

【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25年9月5日(2013.9.5)

【公表番号】特表2013-500021(P2013-500021A)

【公表日】平成25年1月7日(2013.1.7)

【年通号数】公開・登録公報2013-001

【出願番号】特願2012-521908(P2012-521908)

【国際特許分類】

C 12 Q	1/68	(2006.01)
G 01 N	35/02	(2006.01)
G 01 N	35/00	(2006.01)
G 01 N	35/04	(2006.01)
C 12 M	1/00	(2006.01)

【F I】

C 12 Q	1/68	Z N A A
G 01 N	35/02	A
G 01 N	35/00	D
G 01 N	35/04	A
C 12 M	1/00	A

【手続補正書】

【提出日】平成25年7月16日(2013.7.16)

【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】

ポリヌクレオチド分子のバイロシークエンシングを行う方法であって、次の各工程：  
その表面の一以上の個別領域にポリヌクレオチド分子を固定化するようになっている回  
転可能プラットフォームを用意する工程と、

該回転可能プラットフォームの該表面の該個別領域の一以上に該ポリヌクレオチド分子  
を固定化させる工程と、

該プラットフォームの外部の位置から該各個別領域に一連のバイロシークエンシング試  
薬を分注する工程であって、該分注工程の一以上又は全ての後に、該試薬のいかなる残存  
分又は未反応分も該各個別領域から実質的に遠心力で除去されて該プラットフォームから  
除去されるように該プラットフォームを充分に回転させる工程と、

ピロリン酸基の存在を調べる工程と

該分注工程及び該調べる工程を繰り返し、該ポリヌクレオチド分子を配列決定する工程  
と、  
を含む方法。

【請求項2】

前記回転可能プラットフォームが実質的に円形であり、2～500個の個別領域が該円  
形プラットフォームの外周囲に配置されている、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記回転可能プラットフォームの直径が50～500mmであり、該プラットフォーム  
の厚さが1～4mmであり、前記個別領域は実質的に平坦であるか、又は体積が0.5～  
100μLであるか若しくは深さが0.5～3mmの実質的に浅いウェルである、請求項

1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記回転可能プラットフォームが、ポリカーボネート、ポリスチレン、高衝撃ポリスチレン、ポリエチレン及びポリプロピレンからなる群から選択されるプラスチック材料で形成されているか、又はガラス若しくは石英から形成されている、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記一以上の個別領域は前記回転可能プラットフォーム上の被覆であり、該被覆は前記ポリヌクレオチド分子を固定化するようになっている、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記プラットフォームの前記各個別領域に、前記ポリヌクレオチド分子が化学的に吸着されるか、又は共有結合、イオン結合若しくは水素結合されるか、あるいは、該プラットフォームの該各個別領域に、該ポリヌクレオチド分子がファンデルワールス力によって固定化される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記回転可能プラットフォームの回転時に該プラットフォームの表面から除去又は遠心分離される廃棄流体を受けるための、該プラットフォームの外周に配置されたトラフを更に有する、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記パイロシークエンシング試薬は、一種以上の酵素、基質、A、T、G及び／若しくはCヌクレオチド、又は該ヌクレオチドそれぞれの適切なアナログ、洗浄試薬、ならびにリンス試薬からなる群から選択される、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記回転可能プラットフォームの回転が400～1000rpmの速度で行われて、前記試薬のいかなる残存分又は未反応分も該プラットフォームから実質的に遠心力で除去され、かつ該試薬を分注しながら該回転可能プラットフォームを10～200rpmの速度で回転させる工程を更に含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記ポリヌクレオチド分子がDNA若しくはRNA、又はそれらの改変体である、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

前記ポリヌクレオチド分子がビオチン化されており、前記個別領域が該ビオチン化ポリヌクレオチド分子を結合させるためのアビジン若しくはストレプトアビジン、又はそれらのアナログを含む、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

前記一連のパイロシークエンシング試薬を分注する工程は、  
a) 各ヌクレオチド又はそのアナログを所望又は所定の順序で別々にかつ逐次的に添加すること、又は  
b) A + T + G + Cヌクレオチド又はこれらの所定又は所望のサブセットを混合物として添加し、かつ必要に応じて該添加を一回以上繰り返すこと、  
を含む、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記ピロリン酸基の存在を調べる工程が、光シグナルを検出する工程を含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

前記ポリヌクレオチド分子が二重鎖ポリヌクレオチド分子であり、かつ該二重鎖ポリヌクレオチド分子をアニーリング工程前に変性させる工程と、変性後に未結合の鎖を遠心力で除去する工程とを更に含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

前記変性工程が前記二重鎖ポリヌクレオチド分子を加熱して変性させること、又は該二重鎖ポリヌクレオチド分子を高pHに曝露することを含む、請求項14に記載の方法。

**【請求項16】**

前記個別領域を洗浄試薬、及び必要に応じて酵素処理により洗浄する工程を更に含む、請求項1~15のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項17】**

前記洗浄工程が一以上の分注工程の後に行われる、請求項16に記載の方法。

**【請求項18】**

前記酵素がDNAポリメラーゼ、ATPスルフリラーゼ、ルシフェラーゼ及びアピラーゼのうちの一以上を含む、請求項8に記載の方法。

**【請求項19】**

前記基質がアデノシン5'ホスホ硫酸(APS)及び/又はルシフェリンを含む、請求項8に記載の方法。

**【請求項20】**

請求項1~19のいずれか1項に記載の方法で使用される、ポリヌクレオチド分子のパイロシークエンシングを行うためのキットであって、その表面の一以上の個別領域にポリヌクレオチド分子を固定化するようになっている回転可能プラットフォームと、一以上のパイロシークエンシング試薬とを含む、キット。