

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-525880

(P2023-525880A)

(43)公表日 令和5年6月19日(2023.6.19)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/686(2018.01)	C 1 2 Q 1/686	Z Z N A 4 B 0 5 0
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/6876(2018.01)	C 1 2 Q 1/6876	Z
C 1 2 Q 1/6869(2018.01)	C 1 2 Q 1/6869	Z
C 4 0 B 40/06 (2006.01)	C 4 0 B 40/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全142頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-569537(P2022-569537)	(71)出願人	522444298
(86)(22)出願日	令和3年5月17日(2021.5.17)		インテグレイテッド ディーエヌエー テ
(85)翻訳文提出日	令和5年1月13日(2023.1.13)		クノロジーズ, インコーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2021/032824		アメリカ合衆国 アイオワ 5 2 2 4 1,
(87)国際公開番号	WO2021/232023		コーラルビル, コマーシャル パーク
(87)国際公開日	令和3年11月18日(2021.11.18)		1 7 1 0
(31)優先権主張番号	63/025,738	(74)代理人	100078282
(32)優先日	令和2年5月15日(2020.5.15)		弁理士 山本 秀策
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
(81)指定国・地域	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,	(74)代理人	100181674
	最終頁に続く		弁理士 飯田 貴敏
		(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74)代理人	230113332
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ライゲーションカップルドPCRの方法

(57)【要約】

本開示は、ライゲーションカップルドPCRの方法およびキットを提供する。ライゲーションおよびPCR、ならびに必要に応じて酵素消化を単一密閉管で実施する方法が提供される。スプリント媒介プライマーアセンブリおよびライゲーションカップルドPCRの方法およびキットも提供される。次世代シーケンシング(NGS)による分析のための重要な要件は、NGSライブラリーの調製である。このプロセス時に、目的の核酸をまず断片化することができ、RNAから開始する場合はcDNAを生成することができ、多くの標的化シーケンシングワークフローについて目的の遺伝子座に特異的な多重PCRを実施することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 第 1 の鎖および第 2 の鎖を含み、第 1 の 3' オーバーハング、二本鎖部分および第 2 の 3' オーバーハングを含む部分的に二本鎖の DNA 基質を提供することであって、前記第 1 の鎖が、5' から 3' 方向に、第 1 の 5' 末端、第 1 の部分および第 2 の部分を含み、

前記第 2 の鎖が、5' から 3' 方向に、第 2 の 5' 末端、第 3 の部分、および前記部分的に二本鎖の DNA 基質の第 4 の部分を含み、

前記第 1 の鎖の前記第 1 の部分および前記第 2 の鎖の前記第 3 の部分が相補的であり、前記二本鎖部分を形成し、

前記第 1 の鎖の前記第 2 の部分が前記第 1 の 3' オーバーハングを形成し、

前記第 2 の鎖の前記第 4 の部分が前記第 2 の 3' オーバーハングを形成し、

前記第 1 の鎖の前記第 2 の部分および前記第 2 の鎖の前記第 4 の部分が、それぞれ、前記第 1 の 3' オーバーハングおよび前記第 2 の 3' オーバーハングの 5' 末端に位置する第 1 の共通ヌクレオチド配列を含み、

前記第 1 の鎖の前記第 2 の部分および前記第 2 の鎖の前記第 4 の部分が、それぞれ、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列に対して 3' に位置する第 2 の共通ヌクレオチド配列を含むこと、

(ii) 複数の第 1 のインデキシングプライマー、複数の第 2 のインデキシングプライマー、リガーゼ、DNA ポリメラーゼおよびデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) を前記部分的に二本鎖の DNA 基質に添加して第 1 の反応混合物を生成することであって、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々が、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列に相補的な第 1 の 3' 末端部分を含み、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々が、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列に相補的な第 2 の 3' 末端部分、および前記第 2 の 3' 末端部分に対して 5' に位置し、前記第 2 の共通ヌクレオチド配列に相補的な第 1 の 5' 部分を含むこと、

(iii) 前記第 1 の反応混合物を、ライゲーション持続時間にわたるライゲーション温度を含む第 1 の条件集合下でインキュベートすることであって、前記第 1 の条件集合は、

a) 前記第 1 の 3' 末端部分が、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、

b) 前記リガーゼが、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つを前記第 1 の鎖の前記第 1 の 5' 末端に、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つを前記第 2 の鎖の前記第 2 の 5' 末端にライゲーションして、

5' から 3' 方向に、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つ、前記第 1 の部分および前記第 2 の部分を含む第 3 の鎖と、

5' から 3' 方向に、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つ、前記第 3 の部分および前記第 4 の部分を含む第 4 の鎖とを含む第 2 の反応混合物を生成するのに十分であること、

(iv) 前記第 2 の反応混合物を、第 1 の変性持続時間にわたる第 1 の変性温度、第 1 のアニーリング持続時間にわたる第 1 のアニーリング温度、および第 1 の伸長持続時間にわたる第 1 の伸長温度を含む第 2 の条件集合下でインキュベートすることであって、前記第 2 の条件集合は、

a) 前記リガーゼを不活性化し、二本鎖 DNA を変性させ、必要に応じて DNA ポリメラーゼを活性化させ、

b) 前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの 1 つの前記第 2 の 3' 末端部分および前記第 1 の 5' 部分が、前記第 3 の鎖の前記第 2 の部分の少なくとも前記第 1 の共通ヌクレオチド配列および前記第 2 の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの 1 つの第 2 の 3' 末端部分および第 1 の 5' 部分が、前記第 4 の鎖の前記第 4 の部分の少なくとも前記第 1 の共通ヌクレオチド配列および前記第 2 の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、

10

20

30

40

50

c) 前記 DNA ポリメラーゼが、前記第 3 の鎖の前記第 2 の部分の前記第 1 の共通ヌクレオチド配列および第 2 の共通ヌクレオチド配列にアニーリングされた前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの前記 1 つを伸長させ、前記 DNA ポリメラーゼが、前記第 4 の鎖の前記第 4 の部分の前記第 1 の共通ヌクレオチド配列および第 2 の共通ヌクレオチド配列にアニーリングされた前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの前記 1 つを伸長させて、前記第 3 の鎖、前記第 4 の鎖、第 5 の鎖および第 6 の鎖を含む第 3 の反応混合物であって、前記第 5 の鎖が、5' から 3' 方向に、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの 1 つ、前記第 3 の部分、および前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つのリバース相補体を含み、前記第 6 の鎖が、5' から 3' 方向に、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの 1 つ、前記第 1 の部分、および前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つの前記リバース相補体を含む第 3 の反応混合物を生成するのに十分であること、

10

(v) 前記第 3 の反応混合物を、第 2 の変性持続時間にわたる第 2 の変性温度、第 2 のアニーリング持続時間にわたる第 2 のアニーリング温度、および第 2 の伸長持続時間にわたる第 2 の伸長温度を含む第 3 の条件集合下でインキュベートすることであって、前記第 3 の条件集合は、

a) 二本鎖 DNA を変性させ、

b) 前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つが、前記第 5 の鎖の前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つの前記リバース相補体にアニーリングし、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つが、前記第 6 の鎖の前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つの前記リバース相補体にアニーリングし、

20

c) 前記 DNA ポリメラーゼが、前記第 5 の鎖の前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つの前記リバース相補体にアニーリングされた前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの前記 1 つ、および前記第 6 の鎖の前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの前記 1 つの前記リバース相補体にアニーリングされた前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの前記 1 つを伸長させて、前記第 5 の鎖、前記第 6 の鎖、第 7 の鎖および第 8 の鎖を含む第 4 の反応混合物であって、前記第 7 の鎖が、5' から 3' 方向に、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つ、前記第 1 の部分、および前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの 1 つのリバース相補体を含み、前記第 8 の鎖が、5' から 3' 方向に、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つ、前記第 3 の部分、および前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの 1 つの前記リバース相補体を含み、前記第 7 の鎖が前記第 5 の鎖に相補的であり、前記第 8 の鎖が前記第 6 の鎖に相補的である第 4 の反応混合物を生成するのに十分であること、および

30

(vi) 前記第 4 の反応混合物を、第 3 の変性持続時間にわたる第 3 の変性温度、第 3 のアニーリング持続時間にわたる第 3 のアニーリング温度、および第 3 の伸長持続時間にわたる第 3 の伸長温度を含む第 4 の条件集合下でインキュベートすることであって、前記第 4 の条件集合は、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの少なくとも一部分および前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの少なくとも一部分が、前記第 5 の鎖および第 7 の鎖ならびに前記第 6 の鎖および第 8 の鎖を増幅させるのに十分であることを含む、ライゲーションカップルドポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の方法。

40

【請求項 2】

ステップ (i) ~ (vi) が単一密閉管において実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記部分的に二本鎖の DNA 基質が、約 24 塩基から約 6000 塩基の長さを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

それぞれ前記第 1 の鎖および前記第 2 の鎖の前記第 1 の部分および前記第 3 の部分が、それぞれ約 20 塩基から約 6000 塩基の長さを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 の鎖の前記第 2 の部分および前記第 2 の鎖の前記第 4 の部分が、それぞれ約 4

50

塩基から約 100 塩基の長さを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1 の共通ヌクレオチド配列が、約 1 塩基から約 50 塩基の長さを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記第 1 の共通ヌクレオチド配列が 13 塩基の長さを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 1 の共通ヌクレオチド配列が配列番号 127 (5' - A G A T C G G A A G A G C - 3') の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記第 1 の 3' 末端部分および前記第 2 の 3' 末端部分が、それぞれ配列番号 126 (5' - G C T C T T C C G A T C T - 3') の配列を含む、請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 10】

前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々が、約 20 塩基から約 100 塩基の長さを有し、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々が、約 20 塩基から約 100 塩基の長さを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記第 1 の共通ヌクレオチド配列および前記第 1 の 3' 末端部分が、ライゲーション温度より高い融解温度 (T_m) を有し、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列および前記第 1 の 3' 末端部分が、第 1 のアニーリング温度より低い T_m を有する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 12】

前記第 1 の共通ヌクレオチド配列および前記第 1 の 3' 末端部分の T_m が、前記ライゲーション温度より少なくとも 1°C 高く、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列および前記第 1 の 3' 末端部分の T_m が、前記第 1 のアニーリング温度より少なくとも 1°C 低い、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記第 1 の共通ヌクレオチド配列および前記第 1 の 3' 末端部分が、前記第 1 のアニーリング温度より低い融解温度 (T_m) を有し、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列および前記第 2 の 3' 末端部分が、前記第 1 のアニーリング温度より低い T_m を有する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記第 2 の共通ヌクレオチド配列が、約 1 塩基から約 100 塩基の長さを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記第 2 の共通ヌクレオチド配列が、約 1 塩基から約 20 塩基の長さを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記第 2 の共通ヌクレオチド配列が 20 塩基の長さを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記ライゲーション温度が、前記部分的に二本鎖の DNA 基質の融解温度 (T_m) より少なくとも 1°C 低い、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 18】

前記ライゲーション温度が、前記部分的に二本鎖の DNA 基質の融解温度 (T_m) より低い、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記第 3 の鎖および第 4 の鎖の融解温度 (T_m) が、前記第 1 の変性温度より低い、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記ライゲーション温度が、約 25°C から約 40°C である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

50

前記ライゲーション持続時間が、約 5 分から約 60 分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

前記ライゲーション持続時間が約 20 分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

前記リガーゼが、低マグネシウム緩衝液中でのライゲーションが可能な熱不安定性リガーゼである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

前記リガーゼが T3 DNA リガーゼである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

前記リガーゼが、前記第 1 の反応混合物 50 μ L 当たり約 30 から約 300 の酵素単位で添加される、請求項 24 に記載の方法。 10

【請求項 26】

前記リガーゼが温度感受性であり、ステップ (iv) (a) における前記第 1 の変性持続時間にわたる前記第 1 の変性温度が、前記リガーゼを不活性化させるのに十分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 27】

前記 DNA ポリメラーゼが、Kapa HiFi DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL DNA Polymerase (Takara) および High Fidelity DNA Polymerase (Qiagen) からなる群から選択される、3' ~ 5' エクソヌクレアーゼブルーフリーディング活性を有する熱安定性 DNA ポリメラーゼである、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 28】

前記 DNA ポリメラーゼが、前記ライゲーション温度で活性でない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

前記 DNA ポリメラーゼが、ホットスタート抗体またはアプタマーをさらに含み、前記ホットスタート抗体またはアプタマーが、前記 DNA ポリメラーゼの活性化温度を上昇させる、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記 DNA ポリメラーゼが、Kapa HiFi Hot Start DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 Hot Start DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL Hot Start DNA Polymerase (Takara) および High Fidelity Hot Start DNA Polymerase (Qiagen) からなる群から選択される、請求項 29 に記載の方法。 30

【請求項 31】

前記 DNA ポリメラーゼがホットスタートポリメラーゼであり、ステップ (iv) (a) における前記第 1 の変性持続時間にわたる前記第 1 の変性温度が、前記ホットスタートポリメラーゼを活性化させるのに十分である、請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 32】

前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々、ならびに第 1 の鎖および第 2 の鎖の前記第 2 の部分または前記第 4 の部分の融解温度 (T_m) が、それぞれ、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々、ならびに第 1 の鎖および第 2 の鎖の前記第 2 の部分または前記第 4 の部分の T_m より高い、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 33】

前記第 1 の変性温度、前記第 2 の変性温度および前記第 3 の変性温度が、それぞれ独立して約 95 $^{\circ}$ C から約 98 $^{\circ}$ C である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 34】

前記第 1 の変性持続時間、前記第 2 の変性持続時間および前記第 3 の変性持続時間が、 50

それぞれ独立して約 30 秒から約 2 分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 35】

前記第 1 のアニーリング温度、前記第 2 のアニーリング温度および前記第 3 のアニーリング温度が、それぞれ独立して約 55℃から約 65℃である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 36】

前記第 1 のアニーリング持続時間、前記第 2 のアニーリング持続時間および前記第 3 のアニーリング持続時間が、それぞれ独立して約 10 秒から約 60 秒である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 37】

前記第 1 の伸長温度、前記第 2 の伸長温度および前記第 3 の伸長温度が、それぞれ独立して約 62℃から約 72℃である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 38】

前記第 1 の伸長持続時間、前記第 2 の伸長持続時間および前記第 3 の伸長持続時間が、それぞれ独立して約 30 秒から約 5 分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 39】

前記複数の第 1 のインデキシングプライマーおよび前記複数の第 2 のインデキシングプライマーが、それぞれ独立して約 100 nM から約 1 μM で前記第 1 の反応混合物に添加される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 40】

前記複数の第 1 のインデキシングプライマーおよび前記複数の第 2 のインデキシングプライマーが、それぞれ独立して約 100 nM から約 200 nM で前記第 1 の反応混合物に添加される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 41】

ステップ (ii) が、ブロッカーオリゴヌクレオチドを前記第 1 の反応混合物に添加することをさらに含み、前記ブロッカーオリゴヌクレオチドが、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々の前記第 2 の 3' 末端部分の少なくとも一部分に相補的な 5' 部分を含み、前記ブロッカーオリゴヌクレオチドおよび前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々の融解温度 (T_m) が、前記ライゲーション温度より高く、前記第 1 のアニーリング温度および前記第 3 のアニーリング温度より低い、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 42】

前記ブロッカーオリゴヌクレオチドおよび前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々の前記 T_m が、前記ブロッカーオリゴヌクレオチドおよび前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々の T_m より高い、請求項 41 に記載の方法。

30

【請求項 43】

前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々の前記第 1 の鎖の前記第 1 の 5' 末端へのライゲーションおよび前記第 2 の鎖の前記第 2 の 5' 末端へのライゲーションを抑制するのに十分な量の前記ブロッカーオリゴヌクレオチドが添加される、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 44】

前記ブロッカーオリゴヌクレオチドが、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの量の 1 倍、1.5 倍、2 倍、4 倍または 6 倍の量添加される、請求項 41 に記載の方法。

40

【請求項 45】

前記ブロッカーオリゴヌクレオチドが、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々にプレアニーリングされる、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 46】

前記ブロッカーオリゴヌクレオチドが、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々に相補的であり、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々に相補的でない、5' 部分に対して 3' に位置する第 1 のさらなる部分を含む、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 47】

前記第 1 のさらなる部分と 5' 部分および前記複数の第 2 のインデキシングプライマー

50

の各々との間の融解温度 (T_m) が、前記 5' 部分と前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々および前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々との間の融解温度とほぼ同じ、またはそれより高い、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記第 1 のさらなる部分と前記 5' 部分および前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々との間の前記 T_m が、前記 5' 部分と前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々および前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々との間の融解温度より少なくとも 1℃ 高い、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記ブロックオリゴヌクレオチドが、前記 5' 部分と前記第 1 のさらなる部分との間に位置する第 2 のさらなる部分をさらに含み、前記第 2 のさらなる部分が、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々に相補的でなく、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々に相補的でない、請求項 46～48 のいずれかに記載の方法。

【請求項 50】

前記第 2 のさらなる部分が、約 1 塩基から約 30 塩基の長さを有する、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記ブロックオリゴヌクレオチドが、前記第 2 のインデキシングプライマーの各々に相補的でない配列を含む、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 52】

前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々に相補的でない前記配列が、約 1 塩基から約 30 塩基の長さを有する、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

前記ブロックオリゴヌクレオチドが、ポリメラーゼ伸長を阻害するための 3' 修飾をさらに含む、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 54】

ポリメラーゼ伸長を阻害するための前記 3' 修飾が、C3 炭素スパーサー、ヘキサンジオール、スパーサー 9、スパーサー 18、ホスフェート、2', 3'-ジデオキシヌクレオシド ddA、ddT、ddC および ddG、3'-デオキシヌクレオシド 3'-A、3'-T、3'-C および 3'-G、rU などの RNA ヌクレオチド、3'-O-メチルヌクレオチド、またはポリ T、ポリ A、ポリ C およびポリ G などの、前記隣接するプライマー配列に相補的でない DNA 配列であって、ブルーフリーディングポリメラーゼ 3'～5' エクソヌクレアーゼ活性が、前記隣接するプライマー配列に相補的でない前記 DNA 配列を除去することを防止するためにヌクレアーゼ抵抗性結合をさらに含む DNA 配列からなる群から選択される、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

前記ブロックオリゴヌクレオチドと前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々との間の融解温度 (T_m) が、前記ブロックオリゴヌクレオチドと前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々との間の T_m より低い、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 56】

前記ブロックオリゴヌクレオチドと前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々との間の前記 T_m が、前記ブロックオリゴヌクレオチドと前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々との間の T_m より少なくとも 5℃ 低い、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

前記ブロックオリゴヌクレオチドの前記 5' 部分が、配列番号 127 の配列を含む、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 58】

前記ブロックオリゴヌクレオチドが、3' ヒドロキシル基、および前記第 1 のさらなる部分に対して 3' に位置するヘアピン部分をさらに含み、前記ヘアピン部分が、第 1 の

10

20

30

40

50

ヘアピン配列および第 2 のヘアピン配列を含み、前記第 1 のヘアピン配列が、前記第 2 のヘアピン配列に対して 5' に位置し、前記第 1 のヘアピン配列および前記第 2 のヘアピン配列が相補的であり、前記ヘアピン部分が、前記第 1 のアニーリング温度、前記第 2 のアニーリング温度および前記第 3 のアニーリング温度より高い融解温度を有する、請求項 46 ~ 50 のいずれかに記載の方法。

【請求項 59】

前記ヘアピン部分が、前記第 1 のヘアピン配列と前記第 2 のヘアピン配列との間に位置する第 3 のヘアピン配列をさらに含む、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記第 3 のヘアピン配列が、前記ヘアピン部分および前記第 1 のさらなる部分による安定なステムループ構造の形成を可能にするのに十分なループを形成する、請求項 59 に記載の方法。

10

【請求項 61】

前記第 3 のヘアピン配列が、約 4 塩基から約 20 塩基の長さを有する、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

前記ヘアピン部分の融解温度が、前記 5' 部分と前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々、前記さらなる部分および前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々またはその両方との間の融解温度より高い、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 63】

20

前記第 2 の条件集合は、前記 DNA ポリメラーゼが前記ブロッカーオリゴヌクレオチドの 3' 末端を伸長させて、伸長ヘアピンブロッカーを生成するのにさらに十分である、請求項 58 ~ 60 のいずれかに記載の方法。

【請求項 64】

前記伸長ヘアピンブロッカーが、前記第 2 のアニーリング温度および前記第 3 のアニーリング温度より高い融解温度 (T_m) を有する、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

前記伸長ヘアピンブロッカーが、安定した第 2 の構造を有する、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 66】

30

前記伸長ヘアピンブロッカーの融解温度 (T_m) が、前記 5' 部分および前記第 1 のさらなる部分から前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々までの T_m より高い、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 67】

前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々が、配列番号 87 の配列をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 68】

前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々が、配列番号 78 の配列をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 69】

40

前記第 5 の鎖および第 7 の鎖または前記第 6 の鎖および前記第 8 の鎖をシーケンシングすることをさらに含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 70】

前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々が、第 1 の 5' 末端部分を含み、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々が、第 2 の 5' 末端部分をさらに含み、前記第 1 の 5' 末端部分および前記第 2 の 5' 末端部分の各々が、5' から 3' 方向に、2 つまたはそれより多いデオキシヌクレオチドを含む第 1 の配列および 3 つまたはそれより多いリボヌクレオチドを含む第 2 の配列を含み、前記 DNA ポリメラーゼが 3' から 5' のエクソヌクレアーゼ活性を有し、前記第 5 の鎖および第 6 の鎖が、前記第 5 の鎖および第 6 の鎖の 5' 末端に前記第 2 の 5' 末端部分をさらに含み、前記第 7 の鎖および第 8 の鎖が、

50

前記第 7 の鎖および第 8 の鎖の 5' 末端に前記第 1 の 5' 末端部分をさらに含み、前記第 5 の鎖および第 7 の鎖が、第 1 の 5' オーバーハングおよび第 2 の 5' オーバーハングを有する第 1 の二本鎖生成物を形成することができ、前記第 6 の鎖および第 8 の鎖が、第 3 の 5' オーバーハングおよび第 4 の 5' オーバーハングを有する第 2 の二本鎖生成物を形成することができ、前記方法が、

標的モル量の前記第 5 の鎖、第 6 の鎖、第 7 の鎖および第 8 の鎖を生成するのに十分な量の、前記第 1 の 5' オーバーハング、第 2 の 5' オーバーハング、第 3 の 5' オーバーハングおよび第 4 の 5' オーバーハングの各々に相補的なプローブ、ならびに第 2 のリガーゼを添加することであって、前記標的モル量より多い量の前記第 5 の鎖、第 6 の鎖、第 7 の鎖および第 8 の鎖が存在し、前記プローブが、3' エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素による消化に対する抵抗性を得るための修飾を含むこと、

10

前記第 5 の鎖、第 6 の鎖、第 7 の鎖、第 8 の鎖、第 2 のリガーゼおよびプローブを、前記プローブが、前記標的モル量の第 5 の鎖、第 6 の鎖、第 7 の鎖および第 8 の鎖にライゲーションして、事前正規化反応混合物を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること、

3' エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素を前記事前正規化反応混合物に添加すること、および

前記事前正規化反応混合物およびエクソヌクレアーゼ活性を有する酵素を、前記 3' エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素が、前記プローブにライゲーションしていない前記第 5 の鎖、第 6 の鎖、第 7 の鎖および第 8 の鎖を消化して、正規化次世代シーケンシング (NGS) ライブラリーを生成するのに十分な条件下でインキュベートすること

20

をさらに含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 71】

前記正規化 NGS ライブラリーをシーケンシングすることをさらに含む、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 72】

(i) 第 1 の鎖および第 2 の鎖を含み、第 1 の 3' オーバーハング、二本鎖部分および第 2 の 3' オーバーハングを含む部分的に二本鎖の DNA 基質を提供することであって、

前記第 1 の鎖が、5' から 3' 方向に、第 1 の 5' 末端、第 1 の部分および第 2 の部分を含み、

30

前記第 2 の鎖が、5' から 3' 方向に、第 2 の 5' 末端、第 3 の部分および第 4 の部分を含み、

前記第 1 の鎖の前記第 1 の部分および前記第 2 の鎖の前記第 3 の部分が、相補的であり、前記二本鎖部分を形成し、

前記第 1 の鎖の前記第 2 の部分が、前記第 1 の 3' オーバーハングを形成し、

前記第 2 の鎖の前記第 4 の部分が、前記第 2 の 3' オーバーハングを形成し、

前記第 1 の鎖の前記第 2 の部分および前記第 2 の鎖の前記第 4 の部分が、それぞれ第 1 の 3' オーバーハングおよび前記第 2 の 3' オーバーハングの 5' 末端に位置する第 1 の共通ヌクレオチド配列をそれぞれ含み、

前記第 1 の鎖の前記第 2 の部分および前記第 2 の鎖の前記第 4 の部分が、それぞれ前記第 1 の共通ヌクレオチド配列に対して 3' に位置する第 2 の共通ヌクレオチド配列を含むこと、

40

(ii) 複数の第 1 のインデキシングプライマー、複数の第 2 のインデキシングプライマー、複数の 5' アダプター、リガーゼ、DNA ポリメラーゼおよびデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) を前記部分的に二本鎖の DNA 基質に添加して、第 1 の反応混合物を生成することであって、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々が、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列に相補的でない第 1 の 3' 末端部分を含み、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々が、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列に相補的でない第 2 の 3' 末端部分を含み、前記第 2 の 3' 末端配列が、前記第 2 の共通ヌクレオチド配列に相補的であり、前記複数の 5' アダプターの各々が、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列

50

に相補的な第3の3'末端配列、前記複数の第1のインデキシングプライマーの各々の前記第1の3'末端部分の少なくとも一部分を含む、前記第3の3'末端配列に対して5'に位置する第1の5'部分、前記第1の5'部分に対して5'に位置し、前記第1の5'部分に相補的である第2の5'部分、および前記第1の5'部分の5'末端に位置する前記DNAポリメラーゼを阻害することが可能な複製ブロッカーを含み、前記5'アダプターが、前記第1の5'部分を前記第2の5'部分にアニーリングすることによって形成されるヘアピンを形成することができること、

(iii) 前記第1の反応混合物を、1) 前記第3の3'末端部分が、前記第1の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、2) 前記リガーゼが、前記複数の5'アダプターの1つを前記第1の鎖の前記第1の5'末端および前記第2の鎖の前記第2の5'末端にライゲーションして、

5'から3'方向に、前記複数の5'アダプターの1つ、前記第1の部分および前記第2の部分を含む第3の鎖と、

5'から3'方向に、前記複数の5'アダプターの1つ、前記第3の部分および前記第4の部分を含む第4の鎖と

を含む第2の反応混合物を生成するのに十分な、ライゲーション持続時間にわたるライゲーション温度を含む第1の条件集合下でインキュベートすること、

(iv) 前記第2の反応混合物を、

a) 前記リガーゼを不活性化し、二本鎖DNAを変性させ、必要に応じてDNAポリメラーゼを活性化させ、

b) 前記複数の第2のインデキシングプライマーの1つの前記第2の3'末端部分が、前記第3の鎖の前記第2の部分の前記第2の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、前記複数の第2のインデキシングプライマーの1つが、前記第4の鎖の前記第4の部分の前記第2の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、

c) 前記DNAポリメラーゼが、前記第3の鎖の前記第2の部分の前記第2の共通ヌクレオチド配列にアニーリングされた前記複数の第2のインデキシングプライマーの前記1つを伸長させ、前記第4の鎖の前記第4の部分の前記第2の共通ヌクレオチド配列にアニーリングされた前記複数の第2のインデキシングプライマーの前記1つを伸長させて、前記第3の鎖、前記第4の鎖、第5の鎖、第6の鎖を含む第3の反応混合物であって、前記第5の鎖が、5'から3'方向に、前記複数の第2のインデキシングプライマーの1つ、前記第3の部分、前記第1の共通ヌクレオチド配列のリバース相補体、および前記複数の5'アダプターの1つの前記第1の5'部分のリバース相補体を含み、前記第6の鎖が、5'から3'方向に、前記複数の第2のインデキシングプライマーの1つ、前記第1の部分、前記第1の共通ヌクレオチド配列の前記リバース相補体、および前記複数の5'アダプターの1つの前記第1の5'部分の前記リバース相補体を含む、第3の反応混合物を生成するのに十分な、第1の変性持続時間にわたる第1の変性温度、第1のアニーリング持続時間にわたる第1のアニーリング温度、および第1の伸長持続時間にわたる第1の伸長温度を含む第2の条件集合下でインキュベートすること、

(v) 前記第3の反応混合物を、

a) 任意の二本鎖DNAを変性させ、

b) 前記複数の第1のインデキシングプライマーの1つの前記第1の3'末端部分が、前記第5の鎖の前記複数の5'アダプターの1つの前記第1の5'部分の前記リバース相補体にアニーリングし、前記複数の第1のインデキシングプライマーの1つが、前記第6の鎖の前記複数の5'アダプターの1つの前記第1の5'部分の前記リバース相補体にアニーリングし、

c) 前記DNAポリメラーゼが、前記第5の鎖の前記複数の5'アダプターの1つの前記第1の5'部分の前記リバース相補体にアニーリングされた前記複数の第1のインデキシングプライマーの1つを伸長させ、前記第6の鎖の前記複数の5'アダプターの1つの前記第1の5'部分の前記リバース相補体にアニーリングされた前記複数の第1のインデキシングプライマーの1つを伸長させて、前記第5の鎖、前記第6の鎖、第7の鎖および

20

30

40

50

第 8 の鎖を含む第 4 の反応混合物であって、前記第 7 の鎖が、5' から 3' 方向に、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つ、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列、前記第 1 の部分、および前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの 1 つのリバース相補体を含み、前記第 8 の鎖が、5' から 3' 方向に、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つ、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列、前記第 3 の部分、および前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの 1 つの前記リバース相補体を含む第 4 の反応混合物を生成するのに十分な、第 2 の変性持続時間にわたる第 2 の変性温度、第 2 のアニーリング持続時間にわたる第 2 のアニーリング温度、および第 2 の伸長持続時間にわたる第 2 の伸長温度を含む第 3 の条件集合下でインキュベートすること、

(v i) 前記第 4 の反応混合物を、

a) 任意の二本鎖 DNA を変性させ、

b) 前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの 1 つが、前記第 7 の鎖の前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの 1 つの前記リバース相補体にアニーリングし、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの 1 つが、前記第 8 の鎖の前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの 1 つの前記リバース相補体にアニーリングし、

c) 前記 DNA ポリメラーゼが、前記第 7 の鎖および第 8 の鎖の各々にアニーリングされた前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの前記 1 つを伸長させて、前記第 7 の鎖、前記第 8 の鎖、第 9 の鎖および第 10 の鎖を含む第 5 の反応混合物であって、前記第 9 の鎖が、5' から 3' 方向に、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの 1 つ、前記第 3 の部分、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列の前記リバース相補体、および前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つのリバース相補体を含み、前記第 10 の鎖が、5' から 3' 方向に、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの 1 つ、前記第 1 の部分、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列の前記リバース相補体、および前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つの前記リバース相補体を含み、前記第 7 の鎖および第 9 の鎖が相補的であり、前記第 8 の鎖および第 10 の鎖が相補的である第 5 の反応混合物を生成するのに十分な、第 3 の変性持続時間にわたる第 3 の変性温度、第 3 のアニーリング持続時間にわたる第 3 のアニーリング温度、および第 3 の伸長持続時間にわたる第 3 の伸長温度を含む第 4 の条件集合下でインキュベートすること、および

(v i i) 前記第 5 の反応混合物を、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの少なくとも一部分、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの少なくとも一部分、および前記 DNA ポリメラーゼが、前記第 7 の鎖、第 9 の鎖および第 8 の鎖および第 10 の鎖を増幅させるのに十分な、第 4 の変性持続時間にわたる第 4 の変性温度、第 4 のアニーリング持続時間にわたる第 4 のアニーリング温度、および第 4 の伸長持続時間にわたる第 4 の伸長温度を含む第 5 の条件集合下でインキュベートすることを含む、ライゲーションカップルド PCR の方法。

【請求項 73】

ステップ (i) ~ (v i i) が単一密閉管において実施される、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

前記第 1 の 5' 部分および前記第 2 の 5' 部分が、それぞれ約 12 塩基から約 20 塩基の長さを有する、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 75】

前記複数の 5' アダプターの各々が、前記第 1 の 5' 部分と前記第 2 の 5' 部分の間に介在配列をさらに含む、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 76】

前記介在配列が、約 4 塩基から約 20 塩基の長さを有する、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 77】

前記複製ブロッカーが、安定な脱塩基部位、C3 スペーサー、ヘキサンジオール、スペーサー 9、スペーサー 18、3 つまたはそれより多い rU 塩基、および 2'-O-メチル RNA 塩基からなる群から選択される、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 78】

前記複数の 5'アダプターの各々が、約 25 塩基から約 100 塩基の長さを有する、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 79】

前記部分的に二本鎖の DNA 基質が、約 24 塩基から約 6000 塩基の長さを有する、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 80】

それぞれ前記第 1 の鎖および前記第 2 の鎖の前記第 1 の部分および前記第 3 の部分が、それぞれ約 20 塩基から約 6000 塩基の長さを有する、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 81】

前記第 1 の鎖の前記第 2 の部分および前記第 2 の鎖の前記第 4 の部分が、それぞれ約 4 塩基から約 100 塩基の長さを有する、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 82】

前記第 1 の共通ヌクレオチド配列が、約 1 塩基から約 50 塩基の長さを有する、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 83】

前記第 1 の共通ヌクレオチド配列が、13 塩基の長さを有する、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 84】

前記第 1 の共通ヌクレオチド配列が、配列番号 127 の配列を含む、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 85】

前記複数の 5'アダプターの各々の前記第 3 の 3'末端部分が、配列番号 126 の配列を含む、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 86】

前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々が、約 20 塩基から約 100 塩基の長さを有し、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々が、約 20 塩基から約 100 塩基の長さを有する、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 87】

前記第 1 の共通ヌクレオチド配列および前記第 3 の 3'末端部分が、前記ライゲーション温度より高い融解温度を有する、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 88】

前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々の前記第 2 の 3'末端部分および前記第 2 の共通ヌクレオチド配列が、前記第 1 のアニーリング温度より高い融解温度を有する、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 89】

前記第 1 の共通ヌクレオチド配列および前記第 3 の 3'末端部分の融解温度が、前記ライゲーション温度より少なくとも 1℃高く、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列および前記第 3 の 3'末端部分の前記融解温度が、前記第 1 のアニーリング温度より少なくとも 1℃低い、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 90】

前記第 2 の共通ヌクレオチド配列が、約 1 塩基から約 100 塩基の長さを有する、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 91】

前記第 2 の共通ヌクレオチド配列が、約 1 塩基から約 20 塩基の長さを有する、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 92】

前記第 2 の共通ヌクレオチド配列が、配列番号 95 の配列を含む、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 93】

前記ライゲーション温度が、前記部分的に二本鎖のDNA基質の融解温度より低い、請求項72に記載の方法。

【請求項94】

前記第3および第4の鎖の融解温度が、前記第1の変性温度より低い、請求項72に記載の方法。

【請求項95】

前記ライゲーション温度が、約25℃から約40℃である、請求項72に記載の方法。

【請求項96】

前記ライゲーション持続時間が、約5分から約60分である、請求項72に記載の方法。

【請求項97】

前記ライゲーション持続時間が約20分である、請求項72に記載の方法。

【請求項98】

前記リガーゼが、低マグネシウム緩衝液中でのライゲーションが可能な熱不安定性リガーゼである、請求項72に記載の方法。

【請求項99】

前記リガーゼがT3 DNAリガーゼである、請求項72に記載の方法。

【請求項100】

前記リガーゼが、前記第1の反応混合物50μL当たり約30から約300の酵素単位で添加される、請求項99に記載の方法。

【請求項101】

前記リガーゼが温度感受性であり、前記第1の変性持続時間にわたる前記第1の変性温度が、前記リガーゼを不活性化させるのに十分である、請求項72に記載の方法。

【請求項102】

前記DNAポリメラーゼが、Kapa HiFi DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL DNA Polymerase (Takara) およびHigh Fidelity DNA Polymerase (Qiagen) からなる群から選択される、請求項72に記載の方法。

【請求項103】

前記DNAポリメラーゼが、前記ライゲーション温度で活性でない、請求項72に記載の方法。

【請求項104】

前記DNAポリメラーゼが、ホットスタート抗体またはアプタマーをさらに含み、前記ホットスタート抗体またはアプタマーが、前記DNAポリメラーゼの活性化温度を上昇させる、請求項103に記載の方法。

【請求項105】

前記DNAポリメラーゼが、Kapa HiFi Hot Start DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 D Hot Start DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL Hot Start DNA Polymerase (Takara) およびHigh Fidelity Hot Start DNA Polymerase (Qiagen) からなる群から選択される、請求項104に記載の方法。

【請求項106】

前記DNAポリメラーゼがホットスタートポリメラーゼであり、前記第1の変性持続時間にわたる前記第1の変性温度が、前記ホットスタートポリメラーゼを活性化させるのに十分である、請求項72に記載の方法。

【請求項107】

前記第1の変性温度、前記第2の変性温度、前記第3の変性温度および前記第4の変性温度が、それぞれ独立して約95℃から約98℃である、請求項72に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 108】

前記第1の変性持続時間、前記第2の変性持続時間、前記第3の変性持続時間および前記第4の変性持続時間が、それぞれ独立して約30秒から約2分である、請求項72に記載の方法。

【請求項 109】

前記複数の第1のインデキシングプライマーおよび前記複数の第2のインデキシングプライマーが、それぞれ独立して約100 nMから約1 μMで前記第1の反応混合物に添加される、請求項72に記載の方法。

【請求項 110】

前記複数の第1のインデキシングプライマーおよび前記複数の第2のインデキシングプライマーが、それぞれ独立して約100 nMから約200 nMで前記第1の反応混合物に添加される、請求項72に記載の方法。

10

【請求項 111】

前記第1のアニーリング温度、前記第2のアニーリング温度、前記第3のアニーリング温度および前記第4のアニーリング温度が、それぞれ独立して約55℃から約65℃である、請求項72に記載の方法。

【請求項 112】

前記第1のアニーリング持続時間、前記第2のアニーリング持続時間、前記第3のアニーリング持続時間および前記第4のアニーリング持続時間が、それぞれ独立して約10秒から約60秒である、請求項72に記載の方法。

20

【請求項 113】

前記第1の伸長温度、前記第2の伸長温度、前記第3の伸長温度および前記第4の伸長温度が、それぞれ独立して約60℃から約72℃である、請求項72に記載の方法。

【請求項 114】

前記第1の伸長持続時間、前記第2の伸長持続時間、前記第3の伸長持続時間および前記第4の伸長持続時間が、それぞれ独立して約30秒から約5分である、請求項72に記載の方法。

【請求項 115】

前記複数の第1のインデキシングプライマーの各々が、配列番号87の配列をさらに含む、請求項72に記載の方法。

30

【請求項 116】

前記複数の第2のインデキシングプライマーの各々が、配列番号78の配列をさらに含む、請求項72に記載の方法。

【請求項 117】

前記第7の鎖および第9の鎖または前記第8の鎖および前記第10の鎖をシーケンシングすることをさらに含む、請求項72～116のいずれかに記載の方法。

【請求項 118】

前記複数の第1のインデキシングプライマーの各々が、第1の5'末端部分を含み、前記複数の第2のインデキシングプライマーの各々が、第2の5'末端部分をさらに含み、前記第1の5'末端部分および前記第2の5'末端部分の各々が、5'から3'方向に、2つまたはそれより多いデオキシヌクレオチドを含む第1の配列および3つまたはそれより多いリボヌクレオチドを含む第2の配列を含み、前記DNAポリメラーゼが3'から5'のエクソヌクレアーゼ活性を有し、前記第7の鎖および第8の鎖が、前記第7の鎖および第8の鎖の5'末端に前記第1の5'末端部分をさらに含み、前記第9の鎖および第10の鎖が、前記第9の鎖および第10の鎖の5'末端に前記第2の5'末端部分をさらに含み、前記第7の鎖および第9の鎖が、第1の5'オーバーハングおよび第2の5'オーバーハングを有する第1の二本鎖生成物を形成することができ、前記第8の鎖および第10の鎖が、第3の5'オーバーハングおよび第4の5'オーバーハングを有する第2の二本鎖生成物を形成することができ、前記方法が、

40

標的モル量の前記第7の鎖、第8の鎖、第9の鎖および第10の鎖を生成するのに十分

50

な量の、前記第 1 の 5' オーバーハング、第 2 の 5' オーバーハング、第 3 の 5' オーバーハングおよび第 4 の 5' オーバーハングの各々に相補的なプローブ、ならびに第 2 のリガーゼを添加することであって、前記標的モル量より多い量の前記第 7 の鎖、第 8 の鎖、第 9 の鎖および第 10 の鎖が存在し、前記プローブが、3' エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素による消化に対する抵抗性を得るための修飾を含むこと、

前記第 7 の鎖、第 8 の鎖、第 9 の鎖、第 10 の鎖、リガーゼおよびプローブを、前記プローブが、前記標的モル量の第 7 の鎖、第 8 の鎖、第 9 の鎖および第 10 の鎖にライゲーションして、事前正規化反応混合物を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること、

3' エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素を前記事前正規化反応混合物に添加すること、および

前記事前正規化反応混合物およびエクソヌクレアーゼ活性を有する酵素を、前記 3' エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素が、前記プローブにライゲーションしていない前記第 7 の鎖、第 8 の鎖、第 9 の鎖および第 10 の鎖を消化して、正規化次世代シーケンシング (NGS) ライブラリーを生成するのに十分な条件下でインキュベートすること

をさらに含む、請求項 72 ~ 117 のいずれかに記載の方法。

【請求項 119】

第 1 の開始鎖および第 2 の開始鎖を含む開始二本鎖 DNA 基質分子を提供することであって、前記開始二本鎖 DNA 基質分子の前記第 1 の開始鎖が、前記第 1 の開始鎖の 5' 末端にユニバーサルプライマー配列を含み、前記ユニバーサルプライマー配列が、前記ユニバーサルプライマー配列の内部またはその 3' 末端に dU 塩基を含み、前記開始二本鎖 DNA 基質分子の前記第 2 の開始鎖が、前記第 2 の開始鎖の 5' 末端に前記ユニバーサルプライマー配列を含むこと、

前記開始二本鎖 DNA 基質分子の前記 dU 塩基を開裂することが可能な酵素を添加すること、および

前記 dU 塩基および開始二本鎖 DNA 基質分子を開裂することが可能な前記酵素を、ステップ (i) の前記部分的に二本鎖の DNA 基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること

をステップ (i) の前にさらに含む、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 120】

前記 dU 塩基を開裂することが可能な前記酵素が、ウラシル DNA グリコシラーゼとエンドヌクレアーゼ VII の組合せである、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 121】

第 1 の開始鎖および第 2 の開始鎖を含む開始二本鎖 DNA 基質分子を提供することであって、前記開始二本鎖 DNA 基質分子の前記第 1 の開始鎖が、第 1 の 5' 開裂可能配列を含み、前記第 1 の 5' 開裂可能配列が、前記第 1 の 5' 開裂可能配列の内部またはその 3' 末端にリボヌクレオチドを含み、前記二本鎖 DNA 基質分子の前記第 2 の開始鎖が、第 2 の 5' 開裂可能配列を含み、前記第 2 の 5' 開裂可能配列が、前記第 2 の 5' 開裂可能配列の内部またはその 3' 末端にリボヌクレオチドを含むこと、

前記第 1 の 5' 開裂可能配列および前記第 2 の 5' 開裂可能配列の前記リボヌクレオチドを開裂することが可能な酵素を添加すること、および

前記第 1 の 5' 開裂可能配列および前記第 2 の 5' 開裂可能配列のリボヌクレオチドを開裂することが可能な酵素ならびに前記開始二本鎖 DNA 基質分子を、ステップ (i) の前記部分的に二本鎖の DNA 基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること

をステップ (i) の前にさらに含む、請求項 1 ~ 118 のいずれかに記載の方法。

【請求項 122】

前記第 1 の 5' 開裂可能配列および前記第 2 の 5' 開裂可能配列の前記リボヌクレオチドを開裂することが可能な前記酵素が RNアーゼ H である、請求項 121 に記載の方法。

【請求項 123】

第 1 の開始鎖および第 2 の開始鎖を含む開始二本鎖 DNA 基質分子を提供することであ

10

20

30

40

50

って、前記開始二本鎖DNA基質分子の前記第1の開始鎖が、第1の5'開裂可能配列を含み、前記第1の5'開裂可能配列が、前記第1の5'開裂可能配列の内部またはその3'末端にイノシン塩基を含み、前記二本鎖DNA基質分子の前記第2の開始鎖が、第2の5'開裂可能配列を含み、前記第2の5'開裂可能配列が、前記第2の5'開裂可能配列の内部またはその3'末端にイノシン塩基を含むこと、

前記第1の5'開裂可能配列および前記第2の5'開裂可能配列の前記イノシン塩基を開裂することが可能な酵素を添加すること、および

前記第1の5'開裂可能配列および前記第2の5'開裂可能配列の前記イノシン塩基を開裂することが可能な前記酵素ならびに前記開始二本鎖DNA基質分子を、ステップ(i)の前記部分的に二本鎖のDNA基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること

10

をステップ(i)の前にさらに含む、請求項1~118のいずれかに記載の方法。

【請求項124】

前記イノシン塩基を開裂することが可能な前記酵素がエンドヌクレアーゼVである、請求項123に記載の方法。

【請求項125】

断片化DNA基質分子を提供すること、

末端修復を実施して、第1の開始鎖および第2の開始鎖を含む平滑末端化二本鎖開始DNA基質分子を生成することであって、前記第1の開始鎖および前記第2の開始鎖の各々が5'末端および3'末端を含むこと、

20

各3'アダプター鎖が、dU塩基および3'ブロック基を含む相補鎖にアニーリングされた、5'ホスフェートを含む複数の3'アダプター鎖、ならびにリガーゼを前記平滑末端化二本鎖開始DNA基質分子に添加すること、

dU塩基を含む相補鎖にアニーリングされた前記複数の3'アダプター鎖、前記リガーゼおよび前記平滑末端化二本鎖開始DNA基質分子を、前記複数の3'アダプター鎖の1つを前記平滑末端化開始DNA基質分子の第1の鎖および第2の鎖の各3'末端にライゲーションし、各相補鎖と前記第1の開始鎖および第2の開始鎖の各5'末端との間に切れ目を残して、ライゲーションされた二本鎖基質分子を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること、

必要に応じて前記ライゲーションされた二本鎖基質分子を精製すること、

30

前記ライゲーションされた二本鎖基質分子の前記dU塩基を開裂することが可能な酵素を、前記ライゲーションされた二本鎖基質分子に添加すること、および

前記dU塩基を開裂することが可能な前記酵素および前記ライゲーションされた二本鎖基質分子を、前記相補鎖を開裂して、ステップ(i)の前記部分的に二本鎖のDNA基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること

をさらに含む、請求項1~118のいずれかに記載の方法。

【請求項126】

前記dU塩基を開裂することが可能な前記酵素が、ウラシルDNAグリコシレートとエンドヌクレアーゼVIIの組合せである、請求項125に記載の方法。

【請求項127】

40

断片化DNA基質分子を提供すること、

末端修復を実施して、第1の開始鎖および第2の開始鎖を含む平滑末端化二本鎖開始DNA基質分子を生成することであって、前記第1の開始鎖および前記第2の開始鎖の各々が5'末端および3'末端を含むこと、

各3'アダプター鎖が、リボヌクレオチドおよび3'ブロック基を含む相補鎖にアニーリングされた、5'ホスフェートを含む複数の3'アダプター鎖、ならびにリガーゼを前記平滑末端化二本鎖開始DNA基質分子に添加すること、

リボヌクレオチドを含む相補鎖にアニーリングされた前記複数の3'アダプター鎖、前記リガーゼおよび前記平滑末端化二本鎖開始DNA基質分子を、前記複数の3'アダプター鎖の1つを前記平滑末端化開始DNA基質分子の第1の開始鎖および第2の開始鎖の各

50

3'末端にライゲーションし、各相補鎖と前記第1の開始鎖および第2の開始鎖の各5'末端との間に切れ目を残して、ライゲーションされた二本鎖基質分子を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること、

必要に応じて前記ライゲーションされた二本鎖基質分子を精製すること、

前記ライゲーションされた二本鎖基質分子の前記リボヌクレオチドを開裂することが可能な酵素を、前記ライゲーションされた二本鎖基質分子に添加すること、および

前記リボヌクレオチドを開裂することが可能な前記酵素および前記ライゲーションされた二本鎖基質分子を、前記相補鎖を開裂して、ステップ(i)の前記部分的に二本鎖のDNA基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること

をさらに含む、請求項1～118のいずれかに記載の方法。

10

【請求項128】

前記リボヌクレオチドを開裂することが可能な前記酵素がRNアーゼHである、請求項127に記載の方法。

【請求項129】

断片化DNA基質分子を提供すること、

末端修復を実施して、第1の鎖および第2の鎖を含む平滑末端化二本鎖開始DNA基質分子を生成することであって、前記第1の鎖および前記第2の鎖の各々が5'末端および3'末端を含むこと、

各3'アダプター鎖が、イノシン塩基および3'ブロック基を含む相補鎖にアニーリングされた、5'ホスフェートを含む複数の3'アダプター鎖、ならびにリガーゼを前記平滑末端化二本鎖開始DNA基質分子に添加すること、

イノシン塩基を含む相補鎖にアニーリングされた前記複数の3'アダプター鎖、前記リガーゼおよび前記平滑末端化二本鎖開始DNA基質分子を、前記複数の3'アダプター鎖の1つを前記平滑末端化開始DNA基質分子の第1の鎖および第2の鎖の各3'末端にライゲーションし、各相補鎖と前記第1および第2の鎖の各5'末端との間に切れ目を残して、ライゲーションされた二本鎖基質分子を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること、

必要に応じて前記ライゲーションされた二本鎖基質分子を精製すること、

前記ライゲーションされた二本鎖基質分子の前記イノシン塩基を開裂することが可能な酵素を、前記ライゲーションPCR反応混合物に添加すること、および

前記イノシン塩基を開裂することが可能な前記酵素および前記ライゲーションされた二本鎖基質分子を、前記相補鎖を開裂して、ステップ(i)の前記部分的に二本鎖のDNA基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること

をさらに含む、請求項1～118のいずれかに記載の方法。

30

【請求項130】

前記イノシン塩基を開裂することが可能な前記酵素がエンドヌクレアーゼVである、請求項129に記載の方法。

【請求項131】

断片化DNA基質分子を提供すること、

末端修復および断片化DNA基質分子のAテーリングを実施して、第1の開始鎖および第2の開始鎖を含む単一Aテールド二本鎖開始DNA基質分子を生成することであって、前記第1の開始鎖および前記第2の開始鎖の各々が、5'末端および3'末端を含み、前記単一Aテールド二本鎖開始DNA基質分子が、各3'末端に単一A塩基オーバーハングを含むこと、

各3'アダプター鎖が、3'末端dU塩基および3'ヒドロキシル基を含む相補鎖にアニーリングされた、5'ホスフェートを含む複数の3'アダプター鎖、ならびにリガーゼを前記単一Aテールド二本鎖開始DNA基質分子に添加すること、

3'末端dU塩基を含む相補鎖にアニーリングされた前記複数の3'アダプター鎖、前記リガーゼおよび前記単一Aテールド二本鎖開始DNA基質分子を、前記複数の3'アダプター鎖の1つを各単一A塩基オーバーハングにライゲーションし、前記相補鎖の1つを前

40

50

記単一 A テール二本鎖開始 DNA 基質分子の各 5' 末端にライゲーションして、ライゲーションされた二本鎖基質分子を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること、必要に応じて前記ライゲーションされた二本鎖基質分子を精製すること、

d U 塩基を開裂することが可能な酵素を、前記ライゲーションされた二本鎖基質分子に添加すること、および

d U 塩基を開裂することが可能な前記酵素および前記ライゲーションされた二本鎖基質分子を、前記相補鎖を開裂して、ステップ (i) の前記部分的に二本鎖の DNA 基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること

をさらに含む、請求項 1 ~ 118 のいずれかに記載の方法。

【請求項 132】

10

前記 d U 塩基を開裂することが可能な前記酵素が、ウラシル DNA グリコシレートとエンドヌクレアーゼ VII の組合せである、請求項 131 に記載の方法。

【請求項 133】

前記相補鎖が、相補鎖の内部にさらなる d U 塩基を含む、請求項 131 に記載の方法。

【請求項 134】

断片化 DNA 基質分子を提供すること、

末端修復および断片化 DNA 基質分子の A テーリングを実施して、第 1 の開始鎖および第 2 の開始鎖を含む単一 A テール二本鎖開始 DNA 基質分子を生成することであって、前記第 1 の開始鎖および前記第 2 の開始鎖の各々が、5' 末端および 3' 末端を含み、前記単一 A テール二本鎖開始 DNA 基質分子が、各 3' 末端に単一 A 塩基オーバーハングを含むこと、

20

各 3' アダプター鎖が、3' 末端 T 塩基、3' ヒドロキシル基および d U 塩基を含む相補鎖にアニーリングされた、5' ホスフェートを含む複数の 3' アダプター鎖、ならびにリガーゼを前記単一 A テール二本鎖開始 DNA 基質分子に添加すること、

3' 末端 T 塩基を含む相補鎖にアニーリングされた前記複数の 3' アダプター鎖、前記リガーゼおよび前記単一 A テール二本鎖開始 DNA 基質分子を、前記複数の 3' アダプター鎖の 1 つを各単一 A 塩基オーバーハングにライゲーションし、前記相補鎖の 1 つを前記単一 A テール二本鎖開始 DNA 基質分子の各 5' 末端にライゲーションして、ライゲーションされた二本鎖基質分子を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること、

必要に応じて前記ライゲーションされた二本鎖基質分子を精製すること、

30

d U 塩基を開裂することが可能な酵素を、前記ライゲーションされた二本鎖基質分子に添加すること、および

前記 d U 塩基を開裂することが可能な前記酵素および前記ライゲーションされた二本鎖基質分子を、前記相補鎖を開裂して、ステップ (i) の前記部分的に二本鎖の DNA 基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること

をさらに含む、請求項 1 ~ 118 のいずれかに記載の方法。

【請求項 135】

前記 d U 塩基を開裂することが可能な前記酵素が、ウラシル DNA グリコシレートとエンドヌクレアーゼ VII の組合せである、請求項 134 に記載の方法。

【請求項 136】

40

標的 DNA を断片化して、前記断片化 DNA 基質分子を生成することをさらに含む、請求項 125 ~ 135 のいずれかに記載の方法。

【請求項 137】

ステップ (i) ~ (v i) または (i) ~ (v i i) の間に精製が実施されない、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 138】

(i) 第 1 の鎖および第 2 の鎖を含む二本鎖 DNA 基質を提供することであって、前記第 1 の鎖が、第 1 の 3' 末端部分および第 1 の 5' 末端部分を含み、前記第 2 の鎖が、第 2 の 3' 末端部分および第 2 の 5' 末端部分を含むこと、

(i i) リガーゼ、第 1 のオリゴヌクレオチド、第 2 のオリゴヌクレオチド、第 3 のオ

50

リゴヌクレオチド、第1のプライマー、DNAポリメラーゼおよびデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)を前記二本鎖DNA基質に添加して、第1の反応混合物を生成することであって、前記第1のオリゴヌクレオチドが、前記第1の鎖の前記第1の3'末端部分の少なくとも一部分に相補的な第3の3'末端部分、および5'ホスフェートを含み、前記第3のオリゴヌクレオチドが、第1の3'ブロック基を含み、前記第1のプライマーが、前記第2の鎖の前記第2の3'末端部分の少なくとも一部分に相補的な第4の3'末端部分を含み、前記第1の3'ブロック基がポリメラーゼ連鎖伸長の能力がなく、前記第2のオリゴヌクレオチドが、前記第3のオリゴヌクレオチドの3'部分に相補的な3'部分を有し、前記第1のオリゴヌクレオチドが、前記第3のオリゴヌクレオチドの5'部分に相補的な5'部分を有すること、

10

(iii) 前記第1の反応混合物を、前記第1のオリゴヌクレオチドおよび前記第2のオリゴヌクレオチドが、3'-5'方向に前記第3のオリゴヌクレオチドにアニーリングして、前記第1のプライマー、前記二本鎖DNA基質、および前記第2のオリゴヌクレオチドにライゲーションされた前記第1のオリゴヌクレオチドを含む第2のプライマーを含む第2の反応混合物を生成するのに十分な、ライゲーション持続時間にわたるライゲーション温度を含む第1の条件集合下でインキュベートすること、および

(iv) 各サイクルが、独立して、変性持続時間にわたる変性温度、アニーリング持続時間にわたるアニーリング温度、および伸長持続時間にわたる伸長温度を含む少なくとも3回のPCRサイクルを前記第2の反応混合物に施して、前記第2のプライマーを二本鎖ライブラリー分子の第1の5'末端に含み、前記第1のプライマーを前記二本鎖ライブラリー分子の第2の5'末端に含む前記二本鎖ライブラリー分子を含む第3の反応混合物を生成すること

20

を含む、ライゲーションカップルドポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の方法。

【請求項139】

(v) さらにPCRサイクルを前記第3の反応混合物に施して、前記二本鎖ライブラリー分子を増幅させることをさらに含む、請求項138に記載の方法。

【請求項140】

前記ライゲーション温度が、前記二本鎖DNA基質の融解温度より低い、請求項138に記載の方法。

【請求項141】

前記ライゲーション温度が、前記第1のオリゴヌクレオチドおよび前記第3のオリゴヌクレオチドの融解温度より低く、前記ライゲーション温度が、前記第2のオリゴヌクレオチドおよび第3のオリゴヌクレオチドの融解温度より低い、請求項138に記載の方法。

30

【請求項142】

前記リガーゼが低マグネシウムPCR緩衝液中でのライゲーションが可能な熱不安定性リガーゼである、請求項138に記載の方法。

【請求項143】

前記リガーゼがT3 DNAリガーゼである、請求項138に記載の方法。

【請求項144】

前記リガーゼが、前記第1の反応混合物50μL当たり約30から約300の酵素単位で添加される、請求項143に記載の方法。

40

【請求項145】

前記リガーゼが温度感受性であり、ステップ(iv)における前記少なくとも3回のPCRサイクルの最初のサイクル時の変性温度が、前記リガーゼを不活性化させるのに十分である、請求項138に記載の方法。

【請求項146】

ステップ(ii)が、第4のオリゴヌクレオチドおよび第5のオリゴヌクレオチドを添加することをさらに含み、前記第2のオリゴヌクレオチドが、5'ホスフェートをさらに含み、前記第5のオリゴヌクレオチドが、ポリメラーゼ連鎖伸長の能力がない第2の3'ブロック基を含み、前記第5のオリゴヌクレオチドが、前記第2のオリゴヌクレオチ

50

ドの 5' 部分に相補的な 5' 部分、および前記第 4 のオリゴヌクレオチドの 3' 部分に相補的な 3' 部分をさらに含み、前記第 1 の条件集合は、前記第 2 のオリゴヌクレオチドおよび前記第 4 のオリゴヌクレオチドが前記第 5 のオリゴヌクレオチドにアニーリングし、前記リガーゼが、前記第 4 のオリゴヌクレオチドを前記第 2 のオリゴヌクレオチドにライゲーションすることにより、5' から 3' 方向に、前記第 4 のオリゴヌクレオチド、前記第 2 のオリゴヌクレオチドおよび前記第 1 のオリゴヌクレオチドを含む前記第 2 のプライマーを生成するのにさらに十分である、請求項 138 に記載の方法。

【請求項 147】

前記ライゲーション温度が、前記第 2 のオリゴヌクレオチドおよび前記第 5 のオリゴヌクレオチドの融解温度より低く、前記ライゲーション温度が、前記第 4 のオリゴヌクレオチドおよび前記第 5 のオリゴヌクレオチドの融解温度より低い、請求項 146 に記載の方法。

10

【請求項 148】

前記第 2 の 3' ブロッキング基が、C3 スペース、ヘキサンジオール、スペース 9、スペース 18、3 つまたはそれより多い rU 塩基、ホスフェートおよび 2'-O-メチル塩基から選択される、請求項 146 に記載の方法。

【請求項 149】

前記第 4 のオリゴヌクレオチドが、約 5 から約 100 塩基の長さを有する、請求項 146 に記載の方法。

【請求項 150】

前記第 5 のオリゴヌクレオチドが、約 10 から約 50 塩基の長さを有する、請求項 146 に記載の方法。

20

【請求項 151】

前記第 5 のオリゴヌクレオチドおよび前記第 4 のオリゴヌクレオチドおよび第 2 のオリゴヌクレオチドの融解温度が、前記アニーリング温度および前記伸長温度より低い、請求項 146 に記載の方法。

【請求項 152】

ステップ (i) ~ (iv) が同じ管で実施される、請求項 138 ~ 151 のいずれかに記載の方法。

【請求項 153】

ステップ (iii) とステップ (iv) の間に精製が実施されない、請求項 138 ~ 151 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 154】

前記第 1 のオリゴヌクレオチドが、約 5 から約 100 塩基の長さを有する、請求項 138 ~ 153 のいずれかに記載の方法。

【請求項 155】

前記第 2 のオリゴヌクレオチドが、約 5 から約 100 塩基の長さを有する、請求項 138 ~ 154 のいずれかに記載の方法。

【請求項 156】

前記第 3 のオリゴヌクレオチドが、約 10 から約 50 塩基の長さを有する、請求項 138 ~ 155 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 157】

前記第 1 の 3' ブロッキング基が、C3 スペース、ヘキサンジオール、スペース 9、スペース 18、3 つまたはそれより多い rU 塩基、ホスフェートおよび 2'-O-メチル塩基から選択される、請求項 138 ~ 156 のいずれかに記載の方法。

【請求項 158】

前記 DNA ポリメラーゼが、Kapa HiFi DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL DNA Polymerase (Takara) および High Fidelity DNA Polymerase (Qiagen) からなる群から選択される

50

、請求項 138～157 のいずれかに記載の方法。

【請求項 159】

前記 DNA ポリメラーゼが、前記ライゲーション温度で活性でない、請求項 138～157 のいずれかに記載の方法。

【請求項 160】

前記 DNA ポリメラーゼが、ホットスタート抗体またはアプタマーをさらに含み、前記ホットスタート抗体またはアプタマーが、前記 DNA ポリメラーゼの活性温度を上昇させる、請求項 159 に記載の方法。

【請求項 161】

前記 DNA ポリメラーゼが、Kapa HiFi Hot Start DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 Hot Start DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL Hot Start DNA Polymerase (Takara) および High Fidelity Hot Start DNA Polymerase (Qiagen) からなる群から選択される、請求項 160 に記載の方法。

10

【請求項 162】

前記 DNA ポリメラーゼが、ホットスタートポリメラーゼであり、ステップ (iv) における前記少なくとも 3 回の PCR サイクルの最初のサイクル時の変性温度が、前記 DNA ポリメラーゼを活性化させるのに十分である、請求項 138～157 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 163】

前記ライゲーション温度が、約 25℃ から約 40℃ である、請求項 138～162 のいずれかに記載の方法。

【請求項 164】

前記少なくとも 3 回の PCR サイクル時の前記変性温度が、独立して、約 95℃ から約 98℃ である、請求項 138～163 のいずれかに記載の方法。

【請求項 165】

前記少なくとも 3 回の PCR サイクル時の前記アニーリング温度が、独立して、約 55℃ から約 65℃ である、請求項 138～164 のいずれかに記載の方法。

【請求項 166】

前記少なくとも 3 回の PCR サイクル時の前記伸長温度が、独立して、約 62℃ から約 72℃ である、請求項 138～165 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 167】

前記少なくとも 3 回の PCR サイクル時の前記変性持続時間が、独立して、約 30 秒から約 2 分である、請求項 138～166 のいずれかに記載の方法。

【請求項 168】

(i) 第 1 の鎖および第 2 の鎖を含む二本鎖 DNA 基質を提供することであって、前記第 1 の鎖が、第 1 の 3' 末端部分および第 1 の 5' 末端部分を含み、前記第 2 の鎖が、第 2 の 3' 末端部分および第 2 の 5' 末端部分を含むこと、

(ii) リガーゼ、第 1 のオリゴヌクレオチド、第 2 のオリゴヌクレオチド、第 3 のオリゴヌクレオチド、第 4 のオリゴヌクレオチド、第 5 のオリゴヌクレオチド、第 6 のオリゴヌクレオチド、DNA ポリメラーゼおよびデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) を前記二本鎖 DNA 基質に添加して、第 1 の反応混合物を生成することであって、前記第 1 のオリゴヌクレオチドが、前記第 1 の鎖の前記第 1 の 3' 末端部分の少なくとも一部分に相補的な第 3 の 3' 末端部分、および 5' ホスフェートを含み、前記第 3 のオリゴヌクレオチドが、第 1 の 3' ブロッキング基を含み、前記第 2 のオリゴヌクレオチドが、前記第 3 のオリゴヌクレオチドの 3' 部分に相補的な 3' 部分を有し、前記第 1 のオリゴヌクレオチドが、前記第 3 のオリゴヌクレオチドの 5' 部分に相補的な 5' 部分を有し、前記第 4 のオリゴヌクレオチドが、前記第 2 の鎖の前記第 2 の 3' 末端部分の少なくとも一部分に相補的な第 4 の 3' 末端部分、および 5' ホスフェートを含み、前記第 6 のオリゴヌクレオチ

40

50

ドが、前記第4のオリゴヌクレオチドの5'部分に相補的な5'部分、前記第5のオリゴヌクレオチドの3'部分に相補的な3'部分、および第2の3'ブロック基を含み、前記第1の3'ブロック基および前記第2の3'ブロック基が、ポリメラーゼ連鎖伸長の能力がないこと、

(iii) 前記第1の反応混合物を、前記第1のオリゴヌクレオチドおよび前記第2のオリゴヌクレオチドが、3'→5'方向に前記第3のオリゴヌクレオチドにアニーリングし、前記第4のオリゴヌクレオチドおよび前記第5のオリゴヌクレオチドが、3'→5'方向に前記第6のオリゴヌクレオチドにアニーリングして、前記第5のオリゴヌクレオチドにライゲーションされた前記第4のオリゴヌクレオチドを含む第1のプライマー、前記二本鎖DNA基質、および前記第2のオリゴヌクレオチドにライゲーションされた前記第1のオリゴヌクレオチドを含む第2のプライマーを含む第2の反応混合物を生成するのに十分な、ライゲーション持続時間にわたるライゲーション温度を含む第1の条件集合下でインキュベートすること、

10

(iv) 各サイクルが、独立して、変性持続時間にわたる変性温度、アニーリング持続時間にわたるアニーリング温度、および伸長持続時間にわたる伸長温度を含む少なくとも3回のPCRサイクルを前記第2の反応混合物に施して、前記第2のプライマーを二本鎖ライブラリー分子の第1の5'末端に含み、前記第1のプライマーを前記二本鎖ライブラリー分子の第2の5'末端に含む前記二本鎖ライブラリー分子を含む第3の反応混合物を生成すること

を含む、ライゲーションカップルドポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の方法。

20

【請求項169】

(v) さらにPCRサイクルを前記第3の反応混合物に施して、前記二本鎖ライブラリー分子を増幅させることをさらに含む、請求項168に記載の方法。

【請求項170】

前記ライゲーション温度が、前記二本鎖DNA基質の融解温度より低い、請求項168に記載の方法。

【請求項171】

前記ライゲーション温度が、前記第1のオリゴヌクレオチドおよび前記第3のオリゴヌクレオチドの融解温度より低く、前記ライゲーション温度が、前記第2のオリゴヌクレオチドおよび前記第3のオリゴヌクレオチドの融解温度より低く、前記ライゲーション温度が、前記第4のオリゴヌクレオチドおよび第6のオリゴヌクレオチドの融解温度より低く、前記ライゲーション温度が、前記第5のオリゴヌクレオチドおよび第6のオリゴヌクレオチドの融解温度より低い、請求項168に記載の方法。

30

【請求項172】

前記リガーゼが、低マグネシウムPCR緩衝液中でのライゲーションが可能な熱不安定性リガーゼである、請求項168に記載の方法。

【請求項173】

前記リガーゼがT3 DNAリガーゼである、請求項168に記載の方法。

【請求項174】

前記リガーゼが、前記第1の反応混合物50 μL当たり約30から約300の酵素単位で添加される、請求項173に記載の方法。

40

【請求項175】

前記リガーゼが温度感受性であり、ステップ(iv)における前記少なくとも3回のPCRサイクルの最初のサイクル時の変性温度が、前記リガーゼを不活性化させるのに十分である、請求項168に記載の方法。

【請求項176】

前記第1の3'ブロック基および前記第2の3'ブロック基が、それぞれ独立して、C3スペーサー、ヘキサンジオール、スペーサー9、スペーサー18、3つまたはそれより多いrU塩基、ホスフェートおよび2'-O-メチル塩基から選択される、請求項168～175のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 177】

前記第1のオリゴヌクレオチドおよび前記第2のオリゴヌクレオチドおよび前記第3のオリゴヌクレオチドの融解温度が、前記アニーリング温度および前記伸長温度より低く、前記第4のオリゴヌクレオチドおよび前記第5のオリゴヌクレオチドおよび前記第6のオリゴヌクレオチドの融解温度が、前記アニーリング温度および前記伸長温度より低い、請求項168～176のいずれかに記載の方法。

【請求項 178】

ステップ(i)～(iv)が同じ管で実施される、請求項168～177のいずれかに記載の方法。

【請求項 179】

ステップ(iii)とステップ(iv)の間に精製が実施されない、請求項168～177のいずれかに記載の方法。

【請求項 180】

前記第1のオリゴヌクレオチドが、約5塩基から約100塩基の長さを有する、請求項138～179のいずれかに記載の方法。

【請求項 181】

前記第2のオリゴヌクレオチドが、約5塩基から約100塩基の長さを有する、請求項138～180のいずれかに記載の方法。

【請求項 182】

前記第3のオリゴヌクレオチドが、約10塩基から約50塩基の長さを有する、請求項138～181のいずれかに記載の方法。

【請求項 183】

前記第4のオリゴヌクレオチドが、約5塩基から約100塩基の長さを有する、請求項138～182のいずれかに記載の方法。

【請求項 184】

前記第5のオリゴヌクレオチドが、約5塩基から約100塩基の長さを有する、請求項138～183のいずれかに記載の方法。

【請求項 185】

前記第6のオリゴヌクレオチドが、約10塩基から約50塩基の長さを有する、請求項138～184のいずれかに記載の方法。

【請求項 186】

前記第1の3'ブロック基および前記第2の3'ブロック基が、それぞれ独立して、C3スペーサー、ヘキサンジオール、スペーサー9、スペーサー18、3つまたはそれより多いrU塩基、ホスフェートおよび2'-O-メチル塩基からなる群から選択される、請求項138～185のいずれかに記載の方法。

【請求項 187】

前記DNAポリメラーゼが、Kapa HiFi DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL DNA Polymerase (Takara) および High Fidelity DNA Polymerase (Qiagen) からなる群から選択される、請求項138～186のいずれかに記載の方法。

【請求項 188】

前記DNAポリメラーゼが、前記ライゲーション温度で活性でない、請求項138～186のいずれかに記載の方法。

【請求項 189】

前記DNAポリメラーゼが、ホットスタート抗体またはアプタマーをさらに含み、前記ホットスタート抗体またはアプタマーが、前記DNAポリメラーゼの活性化温度を上昇させる、請求項188に記載の方法。

【請求項 190】

前記DNAポリメラーゼが、Kapa HiFi Hot Start DNA Po

10

20

30

40

50

lymerase (Roche)、NEB Q5 Hot Start DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL Hot Start DNA Polymerase (Takara) および High Fidelity Hot Start DNA Polymerase (Qiagen) からなる群から選択される、請求項 189 に記載の方法。

【請求項 191】

前記 DNA ポリメラーゼがホットスタートポリメラーゼであり、ステップ (iv) における前記少なくとも 3 回の PCR サイクルの最初のサイクル時の変性温度が、前記 DNA ポリメラーゼを活性化させるのに十分である、請求項 138 ~ 186 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 192】

前記ライゲーション温度が、約 25 °C から約 40 °C である、請求項 138 ~ 191 のいずれかに記載の方法。

【請求項 193】

前記少なくとも 3 回の PCR サイクル時の前記変性温度が、独立して、約 95 °C から約 98 °C である、請求項 138 ~ 192 のいずれかに記載の方法。

【請求項 194】

前記少なくとも 3 回の PCR サイクル時の前記アニーリング温度が、独立して、約 55 °C から約 65 °C である、請求項 138 ~ 193 のいずれかに記載の方法。

【請求項 195】

前記少なくとも 3 回の PCR サイクル時の伸長温度が、独立して、約 62 °C から約 72 °C である、請求項 138 ~ 194 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 196】

前記少なくとも 3 回の PCR サイクル時の変性持続時間が、独立して、約 30 秒から約 2 分である、請求項 138 ~ 195 のいずれかに記載の方法。

【請求項 197】

前記少なくとも 3 回の PCR サイクルの前記最初のサイクル時の変性温度が、前記二本鎖 DNA 基質の融解温度より高い、請求項 138 ~ 196 のいずれかに記載の方法。

【請求項 198】

ステップ (ii) が、第 7 のオリゴヌクレオチドおよび第 8 のオリゴヌクレオチドを添加することをさらに含み、前記第 2 のオリゴヌクレオチドが、5' ホスフェートをさらに含み、前記第 8 のオリゴヌクレオチドが、ポリメラーゼ連鎖伸長の能力がない第 3 の 3' ブロッキング基を含み、前記第 8 のオリゴヌクレオチドが、前記第 7 のオリゴヌクレオチドの 3' 部分に相補的な 3' 部分、および前記第 2 のオリゴヌクレオチドに相補的な 5' 部分をさらに含み、前記第 1 の条件集合は、前記第 7 のオリゴヌクレオチドおよび前記第 2 のオリゴヌクレオチドが前記第 8 のオリゴヌクレオチドにアニーリングし、前記リガーゼが、前記第 7 のオリゴヌクレオチドを前記第 2 のオリゴヌクレオチドにライゲーションすることにより、5' から 3' 方向に、前記第 7 のオリゴヌクレオチド、前記第 2 のオリゴヌクレオチドおよび前記第 1 のオリゴヌクレオチドを含む前記第 2 のプライマーを生成するのにさらに十分である、請求項 138 ~ 197 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 199】

前記ライゲーション温度が、前記第 7 のオリゴヌクレオチドおよび第 2 のオリゴヌクレオチドおよび第 8 のオリゴヌクレオチドの融解温度より低い、請求項 198 に記載の方法。

40

【請求項 200】

前記少なくとも 3 回の PCR サイクルの少なくとも前記最初のサイクル時の前記アニーリング温度および前記伸長温度が、前記第 7 のオリゴヌクレオチドおよび第 2 のオリゴヌクレオチドおよび第 8 のオリゴヌクレオチドの前記融解温度より高い、請求項 198 ~ 199 のいずれかに記載の方法。

【請求項 201】

50

3'末端部分を含む第1のインデキシングプライマーと、
前記3'末端部分を含む第2のインデキシングプライマーと、
第1のリガーゼと、
第1のDNAポリメラーゼと
を含むキット。

【請求項202】

前記3'末端部分に少なくとも部分的に相補的である5'部分を含むブロッカーオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項201に記載のキット。

【請求項203】

前記ブロッカーオリゴヌクレオチドが、前記第2のインデキシングプライマーにプレアニーリングされている、請求項202に記載のキット。 10

【請求項204】

前記ブロッカーオリゴヌクレオチドが、前記第2のインデキシングプライマーに相補的であり、前記第1のインデキシングプライマーに相補的でない前記5'部分の第1のさらなる部分3'を含む、請求項202～203のいずれかに記載のキット。

【請求項205】

前記ブロッカーオリゴヌクレオチドが、3'ヒドロキシル基、および前記第1のさらなる部分に対して3'に位置するヘアピン部分をさらに含み、前記ヘアピン部分が、第2のヘアピン配列の5'に位置する第1のヘアピン配列を含み、前記第1のヘアピン配列および前記第2のヘアピン配列が相補的であり、ヘアピンを形成することができる、請求項204に記載のキット。 20

【請求項206】

前記ヘアピン部分が、前記第1のヘアピン配列と前記第2のヘアピン配列の間に第3のヘアピン配列をさらに含む、請求項205に記載のキット。

【請求項207】

前記第3のヘアピン配列が、前記第1および第2のヘアピン配列と安定なステムループ構造を形成することを可能にするのに十分なループを形成する、請求項206に記載のキット。

【請求項208】

前記第3のヘアピン配列が、約4塩基から約20塩基の長さを有する、請求項206に記載のキット。 30

【請求項209】

前記ブロッカーオリゴヌクレオチドが、前記5'部分と前記第1のさらなる部分との間に位置する第2のさらなる部分をさらに含み、前記第2のさらなる部分が、前記第1のインデキシングプライマーに相補的でなく、前記第2のさらなる部分が、前記第2のインデキシングプライマーに相補的でない、請求項202～204のいずれかに記載のキット。

【請求項210】

前記第2のさらなる部分が、約1塩基から約30塩基の長さを有する、請求項208に記載のキット。

【請求項211】

前記ブロッカーオリゴヌクレオチドが、ポリメラーゼ伸長を阻害するための3'修飾をさらに含む、請求項202～204および209～211のいずれかに記載のキット。 40

【請求項212】

ポリメラーゼ伸長を阻害するための3'修飾が、C3炭素スパーサー、ヘキサンジオール、スパーサー9、スパーサー18、ホスフェート、2', 3'-ジデオキシヌクレオシド ddA、ddT、ddCおよびddG、3'-デオキシヌクレオシド3'-A、3'-T、3'-Cおよび3'-G、rUなどのRNAヌクレオシド、3'-O-メチルヌクレオチド、ならびに前記第2のインデキシングプライマーに相補的でないDNA配列からなる群から選択される、請求項211に記載のキット。

【請求項213】

前記第 1 のインデキシングプライマーおよび前記第 2 のインデキシングプライマーが、それぞれ独立に、約 20 塩基から約 100 塩基の長さを有する、請求項 201～212 のいずれかに記載のキット。

【請求項 214】

第 1 の 3' 末端部分を含む第 1 のインデキシングプライマーと、
前記第 2 の 3' 末端部分を含む第 2 のインデキシングプライマーと、
第 3 の 3' 末端部分を含む 5' アダプターと、
第 1 のリガーゼと、
第 1 の DNA ポリメラーゼと
を含むキット。

10

【請求項 215】

前記 5' アダプターが、前記第 1 のインデキシングプライマーの前記第 1 の 3' 末端部分の少なくとも一部分を含む、前記第 3 の 3' 末端部分に対して 5' に位置する第 1 の 5' 部分、前記第 1 の 5' 部分に対して 5' に位置し、前記第 1 の 5' 部分に相補的な第 2 の 5' 部分、および前記第 1 の 5' 部分の 5' 末端に位置する前記 DNA ポリメラーゼを阻害することが可能な複製ブロッカーをさらに含む、請求項 214 に記載のキット。

【請求項 216】

前記第 1 の 5' 部分および前記第 2 の 5' 部分が、それぞれ約 12 塩基から約 20 塩基の長さを有する、請求項 215 に記載のキット。

【請求項 217】

前記 5' アダプターが、前記第 1 の 5' 部分と前記第 2 の 5' 部分の間に介在配列をさらに含む、請求項 214～216 のいずれかに記載のキット。

20

【請求項 218】

前記介在配列が、約 4 塩基から約 20 塩基の長さを有する、請求項 217 に記載のキット。

【請求項 219】

前記複製ブロッカーが、安定な脱塩基部位、C3 スペース、ヘキサンジオール、スペース 9、スペース 18、3 つまたはそれより多い rU 塩基、および 2'-O-メチル RNA 塩基からなる群から選択される、請求項 214～218 のいずれかに記載のキット。

30

【請求項 220】

前記 5' アダプターが、約 25 塩基から約 100 塩基の長さを有する、請求項 214～219 のいずれかに記載のキット。

【請求項 221】

前記第 1 の 5' 部分および第 2 の 5' 部分が、ヘアピンを形成することができる、請求項 214～220 のいずれかに記載のキット。

【請求項 222】

前記第 1 のリガーゼが、低マグネシウム緩衝液中でのライゲーションが可能な熱不安定性リガーゼである、請求項 201～221 のいずれかに記載のキット。

【請求項 223】

前記第 1 のリガーゼが T3 DNA リガーゼである、請求項 222 に記載のキット。

40

【請求項 224】

前記第 1 のインデキシングプライマーが、配列番号 1 の配列を含む 5' テール配列をさらに含み、前記 DNA ポリメラーゼが、3'-5' エクソヌクレアーゼ活性を有する、請求項 201～223 のいずれかに記載のキット。

【請求項 225】

前記第 2 のインデキシングプライマーが、前記 5' テール配列をさらに含み、前記 DNA ポリメラーゼが、3'-5' エクソヌクレアーゼ活性を有する、請求項 201～224 のいずれかに記載のキット。

【請求項 226】

50

前記第1のインデキシングプライマーが、3つまたはそれより多いリボヌクレオチド塩基の5'側の2つまたはそれより多いデオキシヌクレオチドを含む5'テール配列をさらに含み、前記DNAポリメラーゼが、3'-5'エクソヌクレアーゼ活性を有する、請求項201～225のいずれかに記載のキット。

【請求項227】

前記第2のインデキシングプライマーが、前記5'テール配列をさらに含み、前記DNAポリメラーゼが、3'-5'エクソヌクレアーゼ活性を有する、請求項226に記載のキット。

【請求項228】

前記5'テール配列に相補的であり、3'エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素による消化に対する抵抗性を得るための修飾を含むプローブオリゴヌクレオチド、3'エクソヌクレアーゼ活性を有する前記酵素、および第2のリガーゼをさらに含む、請求項224～227のいずれかに記載のキット。

【請求項229】

エクソヌクレアーゼ活性を有する前記酵素がエクソヌクレアーゼIIIである、請求項228に記載のキット。

【請求項230】

標的特異的プライマー対をさらに含む、請求項201～229のいずれかに記載のキット。

【請求項231】

複数の標的特異的プライマー対をさらに含む、請求項201～229のいずれかに記載のキット。

【請求項232】

dU塩基、リボヌクレオチドまたはイノシン塩基を含むユニバーサルプライマーをさらに含む、請求項201～231のいずれかに記載のキット。

【請求項233】

第2のDNAポリメラーゼをさらに含む、請求項230～232のいずれかに記載のキット。

【請求項234】

dU塩基を開裂することが可能な酵素をさらに含む、請求項201～233のいずれかに記載のキット。

【請求項235】

dU塩基を開裂することが可能な前記酵素が、ウラシルDNAグリコシラーゼとエンドヌクレアーゼVIIの組合せである、請求項234に記載のキット。

【請求項236】

リボヌクレオチドを開裂することが可能な酵素をさらに含む、請求項201～233のいずれかに記載のキット。

【請求項237】

リボヌクレオチドを開裂することが可能な前記酵素がRNアーゼHである、請求項236に記載のキット。

【請求項238】

イノシン塩基を開裂することが可能な酵素をさらに含む、請求項201～233のいずれかに記載のキット。

【請求項239】

イノシン塩基を開裂することが可能な前記酵素がエンドヌクレアーゼVある、請求項238に記載のキット。

【請求項240】

前記第1のDNAポリメラーゼおよび第2のDNAポリメラーゼが、それぞれ独立して、Kapa HiFi DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL DNA Po

10

20

30

40

50

lymerase (Takara) および High Fidelity DNA Polymerase (Qiagen) からなる群から選択される、請求項 201～239 のいずれかに記載のキット。

【請求項 241】

前記第 1 の DNA ポリメラーゼが、ホットスタート抗体またはアプタマーをさらに含み、前記ホットスタート抗体またはアプタマーが、前記 DNA ポリメラーゼの活性化温度を上昇させる、請求項 201～240 のいずれかに記載のキット。

【請求項 242】

前記第 1 の DNA ポリメラーゼが、Kapa HiFi Hot Start DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 Hot Start DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL Hot Start DNA Polymerase (Takara) および High Fidelity Hot Start DNA Polymerase (Qiagen) からなる群から選択される、請求項 241 に記載のキット。

10

【請求項 243】

前記第 1 のインデキシングプライマーおよび前記第 2 のインデキシングプライマーが、それぞれ独立に、約 20 塩基から約 100 塩基の長さを有する、請求項 215～242 のいずれかに記載のキット。

【請求項 244】

(i) 第 1 の鎖および第 2 の鎖を含む部分的に二本鎖の DNA 基質を提供することであって、前記部分的に二本鎖の DNA 基質が、第 1 の 3' オーバーハング、二本鎖部分および第 2 の 3' オーバーハングを含み、

20

前記第 1 の鎖が、5' から 3' 方向に、第 1 の 5' 末端、第 1 の部分および第 2 の部分を含み、

前記第 2 の鎖が、5' から 3' 方向に、第 2 の 5' 末端、第 3 の部分、および前記部分的に二本鎖の DNA 基質の第 4 の部分を含み、

前記第 1 の鎖の前記第 1 の部分および前記第 2 の鎖の前記第 3 の部分が相補的であり、前記二本鎖部分を形成し、

前記第 1 の鎖の前記第 2 の部分が、前記第 1 の 3' オーバーハングを形成し、

前記第 2 の鎖の前記第 4 の部分が、前記第 2 の 3' オーバーハングを形成し、

30

前記第 1 の鎖の前記第 2 の部分および前記第 2 の鎖の前記第 4 の部分が、それぞれ前記第 1 の 3' オーバーハングおよび前記第 2 の 3' オーバーハングの 5' 末端に位置する第 1 の共通ヌクレオチド配列を含むこと、

(ii) 複数の第 1 のインデキシングプライマー、複数の第 2 のインデキシングプライマー、リガーゼ、DNA ポリメラーゼおよびデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) を前記部分的に二本鎖の DNA 基質に添加して、第 1 の反応混合物を生成することであって、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々が、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列に相補的な第 1 の 3' 末端部分を含み、前記複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々が、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列に相補的な第 2 の 3' 末端部分を含むこと、

(iii) 前記第 1 の反応混合物を、ライゲーション持続時間にわたるライゲーション温度を含む第 1 の条件集合下でインキュベートすることであって、前記第 1 の条件集合は、

40

a) 前記第 1 の 3' 末端部分が、前記第 1 の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、

b) 前記リガーゼが、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つを前記第 1 の鎖の前記第 1 の 5' 末端に、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つを前記第 2 の鎖の前記第 2 の 5' 末端にライゲーションして、

5' から 3' 方向に、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つ、前記第 1 の部分および前記第 2 の部分を含む第 3 の鎖と、

5' から 3' 方向に、前記複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つ、前記第 3 の部分および前記第 4 の部分を含む第 4 の鎖と

50

を含む第2の反応混合物を生成するのに十分であること、

(i v) 前記第2の反応混合物を、第1の変性持続時間にわたる第1の変性温度、第1のアニーリング持続時間にわたる第1のアニーリング温度、および第1の伸長持続時間にわたる第1の伸長温度を含む第2の条件集合下でインキュベートすることであって、前記第2の条件集合は、

a) 前記リガーゼを不活性化させ、二本鎖DNAを変性させ、必要に応じて前記DNAポリメラーゼを活性化させ、

b) 前記複数の第2のインデキシングプライマーの1つの前記第2の3'末端部分が、前記第3の鎖の前記第2の部分の前記第1の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、前記複数の第2のインデキシングプライマーの1つの前記第2の3'末端部分が、前記第4の鎖の前記第4の部分の前記第1の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、

c) 前記DNAポリメラーゼが、前記第3の鎖の前記第2の部分の前記第1の共通ヌクレオチド配列にアニーリングされた前記複数の第2のインデキシングプライマーの1つを伸長させ、前記DNAポリメラーゼが、前記第4の鎖の前記第4の部分の前記第1の共通ヌクレオチド配列にアニーリングされた前記複数の第2のインデキシングプライマーの1つを伸長させて、前記第3の鎖、前記第4の鎖、第5の鎖および第6の鎖を含む第3の反応混合物であって、前記第5の鎖が、5'から3'方向に、前記複数の第2のインデキシングプライマーの1つ、前記第3の部分、および前記複数の第1のインデキシングプライマーの1つのリバス相補体を含み、前記第6の鎖が、5'から3'方向に、前記複数の第2のインデキシングプライマーの1つ、前記第1の部分、および前記複数の第1のインデキシングプライマーの1つの前記リバス相補体を含む第3の反応混合物を生成するのに十分であること、

(v) 前記第3の反応混合物を、第2の変性持続時間にわたる第2の変性温度、第2のアニーリング持続時間にわたる第2のアニーリング温度、および第2の伸長持続時間にわたる第2の伸長温度を含む第3の条件集合下でインキュベートすることであって、前記第3の条件集合は、

a) 二本鎖DNAを変性させ、

b) 前記複数の第1のインデキシングプライマーの1つが、前記第5の鎖の前記複数の第1のインデキシングプライマーの1つの前記リバス相補体にアニーリングし、前記複数の第1のインデキシングプライマーの1つが、前記第6の鎖の前記複数の第1のインデキシングプライマーの1つの前記リバス相補体にアニーリングし、

c) 前記DNAポリメラーゼが、前記第5の鎖の前記複数の第1のインデキシングプライマーの1つの前記リバス相補体にアニーリングされた前記複数の第1のインデキシングプライマーの前記1つ、および前記第6の鎖の前記複数の第1のインデキシングプライマーの前記1つの前記リバス相補体にアニーリングされた前記複数の第1のインデキシングプライマーの前記1つを伸長させて、前記第5の鎖、前記第6の鎖、第7の鎖および第8の鎖を含む第4の反応混合物であって、前記第7の鎖が、5'から3'方向に、前記複数の第1のインデキシングプライマーの1つ、前記第1の部分、および前記複数の第2のインデキシングプライマーの1つのリバス相補体を含み、前記第8の鎖が、5'から3'方向に、前記複数の第1のインデキシングプライマーの1つ、前記第3の部分、および前記複数の第2のインデキシングプライマーの1つの前記リバス相補体を含み、前記第7の鎖が前記第5の鎖に相補的であり、前記第8の鎖が前記第6の鎖に相補的である第4の反応混合物を生成するのに十分であること、および

(vi) 前記第4の反応混合物を、第3の変性持続時間にわたる第3の変性温度、第3のアニーリング持続時間にわたる第3のアニーリング温度、および第3の伸長持続時間にわたる第3の伸長温度を含む第4の条件集合下でインキュベートすることであって、前記第4の条件集合は、前記複数の第1のインデキシングプライマーの少なくとも一部分および前記複数の第2のインデキシングプライマーの少なくとも一部分が、前記第5の鎖および第7の鎖ならびに前記第6の鎖および第8の鎖を増幅させるのに十分であることを含む、ライゲーションカップルドポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の方法。

【請求項 2 4 5】

ステップ (i) がステップ (i i i) 時に実施され、第 1 の開始鎖および第 2 の開始鎖を含む開始二本鎖 DNA 基質分子を提供することをステップ (i i) の前にさらに含み、前記第 1 の開始鎖および前記第 2 の開始鎖が、それぞれ前記第 1 の開始鎖および前記第 2 の開始鎖の 5' 末端の内部に少なくとも 1 つの d U 塩基を含み、ステップ (i i) が、前記二本鎖 DNA 基質分子の前記少なくとも 1 つの d U 塩基を開裂することが可能な酵素を添加することをさらに含み、ステップ (i v) における前記第 2 の条件集合は、前記少なくとも 1 つの d U 塩基を開裂することが可能な前記酵素を不活性化させるのにさらに十分であり、ステップ (i i i) の中間体が、後にステップ (i i i) に従ってライゲーションすることができる部分的に二本鎖の DNA 基質である、請求項 1 ~ 1 1 8 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 2 4 6】

前記少なくとも 1 つの d U 塩基を開裂することが可能な前記酵素が、UDG とエンドヌクレアーゼ V I I I の組合せである、請求項 2 4 5 に記載の方法。

【請求項 2 4 7】

ステップ (i) がステップ (i i i) 時に実施され、第 1 の開始鎖および第 2 の開始鎖を含む開始二本鎖 DNA 基質分子を提供することをステップ (i i) の前にさらに含み、前記第 1 の開始鎖および前記第 2 の開始鎖が、それぞれ前記第 1 の開始鎖および前記第 2 の開始鎖の 5' 末端の内部に少なくとも 1 つのリボヌクレオチドをそれぞれ含み、ステップ (i i) が、前記二本鎖 DNA 基質分子の前記少なくとも 1 つのリボヌクレオチドを開裂することが可能な酵素を添加することをさらに含み、ステップ (i v) における前記第 2 の条件集合は、前記少なくとも 1 つのリボヌクレオチドを開裂することが可能な前記酵素を不活性化させるのにさらに十分であり、ステップ (i i i) の中間体が、後にステップ (i i i) に従ってライゲーションすることができる部分的に二本鎖の DNA 基質である、請求項 1 ~ 1 1 8 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 2 4 8】

前記少なくとも 1 つのリボヌクレオチドを開裂することが可能な前記酵素が RNアーゼ H である、請求項 2 4 7 に記載の方法。

【請求項 2 4 9】

ステップ (i) がステップ (i i i) 時に実施され、第 1 の開始鎖および第 2 の開始鎖を含む開始二本鎖 DNA 基質分子を提供することをステップ (i i) の前にさらに含み、前記第 1 の開始鎖および前記第 2 の開始鎖が、それぞれ前記第 1 の開始鎖および前記第 2 の開始鎖の 5' 末端の内部に少なくとも 1 つのイノシン塩基をそれぞれ含み、ステップ (i i) が、前記二本鎖 DNA 基質分子の前記少なくとも 1 つのイノシン塩基を開裂することが可能な酵素を添加することをさらに含み、ステップ (i v) における前記第 2 の条件集合は、前記少なくとも 1 つのイノシン塩基を開裂することが可能な前記酵素を不活性化させるのにさらに十分であり、ステップ (i i i) の中間体が、後にステップ (i i i) に従ってライゲーションすることができる部分的に二本鎖の DNA 基質である、請求項 1 ~ 1 1 8 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 2 5 0】

前記少なくとも 1 つのイノシン塩基を開裂することが可能な前記酵素がエンドヌクレアーゼ V である、請求項 2 4 9 に記載の方法。

40

【請求項 2 5 1】

前記開始二本鎖 DNA 基質分子が、前記開始二本鎖 DNA 基質分子の 3' オーバーハングにアニーリングされた相補鎖を含む、請求項 2 4 5 ~ 2 5 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 5 2】

前記相補鎖が、d U 塩基、リボヌクレオチドまたはイノシン塩基を含む、請求項 2 5 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2020年5月15日に出版された米国仮特許出願第63／025,738号の利益を主張する。

【0002】

配列表

本件出願は、ASCII形式で電子的に提出されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。2021年5月16日に作成された前記ASCIIのコピーは、85563-337864__SL__051621a.txtと命名され、サイズが33,953バイトである。

【背景技術】

【0003】

背景

次世代シーケンシング(NGS)による分析のための重要な要件は、NGSライブラリーの調製である。このプロセス時に、目的の核酸をまず断片化することができ、RNAから開始する場合はcDNAを生成することができ、多くの標的化シーケンシングワークフローについて目的の遺伝子座に特異的な多重PCRを実施することができる。次に、基質末端を修復し、NGSアダプターにライゲーションして、ライブラリー合成を完了する。NGSアダプターは、ライブラリー増幅、フローセル上でのライブラリー分子のクローン増幅、およびシーケンシングプライマーのアニールリングを可能にする。NGSアダプターは、ライブラリーの多重化シーケンシングを可能にするために試料特異的インデックスをも組み込む一方で、ランダムヌクレオチド(6つまたはそれより多いN塩基)を含むタグを必要に応じて使用することによって各ライブラリー分子の固有の分子バーコーディングが可能になる。ライゲーションステップ時に、完全長のインデキシングされたアダプターを使用してNGSライブラリーを構築することが可能であり、あるいはIlluminaシーケンシングでは、基質に最も近い近隣アダプターを含むトランケーションされたアダプターをライゲーションすることが可能であり、次いで試料特異的インデックスおよびさらなる末端アダプター配列を、トランケーションされたアダプター配列にアニールリングする5'テールドインデキシングPCRプライマーを使用してライブラリー増幅時に組み込む。

【0004】

断片化DNA、cDNAまたは多重化PCRアンプリコンからのIlluminaライブラリー調製のための伝統的方法は、1)DNAポリシング、末端修復、および基質の3'末端に対するAテーリング、2)3'末端にTヌクレオチドオーバーハングを有する二本鎖領域および2つの異なる一本鎖アダプター配列を含むY状またはステムループアダプターの両基質DNA鎖へのライゲーション、ならびに3)2つのアダプター配列に相補的なプライマー対によるPCR増幅を含む3つのステップを必要とする。この方法は、現在、TruSeqナノDNAライブラリーキット(Illumina)、NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit(New England Biolabs)およびKAPA HyperPrep Kits(Roche)などの多くの市販のキットで利用されている。DNA基質AテーリングおよびTオーバーハングアダプターライゲーションを使用すると、2つの挿入物およびアダプター二量体を含むキメラライブラリー分子などの望ましくない生成物の減少が促され、非対称性Y状またはステムループアダプターを使用すると、ライブラリーのコンプレキシティを失うことなく単一ステップの反応でのAテールド基質の両鎖に対するアダプターの接続が可能になる。

【0005】

特定の他の方法は、平滑末端化アダプターを使用し、基質の1つのDNA鎖のみにライゲーションするアダプターを使用することによりアダプター二量体の形成を回避するが、キメラライブラリー分子を防止する手段を有さないためDNA投入量を50ngに制限する。例えば、SMARTer ThruPLEX DNA-Seq(Takara)、お

よび Ion Torrent DNAライブラリー (ThermoFisher) など、AmpliSeq 標的化多重 PCR ライブラリー構築に使用されるキットにおいて使用される方法では、2つの平坦末端アダプターが基質 DNA 分子の 5' 末端にライゲーションし、DNA 基質の 3' 末端は、ライゲーションされずに残留し、次いで PCR 増幅の前に、次のステップで DNA ポリメラーゼによって伸長される。それらのキットは、2つの異なる二本鎖アダプターの混合物を使用するため、完全にライゲーションされた DNA 断片の 50% のみが、シーケンシングに必要とされる 2つの異なるアダプターを含み、完全にライゲーションされた DNA 断片の 50% が、シーケンシングできない同様のアダプターの 2つをライゲーションすることによって失われるため、収率およびライブラリーコンプレキシティが 1/2 に減少した DNA、cDNA または標的化アンプリコンライブラリーが生成する。

10

【0006】

CleanPlex (Paragon Genomics) などの他の標的化シーケンシングライブラリー調製方法は、第1の標的特異的多重 PCR ステップの後に第2のインデキシング PCR ステップが続くように、各フォワード標的特異的プライマーが、第1のランケーションされたアダプター配列を含む 5' テールを有し、各リバース標的特異的プライマーが、第2のランケーションされたアダプターを含む 5' テールを有し、インデキシングプライマー対が試料特異的インデックスおよび末端アダプター配列を 5' テールに含み、第1および第2の NGS アダプター配列を完了するように使用される 5' テールド標的特異的プライマーを利用する。これは、簡素なワークフローであるが、プライマー二量体を除去するためにさらなるバックグラウンド浄化ステップを組み込まなければ、多重 PCR ステップ時に、シーケンシングのコストを増加させる高い割合のプライマー二量体を生成することが可能であり、その方法は、単に一方から各ライブラリー鎖をシーケンシングする方向性ライブラリーをも生成する。体系的なシーケンシング誤差により、変異体コーリングのための最高精度配列データ品質のために、両方向からの各鎖の対合末端シーケンシングを実施することが望ましい。この方法と同様に、上記 AmpliSeq 方法にも、いくつかの多重 PCR 後酵素的ステップを導入する、末端ポリシングにより NGS ライブラリーの完了前にプライマー二量体を除去するためのさらなるステップ、アダプターライゲーションおよび必要に応じた PCR 増幅ステップの組み込みが必要である。

20

30

【0007】

標的化シーケンシングの理想的な方法は、最小数の酵素的ステップから、非方向性の高コンプレキシティライブラリーを生成し、最終的なライブラリーにおけるプライマー二量体含有物を防止する。Accel-Seq および Swift AmpliSeq パネルとして商品化されている既に開示された標的化多重化 PCR ライブラリー調製 (その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 10,316,359 号に記載) では、このワークフローが、二本鎖アダプターライゲーションのライブラリーコンプレキシティの限界を克服し、非方向性ライブラリーを生成し、ワークフローにさらなるステップを組み込むことなくプライマー二量体の蓄積をさらに防止する。この方法は、AmpliSeq、CleanPlex、および重複するアンプリコンを生成するプライマー対を2つの管に分ける必要がある他の多重化 PCR 標的化シーケンシングワークフローと異なり、単一管多重化 PCR 反応で重複するアンプリコンを生成するプライマー対を使用する連続カバレッジをも可能にする。Swift AmpliSeq 法は、単一管ワークフローを利用することによって多数の試料を処理する場合の試料トラッキング誤差を減少させるだけでなく、より重要なこととして、投入材料が限定され、低頻度変異体を検出するための感度が必要である、血液および他の流体からの液体生検/無細胞 DNA などの試料に適する。単一管アッセイは、個別の管を必要とするアッセイと比較して、より高感度で、限定的な試料から投入 DNA 分子のより多くのコピー数を可能にする。

40

【0008】

Swift 多重化 PCR に続いて、精製ステップを実施することが可能であり、完全に

50

ライゲーションされた分子が100%の機能性および非方向性を有し、Y状アダプターに類似する精製多重化PCRアンプリコン上でアダプターライゲーションステップを実施することが可能であるが、この方法は、標的特異的アンプリコンの各鎖の5'末端および3'末端に独立してライゲーションする個別の5'および3'アダプターを使用する。これは、効率的かつ簡易なワークフローであるが、さらなるPCR増幅ステップが存在しないため、Qubitなどの蛍光分析法は、完全にライゲーションされた機能性分子から部分的にライゲーションされたものを区別できないことにより、ライブラリーをqPCRでしか高精度に定量できない。また、Y状アダプターと同様に、5'および3'一本鎖アダプターテールは、バイオアナライザー(Agilent)などの電気泳動チップ上に泳動アーチファクトをもたらすため、これらの方法を使用しても定量が不正確になる。したがって、より高いライブラリー収率を可能にするためのSwift Amplicon法の改造型が望まれる。また、高スループット用途では、シーケンシングの前に高精度の定量のためにqPCRを必要とするライブラリーをもたらさないその方法の改造型も望まれる。しかし、これらの改造型は、好ましくは、多重化PCRを使用する標的化ライブラリー調製のための当該技術分野における好適な標準であるニインキュベーション法を維持するために、さらなる酵素的または精製ステップをワークフローに導入しない。本明細書に開示する新規の方法は、これらの提案されたワークフローの改善に対する解決策を提供する。

10

【0009】

DNA NGSライブラリー調製のための理想的な方法には、酵素的ステップの数が最小限であること(3つまたはそれより少ない)、精製ステップの数が最小限であること(PCR後の精製を含めて2つまたはそれより少ない)、DNA利用率が100%に近いこと、DNA投入量の範囲が広いこと(望ましくは、ピコグラムからフェムトグラム範囲の低閾値およびマイクログラムの投入量範囲の高閾値)、アダプター-アダプター二量体およびDNAキメラがないこと、ならびに多くの現在利用可能なキットに存在するアダプター濃度調整が不要であることが必要とされる。

20

【0010】

その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第10,316,357号に記載のAccel-NGS 2S DNAライブラリーキットとして商品化されている既の開示されたNGSライブラリー調製方法では、ワークフローが、SMARTer、ThruPLEXおよびIon Torrent DNAライブラリーキットに特有の二本鎖アダプターライゲーションライブラリーのライブラリーコンプレキシティの限界を克服し、さらに、低および高投入量DNA試料に同様のアダプター濃度を使用しながら広範囲のDNA濃度でアダプター二量体およびDNAキメラの形成を防止するため、TruSeq Nano、NEBNext Ultra IIおよびKAPA Hyper Prepキットに存在するアダプター濃度調整の必要性を排除する。AT/GCバイアスが他のキットと比較して実質的に低いことも実証される。したがって、Accel-NGS 2Sは、ChIP-seq実験によるDNAおよび無細胞DNAなどの少量かつ貴重な試料に最適な方法であるが、多数の酵素的ステップおよび精製ステップを有する。

30

他の方法に対して競合力があり、多くの用途にとって魅力的であるためには、酵素反応および精製ステップの数を実質的に減少させるためにAccel-NGS 2S法の改造型が望ましい。本明細書に開示する新規の方法は、これらの提案されたワークフローの改善に対する解決策を提供する。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】米国特許第10,316,359号明細書

【特許文献2】米国特許第10,316,357号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

50

概要

本開示は、ライゲーションカップルドポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の方法およびキット、ならびにスプリント媒介プライマー生成の方法およびキットを提供する。

【0013】

以上で参照したSwift Amplicon多重化PCR標的化シーケンシング法および他の方法を使用する場合にライブラリーの収率を増加させ、qPCR定量の必要性を克服するように設計された新規の方法を本明細書に開示する。それらの方法は、ライゲーションカップルドPCR反応にインデキシングプライマーを使用する。それぞれが当該技術分野で広く使用される2つの異なるインデキシングプライマー設計、すなわち各アダプターに固有のすべての配列を含むが、3'末端が両アダプターに共通の配列を除くインデキシングプライマー、および3'末端が両アダプターに共通の配列を含めて各アダプターの完全な完全長配列を含むインデキシングプライマーのうちの1つを利用する2つの方法が存在する。設計は、短くなるとオリゴヌクレオチド合成コストが減少し、長くなると、変性ライブラリー分子をプライミングする場合に共通のアダプター配列およびそのリバース相補体によって形成される二次構造を破壊し得るためPCR効率が高くなる。

【0014】

いずれの方法についても、Swift多重化PCRステップを、ユニバーサルアダプター配列、およびユニバーサルアダプター配列に相補的なユニバーサルプライマーであって、それを後のアダプターライゲーションステップに必要となるエンドヌクレアーゼにより開裂させやすくする修飾を含むユニバーサルプライマーを含む5'テール配列をそれぞれ含む複数の標的特異的プライマー対を利用して、改造することなく既に開示されたように、かつ参考のために以下に概説するように実施することができる。PCRは、修飾塩基に寛容な高性能ブルーフリーディングポリメラーゼを利用し、第1のPCRサイクルが、ユニバーサルアダプター標識アンプリコンをそれらの標的配列から作成するために、それぞれ低濃度である標的特異的プライマー対の高コンプレクシティを可能にするようにアニーリング時間を長くした。多重サイクル（2またはそれより多い）に続いて、各標的特異的アンプリコンに隣接するユニバーサルアダプターにアニーリングするユニバーサルプライマーを使用する第2フェーズの増幅のアニーリング時間を短くしながらPCRを継続する。ユニバーサルプライマーは、標的特異的プライマーと比較して比較的高濃度で 사용되는ため、ユニバーサルプライマーは、さらなるプライマー二量体の形成を生じることなく増幅反応を支える。限定された多重化サイクルの間に蓄積するプライマー二量体は、長さが所望のアンプリコンより有意に短いため、かつそれらの相補的なユニバーサルアダプター配列により、プライマー二量体が、プライマーアニーリング温度で安定な二次構造になって、単一ユニバーサルプライマーによる増幅の効率が低下する。同様に、重複アンプリコンを生成する標的特異的プライマー対が使用される場合は、第1の標的特異的アンプリコンのリバースプライマーおよび第2の標的特異的アンプリコンのフォワードプライマーにより生じる望ましくない短アンプリコンも、プライマー二量体と類似の単一ユニバーサルプライマーによる増幅の効率が低下する。これは、プライマーアニーリング温度でのそれらの相補的なユニバーサルアダプター配列による同様の安定な二次構造によるものであるため、均一な標的カバレッジで単一管アッセイが可能になる。この特別な特徴がなければ、短アンプリコンは、最初の鑄型からそれぞれ意図する第1および第2のアンプリコンならびに短アンプリコンをプライミングできるのでPCR反応において優勢になってしまい、アンプリコン生成物の不均衡によるカバレッジ均一性の喪失、および大幅なシーケンシングコストの上昇をもたらす。この理由により、競合技術は、重複アンプリコンを生成するプライマー対を2つの多重PCR管に分離して、均一な標的カバレッジを達成する上でのこの欠陥を回避する。

【0015】

Swift多重化PCRに続いて、未使用のプライマーを除去し、緩衝液を、それぞれ開裂可能なユニバーサルプライマーを各5'末端に含む複数の多重化PCRアンプリコンと交換するためにビーズベースの精製ステップを実施することができる。図1Aに示され

10

20

30

40

50

るように、既に関示された、インデキシングされたアダプターライゲーションを続ける代わりに、一実施形態において、精製された多重化PCR生成物をエンドヌクレアーゼ、リガーゼ、DNAポリメラーゼおよびデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)を含むPCRマスターミックス、ならびに両アダプターに共通の3'末端配列を含む完全長ライブラリーインデキシングプライマー対と組み合わせる。完全長インデキシングプライマーを使用することにより、5'アダプターに対応するプライマーを、ライゲーションのためのアダプターおよびPCR増幅のためのプライマーの両方として、同一のライゲーションカップルドPCR反応に使用できる。加えて、3'アダプターに対応するインデキシングプライマーの3'末端に相補的な必要に応じたブロッカーオリゴヌクレオチドをこのプライマーにプレアニーリングできる。ブロッカーオリゴヌクレオチドは、このプライマーが第1のインキュベーション温度で初期の5'アダプターライゲーションステップに関与するのを防止するが、PCRアニーリング温度未満の温度 T_m を有する、または不活性化されるため、PCR時にプライミング活性を阻害しない(図2および4参照)。この方法において、反応混合物は、アンプリコン基質の5'末端上の組み込まれたユニバーサルプライマーのエンドヌクレアーゼ開裂を可能にすることにより、5'アダプター配列を含む完全長インデキシングプライマーの3'末端がユニバーサルアダプターのリバーズ相補体の5'末端にアニーリングし、アンプリコン基質の5'末端にライゲーションすることを可能にするのに十分な条件下でインキュベートされ、エンドヌクレアーゼ反応およびライゲーション反応の両方が、両酵素の活性に好適な第1の温度にてPCR反応混合物中で行われる。次いで、反応混合物を高温に加熱してエンドヌクレアーゼおよびリガーゼを不活性化させ、PCRのためにDNA基質を変性させ、ホットスタートポリメラーゼを使用する場合はポリメラーゼを活性化させる。次いで、ランケーションされた3'アダプター配列を含むユニバーサルアダプターのリバーズ相補体、および完全長5'アダプターのリバーズ相補体にアニーリングするインデキシングプライマーを使用して、PCR熱サイクリングを必要なサイクル数だけ実施して所望のライブラリー収率を達成する。

10

20

30

40

50

【0016】

ライゲーションカップルドPCRに続いて、ビーズベースの精製ステップを実施することができ、次いでライブラリー定量、プーリングおよびシーケンシングを実施することができる。この新規の方法は、ライブラリー収率を増加させて、低キロボースの標的領域を有するコピー数の小さい試料に好適なものとする。この方法は、qPCRに加えて、Qubitなどの蛍光分析法またはバイオアナライザーなどの電気泳動チップによって容易に定量できる二本鎖アダプターを有する完全にライゲーションされた機能性分子が富化されたライブラリーをももたらす。単一密閉管にてアダプターライゲーションをPCR増幅と組み合わせることにより、アダプターライゲーションとPCRの間に通常必要とされるさらなる精製ステップが回避されるとともに、精製ステップが必要でなければライゲーション反応に続くPCR試薬の添加が回避される。この点において、新規のワークフローは、2つの酵素的インキュベーションおよび2つの精製ステップの最初のワークフローを維持する。

【0017】

図1Bに示される代替的な実施形態において、精製された多重化PCR生成物を、それぞれが両アダプターに共通の3'末端配列を欠くエンドヌクレアーゼ、ランケーションされた5'アダプター、リガーゼ、PCRマスターミックスおよびライブラリーインデキシングプライマー対と組み合わせる。この実施形態において、インデキシングプライマーが、シーケンシングプライマーのアニーリングに必要とされるアダプターの共通の配列を欠いているため、ライゲーションに個別の5'アダプターが必要になる。反応混合物は、多重PCR時にアンプリコンの5'末端上に組み込まれたユニバーサルプライマーのエンドヌクレアーゼ開裂を可能にすることにより、ユニバーサルアダプターのリバーズ相補体の5'部分に5'ランケーションされたアダプターの3'位をアニーリングし、アンプリコン基質の5'末端にライゲーションすることを可能にするのに十分な条件下でインキュベートされ、エンドヌクレアーゼ反応およびライゲーション反応の両方が、両酵素の活

性に好適な第1の温度にてPCR反応混合物中で行われる。次いで、反応混合物を高温に加熱して、エンドヌクレアーゼおよびリガーゼを不活性化させ、PCRのためのDNA基質を変性させ、ホットスタートポリメラーゼを使用する場合はポリメラーゼを活性化させる。次いで、ランケーションされた3'アダプター配列を含むユニバーサルアダプターのリバース相補体、およびランケーションされた5'アダプターのリバース相補体にアニーリングするインデキシングプライマーを使用して、PCR熱サイクリングを必要なサイクル数だけ実施して所望のライブラリー収率を達成する。また、ランケーションされた5'アダプターは、それがライゲーションに関与することを可能にするが、それが、完成されたライブラリー分子から完全長5'アダプター配列をランケーションすることができないように、PCR時にプライマーとして活性化することを防止する二次構造を含む(図3A、3D~3L、5A~5C参照)。

10

【0018】

ライゲーションカップルドPCRに続いて、精製ステップを実施することができ、次いでライブラリー定量、プーリングおよびシーケンシングを実施することができる。この新規の方法は、ライブラリー収率を増加させるとともに、qPCRに加えて、Qubitなどの蛍光分析法またはバイオアナライザーなどの電気泳動チップによって容易に定量できる二本鎖アダプターを有する完全にライゲーションされた機能性分子が富化されたライブラリーをもたらす。単一密閉管にてアダプターライゲーションをPCR増幅と組み合わせることにより、アダプターライゲーションとPCRの間に通常必要とされるさらなる精製ステップが回避されるとともに、精製ステップが必要でなければライゲーション反応に続くPCR試薬の添加が回避される。この点において、このワークフローは、2つの酵素反応および2つの精製ステップの最初のワークフローを維持する。

20

【0019】

また、上記で開示された新規のライゲーションカップルドPCR方法は、いずれもNormalaseとして商品化されている(かつその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第10,961,562号に記載されている)簡素な酵素的ライブラリー正規化方法と組み合わせることが可能である。Normalaseを添加すると、個々のライブラリー濃度の定量および個々のライブラリー濃度に基づく試料プーリング体積の変更を回避することにより、多重化シーケンシングのためのライブラリープーリングステップが簡素化される。それに対して、この方法は、等モルのライブラリー収率をもたらすため、シーケンシングの前の簡素な高スループットのライブラリー処理後ステップのための各ライブラリーの等体積のプーリングを可能にする。この方法を上記の2つのライゲーションカップルドPCR方法に組み込むための唯一の要件は、1)各インデキシングプライマーが、限定することなく例としてrUであり得る、3つまたはそれより多い連続的なリボヌクレオチド塩基、および3つまたはそれより多い連続的なリボヌクレオチド塩基の5'側の2つまたはそれより多いデオキシヌクレオチドを含む5'テール配列をさらに含む必要があること、および2)増幅ステップで使用されるDNAポリメラーゼが、PCR増幅時に5'オーバーハングを生成するために3'から5'のエクソヌクレアーゼプルーフィング活性を有する必要がある(図1Cおよび1D参照)ことである。また、それぞれが末端5'P5および3'P7アダプター配列に対応する、5'テール上の3つまたはそれより多い連続的なリボヌクレオチド塩基、および3つまたはそれより多い連続的なリボヌクレオチド塩基の5'側の2つまたはそれより多いデオキシヌクレオチドをやはり含むプライマー対を含めてPCR効率を高める(表1の18-221、18-222、図1Cおよび1Dに不図示)。その結果、PCR混合物をインキュベートした後に得られた処理済みのライブラリー分子は、各プライマーの2つまたはそれより多いデオキシヌクレオチドおよび3つまたはそれより多い連続的なリボヌクレオチド塩基の少なくとも1つを含む5'オーバーハングをそれぞれ含む。開始量から所望の標的モル量の各NGSライブラリーを得るためには、開始量が標的量より大きいことが必要であるため、適用されるPCRサイクルの数は、標的量より大きいライブラリー収率を達成するものである必要がある。PCRに続いて、ビーズベースの精製ステップを実施する。

30

40

50

【0020】

次いで、Normalaseを、既に開示された酵素的方法に改造を加えることなく実施することができ、参考のために以下に概説する。精製されたPCR生成物は、リガーゼ、および5'オーバーハングに相補的なプローブと組み合わせられて第1の酵素反応混合物を生成し、プローブが所望の標的モル量と等しい量で各ライブラリーに添加され、第1の反応混合物は、増幅ライブラリー分子の5'オーバーハング部分にアニーリングすることによる3'末端へのプローブのライゲーションを可能にするのに十分な条件下でインキュベートされ、プローブにライゲーションされた増幅ライブラリー分子の部分が、処理ライブラリー分子の標的モル量となる。次に、各ライブラリーは、処理ライブラリー分子の標的量が同じであるため、コシークエンシング対象の各ライブラリーの等体積プーリングが実施される。プローブは、エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素による消化に対する抵抗を与えるための改造型を含むため、ライブラリープールは、プローブにライゲーションされない処理ライブラリー分子を消化することによって、選択された標的量の処理ライブラリー分子を単離することを可能にするのに十分な条件下で、第2の酵素反応混合物におけるエクソヌクレアーゼと組み合わせられる。次いで、第2の酵素反応混合物は、熱不活性化され、プールが、さらなる精製ステップを行うことなくフローセルローディングに利用可能となる。必要に応じて、プールのqPCR定量を実施して、最適なシークエンシングフローセル上での特定クラスター密度を達成するための所望の最終モル濃度を確認することができる。

10

【0021】

20

個別の実施形態において、標的基質の増幅時にさらなる配列を導入するのに使用されるロングPCRプライマーを基質の増幅前にスプリント媒介ライゲーションによってアセンブルすることができるライゲーションカップルドPCR反応を実施することができる。(図6A~6D参照)。例えば、その後の上記酵素的ライブラリー正規化と相溶性を有するNGSライブラリーインデキシングプライマーをスプリントライゲーションによってアセンブルすることで、オリゴ合成コストを減少させることができる。対の各プライマーについて短い試料特異的インデックス配列のみが異なる、それぞれ長さが最大90塩基長またはそれより長い完全長プライマーを整える代わりに、ユニバーサル5'および3'プライマーサブユニットが合成され、次いで各々の固有の試料特異的インデックスを含む短いオリゴヌクレオチドサブユニットのみが合成され、2つのユニバーサルスプリントオリゴヌクレオチドが、5'インデックスおよび3'プライマーサブユニットをライゲーションのために結合させる。スプリントは、5'サブユニットの3'末端をインデックスサブユニットの5'末端に、インデックスサブユニットの3'末端を3'サブユニットの5'末端に繋ぐための2つのプライマーサブユニットの部分に相補的な配列を含む。この実施形態において、アダプターライゲーション、または5'テールドプライマーを使用するPCRによる組み込みを含む任意の方法によって導入された両方のランケーションされたアダプターを含む任意のNGSライブラリーが、各インデキシングプライマー、リガーゼおよびPCRマスターミックスについて3つのサブユニットおよび2つのスプリントオリゴヌクレオチドと組み合わせられる。この方法において、反応混合物は、第1の温度でPCR反応混合物におけるプライマーサブユニットのアニーリングおよびライゲーションを可能にするのに十分な条件下でインキュベートされ、次いで反応混合物を高温に加熱して、リガーゼを不活性化させ、PCRのためにNGSライブラリー基質を変性させ、ホットスタートポリメラーゼを使用する場合はポリメラーゼを活性化させる。次いで、ランケーションされたNGSライブラリーの2つのアダプター配列にアニーリングするインデキシングプライマーライゲーション生成物を使用して、PCR熱サイクリングを必要なサイクル数だけ実施して、アダプター配列のインデックスおよび残りを組み込み、所望のライブラリー収率を達成する。2つのスプリントオリゴヌクレオチドは、PCR時のプライミング活性を防止するための3'ブロック基を含み、インデキシングおよび3'プライマーサブユニットは、スプリントライゲーションのための5'ホスフェートを必要とする。限定することなく、この方法は、単一密閉管での任意の所望のDNA基質の増幅のために任意の数のサブユ

30

40

50

ニットおよびスプリントから任意のプライマーをアセンブルするために使用できる。

【0022】

さらに別の実施形態において、オリゴヌクレオチドスプリントライゲーションによってアセンブルされた任意の生成物が、個々のオリゴヌクレオチド合成の長さ限界より大きいロングDNA生成物の合成などの単一密閉管でのPCR増幅のための基質でもあるライゲーションカップルドPCR反応を実施することができる。この方法では、個々のオリゴヌクレオチドサブユニットを所望の生成物の一本鎖に対してタンデム合成し、次いで、タンデムサブユニットの接合部における3'部分および5'部分に相補的な配列を含むスプリントオリゴヌクレオチドを合成してタンデム一本鎖設計を繋ぐ。この方法において、サブユニットおよびスプリントオリゴヌクレオチドは、リガーゼ、PCRマスターミックス、な
らびに最5'サブユニットの5'部分と同一の配列を含むフォワードプライマー、および最
3'サブユニットの3'末端に相補的なリバースプライマーと組み合わせられる。反応混合物
は、第1の温度でのPCR反応混合物におけるオリゴヌクレオチドサブユニットのアニ
ーリングおよびライゲーションを可能にするのに十分な条件下でインキュベートされる。次
いで、反応混合物を高温に加熱して、リガーゼを不活性化させ、ホットスタートポリメ
ラーゼを使用する場合はポリメラーゼを活性化させる。フォワードおよびリバースプライ
マーを使用してPCR熱サイクリングを必要なサイクル回数だけ実施して、二本鎖生成物の
所望の収率を達成する。スプリントオリゴヌクレオチドは、PCR時のプライミング活性
を防止するための3'ブロック基を含み、オリゴヌクレオチドサブユニットは、スプ
リントライゲーションのための5'ホスフェートを必要とする。サブユニットは、未使用
のサブユニットオリゴヌクレオチドがPCR時のプライミングにより完全にアセンブルさ
れた生成物をトランケーションするのを防止するために、フォワードおよびリバースプ
ライマーのみが生成物を増幅させるように、PCRを支えることができないくらいの低濃度
で反応物に添加され得る。

【0023】

以上で参照したSwift Accel-NGS 2Sにおいてステップの数を減少させ、DNA投入量を低下させることもできる新規のNGSライブラリー方法を本明細書に開示するが、それらに限定されるものと解釈されるべきではない。それらの方法は、ライゲーションカップルドPCR反応にインデキシングプライマーを使用し、それぞれが当該技術分野で広く使用される2つの異なるインデキシングプライマー設計、すなわち各アダプターに固有のすべての配列を含むが、3'末端が両アダプターに共通の配列を除くインデキシングプライマー、ならびに3'末端が両アダプターに共通の配列を含めて完全な完全長アダプターおよび各アダプターの2つの異なる配列を含むインデキシングプライマー、ならびに当該技術分野で使用される2つの異なるアダプターライゲーション化学作用、すなわちアダプターライゲーション効率およびライブラリー収率を向上させるために使用される平滑基質への平滑末端アダプターのライゲーション、ならびにDNAキメラおよびアダプター二量体の形成を防止するために使用される、単一A塩基オーバーハングを有する基質への単一T塩基オーバーハングを有する、アダプターのライゲーションのうちの1つを利用する、少なくとも4つの方法が存在する。インデキシングプライマーの設計は、短くなるとオリゴヌクレオチド合成コストが減少し、長くなると、変性ライブラリー分子
をプライミングする場合に共通の3'アダプター配列およびそのリバース相補体によって
形成される二次構造を破壊し得るためPCR効率が高くなる。ライゲーションカップルド
PCR反応で第2の5'アダプターライゲーションが行われる順次的な2ステップアダプ
ターライゲーションのワークフローにおいて第1の3'アダプターライゲーションステッ
プ時にT/Aアダプターライゲーション化学作用を使用すると、アダプター二量体の形成
がほぼ完全に排除され、DNA投入量閾値がフェムトグラムレベルまで減少し、平滑末端
アダプターライゲーション化学作用を使用すると、AT/GCバイアスを小さくすることが
可能になる。

【0024】

1つの例示的な方法では、Covaris、およびブルーフリーディングT4 DNA

10

20

30

40

50

ポリメラーゼを用いた最適化末端ポリシングプロトコルなどの標準的な音波DNA断片化方法を利用して、DNA断片化および末端修復が実施され、その後65℃で熱不活性化が行われる。T4 DNAポリメラーゼの熱不活性化後、DNAは、ウラシル塩基、および5'末端がリン酸化されたオリゴヌクレオチド2を含むオリゴヌクレオチド1をアニーリングすることによって形成された平滑末端3'アダプター、T4 DNAリガーゼおよびライゲーション緩衝液と組み合わせられ、第1のライゲーション反応が実施される。アダプター二量体の形成を防ぐために、前に開示されたように、オリゴヌクレオチド1の3'末端の塩基を修飾してDNAの5'末端へのそのライゲーションを防止する。当該修飾塩基の例としては、ddTなどの、リボース内の2'および3'位の2つのヒドロキシル基が欠失したジデオキシヌクレオチド、ならびに3'-dTなどの、3'位の1つのヒドロキシル基が欠失している3'-誘導体が挙げられるが、それらに限定されない。DNAの3'末端にライゲーションされた3'アダプターは、DNAの非ライゲーション5'末端と切れ目を形成する。3'アダプターの第2の末端は、アダプター設計、すなわち5'リン酸基を除外し、突出する3'末端にブロッキング基またはライゲーション不能な塩基修飾を配置することによってライゲーションから完全に保護される。

【0025】

別の例示的方法では、Covaris、およびブルーフリーディングT4 DNAポリメラーゼを用いた最適化末端ポリシングプロトコルなどの標準的な音波DNA断片化方法を利用して、DNA断片化および末端修復を実施し、その後65℃でTaq DNAポリメラーゼとインキュベートして、単一A塩基3'オーバーハングを両DNA末端に添加し、T4 DNAポリメラーゼを熱不活性化させる。AテールドDNAは、ウラシル塩基、および5'末端がリン酸化されたオリゴヌクレオチド2を含み、3'末端に単一T（またはU）塩基オーバーハングを含むオリゴヌクレオチド1をアニーリングすることによって形成された3'アダプター、T4 DNAリガーゼおよびライゲーション緩衝液と組み合わせられ、第1のライゲーション反応が実施される。その結果、単一塩基オーバーハングを有する3'アダプターが両DNA鎖に接合する。3'アダプターの第2の末端は、3'アダプター設計、すなわち5'リン酸基を除外し、突出する3'末端にブロッキング基またはライゲーション不能な塩基修飾を配置することによってライゲーションから完全に保護される。

【0026】

平滑または単一塩基オーバーハングを有する3'アダプターのライゲーションに続いて、ビーズベース精製ステップを実施して、未使用のアダプター、酵素および交換緩衝液を除去することができる。図1Eおよび図1Fに示されるように、既の開示された5'アダプターライゲーション、SPRIビーズ精製およびインデキシングPCRを続ける代わりに、一実施形態において、精製DNA生成物が、エンドヌクレアーゼ、リガーゼ、PCRマスターミックス、両3'アダプターに共通の3'末端配列を含む完全長ライブラリーインデキシングプライマー対と組み合わせられる。完全長インデキシングプライマーを使用することによって、5'アダプターに対応するプライマーをライゲーションのためのアダプターおよびPCR増幅のためのプライマーの両方として同じライゲーションカップルドPCR反応に使用できる。加えて、3'アダプターに対応するインデキシングプライマーの3'末端に相補的な必要に応じたブロッカーオリゴヌクレオチドが、このプライマーにプレアニーリングされてもよい。ブロッカーオリゴヌクレオチドは、このプライマーが第1のインキュベーション温度での初期5'アダプターライゲーションステップに関与することを防止するが、PCRアニーリング温度未満の温度 T_m を有する、または不活性化されるため、PCR時にプライミング活性を阻害しない（図2B～2Gおよび4A～4E参照）。この方法において、反応混合物は、ウラシル塩基を含む3'アダプターオリゴヌクレオチド8または9のエンドヌクレアーゼ開裂を可能にすることにより、5'アダプター配列を含む完全長インデキシングプライマーの3'末端がユニバーサルアダプター（第1の共通ヌクレオチド配列）のリバース相補体の5'末端にアニーリングし、DNA断片の5'末端にライゲーションすることを可能にするのに十分な条件下でインキュベートされ、エンド

ヌクレアーゼ反応およびライゲーション反応の両方が、両酵素の活性に好適な第1の温度にてPCR反応混合物中で行われる。次いで、反応混合物を高温に加熱してエンドヌクレアーゼおよびリガーゼを不活性化させ、PCRのためにDNA基質を変性させ、ホットスタートポリメラーゼを使用する場合はポリメラーゼを活性化させる。次いで、ランケーションされた3'アダプター配列を含むユニバーサルアダプターのリバーズ相補体、および完全長5'アダプターのリバーズ相補体にアニーリングするインデキシングプライマーを使用して、PCR熱サイクリングを必要なサイクル数だけ実施して所望のライブラリー収率を達成する。

【0027】

ライゲーションカップルドPCRに続いて、ビーズベースの精製ステップを実施することができ、次いでライブラリーの定量、プーリングおよびシーケンシングを実施することができる。この新規の方法は、DNA転換率が高いこと、アダプター二量体が少ないこと、DNA投入量の範囲が広いこと、および可変投入量による試料に対するアダプター濃度調整が不要であることなどのAccel-NGS 2S DNAワークフローの主たる利点を維持しながらステップの数を減少させる。加えて、UまたはT塩基オーバーハングを有する3'アダプターを利用する方法では、市場で入手可能ないずれのキットによっても提供されないフェムトグラムDNA投入量によるライブラリー調製が可能である。アダプターライゲーションを単一密閉管でのPCR増幅と組み合わせることによって、アダプターライゲーションとPCRとの間に通常必要とされるさらなる精製ステップが回避されるとともに、精製ステップが必要でなければライゲーション反応に続くPCR試薬の添加が回避される。この点において、新規のワークフローは、酵素的インキュベーションおよび精製ステップの数が、最も一般的なDNAライブラリーキットと類似している。

【0028】

図1Gおよび図1Hに示される他の実施形態において、精製3'アダプターライゲーション生成物は、それぞれが両アダプターに共通の3'末端配列を欠くエンドヌクレアーゼ、ランケーションされた5'アダプター、リガーゼ、PCRマスターミックスおよびライブラリーインデキシングプライマー対と組み合わせられる。これらの実施形態において、インデキシングプライマーが、シーケンシングプライマーのアニーリングに必要であるアダプターの共通の配列を欠くため個別の5'アダプターがライゲーションに必要とされる。反応混合物は、ウラシル塩基を含む3'アダプターオリゴヌクレオチド8または9のエンドヌクレアーゼ開裂を可能にすることにより、DNAの3'末端に接合される3'アダプターオリゴヌクレオチド7の5'部分への5'ランケーションされたアダプターの3'部分のアニーリング、そのDNA基質の5'末端へのライゲーションを可能にするのに十分な条件下でインキュベートされ、エンドヌクレアーゼおよびライゲーション反応の両方が、両酵素の活性に好適な第1の温度にてPCR反応混合物中で行われる。次いで、反応混合物を高温に加熱してエンドヌクレアーゼおよびリガーゼを不活性化させ、PCRのためにDNA基質を変性させ、ホットスタートポリメラーゼを使用する場合はポリメラーゼを活性化させる。次いで、ランケーションされた3'アダプター配列を含む配列7にアニーリングするインデキシングプライマーを使用して、PCR熱サイクリングを必要なサイクル数だけ実施して所望のライブラリー収率を達成する。また、ランケーションされた5'アダプターは、それがライゲーションに関与することを可能にするが、完成ライブラリー分子から完全長5'アダプター配列をランケーションすることができないように、PCR時のプライマーとしてのその活性を防止するための二次構造を含む（図3および5参照）。

【0029】

ライゲーションカップルドPCRに続いて、精製ステップを実施することができ、次いでライブラリーの定量、プーリングおよびシーケンシングを実施することができる。この新規の方法は、DNA転換率が高いこと、アダプター二量体が少ないこと、DNA投入量の範囲が広いこと、および可変投入量による試料に対するアダプター濃度調整が不要であることなどのAccel-NGS 2S DNAワークフローの主たる利点を維持しな

がらステップの数を減少させる。加えて、UまたはT塩基オーバーハングを有する3'アダプターを利用する方法では、市場で入手可能ないずれのキットによっても提供されないフェムトグラムのDNA投入量によるライブラリー調製が可能である。アダプターライゲーションを単一密閉管でのPCR増幅と組み合わせることによって、アダプターライゲーションとPCRとの間に通常必要とされるさらなる精製ステップが回避されるとともに、精製ステップが必要でなければライゲーション反応に続くPCR試薬の添加が回避される。この点において、新規のワークフローは、酵素的インキュベーションおよび精製ステップの数が、最も一般的なDNAライブラリーキットと類似している。

【0030】

上記で開示されたDNA NGSライブラリーの調製のためのライゲーションカップルドPCR方法をNormalaseとして商業化されている（かつその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第10,961,562号に記載されている）簡素な酵素的ライブラリー正規化方法と組み合わせることができる。Normalaseを添加すると、個々のライブラリー濃度の定量、および個々のライブラリー濃度に基づく試料プーリング体積の変更を回避することによって、多重化シーケンシングのためのライブラリープーリングステップが簡素化される。それに対して、この方法は、等モルのライブラリー収率をもたらすため、シーケンシングの前の簡素な高スループットのライブラリー処理後ステップのための各ライブラリーの等体積のプーリングを可能にする。この方法を上記の2つのライゲーションカップルドPCR方法に組み込むための唯一の要件は、1) 各インデキシングプライマーが、3つまたはそれより多い連続的なリボヌクレオチド塩基、および3つまたはそれより多い連続的なリボヌクレオチドの5'側の2つまたはそれより多いデオキシヌクレオチドをさらに含むことが必要であること、2) 増幅ステップで 사용되는DNAポリメラーゼが、PCR増幅時に5'オーバーハングを生成するために3'から5'のエクソヌクレアーゼブルーフリーディング活性を有する必要がある（図1Cおよび1Dに示されるアンプリコンライブラリーに類似）ことである。

【0031】

次いで、Normalaseを、既に関示された酵素的方法に改造を加えることなく実施することができ、参考のために以下に概説する。精製されたPCR生成物は、リガーゼ、および5'オーバーハングに相補的なプローブと組み合わされて第1の酵素反応混合物を生成し、プローブが所望の標的モル量と等しい量で各ライブラリーに添加され、第1の反応混合物は、増幅ライブラリー分子の5'オーバーハング部分にアニーリングすることによる3'末端へのプローブのライゲーションを可能にするのに十分な条件下でインキュベートされ、プローブにライゲーションされた増幅ライブラリー分子の部分が、処理ライブラリー分子の標的モル量となる。次に、各ライブラリーは、処理ライブラリー分子の標的量が同じであるため、コシーケンシング対象の各ライブラリーの等体積プーリングが実施される。プローブは、エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素による消化に対する抵抗を与えるための改造型を含むため、ライブラリープールは、プローブにライゲーションされない処理ライブラリー分子を消化することによって、選択された標的量の処理ライブラリー分子を単離することを可能にするのに十分な条件下で、第2の酵素反応混合物におけるエクソヌクレアーゼと組み合わせられる。次いで、第2の酵素反応混合物は、熱不活性化され、プールが、さらなる精製ステップを行うことなくフローセルローディングに利用可能となる。必要に応じて、プールのqPCR定量を実施して、最適なシーケンシングフローセル上での特定クラスター密度を達成するための所望の最終モル濃度を確認することができる。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1A-1】図1Aは、部分的に二本鎖のDNA基質が、標的特異的なプライマーおよびユニバーサルプライマーをdU塩基と使用した多重PCR、ならびに3'オーバーハングを生成するエンドヌクレアーゼ開裂、続いて5'アダプターライゲーション、および3'オーバーハング（第1の共通ヌクレオチド配列）の5'部分に相補的である3'末端部分を

各々有する2つのインデキシングプライマーを使用したインデキシングPCRによって生成され、インデキシングプライマーの1つは5'アダプターとして機能することができ、他はブロッカーオリゴヌクレオチドにアニーリングされるのでそうすることができない、例示的なワークフローを表す。

【図1A-2】同上。

【図1A-3】同上。

【0033】

【図1B-1】図1Bは、部分的に二本鎖のDNA基質が、標的特異的プライマーおよびユニバーサルプライマーをdU塩基と使用した多重PCR、ならびに3'オーバーハングを生成するエンドヌクレアーゼ開裂、続いて3'オーバーハング（第1の共通ヌクレオチド配列）の5'部分に相補的である3'末端配列を有するヘアピンアダプターを使用した5'アダプターライゲーション、および3'オーバーハング（第1の共通ヌクレオチド配列）の5'部分に相補的である3'末端部分を含まない2つのインデキシングプライマーを使用したインデキシングPCRによって生成されるが、第2のインデキシングプライマーは第1の共通ヌクレオチド配列の3'側の第2の共通ヌクレオチド配列に相補的である3'末端部分を有する、例示的なワークフローを表す。ヘアピンは、第1のPCRサイクルの後に第1のインデキシングプライマーを使用した以降のPCRを可能にする第1のインデキシングプライマーの部分を含む。

【図1B-2】同上。

【図1B-3】同上。

【0034】

【図1C】図1Cは、インデキシングプライマーがライゲーションカップルドPCRの後にライブラリー正規化を可能にする5'正規化テールを含む、例示的なワークフローを表す。図1Cは、配列番号1として(T)₁₂(rU)₄を開示する。

【0035】

【図1D】図1Dは、インデキシングプライマーがライゲーションカップルドPCRの後にライブラリー正規化を可能にする5'正規化テールを含む、例示的なワークフローを表す。図1Dは、配列番号1として(T)₁₂(rU)₄を開示する。

【0036】

【図1E】図1Eは、DNA修復、平滑末端を有する3'アダプターのライゲーション、ならびにフルサイズインデキシングプライマーおよびプライマーブロッカーによるライゲーションカップルドPCRを含む、NGSライブラリー調製方法を表す。

【0037】

【図1F】図1Fは、DNA修復、Aテーリング、Uオーバーハングを有する3'アダプターのライゲーション、ならびにフルサイズインデキシングプライマーおよびプライマーブロッカーによるライゲーションカップルドPCRを含む、NGSライブラリー調製方法を表す。

【0038】

【図1G】図1Gは、DNA修復、平滑末端を有する3'アダプターのライゲーション、ならびにトランケーションされたインデキシングプライマーおよびヘアピン5'アダプターによるライゲーションカップルドPCRを含む、NGSライブラリー調製方法を表す。

【0039】

【図1H】図1Hは、DNA修復、Aテーリング、Uオーバーハングを有する3'アダプターのライゲーション、ならびにトランケーションされたインデキシングプライマーおよびヘアピン5'アダプターによるライゲーションカップルドPCRを含む、NGSライブラリー調製方法を表す。

【0040】

【図1I】図1Iは、異なるNGSライブラリープロトコルでのアダプター二量体形成の比較を表す。

【0041】

10

20

30

40

50

【図 2 A - 1】図 2 A は、部分的に二本鎖の DNA 基質が、3' オーバーハングを生成するエンドヌクレアーゼ開裂、続いて 5' アダプターライゲーション、および 3' オーバーハング（第 1 の共通ヌクレオチド配列）の 5' 部分に相補的である 3' 末端部分を各々有する 2 つのインデキシングプライマーを使用したインデキシング PCR によって生成され、インデキシングプライマーのいずれかが 5' アダプターとして機能することができる、例示的なワークフローを表す。

【図 2 A - 2】同上。

【図 2 A - 3】同上。

【0042】

【図 2 B】図 2 B は、部分的に二本鎖の DNA 基質が、3' オーバーハングを生成するエンドヌクレアーゼ開裂、続いて 5' アダプターライゲーション、および 3' オーバーハング（第 1 の共通ヌクレオチド配列）の 5' 部分に相補的である 3' 末端部分を各々有する 2 つのインデキシングプライマーを使用したインデキシング PCR によって生成され、インデキシングプライマーの 1 つは 5' アダプターとして機能することができ、他はブロッカーオリゴヌクレオチドにアニーリングされるのでそうすることができない、例示的なワークフローを表す。

10

【0043】

【図 2 C】図 2 C は、(a) 低い T_m を含むため PCR 時に不活性となる線状ブロッカー、または (b) Illumina TruSeq アダプターを使用するときに PCR の間不活性化されるヘアピンブロッカーのさらなる詳細を表す。図 2 C は、配列番号 78 ~ 80、78 ~ 80、78 ~ 79、81 ~ 82、78 ~ 79 および 83 ~ 84 をそれぞれ出現順に開示する。

20

【0044】

【図 2 D】図 2 D は、多重 PCR、組み込まれたユニバーサルプライマーのエンドヌクレアーゼ開裂、3' アダプターインデキシングプライマー (i7) にプレアニーリングされた 3 つのミスマッチを有する線状ブロッカー 5、および基質アンプリコンのユニバーサルアダプター配列のリバース相補体の 5' 部分への 5' アダプターインデキシングプライマー (i5) の 3' 末端のライゲーションの態様についての Illumina TruSeq アダプター配列を表す。図 2 D は、配列番号 85、85 ~ 87、42、78 ~ 79、89、86、78 ~ 79、89、87、42 および 86 をそれぞれ出現順に開示する。

30

【0045】

【図 2 E】図 2 E は、多重 PCR、組み込まれたユニバーサルプライマーのエンドヌクレアーゼ開裂、3' アダプターインデキシングプライマー (i7) にプレアニーリングされた 6 T 挿入を有する線状ブロッカー 5、および基質アンプリコンの 5' 末端への 5' アダプターインデキシングプライマー (i5) の 3' 末端のライゲーションの態様についての Illumina TruSeq アダプター配列を表す。図 2 E は、配列番号 85、85 ~ 87、42、78 ~ 79、89、86、78 ~ 79、89、87、42 および 86 をそれぞれ出現順に開示する。

【0046】

【図 2 F】図 2 F は、 T_m 還元性 T * G ミスマッチに加えて 3 つの分解可能な U 塩基を有する線状ブロッカーを表す。図 2 F は、配列番号 78 ~ 79、49、78 ~ 79、90、78 ~ 79 および 91 をそれぞれ出現順に開示する。

40

【0047】

【図 2 G】図 2 G は、DNA 修復、平滑末端 3' アダプターのライゲーション、ならびにフルサイズインデキシングプライマーおよび 1 つのミスマッチおよびいくつかの分解可能な d U 塩基を含有する i7 プライマーブロッカーによるライゲーションカップルド PCR を含む、NGS ライブラリー調製を表す。図 2 G は、配列番号 92、92 ~ 93、93、87、42、78 ~ 79、90、93、78 ~ 79、90、87、42 および 93 をそれぞれ出現順に開示する。

【0048】

50

【図 3 A】図 3 A は、3' 末端の 13 塩基を欠くランケーションされたインデキシングプライマー i 5 および i 7 ならびに線状 5' アダプターによるライゲーションカップルド PCR 反応を表す。

【0049】

【図 3 B】3' 末端の 13 塩基を欠くランケーションされたインデキシングプライマー i 5 および i 7 ならびにランケーションされたヘアピン 5' アダプターによるライゲーションカップルド PCR 反応。

【0050】

【図 3 C】図 3 C は、ステムループがランケーションされたアダプター 5 が、ループ配列の中で黒色の円によって表される複製不可能修飾をさらに含み、したがって完全に複製されたヘアピン生成物の形成が防止されることをさらに表す。

10

【0051】

【図 3 D】図 3 D は、ステムループがランケーションされたアダプターがループ配列の中の複製不可能修飾を欠く場合の望ましくない結果を表す。

【0052】

【図 3 E】図 3 E は、内部の複製不可能 C 3 スペースを含む、ヘアピンがランケーションされたアダプターがライゲーションカップルド PCR のために使用されるとき TruSeq Illumina アダプターワークフローを使用した具体的な実施形態を表す。図 3 E は、配列番号 85、85~86、94、42、87、95、78、96~97、86~87、95、78、96~97、94、42、78、96 および 93 をそれぞれ出現順に開示する。

20

【0053】

【図 3 F】図 3 F は、内部の複製不可能 C 3 スペースを有する、ヘアピンがランケーションされたアダプターがライゲーションカップルド PCR のために使用される、TruSeq Illumina アダプターワークフローを使用した代替の実施形態を表す。図 3 F は、配列番号 98、98、86、94、53、87、95、78、96~97、86~87、95、78、96~97、94、42、78、96 および 93 をそれぞれ出現順に開示する。

【0054】

【図 3 G】図 3 G は、Nextera Illumina アダプターワークフローが、ライゲーションカップルド PCR のためにヘアピンがランケーションされたアダプター、完全長インデキシングプライマーおよび線状ブロッカーと使用されることを表す。図 3 G は、配列番号 99、99~102、87、103、78、104~105、100、87、103、78、104~105、101、103 および 100 をそれぞれ出現順に開示する。

30

【0055】

【図 3 H】図 3 H は、ヘアピンがランケーションされたアダプターが、ライゲーションカップルド PCR のための共通アダプター配列を欠くインデキシングプライマーと使用される、別の Nextera Illumina アダプターワークフローを表す。この例では、dU 塩基を含有するユニバーサルアンプリコンプライマーがすべての 5 つの T デオキシヌクレオチドを置き換えるが、3' 末端の 9 つの塩基配列は、USER 開裂が実施されるとき T 塩基の不在のために保持される。図 3 H は、配列番号 99、99~102、87、106、78、107~108、100、87、106、78、107~108、101、103、78、107 および 109 をそれぞれ出現順に開示する。

40

【0056】

【図 3 I】図 3 I は、DNA 修復、A テーリング、U 塩基オーバーハングを有する 3' アダプターのライゲーション、ならびにランケーションされたインデキシングプライマーおよび 13b 3' オーバーハングを有するヘアピン 5' アダプターによるライゲーションカップルド PCR を含む、NGS ライブラリー調製を表す。図 3 I は、配列番号 51、51、24、93~94、42、87、95、78、96、93、87、95、94、42

50

、 7 8、9 6 および 9 3 をそれぞれ出現順に開示する。

【 0 0 5 7 】

【図 3 J】図 3 J は、DNA 修復、平滑末端 3' アダプターのライゲーション、ならびに
 トランケーションされたインデキシングプライマーおよび 1 3 b 3' オーバーハングを
 有するヘアピン 5' アダプターによるライゲーションカップルド PCR を含む、NGS ラ
 イブラリー調製を表す。図 3 J は、配列番号 9 2、9 2 ~ 9 3、9 3 ~ 9 4、4 2、8 7
 、9 5、7 8、9 6、9 3、8 7、9 5、9 4、4 2、7 8、9 6 および 9 3 をそれぞれ
 出現順に開示する。

【 0 0 5 8 】

【図 3 K】図 3 K は、DNA 修復、A テーリング、T 塩基オーバーハングを有する 3' ア
 ダプターのライゲーション、ならびにトランケーションされたインデキシングプライマー
 および 1 1 b 3' オーバーハングを有するヘアピン 5' アダプターによるライゲーション
 カップルド PCR を含む、NGS ライブラリー調製を表す。図 3 K は、配列番号 5 2、5
 2、2 4、9 3 ~ 9 4、5 3、8 7、9 5、7 8、9 6、9 3、8 7、9 5、9 4、4 2
 、7 8、9 6 および 9 3 をそれぞれ出現順に開示する。

【 0 0 5 9 】

【図 3 L】図 3 L は、DNA 修復、A テーリング、T 塩基オーバーハングを有する 3' ア
 ダプターのライゲーション、ならびにフルサイズのインデキシングプライマー、1 つのミ
 スマッチおよびいくつかの分解可能な U 塩基を含有するブロッカー、および 1 0 b オー
 バーハングを有するヘアピン 5' アダプターによるライゲーションカップルド PCR を含む
 、NGS ライブラリー調製を表す。図 3 L は、配列番号 1 1 0、1 1 0 ~ 1 1 1、1 1 1
 、1 0 1 ~ 1 0 2、8 7、1 0 3、7 8、1 0 4 ~ 1 0 5、1 1 2、8 7、1 0 3、7 8
 、1 0 4 ~ 1 0 5、1 0 1、1 0 3 および 1 0 0 をそれぞれ出現順に開示する。

【 0 0 6 0 】

【図 4 A】図 4 A は、線状ブロッカーおよびヘアピンブロッカーの例示的な構造を表す。

【 0 0 6 1 】

【図 4 B】図 4 B は、ブロッカーオリゴヌクレオチドを使用したワークフローを表す。

【 0 0 6 2 】

【図 4 C】図 4 C は、ブロッカーおよびインデキシングプライマーの 1 つを表す。

【 0 0 6 3 】

【図 4 D】図 4 D は、ヘアピンブロッカーを使用したワークフローを表す。

【 0 0 6 4 】

【図 4 E】図 4 E は、伸長ステムが伸長ヘアピンの融解温度を上昇させることができるこ
 とを示す、ヘアピンブロッカーの例示的なワークフローを表す。

【 0 0 6 5 】

【図 5 A】図 5 A は、ヘアピンアダプターおよび第 1 のインデキシングプライマーを表す
 。

【 0 0 6 6 】

【図 5 B】図 5 B は、ヘアピンアダプターを使用したワークフローを表す。

【 0 0 6 7 】

【図 5 C】図 5 C は、ヘアピンアダプターを使用したワークフローを表す。

【 0 0 6 8 】

【図 6 A】図 6 A は、スプリント媒介プライマーアセンブリの例示的なワークフローを表
 す。

【 0 0 6 9 】

【図 6 B】図 6 B は、それらの 5' 末端に (T)₁₂ (rU)₄ (配列番号 1) を含む N
 o r m a l a s e 適合プライマーがアセンブルされる方法の詳細を表す。図 6 B は、配列
 番号 1 として (T)₁₂ (rU)₄ を開示する。

【 0 0 7 0 】

【図 6 C】図 6 C は、下流の酵素正規化に適合する (T)₁₂ (rU)₄ (配列番号 1)

10

20

30

40

50

配列を有する *TruSeq Illumina* インデキシングプライマーのアセンブリを表す。図 6 C は、配列番号 1 1 3 ~ 1 1 8 および 1 1 6 ~ 1 1 7 をそれぞれ出現順に開示する。

【0071】

【図 6 D】図 6 D は、上の 4 C の *i 5 TruSeq Illumina* インデキシングプライマーのプライマーアセンブリが、3' アダプター配列を含む対応する *i 7* インデキシングプライマーのアセンブリ、*i 7* プライマーへのヘアピンブロッカーのアニール、およびトランケーションされた 3' アダプターを含むアンプリコン基質への *i 5* プライマーのライゲーション（エンドヌクレアーゼ開裂に続く、示さず）と組み合わせられるときの、ライゲーションカップルド PCR ワークフローを表す。図 6 D は、配列番号 1 1 3 ~ 1 1 7、1 1 9 ~ 1 2 2、8 3、8 2、9 3、1 1 8、1 1 6 ~ 1 1 8、1 1 6 ~ 1 1 7、9 3、1 2 3、1 2 2、8 3 および 8 2 をそれぞれ出現順に開示する。

10

【0072】

【図 7】図 7 は、実験実施例 1 の結果を表す。フォワードプライマーから始まるリードが上部にプロットされ、リバープライマーからのリードは *IGV* プロットの下部にプロットされる、*IGV* で観察された *Candida albicans* のための *ITS1 rRNA* アンプリコンカバレッジ。

【0073】

【図 8】図 8 は、実験実施例 3 の結果を表す。PCR のために最適化された条件の下でスプリントライゲーションのための *T3 DNA* リガーゼを使用して、ライゲーションによるインデキシングプライマーの 90% を超えるアセンブリが観察されたが、*T4 DNA* リガーゼは非効率であった。

20

【0074】

【図 9】図 9 は、配列番号 4 4、4 9、4 4、5 0、4 4、1 2 4、4 4、1 2 5、4 4 および 4 6 をそれぞれ出現順に開示する。

【0075】

図 9 は、実施例 5 に記載される異なるプライマーブロッカーを有するインデキシングプライマー *i 7* によって形成された二本鎖 DNA 構造を表す。

【0076】

【図 10 A】図 10 A は、実施例 6 に記載される *NGS* ライブラリーの 3' および 5' アダプターの構造を表す。図 10 A は、配列番号 5 2、5 1、2 4、2 4、4 5、5 3、4 5 および 4 2 をそれぞれ出現順に開示する。

30

【0077】

【図 10 B】図 10 B は、実施例 6 に記載される *NGS* ライブラリーのためのピカードプロットを表す (*NGS* ライブラリープレップ A 50 ng)。

【0078】

【図 10 C】図 10 C は、実施例 6 に記載される *NGS* ライブラリーのためのピカードプロットを表す (*NGS* ライブラリープレップ A 250 ng)。

【0079】

【図 10 D】図 10 D は、実施例 6 に記載される *NGS* ライブラリーのためのピカードプロットを表す (*NGS* ライブラリープレップ B 50 ng)。

40

【0080】

【図 10 E】図 10 E は、実施例 6 に記載される *NGS* ライブラリーのためのピカードプロットを表す (*NGS* ライブラリープレップ B 250 ng)。

【0081】

【図 11 A】図 11 A は、実施例 6 に記載される方法によって DNA のピクトグラム量から調製されたライブラリーのための *Bio Analyzer* トレースを表す。

【0082】

【図 11 B】図 11 B は、実施例 6 に記載される方法によって DNA のピクトグラム量から調製されたライブラリーのための *Bio Analyzer* トレースを表す。

50

【0083】

【図11C】図11Cは、実施例6に記載される方法によってDNAのピクトグラム量から調製されたライブラリーのためのBio Analyzerトレースを表す。

【発明を実施するための形態】

【0084】

図では、反応が単一密閉管で起こることが示され、ブラケットが図の連続したページにある場合、ブラケットのすべてのステップのすべては同じ密閉管で起こると理解されることを理解すべきである。例として、図1Aは3ページにまたがるが、多重PCRの後のステップのすべては、別々のブラケットが各ページに出現するとしても、同じ「単一密閉管」にあることを理解すべきである。

10

【0085】

詳細な説明

本開示は、特定の実施形態について、特定の図面を参照しながら説明するが、対象事項はそれらに限定されない。記載の図面は、概略的であり、限定的でない。図面において、一部の要素の大きさは、例示を目的として誇張または改変され、実規模で描かれていない場合もある。本開示の要素は、そうでないことが具体的に指示されていなければ、最初の出現で「1つの(a)」または「1つの(an)」が割り当てられ、二回目またはその後の出現で定冠詞「その(the)」または「前記(said)」が割り当てられる。

【0086】

本開示は、本開示の対象事項のすべてではなく一部の実施形態が示される添付の図面に対する説明を提供する。実際、対象事項は、多くの異なる形態で具体化されてもよく、本明細書に記載される実施形態に限定されるものと解釈されるべきではなく、むしろこれらの実施形態は、本開示がすべての法的要件を満たすように提供される。

20

【0087】

定義

特定の用語類は、単に便宜のために以下の説明に使用されており、限定するものではない。本明細書に使用される特定の用語は、参照される図面において方向を指定する。本明細書に具体的に記載されていなければ、「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」という用語は、1つの要素に限定されず、「少なくとも1つ」を意味するものとして捉えられるべきである。本明細書に用いられる場合、「別の」とは、少なくとも第2またはそれ以降を意味する。用語類は、以上に言及した用語、それらの派生語、および類似の重要性を有する用語を含む。

30

【0088】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、代替のみを指すことが明示される場合、または代替が互いに排他的である場合を除いて「および／または」を意味するように使用される。

【0089】

数値とともに使用される場合の「約」という用語の使用は、 $\pm 10\%$ を含むことを意図する。例えば、アミノ酸の数が約200であると特定される場合、これは180～220（プラスまたはマイナス10%）を含む。

40

【0090】

本明細書に使用される場合、「低マグネシウム緩衝液」は、PCRに好適であるのに十分に低いマグネシウムレベルを有する任意の緩衝液であり得る。例として、限定することなく、低マグネシウム緩衝液は、1～2mMまたはそれより少なくマグネシウムを有することができる。

【0091】

別段の定義がなければ、本明細書に使用されるすべての技術および科学用語は、当業者に広く理解されているのと同様の意味を有する。

【0092】

本開示は、ライゲーションカップルドPCRの方法を提供する。当該方法を使用して、

50

次世代シーケンシング（NGS）および他の用途のためにアダプターをDNA基質に添加することができる。ライゲーションカップルドPCRによるスプリント媒介プライマーのアセンブリおよび使用のための方法も提供する。本開示の方法を実施するためのキットも提供する。

【0093】

本明細書に開示される方法は、2つの3'オーバーハングを含む、もしくは含むように処理可能である任意の開始DNA基質、または2つの3'オーバーハングを有する任意の部分的に二本鎖のDNA基質とともに使用できることが理解されるべきである。次いで、これにより、その後の5'アダプターのライゲーション、およびライゲーションされた二本鎖DNA基質のプライマーによるPCR増幅が可能になる。本明細書に開示される実施形態は、一部の事例において、特定の上流処理方法に関して開示されるが、それらは、それらの方法のみに限定されるものと解釈されるべきではない。

【0094】

i) PCR基質がライゲーションによりDNAサブユニットからアセンブルされ、PCRにより増幅される、ii) PCRプライマーがライゲーションによりDNAサブユニットからアセンブルされ、PCRによる増幅のために使用される、またはライゲーション反応および増幅反応が単一密閉管にて行われるそれらの組合せであるライゲーションカップルドPCRの方法を開示する。i) に関しては、PCR基質が、相補的スプリントオリゴヌクレオチドにより結合されたタンデムオリゴヌクレオチドのライゲーションによって生成される。あるいは、PCR基質が、開裂可能な塩基を有する第1のアダプターを含むトランシェーションされたNGSライブラリーであり、エンドヌクレアーゼが第1のアダプターの1つの鎖を開裂して、第2のアダプターのアニーリングおよびライゲーションを可能にする。ii) に関しては、PCRプライマーも相補的スプリントオリゴヌクレオチドにより結合されたタンデムオリゴヌクレオチドのライゲーションによってアセンブルされる。

【0095】

一実施形態において、共通アダプター配列をそれらの3'末端に含む完全長インデキシングプライマー3（第1のインデキシングプライマー）および4（第2のインデキシングプライマー）を利用するライゲーションカップルドPCRのための多重化アンプリコンワークフローを示す（図1A）。（多数のプライマー対を代表する）ユニバーサルテールド標的特異的プライマーP1およびP2を、多重化PCRにおいて開裂可能dU塩基を含む、P1およびP2のユニバーサルテールに相補的なユニバーサルプライマー1とともに示す。第2の反応は、単一密閉管において、組み込まれたユニバーサルプライマー1をUSER酵素によりエンドヌクレアーゼ開裂して、第1の鎖11および第2の鎖12を含む部分的に二本鎖の基質DNA分子10を生成すること、ユニバーサルプライマー配列2のリバース相補体の少なくとも一部分、すなわち両3'オーバーハングにおいてオーバーハングの5'末端に存在する第1の共通ヌクレオチド配列にアニーリングした後の5'アダプターインデキシングプライマー3（第1のインデキシングプライマー）を基質DNA10の5'末端にライゲーションすること、ならびに必要なに応じて、プレアニーリングされた線状ブロッカー5により、3'アダプターインデキシングプライマー4（第2のインデキシングプライマー）がライゲーション反応に関与するのを防止すること（ユニバーサルプライマー1が、3'アダプター4（第2のインデキシングプライマー）の3'部分と同じ配列を含むため）を同時に行った後に、PCRをインデキシングして、ライブラリーを増幅させ、アダプター配列を完成させる。5'アダプター3（第1のインデキシングプライマー）は、ライゲーションされると、第3の鎖13および第4の鎖14を生成することができる。ブロッカーは、第2のインデキシングプライマー4のライゲーションを防止するという理由、例えばライゲーション反応時の温度より高い融解温度（ T_m ）を有することができるという理由により、基質DNA分子10への第2のインデキシングプライマー4のライゲーションが生じない。最初のPCRサイクルにおいて、第1のインデキシングプライマー3または第2のインデキシングプライマー4は、ユニバーサルプライマー配列（第1

の共通ヌクレオチド配列を含む) 2 のリバーズ相補体の少なくとも一部分にアニーリングできるが、第 1 のインデキシングプライマー 3 がアニーリングして伸長されると、それは、さらなる PCR サイクルで抑制され得る、第 1 のインデキシングプライマーおよびその相補体が反対側の末端にある生成物を生成する。したがって、第 2 のインデキシングプライマー 4 がユニバーサルプライマー配列 2 のリバーズ相補体の少なくとも一部分にアニーリングする場合は、それは、鑄型としての第 3 の鎖 1 3 から第 5 の鎖 1 5 を、鑄型としての第 4 の鎖 1 4 から第 6 の鎖 1 6 を生成する。第 5 の鎖 1 5 および第 6 の鎖 1 6 の両方がそれぞれ第 1 のインデキシングプライマー 3 のリバーズ相補体を有するため、第 1 のインデキシングプライマー 3 は、次の PCR サイクルにて各々にアニーリングし、伸長して、それぞれ第 5 の鎖 1 5 および第 6 の鎖 1 6 に相補的である第 7 の鎖 1 7 および第 8 の鎖 1 8 を生成することができる。さらなる PCR サイクルにおいて、これらの二本鎖生成物を第 1 のインデキシングプライマー 3 および第 2 のインデキシングプライマー 4 によってさらに増幅させることができる。図 1 A は、単一密閉管で行われるインデキシング PCR を通じたエンドヌクレアーゼ開裂からのすべてのステップを示すが、インデキシング PCR を通じた 5' アダプターライゲーションからのステップは、エンドヌクレアーゼ開裂（または他の酵素的処理）も実施されるかどうかに関わらず単一密閉管で実施できることが理解されるべきである。いずれの図および実施形態についても、部分的に二本鎖の DNA 基質を生成するための開裂ステップを、ライゲーションおよび PCR とともに単一密閉管で行うこともできるし、ライゲーションカップルド PCR の前に別途実施することもできることが理解されるべきである。一部の実施形態において、部分的に二本鎖の DNA 基質を得るための酵素的処理を事前のステップで実施することもできるし、図 1 A に示されるように単一密閉管でワークフローの一部として実施することもできる。

10

20

【0096】

別の実施形態において、それらの 3' 末端における共通アダプター配列を欠くインデキシングプライマー 3 および 4 を利用するライゲーションカップルド PCR のための標的化アンプリコンワークフローを示す（図 1 B）。（多数のプライマー対を代表する）ユニバーサ尔特ール標的的特異的プライマー P 1 および P 2 を、多重化 PCR における開裂可能 dU 塩基を含むユニバーサルプライマー 1 とともに示す。第 2 の反応は、単一密閉管において、組み込まれたユニバーサルプライマー 1 を USER 酵素によりエンドヌクレアーゼ開裂すること、ユニバーサルプライマー配列 2 のリバーズ相補体の少なくとも一部分（例えば第 1 の共通ヌクレオチド配列）にアニーリングした後のランケーションされた 5' ヘアピンアダプター 6 をアンプリコン DNA の末端にライゲーションすることを同時に行った後に、インデキシングプライマー 3 および 4 を使用して PCR をインデキシングして、ライブラリーを増幅させ、アダプター配列を完成させる。ヘアピン 5' アダプターの二次構造は、PCR 時のプライマーとしてのその活性を、それが完成したライブラリー分子から 5' アダプターをランケーションしないように防止する。

30

【0097】

図 1 A の方法を、5' テール配列をさらに含むインデキシングプライマー 3 および 4 を利用することにより下流の酵素的ライブラリー正規化のために改造することができ、5' テール配列は、4 つの連続的 U リボヌクレオチド (rU) 塩基を含むことができ、1 2 T デオキシヌクレオチド (配列番号 2) に隣接する 5' を含むことができる（図 1 C）。PCR 効率を高めるために、5' (T)₁₂ (rU)₄ テール (配列番号 1) を含むさらなる正規化プライマーの対ならびに末端 P 5 および P 7 アダプター配列を反応に含めることもできる（オリゴヌクレオチド 1 8 ~ 2 2 1、表 1 の 1 8 ~ 2 2 2、図 1 C に不図示のプライマー）。

40

【0098】

図 1 B の方法を、5' テール配列をさらに含むインデキシングプライマー 3 および 4 を利用することにより下流の酵素的ライブラリー正規化のために改造することができ、5' テール配列は、4 つの連続的 U リボヌクレオチド (rU) 塩基を含むことができ、1 2 T デオキシヌクレオチド (配列番号 2) に隣接する 5' を含むことができる（図 1 D）。P

50

C R 効率を高めるために、5' (T)₁₂ (r U)₄ テール (配列番号 1) を含むさらなる 5' 正規化プライマーの対ならびに末端 P 5 および P 7 アダプター配列を反応に含めることもできる (オリゴヌクレオチド 18~221、表 1 の 18~222、図 1 D に不図示のプライマー)。

【0099】

一実施形態において、ライゲーションカップルド P C R のためのトランケーションされた N G S ライブラリーワークフローは、完全長インデキシングプライマー 3 および 4 を利用している (図 1 E)。このワークフローにおいて、断片化 D N A は、T 4 または T 7 D N A ポリメラーゼなどのポリシング D N A ポリメラーゼによる末端修復、ならびに平滑末端を有するオリゴヌクレオチド 7 および 8 によって形成された、平滑末端を有する 3' アダプターのライゲーションが施され、オリゴヌクレオチド 8 は、U 塩基などの 1 つまたは複数の開裂可能塩基、およびライゲーション反応に関与しない、平滑末端の 3' 末端における修飾ヌクレオチド (例えば、リボースが 3' ヒドロキシルまたは 3' および 2' ヒドロキシル基の両方から欠失した修飾) を有し、オリゴヌクレオチド 7 は、ライゲーション反応に関与する、平滑末端の 5' 末端におけるホスフェートを有する。ビーズ精製後、最終的反應は、単一密閉管において、オリゴヌクレオチド 8 を U S E R 酵素によりエンドヌクレアーゼ開裂すること、3' アダプターオリゴヌクレオチド 7 のリバース相補体にアニーリングした後の 5' アダプター (インデキシングプライマー 3) を D N A の 5' 末端にライゲーションすること、ならびに必要に応じて、プレアニーリングされた線状ブロッカー 5 により、インデキシングプライマー 4 がライゲーション反応に関与するのを防止すること (インデキシングプライマー 4 がインデキシングプライマー 3 の 3' 部分と同じ配列を含むため) を同時に行った後に、P C R をインデキシングして、ライブラリーを増幅させ、アダプター配列を完成させる。

【0100】

図 1 E の方法を、A テールド D N A に使用するように改造することができる。D N A ポリメラーゼ I または T a q D N A ポリメラーゼの (3' エクソ) クレノウ断片などの、3' ブルーフリーディング活性を欠く D N A ポリメラーゼとともにインキュベートした後に、オリゴヌクレオチド 7 および 8 により形成された U 塩基オーバーハングを 3' 末端に有する 3' アダプターをライゲーションすることによって 3' 末端 A テーリングを達成することができ、オリゴヌクレオチド 9 は、ライゲーション反応に関与する、U 塩基を 3' 末端に含む少なくとも 2 つの開裂可能 U 塩基を有し、オリゴヌクレオチド 7 は、やはりライゲーション反応に関与するホスフェートを平滑末端の 5' 末端に有する。ビーズ精製後、最終的反應は、図 1 F に示されるように、単一密閉管において、オリゴヌクレオチド 9 を U S E R 酵素によりエンドヌクレアーゼ開裂すること、3' アダプターオリゴヌクレオチド 7 のリバース相補体にアニーリングした後の 5' アダプターインデキシングプライマー 3 を D N A の 5' 末端にライゲーションすること、ならびに必要に応じて、プレアニーリングされた線状ブロッカー 5 により、インデキシングプライマー 4 がライゲーション反応に関与するのを防止すること (インデキシングプライマー 4 がインデキシングプライマー 3 の 3' 部分と同じ配列を含むため) を同時に行った後に、P C R をインデキシングして、ライブラリーを増幅させ、アダプター配列を完成させる。

【0101】

別の実施形態において、ライゲーションカップルド P C R のためのトランケーションされた N G S ライブラリーワークフローは、それらの 3' 末端における共通アダプター配列を各インデキシングプライマー 3 および 4 を利用している (図 1 G)。このワークフローにおいて、断片化 D N A は、T 4 または T 7 D N A ポリメラーゼなどのポリシング D N A ポリメラーゼによる末端修復、ならびにオリゴヌクレオチド 7 および 8 によって形成された、平滑末端を有する 3' アダプターのライゲーションが施され、オリゴヌクレオチド 8 は、U 塩基などの 1 つまたは複数の開裂可能塩基、およびライゲーション反応に関与しない、平滑末端の 3' 末端における修飾ヌクレオチド (例えば、リボースが 3' ヒドロキシルまたは 3' および 2' ヒドロキシル基の両方から欠失した修飾) を有し、オリゴヌクレオ

チド7は、ライゲーション反応に関与する、平滑末端の5'末端におけるホスフェートを有する。ビーズ精製後、最終的反応は、単一密閉管において、オリゴヌクレオチド8をUSER酵素によりエンドヌクレアーゼ開裂すること、3'アダプターオリゴヌクレオチド7のリバース相補体にアニーリングした後のランケーションされたヘアピン5'アダプター6をDNAの5'末端にライゲーションすることを同時に行った後に、インデキシングプライマー3および4を使用してPCRをインデキシングして、ライブラリーを増幅させ、アダプター配列を完成させる。ヘアピン5'アダプターの二次構造は、それが、完成したライブラリー分子から5'アダプターをランケーションしないように、PCR時にプライマーとしてのその活性を防止する。

【0102】

図1Gの方法を、AテールドDNAに使用するように改造することができる。DNAポリメラーゼIまたはTaq DNAポリメラーゼの(3'エクソ)クレノウ断片などの、3'ブルーフリーディング活性を欠くDNAポリメラーゼとともにインキュベートした後に、オリゴヌクレオチド7および8により形成された、U塩基オーバーハングを3'末端に有する3'アダプターをライゲーションすることによって3'末端Aテリングを達成することができ、オリゴヌクレオチド8は、ライゲーション反応に関与する、U塩基を3'末端に含む少なくとも2つの開裂可能U塩基を有し、オリゴヌクレオチド7は、やはりライゲーション反応に関与するホスフェートを平滑末端の5'末端に有する。ビーズ精製後、最終的反応は、図1Hに示されるように、単一密閉管において、オリゴヌクレオチド8をUSER酵素によりエンドヌクレアーゼ開裂すること、3'アダプターオリゴヌクレオチド7のリバース相補体にアニーリングした後のランケーションされた5'ヘアピンアダプター6をDNAの5'末端にライゲーションすることを同時に行った後に、PCRをインデキシングして、ライブラリーを増幅させ、アダプター配列を完成させる。ヘアピン5'アダプターの二次構造は、それが、完成したライブラリー分子から5'アダプターをランケーションしないように、PCR時にプライマーとしてのその活性を防止する。

【0103】

平滑末端を有する3'アダプターおよびライゲーションカップルドPCRステップを利用するNGSライブラリー調製方法(図1Eおよび図1G)は、ライブラリー収率が高いこと、DNA投入量を変更する際のアダプター濃度の調整が不要であること、およびAT/GCバイアスが非常に低いことなどの、他の利用可能なキットと比較した場合のAccel-NGS 2S DNAライブラリー調製の主たる利点を維持しながら、酵素ステップの数を5から3に減少させ、精製ステップの数を5から2に減少させることにより、Accel-NGS 2S DNAライブラリーワークフローに対する実質的な改良をもたらす。記載の方法の唯一の制限は、50~100ngを超えるDNA投入濃度でキメラDNAを形成することである。

【0104】

UまたはTオーバーハングを有する3'アダプターおよびライゲーションカップルドPCRステップを利用するNGSライブラリー調製方法(図1Fおよび図1H)は、ライブラリー収率が高いこと、DNAキメラが欠如していること、DNA投入量範囲が非常に広いこと、およびDNA投入量を変更する際のアダプター濃度の調整が不要であることなどのAccel-NGS 2S DNAライブラリーのすべての利点を維持しながら、酵素ステップの数を5から3に減少させ、精製ステップの数を5から2に減少させることにより、Accel-NGS 2S DNAライブラリーワークフローに対する実質的な改良をもたらす。アダプター二量体が欠如し、その結果としてDNAの極めて低いヘムトグラム量で機能できることは、既に記載されたすべてのNGSライブラリー方法からそれらを大いに差別化する、図1Fおよび1Hに示されるワークフローの独自の特性である。図1I(a)に示されるように、図1G(ならびに1H)に示されるプロトコルにおけるアダプター二量体形成の強い抑制は、プライマーオリゴヌクレオチド3にアニーリングした後の3'アダプターライゲーションおよび精製後に残留する任意のオリゴヌクレオチド7が、低濃度で存在する場合は自己ライゲーションできないT塩基オーバーハングを有するア

アダプターを形成することに由来する。図 1 I (b、c) に示されるように、A c c e l - N G S 2 S (b)、および Y アダプターを利用する N G S ライブラリープロトコル (c) でもアダプター二量体の形成が可能であり、A c c e l - N G S 2 S ライブラリーの場合は、(キャリア・オーバー 3' アダプター 2 および アダプタープライマー 3 のアニーリングによって形成される) 平滑アダプターの自己ライゲーションが比較的低いアダプター濃度でも生じ得るため、第 2 のライゲーション反応時にアダプター二量体の形成が起こり、(c) の場合は、アダプター末端間の T* T ミスマッチにかかわらず、T 4 DNA リガーゼおよび Y アダプターの濃度が高いためアダプター二量体の形成が生じる。

【0105】

T または U 塩基オーバーハングを有するアンプリコンおよび N G S ライブラリーなどのいくつかの実施形態において、ライゲーションカップルド P C R 反応に使用されるエンドヌクレアーゼは、New England Biolabs の U S E R 酵素もしくは Q i a g e n の U r a c i l C l e a v a g e S y s t e m、またはウラシル DNA グリコシラーゼ (U D G) およびエンドヌクレアーゼ V I I I の任意の他のミックスである。3' アダプターオリゴヌクレオチドの 3' 末端と DNA の 5' 末端の間に共有結合が存在しない、d d T、3' - d T、d d G または 3' - d G 塩基を 3' 末端に有する平滑末端 3' アダプターを利用する N G S ライブラリーの実施形態において、U D G 酵素のみとのインキュベーションによってアダプターオリゴヌクレオチドの不安定化および放出を達成することができる。U D G 酵素は、オリゴヌクレオチド 1 内に途切れを生じさせないが、アニーリング温度を 37℃未満に低下させ、オリゴヌクレオチド 8 を相補的 3' アダプターオリゴヌクレオチド 7 から解離させて、DNA 末端への 5' アダプターインデキシングプライマー 3 のアニーリングおよびライゲーションを可能にするのに十分な多くの脱塩基部位を生成する (図 1 G)。

【0106】

ブロッカーオリゴヌクレオチドを使用する方法

図 2 A に示される一実施形態において、図 1 A に提示されるワークフローを必要に応じたブロッカーの非存在下で実施することができる。示されるように、部分的に二本鎖の DNA 基質分子 10 は、第 2 の鎖 12 に部分的に相補的な第 1 の鎖 11 を含み、第 1 の鎖 11 および第 2 の鎖 12 の各々が、部分的に二本鎖の DNA 基質分子 10 の各末端で 3' オーバーハング 2 を形成する。相補的部分に関して、かつ用語の一貫性のために、この相補的部分を第 1 の鎖の第 1 の部分および第 2 の鎖の第 3 の部分とすることができる。本開示全体を通じて、第 1 の鎖の第 1 の部分および第 2 の鎖の第 3 の部分は、その部分ならびにその配列を指すことが理解されるべきである。したがって、P C R 生成物は、最初の第 1 の部分を含まないが、第 1 の部分の配列を含む可能性があるため、本明細書では第 1 の部分を含むと見なされる。各オーバーハングも各 3' オーバーハング 2 の 5' 末端に第 1 の共通ヌクレオチド配列を含む。限定することを意図するものではないが、図 2 A において、二本鎖 DNA 生成物を、例えば、エンドヌクレアーゼによって開裂して部分的に二本鎖の DNA 基質を生成することができるユニバーサルプライマー 1 からの d U 塩基を含めるための、d U 塩基を含むユニバーサルプライマーによる多重 P C R 増幅によって生成することができる。そのような場合は、3' オーバーハング 2 をユニバーサルプライマー 1 のリバース相補体とすることができる。その対のインデキシングプライマー 3 (第 1 のインデキシングプライマー) および 4 (第 2 のインデキシングプライマー) の各々が、ライゲーション反応温度より高い T_m を有する基質アンプリコン上の 3' オーバーハング 2 の 5' 末端に第 1 の共通ヌクレオチド配列に相補的な同一の 3' 末端配列を有するため、両プライマーをアダプターライゲーションステップに利用することができる。このアニーリング特異性の欠如により、5' および 3' アダプターの両方を必要とする機能性ライブラリー分子の形成を低減することができる。5' アダプタープライマー 3 (第 1 のインデキシングプライマー) のライゲーションのみにより機能性ライブラリーが生成される。3' アダプタープライマー 4 (第 2 のインデキシングプライマー) がライゲーションする場合は、ユニバーサルアダプターがランケーションされた 3' アダプターを含むため、両末端に同様

のアダプターを有する非機能性ライブラリーが生成される。

【0107】

図2Aにさらに示されるように、ライゲーションステップの後に、5'から3'方向に、第1のインデキシングプライマー3の1つ、(第3の鎖13では)第1の部分または(第4の鎖14では)第3の部分、および第1の共通ヌクレオチド配列を含む3'オーバーハング2を含む第3の鎖13および第2のオリゴヌクレオチド14を得ることができる。PCRのさらなるサイクルにおいて、第2のインデキシングプライマー4は、第3の鎖13または第4の鎖14の第1の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、DNAポリメラーゼにより伸長されて、5'から3'方向に、第2のインデキシングプライマーの1つ、(第6の鎖16では)第1の部分または(第5の鎖15では)第3の部分、および第1のインデキシングプライマー3'のリバース相補体を含むそれぞれ第5の鎖15および第6の鎖16を生成することができる。PCRのさらなるサイクルにおいて、第1のインデキシングプライマー3は、第5の鎖15または第6の鎖16上の第1のインデキシングプライマー3'のリバース相補体にアニーリングし、次いでDNAポリメラーゼにより伸長されて、5'から3'方向に、第1のインデキシングプライマー3、(第7の鎖17では)第1の部分または(第8の鎖18では)第3の部分および第2のインデキシングプライマー4'のリバース相補体を含む第7の鎖17および第8の鎖18を生成することができる。第7の鎖17および第8の鎖18は、それぞれ第5の鎖15および第6の鎖16に相補的である。さらなるPCRサイクルは、第1のインデキシングプライマーおよび第2のインデキシングプライマーが、二本鎖の第7の鎖17および第5の鎖15ならびに二本鎖の第8の鎖18および第6の鎖16を増幅させて、最終的なライブラリーを生成することを可能にすることができる。図2Aにさらに示されるように、一方の末端上に第1のインデキシングプライマーを、もう一方の末端上にその相補体を有するオリゴヌクレオチドが生成される場合、例えば第1のインデキシングプライマーがライゲーションし、そのライゲーションされた鎖をプライミングした場合は、PCR時のこれらの末端の相補性が、これらの望ましくない生成物の増幅を抑制する。一方の末端上に第2のインデキシングプライマーを、もう一方の末端上にその相補体を有するオリゴヌクレオチドが生成される場合も同様である。

【0108】

代替的な実施形態において、ライゲーション反応に添加される前に完全長3'アダプターインデキシングプライマー4にプレアニーリングされる線状ブロッカー5が使用される(図2B)。それにより、このプライマーの3'末端が、ライゲーションインキュベーション温度で配列2にアニーリングされた後にアンプリコン基質にライゲーション可能になることが防止される。しかし、ブロッカー T_m はPCRアニーリング温度より低い、またはブロッカーは不活性化されるため、3'アダプターインデキシングプライマー4が、PCR時に効率的にアニーリングすることができる。図2Cは、(a)低い T_m を含むためPCR時に不活性となる線状ブロッカー、または(b)Illumina TruSeqアダプターを使用する場合にPCR時に不活性化するヘアピンブロッカーをさらに詳細に示す。i7インデキシングプライマー4、および、不活性化されているためライゲーション反応時の3'アダプターインデキシングプライマーへのアニーリングは可能であるが、PCR時にアニーリングしない、より低い T_m を有する線状ブロッカー5aまたはヘアピンブロッカー5b:(a)線状ブロッカー5aは、インデキシングプライマー4上のユニバーサルアダプター配列に対して1つまたは複数のミスマッチを含む(3つのミスマッチが示される)、または限定することなく、いずれもブロッカーがインデキシングプライマーのプライミングを阻害できないようにその T_m をPCRアニーリング温度未満に低下させる1つまたは複数のTデオキシヌクレオチド(6つ示される)を含む非相補的塩基の挿入を含む。ブロッカーミスマッチまたは挿入は、共通アダプター配列に相補的な配列の3'に位置し、ブロッカーが、ライゲーションステップ時にプライマーの3'末端にアニーリングすることを可能にし、線状ブロッカーも、伸長を防止するための3'C3スパーサーブロッキング基を含む。(b)に関しては、ヘアピンブロッカー5bは、ブロッカーの5

、オーバーハングが、ライゲーションステップ時にプライマーの3'末端にハイブリダイズすることを可能にするステムループヘアピンを含むが、ポリメラーゼのホットスタート活性化に際して、ヘアピンブロッカーはその3'末端から伸長されて、PCRアニーリング温度でのその安定な二次構造のためにPCR時にアニーリングすることができない完全に二本鎖のヘアピンを生成する。図2Dは、アダプター配列に対するミスマッチにより、より低い T_m を有する線状ブロッカーを使用する方法をさらに説明するために、多重PCR、組み込まれたユニバーサルプライマー1のエンドヌクレアーゼ開裂、3'アダプターインデキシングプライマー(i7)4にプレアニーリングされた、3つのミスマッチを有する線状ブロッカー5、および基質アンプリコン上のユニバーサルアダプター配列2のリバース相補体の5'部分への5'アダプターインデキシングプライマー(i5)3の3'末端のライゲーションの態様についてのIllumina TruSeqアダプター配列を示す。この実施形態において、線状ブロッカーは、ポリメラーゼによる伸長を防止するための非相補的3'テール配列を有する。図2Eは、6Tデオキシヌクレオチドループの挿入により、より低い T_m を有する線状ブロッカーを使用する方法をさらに説明するために、多重PCR、組み込まれたユニバーサルプライマー1のエンドヌクレアーゼ開裂、3'アダプターインデキシングプライマー(i7)4にプレアニーリングされた、6T挿入物を有する線状ブロッカー5、および基質アンプリコンの5'末端への5'アダプターインデキシングプライマー(i5)3の3'末端のライゲーションの態様についてのIllumina TruSeqアダプター配列を示す。

【0109】

図2Fは、 T_m を低下させる T^*G ミスマッチに加えて、3つの分解性U塩基を有する線状ブロッカーを示す。ウラシルグリコシラーゼとのインキュベーションは、ブロッカー内に3つの脱塩基部位を生成することによりそのインデキシングプライマー4との相互作用を、5'アダプターインデキシングプライマー3ライゲーションステップ時のインデキシングプライマー4からのその解離には不十分であるが、PCR時の熱によるその分解には十分にさらに不安定化させる。図2Gは、平滑末端アダプターライゲーション、DNA 3'アダプターオリゴヌクレオチド8にアニーリングするが、共有接合しないUDG開裂および不安定化、3'アダプターインデキシングプライマー(i7)4にプレアニーリングされた、 T^*G ミスマッチおよび3つのウラシルヌクレオチドを有する線状ブロッカー5のUDG開裂および不安定化、ならびに基質DNAの5'末端への5'アダプターインデキシングプライマー(i5)3の3'末端のライゲーションの態様についてのIllumina TruSeqアダプター配列を示す。

【0110】

ヘアピンアダプターを使用する方法

一部の代替的な実施形態は、ライゲーションカップルドPCRのためのトランケーションされたアダプターを利用する。トランケーションされたアダプターは、それらの3'末端における共通アダプター配列を欠くインデキシングプライマーを使用する場合に必要とされる。図3Aに示されるように、線状のトランケーションされたアダプター100を使用する場合と、エンドヌクレアーゼ開裂およびアダプターライゲーションステップは効率的に進行するが、5'アダプターインデキシングプライマーアニーリングのための特異性を付与するために、線状のトランケーションされた5'アダプターは、PCRサイクル時のアニーリングおよび伸長に十分な T_m 温度をも有することで、一部の完成された5'アダプターのトランケーションおよびライブラリー収率の低下がもたらされる。図3Bは、3'末端における共通アダプター配列を欠くインデキシングプライマー3および4を使用する場合にライゲーションカップルドPCRのためにヘアピンがトランケーションされたアダプター5が使用されるこの問題の解決策を示す。エンドヌクレアーゼ開裂の後に、共通アダプター配列の少なくとも一部分を含むヘアピンアダプターの3'一本鎖オーバーハングのアニーリングおよびライゲーションが続く。その後の5'アダプターインデキシングプライマーアニーリングのための特異性を付与するために、ヘアピンアダプターは、5'アダプターの独自の配列、およびTループ配列をも含むヘアピンを生成するためのプロ

ッカーの5'末端におけるこの配列のリバース相補体を含む。この二次構造は、その自己相補性とのアニーリング競合によりPCR時のプライマーとしてのその活性を低下させ、PCR時に、ヘアピンアダプターが完成されたアダプターをトランケーションすることができないため、増幅ライブラリー収率を高める。図3Cは、ステムループがトランケーションされたアダプター6が、ループ配列内に黒丸で表される複製不可能修飾をも含むため、完全に複製されたヘアピン生成物の形成が防止されることをさらに示す。インデキシングPCRがインデキシングプライマー4によって開始されると、ヘアピンの複製が、複製ブロックによってトランケーションされる。これは、その二次構造により、ヘアピンアダプターからのアニーリングの競合のないインデキシングプライマー3の効率的なアニーリング、および効率的なインデキシングPCRを可能にする。図3Dは、ステムループがトランケーションされたアダプター6がループ配列内に複製不可能修飾を欠く場合の望ましくない結果を示す。この場合は、インデキシングPCRがインデキシングプライマー4によって開始されると、完全ヘアピンの複製が生じる。その結果、複製ヘアピンの3'末端がアニーリングし、さらに伸長して、非機能性である完全に二本鎖のヘアピンライブラリー分子を生成する。したがって、トランケーションされたヘアピンアダプターを使用する場合は非複製修飾の使用が必要になる。

10

20

30

40

50

【0111】

内部複製不可能C3スペーサーを含むヘアピンがトランケーションされたアダプターがライゲーションカップルドPCRに使用される場合にTruSeq Illuminaアダプターワークフローを使用する具体的な実施形態を図3Eに提示する。この例において、dU塩基を含むユニバーサルアンプリコンは、すべての6Tデオキシヌクレオチドに取って代わるため、プライマー配列1全体がUSERによって開裂および除去される。したがって、ヘアピンがトランケーションされたアダプター6は、基質へのライゲーションのための3'オーバーハングとしてのTruSeq共通アダプター配列のすべての13の塩基を含む。加えて、それらの3'末端における共通アダプター配列を欠くインデキシングプライマー3および4が使用されるため、PCR時にインデキシングプライマー4のために十分なアニーリング配列を提供するために、3'アダプターの一部であるオリゴ6が、インデキシングプライマー4にアニーリングされると同時に、各アンプリコン上の配列2の3'末端にライゲーションされる。図3Fは、内部複製不可能C3スペーサーを有するヘアピンがトランケーションされたアダプターがライゲーションカップルドPCRに使用されるTruSeq Illuminaアダプターワークフローを使用する代替的な実施形態を示す。この例において、dU塩基を含むユニバーサルアンプリコンプライマー1は、3'最末端T塩基を除いてすべてのTデオキシヌクレオチドに取って代わるため、共通アダプター配列の一部のみがUSER開裂により開裂および除去される。したがって、ヘアピンがトランケーションされたアダプターが、基質へのライゲーションのための3'オーバーハングとしての共通アダプター配列の13の塩基のうちの11のみを含む。これは、変更された塩基組成を含むアンプリコン末端に隣接するU塩基を開裂しないことによりエンドヌクレアーゼ開裂におけるバイアスを低減することができる。加えて、それらの3'末端における共通アダプター配列を欠くインデキシングプライマー3および4が使用されるため、ユニバーサルプライマーがトランケーションされた3'アダプター配列を含むと、PCR時にインデキシングプライマー4のために十分なアニーリング配列を提供するために、3'アダプターの一部であるオリゴ22がインデキシングプライマー4にアニーリングされると同時に、各アンプリコン上の配列2の3'末端にライゲーションされる。

【0112】

別の代替的な実施形態において、ライゲーションカップルドPCRにヘアピンがトランケーションされたアダプター、完全長インデキシングプライマーおよび線状ブロッカーを用いたNextera Illuminaアダプターワークフローが使用される(図3G)。Nexteraアダプターは、両アダプターに共通の19塩基配列を含む。この例において、dU塩基を含むユニバーサルアンプリコンプライマーは、すべての5つのTデオ

キシヌクレオチドに取って代わるが、USER開裂が実施される場合は、T塩基が不在であることにより3'末端9塩基配列が保持される。したがって、ヘアピンがランケーションされたアダプター5は、3'オーバーハングとしての共通アダプター配列の残留する10の塩基を含み、ヘアピンアダプターの5'オーバーハングも同様に、5'アダプターに独自のさらなる配列、そのリバース相補体、および複製不可能スペーサーを含むTループを含む。この例において、完全長Nexteraインデキシングプライマー3および4が使用されるが、USERによる開裂後に残留するユニバーサル配列1の部分によりライゲーションに適応しない。加えて、インデキシングプライマー4が、ヘアピンアダプター6によるアニーリングおよびライゲーションについて競合することを防止するために、線状ブロッキングオリゴヌクレオチド22が使用される。別の実施形態において、図3Hは、ライゲーションカップルドPCRのために、ヘアピンがランケーションされたアダプターが、共通アダプター配列を欠くインデキシングプライマーとともに使用される別のNextera Illuminaアダプターワークフローを示す。この例において、dU塩基を含むユニバーサルアンプリコンプライマー1は、すべての5つのTデオキシヌクレオチドに取って代わるが、USER開裂が実施される場合は、T塩基が不在であることにより3'末端9塩基配列が保持される。したがって、ヘアピンがランケーションされたアダプター6は、3'オーバーハングとしての共通アダプター配列の残留する10の塩基を含み、ヘアピンアダプターの5'オーバーハングも同様に、5'アダプターに独自のさらなる配列、そのリバース相補体、および複製不可能スペーサーを含むTループを含む。この例において、それらの3'末端における19塩基共通アダプター配列を欠くNexteraインデキシングプライマー3および4が利用されるため、さらに、PCR時にインデキシングプライマー4のための十分なアニーリング配列を提供するために、3'アダプターの一部を含むオリゴ22が、インデキシングプライマー4にアニーリングされると同時に、各アンプリコン上の配列2の3'末端にライゲーションされる。異なるインデックス配列を有するアダプターにアニーリングするユニバーサルなランケーションされたアダプターを生成するために、ランケーションされたアダプター6は、試料特異的インデックス配列をスパンして効果的なアニーリング温度を達成する必要があるため、試料特異的インデックス配列が、ユニバーサルTループに置き換えられる。

【0113】

次の4つの実施形態は、NGSライブラリーワークフローのライゲーションカップルドPCRステップにおけるヘアピン5'アダプターの使用を説明する。内部複製不可能C3スペーサーを含むヘアピンがランケーションされたアダプターがライゲーションカップルドPCRに使用される場合にTruSeq Illuminaアダプターワークフローを使用する2つの具体的な実施形態を図3Iおよび図3Jに提示する。図3Iに示される例において、dU塩基を含む3'アダプターオリゴヌクレオチド9は、すべての6つのTデオキシヌクレオチドに取って代わるため、配列9全体がUSERによって開裂および除去される。図3Jに示される例において、3'アダプターオリゴヌクレオチド1とDNAの間の共有結合が不在であることにより、オリゴヌクレオチド9のT_mを、UDGとのインキュベーションおよび6つの脱塩基部位の生成により、オリゴヌクレオチド9の3'アダプターオリゴヌクレオチド7からの解離およびヘアピンアダプター6へのアニーリングのために十分に実質的に低下させることができる。両実施形態において、ヘアピンがランケーションされたアダプター6は、基質へのライゲーションのための3'オーバーハングとしてのTruSeq共通アダプター配列のすべての13の塩基を含む。

【0114】

図3Kは、内部複製不可能C3スペーサーを有するヘアピンがランケーションされたアダプター5がライゲーションカップルドPCRに使用されるTruSeq Illuminaアダプターワークフローを使用する代替的な実施形態を示す。この例において、dU塩基を含む3'アダプターオリゴヌクレオチド9は、3'最末端T塩基を除くすべてのTデオキシヌクレオチドに取って代わるため、共通アダプター配列の一部分のみが、USER開裂によって開裂および除去される。したがって、ヘアピンがランケーションされた

アダプター 6 は、基質へのライゲーションのための 3' オーバーハングとしての共通のアダプター配列の 13 の塩基のうちの 11 のみを含む。これは、変更された塩基組成を含む DNA 末端に隣接する U 塩基を開裂しないことによりエンドヌクレアーゼ開裂におけるバイアスを低減することができる。

【0115】

別の代替的な実施形態において、ライゲーションカップルド PCR にヘアピンがトランケーションされたアダプター、完全長インデキシングプライマーおよび線状ブロッカーを用いた Nextera Illumina アダプターワークフローが使用される (図 3 L)。Nextera アダプターは、両アダプターに共通の 19 塩基配列を含む。この例において、dU 塩基を含む 3' アダプターオリゴヌクレオチド 9 は、すべての 5 つの T デオキシヌクレオチドに取って代わるが、USER 開裂が実施される場合は、T 塩基が不在であることにより 3' 末端 9 塩基配列が保持される。したがって、ヘアピンがトランケーションされたアダプター 6 は、3' オーバーハングとしての共通アダプター配列の残留する 10 の塩基を含み、ヘアピンアダプターの 5' オーバーハングも同様に、5' アダプターに独自のさらなる配列、そのリバーズ相補体、および複製不可能スパーサーを含む T ループを含む。この例において、この例において、完全長 Nextera インデキシングプライマー 3 および 4 が使用されるが、USER による開裂後に残留するユニバーサル配列 1 の部分によりライゲーションに適応しない。加えて、インデキシングプライマー 4 が、ヘアピンアダプター 6 によるアニーリングおよびライゲーションについて競合することを防止するために、線状ブロッキングオリゴヌクレオチド 22 が使用される。

【0116】

ブロッカーの説明

それぞれそれらの 3' 末端に同じ共通アダプター配列を含む完全長インデキシングプライマーを使用すると、開示されるブロッカーオリゴヌクレオチドが、3' アダプターインデキシングプライマーの 3' 部分と二本鎖構造を形成して、それが 5' アダプターインデキシングプライマーライゲーション時にアンプリコン基質にアニーリングおよびライゲーションすることを防止することができる。これは、TruSeq Illumina アダプターが (第 1 の共通ヌクレオチド配列に相補的な) 13 塩基共通アダプター配列を有し、Nextera Illumina アダプターが 19 塩基共通アダプター配列を有し、これらの共通アダプター配列の各々の T_m が、熱不安定なリガーゼのインキュベーション温度より有意に高いため、両プライマーの存在下で 1 つのプライマーをアニーリングおよびライゲーションするための特異性がブロッカーにより達成されるためである。ブロッカーは、設計および機能についての以下の 3 つの基準を含む。i) 3' アダプターインデキシングプライマーへのブロッカーのアニーリングは、5' アダプターインデキシングプライマーの特異的ライゲーションおよび機能性 NGS ライブラリーの形成を可能にするため、5' および 3' アダプターインデキシングプライマーの両方を含む、ライゲーション生成物の混合物、ならびに機能性 NGS ライブラリー構築の減少が防止されること、ii) 5' アダプターインデキシングプライマーの共通アダプター配列へのブロッカーオリゴヌクレオチドのアニーリングが、3' アダプターインデキシングプライマーへのアニーリングと比較して低減されること、ならびに iii) 全体的なブロッカーの T_m が PCR アニーリング温度未満であるため、PCR 時に 3' アダプターインデキシングプライマーのアニーリングを阻害できない、またはブロッカーは、PCR 時に、それが 3' アダプターインデキシングプライマーのアニーリングを阻害できないようにポリメラーゼによって不活性化されること。本開示では、これらの基準を満たす 2 つのブロッカー設計、すなわち線状ブロッカーおよびヘアピンブロッカーについて記載する。

【0117】

線状ブロッカーは、結合ドメイン 31、ブロッカーの 5' 末端に存在する結合ドメイン 32、リンカードメイン 33、および 3' 末端ドメイン 34 を含む (図 4 A 参照)。結合ドメイン 32 は、両インデキシングプライマーの共通アダプター配列 (TruSeq では 13 塩基および Nextera では 19 塩基) の少なくとも一部分に相補的である。結合

ドメイン 3 1 は、3' アダプターインデキシングプライマーの共通アダプター配列の 5' に位置する独自のアダプター配列の少なくとも一部分に相補的であるが、試料特異的インデックス配列を含まない。結合ドメイン 3 1 は、5' アダプターインデキシングプライマーより 3' アダプターインデキシングプライマーへの選択的アニーリングを促進するより高い相補性を提供する。結合ドメイン 3 1 の融解温度は、結合ドメイン 3 2 の融解温度と少なくとも等しいか、または好ましくはそれより高く、その差は、少なくとも 1℃またはそれより大きい。リンカードメイン 3 3 は、インデキシングプライマーのいずれの部分にも相補的でないため、全体的な T_m 、および PCR 時の 3' アダプターインデキシングプライマーへのブロッカー結合効率を低下させるために使用されるミスマッチドメインである。リンカーは、ポリ T、ポリ A もしくはポリ C 配列、または A、T、C および G 塩基の任意の組合せの挿入物を含む。その長さは、1 から 50 ヌクレオチドに変化することができる。リンカードメインは、さらなるヌクレオチドの挿入物でない 2 つまたはそれより多い連続ミスマッチヌクレオチドのミスマッチまたはストレッチを含むこともできる。3' 末端ドメイン 3 4 は、ライゲーションカップルド PCR の PCR フェーズ時のポリメラーゼによる伸長を阻害するために使用される。それは、限定することなく、C3 炭素スパーサー、ヘキサンジオール、スパーサー 9、スパーサー 18、ホスフェート、2', 3'-ジデオキシヌクレオシド ddA、ddT、ddC および ddG、3'-デオキシヌクレオシド 3'-A、3'-T、3'-C および 3'-G、rU などの RNA ヌクレオチド、3'-オームチルヌクレオチド、またはポリ T、ポリ A、ポリ C およびポリ G などの、隣接するプライマー配列に相補的でない DNA 配列であって、ブルーフリーディングポリメラーゼ 3'-5' エクソヌクレアーゼ活性が、隣接するプライマー配列に相補的でない DNA 配列を除去することを防止するためにヌクレアーゼ抵抗性結合をさらに含む DNA 配列を含む 3' 修飾を含むことができる。図 4 B に示されるように、結合ドメイン 3 1 は、5' アダプターインデキシングプライマーに対する 3' アダプターインデキシングプライマーへのブロッカーのアニーリングのための特異性を付与する。必須ではないが、最良の結果は、ブロッカーをライゲーション反応への添加の前に 3' アダプターインデキシングプライマーにプレアニーリングすることによって達成される。しかし、ドメイン 3 2 の T_m は、37℃のインキュベーション温度より高温 (T_m : 約 48℃) であるため、任意の過剰のブロッカー、または 3' アダプターインデキシングプライマーからのブロッカーの解離物が、ドメイン 3 2 により 5' アダプターインデキシングプライマーにアニーリングし得る。しかし、ドメイン 3 1 により、アニーリングは、5' アダプターインデキシングプライマーへのアニーリング (図 4 B (a)) より 3' アダプターインデキシングプライマー (図 4 B (b)) が熱力学的に優先されるため、エンドヌクレアーゼ開裂の後に 5' アダプターインデキシングプライマーがアンプリコン基質に効率的にライゲーションされ、3' アダプターインデキシングプライマーのライゲーションが生じない、または最小限に抑えられる。図 4 C に示されるように、PCR 時に、線状ブロッカーは、非相補的ドメイン 3 3 が、ドメイン 3 1 と 3 2 の間の塩基スタッキング相互作用を妨害し、その結果として、ブロッカーの全体的安定性および T_m が、PCR アニーリング温度より低く、3' アダプターインデキシングプライマーに完全相補的な競合アンプリコン基質より有意に低いことにより、3' アダプターインデキシングプライマーにアニーリングしない。

【0118】

代替的なヘアピンブロッカーは、線状ブロッカーと類似の結合ドメイン 3 1 および 3 2 を含むが、非相補的リンカードメイン 3 3、およびポリメラーゼによる伸長を防止するための封鎖 3' 末端を欠く。その代わり、ヘアピンブロッカーは、ステムドメイン 3 5 および 3 6 ならびにループドメイン 3 4 によって形成されたステムループ構造をその 3' 末端に有する (図 4 D)。ライゲーション反応時に、ヘアピンブロッカーは、ブロッカーおよびプライマーの両ドメイン 3 1 と 3 2 の間の相補性により、熱力学的に優先されて 3' アダプターインデキシングプライマーにアニーリングし (T_m : 約 65~70℃、図 4 D (b))、ブロッカーとプライマーの間のドメイン 3 2 のみとに相補性が低下することにより、5' アダプターインデキシングプライマーへのアニーリングが低減される (T_m : 約

48℃、図4D(a))。したがって、5'アダプターインデキシングプライマーのためのライゲーション特異性は、インデキシングプライマーがそれらの3'末端に同一の共通アダプター配列を有していても、両方のインデキシングプライマー存在下で達成される。ライゲーションカップルドPCRのPCRフェーズ時に、ブロックされないため、ヘアピンブロッカーのステムドメイン36の3'末端は、ヘアピンブロッカーオリゴヌクレオチドの自己複製を開始するDNAポリメラーゼにより伸長可能である。自己複製により、PCRアニーリング温度で維持される約90℃の高T_m二次構造が生成されるため、ドメイン31および32の全体的なT_mがPCRアニーリング温度を超える約73℃であっても、3'アダプターインデキシングプライマーにアニーリングし、それを阻害するブロッカーの能力が不活性化される(図4E参照)。その結果、3'アダプターインデキシングプライマーは、PCR時に鑄型を効率的に増幅させることができ、ライゲーション反応においてのみ阻害されて、5'アダプターインデキシングプライマーによるアンプリコン基質へのライゲーションに対する特異性を付与する。ステムドメイン35および36の長さは、3'ヘアピン安定性およびPCRアニーリング温度でのプライミングを提供するのに十分であるべきであり、望ましくは、その融解温度が、PCR反応とブロッカードメイン31および32の両方のアニーリング温度より高くあるべきである。この場合、ブロッカーが既に不活性化されている場合により低い温度で生じるインデキシングプライマーアニーリングの前に、より高い温度でヘアピンブロッカーオリゴヌクレオチドの自己複製を遂行することができる。ループドメイン34の長さおよび塩基組成は、順応性を有し、1から6またはそれより多いT、A、CもしくはGデオキシヌクレオチド、またはそれらの組合せを含むことで、ブロッカードメイン35および36による安定なステムループ構造の形成を可能にする(図4D)。

10

20

【0119】

ブロッカー内の1つまたは複数のTヌクレオチドをdU塩基に置き換えることによって、ブロッカーと3'アダプターインデキシングプライマーとの相互作用のさらなる不安定化を達成することができる。5'アダプターライゲーション反応時のUDG酵素とのインキュベーションの結果、dU塩基が除去され、最初のPCRサイクル時にブロッカーオリゴヌクレオチドの断片化を促進させる脱塩基部位を生成する。

【0120】

ヘアピンアダプターの説明

インデキシングプライマーをライゲーションのためのアダプターとしても使用できない場合の2つの例が存在する。第1の例は、不十分なアダプター配列を含むものとして、独自のアダプター配列のみを含み、それらの3'末端における共通のアダプター配列を欠くインデキシングプライマーを使用する場合である。他の例において、アンプリコン上のユニバーサルプライマーのエンドヌクレアーゼ開裂がユニバーサルプライマー配列全体を除去する開裂のパターンを生成せず、アンプリコン接合部にプライマーの非消化の3'部分を残す場合は、インデキシングプライマー3'末端が、(共通アダプター配列を欠くインデキシングプライマーを使用するか、または共通アダプター配列を含む完全長インデキシングプライマーを使用するかに応じて)その3'末端に不十分または過剰のアダプター配列含有量を有するため、5'アダプターとしての使用に適合しない。その方法のこれらの2つの実施形態では、ライゲーションカップルドPCRにランケーションされた5'アダプターが補充される。図5Aに示されるように、完全長アダプター(a)と比較したランケーションされた5'アダプターは、線状であること(b)、またはステムループ構造を有するヘアピンを含むこと(c)が可能であり、ヘアピンが、その安定な自己相補性との競合によりPCR時にアダプターのアニーリングおよび伸長を防止する。これにより、ヘアピンアダプターが、PCR時に、完成された5'アダプターをランケーションすることを防止して、それをランケーションされた5'アダプターについての好ましい実施形態とする。これに対して、線状のランケーションされたアダプターは、PCR時に、完成された5'アダプター分子を効率的にアニーリング、伸長およびランケーションすることができ、増幅ライブラリー収率を低下させる。両方のランケーションされた5

30

40

50

、アダプターは、リバーズ相補体においてではあるが、いずれもブロッカーオリゴヌクレオチドに類似するドメイン41および42を含み、その結果、ドメイン42が共通アダプター配列の少なくとも一部分と同一であり、ドメイン41が、共通アダプター配列に隣接する独自の5'アダプター配列5'の少なくとも一部分と同一である。それに応じて、ドメイン42は、トランケーションされたアダプターの3'末端に存在する。図5A(c)に示されるトランケーションされたヘアピンアダプターは、一本鎖ドメイン42、ドメイン45に少なくとも部分的に相補的な二本鎖ドメイン41、複製ブロッキングドメイン43、およびステムループ構造が形成されるループドメイン44の5つのドメインを有する。ドメイン42の長さおよび塩基組成は、多重PCRステップに使用されるユニバーサルプライマー内の最3'開裂可能塩基の位置によって示される。ユニバーサルプライマーのエンドヌクレアーゼ開裂がプライマーの3'末端、またはアンプリコン挿入物との接合部で生じる場合(図5B(a))は、ドメイン42が、共通アダプター配列全体(Truseqアダプターでは13塩基およびNexteraアダプターでは19塩基)を含む。ユニバーサルプライマーのエンドヌクレアーゼ開裂が内部で生じる場合(図5B(b))は、重複塩基または間隙を配列に導入することなく連続的共通アダプター配列を回復するために、開裂可能プライマーの残留3'部分に対応するようにドメイン42の長さが低減され、次いでリガーゼが切れ目を封止する。ループドメイン44の長さおよび塩基組成は、順応性を有し、1から6またはそれより多いT、A、CもしくはGデオキシヌクレオチド、またはそれらの組合せを含むことで、アダプタードメイン41および45による安定なステムループ構造の形成を可能にする。ライゲーションカップルドPCRのライゲーション時およびPCRフェーズ時の両方において、トランケーションされたヘアピンアダプターは、PCRアニーリング温度より高いその高ステムTmによりステムループヘアピン立体構造を維持し、その結果、プライマーとしてのライブラリー増幅に関与しないため、線状のトランケーションされたアダプターでは生成されるトランケーションされたライブラリー生成物を生成しない。本出願において既に言及したように(図3CおよびD)、複製ブロッキングドメイン43は、PCR時におけるライゲーションされたステムループ構造の複製および非増幅性の長いヘアピン構造の形成を防止する。図5Cに示されるように、インデキシングPCRは、3'アダプターインデキシングプライマーi7によって開始され、複製は、複製ブロッキング基で停止し、5'アダプターインデキシングプライマーi5のアニーリングが、アニーリングおよび伸長を行ってインデキシングPCRサイクルを完了することを可能にする。

10

20

30

40

50

【0121】

プライマーアセンブリの方法

ライゲーションカップルドPCRの異なる実施形態において、プライマーサブユニットおよびスプリントが、長いインデキシングプライマーをアセンブルするために使用され、NGSライブラリー増幅と組み合わせられる方法を開示する。これは、個々の完全長インデキシングプライマーを合成する代わりに、短いインデックス特異的オリゴヌクレオチドサブユニットのみをユニバーサルプライマーサブユニットと組み合わせるため、プライマー合成コストを減少させるために使用される。図6Aに示されるように、ユニバーサルプライマーサブユニット51、53、56および58ならびにユニバーサルスプリント54、55、59および60を独自のインデキシングサブユニット52および57と組み合わせる。プライマーサブユニット51、52、56および57は、ライゲーションのための5'ホスフェートを含み、スプリントオリゴヌクレオチドは、PCR時のプライミング活性を防止するための3'ブロッキング基を含む。ライゲーションに好適な第1の温度で、スプリントオリゴヌクレオチドを有するプライマーサブユニットをアニーリングおよびライゲーションした後に、熱サイクリングを行って、トランケーションされたNGSアダプターを含むNGSライブラリーを増幅し、アダプター配列を完成させ、試料特異的インデックス配列を組み込む。図6Bは、それらの5'末端に(T)₁₂(rU)₄(配列番号1)を含むNormalase適応プライマーをアセンブルする方法の詳細を示す。下流の酵素的正規化に必要とされる5'配列52および57は、スプリント53および58を有

するインデキシングプライマー51および56にライゲーションされたスプリントである。プライマー51および56は、ライゲーションのために5'ホスフェートを必要とし、スプリント53および58は、PCR時のプライミング活性を防止するための3'ブロック基を有する。ライゲーションに好適な第1の温度でプライマーサブユニットおよびスプリントをアニーリングおよびライゲーションした後に、熱サイクリングを行って、トランケーションされたNGSアダプターを含むNGSライブラリーを増幅させ、アダプター配列を完成させる。その方法の具体的な実施形態において、図6Cは、下流の酵素的正規化に適応する(T)₁₂(rU)₄(配列番号1)配列を有するTruSeq Illuminaインデキシングプライマーのアセンブリを示す。5'アダプター配列を含むインデキシングプライマーi5は、3'サブユニット51(22塩基)、インデックス配列を含む中間サブユニット52(30塩基)、末端配列(T)₁₂(rU)₄(配列番号1)を含む5'サブユニット53(34塩基)の3つのオリゴヌクレオチドサブユニット、ならびに2つの3'封鎖スプリントオリゴヌクレオチド54および55からアセンブルされる。この実施形態をさらに説明するために、図6Dは、上記の4Cのi5TruSeq Illuminaインデキシングプライマーのプライマーアセンブリを、3'アダプター配列を含む対応するi7インデキシングプライマーのアセンブリ、i7プライマーへのヘアピンブロッカーのアニーリング、および(不図示のエンドヌクレアーゼ開裂に続く)トランケーションされた3'アダプターを含むアンプリコン基質へのi5プライマーのライゲーションと組み合わせる場合のライゲーションカップルドPCRワークフローを示す。
【0122】

10

20

酵素および反応条件の説明

ライゲーションカップルドPCRは、ライゲーションのためのDNA基質、リガーゼ、ポリメラーゼ、DNAサブユニットの生成物であってもよいPCR増幅のためのプライマー対および基質、ならびに必要に応じてエンドヌクレアーゼを含むことができる。ポリメラーゼは、Taq DNA Polymeraseなどの熱安定なホットスタートDNAポリメラーゼ、または好ましくは、NGSライブラリー増幅のために、ポリメラーゼは、3'-5'エクソヌクレアーゼブルーフリーディング活性を有する高性能ポリメラーゼである。3'-5'エクソヌクレアーゼ活性を有するブルーフリーディングポリメラーゼは、(T)₁₂(rU)₄5'テール配列(配列番号1)を含む、下流の酵素的正規化のためのプライマーと組み合わせられる場合は、PCR時に5'オーバーハングを生成することが必要である。市販の酵素としては、Kapa HiFi DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL DNA Polymerase (Takara) および High Fidelity DNA Polymerase (Qiagen) が挙げられるが、それらに限定されない。PCR反応条件は、ビーズベースの精製による20uLのライブラリー溶出物、ならびに2倍マスターミックスPCR配合物を使用する場合のプライマーおよびアダプターの添加に対する5uLを可能にするための50uLの反応体積において、改造することなくポリメラーゼ販売元が推奨する通りに実施される。リガーゼは、T3 DNAリガーゼを含む、低マグネシウムPCR反応緩衝液にて高効率ライゲーションが可能な任意の熱不安定性リガーゼとすることができ、最小で30~300またはそれより多い酵素ユニットを50uLのライゲーションカップルドPCR反応に使用することができる。開裂可能dU塩基を含む第1のNGSアダプターの鎖を除去するためのエンドヌクレアーゼは、UDG (Uracil DNA Glycosylase) とエンドヌクレアーゼVII (NEB) とのブレンドを含むUSER酵素であり、50uLのライゲーションカップルドPCR反応に1つの酵素ユニットが使用される。

30

40

【0123】

単一密閉管ライゲーションカップルドPCRは、ライゲーションおよびPCRに必要なすべての試薬を含み、2つの個別のインキュベーションを含み、第1のインキュベーションは、エンドヌクレアーゼおよびリガーゼ活性を可能にするが、ポリメラーゼ活性を可能にしない温度で行い、次いで反応物が高温に加熱して、エンドヌクレアーゼおよびリガー

50

ぜを不活性化させ、ホットスタートポリメラーゼを活性化させ、PCR熱サイクリングのために基質を変性させる。第1の反応は、熱不安定酵素と25～37℃の温度で実施され、25度がT3リガーゼに最適であり、37度がUSER酵素に最適であるが、いずれもこの温度範囲内で実施できる。このインキュベーションは、PCRの前に反応を確実に完了させるために、理想的には20分実施されるが、5～60分の範囲で実施できる。熱不活性化温度およびインキュベーション時間は、その方法に使用されるポリメラーゼのホットスタート要件によって規定され、典型的には30秒から2分またはそれより長い時間にわたって95～98℃であり、次いでアニーリングおよび伸長温度およびインキュベーション時間は、本開示の方法に基づいて特定の改造をすることなく、当業者に公知のように、プライマーT_m、使用されるポリメラーゼ、および増幅される生成物の長さに依存する。

10

【0124】

これらの開示されるライゲーションカップルドPCRの方法の範囲内において、PCR時のプライマーとしてのみ、またはライゲーション時のアダプターおよびPCR時のプライマーの両方として使用されるインデキシングプライマーを、必要とされるPCRサイクルの数に応じて、それぞれ100nMからそれぞれ1μMまたはそれより多い反応濃度で使うことができる。インデキシングプライマーまたは他の長いプライマーをアセンブルする場合は、スプリントオリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドサブユニットに対して0.75倍のより低モル比率または1.5倍までのモル過剰比率で使用され、最終的なプライマーアセンブリにおいてより5'にあるプライマーサブユニットは、最終的なプライマーアセンブリに対してより3'にあるプライマーサブユニットと比較して2倍またはそれより高いモル濃度である。これにより、PCR時にプライマーとして機能し、完成されたアダプターをランケーションする、ライゲーションされていない3'プライマーサブユニットが過剰になることが防止される。最終的なプライマーアセンブリの5'末端における過剰のプライマーサブユニットは、それらが個々のプライマーとして機能する場合に最終的なライブラリーをランケーションしないため、PCR生成物の最終的な収率を低下させない。線状またはヘアピンブロッカーが利用される場合は、ブロッカーモル濃度は、それがライゲーション反応時に阻害しているインデキシングプライマー濃度に等しいまたはそれより大きく、プライマーに対するブロッカーの比率は、1:1、1.5:1、2:1、4:1、6:1、またはそれより大きいモル比率である。ヘアピンがランケーションされたアダプターが利用される場合は、反応物に存在する基質の量に応じて、50～200nMまたはそれより大きい反応濃度で使うことができる。同時にさらなる部分をアンプリコン基質の3'末端上のランケーションされた3'アダプターの3'末端にライゲーションする場合は、同様の50～200nMまたはそれより大きいオリゴヌクレオチド濃度が使用される。

20

30

【0125】

ライゲーションカップルドPCRの方法—両インデキシングプライマーは、第1の共通ヌクレオチド配列に相補的な共通3'末端配列を含む

一部の実施形態において、(i)第1の鎖および第2の鎖を含み、第1の3'オーバーハング、二本鎖部分および第2の3'オーバーハングを含む部分的に二本鎖のDNA基質を提供することであって、第1の鎖が、5'から3'方向に、第1の5'末端、第1の部分および第2の部分を含み、第2の鎖が、5'から3'方向に、第2の5'末端、第3の部分および第4の部分を含み、第1の鎖の第1の部分および第2の鎖の第3の部分が相補的であり、二本鎖部分を形成し、第1の鎖の第2の部分が第1の3'オーバーハングを形成し、第2の鎖の第4の部分が第2の3'オーバーハングを形成し、第1の鎖の第2の部分および第2の鎖の第4の部分が、それぞれ、第1の3'オーバーハングおよび第2の3'オーバーハングの5'末端に位置する第1の共通ヌクレオチド配列を含むこと、(ii)複数の第1のインデキシングプライマー、複数の第2のインデキシングプライマー、リガーゼ、DNAポリメラーゼおよびデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)を部分的に二本鎖のDNA基質に添加して第1の反応混合物を生成することであって、複数の第1のイン

40

50

デキシングプライマーの各々が、第1の共通ヌクレオチド配列に相補的な第1の3'末端部分を含み、複数の第2のインデキシングプライマーの各々が、第1の共通ヌクレオチド配列に相補的な第2の3'末端部分を含むこと、(iii) 第1の反応混合物を、ライゲーション持続時間にわたるライゲーション温度を含む第1の条件集合下でインキュベートすることであって、第1の条件集合は、1) 複数の第1のインデキシングプライマーの第1の3'末端部分が、第1の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、2) リガーゼが、複数の第1のインデキシングプライマーの1つを第1の鎖の第1の5'末端に、複数の第1のインデキシングプライマーの1つを第2の鎖の第2の5'末端にライゲーションして、5'から3'方向に、複数の第1のインデキシングプライマーの1つ、第1の部分および第2の部分を含む第3の鎖と、5'から3'方向に、複数の第1のインデキシングプライマーの1つ、第3の部分および第4の部分を含む第4の鎖とを含む第2の反応混合物を生成するのに十分であること、(iv) 第2の反応混合物を、1) リガーゼを不活性化させ、二本鎖DNAを変性させ、必要に応じてDNAポリメラーゼを活性化させ、2) 複数の第2のインデキシングプライマーの1つの第2の3'末端部分が、第3の鎖の第2の部分の第1の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、複数の第2のインデキシングプライマーの1つが、第4の鎖の第4の部分の第1の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、3) DNAポリメラーゼが、第3の鎖の第2の部分の第1の共通ヌクレオチド配列にアニーリングされた複数の第2のインデキシングプライマーの1つ、および第4の鎖の第4の部分の第1の共通ヌクレオチド配列にアニーリングされた複数の第2のインデキシングプライマーの1つを伸長させて、第3の鎖、第4の鎖、第5の鎖および第6の鎖を含む第3の反応混合物であって、第5の鎖が、5'から3'方向に、複数の第2のインデキシングプライマーの1つ、第3の部分、および複数の第1のインデキシングプライマーの1つのリバーズ相補体を含み、第6の鎖が、5'から3'方向に、複数の第2のインデキシングプライマーの1つ、第1の部分、および複数の第1のインデキシングプライマーの1つのリバーズ相補体を含む第3の反応混合物を生成するのに十分である、第1の変性持続時間にわたる第1の変性温度、第1のアニーリング持続時間にわたる第1のアニーリング温度、第1の伸長持続時間にわたる第1の伸長温度を含む第2の条件集合下でインキュベートすること、(v) 第3の反応混合物を、1) 二本鎖DNAを変性し、2) 複数の第1のインデキシングプライマーの1つが、第5の鎖または第6の鎖の複数の第1のインデキシングプライマーの1つのリバーズ相補体にアニーリングし、3) DNAポリメラーゼが、第5の鎖の複数の第1のインデキシングプライマーの1つのリバーズ相補体にアニーリングされた複数の第1のインデキシングプライマー、および第6の鎖の複数の第1のインデキシングプライマーの1つのリバーズ相補体にアニーリングされた複数の第1のインデキシングプライマーの1つを伸長させて、第5の鎖、第6の鎖、第7の鎖および第8の鎖を含む第4の反応混合物であって、第7の鎖が、5'から3'方向に、複数の第1のインデキシングプライマーの1つ、第1の部分、および複数の第2のインデキシングプライマーの1つのリバーズ相補体を含み、第8の鎖が、5'から3'方向に、複数の第1のインデキシングプライマーの1つ、第3の部分、および複数の第2のインデキシングプライマーの1つのリバーズ相補体を含み、第7の鎖が第5の鎖に相補的であり、第8の鎖が第6の鎖に相補的である第4の反応混合物を生成するのに十分である、第2の変性持続時間にわたる第2の変性温度、第2のアニーリング持続時間にわたる第2のアニーリング温度、第2の伸長持続時間にわたる第2の伸長温度を含む第3の条件集合下でインキュベートすること、および(vi) 複数の第1のインデキシングプライマーの少なくとも一部分および複数の第2のインデキシングプライマーの少なくとも一部分が、第5のオリゴヌクレオチドおよび第7のオリゴヌクレオチドまたは第6のオリゴヌクレオチドおよび第8のオリゴヌクレオチドを増幅させるのに十分である、第3の変性持続時間にわたる第3の変性温度、第3のアニーリング持続時間にわたる第3のアニーリング温度、第3の伸長持続時間にわたる第3の伸長温度を含む第4の条件集合下でインキュベートすることを含む方法が提供される。

【0126】

前述の実施形態のいずれかにおいて、ステップ(i)～(vi)を単一密閉管で実施す

ることができる。前述の実施形態のいずれかにおいて、方法は、ステップ (i) ~ (vi) の間に任意の精製ステップを含むことができない。

【0127】

前述の実施形態のいずれかにおいて、部分的に二本鎖のDNA基質は、約24塩基から約6000塩基の長さを有することができる。例として、限定することなく、部分的に二本鎖のDNA基質は、約24塩基から約6000塩基、約24塩基から約5500塩基、約24塩基から約5000塩基、約24塩基から約4500塩基、約24塩基から約4000塩基、約24塩基から約3500塩基、約24塩基から約3000塩基、約24塩基から約2500塩基、約24塩基から約2000塩基、約24塩基から約1500塩基、約24塩基から約1000塩基、約24塩基から約750塩基、約24塩基から約500塩基、約24塩基から約250塩基、約24塩基から約200塩基、約24塩基から約100塩基、約24塩基から約50塩基、約100塩基から約6000塩基、約100塩基から約5500塩基、約100塩基から約5000塩基、約100塩基から約4500塩基、約100塩基から約4000塩基、約100塩基から約3500塩基、約100塩基から約3000塩基、約100塩基から約2500塩基、約100塩基から約2000塩基、約100塩基から約1500塩基、約100塩基から約1000塩基、約100塩基から約750塩基、約100塩基から約500塩基、約100塩基から約250塩基、約100塩基から約200塩基、約200塩基から約6000塩基、約200塩基から約5500塩基、約200塩基から約5000塩基、約200塩基から約4500塩基、約200塩基から約4000塩基、約200塩基から約3500塩基、約200塩基から約3000塩基、約200塩基から約2500塩基、約200塩基から約2000塩基、約200塩基から約1500塩基、約200塩基から約1000塩基、約200塩基から約750塩基、約200塩基から約500塩基、約200塩基から約250塩基、約250塩基から約6000塩基、約250塩基から約5500塩基、約250塩基から約5000塩基、約250塩基から約4500塩基、約250塩基から約4000塩基、約250塩基から約3500塩基、約250塩基から約3000塩基、約250塩基から約2500塩基、約250塩基から約2000塩基、約250塩基から約1500塩基、約250塩基から約1000塩基、約250塩基から約750塩基、約250塩基から約500塩基、約500塩基から約6000塩基、約500塩基から約5500塩基、約500塩基から約5000塩基、約500塩基から約4500塩基、約500塩基から約4000塩基、約500塩基から約3500塩基、約500塩基から約3000塩基、約500塩基から約2500塩基、約500塩基から約2000塩基、約500塩基から約1500塩基、約500塩基から約1000塩基、約500塩基から約750塩基、約750塩基から約6000塩基、約750塩基から約5500塩基、約750塩基から約5000塩基、約750塩基から約4500塩基、約750塩基から約4000塩基、約750塩基から約3500塩基、約750塩基から約3000塩基、約750塩基から約2500塩基、約750塩基から約2000塩基、約750塩基から約1500塩基、約750塩基から約1000塩基、約1000塩基から約6000塩基、約1000塩基から約5500塩基、約1000塩基から約5000塩基、約1000塩基から約4500塩基、約1000塩基から約4000塩基、約1000塩基から約3500塩基、約1000塩基から約3000塩基、約1000塩基から約2500塩基、約1000塩基から約2000塩基、約1000塩基から約1500塩基、約1500塩基から約6000塩基、約1500塩基から約5500塩基、約1500塩基から約5000塩基、約1500塩基から約4500塩基、約1500塩基から約4000塩基、約1500塩基から約3500塩基、約1500塩基から約3000塩基、約1500塩基から約2500塩基、約1500塩基から約2000塩基、約2000塩基から約6000塩基、約2000塩基から約5500塩基、約2000塩基から約5000塩基、約2000塩基から約4500塩基、約2000塩基から約4000塩基、約2000塩基から約3500塩基、約2000塩基から約3000塩基、約2000塩基から約2500塩基、約2500塩基から約6000塩基、約2500塩基から約5500塩基、約2500塩基から約5000塩基、約2

10

20

30

40

50

500塩基から約4500塩基、約2500塩基から約4000塩基、約2500塩基から約3500塩基、約2500塩基から約3000塩基、約3000塩基から約6000塩基、約3000塩基から約5500塩基、約3000塩基から約5000塩基、約3000塩基から約4500塩基、約3000塩基から約4000塩基、約3000塩基から約3500塩基、約3500塩基から約6000塩基、約3500塩基から約5500塩基、約3500塩基から約5000塩基、約3500塩基から約4500塩基、約3500塩基から約4000塩基、約4000塩基から約6000塩基、約4000塩基から約5500塩基、約4000塩基から約5000塩基、約4000塩基から約4500塩基、約4500塩基から約6000塩基、約4500塩基から約5500塩基、約4500塩基から約5000塩基、約5000塩基から約6000塩基、約5000塩基から約5500塩基、約5000塩基から約5000塩基、約5500塩基から約6000塩基、約24、30、40、50、60、70、80、90、100、200、250、500、750、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500または6000塩基の長さを有することができる。部分的に二本鎖のDNA基質の長さは例示であること、および他のサイズも本開示の範囲内であることが理解されるべきである。部分的に二本鎖のDNA基質の長さは、部分的に二本鎖のDNA基質の第1の鎖または第2の鎖の長さ、すなわち第1の5'末端から第1の3'オーバーハングの3'末端の長さまたは第2の5'末端から第2の3'オーバーハングの3'末端の長さを指すことが理解されるべきである。

10

20

【0128】

前述の実施形態のいずれかにおいて、それぞれ第1の鎖および第2の鎖の第1の部分および第3の部分は、約20塩基から約6000塩基の長さを有することができる。例として、限定することなく、第1のオリゴヌクレオチドの第1の部分および第2のオリゴヌクレオチドの第3の部分は、それぞれ、約20塩基から約6000塩基、約20塩基から約5500塩基、約20塩基から約5000塩基、約20塩基から約4500塩基、約20塩基から約4000塩基、約20塩基から約3500塩基、約20塩基から約3000塩基、約20塩基から約2500塩基、約20塩基から約2000塩基、約20塩基から約1500塩基、約20塩基から約1000塩基、約20塩基から約750塩基、約20塩基から約500塩基、約20塩基から約250塩基、約20塩基から約200塩基、約20塩基から約100塩基、約20塩基から約50塩基、約100塩基から約6000塩基、約100塩基から約5500塩基、約100塩基から約5000塩基、約100塩基から約4500塩基、約100塩基から約4000塩基、約100塩基から約3500塩基、約100塩基から約3000塩基、約100塩基から約2500塩基、約100塩基から約2000塩基、約100塩基から約1500塩基、約100塩基から約1000塩基、約100塩基から約750塩基、約100塩基から約500塩基、約100塩基から約250塩基、約100塩基から約200塩基、約200塩基から約6000塩基、約200塩基から約5500塩基、約200塩基から約5000塩基、約200塩基から約4500塩基、約200塩基から約4000塩基、約200塩基から約3500塩基、約200塩基から約3000塩基、約200塩基から約2500塩基、約200塩基から約2000塩基、約200塩基から約1500塩基、約200塩基から約1000塩基、約200塩基から約750塩基、約200塩基から約500塩基、約200塩基から約250塩基、約250塩基から約6000塩基、約250塩基から約5500塩基、約250塩基から約5000塩基、約250塩基から約4500塩基、約250塩基から約4000塩基、約250塩基から約3500塩基、約250塩基から約3000塩基、約250塩基から約2500塩基、約250塩基から約2000塩基、約250塩基から約1500塩基、約250塩基から約1000塩基、約250塩基から約750塩基、約250塩基から約500塩基、約500塩基から約6000塩基、約500塩基から約5500塩基、約500塩基から約5000塩基、約500塩基から約4500塩基、約500塩基から約4000塩基、約500塩基から約3500塩基、約500塩基から約3000塩基、約500塩基から約2500塩基、約500塩基から約2000塩基、約500塩基から

30

40

50

約 1 5 0 0 塩基、約 5 0 0 塩基から約 1 0 0 0 塩基、約 5 0 0 塩基から約 7 5 0 塩基、約 7 5 0 塩基から約 6 0 0 0 塩基、約 7 5 0 塩基から約 5 5 0 0 塩基、約 7 5 0 塩基から約 5 0 0 0 塩基、約 7 5 0 塩基から約 4 5 0 0 塩基、約 7 5 0 塩基から約 4 0 0 0 塩基、約 7 5 0 塩基から約 3 5 0 0 塩基、約 7 5 0 塩基から約 3 0 0 0 塩基、約 7 5 0 塩基から約 2 5 0 0 塩基、約 7 5 0 塩基から約 2 0 0 0 塩基、約 7 5 0 塩基から約 1 5 0 0 塩基、約 7 5 0 塩基から約 1 0 0 0 塩基、約 1 0 0 0 塩基から約 6 0 0 0 塩基、約 1 0 0 0 塩基から約 5 5 0 0 塩基、約 1 0 0 0 塩基から約 5 0 0 0 塩基、約 1 0 0 0 塩基から約 4 5 0 0 塩基、約 1 0 0 0 塩基から約 4 0 0 0 塩基、約 1 0 0 0 塩基から約 3 5 0 0 塩基、約 1 0 0 0 塩基から約 3 0 0 0 塩基、約 1 0 0 0 塩基から約 2 5 0 0 塩基、約 1 0 0 0 塩基から約 2 0 0 0 塩基、約 1 0 0 0 塩基から約 1 5 0 0 塩基、約 1 5 0 0 塩基から約 6 0 0 0 塩基、約 1 5 0 0 塩基から約 5 5 0 0 塩基、約 1 5 0 0 塩基から約 5 0 0 0 塩基、約 1 5 0 0 塩基から約 4 5 0 0 塩基、約 1 5 0 0 塩基から約 4 0 0 0 塩基、約 1 5 0 0 塩基から約 3 5 0 0 塩基、約 1 5 0 0 塩基から約 3 0 0 0 塩基、約 1 5 0 0 塩基から約 2 5 0 0 塩基、約 1 5 0 0 塩基から約 2 0 0 0 塩基、約 2 0 0 0 塩基から約 6 0 0 0 塩基、約 2 0 0 0 塩基から約 5 5 0 0 塩基、約 2 0 0 0 塩基から約 5 0 0 0 塩基、約 2 0 0 0 塩基から約 4 5 0 0 塩基、約 2 0 0 0 塩基から約 4 0 0 0 塩基、約 2 0 0 0 塩基から約 3 5 0 0 塩基、約 2 0 0 0 塩基から約 3 0 0 0 塩基、約 2 0 0 0 塩基から約 2 5 0 0 塩基、約 2 5 0 0 塩基から約 6 0 0 0 塩基、約 2 5 0 0 塩基から約 5 5 0 0 塩基、約 2 5 0 0 塩基から約 5 0 0 0 塩基、約 2 5 0 0 塩基から約 4 5 0 0 塩基、約 2 5 0 0 塩基から約 4 0 0 0 塩基、約 2 5 0 0 塩基から約 3 5 0 0 塩基、約 2 5 0 0 塩基から約 3 0 0 0 塩基、約 3 0 0 0 塩基から約 6 0 0 0 塩基、約 3 0 0 0 塩基から約 5 5 0 0 塩基、約 3 0 0 0 塩基から約 5 0 0 0 塩基、約 3 0 0 0 塩基から約 4 5 0 0 塩基、約 3 0 0 0 塩基から約 4 0 0 0 塩基、約 3 0 0 0 塩基から約 3 5 0 0 塩基、約 3 5 0 0 塩基から約 6 0 0 0 塩基、約 3 5 0 0 塩基から約 5 5 0 0 塩基、約 3 5 0 0 塩基から約 5 0 0 0 塩基、約 3 5 0 0 塩基から約 4 5 0 0 塩基、約 3 5 0 0 塩基から約 4 0 0 0 塩基、約 4 0 0 0 塩基から約 6 0 0 0 塩基、約 4 0 0 0 塩基から約 5 5 0 0 塩基、約 4 0 0 0 塩基から約 5 0 0 0 塩基、約 4 0 0 0 塩基から約 4 5 0 0 塩基、約 4 5 0 0 塩基から約 6 0 0 0 塩基、約 4 5 0 0 塩基から約 5 5 0 0 塩基、約 4 5 0 0 塩基から約 5 0 0 0 塩基、約 5 0 0 0 塩基から約 6 0 0 0 塩基、約 5 0 0 0 塩基から約 5 5 0 0 塩基、約 5 5 0 0 塩基から約 6 0 0 0 塩基、約 2 4、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、2 0 0、2 5 0、5 0 0、7 5 0、1 0 0 0、1 5 0 0、2 0 0 0、2 5 0 0、3 0 0 0、3 5 0 0、4 0 0 0、4 5 0 0、5 0 0 0、5 5 0 0 または 6 0 0 0 塩基の長さを有することができる。第 1 の鎖の第 1 の部分および第 2 の鎖の第 3 の部分の長さは例示的であること、および他のサイズも本開示の範囲内であることが理解されるべきである。

10

20

30

40

50

【0129】

前述の実施形態のいずれかにおいて、第 1 の鎖の第 2 の部分および第 2 の鎖の第 4 の部分、すなわちそれぞれ第 1 の 3 ' オーバーハングおよび第 2 の 3 ' オーバーハングは、それぞれ約 4 塩基から約 1 0 0 塩基を含むことができる。例として、限定することなく、第 1 の鎖の第 2 の部分および第 2 の鎖の第 4 の部分は、それぞれ約 4 塩基から約 1 0 0 塩基、約 4 塩基から約 9 0 塩基、約 4 塩基から約 8 0 塩基、約 4 塩基から約 7 5 塩基、約 4 塩基から約 7 0 塩基、約 4 塩基から約 6 0 塩基、約 4 塩基から約 5 0 塩基、約 4 塩基から約 4 0 塩基、約 4 塩基から約 3 0 塩基、約 4 塩基から約 2 5 塩基、約 4 塩基から約 2 0 塩基、約 4 塩基から約 1 5 塩基、約 4 塩基から約 1 0 塩基、約 4 塩基から約 5 塩基、約 5 塩基から約 1 0 0 塩基、約 5 塩基から約 9 0 塩基、約 5 塩基から約 8 0 塩基、約 5 塩基から約 7 5 塩基、約 5 塩基から約 7 0 塩基、約 5 塩基から約 6 0 塩基、約 5 塩基から約 5 5 塩基、約 5 塩基から約 5 0 塩基、約 5 塩基から約 4 0 塩基、約 5 塩基から約 3 0 塩基、約 5 塩基から約 2 5 塩基、約 5 塩基から約 2 0 塩基、約 5 塩基から約 1 5 塩基、約 5 塩基から約 1 0 塩基、約 1 0 塩基から約 1 0 0 塩基、約 1 0 塩基から約 9 0 塩基、約 1 0 塩基から約 8 0 塩基、約 1 0 塩基から約 7 5 塩基、約 1 0 塩基から約 7 0 塩基、約 1 0 塩基から約 6 0 塩基、約 1 0 塩基から約 5 0 塩基、約 1 0 塩基から約 4 0 塩基、約 1 0 塩基から約 3 0 塩

基、約 10 塩基から約 25 塩基、約 10 塩基から約 20 塩基、約 10 塩基から約 15 塩基、約 15 塩基から約 100 塩基、約 15 塩基から約 90 塩基、約 15 塩基から約 80 塩基、約 15 塩基から約 75 塩基、約 15 塩基から約 70 塩基、約 15 塩基から約 60 塩基、約 15 塩基から約 50 塩基、約 15 塩基から約 40 塩基、約 15 塩基から約 30 塩基、約 15 塩基から約 25 塩基、約 15 塩基から約 20 塩基、約 20 塩基から約 100 塩基、約 20 塩基から約 90 塩基、約 20 塩基から約 80 塩基、約 20 塩基から約 75 塩基、約 20 塩基から約 70 塩基、約 20 塩基から約 60 塩基、約 20 塩基から約 50 塩基、約 20 塩基から約 40 塩基、約 20 塩基から約 30 塩基、約 20 塩基から約 25 塩基、約 25 塩基から約 100 塩基、約 25 塩基から約 90 塩基、約 25 塩基から約 80 塩基、約 25 塩基から約 75 塩基、約 25 塩基から約 70 塩基、約 25 塩基から約 60 塩基、約 25 塩基から約 50 塩基、約 25 塩基から約 40 塩基、約 25 塩基から約 30 塩基、約 30 塩基から約 100 塩基、約 30 塩基から約 90 塩基、約 30 塩基から約 80 塩基、約 30 塩基から約 75 塩基、約 30 塩基から約 70 塩基、約 30 塩基から約 60 塩基、約 30 塩基から約 50 塩基、約 30 塩基から約 40 塩基、約 40 塩基から約 100 塩基、約 40 塩基から約 90 塩基、約 40 塩基から約 80 塩基、約 40 塩基から約 75 塩基、約 40 塩基から約 70 塩基、約 40 塩基から約 60 塩基、約 40 塩基から約 50 塩基、約 50 塩基から約 100 塩基、約 50 塩基から約 90 塩基、約 50 塩基から約 80 塩基、約 50 塩基から約 75 塩基、約 50 塩基から約 70 塩基、約 50 塩基から約 60 塩基、約 60 塩基から約 100 塩基、約 60 塩基から約 90 塩基、約 60 塩基から約 80 塩基、約 60 塩基から約 75 塩基、約 60 塩基から約 70 塩基、約 70 塩基から約 100 塩基、約 70 塩基から約 90 塩基、約 70 塩基から約 80 塩基、約 75 塩基から約 100 塩基、約 75 塩基から約 90 塩基、約 75 塩基から約 80 塩基、約 80 塩基から約 100 塩基、約 80 塩基から約 90 塩基、約 90 塩基から約 100 塩基、約 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、33、40、50、60、70、75、80、90 または 100 塩基を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0130】

前述の実施形態のいずれかにおいて、第 1 の共通ヌクレオチド配列は、約 1 塩基から約 50 塩基を含むことができる。例として、限定することなく、第 1 の共通ヌクレオチド配列は、約 1 塩基から約 50 塩基、約 1 塩基から約 45 塩基、約 1 塩基から約 40 塩基、約 1 塩基から約 35 塩基、約 1 塩基から約 30 塩基、約 1 塩基から約 25 塩基、約 1 塩基から約 20 塩基、約 1 塩基から約 15 塩基、約 1 塩基から約 10 塩基、約 5 塩基から約 50 塩基、約 5 塩基から約 45 塩基、約 5 塩基から約 40 塩基、約 5 塩基から約 35 塩基、約 5 塩基から約 30 塩基、約 5 塩基から約 25 塩基、約 5 塩基から約 20 塩基、約 5 塩基から約 15 塩基、約 5 塩基から約 10 塩基、約 10 塩基から約 50 塩基、約 10 塩基から約 45 塩基、約 10 塩基から約 40 塩基、約 10 塩基から約 35 塩基、約 10 塩基から約 30 塩基、約 10 塩基から約 25 塩基、約 10 塩基から約 20 塩基、約 10 塩基から約 15 塩基、約 15 塩基から約 50 塩基、約 15 塩基から約 45 塩基、約 15 塩基から約 40 塩基、約 15 塩基から約 35 塩基、約 15 塩基から約 30 塩基、約 15 塩基から約 25 塩基、約 15 塩基から約 20 塩基、約 20 塩基から約 50 塩基、約 20 塩基から約 45 塩基、約 20 塩基から約 40 塩基、約 20 塩基から約 35 塩基、約 20 塩基から約 30 塩基、約 25 塩基から約 30 塩基、約 30 塩基から約 50 塩基、約 30 塩基から約 45 塩基、約 30 塩基から約 40 塩基、約 30 塩基から約 35 塩基、約 35 塩基から約 50 塩基、約 35 塩基から約 45 塩基、約 35 塩基から約 40 塩基、約 40 塩基から約 50 塩基、約 40 塩基から約 45 塩基、約 45 塩基から約 50 塩基、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、33、35、40 または 50 塩基を含むことができる。好ましくは、第 1 の共通ヌクレオチド配列は 13 塩基を含む。一部の実施形態において、第 1 の共通ヌクレオチド配列は、配列番号 127 (5' - A G A T C G G A A G A G C - 3') の配列を含む。第 1 の共通ヌクレオチド配列が、配列番号 127 の配列を含む場合は、第 1 の 3' 末端部分および第 2 の 3' 末端部分は、それぞれ配列番号 126 (5' - G C T C T T C C G A T C T - 3') を含むことができる。

【0131】

前述の実施形態のいずれかにおいて、第1の鎖の第2の部分および第2の鎖の第4の部分は、それぞれ第1の共通ヌクレオチド配列に対して3'に位置する第2の共通ヌクレオチド配列をさらに含むことができる。ある特定の態様において、第2の共通ヌクレオチド配列は、約3塩基から約100塩基の長さを有することができる。例として、限定することなく、第2の共通ヌクレオチド配列は、約1塩基から約100塩基、約1塩基から約90塩基、約1塩基から約80塩基、約1塩基から約75塩基、約1塩基から約70塩基、約1塩基から約60塩基、約1塩基から約50塩基、約1塩基から約40塩基、約1塩基から約30塩基、約1塩基から約25塩基、約1塩基から約20塩基、約1塩基から約15塩基、約1塩基から約10塩基、約1塩基から約5塩基、約5塩基から約100塩基、約5塩基から約90塩基、約5塩基から約80塩基、約5塩基から約75塩基、約5塩基から約70塩基、約5塩基から約60塩基、約5塩基から約50塩基、約5塩基から約40塩基、約5塩基から約30塩基、約5塩基から約25塩基、約5塩基から約20塩基、約5塩基から約15塩基、約5塩基から約10塩基、約10塩基から約100塩基、約10塩基から約90塩基、約10塩基から約80塩基、約10塩基から約75塩基、約10塩基から約70塩基、約10塩基から約60塩基、約10塩基から約50塩基、約10塩基から約40塩基、約10塩基から約30塩基、約10塩基から約25塩基、約10塩基から約20塩基、約10塩基から約15塩基、約15塩基から約100塩基、約15塩基から約90塩基、約15塩基から約80塩基、約15塩基から約75塩基、約15塩基から約70塩基、約15塩基から約60塩基、約15塩基から約50塩基、約15塩基から約40塩基、約15塩基から約30塩基、約15塩基から約25塩基、約15塩基から約20塩基、約20塩基から約100塩基、約20塩基から約90塩基、約20塩基から約80塩基、約20塩基から約75塩基、約20塩基から約70塩基、約20塩基から約60塩基、約20塩基から約50塩基、約20塩基から約40塩基、約20塩基から約30塩基、約20塩基から約25塩基、約25塩基から約100塩基、約25塩基から約90塩基、約25塩基から約80塩基、約25塩基から約75塩基、約25塩基から約70塩基、約25塩基から約60塩基、約25塩基から約50塩基、約25塩基から約40塩基、約25塩基から約30塩基、約30塩基から約100塩基、約30塩基から約90塩基、約30塩基から約80塩基、約30塩基から約75塩基、約30塩基から約70塩基、約30塩基から約60塩基、約30塩基から約50塩基、約30塩基から約40塩基、約40塩基から約100塩基、約40塩基から約90塩基、約40塩基から約80塩基、約40塩基から約75塩基、約40塩基から約70塩基、約40塩基から約60塩基、約40塩基から約50塩基、約50塩基から約100塩基、約50塩基から約90塩基、約50塩基から約80塩基、約50塩基から約75塩基、約50塩基から約70塩基、約50塩基から約60塩基、約60塩基から約100塩基、約60塩基から約90塩基、約60塩基から約80塩基、約60塩基から約75塩基、約60塩基から約70塩基、約70塩基から約100塩基、約70塩基から約90塩基、約70塩基から約80塩基、約70塩基から約75塩基、約75塩基から約100塩基、約75塩基から約90塩基、約75塩基から約80塩基、約80塩基から約100塩基、約80塩基から約90塩基、約90塩基から約100塩基、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、75、80、90または100塩基の長さを有することができる。

【0132】

第1の鎖の第2の部分および第2の鎖の第4の部分が第2の共通ヌクレオチド配列をさらに含む実施形態において、複数の第2のインデキシングプライマーの各々は、第2の3'末端部分に対して5'に位置し、第2の共通ヌクレオチド配列に相補的な第1の5'部分を含むことができる。そのような実施形態では、ステップ(iv)(b)における第2の条件集合は、複数の第2のインデキシングプライマーの1つの第2の3'末端部分および第1の5'部分が、第3の鎖の第2の部分または第4の鎖の第4の部分上の少なくとも第1の共通ヌクレオチド配列および第2の共通ヌクレオチド配列にアニーリングするのに十

分であり得る。そのような実施形態では、第1の3'末端配列から第1の共通ヌクレオチド配列の融解温度は、第1のアニール温度より低くてもよい。さらなる例として、限定することなく、第1の3'末端配列から第1の共通ヌクレオチド配列の融解温度は、第1のアニール温度、第2のアニール温度および第3のアニール温度より低くてもよい。そのような実施形態では、第1のインデキシングプライマーの各々は、第2の共通ヌクレオチド配列に相補的な配列を含むことができない。そのような実施形態では、第1の共通ヌクレオチド配列および第2の共通ヌクレオチド配列と第2のインデキシングプライマーの各々の第2の3'末端部分および第1の5'部分の間の融解温度は、第1のアニール温度より高くてもよい。そのような実施形態では、第1の共通ヌクレオチド配列および第2の共通ヌクレオチド配列から複数の第2のインデキシングプライマーの各々の融解温度は、第1のアニール温度および第3のアニール温度より高くてもよい。

10

【0133】

前述の実施形態のいずれかにおいて、複数の第1のインデキシングプライマーの各々と第2の部分または第4の部分の間の融解温度は、複数の第2のインデキシングプライマーの各々と第2または第4の部分の間の融解温度より低い。

【0134】

前述の実施形態のいずれかにおいて、複数の第1のインデキシングプライマーの各々は、約20塩基から約100塩基の長さを有することができる。例として、限定することなく、複数の第1のインデキシングプライマーの各々は、約20塩基から約100塩基、約20塩基から約90塩基、約20塩基から約80塩基、約20塩基から約70塩基、約20塩基から約60塩基、約20塩基から約50塩基、約20塩基から約40塩基、約20塩基から約30塩基、約25塩基から約100塩基、約25塩基から約90塩基、約25塩基から約80塩基、約25塩基から約70塩基、約25塩基から約60塩基、約25塩基から約50塩基、約25塩基から約40塩基、約25塩基から約30塩基、約30塩基から約100塩基、約30塩基から約90塩基、約30塩基から約80塩基、約30塩基から約70塩基、約30塩基から約60塩基、約30塩基から約50塩基、約30塩基から約40塩基、約40塩基から約100塩基、約40塩基から約90塩基、約40塩基から約80塩基、約40塩基から約70塩基、約40塩基から約60塩基、約40塩基から約50塩基、約50塩基から約100塩基、約50塩基から約90塩基、約50塩基から約80塩基、約50塩基から約70塩基、約50塩基から約60塩基、約60塩基から約100塩基、約60塩基から約90塩基、約60塩基から約80塩基、約60塩基から約70塩基、約70塩基から約100塩基、約70塩基から約90塩基、約70塩基から約80塩基、約80塩基から約100塩基、約80塩基から約90塩基、約90塩基から約100塩基、約30、35、40、45、50、60、70、80、90または100塩基の長さを有することができる。

20

30

【0135】

前述の実施形態のいずれかにおいて、複数の第2のインデキシングプライマーの各々は、約20塩基から約100塩基の長さを有することができる。例として、限定することなく、複数の第2のインデキシングプライマーの各々は、約20塩基から約100塩基、約20塩基から約90塩基、約20塩基から約80塩基、約20塩基から約70塩基、約20塩基から約60塩基、約20塩基から約50塩基、約20塩基から約40塩基、約20塩基から約30塩基、約25塩基から約100塩基、約25塩基から約90塩基、約25塩基から約80塩基、約25塩基から約70塩基、約25塩基から約60塩基、約25塩基から約50塩基、約25塩基から約40塩基、約25塩基から約30塩基、約30塩基から約100塩基、約30塩基から約90塩基、約30塩基から約80塩基、約30塩基から約70塩基、約30塩基から約60塩基、約30塩基から約50塩基、約30塩基から約40塩基、約40塩基から約100塩基、約40塩基から約90塩基、約40塩基から約80塩基、約40塩基から約70塩基、約40塩基から約60塩基、約40塩基から約50塩基、約50塩基から約100塩基、約50塩基から約90塩基、約50塩基から

40

50

約 80 塩基、約 50 塩基から約 70 塩基、約 50 塩基から約 60 塩基、約 60 塩基から約 100 塩基、約 60 塩基から約 90 塩基、約 60 塩基から約 80 塩基、約 60 塩基から約 70 塩基、約 70 塩基から約 100 塩基、約 70 塩基から約 90 塩基、約 70 塩基から約 80 塩基、約 80 塩基から約 100 塩基、約 80 塩基から約 90 塩基、約 90 塩基から約 100 塩基、約 30、35、40、45、50、60、70、80、90 または 100 塩基の長さを有することができる。

【0136】

前述の実施形態のいずれかにおいて、複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々は、配列番号 87 の配列をさらに含むことができる。前述の実施形態のいずれかにおいて、複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々は、配列番号 78 の配列をさらに含むことができる。

10

【0137】

前述の実施形態のいずれかにおいて、第 1 の共通ヌクレオチド配列および第 1 の 3' 末端部分は、ライゲーション温度より高い融解温度 (T_m) を有することができる。例として、限定することなく、第 1 の共通ヌクレオチド配列および第 1 の 3' 末端部分の融解温度は、ライゲーション温度より 1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃ または 40℃ 高い温度であり得る。さらなる例として、限定することなく、第 1 の共通ヌクレオチド配列および第 1 の 3' 末端部分は、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃、50℃、51℃、52℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃ もしくは 80℃ より高い、または約 40℃ から約 80℃、約 40℃ から約 70℃、約 40℃ から約 60℃、約 40℃ から約 50℃、約 50℃ から約 80℃、約 50℃ から約 70℃、約 50℃ から約 60℃、約 60℃ から約 80℃、約 60℃ から約 70℃ もしくは約 70℃ から約 80℃ の T_m を有することができる。第 1 の共通ヌクレオチド配列および第 1 の 3' 末端部分は、第 1 の変性温度、第 2 の変性温度および第 3 の変性温度未満の T_m を有することが理解されるべきである。

20

【0138】

前述の実施形態のいずれかにおいて、ライゲーション温度は、リガーゼが、複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つを第 1 の鎖の第 1 の 5' 末端または第 2 の鎖の第 2 の 5' 末端にライゲーションするのに十分な任意の温度であり得る。ライゲーション温度は、部分的に二本鎖の DNA 基質の T_m より高くなり得ないことがさらに理解されるべきである。ライゲーション温度が部分的に二本鎖の DNA 基質の T_m より高いと、複数の第 1 のインデキシングプライマーが、ライゲーションされた 5' アダプタではなくプライマーとして作用することが可能となる。例として、限定することなく、ライゲーション温度は、約 25℃ から約 40℃ であり得る。さらなる例として、限定することなく、ライゲーション温度は、約 25℃ から約 40℃、約 25℃ から約 37℃、約 25℃ から約 35℃、約 25℃ から約 30℃、約 30℃ から約 40℃、約 30℃ から約 35℃、約 35℃ から約 40℃、約 25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃ または 40℃ であり得る。

30

40

【0139】

前述の実施形態のいずれかにおいて、ライゲーション持続時間は、複数の第 1 のインデキシングプライマーの 1 つを第 1 の鎖の第 1 の 5' 末端または第 2 の鎖の第 2 の 5' 末端にライゲーションするのに十分な任意の時間であってよい。前述の実施形態のいずれかにおいて、ライゲーション持続時間は、約 5 分から約 60 分であり得る。例として、限定することなく、ライゲーション持続時間は、約 5 分から約 60 分、約 5 分から約 50 分、約 5 分から約 40 分、約 5 分から約 30 分、約 5 分から約 20 分、約 5 分から約 10 分、約 10 分から約 60 分、約 10 分から約 50 分、約 10 分から約 40 分、約 10 分から約 30

50

分、約 10 分から約 20 分、約 20 分から約 60 分、約 20 分から約 50 分、約 20 分から約 40 分、約 20 分から約 30 分、約 30 分から約 60 分、約 30 分から約 50 分、約 30 分から約 40 分、約 40 分から約 60 分、約 40 分から約 50 分、約 50 分から約 60 分、約 5、10、15、20、25、30、40、50 または 60 分であり得る。

【0140】

前述の実施形態のいずれかにおいて、任意の好適なリガーゼを使用することができる。リガーゼは、低マグネシウム緩衝液にてライゲーションが可能な熱不安定性リガーゼであり、第 1 の変性持続時間にわたる第 1 の変性温度で不活性化されるべきであることが理解されるべきである。当該低マグネシウム緩衝液条件は、PCR に好適なものであることが理解されるべきである。例として、限定することなく、リガーゼは、T3 DNA リガーゼであり得る。前述の実施形態のいずれかにおいて、例として、限定することなく、リガーゼを第 1 の反応混合物 1 μ L 当たり約 30 から約 300 の酵素ユニットで添加することができる。

10

【0141】

前述の実施形態のいずれかにおいて、任意の好適なポリメラーゼを使用することができる。一部の実施形態において、ポリメラーゼは、ライゲーション温度で活性でない。例として、限定することなく、ポリメラーゼは、ホットスタート抗体またはアプタマーをさらに含むことができる。前述の実施形態のいずれかにおいて、ポリメラーゼは、活性化温度を有するホットスタートポリメラーゼであることができ、活性化温度は、第 1 の変性温度より低い。例として、限定することなく、活性化温度は、第 1 の変性温度、第 2 の変性温度および第 3 の変性温度より低い温度であり得る。例として、限定することなく、ポリメラーゼは、Kapa HiFi DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL DNA Polymerase (Takara) または High Fidelity DNA Polymerase (Qiagen) からなる群から選択される、3' - 5' エクソヌクレアーゼブルーフリーディング活性を有する熱安定性 DNA ポリメラーゼであり得る。前述の実施形態のいずれかにおいて、DNA ポリメラーゼは、DNA ポリメラーゼの活性化温度を上昇させるホットスタート抗体またはアプタマーをさらに含むことができる。そのような実施形態では、DNA ポリメラーゼは、Kapa HiFi Hot Start DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 Hot Start DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL Hot Start DNA Polymerase (Takara) または High Fidelity Hot Start DNA Polymerase (Qiagen) であり得る。

20

30

【0142】

前述の実施形態のいずれかにおいて、第 1 の変性持続時間、第 2 の変性持続時間および第 3 の変性持続時間は、それぞれ約 30 秒から約 2 分であり得る。例として、限定することなく、第 1 の変性持続時間、第 2 の変性持続時間および第 3 の変性持続時間は、それぞれ約 30 秒から約 2 分、約 30 秒から約 1.5 分、約 30 秒から約 1 分、約 1 分から約 2 分、約 1 分から約 1.5 分、約 1.5 分から約 2 分、約 30 秒、45 秒、1 分、1.5 分または 2 分であり得る。

40

【0143】

前述の実施形態のいずれかにおいて、第 1 の変性温度、第 2 の変性温度および第 3 の変性温度は、それぞれ約 95 $^{\circ}$ C から約 98 $^{\circ}$ C であり得る。各 PCR サイクルでアニーリングされる二本鎖 DNA を変性するための任意の好適な温度を使用できることが理解されるべきである。第 1 の変性温度は、第 1 の鎖および第 2 の鎖の融解温度より高くなるのに十分であるべきことが理解されるべきである。当業者は、当該技術分野における通常の実験および／または知識を通じて当該温度および必要時間を容易に決定することができる。

【0144】

前述の実施形態のいずれかにおいて、第 1 のアニーリング温度、第 2 のアニーリング温度および第 3 のアニーリング温度は、それぞれ約 55 $^{\circ}$ C から約 65 $^{\circ}$ C であり得る。例とし

50

て、限定することなく、第1のアニーリング温度、第2のアニーリング温度および第3のアニーリング温度は、それぞれ約55℃から約65℃、55℃から約60℃、約60℃から約65℃、約55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃または65℃であり得る。

【0145】

前述の実施形態のいずれかにおいて、第1のアニーリング持続時間、第2のアニーリング持続時間および第3のアニーリング持続時間は、それぞれ約10秒から約60秒であり得る。第1のアニーリング温度、第2のアニーリング温度および第3のアニーリング温度、ならびに第1のアニーリング持続時間、第2のアニーリング持続時間および第3のアニーリング持続時間は、それぞれのPCRステップで必要とされるアニーリングを行うのに十分であるべきことが理解されるべきである。当業者は、当該技術分野における通常の実験および／または知識を通じて当該温度および必要時間を容易に決定することができる。

10

【0146】

前述の実施形態のいずれかにおいて、第1の伸長温度、第2の伸長温度および第3の伸長温度は、それぞれ約60℃から約72℃であり得る。例として、限定することなく、第1の伸長温度、第2の伸長温度および第3の伸長温度は、約60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃または72℃であり得る。

【0147】

前述の実施形態のいずれかにおいて、第1の伸長持続時間、第2の伸長持続時間および第3の伸長持続時間は、それぞれ約30秒から約5分であり得る。第1の伸長温度、第2の伸長温度および第3の伸長温度、ならびに第1の伸長持続時間、第2の伸長持続時間および第3の伸長持続時間は、それぞれのPCRステップで必要とされる伸長を行うのに十分であるべきことが理解されるべきである。当業者は、当該技術分野における通常の実験および／または知識を通じて当該温度および必要時間を容易に決定することができる。

20

【0148】

前述の実施形態のいずれかにおいて、複数の第1のインデキシングプライマーおよび複数の第2のインデキシングプライマーを約100nMから約1μMで第1の反応混合物に添加することができる。例として、限定することなく、複数の第1のインデキシングプライマーおよび複数の第2のインデキシングプライマーを約100nMから約200nMで第1の反応混合物に添加することができる。

30

【0149】

前述の実施形態のいずれかにおいて、部分的に二本鎖のDNA基質は、ゲノムDNA、RNAの逆転写によるcDNA、全ゲノム増幅(WGA)、多重PCRまたは合成DNAに由来し得る。

【0150】

ブロッカーオリゴヌクレオチドを使用する方法

前述の実施形態のいずれかにおいて、ステップ(ii)は、ブロッカーオリゴヌクレオチドを第1の反応混合物に添加することであって、ブロッカーオリゴヌクレオチドが、複数の第2のインデキシングプライマーの各々の第2の3'末端部分の少なくとも一部分に少なくとも部分的に相補的な5'部分を含み、ブロッカーオリゴヌクレオチドおよび複数の第2のインデキシングプライマーの各々の融解温度が、ライゲーション温度より高く、第1のアニーリング温度および第3のアニーリング温度より低いことをさらに含むことができる。そのような実施形態では、ブロッカーオリゴヌクレオチドを、第1の鎖の第1の5'末端および第2の鎖の第2の5'末端への複数の第2のインデキシングプライマーの各々のライゲーションを抑制するのに十分な量で添加することができる。一部の実施形態において、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、複数の第2のインデキシングプライマーの各々の第2の3'末端部分の少なくとも一部分に完全に相補的な5'部分を含む。

40

【0151】

前述の実施形態のいずれかにおいて、ブロッカーオリゴヌクレオチドおよび複数の第2

50

10

20

30

40

50

50

50

50

前述の実施形態のいずれかにおいて、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、5'部分と第1のさらなる部分の間に位置する第2のさらなる部分を含むことができ、第2のさらなる部分は、複数の第1のインデキシングプライマーの各々と相補的でなく、複数の第2のプライマーの各々と相補的でない。例として、限定することなく、第2のさらなる部分は、約1塩基から約30塩基の長さを有することができる。例として、限定することなく、第2のさらなる部分は、約1塩基から約30塩基、約1塩基から約25塩基、約1塩基から約20塩基、約1塩基から約15塩基、約1塩基から約10塩基、約1塩基から約5塩基、約5塩基から約30塩基、約5塩基から約25塩基、約5塩基から約20塩基、約5塩基から約15塩基、約5塩基から約10塩基、約10塩基から約30塩基、約10塩基か

ら約 25 塩基、約 10 塩基から約 20 塩基、約 10 塩基から約 15 塩基、約 15 塩基から約 30 塩基、約 15 塩基から約 25 塩基、約 15 塩基から約 20 塩基、約 20 塩基から約 30 塩基、約 20 塩基から約 25 塩基、約 25 塩基から約 30 塩基、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 または 30 塩基の長さを有することができる。

【0156】

前述の実施形態のいずれかにおいて、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、それを複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々に部分的にのみ相補的にするミスマッチをその配列に含むことができる。これを使用して、ブロッカーが PCR ステップ、例えばステップ (i v) ~ (i v) 時に活性にならないように、ブロッカーオリゴヌクレオチドおよび複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々の融解温度を低下させることができる。

10

【0157】

前述の実施形態のいずれかにおいて、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々に相補的でない配列を含むことができる。複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々に相補的でない配列は、約 1 塩基から約 30 塩基の長さを有することができる。例として、限定することなく、複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々に相補的でない配列は、約 1 塩基から約 30 塩基の長さを有することができる。さらなる例として、限定することなく、第 2 のさらなる部分は、約 1 塩基から約 30 塩基、約 1 塩基から約 25 塩基、約 1 塩基から約 20 塩基、約 1 塩基から約 15 塩基、約 1 塩基から約 10 塩基、約 1 塩基から約 5 塩基、約 5 塩基から約 30 塩基、約 5 塩基から約 25 塩基、約 5 塩基から約 20 塩基、約 5 塩基から約 15 塩基、約 5 塩基から約 10 塩基、約 10 塩基から約 30 塩基、約 10 塩基から約 25 塩基、約 10 塩基から約 20 塩基、約 10 塩基から約 15 塩基、約 15 塩基から約 30 塩基、約 15 塩基から約 25 塩基、約 15 塩基から約 20 塩基、約 20 塩基から約 30 塩基、約 20 塩基から約 25 塩基、約 25 塩基から約 30 塩基、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 または 30 塩基の長さを有することができる。

20

【0158】

前述の実施形態のいずれかにおいて、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、ヘアピン部分を含まなければ、ポリメラーゼ伸長を阻害するための 3' 修飾をさらに含むことができる。例として、限定することなく、3' 修飾は、C3 炭素スパーサー、ヘキサンジオール、スパーサー 9、スパーサー 18、ホスフェート、2', 3'-ジデオキシヌクレオシド d d A、d d T、d d C および d d G、3'-デオキシヌクレオシド 3'-A、3'-T、3'-C および 3'-G、r U などの RNA ヌクレオチド、3'-O-メチルヌクレオチド、またはポリ T、ポリ A、ポリ C およびポリ G などの、隣接するプライマー配列に相補的でない DNA 配列であって、ブルーフリーディングポリメラーゼ 3'-5' エクソヌクレアーゼ活性が、隣接するプライマー配列に相補的でない DNA 配列を除去することを防止するためにヌクレアーゼ抵抗性結合をさらに含む DNA 配列であることができる。

30

【0159】

上の実施形態のいずれでも、ブロッカーオリゴヌクレオチドおよび複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々の間の融解温度は、ブロッカーオリゴヌクレオチドおよび複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々の間の融解温度より低い。例として、限定するものではないが、ブロッカーオリゴヌクレオチドおよび複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々の間の融解温度は、ブロッカーオリゴヌクレオチドおよび複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々の間の融解温度より少なくとも 5℃ 低くてもよい。さらなる例として、限定するものではないが、ブロッカーオリゴヌクレオチドおよび複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々の間の融解温度は、ブロッカーオリゴヌクレオチドおよび複数の第 2 のインデキシングプライマーの各々の間の融解温度より少なくとも 5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、15℃、20℃ またはそれ以上低くてもよい。

40

【0160】

上の実施形態のいずれでも、ブロッカーオリゴヌクレオチドの 5' 部分は、配列番号 1

50

27の配列を含むことができる。そのような場合には、複数の第2のインデキシングプライマーの各々は、配列番号126の配列を含むことができる。

【0161】

上の実施形態のいずれでも、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、第1のさらなる部分の3'に位置するヘアピン部分をさらに含むことができ、ヘアピン部分は第1のヘアピン配列および第2のヘアピン配列を含み、第1のヘアピン配列は第2のヘアピン配列の5'に位置し、第1のヘアピン配列および第2のヘアピン配列は相補的であり、ヘアピン部分は第1のアニール温度、第2のアニール温度および第3のアニール温度より高い融解温度を有する。そのような実施形態では、ブロッカーオリゴヌクレオチドは3'ヒドロキシル基をさらに含む。

10

【0162】

上の実施形態のいずれでも、ヘアピン部分は、第1のヘアピン配列と第2のヘアピン配列との間に第3のヘアピン配列をさらに含むことができる。そのような実施形態では、第3の配列は、ヘアピン部分および第1のさらなる部分による安定なステムループ構造の形成を可能にするのに十分なループを形成することができる。そのような実施形態では、第3のヘアピン配列は約4塩基から約20塩基またはそれを超える長さを有することができる。第3のヘアピン配列は、第1および第2のヘアピン配列による安定なステムループ構造の形成を可能にするのに十分なループを形成することができることを理解すべきである。

【0163】

上の実施形態のいずれでも、ヘアピン部分の融解温度は、5'部分および複数の第2のインデキシングプライマーの各々の間、さらなる部分および複数の第2のインデキシングプライマーの各々の間、またはその両方の融解温度より高くてもよい。

20

【0164】

上の実施形態のいずれでも、第2の条件集合は、DNAポリメラーゼがブロッカー（ヘアピン）オリゴヌクレオチドの3'末端を伸長させて、伸長ヘアピンブロッカーを生成するのにさらに十分であってよい。そのような実施形態では、伸長ヘアピンブロッカーは、第2のアニール温度および第3のアニール温度より高い融解温度をそれに提供する、安定化された二次構造を有することができる。例として、限定するものではないが、伸長ヘアピンブロッカーの融解温度は、第2のアニール温度および第3のアニール温度より少なくとも1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、15℃、20℃、25℃または30℃高くてもよい。

30

【0165】

上の実施形態のいずれでも、ブロッカーオリゴヌクレオチドはdU塩基をさらに含むことができ、ステップ(ii)はウラシルDNAグリコシラーゼを第1の反応混合物に添加することをさらに含み、ステップ(iii)の第1の条件集合は、UDGがdU塩基を切除し、ブロッカーオリゴヌクレオチドに脱塩基部位を作製するのにさらに十分であり、ステップ(iv)で、第2の条件集合はUDG酵素を不活性化するのにさらに十分である。

【0166】

上の実施形態のいずれでも、本方法は、第5の鎖および第7の鎖または第6の鎖および第8の鎖をシーケンシングすることをさらに含むことができる。

40

【0167】

上の実施形態のいずれでも、第1の共通ヌクレオチド配列および第1の3'末端部分は、ライゲーション温度より高い融解温度を有することができるが、融解温度は第1のアニール温度より低い。そのような実施形態では、第1の共通ヌクレオチド配列および第1の3'末端部分の融解温度は、ライゲーション温度より少なくとも1℃高くてもよい。例として、限定するものではないが、第1の共通ヌクレオチド配列および第1の3'末端部分の融解温度は、ライゲーション温度より少なくとも1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、10℃、15℃または20℃高くてもよい。さらなる例として、限定するものではないが、第1の共通ヌクレオチド配列および第1の3'末端部分の融解温度は、第1のアニール

50

ング温度、ならびに必要に応じて第2のアニーリング温度および第3のアニーリング温度より少なくとも1℃低くてもよい。さらなる例として、限定するものではないが、第1の共通ヌクレオチド配列および第1の3'末端部分の融解温度は、第1のアニーリング温度、および必要に応じて第2のアニーリング温度または第3のアニーリング温度より、少なくとも1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、10℃、15℃または20℃低くてもよい。

【0168】

一部の実施形態では、第1の3'末端部分および第2の3'末端部分は、第1のアニーリング温度より低い融解温度を有することができる。そのような実施形態では、第2の部分および第4の部分は、第2の共通ヌクレオチド配列をさらに含むことができ、複数の第2のインデキシングプライマーの各々は、第2のインデキシングプライマーおよび第1の共通ヌクレオチド配列の間の融解温度を有する第2のヌクレオチド配列に相補的であってよく、第2の共通ヌクレオチド配列は第1のアニーリング温度より高い。

10

【0169】

上の実施形態のいずれでも、ブロッカーオリゴヌクレオチドおよび複数の第2のインデキシングプライマーの各々は、複数の第2のインデキシングプライマーの各々および部分的に二本鎖のDNA基質の融解温度より低い融解温度を有することができる。

【0170】

ライゲーションカップルドPCRのための方法—両方のインデキシングプライマーは共通3'末端配列を含まない；ヘアピンアダプターが使用される

一部の実施形態では、ライゲーションカップルドPCRのための方法は、第1の鎖および第2の鎖を含み、第1の3'オーバーハング、二本鎖部分および第2の3'オーバーハングを含む部分的に二本鎖のDNA基質を提供することであって、第1の鎖が、5'から3'方向に、第1の5'末端、第1の部分および第2の部分を含み、第2の鎖が、5'から3'方向に、第2の5'末端、第3の部分および第4の部分を含み、第1の鎖の第1の部分および第2の鎖の第3の部分が、相補的であり、二本鎖部分を形成し、第1の鎖の第2の部分が、第1の3'オーバーハングを形成し、第2の鎖の第4の部分が第2の3'オーバーハングを形成し、第1の鎖の第2の部分および第2の鎖の第4の部分が、それぞれ第1の3'オーバーハングおよび第2の3'オーバーハングの5'末端に位置する第1の共通ヌクレオチド配列をそれぞれ含み、第1の鎖の第2の部分および第2の鎖の第4の部分が、第1の共通ヌクレオチド配列に対して3'に位置する第2の共通ヌクレオチド配列を各々含むこと；複数の第1のインデキシングプライマー、複数の第2のインデキシングプライマー、複数の5'アダプター、リガーゼ、DNAポリメラーゼおよびデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)を部分的に二本鎖のDNA基質に添加して、第1の反応混合物を生成することであって、複数の第1のインデキシングプライマーの各々が、第1の共通ヌクレオチド配列に相補的でない第1の3'末端部分を含み、複数の第2のインデキシングプライマーの各々が、第1の共通ヌクレオチド配列に相補的でない第2の3'末端部分を含み、第2の3'末端配列が、第2の共通ヌクレオチド配列に相補的であり、複数の5'アダプターの各々が、第1の共通ヌクレオチド配列に相補的である第3の3'末端配列、複数の第1のインデキシングプライマーの各々の第1の3'末端部分の少なくとも一部分を含む、第3の3'末端配列の5'に位置する第1の5'部分、第1の5'部分に対して5'に位置し、第1の5'部分に相補的である第2の5'部分、および第1の5'部分の5'末端に位置するDNAポリメラーゼを阻害することが可能な複製ブロッカーを含み、5'アダプターが、第1の5'部分を第2の5'部分にアニーリングすることによって形成されるヘアピンを形成することができること；第1の反応混合物を、1)第3の3'末端部分が、第1の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、2)リガーゼが、複数の5'アダプターの1つを第1の鎖の第1の5'末端および第2の鎖の第2の5'末端にライゲーションして、5'から3'方向に複数の5'アダプターの1つ、第1の部分および第2の部分を含む第3の鎖、ならびに5'から3'方向に複数の5'アダプターの1つ、第3の部分および第4の部分を含む第4の鎖を含む第2の反応混合物を生成するのに十分なライゲーション持続時間にわたるライゲーション温度を含む第1の条件集合下でインキュベートすること；第2の反応

20

30

50

混合物を、a) リガーゼを不活性化し、二本鎖DNAを変性させ、必要に応じてDNAポリメラーゼを活性化させ、b) 複数の第2のインデキシングプライマーの1つの第2の3'末端部分が、第3の鎖の第2の部分の第2の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、複数の第2のインデキシングプライマーの1つが、第4の鎖の第4の部分の第2の共通ヌクレオチド配列にアニーリングし、c) DNAポリメラーゼが第3の鎖の第2の部分の第2の共通ヌクレオチド配列にアニーリングされた複数の第2のインデキシングプライマーの1つを伸長させ、第4の鎖の第4の部分の第2の共通ヌクレオチド配列にアニーリングされた複数の第2のインデキシングプライマーの1つを伸長させて、第3の鎖、第4の鎖、第5の鎖は、5'から3'方向に複数の第2のインデキシングプライマーの1つ、第3の部分、第1の共通ヌクレオチド配列のリバース相補体、および複数の5'アダプターの1つの第1の5'部分のリバース相補体を含む第5の鎖、ならびに5'から3'方向に、複数の第2のインデキシングプライマーの1つ、第1の部分、第1の共通ヌクレオチド配列のリバース相補体、および複数の5'アダプターの1つの第1の5'部分のリバース相補体を含む第6の鎖を含む第3の反応混合物を生成するのに十分な、第1の変性持続時間にわたる第1の変性温度、第1のアニーリング持続時間にわたる第1のアニーリング温度および第1の伸張持続時間にわたる第1の伸張温度を含む第2の条件集合下でインキュベートすること、ならびに第6の鎖は、; 第3の反応混合物を、a) 任意の二本鎖DNAを変性させ、b) 複数の第1のインデキシングプライマーの1つの第1の3'末端部分が第5の鎖の複数の5'アダプターの1つの第1の5'部分のリバース相補体にアニーリングし、複数の第1のインデキシングプライマーの1つが、第6の鎖の複数の5'アダプターの1つの第1の5'部分のリバース相補体にアニーリングし、c) DNAポリメラーゼが、第5の鎖の複数の5'アダプターの1つの第1の5'部分のリバース相補体にアニーリングされた複数の第1のインデキシングプライマーの1つを伸長させ、第6の鎖の複数の5'アダプターの1つの第1の5'部分のリバース相補体にアニーリングされた複数の第1のインデキシングプライマーの1つを伸長させて、第5の鎖、第6の鎖、第7の鎖および第8の鎖を含む第4の反応混合物を生成するのに十分な、第2の変性持続時間にわたる第2の変性温度、第2のアニーリング持続時間にわたる第2のアニーリング温度、および第2の伸張持続時間にわたる第2の伸張温度を含む第3の条件集合下でインキュベートすることであって、第7の鎖が、5'から3'方向に複数の第1のインデキシングプライマーの1つ、第1の共通ヌクレオチド配列、第1の部分、および複数の第2のインデキシングプライマーの1つのリバース相補体を含み、第8の鎖が、5'から3'方向に複数の第1のインデキシングプライマーの1つ、第1の共通ヌクレオチド配列、第3の部分、および複数の第2のインデキシングプライマーの1つのリバース相補体を含むこと; 第4の反応混合物を、a) 任意の二本鎖DNAを変性させ、b) 複数の第2のインデキシングプライマーの1つが、第7の鎖の複数の第2のインデキシングプライマーの1つのリバース相補体にアニーリングし、複数の第2のインデキシングプライマーの1つが第8の鎖の複数の第2のインデキシングプライマーの1つのリバース相補体にアニーリングし、c) DNAポリメラーゼが第7の鎖および第8の鎖の各々にアニーリングされた複数の第2のインデキシングプライマーの1つを伸長させて、第7の鎖、第8の鎖、第9の鎖および第10の鎖を含む第5の反応混合物を生成するのに十分な、第3の変性持続時間にわたる第3の変性温度、第3のアニーリング持続時間にわたる第3のアニーリング温度および第3の伸張持続時間にわたる第3の伸張温度を含む第4の条件集合下でインキュベートすることであって、第9の鎖が、5'から3'方向に、複数の第2のインデキシングプライマーの1つ、第3の部分、第1の共通ヌクレオチド配列のリバース相補体、および複数の第1のインデキシングプライマーの1つのリバース相補体を含み、第10の鎖が、5'から3'方向に複数の第2のインデキシングプライマーの1つ、第1の部分、第1の共通配列のリバース相補体、および複数の第1のインデキシングプライマーの1つのリバース相補体を含み、第7の鎖および第9の鎖が相補的であり、第8の鎖および第10の鎖が相補的であること; ならびに第5の反応混合物を、複数の第1のインデキシングプライマーの少なくとも一部分、複数の第2のインデキシングプライマーの少なくとも一部分、およびDNAポリメラーゼが、第

7の鎖および第9の鎖および第8の鎖および第10の鎖を増幅させるのに十分な、第4の変性持続時間にわたる第4の変性温度、第4のアニール持続時間にわたる第4のアニール温度、および第4の伸張持続時間にわたる第4の伸張温度を含む第5の条件集合下でインキュベートすることを含むことができる。

【0171】

上の実施形態では、第2の共通ヌクレオチド配列は第1の共通のヌクレオチド配列と別であってよい、または第1の共通ヌクレオチド配列と重なるかもしくはその3'部分であってよいことを理解すべきである。したがって一部の実施形態では、複数の第2のインデキシングプライマーの1つは第1の鎖にも第2の鎖にもライゲーションすることができないが、なおプライマーとして作用することができるよう、複数の第2のインデキシングプライマーの各々は、第1の共通ヌクレオチド配列の3'末端部分にアニールすることができ、あるいは一部の実施形態では、第2の共通ヌクレオチド配列は第1の共通ヌクレオチド配列と別であってよい。

10

【0172】

上の実施形態のいずれでも、ステップ(i)～(vii)は単一密閉管で実施することができる。上の実施形態のいずれでも、本方法は、ステップ(i)～(vii)の間にいずれの精製ステップも含むことができない。

【0173】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、第1の5'部分および第2の5'部分は、約12塩基から約20塩基の長さを各々有することができる。

20

【0174】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、複数の5'アダプターの各々は、第1の5'部分と第2の5'部分の間に介在配列をさらに含むことができる。例として、限定するものではないが、介在配列は約4塩基から約20塩基の長さを有することができる。

【0175】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、複製ブロックは、安定な脱塩基部位、C3スパーサー、ヘキサンジオール、スパーサー9、スパーサー18、3またはそれより多いrU塩基、および2'-O-メチルRNA塩基から選択することができる。

30

【0176】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、複数の5'アダプターの各々は、約25塩基から約100塩基の長さを有することができる。例として、限定するものではないが、複数の5'アダプターの各々は、約25塩基から約100塩基、約30塩基から約100塩基、約40塩基から約100塩基、約50塩基から約100塩基、約60塩基から約100塩基、約70塩基から約100塩基、約80塩基から約100塩基、約90塩基から約100塩基、約25、30、40、50、60、70、80、90または100塩基の長さを有することができる。

40

【0177】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、部分的に二本鎖のDNA基質は、約24塩基から約6000塩基の長さを有することができる。例として、限定するものではないが、部分的に二本鎖のDNA基質は、約24塩基から約6000塩基、約24塩基から約5500塩基、約24塩基から約5000塩基、約24塩基から約4500塩基、約24塩基から約4000塩基、約24塩基から約3500塩基、約24塩基から約3000塩基、約24塩基から約2500塩基、約24塩基から約2000塩基、約24塩基から約1500塩基、約24塩基から約1000塩基、約24塩基から約750塩基、約24塩基から約500塩基、約24塩基から約250塩基、約24塩基から約200塩基、約24塩基から約100塩基、

50

[illegible]

、200、250、500、750、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500または6000塩基の長さを有することができる。部分的に二本鎖のDNA基質の長さは例示的であること、および他のサイズが本開示の範囲内であることを理解すべきである。部分的に二本鎖のDNA基質の長さは、部分的に二本鎖のDNA基質の第1の鎖または第2の鎖の長さ、すなわち第1の3'オーバーハングの第1の5'末端から3'末端まで、または第2の3'オーバーハングの第2の5'末端から3'末端までを指すことを理解すべきである。

【0178】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、それぞれ第1の鎖および第2の鎖の第1の部分および第3の部分は、約20塩基から約6000塩基の長さを有することができる。例として、限定するものではないが、第1のオリゴヌクレオチドの第1の部分および第2のオリゴヌクレオチドの第3の部分は、約20塩基から約6000塩基、約20塩基から約5500塩基、約20塩基から約5000塩基、約20塩基から約4500塩基、約20塩基から約4000塩基、約20塩基から約3500塩基、約20塩基から約3000塩基、約20塩基から約2500塩基、約20塩基から約2000塩基、約20塩基から約1500塩基、約20塩基から約1000塩基、約20塩基から約750塩基、約20塩基から約500塩基、約20塩基から約250塩基、約20塩基から約200塩基、約20塩基から約100塩基、約20塩基から約50塩基、約100塩基から約6000塩基、約100塩基から約5500塩基、約100塩基から約5000塩基、約100塩基から約4500塩基、約100塩基から約4000塩基、約100塩基から約3500塩基、約100塩基から約3000塩基、約100塩基から約2500塩基、約100塩基から約2000塩基、約100塩基から約1500塩基、約100塩基から約1000塩基、約100塩基から約750塩基、約100塩基から約500塩基、約100塩基から約250塩基、約100塩基から約200塩基、約200塩基から約6000塩基、約200塩基から約5500塩基、約200塩基から約5000塩基、約200塩基から約4500塩基、約200塩基から約4000塩基、約200塩基から約3500塩基、約200塩基から約3000塩基、約200塩基から約2500塩基、約200塩基から約2000塩基、約200塩基から約1500塩基、約200塩基から約1000塩基、約200塩基から約750塩基、約200塩基から約500塩基、約200塩基から約250塩基、約200塩基から約2000塩基、約250塩基から約5500塩基、約250塩基から約5000塩基、約250塩基から約4500塩基、約250塩基から約4000塩基、約250塩基から約3500塩基、約250塩基から約3000塩基、約250塩基から約2500塩基、約250塩基から約2000塩基、約250塩基から約1500塩基、約250塩基から約1000塩基、約250塩基から約750塩基、約250塩基から約500塩基、約500塩基から約6000塩基、約500塩基から約5500塩基、約500塩基から約5000塩基、約500塩基から約4500塩基、約500塩基から約4000塩基、約500塩基から約3500塩基、約500塩基から約3000塩基、約500塩基から約2500塩基、約500塩基から約2000塩基、約500塩基から約1500塩基、約500塩基から約1000塩基、約500塩基から約750塩基、約750塩基から約6000塩基、約750塩基から約5500塩基、約750塩基から約5000塩基、約750塩基から約4500塩基、約750塩基から約4000塩基、約750塩基から約3500塩基、約750塩基から約3000塩基、約750塩基から約2500塩基、約750塩基から約2000塩基、約750塩基から約1500塩基、約750塩基から約1000塩基、約1000塩基から約6000塩基、約1000塩基から約5500塩基、約1000塩基から約5000塩基、約1000塩基から約4500塩基、約1000塩基から約4000塩基、約1000塩基から約3500塩基、約1000塩基から約3000塩基、約1000塩基から約2500塩基、約1000塩基から約2000塩基、約1000塩基から約1500塩基、約1500塩基から約6000塩基、約1500塩基から約5500塩基、約1500塩基から約5000塩基、約1500塩基から約4500

10

20

30

40

50

塩基、約1500塩基から約4000塩基、約1500塩基から約3500塩基、約1500塩基から約3000塩基、約1500塩基から約2500塩基、約1500塩基から約2000塩基、約2000塩基から約6000塩基、約2000塩基から約5500塩基、約2000塩基から約5000塩基、約2000塩基から約4500塩基、約2000塩基から約4000塩基、約2000塩基から約3500塩基、約2000塩基から約3000塩基、約2000塩基から約2500塩基、約2500塩基から約6000塩基、約2500塩基から約5500塩基、約2500塩基から約5000塩基、約2500塩基から約4500塩基、約2500塩基から約4000塩基、約2500塩基から約3500塩基、約2500塩基から約3000塩基、約3000塩基から約6000塩基、約3000塩基から約5500塩基、約3000塩基から約5000塩基、約3000塩基から約4500塩基、約3000塩基から約4000塩基、約3000塩基から約3500塩基、約3500塩基から約6000塩基、約3500塩基から約5500塩基、約3500塩基から約5000塩基、約3500塩基から約4500塩基、約3500塩基から約4000塩基、約4000塩基から約6000塩基、約4000塩基から約5500塩基、約4000塩基から約5000塩基、約4000塩基から約4500塩基、約4500塩基から約6000塩基、約4500塩基から約5500塩基、約4500塩基から約5000塩基、約5000塩基から約6000塩基、約5000塩基から約5500塩基、約5500から約6000塩基、約24、30、40、50、60、70、80、90、100、200、250、500、750、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500または6000塩基の長さを各々有することができる。第1の鎖の第1の部分および第2の鎖の第3の部分の長さは例示的であること、および他のサイズが本開示の範囲内であることを理解すべきである。

10

20

30

40

50

【0179】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、第1の鎖の第2の部分および第2の鎖の第4の部分、すなわちそれぞれ第1の3'オーバーハングおよび第2の3'オーバーハングは、約4塩基から約100塩基を各々含むことができる。例として、限定するものではないが、第1の鎖の第2の部分および第2の鎖の第4の部分は、約4塩基から約100塩基、約4塩基から約90塩基、約4塩基から約80塩基、約4塩基から約75塩基、約4塩基から約70塩基、約4塩基から約60塩基、約4塩基から約50塩基、約4塩基から約40塩基、約4塩基から約30塩基、約4塩基から約25塩基、約4塩基から約20塩基、約4塩基から約15塩基、約4塩基から約10塩基、約4塩基から約5塩基、約5塩基から約100塩基、約5塩基から約90塩基、約5塩基から約80塩基、約5塩基から約75塩基、約5塩基から約70塩基、約5塩基から約60塩基、約5塩基から約55塩基、約5塩基から約50塩基、約5塩基から約40塩基、約5塩基から約30塩基、約5塩基から約25塩基、約5塩基から約20塩基、約5塩基から約15塩基、約5塩基から約10塩基、約10塩基から約100塩基、約10塩基から約90塩基、約10塩基から約80塩基、約10塩基から約75塩基、約10塩基から約70塩基、約10塩基から約60塩基、約10塩基から約50塩基、約10塩基から約40塩基、約10塩基から約30塩基、約10塩基から約25塩基、約10塩基から約20塩基、約10塩基から約15塩基、約15塩基から約100塩基、約15塩基から約90塩基、約15塩基から約80塩基、約15塩基から約75塩基、約15塩基から約70塩基、約15塩基から約60塩基、約15塩基から約50塩基、約15塩基から約40塩基、約15塩基から約30塩基、約15塩基から約25塩基、約15塩基から約20塩基、約20塩基から約100塩基、約20塩基から約90塩基、約20塩基から約80塩基、約20塩基から約75塩基、約20塩基から約70塩基、約20塩基から約60塩基、約20塩基から約50塩基、約20塩基から約40塩基、約20塩基から約30塩基、約20塩基から約25塩基、約25塩基から約100塩基、約25塩基から約90塩基、約25塩基から約80塩基、約25塩基から約75塩基、約25塩基から約70塩基、約25塩基から約60塩基、約25塩基から約50塩基、約25

塩基から約 40 塩基、約 25 塩基から約 30 塩基、約 30 塩基から約 100 塩基、約 30 塩基から約 90 塩基、約 30 塩基から約 80 塩基、約 30 塩基から約 75 塩基、約 30 塩基から約 70 塩基、約 30 塩基から約 60 塩基、約 30 塩基から約 50 塩基、約 30 塩基から約 40 塩基、約 40 塩基から約 100 塩基、約 40 塩基から約 90 塩基、約 40 塩基から約 80 塩基、約 40 塩基から約 75 塩基、約 40 塩基から約 70 塩基、約 40 塩基から約 60 塩基、約 40 塩基から約 50 塩基、約 50 塩基から約 100 塩基、約 50 塩基から約 90 塩基、約 50 塩基から約 80 塩基、約 50 塩基から約 75 塩基、約 50 塩基から約 70 塩基、約 50 塩基から約 60 塩基、約 60 塩基から約 100 塩基、約 60 塩基から約 90 塩基、約 60 塩基から約 80 塩基、約 60 塩基から約 75 塩基、約 60 塩基から約 70 塩基、約 70 塩基から約 100 塩基、約 70 塩基から約 90 塩基、約 70 塩基から約 80 塩基、約 70 塩基から約 75 塩基、約 75 塩基から約 100 塩基、約 75 塩基から約 90 塩基、約 75 塩基から約 80 塩基、約 80 塩基から約 100 塩基、約 80 塩基から約 90 塩基、約 90 塩基から約 100 塩基、約 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、33、40、50、60、70、75、80、90 または 100 塩基を各々含むことができる。

10

20

30

40

【0180】

上の実施形態のいずれでも、複数の 5'アダプターが 5'アダプターライゲーションのために使用される場合、第 1 の共通配列は、約 1 塩基から約 50 塩基を含むことができる。

例として、限定するものではないが、第 1 の共通配列は、約 1 塩基から約 50 塩基、約 1 塩基から約 45 塩基、約 1 塩基から約 40 塩基、約 1 塩基から約 35 塩基、約 1 塩基から約 30 塩基、約 1 塩基から約 25 塩基、約 1 塩基から約 20 塩基、約 1 塩基から約 15 塩基、約 1 塩基から約 10 塩基、約 5 塩基から約 50 塩基、約 5 塩基から約 45 塩基、約 5 塩基から約 40 塩基、約 5 塩基から約 35 塩基、約 5 塩基から約 30 塩基、約 5 塩基から約 25 塩基、約 5 塩基から約 20 塩基、約 5 塩基から約 15 塩基、約 5 塩基から約 10 塩基、約 10 塩基から約 50 塩基、約 10 塩基から約 45 塩基、約 10 塩基から約 40 塩基、約 10 塩基から約 35 塩基、約 10 塩基から約 30 塩基、約 10 塩基から約 25 塩基、約 10 塩基から約 20 塩基、約 10 塩基から約 15 塩基、約 15 塩基から約 50 塩基、約 15 塩基から約 45 塩基、約 15 塩基から約 40 塩基、約 15 塩基から約 35 塩基、約 15 塩基から約 30 塩基、約 15 塩基から約 25 塩基、約 15 塩基から約 20 塩基、約 20 塩基から約 50 塩基、約 20 塩基から約 45 塩基、約 20 塩基から約 40 塩基、約 20 塩基から約 35 塩基、約 20 塩基から約 30 塩基、約 25 塩基から約 30 塩基、約 30 塩基から約 50 塩基、約 30 塩基から約 45 塩基、約 30 塩基から約 40 塩基、約 30 塩基から約 35 塩基、約 35 塩基から約 50 塩基、約 35 塩基から約 45 塩基、約 35 塩基から約 40 塩基、約 40 塩基から約 50 塩基、約 40 塩基から約 45 塩基、約 45 塩基から約 50 塩基、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、33、35、40 または 50 塩基を含むことができる。好ましくは、第 1 の共通ヌクレオチド配列は、13 塩基を含む。一部の実施形態では、第 1 の共通ヌクレオチド配列は、配列番号 127 (5'-AGATCGGAAGAGC-3') の配列を含む。第 1 の共通ヌクレオチド配列が配列番号 127 の配列を含む場合、複数の 5'アダプターの各々の第 3 の 3'末端部分は、配列番号 126 (5'-GCTCTTCCGATCCT-3') の配列を各々含むことができる。

【0181】

上の実施形態のいずれでも、複数の 5'アダプターが 5'アダプターライゲーションのために使用される場合、複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々は、約 20 塩基から約 100 塩基の長さを有することができる。例として、限定するものではないが、複数の第 1 のインデキシングプライマーの各々は、約 20 塩基から約 100 塩基、約 20 塩基から約 90 塩基、約 20 塩基から約 80 塩基、約 20 塩基から約 70 塩基、約 20 塩基から約 60 塩基、約 20 塩基から約 50 塩基、約 20 塩基から約 40 塩基、約 20 塩基から約 30 塩基、約 25 塩基から約 100 塩基、約 25 塩基から約 90 塩基、約 25 塩基から約 80 塩基、約 25 塩基から約 70 塩基、約 25 塩基から約 60 塩基、約 25 塩基から約 5

50

0塩基、約25塩基から約40塩基、約25塩基から約30塩基、約30塩基から約100塩基、約30塩基から約90塩基、約30塩基から約80塩基、約30塩基から約70塩基、約30塩基から約60塩基、約30塩基から約50塩基、約30塩基から約40塩基、約40塩基から約100塩基、約40塩基から約90塩基、約40塩基から約80塩基、約40塩基から約70塩基、約40塩基から約60塩基、約40塩基から約50塩基、約50塩基から約100塩基、約50塩基から約90塩基、約50塩基から約80塩基、約50塩基から約70塩基、約50塩基から約60塩基、約60塩基から約100塩基、約60塩基から約90塩基、約60塩基から約80塩基、約60塩基から約70塩基、約70塩基から約100塩基、約70塩基から約90塩基、約70塩基から約80塩基、約80塩基から約100塩基、約80塩基から約90塩基、約90塩基から約100塩基、約30、35、40、45、50、60、70、80、90または100塩基の長さを有することができる。

10

【0182】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、複数の第2のインデキシングプライマーの各々は、約20塩基から約100塩基の長さを有することができる。例として、限定するものではないが、複数の第2のインデキシングプライマーの各々は、約20塩基から約100塩基、約20塩基から約90塩基、約20塩基から約80塩基、約20塩基から約70塩基、約20塩基から約60塩基、約20塩基から約50塩基、約20塩基から約40塩基、約20塩基から約30塩基、約25塩基から約100塩基、約25塩基から約90塩基、約25塩基から約80塩基、約25塩基から約70塩基、約25塩基から約60塩基、約25塩基から約50塩基、約25塩基から約40塩基、約25塩基から約30塩基、約30塩基から約100塩基、約30塩基から約90塩基、約30塩基から約80塩基、約30塩基から約70塩基、約30塩基から約60塩基、約30塩基から約50塩基、約30塩基から約40塩基、約40塩基から約100塩基、約40塩基から約90塩基、約40塩基から約80塩基、約40塩基から約70塩基、約40塩基から約60塩基、約40塩基から約50塩基、約50塩基から約100塩基、約50塩基から約90塩基、約50塩基から約80塩基、約50塩基から約70塩基、約50塩基から約60塩基、約60塩基から約100塩基、約60塩基から約90塩基、約60塩基から約80塩基、約70塩基から約100塩基、約70塩基から約90塩基、約70塩基から約80塩基、約80塩基から約100塩基、約80塩基から約90塩基、約90塩基から約100塩基、約30、35、40、45、50、60、70、80、90または100塩基の長さを有することができる。

20

30

【0183】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、第1の共通ヌクレオチド配列および第3の3'末端部分は、ライゲーション温度より高い融解温度を有することができる。

【0184】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、複数の第2のインデキシングプライマーの各々の第2の3'末端部分および第2の共通ヌクレオチド配列は、第1のアニーリング温度より高い融解温度を有することができる。例として、限定するものではないが、第2の共通ヌクレオチド配列および第2の3'末端部分の融解温度は、アニーリング温度より少なくとも1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、15℃、20℃または25℃高くてもよい。

40

【0185】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、第1の共通ヌクレオチド配列および第3の3'末端部分の融解温度は、ライゲーション温度より少なくとも1℃高くてもよい。例として、限定するものではないが、第1の共通ヌクレオチド配列および第3の3'末端部分の融解温度は、ライゲ-

50

シオン温度より少なくとも1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、15℃、20℃または25℃高くてもよい。

【0186】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、第1の共通ヌクレオチド配列および第3の3'末端部分の融解温度は、第1のアニリング温度より少なくとも1℃低くてもよい。例として、限定するものではないが、第1の共通ヌクレオチド配列および第3の3'末端部分の融解温度は、第1のアニリング温度より少なくとも1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、15℃、20℃または25℃低くてもよい。

【0187】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、第2の共通ヌクレオチド配列は、約3塩基から約100塩基の長さを有することができる。例として、限定するものではないが、第2の共通ヌクレオチド配列は、約1塩基から約100塩基、約1塩基から約90塩基、約1塩基から約80塩基、約1塩基から約75塩基、約1塩基から約70塩基、約1塩基から約60塩基、約1塩基から約50塩基、約1塩基から約40塩基、約1塩基から約30塩基、約1塩基から約25塩基、約1塩基から約20塩基、約1塩基から約15塩基、約1塩基から約10塩基、約1塩基から約5塩基、約5塩基から約100塩基、約5塩基から約90塩基、約5塩基から約80塩基、約5塩基から約75塩基、約5塩基から約70塩基、約5塩基から約60塩基、約5塩基から約50塩基、約5塩基から約40塩基、約5塩基から約30塩基、約5塩基から約25塩基、約5塩基から約20塩基、約5塩基から約15塩基、約5塩基から約10塩基、約10塩基から約100塩基、約10塩基から約90塩基、約10塩基から約80塩基、約10塩基から約75塩基、約10塩基から約70塩基、約10塩基から約60塩基、約10塩基から約50塩基、約10塩基から約40塩基、約10塩基から約30塩基、約10塩基から約25塩基、約10塩基から約20塩基、約10塩基から約15塩基、約15塩基から約100塩基、約15塩基から約90塩基、約15塩基から約80塩基、約15塩基から約75塩基、約15塩基から約70塩基、約15塩基から約60塩基、約15塩基から約50塩基、約15塩基から約40塩基、約15塩基から約30塩基、約15塩基から約25塩基、約15塩基から約20塩基、約20塩基から約100塩基、約20塩基から約90塩基、約20塩基から約80塩基、約20塩基から約75塩基、約20塩基から約70塩基、約20塩基から約60塩基、約20塩基から約50塩基、約20塩基から約40塩基、約20塩基から約30塩基、約20塩基から約25塩基、約25塩基から約100塩基、約25塩基から約90塩基、約25塩基から約80塩基、約25塩基から約75塩基、約25塩基から約70塩基、約25塩基から約60塩基、約25塩基から約50塩基、約25塩基から約40塩基、約25塩基から約30塩基、約30塩基から約100塩基、約30塩基から約90塩基、約30塩基から約80塩基、約30塩基から約75塩基、約30塩基から約70塩基、約30塩基から約60塩基、約30塩基から約50塩基、約30塩基から約40塩基、約40塩基から約100塩基、約40塩基から約90塩基、約40塩基から約80塩基、約40塩基から約75塩基、約40塩基から約70塩基、約40塩基から約60塩基、約40塩基から約50塩基、約50塩基から約100塩基、約50塩基から約90塩基、約50塩基から約80塩基、約50塩基から約75塩基、約50塩基から約70塩基、約50塩基から約60塩基、約60塩基から約100塩基、約60塩基から約90塩基、約60塩基から約80塩基、約60塩基から約75塩基、約60塩基から約70塩基、約70塩基から約100塩基、約70塩基から約90塩基、約70塩基から約80塩基、約70塩基から約75塩基、約75塩基から約100塩基、約75塩基から約90塩基、約75塩基から約80塩基、約80塩基から約100塩基、約80塩基から約90塩基、約90塩基から約100塩基、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、75、80、90または100塩基の長さを有することができる。

【0188】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、ライゲーション温度は、部分的に二本鎖のDNA基質の融解温度より低くてよい。

【0189】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、第3の鎖および第4の鎖の融解温度は、第1の変性温度より低くてよい。

【0190】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、ライゲーション温度は、約25℃から約40℃であってよい。さらなる例として、限定するものではないが、ライゲーション温度は、約25℃から約40℃、約25℃から約37℃、約25℃から約35℃、約25℃から約30℃、約30℃から約40℃、約30℃から約35℃、約35℃から約40℃、約25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃または40℃であってよい。

【0191】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、ライゲーション持続時間は、複数の第1のインデキシングプライマーの1つを第1の鎖の第1の5'末端または第2の鎖の第2の5'末端にライゲーションするのに十分である任意の時間であってよい。上の実施形態のいずれでも、ライゲーション持続時間は約5分から約60分であってよい。例として、限定するものではないが、ライゲーション持続時間は、約5分から約60分、約5分から約50分、約5分から約40分、約5分から約30分、約5分から約20分、約5分から約10分、約10分から約60分、約10分から約50分、約10分から約40分、約10分から約30分、約10分から約20分、約20分から約60分、約20分から約50分、約20分から約40分、約20分から約30分、約30分から約60分、約30分から約50分、約30分から約40分、約40分から約60分、約40分から約50分、約50分から約60分、約5、10、15、20、25、30、40、50または60分であってよい。

【0192】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、任意の好適なリガーゼを使用することができる。リガーゼは低マグネシウム緩衝液中でのライゲーションが可能である熱不安定性リガーゼであるリガーゼであるべきであり、第1の変性持続時間の第1の変性温度で不活性化されるべきであることを理解すべきである。そのような低マグネシウム緩衝液条件は、PCRに好適な条件であることを理解すべきである。例として、限定するものではないが、リガーゼはT3 DNAリガーゼであってよい。上の実施形態のいずれでも、例として、限定するものではないが、リガーゼは、第1の反応混合物の1μLあたり約30～約300酵素単位で添加することができる。

【0193】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、任意の好適なポリメラーゼを使用することができる。一部の実施形態では、ポリメラーゼはライゲーション温度で活性でない。例として、限定するものではないが、ポリメラーゼはホットスタート抗体またはアプタマーをさらに含むことができる。上の実施形態のいずれでも、ポリメラーゼは、活性化温度を有するホットスタートポリメラーゼであってよく、活性化温度は第1の変性温度より低い。例として、限定するものではないが、活性化温度は、第1の変性温度、第2の変性温度および第3の変性温度より低くてよい。例として、限定するものではないが、ポリメラーゼは、Kapa HiFi DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL DNA Polymerase (Takara) または High Fidelity DNA Polymerase (Qia

gen) からなる群から選択することができる。上の実施形態のいずれでも、DNAポリメラーゼは、DNAポリメラーゼの活性化温度を上昇させるホットスタート抗体またはアダプターをさらに含むことができる。そのような実施形態では、DNAポリメラーゼは、Kapa HiFi Hot Start DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 Hot Start DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL Hot Start DNA Polymerase (Takara) または High Fidelity Hot Start DNA Polymerase (Qiagen) であってよい。

【0194】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、第1の変性温度、第2の変性温度、第3の変性温度および第4の変性温度は、各々約95℃から約98℃であってよい。上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、第1の変性持続時間、第2の変性持続時間、第3の変性持続時間および第4の変性持続時間は、各々約30秒から約2分であってよい。例として、限定するものではないが、第1の変性持続時間、第2の変性持続時間、第3の変性持続時間および第4の変性持続時間は、各々約30秒から約2分、約30秒から1.5分、約30秒から1分、約1分から約2分、約1分から約1.5分、約1.5分から約2分、約30秒、45秒、1分、1.5分または2分であってよい。各PCRサイクルでアニーリングされる二本鎖DNAを変性させるための任意の好適な温度を使用することができることを理解すべきである。第1の変性温度は、それが第1の鎖および第2の鎖の融解温度より高いように十分であるべきであることを理解すべきである。当業者は、通常の実験および／または知識を通してそのような温度および必要な時間を容易に決定することができる。

【0195】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、第1のアニーリング温度、第2のアニーリング温度、第3のアニーリング温度および第4のアニーリング温度は、各々約55℃から約65℃であってよい。例として、限定するものではないが、第1のアニーリング温度、第2のアニーリング温度および第3のアニーリング温度は、各々約55℃から約65℃、55℃から約60℃、約60℃から約65℃、約55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃または65℃であってよい。

【0196】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、第1のアニーリング持続時間、第2のアニーリング持続時間、第3のアニーリング持続時間および第4のアニーリング持続時間は、各々約10秒から約60秒であってよい。第1のアニーリング温度、第2のアニーリング温度および第3のアニーリング温度、ならびに第1のアニーリング持続時間、第2のアニーリング持続時間および第3のアニーリング持続時間は、各それぞれのPCRステップで必要とされるアニーリングが起こるのに十分であるべきであることを理解すべきである。当業者は、通常の実験および／または知識を通してそのような温度および必要な時間を容易に決定することができる。

【0197】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、第1の伸張温度、第2の伸張温度、第3の伸張温度および第4の伸張温度は、各々約60℃から約72℃であってよい。例として、限定するものではないが、第1の伸張温度、第2の伸張温度および第3の伸張温度は、約60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃または72℃であってよい。

【0198】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのた

めに使用される場合、第1の伸長持続時間、第2の伸長持続時間、第3の伸長持続時間および第4の伸長持続時間は、各々約30秒から約5分であってよい。第1の伸長温度、第2の伸長温度および第3の伸長温度、ならびに第1の伸長持続時間、第2の伸長持続時間および第3の伸長持続時間は、各それぞれのPCRステップで必要とされる伸長が起こるのに十分であるべきであることを理解すべきである。当業者は、通常の実験および／または知識を通してそのような温度および必要な時間を容易に決定することができる。

【0199】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、複数の第1のインデキシングプライマーおよび複数の第2のインデキシングプライマーを約100 nMから約1 μ Mで第1の反応混合物に添加することができる。例として、限定するものではないが、複数の第1のインデキシングプライマーおよび複数の第2のインデキシングプライマーを約100 nMから約200 nMで第1の反応混合物に添加することができる。

10

【0200】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、複数の第1のインデキシングプライマーの各々は、配列番号87の配列をさらに含むことができる。上の実施形態のいずれでも、複数の第2のインデキシングプライマーの各々は、配列番号78の配列をさらに含むことができる。

【0201】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、本方法は、第7の鎖および第9の鎖または第8の鎖および第10の鎖をシーケンシングすることをさらに含むことができる。

20

【0202】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、

【0203】

上の実施形態のいずれでも、第3の3'末端部分および第1の共通ヌクレオチド配列は、ライゲーション温度より高いが、第1のアニーリング温度、第2のアニーリング温度、第3のアニーリング温度および第4のアニーリング温度より低い T_m を有することができることを理解すべきである。

30

【0204】

ライゲーションカップルドPCRのための上の実施形態のいずれでも、複数の第1のインデキシングプライマーの各々は、第2の共通ヌクレオチド配列に相補的でなくてもよいことを理解すべきである。

【0205】

ライゲーションカップルドPCRのための上の実施形態のいずれでも、鎖が、ある特定の元素を含むものとして挙げられる場合、その鎖はさらなる挙げられていない元素を含むことができることを理解すべきである。例として、限定するものではないが、5'ヘアピンアダプターを利用する実施形態では、第5の鎖は、第1の共通ヌクレオチド配列および第1の共通ヌクレオチド配列のリバース相補体を含むことができる。したがって、これらの元素を挙げないことによって、それらが省略によって排除されるものでないことを理解すべきである。

40

【0206】

部分的に二本鎖のDNA基質を生成するための方法

本開示の方法では、記載されるように部分的に二本鎖のDNA基質から開始する代わりに、本方法は、ライゲーションステップ、例えばステップ(i i)の間にプロセッシングして部分的に二本鎖のDNA基質を生成することができる開始DNA基質分子から開始するように改変することができることを理解すべきである。例として、限定するものではないが、ステップ(i)および(i i)は、開始DNA基質分子を、部分的に二本鎖のDNA基質を調製するための本明細書に開示される処理および酵素に加えて第1の反応混合物の

50

ための試薬と組み合わせて提供することができるように、組み合わせることができる。そのような実施形態では、第1の条件集合は、ライゲーションステップ (i i) の間に d U 塩基、リボヌクレオチドまたはイノシン塩基をそれぞれ開裂するために、酵素、例えば U D G およびエンドヌクレアーゼ V I I I、R N アーゼ H またはエンドヌクレアーゼ V のために十分であってもよい。ステップ (i i i) で、第2の条件集合は、いかなるそのような酵素がさらなる P C R 増幅に影響を及ぼさないようにそれらを不活性化するのにさらに十分であってもよい。

【0207】

一部の実施形態では、部分的に二本鎖の D N A 基質は、それらの 5' 末端にユニバーサルプライマー配列を各々含む第1の開始鎖および第2の開始鎖を含む開始二本鎖 D N A 基質分子を提供することであって、ユニバーサルプライマー配列はユニバーサルプライマー配列の内部またはその 3' 末端に d U 塩基を含むこと、d U 塩基を開裂することが可能な酵素を添加すること、ならびに d U 塩基を開裂することが可能な酵素および開始二本鎖 D N A 基質分子を、ステップ (i) の部分的に二本鎖の D N A 基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすることによって生成することができる。例として、限定するものではないが、d U 塩基を開裂することが可能な酵素は、U D G およびエンドヌクレアーゼ V I I I の組合せであってよい。

【0208】

一部の実施形態では、部分的に二本鎖の D N A 基質は、第1の開始鎖および第2の開始鎖を含む開始二本鎖 D N A 基質分子を提供することであって、第1の開始鎖が、第1の 5' 開裂可能な配列を含み、第2の開始鎖が、第2の 5' 開裂可能な配列を含み、第1の 5' 開裂可能な配列および第2の 5' 開裂可能な配列の各々が、第1の 5' 開裂可能な配列および第2の 5' 開裂可能な配列の内部またはその 3' 末端にリボヌクレオチドを含むこと、リボヌクレオチドを開裂することが可能な酵素を添加すること、ならびにリボヌクレオチドを開裂することが可能な酵素および開始二本鎖 D N A 基質分子を、ステップ (i) の部分的に二本鎖の D N A 基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすることによって生成することができる。例として、限定するものではないが、リボヌクレオチドを開裂することが可能な酵素は R N アーゼ H である。

【0209】

一部の実施形態では、部分的に二本鎖の D N A 基質は、第1の開始鎖および第2の開始鎖を含む開始二本鎖 D N A 基質分子を提供することであって、第1の開始鎖が、第1の 5' 開裂可能な配列を含み、第2の開始鎖が、第2の 5' 開裂可能な配列を含み、第1の 5' 開裂可能な配列および第2の 5' 開裂可能な配列の各々が、第1の 5' 開裂可能な配列および第2の 5' 開裂可能な配列の内部またはその 3' 末端にイノシン塩基を含むこと、イノシン塩基を開裂することが可能な酵素を添加すること、ならびにイノシン塩基を開裂することが可能な酵素および開始二本鎖 D N A 基質分子を、ステップ (i) の部分的に二本鎖の D N A 基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすることによって生成することができる。例として、限定するものではないが、イノシン塩基を開裂することが可能な酵素はエンドヌクレアーゼ V である。

【0210】

一部の実施形態では、部分的に二本鎖の D N A 基質は、断片化 D N A 基質分子を提供すること、末端修復を実施して、5' 末端および 3' 末端を各々有する第1の開始鎖および第2の開始鎖を有する平滑末端の二本鎖開始 D N A 基質分子を生成すること、複数の 3' アダプター鎖を平滑末端の二本鎖開始 D N A 分子に添加することであって、各 3' アダプター鎖が、d U 塩基およびリガーゼを含む相補鎖にアニーリングされていること、d U 塩基を含む相補鎖にアニーリングされた複数の 3' アダプター鎖、リガーゼおよび平滑末端の二本鎖 D N A 基質分子を、複数の 3' アダプター鎖の 1 つを、平滑末端の開始 D N A 基質分子の第1の開始鎖および第2の開始鎖の各 3' 末端にライゲーションし、各相補鎖と第1の開始鎖および第2の開始鎖の各 5' 末端との間に切れ目を残して、ライゲーションされた二本鎖基質分子を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること、必要に応じ

10

20

30

40

50

てライゲーションされた二本鎖分子を精製すること、ライゲーションされた二本鎖分子の d U 塩基を開裂することが可能な酵素を、ライゲーションされた二本鎖基質分子に添加すること、ならびに d U 塩基を開裂することが可能な酵素およびライゲーションされた二本鎖基質分子を、相補鎖を開裂して、部分的に二本鎖の DNA 基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすることによって生成することができる。例として、限定するものではないが、d U 塩基を開裂することが可能な酵素は、UDG およびエンドヌクレアーゼ V I I I の組合せであってよい。

【0211】

一部の実施形態では、部分的に二本鎖の DNA 基質は、断片化 DNA 基質分子を提供すること、末端修復を実施して、5'末端および3'末端を各々有する第1の開始鎖および第2の開始鎖を有する平滑末端の二本鎖開始 DNA 基質分子を生成すること、複数の3'アダプター鎖を平滑末端の二本鎖開始 DNA 分子に添加することであって、各3'アダプター鎖が、リボヌクレオチドおよびリガーゼを含む相補鎖にアニーリングされていること、d U 塩基を含む相補鎖にアニーリングされた複数の3'アダプター鎖、リガーゼおよび平滑末端の二本鎖 DNA 基質分子を、複数の3'アダプター鎖の1つを平滑末端の開始 DNA 基質分子の第1の開始鎖および第2の開始鎖の各3'末端にライゲーションし、各相補鎖と第1の開始鎖および第2の開始鎖の各5'末端との間に切れ目を残して、ライゲーションされた二本鎖基質分子を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること、必要に応じてライゲーションされた二本鎖分子を精製すること、ライゲーションされた二本鎖基質分子にライゲーションされた二本鎖分子のリボヌクレオチドを開裂することが可能な酵素を添加すること、ならびにリボヌクレオチドを開裂することが可能な酵素およびライゲーションされた二本鎖基質分子を、相補鎖を開裂して部分的に二本鎖の DNA 基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすることによって生成することができる。例として、限定するものではないが、リボヌクレオチドを開裂することが可能な酵素は RNアーゼ H である。

【0212】

一部の実施形態では、部分的に二本鎖の DNA 基質は、断片化 DNA 基質分子を提供すること、末端修復を実施して5'末端および3'末端を各々有する第1の開始鎖および第2の開始鎖を有する平滑末端の二本鎖開始 DNA 基質分子を生成すること、複数の3'アダプター鎖を平滑末端の二本鎖開始 DNA 分子に添加することであって、各3'アダプター鎖が、イノシン塩基およびリガーゼを含む相補鎖にアニーリングされていること、イノシン塩基を含む相補鎖にアニーリングされた複数の3'アダプター鎖、リガーゼおよび平滑末端の二本鎖 DNA 基質分子を、複数の3'アダプター鎖の1つを平滑末端の開始 DNA 基質分子の第1の開始鎖および第2の開始鎖の各3'末端にライゲーションし、各相補鎖と第1の開始鎖および第2の開始鎖の各5'末端との間に切れ目を残してライゲーションされた二本鎖基質分子を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること、必要に応じてライゲーションされた二本鎖分子を精製すること、ライゲーションされた二本鎖分子のイノシン塩基を開裂することが可能な酵素を、ライゲーションされた二本鎖基質分子に添加すること、ならびにイノシン塩基を開裂することが可能な酵素およびライゲーションされた二本鎖基質分子を、相補鎖を開裂して部分的に二本鎖の DNA 基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすることによって生成することができる。例として、限定するものではないが、イノシン塩基を開裂することが可能な酵素はエンドヌクレアーゼ V である。

【0213】

一部の実施形態では、部分的に二本鎖の DNA 基質は、断片化 DNA 基質分子を提供すること、末端修復および断片化 DNA 基質分子の A テーリングを実施して、第1の開始鎖および第2の開始鎖を含む単一 A テールド二本鎖開始 DNA 基質分子を生成することであって、単一 A テールド二本鎖開始 DNA 基質分子が、各3'末端に単一 A 塩基オーバーハングを含むこと；複数の3'アダプター鎖を単一 A テールド二本鎖開始 DNA 基質分子に添加することであって、各3'アダプター鎖が、3'末端の d U 塩基およびリガーゼを含む

相補鎖にアニーリングされていること；3'末端のdU塩基を含む相補鎖にアニーリングされた複数の3'アダプター鎖、リガーゼおよび単一Aテールド二本鎖開始DNA基質分子を、複数の3'アダプター鎖の1つを各単一A塩基オーバーハングにライゲーションし、相補鎖の1つを単一Aテールド二本鎖開始DNA基質分子の各5'末端にライゲーションして、ライゲーションされた二本鎖基質分子を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること；必要に応じてライゲーションされた二本鎖基質分子を精製すること；dU塩基を開裂することが可能な酵素を、ライゲーションされた二本鎖基質分子に添加すること；ならびにdU塩基を開裂することが可能な酵素およびライゲーションされた二本鎖基質分子を、相補鎖を開裂して、ステップ(i)の部分的に二本鎖のDNA基質を生成するのに十分な条件下でインキュベートすることによって生成することができる。

10

【0214】

代わりに、直前の実施形態では、相補鎖は3'末端dU塩基の代わりに3'末端T塩基を含むことができるが、dU塩基をさらに含むことができる。そのような場合には、ライゲーションはなお起こることができるが、相補鎖の一部はエンドヌクレアーゼ開裂の後もそのままである。さらに、代わりに、3'末端T塩基を有するが、相補鎖はリボヌクレオチドまたはイノシン塩基を含むことができ、添加される酵素はリボヌクレオチドまたはイノシン塩基をそれぞれ開裂することが可能であってよい。

【0215】

断片化DNA基質分子が提供される上の方法のいずれでも、方法は、標的DNAを断片化して、断片化DNA基質分子を生成することをさらに含むことができる。

20

【0216】

上の実施形態のいずれでも、例えば多重PCRのためにポリメラーゼが使用される場合、DNAポリメラーゼは任意の好適なポリメラーゼであってよい。一部の実施形態では、ポリメラーゼはハイフィデリティDNAポリメラーゼのようなウラシル耐性のDNAポリメラーゼであってよい。

【0217】

部分的に二本鎖のDNA基質を生成するためのリガーゼ、および使用するならばポリメラーゼは、ライゲーションカップルドPCRのために使用されるリガーゼおよびポリメラーゼと異なるかまたは同じであってもよいことを理解すべきである。

【0218】

複数の3'アダプター鎖が使用される上の実施形態のいずれでも、複数の3'アダプター鎖の各々は5'ホスフェートをさらに含むことができ、相補鎖は3'ブロック基をさらに含むことができる。例として、限定するものではないが、3'ブロック基は、3'-デオキシチミジン、3'-デオキシアデニン、3'-デオキシグアニン、3'-デオキシシトシンおよび2',3'-ジデオキシヌクレオチドからなる群から選択することができる。

30

【0219】

ライゲーションカップルドPCRの後のライブラリー正規化

上の実施形態のいずれでも、PCRサイクルの後、ライブラリー正規化を実施することができる。

【0220】

上の実施形態のいずれでも、複数の第1のインデキシングプライマーの各々が、第1の共通ヌクレオチド配列に相補的である第1の3'末端部分を有し、複数の第2のインデキシングプライマーの各々が第1の共通ヌクレオチド配列に相補的である第2の3'末端部分を有する場合、複数の第1のインデキシングプライマーの各々は第1の5'末端部分を含み、複数の第2のインデキシングプライマーの各々は第2の5'末端部分をさらに含み、第1の5'末端部分および第2の5'末端部分の各々は、5'から3'方向に、2つまたはそれより多いデオキシヌクレオチドを含む第1の配列および3つまたはそれより多いリボヌクレオチドを含む第2の配列を含み、DNAポリメラーゼは、3'-5'のエクソヌクレアーゼ活性を有し、第5の鎖および第6の鎖は、第5の鎖および第6の鎖の5'末端に第2の5'末端部分をさらに含み、第7の鎖および第8の鎖は、第7の鎖および第8の鎖の

40

50

5'末端に第1の5'末端部分をさらに含み、第5の鎖および第7の鎖は、第1の5'オーバーハングおよび第2の5'オーバーハングを有する第1の二本鎖の生成物を形成することができ、第6の鎖および第8の鎖は、第3の5'オーバーハングおよび第4の5'オーバーハングを有する第2の二本鎖の生成物を形成することができ、本方法は、標的モル量の第5の鎖、第6の鎖、第7の鎖および第8の鎖を生成するのに十分な量の、第1の5'オーバーハング、第2の5'オーバーハング、第3の5'オーバーハングおよび第4の5'オーバーハングの各々に相補的なプローブであって、標的モル量より多い量の第5の鎖、第6の鎖、第7の鎖および第8の鎖が存在するプローブ、ならびに第2のリガーゼを添加すること；第5の鎖、第6の鎖、第7の鎖、第8の鎖、第2のリガーゼおよびプローブを、
10 プローブが、標的モル量の第5の鎖、第6の鎖、第7の鎖および第8の鎖にライゲーションして、事前正規化反応混合物を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること；エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素を事前正規化反応混合物に添加すること；ならびに事前正規化反応混合物およびエクソヌクレアーゼ活性を有する酵素を、エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素が、プローブにライゲーションしない第5の鎖、第6の鎖、第7の鎖および第8の鎖を消化して、正規化次世代シーケンシング（NGS）ライブラリーを生成するのに十分な条件下でインキュベートすることをさらに含む。例として、限定するものではないが、第2のリガーゼはT4 DNAの第2のリガーゼであってよい。

【0221】

上の実施形態のいずれでも、複数の5'アダプターが5'アダプターライゲーションのために使用される場合、本方法では、さらに、複数の第1のインデキシングプライマーの各々は、第1の5'末端部分を含み、複数の第2のインデキシングプライマーの各々は、第2の5'末端部分をさらに含み、第1の5'末端部分および第2の5'末端部分の各々は、5'から3'方向に、2つまたはそれより多いデオキシヌクレオチドを含む第1の配列および3つまたはそれより多いリボヌクレオチドを含む第2の配列を含み、DNAポリメラーゼは、3'-5'のエクソヌクレアーゼ活性を有することにより、第7の鎖および第8の鎖は、第7の鎖および第8の鎖の5'末端に第1の5'末端部分をさらに含むことにより、第9の鎖および第10の鎖は、第9の鎖および第10の鎖の5'末端に第2の5'末端部分をさらに含むことにより、第7の鎖および第9の鎖は、第1の5'オーバーハングおよび第2の5'オーバーハングを有する第1の二本鎖の生成物を形成することができることにより、第8の鎖および第10の鎖は、第3の5'オーバーハングおよび第4の5'オーバーハングを有する第2の二本鎖の生成物を形成することができ、本方法は、標的モル量の第7の鎖、第8の鎖、第9の鎖および第10の鎖を生成するのに十分な量の第1の5'オーバーハング、第2の5'オーバーハング、第3の5'オーバーハングおよび第4の5'オーバーハングの各々に相補的なプローブ、ならびに第2のリガーゼを添加することであって、
30 第7の鎖、第8の鎖、第9の鎖および第10の鎖が、標的モル量より多い量で存在すること；第7の鎖、第8の鎖、第9の鎖および第10の鎖、第2のリガーゼおよびプローブを、プローブが、標的モル量の第7の鎖、第8の鎖、第9の鎖および第10の鎖にライゲーションして、事前正規化反応混合物を生成するのに十分な条件下でインキュベートすること；エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素を事前正規化反応混合物に添加すること；ならびに事前正規化反応混合物およびエクソヌクレアーゼ活性を有する酵素を、エクソヌクレ
40 アーゼ活性を有する酵素が、プローブにライゲーションしない第7の鎖、第8の鎖、第9の鎖および第10の鎖を消化して、正規化次世代シーケンシング（NGS）ライブラリーを生成するのに十分な条件下でインキュベートすることをさらに含む。

【0222】

正規化のための上の実施形態では、エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素はエクソヌクレアーゼIIIであってよいことを理解すべきである。正規化のための上の実施形態では、プローブは、3'エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素によるエクソヌクレアーゼ消化に対する抵抗性を得るための修飾、例えば例として、限定するものではないが、ホスホリチオエート連結を含むことをさらに理解すべきである。

【0223】

10

20

30

40

50

スプリント媒介プライマーアセンブリのための方法

スプリント媒介プライマーアセンブリ（１つのプライマー）のための方法

一部の実施形態では、（i）第１の鎖および第２の鎖を含む二本鎖DNA基質を提供することであって、第１の鎖が、第１の３'末端部分および第１の５'末端部分を含み、第２の鎖が、第２の３'末端部分および第２の５'末端部分を含むこと；（ii）リガーゼ、第１のオリゴヌクレオチド、第２のオリゴヌクレオチド、第３のオリゴヌクレオチド、第１のプライマー、DNAポリメラーゼおよびデオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）を二本鎖DNA基質に添加して第１の反応混合物を生成することであって、第１のオリゴヌクレオチドが、第１の鎖の第１の３'末端部分の少なくとも一部分に相補的である第３の３'末端部分および５'ホスフェートを含み、第３のオリゴヌクレオチドが、第１の３'ブ
10
ロッキング基を含み、第１のプライマーが、第２の鎖の第２の３'末端部分の少なくとも一部分に相補的な第４の３'末端部分を含み、第１の３'ブロッキング基がポリメラーゼ連鎖伸張の能力がなく、第２のオリゴヌクレオチドが、第３のオリゴヌクレオチドの３'部分に相補的な３'部分を有し、第１のオリゴヌクレオチドが、第３のオリゴヌクレオチドの５'部分に相補的である５'部分を有すること；（iii）第１の反応混合物を、第１のオリゴヌクレオチドおよび第２のオリゴヌクレオチドが、３'→５'方向に第３のオリゴヌクレオチドにアニーリングして、第１のプライマー、二本鎖DNA基質および第２のオリ
20
ゴヌクレオチドにライゲーションされた第１のオリゴヌクレオチドを含む第２のプライマーを含む第２の反応混合物を生成するのに十分な、ライゲーション持続時間にわたるライゲーション温度を含む第１の条件集合下でインキュベートすること；ならびに（iv）各
20
サイクルが、独立して、変性持続時間にわたる変性温度、アニーリング持続時間にわたるアニーリング温度、および伸張持続時間にわたる伸張温度を含む少なくとも３回のPCRサイクルを第２の反応混合物に施して、第２のプライマーを二本鎖ライブラリー分子の第１の５'末端に含み、第１のプライマーを二本鎖ライブラリー分子の第２の５'末端に含む二本鎖ライブラリー分子を含む第３の反応混合物を生成することを含むことができるライゲーションカップルドPCRのための方法が提供される。

【0224】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、ステップ（ii）は、第４のオリゴヌクレオチドおよび第５のオリゴヌクレオチドを添加することであって、第２のオリゴヌクレオチドが、５'ホスフェートをさらに含み、第５のオリゴヌ
30
クレオチドが、ポリメラーゼ連鎖伸張の能力がない第２の３'ブロッキング基を含み、第５のオリゴヌクレオチドが、第２のオリゴヌクレオチドの５'部分に相補的な５'部分、および第４のオリゴヌクレオチドの３'部分に相補的な３'部分をさらに含み、第１の条件集合は、第２のオリゴヌクレオチドおよび第４のオリゴヌクレオチドが第５のオリゴヌクレオチドにアニーリングし、リガーゼが、第４のオリゴヌクレオチドを第２のオリゴヌクレオチドにライゲーションすることにより、５'から３'方向に、第４のオリゴヌクレオチド、第２のオリゴヌクレオチドおよび第１のオリゴヌクレオチドを含む第２のプライマーを生成するのにさらに十分であることをさらに含むことができる。そのような実施形態では、ライゲーション温度は、第２のオリゴヌクレオチドおよび第５のオリゴヌクレオチドの融解温度より低く、第４のオリゴヌクレオチドおよび第５のオリゴヌクレオチドの融解温
40
度未満より低くてもよい。そのような実施形態では、第５のオリゴヌクレオチド、第４のオリゴヌクレオチドおよび第２のオリゴヌクレオチドの融解温度は、アニーリング温度および伸張温度より低くてもよい。

【0225】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、第１のオリゴヌクレオチド、第２のオリゴヌクレオチドおよび第３のオリゴヌクレオチドは、アニーリング温度および伸張温度より低い融解温度を有することができる。

【0226】

スプリント媒介プライマーアセンブリ（両プライマー）のための方法

一部の実施形態では、ライゲーションカップルドPCRのための方法は、（i）第１の
50

鎖および第2の鎖を含む二本鎖DNA基質を提供することであって、第1の鎖が、第1の3'末端部分および第1の5'末端部分を含み、第2の鎖が、第2の3'末端部分および第2の5'末端部分を含むこと；(ii)リガーゼ、第1のオリゴヌクレオチド、第2のオリゴヌクレオチド、第3のオリゴヌクレオチド、第4のオリゴヌクレオチド、第5のオリゴヌクレオチド、第6のオリゴヌクレオチド、DNAポリメラーゼおよびデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)を二本鎖DNA基質に添加して、第1の反応混合物を生成することであって、第1のオリゴヌクレオチドが、第1の鎖の第1の3'末端部分の少なくとも一部分に相補的な第3の3'末端部分、および5'ホスフェートを含み、第3のオリゴヌクレオチドが、第1の3'ブロック基を含み、第2のオリゴヌクレオチドが、第3のオリゴヌクレオチドの3'部分に相補的な3'部分を有し、第1のオリゴヌクレオチドが、第3のオリゴヌクレオチドの5'部分に相補的な5'部分を有し、第4のオリゴヌクレオチドが、第2の鎖の第2の3'末端部分の少なくとも一部分に相補的な第4の3'末端部分、および5'ホスフェートを含み、第6のオリゴヌクレオチドが、第4のオリゴヌクレオチドの5'部分に相補的な5'部分、第5のオリゴヌクレオチドの3'部分に相補的な3'部分、および第2の3'ブロック基を含み、第1の3'ブロック基および第2の3'ブロック基が、ポリメラーゼ連鎖伸張の能力がないこと；(iii)第1の反応混合物を、第1のオリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチドが3'-5'方向で第3のオリゴヌクレオチドにアニーリングし、第4のオリゴヌクレオチドおよび第5のオリゴヌクレオチドが3'-5'方向で第6のオリゴヌクレオチドにアニーリングして、第5のオリゴヌクレオチドにライゲーションされた第4のオリゴヌクレオチドを含む第1のプライマー、二本鎖DNA基質、および第2のオリゴヌクレオチドにライゲーションされた第1のオリゴヌクレオチドを含む第2のプライマーを含む第2の反応混合物を生成するのに十分である、ライゲーション持続時間にわたるライゲーション温度を含む第1の条件集合下でインキュベートすること；(iv)各サイクルが、独立して、変性持続時間にわたる変性温度、アニーリング持続時間にわたるアニーリング温度、および伸張持続時間にわたる伸張温度を含む少なくとも3回のPCRサイクルを第2の反応混合物に施して、第2のプライマーを二本鎖ライブラリー分子の第1の5'末端に含み、第1のプライマーを二本鎖ライブラリー分子の第2の5'末端に含む二本鎖ライブラリー分子を含む第3の反応混合物を生成することを含むことができる。

【0227】

両プライマーのスプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、第1のオリゴヌクレオチド、第2のオリゴヌクレオチドおよび第3のオリゴヌクレオチドの融解温度は、アニーリング温度および伸張温度より低くてもよく、第4、5および6のオリゴヌクレオチドの融解温度は、アニーリング温度および伸張温度より低くてもよい。そのような実施形態では、スプリントオリゴヌクレオチド、これらの実施形態では第3のオリゴヌクレオチドおよび第5のオリゴヌクレオチドは、したがってアセンブルされたライゲーションされたプライマーから変性させることができることを理解すべきである。したがって、融解温度はスプリントからライゲーションされたオリゴヌクレオチドへの融解温度を指すことができる。

【0228】

両プライマーのスプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、ステップ(ii)は、第7のオリゴヌクレオチドおよび第8のオリゴヌクレオチドを添加することであって、ここで、第2のオリゴヌクレオチドが、5'ホスフェートをさらに含み、第8のオリゴヌクレオチドが、ポリメラーゼ連鎖伸張の能力がない第3の3'ブロック基を含み、第8のオリゴヌクレオチドが、第7のオリゴヌクレオチドの3'部分に相補的な3'部分および第2のオリゴヌクレオチドに相補的な5'部分をさらに含み、第1の条件集合が、第7のオリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチドが第8のオリゴヌクレオチドにアニーリングし、リガーゼが第7のオリゴヌクレオチドを第2のオリゴヌクレオチドにライゲーションすることにより、5'から3'方向に、第7のオリゴヌクレオチド、第2のオリゴヌクレオチドおよび第1のオリゴヌクレオチドを含む第2のプ

ライマーを生成するのにさらに十分であることをさらに含むことができる。そのような実施形態では、ライゲーション温度は第7のオリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチドから第8のオリゴヌクレオチドへの融解温度より低くてよい。そのような実施形態では、アニーリング温度および伸張温度は、第7のオリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチドから第8のオリゴヌクレオチドへの融解温度より高くてもよい。

【0229】

一方または両方のプライマーのスプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、ライゲーションされるオリゴヌクレオチドは、約5から約100塩基の長さを各々有することができ、3'ブロック基を有するオリゴヌクレオチドは約10から約50塩基の長さを有することができる。

10

【0230】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、本方法は、(v)さらなるPCRサイクルを第3の反応混合物に施して、二本鎖ライブラリー分子を増幅させることをさらに含むことができる。

【0231】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、ライゲーション温度は、二本鎖のDNA基質の融解温度より低くてよい。

【0232】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、ライゲーション温度は、第1のオリゴヌクレオチドおよび第3のオリゴヌクレオチドの融解温度より低くてよく、ライゲーション温度は、第2のオリゴヌクレオチドおよび第3のオリゴヌクレオチドの融解温度より低くてよい。さらなる例として、限定するものではないが、単一スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、ライゲーション温度は、第4のオリゴヌクレオチドおよび第5のオリゴヌクレオチドの融解温度より低くてよい。さらなる例として、限定するものではないが、両方のプライマーのスプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、ライゲーション温度は、第4のオリゴヌクレオチドおよび第6のオリゴヌクレオチド、ならびに第5のオリゴヌクレオチドおよび第6のオリゴヌクレオチドの融解温度より低くてもよい。

20

【0233】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、任意の好適なりガーゼを使用することができる。リガーゼは低マグネシウム緩衝液中でのライゲーションが可能である熱不安定性リガーゼであるリガーゼであるべきであり、第1の変性持続時間にわたる第1の変性温度で不活性化されるべきであることを理解すべきである。そのような低マグネシウム緩衝液条件は、PCRに好適な条件であることを理解すべきである。例として、限定するものではないが、リガーゼはT3 DNAリガーゼであってよい。上の実施形態のいずれでも、例として、限定するものではないが、リガーゼは、第1の反応混合物の1 μ Lあたり約30～約300酵素単位で添加することができる。

30

【0234】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、3'ブロック基のいずれも、C3スパーサー、ヘキサンジオール、スパーサー9、スパーサー18、3またはそれより多くのrU塩基、ホスフェートおよび2'-O-メチル塩基からなる群から独立して選択することができる。

40

【0235】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、ステップ(i)～(iv)は同じ管で実施することができる。

【0236】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、ステップ(ii)および(iv)の間で精製を実施することができない。

【0237】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、任意の好適

50

なポリメラーゼを使用することができる。一部の実施形態では、ポリメラーゼはライゲーション温度で活性でない。例として、限定するものではないが、ポリメラーゼはホットスタート抗体またはアプタマーをさらに含むことができる。上の実施形態のいずれでも、ポリメラーゼは、活性化温度を有するホットスタートポリメラーゼであってよく、活性化温度は第1の変性温度より低い。例として、限定するものではないが、活性化温度は、第1の変性温度、第2の変性温度および第3の変性温度より低くてよい。例として、限定するものではないが、ポリメラーゼは、Kapa HiFi DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL DNA Polymerase (Takara) または High Fidelity DNA Polymerase (Qiagen) からなる群から選択することができる。上の実施形態のいずれでも、DNAポリメラーゼは、DNAポリメラーゼの活性化温度を増加させるホットスタート抗体またはアプタマーをさらに含むことができる。そのような実施形態では、DNAポリメラーゼは、Kapa HiFi Hot Start DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 Hot Start DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL Hot Start DNA Polymerase (Takara) または High Fidelity Hot Start DNA Polymerase (Qiagen) であってよい。

10

【0238】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、ライゲーション温度は、約25℃から約40℃であってよい。さらなる例として、限定するものではないが、ライゲーション温度は、約25℃から約40℃、約25℃から約37℃、約25℃から約35℃、約25℃から約30℃、約30℃から約40℃、約30℃から約35℃、約35℃から約40℃、約25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃または40℃であってよい。

20

【0239】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、ライゲーション持続時間は、複数の第1のインデキシングプライマーの1つを第1の鎖の第1の5'末端または第2の鎖の第2の5'末端にライゲーションするのに十分な任意の時間であってよい。上の実施形態のいずれでも、ライゲーション持続時間は約5分から約60分であってよい。例として、限定するものではないが、ライゲーション持続時間は、約5分から約60分、約5分から約50分、約5分から約40分、約5分から約30分、約5分から約20分、約5分から約10分、約10分から約60分、約10分から約50分、約10分から約40分、約10分から約30分、約10分から約20分、約20分から約60分、約20分から約50分、約20分から約40分、約20分から約30分、約30分から約60分、約30分から約50分、約30分から約40分、約40分から約60分、約40分から約50分、約50分から約60分、約5、10、15、20、25、30、40、50または60分であってよい。

30

【0240】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、変性温度は、約95℃から約98℃であってよい。各PCRサイクルでアニーリングされる二本鎖DNAを変性させるための任意の好適な温度を使用することができることを理解すべきである。第1の変性温度は、それが二本鎖DNA基質の融解温度より高いように十分であるべきであることを理解すべきである。当業者は、通常の実験および／または知識を通してそのような温度および必要な時間を容易に決定することができる。

40

【0241】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、アニーリング温度は、約55℃から約65℃であってよい。例として、限定するものではないが、アニーリング温度は、各々約55℃から約65℃、55℃から約60℃、約60℃から約6

50

5℃、約55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃または65℃であってよい。

【0242】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、伸長温度は、各々約60℃から約72℃であってよい。例として、限定するものではないが、伸張温度は、約60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃または72℃であってよい。

【0243】

スプリント媒介プライマーアセンブリのための上の実施形態のいずれでも、変性持続時間は約30秒から約2分であってよい。例として、限定するものではないが、変性持続時間は、各々約30秒から約2分、約30秒から1.5分、約30秒から1分、約1分から約2分、約1分から約1.5分、約1.5分から約2分、約30秒、45秒、1分、1.5分または2分であってよい。

10

キット

【0244】

本開示は、本開示の方法を実施するためのキットも提供する。キットは、各方法で使用する試薬のいずれかまたは一部を含むことができ、試薬が含まれる場合、それは本開示で開示される特性のいずれかを有することができ、それに限定されないことを理解すべきである。

【0245】

一部の実施形態では、3'末端部分を有する第1のインデキシングプライマーと、同じ3'末端部分を有する第2のインデキシングプライマーと、第1のリガーゼと、第1のDNAポリメラーゼとを含むキットが提供される。上のキット実施形態のいずれでも、キットは、3'末端部分に少なくとも部分的に相補的である5'部分を含むブロッカーオリゴヌクレオチドをさらに含むことができる。ある特定の態様では、ブロッカーオリゴヌクレオチドは第2のインデキシングプライマーにプリアニリングされる。上のキット実施形態のいずれでも、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、第2のインデキシングプライマーに相補的であるが第1のインデキシングプライマーに相補的でない5'部分の3'側に第1のさらなる部分を含むことができる。上のキット実施形態のいずれでも、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、3'ヒドロキシル基第1のさらなる部分に対して3'に位置するおよびヘアピン部分をさらに含むことができ、ヘアピン部分は、第2のヘアピン配列の5'に位置する第1のヘアピン配列を含み、第1のヘアピン配列および第2のヘアピン配列は相補的であり、ヘアピンを形成することができる。そのような実施形態では、本開示で開示される通り、第2のさらなる部分は約1から約30塩基の長さを有することができる。そのような実施形態では、ヘアピン部分は、第1のヘアピン配列と第2のヘアピン配列の間に第3のヘアピン配列をさらに含むことができる。例として、限定するものではないが、第3のヘアピン配列は、約4塩基から約20塩基の長さを有することができる。第3のヘアピン配列は、第1および第2のヘアピン配列と安定なステムループ構造を形成することを可能にするのに十分なループを形成することができることを理解すべきである。

20

30

【0246】

上のキット実施形態のいずれでも、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、5'部分と第1のさらなる部分との間に位置する第2のさらなる部分をさらに含むことができ、第2のさらなる部分は、第1のインデキシングプライマーに相補的でなく、第2のさらなる部分は、第2のインデキシングプライマーに相補的でない。そのような実施形態では、本開示で開示される通り、第2のさらなる部分は約1塩基から約30塩基の長さを有することができる。

40

【0247】

上のキット実施形態のいずれでも、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、それがヘアピン部分を含まない場合、ポリメラーゼ伸張を阻害するための3'修飾をさらに含むことができる。例として、限定するものではないが、ポリメラーゼ伸張を阻害するための3'修飾

50

は、C3炭素スパーサー、ヘキサンジオール、スパーサー9、スパーサー18、ホスフェート、2'，3'-ジデオキシヌクレオシド d d A、d d T、d d Cおよび d d G、3'-デオキシヌクレオシド 3'-A、3'-T、3'-Cおよび 3'-G、r UなどのRNAヌクレオチド、3'-O-メチルヌクレオチド、または第2のインデキシングプライマーに相補的でないDNA配列であってよい。

【0248】

一部の実施形態では、第1の3'末端部分を有する第1のインデキシングプライマーと、第2の3'末端部分を有する第2のインデキシングプライマーと、第3の3'末端部分を有する5'アダプターと、第1のリガーゼと、第1のDNAポリメラーゼとを含むことができるキットが提供される。そのような実施形態では、5'アダプターは、第1のインデキシングプライマーの第1の3'末端部分の少なくとも一部分を含むことができる、第3の3'末端部分に対して5'に位置する第1の5'部分、第1の5'部分に対して5'に位置し、第1の5'部分に相補的な第2の5'部分、および第1の部分の5'末端に位置するDNAポリメラーゼを阻害することが可能な複製ブロッカーをさらに含むことができる。例として、限定するものではないが、本開示に記載される通り、第1の5'部分および第2の5'部分は、約12塩基から約20塩基の長さを各々有することができる。そのような実施形態では、5'アダプターは、第1の5'部分と第2の5'部分の間に位置する介在配列をさらに含むことができる。例として、限定するものではないが、介在配列は約4塩基から約20塩基の長さを有することができる。

【0249】

上のキット実施形態のいずれでも、複製ブロックは、安定な脱塩基部位、C3スパーサー、ヘキサンジオール、スパーサー9、スパーサー18、3つまたはそれより多いr U塩基、および2'-O-メチルRNA塩基からなる群から選択することができる。

【0250】

上のキット実施形態のいずれでも、本開示に記載される通り、5'アダプターは約25塩基から約100塩基の長さを有することができる。

【0251】

上のキット実施形態のいずれでも、第1の5'部分および第2の5'部分は、ヘアピンを形成することができる。

【0252】

上のキット実施形態のいずれでも、第1のインデキシングプライマーおよび第2のインデキシングプライマーは、3つまたはそれより多いリボヌクレオチド塩基の2つまたはそれより多いデオキシヌクレオチド5'を含む5'テール配列をさらに含むことができ、DNAポリメラーゼは、3'-5'エクソヌクレアーゼ活性を有する。上のキット実施形態のいずれでも、第1のインデキシングプライマーおよび第2のインデキシングプライマーは、配列番号1の配列を含む5'テール配列をさらにさらに含むことができ、DNAポリメラーゼは3'-5'エクソヌクレアーゼ活性を有する。そのような実施形態では、キットは、5'テール配列に相補的なプローブオリゴヌクレオチドをさらに含むことができ、3'エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素による消化に対する抵抗性を得るための修飾、および3'エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素を含むことができる。例として、限定するものではないが、3'エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素はエクソヌクレアーゼIIIであってよい。例として、限定するものではないが、3'エクソヌクレアーゼ活性を有する酵素による消化に対する抵抗性を得るための修飾は、少なくとも1つのホスホロチオエート連結であってよい。そのような実施形態では、キットは第2のリガーゼをさらに含むこともできる。例として、限定するものではないが、第2のリガーゼはT4 DNAリガーゼであってよい。

【0253】

上のキット実施形態のいずれでも、キットは、標的特異的プライマー対をさらに含むことができる。上のキット実施形態のいずれでも、キットは、複数の標的特異的プライマー対をさらに含むことができる。そのような実施形態では、キットは、d U塩基、リボヌク

レオチドまたはイノシン塩基を含むユニバーサルプライマーをさらに含むことができる。そのような実施形態では、キットは、dU塩基、リボヌクレオチドまたはイノシン塩基を開裂することが可能な酵素をさらに含むことができる。そのような酵素の例示的な非限定例には、ウラシルDNAグリコシラーゼおよびエンドヌクレアーゼVIIII、RNAアーゼHおよびエンドヌクレアーゼVのそれぞれの組合せが含まれる。そのような実施形態では、キットは、標的特異的プライマー対およびユニバーサルプライマーを使用した多重PCRのための第2のDNAポリメラーゼをさらに含むことができる。

【0254】

上のキット実施形態のいずれでも、第1のDNAポリメラーゼおよび第2のDNAポリメラーゼは、Kapa HiFi DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL DNA Polymerase (Takara) および High Fidelity DNA Polymerase (Qiagen) からなる群から選択することができる。さらなる例として、限定するものではないが、第2のDNAポリメラーゼは、ハイフィデリティDNAポリメラーゼなどのウラシル耐性ポリメラーゼであってよい。

10

【0255】

上のキット実施形態のいずれでも、第1のDNAポリメラーゼはホットスタート抗体またはアプタマーをさらに含むことができ、ホットスタート抗体またはアプタマーは、DNAポリメラーゼの活性化温度を上昇させる。そのような実施形態では、DNAポリメラーゼは、Kapa HiFi Hot Start DNA Polymerase (Roche)、NEB Q5 Hot Start DNA Polymerase (NEB)、PrimeStar GXL Hot Start DNA Polymerase (Takara) または High Fidelity Hot Start DNA Polymerase (Qiagen) であってよい。

20

【0256】

上のキット実施形態のいずれでも、本開示に記載される通り、第1のインデキシングプライマーおよび第2のインデキシングプライマーは、約20塩基から約100塩基の長さを有することができる。

【0257】

上のキット実施形態のいずれでも、リガーゼは、T3 DNAリガーゼなどの低マグネシウム緩衝液中でのライゲーションが可能な熱不安定性リガーゼである。

30

【0258】

本開示全体で、二本鎖DNAを変性させるまたは任意の二本鎖DNAを変性させるのに十分な条件への言及は、すべての二本鎖DNAが変性される、またはアニーリングされるものだけが変性される条件を含むことができることを理解すべきである。

【0259】

本開示全体で、ライゲーションおよびPCRサイクルの間の鎖の合成が言及されること、ならびに複数の鎖の生成のための用語「および」の使用は、1分子基準あたりでの最小値で「または」と解釈することもできることも理解すべきである。部分的に二本鎖のDNA基質が提供される方法では、それが複数の部分的に二本鎖のDNA基質であってもよいこと、および特定の鎖へのライゲーションまたはそのPCR増幅が、単一分子または異なる基質の上で起こることができ、したがってなお本開示の範囲に入ることをさらに理解すべきである。例として、限定するものではないが、第1の鎖は部分的に二本鎖のDNA基質の1つにライゲーションさせることができ、第2の鎖はもう1つにライゲーションさせることができ、そのような場合では、第3のオリゴヌクレオチドおよび第4のオリゴヌクレオチドをなお形成することができる。

40

【0260】

以下の実施例は、本開示のある特定の実施形態を例示するものである。これらの実施例は、非限定的と解釈するべきであり、当業者は、本開示の精神から逸脱することなく本開示の範囲内で実施形態を改変することができることを理解するだろう。

50

【実施例】

【0261】

(実施例1)

真菌ITS1遺伝子を標的にするアンプリコンパネルによるライゲーションカップルドPCR

理論的根拠

この実施例は、ITS1遺伝子のための非常に小さい標的化パネルの調製における最終のインデキシングおよび増幅ステップとしてのライゲーションカップルドPCRの有用性を例示する。多重化PCRのためにITS1遺伝子をカバーするように15プライマーパネルを設計した。以降のライゲーションカップルドPCRは、共通アダプター配列を含む完全長Illumina TruSeqインデキシングプライマーを使用して実施した。3'アダプター(i7)を含むインデキシングプライマーのライゲーションを防止するために、ブロッカーオリゴヌクレオチド19-04を使用し、それは、ライゲーションカップルドPCR反応へ添加する前にプライマーにプレアニーリングした。ITS1のための標的特異的設計は、Bellemain et al. BMC Microbiol. 2010; 10: 189に由来した。

10

材料

【0262】

Candida albicans DNA (ATCC cat# 10231)

【0263】

Q5 dUバイパスマスターミックス(2×)、(NEB cat# M0598)

20

【0264】

15標的特異的プライマー(表1、プライマーF1~F8およびR9~R15)

【0265】

トランシェーションされた3'アダプター配列14-882を含有するユニバーサルプライマー(表1)

【0266】

完全長5'アダプター(i5)および酵素正規化適合5'テール(T)₁₂(rU)₄配列(配列番号1)18-460からなるインデキシングプライマー(表1)

【0267】

完全長3'アダプター(i7)と酵素正規化適合5'テール(T)₁₂(rU)₄(配列番号1)18-451からなるインデキシングプライマー、ブロッカー19-04にプレアニーリングされる(表1)

30

【0268】

酵素正規化適合テール(T)₁₂(rU)₄(配列番号1)18-221を有する5'アダプターのためのP5末端プライマー(表1)

【0269】

酵素正規化適合テール(T)₁₂(rU)₄(配列番号1)18-222を有する3'アダプターのためのP7末端プライマー(表1)

【0270】

SPRIselect試薬(Beckman Coulter cat# B23318)

40

【0271】

20%PEG-8000/2.5M NaCl溶液

【0272】

DNA懸濁緩衝液、10mMトリス、0.1mM EDTA、pH8.0(Teknova, cat# T0227)

【0273】

T3 DNAリガーゼ(Enzymatics, cat# L6010)

【0274】

USER酵素(NEB, cat# M5505B)

50

【0275】

H i F i P C R マスターミックス (E n z y m a t i c s 、 c a t # P 7 6 7 0)

【0276】

S w i f t N o r m a l a s e キット (c a t # 6 6 0 9 6)

方法

【0277】

C a n d i d a a l b i c a n s DNA を、DNA 懸濁緩衝液に希釈した。標的選択および増幅のための第1の反応は、30 μ l で実施した。ITS1 アンプリコンパネルのために、フォワードおよびリバース標的特異的プライマーは、ランケーションされた3' アダプター配列であるユニバーサルアダプターを含む5' テールを含んだ。この反応は10、Q5 dU バイパスマスターミックス (2x)、各々60 nM の等濃度で存在する、15 標的特異的プライマー F1 ~ F8 および R9 ~ R15 (表1) のミックス、エンドヌクレアーゼ14-882 による以降の開裂のための改変塩基を有する10 μ M ユニバーサルプライマー (表1) および1 ng ゲノムDNA からなった。この反応ミックスで以下のサイクリングプログラムを実行した: 98 $^{\circ}$ C で30秒、その後98 $^{\circ}$ C で10秒、63 $^{\circ}$ C で5分および65 $^{\circ}$ C で1分を4サイクル、続いて98 $^{\circ}$ C で10秒、および64 $^{\circ}$ C で1分を14サイクル、最後に65 $^{\circ}$ C で1分のインキュベーション。未使用の標的特異的プライマーを除去し、緩衝液交換を促進するために、精製を実施した。精製は、30 μ l のSPRI select ビーズ (1.0 $\times$ 比) を使用して実施し、反応は17.4 μ l のTE に溶出させたが、ビーズから除去されなかった。アダプターライゲーションおよびPCR 増幅を合わせた第2の反応は50 μ l で実施し、ビーズを有する17.4 μ l の溶出反応ミックス、1x High-Fidelity PCR マスターミックス、1 μ L のT3 DNA リガーゼ、1 μ L のUSER、各々200 nM 濃度のインデキシングプライマー18-460 および18-451、ならびに各々400 nM 濃度の末端プライマー18-221 および18-222 を含んだ (表1)。この反応ミックスで以下のサイクリングプログラムを実行した: USER およびT3 リガーゼ活性を可能にするために37 $^{\circ}$ C で20分、その後エンドヌクレアーゼおよびリガーゼを不活性化し、DNA 基質を変性させ、ホットスタートポリメラーゼを活性化するために98 $^{\circ}$ C で30秒、これに続いて標的特異的アンプリコンのインデキシングPCR のために98 $^{\circ}$ C で10秒、60 $^{\circ}$ C で30秒および66 $^{\circ}$ C で1分を7サイクル。反応は次に42.5 μ L の20% PEG-8000 / 2.5 M NaCl 溶液 (0.85 $\times$ 比) で精製し、DNA は20 μ l のDNA 懸濁緩衝液に溶出させ、新規の管へ移した。ライブラリーは、Illumina のためのKapa qPCR アッセイキットを使用して定量化し、その後、製造業者のワークフロー推奨によるSwift Normalase キットを通して正規化を完了して、2 nM プールを達成した。プールをIllumina MiniSeq にローディングし、151塩基の対末端リードでシーケンシングをした。

結果

【0278】

ライブラリー収量は、正規化の前で53 nM であった。リードの98% より多くが意図する標的領域に整列したように、シーケンシングデータは高品質であった。図7は、IGV で観察されたITS1 のカバレッジを表す。35塩基未満の挿入断片サイズを有する短いリードが全リードの0.1% 未満を占めるように、プライマー二量体も最終ライブラリーで最小である。

結論

【0279】

この標的化アンプリコンライブラリーワークフローは、15個のプライマーを使用して単一遺伝子座の極めて小さい標的領域から十分なライブラリー収量を首尾よくもたらした。第1のアダプターを含む標的特異的アンプリコンは、NGS ライブラリーに変換され、第2のアダプターライゲーションおよびライブラリーインデキシング戦略としてライゲーションカップルドPCR を使用してインデックス化された。アダプター二量体およびプラ

イマー二量体は、最終ライブラリーに有意には寄与しなかった。ライブラリー調製は、アンプリコンベースのライブラリーのための統合されたライブラリー調製および正規化手順を実証した。

【0280】

(実施例2)

長いプライマーアセンブリおよび酵素ライブラリー正規化の理論的根拠のためのライゲーションカップルドPCR

理論的根拠

単一密閉管での酵素正規化のために、ライブラリーをインデックス化、増幅および調整するためにライゲーションカップルドPCRを使用した。詳細には、ユニバーサルスプリントを使用して酵素正規化のための末端修飾オリゴをインデキシングプライマーにライゲーションし、続いてPCRサイクリングによってランケーションされたアダプターを有するライブラリーをインデックス化および増幅する。PCRのために最適化された条件でのオリゴサブユニットからのプライマーのライゲーションベースのアセンブリのために、T3 DNAリガーゼを使用した。ライゲーションカップルドPCR方法は、酵素正規化のためのRNAおよびDNA塩基を含有する完全長92および86塩基オリゴの合成を置き換え、より低い合成費用のために短いユニバーサル正規化5'テール配列が既存のインデキシングプライマーにライゲーションすることを可能にする。

材料

【0281】

酵素的断片化、Swift 2S Turbo Flexible DNAライブラリーキット (Swift Biosciences、cat# 45024)

【0282】

T4 DNAリガーゼ (Rapid) (Enzymatics、cat# L6030-HC-L)

【0283】

5X Quick Ligation反応緩衝液 (New England Biolabs、cat# 6058)

【0284】

ランケーションされたアダプター；第1のオリゴヌクレオチド13-691 (表1)

【0285】

ランケーションされたアダプター；第2のオリゴヌクレオチド16-349 (表1)

【0286】

i5およびi7のためのランケーションされたインデキシングオリゴ 18-206、18-207、18-210、18-211、18-212、18-213 (表1)

【0287】

修飾末端正規化テールオリゴ18-204、18-205 (表1)

【0288】

ランケーションされたインデキシングオリゴの正規化オリゴ18-214、18-215へのライゲーションのためのユニバーサルスプリント (表1)

【0289】

T3 DNAリガーゼ (Enzymatics、cat# L6010L)

【0290】

PrimeSTAR (登録商標) GXL SP HiFi DNAポリメラーゼおよび緩衝液 (Takara、cat# RF220Q)

【0291】

Swift Normalaseキット (Swift Biosciences、cat# 66096)

【0292】

MiSeq試薬キットV2、50サイクル (Illumina、cat# MS102

10

20

30

40

50

— 2001)

【0293】

SPRIselect (Beckman coulter、cat# B23419)

【0294】

ヒトゲノムDNA (Coriell Institute、NA12878)

方法

【0295】

ヒトゲノムDNAをDNA懸濁緩衝液(10mMトリス-HCl、pH8.0、0.1mM EDTA、pH8.0)に再懸濁させた。10ngのDNAを断片化し、末端修復し、酵素断片化ミックスを30μl反応で使用してアデニル化した。DNAは、32℃で22分の断片化時間で200bpの平均サイズを有するように断片化し、続いて65℃で30分の不活性化およびアデニル化を実施した。酵素断片化の後、ランケーションされたアダプターは、最終濃度の1X Quick Ligation反応緩衝液、1200単位のT4 DNAリガーゼ、および1.25μMのランケーションされたアダプターを60μl反応で使用してライゲーションした。反応は、20℃で20分間インキュベートした。ランケーションされたアダプターでライゲーションしたDNAは、48μlのSPRIselectビーズ(比:0.80x)を使用して精製し、20μlのDNA再懸濁緩衝液で溶出した。20μMのユニバーサルスプリントオリゴの保存溶液は、50mMのNaClと80℃で15分間インキュベートし、20℃で30分間冷却することによって、27.5μMの修飾末端Normalaseプロトコールオリゴにプレアニーリングした。プレアニーリングされたスプリントおよび修飾末端Normalaseプロトコールオリゴの修飾インデックスプライマーオリゴへのライゲーション、ならびにライゲーションされたインデキシングオリゴによる調整されたDNAの増幅のための成分は、すべて単一密閉管反応に存在し;この反応は、PCRのために最適化された1xHiFi PCR DNAポリメラーゼおよび緩衝液条件、各々0.6μMのi5およびi7修飾インデキシングオリゴ、各々1μMのユニバーサルスプリントオリゴ、ならびに各々1.37μMの末端修飾Normalaseプロトコールオリゴ、3700単位のT3 DNAリガーゼ、およびランケーションされたアダプターとライゲーションした20μlの精製されたDNAを含有する50μlの最終量でアセンブルした。反応は、以下のプログラムによるサーモサイクラーに置いた:25℃で15分;98℃で30秒;98℃で10秒、60℃で30秒、68℃で60秒を7サイクル;68℃で5分、および4℃で保持。最終ライブラリーは50μlのSPRIselectビーズ(比:1.0x)を使用して精製し、20μlのTEで溶出し、蛍光定量的方法(Qubitおよび高感度DNA Agilentバイオアナライザーキット)およびqPCRによって調査し、所望のライブラリーサイズを確実にし、量を確認した。Swift酵素正規化キットを使用してライブラリーを4nMに正規化し、インデックスバランスを測定するために12pMを50サイクルのMiSeqカートリッジにローディングした。

結果

【0296】

ライゲーションカップルドPCRのために修飾したインデキシングプライマーの複数の組合せで調製した7反復のライブラリーの平均収量は、18nMであった。ライブラリーのインデックスバランスは、MiSeqの上のフィルターを通過したリードによって測定される10.6%変動係数および752K/mm²のクラスター密度を有した。

結論

【0297】

NGSライブラリーは、単一密閉管でのライゲーションカップルドPCRを使用した酵素正規化方法のために首尾よくインデックス化、増幅および調整された。

【0298】

(実施例3)

ライゲーションカップルドPCRのためのPCRマスターミックスでT3 DNAリガー

ゼを使用したプライマーアセンブリの効率

理論的根拠

この実施例は、PCRのために最適化された条件でのスプリントライゲーションによるインデキシングプライマーアセンブリを実証し、これは単一密閉管での複合的プライマーアセンブリおよび基質分子のPCR増幅を可能にする。

材料

- 【0299】
T4 DNAリガーゼ (Enzymatics cat# L6030-LC-L)
- 【0300】
i5のための改変されたランケーションされたインデキシングオリゴ 18-206 (表1) 10
- 【0301】
修飾末端正規化テールオリゴ18-204 (表1)
- 【0302】
改変されたランケーションされたインデキシングオリゴの正規化オリゴ18-214へのライゲーションのためのユニバーサルスプリントオリゴ (表1)
- 【0303】
T3 DNAリガーゼ (Enzymatics cat# L6010L)
- 【0304】
PrimeSTAR (登録商標) GXL SP HiFi DNAポリメラーゼおよび緩衝液 (Takara cat# RF220Q) 20
- 【0305】
Novex (商標) TBE-尿素ゲル、15%、12ウェル (ThermoFisher Scientific cat# EC68852BOX)
- 【0306】
TBEランニングバッファー5× (ThermoFisher Scientific cat# LC6675)
- 【0307】
Novex (商標) TBE-尿素サンプル緩衝液2× (ThermoFisher Scientific cat# LC6876) 30
- 【0308】
SYBR Gold核酸ゲル染色10,000× (ThermoFisher Scientific cat# S11494)
- 【0309】
TrackIt (商標) 25bp DNAラダー (Invitrogen cat# 10488-022)

方法

- 【0310】
20 μMのユニバーサルスプリントオリゴ (18-214) の保存溶液は、50 mMのNaClと80℃で15分間インキュベートし、20℃で30分間冷却することによって、27.5 μMの修飾末端Normalaseプロトコールオリゴ (18-204) にプレアニーリングした。プレアニーリングされたスプリントおよび修飾末端Normalaseプロトコールオリゴの修飾インデックスプライマーオリゴへのライゲーションのための成分は、単一密閉管反応に存在し；ライゲーションカップルドPCRは、PCRのために最適化された1×緩衝液条件、0.6 μMのi5改変インデキシングオリゴ、1 μMのユニバーサルスプリントオリゴ、および1.37 μMの末端改変Normalaseプロトコールオリゴ、3700単位のT3 DNAリガーゼまたは300単位のT4 DNAリガーゼを含有する50 μlの最終量でアセンブルした。25℃に設定したサーモサイクラーに反応を15分間置いた。反応の一部は、15分間のインキュベーションの前またはその後に添加した1×HiFi PCR DNAポリメラーゼで実行した。インキュベー 40 50

シヨンの後、各反応の10 μ lを、10 μ lのTBE-尿素サンプル緩衝液と混合し、95 $^{\circ}$ Cで2分間変性させ、TBE尿素ゲルの各レーンに変性混合物の18 μ lをローディングした。ゲルの最外部のレーンには、25塩基ラダーの1.5 μ lをローディングした。ゲルは、65 $^{\circ}$ Cのオープンの中の1 $\times$ TBEランニングバッファーに140 Vで1時間流した。ゲルは2 $\times$ SYBR Goldを使用して室温で10分間染色し、蒸留水で1分間水洗し、紫外光源で画像を獲得した。

結果

【0311】

ゲルに示されるように（図8）、バンド4はライゲーションした生成物（73塩基）を示し、バンド1は末端Normalaseオリゴ（バンド2、18-204、28塩基）を修飾インデキシングプライマー（バンド3、18-206、45塩基）にライゲーションするために使用したユニバーサルスプリントオリゴ（18-214、24塩基）である。レーン（A）から（E）は、修飾インデキシングオリゴ単独の100%、60%、40%、20%および10%をそれぞれ示し、それはライゲーション反応における限界オリゴである。レーン（F）および（G）は、HiFi DNAポリメラーゼ無しおよび有りのPCRのために最適化された条件でT4 DNAリガーゼを使用した、修飾インデキシングオリゴの部分的なライゲーションだけを実証する。レーン（H）、（I）および（J）は、それぞれ25 $^{\circ}$ Cで15分間のインキュベーションの後および前に加えたHiFi DNAポリメラーゼ無しおよび有りのPCRのために最適化された反応条件でインキュベートしたT3 DNAリガーゼを使用した、修飾インデキシングオリゴの90%を超えるライゲーションを実証する。

結論

【0312】

結果は、PCRのために最適化された条件でT3 DNAリガーゼを使用して90%を超えるライゲーションを実証するが、T4 DNAリガーゼを使用すると部分的なライゲーションだけが観察される。

【0313】

（実施例4）

連続アダプター結合化学および平滑末端を有する3'アダプターを利用したDNA NG Sライブラリー方法のためのランケーションされたインデキシングプライマーおよびヘアピン5'アダプターによるライゲーションカップルPCR。

理論的根拠

この実施例は、3'末端の13塩基を欠くランケーションされたインデキシングプライマーi5およびi7ならびにランケーションされたヘアピン5'アダプターによるライゲーションカップルドPCR反応の実行可能性を実証する。それは、線状5'アダプターに対するヘアピン5'アダプターの利点も実証する（図3Aおよび3Bに示す）。13塩基の3'末端ランケーションのために、ランケーションされたインデキシングプライマーi5（図3A、Bのドメイン3）は5'アダプターとして使用することができないので、ライゲーションカップルドPCR反応にさらなる5'アダプターを添加する必要がある。この実施例で利用される3'アダプターは、平滑末端のランケーションされたアダプター（ドメイン2）であり；一方、5'アダプターは比較的短い一本鎖の3'部分を持つランケーションされたヘアピン（図3Bのドメイン5）であるか、または実質的により高いT_mを有するランケーションされた線状アダプター（図3Aのドメイン5）である。この実施例で使用されるヘアピン5'アダプターのステム領域の融解温度は非常に高い（T_m約80 $^{\circ}$ C）ので、プライマーアニーリングおよび伸張の間、ヘアピン5'アダプターはその一本鎖の3'部分の低T_m（T_m約50 $^{\circ}$ C）のために折りたたまれ、PCRに参加しない。線状のランケーションされた5'アダプターの融解温度は実質的に高く（T_m約73 $^{\circ}$ C）、ライブラリー分子のPCR増幅および生成におけるこのアダプターの可能性の高い関与が、シーケンシングの間のフローセルの上でのクラスター形成を支えることを不可能にしている。さらに、ヘアピンアダプター領域は、ライゲーションカ

アップルドPCR反応の間のヘアピン複製および望ましくない生成物の形成を防止するための複製不能なスパーサーを含有する。

【0314】

この実施例では、オリゴヌクレオチド1によって表されるデオキシウリジン含有鎖は、UDG酵素によって完全に分解され、その後、5'トランケーションされたヘアピンアダプターの3'アダプター（オリゴヌクレオチド1）の残りの一本鎖へのアニーリング、およびT3 DNAリガーゼによるDNA基質の5'末端へのライゲーションが続いた。さらに、95~98℃でのUDGおよびT3 DNAリガーゼの不活性化、およびホットスタート耐熱性DNAポリメラーゼの活性化が同時発生し、その後、トランケーションされたインデキシングプライマーの存在下でNGS DNAライブラリーの以降のPCRが続き、すべては単一管でのインキュベーションで生じた。

10

材料

【0315】

T4 DNAリガーゼ（Rapid）（Enzymatics cat# L6030-HC-L）

【0316】

オリゴヌクレオチド配列（表1）

【0317】

5×Quick Ligation反応緩衝液（New England Biolabs、cat# 6058）

20

【0318】

T3 DNAリガーゼ（Enzymatics cat# L6010L）

【0319】

ウラシル-DNAグリコシラーゼ（Enzymatics cat# G5010L）

【0320】

2×HiFi PCRマスターミックス（Enzymatics、cat# P7670）

【0321】

100mM 2'-デオキシヌクレオシド5'-三リン酸（dNTP）セット（Invitrogen、cat# 10297018）

30

【0322】

T4 DNAポリメラーゼ（Enzymatics、cat# P7080L）

【0323】

T4ポリヌクレオチドキナーゼ（Enzymatics、cat# Y904L）

【0324】

SPRIselect（Beckman coulter、cat# B23419）

【0325】

ヒトゲノムDNA（Coriell Institute、NA12878）

【0326】

DNA懸濁緩衝液、10mMトリス、0.1mM EDTA、pH8.0（Teknova、cat# T0227）

40

方法

【0327】

ヒトゲノムDNAを、DNA懸濁緩衝液（10mMトリス-HCl、pH8.0、0.1mM EDTA、pH8.0）に100ng/μlの濃度で再懸濁させた。DNAは、Covaris M220 Focused-Ultrasonicatorで200塩基対の平均サイズに断片化した。約150bpから約250bpの断片化DNAのタイトな分布が得られた。

【0328】

断片化DNAは、NGSライブラリーを調製するために使用した。ポリシング反応は、

50

各 d N T P の 1 0 0 μ M 、 0 . 1 5 単位の T 4 DNA ポリメラーゼ、1 0 単位の T 4 ポリヌクレオチドキナーゼを含む 3 0 μ l でアセンブルした。反応は、2 0 ° C で 2 0 分間インキュベートし、その後、6 5 ° C で 1 0 分間の熱不活化が続いた。3 ' アダプターライゲーション反応は、1 × Q u i c k L i g a t i o n 反応緩衝液、2 2 0 ピコモルの 3 ' アダプターオリゴヌクレオチド 1 3 - 7 1 2 、 1 1 0 ピコモルの 3 ' アダプターオリゴヌクレオチド 1 3 - 6 9 0 、 3 0 μ l のポリッシュされた DNA および 1 2 0 0 単位の T 4 DNA リガーゼを含む 6 0 μ l でアセンブルした。ライゲーション反応は、2 0 ° C で 2 0 分間インキュベートした。DNA は、4 8 μ l の S P R I s e l e c t ビーズ（比：0 . 8 ×）を使用して精製した。DNA は 1 8 . 5 μ l の DNA 懸濁緩衝液に溶出させた。ライゲーションカップルドインデキシング P C R 反応は、1 × H i F i P C R マスターミックス、1 ピコモルのランケーションされたヘアピン 5 ' アダプターオリゴヌクレオチド 1 9 - 3 5 1 または線状 5 ' アダプター 1 9 - 3 1 、 6 0 ピコモルのインデキシングプライマー i 5 オリゴヌクレオチド 1 7 - 2 7 7 、 6 0 ピコモルのインデキシングプライマーオリゴヌクレオチド 1 4 - 1 6 1 、 1 5 0 0 単位の T 3 DNA リガーゼ、2 単位のウラシル DNA グリコシラーゼおよび 3 ' アダプターライゲーション反応の後に精製された 1 8 μ l の DNA を含有する 5 0 μ l 量でアセンブルした。反応は、以下の設定プログラムによるサーモサイクラーに置いた：3 7 ° C で 2 0 分間、続いて 9 8 ° C で 2 分間、続いて（9 8 ° C で 2 0 秒間、6 0 ° C で 3 0 秒間、7 2 ° C で 6 0 秒間）を 7 サイクル、続いて 7 2 ° C で 1 分間、および 4 ° C で保持。最終ライブラリーは、4 2 . 5 μ l の S P R I s e l e c t ビーズ（比：0 . 8 ×）を使用して精製した。DNA は 2 0 μ l の DNA 懸濁緩衝液に溶出させ、蛍光定量的方法（Q u b i t および高感度 DNA A g i l e n t バイオアナライザーキット）および q P C R によって調査し、所望のライブラリーサイズを確実にし、定量を確認した。

10

20

【0329】

ランケーションされた平滑末端の 3 ' アダプターは、2 つのオリゴヌクレオチドのアニリングによって調製した（参照により本明細書に完全に組み込まれる、米国特許第 1 0 , 2 0 8 , 3 3 8 号に記載される通り）：5 ' 末端のホスフェート基および 3 ' 末端のブロック基（C 3 スペーサーなど）を有するオリゴヌクレオチド 1 3 - 6 9 0 、ならびに 3 ' 末端に分解可能なデオキシウリジン塩基およびライゲーション不能の 3 ' - d T 塩基を含むオリゴヌクレオチド 1 3 - 7 1 2 （3 ' リボース位置のヒドロキシル基を欠くチミン塩基修飾）。

30

結果

【0330】

表 2 は、Q u b i t および A g i l e n t バイオアナライザーを使用したライブラリー収量の定量調査によって得られた実験結果を概説する。5 ' トランケーションされたヘアピンアダプターは、フルサイズのインデキシングプライマーが使用され、アダプター i 5 のライゲーションが完了した後に i 7 アダプターが添加された条件と比較して同等のライブラリー収量によって実証される通り、ライゲーションカップルドインデキシング P C R 反応の効率を維持した。さらに、5 ' トランケーションされたヘアピンアダプターを線状アダプターで置き換えることは、ライブラリー収量の低減をもたらした。

40

結論

【0331】

N G S ライブラリーは、2 つの N G S アダプターの連続ライゲーションによる 3 ステッププロトコルを使用して首尾よく作製され、ここで、図 1 G および図 3 B に示すように、第 1 のステップは DNA 末端を修復し、第 2 のステップは 3 ' 平滑末端アダプターを加え、最終ステップは、ランケーションされたインデキシングプライマーを使用した単一密閉管反応において 5 ' ヘアピンアダプターをライゲーションし、インデックスを加え、P C R によって N G S ライブラリーを増幅した。ループ領域の中の複製不可能スペーサーからなるランケーションされたヘアピン 5 ' アダプターの使用はライブラリー収量を向上させ、ライゲーションカップルド P C R 反応中の望ましくない生成物の形成を防止する

50

。

【0332】

(実施例5)

連続アダプター結合化学および平滑末端を有する3'アダプターを利用したDNA NG Sライブラリー方法のためのフルサイズインデキシングプライマーおよびプライマーブロッカーによるライゲーションカップルPCR

理論的根拠

この実施例は、フルサイズインデキシングプライマーによるライゲーションカップルドPCR反応の実行可能性を実証し、ここで、インデキシングプライマーの1つ(i5)は5'アダプターとして使用してDNAにライゲーションし、図1Eおよび図2Bに示すように第2のインデキシングプライマー(i7)のライゲーションは、第2のインデキシングプライマーにプレアニーリングされたブロッカーオリゴヌクレオチドによって防止される。この実施例は、ブロッカーオリゴヌクレオチドがない場合の実質的により低いライブラリー収量を実証することによって(図2A)、開裂可能なdU塩基およびミスマッチを含有するブロッカーオリゴヌクレオチドの有用性を示す(図2Fおよび図2G)。ブロッカーオリゴヌクレオチドの中のミスマッチおよび開裂可能な塩基の数および位置の両方がその性能にとって重要であることも示す。PCR反応の間のブロッカーオリゴヌクレオチドの不活性化は、図2Fおよび図2Gに示すように、T3 DNAリガーゼによる5'アダプターライゲーションおよび37℃でのウラシルデオキシグリコシラーゼとのインキュベーションを合わせた間に生成される脱塩基部位における高温でのオリゴヌクレオチド断片化によって達成される。最後の反応は、dU塩基を有する3'アダプターオリゴヌクレオチドをDNAに結合したオリゴヌクレオチドから解離させるのを助けるが、ブロッカーオリゴヌクレオチドとインデキシングプライマーi7の間の相互作用を実質的に破壊しない。この実施例で利用される3'アダプターは、平滑末端のランケーションされたアダプターである。フルサイズインデキシングプライマーの存在下でのUDG処理、T3 DNAリガーゼによる5'アダプターライゲーションおよびライブラリー増幅を含むすべての3つの反応は、単一密閉管反応で起こる。

材料

【0333】

T4 DNAリガーゼ(Rapid)(Enzymatics cat# L6030-HC-L)

【0334】

オリゴヌクレオチド配列(表1)

【0335】

5×Quick Ligation反応緩衝液(New England Biolabs、cat# 6058)

【0336】

T3 DNAリガーゼ(Enzymatics cat# L6010L)

【0337】

ウラシル-DNAグリコシラーゼ(Enzymatics cat# G5010L)

【0338】

2×HiFi PCRマスターミックス(Enzymatics、cat# P7670)

【0339】

100mM 2'-デオキシヌクレオシド5'-三リン酸(dNTP)セット(Invitrogen、cat# 10297018)

【0340】

T4 DNAポリメラーゼ(Enzymatics、cat# P7080L)

【0341】

T4ポリヌクレオチドキナーゼ(Enzymatics、cat# Y904L)

【0342】

SPRIselect (Beckman coulter、cat# B23419)

【0343】

ヒトゲノムDNA (Coriell Institute、NA12878)

【0344】

DNA懸濁緩衝液、10mMトリス、0.1mM EDTA、pH8.0 (Teknova、cat# T0227)

方法

【0345】

ヒトゲノムDNAを、DNA懸濁緩衝液（10mMトリス-HCl、pH8.0、0.1mM EDTA、pH8.0）に100ng/μlの濃度で再懸濁させた。DNAは、Covaris M220 Focused-Ultrasonicatorで200塩基対の平均サイズに断片化した。約150bpから約250bpの断片化DNAのタイトな分布が得られた。

【0346】

断片化DNAは、NGSライブラリーを調製するために使用した。ポリシング反応は、各dNTPの100μM、0.15単位のT4 DNAポリメラーゼ、10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼを含む30μlでアセンブルした。反応は、20℃で20分間インキュベートし、その後、65℃で10分間のインキュベーションが続いた。3'アダプターライゲーション反応は、1×Quick Ligation反応緩衝液、220ピコモルの3'アダプターオリゴヌクレオチド13-712、110ピコモルの3'アダプターオリゴヌクレオチド13-690、30μlのポリッシュされたDNAおよび1200単位のT4 DNAリガーゼを含む60μlでアセンブルした。反応は、20℃で20分間インキュベートした。DNAは、48μlのSPRIselectビーズ（比：0.8×）を使用して精製した。DNAは18.5μlのDNA再懸濁緩衝液に溶出させた。ライゲーションカップルドインデキシングPCRは、1×HiFi PCRマスターミックス、60ピコモルのフルサイズインデキシングプライマーi5オリゴヌクレオチド19-34、60ピコモルのフルサイズインデキシングプライマーi7オリゴヌクレオチド19-37、72ピコモルのインデキシングプライマーi7ブロッカー、1500単位のT3 DNAリガーゼ、2単位のウラシルDNAグリコシラーゼ、および3'アダプターライゲーション反応の後に精製したDNAの18μlを含有する50μlの反応量でアセンブルした。反応は、以下の設定プログラムによるサーモサイクラーに置いた：37℃で20分、続いて98℃で2分、続いて98℃で20秒、60℃で30秒、72℃で60秒を7サイクル、続いて72℃で1分、および4℃で保持。最終ライブラリーは、42.5μlのSPRIselectビーズ（比：0.85×）を使用して精製した。DNAは20μlに溶出させ、蛍光定量的方法（Qubitおよび高感度DNA Agilentバイオアナライザーキット）およびqPCRによって調査し、所望のライブラリーサイズを確実にし、定量を確認した。

【0347】

トランケーションされた平滑末端の3'アダプターは、2つのオリゴヌクレオチドのアニーリングによって調製した（参照により本明細書に完全に組み込まれる、米国特許第10,208,338号に記載される）：5'末端のホスフェート基および3'末端のブロッキング基（C3スペーサーなど）を有するオリゴヌクレオチド13-690、および3'末端に分解可能なデオキシウリジン塩基およびライゲーション不能の3'-dT塩基を含むオリゴヌクレオチド13-712（3'リボース位置のヒドロキシル基を欠くチミン塩基修飾）。

結果

【0348】

表1にオリゴヌクレオチド19-356、19-357、19-352、19-353および19-354として掲載したすべての試験したプライマーブロッカーの配列は、そ

これらの標的、インデキシングプライマーP7オリゴヌクレオチド19-37と合わせて図9に示す。表2は、QubitおよびAgilentバイオアナライザーを使用したライブラリー収量の定量調査によって得られた実験結果を概説する。ライゲーションカップルドインデキシングPCR反応の効率は、ブロッカーオリゴヌクレオチドの追加およびその組成に高度に依存していた。図9に示すすべてのブロッキングオリゴヌクレオチドは、プライマーi7を効率的に阻害し、3つのdU塩基および1つのT*Gミスマッチを含有するブロッカーオリゴヌクレオチド19-356は、ライブラリー収量の最大の増加をもたらした。i5プライマー-アダプターのライゲーションが完了した後にインデキシングプライマーが加えられた条件と同等であった。ブロッカーがライゲーションカップルドPCRに添加されなかったときにはライブラリー収量の4分の1の低減があったが、他のブロッカーが使用されたときはより少ない低減であった。

10

結論

【0349】

2つのNGSアダプターの連続ライゲーションによる3ステッププロトコルを使用して、NGSライブラリーは首尾よく作製され、ここで、図1Eおよび図2Bに示すように、第1のステップはDNA末端を修復し、第2のステップは3'平滑末端アダプターを加え、最終ステップは、フルサイズインデキシングプライマーを使用した単一密閉管反応において5'プライマー-アダプターi5をライゲーションし、インデックスを加え、PCRによってNGSライブラリーを増幅した。dU塩基およびミスマッチを含有するプライマーブロッカーの使用はライブラリー収量を4倍向上させ、5'アダプターの100%組込みを特徴とする対照例と同じ性能を達成することを可能にする。

20

【0350】

(実施例6)

連続アダプター結合化学および単一塩基オーバーハングを有する3'アダプターを利用したDNA NGSライブラリー方法のためのランケーションされたインデキシングプライマーおよびヘアピン5'アダプターによるライゲーションカップルドPCR

理論的根拠

この実施例は、3'末端の13塩基を欠くランケーションされたインデキシングプライマーi5およびi7ならびにランケーションされたヘアピン5'アダプターを利用したライゲーションカップルドPCR反応の実行可能性を実証する。この実施例で使用する3'アダプターは、TまたはUの単一塩基3'オーバーハングを有するランケーションされたアダプターであり（それぞれ、図3Kおよび3I）、一方、5'アダプターは、11bまたは13bの一本鎖3'部分をそれぞれ有するランケーションされたヘアピンアダプター（図3Kおよび3Iのドメイン5）である。この実施例で使用するヘアピン5'アダプターのステム領域の融解温度は80℃であり、プライマーアニーリングおよび伸張PCR相の間にヘアピンアダプターはその残りの一本鎖3'部分の低 T_m （ T_m 約50℃）のために折りたたまれ、PCRに参加しないことを示唆する。さらに、ヘアピンループ領域は、ライゲーションカップルドPCR反応の間のその複製および他の望ましくない生成物の形成を防止するための複製不能なスパーサーを有する。図10Aは、この実施例で使用する3'および5'アダプターを示す。

30

40

【0351】

この実施例では、オリゴヌクレオチド1によって表されるデオキシウリジン含有3'アダプター鎖は、USER酵素によって完全に分解され、その後、5'ランケーションされたヘアピンアダプターの3'アダプターの残りの一本鎖（オリゴヌクレオチド2）へのアニーリング、およびT3 DNAリガーゼによるライゲーションが続いた。単一塩基Uオーバーハングを有する3'アダプターの場合、ライゲーションはヘアピンアダプターの13b一本鎖部分とDNA断片の5'末端の間で起こったが（図3I）、単一塩基Tオーバーハングを有する3'アダプターの場合、ライゲーションはヘアピンアダプターの11b一本鎖部分とDNA断片に共有結合しているオリゴヌクレオチド1のCTジヌクレオチド部分の間で起こった（図3K）。ライゲーション不能なddTまたはこの場合3'-d

50

T塩基アナログを有する3'アダプターの使用は、単一塩基オーバーハングを有するアダプターの1本のDNA鎖だけへのライゲーションの低効率のために、平滑末端3'アダプターの場合ほど有益ではない（実施例4および5）（データは示さず）。さらに、95～98℃でのUSERおよびT3 DNAリガーゼの不活性化、ならびにホットスタート耐熱性DNAポリメラーゼの活性化が同時発生し、その後、ランケーションされたインデキシングプライマーの存在下でNGS DNAライブラリーの以降のPCRが続き、すべては単一管でのインキュベーションで生じた。

【0352】

この実施例は、非常に広範囲のDNA投入量の中での汎用濃度の3'および5'アダプター、ならびにフェムトグラムレベルまで下げたDNA投入量でのアダプター二量体形成の欠如を使用してNGSライブラリーを作成する、記載されたアプローチの能力を実証する。

10

材料

【0353】

T4 DNAリガーゼ (Rapid) (Enzymatics cat# L6030-HC-L)

【0354】

オリゴヌクレオチド配列 (表1)

【0355】

5×Quick Ligation反応緩衝液 (New England Biolabs、cat# 6058)

20

【0356】

T3 DNAリガーゼ (Enzymatics cat# L6010L)

【0357】

USER (New England Biolabs cat# M5505L)

【0358】

2×HiFi PCRマスターミックス (Enzymatics、cat# P7670)

【0359】

100mM 2'-デオキシヌクレオシド5'-三リン酸 (dNTP) セット (Invitrogen、cat# 10297018)

30

【0360】

T4 DNAポリメラーゼ (Enzymatics、cat# P7080L)

【0361】

T4ポリヌクレオチドキナーゼ (New England Biolabs、cat# M0202L)

【0362】

Taq DNAポリメラーゼ (Enzymatics、cat# P72250L)

【0363】

SPRIselect (Beckman coulter、cat# B23419)

40

【0364】

ヒトゲノムDNA (Coriell Institute、NA12878)

【0365】

DNA懸濁緩衝液、10mMトリス、0.1mM EDTA、pH8.0 (Teknova、cat# T0227)

方法

【0366】

ヒトゲノムDNAを、DNA懸濁緩衝液 (10mMトリス-HCl、pH8.0、0.1mM EDTA、pH8.0) に100ng/μlの濃度で再懸濁させた。DNAは、Covaris M220 Focused-Ultrasonicatorで200塩

50

基対の平均サイズに断片化した。約 150 bp から約 250 bp の断片化 DNA のタイトな分布が得られた。

【0367】

断片化 DNA は、NGS ライブラリーを調製するために使用した。ライブラリー調製のために使用した DNA の量は、250 ng から 0.3 fg まで変化した。非常に低い DNA 投入量による一部の試験では、ライブラリー調製の間の DNA の損失を防止する担体として 3.3 pg の一本鎖 DNA を添加した。ポリシング反応は、各 dNTP の 100 μM、0.15 単位の T4 DNA ポリメラーゼ、10 単位の T4 ポリヌクレオチドキナーゼ、および 1.5 単位の Taq DNA ポリメラーゼを含む 30 μl でアセンブルした。反応は、20℃で20分間インキュベートし、その後、65℃で10分間インキュベートした。3'アダプターライゲーション反応は、1×Quick Ligation 反応緩衝液、220 ピコモルの 3'アダプターオリゴヌクレオチド 20-141 または 20-146、110 ピコモルの 3'アダプターオリゴヌクレオチド 20-148、30 μl のポリッシュされた DNA および 1200 単位の T4 DNA リガーゼを含む 60 μl でアセンブルした。反応は、20℃で20分間インキュベートした。DNA は、48 μl の SPRI Select ビーズ（比：0.8×）を使用して精製した。DNA は 18.5 μl の DNA 再懸濁緩衝液に溶出させた。3'アダプターの dU 含有鎖の分解、トランケーションされたヘアピン 5'アダプターオリゴヌクレオチドのアニールングおよびライゲーション、ならびに調整した DNA の増幅は、すべて単一密閉管反応の中で起こり、それは、1×HiFi PCR マスターミックス、1 ピコモルのトランケーションされたヘアピン 5'アダプターオリゴヌクレオチド 20-147 または 19-351、60 ピコモルのトランケーションされたインデキシングプライマー i5 オリゴヌクレオチド 17-277、60 ピコモルのトランケーションされたインデキシングプライマー i7 オリゴヌクレオチド 14-161、1500 単位の T3 DNA リガーゼ、1 単位の USER および 3'アダプターライゲーション反応の後に精製された DNA の 19 μl を含有した 50 μl の最終量でアセンブルされた。反応は、以下の設定プログラムによるサーモサイクラーに置いた：37℃で20分、続いて98℃で2分、続いて（98℃で20秒、60℃で30秒、72℃で60秒）を7サイクル、続いて72℃で1分、および4℃で保持。最終ライブラリーは、42.5 μl の SPRI Select ビーズ（比：0.85×）を使用して精製した。DNA は 20 μl の DNA 懸濁緩衝液に溶出させ、蛍光定量的方法（高感度 DNA Agilent バイオアナライザーキット）および qPCR によって調査し、所望のライブラリーサイズを確実にし、定量を確認した。定量化したライブラリーをプールし、Illumina MiniSeq に加え、151 塩基の対末端リードでシーケンシングをした。

結果

【0368】

表 4 は、Agilent バイオアナライザーおよび qPCR を使用したライブラリー収量の定量調査によって得られた実験結果を概説する。表 5 および図 10A~10E は、理論的根拠で概説される 2 つの別々のライブラリー調製条件で得られた配列測定基準を概説する。

【0369】

単一塩基オーバーハングを含有する 3'アダプターによる連続アダプターライゲーション化学およびライゲーションカップルドインデキシング PCR を使用して合成された NGS ライブラリーは、3'アダプターで T か U のどのタイプの末端 3'塩基が利用されたかに関係なしに等しく優れた結果をもたらした。T オーバーハングを有する 3'アダプターおよび 11 b オーバーハングを有するヘアピン 5'アダプターを利用したライブラリープロトコル（図 10A の NGS ライブラリー A）は、より低い投入量試料（50 および 100 ng）に対してわずかにより効率的であったが、U オーバーハングを有する 3'アダプターおよび 13 b オーバーハングを有するヘアピン 5'アダプターを利用したプロトコル（図 10A の NGS ライブラリー B）は、より高い投入量試料（250 ng）に対して

より効率的であった（表４）。両方法のシーケンシング測定基準はかなり優れており、非常に類似していた（表５）。図１０Ｂ～１０Ｃに示すピカードプロット（NGSライブラリーＡ）は、YアダプターによるT/Aライゲーション化学によって調製されるNGSライブラリーに一般的なAT/GCバイアスを実証する（データ示さず）。NGSライブラリーＢは、特に最も高いDNA投入量（250 ng）に対してより強力なAT/GCバイアスを実証する（図１０Ｄ～１０Ｅ）。そのようなバイアスは、おそらくライゲーションカップルドPCR反応の間のUSER酵素による、GCに富むDNA配列を有する接合部におけるdU塩基の開裂効率の低減の結果である。3'アダプターが3'末端にT塩基を有するNGSライブラリーＡの場合のように、dU塩基が3'アダプター配列の中に位置するとき、開裂は向上し、バイアスはより低くなる。

10

【0370】

NGSライブラリー方法Ａを非常に低いDNA投入量に適用したとき、それは、サブフェムトグラム量までアダプター二量体の欠如を実証した。表６および図１１Ａ～１１Ｂは、方法ＡによってDNAについて3 pg～100 pgのDNA投入量範囲で調製されたNGSライブラリーのAgilentバイオアナライザートレースを示、一方、表７および図１１Ｃは、0.3 fg～3 pg範囲の極めて低いDNA試料で調製されたライブラリーを例示する。DNAのそのような低い量および多数のPCRサイクル（30）にもかかわらず、アダプター二量体は観察されなかった。図１１Ａ～１１Ｃに示すすべてのライブラリートレースは、同じアダプター濃度で調製されたNGSライブラリーによって生成されたことを強調することが重要である。

20

結論

【0371】

5'アダプターの結合およびライブラリー増幅が単一密閉管でのライゲーションカップルドPCR反応で起こり、3'アダプターがTまたはU塩基の3'オーバーハングを有する、3'および5'アダプターの連続添加を含むアダプターライゲーション化学によるNGSライブラリーは、いかなるアダプター濃度調整もなしで1つのユニバーサルプロトコールを使用して、高DNAおよび低DNA試料のために効率的に使用することができる。NGSライブラリーは、DNAのトレース量を含む試料から調製することができ、法医学適用、古代DNA試料および細菌性DNAの単細胞シーケンシングのために潜在的に有益である。

30

【0372】

（実施例７）

16S DNA アンプリコンパネルのためのフルサイズインデキシングプライマーおよびプライマーブロッカーによるライゲーションカップルドPCR

理論的根拠

この実施例は、ライゲーションカップルドPCRステップによるアンプリコンワークフローにおけるP7インデキシングプライマーにアニーリングされたプライマーブロッカーの有用性を実証する。様々なi7プライマーブロッカーを試験するために、23個の16Sプライマーを含むアンプリコンパネルを使用した。標的特異的プライマーは、多重PCRの間ユニバーサルプライマー配列として、およびライゲーションカップルドPCRの間P5アダプター配列の組込みのための分解可能なアダプター領域として使用される、トランケーションされたアダプターP7配列を含んだ。

40

材料

【0373】

E. coli DNA (ATCC、cat# EDL933)

【0374】

Q5（登録商標）dUバイパスハイフィデリティ2×マスターミックス（NEB、cat# M0494）

【0375】

23個の標的特異的プライマーP1～P23（表1）

50

【0376】

トランケーションされたP7アダプター配列14-882を含有するユニバーサルプライマー（表1）

【0377】

完全長P7アダプター配列18-453からなるインデキシングプライマー（表1）

【0378】

完全長P5アダプター配列18-452からなるインデキシングプライマー（表1）

【0379】

P7アダプター19-04の3'末端に一部対応するブロッキングオリゴ（表1）

【0380】

アダプター配列の末端領域に対応するプライマー（表1）

【0381】

SPRIselect試薬（Beckman Coulter、B23318）

【0382】

20%PEG-8000／2.5M NaCl溶液

【0383】

DNA懸濁緩衝液、10mMトリス、0.1mM EDTA、pH8.0（Teknova、cat# T0227）

【0384】

T3リガーゼ（Enzymatics、cat# L6010）

【0385】

USER酵素（NEB、cat# M5505B）

【0386】

HiFi PCRマスターミックス（Enzymatics、cat# P7670）

【0387】

Qubit（商標）dsDNA HSアッセイキット（Thermo Fisher Scientific、Q32851）

方法

【0388】

E.coli DNAはDNA懸濁緩衝液に希釈した。標的選択のための第1の反応は、30μlで実行した。標的アンプリコンのために、フォワード標的特異的プライマーおよびリバース標的特異的プライマーは、5'末端にトランケーションされたP7アダプター配列を含有した。この反応は、1×Q5 dU High-Fidelityマスターミックス、30～90nMの様々な濃度で存在する23個の標的特異的プライマーP1～P23のミックス（表1）、10μMのオリゴ14-882および1ngのE.coli DNAからなった。この反応ミックスで以下のサイクリングプログラムを実行した：98℃で30秒、その後98℃で10秒、63℃で5分および65℃で1分を4サイクル、続いて98℃で10秒、および64℃で1分を14サイクル。65℃で1分の最後の仕上げステップは、標的特異的アンプリコンを生成する。標的特異的プライマーの除去を最大化し、緩衝液交換を促進するために、精製を実行した。精製は30μlのSPRIselectビーズ（1.0×比）で実行し、反応は17.4μlのTEに溶出させたが、ビーズから除去されなかった。標的特異的アンプリコンのアダプターライゲーションおよびPCR増幅を合わせた第2の反応。この反応は、ビーズを有する17.4μlの溶出された反応ミックス、1×HiFi PCRマスターミックス、アダプター（配列18-204および18-205）の末端配列に対応する400nMのプライマー、T3 DNAリガーゼ、USERおよびインデキシングプライマー（配列18-452および18-453）を含有した。ライブラリーは、第2のPCR反応で1μMのP7ブロッキングオリゴ（配列19-04）有りおよび無しで調製した。標的特異的アンプリコンの増幅のために、この反応ミックスで以下のサイクリングプログラムを実行した：37℃で20分、続いて98℃で30秒、続いて98℃で10秒、60℃で30秒および66℃で1分を8サイクル

10

20

30

40

50

。反応は次に $42.5 \mu\text{L}$ の 20% PEG-8000 / 2.5 M NaCl 溶液 ($0.85 \times$ 比) で精製し、DNA は $20 \mu\text{L}$ の DNA 懸濁緩衝液に溶出させた。ライブラリーは、Qubit (商標) dsDNA HS キット (Thermo Fisher Scientific) を使用して定量化した。

結果

【0389】

ライブラリーは一貫した予想収量をもたらし、ブロッカーオリゴなしのライブラリーでは $17.6 \text{ ng} / \mu\text{L}$ の平均収量 ($n=2$) で、ブロッカーオリゴを含有するライブラリーでは $25.5 \text{ ng} / \mu\text{L}$ の平均収量 ($n=2$) であった。平均収量の差は、概ね 44.9% であった。

10

結論

【0390】

標的特異的プライマーを通して導入されたトランケーションされた P7 配列を使用して、標的化 16S アンプリコンライブラリーが首尾よく作製された。標的特異的アンプリコンは、1 ステップの密閉管ライゲーション増幅戦略を使用してインデックス化した。ブロッキングオリゴ有りおよび無しのアンプリコンライブラリーの間の収量の 1.5 倍の差は、その差が 4 倍である NGS DNA ライブラリー (実施例 4) の場合より実質的に低い。この実施例は、ライゲーションカップルド PCR 反応においてブロッキングオリゴヌクレオチド無しでアンプリコンライブラリーを効率的に作製し、増幅することができることを実証する。

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表1. オリゴヌクレオチド配列(拡張表)

識別子	配列	配列番号
14-882	TCAGACGUGUGUCUCUCCGAU*C*U	3
18-460	TTTTTTTTTTTTTrUrUrUAATGATACGGCGACCACCG AGATCTACACGTACTGACACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT	4
18-451	TTTTTTTTTTTTTrUrUrUCAAGCAGAAGACGGCATAAC GAGATGCGCGAGAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGC TCTTCCGATCT	5
18-221	TTTTTTTTTTTTTrUrUrUAATGATACGGCGACCACCG AGA	6
18-222	TTTTTTTTTTTTTrUrUrUCAAGCAGAAGACGGCATAAC GAGAT	7
19-04	AGATCGGAAGAGCTTTTTTACACGTCTGAACTCC*T* T/3SpC3/	8
F1	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTGGTCATTTAGA GGAAGTAA	9
F2	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCGGTCATTTAGA GGAAGTAA	10
F3	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTGGTCATTTAGA GGAAGTAA	11
F4	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCGGTCATTTAGA GGAAGTAA	12
F5	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTAGGCTATTTAGA GGAAGTAA	13
F6	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTAGTTATTTAGA GGAAGTAA	14
F7	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTACGTCATTTAGA GGAAGTAA	15
F8	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTGGTCATTTAGA GGTCGTAA	16
R9	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTGCGTTCTTCAT CGATGC	17
R10	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTGCGTTCTTCAT CGATGG	18
R11	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTACGTTCTTCAT CGATGC	19
R12	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTGCGTTCTTCAT CGATGT	20
R13	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTGTGTTCTTCAT CGATGT	21

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

R14	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTGCGTTCTTCATCGTTGC	22
R15	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCGTTCTTCATCGATGC	23
16-349	/5Phos/ GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC /3Phos/	24
13-691	/5SpC3/ G*A*TCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	25
18-214	ATCTCGGTGGTCGCCGTATCAT /3SpC3/	26
18-215	ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG /3SpC3/	27
18-204	TTTTTTTTTTTTTrUrUrUrUAATGATACGGCG	28
18-205	TTTTTTTTTTTTTrUrUrUrUCAAGCAGAAGAC	29
18-206	/5Phos/ ACCACCGAGATCTACAC TATAGCCT ACACTCTTCCCTACACGAC	30
18-207	/5Phos/ ACCACCGAGATCTACAC ATAGAGGC ACACTCTTCCCTACACGAC	31
18-210	/5Phos/ GGCATACGAGAT CGAGTAAT GTGACTGGAGTTCAGACGTGT	32
18-211	/5Phos/ GGCATACGAGAT TCTCCGGA GTGACTGGAGTTCAGACGTGT	33
18-212	/5Phos/ GGCATACGAGAT AATGAGCG GTGACTGGAGTTCAGACGTGT	34
18-213	/5Phos/ GGCATACGAGAT GGAATCTC GTGACTGGAGTTCAGACGTGT	35
13-690	/Phos/AGATTCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTC*A*C/3SpC3/	36
13-712	AGACGUGUGCUCUTCCGATC/3'-dT/	37
14-161	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCTACACTCTTCCCTACACGAC	38
14-882	TCAGACGUGUGCUCUCCGAU*C*U	3
17-277	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTGTGTTGGTGACTGGAGTTCAGACGTG	39
18-452	TTTTTTTTTTTTTrUrUrUrUCAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTATCGCTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	40
18-453	TTTTTTTTTTTTTrUrUrUrUAATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	41

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

19-31	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	42
19-34	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGACTGC GAA ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	43
19-37	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCACCTATGCCGT GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT	44
19-351	GTCGTGTAGGGAAAGAGTGT/SPC3/ACACTCTTT CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	それぞれ 45および42
19-352	GAAGAGCACACGTCUGAACUCCAGTCAC/3SpC3/	46
19-353	AGATCGGAAGAGCACACGTCUGAACUCCAGTCAC/3 SpC3/	47
19-354	AGAUCGGAAGAGCACACGTCUGAACUCCAGTCAC/3 SpC3/	48
19-356	AGAUCGGAAGAGTACACGTCUGAACUCCAGTCACTT T	49
19-357	AGAUCGGAAGAGTACATGTCUGAACUCCAGTCACTT T	50
20-141	AGACGUGUGCUCUUCCGATCU	51
20-146	AGACGUGUGCUCUUCCGAUCT	52
20-147	GTCGTGTAGGGAAAGAGTGT/SpC3/ACACTCTTT CCCTACACGACGCTCTTCCGAT	それぞれ 45および53
20-148	5Phos/GATCGGAAGAGCACACGTCGAACTCCAGTCA C/3Phos/	54
P1	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTACGGGAGGCA GCAG	55
P2	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTACCAGGGTATCT AATCC	56
P3	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCAGCAGCCGCG GTAA	57
P4	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGTCAATTCMTT GAGTTT	58
P5	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGYAACGAGCGCAA CCC	59
P6	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACGGGCGGTGTG TACAA	60
P7	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGGCTGTCGTCAG CT	61
P8	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCTTGTTACGAC TT	62
P9	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGTTTGATCMTG GCTCAG	63
P10	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGTCAGGCTTTCGC CCATTG	64

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

P11	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTTCAGGCTTCCGC CCATTG	65
P12	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTCAGGCTTTTCGC CCATTG	66
P13	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGATCAGGCTTTTCGC CCATTG	67
P14	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTCAGACTTTTCGT CCATTG	68
P15	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGATCAGGGTTTCCC CCATTG	69
P16	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATCAGAGTTGCCT CCATTG	70
P17	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGTCAGGCTTGCGC CCATTG	71
P18	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAACGCGAAGAAC CTTACC	72
P19	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATACGCGAGGAAC CTTACC	73
P20	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTAACCGANGAAC CTYACC	74
P21	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAACGCGAAAAAC CTTACC	75
P22	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAACGCGCAGAAC CTTACC	76
P23	TCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATACGCGARGAAC CTTACC	77

10

20

オリゴヌクレオチド修飾のために使用した略記号:

/5Phos/5'ホスフェート基

/3SpC3/C3スペーサー、3'末端の、DNAポリメラーゼによる伸張またはDNAリガーゼによるライゲーションを防止する

/5SpC3/C3スペーサー、5'末端のライゲーションおよび分解を防止する

/iSpC3/内部C3スペーサー、DNAポリメラーゼによる連続複製を防止する

*3'末端の分解を防止するヌクレアーゼ耐性ホスホロチオエート結合

【表 2】

表 2. ヘアピンまたは線状 5'アダプターの存在下でライゲーションカップルド PCR 方法によって調製された NGS ライブラリーの収量の定量化

30

40

50

ライゲーション/PCR 反応条件	量子ビット (ng/μl)	Agilent バイオアナライザーによっ て定量化された平均モル濃度 (nM)
複製不可能スペーサーを有するト ランケーションされたヘアピン 5'アダ プター	5.58	29.35
	5.54	
ランケーションされた線状 5'アダプ ター	3.75	15.75
	3.34	
ライゲーション後に添加したインデ キシングプライマー	5.23	27.35
	4.94	

【表 3】

表 3. 異なるプライマーブロッカーの存在下でライゲーションカップルド PCR 方法によって調製された NGS ライブラリーの収量の定量化

ライゲーション/PCR 反応条件	量子ビット (ng/μl)	Agilent バイオアナライザーによ って定量化された平均モル濃 度(nM)
ブロッカーなし	1.47	6.58
	1.58	
ブロッカー_1 (19-356)	5.98	28.84
	5.67	
ブロッカー_2 (19-357)	3.8	16.26
	3.7	
ブロッカー_3 (19-352)	3.84	16.93
	4.03	
ブロッカー_4 (19-353)	3.67	16.12
	3.65	
ブロッカー_5 (19-354)	3.62	15.95
	3.5	
ライゲーション後に添加したインデ キシングプライマー	5.23	27.35
	4.94	

10

20

【表 4】

表 4. 3'アダプターを T または U オーバーハングと使用したときのライゲーションカップルド PCR 方法によ
って調製された NGS ライブラリーの収量の定量化

NGS ライブラ リー	スキーム	DNA 投入 (ng)	Agilent バイオアナライザ ーによって定量化された モル濃度(nM)
ライブラリーブ レップ A	3'アダプターの T オーバーハングによる ライゲーションおよび続くヘアピン 5'アダ プターおよびトランケーションされたイン デキシングプライマーによるライゲージョ ンカップルド PCR	50	9.3
			9
		100	17.5
			15.4
		250	32
			31.7
ライブラリーブ レップ B	3'アダプターの U オーバーハングによる ライゲーションおよび続くヘアピン 5'アダ プターおよびトランケーションされたイン デキシングプライマーによるライゲージョ ンカップルド PCR	50	6.7
			6.7
		100	12.8
			11.3
		250	26.4
			25

30

40

50

【表 5】

表 5. 3'アダプターを T または U オーバーハングと使用したときのライゲーションカップルド PCR 方法によって調製した NGS ライブラリーのシーケンシング測定法

NGS ライブラリー	DNA 投入 (ng)	推定されたライブラリーサイズ	平均の整列した挿入断片	%キメラ	%2 反復	%整列したリード
ライブラリープレップ A	50	1,210,601,387	200	1.6	0.08	99.6
		1,057,670,303	200	1.7	0.08	99.6
	100	1,208,874,574	203	2.7	0.07	99.5
		1,031,607,179	199	2.6	0.08	99.5
	250	907,367,064	199	6.8	0.09	99.4
		965,921,523	202	8.5	0.09	99.2
ライブラリープレップ B	50	939,292,885	201	1.5	0.08	99.6
		951,672,989	201	1.7	0.08	99.6
	100	945,015,752	206	2.4	0.09	99.5
		926,181,356	201	2.9	0.08	99.5
	250	841,055,892	205	7.3	0.1	99.2
		743,955,829	204	7.6	0.12	99.1

10

【表 6】

表 6. 3'アダプターを T オーバーハングとピコグラム DNA 投入範囲で使用したときのライゲーションカップルド PCR 方法によって調製された NGS ライブラリーの収量の定量化

試料番号	DNA 投入 (pg)	PCR サイクル数	モル濃度 (nM)	平均サイズ (bp)
1	100	12	4	373
2			4.42	380
3	6.6	17	10.6	379
4			7.4	385
5	3.3	17	6.2	375
6			6.2	377

30

40

50

【表 7】

表 7. 3'アダプターを T オーバーハングとフェムトグラム DNA 投入範囲で使用したときのライゲーションカップルド

PCR 方法によって調製された NGS ライブラリーの収量の定量化

試料番号	DNA 投入 (fg)	スパイクと して添加さ れた担体 ssDNA (pg)	PCR サイ クル数	量子ビット (ng/ul)	平均サイズ (bp)
1	3,300	3.3	17	1.2	380
2		0		1.4	384
3	300	3.3	21	30.5	416
4		0		24.4	411
5	30	3.3	24	23.6	420
6		0		21	409
7	3	3.3	27	24.3	517
8		0		23.9	495
9	0.3	3.3	30	25	497
10		0		20	509

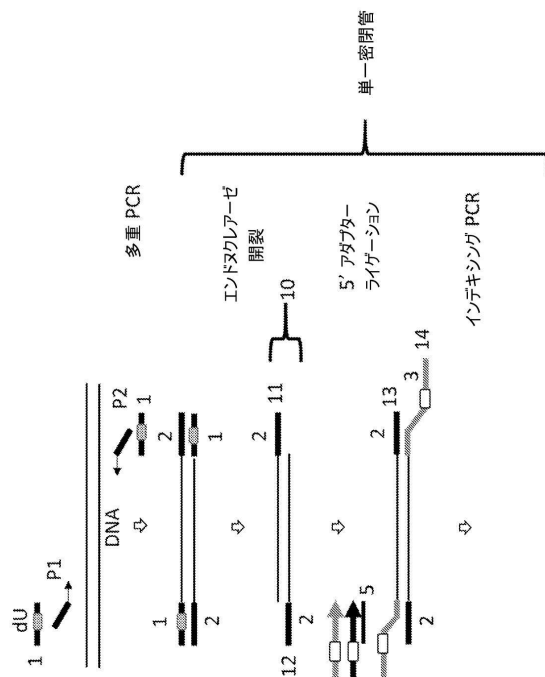
10

20

【図面】

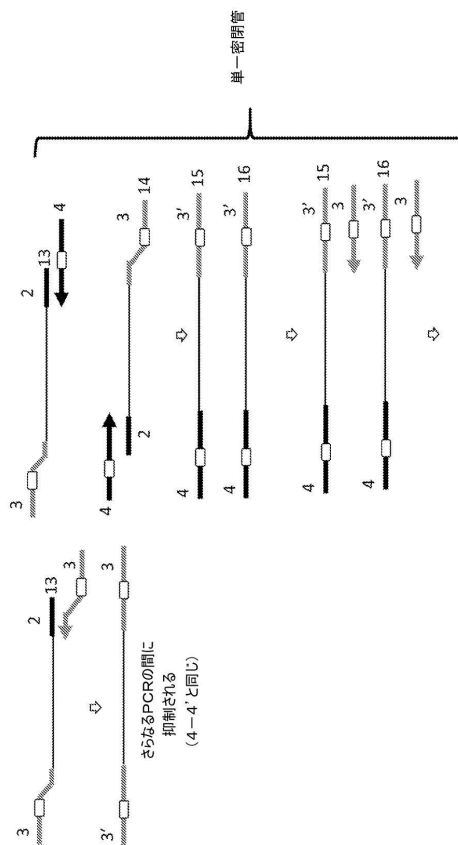
【図 1 A - 1】

Fig. 1A



【図 1 A - 2】

Fig. 1A (続き)

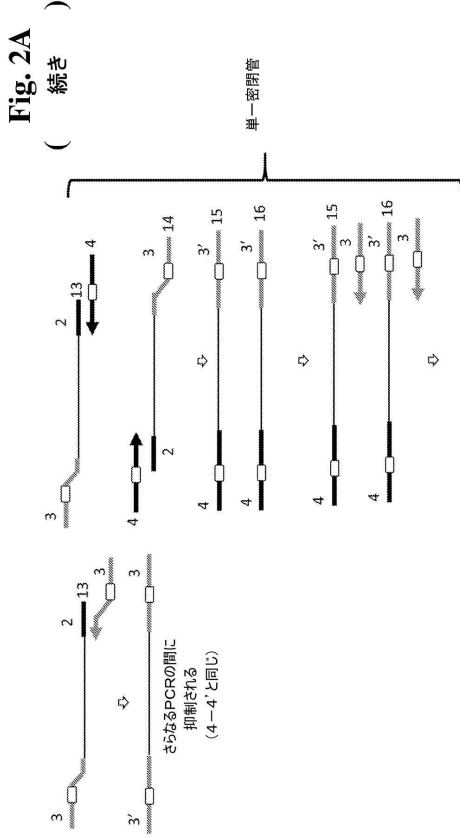


30

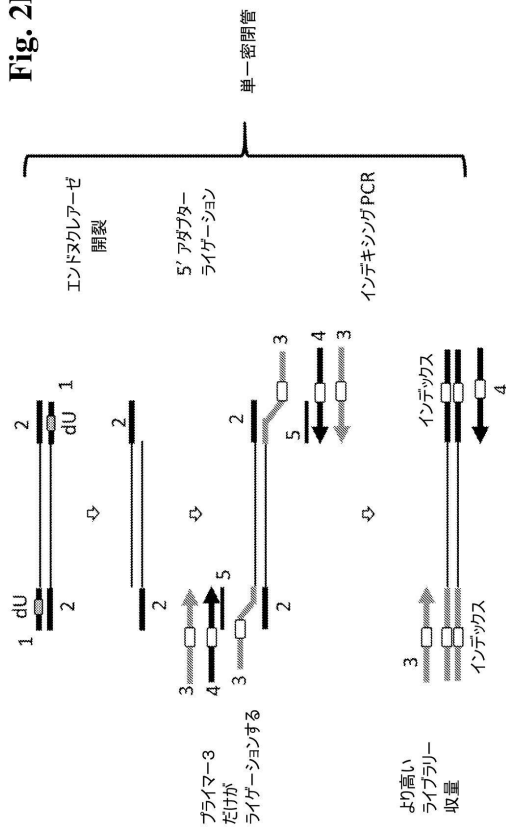
40

50

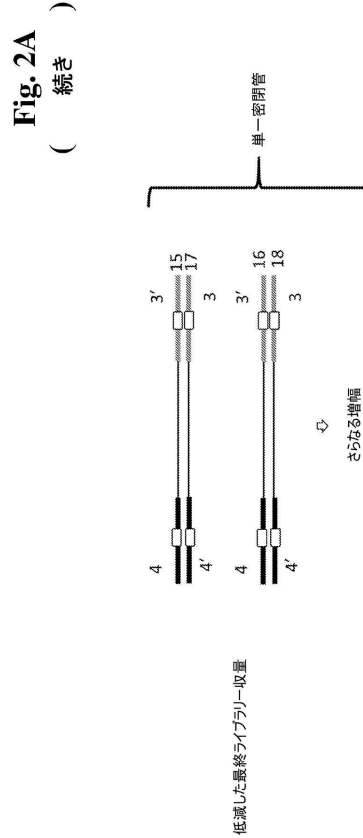
【図 2 A - 2】



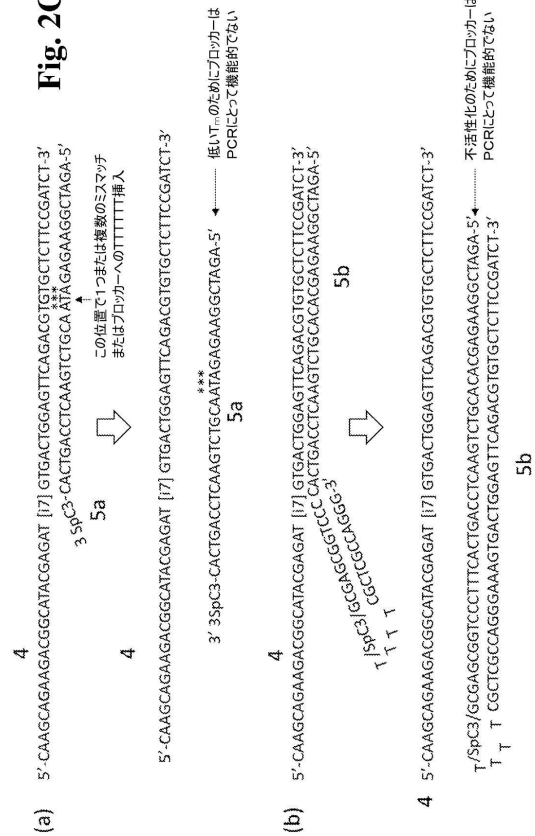
【図 2 B】



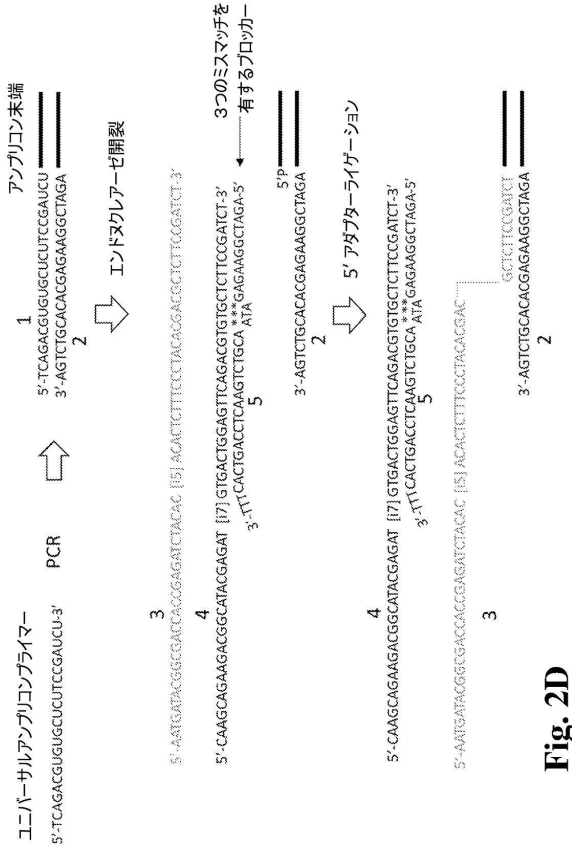
【図 2 A - 3】



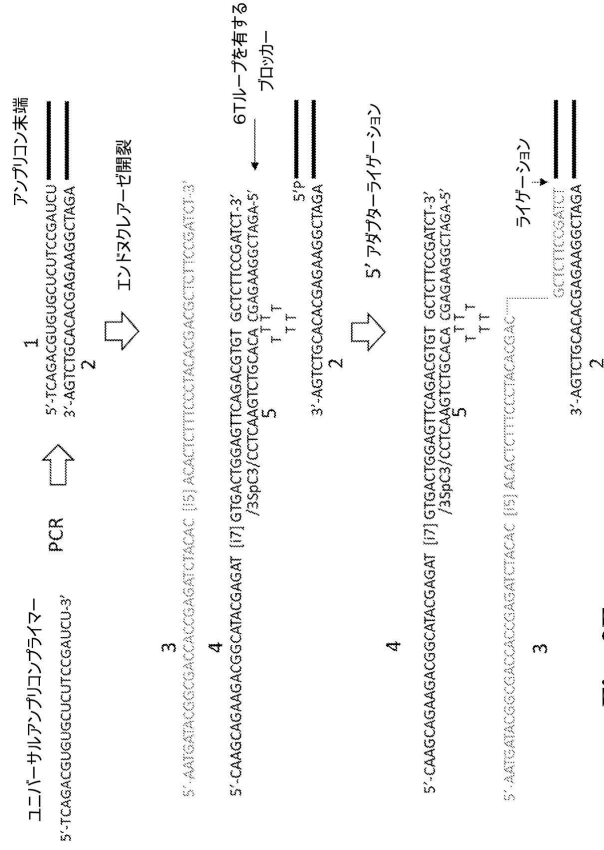
【図 2 C】



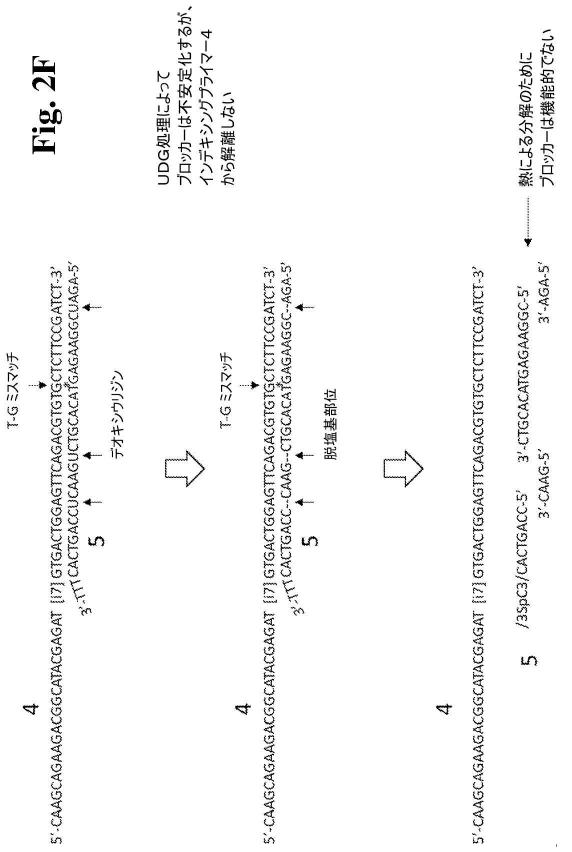
【図 2 D】



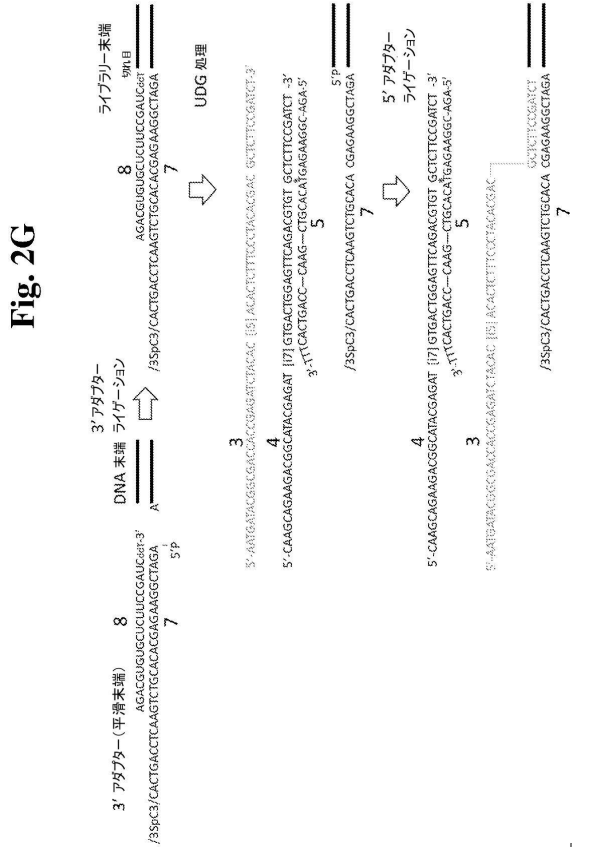
【図 2 E】



【図 2 F】



【図 2 G】



【図 2 F】



【図 2 G】



Fig. 3I

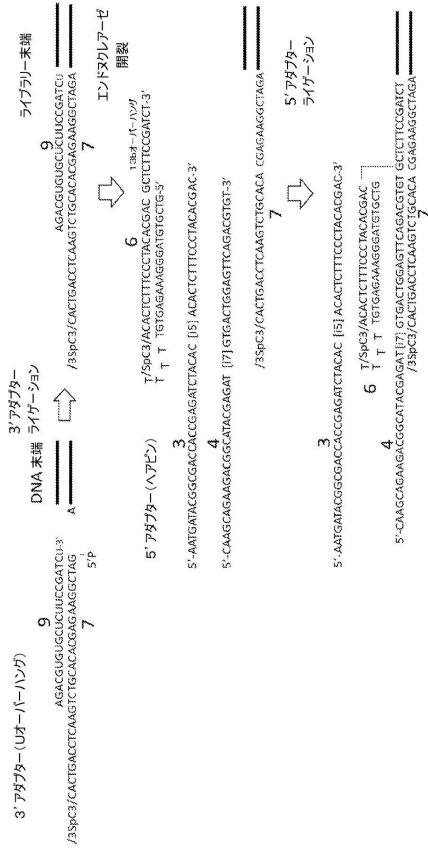
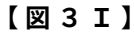


Fig. 3J

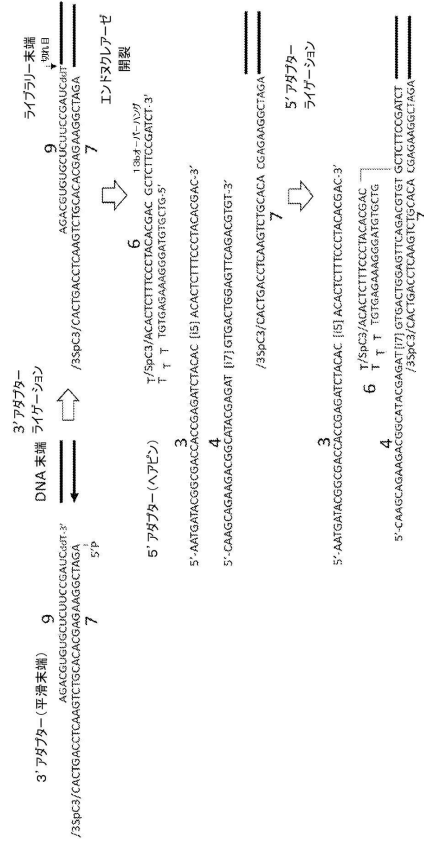
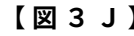


Fig. 3K

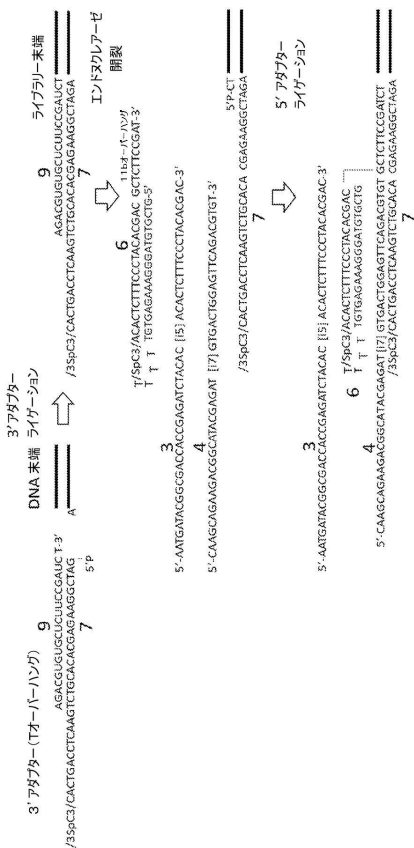
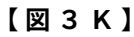
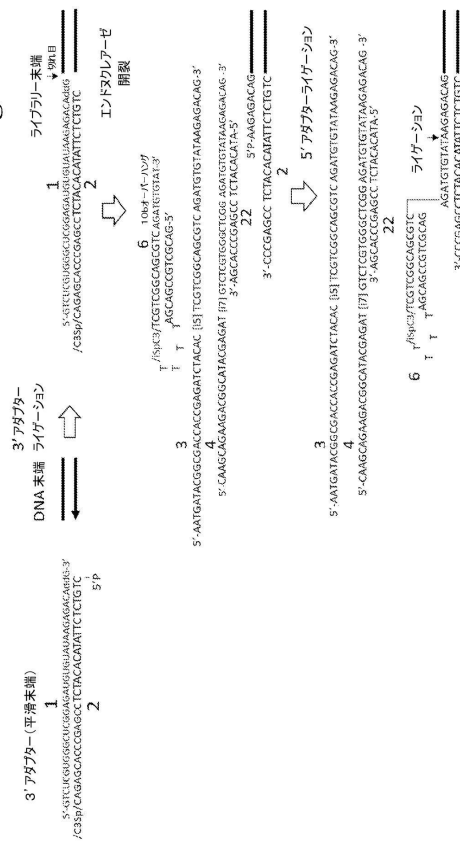
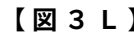
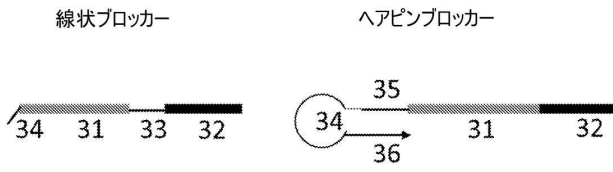


Fig. 3L



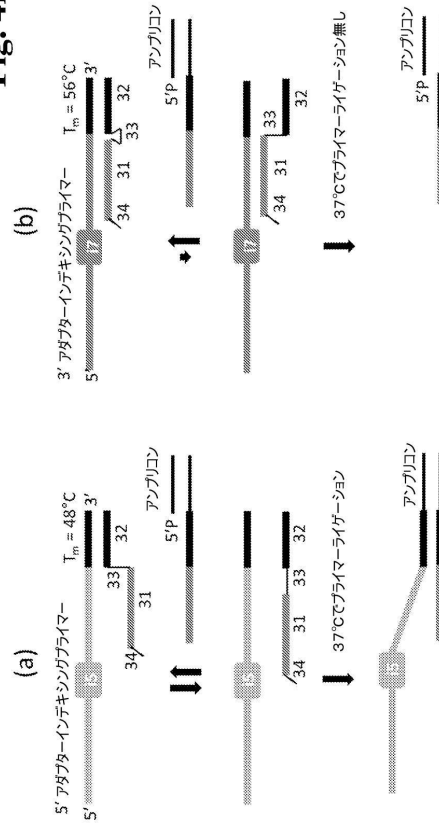
【図 4 A】

Fig. 4A



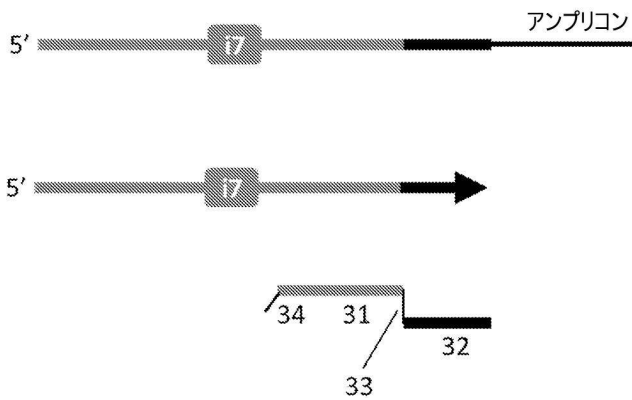
【図 4 B】

Fig. 4B



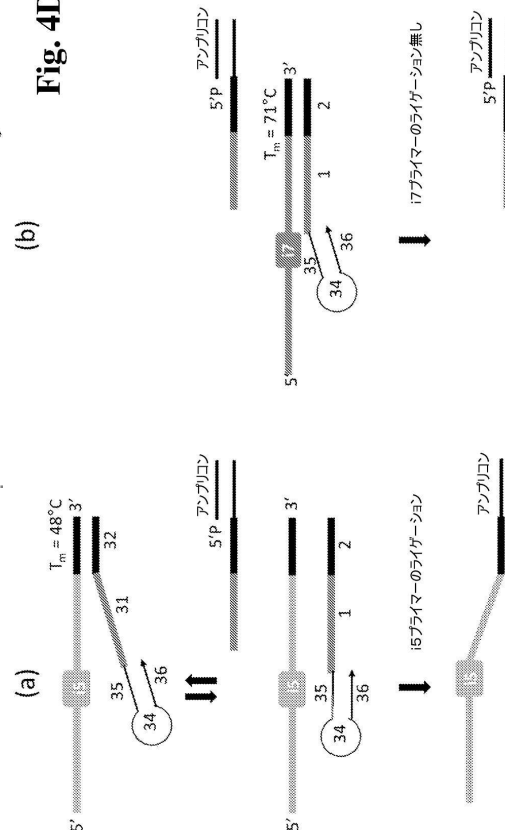
【図 4 C】

Fig. 4C



【図 4 D】

Fig. 4D



10

20

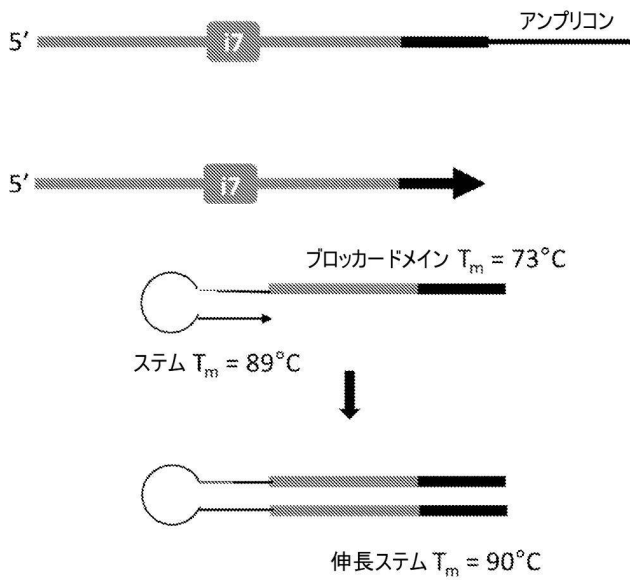
30

40

50

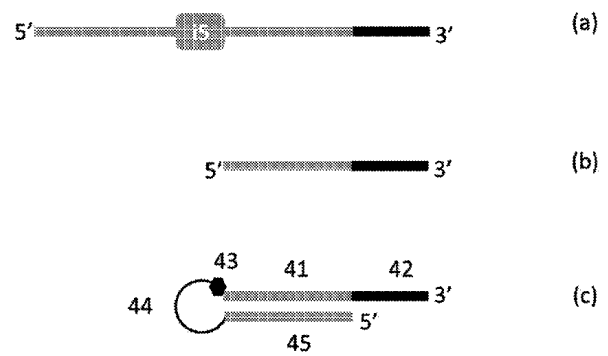
【図 4 E】

Fig. 4E



【図 5 A】

Fig. 5A

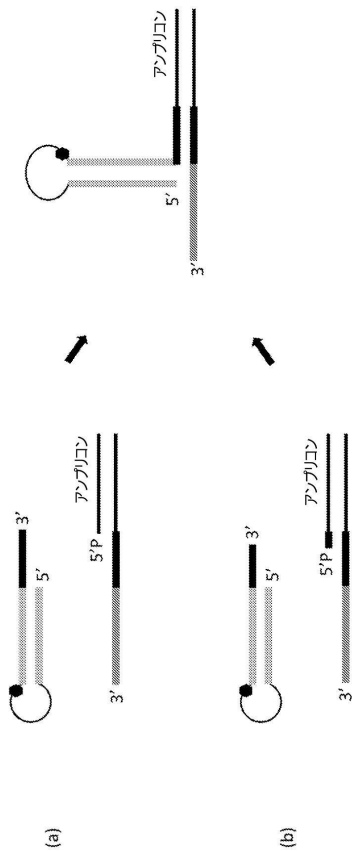


10

20

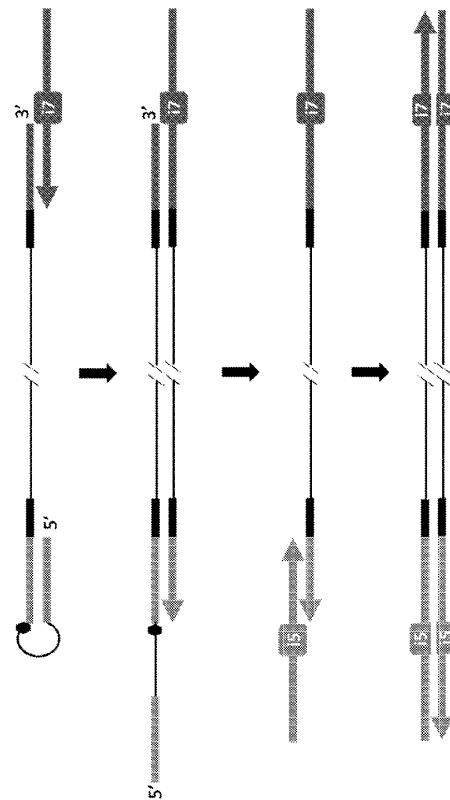
【図 5 B】

Fig. 5B



【図 5 C】

Fig. 5C



30

40

50

Fig. 6C

【図 6 C】

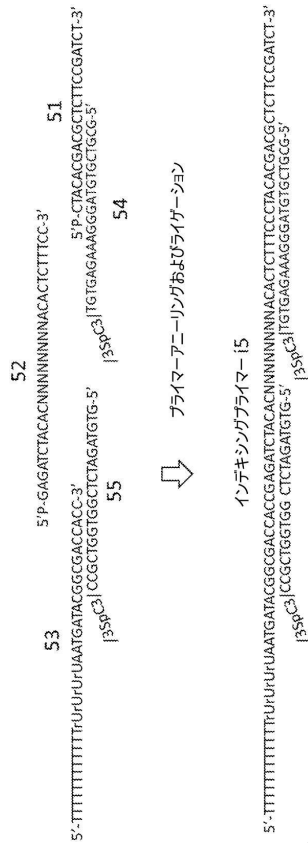


Fig. 6A

【図 6 A】

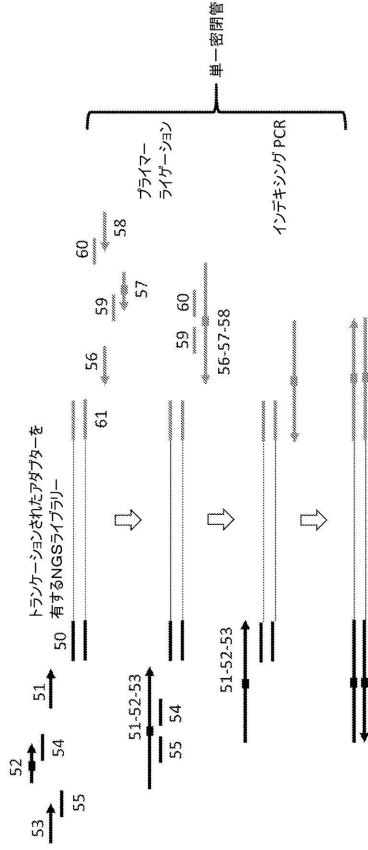


Fig. 6D

【図 6 D】

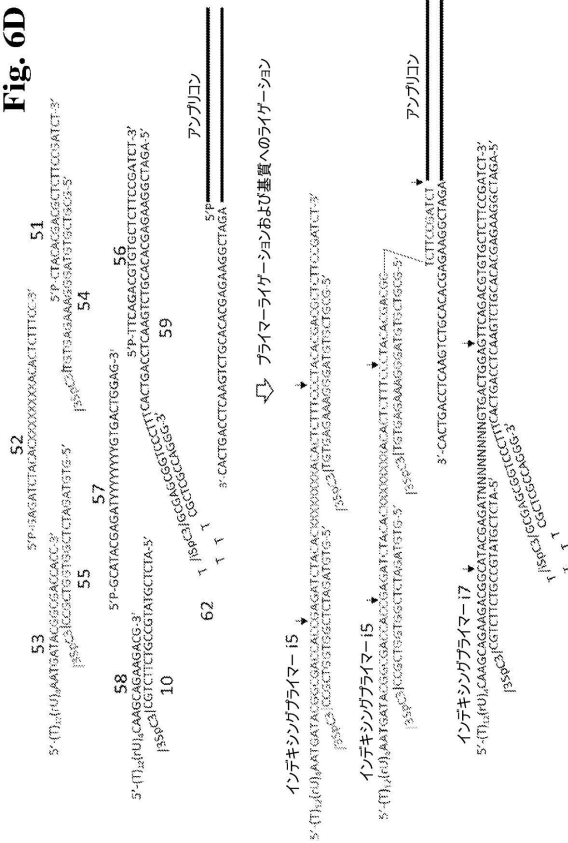
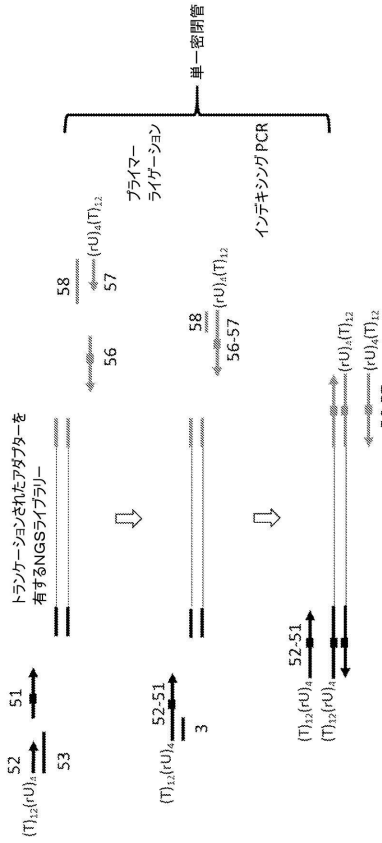


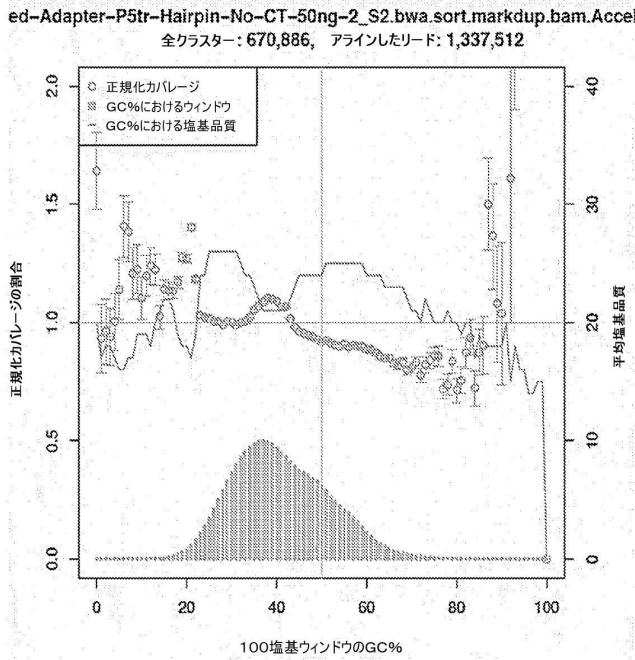
Fig. 6B

【図 6 B】



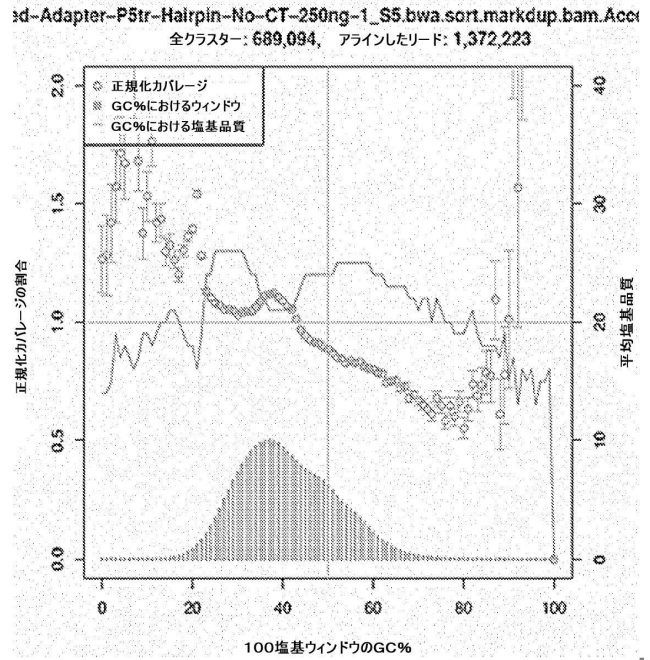
【図 10B】

Fig. 10B



【図 10C】

Fig. 10C

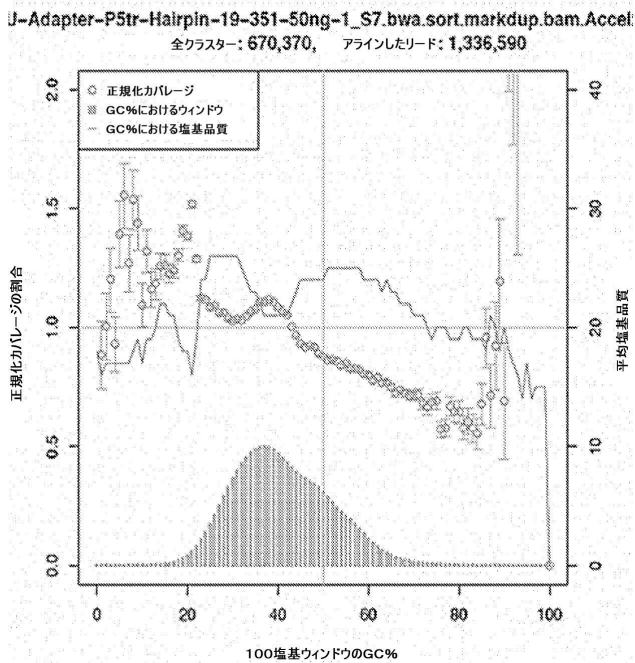


10

20

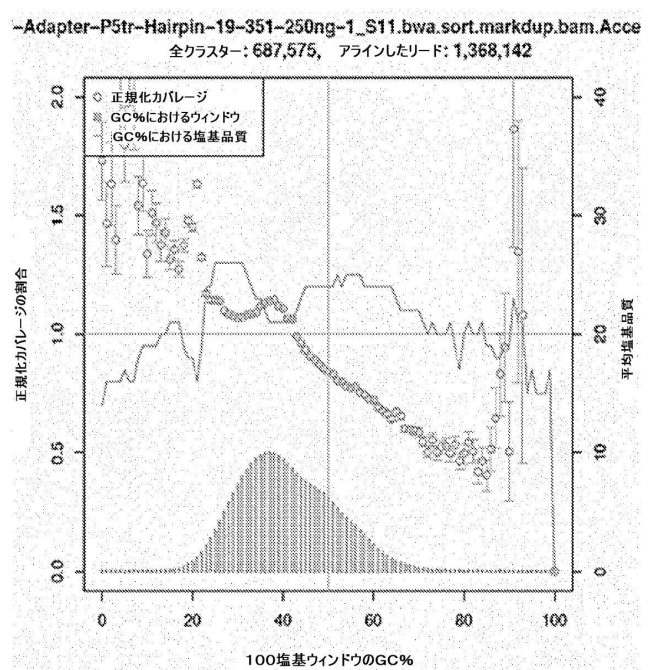
【図 10D】

Fig. 10D



【図 10E】

Fig. 10E



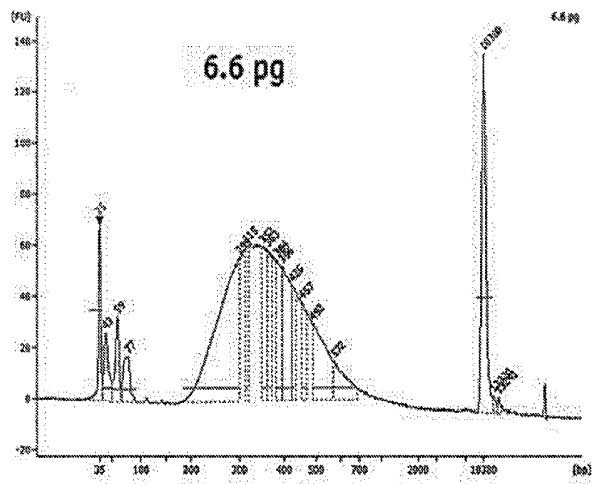
30

40

50

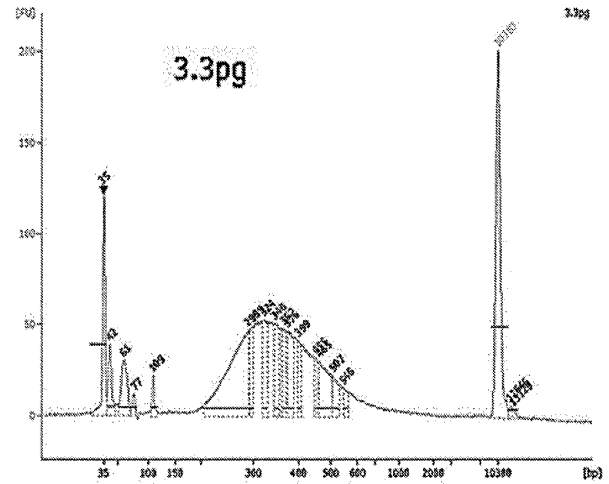
【図 1 1 A】

Fig. 11A



【図 1 1 B】

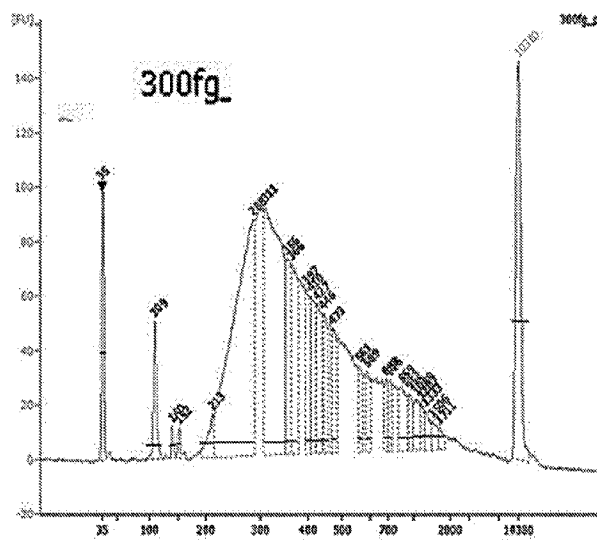
Fig. 11B



10

【図 1 1 C】

Fig. 11C



20

30

【配列表】

202352588000001.app

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/32824

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C12P 19/34, C12N 15/10, C12Q 1/6855 (2021.01) CPC - C12P 19/34, C12Q 1/6855, C12Q 1/6806, C12Q 1/6853, C12Q 1/686		
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) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2015/0203887 A1 (TUFTS UNIVERSITY) 23 July 2015 (23.07.2015) abstract, para [0006], [0011], [0089], [0174], [0177], [0190], [0207], [0224], [0224], [0226], [0227], Fig. 1-2, Fig. 3-3	1-7, 10-23, 26, 28, 32-40, 244 ----- 8-9, 24-25, 27, 29-31, 41-57, 67-68
Y	US 2019/0085384 A1 (ILLUMINA, INC.) 21 March 2019 (21.03.2019) para [0004], [0306], [0307], SEQ ID NOs: 9-10	8-9, 57
Y	US 2019/0256924 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY et al.) 22 August 2019 (22.08.2019) para [0610], [0657], [1224]	24-25, 27, 29-31
Y	US 2020/0017907 A1 (TWIST BIOSCIENCE CORPORATION) 16 January 2020 (16.01.2020) para [0007], [0120], [0226]	41-57
Y	WO 2019/236599 A (ILLUMINA, INC. et al.) 12 December 2019 (12.12.2019) para [00376], SEQ ID Nos: 3-4	67-68
Y	WO 2020/036991 A1 (ILLUMINA, INC.) 20 February 2020 (20.02.2020) para [0073]	53-54
☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 18 October 2021		Date of mailing of the international search report NOV 10 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Kari Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/32824

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/32824

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 58-66, 69-71, 118-137, 154-167, 177-184, 186-200, 209, 211-213, 219-243, 245-252
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- see extra sheet for Box No. III Observations where unity of invention is lacking -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-57, 67-68, 244

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/32824

Continuation of:

Box No. III. Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: claims 1-57, 67-68, 244, drawn to a method for ligation-coupled polymerase chain reaction (PCR), comprising: (i) providing a partially double-stranded DNA substrate; (ii) adding a plurality of first and second indexing primers wherein each of the plurality of first indexing primers comprise a first 3' terminal portion complementary to the first common nucleotide sequence, and wherein each of the plurality of second indexing primers comprise a second 3' terminal portion complementary to the first common nucleotide sequence.

Group II: claims 72-117, drawn to a method for ligation-coupled PCR, comprising: (i) providing a partially double-stranded DNA substrate; (ii) adding a plurality of first and second indexing primers wherein each of the plurality of first indexing primers comprise a first 3' terminal portion that is not complementary to the first common nucleotide sequence, wherein each of the plurality of second indexing primers comprises a second 3' terminal portion that is not complementary to the first common nucleotide sequence.

Group III: claims 138-153, drawn to a method for ligation-coupled polymerase chain reaction (PCR), comprising: (i) providing a double-stranded DNA substrate; (ii) adding a ligase, three oligonucleotides, a first primer, a DNA polymerase and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to the double-stranded DNA substrate to yield a first reaction mixture.

Group IV: claims 168-176, 185, drawn to a method for ligation-coupled polymerase chain reaction (PCR), comprising: (i) providing a double-stranded DNA substrate; (ii) adding a ligase, six oligonucleotides, a DNA polymerase and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to the double-stranded DNA substrate to yield a first reaction mixture.

Group V: claims 201-208, 210, 214-218, drawn to kit comprising indexing primers, a ligase; and a polymerase.

The inventions listed as Groups I through V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Groups I-IV include the special technical feature of a method which differs from the special technical feature of a composition, as disclosed by Group V.

Groups I and II include the special technical feature of a partially double-stranded DNA substrate, not required by Groups III and IV.

Groups III and IV include the special technical feature of a double-stranded DNA substrate, not required by Groups I and II.

Group I includes the special technical feature wherein an indexing primer comprise a 3' terminal portion complementary to the common nucleotide sequence, not required by Group II.

Group II includes the special technical feature wherein an indexing primers comprise a 3' terminal portion that is not complementary to the common nucleotide sequence, not required by Group I.

Group III includes the special technical feature wherein a reaction mixture comprising a primer, not required by Group IV.

Group IV includes the special technical feature wherein a reaction mixture does not comprise a primer, not required by Group III.

Common Technical Features

The inventions of Groups I-V share the technical feature of indexing primers, a ligase; and a polymerase.

The inventions of Groups I-II share the technical feature of a partially double-stranded DNA substrate.

The inventions of Groups III-IV share the technical feature of a double-stranded DNA substrate.

---continued on next sheet---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/32824

Continuation of:

Box No. III. Observations where unity of invention is lacking

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art in view of US 2015/0203887 A1 to Tufts University (hereinafter "Tufts Univ").

Tufts Univ teaches (instant claim 1) a method for ligation-coupled polymerase chain reaction (PCR) (abstract, methods of amplifying nucleic acids using homopolymer-dedicated ligation.), comprising:

(i) providing a partially double-stranded DNA substrate comprising a first strand and a second strand, the partially double-stranded DNA substrate comprising a first 3' overhang, a double-stranded portion, and a second 3' overhang (abstract, The methods...comprise adding a first homopolymer of at least 12 nucleotides to each 3' end of blunt-ended double-stranded nucleic acid containing a target nucleic acid, thereby producing a partially double-stranded nucleic acid.; Fig. 1-2, the "partially double-stranded nucleic acid" after step 3),

the second strand comprising, in a 5' to 3' direction: a second 5' end, a third portion, and a fourth portion of the partially double-stranded DNA substrate (Fig. 1-2, the "partially double-stranded nucleic acid" after step 3),

wherein the first portion of the first strand and the third portion of the second strand are complementary and form the double-stranded portion (Fig. 1-2, the "partially double-stranded nucleic acid" after step 3.; the "NNNNNNNN" of the first strand is complementary to the "NNNNNNNN" of the second strand.),

wherein the second portion of the first strand forms the first 3' overhang (Fig. 1-2, the "partially double-stranded nucleic acid" after step 3.; the 19 "C" residues is the 3' overhang.),

wherein the fourth portion of the second strand forms the second 3' overhang (Fig. 1-2, the "partially double-stranded nucleic acid" after step 3.; the 19 "C" residues is the 3' overhang.),

wherein the second portion of the first strand and the fourth portion of the second strand each comprise a first common nucleotide sequence positioned at a 5' end of the first 3' overhang and the second 3' overhang, respectively (Fig. 1-2, the "partially double-stranded nucleic acid" after step 3.; the first 7 "C" residues is the common nucleotide), and

wherein the second portion of the first strand and the fourth portion of the second strand each comprise a second common nucleotide sequence positioned 3' to the first common nucleotide sequence (Fig. 1-2, the "partially double-stranded nucleic acid" after step 3.; the second 12 "C" residues is the common nucleotide);

(ii) adding a plurality of first indexing primers, a plurality of second indexing primers, a ligase, a DNA polymerase and deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) to the partially double stranded DNA substrate to yield a first reaction mixture (para [0177], provided herein are methods that include adding a first homopolymer of at least 12 nucleotides to the 3' end of a linear single-stranded nucleic acid containing a target nucleic acid, adding a first oligonucleotide to the 5' end of the linear single-stranded nucleic acid; and amplifying the target nucleic acid by polymerase chain reaction using a first primer and a second primer.), wherein each of the plurality of first indexing primers comprise a first 3' terminal portion complementary to the first common nucleotide sequence, and wherein each of the plurality of second indexing primers comprise a second 3' terminal portion complementary to the first common nucleotide sequence (Fig. 1-2, the "nucleic acid" after step 4. the index primer is "X-dG7") and a first 5' portion positioned 5' to the second 3' terminal portion and complementary to the second common nucleotide sequence (Fig. 1-2, the "nucleic acid" after step 5. the index primer is "Y-dG16");

(iii) incubating the first reaction mixture under a first set of conditions comprising a ligation duration, wherein the first set of conditions is sufficient:

a) for the first 3' terminal portion to anneal to the first common nucleotide sequence (Fig. 1-2, Step 4, "Anneal and ligate chimeric oligonucleotide X-dG7 to 5' end using T4 DNA ligase or other ligase, where X can be any defined sequence."), and

b) for the ligase to ligate one of the plurality of first indexing primers to the first 5' end of the first strand and one of the plurality of first indexing primers to the second 5' end of the second strand to yield a second reaction mixture (Fig. 1-2, Step 4, "Anneal and ligate chimeric oligonucleotide X-dG7 to 5' end using T4 DNA ligase or other ligase, where X can be any defined sequence.") comprising:

a third strand comprising, in a 5' to 3' direction, one of the plurality of first indexing primers, the first portion, and the second portion, and a fourth strand comprising, in a 5' to 3' direction, one of the plurality of first indexing primers, the third portion, and the fourth portion (see Fig. 3-3, final product);

(iv) incubating the second reaction mixture under a second set of conditions comprising a first denaturation temperature for a first denaturation duration, a first annealing temperature for a first annealing duration, and a first extension temperature for a first extension duration, wherein the second set of conditions is sufficient (para [0174]. In Step 5, the nucleic acid is amplified by polymerase chain reaction (PCR).):

a) to inactivate the ligase, denature double-stranded DNA, and, optionally, to activate the DNA polymerase (para [0174]. In Step 5, the nucleic acid is amplified by polymerase chain reaction (PCR).),

b) for the second 3' terminal portion and the first 5' portion of one of the plurality of second indexing primers to anneal to at least the first common nucleotide sequence and the second common nucleotide sequence of the second portion of the third strand and for the second 3' terminal portion and the first 5' portion of one of the plurality of second indexing primers to anneal to at least the first common nucleotide sequence and the second common nucleotide sequence of the fourth portion of the fourth strand (Fig. 1-2, X-dG7 and Y-dG16 in step 5) and

c) for the DNA polymerase to extend the one of the plurality of second indexing primers annealed to the first common nucleotide sequence and second common nucleotide sequence of the second portion of the third strand and for the DNA polymerase to extend the one of the plurality of second indexing primers annealed to the first common nucleotide sequence and second common nucleotide sequence of the fourth portion of the fourth strand, to yield a third reaction mixture comprising the third strand, the fourth strand, a fifth strand, and a sixth strand, the fifth strand comprising, in a 5' to 3' direction, one of the plurality of second indexing primers, the third portion, and a reverse complement of one of the plurality of first indexing primers, the sixth strand comprising, in a 5' to 3' direction, one of the plurality of second indexing primers, the first portion, and the reverse complement of one of the plurality of first indexing primers (Fig. 1-2, X-dG7 and Y-dG16 in step 5.; Step 5 "PCR amplify using chimeric oligonucleotide primers X-dG7 and Y-dG16, wherein Y' is the complement of Y and X and Y can be any defined sequence.").

---continued on next sheet---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/32824

Continuation of:

Box No. III. Observations where unity of invention is lacking

Tufts Univ does not specifically teach: does not specifically teach:

(v) incubating the third reaction mixture under a third set of conditions comprising a second denaturation temperature for a second denaturation duration, a second annealing temperature for a second annealing duration, and a second extension temperature for a second extension duration, wherein the third set of conditions is sufficient

a) to denature double-stranded DNA,

b) for one of the plurality of first indexing primers to anneal to the reverse complement of one of the plurality of first indexing primers of the fifth strand and for one of the plurality of first indexing primers to anneal to the reverse complement of one of the plurality of first indexing primers of the sixth strand, and

c) for the DNA polymerase to extend the one of the plurality of first indexing primers annealed to the reverse complement of one of the plurality of first indexing primers of the fifth strand and the one of the plurality of first indexing primers annealed to the reverse complement of one of the plurality of first indexing primers of the sixth strand, to yield a fourth reaction mixture comprising the fifth strand, the sixth strand, a seventh strand, and an eighth strand,

the seventh strand comprising, in a 5' to 3' direction, one of the plurality of first indexing primers, the first portion, and a reverse complement of one of the plurality of second indexing primers, the eighth strand comprising, in a 5' to 3' direction, one of the plurality of first indexing primers, the third portion, and the reverse complement of one of the plurality of second indexing primers,

wherein the seventh strand is complementary to the fifth strand, and wherein the eighth strand is complementary to the sixth strand; and (vi) incubating the fourth reaction mixture under a fourth set of conditions comprising a third denaturation temperature for a third denaturation duration, a third annealing temperature for a third annealing duration, and a third extension temperature for a third extension duration,

wherein the fourth set of conditions is sufficient for at least a portion of the plurality of first indexing primers and at least a portion of the plurality of second indexing primers to amplify the fifth strand and seventh strand and the sixth strand and eighth strand.

However, since Tufts Univ further teaches that the nucleic acid is amplified by PCR (para [0174], In Step 5, the nucleic acid is amplified by polymerase chain reaction (PCR).), it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to have recognized that continued cycles of polymerase chain reaction would have generated additional nucleic acid strands as disclosed in (v) and (vi) in routine process.

Lazinski further teaches a double-stranded DNA substrate (para [0179], In some embodiments, a nucleic acid may be single stranded, double-stranded, or partially double-stranded.).

As said technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I through V therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued):

Claims 58-66, 69-71, 118-137, 154-167, 177-184, 186-200, 209, 211-213, 219-243, 245-252 are improper multiple dependent claims because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

NOTE: Claims 252 is self-dependent. For the purposes of this application, claim 252 is construed as though depending from claim 251.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	9/88 (2006.01)	C 1 2 N	9/88
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10
C 1 2 N	9/14 (2006.01)	C 1 2 N	9/14

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,N
E,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁護士 山本 健策

(72)発明者 マカロフ, ブラディミル

アメリカ合衆国 ミシガン 4 8 1 0 8, アナーバー, ポンド ショア ドライブ 1 6 0 1

(72)発明者 ローズフィグラ, ジョーダン

アメリカ合衆国 ミシガン 4 8 1 0 4, アナーバー, キング ジョージ ブールバード 1 5 0 1

(72)発明者 ラハン, ビタ

アメリカ合衆国 ミシガン 4 8 1 0 5, アナーバー, ティビッツ コート 2 0 0 9

(72)発明者 ステットフェルド, ロバート ディー.

アメリカ合衆国 ミシガン 4 8 1 0 3, アナーバー, エス. ワグナー ロード 6 7 4

F ターム (参考) 4B050 LL03

4B063 QA13 QQ42 QR08 QR14 QR20 QR62 QS25