

【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22年4月8日(2010.4.8)

【公表番号】特表2006-515522(P2006-515522A)
 【公表日】平成18年6月1日(2006.6.1)
 【年通号数】公開・登録公報2006-021
 【出願番号】特願2006-503134(P2006-503134)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 A

【誤訳訂正書】
 【提出日】平成22年2月15日(2010.2.15)
 【誤訳訂正1】
 【訂正対象書類名】特許請求の範囲
 【訂正対象項目名】全文
 【訂正方法】変更
 【訂正の内容】
 【特許請求の範囲】
 【請求項1】

以下の工程を含む、核酸分子の2つの末端をシーケンシングする方法：

(a) 2つまたはそれ以上のシーケンシング・プライマーであって、1つ以外の全てのプライマーが可逆的にブロックされたプライマーを、核酸分子の1つまたは複数の一本鎖に対してハイブリダイズさせる工程；

(b) ブロックが取り除かれたプライマーからポリメラーゼ伸長によって核酸分子に少なくとも1つの塩基を組み込む工程；

(c) 該ブロックが取り除かれたプライマーのさらなる伸長を防止する工程；

(d) 可逆的にブロックされたプライマーの1つを、ブロックが取り除かれたプライマーに脱ブロックする工程；および

(e) 可逆的にブロックされたプライマーの少なくとも1つが脱ブロックされて、少なくとも2つのシーケンシング・プライマーからポリメラーゼ伸長により組み込まれた塩基から核酸分子の配列を決定するために使用されるまで、工程(b)～(d)を繰り返す工程。

【請求項2】

さらなる伸長を防止する工程(c)が、

(a) ポリメラーゼおよびdNTPで、ブロックが取り除かれたプライマーからの伸長を完了する工程；または、

(b) マンガン含有緩衝液、dNTP、および少なくとも1つのddNTP中でポリメラーゼによる伸長を終結する工程；または、

(c) 化学的に伸長を終結する工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

工程(d)の前に、該ポリメラーゼ、dNTP、およびddNTPを除去する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】

少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーが、PO₄基、チオ基、およびホスホロチオール基からなる群より選択される化学的部分によってブロックされる、請求項1記

載の方法。

【請求項 5】

少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーが、エキソヌクレアーゼと該プライマーを接触させることによって脱ブロックすることができる3'ミスマッチ末端を有する、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーが、ループを形成し、かつ核酸分子にハイブリダイズしない1つまたは複数の非相補的な塩基を有し、該1つまたは複数の塩基が、該可逆的にブロックされたプライマーの5'または3'末端以外であり、および該可逆的にブロックされたプライマーは、その3'末端にジデオキシヌクレオチドを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーが、該1つまたは複数の非相補的な塩基のエンドヌクレアーゼ消化によってブロックが取り除かれて、該1つまたは複数の非相補的な塩基にニックを形成する、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

工程(b)が、鎖置換ポリメラーゼによる該ニックでのポリメラーゼ伸長を含む、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーが、5'-N₁UX-3'の配列を有し、Nが、任意の長さのオリゴヌクレオチド配列を表し、Uがウラシルであり、およびXがジデオキシ-ヌクレオチドである、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

可逆的にブロックされたプライマーが、ウラシルDNAグリコシラーゼおよびAPエンドヌクレアーゼによってブロックが取り除かれて、伸長可能な3'末端を有するブロックが除かれたプライマーを生じる、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーが、5'-N₁YZ-3'の配列を有し、Nが任意の長さのオリゴヌクレオチド配列を表し、Yが修飾されたヌクレオチドであり、およびZが単一のヌクレオチド塩基を表し；かつ該修飾されたヌクレオチドが、ホルムアミドピリミジン(fapy)-DNAグリコシラーゼによって脱ブロックすることができる、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

修飾塩基が、8-オキソグアニン、8-オキソアデニン、fapy-グアニン、メチル-fapy-グアニン、fapy-アデニン、アフマトキシンB₁-fapy-グアニン、5-ヒドロキシシトシン、および5-ヒドロキシ-ウラシルからなる群より選択される、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

核酸分子が、ゲノムDNA、cDNA、またはエピソームDNAである、請求項1記載の方法。

【請求項 14】

少なくとも1つのシーケンシング・プライマーが、核酸のセンス鎖にハイブリダイズし、かつ少なくとも1つのシーケンシング・プライマーが、工程(a)の核酸分子のアンチセンス鎖にハイブリダイズする、請求項1記載の方法。

【請求項 15】

ポリメラーゼ伸長が、1~250の塩基の間である、請求項1記載の方法。

【請求項 16】

試験管、ピコタイタープレートの反応チャンバー、アレイの反応チャンバー、および油中水型エマルジョンのマイクロカプセル化された反応チャンバーからなる群より選択される反応容器で行われる、請求項1記載の方法。

【請求項 17】

核酸分子が、100~1000の間の塩基対の長さである、請求項1記載の方法。

【請求項 18】

少なくとも1つの該核酸分子の鎖または少なくとも1つの該プライマーが固体担体に付着されている、請求項1記載の方法。

【請求項 19】

少なくとも1つの該核酸分子の鎖が固体担体に結合されている、請求項1記載の方法。

【請求項 20】

少なくとも1つの該プライマーが、固体担体に固定されて固定されたプライマーを形成し、および該少なくとも1つの鎖が、該固定されたプライマーとのハイブリダイゼーションによって固体担体に結合される請求項18記載の方法。

【請求項 21】

固体担体が、球面可動性の固体担体である、請求項20記載の方法。

【請求項 22】

少なくとも1つのプライマーが検出可能なラベルを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 23】

ポリメラーゼ伸長により配列を決定する方法が、ピロリン酸シーケンシング法またはサンガーシーケンシング法を用いて行われる、請求項1記載の方法。

【請求項 24】

脱ブロック工程が、可逆的にブロックされたプライマーを該可逆的にブロックされたプライマー上の PO_4 基を除去するための薬剤と接触させることを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 25】

薬剤が、ポリヌクレオチドキナーゼおよびアルカリホスファターゼからなる群より選択される、請求項24記載の方法。

【請求項 26】

該ポリメラーゼが、3'から5'エキソヌクレアーゼ活性を欠いている、請求項1記載の方法。

【請求項 27】

核酸分子の第1の末端に近接する第1の核酸配列、および該核酸分子の第2の末端に近接する第2の核酸配列を決定する、請求項1記載の方法。

【請求項 28】

以下の工程を含む、核酸分子の2つの末端をシーケンシングする方法であって、該核酸分子は、第1及び第2のシーケンシング・プライマーからポリメラーゼ伸長により組み込まれた塩基からシーケンシングされる方法：

(a) 核酸分子の第1の鎖に対して第1のブロックが取り除かれたシーケンシング・プライマーをハイブリダイズさせる工程；

(b) 核酸分子の第2の鎖に対して第2のブロックされたシーケンシング・プライマーをハイブリダイズさせる工程；

(c) 該第1のブロックが取り除かれたプライマーをポリメラーゼで伸長することによって該第1の鎖に少なくとも1つの塩基を組み込む工程；

(d) 該ブロックが取り除かれたプライマーのさらなる伸長を防止する工程；

(e) 第2のシーケンシング・プライマーを脱ブロックする工程；および、

(f) 該第2のプライマーをポリメラーゼで伸長することによって該第2の鎖に少なくとも1つの塩基を組み込む工程。

【請求項 29】

さらなる伸長を防止する工程(d)が、

(a) ポリメラーゼおよびdNTPで、ブロックが取り除かれたプライマーからの伸長を完了する工程；または、

(b) マンガン含有緩衝液、dNTP、および少なくとも1つのddNTP中でポリメラーゼによる伸長を終結する工程；または、

(c) 化学的に伸長を終結する工程、を含む、請求項28記載の方法。

【請求項 30】

防止工程の後に、該ポリメラーゼ、dNTP、およびddNTPを除去する工程をさらに含む請求項29記載の方法。

【請求項 31】

第2のプライマーが、 PO_4 基、チオ基、およびホスホロチオール基からなる群より選択される化学的部分によってブロックされる、請求項28記載の方法。

【請求項 32】

核酸分子の第1の末端に近接する第1の核酸配列を少なくとも決定し、該核酸分子の第2の末端に近接する第2の核酸配列を決定する、請求項28記載の方法。

【請求項 33】

以下の工程を含む、複数の座位でのDNA試料の分子ハプロタイプをシーケンシングにより決定する方法：

(a) DNA試料中の複数の座位に隣接した2つまたはそれ以上のシーケンシング・プライマーをハイブリダイズさせ、ここで1つ以外の全てのプライマーは、可逆的にブロックされたプライマーであり、かつそれぞれの座位は、ハプロタイプを決定する核酸配列を含む工程；

(b) ブロックが取り除かれたプライマーからのポリメラーゼ伸長によって1つの座位のハプロタイプを決定する工程；

(c) 該ブロックが取り除かれたプライマーのさらなる伸長を防止する工程；

(d) 可逆的にブロックされたプライマーの1つを、ブロックが取り除かれたプライマーに脱ブロックする工程；および

(e) 少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーが脱ブロックされて、少なくとも2つのシーケンシング・プライマーからポリメラーゼ伸長により組み込まれた塩基から分子ハプロタイプを決定するために使用されるまで、工程(b)～(d)を繰り返す工程。

【請求項 34】

さらなる伸長を防止する工程(c)が、

(a) ポリメラーゼおよびdNTPで、ブロックが取り除かれたプライマーからの伸長を完了する工程；または、

(b) マンガン含有緩衝液、dNTP、および少なくとも1つのddNTP中でポリメラーゼによる伸長を終結する工程；または、

(c) 化学的に伸長を終結する工程、を含む、請求項33記載の方法。

【請求項 35】

防止工程の後に、該ポリメラーゼ、dNTP、およびddNTPを除去する工程をさらに含む、請求項34記載の方法。