

【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 17 年 12 月 22 日 (2005.12.22)

【公表番号】特表 2002-523062 (P2002-523062A)

【公表日】平成 14 年 7 月 30 日 (2002.7.30)

【出願番号】特願 2000-566472 (P2000-566472)

【国際特許分類第 7 版】

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/68

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/566

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/68 A

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 33/566

【手続補正書】

【提出日】平成 16 年 11 月 8 日 (2004.11.8)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 第 1 のポリヌクレオチドと第 2 のポリヌクレオチドとの間のヌクレオチド配列における変異の存在および同一性を決定する方法であって、該方法は、以下の工程：

- a) 該第 1 のポリヌクレオチドのサンプルを提供する工程；
 - b) 該変異を含む可能性のある該第 1 のポリヌクレオチドの領域を選択する工程；
 - c) 該選択された領域を、鋳型生成増幅反応に供し、該選択された領域を含む第 1 の複数の二本鎖ポリヌクレオチド鋳型を生成する工程；
 - d) 該変異を含む可能性のある該鋳型の領域を選択する工程；
 - e) 標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第 1 のファミリーを、以下、
 - i) 第 1 のプライマーおよび第 2 のプライマーを含む、少なくとも 2 つのプライマーのセット、
 - i i) 2 つのワトソン - クリック対合塩基の少なくとも 2 つの異なるセットを含む、少なくとも 4 つの型のヌクレオチド三リン酸、および
 - i i i) 第 1 のターミネーターおよび第 2 のターミネーターを含む、2 つの型のフラグメントターミネーター；
- を含むフラグメント生成反応によって同時に該鋳型の両鎖から生成する工程であって、ここで、該第 1 のプライマーおよび該第 2 のプライマーが、該鋳型鎖の該選択された領域に隣接し；
- ここで、該第 1 のプライマーが第 1 のプライマー標識を有し、そして該第 2 のプライマーが第 2 のプライマー標識を有し；
- ここで、該型のヌクレオチド三リン酸の 1 つの少なくとも一部分が、第 1 のヌクレオチド標識で標識され；
- ここで、該第 1 のターミネーターおよび該第 2 のターミネーターが、非ワトソン - クリック対合であり；

ここで、該第1のターミネーターが第1のターミネーター標識で標識され、そして該第2のターミネーターが第2のターミネーター標識で標識され；

ここで、該第1のプライマー標識、該第2のプライマー標識、該第1のヌクレオチド標識、該第1のターミネーター標識および該第2のターミネーター標識の各々が、互いに全て識別可能であり；

ここで、該フラグメントの第1のファミリーが、該フラグメントの3'末端で該第1のターミネーターまたは該第2のターミネーターのいずれかによって終結され；そして

ここで、該フラグメントの第1のファミリーが、該第1のターミネーターまたは該第2のターミネーターのいずれかによって示される、プライマーによって隣接される両方の鋳型鎖の該選択された領域の一部分の可能な各塩基で終結する少なくとも1つのフラグメントを含む、工程；ならびに

f) 該フラグメントに存在する該第1のプライマー標識、該第2のプライマー標識、該第1のヌクレオチド標識、該第1のターミネーター標識および該第2のターミネーター標識を検出することによって該第1のポリヌクレオチドの該選択された領域における該塩基の位置および同一性を決定する工程、を包含する、方法。

【請求項2】 決定された前記塩基の位置および同一性を、第2のポリヌクレオチドからの塩基の位置および同一性と比較して、それによって、前記第1のポリヌクレオチドの前記選択された領域における該塩基の位置および同一性を決定する工程の後に、該第1のポリヌクレオチドの該選択された領域と該第2のポリヌクレオチドの対応する領域との間のヌクレオチド配列における変異の存在および同一性を同定する工程、をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記第1のポリヌクレオチドの前記選択された領域が、該第1のポリヌクレオチド上に複数の不連続の配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記鋳型生成増幅反応が、前記選択された領域をPCRに供することを包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記鋳型生成増幅反応が、前記選択された領域をRT-PCRに供することを包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記第1の複数の二本鎖ポリヌクレオチド鋳型が、鎖あたり約50~50,000ヌクレオチドの二本鎖の核酸鎖を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記選択された領域を鋳型生成増幅反応に供した後に、他の増幅反応成分を除去するために前記鋳型を精製する工程をさらに包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記フラグメント生成増幅反応が、前記選択された領域をPCRに供する工程を包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記フラグメント生成増幅反応が、前記選択された領域をRT-PCRに供する工程を包含する、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 前記鋳型鎖の前記選択された領域が、鎖あたり約100~1000ヌクレオチドである、請求項1に記載の方法。

【請求項11】 前記少なくとも4つの型のヌクレオチド三リン酸が、dATP、dCTP、dGTPおよびdTTPを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項12】 前記少なくとも4つの型のヌクレオチド三リン酸が、dATP、dCTP、dGTPおよびdUTPを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項13】 前記ターミネーターが2'-3'-ジデオキシターミネーターである、請求項1に記載の方法。

【請求項14】 前記第1のターミネーターがピリミジンヌクレオチドを含み、前記第2のターミネーターがプリンヌクレオチドを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項15】 前記第1のターミネーターおよび前記第2のターミネーターが、ddATP:ddCTP、ddATP:ddGTP、ddCTP:ddTTPおよびddGTP:ddTTPからなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 16】 前記第 1 のターミネーターおよび前記第 2 のターミネーターが、 $ddATP : ddCTP$ 、 $ddATP : ddGTP$ 、 $ddCTP : ddUP$ および $ddGTP : ddUTP$ からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】 前記第 1 のプライマー標識、前記第 2 のプライマー標識、前記第 1 のヌクレオチド標識、前記第 1 のターミネーター標識および前記第 2 のターミネーター標識が、蛍光標識、蛍光エネルギー移動標識、ルミネッセンス標識、化学ルミネッセンス標識、リン光標識およびフォトルミネッセンス標識からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】 第 1 のヌクレオチド標識で標識された前記型のヌクレオチド三リン酸の 1 つの一部分が、標識されていないヌクレオチド三リン酸の総濃度の約 1 % ~ 約 10 % を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】 前記第 1 のポリヌクレオチドの前記選択された領域中の前記塩基の位置および同一性を決定する工程の前に、前記フラグメント生成反応から標識された反応生成物を精製する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】 前記第 2 のポリヌクレオチドの前記対応する領域の配列が、以下の工程：

a) 該第 2 のポリヌクレオチドのサンプルを提供する工程；
b) 前記変異を含む可能性のある前記第 1 のポリヌクレオチドの領域に対応する該第 2 のポリヌクレオチドの領域を選択する工程；
c) 該第 2 のポリヌクレオチドの該対応する領域を、鋳型生成増幅反応に供し、該対応する領域を含む第 2 の複数の二本鎖ポリヌクレオチド鋳型を生成する工程；

d) 標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第 2 のファミリーを、以下、
i) 第 3 のプライマーおよび第 4 のプライマーを含む少なくとも 2 つのプライマーのセット、

ii) 2 つのワトソン - クリック対合塩基の少なくとも 2 つの異なるセットを含む、少なくとも 4 つの型のヌクレオチド三リン酸、

iii) 第 3 のターミネーターおよび第 4 のターミネーターを含む、2 つの型のフラグメントターミネーター；

を含むフラグメント生成反応によって同時に該鋳型の両鎖から生成する工程であって、

ここで、該第 3 のプライマーおよび該第 4 のプライマーが、該鋳型鎖の該選択された領域に隣接し；

ここで、該第 3 のターミネーターおよび該第 4 のターミネーターが非ワトソン - クリック対合であり；

ここで、該フラグメントの第 2 のファミリーの各々が、該フラグメントの 3' 末端で該第 3 のターミネーターまたは該第 4 のターミネーターのいずれかによって終結され；そして

ここで、該フラグメントの第 2 のファミリーが、プライマーによって隣接される両方の鋳型鎖の該選択された領域の一部分の、該第 3 のターミネーターまたは該第 4 のターミネーターのいずれかによって示される、各々可能な塩基で終結する少なくとも 1 つのフラグメントを含む、工程；

e) 該第 2 のポリヌクレオチドの該対応する領域において少なくともいくつかの該塩基の位置および同一性を決定する工程、
によって決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】 前記第 2 のポリヌクレオチドの前記対応する領域の配列が、前記第 1 のポリヌクレオチドの選択された領域における塩基の位置および同一性を決定する工程と同時に決定される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】 前記標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第 1 のファミリーを生成する工程、および前記標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第 2 のファミリーを生成する工程が、1 つの反応において実施される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】 前記第 3 のプライマーが第 3 のプライマー標識を有し、そして前記第 4 のプライマーが第 4 のプライマー標識を有し、そしてここで、該第 3 のプライマー標識および該第 4 のプライマー標識が互いに全て識別可能である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 24】 前記標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第 2 のファミリーの生成において前記型のヌクレオチド三リン酸の 1 つの少なくとも一部分が、第 2 のヌクレオチド標識で標識される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 25】 前記第 3 のターミネーターが第 3 のターミネーター標識で標識され、そして前記第 4 のターミネーターが第 4 のターミネーター標識で標識され、そしてここで、該第 3 のターミネーター標識および該第 4 のターミネーター標識が互いに全て識別可能である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 26】 前記第 3 のプライマーが第 3 のプライマー標識を有し、前記第 4 のプライマーが第 4 のプライマー標識を有し、そして前記標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第 2 のファミリーの生成において前記型のヌクレオチド三リン酸の 1 つの少なくとも一部分が、第 2 のヌクレオチド標識で標識され、そしてここで、該第 3 のプライマー標識、該第 4 のプライマー標識および該第 2 のヌクレオチド標識が互いに全て識別可能である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 27】 前記第 3 のプライマーが第 3 のプライマー標識を有し、前記第 4 のプライマーが第 4 のプライマー標識を有し、前記第 3 のターミネーターが第 3 のターミネーター標識で標識され、そして前記第 4 のターミネーターが第 4 のターミネーター標識で標識され、そしてここで、該第 3 のプライマー標識、該第 4 のプライマー標識、該第 3 のターミネーター標識および該第 4 のターミネーター標識が互いに全て識別可能である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 28】 前記標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第 2 のファミリーの生成において前記型のヌクレオチド三リン酸の 1 つの少なくとも一部分が、第 2 のヌクレオチド標識で標識され、ここで、前記第 3 のターミネーターが第 3 のターミネーター標識で標識され、そして前記第 4 のターミネーターが第 4 のターミネーター標識で標識され、そしてここで、該第 2 のヌクレオチド標識、該第 3 のターミネーター標識および該第 4 のターミネーター標識が互いに全て識別可能である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 29】 前記第 3 のプライマーが第 3 のプライマー標識を有し、前記第 4 のプライマーが第 4 のプライマー標識を有し、前記標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第 2 のファミリーの生成において前記型のヌクレオチド三リン酸の 1 つの少なくとも一部分が、第 2 のヌクレオチド標識で標識され、前記第 3 のターミネーターが第 3 のターミネーター標識で標識され、そして前記第 4 のターミネーターが第 4 のターミネーター標識で標識され、そしてここで、該第 3 のプライマー標識、該第 4 のプライマー標識、該第 2 のヌクレオチド標識、該第 3 のターミネーター標識および該第 4 のターミネーター標識が互いに全て識別可能である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 30】 第 1 のポリヌクレオチドと第 2 のポリヌクレオチドとの間のヌクレオチド配列における変異の存在および同一性を決定する方法であって、該方法は、以下の工程：

- a) 該第 1 のポリヌクレオチドのサンプルを提供する工程；
- b) 該変異を含む可能性のある該第 1 のポリヌクレオチドの領域を選択する工程；
- c) 該選択された領域を、鋳型生成増幅反応に供し、該選択された領域を含む第 1 の複数の二本鎖ポリヌクレオチド鋳型を生成する工程；
- d) 該変異を含む可能性のある該鋳型の領域を選択する工程；
- e) 標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第 1 のファミリーを、以下、
 - i) 第 1 のプライマーおよび第 2 のプライマーを含む少なくとも 2 つのプライマーのセット、
 - ii) 2 つのワトソン - クリック対合塩基の少なくとも 2 つの異なるセットを含む、少なくとも 4 つの型のヌクレオチド三リン酸、および

i i i) 第1のターミネーターおよび第2のターミネーターを含む、2つの型のフラグメントターミネーター；

を含むフラグメント生成反応によって同時に該鋳型の両鎖から生成する工程であって、

ここで、該第1のプライマーおよび該第2のプライマーが、該鋳型鎖の該選択された領域に隣接し；

ここで、該第1のターミネーターおよび該第2のターミネーターが、非ワトソン - クリック対合であり；

ここで、該フラグメントの第1のファミリーの各々が、該フラグメントの3'末端で第1のターミネーターまたは第2のターミネーターのいずれかによって終結され；そして

ここで、該フラグメントの第1のファミリーが、プライマーによって隣接される両方の鋳型鎖の該選択された領域の一部分の、該第1のターミネーターまたは該第2のターミネーターのいずれかによって示される、各々可能な塩基で終結する少なくとも1つのフラグメントを含む工程；ならびに

f) 該選択された領域における該塩基の位置および同一性を決定する工程、を包含する、方法。

【請求項31】 決定された前記塩基の位置および同一性を、第2のポリヌクレオチドからの塩基の位置および同一性と比較して、それによって、前記第1のポリヌクレオチドの前記選択された領域における塩基の位置および同一性を決定する工程の後に、該第1のポリヌクレオチドの該選択された領域と該第2のポリヌクレオチドの対応する領域との間のヌクレオチド配列における変異の存在および同一性を同定する工程、をさらに包含する、請求項30に記載の方法。

【請求項32】 前記第1のプライマーが第1のプライマー標識を有し、そして前記第2のプライマーが第2のプライマー標識を有し、そしてここで、該第1のプライマー標識および該第2のプライマー標識が互いに全て識別可能である、請求項30に記載の方法。

【請求項33】 前記型のヌクレオチド三リン酸の1つの少なくとも一部分が、第1のヌクレオチド標識で標識される、請求項30に記載の方法。

【請求項34】 前記第1のターミネーターが第1のターミネーター標識で標識され、そして前記第2のターミネーターが第2のターミネーター標識で標識され、そしてここで、該第1のターミネーター標識および該第2のターミネーター標識が互いに全て識別可能である、請求項30に記載の方法。

【請求項35】 前記第1のプライマーが第1のプライマー標識を有し、前記第2のプライマーが第2のプライマー標識を有し、そして前記型のヌクレオチド三リン酸の1つの少なくとも一部分が、第1のヌクレオチド標識で標識され、そしてここで、該第1のプライマー標識、該第2のプライマー標識および該第1のヌクレオチド標識が互いに全て識別可能である、請求項30に記載の方法。

【請求項36】 前記第1のプライマーが第1のプライマー標識を有し、前記第2のプライマーが第2のプライマー標識を有し、前記第1のターミネーターが第1のターミネーター標識で標識され、そして前記第2のターミネーターが第2のターミネーター標識で標識され、そしてここで、該第1のプライマー標識、該第2のプライマー標識、該第1のターミネーター標識および該第2のターミネーター標識が互いに全て識別可能である、請求項30に記載の方法。

【請求項37】 前記型のヌクレオチド三リン酸の1つの少なくとも一部分が、第1のヌクレオチド標識で標識され、ここで、前記第1のターミネーターが第1のターミネーター標識で標識され、そして前記第2のターミネーターが第2のターミネーター標識で標識され、そしてここで、該第1のヌクレオチド標識、該第1のターミネーター標識および該第2のターミネーター標識が互いに全て識別可能である、請求項30に記載の方法

【請求項38】 前記第1のプライマーが第1のプライマー標識を有し、前記第2のプライマーが第2のプライマー標識を有し、前記型のヌクレオチド三リン酸の1つの少なくとも一部分が、第1のヌクレオチド標識で標識され、前記第1のターミネーターが第1

のターミネーター標識で標識され、そして前記第2のターミネーターが第2のターミネーター標識で標識され、そしてここで、該第1のプライマー標識、該第2のプライマー標識、該第1のヌクレオチド標識、該第1のターミネーター標識および該第2のターミネーター標識が互いに全て識別可能である、請求項30に記載の方法。

【請求項39】 前記第1のポリヌクレオチドの前記選択された領域が、該第1のポリヌクレオチド上に複数の不連続の配列を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項40】 前記鋳型生成増幅反応が、前記選択された領域をPCRに供する工程を包含する、請求項30に記載の方法。

【請求項41】 前記鋳型生成増幅反応が、前記選択された領域をRT-PCRに供する工程を包含する、請求項30に記載の方法。

【請求項42】 前記第1の複数の二本鎖ポリヌクレオチド鋳型が、鎖あたり約50～50,000ヌクレオチドの二本鎖の核酸鎖を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項43】 前記選択された領域を鋳型生成増幅反応に供した後に、他の増幅反応成分を除去するために前記鋳型を精製する工程をさらに包含する、請求項30に記載の方法。

【請求項44】 前記フラグメント生成増幅反応が、前記選択された領域をPCRに供する工程を包含する、請求項30に記載の方法。

【請求項45】 前記フラグメント生成増幅反応が、前記選択された領域をRT-PCRに供する工程を包含する、請求項30に記載の方法。

【請求項46】 前記鋳型鎖の前記選択された領域が、鎖あたり約100～1000ヌクレオチドである、請求項30に記載の方法。

【請求項47】 前記少なくとも4つの型のヌクレオチド三リン酸が、dATP、dCTP、dGTPおよびdTTPを含む、請求項30に記載の方法。

【請求項48】 前記少なくとも4つの型のヌクレオチド三リン酸が、dATP、dCTP、dGTPおよびdUTPを含む、請求項30に記載の方法。

【請求項49】 前記ターミネーターが2'-3'-ジデオキシターミネーターである、請求項30に記載の方法。

【請求項50】 前記第1のターミネーターがピリミジンヌクレオチドを含み、かつ前記第2のターミネーターがプリンヌクレオチドを含む、請求項30に記載の方法。

【請求項51】 前記第1のターミネーターおよび前記第2のターミネーターが、ddATP：ddCTP、ddATP：ddGTP、ddCTP：ddTTPおよびddGTP：ddTTPからなる群より選択される、請求項30に記載の方法。

【請求項52】 前記第1のターミネーターおよび前記第2のターミネーターが、ddATP：ddCTP、ddATP：ddGTP、ddCTP：ddUTPおよびddGTP：ddUTPからなる群より選択される、請求項30に記載の方法。

【請求項53】 前記第1のプライマー標識、前記第2のプライマー標識、前記第1のヌクレオチド標識、前記第1のターミネーター標識および前記第2のターミネーター標識が、蛍光標識、蛍光エネルギー移動標識、ルミネッセンス標識、化学ルミネッセンス標識、リン光標識およびフォトルミネッセンス標識からなる群より選択される、請求項30に記載の方法。

【請求項54】 第1のヌクレオチド標識で標識された前記型のヌクレオチド三リン酸の1つの一部分が、標識されていないヌクレオチド三リン酸の総濃度の約1%～約10%を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項55】 前記第1のポリヌクレオチドの選択された領域中の塩基の位置および同一性を決定する工程の前に、前記フラグメント生成反応から標識された反応生成物を精製する工程をさらに包含する、請求項30に記載の方法。

【請求項56】 前記第1のプライマー、前記第2のプライマー、前記型のヌクレオチド三リン酸の1つの一部分、前記第1のターミネーターおよび前記第2のターミネーターの1つ以上が標識され、そしてここで、前記第1のポリヌクレオチドの前記選択された領域における前記塩基の位置および同一性を決定する工程が該標識を検出する工程によっ

て達成される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 57】 前記第 2 のポリヌクレオチドの前記対応する領域の配列が、以下の工程：

- a) 該第 2 のポリヌクレオチドのサンプルを提供する工程；
- b) 前記変異を含む可能性のある前記第 1 のポリヌクレオチドの領域に対応する該第 2 のポリヌクレオチドの領域を選択する工程；
- c) 該第 2 のポリヌクレオチドの該対応する領域を、鋳型生成増幅反応に供し、該対応する領域を含む第 2 の複数の二本鎖ポリヌクレオチド鋳型を生成する工程；
- d) 標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第 2 のファミリーを、以下、
 - i) 第 3 のプライマーおよび第 4 のプライマーを含む少なくとも 2 つのプライマーのセット、

- ii) 2 つのワトソン - クリック対合塩基の少なくとも 2 つの異なるセットを含む、少なくとも 4 つの型のヌクレオチド三リン酸；および

- iii) 第 3 のターミネーターおよび第 4 のターミネーターを含む、2 つの型のフラグメントターミネーター；

を含むフラグメント生成反応によって同時に該鋳型の両鎖から生成する工程であって、

ここで、該第 3 のプライマーおよび該第 4 のプライマーが、該鋳型鎖の該選択された領域に隣接し；

ここで、該第 3 のターミネーターおよび該第 4 のターミネーターが非ワトソン - クリック対合であり；

ここで、該フラグメントの第 2 のファミリーの各々が、該フラグメントの 3' 末端で該第 3 のターミネーターまたは該第 4 のターミネーターのいずれかによって終結され；そして

ここで、該フラグメントの第 2 のファミリーが、プライマーによって隣接される両方の鋳型鎖の該選択された領域の一部分の、該第 3 のターミネーターまたは該第 4 のターミネーターのいずれかによって示される、各々可能な塩基で終結する少なくとも 1 つのフラグメントを含む工程；

- e) 該第 2 のポリヌクレオチドの対応する領域において少なくともいくつかの該塩基の位置および同一性を決定する工程、
- によって決定される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 58】 前記第 2 のポリヌクレオチドの前記対応する領域の配列が、前記第 1 のポリヌクレオチドの前記選択された領域における塩基の位置および同一性を決定する工程と同時に決定される、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】 前記標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第 1 のファミリーを生成する工程、および前記標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第 2 のファミリーを生成する工程が、1 つの反応において実施される、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 60】 前記第 3 のプライマーが第 3 のプライマー標識を有し、そして前記第 4 のプライマーが第 4 のプライマー標識を有し、そしてここで、該第 3 のプライマー標識および該第 4 のプライマー標識が互いに全て識別可能である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 61】 前記標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第 2 のファミリーの生成において前記型のヌクレオチド三リン酸の 1 つの少なくとも一部分が、第 2 のヌクレオチド標識で標識される、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 62】 前記第 3 のターミネーターが第 3 のターミネーター標識で標識され、そして前記第 4 のターミネーターが第 4 のターミネーター標識で標識され、そしてここで、該第 3 のターミネーター標識および該第 4 のターミネーター標識が互いに全て識別可能である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 63】 前記第 3 のプライマーが第 3 のプライマー標識を有し、前記第 4 のプライマーが第 4 のプライマー標識を有し、そして前記標識された直鎖状のポリヌクレオ

チドフラグメントの第2のファミリーの生成において前記型のヌクレオチド三リン酸の1つの少なくとも一部分が、第2のヌクレオチド標識で標識され、そしてここで、該第3のプライマー標識、該第4のプライマー標識および該第2のヌクレオチド標識が互いに全て識別可能である、請求項57に記載の方法。

【請求項64】 前記第3のプライマーが第3のプライマー標識を有し、前記第4のプライマーが第4のプライマー標識を有し、前記第3のターミネーターが第3のターミネーター標識で標識され、そして前記第4のターミネーターが第4のターミネーター標識で標識され、そしてここで、該第3のプライマー標識、該第4のプライマー標識、該第3のターミネーター標識および該第4のターミネーター標識が互いに全て識別可能である、請求項57に記載の方法。

【請求項65】 前記標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第2のファミリーの生成において前記型のヌクレオチド三リン酸の1つの少なくとも一部分が、第2のヌクレオチド標識で標識され、ここで、前記第3のターミネーターが第3のターミネーター標識で標識され、そして前記第4のターミネーターが第4のターミネーター標識で標識され、そしてここで、該第2のヌクレオチド標識、該第3のターミネーター標識および該第4のターミネーター標識が互いに全て識別可能である、請求項57に記載の方法。

【請求項66】 前記第1のプライマーが第1のプライマー標識を有し、前記第2のプライマーが第2のプライマー標識を有し、前記第3のプライマーが第3のプライマー標識を有し、前記第2のプライマーが第2のプライマー標識を有し、前記標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第1のファミリーの生成において前記型のヌクレオチド三リン酸の1つの少なくとも一部分が、第1のヌクレオチド標識で標識され、前記標識された直鎖状のポリヌクレオチドフラグメントの第2のファミリーの生成において該型のヌクレオチド三リン酸の1つの少なくとも一部分が、第2のヌクレオチド標識で標識され、前記第1のターミネーターが第1のターミネーター標識で標識され、前記第2のターミネーターが第2のターミネーター標識で標識され、前記第3のターミネーターが第3のターミネーター標識で標識され、そして前記第4のターミネーターが第4のターミネーター標識で標識され、そしてここで、該第1のプライマー標識、該第2のプライマー標識、該第3のプライマー標識、該第4のプライマー標識、該第1のヌクレオチド標識、該第2のヌクレオチド標識、該第1のターミネーター標識、該第2のターミネーター標識、該第3のターミネーター標識および該第4のターミネーター標識が互いに全て識別可能である、請求項57に記載の方法。