

【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】令和2年11月12日(2020.11.12)

【公表番号】特表2019-536448(P2019-536448A)

【公表日】令和1年12月19日(2019.12.19)

【年通号数】公開・登録公報2019-051

【出願番号】特願2019-522971(P2019-522971)

【国際特許分類】

C 1 2 Q	1/6869	(2018.01)
C 0 7 H	19/10	(2006.01)
C 0 7 H	19/14	(2006.01)
C 0 7 H	19/207	(2006.01)
C 1 2 Q	1/6876	(2018.01)
C 1 2 M	1/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q	1/6869	Z
C 0 7 H	19/10	
C 0 7 H	19/14	
C 0 7 H	19/207	
C 1 2 Q	1/6876	Z
C 1 2 M	1/00	A

【手続補正書】

【提出日】令和2年9月29日(2020.9.29)

【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】

D N A配列中の標識ヌクレオチドを検出するための方法であって、

a) 核酸鑄型ならびに前記鑄型にハイブリダイズしてプライマー／鑄型ハイブリダイゼーション複合体を形成することが可能なプライマー、ジメルカプトプロパンスルホネートを含む切断試薬、D N Aポリメラーゼ、ならびにA、G、CおよびTまたはUのアナログを表す、4種の異なって標識されたデオキシヌクレオシド三リン酸化合物の集団、ならびに切断スカベンジャー試薬を提供するステップであって、ここで、前記標識されたデオキシヌクレオシド三リン酸化合物の各々が核酸塩基および糖を含み、前記糖が3' - Oに切断可能な保護基を含み、前記切断可能な保護基がメチレンジスルフィドを含み、前記標識されたデオキシヌクレオシド三リン酸化合物が、切断可能なオキシメチレンジスルフィド含有リンカーを介して前記核酸塩基に結合した標識を含む、ステップと、

b) 前記D N Aポリメラーゼおよび前記デオキシヌクレオシド三リン酸化合物の標識された集団を前記プライマーおよび鑄型に添加して反応混合物を作製するステップと、

c) 前記反応混合物を、D N Aポリメラーゼ触媒プライマー伸長反応を可能にする条件に供して改変プライマー／鑄型ハイブリダイゼーション複合体を作製するステップであって、ここで、第1の標識されたデオキシヌクレオシド三リン酸が組み込まれる、ステップと、

d) 前記改変プライマー／鑄型ハイブリダイゼーション複合体中の前記第1の標識されたデオキシヌクレオシド三リン酸の前記標識を検出するステップであって、前記検出するス

ステップが、前記組み込まれた第1のデオキシヌクレオシド三リン酸の核酸塩基の決定を可能とする、ステップと、

e ) 前記切断可能な保護基および前記検出可能な標識を前記改変プライマー／鑄型ハイブリダイゼーション複合体から除去する条件下で前記切断試薬を導入するステップと、

f ) 前記切断スカベンジャー試薬を導入するステップと  
を含む方法。

【請求項2】

前記ステップa)がフローセルをさらに提供し、前記フローセルが第1のリザーバーおよび第2のリザーバーと流体連通しており、前記第1のリザーバーが前記切断試薬を含み、前記第2のリザーバーが酸化的洗浄液を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記酸化的洗浄液が、前記第2のリザーバーから前記フローセルに導入される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

ステップb)の前記反応混合物が前記フローセル中にある、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

前記フローセルが移動支持体上に配置されている、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記移動支持体が回転ステージである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記フローセルの少なくとも一部が透明である、請求項4に記載の方法。

【請求項8】

前記フローセルが機器内に組み込まれている、請求項4に記載の方法。

【請求項9】

前記切断スカベンジャーが酸化的スカベンジャーである、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

ステップb)からステップf)を少なくとも50回繰り返すことをさらに含み、誤った塩基を同定することの発生が、前記切断試薬の使用によって低減する、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記酸化的スカベンジャーが過酸化水素である、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

前記過酸化水素が緩衝液中にある、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記緩衝液がTRSである、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記TRS緩衝液が、8.5～9.0の間のpHにある、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記TRS緩衝液が8.8のpHにある、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記酸化的スカベンジャーがtert-ブチルペルオキシドである、請求項9に記載の方法。

【請求項17】

ステップb)の繰り返しの間に、第2のデオキシヌクレオシド三リン酸を添加するステップをさらに含み、前記第2のデオキシヌクレオシド三リン酸が切断可能なオキシメチレンジスルフィドリンカーを介して結合した第2の検出可能な標識を含み、前記第2の検出可能な標識が前記第1の検出可能な標識と異なる、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

前記ジメルカプトプロパンスルホネートがCHES緩衝液中にあり、前記切断試薬のp

Hが9.0～10.0の間である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

1つまたは複数のDNA配列決定試薬、使用説明書、酸化的スカベンジャー、およびジメルカプトプロパンスルホネートを含む切断試薬を含むキット。

【請求項20】

前記酸化的スカベンジャーが過酸化水素である、請求項19に記載のキット。

【請求項21】

前記酸化的スカベンジャーがtert-ブチルペルオキシドである、請求項19に記載のキット。

【請求項22】

前記1つまたは複数のDNA配列決定試薬が、ポリメラーゼ、プライマー、鋳型およびヌクレオチドを含む群から選択される、請求項19に記載のキット。

【請求項23】

溶液中で鋳型にハイブリダイズしたプライマーを含むフローセルであって、前記溶液がジメルカプトプロパンスルホネートおよび酸化的スカベンジャーを含む、フローセル。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0094

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0094】

反応は、様々は場所、例えば、ウェル、チャネル、スライド、フローセルなどで起こり得る。フローセルは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,940,481号に記載されるチャネルを有することができる。フローセルは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,900,810号に記載される機器内の移動支持体上に存在し得る。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目1)

DNA配列中の標識ヌクレオチドを検出するための方法であって、

a) 核酸鋳型および前記鋳型にハイブリダイズしてプライマー／鋳型ハイブリダイゼーション複合体を形成することができるプライマー、チオール含有化合物を含む切断試薬および切断スカベンジャー試薬を提供するステップと、

b) DNAポリメラーゼおよび第1のデオキシヌクレオシド三リン酸を前記プライマーおよび鋳型に添加して反応混合物を作製するステップであって、前記第1のデオキシヌクレオシド三リン酸が核酸塩基および糖を含み、前記糖が3'-Oに切断可能な保護基を含み、前記切断可能な保護基がメチレンジスルフィドを含み、前記デオキシヌクレオシド三リン酸が、切断可能なオキシメチレンジスルフィド含有リンカーを介して前記核酸塩基に結合した第1の検出可能な標識をさらに含む、ステップと、

c) 前記反応混合物を、DNAポリメラーゼ触媒プライマー伸長反応を可能にする条件に供して改変プライマー／鋳型ハイブリダイゼーション複合体を作製するステップであって、前記第1のデオキシヌクレオシド三リン酸が組み込まれている、ステップと、

d) 前記改変プライマー／鋳型ハイブリダイゼーション複合体中の前記デオキシヌクレオシド三リン酸の前記第1の検出可能な標識を検出するステップと、

e) 前記切断可能な保護基および前記検出可能な標識を前記改変プライマー／鋳型ハイブリダイゼーション複合体から除去する条件下で前記切断試薬を導入するステップと、

f) 前記切断スカベンジャー試薬を導入するステップと  
を含む方法。

(項目2)

前記切断試薬がジメルカプトプロパンスルホネートを含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記ジメルカプトプロパンスルホネートが緩衝液中にある、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記緩衝液がCHESである、項目3に記載の方法。

(項目5)

前記切断試薬のpHが9.0～10.0の間である、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記切断試薬の前記pHが9.5である、項目5に記載の方法。

(項目7)

前記切断スカベンジャーが酸化的スカベンジャーである、項目1に記載の方法。

(項目8)

前記酸化的スカベンジャーが過酸化水素である、項目7に記載の方法。

(項目9)

前記過酸化水素が緩衝液中にある、項目8に記載の方法。

(項目10)

前記緩衝液がTRISである、項目9に記載の方法。

(項目11)

前記TRIS緩衝液が、8.5～9.0の間のpHにある、項目10に記載の方法。

(項目12)

前記TRIS緩衝液が8.8のpHにある、項目11に記載の方法。

(項目13)

前記酸化的スカベンジャーがtert-ブチルペルオキシドである、項目7に記載の方法。

(項目14)

ステップb)の前記反応混合物がフローセル中にある、項目1に記載の方法。

(項目15)

前記フローセルが移動支持体上に配置されている、項目14に記載の方法。

(項目16)

前記移動支持体が回転ステージである、項目15に記載の方法。

(項目17)

前記フローセルの少なくとも一部が透明である、項目14に記載の方法。

(項目18)

前記フローセルが機器内に組み込まれている、項目14に記載の方法。

(項目19)

ステップb)の繰り返しの間に、第2のデオキシヌクレオシド三リン酸を添加するステップをさらに含み、前記第2のデオキシヌクレオシド三リン酸が第2の切断可能なオキシメチレンジスルフィドリンカーを介して結合した第2の検出可能な標識を含み、前記第2の検出可能検出可能な(detectable detectable)標識が前記第1の検出可能検出可能な(detectable detectable)標識と異なる、項目1に記載の方法。

(項目20)

前記チオール含有化合物がビシナルジチオール系化合物である、項目1に記載の方法。

(項目21)

前記第2のデオキシヌクレオシド三リン酸の前記核酸塩基が、前記第1のデオキシヌクレオシド三リン酸の前記核酸塩基と異なる、項目20に記載の方法。

(項目22)

A、G、CおよびTまたはUのアナログを表す、少なくとも4種の異なって標識された、3'-Oメチレンジスルフィドでキャップされたデオキシヌクレオシド三リン酸化合物の混合物が、ステップb)で使用される、項目1に記載の方法。

(項目23)

前記検出するステップが、前記組み込まれた第1のデオキシヌクレオシド三リン酸の核酸塩基の決定を可能とする、項目22に記載の方法。

(項目24)

DNA配列中の標識ヌクレオチドを検出するための方法であって、

- a) 核酸鑄型および前記鑄型にハイブリダイズしてプライマー／鑄型ハイブリダイゼーション複合体を形成することが可能なプライマー、ならびにフローセルを提供するステップであって、前記フローセルが、チオール含有化合物を含む切断試薬を含む第1のリザーバーおよび酸化的洗浄液を含む第2のリザーバーと流体連通する、ステップと、
- b) DNAポリメラーゼおよび第1のデオキシヌクレオシド三リン酸を前記プライマーおよび鑄型に添加して、前記フローセル中で反応混合物を作製するステップであって、前記第1のデオキシヌクレオシド三リン酸が核酸塩基および糖を含み、前記糖が3'-Oに切断可能な保護基を含み、前記切断可能な保護基がメチレンジスルフィドを含み、前記デオキシヌクレオシド三リン酸が切断可能なオキシメチレンジスルフィド含有リンカーを介して前記核酸塩基に結合した第1の検出可能な標識をさらに含む、ステップと、
- c) 前記反応混合物を、DNAポリメラーゼ触媒プライマー伸長反応を可能にする条件に供して改変プライマー／鑄型ハイブリダイゼーション複合体を作製するステップであって、前記第1のデオキシヌクレオシド三リン酸が組み込まれている、ステップと、
- d) 前記改変プライマー／鑄型ハイブリダイゼーション複合体中の前記デオキシヌクレオシド三リン酸の前記第1の検出可能な標識を検出するステップと、
- e) 前記切断可能な保護基および前記検出可能な標識を前記改変プライマー／鑄型ハイブリダイゼーション複合体から除去する条件下で前記切断試薬を前記第1のリザーバーから前記フローセルに導入するステップと、
- f) 前記酸化的洗浄液を、前記第2のリザーバーから、前記フローセルに導入するステップと  
を含む方法。

(項目25)

前記切断試薬が、ジメルカプトプロパンスルホネートを含む、項目24に記載の方法。

(項目26)

前記ジメルカプトプロパンスルホネートが緩衝液中にある、項目25に記載の方法。

(項目27)

前記緩衝液がCHESである、項目26に記載の方法。

(項目28)

前記切断試薬のpHが9.0～10.0の間である、項目24に記載の方法。

(項目29)

前記切断試薬の前記pHが9.5である、項目28に記載の方法。

(項目30)

前記酸化的洗浄液が過酸化水素を含む、項目24に記載の方法。

(項目31)

前記過酸化水素が緩衝液中にある、項目30に記載の方法。

(項目32)

前記緩衝液がTRISである、項目31に記載の方法。

(項目33)

前記酸化的洗浄液がtert-ブチルペルオキシドを含む、項目24に記載の方法。

(項目34)

1つまたは複数のDNA配列決定試薬、使用説明書、酸化的スカベンジャー、およびチオール含有化合物を含む切断試薬を含むキット。

(項目35)

前記チオール含有化合物がジメルカプトプロパンスルホネートである、項目34に記載のキット。

(項目36)

前記酸化的スカベンジャーが過酸化水素である、項目34に記載のキット。

(項目37)

前記酸化的スカベンジャーがter-ブチルペルオキシドである、項目34に記載のキット。

(項目38)

前記1つまたは複数のDNA配列決定試薬が、ポリメラーゼ、プライマー、鋳型およびヌクレオチドを含む群から選択される、項目34に記載のキット。

(項目39)

溶液中で鋳型にハイブリダイズしたプライマーを含むフローセルであって、前記溶液がチオール含有化合物および酸化的スカベンジャーを含む、フローセル。