

【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3年7月26日(2021.7.26)

【公開番号】特開2021-72816(P2021-72816A)
 【公開日】令和3年5月13日(2021.5.13)
 【年通号数】公開・登録公報2021-022
 【出願番号】特願2021-6893(P2021-6893)
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

C 1 2 Q 1/48 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6869 Z N A Z

C 1 2 Q 1/6876 Z

C 1 2 Q 1/48

【手続補正書】

【提出日】令和3年6月8日(2021.6.8)

【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】

プライミングされた鋳型核酸の、次の適正なヌクレオチドのアイデンティティーを決定する方法であって、

(a) いかなるヌクレオチドの、プライマーへの組込みをも回避しながら、逐次的に、複数のヌクレオチド混合物と、プライミングされた鋳型核酸を接触させ、ここでヌクレオチド混合物のそれぞれは、鋳型核酸における2つ、3つ又は4つの異なる塩基のタイプに相補的なヌクレオチドの組み合わせを含み、それにより、プライミングされた鋳型核酸分子、ポリメラーゼ及びそれぞれのヌクレオチド混合物からの次の適正なヌクレオチドを含む、安定化された三元複合体を形成するステップ、及び

(b) いかなるヌクレオチドの、プライマーへの組込みをも回避しながら、安定化された三元複合体を検出し、それにより、プライミングされた鋳型核酸の、次の適正なヌクレオチドのアイデンティティーを決定するステップを含み、

ここで、ステップ(a)の間及びステップ(b)の間、又はステップ(a)及び(b)の間、プライマーの3'末端に、ヌクレオチドが取り込まれない、方法。

【請求項2】

複数のヌクレオチド混合物が、複数の異なるヌクレオチド混合物を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

複数の異なるヌクレオチド混合物が、4つの異なるヌクレオチド混合物を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

複数の異なるヌクレオチド混合物が、6つの異なるヌクレオチド混合物を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

ステップ(b)における決定が、2つのヌクレオチド混合物に共通するヌクレオチドが

、プライミングされた鋳型核酸の、次の適正なヌクレオチドであるか決定することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

三元複合体が、プライミングされた鋳型核酸のプライマーの 3' 末端のヌクレオチド上の可逆性のターミネーター部分の存在によって安定化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ (b) の後、プライマーの 3' 末端のヌクレオチド上の可逆性のターミネーター部分を除去することをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

プライマーの 3' 末端のヌクレオチド上の可逆性のターミネーター部分を除去した後、さらにプライマーに可逆性のターミネーターヌクレオチドを加えることを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

ヌクレオチド混合物のそれぞれが非標識化ヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法

。

【請求項 10】

ヌクレオチド混合物のそれぞれが、外因性の標識を有する 1 以上のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

外因性の標識がフルオロフォアを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

次の適正なヌクレオチドが、ステップ (b) で検出される外因性の標識を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

ポリメラーゼが、ステップ (b) で検出される外因性の標識を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

ステップ (b) の後、プライマーの 3' 末端にヌクレオチドを組み込むことをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

組み込まれたヌクレオチドが外因性の標識を欠く、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

組み込まれたヌクレオチドがさらに可逆性のターミネーターを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

ステップ (a) において、プライミングされた鋳型核酸をヌクレオチド混合物と接触させる前に、プライミングされた鋳型核酸をポリメラーゼと接触させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

プライミングされた鋳型核酸が、固体支持体に接合される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

プライミングされた鋳型核酸が、鋳型核酸のクローン集団のメンバーである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

三元複合体が非触媒性金属イオンの存在によって安定化される、請求項 1 に記載の方法

。

【請求項 21】

プライミングされた鋳型核酸をシーケンシングする方法であって、(a) プライミングされた鋳型核酸を、鋳型核酸における 2 つ、3 つ又は 4 つの異なるタイプの塩基に相補的なヌクレオチドの第 1 の組合せと接触させ、それにより、プライミン

グされた鋳型核酸、ポリメラーゼ、及びプライミングされた鋳型核酸の次の塩基と相補的なヌクレオチドの第1の組合せからのヌクレオチドの間の安定化された三元複合体を形成するステップ、

(b)ヌクレオチドの、プライマーへの組込みを回避しながら三元複合体を検出するステップ、

(c)プライミングされた鋳型核酸、及び鋳型核酸における2つ、3つ又は4つの異なるタイプの塩基に相補的なヌクレオチドの第2の組合せを使用して、ステップ(a)及び(b)を反復するステップであって、ここで、ステップ(a)の次の塩基が、次の塩基での伸長ステップの前に、ヌクレオチドの第1の組合せを使用し、その後、ヌクレオチドの第2の組合せを使用してアッセイされるように、ヌクレオチドの第2の組合せがヌクレオチドの第1の組合せと異なり、

(d)ステップ(c)の後において、プライマーへと、次の塩基と相補的なヌクレオチドを組み込むステップ、及び

(e)連続的な後続の次の塩基位置でステップ(a)~(d)を反復して、プライミングされた鋳型核酸の配列を同定するステップ、を含む方法。