

【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】

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) 核酸鋳型ならびに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、DNA 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 DNA 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鋳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、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、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/鋳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

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 / 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。

【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 T R I S である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 T R I S 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 T R I S 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 t e r t - 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 C H E S 緩衝液中にあり、前記切断試薬の p

H が 9 . 0 ~ 1 0 . 0 の間である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

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 2 0】

前記酸化的スカベンジャーが過酸化水素である、請求項 1 9 に記載のキット。

【請求項 2 1】

前記酸化的スカベンジャーが t e r t - ブチルペルオキシドである、請求項 1 9 に記載のキット。

【請求項 2 2】

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 1 9 に記載のキット。

【請求項 2 3】

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】0 0 9 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 9 4】

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 , 9 4 0 , 4 8 1 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 , 9 0 0 , 8 1 0 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可能なプライマー、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 C H E S である、項目 3 に記載の方法。

(項目 5)

前記切断試薬の p H が 9 . 0 ~ 1 0 . 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 p H 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 1 0)

前記緩衝液が T R I S である、項目 9 に記載の方法。

(項目 1 1)

前記 T R I S 緩衝液が、8 . 5 ~ 9 . 0 の間の p H にある、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 1 2)

前記 T R I S 緩衝液が 8 . 8 の p H にある、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

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

(項目 1 4)

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 1 5)

前記フローセルが移動支持体上に配置されている、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記移動支持体が回転ステージである、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記フローセルの少なくとも一部が透明である、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記フローセルが機器内に組み込まれている、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 9)

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 の検出可能な検出可能な (detectible detectable) 標識が前記第 1 の検出可能な検出可能な (detectible detectable) 標識と異なる、項目 1 に記載の方法。

(項目 2 0)

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 2 1)

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 2 0 に記載の方法。

(項目 2 2)

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 2 3)

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 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

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鋳型に添加して、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 / 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 2 5)

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 2 4 に記載の方法。

(項目 2 6)

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 5 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記緩衝液が C H E S である、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記切断試薬の pH が 9 . 0 ~ 1 0 . 0 の間である、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記切断試薬の前記 pH が 9 . 5 である、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記酸化的洗浄液が過酸化水素を含む、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記過酸化水素が緩衝液中にある、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記緩衝液が T R I S である、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記酸化的洗浄液が t e r t - ブチルペルオキシドを含む、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 3 4)

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 3 5)

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 3 4 に記載のキット。

(項目 3 6)

前記酸化的スカベンジャーが過酸化水素である、項目 3 4 に記載のキット。

(項目 3 7)

前記酸化的スカベンジャーが t e r - ブチルペルオキシドである、項目 3 4 に記載のキット。

(項目 3 8)

前記 1 つまたは複数の D N A 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 3 4 に記載のキット。

(項目 3 9)

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。