

【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2003-526331(P2003-526331A)  
 【公表日】平成15年9月9日(2003.9.9)  
 【出願番号】特願2000-603433(P2000-603433)  
 【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 21/78  
 G 0 1 N 31/22  
 G 0 1 N 33/53  
 G 0 1 N 33/58  
 G 0 1 N 37/00

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	21/78	C
G 0 1 N	31/22	1 2 1 P
G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N	33/58	A
G 0 1 N	37/00	1 0 2

【手続補正書】  
 【提出日】平成16年7月28日(2004.7.28)  
 【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】

下記式Iに記載のジスルフィド結合切断可能なヌクレオチド複合体：

色素 - SS - リンカー - ヌクレオチド (式I)

式中、

色素は、フロオロフォア(fluorophore)であり、

SSは、ジスルフィド架橋であり、

リンカーは、- C C - CH<sub>2</sub> - NH - CO - CH<sub>2</sub> - のような、有用な結合基であり、

ヌクレオチドは、dCTP、dATP、dGTP、dTTP、リボヌクレオチド、またはさらに修飾されたヌクレオチドからなる群より選択されるヌクレオチドである。

【請求項2】

フロオロフォアが、シアニン(Cyanine)5またはシアニン(Cyanine)3からなる群より選択される、請求項1記載のヌクレオチド複合体。

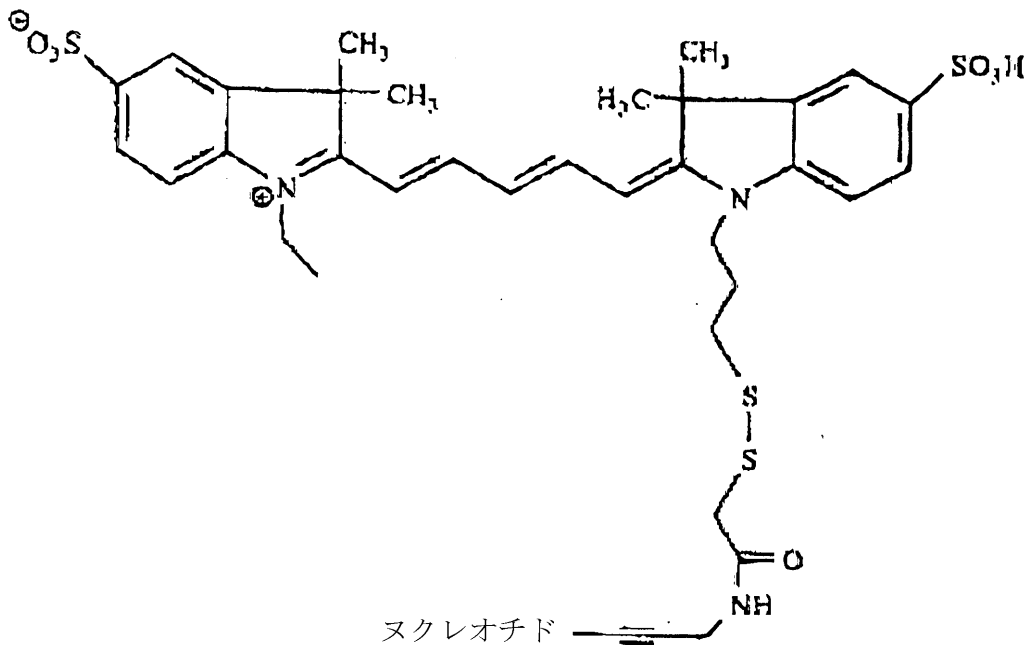
【請求項3】

フロオロフォアが、ニューイングランドニュークリア-デュポン社(New England Nuclear-Dupont)から入手可能であるシアニン5またはシアニン3からなる群より選択される、請求項1記載のヌクレオチド複合体。

【請求項4】

下記式IIに記載の構造を有する、請求項1記載のヌクレオチド複合体：

【化1】



但し、ヌクレオチドは、請求項1に定義したものである。

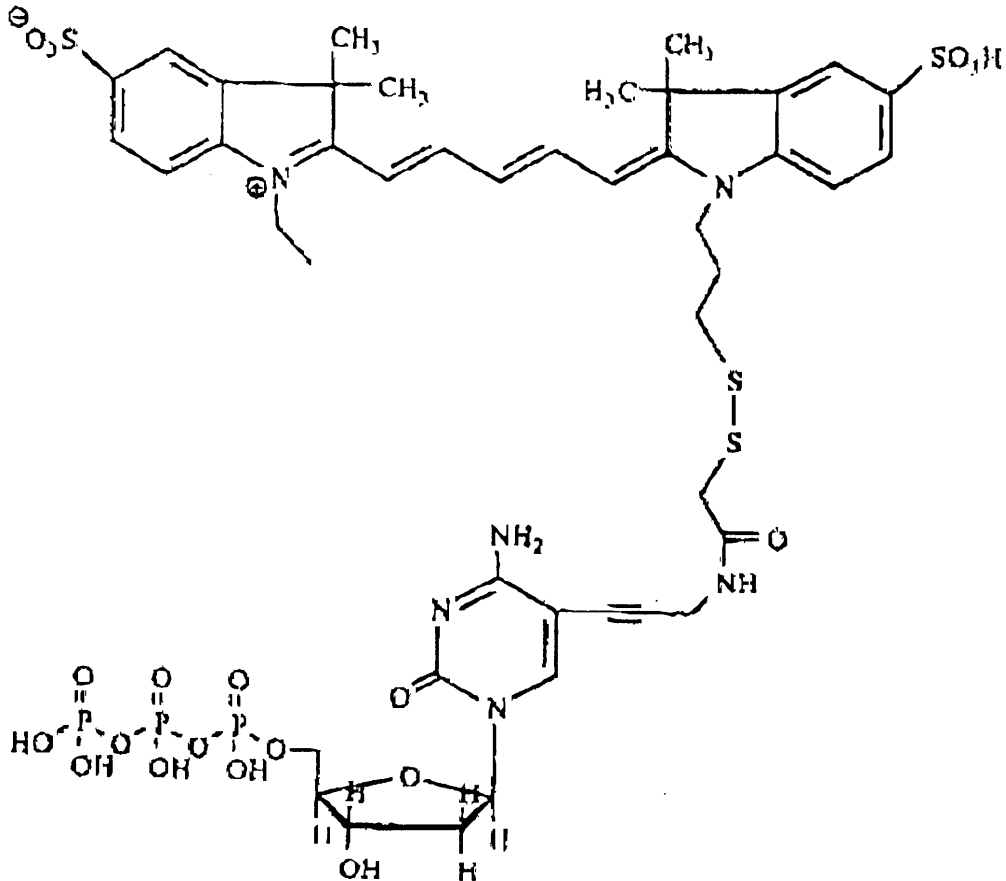
【請求項5】

ヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、およびdTTPからなる群より選択される、請求項4記載のヌクレオチド複合体。

【請求項6】

下記式の請求項5記載のヌクレオチド複合体：

【化2】



【請求項7】

請求項1記載の色素標識ヌクレオチド複合体を使用して、以下の段階を含む固定された核

酸のアレイの特徴部のヌクレオチド配列を決定する方法：

- a) プライマーと固定された核酸とのハイブリダイゼーションを可能にする条件で、固定された核酸特徴部のアレイに、オリゴヌクレオチドプライマーと鋳型依存的ポリメラーゼとを含む混合物を加える段階；
- b) 標識されたデオキシヌクレオチドが、決定すべき配列において次に隣接する塩基と相補的であれば、プライマーの3'末端に組み入れられるような条件で、切断可能な結合を有する単一の蛍光標識したデオキシヌクレオシド三リン酸を混合物に加える段階；
- c) 蛍光をモニターすることによって組み入れられた標識を検出する段階；
- d) 切断可能な結合を有する残りの三つの標識デオキシヌクレオシド三リン酸のそれぞれについて順に段階(b)～(c)を繰り返す段階；および
- e) ヌクレオチド配列が決定されるまで、段階(b)～(d)を繰り返す段階。

【請求項 8】

プライマー、緩衝液、およびポリメラーゼが、固定された核酸のアレイを有するポリアクリルアミドゲルに配列される、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

一本鎖結合タンパク質が段階(b)の間に存在する、請求項7記載の方法。

【請求項 10】

切断可能な結合を有する単一の蛍光標識デオキシヌクレオチドが、標識型および非標識型において単一のデオキシヌクレオシド三リン酸の混合物をさらに含む、請求項7記載の方法。

【請求項 11】

段階(d)の後であって段階(e)の前に、アレイを光退色させるさらなる段階が行われる、請求項7記載の方法。

【請求項 12】

段階(d)の後で段階(e)の前に、蛍光体との結合を切断するさらなる段階が行われる、請求項7記載の方法。

【請求項 13】

段階(c)の後で段階(d)の前に、蛍光体との結合を切断するさらなる段階が行われる、請求項7記載の方法。

【請求項 14】

切断段階が、結合に還元剤を接触させる段階を含む、請求項12または13記載の方法。

【請求項 15】

還元剤がジチオスレイトールである、請求項14記載の方法。