



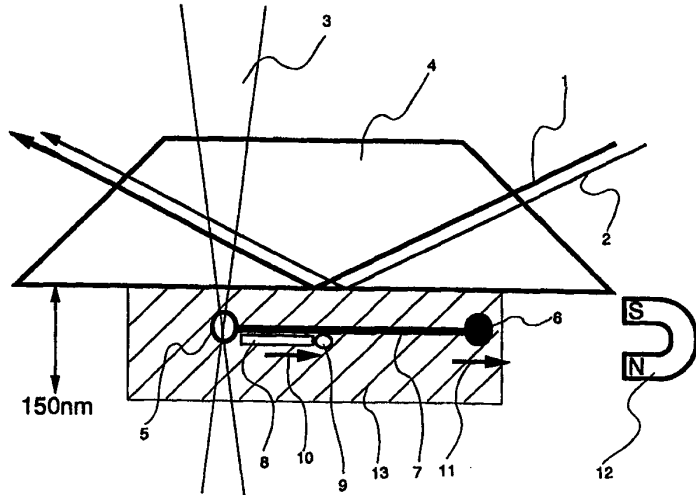
<p>(51) 国際特許分類 C12Q 1/68, C12M 1/00, G01N 33/50, C12N 15/10</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/33939</p> <p>(43) 国際公開日 1998年8月6日(06.08.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00239</p> <p>(22) 国際出願日 1997年1月31日(31.01.97)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 日立製作所(HITACHI, LTD.)(JP/JP) 〒101 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 穴沢 隆(ANAZAWA, Takashi)(JP/JP) 植松千宗(UEMATSU, Chihiro)(JP/JP) 〒185 東京都国分寺市西恋ヶ窪3-8-1 Tokyo, (JP) 岡野和宣(OKANO, Kazunori)(JP/JP) 〒353 埼玉県志木市本町5-17-2-402 Saitama, (JP) 神原秀記(KAMBARA, Hideki)(JP/JP) 〒192 東京都八王子市北野台1-4-3 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 小川勝男(OGAWA, Katsuo) 〒100 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 株式会社 日立製作所内 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>

(54)Title: METHOD FOR DETERMINING NUCLEIC ACID BASE SEQUENCE AND APPARATUS THEREFOR

(54)発明の名称 核酸塩基配列決定法及び核酸塩基配列決定装置

(57) Abstract

A method for determining a DNA base sequence which comprises fixing in an extended state a molecule of a single-stranded sample DNA (7) carrying a bead (5) at one end thereof and a magnetic bead (6) at the other end within the visual field of a fluorescence microscope by means of a magnetic force (11) and a laser trap (3); binding a primer (8) thereto; effecting an extension reaction (10) with a polymerase to thereby cause the incorporation of a single chemically modified nucleotide (9) alone labeled with a fluorescent substance differing from base species to base species; measuring exclusively the fluorescent substance thus incorporated as a fluorescent microscopic image by the evanescent irradiation (13) with an excitation laser (1); determining the base species from the fluorescent substance; liberating the fluorescent substance with which the incorporated nucleotide has been labeled by the evanescent irradiation (13) with an ultraviolet laser (2); and then effecting the step of the incorporation of the next nucleotide followed by repeating these steps. Thus, the base sequence can be determined by using a single DNA molecule, and a DNA consisting of several hundred bases or more can be efficiently sequenced.



(57) 要約

一端にビーズ(5)、他端に磁気ビーズ(6)をもつ1本鎖試料DNA(7)の単一分子を磁力(11)、レーザトラップ(3)で蛍光顕微鏡の視野内に伸長固定し、プライマー(8)を結合しポリメラーゼによる伸長反応(10)を行なう。塩基種毎に異なる蛍光体が標識された単一化学的修飾ヌクレオチド(9)のみが取り込まれる。励起レーザ(1)によるエバネッセント照射(13)で、取り込まれた単一蛍光体のみが蛍光顕微鏡像として計測され、蛍光体の種類から塩基種を決定する。紫外レーザ(2)によるエバネッセント照射(13)により、取り込まれたヌクレオチドを標識する蛍光体を遊離し、次のヌクレオチドを取り込む。以上を繰り返しDNA塩基配列決定を行なう。単一DNA分子を用いて塩基配列決定を実行でき、数100k塩基以上のDNA塩基配列決定を効率的にできる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AC	オーストラリア	GG	ガブーン	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BE	ベルギー	GM	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MW	モザンビーク	US	米国
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CA	カナダ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ベトナム
CC	中央アフリカ共和国	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CG	コンゴ	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CH	スイス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CI	コートジボワール	KG	キルギス	PT	ポルトガル		
CM	カメルーン	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
CN	中国	KR	韓国	RO	ルーマニア		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	RS	セルビア		
CY	キプロス	LC	セント・ルシア	SE	スウェーデン		
CZ	チェコ						

明 細 書

核酸塩基配列決定法及び核酸塩基配列決定装置

技術分野

本発明は、DNA、RNA等の分析装置に関する。特にDNA、RNAの塩基配列決定、あるいは制限酵素断片や特定断片の解析に有効な装置に関する。

背景技術

DNA、RNA等の分析技術は、遺伝子解析や遺伝子診断を含む医学、生物学の分野で重要となっている。DNA、RNAの塩基配列決定、又は制限酵素断片や特定断片の解析はいずれも電気泳動による分子量分離を基本としている。予め断片又は断片群に放射性標識又は蛍光標識を施し、電気泳動した後又は電気泳動中に分子量分離展開パターンを計測し解析している。最近では、ゲノム解析に関連して、特にDNA塩基配列決定装置のニーズが高まり、装置の開発が進められている。以下、蛍光標識を用いるDNA塩基配列決定について説明する。電気泳動分離に先立ち、サンガー法によるジデオキシ反応を実行する。分析すべき試料DNAの既知の塩基配列部分と相補的な約20塩基長のオリゴヌクレオチドを合成し蛍光体を標識する。このオリゴヌクレオチドをプライマーとし、約 10^{-12} molの試料DNAと相補鎖結合させて、ポリメラーゼにより相補鎖伸長反応を実行する。このとき基質として、4種のデオキシヌクレオチド3リン酸、即ち、デオキシアデノシン3リン酸(dATP)、デオキシシチジン3リン酸(dCTP)、デオキシグアノシン3リン酸(dGTP)、デオキシチミジン3リン酸(dTTP)、及びこれらに加えてジデオキシアデノシン3リン酸(ddATP)を加える。

ddATPが相補鎖伸長で取り込まれると、それ以上相補鎖が伸長しないため、アデニン（A）で終結する様々な長さの断片が調製される。上記反応でddATPの代わりに、ジデオキシシチジン3リン酸（ddCTP）、ジデオキシグアノシン3リン酸（ddGTP）、ジデオキシチミジン3リン酸（ddTTP）を各々加えた反応を独立に行なう。但し、各反応で用いるプライマーは、塩基配列は同じであるが、蛍光を分光して互いに識別できる4種の蛍光体を標識してある。

以上の4種の反応物を混合すると、試料DNAに相補的な約1000塩基長までの1塩基ずつ長さが異なる断片が、末端の塩基種に応じて異なる4種の蛍光体が標識されて調製される。各塩基長の断片数は各々約 10^{-15} molである。次に、調製された試料を電気泳動により1塩基の分解能で分離する。電気泳動にはアクリルアミドを間隔約0.3mmの2枚のガラス板の間に重合させた平板ゲルが広く使用されている。平板ゲル上端に試料を注入し、平板ゲルの上下両端に電界を印加すると、試料は分離されながら下端方向に泳動する。電気泳動を実行しながら、上端より約30cmの位置をレーザーで照射すると、分離された蛍光標識断片が短いものから順にレーザー照射位置を通過し励起される。発光蛍光を複数のフィルターを用いて分光しながら計測すると、4種の蛍光体の蛍光強度の時間変化から、全ての断片の末端塩基種を短い断片から順に決定できる。この塩基種の順は試料DNAと相補的な関係にあり試料DNAの塩基配列を決定できる。

電気泳動を用いない新しいDNA塩基配列決定法がいくつか提案されている。第1の従来技術では、試料DNAを鋳型とするポリメラーゼによる相補鎖伸長反応を実行するとき、4種の基質を1種ずつ順番に加え、各段階で相補鎖に取り込まれた基質量を吸光や蛍光により定量して試料DNAの塩基配列を決定している（特開平4-505251号公報）。第2の従来技術では、試料DNAを鋳型とし、互いに異なる標識がされ

た4種の基質を用いてポリメラーゼによる相補鎖伸長反応を実行した後、エキソヌクレアーゼにより合成された相補鎖の3'末端から1塩基ずつ離脱させ、遊離した塩基の標識体を順番に測定して試料DNAの塩基配列を決定している (Journal of Biomolecular Structure & Dynamics 7, 301-309 (1989))。第3の従来技術では、DNAポリメラーゼの基質として鋳型DNAに取り込まれてDNA鎖伸長反応を保護基の存在により停止することができかつ検出され得る標識を持つ4種のdNTPの誘導体 (MdNTP) を用いてDNAポリメラーゼ反応を行わせる工程、次いで取り込まれたMdNTPを検出する工程、及びMdNTPを伸長可能な状態に戻す工程を1サイクルとし、それを繰り返すことにより、試料DNAの塩基配列を決定している。この従来技術では、1塩基伸長時点でDNA鎖の伸長を停止させ、鋳型・プライマー・MdNTPの存在する系 (溶液) から、酵素と基質を除去し、取り込まれたMdNTPを検出し、さらに鋳型に取り込まれたMdNTPの保護基 (及び標識) を脱離して、DNA鎖伸長が可能な状態に導いている (特願平2-57978)。しかし、これらの提案は現在のところアイデアの段階であり、実用化されたという報告はない。

発明の開示

現在、実用になっているDNA塩基配列決定法では電気泳動により分子量分離を行っている。DNA塩基配列決定には分子量分離に1塩基長の分解能が要求される。電気泳動の分解能は通常、分離すべき塩基長が長くなる程低下する。即ち、50塩基長と51塩基長の1塩基長は分離ができて、500塩基長と501塩基長の1塩基長は分離できるとは限らない。どれだけ長い塩基長まで1塩基長の分解能が得られるかを示す分離限界塩基長は、電気泳動の諸条件、即ち、分離媒体の組成、電気

Explore Litigation Insights

Docket Alarm provides insights to develop a more informed litigation strategy and the peace of mind of knowing you're on top of things.

Real-Time Litigation Alerts



Keep your litigation team up-to-date with **real-time alerts** and advanced team management tools built for the enterprise, all while greatly reducing PACER spend.

Our comprehensive service means we can handle Federal, State, and Administrative courts across the country.

Advanced Docket Research



With over 230 million records, Docket Alarm's cloud-native docket research platform finds what other services can't. Coverage includes Federal, State, plus PTAB, TTAB, ITC and NLRB decisions, all in one place.

Identify arguments that have been successful in the past with full text, pinpoint searching. Link to case law cited within any court document via Fastcase.

Analytics At Your Fingertips



Learn what happened the last time a particular judge, opposing counsel or company faced cases similar to yours.

Advanced out-of-the-box PTAB and TTAB analytics are always at your fingertips.

API

Docket Alarm offers a powerful API (application programming interface) to developers that want to integrate case filings into their apps.

LAW FIRMS

Build custom dashboards for your attorneys and clients with live data direct from the court.

Automate many repetitive legal tasks like conflict checks, document management, and marketing.

FINANCIAL INSTITUTIONS

Litigation and bankruptcy checks for companies and debtors.

E-DISCOVERY AND LEGAL VENDORS

Sync your system to PACER to automate legal marketing.