

【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3部門第2区分

【発行日】令和6年11月21日(2024.11.21)

【公開番号】特開2024-160269(P2024-160269A)

【公開日】令和6年11月13日(2024.11.13)

【年通号数】公開公報(特許)2024-212

【出願番号】特願2024-124506(P2024-124506)

【国際特許分類】

C 40 B 40/06(2006.01)

10

C 12 N 15/11(2006.01)

C 12 N 15/10(2006.01)

【F I】

C 40 B 40/06 Z N A

C 40 B 40/06

C 12 N 15/11 Z

C 12 N 15/10 110Z

【手続補正書】

【提出日】令和6年11月13日(2024.11.13)

20

【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】

(a) 標的核酸を複数のトランスポソーム複合体と接触させるステップであって、

各トランスポソーム複合体は、トランスポゾン及びトランスポザーゼを含み、

前記トランスポゾンは、転移鎖及び非転移鎖を含み、前記トランスポソーム複合体の少なくとも1つの前記トランスポゾンは、相補的な捕捉配列にハイブリダイズすることができるアダプター配列を含む、ステップと、

(b) 前記トランスポソーム複合体により、前記標的核酸を複数のフラグメントにフラグメント化し、複数の転移鎖を挿入するステップであって、隣接する前記フラグメントは前記トランスポソーム複合体を介して互いに連結しており、前記標的核酸の前記フラグメントの連續性が前記トランスポザーゼにより維持される、ステップと、

(c) 前記標的核酸の前記連結した複数のフラグメントを複数の固体支持体と接触させるステップであって、前記複数の固体支持体の各々は複数の固定化オリゴヌクレオチドを含み、各前記固定化オリゴヌクレオチドは相補的な捕捉配列及び第1のバーコード配列を含み、前記複数の固体支持体中の各固体支持体からの第1のバーコード配列は、前記複数の固体支持体中の他の固体支持体からの第1のバーコード配列とは異なる、ステップと、

(d) 前記バーコード配列の情報を前記標的核酸の前記連結した複数のフラグメントに転移させるステップであって、同じ前記標的核酸の少なくとも2つのフラグメントが同一のバーコード情報を受け取る、ステップと

(e) バーコードを含む前記標的核酸のフラグメントを亜硫酸水素塩処理に付し、それによりバーコードを含む亜硫酸水素塩処理標的核酸フラグメントを生成させるステップと、

(f) 前記亜硫酸水素塩処理標的核酸フラグメントの配列及び前記バーコード配列を決定するステップと、

(g) 前記バーコード配列を識別することにより、前記標的核酸の連續性情報を決定するステップとを含み、

30

40

50

前記配列情報は、前記標的核酸のメチル化状態を示し、前記連續性情報は、ハプロタイプ情報を示す。

標的核酸配列のフェージング情報及びメチル化状態を同時に決定する方法。

【請求項 2】

単一のバーコード配列が、各個々の前記固体支持体上の前記複数の固定化オリゴヌクレオチドに存在する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

異なるバーコード配列が、各個々の前記固体支持体上の前記複数の固定化オリゴヌクレオチドに存在する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記バーコード配列情報の前記標的核酸フラグメントへの転移を、ライゲーションにより行う、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 5】

前記バーコード配列情報の前記標的核酸フラグメントへの転移を、ポリメラーゼ伸長により行う、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記バーコード配列情報の前記標的核酸フラグメントへの転移を、ライゲーション及びポリメラーゼ伸長の両方により行う、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ポリメラーゼ伸長を、ライゲートされた前記固定化オリゴヌクレオチドを鋳型として用い、ライゲートされていない前記トランスポゾン鎖の 3' 末端を DNA ポリメラーゼで伸長することにより行う、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記アダプター配列の少なくとも一部が、第 2 のバーコード配列をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記トランスポソーム複合体が多量体であり、各单量体単位の前記トランスポゾンの前記アダプター配列が、同じ前記トランスポソーム複合体の他の单量体単位とは異なる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記アダプター配列が、第 1 のプライマー結合配列をさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 1 のプライマー結合部位が、前記捕捉配列又は前記捕捉配列の相補体に対して配列相同性を持たない、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記固体支持体上の前記固定化オリゴヌクレオチドが、第 2 のプライマー結合配列をさらに含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記トランスポソーム複合体が多量体であり、前記トランスポソームの单量体単位が、同じ前記トランスポソーム複合体内で互いに結合している、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 14】

トランスポソーム单量体単位のトランスポザーゼが、同じ前記トランスポソーム複合体の別のトランスポソーム单量体単位の別のトランスポザーゼに結合している、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

トランスポソーム单量体単位のトランスポゾンが、同じ前記トランスポソーム複合体の別のトランスポソーム单量体単位のトランスポゾンに結合している、請求項 14 に記載の方法。

50

【請求項 16】

標的核酸配列の前記連續性情報が、ハプロタイプ情報を示す、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

標的核酸配列の前記連續性情報が、ゲノム変異を示す、請求項1～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記ゲノム変異が、欠損、転位、染色体間遺伝子融合、重複、及びパラログからなる群から選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

前記固体支持体上に固定化された前記オリゴヌクレオチドが、部分的二本鎖領域及び部分一本鎖領域を含む、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 20】

前記オリゴヌクレオチドの前記部分的一本鎖領域が、前記第2のバーコード配列及び前記第2のプライマー結合配列を含む、請求項19に記載の方法。

【請求項 21】

前記バーコードを含む標的核酸フラグメントが、前記標的核酸フラグメントの配列を決定する前に増幅される、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記ステップ(a)～(d)及びその後の前記増幅が、前記標的核酸フラグメントの配列を決定する前に、单一の反応区画で行われる、請求項21に記載の方法。

20

【請求項 23】

前記増幅の間に、第3のバーコード配列が前記標的核酸フラグメントに挿入される、請求項21に記載の方法。

【請求項 24】

前記ステップ(d)の前記バーコードを含む前記標的核酸フラグメントを、複数の第1のセットの反応区画から前記バーコードを含む標的核酸フラグメントのプールにまとめるステップと、

前記バーコードを含む標的核酸フラグメントの前記プールを複数の第2のセットの反応区画に再分配するステップと、

前記標的核酸フラグメントを前記第2のセットの反応区画内でシーケンシング前に増幅することにより、第3のバーコードを前記標的核酸フラグメントに導入するステップとをさらに含む、請求項1～23のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 25】

前記標的核酸をトランスポソーム複合体と接触させる前に、前記標的核酸をプレフラグメント化するステップをさらに含む、請求項1～24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記標的核酸をプレフラグメント化するステップが、超音波処理及び制限消化からなる群から選択される方法により行われる、請求項25に記載の方法。

40

50