

【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 3 部門第 3 区分  
 【発行日】平成 17 年 9 月 2 日 (2005.9.2)

【公開番号】特開 2004-68023 (P2004-68023A)  
 【公開日】平成 16 年 3 月 4 日 (2004.3.4)  
 【年通号数】公開・登録公報 2004-009  
 【出願番号】特願 2003-288286 (P2003-288286)  
 【国際特許分類第 7 版】

C 0 9 B 11/28  
 C 0 9 B 23/00  
 C 0 9 K 11/06  
 G 0 1 N 21/78  
 G 0 1 N 27/447  
 G 0 1 N 33/533  
 // C 1 2 Q 1/68  
 G 0 1 N 31/00  
 G 0 1 N 31/22

## 【F I】

C 0 9 B	11/28	N
C 0 9 B	23/00	L
C 0 9 K	11/06	
G 0 1 N	21/78	C
G 0 1 N	33/533	
G 0 1 N	27/26	3 0 1 B
C 1 2 Q	1/68	Z
G 0 1 N	31/00	V
G 0 1 N	31/22	1 2 2

【手続補正書】  
 【提出日】平成 17 年 5 月 2 日 (2005.5.2)  
 【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】

エネルギー転移色素であって、キサンテンドナー色素、シアニンアクセプター色素、フタロシアニンアクセプター色素、またはスクアラインアクセプター色素、および該ドナー色素を該アクセプター色素に連結するリンカーを含み、ここで、該アクセプター色素は、該ドナー色素よりも、600 nm 大きい放射極大および / または少なくとも約 100 nm 大きい吸収極大を有する、エネルギー転移色素。

【請求項 2】

前記アクセプター色素が 600 nm よりも大きい放射極大を有する、請求項 1 に記載のエネルギー転移色素。

【請求項 3】

前記ドナー色素が、フルオレセイン色素である、請求項 1 に記載のエネルギー転移色素。

【請求項 4】

前記アクセプター色素が、シアニン色素である、請求項 1 に記載のエネルギー転移色素。

## 【請求項 5】

前記アクセプター色素が Cy 5 である、請求項 1 に記載のエネルギー転移色素。

## 【請求項 6】

前記アクセプター色素が、フタロシアニン色素である、請求項 1 に記載のエネルギー転移色素。

## 【請求項 7】

前記アクセプター色素がスクアライン色素である、請求項 1 に記載のエネルギー転移色素。

## 【請求項 8】

前記リンカーが前記キサンテン環構造の環における 4' 位で前記ドナー色素に結合している、請求項 1 に記載のエネルギー転移色素。

## 【請求項 9】

前記リンカーが、式 - R<sup>3</sup> X - の群を含み、ここで、R<sup>3</sup> は、前記キサンテン環構造の環における 4' 位に結合している - (CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub> - であり、かつ、X は、NH、O または S である、請求項 1 に記載のエネルギー転移色素。

## 【請求項 10】

試薬および請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のエネルギー転移色素を含む、蛍光標識試薬。

## 【請求項 11】

請求項 10 に記載の蛍光標識試薬であって、ここで、前記試薬が、タンパク質、ポリペプチド、ポリサッカリド、ヌクレオシドまたはヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチドアナログ、脂質、固体支持体ならびに有機ポリマーおよび無機ポリマーから選択される、蛍光標識試薬。

## 【請求項 12】

前記試薬が、ヌクレオシドまたはヌクレオチドである、請求項 11 に記載の蛍光標識試薬。

## 【請求項 13】

前記エネルギー転移色素が、前記ヌクレオシドまたはヌクレオチドの核酸塩基に結合している、請求項 12 に記載の蛍光標識試薬。

## 【請求項 14】

前記核酸塩基とエネルギー転移色素とを連結する結合が、アセチルアミド結合またはアルケンアミド結合を含む、請求項 13 に記載の蛍光標識試薬。

## 【請求項 15】

請求項 14 に記載の蛍光標識試薬であって、ここで、前記アセチレン性アミド結合またはアルケン性アミド結合が、- C≡C - CH<sub>2</sub> - NH - C(O) -、3 - アミノ - 1 - プロピン - 1 - イル、- C≡C - CH<sub>2</sub> - NH - C(O) - (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> - C(O) -、- C≡CH - C(O) - NH - (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> - NH - C(O) - および - C≡C - CH<sub>2</sub> - O - CH<sub>2</sub> - CH<sub>2</sub> - NR - から選択され、ここで、R は、水素、保護基またはアルキルである、蛍光標識試薬。

## 【請求項 16】

前記ヌクレオシドまたはヌクレオチドが、2' - デオキシリボヌクレオチドである、請求項 12 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の蛍光標識試薬。

## 【請求項 17】

前記ヌクレオシドまたはヌクレオチドが、2' - デオキシリボヌクレオシド - 5' - トリホスフェートである、請求項 12 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の蛍光標識試薬。

## 【請求項 18】

前記ヌクレオシド / ヌクレオチドが、終止ヌクレオチドである、請求項 12 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の蛍光標識試薬。

## 【請求項 19】

前記終止ヌクレオチドが、2' , 3' - ジデオキシリボヌクレオチド - 5' - トリホスフ

エートである、請求項 18 に記載の蛍光標識試薬。

【請求項 20】

前記試薬が、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドアナログである、請求項 11 に記載の蛍光標識試薬。

【請求項 21】

前記エネルギー転移色素が、前記オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドアナログの 5' 末端に結合している、請求項 20 に記載の蛍光標識試薬。

【請求項 22】

前記エネルギー転移色素が、前記オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドアナログの 3' 末端に結合している、請求項 11 に記載の蛍光標識試薬。

【請求項 23】

前記エネルギー転移色素が、前記オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドアナログの前記核酸塩基に結合している、請求項 20 に記載の蛍光標識試薬。

【請求項 24】

核酸を分析するためのキットであって、

4つの異なる終止ヌクレオチドのセットを備え、そして、該終止ヌクレオチドの各々は、異なるテンプレートヌクレオチドでテンプレート依存性プライマー伸長反応を終止させ、ここで、該キットは、検出可能である空間的に分解可能な蛍光シグナルを生じ得る蛍光標識を備え、該蛍光標識のうちの少なくとも1つは、請求項 1～9のいずれか1項に記載のエネルギー転移色素を含む、キット。

【請求項 25】

蛍光標識の各々が請求項 1～9の1いずれか1項に記載のエネルギー転移色素を含む、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 26】

エネルギー転移色素の各々が、同じドナー色素を含む、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 27】

前記終止ヌクレオチドの蛍光標識が、単一光源によって励起可能である、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 28】

請求項 24～27に記載のいずれか1項に記載のキットであり、テンプレート依存性プライマー伸長反応においてオリゴヌクレオチドプライマーを伸長し得る4つのヌクレオシドトリホスフェートのセットをさらに含む、キット。

【請求項 29】

ポリメラーゼをさらに含む、請求項 28 に記載のキット。

【請求項 30】

蛍光標識オリゴヌクレオチドを形成するための方法であって、以下の工程：

テンプレート核酸およびヌクレオチドトリホスフェートの存在下でオリゴヌクレオチドプライマーを酵素反応的に伸長する工程を包含し、ここで、該オリゴヌクレオチドプライマーまたは該少なくとも1つのトリホスフェートが、請求項 1～9のいずれかに1項に記載の蛍光エネルギー転移色素を含む、方法。

【請求項 31】

前記オリゴヌクレオチドプライマーがエネルギー転移色素を含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記少なくとも1つのヌクレオチドトリホスフェートが、エネルギー転移色素を含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

核酸を分析する方法であって、以下：

複数の異なるサイズの蛍光標識伸長オリゴヌクレオチドプライマーを形成する工程；

該蛍光標識伸長オリゴヌクレオチドプライマーをそれらのサイズに基づいて分離する工程；

該蛍光標識伸長オリゴヌクレオチドプライマーをそれらの蛍光に基づいて検出する項手であって、該蛍光標識伸長オリゴヌクレオチドプライマーのうちの少なくとも1つのうちの蛍光標識が、請求項1～9のいずれか1項に記載のエネルギー転移色素を含む、工程を包含する、方法。

【請求項34】

請求項33に記載の方法であって、前記複数の異なるサイズの蛍光標識伸長オリゴヌクレオチドプライマーが、オリゴヌクレオチドプライマーを酵素的に伸長することによって形成され、該オリゴヌクレオチドプライマーは、テンプレート核酸、ヌクレオチドトリホスフェートおよび少なくとも1つの終止ヌクレオチドの存在下でエネルギー転移色素を含み、その結果、該標識されたプライマーが、該終止ヌクレオチドが該標識された伸長プライマーに取り込まれるまで、伸長される、方法。

【請求項35】

請求項33に記載の方法であって、ここで、前記複数の異なるサイズの蛍光標識した伸長オリゴヌクレオチドプライマーが、テンプレート核酸、ヌクレオチドトリホスフェートおよび前記エネルギー転移色素を含む少なくとも1つの終止ヌクレオチドの存在下でオリゴヌクレオチドプライマーを酵素的に伸長することによって形成され、その結果、該プライマーが、該標識された終止ヌクレオチドが該伸長プライマーに取り込まれるまで、伸長される、方法。

【請求項36】

前記少なくとも1つ終止ヌクレオチドが、2'，3'-ジデオキシリボヌクレオチド-5'-トリホスフェートである、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記少なくとも1つの終止ヌクレオチドが、ddATP、ddCTP、ddGTPおよびddTTPから選択される、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

請求項35に記載の方法であって、前記酵素的な伸長が、4つの異なる終止ヌクレオチドの存在下で実行され、該ヌクレオチドの各々は異なるテンプレートヌクレオチドでプライマー伸長を終止し、そして、該異なる終止ヌクレオチドの各々は、異なる空間的に分解可能な蛍光色素を含み、該異なる空間的に分解可能な蛍光色素のうちの少なくとも1つは、エネルギー転移色素である、方法。

【請求項39】

請求項39に記載の方法であって、ここで、異なる終止ヌクレオチドの各々は、前記エネルギー転移色素、ターミネーターごとに異なる空間的に分解可能なエネルギー転移色素を含む、方法。

【請求項40】

エネルギー転移色素の各々は、同じドナー色素を含む、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

終止ヌクレオチドの各々は、2'，3'-ジデオキシリボヌクレオチド-5'-トリホスフェートである、請求項38に記載の方法。

【請求項42】

前記終止ヌクレオチドが、ddATP、ddCTP、ddGTP、およびddTTPの混合物を含む、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記終止ヌクレオチドトリホスフェートが、dATP、dCTP、dGTP、およびdTTPの混合物を含む、請求項34～42に記載の方法。

【請求項44】

請求項33～43のいずれかの1項に記載の方法であって、前記核酸の配列を決定する工程をさらに包含する、方法。