

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7075937号

(P7075937)

(45)発行日 令和4年5月26日(2022.5.26)

(24)登録日 令和4年5月18日(2022.5.18)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

C 1 2 Q 1/6869

Z

C 1 2 Q 1/6823(2018.01)

C 1 2 Q 1/6823

Z

G 0 1 N 21/64 (2006.01)

G 0 1 N 21/64

F

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09

Z

C 1 2 P 19/34 (2006.01)

C 1 2 P 19/34

A

請求項の数 10 (全30頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-544801(P2019-544801)

(86)(22)出願日 平成29年10月31日(2017.10.31)

(65)公表番号 特表2020-511955(P2020-511955
A)

(43)公表日 令和2年4月23日(2020.4.23)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/059318

(87)国際公開番号 WO2018/089231

(87)国際公開日 平成30年5月17日(2018.5.17)

審査請求日 令和2年8月26日(2020.8.26)

(31)優先権主張番号 62/419,702

(32)優先日 平成28年11月9日(2016.11.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 514000473

キアゲン サイエンスーズ, エルエルシー
アメリカ合衆国、メリーランド、208
74、ジヤーマンタウン、ジヤーマンタ
ウン・ロード・19300

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 Sequencing-By-Synthesis法におけるイメージング試薬としての
光防護性混合物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

標識ヌクレオチドを組み込む方法であって：

a) i) 複数の核酸プライマーおよびテンプレート分子、

ii) ポリメラーゼ、

iii) 少なくとも1つの蛍光消光阻害剤と、少なくとも1つの抗酸化物質と、少なくとも1つのラジカル捕捉化合物とを含む化合物の光防護性混合物を含むイメージング試薬であって、該少なくとも1つの抗酸化物質は、ゲンチジン酸、およびプロトカテク酸エチルエステルからなる群から選択され、該少なくとも1つのラジカル捕捉化合物はカルニチンである、イメージング試薬、ならびにiv) 複数のヌクレオチドアナログであって、該ヌクレオチドアナログの少なくとも一部が、切断可能なリンカーを介して塩基へと取り付けられた標識により標識されているヌクレオチドアナログ、
を提供することと；

b) ハイブリダイズされたプライマーを作り出すために、該プライマーの少なくとも一部を該テンプレート分子の少なくとも一部へとハイブリダイズすることと；

c) 組み込まれた標識ヌクレオチドアナログを含む伸長プライマーを作り出すために、第1の標識ヌクレオチドアナログを、該ポリメラーゼを用いて、該ハイブリダイズされたプライマーの少なくとも一部へと組み込むことと；

d) 該組み込まれた標識ヌクレオチドアナログを、該イメージング試薬の存在下でイメー

ジングすることと
を含む、方法。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの蛍光消光阻害剤が、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸 (t r o l o x) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ (e) 第 2 のヌクレオチドアナログを、前記ポリメラーゼを用いて、前記伸長プライマーの少なくとも一部へと組み込むこと、をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

ゲンチジン酸、およびプロトカテク酸エチルエステルからなる群から選択される少なくとも 1 つの抗酸化物質と、少なくとも 1 つの蛍光消光阻害剤と、少なくとも 1 つのラジカル捕捉化合物と、緩衝液とを含む、該少なくとも 1 つのラジカル捕捉化合物はカルニチンである、標識ヌクレオチドアナログイメージング試薬。

【請求項 5】

前記蛍光消光阻害剤が、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸 (t r o l o x) である、請求項 4 に記載のイメージング試薬。

【請求項 6】

フローセルを含むシステムであって、該フローセルが、
切断可能な標識を取り付けられた複数のヌクレオチドアナログを含むテンプレートへとハイブリダイズされるプライマーの溶液と、
ゲンチジン酸、およびプロトカテク酸エチルエステルからなる群から選択される少なくとも 1 つの抗酸化物質と、少なくとも 1 つの蛍光消光阻害剤と、少なくとも 1 つのラジカル捕捉化合物と、緩衝液とを含むイメージング試薬であって、該少なくとも 1 つのラジカル捕捉化合物はカルニチンである、イメージング試薬と
を含む、システム。

【請求項 7】

前記ハイブリダイズされるプライマーおよび前記テンプレートが、固定されている、請求項 6 に記載のシステム。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つの蛍光消光阻害剤が、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸 (t r o l o x) である、請求項 6 に記載のシステム。

【請求項 9】

前記緩衝液は、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸 (H E P E S) 緩衝液およびトリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン (T R I S) 緩衝液のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 4 に記載の標識ヌクレオチドアナログイメージング試薬。

【請求項 10】

前記緩衝液は、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸 (H E P E S) 緩衝液およびトリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン (T R I S) 緩衝液のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 6 に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、例えば s e q u e n c i n g - b y - s y n t h e s i s 法を用いる、記載される方法、組成物、装置、システムおよびキット(ヌクレオチド配列内の核酸の正体を決定するための試薬および混合物を含むが、これらに限定されない)に関連する。特に、本発明は、イメージング試薬として化合物の光防護性混合物を使用して、蛍光化合物(蛍光標識された核酸を含むが、これに限定されない)の安定性および保存を向上することを企図する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

背景

過去25年に渡り、生成され、そしてGenbankへ預けられるDNA配列情報の量は、指数関数的に増大している。伝統的なシーケンシング法（例えばサンガーシーケンシング法）は、sequencing by synthesis（SBS）法の形態を用いる次世代シーケンシング技術に置き換えられている。SBS法では、特別に設計されたヌクレオチドおよびDNAポリメラーゼが用いられ、チップに結合された1本鎖DNAテンプレートの配列を制御された方法で解読する。高スループットを達成するために、そのようなテンプレートの何百万ものスポットが、シーケンシングチップのいたる所に整列され、そしてこれらの配列が独立して読み出され、そして記録される。

10

【0003】

DNAシーケンシングのためにアレイを用いるシステムは、周知である（例えばJura、米国特許第6,664,079号）。しかし、自動化シーケンシングを用いて核酸配列をシーケンシングするため、効率性および／または試薬の安定性を高めるための方法および組成物が、引き続き必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【文献】米国特許第6,664,079号明細書

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の要約

本発明は、例えばsequencing-by-synthesis法を用いる、記載される方法、組成物、装置、システムおよびキット（ヌクレオチド配列内の核酸の正体を決定するための試薬および混合物を含むが、これらに限定されない）に関連する。特に、本発明は、イメージング試薬として化合物の光防護性試薬混合物を使用して、蛍光化合物（蛍光標識された核酸を含むが、これに限られない）の安定性および保存を向上することを企図する。

30

【0006】

1つの実施形態では、本発明は、sequencing-by-synthesis（SBS）法におけるヌクレオチドの組み込みの後の蛍光体検出ステップの間の、イメージング試薬としての化合物の光防護性混合物（例えばカクテル）を企図する。1つの実施形態では、光防護性混合物は、少なくとも1種の有効な抗酸化物質（例えば、2,5-ジヒドロキシ安息香酸（ゲンチジン酸）；3,4-ジヒドロキシ安息香酸（プロトカテク酸）、または3,4-ジヒドロキシ安息香酸エチルエステル（プロトカテク酸エチルエステル）であるが、これらに限定されない）、少なくとも1種の蛍光消光阻害剤（例えば6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸（trolox）であるが、これに限定されない）、および少なくとも1種のラジカル捕捉剤（例えばカルニチンであるが、これに限定されない）を含む。

40

【0007】

1つの実施形態では、本発明は、以下を含む標識ヌクレオチドの組み込み法を企図する。この方法は、a) i) 複数の核酸プライマーおよびテンプレート分子、ii) ポリメラーゼ、iii) 化合物の光防護性混合物を含むイメージング試薬、ならびにiv) 複数のヌクレオチドアナログ（少なくともその一部が、切断可能なリンカーを介して塩基へと取り付けられた標識により標識される）を提供することと、b) 前記プライマーの少なくとも一部を、前記テンプレート分子の少なくとも一部へとハイブリダイズ（例えば高いストリンジェンシーで）して、ハイブリダイズされたプライマーを作り出すことと、c) 第1の標識ヌクレオチドアナログを、前記ポリメラーゼを用いて前記ハイブリダイズされたプラ

50

イマーの少なくとも一部へと組み込み、組み込まれた標識ヌクレオチドアナログを含む伸長プライマーを作り出すことと； d) 前記組み込まれた標識ヌクレオチドアナログを、前記イメージング試薬存在下でイメージングすることを含む。1つの実施形態では、イメージング試薬は蛍光消光阻害剤を含む。1つの実施形態では、蛍光消光阻害剤は *t r o l o x* である。1つの実施形態では、光防護性混合物は、少なくとも1種の抗酸化物質、少なくとも1種の消光阻害剤、および少なくとも1種のラジカル捕捉化合物を含む。1つの実施形態では、抗酸化物質はゲンチジン酸、プロトカテク酸、およびプロトカテク酸エチルエステルからなる群から選択される。1つの実施形態では、ラジカル捕捉化合物はカルニチンである。1つの実施形態では、当該方法はさらに、 e) 第2のヌクレオチドアナログを、前記ポリメラーゼを用いて前記伸長プライマーの少なくとも一部へと組み込むことを含む。1つの実施形態では、標識は蛍光である。

10

【0008】

1つの実施形態では、本発明は、少なくとも1種の抗酸化物質、少なくとも1種の蛍光消光阻害剤、そして緩衝液を含むイメージング試薬を企図する。1つの実施形態では、抗酸化物質はゲンチジン酸、プロトカテク酸、およびプロトカテク酸エチルエステルからなる群から選択される化合物を含む。1つの実施形態では、イメージング試薬はさらにラジカル捕捉剤を含む。1つの実施形態では、ラジカル捕捉剤はカルニチンである。1つの実施形態では、蛍光消光阻害剤は *t r o l o x* である。1つの実施形態では、緩衝液は *T R I S* 緩衝液である。1つの実施形態では、緩衝液は *H E P E S* 緩衝液である。

【0009】

1つの実施形態では、本発明は、以下を含むキットを企図する。 i) イメージング試薬（少なくとも1種の抗酸化物質、少なくとも1種の蛍光消光阻害剤、および緩衝液を含む）を含む第1の容器、ならびに i i) 複数のヌクレオチドアナログ（少なくともその一部が、切断可能なリンカーを介して塩基へと取り付けられた標識により標識される）を含む第2の容器を含む。1つの実施形態では、イメージング試薬はさらにラジカル捕捉剤を含む。1つの実施形態では、ラジカル捕捉剤はカルニチンである。1つの実施形態では、蛍光消光阻害剤は *t r o l o x* である。1つの実施形態では、緩衝液は *T R I S* 緩衝液である。1つの実施形態では、緩衝液は *H E P E S* 緩衝液である。

20

【0010】

1つの実施形態では、本発明は、切断可能な標識を取り付けられた複数のヌクレオチドアナログを含むテンプレートにハイブリダイズされるプライマーの溶液、ならびに少なくとも1種の抗酸化物質、少なくとも1種の蛍光消光阻害剤、および緩衝液を含むイメージング試薬を含むシステムを企図する。1つの実施形態では、ハイブリダイズされたプライマーおよび前記テンプレートは、固定される。1つの実施形態では、ハイブリダイズされたプライマーおよび前記テンプレートは、フローセル内にある。1つの実施形態では、イメージング試薬はさらにラジカル捕捉剤を含む。1つの実施形態では、ラジカル捕捉剤はカルニチンである。1つの実施形態では、蛍光消光阻害剤は *t r o l o x* である。1つの実施形態では、緩衝液は *T R I S* 緩衝液である。1つの実施形態では、緩衝液は *H E P E S* 緩衝液である。

30

【0011】

1つの実施形態では、本発明は、 i) *T R I S H C l* 緩衝液； i i) およそ5～50 mMの範囲内の濃度のカルニチン； i i i) およそ5～15 mMの範囲内の濃度の *t r o l o x*； i v) およそ10～50 mMの範囲内の濃度の2，5ジヒドロキシ安息香酸；および v) およそ10～20 mMの範囲内の濃度の3，4，ジヒドロキシ安息香酸エチルエステルを含むイメージング試薬を企図する。

40

【0012】

定義

本発明についての理解を促進するために、以下で多数の用語が定義される。本明細書において定義される用語は、本発明に関連する当業者によって一般的に理解されるような意味を有する。" a "、" a n "、および" t h e "といった用語は、単一の実体のみならず複数の

50

実体をも指すよう意図され、そして例示のために用いられ得る具体例の汎用のクラスをも含む。本明細書における用語法は、本発明の特定の実施形態を記載するために用いられるが、しかし、これらの使用は、特許請求の範囲において概説される場合を除いて、本発明の範囲を定めない。

【0013】

本明細書における用語「約」は、任意のアッセイ測定 of 任意の文脈において、所定の測定の $+/-5\%$ を指す。

【0014】

本明細書における用語「イメージング試薬」は、標識の発光強度の増強および／または蛍光体の検出を、少なくとも1桁、向上し得る化合物の混合物を指す。何らかの特定の機構へと本発明を限定することを意図しないが、本明細書に記載される混合物は、シグナルーノイズ比を増強するか、あるいは蛍光の退色および／または蛍光体の「ブリンキング」を減らすと考えられる。イメージング試薬において有用な化合物の1つのクラスは、蛍光消光阻害剤である。

【0015】

本明細書における用語「蛍光消光阻害剤」は、蛍光標識のシグナルの質を向上する化合物のクラスを指す。いかなる機構にも拘束されることなく、そのような化合物は、非特異的な蛍光退色現象によって蛍光シグナルの消光という結果をもたらす酸化性の化合物と反応することにより働くと考えられる。例えば、そのような化合物の1つは *trolox* (6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸) である。

【0016】

本明細書における互換的に使用される用語「混合物」または「カクテル」は、ヌクレオチド配列内の標識ヌクレオチドアナログを検出するためのイメージング試薬と一緒に作る、一般に、例えば緩衝溶液のような溶液内の複数の化合物を指す。

【0017】

本明細書における用語「光防護性」は、蛍光化合物の安定性および保存可能期間の増強という、イメージング試薬の混合物またはカクテルの最終結果を指す。理論に拘束されないが、光防護性化合物は、i) ヌクレオチド蛍光標識の光退色；ii) シグナルの消光；およびiii) ラジカルで誘導されるDNAの光損傷および光切断、に対して防護することによって働くと考えられる。

【0018】

本明細書における用語「抗酸化化合物」は、フリーラジカルを生成し得る化学反応を阻害する分子を指す。例えば、特定の酵素（カタラーゼおよびスーパーオキシドディスムターゼ）に加えて多くのビタミン（例えば、ビタミンEおよびビタミンC）は、天然由来の抗酸化物質である。他の化学物質（ゲンチジン酸、プロトカテク酸、および／またはプロトカテク酸エチルエステルを含むが、これらに限定されない）も、これらの特性を有する。

【0019】

本明細書における用語「ラジカル捕捉化合物」は、不純物および望まぬ反応産物、例えば酸素、を除去または不活化する分子を指す。ラジカル捕捉化合物は抗酸化物質の最終結果をもたらすが、抗酸化化合物とは異なる機構で働くと考えられる。例えば、そのようなラジカル捕捉化合物の1つとして、トコフェロール、カルニチン、および／またはナリングニンが挙げられるが、これらに限定されない。そうであっても、いくつかのラジカル捕捉化合物が、例えば抗酸化作用および一重項酸素除去のような他の生化学的作用を有するということが知られている。

【0020】

本明細書における用語「緩衝液」は、水素イオンの濃度変化を含む幅広い範囲の環境条件（例えば温度、塩分濃度）に渡って安定なpHレベルを維持し得る、塩基性塩および水素交換化合物（弱酸または弱塩基のいずれか）の混合物を指す。そのような緩衝液として例えば、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸 (HEPES) 緩衝液、および／またはトリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン (TRIS) 緩衝液

10

20

30

40

50

が挙げられ得るが、これらに限定されない。

【0021】

本明細書における用語「リンカー」は、切断可能な標識および／または化学部分を取り付けできる任意の分子（または分子の一群）を指す。1つの実施形態では、リンカーの切断は毒性のラジカル生成物を生成し得る。リンカーとして例えば、ジスルフィドリンカーおよび／またはアジドリンカーが挙げられ得るが、これらに限定されない。

【0022】

本明細書における用語「取り付けられる」は、第1の分子（例えば核酸）と第2の分子（例えば標識分子）との間の任意の相互作用を指す。取り付けは、可逆性または不可逆性であり得る。そのような取り付けとして、共有結合、イオン結合、ファンデルワールス力、または摩擦などが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0023】

本明細書における「核酸配列」および「ヌクレオチド配列」は、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、およびこれらの断片または一部を指し、そしてゲノムまたは合成起源の1本鎖または2本鎖であり得るDNAまたはRNAを指し、そしてセンス鎖またはアンチセンス鎖を示す。そのような核酸として、cDNA、mRNA、または他の核酸配列が挙げられ得るが、これらに限定されない。

【0024】

本明細書における用語「単離された核酸」は、その天然の状態から取り除かれている（例えば、細胞から取り除かれ、そして好ましい実施形態においては、他のゲノム核酸を含まない）任意の核酸分子を指す。

20

【0025】

いくつかの実施形態では、本発明は、核酸と一緒にハイブリダイズすることを企図する。このためには、ある程度の相補性が必要とされる。本明細書における用語「相補的な」または「相補性」は、塩基対合の規則によって関係付けられる「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」（これらは、ヌクレオチドの配列を指す互換的な用語である）を参照して用いられる。例えば、配列「C-A-G-T」は、配列「G-T-C-A」と相補的である。相補性は、「部分的」または「全体的」であり得る。「部分的」な相補性では、1つまたは複数の核酸塩基が塩基対合規則に従ってマッチしない。核酸間の「全体的」または「完全な」相補性では、核酸塩基の各々かつ全てが、他の塩基と、塩基対合規則に従ってマッチする。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に対して有意な影響を有する。これは、増幅反応と同様に核酸間の結合に依存する検出の方法においても、特に重要である

30

【0026】

本明細書における、ヌクレオチド配列に関して用いられる用語「相同」および「相同な」は、他のヌクレオチド配列との相補性の程度を指す。部分的な相同または完全な相同（すなわち、同一）があり得る。ある核酸に対して部分的に相補的、すなわち「実質的に相同」な核酸配列は、完全に相補的な配列が標的核酸配列にハイブリダイズすることを、少なくとも部分的に阻害するものである。完全に相補的な配列が標的配列へとハイブリダイズすることの阻害は、ハイブリダイゼーションアッセイ（サザンまたはノーザンブロット、*solution hybridization*法など）を用いて、ストリンジェンシーの低い条件下で検査され得る。実質的に相同な配列またはプローブは、完全に相同な配列の標的配列への結合（すなわちハイブリダイゼーション）を、ストリンジェンシーの低い条件下で競合および阻害する。これは、ストリンジェンシーの低い条件なので、非特異的な結合が許されているということではない；ストリンジェンシーの低い条件では、2つの配列の結合が互いに、特異的な（すなわち選択的な）相互作用をすることを要する。非特異的な結合のないことは、ある程度の相補性を欠く（例えば、同一性約30%未満）第2の標的配列を用いることによって試験され得る；非特異的な結合の非存在下では、プローブは、第2の非相補的な標的にハイブリダイズしない。

40

【0027】

50

約500ヌクレオチドの長さのプローブが用いられる場合、ストリンジェンシーの低い条件は、 $5 \times \text{SSPE}$ (43.8 g/l NaCl 、 $6.9 \text{ g/l NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、および 1.85 g/l EDTA 、 pH は NaOH で7.4に調整)、0.1% SDS、5×デンハルト試薬 {50×デンハルトは500mlあたり以下を含む：5gフィコール(400型、Pharmacia)、5gBSA(フラクションV; Sigma)}、ならびに $100 \mu\text{g/ml}$ 断片処理済みサケ精子DNAからなる溶液内で 42°C での結合またはハイブリダイゼーションと、続く $5 \times \text{SSPE}$ 、0.1% SDSを含む溶液内で 42°C での洗浄、に相当する条件を含む。ストリンジェンシーの低い条件を構成するために、相当する多数の条件も使用され得る；例えば、プローブの長さおよび性質(DNA、RNA、塩基組成)、標的の性質(DNA、RNA、塩基組成、溶液内に存在するか固定されているかなど)、ならびに塩および他の構成要素(例えば、ホルムアミド、デキストラン硫酸塩、ポリエチレングリコールの有無)の濃度、ならびにハイブリダイゼーション溶液の構成要素、といった要素が、上に列挙された条件とは異なるがこれに相当するストリンジェンシーの低いハイブリダイゼーションの条件を生成するために変動され得る。さらに、ストリンジェンシーの高い条件下でハイブリダイゼーションを促進する条件(例えば、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄段階での温度上昇、ハイブリダイゼーション溶液におけるホルムアミドの使用など)もまた、使われ得る。

【0028】

本明細書における用語「ハイブリダイゼーション」は、核酸鎖が相補鎖と塩基対合を介して結合して、ハイブリダイゼーション複合体を形成するような任意のプロセスを用いる、相補的な核酸の対合を参照する際に用いられる。ハイブリダイゼーション、およびハイブリダイゼーションの強さ(すなわち、核酸間の関連の強さ)は、例えば、核酸間の相補性の程度、関与する条件のストリンジェンシー、形成されるハイブリッドの T_m 、および核酸内のG:C比率といった要素に影響される。

【0029】

本明細書における用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、2つの核酸配列間で、相補的なG塩基とC塩基との間、および相補的なA塩基とT塩基との間での水素結合形成により生じる複合体を指す；これらの水素結合は、塩基スタッキング相互作用によりさらに安定化され得る。2つの相補的な核酸配列は、逆平行な形状をとって水素結合する。ハイブリダイゼーション複合体は、溶液内(例えば、CotまたはRot解析)において、または溶液内に存在する1つの核酸配列と固体の支持体(例えば、サザンブロッティングおよびノーザンブロッティング、ドットブロッティングに用いられるナイロン膜もしくはニトロセルロースフィルター、またはFISH(蛍光in situハイブリダイゼーション)法を含むin situハイブリダイゼーションで用いられるガラススライド)に固定されたもう1つの核酸配列との間で形成され得る。

【0030】

本明細書における用語「 T_m 」は、「融解温度」を参照する際に用いられる。融解温度とは、2本鎖核酸分子の集団が、1本鎖へと半解離する温度である。標準的な参考文献で示されるように、 T_m 値の簡単な推定値は、次の方程式により計算され得る： $81.5 + 0.41(\%G + C)$ 、ただし核酸が 1 M NaCl 溶液内に存在する場合。Andersonら、“Quantitative Filter Hybridization” In: Nucleic Acid Hybridization (1985)。さらに洗練された計算では、構造の特性と同様に配列の特性も、 T_m 算出のために考慮する。

【0031】

本明細書における用語「ストリンジェンシー」は、核酸のハイブリダイゼーションが行われる、温度、イオン強度、および他の化合物(例えば有機溶媒)の存在、といった条件を参照する際に用いられる。典型的には、「ストリンジェンシー」は、約 T_m から、 T_m から約 $20^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C}$ 低い範囲内で生じる。「ストリンジェントなハイブリダイゼーション」は、同一なポリヌクレオチド配列の特定もしくは検出に用いられ得るか、または類似もしくは関連するポリヌクレオチド配列の特定もしくは検出に用いられ得る。例えば断片が

10

20

30

40

50

、ハイブリダイゼーション反応にストリンジェントな条件下で使用される場合には、特有の配列（すなわち、非相同的であるか、または約50%未満の相同性もしくは相補性を含む配列）を含んでいる断片のハイブリダイゼーションが好まれる。一方では、ストリンジェンシーの「弱い」または「低い」条件が用いられる場合には、ハイブリダイゼーションは、遺伝的に多様な生物（すなわち、例えば、そのような生物間では通常、相補的な配列の頻度が低い）に由来する核酸であっても、起こり得る。

【0032】

本明細書における用語「増幅可能な核酸」は、任意の増幅法によって増幅され得る核酸を参照する際に用いられる。「増幅可能な核酸」は、通常、「試料テンプレート」を含むものと企図される。

【0033】

本明細書における用語「試料テンプレート」または（より簡潔に）「テンプレート」は、試料に由来する、目的の標的配列の存在を解析される核酸を指す。対照的に、「背景テンプレート」は、試料テンプレート以外の核酸を参照する際に用いられ、これは、試料内に存在することもあれば、存在しないこともある。背景テンプレートは、ほとんどの場合、偶発的である。これは、キャリーオーバーによるものであり得るか、または、試料から精製されて除かれるべき核酸汚染物質の存在によるものである。例えば、生物に由来する検出されるべき核酸以外の核酸が、背景として試験試料内に存在し得る。

【0034】

「増幅」は、核酸配列の追加コピーの産生として定義され、一般にポリメラーゼ連鎖反応を用いて行われる。Dieffenbach C. W. および G. S. Dveksler (1995) In: PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y.。

【0035】

本明細書における用語「ポリメラーゼ連鎖反応」（“PCR”）は、K. B. Mullis、米国特許4,683,195号および4,683,202号（本明細書に参考として援用される）の方法を指す。これらの特許は、標的配列のセグメントの濃度を、ゲノムDNAの混合物内でクローニングまたは精製を行わずに増加させるための方法を記載する。所望の標的配列の増幅されるセグメントの長さは、2つのオリゴヌクレオチドプライマーの相対位置によって互いに決められ、したがって、この長さは制御可能なパラメーターである。このプロセスには繰り返しという側面があるため、この方法は「ポリメラーゼ連鎖反応」（以下“PCR”）と呼ばれる。標的配列の所望の増幅セグメントが混合物内で支配的な配列（濃度に関して）になるゆえに、このセグメントが「PCRで増幅される」と言われる。PCRにより、ゲノムDNA内の単一コピーの特定の標的配列を、いくつかの異なる方法論（例えば、標識されたプローブによるハイブリダイゼーション；ビオチン化プライマーの組み込みと、続くアビジン-酵素複合体による検出；例えば、dCTPまたはdATPのような32P標識デオキシヌクレオチド3リン酸の増幅セグメントへの組み込み）によって検出できる水準まで増幅することができる。ゲノムDNAに加えて、任意のオリゴヌクレオチド配列も、適切なプライマー分子のセットを用いて増幅され得る。特に、PCRプロセス自体により作り出された増幅セグメントは、これ自体が、続くPCR増幅のための有効なテンプレートである。

【0036】

本明細書における用語「プライマー」は、精製された制限酵素分解物のような天然由来であるか、または合成により産生されたかを問わず、核酸に相補的なプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下（すなわち、ヌクレオチド、および例えばDNAポリメラーゼのような誘導剤が存在し、そして適切な温度およびpHである）に置かれたときに、合成開始点として機能し得るオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、増幅の効率を最大にするために1本鎖が好ましいが、代替として2本鎖でもあり得る。2本鎖である場合には、プライマーは、伸長産物の調製に用いられる前にまず、鎖を分離するよう処置される。プライマーは、オリゴデオキシリボヌクレオチドであることが好ましい。プライマーは誘

10

20

30

40

50

導剤の存在下で伸長産物の合成を開始できるように、十分に長くなければならない。プライマーの正確な長さは、多くの要素（例えば、温度、プライマーの供給源、および使用する方法を含むが、これらに限定されない）に依存する。

【0037】

本明細書における用語「プローブ」は、以下を指す；精製された制限酵素分解物のような天然由来であるか、または合成、組み換え、もしくはPCR増幅によって産生されたかを問わず、目的の他のヌクレオチドとハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチド配列）。プローブは、1本鎖または2本鎖であり得る。プローブは、特定の遺伝子配列の検出、特定、および単離に有用である。本発明で用いられる任意のプローブは、任意の「レポーター分子」によって標識され、そのために、例えば、酵素（例えば、ELISA、および酵素に基づく組織化学アッセイ）、蛍光性、放射性、および発光性システムが挙げられるが、これらに限定されない任意の検出システムによって検出され得ることが企図される。本発明が、任意の特定の検出システムおよび標識に限定されることは、意図されない。

10

【0038】

本明細書における用語「標識」および「検出可能な標識」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、または化学的な手法により検出可能な、任意の組成物を指す。そのような標識として、標識ストレプトアビジンコンジュゲートによる染色のためのビオチンと、磁気ビーズ（例えばダイナビーズ（登録商標））と、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など）と、放射性標識（例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P）と、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、およびELISAで一般的に用いられる他の酵素）と、例えば金コロイドまたは色ガラスビーズもしくは色プラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス、etc.）ビーズのような熱量測定標識とが挙げられる。そのような標識の使用を教示する特許として、米国特許第3,817,837号；第3,850,752号；第3,939,350号；第3,996,345号；第4,277,437号；第4,275,149号；および第4,366,241号（全て、本明細書に参考として援用される）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0039】

好ましい実施形態では、典型的に、標識は蛍光性あり、そしてヌクレオチドの塩基へと連結される。シトシンおよびチミンに関しては、取り付けは通常5位である。他の塩基に関しては、デアザ誘導体が作り出され、そして標識はデアザーアデニンまたはデアザーグアニンの7位に連結される。

30

【0040】

本発明で企図される標識は、多くの方法によって検出され得る。例えば、放射性標識は、写真用フィルムまたはシンチレーション検出器を用いて検出され得、蛍光マーカは、放出された光を検出するための光検出器を用いて検出され得る。典型的には、酵素による標識は、酵素に基質を提供し、そして酵素の基質に対する作用によって産生される反応産物を検出することによって検出される。そして、熱量測定標識は、単純に色付きの標識を視覚化することで検出される。

40

【0041】

本明細書における用語「発光」および／または「蛍光」は、電磁放射（光）を物体、化学物質、および／または化合物から放射させる、任意のプロセスを指す。発光および／または蛍光は、光子の形でエネルギーの開放に相当し、励起状態からより低い状態へと「リラックス」させる系に起因する。これらの状態は、電子的、振電的、回転的、またはこれら3つの任意の組み合わせであり得る。発光の原因となる遷移は、系内部で化学的に蓄えられたエネルギー、または外部供給源から系に加えられたエネルギーの開放を介して刺激され得る。エネルギーの外部供給源は、様々なタイプであり得る（例えば、化学的、熱的、電気的、磁氣的、電磁的、物理的、または系を基底状態より高い状態へと励起させ得る

50

任意の他のタイプが挙げられるが、これらに限定されない)。例えば系は、光の光子の吸収、磁場内への設置、または化学的な酸化還元反応を介して励起され得る。発光の間に放出される光子のエネルギーは、低エネルギーなマイクロ波放射から高エネルギーなX線放射までの範囲内であり得る。典型的には、発光はUVからIR放射の範囲内の光子を指す。特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

標識ヌクレオチドを組み込む方法であって：

a) i) 複数の核酸プライマーおよびテンプレート分子、

ii) ポリメラーゼ、

iii) 化合物の光防護性混合物を含むイメージング試薬、ならびに

iv) 複数のヌクレオチドアナログであって、該ヌクレオチドアナログの少なくとも一部が、切断可能なリンカーを介して塩基へと取り付けられた標識により標識されているヌクレオチドアナログ、
を提供することと；

b) ハイブリダイズされたプライマーを作り出すために、該プライマーの少なくとも一部を該テンプレート分子の少なくとも一部へとハイブリダイズすることと；

c) 組み込まれた標識ヌクレオチドアナログを含む伸長プライマーを作り出すために、第1の標識ヌクレオチドアナログを、該ポリメラーゼを用いて、該ハイブリダイズされたプライマーの少なくとも一部へと組み込むことと；

d) 該組み込まれた標識ヌクレオチドアナログを、該イメージング試薬の存在下でイメージングすることと
を含む、方法。

(項目2)

前記光防護性混合物が、少なくとも1つの蛍光消光阻害剤を含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記少なくとも1つの蛍光消光阻害剤が、troloxである、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記光防護性混合物が、少なくとも1つの抗酸化物質および少なくとも1つのラジカル捕捉化合物をさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目5)

前記少なくとも1つの抗酸化物質が、ゲンチジン酸、プロトカテク酸、およびプロトカテク酸エチルエステルからなる群から選択される、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記少なくとも1つのラジカル捕捉化合物が、カルニチンである、項目4に記載の方法。

(項目7)

ステップ(e)第2のヌクレオチドアナログを、前記ポリメラーゼを用いて、前記伸長プライマーの少なくとも一部へと組み込むこと、をさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目8)

前記標識が蛍光性である、項目1に記載の方法。

(項目9)

少なくとも1つの抗酸化物質、少なくとも1つの蛍光消光阻害剤、および緩衝液を含む、イメージング試薬。

(項目10)

前記少なくとも1つの抗酸化物質が、ゲンチジン酸、プロトカテク酸、およびプロトカテク酸エチルエステルからなる群から選択される化合物を含む、項目9に記載のイメージング試薬。

(項目11)

少なくとも1つのラジカル捕捉剤をさらに含む、項目9に記載のイメージング試薬。

(項目12)

前記少なくとも1つのラジカル捕捉剤が、カルニチンである、項目11に記載のイメージ

10

20

30

40

50

ング試薬。

(項目 13)

前記蛍光消光阻害剤が、t r o l o xである、項目 9 に記載のイメージング試薬。

(項目 14)

前記緩衝液が、T R I S 緩衝液である、項目 9 に記載のイメージング試薬。

(項目 15)

前記緩衝液が、H E P E S 緩衝液である、項目 9 に記載のイメージング試薬。

(項目 16)

i) 少なくとも 1 つの抗酸化物質、少なくとも 1 つの蛍光消光阻害剤、および緩衝液を含むイメージング試薬を含む第 1 の容器、ならびに

i i) 複数のヌクレオチドアナログを含む第 2 の容器であって、該ヌクレオチドアナログの少なくとも一部が、切断可能なリンカーを介して塩基へと取り付けられた標識により標識されている、第 2 の容器、

を含むキット。

(項目 17)

前記第 1 の容器が、少なくとも 1 つのラジカル捕捉剤をさらに含む、項目 16 に記載のキット。

(項目 18)

前記少なくとも 1 つのラジカル捕捉剤が、カルニチンである、項目 17 に記載のキット。

(項目 19)

前記少なくとも 1 つの蛍光消光阻害剤が、t r o l o xである、項目 16 に記載のキット。

(項目 20)

前記緩衝液が、T R I S 緩衝液である、項目 16 に記載のキット。

(項目 21)

前記緩衝液が、H E P E S 緩衝液である、項目 16 に記載のキット。

(項目 22)

切断可能な標識を取り付けられた複数のヌクレオチドアナログを含むテンプレートへとハイブリダイズされるプライマーの溶液と、少なくとも 1 つの抗酸化物質、少なくとも 1 つの蛍光消光阻害剤、および緩衝液を含むイメージング試薬とを含む、システム。

(項目 23)

前記ハイブリダイズされるプライマーおよび前記テンプレートが、固定されている、項目 22 に記載のシステム。

(項目 24)

前記ハイブリダイズされるプライマーおよび前記テンプレートが、フローセル内にある、項目 22 に記載のシステム。

(項目 25)

前記イメージング試薬が、少なくとも 1 つのラジカル捕捉剤をさらに含む、項目 22 に記載のシステム。

(項目 26)

前記少なくとも 1 つのラジカル捕捉剤が、カルニチンである、項目 25 に記載のシステム。

(項目 27)

前記少なくとも 1 つの蛍光消光阻害剤が、t r o l o xである、項目 22 に記載のシステム。

(項目 28)

前記緩衝液が、T R I S 緩衝液である、項目 22 に記載のシステム。

(項目 29)

前記緩衝液が、H E P E S 緩衝液である、項目 22 に記載のシステム。

(項目 30)

i) T R I S H C l 緩衝液；

i i) およそ 5 ～ 5 0 m M の範囲内の濃度のカルニチン；

10

20

30

40

50

i i i) およそ 5 ~ 15 mM の範囲内の濃度の t r o l o x ;

i v) およそ 10 ~ 50 mM の範囲内の濃度の 2 , 5 - ジヒドロキシ安息香酸 ; および

v) およそ 10 ~ 20 mM の範囲内の濃度の 3 , 4 - ジヒドロキシ安息香酸エチルエステル、

を含むイメージング試薬。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】図1は、従来のイメージング緩衝液構成と光防護性緩衝液構成との間の、ワークフローの比較を提示する。図1A：従来のイメージング緩衝液キット構成のための例示的なワークフロー。図1B：新規かつ向上された、切断およびイメージング緩衝液消耗品を含む光防護性イメージング緩衝液キット構成。

10

【図2】図2は、SBS評価指標が従来のイメージング緩衝液と光防護性イメージング緩衝液7Bとの間で同等である、ということを示す例示的なデータを提示する。

【図3-1】図3は、従来のイメージング緩衝液と光防護性イメージング緩衝液7Bとの間の、各SBSラン後のリード長の分布の比較を示す例示的なデータを提示する。図3A：ラン8.3 図3B：ラン8.5 図3C：ラン8.6 図3D：ラン8.41（再試験）

【図3-2】同上

【図4-1】図4は、従来のイメージング緩衝液と光防護性イメージング緩衝液7Bとの間の、各SBSラン後の生エラープロットを示す例示的なデータを提示する。図4A：ラン8.3 図4B：ラン8.5 図4C：ラン8.6 図4D：ラン8.41（再試験）

20

【図4-2】同上

【図5】図5は、従来のイメージング緩衝液（IB__ベースライン）と3バージョンの光防護性イメージング緩衝液SC-Pバージョン9との間の、平均リード長のデータの比較を示す例示的なデータを提示する。

【図6-1】図6は、従来のイメージング緩衝液（IB__ベースライン）と3バージョンの光防護性イメージング緩衝液SC-Pバージョン9との間の、生エラープロットのデータの比較を示す例示的なデータを提示する。図6A：光防護性イメージング緩衝液SC-P9。図6B：光防護性イメージング緩衝液SC-P9B。図6C：光防護性イメージング緩衝液SC-P9C。

30

【図6-2】同上

【図7】図7は、ヌクレオチドシグナルの保持における、イメージング緩衝液中のイオンおよび芳香族化合物の濃度の低下の影響を示す例示的なデータを提示する。

【図8】図8は、SC-P9Cイメージング試薬を用いるシーケンシングランにおける生エラー率を、ベースラインIBに対して示す例示的なデータを提示する。

【図9】図9は、HEPES緩衝液またはTRIS緩衝液で調合されたSC-P9Cイメージング試薬を用いるシーケンシングランにおける生エラー率を、ベースラインIBに対して示す例示的なデータを提示する。図9A：HEPES緩衝液を用いる結果。図9B：TRIS緩衝液を用いる結果。

【図10】図10は、カルニチン濃度がMFSTデータ出力へと与える影響を、101x遺伝子パネル（青）およびBRCA遺伝子パネル（赤）の両方について示す例示的なデータを提示する。

40

【図11】図11は、カルニチン濃度が完全パラメーターのパーセントへと与える影響を、101x遺伝子パネル（青）およびBRCA遺伝子パネル（赤）の両方について示す例示的なデータを提示する。

【図12】図12は、カルニチン濃度が平均リード長へと与える影響を、101x遺伝子パネル（青）およびBRCA遺伝子パネル（赤）の両方について示す例示的なデータを提示する。

【図13】図13は、カルニチン濃度がエラー率のパーセントへと与える影響を、101x遺伝子パネル（青）およびBRCA遺伝子パネル（赤）の両方について示す例示的なデ

50

ータを提示する。

【図14】図14は、カルニチン濃度が生エラー率へと与える影響を、101x遺伝子パネル（青）およびBRCA遺伝子パネル（赤）の両方について示す例示的なデータを提示する。図14A：SC-9IBおよびSC9BIB 対 リファレンスIB。図14B：SC-9DIB 対 リファレンスIB。

【図15】図15は、カルニチン濃度がリード長の分布へと与える影響を、101x遺伝子パネル（青）およびBRCA遺伝子パネル（赤）の両方について示す例示的なデータを提示する。図15A：SC-9IBおよびSC9BIB 対 リファレンスIB。図15B：SC-9DIB 対 リファレンスIB。

【図16】図16は、カルニチン濃度がヌクレオチドシグナルの保持へと与える影響を、101x遺伝子パネル（青）およびBRCA遺伝子パネル（赤）の両方について示す例示的なデータを提示する。

【発明を実施するための形態】

【0043】

本発明の詳細な記載

本発明は、例えばsequencing-by-synthesis法を用いる、記載される方法、組成物、装置、システムおよびキット（ヌクレオチド配列内の核酸の正体を決定するための試薬および混合物を含むが、これらに限定されない）に関連する。特に、本発明は、イメージング試薬として化合物の光防護性緩衝液混合物を使用して、蛍光化合物（蛍光標識された核酸を含むが、これに限定されない）の安定性および保存を向上することを企図する。

【0044】

1つの実施形態では、本発明は、sequencing-by-synthesis（SBS）法の間イメージング試薬としての光防護性混合物を含む組成物を企図する。1つの実施形態では、イメージングを含む方法は、蛍光体検出ステップの間に生じる。1つの実施形態では、イメージングを含む方法は、ヌクレオチド組み込みの後に生じる。1つの実施形態では、光防護性混合物は例えば以下の化合物を含むが、これらに限定されない：カルニチン；6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸（trolox）；2, 5-ジヒドロキシ安息香酸（ゲンチジン酸）；3, 4-ジヒドロキシ安息香酸（プロトカテク酸）；3, 4-ジヒドロキシ安息香酸エチルエステル（プロトカテク酸エチルエステル）；4-ヒドロキシケイ皮酸；3, 4-ジヒドロキシベンゼンアクリル酸；1, 4-ジアザビシクロ[2, 2, 2]オクタン（DABCO）；リポ酸および／またはアセチルカルニチン。

【0045】

1つの実施形態では、本発明は、150bpリード長のシーケンシングのための方法を企図する。以下を含むがこれらに限定されない、他の有意な追加利益も提供される：製造、保存および品質制御プロセスの向上、キットのコンセプトおよびワークフローが使用者に分かりやすいことによる利便性の向上、次世代シーケンシングプラットフォームであるフルイディクスを通じて個々の構成要素を混合する必要がない、単一構成要素の溶液の送達に起因する機器の信頼性の向上。

【0046】

I. Sequencing-By-Synthesis（SBS）法

1つの実施形態では、本発明は、自動化sequencing-by-synthesis装置（例えば次世代シーケンシングプラットフォーム）によって実施される一連の方法ステップを企図する。米国特許第9, 145, 589号（本明細書に参考として援用される）を参照。1つの実施形態では、当該装置は多数の試薬リザーバーから構成される。各試薬リザーバーは、SBSプロセスをサポートするためにリザーバー内に分配された特定の反応試薬を有し、例えば：

1つの実施形態では、SBS法は異なるステーションで異なるステップを行うことを含む。例として、各ステーションは、特定のステップと関連する。特定の調合物に限定されな

10

20

30

40

50

いが、これらのステップおよび関連する試薬のいくつかの例が、以下に示される：

1) 伸長 A 試薬：可逆的に終結される標識ヌクレオチド、およびポリメラーゼを含む。伸長 A 試薬の 1 つの組成は、以下であり得る：

【表 6 - 1】

構成要素	濃度	
PNSE (% wt/vol)	0.005%	
Tris x HCl (pH 8.8), mM	50	
NaCl (mM)	50	10
EDTA (mM)	1	
MgSO ₄ (mM)	10	
シスタミン (mM)	1	
グリセロール (% wt/vol)	0.01%	
Therminator IX* (U/ml)	10	
N3-dCTP (μM)	3.83	
N3-dTTP (μM)	3.61	
N3-dATP (μM)	4.03	20
N3-dGTP (μM)	0.4	
アレクサ488-dCTP (nM)	550	
R6G-dUTP (nM)	35	

【表 6 - 2】

ROX-dATP (nM)	221	
Cy5-dGTP (nM)	66	30

*アルキル化フリーシステインを有する

2) 伸長 B 試薬：可逆的に終結される無標識ヌクレオチド、およびポリメラーゼを含むが、標識ヌクレオチドアナログを欠く。伸長 B 試薬の 1 つの組成は、以下であり得る：

【表 7】

構成要素	濃度
PNSE (% wt/vol)	0.005%
Tris x HCl (pH 8.8), mM	50
NaCl (mM)	50
EDTA (mM)	1
MgSO ₄ (mM)	10
グリセロール (% wt/vol)	0.01%
Therminator IX* (U/ml)	10
N3-dCTP (μM)	21
N3-dTTP (μM)	17
N3-dATP (μM)	21
N3-dGTP (μM)	2

* アルキル化フリーシステインを有する

3) 洗浄剤 (例えばポリソルベート 20)、クエン酸緩衝液 (例えば生理食塩水) を有する、洗浄溶液 1

4) 切断試薬: 切断試薬の 1 つの組成は、以下であり得る:

【表 8】

構成要素	濃度
NaOH (mM)	237.5
TrisHCl (pH 8.0) (mM)	237.5
TCEP (mM)	50

5) 洗浄剤 (例えばポリソルベート 20)、トリス (ヒドロキシメチル) - アミノメタン (Tris) 緩衝液を有する、洗浄溶液 2。

【0047】

II. 従来のイメージング溶液

現在イメージング試薬 (IB) として用いられている酵素の調合物の 1 つは、4 つの構成要素を含む。これら 4 つの構成要素は、HEPES 緩衝液、グルコースオキシダーゼ、グルコース、および *t*rolon を含み、そして、SBS 法をサポートするに先立って、組み合わされて 2 つの別々の溶液を作る必要がある。グルコースオキシダーゼおよびグルコースが時期尚早に酸素と反応し、酵素系の分解および H₂O₂ の放出を引き起こすことを防ぐため、これらの 2 つの溶液は、シーケンシングプロセスに渡って分けられていなければならない。これらの 2 つの最終溶液は、SBS の間に混合弁を介して、各イメージングステップでフローセルに導入される前に混合される。このタイプのイメージング方法ステップの使用は、有効ではあるが、いくつかの分野において、以下を含むがこれらに限定されない困難をもたらす: i) 製造プロセスの安定性; ii) 複雑な *ex o*/*end o* 仕様パラダイムゆえの品質制御の維持; iii) 複雑なキット構成およびワークフローゆえの使いにくさ; iv) 混合弁の信頼性の問題を原因とする送達量の失敗様式ゆえの、限定的な機器の信頼性。本明細書に見られるように、従来の、またはベースラインのイメージング試薬 (IB) は、本開示の光防護性混合物イメージング試薬の様々な実施形態の性能ベンチマークのために用いられる。

【0048】

III. 光防護性イメージング溶液

1つの実施形態では、SBS法のための有効なイメージング溶液および緩衝液調合物は、露光の間の光防護を確実にする分子構成要素を含む。理論に拘束されないが、これらの構成要素は、3つの主要な現象を防ぐと考えられる：i) ヌクレオチド蛍光標識の光退色；ii) シグナルの消光；およびiii) ラジカルで誘導されるDNAの光損傷および光切断。イメージング溶液は、酵素システムとしてか、または様々な化学物質混合物（例えば、分子的な酸素「捨て場」、つまり、抗酸化物質／ラジカル捕捉剤および一重項酸素クエンチャーを含むが、これに限定されない混合物）を含む混合物のいずれかとして調合され得る。これらの混合物内のいくつかの構成要素は、長期保存の際の酸化ストレスおよびイメージング溶液の分解に対するさらなる保護も提供する。

10

【0049】

発明の機構について理解する必要はないが、「混合物」または「カクテル」によるアプローチは、保存期間の長いイメージング試薬を調合するために最適であると考えられる。これは、当該アプローチが、機能的な性能および調合の安定性から、製造性、利便性および保存に渡る、製品設計の頑健性に付随する様々な機能的な側面を最もサポートするからである。

【0050】

1つの実施形態では、本発明は、sequencing-by-synthesis (SBS) 法におけるヌクレオチドの組み込みの後の蛍光体検出ステップの間の、イメージング試薬としての光防護性混合物を企図する。これらの光防護性混合物イメージング試薬は、有効な抗酸化物質（例えば、2,5-ジヒドロキシ安息香酸（ゲンチジン酸）；3,4-ジヒドロキシ安息香酸（プロトカテク酸）、または3,4-ジヒドロキシ安息香酸エチルエステル（プロトカテク酸エチルエステル）であるが、これらに限定されない）、蛍光消光阻害剤（例えば6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸（trolox）であるが、これに限定されない）、ならびにラジカル捕捉剤（例えばカルニチン）、抗酸化物質および／または一重項酸素クエンチャーを含む。

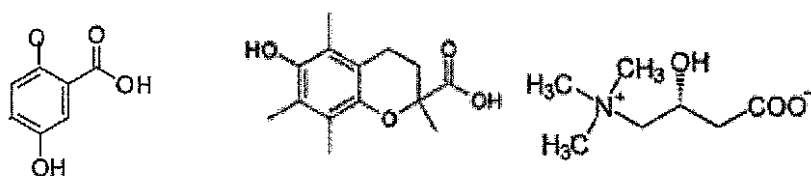
20

【0051】

1つの実施形態では、光防護性カクテルは、以下の構成要素を含む混合物（例えばイメージング試薬SCP7B）を含む：

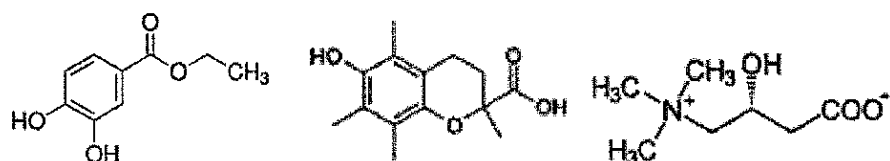
30

【化1】



1つの実施形態では、光防護性カクテルは、以下の構成要素を含む混合物（例えばイメージング試薬SCP9C）を含む：

【化2】



40

上で例示された光防護性カクテル混合物は、光防護性、安定性、製造性、長期保存性、および利便性を含むが、これらに限定されない特性を考慮して設計されている。これらの混合物はまた、入手可能なシーケンシングキット（すなわち、GeneReader（登録商標）1.1シーケンシングキット）との互換性のためにも設計されている。特に力

50

ルニチンは、酸化ストレスの減少、ならびに化学活性および／または生物学的機能の保存を、生物学的な液体または機能的な緩衝液の長期保存の後であっても誘導することが見出されている。理論に拘束されないが、カルニチンはおそらく、酸素、ペルオキシラジカル、または一重項酸素を含むがこれらに限定されない分子に起因する酸化ストレスの減少ゆえに、複雑な分子混合物の保存性の増強をサポートし得る。発明の機構を理解する必要はないが、例えばカルニチンのような化合物は、その保護的な特性（分子の還元状態および化学結合の切断（例えば、ラジカルまたは光による切断）に対する安定性を含むが、これらに限られない）を、たとえ調合物としての長期保存の時でも保持すると考えられる。

【0052】

本明細書において提供されるデータは、イメージング試薬としての化合物の様々な光防護性イメージング混合物についての照会能力を実証する。さらに、シークエンスの最後に装置および液体廃棄物の両方の検査から観察されているように、SBS装置ハードウェアとの完全な互換性が全ての構成要素に対して確認される。本開示の光防護性混合物イメージング試薬の向上が、シーケンシングワークフローの比較と共に例示される。

【0053】

例えば、光防護性混合物イメージング試薬のための予想されるキットの構成が、 -20°C の保存条件と相性の良いキットボックス内で保存される、単一構成要素の消耗品として示される。図1を参照。従来のイメージング試薬キット構成のための比較ワークフロー（図1A）は、本開示の光防護性イメージング試薬キット構成（図1B）とは反対に、複雑性の増加を示している。発明の機構を理解する必要はないが、本開示の光防護性イメージング試薬のキット構成は、キットおよびワークフロー内の必要とされる構成要素の数を減らすことにより、SBS法の間の利便性を大きく向上させると考えられる。

【0054】

本発明で企図される光防護性イメージング試薬は、長いリード長のシークエンスの実施（例えば、およそ150bp）について試験されている。これらの試験のいくつかは、157サイクルのシーケンシング、および従来のイメージング試薬（例えばベースラインIB試薬）に対する光防護性混合物イメージング試薬の一対一の比較を伴った。研究は、GeneReader装置および2つのタイプのDNAライブラリー、すなわちNA12878／101X遺伝子パネルおよびNA12878／BRCA遺伝子パネルを用いて実施された。シーケンシング評価指標が、例えば、生エラー率、平均リード長、出力（Gb）のような比較システム性能指標を提供するために解析された。

【0055】

例えばGDP4試験は、実施例IIに従って作られた光防護性イメージング緩衝液SCP7Bを用いて実施された。当該試験は、157サイクルおよび130サイクルを含むAPFプロトコルv2を用いて、SP101x遺伝子パネルを利用してランされた。実施されたランのうちの1つ（例えば8.41）は、無効とみなされて再試験された（”**”で注釈）。従来のイメージング試薬（ベースラインIB）および光防護性イメージング試薬SCP7Bは、全てのシーケンシング評価指標に渡って同等であったということが分かる。図2および表1を参照。

表1：シーケンシング評価指標の比較：従来のIB（ベースライン）対SCP7BIB

10

20

30

40

50

【表 1】

日付	ラン	GR	試料番号	出力 (MFST)	ピース/タイル	エラー率	%ライブ	%マップ化	%ポリクローマル	%完全	AVG RL	リード	ラグ
3/25/2016	IB 78	8.5	SP101x	1.77127963	429218.169	0.747583	48%	29%	36%	0.5955009	109.6339	0.337969	0.1115
4/15/2016	IB 78 再テスト**	8.41	SP101x	1.904151381	428153.625	0.775158	50%	31%	35%	0.5969785	110.6978	0.405625	0.084068
4/5/2016	IB 78	8.6	SP101x	1.87757536	440901.246	0.751118	49%	30%	34%	0.5990901	108.7261	0.347992	0.098931
4/11/2016	IB 78	8.3	SP101x	2.052871269	444646.646	0.728655	51%	31%	35%	0.6067697	113.2278	0.406538	0.117338
				1.901	435729	0.75%	49%	30%	35%	59%	110	0.374	0.102

日付	ラン	GR	試料番号	出力 (MFST)	ピース/タイル	エラー率	%ライブ	%マップ化	%ポリクローマル	%完全	AVG RL	リード	ラグ
3/28/2016	ベースライン	8.5	SP101x	1.852687368	434523.031	0.795124	48%	29%	36%	0.5857853	112.4375	0.4325	0.123562
3/28/2016	ベースライン	8.41	SP101x	1.808664963	435729	0.77365	49%	29%	37%	0.5938026	110.3599	0.424246	0.126323
4/8/2016	ベースライン	8.6	SP101x	1.890117702	438295.654	0.803485	51%	31%	36%	0.583074	108.433	0.332783	0.187277
4/14/2016	ベースライン	8.3	SP101x	2.023612666	431433.115	0.778109	52%	31%	36%	0.5949944	115.0466	0.409185	0.157954
				1.893	434999	0.75%	49%	30%	36%	58%	111	0.399	0.149

これらのデータは、光防護性イメージング試薬 S C - P 7 B を用いて検定した場合、評価指標のラグのみが、30%低いラグで統計学的に関連のある違いを2つのイメージング試薬間で示す、ということを示す。2つのイメージング試薬間で検定した場合、4ラン間でのリード長の分布は同等であった。図3A-3Dを参照。2つのイメージング試薬間で検定した場合、4ラン間での生エラープロットも同等であった。図4A-4Dを参照。

【0056】

試験は、実施例 I I I に従って作られる例示的な光防護性イメージング試薬 9 C V 2 T の様々な実施形態を用いても実施された。3つの異なるバージョンの 9 C V 2 T 試薬が作られた。発明の機構を理解する必要はないが、3つの試薬の内の少なくとも1つは、シグナル保持の向上という結果をもたらしたと考えられる。例えば、3つの試験されたバージョンの 9 C V 2 T イメージング試薬は、以下を含んだ：

【表 9】

SC-P9 pH 8.5

Tris	50 mM
L-カルニチン	50 mM
Trolox	15 mM
プロトカテク酸	20 mM
エチルエステル	

または

10

20

30

40

50

【表 1 0】

SC-P9B pH 8.5

Tris	50 mM
L-カルニチン	15 mM
Trolox	15 mM
プロトカテク酸 エチルエステル	20 mM

10

および

【表 1 1】

SC-P9C pH 8.5

Tris	50 mM
L-カルニチン	15 mM
Trolox	15 mM
プロトカテク酸 エチルエステル	10 mM

20

基本的なシーケンシング評価指標の比較が、これら3つのSC-Pバージョン9CV2
Tイメージング試薬と従来のIB試薬との間において、137サイクルのシーケンシン
グプロトコルでワクチニアウイルス（VACV）株TianTanTP03ゲノムを用い
てなされた。表2を参照。

30

表2：SC-Pバージョン9IBと従来のIB（IB__ベースライン）との間の、シーク
エンシング評価指標の比較

【表 2】

ラン名	GR/試料	出力(MFST)	%マップ化	AVG RL	エラー率 (MFST)	%完全	リード	ラグ
IB__ベースライン	8.26/TP03	1.23E+09	32.6%	99.5	0.60%	67.6%	0.421	0.125
IB_SC-P9	8.26/TP03	1.21E+09	33.1%	98.5	0.54%	69.00%	0.407	0.116
IB_SC-P9B	8.26/TP03	1.16E+09	31.8%	98.9	0.54%	69.1%	0.369	0.124
IB_SC-P9C	8.17/TP03	1.12E+09	30.6%	99.7	0.58%	67.5%	0.432	0.093

40

相対的な同等性が、これらのSC-Pバージョン9CV2Tイメージング試薬とベースラ
インイメージング試薬との間において、平均リード長の点で見られた。図5を参照。この
ような同等性は、SC-Pバージョン9CV2Tイメージング試薬とベースラインイメー
ジング試薬との間の生データプロットについても見られた。図6A-Cを参照。これらの
データは、イオンおよび芳香族化合物（例えばそれぞれ、カルニチンおよびプロトカテク
酸）の濃度低下がシグナル保持を向上させるということを実証する。図7を参照。発明の
機構を理解する必要はないが、この観察結果はおそらく、シグナル消光（通常、光防護性

50

緩衝液中の蛍光体と芳香族／イオン種との間の相互作用によって生ずる)の軽減ゆえと考えられる。

【0057】

SC-P9Cイメージング試薬が、157サイクルの非APF／88タイルプロトコルにおいて、BRCA遺伝子パネルに対して用いられた(ラン8.17;8.24;8.26)。シーケンシング評価指標は、リファレンスイメージングIBに対して比較された。

表3を参照。

表3: BRCA遺伝子パネルにおける、ベースラインIBに対するSC-P9Cのシーケンス評価指標の比較

【表3】

ラン条件	GR	ラン日付	タイプ	出力 (MFST)	ビーズ/タイル	%ライプ	%マップ化	%ポリロ-ナル	AVG RL	エラー (MFST)	%完全	リード	ラグ
ベースライン_BRCA	8.17	4/15/2016	HG19 BRCA	1.14E+09	426294	47%	26%	41%	115.0	0.72%	56%	0.513	0.060
ベースライン_BRCA	8.17	4/15/2016	HG19 BRCA	1.17E+09	424933	45%	27%	38%	114.0	0.74%	57%	0.466	0.091
プロトタイプ9C_BRCA	8.26	4/15/2016	HG19 BRCA	1.09E+09	428096	44%	26%	36%	110.0	0.78%	53%	0.477	0.061
プロトタイプ9C_BRCA	8.26	4/15/2016	HG19 BRCA	1.14E+09	422093	45%	26%	36%	112.0	0.79%	54%	0.446	0.084
プロトタイプ9C_BRCA	8.24	4/15/2016	HG19 BRCA	1.13E+09	427948	43%	25%	35%	110.0	0.82%	51%	0.444	0.072
プロトタイプ9C_BRCA	8.24	4/15/2016	HG19 BRCA	1.13E+09	424163	43%	26%	35%	113.0	0.87%	52%	0.454	0.052

生エラー率の比較は、2つのイメージング試薬間の同等性を実証した。図8を参照。SC-P9Cイメージング試薬のシーケンシング評価指標はまた、HEPES緩衝液とTRIS緩衝液との間においても、157サイクルの非APF／88タイルプロトコルを用いて、DHMG02BRCA遺伝子パネルにおいて比較された。表4を参照。

表4: HEPES緩衝液とTRIS緩衝液とを比較する、BRCA遺伝子パネルにおけるベースラインIBに対するSC-P9Cのシーケンス評価指標の比較

【表4】

ラン条件	GR	試料番号	ラン日付	タイプ	サイクル	出力 (MFST)	ビーズ/タイル	%ライプ	%マップ化	%ポリロ-ナル	AVG RL	エラー (MFST)	%完全	リード	ラグ
Ref. ベースライン	8.24	FC1_DHM02	4/26/2016	HG19 BRCA	150	1.28E+09	419417	51%	31%	36%	110.8	0.83%	56%	0.490	0.024
Ref. ベースライン	8.24	FC2_DHM02	4/26/2016	HG19 BRCA	150	1.34E+09	409874	50%	33%	36%	113.2	0.83%	56%	0.490	0.035
IB_P9CV2_HEPES	8.26	FC1_DHM02	4/26/2016	HG19 BRCA	150	1.37E+09	417428	49%	31%	35%	112.6	0.79%	57%	0.420	0.040
IB_P9CV2_HEPES	8.26	FC2_DHM02	4/26/2016	HG19 BRCA	150	1.35E+09	423908	50%	32%	35%	114.5	0.76%	58%	0.448	0.046
Proto9C_V2_Tris	8.26	FC1_DHM02	4/15/2016	HG19 BRCA	150	1.07E+09	428096	44%	20%	36%	109.0	0.90%	51%	0.477	0.061
Proto9C_V2_Tris	8.26	FC2_DHM02	4/15/2016	HG19 BRCA	150	1.10E+09	422093	45%	26%	36%	111.5	0.94%	52%	0.446	0.084
Proto9C_V2_Tris	8.24	FC1_DHM02	4/15/2016	HG19 BRCA	150	1.09E+09	427948	43%	25%	35%	108.7	1.03%	50%	0.444	0.072
Proto9C_V2_Tris	8.24	FC2_DHM02	4/15/2016	HG19 BRCA	150	1.08E+09	424163	43%	26%	35%	112.3	1.02%	50%	0.454	0.052

このデータは、HEPES緩衝液で調合されたSC-P9Cイメージング試薬はTris HCl緩衝液で調合されたSC-P9Cイメージング試薬よりも優れる、ということを実証する。同様に生エラー率は、HEPES緩衝液を用いる際にTris HCl緩衝液と比較して低く、そしてベースラインIBにより近い。図9Aおよび9Bを参照。

【0058】

これらのデータは、プロトカテク酸エチルエステルを有する光防護性イメージング試薬は、ゲンチジン酸を有する光防護性イメージング試薬より、シグナルの安定性および質という点で優れているということを実証する。発明の機構を理解する必要はないが、シグナルの安定性および質は、シーケンシングの性能品質に関与すると考えられる。それでもなお、ゲンチジンおよびプロトカテクに基づくカクテル化学物質(すなわち、それぞれSC-P7BおよびSC-P9C)はいずれも、長いリードのシーケンシングのための性能の比較に関して、競合的にベンチマークすることを期待される。しかし製造の観点から、当該調合物の生成におけるより良い柔軟性および費用対効果ゆえに、プロトカテク酸エチルエステルを有する光防護性イメージング試薬が、ゲンチジン酸を有する光防護性イメージング試薬よりも好ましくあり得る。

【0059】

光防護性イメージング試薬内のカルニチン濃度の減少(例えば、およそ50mMから5mMの間)がシーケンシング性能に影響するかどうかを決定するために、さらなる研究が実施された。試験された光防護性カルニチンイメージング試薬(例えば、SC-P9、SC-P9B、およびSC-P9C)の組成は、以下である:

10

20

30

40

50

【表 1 2】

Prototype 9

50 mM	Tris 緩衝液 pH 8.5
50mM	L- カルニチン
15 mM	Trolox
20 mM	プロトカテク酸エチル エステル

10

【表 1 3】

Prototype 9B

50 mM	Tris 緩衝液 pH 8.5
15 mM	L-カルニチン
15 mM	Trolox
20 mM	プロトカテク酸エチル エステル

20

【表 1 4】

Prototype 9D

50 mM	Tris 緩衝液 pH 7.8
5 mM	L-カルニチン
15 mM	Trolox
20 mM	プロトカテク酸エチル エステル

30

シーケンシングラン（8.17、8.24、8.26）セットアップは、試料NA12878／101X（ID：TP03）またはNA12878／BRCA（ID：DHMG02）を用いる、リファレンスならびに／またはベースラインIB試薬および光防護性IB試薬の両方についての132サイクルを含んだ。当該データは、平均リード長およびシグナル保持に基づいて、15 mMカルニチンが最適な作業濃度を提供するということを示す。表5を参照。

40

表5. カルニチン濃度解析からのADAM結果

50

【表 5】

ラン条件	試料番号	ラン日付	タイプ	サイクル	出力(MFST)	ピーク/サイクル	%BC	%マッピング	リード長	エラー率	%完全	リード	ラジ	注釈
IB ベースライン 8.26 FC1	TP03 FC1	3/30/2016	HC19 101X	125	1.18E+09	446579.5	48.8%	73.0%	31.3%	99.0	0.52%	0.415	0.139	ベースライン 101X
IB ベースライン 8.26 FC2	TP05 FC2	3/30/2016	HC19 101X	125	1.20E+09	414836.1	51.2%	73.6%	32.5%	100.9	0.54%	0.378	0.149	ベースライン 101X
IB ベースライン 8.17 FC1	FC1 TP03	4/4/2016	HC19 101X	125	1.27E+09	624581.5	58.6%	74.3%	34.1%	99.4	0.58%	0.470	0.105	ベースライン 101X
IB ベースライン 8.17 FC2	FC2 TP03	4/4/2016	HC19 101X	125	1.26E+09	426191.8	57.8%	73.9%	33.2%	100.9	0.59%	0.423	0.127	ベースライン 101X
IB SC-P9 FC1	FC1 TP03	4/4/2016	HC19 101X	125	1.21E+09	424152.6	52.4%	74.6%	33.6%	97.9	0.57%	0.408	0.111	50mM カルニチン
IB SC-P9 FC2	FC2 TP03	4/4/2016	HC19 101X	125	1.22E+09	432521.2	52.8%	75.1%	33.1%	97.0	0.56%	0.406	0.122	50mM カルニチン
IB SC-P9B FC1	FC1 TP03	4/11/2016	HC19 101X	125	1.19E+09	419886.9	49.6%	73.3%	31.7%	98.6	0.52%	0.389	0.126	15mM カルニチン
IB SC-P9B FC2	FC2 TP03	4/11/2016	HC19 101X	125	1.16E+09	414872.6	49.9%	73.5%	31.9%	98.2	0.54%	0.389	0.123	15mM カルニチン
ベースライン BRCA AGR 8.17	1 DHMAG	4/19/2016	HC19 BRCA	125	1.01E+09	426294.1	47.1%	73%	26%	103.5	0.65%	0.473	0.139	ベースライン BRCA
ベースライン BRCA AGR 8.17	2 DHMAG	4/19/2016	HC19 BRCA	125	1.03E+09	414872.6	45.1%	72%	27%	104.1	0.70%	0.431	0.117	ベースライン BRCA
IB ProSeo SC BRCA AGR 8.26	1 DHMAG	4/19/2016	HC19 BRCA	125	9.85E+08	423794.6	44.9%	73%	27%	97.2	0.65%	0.425	0.101	5mM カルニチン
IB ProSeo SC BRCA AGR 8.26	2 DHMAG	4/19/2016	HC19 BRCA	125	1.02E+09	430237.1	45.6%	73%	27%	93.0	0.67%	0.425	0.111	5mM カルニチン

特にカルニチン濃度の減少は、101x 遺伝子パネルおよびBRCA 遺伝子パネルの両方において濃度依存的に、データ出力(MFST)を低下させる。図10を参照。この出力データは、リファレンスIB試薬と比較して完全パラメーターのパーセントが変わらなかった条件下で集められた。図11を参照。しかし、光防護性イメージング試薬がカルニチンを含む場合、平均リード長が全体的に低下することが分かった。図12を参照。それでもなお、リファレンスIBと比較された場合、エラー率のパーセントにおいてカルニチンを含む光防護性イメージング試薬の影響はなかった。図13を参照。しかし、異なるカルニチン濃度を有する光防護性イメージング試薬の間では、生エラー率パラメーターの点で違いがあった。例えば、SC-9IB試薬(50mMカルニチン)およびSC-9BIB試薬(15mMカルニチン)は、リファレンスIBに類似する生エラー率を有した。図14Aを参照。しかし、SC-9DIB試薬(5mMカルニチン)は、リファレンスIB試薬と比較してより高い生エラー率を示した。図14Bを参照。このデータパターンは、試験されたイメージング試薬間において、リード長の分布について見られた。SC-9IB試薬(50mMカルニチン)およびSC-9BIB試薬(15mMカルニチン)は、リファレンスIB試薬に類似したリード長分布を有した。図15Aを参照。しかし、SC-9DIB試薬(5mMカルニチン)は、初期サイクルへバイアスがかかり、そしてリファレンスIB試薬と比較してやや低いリード長分布を示した。図15Bを参照。光防護性IB試薬のカルニチン濃度(例えば、SC-9Bにおいては15mM)が下がると、シグナル保持が最高になるということが示すように、すべてのヌクレオチドに関するシグナル保持はカルニチンの存在下において減少した。図16を参照。

【0060】

全体として、本明細書において提供されるデータは、光防護性SC-P7BIB試薬およびSC-P9CIB試薬が、従来のイメージング緩衝液試薬(例えば、ベースラインIB)と同様の性能を有し、そして本分野の遺伝子リーダーの状態と互換的な、平均リード長の必要最小限を送達する、ということを示す。特に、当該データは、およそ110bpの平均リード長をスキャンする場合、本明細書において企図される光防護性イメージング緩衝液試薬は、本分野の遺伝子リーダーの最適スキャン幅(およそ110~130bpの間)の状態と比較して有効である、ということを示す。

【実施例】

【0061】

実験

実施例I

光防護性イメージング調合物の安定性および保存

本明細書に記載される様々な光防護性イメージング混合液の構成要素を、溶解性、沈殿に対する安定性、およびTris HClを緩衝塩基として用いるイメージング溶液調合物内での変色のために試験した。様々な構成要素のための最適濃度ウィンドウは、以下のように見出されている: カルニチン(5~50mM); Trolox(5~15mM); 2,5-ジヒドロキシ安息香酸(10~50mM); および3,4-ジヒドロキシ安息香酸

エチルエステル（プロトカテク酸エチルエステル）（10～20mM）。

【0062】

実施例ⅠⅠ

光防護性イメージング試薬SC-P7Bの組成および調合

以下の例は、およそ200ミリリットルの、4FC/157サイクルのSBS法をサポートすることが期待されるイメージング試薬の調製について記載する。

・50mM Tris緩衝液：121.4g/mol=1.21g（Sigma：Cat # T1378-1kg）

・50mM Lカルニチン：197.66g/mol=1.98g（Sigma：Cat # C0283-100G）

・15mM Trolox：250.29g/mol=0.75g（Sigma：Cat # 238813-5G）

・50mM ゲンチジン酸：176.1g/mol=1.76g（Sigma：G5129-10G）

1. Tris塩基を180mLミリQ水に溶解する。

2. ステップ1のトリス緩衝液にTroloxを添加する。

3. 上記溶液にLカルニチンを添加する。

4. ゲンチジン酸ナトリウム塩水和物を添加し、そして溶解する。

5. pHをチェックする：約4。

6. 10M NaOH溶液によってpHを7.8に調整する。

7. ミリQ水によって総体積を200mLにする。

8. フィルター滅菌。

9. 単一FC GRランのために、イメージング緩衝液を2つのコニカルチューブに分ける（それぞれ分割量およそ25mL）。

【0063】

実施例ⅠⅡ

光防護性イメージング試薬9CV2Tの組成および調合

以下の例は、およそ200ミリリットルのイメージング試薬の調製について記載する。

・50mM Tris緩衝液：121.4g/mol=0.607g（Sigma：Cat # T1378-1kg）

・15mM Lカルニチン：197.66g/mol=0.296g（Sigma：Cat # C0238-100G）

・15mM Trolox：250.29g/mol=0.375g（Sigma：Cat # 238813-5G）

・10mM プロトカテク酸エチルエステル：182.17g/mol=182.17mg
ミリグラム（Sigma：Cat # E24859-5G）

1. Tris塩基を75mLミリQ水に溶解する。

2. Troloxを添加し、そして完全に溶解する

3. プロトカテク酸を添加する

4. Lカルニチンを添加し、そして完全に溶解する。

5. pHをチェックする：

6. 10M NaOH溶液によってpHを8.5に調整する。

7. 任意：よく溶けるまで超音波処理する

8. ミリQ水によって総体積を100mLにする。

9. フィルター滅菌。

【0064】

実施例ⅠⅣ

光防護性イメージング試薬9CV2Hの組成および調合

以下の例は、およそ100ミリリットルのイメージング試薬の調製について記載する。

・100mM HEPES：238.3gr/mole=2.39g（Sigma：Ca

10

20

30

40

50

- t # H 4 0 3 4)
- ・ 15mM Lカルニチン：197.66g/mol=0.296g (Sigma：Cat # C0283-100G)
 - ・ 15mM Trolox：250.29g/mol=0.375g (Sigma：Cat # 238813-5G)
 - ・ 10mM プロトカテク酸エチルエステル：182.17g/mol=.182g (Sigma：Cat # E24859-5G)
- 1リットルの100mM HEPES
23.9g HEPES
ミリQ水に溶解ー終体積1リットル
pHを7.0に調整。
1. 75mLのHEPES緩衝液を得る（上（below）を参照）。
 2. Troloxを添加し、そして完全に溶解する
 3. プロトカテク酸を添加する。
 4. Lカルニチンを添加し、そして完全に溶解する。
 5. pHをチェックする：約5
 6. 10M NaOH溶液によってpHを7.5に調整する。
 7. 任意：よく溶けるまで超音波処理する。
 8. ミリQ水によって総体積を100mLにする。
 9. フィルター滅菌。

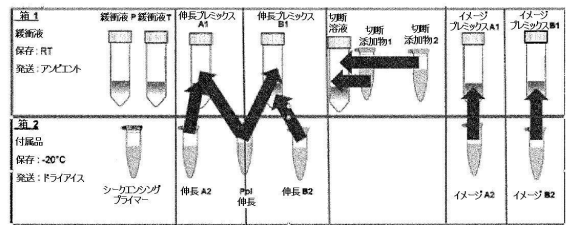
10

20

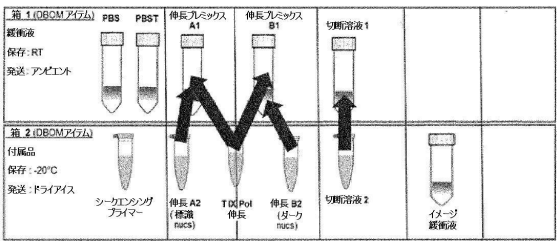
【図面】

【図 1】

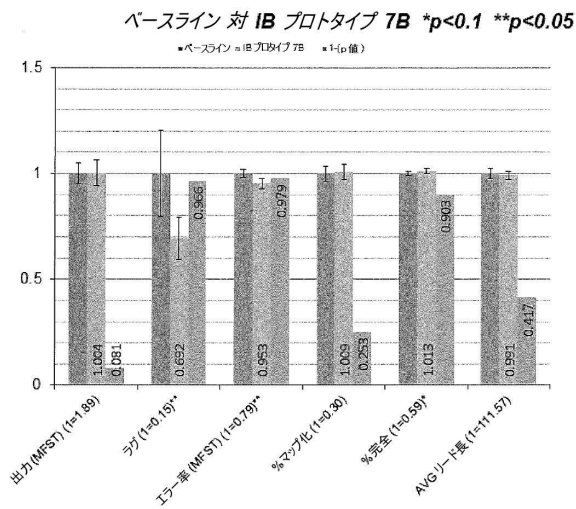
A



B



【図 2】



30

Figure 2

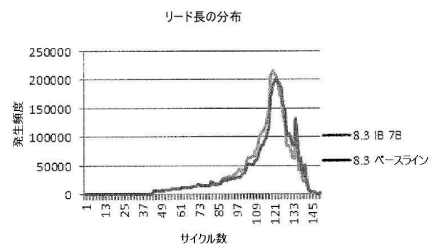
40

Figure 1

50

【図 3 - 1】

A



B

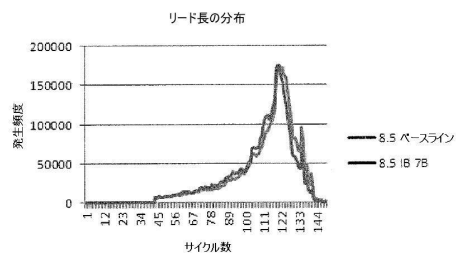
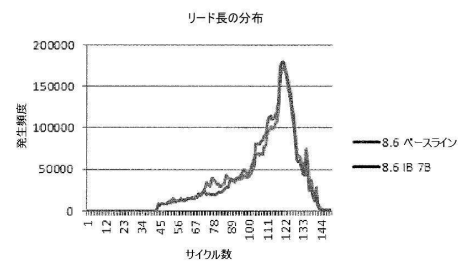


Figure 3

【図 3 - 2】

C



D

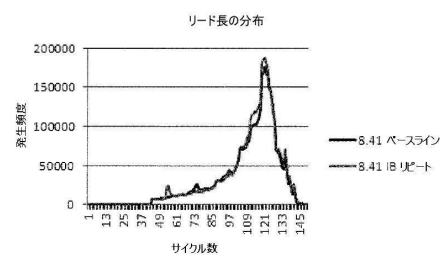
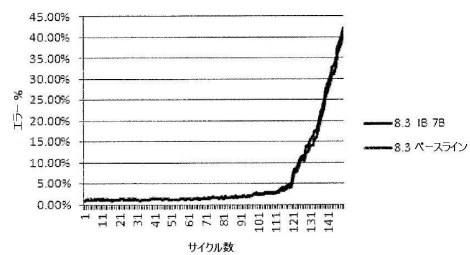


Figure 3 (続き)

【図 4 - 1】

A



B

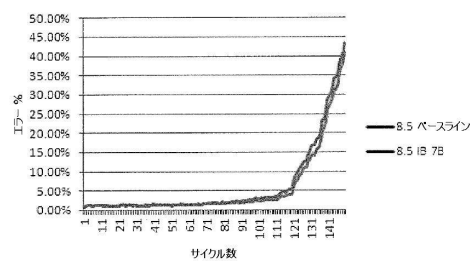
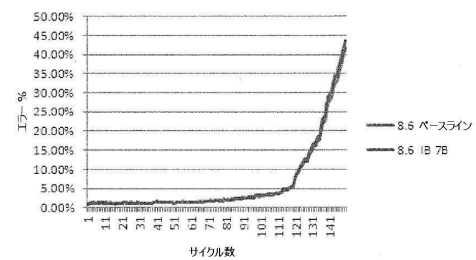


Figure 4

【図 4 - 2】

C



D

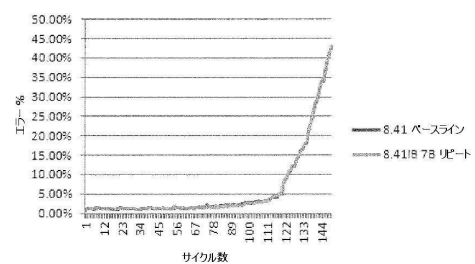


Figure 4 (続き)

10

20

30

40

50

【図 5】

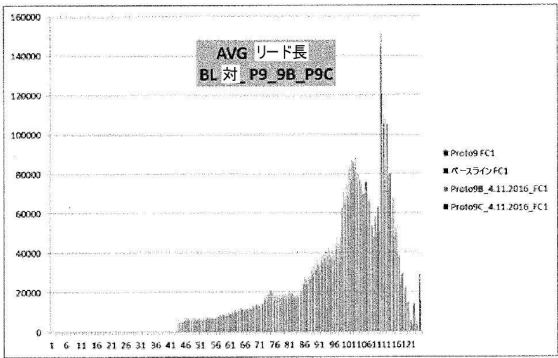
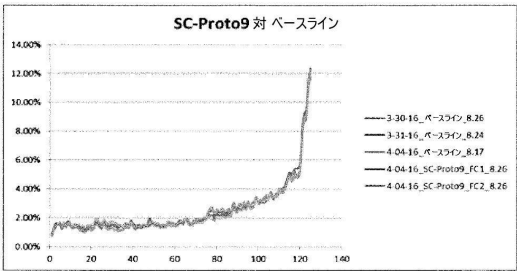


Figure 5

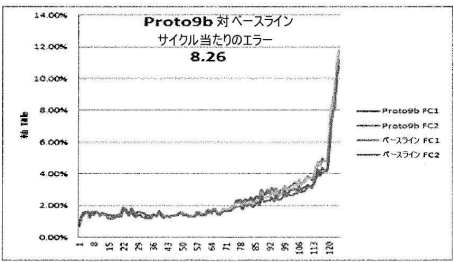
【図 6 - 1】

A



10

B



20

Figure 6

【図 6 - 2】

C

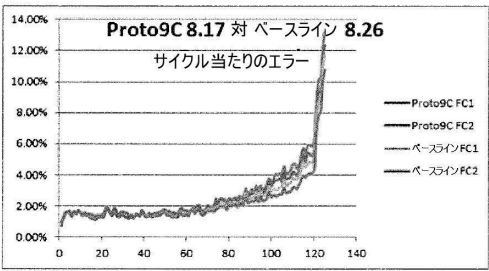
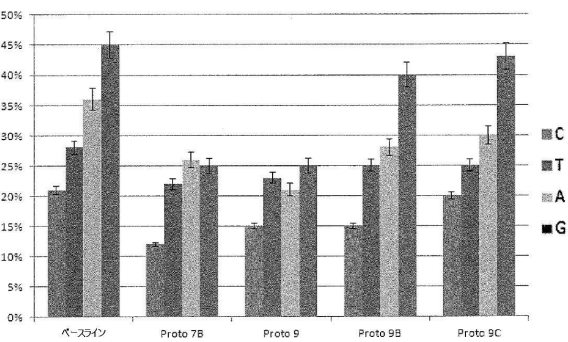


Figure 6 (続き)

【図 7】



30

Figure 7

40

50

【図 8】

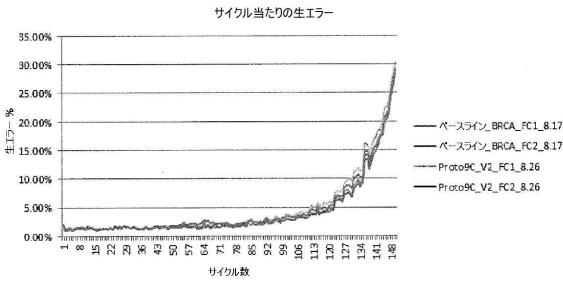


Figure 8

【図 9】

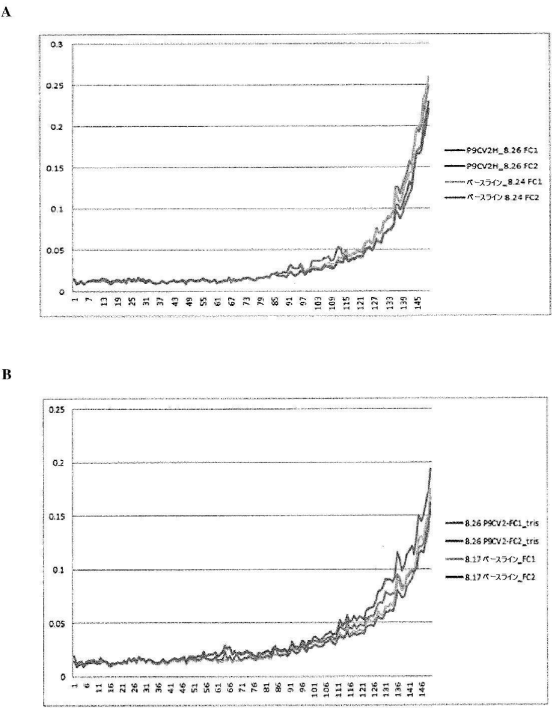


Figure 9

【図 10】

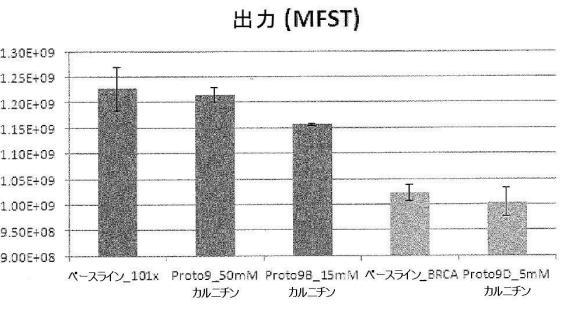


Figure 10

【図 11】

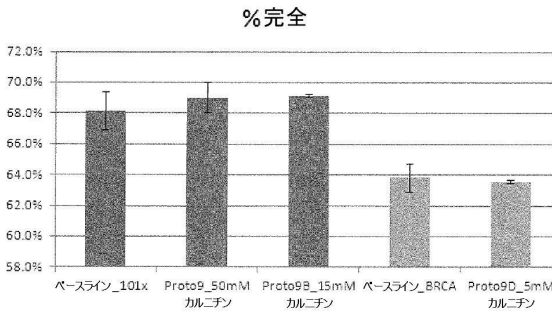


Figure 11

10

20

30

40

50

【図 1 2】

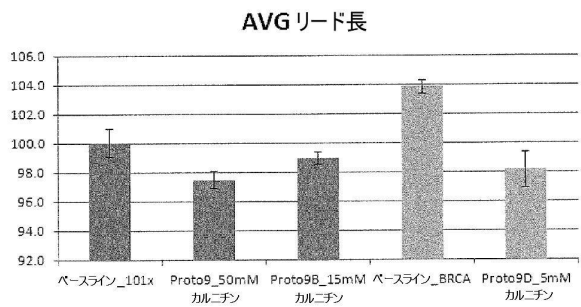


Figure 12

【図 1 3】

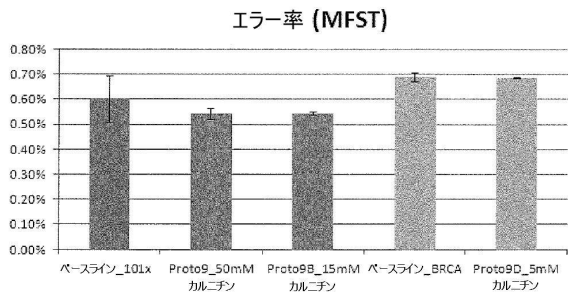
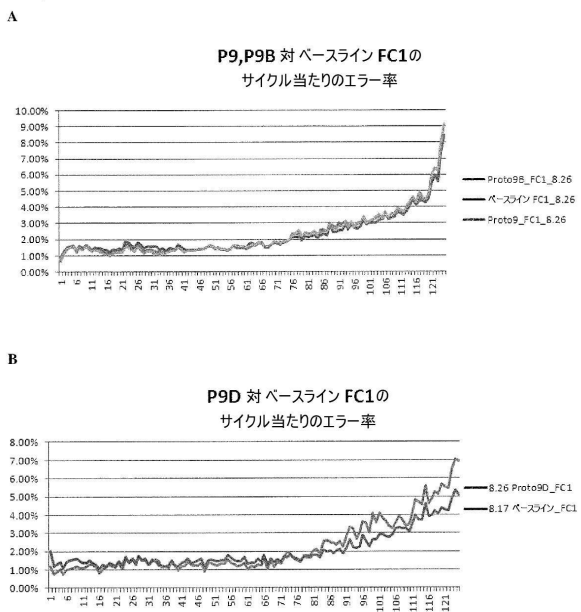


Figure 13

【図 1 4】



【図 1 5】

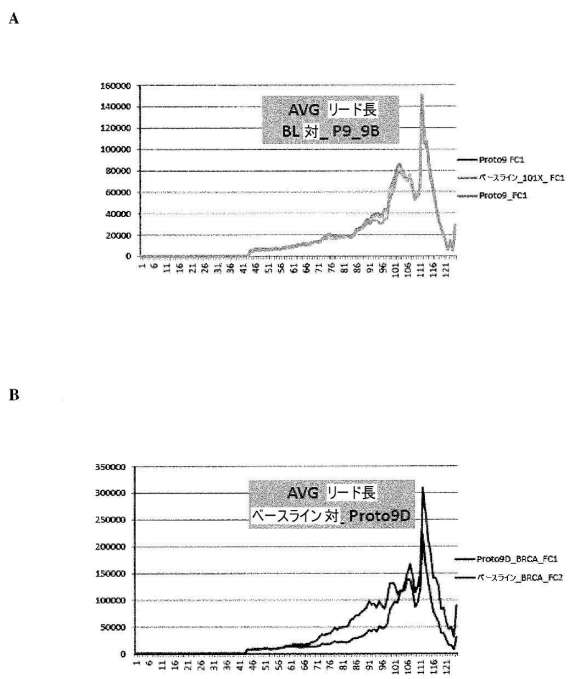
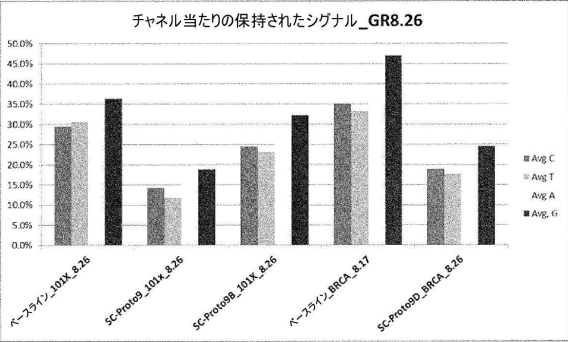


Figure 14

Figure 15

【図 16】



10

Figure 16

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

F I

C 1 2 M

1/00

A

(72)発明者 アンドラジー, ルイーザ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01742, コンコード, ハイワード ミル ロード 491

(72)発明者 パーボスト, マイケル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02478, ベルモント, クロス ストリート 30

(72)発明者 ヘブロニ, ドナ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02421, レキシントン, コンスティテューション ロード 25

(72)発明者 グプタ, ミナクシ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01880, ウェイクフィールド, アルビオン ストリート 339-1

(72)発明者 リッカー, オースティン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02451, ウォルサム, フィスク ストリート 62

(72)発明者 ペレティエ, ティモシー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01420, フィッチバーグ, オーク ヒル ロード 1085

審査官 白井 美香保

(56)参考文献

米国特許出願公開第2015/0079603 (US, A1)

米国特許第09145589 (US, B2)

韓国公開特許第10-2009-0069063 (KR, A)

韓国公開特許第10-2014-0067876 (KR, A)

特開2002-179578 (JP, A)

特開2006-137751 (JP, A)

国際公開第2015/178679 (WO, A1)

Bioresource Technology, 2007年, Vol.98, p.1120-1123

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12Q1/00-3/00

Pubmed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)