

【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】平成21年3月12日(2009.3.12)

【公表番号】特表2008-528040(P2008-528040A)

【公表日】平成20年7月31日(2008.7.31)

【年通号数】公開・登録公報2008-030

【出願番号】特願2007-553388(P2007-553388)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

G 0 1 N 33/58 (2006.01)

G 0 1 N 33/553 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z C C A

C 4 0 B 40/06 Z N A

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 F

C 1 2 M 1/00 A

G 0 1 N 33/58 A

G 0 1 N 33/553

【手続補正書】

【提出日】平成21年1月22日(2009.1.22)

【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】

少なくとも 2 つの識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーの第 1 のコレクションを用いて、鋳型ポリヌクレオチド内のヌクレオチドの配列に関する情報を決定する方法であって、

(a) オリゴヌクレオチドプローブを該鋳型ポリヌクレオチドにライゲートさせ、伸長された二本鎖を形成することにより、初期オリゴヌクレオチドを該鋳型ポリヌクレオチドに沿って伸長させる工程であって、ここで、該オリゴヌクレオチドプローブは、識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーの該コレクションのメンバーである、工程；

(b) 該オリゴヌクレオチドプローブと会合した標識を検出する工程；ならびに

(c) プローブファミリー名の序列リストが得られるまで工程 (a) および (b) を反復する工程；ならびに

(d) 該ヌクレオチドの配列に対する 1 つ以上の可能性を排除するためにプローブファミリー名の該序列リストを使用する工程

を含む、方法。

【請求項 2】

工程 (d) が、前記配列を決定するためにプローブファミリー名の前記序列リストをデコード化することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

鋳型ポリヌクレオチドにハイブリダイズされた初期オリゴヌクレオチドプローブであって、伸長可能な末端を有するプローブを含むプローブ - 鋳型二本鎖を提供することを含み、前記伸長させる工程が、該オリゴヌクレオチドプローブを該伸長可能な末端にライゲートさせて、伸長されたオリゴヌクレオチドプローブを含有する伸長された二本鎖を形成させることを含み、さらに、該伸長させる工程において該オリゴヌクレオチドプローブが該伸長可能な末端にライゲートされない場合はいつでも、任意の残留する伸長可能な末端をキャッピングする工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

各プローブファミリー内の前記オリゴヌクレオチドプローブが伸長不可能な部分を一方の末端に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

各検出工程後に、(f)もし伸長可能な末端が既に存在しない場合は、生成される末端が最も新しくライゲートされたオリゴヌクレオチドプローブがライゲートされた末端と異なるように、伸長可能な末端を、該最も新しくライゲートされたオリゴヌクレオチドプローブ上に生成させることをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記オリゴヌクレオチドプローブがホスホロチオレート結合を含み、前記伸長可能なプローブ末端が、該ホスホロチオレート結合を、Ag、Hg、Cu、Mn、ZnおよびCdからなる群より選択される原子を含む切断剤で切断させることにより生成される、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記切断剤がAgNO₃である、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記伸長させる工程が半固相支持体内または該支持体上で行なわれる、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記鋳型が、実質的に平面状で剛性の基材に結合された微粒子に結合されている、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

前記コレクションが2つの識別可能に標識されたプローブファミリーを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

前記コレクションが3つの識別可能に標識されたプローブファミリーを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

前記コレクションが4つの識別可能に標識されたプローブファミリーを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

前記コレクションが、4つより多くの識別可能に標識されたプローブファミリーを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 14】

前記オリゴヌクレオチドプローブが、ヌクレオシドが独立しては選択されない拘束部分を含み、配列が異なる拘束部分を有するオリゴヌクレオチドプローブが、コード化に従ってプローブファミリーに割り当てられる、請求項1に記載の方法。

【請求項 15】

オリゴヌクレオチドプローブが、表1に示す24個のコード化の1つに従って第1、第2、第3および第4のプローブファミリーに割り当てられる、請求項1に記載の方法。

【請求項 16】

前記鋳型内の少なくとも1つのヌクレオチドが既知実体を有し、前記デコード化する工程

が：

(i) どの実体が既知ヌクレオチドの実体と一致するか、およびその近位ヌクレオチドが既知実体のヌクレオチドに隣接するヌクレオチドに対向してライゲートされたプローブの、拘束部分の可能な配列を調べることにより、該既知実体のヌクレオチドに隣接する該鋳型内のヌクレオチドに、実体を割り当てる工程；

(i i) どの実体が、その近位ヌクレオチドが後続のヌクレオチドに対向してライゲートされたプローブの拘束部分の可能な配列と一致するかを調べることにより、実体を後続のヌクレオチドに割り当てる工程；ならびに

(i i i) 該配列が決定されるまで工程 (i i) を反復する工程を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 17】

(a) 前記ヌクレオチドが既知実体を有するように、前記鋳型内のヌクレオチドの該実体を決定する工程をさらに含み、ここで前記デコード化する工程は：

(i) 実体を、どの実体が既知ヌクレオチドの実体と一致するか、およびその近位ヌクレオチドが既知実体のヌクレオチドに隣接するヌクレオチドに対向してライゲートされたプローブの拘束部分の可能な配列を調べることにより、既知実体のヌクレオチドに隣接する該鋳型内のヌクレオチドに割り当てる工程；

(i i) どの実体が、その近位ヌクレオチドが後続のヌクレオチドに対向してライゲートされたプローブの拘束部分の可能な配列と一致するかを調べることにより、実体を後続のヌクレオチドに割り当てる工程；ならびに

(i i i) 配列が決定されるまで工程 (i i) を反復する工程を含む

をさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 18】

前記決定する工程が、鋳型プローブ二本鎖を標識されたヌクレオチドと、ポリメラーゼの存在下、該二本鎖に隣接する位置の該鋳型に相補的である場合は、標識されたヌクレオチドの組込みを可能にする条件下で接触させることを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記デコード化する工程が、少なくとも 1 つの候補配列をプローブファミリー名の前記序列リストから生成させること；および前記鋳型内のヌクレオチドの配列として候補配列を選択することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 20】

前記生成させる工程が、少なくとも 4 つの候補配列を生成させることを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記生成させる工程が、

(i) 実体をヌクレオチドの前記配列内の第 1 のヌクレオチドと仮定すること；

(i i) 該第 1 のヌクレオチドに対応するプローブファミリー名に基づいて隣接するヌクレオチドとして可能な実体を決定することにより、実体を第 1 のヌクレオチドに隣接するヌクレオチドに割り当てること；

(i i i) その実体が最も新しく割り当てられたヌクレオチドに対応するプローブファミリー名に基づいて後続のヌクレオチドとして可能な実体を決定することにより、実体を後続のヌクレオチドに割り当てること；

(i v) 候補配列が生成されるまで工程 (i i i) を反復すること；ならびに

(v) 工程 (i) ~ (i v) を反復することであって、ここで、各反復において、所望数の候補配列が生成されるまで、異なる実体を該第 1 のヌクレオチドと仮定することを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記選択工程が、少なくとも 1 つの候補配列を 1 つ以上の既知配列と比較すること、および該既知配列の 1 つ以上と所定の程度の同一性を示すか、またはほとんどほぼ同一である

候補配列を選択することを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

前記鋳型が、目的の生物体由来のものであり、前記比較工程が、少なくとも1つの候補配列を、該生物体から得られた配列を含むデータベース内の配列と比較することを含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記比較工程が、少なくとも1つの候補配列を、各々が、測定対象のポリヌクレオチドの配列の可能な択一的な配列を含む複数の比較配列を含むデータベース内の配列と比較することを含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記選択工程が、

(i) プローブファミリー名の第2の序列リストを、前記鋳型から、識別可能に標識されたコードされたプローブのファミリーの第2のコレクションを用いて得ることであって、ここで、該プローブファミリーの該第2のコレクション内のプローブファミリーは、プローブファミリーの前記第1のコレクション内のプローブファミリーと異なるようにコードされていること；

(ii) 少なくとも1つの比較配列を、該プローブファミリー名の第2の序列リストから生成させること；

(iii) 該候補配列の少なくとも1つの一部分を該比較配列の少なくとも1つの一部分と比較すること；ならびに

(iv) 所定のレベルの同一性を示すか、または該鋳型内のヌクレオチドの配列として工程(c)で比較される部分において、該比較配列とほとんどほぼ同一である候補配列を選択すること

を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 26】

前記比較される部分が単一のジヌクレオチドである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記プローブファミリー名の第2の序列リストが、単一の要素のみを含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

各プローブファミリー内のオリゴヌクレオチドプローブが、構造 $5' - (XY)(N)_k N_B^* - 3'$ または $3' - (XY)(N)_k N_B^* - 5'$ (式中、Nは任意のヌクレオチドを表し、 N_B はリガーゼによって伸長可能でない部分を表し、 $*$ は検出可能な部分を表し、XYは該プローブの拘束部分であり、ここで、XおよびYは、同一または異なるが独立しては選択されないヌクレオチドを表し、XおよびYは少なくとも2重に縮重しており、少なくとも1つのヌクレオチド間結合は切れやすい連結であり、kは1~100(両端を含む)であり、ただし、検出可能な部分は、Y上に、または $(N)_k$ の任意のヌクレオチド上に、 N_B の代わりまたはこれに加えて存在し得るものとする)

を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

前記切れやすい連結がホスホロチオレート連結である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記検出可能な部分が、切断可能なリンカーに結合されているか、光退色性であるか、またはその両方である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記切断可能なリンカーがジスルフィド結合を含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

4つの識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーが使用され、前記プローブの拘束部分の異なる配列を有するオリゴヌクレオチドプローブが、表1に示す24個のコード化の1つに従って第1、第2、第3および第4のプローブファミリーに割り当

てられる、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記検出工程が、平均 2 ビットの情報を同時に、任意の個々のヌクレオチドから 2 ビットの情報を取得することなく、少なくとも 2 つの前記鋳型内のヌクレオチドの各々から取得することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記検出工程が、2 ビット未満の情報を同時に、前記鋳型内の少なくとも 2 つのヌクレオチドの各々から取得することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

少なくとも 2 つの識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーの第 1 のコレクションを用いて、鋳型ポリヌクレオチド内のヌクレオチドの配列に関する情報を決定する方法であって、

(a) 二本鎖部分を含むプローブ - 鋳型複合体を伸長可能な末端と、および配列決定対象の単鎖部分を少なくとも 2 つの識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーと、ハイブリダイゼーションが該二本鎖部分に直接隣接する該鋳型の部分に相補的な部分を含むオリゴヌクレオチドプローブ間で起こるように接触させる工程；

(b) ハイブリダイズされた該オリゴヌクレオチドプローブを該伸長可能な末端にライゲートさせ、それにより、伸長された二本鎖を含むプローブ - 鋳型複合体を生成させる工程；

(c) 該ライゲートされたプローブと会合した標識を検出する工程；

(d) 伸長可能なプローブ末端が既に存在しない場合は、該伸長可能なプローブ末端を該伸長された二本鎖上に生成させる工程；ならびに

(e) プローブファミリー名 の 序列リスト が 得られるまで (a) ~ (d) を反復する工程

を含む、方法。

【請求項 3 6】

前記検出工程が、平均 2 ビットの情報を同時に、任意の個々のヌクレオチドから 2 ビットの情報を取得することなく、少なくとも 2 つの前記鋳型内のヌクレオチドの各々から取得することを含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記検出工程が、2 ビット未満の情報を同時に、前記鋳型内の少なくとも 2 つのヌクレオチドの各々から取得することを含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 8】

オリゴヌクレオチドプローブファミリーの第 1 のコレクションを用いて、鋳型ポリヌクレオチド内のヌクレオチドの配列に関する情報を決定する方法であって、

(a) 伸長、ライゲーション、検出および切断の連続的サイクルを行なう工程であって、ここで、該検出工程が、平均 2 ビットの情報を同時に、任意の個々のヌクレオチドから 2 ビットの情報を取得することなく、少なくとも 2 つの該鋳型内のヌクレオチドの各々から取得することを含む、工程；ならびに

(b) 工程 (a) で得られた情報を少なくとも 1 ビットのさらなる情報と組み合わせる工程

を含む、方法。

【請求項 3 9】

前記少なくとも 1 ビットのさらなる情報が、前記鋳型内のヌクレオチドの実体、候補配列を少なくとも 1 つの既知配列と比較することにより得られる情報；およびオリゴヌクレオチドプローブファミリーの第 2 のコレクションを用いて前記方法を反復することにより得られる情報からなる群より選択される項目を含む、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

一塩基多型を配列決定エラーと識別する方法であって、

(a) 請求項 2 に記載の方法を用いて複数の鋳型を配列決定する工程であって、ここ

で、該鋳型は、単一の核酸配列の重複断片を表す工程；

(b) 工程(a)で得られた配列をアライメントする工程；ならびに

(c) 該配列が第1の部分にわたって全体的に実質的に同一であり、第2の部分にわたって実質的に異なる場合(各部分は少なくとも3ヌクレオチド長を有する)、該配列間の差が配列決定エラーを表すと決定する工程を含む、方法。

【請求項41】

一塩基多型を配列決定エラーと識別する方法であって、

(a) 単一の核酸配列の重複断片を表す複数の鋳型を用いて請求項2に記載の工程(a)～(c)を行なうことにより、プローブファミリーの複数の序列リストを得る工程；

(b) 工程(a)で得られたプローブファミリーの該序列リストをアライメントし、該リストが少なくとも90%同一であるアライメント領域を得る工程；ならびに

(c) 該リストが該アライメント領域内のたった1つの位置で異なる場合、プローブファミリーの該序列リスト間の差は、配列決定エラーを表すと決定する工程；または

(d) 該リストが該アライメント領域内の2つ以上の隣接する位置で異なる場合、プローブファミリーの該序列リスト間の差は一塩基多型を表すと決定する工程を含む、方法。

【請求項42】

少なくとも2つの識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクションであって、各プローブファミリー内のプローブが拘束部分および非拘束部分を含み、該拘束部分内の各位置が少なくとも2重に縮重しており、各ファミリー内のプローブが切れやすいヌクレオチド間結合を含む、コレクション。

【請求項43】

各プローブがリガーゼによって伸長可能でない末端を含む、請求項42に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項44】

各プローブがリガーゼによって伸長可能でない末端を含み、各プローブが検出可能な部分を、前記切れやすい連結と、前記リガーゼによって伸長可能でない末端との間の位置を含む、請求項42に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項45】

前記切れやすい連結がホスホロチオレート結合である、請求項42に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項46】

2つのプローブファミリーを含む、請求項42に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項47】

3つのプローブファミリーを含む、請求項42に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項48】

4つのプローブファミリーを含む、請求項42に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項49】

4つより多くのプローブファミリーを含む、請求項42に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項50】

前記プローブが、切断可能なリンカーに結合されているか、光退色性であるか、またはその両方である検出可能な部分を含む、請求項42に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項51】

各プローブファミリー内のオリゴヌクレオチドプローブが、構造 $5' - (X)_j (N)_k N_B - 3'$ または $3' - (X)_j (N)_k N_B - 5'$ (式中、 N は任意のヌクレオシドを表し、 N_B はリガーゼによって伸長可能でない部分を表し、 $(X)_j$ は該プローブの拘束部分であり、ここで、各 X はヌクレオシドを表し、 $(X)_j$ 内のヌクレオシドは、同一または異なるが独立しては選択されず、各 X は少なくとも2重に縮重しており、 j は2～5であり、 k は1～100 (両端を含む) であり、各プローブは、検出可能な部分をプローブ末端である $(X)_j$ 内のヌクレオシド以外の位置に含み、各プローブファミリー内のプローブは同じ標識を含み、異なるプローブファミリー内のプローブは、異なる識別可能な標識を含む)

を有する、少なくとも2つの識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項52】

少なくとも1つのヌクレオシド間結合が切れやすい連結である、請求項51に記載の識別可能に標識されたコードされたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項53】

前記切れやすい連結がホスホロチオレート結合である、請求項51に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項54】

前記検出可能な部分が、切断可能なリンカーに結合されているか、光退色性であるか、またはその両方である、請求項51に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項55】

前記切断可能なリンカーがジスルフィド結合を含む、請求項54に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項56】

4つのプローブファミリーからなり、ここで、各プローブファミリー内のオリゴヌクレオチドプローブが構造 $5' - (XY)(N)_k N_B^* - 3'$ または $3' - (XY)(N)_k N_B^* - 5'$ (式中、 N は任意のヌクレオシドを表し、 N_B はリガーゼによって伸長可能でない部分を表し、 $*$ は検出可能な部分を表し、 XY は該プローブの拘束部分であり、ここで、 X および Y は、同一または異なるが独立しては選択されないヌクレオシドを表し、 X および Y は少なくとも2重に縮重しており、少なくとも1つのヌクレオシド間結合は切れやすい連結であり、 k は1～100 (両端を含む) であり、ただし、検出可能な部分は、 $(N)_k$ の任意のヌクレオシド上に、または Y 上に、 N_B の代わりまたはこれに加えて存在し得るものとする)

を有する、請求項51に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項57】

前記切れやすい連結がホスホロチオレート結合である、請求項56に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項58】

前記検出可能な部分が、切断可能なリンカーに結合されているか、光退色性であるか、またはその両方である、請求項56に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項59】

前記切断可能なリンカーがジスルフィド結合を含む、請求項58に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項60】

前記プローブの前記拘束部分の異なる配列を有するオリゴヌクレオチドプローブが、表1に示す24個のコード化の1つに従って第1、第2、第3および第4のプローブファミリーに割り当てられる、請求項56に記載の識別可能に標識されたプローブファミリーのコ

レクション。

【請求項 6 1】

各プローブファミリー内のオリゴヌクレオチドプローブが、構造 $5' - (X)_j (N)_k N_B - 3'$ または $3' - (X)_j (N)_k N_B - 5'$ (式中、N は、任意のヌクレオシドまたは無塩基残基を表し、 N_B はリガーゼによって伸長可能でない部分を表し、 $(X)_j$ は該プローブの拘束部分であり、ここで、各 X は、ヌクレオシドまたは無塩基残基を表し、ただし、 X_1 は、ヌクレオチドを表し、 $(X)_j$ 内のヌクレオシドは同一または異なるが独立しては選択されず、各 X は少なくとも 2 重に縮重しており、j は 2 ~ 5 であり、k は 1 ~ 100 (両端を含む) であり、各プローブは検出可能な部分をプローブ末端である $(X)_j$ 内のヌクレオシド以外の位置に含み、各プローブファミリー内のプローブは同じ標識を含み、異なるプローブファミリー内のプローブは、異なる識別可能な標識を含むものとする)

を有する、少なくとも 2 つの識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項 6 2】

少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合が切れやすい連結である、請求項 6 1 に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項 6 3】

前記切れやすい連結がヌクレオシドと無塩基残基との間にある、請求項 6 1 に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項 6 4】

前記検出可能な部分が、切断可能なリンカーに結合されているか、光退色性であるか、またはその両方である、請求項 6 1 に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項 6 5】

前記切断可能なリンカーがジスルフィド結合を含む、請求項 6 4 に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項 6 6】

4 つのプローブファミリーからなり、ここで、各プローブファミリー内のオリゴヌクレオチドプローブが、構造 $5' - (XY)(N)_k N_B^* - 3'$ または $3' - (XY)(N)_k N_B^* - 5'$ (式中、N は、任意のヌクレオシドまたは無塩基残基を表し、 N_B はリガーゼによって伸長可能でない部分を表し、 $*$ は検出可能な部分を表し、XY は該プローブの拘束部分であり、ここで、X および Y は、同一または異なるが独立しては選択されないヌクレオシドを表し、X および Y は少なくとも 2 重に縮重しており、少なくとも 1 つのヌクレオシド間結合は切れやすい連結であり、k は 1 ~ 100 (両端を含む) である、ただし、検出可能な部分は、 $(N)_k$ の任意のヌクレオシド上に、または Y 上に、 N_B の代わりまたはこれに加えて存在し得るものとする)

を有する、請求項 6 1 に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項 6 7】

前記切れやすい連結がヌクレオシドと無塩基残基との間にある、請求項 6 6 に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項 6 8】

前記検出可能な部分が、切断可能なリンカーに結合されているか、光退色性であるか、またはその両方である、請求項 6 6 に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項 6 9】

前記切断可能なリンカーがジスルフィド結合を含む、請求項 6 6 に記載の識別可能に標識されたオリゴヌクレオチドプローブファミリーのコレクション。

【請求項 7 0】

前記プローブの前記拘束部分の異なる配列を有するオリゴヌクレオチドプローブが、表 1 に示す 24 個のコード化の 1 つに従って第 1、第 2、第 3 および第 4 のプローブファミリーに割り当てられる、請求項 66 に記載の識別可能に標識されたプローブファミリーのコレクション。

【請求項 71】

鋳型ポリヌクレオチドにおいてヌクレオチドの配列を同定するための方法であって、

(a) 検出可能な標識で標識されたオリゴヌクレオチドプローブを該鋳型ポリヌクレオチドにライゲートさせ、伸長された二本鎖を形成することにより、初期オリゴヌクレオチドを該鋳型ポリヌクレオチドに沿って伸長させる工程であって、該オリゴヌクレオチドプローブは切れやすい連結を含む、工程；

(b) 該伸長された二本鎖において該検出可能な標識を同定する工程；

(c) ヌクレオチドの配列が決定されるまで (a) ~ (c) を反復する工程；および

(d) 同じ該鋳型ポリヌクレオチドの異なる配列に結合した初期オリゴヌクレオチドを用いて上記工程を複数回反復する工程、を含む、方法。

【請求項 72】

前記切れやすい連結がホスホロチオレート結合である、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 73】

各伸長プローブが伸長不可能な部分を一方の末端に有する、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 74】

前記同定する工程が、前記伸長不可能な部分を除去すること、および前記伸長されたオリゴヌクレオチドプローブを核酸ポリメラーゼにより、1 種類以上の標識された連鎖停止ヌクレオシド三リン酸の存在下で伸長させることを含む、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 75】

前記ライゲーション工程において伸長プローブが前記伸長可能な末端にライゲートされなかった場合はいつでも、伸長されたオリゴヌクレオチドプローブをキャッピングする工程をさらに含む、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 76】

前記生成させる工程が、前記ホスホロチオレート結合を、Ag、Hg、Cu、Mn、Zn および Cd からなる群より選択される原子を含む切断剤で切断することを含む、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 77】

前記切断剤が AgNO_3 である、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

前記工程 (d) において、前記ライゲートされたプローブは、前記鋳型ポリヌクレオチドの異なる配列に結合した初期オリゴヌクレオチドを用いる前に除去される、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 79】

前記除去する工程が、ライゲートされたプローブ、初期オリゴヌクレオチドおよび鋳型を、約 1.0 ~ 3.0 % SDS、100 ~ 300 mM NaCl および 5 ~ 15 mM 重硫酸ナトリウム (NaHSO_4) を含む水溶液と接触させることを含む、請求項 78 に記載の方法。

【請求項 80】

前記除去する工程が、ライゲートされたプローブ、初期オリゴヌクレオチドおよび鋳型を、約 2 % SDS、200 mM NaCl および 10 mM 重硫酸ナトリウム (NaHSO_4)、例えば、2 % SDS、200 mM NaCl および 10 mM 重硫酸ナトリウム (NaHSO_4) を含有する溶液と接触させることを含む、請求項 78 に記載の方法。

【請求項 81】

ホスホロチオレート結合を含むオリゴヌクレオチドプローブを含むキットであって、該プローブは検出可能な部分で標識されている、キット。

【請求項 8 2】

前記検出可能な部分が蛍光染料である、請求項 8 1 に記載のキット。

【請求項 8 3】

前記ホスホロチエート連結を切断できる薬剤をさらに含む、請求項 8 1 に記載のキット。

【請求項 8 4】

リガーゼをさらに含む、請求項 8 1 に記載のキット。

【請求項 8 5】

リガーゼおよび前記ホスホロチオレート結合を切断できる薬剤をさらに含む、請求項 8 1 に記載のキット。

【請求項 8 6】

リガーゼ、前記ホスホロチオレート結合を切断できる薬剤、ホスファターゼ、ポリメラーゼ、支持体、バッファー、熱安定性ポリメラーゼ、ヌクレオチド、エマルジョン調製のための試薬およびゲル調製のための試薬からなる群より選択される少なくとも 1 つの品目をさらに含む、請求項 8 1 に記載のキット。

【請求項 8 7】

前記プローブの異なる末端ヌクレオチドに対応するプローブが異なるスペクトルにより分離可能な蛍光染料を担持するようにホスホロチオレート結合を含む複数の蛍光標識されたオリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項 8 1 に記載のキット。