

【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6部門第1区分
 【発行日】平成23年4月7日(2011.4.7)

【公表番号】特表2010-513869(P2010-513869A)
 【公表日】平成22年4月30日(2010.4.30)
 【年通号数】公開・登録公報2010-017
 【出願番号】特願2009-541416(P2009-541416)
 【国際特許分類】

G 0 1 N 27/414 (2006.01)
 G 0 1 N 37/00 (2006.01)
 C 1 2 M 1/00 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 27/30 3 0 1 U
 G 0 1 N 27/30 3 0 1 P
 G 0 1 N 27/30 3 0 1 X
 G 0 1 N 27/30 3 0 1 Y
 G 0 1 N 27/30 3 0 1 W
 G 0 1 N 37/00 1 0 2
 C 1 2 M 1/00 A
 C 1 2 N 15/00 Z N A A

【手続補正書】
 【提出日】平成22年12月14日(2010.12.14)
 【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】

核酸シーケンシングのための方法であって、
 複数のテンプレート核酸、酵素およびシーケンシングプライマを、それぞれの反応体積
 (reaction volume) が少なくとも1つの電界効果トランジスタを有する少なくとも1つ
 のセンサアレイを伴うものである複数の反応体積内に配置すること、
 既知のヌクレオチドを、順番に複数の反応体積に導入すること、ここにおいて反応体積の
 第一のものについてはシーケンシングプライマが既知のヌクレオチドを取り込んだ酵素
 によって伸長されたものであり、
 第一の反応体積におけるヌクレオチドの取り込みに応答する信号を発生させること、この
 信号はヌクレオチドの取り込みが生じる対応するそれぞれの反応体積における最初のセン
 サの電界効果トランジスタの電流変化に対応した信号であり、
 テンプレート核酸配列における対応するヌクレオチドを決定するために第一の反応体積に
 おける信号を解読すること、
 を含む、前記方法。

【請求項2】

対応するそれぞれの反応体積におけるテンプレート核酸配列は、既知の異なったヌクレ
 オチドを順番に導入することにより発生させた信号を解読することにより決定するもので
 ある、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

既知のヌクレオチドの導入に先立って、複数の反応体積から未取り込みのヌクレオチドを洗浄することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

それぞれの反応体積におけるシーケンシングプライマーのヌクレオチド伸長 (nucleotide extension) に応答して発生した信号の少なくとも一部は、既知のヌクレオチドのそれぞれの逐次導入の間に取り込まれた複数のヌクレオチドを表すものであり、それら発生した信号は、テンプレート核酸配列中の対応するヌクレオチドの種類と数との両方を知るために解読されるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

酵素は、各テンプレート核酸と少なくとも部分的にハイブリダイズするシーケンシングプライマーを伸長することができる、ポリメラーゼを含むものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

反応体積は、反応チャンバまたはマイクロウェルを含むものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの電界効果トランジスタは、シーケンシングプライマーの酵素伸長に関連した少なくとも 1 つの化学的生成物を検出する、化学感応性電界効果トランジスタを含むものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

シーケンシングプライマーの酵素伸長に関連した少なくとも 1 つの化学的生成物は、水素イオンを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

シーケンシングプライマーの酵素伸長に関連した少なくとも 1 つの化学的生成物は、無機ピロリン酸 (P P i) を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

核酸配列を決定するための装置であって、

半導体基板から形成されたセンサアレイであって、そのセンサアレイのセンサは、フローティングゲートを有していて、フローティングゲートにおいてトラップされた電荷に少なくとも部分的に依存する閾値電圧を有する電界効果トランジスタを含み、その電界効果トランジスタは閾値電圧に依存した少なくとも 1 つの出力信号を提供するものであり、センサの閾値電圧は近傍の伸長反応生成物の特定の値に類似した応答を提供するものであるセンサアレイと、

半導体基板上に設けられた複数の反応体積であって、各反応体積は、別々の核酸伸長反応を収納することができ、かつ、センサアレイの少なくともひとつのセンサに近接して設けられている反応体積と、

半導体基板に付属して設けられた制御回路であって、各反応体積の伸長反応生成物の相対的分量を反映した電界効果トランジスタからの出力信号を収集するためにセンサアレイと結合され、それら信号から決定がなされる制御回路とを含む、前記装置。

【請求項 11】

伸長反応性生物は水素イオンを含み、電界効果トランジスタは対応する反応体積内の相対的水素イオン濃度に比例した信号を出力するものである、請求項 10 に記載の装置。

【請求項 12】

センサの出力信号はほぼ pH7 ~ pH9 の範囲の水素イオン濃度の変化を反映するものである、請求項 11 に記載の装置。

【請求項 13】

センサアレイは、少なくとも 1000 個のセンサを含む、請求項 10 に記載の装置。

【請求項 14】

反応体積のそれぞれは、1 マイクロリットル未満の容量を有する、請求項 10 に記載の装置。

【請求項 15】

センサは、参照電極をさらに含み、出力信号は参照電極の電圧に関連して測定される、請求項 10 に記載の装置。

【請求項 16】

複数のテンプレート核酸をシークエンシングする方法であって、

(a) 半導体基板から形成されたセンサアレイ上に配置され、複数のセンサを含む複数の反応体積であって、各反応体積は少なくとも 1 つのセンサに近接して設けられており、センサアレイ中の各センサは電界効果トランジスタを含んでおり、電界効果トランジスタは近傍で発生するシークエンシング反応を反映した少なくとも 1 つの信号を提供するように構成されている反応体積の中に、複数のテンプレート核酸を投入するステップであって、テンプレート核酸のそれぞれは、シークエンシングプライマーとハイブリダイズし、かつポリメラーゼと結合したものであるステップ、

(b) 反応体積中に既知のヌクレオチドを導入するステップ、

(c) 1 つまたは複数のヌクレオチドを取り込んで、複数のセンサにより検出可能なシークエンシング反応生成物を生成するポリメラーゼによる、シークエンシングプライマーの伸長を検出するステップ、

(d) 取り込まれなかったヌクレオチドを反応体積から洗浄するステップ、

(e) 複数のテンプレート核酸の少なくとも一部の配列を決定するために、導入、検出、および洗浄を繰り返すステップ、
を含む、上記方法。

【請求項 17】

シークエンシング反応生成物は、水素イオンを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

複数のセンサは水素イオン濃度の変化を検出するように構成される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

センサアレイは、少なくとも 1000 個のセンサを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

各反応体積は、1 マイクロリッター未満の容積である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

検出するステップは、各反応体積中の水素イオン濃度の変化の測定を含み、反応体積のそれぞれは、テンプレート核酸のうちの 1 つの少なくとも 10000 個のコピーを含むものである、請求項 16 に記載の方法。