

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-142233

(P2010-142233A)

(43) 公開日 平成22年7月1日(2010.7.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A Z	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B O 6 3
G O 1 N 37/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	
	G O 1 N 37/00 1 O 1	
審査請求 有 請求項の数 72 O L (全 131 頁)		

(21) 出願番号	特願2009-297745 (P2009-297745)	(71) 出願人	505286730
(22) 出願日	平成21年12月28日 (2009.12.28)		4 5 4 コーポレーション
(62) 分割の表示	特願2006-532273 (P2006-532273) の分割		アメリカ合衆国 コネチカット州 ブラン フォード コマーシャル ストリート 2 O
原出願日	平成16年1月28日 (2004.1.28)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	60/443, 471		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成15年1月29日 (2003.1.29)	(74) 代理人	100128048
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新見 浩一
(31) 優先権主張番号	60/465, 071	(72) 発明者	リーモン ジョン エイチ.
(32) 優先日	平成15年4月23日 (2003.4.23)		アメリカ合衆国 コネチカット州 ギルフ ォード ノートンタウン ロード 2 5 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ローマン ケントン
(31) 優先権主張番号	60/476, 602		アメリカ合衆国 コネチカット州 ギルフ ォード スクールサイド レーン 4 2 5
(32) 優先日	平成15年6月6日 (2003.6.6)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 核酸を増幅および配列決定する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ゲノム配列決定のような迅速DNA配列決定を行うための装置および方法を提供する。

【解決手段】大きなテンプレート核酸分子を断片化して、複数の断片化核酸を産出する工程；断片化核酸を油中水型エマルジョン中の水性マイクロリアクター中に送達する工程；マイクロリアクター中の断片化核酸を増幅して、該核酸の増幅コピーを形成し、増幅コピーをマイクロリアクター中のビーズに結合させる工程；ビーズを、平坦表面上の少なくとも10,000個の反応チャンバーのアレイに送達する工程であって、複数の反応チャンバーが、単一のビーズのみを含む、工程；および複数の反応チャンバーにおいて配列決定反応を同時に実行する工程を含む、核酸の配列を決定する方法、および装置。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

- (a) 大きなテンプレート核酸分子を断片化して、複数の断片化核酸を産出する工程；
- (b) 複数の水性マイクロリアクターが、断片化核酸の単一コピー、断片化核酸に結合することができる単一のビーズ、および核酸増幅を行うのに必要な試薬を含む増幅反応溶液を含むように、断片化核酸を油中水型エマルジョン中の水性マイクロリアクター中に送達する工程；
- (c) マイクロリアクター中の断片化核酸を増幅して、該核酸の増幅コピーを形成し、増幅コピーをマイクロリアクター中のビーズに結合させる工程；
- (d) ビーズを、平坦表面上の少なくとも10,000個の反応チャンバーのアレイに送達する工程であって、複数の反応チャンバーが、単一のビーズのみを含む、工程；および
- (e) 複数の反応チャンバーにおいて配列決定反応を同時に実行する工程を含む、核酸の配列を決定する方法。

10

【請求項2】

反応チャンバーの中心間間隔が20～100 μm である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

断片化核酸が30～500塩基である、請求項1記載の方法。

【請求項4】

複数のビーズが、少なくとも10,000個の増幅コピーを結合する、請求項1記載の方法。

【請求項5】

20

工程(c)がポリメラーゼ連鎖反応を用いることにより達成される、請求項1記載の方法。

【請求項6】

配列決定反応がピロリン酸に基づく配列決定反応である、請求項1記載の方法。

【請求項7】

配列決定反応が、

- (a) 有効量の配列決定プライマーを核酸の増幅コピーにアニーリングし、ポリメラーゼおよび所定のヌクレオチド三リン酸を用いて配列決定プライマーを伸長して配列決定産物を産生し、かつ所定のヌクレオチド三リン酸が該配列決定プライマーの3'末端に組み込まれる場合は、配列決定反応副産物を産生する工程；および

30

(b) 配列決定反応副産物を同定し、それにより複数の反応チャンバー中における核酸の配列を決定する工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項8】

配列決定反応が、

- (a) 複数の配列決定プライマーを、一つまたは複数の核酸分子一本鎖にハイブリダイズさせる工程であって、一つを除いて全てのプライマーが可逆的に遮断されたプライマーである工程；

(b) 少なくとも一つの塩基を、非遮断プライマーからのポリメラーゼ伸長により核酸分子に組み込む工程；

40

(c) 該非遮断プライマーのさらなる伸長を防止する工程；

(d) 可逆的に遮断されたプライマーの一つを脱遮断して非遮断プライマーにする工程；および

(e) 少なくとも一つの可逆的遮断プライマーが脱遮断され配列の決定に用いられるまで工程(b)～(d)を繰り返す工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項9】

反応チャンバーが、光ファイバー束の一端をエッチングすることにより形成された空洞である、請求項1記載の方法。

【請求項10】

50

複数の空洞を上にも有する平坦表面を含むアレイであって、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、反応チャンバーは20～100 μm の中心間隔を有し、各空洞は少なくとも一つの寸法において20 μm ～70 μm であり、少なくとも10,000個の反応チャンバーが存在する、アレイ。

【請求項 1 1】

複数の反応チャンバーが、単一種の一本鎖核酸テンプレートを含み、請求項10記載のアレイ。

【請求項 1 2】

一本鎖核酸テンプレートが、反応チャンバー内に配置された可動性固体支持体上で固定されている、請求項11記載のアレイ。

10

【請求項 1 3】

中心間隔が40～60 μm である、請求項10記載のアレイ。

【請求項 1 4】

各空洞の深さが20 μm ～60 μm である、請求項10記載のアレイ。

【請求項 1 5】

平坦頂部表面と平坦底部表面とを含むアレイであって、平坦頂部表面はその上に少なくとも10,000個の空洞を有し、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、平坦底部表面は反応チャンバーからの光学的シグナルを底部平坦表面を通して検出することができるように光学的に伝導性であり、頂部表面と底部表面との間の距離が5mmを超えず、反応チャンバーは20～100 μm の中心間隔を有し、各チャンバーの幅は少なくとも一つの寸法において20 μm ～70 μm である、アレイ。

20

【請求項 1 6】

頂部表面と底部表面との間の距離が2mmを超えない、請求項15記載のアレイ。

【請求項 1 7】

空洞の数が50,000を超える、請求項10または15記載のアレイ。

【請求項 1 8】

空洞の数が100,000を超える、請求項10または15記載のアレイ。

【請求項 1 9】

各反応チャンバーの形状が実質的に六角形である、請求項10または15記載のアレイ。

【請求項 2 0】

各空洞が少なくとも一つの不規則な壁面を有する、請求項10または15記載のアレイ。

30

【請求項 2 1】

アレイが溶融光ファイバー束内に形成される、請求項10または15記載のアレイ。

【請求項 2 2】

各空洞が平滑壁面を有する、請求項10または15記載のアレイ。

【請求項 2 3】

光ファイバー束の一端をエッチングすることにより空洞が形成される、請求項10または15記載のアレイ。

【請求項 2 4】

各空洞が核酸またはタンパク質を分析するための試薬を含む、請求項10または15記載のアレイ。

40

【請求項 2 5】

アレイ上に流動チャンバーが形成されるように平坦アレイから間隔を空けられ、かつそれと対向して接している第二の表面をさらに含む、請求項10または15記載のアレイ。

【請求項 2 6】

水性環境中において別々の平行共通反応を行うためのアレイ手段であって、該アレイ手段が、試薬と反応することができる出発材料を含む少なくとも10,000の別個の反応チャンバーを含む基質を含み、各反応チャンバーが、少なくとも一つの試薬を含む一つまたは複数の流体が各反応チャンバー中に送達されたときに、該試薬がウェルから拡散して出る拡散時間が、出発材料が試薬と反応して産物を形成するのに必要な時間を超えるような寸法

50

にされている、アレイ手段。

【請求項 27】

各空洞が核酸またはタンパク質を分析するための試薬を含む、請求項26記載のアレイ。

【請求項 28】

反応チャンバー内に配置された可動性固体支持体の集団をさらに含み、各可動性固体支持体はそこに付着された一つまたは複数の生物活性剤を有する、請求項26記載のアレイ。

【請求項 29】

空洞が、エッチング、成形、または微細機械加工により基質中に形成される、請求項26記載のアレイ。

【請求項 30】

基質が光ファイバー束である、請求項17記載のアレイ。

【請求項 31】

反応チャンバーの少なくとも5%~20%が、少なくとも一つの試薬が上に固定された少なくとも一つの可動性固体支持体を含む、請求項10、15または26記載のアレイ。

【請求項 32】

反応チャンバーの少なくとも20%~60%が、少なくとも一つの試薬が上に固定された少なくとも一つの可動性固体支持体を有する、請求項10、15または26記載のアレイ。

【請求項 33】

反応チャンバーの少なくとも50%~100%が、少なくとも一つの試薬が上に固定された少なくとも一つの可動性固体支持体を有する、請求項10、15または26記載のアレイ。

【請求項 34】

可動性固体支持体上に固定された試薬が、スルフリラーゼ活性を有するポリペプチドである、請求項31記載のアレイ。

【請求項 35】

可動性固体支持体上に固定された試薬が、ルシフェラーゼ活性を有するポリペプチドである、請求項31記載のアレイ。

【請求項 36】

可動性固体支持体が、固定されたスルフリラーゼとルシフェラーゼの両方を有する、請求項31記載のアレイ。

【請求項 37】

複数の反応チャンバーが、単一種の一本鎖核酸テンプレートを少なくとも100,000コピー含む、請求項31記載のアレイ。

【請求項 38】

一本鎖核酸テンプレートが、反応チャンバー内に配置された可動性固体支持体上に固定されている、請求項31記載のアレイ。

【請求項 39】

核酸が、ピロシーケンシング反応(pyrosequencing reaction)に用いるのに適している、請求項10、15または26記載のアレイ。

【請求項 40】

生物活性剤をアレイに送達する方法であって、
各可動性固体支持体の上に少なくとも一つの試薬が固定されている複数の可動性固体支持体をアレイ上に分散させる工程を含み、該試薬は核酸配列決定反応での使用に適し、該アレイは複数の反応チャンバーが上に配置された平坦表面を含み、該反応チャンバーの中心間隔は20~100 μm であり、各反応チャンバーの幅は少なくとも一つの寸法において20 μm ~70 μm である、方法。

【請求項 41】

反応が特定の部位で起こっていることを示す光について反応チャンバーのアレイを同時にモニターする装置であって、

(a) 空洞を設けた複数の表面を含む平坦基材から形成された反応チャンバーのアレイであって、空洞を設けた各表面が、分析体を含むように適合された反応チャンバーを形成

10

20

30

40

50

し、かつ反応チャンバーの中心間間隔が20~100 μm であり、各反応チャンバーの体積が10~150pLであり、10,000個を超える別々の反応チャンバーを含む、アレイ；

(b) 使用時に、特定の反応チャンバーからの光が、光学的感受性装置の特定の所定の領域に衝突するように配列された光学的感受性装置；

(c) 該所定の領域の各々に衝突する光レベルを決定するための手段；および

(d) 該反応チャンバーの各々について、該光レベルの経時変動を記録するための手段を含む装置。

【請求項42】

(a) 空洞を設けた複数の表面を一端に有する光ファイバーの第1の束から形成されるアレイであって、空洞を設けた各表面が、分析体を含むように適合された反応チャンバーを形成し、該反応チャンバーの中心間間隔が20~100 μm であり、幅が20~70 μm であり、10,000個を超える別々の反応チャンバーを含む、アレイ；

(b) 反応チャンバー内において光を発生させるための酵素的または蛍光的手段；

(c) 光捕捉手段と、光検出手段に光を伝達するための第2の光ファイバー束とを含む光検出手段であって、個々の反応チャンバー内において発生した光が、光捕捉手段に伝達するための第2の光ファイバー束の別々のファイバーまたは別々のファイバー群より捕捉されるように、第2の光ファイバー束がアレイと光学的に接触している、光検出手段を含む、分析センサー。

【請求項43】

生化学的アッセイにおける使用に適している、請求項42記載のセンサー。

【請求項44】

細胞に基づくアッセイにおける使用に適している、請求項42記載のセンサー。

【請求項45】

光捕捉手段がCCDカメラである、請求項42記載のセンサー。

【請求項46】

反応チャンバーが、生物活性剤が上に固定された一つまたは複数の可動性固体支持体を含む、請求項42記載のセンサー。

【請求項47】

水性環境中で、別々の平行共通反応を行うための方法であって、

(a) 少なくとも一つの試薬を含む流体をアレイに送達する工程であって、該アレイは、少なくとも10,000個の別々の反応チャンバーを含む基質を含み、各反応チャンバーは分析体を含むように適合されており、反応チャンバーは体積が10~150pLであり、かつ試薬と反応することができる出発材料を含み、反応チャンバーの各々は、流体が各反応チャンバー中に送達されたときに、該試薬がウェルから拡散して出る拡散時間が、出発材料が試薬と反応して産物を形成するのに必要な時間を超えるような寸法にされている、工程；および

(b) (i) 各反応チャンバーにおいて出発材料が試薬と反応して産物を形成した後であるが(ii) いずれか一つの反応チャンバーに送達された試薬が該反応チャンバーから拡散して出て他の反応チャンバーに入る前の期間に、アレイから流体を洗う工程を含む方法。

【請求項48】

いずれか一つの反応チャンバーにおいて形成された産物が、他のいずれかの反応チャンバーにおいて形成された産物から独立しているが、一つまたは複数の共通の試薬を用いて生成する、請求項47記載の方法。

【請求項49】

出発材料が核酸配列であり、流体中の少なくとも一つの試薬がヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体である、請求項47記載の方法。

【請求項50】

流体が、核酸配列とヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を反応させることができるポリメラーゼをさらに含む、請求項47記載の方法。

【請求項 5 1】

工程 (a) および (b) を順次繰り返す工程をさらに含む、請求項47記載の方法。

【請求項 5 2】

核酸配列決定酵素をアレイに送達するための方法であって、該アレイが複数の空洞を上にも有する平坦表面を有し、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間間隔が20~100 μm であり、該方法は、複数の反応チャンバーが少なくとも一つの可動性固体支持体を含むように、一つまたは複数の核酸配列決定酵素が上に固定された複数の可動性固体支持体をアレイ上に分散させる工程を含む、方法。

【請求項 5 3】

核酸配列決定酵素の一つが、スルフリラーゼ活性、ルシフェラーゼ活性またはその両方を有するポリペプチドである、請求項52記載の方法。

10

【請求項 5 4】

複数の核酸テンプレートをアレイに送達するための方法であって、該アレイが複数の空洞を上にも有する平坦表面を有し、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間間隔が20~100 μm であり、アレイは少なくとも10,000個の反応チャンバーを有し、該方法は、複数の可動性固体支持体をアレイ上に分散させる工程を含み、各可動性固体支持体は一種のみの核酸テンプレートがその上に固定されており、分散は、一つの可動性固体支持体のみをいずれか一つの反応チャンバー内へ配置させる、方法。

【請求項 5 5】

核酸配列が一本鎖核酸である、請求項54記載の方法。

20

【請求項 5 6】

単一種の核酸テンプレートの少なくとも100,000個のコピーを、複数の可動性固体支持体上に固定する、請求項54記載の方法。

【請求項 5 7】

反応チャンバー中に配置された後に、単一種の核酸テンプレートの各々をピコタイタープレート上で増幅して、ウェル1つ当たり少なくとも2,000,000個の該核酸テンプレートのコピーを生成する、請求項54記載の方法。

【請求項 5 8】

ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応および等温DNA増幅からなる群より選択される増幅技術を用いて核酸配列を増幅させる、請求項57記載の方法。

30

【請求項 5 9】

核酸の配列を決定する方法であって、

(a) 平坦表面上の複数の空洞中に配置された複数の一本鎖核酸テンプレートを提供する工程であって、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、該反応チャンバーの中心間間隔が20~100 μm であり、かつ平坦表面は少なくとも10,000個の反応チャンバーを有する、工程；

(b) 有効量の配列決定プライマーを核酸テンプレートにアニーリングし、配列決定プライマーをポリメラーゼおよび所定のヌクレオチド三リン酸を用いて伸長させて配列決定産物を産生させ、かつ所定のヌクレオチド三リン酸が該配列決定プライマーの3'末端に組み込まれる場合は、配列決定反応副産物を産生することにより、全ての反応チャンバー上においてピロリン酸に基づく配列決定反応を同時に行う工程；

40

(c) 配列決定反応副産物を同定し、それにより、各反応チャンバー中の核酸の配列を決定する工程を含む方法。

【請求項 6 0】

配列決定反応副産物がPPiであり、検出のための光を発生させるためにスルフリラーゼ/ルシフェラーゼ共役反応を用いる、請求項59記載の方法。

【請求項 6 1】

スルフリラーゼおよびルシフェラーゼのいずれかまたは両方が、各反応部位において配置された一つまたは複数の可動性固体支持体上に固定される、請求項60記載の方法。

50

【請求項 6 2】

アレイ上の複数のヌクレオチドの塩基配列を決定する方法であって、

(a) 平坦表面上の複数の空洞内に各々別々に配置された少なくとも10,000個のDNAテンプレートを提供する工程であって、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間間隔が20~100 μm であり、体積が10~150pLである、工程；

(b) 活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体をプライマー鎖の3'-末端に組みこむことができる反応条件下において、一つの既知の窒素性塩基の活性化ヌクレオチド5'-三リン酸前駆体を各反応チャンバー中の反応混合物に添加する工程であって、各反応混合物が、テンプレート依存性ヌクレオチドポリメラーゼ、および、テンプレートより少なくとも一ヌクレオチド残基短い相補性オリゴヌクレオチドプライマー鎖にハイブリダイズし、プライマー鎖の3'末端で各テンプレート中に少なくとも一つの不对ヌクレオチド残基が形成する、一本鎖ポリヌクレオチドテンプレートを含み、工程（ただし、活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の窒素性塩基は、テンプレートの不对ヌクレオチド残基の窒素性塩基に相補的である）；

(c) ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体がプライマー鎖中に組み込まれたかどうか検出する工程であって、ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の組み込みは、テンプレートの不对ヌクレオチド残基が、組み込まれたヌクレオシド5'-三リン酸前駆体に相補的な窒素性塩基組成を有することを示す、工程；ならびに

(d) 工程 (b) および (c) を順次繰り返す工程であって、各順次繰り返しが、既知の窒素性塩基組成の活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の一つの種類の組み込みを増加し、かつ検出する工程；ならびに

(e) 該ヌクレオシド前駆体の組み込みの配列から、各反応チャンバー中でテンプレートの不对ヌクレオチド残基の塩基配列を決定する工程を含む方法。

【請求項 6 3】

テンプレートDNAのDNA配列中の標的位置における塩基を同定する方法であって、

(a) 少なくとも10,000個の別々のDNAテンプレートが、平坦表面上の複数の空洞中に別々に配置され（各空洞は分析体反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間間隔は20~100 μm であり、該DNAは、反応チャンバー中に配置される前または後に一本鎖にされる）；

(b) 該標的位置に直接隣接する位置で固定化一本鎖DNAにハイブリダイズする伸長プライマーが提供され；

(c) 該固定化一本鎖DNAが、所定のデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドの存在下でポリメラーゼ反応に供され、所定のデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドが配列決定プライマーの3'末端に組み込まれると、配列決定反応副産物が形成され；かつ

(d) 配列決定反応副産物を同定し、それにより、10,000個のDNAテンプレートの各々における標的位置の塩基に相補的なヌクレオチドを決定する、方法。

【請求項 6 4】

デオキシまたはジデオキシアデノシン三リン酸（ATP）の代わりに、ポリメラーゼ用の基質として作用することができるが、該PPi-検出酵素用の基質として作用することはできないdATPまたはddATP類似体を用いる、請求項63記載の方法。

【請求項 6 5】

核酸配列を分析するための装置であって、

(a) 試薬送達キュベットであって、該キュベットが、複数の空洞を上には有する平坦表面を含むアレイを含み、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間間隔が20~100 μm であり、10,000個を超える反応チャンバーがあり、配列決定反応に用いるための試薬を含む、試薬送達キュベット；

(b) 試薬送達キュベットと連通している試薬送達手段；

(c) 試薬送達チャンバーと連通している結像システム；および

(d) 結像システムと連通しているデータ収集システムを含む装置。

【請求項 6 6】

アレイ上の複数のヌクレオチドの塩基配列を決定するための装置であって、

(a) 平坦表面上に複数の空洞を含む試薬キュベットであって、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、10,000個を超える反応チャンバーがあり、その各々の中心間間隔が20~100 μm であり、かつ体積が10~150pLである、試薬キュベット；

(b) 活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体をプライマー鎖の3'-末端に組み込むことができる反応条件下において、各反応チャンバーに一つの既知の窒素性塩基の活性化ヌクレオチド5'-三リン酸前駆体を各反応チャンバー中の反応混合物に同時に添加するための試薬送達手段であって、各反応混合物が、テンプレート依存性ヌクレオチドポリメラーゼ、および、テンプレートより少なくとも一ヌクレオチド残基短い相補性オリゴヌクレオチドプライマー鎖にハイブリダイズし、プライマー鎖の3'末端で各テンプレート中に少なくとも一つの不對ヌクレオチド残基を形成する、一本鎖ポリヌクレオチドテンプレートを含み、手段（ただし、活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の窒素性塩基は、テンプレートの不對ヌクレオチド残基の窒素性塩基に相補的である）；

(c) 各反応チャンバーにおいてヌクレオシド5'-三リン酸前駆体がプライマー鎖中に組み込まれたかどうか検出するための検出手段であって、ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の組み込みは、テンプレートの不對ヌクレオチド残基が、組み込まれたヌクレオシド5'-三リン酸前駆体に相補的な窒素性塩基組成を有することを示す、検出手段；

(d) 工程 (b) および (c) を順次繰り返すための手段であって、各順次繰り返しは、既知の窒素性塩基組成の活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の一つの種類の組み込みを増加し、かつ検出する、手段；および

(e) 該ヌクレオシド前駆体の組み込みの配列から、各反応チャンバー中で同時にテンプレートの不對ヌクレオチド残基の塩基配列を決定するための、データ処理手段を含む装置。

【請求項 6 7】

複数の分析体を処理するための装置であって、該装置は、

(a) 光ファイバー束上に空洞を設けた少なくとも50,000個の表面を含む基質が中に配置されたフローチャンバーであって、空洞を設けた各表面が、分析体を含むように適合された反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間間隔が20~100 μm であり、かつ直径が20~70 μm である、フローチャンバー；

(b) 一つまたは複数の貯蔵器からの処理試薬を、反応チャンバー中に配置された分析体が試薬に曝されるように、フローチャンバーに送達するための流体手段；および

(c) 反応チャンバーの各々からの光シグナルの配列を同時に検出するための検出手段であって、配列の各光シグナルは、処理試薬と反応チャンバー中に配置された分析体との間の相互作用を示し、検出手段が空洞を設けた表面と連通している、検出手段を含む装置。

【請求項 6 8】

検出手段がCCDカメラである、請求項67記載の装置。

【請求項 6 9】

分析体が核酸である、請求項67記載の装置。

【請求項 7 0】

分析体が、反応チャンバー中に配置された一つまたは複数の可動性固体支持体上に固定されている、請求項67記載の装置。

【請求項 7 1】

処理試薬が、一つまたは複数の可動性固体支持体上に固定されている、請求項67記載の装置。

【請求項 7 2】

核酸の配列を決定するための方法であって、

(a) 少なくとも50,000個の別々の反応部位を有するアレイ中に、複数の一本鎖核酸テンプレートを提供する工程；

(b) 核酸テンプレートを、発光と共役するピロリン酸に基づく配列決定反応を行うのに必要な試薬に接触させる工程；

(c) 光学的感受性装置のそれぞれの部分上における複数の反応部位から放出された光を検出する工程；

(d) 該光学的感受性装置の該部分の各々に衝突する光を、他の全ての反応部位からのシグナルと区別できる電気シグナルに転換する工程；

(e) 核酸テンプレートの配列を、別々の反応部位の各々についての発光に基づき。対応する電気シグナルから決定する工程を含む方法。

10

【請求項 7 3】

(a) 異なる生物学的供給源ライブラリーからの断片化核酸を固有に標識して、異なる検出可能配列標識を有する断片化核酸のライブラリーを作る工程；および

(b) 該断片化核酸の配列を決定し、標識核酸断片の各々から該検出可能配列標識を検出する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 7 4】

ライブラリーを個々に送達するか、またはライブラリーを同時に混合および送達する、請求項1記載の方法。

20

【請求項 7 5】

検出可能配列標識が、2～50塩基のオリゴヌクレオチドを含む、請求項1記載の方法。

【請求項 7 6】

核酸の配列を決定する方法であって、

(a) 大きなテンプレート核酸分子を断片化して複数の断片化核酸を生成する工程；

(b) 複数の断片化核酸の一つの鎖を個々にビーズに付着させて、個々にビーズに付着した一本鎖核酸を生成する工程；

(c) 個々にビーズに付着した一本鎖断片化核酸の集団を、平坦表面上の少なくとも10,000個の反応チャンバーのアレイに送達する工程であって、複数のウェルが、一本鎖断片化核酸を有する一つのビーズしか含まない工程；

30

(d) 複数の反応チャンバー上において配列決定反応を同時に行う工程を含む方法。

【請求項 7 7】

反応チャンバーの中心間間隔が20～100 μmである、請求項76記載の方法。

【請求項 7 8】

断片化核酸が30～500塩基である、請求項76記載の方法。

【請求項 7 9】

断片化核酸を、工程 (d) の前に反応チャンバー中で増幅する、請求項76記載の方法。

【請求項 8 0】

増幅工程がポリメラーゼ連鎖反応を用いて達成される、請求項76記載の方法。

40

【請求項 8 1】

配列決定反応がピロリン酸に基づく配列決定反応である、請求項76記載の方法。

【請求項 8 2】

配列決定反応が、

(f) 有効量の配列決定プライマーを一本鎖断片化核酸テンプレートにアニーリングし、ポリメラーゼおよび所定のヌクレオチド三リン酸を用いて配列決定プライマーを伸長して配列決定産物を産生し、かつ、所定のヌクレオチド三リン酸が該配列決定プライマーの3'末端に組み込まれる場合は、配列決定反応副産物を産生する工程；および

(g) 配列決定反応副産物を同定し、それにより複数の反応チャンバー中における核酸の配列を決定する工程

50

を含む、請求項76記載の方法。

【請求項 8 3】

配列決定反応が、

(a) 一つを除いて全てのプライマーが可逆的に遮断されたプライマーである2つ以上の配列決定プライマーを、核酸分子の一つまたは複数の一本鎖にハイブリダイズする工程；

(b) 少なくとも一つの塩基を、非遮断プライマーからのポリメラーゼ伸長により核酸分子に組み込む工程；

(c) 該非遮断プライマーのさらなる伸長を防止する工程；

(d) 可逆的に遮断されたプライマーの一つを脱遮断して非遮断プライマーにする工程；および

(e) 少なくとも一つの可逆的遮断プライマーが脱遮断され配列の決定に用いられるまで、工程 (b) ~ (d) を繰り返す工程

を含む請求項76記載の方法。

【請求項 8 4】

反応チャンバーが、光ファイバー束の一端をエッチングすることにより形成された空洞である、請求項76記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、DNAの塩基配列を決定するための方法および装置に関する。より詳しくは、本発明は、ゲノムの塩基配列を自動的または半自動的に増幅および決定することができる方法および装置に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

自動的DNAシーケンサーを利用する迅速で高感度な核酸配列決定法の開発が、近代分子生物学に急激な変化をもたらした。一連の機械および技術者のチームによる一致団結した努力により、今では植物、真菌、動物、細菌およびウイルスの全ゲノムの分析が可能である。しかしながら、短時間でゲノムを迅速かつ自動的または半自動的に配列決定することは可能でなかった。正確なサンプル調製、増幅および配列決定について依然として技術的問題があった。

【0003】

ゲノムの配列分析を妨害する一つの技術的問題は、研究者が、完全ゲノムを含む種々の核酸サンプルを短時間で迅速に調製することができないことであった。

【0004】

もう一つの技術的問題は、最近の配列決定法の感度に適合性のあるレベルまでゲノムを典型的に増幅することができないことである。最近の経済的に実現可能な配列決定機械は、感度は高いが、なお、百万を超える配列決定用のDNA断片のコピーを必要とする。DNA配列決定用の多量のコピーを提供する最近の方法は、全ゲノムを経済的に配列決定するのに必要な数（600,000以上、ヒトゲノムについては1千万）の個々のクローンを増幅することができないクローニングまたはインビトロ増幅の種々の方法を含む。

【0005】

実施することができる最近の配列決定法の制限におけるさらにもう一つの技術的問題は、オリゴヌクレオチドプライマーのハイブリダイゼーション当たりの配列決定反応がせいぜい一つであることである。配列決定プライマーのハイブリダイゼーションは、多くの場合、DNAシーケンサーの出力を抑制する律速段階である。

【0006】

大部分の場合、ポリメラーゼ連鎖反応

(PCR;Saiki,R.K.,et al.,Science 1985,230,1350-1354 (非特許文献1);Mullis,K.,et

10

20

30

40

50

al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1986, 51 Pt 1, 263-273 (非特許文献 2))

は、DNA配列情報を得、微小な量の特異的DNAを増幅させて配列決定に十分な濃度を達成するのに肝要な役割を果たす。さらに、近年の遺伝学の増加している要求を満たすために最近のPCR技術を拡張 (scaling) することは、特に全ゲノム配列決定への要求を考慮すると、費用効果的でも効率的でもない。

【0007】

時間および費用効率を最大化しようとする努力は、典型的には、2つの領域に集中されてきた。増幅に必要な反応体積の減少と、実施される同時増幅の数の増加である。小型化は、サンプルおよび試薬利用の低下、増幅時間の減少、および出力拡張能の増加という利益を与える。

10

【0008】

従来の熱サイクラーは、熱的質量の制限故に比較的長いサイクル時間を必要とするが (Woolley, A.T., et al., Anal. Chem. 1996, 68, 4081-4086 (非特許文献 3))、より小さな反応体積はより迅速に循環することができる。連続フローPCR装置は、エッチングされたマイクロチャンネルを固定温度領域と共に利用して、反応体積をサブマイクロリッターサンプルレベルまで低下させていた (Lagally, E.T., et al., Analytical Chemistry 2001, 73, 565-570 (非特許文献 4)) ; Schneegas, I., et al., Lab on a Chip-The Royal Society of Chemistry 2001, 1, 42-49 (非特許文献 5))。

【0009】

空気により加熱されたガラスマイクロ毛細管 (Kalinina, O., et al., Nucleic Acids Res. 1997, 25, 1999-2004 (非特許文献 6)) または赤外線により加熱されたガラスマイクロ毛細管 (Oda, R.P. et al., Anal. Chem. 1998, 70, 4361-4368 (非特許文献 7)) ; Huhmer, A.F. and Landers, J.P., Anal. Chem. 2000, 72, 5507-5512 (非特許文献 8)) もナノリットースケール反応のための効率的容器として機能していた。同様の反応体積が、微細加工ケイ素熱サイクラーを用いて達成された (Burns, M.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 5556-5561 (非特許文献 9))。

20

【0010】

多くの場合、これらの小型化は、合計PCR反応時間を、改変電氣的加熱要素 (modified electric heating elements) (Kopp, M.U., et al., Science 1998, 280, 1046-1048 (非特許文献 10)) ; Chiou, J., Matsudaira, P., Sonin, A. and Ehrlich, D., Anal. Chem. 2001, 73, 2018-2021 (非特許文献 11)) および熱風サイクラー (Kalinina, O., et al., Nucleic Acids Res. 1997, 25, 1999-2004 (非特許文献 6)) については30分未満に、および一部の赤外線調節反応 (Giordano, B.C., et al., Anal. Biochem. 2001, 291, 124-132 (非特許文献 12)) については240秒に減少させた。

30

【0011】

特定の技術は、反応体積を1 μ l未満に維持したSasakiら (Sasaki, N., et al., DNA Res. 1997, 4, 387-391 (非特許文献 13)) による1536ウェルシステム設計におけるように、増加した処理量および小型化を同時に用いる。もう一つの例として、Nagaiら (Nagai, H., et al., Biosens. Bioelectron. 2001, 16, 1015-1019 (非特許文献 14)) ; Nagai, H., et al., Anal. Chem. 2001, 73, 1043-1047 (非特許文献 15)) は、単一のケイ素ウエハにエッチングされた1万個の86plの反応ピット中での単一試験断片の増幅を報告した。不運なことに、これらの方法からのアンプリコンの回収および利用は問題があり、選択的透過性膜を通る蒸発を必要とする。

40

【0012】

反応体積およびサイクル時間のこれらの著しい向上にも拘わらず、先の方策のいずれも、全ヒトゲノムの分析に必要なレベルまで処理量を劇的に増加させるのに必要な大量の平行増幅を提供していない。DNAシーケンサーは処理が遅く所望されるよりも高価になり続ける。純粋な研究の設定において、シーケンサーが処理が遅く高価であることはおそらく許容される。しかし、臨床診断の設定においてDNAシーケンサーを用いることが望まれる場合、そのような非効率的配列決定法は、十分に資金のある装置についても禁止される。

50

クローニングにより増幅された数千の標的の大規模平行配列決定は、時間を消費するサンプル調製プロセスおよび高価で間違いを起しやすいくローニングプロセスを用いることなく、大規模の全ゲノムライブラリー分析を著しく容易にする。上出来な高性能固相クローンDNA増幅を、多くの用途に用いることができる。従って、配列決定用のゲノムまたは大きなテンプレート核酸を調製すること、核酸テンプレートを増幅すること、および、ハイブリダイゼーション当たり配列決定反応が一つに制約されることなく、増幅されたテンプレート核酸の配列を決定することの必要が存在することが明らかである。さらに、これらの種々の技術を多様な自動的または半自動的配列決定機械に組み合わせるシステムが必要とされている。

【先行技術文献】

10

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】PCR;Saiki,R.K.,et al.,Science 1985,230,1350-1354

【非特許文献2】Mullis,K.,et al.,Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.1986,51 Pt 1,2 63-273

【非特許文献3】Woolley,A.T.,et al.,Anal.Chem.1996,68,4081-4086

【非特許文献4】Lagally,E.T.,et al.,Analytical Chemistry 2001,73,565-570

【非特許文献5】Schneegas,I.,et al.,Lab on a Chip-The Royal Society of Chemistry 2001,1,42-49

【非特許文献6】Kalinina,O.,et al.,Nucleic Acids Res.1997,25,1999-2004

20

【非特許文献7】Oda,R.P.et al.,Anal.Chem.1998,70,4361-4368

【非特許文献8】Huhmer,A.F.and Landers,J.P.,Anal.Chem.2000,72,5507-5512

【非特許文献9】Burns,M.A.,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1996,93,5556-5561

【非特許文献10】Kopp,M.U.,et al.,Science 1998,280,1046-1048

【非特許文献11】Chiou,J.,Matsudaira,P.,Sonin,A.and Ehrlich,D.,Anal.Chem.2001,73,2018-2021

【非特許文献12】Giordano,B.C.,et al.,Anal.Biochem.2001,291,124-132

【非特許文献13】Sasaki,N.,et al.,DNA Res.1997,4,387-391

【非特許文献14】Nagai,H.,et al.,Biosens.Bioelectron.2001,16,1015-1019

【非特許文献15】Nagai,H.,et al.,Anal.Chem.2001,73,1043-1047

30

【発明の概要】

【0014】

発明の簡単な概要

本発明は、(1)核酸サンプル調製、(2)核酸増幅、および(3)DNA配列決定のための新規方法および新規装置を含む統合システムを説明する。

【0015】

本発明は、特に大きなテンプレートDNAまたは全(または部分的)ゲノムDNAから誘導される多重DNA配列のライブラリーを調製するための新規方法を提供する。一本鎖DNAの配列は、大きなテンプレートDNAまたは全もしくは部分的DNAゲノムのサンプルから、一本鎖DNAの断片化、研磨、アダプターライゲーション、ニック修復および単離により、調製される。この方法は、(a) ssDNAテンプレートのライブラリーを生成すること、(b) ssDNAテンプレートを固体支持体に付着させること、および(c) 一つのssDNAテンプレートが付着している固体支持体を単離することを含み、固体支持体に結合されたssDNAライブラリーを生成する。

40

【0016】

本発明は、例えば、エマルジョンのマイクロカプセル中に複数のDNAサンプルを個々に封入し、複数の封入された核酸サンプルの増幅を同時に行い、かつ前記増幅された複数のDNAをその後の反応のためにマイクロカプセルから放出させることにより、一本の反応管内のDNAライブラリーの個々のメンバーを増幅する方法も提供する。一つの態様において、核酸テンプレート種の単一コピーを、DNA捕捉ビーズにハイブリダイズし、完全増幅溶

50

液中に懸濁させ、マイクロリアクター中に乳化し（典型的には、直径が100～200ミクロン）、その後、増幅（例えばPCR）を利用して、初期テンプレート種のコピー数をクローニング的に単一核酸配列の1,000,000より多くのコピー、好ましくは単一核酸の2百万～2千万コピーに増やす。例えば、増幅反応を、反応混合物の1マイクロリッター当たり少なくとも3,000個のマイクロリアクターを用いて同時に行うことができ、単一の体積100 μ lの試験管（例えば、PCR反応管）内で300,000個を超えるマイクロリアクターを用いて行うことができる。本発明は、奏功するDNA増幅事象を含む、ビーズを濃縮する（すなわち、そこに付着したDNAを有さないビーズを除去することによる）方法も提供する。

【0017】

本発明は、また、単一のプライマーハイブリダイゼーション工程を用いて、複数のプライマーからの核酸の配列を決定する方法も提供する。2以上の配列決定プライマーを、配列決定すべきテンプレートDNAにハイブリダイズする。全ての配列決定プライマーを、次に、一つを除いて保護する。非保護プライマーを伸長することにより、配列決定（例えば、ピロリン酸配列決定）を再び行う。伸長は、完了させられるか（必要ならば、さらなるポリメラーゼおよびdNTPを用いて）または、停止される（ポリメラーゼおよびddNTPにより）。連鎖完了および/または停止試薬を除去する。次に、保護プライマーの一つを脱保護し、新たに脱保護されたプライマーを伸長することにより配列決定を行う。このプロセスを、全ての配列決定プライマーが脱保護され配列決定されるまで続ける。好ましい態様において、2つのプライマー（一方は保護され一方は保護されていない）を用いて、二本鎖核酸の両末端の配列を決定する。

【0018】

本発明は、ピロリン酸に基づく配列決定手段を用いて核酸の配列を決定する装置および方法も提供する。この装置は、荷電結合素子（CCD）カメラ、マイクロ流体チャンバー、サンプルカートリッジホルダー、ポンプおよびフロー弁を有する。この装置は、検出法として化学発光を使用し、これは、ピロリン酸配列決定のために、固有の低いバックグラウンドを有する。好ましい態様において、配列決定のためのサンプルカートリッジを、「ピコタイタープレート」と呼び、これは市販の光ファイバー面板から形成され、酸でエッチングされ、各ウェルの体積が75pLである数十万の非常に小さなウェルを産生する。装置は、本明細書に記載の配列と共に用いるために適合された新規試薬送達キュベットを含み、それにより、流体試薬が、ピコタイタープレートおよび、試薬送達キュベットと連通する試薬送達手段に提供される。ピコタイタープレート上の各ウェルからの光子を、CCDカメラ上の特定のピクセルに導いて、配列決定反応を検出する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1A】テンプレートDNA断片化（図1A）、末端研磨（図1B）、アダプターライゲーション（図1C）、ニック補修、鎖伸長およびゲル単離（図1D）の工程を含むライブラリー調製のプロセス全体を模式的に示す。

【図1B】テンプレートDNA断片化（図1A）、末端研磨（図1B）、アダプターライゲーション（図1C）、ニック補修、鎖伸長およびゲル単離（図1D）の工程を含むライブラリー調製のプロセス全体を模式的に示す。

【図1C】テンプレートDNA断片化（図1A）、末端研磨（図1B）、アダプターライゲーション（図1C）、ニック補修、鎖伸長およびゲル単離（図1D）の工程を含むライブラリー調製のプロセス全体を模式的に示す。

【図1D】テンプレートDNA断片化（図1A）、末端研磨（図1B）、アダプターライゲーション（図1C）、ニック補修、鎖伸長およびゲル単離（図1D）の工程を含むライブラリー調製のプロセス全体を模式的に示す。

【図1E】増幅の段階およびテンプレートDNAの配列決定を模式的に示す。

【図1F】本発明の方法による180～350塩基対アデノウイルスDNAライブラリーのサンプル調製物を含む代表的アガロースゲルを示す。

【図1G】ライブラリー調製、増幅および配列決定を詳細に模式的に示す。

【図 2】本発明のユニバーサルアダプター設計を模式的に示す。各ユニバーサルアダプターは、PCRプライミング用の20bpヌクレオチド配列、配列プライミング用の20bpヌクレオチド配列、および非繰り返しヌクレオチド配列（すなわち、ACGT、CAGT等）からなる固有の4bp識別用配列を含むように設計された2つの相補的ssDNAオリゴヌクレオチドから生成する。図2Bは、本発明で用いるための代表的ユニバーサルアダプター配列対を示す。アダプターAセンス鎖：SEQ ID NO：1；アダプターAアンチセンス鎖：SEQ ID NO：2；アダプターBセンス鎖：SEQ ID NO：3；アダプターBアンチセンス鎖：SEQ ID NO：4。図2Cは、本発明で用いるためのユニバーサルアダプター設計を模式的に示す。

【図 3】本発明によるニック付二本鎖DNA断片の鎖置換および伸長を示す。合成オリゴヌクレオチドから生じるユニバーサルアダプターのライゲーションに続いて、T4 DNAリガーゼ処理に続いて2つのニック付領域を含む二本鎖DNA断片が生じる（図3A）。鎖置換酵素（すなわち、Bst DNAポリメラーゼI）の添加は、ニックを結合（図3B）し、ニック付鎖を置換し、鎖のヌクレオチド伸長を完了させ（図3C）て、ニックの付いていない二本鎖DNA断片を生成する（図3D）。

【図 4】ストレプトアビジン被覆ビーズを用いて、本発明により直接ライゲートされた一本鎖DNAを単離することを示す。ユニバーサルアダプターAおよびB（二つの異なるアダプターを「第1の」および「第2の」ユニバーサルアダプターと呼ぶことがある）とのライゲーションに続いて、二本鎖DNAは、4つの可能な組み合わせ：AA、BB、ABおよびBAでアダプターを含む。ユニバーサルアダプターBが5'ビオチンを含む場合、磁性ストレプトアビジン被覆固体支持体を用いて、AB、BAおよびBB集団（集団AAは洗い流される）を捕捉および単離する。二本鎖DNAの各末端がビーズに付着され放出されないため、BB集団は、ビーズ上に保持される。しかしながら、低塩緩衝液の存在下における洗浄時に、集団ABおよびBAのみが、結合された鎖に相補的である一本鎖DNA断片を放出する。一本鎖DNA断片が、上澄みから単離され、その後の増幅および配列決定用のテンプレートとして用いられる。この方法を、より詳細に以下に示す。

【図 5】DNA捕捉ビーズの構造の模式図である。

【図 6 A】ビーズエマルジョン増幅プロセスの一つの態様の模式図である。

【図 6 B】ビーズエマルジョン増幅プロセスの一つの態様の模式図である。

【図 7】DNAが付着されていないビーズを除去するための濃縮プロセスの模式図である。

【図 8 A】本発明による二本鎖配列決定領域の模式図である。

【図 8 B】本発明による二本鎖配列決定領域の模式図である。

【図 8 C】本発明による二本鎖配列決定領域の模式図である。

【図 8 D】本発明による二本鎖配列決定領域の模式図である。

【図 8 E】本発明による二本鎖配列決定領域の模式図である。

【図 8 F】本発明による二本鎖配列決定領域の模式図である。

【図 8 G】本発明による二本鎖配列決定領域の模式図である。

【図 8 H】本発明による二本鎖配列決定領域の模式図である。

【図 8 I】本発明による二本鎖配列決定領域の模式図である。

【図 8 J】本発明による二本鎖配列決定領域の模式図である。

【図 9】本発明のピロシーケンシング装置上の二本鎖配列決定を示す。

【図 10 A】二本鎖配列決定プロセスの例示である。

【図 10 B】二本鎖配列決定プロセスの例示である。

【図 10 C】二本鎖配列決定プロセスの例示である。

【図 10 D】二本鎖配列決定プロセスの例示である。

【図 10 E】二本鎖配列決定プロセスの例示である。

【図 10 F】二本鎖配列決定プロセスの例示である。

【図 11 A】アンカープライマーを用いるローリングサークル増幅の模式図である。

【図 11 B】アンカープライマーを用いるローリングサークル増幅の模式図である。

【図 11 C】アンカープライマーを用いるローリングサークル増幅の模式図である。

【図 11 D】アンカープライマーを用いるローリングサークル増幅の模式図である。

【図 1 2】本発明の配列決定装置の図である。

【図 1 3】本発明の試薬送達/灌流チャンバーの図である。

【図 1 4】本発明の、PicoTiterPlate（商標）と呼ばれる、空洞を設けた光ファイバー束の顕微鏡写真である。

【図 1 5】DNAテンプレートが上に固定されていると共にスルフリラーゼおよびルシフェラーゼが上に固定されているビーズが敷かれたピコタイタープレートの顕微鏡写真である。

【図 1 6】試薬フローチャンバーおよびFORA（PicoTiterPlate（商標））の模式図である。

【図 1 7】本発明の分析装置の図である。

10

【図 1 8】PicoTiterPlate（商標）中における微小並行配列決定反応の模式図である。

【図 1 9】単一ウェル反応の顕微鏡写真である。

【図 2 0】PicoTiterPlate（商標）充填カートリッジを示す。「A」は、マイクロウェルがカートリッジ内に向いているPicoTiterPlate（商標）を示し、PicoTiterPlate（商標）ウェルの開放側と充填カートリッジの壁との距離は0.3mmであり；「B」はケイ素封止ガasketを示し、「C」は入口ポートを示し、「D」は入口充填管を示し、「E」は出口ポートを示し、「F」は出口管を示す。PicoTiterPlate（商標）は、プラスチッククランプでカートリッジ中に保持される。液体が、入口充填管Dを通して満たされ、PicoTiterPlate（商標）の開放側と充填カートリッジの壁との間の空間に、入口Cを通して入る。ケイ素封止ガasket Bにより定められる領域が充填され、過剰の液体が、出口Eおよび出口管Fを通してカートリッジから出る。

20

【図 2 1】PicoTiterPlate（商標）の増幅チャンバーの拡大図である。「A」は、6個の保持ボルトを有する増幅チャンバーを示し、「B」は、独立気泡フォーム絶縁パッドを示し、「C」は25mm×75mmの標準的ガラス顕微鏡スライドを示し、「D」は厚さ0.25mmのケイ素シートを示し、「E」はPicoTiterPlate（商標）を示し、「F」は増幅チャンバーベースを示し、「G」は第2の厚さ0.25mmのケイ素シートを示す。

【図 2 2】固相PicoTiterPlate（商標）PCRの模式図である。円筒形構造体が、個々のPicoTiterPlate（商標）ウェルを示す。灰色の球が、プライマーが固定されたビーズを示す。フォワード「F」（赤色）およびリバース「R」（青色）プライマーを、矢印により示されるような5'から3'の方向に示す。フォワードおよびリバースプライマーに相補的な合成された配列を、暗赤色（F相補物）および暗青色（R相補物）のバーとして示す。一本鎖テンプレートDNAを、中実灰色線として示し、新しく合成されたDNA鎖を灰色破線として示す。蛍光標識されたハイブリダイゼーションプローブを、緑色のバーとして示す。

30

【図 2 3】ビーズ固定試験DNA断片への蛍光プローブハイブリダイゼーションを示す。図23A（左上）および23B（右下）は、それぞれ、対照ビーズ上に固定された断片Aおよび断片Bにハイブリダイズされたプローブの混合集団の特異性を示す。断片Bビーズは、Alexa Fluor 647のシグナル（赤色）を示し、断片Aビーズは、Alexa Fluor 488のシグナル（緑色）を示す。図23C（下部パネル）は、PTPCR後のDNA捕捉ビーズからのプローブ蛍光を示す。ビーズは、均質な断片Aおよび断片Bシグナル、ならびに種々の程度の黄色として示されるテンプレートの混合を示す。

40

【図 2 4】一本鎖DNAライブラリーの分析からの代表的BioAnalyzer出力を示す。

【図 2 5】PCRプライマーおよび配列決定プライマーが隣接する挿入部を示す。

【図 2 6】交差ハイブリダイゼーション領域（CHR）におけるPCRプライマーミスマッチにより生成される切断型産物を示す。

【図 2 7】融解温度に基づくプライマー候補の計算を示す。

【図 2 8】本発明の方法に用いられる噴霧器用のアセンブリーを示す。管のキャップを噴霧器の頂部上に配置し（図7A）、キャップを噴霧器クランプアセンブリーで固定した（図7B）。噴霧器の底部を、窒素供給器に取り付け（図7C）、装置全体をパラフィルムに包んだ（図7D）。

【図 2 9 A】噴霧および研磨に続く、一本鎖DNAライブラリーのLabChip分析の代表的結果

50

を示す。

【図 29 B】噴霧、研磨およびゲル精製に続く、アダプターをライゲートした一本鎖DNAライブラリーについての代表的サイズ分布結果を示す。

【図 30】垂直注射器ポンプの下側の攪拌プレート上に管を保持するために用いられるジグを示す。3組のビーズエマルジョン増幅反応混合物を保持するためにジグを改変した。注射器に、PCR反応混合物およびビーズを充填した。

【図 31】垂直注射器ポンプ中での注射器の最適な配置、および注射器出口の下側のエマルジョン管の配向を示す。

【図 32】注射器プランジャーに対する注射器ポンププッシャーブロックの最適配置および、攪拌プレート上のジグの最適配向を示す。この構成を用いて、注射器内容物を、攪拌されたエマルジョンオイル中に排出した。

【図 33】本発明の方法による個々のマイクロリアクター中に懸濁されたビーズ（矢印参照）を示す。

【図 34】DNAテンプレートの両端の配列が決められることを示している両端配列決定結果を示す。 SEQ ID NO:44:atgcacatggttgacacagtgtgt; SEQ ID NO:45:atgcacatggttgacacagtgtgt; SEQ ID NO:46:atgccaccgacacctagtctcaaaactt

【図 35】二本鎖配列決定用の2つのオリゴヌクレオチド配列を含むビーズのカプセル封入を示す。

【図 36】溶液相PCRおよびビーズに送る手順ー両端配列決定の好ましい態様における工程を示す。

【図 37】エマルジョン破壊および、ビーズ上の増幅テンプレートDNAの回収ー両端配列決定の好ましい態様の工程を示す。

【図 38】二本鎖配列決定の好ましい方法の模式図である。

【図 39 A】黄色ブドウ球菌ゲノムの配列決定の結果を示す。

【図 39 B】黄色ブドウ球菌ゲノムの配列決定の結果を示す。

【図 40】両端配列決定を含む一つの実験における平均読み取り長を示す。

【図 41】両端配列決定実験における各ゲノム範囲用のウェルの数を示す。

【図 42】両端配列決定手順からの典型的出力および配列ストリングを示す。上から下に順番に配列を示す：SEQ ID NO：47～SEQ ID NO：60。

【発明を実施するための形態】

【0020】

発明の詳細な説明

39.5ピコリッターという低体積の三十万個の別々のPCR反応（PTPCR）を同時に増幅させる新規プラットフォームを本明細書に記載する。全反応からの貯蔵PTPCR産物を、洗浄工程により回収し、特定のテンプレートの存在および存在量についてリアルタイムPCRによりアッセイすることができる。より対象となるのは、本明細書で、これらのPTPCR産物を固体支持体に運び、2つのカラー蛍光プローブとハイブリダイズすることにより検出することができ、高容量固相クローンDNA増幅および大規模平行配列決定を可能にすることが示される。

【0021】

本発明は、（1）配列決定のための迅速かつ効率的な方法で核酸（例えば、ゲノム）を調製し、（2）核酸を典型的方法で増幅し、かつ（3）一回のみのプライマーハイブリダイゼーションを用いて多重配列決定反応を行うという目的を満たすゲノム配列決定を行うための方法および装置に関する。本発明は、費用効率的な方法で、核酸の小さなサンプルから遺伝子型決定、検出および診断を行うのに特に適している。これらの目的の各々を以下に列挙する。

【0022】

定義

特記しない限り、本明細書で用いられる全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと

10

20

30

40

50

類似または同等の方法および材料を、本発明の実施に用いることができ、適当な方法および材料の例を以下に記載する。例えば、2より多くの工程を含む方法を記載することができる。そのような方法において、定められた目的を達成するのに全ての工程は必要とされず、本発明は、これらの別々の目的を達成するために分離された工程を用いることを構想する。全ての公報、特許出願、特許および他の参考文献の開示を全て、参照として本明細書に組み入れられる。さらに、材料、方法および実施例は説明するためだけのものであり、制限することを意図しない。

【0023】

本明細書で用いられる「ユニバーサルアダプター」という用語は、PCRプライミング用のヌクレオチド配列および配列決定プライミング用のヌクレオチド配列を含むように設計されている二つの相補的かつアニーリングしたオリゴヌクレオチドを意味する。任意に、ユニバーサルアダプターは、さらに、非繰返しヌクレオチド配列（すなわち、ACGT、CA GT等）からなる固有の識別用キー配列を含んでよい。一組のユニバーサルアダプターは、二本鎖DNAの末端にライゲートすることができる二つの固有の別個の二本鎖配列を含む。従って、同じユニバーサルアダプターまたは異なるユニバーサルアダプターを、DNA分子のいずれかの末端にライゲートすることができる。一本鎖である大きなDNA分子に含まれる場合、またはオリゴヌクレオチドとして存在する場合、ユニバーサルアダプターは、一本鎖ユニバーサルアダプターと呼ぶことができる。

【0024】

「標的DNA」は、その配列が、本発明の方法および装置により決定されるDNAを意味する。

【0025】

結合対は、含まれる分子の三次元構造に依存する特定の非共有的相互作用により相互に作用する一対の分子を意味する。特定の結合性パートナーの典型的対には、抗原-抗体、ハプテン-抗体、ホルモン-受容体、核酸鎖-相補性核酸鎖、基質-酵素、基質類似体-酵素、阻害因子-酵素、炭水化物-レクチン、ビオチン-アビジンおよびウイルス-細胞質受容体がある。

【0026】

本明細書で用いられる「識別用キー配列」という用語は、4つのデオキシリボヌクレオチド（すなわち、A、C、G、T）の各々の少なくとも一つからなる配列を意味する。DNA断片の全ライブラリーのために、同じ識別性配列を用いることができる。または、異なる生物から誘導されるDNA断片のライブラリーを追跡するために、異なる識別用キー配列を用いることができる。

【0027】

本明細書で用いられる「複数の分子」という用語は、同じ供給源から単離されたDNAを指し、それにより、異なる生物を同じ方法により別々に調製することができる。一つの態様において、複数のDNAサンプルが、DNAの大きなセグメント、全ゲノムDNA、cDNA、ウイルスDNAから、またはウイルスRNAの逆転写体から誘導される。このDNAは、哺乳動物（すなわち、ヒト、非ヒト霊長類、齧歯動物またはイヌ）、植物、鳥類、爬虫類、魚類、真菌、細菌またはウイルスを含む任意の供給源から誘導することができる。

【0028】

本明細書で用いられる「ライブラリー」という用語は、断片化されたまたは全ゲノムの単一DNAテンプレートから生成する小さな寸法のDNA種の亜集団を指す。

【0029】

本明細書で用いられる「固有PCRプライミング領域」におけるような「固有」という用語は、増幅または配列決定すべきDNA分子中に存在しないかまたは極めて低いコピーレベルで存在する配列を指す。

【0030】

本明細書で用いられる「適合性のある」という用語は、アダプター分子を付着することができる二本鎖DNAの末端（すなわち、平滑末端または粘着末端）を指す。

【0031】

本明細書で用いられる「断片化」という用語は、DNAの大きな分子をDNAの小さな断片に変換するプロセスを指す。

【0032】

本明細書で用いられる「大きなテンプレートDNA」は、25kbより多く、好ましくは500kbより多く、より好ましくは1MBより多く、最も好ましくは5MB以上のDNAである。

【0033】

本明細書で用いられる「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という用語は、相補的配列のみが互いにハイブリダイズする条件を指す。

【0034】

本明細書に記載の本発明は、概して、核酸を加工するシステムおよび方法である。このシステムおよび方法を用いて、核酸の配列決定を利用する種々の方法で、核酸を加工することができる。そのような配列決定を、核酸の配列の同一性を決定するため、または、核酸断片中の単一ヌクレオチド多型検出のため、核酸発現のプロファイリング（2以上の状態の間の核酸発現プロファイルを比較、例えば、疾患組織と正常組織との間の比較、または未処理組織と、薬剤、酵素、放射線または化学的処理法で処理した組織との比較）のため、ハプロタイプ検査（ヒト被検体中に存在する2つの対立遺伝子の各々における遺伝子または遺伝子中の変異体を比較する）のため、核型検査（典型的には、出産時欠損を検出するため、受胎前の胚/胎児からの試験組織中の一つまたは複数の遺伝子を、「正常」核化被検体からの同じ遺伝子と、診断的に比較する）のために、および遺伝子型検査（種の第1の個体中の一つまたは複数の遺伝子を、同じ種の他の個体中の同じ遺伝子と比較する）のために行うことができる。

【0035】

このシステムは、多くの成分を有する。これらには、（1）加工すべき核酸テンプレート、（2）核酸テンプレートを含むためのピコタイタプレート、（3）核酸テンプレートの上に核酸処理試薬を流すフローチャンバーおよび流体送達手段（核酸を処理したときに処理試薬は光を発生する）、（4）核酸を加工するときに発生する光を検出すると共に捕捉された光をデータに変換する光捕捉手段、および（5）データを加工して、加工された核酸についての意義のある情報を生み出すデータ処理手段がある。システムのこれらの成分の各々を、以下に詳細に説明する。

【0036】

1. 核酸テンプレートおよびその調製

核酸テンプレート

本発明により配列決定することができる核酸テンプレート、例えば、核酸ライブラリーは、通常、開放環状または閉鎖環状核酸分子を含み得る。「閉鎖環」は、共有結合的に閉鎖した環状核酸分子、例えば、環状DNAまたはRNA分子である。「開放環」は、5'リン酸基および3'ヒドロキシル基を有する線形一本鎖核酸分子である。

【0037】

一つの態様において、一本鎖核酸は、特定の核酸配列の少なくとも100個のコピーであって各コピーが末端同士で共有結合しているコピーを含む。一部の態様において、開放環を、インサイチューで、線形二本鎖核酸分子から形成する。所与の開放環状核酸分子の末端を、DNAリガーゼによりライゲートすることができる。開放環状分子の5'および3'末端における配列は、第2の核酸分子中の隣接ヌクレオチドの2つの領域、例えば、アンカープライマーのアダプター領域（アダプターと呼ぶことがある）、または、第2のDNA分子中で近くに隣接する2つの領域に相補的である。すなわち、開放環状分子の末端を、DNAリガーゼを用いてライゲートするか、または、ギャップ充填反応においてDNAポリメラーゼにより伸長することができる。開放環状は、Lizardiの米国特許第5,854,033号に詳細に記載されており、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。例えば開放環をアンカープライマーにアニーリングした後に、DNAリガーゼ（例えばDNA）またはRNAリガーゼの存在下で、開放環を閉鎖環に変換することができる。

【0038】

望ましいならば、核酸テンプレートを、南京錠プローブとして提供することができる。南京錠プローブは、各末端に配置されリンカー配列により分離されている標的相補的配列を含む、線形オリゴヌクレオチドである。リンカーを、例えば物理的に剪断されるかまたは制限エンドヌクレアーゼで消化された核酸配列のライブラリーのメンバーの末端にライゲートすることができる。標的配列にハイブリダイズしたときに、これらの線形オリゴヌクレオチドの5'および3'末端領域が並置される。この並置により、2つのプローブセグメント（適切にハイブリダイズされている場合）を酵素的ライゲーション（例えば、T4 DNA リガーゼを用いて）により共有結合させ、プローブを、特定の標的配列に連鎖される環状閉鎖分子に変換する（例えば、Nilsson, et al., 1994. Science 265: 2085-2088を参照されたい）。得られるプローブは、遺伝子配列変異体に対する特異性および選択性（例えば、Lizardi, et al., 1998. Nat. Genet. 19: 225-232; Nilsson, et al., 1997. Nat. Genet. 16: 252-255を参照されたい）と、得られる反応産物が、特定の標的配列に局在化されたままであるという事実との両方により、多くの遺伝子配列の同時分析に適している。さらに、多くの異なるプローブの分子内ライゲーションは、非同起源のプライマー対が不適切な増幅産物を発生させ得る多重PCRに基づく方法よりも、非特異的交差反応に対して感受性が低いことが予想される（例えば、Landegren and Nilsson, 1997. Ann. Med. 29: 585-590を参照されたい）。

10

【0039】

ライブラリー中に存在する場合にアンカープライマー配列へのアニーリングに利用可能である領域、またはアンカープライマー配列へのアニーリングに利用可能にすることができる領域を、核酸配列が含むことを条件として、一本鎖または二本鎖核酸分子のいずれかを含有する出発核酸テンプレートライブラリーを構築することができる。例えば、ローリングサークル増幅のためのテンプレートとして用いる場合、二本鎖テンプレートの領域は、アンカープライマーの伸長のためのテンプレートとして作用するために、少なくとも一時的に一本鎖である必要がある。

20

【0040】

ライブラリーテンプレートは、アンカープライマーに相補的な一つまたは複数の領域を含む複数の要素を含むことができるが、これらに制限されない。例えば、テンプレートライブラリーは、配列決定プライマーに相補的な領域、対照ヌクレオチド領域、および後に特徴付けられる配列決定テンプレートからなる挿入配列を含み得る。以下により詳細に説明するように、対照ヌクレオチド領域を、副産物の量と組み込まれたヌクレオチドの数との間の関係を調べるために用いる。本明細書で用いられる「相補性」という用語は、特定のヌクレオチド配列にハイブリダイズして適合した二本鎖を形成することができるヌクレオチド配列を指す。

30

【0041】

一つの態様において、ライブラリーテンプレートには（i）アンカープライマーに相補的な2つの別個の領域、（ii）配列決定プライマーに相同的な一つの領域、（iii）一つの任意の対照ヌクレオチド領域、（iv）配列決定すべき例えば30～500、50～200または60～100個のヌクレオチドの挿入配列が含まれる。テンプレートは、当然これらの特徴の2つ、3つまたは4つ全てを含み得る。

40

【0042】

テンプレート核酸は、核酸の任意の供給源、例えば、任意の細胞、組織または生物から構築できると共に、任意の当技術分野において認められた方法により生成することができる。適当な方法には、例えば、ゲノムDNAを音波処理し、一つまたは複数の制限エンドヌクレアーゼ（RE）で消化することにより、核酸分子の初期集団から所望の長さの範囲の断片を生成することがある。好ましくは、制限酵素の一つまたは複数が、異なる四塩基識別配列を有する。そのような酵素の例には、例えば、Sau3A1、MspIおよびTaqIがある。好ましくは、酵素を、対応する制限酵素のための識別配列を含む領域を有するアンカープライマーと組み合わせて用いる。一部の態様において、アンカープライマーのアダ

50

プター領域の一方または両方が、既知の制限酵素識別配列に隣接するさらなる配列を含み、それにより、アンカープライマーに特異的な対象となる制限断片のアンカープライマーへのアニーリングまたは捕捉が可能になる。他の態様において、制限酵素を、IIS型制限酵素と共に用いる。

【0043】

または、RNA、例えばメッセンジャーRNA (mRNA) から相補的DNA (cDNA) ライブラリーを生成することにより、テンプレートライブラリーを作ることができる。cDNAライブラリーを、必要ならば、制限エンドヌクレアーゼを用いてさらに加工して、特定のRNA、内部断片、または単離RNAの3'末端を含む断片に特徴的な3'末端を得ることができる。アンカープライマー中のアダプター領域は、テンプレートライブラリー中で生じると考えられる対象配列、例えば、エンドヌクレアーゼ消化により発生する断片中の既知のまたは疑われる配列多型に相補的であり得る。

10

【0044】

一つの態様において、指示性 (indexing) オリゴヌクレオチドを、テンプレートライブラリーのメンバーに付着させて、その後、テンプレート核酸と、テンプレート核酸が誘導される核酸の集団とを相関させることができる。例えば、出発DNA集団の一つまたは複数のサンプルを、先に開示された方法 (例えば、制限消化、音波処理) のいずれかを用いて、別々に断片化することができる。各サンプルに特異的な指示性オリゴヌクレオチド配列を、断片化集団のメンバーの末端に付着、例えば、ライゲートさせる。指示性オリゴヌクレオチドは、環化、増幅および、任意に配列決定のための領域として作用することができ、それにより、誘導元の出発サンプルを同定するように核酸を指示またはコードするために用いることが可能になる。

20

【0045】

複数の識別可能な指示性プライマーを用いて作った異なるテンプレートライブラリーを、その後の反応のために混合することができる。ライブラリーのメンバーの配列を決定することにより、指示性オリゴヌクレオチドに対応する配列を同定することができる。この情報に基づき、いかなる所与の断片の起源も推定することができる。

【0046】

本発明は、テンプレート核酸に共有結合した複数のアンカープライマーまたはアダプターを含む固体または可動性固体基質を得るサンプル調製プロセスを含む。

30

【0047】

テンプレート核酸が環状の場合、アンカープライマーを環状核酸の相補性領域にアニーリングし、次に、アニーリングしたアンカープライマーをポリメラーゼで伸長して、環状核酸に相補性の配列の一つまたは複数のコピーを含む核酸を形成することにより、共有結合したアンカープライマーおよび標的核酸の一つまたは複数のコピーが形成されるのが好ましい。

【0048】

固体または可動性固体基質へのアンカープライマーの付着は、アニーリングされたアンカープライマーの伸長の前、伸長中、またはその後に起こることができる。すなわち、一つの態様において、一つまたは複数のアンカープライマーを固体または可動性固体基質に結合し、その後、アンカープライマーを標的核酸にアニーリングし、ポリメラーゼの存在下で伸長する。または、第2の態様において、アンカープライマーをまず、標的核酸にアニーリングし、アニーリングされたアンカープライマーの3'OH末端をポリメラーゼを用いて伸長する。次に、伸長されたアンカープライマーを、固体または可動性固体基質に結合する。アンカープライマーの配列を変えることにより、核酸の集団中に存在する異なる標的核酸を特異的に増幅することができる。

40

【0049】

増幅および配列決定反応のためのテンプレート核酸の調製のための好ましい態様を以下に概説する。本発明は、7つの一般的工程からなるサンプルDNAを調製する方法を含む。(a) 大きなテンプレートDNAまたは全ゲノムDNAサンプルを断片化して、複数の消化DNA断片

50

を生成する；(b) 複数の消化されたDNAサンプル上に適合性末端を作る；(c) 一組のユニバーサルアダプター配列を断片化DNA分子の末端にライゲートして複数のアダプターライゲートDNA分子を作る（各ユニバーサルアダプター配列は、共通のPCRプライマー配列、共通の配列決定プライマー配列および識別性四塩基キー配列を含む既知で固有の塩基配列を有し、一つのアダプターがビオチンに付着している）；(d) 複数のライゲートされたDNA断片を分離および単離する；(e) 複数のライゲートされたDNA断片の任意の部分を除去し；(f) 複数のライゲートされたDNA断片のニック修復および鎖伸長；(g) ライゲートされたDNA断片の各々を固体支持体に付着する；および(h) 各末端に固有のアダプターがある一本鎖アダプターライゲートDNA断片を含む集団の単離（すなわち、指向性の提供）。

10

【0050】

以下の説明により、本発明の方法に含まれる基本的工程を要約する。これらの工程を特定の順番で挙げるが、当業者に知られているように、これらの工程の順番を、同じ結果を達成するように操作することができる。そのような操作が本発明者らにより企図されている。さらに、一部の工程を、当業者にも知られているように、最小化することができる。

【0051】

断片化

本発明の方法の実施において、DNAサンプルの断片化を、当業者に知られている手段により行うことができる。好ましくは、断片化は、酵素的または機械的手段により行われる。機械的手段は、音波処理または物理的剪断である。酵素的手段は、ヌクレアーゼ（例えば、デオキシリボヌクレアーゼI（DNaseI））または一つまたは複数の制限エンドヌクレアーゼでの消化により行うことができる。好ましい態様において、断片化により、配列が知られていない末端が得られる。

20

【0052】

好ましい態様において、酵素的手段はDNaseIである。DNaseIは、二本鎖DNA（dsDNA）を非特異的に開裂して5'リン酸化ジ-、トリ-およびオリゴヌクレオチド産物を放出する多目的酵素である。DNaseIは、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} および Ca^{2+} を含むが他の塩は含まない緩衝液中で最適活性を有する。DNaseI消化工程の目的は、大きなDNAゲノムを断片化して、ライブラリーを含むより小さな種にすることである。DNaseIの開裂特性により、テンプレートDNAのランダム消化（すなわち、配列の偏りが無い）が生じ、マンガン系緩衝液の存在下で用いたときに平滑末端dsDNA断片が優勢になる（Melgar, E. and D.A. Goldthwait. 1968. Deoxyribonucleic acid nucleases. II. The effects of metal on the mechanism of action of deoxyribonuclease I. J. Biol. Chem. 243: 4409）。ゲノムテンプレートのDNaseI処理の後に発生する消化産物の範囲は、3つの因子に依存する。i) 用いられる酵素の量（単位）；ii) 消化の温度（℃）；およびiii) インキュベーション時間（分）。以下に概説するDNaseI消化条件を最適化して、50～700塩基対（bp）のサイズ範囲のゲノムライブラリーを発生させた。

30

【0053】

好ましい態様において、DNaseIが、大きなテンプレートDNAまたは全ゲノムDNAを1～2分間消化して、ポリヌクレオチドの集団を生成する。もう一つの好ましい態様において、DNaseI消化は10℃～37℃の温度で行われる。さらにもう一つの好ましい態様において、消化されたDNA断片は、長さが50bp～700bpの範囲である。

40

【0054】

研磨

Mn^{2+} の存在下でDNaseIでゲノムDNA（gDNA）テンプレートを消化すると、平滑末端であるか、1個または2個のヌクレオチドの長さの突出している末端を有するDNAの断片が産生される。好ましい態様において、Pfu DNAポリメラーゼを用いて、数の増えた平滑末端が作られる。他の態様において、T4 DNAポリメラーゼまたはクレノウDNAポリメラーゼのような効率のより低いDNAポリメラーゼを用いて平滑末端を作ることができる。Pfu「研磨」または平滑末端化により、DNaseIでのゲノムテンプレートの消化に続いて発生する平滑末

50

端種の量が増加する。断片の研磨のためにPfu DNAポリメラーゼを用いると、5'突出部が埋められる。さらに、Pfu DNAポリメラーゼは、DNAエキステンダーゼ活性を示さないが、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有し、それにより、一本および二本ヌクレオチド伸長部が除去されて、アダプターライゲーションに利用できる平滑末端DNA断片の量が増加する

(Costa,G.L.and M.P.Weiner.1994a.Protocols for cloning and analysis of blunt-ended PCR-generated DNA fragments.PCR Methods Appl 3 (5) : S95 ; Costa,G.L.,A.Grafsky and M.P.Weiner.1994b.Cloning and analysis of PCR-generated DNA fragments.PCR Methods Appl 3 (6) : 338 ; Costa,G.L.and M.P.Weiner.1994c.Polishing with T4 or Pfu Polymerase increases the efficiency of cloning of PCR products.Nucleic Acids Res.22 (12) : 2423)。

10

【0055】

アダプターライゲーション

核酸のライブラリーを固体基質に付着させる場合、好ましくは、核酸テンプレートが、認められた技術を用いてアンカープライマー配列にアニーリングされる（例えば、Hatch, et al.,1999.Genet.Anal.Biomol.Engineer.15 : 35-40 ; Koolの米国特許第5,714,320号およびLizardiの米国特許第5,854,033号を参照されたい）。通常、アンカープライマーをテンプレート核酸配列にアニーリングするための手順は、アンカープライマー配列中の一つまたは複数のアダプター領域とテンプレートライブラリー中に存在する配列との間の、特定の、すなわち完全または完全に近い相補性の形成が得られる限り、適している。

【0056】

好ましい態様において、DNAライブラリーの断片化および平滑末端化に続いて、ユニバーサルアダプター配列を各DNA断片に付加する。ユニバーサルアダプターは、4つのデオキシリボヌクレオチドそれぞれ（すなわち、A、C、G、T）の少なくとも1つからなる固有の識別性キー配列が任意に続く典型的に20bpの長さの一组の固有の配列決定プライミング領域に隣接して配置された、典型的に20bpの長さの一组の固有のPCRプライミング領域を含むように設計されている。好ましい態様において、識別性キー配列は長さが4塩基である。もう一つの態様において、識別性キー配列は、1~4個の塩基の組み合わせであり得る。さらにもう一つの態様において、各固有のユニバーサルアダプターは、長さが44bpである。好ましい態様において、ユニバーサルアダプターが、T4 DNAリガーゼを用いて、DNA断片の各末端にライゲートされて、各DNA断片に合計88bpのヌクレオチドが付加される。異なるユニバーサルアダプターが、各DNAライブラリー調製のために特異的に設計され、従って、各生物について固有の識別子が提供される。当業者に明白であるように、ユニバーサルアダプターのサイズおよび配列を、改変することができる。

20

30

【0057】

例えば、2つの異なるユニバーサルアダプター（すなわち、「第1」および「第2」）を調製するために、市場の販売者（すなわち、Integrated DNA Technologies,IAまたはOperon Technologies,CA）から一本鎖オリゴヌクレオチドを注文することができる。一つの態様において、5'末端と3'末端の両方において、ホスホジエステル結合の代わりに2または3個のホスホロチオエート結合を用いて、合成中に、ユニバーサルアダプターオリゴヌクレオチド配列が修飾される。非修飾オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼにより迅速な変性に供され、従って、有用性が制限される。ヌクレアーゼは、ヌクレオチド塩基の間のホスホジエステル結合を開裂することによりポリヌクレオチド鎖の加水分解的開裂を触媒する酵素である。オリゴヌクレオチド用途に用いるのに利用できる一つの簡単で広く利用されているヌクレアーゼ抵抗性化学は、ホスホロチオエート修飾である。ホスホロチオエートにおいて、イオウ原子がオリゴヌクレオチド骨格中の非架橋性酸素を置き換えて、ヌクレアーゼ消化の全ての形態に抵抗性（すなわち、エンドヌクレアーゼ消化およびエキソヌクレアーゼ消化の両方に抵抗性）にする。各オリゴヌクレオチドをHPLCで精製して、合成オリゴヌクレオチド調製中に汚染または偽性オリゴヌクレオチド配列が生じないことを確保する。ユニバーサルアダプターは、平滑末端断片化DNAへの指向性ライゲーションを可能にするように設計される。平滑末端DNA断片に結合することができないと共にこれらの末

40

50

端における相互のライゲーションを防止する非相補性5'四塩基突出部を含むPCRプライミング領域を用いて、二本鎖ユニバーサルアダプターの各組を設計する。従って、アダプターの3'末端とDNA断片の5'末端との間またはDNA断片の3'末端とアダプターの5'末端との間においてしか結合が起こらない。主に相補性のオリゴヌクレオチドをアニーリングさせると共に2つの非相補性オリゴヌクレオチドの間の交差ハイブリダイゼーションを防止させる配列を用いて設計された一本鎖オリゴヌクレオチドを使用することにより、二本鎖ユニバーサルアダプター配列が生じる。一つの態様において、相補性オリゴヌクレオチドのアニーリングから、95%のユニバーサルアダプターが形成される。好ましい態様において、相補性オリゴヌクレオチドのアニーリングから、97%のユニバーサルアダプターが形成される。より好ましい態様において、相補性オリゴヌクレオチドのアニーリングから、99%のユニバーサルアダプターが形成される。最も好ましい態様において、相補性オリゴヌクレオチドのアニーリングから、100%のユニバーサルアダプターが形成される。

10

【0058】

2つのアダプターの一方を、支持体結合性部分に結合することができる。好ましい態様において、5'ビオチンが第1のユニバーサルアダプターに付加されて、ssDNAテンプレートのその後の単離およびビオチン結合タンパク質（すなわち、ストレプトアビジン、ニュートラビジンまたはアビジン）で飽和された固体支持体の表面へのユニバーサルアダプターの非共有結合が可能になる。他の結合は当技術分野において周知であり、ビオチン-ストレプトアビジンの代わりに用いることができる（例えば、抗体/抗原-エピトープ、受容体/リガンドおよびオリゴヌクレオチドの対合または相補性）。一つの態様において、固体支持体はビーズ、好ましくは、ポリスチレンビーズである。一つの好ましい態様において、ビーズは直径が約2.8 μm である。本明細書で用いられるように、このビーズは「サンプルプレップ (prep) ビーズ」と呼ばれる。

20

【0059】

一方がセンス配列を含み他方がアンチセンス（相補性）配列を含む2つのssDNAオリゴヌクレオチドを組み合わせてアニーリングすることにより各ユニバーサルアダプターを調製することができる。ユニバーサルアダプターの設計を概略的に図2に示す。

【0060】

ライゲーショ产物の単離

ユニバーサルアダプターのライゲーションにより、各末端のアダプター、非結合単一アダプターおよびアダプターダイマーを有する断片化DNAが形成される。好ましい態様において、非結合単一アダプターおよびアダプターダイマー集団から、適合されたDNAライブラリー集団を分離および単離するための方法としてアガロースゲル電気泳動が用いられる。他の態様において、サイズ排除クロマトグラフィーまたはスクロース沈殿により断片を分離することができる。DNAのDNaseI消化の手順により、典型的に、50~700bpに及ぶライブラリー集団が産生される。好ましい態様において、DNAマーカの存在下でアガロースゲル電気泳動を行う際、88bpユニバーサルアダプターセットの付加は、DNAライブラリー集団をより大きな寸法にシフトさせ、約130~800bpのサイズ範囲の泳動プロファイルが得られ、アダプターダイマーが88bpに泳動し、ライゲーションしていないアダプターが44bpに泳動する。従って、200~800bpに及ぶ寸法の多くの二本鎖DNAライブラリーを、アガロースゲルから物理的に単離し、標準的ゲル抽出技術を用いて精製することができる。一つの態様において、適合されたライゲートDNAライブラリーのゲル単離により、200~400bpに及ぶ寸法のライブラリー集団が回収される。アダプターをライゲートした断片を識別する他の方法が当業者に知られている。

30

40

【0061】

ニック修復

ユニバーサルアダプターのために用いられるDNAオリゴヌクレオチドは5'リン酸化されていないので、リガーゼ処理の後に断片化DNAの3'接合部においてギャップが存在する（図3A参照）。これらの「ギャップ」または「ニック」の二つを、ニックのあるDNA断片に結合し、鎖を置換し、伸長することができるDNAポリメラーゼ酵素を用いて、埋めること

50

ができる。3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を欠くが5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を示すDNAポリメラーゼは、ニックが修復されると共に非ニック二本鎖DNAが形成されるように、ニックを認識し、ニック鎖を置換し、鎖を伸長する性能を有する（図3Bおよび3Cを参照されたい）（Hamilton, S.C., J.W. Farchaus and M.C. Davis. 2001. DNA polymerases as engines for biotechnology. *BioTechniques* 31: 370）。

【0062】

ニック修復工程のために、制限はされないがポリメラーゼ、リガーゼおよびキナーゼを含む複数の修飾酵素が利用される。この用途に用いることができるDNAポリメラーゼには、例えば、大腸菌（*E. coli*）DNA pol I、サーモアナエロバクター・サーモヒドロスルフルカス（*Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*）pol I、およびバクテリオファージφ29がある。好ましい態様において、鎖置換性酵素パチルス・ステアロサーモフィルス（*Bacillus stearothermophilus*）pol I（Bst DNAポリメラーゼI）が、ニックのあるdsDNAを修復するために用いられ、ニックのないdsDNAが得られる（図3Dを参照）。もう一つの好ましい態様において、リガーゼはT4であり、キナーゼはポリヌクレオチドキナーゼである。

【0063】

一本鎖DNAの単離

ニックのないdsDNAの発生の後に、第1のアダプター分子と第2のアダプター分子の両方を含むssDNAが単離される（所望の集団を、アスタリスクを付して以下に示す；「A」および「B」は、第1のおよび第2のアダプターに相当する）。二本鎖DNAライブラリーは、以下の構造で結合したアダプターを有する。

ユニバーサルアダプターA-DNA断片-ユニバーサルアダプターA

ユニバーサルアダプターB-DNA断片-ユニバーサルアダプターA*

ユニバーサルアダプターA-DNA断片-ユニバーサルアダプターB*

ユニバーサルアダプターB-DNA断片-ユニバーサルアダプターB

【0064】

ユニバーサルアダプターは、一つのユニバーサルアダプターのみが5'ビオチン部分を有するように設計される。例えば、ユニバーサルアダプターBが5'ビオチン部分を有する場合、ストレプトアビジン被覆サンプルプレップビーズを用いて、全ての二本鎖DNAライブラリー種を、ユニバーサルアダプターBに結合することができる。2つのユニバーサルアダプターA種を含むゲノムライブラリー集団は、5'ビオチン部分を含まず、ストレプトアビジン含有サンプルプレップビーズに結合せず、そのために洗浄して除くことができる。ビーズに付着した状態を維持する唯一の種は、ユニバーサルアダプターAおよびBを有するもの、および2つのユニバーサルアダプターB配列を有するものである。2つのユニバーサルアダプターB配列を有するDNA種（すなわち、各5'末端にビオチン部分がある）は、二本鎖に含まれる各鎖が結合されるので、各末端においてストレプトアビジン被覆サンプルプレップビーズに結合する。ユニバーサルアダプターAおよびユニバーサルアダプターBを有する二本鎖DNA種は、単一の5'ビオチン部分を含み、従って、一つの末端のみにおいてストレプトアビジン被覆ビーズに結合する。サンプルプレップビーズは磁性があり、そのために、サンプルプレップビーズは、磁化したときに固体支持体への結合を維持する。従って、低塩（「融解」または変性）溶液の存在下において、単一のユニバーサルアダプターAおよび単一のユニバーサルアダプターB配列を含むDNA断片のみが、相補的非結合鎖を放出する。この一本鎖DNA集団を、例えば、ピロリン酸に基づく配列決定、リアルタイム定量的PCR、アガロースゲル電気泳動またはキャピラリーゲル電気泳動により収集し定量することができる。

【0065】

テンプレートのビーズへの付着

一つの態様において、本発明の方法により作られるssDNAライブラリーは、単位体積当たりの分子の数を計算するために定量される。これらの分子は、ssDNA種のユニバーサルアダプター末端のPCRプライミング領域に相補的であるオリゴヌクレオチド捕捉プライマ

ーを含む固体支持体（ビーズ）にアニーリングされる。次に、ビーズが、増幅プロトコルに移される。次に、DNAビーズ上に捕捉された単一種のクローン集団の配列を決定することができる。一つの態様において、固体支持体はビーズ、好ましくはセファロースビーズである。本明細書で用いられるように、このビーズは「DNA捕捉ビーズ」と呼ばれる。

【0066】

本明細書で用いられるビーズは、任意の都合の良い寸法であり、任意の数の既知の材料から構築することができる。そのような材料の例には、無機材料、天然ポリマー、および合成ポリマーがある。これらの材料の具体例には、セルロース、セルロース誘導体、アクリル樹脂、ガラス；シリカゲル、ポリスチレン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ビニルとアクリルアミドとのコポリマー、ジビニルベンゼン等と架橋されたポリスチレン（Merrifield Biochemistry 1964,3,1385-1390を参照されたい）、ポリアクリルアミド、ラテックスゲル、ポリスチレンデキストラン、ゴム、ケイ素、プラスチック、ニトロセルロース、セルロース、天然スポンジ、シリカゲル、ガラス、金属プラスチック、セルロース、架橋デキストラン（例えば、Sephadex（商標））およびアガロースゲル（セファロース（商標））、並びに当業者に知られている固相支持体がある。一つの態様において、DNA捕捉ビーズの直径は20～70 μm の範囲である。好ましい態様において、DNA捕捉ビーズの直径は20～50 μm の範囲である。より好ましい態様において、DNA捕捉ビーズの直径は約30 μm である。

【0067】

一つの局面において、本発明は、（a）本明細書に開示の方法に従ってssDNAテンプレートの集団を調製する工程、（b）各DNAテンプレートを、固体支持体当たり一つのDNAの分子が存在するように固体支持体に付着させる工程、（c）一本鎖テンプレートの集団を、増幅が、各固体支持体上に各DNA断片のクローン集団を生成するように増幅させる工程、（d）ビーズのクローン集団を配列させる工程を含み、固体支持体のライブラリーを生成するための方法を含む。

【0068】

一つの態様において、固体支持体はDNA捕捉ビーズである。もう一つの態様において、DNAはゲノムDNA、cDNAまたは、ウイルスRNAの逆転写体である。DNAを、例えば、ビオチン-ストレプトアビジン結合、共有結合または、相補的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションにより固体支持体に付着させることができる。一つの態様において、各DNAテンプレートを、一組のユニバーサルアダプターにライゲートする。もう一つの態様において、ユニバーサルアダプター対は、共通のPCRプライマー配列、共通の配列決定プライマー配列、および識別性キー配列を含む。固有の末端を与える一本鎖DNAを単離し、一本鎖分子を次に固体支持体に付着させ、集団のクローンの伸長用の増幅技術に供する。DNAを、PCRにより増幅することができる。

【0069】

もう一つの局面において、本発明は、本明細書に記載の方法により製造された固体支持体のライブラリーを提供する。

【0070】

この方法により調製された核酸テンプレート（例えば、DNAテンプレート）は、線状伸長、ローリングサークル増幅、PCRおよび配列決定のような多くの分子生物学的手順のために用いることができる。この方法は、例えば、ビーズ対DNAの高いモル比を用いて、結合反応において行うことができる。一本鎖DNA分子の捕捉は、ポアソン分布に従い、DNAが付着していないビーズの亜集団およびDNAの2分子が付着しているビーズの亜集団を生成する。好ましい態様において、DNAの一つの分子について一つのビーズが存在する。さらに、単離されたライブラリーのさらなる操作のために有用であるさらなる成分をアダプター中に含むことが可能である。

【0071】

2. 核酸テンプレート増幅

本発明の方法に従って核酸テンプレートの配列を決定するため、光検出手段により検出

可能なシグナルを発生させるようにテンプレートの十分な数のコピーを生成するために、コピー数を増幅しなければならない。任意の適当な核酸増幅手段を用いることができる。

【0072】

多くのインビトロ核酸増幅技術が記載されている。これらの増幅技術は次の方法に分けることができる。(i) 温度循環-ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) (例えば、Saiki, et al., 1995. Science 230: 1350-1354を参照されたい)、リガーゼ連鎖反応 (例えば、Barany, 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193; Barringer, et al., 1990. Gene 89: 117-122を参照されたい) および転写に基づく増幅 (例えば、Kwoh, et al., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177を参照されたい) を必要とする方法、および (ii) 等温増幅システム-自立性配列複製 (例えば、Guatelli, et al., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878を参照されたい)、QBレプリカーゼシステム (例えば、Lizardi, et al., 1988. BioTechnology 6: 1197-1202を参照されたい)、鎖置換増幅 (Nucleic Acids Res. 1992 Apr 11; 20 (7): 1691-6); ならびに PNAS 1992 Jan 1; 89 (1): 392-6、および NASBA J Virology Methods. 1991 Dec; 35 (3): 273-86に記載の方法。

【0073】

一つの態様において、等温増幅を用いる。等温増幅は、ローリングサークル増幅 (RCA) も含む。RCAは、例えば、Koolの米国特許第5,714,320号およびLizardiの米国特許第5,854,033号; Hatch, et al., 1999. Genet. Anal. Biomol. Engineer. 15: 35-40に記載されている。RCAの結果は、アンカープライマーの3'末端から伸長 (従って、固体支持体マトリクスに結合) され、プライマー配列にアニーリングした環状テンプレートの複数のコピーを含むコンカテマーを含む、単一のDNA鎖である。典型的には、各々が例えば約30~500、50~200または60~100ヌクレオチドのサイズ範囲である1,000~10,000個以上の環状テンプレートのコピーを、RCAにより得ることができる。

【0074】

環状核酸分子をアンカープライマーにアニーリングした後のRCA増幅の産物を、図11Aに概略的に示す。その5'末端において表面106に結合されると共に伸長に利用できる遊離3'-OHを有するアンカープライマー104に、環状テンプレート核酸102がアニーリングされる。環状テンプレート核酸102は、アンカープライマー104中の配列の領域に相補的である2つのアダプター領域108および110を含む。環状テンプレート核酸102には、以下に記載の配列決定反応において用いられる配列決定性プライマーに相同性である領域114およびインサート112も含まれる。

【0075】

アニーリングの際に、テンプレート核酸102中の配列を用いて、アンカープライマー104上の遊離3'-OHを伸長することができる。アンカープライマー102を、テンプレートに沿って複数回伸長することができ、各繰り返しにおいて、アンカープライマーから伸長された配列に、環状テンプレート核酸に相補的な配列を付加する。4回の繰り返しまたは、4回のローリングサークル複製を、伸長したアンカープライマー増幅産物114として図11Aに示す。アンカープライマーの伸長により、基質106に共有結合または他の方法で物理的に付着している増幅産物が得られる。多くのインビトロ核酸増幅技術を利用して、アンカープライマー配列を増幅させることができる。増幅は、典型的には、ポリメラーゼ、例えば、DNAまたはRNA誘導DNAポリメラーゼ、および1、2、3または4つのタイプのヌクレオチド三リン酸、および任意に、助剤結合タンパク質の存在下で行われる。通常、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を欠くなら、プライミングされた3'-OH基を伸長することができる任意のポリメラーゼを用いることができる。適当なポリメラーゼは、例えば、バチルス・ステアロサーモフィルス、サーマス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*)、ピロコッカス・フルリオシス (*Pyrococcus furiosus*)、サーモコッカス・リトラリス (*Thermococcus litoralis*)、およびサーマス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*)、バクテリオファージT4およびT7、ならびに大腸菌DNAポリメラーゼIクレノウ断片からのDNAポリメラーゼを含む。適当なRNA誘導DNAポリメラーゼには、例えば、鳥類骨髄芽球症ウイルスからの逆転写酵素、モロニーネズミ白血病ウイルスからの逆転写酵素、およびヒト免疫不全ウイル

スIからの逆転写酵素がある。

【0076】

環状テンプレートおよびアンカープライマーのさらなる態様を、図11B～11Dにより詳細に示す。図11Bは、ライゲーション時にアンカープライマーの伸長のためのテンプレートとして働くことができる、アニーリングされた開放環線形基質を示す。配列

5' - tcg tgt gag gtc tca gca tct tat gta tat tta ctt cta ttc tca gtt
gcc taa gct gca gcc a - 3' (SEQ ID NO:5)

を有するテンプレート分子を、その5'末端のビオチンリンカーおよび、配列5'-gac ctc aca cga tgg ctg cag ctt-3' (SEQ ID NO:6) を有するアンカープライマーにアニーリングする。テンプレートをアニーリングすることにより、テンプレート分子の5'末端および3'末端が近接する。アンカープライマーの3'OHを、環状テンプレートを用いて伸長することができる。

【0077】

単一ヌクレオチド多型を確認するための環状テンプレートおよびアンカープライマーの使用を、図11Cに示す。配列

5' - gac ctc aca cga tgg ctg cag ctt - 3' (SEQ ID NO:7)

を有する一般的アンカープライマーが示されている。アンカープライマーが、配列

5' - ttt ata tgt att cta cga ctc tgg agt gtg cta ccg
acg tgc aat ccg ttg act ctt atc ttc a - 3' (SEQ ID NO:8)

を有するSNPプローブにアニーリングされる。SNPプローブは、次に、配列

5' - cta gct cgt aca tat aaa tga aga taa gat cct g - 3' (SEQ ID NO:9)

を有する遺伝子のSNP含有領域の一つの領域にハイブリダイズする。多型を含む核酸配列が、SNPプローブ複合体にハイブリダイズすることにより、続いて、SNPプローブがライゲーションおよび環化される。SNPプローブは、図11Cに示すように5'および3'末端がゲノム領域にアニーリングして多型部位の領域に隣接するように設計される。続いて、環化SNPプローブを、本明細書に記載の方法を用いて伸長および配列決定することができる。多型を欠く核酸は、SNPプローブの5'末端および3'末端が隣接するようにハイブリダイズすることはない。この場合、SNPプローブは、その後の伸長に必要な環状基質を形成するようにライゲートすることはできない。

【0078】

図11Dは、環状テンプレート分子と共に、ギャップオリゴヌクレオチドを使用することを示す。配列

5'-gac ctc aca cga gta gca tgg ctg cag ctt - 3' (SEQ ID NO:10)

を有するアンカープライマーを、ビオチンリンカーを介して表面に付着させる。配列

5' - tcg tgt gag gtc tca gca tct tat gta tat tta ctt cta ttc tca gtt gcc
taa gct gca gcc a - 3' (SEQ ID NO:11)

を有するテンプレート分子を、アンカープライマーにアニーリングすると、部分的一本鎖、またはギャップのある領域、二本鎖領域により隣接されるアンカープライマーが生じる。配列

5' - tgc tac - 3'

を有するギャップ形成 (gapping) 分子が、次に、アンカープライマーにアニーリングされる。ギャップオリゴヌクレオチドの両末端をテンプレート分子にライゲーションすると、ローリングサークル増幅用のテンプレートとして作用することができる環状核酸分子が

形成される。

【0079】

基点において二本鎖分子の複製が始まると、RCAが起こり得る。続いて、ニックが鎖の一つを開き、ニックにより生じた遊離3'末端ヒドロキシ部分を、DNAポリメラーゼの作用により伸長する。新しく合成された鎖は、結局、最初の親DNA鎖を置換する。この前記タイプの複製は、複製点が環状テンプレート鎖「の周りに回転する」と考えられ、理論的には無制限に続けることができるので、ローリングサークル複製（RCR）として知られている。さらに、新しく合成されたDNA鎖は、最初のテンプレートに共有結合するので、置換された鎖は、その5'末端において最初のゲノム配列（例えば、対象となる遺伝子または他の配列）を有する。RCRにおいて、最初のゲノム配列に、最初のテンプレート配列に相補的である任意の数の「複製単位」が続き、各複製単位は、前記最初のテンプレート配列の回転を続けることにより合成される。従って、その後の各回転により、先の複製サイクルにおいて合成されたDNAを置換する。

10

【0080】

RCA反応の使用により、環化分子に対する相補物の多くのタンデムコピーを表す鎖を生成することができる。例えば、最近、ヒトゲノムDNAサンプル中の単一コピー遺伝子を検出するようにインビトロで環化南京錠プローブの等温カスケード増幅反応を行うためにRCAが利用された（Lizardi, et al., 1998. Nat. Genet. 19: 225-232を参照されたい）。さらに、固相系アッセイにおいて単一DNA分子を検出するためにもRCAが利用されたが、この技術がインサイチューでのハイブリダイゼーションに適用されたときに困難が生じた（Lizardi, et al., 1998, Nat. Genet. 19: 225-232を参照されたい）。

20

【0081】

望ましい場合、高められた温度、例えば、37℃、42℃、45℃、50℃、60℃または70℃を超える温度においてRCAを行うことができる。さらに、RCAを、最初に低い温度、例えば、室温で行い、次に、高い温度に変えることができる。高温RCAは、好ましくは、熱安定性核酸ポリメラーゼを用いて、および高温で安定かつ特異的にアニーリングすることができるプライマーを用いて行われる。

【0082】

非天然オリゴヌクレオチド、例えば、ペプチド核酸を用いてRCAを行うこともできる。さらに、一本鎖結合タンパク質のような補助タンパク質の存在下でRCAを行うことができる。

30

【0083】

RCAと呼ばれる固体支持体に固定された短いDNA分子を増幅する方法の開発が、近年、文献に記載された（例えば、

Hatch, et al., 1999. *Genet. Anal. Biomol. Engineer.* 15: 35-40; Zhang, et al., 1998. *Gene* 211: 277-85; Baner, et al., 1998. *Nucl. Acids Res.* 26: 5073-5078; Liu, et al., 1995. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 1587-1594; Fire and Xu, 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4641-4645; Nilsson, et al., 1994. *Science* 265: 2085-2088

40

を参照されたい）。RCAは、ハイブリダイゼーションおよびDNAリガーゼ反応により、特定のDNA配列を標的とする。次に、環状産物を、続いて、ローリングサークル複製反応においてテンプレートとして用いる。

【0084】

等温増幅システムの他の例には、例えば、(i) 自立性配列複製（例えば、Guatelli, et al., 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874-1878を参照されたい）、(ii) Q β レプリカーゼシステム（例えば、Lizardi, et al., 1988. *BioTechnology* 6: 1197-1202を参照されたい）および (iii) 核酸配列に基づく増幅（NASBA（商標）；Kievits, et al., 1991. *J. Virol. Methods* 35: 273-286を参照されたい）がある。

【0085】

50

核酸テンプレートのPCR増幅

好ましい態様において、テンプレート核酸のさらなるコピーを生成するためにポリメラーゼ連鎖反応（「PCR」）を用いる。PCR増幅工程は、核酸テンプレートをピコタイタープレート上に分散させる前に行うか、または、核酸テンプレートをピコタイタープレート上に分散した後に行うことができる。

【0086】

ビーズエマルジョンPCR増幅

好ましい態様において、核酸テンプレートをピコタイタープレート上に分散させる前にPCR増幅工程を行う。

【0087】

特に好ましい態様において、本明細書で「ビーズエマルジョン増幅」と呼ばれる新規増幅システムを、増幅すべきテンプレート核酸（例えば、DNA）を、好ましくは概ね球状のビーズの形態の固体支持体に付着させることにより行う。本発明のサンプル調製法により調製された一本鎖テンプレートDNAのライブラリーが、この増幅法に用いるためのビーズに付着すべき出発核酸テンプレートライブラリーの一つの適当な供給源の一例である。

【0088】

テンプレートDNAの領域に相補的な多数の単一プライマー種（すなわち、図6におけるプライマーB）に、ビーズが結合される。テンプレートDNAが、ビーズ結合プライマーにアニーリングされる。ビーズが、水性反応混合物中に懸濁され、次に、油中水エマルジョン中に封入される。エマルジョンは、熱安定性油相により囲まれた直径約60~200 μm の別個の水相微小滴からなる。各微小滴は、好ましくは、増幅反応溶液（すなわち、核酸増幅に必要な試薬）を含む。増幅の一例は、PCR反応混合物（ポリメラーゼ、塩、dNTP）および一対のPCRプライマー（プライマーAおよびプライマーB）である。図6Aを参照のこと。微小滴集団の亜集団も、DNAテンプレートを含有するDNAビーズを含む。この微小滴の亜集団が、増幅の基礎となる。この亜集団に含まれない微小滴は、テンプレートDNAを有さず、増幅に関与しない。一つの態様において、増幅技術はPCRであり、PCRプライマーが非対称PCRを行うために8:1または16:1の比（すなわち、第1のプライマー8または16に対して第2のプライマー1）で存在する。

【0089】

この概観において、ビーズに固定されたオリゴヌクレオチド（プライマーB）にDNAがアニーリングされる。熱循環（図6B）中、一本鎖DNAテンプレートと、ビーズ上の固定Bプライマーとの間の結合が破壊され、周囲のマイクロカプセル化溶液中にテンプレートを放出する。増幅溶液、この場合はPCR溶液は、さらなる溶液相プライマーAおよびプライマーBを含む。溶液相Bプライマーは、固定プライマーよりも溶液相プライマーの方が結合速度が迅速であるので、容易にテンプレートの相補的b'領域に結合する。初期相PCRにおいて、A鎖とB鎖の両方が、同等に良好に増幅する（図6C）。

【0090】

中間相PCR（すなわち、10サイクルと30サイクルとの間）により、Bプライマーが激減し、指数的増幅を停止させる。次に、反応は非対称増幅になり、アンプリコン集団はA鎖が優勢になる（図6D）。後期相PCR（図6E）において、30~40サイクル後、非対称増幅は、溶液中のA鎖の濃度を増加させる。過剰のA鎖が、ビーズ固定Bプライマーにアニーリングし始める。次に、熱安定性ポリメラーゼがA鎖をテンプレートとして利用して、アンプリコンの固定ビーズ結合B鎖が合成される。

【0091】

最終相PCR（図6F）において、連続的熱循環により、ビーズ結合プライマーにさらにアニーリングが成される。溶液相増幅は、この段階において最少であるが、固定されたB鎖の濃度が増加する。次に、エマルジョンを破壊し、固定産物を変性（熱、pH等により）により一本鎖にし、それにより、相補的A鎖を除去する。Aプライマーを、固定鎖のA'領域にアニーリングし、固定鎖に配列決定酵素および必要な補助タンパク質を充填する。次に、ビーズを、認められたピロリン酸技術（例えば、米国特許第6,274,320号、第6,258,568号

10

20

30

40

50

、および第6,210,891号に記載されており、これらは参照として本明細書に組み入れられる)を用いて配列決定する。

【0092】

温度設計

好ましい態様において、ビーズエマルジョン増幅により増幅すべきDNAテンプレートは、例えばゲノムDNAライブラリーまたはcDNAライブラリーのようなDNAの集団であり得る。集団の各メンバーが、第1の末端に共通の核酸配列を有し、第2の末端に共通の核酸配列を有することが好ましい。これは、例えば、第1のアダプターDNA配列をDNA集団の一つの末端にライゲートし、第2のアダプターDNA配列をDNA集団の第2の末端にライゲートすることにより達成することができる。多くのDNAおよびcDNAライブラリーは、クローニングベクター（例えば、Bluescript, Stratagene, La Jolla, CA）の性質により、各メンバーDNAの第1の末端において共通の配列を有し第2の末端において第2の共通の配列を有するこの記述に適合する。DNAテンプレートは、インビトロ増幅（PCRおよび非対称PCRの好ましい増幅技術を含む）をしやすい任意の寸法であり得る。好ましい態様において、DNAテンプレートは、サイズが約150~750bpであり、例えば、約250bpのサイズである。

【0093】

捕捉ビーズへの核酸テンプレートの結合

第1の工程において、増幅すべき一本鎖核酸テンプレートを、捕捉ビーズに付着させる。核酸テンプレートを、当技術分野において知られている任意の方法において、固体支持体捕捉ビーズに付着させることができる。好ましい微小ビーズのような固体支持体にDNAを付着させるための種々の方法が当技術分野に存在する。本発明によれば、ビーズにDNAを化学的に共有結合させることは、水溶性カルボジイミドのような標準的カップリング剤を用いて達成することができ、DNA上の5'リン酸基がホスホアミデート結合によりアミン被覆捕捉ビーズに結合される。もう一つの方法は、まず、同様の化学的手段を用いて特定のオリゴヌクレオチドリンカーをビーズにカップリングさせ、次に、DNAリガーゼを用いてDNAをビーズ上のリンカーに結合させることである。オリゴヌクレオチドをビーズに結合させる他の化学的結合手段は、N-ヒドロキシスクシンアミド（NHS）およびその誘導体の使用を含む。そのような方法において、オリゴヌクレオチドの一端が、固体支持体と共有結合する反応性基（例えばアミド基）を含み、リンカーの他端が、固定すべきオリゴヌクレオチドと結合することができる第2の反応性基を含む。好ましい態様において、オリゴヌクレオチドが共有結合によりDNA捕捉ビーズに結合する。しかしながら、キレート結合または抗原-抗体複合体のような非共有結合を用いて、オリゴヌクレオチドをビーズに結合させることもできる。

【0094】

制限酵素部位からの重複末端またはバクテリオファージ入に基づくクローニングベクターの「粘着末端」のようなDNA断片の末端において固有の配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドリンカーを用いることができるが、平滑末端ライゲーションも有利に用いることができる。これらの方法が、米国特許第5,674,743号に詳細に記載されている。ビーズの固定に用いられる任意の方法を、本発明の方法の工程全体を通して続けて固定オリゴヌクレオチドを結合させることが好ましい。

【0095】

一つの態様において、各捕捉ビーズは、核酸テンプレートの一部を認識する（すなわち、相補的である）複数の核酸プライマーを有するように設計され、従って核酸テンプレートが捕捉ビーズにハイブリダイズされる。本明細書に記載の方法において、テンプレート種のクローンの増幅が望まれるので、一つの固有の核酸テンプレートのみが任意の一つの捕捉ビーズに付着させることが好ましい。

【0096】

本明細書で用いられるビーズは任意の都合の良いサイズであり、任意の数の既知の材料から作られる。そのような材料の例には、無機材料、天然ポリマーおよび合成ポリマーがある。これらの材料の具体例には、セルロース、セルロース誘導体、アクリル樹脂、ガラ

ス、シリカゲル、ポリスチレン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ビニルとアクリルアミドとのコポリマー、ジビニルベンゼン等と架橋したポリスチレン（例えば、Merrifield, Biochemistry 1964, 3, 1385-1390に記載）、ポリアクリルアミド、ラテックスゲル、ポリスチレン、デキストラン、ゴム、ケイ素、プラスチック、ニトロセルロース、天然スポンジ、シリカゲル、細孔性ガラス（control pore glass）、金属、架橋デキストラン（例えば、Sephadex（商標））、アガロースゲル（セファロース（商標））、並びに当業者に知られている固相支持体がある。好ましい態様において、捕捉ビーズは直径が約25～40 μm のセファロースビーズである。

【0097】

乳化

一本鎖テンプレート核酸が付着した捕捉ビーズが、熱安定性油中水エマルジョンとして乳化される。エマルジョンは、当技術分野において知られている任意の適当な方法に従って形成することができる。エマルジョンを作る一つの方法を以下に記載するが、エマルジョンを作るための任意の方法を用いることができる。これらの方法は、当技術分野において知られており、アジュバント法、向流法、交差流法、回転ドラム法、および膜法を含む。さらに、マイクロカプセルのサイズを、成分の流量および速度を変えることにより調節することができる。例えば、滴加において、液滴の寸法および送達の合計時間を変えることができる。好ましくは、エマルジョンは、約3,000ビーズ/ μl の密度でビーズ「マイクロリアクター」を含む。

【0098】

エマルジョンは、好ましくは、テンプレート付着ビーズを、増幅溶液中に懸濁させることにより得られる。本明細書で用いられる「増幅溶液」という用語は、テンプレートDNAの増幅を行うのに必要な試薬の十分な混合物を意味する。増幅溶液の一例、すなわちPCR増幅溶液が以下の実施例において提供されるが、このPCR溶液は種々に変化させ得ると考えられる。

【0099】

一つの態様において、ビーズ/増幅溶液混合物を、生物適合性油（例えば、軽油、Sigma製）の回転している混合物中に滴下して乳化させる。用いられる油に、一つまたは複数の生物適合性エマルジョン安定化剤を補足することができる。これらのエマルジョン安定化剤には、Atlox 4912、Span 80、および他の認識され市販されている適当な安定化剤がある。好ましくは、形成される液滴の寸法は5 μm ～500 μm 、より好ましくは約50～300 μm 、最も好ましくは100～150 μm である。

【0100】

マイクロリアクターのサイズは制限されない。マイクロリアクターは、必要な増幅度のために十分な増幅試薬を含むように十分に大きい必要がある。しかしながら、マイクロリアクターは、各々がDNAライブラリーのメンバーを含むマイクロリアクターの集団を、従来の実験室設備（例えば、PCR熱循環設備、試験管、インキュベーター等）により増幅できるように十分に小さい必要がある。

【0101】

前述の制限により、マイクロリアクターの最適なサイズは、直径が100～200 μm であり得る。このサイズのマイクロリアクターにより、体積が10ml未満のマイクロリアクターの懸濁液中で約600,000のメンバーを含むDNAライブラリーの増幅が可能になる。例えば、PCRが選択された増幅法である場合、96本管の容量を持つ普通の熱サイクラーの96本の管中に10mlが満たされる。好ましい態様において、600,000個のマイクロリアクターの懸濁液は、体積が1ml未満である。1ml未満の懸濁液を、従来のPCR熱サイクラーの約10本の管中で増幅することができる。最も好ましい態様において、600,000個のマイクロリアクターの懸濁液は体積が0.5ml未満である。

【0102】

増幅

封入後、転写に基づく増幅システム

(Kwoh D.

et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:1173 (1989); Gingeras T. R. et al., PCT appl. WO

88/10315; Davey, C. et al., 欧州特許出願第 329,822 号 ; Miller, H.

I. et al., PCT appl. WO 89/06700, およびレース (race) (Frohman, M. A., In: PCR Protocols: A Guide

to Methods and Applications, Academic Press, NY (1990)) および「一方向 PCR」 (Ohara, O.

et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:5673-5677 (1989))

を含むDNA増幅の任意の適当な方法により、テンプレート核酸を増幅させることができる。 「ジ-オリゴヌクレオチド」増幅、等温増幅 (Walker, G.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89: 392-396 (1992)) およびローリングサークル増幅 (5,714,320で概説) のような一般性のより低い他の方法を、本発明で用いることができる。

10

【0103】

好ましい態様において、DNA増幅をPCRにより行う。本発明によるPCRを、PCR用の全ての必要な試薬を含むPCR溶液を用いて、ビーズに結合された標的核酸を封入することにより行うことができる。次に、PCRを、当技術分野において知られている任意の適当な熱サイクル方式にエマルジョンを曝すことにより行うことができる。好ましい態様において、30~50サイクル、好ましくは約40サイクルの増幅が行われる。増幅手順に続いて、増幅サイクルの後に一つまたは複数のハイブリダイゼーションおよび伸長サイクルを設けることが望ましいが、必要ではない。好ましい態様において、10~30サイクル、好ましくは約25サイクルのハイブリダイゼーションおよび伸長が行われる (例えば、実施例に記載)。一般的には、ビーズ当たり典型的には少なくとも2百万~5千万、好ましくは約1千万~3千万のテンプレートDNAのコピーが固定されるまで、テンプレートDNAを増幅する。

20

【0104】

エマルジョンの破壊およびビーズ回収

テンプレートの増幅に続いて、エマルジョンを「破壊」する (当技術分野において「解乳化」とも呼ばれる)。エマルジョンを破壊する多くの方法があり (例えば、米国特許第5,989,892号およびそこに引用された参考文献を参照されたい)、当業者は適当な方法を選択することができる。本発明において、エマルジョンを破壊する一つの好ましい方法は、さらなる油を添加して、エマルジョンを2相に分離させる。次に油相を除去し、適当な有機溶媒 (例えば、ヘキサン) を添加する。混合後、油/有機溶媒相を除去する。この工程を数回繰り返すことができる。最後に、ビーズ上の水層を除去する。次に、ビーズを、有機溶媒/アニーリング緩衝混合物 (例えば、一つの適当なアニーリング緩衝液が実施例に記載されている) で洗い、次に、アニーリング緩衝液中で再び洗浄する。適当な有機溶媒は、メタノール、エタノール等のアルコールを含む。

30

【0105】

増幅テンプレート含有ビーズを、次に、例えば、既知の技術による配列決定反応に用いるために水溶液中に再懸濁させることができる (

40

Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5463-5467 (1977); Maxam, A. M. &

Gilbert, W. Proc Natl Acad Sci USA 74, 560-564 (1977); Ronaghi, M. et al., Science 281,

363, 365 (1998); Lysov, I. et al., Dokl Akad Nauk SSSR 303, 1508-1511 (1988); Bains W. &

Smith G. C. J.TheorBiol 135, 303-307(1988); Drmanac, R. et al., Genomics 4, 114-128

(1989); Khrapko, K. R. et al., FEBS Lett 256. 118-122 (1989); Pevzner P. A. J Biomol Struct

Dyn 7, 63-73 (1989); Southern, E. M. et al., Genomics 13, 1008-1017 (1992)

を参照されたい)。ビーズをピロリン酸に基づく配列決定反応 (例えば、米国特許第6,274,320号、第6,258,568号、および第6,210,891号に記載されており、これらは参照として本明細書に組み入れられる) に用いる場合、PCR産物の第2の鎖を除去し、ビーズに結合さ

50

れた一本鎖テンプレートに配列決定プライマーをアニーリングすることが必要である。

【0106】

簡単に言えば、NaOH、低イオン（例えば、塩）強度または熱処理のような一般的に知られている任意の数の方法を用いて、第2の鎖を融解除去する。この融解工程に続いて、ビーズをペレット化し、上澄みを廃棄する。ビーズをアニーリング緩衝液中に再懸濁し、配列決定プライマーを添加し、標準的アニーリングサイクルを用いてビーズ付着一本鎖テンプレートにアニーリングする。

【0107】

ビーズの精製

この時点において、ビーズ上の増幅DNAを、ビーズ上で直接または、異なる反応容器内で配列決定することができる。本発明の一つの態様において、ビーズを反応容器に移し、DNAを配列決定反応（例えば、ピロリン酸に基づく配列決定またはサンガー配列決定）に供することにより、DNAをビーズ上で直接配列決定する。または、ビーズを単離し、DNAを各ビーズから除去し配列決定することができる。いずれの場合にも、個々それぞれのビーズ上において配列決定工程を行うことができる。しかしながら、この方法は、商業的に実行可能であり技術的に可能であるが、最も効果的ではない。これは、ビーズの多くが、陰性ビーズ（付着した増幅DNAを有さないビーズ）であるからである。従って、ピコタイタープレート上での分布の前に核酸テンプレートを含まないビーズを除去するために以下の任意のプロセスを用いることができる。

【0108】

初期DNA付着の目的がDNAの2つの異なるコピーを有するビーズを最小化することである場合、ビーズの多くの部分が「陰性」（すなわち、付着した増幅核酸テンプレートを有さない）である。有用なピロリン酸に基づく配列決定のためには、各ビーズは、DNAの単一種の複数のコピーを含むべきである。この要求は、（増幅前に）結合しているDNAの単一断片を有するビーズの合計数を最大化することにより、最も近く満たされる。この目的は、数学的モデルを観察することにより達成することができる。

【0109】

M個のビーズ中にランダムに分布されたN個のDNAの一般的な場合に、任意数のDNAを含む相対的ビーズ集団は、N/Mの比に依存する。N個のDNA R(N)を含むビーズの割合は、ポアソン分布を用いて計算することができる。

$$R(N) = \exp(-N/M) \times (N/M)^N / N! \quad (\text{式中、} X \text{は乗算記号である})$$

【0110】

以下の表は、種々のN/M（平均DNA断片とビーズとの比）およびN（ビーズに実際に結合している断片の数）について計算された値を示す。

【0111】

N/M	0.1	0.5	1	2
R(0)	0.9	0.61	0.37	0.13
R(1)	0.09	0.3	0.37	0.27
R(N>1)	0.005	0.09	0.26	0.59

【0112】

この表において、最上列は、N/Mの種々の比を表す。R(0)は、DNAを有さないビーズの割合を表し、R(1)は一つのDNAが付着しているビーズの割合（増幅前）を表し、R(N>1)は1より多くのDNAが付着しているDNAの割合（増幅前）を表わしている。

【0113】

表は、単一DNA断片を含むビーズの最大割合が0.37（37%）であり、断片とビーズとの比が1において生じることを示している。この混合物において、ビーズの約63%が、配列決定に役立たない。これらは、DNAを有さないか、1より多くの1種のDNAを有するからである。さらに、断片対ビーズ比の調節は複雑な計算を必要とし、可変性により、使用可能なビーズの割合が著しく小さなビーズバッチを産生することがある。

【0114】

この非効率性、アンプリコンを含むビーズ（少なくとも一つの断片の結合から発生する）を、アンプリコンを有さないビーズ（断片が結合していないビーズから発生する）から分離することができれば、著しく改善することができる。アンプリコンは、インビトロ核酸増幅技術により生成される任意の核酸分子として定義される。結合は、低い平均断片対ビーズ比（ $N/M < 1$ ）において行われ、1より多くのDNAが結合しているビーズの比が最小化する。分離工程により、DNAを有さないビーズの大部分または全てが除去され、一つの種の増幅DNAを有するビーズの濃縮集団が残る。これらのビーズを、例えば、ピロリン酸配列決定のような任意の配列決定の方法に適用することができる。一つのアンプリコン（ $N = 1$ ）を有するビーズのフラクションが濃縮されているので、配列決定の任意の方法がより効果的である。

10

【0115】

一例として、平均断片対ビーズ比0.1の場合、ビーズの90%はアンプリコンを有さず、ビーズの9%は一つのアンプリコンを有するので有用であり、ビーズの0.5%が1つより多くのアンプリコンを有する。本発明の濃縮プロセスは、ゼロアンプリコンビーズの90%を除去し、配列決定できるフラクション（ $N = 1$ ）が

$$1 - (0.005/0.09) = 94\%$$

であるビーズの集団が残る。

【0116】

アンプリコンを含むビーズの分離とともに、断片をビーズ混合物に希釈することは、最適な非濃縮方法に比べて2.5倍の濃縮を提供し得る。94%/37%（前記表を参照、 $N/M = 1$ ） $= 2.5$ 。本発明の濃縮手順のさらなる利点は、配列決定可能なビーズの最終的割合が、 N/M の可変性に比較的感受性がないことである。すなわち、最適 N/M 比を誘導するための複雑な計算は、不必要であるか、低いレベルの正確さで行うことができる。これは、最終的には、手順を、あまり訓練されていない人員によりまたは自動的に行うのに、より適しているようにする。この手順のさらなる利益は、ゼロアンプリコンビーズを再生利用および再使用することである。再生利用は必要でないが、これは、試薬のコストまたは合計体積を低減させ、その本発明の方法を、例えば、移動可能なサンプリング、遠隔ロボットサンプリング等のような一部の目的に適しているようにすることができる。さらに、この手順の全ての利点（すなわち、あまり訓練されていない人員、自動化、試薬の再生利用）が、この手順の費用を減少させる。この手順を、以下により詳細に説明する。

20

30

【0117】

前記ビーズエマルジョン法において増幅されたビーズを処理するために濃縮手順を用いることができる。各増幅された分子がその3'末端において同じDNA配列を含むように増幅が設計される。ヌクレオチド配列は20量体であってよいが、15塩基以上の任意の配列、例えば、25塩基、30塩基、35塩基または40塩基以上であり得る。当然、より長いオリゴヌクレオチド末端が機能的であるが、それらは必要ではない。このDNA配列を、当業者により、増幅DNAの末端に導入することができる。例えば、DNAの増幅にPCRを用いる場合、配列は、PCRプライマー対の一つのメンバーの一部である。

【0118】

濃縮プロセスの概略を図7に示す。ここで、4個の空ビーズと混合されたアンプリコン結合ビーズは、断片希釈増幅ビーズ混合物を表す。工程1において、アンプリコンの3'末端に相補的なビオチン化プライマーを、アンプリコンにアニーリングする。工程2において、DNAポリメラーゼおよび4つの天然デオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）をビーズ混合物に添加し、ビオチン化プライマーを伸長する。この伸長は、ビオチン化プライマーとビーズ結合DNAとの間の結合を高めるためである。この工程は、ビオチン化プライマー-DNA結合が強力である場合（例えば、高イオン性環境中）、省略することができる。工程3において、磁場による引力を受けやすいストレプトアビジン被覆ビーズ（本明細書で、「磁性ストレプトアビジンビーズ」と呼ばれる）を、ビーズ混合物に導入する。磁性ビーズは、例えば、Dynal（M290）から市販されている。ストレプトアビジン捕捉部分は、アンプ

40

50

リコンにハイブリダイズしたビオチンに結合し、それにより、アンプリコン結合ビーズが特異的に磁性ストレプトアビジンビーズに固定される。

【0119】

工程5において、磁場（磁石により出される）が反応混合物の近くに適用され、それにより、全ての「磁性ストレプトアビジンビーズ/アンプリコン結合ビーズ複合体」が、磁場に最も近い管の一つの側部に沿って配置される。アンプリコン結合ビーズが付着していない磁性ビーズも同じ側部に沿って配置されることが予想される。アンプリコンを有さないビーズは、溶液中に留まる。ビーズ混合物が洗浄され、磁石により固定されていないビーズ（すなわち、空ビーズ）が除去され廃棄される。工程6において、伸長したビオチン化プライマー鎖が、例えば加熱またはpHの変化により達成することができる工程である「融解」によりアンプリコン鎖から分離される。加熱は、低塩条件（すなわち、 $0.1 \times \text{SSC}$ のような低イオン性環境）において 60°C である。pHの変化は、NaOHの添加により達成することができる。次に、混合物を洗い、アンプリコン結合ビーズを含む上澄みを回収する一方、ここで非結合の磁性ビーズが磁場により保持される。得られる濃縮ビーズを、DNA配列決定に用いることができる。DNA捕捉ビーズ上のプライマーが、前記工程2のプライマーと同じであり得ることが注目される。この場合、アンプリコンプライマー相補鎖のアニーリング（伸長ありまたは伸長無し）が、標的捕捉親和性の供給源である。

10

【0120】

ビオチンストレプトアビジン対を、種々の捕捉標的対により置き換えることができる。2つのカテゴリーは、その結合がその後開裂される対と、実用的に達成し得る条件下で不可逆的に結合する対である。開裂可能な対は、標的-捕捉複合体の開裂が望まれる場合、チオール-チオール、ジゴキシゲニン-抗ジゴキシゲニン、Captavidin（商標）を含む。

20

【0121】

前述のように、工程2は任意である。工程2を省略する場合、アンプリコン結合ビーズから磁性ビーズを分離することは必要でないかもしれない。アンプリコン結合ビーズは、磁性ビーズが付着し、配列決定に直接用いることができる。配列決定を微小ウェル内で行うべき場合、アンプリコン結合ビーズ-磁性ビーズ複合体が微小ウェルの内側に適合するならば、分離は必要でない。

【0122】

磁性捕捉ビーズの使用が都合よいが、捕捉部分は他の表面に結合することができる。例えば、ストレプトアビジンを、管の内面のような表面に化学的に結合することができる。この場合、増幅したビーズ混合物を流通させることができる。アンプリコン結合ビーズは、「融解」するまで保持される傾向があるが、空ビーズは通過する。この配置は、ビーズ調製プロセスの自動化に特に有利であり得る。

30

【0123】

前述の態様は特に有用であるが、ビーズを分離するために他の方法を考えることができる。例えば、捕捉ビーズを、標的-捕捉ビーズ複合体を蛍光性にする蛍光部分で標識することができる。標的-捕捉ビーズ複合体は、フローサイトメトリーまたは蛍光細胞ソーターで分離することができる。大きな捕捉ビーズを用いると、濾過または他の粒径分離技術による分離が可能になる。捕捉ビーズと標的ビーズの両方が、多くの他のビーズと複合体を形成することができるので、架橋された捕捉-標的ビーズの塊を凝集させることができる。凝集塊の寸法が大きいので、凝集していない空ビーズを簡単に洗浄除去することにより分離することが可能になる。この方法は、例えば、Bauer, J. ; J.Chromatography B, 722 (1999) 55-69およびBrody et al., Applied Physics Lett. 74 (1999) 144-146に、より詳細に記載されている。

40

【0124】

前記方法により調製された核酸テンプレートの単一種の複数のコピーを各々が含むDNA捕捉ビーズは、ピコタイタープレート上に分布させるのに適している。

【0125】

ピコタイタープレート上での核酸増幅

50

別の態様において、核酸テンプレートを、増幅前にピコタイタープレート上に分布させ、次に、ピコタイタープレート上でインサイチューで増幅させる。この方法を実施例に詳細に記載する。

【0126】

3. 核酸テンプレートの配列決定

ピロリン酸配列決定を、本発明の方法に従って用いて、核酸テンプレートの配列を決定する。この技術は、DNA合成中に放出されたピロリン酸塩 (Ppi) を検出することに基づく。例えば、Hyman, 1988. A new method of sequencing DNA. Anal Biochem. 174: 423-36; Ronaghi, 2001. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. Genome Res. 11: 3-11 を参照されたい。

10

【0127】

酵素的反応のカスケードにおいて、組み込んだヌクレオチドの数に比例して可視光が生じる。無機Ppiが放出されポリメラーゼによりヌクレオチドが組み込まれる核酸重合反応からカスケードが開始する。放出されたPpiがATPスルフィラーゼによりATPに転換され、それにより、エネルギーをルシフェラーゼに提供して、ルシフェリンを酸化し光を発生させる。添加されたヌクレオチドは既知なので、テンプレートの配列を決定することができる。固相ピロリン酸に基づく配列決定は、三酵素系中で固定DNAを利用する (図を参照)。シグナル雑音比を増すために、天然dATPを、dATP α Sで置換した。典型的に、dATP α Sは、2つの異性体 (SpおよびRp) の混合物であり; ピロリン酸に基づく配列決定において純粋な2'-デオキシアデノシン-5'-0'-(1-チオトリホスフェート) Sp-異性体を用いると、実質的に長い読み取り、最大二倍の読み取り長が得られる。

20

【0128】

4. 核酸の配列を決定するための装置

本発明は、通常、配列決定反応を行うための一つまたは複数の反応チャンバー、反応チャンバーからおよび反応チャンバーに反応体を送達するための手段、および配列決定反応事象を検出するための手段を含む、核酸の配列を決定するための装置を提供する。もう一つの態様において、この装置は、平坦表面上に複数の空洞を含む試薬送達キュベットを含む。好ましい態様において、この装置は、装置の個々の成分を制御するため、および配列決定反応事象の検出から得られる情報を貯蔵および/または分析するための少なくとも一つのコンピューターに接続される。

30

【0129】

本発明は、核酸テンプレートおよび定められた空間中での配列決定反応における反応体を別々に局在化させ、かつ配列決定反応事象を検出させる、本明細書で「固体支持体」とも呼ばれる、不活性基質材料上に配列された一つまたは複数の反応チャンバーも提供する。すなわち、本明細書で用いられる「反応チャンバー」または「分析体反応チャンバー」という用語は、例えば核酸配列決定反応において反応体の相互作用を容易にする基質材料上の局在領域を指す。以下により詳細に説明するように、本発明により考えられる配列決定反応は、好ましくは、多くの個々の核酸サンプル上でタンデムに起こり、特に、同時に、ゲノムおよび染色体核酸テンプレート (例えば、DNA) から誘導された多くの核酸サンプルの配列を決定する。

40

【0130】

従って、本発明の装置は、好ましくは、そのような多くの個々の配列決定反応を行うために、十分な数の反応チャンバーを含む。一つの態様において、少なくとも10,000個の反応チャンバー、好ましくは少なくとも50,000個の反応チャンバー、より好ましくは100,000個を超える反応チャンバー、さらにより好ましくは200,000個を超える反応チャンバーがある。

【0131】

同時配列決定反応の数は、反応チャンバーの数により制限されるので、処理量は、増加密度のウェルを含むプレートを作成することにより増やすことができる。以下の表は、25×75mmおよび40×75mmのアレイからそれぞれ誘導される14×43mmおよび30×60mmの活性領

50

域についての、この進行を示す。

【0132】

(表) 高ウェル数アレイの開発

ピッチ (μm)	ウェル 直径 (μm)	ウェル数 (14 x 43 mm)	ウェル数 (30 x 60 mm)
50	44	275K	800K
43	38	375K	1.2M
35	31	575K	1.6M
25	22	1.1M	3.2M

10

【0133】

アレイ上の反応チャンバーは、典型的に、反応体をその中に配置することができる幅および深さを有する基質材料中の空洞またはウェルの形態となる。典型的には、核酸テンプレートが、一つまたは複数の固体支持体またはビーズ上の反応チャンバー中に分布し、反応体は、反応を容易にすると共に反応チャンバーを流通する媒体中に含まれる。空洞またはウェルとして形成される場合、これらの反応チャンバーは、好ましくは、(i) 必要な反応体の反応チャンバーへの導入、(ii) 反応チャンバー内で起こる反応、および (iii) 反応チャンバー間の反応体の混合の阻害、に十分な寸法および順番である。ウェルまたは空洞の形状は、好ましくは、環状または円筒状であるが、環状または円筒状に近づくような多面体とすることができる。一つの好ましい態様において、ウェルまたは空洞の形状は、実質的に六角形である。空洞は平滑な壁面を有する。さらなる態様において、空洞は、少なくとも一つの不規則な壁面を有する。空洞は、平滑底部または凹面底部を有することができる。

20

【0134】

反応チャンバーは、 $5\mu\text{m}$ ~ $200\mu\text{m}$ の間隔で配置することができる。間隔は、2つの隣接反応チャンバー間の中心間隔を測定することにより決められる。典型的には、反応チャンバーは、 $10\mu\text{m}$ ~ $150\mu\text{m}$ の間隔、好ましくは $20\mu\text{m}$ ~ $100\mu\text{m}$ の間隔、最も好ましくは $40\mu\text{m}$ ~ $60\mu\text{m}$ の間隔で配置することができる。一つの態様において、反応チャンバーは、一つの次元の幅（直径）が $0.3\mu\text{m}$ ~ $100\mu\text{m}$ 、より好ましくは $20\mu\text{m}$ ~ $70\mu\text{m}$ 、最も好ましくは約 $30\sim 50\mu\text{m}$ である。反応チャンバーの深さは、好ましくは $10\mu\text{m}$ ~ $100\mu\text{m}$ 、より好ましくは $20\mu\text{m}$ ~ $60\mu\text{m}$ である。または、反応チャンバーは、反応チャンバーの一つの寸法の幅の0.25~5倍の深さを有し、もう一つの態様において、反応チャンバーの一つの寸法の幅の0.3~1倍の深さを有する。

30

【0135】

好ましい態様において、アレイは、スライスされた光ファイバー束（すなわち、溶融光ファイバーケーブルの束）から形成され、反応チャンバーは、光ファイバーリアクターアレイの一つの表面をエッチングすることにより形成される。空洞を、エッチング、成形または微細機械加工により基質中に形成することもできる。

【0136】

各空洞または反応チャンバーは、典型的に、深さが $10\mu\text{m}$ ~ $100\mu\text{m}$ である、または、深さが、空洞の幅の寸法の0.25~5倍、好ましくは空洞の幅の寸法の0.3~1倍である。

40

【0137】

一つの態様において、本明細書に記載のアレイは、典型的に、平坦頂部表面および平坦底部表面を含み、これは、反応チャンバーからの光シグナルを底部平坦表面を通して検出できるように導光性である。これらのアレイにおいて、典型的に、頂部表面と底部表面との間の距離は10cmを越えず、好ましくは2cmを超えず、通常、 0.5mm ~ 5mm 、最も好ましくは約2mmである。

【0138】

特に好ましい態様において、固体支持体をピコタイタープレートと呼び、反応チャンバーは中心間隔が約 $43\mu\text{m}$ ~ $50\mu\text{m}$ であり、ウェルの直径が $38\mu\text{m}$ ~ $44\mu\text{m}$ であり、ウェル体

50

積が10～150pL、好ましくは20～90pL、より好ましくは40～85pL、最も好ましくは75pLである。

【0139】

一つの態様において、アレイの各空洞または反応チャンバーは、核酸またはタンパク質を分析するための試薬を含む。典型的に、核酸を含む反応チャンバーは（アレイ中の全ての反応チャンバーがそうする必要はないが）、核酸の単一の種（すなわち、対象となる一本鎖）のみを含む。特定の反応チャンバー中にはこの種の核酸の単一コピーが存在し得るか、あるいは、複数のコピーが存在し得る。通常、反応チャンバーが、核酸テンプレート配列の少なくとも100,000個のコピー、好ましくは少なくとも1,000,000個のコピー、より好ましくは2,000,000～20,000,000個のコピー、最も好ましくは5,000,000～15,000,000個の核酸のコピーを含むことが好ましい。当業者は、任意の一つの反応チャンバー中の核酸種のコピーの数における変化が、ピロシーケンシング（pyrosequencing）反応において生じる光子の数に影響を与え、必要に応じてより多くまたはより少ないの光子シグナルを提供するように日常的に調節し得ることを理解する。一つの態様において、PCR、RCA、リガーゼ連鎖反応、他の等温増幅、または核酸増幅の他の従来手段を用いて、核酸種を増幅して所望数のコピーを提供する。一つの態様において、核酸は一本鎖である。

10

【0140】

固体支持体材料

表面がプライマーの安定付着および核酸配列の検出を可能にするなら、いかなる材料も固体支持体材料として用いることができる。固体支持体材料は平坦であるかまたは空洞を設けることができる（例えば、微小電気機械システムの構築において一般的に用いられる技術を用いて、平坦表面中にエッチング、成形、または他の方法で微細機械加工された、マイクロウェルまたは空洞を設けた光ファイバーの末端）。例えば、

20

Rai-Choudhury, HANDBOOK OF MICROLITHOGRAPHY, MICROMACHINING, AND MICROFABRICATION, VOLUME I: MICROLITHOGRAPHY, Volume PM39, SPIE Press (1997); Madou, CRC Press (1997), Aoki, *Biotech. Histochem.* 67: 98-9 (1992); Kane *et al.*, *Biomaterials*. 20: 2363-76 (1999); Deng *et al.*, *Anal. Chem.* 72:3176-80 (2000); Zhu *et al.*, *Nat. Genet.* 26:283-9 (2000)

30

を参照されたい。一部の態様において、固体支持体は光学的に透明であり、例えばガラスである。

【0141】

光学的透明固体支持体上の付着部位のアレイを、例えば、米国特許第5,143,854号、第5,445,934号、第5,744,305号、および第5,800,992号；

Chee *et al.*, *Science* 274: 610-614

(1996); Fodor *et al.*, *Nature* 364: 555-556 (1993); Fodor *et al.*, *Science* 251: 767-773

(1991); Gushin, *et al.*, *Anal. Biochem.* 250: 203-211 (1997); Kinoshita *et al.*, *Cell* 93: 21-24

(1998); Kato-Yamada *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273: 19375-19377 (1998);およびYasuda *et al.*,

40

Cell 93: 1117-1124 (1998)

に記載の付着用技術に記載のような電子集積回路の構築において一般的に用いられるリソグラフィ技術を用いて構築することができる。リソグラフィおよび電子線リソグラフィは、修飾された生物分子（例えば、タンパク質または核酸）を付着させる結合性基で、固体支持体または基質を感作する。例えば、

Service, *Science* 283: 27-28

(1999); Rai-Choudhury, HANDBOOK OF MICROLITHOGRAPHY, MICROMACHINING, AND

MICROFABRICATION, VOLUME I: MICROLITHOGRAPHY, Volume PM39, SPIE Press (1997)

を参照されたい。または、感作部位のアレイを、Zasadzinski et al., *Science* 263: 1726-1733 (1994) に記載のような薄膜技術を用いて生成することができる。

【0142】

基質材料は、好ましくは、反応事象の検出を容易にする材料から作られる。例えば、典型的な配列決定反応において、配列決定すべきサンプル核酸へのdNTPの結合を、配列決定反応において遊離されたホスフェートへの酵素作用により生じた光子を検出することによりモニターすることができる。すなわち、透明または導光製材料からなる基質材料を有することは、光子の検出を容易にする。

10

【0143】

一部の態様において、固体支持体を、光産物を検出および伝導するのに用いられる光ファイバー束に結合させることができる。束中の光ファイバーの合計数を、配列決定反応において利用されるアレイ中の個々の反応チャンバーの数に適合するように変化させることができる。この束に組み込まれた光ファイバーの数は、1:1結像を起こすように検出装置の解像度を適合させるように設計される。束の全体的寸法は、反応チャンバー中の所望の試薬（フロー）特性を維持しつつ、検出装置の使用可能領域を最適化するように選択される。すなわち、15 μm ピクセルを有する4096 $\times$ 4096ピクセルCCD（電荷結合素子）の場合、ファイバー束は約60mm $\times$ 60mmになるように、または約90mmの直径を有するように選択される。所望数の光ファイバーを、最初に、束または光ファイバーアレイ中に溶融し、その末端を、次に、切断し、所望の厚さ（例えば、1.5mm）の「ウエハ」を形成するように研磨する。得られる光ファイバーウエハは、ガラスの平面に類似の取り扱い特性を有する。この個々の繊維は、任意のサイズ直径であり得る（例えば、3 μm ~100 μm ）。

20

【0144】

一部の態様において、2つの光ファイバー束が用いられる。第1の束は検出装置（本明細書で、ファイバー束またはコネクタとも呼ばれる）に直接付着され、第2の束が、反応チャンバー基質（ウエハまたは基質）として用いられる。この場合、両者が直接接触して配置され、任意に、光学的結合性流体が用いられ、それにより、検出装置上に反応中心が結像される。CCDを検出装置として用いる場合、ウエハは、CCD領域の使用を最大化するために、僅かに大きくすることができる、または、典型的顕微鏡のスライドのフォーマット：25mm $\times$ 75mmに適合するように僅かに小さくすることができる。束中の個々の繊維の直径は、単一反応が、当技術分野の制約内で、検出装置中の単一ピクセル上に結像される可能性を最大化するように選択される。直径の例としては、ファイバー束について6~8 μm であり、ウエハについて6~50 μm であるが、3~100 μm の範囲内のいかなる直径を用いることもできる。ファイバー束は、CCDカメラ製造者から市場で得ることができる。例えば、ウエハは、Incom, Inc. (Charlton, MA) から得ることができ、0.5~5mmの厚さが可能であるが典型的には2mmの厚さの光ファイバーの大きな融合体から切断および研磨される。ウエハは、窓ガラスまたは顕微鏡ガラススライドに類似の取り扱い特性を有する。

30

40

【0145】

光ファイバー材料から作られた基質中に反応チャンバーを形成することができる。例えば酸で繊維の束の末端を処理することにより、光ファイバーの表面にくぼみが設けられ、光ファイバー材料を形成する。すなわち、一つの態様において、光ファイバー束から空洞が形成され、好ましくは、光ファイバー束の一端をエッチングすることにより空洞を設けることができる。空洞を設けた各表面が、反応チャンバーを形成する。そのようなアレイは、本明細書で、光ファイバーリアクターアレイ、すなわちFORAと呼ばれる。刻みの深さは、個々の光ファイバーの直径の約半分から、繊維の直径の2~3倍までに及ぶ。光ファイバーウエハの片側を酸浴中に種々の時間浸すことにより、繊維の末端に空洞を導入するこ

50

とができる。時間は、所望の反応空洞の全深さに依存して変わることができる（例えば、Walt, et al., 1996. Anal. Chem. 70: 1888を参照されたい）。広いチャンネル空洞は、約14mm×43mmの均一流速寸法を有する。すなわち、このおよその寸法および約 4.82×10^{-4} 空洞/ μm^2 の密度で、装置は、流体が入ることができる空洞を約290,000個有することができる。光ファイバー束の端部においてエッチングされた空洞中に分子を付着させる（および、付着分子を脱着させる）幾つかの方法が当技術分野において知られている。例えば、

Michael, et al., *Anal. Chem.* 70: 1242-1248 (1998);

Ferguson, et al., *Nature Biotechnology* 14: 1681-1684 (1996); Healey and Walt, *Anal.*

Chem. 69: 2213-2216 (1997)

10

を参照されたい。反応性部位のパターンを、平坦支持体上の反応パッドのパターンの生成において用いられる技術に類似のフォトリソグラフィー技術を用いて、マイクロウェル内に作ることもできる。

Healey, et al., *Science* 269: 1078-1080

(1995); Munkholm and Walt, *Anal. Chem.* 58: 1427-1430 (1986),およびBronk, et al., *Anal.*

Chem. 67: 2750-2757 (1995)

を参照されたい。

20

【0146】

光ファイバーウエハの対向側（すなわち、非エッチング側）は、典型的に、第2の光ファイバー束に光学的に結合（例えば、浸漬油または他の光学的結合性流体により）させるように、高度に研磨される。この第2の光ファイバー束は、反応チャンバーを含む光学的ウエハの直径に正確に適合し、CCD結像システムまたはカメラのような取り付けられた検出装置に光産物を送るための導管として作用することができる。

【0147】

一つの好ましい態様において、例えば、水溶液中15% H_2O_2 /15% NH_4OH 体積：体積で繰り返し洗い、次に脱イオン水で6回濯ぎ、次に0.5M EDTAで濯ぎ、次に脱イオン水で6回濯ぎ、次に15% H_2O_2 /15% NH_4OH で濯ぎ、次に脱イオン水で6回濯ぐ（各洗浄において半時間インキュベーション）ことにより、光ファイバーウエハが完全に清浄化される。

30

【0148】

光ファイバーウエハの表面は、好ましくは、被覆されて、配列決定反応におけるその使用が容易になる。被覆された表面は、好ましくは、光学的に透明であり、タンパク質および核酸の付着が容易であり、固定されたタンパク質の活性に悪影響を与えない。さらに、この表面は、好ましくは、マクロ分子の非特異的吸収を最小化し、結合したマクロ分子（例えば、付着した核酸およびタンパク質）の安定性を高める。

【0149】

アレイを被覆するための適当な材料には、例えば、プラスチック（例えば、ポリスチレン）がある。プラスチックは、好ましくは、スピンコートまたはスパッタリングすることができる（厚さ $0.1 \mu\text{m}$ ）。アレイを被覆するための他の材料は金層、例えば、24カラット金で厚さ $0.1 \mu\text{m}$ の層であり、長鎖チオアルカンの自己集合性の単層が吸着されている。次に、ビオチンを表面に共有結合し、ビオチン結合タンパク質（例えば、ストレプトアビジンまたはアビジン）で飽和される。

40

【0150】

被覆材料は、さらに、アンカープライマーを基質に付着させるために用いられるシステムを含む。アミノ、スルフヒドリルまたはカルボキシル基を介してタンパク質を直接共有結合させるオルガノシラン試薬を用いてアレイを被覆することもできる。さらなる被覆基質には光反応性リンカー、例えば、光ビオチンがある。

(Amos et al.,

"Biomaterial Surface Modification Using Photochemical Coupling Technology," in

Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A: Materials, Wise et al.

(eds.), New York, Marcel Dekker, pp. 895926, 1995)

【0151】

さらなる被覆材料には、好ましくは表面上で直接重合するかまたは重合後に共有結合されるポリマー鎖を重合する親水性ポリマーゲル（ポリアクリルアミド、多糖類）（Hjerten, J. Chromatogr. 347, 191 (1985) ; Novotny, Anal. Chem. 62, 2478 (1990) ）、ならびにブルロニックポリマー（トリブロックコポリマー、例えば、PPO-PEO-PPO、F-108としても知られている）であってポリスチレンまたはシラン化ガラス表面に特異的に吸着しているもの（Ho et al., Langmuir 14: 3889-94, 1998））、ならびにビオチン結合タンパク質の受動的に吸着された層がある。表面を、アミン結合を介して試薬をカップリングさせるエポキシドで被覆することもできる。

10

【0152】

さらに、酵素およびヌクレオチドの固定のために当技術分野において一般的に知られている一つまたは複数の官能基、例えば、6×His-標識タンパク質および核酸を結合する金属キレート化基（例えば、ニトリロ三酢酸、イミノ二酢酸、ペンタデナレート（pentadentate）キレーター）を用いて前記材料のいずれかを誘導することができる。

20

【0153】

その後の処理、例えば、酵素の付着（後述）のために利用できる結合性部位の数を、二次元表面の理論的結合能を越えるように増やす表面被覆を用いることができる。

【0154】

好ましい態様において、溶融光ファイバー束/ウエハを生成するために利用される個々の光ファイバーは、光学的結像システムで利用されるもの（すなわち、3 μm）よりも直径が大きい（すなわち、6 μm~12 μm）。すなわち、複数の光学的結像性繊維を利用して、単一反応部位を結像させることができる。

【0155】

特に好ましい態様において、「ピコタイタープレート」と呼ばれる核酸テンプレート配列決定用のサンプルカートリッジが、ウェル構造を得るために酸でエッチングされた市販の光ファイバー面板から形成される。各光ファイバー核は、直径が約44ミクロンであり、2~3ミクロンの被覆を有し、酸エッチングにより各ウェルが形成されて反応ウェル体積が約65pL~85pL、最も好ましくは約75pLである。光ファイバー面板表面上にエッチングされたウェルを用いることは、三重の目的に役立つ；i) アレイの異なる領域における光の放射からの発光の遅延拡散、ii) 増幅テンプレート分子を含む反応チャンバー（「試験管」）の単離、およびiii) 非常に効率的なCCDへの高開口数光学的カップリング。最後に、ウェル内で固定された配列決定性テンプレートの量が多いほど、より多くの光学的シグナルを達成することができる。

30

【0156】

送達手段

反応チャンバーに反応体を送達するための手段の例は、図13に示す本発明の灌流チャンバーである。灌流チャンバーとしては、透明の上側面および下側面を有する封止区画がある。これは、基質表面の表面上に溶液を流す、および試薬の迅速な交換を可能にするように設計されている。すなわち、例えばピロリン酸配列決定反応を行うのに適している。反応チャンバーの形状および寸法を、試薬交換を最適化するように調節して、層流または乱流式のバルクフロー交換、拡散性交換または両者を含むことができる。

40

【0157】

灌流チャンバーは、好ましくは、調製されているときに、結像システムから脱着され、配列決定分析を行うときにのみ結像システム上に配置される。一つの態様において、固体

50

支持体（すなわち、DNAチップまたはガラススライド）が、金属またはプラスチックハウジングにより所定の位置に保持され、これを集めまたは解放して前記固体支持体を置換させることができる。灌流チャンバーの固体支持体の下側面が、反応チャンバーアレイを有し、従来の光学系焦点システムが用いられる場合、高開口数対物レンズを用いて、反応中心アレイの像をCCD結像システム上に集中させる。

【0158】

それにより、多くのサンプルを平行して分析することができる。本発明の方法を用いて、酵素および一つのヌクレオチドを含む溶液を表面上に流し、次に、各サンプルについて生成されたシグナルを検出することにより、多くの核酸テンプレートをこのように分析することができる。次に、この手順を繰り返すことができる。または、テンプレートに相補的な異なるオリゴヌクレオチドを、表面上に分布させ、続いて、テンプレートをハイブリダイズさせることができる。デオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドの組み込みを、種々のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて作られたシグナルにより、各オリゴヌクレオチドについてモニターすることができる。表面の異なる領域からのシグナルを組み合わせることにより、種々のジデオキシヌクレオチドを用いるポリメラーゼ反応の4サイクルにより、配列に基づく分析を行うことができる。

【0159】

支持体が、空洞が設けられたアレイの形態、例えばピコタイタープレートの末端またはマイクロウェルの他のアレイである場合、試薬用の適当な送達手段は、流動および洗浄、および、例えば、流動、噴霧、電子噴霧、インクジェット送達、スタンピング、超音波噴霧化（Sonotek Corp., Milton, NY）および回転を含む。噴霧を用いる場合、CAMAG TLC Sprayer（Camag Scientific Inc., Wilmington, NC）のような薄層クロマトグラフィー（TLC）において用いられるアトマイザーまたは産業型噴霧ノズル（Spraying Systems, Co., Wheaton, IL）により製造される均質薄層中のピコタイタープレートに試薬を送達することができる。これらの噴霧手段は、試薬を、0.3~10 μmのサイズ範囲のエアロゾル噴霧粒子に霧化する。

【0160】

連続的試薬送達工程は、好ましくは、当技術分野において一般的に知られている技術を用いる洗浄工程により分離される。これらの洗浄は、例えば、高フロープレーまたは、ピコタイタープレートもしくはマイクロウェルアレイ表面上の液体流動を含む前述の方法を用いて行うことができる。洗浄は、各反応チャンバー内で出発材料が試薬と反応して産物を形成した後であるがいずれかの一つの反応チャンバーに送達された試薬がその反応チャンバーから拡散して出て任意の他の反応チャンバーに入る前の、任意の期間に起こり得る。一つの態様において、いずれか一つの反応チャンバーは、任意の他の反応チャンバーにおいて形成された産物から独立しているが、一つまたは複数の共通試薬を用いて発生する。

【0161】

完全装置の一つの態様を図12に示す。この装置は、検出可能な灌流チャンバー226と連通している入口導管200を含む。入口導管200は、各々が複数の配列決定用分配試薬容器214~224と連通している複数の管202~212を介して配列決定試薬を侵入させる。

【0162】

試薬は、正流を起こす加圧システムまたはポンプのいずれかを用いて、導管200を通して灌流チャンバー226に導入される。典型的には、試薬流量は0.05~50ml/分（例えば、1から50ml/分）であり、体積は0.100mlから連続流（洗浄用）である。弁は、ヌクレオチドおよび洗浄試薬を循環させるためにコンピューター制御下にある。配列決定試薬、例えば、ポリメラーゼを、ヌクレオチドと予備混合する、または流れに添加することができる。多岐管は、灌流チャンバーに供給するために、全部で6本の管202~212を一緒にして一つにまとめる。すなわち、複数の試薬送達ポートが、灌流チャンバーへの侵入を可能にする。例えば、ポートの一本を利用して水性配列決定試薬を入れることができ、もう一つのポートが、これらの試薬（および任意の反応産物）を灌流チャンバーから引き出されるよう

にすることができる。

【0163】

好ましい態様において、一つまたは複数の試薬が、可動式固体支持体、例えば、ビーズまたはミクロスフェアの集団に固定または付着されたアレイに送達される。ビーズまたはミクロスフェアは球状である必要はなく、不規則形状のビーズを用いることができる。これらは、典型的には、多くの基質、例えば、プラスチック、ガラスまたはセラミックから構築され、ビーズの寸法は、反応チャンバーの幅に依存してnm~mmである。種々の化学的ビーズ材料、例えば、メチルスチレン、ポリスチレン、アクリルポリマー、ラテックス、常磁性体、トリアゾル、カーボングラファイトおよび二酸化チタンを用いることができる。ビーズの構造または化学的材料は、所望の試薬の付着を容易にするように選択することができる。

10

【0164】

もう一つの態様において、最初に生物活性剤を合成し、次に、ビーズに共有結合する。当業者に理解されるように、このことは、生物活性剤およびビーズの組成に依存して行われる。チオール、アミン、カルボキシル等のような化学的反応性基を有する特定のポリマーのような固体支持体表面の官能化は、通常、当技術分野において知られている。

【0165】

好ましい態様において、核酸テンプレートが、ビーズ上のピコタイタープレートに送達される。ルシフェラーゼおよびスルフリラーゼ酵素が、DNAポリメラーゼのように、同様に、ビーズ上の各ウェルに送達される（図参照）。核酸テンプレート、ルシフェラーゼおよびスルフリラーゼの一つまたは複数が、各々、別々のビーズ上に、または一緒になって同じビーズ上に送達できることが注目される。高められた温度でDNAの配列を決定できるようにするために、パチルス・ステアロサーモフィルスから熱安定性スルフリラーゼをクローニングおよび改変した。また、P.ペンシルバニカ (pennsylvanica) およびP.ピラリス (pyralis) を含む固相酵素活性のための幾つかのルシフェラーゼ酵素もクローニングおよび修飾した。P.pyralisルシフェラーゼが、好ましい態様において用いられる。

20

【0166】

使用者は所望の官能基の付着を容易にする表面化学物質を有する「ブランク」ビーズを用いることができる。ブランクビーズ用のこれらの表面化学物質のさらなる例には、脂肪族および芳香族アミンを含むアミノ基、カルボン酸、アルデヒド、アミン、クロロメチル基、ヒドラジド、ヒドロキシル基、スルホン酸基および硫酸基があるが、これらに制限されない。

30

【0167】

通常、既知の化学物質を用いて、任意数の異なる候補剤をビーズに付加するために、これらの官能基を用いることができる。例えば、炭水化物を含む候補剤を、アミノ官能化支持体に付着させることができ；炭水化物のアルデヒドは、標準的技術を用いて作られ、次に、アルデヒドが、表面上のアミノ基と反応する。別の態様において、スルフヒドリルリンカーを用いることができる。システイン含有蛋白性剤を支持体に付着させるために用いることができる、SPDP、マレイミド、 α -ハロアセチルおよび二硫化ピリジル（例えば、参照として本明細書に組み入れられる1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on cross-linkers, 155-200ページを参照されたい）のような当技術分野において知られている多くのスルフヒドリル反応性リンカーがある。または、候補剤上のアミノ基を用いて、表面上のアミノ基に付着させることができる。例えば、ホモ二官能およびヘテロ二官能リンカーを含む多数の安定二官能基が当技術分野において周知である（Pierce Catalog and Handbook, 155-200ページを参照されたい）。さらなる態様において、周知であるリンカー（Pierce Catalog参照）を用いて、カルボキシル基（表面から、または候補剤から）を誘導体化することができる。例えば、カルボジイミドは、アミンのような良好な求核試薬による攻撃のためにカルボキシル基を活性化する（Torchilin et al., Critical Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems, 7 (4) : 275-308 (1991) を参照されたい）。蛋白性候補剤は、例えば、抗体のポリマーへの付着のための当技術分野において知

40

50

られている他の技術を用いて、付着させることもできる。

Slinkin et al., *Bioconj. Chem.* 2:342-348 (1991); Torchilin et al., *supra*;

Trubetskoy et al., *Bioconj. Chem.* 3:323-327 (1992); King et al., *Cancer Res.* 54:6176-6185

(1994);および Wilbur et al., *Bioconjugate Chem.* 5:220-235 (1994)

を参照されたい。候補剤を、先に列挙したものを含む種々の方法において付着することができることが理解されるはずである。好ましくは、付着の方法は、候補剤の官能性を著しく変えることはない、すなわち、標的との相互作用を可能にするような柔軟性のある方法で候補剤を付着できるはずである。

10

【0168】

酵素をビーズ上に固定するための特定の技術は先行技術において知られている。一つの場合、NH₂表面化学ビーズが用いられる。表面活性化は、pHを6.9にする（138mM NaCl, 2.7 mM KCl）リン酸塩緩衝食塩水（10mM）中で2.5%のグルタルアルデヒドを用いて達成される。この混合物を、攪拌床において室温で約2時間攪拌する。次に、ビーズを、超純水+0.01% Tween 20（界面活性剤）-0.02%で濯ぎ、pH7.7のPBS+0.01% tween 20で再び濯ぐ。最後に、この溶液に、好ましくは0.45 μmアミコンマイクロピュアフィルターを用いて予備濾過した後に、酵素を添加する。

【0169】

可動性固体支持体の集団を、反応チャンバー内に配置する。一部の態様において、反応チャンバーの5%~20%が少なくとも一つの試薬が上に固定されている可動性固体支持体を有することができるか、反応チャンバーの20%~60%が、少なくとも一つの試薬が上に固定されている可動性固体支持体を有することができるか、または反応チャンバーの50%~100%が、少なくとも一つの試薬が上に固定されている可動性固体支持体を有することができる。好ましくは、少なくとも一つの反応チャンバーが、少なくとも一つの試薬が上に固定された可動性固体支持体を有し、その試薬は、核酸配列決定反応に用いるのに適している。

20

【0170】

一部の態様において、可動性固体支持体に固定された試薬は、スルフリラーゼ活性を有するポリペプチド、ルシフェラーゼ活性を有するポリペプチド、またはスルフリラーゼ活性とルシフェラーゼ活性の両方を有するキメラポリペプチドであり得る。一つの態様において、これは、ATPスルフリラーゼおよびルシフェラーゼ融合タンパク質であり得る。スルフリラーゼ反応の産物はルシフェラーゼにより消費されるので、これらの2つの酵素間の近接は、これらの2つの酵素を融合タンパク質の状態状態で共有結合することにより達成することができる。本発明は、基質チャネリングのみならず、製造コストを下げ、ストレプトアビジン被覆ビーズ上の結合部位の数を潜在的に倍加する性能においても有用である。

30

【0171】

もう一つの態様において、スルフリラーゼは、熱安定性ATPスルフリラーゼである。好ましい態様において、熱安定性スルフリラーゼは、周囲温度を超える温度（少なくとも50℃）で活性である。一つの態様において、ATPスルフリラーゼは、耐熱性菌から得られる。さらなる態様において、可動性固体支持体は、その上に固定された第1の試薬と第2の試薬を有することができ、第1の試薬はスルフリラーゼ活性を有するポリペプチドであり、第2の試薬はルシフェラーゼ活性を有するポリペプチドである。

40

【0172】

もう一つの態様において、可動性固体支持体に固定されている試薬は核酸であり得；好ましくは、この核酸は一本鎖コンカテマーである。好ましい態様において、核酸を、核酸の配列決定のために、例えば、ピロシーケンシング反応のために用いることができる。

【0173】

本発明は、可動性固体支持体を用いてATP活性を検出または定量する方法も提供し、好ましくは、ATPを、核酸配列決定反応の一部として検出または定量することができる。

50

【0174】

核酸または試薬酵素がそこに付着している可動性固体支持体を「敷いた (carpeted)」ピコタイタープレートを図15に示す。

【0175】

5. 核酸の配列決定方法

次にピロリン酸に基づく配列決定を行う。サンプルDNA配列および伸長プライマーを、次に、ヌクレオチド三リン酸の存在下でポリメラーゼ反応に供し、それにより、標的位置の塩基に相補性であるならば、ヌクレオチド三リン酸が組み込まれピロリン酸 (PPi) が放出されるのみであり、ヌクレオチド三リン酸は、サンプル-プライマー混合物の別々のアリコートに添加、または同じサンプル-プライマー混合物に連続的に添加される。次に、どのヌクレオチドが組み込まれたか示すためにPPiの放出を検出する。

10

【0176】

一つの態様において、配列産物の領域は、配列決定プライマーをテンプレート核酸の領域にアニーリングし、次に、配列決定プライマーを、DNAポリメラーゼおよび既知のヌクレオチド三リン酸、すなわち、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、あるいはこれらのヌクレオチドの一つの類似体に接触させることにより決められる。配列は、以下に説明するように、配列決定反応副産物を検出することにより決定することができる。

【0177】

配列決定プライマーは、増幅した核酸テンプレートの領域に特異的にアニーリングできるのであれば、任意の長さまたは塩基組成を有することができる。増幅されたテンプレート核酸上の領域を特異的にプライミングできるのであれば、配列決定プライマーのために特別の構造は必要とされない。好ましくは、配列決定プライマーは、特徴付けるべき配列とアンカープライマーにハイブリダイズできる配列との間にあるテンプレートの領域に相補的である。配列決定プライマーは、配列産物を形成するためのDNAポリメラーゼを用いて伸長される。伸長は、一つまたは複数のタイプのヌクレオチド三リン酸、および必要ならば、補助的結合タンパク質の存在下で行われる。

20

【0178】

dNTPの組み込みは、配列決定副産物の存在を調べることにより好ましく決められる。好ましい態様において、配列決定産物のヌクレオチド配列は、dNMPが伸長された配列決定プライマーに組み込まれるときにヌクレオチド三リン酸 (dNTP) から遊離される無機ピロリン酸塩 (PPi) を測定することにより決められる。この配列決定法は、Pyrosequencing (商標) technology (PyroSequencing AB, Stockholm, Sweden) と呼ばれ、溶液中 (液相) で行う、または固相技術として行うことができる。PPiに基づく配列決定法は、一般的に、例えば、W09813523A1、Ronaghi, et al., 1996. Anal. Biochem. 242: 84-89, Ronaghi, et al., 1998. Science 281: 363-365 (1998) および米国特許出願第2001/0024790号に記載されている。PPi配列決定のこれらの開示の全体が参照として本明細書に組み入れられる。例えば、各々の全体が参照として本明細書に組み入れられる米国特許第6,210,891号および第6,258,568号も参照されたい。

30

【0179】

これらの条件下に放出されるピロリン酸は、酵素的に検出することができる (例えば、ルシフェラーゼ-ルシフェリン反応において光を発生させることによる)。そのような方法は、ヌクレオチドを所与の標的位置で同定可能にし、DNAを簡単かつ迅速に配列決定できるようにすると同時に、電気泳動の必要性および潜在的に危険な放射標識の使用が回避される。

40

【0180】

PPiを多くの異なる方法により検出することができ、種々の酵素的 방법이以前に記載されている (例えば、

Reeves, *et al.*, 1969. *Anal. Biochem.* 28:

282-287; Guillory, *et al.*, 1971. *Anal. Biochem.* 39: 170-180; Johnson, *et al.*, 1968. *Anal.*

Biochem. 15: 273; Cook, *et al.*, 1978. *Anal. Biochem.* 91: 557-565;およびDrake, *et al.*, 1979.

Anal. Biochem. 94: 117-120)

を参照されたい)。

【0181】

ポリメラーゼによりdNTPが組み込まれた結果として遊離されたPPiは、例えばATPスル
フリラーゼを用いてATPに変換することができる。この酵素は、イオウ代謝に関係すると同
定されている。イオウは、還元型および酸化型の両方において、植物および動物の成長に
とって必須の無機栄養素である(例えば、Schmidt and Jager, 1992. *Ann. Rev. Plant Physiol.*
Plant Mol. Biol. 43: 325-349を参照されたい)。植物と微生物の両方において、硫酸
塩の活性取り込みの後に、硫化物への還元が起こる。硫酸塩は、利用可能な細胞性還元剤
と比べて酸化/還元能が非常に低く、同化における主要な工程は、ATP依存反応を介するそ
の活性化を必要とする(例えば、Leyh, 1993. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28: 515-542を
参照されたい)。ATPスルフリラーゼ(ATP: アデニリルトランスフェラーゼ硫酸; EC2.7.
7.4)が、無機硫酸塩(SO_4^{2-})の代謝における初期反応を触媒する(例えば、Robbins an
d Lipmann, 1958. *J. Biol. Chem.* 233: 686-690; Hawes and Nicholas, 1973. *Biochem. J.* 133:
541-550を参照されたい)。この反応において、 SO_4^{2-} が活性化されてアデノシン5'ホスホ
スルフェート(APS)を得る。 10 20

【0182】

ATPスルフリラーゼは、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)
(例えば、Hawes and Nicholas, 1973. *Biochem. J.* 133: 541-550を参照); ペニシリウム・
クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*) (例えば、Renosto, *et al.*, 1990. *J. Biol. Chem.*
.265: 10300-10308を参照); ラット肝臓(例えば、Yu, *et al.*, 1989. *Arch. Biochem. Biophy*
ys. 269: 165-174を参照); および植物(例えば、Shaw and Anderson, 1972. *Biochem. J.* 12
7: 237-247; Osslund, *et al.*, 1982. *Plant Physiol.* 70: 39-45を参照)のような複数の供
給源から高度に精製された。さらに、ATPスルフリラーゼ遺伝子は、原核生物(例えば、L
eyh, *et al.*, 1992. *J. Biol. Chem.* 267: 10405-10410; Schwedock and Long, 1989. *Mol. Plant*
Microbe Interaction 2: 181-194; Laue and Nelson, 1994. *J. Bacteriol.* 176: 3723-3729
を参照); 真核生物(例えば、Cherest, *et al.*, 1987. *Mol. Gen. Genet.* 210: 307-313; Moun
tain and Korch, 1991. *Yeast* 7: 873-880; Foster, *et al.*, 1994. *J. Biol. Chem.* 269: 19777-
19786を参照); 植物(例えば、Leustek, *et al.*, 1994. *Plant Physiol.* 105: 897-90216を
参照)および動物(例えば、Li, *et al.*, 1995. *J. Biol. Chem.* 270: 29453-29459を参照)か
らクローニングされた。酵素は、特定の供給源に依存してホモオリゴマーまたはヘテロダ
イマーである(例えば、Leyh and Suo, 1992. *J. Biol. Chem.* 267: 542-545を参照されたい)
。 30

【0183】

一部の態様において、熱安定性スルフリラーゼが用いられる。熱安定性スルフリラーゼ
は、例えば、アルケオグロブス(*Archaeoglobus*)またはピロコッカス(*Pyrococcus*) spp
.から得ることができる。熱安定性スルフリラーゼの配列は、データベースアクセッショ
ン番号028606、アクセッション番号Q9YCR4、およびアクセッション番号P56863で得ること
ができる。 40

【0184】

ATPスルフリラーゼは多くの異なる用途、例えば、高濃度のATPでのADPの生物発光的検
出(例えば、Schultz, *et al.*, 1993. *Anal. Biochem.* 215: 302-304を参照); DNAポリメラー
ゼ活性の連続的モニタリング(例えば、Nyrbn, 1987. *Anal. Biochem.* 167: 235-238を参照)
; およびDNA配列決定(例えば、Ronaghi, *et al.*, 1996. *Anal. Biochem.* 242: 84-89; Ronagh
i, *et al.*, 1998. *Science* 281: 363-365; Ronaghi, *et al.*, 1998. *Anal. Biochem.* 267: 65-71 50

を参照されたい) に用いられていた。

【0185】

先のATPスルフリラーゼ反応の検出のために幾つかのアッセイが開発された。比色分析モリブデン分解アッセイは、リン酸塩検出に基づき(例えば、Wilson and Bandurski, 1958. J. Biol. Chem. 233: 975-981を参照されたい)、一方、連続的分光光度モリブデン分解アッセイは、NADH酸化の検出に基づく(例えば、Seubert, et al., 1983. Arch. Biochem. Biophys. 225: 679-691; Seubert, et al., 1985. Arch. Biochem. Biophys. 240: 509-523を参照されたい)。後者のアッセイは、幾つかの検出酵素の存在を必要とする。さらに、幾つかの放射活性アッセイも文献に記載されている(例えば、Daley, et al., 1986. Anal. Biochem. 157: 385-395を参照されたい)。例えば、一つのアッセイは、 ^{32}P -標識ATPから放出される ^{32}PPi の検出に基づき(例えば、Seubert, et al., 1985. Arch. Biochem. Biophys. 240: 509-523を参照されたい)、もう一つのアッセイは ^{35}S を $[\text{}^{35}\text{S}]$ -標識APSに組み込むことに基づき(このアッセイも、共役酵素として精製されたAPSキナーゼを必要とする; 例えば、Seubert, et al., 1983. Arch. Biochem. Biophys. 225: 679-691) および第3の反応は $[\text{}^{35}\text{S}]$ -標識APSからの $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ の放出に依存する(例えば、Daley, et al., 1986. Anal. Biochem. 157: 385-395を参照されたい)。

10

【0186】

逆ATPスルフリラーゼ反応の検出のために、連続的分光光度アッセイ(例えば、Segel, et al., 1987. Methods Enzymol. 143: 334-349を参照)、生物発光アッセイ(例えば、Balharry and Nicholas, 1971. Anal. Biochem. 40: 1-17を参照)、 $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ 放出アッセイ(例えば、Seubert, et al., 1985. Arch. Biochem. Biophys. 240: 509-523を参照)、および ^{32}PPi 組み込みアッセイ(例えば、Osslund, et al., 1982. Plant Physiol. 70: 39-45を参照されたい)が前述されている。

20

【0187】

ATPスルフリラーゼにより生成されたATPを、酵素反応を用いて加水分解して光を発生させることができる。発光化学的反応(すなわち、化学的発光)および生物学的反応(すなわち、生物発光)が、種々の代謝産物の高感度測定のための分析的生化学において広く用いられている。生物発光反応において、光の放出を導く化学的反応は、酵素で触媒される。例えば、ルシフェリン-ルシフェラーゼシステムにより、ATPの特異的アッセイが可能になり、細菌性ルシフェラーゼ-酸化還元酵素システムを用いてNAD(P)Hをモニターすることができる。ATPまたはNAD(P)Hの生成または利用を含む組み合わせた反応により多くの物質を分析するために両システムを拡張した。(例えば、Kricka, 1991. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. Clin. Chem. 37: 1472-1281を参照されたい)。

30

【0188】

新しい試薬の開発により、ATP(例えば、Lundin, 1982. Applications of firefly luciferase In; Luminescent Assays (Raven Press, New York)を参照)またはNAD(P)H(例えば、Lovgren et al., Continuous monitoring of NADH-converting reactions by bacterial luminescence. J. Appl. Biochem. 4: 103-111を参照されたい)の濃度に比例して安定な発光を得ることが可能になった。そのような安定な発光試薬を用いると、終点アッセイを行うことおよび既知量のATPまたはNAD(P)Hを添加することにより、個々のアッセイそれぞれを較正することが可能である。

40

【0189】

ATPを光に転換するための適当な酵素は、ルシフェラーゼ、例えば昆虫ルシフェラーゼを含む。ルシフェラーゼは、触媒作用の最終産物として光を発生させる。最もよく知られた発光酵素は、ホタルPhotinus pyralis (Coleoptera)の酵素である。対応する遺伝子を、細菌(例えば、Wet, et al., 1985. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 7870-7873を参照)および植物(例えば、Ow, et al., 1986. Science 234: 856-859を参照)、並びに昆虫(例えば、Jha, et al., 1990. FEBS Lett. 274: 24-26を参照)および哺乳動物細胞中でクローニングおよび発現させた(例えば、

de Wet, et al., 1987. *Mol. Cell. Biol.* 7: 725-737; Keller, et al., 1987. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 82: 3264-3268)

を参照されたい)。さらに、ジャマイカクリックビートル *Pyroplorus plagiophthalmus* (Coleoptera) からの多くのルシフェラーゼ遺伝子を、近年、クローニングし、部分的に特徴付けた。(例えば、Wood, et al., 1989. *J. Biolumin. Chemilumin.* 4: 289-301; Wood, et al., 1989. *Science* 244: 700-702を参照されたい)。異なるルシフェラーゼが、異なる波長の光を生み出すことがあり、これにより、異なる波長での発光を同時にモニタリングすることが可能になる。従って、これらの前記特徴は固有であり、現在のレポーターシステムの利用に関して新しい局面を加える。

10

【0190】

ホタルルシフェラーゼは、ルシフェリン、アデノシン5'三リン酸(ATP)、マグネシウムイオンおよび酸素の存在下で生物発光を触媒し、量子収率が0.88になる(例えば、McElroy and Selinger, 1960. *Arch. Biochem. Biophys.* 88: 136-145を参照されたい)。ホタルルシフェラーゼ生物発光反応は、約 1×10^{-13} Mの検出限界でATPを検出するためのアッセイとして利用することができる(例えば、Leach, 1981. *J. Appl. Biochem.* 3: 473-517を参照されたい)。さらに、全面的に感度があることおよび、ルシフェラーゼ媒介検出システムの便利さのために、ホタルルシフェラーゼに基づくバイオセンサーの開発にかなりの関心が示されていた(例えば、Green and Kricka, 1984. *Talanta* 31: 173-176; Blum, et al., 1989. *J. Biolumin. Chemilumin.* 4: 543-550を参照されたい)。

20

【0191】

前述の酵素を用いて、配列決定プライマーを、ポリメラーゼおよび既知のdNTPに曝す。dNTPをプライマー配列の3'末端に組み込むと、dNTPが開裂されPPi分子が遊離される。次に、PPiを、ATPスルフリラーゼを用いて、ATPに転換する。ATPスルフリラーゼが十分に高い濃度で存在し、PPiについて一次速度論でPPiの転換が進行することが好ましい。ルシフェラーゼの存在下で、ATPが加水分解されて光子が生じる。反応は、好ましくは、反応混合物中に十分な濃度のルシフェラーゼを含み、それにより、反応： $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{PO}_4^{3-} + \text{光子(光)}$ が、ATPに関して一次速度論で進行する。光子は、以下に記載の方法および装置を用いて測定することができる。一つの態様において、検出用の光を発生させるために、PPiおよびスルフリラーゼ/ルシフェラーゼ共役反応が用いられる。一部の態様において、スルフリラーゼおよびルシフェラーゼのいずれかまたは両方が、各反応部位に配置された一つまたは複数の可動性固体支持体上に固定される。

30

【0192】

本発明は、このように、PPiの放出をポリメラーゼ反応中に検出し、リアルタイムシグナルを得る。配列決定反応を、リアルタイムで連続的にモニターすることができる。このように、本発明により、PPi放出の迅速検出のための手順が可能になる。反応が、2秒未満で起こることが予想された(Nyren and Lundin, 前記)。律速段階は、ATPスルフリラーゼによるPPiのATPへの転換であり、一方、ルシフェラーゼ反応は迅速であり、0.2秒未満で起こると予想された。ポリメラーゼのための組み込み速度も種々の方法により推定され、例えば、クレノウポリメラーゼの場合、一つの塩基の完全な組み込みが0.5秒未満で起こることが発見された。すなわち、一つの塩基の組み込みおよびこの酵素的アッセイによる検出のための推定合計時間は約3秒である。従って、非常に迅速な反応時間が可能であり、リアルタイム検出が可能になることが分かる。反応時間を、さらに、より熱安定性のルシフェラーゼを用いることにより短縮させることができる。

40

【0193】

大部分の用途において、ATPおよびPPiのような汚染物質を含まない試薬を用いることが望ましい。これらの汚染物質を、樹脂に結合したアピラーゼおよび/またはピロホスファターゼを含むプレカラムを通して試薬を流すことにより除去することができる。または、アピラーゼまたはピロホスファターゼを、磁性ビーズに結合し、試薬中に存在する汚染性ATPおよびPPiを除去するために用いることができる。さらに、拡散性の配列決定試薬、例

50

えば、非組み込みdNTPを、洗浄緩衝液を用いて洗い流すことが望ましい。ピロリン酸配列決定において用いられるいかなる洗浄緩衝液も用いることができる。

【0194】

一部の態様において、配列決定反応中の反応体の濃度としては、緩衝液0.2ml中の1pmol DNA、3pmolポリメラーゼ、40pmol dNTPが挙げられる。Ronaghi, et al., Anal. Biochem. 242: 84-89 (1996) を参照されたい。

【0195】

配列決定は、望ましいならば、4つの所定のヌクレオチドの各々を用いて行うことができる。「完全」サイクルは、通常、予め定められた順番で、ヌクレオチドdATP、dGTP、dCTPおよびdTTP（またはdUTP）の各々について、配列決定試薬を順次投与することを含む。非組み込みdNTPを、各ヌクレオチド付加の間に洗い流す。または、非組み込みdNTPを、アピラーゼ（下記参照）により分解する。配列決定産物の所望の量の配列が得られるまで、サイクルを所望により繰り返す。一部の態様において、配列情報の約10~1000、10~100、10~75、20~50または約30ヌクレオチドが、一つのアニーリングされた配列決定プライマーの伸長により得られる。

【0196】

一部の態様において、ヌクレオチドを修飾して、ビオチンのようなハプテンのジスルフィド誘導体を含むようにする。アンカー基質にアニーリングされた初期プライマーへの修飾ヌクレオチドの付加は、i) ビオチンによる修飾の例の場合、酵素分子に結合されたアビジンまたはストレプトアビジン共役部分を順次結合させること、ii) 過剰のアビジンまたはストレプトアビジン結合酵素を洗い流すこと、iii) 酵素活性の影響を受けやすい条件下に適当な酵素基質を流すこと、およびiv) 一つまたは複数の酵素基質反応産物を検出すること、を含む重合後工程により分析される。この態様において、還元剤の添加により、ハプテンが除去される。そのような方法は、所与の標的位置でヌクレオチドを同定できるようにし、DNAを単純かつ迅速に配列決定できるようにすると共に、電気泳動の必要性および潜在的に危険な放射線標識の使用が回避される。

【0197】

ハプテンを検出するための好ましい酵素は、セイヨウワサビエルオキシダーゼである。必要ならば、ここでの種々の反応体の添加の間に、洗浄緩衝液を用いることができる。配列決定プライマーを伸長するために用いられる未反応dNTPを除去するためにアピラーゼを用いることができる。洗浄緩衝液は、任意に、アピラーゼを含み得る。

【0198】

ハプテンの例、例えば、ビオチン、ジゴキシゲニン、蛍光染料分子cy3およびcy5、およびフルオレセインが、種々の効率で、伸長DNA分子に組み込まれる。ハプテンの付着は、糖、塩基を介して、およびヌクレオチド上のリン酸部分を介した結合により起こり得る。シグナル増幅の例としては、蛍光、電気化学および酵素的な増幅がある。酵素的増幅を用いる好ましい態様において、酵素、例えば、アルカリホスファターゼ（AP）、セイヨウワサビエルオキシダーゼ（HRP）、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼは、その光発生基質が知られているものを含むことができ、これらの光発生（化学発光）基質の検出用の手段としてCCDカメラを含み得る。

【0199】

好ましい形態において、修飾された塩基が付加され、検出が行われ、開裂用または不活性化用薬剤のいずれかを用いることにより、ハプテン結合部分が除去または不活性化される。例えば、開裂可能リンカーがジスルフィドである場合、開裂用薬剤は、還元剤、例えば、ジチオスレイトール（DDT）、 β -メルカプトエタノール等であり得る。不活性化の他の態様には、熱、低温、化学的変性剤、界面活性剤、疎水性剤、および自己不活化阻害剤がある。

【0200】

ルシフェラーゼは、光の放出を伴ってdATPを直接加水分解することができる。これにより、偽陽性シグナルが得られる。何故なら、伸長された配列決定プライマーへのdATPの組

10

20

30

40

50

み込みと無関係に加水分解が起こるからである。この問題を避けるために、DNAに組み込まれるdATP類似体を用いることができる、すなわち、これはDNAポリメラーゼ用の基質であるが、ルシフェラーゼ用の基質ではない。一つのそのような類似体は、 α -チオ-dATPである。すなわち、 α -チオ-dATPの使用により、成長している核酸鎖に組み込まれることなくdATPが加水分解されるときに起こり得る偽の光子発生が回避される。

【0201】

典型的に、PPiに基づく検出は、配列決定プライマーの添加の直後に配列決定反応混合物に対照ヌクレオチドを添加した後に放出される光を測定することにより校正される。これにより、反応条件が正規化される。2つ以上の同一のヌクレオチドが順次組み込まれることは、放出された光の量の対応する増加により示される。すなわち、対照ヌクレオチドに対する放出光の2倍増加は、伸長されたプライマー中に2つのdNTPが順次組み込まれたことを示している。

10

【0202】

望ましいならば、配列決定反応混合物中の残留している非組み込みdNTPの分解を容易にするように固体支持体の表面上で、アピラーゼを「洗浄」または「流す」ことができる。アピラーゼは、生成したATPも分解し、よって、反応から発生する光を「抑制」する。アピラーゼでの処理時に、その後のdNTPインキュベーションおよび光子検出工程に備えて残りの反応体を洗い流す。または、固体または可動性固体支持体にアピラーゼを結合することができる。

【0203】

20

両端配列決定

好ましい態様において、本発明者らは、核酸テンプレートの両末端から配列決定する方法を提供する。伝統的に、二本鎖DNA分子の2つの末端の配列決定は、少なくとも、プライマーのハイブリダイゼーション、一つの末端の配列決定、第2のプライマーのハイブリダイゼーション、および他の末端の配列決定を必要とする。別の方法は、二本鎖核酸の個々の鎖を分離し、各鎖を個々に配列決定することである。本発明は、最初の2つの方法よりも迅速であり労力を要さない第3の選択肢を提供する。

【0204】

本発明は、多数のプライマーから核酸を順次配列決定する方法を提供する。この用途におけるDNA配列決定は、配列決定プライマーの成長している鎖にヌクレオチド三リン酸 (NTP) を組み込むときに配列が決められる、ポリメラーゼを用いる配列決定を指す。このタイプの配列決定の一例は、ピロシーケンシング検出ピロリン酸法である（例えば、米国特許第6,274,320号、第6,258,568号および第6,210,891号；それらの各々の全体が参照として本明細書に組み入れられる）。

30

【0205】

一つの態様において、本発明は、テンプレート二本鎖核酸の2つの末端を配列決定する方法を提供する。二本鎖DNAは、本明細書において、第1の一本鎖DNAおよび第2の一本鎖DNAと呼ばれる2つの一本鎖DNAからなる。第1のプライマーが、第1の一本鎖DNAにハイブリダイズされ、第2のプライマーが、第2の一本鎖DNAにハイブリダイズされる。第1のプライマーは保護されておらず、一方、第2のプライマーは保護されている。「保護」および「保護された」は、この開示において、プライマーがDNAポリメラーゼにより重合されないようにする、プライマー上の反応部位への化学的基の付加と定義される。さらに、そのような化学的保護基の付加は、逆転後に新しく脱保護されたプライマーがもう一度配列決定プライマーとして働くことができるように、可逆的とすべきである。ピロリン酸配列決定のような従来法を用いてDNAポリメラーゼで第1のプライマーを伸長することにより一つの方向（例えば、テンプレートの一端から）において核酸配列が決められる。第2のプライマーが、次に、脱保護され、DNAポリメラーゼおよび、ピロリン酸配列決定のような従来法を用いて、他の方向（例えば、テンプレートの他端から）において第2のプライマーを伸長することにより配列が決められる。第1および第2のプライマーの配列は、二本鎖DNAの2つの末端に、または、この方法におけるテンプレートに沿った任意の場所においてハイブ

40

50

リダイズするように特異的に設計される。

【0206】

もう一つの態様において、本発明は、複数のプライマーから核酸の配列を決定する方法を提供する。この方法において、多くの配列決定用プライマーが、配列決定すべきテンプレート核酸にハイブリダイズされる。全ての配列決定用プライマーが、一つを除いて可逆的に保護される。保護されたプライマーは、DNA配列決定反応において一般的に用いられるdNTPおよびポリメラーゼを用いて伸長することができないオリゴヌクレオチドプライマーである。可逆的に保護されたプライマーは、脱保護することができる保護プライマーである。本発明で言及される全ての保護プライマーは、可逆的に保護される。脱保護後、可逆的に保護されたプライマーは、正常な配列決定用プライマーとして作用し、正常な配列決定反応に参与することができる。

10

【0207】

本発明は、多数のプライマーから核酸を順次配列決定する方法を提供する。この方法は以下の工程を含む。まず、配列決定すべき一つまたは複数のテンプレート核酸が提供される。次に、複数の配列決定用プライマーを、一つまたは複数のテンプレート核酸にハイブリダイズする。配列決定用プライマーの数は、1より大きな正の数であり得る n により表すことができる。この数は、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上であり得る。これらのプライマーにおいて、 $n-1$ の数を保護基で保護することができる。よって、例えば、 n が2、3、4、5、6、7、8、9、または10である場合、 $n-1$ は、それぞれ、1、2、3、4、5、6、7、8または9である。残りのプライマー（例えば、 n 個のプライマー（ $n-1$ ）個の保護プライマー＝一つの残ったプライマー）は保護されていない。第3に、非保護プライマーが伸長され、例えばピロリン酸配列決定のような従来法によりテンプレートDNA配列が決められる。第4に、第1のプライマーの配列決定後、残りの保護プライマーの一つを非保護にする。第5に、非保護プライマーを伸長し、例えばピロリン酸配列決定のような従来法によりテンプレートDNA配列を決定する。任意に、この方法を、全ての保護プライマー上で配列決定が行われるまで、繰り返すことができる。

20

【0208】

もう一つの局面において、本発明は、（a）核酸に2以上の配列決定用プライマーをハイブリダイズする工程（一つを除いて全てのプライマーが可逆的に保護される）、（b）非保護プライマーからのポリメラーゼ伸長により核酸の一つの鎖の配列を決定する工程、（c）可逆的保護プライマーの一つを脱保護して非保護プライマーにする工程、（d）可逆的に保護されたプライマーの全てが脱保護され配列を決定するために用いられるまで、工程（b）および（c）を繰り返す工程を含む、核酸を順次配列決定する方法を含む。一つの態様において、この方法は、工程（b）と工程（c）との間に、一つのさらなる工程、すなわち、非保護プライマーを、DNAプライマーと、および一つまたは複数のヌクレオチド三リン酸またはジデオキシヌクレオチド三リン酸とに接触させることにより、非保護プライマーの伸長を停止させる工程を含む。さらにもう一つの態様において、この方法は、さらに、前記工程（b）と工程（c）との間にさらなる工程、すなわち、非保護プライマーを、DNAポリメラーゼと、およびddATP、ddTTP、ddCTP、ddGTPまたはそれらの組み合わせ由来のジデオキシヌクレオチド三リン酸とに接触させることにより、非保護プライマーの伸長を停止させる工程を含む。

30

40

【0209】

もう一つの局面において、本発明は、（a）第1の非保護プライマーを、核酸の第1の鎖にハイブリダイズする工程、（b）第2の保護されたプライマーを、第2の鎖にハイブリダイズする工程、（c）第1および第2の鎖をポリメラーゼに曝し、第1の非保護プライマーを第1の鎖に沿って伸長させる工程、（d）第1の配列決定用プライマーの伸長を完了する工程、（e）第2の配列決定用プライマーを脱保護する工程、および（f）第1および第2の鎖をポリメラーゼに曝して、第2の配列決定用プライマーを第2の鎖に沿って伸長する工程を含む、核酸の配列を決定する方法を含む。好ましい態様において、完了は、伸長をキャッピングまたは停止することを含む。

50

【0210】

もう一つの態様において、本発明は、第1および第2の一本鎖DNAを含むテンプレート二本鎖核酸の2つの末端の配列を決定する方法を提供する。この態様において、第1のプライマーを、第1の一本鎖DNAにハイブリダイズし、第2のプライマーを、同じ工程において、第2の一本鎖DNAにハイブリダイズする。第1のプライマーは保護されておらず、一方、第2のプライマーは保護されている。

【0211】

ハイブリダイゼーションに続いて、ピロリン酸配列決定のような従来法を用いてDNAポリメラーゼで第1のプライマーを伸長することにより、核酸の配列を一方向（例えば、テンプレートの一端から）において決定する。好ましい態様において、ポリメラーゼは、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を欠く。次に、第2のプライマーを脱保護し、その配列を、ピロリン酸配列決定のような従来法を用いて他の方向（例えば、テンプレート他端から）においてDNAポリメラーゼで第2のプライマーを伸長することにより決定する。前述のように、第1のプライマーおよび第2のプライマーの配列は、二本鎖DNAの2つの端部に、またはテンプレートに沿った任意の位置においてハイブリダイズするように設計される。この技術は、その2つの末端において固有の配列決定プライマーハイブリダイゼーション部位を含む多くのテンプレートDNAの配列を決定するのに特に有用である。例えば、多くのクローニングベクターが、クローニングされた配列のその後の配列決定を容易にするためにインサート部位と側面を接する固有の配列決定プライマーハイブリダイゼーション部位を提供する（例えば、Bluescript, Stratagene, La Jolla, CA）。

【0212】

本発明のこの方法の一つの利点は、両方のプライマーを単一工程でハイブリダイズすることができることである。この方法および他の方法の利点は、ハイブリダイゼーションが正常よりも多く含まれる並行配列決定システムにおいて特に有用である。並行配列決定システムの例が、同時係属中の米国特許出願第10/104,280号に開示されており、その開示内容は全て参照として本明細書に組み入れられる。

【0213】

本発明のオリゴヌクレオチドプライマーは、従来の技術により、例えば市販のオリゴヌクレオチド合成器を用いて、および/または、そのように合成されたサブ断片を一緒にライゲートすることにより、合成することができる。

【0214】

本発明のもう一つの態様において、二本鎖標的核酸の長さを決定することができる。二本鎖核酸の長さを決定するための方法は、当技術分野において知られている。長さの決定は、核酸の配列を決定する前または後に行うことができる。核酸分子の長さを決定する既知の方法には、ゲル電気泳動、パルスフィールドゲル電気泳動、質量分析等がある。平滑末端二本鎖核酸は同じ長さの2つの一本鎖からなり、核酸の一つの鎖の長さの決定は、対応する二本鎖の長さの決定に十分である。

【0215】

本発明による配列決定反応は、テンプレート核酸の長さも決定することができる。第1に、核酸の一端からもう一方の端部への完全配列により、長さを決定することができる。第2に、2つの末端の配列決定は、途中で重複し、それにより、2つの配列を結合することができる。完全配列を決めて長さを示すことができる。例えば、テンプレートの長さが100bpの場合、一端からの配列決定は塩基1～75を決め、他端からの配列決定は塩基25～100を決め；よって、途中で塩基25から塩基75までの51個の塩基重複があり；この情報から、1～100の完全配列を決定することができ、この完全配列により100塩基の長さを示すことができる。

【0216】

本発明のもう一つの方法は、以下の工程を含む方法に関する。第1に、各々が異なる配列を有する複数の配列決定プライマーが、配列決定すべきDNAにハイブリダイズされる。配列決定用プライマーの数は、2以上の任意の値、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10

またはそれ以上である。これらのプライマーの全てが、一つを除いて可逆的に保護されている。一つの非保護プライマーが配列決定反応において伸長され、配列が決められる。通常、プライマーを完全に伸長すると、プライマーは伸長することができず、もう一つのプライマーからのその後の配列決定に影響を与えない。必要ならば、配列決定されたプライマーを、過剰のポリメラーゼおよびdNTPを用いるかまたはddNTPを用いることにより終了することができる。停止工程を行う場合、停止試薬（dNTPおよびddNTP）をその工程の後に除去すべきである。そこで、可逆的に保護されたプライマーの一つを非保護にし、第2のプライマーからの配列決定が進む。プライマーを脱保護する工程、脱保護されたプライマーから配列決定する工程、および任意に、プライマーからの配列決定を停止する工程を、全ての保護されたプライマーが非保護となり配列決定に用いられるまで繰り返す。

10

【0217】

可逆的に保護されたプライマーを、異なる化学的基で保護すべきである。脱保護の適当な方法を選択することにより、一つのプライマーを、他のプライマーの保護基に影響を与えることなく脱保護することができる。好ましい態様において、保護基は PO_4 である。すなわち、第2のプライマーが PO_4 で保護され、脱保護がT4ポリヌクレオチドキナーゼにより（その3'-ホスファターゼ活性を利用して）達成される。もう一つの好ましい態様において、保護はチオ基またはホスホロチオール基である。

【0218】

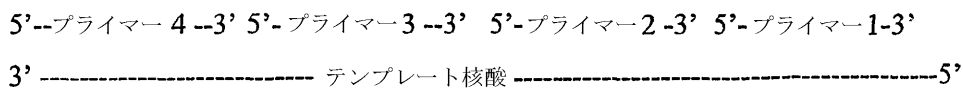
テンプレート核酸は、DNA、RNAまたはペプチド核酸（PNA）であり得る。DNAは好ましいテンプレートであるが、RNAおよびPNAを、ランダムプライミングPCR、逆転写、RT-PCRまたはこれらの技術の組み合わせのような既知の技術により、DNAに転換することができる。さらに、本発明の方法は、配列が未知および既知である核酸の配列を決定するために有用である。配列既知の核酸の配列決定は、例えば、合成されたDNAの配列の確認、または核酸配列が知られている疑わしい病原体の同一性を確認するのに有用である。核酸は、複数の核酸集団の混合物であってよい。十分な特異性を有する配列決定用プライマー（例えば、20塩基、25塩基、30塩基、35塩基、40塩基、45塩基、または50塩基）を、長い核酸中または無関係な核酸集団中の配列のサブセットを配列決定するために用い得ることが知られている。すなわち、例えば、テンプレートは、10kbの一つの配列または各1kbの10個の配列であり得る。好ましい態様において、テンプレートDNAは、長さが50bp〜700bpである。DNAは一本鎖または二本鎖であり得る。

20

30

【0219】

テンプレート核酸が一本鎖である場合、多くのプライマーが、以下に示すようにテンプレート核酸にハイブリダイズすることができる。



【0220】

この場合、最初の非保護プライマーが、テンプレートの最も5'末端においてハイブリダイズするプライマーであることが好ましい。前記図のプライマー1を参照されたい。この配向において、プライマー1の伸長は、プライマー2、3または4を（鎖置換により）置き換えることはない。プライマー1からの配列決定が終わると、プライマー2は非保護となり得、核酸の配列決定が始まり得る。プライマー2からの配列決定は、プライマー1またはプライマーを伸長したものを置き換え、残りの保護されたプライマー（プライマー3および4）に影響を与えない。この手順を用いると、各プライマーを順次用いることができ、一つのプライマーからの配列決定反応は、その次のプライマーからの配列決定に影響を与えない。

40

【0221】

本発明の一つの特徴は、一つまたは複数の核酸上で多数の配列決定プライマーを用いることができる能力、および一つのハイブリダイゼーション工程のみを用いて多数のプライ

50

マーから配列決定する能力である。ハイブリダイゼーション工程において、全ての配列決定用プライマー（例えば、 n 個の配列決定用プライマー）を、同時に、テンプレート核酸にハイブリダイズすることができる。従来の配列決定において、通常、一つのプライマーからの配列決定に、一つのハイブリダイゼーション工程が必要である。本発明の一つの特徴は、 n 個のプライマー（先に定義）からの配列決定を、単一のハイブリダイゼーション工程により行うことができる。これは、 $n-1$ 個のハイブリダイゼーション工程を効果的に排除する。

【0222】

好ましい態様において、 n 個のプライマーの配列がかなり異なっているので、プライマーは交差ハイブリダイズまたは自己ハイブリダイズしない。交差ハイブリダイゼーションとは、配列相補性のため、一つのプライマーがもう一つのプライマーへハイブリダイズすることをいう。交差ハイブリダイゼーションの一つの形態は、通常、「プライマーダイマー」と呼ばれている。プライマーダイマーの場合、2つのプライマーの3'末端は相補的であると共に、伸長したときに2つのプライマーの長さのおよそ合計である構造を形成する。自己ハイブリダイゼーションとは、プライマーの5'末端がプライマーの3'末端に相補的である状況を指す。その場合、プライマーは、自己ハイブリダイズしてヘアピン様構造を形成する傾向を有する。

【0223】

プライマーは、テンプレート分子と相互作用するか、または特異的に会合する。「相互作用」または「会合」という用語は、本明細書で、2つの物質または化合物（例えば、プライマーとテンプレート；化学的部分とヌクレオチド）が互いに十分に結合（例えば、付着、結合、ハイブリダイゼーション、接合、アニーリング、共有結合、または他の会合）し、意図するアッセイを行い得ることを意図する。「特異的」または「特異的に」という用語は、本明細書で、2つの成分が選択的に互いに結合することを意味する。特定の相互作用を達成するのに必要なパラメーターは、通常の方法により、例えば当技術分野の従来法を用いて行うことができる。

【0224】

さらなる感受性を得るか、または複合混合物の分析において補助するために、保護プライマーを、はっきりした固有のシグナルを得るように設計された化学的部分で修飾（例えば、誘導体化）することができる。例えば、鎖のハイブリダイゼーション部分に沿った一つまたは複数の位置においてアミド結合を介してオリゴヌクレオチド鎖に付着した異なる天然または合成アミノ酸を用いて各保護プライマーを誘導することができる。化学的修飾は、当然、標的核酸から開裂された後、または、標的核酸と会合しているときに、検出することができる。各保護された標的核酸を識別できる方法で確認させることにより、単一のアッセイにおいて、多数の異なる標的核酸をアッセイ（例えば、スクリーニング）することができる。多くのそのようなアッセイは、迅速かつ容易に行うことができる。従って、そのようなアッセイまたはアッセイの組を、本明細書に定義される高い処理量効率で行うことができる。

【0225】

本発明の方法において、第1のプライマーを伸長しテンプレートDNAの配列を決めた後、第2のプライマーを脱保護し配列決定する。第1のプライマーの配列決定反応と、第2の非保護プライマーの配列決定反応との間に干渉はない。これは、第1のプライマーが完全に伸長または停止されているからである。第1のプライマーが完全に伸長されているので、ピロリン酸配列決定のような従来法を用いる第2のプライマーからの配列決定は、伸長された第1のプライマーの存在により影響されない。本発明は、第1のプライマーからの、あり得るシグナル汚染を減少させる方法も提供する。シグナル汚染とは、第1のプライマーが完全には伸長されていないことをいう。この場合、第1のプライマーは、その次のプライマーが脱保護および伸長されるときに、伸長し続ける。第1のプライマーおよび第2のプライマーの両者の伸長は、DNA配列の決定を妨げる。

【0226】

好ましい態様において、一つのプライマーからの配列決定反応（例えば、鎖伸長反応）をまず、停止または完了してから、第2のプライマー上で配列決定反応が開始する。DNAの鎖伸長反応は、ddATP、ddTTP、ddGTPおよびddCTPのようなジデオキシヌクレオチド三リン酸（ddNTP）およびDNAポリメラーゼにテンプレートDNAを接触させることにより停止することができる。停止に続いて、反応液をddNTPを含まない溶液で洗うことにより、ジデオキシヌクレオチド三リン酸を除去することができる。プライマーのさらなる伸長を防止する第2の方法は、ヌクレオチド三リン酸（dATP、dTTP、dGTPおよびdCTPのようなdNTP）およびDNAポリメラーゼを反応液に添加して、完全に伸長されていない任意のプライマーを完全に伸長することである。完全な伸長に続いて、dNTPおよびポリメラーゼを除去してから、次のプライマーを脱保護する。もう一つのプライマーを脱保護する前に一つのプライマーを完了または停止することにより、配列決定反応（例えば、ピロリン酸配列決定）のシグナル雑音比を向上させることができる。

10

【0227】

(a) 配列決定を任意に停止または完了する工程、(b) 新たなプライマーを脱保護する工程、および(c) 脱保護されたプライマーから配列決定する工程を、各プライマーの伸長から、配列が決定されるまで繰り返すことができる。この方法において、ハイブリダイゼーション工程は、「n」個のプライマーおよび一つの非保護プライマーを含む。非保護プライマーをまず配列決定し、前記工程(a)、(b)、および(c)を繰り返すことができる。

【0228】

20

好ましい態様において、本発明の方法により行われる全ての配列決定のためにピロリン酸配列決定が用いられる。

【0229】

もう一つの好ましい態様において、図10に概説されたプロセスに従って、両端配列決定が行われる。このプロセスは、6つの工程に分割することができる。(1) 捕捉ビーズの作成(図10A)、(2) ドライブトゥビーズ(drive to bead) (DTB) PCR増幅(図10B)、(3) SLレポーターシステム調製(図10C)、(4) 第1の鎖の配列決定(図10D)、(5) 第2の鎖の調製(図10Eおよび10F)、および(6) 各鎖の分析(図10G)。このプロセス例を以下に概説する。

【0230】

30

工程1において、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)活性化捕捉ビーズ(例えば、Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)を、フォワードプライマーとリバースプライマーの両方に結合させる。NHSカップリングにより、第一アミノ基を含む配位子との化学的安定アミド結合が形成される。捕捉ビーズもビオチンにカップリングされている(図10A)。本明細書で用いられるビーズ(すなわち、固体核酸捕捉支持体)は、任意の好都合な寸法であり、任意数の既知の材料から作られる。そのような材料の例には、無機材料、天然ポリマーおよび合成ポリマーがある。これらの材料の具体例には、セルロース、セルロース誘導体、アクリル樹脂、ガラス；シリカゲル、ポリスチレン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ビニルとアクリルアミドとのコポリマー、ジビニルベンゼン等と架橋されたポリスチレン(Merrifield Biochemistry 1964, 3, 1385-1390を参照されたい)、ポリアクリルアミド、ラテックスゲル、ポリスチレン、デキストラン、ゴム、ケイ素、プラスチック、ニトロセルロース、セルロース、天然スポンジ、シリカゲル、ガラス、金属プラスチック、セルロース、架橋デキストラン(例えば、Sephadex(商標))およびアガロースゲル(セファロース(商標))、並びに当業者に知られている固相支持体がある。一つの好ましい態様において、捕捉ビーズは直径が約25~40 μm であるセファロースビーズである。

40

【0231】

工程2において、フォワードおよびリバースプライマーにハイブリダイズしたテンプレートDNAを添加し、このDNAをPCR増幅法により増幅する(図10B)。一つの態様において、DNAを、エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応、ドライブ-トゥ-ビーズポリメラーゼ連鎖反応、ローリングサークル増幅またはループ媒介等温増幅により増幅させる。工程3におい

50

て、ストレプトアビジンを添加してから、ストレプトアビジンにカップリングされたスルフリラーゼおよびルシフェラーゼを添加する（図10C）。配列決定法中の補助酵素の添加が、米国特許出願第10/104,280号および第10/127,906号に開示され、これらの全体は参照として本明細書に組み入れられる。一つの態様において、テンプレートDNAは、5'および3'末端の両方においてライゲートされたDNAアダプターを有する。好ましい態様において、DNA捕捉ビーズ上の相補性配列にDNAアダプターの一つをハイブリダイズすることにより、DNAを、DNA捕捉ビーズにカップリングする。

【0232】

第1の工程において、増幅すべき一本鎖核酸テンプレートを、捕捉ビーズに付着させる。核酸テンプレートを、当技術分野において知られる方法により、捕捉ビーズに付着させることができる。DNAを微小ビーズに付着させるための多くの方法が当技術分野において存在する。DNAのビーズへの化学的共有結合を、水溶性カルボジイミドのような標準的カップリング剤を用いて達成して、DNA上の5'リン酸をホスホアミデート結合を介してアミン被覆マイクロスフェアに結合させることができる。もう一つの方法は、まず、特定のオリゴヌクレオチドリンカーを同様の化学的手段によりビーズに連結させ、次に、DNAリガーゼを用いてDNAをビーズ上のリンカーに結合させることである。他の化学的結合法には、N-ヒドロキシスクシンアミド（NHS）およびその誘導体を用いて、オリゴヌクレオチドをビーズに結合させることがある。そのような方法において、オリゴヌクレオチドの一端は、固体支持体と共有結合を形成する反応性基（例えば、アミド結合）を含み、リンカーの他端は、固定すべきオリゴヌクレオチドに結合することができるもう一つの反応性基を含むことができる。好ましい態様において、オリゴヌクレオチドが、共有結合によりDNA捕捉ビーズに結合される。しかしながら、キレート結合または抗原-抗体複合体のような非共有結合を用いて、オリゴヌクレオチドをビーズに結合させることもできる。

【0233】

制限酵素部位からの重複末端またはバクテリオファージλに基づくクローニングベクターの「接着末端」のようなDNA断片の末端における固有の配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドリンカーを用いることができるが、平滑末端ライゲーションも有益に用いることができる。これらの方法が、米国特許第5,674,743号に詳細に説明されており、その開示は参照として本明細書に組み入れられる。ビーズを固定するために用いられる方法を経て、本発明の方法の工程全体において固定オリゴヌクレオチドを結合させることが好ましい。好ましい態様において、オリゴヌクレオチドを、共有結合により、DNA捕捉ビーズに結合させる。しかしながら、キレート結合または抗原-抗体複合体のような非共有結合を用いて、オリゴヌクレオチドをビーズに結合させることができる。

【0234】

工程4において、捕捉ビーズをピコタイタープレート（PTP）上に沈着させ、当業者に知られている方法（例えば、ピロリン酸配列決定）により配列決定することにより、DNAの第1の鎖の配列を決定する（図10D）。配列決定に続いて、dNTPとddNTPとの混合物を添加して、配列決定プロセスを「キャッピング」または停止させる（図10E）。工程5において、アピラーゼを添加してddNTPを除去し、ポリヌクレオチドキナーゼ（PNK）を添加して遮断されたプライマー鎖から3'リン酸基を除去することにより、核酸の第2の鎖を調製する（図10F）。次に、ポリメラーゼを添加して、第2の鎖をプライミングし、続いて、当業者に知られている標準的方法に従って第2の鎖を配列決定する（図10G）。工程7において、第1および第2の鎖の両方の配列を、近接DNA配列が決定されるように、分析する。

【0235】

検出手段

固体支持体を、任意に、従来の光学機器および光ファイバー束と組み合わせてCCDシステムを含む結像システム230に光学的に結合させる。一つの態様において、灌流チャンバー基質は光ファイバーアレイウエハを含み、それにより、水性界面の近くに発生した光が、光ファイバーを通して基質またはチャンバーの外側に直接送られる。CCDシステムが光ファイバーコネクタを含む場合、灌流チャンバー基質をそのコネクタに直接接触させ

て配置することにより結像を達成することができる。または、従来の光学機器を用いて、例えば、1-1倍率高開口数レンズシステムを用いて、光ファイバー基質の外側からCCDセンサー上に光を直接結像する。基質が光ファイバーカップリングを提供しない場合は、前述のようにレンズシステムを用いることもでき、その場合、基質または灌流チャンバーカバーのいずれかが光学的に透明である。CCD結像システムの例は前述されている。

【0236】

結像システム230を用いて、リアクターからの光を基質表面上に集める。光を、例えば、当技術分野において知られている高感度低ノイズ装置を用いてCCD上に結像することができる。光ファイバーによる結像の場合、光ファイバーをカバースリップに直接組み込むか、または、FORAの場合、光を検出器に運ぶ光ファイバーでもあるマイクロウェルを形成する光ファイバーを有することが好ましい。

10

【0237】

結像システムは、コンピューター制御およびデータ収集システム240に結合される。通常、任意の一般的に入手できるハードウェアおよびソフトウェアパッケージを用いることができる。コンピューター制御およびデータ収集システムは、試薬の送達を制御するための導管200にも結合される。

【0238】

ピロリン酸配列決定反応により発生する光は、合焦装置（例えば、光学レンズまたは光ファイバー）を通して通過しCCD要素上に集束しさえすれば、CCDにより捕捉される。しかしながら、発せられた光子は、等しく全ての方向に逃げる。平坦アレイ（例えば、DNAチップ）を用いる場合、その後の「捕捉」および定量を最大にするために、光子を、それらが発生される地点のできるだけ近く、例えば、平坦固体支持体の直ぐ近くに集めることが好ましい。これは、(i) カバースリップと従来の光学レンズまたは光ファイバー束との間に光学的浸漬油を利用するか、または好ましくは、(ii) 光ファイバーをカバースリップそのものに直接組み込むことのいずれかにより達成される。同様に、薄い光学的に透明な平坦表面を用いる場合、光ファイバー束を、その背部表面の反対側に配置することもでき、反応/灌流チャンバー全体の深さを通して結像する必要性が無くなる。

20

【0239】

反応事象、例えば、ルシフェラーゼにより発生する光子を、種々の検出装置、例えば、光電子増倍管、CCD、CMOS、吸光度計、照度計、電荷注入素子（CID）または他の固体検出器、並びに本明細書に記載の装置を用いることにより検出および定量することができる。好ましい態様において、発せられた光子の定量を、溶融光ファイバー束が装着されたCCDカメラの使用により行う。もう一つの好ましい態様において、発せられた光子の定量を、マイクロチャンネルプレート増強器が装着されたCCDカメラの使用により行う。背面薄型（back-thinned）CCDを用いて、感度を上げることができる。CCD検出器は、例えば、Bronks, et al., 1995. Anal. Chem. 65: 2750-2757に記載されている。

30

【0240】

CCDシステムの例は、個々の繊維の直径が6~8 μm である1-1光ファイバーコネクタ（束）およびLockheed-Martin LM485 CCDチップを備えるSpectral Instruments, Inc. (Tucson, AZ) Series 600 4-ポートカメラである。このシステムは、4096×4096または千六百万ピクセル以上であり、量子効率が10%~40%超の範囲である。すなわち、波長に依存して、CCDセンサー上に結像された光子の40%が、検出可能な電子に転換される。

40

【0241】

他の態様において、蛍光部分を標識として用いることができ、レーザーまたは他の技術でアレイの表面を走査するために走査型共焦顕微鏡を用いて反応事象を検出することができる。ここで、小さな光学的解像が可能であり、それにより「より密な」アレイの使用が可能になる走査型近接場光学顕微鏡（SNOM）のような技術を利用することができる。例えば、100nm未満の距離、例えば、10nm×10nmで分離している場合、SNOMを用いて、個々のポリヌクレオチドを識別することができる。さらに、走査トンネル型顕微鏡（Binnig et al., Helvetica Physica Acta, 55: 726-735, 1982）および原子力顕微鏡（Hansma et al., A

50

nnu Rev Biophys Biomol Struct,23:115-139,1994)を用いることができる。

【0242】

ハプロタイプ適用

実質的にいかなる配列決定適用も、本発明の方法および装置を用いて達成することができる。一つの態様において、本発明者らはハプロタイプマッピングを企図する。ヒト遺伝子多様性は、薬剤に対する患者の反応の変動性において重要な因子である。この多様性の最も正確な測定手段はハプロタイプであり、これは、染色体上で見られるような多型変化の機構である。最近、米国、カナダおよび欧州の主要な政府機関および学術的ゲノム研究者が、ハプロタイプが、遺伝子情報の複雑性を実用的状態まで低下させることができる有力なツールであるという点で一致した。ハプロタイプを薬剤の発見に用いて、標的確認および薬剤スクリーニング研究の結果を向上することができ、かつ薬剤の開発に用いて、臨床的試行の設計および信頼性を向上することができる。ハプロタイプマーカーを、新しい認可された薬剤の効能および安全性を予想するために用いることができ、個人用薬剤の新しい範例の基礎として作用し、臨床的マーカー組み合わせのデータベースからのガイダンスを介して患者を正しい薬および正しい投与量に適合させる。

【0243】

多くの経験的研究により、近隣のSNP対立遺伝子は、しばしば、互いに連鎖不平衡(LD)であり、それにより、一つのSNP対立遺伝子の状態が、もう一つの近いSNPの対立遺伝子と高度に相関することが多いことが示された。世代から世代へと共伝達される密に連鎖されたSNPの共有された履歴のため、これらの相関が存在する。従って、ヒト配列多様性のパターン(ハプロタイプ)は、先祖DNAセグメントを表す。歴史的な減数分裂は、密に連鎖した変異体を除いて、先祖染色体上の隣接対立遺伝子から対立遺伝子をゆっくりと解離した。最近の障害を有する創始者集団における連鎖不平衡の程度が、多くの研究、特に、嚢胞性線維症(16)、ハンチントン病(11)、捻曲性骨形成異常(DTD)(8)のような単純メンデル遺伝病のクローニングにおける多くの研究の対象であった。これらのクローニング研究は、長い距離(しばしば、メガベース範囲)に渡ってLDの広がりを示す大きな染色体セグメントから利益を得るが、世界的集団におけるヒトゲノムのLDに関して、最近まで、非常に僅かの経験的データしか得られていなかった。

【0244】

本発明者らは、LD(およびハプロタイプ)の大規模調査の3つの最近の例に注目した(例えば、

Reich, D. E., Cargill, M., Bolk, S., Ireland, J., Sabeti, P. C., Richter, D. J., Lavery, T., Kouyoumjian, R., Farhadian, S. F., Ward, R. & Lander, E. S. 2001. Linkage disequilibrium in the human genome. Nature 411, 199-204.

を参照されたい)。本発明者らは、そのSNP含量について、19個の染色体領域をサンプリングした。2~160kbの高頻度SNP間隔について、最初に、コーカサス人サンプルにおいて遺伝子型が決定された。全領域において、LDは、約60kbの距離において検出可能であり、領域間における差が大きく、一つの座においてその範囲は6kbと短くもう一つの座において155kbと長かった。LDが、推定された局所的組み換え速度と著しく相関したことは驚くことではない。さらに、ナイジェリア人サンプル中における分析は、この集団における短いLDの証拠を提供したが、短い距離に渡る対立遺伝子の組み合わせは、コーカサス人サンプルに類似であった。全体として、この研究は、LDの大きなブロックがヒトゲノムを通して共通であり、かつ疾患遺伝子のゲノム全体にわたるLDマッピングが可能であるという証拠を提供した。

【0245】

キット

本発明は、以下の成分の一つまたは複数を含み得る本発明の方法に用いるためのキットも含む：(a) 標的位置がプライマーの3'末端に直接隣接するようにサンプルDNAにハイブ

リダイズする試験特異的プライマー；(b) ポリメラーゼ；(c) PPI放出を確認するための検出酵素手段；(d) dATPの代わりに、ポリメラーゼ用の基質として作用することができるが前記PPI検出酵素用の基質として作用することができないdATP類似体を含むデオキシヌクレオチド；および(e) 任意のジデオキシヌクレオチドであって、ddATPは、任意に、ポリメラーゼ用の基質として作用することができるが前記PPI検出酵素用の基質として作用することができないddATP類似体により置換される。キットを初期PCR増幅に用いる場合、以下の成分も含み得る。(i) 一对のPCR用プライマーであって、少なくとも一方のプライマーが、前記プライマーを固定化させる手段を有する；(ii) 好ましくは熱安定性であるポリメラーゼ、例えば、TaqIポリメラーゼ；(iii) PCR反作用の緩衝液；および(iv) デオキシヌクレオチド。PCRを評価するために酵素標識を用いる場合、キットは、酵素用の基質、および検出システムの他の成分を有利に含む。

【0246】

本発明の一つの態様は、核酸の配列を決定する方法に関する。この方法は、大きなテンプレート核酸分子を断片化して、複数の断片化核酸を生成することを含む。次に、複数の水性マイクロリアクターが断片化核酸の単一コピーを含むように、断片化された核酸を、油中水型エマルジョン中の水性マイクロリアクター中に送達する（単一のビーズは断片化核酸に結合することができ、増幅反応溶液は核酸増幅を行うのに必要な試薬を含む）。次の工程において、断片化された核酸がマイクロリアクター中で増幅されて、核酸の増幅コピーが形成され、増幅コピーがマイクロリアクター中のビーズに結合する。次に、ビーズが、平坦表面上の少なくとも10,000個の反応チャンバーのアレイに送達される（複数の反応チャンバーは単一のビーズしか含まない）。最後に、配列決定反応が、複数の反応チャンバー上で同時に行われる。

【0247】

本発明のもう一つの態様は、上に複数の空洞を有する平坦表面を含むアレイであって、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間間隔が20~100 μm であり、各空洞の少なくとも一つの寸法の幅が20 μm と70 μm の間であるアレイに関する。さらに、アレイ中に少なくとも10,000個の反応チャンバーがある。各反応チャンバーは、一本鎖核酸テンプレートの単一種の少なくとも100,000個のコピーを含み得る。

【0248】

本発明のもう一つの態様は、平坦頂部表面と平坦底部表面とを含むアレイであって、平坦頂部表面はその上に各々が分析体反応チャンバーを形成している少なくとも10,000個の空洞を有し、平坦底部表面は光学的伝導性であるために反応チャンバーからの光学的シグナルを底部平坦表面を通して検出することができ、頂部表面と底部表面との間の距離は5mmを超えず、反応チャンバーは20~100 μm の中心間間隔を有し、各チャンバーは少なくとも一つの寸法の幅が20 μm ~70 μm である、アレイに関する。頂部表面と底部表面との間の距離は、一つの態様において、2mmを超えない。

【0249】

本発明のもう一つの態様は、水性環境中で別々の並行共通反応を行うためのアレイ手段に関する。アレイ手段は、試薬と反応することができる出発材料を含む少なくとも10,000の別個の反応チャンバーを含む基質を含み、反応チャンバーの各々が、少なくとも一つの試薬を含む一つまたは複数の流体を各反応チャンバー中に送達したときに、その試薬がウェルから拡散して出るための拡散時間が、出発材料が試薬と反応して産物を形成するのに必要な時間を超えるような寸法である。

【0250】

本発明のもう一つの態様は、生物活性剤をアッセイに送達するための方法に関する。この方法は、複数の可動性固体支持体のアレイの上に、上に固定された少なくとも一つの試薬を有する各可動性固体支持体を分散させることを含み、試薬は、核酸配列決定反応に用いるのに適し、このアレイは、複数の反応チャンバーが上に配置されている平坦表面を含む。反応チャンバーは、中心間間隔が20~100 μm であり、各反応チャンバーの幅は、少なくとも一つの寸法において20 μm ~70 μm である。

【0251】

本発明のもう一つの態様は、特定の部位において反応が起こっていることを示す光について反応チャンバーのアレイを同時にモニターするための装置に関する。この装置は、(a) 空洞を設けた各表面が分析体を含むように適合された反応チャンバーを形成している、複数の空洞を設けた表面を含む平坦基質から形成された反応チャンバーのアレイ（反応チャンバーは中心間間隔が20～100 μm であり、各反応チャンバーは体積が10～150pLであり、アレイは、10,000個より多くの別個の反応チャンバーを含む）；(b) 使用時に、特定の反応チャンバーからの光が、光学的感受性装置の特別の所定の領域に衝突するように配置された光学的感受性装置；(c) 各々の所定の領域に衝突する光のレベルを決定するための手段、および(d) 反応チャンバーの各々について経時的な光レベルの変動を記録する手段を含む。

10

【0252】

本発明のもう一つの態様は、(a) 一端に複数の空洞を設けた表面を有する光ファイバーの第1の束から形成されるアレイ（空洞を設けた各表面は、分析体を含むように適合された反応チャンバーを形成し、反応チャンバーは中心間間隔が20～100 μm であり、幅は20～70 μm であり、アレイは10,000個より多くの別個の反応チャンバーを含む）；(b) 反応チャンバー中で光を発生させるための酵素的または蛍光的手段；および(c) 光捕捉手段および、光検出手段に光を伝達するための第2の光ファイバー束を含む光検出手段（第2の光ファイバー束はアレイと光学的に接触し、それにより、個々の反応チャンバー中で発生した光が、光捕捉手段に伝達するための第2の光ファイバー束の別々の繊維または別々の繊維の群により捕捉される）を含む分析用センサーに関する。

20

【0253】

本発明のもう一つの態様は、水性環境中で別々の並行共通反応を行うための手段に関する。第1の工程は、少なくとも一つの試薬を含む流体をアレイに送達することを含み、そのアレイは、各反応チャンバーが分析体を含むように適合されている少なくとも10,000個の別個の反応チャンバーを含む基質を含み、反応チャンバーは10～150pLの体積を有し、試薬と反応することができる出発材料を含み、反応チャンバーの各々は、流体が各反応チャンバーに送達されたときに、試薬がウェルから拡散して出る拡散時間が、出発材料が試薬と反応して産物を形成するのに必要な時間を超えるような寸法とされている。第2の工程は、(i) 各反応チャンバーにおいて出発材料が試薬と反応して産物を形成した後であるが(ii) いずれか一つの反応チャンバーに送達された試薬がその反応チャンバーから拡散して出て任意の他の反応チャンバーに入る前の期間に、アレイからの流体を洗うことを含む。

30

【0254】

本発明のもう一つの態様は、核酸配列決定用酵素をアレイに送達する方法に関する。アレイは、各空洞が分析体反応チャンバーを形成している複数の空洞を上には有する平坦表面を有し、反応チャンバーは中心間間隔が20～100 μm である。この方法は、一つまたは複数の核酸配列決定用酵素が上に固定されている複数の可動性固体支持体を、複数の反応チャンバーが少なくとも一つの可動性固体支持体を含むように、そのアレイ上に分散させる工程を含む。

40

【0255】

本発明のもう一つの態様は、複数の核酸テンプレートをアレイに送達する方法に関する。このアレイは、各空洞が分析体反応チャンバーを形成している複数の空洞をその上に有する平坦表面を有し、反応チャンバーは中心間間隔が20～100 μm であり、そのアレイは少なくとも10,000個の反応チャンバーを有する。この方法は、各可動性固体支持体が単一の核酸テンプレートのみをその上に固定している複数の可動性固体支持体を、そのアレイ上に分散させる工程を含み、分散により、一つの可動性固体支持体のみが任意の一つの反応チャンバー中に配置される。

【0256】

本発明のもう一つの態様は、核酸の配列を決定する方法に関する。この方法は、各空洞

50

が分析体反応チャンバーを形成している平坦表面上の複数の空洞中に配置された複数の一本鎖核酸テンプレートを提供する工程を含み、反応チャンバーは中心間間隔が20~100 μmであり、平坦表面は少なくとも10,000個の反応チャンバーを有する。次の工程は、有効量の配列決定用プライマーを核酸テンプレートにアニーリングすると共にポリメラーゼおよび所定のヌクレオチド三リン酸を用いて配列決定用プライマーを伸長して配列決定産物を生成し、かつ、所定のヌクレオチド三リン酸が配列決定用プライマーの3'末端に組み込まれたときは、反応副産物を生成することにより、全ての反応チャンバー上でピロリン酸に基づく配列決定反応を同時に行うことを含む。第3の工程は、配列決定反応副産物を同定し、それにより、各反応チャンバー中の核酸の配列を決定することを含む。

【0257】

本発明のもう一つの態様は、アレイ上の複数のヌクレオチドの塩基配列を決定する方法に関する。第1の工程は、各空洞が分析体反応チャンバーを形成している平坦表面上の複数の空洞中に各々が別々に配置されている少なくとも10,000個のDNAテンプレートを提供することを含み、反応チャンバーは中心間間隔が20~100 μmであり、体積は10~150pLである。第2の工程は、一つの既知の窒素性塩基の活性化ヌクレオチド5'三リン酸前駆体を、各反応チャンバー中の反応混合物に添加することを含み、各反応混合物は、テンプレート依存性ヌクレオチドポリメラーゼ、および、テンプレートより少なくとも一ヌクレオチド残基短い相補性オリゴヌクレオチドプライマー鎖にハイブリダイズし、プライマー鎖の3'末端における各テンプレート中に少なくとも一つの不對ヌクレオチド残基を形成する一本鎖ポリヌクレオチドテンプレートを含む。この反応は、プライマー鎖の3'末端に活性化ヌクレオチド5'三リン酸前駆体を組み込ませることができる条件下で行われるが、活性化ヌクレオチド5'三リン酸前駆体の窒素性塩基が、テンプレートの不對ヌクレオチド残基の窒素性塩基に相補性であることを条件とする。第3の工程は、ヌクレオチド5'三リン酸前駆体がプライマー鎖に組み込まれたかどうかを検出することを含み、ヌクレオチド5'三リン酸前駆体の組み込みは、テンプレートの不對ヌクレオチド残基が、組み込まれたヌクレオチド5'三リン酸前駆体の組成に相補的な窒素性塩基組成を有することを示す。第4の工程は、工程(b)と工程(c)を順次繰り返すことを含み、各繰り返しにより、窒素性塩基組成が知られている一つの種類の活性化ヌクレオチド5'三リン酸前駆体の組み込みを増加させ、かつ検出する。第5の工程は、ヌクレオチド前駆体の組み込みの配列から各反応チャンバー中のテンプレートの不對ヌクレオチド残基の塩基配列を決定することを含む。

【0258】

本発明のもう一つの態様は、テンプレートDNAのDNA配列中の標的位置における塩基を同定する方法に関する。第1の工程は、各空洞が分析体反応チャンバーを形成している平坦表面上の複数の空洞中に別々に配置された少なくとも10,000個の別個のDNAテンプレートを提供することを含み、反応チャンバーは中心間間隔が20~100 μmであり、DNAが、反応チャンバー中に配置される前または後に一本鎖にされる。第2の工程は、標的位置に直に隣接する位置において固定化一本鎖DNAにハイブリダイズする伸長プライマーを提供することを含む。固定化一本鎖DNAは、所定のデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドの存在下でポリメラーゼ反応に供され、所定のデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドが配列決定用プライマーの3'末端に組み込まれると、配列決定反応副産物が形成される。第4の工程は、配列決定反応副産物を同定し、それにより、10,000個のDNAテンプレートの各々の中の標的位置における塩基に相補性であるヌクレオチドを決定することを含む。

【0259】

本発明のもう一つの態様は、核酸配列を分析するための装置に関する。この装置は、(a) 試薬送達キュベットであって、複数の空洞を上にも有する平坦表面を含むアレイを含み、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間間隔が20~100 μmであり、10,000個を超える反応チャンバーがあり、配列決定反応に用いるための試薬を含む、試薬送達キュベット、(b) 試薬送達キュベットと連通している試薬送達手段、(c) 試薬送達チャンバーと連通している結像システム、および(d) 結像システムと連通してい

るデータ収集システムを含む。

【0260】

本発明のもう一つの態様は、アレイ上の複数のヌクレオチドの塩基配列を決定するための装置に関する。この装置は、(a) 平坦表面上に複数の空洞を含む試薬キュベットであって、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、10,000個を超える反応チャンバーがあり、その各々の中心間間隔が20~100 μm であり体積が10~150pLであるような試薬キュベット、(b) 活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体をプライマー鎖の3'-末端に組み込むことができる条件下において、一つの既知の窒素性塩基の活性化ヌクレオチド5'-三リン酸前駆体を各反応チャンバー中の反応混合物に同時に添加するための試薬送達手段であって、各反応混合物が、テンプレート依存性ヌクレオチドポリメラーゼ、および、テンプレートより少なくとも一ヌクレオチド残基短い相補性オリゴヌクレオチドプライマー鎖にハイブリダイズし、プライマー鎖の3'末端における各テンプレート中に少なくとも一つの不對ヌクレオチド残基を形成する一本鎖ポリヌクレオチドテンプレートを含む（ただし、活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の窒素性塩基はテンプレートの不對ヌクレオチド残基の窒素性塩基に相補的である）試薬送達手段、(c) 各反応チャンバーにおいてヌクレオシド5'-三リン酸前駆体がプライマー鎖中に組み込まれたかどうか検出するための検出手段であって、ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の組み込みが、テンプレートの不對ヌクレオチド残基が、組み込まれたヌクレオシド5'-三リン酸前駆体に相補的な窒素性塩基組成を有することを示すような検出手段、(d) 工程(b)および(c)を順次繰り返すための手段であって、各順次繰り返しが、既知の窒素性塩基組成を有する一つのタイプの活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の組み込みを増加させ、かつ検出する手段、および(e) 前記ヌクレオシド前駆体の組み込みの配列から、各反応チャンバー中で同時にテンプレートの不對ヌクレオチド残基の塩基配列を決定するための、データ処理手段を含む。

【0261】

本発明のもう一つの態様は、複数の分析体を処理するための装置に関する。この装置は、(a) 光ファイバー束上に少なくとも50,000個の空洞を設けた表面を含む基質の中に配置されたフローチャンバーであって、空洞を設けた各表面が、分析体を含むように適合された反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間間隔が20~100 μm であり、直径が20~70 μm であるフローチャンバー、(b) 一つまたは複数の貯蔵器からの処理試薬を、反応チャンバー中に配置された分析体が試薬に曝されるように、フローチャンバーに送達するための流体手段、および(c) 反応チャンバーの各々からの光シグナルのアレイを同時に検出するための検出手段であって、配列の各光シグナルが、処理試薬と反応チャンバー中に配置された分析体との間の相互作用を示し、検出手段が空洞を設けた表面と連通している、検出手段を含む。

【0262】

本発明のもう一つの態様は、核酸の配列を決定するための方法に関する。第1の工程は、少なくとも50,000個の別々の反応部位を有するアレイ中に、複数の一本鎖核酸テンプレートを提供することを含む。第2の工程は、核酸テンプレートを、発光と共役するピロリン酸に基づく配列決定反応を行うのに必要な試薬に接触させることを含む。第3の工程は、光学的感受性装置のそれぞれの部分上における複数の反応部位から放出された光を検出することを含む。第4の工程は、光学的感受性装置の部分の各々に衝突する光を、全ての他の反応部位からのシグナルと区別できる電気シグナルに転換することを含む。第5の工程は、核酸テンプレートの配列を、別々の反応部位の各々についての発光に基づき対応する電気シグナルから決定することを含む。

【0263】

本発明のもう一つの態様は、核酸の配列を決定する方法に関する。第1の工程は、大きなテンプレート核酸分子を断片化して複数の断片化核酸を生成することを含む。第2の工程は、複数の断片化核酸の一つの鎖を個々にビーズに付着させて、個々にビーズに付着した一本鎖核酸を生成することを含む。第3の工程は、個々にビーズに付着した一本鎖断片化核酸の集団を、平坦表面上の少なくとも10,000個の反応チャンバーのアレイに送達する

ことを含む（複数のウェルは、一本鎖断片化核酸上に一つのビーズしか含まない）。第4の工程は、複数の反応チャンバー上において配列決定反応を同時に行うことを含む。配列決定反応は、（a）有効量の配列決定プライマーを一本鎖断片化核酸テンプレートにアニーリングし、ポリメラーゼおよび所定のヌクレオチド三リン酸を用いて配列決定プライマーを伸長して配列決定産物を産生し、かつ所定のヌクレオチド三リン酸が配列決定プライマーの3'末端に組み込まれる場合は、配列決定反応副産物を産生する工程、および（b）複数の反応チャンバー中において配列決定反応副産物を同定し、それにより核酸の配列を決定する工程を含む。または、配列決定反応は、（a）一つを除いて全てのプライマーが可逆的に遮断されたプライマーである2つ以上の配列決定プライマーを、核酸分子の一本または複数の一本鎖にハイブリダイズする工程、（b）少なくとも一つの塩基を、非遮断プライマーからのポリメラーゼ伸長により核酸分子に組み込む工程、（c）非遮断プライマーのさらなる伸長を防止する工程、（d）可逆的に遮断されたプライマーの一つを脱遮断して非遮断プライマーにする工程、および（e）少なくとも一つの可逆的遮断プライマーが脱遮断され配列の決定に用いられるまで工程（b）～（d）を繰り返す工程を含む。

10

【0264】

他の材料および方法を、以下の2003年1月29日出願の同時係属中の米国特許出願第60/443,471号および、2003年4月23日出願の米国特許出願第60/465,071号に見出すことができる。この開示に引用されている全ての特許、特許出願および参考文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

20

【実施例】

【0265】

実施例1: サンプル調製

DNAサンプル

DNAは高品質で、タンパク質、ヌクレアーゼ、脂質および他の化学物質（例えば、調製からの残留EDTA）のような汚染物質および塩を含まないようにすべきである。ゲノムDNAの260/280比が1.8以上であることが好ましい。一つの生物のみのゲノムの配列を決定することが望まれる場合、DNAは、汚染性DNAが無いことを確認するために品質を調べるべきである。例えば、ヒトDNAの調製をPCRにより調べて、細菌性DNA分子により汚染されていないことを確認することができる。汚染を調べるもう一つの方法は、制限消化パターン、および特に、制限消化およびその後の、生物（例えば、ヒトまたはマウス）に特異的であると知られている適当なプローブ、およびあり得る汚染性生物（例えば、大腸菌）に特異的であると知られている第2のプローブを用いるサザンブロットによる。望まれる場合、DNAは生物の単一クローン（例えば、細菌からの場合、コロニー）から生じるべきである。

30

【0266】

工程1: DNase I消化

DNase I消化工程の目的は、全ゲノムまたはゲノムの大きな部分のようなDNAの大きなストレッチを小さな断片に断片化することである。単一DNAテンプレートから発生した小さな寸法のDNA種のこの集団を、「ライブラリー」と呼ぶ。デオキシリボヌクレアーゼI (DNase I) は、二本鎖テンプレートDNAを開裂するエンドヌクレアーゼである。DNase Iの開裂特性により、テンプレートDNAがランダムに消化される（すなわち、最少配列バイアス）と共に、マンガン系緩衝液 (Melgar and Goldthwait 1968) の存在下で用いたときに平滑末端二本鎖DNA断片が優位になる。DNase Iによるゲノムテンプレートの消化は、3つの因子に依存する。i) 用いられる酵素の量（単位）；ii) 消化の温度（℃）；およびiii) インキュベーション時間（分）。以下に概説されるDNase I消化条件を最適化して、50～700塩基対（bp）のサイズ範囲のDNAライブラリーを得た。

40

【0267】

1. DNAを得てTris-HCl中0.3mg/ml（10mM、pH7～8）の濃度に調製した。合計で134μlのDNA（15μg）が、この調製に必要であった。EDTAを含む緩衝液（すなわち、TE、Tris/EDTA）で希釈されたDNA調製物を用いないほうが良い。EDTAの存在は、DNase Iでの酵素消化に抑制的である。DNA調製物がEDTAを含む場合、DNAを溶液から「塩析」し、適当なTris

50

-HCl緩衝液（10mM、pH7～8）またはナノピュア（nanopure）H₂O（pH7～8）を用いて再構成されることが重要である。

2. 0.2ml管において、Tris pH7.5（1M）50 μ l、MnCl₂（1M）10 μ l、BSA（100mg/ml）1 μ lおよび水39 μ lを含むDNase I緩衝液を調製した。

3. 別の0.2ml管において、DNase I緩衝液15 μ lおよびDNase I（1U/ml）1.5 μ lを添加した。反応管を、15℃に設定された熱サイクラー内に配置した。

4. DNA（0.3mg/ml）134 μ lを、15℃に設定された熱サイクラー内に配置されたDNase I反応管に添加した。蓋を閉め、サンプルを正確に1分間インキュベートした。インキュベーションに続いて、50 μ lの50mM EDTAを添加して、酵素的消化を停止した。

5. 消化したDNAを、QiaQuick PCR精製キットを用いることにより精製した。消化反応液を、次に、4つの部分に分け、各部分を精製するために4つのスピンカラムを用いた（スピンカラム当たり37.5 μ l）。各カラムを、製造者のプロトコールに従って、溶出緩衝液（EB）30 μ lで溶出した。次に、溶出液を組み合わせ、最終的反応体積120 μ lを得た。

6. 消化反応液の3 μ lの部分を、BioAnalyzer DNA 1000 LabChipを用いる分析のために貯蔵した。

【0268】

工程2：Pfu研磨

DNase IでDNAテンプレートを消化すると、主に平滑末端であるDNAの断片を生成されるが、一部の断片は、1または2個のヌクレオチドの長さの突出している端部を含む末端を有する。Pfu研磨を用いて、5'突出部の充填（すなわち、「平滑化」）により平滑末端種の量を増加させる。さらに、Pfu DNAポリメラーゼは、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有し、一本または二本のヌクレアーゼ伸長が除去されることになる。Pfu研磨により、アダプターライゲーション（Costa 1994a、1994b、1994c）に利用できる平滑末端DNA断片の量が増加する。以下のPfu研磨プロトコールを用いた。

【0269】

1. 0.2ml管中において、精製したDNase I消化DNA断片115 μ l、10×クローン化Pfu緩衝液15 μ l、dNTP（10mM）5 μ l、およびクローン化Pfu DNAポリメラーゼ（2.5U/ μ l）15 μ lを、順番に添加した。

2. 研磨反応成分を十分に混合し、72℃で30分間インキュベーションした。

3. インキュベーションに続いて、反応管を除去し、氷上に2分間置いた。

4. 研磨反応混合物を、次に、4つのアリコートに分け、QiaQuickPCR精製カラム（各カラム上に37.5 μ l）を用いて精製した。各カラムを、製造者のプロトコールに従って、緩衝液EB30 μ lで溶出した。次に、溶出液を組み合わせ、最終的反応体積120 μ lを得た。

5. 最終的研磨反応液の3 μ lのアリコートを、BioAnalyzer DNA 1000 LabChipを用いる分析のために貯蔵した。

【0270】

工程3：断片DNAライブラリーへのユニバーサルアダプターのライゲーション

ゲノムDNAライブラリーの断片化および研磨に続いて、各DNA断片末端にプライマー配列を付加する。これらのプライマー配列を「ユニバーサルアダプター」と呼び、PCR増幅およびヌクレオチド配列決定の両者を提供する特定のプライミング領域を含む二本鎖オリゴヌクレオチドからなる。ユニバーサルアダプターは、各デオキシリボヌクレオチド（すなわち、A、C、G、T）の一つからなる固有の4-塩基「キー」が続く、20塩基対の長さの一組の固有の配列決定プライミング領域の近傍にある20塩基対の長さの一組の固有のPCRプライミング領域を含むように設計される。各固有のユニバーサルアダプター（「ユニバーサルアダプターA」および「ユニバーサルアダプターB」と呼ばれる）は、44bpの長さである。ユニバーサルアダプターは、T4 DNAリガーゼを用いてDNA断片の各末端にライゲートされて、各DNA断片に合計88bpのヌクレオチドを付加する。異なるユニバーサルアダプターが、各ゲノムDNAライブラリー調製のために特異的に設計され、従って、各生物のための固有の確認手段が提供される。

【0271】

一对のユニバーサルアダプターを調製するために、一本鎖オリゴヌクレオチドが内部（in-house）で設計され、商業的供給業者により製造される。ユニバーサルアダプターDNAオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ活性に対して保護するように作用する各オリゴヌクレオチド末端における2つのホスホロチオエート結合を有するように設計される（Samini, T.D., B.Jolles, and A.Laigle.2001, Best minimally modified antisense oligonucleotides according to cell nuclease activity. Antisense Nucleic Acid Drug Dev.11(3):129、この開示内容は全て参照として本明細書に組み入れられる）。各オリゴヌクレオチドがHPLCで精製され、最終的調製において汚染または偽DNAオリゴヌクレオチド配列が無いことが確認される。

【0272】

ユニバーサルアダプターは、平滑末端断片化ゲノムDNAへの指向性ライゲーションを可能にするように設計される。各ユニバーサルアダプター対について、PCRプライミング領域は、5'四塩基突出部および平滑末端3'キー領域を含む。ユニバーサルアダプターの平滑末端側が平滑末端DNA断片にライゲートし、アダプターの5'突出部が平滑末端DNA断片にライゲートできないときに指向性が達成される。さらに、5'ビオチンがユニバーサルアダプターBに付加されて、ssDNAテンプレートのその後の単離が可能になる（工程8）。各ユニバーサルアダプターは、単一の管中で、2つの一本鎖相補性DNAオリゴヌクレオチド（すなわち、一つのオリゴ部分がセンス配列を含み、第2のオリゴ部分がアンチセンス配列を含む）をアニーリングすることにより調製される。以下のライゲーションプロトコルを用いた。

【0273】

1. 0.2ml管中で、nH₂O（分子生物学級水）39 μ l、消化され研磨されたDNAライブラリー25 μ l、2×Quick Ligase Reaction緩衝液100 μ l、100:1比のMMP1（10pm/ μ l）アダプターセット20 μ l、およびQuick Ligase 16 μ lを順番に添加した。ライゲーション反応液を十分に混合し、室温で20分間インキュベートした。

2. 次に、ライゲーション反応を取り除き、BioAnalyzer上で用いるためにライゲーション反応液10 μ lを精製した。Qiagen Min-Eluteキットからの単一のスピнкаラムを用いた。カラムを、製造者プロトコルの手順に従って、10 μ lのEBで溶出した。精製されたライゲーション反応液1 μ lを、BioAnalyzer DNA 1000 LabChipを用いて充填した。非精製ライゲーション反応液は、サンプルがBioAnalyzer上で適切にランすることを阻害するPEG および塩を多量に含むので、この精製工程は推奨される。

3. ライゲーション反応の残り（190 μ l）を、工程4のゲル単離のために用いた。

【0274】

工程3a：Microcon濾過およびアダプター構築。合計調製時間は約25分

ユニバーサルアダプターライゲーション反応は、100倍過剰のアダプターを必要とする。これらの過剰アダプターの除去を補助するために、二本鎖gDNAライブラリーを、Microcon YM-100濾過デバイスを通して濾過する。Microcon YM-100膜を用いて、125bpより小さな二本鎖DNAを除去することができる。従って、非結合アダプター（44bp）、並びにアダプターダイマー（88bp）を、ライゲートされたgDNAライブラリー集団から除去することができる。以下の濾過プロトコルを用いた。

【0275】

1. 工程4からのライゲーション反応液190 μ lを、組み立てたMicrocon YM-100装置中に適用した。

2. この装置を遠心分離機内に置き、5000×gで約6分間、または膜が殆ど乾燥するまで回転させた。

3. 洗浄のために、200 μ lの1×TEを添加した。

4. サンプルを5000×gでさらに9分間、または膜が殆ど乾燥するまで回転させた。

5. 回収のために、貯蔵部分を新しいバイアルに挿入し、3,000×gで3分間回転させた。貯蔵部を廃棄した。回収体積は約10 μ lであった。次に、80 μ lのTEを添加した。

【0276】

アダプター（AおよびB）を、HPLCで精製し、使用前に、ホスホロチオエート結合で修飾した。アダプター「A」（10 μ M）については、100 μ MアダプターA（44bp、センス）10 μ lを、100 μ MアダプターA（40bp、アンチセンス）10 μ lと混合し、1×アニーリング緩衝液（ $V_f=50$ μ l）30 μ lを混合した。プライマーを、ANNEALプログラムを用いて、Sample Prep Lab thermalサイクラー（以下参照）上でアニーリングさせた。アダプター「B」（10 μ M）については、100 μ MアダプターB（40bp、センス）10 μ lを、100 μ MアダプターB（44bp、アンチセンス）10 μ lと混合し、1×アニーリング緩衝液（ $V_f=50$ μ l）30 μ lを混合した。プライマーを、ANNEALプログラムを用いて、Sample Prep Lab thermalサイクラー上でアニーリングさせた。アダプターセットは、-20℃で使用するまで貯蔵することができる。

10

【0277】

プライマーアニーリングのためのANNEAL-Aプログラム

1. 95℃で1分間インキュベーション
2. 0.1℃/秒で15℃まで温度低下、および
3. 15℃で保持

【0278】

ゲノムDNAインサート断片およびアダプターに必要な配向は無かった。断片は、いずれの末端においてもライゲートすることができた。四つの一本鎖DNAオリゴヌクレオチドを、ユニバーサルアダプターセットにおいてインキュベートした。各一本鎖オリゴヌクレオチドを、1 μ モルスケールで合成し、HPLCで精製した。各一本鎖オリゴヌクレオチドは、各末端に四つのホスホロチオエート結合を含んでいた。

20

【0279】

工程4：ゲル電気泳動および、適合されたDNAライブラリーの抽出

ユニバーサルアダプターライゲーションプロトコルにより以下が生じる：1) いずれかの末端にアダプターを有する断片化DNA；2) 非結合単一アダプター；または3) アダプターダイマーの形成。アガロースゲル電気泳動を、適合されたDNAライブラリー集団を、ライゲートされていない単一のアダプターおよびアダプターダイマー集団から分離および単離する方法として用いる。ゲノムDNAのDNase I消化の手順により、50～700bp（工程1）の範囲のライブラリー集団が得られる。88bpユニバーサルアダプターセットの添加により、集団が大きい寸法側にシフトし、約130～800bpのサイズ範囲の移動プロフィールが得られる。アダプターダイマーは、88bpに移動し、ライゲートしていないアダプターは、44bpに移動する。従って、200bpを超えるサイズ範囲のゲノムDNAライブラリーを、アガロースゲルから物理的に単離し、標準的ゲル抽出技術を用いて精製することができる。適合されたDNAライブラリーのゲル単離により、200bpを超えるサイズ範囲のライブラリー集団が回収されることになる（ライブラリーのサイズ範囲は、用途により変化し得る）。以下の電気泳動および抽出プロトコルを用いた。

30

【0280】

1. 2%アガロースゲルを調製した。
2. 10×Ready-Load Dye 10 μ lを、DNAライゲーション混合物の残りの90 μ lに添加した。
3. 染料/ライゲーション反応混合物を、4つの隣接レーンを用いてゲル中に充填した（レーン毎に25 μ l）。
4. 100bpラダー（0.1 μ g/ μ l）10 μ lを、ライゲーション反応レーンから2レーン離れて充填した。
5. ゲルは100Vで3時間ランした。
6. ゲルランが完了したら、ゲルをゲルボックスから除去し、プラスチックラップで覆われた平らな面に移した。DNAバンドを、手持ち型長波長UV光を用いて可視化した。滅菌使い捨てメスを用いて、200～400bpの寸法の断片を、アガロースゲルから切り出した。この手法を用いて、任意のサイズ範囲のライブラリーを単離することができる。複数のサイズ範囲を単離することもできる。ライブラリーのサイズ範囲が200～900bpの場合、単一の

40

50

ウェルから幾つかのサイズ範囲を単離することができる（すなわち、200～400bpおよび500～700bp）。

7. アガロースゲルに埋められたDNAを、製造者の指示に従って、Qiagen MinElute Gel Extractionキットを用いて単離した。簡単に言うと、緩衝液QGを添加して、管中のアガロースを覆った。アガロースを、完全に溶解させた。緩衝液QGの色は、Qiagenの指示に従ってサンプル損失を最小化するようにpHを調節することにより維持した。精製のために、2つのMinEluteスピンカラム（Qiagen）を用いた。溶解した大量のアガロースは、各カラムを数回充填させることを必要とする。カラムを、55℃に予め暖められた緩衝液EB 10 µlを用いて溶出した。溶出液を貯蔵して、gDNAライブラリー20 µlを得た。

8. 各単離DNAライブラリー1 µlを、BioAnalyzer DNA 1000 LabChipを用いて分析して、DNAライブラリー集団の正確な分布を調べた。

【0281】

工程5：鎖置換およびニック付二本鎖DNAライブラリーの伸長

ユニバーサルアダプターのために用いられるDNAオリゴヌクレオチドはリン酸化されていないので、断片化gDNAの3'接合部にギャップが存在する。これらの2つの「ギャップ」または「ニック」は、標準的な置換用DNAポリメラーゼを用いて埋めることができる。ポリメラーゼはニックを認識し、ニック付鎖を置換し、および、結果としてニックが修復され無ニック二本鎖DNAが形成されるように鎖を伸長する。用いられる鎖置換酵素は、BstDNAポリメラーゼの大きな断片である。

【0282】

1. 0.2ml管中において、ゲル-抽出DNAライブラリー19 µl、nH₂O 40 µl、10×ThermoPol Reacion緩衝液8 µl、BSA (1mg/ml) 8 µl、dNTP (10mM) 2 µl、およびBstIポリメラーゼ (8U/µl) 3 µlを順番に添加した。

2. サンプルを十分に混合し、熱サイクラー内に配置し、鎖置換インキュベーションプログラム「BST」を用いてインキュベートした。BSTは、ニック付二本鎖DNAの鎖置換および伸長のプログラムである。

1. 65℃で30分間インキュベーション；
2. 80℃で10分間インキュベーション；
3. 58℃で10分間インキュベーション；および
4. 14℃に保持

3. Bst処理DNAライブラリー1 µlを、BioAnalyzer DNA 1000 LabChipを用いてランした。

【0283】

工程6：ストレプトアビジンビーズの調製

ニックの無い二本鎖ゲノムDNAの生成に続いて、隣接するユニバーサルアダプター配列を含む一本鎖ゲノムDNAを単離することが必要である。この工程は、ビオチンで標識した二本鎖DNAのストレプトアビジンビーズへの結合を概説する。ストレプトアビジンビーズの調製のために、以下のプロトコルを用いた。

【0284】

1. Dynal M-270ストレプトアビジンビーズ100 µlを、磁気ビーズをMPCに適用することにより、1×Binding Buffer (1M NaCl、0.5mM EDTA、5mM Tris、pH7.5) 200 µlで2回洗った。

2. ビーズを2×Binding Buffer 100 µl中に再懸濁し、残りのBst処理DNAサンプル（工程5から）79 µlおよび水20 µlを添加した。

3. ビーズ溶液を十分に混合し、管回転器上に室温で20分間置いた。ビーズ混合物を、MPCを用いて、1×Binding Buffer 100 µlで2回洗い、次に、nH₂Oで2回洗った。Binding & Washing (B&W) Buffer (2×および1×)：2×B&W緩衝液を、10mM Tris・HCl (pH7.5)、1mM EDTAおよび2M NaClを混合することにより調製した。試薬を先に列挙したように組み合わせ、完全に混合した。溶液を室温で六ヶ月間貯蔵することができる；1×B&W緩衝液を、2×B&W緩衝液をnH₂Oと1：1で混合することにより調製した。最終濃度は、前述

の半分である、すなわち、5mM Tris・HCl (pH7.5)、0.5mM EDTA、および1M NaClであった。

【0285】

工程7: ストレプトアビジンビーズを用いる一本鎖DNAライブラリーの単離

二本鎖gDNAライブラリーのストレプトアビジンビーズへの結合に続いて、ライゲートされたプールから、ユニバーサルアダプターAおよびユニバーサルアダプターB（望ましい集団は、アスタリスクを付して以下に示す）を含む一本鎖gDNAのみを単離するのが好ましい。二本鎖ゲノムDNA断片プールは、以下の可能な構造で結合されたアダプターを有する。

ユニバーサルアダプターA-gDNA断片-ユニバーサルアダプターA

ユニバーサルアダプターB-gDNA断片-ユニバーサルアダプターA*

ユニバーサルアダプターA-gDNA断片-ユニバーサルアダプターB*

ユニバーサルアダプターB-gDNA断片-ユニバーサルアダプターB

10

【0286】

ユニバーサルアダプターBのみが5'ビオチン部分を有するので、磁性ストレプトアビジン含有ビーズを用いて、ユニバーサルアダプターBを有する全てのgDNAライブラリー種を結合することができる。2つのユニバーサルアダプターA種（または、ライゲートされていない種）を含むゲノムライブラリー集団は、ストレプトアビジン含有ビーズに結合せず、洗浄手順中に除去される。洗浄後にビーズに結合したままの種は、ユニバーサルアダプターAおよびBを有する種、または2つのユニバーサルアダプターB末端を有する種を含む。

【0287】

2つのビオチン分子を有する2つのユニバーサルアダプターB配列を有するゲノムDNA種は、ストレプトアビジン含有ビーズに両末端で結合することができる。単一のビオチン分子のみを有するAおよびBアダプターを有する種は、「B」末端でしかビーズに結合することができない。一本鎖集団を単離するために、ビーズ結合二本鎖DNAを、相補性DNA鎖の間の水素結合を破壊するように作用する水酸化ナトリウム溶液で処理する。DNA断片が、各末端（ユニバーサルアダプターB末端）にビオチンを有する場合、得られる両方の単鎖はビーズへの結合を維持する。断片が単一のビオチンしか有さない（ユニバーサルアダプターAおよびB）場合、相補鎖が、DNA-ビーズ複合体から分離される。

20

【0288】

得られる一本鎖ゲノムDNAライブラリーは、溶液相から集められ、例えば、ピロリン酸配列決定 (PyroSequence) を用いて、またはRNA Pico 6000 LabChip (Agilent, Palo Alto, CA) を用いることにより定量される。一本鎖ゲノムDNAライブラリーを、単位体積当たりの分子の数を計算することにより定量する。一本鎖gDNA分子を、次に、DNA捕捉プライマー (PCRプライマーB) を含む25~30 μ m sepharoseビーズに（ビーズ当たり一つの有効なコピーを得るためにビーズ当たり半コピーで）アニーリングする。テンプレートを、次に、エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応プロトコルを用いて増幅する。その次の配列決定は、既知の技術を用いて行うことができる。一本鎖ライブラリーの単離のために、以下のプロトコルを用いた。

30

【0289】

1. 融解溶液 (0.125M NaOH、0.1M NaCl) 250 μ lを、前記工程6からの洗浄ビーズに添加した。
2. ビーズ溶液を十分に混合し、ビーズ混合物を、管回転器上で室温で10分間インキュベートした。
3. Dynal MPC (磁気粒子濃縮器) を用い、ペレットビーズを注意深く除去し、上澄みを取り除いた。250 μ lの上澄みは、一本鎖DNAライブラリーを含んでいた。
4. 別の管において、PB (QiaQuick精製キットから) 1250 μ lを添加し、溶液を、20% 酢酸9 μ lを添加することにより中和した。
5. Dynal MPCを用いて、一本鎖gDNAライブラリーを含む上澄み250 μ lからのビーズをペレット化し、上澄みを注意深く除去し、新しく調製したPB/酢酸溶液に移した。
6. 溶液1500 μ lを、単一のQiaQuick精製回転カラムを用いて精製した (同じカラムを

40

50

通して、一回の充填当たり750 μ lでサンプルを2回充填する）。一本鎖DNAライブラリーをEB 50 μ lで溶出した。

【0290】

工程8a：ピロリン酸に基づく配列決定を用いる一本鎖gDNA定量。合計調製時間は約1時間

1. 0.2ml管中で、以下の試薬を順番に添加した。

一本鎖gDNA 25 μ l

NMP2B配列決定プライマー 1 μ l

ライブラリーアニーリング緩衝液 14 μ l

合計 40 μ l

2. DNAを、ANNEAL-Sプログラム（以下の付表参照）を用いてアニーリングさせた。

3. サンプルをPSQ（ピロリン酸に基づく配列決定ジグ）上を流して、各サンプル（以下参照）中のテンプレートのピコモル数を決めた。配列決定の方法を、米国特許第6,274,320号；米国特許第4,863,849号；米国特許第6,210,891号および米国特許第6,258,568号中で見出すことができ、その開示内容は全て参照として本明細書に組み入れられる。 μ l当たりの一本鎖gDNAテンプレート分子の数を決定するために、計算した。残りの25 μ lの調製された一本鎖gDNAライブラリーを、増幅およびその後の配列決定のために用いた（約 1×10^6 の反応）。

【0291】

工程8b：RNA Pico 6000 LabChipを用いる一本鎖gDNA定量。合計調製時間は約30分

1. BioAnalyzer（ソフトウェアバージョン2.12）上で、mRNA Picoアッセイオプションを選択した。

2. RNA Pico 6000 LabChipを、製造者のガイドラインに従ってBioAnalyzer上で調製した。

3. RNA LabChipラダー（RNA 6000ラダー）を、製造者（Ambion）の指示に従って調製した。簡単に説明すると、溶液中のRNA LabChipラダーを、70℃で2分間加熱した。溶液を、氷上で5分間冷却して、ラダーを急激に冷却する。溶液を、短時間遠心分離して、管壁から濃縮物を除去した。RNA LabChipラダーを、氷上に貯蔵し、1日以内に用いた。

4. 分析すべきssDNAライブラリーを、三つの1 μ lのアリコートを用いて隣接レーンにおいて3つ組でランした。

5. BioAnalyzerソフトウェアを用いて、各ssDNAライブラリーレーンの濃度を計算した（以下の表および図24を参照されたい）。全ての三つのレーンの平均を用いて、以下に概説する手順を用いて、ライブラリーのDNA濃度を計算した。

a. ピーク積算下限線（図24における長破線）を、ライブラリーピークの直ぐ前方に移動する（以下参照）。

b. ピーク積算上限線（図24における長破線）を、ライブラリーピークの直ぐ後方に移動する。このようにして、下方および上方集積ラインを連結するピーク積算ラインが、バックグラウンドの勾配に続いた。

c. マウス矢印を用いてベースにおけるピークの平均寸法を決定する（通常、ピーク最高点に近い）か、またはソフトウェアにより選択される規定のピークを用いた。

d. 積算値を、ピーク中の材料の量に用いた。回収されたピコグラムについて得られた値を、回収された分子に換算した（以下の表を参照）。次に、ライブラリー濃度を決定した（ μ l当たりの分子）。

【0292】

（表）

10

20

30

40

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	pg/ μ L (1)	pg/ μ L (2)	pg/ μ L (3)	平均	平均	平均	平均	平均
サンプル	1633	1639	1645	1639	435	435	432	434

10	11	12	13	14	15
平均分子量 (g/モル)	平均分子量	ライブラリー			
リボヌクレオチド	(g/モル)	g/ μ L	モル/g	モル/ μ L	分子/ μ L
328.2	1.42E+05	1.64E-09	7.02E-06	1.15E-14	6.93E+09

10

【0293】

前記表に示すように、ライブラリー1の濃度を1639pg/ μ l (列5) と計算し、平均断片寸法は434ヌクレオチド (列9) であった。これらの値は、前記工程 (a) ~ (d) に記載のようなAgilent2100ソフトウェアから得た。リボヌクレオチドの平均分子量 (MW) は328.3g/モル (列10) である。平均ライブラリー断片のMW (1.42×10^5 g/モル、列11) は、平均断片長さ (434) に平均リボヌクレオチド (328.2) を掛けることにより計算した。定量化されたライブラリー (1639pg/ μ l) を、g/ μ lに換算した (1.64×10^{-9} g/ μ l、列12)。 μ l当たりの分子の数 (1.15×10^{-14} モル/ μ l、列14) を、 μ l当たりのグラム数 (1.64×10^{-9} g/ μ l、列12) をライブラリー断片の平均分子量 (1.42×10^5 g/モル、列11) で割ることにより計算した。最後に、 μ l当たりの分子数 (6.93×10^9 分子/ μ l、列15) を、 μ l当たりの

20

【0294】

最終的ライブラリー濃度は、 1×10^8 分子/ μ lより大きいと予想された。ライブラリーの品質のためのより重要な因子は、アダプターダイマー濃度であった。図24において、ライブラリーピークの高さは、アダプターダイマーピーク (マーカー後の最初のピーク) より約10倍大きいと決定された。優れた品質のライブラリーは、ダイマーピークより少なくとも2倍大きいピーク高さを有すると予想される。RNA Pico 6000 LabChipは、一本鎖gDNA濃度の500%精度内の推定値を提供することに注目すべきである。すなわち、入力gDNAのビーズ当たりのコピー数 (cpb) を決定するために、テンプレートの滴定を用いて初期配列

30

【0295】

工程9：一本鎖gDNAライブラリーの希釈および貯蔵

一本鎖gDNAライブラリーを溶出し、緩衝液EB中で定量した。変性を防止するために、一本鎖gDNAライブラリーを、EDTAの存在下で-20℃で凍結して貯蔵した。定量後、同じ量の10mM TEをライブラリーストックに添加した。全てのその後の希釈はTE中で行った。収率を以下に示す。

PSQ分析後のssDNAライブラリーの残りの最終体積=25 μ l。

40

LabChip分析後のssDNAライブラリーの残りの最終体積=47 μ l。

【0296】

初期ストックの希釈のために、一本鎖gDNAライブラリーを、1 $\times$ ライブラリー級 (Library-Grade) 溶出緩衝液中で1億分子/ μ lに希釈した。一般的使用のために、一本鎖gDNAライブラリーのアリコート調製した。このために、1 $\times$ ライブラリー級溶出緩衝液中に200,000分子/ μ lを希釈し、20 μ lのアリコートを測定した。使い切りのライブラリーアリコートを-20℃で貯蔵した。

【0297】

工程10：エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応

cpb数の増加が好ましい場合、ビーズエマルジョンPCRを、全体が参照として本明細書に

50

組み入れられる2003年6月6日出願の米国特許出願第06/476,504号に記載されているように行った。

【0298】

試薬調製

停止溶液 (50mM EDTA) は、 nH_2O 900 μl と混合された 0.5M EDTA 100 μl を含み、1.0ml の 50mM EDTA 溶液を得た。10mM dNTP のために、dCTP (100mM) 10 μl 、dATP (100mM) 10 μl 、dGTP (100mM) 10 μl および dTTP (100mM) 10 μl を、分子生物学級水 60 μl と混合した。全部で 4 つの 100mM ヌクレオチドストックを、氷上で溶かした。次に、各ヌクレオチド 10 μl を、 nH_2O 60 μl と組み合わせて、最終的体積 100 μl とし、完全に混合した。次に、1ml を、1.5ml 微小遠心分離管に入れた。ストック溶液を -20°C で 1 年貯蔵することができた。

10

【0299】

10×アニーリング緩衝液は 200mM Tris (pH7.5) および 50mM 酢酸マグネシウムを含んでいた。この溶液のために、24.23g の Tris を、800ml の nH_2O に添加し、混合物を pH7.5 に調節した。この溶液に、酢酸マグネシウム 10.72g を添加し、完全に溶解した。溶液を、最終体積 1000ml とし、 4°C で 1 ヶ月間貯蔵することができた。10×TE は、100mM Tris・HCl (pH7.5) および 50mM EDTA を含んでいた。これらの試薬と一緒に添加し、十分に混合した。溶液は、室温で 6 ヶ月間貯蔵することができた。

【0300】

実施例 2：プライマー設計

前述のように、ユニバーサルアダプターは、1) 典型的に 20bp の長さの一組の固有の PCR プライミング領域 ((2) に隣接して配置) ; 2) 典型的に 20bp の長さの一組の固有の配列決定プライミング領域; および 3) 任意に続く、4 つのデオキシリボヌクレオチド (すなわち、A、C、G、T) の各々の少なくとも一つからなる固有の識別性キー配列、を含むように設計される。プライマーと、対象となるゲノムの意図しない領域との間の交差ハイブリダイゼーションの可能性は、ゲノムサイズが増加し、プライマーとの完全マッチの長さが減少すると、増加する。しかしながら、交差ハイブリダイゼーション領域 (CHR) と起こりうるこの相互作用は、以下に記載の理由により、問題を生じないと予想される。

20

【0301】

本発明の好ましい態様において、PCR 増幅およびその後の配列決定のために、一本鎖 DNA ライブラリーが利用される。配列決定法は、所与のゲノムを 150~500 塩基対断片へとランダム消化することを必要とし、その後、2 つの固有の二連プライマー (PCR および配列決定領域の両方からなる) が断片の 5' および 3' 末端にライゲートされる (図 25)。融解温度 (T_m)、ゲノム中のプライミング配列の固有性、および対象となる特定領域または遺伝子への近接に基づいて、プライミング部位としてゲノムの存在部位が選択される典型的 PCR 増幅とは異なり、開示されたプロセスは、注意深い新たなプライマー設計を必要とする合成プライミング部位を利用する。

30

【0302】

テトラマー選択

新規プライマー設計のための方法が、ハイブリダイゼーション実験についての分子タグに対する研究 (Hensel, M. and D.W.Holden, Molecular genetic approaches for the study of virulence in both pathogenic bacteria and fungi. Microbiology, 1996.142 (Pt5) : p.1049-58; Shoemaker, D.D., et al., Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. Nat Genet.1996.14 (4) : p.450-6 を参照されたい) および PCR/LDR (ポリメラーゼ連鎖反応/ライゲーション検出反応) ハイブリダイゼーションプライマーに対する研究 (

40

Gerry, N.P., et al., Universal

DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations. Journal of Molecular Biology, 1999. 292: p. 251-262; Witowski, N.E., et al., Microarray-based detection of select cardiovascular disease markers. BioTechniques, 2000. 29(5): p. 936-944

を参照されたい)

に関する公開された文献中に見られる。

【0303】

PCR/LDR研究は、類似の最終 T_m を有する6つの特異的に設計されたテトラマーからなる24塩基プライマーであるオリゴヌクレオチド「ジップコード」の設計に特に関連がありそれに集中した (10

Gerry, N.P., et al., Universal DNA microarray method for

multiplex detection of low abundance point mutations. Journal of Molecular Biology, 1999.

292: p. 251-262; 米国特許第 6,506,594号

を参照されたい)。テトラマー成分を、以下の基準に基づいて選択した。各テトラマーは少なくとも2つの塩基が他のものと異なり、自己対形成またはヘアピン形成を誘発するテトラマーを排除し、パリンドローム (AGCT) または繰り返しテトラマー (TATA) も同様に除いた。256 (4^4) の可能な順列のうち36個が、必要な要求を満たし、次に、許容できるPCRプライマー設計 (表1) に必要なさらなる制限に供した。 (20

【0304】

(表1)

	TT	TC	TG	TA	CT	CC	CG	CA	GT	GC	GG	GA	AT	AC	AG	AA
TT	TTTT	TTTC	TTTG	TTTA	TTCT	TTCC	TTCG	TTCA	TTGT	TTGC	TTGG	TTGA	TTAT	TTAC	TTAG	TTAA
TC	TCIT	TCIC	TCIG	TCIA	TCIT	TCOC	TCOG	TCOA	TCGT	TCGC	TCGG	TCGA	TCAT	TCAC	TCAG	TCAA
TG	TGIT	TGIC	TGIG	TGIA	TGCT	TGOC	TGCG	TGCA	TGGT	TGGC	TGGG	TGGA	TGAT	TGAC	TGAG	TGAA
TA	TATT	TATC	TATG	TATA	TACT	TACC	TACG	TACA	TAGT	TAGC	TAGG	TAGA	TAAT	TAAC	TAAG	TAAA
CT	CTIT	CTIC	CTIG	CTIA	CTCT	CTCC	CTCG	CTCA	CTGT	CTGC	CTGG	CTGA	CTAT	CTAC	CTAG	CTAA
CC	CCIT	CCIC	CCIG	CCIA	CCCT	CCCC	CCCG	CCCA	CCGT	CCGC	CCGG	CCGA	CCAT	CCAC	CCAG	CCAA
CG	CGIT	CGIC	CGIG	CGIA	CGCT	CGCC	CGCG	CGCA	CGGT	CGGC	CGGG	CGGA	CGAT	CGAC	CGAG	CGAA
CA	CATIT	CATIC	CATIG	CATIA	CACIT	CACC	CACG	CACA	CAGT	CAGC	CAGG	CAGA	CAAT	CAAC	CAAG	CAAA
GT	GTIT	GTIC	GTIG	GTIA	GTCT	GTCC	GTGC	GTCA	GTGT	GTGC	GTGG	GTGA	GTAT	GTAC	GTAG	GTAA
GC	GCTIT	GCTIC	GCTIG	GCTIA	GCTCT	GCTCC	GCTCG	GCTCA	GCGT	GCGC	GCGG	GCGA	GCAT	GCAC	GCAG	GCAA
GG	GGIT	GGIC	GGIG	GGIA	GGCT	GGCC	GGCG	GGCA	GGGT	GGGC	GGGG	GGGA	GGAT	GGAC	GGAG	GGAA
GA	GATIT	GATIC	GATIG	GATIA	GACT	GACC	GACG	GACA	GAGT	GAGC	GAGG	GAGA	GAAT	GAAC	GAAG	GAAA
AT	ATIT	ATIC	ATIG	ATIA	ATCT	ATCC	ATCG	ATCA	ATGT	ATGC	ATGG	ATGA	ATAT	ATAC	ATAG	ATAA
AC	ACTIT	ACTIC	ACTIG	ACTIA	ACTCT	ACTCC	ACTCG	ACTCA	ACGT	ACGC	ACGG	ACGA	ACAT	ACAC	ACAG	ACAA
AG	AGIT	AGIC	AGIG	AGIA	AGCT	AGCC	AGCG	AGCA	AGGT	AGGC	AGGG	AGGA	AGAT	AGAC	AGAG	AGAA
AA	AATIT	AATIC	AATIG	AATIA	AACT	AACC	AACG	AACA	AAGT	AAGC	AAGG	AAGA	AAAT	AAAC	AAAG	AAAA

【0305】

この表は、Gerry et al.1999.J.Mol.Bio.292:251-262により概説された基準に基づくテトラマープライマー成分選択を表すマトリクスを示している。各テトラマーは、全ての他のテトラマーから少なくとも2塩基異なることが必要とされた。テトラマーは、パリンドロームまたは他のテトラマーと相補性であることはできなかった。36個のテトラマーを選択し (太字下線)、イタリック体の配列は、検討から排除されたシグナルパリンドロームテトラマーである。 (40

【0306】

プライマー設計

PCRプライマーを、一般的プライマー設計に共通の仕様を満たすように設計し (Rubin, E. and A.A.Levy, A mathematical model and a computerized simulation of PCR using complex templates. Nucleic Acids Res, 1996.24 (18) :p.3538-45; Buck, G.A., et al., Design strategies and performance of custom DNA sequencing primers. Biotechniques, 1999.27(3) :p.528-36を参照されたい)、実際の選択を、コンピュータープログ (50

ラムMMPにより行った。プライマーは、全二連PCR/配列決定用プライマーの効率的合成のために20塩基（5つのテトラマー）の長さに制限された。各プライマーは、5'末端に2つの塩基GCクランプ、および3'末端に単一のGCクランプを含み（表2）、全てのプライマーが類似の T_m （ $\pm 2^\circ\text{C}$ ）を有していた（図27）。プライマー内のヘアピンは（内部ヘアピンステム $\Delta G > -1.9\text{kcal/モル}$ ）許容されなかった。二量化も制御された。最大3塩基ダイマーが許容されたが、それは、最後の6個の3'塩基において生じ、3'ダイマーについて最大の許容できる ΔG は -2.0kcal/モル であった。さらに、3'末端が群のうちの他のものに類似し過ぎているプライマーは不良とされ、これにより一つのプライマーともう一つの逆相補物との間の交差ハイブリダイゼーションが防止される。

【0307】

10

（表2）

	1-pos	2-pos	3-pos	4-pos	5-pos
1	CCAT	TGAT	TGAT	TGAT	ATAC
2	CCTA	CTCA	CTCA	CTCA	AAAG
3	CGAA	TACA	TACA	TACA	TTAG
4	CGTT	AGCC	AGCC	AGCC	AATC
5	GCAA	GACC	GACC	GACC	TGTC
6	GCTT	TCCC	TCCC	TCCC	AGTG
7	GGAC	ATCG	ATCG	ATCG	CTTG
8	GGTA	CACG	CACG	CACG	GATG
9		TGCG	TGCG	TGCG	TCTG
10		ACCT	ACCT	ACCT	
11		GTCT	GTCT	GTCT	
12		AGGA	AGGA	AGGA	
13		TTGA	TTGA	TTGA	
14		CAGC	CAGC	CAGC	
15		GTGC	GTGC	GTGC	
16		ACGG	ACGG	ACGG	
17		CTGT	CTGT	CTGT	
18		GAGT	GAGT	GAGT	
19		TCGT	TCGT	TCGT	

20

【0308】

表2は、2つの5'および一つの3'G/Cクランプを提供する36個の選択された四分子の可能な順列を示す。内側は、残りの四分子からなる。これにより、 $8 \times 19 \times 19 \times 19 \times 9$ 順列、または493,848個の可能な組み合わせとなる。図27は、最初のパスを示し、許容されるプライマーの T_m に基づく選択を示し、493,848個のプライマーが、 T_m が $64 \sim 66^\circ\text{C}$ である56,246個の候補に減少している。

30

【0309】

（表3）プライマーに完全配列がマッチする確率は、マッチする長さ用件が低下し、対象となるゲノムのサイズが増加すると上昇する

マッチ長	完全マッチ確率 (1/(4 ⁿ 長さ))	アデノ35K塩基中の マッチ割合(%)	NCBI 細菌データベース 488M 塩基中のマッチ割合(%)	ヒト3B塩基中の マッチ割合(%)
20	9.1E-13	0.00%	0.04%	0.27%
19	7.3E-12	0.00%	0.65%	4.32%
18	4.4E-11	0.00%	5.76%	34.37%
17	2.3E-10	0.00%	35.69%	99.17%
16	1.2E-09	0.02%	97.52%	>100%
15	5.6E-09	0.12%	>100%	>100%
14	2.6E-08	0.64%	>100%	>100%
13	1.2E-07	3.29%	>100%	>100%
12	5.4E-07	15.68%	>100%	>100%
11	2.4E-06	58.16%	>100%	>100%
10	1.0E-05	99.35%	>100%	>100%
9	4.6E-05	99.77%	>100%	>100%
8	2.0E-04	>100%	>100%	>100%
7	8.5E-04	>100%	>100%	>100%
6	3.7E-03	>100%	>100%	>100%
5	1.6E-02	>100%	>100%	>100%
4	6.4E-02	>100%	>100%	>100%
3	2.5E-01	>100%	>100%	>100%
2	7.1E-01	>100%	>100%	>100%
1	1.0E+00	>100%	>100%	>100%

10

【0310】

対象となるゲノム中に生じる相補性領域の可能性は、複合体サンプル集団中でのミスマッチに対するPCRの報告された許容度に拘わらず、プライマー設計プロセス中で重要でない。（例えば、Rubin, E.and A.A.Levy, A mathematical model and a computerized simulation of PCR using complex templates. Nucleic Acids Res, 1996.24 (18) : p.3538-45を参照されたい）。20塩基プライマーへの完全マッチを発見する可能性は極めて低い（4²⁰）（表3）が、非連続性の低いマッチを発見する確率は、対象となるゲノムの寸法と共に著しく増加する。その結果、20個の塩基のうちの少なくとも10個の完全マッチを発見する確率は、アデノウイルスゲノムについて99.35%である。16個の塩基の完全マッチを発見する確率は、NCBIデータベース中の配列について97%である（アデノウイルスゲノムより、約100倍大きい）。20個の塩基プライマーについて17個の塩基の完全マッチを発見する確率は、ヒトゲノム（30億個塩基）の配列について99%である。

20

30

【0311】

ゲノムの領域へのプライマー交差ハイブリダイゼーションの高い確率は、テンプレート断片を生成するために用いられるランダムDNA消化のため、予想されるより問題が小さい。すなわち、交差ハイブリダイゼーション領域（CHR）の効果はかなり良好である。溶液中のPCRプライマーと、テンプレートとの間の完全マッチに、CHRが首尾よく競合する可能性は低い。さらに、3'末端にミスマッチを含むプライマーは、競合的に著しい不利益がある。CHRが意図するPCRプライマーを競合排除（out-compete）する場合、配列決定プライマー用の下流部位を有しない切断型PCR産物が生成される。切断型産物を捕捉ビーズに向かわせ固定することができた場合、2つの状況のうち一方が生じる。CHRが溶液相プライマーを競合排除した場合、固定された産物は、配列決定プライマー結合部位を欠き、空のピコタイタープレート（PTP）ウェルが得られる。CHRがビーズ結合プライマーを競合排除した場合、配列決定プライマーが依然として存在し、より短い挿入部しか得られない。いずれの結果も、不当に配列決定品質を損なうことはない。サンプル調製プロセスにおいて用いられるゲノム材料が大量であると（現在は25 μg、35Kbアデノウイルスゲノムの5.29×10¹⁶コピーを含む）、過剰サンプリングを用いて完全CHRを欠く断片を提供することができ、問題の領域の標準的PCR増幅が成される。

40

【0312】

実施例3：噴霧によるサンプル調製

噴霧によるDNAの調製

噴霧工程の目的は、全ゲノムまたはゲノムの大部分のような大きなDNAのストレッチを

50

断片化して、DNAの配列を決定し易い小さな分子種を得ることである。単一のDNAテンプレートから生じたこの小さな寸法のDNA種の集団は、ライブラリーと呼ばれる。噴霧は、二本鎖テンプレートDNAを剪断して、50～900塩基対の断片にする。剪断されたライブラリーは、T4 DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼI（クレノウ断片）およびT4ポリヌクレオチドキナーゼの組み合わせにより末端が修復された一本鎖末端を含む。T4とクレノウDNAポリメラーゼの両方が、それらの5'-3'ポリメラーゼ活性を介してDNAの3'窪み末端（5'突出部）を「満たす」するために用いられる。T4およびクレノウポリメラーゼの一本鎖3'-5'エキソヌクレアーゼ活性により、3'突出末端が除去され、T4ポリヌクレオチドキナーゼのキナーゼ活性により、リン酸基が5'ヒドロキシ末端に付加される。

【0313】

10

サンプルは以下のように調製した。

1. gDNA（ゲノムDNA）15 μgを得、10mM TE（10mM Tris、0.1mM EDTA、pH7.6、節の最後の試薬表を参照）中100 μlの最終体積に調節した。1.8以上のO.D._{260/280}比を測定することにより、DNAを汚染について分析した。最終的gDNA濃度は、約300 μg/mlであると予想された。

2. 氷冷噴霧緩衝液（節の最後を参照）1600 μlを、gDNAに添加した。

3. 反応混合物を、氷冷した噴霧器内に配置した（CIS-US, Bedford, MA）。

4. 15ml スナップキャップファルコン管からのキャップを、噴霧器の頂部に置いた（図28A）。

5. キャップを、適合カバー（ファルコン管の蓋のため）および2つのゴム製Oリングからなるきれいな噴霧器クランプアセンブリーで固定した（図28B）。

20

6. 噴霧器の底部を窒素供給部に取り付け、装置全体をパラフィルムで包んだ（図28Cおよび28D）。

7. 噴霧器を（図28Dに示すように）直立に維持しつつ、50psi（立方インチ当たりのポンド）の窒素を5分間供給した。噴霧器の底部を、数秒毎に硬い面上に叩き付けて、圧縮された液体を底部に押し付けた。

8. 5分後、窒素を停止した。圧力を正常化（30秒間）した後、窒素供給源を噴霧器から取り外した。

9. パラフィルムを取り外し、噴霧器頂部のねじを外した。サンプルを除去し、1.5ml 微小遠心分離管に移した。

30

10. 噴霧器頂部を再び取り付け、噴霧器を500rpmで5分間遠心分離した。

11. 噴霧器中のサンプルの残りを集めた。合計回収量は約700 μlであった。

12. 回収されたサンプルを、QIAquickカラム（Qiagen Inc., Valencia, CA）を用いて、製造者の指示に従って精製した。大きな体積なので、カラムに数回充填することが必要であった。サンプルを、55℃に予め暖められた30 μlの緩衝液EB（10mM Tris HCl、pH8.5、Qiagenキットに供給）で溶出した。

13. サンプルを、UV分光法（1：100希釈のために、水198 μl中に2 μl）により定量した。

【0314】

酵素的研磨

40

DNAテンプレートを噴霧して、摩損末端を有する多くのDNA断片を得る。これらの末端は平滑にされ、T4 DNAポリメラーゼ、大腸菌でポリメラーゼ（クレノウ断片）およびT4ポリヌクレオチドキナーゼの3つの酵素を用いてアダプター断片にライゲートする準備ができている。

【0315】

サンプルは以下のように調製した。

1. 0.2ml管に、以下の試薬を順番に添加した。

精製噴霧gDNA断片 28 μl

水 5 μl

10×T4 DNAポリメラーゼ緩衝液 5 μl

50

BSA (1mg/ml) 5 μ l
 dNTP (10mM) 2 μ l
T4 DNAポリメラーゼ (3単位/ μ l) 5 μ l
 最終体積 50 μ l

2. 工程1の溶液を十分に混合し、MJ熱サイクラー（任意の正確なインキュベーターを使用できる）内で25℃で10分間インキュベートした。

3. 大腸菌DNAポリメラーゼ（クレノウ断片）（5単位/ml）1.25 μ lを添加した。

4. 反応液を十分に混合し、MJ熱サイクラー内で25℃で10分間インキュベートし、16℃でさらに2時間インキュベートした。

5. 処理したDNAを、QiaQuickカラムを用いて精製し、55℃に予め暖められた緩衝液EB (10mM Tris HCl, pH8.5) 30 μ lで溶出した。

10

6. 以下の試薬を、0.2ml管内で組み合わせた。

Qiagen精製研磨噴霧gDNA断片 30 μ l
 水 5 μ l
 10×T4 PNK緩衝液 5 μ l
 ATP (10mM) 5 μ l
T4PNK (10単位/ml) 5 μ l
 最終体積 50 μ l

7. 溶液を混合し、MJ熱サイクラー中に配置してT4PNKプログラムを用いて37℃で30分間インキュベートし、65℃で20分間インキュベートしてから、14℃で貯蔵した。

20

8. サンプルをQiaQuickカラムを用いて精製し、55℃に予め暖められた緩衝液EB30 μ l中で溶出した。

9. 最終研磨反応液2 μ lを、BioAnalyzer DNA 1000 LabChipを用いる分析（以下参照）のために保持した。

【0316】

アダプターのライゲーション

アダプターをライゲートするための手順は以下のように行った。

1. 0.2ml管に、以下の試薬を順番に添加した。

分子生物学級水 20.6 μ l
 消化され研磨されたgDNAライブラリー 28 μ l
 2×Quick Ligase反応緩衝液 60 μ l
 MMP (200ピコモル/ μ l) ユニバーサルアダプターセット 1.8 μ l
Quick Ligase 9.6 μ l
 合計 120 μ l

30

【0317】

前記反応液は5 μ g用に設計され、用いたgDNAの量に依存して調節した。

【0318】

2. 試薬を十分に混合し、25℃で20分間インキュベートした。管を、アガロースゲル電気泳動のためにゲルが調製されるまで氷上に置いた。

【0319】

40

適合されたgDNAライブラリーのゲル電気泳動および抽出

ゲノムDNAの噴霧により、50bpから900bpに及ぶライブラリー集団を得る。88bpユニバーサルアダプターの添加が、集団を大きい寸法側にシフトさせ、大きなサイズ範囲（約130～980bp）の移動プロファイルが得られる。アダプターダイマーが88bpに移動し、ライゲートしていないアダプターが44bpに移動する。従って、250bp以上のサイズ範囲に単離されたゲノムDNAライブラリーは、アガロースゲルから物理的に単離することができ、標準的ゲル抽出技術を用いて精製することができる。適合されたgDNAライブラリーのゲル単離により、250bp以上のサイズ範囲のライブラリー集団が回収される（ライブラリーのサイズ範囲は、用途に応じて変化することができる）。アダプターのライゲーションの後のライブラリーサイズ範囲は130～980bpである。手順を、異なる領域のゲルを切断することに

50

より、例えば、130～200bp、200～400bp、250～500bp、300～600bp、500～700bp等のような任意のバンドサイズ範囲の単離のために適合させることができることに注目すべきである。以下に記載の手順を用いて、250bp～500bpの断片を単離した。

【0320】

2%アガロース、1×TBEおよび臭化エチジウム（10mg/mlストック）4.5 μlを含むようにアガロースゲル150mlを調製した。ライゲートしたDNAを、10×Ready Load Dyeと混合し、ゲル上に充填した。さらに、100bpラダー（0.1 μg/μl）10 μlを、サンプルに隣接するライゲーション反応液から離れた2つのレーンに充填した。ゲルを100Vで3時間電気泳動した。ゲルランが完了すると、ゲルボックスからゲルを取り出し、GelDocに移し、プラスチックラップを被せた。DNAバンドを、PrepUV光を用いて可視化した。滅菌使い捨てメスを用いて、断片寸法が250～500bpであるアガロースゲルからライブラリー集団を切り出した。このプロセスは、DNAのニック形成を防止するためにできるだけ迅速に行った。ゲルスライスを、15mlファルコン管内に入れた。アガロースに包埋されたgDNAライブラリーを、Qiagen MinElute Gel Extractionキットを用いて単離した。各単離したgDNAライブラリーのアリコート、BioAnalyzer DNA 1000 LabChipを用いて分析し、gDNAライブラリー集団の正確な分布を調べた。

10

【0321】

gDNAライブラリーの鎖置換および伸長、およびストレプトアビジンビーズを用いる一本鎖gDNAライブラリーの単離

ニック付二本鎖gDNAライブラリーの鎖置換および伸長を、Bst処理サンプルを熱サイクラー中で65℃で30分間インキュベートし、必要になるまで氷上に配置した以外は実施例1に記載のように行った。ストレプトアビジンビーズを、1×Binding緩衝液200 μlで2回洗い、nH₂O200 μlで2回洗って最終洗浄を行った以外は実施例1に記載のように調製した。一本鎖gDNAライブラリーを、以下のように、ストレプトアビジンビーズを用いて単離した。洗浄ビーズからの水を除去し、融解溶液（以下参照）250 μlを添加した。ビーズ懸濁液を十分に混合し、管回転器上で室温で10分間インキュベートした。別の管において、PB（QiaQuick精製キットから）1250 μlおよび20%酢酸9 μlを混合した。融解溶液250 μl中のビーズを、DynaL MPCを用いてベレット化し、上澄みを注意深く除去し、新しく調製したPC/酢酸溶液に移した。溶液1500 μlからのDNAを、単一のMinElute精製スピナラムを用いて精製した。これは、サンプルカラムを通して、サンプルを一回の充填当たり750 μlで2回充填することにより行った。一本鎖gDNAライブラリーを、予め55℃に暖められた15 μlの緩衝液EBで溶出した。

20

30

【0322】

一本鎖gDNAの定量および貯蔵

一本鎖gDNAを、実施例1に記載のように、RNA Pico 6000 LabChipを用いて定量した。一部の場において、一本鎖ライブラリーを、第2のアッセイにより定量して、初期Agilent 2100定量が正確に行われたことを確認した。この目的のために、RiboGreen定量を、記載（蛍光測定によるssDNA定量）のように行って、Agilent2100定量を確認した。推定値が3倍より多く異なる場合、各分析を繰り返した。定量が、2つの手順間で3倍を超える相違を示した場合、広範囲のテンプレート対ビーズを用いた。

40

【0323】

一本鎖gDNAライブラリーの希釈および貯蔵は、実施例1に記載のように行った。収量を以下に示す。

LabChip分析に続くssDNAライブラリーの残留最終体積=12 μl。

RiboGreen分析に続くssDNAライブラリーの残留最終体積=9 μl。

TEの添加後のssDNAライブラリーの最終体積=18 μl。

【0324】

同じ体積のTEを、一本鎖gDNAライブラリーストックに添加した。一本鎖gDNAライブラリーは、緩衝液TE中において1×10⁸分子/μlとした。ストックを希釈（1/500）して、TE中で200,000分子/μlとし、その20 μlをのアリコートを調製した。

50

【0325】

噴霧後のライブラリー断片サイズ分布

噴霧および研磨に続く材料1μlのAgilent 2100 DNA 1000 LabChip分析の典型的結果を図29Aに示す。生成物の大部分のサイズ範囲分布は、約50～900塩基対と予想された。平均寸法（ピークの最高部）は、約450bpと予想された。アダプターがライゲートされたライブラリー断片のゲル精製の典型的結果を図29Bに示す。

【0326】

試薬

特記しない限り、実施例に列挙する試薬は、市販されている標準的試薬を表す。例えば、クレノウ、T4 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ緩衝液、T4 PNK、T4 PNK緩衝液、Quick T4 DNAリガーゼ、Quickライゲーション緩衝液、Bst DNAポリメラーゼ（大断片）およびThermoPol反応緩衝液が、New England Biolabs (Beverly, MA) から得られる。dNTP混合物は、Pierce (Rockford, IL) から得られる。アガロース、UltraPure TBE、BlueJui ceゲル充填緩衝液およびReady-Load 100bp DNAラダーを、Invitrogen (Carlsbad, CA) から購入することができる。臭化エチジウムおよび2-プロパノールはFisher (Hampton, NH) から購入することができる。RNAラダーをAmbion (Austin, TX) から購入することができる。他の試薬は、一般的に知られているか、および/または以下に列挙される。

【0327】

融解溶液

成分	必要量	提供元	ストック番号
NaCl (5 M)	200 μl	Invitrogen	24740-011
NaOH (10 N)	125 μl	Fisher	SS255-1
分子生物学級水	9.675 ml	Eppendorf	0032-006-205

【0328】

融解溶液は、100mM NaClおよび125mM NaOHを含んでいた。列挙された試薬を組み合わせ、十分に混合した。溶液は室温で6ヶ月間貯蔵することができた。

【0329】

結合および洗浄（B&W）緩衝液（2×および1×）

成分	必要量	提供元	ストック番号
UltraPure Tris-HCl (pH 7.5, 1 M)	250 μl	Invitrogen	15567-027
EDTA (0.5 M)	50 μl	Invitrogen	15575-020
NaCl (5 M)	10 ml	Invitrogen	24740-011
分子生物学級水	14.7 ml	Eppendorf	0032-006-205

【0330】

2×B&W緩衝液は、10mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM EDTA、および2M NaClの最終濃度を含んでいた。列挙した試薬を組み合わせ、十分に混合した。溶液は室温で6ヶ月間貯蔵することができた。1×B&W緩衝液は、2×B&W緩衝液をピコピュアH₂Oと1：1で混合することにより調製した。最終濃度は、前述のものの半分であった、すなわち、5mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5mM EDTA、および1M NaCl。

【0331】

他の緩衝液は以下のものを含んでいた。1×T4 DNAポリメラーゼ緩衝液：50mM NaCl、10 mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、1mMジチオスレイトール (pH7.9、25℃)。TE：10mM Tris、1m M EDTA。

【0332】

特別試薬調製

TE (10mM)

成分	必要量	提供元	ストック番号
TE (1M)	1 ml	Fisher	BP1338-1
分子生物学級水	99 ml	Eppendorf	0032-006-205

【0333】

試薬を混合し、溶液は室温で6ヶ月間貯蔵することができた。

【0334】

噴霧緩衝液

成分	必要量	提供元	ストック番号
グリセロール	53.1 ml	Sigma	G5516
分子生物学級水	42.1 ml	Eppendorf	0032-006-205
UltraPure Tris-HCl (pH 7.5, 1M)	3.7 ml	Invitrogen	15567-027
EDTA (0.5M)	1.1 ml	Sigma	M-10228

10

【0335】

全ての試薬を、Stericupに添加し（グリセロールを最後に添加）、十分混合した。溶液を標識し、室温で6ヶ月貯蔵することができた。

【0336】

ATP (10mM)

成分	必要量	提供元	ストック番号
ATP (100 mM)	10 μl	Roche	1140965
分子生物学級水	90 μl	Eppendorf	0032-006-205

20

【0337】

試薬を混合し、溶液を-20℃で6ヶ月貯蔵することができた。

【0338】

BSA (1mg/ml)

成分	必要量	提供元	ストック番号
BSA (10 mg/ml)	10 μl	NEB	M0203 kit
分子生物学級水	90 μl	Eppendorf	0032-006-205

30

【0339】

試薬を混合し、溶液は4℃で6ヶ月貯蔵することができた。

【0340】

ライブラリーアニーリング緩衝液、10×

成分	必要量	提供元	ストック番号
UltraPure Tris-HCl (pH 7.5, 1 M)	200 ml	Invitrogen	15567-027
酢酸マグネシウム、酵素級 (1 M)	10.72 g	Fisher	BP-215-500
分子生物学級水	~ 1 L	Eppendorf	0032-006-205

40

【0341】

10×アニーリング緩衝液は、200mM Tris (pH7.5) および50mM酢酸マグネシウムを含んでいた。この緩衝液のために、200mlのTrisを500mlのピコピュアH₂Oに添加した。次に、酢酸マグネシウム10.72gをその溶液に添加し、完全に溶解させた。溶液は最終体積1000mlに調節した。溶液は4℃で6ヶ月貯蔵することができた。ライブラリーの汚染の可能性を避けるために、緩衝液を、一回または短期間使用のために分割した。

【0342】

アダプター

アダプター「A」 (400 μ M)

成分	必要量	提供元	ストック番号
アダプター A (センス; HPLC 精製、 ホスホロチオエート結合、44 bp、1000 pmol/μl)	10.0 μl	IDT	特別注文
アダプター A (アンチセンス; HPLC 精製、 ホスホロチオエート結合、40 bp、1000 pmol/μl)	10.0 μl	IDT	特別注文
アニーリング緩衝液 (10X)	2.5 μl	454 Corp.	先の表に記載
分子生物学級水	2.5 μl	Eppendorf	0032-006-205

【0343】

この溶液のために、1000pmol/μl アダプター-A (44bp、センス) 10 μl を、1000pmol/μl アダプター-A (40bp、アンチセンス) 10 μl、10×ライブラリーアニーリング緩衝液2.5 μl、および水2.5 μl ($V_f = 25 \mu l$) と混合した。アダプターを、Sample Prep Lab熱サイクラーにおいてANNEAL-Aプログラム (下記付表参照) を用いてアニーリングした。アダプター設計についてのさらなる詳細は、付表に提供する。

10

【0344】

アダプター「B」 (400 μM)

成分	必要量	提供元	ストック番号
アダプター B (センス; HPLC 精製、 ホスホロチオエート結合、40 bp、1000 pmol/μl)	10 μl	IDT	特別注文
アダプター B (アンチセンス; HPLC 精製、ホスホロ チオエート結合、5' ビオチン化、44 bp、1000 pmol/μl)	10 μl	IDT	特別注文
アニーリング緩衝液 (10X)	2.5 μl	454 Corp.	先の表に記載
分子生物学級水	2.5 μl	Eppendorf	0032-006-205

20

【0345】

この溶液のために、1000pmol/μl アダプター-B (40bp、センス) 10 μl を、1000pmol/μl アダプター-B (44bp、アンチセンス) 10 μl、10×ライブラリーアニーリング緩衝液2.5 μl、および水2.5 μl ($V_f = 25 \mu l$) と混合した。アダプターを、Sample Prep Lab熱サイクラーにおいてANNEAL-Aプログラム (下記付表参照) を用いてアニーリングした。アニーリング後、アダプター「A」とアダプター「B」 ($V_f = 25 \mu l$) を組み合わせた。アダプターセットを、使用するまで-20℃で貯蔵した。

30

【0346】

20% 酢酸

成分	必要量	提供元	ストック番号
氷酢酸	2 ml	Fisher	A35-500
分子生物学級水	8 ml	Eppendorf	0032-006-205

【0347】

この溶液のために、氷酢酸を水に添加した。溶液を室温で6ヶ月貯蔵することができた。

40

【0348】

アダプターアニーリングプログラム

プライマーのアニーリングのためのANNEAL-Aプログラム：

1. 95℃で1分間インキュベーション；
2. 0.1℃/秒の割合で15℃まで温度下降；および
3. 14℃に保持。

【0349】

末端修復のためのT4ポリメラーゼ/クレノウPOLISHプログラム：

1. 25℃で10分間インキュベーション；
2. 16℃で2時間インキュベーション；および

50

3. 4℃に保持。

【0350】

末端修復のためのT4 PNKプログラム

1. 37℃で30分間インキュベーション；
2. 65℃で20分間インキュベーション；および
3. 14℃に保持。

【0351】

ニック付二本鎖gDNAの鎖置換および伸長のためのBSTプログラム：

1. 65℃で30分間インキュベーション；および
2. 14℃に保持。

10

【0352】

工程9：一本鎖DNAライブラリーの希釈および貯蔵

EB緩衝液中の一本鎖DNAライブラリー：残留最終体積=25 μl。

【0353】

初期ストック希釈液を以下のように作った。ピロシーケンシング（Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden）結果を用いて、一本鎖DNAライブラリーを、1×アニーリング緩衝液中で100M分子/μlに希釈した（通常、これは1：50希釈であった）。

【0354】

200,000分子/μlを1×アニーリング緩衝液中に希釈し、30 μlを調製することにより、一般的使用のための一本鎖DNAライブラリーのアリコートを作った。-20℃で貯蔵する。サンプルを、エマルジョンPCRで利用した。

20

【0355】

試薬調製

停止溶液（50mM EDTA）：0.5M EDTA 100 μlを、nH₂O 900 μlと混合して、50mM EDTA溶液1.0mlを得た。

【0356】

10mM dNTPの溶液は、dCTP（100mM）10 μl、dATP（100mM）10 μl、dGTP（100mM）10 μl およびdTTP（100mM）10 μl、分子生物学級水（nH₂O）60 μlを含んでいた。4つ全ての100Mヌクレオチドストックを氷上で溶解した。各ヌクレオチド10 μlを、60 μlのnH₂Oと組み合わせ、最終体積100 μlとし、十分に混合した。その1mlのアリコートを1.5ml微小遠心分離管に入れ、-20℃で1年未満貯蔵した。

30

【0357】

アニーリング緩衝液（10×）：10×アニーリング緩衝液は、200mM Tris（pH7.5）および50mM酢酸マグネシウムを含んでいた。この溶液のために、24.23gのTrisを800mlのnH₂Oに添加し、pH7.5に調節した。これに、酢酸マグネシウム10.72gを添加し、完全に溶解させた。溶液を最終体積1000mlとした。この溶液は4℃で1ヶ月貯蔵することができた。

【0358】

10×TE：10×TEは、100mM Tris・HCl（pH7.5）および50mM EDTAを含んでいた。これらの試薬を一緒に添加し、十分に混合した。溶液は室温で6ヶ月貯蔵することができた。

【0359】

40

実施例4：ビーズエマルジョンPCR

テンプレートDNAの捕捉、DNA増幅、および増幅テンプレートに結合したビーズの回収を含む以下の手順を、単一の管中で行うことができる。このエマルジョンフォーマットは、この単一の管中でビーズを物理的に分離して100~200 μmの「マイクロリアクター」にし、種々のテンプレートをクローニング的に増幅させることを確実にする。増幅産物の固定は、DNA捕捉ビーズに結合されたオリゴヌクレオチドに沿ってテンプレートを伸長させることにより達成される。典型的には、固定テンプレートのコピー数は、ビーズ当たり1~3千万コピーの範囲である。核酸テンプレートの単一種の複数コピーが付着されたDNA捕捉ビーズは、PTP上に分布する準備ができています。

【0360】

50

PTP表面に作製された300,000個の75ピコリットルのウェルは、大量に平行して効率良く費用効果高く、短いDNAテンプレートの配列決定を行なうための固有のアレイを提供する。しかし、これには各反応ウェルにクローンテンプレートがかなり大量に（何百万コピー）必要である。本発明の方法を用いると、標準的な管またはマイクロタイタープレートにおいて、PCR反応を行なうことにより、一本鎖ゲノムテンプレートをクローン増幅することができる。テンプレート種の単一コピーは、捕捉ビーズと混合し、完全PCR増幅溶液に再懸濁し、乳化してマイクロリアクター（直径100～200 μm ）とし、その後PCR増幅を行なうと、元のテンプレート種は 10^7 倍に増幅される可能性がある。この手順は、以前の方法よりもはるかに単純で費用効果が高い。

【0361】

捕捉ビーズに対する核酸テンプレートの結合

本実施例は、1つの唯一の核酸テンプレートが選択的に結合したビーズ集団の調製を記述する。クローン増幅の成功は、各ビーズに制御された数のテンプレート種（0.5から1）を送達することに依存する。過剰なテンプレート種が送達されると、混合したテンプレート集団のPCR増幅が行われ、意味のある配列データが得られなくなり、テンプレート種の数がいずれも不足すると、配列決定するためのテンプレートを含むウェルの数が減少してしまう。これにより、配列決定段階によって提供されるゲノムのカバー範囲が低下する。その結果、定量を繰り返して正確にテンプレート濃度を決定し、以下に概説する結合プロトコールに従うことが好ましい。

【0362】

テンプレートの品質管理

エマルジョンPCR反応の成功は、テンプレート種の質に関連している。増幅段階をいくら詳細に注意深く行なっても、テンプレートの質が悪ければ、増幅の成功と意味のある配列データの生成が損なわれてしまう。時間と費用の無駄を避けるためには、本過程のエマルジョンPCR段階を開始する前に、テンプレート材料の質を確認することが重要である。好ましくは、ライブラリーはエマルジョンPCRに使用する前に、2つの品質管理段階に合格する必要がある。その濃度および産物の分布を決定する必要がある。理想的には、ライブラリーはアダプターダイマー（例えば、～90塩基）がほとんどまたは全く見られない異質な断片集団である。また、PCRプライマーを用いた増幅では、例えば、300から500 bpの範囲の産物のスミアが得られる。増幅産物がないということは、アダプターがテンプレートに適切に連結されていないことを反映する可能性があり、サイズを問わず単一のバンドが存在することはテンプレートが汚染されていたことを反映する可能性がある。

【0363】

PCR溶液の調製

この段階で主に考慮するのは、散在するアンプリコンでPCR反応混合物を汚染しないようにすることである。残存アンプリコンによるPCR反応液の汚染は、配列決定段階の失敗に至る重要な問題の1つである。汚染の可能性を低下させるために、適切な実験室テクニックを用い、反応液の調製はクリーンルームのUV処理した層流フード内で実施する。

【0364】

PCR反応混合物

200 μl のPCR反応混合物（600,000ビーズの増幅に十分な量）には、0.2 mlのPCR管内で、以下の試薬を混合する。

【0365】

（表4）

10

20

30

40

	ストック	最終	マイクロリットル
HIFI 緩衝液	10 X	1 X	20
処理スクレオチド	10 mM	1 mM	20
Mg	50 mM	2 mM	8
BSA	10 %	0.1 %	2
Tween 80	1 %	0.01 %	2
Ppase	2 U	0.003 U	0.333333
プライマーMMP1a	100 μ M	0.625 μ M	1.25
プライマーMMP1b	10 μ M	0.078 μ M	1.56
Taq ポリメラーゼ	5 U	0.2 U	8
水			136.6
合計			200

10

【0366】

管は十分にボルテックス攪拌し、テンプレートにビーズをアニーリングさせるまで氷上で保管した。

【0367】

DNA捕捉ビーズ

1. 600,000個のDNA捕捉ビーズをストック管から1.5 ml遠心管へ移した。使用される量は、調製された試薬のビーズ濃度に依存する。

2. ベンチトップミニ遠心機でビーズを沈殿させ、上清を除去した。

20

3. 段階4～11は、PCRクリーンルーム内で行った。

4. ビーズを1 mLの1Xアニーリング緩衝液で洗浄した。

5. マイクロ遠心機で捕捉ビーズを沈殿させた。管を180°回転させ、再度遠心した。

6. ビーズを含む管から上清を約10 μ l残して除去した。ビーズは乱さなかった。

7. 1 mLの1Xアニーリング緩衝液を添加し、混合液を1分間インキュベートした。その後、ビーズを段階5と同様にして沈殿させた。

8. 管から内容物を約100 μ l残して除去した。

9. 残りのビーズと溶液をPCR管に移し替えた。

10. 150 μ lの1Xアニーリング緩衝液を用いて、数回ピペットで出し入れして、1.5 mL管を洗浄した。この液を、ビーズを含むPCR管に添加した。

30

11. 段階5と同様にしてビーズを沈殿させ、ビーズ沈殿を乱さないように注意しながら、上清を10 μ l残して除去した。

12. 定量した一本鎖テンプレートDNA (sstDNA) の一部を除去した。最終濃度は200,000-sst DNA分子/ μ lだった。

13. 希釈したsstDNA 3 μ lをビーズを含むPCR管に添加した。これは、sstDNA 600,000コピーに相当する。

14. 管を穏やかにボルテックス攪拌し、内容物を混合した。

15. MJサーモサイクラーのEPCRフォルダー中に保存されたプログラム80Annealを用いて、PCRサーモサイクラー中で、sstDNAを捕捉ビーズにアニーリングさせた。以下のプロトコールが用いられた。

40

- ・ 65℃で5分；
- ・ 0.1℃/秒で60℃に低下；
- ・ 60℃で1分間保持；
- ・ 0.1℃/秒で50℃に低下；
- ・ 50℃で1分間保持；
- ・ 0.1℃/秒で40℃に低下；
- ・ 40℃で1分間保持；
- ・ 0.1℃/秒で20℃に低下；および
- ・ 次の段階の用意ができるまで10℃で保持

【0368】

50

大部分の場合は、テンプレート結合の直後に、ビーズは増幅に使用された。ビーズが直ちに使用されない場合は、必要になるまで4℃でテンプレート溶液中で保存した。保存後、ビーズは以下のように処理された。

【0369】

16. 段階6と同様に、ビーズをサーモサイクラーから取り出し、遠心し、そしてビーズを乱さないようにしてアニーリング緩衝液を除去した。

17. 乳化まで、ビーズは氷バケツ中に保存した（実施例2）。

18. 捕捉ビーズには、1つのビーズあたり平均sstDNAが0.5から1コピー結合しており、乳化の準備ができた。

【0370】

実施例5：乳化

この工程で用いるのに適したPCR溶液を以下に挙げる。PCR反応混合物200 μl（600Kビーズの増幅に十分）のために、以下の材料を0.2ml PCR管に添加した。

【0371】

	ストック	最終	マイクロリットル
HIFI 緩衝液	10 X	1 X	20
処理スクレオチド	10 mM	1 mM	20
Mg	50 mM	2 mM	8
BSA	10 %	0.1 %	2
Tween 80	1 %	0.01 %	2
Ppase	2 U	0.003 U	0.333333
プライマー MMP1a	100 μM	0.625 μM	1.25
プライマー MMP1b	10 μM	0.078 μM	1.56
Taq	5 U	0.2 U	8
水			136.6
合計			200

【0372】

本実施例は、1マイクロリットルあたり約3,000のPCRマイクロリアクターを含む熱安定性の油中水エマルジョンを作製する方法を記述する。以下にエマルジョンの調製のためのプロトコルの概要を示す。

【0373】

1. 200 μlのPCR溶液を、600,000ビーズに添加した（いずれの成分も実施例1から得られた）。

2. 溶液をピペットで数回出し入れして、ビーズを再懸濁した。

3. PCR-ビーズ混合液を室温で2分間インキュベートし、ビーズをPCR溶液で平衡化した。

4. 400 μlのエマルジョン油をUV照射した2 mlマイクロ遠心管に添加した。

5. エマルジョン油の管に、「アンプリコンなし」の1/4"磁気攪拌バーを添加した。

【0374】

アンプリコンなしの攪拌バーは、以下のようにして調製した。1/4"攪拌バーを保持するために、大きな攪拌バーを使用した。その後、攪拌バーは：

- ・ DNA-Off（液滴またはスプレー）で洗浄し；
- ・ picopure水ですすぎ；
- ・ キムワイプの端で乾燥させ；そして
- ・ UVを5分間照射した。

【0375】

6. Dynal MPC-S管ホルダーの磁気インサートを取り出した。エマルジョン油の管をホルダーに設置した。管は600 rpmにセットした攪拌プレートの中央に設置された。

7. 管を十分にボルテックス攪拌し、ビーズを再懸濁した。これにより、凝集したビーズを最低限に抑えた。

8. P-200ピペットを用いて、次の液滴を添加する前に、各液滴が磁気攪拌バーのレベル

に沈み、乳化するようにしながら、PCR-ビーズ混合物を2秒ごとに1滴の割合で1滴ずつ回転する油に添加した。溶液はマヨネーズと類似した粘性を有する、均一な乳白色の液体になった。

9. 全てのPCR-ビーズ混合物を添加したら、遠心管を数回はじき、表面にある油と乳状のエマルジョンを混合した。

10. さらに5分間攪拌を継続した。

11. 段階9および10を繰り返した。

12. より大きな攪拌バーを用いて、管から攪拌バーを引っ張り出すことにより、エマルジョンから攪拌バーを取り出した。

13. エマルジョン10 μ Lを取り出し、顕微鏡スライド上に置いた。エマルジョンをカバースリップで覆い、50Xの倍率（接眼レンズ10X、対物レンズ5X）で観察した。「良い」エマルジョンは、油中にあるPCR溶液の分離した液滴（マイクロリアクター）中に単一のビーズが主に含まれているものである。

14. 以下のようにして、乳化安定剤を含む適当なエマルジョン油混合物が作製された。エマルジョン液の成分は、表5に示されている。

【0376】

（表5）

成分	必要量	提供元	参照番号
Sigma 軽油	94.5 g	Sigma	M-5904
Atlox 4912	1 g	Uniqema	NA
Span 80	4.5 g	Uniqema	NA

【0377】

エマルジョン油混合物は、水槽中でAtlox 4912を60℃にあらかじめ温めて作製した。その後、4.5グラムのSpan 80を94.5グラムの鉱油に添加して、混合液を調製した。その後、温めてあったAtlox 4912を1 g混合液に添加した。溶液を密閉容器に入れ、震盪および反転させて混合した。Atloxが硬化または凝固する徴候があれば、混合液を60℃に温め、さらに震盪して修正した。

【0378】

実施例6：増幅

本実施例は、ビーズ-エマルジョン混合物におけるテンプレートDNAの増幅を記述する。本発明のプロトコルに従うと、過程のDNA増幅段階は、3時間から4時間かかる。増幅の完了後、ビーズの単離過程を始める前に、エマルジョンは最高12時間、サーモサイクラー中に放置してもよい。PCRサーモサイクリングは、50から100 μ lの乳化反応液を個々のPCR反応チャンバー（すなわちPCR管）に入れて実施された。PCRは以下のようにして行なわれた。

【0379】

1. 1つのピペットチップを用いて、50から100 μ Lのエマルジョンを、約10の別々のPCR管または96ウェルプレートに移した。この段階では、油中水エマルジョンは、非常に粘性が高い。

2. プレートに密封またはPCR管のフタを閉じ、96ウェルプレートアダプターを用いてまたは用いずに、容器をMJサーモサイクラー中に入れた。

3. PCRサーモサイクラーは、以下のプログラムで運転した：

- ・1サイクル（94℃で4分間） - ホットスタート；
- ・40サイクル（94℃で30秒間、58℃で30秒間、68℃で90秒間）；
- ・25サイクル（94℃で30秒間、58℃で6分間）；および
- ・14℃で保存

4. PCR反応完了後、エマルジョンの破壊およびビーズ回収に進むために、増幅産物を取り出した。

【0380】

実施例7：エマルジョンの破壊およびビーズ回収

本実施例は、どのようにしてエマルジョンを破壊し、増幅テンプレートと結合したビーズを回収するかを説明する。好ましくは、PCR後のエマルジョンは、完全な状態のままである。エマルジョンの下の方の層は、目視検査では乳白色の懸濁液のままである。溶液が透明な場合には、エマルジョンは水層と油層に部分的に分離した可能性があり、ビーズの多くがテンプレートの混合物を有する可能性が高い。エマルジョンが1本または2本の管で破壊されている場合は、これらのサンプルは他のサンプルと混合しない。全ての管でエマルジョンが破壊されている場合は、本手順を継続しない。

【0381】

1. 元の600 μ lサンプルから得られた全てのPCR反応液は、単一のピペットチップを用いて、単一の1.5 mlマイクロ遠心管で混合した。上述のように、エマルジョンは非常に粘性が高い。場合によっては、各管でピペッティングを数回繰り返した。できるだけ多くの材料を、1.5 ml管に移した。

2. 残ったエマルジョンは、各サンプルに50 μ lのSigma鉱油を添加して、各PCR管から回収された。単一のピペットチップを用いて、各管で数回出し入れして、残った材料を再懸濁した。

3. この材料を、乳化材料の大部分を入れた1.5 ml管に添加した。

4. サンプルを30秒間ボルテックスで攪拌した。

5. Eppendorfのテーブルトップマイクロ遠心機中で、13.2K rpmでサンプルを20分間遠心した。

6. エマルジョンは、大きな白色の界面を有する2つの層に分離した。上部の透明な油層をできるだけ多く除去した。混濁した材料は、管に残された。しばしば、白色の層が油層と水層を分離していた。ビーズはしばしば管の底に沈殿しているのが観察された。

7. ビーズの上の水層を取り出し、分析用（ゲル分析、Agilent2100、およびTaqman）に保存した。水層の上に白色の材料の界面が残る場合は、下の水層20 μ lが取り出された。これは、ピペットチップで界面材料を貫通し、その下から溶液を取り出すことによって行なった。

8. PTP製造および表面化学研究室のドラフト（PTP Fabrication and Surface Chemistry Room Fume Hood）内において、残りのエマルジョンに、1 mlのヘキサンが添加された。

9. サンプルを1分間攪拌し、1分間最高速度で遠心した。

10. PTP製造および表面化学研究室のドラフト内において、上部の油/ヘキサン層を除去し、有機廃液入れに入れた。

11. 1 mlの80%エタノール中の1Xアニーリング緩衝液を残りの水層、界面、およびビーズに添加した。

12. サンプルを1分間または白い物質が溶解するまでボルテックスで攪拌した。

13. サンプルを高速で1分間遠心した。管を180度回転させ、また1分間遠心した。ビーズの沈殿を乱さないようにして、上清を除去した。

14. 0.1% Tween20を含む1Xアニーリング緩衝液1 mlでビーズを洗浄し、この段階を繰り返した。

【0382】

実施例8：一本鎖の除去およびプライマーのアニーリング

ピロリン酸ベースの配列決定反応にビーズが使用される場合には、PCR産物の2本目の鎖を除去し、ビーズに結合した一本鎖テンプレートに配列決定プライマーをアニールさせる必要がある。本実施例は、そのためのプロトコルを記述する。

【0383】

1. ビーズを1 mlの水で洗浄し、1分間の遠心を2回行なった。2回の遠心の間には、管を180度回転させた。遠心後、水層を除去した。

2. ビーズを1 mlの1 mM EDTAで洗浄した。管を段階1のようにして遠心し、水層を除去した。

3. 1 mlの0.125 M NaOHを添加し、サンプルを8分間インキュベートした。

4. サンプルを軽くボルテックスで攪拌し、マイクロ遠心機中にいれた。
5. 6分後、ビーズを段階1と同様に沈殿させ、できるだけ多くの溶液を除去した。
6. 8分間のNaOHインキュベーションの完了後、1 mlの1Xアニーリング緩衝液を添加した。
7. サンプルを軽くボルテックス攪拌し、ビーズを段階1と同様に沈殿させた。できるだけ多くの上清を除去し、さらに1 mlの1Xアニーリング緩衝液を添加した。
8. サンプルを軽くボルテックスで攪拌し、ビーズは段階1と同様に沈殿させ、800 μ lの1Xアニーリング緩衝液を除去した。
9. ビーズを0.2 ml PCR管に移した。
10. ビーズを移し、ビーズを乱さずにできるだけ多くのアニーリング緩衝液を除去した。
11. 100 μ lの1Xアニーリング緩衝液を添加した。
12. 4 μ lの100 μ M配列決定プライマーを添加した。アニーリングの直前に、サンプルをボルテックスで攪拌した。
13. アニーリングは「80Anneal」プログラムを用いて、MJサーモサイクラー中で行った。
14. 200 μ lの1Xアニーリング緩衝液でビーズを3回洗浄し、100 μ lの1Xアニーリング緩衝液中に再懸濁した。
15. Hausser 血球計算板でビーズを計数した。通常、300,000から500,000個のビーズが回収された (3,000~5,000ビーズ/ μ L)。
16. ビーズは4°Cで保存し、1週間は配列決定に使用できた。

【0384】

実施例9：任意の濃縮段階

以下の手順を用いてアンプリコンを含むビーズの濃縮を行なっても良い。濃縮は必要ではないが、この後のDNA配列決定のような分子生物学技術を、より効率良くするために使用できる。

【0385】

実施例5で得られたアンプリコンを含むセファロースビーズに、10 μ M (合計500 pmol)のビオチン配列決定プライマー50 μ lを添加した。ビーズをサーモサイクラーに入れた。実施例のサーモサイクラーアニーリングプログラムによって、ビーズ上のDNAにプライマーをアニーリングさせた。

【0386】

アニーリング後、セファロースビーズを0.1% Tween 20を含むアニーリング緩衝液で3回洗浄した。ビオチン配列決定プライマーにアニーリングしたssDNA断片を含むビーズは、遠心によって濃縮し、BST結合緩衝液200 μ lに再懸濁した。再懸濁したビーズに10 μ lの50,000ユニット/mlのBstポリメラーゼを添加し、ビーズを入れた容器を回転装置上に5分間置いた。2 μ lの10 mM dNTP混合液 (すなわち、10 mM dATP、dGTP、dCTPおよびdTTPを各々2.5 μ lずつ) を添加し、混合液をさらに室温で10分間インキュベートした。0.1% Tween 20を含むアニーリング緩衝液でビーズを3回洗浄し、元の体積のアニーリング緩衝液に再懸濁した。

【0387】

50 μ lのDynaL Streptavidinビーズ (DynaL Biotech Inc.、レークサクセス、ニューヨーク州；10 mg/mlのM270またはMyOne(商標)ビーズ) を0.1% Tween 20を含むアニーリング緩衝液で3回洗浄し、元の体積の0.1% Tween 20を含むアニーリング緩衝液に再懸濁した。その後、DynaLビーズ混合液を再懸濁したセファロースビーズに添加した。混合液をボルテックス攪拌し、室温で回転装置上に10分間置いた。

【0388】

ビーズは2300 $\times$ g (Eppendorf Centrifuge 5415Dでは500 rpm) で遠心することによって、試験管の底に集められた。ビーズは元の体積の0.1% Tween 20を含むアニーリング緩衝液に再懸濁した。試験管中の混合液は、磁気分離装置 (DynaL) に入れられた。ビーズを0

.1% Tween 20を含むアニーリング緩衝液で3回洗浄し、元の体積の同じ緩衝液に再懸濁した。アンプリコンを持たないビーズは、以前に述べたように、洗浄段階で除去された。適当なDNA断片を含むセファロースビーズのみが、保持された。

【0389】

磁気ビーズは、500 μ lの0.125 M NaOHを添加することにより、セファロースビーズから分離した。混合液をボルテックス攪拌し、磁気ビーズは磁気分離によって除去した。溶液中に残ったセファロースビーズは別の管に移し、pHが7.6で安定化するまで、400 μ lの50 mM Tris酢酸で洗浄した。

【0390】

実施例10：ビーズエマルジョンPCRを用いた核酸配列決定

以下の実験は、ビーズエマルジョンPCRの有効性を検定するために行われた。このプロトコールでは、平均直径25~35 μ m（製造元の供給による）の600,000個のセファロースビーズを、ビーズ1つあたり3000万から5000万コピーの比率で、捕捉プライマーに共有結合した。捕捉プライマーが共有結合したビーズを、120万コピーの一本鎖アデノウイルスライブラリーと混合した。ライブラリー構築物は、ビーズ上の捕捉プライマーに相補的な配列を含んでいた。

【0391】

アデノウイルスライブラリーを、実施例1に記述される手順を用いて、ビーズにアニーリングした。その後、ビーズを完全PCR溶液に再懸濁した。PCR溶液およびビーズは、実施例2に記述されたのと同じ手順を用いて、2倍の体積の回転するエマルジョン油中に乳化させた。乳化（封入）されたビーズは、実施例3に概説されるようにして、PCRにより増幅した。エマルジョンは、実施例4に概説されるようにして、破壊した。実施例5の手順を用いて、DNAビーズを一本鎖にし、配列決定プライマーをアニーリングした。

【0392】

次に、454 Life Sciences（ニューヘブン、コネチカット州）のピロリン酸シーケンサーを用いて、ピロリン酸配列決定によって、70,000個のビーズの配列決定を同時に行った（2003年6月6日に本願に伴い出願した米国特許出願第60/476,592号「核酸の増幅および配列決定方法」という名称の、Lohmanらの同時係属中の出願を参照されたい）。70,000個のビーズの複数のバッチを配列決定し、そのデータを以下の表6に示した。

【0393】

（表6）

アラインメント誤差 許容度	アラインメント				カバー率	推測読み取り 誤差
	なし	単一	複数	固有		
0%	47916	1560		1110	54.98%	0.00%
5%	46026	3450		2357	83.16%	1.88%
10%	43474	6001	1	3742	95.64%	4.36%

【0394】

この表は、アデノウイルス配列と、ピロリン酸シーケンサーから得られた配列とを比較したBLAST解析の結果を示す。最初の列はBLASTプログラムで使用された誤差の許容量を示す。最後の列は既知の配列との直接比較により決定された、真の誤差を示す。

【0395】

両端配列決定のためのビーズエマルジョンPCR

実施例11：テンプレート品質管理

既述のように、エマルジョンPCR反応の成功は、一本鎖テンプレート種の質に関連することが分かった。したがって、エマルジョンPCRプロトコールを開始する前に、2つの異なる品質管理手段によってテンプレート材料の質を評価した。まず、一本鎖テンプレートの一部を2100 BioAnalyzer (Agilent)で分析した。サンプルに約200から500塩基のサイズの異質な断片集団が含まれていることを確認するために、RNA Pico Chipを使用した。第2

に、Bio-Tek FL600プレート蛍光光度計でRiboGreen蛍光アッセイを用いて、ライブラリーを定量した。DNA濃度が5 ng/μlに満たないサンプルは、濃度が低過ぎて使用できないと考えられた。

【0396】

実施例12：DNA捕捉ビーズの合成

1 mL N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (NHS) -活性化セファロースHPアフィニティカラム (Amersham Biosciences、ピスカタウェイ、ニュージャージー州) に詰められたビーズをカラムから取り出した。30 μmおよび25 μmのポアフィルターメッシュセクション (Sefar America、デピュー、ニューヨーク州、米国) を連続して通過させることによって、30~25 μmサイズのビーズが選択された。第1のフィルターを通過したが、第2のフィルターに保持されたビーズを採集して、製品文献 (Amersham Pharmaciaプロトコール#717 00600AP) に記述されるようにして活性化した。増幅するテンプレート

(5'-アミン-3 HEG

スパーサー-gcttacctgaccgacctctgcctatcccctgttgcgtgc-3'; SEQ ID NO:12; および5'-アミン-3 HEG

スパーサー ccattccccagctcgtcttgccatctgttcctccctgc-3'; SEQ ID NO:13) (IDT Technologies,

Coralville, IA, USA)

のセンスおよびアンチセンス鎖の5'末端に対応する2つの異なるアミン標識HEG (ヘキサエチレングリコール) 長捕捉プライマーを得た。プライマーは、両端配列決定、すなわち、増幅産物の第1および第2の鎖の配列決定ができるように、増幅産物の両方の鎖を捕捉するように設計されている。捕捉プライマーは、20 mMリン酸緩衝液pH 8.0に溶解し、最終濃度を1 mMとした。各プライマー3 μlをふり分けた30~25 μmビーズに結合させた。その後、ビーズはビーズ保存緩衝液 (50 mM Tris、0.02% Tweenおよび0.02% アジ化ナトリウム、pH 8) 中で保存した。ビーズは血球計算板 (Hausser Scientific、ホーシャム、ペンシルベニア州、米国) を用いて計数し、必要になるまで4°Cで保存した。

【0397】

実施例13：PCR反応混合物の調製および調合

他の全ての一本鎖分子の増幅技術と同様に、反応液に外来アンプリコンまたは他の実験からの残存アンプリコンが混入していると、配列決定に干渉する恐れがある。汚染の可能性を低下させるために、PCR反応混合物はPCRクリーンルームにあるUV処理の層流フード中で調製された。600,000ビーズのエマルジョンPCR反応1つあたり、1.5 ml管中で以下の試薬が混合された：225 μlの反応混合液 (1X Platinum HiFi 緩衝液 (Invitrogen))、1 mM dNTP、2.5 mM MgSO₄ (Invitrogen)、0.1% BSA、0.01% Tween、0.003 U/μl 熱安定性 PPI-ase (NEB)、0.125 μM フォワードプライマー

(5'-gcttacctgaccgacctctg-3'; SEQ ID NO:14) および 0.125 μM リバースプライマー

(5'-ccattccccagctcgtcttg-3'; SEQ ID NO:15) (IDT Technologies, Coralville, IA, USA)

および0.2 U/μl Platinum Hi-Fi Taqポリメラーゼ (Invitrogen)。25 μlの反応液を取り出し、陰性対照として使用するために、200 μlのPCR管中に保存した。反応液および陰性対照の両方を、必要となるまで氷上で保存した。

【0398】

実施例14：DNA捕捉ビーズへのテンプレート種の結合

配列決定のためのクローンDNA増幅の成功は、各ビーズに制御された数のテンプレート種を送達することに関連している。以下に記述する実験では、典型的な標的テンプレート濃度は、捕捉ビーズ1つあたり0.5テンプレートコピーであると決定された。この濃度では、ポワソン分布によるとビーズの61%にはテンプレートが結合しておらず、30%にはテンプレートが1種結合し、9%には2つまたはそれ以上のテンプレート種が結合している。過剰のテンプレート種が送達されると、単一のビーズ上で混合した集団 (2つまたはそれ以上の種) が結合し、そして増幅されることになり、意味のある配列データが得られなくな

る。しかし、送達される種の数が少な過ぎると、テンプレートを含むウェルの数が減り（ビーズ1つあたり1種）、配列決定のカバー範囲が減少する。したがって、一本鎖ライブラリーテンプレートの濃度が重要であると考えられた。

【0399】

テンプレート核酸分子を、以下の方法によって、UV処理層流フード中で、DNA捕捉ビーズ上の相補的プライマーにアニーリングした。ビーズ保存緩衝液（上記実施例9を参照されたい）中に懸濁された600,000個のDNA捕捉ビーズを、200 μ lのPCR管に移した。管はベンチトップミニ遠心機で10秒間遠心し、180度回転させ、さらに10秒間遠心して均一な沈殿物を形成させた。上清を除去し、ビーズを200 μ lのアニーリング緩衝液（20 mM Tris、pH 7.5および5 mM酢酸マグネシウム）で洗浄した。管を5秒間ボルテックスで攪拌してビーズを再懸濁し、上述のようにビーズを沈殿させた。ビーズの上の約10 μ lのみを残してビーズの上清を除去し、さらに200 μ lのアニーリング緩衝液を添加した。さらにビーズを5秒間ボルテックスで攪拌し、1分間静置し、上述のように沈殿させた。10 μ lのみを残して上清を廃棄した。

10

【0400】

次に、300,000分子/ μ lのテンプレートライブラリー1.5 μ lをビーズに添加した。管を5秒間ボルテックスで攪拌して内容物を混合し、MJサーモサイクラー中に行なう制御された変性/アニーリングプログラムにより、ビーズにテンプレートをアニーリングさせた。プログラムに従い、80°Cで5分間インキュベートし、70°Cまで0.1°C/秒で低下させ、70°Cで1分間インキュベーション、60°Cまで0.1°C/秒で低下させ、60°Cで1分間保持し、50°Cまで0.1°C/秒で低下させ、50°Cで1分間保持し、20°Cまで0.1°C/秒で低下させ、20°Cで保持した。アニーリング過程の完了後、ビーズをサーモサイクラーから取り出し、上述のように遠心し、アニーリング緩衝液を注意深くデカンテーションした。捕捉ビーズには、各ビーズあたり平均0.5コピーの一本鎖テンプレートDNAが結合しており、これは使用するまで氷上で保存した。

20

【0401】

実施例15：乳化

乳化過程では、1 μ lあたり10,000の別々のPCRマイクロリアクターを含む熱安定性の油中水型エマルジョンが作製される。これは、単一分子、標的ライブラリーの個々の分子のクローン増幅のための基質となる。単一反応のための反応液およびDNA捕捉ビーズは、以下のようにして乳化された。UV処理した層流フードにおいて、200 μ lのPCR溶液（実施例10より）を600,000個のDNA捕捉ビーズ（実施例11より）を含む管に添加した。ビーズはピペッティングを繰り返して再懸濁した。その後、PCRビーズ混合液を室温で少なくとも2分間インキュベートし、ビーズとPCR溶液を平衡化した。同時に、450 μ lのエマルジョン油（軽油（Sigma）中、4.5% (w:w) Span 80、1% (w:w) Atlox 4912（Uniqema、デラウェア州））を、無菌の1/4インチ磁気攪拌バー（Fischer）を含む、フラットトップの2 mlの遠心管（Dot Scientific）に分注した。その後、この管を特注のプラスチック管保持ジグに入れ、これを450 RPMに設定したFisher Isotempデジタル攪拌ホットプレート（Fisher Scientific）の中央に入れた。

30

【0402】

PCRビーズ溶液を15秒間ボルテックス攪拌して、ビーズを再懸濁した。その後、プラスチックの安全シリンジニードル（HenrySchein）を付けた1 mlのディスプレイブルのプラスチックシリンジ（Benton-Dickenson）中に溶液を吸引した。ポンプを水平ではなく垂直に向けるアルミニウムベースを用いて改造したシリンジポンプ（Cole-Parmer）にシリンジを置いた（図30）。エマルジョン油を入れた管を攪拌プレート上に置き、この中心がプラスチックシリンジニードルの下になり、磁気攪拌バーが適切に回転するようにした。シリンジポンプは5.5 ml/hrで0.6 mlを注入するように設定した。PCRビーズ溶液は、一滴ずつ、油中エマルジョンに添加された。回転する油中に落ちる時に、液滴が管の側面に接触しないように注意した。

40

【0403】

50

エマルジョンが形成されたら、乳化過程および乳化後の分注段階のいずれにおいても、エマルジョンの攪拌を抑えるように注意した。ボルテックス攪拌、速いピペッティング、または過剰な混合はエマルジョンを破壊し、個々のマイクロリアクターを破壊することが分かった。エマルジョンを形成する際には、2つの溶液が、マヨネーズのような粘性を持った乳白色の均一な混合液になった。シリンジの内容物を回転する油に添加した。その後、エマルジョン管を保持ジグから取り外し、エマルジョンの上端の残存油層が消えるまで、人さし指で軽くはじいた。管を保持ジグに戻し、さらに1分間、磁気攪拌バーで攪拌した。攪拌バーは、管の外側に沿って、磁気回収ツールを動かすことによってエマルジョンから取り出し、攪拌バーを廃棄した。

【0404】

P100ピペッターを用いて、管の中央から20 μ lのエマルジョンを取り出し、顕微鏡スライド上に載せた。切断力を抑えるために、大きめのピペットチップが用いられた。50Xの倍率でエマルジョンを観察し、エマルジョンが、油中において直径30~150ミクロンのPCR溶液のマイクロリアクター中にある、単一ビーズから主に構成されていることを確認した(図33)。目視検査後、エマルジョンを直ちに増幅した。

【0405】

実施例16：増幅

エマルジョンは、7~8個の別々のPCR管に分注した。各管には、約75 μ lのエマルジョンが入れた。管を密封し、上述の25 μ lの陰性対照と共に、MJサーモサイクラー中に入れた。以下のサイクルタイムを使用した：94℃で4分のインキュベーションを1サイクル（ホットスタート）、94℃で30秒間および68℃で150秒間のインキュベーションを30サイクル（増幅）、ならびに94℃で30秒間および68℃で360秒間のインキュベーションを40サイクル（ハイブリダイゼーションおよび伸長）。PCRプログラムの完了後に、管を取り出し、直ちにエマルジョンを破壊するか、反応液を破壊過程の開始まで最高16時間10℃で保存した。

【0406】

実施例17：エマルジョンの破壊およびビーズの回収

増幅後、エマルジョンの破壊（油層と水層の分離）を検査した。破壊されていないエマルジョンは合わせて1.5 mlのマイクロ遠心管に入れ、時折見られる破壊されたエマルジョンは、廃棄した。エマルジョンサンプルの粘性が非常に高いので、各PCR管には、かなりの量が残った。管に残ったエマルジョンは、各PCR管に鉱油を75 μ l添加し、混合液をピペッティングして回収した。この混合液は乳化材料の大部分を含む1.5 mlの管に添加した。その後、1.5 ml管を30秒間ボルテックス攪拌した。その後管は、ベンチトップマイクロ遠心機中で、13.2K rpm（最高速度）で20分間遠心した。

【0407】

遠心後、エマルジョンは大きな白色の界面を有する2つの層に分離した。上部の透明な油層は廃棄し、濁った界面の材料は管に残した。化学ドラフト（chemical fume hood）内で、下層および界面層に1 mlのヘキサンを添加した。混合液を1分間ボルテックス攪拌し、ベンチトップマイクロ遠心機の最高速度で1分間遠心した。上部の油/ヘキサン層は除去し、廃棄した。その後、残りの水層、界面、およびビーズに1 mlの80%エタノール/1Xアニーリング緩衝液を添加した。この混合液を1分間または界面の白色材料が溶解するまでボルテックス攪拌した。その後、サンプルはベンチトップマイクロ遠心機の最高速度で1分間遠心した。管を180度回転させ、さらに1分間遠心した。ビーズの沈殿を乱さないようにして、上清を注意深く除去した。

【0408】

白色のビーズ沈殿物は1 mlの0.1% Tween20を含むアニーリング緩衝液で2回洗浄した。洗浄液は廃棄し、各洗浄ごとに、上述のようにしてビーズを沈殿させた。沈殿物は1 ml Picopure水で洗浄した。ビーズは、上記で使用した遠心-回転-遠心の方法で沈殿させた。水層を注意深く除去した。その後、沈殿と上清の除去の前に中間の設定で2秒間、ビーズを軽くボルテックスで攪拌したこと以外は、上記と同様にしてビーズを1 mlの1 mM EDTA

10

20

30

40

50

で洗浄した。

【0409】

捕捉ビーズ上に固定された増幅DNAに、一本鎖DNAを得るための処理をした。2番目の鎖は、塩基性融解溶液中でインキュベートすることによって除去された。その後1 mlの融解溶液(0.125 M NaOH、0.2 M NaCl)をビーズに添加した。沈殿物は、中間の設定で2秒間ボルテックス攪拌することによって再懸濁し、管はThermolyne LabQuakeチューブローラーに3分間設置した。その後、ビーズを上述のようにして沈殿させ、上清を注意深く除去して廃棄した。残った融解溶液は、1 mlのアニール緩衝液を添加することにより中和した。その後、ビーズを中間の速度で2秒間ボルテックス攪拌した。前記のようにビーズを沈殿させ、上清を除去した。遠心後に800 µlのアニール緩衝液しか除去しなかったこと以外は同様に、アニール緩衝液による洗浄を繰り返した。ビーズと残ったアニール緩衝液は、0.2 ml PCR管に移された。ビーズは直ちに使用するか、最高48時間まで4°Cで保存した後、濃縮過程に進んだ。

10

【0410】

実施例18：任意のビーズの濃縮

ビーズの塊には、増幅され、固定されたDNA鎖を有するビーズ、および空または無効のビーズが含まれていた。上述のように、ビーズの61%は、増幅過程でテンプレートDNAを持っていないと計算された。濃縮は、テンプレートDNAを有するビーズを選択的に単離し、配列決定効率を最大化するために使用された。濃縮過程は以下に詳細に述べられている。

20

【0411】

実施例14から得られた一本鎖ビーズを遠心-回転-遠心法で沈殿させ、ビーズを乱さないようにしてできるだけ多くの上清を除去した。ビーズに15 µlのアニール緩衝液を添加し、その後、100 µMのビオチン化40塩基濃縮プライマー

(5'-ビオチン-テトラエチレングリコールスパーサー

ccattccccagctcgtcttgcctcgttcctcctgtctcag-3'; SEQ ID NO:16)

を2 µl添加した。プライマーは、ビーズに固定されたテンプレートの3'末端の、結合した増幅および配列部位(各々20塩基の長さ)に相補的だった。溶液は中間の設定で2秒間ボルテックス攪拌することにより混合し、濃縮プライマーはMJサーモサイクラー中で制御された変性/アニールプログラムを用いて、固定されたDNA鎖にアニールした。プログラムでは、以下のサイクルタイムと温度が使用された：65°Cで30秒間インキュベーション、58°Cまで0.1/秒で低下、58°Cで90秒間インキュベーション、および10°Cで保持。

30

【0412】

プライマーがアニールしている間に、Dyna1 MyOne(商標)ストレプトアビジンビーズを穏やかに攪拌して再懸濁した。次に、20 µlのMyOne(商標)ビーズを、1 mlの増強溶液(2M NaCl、10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 7.5)を含む1.5 mlのマイクロ遠心管に添加した。MyOne(商標)ビーズ混合物は、5秒間ボルテックスで攪拌し、管をDyna1 MPC-S磁石中に設置した。常磁性ビーズはマイクロ遠心管の側面に沈殿した。MyOne(商標)ビーズを乱さないようにして、上清を注意深く除去し、廃棄した。管を磁石から取り出し、増強溶液を100 µl添加した。管を3秒間ボルテックス攪拌してビーズを再懸濁し、必要になるまで氷上で保存した。

40

【0413】

アニールプログラムが完了したら、DNA捕捉ビーズと濃縮プライマーを含むPCR管に、100 µlのアニール緩衝液を添加した。管を5秒間ボルテックス攪拌し、内容物を新しい1.5 mlのマイクロ遠心管に移した。濃縮プライマーの捕捉ビーズへのアニールに使用されたPCR管は、200 µlのアニール緩衝液で1回洗浄し、洗浄液を1.5 ml管に添加した。ビーズは1 mlのアニール緩衝液で3回洗浄し、2秒間ボルテックス攪拌し、前記と同様に沈殿させた。上清を注意深く除去した。3回目の洗浄後、ビーズは1 mlの氷冷した増強溶液で2回洗浄した。前記と同様にビーズをボルテックスで攪拌し、沈殿させ、上

50

清を除去した。ビーズを150 μ lの氷冷した増強溶液に再懸濁し、ビーズ溶液を洗浄したMyOne(商標)ビーズに添加した。

【0414】

ビーズ混合液を3秒間ボルテックス攪拌し、LabQuakeチューブローラー上で、室温で3分間インキュベートした。ストレプトアビジンでコーティングしたMyOne(商標)ビーズを、DNA捕捉ビーズ上に固定されたテンプレートにアニーリングしたデオキシ化濃縮プライマーに結合させた。その後、ビーズを2,000 RPMで3分間遠心し、その後、ビーズが再懸濁するまで、2秒間のパルスでボルテックス攪拌した。再懸濁したビーズを氷上に5分間静置した。その後、500 μ lの冷却した増強溶液をビーズに添加し、管をDyna1 MPC-S磁石中に設置した。ビーズを60秒間静置し、磁石で沈殿させた。その後、過剰なMyOne(商標)および無効なDNA捕捉ビーズを含む上清を注意深く除去し、廃棄した。

10

【0415】

MPC-S磁石から管を取り出し、ビーズに1 mlの冷却した増強溶液を添加した。ビーズは穏やかに指ではじいて再懸濁した。強く混合するとMyOne(商標)とDNA捕捉ビーズの間の結合が破壊される恐れがあるので、この時点ではビーズをボルテックスで攪拌しないことが重要である。ビーズを磁石に戻し、上清を除去した。この洗浄をさらに3回繰り返し、すべての無効な捕捉ビーズを確実に除去した。アニーリングした濃縮プライマーとMyOne(商標)ビーズを取り出すために、DNA捕捉ビーズを400 μ lの融解溶液中に再懸濁し、5秒間ボルテックス攪拌し、磁石を用いて沈殿させた。濃縮されたビーズを含む上清は、別の1.5 mlマイクロ遠心管に移した。濃縮されたビーズの回収を最大化するために、さらに400 μ lの融解溶液をMyOne(商標)ビーズを含む管に添加した。前記同様にビーズをボルテックスで攪拌し、沈殿させた。2回目の洗浄で得られた上清を取り出し、最初の濃縮されたビーズの塊と一緒にした。使用済みのMyOne(商標)ビーズの管は廃棄した。

20

【0416】

濃縮DNA捕捉ビーズのマイクロ遠心管は、Dyna1 MPC-S磁石に設置して、残りのDyna1 MyOne(商標)ビーズを沈殿させた。上清の濃縮ビーズは、第2の1.5 mlのマイクロ遠心管に移し、遠心した。上清を除去し、1 mlのアニーリング緩衝液でビーズを3回洗浄して、残った融解溶液を中和した。3回目の洗浄後、上清800 μ lを除去し、残ったビーズと溶液を0.2 ml PCR管に移した。濃縮ビーズは2,000 RPMで3分間遠心し、上清をデカンテーションした。次に、20 μ lのアニーリング緩衝液および2つの異なる100 μ Mの配列決定プライマー

30

(5'-ccatctgttcctccctgtc-3'; SEQ ID NO:17; および 5'-cctatcccctgttgctgtc-3'リン酸 ; SEQ ID NO:18)

を3 μ l添加した。管を5秒間ボルテックス攪拌し、MJサーモサイクラーに設置し、以下の4段階アニーリングプログラムを行なった：65°Cで5分間インキュベーション、50°Cまで0.1°C/秒で低下、50°Cで1分間インキュベーション、40°Cまで0.1°C/秒で低下、40°Cで1分間保持、15°Cまで0.1°C/秒で低下、15°Cで保持。

【0417】

アニーリングプログラムの完了後、サーモサイクラーからビーズを取り出し、10秒間遠心して沈殿させた。管を180度回転させ、さらに10秒間遠心した。上清をデカンテーションして廃棄し、200 μ lのアニーリング緩衝液を管に添加した。ビーズは5秒間のボルテックス攪拌により再懸濁し、前記同様に沈殿させた。上清を除去し、ビーズを100 μ lのアニーリング緩衝液に再懸濁した。この時点で、ビーズはMultisizer 3 Coulter Counter (Beckman Coulter)を用いて定量した。ビーズを4°Cで保存し、少なくとも1週間は安定だった。

40

【0418】

実施例19：二本鎖配列決定

二本鎖配列決定のために、2つの異なる配列決定用プライマーを用いる。非修飾プライマーMMP7Aおよび3'リン酸化プライマーMMP2Bp。このプロセス中に複数の工程がある。このプロセスを、図38に模式的に示す。

【0419】

50

1. 第1の鎖の配列決定：第1の鎖の配列決定は、所定の数のサイクルの間にヌクレオチドを順次添加することによってDNAポリメラーゼにより非修飾プライマーを伸長することを含む。

2. キャッピング：25mM トリシン、5mM酢酸マグネシウム、1mM DTT、0.4mg/ml PVP、0.1mg/ml BSA、0.01%Tween、および2 μ Mの各ジデオキシヌクレオチドおよび2 μ Mの各デオキシヌクレオチドを含むキャッピング緩衝液を流すことにより第1の鎖配列決定を停止させた。

3. 清浄化：25mM トリシン、5mM酢酸マグネシウム、1mM DTT、0.4mg/ml PVP、0.1mg/ml BSA、0.01%Tweenおよび8.5単位/Lのアピラーゼを含むアピラーゼ緩衝液中に流すことにより残留デオキシヌクレオチドおよびジデオキシヌクレオチドを除去した。

4. 切断：5単位/mlの子牛腸ホスファターゼを含む切断緩衝液を流すことにより、修飾3'リン酸化プライマーの3'末端からリン酸基を除去することにより第2の遮断プライマーを非遮断化した。

5. 継続：全ての利用可能なプライマー部位を捕捉するように1000単位/mlのDNAポリメラーゼを流すことにより、ポリメラーゼを添加することにより第2の非遮断プライマーを活性化させた。

6. 第2の鎖の配列決定：所定のサイクル数の間、ヌクレオチドを順次添加することによりDNAポリメラーゼにより第2の鎖を配列決定する。

【0420】

前述の方法を用いて、黄色ブドウ球菌のゲノムDNAの配列を決定した。結果を図39に示す。第1の鎖の15770個の読み(read)と第2の鎖の16015個の読みに基づいて合計で31,785個の読みを得た。これらのうち、合計で11,799個の読みを対とし、8187個の読みを不對とし、38%の合計カバー率を得た。

【0421】

読み取り長は60~130に及び、平均は95 $\pm$ 9塩基であった(図40)。ゲノム長さの分布と、各ゲノム長さのウェルの数を図41に示す。このゲノム配列決定からの代表的配列を図42に示す。

【0422】

実施例20：テンプレートPCR

30 μ m NHS セファロースビーズを、以下のプライマーの各々1mMと結合させた。

MMP1A: cgttccctgtgtgccttg (SEQ ID NO:19)

MMP1B: ccatctgttgcgtgcgtgtc (SEQ ID NO:20)

洗浄したプライマー結合ビーズ50 μ lを、1対1の体積比でPCRマスター混合物に添加することにより、MJ熱サイクラー上の管中で、ドライブトゥビーズPCRを行った。PCRマスター混合物は、

1 $\times$ PCR緩衝液；

1mM各dNTP；

0.625 μ MプライマーMMP1A；

0.625 μ MプライマーMMP1B；

1単位/ μ l HiFiTaq (Invitrogen, San Diego, CA) の1 μ l；および

テンプレートDNA (配列決定すべきDNA) 5~10ngを含んだ。

【0423】

MJ熱サイクラーを以下のようにプログラムすることによりPCR反応を行った：94 $^{\circ}$ Cで3分間のインキュベーション；94 $^{\circ}$ Cで30秒、58 $^{\circ}$ Cで30秒、68 $^{\circ}$ Cで30秒のインキュベーションを39サイクル；続いて、94 $^{\circ}$ Cで30秒および58 $^{\circ}$ Cで10分のインキュベーション；94 $^{\circ}$ Cで30秒、58 $^{\circ}$ Cで30秒、68 $^{\circ}$ Cで30秒のインキュベーションの10サイクル；および10 $^{\circ}$ Cでの貯蔵。

【0424】

実施例21：テンプレートDNA調製および配列決定用プライマーのアニーリング

実施例1からのビーズを、蒸留水で2回洗い、1mM EDTAで1回洗い、0.125M NaOHと5分間インキュベートした。これにより、ビーズに結合していないDNA鎖を除去した。次に、ビーズを、50mM Tris酢酸緩衝液で1回洗い、アニーリング緩衝液（200mM Tris酢酸、50mM 酢酸Mg、pH7.5）で2回洗った。次に、配列決定用プライマー

MMP7A (ccatctgttcctccctgtc; SEQ ID

NO:21) および MMP2B-phos (cctatcccctgttgctgtc; SEQ ID NO:22)

500ピコモルをビーズに添加した。プライマーを、MJ熱サイクラー上で以下のプログラムに従ってアニーリングした：60℃で5分間インキュベーション；1秒当たり0.1℃の割合で50℃まで温度降下；50℃で5分間インキュベーション；1秒当たり0.1℃の割合で4℃まで温度降下；40℃で5分間のインキュベーション；1秒当たり0.1℃の割合で10℃まで温度降下。次に、テンプレートを、標準的ピロリン酸に基づく配列決定により配列決定した。

【0425】

実施例22：第1の鎖の配列決定および停止

ビーズを3,000rpmで10分間で回転して55 μmピコタイタープレート（PTP）に入れた。PTPをリグに置き、新たな配列決定において所定のサイクル数でランした。配列決定を、第1の鎖をキャッピングすることにより停止させた。1×AB（50mM酢酸マグネシウム、250mM トリシン）100 μl、1000単位/ml BSTポリメラーゼ、0.4mg/ml 一本鎖DNA結合タンパク質、1mM DTT、0.4mg/ml PVP（ポリビニルピロリドン）、10 μMの各ddNTP、および2.5 μMの各dNTPを添加することにより第1の鎖をキャッピングした。次に、1×AB、0.4mg/ml PVP、1mM DTT、0.1mg/ml BSA、0.125単位/ml アピラーゼを添加することによりアピラーゼを流し、過剰のヌクレオチドを除去し、20分間インキュベートした。

【0426】

実施例23：配列決定用の第2の鎖の調製

第2の鎖を、1×AB 100 μl、0.1単位/ml ポリヌクレオチドキナーゼ、5mM DTTを添加することにより脱遮断した。得られたテンプレートを、標準的ピロリン酸に基づく配列決定（例えば、米国特許第6,274,320号、第6,258,568号および第6,210,891号に記載、これらは参照として本明細書に組み入れられる）を用いて配列決定した。配列決定法の結果を、174bpの断片をピロリン酸に基づく配列決定法およびこれらの実施例に記載の方法により両端で配列決定した図10Fに見ることができる。

【0427】

実施例24：ピコタイタープレート上での核酸の配列分析

実施例2に記載のような増幅核酸を含むピコタイタープレートを、灌流チャンバー中に置く。次に、スルフリラーゼ、アピラーゼおよびルシフェラーゼを、ピコタイタープレートに送達する。

【0428】

配列決定用プライマーは、DNA合成を準備し、図11A～11Dに示すような多型を有すると思われるインサートへと伸長させた。配列決定用プライマーを、まず、灌流チャンバー中に、洗浄溶液、DNAポリメラーゼ、およびdTTP、dGTP、dCTPまたはαチオdATP（dATP類似体）の一つを順次送達することにより伸長した。末端に付着したスルフリラーゼ、ルシフェラーゼおよびアピラーゼは、配列決定反応の一部として遊離されたPPiを、検出可能な光に転換した。存在するアピラーゼは、未反応dNTPを分解する。典型的に、ファイバー結像束に連結されたCCDカメラにより光を3秒間（しかし1～100秒、例えば、2～10秒も適当である）集め、その後、さらなる洗浄溶液を灌流チャンバーに添加して、過剰のヌクレオチドおよび副産物を除去する。その後、次のヌクレオチドをポリメラーゼと共に添加し、それにより、サイクルを繰り返す。

【0429】

洗浄中、集めた光像を、CCDカメラから、コンピューターに送る。発光を、コンピューターにより分析し、対応するdNTPが伸長した配列決定用プライマーに組み込まれたかどうか決定するために用いる。dNTPおよびピロリン酸に基づく配列決定剤の添加を、考えられ

る多型を含むインサート領域の配列が得られるまで繰り返す。

【0430】

実施例25：ピコタイタープレート上でのPCR増幅

ピコタイタープレート調製：さらなる態様において、ビーズに付着している一本鎖ライブラリーを、ピコタイタープレート上に直接分布させ、次に、各ビーズ上の核酸テンプレートを増幅（PCRまたは他の既知の増幅技術を用いて）して十分なコピー数のテンプレートを生成し、これらが、本明細書に開示のピロリン酸に基づく配列決定法において検出可能なシグナルを発生させる。

【0431】

実施例26：PTP上の核酸の配列分析

配列分析用および対照として用いられる試薬は4つのヌクレオチドを有するものであり、基質溶液中で0.1 μ Mピロリン酸（PPi）を作った。基質溶液は、PPi、ルシフェラーゼ、およびスルフィラーゼを含む反応のカスケード用の基質である、300 μ Mルシフェリンおよび4 μ Mアデノシン5'ホスホ硫酸（APS）の混合物と呼ばれる。基質は、アッセイ緩衝液中で作られた。酵素を試験すると共にチャンバーを通過する試薬のバックグラウンドレベルを決定するために用いられるPPiの濃度は0.1 μ Mであった。ヌクレオチドdTTP、dGTP、dCTPの濃度は6.5 μ Mであり、 α dATPの濃度は50 μ Mであった。ヌクレオチドの各々を、DNAポリメラーゼであるクレノウと、100U/mLの濃度で混合した。

【0432】

PTPを具体化された装置のフローチャンバー中に配置し、フローチャンバーをCCDカメラの面板に付着させた。基質（1分当たり3ml、2分間）をチャンバーに流通させることによりPTPを洗った。この後、試薬の配列を、位置を切り替えるようにプログラムされた、異なる試薬中に挿入された管を有するアクチュエーターに接続されたポンプにより、室を流通させた。試薬の配列、流量および流通時間を決めた。カメラは、露出時間=2.5秒の迅速撮影モードに設定した。

【0433】

パッドからのシグナル出力は、パッド中の全てのピクセルの数の平均として決定した。フレーム数は、実験中に経過した等価時間である。図形化により、異なる試薬の流れを表した。

【0434】

実施例27：ピコリットルスケールPCR反応用のプレートに基づくプラットフォーム

材料および方法

特記しない限り、全ての一般的実験室用化学物質を、Sigma（Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis, MI）またはFisher（Fisher Scientific, Pittsburgh, PA）から購入した。

【0435】

PicoTiterPlates（商標）（25×75×2mm）を、前述の方法と類似の方法で、光ファイバー面板を異方性エッチングすることにより製造した（Pantano, P. and Walt, D.R., Chemistry of Materials 1996, 8, 2832-2835）。プレートは、3つの異なるマイクロウェル深さ26、50、および76 μ mでエッチングした。マイクロウェルの中心間隔は50 μ mであり、ウェルの直径は39～44 μ m（図14参照）であり、計算されたウェル密度は480ウェル/mm²であった。

【0436】

オリゴヌクレオチドプライマーの固相固定化：1ml NHS活性化セファロース HP親和性カラム（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ）からの包装ビーズを、製造者の指示（Amersham Pharmacia Protocol # 71700600AP）に従ってカラムから除去し活性化した。20mMリン酸塩緩衝液（pH8.0）中の1mMアミン標識HEG捕捉プライマー

(5'-アミン-3'ヘキサエチレングリコールスパーサー **ccatctgtgtgcgtgcgtg** -
3'; SEQ ID NO:23) (IDT Technologies, Coralville, IA)

25 μ lを、ビーズに結合した。その後、36および25 μ m孔フィルターメッシュセクション (Sefar America, Depew, NY) を順次通過させることにより36~25 μ mのビーズを選択した。第1のフィルターを通過したが第2のフィルターに保持されたDNA捕捉ビーズを、ビーズ貯蔵緩衝液 (50mM Tris、0.02% Tween、0.02% アジ化ナトリウム、pH8) 中に集め、血球計算機 (Hausser Scientific, Horsham, PA) で定量し、必要となるまで4°Cで貯蔵した。

【0437】

10

試験DNA断片の生成：市販のアデノウイルス血清型5ベクターpAdEasy (Stratagene, La Jolla, CA) から、増幅試験断片を誘導した。二連PCRプライマーを用いて断片を増幅し、その5'末端は、20塩基の増幅領域および、アデノウイルスゲノムの特定領域に相補性である20塩基の3'セクションを含んでいた。これらのプライマーを用いて、2つの断片を、アデノウイルスゲノムの12933~13070および5659~5767位置から増幅し、それぞれ、断片Aおよび断片Bの標識を付した。

【0438】

断片A用のフォワードおよびリバースプライマーの配列を以下に示す。スラッシュ (/) は、プライマーの2つの領域間の分離を示す。

20

フォワード (5'-

cggttccccctgtgtgccttg / catctgtccactaggctct-3'; SEQ ID NO:24-SEQ ID NO:25), およびリバース

(5'-**ccatctgtgtgcgtgcgtg** / **accagcactcgaccacc-3'**; SEQ ID NO:26-SEQ ID NO:27)

断片B用のプライマーは次のものを含む。

フォワード (5'-**cggttccccctgtgtgccttg / tacctctccgcgtagggcg-**

3'; SEQ ID NO:28-SEQ ID NO:29), およびリバース (5'-**ccatctgtgtgcgtgcgtg** /

ccccggcagacgcag-3'; SEQ ID NO:30-SEQ ID NO:31)

30

【0439】

反応条件は、50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH9.0)、0.1% Triton X-100、2.5mM MgCl₂、0.2mM dNTP、各フォワードプライマーおよびリバースプライマー1 μ M、0.1U/ μ l Taq (Promega, Madison, WI) および50ナノモルテンプレートDNAを含んだ。両方のテンプレートを、94°Cで30秒、56°Cで30秒、および72°Cで90秒のインキュベーションの35サイクルを含むPCRプログラムで増幅させた。PCRプライマーを用いると、増幅断片の合計長さは断片Aについて178bpおよび断片Bについて148bpであった。

【0440】

蛍光プローブを生成するために、ビオチン化二本鎖蛍光プローブを、前述のようなpAdEasyベクターからPCR増幅により調製した。しかしながら、試験断片とプローブプライマー領域との間のハイブリダイゼーションを防止するために、プライマー配列を変化させた。さらに、両断片用のリバースプライマーは、5'ビオチンおよびその次の3×ヘキサエチレングリコールスパーサーを利用して、一本鎖プローブの溶出前に産物をビーズに固定させた。

40

【0441】

蛍光断片Aプローブ用のフォワードプライマー用の配列は以下のものであった。スラッシュ (/) は、プライマーの2つの領域間の分離を示す。

(5'- **atctctgcctactaacatgaag / catctgtccactaggctct-3'**; SEQ ID NO:32-SEQ ID NO:33)

リバースプライマー用の配列は、

50

5'-ビオチン-3Xヘキサエチレングリコールスペーサー-

gtttctctccagcctctcaccga / accagcactgcaccacc-3'; SEQ ID NO:34-SEQ ID NO:35

であった。断片B用のプライマーは次のようであった。

フォワード (5'-atctctgcctactaaccatgaag /

tacctctccgcgtaggcg-3'; SEQ ID NO:36-SEQ ID NO:37), およびリバー (5'-ビオチン-3x

ヘキサエチレングリコールスペーサー-gtttctctccagcctctcaccga / ccccgacgagacgcag-3'; SEQ ID

NO:38-SEQ ID NO:39)

10

【0442】

蛍光部分を、ヌクレオチド混合物を介して組み込んだ。これは、断片Aについて、0.2mM dATP/dGTP/dCTP、0.15mM TTPおよび0.05mM Alexa Fluor 488-dUTP (Molecular Probes, Eugene, OR) を含んでいた。または、断片Bの増幅のために、0.2mM dATP/dGTP/TTP、0.15mM dCTPおよび0.05mM Alexa Fluor 647-dCTP (Molecular Probes, Eugene, OR) を用いた。蛍光産物を、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA) で精製した。ビオチン化DNAを、続いて、1×結合洗浄液 (5mM Tris HCl, pH7.5、1M NaCl、0.5mM EDTA、0.05% Tween-20) 中の100 μl (約8,100,000) のStreptavidin Sepharose High Performanceビーズ (Amersham Biosciences) に、室温で2時間、結合させた。インキュベーション後、ビーズを、TE緩衝液 (10mM Tris、1mM EDTA、pH8.0) 中で3回洗い、250 μl融解溶液 (0.125N NaOH/0.1M NaCl) で2分間インキュベートして、ビーズから一本鎖プローブを放出させた。

20

【0443】

ビーズを、ベンチトップ遠心分離器中で短時間遠心分離してペレット化し、上澄みを、緩衝液PB (Qiagen) 1.25ml中において氷酢酸1.9 μlで中和した。この混合物を、QiaQuickカラム (Qiagen) 上で精製し、精製プローブの濃度を、BioRad iCycler (BioRad, Hercules, CA) を用いてTaqMan定量により決めた。

【0444】

溶液相PTPCRを以下のように行った。PCR反応混合物を、単一の14mm×43mm PicoTiterPlate (商標) の個々のウェル中に充填した。このために、PCR反応混合物 (1×Platinum HiFi緩衝液 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、2.5mM MgSO₄、0.5% BSA、1mM dNTP (MBIFermentas, Hanover, MD)、

30

1 μM フォワード (5'-cgtttcccctgtgtgccttg-3'; SEQ ID NO:40) および

リバー (5'-ccatctgttgcggtgctgc-3'; SEQ ID NO:41)

プライマー、0.05% Tween-80、1U/μlのPlatinum HiFi Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen)、0.003U/μl 熱安定性ピロホスファターゼ (USB, Cleveland, OH)、およびウェル当たり断片Bテンプレートの算出された5コピー) 500 μlを、1.5ml微小遠心分離管において併せた。管を十分にボルテックスにかけ、PicoTiterPlate (商標) 充填カートリッジを組み立てるまで氷上に貯蔵した。

40

【0445】

自家製 (in-house) PicoTiterPlate (商標) 充填カートリッジを、2つのプラスチッククリップを用いてPicoTiterPlate (商標) に付着させ、ケイ素カートリッジガasketを、PicoTiterPlate (商標) 表面にしっかりと敷いた (図20参照)。PCR反応混合物を、1ml使い捨て注射器に引き込み、注射器の口を、充填カートリッジの投入管に挿入した。充填カートリッジを、投入ポートがカートリッジの底部に配向されるように、末端に置き、PCR混合物を、ゆっくりとチャンバー中に充填した。充填中、PicoTiterPlate (商標) の透明背部を通して検査して、気泡の無い送達を確実にした。

【0446】

充填後、PCR混合物を5分間インキュベートし、その時点で、反応混合物をPicoTiterPla

50

te (商標) 充填カートリッジから引き出した。PicoTiterPlate (商標) を、充填カートリッジから除去し、直ぐに、増幅チャンバー中に入れた (図21参照)。PicoTiterPlate (商標) 表面を、厚さ0.25mmのSilpadA-2000ケイ素シート (The Bergquist Company, Chanhassen, MN) で覆った。この頂部に、25mm×75mm標準ガラス顕微鏡スライド (Fisher) を置いた。独立気泡フォーム絶縁パッド (closed cell foam insulation pad) (Wicks Aircraft Supply, Highland, IL) を、顕微鏡スライドの頂部に置いた。アルミニウム蓋を、6個の25mmボルトによりチャンバーの基礎部分に付着させて、増幅チャンバーを封止した。

【0447】

いったん封止したら、増幅チャンバーを、Flat Block Alpha Unitを備えるThermocycler MJ PTC225 Tetrad (MJ Research, Waltham, MA) 上に置いた。増幅プログラムは、94℃で3分間インキュベーション (ホットスタート開始: Hotstart Initiation) した後、94℃で12秒、58℃で12秒、68℃で12秒の40サイクル、最後の10℃での維持を含んでいた。PCRプログラムの完了後、PicoTiterPlate (商標) を増幅チャンバーから除去し、充填カートリッジを再付着した。使い捨て注射器を用いて、カートリッジチャンバーをH₂O 1mlで充填し、10℃の室温で20分間インキュベートさせた。

【0448】

インキュベーションの完了後、回収溶液を充填カートリッジから引き出し、1.5ml微小遠心分離管に移した。PCR産物を、iCycler RealTime PCRユニット (BioRad) およびFAM-標識レポータープローブ (Epoch Biosciences, Bothell, WA) を用いて定量した。TaqMan Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems, Foster City, CA) を0.3 μMフォワードおよびリバースプライマー、0.15 μM FAM-標識プローブと組み合わせ、反応混合物27 μlを、96ウェルPCRプレートの各ウェルに添加した。

【0449】

精製された断片を用いて、標準曲線 (ウェル当たり $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^4$ 分子の範囲の6つの標準) を形成した (3つ組でランした)。以下のパラメーターでPCR増幅を行った: 94℃で5分間インキュベーション (ホットスタート開始)、および94℃で15秒、68℃で45秒のインキュベーションの60サイクル、最後の4℃での維持。データを、iCycler Optical Systems Software Version 2.3 (BioRad) を用いて分析し、PCR収率を、iCyclerデータおよびMicrosoft Excel (Microsoft, Redmond, WA) を用いて定量した。

【0450】

以下に記載のように遠心分離により増幅する前にPicoTiterPlate (商標) ウェルにDNA捕捉ビーズを充填する以外は、溶液相PTPCRと同様の方法で固相PTPCRを行った。さらに、ビーズ沈着が完了した後、PCR混合物をマイクロウェルに充填した。洗浄工程中の捕捉ビーズの保持を容易にするために、固相実験は、50 μmの深さのPicoTiterPlate (商標) を利用した。PicoTiterPlate (商標) を、自家製網状ガラスビーズ充填ジグ内に配置した。これは、PicoTiterPlate (商標) が、底部網状ガラスプレートと入口および出口を含むジグトッププレートとの間に挟まれ、プラスチックねじを有するケイ素ガスを介して封止される以外は、図20に示すPicoTiterPlate (商標) 充填ジグに類似している。

【0451】

テンプレートDNAは、80℃で3分間インキュベートすることにより、ビーズ当たり5つのテンプレートコピーとして、DNA捕捉ビーズに予備アニーリングし、その後、ビーズを15分で室温まで冷やした。次に、ビーズを、PCR反応混合物を充填する前に、PicoTiterPlate (商標) ウェルに入れた。100,000個のセファロースDNA捕捉ビーズ (3つのPicoTiterPlate (商標) ウェル当たり約1個のビーズ) を含むビーズ充填緩衝液 (450 μl; 1×Platinum HiFi PCR緩衝液 (Invitrogen)、0.02% Tween-80) を、入口の一つを通して、ピペットによりジグに注入した。各入口の穴を、次に、環状接着性パッド (3M VHS, St. Paul, MN) で封止した。ジグは、PicoTiterPlate (商標) を、そのウェルが上を向くように保持し、ビーズ懸濁液で覆った。これを、マイクロタイターローター (Microtiter Rotor) を用いて、Allegra 6遠心分離機 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) において、室温で2000rpmで5分間遠心分離した。

【0452】

遠心分離後、PicoTiterPlate（商標）をジグから除去した。PCR反応混合物を、溶液相PCRについて記載したようなPicoTiterPlate（商標）上に充填した。しかしながら、固相PCR混合物は、テンプレートがDNA捕捉ビーズに予備アニーリングされたので、テンプレートを省いた。固相PCR増幅プログラムは、固定プライマーの遅い反応速度を補うために、さらなるハイブリダイゼーション/伸長サイクルを含んでいた。プログラムは、ホットスタート開始のために94℃で3分のインキュベーション、および94℃で12秒、58℃で12秒、68℃で12秒のインキュベーションの40サイクル、続いて、ハイブリダイゼーションおよび伸長のための94℃で12秒、68℃で10分のインキュベーションの10サイクル、および最後の10℃での維持を含んでいた。

10

【0453】

PCRプログラムの完了時に、溶液相PCRについて記載したように、PicoTiterPlate（商標）を増幅チャンバーから除去し、H₂O 1mlで洗った。次に、PicoTiterPlate（商標）を、固定PCR産物のハイブリダイゼーション検出のために調製した。

【0454】

ハイブリダイゼーションを、以下のように蛍光標識されたプローブを用いて行った。PT PCRが完了した後、固定鎖に相補的な鎖を除去した。このために、全PicoTiterPlate（商標）を、0.125M NaOH中にて室温で8分間インキュベートした。この溶液を、20mM Tris酢酸（pH7.5）50ml中で5分間の洗浄を2回行って中和した。次に、PicoTiterPlate（商標）を、特注の800 μ lハイブリダイゼーション室中に置き、ハイブリダイゼーション緩衝液（3.5×SSC、3.0%SDS、20×SSC緩衝液は、3M NaCl、0.3Mクエン酸Na₃である）により65℃で30分間遮断した。チャンバーの内容物を、プローブ、20nM蛍光断片A（Alexa-488）および断片B（Alexa-647）を含む新しいハイブリダイゼーション緩衝液で置き換えた。プローブを、それらの標的にハイブリダイズさせた。インキュベーションを、軌道型振動機（Barnstead International, Dubuque, IA）上で200RPMで振盪しつつ、65℃で4時間行った。

20

【0455】

ハイブリダイゼーション後、PicoTiterPlate（商標）を、2×SSC、0.1%SDSにより37℃で15分間洗い、続いて、1×SSC中にて37℃で15分間洗い、最後に、0.2×SSC中にて37℃で15分間の洗浄を2回行った。ハイブリダイゼーション後洗浄に続いて、PicoTiterPlate（商標）を、風乾し、FLA-8000 Fluorescent Image Analyzer（Fujifilm Medical Systems USA, Stamford, CT）中に配置し、波長635nmおよび473nmでスキャンした。得られる16ビットtiff画像をGenepix 4.0（Axon Instruments, Union City, CA）にインポートした。100の分析特徴のブロックを、対象となる領域に導き、635および473蛍光強度を各特徴について記録した。次に、データを、さらなる分析のためにMicrosoft Excelにエクスポートした。

30

【0456】

対照ビーズを以下のように調製した。ビオチン化試験テンプレートAおよびBを、pAdEasyベクターからPCR増幅により調製し、精製し、Streptavidin Sepharose High Performanceビーズ上に固定し、「蛍光プローブの調製」に記載のように鎖を分離した。しかしながら、蛍光標識dNTPは、PCR反応において省略した。ペレット化ビーズを、TE緩衝液で3回洗い、PicoTiterPlate（商標）上に沈着するまで、TE中に4℃で貯蔵した。

40

【0457】

結果

PicoTiterPlate（商標）ウェル当たり算出された5個のテンプレートコピーを含むPCRマスター混合物をPicoTiterPlateに充填することにより、溶液相増幅が示された。深さ26、50および76 μ mのウェルを有するPicoTiterPlateにおいて反応を2連で行った。材料および方法の項目に記載のように、PTPCR増幅の40サイクルを行った。添加剤を組み込んで、シリカ反応容器で通常報告される有害な表面効果を防止した（Kalinina, O., et al., Nucleic Acids Res.1997, 25, 1999-2004; Wittwer, C.T.and Garling, D.J., Biotechniques 1991, 10, 76-83; Taylor, T.B., et al., Nucleic Acids Res.1997, 25, 3164-3168）

50

。

【0458】

反応混合物中に0.5%BSAおよび0.05% Tween-80を含むことは、表面効果の低下において効果的であるのみならず、増幅を容易にもする。いずれかの試薬の相対的濃度を低下させることは、増幅に負の効果をもたしていた。さらに、シリカ表面のポリメラーゼ不活性化特性

(Taylor, T.B., *et al.*, *Nucleic Acids*

*Res.*1997, 25, 3164-3168; Shoffner, M.A., Cheng, J., Hvichia, G.E., Kricka, L.J. and Wilding,

P., *Nucleic Acids Res.* 1996, 24, 375-379)

10

故に、高いTaq濃度は有利であると分かった。1U/μlを超える濃度は、アンプリコンの収率を向上させるのに最適であった。

【0459】

PTPCRに続いて、各PicoTiterPlate（商標）からの溶液を回収し、各溶液の3種類のサンプルを、TaqManアッセイにより定量した。希釈されたテンプレートの標準曲線（ $1 \times 10^9 \sim 10^4$ 分子からの線形、 $r^2 = 0.995$ ）を用いて、増幅産物の濃度を決めた。ウェル当たりの増幅された分子の数は、PicoTiterPlate（商標）中のウェルの合計数（372,380）で増幅産物の量を割ることにより得た。ウェル当たりの増幅の量は、この数を、ウェル当たりの初期テンプレート濃度で割ることにより計算した。PTPCR増幅は、PicoTiterPlate（商標）の全てにおいて成功し、収率は、39.5plウェルにおける 2.36×10^6 倍から50plウェルにおける 1.28×10^9 倍の範囲である（以下の表を参照）。

20

【0460】

ピコタイタープレート の深さ[μm]	ウェル体積 [pl]	平均増幅倍率 N=6	増幅倍率 SD	最終産物濃度 [M]
26	39.5	2.36E+06	1.02E+06	4.96E-07
50	76.0	1.28E+09	1.03E+09	1.40E-04
76	115.6	9.10E+08	4.95E+08	6.54E-05

【0461】

表は、TaqManアッセイにより決められるPicoTiterPlate（商標）PCR増幅を示す。値は、2連のピコタイタープレートから得られる3回の測定値を反映する。（N=6）；SD=標準偏差。

30

【0462】

収率は、ウェル体積の影響を受ける。深さ50μmのウェルについて得られた最終産物の濃度（ 1.4×10^{-4} M）は、深さ76μmのウェルについて得られた濃度（ 6.54×10^{-5} M）よりも著しく大きく（ANOVAについてのp値=0.023）、いずれも深さ26μmのウェルについて得られた濃度（ 4.96×10^{-7} M）より倍率が2桁大きい。深さ50μmのマイクロウェルの収率は、低体積PCRに係わる費用と利益との最適バランスを示した。この場合、効果的濃度の最大上昇と試薬の低熱質量が得られるが、表面对体積比はそれでも十分に低いので、有害表面効果が、増幅効率を著しく低下させることを防止する。

40

【0463】

異なる深さのウェルの各々において得られるPTPCR産物の最終的濃度（ $4.96 \times 10^{-7} \sim 1.4 \times 10^{-4}$ M）は、PCRプラトー効果が生じる前に達成することができる最大値として典型的に報告される 10^{-8} Mの濃度を超えていた（Sardelli, A., *Amplifications* 1993, 9, 1-5）。低マイクロウェル体積から生じるプライマーおよびテンプレート分子の高い効果的濃度が、全反応効率を高め、プラトー相の開始を高いモル収率が得られるまで遅らせた。または、高いポリメラーゼ濃度もプラトー効果の遅延において効果的であると示されたように、この効果は、PTPCR反応において用いられるTaqの高い濃度により引き起こされた（Kainz, P., *Biochim.Biophys.Acta* 2000, 1494, 23-27; Collins, F.S., *et al.*, *Science* 2003

50

、300、286-290)。40サイクルでの増幅効率は、26、50および76 μm の深さのウェルについて、それぞれ、44.3%、68.9%および67.5%であり、アンプリコンの高い最終濃度が提供された。深さ50 μm のウェルにおいて最も大きな収率が観察された。しかしながら、サイクル数の最適化は行われておらず、はるかに少ないサイクルで同様の増幅収率が同様に達成することができ、それにより、PTPCR増幅の効果が増加することを理解すべきである。

【0464】

一本鎖DNA断片の単一の有効なコピーから始まり蛍光プローブハイブリダイゼーションにより検出される特定のビーズ固定DNAアンプリコンで終了する、クローン固相PTPCRの実験的手法を、図22に示し以下に詳細に説明する。

【0465】

工程1：各PicoTiterPlate（商標）ウェルは、一本鎖テンプレート分子（ここに示すように一本鎖でありDNA捕捉ビーズにアニーリングされているか、溶液中で自由に動く）、溶液中のフォワード「F」（赤）およびリバース「R」（青）プライマー、およびDNA捕捉ビーズに付着したRプライマー、からなるPCR反応混合物を含む。溶液相プライマーは、8：1モル比で、過剰のFプライマーと共に存在する。矢印は、5'→3'DNA配向を示す。

【0466】

工程2：初期熱サイクルはDNAテンプレートを変性させ、溶液中のRプライマーを、テンプレート分子上の相補性領域に結合させる。熱安定性ポリメラーゼは、プライマー部位（破線）において伸長し始め、次のサイクルにおいて、溶液相指数的増幅が続いて起こる。ビーズ固定プライマーは、この段階における増幅への主な貢献であるとは考えられない。

【0467】

工程3：初期相PCR。初期指数的増幅（1～10サイクル）中、溶液中のFプライマーが過剰であるにも係わらず、FプライマーとRプライマーの両方が等しくテンプレートを増幅させる。

【0468】

工程4：中間相PCR：10サイクルと30サイクルとの間において、Rプライマーが枯渇し、指数的増幅を停止させる。次に、反応が非対称的増幅相に入り、アンプリコン集団が次第にF鎖により占められるようになる。

【0469】

工程5：後期相PCR。30～40サイクルの後、非対称的増幅は、溶液中のF鎖の濃度を増加させ続ける。過剰のF鎖が、R鎖で捕捉されることなく、ビーズ固定Rプライマーにアニーリングされる。熱安定性ポリメラーゼが、アンプリコンの固定R鎖を合成するためのテンプレートとしてF鎖を利用している。

【0470】

工程6：最終相PCR。連続的熱サイクルが、ビーズ結合プライマーへのさらなるアニーリングを引き起こす。溶液相増幅はこの段階では最少であるが、固定R鎖の濃度は上昇し続ける。

【0471】

工程7：固定R鎖に相補的である非固定F鎖は、アルカリ変性により除去される。DNA捕捉ビーズは、ここで、アンプリコンの一本鎖R鎖により占められる。

【0472】

工程8：R鎖に相補的である蛍光標識プローブ（緑色棒）が、固定鎖にアニーリングされる。特定の鎖配列に特異的なプローブが、固有の蛍光プローブで標識され、所与のPicoTiterPlate（商標）ウェル内で増幅された別個のテンプレートの数に依存してある範囲の均質および不均質蛍光シグナルが得られる。

【0473】

最初に、蛍光標識プローブの特異性を、ビオチン化断片Aまたは断片B試験DNA断片をストレプトアビジンセファロースビーズに結合させ、ビーズを50 μm の深さのPicoTiterPlate（商標）に遠心分離により充填し、蛍光標識したプローブの混合集団を、断片Aおよび断

10

20

30

40

50

片B断片のためにハイブリダイズすることにより確認した。混合シグナルまたは非特異的ハイブリダイゼーションは観察されず；断片A産物を有するビーズは448nmシグナルを示し、一方、断片Bビーズは、635nmシグナルを示した（図23Aおよび23Bを参照）。図23Aおよび23Bを綿密に調べると、断片Bパッド中の断片Aビーズは少なく、その逆も同様であることがわかる。シグナルの純度がこれらの遊動ビーズにより示される場合、それらは、充填プロセス中の一部の交差汚染の産物であるか、その後の洗浄工程中に一つのパッドから洗浄された他のパッドに移された可能性が高い。

【0474】

図23Cに示すように、蛍光プローブは、断片Aテンプレートと断片Bテンプレートの両方の成功した固相PTPCR増幅を検出した。ハイブリダイゼーションプローブにより発生されたシグナルは、プローブ中の染料組み込みの相対的効率、不等量のテンプレートDNAへの反応の感受性、および各ビーズ上に存在する増幅産物の合計および相対量に依存する。さらに、DNA捕捉ビーズ上で生成し保持されたテンプレートの量は、ウェルからウェルへと変化するようであり、各ビーズに結合した捕捉プライマーの数も、ビーズ寸法分布故に変化するようである。その結果、プローブのハイブリダイゼーションにより生じる非正規化比が、定量的データというより半定性的に見えるはずである。それにも係わらず、ハイブリダイズされたプローブにより生じる蛍光シグナルは、均質断片Bシグナル（赤色）から同等に均質の断片Aシグナル（緑色）の範囲であり、2つのシグナルの不均質混合物（黄色の程度）も同様に明らかである。

【0475】

対照により示されるプローブ特異性、およびPicoTiterPlate（商標）上の均質赤色および緑色ビーズのかかりの数のために、非特異的プローブハイブリダイゼーションが、不均質シグナルを生じる可能性は低い。いずれかのテンプレートの均質ビーズが近接していることは、増幅中のウェル間のアンプリコンの漏出から不均質ビーズが生じる可能性は低いことを示唆する（ウェル内交差混入が原因ならば、いずれかのテンプレートの均質ビーズ間に配置された不均質ビーズ、および一般に均質シグナルのむらのある分布が見られることが予想される）。むしろ、テンプレート分子が、マイクロウェル内に入れられる前に最初のビーズから解離しPicoTiterPlate（商標）充填混合物中の新しいビーズに再びアニーリングされるか、または、PCR混合物がPicoTiterPlate（商標）に適用されるときに一つのビーズから洗い流されて他のビーズに送られるようである。混合テンプレートビーズの原因に拘わらず、ハイブリダイゼーションの結果は、PicoTiterPlate（商標）マイクロウェル中におけるPCR増幅が、十分な産物をDNA捕捉ビーズに送り、蛍光プローブのハイブリダイゼーションおよび検出を可能にできることを示している。

【0476】

考察

この実施例における結果は、PicoTiterPlate（商標）に基づくPCRが、試薬の高コスト、反応の数の多さおよび長い反応時間のようなDNA増幅プロセスに関する多くの要因を緩和し、PCR技術において「進化的飛躍」を提供することを示している。単一のPicoTiterPlate（商標）上のマイクロウェルは、39.5ピコリッターという低い反応体積においても、370,000個までの別個の反応容器として機能することができ、高収率（ $2.3 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^9$ 倍）増幅を達成する。その結果、処理能力が増加し、PTPCR用の合計試薬コストが低下し；深さが26または76 μm であるPicoTiterPlate（商標）の全体に含まれる反応体積は、それぞれ、15.3および43 μl である。PicoTiterPlate（商標）の寸法の増加は、最大処理量をさらに増加させることができる。例えば、PicoTiterPlate（商標）寸法を40mm×75mmに増加させることは、約 1.4×10^6 個の別個の反応容器を提供し、市販の96-ウェルPCRプレート（85.47mm×127.81mm）と同じ周囲寸法を有するPicoTiterPlate（商標）は、 5.24×10^6 個という多数のウェルを含むことができる。

【0477】

溶液相PCR増幅は、それらが行われる数および体積に拘わらず、産物を容易かつ効果的に回収できないのであれば、有用性が制限される。並行PCRについての以前の研究（Nagai

, H., et al., Anal.Chem.2001, 73, 1043-1047) は、液体反応混合物の蒸発を必要とし、マイクロリアクターの壁に乾燥されたアンプリコンを残し、その後、これをさらなる処理のために回収することができる。本明細書の開示の方法は、固相増幅を含み、PCR産物をDNA捕捉ビーズに固定することにより、産物回収の問題を回避する。すなわち、PicoTiterPlate (商標) マイクロウェル反応の産物は、溶液相PCR産物を含む370,000個のウェルではなく、固定PCR産物が結合した370,000個までのビーズである。これらのPCR産物は、数億個までの塩基を含む全ゲノムを配列決定するための大規模な並行的手法を支持する潜在的性能を含む、核酸を調べる多くの固相法に適している。開示された方法の簡易さは、大規模クローニングおよびPCRを維持するためのロボット工学を現在必要とする配列決定および他の用途のためのコストを劇的に低下させる。

10

【0478】

本発明の一つまたは複数の態様の開示を、添付の記述に示す。本明細書に記載のものに類似または同等の任意の方法および材料を、本発明の実施または試験に用いることができ、好ましい方法および材料を本明細書で記載する。本発明の他の特徴、目的および利点が、明細書の記載および特許請求の範囲から明らかである。明細書および添付の特許請求の範囲において、特記しない限り、単数型は複数型を含む。特記しない限り、本明細書で用いられる全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。特記しない限り、本明細書で用いられるまたは企図される技術は、当業者に知られている標準的技術である。態様の実施例は、説明の目的だけのものである。本明細書で引用された全ての特許および刊行物は、参照として組み入れられる。

20

【0479】

実施例28：リグ配列決定法

工程1：pAdEasy PCR DNAビーズの調製

この手順は、アデノウイルススクローンの384-ウェルプレートPCRのために用いた。2M NaCl溶液で1回洗い、288mlの2M NaClの中に再懸濁させることにより、PCR断片を結合させるためのストレプトアビジン-セファロースビーズ(12ml)を調製した。洗浄したビーズは、200 μ lのビーズ懸濁液/ウェルで15の96-ウェルプレートに移した。PCR産物(25 μ l)を、Tecan TeMoロボットを用いて、384-深ウェルプレートに移した。DNAを固体支持体に結合するために、Tecan TeMoロボットを用いて、全ての384-深ウェルプレートの各ウェルに、ビーズ懸濁液(15,000ビーズ)25 μ lを添加し、混合した。結合反応液中のNaClの最終濃度は1Mであった。結合反応液を、振盪器上で室温で振盪しながら3時間インキュベートした。マイクロタイタープレートの内容物を、384-ウェルプレートを貯蔵器の上に逆さまにすることにより貯蔵し、Beckman Allegraベンチトップ遠心分離機において1000×Gで遠心分離した。貯蔵ビーズを、50ml Falcon管中に移し、1000×Gで遠心分離し、上澄みを除去した。

30

【0480】

約百万個のビーズ(可動性固体支持体)を、100 μ lの2M NaClので1回洗い、続いて蒸留水で2回洗った(各100 μ l)。洗浄したビーズを、回転器内において融解試薬(0.1M NaClおよび0.125M NaOH)300 μ l中で10分間インキュベートして、非ビオチン化DNA鎖を除去した。管を、最高スピードで遠心分離してビーズをペレット化し、融解溶液を除去し廃棄した。ビーズを、融解溶液100 μ lで洗い、続いて、1×アニーリング緩衝液でもう3回洗った。洗浄後、ビーズを、1×アニーリング緩衝液25 μ l中で再び懸濁した。

40

【0481】

プライマーP2(500ピコモル)を、ビーズ混合物に添加し、混合した。管中のビーズ混合物を、以下の温度プロフィールで、自動インキュベーター(この場合、PCR熱サイクラー)に入れた：60℃で5分間インキュベーション、0.1℃/秒の割合で50℃まで温度降下、50℃で5分間インキュベーション、0.1℃/秒の割合で40℃まで温度降下、40℃で5分間インキュベーション、0.1℃/秒の割合で4℃まで温度降下、4℃で長時間インキュベーション。

【0482】

50

アニーリング後、ビーズを注意深く洗い、Bst DNAポリメラーゼ結合溶液200 μ lに再懸濁させた。次に、ビーズ懸濁液の10 μ lのアリコート（50,000ビーズ）を、以下に記載の装置において配列決定するために処理した。

【0483】

工程2：対照DNAビーズの調製

6種類の対照DNA配列TF2、7、9、10、12および15を、pBluescript II KS+ベクター内にクローニングし、プラスミドDNAを、アンプリコンの固相固定のために1個のビオチン化プライマーを用いてPCR用のテンプレートとして用いた。

【0484】

以下の薬剤を、1.7ml管に添加してPCR混合物を作った。

10 X HIFI 緩衝液	100 μ l
10 mM dNTP 混合物	100 μ l
50 mM MgSO ₄	60 μ l
5'-Bio-3HEG-MMP1B	10 μ l
MMP1A	10 μ l
HIFI <i>Taq</i> ポリメラーゼ	10 μ l
分子生物学級水	690 μ l

【0485】

プラスミドテンプレートDNA20 μ lを添加し、混合物を50 μ l分取し、0.2ml PCR管に入れた。熱サイクルのために以下のプログラムを用いた。94℃で4分間インキュベーション；94℃で15秒、58℃で30秒、68℃で90秒および68℃で120秒のインキュベーションを39サイクル；10℃に維持。

【0486】

各試験断片の増幅DNAを、Qiagen MinElute PCR Clean-Upキットを用いて、製造者の指示に従って精製した。試験断片DNAの各々の純度および収率を、Agilent 2100 BioanalyzerおよびDNA500試薬キット並びにチップを用いて調べた。ビオチン化PCR産物を、一千万DNAコピー/ビーズの割合でセファロースストレプトアビジンビーズ上に固定した。

【0487】

ビーズを、2M NaCl溶液で1回洗った。これは、100 μ lを添加し、ボルテックスに短時間かけてビーズを再懸濁させ、最高速度で1分間遠心分離してビーズをペレット化し、上澄みを除去することにより行った。これに続いて、2M NaClで2回洗った。次に、ビーズを2M NaClの30 μ lに再懸濁させた。PCR産物をビーズに添加した。混合物をボルテックスにかけて、ビーズを溶液中に再懸濁させ、次に、タイタープレート振盪器上のラックに入れて室温でスピード7で1時間置いた。

【0488】

非ビオチン化第2鎖を、オーバーヘッド回転器中で、室温でアルカリ融解溶液（0.1 M NaOH/0.15M NaCl）と共に10分間インキュベートすることにより除去した。これに続いて、ビーズを、融解溶液100 μ lで1回洗い、1×アニーリング緩衝液（50mM Tris-酢酸、pH7.5；5mM MgCl₂）100 μ lで3回洗った。配列決定プライマーを、最高速度で1分間遠心分離することにより固定一本鎖DNAにアニーリングした。上澄みを除去し、ビーズを1×アニーリング緩衝液25 μ lに再懸濁させた。次に、配列決定プライマーMMP7A（100pmol/ μ l）5 μ lを、ビーズ懸濁液に添加し、以下の温度プロフィールを用いて配列決定プライマーをハイブリダイズした：

- ・60℃で5分間インキュベーション、
- ・0.1℃/秒の割合で50℃まで温度降下、
- ・50℃で5分間インキュベーション、

- ・ 0.1℃/秒の割合で40℃まで温度降下、
- ・ 40℃で5分間インキュベーション、
- ・ 0.1℃/秒の割合で4℃まで温度降下、および
- ・ 4℃で保持。

【0489】

ビーズを、1×アニーリング緩衝液100 μlで2回洗い、次に、1×アニーリング緩衝液を用いて再懸濁して最終的体積200 μlとし、4℃の冷蔵庫内で標識管ストリップ中で10 μlのアリコートで貯蔵した。

【0490】

工程3：配列決定化学

固定一本鎖DNAテンプレートおよびアニーリングした配列決定プライマーを有するセファロースビーズを、回転器上で、Bstポリメラーゼ結合溶液（25mM Tricine pH7.8；5mM 酢酸マグネシウム；1mM DTT；0.4mg/ml PVP MW 360,000）200 μl中の大腸菌一本鎖結合タンパク質（Amersham Biosciences）（ビーズ50,000個当たり、2.5 μg/μl ssbストック溶液5 μl）およびBst DNA ポリメラーゼ（NEB）500U（50U/μlを10 μl）と共に、室温で30分間インキュベートした。この後、DNAビーズをSLビーズと混合し、以下のようにPicoTiterPlateのウェル中に沈着させた。454装置上の配列決定に必要な試薬は、1）基質洗浄溶液、2）アピラーゼ含有洗浄溶液、3）100nM無機ピロリン酸校正標準、4）個々のヌクレオチド三リン酸溶液、を含んでいた。

【0491】

全ての溶液は、酵素基質を用いてスルフリラーゼ-ルシフェラーゼアッセイ緩衝液中で調製した（25mM Tricine pH7.8；5mM 酢酸マグネシウム；0.4mg/ml PVP MW 360,000；0.01% Tween 20；300 μM D-ルシフェリン；4 μM APS）。基質洗浄溶液は、ルシフェラーゼアッセイ緩衝液と同じである。アピラーゼ含有洗浄溶液は、酵素基質（APSおよびD-ルシフェリン）を添加しないことを除いてルシフェラーゼアッセイ緩衝液に基づいており、この洗浄液は、アピラーゼ（Sigma St.Louis, MO；Pyrosequencing AB, Pyrosequencing, Inc. Westborough, MA）を8.5U/Lの最終的濃度で含んでいた。

【0492】

ピロリン酸ナトリウム（PP_i）標準液は、ピロリン酸ナトリウム四塩基性10水和物（Sigma St.Louis, MO）をルシフェラーゼアッセイ緩衝液に最終濃度が100nMになるように添加することにより調製した。ヌクレオチド三リン酸（dCTP、dGTP、TTP；最小二リン酸級）（Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden）を、ルシフェラーゼアッセイ緩衝液中に最終濃度が6.5 μMとなるように希釈した。デオキシアデノシン三リン酸類似体である2'-デオキシアデノシン-5'-O-（1-チオ三リン酸）、Sp-異性体（Sp-dATP-α-S, Biolog Life Science Institute, Bremen, Germany）を、ルシフェラーゼアッセイ緩衝液中に最終濃度が50 μMになるように希釈した。

【0493】

工程4：His6-BCCP-スルフリラーゼおよびHis6-BCCP-ルシフェラーゼのクローニング

Bacillus stearothermophilus (Bst) ATPスルフリラーゼ（E.C.2.7.7.4）およびホタル（*Photinus pyralis*）ルシフェラーゼ（E.C.1.13.12.7）を、Nhe-I-BamH I消化pRSET-Aベクター（Invitrogen）中にクローニングした。BCCP（ビオチンカルボキシル担体タンパク質）遺伝子のコード配列

(Alix, J.H., DNA 8 (10), 779-789 (1989); Muramatsu, S. and Mizuno, T., Nucleic Acids Res.

17 (10), 3982 (1989), Jackowski, S. and Alix, J.H., J. Bacteriol. 172 (7), 3842-3848 (1990);

Li, S.J. and Cronan, J.E. Jr., J. Biol. Chem. 267 (2), 855-863 (1992), Genbank

アクセッション番号 M80458)

を用いて、BCCPタンパク質のアミノ酸87-165に相当する断片を増幅させるためのPCRプライマーを設計した。フォワードプライマーは

5'- ctagctagcatggaagcgccagcagca-3'; SEQ ID NO:42

であり、リバースプライマーは

5'- ccgggatccctcgatgacgaccagcggc-3'; SEQ ID NO:43

であった。PCRカクテルを、各25 μ lの混合物1および混合物2として調製した。混合物1は、プライマー75ピコモル、大腸菌ゲノムDNA 100ngおよびdNTP 5 μ モルを含んでいた。混合物2は、Fidelity Expand DNAポリメラーゼ (Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, Cat.No.1 732 641) 1単位および10 $\times$ Fidelity Expand 緩衝液 (Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) 5 μ lを含んでいた。PCRホットスタートのために、混合物1および混合物2を別々に96 $^{\circ}$ Cで20秒間加熱してから、プールした。プールした反応液を以下のように循環させた。96 $^{\circ}$ Cで3分間インキュベーション、96 $^{\circ}$ Cで30秒、55 $^{\circ}$ Cで1分および68 $^{\circ}$ Cで2分のインキュベーションの10サイクル、次に、96 $^{\circ}$ Cで30秒、60 $^{\circ}$ Cで1分および68 $^{\circ}$ Cで2分のインキュベーションを20サイクル、続いて、72 $^{\circ}$ Cで7分間のインキュベーションの研磨工程。PCR後、単一の250bp断片を得た。BCCP断片を、Nhe IおよびBamH Iで消化し、Nhe I-BamH I消化pRSET-A中にサブクローニングした。

10

【0494】

工程5：スルフリラーゼおよびルシフェラーゼの発現

Bst ATPスルフリラーゼおよびP.pyralisルシフェラーゼオープンリーディングフレームを、Pst I/Hind IIIおよびBamH I/Xho I部位 (5'末端において第1の酵素および3'末端において第2の酵素を用いた) をそれぞれ含むプライマーを用いたPCRにより増幅した。これにより、6 $\times$ HisおよびBCCP領域の、ATPスルフリラーゼおよびルシフェラーゼへのN-末端融合を起こした。酵素を、ビオチン補足成長培地を用いて大腸菌中で発現させて、BCCP領域を介するインビボビオチン化を引き起こした。酵素を、IMACとサイズ排除カラムクトマトグラフィーとを組み合わせて用いて精製して均質に近づけた。精製を、Protein 200 Plusチップ上でAgilent 2100 Bioanalyzerを用いて電気泳動することにより評価した。

20

【0495】

工程6：ルシフェラーゼおよびスルフリラーゼの固相固定

酵素を、ATPスルフリラーゼとルシフェラーゼそれぞれの1:3混合物をインキュベートすることにより、Dynal M-280ストレプトアビジン被覆磁気微粒子 (Dynal, Oslo, Norway) およびBangs微粒子 (300nm) 上に固定した。結合は、TAGE緩衝液 (25mM Tris-酢酸 pH7.8、200mM酢酸アンモニウム、15% v/v グリセロールおよび30% v/v エチレングリセロール) 中で、ATPスルフリラーゼ50 μ gおよびルシフェラーゼ150 μ gをDynal M-280ビーズ1mgまたはBangs微粒子0.6mgと混合することにより行った。混合物を、回転器上で4 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。結合後、ビーズを、酵素溶液中に-20 $^{\circ}$ Cで3ヶ月貯蔵することができた。使用前に、ビーズを、0.1mg/ml子牛血清アルブミン (Sigma, St Louis, MO) を含むルシフェラーゼアッセイ緩衝液中で十分に洗った。固定酵素活性を、ルミノメーター (Turner, Sunnyvale, California) を用いて調べた。洗浄されたビーズを、PTPスライド上に沈着されるまで氷上で貯蔵した。

30

40

【0496】

工程7：PicoTiterPlate (商標) (PTP)

PicoTiterPlate (商標) (25 $\times$ 75 $\times$ 2mm) を、文献に記載の方法と同様の方法で光ファイバー面板を異方性エッチングすることにより製造した。プレートを、26、50および76mmの異なる3種類のマイクロウェルの深さでエッチングした。マイクロウェルの中心間間隔は50 μ mであり、ウェルの直径は39~44 μ mであり、計算されたウェル密度は480ウェル/mm²であった。

【0497】

工程8：PTP充填

DNAテンプレートを持するセファロースビーズおよび、スルフリラーゼおよびルシフェ

50

ラーゼ酵素が固定されたDyna1 M-280/Bangs0.3 μm ビーズ混合物を、遠心分離に基づく方法を用いて、PicoTiterPlateの個々のウェル中に沈着させた。この手順は、底部プレート（スライド位置決めペグ）、エラストマー封止ガスケットおよび、2つの充填口を有する頂部プレートを含む自家製ポリカーボネート固定具（ジグ）を用いた。PTPスライドを、エッチングされた側が上を向くように底部プレート上に置き、所定の位置に封止ガスケットを有する頂部プレートを、PTPスライドの頂部に締め付けた。アセンブリー全体を、4つのプラスチックねじで締めて、水密シールを提供した。シーリングガスケットは、ビーズ沈着用のマスクを形成して、約270,000個のPTPウェルを覆う一つの六角形領域（ $14 \times 43\text{mm}$ ）を得るように設計した。

【0498】

ビーズは順に層を形成するように沈着させた。PTPを、ビーズ洗浄緩衝液中におけるインキュベーションから除去した。層1、すなわち、DNAと酵素ビーズとの混合物を沈着させた。遠心分離後、層1の上澄みを吸引してPTPを除去し、層2であるDyna1酵素ビーズを沈着させた。

【0499】

ビーズ懸濁液を、ssb/Bst pol結合混合物（前記参照）120 μl 中の15,000個のDNA含有セファロースビーズを、0.1mg/mlウシ血清アルブミンを含む合計体積500 μl のルシフェラーゼアッセイ緩衝液中のDyna1-SLおよびBangs-SLビーズ（いずれも10mg/ml）270 μl と混合することにより調製した。ビーズのスラリーをボルテックスにかけ、ピペット口を通してビーズ沈着ジグに流し込んだ。気泡の導入を避けるように注意した。ジグ/PTPアセンブリーを、4位置プレート振り出しローター（4-position plate swing-out rotor）を備えるBeckman Allegra 6遠心分離機において2000rpmで8分間遠心分離した。遠心分離後、ピペットを用いて上澄みをジグチャンバーから注意深く除去した。Dyna1-SLビーズのみの第2の層を沈着させた。この層は、1.5ml管中にDyna1-SL（10mg/ml）125 μl およびビーズ洗浄緩衝液375 μl を含んでいた（2.5mg/ml Dyna1ビーズ）。Dyna1ビーズ混合物を、PTP主活性領域にピペットで入れ、2000rpmで8分間遠心分離した。層2の混合物を吸引し、PTPを、シーケンサーに充填する準備ができるまで、ビーズ洗浄緩衝液（0.1mg/mlウシ血清アルブミンおよび8.5U/Lアピラーゼを含むルシフェラーゼアッセイ緩衝液）中に戻し入れた。

【0500】

工程9：配列決定装置

自家製配列決定装置は、3つの主なアセンブリーを含んでいた。流体サブシステム、PTPカートリッジ/フローチャンバー、および結像サブシステム。流体システムは、試薬貯蔵部、試薬入口ライン、多弁マニホールド、および蠕動性ポンプを含んでいた。これにより、試薬をフローチャンバー中に送達し、一つの試薬を、一度に、予めプログラムされた流量および期間送達することができる。PTPカートリッジ/フローチャンバーを、PTPを付着させた後、PTP頂部（エッチングされた側）およびチャンバー天井との間に300 μm の空間ができるように設計した。これは、試薬およびPTPの温度制御用手段、並びに光密ハウジングを含んでいた。PTPの研磨側を、PTPカートリッジの背面側で露出させ、結像システムと直接接触させて配置した。結像システムは、1-1結像ファイバー束を有するCCDカメラ、並びに、カメラ用の低温冷却システムおよびカメラ制御電気機器を含んでいた。用いたカメラは、Spectral Instruments (Tucson, AZ) シリーズ600カメラであり、Fairchild Imaging LM485 CCD（1600万ピクセル、15 μm ピクセルサイズ）を備えていた。これを、6 μm ファイバーピッチの結像ファイバー束に直接結合させた。カメラを -70°C に冷却し、フレーム転送モードで操作した。このようにして、CCDの中心部分を結像のために用い、CCDの外側部分を、像貯蔵および読み出しのために用いた。CCDの各々の角における4つのポートを通して読み出しを行った。データ取得速度は、30秒当たり1フレームに設定した。フレーム転送シフト時間は約0.25秒であった。全てのカメラ画像を、コンピューターハードドライブ上のUTIFF 16フォーマットで貯蔵した（IBM eServer xSeries 335, IBM, White Plains, NY）。

【0501】

工程10：配列決定ラン条件

配列決定試薬のPTPウェル中への循環的送達、およびウェルからの配列決定反応副産物の洗浄を、流体システムの予めプログラムされた操作により達成した。プログラムは、試薬の名称（Wash、dATP α S、dCTP、dGTP、dTTP、PP_i 標準）、流量および各スクリプト工程の持続時間を特定するMicrosoft Excelスクリプトの形態で書き込んだ。流量は、全ての試薬について3ml/分に設定し、フローチャンバー中の線形速度は概算であった。初期洗浄工程（5分間）に続いて、PP_i 標準のフロー（2分間）、続いて、（Wash-C-Wash-A-Wash-G-Wash-T）を21または42サイクル繰り返した（各ヌクレオチドフローは0.5分であり、洗浄工程は2分であった）。全てのヌクレオチド添加および洗浄のサイクル後、第2のPP_i 標準のフロー（2分）を送達し、続いて、最終的な5分間の洗浄工程を行った。合計ラン時間は4時間であった。このランスクリプトを完了するのに必要な試薬体積を以下に示す。300mlの各洗浄溶液、50mlの各ヌクレオチド溶液、20mlのPP_i 標準溶液。ラン中、全ての試薬を室温に維持した。フローチャンバーおよびフローチャンバー入口管は3℃に維持されたので、フローチャンバーに入る全ての試薬は30℃であった。

10

【0502】

引用文献

Hamilton, S.C., J.W. Farchaus and M.C. Davis. 2001. DNA polymerases as engines for biotechnology. *BioTechniques* 31:370.

QiaQuick Spin Handbook (QIAGEN, 2001): hypertext transfer protocol://world wide web.qiagen.com/literature/handbooks/qqspin/1016893HBQQSpin_PCR_mc_prot.pdf.

20

Quick Ligation Kit (NEB): hypertext transfer protocol://world wide web.neb.com/neb/products/mod_enzymes/M2200.html.

MinElute kit (QIAGEN): hypertext transfer protocol://world wide web.qiagen.com/literature/handbooks/minelute/1016839_HBMinElute_Prot_Gel.pdf.

Biomagnetic Techniques in Molecular Biology, Technical Handbook, 3rd edition (Dynal, 1998): hypertext transfer protocol://world wide web.dynal.no/kunder/dynal/DynalPub36.nsf/cb927fbab127a0ad4125683b004b011c/4908f5b1a665858a41256adf005779f2/\$FILE/Dynabeads M-280 Streptavidin.pdf.

30

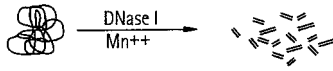
Bio Analyzer User Manual (Agilent): hypertext transfer protocol://world wide web.chem.agilent.com/temp/rad31B29/00033620.pdf

BioAnalyzer DNA and RNA LabChip Usage (Agilent): hypertext transfer protocol://world wide web.agilent.com/chem/labonachip

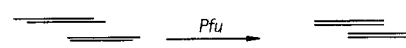
BioAnalyzer RNA 6000 Ladder (Ambion): hypertext transfer protocol://world wide web.ambion.com/techlib/spec/sp_7152.pdf

40

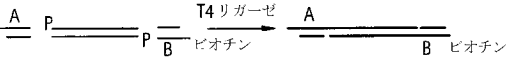
【図 1 A】



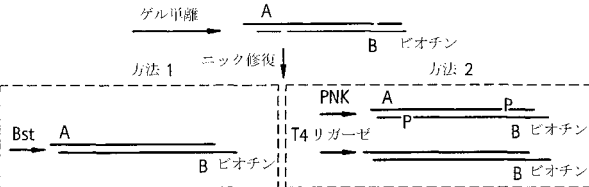
【図 1 B】



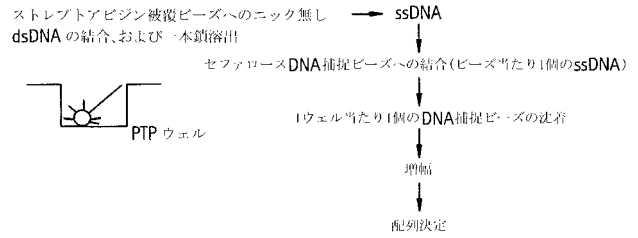
【図 1 C】



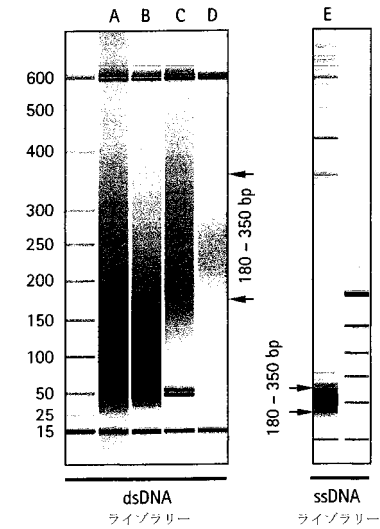
【図 1 D】



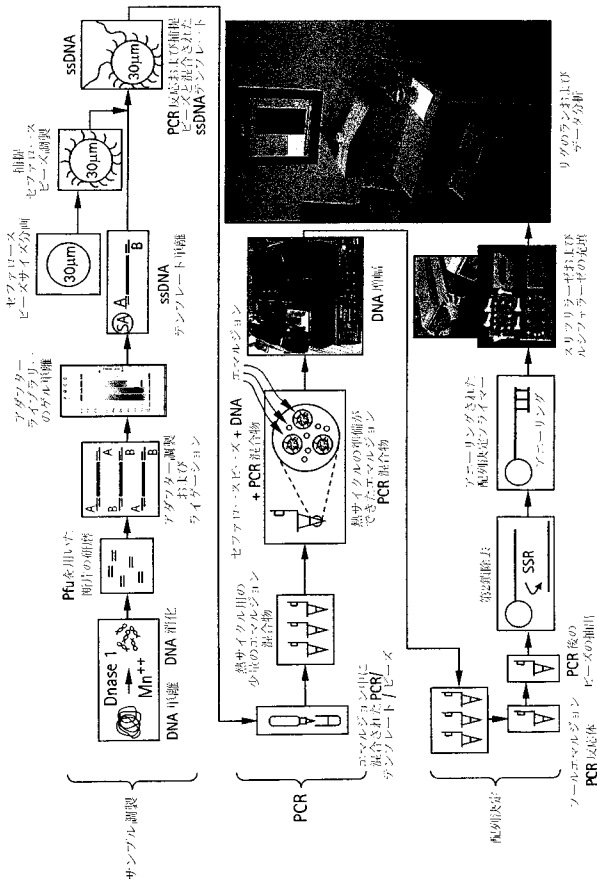
【図 1 E】



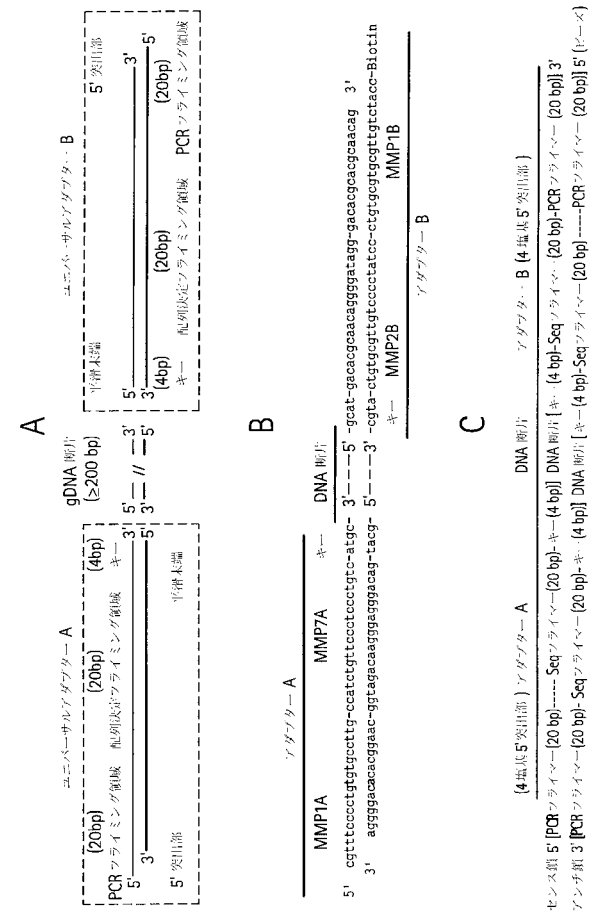
【図 1 F】



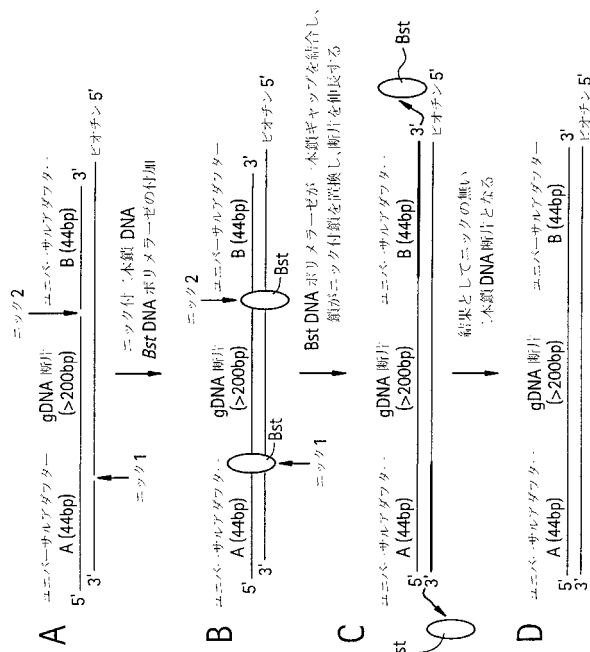
【図 1 G】



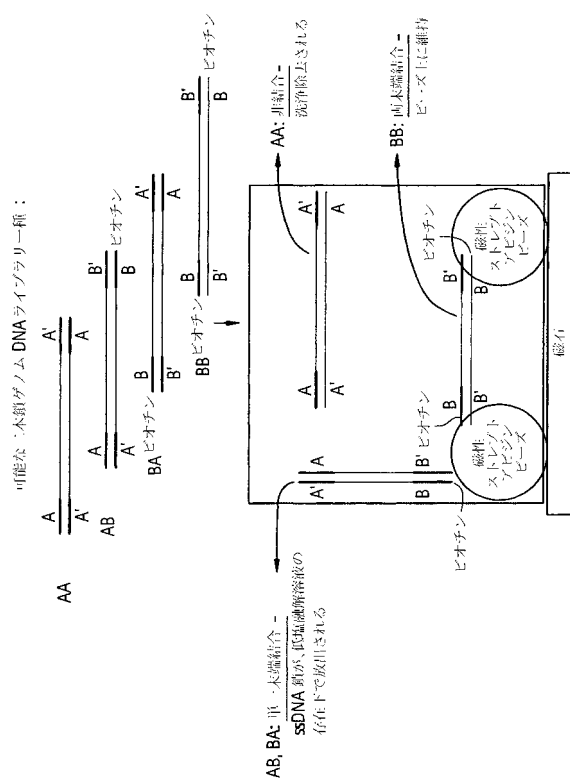
【図 2】



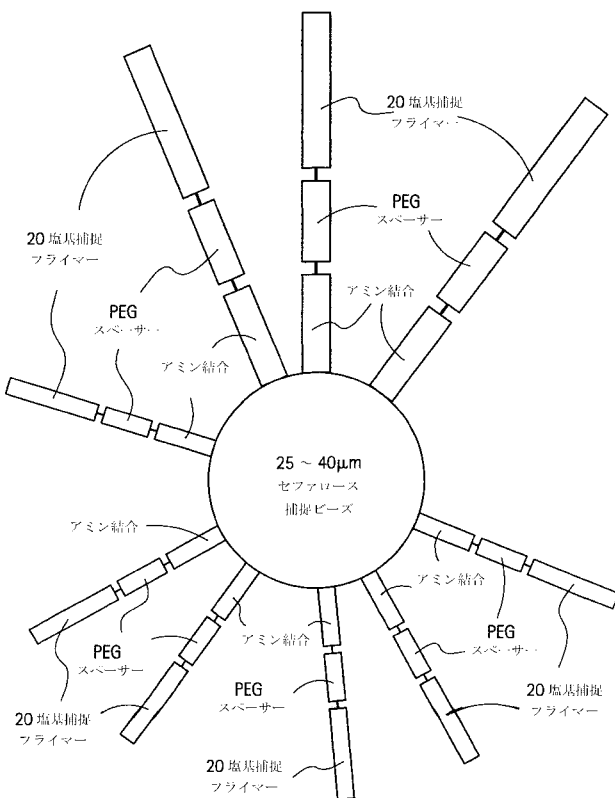
【図 3】



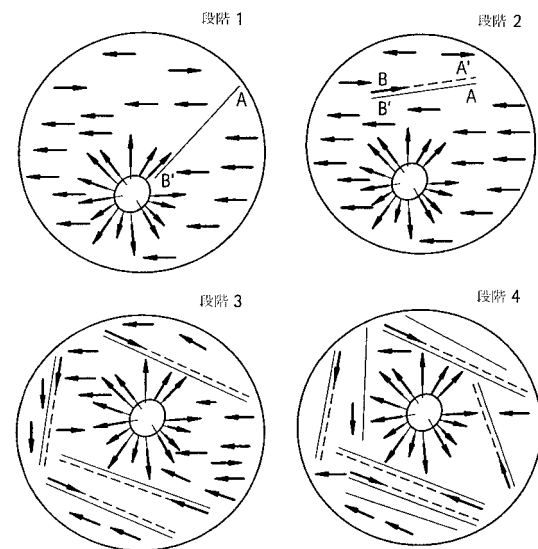
【図 4】



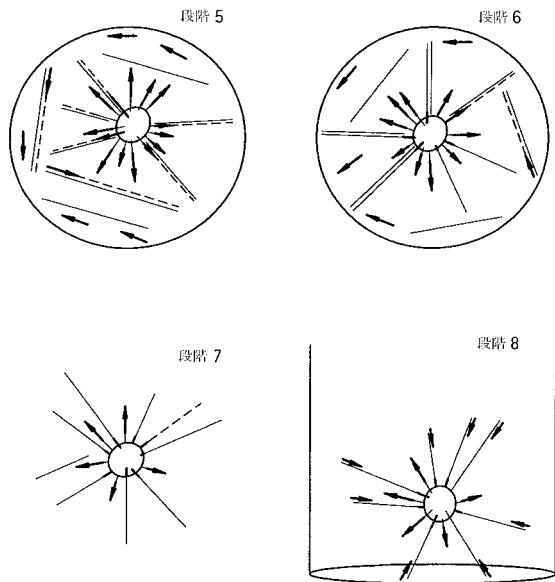
【図 5】



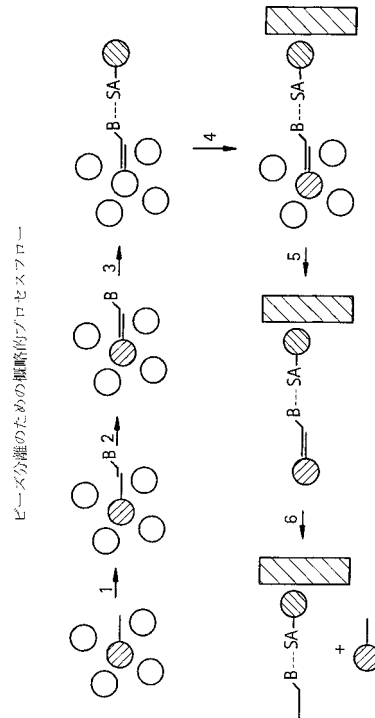
【図 6 A】



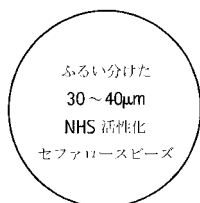
【図 6 B】



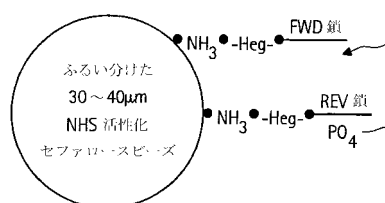
【図 7】



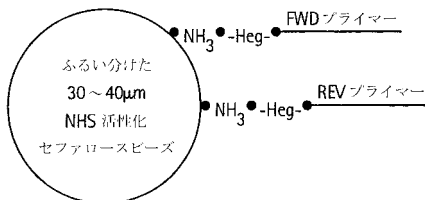
【図 8 A】



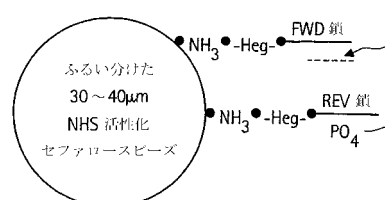
【図 8 D】



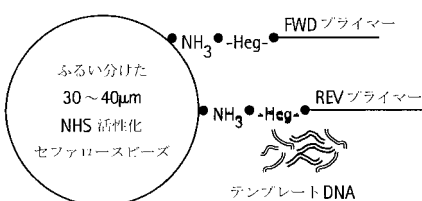
【図 8 B】



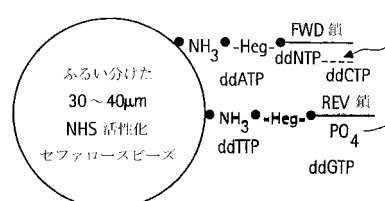
【図 8 E】



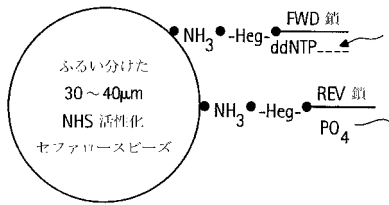
【図 8 C】



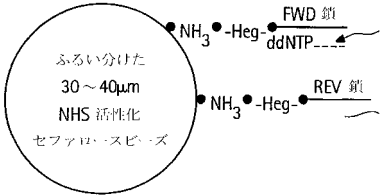
【図 8 F】



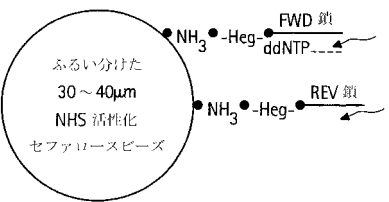
【図 8 G】



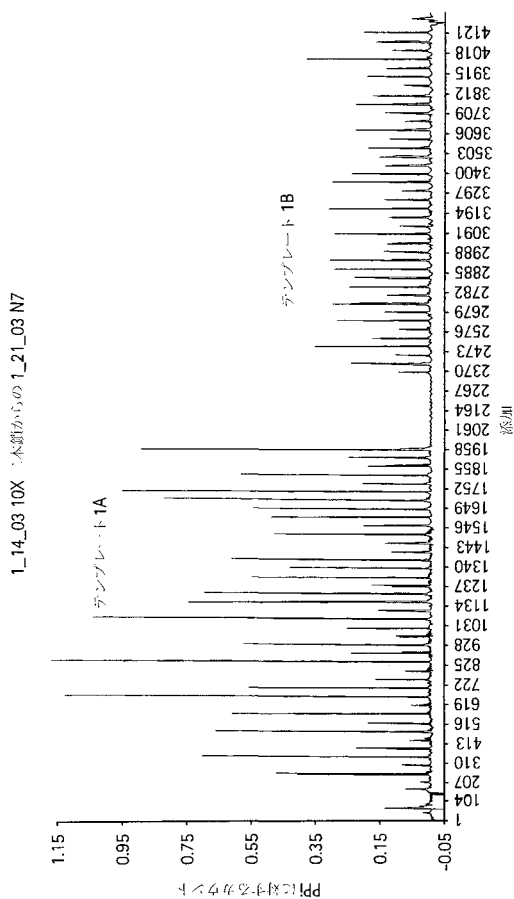
【図 8 H】



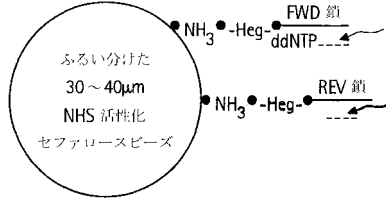
【図 8 I】



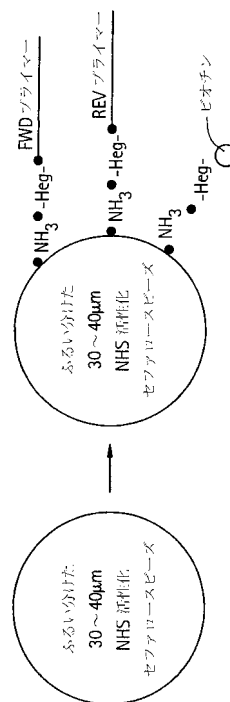
【図 9】



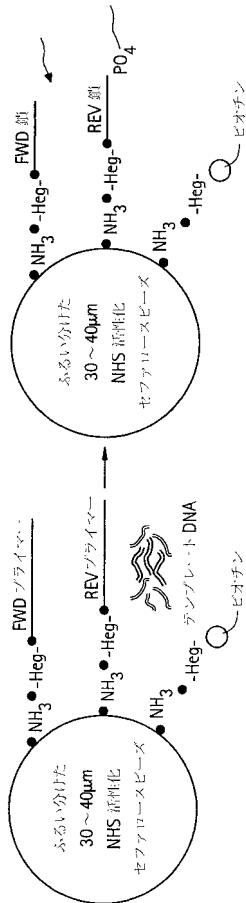
【図 8 J】



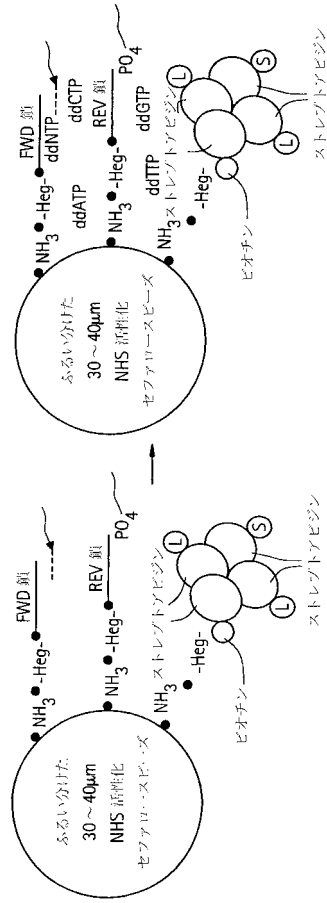
【図 10 A】



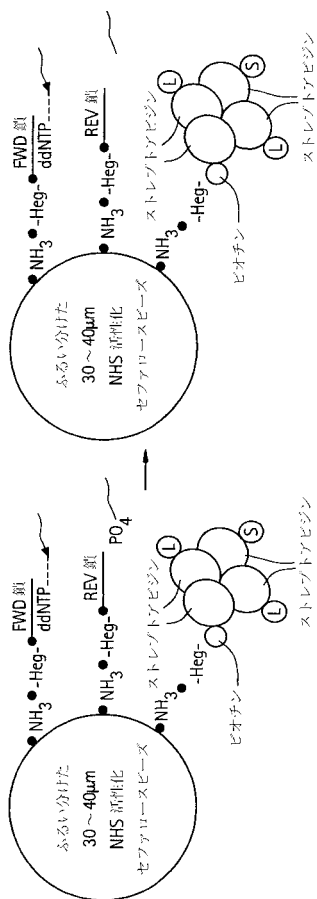
【図 10 B】



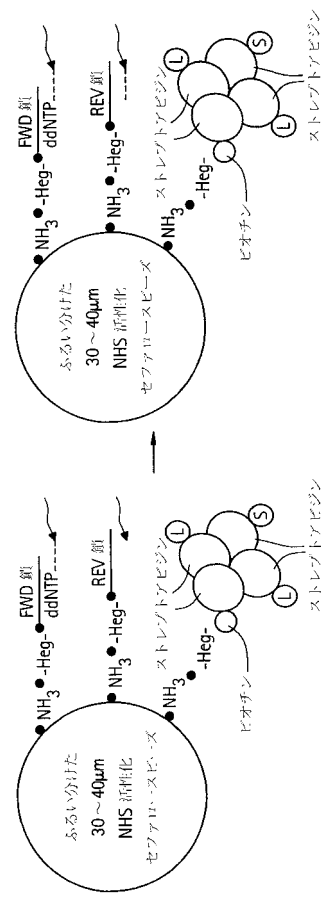
【図 10 C】



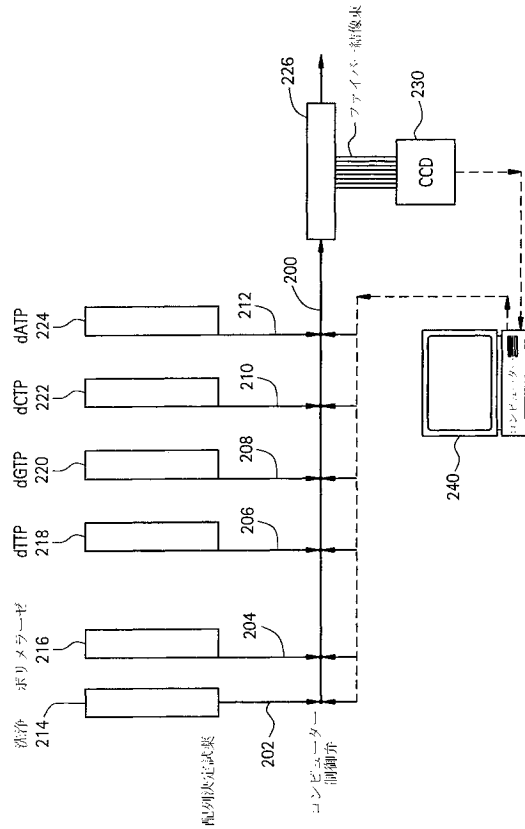
【図 10 D】



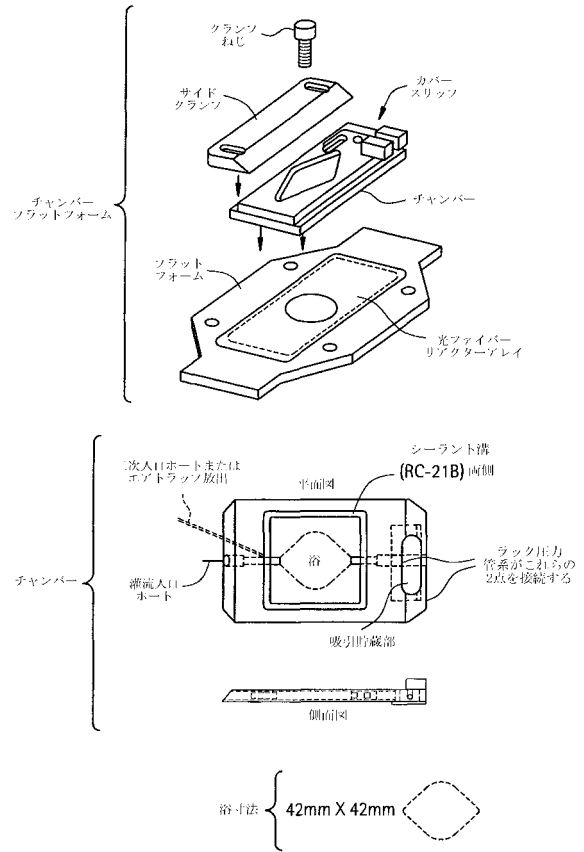
【図 10 E】



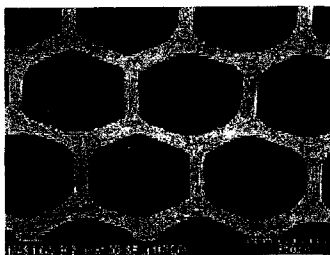
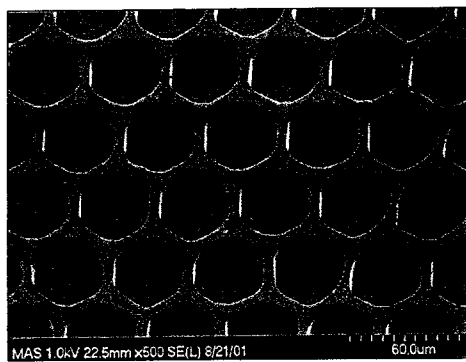
【図 1 2】



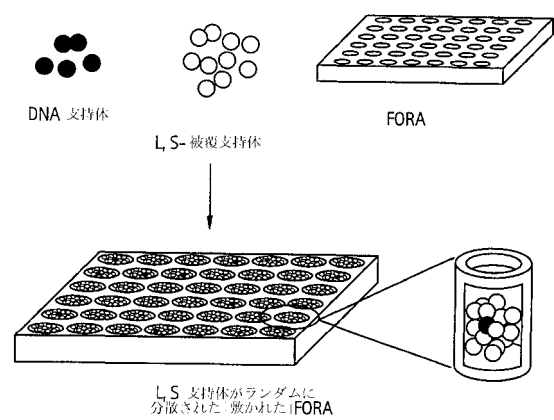
【図 1 3】



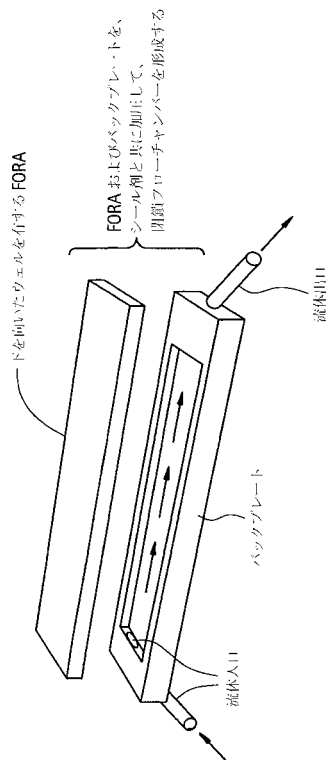
【図 1 4】



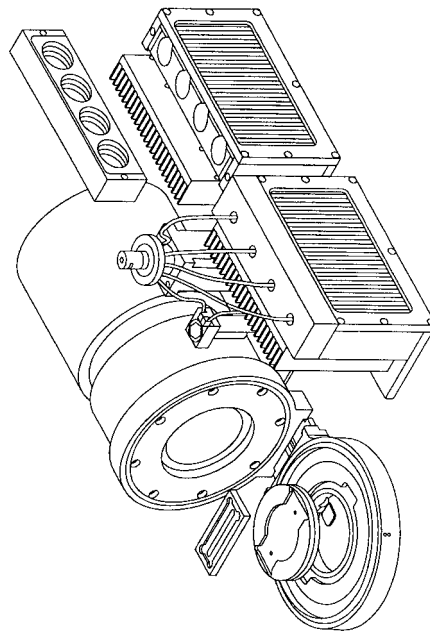
【図 1 5】



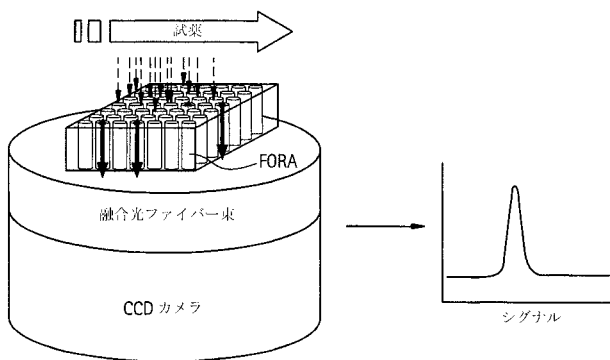
【図 16】



【図 17】



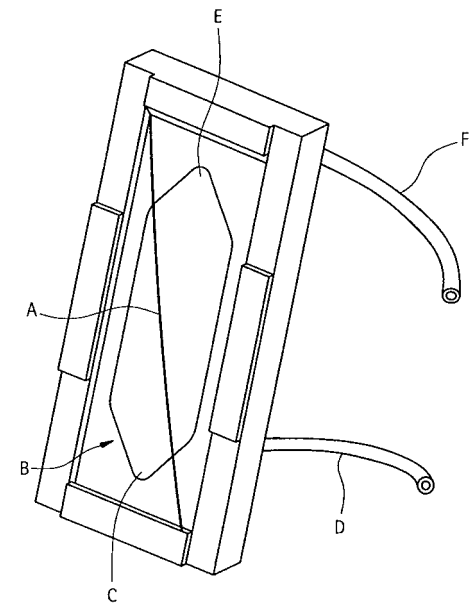
【図 18】



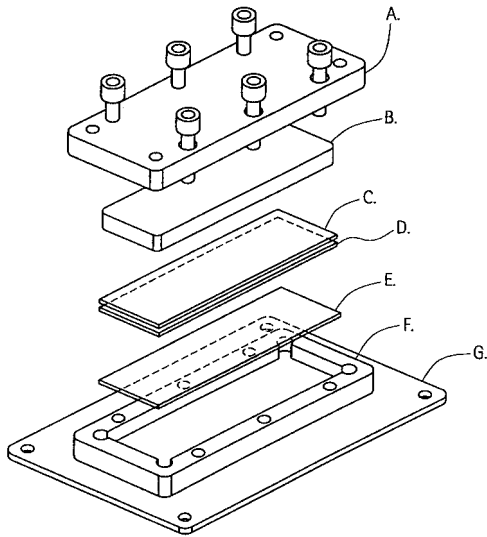
【図 19】



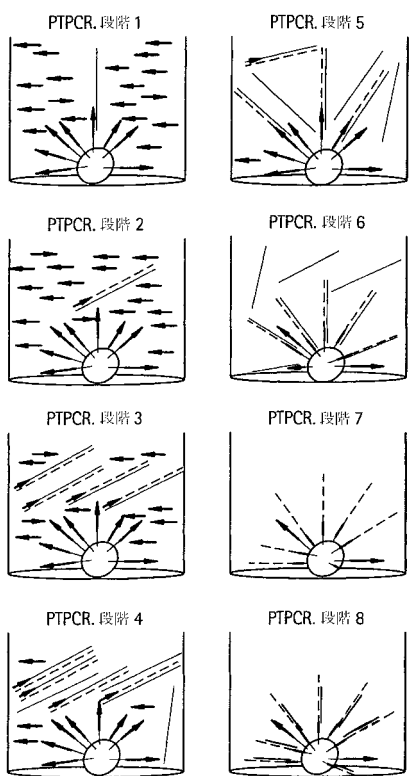
【図 20】



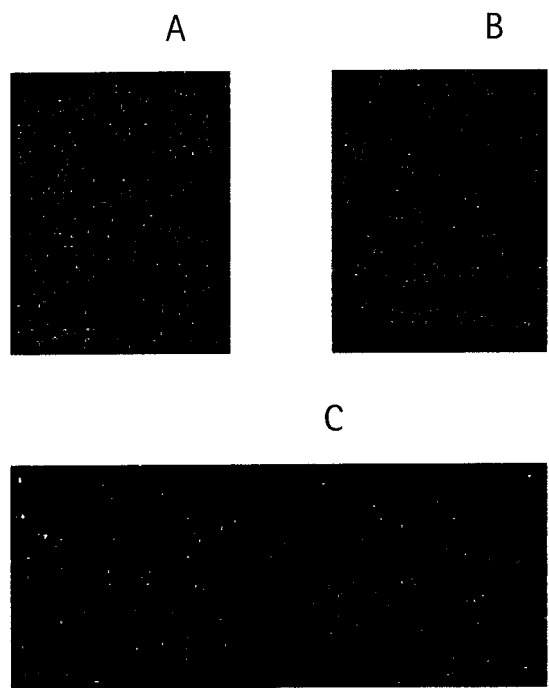
【図 21】



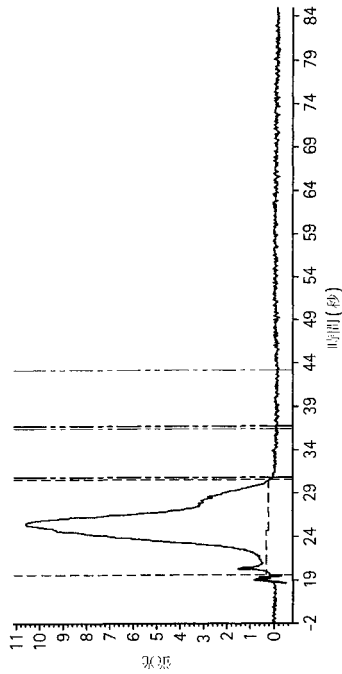
【図 22】



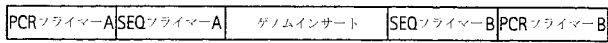
【図 23】



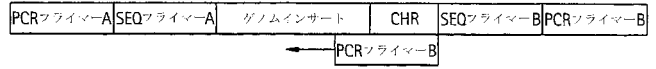
【図 2 4】



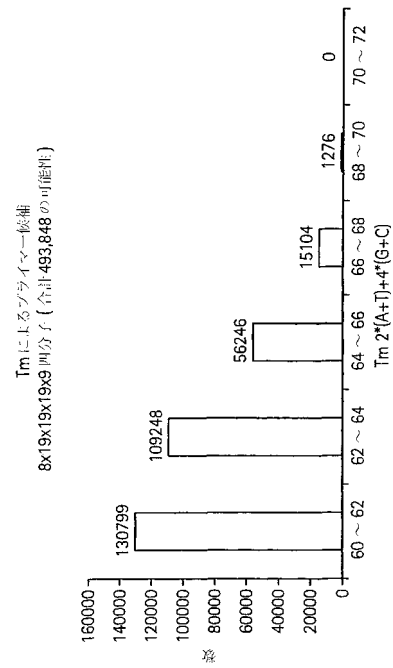
【図 2 5】



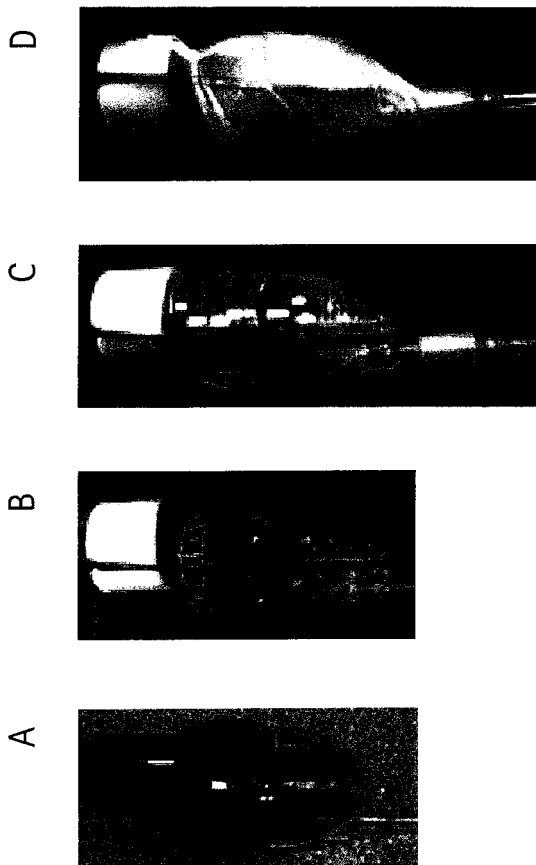
【図 2 6】



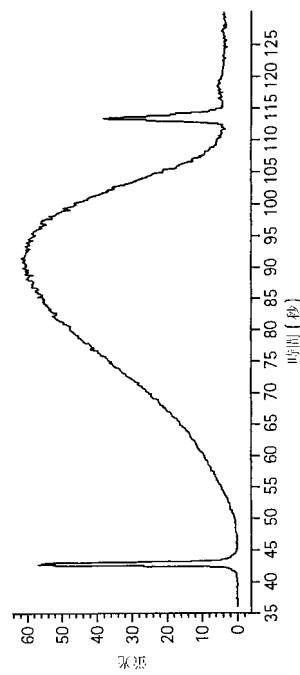
【図 2 7】



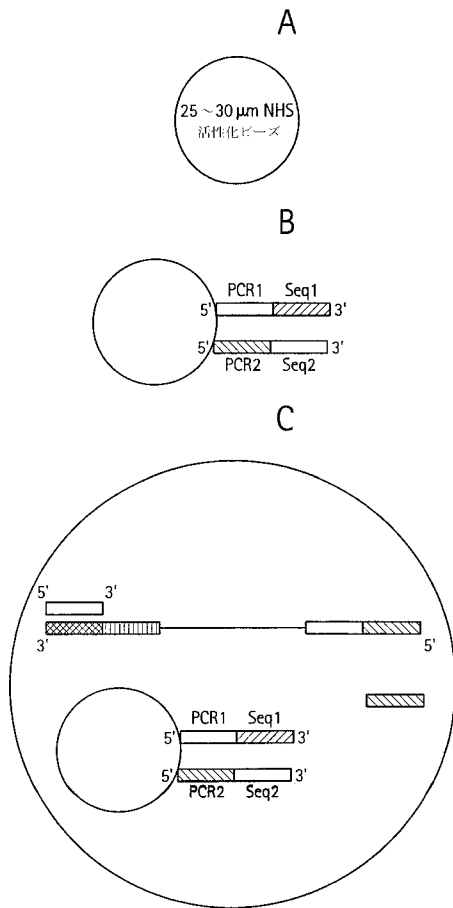
【図 2 8】



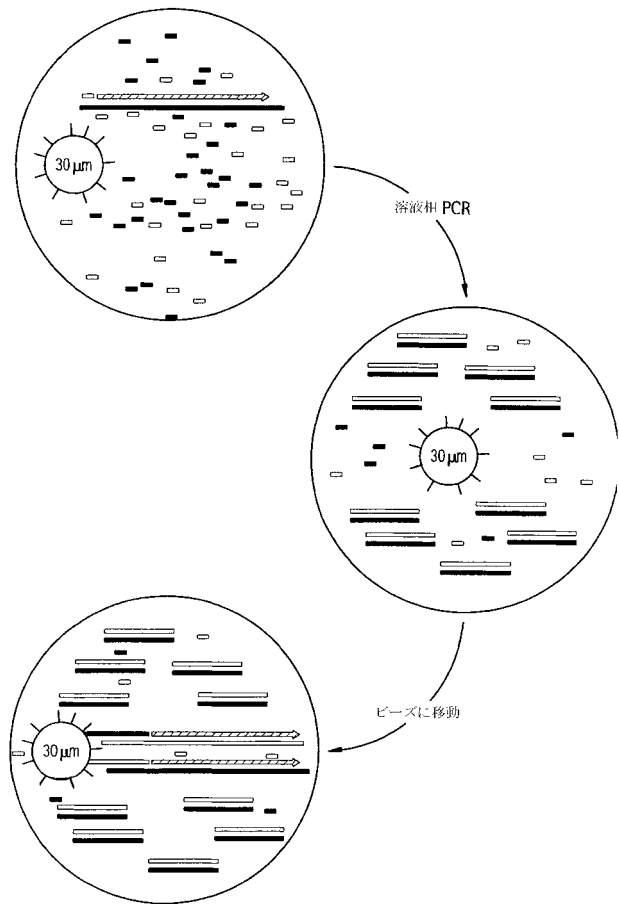
【図 2 9 A】



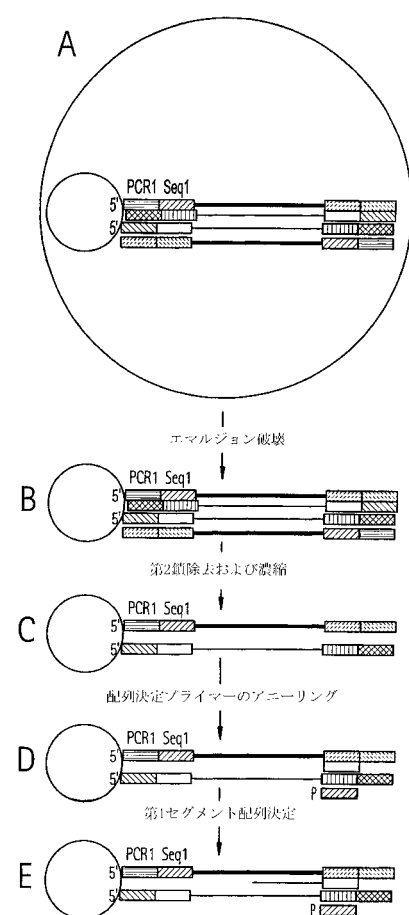
【図 35】



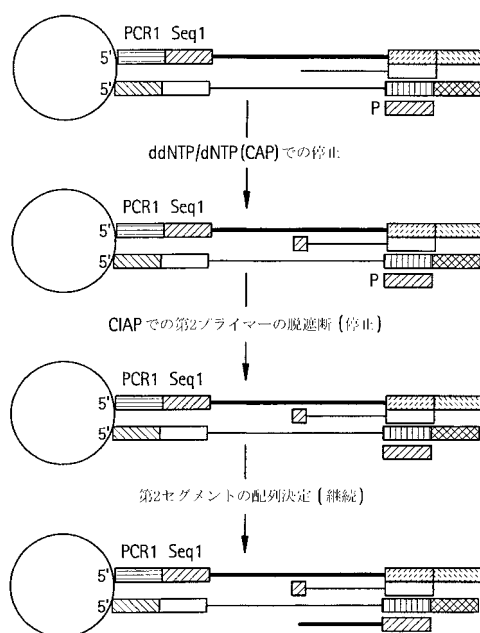
【図 36】



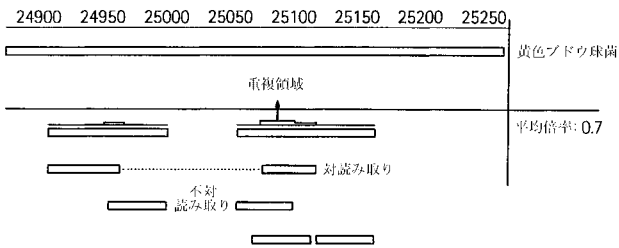
【図 37】



【図 38】



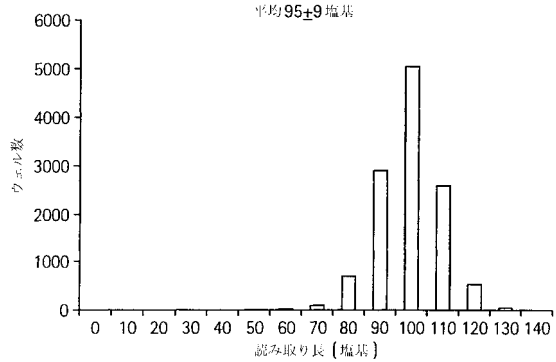
【図 3 9 A】



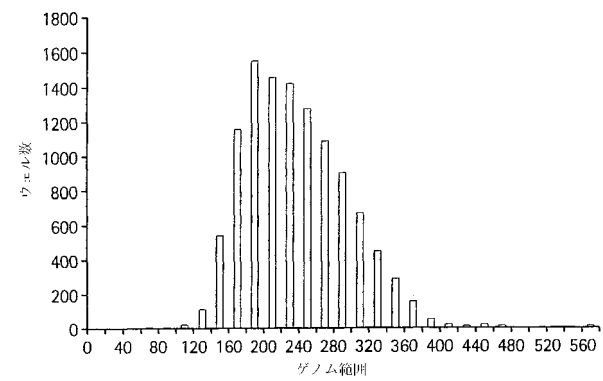
【図 3 9 B】

合計読み取り数	31,785
第1鎖合計	15,770
第2鎖合計	16,015
対形成	11,799
不対読み取り	8,187
合計カバー率	38%

【図 4 0】



【図 4 1】



【図 4 2】

ウェル	ゲノム位置	配向	配列ストリング
00364_0548_2509	571366	F	TATTGTTGATGCTGTAAAAaGAAGCTACTGGTGTAGATTTTATGAAGTT
00364_0548_2509_D2	571512	R	TGCTCAAAGAATTCATTTAAATATGACCATATTTCAATTGTATCTTT
00383_0985_2232	1487890	R	AAGCGAACAGTCAAGTACCACAGTCAGTTGACHTTACACAAGCGGAT
00383_0985_2232_D2	1487769	F	TACAGGTGTTGGTATGCCATTTGCGATTTGTCGCTTGGTTAGCCG
00397_0940_2923	2611033	F	AACATATAAACATCCCTATCTCAATTTCCGCTTCCATGTAAaCAAAAAAAGC
00397_0940_2923_D2	2611164	R	TAGATATCACTTGCCTGTTACTGGTAATGCAGGCATGAG
00417_0611_1933	122001	R	ATTCAACTCTGGAATGCTTCTTGATACGCCCTCGATGATG
00417_0611_1933_D2	121930	F	GATGAGGAGCTGCAATGGCAATGGTTAAAGGCATCATCG
00434_0595_0993	2022591	R	TGTATCTCGATTGGATTAGTTGCTTTTGCATCTTCATTAGACC
00434_0595_0993_D2	2022473	F	CATTAAACATCTGCCACAGAAATAGCTTCTAATACGATTGC
00443_1003_0754	107373	F	GCACGACGTCAGCTAATAACGCTGCACCTAAGGCTAATGATAAT
00443_1003_0754_D2	107502	R	AAACCATGCAGATGCTAAaAAAGCTCAAGCATTACAGAAACT
00454_1257_3047	59038	R	TGTTGCTGCATCATAATTTAATACTACATCATTTAATCTTTGG
00454_1257_3047_D2	58880	F	GCAGATGGTGTGACTAACCAAGTTGGTCAAAATGCCCTAAATACAAAAGAT

【配列表】

2010142233000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年1月22日(2010.1.22)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数の空洞を上にも有する平坦表面を含むアレイであって、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、反応チャンバーは20～100 μm の中心間間隔を有し、各空洞は少なくとも一つの寸法においてその幅が20 μm ～70 μm であり、少なくとも10,000個の反応チャンバーが存在する、アレイ。

【請求項 2】

複数の反応チャンバーが、単一種の一本鎖核酸テンプレートを少なくとも100,000コピー含む、請求項1記載のアレイ。

【請求項 3】

一本鎖核酸テンプレートが、反応チャンバー内に配置された可動性固体支持体上で固定されている、請求項2記載のアレイ。

【請求項 4】

中心間間隔が40～60 μm である、請求項1記載のアレイ。

【請求項 5】

各空洞の深さが20 μm ～60 μm である、請求項1記載のアレイ。

【請求項 6】

平坦頂部表面と平坦底部表面とを含むアレイであって、平坦頂部表面はその上に少なくとも10,000個の空洞を有し、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、平坦底部表面は反応チャンバーからの光学的シグナルを底部平坦表面を通して検出することができるように光学的に伝導性であり、頂部表面と底部表面との間の距離が5mmを超えず、反応チャンバーは20～100 μm の中心間間隔を有し、各チャンバーの幅は少なくとも一つの寸法において20 μm ～70 μm である、アレイ。

【請求項 7】

頂部表面と底部表面との間の距離が2mmを超えない、請求項6記載のアレイ。

【請求項 8】

空洞の数が50,000を超える、請求項1または6記載のアレイ。

【請求項 9】

空洞の数が100,000を超える、請求項1または6記載のアレイ。

【請求項 10】

各反応チャンバーの形状が実質的に六角形である、請求項1または6記載のアレイ。

【請求項 11】

各空洞が少なくとも一つの不規則な壁面を有する、請求項1または6記載のアレイ。

【請求項 12】

アレイが溶融光ファイバー束内に形成される、請求項1または6記載のアレイ。

【請求項 13】

各空洞が平滑壁面を有する、請求項1または6記載のアレイ。

【請求項 14】

光ファイバー束の一端をエッチングすることにより空洞が形成される、請求項1または6記載のアレイ。

【請求項 15】

各空洞が核酸またはタンパク質を分析するための試薬を含む、請求項1または6記載のアレイ。

【請求項 16】

アレイ上に流動チャンバーが形成されるように平坦アレイから間隔を空けられ、かつそれと対向して接している第二の表面をさらに含む、請求項1または6記載のアレイ。

【請求項 17】

水性環境中において別々の並行共通反応を行うためのアレイ手段であって、該アレイ手段が、試薬と反応することができる出発材料を含む少なくとも10,000の別個の反応チャンバーを含む基質を含み、各反応チャンバーが、少なくとも一つの試薬を含む一つまたは複数の流体が各反応チャンバー中に送達されたときに、該試薬がウェルから拡散して出る拡散時間が、出発材料が試薬と反応して産物を形成するのに必要な時間を超えるような寸法にされている、アレイ手段。

【請求項 18】

各空洞が核酸またはタンパク質を分析するための試薬を含む、請求項17記載のアレイ。

【請求項 19】

反応チャンバー内に配置された可動性固体支持体の集団をさらに含み、各可動性固体支持体はそこに付着された一つまたは複数の生物活性剤を有する、請求項17記載のアレイ。

【請求項 20】

空洞が、エッチング、成形、または微細機械加工により基質中に形成される、請求項17記載のアレイ。

【請求項 21】

基質が光ファイバー束である、請求項8記載のアレイ。

【請求項 22】

反応チャンバーの少なくとも5%~20%が、少なくとも一つの試薬が上に固定された少なくとも一つの可動性固体支持体を含む、請求項1、6または17記載のアレイ。

【請求項 23】

反応チャンバーの少なくとも20%~60%が、少なくとも一つの試薬が上に固定された少なくとも一つの可動性固体支持体を有する、請求項1、6または17記載のアレイ。

【請求項 24】

反応チャンバーの少なくとも50%~100%が、少なくとも一つの試薬が上に固定された少なくとも一つの可動性固体支持体を有する、請求項1、6または17記載のアレイ。

【請求項 25】

可動性固体支持体上に固定された試薬が、スルフリラーゼ活性を有するポリペプチドである、請求項22記載のアレイ。

【請求項 26】

可動性固体支持体上に固定された試薬が、ルシフェラーゼ活性を有するポリペプチドである、請求項22記載のアレイ。

【請求項 27】

可動性固体支持体が、固定されたスルフリラーゼとルシフェラーゼの両方を有する、請求項22記載のアレイ。

【請求項 28】

複数の反応チャンバーが、単一種の一本鎖核酸テンプレートを少なくとも100,000コピー含む、請求項22記載のアレイ。

【請求項 29】

一本鎖核酸テンプレートが、反応チャンバー内に配置された可動性固体支持体上に固定されている、請求項22記載のアレイ。

【請求項 30】

核酸が、ピロシーケンシング反応(pyrosequencing reaction)に用いるのに適している、請求項1、6または17記載のアレイ。

【請求項 31】

生物活性剤をアレイに送達する方法であって、各可動性固体支持体の上に少なくとも一つの試薬が固定されている複数の可動性固体支持体をアレイ上に分散させる工程を含み、該試薬は核酸配列決定反応での使用に適し、該アレイは複数の反応チャンバーが上に配置された平坦表面を含み、該反応チャンバーの中心間隔は20～100 μm であり、各反応チャンバーの幅は少なくとも一つの寸法において20 μm ～70 μm である、方法。

【請求項 3 2】

反応が特定の部位で起こっていることを示す光について反応チャンバーのアレイを同時にモニターする装置であって、

(a) 空洞を設けた複数の表面を含む平坦基材から形成された反応チャンバーのアレイであって、空洞を設けた各表面が、分析体を含むように適合された反応チャンバーを形成し、かつ反応チャンバーの中心間隔が20～100 μm であり、各反応チャンバーの体積が10～150pLであり、10,000個を超える別々の反応チャンバーを含む、アレイ；

(b) 使用時に、特定の反応チャンバーからの光が、光学的感受性装置の特定の所定の領域に衝突するように配列された光学的感受性装置；

(c) 該所定の領域の各々に衝突する光レベルを決定するための手段；および

(d) 該反応チャンバーの各々について、該光レベルの経時変動を記録するための手段を含む装置。

【請求項 3 3】

(a) 空洞を設けた複数の表面を一端に有する光ファイバーの第1の束から形成されるアレイであって、空洞を設けた各表面が、分析体を含むように適合された反応チャンバーを形成し、該反応チャンバーの中心間隔が20～100 μm であり、幅が20～70 μm であり、10,000個を超える別々の反応チャンバーを含む、アレイ；

(b) 反応チャンバー内において光を発生させるための酵素的または蛍光的手段；

(c) 光捕捉手段と、光検出手段に光を伝達するための第2の光ファイバー束とを含む光検出手段であって、個々の反応チャンバー内において発生した光が、光捕捉手段に伝達するための第2の光ファイバー束の別々のファイバーまたは別々のファイバー群より捕捉されるように、第2の光ファイバー束がアレイと光学的に接触している、光検出手段を含む、分析センサー。

【請求項 3 4】

生化学的アッセイにおける使用に適している、請求項33記載のセンサー。

【請求項 3 5】

細胞に基づくアッセイにおける使用に適している、請求項33記載のセンサー。

【請求項 3 6】

光捕捉手段がCCDカメラである、請求項33記載のセンサー。

【請求項 3 7】

反応チャンバーが、生物活性剤が上に固定された一つまたは複数の可動性固体支持体を含む、請求項33記載のセンサー。

【請求項 3 8】

水性環境中で、別々の並行共通反応を行うための方法であって、

(a) 少なくとも一つの試薬を含む流体をアレイに送達する工程であって、該アレイは、少なくとも10,000個の別々の反応チャンバーを含む基質を含み、各反応チャンバーは分析体を含むように適合されており、反応チャンバーは体積が10～150pLであり、かつ試薬と反応することができる出発材料を含み、反応チャンバーの各々は、流体が各反応チャンバー中に送達されたときに、該試薬がウェルから拡散して出る拡散時間が、出発材料が試薬と反応して産物を形成するのに必要な時間を超えるような寸法にされている、工程；および

(b) (i) 各反応チャンバーにおいて出発材料が試薬と反応して産物を形成した後であるが (ii) いずれか一つの反応チャンバーに送達された試薬が該反応チャンバーから拡散して出て他の反応チャンバーに入る前の期間に、アレイから流体を洗う工程

を含む方法。

【請求項 39】

いずれか一つの反応チャンバーにおいて形成された産物が、他のいずれかの反応チャンバーにおいて形成された産物から独立しているが、一つまたは複数の共通の試薬を用いて生成する、請求項38記載の方法。

【請求項 40】

出発材料が核酸配列であり、流体中の少なくとも一つの試薬がヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体である、請求項38記載の方法。

【請求項 41】

流体が、核酸配列とヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を反応させることができるポリメラーゼをさらに含む、請求項38記載の方法。

【請求項 42】

工程 (a) および (b) を順次繰り返す工程をさらに含む、請求項38記載の方法。

【請求項 43】

核酸配列決定酵素をアレイに送達するための方法であって、該アレイが複数の空洞を上にも有する平坦表面を有し、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間隔が20～100 μm であり、該方法は、複数の反応チャンバーが少なくとも一つの可動性固体支持体を含むように、一つまたは複数の核酸配列決定酵素が上に固定された複数の可動性固体支持体をアレイ上に分散させる工程を含む、方法。

【請求項 44】

核酸配列決定酵素の一つが、スルフリラーゼ活性、ルシフェラーゼ活性またはその両方を有するポリペプチドである、請求項43記載の方法。

【請求項 45】

複数の核酸テンプレートをアレイに送達するための方法であって、該アレイが複数の空洞を上にも有する平坦表面を有し、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間隔が20～100 μm であり、アレイは少なくとも10,000個の反応チャンバーを有し、該方法は、複数の可動性固体支持体をアレイ上に分散させる工程を含み、各可動性固体支持体は一種のみの核酸テンプレートがその上に固定されており、分散は、一つの可動性固体支持体のみをいずれか一つの反応チャンバー内へ配置させる、方法。

【請求項 46】

核酸配列が一本鎖核酸である、請求項45記載の方法。

【請求項 47】

単一種の核酸テンプレートの少なくとも100,000個のコピーを、複数の可動性固体支持体上に固定する、請求項45記載の方法。

【請求項 48】

反応チャンバー中に配置された後に、単一種の核酸テンプレートの各々をピコタイタープレート上で増幅して、ウェル1つ当たり少なくとも2,000,000個の該核酸テンプレートのコピーを生成する、請求項45記載の方法。

【請求項 49】

ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応および等温DNA増幅からなる群より選択される増幅技術を用いて核酸配列を増幅させる、請求項48記載の方法。

【請求項 50】

核酸の配列を決定する方法であって、

(a) 平坦表面上の複数の空洞中に配置された複数の一本鎖核酸テンプレートを提供する工程であって、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、該反応チャンバーの中心間隔が20～100 μm であり、かつ平坦表面は少なくとも10,000個の反応チャンバーを有する、工程；

(b) 有効量の配列決定プライマーを核酸テンプレートにアニーリングし、配列決定プライマーをポリメラーゼおよび所定のヌクレオチド三リン酸を用いて伸長させて配列決定産物を産生させ、かつ所定のヌクレオチド三リン酸が該配列決定プライマーの3'末端に組

み込まれる場合は、配列決定反応副産物を産生することにより、全ての反応チャンバー上においてピロリン酸に基づく配列決定反応を同時に行う工程；

(c) 配列決定反応副産物を同定し、それにより、各反応チャンバー中の核酸の配列を決定する工程を含む方法。

【請求項 5 1】

配列決定反応副産物がPPiであり、検出のための光を発生させるためにスルフリラーゼ/ルシフェラーゼ共役反応を用いる、請求項50記載の方法。

【請求項 5 2】

スルフリラーゼおよびルシフェラーゼのいずれかまたは両方が、各反応部位において配置された一つまたは複数の可動性固体支持体上に固定される、請求項51記載の方法。

【請求項 5 3】

アレイ上の複数のヌクレオチドの塩基配列を決定する方法であって、

(a) 平坦表面上の複数の空洞内に各々別々に配置された少なくとも10,000個のDNAテンプレートを提供する工程であって、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間間隔が20~100 μm であり、体積が10~150pLである、工程；

(b) 活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体をプライマー鎖の3'-末端に組みこむことができる反応条件下において、一つの既知の窒素性塩基の活性化ヌクレオチド5'-三リン酸前駆体を各反応チャンバー中の反応混合物に添加する工程であって、各反応混合物が、テンプレート依存性ヌクレオチドポリメラーゼ、および、テンプレートより少なくとも一ヌクレオチド残基短い相補性オリゴヌクレオチドプライマー鎖にハイブリダイズし、プライマー鎖の3'末端で各テンプレート中に少なくとも一つの不對ヌクレオチド残基が形成する、一本鎖ポリヌクレオチドテンプレートを含む、工程（ただし、活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の窒素性塩基は、テンプレートの不對ヌクレオチド残基の窒素性塩基に相補的である）；

(c) ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体がプライマー鎖中に組み込まれたかどうか検出する工程であって、ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の組み込みは、テンプレートの不對ヌクレオチド残基が、組み込まれたヌクレオシド5'-三リン酸前駆体に相補的な窒素性塩基組成を有することを示す、工程；ならびに

(d) 工程 (b) および (c) を順次繰り返す工程であって、各順次繰り返しが、既知の窒素性塩基組成の活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の一つの種類の組み込みを増加し、かつ検出する工程；ならびに

(e) 該ヌクレオシド前駆体の組み込みの配列から、各反応チャンバー中でテンプレートの不對ヌクレオチド残基の塩基配列を決定する工程を含む方法。

【請求項 5 4】

テンプレートDNAのDNA配列中の標的位置における塩基を同定する方法であって、

(a) 少なくとも10,000個の別々のDNAテンプレートが、平坦表面上の複数の空洞中に別々に配置され（各空洞は分析体反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間間隔は20~100 μm であり、該DNAは、反応チャンバー中に配置される前または後に一本鎖にされる）；

(b) 該標的位置に直接隣接する位置で固定化一本鎖DNAにハイブリダイズする伸長プライマーが提供され；

(c) 該固定化一本鎖DNAが、所定のデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドの存在下でポリメラーゼ反応に供され、所定のデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドが配列決定プライマーの3'末端に組み込まれると、配列決定反応副産物が形成され；かつ

(d) 配列決定反応副産物を同定し、それにより、10,000個のDNAテンプレートの各々における標的位置の塩基に相補的なヌクレオチドを決定する、方法。

【請求項 5 5】

デオキシまたはジデオキシアデノシン三リン酸（ATP）の代わりに、ポリメラーゼ用の基質として作用することができるが、該PPi-検出酵素用の基質として作用することはできないdATPまたはddATP類似体を用いる、請求項54記載の方法。

【請求項 5 6】

核酸配列を分析するための装置であって、

(a) 試薬送達キュベットであって、該キュベットが、複数の空洞を上にも有する平坦表面を含むアレイを含み、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間間隔が20~100 μm であり、10,000個を超える反応チャンバーがあり、配列決定反応に用いるための試薬を含む、試薬送達キュベット；

(b) 試薬送達キュベットと連通している試薬送達手段；

(c) 試薬送達チャンバーと連通している結像システム；および

(d) 結像システムと連通しているデータ収集システム

を含む装置。

【請求項 5 7】

アレイ上の複数のヌクレオチドの塩基配列を決定するための装置であって、

(a) 平坦表面上に複数の空洞を含む試薬キュベットであって、各空洞が分析体反応チャンバーを形成し、10,000個を超える反応チャンバーがあり、その各々の中心間間隔が20~100 μm であり、かつ体積が10~150pLである、試薬キュベット；

(b) 活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体をプライマー鎖の3'-末端に組み込むことができる反応条件下において、各反応チャンバーに一つの既知の窒素性塩基の活性化ヌクレオチド5'-三リン酸前駆体を各反応チャンバー中の反応混合物に同時に添加するための試薬送達手段であって、各反応混合物が、テンプレート依存性ヌクレオチドポリメラーゼ、および、テンプレートより少なくとも一ヌクレオチド残基短い相補性オリゴヌクレオチドプライマー鎖にハイブリダイズし、プライマー鎖の3'末端で各テンプレート中に少なくとも一つの不對ヌクレオチド残基を形成する、一本鎖ポリヌクレオチドテンプレートを含む、手段（ただし、活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の窒素性塩基は、テンプレートの不對ヌクレオチド残基の窒素性塩基に相補的である）；

(c) 各反応チャンバーにおいてヌクレオシド5'-三リン酸前駆体がプライマー鎖中に組み込まれたかどうか検出するための検出手段であって、ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の組み込みは、テンプレートの不對ヌクレオチド残基が、組み込まれたヌクレオシド5'-三リン酸前駆体に相補的な窒素性塩基組成を有することを示す、検出手段；

(d) 工程 (b) および (c) を順次繰り返すための手段であって、各順次繰り返しは、既知の窒素性塩基組成の活性化ヌクレオシド5'-三リン酸前駆体の一つの種類の組み込みを増加し、かつ検出する、手段；および

(e) 該ヌクレオシド前駆体の組み込みの配列から、各反応チャンバー中で同時にテンプレートの不對ヌクレオチド残基の塩基配列を決定するための、データ処理手段を含む装置。

【請求項 5 8】

複数の分析体を処理するための装置であって、該装置は、

(a) 光ファイバー束上に空洞を設けた少なくとも50,000個の表面を含む基質の中に配置されたフローチャンバーであって、空洞を設けた各表面が、分析体を含むように適合された反応チャンバーを形成し、反応チャンバーの中心間間隔が20~100 μm であり、かつ直径が20~70 μm である、フローチャンバー；

(b) 一つまたは複数の貯蔵器からの処理試薬を、反応チャンバー中に配置された分析体が試薬に曝されるように、フローチャンバーに送達するための流体手段；および

(c) 反応チャンバーの各々からの光シグナルの配列を同時に検出するための検出手段であって、配列の各光シグナルは、処理試薬と反応チャンバー中に配置された分析体との間の相互作用を示し、検出手段が空洞を設けた表面と連通している、検出手段を含む装置。

【請求項 5 9】

検出手段がCCDカメラである、請求項58記載の装置。

【請求項60】

分析体が核酸である、請求項58記載の装置。

【請求項61】

分析体が、反応チャンバー中に配置された一つまたは複数の可動性固体支持体上に固定されている、請求項58記載の装置。

【請求項62】

処理試薬が、一つまたは複数の可動性固体支持体上に固定されている、請求項58記載の装置。

【請求項63】

核酸の配列を決定するための方法であって、

(a) 少なくとも50,000個の別々の反応部位を有するアレイ中に、複数の一本鎖核酸テンプレートを提供する工程；

(b) 核酸テンプレートを、発光と共役するピロリン酸に基づく配列決定反応を行うのに必要な試薬に接触させる工程；

(c) 光学的感受性装置のそれぞれの部分上における複数の反応部位から放出された光を検出する工程；

(d) 該光学的感受性装置の該部分の各々に衝突する光を、他の全ての反応部位からのシグナルと区別できる電気シグナルに転換する工程；

(e) 核酸テンプレートの配列を、別々の反応部位の各々についての発光に基づき、対応する電気シグナルから決定する工程を含む方法。

【請求項64】

核酸の配列を決定する方法であって、

(a) 大きなテンプレート核酸分子を断片化して複数の断片化核酸を生成する工程；

(b) 複数の断片化核酸の一つの鎖を個々にビーズに付着させて、個々にビーズに付着した一本鎖核酸を生成する工程；

(c) 個々にビーズに付着した一本鎖断片化核酸の集団を、平坦表面上の少なくとも10,000個の反応チャンバーのアレイに送達する工程であって、複数のウェルが、一本鎖断片化核酸を有する一つのビーズしか含まない工程；

(d) 複数の反応チャンバー上において配列決定反応を同時に行う工程を含む方法。

【請求項65】

反応チャンバーの中心間間隔が20～100 μmである、請求項64記載の方法。

【請求項66】

断片化核酸が30～500塩基である、請求項64記載の方法。

【請求項67】

断片化核酸を、工程(d)の前に反応チャンバー中で増幅する、請求項64記載の方法。

【請求項68】

増幅工程がポリメラーゼ連鎖反応を用いて達成される、請求項64記載の方法。

【請求項69】

配列決定反応がピロリン酸に基づく配列決定反応である、請求項64記載の方法。

【請求項70】

配列決定反応が、

(f) 有効量の配列決定プライマーを一本鎖断片化核酸テンプレートにアニーリングし、ポリメラーゼおよび所定のヌクレオチド三リン酸を用いて配列決定プライマーを伸長して配列決定産物を産生し、かつ、所定のヌクレオチド三リン酸が該配列決定プライマーの3'末端に組み込まれる場合は、配列決定反応副産物を産生する工程；および

(g) 配列決定反応副産物を同定し、それにより複数の反応チャンバー中における核酸の配列を決定する工程

を含む、請求項64記載の方法。

【請求項 7 1】

配列決定反応が、

(a) 一つを除いて全てのプライマーが可逆的に遮断されたプライマーである2つ以上の配列決定プライマーを、核酸分子の一つまたは複数の一本鎖にハイブリダイズする工程；

(b) 少なくとも一つの塩基を、非遮断プライマーからのポリメラーゼ伸長により核酸分子に組み込む工程；

(c) 該非遮断プライマーのさらなる伸長を防止する工程；

(d) 可逆的に遮断されたプライマーの一つを脱遮断して非遮断プライマーにする工程；および

(e) 少なくとも一つの可逆的遮断プライマーが脱遮断され配列の決定に用いられるまで、工程 (b) ～ (d) を繰り返す工程

を含む請求項64記載の方法。

【請求項 7 2】

反応チャンバーが、光ファイバー束の一端をエッチングすることにより形成された空洞である、請求項64記載の方法。

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/476,504
(32)優先日 平成15年6月6日(2003.6.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/476,313
(32)優先日 平成15年6月6日(2003.6.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/476,592
(32)優先日 平成15年6月6日(2003.6.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/497,985
(32)優先日 平成15年8月25日(2003.8.25)
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ロスバーク ジョナサン エム.
アメリカ合衆国 コネチカット州 ギルフォード ムース ヒル ロード 1701

(72)発明者 ウェイナー マイケル ピー.
アメリカ合衆国 コネチカット州 ギルフォード レイトン トレイル 52

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 CA20 HA14
4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA15
4B063 QA13 QQ42 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34