

【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 1 年 5 月 23 日 (2019.5.23)

【公表番号】特表 2018-511341 (P2018-511341A)

【公表日】平成 30 年 4 月 26 日 (2018.4.26)

【年通号数】公開・登録公報 2018-016

【出願番号】特願 2017-554339 (P2017-554339)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 Z

【手続補正書】

【提出日】平成 31 年 4 月 15 日 (2019.4.15)

【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】

液滴の少なくとも約 90% が 1 つの粒子を含むか、または粒子を含まないような、粒子を含む複数の液滴であって、該粒子がオリゴヌクレオチドを含み、該オリゴヌクレオチドが、実質的に各粒子が識別可能なバーコード配列を含むように、第 1 のバーコードの所定のプールから選択される第 1 のバーコードおよび第 2 のバーコードの所定のプールから選択される第 2 のバーコードであるバーコード配列を含む、粒子を含む複数の液滴を提供すること；および

該オリゴヌクレオチドに核酸配列を結合させること

を含む、方法。

【請求項 2】

粒子がヒドロゲル粒子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

識別可能なバーコード配列が、少なくとも 1, 0 0 0、少なくとも 3, 0 0 0、少なくとも 1 0, 0 0 0 または少なくとも 1 0 0, 0 0 0 の識別可能なバーコード配列である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

核酸配列が、ゲノム DNA に結合するように構成されている、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

ゲノム DNA がヒトゲノム DNA である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

該粒子からオリゴヌクレオチドの少なくともいくつかを遊離すること、場合により開裂可能なリンカーを介して遊離することをさらに含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

該液滴の少なくとも約 95% が、1 つのヒドロゲル粒子を含むか、またはヒドロゲル粒子を含まない、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記オリゴヌクレオチドに結合した核酸配列を、複数の細胞から得られる核酸に暴露することをさらに含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

複数の細胞が、複数の液滴の少なくともいくつかに存在する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

液滴内の細胞の少なくともいくつかを溶解することをさらに含む、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

液滴内の細胞の少なくともいくつかを細胞溶解試薬を用いて溶解することを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

該オリゴヌクレオチドに核酸配列を結合させる工程が、アダプター配列を、相補的アダプター配列およびプライマーを含む配列に曝露すること；プライマーを該プライマーの標的を含む核酸配列に曝露すること；および増幅させて、第 1 のバーコード、第 2 のバーコードおよび核酸配列を含むオリゴヌクレオチドを作製すること、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】

第 1 のバーコードの所定のプールから選択される第 1 のバーコード、第 2 のバーコードの所定のプールから選択される第 2 のバーコード、およびアダプター配列を含むオリゴヌクレオチドを付着させた複数の粒子を提供すること；および該アダプター配列を介してオリゴヌクレオチドに核酸配列を結合させることを含む、方法。

【請求項 14】

複数の微小流体液滴内に複数の細胞および複数の粒子を封入すること（ここで、少なくとも 10,000 の液滴のそれぞれが、該複数の液滴の他の液滴中に含まれるオリゴヌクレオチドと識別可能な 1 以上のオリゴヌクレオチドを含むように、各粒子が実質的にオリゴヌクレオチドおよびそれに共有結合した核酸配列を含む）；および液滴内で少なくともいくつかの細胞を溶解させて、該細胞から核酸を遊離させること（ここで、該核酸配列が、少なくともいくつかの遊離された核酸と相互作用できる部分を含む）を含む、方法。

【請求項 15】

細胞を含む少なくとも 10,000 の微小流体液滴を提供すること（ここで、該複数の液滴の少なくとも約 90% が細胞を含むか、または細胞を含まない）；複数の微小流体液滴内で細胞を溶解させて、該細胞から核酸を遊離させること；およびオリゴヌクレオチドに結合した該液滴内の選択的に増幅された核酸を産生すること（ここで、液滴の少なくとも約 90% について、液滴内のオリゴヌクレオチドは、複数の液滴の他の液滴中のオリゴヌクレオチドと識別可能である）を含む、方法。

【請求項 16】

液滴の 10% 以下が 2 以上の細胞を含むような細胞を含む少なくとも約 10,000 の微小流体液滴を提供すること、複数の液滴内の細胞を溶解して該細胞から核酸を遊離させること；および遊離された核酸の部分を液滴内で選択的に増幅させて、増幅部分および液滴特異的バーコードを含む配列を作製することを含む、方法。

【請求項 17】

液滴の 10% 以下が 2 以上の細胞を含むような細胞を含む複数の液滴を提供すること；

複数の液滴内の細胞を溶解して該細胞から核酸を遊離させること；および
遊離された核酸の部分を液滴内で選択的に増幅させて、増幅部分および少なくとも１０，
０００の識別可能なバーコードのプールから選択されたバーコードを含む配列を作製する
こと
を含む、方法。