

【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】令和 2 年 7 月 9 日 (2020.7.9)

【公表番号】特表 2019-529865 (P2019-529865A)

【公表日】令和 1 年 10 月 17 日 (2019.10.17)

【年通号数】公開・登録公報 2019-042

【出願番号】特願 2018-562554 (P2018-562554)

【国際特許分類】

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

G 1 6 B 40/00 (2019.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/52 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 21/64 F

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 M 1/00 A

G 1 6 B 40/00

G 0 1 N 33/50 P

G 0 1 N 33/52 C

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 5 月 27 日 (2020.5.27)

【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】

ヌクレオチドの取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出される光の特性を取得する工程であって、前記特性は、各ヌクレオチドの取り込みイベントについて、

i) 励起後の蛍光標識によるフォトン放出の確率の減衰速度を示す光の時間特性と、

i i) 光の強度特性と、を含む、ヌクレオチドの取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出される光の特性を取得する工程と、

ヌクレオチドの取り込みイベントの特性を示す点をグループ分けする工程であって、各点は、対応するヌクレオチドの取り込みイベントに対する少なくとも前記時間特性と前記強度特性とを表す、ヌクレオチドの取り込みイベントの特性を示す点をグループ分けする工程と、

前記点からなるグループを各ヌクレオチドに割り当てる工程と、
からなる方法。

【請求項 2】

前記時間特性は、異なる時間ビンに検出された蛍光寿命又はフォトン比率からなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記点をグループ分けする工程は、クラスタリングアルゴリズムによって実行される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記クラスタリングアルゴリズムは、 k が 4 以上の k - 平均クラスタリングを実行する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

各前記点からなるグループは、前記蛍光標識の予め決められた光放出特性に基づいて各ヌクレオチドに割り当てられる、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

ヌクレオチドの取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出される光の特性を取得する工程であって、前記特性は、各ヌクレオチドの取り込みイベントについて、

i) 励起後の蛍光標識によるフォトン放出の確率の減衰速度を表す光の時間特性と、

i i) 光の強度特性と、を含む、ヌクレオチドの取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出される光の特性を取得する工程と、

前記ヌクレオチドの取り込みイベントの特性を表す点をグループ分けする工程であって、各点は、対応するヌクレオチドの取り込みイベントについて少なくとも前記時間特性と前記強度特性とを表す、前記ヌクレオチドの取り込みイベントの特性を表す点をグループ分けする工程と、

各点からなるグループを各ヌクレオチドに割り当てる工程と、

前記点からなるグループを判別する 1 つ以上の基準を決める工程と、

前記 1 つ以上の基準を保存する工程と、

からなる方法。

【請求項 7】

前記 1 つ以上の基準は、前記点からなるグループ間の 1 つ以上の境界からなる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 1 つ以上の基準は、前記点からなるグループの重心からなる、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 1 つ以上の基準は、不揮発性メモリに保存される、請求項 6 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記点をグループ分けする工程は、前記点に対してクラスタリングアルゴリズムを実行する工程からなる、請求項 6 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

ヌクレオチドを同定する方法において、

ヌクレオチドの取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出される光の特性を取得する工程であって、前記特性は、各ヌクレオチドの取り込みイベントについて、

i) 励起後の蛍光標識によるフォトン放出の確率の減衰速度を表す光の時間特性と、

i i) 光の強度特性と、を含む、ヌクレオチドの取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出される光の特性を取得する工程と、

前記蛍光標識について前記光の特性の間で判別を行うシーケンシング機器の為に保存された基準を考慮して前記時間特性と前記強度特性とを評価することによって前記ヌクレオチドの取り込みイベントにヌクレオチドを割り当てる工程と、

からなる方法。

【請求項 12】

前記保存された基準は、異なるヌクレオチドに対する前記蛍光標識の特性間の 1 つ以上の境界からなり、前記ヌクレオチドの取り込みイベントを割り当てる工程は、前記時間特性と前記強度特性とを表す点を前記 1 つ以上の境界と比較する工程からなる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 1 3】

1 つ以上の前記保存された基準は、点からなるグループの重心からなり、各グループは、それぞれのヌクレオチドに対応し、前記ヌクレオチドの取り込みイベントを割り当てる工程は、

各取り込みイベントについて前記時間特性と前記強度特性とを表す点と重心との間の距離を決定する工程と、

前記ヌクレオチドの取り込みイベントを前記点に最も近い重心を有するヌクレオチドに割り当てる工程と、

からなる、請求項 1 1 又は 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記保存された基準は、非揮発メモリに保存された較正基準である、請求項 1 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

ヌクレオチドを同定する方法において、

ヌクレオチドの取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出される光の特性を取得する工程であって、前記特性は、各ヌクレオチドの取り込みイベントについて、

i) 励起後の蛍光標識によるフォトン放出の確率の減衰速度を表す光の時間特性と、

i i) 光の第 2 特性と、を含む、ヌクレオチドの取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出される光の特性を取得する工程と、

前記ヌクレオチドの取り込みイベントの特性を表す点を点からなるグループにグループ分けする工程であって、各点は、対応するヌクレオチドの取り込みイベントの少なくとも前記時間特性と強度特性とを表す、前記ヌクレオチドの取り込みイベントの特性を表す点を点からなるグループにグループ分けする工程と、

前記点からなるグループを各ヌクレオチドに割り当てる工程と、

からなる方法。

【請求項 1 6】

シーケンシング機器を較正する方法において、

ヌクレオチドの取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出される光の特性を取得する工程であって、前記特性は、各ヌクレオチドの取り込みイベントについて、

i) 励起後の蛍光標識によるフォトン放出の確率の減衰速度を表す光の時間特性と、

i i) 光の第 2 特性と、を含む、ヌクレオチドの取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出される光の特性を取得する工程と、

前記ヌクレオチドの取り込みイベントの特性を示す点を点からなるグループにグループ分けする工程であって、各点は、対応するヌクレオチド取り込みイベントについて少なくとも前記時間特性と強度特性とを表す、前記ヌクレオチドの取り込みイベントの特性を示す点を点からなるグループにグループ分けする工程と、

各前記点からなるグループを各ヌクレオチドに割り当てる工程と、

前記点からなるグループを判別する 1 つ以上の基準を決定する工程と、

前記 1 つ以上の基準を保存する工程と、

からなる方法。

【請求項 1 7】

ヌクレオチド取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出される光の特性を取得する工程であって、前記特性は、各ヌクレオチドの取り込みイベントについて、

i) 励起後の蛍光標識によるフォトン放出の確率の減衰速度を表す光の時間特性と、

i i) 光の強度特性と、を含む、ヌクレオチド取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出される光の特性を取得する工程と、

前記蛍光標識の光の特性間で判別を行うシーケンシング機器の為に保存された基準を

考慮して、前記時間特性と第2特性とを評価することによって前記ヌクレオチドの取り込みイベントをヌクレオチドに割り当てる工程と、

からなる方法。

【請求項18】

ヌクレオチド取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出された光の特性を取得する工程であって、前記特性は、各ヌクレオチドの取り込みイベントについて、

i) 励起後の蛍光標識によるフォトン放出の確率の減衰速度を表す光の時間特性と、

i i) 光の強度特性と、を含む、ヌクレオチド取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出された光の特性を取得する工程と、

前記ヌクレオチドの取り込みイベントの特性を表す点のグループを区別する1つ以上の基準を決める工程であって、各点は、対応するヌクレオチド取り込みイベントについて前記時間特性と前記強度特性とを表示する、前記ヌクレオチドの取り込みイベントの特性を表す点のグループを区別する1つ以上の基準を決める工程と、

からなる方法。

【請求項19】

前記グループにヌクレオチドを割り当てる為に前記グループを各ヌクレオチドに割り当てる工程をさらに含む、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記1つ以上の基準と、前記グループに対するヌクレオチドの割り当てとに基づいて、前記点をヌクレオチドに割り当てる工程をさらに含む、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

ヌクレオチドの取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出される光の特性を取得する工程であって、前記特性が、各ヌクレオチドの取り込みイベントについて、

i) 励起後の蛍光標識によるフォトン放出の確率の減衰速度を表す光の時間特性と、

i i) 光の第2特性と、を含む、ヌクレオチドの取り込みイベント中にヌクレオチドに結合した蛍光標識から検出される光の特性を取得する工程と、

前記ヌクレオチドの取り込みイベントの前記特性を表す点からなるグループを区別する1つ以上の基準を決定する工程であって、各点は、対応するヌクレオチド取り込みイベントについて前記時間特性と前記第2特性とを表示する、前記ヌクレオチドの取り込みイベントの前記特性を表す点からなるグループを区別する1つ以上の基準を決定する工程と、

からなる方法。

【請求項22】

第1蛍光標識が第1蛍光標識の励起に応答して光を放出した時間に関する第1時間ビン情報を受信する工程と、

前記第1時間ビン情報に基づいて第1光強度情報を計算する工程と、

第2蛍光標識が第2蛍光標識の励起に応答して光を放出した時間に関する第2時間ビン情報を受信する工程と、

前記第2時間ビン情報に基づいて第2光強度情報を計算する工程と、

前記第1光強度情報と前記第2光強度情報とを用いてヌクレオチドの取り込みイベントが生じた時間を計算する工程と、

からなる方法。

【請求項23】

前記ヌクレオチドの取り込みイベントが生じた時間を計算する工程は、パルス同定アルゴリズムを用いて実行される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記パルス同定アルゴリズムは、変化点アルゴリズム、活動平均／中間値及び分散アルゴリズム、又は状態機械アルゴリズムからなる、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

第 1 光強度情報を計算する工程は、第 1 時間ビン情報を合計する工程からなり、第 2 光強度情報を計算する工程は、第 2 時間ビン情報を合計する工程からなる、請求項 22～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

第 1 蛍光標識が第 1 蛍光標識の励起に応答して第 1 光を放出した時間に関する第 1 時間ビン情報を受信する工程と、

前記第 1 時間ビン情報に基づいて前記第 1 光の第 1 時間特性を計算する工程であって、前記第 1 時間特性は、励起後の第 1 蛍光標識によるフォトン放出の確率の減衰速度を表す、前記第 1 光の第 1 時間特性を計算する工程と、

第 2 蛍光標識が第 2 蛍光標識の励起に応答して第 2 光を放出する時間に関する第 2 時間ビン情報を受信する工程と、

前記第 2 時間ビン情報に基づいて前記第 2 光の第 2 時間特性を計算する工程であって、前記第 2 時間特性は、励起後の第 2 蛍光標識によるフォトン放出の確率の減衰速度を表す、前記第 2 光の第 2 時間特性を計算する工程と、

前記第 1 時間特性と前記第 2 時間特性とを用いてヌクレオチドの取り込みイベントが生じた時間を計算する工程と、

からなる方法。

【請求項 27】

前記ヌクレオチドの取り込みイベントが生じた時間を計算する工程は、パルス同定アルゴリズムを用いて実行される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記パルス同定アルゴリズムは、変化点アルゴリズム、活動平均／中央値及び分散アルゴリズム、又は状態機械アルゴリズムからなる、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

励起後の 1 つ以上の蛍光標識におけるフォトン放出の確率の減衰速度を示す 1 つ以上の時間特性を決定する工程と、

少なくとも 1 つの時間特性を用いてヌクレオチドの取り込みイベントが生じた時間を計算する工程と、

からなる方法。

【請求項 30】

前記ヌクレオチドの取り込みイベントが生じた時間を計算する工程は、1 つ以上の蛍光標識から放出された光の強度を用いて実施される、請求項 29 の方法。

【請求項 31】

蛍光標識が蛍光標識の励起に応答して光を放出した時間に関する時間ビン情報を受信する工程と、

前記時間ビン情報に基づいて光強度情報を計算する工程と、

前記光強度情報を用いて少なくとも 1 つのヌクレオチドの取り込みイベントが生じた時間を計算する工程と、

からなる方法。

【請求項 32】

前記少なくとも 1 つのヌクレオチドの取り込みイベントが生じた時間は、光の時間特性を用いて実施される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

処理装置によって実行された際に請求項 1～32 のいずれか一項に記載の方法を実施する命令を内部に保存した非一過性計算機可読記録媒体。

【請求項 34】

請求項 1～33 のいずれか一項に記載の方法を実施する処理装置からなる装置。

【請求項 35】

シーケンシング反応中に蛍光標識から光を受け取る光検出器と、請求項 1～34 のいずれか一項に記載の方法を実施する処理装置と、

からなるシーケンシング機器。