨髄腫、急性リンパ芽球性白血病、および慢性リンパ性白血病からなる群より選択される、請求項 1 1に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記捕捉部分改変プライマーは、相補性決定領域3(CDR3)の下流にある定常領域に特異的にアニールする、請求項 1 4に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

本開示の他の利点および新規な特徴は、添付の図面とともに考慮される場合に、本発明の種々の非限定的実施形態の以下の詳細な説明から明らかになる。本明細書および参考として援用される文献が矛盾するおよび／または一致しない開示を含む場合には、本明細書が優先するものとする。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目1)

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

(a) 標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする捕捉部分改変プライマーとを、ハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；

(b) ハイブリダイズした捕捉部分改変プライマーによってプライムされかつ該核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応を行う工程；

(c) 該第1鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第2鎖合成反応を行って、捕捉部分を含む2本鎖核酸を生成する工程；

(d) アダプター核酸を該2本鎖核酸にライゲーションして、該捕捉部分を含むライゲーション生成物を生成する工程；

(e) 該ライゲーション生成物と該捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによって、該ライゲーション生成物を捕捉する工程；および

(f) 該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする3'部分を含む標的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該捕捉したライゲーション生成物を増幅する工程であって、ここで該標的特異的プライマーは、該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない5'テール部分を含む工程、

を包含する方法。

(項目2)

(g) 前記標的特異的プライマーの5'テール部分の相補的配列に特異的にアニールする3'部分を含むテールプライマーおよび前記アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第2のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程

(f) の増幅生成物を増幅する工程であって、ここで該テールプライマーは、該標的特異的プライマーの相補的配列に特異的にアニールしない5'部分を含む工程、
をさらに包含する項目1に記載の方法。

(項目3)

前記テールプライマーの5'部分は、サンプルインデックス領域、分子バーコード領域、およびシーケンシングプライマー部位領域のうちの少なくとも1つを含む、項目2に記載の方法。

(項目4)

工程(d)は、前記アダプター核酸、前記2本鎖核酸、およびリガーゼを、該リガーゼが該アダプター核酸を該2本鎖核酸にライゲーションする条件下で合わせる工程を包含し、ここで該2本鎖核酸と合わされた該アダプター核酸は、二重鎖部分およびオーバーハング配列を含み、ここで該オーバーハング配列は、該2本鎖核酸の3'末端におけるオーバーハング配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む、前述の項目のうちのいずれか1項に記載の方法。

(項目5)

工程(d)は、前記アダプター核酸、前記2本鎖核酸、およびリガーゼを、該リガーゼが該アダプター核酸を該2本鎖核酸にライゲーションする条件下で合わせる工程を包含し、ここで該2本鎖核酸と合わされた該アダプター核酸は、1本鎖である、項目1～3のいずれか1項に記載の方法。

(項目6)

前記捕捉部分改変プライマーは、少なくとも1つの捕捉部分改変ヌクレオチドを含む、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目7)

前記捕捉部分改変プライマーは、捕捉部分に付着した第2の化学カップリング基に結合するように構成された第1の化学カップリング基を含む、項目1～5のいずれか1項に記載の方法。

(項目 8)

前記捕捉部分はビオチン部分である、前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 9)

前記ビオチン部分は、ビオチン - トリエチレングリコール、ビス - ビオチン、光切断性ビオチン、デスチオビオチン、デスチオビオチン - トリエチレングリコール、またはアジ化ビオチンを含む、項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

前記結合パートナーは、ストレプトアビシンである、前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 11)

前記ストレプトアビシンは、基材に付着している、項目 10 に記載の方法。

(項目 12)

前記基材は固体表面を含む、項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

前記固体表面は、常磁性ビーズを含む、項目 12 に記載の方法。

(項目 14)

工程 (d) の後でかつ工程 (e) の前に洗浄工程をさらに包含する、前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 15)

工程 (e) の後でかつ工程 (f) の前に：

i) 前記捕捉部分を含む前記 2 本鎖核酸を、常磁性基材上に固定化する工程；および

i i) 該固定化した 2 本鎖核酸を洗浄する工程、

をさらに包含する、前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 16)

工程 i i) の後に：

i i i) 前記洗浄した固定化 2 本鎖核酸を前記常磁性基材から放出する工程、
をさらに包含する、項目 15 に記載の方法。

(項目 17)

工程 (c) の後でかつ工程 (d) の前に、前記 2 本鎖核酸を 5' リン酸化する工程をさ
らに包含する、前述の項目のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 18)

工程 (c) の後でかつ工程 (d) の前に、前記 2 本鎖核酸を末端修復して、平滑末端化
した 2 本鎖核酸を生成する工程をさらに包含する、前述の項目のいずれか 1 項に記載の
方法。

(項目 19)

前記平滑末端化した 2 本鎖核酸の 3' 末端に 1 またはこれより多くのヌクレオチドを付
加する工程をさらに包含する、項目 18 に記載の方法。

(項目 20)

前記 1 またはこれより多くのヌクレオチドは、デオキシアデノシンヌクレオチドを含む
、項目 19 に記載の方法。

(項目 21)

前記アダプター核酸は、前記平滑末端化した 2 本鎖核酸の 3' 末端に付加した前記 1 ま
たはこれより多くのヌクレオチドに相補的な 1 またはこれより多くのヌクレオチドを含む
3' 末端においてヌクレオチド配列を含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 22)

前記アダプター核酸の 3' 末端における前記ヌクレオチド配列は、1 またはこれより多
くのデオキシチミジンヌクレオチドを含む、項目 21 に記載の方法。

(項目 23)

前記アダプター核酸は、前記 3' 末端において前記ヌクレオチド配列を含む增幅鎖にア
ニールしたブロッキング鎖をさらに含み、該 3' 末端における該ヌクレオチド配列は、該

ヌクレオチド配列がオーバーハング配列を形成するように不対化される、項目21に記載の方法。

(項目24)

末端修復後に、

i) 前記捕捉部分を含む前記2本鎖核酸を、常磁性基材上に固定化する工程；
i i) 該固定化した2本鎖核酸を洗浄する工程；および
i i i) 該洗浄した固定化2本鎖核酸を該常磁性基材から放出する工程、
をさらに包含する、項目18に記載の方法。

(項目25)

末端修復後に、

i) 前記捕捉部分を含む前記2本鎖核酸を、常磁性基材上に固定化する工程；および
i i) 該固定化した2本鎖核酸を洗浄する工程、
をさらに包含する、項目18に記載の方法。

(項目26)

末端修復の後でかつ工程i)の前に、洗浄工程をさらに包含する、項目24または項目25に記載の方法。

(項目27)

(h) 工程(g)の增幅生成物を常磁性基材上に固定化する工程；
(i) 該固定化した増幅生成物を洗浄する工程；および
(j) 該洗浄した固定化増幅生成物を該常磁性基材から放出する工程、
をさらに包含する、いずれか1項の項目2~26に記載の方法。

(項目28)

工程(g)の後でかつ工程(h)の前に、洗浄工程をさらに包含する、項目27に記載の方法。

(項目29)

工程(d)において、前記2本鎖核酸は、クラウディング剤の存在下で前記アダプターナイクレオチドにライゲーションされる、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目30)

工程(b)の後でかつ工程(c)の前に、前記核酸分子とリボヌクレアーゼ酵素とを接觸させる工程をさらに包含する、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目31)

前記第2鎖合成反応は、前記第1鎖合成反応の生成物にハイブリダイズした前記核酸分子のフラグメントによってプライムされる、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目32)

前記第2鎖合成は、複数のランダムプライマーを使用してランダムにプライムされる、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目33)

前記複数のランダムプライマーは、6塩基長~15塩基長の間である、項目32に記載の方法。

(項目34)

前記核酸分子はmRNAを含む、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目35)

前記核酸分子は、T細胞、B細胞、またはこれらの混合物を含むサンプルから得られる、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目36)

前記サンプルは、T細胞悪性腫瘍またはB細胞悪性腫瘍を有するかまたは有すると疑われる被験体から得られる、項目35に記載の方法。

(項目37)

前記T細胞悪性腫瘍または前記B細胞悪性腫瘍は、リンパ腫、多発性骨髄腫、急性リンパ芽球性白血病、および慢性リンパ性白血病からなる群より選択される、項目36に記載

の方法。

(項目38)

前記サンプルは、移植を受けた被験体または移植を受ける予定の被験体から得られる、項目35～37のいずれか1項に記載の方法。

(項目39)

前記サンプルは、処置に対する免疫応答が評価されている最中である被験体から得られる、項目35～37のいずれか1項に記載の方法。

(項目40)

前記サンプルは、白血球悪性腫瘍を有するか、または有すると疑われる被験体から得られる、項目35～37のいずれか1項に記載の方法。

(項目41)

前記被験体はヒトである、項目36～40のいずれか1項に記載の方法。

(項目42)

前記被験体は脊索動物である、項目36～40のいずれか1項に記載の方法。

(項目43)

前記核酸分子は、白血球を含むサンプルから得られる、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目44)

前記標的ヌクレオチド配列は、T細胞レセプター(TCR)遺伝子またはB細胞レセプター(BCR)遺伝子の一部に相当するヌクレオチド配列を含む、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目45)

前記捕捉部分改変プライマーは、免疫レセプター遺伝子または免疫グロブリン遺伝子に相補的であるヌクレオチド配列を含む、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目46)

前記捕捉部分改変プライマーは、相補性決定領域3(CDR3)の下流にある定常領域に特異的にアニールする、項目45に記載の方法。

(項目47)

前記標的特異的プライマーは、CDR3の下流にある定常領域またはJセグメントに特異的にアニールする、項目45または46に記載の方法。

(項目48)

前記標的特異的プライマーは、定常領域とJセグメントとの間に形成されるエキソン-エキソン接合部に特異的にアニールし、ここで該エキソン-エキソン接合部は、CDR3の下流にある、項目45または46に記載の方法。

(項目49)

前記第1のアダプタープライマーおよび前記第2のアダプタープライマーは同じである、項目2～48のいずれか1項に記載の方法。

(項目50)

前記第1のアダプタープライマーおよび前記第2のアダプタープライマーは異なる、項目2～48のいずれか1項に記載の方法。

(項目51)

前記第2のアダプタープライマーは、前記第1のアダプタープライマーに対してネスト化される、項目2～48のいずれか1項に記載の方法。

(項目52)

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

(a)既知の標的ヌクレオチド配列および未知の標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と、該既知の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする捕捉部分改変プライマーとをハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；

(b)ハイブリダイズした捕捉部分改変プライマーによってプライムされかつ該核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応を行う工程；

(c) 該核酸分子のフラグメントによってプライムされかつ該第1鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第2鎖合成反応を行って、捕捉部分を含む2本鎖核酸を生成する工程；

(d) 該2本鎖核酸を末端修復して、該捕捉部分を含む平滑末端化した2本鎖核酸を生成する工程；

(e) アダプター核酸を該平滑末端化した2本鎖核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程であって、ここで該ライゲーション生成物は、該アダプター核酸および該捕捉部分に隣接した該未知の標的ヌクレオチド配列を含む工程；

(f) 該ライゲーション生成物と該捕捉部分の固定化した結合パートナーとを接触させることによって、該ライゲーション生成物を捕捉する工程；

(g) 該既知の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする3'部分を含む標的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該ライゲーション生成物を増幅する工程であって、ここで該標的特異的プライマーは、該既知の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない5'テール部分を含む工程；

(h) 該標的特異的プライマーの5'テール部分の相補的配列に特異的にアニールするテールプライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第2のアダブタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程(g)の増幅生成物を増幅する工程；ならびに

(i) 工程(h)の増幅生成物を洗浄する工程、
を包含する方法。

(項目53)

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

(a) 標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第1の標的特異的プライマーとをハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；

(b) ハイブリダイズした第1の標的特異的プライマーによってプライムされかつ該核酸分子をテンプレートとして使用する第1鎖合成反応を行う工程；

(c) 該核酸分子のハイブリダイズしたフラグメントによってプライムされかつ該第1鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第2鎖合成反応を行って、2本鎖核酸を生成する工程；

(d) アダプター核酸を該2本鎖核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程；

(e) 該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする3'部分を含む第2の標的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第1のアダブタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該ライゲーション生成物を増幅する工程であって、ここで該第2の標的特異的プライマーは、該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない5'テール部分を含む工程；ならびに

(f) 該第2の標的特異的プライマーの5'テール部分の相補的配列に特異的にアニールする3'部分を含むテールプライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第2のアダブタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程(e)の増幅生成物を増幅する工程であって、ここで該テールプライマーは、該第2の標的特異的プライマーの相補的配列に特異的にアニールしない5'部分を含む工程、
を包含する方法。

(項目54)

前記第1の標的特異的プライマーは、捕捉部分を含む、項目53に記載の方法。

(項目55)

工程(d)の後でかつ工程(e)の前に、前記ライゲーション生成物と該捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによって、該ライゲーション生成物を捕捉する工程をさらに包含する、項目54に記載の方法。

(項目 5 6)

前記第 1 鎖合成反応は、捕捉部分改変ヌクレオチドの少なくとも 1 つのタイプを使用して行われ、該第 1 鎖合成反応の生成物は、少なくとも 1 つの捕捉部分を含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 7)

工程 (d) の後でかつ工程 (e) の前に、前記ライゲーション生成物と前記少なくとも 1 つの捕捉部分の固定化された結合パートナーとを接触させることによって、該ライゲーション生成物を捕捉する工程をさらに包含する、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 8)

工程 (c) の後でかつ工程 (d) の前に、前記 2 本鎖核酸と前記少なくとも 1 つの捕捉部分の固定化された結合パートナーとを接触させることによって、該 2 本鎖核酸を捕捉する工程をさらに包含する、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 9)

サンプル中の免疫レパートリーを決定する方法であって、該方法は、
(a) 免疫レセプターおよび免疫グロブリンのうちの少なくとも一方をコードする核酸分子を含むサンプルを得る工程；

(b) 該サンプルからの該核酸分子と該核酸分子の標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第 1 の標的特異的プライマーとをハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程；

(c) ハイブリダイズした第 1 の標的特異的プライマーによってプライムされかつ該核酸分子をテンプレートとして使用する第 1 鎖合成反応を行う工程；

(d) 該第 1 鎖合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第 2 鎖合成反応を行って、2 本鎖核酸を生成する工程；

(e) アダプター核酸を該 2 本鎖核酸にライゲーションして、ライゲーション生成物を生成する工程；

(f) 該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする 3' 部分を含む第 2 の標的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 1 のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該ライゲーション生成物を増幅する工程であって、ここで該第 2 の標的特異的プライマーは、該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない 5' テール部分を含む工程；

(g) 該第 2 の標的特異的プライマーの 5' テール部分の相補的配列に特異的にアニールする 3' 部分を含むテールプライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 2 のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程 (f) の増幅生成物を増幅する工程であって、ここで該テールプライマーは、該第 2 の標的特異的プライマーの相補的配列に特異的にアニールしない 5' 部分を含む工程；ならびに

(h) 第 1 のおよび第 2 のシーケンシングプライマーを使用して、工程 (g) の増幅生成物をシーケンシングする工程、
を包含する方法。

(項目 6 0)

前記免疫レセプターは T C R を含み、前記免疫グロブリンは B C R を含む、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記標的ヌクレオチド配列は、遺伝的に組み換えた配列に相当する、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記サンプルは、T 細胞、B 細胞、またはこれらの混合物を含む、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記サンプルは被験体から得られる、項目 6 2 に記載の方法。

(項目 6 4)

前記被験体はヒトである、項目 6 3 に記載の方法。

(項目 6 5)

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

(a) 標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする第 1 の標的特異的プライマーとを、プライマーがハイブリダイズした核酸分子を生成する条件下で接触させる工程；

(b) 該プライマーがハイブリダイズした核酸分子と、該核酸分子に相補的である第 1 鎮へと組み込むための複数のタイプのヌクレオチドとを接触させる工程であって、ここで該複数のタイプのヌクレオチドの少なくとも 1 つは、捕捉部分を含む工程；

(c) 該プライマーがハイブリダイズした核酸分子の該第 1 の標的特異的プライマーによってプライムされかつ該プライマーがハイブリダイズした核酸分子の該核酸分子をテンプレートとして使用する第 1 鎮合成反応を行う工程であって、ここで該第 1 鎮合成反応の生成物は、少なくとも 1 つの捕捉部分を含む工程；

(d) 該核酸分子のフラグメントによってプライムされかつ該第 1 鎮合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第 2 鎮合成反応を行って、該少なくとも 1 つの捕捉部分を含む 2 本鎖核酸を生成する工程；

(e) アダプター核酸を該 2 本鎖核酸にライゲーションして、該少なくとも 1 つの捕捉部分を含むライゲーション生成物を生成する工程；ならびに

(f) 該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする 3' 部分を含む第 2 の標的特異的プライマーおよび該アダプター核酸の相補的配列に特異的にアニールする第 1 のアダプタープライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該ライゲーション生成物を増幅する工程であって、ここで該第 2 の標的特異的プライマーは、該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない 5' テール部分を含む工程、

を包含する方法。

(項目 6 6)

工程 (e) の後でかつ工程 (f) の前に、前記ライゲーション生成物と前記捕捉部分の固定化された結合パートナーとを接触させることによって、該ライゲーション生成物を捕捉する工程をさらに包含する、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 6 7)

工程 (d) の後でかつ工程 (e) の前に、前記 2 本鎖核酸と前記捕捉部分の固定化された結合パートナーとを接触させることによって、該 2 本鎖核酸を捕捉する工程をさらに包含する、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 6 8)

分析用の核酸を調製する方法であって、該方法は、

(a) 標的ヌクレオチド配列を含む核酸分子と、ハイブリダイゼーション条件下で該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする 3' 部分および該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない 5' テール部分を含む捕捉部分改変プライマーとを、接触させる工程；

(b) ハイブリダイズした捕捉部分改変プライマーによってプライムされかつ該核酸分子をテンプレートとして使用する第 1 鎮合成反応を行う工程；

(c) 該第 1 鎮合成反応の生成物と複数のランダムプライマーとを、ハイブリダイゼーション条件下で接触させる工程であって、ここで該複数のランダムプライマーの各々は、共通配列を含む非ランダム 5' テール部分を含む工程；

(d) 該複数のランダムプライマーのうちの少なくとも 1 つによってプライムされかつ該第 1 鎮合成反応の生成物をテンプレートとして使用する第 2 鎮合成反応を行って、該捕捉部分を含む 2 本鎖核酸を生成する工程；

(e) 該 2 本鎖核酸と該捕捉部分の結合パートナーとを接触させることによって、該捕捉部分を含む 2 本鎖核酸を捕捉する工程；

(f) 第 1 のテールプライマーおよび該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする

第 1 の標的特異的プライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、該 2 本鎖核酸を増幅する工程であって、ここで該第 1 のテールプライマーは、該共通配列の相補体に特異的にアニールする 3' 部分および該共通配列の相補体に特異的にアニールしない 5' テール部分を含む工程；ならびに

(g) 第 2 の標的特異的プライマーおよび該第 1 のテールプライマーの 5' テール部分の相補体に特異的にアニールする第 2 のテールプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応によって、工程 (f) の増幅生成物を増幅する工程であって、ここで該第 2 の標的特異的プライマーは、該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールする 3' 部分および該標的ヌクレオチド配列に特異的にアニールしない 5' テール部分を含む工程、を包含する方法。