

【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1月28日(2010.1.28)

【公表番号】特表2009-519041(P2009-519041A)
 【公表日】平成21年5月14日(2009.5.14)
 【年通号数】公開・登録公報2009-019
 【出願番号】特願2008-545768(P2008-545768)
 【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

【手続補正書】

【提出日】平成21年12月2日(2009.12.2)

【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】

核酸分子を配列決定するためのプローブであって、

標的核酸分子に結合すること、および相補的ヌクレオチドが相補的核酸分子に組み込まれるように、伸長する前記相補的核酸分子の合成を促進することができる、活性部位を有する重合剤と、

前記重合剤上で離間している1つまたは複数の分子リンカーであって、前記リンカーのうち1つ以上は、前記標的核酸分子内の相補的ヌクレオチドに特異的に結合することによって、前記リンカーから分離することなく、前記標的核酸分子に可逆的に結合することができる化学的部分を有しており、前記標的核酸分子内の相補的ヌクレオチドと前記リンカー上の前記化学的部分との特異的結合は、相補的ヌクレオチドと前記リンカー上の前記化学的部分との対合を示す特性シグナルの放出によって示される、1つまたは複数の分子リンカー

とを含む、プローブ。

【請求項2】

前記化学的部分がヌクレオチド類似体を含む、請求項1記載のプローブ。

【請求項3】

前記ヌクレオチド類似体が非加水分解性ヌクレオチド類似体を含む、請求項2記載のプローブ。

【請求項4】

前記非加水分解性ヌクレオチド類似体が、非加水分解性ヌクレオチド三リン酸類似体を含む、請求項2記載のプローブ。

【請求項5】

前記非加水分解性ヌクレオチド三リン酸類似体が、非加水分解性である - 結合を有する非加水分解性ヌクレオチド三リン酸類似体を含む、請求項4記載のプローブ。

【請求項6】

前記化学的部分がモノヌクレオチドである、請求項1記載のプローブ。

【請求項7】

前記モノヌクレオチドが、塩基、3'リボース炭素、2'リボース炭素、またはリン酸上の前記リンカーに結合される、請求項6記載のプロープ。

【請求項8】

前記1つまたは複数の分子リンカーが、少なくとも4つの独立したリンカーを含み、それぞれが、前記標的核酸分子内の異なるヌクレオチドに特異的に結合することができる、異なるヌクレオチド類似体を有する、請求項2記載のプロープ。

【請求項9】

前記1つまたは複数の分子リンカーが分岐構造を形成し、それぞれの分岐が、前記標的核酸分子内の異なるヌクレオチドに特異的に結合することができる異なるヌクレオチド類似体を有する、請求項2記載のプロープ。

【請求項10】

前記分岐構造が少なくとも4つの分岐を含み、それぞれの分岐が、前記標的核酸分子内の異なるヌクレオチドに特異的に結合することができる異なるヌクレオチド類似体を有する、請求項9記載のプロープ。

【請求項11】

前記重合剤がタグに関連し、前記ヌクレオチド類似体のそれぞれが、前記リンカーが有する特定のヌクレオチド類似体を識別するタグに関連し、前記重合剤に関連する前記タグと、前記ヌクレオチド類似体に関連する前記タグとの相互作用が、前記標的核酸分子内の相補的ヌクレオチドとの前記リンカー上の前記ヌクレオチド類似体の対合を示す前記特性シグナルの放出を誘発する、請求項2記載のプロープ。

【請求項12】

前記重合剤に関連する前記タグが、それぞれのヌクレオチド類似体に関連する前記タグにより供与体-受容体の対を形成し、それによって、前記供与体-受容体の対の相互作用が、前記特性シグナルの放出を刺激する、請求項11記載のプロープ。

【請求項13】

前記リンカーが有する特定のヌクレオチド類似体を識別する前記タグのそれぞれが、一意的な放出シグナルを放出する1つまたは複数のフルオロフォアを含む、請求項11記載のプロープ。

【請求項14】

前記1つまたは複数の分子リンカーが4つの分子リンカーを含み、それぞれが、前記リンカーから分離することなく前記標的核酸分子の鑄型鎖に可逆的に結合することができる異なる化学的部分と、それぞれの化学的部分に関連する受容体タグとを有し、ここで前記受容体タグが、前記リンカーが有する前記特定の化学的部分を識別し、前記重合剤が供与体タグに関連し、前記標的核酸分子への前記化学的部分の可逆的結合が、前記リンカーが有する前記化学的部分の識別性を示す前記受容体タグの特性シグナルの放出を誘発するように、前記供与体および受容体タグを十分に接近させる、請求項1記載のプロープ。

【請求項15】

前記1つまたは複数の分子リンカーが、前記分子リンカーの絡み合いを抑制するために十分な距離をおいて前記重合剤の周囲に離間し、前記分子リンカーが、前記重合剤の前記活性部位に到達するほど十分に長い、請求項1記載のプロープ。

【請求項16】

前記分子リンカーが線状ポリマーを含む、請求項15記載のプロープ。

【請求項17】

前記1つまたは複数の分子リンカーが、前記標的核酸分子の非存在下で、前記重合剤および前記化学的部分との実質上の絡み合いを回避するように、前記重合剤および前記化学的部分を互いに十分な距離をおいて維持する、請求項1記載のプロープ。

【請求項18】

前記分子リンカーが、テザー (t e t h e r)、分子ロッド、またはそれらの組み合わせを含む、請求項1記載のプロープ。

【請求項19】

前記分子ロッドが、少なくとも10ヌクレオチドの二本鎖DNA(dsDNA)を含む、請求項18記載のプロープ。

【請求項20】

十分な剛性を有する前記分子リンカーが、分子ロッドによって連結される少なくとも2つのテザーを含む、請求項19記載のプロープ。

【請求項21】

前記テザーが長さが187未満である、請求項18記載のプロープ。

【請求項22】

前記重合剤が、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、リボソーム、または逆転写酵素を含む、請求項1記載のプロープ。

【請求項23】

標的核酸分子に結合すること、および相補的ヌクレオチドが相補的核酸分子に組み込まれるように、伸長する前記相補的核酸分子の合成を促進することができる活性部位と、

絡み合いを抑制するために前記重合剤上で離間している1つまたは複数の分子リンカーであって、それぞれのリンカーが、前記標的核酸分子内の相補的ヌクレオチドに特異的に結合することによって、前記リンカーから分離することなく核酸分子の前記鑄型鎖に可逆的に結合することができる異なる非加水分解性ヌクレオチド類似体を有している、1つまたは複数の分子リンカーと、

核酸分子の前記鑄型鎖に可逆的に結合することができる前記リンカーが有する前記非加水分解性ヌクレオチド類似体を識別するそれぞれの非加水分解性ヌクレオチド類似体に関連するタグと、

前記リンカーが有する前記非加水分解性ヌクレオチド類似体を識別する特性シグナルを放出するために、前記非加水分解性ヌクレオチド類似体に関連する前記タグと相互に作用する前記ポリメラーゼに関連するタグ

とを含む、重合剤。

【請求項24】

標的核酸分子の核酸配列を決定する方法であって、

オリゴヌクレオチドプライマーと、前記標的核酸分子内の相補的ヌクレオチドとハイブリダイズし、前記鑄型核酸分子に可逆的に結合する前記化学的部分を置換することによって、伸長している核酸分子に組み込むことができる加水分解性ヌクレオチドの混合物との存在下で、前記標的核酸分子を請求項1記載のプロープに曝露する工程と、

相補的ヌクレオチドと前記分子リンカー上の前記化学的部分との対合を示す複数の前記特性シグナルの放出を含む、一連のシグナルの放出を検出する工程

とを含む、方法。

【請求項25】

前記重合剤がタグに関連し、前記化学的部分のそれぞれもまた、前記リンカーが有する特定の化学的部分を識別するタグに関連し、前記重合剤に関連する前記タグと、前記化学的部分に関連する前記タグとの相互作用が、相補的ヌクレオチドと前記リンカー上の前記化学的部分との対合を示す前記特性シグナルの放出を誘発する、請求項24記載の方法。

【請求項26】

一連のシグナルの前記放出が核酸配列に変換される、請求項24記載の方法。

【請求項27】

前記プロープが基板に固定されている、請求項24記載の方法。

【請求項28】

前記標的核酸分子または前記オリゴヌクレオチドプライマーが基板に固定されている、請求項24記載の方法。

【請求項29】

実質上同時に複数の配列決定反応を行う工程と、前記複数の配列決定反応から一連のシグナルを検出する工程とを含む、請求項24記載の方法。

【請求項30】

複数の重合剤、標的核酸分子、またはオリゴヌクレオチドプライマーが、所定のパターンで前記基板に直接的または間接的に固定され、一連のシグナルを検出する工程が、そのようなパターン内の所定の位置に対応する核酸分子と前記シグナルとを相関させる工程をさらに含む、請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 1】

前記重合剤、標的核酸分子、またはオリゴヌクレオチドプライマーが、規則的なアレイにエッチングされたチャンネル内で、前記所定のパターンで前記基板に固定される、請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 2】

前記標的核酸分子が、対象から取得された生体試料に存在している、請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 3 3】

高ストリンジェンシー条件下で前記標的核酸配列に特異的にハイブリダイズするプライマーをさらに含むプローブであって、前記プライマーが、分子リンカーを介して前記重合剤に結合される、請求項 1 記載のプローブ。

【請求項 3 4】

前記ヌクレオチド類似体に関連する前記タグが、エラーの検出および修正を可能にする、コード化したフルオロフォアの集まりである、請求項 1 1 記載のプローブ。