

【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6年8月27日(2024.8.27)

【国際公開番号】WO2022/038291  
 【公表番号】特表2023-539169(P2023-539169A)  
 【公表日】令和5年9月13日(2023.9.13)  
 【年通号数】公開公報(特許)2023-173  
 【出願番号】特願2023-512403(P2023-512403)  
 【国際特許分類】

10

C 1 2 Q 1/68(2018.01)  
 C 1 2 Q 1/6876(2018.01)  
 C 1 2 N 15/09(2006.01)  
 C 1 2 N 15/11(2006.01)  
 C 1 2 Q 1/25(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z N A  
 C 1 2 Q 1/6876 Z  
 C 1 2 N 15/09 Z  
 C 1 2 N 15/11 Z  
 C 1 2 Q 1/25

20

【手続補正書】  
 【提出日】令和6年8月19日(2024.8.19)  
 【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】

30

【請求項1】

核酸サンプル内のDNA二本鎖切断(DSB)を同定するためのサンプル調製方法であって、  
 i) DSBを含有することが疑われる核酸のサンプルを、ライゲーション条件下で、オリゴヌクレオチドの第1の対に曝露する工程であって、その対の第1のオリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドと前記DSBの第1の鎖とのライゲーションを可能にする5'結合構造、第1のシーケンシングプライマーが結合することができるハイブリダイゼーション部位(RD1 SP)、及び前記DSBをDSBのプールから分離するための結合配列を含み、第2のオリゴヌクレオチドが、前記第1の対の前記第1のオリゴヌクレオチドに対して相補的であり、前記オリゴヌクレオチドと前記DSBの第2の鎖とのライゲーションを可能にする3'結合構造を含み、前記オリゴヌクレオチドのいずれか又は両方が3'及び/又は5'保護構造を含む、工程と、

40

ii) 前記サンプルの核酸を断片に断片化する工程と、

iii) 前記断片を、ライゲーション条件下で、オリゴヌクレオチドの第2の対に曝露する工程であって、その対の第1のオリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドと断片化された前記核酸の第1の鎖とのライゲーションを可能にする5'結合構造、及び第2のシーケンシングプライマーが結合することができるハイブリダイゼーション部位(RD2 SP)を含み、第2のより長いオリゴヌクレオチドが、前記第2の対の前記第1のオリゴヌクレオチドに対して一部相補的であり、断片化された前記核酸の第2の鎖と結合するための3'結合構造、前記ハイブリダイゼーション部位に対して相補的な配列、及び、任意選択的に、ブリッジ増幅を可能にするための結合配列である更なる配列を含み、前記オリゴヌクレ

50

オチドのいずれか又は両方が3'及び/又は5'保護構造を含む、工程とを含む方法。

【請求項2】

請求項1に記載の方法であって、

核酸サンプル内のDNA二本鎖切断(DSB)を同定するための方法であり、

iv)前記断片を変性させて一本鎖核酸を提供する工程と、

v)パートiv)の鎖を群A及び群Bの2群に分離する工程であって、群Aが、第1の末端において、パートi)のオリゴヌクレオチドにより提供される第1のハイブリダイゼーション部位及び結合配列とを、別の末端において、パートiii)のオリゴヌクレオチドにより提供される第2のハイブリダイゼーション部位及び異なる配列とをすでにライゲートしている断片であり、群Bが、第1の末端において、パートi)のオリゴヌクレオチドにより提供される前記ハイブリダイゼーション部位及び結合配列とを、別の末端において、パートiii)のオリゴヌクレオチドにより提供される第2のハイブリダイゼーション部位及び異なる配列とをいまだライゲートしていない断片である、工程と、

vi)第1及び/又は第2のハイブリダイゼーション部位と結合するプライマーを使用して群Aの鎖を配列決定する工程であって、各配列がDSB切断に相当し、更に塩基対欠損の数及び性質が、各配列を前記サンプルが採取された前記種を代表するゲノムと比較することにより決定可能である、工程と、をさらに含む方法。

【請求項3】

前記第2の対の前記オリゴヌクレオチドが、断片化された前記核酸を分離するための結合配列を含まない5'結合構造を含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

パートi)及びパートiii)の前記オリゴヌクレオチドが入れ替わり、それによって、工程ii)の断片化する工程の後に、前記核酸が、パートiii)の前記オリゴヌクレオチドに最初に曝露され、次に前記核酸が、パートi)の前記オリゴヌクレオチドに曝露される、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記5'及び/又は3'結合構造が、リン酸基;トリホスフェート「T尾部」、好ましくはデオキシチミジントリホスフェート「T尾部」;トリホスフェート「A尾部」、好ましくはデオキシアデノシントリホスフェート「A尾部」;少なくとも1つのランダムNヌクレオチド、及び複数のNヌクレオチドのうちの1つを含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記5'及び/又は3'保護構造が、リン酸化活性、ホスファターゼ活性、ターミナルトランスフェラーゼ活性、核酸ハイブリダイゼーション、エンドヌクレアーゼ活性、エキソヌクレアーゼ活性、リガーゼ活性、ポリメラーゼ活性、及びタンパク質結合のうちの任意の1つ又は複数に対する耐性を提供する構造を含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記保護構造が、ホスホロチオエート結合、ジデオキシヌクレオチド又は共有結合性ブロック、ホスホラミダイト、C3スペーサーホスホラミダイト(3SpC3)を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

パートi)の前記第1のオリゴヌクレオチドの前記5'結合構造がリン酸基であり、パートi)の前記第2のオリゴヌクレオチドの前記3'結合構造がトリホスフェート尾部である、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

パートi)の前記第1及び第2のオリゴヌクレオチドが、プールのサンプルの起源の決定を可能にするヌクレオチドの特定の配列であるインデックス構造も含む、請求項1か

10

20

30

40

50

ら8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

パートi)の前記第1のオリゴヌクレオチドが、5'から3'方向に読み取る場合、5'結合構造、次に、任意選択的に保護構造、シークエンシングプライマーが結合することができるハイブリダイゼーション部位(RD1 SP)、インデックス配列、前記DSBをDSBのプールから分離するための結合配列、並びに3'結合及び/又は保護構造を含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記結合構造がリン酸基である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

パートi)の前記第2のオリゴヌクレオチドが、3'から5'方向に読み取る場合、3'結合構造、次に、任意選択的に保護構造、シークエンシングプライマーが結合することができるハイブリダイゼーション配列(RD1 SP)、インデックス配列、前記DSBをDSBのプールから分離するための結合配列、及び5'結合及び/又は保護構造を含む、請求項1から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記3'結合構造が、3'デオキシチミジントリホスフェート「T尾部」を含み、ホスホチオエート結合を更に含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

パートi)の前記第1のオリゴヌクレオチドの対の第1及び/又は第2のオリゴヌクレオチドが、2つの異なる末端保護構造を含む、又は  
オリゴヌクレオチドの第1の対の第1のオリゴヌクレオチドが、3'保護構造を含む、又はオリゴヌクレオチドの第2の対の第1のオリゴヌクレオチドが、3'保護構造を含む、  
 請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

パートiii)の第2のオリゴヌクレオチド対の前記第1のオリゴヌクレオチドの前記5'結合構造がリン酸基であり、パートiii)の前記第2のオリゴヌクレオチドの前記3'結合構造がトリホスフェート尾部である、請求項1から14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

パートiii)の前記第1及び第2のオリゴヌクレオチドが、プールされたサンプルの起源の決定を可能にするヌクレオチドの特定の配列であるインデックス構造も含む、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

パートiii)の前記第2のオリゴヌクレオチドが、5'から3'方向に読み取る場合、5'結合構造、次に、任意選択的に、保護構造、任意選択的に、ブリッジ増幅を可能にする更なる配列、インデックス配列、シークエンシングプライマーが結合することができるハイブリダイゼーション部位(RD2 SP)、並びに3'結合及び/又は保護構造を含む、請求項1から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

パートiii)のこの第2のオリゴヌクレオチド対の第1又は第2のオリゴヌクレオチドが、2つの異なる末端保護構造を含む、請求項1から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

パートi)の前記オリゴヌクレオチドが、配列番号1を有する第1のオリゴヌクレオチド及び配列番号2を有する第2のオリゴヌクレオチド、又は配列番号1若しくは2と少なくとも80%の同一性若しくは相同性を共有するオリゴヌクレオチドを含む、請求項1から18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

パートiii)のオリゴヌクレオチドの前記第2の対が、配列番号3を有する第1のオリゴヌクレオチド、及び配列番号4を有する第2のオリゴヌクレオチド、又は配列番号3若しくは4と少なくとも80%の同一性若しくは相同性を共有するオリゴヌクレオチドを含む、請

10

20

30

40

50

求項1から19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

パートiii)のオリゴヌクレオチドの前記第2の対の前記第2のオリゴヌクレオチドが、配列番号4~28の配列の任意の1つ、又は配列番号4~28の1つと少なくとも80%の同一性若しくは相同性を共有するオリゴヌクレオチドを含む、請求項1から20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記核酸サンプルがgDNAである、および/または前記サンプルが哺乳動物又はヒトである、請求項1から21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

パートi)の前記ライゲーションが、細胞又は組織サンプルを使用してin situ又はin vitroで生ずる、請求項1から22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

前記サンプルが、工程i)が実施される前に、透過処理剤に曝露される、請求項1から23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

前記サンプルが、工程i)が実行される前に、アデノシン尾部修復を実施するための少なくとも1つの薬剤に曝露される、請求項1から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

パートi)が、後続する工程を実施する前に、前記サンプルからgDNAを抽出する工程も含む、請求項1から25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

パートii)及び/又はパートiv)の後に、約100bp未満若しくは約150bp未満のサイズを有する断片を除去する工程、及び/又は約150bpを上回るサイズを有する断片を保持する工程を更に含む、請求項1から26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

パートv)の前記分離する工程が、パートi)のオリゴヌクレオチドにより提供される前記結合配列を使用してパートナーに結合することによって、パートiv)の群A鎖を任意のその他の鎖から分離することを含む、請求項1から27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

パートi)のオリゴヌクレオチドにより提供される前記結合配列に対する相補的結合鎖が基質に係留され、核酸の前記一本鎖が、係留された相補的結合鎖の近傍又はその上を流れる、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

パートvi)が、パートi)の前記第1のオリゴヌクレオチドの結合配列及びパートiii)の前記第2のオリゴヌクレオチドの更なる配列に対するオリゴヌクレオチド/結合部位をその上に係留している基質上で、パートv)において分離された一本鎖がクローン的に増幅されるブリッジ増幅を含む、請求項1から29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

前記請求項に記載の方法を実施する前に、一本鎖切断を含有するか又はそれを含有することが疑われるサンプルが、前記一本鎖切断が二本鎖切断に確実に変換されるようにライゲートされるか又は切断される、請求項1から30のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】

gDNAサンプル内のDNA二本鎖切断(DSB)を同定するためのパーツキットであって、  
i)オリゴヌクレオチドの第1の対であって、その対の第1のオリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドと前記DSBの第1の鎖とのライゲーションを可能にする5'結合構造、第1のシーケンシングプライマーが結合することができるハイブリダイゼーション部位(RD1 SP)、及び前記DSBをDSBのプールから分離するための結合配列を含み、第2のオリゴヌクレオチドが、この第1の対の前記第1のオリゴヌクレオチドに対して相補的であり、前記DSBの第2の鎖と結合するための3'結合構造を含み、前記オリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

のいずれか又は両方が3'及び/又は5'保護構造を含む、オリゴヌクレオチドの第1の対と、  
 ii)オリゴヌクレオチドの第2の対であって、その対の第1のオリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドと前記DSBの第1の鎖とのライゲーションを可能にする5'結合構造、及び第2のシーケンシングプライマーが結合することができるハイブリダイゼーション部位(RD2 SP)を含み、第2のより長いオリゴヌクレオチドが、この第2の対の前記第1のオリゴヌクレオチドに対して一部相補的であり、前記DSBの第2の鎖と結合するための3'結合構造、前記ハイブリダイゼーション部位に対して相補的な配列、及び、任意選択的に、ブリッジ増幅を可能にするための結合配列である更なる配列を含み、前記オリゴヌクレオチドのいずれか又は両方が3'及び/又は5'保護構造を含む、オリゴヌクレオチドの第2の対と

10

を含むパーツキット。

【請求項33】

gDNAサンプル内のDSBを同定するためのサンプル調製用のキットであって、

i)オリゴヌクレオチドの第1の対であって、その対の第1のオリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドと二本鎖核酸の鎖とのライゲーションを可能にし、TCGGTGGTCGCCGTATCATT(配列番号31)で表される配列を含む5'結合構造を含み、第2のオリゴヌクレオチドが、前記第1の対の前記第1のオリゴヌクレオチドに対して相補的であり、前記オリゴヌクレオチドのいずれか又は両方が3'及び/又は5'保護構造をそれぞれ含む、オリゴヌクレオチドの第1の対と、

ii)オリゴヌクレオチドの第2の対であって、その対の第1のオリゴヌクレオチドが、配列ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG(配列番号30)の5、10、15、若しくは20塩基を超える配列を含まないか又は24塩基すべてを含まず、並びに第2のオリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドと二本鎖核酸の鎖とのライゲーションを可能にし、CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT(配列番号32)で表される配列を含む3'結合構造を含み、前記オリゴヌクレオチドのいずれか又は両方が3'及び/又は5'保護構造をそれぞれ含む、オリゴヌクレオチドの第2の対と

20

を含むキット。

【請求項34】

gDNAサンプル内のDSBを同定するためのサンプル調製用のキットであって、

i)オリゴヌクレオチドの第1の対であって、その対の第1のオリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドと二本鎖核酸の鎖とのライゲーションを可能にし、TCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG(配列番号30)で表される配列を含む5'結合構造を含み、第2のオリゴヌクレオチドが、前記第1の対の前記第1のオリゴヌクレオチドに対して相補的であり、前記オリゴヌクレオチドのいずれか又は両方が3'及び/又は5'保護構造をそれぞれ含む、オリゴヌクレオチドの第1の対と、

30

ii)オリゴヌクレオチドの第2の対であって、その対の第1のオリゴヌクレオチドが、配列TCGGTGGTCGCCGTATCATT(配列番号31)の5、10、若しくは15塩基を超える配列を含まないか又は20塩基すべてを含まず、並びに第2のオリゴヌクレオチドが、前記オリゴヌクレオチドと二本鎖核酸の鎖とのライゲーションを可能にし、AATGATACGGCGACCAACCGA(配列番号34)で表される配列を含む3'結合構造を含み、前記オリゴヌクレオチドのいずれか又は両方が3'及び/又は5'保護構造をそれぞれ含む、オリゴヌクレオチドの第2の対と

40

を含むキット。

【請求項35】

オリゴヌクレオチドの前記第1の対及び/又は前記第2の対の第1のオリゴヌクレオチドが、第1のシーケンシングプライマーが結合することができるハイブリダイゼーション部位を含む、請求項33又は34に記載のキット。

【請求項36】

パートi)及び/又はパートii)の前記第1及び前記第2のオリゴヌクレオチドが、プールされたサンプルの起源の決定を可能にするヌクレオチドの特定の配列であるインデックス

50

構造も含む、請求項32又は35に記載のキット。

【請求項37】

配列決定を目的として、第1及び/又は第2のハイブリダイゼーション部位と結合する少なくとも1つのプライマーを更に含む、請求項32、35、又は36のいずれか一項に記載のキット。

【請求項38】

核酸を断片及び/又は一本鎖にそれぞれ断片化及び/又は変性させるための断片化剤及び/又は変性剤を更に含む、請求項32から37のいずれか一項に記載のキット。

【請求項39】

核酸サンプル、例えばgDNAサンプル等内のDNA二本鎖切断(DSB)を同定するための二本鎖アダプターであって、

前記オリゴヌクレオチドと前記DSBの第1の鎖とのライゲーションを可能にする5'結合構造、シーケンシングプライマーが結合することができるハイブリダイゼーション部位(RD1 SP)、及び前記DSBをDSBのプールから分離するための結合配列を含む第1のオリゴヌクレオチド鎖と、前記第1のオリゴヌクレオチドに対して相補的であり、前記DSBの第2の鎖と結合するための3'結合構造を含む第2のオリゴヌクレオチド鎖とを含み、前記オリゴヌクレオチドのいずれか又は両方が3'及び/又は5'保護構造を含む、二本鎖アダプター。

【請求項40】

核酸サンプル、例えばgDNAサンプル等内のDNA二本鎖切断(DSB)を同定するための二本鎖アダプターであって、

前記オリゴヌクレオチドと前記DSBの第1の鎖とのライゲーションを可能にする5'結合構造、及びシーケンシングプライマーが結合することができるハイブリダイゼーション部位(RD2 SP)を含む第1のオリゴヌクレオチド鎖と、前記第1のオリゴヌクレオチドに対して一部相補的であり、前記DSBの第2の鎖と結合するための3'結合構造、前記ハイブリダイゼーション部位に対して相補的な配列、及び任意選択的に、ブリッジ増幅を可能にするための結合配列である更なる配列を含む第2のより長いオリゴヌクレオチド鎖とを含み、前記オリゴヌクレオチドのいずれか又は両方が3'及び/又は5'保護構造を含む二本鎖アダプター。

【請求項41】

前記第1及び第2のオリゴヌクレオチドが、プールされたサンプルの起源の決定を可能にするヌクレオチドの特定の配列であるインデックス構造も含む、請求項39又は40に記載のアダプター。

【請求項42】

核酸サンプル内のDNA二本鎖切断(DSB)を同定するための二本鎖アダプターであって、配列ATCTCGTATGCCGCTTCTGCTTG(配列番号30)の5、10、15、若しくは20塩基を超える配列を含まないか又は24塩基すべてを含まない第1のオリゴヌクレオチド鎖と、前記オリゴヌクレオチドと二本鎖核酸の鎖とのライゲーションを可能にし、CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT(配列番号32)で表される配列を含む3'結合構造を含む第2のオリゴヌクレオチドとを含み、前記オリゴヌクレオチドのいずれか又は両方が3'及び/又は5'保護構造をそれぞれ含む、二本鎖アダプター。

【請求項43】

核酸サンプル内のDNA二本鎖切断(DSB)を同定するための二本鎖アダプターであって、配列TCGGTGGTCCGCTATCATT(配列番号31)の5、10、若しくは15塩基を超える配列を含まないか又は20塩基すべてを含まない第1のオリゴヌクレオチド鎖と、前記オリゴヌクレオチドと二本鎖核酸の鎖とのライゲーションを可能にし、AATGATACGGCGACCACCGA(配列番号34)で表される配列を含む3'結合構造を含む第2のオリゴヌクレオチドとを含み、前記オリゴヌクレオチドのいずれか又は両方が3'及び/又は5'保護構造をそれぞれ含む、

二本鎖アダプター。

【請求項 4 4】

核酸サンプル内のDNA二本鎖切断(DSB)を同定するためのサンプル調製方法であって、調製が、固定されたプライマーを含む基質と結合するのに適するように、DSB関連核酸を改変する工程を含み、方法が、

a) 複数の核酸を含むサンプルを提供する工程と、

b) 前記複数の核酸を、ライゲーションを促進する条件下で、第1のアダプターに曝露する工程であって、前記第1のアダプターが、DSBの鎖の3'末端にライゲートされる能力を有するオリゴヌクレオチドを含み、ハイブリダイゼーションにより、前記基質に固定されたプライマーに結合する能力を有する配列を含む、工程と

10

c) 前記複数の核酸を断片化する工程と、

d) 前記複数の核酸を、ライゲーションを促進する条件下で、第2のアダプターに曝露する工程であって、前記第2のアダプターが、断片化により誘発された切断において、鎖の5'末端にライゲートされる能力を有するオリゴヌクレオチドを含み、前記第2のアダプターが、ハイブリダイゼーションにより、前記基質に固定されたプライマーに結合する能力を有する配列を含まず、前記第2のアダプターが、前記第1のアダプターのオリゴヌクレオチドにライゲートされる能力を有さない工程と

を含む、方法。

【請求項 4 5】

工程d)のオリゴヌクレオチドが、第2のプライマーの領域と同一の配列を含む、請求項44に記載の方法。

20

【請求項 4 6】

前記基質が、第1及び第2の固定されたプライマーを含み、

工程b)のオリゴヌクレオチドが、ハイブリダイゼーションにより、第1の固定されたプライマーに結合する能力を有する配列を含み、

工程d)のオリゴヌクレオチドが、第2の固定されたプライマーの領域と同一の配列を含む、請求項44又は45に記載の方法。

【請求項 4 7】

工程b)が、

前記複数の核酸を、ライゲーションを促進する条件下で、第1のアダプターの対に曝露する工程であって、前記第1のアダプターの対が、DSBの鎖の少なくとも3'末端にライゲートされる能力を有し、並びに前記第1のアダプターの対が、少なくとも部分的に相補的である第1及び第2のオリゴヌクレオチドを含み、前記第1のオリゴヌクレオチドが3'末端にライゲート可能であり、ハイブリダイゼーションにより、前記基質に固定されたプライマーに結合する能力を有する配列を含む、工程であり、

30

工程d)が、

前記複数の核酸を、ライゲーションを促進する条件下で、第2のアダプターの対に曝露する工程であって、前記第2のアダプターの対が、断片化により誘発された切断において、鎖の少なくとも5'末端にライゲートされる能力を有するが、しかし前記第1のアダプターの対の前記第1のオリゴヌクレオチドにライゲートされる能力を有さず、前記第2のアダプターが、第1及び第2の部分的に相補的なオリゴヌクレオチドを含み、前記第1のオリゴヌクレオチドが5'末端にライゲート可能であり、第2のプライマーの領域と同一の配列を含み、前記第2のオリゴヌクレオチドが、前記第2のプライマーの領域と同一の前記配列に対して相補的である配列を含まない、工程である、請求項44から46のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 4 8】

前記第2のアダプターの対が、

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT(配列番号32)で表される配列を含む第1のオリゴヌクレオチド、及び配列ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG(配列番号30)の5、10、15、若しくは20塩基を超える配列を含まないか又は24塩基すべてを含まない配列を

50

含む第2のオリゴヌクレオチド、或いは

AATGATACGGCGACCACCGA(配列番号34)で表される配列を含む第1のオリゴヌクレオチド、及び配列TCGGTGGTCGCCGTATCATT(配列番号31)の5、10、若しくは15塩基を超える配列を含まないか又は20塩基すべてを含まない配列を含む第2のオリゴヌクレオチドを含む、請求項44から47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

前記第1のアダプターの対の前記第1及び/又は第2のオリゴヌクレオチドが3'及び/又は5'保護構造を含み、並びに/或いは前記第2のアダプターの対の前記第1及び/又は第2のオリゴヌクレオチドが3'及び/又は5'保護構造を含む、請求項47又は48に記載の方法。

10

【請求項50】

前記第2のアダプターが、前記第1のアダプターの3'改変の存在に起因して、前記第1のアダプターにライゲートされる能力を有さない、請求項44から49のいずれか一項に記載の方法。

【請求項51】

5'末端にライゲート可能である前記第2のアダプターの前記オリゴヌクレオチドが、固定されたプライマーの5、10、15、20、21、24個、又はそれ超の塩基と同一の配列を含む、請求項44から50のいずれか一項に記載の方法。

【請求項52】

前記複数の核酸を変性させて複数の一本鎖核酸を形成する工程を更に含む、請求項44から51のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項53】

前記複数の核酸を、固定されたプライマーと相補的核酸とのハイブリダイゼーションに適する条件下で、前記固定されたプライマーを含む基質と接触させる工程を更に含む、請求項44から52のいずれか一項に記載の方法。

【請求項54】

前記基質にハイブリダイズした任意の核酸に関する配列情報を取得する工程を更に含む、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

工程が、a)、b)、c)、次にd)の順番で実施されるか、又は工程が、a)、c)、d)、次にb)の順番で実施され、前記サンプルが、工程d)及びb)の間で、DSBを引き起こす能力を有するか又はそれを引き起こす能力を有することが疑われる条件に曝露される、請求項44から54のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項56】

前記サンプルが、核酸サンプル内の目的とする構造において、DSBを引き起こす能力を有する条件に曝露される、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

核酸サンプル内のDNA二本鎖切断(DSB)を同定するためのサンプル調製方法であって、調製が、固定された第1のプライマーを含む基質と結合するのに適するように、DSB関連核酸を改変する工程を含み、方法が、

40

1)複数の核酸を含むサンプルを提供する工程と、

2)前記複数の核酸を、ライゲーションを促進する条件下で、第1のアダプターに曝露する工程であって、前記第1のアダプターが、DSBの鎖の3'末端にライゲートされる能力を有するオリゴヌクレオチドを含み、第2のプライマーにハイブリダイズする能力を有する配列を含む、工程と、

3)前記複数の核酸を断片化する工程と、

4)前記複数の核酸を、ライゲーションを促進する条件下で、第2のアダプターに曝露する工程であって、前記第2のアダプターが、断片化により誘発された切断において、鎖の5'末端にライゲートされる能力を有するオリゴヌクレオチドを含み、前記固定された第1

50

のプライマーの領域と同一の配列を含み、前記第2のアダプターが、前記第1のアダプターのオリゴヌクレオチドにライゲートされる能力を有さない、工程と、

5)前記複数の核酸を、プライマーの伸長に適する条件下で、前記第2のプライマーと接触させる工程とを含む方法。

【請求項58】

工程2)が、

前記複数の核酸を、ライゲーションを促進する条件下で、第1のアダプターの対に曝露する工程であって、前記第1のアダプターの対が、DSBの鎖の少なくとも3'末端にライゲートされる能力を有し、並びに前記第1のアダプターの対が、少なくとも部分的に相補的である第1及び第2のオリゴヌクレオチドを含み、前記第1のオリゴヌクレオチドが3'末端にライゲート可能であり、第2のプライマーにハイブリダイズする能力を有する配列を含む、工程であり、

10

工程4)が、

前記複数の核酸を、ライゲーションを促進する条件下で、第2のアダプターの対に曝露する工程であって、前記第2のアダプターの対が、断片化により誘発された切断において、鎖の少なくとも5'末端にライゲートされる能力を有するが、しかし前記第1のアダプターの対の前記第1のオリゴヌクレオチドにライゲートされる能力を有さず、前記第2のアダプターが、第1及び第2の部分的に相補的なオリゴヌクレオチドを含み、第1のオリゴヌクレオチドが5'末端にライゲート可能であり、前記固定された第1のプライマーの領域と同一の配列を含み、第2のオリゴヌクレオチドが、前記固定された第1のプライマーの領域と同一の前記配列に対して相補的である配列を含まない、工程である、請求項57に記載の方法。

20

【請求項59】

前記第2のアダプターの対が、

AACCCACTACGCCTCCGCTTTCC(配列番号40)で表される配列を含む第1のオリゴヌクレオチドと、

配列GGAAAGCGGAGGCGTAGTGTT(配列番号36)の5、10、15、20塩基を超える配列を含まないか又は22塩基すべてを含まない第2のオリゴヌクレオチドとを含む、請求項57又は58に記載の方法。

【請求項60】

前記第1のアダプターの対の第1及び/又は第2のオリゴヌクレオチドが3'及び/又は5'保護構造を含み、並びに/或いは前記第2のアダプターの対の第1及び/又は第2のオリゴヌクレオチドが3'及び/又は5'保護構造を含む、請求項58又は59に記載の方法。

30

【請求項61】

前記第2のアダプターが、前記第1のアダプターの3'改変の存在に起因して、前記第1のアダプターにライゲートされる能力を有さない、請求項57から60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項62】

5'末端にライゲート可能である、前記第2のアダプターのオリゴヌクレオチドが、固定されたプライマーの5、10、15、20、21、24個、又はそれ超の塩基と同一の配列を含む、請求項57から61のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項63】

前記複数の核酸を変性させて複数の一本鎖核酸を形成する工程を更に含む、請求項57から62のいずれか一項に記載の方法。

【請求項64】

前記複数の核酸を、前記固定された第1のプライマーと相補的核酸とのハイブリダイゼーションに適する条件下で、前記固定された第1のプライマーを含む基質と接触させる工程を更に含む、請求項57から63のいずれか一項に記載の方法。

【請求項65】

前記基質にハイブリダイズした任意の核酸に関する配列情報を取得する工程を更に含む

50

、請求項64に記載の方法。

【請求項66】

工程が、1)、2)、3)、4)、次に5)の順番で実施されるか、又は工程が、1)、3)、4)、2)、次に5)の順番で実施され、前記サンプルが、工程4)及び2)の間で、DSBを引き起こす能力を有するか又はそれを引き起こす能力を有することが疑われる条件に曝露される、請求項57から65のいずれか一項に記載の方法。

【請求項67】

前記サンプルが、前記核酸サンプル内の目的とする構造において、DSBを引き起こす能力を有する条件に曝露される、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

複数の核酸を含む前記サンプルがgDNAである、請求項44から67のいずれか一項に記載の方法。

【請求項69】

前記第1のアダプターの対が、第1のシーケンシングプライマーが結合することができる第1のハイブリダイゼーション部位を含む、および/または前記第2のアダプターの対が、第2のシーケンシングプライマーが結合することができる第2のハイブリダイゼーション部位を含む、請求項44から68のいずれか一項に記載の方法。

【請求項70】

核酸サンプル内の目的とする構造を同定するためのサンプル調製方法であって、調製が、固定されたプライマーを含む基質と結合するのに適するように、目的とする構造と関連する核酸を改変する工程を含み、方法が、

a) 複数の核酸を含むサンプルを提供し、前記複数の核酸を、目的とする構造において、核酸の少なくとも一方の鎖を切断する能力を有する条件に曝露し、及び前記複数の核酸を一本鎖核酸に変性させる工程と、

b) 前記複数の核酸を、ライゲーションを促進する条件下で、第1のアダプターに曝露する工程であって、前記第1のアダプターが、切断部位の鎖の3'末端にライゲートされる能力を有するオリゴヌクレオチドを含み、ハイブリダイゼーションにより、前記基質に固定されたプライマーに結合する能力を有する配列を含む、工程と、

c) 前記複数の核酸を断片化する工程と、

d) 前記複数の核酸を、ライゲーションを促進する条件下で、第2のアダプターに曝露する工程であって、前記第2のアダプターが、断片化により誘発された切断において、鎖の5'末端にライゲートされる能力を有するオリゴヌクレオチドを含み、第2のアダプターが、ハイブリダイゼーションにより、前記基質に固定されたプライマーに結合する能力を有する配列を含まず、前記第2のアダプターが、前記第1のアダプターのオリゴヌクレオチドにライゲートされる能力を有さない、工程と

を含む方法。

【請求項71】

前記目的とする構造が、特異的に切断される能力を有する任意の構造である、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

前記目的とする構造が、シクロブタンピリミジンダイマー(CPD)、8-オキソグアニン、又は非塩基部位である、請求項70又は71に記載の方法。

【請求項73】

工程d)のオリゴヌクレオチドが、第2のプライマーの領域と同一の配列を含む、請求項70から72のいずれか一項に記載の方法。

【請求項74】

前記基質が、第1及び第2の固定されたプライマーを含み、

工程b)のオリゴヌクレオチドが、ハイブリダイゼーションにより、第1の固定されたプライマーに結合する能力を有する配列を含み、

10

20

30

40

50

工程d)のオリゴヌクレオチドが、第2の固定されたプライマーの領域と同一の配列を含む、請求項70から73のいずれか一項に記載の方法。

【請求項75】

工程b)が、

前記複数の核酸を、ライゲーションを促進する条件下で、第1のアダプターの対に曝露する工程であって、前記第1のアダプターの対が、切断部位の鎖の少なくとも3'末端にライゲートされる能力を有し、並びに前記第1のアダプターの対が、少なくとも部分的に相補的である第1及び第2のオリゴヌクレオチドを含み、前記第1のオリゴヌクレオチドが3'末端にライゲート可能であり、ハイブリダイゼーションにより、前記基質に固定されたプライマーに結合する能力を有する配列を含む、工程であり、

10

工程d)が、

前記複数の核酸を、ライゲーションを促進する条件下で、第2のアダプターの対に曝露する工程であって、前記第2のアダプターの対が、断片化により誘発された切断において、鎖の少なくとも5'末端にライゲートされる能力を有するが、しかし前記第1のアダプターの対の前記第1のオリゴヌクレオチドにライゲートされる能力を有さず、前記第2のアダプターが、第1及び第2の部分的に相補的なオリゴヌクレオチドを含み、前記第1のオリゴヌクレオチドが5'末端にライゲート可能であり、第2のプライマーの領域と同一の配列を含み、前記第2のオリゴヌクレオチドが、前記第2のプライマーの領域と同一の前記配列に対して相補的である配列を含まない、工程である、請求項70から74のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項76】

前記第2のアダプターの対が、

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT(配列番号32)で表される配列を含む第1のオリゴヌクレオチド、及び配列ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG(配列番号30)の5、10、15、若しくは20塩基を超える配列を含まないか又は24塩基すべてを含まない配列を含む第2のオリゴヌクレオチド、或いは

AATGATACGGCGACCACCGA(配列番号34)で表される配列を含む第1のオリゴヌクレオチド、及び配列TCGGTGGTCCCGTATCATT(配列番号31)の5、10、若しくは15塩基を超える配列を含まないか又は20塩基すべてを含まない配列を含む第2のオリゴヌクレオチドを含む、請求項70から75のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項77】

前記第1のアダプターの対の前記第1及び/又は第2のオリゴヌクレオチドが、3'及び/又は5'保護構造を含み、並びに/或いは前記第2のアダプターの対の前記第1及び/又は第2のオリゴヌクレオチドが、3'及び/又は5'保護構造を含む、請求項75又は76に記載の方法。

【請求項78】

前記第2のアダプターが、前記第1のアダプターの3'改変の存在に起因して、前記第1のアダプターにライゲートされる能力を有さない、請求項70から77のいずれか一項に記載の方法。

【請求項79】

5'末端にライゲート可能である、前記第2のアダプターのオリゴヌクレオチドが、固定されたプライマーの5、10、15、20、21、24個、又はそれ超の塩基と同一の配列を含む、請求項70から78のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項80】

前記複数の核酸を変性させて複数の一本鎖核酸を形成する工程を更に含む、請求項70から79のいずれか一項に記載の方法。

【請求項81】

前記複数の核酸を、固定されたプライマーと相補的核酸とのハイブリダイゼーションに適する条件下で、前記固定されたプライマーを含む基質と接触させる工程を更に含む、請求項70から80のいずれか一項に記載の方法。

50

**【請求項 8 2】**

前記基質にハイブリダイズした任意の核酸に関する配列情報を取得する工程を更に含む、請求項 8 1 に記載の方法。

**【請求項 8 3】**

複数の核酸を含む前記サンプルが gDNA である、請求項 7 0 から 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 8 4】**

工程が、a)、b)、c)、次に d) の順番で実施されるか、又は工程が、c)、d)、a)、次に b) の順番で実施される、請求項 7 0 から 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

**【請求項 8 5】**

核酸サンプル、例えば gDNA サンプル等内の DNA 二本鎖切断 (DSB) を同定するための二本鎖アダプターであって、

配列 GGAAAGCGGAGGCGTAGTGGTT (配列番号 36) の 5、10、15、20 塩基を超える配列を含まないか又は 22 塩基すべてを含まない第 1 のオリゴヌクレオチド鎖と、

前記オリゴヌクレオチドと二本鎖核酸の鎖とのライゲーションを可能にする 3' 結合構造を含み、AACCCACTACGCCTCCGCTTTCC (配列番号 40) で表される配列を含む第 2 のオリゴヌクレオチドと

を含み、

前記オリゴヌクレオチドのいずれか又は両方が 3' 及び / 又は 5' 保護構造をそれぞれ含む二本鎖アダプター。

20

30

40

50