

【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 12 Q 1/6869 (2018.01)

C 12 N 9/12 (2006.01)

C 12 N 15/54 (2006.01)

【F I】

C 12 Q 1/6869 Z N A Z

C 12 N 9/12

C 12 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価マンガンイ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価マンガンイオンを含まない、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錠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ヌクレオチドであり、前記可逆的ターミネータ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錠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錠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錠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錠型核酸の代わりに前記ブロックされたプライマー結合錠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<sup>2+</sup>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、dTTP、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、dTTP、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'-ONH<sub>2</sub>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12を含み、

前記変異型DNAポリメラーゼが、プライマー結合鑄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、  
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、  
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、及び  
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14を含み、  
前記変異型DNAポリメラーゼが、プライマー結合鑄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、  
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、  
541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  
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。