

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-503512

(P2017-503512A)

(43) 公表日 平成29年2月2日 (2017. 2. 2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 19/34 (2006. 01)	C 1 2 P 19/34 A	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 4
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A	
	C 1 2 Q 1/68 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁)

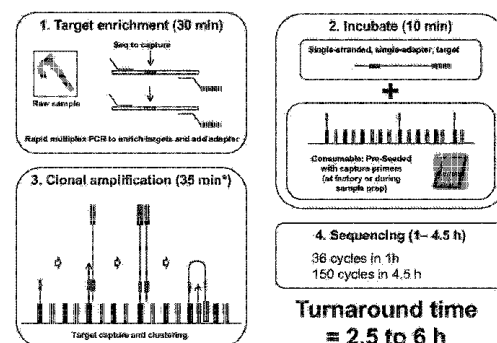
(21) 出願番号	特願2016-545978 (P2016-545978)	(71) 出願人	514202402 イラミーナ インコーポレーテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イラミーナ ウェ イ 5 2 0 0
(86) (22) 出願日	平成26年12月18日 (2014. 12. 18)	(74) 代理人	100147485 弁理士 杉村 憲司
(85) 翻訳文提出日	平成28年9月9日 (2016. 9. 9)	(74) 代理人	100181272 弁理士 神 紘一郎
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/071263	(74) 代理人	100193437 弁理士 高木 義和
(87) 国際公開番号	W02015/108663	(72) 発明者	ホンシアイ シュー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 5 8 サンフランシスコ イリノイ ス トリート 4 9 9 スイート 2 1 0 最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成27年7月23日 (2015. 7. 23)		
(31) 優先権主張番号	61/928, 368		
(32) 優先日	平成26年1月16日 (2014. 1. 16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 固相担体におけるアンブリコン調製および配列決定

(57) 【要約】

本開示は、分子生物学の分野に関し、より具体的には、固相表面上の標的ポリヌクレオチドを捕捉し、増幅し、そして、配列を決定する方法に関する。

Figure 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 複数の標的ポリヌクレオチドを含む核酸サンプルを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で少なくとも 1 つのプライマーに接触させるステップであって、前記少なくとも 1 つのプライマーはアダプターを含む、ステップと；

(b) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により前記複数の標的ポリヌクレオチドを増幅し、複数のアンプリコンを生成するステップと；

(c) 固相担体に固定化した複数の標的特異的捕捉プライマーを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で前記複数のアンプリコンと直接的に接触させて、第 1 の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記固相担体はさらに、複数のユニバーサル捕捉プライマーを含む、ステップと；

(d) 前記複数の標的特異的捕捉プライマーを伸長して、前記標的ポリヌクレオチドに対し相補的な、複数の固定化伸長生成物を生成するステップと；

(e) 前記複数の固定化伸長生成物に対して前記複数のユニバーサル捕捉プライマーをアニールするステップと；

(f) PCR により前記複数の固定化伸長生成物を増幅して、第 2 の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記固定化アンプリコンの集団は 85 % 以上の均一性を備えるステップと、を含む、アンプリコン調製方法。

【請求項 2】

前記複数の標的ポリヌクレオチドは 10 ng 以下の入力核酸を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ハイブリダイゼーションに十分な条件には 10 分以下の培養を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記直接的に接触させるステップ (c) は、実質的に未精製である第 1 の複数のアンプリコンを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 の複数のアンプリコンは高比率の細胞成分を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記アダプターは、前記複数のユニバーサル捕捉プライマーに対し相補的である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記複数の標的ポリヌクレオチドの増幅は、非対称 PCR を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つのプライマーは 2 つのプライマーを含み、前記 2 つのプライマーのうち少なくとも一方は前記アダプターを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記複数の標的ポリヌクレオチドの増幅はマルチプレックス増幅を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記マルチプレックス増幅は 180 以上のマルチプレックス性を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記固相担体はさらに、第 2 の複数のユニバーサル捕捉プライマーを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記複数の標的特異的捕捉プライマーはさらに、ユニバーサル捕捉プライマー領域を含む、請求項 11 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3】

前記ユニバーサル捕捉プライマー領域は、前記第 2 の複数のユニバーサル捕捉プライマーに対応するヌクレオチド配列を有する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記複数の標的特異的捕捉プライマーは、200 以上の異なるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記複数の標的ポリヌクレオチドは、200 以上の異なるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記複数の標的ポリヌクレオチドは複数のゲノム核酸を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記固定化伸長生成物の増幅はブリッジ増幅を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記固相担体はフローセルを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記第 2 の複数の固定化アンプリコンの配列を決定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記配列を決定するステップは 50 サイクルを含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

開始～終了時間は 3 時間以下である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

(a) 複数の標的ポリヌクレオチドを含む核酸サンプルを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で少なくとも 1 つのプライマーに接触させるステップであって、前記少なくとも 1 つのプライマーはアダプターを含む、ステップと；

(b) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により前記複数の標的ポリヌクレオチドを増幅し、複数のアンプリコンを生成するステップと；

(c) 固相担体に固定化した、1 つまたは 2 つ以上の異なるがんの特異的な複数の標的特異的捕捉プライマーを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で前記複数のアンプリコンに直接的に接触させて第 1 の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記固相担体は複数のユニバーサル捕捉プライマーをさらに含む、ステップと；

(d) 前記複数の標的特異的捕捉プライマーを伸長して、前記標的ポリヌクレオチドに対し相補的な、複数の固定化伸長生成物を生成するステップと；

(e) 前記複数の固定化伸長生成物に対し、前記複数のユニバーサル捕捉プライマーをアニールするステップと；

(f) PCR により、前記複数の固定化伸長生成物を増幅して、第 2 の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記固定化アンプリコンの集団は、85 % 以上の均一性を備える、ステップと；

(g) 前記第 2 の複数の固定化伸長生成物の配列を決定し、がん関連遺伝子の有無を判断するステップと、を含む、がん関連遺伝子の存在を判断する方法。

【請求項 2 3】

前記複数の標的ポリヌクレオチドは、10 ng 以下の入力核酸を含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記複数の標的ポリヌクレオチドはセルフリー DNA (cfDNA) を含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記ハイブリダイゼーションに十分な条件には 10 分以下の培養を含む、請求項 2 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 26】

前記直接的に接触させるステップ(c)は、実質的に未精製である第1の複数のアンプリコンを含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 27】

前記アダプターは、前記複数のユニバーサル捕捉プライマーに対し相補的である、請求項22に記載の方法。

【請求項 28】

前記複数の標的ポリヌクレオチドの増幅は非対称PCRを含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 29】

前記少なくとも1つのプライマーは2つのプライマーを含み、前記2つのプライマーのうち少なくとも1つは前記アダプターを含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 30】

前記複数の標的ポリヌクレオチドの増幅はマルチプレックス増幅を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項 31】

前記マルチプレックス増幅は180以上のマルチプレックス性を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項 32】

前記固相担体は、第2の複数のユニバーサル捕捉プライマーをさらに含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 33】

前記複数の標的特異的捕捉プライマーは、ユニバーサル捕捉プライマー領域をさらに含む、請求項32に記載の方法。

【請求項 34】

前記ユニバーサル捕捉プライマー領域は、前記第2の複数のユニバーサル捕捉プライマーに対応するヌクレオチド配列を有する、請求項33に記載の方法。

【請求項 35】

前記複数の標的特異的捕捉プライマーは、200以上の異なるヌクレオチド配列を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 36】

前記複数の標的特異的捕捉プライマーは、AKT1、CTNNB1、FLT3、KRAS、PTPN11、SRC、ALK、EGFR、GNAS、MLH1、RB1、STK11、ATM、ERBB2、HNF1A、MPL、RAD50、TP53、BRAF、ERBB4、IDH1、NRAS、RET、VHL、BRCA1、FBXW7、JAK3、PIK3CA、SMAD4、CDH1、FGFR2、KIT、PTEN、SMARCB1、ABL1、CSF1R、GNA11、JAK2、NOTCH1、SMO、APC、FGFR1、GNAQ、KDR、NPM1、CDKN2、FGFR3、HRAS、MET、およびPDGFRAからなる遺伝子群から選択される、2つ以上の異なるヌクレオチド配列を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 37】

前記複数の標的特異的捕捉プライマーは、AKT1、CTNNB1、FLT3、KRAS、PTPN11、SRC、ALK、EGFR、GNAS、MLH1、RB1、STK11、ATM、ERBB2、HNF1A、MPL、RAD50、TP53、BRAF、ERBB4、IDH1、NRAS、RET、VHL、BRCA1、FBXW7、JAK3、PIK3CA、SMAD4、CDH1、FGFR2、KIT、PTEN、SMARCB1、ABL1、CSF1R、GNA11、JAK2、NOTCH1、SMO、APC、FGFR1、GNAQ、KDR、NPM1、CDKN2、FGFR3、HRAS、MET、およびPDGFRAという各遺伝子のヌクレオチド配列を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 38】

前記固定化伸長生成物の増幅はブリッジ増幅を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 39】

前記固相担体はフローセルを含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 40】

前記配列を決定するステップは50サイクルを含む、請求項22に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 1】

開始～終了時間は 3 時間以下である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 4 2】

(a) 複数の標的ポリヌクレオチドを含む核酸サンプルを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で、遺伝子特異的フォワードプライマーおよび遺伝子特異的リバープライマーに接触させるステップであって、前記遺伝子特異的フォワードプライマーの各種は固有の配列インデックスおよびアダプターを含む、ステップと；

(b) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、前記複数の標的ポリヌクレオチドを増幅し、複数のアンプリコンを生成するステップと；

(c) 固相担体に固定化した複数の標的の特異的捕捉プライマーを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で前記複数のアンプリコンと直接的に接触させて、第 1 の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記固相担体は複数のユニバーサル捕捉プライマーをさらに含む、ステップと；

(d) 前記複数の標的の特異的捕捉プライマーを伸長して、前記標的ポリヌクレオチドに対し相補的な、複数の固定化伸長生成物を生成するステップと；

(e) 前記複数のユニバーサル捕捉プライマーを前記複数の固定化伸長生成物にアニールするステップと；

(f) PCR により前記複数の固定化伸長生成物を増幅して、第 2 の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記第 2 の複数の固定化アンプリコンは 85 % 以上の均一性を備える、ステップと；

(g) 前記第 2 の複数の固定化アンプリコンの配列を決定するステップと；

(h) 標的ポリヌクレオチド種に関し、変異体位置にある 3 つ以上のヌクレオチド配列を比較することにより、1 つまたは 2 つ以上の標的ポリヌクレオチドに関するランダムな配列エラーを解消するステップであって、前記標的ポリヌクレオチド種を前記固有の配列インデックスにより特定し、それにより、前記 1 つまたは 2 つ以上の標的ポリヌクレオチドにおける真のヌクレオチド配列変異体を求める、ステップと、を含む、核酸配列変異体の検出感度を高める方法。

【請求項 4 3】

前記複数の標的ポリヌクレオチドは、10 ng 以下の入力核酸を含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記ハイブリダイゼーションに十分な条件には 10 分以下の培養を含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

変異体ヌクレオチド位置について 0.3 % 以下のミスマッチ率を検出する、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 6】

接触させるステップ (a) は、第 1 の遺伝子特異的フォワードプライマーおよびリバープライマーを用いる PCR 増幅の第 1 ラウンドと、前記第 1 の遺伝子特異的フォワードプライマーの一部に対し相補的な第 2 のフォワードプライマーを用いる PCR 増幅の第 2 ラウンドを含み、第 2 のフォワードプライマーは前記固有配列インデックスおよび前記アダプターを含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記アダプターは、前記複数のユニバーサル捕捉プライマーに対し相補的である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記複数の標的ポリヌクレオチドの増幅は非対称 PCR を含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記複数の標的ポリヌクレオチドの増幅はマルチプレックス増幅を含む、請求項 4 2 に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 50】

前記マルチプレックス増幅は 180 以上のマルチプレックス性を含む、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記固相担体は第 2 の複数のユニバーサル捕捉プライマーを含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 52】

前記複数の標的特異的捕捉プライマーは、ユニバーサル捕捉プライマー領域をさらに含む、請求項 51 に記載の方法。

10

【請求項 53】

前記ユニバーサル捕捉プライマー領域は、前記第 2 の複数のユニバーサル捕捉プライマーに対応するヌクレオチド配列を有する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

前記複数の標的特異的捕捉プライマーは、200 以上の異なるヌクレオチド配列を含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 55】

前記複数の標的ポリヌクレオチドは、200 以上の異なるヌクレオチド配列を有する、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 56】

前記複数の標的ポリヌクレオチドは複数のゲノム核酸を含む、請求項 42 に記載の方法。

20

【請求項 57】

前記固定化伸長生成物の増幅はブリッジ増幅を含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 58】

前記固相担体はフローセルを含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 59】

前記配列を決定するステップは 50 サイクルを含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 60】

開始～終了時間は 3 時間以下である、請求項 59 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は概して、核酸増幅および配列決定のための方法および組成物に関し、具体的には、標的ポリヌクレオチドの固相担体への捕捉および配列決定に関する。

【背景技術】

【0002】

ポリヌクレオチドにコードされた情報（例えば、DNA または RNA）は、医学および生命科学にとって最も重要であるため、ポリヌクレオチドを迅速かつ安価に配列決定する必要性が存在する。現在のところ、商用の配列決定技法はサンプルとライブラリの調製を必要とし、これは双方とも手がかかる。さらに読み出しは、多くのアプリケーションにおいて所望より遅い。そのため処理量は限定され、コストは比較的高い。

40

【0003】

したがって、標的ポリヌクレオチドを調整し配列を決定する、より迅速で効率的な方法の必要性が存在する。本開示はこの必要性を満たし、関連する利点も同様に提示する。

【発明の概要】

【0004】

本開示は、アンプリコンの調製方法を提供する。該方法は、（a）複数の標的ポリヌクレオチドを含む核酸サンプルを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で少なくとも 1 つのプライマーに接触させるステップであって、前記少なくとも 1 つのプライマーはアダ

50

プターを含む、ステップと；(b) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により前記複数の標的ポリヌクレオチドを増幅し、複数のアンプリコンを生成するステップと；(c) 固相担体に固定化した複数の標的特異的捕捉プライマーを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で前記複数のアンプリコンと直接的に接触させて、第1の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記固相担体はさらに、複数のユニバーサル捕捉プライマーを含む、ステップと；(d) 前記複数の標的特異的捕捉プライマーを伸長して、前記標的ポリヌクレオチドに対し相補的な複数の固定化伸長生成物を生成するステップと；(e) 前記複数の固定化伸長生成物に対して前記複数のユニバーサル捕捉プライマーをアニールするステップと；(f) PCRにより前記複数の固定化伸長生成物を増幅し、第2の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記固定化アンプリコンの集団は85%以上の均一性を備える、ステップを含む。該方法は、10 ng以下の入力核酸と共に使用することが可能であり、さらに、第2の複数の固定化アンプリコンの配列を決定するステップを含むことが可能である。該方法はまた、がん関連遺伝子など、疾患または疾病に関連した遺伝子の存在を判断するのに用いることが可能である。セルフリーDNAも本開示の方法で用いることが可能である。

10

【0005】

本開示はさらに、核酸配列変異体の検出感度を高める方法を提供する。該方法は、(a) 複数の標的ポリヌクレオチドを含む核酸サンプルを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で遺伝子特異的フォワードプライマーおよび遺伝子特異的リバープライマーと接触させるステップであって、前記遺伝子特異的フォワードプライマーの各種は、固有の配列インデックスとアダプターを含む、ステップと；(b) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、前記複数の標的ポリヌクレオチドを増幅して、複数のアンプリコンを生成するステップと、(c) 固相担体に固定化した複数の標的特異的捕捉プライマーを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で前記複数のアンプリコンと直接的に接触させて、第1の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記固相担体はさらに、複数のユニバーサル捕捉プライマーを含む、ステップと；(d) 前記複数の標的特異的捕捉プライマーを伸長して、前記標的ポリヌクレオチドに対し相補的な複数の固定化伸長生成物を生成するステップと；(e) 前記複数の固定化伸長生成物に対し、前記複数のユニバーサル捕捉プライマーをアニールするステップと；(f) PCRにより、前記複数の固定化伸長生成物を増幅して第2の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記第2の複数の固定化アンプリコンは、85%以上の均一性を備える、ステップと；(g) 前記第2の複数の固定化アンプリコンの配列を決定するステップと；(h) 標的ポリヌクレオチド種に関し、変異体位置にある3つ以上のヌクレオチド配列を比較することにより、1つまたは2つ以上の標的ポリヌクレオチドに関するランダムな配列エラーを解消するステップであって、前記標的ポリヌクレオチド種を固有の配列インデックスにより特定し、それにより前記1つまたは2つ以上の標的ポリヌクレオチドにおける真のヌクレオチド配列変異体を求める、ステップを含む。該方法は、変異体ヌクレオチド位置について0.3%以下のミスマッチ率を検出することが可能である。

20

30

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】固相担体上のアンプリコンの調製および配列決定における、例示的なステップを示す図である。

【図2】ゲノムDNAのマルチプレックス100サイクル配列決定ランに関し、2つの異なる核酸入力量についての配列決定均一性および配列決定深度の比較を示す図である。

【図3】ホルマリン固定パラフィン包埋組織から得たDNAのマルチプレックス50サイクル配列決定ランに関し、4つの異なる核酸入力量についての配列決定均一性および配列決定深度の比較を示す図である。

【図4】マルチプレックス配列決定ランにおいて、1 mLの血漿から単離した10 ngのセルフリーDNAについての配列決定均一性および配列決定深度の比較を示す図である。

【図5】ランダムなヌクレオチド配列決定エラーから真のヌクレオチド変異体を区別する

40

50

ための、固有の分子バーコードまたはヌクレオチドインデックスの使用を例示する図である。

【図6】固有分子バーコード修正を使用したヌクレオチドミスマッチ率（右）と、固有分子バーコード修正を使用しないヌクレオチドミスマッチ率（左）の比較を示す図である。

【図7】インデックスを、標的特異的増幅プライマーを介して標的ポリヌクレオチドに組み込む1つのステップであって、該インデックスはシーケンシングプライマーの結合部位の下流にある、ステップを示す図である。

【図8】インデックスを、配列決定プライマーを介して標的ポリヌクレオチドに組み込む2つのステップであって、該インデックスは配列決定プライマーの結合部位の上流にある、ステップを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0007】

本開示は、標的ポリヌクレオチドを迅速で効率的に調製および配列決定する方法を対象にする。該方法は、標的ポリヌクレオチドのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、固相担体への直接固定化、クローン増幅、および配列決定を含む。それらは、統合工程において個別または共に利用することでき、サンプル～結果（sample-to-answer）が迅速なアンプリコン配列決定を可能にする。統合方法は、アンプリコンライブラリ調整が不必要であり、それによってライゲーションに関連する非効率性が解消されることから、特に有用である。配列決定用統合方法が持つ、他の特に有用な特質には、例えばアンプリコン精製とPCR後の追加の濃縮ステップの必要性が解消されることが含まれ、アンプリコンを固定化する迅速なハイブリダイゼーションステップを可能にし、非常に少量の入力核酸とともに利用しながら高品質の配列決定結果を達成することが可能である。

【0008】

特異的な一実施形態において、本開示の方法は標的ポリヌクレオチドの集団のマルチプレックスPCRを利用し、ここで1つのプライマーは、固相担体に固定化したオリゴヌクレオチドに対し、相補的なアダプターを含む。標的ポリヌクレオチドの増幅集団は、最初に精製ステップにかけずに固相担体に固定化する。固定化は、固相担体に予め播種した標的特異的捕捉オリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションによる。標的ポリヌクレオチドの増幅集団のアダプター末端を固定化相補的オリゴヌクレオチドにアニールし、該相補的オリゴヌクレオチドを伸長反応においてプライマーとして用いて二本鎖の標的ポリヌクレオチドの集団を生成する。クローン増幅に続き、標的ポリヌクレオチドコロニーを35以上のサイクルからなるマルチプレックス配列決定にかける。

【0009】

本明細書で用いる場合、「複数」という用語は、2つ以上の異なるポリヌクレオチドまたは他の参照分子の集団を指す。したがって特に明記しない限り、「複数」という用語は集団と同義的に用いる。複数には、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90または100以上の異なる要素の集団が含まれる。複数にはまた、200、300、400、500、1000、5000、10000、50000、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、または、 1×10^7 以上の異なる要素が含まれ得る。複数には、上記の例示的な集団数の間にある整数が全て含まれる。

【0010】

本明細書で用いる場合、「標的ポリヌクレオチド」という用語は、分析または処置の対象であるポリヌクレオチドを意味することを目的とする。分析または処置には、ポリヌクレオチドをコピー、増幅、配列決定、および／または、核酸照合のための他の工程にかけるステップが含まれる。標的ポリヌクレオチドは、分析すべき標的配列とは別のヌクレオチド配列を含み得る。例えば、標的ポリヌクレオチドは、プライマー結合部位として機能するアダプターなど、分析すべき標的ポリヌクレオチド配列の側面に位置する1つまたは

10

20

30

40

50

2つ以上のアダプターを含み得る。捕捉オリゴヌクレオチドまたは捕捉プライマーに対しハイブリダイズした標的ポリヌクレオチドは、ヌクレオチドを含み得、これは標的ポリヌクレオチドの全てが伸長に非常に適しているとは限らないやり方で、捕捉オリゴヌクレオチドの5'末端または3'末端を超えて伸長する。以下でさらに詳細に述べるように、特定の実施形態において複数の標的ポリヌクレオチドは異種を含み、これは、その標的ポリヌクレオチド配列は異なるものの、2つ以上の異種に共通のアダプターを有する。特定の標的ポリヌクレオチド配列に隣接することが可能な2つのアダプターは、同一の配列を有するか、または、該2つのアダプターは異なる配列を有することが可能である。したがって、複数の異なる標的ポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド配列の各末端に、同じアダプター配列か、または、2つの異なるアダプター配列を有することが可能である。したがって、複数の標的ポリヌクレオチドの種は既知の配列領域を含むことが可能であり、これは、例えば、配列決定により評価される未知の配列領域に隣接する。標的ポリヌクレオチドが一方の末端にのみアダプターを有する場合、該アダプターは標的ポリヌクレオチドの3'末端または5'末端の何れかに位置させることが可能である。標的ポリヌクレオチドはアダプター無しに用いることが可能で、この場合、プライマー結合配列は、標的ポリヌクレオチドで見つけられた配列から直接的に生成することが可能である。

10

【0011】

本明細書で用いる場合、複数の捕捉プライマーを接触させることに関連して用いる際の「直接的」という用語は、参照工程後の重大な介在精製ステップなしに、接触物質を複数の捕捉プライマーに適用することを意味することを目的とする。重大な介在精製ステップは、細胞成分の複雑さを低減することを目的とした工程を含み、例えば、増幅反応後にプライマー、酵素、および、未増幅または不適切に増幅された鋳型の存在を減少させるステップを含む。重大な介在精製ステップは、バッファの修正、サンプル核酸の沈殿、および他の副次的な核酸操作工程を含むことは目的にしない。

20

【0012】

本明細書で用いる場合、「捕捉プライマー」という用語は、ヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを意味することを目的とし、これは、例えば、増幅もしくは配列決定反応のプライマーアニーリングステップで遭遇する条件下で分析する、または、核酸照合にかける、一本鎖ポリヌクレオチド配列に対し、特異的にアニールすることが可能である。該して、「核酸」、「ポリヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」という用語は、本明細書で互換的に用いる。異なる用語は、具体的に別の指示がない限り、サイズ、配列、または他の特性の特段の違いを表すことを目的としない。記載の明確性のため、特定の方法またはいくつかの核酸種を含む組成物を記載する際、核酸のある種を別のものから区別するために該用語を用いることが可能である。

30

【0013】

本明細書で用いる場合、捕捉プライマーまたは他のオリゴヌクレオチドに関連して用いる際の「標的特異的」という用語は、標的ポリヌクレオチド配列に対し特異的なヌクレオチド配列、つまり、標的ポリヌクレオチドの識別領域に対し選択的にアニールすることが可能なヌクレオチド配列を含む、捕捉プライマーまたは他のオリゴヌクレオチドを意味することを目的とする。標的特異的捕捉プライマーは、単一種のオリゴヌクレオチドを有するか、または、異なる配列を有する2つ以上の種を含むことが可能である。したがって、標的特異的捕捉プライマーは、3、4、5、6、7、8、9、または10以上の異なる配列など、2つ以上の配列とすることができ。標的特異的捕捉オリゴヌクレオチドは、標的特異的捕捉プライマー配列と、ユニバーサル捕捉プライマー配列を含むことが可能である。配列決定プライマー配列などの他の配列は、標的特異的捕捉プライマーに含むことが可能である。

40

【0014】

比較すると、捕捉プライマーまたは他のオリゴヌクレオチド配列に関連して用いる「ユニバーサル」という用語は、複数の捕捉プライマーのうち共通のヌクレオチド配列を有する捕捉プライマーまたは他のオリゴヌクレオチドを意味することを目的とする。共通の配

50

列は、例えば、同一のアダプター配列に対し相補的な配列とすることが可能である。ユニバーサル捕捉プライマーは、異種を必ずしも区別せず、複数の異なるポリヌクレオチドを照合するのに適用可能であるのに対し、標的特異的捕捉プライマーは、異種の区別に適用可能である。

【0015】

本明細書で用いる場合、ヌクレオチド配列に関連して用いる際の「インデックス」という用語は、サンプル内に含まれるポリヌクレオチド内の他のインデックスおよび他のヌクレオチド配列から区別可能な、固有ヌクレオチド配列を意味することを目的とする。ヌクレオチドインデックスは、ランダムまたは特異的にデザインされた、ヌクレオチド配列とすることができる。インデックスは、分析または照合する集団および／または複数のポリヌクレオチドの、複数のインデックス内固有ヌクレオチド配列であるのに十分な長さである限り、所望の配列長さとする事が可能である。本開示のヌクレオチドインデックスは、例えば、標的ポリヌクレオチドに付着させて特定の種をタグ付けまたはマーク付けし、集団内でタグ付けした種の全要素を識別するのに有用である。したがって、インデックスはバーコードとして有用であり、ここで同一分子種の異なる要素は、同一のインデックスを含むことが可能であり、異なるポリヌクレオチド集団内にある異種は、異なるインデックスを有することが可能である。

【0016】

本明細書で用いる場合、核酸に関連して用いる際の「固定化した」という用語は、共有結合または非共有結合を介して、固相担体に直接的または非直接的に付着させることを意味することを目的とする。本開示のある実施形態において、共有結合付着を用いることができるが、概して必要なのは、核酸が、例えば核酸増幅および／または配列決定を必要とするアプリケーションにおいて、担体を使用することを目的とする条件下で静止するか、または、担体に付着することだけである。典型的に、捕捉プライマーまたは増幅プライマーとして使用するオリゴヌクレオチドを固定化し、その結果、3'末端が酵素伸長に適用可能になり、配列の少なくとも一部を相補的な配列に対しハイブリダイズすることができる。固定化は、表面に付着させたオリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションによって生じさせることが可能であり、この場合、固定化したオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、3'-5'方向とすることが可能である。あるいは、固定化は、上で述べた共有結合付着といった塩基対ハイブリダイゼーション以外の手段により生じさせることが可能である。

【0017】

本明細書で用いる場合、「固相担体」という用語は、例えば、ラテックスビーズ、デキストランビーズ、ポリスチレン表面、ポリプロピレン表面、ポリアクリルアミドゲル、金表面、ガラス表面、およびシリコンウエハなど、核酸を付着させることが可能な任意の不溶性基板またはマトリックスを意味することを目的とする。表面は、平面、球状、または多孔質など、特定のアプリケーションに適切な任意の所望の形状とすることが可能である。例えば、固相担体は平坦なガラス表面とすることが可能である。固相担体はまた、フローセルの内側に取り付けて、種々の反応物の溶液との相互作用を可能にすることもできる。

【0018】

ある実施形態において、固相担体は不活性な基板またはマトリックスを含むことが可能であり、これは例えば、ポリヌクレオチドに対する共有結合付着を可能にする反応基を有する中間物質の層またはコーティングを適用することにより、化学的に官能基化されている。中間物質を、共有結合または非共有結合により固相担体に直接的または非直接的に付着させることが可能である。固相担体に対する非共有結合付着の非限定的例として、このような担体は、ガラスなどの不活性基板上にポリアクリルアミドヒドロゲル層を備えることが可能である。このような実施形態において、ポリヌクレオチドは中間層（例えば、ヒドロゲル）に対し直接的に、共有結合的に付着させることが可能であるが、中間層自体は、他の基板またはマトリックス（例えば、ガラス基板）の層に非共有結合的に付着させる

10

20

30

40

50

ことが可能である。

【0019】

本開示は、アンプリコンの調製方法を提供する。該方法は、(a) 複数の標的ポリヌクレオチドを有する核酸サンプルを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で少なくとも1つのプライマーと接触させるステップであって、前記少なくとも1つのプライマーはアダプターを含む、ステップと；(b) ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により前記複数の標的ポリヌクレオチドを増幅し、複数のアンプリコンを生成するステップと；(c) 固相担体に固定化した複数の標的特異的捕捉プライマーを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で前記複数のアンプリコンと直接的に接触させて、第1の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記固相担体はさらに、複数のユニバーサル捕捉プライマーを有する、ステップと；(d) 前記複数の標的特異的捕捉プライマーを伸長して、前記標的ポリヌクレオチドに対し相補的な、複数の固定化伸長生成物を生成するステップと；(e) 前記複数の固定化伸長生成物に対して前記複数のユニバーサル捕捉プライマーをアニールするステップと；(f) PCRにより前記複数の固定化伸長生成物を増幅して、第2の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記第2の複数の固定化アンプリコンは85%以上の均一性を備える、ステップを含む。

10

【0020】

本開示のアンプリコンの調製方法は、標的ポリヌクレオチドまたはその照合生成物のサンプルの質を高める1つまたは2つ以上の特徴を統合し、固定化標的ポリヌクレオチドのクローン集団の調製に関し、迅速で効率的なマルチステッププロセスを可能にする。各調製工程は使用準備が整った複数の標的ポリヌクレオチドを生成し、これは本明細書で記載するいずれの工程でも利用可能である。

20

【0021】

アンプリコン調製に関する本開示の方法は、複数の標的ポリヌクレオチドを有する核酸サンプルを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で少なくとも1つのプライマーと接触させるステップを含む。該少なくとも1つのプライマーは、アダプターを含むことが可能である。

【0022】

核酸サンプルは、真核生物ソースまたは原核生物ソース、および合成ソースを含む任意の所望のソースから生じさせることが可能である。ある実施形態では、核酸サンプルソースを対象の生物から生じさせ、これはゲノムデオキシリボ核酸(DNA)を含むだろう。例えば、サンプルはヒトソースから生じさせることができ、ここでゲノム情報は、診断または治療の目的に望ましい。同様に、サンプルは、飼育動物ソースまたは家畜ソースから生じさせることが可能であり、ここでゲノム情報はまた、診断または治療の目的に望ましい。他の核酸サンプルソースには、例えば、細菌、酵母、真菌、およびげっ歯類等が含まれる。本明細書で提供する教示および指導を考慮すると、当業者は、任意の核酸ソースを本開示の方法で使用可能であることを理解しよう。

30

【0023】

標的ポリヌクレオチドには、照合する任意の所望の核酸が含まれる。これに関し、標的ポリヌクレオチドには、例えば、ゲノムDNA、cDNA、セルフリーDNA(cfDNA)、EST、mRNA、hnRNA、rRNA、tRNA、snRNA、ミトコンドリアDNA、および合成DNAまたはRNAが含まれる。特定の実施形態において、標的ポリヌクレオチドはゲノムDNAであり、照合は診断情報または治療介入に適用可能である。

40

【0024】

したがって、「ポリヌクレオチド」という用語は、デオキシリボ核酸(DNA)およびリボ核酸(RNA)を意味する。該用語は、同義語としてヌクレオチド類似物から作成されるDNAまたはRNAいずれかの類似物を含み、(センスまたはアンチセンスなどの)一本鎖および二本鎖のポリヌクレオチドに適用可能であることを理解すべきである。

【0025】

50

標的ポリヌクレオチド分子は、二本鎖DNA（dsDNA）形状（例えば、ゲノムDNA断片、PCR、および増幅生成物等）で生じさせるか、または、DNAまたはRNAとして一本鎖形状で生じさせ、dsDNA形状に変換することが可能である。例として、mRNA分子を、当技術分野で周知の標準的な技法を用いて、本開示の方法で使用するのに適した二本鎖cDNAにコピーすることが可能である。標的ポリヌクレオチド分子の正確な配列は、既知の場合も未知の場合もあり得る。

【0026】

核酸サンプルは、未濃縮ゲノムDNAの初期サンプルとすることが可能である。核酸サンプルとして有用なゲノムDNAの例として、ヒトゲノムは約31億の配列塩基からなる。本開示の方法で使用可能な他のゲノムについての例示的なサイズ推定値は、約2.7Gb（マウス）、2.8Gb（ラット）1.7Gb（ゼブラフィッシュ）、165Mb（ミバエ）、13.5Mb（出芽酵母）、390Mb（フグ）278Mb（蚊）または103Mb（シー・エレガンス）である。当業者は、例えば、より小さいまたはより大きいゲノムなど、上記の例示的なもの以外のサイズを有するゲノムを本開示の方法で使用可能であることを理解しよう。

【0027】

特定の実施形態において、標的ポリヌクレオチド分子はDNA分子である。特に、標的ポリヌクレオチド分子は生物の全ゲノム相補物を表し、プロモーター配列およびエンハンサー配列などのノンコーディング調節配列と同様にイントロン配列およびエクソン配列の両方（コーディング配列）を含む、ゲノムDNA分子である。特定の染色体など、ポリヌクレオチド配列またはゲノムDNAの特定のサブセットも使用することが可能である。特に、標的ポリヌクレオチド分子の配列またはその一部を、標的配列とすることが可能である。さらに、標的ポリヌクレオチド分子は、例えば、上記で例示したように、ヒト、哺乳動物、細菌、真菌または植物のゲノムDNA分子に由来する。したがって、本開示は、複数のポリヌクレオチドを用いる方法を提供し、ここで該複数の標的ポリヌクレオチドには、複数のゲノム核酸が含まれる。

【0028】

ある実施形態において、標的ポリヌクレオチドは、疾患または疾病がある、または、あると疑われる対象から得たゲノムDNAに対応する。他の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、疾患または疾病があると疑われる対象から得たゲノムDNAに対応する。さらに他の実施形態では、標的ポリヌクレオチドは、疾患または疾病の兆候がない対象から得たゲノムDNAに対応する。最初の実施形態では、本開示の方法は、例えば、疾患または疾病か否かを確かめるために用いることが可能である。後の2つの実施形態では、本開示の方法は、例えば、疾患または疾病の可能性または流行を判断するために用いることが可能である。

【0029】

テストする疾患または疾病は、流行または可能性について遺伝子的に判断または評価することが可能な疾患または疾病とすることができ。このような疾患または疾病には、遺伝的に受け継がれる全ての疾患または疾病、および、遺伝子変化もしくは特異的な対立遺伝子により引き起こされる、または、相関関係にある全ての疾患または疾病が含まれる。遺伝子変化には、例えば、1つまたは2つ以上の核酸変異が含まれる。このような疾患または疾患は、当業者に周知である。例えば、遺伝子疾患または遺伝病に関連する既知の遺伝子は19000超ある（例えば、GENECARDS、Weizmann Institute of Science、アクセス日2014年1月6日、URL: genecards.org/cgi-bin/listdiseasecards.pl?type=fullを参照）。対象における、これらの遺伝子または遺伝子変異のいずれかまたは全ての存在を、例えば、対象由来のゲノムDNAを本開示の方法で用いて評価することが可能である。

【0030】

例示的な遺伝性の疾患または疾病には、がん、嚢胞性線維症、ダウン症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、血友病、神経線維腫症、テイ・サックス病、アルツハイマー病

10

20

30

40

50

、パーキンソン病、ハンチントン病、軟骨無形成症、 α -1アンチトリプシン欠損症、抗リン脂質症候群、自閉症、常染色体優性多発性嚢胞腎疾患、シャルコー・マリー・トゥース病、猫鳴き症候群、クローン病、ダーカム病、デュアン症候群、第V因子ライデン栓友病、家族性高コレステロール血症、家族性地中海熱、脆弱X症候群、ゴーシェ病、ヘモクロマトーシス、遺伝性球状赤血球、全前脳症、クライنفエルター症候群、マルファン症候群、筋緊張性ジストロフィー、ヌーナン症候群、不完全な骨形成、フェニルケトン、ポーランド異常、ポルフィリン症、多発性嚢胞腎疾患、原発性線毛ジスキネジア、早老症、網膜色素変性症、レット症候群、重症複合免疫不全（SCID）、鎌状赤血球症、脊髄性筋萎縮症、サラセミア、トリメチルアミン、ターナー症候群、多彩ポルフィリン症、口蓋心臓顔面症候群、WAGR症候群、および、ウィルソン病が含まれる。

10

【0031】

例示的ながんには、乳がん、膀胱がん、結腸がん、大腸がん、胃がん、消化管間質腫瘍、炎症性筋線維芽細胞腫瘍、腎臓がん、白血病、リンパ腫、肺がん、網膜芽細胞腫、メラノームなどの皮膚がん、前立腺がん、神経線維腫症、卵巣がん、横紋筋肉腫および甲状腺がんが含まれる。

【0032】

遺伝子疾患または遺伝病の有無または傾向を判断するための、対象由来の有用なゲノムDNAソースには、cfDNAが含まれる。セルフリーDNAは当技術分野では周知である。例えば、母体循環系にある周知の胎児核酸の存在に加え、他の核酸を血清から単離し増幅可能であることもまた、周知である。この点に関し、Mulcahyら、LANCET 348: 628 (1996), Cancer and Mutant DNA in Blood Plasmaは特に、がん患者の血漿（Chenら）および血清（Narwozら）中の循環DNAの存在を示すいくつかのレポートを再検討し、自由に循環する遺伝物質の量の増大が、自己免疫疾患患者と同様ながん患者でも記載されていることを指摘した。さらに、セルフリー循環DNAの発見はまた、疾病状態に特有のものではない。EmanuelおよびPestka、GATA 10(6):144-146 (1993), Amplification of Specific Gene Products from Serumは、健康な人の血清中にある、PCRによる遺伝子分析を実行するのに十分な量のフリーDNAの存在について記載している。加えて、Shapiro、Determination of Circulating DNA Levels in Patients with Benign or Malignant Gastrointestinal Disease, Cancer 51(11):2116-20 (1983)は、血清DNA濃度が悪性腫瘍では著しく上昇し、良性の胃腸疾患では中程度に上昇することを報告している。

20

30

【0033】

したがって、本開示は、がん関連遺伝子の存在を判断する方法を提供する。該方法は、（a）複数の標的ポリヌクレオチドを含む核酸サンプルを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で少なくとも1つのプライマーに接触させるステップであって、前記少なくとも1つのプライマーはアダプターを含む、ステップと；（b）ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により前記複数の標的ポリヌクレオチドを増幅し、複数のアンプリコンを生成するステップと；（c）固相担体に固定化した、1つまたは2つ以上の異なるがんに特異的な複数の標的特異的捕捉プライマーを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で前記複数のアンプリコンに直接的に接触させて第1の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記固相担体は複数のユニバーサル捕捉プライマーをさらに含む、ステップと；（d）前記複数の標的特異的捕捉プライマーを伸長して、前記標的ポリヌクレオチドに対し相補的な、複数の固定化伸長生成物を生成するステップと；（e）前記複数の固定化伸長生成物に対し、前記複数のユニバーサル捕捉プライマーをアニールするステップと；（f）PCRにより、前記複数の固定化伸長生成物を増幅して、第2の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記固定化アンプリコンの集団は85%以上の均一性を備える、ステップと；（g）前記第2の複数の固定化伸長生成物を配列決定し、がん関連遺伝子の有無を判断するステップを含む。複数の標的ポリヌクレオチドは10 ng以下の入力核酸とすることが可能であり、入力核酸はcfDNAとすることが可能である。

40

【0034】

50

標的ポリヌクレオチド分子は、本明細書に記載のいずれかの方法の前または後で化学的または酵素的に処置することが可能である。本明細書に記載の方法において、核酸サンプルは断片化するか、または、断片化せずに用いることが可能である。サンプルは、例えば、ランダムプライマー伸長といった全サンプル増幅技法を用いる前に増幅することが可能である。

【0035】

複数の標的ポリヌクレオチドを、少なくとも1つのプライマーに接触させることが可能である。図1パネル1は例示的な構成を図示し、ここで複数の標的ポリヌクレオチドの各要素を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による増幅のために、一对のプライマーに接触させ、ハイブリダイズする。以下でさらに記載するように、非対称PCRを要求される場合、標的ポリヌクレオチドを単一プライマーにハイブリダイズすることが可能である。図1パネル1に示すように、少なくとも1つのプライマーはまた、例えば、下流工程で用いることが可能なアダプターを含む。したがって、本開示は、2つのプライマーを用いて増幅し、指数関数的な増幅をもたらす方法を提供する。片方または両方のプライマーは、アダプターを含むことが可能である。複数の標的ポリヌクレオチドを1つのプライマーを用いて増幅し、非対称増幅をもたらす増幅方法も提供する。該1つのプライマーはアダプターを含み得る。

【0036】

概して増幅反応は、しばしばフォワードプライマーおよびリバースプライマーと呼ばれる2つのプライマーを用いる。増幅プライマーは、典型的には一本鎖ポリヌクレオチド構造である。これはまた、少なくとも一部の実施形態において任意の非天然修飾がプライマーとしての機能を永続的または不可逆的に含まないという条件で、天然または非天然の塩基の混合物を含み、天然および非天然の骨格リンケージもまた含む。増幅プライマーは、伸長または増幅反応時に鋳型ポリヌクレオチド鎖にアニールし、アニールした鋳型鎖に対し相補的な新しいポリヌクレオチド鎖の酵素的合成の開始点として作用する能力を有する。

【0037】

プライマーは、追加的に非ヌクレオチド化学修飾を含み、例えば、必要な場合、プライマーの固相担体への共有結合を促進する。ある化学修飾はそれ自体がプライマーとしての分子の機能を向上するか、または、プライマー（またはそれに由来する伸長ポリヌクレオチド鎖）を固相担体から切断することを可能にする切断部位を提供するなど、他の有用な機能を提供することが可能である。有用な化学修飾は可逆修正も提供し、これは、修飾を除去または逆転させるまで、プライマーのハイブリダイゼーションまたは伸長を防ぐ。

【0038】

5'末端および3'末端が既知の配列領域を保持するように、プライマーをデザインすることが可能である。既知の配列は、本明細書でいうユニバーサル配列とすることができ、そのため、複数のオリゴヌクレオチドに共通の配列を有することが可能である。あるいは、例えば、既知だが複数のオリゴヌクレオチドに固有の配列とすることが可能である。ユニバーサル配列は、プライマーのハイブリダイゼーションに便利な部位として機能し、ユニバーサル配列に対し相補的な単一プライマー対を用いて多数の異なる配列の増幅を可能にすることができる。さらに、ユニバーサル配列はまた、例えば捕捉プライマーに対し相補的なアダプターとして機能することが可能であり、捕捉プライマーを固相担体に付着させた実施形態において、ポリヌクレオチドを含むアダプターを捕捉プライマーに固定化することを可能にする。図1パネル1は、下部プライマーの厚肉部として、アダプターとしてのユニバーサル配列を示す。上部プライマーはまた、標的ポリヌクレオチドとハイブリダイズしない配列を含んでいるように示されている。この領域は、ユニバーサル配列または他の配列とすることが可能であり、ユニバーサル配列以外の配列である場合、既知または未知の配列を有することが可能である。

【0039】

一実施形態において、少なくとも1つのプライマーのハイブリダイゼーション後、複数

10

20

30

40

50

の標的ポリヌクレオチドを、例えばPCRにより増幅することが可能である。PCR増幅は、図1パネル1に示すように、フォワードプライマーおよびリバースプライマーとともに実行し、標的ポリヌクレオチドの指数関数的増幅をもたらすことが可能である。PCR増幅はまた、1つのプライマーとともに実行し、標的ポリヌクレオチドの非対称増幅または線形増幅をもたらすことが可能である。非対称増幅は、複数の標的ポリヌクレオチドの一本鎖アンプリコンを生成するのに有用である。本明細書に記載の増幅反応の生成物をアンプリコンと呼ぶ。したがって、複数の標的ポリヌクレオチドの増幅は、鋳型として同一のヌクレオチド配列を有する複数のアンプリコンを生成するだろう。

【0040】

PCR増幅反応に一般的に関連して本明細書で例示するが、本明細書で提供する教示および指導を考慮すると、当業者は、種々の異なる種類のPCR法といった核酸を増幅する他の方法が、本明細書で開示する増幅ステップで用いるために修正可能であることを知っているだろう。例えば、オリゴヌクレオチドの標的ポリヌクレオチドへのハイブリダイゼーションを用いる増幅反応は、本明細書に開示する増幅ステップにおいて有用である。これは、それが、例えば捕捉プライマーへのハイブリダイゼーションを可能にするアダプターを含むためである。このような、異なるタイプのPCR法といった他の増幅反応には、例えば、米国特許第8003354号明細書に記載されるように、マルチプレックスPCR、デジタルPCR(dPCR)、ダイヤルアウト(dial-out)PCR、アレル特異的(allele-specific)PCR、非対称PCR、ヘリカーゼ依存(helicase-dependent)増幅、ホットスタート(hot start)PCR、ライゲーション媒介(ligation-mediated)PCR、ミニプライマーPCR、マルチプレックスライゲーション依存プローブ増幅(multiplex ligation-dependent probe amplification、MLPA)、ネステッド(nested)PCR、定量PCR(qPCR)、逆転写PCR(RT-PCR)、固相PCR、リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅(strand displacement amplification、SDA)、転写媒介増幅(transcription mediated amplification、TMA)、および、核酸配列ベース増幅(nucleic acid sequence based amplification、NASBA)が含まれる。

【0041】

ポリヌクレオチド照合用マルチプレックス法は、複数の標的ポリヌクレオチドを操作および分析するのに特に有用な方法である。これは、それが、一回の反応で多くの異種標的ポリヌクレオチドの照合を可能にするためである。マルチプレックス法には、例えば、マルチプレックス増幅およびマルチプレックス配列決定が含まれる。他のマルチプレックス核酸照合法が当技術分野では周知である。

【0042】

マルチプレックスPCRに典型的に関連し、マルチプレックス増幅は単一標的ポリヌクレオチド混合物内にある多数のプライマーセットから成り、異なる標的ポリヌクレオチド配列に特異的な、様々なサイズのアンプリコンを生成する。多数の、異なる標的ポリヌクレオチドを同時に標的にすることにより、一回の増幅反応で複数の標的ポリヌクレオチドの配列情報を得ることが可能であり、これは別の方法では、数倍の反応物とより多くの実行時間を必要とするだろう。各標的特異的プライマーセットのアニーリング温度は、一回の反応で正しく機能するように最適化することが可能であり、アンプリコンサイズ(つまり、塩基対長さ)は同じ、または、異なる長さとするのが可能である。PCR用マルチプレキシングキットが商業的に利用可能であり、当技術分野で周知である。異なる標的ポリヌクレオチド種の数、は、所望のアプリケーション次第で変動し得る。例えば、マルチプレックス増幅は、25、50、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、320、340、360、380、400、450、500、600、700、800、900、1000以上の異種標的ポリヌクレオチドについて実行することが可能である。マルチプレックス増幅はまた、上記範囲の任意の整数に対応する複数の標的ポリヌクレオチドについて実行することができる。したがって、本開示はまた、200以上の異なるヌクレオチド配列を有する複数の標的ポリヌクレオチドなど、上記の数または多数の異なる標的

ポリヌクレオチド要素を有する複数の標的ポリヌクレオチドを提供する。

【0043】

したがって、本開示は、複数の標的ポリヌクレオチドの増幅方法を提供し、ここで該方法はマルチプレックス増幅を含む。マルチプレックス増幅は、マルチプレックスPCRとすることが可能である。本開示はまた、180以上の異なる標的ポリヌクレオチド種というマルチプレックス性を有するマルチプレックス増幅方法を提供する。

【0044】

他の適切な核酸増幅方法には、オリゴヌクレオチド伸長法、ライゲーションローリングサークル型増幅 (ligation, rolling circle amplification、RCA) 法 (Lizardiら、Natl. Genet. 19:225-232 (1998))、およびオリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ (oligonucleotide ligation assay、OLA) (概して、米国特許第7582420号明細書；同第5185243号明細書；同第5679524号明細書；同第5573907号明細書；欧州特許第0320308号明細書；同第0336731号明細書；同第0439182号明細書；国際公開第90/01069号；同第89/12696号；および、同第89/09835号を参照) が含まれる。対象の核酸を増幅するように特異的にデザインすることが可能な、プライマー伸長およびライゲーションのプライマーの非限定的例として、増幅は、米国特許第7582420号明細書および同第7611869号明細書に例示されているGoldenGate assay (カリフォルニア州サンディエゴ、Illumina (登録商標) 社) に用いるプライマーを含み得る。

【0045】

本開示の方法で用いることが可能な例示的な等温増幅法には、例えばDeanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:5261-66 (2002)で例示される多置換増幅 (Multiple Displacement Amplification、MDA)、または、例えば米国特許第6214587号明細書で例示される等温鎖置換核酸増幅 (isothermal strand displacement nucleic acid amplification) が含まれ、これらはそれぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれるが、これらに限定されるわけではない。本開示で用いることが可能な別の非PCRベース法には、例えば、Walkerら、Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press, Inc., 1995；米国特許第5455166号明細書；同第5130238号明細書；およびWalkerら、Nucl. Acids Res. 20:1691-96 (1992)に記載されている鎖置換増幅 (strand displacement amplification、SDA)、または、例えば、Lageら、Genome Research 13:294-307 (2003)に記載されている超分岐鎖置換増幅 (hyperbranched strand displacement amplification) が含まれる。等温増幅法は、鎖置換Phi29ポリメラーゼ、または、Bst DNAポリメラーゼラージフラグメントつまりゲノムDNAのランダムプライマー増幅用5'->3' exo⁻とともに用いることが可能である。これらのポリメラーゼの使用は、その高い処理能力および鎖置換作用を利用する。高い処理能力は、ポリメラーゼが長さ10~20kbの断片を生成することを可能にする。上記したように、より小さい断片は、クレノウポリメラーゼといった処理能力および鎖置換作用が低いポリメラーゼを用いて、等温条件下で生成することが可能である。増幅反応、条件およびコンポーネントについての追加の記載は、米国特許第7670810号明細書の開示に詳細に述べられており、その全体は参照により本明細書に組み込まれる。

【0046】

本開示で有用な別の核酸増幅法はTagged PCRであり、これは、例えば、Grothuesら、Nucleic Acids Res. 21(5):1321-2 (1993)に記載されるように、定常5'領域の後にランダム3'領域が続く2ードメインプライマーの集団を用いる。増幅の第1ラウンドを実行し、個別ハイブリダイゼーションに基づく熱変性DNAにおいてランダムに合成した3'領域から多数の開始を可能にする。3'領域の性質により、開始部位はゲノム全体を通してランダムであるようにする。そのため、非結合プライマーを除去し、さらに、定常5'領域に対し相補的なプライマーを用いて複製を起こすことが可能である。

【0047】

上記の例示的な増幅方法を用いて、複数の標的ポリヌクレオチドなど、1つまたは2つ

以上の標的ポリヌクレオチドを増幅することが可能である。標的ポリヌクレオチドを溶液中で増幅するか、または、固相担体に固定化し、溶液中で遊離した複数のアンプリコンまたは固相担体に固定化した複数のアンプリコンを生成することが可能である。

【0048】

増幅反応における複数の標的ポリヌクレオチドの入力量は、マイクログラム (μg) ～ ナノグラム (ng) 以下に及び得る。一部の実施形態において、複数の標的ポリヌクレオチドの開始量は、例えば、 $100\mu\text{g}$ 以上の入力核酸とすることが可能である。開始量はまた、例えば、 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 または $90\mu\text{g}$ の入力核酸とすることが可能である。他の実施形態では、入力核酸の開始量は、低ナノグラム範囲を含むナノグラム範囲とすることが可能である。このような実施形態では、複数の標的ポリヌクレオチドの開始量は、例えば、 100ng 以下の入力核酸とすることが可能である。開始量はまた、例えば、 90 、 80 、 70 、 60 、 50 、 40 、 30 、 20 または 10ng 未満の入力核酸とすることが可能である。他の実施形態では、複数の標的ポリヌクレオチドの開始量は、例えば、 9 、 8 、 7 、 6 、 5 、 4 、 3 、 2 または 0.5ng 未満の入力核酸とすることが可能である。開始量はまた、上記の例示量の間の任意の量とすることが可能である。したがって、本開示は、複数の標的ポリヌクレオチドが増幅反应用到に 10ng 未満の入力核酸を含む方法を提供する。さらに、複数の標的ポリヌクレオチドは、増幅反应用到の 1ng の入力核酸または 1ng 未満の入力核酸とすることが可能である。

【0049】

一部の実施形態において、複数の固定化標的特異的捕捉プライマーを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で複数のアンプリコンと接触させる。標的特異的捕捉プライマーの標的特異的領域は、 1 つまたは 2 つ以上の標的ポリヌクレオチドにアニールするようにデザインすることが可能である。ハイブリダイズした標的ポリヌクレオチド捕捉プライマーは、標的特異的捕捉プライマーを介して固定化されるだろう。

【0050】

図1 パネル2は、固相担体に固定化された複数の標的特異的捕捉プライマーを例示する。この図において、標的特異的捕捉プライマーは固相担体に固定化された他の捕捉プライマーより長い。当業者は、標的特異的捕捉プライマーが他の捕捉プライマーより長い、短い、または同じ長さであるか否かは重要ではないことを理解しよう。むしろ、任意の捕捉プライマーは、その機能を果たすのに必要な配列を有するだろう。標的特異的捕捉プライマーはその標的ポリヌクレオチドに、選択的または特異的にアニールするように機能する。あるユニバーサル捕捉プライマーのような他の捕捉プライマーは、アダプター、プライマー結合部位、または他の既知の配列といった既知の配列にアニールするように機能する。

【0051】

複数の標的特異的捕捉プライマー内の各要素は、同一の標的特異的配列か、または異なる標的特異的配列を有することが可能である。前者の実施形態では、複数の標的特異的捕捉プライマーは、複数の同一種の標的ポリヌクレオチドにアニールし、該複数の同一種の標的ポリヌクレオチドを捕捉するだろう。後者の実施形態では、複数の標的特異的捕捉プライマーは、複数の異種標的ポリヌクレオチドにアニールし、該複数の異種標的ポリヌクレオチドを捕捉するだろう。該して、捕捉プライマーの標的特異的領域は、複数の標的ポリヌクレオチドの特定の要素に関し、同一領域に対して相補的であるようにデザインする。しかしながら、標的特異的領域はまた、特定の標的ポリヌクレオチド内で異なるヌクレオチド配列に対し相補的であるようにデザインすることが可能である。したがって、本明細書で提供する教示および指導を考慮すると、当業者は、どのような要素組成物を複数の標的特異的捕捉プライマーに含むことが特定のアプリケーションに必要なかを理解しよう。

【0052】

複数の標的特異的捕捉プライマーは大きく、または、小さくすることが可能である。当業者は、複数の標的特異的捕捉プライマーは、捕捉することを望む各標的ポリヌクレオチ

ドに対し、少なくとも1つの標的特異的捕捉プライマーを含むことを理解しよう。複数はまた、複数の標的ポリヌクレオチド内の一部またはすべての標的ポリヌクレオチド種について、多数の標的特異的捕捉プライマーなど、同一の標的ポリヌクレオチド種に対する多数の標的特異的捕捉プライマーを含み得る。したがって、本開示は、複数の標的特異的捕捉プライマーを提供し、これは2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100または200以上の異なる要素の集団を含む。複数の標的特異的捕捉プライマーはまた、例えば、300、400、500、1000、5000、10000、50000、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 以上の異なる要素を含み得る。複数の標的特異的捕捉プライマーはまた、上記の例示的集団数の間の全ての整数を含み得る。したがって、本開示は、200以上の異なるヌクレオチド配列を有する複数の標的特異的捕捉プライマーを提供する。

【0053】

複数の標的特異的捕捉プライマーは、図1パネル2に示すように固相担体に固定化することが可能である。複数の標的特異的捕捉プライマーはまた、溶液中に遊離させて用い、その後、例えば、標的特異的捕捉プライマーの第2領域に対し相補的なユニバーサル配列を有する捕捉プライマーへのハイブリダイゼーションにより、固相担体に固定化することが可能である。

【0054】

図1パネル2に例示するように、複数の標的特異的捕捉プライマーをまず固相担体に固定化する特異的な実施形態では、標的特異的捕捉プライマーを、図示するように固相担体に直接的に付着させることが可能である。あるいは、標的特異的捕捉プライマーをユニバーサル捕捉プライマーから固相担体に生成することができる。この点に関し、捕捉プライマーのより厚い部分は、固相担体に予め播種したユニバーサル配列を表す。ユニバーサルプライマーに対し相補的な領域を有する標的特異的捕捉プライマーまたは複数の標的特異的捕捉プライマーは、例えば、図1パネル2に示すように、ユニバーサル捕捉プライマーにアニールし、その後伸長させて、標準の長さの標的特異的捕捉プライマーまたは複数の標的特異的捕捉プライマーを生成することが可能である。

【0055】

固定化標的特異的捕捉プライマーを用いる実施形態は、複数のアンプリコンの正規化を可能にすることから有用である。例えば、固相担体を、標準コピー数の各種標的特異的捕捉プライマーを含むように生成し、標準コピー数の標的ポリヌクレオチドまたはそのアンプリコンの捕捉を可能にすることができる。標的特異的捕捉プライマーの標準コピー数は変更可能であり、標準コピー数の、豊富または稀有な標的ポリヌクレオチド種の両方を等しい頻度で捕捉するようにデザインすることが可能である。他の実施形態では、異種標的特異的捕捉プライマーを標準化せず、ランダムを含む任意の所望比率で固定化することが可能である。本明細書で提供する教示および指導を考慮すると、当業者は、等量のコピー数などの標準化コピー数または他の比率の、どちらの異種標的特異的捕捉プライマーが特定の使用に望ましいか、分かるだろう。

【0056】

複数の標的特異的捕捉プライマーを有することに加え、固相担体はまた、図1パネル2に示すように、複数の他タイプの捕捉プライマーを含むことが可能である。複数の捕捉プライマーは、同じまたは異なる配列を有することが可能である。図1パネル2は、2つの複数のユニバーサル捕捉プライマーを示す（垂直オリゴヌクレオチドの塗りつぶした厚肉部および点描した厚肉部）。この例示的な実施形態において、一方の複数のユニバーサル捕捉プライマーは、複数の標的ポリヌクレオチドに加えたアダプターに対し相補的である。ユニバーサル捕捉プライマーは、例えば、アダプターを含む複数の標的ポリヌクレオチドまたはそのアンプリコンを捕捉するのに有用である。ユニバーサル捕捉プライマーはまた、例えば、図1パネル3および下記でさらに示すブリッジ増幅を行うのに有用である。

固相担体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10以上の異なる複数のユニバーサル捕捉プライマーを含むことが可能である。

【0057】

したがって、本開示は、複数のユニバーサル捕捉プライマーに対し相補的なアダプターを有する、複数の標的ポリヌクレオチドおよび／またはそのアンプリコンを提供する。固相担体は、第1、第2またはより大きい数の、異なる複数のユニバーサル捕捉プライマーを含むことが可能である。ユニバーサル捕捉プライマー領域をさらに有する複数の特異的捕捉プライマーも提供する。ユニバーサル捕捉プライマー領域は、第1または第2の複数のユニバーサル捕捉プライマーに対応するヌクレオチド配列を有することが可能である。

【0058】

したがって、一部の実施形態において、本開示の方法は、複数の固定化標的特異的捕捉プライマーを有する固相担体を提供するステップを含む。一部の実施形態において、固相担体を提供するステップは、標的特異的捕捉プライマーを固相担体に固定化するステップを含む。一部の実施形態において、複数の標的特異的捕捉プライマーは固相担体に直接的に固定化する。

【0059】

一部の実施形態では、標的特異的捕捉プライマーを1つまたは2つ以上のステップで固相担体に集める。一部の実施形態では、標的特異的捕捉プライマーの固定化は、ユニバーサル捕捉プライマーを固相担体に固定化するステップを含む。ある実施形態では、標的特異的捕捉プライマーの固定化はさらに、固定化ユニバーサル捕捉プライマーを標的特異的捕捉プライマーに変換するステップを含む。ある実施形態では、標的特異的捕捉プライマーの固定化はさらに、スプリントオリゴヌクレオチドをユニバーサル捕捉プライマーとアニールするステップを含み、ここで該スプリントオリゴヌクレオチドは、標的特異的捕捉プライマーのユニバーサル領域に対し相補的なユニバーサル領域と、標的ヌクレオチドの標的特異的領域に対し相補的な標的特異的領域を含む。ある実施形態では、標的特異的捕捉プライマーの固定化はさらに、ユニバーサル捕捉プライマーを伸長し、標的特異的捕捉プライマーを生成するステップを含む。

【0060】

一部の実施形態では、標的特異的捕捉プライマーを、他の標的特異的捕捉プライマーと組み合わせて固定化する。一部の実施形態では、標的特異的捕捉プライマーは複数の標的特異的捕捉プライマーを含む。一部の実施形態では、複数の標的特異的捕捉プライマーは2タイプの標的特異的捕捉プライマーのみを含む。例えば、標的特異的捕捉プライマーは、P5またはP7などの2つのユニバーサル捕捉領域のうち何れか1つと、1つの標的特異的領域を含む。P5領域は、ヌクレオチド配列5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'を含む。P7領域は、ヌクレオチド配列5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3'を含む。ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、P5領域配列の逆相補体（「反P5」：5'-TCGGTGGTCGCCGTA TCATT-3'）またはP7領域配列の逆相補体（「反P7」：5'-TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'）の捕捉プライマーである。ある実施形態において、オリゴヌクレオチドはIllumina（登録商標）捕捉プライマーのP5（対の末端）（5'-AATGATACGGCGACCACCGAGAUCTACAC-3'）またはP7（対の末端）（5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA(8-oxo-G)AT-3'）とハイブリダイズすることが可能である。ある実施形態において、オリゴヌクレオチドは、Illumina（登録商標）捕捉プライマーのP5（対の末端）の逆相補体（「反P5（対の末端）」：5'-GTG TAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCATT-3'）またはP7（対の末端）の逆相補体（「反P7（対の末端）」：5'-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'）とハイブリダイズすることが可能である。

【0061】

他の実施形態において、複数の標的特異的捕捉プライマーは、異なる要素の集団を含む。ある実施形態において、標的特異的捕捉プライマーの集団は、10、100、1000、10000、100000、1000000、10000000、100000000超の異なる要素を含み得る。ある実施形態において、標的特異的捕捉プライマーは、標的特異的捕捉領域に含まれる配列が異なる。ある実施形態において、標的特異的捕捉プライマーは、異なる標的ポ

10

20

30

40

50

リヌクレオチドを標的にする。

【0062】

本開示の一部の実施形態において、固定化標的特異的捕捉プライマーには複数の固定化標的特異的捕捉プライマーが含まれ、標的ポリヌクレオチドには複数の標的ポリヌクレオチドが含まれる。

【0063】

一部の実施形態では、基本的に、全ての固定化捕捉プライマーが標的特異的捕捉プライマーである。他の実施形態では、標的特異的捕捉プライマーをユニバーサル捕捉プライマーと組み合わせて固定化する。ある実施形態では、超過標的特異的捕捉プライマーを固定化する。ある実施形態では、ユニバーサル捕捉プライマーに対する標的特異的捕捉プライマーの超過は、2 : 1、3 : 1、5 : 1、10 : 1、50 : 1、100 : 1、500 : 1、1000 : 1、10000 : 1、50 : 000 : 1または100000 : 1より大きい。ある実施形態では、超過ユニバーサル捕捉プライマーを固定化する。ある実施形態では、標的特異的捕捉プライマーに対するユニバーサル捕捉プライマーの超過は、2 : 1、3 : 1、5 : 1、10 : 1、50 : 1、100 : 1、500 : 1、1000 : 1、10000 : 1、50 : 000 : 1または100000 : 1より大きい。

【0064】

遺伝子疾患または遺伝病の有無またはかかりやすさを判断するためのある実施形態では、複数の標的特異的捕捉プライマーを、そのような遺伝子疾患または遺伝病に関連する1つまたは2つ以上の遺伝子に向けることが可能である。このような遺伝子疾患または遺伝病には、以前例示したものまたは当技術分野で周知のもののいずれかを含む。例えば、複数の標的特異的捕捉プライマーを2つ以上の疾患に向け、多数の異なる疾患または疾病の有無またはかかりやすさを検出することが可能である。したがって、標的特異的捕捉プライマーのパネルを利用して、多数の異なる疾病を検出することが可能である。パネルは、異なるまたは同じ遺伝子疾患または遺伝子病に関連する、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100または200以上の遺伝子に対し特異的な、複数の標的特異的捕捉プライマー内の要素が含み得る。

【0065】

がんに関連した遺伝子パネルに関する例として、複数の標的特異的捕捉プライマーは、以下のがん関連遺伝子の全ての組み合わせおよび／または順列など、任意の組み合わせを含み得る：AKT1、CTNNB1、FLT3、KRAS、PTPN11、SRC、ALK、EGFR、GNAS、MLH1、RB1、STK11、ATM、ERBB2、HNF1A、MPL、RAD50、TP53、BRAF、ERBB4、IDH1、NRAS、RET、VHL、BRCA1、FBXW7、JAK3、PIK3CA、SMAD4、CDH1、FGFR2、KIT、PTEN、SMARCB1、ABL1、CSF1R、GNA11、JAK2、NOTCH1、SMO、APC、FGFR1、GNAQ、KDR、NPM1、CDKN2、FGFR3、HRAS、MET、および／またはPDGFRA。

【0066】

したがって、本開示は、がん関連遺伝子の存在を判断する方法を提供し、ここで複数の標的特異的捕捉プライマーは、以下の遺伝子から選択した2つ以上の異なるヌクレオチド配列を含む：AKT1、CTNNB1、FLT3、KRAS、PTPN11、SRC、ALK、EGFR、GNAS、MLH1、RB1、STK11、ATM、ERBB2、HNF1A、MPL、RAD50、TP53、BRAF、ERBB4、IDH1、NRAS、RET、VHL、BRCA1、FBXW7、JAK3、PIK3CA、SMAD4、CDH1、FGFR2、KIT、PTEN、SMARCB1、ABL1、CSF1R、GNA11、JAK2、NOTCH1、SMO、APC、FGFR1、GNAQ、KDR、NPM1、CDKN2、FGFR3、HRAS、MET、およびPDGFRA。複数の標的特異的捕捉プライマーは以下の各遺伝子のヌクレオチド配列とすることが可能である：AKT1、CTNNB1、FLT3、KRAS、PTPN11、SRC、ALK、EGFR、GNAS、MLH1、RB1、STK11、ATM、ERBB2、HNF1A、MPL、RAD50、TP53、BRAF、ERBB4、IDH1、NRAS、RET、VHL、BRCA1、FBXW7、JAK3、PIK3CA、SMAD4、CDH1、FGFR2、KIT、PTEN、SMARCB1、ABL1、CSF1R、GNA11、JAK2、NOTCH1、SMO、APC、FGFR1、GNAQ、KDR、NPM1、CDKN2、FGFR3、HRAS、MET、およびPDGFRA。

【0067】

一部の実施形態では、複数のアンプリコンを、例えば、固相担体に固定化した複数の標

的特異的捕捉プライマーを直接的に接触させるなどの増幅工程後に、複数の標的特異的捕捉プライマーに直接的に適用または接触させる。したがって、複数のアンプリコンを、著しい精製ステップを挟まず複数の捕捉プライマーに適用することが可能であり、部分的または実質的に未精製の複数のアンプリコンとすることが可能である。そのためこの実施形態では、複数のアンプリコンは、高比率の細胞成分、プライマー、増幅酵素、および未増幅または誤って増幅されたポリヌクレオチドといった混合細胞成分を含む。

【0068】

他の実施形態では、複数の標的捕捉プライマーを接触させる前に、複数のアンプリコンを部分的または完全に精製することが可能である。このような核酸精製工程は当業者にとって周知であり、例えば、高分子および塩などの細胞成分を除去する沈殿、ろ過、およびクロマトグラフィーを含む。

【0069】

例えば、固相担体に固定化した複数の標的特異的捕捉プライマーを含む複数の標的特異的捕捉プライマーをハイブリダイズするのに十分な条件には、数分から1時間以上にわたる培養またはアニーリングが含まれ得る。より短いハイブリダイゼーション時間は、任意の後続のステップまたは統合工程でのステップに効率的に移るのに有用である。一部の実施形態において、ハイブリダイゼーションは、例えば60分以下とすることが可能である。ハイブリダイゼーション時間はまた、例えば、50、45、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、または10分以下とすることが可能である。ハイブリダイゼーションはまた、例えば、9、8、7、6、5分など10分より短くすることが可能である。ハイブリダイゼーション時間は、さらに、上記の例示時間の間で任意の時間とすることが可能である。したがって、本開示は、ハイブリダイゼーションに十分な条件に、標的特異的捕捉プライマーを培養する、または、アンプリコンもしくは他のポリヌクレオチドへアニールする時間が10分以下であることを含む、方法を提供する。

【0070】

一部の実施形態において、複数のアンプリコンは、複数の標的特異的捕捉プライマーに接触させる前は二本鎖とすることが可能である。標的特異的捕捉プライマーによりアニールし捕捉することを可能にするため、複数のアンプリコンを、例えば、高温、または、二本鎖ポリヌクレオチドの2つの鎖を分離する T_m を降下させる化学反応物により、変性することが可能である。部分的な鎖分離を含む鎖分離は、例えば、複数の標的特異的捕捉プライマーを接触させる前または同時に、行うことが可能である。他の実施形態では、複数のアンプリコンは一本鎖とすることが可能である。このような一本鎖の実施形態では、鎖分離のステップは必要ではないが、該ステップは一本鎖内の第2構造を除去するために有益に用いることが可能である。

【0071】

固相担体に固定化した標的特異的捕捉プライマーにアニールし固定化した複数のアンプリコンを生成することによるアンプリコン捕捉に続き、例えば、固定化した複数のアンプリコンを部分的に二本鎖に、部分的に一本鎖にすることが可能である。図1パネル3に示すように、最も左の固定化アンプリコンを標的特異的捕捉プローブにハイブリダイズし、非相補的領域は一本鎖のままとする。複数の固定化アンプリコンを含む固定化アンプリコンは、標的特異的捕捉プライマーから酵素伸長することにより二本鎖とすることが可能である。このような二本鎖の伸長生成物を、図3パネル3の中間の固定化アンプリコンで示す。伸長反応は当技術分野で周知であり、下記および実施例においてさらに例示する。

【0072】

本開示の特定の実施形態に従う次のステップで、固定化した複数のアンプリコンをさらなる工程に進めることが可能である。このようなさらなる工程には、例えば、増幅または配列決定が含まれる。ある実施形態において、第1の複数の固定化アンプリコンを、前述の方法または当技術分野で周知の他の方法のいずれかを用いて増幅し、第2の複数の固定化アンプリコンを生成する。固相担体に固定化する場合、1つの特に有用な増幅工程には

、ブリッジ増幅が含まれる。図1パネル3に示すように、例えば、伸長反応から生成した二本鎖または部分的に二本鎖のアンプリコンを変性し、固定化鎖を、例示のようにアダプターへのハイブリダイゼーションを介してユニバーサル捕捉プライマーにアニールする。結果として生じる構造を両末端に固定化してブリッジを作成し、そして、ユニバーサル捕捉プライマーを伸長し、その後例えば標的特異的捕捉プライマーに含まれるユニバーサルプライマー領域を用いて増幅することが可能である。この第2のユニバーサル捕捉プライマーは、アダプター配列に対し相補的な第1のユニバーサルプライマーと異なっておりよい。固定化していない鎖は、例えば、洗い流される場合がある。したがって、本開示の方法は、ブリッジ増幅を含む増幅方法を提供する。

【0073】

10

本明細書に記載のブリッジ増幅方法は、複数内のアンプリコンに対し均一なクラスタまたはコロニー数をもたらす。クラスタの均一性は図2および3に示し、下記の実施例でさらに記載する。したがって、本開示は固定化ポリヌクレオチドの増幅方法を提供し、ここで均一性には0.1平均で80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、または95以上が含まれる。

【0074】

ブリッジ増幅において、例えば、適切な条件を、固定化した複数の一本鎖伸長生成物などの固定化一本鎖伸長生成物に適用し、その結果、一本鎖伸長生成物を固定化ユニバーサル捕捉プライマーにアニールしてブリッジ構造の形をした複合体を形成する。バッファを無効化および／またはハイブリダイズするといった適切な条件は当技術分野では周知である (SambrookおよびRussell、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1998)を参照)。無効化および／またはハイブリダイズしたバッファはその後除去することが可能である。

20

【0075】

次に、伸長に対し適切な条件を適用することにより伸長反応を行う。複合体の増幅オリゴヌクレオチドをヌクレオチドの配列追加により伸長し、一本鎖ポリヌクレオチド分子に対し相補的な伸長生成物を生成する。結果として生じる二本鎖を両末端で固定化し、その結果、各鎖を固定する。

【0076】

30

ポリメラーゼ活性を有する酵素を含む伸長バッファ／溶液などの適切な条件が当技術分野では周知である (Sambrookら、上記参考文献; Ausubelら、上記参考文献を参照)。このブリッジ増幅技法は、例えば、米国特許第7115400号明細書および米国特許出願公開第2005/0100900号明細書に記載されているように実行することが可能であり、これらの内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0077】

本開示で用いることが可能なポリメラーゼ活性を有する酵素の例には、DNAポリメラーゼ (クレノウ断片、T4DNAポリメラーゼ)、種々の熱安定性バクテリアに由来する耐熱DNAポリメラーゼ (Taqポリメラーゼ、VENTポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼ、またはTfIDNAポリメラーゼなど)、およびその遺伝子改変誘導体 (TaqGold、VENTexo、またはPfuexo) がある。RNAポリメラーゼおよび逆転写酵素の組み合わせも、伸長生成物を生成するのに用いることが可能である。特に酵素は、これらおよび関連する実施形態において鎖置換能を有することが可能であり、特に酵素は約7～約9のpH、特に7.9～8.8のpHで活性し、特に、ある例示的な実施形態では酵素はBstまたはクレノウである。

40

【0078】

使用するヌクレオシドトリホスフェート分子は、典型的に、例えばdATP、dTTP、dCTP、dGTPといったデオキシリボヌクレオシドトリホスフェートであるか、または、例えばATP、UTP、CTP、GTPといったリボヌクレオシドトリホスフェートである。ヌクレオシドトリホスフェート分子は、天然または非天然に発生することが可

50

能である。

【0079】

ハイブリダイゼーションおよび伸長のステップ後、担体および付着核酸を変性条件に従わせることが可能である。伸長バッファを変性バッファの流入により概ね除去するように、フローセルを用いることが可能である。適切な変性バッファが当技術分野で周知である (Sambrookら、上記参考文献; Ausubelら、上記参考文献を参照)。例として、pH変化およびイオン強度の低い溶液により、実質的に等しい温度で核酸を変性することが可能である。ホルムアミドおよび尿素は核酸の塩基とともに新しい水素結合を形成し、ワトソン・クリック型塩基対につながる水素結合を阻害する。特定の実施形態において、ホルムアミド濃度は50%以上である。これらは一本鎖核酸分子をもたらす。必要であれば、鎖は、非常に低塩（例えば0.01Mカチオン状態）かつ高pH (>12) の溶液で処置するか、カオトロピック塩（例えば塩化グアニジニウム）を用いることにより分離することが可能である。特定の実施形態では強塩基を用いる。強塩基は、酸塩基反応において非常に弱い酸を脱プロトン化することができる塩基性化合物である。塩基の強度はそのpKb値により示され、pKb値が約1未満の化合物は強塩基と呼ばれ、当業者に周知である。特定の実施形態において、強塩基は0.05M~0.25M、特に0.1Mの濃度で用いる水酸化ナトリウム (NaOH) である。

10

【0080】

上で例示したハイブリダイゼーション、伸長、および変性のステップ後、（初めに固定化した）第1の鋳型一本鎖ポリヌクレオチド分子と同じ配列を含む第1核酸と、それに対し相補的であり、固定化捕捉オリゴヌクレオチドの一つから伸長する第2核酸の、2つの固定化核酸が存在するだろう。両方の固定化鎖をその後、担体をさらにハイブリダイゼーション、伸長、および変性のサイクルにかけることにより、増幅ラウンドを始めることができる。したがって増幅は、アニーリング、伸長、および変性のサイクルを通して、一本鎖から二本鎖へ、1つの二本鎖から2つの二本鎖へ、2つの二本鎖から4つの二本鎖へなどと進む。

20

【0081】

増幅方法の各ステップの間で、任意の洗浄ステップを実行することが有益であり得る。例えば、dNTPの有無を問わないポリメラーゼ酵素なしの伸長バッファを、固相担体を除去して全伸長バッファと交換する前に該固相担体に適用することが可能である。

30

【0082】

このようなさらなる増幅ラウンドを用いて、一本鎖ポリヌクレオチド配列およびその相補的配列の多数の固定化コピーを有する核酸コロニーまたはクラスタを生成することが可能である。

【0083】

アンプリコンの最初の固定化は、伸長生成物を、鋳型ポリヌクレオチド分子の全長のある距離に位置するユニバーサル捕捉プライマーと、ハイブリダイズすることが可能であることを意味する。固定化伸長生成物およびその相補物のより多くのコピーを、さらなる増幅ラウンドを実行することにより、つまり、ハイブリダイゼーション、伸長、および変性のさらなるラウンドを実行することにより合成したら、生成された核酸コロニーまたはクラスタの境界をさらに伸長させることができるだろう。

40

【0084】

したがって、本開示の方法は、第1の複数の多重固定化一本鎖アンプリコンから第2の複数の固定化アンプリコンまたはポリヌクレオチドのコロニーを生成することを可能にし、そして、これらのコロニーの密度を、固相担体に固定化したユニバーサル捕捉プライマーの比率を変えることにより制御することを可能にする。

【0085】

特定の一態様では、本開示の方法を用いて、固相増幅により、米国特許第7115400号明細書、米国特許出願公開第2005/0100900号明細書、国際公開第00/18957号、および同98/44151号に記載されているものと類似した核酸コロニ

50

一のクラスタ化アレイが調製される。

【0086】

本開示の方法により形成したクラスタ化アレイは、マイクロアレイなど規則正しいアレイで通常実行されるアプリケーションでの使用に適している。非限定的例として、このようなアプリケーションには、ハイブリダイゼーション分析、遺伝子発現分析、タンパク質結合分析、配列決定、遺伝子型決定、および核酸メチル化分析等が含まれる。クラスタ化アレイは、例えば、蛍光RNAとのハイブリダイゼーションまたは蛍光標識タンパク質を用いた結合研究など下流アプリケーションに用いる前に、配列決定することが可能である。

【0087】

図1パネル4に示すように、本開示はまた、固相増幅により生成した増幅核酸の配列を決定する方法を含む。したがって、本開示は、上記のように固相増幅を用いた複数の固定化伸長生成物を増幅するステップと、核酸配列決定反応を実行して、固相増幅反応で生成された少なくとも1つの増幅核酸鎖の全てまたは一部の配列を決定するステップを含む、核酸配列決定方法を提供する。

【0088】

ある実施形態において、本明細書に記載の、複数の異なる標的ポリヌクレオチドの配列を獲得する方法は、連続的または統合したやり方で行うことが可能であり、これは開始～終了時間を短くする。例えば、本明細書に記載の方法を使うと、複数の標的ポリヌクレオチドの配列は3時間以下50回の配列決定サイクルで決定することが可能である。開始～終了時間はまた、例えば、50回の配列決定サイクルで2.9、2.8、2.7、2.6または2.5時間以下とすることが可能である。統合方法は、例えば、10ng以下の入力核酸で開始するステップと；複数の標的ポリヌクレオチドを増幅して複数のアンプリコンを生成するステップと；前記複数のアンプリコンを捕捉して第1の複数の固定化アンプリコンを生成するステップと；前記第1の複数の固定化アンプリコンを増幅して第2の複数の固定化アンプリコンを生成し、少なくとも50回の配列決定サイクルで前記アンプリコンの配列を決定するステップを含む。当業者は、複数の標的ポリヌクレオチドについて配列の獲得にかかる開始～終了時間は同じように効率的であるものの、より多くの配列決定サイクルを行う場合はより長くなるだろうということを理解しよう。例えば、50回の配列決定サイクルは約2時間かかり、開始～終了までの全時間は約2時間50分になり得る一方、150回の配列決定サイクルは4.5時間かかり、開始～終了の全時間は約5～6時間の間になり得る。

【0089】

配列決定は、任意の適切な配列決定技法を用いて行うことが可能である。特に有用な方法は、ヌクレオチドを連続的に遊離3'ヒドロキシル基に付加し、5'から3'の方向でポリヌクレオチド鎖を合成するものである。付加するヌクレオチドの性質は、各ヌクレオチド付加後または配列決定プロセス終了時に判断することが可能である。ライゲーションによる配列決定を用い、隣接塩基の全てを配列決定するわけではない配列決定技法、および、塩基を表面の鎖に付加するのではなく除去する、超並列的遺伝子ビーズクロン解析法 (massively parallel signature sequencing; MPSS) などの技法もまた、本開示の範囲内である。

【0090】

例えば、1つの有用な配列決定方法は、合成時解読 (sequencing-by-synthesis; SBS) 法である。SBSでは、核酸鋳型 (例えば、標的核酸またはそのアンプリコン) に沿った核酸プライマーの伸長をモニタリングして、鋳型のヌクレオチド配列を決定する。基礎となる化学プロセスは、(例えば、ポリメラーゼ酵素により触媒される) 重合とすることが可能である。特定のポリメラーゼに基づいたSBSの実施形態では、蛍光標識ヌクレオチドを鋳型依存方法でプライマーに付加し (それによりプライマーを伸長し)、その結果、プライマーに付加したヌクレオチドの順番と型の検出を用いて鋳型の配列を決定することが可能である。

10

20

30

40

50

【0091】

以下でさらに記載するように、フローセルは、本開示の方法により生成した増幅DNA断片を収容するのに便利な固相担体を提供する。このようなフォーマットにおける1つまたは2つ以上のアンプリコンは、SBSまたは他の、サイクルにおいて反応物の送達を繰り返す検出技法にかけることが可能である。例えば、第1のSBSサイクルを開始するため、1つまたは2つ以上のヌクレオチド、DNAポリメラーゼなどを、1つまたは2つ以上の増幅核酸分子を収容するフローセルに／フローセルを介して流すことが可能である。プライマー伸長が標識ヌクレオチドの取り込みを引き起こす部位を検出することが可能である。任意で、ヌクレオチドは可逆性終結特性をさらに含むことができ、これはヌクレオチドをプライマーに付加したら、さらなるプライマー伸長を終結する。例えば、可逆性ターミネーター部を有するヌクレオチド類似物をプライマーに付加し、その結果、脱ブロック剤を送達して該部を取り除くまで、後続の伸長を生じ得なくすることが可能である。したがって、可逆性終結法を用いる実施形態では、脱ブロック化試薬を（検出が起きる前後で）フローセルに送達することが可能である。洗浄は、種々の送達ステップの間で行うことが可能である。その後、サイクルをn回繰り返し、nヌクレオチド分、プライマーを伸長し、それにより長さnの配列を検出することが可能である。本開示の方法により生成されるアンプリコンと共に使用する上で容易に適合させることが可能な例示的な工程、流体システム、および検出プラットフォームは、例えば、Bentleyら、Nature 456:53-59 (2008)；国際公開第04/018497号、米国特許第7057026号明細書、国際公開第91/06678号、同第07/123744号、米国特許第7329492号明細書、同第7211414号明細書、同第7315019号明細書、同第7405281号明細書、および、米国特許出願公開第2008/0108082号に記載されており、これらはそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。

【0092】

パイロシーケンシングなど、サイクル反応を用いる他の配列決定工程を用いることが可能である。パイロシーケンシングは、特定のヌクレオチドが新生核酸鎖に取り込まれると、無機ピロリン酸（PPi）の放出を検出する（それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、Ronaghiら、Analytical Biochemistry 242(1), 84-9 (1996)；Ronaghi、Genome Res. 11(1), 3-11 (2001)；Ronaghiら、Science 281(5375), 363 (1998)；米国特許第6210891号明細書；同第6258568号明細書；および同第6274320号明細書を参照）。パイロシーケンシングにおいて、放出されたPPiは、ATPスルフリラーゼによりアデノシン三リン酸（ATP）に即座に変換することにより検出することが可能であり、発生したATP量はルシフェラーゼ発光光子を介して検出することが可能である。したがって、配列決定反応は、発光検出系によりモニタリングすることが可能である。蛍光ベース検出系で用いる励起放射線源は、パイロシーケンシング工程に必要なではない。本開示に従って生成したアンプリコンへのパイロシーケンス法の適用に適合させることができる、本開示に従って生成したアンプリコンに対するパイロシーケンシングの適用において、適合させることが可能な有用な流体形、検出器および工程は、例えば、WIPO特許出願第PCT/US11/57111、米国特許出願公開第2005/0191698号明細書、米国特許第7595883号、および同第7244559号明細書明細書に記載されており、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

【0093】

一部の実施形態は、DNAポリメラーゼ活性のリアルタイムモニタリングを要する方法を利用することが可能である。例えば、ヌクレオチドの取り込みは、フルオロフォア担持ポリメラーゼと γ -ホスフェート標識ヌクレオチドの間の蛍光共鳴エネルギー移動（fluorescence resonance energy transfer；FRET）相互作用により、または、zeromode waveguides（ZMW）法により検出することが可能である。FRETをベースとする配列決定用の技法および試薬は、例えば、Leveneら、Science 299, 682-686 (2003)；Lundquistら、Opt. Lett. 33, 1026-1028 (2008)；Korlachら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 1176-1181 (2008)に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれ

る。

【0094】

一部のSBS実施形態は、ヌクレオチドが伸長生成物に取り込まれた際に放出される光子の検出を含む。例えば、放出光子の検出に基づいた配列決定は、Ion Torrent（コネチカット州ギルフォード、Life Technologies子会社）から市販されている電氣的検出器および関連技法、または、それぞれが参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2009/0026082号明細書；同第2009/0127589号明細書；同第2010/0137143号明細書；または同第2010/0282617号明細書に記載されている配列決定方法および系を用いることが可能である。本明細書で述べる、結合平衡除外法（kinetic exclusion）を用いた標的核酸を増幅する方法は、プロトンを検出

10

【0095】

別の有用な配列決定技法は、ナノポアシーケンシングである（例えば、Deamerら、Trends Biotechnol. 18, 147-151 (2000)；Deamerら、Acc. Chem. Res. 35:817-825 (2002)；Liら、Nat. Mater. 2:611-615 (2003)を参照。これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）。一部のナノポア実施形態では、標的核酸または標的核酸から除去した別ヌクレオチドをナノポアに通す。核酸またはヌクレオチドをナノポアに通すと、ポアの電気伝導度の変動を測定することにより、それぞれのヌクレオチド型を特定することが可能である（米国特許第7001792号明細書；Soniら、Clin. Chem. 53, 1996-2001 (2007)；Healy、Nanomed. 2, 459-481 (2007)；Cockroftら、J. Am. Chem. Soc. 130, 818-820 (2008)。これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）。

20

【0096】

本開示に従った検出に適用可能な、アレイをベースとする発現および遺伝子型決定の例示的方法は、米国特許第7582420号明細書；同第6890741号明細書；同第6913884号明細書もしくは同第6355431号明細書、または、米国特許出願公開第2005/0053980号明細書；同第2009/0186349号明細書もしくは同第2005/0181440号明細書に記載されており、これらはそれぞれ、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0097】

フォワード増幅オリゴヌクレオチドおよびリバース増幅オリゴヌクレオチドの両方が固相表面に共有結合的に固定化される固相増幅反応の生成物は、上記のようないわゆるブリッジ構造である。例えば配列決定といった核酸照合工程に、より適した鑄型を生成するため、少なくとも部分的に一本鎖である鑄型を生成することを目的に、ブリッジ構造の固定化鎖のうち1つの全てまたは少なくとも一部を、実質的に除去または置換することが有用であり得る。したがって、一本鎖の鑄型の一部は、配列決定プライマーにハイブリダイズするために利用可能である。ブリッジ2本鎖核酸構造において、1本の固定化鎖の全てまたは一部を除去するプロセスは、本明細書で線形化ということが可能であり、そして、国際公開第07010251号および米国特許出願公開第2009/118128号明細書にさらに詳細に記載され、これらの内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0098】

ブリッジ鑄型構造は、限定エンドヌクレアーゼで一方または両方の鎖を切断することにより、または、ニッキングヌクレアーゼで一方の鎖を切断することにより、線形化することが可能である。他の切断方法を限定酵素またはニッキング酵素の代替案として用いることが可能であり、該切断方法には、とりわけ、化学切断（例えば、過ヨウ素酸塩を用いたジオールリンケージの切断）、エンドヌクレアーゼ（例えば、アメリカ合衆国マサチューセッツ州イプスウィッチ、NEB社により提供される、製品番号M5505SのUSER）を用いるか、熱もしくはアルカリにさらすことによる非塩基部位の切断、増幅生成物に

50

取り込まれるか、さもなければデオキシリボヌクレオチドから成るリボヌクレオチドの切断、光化学切断、または、ペプチドリinkerの切断が含まれる。

【0099】

切断ステップ後、切断に用いた方法を問わず、固相担体に付着していない切断鎖の一部を除去するため切断反応の生成物を変性条件に従わせることが可能である。例えば、水酸化ナトリウム溶液、ホルムアミド溶液、または熱といった適切な変性条件が、標準分子生物学プロトコル（Sambrookら、上記参考文献；Ausubelら、上記参考文献）に関して熟練の読者には明らかであろう。変性は、部分的または実質的に一本鎖の配列決定鋳型の生成をもたらす。その後、配列決定プライマーを鋳型の一本鎖部にハイブリダイズすることにより、配列決定反応を開始することが可能である。

10

【0100】

種々の固相担体を本開示の方法で使用可能である。例えば、一部の実施形態において固相担体は、捕捉プライマーを規則正しいパターンで固定化するのに適したパターン付き表面を含む。「パターン付き表面」は、固相担体の露出層における異なる領域の配置を意味する。例えば、1つまたは2つ以上の領域は、1つまたは2つ以上の捕捉プライマーが存在するフィーチャとすることが可能である。フィーチャは、捕捉プライマーが存在しない格子間領域により分離することが可能である。一部の実施形態において、パターンは、行と列の形をしたx-yフォーマットのフィーチャとすることが可能である。一部の実施形態においてパターンは、フィーチャおよび／または格子間領域の繰り返し配置とすることが可能である。一部の実施形態において、パターンは、フィーチャおよび／または格子間領域のランダム配置とすることが可能である。一部の実施形態において、捕捉プライマーは固相担体にランダムに分布させる。一部の実施形態において、捕捉プライマーはパターン付き表面に分布させる。本明細書に述べる方法および組成物で用いることが可能な例示的パターン付き表面は、米国特許出願番号第13／661524号明細書または米国特許出願公開第2012／0316086号明細書に記載されており、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0101】

一部の実施形態において、固相担体は表面にウェルまたはくぼみのアレイを含む。これは、種々の技法を用いて当技術分野で一般的に知られているように製造することができ、該技法にはフォトリソグラフィ、スタンピング技法、成形技法、およびマイクロエッチング技法が含まれるが、これらに限定されるわけではない。当業者には理解されるだろうが、用いる技法は組成物およびアレイ基板の形に左右されるだろう。

30

【0102】

固相担体の組成物および形状寸法は、その用途によって変化する。一部の実施形態において、固相担体は、スライド、チップ、マイクロチップ、および／またはアレイなどの平面構造である。したがって、基板の表面は平面層形状とすることが可能である。一部の実施形態において、固相担体は1つまたは2つ以上のフローセル表面を含む。本明細書で用いる場合の「フローセル」という用語は、1つまたは2つ以上の流体試薬を流すことができる固相表面を含んだチャンバを意味する。本明細書で容易に使用可能なフローセル、関連する流体系、および検出プラットフォームの例は、例えば、Bentleyら、Nature 456:53-59 (2008)；国際公開第W004／018497号；米国特許第7057026号明細書；国際公開第W091／06678号；同第W007／123744号；米国特許第7329492号明細書；米国特許第7211414号明細書；米国特許第7315019号明細書；米国特許第7405281号明細書、および米国特許出願公開2008／0108082号明細書に記載されており、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0103】

一部の実施形態において、固相担体またはその表面は、チューブまたは容器の内部表面または外部表面のような非平面状である。一部の実施形態において、固相担体は微小球またはビーズを含む。本明細書の「微小球」、「ビーズ」、「微粒子」、もしくは「粒子」

50

、または文法上の同義語は、離散小粒子を意味する。適切なビーズ組成物には、プラスチック、セラミック、ガラス、ポリスチレン、メチルスチレン、アクリルポリマー、常磁性体、トリアゾル、カーボングラファイト、二酸化チタン、ラテックス、または、セファロースなどの架橋デキストラン、セルロース、ナイロン、架橋ミセルおよびテフロン（登録商標）が含まれるが、これらに限定されるわけではなく、同様に、固相担体として本明細書で略述した任意の他の物質を全て用いることができる。インディアナ州フィッシャーズ Bangs Laboratories社の「微小球検出ガイド」は有用なガイドである。ある実施形態では、微小球は磁気微小球または磁気ビーズである。

【0104】

ビーズは球体である必要がなく、不規則な粒子を用いることができる。あるいは、または、加えて、ビーズは多孔質とすることができる。ビーズのサイズは、ナノメートルつまり100nmからミリメートルつまり1mmに及び、約0.2ミクロン～約200ミクロンのビーズが好適であり、約0.5～約5ミクロンのビーズが特に好適であるが、一部の実施形態ではより小さいまたはより大きいビーズを用いることができる。

【0105】

本開示はまた、ある実施形態において、1つまたは2つ以上の捕捉プライマーを固定化するフローセルを提供する。ある複数の捕捉プライマーは標的捕捉プライマーとすることが可能である。標的特異的捕捉プライマーは、ユニバーサルプライマー領域を含むことが可能である。別の複数の捕捉プライマーは、ユニバーサル捕捉プライマーとすることが可能である。上記の例示的な複数の捕捉プライマーの片方または両方を、フローセルに固定化することが可能である。

【0106】

従って、本開示はまた、複数のアンプリコンクラスタを調整するためのフローセルにも関連し、ここでフローセルは、1つまたは2つ以上の複数の固定化捕捉プライマーのコーティングを含む。したがって、本明細書に記載の固相担体は、フローセル内またはフローセルの一部として生じさせることが可能であり、本明細書で述べる方法は、フローセル内で実行することが可能である。1つまたは2つ以上の複数の捕捉プライマーは、狭小な各位置にある異なる配列を含んだ離散位置ではなく、フローセルの表面全体にコーティングすることが可能である。フローセルは1cm²以上の大きさとすることができ、それにより、1cm²以上の全体は、1つまたは2つ以上の複数の捕捉プライマーそれぞれにつき、捕捉プライマーの多数のコピーのコーティングを含む。オリゴヌクレオチドをアレイの単一平面ではなく、フローセルチャンバそれぞれの表面；上部、下部、壁、および端に付着させることから、フローセルは、例えば、まだらのアレイまたはフォトリソグラフィで合成したアレイと区別することが可能である。しかしながら、必要であれば、本明細書で述べる方法で用いるフローセルは、オリゴヌクレオチドに対し異なる反応度の表面を有することが可能であり、この結果、オリゴヌクレオチドは、1つもしくはサブセットの前記表面か、または、これらの表面内サブセット領域にのみ付着する。

【0107】

フローセルは、ある実施形態において、異なる配列組成物、つまり、図1パネル3に示すように2つの捕捉プライマー種と標的特異的捕捉プライマーという3つの複数の捕捉プライマー種でコーティングすることが可能である。さらに、標的特異的捕捉プライマーは、図1パネル3で示すように、2つの複数の捕捉プライマーの一方として、同一の配列を有するユニバーサルプライマー領域を含むことが可能である。フローセルはある実施形態において、わずか3つの複数の捕捉プライマー種でコーティングすることが可能である。しかしながら、他の特定の実施形態では、フローセルはさらに、ユニバーサル捕捉プライマー、標的特異的捕捉プライマー、または他の捕捉プライマー種という、1つまたは2つ以上の他の複数の捕捉プライマー種を含むことが可能である。標的特異的捕捉プライマーは、ユニバーサル捕捉プライマーより低い濃度、例えば、少なくとも、100、1000、100000倍低い相対濃度で存在し得る。2つの複数のユニバーサル捕捉プライマーは、例えば、2倍未満で変化させながら、互いに同程度の比率で存在させることが可能で

ある。本明細書で提供する教示および指導を考慮すると、当業者は、所望の結果を得るためにどのような構成のユニバーサル捕捉プライマーと標的特異的捕捉プライマーをフローセルに固定化すべきか、理解するだろう。

【0108】

本開示はまた、核酸配列変異体の検出感度を高める方法を提供する。該方法は、(a) 複数の標的ポリヌクレオチドを含む核酸サンプルを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で、遺伝子特異的フォワードプライマーおよび遺伝子特異的リバースプライマーに接触させるステップであって、前記遺伝子特異的フォワードプライマーの各種は固有の配列インデックスおよびアダプターを含む、ステップと；(b) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、前記複数の標的ポリヌクレオチドを増幅し、複数のアンプリコンを生成するステップと；(c) 固相担体に固定化した複数の標的特異的捕捉プライマーを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で前記複数のアンプリコンと直接的に接触させて、第1の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記固相担体は複数のユニバーサル捕捉プライマーをさらに含む、ステップと；(d) 前記複数の標的特異的捕捉プライマーを伸長して、前記標的ポリヌクレオチドに対し相補的な、複数の固定化伸長生成物を生成するステップと；(e) 前記複数のユニバーサル捕捉プライマーを前記複数の固定化伸長生成物にアニールするステップと；(f) PCRにより前記複数の固定化伸長生成物を増幅して、第2の複数の固定化アンプリコンを生成するステップであって、前記第2の複数の固定化アンプリコンは85%以上の均一性を備える、ステップと；(g) 前記第2の複数の固定化アンプリコンの配列を決定するステップと；(h) 標的ポリヌクレオチド種に関し、変異体位置にある3つ以上のヌクレオチド配列を比較することにより、1つまたは2つ以上の標的ポリヌクレオチドに関するランダムな配列エラーを解消するステップであって、前記標的ポリヌクレオチド種を前記固有の配列インデックスにより特定し、それにより、前記1つまたは2つ以上の標的ポリヌクレオチドにおける真のヌクレオチド配列変異体を求める、ステップを含む、方法を提供する。

【0109】

上記の方法はまた、核酸配列変異体の検出感度を高めるために用いることが可能である。核酸増幅および配列決定において、これらの工程におけるポリメラーゼの非忠実性から生じる配列決定エラーを、例えば、真の配列と区別することが重要である。この区別は、サンプルにおいて自然に生じる変異体配列を特定するために特に重要である。真の配列変異体をランダムなヌクレオチド配列エラーと区別することは、固有の配列バーコードまたは配列インデックスを複数の標的ポリヌクレオチド内の各ポリヌクレオチド種と関連付けることにより達成可能である。

【0110】

図5は、固有インデックスの各標的ポリヌクレオチド種への付着を示す。図5は（該図で「鋳型」と特定されている）複数の標的ポリヌクレオチドを示す。説明のため、複数体は3つの要素からなり、ここで要素の1つは真のヌクレオチド変異体（白星）である。固有バーコードを各要素に加え、前記複数体を増幅して、固有にバーコードを付けた最初の要素にそれぞれ由来する3つの複数のアンプリコンを生成する。3つの複数体の起源は、バーコードの配列決定および特定により、特定することが可能である。各複数体の要素の比較により、それぞれまたはほとんどの要素で変異体が生じているのが分かる。対照的に、ある複数のアンプリコンは、アンプリコン複数体の残りの要素と比較して配列の違う要素（黒星）を含む。この複数体の要素の大多数はそのヌクレオチド変化を含まないため、その混入はランダムエラーにより起きたものである。

【0111】

上記の設計はまた、複数の異なる標的ポリヌクレオチド内の真の変異体を特定するのに適用可能である。本明細書に記載するように、標的ポリヌクレオチド種は、同一の配列を有する複数の標的ポリヌクレオチドの要素を意味する。この実施形態では、各標的ポリヌクレオチド種を、該標的ポリヌクレオチド種を他の標的ポリヌクレオチド種と区別する同一の固有インデックスで特定する（逆の場合も同じ）。したがって、同一の配列を有する

標的ポリヌクレオチド（つまり、種の要素）は同一のインデックスを有する。増幅に続くことと種の要素の配列を決定することは、同一のインデックスを有することにより特定することが可能であり、ランダムエラーと比較される真の変異体の発生は、複数の種の要素内の他の要素との配列比較に基づいて判断することが可能である。

【0112】

したがって、上述の方法はさらに、標的ポリヌクレオチドを増幅するのに用いる遺伝子特異的プライマー内にインデックス配列を含むことが可能である。そのため、各遺伝子特異的プライマーは、それが対応する標的ポリヌクレオチドを特定する固有のインデックスを含むことになる。したがって、複数の異なる標的ポリヌクレオチドに対応する複数の遺伝子特異的プライマーを用いて複数の異なる標的ポリヌクレオチドを増幅し、そして、固有に特定するインデックスを、このように生成される、結果として生じる複数のアンプリコン内の各アンプリコン種に組み込む。

【0113】

インデックスは、他のインデックスと区別可能な固有ヌクレオチド配列とすることが可能である。それはまた、標的ポリヌクレオチド内の配列または位置の何れかによって、複数のポリヌクレオチド内にある他のヌクレオチド配列と区別することが可能である。ヌクレオチドインデックスは、ランダムな、または、特異的にデザインした、ヌクレオチド配列とすることが可能である。インデックスは、分析または照合する集団の複数のインデックスおよび／または複数のポリヌクレオチド内の、固有ヌクレオチド配列であるのに十分な長さである限り、任意の所望の配列長とすることが可能である。一部の実施形態において、インデックスは、ポリヌクレオチド、または、約8～30個のヌクレオチドにわたるポリヌクレオチド内領域である。インデックスは、例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30個以上の長さのヌクレオチドとすることが可能である。例えば、インデックスは、35、40、45、50個以上の長さのヌクレオチドとすることが可能である。

【0114】

図7は、インデックスを標的ポリヌクレオチドに取り込むための、1つの例示的な遺伝子特異的プライマーデザインを示す。この実施形態において、インデックスは、遺伝子特異的フォワードプライマー（GSF）におけるグレー色の領域に対応する。図7に示すように、インデックスを含む遺伝子特異的フォワードプライマーと遺伝子特異的リバープライマーに対応するプライマー対での増幅により、インデックスをアンプリコンに取り込む。図7はさらに、非対称増幅および後続のブリッジ増幅による継続増幅フォローインデックスの取り込みと、GSFによりまた導入されたプライマー結合部位に対し特異的な配列決定プライマーを用いる配列決定を示す。

【0115】

図8はインデックスを標的ポリヌクレオチドに取り込むための、別の例示的な遺伝子特異的プライマーを示す。この実施形態では、インデックスを第2の増幅ステップで取り込む。例えば最初の増幅は、遺伝子特異的フォワード（GSF）プライマーおよび遺伝子特異的リバー（GSR）プライマーの対で実行する。プライマーの一方または両方は、増幅の後続ラウンド用のプライマー結合部位など、ユニバーサル配列領域を含むことが可能である。この実施形態において、インデックスはグレー色の領域にも対応し、それは後続ラウンドのプライマーの何れかに含めることが可能であるが、GSFにより取り込まれるプライマー結合部位に結合するプライマー（SBS3配列決定プライマー）にあるように図示されている。図8に示すように、インデックスを含むプライマーとリバープライマーに対応するプライマー対での増幅は、インデックスをアンプリコンに取り込む。図8はさらに、非対称増幅および後続のブリッジ増幅による継続増幅フォローインデックスの取り込みと、後続の増幅ラウンドで用いるプライマーによりまた導入されたプライマー結合部位に対し特異的な、配列決定プライマーを用いた配列決定とを示す。このプライマーはまた第2のプライマー結合部位を含み、この結果、それは、標的ポリヌクレオチドと並

行して配列決定するためのインデックスの上流にある。

【0116】

本明細書で提供する教示および指導を考慮すると、当業者は、本明細書で開示する全ての方法はまた、標的特異的捕捉プライマーに取り込んだ固有インデックスで実行し、核酸配列変異体の検出感度を高めることが可能であることを理解するだろう。

【0117】

したがって、本開示の方法は、核酸配列変異体の検出感度を高める方法を提供し、ここで複数の標的ポリヌクレオチドは10 ng以下の入力核酸を含む。該方法は、ハイブリダイゼーションに十分な条件を有し、10分以下の培養を含むことが可能である。該方法はさらに、変異体ヌクレオチド位置について0.3%以下のミスマッチ率を検出するステップを含む。

10

【0118】

核酸配列変異体の検出感度を高める方法であって、複数の標的ポリヌクレオチドを有する核酸を接触させるステップは、第1の遺伝子特異的フォワードプライマーとリバースプライマーを用いるPCR増幅の第1ラウンドと、第1の遺伝子特異的フォワードプライマーの一部に対し相補的な第2のフォワードプライマーを用いたPCR増幅の第2ラウンドを含み、前記第2のフォワードプライマーは固有配列インデックスおよびアダプターを含む、方法も提供する。アダプターは、複数のユニバーサル捕捉プライマーに対し相補的とすることが可能である。ユニバーサル捕捉プライマーは、固相担体に固定化することが可能である。

20

【0119】

核酸配列変異体の検出感度を高める方法であって、前記複数の標的ポリヌクレオチドの増幅には非対称PCRを含む方法を、さらに提供する。前記複数の標的ポリヌクレオチドの増幅はまた、マルチプレックス増幅を含み得る。マルチプレックス増幅は180以上のマルチプレックス性を含む。

【0120】

核酸配列変異体の検出感度を高める方法であって、前記固相担体はさらに、第2の複数のユニバーサル捕捉プライマーを含む方法を、さらに提供する。さらに、複数の標的特異的捕捉プライマーはさらにユニバーサル捕捉プライマー領域を含むことが可能である。前記ユニバーサル捕捉プライマー領域は、前記第2の複数のユニバーサル捕捉プライマーに対応する、または、相補的である、ヌクレオチド配列を有することが可能である。

30

【0121】

核酸配列変異体の検出感度を高める方法であって、前記複数の標的特異的捕捉プライマーは200以上の異なるヌクレオチド配列を含む方法も提供する。該方法は、200個以上の異なるヌクレオチド配列を含む複数の標的ポリヌクレオチド内での、配列変異体検出を含む。前記複数の標的ポリヌクレオチドは、複数のゲノム核酸とすることが可能である。

【0122】

核酸配列変異体の検出感度を高める方法であって、固定化伸長生成物の増幅はブリッジ増幅を含む方法を、追加的に提供する。該方法は固相担体を含み、ここで該固相担体はフローセルとすることが可能である。

40

【0123】

核酸配列変異体の検出感度を高める方法であって、増幅した複数の標的ポリヌクレオチドから生成した複数のアンプリコンの配列決定は50回の配列決定サイクルを含む方法を、さらに提供する。該方法は開始～終了時間が3時間以下である。

【実施例】

【0124】

本開示の種々の実施形態の作業に実質的に影響を与えない修飾も、本明細書で提供する開示の定義内に含まれると理解される。したがって、以下の実施例は本開示を説明することを意図するが、本開示を限定するわけではない。

50

【0125】

(実施例1)

アンプリコンの調製および配列決定の工程

この実施例では、アンプリコンの調製および標的ポリヌクレオチド配列決定のための統合工程を記載する。

【0126】

簡潔に言うと、サンプルのゲノムDNAを、50 μ LのKAPA 2X 2GマルチプレックスPCRバッファ（マサチューセッツ州ウィルミントン、Kapa Biosystems社）、0.5 μ Mのフォワードプライマーミックス（F）、0.02 μ Mのリバースプライマーミックス（R）、20単位のKAPA 2G Hot Start Enzyme（バッファ（マサチューセッツ州ウィルミントン、Kapa Biosystems社）、および水を含む、総容量100 μ LのPCR反応混合物に加えた。以下のPCRプログラムを用いて増幅を行った：95℃1分間の培養後、以下の培養を30サイクル行った：（1）97℃5秒；（2）58℃45秒；（3）72℃1分；および、（4）4℃で保持。PCR生成物を下記のようにフローセルに固定化しクラスタ化した後、続いて配列を決定した。

10

【0127】

捕捉プローブ伸長、上記PCR生成物の標的クラスタ化、および配列決定を、MiSeq（登録商標）ベンチトップ型シーケンサー（カリフォルニア州サンディエゴ、Illumina社）を用いて行った。

【0128】

この工程では、MiSeqキットカートリッジ（カリフォルニア州サンディエゴ、Illumina社）を、自動MiSeqランの前に約30分、水中で解凍し、ヒートブロックを95℃にした。加えて、HFEチューブ（600 μ L（カリフォルニア州サンディエゴ、Illumina社））を冷蔵庫で解凍し、0.1N NaOHの溶液1mLを調製した。PCR生成物（100 μ L）を、エッペンチューブ内で400 μ LのHT1バッファ（カリフォルニア州サンディエゴ、Illumina社）で希釈した。同様に、捕捉プローブ鋳型を、別のチューブ内で、600 μ LのHT1バッファにおいて調製した。脱イオン水をヒートブロックウェルに加え、上記2つのチューブを5分間ゆっくりと振りながら（約100 rpm）ウェルに差し込んだ。5分間のヒートブロック培養後、チューブを少なくとも2分間冷蔵庫に置いた。解凍したMiSeqカートリッジを数回逆にして試薬を分散させ、再度底に沈降させた。試薬を以下のようにMiSeqカートリッジに投入した：PCR生成物をカートリッジ内の#17チューブに移し；捕捉プローブを#18チューブに移し、HFEを#19チューブに投入し、0.1N NaOHを#20チューブに加えた。MiSeqカートリッジ、MiSeq FC（カリフォルニア州サンディエゴ、Illumina社）、およびMiSeqに対するPR2（カリフォルニア州サンディエゴ、Illumina社）ボトルをMiSeqシーケンサーにセットアップし、配列決定ランプロセスを製造業者の助言に従って開始した。調製したサンプルシートを投入し（Javelin v.51 chemistry）、製造業者の助言に従いフローチェックステップを経た後、伸長、標的クラスタ化、および配列決定のランを開始した。

30

【0129】

捕捉プローブ伸長、上記PCR生成物の標的クラスタ化、および配列決定も、Genome Analyzer（カリフォルニア州サンディエゴ、Illumina社）を用いて行った。

40

【0130】

この工程に関し、クラスタ化および配列決定の鋳型を、8-チューブストリップ内でHT1バッファをPCR生成物を混合することにより調製した（それぞれ、1~10 μ LのPCR生成物と19~10 μ LのHT1バッファ）。捕捉プローブ（3~500 pM）を別の8-チューブストリップで調製した。解凍したcBOT Paired End Cluster Plate v3（カリフォルニア州サンディエゴ、Illumina社）をcBOT自動クラスタ化システムに置き、捕捉プローブ伸長と増幅の工程を、ランコマンドを用いて開始した。（Run <Capture_Probe_Extension_Amp_LBH_v#> recipe）。一連の標準Genome Analyzer（GA）配列決定試薬（カリフォルニア州サンディエゴ、Illumina社）を解凍し（IMX、LFN、CLM、SMX）、L

50

F Nのチューブの全内容物をI M Xチューブに加え、続いてHDP36を同じIMXチューブに加えた。内容物をよく混ぜた。PR1、PR2、PR3（カリフォルニア州サンディエゴ、Illumina社）を含む全ての試薬とバッファを指定された位置でGAに置き、続いてGAコマンド<Prime_v#> recipeを用いて全ラインと試薬をプライミングした。フローセルとプリズムをそれぞれエタノールワイプとレンズペーパーできれいにし、プリズムを機械に再度挿入した。ビームダンプを下げた。フローセルをプリズムの頂部に適切に位置させ、マニホールドをゆっくりと下げた。フローセルへの試薬の適切な流れを、100 μ Lの溶液5（PR2）を60 μ L／分の吸引速度および2000 μ L／分に分注速度で手動で注入することにより確かめた。イメージンオイル（135 μ L）をプリズムとフローセルの間に適用した。計測器の扉を閉め、配列決定ランをGAコマンドラン<GA2_40cycle_10rows_SR_v8.3> recipeで開始した。

10

【0131】

（実施例2）

統合調製から生じる配列の質および配列決定工程

この実施例では、種々の濃度およびタイプの入力核酸を用いた、配列の均一性および配列決定の深度の比較を記載する。

【0132】

実施例1で記載した工程を用いて標的ポリヌクレオチドの集団からアンプリコンを調製し、マルチプレックス配列決定によりその配列を決定した。1 ngおよび10 ngの入力ゲノムDNAを用いた結果を図2に示す。

20

【0133】

MiSeqReporterからの各アンプリコンクラスタを基に均一性を計算した。0.1平均、0.2平均、0.3平均、0.5平均超のクラスタを有するアンプリコンの数を数えた。例えば、0.2平均では、80%超のアンプリコンが0.2超の平均クラスタ数を有した。

【0134】

配列決定深度に関し、10／100／250／500超のクラスタを有するアンプリコンの数を数えた。例えば、80%超のアンプリコンが少なくとも500xを対象範囲とした。均一性および対象範囲は、人々が配列決定の質を測るのに使う典型的な尺度である。図2に示す結果は、良質な配列決定が1 ngと10 ngのゲノムDNAを用いて達成可能であることを示した。

30

【0135】

ホルマリン固定パラフィン包埋組織から得た4つの異なる量のDNAを用いた結果を図3に示す。4つの異なる濃度は、図に示すように1 ng～50 ngに分布した。

【0136】

図3に示す均一性と配列決定深度の結果はさらに、良質な配列決定がホルマリン固定パラフィン包埋組織から得られる広範囲のDNAについて達成可能であることを示した。クラスタPF（Passing Filter）濃度は特定の質を有するクラスタ数を示すが、該クラスタPFは非常に良好だった。特異性は、いくつかのリードが正確であるかについての計測である。90%超の特異性がこの研究で達成された。

40

【0137】

追加の研究を、正常な人およびがん患者の血漿から抽出したセルフリーDNA（cfDNA）を用いて実行し、同様の結果を得た。1 mLの血漿から単離した10 ngのcfDNAを用いた結果を図4に示す。

【0138】

図2および3のように、MiSeqReporterからの各アンプリコンのクラスタに基づいて均一性を計算した。0.1平均、0.2平均、0.3平均、0.5平均超のクラスタを有するアンプリコンの数を数えた。80%超のアンプリコンが、0.2超の平均クラスタ数を有した。

【0139】

50

同様に、配列決定深度に関し、10/100/250/500超のクラスタを有するアンプリコン数を数えた。全てのアンプリコンは少なくとも500xを対象範囲とした。加えて、クラスタPF濃度および挿入した表に示す他のパラメータも非常に良好だった。93%の特異性を示す結果が得られ、これは、93%のクラスタが正しい標的に対して整列することを意味する。これらの結果は、良質な配列決定は、結晶から単離したセルフリーDNAより直接獲得可能であることを追加的に示す。

【0140】

(実施例3)

統合調製および配列決定工程から生じる検出感度

この実施例は、標的ポリヌクレオチドの集団内の単一変異の検出精度を示す。

10

【0141】

本明細書に記載の方法に従い、201マルチプレックスフォーマット(201 plex)において、Horizon Diagnostics社より得た1.65 ngのDNAを用いてライブラリを調製し、配列決定した。以下の表に列記した変異を、列記の表示頻度で特定した。このDNAは、デジタルPCRを用いて、Horizon Diagnostics社により、ある変異頻度を有することを確かめられている。1.65 ngは約500個の半数体ゲノムコピーである。1%の比率で、約5コピーの突然変異体が存在する。そのためこの方法は、種々の配列の集団で5コピーの突然変異体を検出するのに十分高感度である。

【0142】

【表1】

20

複数の突然変異体*の同時検出

遺伝子名	変異	変異タイプ	デジタルPCRで 確認された頻度	Javelin**による 頻度
BRAF	V600E	A→T	10.5%	10%, 11%
PI3KCA	E545K	G→A	9%	9%, 9%
KRAS	G12D	C→T	6%	6%, 8%
EGFR	L858R	T→G	3%	3%, 4%
EGFR	T790M	C→T	1%	1%, 1%

30

*変異あり参照ゲノムDNAは、Horizon Diagnostics社より獲得する。

**2つの個別実験の結果

【0143】

(実施例4)

40

エラーから真の配列変異体を求める固有分子インデックス

この実施例は、標的ポリヌクレオチド配列での真の変異体による配列決定エラーを区別する、固有ヌクレオチドインデックスの使用について記載する。

【0144】

固有分子バーコード(Unique Molecular Barcode、UMB)またはランダムヌクレオチドのインデックス(10-15N)を、配列決定プライマー領域とPCRフォワードプライマーの遺伝子特異的配列領域の間に挿入した。UMBを、UMBを挿入しながらPCRプライマーで2-4サイクルのPCRを実行することにより鋳型DNAに導入した。2-4サイクル後、残りのUMBプライマーをエクソヌクレアーゼ1処置とSPRIビーズ除去を用いて取り除いた。ユニバーサルアダプターシーケンスからなるプライマーを用いて

50

、追加で30～35サイクルのPCRを実行した。リードの配列を同一のUMBと比較することにより、データ分析を実行した。70%超のUMB配列によりベースコールを決定する。2超のコピーを有するUMBのみをデータ分析で考慮した。下記に示すように、データ分析でUMBからの情報を考慮しないと、PCRおよび配列決定エラーにより起きるノイズは0.24%にまでなり得る。UMBからの情報をデータ分析で考慮すると、ノイズを全て除去することが可能である。そして、実際の突然変異体の観測頻度は、0.05%という予測頻度にずっと近づく。

【0145】

【表2】

UMBを使用した信号とノイズの区別

	UMB修正なし (頻度)	UMB修正後 (頻度)
A*	99.718%	99.978%
C	0.024%	0.000%
T	0.001%	0.000%
G*	0.254%	0.032%
N	0.002%	0.000%
D	0.001%	0.000%

*鋳型DNAは、ワイルドタイプ(A)にPIK3CA H1045KR突然変異体(G)ゲノムDNAを混ぜることにより獲得。0.05%変異体～10分子(G)が予測された。

【0146】

この点に関し、図6は、ヌクレオチドミスマッチ率と、固有分子バーコード修正あり(右)および固有分子バーコード修正なし(左)との比較を示す。簡潔に言うと、予測変異部位周りにある20個の位置でのミスマッチ率を、データ分析におけるUMBからの情報を考慮して、および、該情報を考慮しないで、示した。図6に示すように、UMBがなければ、結果は重大な非特異的ノイズを含んだ。ノイズは0.15%にまでなり得る。データ分析におけるUMBからの情報を考慮した後、ノイズは全て除去された。

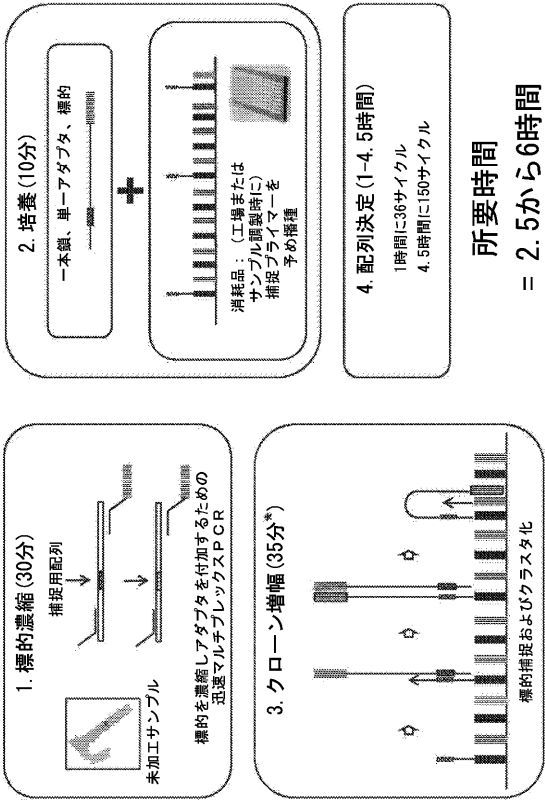
【0147】

この出願を通し、種々の刊行物を括弧内で言及した。任意のGenBankおよびGI number刊行物を含むこれらの刊行物全体の開示は、この結果、本開示が関連する技術の水準をより完全に記載するために参照によって本出願に組み込まれる。

【0148】

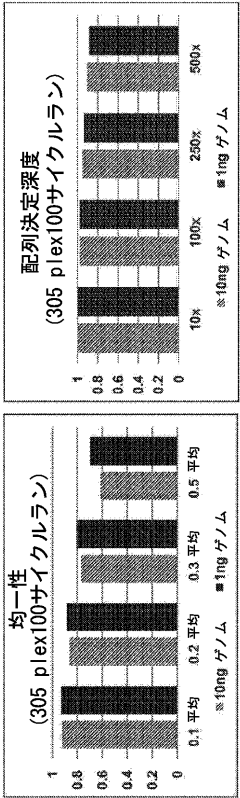
本開示は、開示する実施形態に関連して記載したが、当業者は、上記で詳述した特異的な実施例および研究は本開示の単なる例示にすぎないことを容易に理解しよう。本開示の趣旨を離れることなく種々の修正が可能であることを理解すべきである。加えて、本開示は以下の請求の範囲によってのみ限定されるものである。

【図 1】



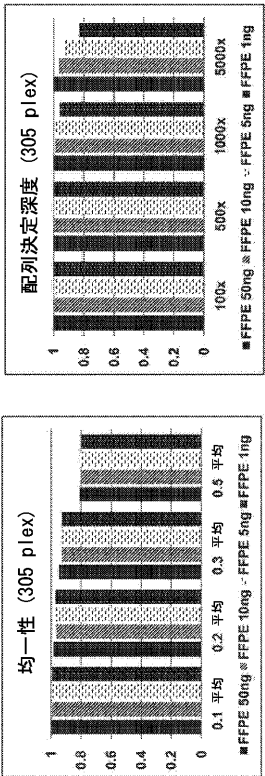
【図 2】

305 plex用MiSeqにおける100サイクルラン



【図 3】

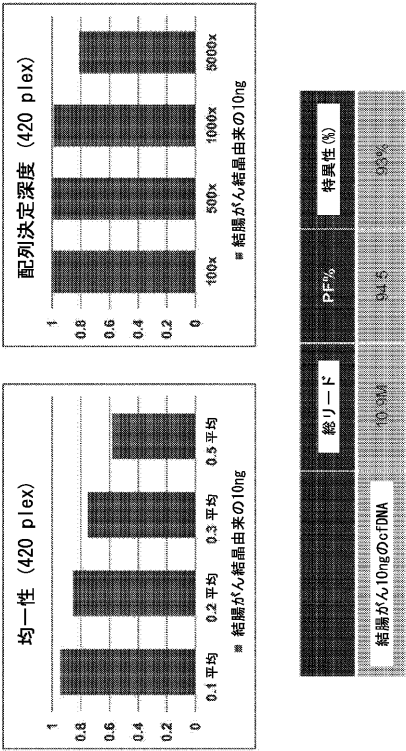
FFPE DNAにおけるヒト305 plexの実行*



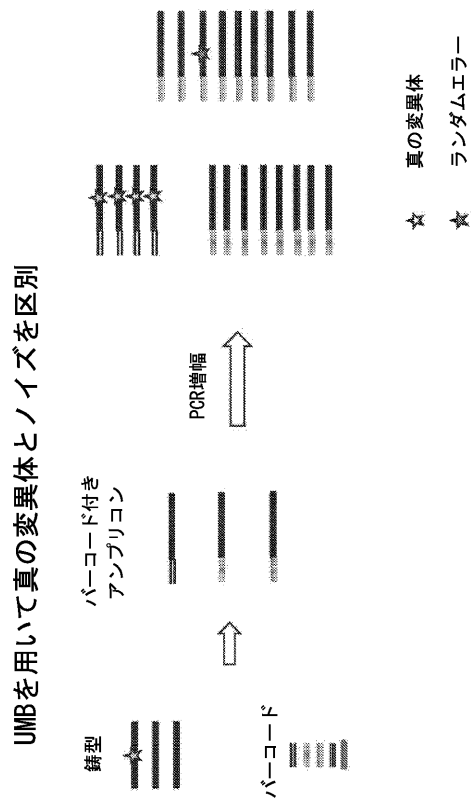
*2つ以上の実験の代表
*PFクラスタは300~800k/mm²にわたる
*特異性は90%超である
*50サイクルランに基づく

【図 4】

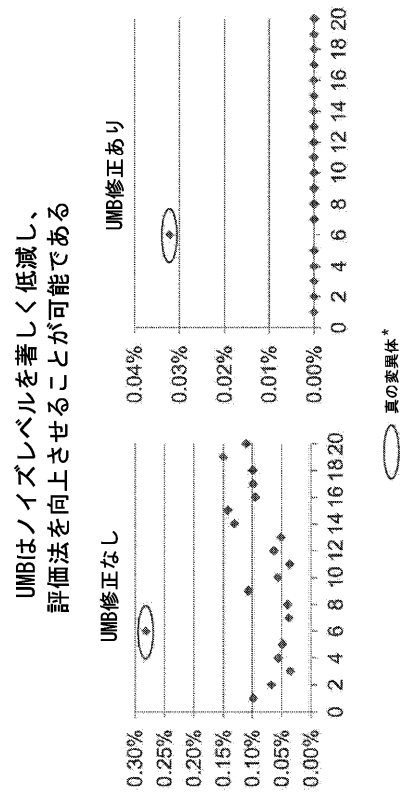
MiSeqでの、結腸がんセルフリーDNAについてのヒト420 plexの実行



【図 5】

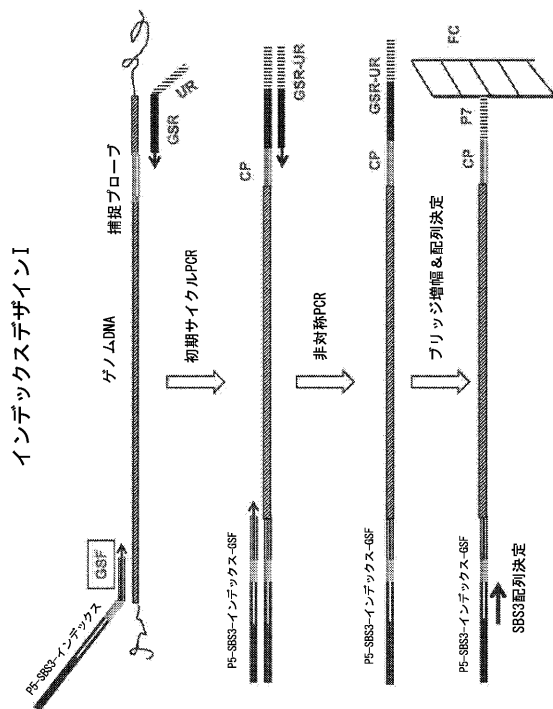


【図 6】

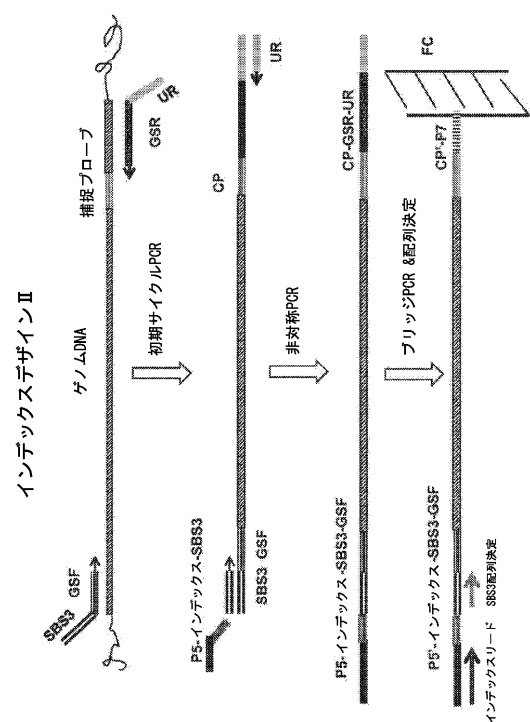


*鋳型DNAは、ワイルドタイプ(A)にPIK3CA H1045KR突然変異体(G)ゲノムDNAを混ぜることにより獲得。0.05%(~ 10 分子)変異体(G)が予測された。

【図 7】



【図 8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/071263

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/44151 A1 (GLAXO GROUP LTD [GB]; KAWASHIMA ERIC [CH]; FARINELLI LAURENT [CH]; MAY) 8 October 1998 (1998-10-08)	1-41
Y	abstract; claims 1,3,8	42-60
Y	----- CN 102 787 118 A (YI SUN; QIAO ZENG; ZHANPING SHI; AIBIN LIANG) 21 November 2012 (2012-11-21)	42-60
A	abstract	1-41
Y	----- WO 2013/166444 A2 (BOREAL GENOMICS CORP [US]; UNIV BRITISH COLUMBIA [CA]) 7 November 2013 (2013-11-07)	42-60
A	abstract page 17	1-41

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 April 2015

Date of mailing of the international search report

29/04/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Celler, Jakub

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/071263

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9844151	A1	08-10-1998	AT 364718 T 15-07-2007
			AT 545710 T 15-03-2012
			AU 6846698 A 22-10-1998
			DE 69837913 T2 07-02-2008
			EP 0972081 A1 19-01-2000
			EP 1591541 A2 02-11-2005
			EP 2327797 A1 01-06-2011
			JP 2002503954 A 05-02-2002
			US 2005100900 A1 12-05-2005
			US 2008286795 A1 20-11-2008
			US 2011045541 A1 24-02-2011
			US 2013217586 A1 22-08-2013
			US 2013231254 A1 05-09-2013
			US 2014371100 A1 18-12-2014
			US 2015087531 A1 26-03-2015
			WO 9844151 A1 08-10-1998

CN 102787118	A	21-11-2012	NONE

WO 2013166444	A2	07-11-2013	EP 2844773 A2 11-03-2015
			US 2013296176 A1 07-11-2013
			WO 2013166444 A2 07-11-2013

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 アレックス アラバニス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94158 サンフランシスコ イリノイ ストリート 4
99 スイート 210

(72)発明者 シェンロン リン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94555 フリーモント ウィルブリッジ テラス 34
568

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA17 QA19 QQ28 QQ42 QR32 QR62 QR82 QS12 QS25

QS39 QX02

4B064 AF27 CA21 CA31 CB30 CC24 DA13