

【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 12 月 26 日 (2019.12.26)

【公表番号】特表 2019-526225 (P2019-526225A)

【公表日】令和 1 年 9 月 19 日 (2019.9.19)

【年通号数】公開・登録公報 2019-038

【出願番号】特願 2018-556287 (P2018-556287)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/54 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6869 Z N A Z

C 1 2 N 9/12

C 1 2 N 15/54

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 11 月 12 日 (2019.11.12)

【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】

試験ヌクレオチドが、プライマー結合鑄型核酸のプライマーのすぐ下流の鑄型鎖にある次の塩基と相補的な塩基を含む次の正しいヌクレオチドであるかどうかを決定する方法であって、

(a) 前記プライマー結合鑄型核酸を、機能欠損 DNA ポリメラーゼ及び前記試験ヌクレオチドを含む第 1 の反応混合物と接触させ、

それによって、前記試験ヌクレオチドが次の正しいヌクレオチドである場合は、前記プライマー結合鑄型核酸、前記機能欠損 DNA ポリメラーゼ、及び前記試験ヌクレオチドを含む複合体が形成され、かつ

前記機能欠損 DNA ポリメラーゼが実質的にマグネシウム触媒ホスホジエステル結合を形成できない工程であって、

前記機能欠損 DNA ポリメラーゼが、モチーフ A 中に配列番号 1 2 を含むポリペプチド配列、またはモチーフ C 中に配列番号 1 4 を含むポリペプチド配列のいずれかを含む工程；

(b) 前記プライマー結合鑄型核酸の前記プライマーへの前記試験ヌクレオチドの化学的取り込みを伴わずに、前記試験ヌクレオチドの存在下で、前記プライマー結合鑄型核酸と前記機能欠損 DNA ポリメラーゼとの結合を測定する工程；ならびに

(c) 工程 (b) の結果から、前記試験ヌクレオチドが次の正しいヌクレオチドであるかどうかを決定する工程を含む、方法。

【請求項 2】

前記機能欠損 DNA ポリメラーゼが、2 価マンガニオンの存在下でホスホジエステル結合の形成を触媒し、前記第 1 の反応混合物が、ホスホジエステル結合の形成を促進する濃度の 2 価マンガニオンを含まない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記試験ヌクレオチドが外部標識を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記試験ヌクレオチドの外部標識が蛍光部分を有し、工程 (b) が、前記試験ヌクレオチドの前記蛍光部分が生成する蛍光シグナルを測定することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記機能欠損 DNA ポリメラーゼが外部標識を有し、工程 (b) が前記機能欠損 DNA ポリメラーゼの前記外部標識を検出することを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記機能欠損 DNA ポリメラーゼの前記外部標識が蛍光部分を有し、工程 (b) が、前記機能欠損 DNA ポリメラーゼの前記蛍光部分が生成する蛍光シグナルを測定することを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記プライマーが遊離 3' ヒドロキシル部分を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

工程 (b) の後に、前記第 1 の反応混合物を、第 2 のポリメラーゼ及び第 2 の種類のヌクレオチドを含む第 2 の反応混合物に置き換え、次いで前記第 2 の種類のヌクレオチドを前記プライマー結合鋳型核酸の前記プライマーに取り込む工程をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記第 2 の種類のヌクレオチドが、可逆的ターミネーター部分を含む可逆的ターミネーターヌクレオチドであり、前記可逆的ターミネーターヌクレオチドの取り込みにより、ブロックされたプライマー結合鋳型核酸分子が生成される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ブロックされたプライマー結合鋳型核酸分子から前記可逆的ターミネーター部分を除去して、前記プライマー結合鋳型核酸分子を再生する工程をさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記プライマー結合鋳型核酸の代わりに前記ブロックされたプライマー結合鋳型核酸分子を用いて工程 (a) ~ (c) を繰り返すことをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

工程 (a) ~ (c) を繰り返すことをさらに含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記機能欠損 DNA ポリメラーゼのポリペプチド配列が、381 アミノ酸位がグルタミン酸で置換されている以外は配列番号 1 であるか、または 558 アミノ酸位がグルタミン酸で置換されている以外は配列番号 1 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記機能欠損 DNA ポリメラーゼのポリペプチド配列が、364 アミノ酸位がグルタミン酸で置換されている以外は配列番号 2 であるか、または 551 アミノ酸位がグルタミン酸で置換されている以外は配列番号 2 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記機能欠損 DNA ポリメラーゼのポリペプチド配列が、355 アミノ酸位がグルタミン酸で置換されている以外は配列番号 3 であるか、または 532 アミノ酸位がグルタミン酸で置換されている以外は配列番号 3 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記第 1 の反応混合物が 2 価のマグネシウムイオンを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記第 1 の反応混合物が Mg^{2+} イオンを含み、前記プライマーが 3' ヒドロキシル部分を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

プライマー結合鑄型核酸分子に取り込まれるべき次の正しいヌクレオチドを同定するためのキットであって、前記キットは、

(a) 前記プライマー結合鑄型核酸及び前記次の正しいヌクレオチドとの三元複合体を形成するが、実質的にマグネシウム触媒ホスホジエステル結合を形成できない機能欠損 DNA ポリメラーゼであって、前記機能欠損 DNA ポリメラーゼが、モチーフ A 中に配列番号 12 を含むポリペプチド配列、またはモチーフ C 中に配列番号 14 を含むポリペプチド配列のいずれかを含む機能欠損 DNA ポリメラーゼ；

(b) 4 種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸分子；及び

(c) 4 種類の可逆的ターミネーターヌクレオチドの 1 つ以上の容器をパッケージにした組み合わせを含む、キット。

【請求項 19】

前記 4 種の可逆的ターミネーターヌクレオチドが、4 種の非蛍光性可逆的ターミネーターヌクレオチドである、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

前記機能欠損 DNA ポリメラーゼが検出可能な標識を含む、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 21】

前記 4 種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸分子のうち少なくとも 1 つが検出可能な標識を含む、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 22】

前記機能欠損 DNA ポリメラーゼが、マンガンイオンの存在下でホスホジエステル結合形成を触媒する、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 23】

前記 4 種類の可逆的ターミネーターヌクレオチドから可逆的ターミネーター部分を除去する化学試薬をさらに含む、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 24】

前記 4 種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸分子のそれぞれが、マグネシウム依存性ポリメラーゼ活性を含む DNA ポリメラーゼによって取り込み可能である、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 25】

前記プライマー結合鑄型核酸分子に前記次の正しいヌクレオチドを取り込む第 2 の DNA ポリメラーゼをさらに含む、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 26】

前記第 2 の DNA ポリメラーゼが、前記 4 種類の可逆的ターミネーターヌクレオチドの 1 つを前記次の正しいヌクレオチドとして取り込む、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 27】

フローセルをさらに含む、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 28】

前記 4 種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸分子が、dATP、dGTP、dCTP、及び dTTP または dUTP のいずれかを含み、前記 4 種類の可逆的ターミネーターヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、及び dTTP または dUTP のいずれかの類似体を含み、各類似体は 3' - ONH₂ 可逆的ターミネーター部分を含む、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 29】

配列番号 12 を含む前記ポリペプチド配列が、355 アミノ酸位がグルタミン酸で置換されている以外は配列番号 3 を含む、請求項 18 ~ 28 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 30】

配列番号 14 を含む前記ポリペプチド配列が、532 アミノ酸位がグルタミン酸で置換されている以外は配列番号 3 を含む、請求項 18 ~ 28 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 3 1】

ポリペプチド配列を含む変異型 DNA ポリメラーゼであって、前記ポリペプチド配列が モチーフ A 中に配列番号 1 2 を含み、
前記変異型 DNA ポリメラーゼが、プライマー結合鋳型核酸分子及び同種ヌクレオチドとの三元複合体を形成し、
前記変異型 DNA ポリメラーゼが、実質的にマグネシウム触媒ホスホジエステル結合を形成できない、変異型 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 3 2】

前記機能欠損 DNA ポリメラーゼが、2 価マンガンイオンの存在下でホスホジエステル結合形成を触媒する、請求項 3 1 に記載の変異型 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 3 3】

前記変異型 DNA ポリメラーゼの前記ポリペプチド配列が、
3 8 1 アミノ酸位がグルタミン酸で置換されている以外は配列番号 1、
3 6 4 アミノ酸位がグルタミン酸で置換されている以外は配列番号 2、及び
3 5 5 アミノ酸位がグルタミン酸で置換されている以外は配列番号 3 からなる群から選択される、請求項 3 1 に記載の変異型 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 3 4】

それに結合したレポーター部分をさらに含む、請求項 3 3 に記載の変異型 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 3 5】

ポリペプチド配列を含む変異型 DNA ポリメラーゼであって、前記ポリペプチド配列が モチーフ C 中に配列番号 1 4 を含み、
前記変異型 DNA ポリメラーゼが、プライマー結合鋳型核酸分子及び同種ヌクレオチドとの三元複合体を形成し、
前記変異型 DNA ポリメラーゼが、実質的にマグネシウム触媒ホスホジエステル結合を形成できない、変異型 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 3 6】

前記変異型 DNA ポリメラーゼの前記ポリペプチド配列が、
5 5 8 アミノ酸位がグルタミン酸で置換されている以外は配列番号 1、
5 4 1 アミノ酸位がグルタミン酸で置換されている以外は配列番号 2、及び
5 3 2 アミノ酸位がグルタミン酸で置換されている以外は配列番号 3 からなる群から選択される、請求項 3 5 に記載の変異型 DNA ポリメラーゼ。

【請求項 3 7】

それに結合したレポーター部分をさらに含む、請求項 3 6 に記載の単離された変異型 DNA ポリメラーゼ。