

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-507898

(P2025-507898A)

(43)公表日 令和7年3月21日(2025.3.21)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A	4 B 0 6 3
C 4 0 B	40/06 (2006.01)	C 4 0 B	40/06		
C 1 2 Q	1/6844(2018.01)	C 1 2 Q	1/6844	Z	
C 1 2 Q	1/6869(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869	Z	
C 1 2 Q	1/6813(2018.01)	C 1 2 Q	1/6813	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全200頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-552163(P2024-552163)	(71)出願人	523473143		
(86)(22)出願日	令和5年3月3日(2023.3.3)		エレメント バイオサイエンシズ, イン		
(85)翻訳文提出日	令和6年10月30日(2024.10.30)		コーポレイティド		
(86)国際出願番号	PCT/US2023/063734		アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2		
(87)国際公開番号	WO2023/168443		1 2 1, サンディエゴ, バーンズ キャ		
(87)国際公開日	令和5年9月7日(2023.9.7)		ニオン ロード 1 0 0 5 5, スイート		
(31)優先権主張番号	63/316,784		1 0 0		
(32)優先日	令和4年3月4日(2022.3.4)	(74)代理人	100099759		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 青木 篤		
(31)優先権主張番号	17/725,065	(74)代理人	100123582		
(32)優先日	令和4年4月20日(2022.4.20)		弁理士 三橋 真二		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100117019		
			弁理士 渡辺 陽一		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ	(74)代理人	100141977		
	最終頁に続く		弁理士 中島 勝		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 二本鎖スプリントアダプター及び使用方法

(57)【要約】

本開示は、キットを含む、核酸二本鎖スプリントアダプターを含む組成物、及び二本鎖スプリントアダプターを用いる方法を提供する。二本鎖スプリントアダプター(200)は、1つ以上の新しいアダプター配列をライブラリ分子内に導入するために、ワンポット多酵素反応において使用され得る。二本鎖スプリントアダプター(200)は、第1のスプリント鎖(長スプリント鎖(300))及び第2のスプリント鎖(短スプリント鎖(400))を含み、第1及び第2のスプリント鎖は一緒にハイブリダイズして、二本鎖領域及び2つの隣接する一本鎖領域を有する二本鎖スプリントアダプター(200)を形成する。第2のスプリント鎖(400)は、導入される新しいアダプター配列(複数可)、例えば、ユニバーサル結合配列及び／又はインデックス配列を保有する。

【選択図】 図1

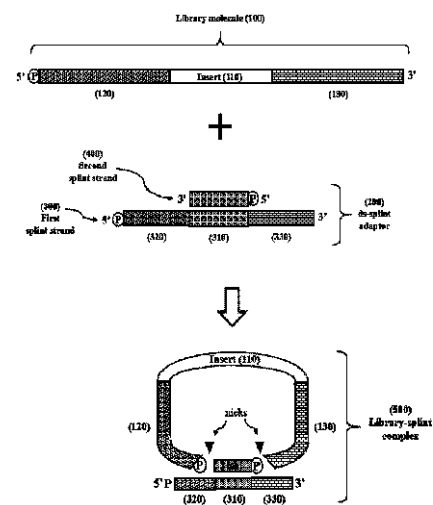


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 少なくとも第 1 の左ユニバーサルアダプター配列 (1 2 0) に一方の側において隣接し、少なくとも第 1 の右ユニバーサルアダプター配列 (1 3 0) に他方の側において隣接する目的の配列 (1 1 0) を含む一本鎖核酸ライブラリ分子 (1 0 0) と、

(i i) 第 1 のスプリント鎖 (長スプリント鎖 (3 0 0)) 及び第 2 のスプリント鎖 (短スプリント鎖 (4 0 0)) を含む二本鎖スプリントアダプター (2 0 0) であって、前記二本鎖スプリントアダプター (2 0 0) が、二本鎖領域及び 2 つの隣接する一本鎖領域を含み、前記第 1 のスプリント鎖が、第 1 の領域 (3 2 0)、内部領域 (3 1 0)、及び第 2 の領域 (3 3 0) を含む、二本鎖スプリントアダプター (2 0 0) と、を含む、ライ

10

ブラリースプリント複合体 (5 0 0) であって、
前記第 1 のスプリント鎖 (3 1 0) の前記内部領域が、前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) にハイブリダイズしており、前記第 1 のスプリント鎖 (3 2 0) の前記第 1 の領域が、前記ライブラリ分子の前記少なくとも第 1 の左ユニバーサルアダプター配列 (1 2 0) にハイブリダイズしており、前記第 1 のスプリント鎖 (3 3 0) の第 2 の領域が、前記ライブラリ分子の前記少なくとも第 1 の右ユニバーサル配列 (1 3 0) にハイブリダイズしており、それによって、前記ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体 (5 0 0) を生成する、ライブラリースプリント複合体 (5 0 0)。

【請求項 2】

前記核酸ライブラリ分子 (1 0 0) が、第 2 の左ユニバーサルアダプター配列 (1 4 0) を更に含む、請求項 1 に記載のライブラリースプリント複合体 (5 0 0)。

20

【請求項 3】

前記核酸ライブラリ分子 (1 0 0) が、第 2 の右ユニバーサルアダプター配列 (1 5 0) を更に含む、請求項 1 に記載のライブラリースプリント複合体 (5 0 0)。

【請求項 4】

前記核酸ライブラリ分子 (1 0 0) が、第 1 の左インデックス配列 (1 6 0) を更に含む、請求項 1 に記載のライブラリースプリント複合体 (5 0 0)。

【請求項 5】

前記核酸ライブラリ分子 (1 0 0) が、第 1 の右インデックス配列 (1 7 0) を更に含む、請求項 1 に記載のライブラリースプリント複合体 (5 0 0)。

30

【請求項 6】

前記核酸ライブラリ分子 (1 0 0) が、第 1 の左固有識別配列 (1 8 0) を更に含む、請求項 1 に記載のライブラリースプリント複合体 (5 0 0)。

【請求項 7】

前記核酸ライブラリ分子 (1 0 0) が、第 1 の右固有識別配列 (1 9 0) を更に含む、請求項 1 に記載のライブラリースプリント複合体 (5 0 0)。

【請求項 8】

前記核酸ライブラリ分子 (1 0 0) が、

(i) 第 2 の左ユニバーサルアダプター配列 (1 4 0)、

(i i) 第 2 の右ユニバーサルアダプター配列 (1 5 0)、

40

(i i i) 第 1 の左インデックス配列 (1 6 0)、

(i v) 第 1 の右インデックス配列 (1 7 0)、

(v) 第 1 の左固有識別配列 (1 8 0)、及び／又は

(v i) 第 1 の右固有識別配列 (1 9 0) いずれか 1 つ又は 2 つ以上のいずれかの組み合わせを更に含む、請求項 1 に記載のライブラリースプリント複合体 (5 0 0)。

【請求項 9】

前記第 1 の左ユニバーサルアダプター配列 (1 2 0) 及び／又は前記第 2 の左ユニバーサルアダプター配列 (1 4 0) が、

(i) フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

(i i) リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

50

(i i i) 第 1 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、
(i v) 第 2 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、
(v) フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、
(v i) リバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は
(v i i) コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む
、請求項 1 に記載のライブラリースプリント複合体 (5 0 0) 。

【請求項 1 0】

前記第 1 の右ユニバーサルアダプター配列 (1 3 0) 及び／又は前記第 2 の右ユニバーサルアダプター配列 (1 5 0) が、

(i) フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、
(i i) リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、
(i i i) 第 1 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、
(i v) 第 2 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、
(v) フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、
(v i) リバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は
(v i i) コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む
、請求項 1 に記載のライブラリースプリント複合体 (5 0 0) 。

【請求項 1 1】

前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) が、少なくとも 2 つのサブ領域を含み、第 1 のサブ領域が、第 3 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第 2 のサブ領域が、第 4 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、前記第 1 及び第 2 のサブ領域が、前記第 1 及び第 2 の表面プライマーにハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）、請求項 9 又は 1 0 に記載のライブラリースプリント複合体 (5 0 0) 。

【請求項 1 2】

前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) が、任意選択の第 3 のサブ領域を更に含み、前記任意選択の第 3 のサブ領域が、5 ～ 2 0 個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は 2 ～ 1 0 個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、NN）を含む、請求項 1 1 に記載のライブラリースプリント複合体 (5 0 0) 。

【請求項 1 3】

前記第 1 のスプリント鎖 (3 0 0) が、少なくとも 2 つのサブ領域を含む内部領域 (3 1 0) を含み、第 4 のサブ領域が、第 3 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、前記第 4 のサブ領域が、前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) の前記第 1 のサブ領域にハイブリダイズし、第 5 のサブ領域が、第 4 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、前記第 5 のサブ領域が、前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) の前記第 2 のサブ領域にハイブリダイズし、前記第 4 及び第 5 のサブ領域が、前記第 1 及び第 2 の表面プライマーにハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）、請求項 9 又は 1 0 に記載のライブラリースプリント複合体 (5 0 0) 。

【請求項 1 4】

前記第 1 のスプリント鎖 (3 0 0) が、第 6 のサブ領域を更に含む内部領域 (3 1 0) を含み、前記第 6 のサブ領域が、5 ～ 2 0 個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は 2 ～ 1 0 個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、NN）を含み、前記第 6 のサブ領域が、前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) の前記第 3 のサブ領域にハイブリダイズする、請求項 1 3 に記載のライブラリースプリント複合体 (5 0 0) 。

【請求項 1 5】

a) 5 ' から 3 ' の順序で配置された構成要素である、(i) 第 1 の表面プライマー (1 2 0) についての結合配列を有する第 1 の左ユニバーサルアダプター配列 (1 2 0) 、(i i) 第 1 のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第 2 の左ユニバーサルアダプター配列 (1 4 0) 、(i i i) 目的の配列 (1 1 0) 、(i v) 第 2 のシーケ

ンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）、及び（v）第2の表面プライマー（130）についての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）を含む一本鎖核酸ライブラリ分子（100）と、

b) 5'から3'の順序で配置された構成要素である、第1の領域（320）、内部領域（310）、及び第2の領域（330）を含む第1のスプリント鎖（300）と、

c) 3'から5'の順序で配置されたサブ領域である、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第1のサブ領域、及び第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第2のサブ領域を含む第2のスプリント鎖（400）と、を含む、ライブラリースプリント複合体（500）であって、前記第1のスプリント鎖（300）が、前記ライブラリ分子（100）の部分にハイブリダイズしており、それによって、前記ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体（500）を生成し、これにより、前記第1のスプリント鎖の前記第1の領域（320）が、前記第1の表面プライマー（120）についての前記結合配列にハイブリダイズしており、前記第1のスプリント鎖の前記第3の領域（330）が、前記第2の表面プライマー（130）についての前記結合配列にハイブリダイズしており、前記第2のスプリント鎖（400）が、前記第1のスプリント鎖（300）の前記内部領域（310）にハイブリダイズしており、前記ライブラリースプリント複合体（500）が、前記ライブラリ分子の5'末端と前記第2のスプリント鎖の3'末端との間の第1のニックを含み、前記ライブラリースプリント複合体（500）が、前記第2のスプリント鎖の5'末端と前記ライブラリ分子の3'末端との間の第2のニックを含み、前記第1及び第2のニックが、酵素的にライゲーション可能である、ライブラリースプリント複合体（500）。

10

20

【請求項16】

前記ライブラリースプリント複合体（500）が、複数のライブラリースプリント複合体（500）を更に含み、前記複数のライブラリースプリント複合体における個々のライブラリースプリント複合体の目的の配列（110）が、同じ目的の配列又は異なる目的の配列を含む、先行請求項のいずれか一項に記載のライブラリースプリント複合体（500）。

【請求項17】

請求項16に記載の複数のライブラリースプリント複合体（500）と、T4ポリヌクレオチドキナーゼと、を含む、反応混合物。

30

【請求項18】

請求項16に記載の複数のライブラリースプリント複合体（500）と、リガーゼ酵素と、を含む、反応混合物。

【請求項19】

請求項16に記載の複数のライブラリースプリント複合体（500）と、T4ポリヌクレオチドキナーゼと、リガーゼ酵素と、を含む、反応混合物。

【請求項20】

前記リガーゼ酵素が、T7 DNAリガーゼ、T3リガーゼ、T4リガーゼ、又はTaqリガーゼを含む、請求項18又は19に記載の反応混合物。

40

【請求項21】

目的の配列（110）と、少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）と、少なくとも第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）と、第2のスプリント鎖配列（400）と、を含む、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）。

【請求項22】

第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）を更に含む、請求項21に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）。

【請求項23】

第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）を更に含む、請求項21に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）。

50

【請求項 24】

第1の左インデックス配列(160)を更に含む、請求項21に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)。

【請求項 25】

第1の右インデックス配列(170)を更に含む、請求項21に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)。

【請求項 26】

第1の左固有識別配列(180)を更に含む、請求項21に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)。

【請求項 27】

第1の右固有識別配列(190)を更に含む、請求項21に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)。

【請求項 28】

(i) 第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、

(ii) 第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、

(iii) 第1の左インデックス配列(160)、

(iv) 第1の右インデックス配列(170)、

(v) 第1の左固有識別配列(180)、及び／又は

(vi) 第1の右固有識別配列(190)いずれか1つ又は2つ以上のいずれかの組み合わせを更に含む、請求項21に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)。

【請求項 29】

前記第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)及び／又は前記第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)が、

(i) フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

(ii) リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

(iii) 第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

(iv) 第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

(v) フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、

(vi) リバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は

(vii) コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、請求項21に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)。

【請求項 30】

前記第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)及び／又は前記第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)が、

(i) フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

(ii) リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

(iii) 第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

(iv) 第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

(v) フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、

(vi) リバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は

(vii) コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、請求項21に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)。

【請求項 31】

前記共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)が、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含む第1のスプリント鎖(長スプリント鎖(300))にハイブリダイズしており、前記共有結合性閉環状ライブラリ分子の前記第2のスプリント鎖配列(400)が、前記第1のスプリント鎖の前記内部領域(310)にハイブリダイズしており、前記第1のスプリント鎖(320)の前記第1の領域が、前記ライブラリ分子の前記少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)にハイブリダイズしており、前記第1のスプリント鎖(330)の第2の領域が、前記ライブラリ

分子の前記少なくとも第 1 の右ユニバーサル配列（130）にハイブリダイズしている、請求項 21～30 のいずれか一項に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）。

【請求項 32】

前記第 2 のスプリント鎖（400）が、少なくとも 2 つのサブ領域を含み、第 1 のサブ領域が、第 3 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第 2 のサブ領域が、第 4 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、前記第 1 及び第 2 のサブ領域が、前記第 1 及び第 2 の表面プライマーにハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）、請求項 31 に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）。

【請求項 33】

前記第 2 のスプリント鎖（400）が、任意選択の第 3 のサブ領域を更に含み、前記任意選択の第 3 のサブ領域が、5～20 個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は 2～10 個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、NN）を含む、請求項 32 に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）。

【請求項 34】

前記第 1 のスプリント鎖（300）が、少なくとも 2 つのサブ領域を含む内部領域（310）を含み、第 4 のサブ領域が、第 3 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、前記第 4 のサブ領域が、前記第 2 のスプリント鎖（400）の前記第 1 のサブ領域にハイブリダイズし、第 5 のサブ領域が、第 4 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、前記第 5 のサブ領域が、前記第 2 のスプリント鎖（400）の前記第 2 のサブ領域にハイブリダイズし、前記第 4 及び第 5 のサブ領域が、前記第 1 及び第 2 の表面プライマーにハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）、請求項 31 に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）。

【請求項 35】

前記第 1 のスプリント鎖（300）が、第 6 のサブ領域を更に含む内部領域（310）を含み、前記第 6 のサブ領域が、5～20 個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は 2～10 個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、NN）を含み、前記第 6 のサブ領域が、前記第 2 のスプリント鎖（400）の前記第 3 のサブ領域にハイブリダイズする、請求項 34 に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）。

【請求項 36】

（i）第 1 の表面プライマー（120）についての結合配列を有する第 1 の左ユニバーサルアダプター配列（120）と、（ii）第 1 のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第 2 の左ユニバーサルアダプター配列（140）と、（iii）目的の配列（110）と、（iv）第 2 のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第 2 の右ユニバーサルアダプター配列（150）と、（v）第 2 の表面プライマー（130）についての結合配列を有する第 1 の右ユニバーサルアダプター配列（130）と、（vi）第 2 のスプリント鎖（400）と、を含む、一本鎖共有結合性閉環状分子（600）であって、前記共有結合性閉環状分子（600）が、任意選択で、第 1 のスプリント鎖（300）にハイブリダイズしている、一本鎖共有結合性閉環状分子（600）。

【請求項 37】

共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）が、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を更に含み、前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）の目的の配列（110）が、同じ目的の配列又は異なる目的の配列を含む、請求項 21～36 のいずれか一項に記載の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）。

【請求項 38】

請求項 36 に記載の複数の複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を含む反応混合物であって、個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）が、第 1 のスプリント鎖（300）にハイブリダイズしている、反応混合物。

【請求項 39】

前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）と、少なくとも1つのエキソヌクレアーゼ酵素と、を含む、請求項38に記載の反応混合物。

【請求項 40】

前記エキソヌクレアーゼ酵素が、エキソヌクレアーゼⅠ、熱不安定性エキソヌクレアーゼⅠ、又はT7エキソヌクレアーゼを含む、請求項38に記載の反応混合物。

【請求項 41】

二本鎖スプリントアダプター（200）を含むキットであって、前記二本鎖スプリントアダプター（200）が、

（i）第1のスプリント鎖（長スプリント鎖（300））、及び

10

（ii）第2のスプリント鎖（短スプリント鎖（400））を含み、前記第1のスプリント鎖（300）が、前記第2のスプリント鎖（400）にハイブリダイズして、二本鎖領域及び2つの隣接する一本鎖領域を形成することができ、前記第1のスプリント鎖（300）が、第1の領域（320）、内部領域（310）、及び第2の領域（330）を含み、前記第1のスプリント鎖（310）の前記内部領域が、前記第2のスプリント鎖（400）にハイブリダイズすることができる、キット。

【請求項 42】

前記第1のスプリント鎖（300）及び前記第2のスプリント鎖（400）が、互いにハイブリダイズしており、二本鎖領域及び2つの隣接する一本鎖領域を有する二本鎖スプリントアダプター（200）を形成し、前記第1のスプリント鎖（310）の前記内部領域が、前記第2のスプリント鎖（400）にハイブリダイズすることができる、請求項41に記載のキット。

20

【請求項 43】

少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）に一方の側において隣接し、少なくとも第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）に他方の側において隣接する目的の配列（110）を有する一本鎖核酸ライブラリ分子（100）の環状化における使用のための、請求項41又は42に記載のキット。

【請求項 44】

前記第1のスプリント鎖（320）の前記第1の領域が、前記ライブラリ分子（100）の少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）にハイブリダイズすることができ、前記第1のスプリント鎖（330）の第2の領域が、前記ライブラリ分子の前記少なくとも第1の右ユニバーサル配列（130）にハイブリダイズすることができる、請求項43に記載のキット。

30

【請求項 45】

前記ライブラリ分子（100）の前記少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）が、

（i）フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

（ii）リバーシシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

（iii）第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

（iv）第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

40

（v）フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、

（vi）リバーシ増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は

（vii）コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、請求項43に記載のキット。

【請求項 46】

前記ライブラリ分子（100）の前記少なくとも第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）が、

（i）フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

（ii）リバーシシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

（iii）第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

50

(i v) 第 2 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、
(v) フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、
(v i) リバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は
(v i i) コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、請求項 4 3 に記載のキット。

【請求項 4 7】

前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) が、少なくとも 2 つのサブ領域を含み、第 1 のサブ領域が、第 3 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第 2 のサブ領域が、第 4 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、前記第 1 及び第 2 のサブ領域が、前記第 1 及び第 2 の表面プライマーハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）、請求項 4 3 に記載のキット。

10

【請求項 4 8】

前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) が、任意選択の第 3 のサブ領域を更に含み、前記任意選択の第 3 のサブ領域が、5 ～ 2 0 個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は 2 ～ 1 0 個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、N N）を含む、請求項 4 7 に記載のキット。

【請求項 4 9】

前記第 1 のスプリント鎖 (3 0 0) が、少なくとも 2 つのサブ領域を含む内部領域 (3 1 0) を含み、第 4 のサブ領域が、第 3 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、前記第 4 のサブ領域が、前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) の前記第 1 のサブ領域にハイブリダイズし、第 5 のサブ領域が、第 4 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、前記第 5 のサブ領域が、前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) の前記第 2 のサブ領域にハイブリダイズし、前記第 4 及び第 5 のサブ領域が、前記第 1 及び第 2 の表面プライマーハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）、請求項 4 3 に記載のキット。

20

【請求項 5 0】

前記第 1 のスプリント鎖 (3 0 0) が、第 6 のサブ領域を更に含む内部領域 (3 1 0) を含み、前記第 6 のサブ領域が、5 ～ 2 0 個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は 2 ～ 1 0 個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、N N）を含み、前記第 6 のサブ領域が、前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) の前記第 3 のサブ領域にハイブリダイズする、請求項 4 9 に記載のキット。

30

【請求項 5 1】

T 4 ポリヌクレオチドキナーゼを更に含む、請求項 4 1 ～ 5 0 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 2】

リガーゼ酵素を更に含む、請求項 4 1 ～ 5 0 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 3】

T 4 ポリヌクレオチドキナーゼと、リガーゼ酵素と、を更に含む、請求項 4 1 ～ 5 0 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 4】

前記リガーゼ酵素が、T 7 DNA リガーゼ、T 3 リガーゼ、T 4 リガーゼ、又は T a q リガーゼを含む、請求項 5 2 又は 5 3 に記載のキット。

40

【請求項 5 5】

複数のライブラリースプリント複合体 (5 0 0) を形成するための方法であって、

a) 複数の二本鎖スプリントアダプターを提供することであって、個々の二本鎖スプリントアダプター (2 0 0) が、第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) にハイブリダイズした第 1 のスプリント鎖 (3 0 0) を含み、前記二本鎖スプリントアダプターが、二本鎖領域及び 2 つの隣接する一本鎖領域を含み、前記第 1 のスプリント鎖が、第 1 の領域 (3 2 0)、内部領域 (3 1 0)、及び第 2 の領域 (3 3 0) を含み、前記第 1 のスプリント鎖 (3 1 0) の前記内部領域が、前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) にハイブリダイズしている、

50

提供することと、

ｂ）前記複数の二本鎖スプリントアダプターを、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子（１００）とハイブリダイズさせることであって、個々のライブラリ分子が、少なくとも第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）に一方の側において隣接し、少なくとも第１の右ユニバーサルアダプター配列（１３０）に他方の側において隣接する目的の配列（１１０）を含み、前記ハイブリダイズさせることが、前記第１のスプリント鎖（３２０）の前記第１の領域を、前記ライブラリ分子の前記少なくとも第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で行われ、前記条件が、前記第１のスプリント鎖（３３０）の前記第２の領域を、前記ライブラリ分子の前記少なくとも第１の右ユニバーサル配列（１３０）にハイブリダイズさせるのに好適であり、それによって、前記複数のライブラリ分子を環状化させて、複数のライブラリースプリント複合体（５００）を形成する、ハイブリダイズさせることと、を含む、方法。

10

【請求項５６】

前記複数のライブラリースプリント複合体（５００）における個々のライブラリースプリント複合体（５００）が、前記ライブラリ分子の５'末端と前記第２のスプリント鎖の３'末端との間の第１のニックを含み、前記複数のライブラリースプリント複合体（５００）における個々のライブラリースプリント複合体（５００）が、前記第２のスプリント鎖の５'末端と前記ライブラリ分子の３'末端との間の第２のニックを含む、請求項５５に記載の方法。

【請求項５７】

20

前記複数の核酸ライブラリ分子（１００）における個々の核酸ライブラリ分子（１００）が、第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）を更に含む、請求項５５に記載の方法。

【請求項５８】

前記複数の核酸ライブラリ分子（１００）における個々の核酸ライブラリ分子（１００）が、第２の右ユニバーサルアダプター配列（１５０）を更に含む、請求項５５に記載の方法。

【請求項５９】

前記複数の核酸ライブラリ分子（１００）における個々の核酸ライブラリ分子（１００）が、第１の左インデックス配列（１６０）を更に含む、請求項５５に記載の方法。

30

【請求項６０】

前記複数の核酸ライブラリ分子（１００）における個々の核酸ライブラリ分子（１００）が、第１の右インデックス配列（１７０）を更に含む、請求項５５に記載の方法。

【請求項６１】

前記複数の核酸ライブラリ分子（１００）における個々の核酸ライブラリ分子（１００）が、第１の左固有識別配列（１８０）を更に含む、請求項５５に記載の方法。

【請求項６２】

前記複数の核酸ライブラリ分子（１００）における個々の核酸ライブラリ分子（１００）が、第１の右固有識別配列（１９０）を更に含む、請求項５５に記載の方法。

【請求項６３】

40

前記複数の核酸ライブラリ分子（１００）における個々の核酸ライブラリ分子（１００）が、

（ｉ）第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）、

（ｉｉ）第２の右ユニバーサルアダプター配列（１５０）、

（ｉｉｉ）第１の左インデックス配列（１６０）、

（ｉｖ）第１の右インデックス配列（１７０）、

（ｖ）第１の左固有識別配列（１８０）、及び／又は

（ｖｉ）第１の右固有識別配列（１９０）のうちのいずれか１つ又は２つ以上のいずれかの組み合わせを更に含む、請求項５５に記載の方法。

【請求項６４】

50

前記第 1 及び／又は前記第 2 の左ユニバーサルアダプター配列が、

(i) フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

(i i) リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

(i i i) 第 1 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

(i v) 第 2 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

(v) フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、

(v i) リバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は

(v i i) コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む

、請求項 5 5 又は 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記第 1 及び／又は前記第 2 の右ユニバーサルアダプター配列が、

(i) フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

(i i) リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

(i i i) 第 1 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

(i v) 第 2 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

(v) フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、

(v i) リバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は

(v i i) コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む

、請求項 5 5 又は 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) が、少なくとも 2 つのサブ領域を含み、第 1 のサブ領域が、第 3 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第 2 のサブ領域が、第 4 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、前記第 1 及び第 2 のサブ領域が、前記第 1 及び第 2 の表面プライマーにハイブリダイズしない (又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す)、請求項 6 4 又は 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) が、任意選択の第 3 のサブ領域を更に含み、前記任意選択の第 3 のサブ領域が、5 ~ 2 0 個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は 2 ~ 1 0 個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列 (例えば、NN) を含む、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記第 1 のスプリント鎖 (3 0 0) が、少なくとも 2 つのサブ領域を含む内部領域 (3 1 0) を含み、第 4 のサブ領域が、第 3 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、前記第 4 のサブ領域が、前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) の前記第 1 のサブ領域にハイブリダイズし、第 5 のサブ領域が、第 4 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、前記第 5 のサブ領域が、前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) の前記第 2 のサブ領域にハイブリダイズし、前記第 4 及び第 5 のサブ領域が、前記第 1 及び第 2 の表面プライマーハイブリダイズしない (又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す)、請求項 6 4 又は 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記第 1 のスプリント鎖 (3 0 0) が、第 6 のサブ領域を更に含む内部領域 (3 1 0) を含み、前記第 6 のサブ領域が、5 ~ 2 0 個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は 2 ~ 1 0 個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列 (例えば、NN) を含み、前記第 6 のサブ領域が、前記第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) の前記第 3 のサブ領域にハイブリダイズする、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

複数のライブラリースプリント複合体 (5 0 0) を形成するための方法であって、

a) 複数の二本鎖スプリントアダプター (2 0 0) を提供することであって、個々の二本鎖スプリントアダプター (2 0 0) が、第 2 のスプリント鎖 (4 0 0) にハイブリダイ

10

20

30

40

50

ズした第1のスプリント鎖(300)を含み、前記第1のスプリント鎖(300)が、5'から3'の順序で配置された領域である、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含み、前記第1のスプリント鎖(310)の前記内部領域が、前記第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズしており、前記第2のスプリント鎖が、5'から3'の順序で配置された領域である、(i)第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第2のサブ領域、及び(ii)第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第1のサブ領域を含む、提供することと、

b) 前記複数の二本鎖スプリントアダプターを、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)とハイブリダイズさせることであって、個々のライブラリ分子が、5'から3'の順序で配置された領域である、(i)第1の表面プライマー(120)についての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、(ii)第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、(iii)目的の配列(110)、(iv)第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、及び(v)第2の表面プライマー(130)についての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)を含み、前記ハイブリダイズさせることが、前記第1のスプリント鎖(300)の部分と、前記ライブラリ分子(100)の部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で行われ、それによって、前記ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体(500)を生成し、これにより、前記第1のスプリント鎖の前記第1の領域(320)が、前記第1の表面プライマー(120)についての前記結合配列にハイブリダイズしており、前記第1のスプリント鎖の前記第3の領域(330)が、前記第2の表面プライマー(130)についての前記結合配列にハイブリダイズしており、前記ライブラリースプリント複合体(500)が、前記ライブラリ分子の5'末端と前記第2のスプリント鎖(300)の3'末端との間の第1のニックを含み、前記ライブラリースプリント複合体(500)が、前記第2のスプリント鎖(300)の5'末端と前記ライブラリ分子(100)の3'末端との間の第2のニックを含み、前記第1及び第2のニックが、酵素的にライゲーション可能である、ハイブリダイズさせることと、を含む、方法。

【請求項71】

前記複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)が、第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス配列(170)を更に含む、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

前記複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)が、第1の左固有識別配列(180)及び／又は第1の右固有識別配列(190)を更に含む、請求項70に記載の方法。

【請求項73】

前記複数の二本鎖スプリントアダプター(200)及び前記複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)を、T4ポリヌクレオチドキナーゼ酵素と、前記複数の二本鎖スプリントアダプター(200)及び／又は前記複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)の5'末端をリン酸化するのに好適である条件下で接触させることを更に含む、請求項55～72のいずれか一項に記載の方法。

【請求項74】

前記複数の二本鎖スプリントアダプター(200)及び前記複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)を、リガーゼと、前記第1及び第2のニックを酵素的にライゲーションするのに好適である条件下で接触させ、それによって、各々が前記第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズした複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を生成することを更に含む、請求項55～72のいずれか一項に記載の方法。

【請求項75】

a) 前記複数の二本鎖スプリントアダプター(200)及び前記複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)を、T4ポリヌクレオチドキナーゼ酵素と、前記複数の二本鎖スプ

リントアダプター（２００）及び前記複数の一本鎖核酸ライブラリ分子（１００）の５'末端をリン酸化するのに好適である条件下で接触させることと、

ｂ）リン酸化された前記二本鎖スプリントアダプター（２００）及びリン酸化された前記一本鎖核酸ライブラリ分子（１００）を、リガーゼと、前記第１及び第２のニックを酵素的にライゲーションするのに好適である条件下で接触させ、それによって、各々が前記第１のスプリント鎖（３００）にハイブリダイズした複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を生成することとの順次のステップを行うことを更に含む、請求項５５～７２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７６】

前記複数の二本鎖スプリントアダプター（２００）及び前記複数の一本鎖核酸ライブラリ分子（１００）を、（ｉ）Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ酵素及び（ｉｉ）リガーゼ酵素と、前記複数の二本鎖スプリントアダプター（２００）及び前記複数の一本鎖核酸ライブラリ分子（１００）の５'末端をリン酸化するのに好適である条件下で接触させることであって、前記条件が、前記第１及び第２のニックを酵素的にライゲーションするのに好適であり、それによって、各々が前記第１のスプリント鎖（３００）にハイブリダイズした複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を生成する、接触させることの本質的に同時のステップを行うことを更に含む、請求項５５～７２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７７】

前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を、少なくとも１つのエキソヌクレアーゼ酵素と接触させて、前記複数の第１のスプリント鎖（３００）を除去し、前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を保持することを更に含む、請求項７４に記載の方法。

【請求項７８】

前記少なくとも１つのエキソヌクレアーゼ酵素が、エキソヌクレアーゼⅠ、熱不安定性エキソヌクレアーゼⅠ、及び／又はＴ７エキソヌクレアーゼを含む、請求項７７に記載の方法。

【請求項７９】

前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）が、第３の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第２のスプリント鎖領域（４００）を含み、前記方法が、保持された前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を、複数の前記第３の表面プライマーが支持体上に固定化された前記支持体上に、個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を、個々の固定化された第３の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を固定化することを更に含む、請求項７７に記載の方法。

【請求項８０】

複数の固定化された前記共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、前記支持体上でのローリングサークル増幅反応を、前記複数の第３の表面プライマーを固定化された増幅プライマーとして使用し、前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を生成することを更に含む、請求項７９に記載の方法。

【請求項８１】

前記複数のヌクレオチドが、ｄＡＴＰ、ｄＧＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＴＴＰ、及び／又はｄＵＴＰを含む、請求項８０に記載の方法。

【請求項８２】

前記複数のライブラリ分子における個々のライブラリ分子の前記第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）又は前記第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）が、フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、前記方法が、

a) 複数の可溶性フォワード増幅プライマーを、フォワード増幅プライマーについての前記ユニバーサル結合配列を含む前記第1又は第2の左ユニバーサルアダプター配列にハイブリダイズさせることと、

b) ローリングサークル増幅反応を行い、それによって、複数の核酸コンカテマー分子を生成することと、を更に含む、請求項77に記載の方法。

【請求項83】

前記複数のライブラリ分子における個々のライブラリ分子の前記第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)又は前記第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)が、フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、前記方法が、

a) 複数の可溶性フォワード増幅プライマーを、フォワード増幅プライマーについての前記ユニバーサル結合配列を含む前記第1又は第2の右ユニバーサルアダプター配列にハイブリダイズさせることと、

b) ローリングサークル増幅反応を行い、それによって、各々が共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)にハイブリダイズした複数の核酸コンカテマー分子を生成することと、を更に含む、請求項77に記載の方法。

【請求項84】

前記複数のコンカテマー分子における個々のコンカテマー分子が、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第2のスプリント鎖領域(400)を含み、個々のコンカテマー分子が、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)にハイブリダイズしており、前記方法が、前記複数のコンカテマー分子を、複数の前記第3の表面プライマーが上に固定化された支持体上に、前記コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された前記第3の表面プライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、前記複数のコンカテマー分子を固定化することを更に含む、請求項82又は83に記載の方法。

【請求項85】

固定化された前記複数のコンカテマー分子(共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)にハイブリダイズしたもの)を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、前記支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の前記共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることを更に含む、請求項84に記載の方法。

【請求項86】

前記複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、請求項85に記載の方法。

【請求項87】

前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)が、第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズしており、前記方法が、前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、ローリングサークル増幅反応を、前記第1のスプリント鎖(300)を増幅プライマーとして使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数のコンカテマー分子を生成することを更に含む、請求項74～76のいずれか一項に記載の方法。

【請求項88】

前記複数のコンカテマー分子における個々のコンカテマー分子が、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第2のスプリント鎖領域(400)を含み、前記方法が、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)にハイブリダイズした前記複数のコンカテマー分子を、複数の前記第3の表面プライマーが上に固定化された支持体上に、前記コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された前記第3の表面プライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)にハイブリダイズした前記複数のコンカ

テマー分子を固定化することを更に含む、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 89】

複数の固定化された前記コンカテマー分子を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、前記支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の前記共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることを更に含む、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

前記複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又は dUTP を含む、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

前記支持体が、前記支持体上に固定化された複数の前記第 4 の表面プライマーを更に含む、請求項 80、85、又は 89 に記載の方法。

【請求項 92】

前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子が、少なくとも 2 つの第 2 のスプリント鎖領域（400）を含み、前記少なくとも 2 つの第 2 のスプリント鎖領域（400）が各々、前記第 3 及び第 4 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有し、前記方法が、前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子を、少なくとも 1 つのコンカテマー分子の少なくとも 1 つの第 2 のスプリント鎖領域（400）を固定化された第 4 の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下でインキュベートし、それによって、前記固定化されたコンカテマー分子の少なくとも 1 つの部分を、前記支持体に押え付けることを更に含む、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

前記方法が、複数の前記固定化されたコンカテマーをシーケンシングすることを更に含む、前記方法が、

a) 前記複数の固定化されたコンカテマー分子を、(i) 複数のシーケンシングポリメラーゼ、及び (ii) 複数の可溶性シーケンシングプライマーと接触させることであって、前記接触させることが、複数の複合型ポリメラーゼを形成するのに好適である条件下で行われ、前記複数の複合型ポリメラーゼが各々、核酸二重鎖に結合したシーケンシングポリメラーゼを含み、前記核酸二重鎖が、可溶性シーケンシングプライマーにハイブリダイズしたコンカテマー分子を含む、接触させることと、

b) 前記複数の複合型シーケンシングポリメラーゼを、複数のヌクレオチドと、少なくとも 1 つのヌクレオチドを複合型シーケンシングポリメラーゼに結合させるのに好適である条件下で接触させることであって、前記複数のヌクレオチドが、少なくとも 1 つのヌクレオチド類似体を含み、前記少なくとも 1 つのヌクレオチド類似体が、フルオロフォアで標識されており、除去可能な鎖終結部分を糖 3' 位において有する、接触させることと、

c) 少なくとも 1 つのヌクレオチドを、ハイブリダイズした前記シーケンシングプライマーの 3' 末端内に組み込み、それによって、複数の新生の伸長したシーケンシングプライマーを生成することと、

d) 組み込まれた前記ヌクレオチドを検出し、前記組み込まれたヌクレオチドの核酸塩基を特定することと、を含む、請求項 80、85、89、又は 92 に記載の方法。

【請求項 94】

前記方法が、複数の前記固定化されたコンカテマーをシーケンシングすることを更に含む、前記方法が、

a) 前記複数の固定化されたコンカテマー分子を、(i) 複数のシーケンシングポリメラーゼ、及び (ii) 複数の可溶性シーケンシングプライマーと接触させることであって、前記接触させることが、複数の第 1 の複合型ポリメラーゼを形成するのに好適である条件下で行われ、前記複数の第 1 の複合型ポリメラーゼが各々、核酸二重鎖に結合したシーケンシングポリメラーゼを含み、前記核酸二重鎖が、可溶性シーケンシングプライマーにハイブリダイズしたコンカテマー分子を含む、接触させることと、

b) 前記複数の複合型シーケンシングポリメラーゼを、複数の検出可能に標識された多価分子と、前記多価分子の相補的ヌクレオチド単位を、前記複数の第1の複合型ポリメラーゼのうちの少なくとも2つに結合させて、それによって、複数の多価複合型ポリメラーゼを形成するのに好適である条件下で接触させて、複数の多価複合型ポリメラーゼを形成することであって、前記条件が、前記複数の多価複合型ポリメラーゼのシーケンシングプライマー内への前記相補的ヌクレオチド単位の組み込みを阻害し、前記複数の多価分子における個々の多価分子が、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、各ヌクレオチドアームが、ヌクレオチド単位に付着している、形成することと、

c) 前記複数の多価複合型ポリメラーゼを検出することと、

d) 前記複数の多価複合型ポリメラーゼにおける前記複数の第1の複合型ポリメラーゼに結合した前記相補的ヌクレオチド単位の核酸塩基を特定し、それによって、前記核酸テンプレートの配列を決定することと、を含む、請求項80、85、89、又は92に記載の方法。

10

【請求項95】

e) 前記複数の多価複合型ポリメラーゼを解離させ、前記複数の第1のシーケンシングポリメラーゼ及びそれらの結合した多価分子を除去し、前記複数の核酸二重鎖を保持すること、

f) ステップ(e)の複数の保持された前記核酸二重鎖を、複数の第2のシーケンシングポリメラーゼと接触させることであって、前記接触させることが、前記複数の第2のシーケンシングポリメラーゼを前記複数の保持された核酸二重鎖に結合させるのに好適である条件下で行われ、それによって、複数の第2の複合型ポリメラーゼを形成し、前記複数の第2の複合型ポリメラーゼが各々、保持された核酸二重鎖に結合した第2のシーケンシングポリメラーゼを含む、接触させることと、

20

g) 前記複数の第2の複合型ポリメラーゼを、複数のヌクレオチドと接触させることであって、前記接触させることが、前記複数のヌクレオチドからの相補的ヌクレオチドを、ステップ(f)の前記第2の複合型ポリメラーゼのうちの少なくとも2つに結合させるのに好適である条件下で行われ、それによって、複数のヌクレオチド複合型ポリメラーゼを形成し、前記条件が、前記ヌクレオチド複合型ポリメラーゼのシーケンシングプライマー内への結合した前記相補的ヌクレオチドの組み込みを促進するのに好適である、接触させることを更に含む、請求項94に記載の方法。

30

【請求項96】

前記複数のヌクレオチドが、少なくとも1つのヌクレオチド類似体を含み、前記少なくとも1つのヌクレオチド類似体が、フルオロフォアで標識されており、除去可能な鎖終結部分を糖3'位において有する、請求項95に記載の方法。

【請求項97】

h) 前記ヌクレオチド複合型ポリメラーゼの前記シーケンシングプライマー内に組み込まれた前記相補的ヌクレオチドを検出することを更に含む、請求項95に記載の方法。

【請求項98】

h) 前記ヌクレオチド複合型ポリメラーゼの前記シーケンシングプライマー内に組み込まれた前記相補的ヌクレオチドを検出することと、

40

i) 前記ヌクレオチド複合型ポリメラーゼの前記シーケンシングプライマー内に組み込まれた前記相補的ヌクレオチドの核酸塩基を特定することと、を更に含む、請求項95に記載の方法。

【請求項99】

少なくとも1つのアビディティ複合体を形成するための方法であって、

a) 第1のユニバーサル核酸プライマー、第1のDNAポリメラーゼ、及び第1の多価分子を、請求項80、85、89、又は92に記載のコンカテマー分子のうちのいずれかの第1の部分に結合させ、それによって、第1の結合複合体を形成することであって、前記第1の多価分子の第1のヌクレオチド単位が、前記第1のDNAポリメラーゼに結合する、形成することと、

50

b) 第2のユニバーサル核酸プライマー、第2のDNAポリメラーゼ、及び前記第1の多価分子を、同じコンカテマーテンプレート分子の第2の部分に結合させ、それによって、第2の結合複合体を形成することであって、前記第1の多価分子の第2のヌクレオチド単位が、前記第2のDNAポリメラーゼに結合し、同じ多価分子を含む前記第1及び第2の結合複合体が、アビディティ複合体を形成し、前記第1の多価分子が、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、各ヌクレオチドアームが、ヌクレオチド単位に付着しており、前記コンカテマー分子が、目的の配列(110)、並びに前記第1及び第2のユニバーサル核酸プライマーに結合するユニバーサルプライマー結合部位の2つ以上のタンデムリピート配列を含む、形成することと、を含む、方法。

【請求項100】

少なくとも1つのアビディティ複合体を形成することによってシーケンシングするための方法であって、

a) 第1のユニバーサル核酸プライマー、第1のDNAポリメラーゼ、及び第1の多価分子を、請求項80、85、89、又は92に記載のコンカテマー分子のうちのいずれかの第1の部分に結合させ、それによって、第1の結合複合体を形成することであって、前記第1の多価分子の第1のヌクレオチド単位が、前記第1のDNAポリメラーゼに結合する、形成することと、

b) 第2のユニバーサル核酸プライマー、第2のDNAポリメラーゼ、及び前記第1の多価分子を、同じコンカテマーテンプレート分子の第2の部分に結合させ、それによって、第2の結合複合体を形成することであって、前記第1の多価分子の第2のヌクレオチド単位が、前記第2のDNAポリメラーゼに結合し、同じ多価分子を含む前記第1及び第2の結合複合体が、アビディティ複合体を形成し、前記第1の多価分子が、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、各ヌクレオチドアームが、ヌクレオチド単位に付着しており、前記コンカテマー分子が、目的の配列(110)、並びに前記第1及び第2のユニバーサル核酸プライマーに結合するユニバーサルプライマー結合部位の2つ以上のタンデムリピート配列を含み、前記接触させることが、前記第1及び第2の結合複合体における結合した前記第1及び第2のヌクレオチド単位のポリメラーゼ触媒組み込みを阻害するのに好適である条件下で行われる、形成することと、

c) 前記同じコンカテマーテンプレート分子上の前記第1及び第2の結合複合体を検出することと、

d) 前記第1の結合複合体における前記第1のヌクレオチド単位を特定し、それによって、前記コンカテマーテンプレート分子の前記第1の部分の配列を決定し、前記第2の結合複合体における前記第2のヌクレオチド単位を特定し、それによって、前記コンカテマーテンプレート分子の前記第2の部分の配列を決定することと、を含む、方法。

【請求項101】

複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を調製するための方法であって、

a) 一本鎖核酸ライブラリ分子(100)の2つ以上の集団を提供することであって、ライブラリ分子(100)の各集団が、別個の区画内に収容されており、所与の集団における前記核酸ライブラリ分子が、

●(i) 第1の表面プライマーについての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、

●(ii) 第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、

●(iii) 試料供給源から単離された目的の配列(110)、

●(iv) 第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、

●(v) 第2の表面プライマーについての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)、並びに

●(vii) 第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス

10

20

30

40

50

配列（１７０）を含み、前記左インデックスの前記配列（１６０）及び／又は前記右インデックスの前記配列（１７０）が、別個に又は組み合わせで、前記目的の配列（１１０）が単離された前記試料供給源を特定する、提供することと、

ｂ）複数の二本鎖スプリントアダプター（２００）を提供することであって、個々の二本鎖スプリントアダプター（２００）が、第２のスプリント鎖（４００）にハイブリダイズした第１のスプリント鎖（３００）を含み、前記第１のスプリント鎖（３００）が、５'から３'の順序で配置された領域である、第１の領域（３２０）、内部領域（３１０）、及び第２の領域（３３０）を含み、前記第１のスプリント鎖（３１０）の前記内部領域が、前記第２のスプリント鎖（４００）にハイブリダイズしており、前記第２のスプリント鎖が、５'から３'の順序で配置された領域である、（ｉ）第４の表面プライマーについて 10
のユニバーサル結合配列を有する第２のサブ領域、及び（ｉｉ）第３の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第１のサブ領域を含む、提供することと、

ｃ）前記別個の区画内で、前記一本鎖核酸ライブラリ分子（１００）の集団を、複数の二本鎖スプリントアダプター（２００）と接触させることであって、前記接触させることが、前記第１のスプリント鎖（３００）の部分を、前記ライブラリ分子（１００）の部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で行われ、それによって、前記ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体（５００）の集団を生成し、これにより、個々の第１のスプリント鎖の前記第１の領域（３２０）が、個々のライブラリ分子（１００）の前記第１の表面プライマー（１２０）についての前記結合配列にハイブリダイズしており、前記個々の第１のスプリント鎖の前記第３の領域（３３０）が、前記個々の 20
ライブラリ分子（１００）の前記第２の表面プライマー（１３０）についての前記結合配列にハイブリダイズしており、前記ライブラリースプリント複合体（５００）の各々が、前記ライブラリ分子の５'末端と前記第２のスプリント鎖（３００）の３'末端との間の第１のニックを含み、前記ライブラリースプリント複合体（５００）の各々が、前記第２のスプリント鎖（３００）の５'末端と前記ライブラリ分子（１００）の３'末端との間の第２のニックを含み、前記第１及び第２のニックが、酵素的にライゲーション可能である、接触させることと、

ｄ）前記別個の区画内で、前記ライブラリースプリント複合体（５００）の集団を、リガーゼと、前記第１及び第２のニックを酵素的にライゲーションするのに好適である条件下で接触させ、それによって、各々が前記第１のスプリント鎖（３００）にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）の２つ以上の集団を生成することと、 30

ｅ）前記別個の区画からの前記共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）の２つ以上の集団を一緒にプールして、前記複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を含む、共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）のマルチプレックス混合物を生成することと、を含む、方法。

【請求項１０２】

ステップ（ｅ）の前記マルチプレックス混合物中の個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）が、第３の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第２のスプリント鎖領域（４００）を含み、前記方法が、

ａ）前記共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）のマルチプレックス混合物を、複数の前記第３の表面プライマーが支持体上に固定化された前記支持体上に、個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を、個々の固定化された第３の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、複数の前記共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を固定化することと、 40

ｂ）固定化された前記共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）のマルチプレックス混合物を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、前記支持体上でのローリングサークル増幅反応を、前記複数の第３の表面プライマーを固定化された増幅プライマーとして使用し、前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を生成することであって、前記複数のヌクレオチドが、 d 50

A T P、d G T P、d C T P、d T T P、及び／又はd U T Pを含む、生成することと、を更に含む、請求項101に記載の方法。

【請求項103】

ローリングサークル増幅反応を、

a) ステップ(d)又は(e)の、前記第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズした前記共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の2つ以上の集団を、少なくとも1つのエキソヌクレアーゼ酵素と、前記複数の第1のスプリント鎖(300)を除去するのに好適である条件下で接触させ、前記共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の集団を保持することと、

b) 共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の保持された前記2つ以上の集団を、複数の可溶性増幅プライマー、複数の鎖置換ポリメラーゼ、及び複数のヌクレオチドと、ローリングサークル増幅反応を行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の核酸コンカテマー分子を生成することであって、前記複数のヌクレオチドが、d A T P、d G T P、d C T P、d T T P、及び／又はd U T Pを含む、生成することによって行うことを更に含む、請求項101に記載の方法。

【請求項104】

c) 前記複数のコンカテマー分子を、複数の前記第3の表面プライマーが上に固定化された支持体上に、前記コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された前記第3の表面プライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、前記複数のコンカテマー分子を固定化することと、

d) 固定化された前記複数のコンカテマー分子(共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)にハイブリダイズしたもの)を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、前記支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の前記共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることであって、前記複数のヌクレオチドが、d A T P、d G T P、d C T P、d T T P、及び／又はd U T Pを含む、伸長させることと、を更に含む、請求項103に記載の方法。

【請求項105】

ローリングサークル増幅反応を、ステップ(d)又は(e)の、各々が前記第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズした前記共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の2つ以上の集団を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、ローリングサークル増幅反応を行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数のコンカテマー分子を生成することであって、前記複数のヌクレオチドが、d A T P、d G T P、d C T P、d T T P、及び／又はd U T Pを含む、生成することによって行うことを更に含む、請求項101に記載の方法。

【請求項106】

a) 共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)にハイブリダイズした前記複数のコンカテマー分子を、複数の前記第3の表面プライマーが上に固定化された支持体上に、前記コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された前記第3の表面プライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)にハイブリダイズした前記複数のコンカテマー分子を固定化することと、

b) 複数の固定化された前記コンカテマー分子を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、前記支持体上でのローリングサークル増幅反応を、前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることであって、前記複数のヌクレオチドが、d A T P、d G T P、d C T P、d T T P、及び／又はd U T Pを含む、伸長させることと、を更に含む、請求項105に記載の方法。

【請求項107】

前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子の挿入領域（１１０）及び第１の左インデックス配列（１６０）及び／又は第１の右インデックス配列（１７０）をシーケンシングすることであって、前記挿入領域（１１０）の配列が、前記第１の左インデックス配列（１６０）及び／又は第１の右インデックス配列（１７０）とともに、前記目的の配列の前記試料供給源を特定するために使用され得る、シーケンシングすることを更に含む、請求項１０２、１０４、又は１０６に記載の方法。

【請求項１０８】

前記シーケンシング反応が、

a) 前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子を、複数のシーケンシングプライマー、複数のシーケンシングポリメラーゼ、及び各々が２'又は３'鎖終結部分を含む複数の検出可能に標識されたヌクレオチド類似体と、前記検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を、前記シーケンシングプライマーの３'末端内に組み込むのに好適である条件下で結合させることと、

b) 結合した前記検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を検出することと、

c) 前記検出可能に標識されたヌクレオチド類似体の核酸塩基を特定することと、を含む、請求項１０７に記載の方法。

【請求項１０９】

前記シーケンシング反応が、２段階のシーケンシング反応を用い、第１の段階が、

a) 前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子を、複数のシーケンシングプライマー、複数の第１のシーケンシングポリメラーゼ、及び複数の検出可能に標識された多価分子と、個々のコンカテマー分子を、シーケンシングプライマー、第１のシーケンシングポリメラーゼ、及び検出可能に標識された多価分子に結合させる（例えば、複数の多価複合型ポリメラーゼを形成する）のに好適である条件下で結合させることと、

b) 結合した前記検出可能に標識された多価分子を検出することと、

c) 前記検出可能に標識された多価分子の核酸塩基を特定することと、を含む、請求項１０７に記載の方法。

【請求項１１０】

前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子への前記検出可能に標識された多価分子の前記結合が、請求項９９又は１００に記載の方法による少なくとも１つのアビディティ複合体を形成する、請求項１０９に記載の方法。

【請求項１１１】

前記方法が、第２の段階を行うことを更に含み、前記第２の段階が、

d) 前記複数の第１のシーケンシングポリメラーゼ及び複数の結合した前記多価分子を、前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子から除去し、各々がシーケンシングプライマーにハイブリダイズした固定化された前記コンカテマー分子（核酸二重鎖）を保持することと、

e) 保持された前記固定化されたコンカテマー分子及びハイブリダイズした前記シーケンシングプライマーを、複数の第２のポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、前記ヌクレオチドを、前記シーケンシングプライマーの３'末端内に組み込むのに好適である条件下で接触させることと、を含む、請求項１０９に記載の方法。

【請求項１１２】

複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を調製する方法であって、

a) 一本鎖核酸ライブラリ分子（１００）の２つ以上の集団を提供することであって、ライブラリ分子（１００）の各集団、一本鎖核酸ライブラリ分子の各集団が、別個の区画内に收容されており、所与の集団における前記核酸ライブラリ分子が、

● (i) 第１の表面プライマーについての結合配列を有する第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）、

● (ii) 第１のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）、

10

20

30

40

50

● (i i i) 試料供給源から単離された目的の配列 (1 1 0)、

● (i v) 第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列 (1 5 0)、

● (v) 第2の表面プライマーについての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列 (1 3 0)、並びに

● (v i) 第1の左インデックス配列 (1 6 0) 及び／又は第1の右インデックス配列 (1 7 0) を含み、前記左インデックスの前記配列 (1 6 0) 及び／又は前記右インデックスの前記配列 (1 7 0) が、別個に又は組み合わせで、前記目的の配列 (1 1 0) が単離された前記試料供給源を特定する、提供することと、

b) 前記一本鎖核酸ライブラリ分子 (1 0 0) の2つ以上の集団と一緒に、同じ区画内にプールすることと、 10

c) ステップ (b) の前記区画に、複数の二本鎖スプリントアダプター (2 0 0) を添加することであって、個々の二本鎖スプリントアダプター (2 0 0) が、第2のスプリント鎖 (4 0 0) にハイブリダイズした第1のスプリント鎖 (3 0 0) を含み、前記第1のスプリント鎖 (3 0 0) が、5' から3' の順序で配置された領域である、第1の領域 (3 2 0)、内部領域 (3 1 0)、及び第2の領域 (3 3 0) を含み、前記第1のスプリント鎖 (3 1 0) の前記内部領域が、前記第2のスプリント鎖 (4 0 0) にハイブリダイズしており、前記第2のスプリント鎖が、(i) 第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第2のサブ領域、及び (i i) 第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第1のサブ領域の5' から3' の順序で配置された領域を含む、 20

d) ステップ (c) の同じ区画内にある前記一本鎖核酸ライブラリ分子 (1 0 0) の集団及び前記複数の二本鎖スプリントアダプター (2 0 0) をインキュベートすることであって、前記インキュベートすることが、前記第1のスプリント鎖 (3 0 0) の部分を、前記ライブラリ分子 (1 0 0) の部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で行われ、それによって、前記ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体 (5 0 0) の集団を生成し、これにより、個々の第1のスプリント鎖の前記第1の領域 (3 2 0) が、個々のライブラリ分子 (1 0 0) の前記第1の表面プライマー (1 2 0) についての前記結合配列にハイブリダイズしており、前記個々の第1のスプリント鎖の前記第3の領域 (3 3 0) が、前記個々のライブラリ分子 (1 0 0) の前記第2の表面プライマー (1 3 0) についての前記結合配列にハイブリダイズしており、前記ライブラリースプリント複合体 (5 0 0) の各々が、前記ライブラリ分子の5' 末端と前記第2のスプリント鎖 (3 0 0) の3' 末端との間の第1のニックを含み、前記ライブラリースプリント複合体 (5 0 0) の各々が、前記第2のスプリント鎖 (3 0 0) の5' 末端と前記ライブラリ分子 (1 0 0) の3' 末端との間の第2のニックを含み、前記第1及び第2のニックが、酵素的にライゲーション可能である、インキュベートすることと、

e) ステップ (d) の前記区画内の前記ライブラリースプリント複合体 (5 0 0) の集団を、リガーゼと、前記第1及び第2のニックを酵素的にライゲーションするのに好適である条件下で接触させ、それによって、各々が前記第1のスプリント鎖 (3 0 0) にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子 (6 0 0) の集団を生成し、それによって、前記複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を含む、共有結合性閉環状ライブラリ分子 (6 0 0) のマルチプレックス混合物を生成することと、を含む、方法。 40

【請求項 1 1 3】

ステップ (e) の前記マルチプレックス混合物中の個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子 (6 0 0) が、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第2のスプリント鎖領域 (4 0 0) を含み、前記方法が、

a) 複数の前記共有結合性閉環状ライブラリ分子 (6 0 0) を、複数の前記第3の表面プライマーが支持体上に固定化された前記支持体上に、個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子 (6 0 0) を、個々の固定化された第3の表面プライマーにハイブリダイズさせる 50

のに好適である条件下で分配し、それによって、前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を固定化することと、

ｂ）複数の固定化された前記共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、前記支持体上でのローリングサークル増幅反応を、前記複数の第３の表面プライマーを固定化された増幅プライマーとして使用し、前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を生成することであって、前記複数のヌクレオチドが、 $dATP$ 、 $dGTP$ 、 $dCTP$ 、 $dTTP$ 、及び／又は $dUTP$ を含む、生成することと、を更に含む、請求項１１２に記載の方法。

10

【請求項１１４】

ローリングサークル増幅反応を、

ａ）ステップ（ｄ）又は（ｅ）の、前記第１のスプリント鎖（３００）にハイブリダイズした前記共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）の集団を、少なくとも１つのエキソヌクレアーゼ酵素と、前記複数の第１のスプリント鎖（３００）を除去するのに好適である条件下で接触させ、前記共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）の集団を保持すること、

ｂ）共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）の保持された前記集団を、複数の可溶性増幅プライマー、複数の鎖置換ポリメラーゼ、及び複数のヌクレオチドと、ローリングサークル増幅反応を行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の核酸コンカテマー分子を生成することであって、前記複数のヌクレオチドが、 $dATP$ 、 $dGTP$ 、 $dCTP$ 、 $dTTP$ 、及び／又は $dUTP$ を含む、生成することによって行うことを更に含む、請求項１１２に記載の方法。

20

【請求項１１５】

ｃ）前記複数のコンカテマー分子を、複数の前記第３の表面プライマーが上に固定化された支持体上に、前記コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された前記第３の表面プライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、前記複数のコンカテマー分子を固定化することと、

ｄ）固定化された前記複数のコンカテマー分子（共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）にハイブリダイズしたもの）を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、前記支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の前記共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることであって、前記複数のヌクレオチドが、 $dATP$ 、 $dGTP$ 、 $dCTP$ 、 $dTTP$ 、及び／又は $dUTP$ を含む、伸長させることと、を更に含む、請求項１１４に記載の方法。

30

【請求項１１６】

ローリングサークル増幅反応を、ステップ（ｄ）又は（ｅ）の、各々が前記第１のスプリント鎖（３００）にハイブリダイズした前記共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）の集団を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、ローリングサークル増幅反応を行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数のコンカテマー分子を生成することであって、前記複数のヌクレオチドが、 $dATP$ 、 $dGTP$ 、 $dCTP$ 、 $dTTP$ 、及び／又は $dUTP$ を含む、生成することによって行うことを更に含む、請求項１１２に記載の方法。

40

【請求項１１７】

ｃ）共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）にハイブリダイズした前記複数のコンカテマー分子を、複数の前記第３の表面プライマーが上に固定化された支持体上に、前記コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された前記第３の表面プライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）にハイブリダイズした前記複数のコンカテマー分子を固定化することと、

50

d) 複数の固定化された前記コンカテマー分子を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、前記支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の前記共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることであって、前記複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、伸長させることと、を更に含む、請求項116に記載の方法。

【請求項118】

前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子の挿入領域(110)及び第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス配列(170)をシーケンシングすることであって、前記挿入領域(110)の配列が、前記第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス配列(170)とともに、前記目的の配列の前記試料供給源を特定するために使用され得る、シーケンシングすることを更に含む、請求項113、115、又は117に記載の方法。

10

【請求項119】

前記シーケンシング反応が、

a) 前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子を、複数のシーケンシングプライマー、複数のシーケンシングポリメラーゼ、及び各々が2'又は3'鎖終結部分を含む複数の検出可能に標識されたヌクレオチド類似体と、前記検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を、前記シーケンシングプライマーの3'末端内に組み込むのに好適である条件下で結合させることと、

20

b) 結合した前記検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を検出することと、

c) 前記検出可能に標識されたヌクレオチド類似体の核酸塩基を特定することと、を含む、請求項118に記載の方法。

【請求項120】

前記シーケンシング反応が、2段階のシーケンシング反応を用い、第1の段階が、

a) 前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子を、複数のシーケンシングプライマー、複数の第1のシーケンシングポリメラーゼ、及び複数の検出可能に標識された多価分子と、個々のコンカテマー分子を、シーケンシングプライマー、第1のシーケンシングポリメラーゼ、及び検出可能に標識された多価分子に結合させる(例えば、複数の多価複合型ポリメラーゼを形成する)のに好適である条件下で結合させることと、

30

b) 結合した前記検出可能に標識された多価分子を検出することと、

c) 前記検出可能に標識された多価分子の核酸塩基を特定することと、を含む、請求項118に記載の方法。

【請求項121】

前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子への前記検出可能に標識された多価分子の前記結合が、請求項99又は100に記載の方法による少なくとも1つのアビディティ複合体を形成する、請求項120に記載の方法。

【請求項122】

前記方法が、第2の段階を行うことを更に含み、前記第2の段階が、

40

d) 前記複数の第1のシーケンシングポリメラーゼ及び前記複数の結合した多価分子を、前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子から除去し、各々がシーケンシングプライマーにハイブリダイズした固定化された前記コンカテマー分子(核酸二重鎖)を保持することと、

e) 保持された前記固定化されたコンカテマー分子及びハイブリダイズしたシーケンシングプライマーを、複数の第2のポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、前記ヌクレオチドを、前記シーケンシングプライマーの3'末端内に組み込むのに好適である条件下で接触させることと、を含む、請求項120に記載の方法。

【請求項123】

追加のユニバーサルアダプターシーケンシングを核酸ライブラリ分子に付加するための

50

方法であって、

a) 複数の核酸ライブラリ分子 (100) を提供することであって、前記複数の核酸ライブラリ分子 (100) が各々、5' から 3' の順序で配置された配列である、

(i) 第1の左ユニバーサルアダプター配列 (120)、

(ii) 第2の左ユニバーサルアダプター配列 (140)、

(iii) 目的の配列 (110)、

(iv) 第2の右ユニバーサルアダプター配列 (150)、及び

(v) 第1の右ユニバーサルアダプター配列 (130) を含む、提供することと、

b) ステップ (a) の個々のライブラリ分子を、第1のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第1のプライマー伸長反応 (又は第1のPCR) を行うことであって、前記第1のテール付きプライマーが、第3の左ユニバーサルアダプター配列を保有する5' 領域、及び前記ライブラリ分子 (100) の前記第1の左ユニバーサルアダプター配列 (120) の少なくとも一部分と相補的である3' 領域を含み、前記第1のプライマー伸長反応 (又は第1のPCR) が、複数の第1の修飾されたライブラリ分子を生成し、前記複数の第1の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、前記第3の左ユニバーサルアダプター配列が付加されており、前記第1のテール付きプライマーの前記第3の左ユニバーサルアダプター配列が、

フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は

コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、

c) ステップ (a) の個々の第1の修飾されたライブラリ分子を、第2のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第2のプライマー伸長反応 (又は第2のPCR) を行うことであって、前記第2のテール付きプライマーが、第3の右ユニバーサルアダプター配列を保有する5' 領域、及び前記第1の修飾されたライブラリ分子の前記第1の右ユニバーサルアダプター配列 (130) の少なくとも一部分と相補的である3' 領域を含み、前記第2のプライマー伸長反応 (又は第2のPCR) が、複数の第2の修飾されたライブラリ分子を生成し、前記複数の第2の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、前記第3の右ユニバーサルアダプター配列が付加されており、前記第2のテール付きプライマーの前記第3の右ユニバーサルアダプター配列が、

フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は

コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、を含む、方法。

【請求項124】

前記核酸ライブラリ分子が各々、5' から 3' の順序で配置された配列である、

(i) 第1の表面プライマーについての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列 (120)、

(ii) 第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列 (140)、

(iii) 目的の配列 (110)、

(iv) 第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列 (150)、及び

(v) 第2の表面プライマーについての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプ

10

20

30

40

50

ター配列（１３０）を含む、請求項１２３に記載の方法。

【請求項１２５】

d) ステップ(c)の個々の第２の修飾されたライブラリ分子を、第３のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第３のプライマー伸長反応（又は第３のPCR）を行うことであって、前記第３のテール付きプライマーが、第４の左ユニバーサルアダプター配列を保有する５'領域、及び前記第２の修飾されたライブラリ分子の前記第３の左ユニバーサルアダプター配列の少なくとも一部分と相補的である３'領域を含み、前記第３のプライマー伸長反応（又は第３のPCR）が、複数の第３の修飾されたライブラリ分子を生成し、前記複数の第３の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、前記第４の左ユニバーサルアダプター配列が付加されており、前記第３のテール付きプライマーの前記第４の左ユニバーサルアダプター配列が、

10

フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

第１若しくは第２の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は

コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、

e) ステップ(d)の個々の第３の修飾されたライブラリ分子を、第４のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第４のプライマー伸長反応（又は第４のPCR）を行うことであって、前記第４のテール付きプライマーが、第４の右ユニバーサルアダプター配列を保有する５'領域、及び前記第３の修飾されたライブラリ分子の前記第３の右ユニバーサルアダプター配列の少なくとも一部分と相補的である３'領域を含み、前記第４のプライマー伸長反応（又は第４のPCR）が、複数の第４の修飾されたライブラリ分子を生成し、前記複数の第４の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、前記第４の右ユニバーサルアダプター配列が付加されており、前記第４のテール付きプライマーの前記第４の右ユニバーサルアダプター配列が、

20

フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

第１若しくは第２の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

30

フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は

コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、を更に含む、請求項１２３に記載の方法。

【請求項１２６】

f) ステップ(e)の個々の第４の修飾されたライブラリ分子を、第５のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第５のプライマー伸長反応（又は第５のPCR）を行うことであって、前記第５のテール付きプライマーが、第５の左ユニバーサルアダプター配列を保有する５'領域、及び前記第４の修飾されたライブラリ分子の前記第４の左ユニバーサルアダプター配列の少なくとも一部分と相補的である３'領域を含み、前記第５のプライマー伸長反応（又は第５のPCR）が、複数の第５の修飾されたライブラリ分子を生成し、前記複数の第５の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、前記第５の左ユニバーサルアダプター配列が付加されており、前記第５のテール付きプライマーの前記第５の左ユニバーサルアダプター配列が、

40

フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

第１若しくは第２の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は

コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行う

50

ことと、

g) ステップ (f) の個々の第 5 の修飾されたライブラリ分子を、第 6 のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第 6 のプライマー伸長反応 (又は第 6 の PCR) を行うことであって、前記第 6 のテール付きプライマーが、第 6 の右ユニバーサルアダプター配列を保有する 5' 領域、及び前記第 5 の修飾されたライブラリ分子の前記第 4 の右ユニバーサルアダプター配列の少なくとも一部分と相補的である 3' 領域を含み、前記第 6 のプライマー伸長反応 (又は第 6 の PCR) が、複数の第 6 の修飾されたライブラリ分子を生成し、前記複数の第 6 の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、前記第 6 の右ユニバーサルアダプター配列が付加されており、前記第 6 のテール付きプライマーの前記第 6 の右ユニバーサルアダプター配列が、

10

フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、

第 1 若しくは第 2 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、

フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は

コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、を更に含む、請求項 125 に記載の方法。

【請求項 127】

前記第 1 のテール付きプライマー、前記第 3 のテール付きプライマー、及び／又は前記第 5 のテール付きプライマーが、左インデックス配列を更に含む、請求項 123～126 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 128】

前記第 1 のテール付きプライマー、前記第 3 のテール付きプライマー、及び／又は前記第 5 のテール付きプライマーが、左固有識別配列を更に含む、請求項 123～126 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 129】

前記第 2 のテール付きプライマー、前記第 4 のテール付きプライマー、及び／又は前記第 6 のテール付きプライマーが、右インデックス配列を更に含む、請求項 123～126 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 130】

前記第 2 のテール付きプライマー、前記第 4 のテール付きプライマー、及び／又は前記第 6 のテール付きプライマーが、右固有識別配列を更に含む、請求項 123～126 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 131】

ステップ (b) の付加された前記第 3 の左ユニバーサルアダプター配列が、第 1 のスプリント鎖の第 1 の領域 (320) に結合することができる、請求項 123 に記載の方法。

【請求項 132】

ステップ (c) の付加された前記第 3 の右ユニバーサルアダプター配列が、第 1 のスプリント鎖の第 2 の領域 (330) に結合することができる、請求項 123 に記載の方法。

【請求項 133】

ステップ (d) の付加された前記第 4 の左ユニバーサルアダプター配列が、第 1 のスプリント鎖の第 1 の領域 (320) に結合することができる、請求項 125 に記載の方法。

【請求項 134】

ステップ (e) の付加された前記第 4 の右ユニバーサルアダプター配列が、第 1 のスプリント鎖の第 2 の領域 (330) に結合することができる、請求項 125 に記載の方法。

【請求項 135】

ステップ (f) の付加された前記第 5 の左ユニバーサルアダプター配列が、第 1 のスプリント鎖の第 1 の領域 (320) に結合することができる、請求項 126 に記載の方法。

【請求項 136】

ステップ (g) の付加された前記第 5 の右ユニバーサルアダプター配列が、第 1 のスプ

50

リント鎖の第2の領域(330)に結合することができる、請求項126に記載の方法。

【請求項137】

複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法であって、

a) 複数の二本鎖スプリントアダプター(200)を提供することであって、個々の二本鎖スプリントアダプター(200)が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズした第1のスプリント鎖(300)を含み、前記第1のスプリント鎖(300)が、5'から3'の順序で配置された領域である、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含み、前記第1のスプリント鎖(310)の前記内部領域が、前記第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズしており、前記第2のスプリント鎖が、5'から3'の順序で配置された領域である、(i)第1の表面プライマーについて 10
のユニバーサル結合配列を有する第2のサブ領域、及び(ii)第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第1のサブ領域を含む、提供することと、

b) 前記複数の二本鎖スプリントアダプターを、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)とハイブリダイズさせることであって、個々のライブラリ分子が、5'から3'の順序で配置された領域である、(i)第3の表面プライマーについての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、(ii)第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、(iii)目的の配列(110)、(iv)第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、及び(v)第4の表面プライマーについての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)を含 20
み、前記ハイブリダイズさせることが、前記第1のスプリント鎖(300)の部分を、前記ライブラリ分子(100)の部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で行われ、それによって、前記ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体(500)を生成し、これにより、前記第1のスプリント鎖の前記第1の領域(320)が、前記第3の表面プライマー(120)についての前記結合配列にハイブリダイズしており、前記第1のスプリント鎖の前記第3の領域(330)が、前記第4の表面プライマー(130)についての前記結合配列にハイブリダイズしており、前記ライブラリースプリント複合体(500)が、前記ライブラリ分子の5'末端と前記第2のスプリント鎖(400)の3'末端との間の第1のニックを含み、前記ライブラリースプリント複合体(500)が、前記第2のスプリント鎖(400)の5'末端と前記ライブラリ分子(100)の3'末端との間の第2のニックを含み、前記第1及び第2のニックが、酵素的にライゲーション可能である、ハイブリダイズさせることと、を含む、方法。 30

【請求項138】

前記複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)が、第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス配列(170)を更に含む、請求項137に記載の方法。

【請求項139】

前記複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)が、第1の左固有識別配列(180)及び／又は第1の右固有識別配列(190)を更に含む、請求項137に記載の方法。

【請求項140】

前記複数の二本鎖スプリントアダプター(200)及び前記複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)を、リガーゼと、前記第1及び第2のニックを酵素的にライゲーションするのに好適である条件下で接触させ、それによって、各々が前記第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズした複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を生成することを更に含む、請求項137に記載の方法。 40

【請求項141】

前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を、少なくとも1つのエキソヌクレアーゼ酵素と接触させて、前記複数の第1のスプリント鎖(300)を除去し、前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を保持することを更に含む、請求項140に記載の方法。 50

【請求項 1 4 2】

前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）が、前記第2の表面プライマーについての前記ユニバーサル結合配列を含む第2のスプリント鎖領域（400）を含み、前記方法が、保持された前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を、複数の前記第2の表面プライマーが支持体上に固定化された前記支持体上に、個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を、個々の固定化された第2の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を固定化することを更に含む、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

複数の固定化された前記共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、前記支持体上でのローリングサークル増幅反応を、前記複数の第2の表面プライマーを固定化された増幅プライマーとして使用し、前記複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を生成することを更に含む、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、請求項 1 4 3 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記支持体上の前記複数の固定化された第2の表面キャプチャープライマーが、前記支持体上の所定の又はランダムな位置において位置する、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

前記支持体上の前記複数の固定化された第2の表面キャプチャープライマーが、各々と流体連通しており、試薬の溶液が前記支持体上に流れることを可能にし、これにより、前記複数の固定化された第2の表面プライマーが、前記試薬と本質的に同時に超並列様式で反応することができ、任意選択で、前記試薬の溶液が、酵素、ヌクレオチド、及び二価カチオンを含む、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記支持体上の前記複数の固定化された核酸コンカテマー分子の密度が、 1 mm^2 当たり $10^4 \sim 10^8$ である、請求項 1 4 3 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

前記方法が、前記複数の固定化されたコンカテマーをシーケンシングすることを更に含む、前記シーケンシングすることが、

a) 前記複数の固定化されたコンカテマー分子を、(i) 複数のシーケンシングポリメラーゼ、及び(ii) 複数の可溶性シーケンシングプライマーと接触させることであって、前記接触させることが、複数の複合型ポリメラーゼを形成するのに好適である条件下で行われ、前記複数の複合型ポリメラーゼが各々、核酸二重鎖に結合したシーケンシングポリメラーゼを含み、前記核酸二重鎖が、可溶性シーケンシングプライマーにハイブリダイズしたコンカテマー分子を含む、接触させることと、

b) 前記複数の複合型シーケンシングポリメラーゼを、複数のヌクレオチドと、少なくとも1つのヌクレオチドを複合型シーケンシングポリメラーゼに結合させるのに好適である条件下で接触させることであって、前記複数のヌクレオチドが、少なくとも1つのヌクレオチド類似体を含み、前記少なくとも1つのヌクレオチド類似体が、フルオロフォアで標識されており、除去可能な鎖終結部分を糖3'位において有する、接触させることと、

c) 少なくとも1つのヌクレオチドを、ハイブリダイズした前記シーケンシングプライマーの3'末端内に組み込み、それによって、複数の新生の伸長したシーケンシングプライマーを生成することと、

d) 組み込まれた前記ヌクレオチドを検出し、前記組み込まれたヌクレオチドの核酸塩基を特定することと、を含む、請求項 1 4 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 149】

前記複数のヌクレオチドが、除去可能な鎖終結部分を 3' 糖基において含み、前記除去可能な鎖終結部分が、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリル基、アリール基、ベンジル基、アジド基 (azide group)、アジド基 (azido group)、O-アジドメチル基、アミン基、アミド基、ケト基、イソシアネート基、リン酸基、チオ基、ジスルフィド基、カーボネート基、尿素基、又はシリル基を含み、前記除去可能な鎖終結部分が、伸長可能な 3' OH 部分を糖基上で生成するように、化学化合物で切断可能である、請求項 148 に記載の方法。

【請求項 150】

前記複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び dUTP からなる群から選択される 1 つのタイプのヌクレオチドを含む、請求項 148 に記載の方法。

10

【請求項 151】

前記複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又は dUTP からなる群から選択される 2 つ以上のタイプのヌクレオチドのいずれかの組み合わせの混合物を含む、請求項 148 に記載の方法。

【請求項 152】

前記方法が、前記複数の固定化されたコンカテマーをシーケンシングすることを更に含み、前記シーケンシングすることが、

a) 前記複数の固定化されたコンカテマー分子を、(i) 複数のシーケンシングポリメラーゼ、及び (ii) 複数の前記可溶性ユニバーサルシーケンシングプライマーと接触させることであって、前記接触させることが、複数の第 1 の複合型ポリメラーゼを形成するのに好適である条件下で行われ、前記複数の第 1 の複合型ポリメラーゼが各々、核酸二重鎖に結合したシーケンシングポリメラーゼを含み、前記核酸二重鎖が、可溶性シーケンシングプライマーにハイブリダイズしたコンカテマー分子を含む、接触させることと、

20

b) 前記複数の複合型シーケンシングポリメラーゼを、複数の検出可能に標識された多価分子と、前記多価分子の相補的ヌクレオチド単位を、前記複数の第 1 の複合型ポリメラーゼのうちの少なくとも 2 つに結合させて、それによって、複数の多価複合型ポリメラーゼを形成するのに好適である条件下で接触させて、複数の多価複合型ポリメラーゼを形成することであって、前記条件が、前記複数の多価複合型ポリメラーゼのシーケンシングプライマー内への前記相補的ヌクレオチド単位の組み込みを阻害し、前記複数の多価分子における個々の多価分子が、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、各ヌクレオチドアームが、ヌクレオチド単位に付着している、形成することと、

30

c) 前記複数の多価複合型ポリメラーゼを検出することと、を含む、請求項 142 に記載の方法。

【請求項 153】

d) 前記複数の多価複合型ポリメラーゼを解離させ、前記複数の第 1 のシーケンシングポリメラーゼ及びそれらの結合した多価分子を除去し、複数の前記核酸二重鎖を保持すること、

e) ステップ d) の複数の保持された前記核酸二重鎖を、複数の第 2 のシーケンシングポリメラーゼと接触させることであって、前記接触させることが、前記複数の第 2 のシーケンシングポリメラーゼを、前記複数の保持された核酸二重鎖に結合させるのに好適である条件下で行われ、それによって、複数の第 2 の複合型ポリメラーゼを形成し、前記複数の第 2 の複合型ポリメラーゼが各々、保持された核酸二重鎖に結合した第 2 のシーケンシングポリメラーゼを含む、接触させること、

40

f) 前記複数の第 2 の複合型ポリメラーゼを、除去可能な鎖終結部分を糖 3' 位において有する少なくとも 1 つのヌクレオチド類似体を含む複数のヌクレオチドと接触させることであって、前記接触させることが、前記複数のヌクレオチドからの相補的ヌクレオチドを、ステップ e) の前記第 2 の複合型ポリメラーゼのうちの少なくとも 2 つに結合させるのに好適である条件下で行われ、それによって、複数のヌクレオチド複合型ポリメラーゼ

50

を形成し、前記条件が、前記ヌクレオチド複合型ポリメラーゼのシーケンシングプライマー内への結合した前記相補的ヌクレオチドの組み込みを促進するのに好適である、接触させることを更に含む、請求項 1 5 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

g) 前記ヌクレオチド複合型ポリメラーゼの前記シーケンシングプライマー内に組み込まれた相補的ヌクレオチドを検出することを更に含む、請求項 1 5 3 に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

g) 前記ヌクレオチド複合型ポリメラーゼの前記シーケンシングプライマー内に組み込まれた相補的ヌクレオチドを検出することと、

h) 前記ヌクレオチド複合型ポリメラーゼの前記シーケンシングプライマー内に組み込まれた前記相補的ヌクレオチドの核酸塩基を特定することと、を更に含む、請求項 1 5 3 に記載の方法。

【請求項 1 5 6】

少なくとも 1 つのアビディティ複合体を形成することによってシーケンシングする方法であって、

a) 第 1 のユニバーサルシーケンシングプライマー、第 1 のシーケンシングポリメラーゼ、及び第 1 の検出可能に標識された多価分子を、請求項 1 6 に記載のコンカテマー分子の第 1 の部分に結合させ、それによって、第 1 の結合複合体を形成することであって、前記第 1 の多価分子の第 1 のヌクレオチド単位が、前記第 1 のシーケンシングポリメラーゼに結合する、形成することと、

b) 第 2 のユニバーサルシーケンシングプライマー、第 2 のシーケンシングポリメラーゼ、及び前記第 1 の検出可能に標識された多価分子を、同じコンカテマー分子の第 2 の部分に結合させ、それによって、第 2 の結合複合体を形成することであって、前記第 1 の多価分子の第 2 のヌクレオチド単位が、前記第 2 のシーケンシングポリメラーゼに結合し、同じ多価分子を含む前記第 1 及び第 2 の結合複合体が、アビディティ複合体を形成し、前記第 1 の検出可能に標識された多価分子が、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、各ヌクレオチドアームが、ヌクレオチド単位に付着しており、前記コンカテマー分子が、目的の配列 (1 1 0)、並びに前記第 1 及び第 2 のユニバーサルシーケンシングプライマーに結合するユニバーサルプライマー結合部位の 2 つ以上のタンデムリピート配列を含み、前記接触させることが、前記第 1 及び第 2 の結合複合体における結合した第 1 及び第 2 のヌクレオチド単位のポリメラーゼ触媒組み込みを阻害するのに好適である条件下で行われる、形成することと、

c) 前記同じコンカテマー分子上の前記第 1 及び第 2 の結合複合体を検出することと、

d) 前記第 1 の結合複合体における前記第 1 のヌクレオチド単位を特定し、それによって、前記コンカテマーテンプレート分子の前記第 1 の部分の配列を決定し、前記第 2 の結合複合体における前記第 2 のヌクレオチド単位を特定し、それによって、前記コンカテマーテンプレート分子の前記第 2 の部分の配列を決定することと、を含む、方法。

【請求項 1 5 7】

前記個々の多価分子の前記コアに付着した前記複数のヌクレオチドアームが、同じタイプのヌクレオチド単位を有し、前記ヌクレオチド単位のタイプが、d A T P、d G T P、d C T P、d T T P、及び d U T P からなる群から選択される、請求項 1 5 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 8】

前記複数の多価分子が、2 つ以上のタイプの多価分子のいずれかの組み合わせの混合物を含み、各タイプが、d A T P、d G T P、d C T P、d T T P、及び／又は d U T P からなる群から選択されるヌクレオチド単位を有する、請求項 1 5 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

前記複数のヌクレオチドが、除去可能な鎖終結部分を 3' 糖基において含み、前記除去可能な鎖終結部分が、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリル基、アリール基、ベンジル基、アジド基 (azide group)、アジド基 (azido group)

p)、O-アジドメチル基、アミン基、アミド基、ケト基、イソシアネート基、リン酸基、チオ基、ジスルフィド基、カーボネート基、尿素基、又はシリル基を含み、前記除去可能な鎖終結部分が、伸長可能な3'OH部分を糖基上で生成するように、化学化合物で切断可能である、請求項153に記載の方法。

【請求項160】

前記複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及びdUTPからなる群から選択される1つのタイプのヌクレオチドを含む、請求項153に記載の方法。

【請求項161】

前記複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPからなる群から選択される2つ以上のタイプのヌクレオチドのいずれかの組み合わせの混合物を含む、請求項153に記載の方法。

【請求項162】

前記支持体が、ガラス又はプラスチック基質を含む、請求項142に記載の方法。

【請求項163】

前記支持体が、45度以下の水接触角を有する少なくとも1つの親水性ポリマーコーティングで不動態化されている、請求項142に記載の方法。

【請求項164】

前記少なくとも1つの親水性ポリマーコーティングが、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリ(ビニルアルコール)(PVA)、ポリ(ビニルピリジン)、ポリ(ビニルピロリドン)(PVP)、ポリ(アクリル酸)(PAA)、ポリアクリルアミド、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAM)、ポリ(メチルメタクリレート)(PMA)、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(HEMA)、ポリ(オリゴ(エチレングリコール)メチルエーテルメタクリレート)(POEGMA)、ポリグルタミン酸(PGA)、ポリリジン、ポリグルコシド、ストレプトアビジン、及びデキストランからなる群から選択される分子を含む、請求項142に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2022年3月4日に提出された米国特許仮出願第63/316,784号及び2022年4月20日に提出された米国特許出願第17/725,065号の優先権及び利益を主張し、それらの各々の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

参照による配列表の組み込み

電子配列表(ELEM-003_001WO_SequenceListing_ST26.xml、サイズ:65,027バイト、及び作成日:2023年3月3日)の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

本開示は、核酸二本鎖スプリントアダプターを含む組成物、及び二本鎖スプリントアダプターを使用するための方法を提供する。二本鎖スプリントアダプターは、ライブラリ分子の一部分にハイブリダイズして、ニックを有するライブラリースプリント複合体を形成することができ、ニックは、ライゲーションされて、共有結合性閉環状分子を形成することができ、共有結合性閉環状分子は、下流増幅及びシーケンシングワークフローに供され得る。

【背景技術】

【0004】

本開示は、共有結合性閉環状分子のライブラリからのポリヌクレオチドの調製及びシーケンシングに関する。次世代シーケンシング技術における改善は、シーケンシング速度及

10

20

30

40

50

びデータ出力を大きく増加させており、これは、現在のシーケンシングプラットフォームの高い試料スループットをもたらしている。標的配列を有する閉環状ライブラリ分子の効率的な調製は、下流増幅及びシーケンシングワークフローに重要である。シーケンシングスループットを増加させる別の態様は、ライブラリ調製中に固有インデックス配列をDNA断片に添加することであり、これは、多数のライブラリが、各シーケンシング実行中に同時にプール及びシーケンシングされることを可能にする。したがって、下流の次世代シーケンシング技術に適合する、標的配列及び固有インデックス配列を含有する環状ライブラリ分子を産生及びシーケンシングするための代替の方法の必要性がある。この必要性に対処する組成物、方法、及びキットが、本明細書で提供される。

【発明の概要】

【0005】

本開示は、(i) 少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)に一方の側において隣接し、少なくとも第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)に他方の側において隣接する目的の配列(110)を含む一本鎖核酸ライブラリ分子(100)と、(ii) 第1のスプリント鎖(長スプリント鎖(300))及び第2のスプリント鎖(短スプリント鎖(400))を含む二本鎖スプリントアダプター(200)であって、二本鎖スプリントアダプター(200)が、二本鎖領域及び2つの隣接する一本鎖領域を含み、第1のスプリント鎖が、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含む、二本鎖スプリントアダプター(200)と、を含む、ライブラリースプリント複合体(500)であって、第1のスプリント鎖(310)の内部領域が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズしており、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域が、ライブラリ分子の少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)にハイブリダイズしており、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域が、ライブラリ分子の少なくとも第1の右ユニバーサル配列(130)にハイブリダイズしており、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体(500)を生成する、ライブラリースプリント複合体(500)を提供する。

【0006】

いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子(100)は、第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)を更に含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子(100)は、第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)を更に含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子(100)は、第1の左インデックス配列(160)を更に含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子(100)は、第1の右インデックス配列(170)を更に含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子(100)は、第1の左固有識別配列(180)を更に含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子(100)は、第1の右固有識別配列(190)を更に含む。

【0007】

いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子(100)は、(i) 第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、(ii) 第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、(iii) 第1の左インデックス配列(160)、(iv) 第1の右インデックス配列(170)、(v) 第1の左固有識別配列(180)、及び／又は(vi) 第1の右固有識別配列(190)いずれか1つ又は2つ以上のいずれかの組み合わせを更に含む。

【0008】

いくつかの実施形態において、第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)及び／又は第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)は、(i) フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、(ii) リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、(iii) 第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、(iv) 第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、(v) フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、(vi) リバース増幅

プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は（v i i）コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。

【0009】

いくつかの実施形態において、第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）及び／又は第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）は、（i）フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、（i i）リバーシシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、（i i i）第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、（i v）第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、（v）フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、（v i）リバーシ増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は（v i i）コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。

10

【0010】

いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、少なくとも2つのサブ領域を含み、第1のサブ領域は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第2のサブ領域は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第1及び第2のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーにハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）。

【0011】

いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、任意選択の第3のサブ領域を更に含み、任意選択の第3のサブ領域は、5～20個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は2～10個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、NN）を含む。

20

【0012】

いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）は、少なくとも2つのサブ領域を含む内部領域（310）を含み、第4のサブ領域は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第4のサブ領域は、第2のスプリント鎖（400）の第1のサブ領域にハイブリダイズし、第5のサブ領域は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第5のサブ領域は、第2のスプリント鎖（400）の第2のサブ領域にハイブリダイズし、第4及び第5のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーにハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）は、第6のサブ領域を更に含む内部領域（310）を含み、第6のサブ領域は、5～20個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は2～10個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、NN）を含み、第6のサブ領域は、第2のスプリント鎖（400）の第3のサブ領域にハイブリダイズする。

30

【0013】

本開示は、a) 5'から3'の順序で配置された構成要素である、（i）第1の表面プライマー（120）についての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）、（i i）第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）、（i i i）目的の配列（110）、（i v）第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）、及び（v）第2の表面プライマー（130）についての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）を含む一本鎖核酸ライブラリ分子（100）と、b) 5'から3'の順序で配置された構成要素である、第1の領域（320）、内部領域（310）、及び第2の領域（330）を含む第1のスプリント鎖（300）と、c) 3'から5'の順序で配置されたサブ領域である、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第1のサブ領域、及び第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第2のサブ領域を含む第2のスプリント鎖（400）と、を含む、ライブラリスプリント複合体（500）であって、第1のスプリント鎖（300）が、ライブラリ分子（100）の部分にハイブリダイズしており、それによって、

40

50

ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体（５００）を生成し、これにより、第１のスプリント鎖の第１の領域（３２０）が、第１の表面プライマー（１２０）についての結合配列にハイブリダイズしており、第１のスプリント鎖の第３の領域（３３０）が、第２の表面プライマー（１３０）についての結合配列にハイブリダイズしており、第２のスプリント鎖（４００）が、第１のスプリント鎖（３００）の内部領域（３１０）にハイブリダイズしており、ライブラリースプリント複合体（５００）が、ライブラリ分子の５'末端と第２のスプリント鎖の３'末端との間の第１のニックを含み、ライブラリースプリント複合体（５００）が、第２のスプリント鎖の５'末端とライブラリ分子の３'末端との間の第２のニックを含み、第１及び第２のニックが、酵素的にライゲーション可能である、ライブラリースプリント複合体（５００）を提供する。

10

【００１４】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体（５００）を更に含むライブラリースプリント複合体（５００）において、複数のライブラリースプリント複合体における個々のライブラリースプリント複合体の目的の配列（１１０）は、同じ目的の配列又は異なる目的の配列を含む。

【００１５】

本開示は、本開示の複数のライブラリースプリント複合体（５００）と、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼと、を含む、反応混合物を提供する。本開示は、本開示の複数のライブラリースプリント複合体（５００）と、リガーゼ酵素と、を含む、反応混合物を提供する。本開示は、本開示の複数のライブラリースプリント複合体（５００）と、Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼと、リガーゼ酵素と、を含む、反応混合物を提供する。いくつかの実施形態において、リガーゼ酵素は、Ｔ７ DNAリガーゼ、Ｔ３リガーゼ、Ｔ４リガーゼ、又はＴaqリガーゼを含む。

20

【００１６】

本開示は、目的の配列（１１０）と、少なくとも第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）と、少なくとも第１の右ユニバーサルアダプター配列（１３０）と、第２のスプリント鎖配列（４００）と、を含む、共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を提供する。

【００１７】

いくつかの実施形態において、本開示の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）は、第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）を更に含む。いくつかの実施形態において、本開示の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）は、第２の右ユニバーサルアダプター配列（１５０）を更に含む。いくつかの実施形態において、本開示の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）は、第１の左インデックス配列（１６０）を更に含む。いくつかの実施形態において、本開示の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）は、第１の右インデックス配列（１７０）を更に含む。いくつかの実施形態において、本開示の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）は、第１の左固有識別配列（１８０）を更に含む。いくつかの実施形態において、本開示の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）は、第１の右固有識別配列（１９０）を更に含む。

30

【００１８】

いくつかの実施形態において、本開示の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）は、（ｉ）第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）、（ｉｉ）第２の右ユニバーサルアダプター配列（１５０）、（ｉｉｉ）第１の左インデックス配列（１６０）、（ｉｖ）第１の右インデックス配列（１７０）、（ｖ）第１の左固有識別配列（１８０）、及び／又は（ｖｉ）第１の右固有識別配列（１９０）いずれか１つ又は２つ以上のいずれかの組み合わせを更に含む。

40

【００１９】

いくつかの実施形態において、第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）及び／又は第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）は、（ｉ）フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、（ｉｉ）リバーシシーケンシングプライ

50

マーについてのユニバーサル結合配列、(i i i) 第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、(i v) 第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、(v) フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、(v i) リバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は(v i i) コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。

【0020】

いくつかの実施形態において、第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)及び／又は第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)は、(i) フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、(i i) リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、(i i i) 第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、(i v) 第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、(v) フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、(v i) リバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は(v i i) コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。

10

【0021】

いくつかの実施形態において、本開示の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)は、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含む第1のスプリント鎖(長スプリント鎖(300))にハイブリダイズしており、共有結合性閉環状ライブラリ分子の第2のスプリント鎖配列(400)は、第1のスプリント鎖の内部領域(310)にハイブリダイズしており、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、ライブラリ分子の少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)にハイブリダイズしており、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、ライブラリ分子の少なくとも第1の右ユニバーサル配列(130)にハイブリダイズしている。

20

【0022】

いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)は、少なくとも2つのサブ領域を含み、第1のサブ領域は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第2のサブ領域は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第1及び第2のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーにハイブリダイズしない(又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す)。

【0023】

いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)は、任意選択の第3のサブ領域を更に含み、任意選択の第3のサブ領域は、5～20個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は2～10個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列(例えば、NN)を含む。

30

【0024】

いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、内部領域(310)を含み、少なくとも2つのサブ領域を含み、第4のサブ領域は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第4のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第1のサブ領域にハイブリダイズし、第5のサブ領域は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第5のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第2のサブ領域にハイブリダイズし、第4及び第5のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーにハイブリダイズしない(又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す)。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、第6のサブ領域を更に含む内部領域(310)を含み、第6のサブ領域は、5～20個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は2～10個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列(例えば、NN)を含み、第6のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第3のサブ領域にハイブリダイズする。

40

【0025】

本開示は、(i) 第1の表面プライマー(120)についての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)と、(i i) 第1のシーケンシングプライマー

50

についての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)と、(ii) 目的の配列(110)と、(iv) 第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)と、(v) 第2の表面プライマー(130)についての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)と、(vi) 第2のスプリント鎖(400)と、を含む、一本鎖共有結合性閉環状分子(600)であって、共有結合性閉環状分子(600)が、任意選択で、第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズしている、一本鎖共有結合性閉環状分子(600)を提供する。

【0026】

いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)は、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を更に含み、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の目的の配列(110)は、同じ目的の配列又は異なる目的の配列を含む。

10

【0027】

本開示は、本開示の複数の複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を含む反応混合物であって、個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)が、第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズしている、反応混合物を提供する。いくつかの実施形態において、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)及び少なくとも1つのエキソヌクレアーゼ酵素。いくつかの実施形態において、エキソヌクレアーゼ酵素は、エキソヌクレアーゼI、熱不安定性エキソヌクレアーゼI、又はT7エキソヌクレアーゼを含む。

20

【0028】

本開示は、二本鎖スプリントアダプター(200)を含むキットであって、二本鎖スプリントアダプター(200)が、(i) 第1のスプリント鎖(長スプリント鎖(300))、及び(ii) 第2のスプリント鎖(短スプリント鎖(400))を含み、第1のスプリント鎖(300)が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズして、二本鎖領域及び2つの隣接する一本鎖領域を形成することができ、第1のスプリント鎖(300)が、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含み、第1のスプリント鎖(310)の内部領域が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズすることができる、キットを提供する。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)及び第2のスプリント鎖(400)は、互いにハイブリダイズしており、二本鎖領域及び2つの隣接する一本鎖領域を有する二本鎖スプリントアダプター(200)を形成し、第1のスプリント鎖(310)の内部領域は、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズすることができる。

30

【0029】

いくつかの実施形態において、本開示のキットは、少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)に一方の側において隣接し、少なくとも第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)に他方の側において隣接する目的の配列(110)を有する一本鎖核酸ライブラリ分子(100)の環状化における使用のためのものである。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、ライブラリ分子(100)の少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)にハイブリダイズすることができ、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、ライブラリ分子の少なくとも第1の右ユニバーサル配列(130)にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態において、ライブラリ分子(100)の少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)は、(i) フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、(ii) リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、(iii) 第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、(iv) 第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、(v) フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、(vi) リバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は(vii) コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニ

40

50

バーサル結合配列を含む。

【0030】

いくつかの実施形態において、ライブラリ分子（100）の少なくとも第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）は、（i）フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、（ii）リバーシシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、（iii）第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、（iv）第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、（v）フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、（vi）リバーシ増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は（vii）コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。

10

【0031】

いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、少なくとも2つのサブ領域を含み、第1のサブ領域は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第2のサブ領域は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第1及び第2のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、任意選択の第3のサブ領域を更に含み、任意選択の第3のサブ領域は、5～20個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は2～10個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、NN）を含む。

20

【0032】

いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）は、少なくとも2つのサブ領域を含む内部領域（310）を含み、第4のサブ領域は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第4のサブ領域は、第2のスプリント鎖（400）の第1のサブ領域にハイブリダイズし、第5のサブ領域は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第5のサブ領域は、第2のスプリント鎖（400）の第2のサブ領域にハイブリダイズし、第4及び第5のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）は、第6のサブ領域を更に含む内部領域（310）を含み、第6のサブ領域は、5～20個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は2～10個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、NN）を含み、第6のサブ領域は、第2のスプリント鎖（400）の第3のサブ領域にハイブリダイズする。

30

【0033】

いくつかの実施形態において、本開示のキットは、T4ポリヌクレオチドキナーゼを更に含む。いくつかの実施形態において、本開示のキットは、リガーゼ酵素を更に含む。いくつかの実施形態において、本開示のキットは、T4ポリヌクレオチドキナーゼと、リガーゼ酵素と、を更に含む。いくつかの実施形態において、リガーゼ酵素は、T7 DNAリガーゼ、T3リガーゼ、T4リガーゼ、又はTaqリガーゼを含む。

【0034】

本開示は、複数のライブラリースプリント複合体（500）を形成するための方法であって、a）複数の二本鎖スプリントアダプターを提供することであって、個々の二本鎖スプリントアダプター（200）が、第2のスプリント鎖（400）にハイブリダイズした第1のスプリント鎖（300）を含み、二本鎖スプリントアダプターが、二本鎖領域及び2つの隣接する一本鎖領域を含み、第1のスプリント鎖が、第1の領域（320）、内部領域（310）、及び第2の領域（330）を含み、第1のスプリント鎖（310）の内部領域が、第2のスプリント鎖（400）にハイブリダイズしている、提供することと、b）複数の二本鎖スプリントアダプターを、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子（100）とハイブリダイズさせることであって、個々のライブラリ分子が、少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）に一方の側において隣接し、少なくとも第1の右ユ

40

50

ニバーサルアダプター配列（１３０）に他方の側において隣接する目的の配列（１１０）を含み、ハイブリダイズさせることが、第１のスプリント鎖（３２０）の第１の領域を、ライブラリ分子の少なくとも第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で行われ、条件が、第１のスプリント鎖（３３０）の第２の領域を、ライブラリ分子の少なくとも第１の右ユニバーサル配列（１３０）にハイブリダイズさせるのに好適であり、それによって、複数のライブラリ分子を環状化させて、複数のライブラリースプリント複合体（５００）を形成する、ハイブリダイズさせることと、を含む、方法を提供する。

【００３５】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体（５００）における個々のライブラリースプリント複合体（５００）は、ライブラリ分子の５'末端と第２のスプリント鎖の３'末端との間の第１のニックを含み、複数のライブラリースプリント複合体（５００）における個々のライブラリースプリント複合体（５００）は、第２のスプリント鎖の５'末端とライブラリ分子の３'末端との間の第２のニックを含む。いくつかの実施形態において、複数の核酸ライブラリ分子（１００）における個々の核酸ライブラリ分子（１００）は、第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）を更に含む。いくつかの実施形態において、複数の核酸ライブラリ分子（１００）における個々の核酸ライブラリ分子（１００）は、第２の右ユニバーサルアダプター配列（１５０）を更に含む。いくつかの実施形態において、複数の核酸ライブラリ分子（１００）における個々の核酸ライブラリ分子（１００）は、第１の左インデックス配列（１６０）を更に含む。いくつかの実施形態において、複数の核酸ライブラリ分子（１００）における個々の核酸ライブラリ分子（１００）は、第１の右インデックス配列（１７０）を更に含む。いくつかの実施形態において、複数の核酸ライブラリ分子（１００）における個々の核酸ライブラリ分子（１００）は、第１の左固有識別配列（１８０）を更に含む。いくつかの実施形態において、複数の核酸ライブラリ分子（１００）における個々の核酸ライブラリ分子（１００）は、第１の右固有識別配列（１９０）を更に含む。

【００３６】

いくつかの実施形態において、複数の核酸ライブラリ分子（１００）における個々の核酸ライブラリ分子（１００）は、（ｉ）第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）、（ｉｉ）第２の右ユニバーサルアダプター配列（１５０）、（ｉｉｉ）第１の左インデックス配列（１６０）、（ｉｖ）第１の右インデックス配列（１７０）、（ｖ）第１の左固有識別配列（１８０）、及び／又は（ｖｉ）第１の右固有識別配列（１９０）のうちのいずれか１つ又は２つ以上のいずれかの組み合わせを更に含む。いくつかの実施形態において、第１及び／又は第２の左ユニバーサルアダプター配列は、（ｉ）フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、（ｉｉ）リバーシシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、（ｉｉｉ）第１の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、（ｉｖ）第２の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、（ｖ）フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、（ｖｉ）リバーシ増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は（ｖｉｉ）コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。

【００３７】

いくつかの実施形態において、第１及び／又は第２の右ユニバーサルアダプター配列は、（ｉ）フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、（ｉｉ）リバーシシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、（ｉｉｉ）第１の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、（ｉｖ）第２の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、（ｖ）フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、（ｖｉ）リバーシ増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は（ｖｉｉ）コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。

【００３８】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)は、少なくとも2つのサブ領域を含み、第1のサブ領域は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第2のサブ領域は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第1及び第2のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーにハイブリダイズしない(又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す)。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)は、任意選択の第3のサブ領域を更に含み、任意選択の第3のサブ領域は、5〜20個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は2〜10個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列(例えば、NN)を含む。

【0039】

いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、少なくとも2つのサブ領域を含む内部領域(310)を含み、第4のサブ領域は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第4のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第1のサブ領域にハイブリダイズし、第5のサブ領域は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第5のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第2のサブ領域にハイブリダイズし、第4及び第5のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーにハイブリダイズしない(又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す)。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、第6のサブ領域を更に含む内部領域(310)を含み、第6のサブ領域は、5〜20個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は2〜10個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列(例えば、NN)を含み、第6のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第3のサブ領域にハイブリダイズする。

【0040】

本開示は、複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法であって、a) 複数の二本鎖スプリントアダプター(200)を提供することであって、個々の二本鎖スプリントアダプター(200)が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズした第1のスプリント鎖(300)を含み、第1のスプリント鎖(300)が、5'から3'の順序で配置された領域である、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含み、第1のスプリント鎖(310)の内部領域が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズしており、第2のスプリント鎖が、5'から3'の順序で配置された領域である、(i) 第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第2のサブ領域、及び(ii) 第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第1のサブ領域を含む、提供することと、b) 複数の二本鎖スプリントアダプターを、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)とハイブリダイズさせることであって、個々のライブラリ分子が、5'から3'の順序で配置された領域である、(i) 第1の表面プライマー(120)についての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、(ii) 第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、(iii) 目的の配列(110)、(iv) 第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、及び(v) 第2の表面プライマー(130)についての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)を含み、ハイブリダイズさせることが、第1のスプリント鎖(300)の部分を、ライブラリ分子(100)の部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で行われ、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体(500)を生成し、これにより、第1のスプリント鎖の第1の領域(320)が、第1の表面プライマー(120)についての結合配列にハイブリダイズしており、第1のスプリント鎖の第3の領域(330)が、第2の表面プライマー(130)についての結合配列にハイブリダイズしており、ライブラリースプリント複合体(500)が、ライブラリ分子の5'末端と第2のスプリント鎖(300)の3'末端との間の第1のニックを含み、ライブラリースプリント複合体(500)が、第2のスプリント鎖(300)の5'末端とライブラリ分子(100)

10

20

30

40

50

0) の 3' 末端との間の第 2 のニックを含み、第 1 及び第 2 のニックが、酵素的にライゲーション可能である、ハイブリダイズさせることと、を含む、方法を提供する。

【0041】

いくつかの実施形態において、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) は、第 1 の左インデックス配列 (160) 及び／又は第 1 の右インデックス配列 (170) を更に含む。いくつかの実施形態において、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) は、第 1 の左固有識別配列 (180) 及び／又は第 1 の右固有識別配列 (190) を更に含む。

【0042】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の二本鎖スプリントアダプター (200) 及び複数の一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ酵素と、複数の二本鎖スプリントアダプター (200) 及び／又は複数の一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) の 5' 末端をリン酸化するのに好適である条件下で接触させることを更に含む。

【0043】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の二本鎖スプリントアダプター (200) 及び複数の一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) を、リガーゼと、第 1 及び第 2 のニックを酵素的にライゲーションするのに好適である条件下で接触させ、それによって、各々が第 1 のスプリント鎖 (300) にハイブリダイズした複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子 (600) を生成することを更に含む。

【0044】

いくつかの実施形態において、方法は、a) 複数の二本鎖スプリントアダプター (200) 及び複数の一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ酵素と、複数の二本鎖スプリントアダプター (200) 及び複数の一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) の 5' 末端をリン酸化するのに好適である条件下で接触させることと、b) リン酸化された二本鎖スプリントアダプター (200) 及びリン酸化された一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) を、リガーゼと、第 1 及び第 2 のニックを酵素的にライゲーションするのに好適である条件下で接触させ、それによって、各々が第 1 のスプリント鎖 (300) にハイブリダイズした複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子 (600) を生成することとの順次のステップを行うことを更に含む。

【0045】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の二本鎖スプリントアダプター (200) 及び複数の一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) を、(i) T4 ポリヌクレオチドキナーゼ酵素及び (ii) リガーゼ酵素と、複数の二本鎖スプリントアダプター (200) 及び複数の一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) の 5' 末端をリン酸化するのに好適である条件下で接触させることであって、条件が、第 1 及び第 2 のニックを酵素的にライゲーションするのに好適であり、それによって、各々が第 1 のスプリント鎖 (300) にハイブリダイズした複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子 (600) を生成する、接触させることの本質的に同時のステップを行うことを更に含む。

【0046】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子 (600) を、少なくとも 1 つのエキソヌクレアーゼ酵素と接触させて、複数の第 1 のスプリント鎖 (300) を除去し、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子 (600) を保持することを更に含む。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つのエキソヌクレアーゼ酵素は、エキソヌクレアーゼ I、熱不安定性エキソヌクレアーゼ I、及び／又は T7 エキソヌクレアーゼを含む。

【0047】

いくつかの実施形態において、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子 (600) における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子 (600) は、第 3 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第 2 のスプリント鎖領域 (400) を含み、方法は、保持された複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子 (600) を、複数の第 3 の表面プライ

10

20

30

40

50

マーが支持体上に固定化された当該支持体上に、個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を、個々の固定化された第3の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を固定化することを更に含む。

【0048】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の固定化された共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の第3の表面プライマーを固定化された増幅プライマーとして使用し、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を生成することを更に含む。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む。

10

【0049】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリ分子における個々のライブラリ分子の第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）又は第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）は、フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、方法は、a）複数の可溶性フォワード増幅プライマーを、フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第1又は第2の左ユニバーサルアダプター配列にハイブリダイズさせることと、b）ローリングサークル増幅反応を行い、それによって、複数の核酸コンカテマー分子を生成することと、を更に含む。

20

【0050】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリ分子における個々のライブラリ分子の第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）又は第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）は、フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、方法は、a）複数の可溶性フォワード増幅プライマーを、フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第1又は第2の右ユニバーサルアダプター配列にハイブリダイズさせることと、b）ローリングサークル増幅反応を行い、それによって、各々が共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズした複数の核酸コンカテマー分子を生成することと、を更に含む。

30

【0051】

いくつかの実施形態において、複数のコンカテマー分子における個々のコンカテマー分子は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第2のスプリント鎖領域（400）を含み、個々のコンカテマー分子は、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズしており、方法は、複数のコンカテマー分子を、複数の第3の表面プライマーが上に固定化された支持体上に、コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された第3の表面プライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、複数のコンカテマー分子を固定化することを更に含む。

【0052】

いくつかの実施形態において、方法は、固定化された複数のコンカテマー分子（共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズしたもの）を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることを更に含む。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む。

40

【0053】

いくつかの実施形態において、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）は、第1のスプリント鎖（300

50

）にハイブリダイズしており、方法は、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、ローリングサークル増幅反応を、第1のスプリント鎖（300）を増幅プライマーとして使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数のコンカテマー分子を生成することを更に含む。

【0054】

いくつかの実施形態において、複数のコンカテマー分子における個々のコンカテマー分子は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第2のスプリント鎖領域（400）を含み、方法は、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズした複数のコンカテマー分子を、複数の第3の表面プライマーが上に固定化された支持体上に、コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された第3の表面プライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズした複数のコンカテマー分子を固定化することを更に含む。

10

【0055】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の固定化されたコンカテマー分子を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることを更に含む。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む。いくつかの実施形態において、支持体は、支持体上に固定化された複数の第4の表面プライマーを更に含む。

20

【0056】

いくつかの実施形態において、複数の固定化された核酸コンカテマー分子は、少なくとも2つの第2のスプリント鎖領域（400）を含み、少なくとも2つの第2のスプリント鎖領域（400）は各々、第3及び第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有し、方法は、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を、少なくとも1つのコンカテマー分子の少なくとも1つの第2のスプリント鎖領域（400）を固定化された第4の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下でインキュベートし、それによって、固定化されたコンカテマー分子の少なくとも1つの部分を、支持体に押え付けることを更に含む。

30

【0057】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の固定化されたコンカテマーをシーケンシングすることを更に含み、方法は、a) 複数の固定化されたコンカテマー分子を、(i) 複数のシーケンシングポリメラーゼ、及び(ii) 複数の可溶性シーケンシングプライマーと接触させることであって、接触させることが、複数の複合型ポリメラーゼを形成するのに好適である条件下で行われ、複数の複合型ポリメラーゼが各々、核酸二重鎖に結合したシーケンシングポリメラーゼを含み、核酸二重鎖が、可溶性シーケンシングプライマーにハイブリダイズしたコンカテマー分子を含む、接触させることと、b) 複数の複合型シーケンシングポリメラーゼを、複数のヌクレオチドと、少なくとも1つのヌクレオチドを、複合型シーケンシングポリメラーゼに結合させるのに好適である条件下で接触させることであって、複数のヌクレオチドが、少なくとも1つのヌクレオチド類似体を含み、少なくとも1つのヌクレオチド類似体が、フルオロフォアで標識されており、除去可能な鎖終結部分を糖3'位において有する、接触させることと、c) 少なくとも1つのヌクレオチドを、ハイブリダイズしたシーケンシングプライマーの3'末端内に組み込み、それによって、複数の新生の伸長したシーケンシングプライマーを生成することと、d) 組み込まれたヌクレオチドを検出し、組み込まれたヌクレオチドの核酸塩基を特定することと、を含む。

40

【0058】

50

いくつかの実施形態において、方法は、複数の固定化されたコンカテマーをシーケンシングすることを更に含み、方法は、a) 複数の固定化されたコンカテマー分子を、(i) 複数のシーケンシングポリメラーゼ、及び(ii) 複数の可溶性シーケンシングプライマーと接触させることであって、接触させることが、複数の第1の複合型ポリメラーゼを形成するのに好適である条件下で行われ、複数の第1の複合型ポリメラーゼが各々、核酸二重鎖に結合したシーケンシングポリメラーゼを含み、核酸二重鎖が、可溶性シーケンシングプライマーにハイブリダイズしたコンカテマー分子を含む、接触させることと、b) 複数の複合型シーケンシングポリメラーゼを、複数の検出可能に標識された多価分子と、多価分子の相補的ヌクレオチド単位を、複数の第1の複合型ポリメラーゼのうちの少なくとも2つに結合させて、それによって、複数の多価複合型ポリメラーゼを形成するのに好適である条件下で接触させて、複数の多価複合型ポリメラーゼを形成することであって、条件が、複数の多価複合型ポリメラーゼのシーケンシングプライマー内への相補的ヌクレオチド単位の組み込みを阻害し、複数の多価分子における個々の多価分子が、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、各ヌクレオチドアームが、ヌクレオチド単位に付着している、形成することと、c) 複数の多価複合型ポリメラーゼを検出することと、d) 複数の多価複合型ポリメラーゼにおける複数の第1の複合型ポリメラーゼに結合した相補的ヌクレオチド単位の核酸塩基を特定し、それによって、核酸テンプレートの配列を決定することと、を含む。

10

【0059】

いくつかの実施形態において、方法は、e) 複数の多価複合型ポリメラーゼを解離させ、複数の第1のシーケンシングポリメラーゼ及びそれらの結合した多価分子を除去し、複数の核酸二重鎖を保持すること、f) ステップ(e)の複数の保持された核酸二重鎖を、複数の第2のシーケンシングポリメラーゼと接触させることであって、接触させることが、複数の第2のシーケンシングポリメラーゼを、複数の保持された核酸二重鎖に結合させるのに好適である条件下で行われ、それによって、複数の第2の複合型ポリメラーゼを形成し、複数の第2の複合型ポリメラーゼが各々、保持された核酸二重鎖に結合した第2のシーケンシングポリメラーゼを含む、接触させること、g) 複数の第2の複合型ポリメラーゼを、複数のヌクレオチドと接触させることであって、接触させることが、複数のヌクレオチドからの相補的ヌクレオチドを、ステップ(f)の第2の複合型ポリメラーゼのうちの少なくとも2つに結合させるのに好適である条件下で行われ、それによって、複数のヌクレオチド複合型ポリメラーゼを形成し、条件が、ヌクレオチド複合型ポリメラーゼのシーケンシングプライマー内への結合した相補的ヌクレオチドの組み込みを促進するのに好適である、接触させることを更に含む。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、少なくとも1つのヌクレオチド類似体を含み、少なくとも1つのヌクレオチド類似体は、フルオロフォアで標識されており、除去可能な鎖終結部分を糖3'位において有する。

20

30

【0060】

いくつかの実施形態において、方法は、h) ヌクレオチド複合型ポリメラーゼのシーケンシングプライマー内に組み込まれた相補的ヌクレオチドを検出することを更に含む。いくつかの実施形態において、方法は、h) ヌクレオチド複合型ポリメラーゼのシーケンシングプライマー内に組み込まれた相補的ヌクレオチドを検出することと、i) ヌクレオチド複合型ポリメラーゼのシーケンシングプライマー内に組み込まれた相補的ヌクレオチドの核酸塩基を特定することと、を更に含む。

40

【0061】

本開示は、少なくとも1つのアビディティ複合体を形成するための方法であって、a) 第1のユニバーサル核酸プライマー、第1のDNAポリメラーゼ、及び第1の多価分子を、請求項80、85、89、又は92に記載のコンカテマー分子のうちのいずれかの第1の部分に結合させ、それによって、第1の結合複合体を形成することであって、第1の多価分子の第1のヌクレオチド単位が、第1のDNAポリメラーゼに結合する、形成することと、b) 第2のユニバーサル核酸プライマー、第2のDNAポリメラーゼ、及び第1の

50

多価分子を、同じコンカテマーテンプレート分子の第2の部分に結合させ、それによって、第2の結合複合体を形成することであって、第1の多価分子の第2のヌクレオチド単位が、第2のDNAポリメラーゼに結合し、同じ多価分子を含む第1及び第2の結合複合体が、アビディティ複合体を形成し、第1の多価分子が、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、各ヌクレオチドアームが、ヌクレオチド単位に付着しており、コンカテマー分子が、目的の配列(110)、並びに第1及び第2のユニバーサル核酸プライマーに結合するユニバーサルプライマー結合部位の2つ以上のタンデムリピート配列を含む、形成することと、を含む、方法を提供する。

【0062】

本開示は、少なくとも1つのアビディティ複合体を形成することによってシーケンシングするための方法であって、a) 第1のユニバーサル核酸プライマー、第1のDNAポリメラーゼ、及び第1の多価分子を、本開示のコンカテマー分子のうちのいずれかの第1の部分に結合させ、それによって、第1の結合複合体を形成することであって、第1の多価分子の第1のヌクレオチド単位が、第1のDNAポリメラーゼに結合する、形成することと、b) 第2のユニバーサル核酸プライマー、第2のDNAポリメラーゼ、及び第1の多価分子を、同じコンカテマーテンプレート分子の第2の部分に結合させ、それによって、第2の結合複合体を形成することであって、第1の多価分子の第2のヌクレオチド単位が、第2のDNAポリメラーゼに結合し、同じ多価分子を含む第1及び第2の結合複合体が、アビディティ複合体を形成し、第1の多価分子が、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、各ヌクレオチドアームが、ヌクレオチド単位に付着しており、コンカテマー分子が、目的の配列(110)、並びに第1及び第2のユニバーサル核酸プライマーに結合するユニバーサルプライマー結合部位の2つ以上のタンデムリピート配列を含み、接触させることが、第1及び第2の結合複合体における結合した第1及び第2のヌクレオチド単位のポリメラーゼ触媒組み込みを阻害するのに好適である条件下で行われる、形成することと、c) 同じコンカテマーテンプレート分子上の第1及び第2の結合複合体を検出することと、d) 第1の結合複合体における第1のヌクレオチド単位を特定し、それによって、コンカテマーテンプレート分子の第1の部分の配列を決定し、第2の結合複合体における第2のヌクレオチド単位を特定し、それによって、コンカテマーテンプレート分子の第2の部分の配列を決定することと、を含む、方法を提供する。

【0063】

本開示は、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を調製するための方法であって、a) 一本鎖核酸ライブラリ分子(100)の2つ以上の集団を提供することであって、ライブラリ分子(100)の各集団が、別個の区画内に収容されており、所与の集団における核酸ライブラリ分子が、(i) 第1の表面プライマーについての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、(ii) 第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、(iii) 試料供給源から単離された目的の配列(110)、(iv) 第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、(v) 第2の表面プライマーについての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)、並びに(vi) 第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス配列(170)を含み、左インデックスの配列(160)及び／又は右インデックスの配列(170)が、別個に又は組み合わせで、目的の配列(110)が単離された試料供給源を特定する、提供することと、b) 複数の二本鎖スプリントアダプター(200)を提供することであって、個々の二本鎖スプリントアダプター(200)が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズした第1のスプリント鎖(300)を含み、第1のスプリント鎖(300)が、5'から3'の順序で配置された領域である、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含み、第1のスプリント鎖(310)の内部領域が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズしており、第2のスプリント鎖が、5'から3'の順序で配置された領域である、(i) 第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する

第2のサブ領域、及び(i i)第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第1のサブ領域を含む、提供することと、c)別個の区画内で、一本鎖核酸ライブラリ分子(100)の集団を、複数の二本鎖スプリントアダプター(200)と接触させることであって、接触させることが、第1のスプリント鎖(300)の部分を、ライブラリ分子(100)の部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で行われ、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体(500)の集団を生成し、これにより、個々の第1のスプリント鎖の第1の領域(320)が、個々のライブラリ分子(100)の第1の表面プライマー(120)についての結合配列にハイブリダイズしており、個々の第1のスプリント鎖の第3の領域(330)が、個々のライブラリ分子(100)の第2の表面プライマー(130)についての結合配列にハイブリダイズしており、ライブラリースプリント複合体(500)の各々が、ライブラリ分子の5'末端と第2のスプリント鎖(300)の3'末端との間の第1のニックを含み、ライブラリースプリント複合体(500)の各々が、第2のスプリント鎖(300)の5'末端とライブラリ分子(100)の3'末端との間の第2のニックを含み、第1及び第2のニックが、酵素的にライゲーション可能である、接触させることと、d)別個の区画内で、ライブラリースプリント複合体(500)の集団を、リガーゼと、第1及び第2のニックを酵素的にライゲーションするのに好適である条件下で接触させ、それによって、各々が第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の2つ以上の集団を生成することと、e)別個の区画からの共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の2つ以上の集団を一緒にプールして、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を含む、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)のマルチプレックス混合物を生成することと、を含む、方法を提供する。

10

20

【0064】

いくつかの実施形態において、ステップ(e)のマルチプレックス混合物中の個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第2のスプリント鎖領域(400)を含み、方法は、a)共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)のマルチプレックス混合物を、複数の第3の表面プライマーが支持体上に固定化された当該支持体上に、個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を、個々の固定化された第3の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を固定化することと、b)固定化された共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)のマルチプレックス混合物を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の第3の表面プライマーを固定化された増幅プライマーとして使用し、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を生成することであって、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、生成することと、を更に含む。

30

【0065】

いくつかの実施形態において、方法は、ローリングサークル増幅反応を、a)ステップ(d)又は(e)の、第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の2つ以上の集団を、少なくとも1つのエキソヌクレアーゼ酵素と、複数の第1のスプリント鎖(300)を除去するのに好適である条件下で接触させ、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の集団を保持することと、b)共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の保持された2つ以上の集団を、複数の可溶性増幅プライマー、複数の鎖置換ポリメラーゼ、及び複数のヌクレオチドと、ローリングサークル増幅反応を行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の核酸コンカテマー分子を生成することであって、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、生成することとによって行うことを更に含む。

40

50

【0066】

いくつかの実施形態において、方法は、a) 複数のコンカテマー分子を、複数の第3の表面プライマーが上に固定化された支持体上に、コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された第3の表面プライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、複数のコンカテマー分子を固定化することと、b) 固定化された複数のコンカテマー分子（共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズしたもの）を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることであって、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、伸長させることと、を更に含む。

10

【0067】

いくつかの実施形態において、方法は、ローリングサークル増幅反応を、ステップ（d）又は（e）の、各々が第1のスプリント鎖（300）にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）の2つ以上の集団を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、ローリングサークル増幅反応を行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数のコンカテマー分子を生成することであって、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、生成することによって行うことを更に含む。

20

【0068】

いくつかの実施形態において、方法は、a) 共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズした複数のコンカテマー分子を、複数の第3の表面プライマーが上に固定化された支持体上に、コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された第3の表面プライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズした複数のコンカテマー分子を固定化することと、b) 複数の固定化されたコンカテマー分子を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることであって、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、伸長させることと、を更に含む。

30

【0069】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の固定化された核酸コンカテマー分子の挿入領域（110）及び第1の左インデックス配列（160）及び／又は第1の右インデックス配列（170）をシーケンシングすることであって、挿入領域（110）の配列が、第1の左インデックス配列（160）及び／又は第1の右インデックス配列（170）とともに、目的の配列の試料供給源を特定するために使用され得る、シーケンシングすることを更に含む。

40

【0070】

いくつかの実施形態において、シーケンシング反応は、a) 複数の固定化された核酸コンカテマー分子を、複数のシーケンシングプライマー、複数のシーケンシングポリメラーゼ、及び各々が2'又は3'鎖終結部分を含む複数の検出可能に標識されたヌクレオチド類似体と、検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を、シーケンシングプライマーの3'末端内に組み込むのに好適である条件下で結合させることと、b) 結合した検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を検出することと、c) 検出可能に標識されたヌクレオチド類似体の核酸塩基を特定することと、を含む。いくつかの実施形態において、シーケンシング反応は、2段階のシーケンシング反応を用い、第1の段階は、a) 複数の固定化された核酸コンカテマー分子を、複数のシーケンシングプライマー、複数の第1のシーケンシ

50

ングポリメラーゼ、及び複数の検出可能に標識された多価分子と、個々のコンカテマー分子を、シーケンシングプライマー、第1のシーケンシングポリメラーゼ、及び検出可能に標識された多価分子に結合させる（例えば、複数の多価複合型ポリメラーゼを形成する）のに好適である条件下で結合させることと、b) 結合した検出可能に標識された多価分子を検出することと、c) 検出可能に標識された多価分子の核酸塩基を特定することと、を含む。いくつかの実施形態において、複数の固定化された核酸コンカテマー分子への検出可能に標識された多価分子の結合は、少なくとも1つのアビディティ複合体を形成する。

【0071】

いくつかの実施形態において、方法は、第2の段階を行うことを更に含み、第2の段階は、d) 複数の第1のシーケンシングポリメラーゼ及び複数の結合した多価分子を、複数の固定化された核酸コンカテマー分子から除去し、各々がシーケンシングプライマーにハイブリダイズした固定化されたコンカテマー分子（核酸二重鎖）を保持することと、e) 保持された固定化されたコンカテマー分子及びハイブリダイズしたシーケンシングプライマーを、複数の第2のポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、ヌクレオチドを、シーケンシングプライマーの3'末端内に組み込むのに好適である条件下で接触させることと、を含む。

【0072】

本開示は、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を調製するための方法であって、a) 一本鎖核酸ライブラリ分子（100）の2つ以上の集団を提供することであって、ライブラリ分子（100）の各集団、一本鎖核酸ライブラリ分子の各集団が、別個の区画内に収容されており、所与の集団における核酸ライブラリ分子が、(i) 第1の表面プライマーについての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）、(ii) 第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）、(iii) 試料供給源から単離された目的の配列（110）、(iv) 第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）、(v) 第2の表面プライマーについての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）、並びに(vi) 第1の左インデックス配列（160）及び／又は第1の右インデックス配列（170）を含み、左インデックスの配列（160）及び／又は右インデックスの配列（170）が、別個に又は組み合わせで、目的の配列（110）が単離された試料供給源を特定する、提供することと、b) 一本鎖核酸ライブラリ分子（100）の2つ以上の集団と一緒に、同じ区画内にプールすることと、c) ステップ(b)の区画に、複数の二本鎖スプリントアダプター（200）を添加することであって、個々の二本鎖スプリントアダプター（200）が、第2のスプリント鎖（400）にハイブリダイズした第1のスプリント鎖（300）を含み、第1のスプリント鎖（300）が、5'から3'の順序で配置された領域である、第1の領域（320）、内部領域（310）、及び第2の領域（330）を含み、第1のスプリント鎖（310）の内部領域が、第2のスプリント鎖（400）にハイブリダイズしており、第2のスプリント鎖が、(i) 第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第2のサブ領域、及び(ii) 第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第1のサブ領域の5'から3'の順序で配置された領域を含む、添加することと、d) ステップ(c)の同じ区画内にある一本鎖核酸ライブラリ分子（100）の集団及び複数の二本鎖スプリントアダプター（200）をインキュベートすることであって、インキュベートすることが、第1のスプリント鎖（300）の部分を、ライブラリ分子（100）の部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で行われ、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体（500）の集団を生成し、これにより、個々の第1のスプリント鎖の第1の領域（320）が、個々のライブラリ分子（100）の第1の表面プライマー（120）についての結合配列にハイブリダイズしており、個々の第1のスプリント鎖の第3の領域（330）が、個々のライブラリ分子（100）の第2の表面プライマー（130）についての結合配列にハイブリダイズしており、ライブラリースプリント複合体（500）の各々が、

10

20

30

40

50

ライブラリ分子の5'末端と第2のスプリント鎖(300)の3'末端との間の第1のニックを含み、ライブラリースプリント複合体(500)の各々が、第2のスプリント鎖(300)の5'末端とライブラリ分子(100)の3'末端との間の第2のニックを含み、第1及び第2のニックが、酵素的にライゲーション可能である、インキュベートすることと、e)ステップ(d)の区画内のライブラリースプリント複合体(500)の集団を、リガーゼと、第1及び第2のニックを酵素的にライゲーションするのに好適である条件下で接触させ、それによって、各々が第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の集団を生成し、それによって、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を含む、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)のマルチプレックス混合物を生成することと、を含む、方法を提供する。

10

【0073】

いくつかの実施形態において、ステップ(e)のマルチプレックス混合物中の個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第2のスプリント鎖領域(400)を含み、方法は、a)複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を、複数の第3の表面プライマーが支持体上に固定化された当該支持体上に、個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を、個々の固定化された第3の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を固定化することと、b)複数の固定化された共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の第3の表面プライマーを固定化された増幅プライマーとして使用し、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を生成することと、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び/又はdUTPを含む、生成することと、を更に含む。

20

【0074】

いくつかの実施形態において、方法は、ローリングサークル増幅反応を、a)ステップ(d)又は(e)の、第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の集団を、少なくとも1つのエキソヌクレアーゼ酵素と、複数の第1のスプリント鎖(300)を除去するのに好適である条件下で接触させ、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の集団を保持すること、b)共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の保持された集団を、複数の可溶性増幅プライマー、複数の鎖置換ポリメラーゼ、及び複数のヌクレオチドと、ローリングサークル増幅反応を行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の核酸コンカテマー分子を生成することと、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び/又はdUTPを含む、生成することによって行うことを更に含む。

30

【0075】

いくつかの実施形態において、方法は、c)複数のコンカテマー分子を、複数の第3の表面プライマーが上に固定化された支持体上に、コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された第3の表面プライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、複数のコンカテマー分子を固定化することと、d)固定化された複数のコンカテマー分子(共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)にハイブリダイズしたものを)、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることと、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び/又はdUTPを含む、伸長させることと、を更に含む。

40

【0076】

50

いくつかの実施形態において、方法は、ローリングサークル増幅反応を、ステップ（d）又は（e）の、各々が第1のスプリント鎖（300）にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）の集団を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、ローリングサークル増幅反応を行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数のコンカテマー分子を生成することであって、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、生成することによって行うことを更に含む。

【0077】

いくつかの実施形態において、方法は、c）共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズした複数のコンカテマー分子を、複数の第3の表面プライマーが上に固定化された支持体上に、コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された第3の表面プライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズした複数のコンカテマー分子を固定化することと、d）複数の固定化されたコンカテマー分子を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることであって、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、伸長させることと、を更に含む。

【0078】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の固定化された核酸コンカテマー分子の挿入領域（110）及び第1の左インデックス配列（160）及び／又は第1の右インデックス配列（170）をシーケンシングすることであって、挿入領域（110）の配列が、第1の左インデックス配列（160）及び／又は第1の右インデックス配列（170）とともに、目的の配列の試料供給源を特定するために使用され得る、シーケンシングすることを更に含む。

【0079】

いくつかの実施形態において、シーケンシング反応は、a）複数の固定化された核酸コンカテマー分子を、複数のシーケンシングプライマー、複数のシーケンシングポリメラーゼ、及び各々が2'又は3'鎖終結部分を含む複数の検出可能に標識されたヌクレオチド類似体と、検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を、シーケンシングプライマーの3'末端内に組み込むのに好適である条件下で結合させることと、b）結合した検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を検出することと、c）検出可能に標識されたヌクレオチド類似体の核酸塩基を特定することと、を含む。

【0080】

いくつかの実施形態において、シーケンシング反応は、2段階のシーケンシング反応を用い、第1の段階は、a）複数の固定化された核酸コンカテマー分子を、複数のシーケンシングプライマー、複数の第1のシーケンシングポリメラーゼ、及び複数の検出可能に標識された多価分子と、個々のコンカテマー分子を、シーケンシングプライマー、第1のシーケンシングポリメラーゼ、及び検出可能に標識された多価分子に結合させる（例えば、複数の多価複合型ポリメラーゼを形成する）のに好適である条件下で結合させることと、b）結合した検出可能に標識された多価分子を検出することと、c）検出可能に標識された多価分子の核酸塩基を特定することと、を含む。いくつかの実施形態において、複数の固定化された核酸コンカテマー分子への検出可能に標識された多価分子は、少なくとも1つのアビディティ複合体を形成する。

【0081】

いくつかの実施形態において、方法は、第2の段階を行うことを更に含み、第2の段階は、d）複数の第1のシーケンシングポリメラーゼ及び複数の結合した多価分子を、複数の固定化された核酸コンカテマー分子から除去し、各々がシーケンシングプライマーにハ

イブリダイズした固定化されたコンカテマー分子（核酸二重鎖）を保持することと、e）保持された固定化されたコンカテマー分子及びハイブリダイズしたシーケンシングプライマーを、複数の第2のポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、ヌクレオチドを、シーケンシングプライマーの3'末端内に組み込むのに好適である条件下で接触させることと、を含む。

【0082】

本開示は、追加のユニバーサルアダプターシーケンシングを核酸ライブラリ分子に付加するための方法であって、a）複数の核酸ライブラリ分子（100）を提供することであって、複数の核酸ライブラリ分子（100）が各々、5'から3'の順序で配置された配列である、（i）第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）、（ii）第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）、（iii）目的の配列（110）、（iv）第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）、及び（v）第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）を含む、提供することと、b）ステップ（a）の個々のライブラリ分子を、第1のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第1のプライマー伸長反応（又は第1のPCR）を行うことであって、第1のテール付きプライマーが、第3の左ユニバーサルアダプター配列を保有する5'領域、及びライブラリ分子（100）の第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）の少なくとも一部分と相補的である3'領域を含み、第1のプライマー伸長反応（又は第1のPCR）が、複数の第1の修飾されたライブラリ分子を生成し、複数の第1の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、第3の左ユニバーサルアダプター配列が付加されており、第1のテール付きプライマーの第3の左ユニバーサルアダプター配列が、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、c）ステップ（a）の個々の第1の修飾されたライブラリ分子を、第2のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第2のプライマー伸長反応（又は第2のPCR）を行うことであって、第2のテール付きプライマーが、第3の右ユニバーサルアダプター配列を保有する5'領域、及び第1の修飾されたライブラリ分子の第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）の少なくとも一部分と相補的である3'領域を含み、第2のプライマー伸長反応（又は第2のPCR）が、複数の第2の修飾されたライブラリ分子を生成し、複数の第2の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、第3の右ユニバーサルアダプター配列が付加されており、第2のテール付きプライマーの第3の右ユニバーサルアダプター配列が、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、を含む、方法を提供する。

【0083】

いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子は各々、5'から3'の順序で配置された配列である、（i）第1の表面プライマーについての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）、（ii）第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）、（iii）目的の配列（110）、（iv）第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）、及び（v）第2の表面プライマーについての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）を含む。

【0084】

いくつかの実施形態において、方法は、d）ステップ（c）の個々の第2の修飾されたライブラリ分子を、第3のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第3のプライマー伸長反応（又は第3のPCR）を行うことであって、第3のテール付きプライマーが、第4の左ユニバーサルアダプター配列を保有する5'領域、及び第2の修飾されたライブ

ライ分子の第3の左ユニバーサルアダプター配列の少なくとも一部分と相補的である3'領域を含み、第3のプライマー伸長反応（又は第3のPCR）が、複数の第3の修飾されたライブラリ分子を生成し、複数の第3の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、第4の左ユニバーサルアダプター配列が付加されており、第3のテール付きプライマーの第4の左ユニバーサルアダプター配列が、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、e) ステップ(d)の個々の第3の修飾されたライブラリ分子を、第4のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第4のプライマー伸長反応（又は第4のPCR）を行うことであって、第4のテール付きプライマーが、第4の右ユニバーサルアダプター配列を保有する5'領域、及び第3の修飾されたライブラリ分子の第3の右ユニバーサルアダプター配列の少なくとも一部分と相補的である3'領域を含み、第4のプライマー伸長反応（又は第4のPCR）が、複数の第4の修飾されたライブラリ分子を生成し、複数の第4の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、第4の右ユニバーサルアダプター配列が付加されており、第4のテール付きプライマーの第4の右ユニバーサルアダプター配列が、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、を更に含む。

10

20

【0085】

いくつかの実施形態において、方法は、f) ステップ(e)の個々の第4の修飾されたライブラリ分子を、第5のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第5のプライマー伸長反応（又は第5のPCR）を行うことであって、第5のテール付きプライマーが、第5の左ユニバーサルアダプター配列を保有する5'領域、及び第4の修飾されたライブラリ分子の第4の左ユニバーサルアダプター配列の少なくとも一部分と相補的である3'領域を含み、第5のプライマー伸長反応（又は第5のPCR）が、複数の第5の修飾されたライブラリ分子を生成し、複数の第5の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、第5の左ユニバーサルアダプター配列が付加されており、第5のテール付きプライマーの第5の左ユニバーサルアダプター配列が、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、g) ステップ(f)の個々の第5の修飾されたライブラリ分子を、第6のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第6のプライマー伸長反応（又は第6のPCR）を行うことであって、第6のテール付きプライマーが、第6の右ユニバーサルアダプター配列を保有する5'領域、及び第5の修飾されたライブラリ分子の第4の右ユニバーサルアダプター配列の少なくとも一部分と相補的である3'領域を含み、第6のプライマー伸長反応（又は第6のPCR）が、複数の第6の修飾されたライブラリ分子を生成し、複数の第6の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、第6の右ユニバーサルアダプター配列が付加されており、第6のテール付きプライマーの第6の右ユニバーサルアダプター配列が、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、を更に含む。

30

40

【0086】

いくつかの実施形態において、第1のテール付きプライマー、第3のテール付きプライマー、及び／又は第5のテール付きプライマーは、左インデックス配列を更に含む。いく

50

つかの実施形態において、第1のテール付きプライマー、第3のテール付きプライマー、及び／又は第5のテール付きプライマーは、左固有識別配列を更に含む。いくつかの実施形態において、第2のテール付きプライマー、第4のテール付きプライマー、及び／又は第6のテール付きプライマーは、右インデックス配列を更に含む。いくつかの実施形態において、第2のテール付きプライマー、第4のテール付きプライマー、及び／又は第6のテール付きプライマーは、右固有識別配列を更に含む。いくつかの実施形態において、ステップ(b)の付加された第3の左ユニバーサルアダプター配列は、第1のスプリント鎖の第1の領域(320)に結合することができる。いくつかの実施形態において、ステップ(c)の付加された第3の右ユニバーサルアダプター配列は、第1のスプリント鎖の第2の領域(330)に結合することができる。いくつかの実施形態において、ステップ(d)の付加された第4の左ユニバーサルアダプター配列は、第1のスプリント鎖の第1の領域(320)に結合することができる。いくつかの実施形態において、ステップ(e)の付加された第4の右ユニバーサルアダプター配列は、第1のスプリント鎖の第2の領域(330)に結合することができる。

10

【0087】

いくつかの実施形態において、ステップ(f)の付加された第5の左ユニバーサルアダプター配列は、第1のスプリント鎖の第1の領域(320)に結合することができる。いくつかの実施形態において、ステップ(g)の付加された第5の右ユニバーサルアダプター配列は、第1のスプリント鎖の第2の領域(330)に結合することができる。

20

【0088】

本開示は、複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法であって、a)複数の二本鎖スプリントアダプター(200)を提供することであって、個々の二本鎖スプリントアダプター(200)が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズした第1のスプリント鎖(300)を含み、第1のスプリント鎖(300)が、5'から3'の順序で配置された領域である、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含み、第1のスプリント鎖(310)の内部領域が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズしており、第2のスプリント鎖が、5'から3'の順序で配置された領域である、(i)第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第2のサブ領域、及び(ii)第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第1のサブ領域を含む、提供することと、b)複数の二本鎖スプリントアダプターを、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)とハイブリダイズさせることであって、個々のライブラリ分子が、5'から3'の順序で配置された領域である、(i)第3の表面プライマーについての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、(ii)第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、(iii)目的の配列(110)、(iv)第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、及び(v)第4の表面プライマーについての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)を含み、ハイブリダイズさせることが、第1のスプリント鎖(300)の部分を、ライブラリ分子(100)の部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で行われ、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体(500)を生成し、これにより、第1のスプリント鎖の第1の領域(320)が、第3の表面プライマー(120)についての結合配列にハイブリダイズしており、第1のスプリント鎖の第3の領域(330)が、第4の表面プライマー(130)についての結合配列にハイブリダイズしており、ライブラリースプリント複合体(500)が、ライブラリ分子の5'末端と第2のスプリント鎖(400)の3'末端との間の第1のニックを含み、ライブラリースプリント複合体(500)が、第2のスプリント鎖(400)の5'末端とライブラリ分子(100)の3'末端との間の第2のニックを含み、第1及び第2のニックが、酵素的にライゲーション可能である、ハイブリダイズさせることと、を含む、方法を提供する。

30

40

【0089】

50

いくつかの実施形態において、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子（１００）は、第１の左インデックス配列（１６０）及び／又は第１の右インデックス配列（１７０）を更に含む。いくつかの実施形態において、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子（１００）は、第１の左固有識別配列（１８０）及び／又は第１の右固有識別配列（１９０）を更に含む。

【００９０】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の二本鎖スプリントアダプター（２００）及び複数の一本鎖核酸ライブラリ分子（１００）を、リガーゼと、第１及び第２のニックを酵素的にライゲーションするのに好適である条件下で接触させ、それによって、各々が第１のスプリント鎖（３００）にハイブリダイズした複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を生成することを更に含む。いくつかの実施形態において、方法は、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を、少なくとも１つのエキソヌクレアーゼ酵素と接触させて、複数の第１のスプリント鎖（３００）を除去し、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を保持することを更に含む。

【００９１】

いくつかの実施形態において、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）は、第２の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第２のスプリント鎖領域（４００）を含み、方法は、保持された複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を、複数の第２の表面プライマーが支持体上に固定化された当該支持体上に、個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を、個々の固定化された第２の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を固定化することを更に含む。

【００９２】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の固定化された共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の第２の表面プライマーを固定化された増幅プライマーとして使用し、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を生成することを更に含む。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、 $dATP$ 、 $dGTP$ 、 $dCTP$ 、 $dTTP$ 、及び／又は $dUTP$ を含む。

【００９３】

いくつかの実施形態において、支持体上の複数の固定化された第２の表面キャプチャープライマーは、支持体上の所定の又はランダムな位置において位置する。いくつかの実施形態において、支持体上の複数の固定化された第２の表面キャプチャープライマーは、各々と流体連通しており、試薬の溶液が支持体上に流れることを可能にし、これにより、複数の固定化された第２の表面プライマーは、試薬と本質的に同時に超並列様式で反応することができ、任意選択で、試薬の溶液は、酵素、ヌクレオチド、及び二価カチオンを含む。いくつかの実施形態において、支持体上の複数の固定化された核酸コンカテマー分子の密度は、 1 mm^2 当たり $10^4 \sim 10^8$ である。

【００９４】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の固定化されたコンカテマーをシーケンシングすることを更に含み、シーケンシングすることは、a) 複数の固定化されたコンカテマー分子を、(i) 複数のシーケンシングポリメラーゼ、及び(ii) 複数の可溶性シーケンシングプライマーと接触させることであって、接触させることが、複数の複合型ポリメラーゼを形成するのに好適である条件下で行われ、複数の複合型ポリメラーゼが各々、核酸二重鎖に結合したシーケンシングポリメラーゼを含み、核酸二重鎖が、可溶性シーケンシングプライマーにハイブリダイズしたコンカテマー分子を含む、接触させることと、b) 複数の複合型シーケンシングポリメラーゼを、複数のヌクレオチドと、少なくとも１つのヌクレオチドを、複合型シーケンシングポリメラーゼに結合させるのに好適である条

件下で接触させることであって、複数のヌクレオチドが、少なくとも1つのヌクレオチド類似体を含み、少なくとも1つのヌクレオチド類似体が、フルオロフォアで標識されており、除去可能な鎖終結部分を糖3'位において有する、接触させることと、c) 少なくとも1つのヌクレオチドを、ハイブリダイズしたシーケンシングプライマーの3'末端内に組み込み、それによって、複数の新生の伸長したシーケンシングプライマーを生成することと、d) 組み込まれたヌクレオチドを検出し、組み込まれたヌクレオチドの核酸塩基を特定することと、を含む。

【0095】

いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、除去可能な鎖終結部分を3'糖基において含み、除去可能な鎖終結部分は、アルキル基、アルケニル基、アリル基、アリアル基、ベンジル基、アジド基 (azide group)、アジド基 (azido group)、O-アジドメチル基、アミン基、アミド基、ケト基、イソシアネート基、リン酸基、チオ基、ジスルフィド基、カーボネート基、尿素基、又はシリル基を含み、除去可能な鎖終結部分は、伸長可能な3'OH部分を糖基上で生成するように、化学化合物で切断可能である。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及びdUTPからなる群から選択される1つのタイプのヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPからなる群から選択される2つ以上のタイプのヌクレオチドのいずれかの組み合わせの混合物を含む。

【0096】

いくつかの実施形態において、方法は、複数の固定化されたコンカテマーをシーケンシングすることを更に含み、シーケンシングすることは、a) 複数の固定化されたコンカテマー分子を、(i) 複数のシーケンシングポリメラーゼ、及び(ii) 複数の可溶性ユニバーサルシーケンシングプライマーと接触させることであって、接触させることが、複数の第1の複合型ポリメラーゼを形成するのに好適である条件下で行われ、複数の第1の複合型ポリメラーゼが各々、核酸二重鎖に結合したシーケンシングポリメラーゼを含み、核酸二重鎖が、可溶性シーケンシングプライマーにハイブリダイズしたコンカテマー分子を含む、接触させることと、b) 複数の複合型シーケンシングポリメラーゼを、複数の検出可能に標識された多価分子と、多価分子の相補的ヌクレオチド単位を、複数の第1の複合型ポリメラーゼのうちの少なくとも2つに結合させて、それによって、複数の多価複合型ポリメラーゼを形成するのに好適である条件下で接触させて、複数の多価複合型ポリメラーゼを形成することであって、条件が、複数の多価複合型ポリメラーゼのシーケンシングプライマー内への相補的ヌクレオチド単位の組み込みを阻害し、複数の多価分子における個々の多価分子が、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、各ヌクレオチドアームが、ヌクレオチド単位に付着している、形成することと、c) 複数の多価複合型ポリメラーゼを検出することと、を含む。

【0097】

いくつかの実施形態において、方法は、d) 複数の多価複合型ポリメラーゼを解離させ、複数の第1のシーケンシングポリメラーゼ及びそれらの結合した多価分子を除去し、複数の核酸二重鎖を保持すること、e) ステップd)の複数の保持された核酸二重鎖を、複数の第2のシーケンシングポリメラーゼと接触させることであって、接触させることが、複数の第2のシーケンシングポリメラーゼを、複数の保持された核酸二重鎖に結合させるのに好適である条件下で行われ、それによって、複数の第2の複合型ポリメラーゼを形成し、複数の第2の複合型ポリメラーゼが各々、保持された核酸二重鎖に結合した第2のシーケンシングポリメラーゼを含む、接触させること、f) 複数の第2の複合型ポリメラーゼを、除去可能な鎖終結部分を糖3'位において有する少なくとも1つのヌクレオチド類似体を含む複数のヌクレオチドと接触させることであって、接触させることが、複数のヌクレオチドからの相補的ヌクレオチドを、ステップe)の第2の複合型ポリメラーゼのうちの少なくとも2つに結合させるのに好適である条件下で行われ、それによって、複数のヌクレオチド複合型ポリメラーゼを形成し、条件が、ヌクレオチド複合型ポリメラーゼの

シーケンシングプライマー内への結合した相補的ヌクレオチドの組み込みを促進するのに好適である、接触させることを更に含む。

【0098】

いくつかの実施形態において、方法は、g)ヌクレオチド複合型ポリメラーゼのシーケンシングプライマー内に組み込まれた相補的ヌクレオチドを検出することを更に含む。いくつかの実施形態において、方法は、g)ヌクレオチド複合型ポリメラーゼのシーケンシングプライマー内に組み込まれた相補的ヌクレオチドを検出することと、h)ヌクレオチド複合型ポリメラーゼのシーケンシングプライマー内に組み込まれた相補的ヌクレオチドの核酸塩基を特定することと、を更に含む。

【0099】

本開示は、少なくとも1つのアビディティ複合体を形成することによってシーケンシングするための方法であって、a)第1のユニバーサルシーケンシングプライマー、第1のシーケンシングポリメラーゼ、及び第1の検出可能に標識された多価分子を、請求項16に記載のコンカテマー分子の第1の部分に結合させ、それによって、第1の結合複合体を形成することであって、第1の多価分子の第1のヌクレオチド単位が、第1のシーケンシングポリメラーゼに結合する、形成することと、b)第2のユニバーサルシーケンシングプライマー、第2のシーケンシングポリメラーゼ、及び第1の検出可能に標識された多価分子を、同じコンカテマー分子の第2の部分に結合させ、それによって、第2の結合複合体を形成することであって、第1の多価分子の第2のヌクレオチド単位が、第2のシーケンシングポリメラーゼに結合し、同じ多価分子を含む第1及び第2の結合複合体が、アビディティ複合体を形成し、第1の検出可能に標識された多価分子が、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、各ヌクレオチドアームが、ヌクレオチド単位に付着しており、コンカテマー分子が、目的の配列(110)、並びに第1及び第2のユニバーサルシーケンシングプライマーに結合するユニバーサルプライマー結合部位の2つ以上のタンデムリピート配列を含み、接触させることが、第1及び第2の結合複合体における結合した第1及び第2のヌクレオチド単位のポリメラーゼ触媒組み込みを阻害するのに好適である条件下で行われる、形成することと、c)同じコンカテマー分子上の第1及び第2の結合複合体を検出することと、d)第1の結合複合体における第1のヌクレオチド単位を特定し、それによって、コンカテマーテンプレート分子の第1の部分の配列を決定し、第2の結合複合体における第2のヌクレオチド単位を特定し、それによって、コンカテマーテンプレート分子の第2の部分の配列を決定することと、を含む、方法を提供する。

【0100】

いくつかの実施形態において、個々の多価分子のコアに付着した複数のヌクレオチドアームは、同じタイプのヌクレオチド単位を有し、ヌクレオチド単位のタイプは、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及びdUTPからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、複数の多価分子は、2つ以上のタイプの多価分子のいずれかの組み合わせの混合物を含み、多価分子の2つ以上のタイプの各々は、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPからなる群から選択されるヌクレオチド単位を有する。

【0101】

いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、除去可能な鎖終結部分を3'糖基において含み、除去可能な鎖終結部分は、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリル基、アリール基、ベンジル基、アジド基(azide group)、アジド基(azido group)、O-アジドメチル基、アミン基、アミド基、ケト基、イソシアネート基、リン酸基、チオ基、ジスルフィド基、カーボネート基、尿素基、又はシリル基を含み、除去可能な鎖終結部分は、伸長可能な3'OH部分を糖基上で生成するように、化学化合物で切断可能である。

【0102】

いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及びdUTPからなる群から選択される1つのタイプのヌクレオチドを含む

10

20

30

40

50

。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、d A T P、d G T P、d C T P、d T T P、及び／又はd U T Pからなる群から選択される2つ以上のタイプのヌクレオチドのいずれかの組み合わせの混合物を含む。

【0103】

いくつかの実施形態において、支持体は、ガラス又はプラスチック基質を含む。いくつかの実施形態において、支持体は、45度以下の水接触角を有する少なくとも1つの親水性ポリマーコーティングで不動態化されている。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの親水性ポリマーコーティングは、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリ（ビニルアルコール）（PVA）、ポリ（ビニルピリジン）、ポリ（ビニルピロリドン）（PVP）、ポリ（アクリル酸）（PAA）、ポリアクリルアミド、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAM）、ポリ（メチルメタクリレート）（PMA）、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）（HEMA）、ポリ（オリゴ（エチレングリコール）メチルエーテルメタクリレート）（POEGMA）、ポリグルタミン酸（PGA）、ポリリジン、ポリグルコシド、ストレプトアビジン、及びデキストランからなる群から選択される分子を含む。

【0104】

本発明の新規特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に述べられる。本開示の特徴及び利点のより良好な理解が、本開示の原理が使用される例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、及び添付の図面を参照することによって得られる。

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1】例示的な直鎖一本鎖ライブラリ分子（100）を示す概略図であり、直鎖一本鎖ライブラリ分子（100）は、二本鎖スプリント分子（200）とハイブリダイズし、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、2つのニックを有するライブラリースプリント複合体（500）を形成する。ライブラリ分子（100）は、第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）に一方の側において隣接し、第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）に他方の側において隣接する目的の配列（110）を含む。二本鎖スプリント分子は、第2のスプリント鎖（短鎖（400））にハイブリダイズした第1のスプリント鎖（長鎖（300））を含む。第1のスプリント鎖は、線形一本鎖ライブラリ分子の一方の末端上の配列とハイブリダイズする第1の配列（320）、及び線形一本鎖ライブラリ分子の他方の末端上の配列とハイブリダイズする第2の配列（330）を含む。第1のスプリント鎖の内部領域（310）は、第2のスプリント鎖（400）にハイブリダイズする。

【図2】第1のスプリント鎖（300）の内部領域（310）及び第2のスプリント鎖（400）の実施形態に関する更なる詳細を有する、図1に示される同じ概略図である。第2のスプリント鎖（400）は、2つのサブ領域を含み、第1のサブ領域は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第2のサブ領域は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む。第1のスプリント鎖（300）の内部領域（310）は、2つのサブ領域を含み、第4のサブ領域は、第2のスプリント鎖（400）の第1のサブ領域にハイブリダイズし、第5のサブ領域は、第2のスプリント鎖（400）の第2のサブ領域にハイブリダイズする。

【図3】第1のスプリント鎖（300）の内部領域（310）及び第2のスプリント鎖（400）の実施形態に関する更なる詳細を有する、図1に示される同じ概略図である。第2のスプリント鎖（400）は、3つのサブ領域を含み、第1のサブ領域は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第2のサブ領域は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第3のサブ領域は、5～20個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は2～10個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、NN）を含む。第1のスプリント鎖（300）の内部領域（310）は、3つのサブ領域を含み、第4のサブ領域は、第2のスプリント鎖（400）の第1のサブ領域にハイブリダイズし、第5のサブ領域は、第2のスプリント鎖（400）の第

2のサブ領域にハイブリダイズし、第6のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第3のサブ領域にハイブリダイズする。

【図4】例示的な直鎖一本鎖ライブラリ分子(100)を示す概略図であり、直鎖一本鎖ライブラリ分子(100)は、二本鎖スプリント分子(200)とハイブリダイズし、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、2つのニックを有するライブラリースプリント複合体(500)を形成する。ライブラリ分子(100)は、第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)及び第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)に一方の側において隣接し、第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)及び第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)に他方の側において隣接する目的の配列(110)を含む。二本鎖スプリント分子は、第2のスプリント鎖(短鎖(400))にハイブリダイズした第1のスプリント鎖(長鎖(300))を含む。第1のスプリント鎖は、線形一本鎖ライブラリ分子の一方の末端上の配列とハイブリダイズする第1の配列(320)、及び線形一本鎖ライブラリ分子の他方の末端上の配列とハイブリダイズする第2の配列(330)を含む。第1のスプリント鎖の内部領域(310)は、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズする。

10

【図5】例示的な直鎖一本鎖ライブラリ分子(100)を示す概略図であり、直鎖一本鎖ライブラリ分子(100)は、二本鎖スプリント分子(200)とハイブリダイズし、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、2つのニックを有するライブラリースプリント複合体(500)を形成する。ライブラリ分子(100)は、第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、第1の左固有識別配列(180)、第1の左インデックス配列(160)、第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、目的の配列(110)、第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、第1の右インデックス配列(170)、及び第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)を含む。二本鎖スプリント分子は、第2のスプリント鎖(短鎖(400))にハイブリダイズした第1のスプリント鎖(長鎖(300))を含む。第1のスプリント鎖は、線形一本鎖ライブラリ分子の一方の末端上の配列とハイブリダイズする第1の配列(320)、及び線形一本鎖ライブラリ分子の他方の末端上の配列とハイブリダイズする第2の配列(330)を含む。第1のスプリント鎖の内部領域(310)は、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズする。

20

【図6】例示的な直鎖一本鎖ライブラリ分子(100)を示す概略図であり、直鎖一本鎖ライブラリ分子(100)は、二本鎖スプリント分子(200)とハイブリダイズし、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、2つのニックを有するライブラリースプリント複合体(500)を形成する。ライブラリ分子(100)は、第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、第1の左インデックス配列(160)、第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、目的の配列(110)、第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、第1の右インデックス配列(170)、第1の右固有識別配列(190)、及び第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)を含む。二本鎖スプリント分子は、第2のスプリント鎖(短鎖(400))にハイブリダイズした第1のスプリント鎖(長鎖(300))を含む。第1のスプリント鎖は、線形一本鎖ライブラリ分子の一方の末端上の配列とハイブリダイズする第1の配列(320)、及び線形一本鎖ライブラリ分子の他方の末端上の配列とハイブリダイズする第2の配列(330)を含む。第1のスプリント鎖の内部領域(310)は、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズする。

30

40

【図7】例示的な直鎖一本鎖ライブラリ分子(100)を示す概略図であり、直鎖一本鎖ライブラリ分子(100)は、二本鎖スプリント分子(200)とハイブリダイズし、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、2つのニックを有するライブラリースプリント複合体(500)を形成する。ライブラリ分子(100)は、第1の付加された左ユニバーサルアダプター配列(121)、第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、第1の左接合部アダプター配列(125)、第1の左インデックス配列(160)、第2の左接合部アダプター配列(165)、第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、第3の左接合部アダプター配列(145)、目的の配列(110)、第3の右接合部アダプター配列(155)、第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、第2の右

50

接合部アダプター配列（１７５）、第１の右インデックス配列（１７０）、第１の右接合部アダプター配列（１３５）、第１の右ユニバーサルアダプター配列（１３０）、及び第１の付加された右ユニバーサルアダプター配列（１３１）を含む。二本鎖スプリント分子は、第２のスプリント鎖（短鎖（４００））にハイブリダイズした第１のスプリント鎖（長鎖（３００））を含む。第１のスプリント鎖は、線形一本鎖ライブラリ分子の一方の末端上の配列とハイブリダイズする第１の配列（３２０）、及び線形一本鎖ライブラリ分子の他方の末端上の配列とハイブリダイズする第２の配列（３３０）を含む。第１のスプリント鎖の内部領域（３１０）は、第２のスプリント鎖（４００）にハイブリダイズする。簡略化のために、ライブラリースプリント複合体（５００）は、接合部アダプター配列又は付加されたユニバーサルアダプター配列のいずれも示さない。当業者は、線形ライブラリ分子（１００）が、付加されたユニバーサルアダプター配列のうちの１つ又は両方を伴うか又は伴わない、接合部アダプターのうちのいずれか１つ、又は接合部アダプターのうちの２つ以上のいずれかの組み合わせを含むことができることを認識するであろう。ライブラリースプリント複合体（５００）が、ライブラリ分子（１００）内に存在する付加されたユニバーサルアダプター配列のうちの１つ又は両方を有する又は有しない接合部アダプターのうちのいずれか１つ又は２つ以上のいずれかの組み合わせを含むことができることが、当業者には認識されよう。

10

【図８】各々が第１のスプリント鎖（３００）にハイブリダイズした例示的な共有結合性閉環状ライブラリ分子の３つの概略図を示す。上部概略図は、目的の配列（１１０）、第１の右ユニバーサルアダプター配列（１３０）、第２のスプリント鎖配列（４００）、及び第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）を有する共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を示す。中央概略図は、目的の配列（１１０）、第２の右ユニバーサルアダプター配列（１５０）、第１の右ユニバーサルアダプター配列（１３０）、第２のスプリント鎖配列（４００）、第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）、及び第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）を有する共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を示す。下部概略図は、目的の配列（１１０）、第２の右ユニバーサルアダプター配列（１５０）、第１の右インデックス配列（１７０）、第１の右ユニバーサルアダプター配列（１３０）、第２のスプリント鎖配列（４００）、第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）、第１の左固有識別配列（１８０）、第１の左インデックス配列（１６０）、及び第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）を有する共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を示す。

20

30

【図９】例示的なライブラリースプリント複合体を示す概略図であり、ライブラリースプリント複合体は、ライゲーション反応に供されて、ニックを閉鎖して、共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を形成し、共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）は、第１のスプリント鎖（３００）にハイブリダイズしており、第１のスプリント鎖（３００）は、ローリングサークル増幅反応を行うための増幅プライマーとして使用される。点線は、新生の伸長産物を表す。

【図１０】第１のスプリント鎖（３００）及び第２のスプリント鎖（４００）を有する例示的な二本鎖スプリント分子（２００）のヌクレオチド配列を示す。例示的な第１のスプリント鎖は、第１の領域（３２０、配列番号４）、第２の領域（３３０、配列番号５）、並びに第４のサブ領域（配列番号６）及び第５のサブ領域（配列番号７）を有する内部領域（３１０）を含む。例示的な第２のスプリント鎖（４００）は、第１のサブ領域（配列番号１）及び第２のサブ領域（配列番号２）を含む。

40

【図１１】ガラス基質及び親水性コーティングの交互の層を含む例示的な低結合支持体の概略図であり、親水性コーティングの交互の層は、ガラスに共有結合的に又は非共有結合的に接着しており、化学反応性官能基を更に含み、化学反応性官能基は、オリゴヌクレオチドプライマー（例えば、キャプチャーオリゴヌクレオチド及び環状化オリゴヌクレオチド）のための付着部位として機能する。代替の実施形態において、支持体は、ガラス、プラスチック、又はポリマー材料などのいずれかの材料から作製され得る。

【図１２】多価分子の様々な例示的な構成の概略図である。左：スターバースト又はヘル

50

タースケルター構成を有する多価分子の概略図。中央：デンドリマー構成を有する多価分子の概略図。右：ストレプトアビジンを、ビオチンを有する4アーム又は8アーム型PEG-NHS及びdNTPと反応させることによって形成された複数の多価分子の概略図。ヌクレオチド単位は、「N」と表され、ビオチンは、「B」と表され、ストレプトアビジンは、「SA」と表される。

【図13】複数のヌクレオチドアームに付着した一般的なコアを含む例示的な多価分子の概略図である。

【図14】複数のヌクレオチドアームに付着したデンドリマーコアを含む例示的な多価分子の概略図である。

【図15】複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含む例示的な多価分子の概略図を示し、ヌクレオチドアームは、ビオチン、スペーサー、リンカー、及びヌクレオチド単位を含む。

【図16】コア付着部分、スペーサー、リンカー、及びヌクレオチド単位を含む例示的なヌクレオチドアームの概略図である。

【図17】例示的なスペーサーの化学構造（上部）、並びに11原子リンカー、16原子リンカー、23原子リンカー、及びN3リンカーを含む様々な例示的なリンカーの化学構造（下部）を示す。

【図18】リンカー1～9を含む様々な例示的なリンカーの化学構造を示す。

【図19】ヌクレオチド単位に連結された／付着した様々な例示的なリンカーの化学構造を示す。

【図20】ヌクレオチド単位に連結された／付着した様々な例示的なリンカーの化学構造を示す。

【図21】ヌクレオチド単位に連結された／付着した様々な例示的なリンカーの化学構造を示す。

【図22】例示的なビオチン化ヌクレオチドアームの化学構造を示す。この例において、ヌクレオチド単位は、ピリミジン塩基の5位又はプリン塩基の7位におけるプロパルギルアミン付着を介して、リンカーに接続されている。

【図23A】例示的な第1の左インデックス配列（160）及び第1の右インデックス配列（170）の配列を列挙する表1（6つのシート）である。

【図23B】例示的な第1の左インデックス配列（160）及び第1の右インデックス配列（170）の配列を列挙する表1（6つのシート）である。

【図23C】例示的な第1の左インデックス配列（160）及び第1の右インデックス配列（170）の配列を列挙する表1（6つのシート）である。

【図23D】例示的な第1の左インデックス配列（160）及び第1の右インデックス配列（170）の配列を列挙する表1（6つのシート）である。

【図23E】例示的な第1の左インデックス配列（160）及び第1の右インデックス配列（170）の配列を列挙する表1（6つのシート）である。

【図23F】例示的な第1の左インデックス配列（160）及び第1の右インデックス配列（170）の配列を列挙する表1（6つのシート）である。

【図24】qPCRによって決定された場合の、様々な種からの入力DNAを使用する共有結合性閉環状ライブラリ分子の平均パーセント回収率を示す棒グラフである。レーン1：Haemophilus influenzae（38%のGC）、レーン2：E. coli（51%のGC）、レーン3：Rhodopseudomonas palustris（65%のGC）、レーン4：PhiX、レーン5：ヒト、レーン6：ヒトエキソーム、レーン7：ヒトmRNA。実施例1～3を参照されたい。

【図25】共有結合性閉環状ライブラリ分子を支持体上に分配することと、支持体上ローリングサークル増幅を実行することによって得られた平均ポロニー密度を示す棒グラフである。共有結合性閉環状ライブラリ分子は、様々な種からの入力DNAから調製された。レーン1：無細胞DNA、レーン2：E. coli、レーン3：ヒト、レーン4：メタゲノムDNA、及びレーン5：PhiX。実施例4を参照されたい。

10

20

30

40

50

【図 2 6】3 塩基長ランダム配列 (NNN) を含む右試料インデックス配列 (1 7 0) のヌクレオチド塩基多様性を示すグラフである。グラフは、A 及び T ベースコールについておよそ 3 0 %、並びに C 及び G ベースコールについておよそ 2 0 % の 3 塩基長ランダム配列 (NNN) のヌクレオチド多様性を示す。

【図 2 7】3 塩基長ランダム配列 (NNN) を欠く左試料インデックス配列 (1 6 0) のヌクレオチド塩基多様性を示すグラフである。グラフは、A 及び T ベースコールについておよそ 4 0 %、C ベースコールについておよそ 1 5 %、並びに G ベースコールについておよそ 5 % のヌクレオチド多様性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0 1 0 6】

10

本出願全体にわたって、様々な刊行物、特許、及び／又は特許出願が参照される。刊行物、特許、及び／又は特許出願の開示は、それらの全体が、本開示が属する現状技術をより十分に説明するために参照により本出願に組み込まれる。

【0 1 0 7】

定義：

本明細書で提供される表題は、本開示の様々な態様の限定ではなく、これらの態様は、本明細書全体を参照することによって理解され得る。

【0 1 0 8】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、別途定義されない限り、当業者によって一般に理解される意味を有する。概して、本明細書に記載される分子生物学、核酸化学、タンパク質化学、遺伝学、微生物学、遺伝子導入細胞産生、及びハイブリダイゼーションの技法に関する用語は、当該技術分野で周知であり一般に使用されるものである。本明細書に記載される技法及び手順は、概して、当該技術分野で周知の従来の方法に従って実行され、本明細書全体にわたって引用及び考察される様々な一般的な及びより具体的な参照文献に記載されているように実行される。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 2000) を参照されたい。また、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992) を参照されたい。本明細書に記載される実験手順及び技法に関連して使用される命名法、並びに実験手順及び技法は、当該技術分野で周知であり一般に使用されるものである。

20

30

【0 1 0 9】

別途本明細書で文脈によって必要とされない限り、単数形用語は、複数形を含み、複数形用語は、単数形を含む。1 つという言葉及びに明確にかつ明解に限定されない限り、単数形の「a」、「an」、及び「the」、並びにいずれもの単語の単数形の使用は、複数の言及を含む。

【0 1 1 0】

代替用語（例えば、「又は」）の使用は、代替形態の一方若しくは両方、又はそれらのいずれかの組み合わせのいずれかを意味すると理解される。

40

【0 1 1 1】

本明細書で使用される場合、「及び／又は」という用語は、特定の特徴又は構成要素の各々が、他方を有するか又は有しないという具体的な開示を意味すると理解されるべきである。例えば、本明細書で「A 及び／又は B」という語句などにおいて使用される場合、「及び／又は」という用語は、「A 及び B」、「A 又は B」、「A」（A 単独で）、及び「B」（B 単独で）を含むことが意図されている。同様の様式で、「A、B、及び／又は C」という語句などにおいて使用される場合、「及び／又は」という用語は、以下の態様、「A、B、及び C」、「A、B、又は C」、「A 又は C」、「A 又は B」、「B 又は C」、「A 及び B」、「B 及び C」、「A 及び C」、「A」（単独で）、「B」（単独で）

50

、及び「C」（単独で）の各々を包含することが意図されている。

【0112】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、「含む (comprising)」、「含む (including)」、「有する (having)」、及び「含有する (containing)」という用語、並びに本明細書で使用される場合、それらの文法上の変形は、列挙内の1つの項目又は複数の項目が、列挙された項目に置換又は追加され得る他の項目を排除しないように非限定的であることが意図されている。態様が、「含む (comprising)」という用語で本明細書に記載されるいかなる場合も、「からなる」及び／又は「から本質的になる」という用語で記載される別法の類似の態様もまた提供されることが理解される。

10

【0113】

本明細書で使用される場合、「約」又は「およそ」という用語は、当業者によって決定される場合の、特定の値又は組成物についての許容されるエラー範囲内である値又は組成物を指し、許容されるエラー範囲は、どのように値又は組成物が測定又は決定されるか、すなわち、測定システムの制限に部分的に依存する。例えば、「約」又は「およそ」とは、当該技術分野における実施当たり1つの又は2つ以上の標準偏差内を意味することができる。代替として、「約」又は「およそ」とは、測定システムの制限に依存して、最大10%（すなわち、±10%）以上の範囲を意味することができる。例えば、約5mgは、4.5mg～5.5mgのいずれかの数を含むことができる。更に、特に、生物学的システム又はプロセスに関して、この用語は、値の最大1桁又は最大5倍を意味することができる。特定の値又は組成物が本開示で提供されるときに、別途記載されない限り、「約」又は「およそ」の意味は、この特定の値又は組成物についての許容されるエラー範囲内であると考えられるべきである。また、値の範囲及び／又はサブ範囲が提供される場合、範囲及び／又はサブ範囲は、範囲及び／又はサブ範囲の終点を含むことができる。

20

【0114】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語並びに本明細書で用いられる他の関連用語は、同義的に使用され、アミノ酸のポリマーを指し、任意の特定の長さ限定されない。ポリペプチドは、天然及び非天然アミノ酸を含み得る。ポリペプチドとしては、組換え型又は化学合成型が挙げられる。また、ポリペプチドには、タンパク質分解切断、リボソームスキッピングによる切断、ヒドロキシル化、メチル化、脂質化、アセチル化、SUMO化、ユビキチン化、グリコシル化、リン酸化、及び／又はジスルフィド結合形成などの翻訳後修飾をまだ受けていない前駆体分子も含まれる。これらの用語は、タンパク質配列の天然及び人工タンパク質、タンパク質断片及びポリペプチド類似体（変異タンパク質、バリエント、キメラタンパク質、及び融合タンパク質など）、並びに翻訳後、又はそうでなければ共有結合的若しくは非共有結合的に修飾されたタンパク質を包含する。

30

【0115】

「細胞生体試料」という用語は、単一の細胞、複数の細胞、組織、臓器、生物、又はこれらの細胞生体試料のうちのいずれかの切片を指す。細胞生体試料は、生物から抽出（例えば、生検）されてもよく、又は液体中の若しくは培養皿において増殖する細胞培養物から得られてもよい。細胞生体試料は、新鮮な試料、凍結した試料、新鮮な凍結した試料、又はアーカイブされた（例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋；FFPE）試料を含む。細胞生体試料は、ワックス、樹脂、エポキシ、又は寒天内に埋め込まれ得る。細胞生体試料は、例えば、アセトン、エタノール、メタノール、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド-Triton（登録商標）、又はグルタルアルデヒドのうちのいずれか1つ又は2つ以上のいずれかの組み合わせ中で固定され得る。細胞生体試料は、切片化されてもよく、又は切片化されなくてもよい。細胞生体試料は、染色されてもよく、脱染色されてもよく、又は染色されなくてもよい。

40

【0116】

目的の核酸は、細胞又は細胞生体試料から、当業者に既知のいくつかの技法のうちのい

50

ずれかを使用して抽出され得る。例えば、典型的なDNA抽出手順は、(i) DNAが抽出される細胞試料又は組織試料を収集することと、(ii) 細胞膜を破壊して(すなわち、細胞溶解させて)、DNA及び他の細胞質構成要素を遊離することと、(iii) 溶解した試料を、濃縮塩溶液で処理して、タンパク質、脂質、及びRNAを沈殿させ、続いて、遠心分離して、沈殿されたタンパク質、脂質、及びRNAを分離することと、(iv) DNAを上清から精製して、細胞膜溶解中に使用された洗浄剤、タンパク質、塩、又は他の試薬を除去することと、を含む。様々な好適な市販の核酸抽出及び精製キットが、本明細書の開示と一致する。例としては、Qiagen (Germantown, MD) からのヒト試料からのゲノムDNAの単離のための) QIAampキット及び(動物又は植物試料からのゲノムDNAの単離のための) DNAeasyキット、又はPromega (Madison, WI) からのMaxwell (登録商標) 及びReliaPrep (商標) シリーズのキットが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0117】

本明細書で使用される場合、「ポリメラーゼ」という用語及びその変形は、ヌクレオチド(又はヌクレオシド)に結合するドメインを含む酵素を含み、ポリメラーゼは、テンプレート核酸及び相補的ヌクレオチドを有する複合体を形成することができる。ポリメラーゼは、1つ以上の活性を有することができ、1つ以上の活性は、塩基類似体検出活性、DNA重合活性、逆転写酵素活性、DNA結合、鎖置換活性、並びにヌクレオチド結合及び認識を含むが、これらに限定されない。ポリメラーゼは、核酸鎖内へのヌクレオチド(それらの類似体を含む)の重合を触媒することができるいずれかの酵素であることができる。典型的には、必ずしもそうではないが、このようなヌクレオチド重合は、テンプレートに依存的な様式で発生することができる。典型的には、ポリメラーゼは、1つ以上の活性部位を含み、1つ以上の活性部位において、ヌクレオチド結合及び/又はヌクレオチド重合の触媒が発生することができる。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼは、他の酵素活性、例えば、3'から5'エキソヌクレアーゼ活性又は5'から3'エキソヌクレアーゼ活性を含む。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼは、鎖置換活性を有する。ポリメラーゼは、自然発生のポリメラーゼ並びにそれらのいずれかのサブユニット及び切断化、変異型ポリメラーゼ、バリエーションポリメラーゼ、組換え、融合又は別法で操作されたポリメラーゼ、化学修飾ポリメラーゼ、合成分子又はアセンブリ、並びにヌクレオチド重合を触媒する能力を保持するそれらのいずれかの類似体、誘導體、又は断片(例えば、触媒活性断片)を含むことができるが、これらに限定されない。ポリメラーゼは、触媒不活性ポリメラーゼ、触媒活性ポリメラーゼ、逆転写酵素、及びヌクレオチド結合ドメインを含む他の酵素を含む。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼは、細胞から単離されてもよく、又は組換えDNA技術若しくは化学合成方法を使用して生成されてもよい。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼは、原核生物、真核生物、ウイルス、又はファージ生物において発現され得る。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼは、翻訳後修飾タンパク質又はそれらの断片であることができる。ポリメラーゼは、原核生物、真核生物、ウイルス、又はファージに由来することができる。ポリメラーゼは、DNA指向性DNAポリメラーゼ及びRNA指向性DNAポリメラーゼを含む。

20

30

【0118】

「鎖置換」という用語は、二本鎖核酸の鎖を局所的に分離し、新しい鎖をテンプレートベースの様式で合成するポリメラーゼの能力を指す。鎖置換ポリメラーゼは、相補鎖をテンプレート鎖から置換し、新しい鎖合成を触媒する。鎖置換ポリメラーゼは、中温性及び好熱性ポリメラーゼを含む。鎖置換ポリメラーゼは、野生型酵素、並びにエキソヌクレアーゼマイナス変異体、変異型バージョン、キメラ酵素、及び切断型酵素を含むバリエーションを含む。鎖置換ポリメラーゼの例としては、phi29 DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼの大きい断片、Bsu DNAポリメラーゼ(エキソ-)の大きい断片、Bca DNAポリメラーゼ(エキソ-)、E.coli DNAポリメラーゼのクレノウ断片、T5ポリメラーゼ、M-MuLV逆転写酵素、HIVウイルス逆転写酵素、Deep Vent DNAポリメラーゼ、及びKOD DNAポリメラーゼが挙げられ

40

50

る。phi 29 DNAポリメラーゼは、野生型phi 29 DNAポリメラーゼ（例えば、ExpedeonからのMagniPhi）、又はバリエーションEquiPhi 29 DNAポリメラーゼ（例えば、Thermo Fisher Scientificから）、又はキメラQualiPhi DNAポリメラーゼ（例えば、4basebioから）であることができる。

【0119】

本明細書で使用される「核酸」、「ポリヌクレオチド」、及び「オリゴヌクレオチド」という用語、並びに他の関連用語は、互換的に使用され、ヌクレオチドのポリマーを指し、いずれもの特定の長さには限定されない。核酸は、組換え及び化学合形成態を含む。核酸は、単離され得る。核酸としては、DNA分子（例えば、cDNA又はゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、ヌクレオチド類似体を使用して生成されたDNA又はRNAの類似体（例えば、ペプチド核酸及び天然に存在しないヌクレオチド類似体）、並びにDNA及びRNAを含有するキメラ型が挙げられる。核酸は、一本鎖又は二本鎖であり得る。核酸は、ヌクレオチドのポリマーを含み、ヌクレオチドは、自然又は非自然塩基及び／又は糖を含む。核酸は、自然発生のヌクレオシド間結合、例えば、ホスホジエステル結合を含む。核酸は、非自然ヌクレオシド間結合を含み、非自然ヌクレオシド間結合は、ホスホロチオエート、ホスホロチオレート、又はペプチド核酸（PNA）結合を含む。いくつかの実施形態において、核酸は、1つのタイプのポリヌクレオチド、又は2つ以上の異なるタイプのポリヌクレオチドの混合物を含む。

10

【0120】

本明細書で使用される場合、「動作可能に結合した」及び「動作可能に連結された」という用語、又は関連用語は、構成要素の並列を指す。並列した構成要素は、共有結合的に一緒に結合し得る。例えば、2つの核酸構成要素は、酵素的に一緒にライゲーションされ得、2つの構成要素と一緒に連結する結合は、ホスホジエステル結合を含む。第1及び第2の核酸構成要素は、一緒に結合することができ、第1の核酸構成要素は、機能を第2の核酸構成要素に付与することができる。例えば、プライマー結合配列と目的の配列との間の結合は、プライマーに結合することができる一部分を有する核酸ライブラリ分子を形成する。別の例において、導入遺伝子（例えば、目的のポリペプチド又は核酸配列をコードする核酸）は、ベクターにライゲーションされ得、結合は、ベクター内に含有された導入遺伝子配列の発現又は機能を可能にする。いくつかの実施形態において、導入遺伝子は、導入遺伝子の発現に影響する宿主細胞調節配列（例えば、プロモーター配列）に動作可能に結合している。いくつかの実施形態において、ベクターは、少なくとも1つの宿主細胞調節配列を含み、少なくとも1つの宿主細胞調節配列は、プロモーター配列、エンハンサー、転写及び／又は翻訳開始配列、転写及び／又は翻訳終結配列、並びにポリペプチド分泌シグナル配列などを含む。いくつかの実施形態において、宿主細胞調節配列は、導入遺伝子のレベル、タイミング、及び／又は位置の発現を制御する。

20

30

【0121】

「結合した」、「連結された」、「付着した」、「付加された」という用語、及びそれらの変形は、特定の手順における使用に耐えるのに十分な安定性を有する化合物又は分子のいずれもの組み合わせ間のいずれものタイプの融合、結合、接着、又は会合を含む。手順は、ヌクレオチド結合、ヌクレオチド組み込み、デブロッキング（例えば、鎖終結部分の除去）、洗浄、除去、流れ、検出、イメージング、及び／又は特定を含むことができるが、これらに限定されない。このような結合は、例えば、共有結合、イオン、水素、双極子-双極子、親水性、疎水性、又は親和性結合、ファンデルワールス力を含む結合又は会合、及び機械的結合などを含むことができる。いくつかの実施形態において、このような結合は、分子内で、例えば、一本鎖又は二本鎖直鎖核酸分子の末端と一緒に結合させて環状分子を形成するように発生する。いくつかの実施形態において、このような結合は、異なる分子の組み合わせ間、又は分子と非分子との間で発生することができ、核酸分子と固体表面との間の結合、タンパク質と検出可能なレポーター部分との間の結合、及びヌクレオチドと検出可能なレポーター部分との間の結合などを含むが、これらに限定されない。

40

50

結合のいくつかの例は、例えば、Hermanson, G., “Bioconjugate Techniques”, Second Edition (2008)、Aslam, M., Dent, A., “Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences”, London: Macmillan (1998)、Aslam, M., Dent, A., “Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences”, London: Macmillan (1998)に見出され得る。

【0122】

本明細書で使用される「プライマー」という用語及び関連用語は、DNA及び／又はRNAポリヌクレオチドテンプレートとハイブリダイズして、二重鎖分子を形成することが可能であるオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、それらの長さ全体に沿って一本鎖であってもよく、又は一本鎖及び二本鎖部分を有してもよい。プライマーは、自然ヌクレオチド及び／又はヌクレオチド類似体を含む。プライマーは、組換え核酸分子であることができる。プライマーは、いずれかの長さを有し得るが、典型的には、4つ～50個のヌクレオチドの範囲であり得る。典型的なプライマーは、5'末端及び3'末端を含む。プライマーの3'末端は、ポリメラーゼ触媒プライマー伸長反応におけるヌクレオチド重合開始部位として機能する3'OH部分を含むことができる。代替として、プライマーの3'末端は、3'OH部分を欠いてもよく、又はポリメラーゼ触媒反応におけるヌクレオチド重合を阻害する末端3'ブロック基を含んでもよい。プライマーの長さに沿ういずれか1つのヌクレオチド又は2つ以上のヌクレオチドは、検出可能なレポーター部分で標識され得る。プライマーは、溶液中にあってもよく（例えば、可溶性プライマー）、又は支持体に固定化されてもよい（例えば、キャプチャープライマー）。

【0123】

「テンプレート核酸」、「テンプレートポリヌクレオチド」、「標的核酸」、「標的ポリヌクレオチド」、「テンプレート鎖」という用語及び他の変形は、本明細書に記載される増幅及び／又はシーケンシング方法のうちのいずれかのための基礎核酸分子として機能する核酸鎖を指す。テンプレート核酸は、一本鎖若しくは二本鎖であってもよく、又はテンプレート核酸は、一本鎖若しくは二本鎖部分を有してもよい。テンプレート核酸は、自然発生の供給源若しくは組換え形態から得られてもよく、又はいずれかのタイプの核酸類似体を含むように化学的に合成されてもよい。テンプレート核酸は、直鎖、コンカテマー、環状、又は他の形態であることができる。

【0124】

「アダプター」という用語及び関連用語は、標的ポリヌクレオチドに動作可能に結合し得る（付加され得る）オリゴヌクレオチドを指し、アダプターは、機能を共連結されたアダプター-標的分子に付与する。アダプターは、DNA、RNA、キメラDNA/RNA、又はそれらの類似体を含む。アダプターは、少なくとも1つのリボヌクレオチド残基を含むことができる。アダプターは、一本鎖若しくは二本鎖であってもよく、又は一本鎖及び／若しくは二本鎖部分を有してもよい。アダプターは、直鎖、ステムループ、ヘアピン、又はY字形状の形態であるように構成され得る。アダプターは、4つ～100個のヌクレオチド以上を含むいずれかの長さであることができる。アダプターは、平滑末端、オーバーハング末端、又は両方の組み合わせを有することができる。オーバーハング末端は、5'オーバーハング及び3'オーバーハング末端を含む。一本鎖アダプターの5'末端、又は二本鎖アダプターの一方の鎖は、5'リン酸基を有してもよく、又は5'リン酸基を欠いてもよい。アダプターは、標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズしない5'テールを含んでもよく（例えば、テール付きアダプター）、又はアダプターは、テールなしであってもよい。アダプターの少なくとも一部分は、既知の及び所定の配列を含む。アダプターは、プライマー、例えば、増幅プライマー、シーケンシングプライマー、又はキャプチャープライマー（例えば、可溶性又は固定化されたキャプチャープライマー）の少なくとも一部分と相補的である配列を含むことができる。アダプターは、ランダム配列又は縮重配列

を含むことができる。アダプターは、少なくとも1つのイノシン残基を含むことができる。アダプターは、少なくとも1つのホスホロチオエート、ホスホロチオレート、及び／又はホスホロアミデート結合を含むことができる。アダプターは、少なくとも1つのバーコード／インデックス配列を含むことができ、少なくとも1つのバーコード／インデックス配列は、マルチプレックスアッセイにおいて、異なる試料供給源からのポリヌクレオチド（例えば、挿入配列）を区別するために使用され得る。アダプターは、少なくとも1つの固有識別配列（例えば、分子タグ）を含むことができ、少なくとも1つの固有識別配列は、アダプターが付加された核酸分子を固有に特定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、固有識別配列は、既知の配列を有する2つ～12個又はそれ以上のヌクレオチドを含む。例えば、固有識別配列は、既知のランダム配列を含み、既知のランダム配列において、各位置におけるヌクレオチドは、塩基A、G、C、T、又はUを有するヌクレオチドからランダムに選択される。アダプターは、少なくとも1つの制限酵素認識配列を含むことができ、少なくとも1つの制限酵素認識配列は、I型、II型、III型、IV型、Hs型、又はIIB型からなる群から選択されるいずれか1つ又は2つ以上のいずれかの組み合わせを含む。

10

【0125】

「ユニバーサル配列」という用語及び関連用語は、2つ以上のポリヌクレオチド分子間で共通する、核酸分子における配列を指す。例えば、ユニバーサル配列を有するアダプターは、複数のポリヌクレオチドに動作可能に連結され得、これにより、共連結された分子の集団は、同じユニバーサルアダプター配列を保有する。ユニバーサルアダプター配列の例としては、増幅プライマー配列、シーケンシングプライマー配列、又はキャプチャープライマー配列（例えば、可溶性又は固定化されたキャプチャープライマー）が挙げられる。

20

【0126】

核酸分子に関して使用されるときに、「ハイブリダイズする」若しくは「ハイブリダイズすること」若しくは「ハイブリダイゼーション」という用語、又は他の関連用語は、二重鎖核酸を形成するための2つの異なる核酸間の水素結合を指す。ハイブリダイゼーションはまた、二重鎖領域を有する自己ハイブリダイゼーション分子を形成するための単一の核酸分子の2つの異なる領域間の水素結合を含む。ハイブリダイゼーションは、二重鎖二本鎖核酸、又は核酸分子内の二本鎖領域を形成するためのワトソンクリック又はフーグステイン結合を含むことができる。二本鎖核酸、又は単一の核酸の2つの異なる領域は、完全に相補的であってもよく又は部分的に相補的であってもよい。相補的核酸鎖は、それらの長さ全体にわたって互いにハイブリダイズする必要はない。相補的塩基対形成は、標準的なA-T若しくはC-G塩基対形成であってもよく、又は塩基対形成相互作用の他の形態であってもよい。二重鎖核酸は、ミスマッチ塩基対形成ヌクレオチドを含み得る。

30

【0127】

核酸に関して使用されるときに、「伸長する」、「伸長すること」、「伸長」という用語及び他の変形は、核酸分子内への1つ以上のヌクレオチドの組み込みを指す。ヌクレオチドの取り込みは、核酸鎖の末端3' OH末端への1つ以上のヌクレオチドの重合を含み、核酸鎖の伸長をもたらす。ヌクレオチド組み込みは、自然ヌクレオチド及び／又はヌクレオチド類似体で行われ得る。典型的には、必ずしもそうではないが、ヌクレオチド組み込みは、テンプレートに依存的な様式で発生する。核酸分子を伸長させるいずれかの好適な方法が使用され得、好適な方法は、DNAポリメラーゼ又はRNAポリメラーゼによって触媒されるプライマー伸長を含む。

40

【0128】

「ヌクレオチド」という用語及び関連用語は、芳香族塩基、5炭素糖（例えば、リボース又はデオキシリボース）、及び少なくとも1つのリン酸基を含む分子を指す。標準又は非標準ヌクレオチドは、この用語の使用と一致する。いくつかの実施形態において、ヌクレオチドは、一リン酸、二リン酸、若しくは三リン酸、又は対応するリン酸類似体を含む。「ヌクレオシド」という用語は、芳香族塩基及び糖を含む分子を指す。ヌクレオチド及

50

びヌクレオシドは、非標識であってもよく、又は検出可能なレポーター部分で標識されてもよい。

【0129】

ヌクレオチド（及びヌクレオシド）は、典型的には、置換された又は非置換の窒素含有親ヘテロ芳香族環を含むヘテロ環状塩基を含み、これらは、核酸において一般に見出され、自然発生の、置換された、修飾された、若しくは操作されたバリエーション、又はそれらの類似体を含む。ヌクレオチド（又はヌクレオシド）の塩基は、適切な相補的塩基とのワトソンクリック及び／又はフーグステイン水素結合を形成することが可能である。例示的な塩基は、プリン及びピリミジン、例えば、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、アデニン（A）、エテノアデニン、 $N^6-\Delta^2$ -イソペンテニルアデニン（6iA）、 $N^6-\Delta^2$ -イソペンテニル-2-メチルチオアデニン（2ms6iA）、 N^6 -メチルアデニン、グアニン（G）、イソグアニン、 N^2 -ジメチルグアニン（dmG）、7-メチルグアニン（7mG）、2-チオピリミジン、6-チオグアニン（6sG）、ヒポキサンチン、及び O^6 -メチルグアニン；7-デアザプリン、例えば、7-デアザアデニン（7-デアザ-A）及び7-デアザグアニン（7-デアザ-G）；ピリミジン、例えば、シトシン（C）、5-プロピニルシトシン、イソシトシン、チミン（T）、4-チオチミン（4sT）、5,6-ジヒドロチミン、 O^4 -メチルチミン、ウラシル（U）、4-チオウラシル（4sU）、及び5,6-ジヒドロウラシル（ジヒドロウラシル；D）；インドール、例えば、ニトロインドール及び4-メチルインドール；ピロール、例えば、ニトロピロール；ネブラリン；イノシン；ヒドロキシメチルシトシン；5-メチシトシン；塩基（Y）；並びにメチル化、グリコシル化、及びアシル化された塩基部分などを含むが、これらに限定されない。追加の例示的な塩基は、Fasman, 1989, "Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology", pp. 385-394, CRC Press, Boca Raton, Flaに見出され得る。

10

20

【0130】

ヌクレオチド（及びヌクレオシド）は、典型的には、糖部分、例えば、炭素環式部分（Ferraro and Gotor 2000 Chem. Rev. 100:4319-48）、非環式部分（Martinez, et al., 1999 Nucleic Acids Research 27:1271-1274、Martinez, et al., 1997 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters vol. 7:3013-3016）、及び他の糖部分（Joeng, et al., 1993 J. Med. Chem. 36:2627-2638、Kim, et al., 1993 J. Med. Chem. 36:30-7、Eschenmosser 1999 Science 284:2118-2124、及び米国特許第5,558,991号）を含む。糖部分は、リボシル；2'-デオキシリボシル；3'-デオキシリボシル；2',3'-ジデオキシリボシル；2',3'-ジデヒドロジデオキシリボシル；2'-アルコキシリボシル；2'-アジドリボシル；2'-アミノリボシル；2'-フルオロリボシル；2'-メルカプトリボシル；2'-アルキルチオリボシル；3'-アルコキシリボシル；3'-アジドリボシル；3'-アミノリボシル；3'-フルオロリボシル；3'-メルカプトリボシル；3'-アルキルチオリボシル炭素環式；非環式、又は他の修飾糖を含む。

30

40

【0131】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチドは、1、2、又は3つのリン原子の鎖を含み、鎖は、典型的には、エステル又はホスホラミド結合を介して、糖部分の5'炭素に付着している。いくつかの実施形態において、ヌクレオチドは、リン鎖を有する類似体であり、リン鎖において、リン原子と一緒に、介在するO、S、NH、メチレン、又はエチレンと結合している。いくつかの実施形態において、鎖におけるリン原子は、O、S、又は BH_3 を含む置換された側鎖基を含む。いくつかの実施形態において、鎖は、ホスホロアミデート、ホスホロチオエート、ホスホルジチオエート、及びO-メチルホスホロアミダイト基を含む類似体で置換されたリン酸基を含む。

50

【0132】

「ローリングサークル増幅」という用語は、概して、目的の標的配列、増幅プライマー結合配列、並びに任意選択で、1つ以上のアダプター配列、例えば、シーケンシングプライマー結合配列及び／又は試料インデックス配列を含有する環状化核酸テンプレート分子を用いる増幅方法を指す。ローリングサークル増幅反応は、等温増幅条件下で行われ得、環状化核酸テンプレート分子、増幅プライマー、鎖置換ポリメラーゼ、及び複数のヌクレオチドを含み、環状テンプレート分子及び本来の環状化核酸テンプレート分子内に存在するいずれかのアダプター配列のタンデムリピート配列を含有するコンカテマーを生成する。コンカテマーは、自己崩壊して、核酸ナノボールにすることができる。ナノボールの形状及びサイズは、環状テンプレート分子内の一对の反転リピート配列を含むことによって、又はローリングサークル増幅反応を1つ以上のコンパクションオリゴヌクレオチドで行うことによって更にコンパクトにされ得る。ローリングサークル増幅を使用して、シーケンシングワークフローのためのクローンアンプリコンを生成する利点のうちの1つは、ナノボールにおける標的配列のリピートコピーが、同時にシーケンシングされて、シグナル強度を増加させることができることである。いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応は、少なくとも4つの連続したグアニンを有する複数のコンパクションオリゴヌクレオチドの存在下で行われ得る。ローリングサークル増幅反応は、コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列のリピートコピーを含むコンカテマーを生成する。少なくとも1つのコンパクションオリゴヌクレオチドは、グアニン四重鎖を形成することができ、コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列にハイブリダイズすることができ、得られたコンカテマーは、フォールドして、分子内G四重鎖構造を形成することができる。コンカテマーは、コンパクトなナノボールを形成するように自己崩壊することができる。ナノボールにおけるグアニン四重鎖及びG四重鎖の形成は、ナノボールの安定性を増加させて、それらのコンパクトなサイズ及び形状を保持し得、それらのコンパクトなサイズ及び形状は、本明細書に記載されるシーケンシングワークフローのうちのいずれかを行うための試薬の繰り返される流れに耐えることができる。

10

20

【0133】

核酸に関して使用されるときに、「増幅する」、「増幅すること」、「増幅」という用語及び他の関連用語は、本来のポリヌクレオチドテンプレート分子の複数のコピーを産生することであって、コピーが、テンプレート配列と相補的である配列を含み、かつ／又はコピーが、テンプレート配列と同じである配列を含む、産生することを含む。いくつかの実施形態において、コピーは、テンプレート配列と実質的に同一である配列、及び／又はテンプレート配列と相補的である配列と実質的に同一である配列を含む。

30

【0134】

「レポーター部分 (reporter moiety)」、「レポーター部分 (reporter moieties)」という用語又は関連用語は、検出可能なシグナルを生成するか、又はそれを生成することを引き起こす化合物を指す。レポーター部分は、しばしば、「標識」と称される。いずれかの好適なレポーター部分を使用され得、好適なレポーター部分は、ルミネセンス、光ルミネセンス、エレクトロルミネセンス、生物ルミネセンス、化学ルミネセンス、蛍光、リン光、発色団、放射性同位体、電気化学、質量分析、ラマン、ハプテン、親和性タグ、原子、又は酵素を含む。レポーター部分は、化学的又は物理的变化 (例えば、熱、光、電気、pH、塩濃度、酵素活性、又は近接事象) からもたらされる検出可能なシグナルを生成する。近接事象は、2つのレポーター部分が、互いに接近するか、又は互いに会合するか、又は互いに結合することを含む。レポーター部分を、各々が、励起放射線を吸収し、かつ／又は蛍光を、他のレポーター部分から区別可能な波長で発光して、同じ反応又は異なる反応における異なるレポーター部分の存在を監視することを可能にするように選択することは、当業者に周知である。スペクトル的に異なる発光プロファイルを有するか、又は最小のオーバーラップスペクトル発光プロファイルを有する2つ以上の異なるレポーター部分が選択され得る。レポーター部分は、ヌクレオチ

40

50

ド、ヌクレオシド、核酸、酵素（例えば、ポリメラーゼ又は逆転写酵素）、又は支持体（例えば、表面）に結合（例えば、動作可能に結合）し得る。

【0135】

蛍光レポーター部分（又は標識）は、蛍光標識又はフルオロフォアを含む。蛍光標識又はフルオロフォアとして機能し得る例示的な蛍光部分は、フルオレセイン及びフルオレセイン誘導体、例えば、カルボキシフルオレセイン、テトラクロロフルオレセイン、ヘキサクロロフルオレセイン、カルボキシナフトフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、NHS-フルオレセイン、ヨードアセトアミドフルオレセイン、フルオレセインマレイミド、SAMSA-フルオレセイン、フルオレセインチオセミカルバジド、カルボヒドラジノメチルチオアセチル-アミノフルオレセイン、ローダミン及びローダミン誘導体、例えば、TRITC、TMR、Lissamineローダミン、Texas Red、ローダミンB、ローダミン6G、ローダミン10、NHS-ローダミン、TMR-ヨードアセトアミド、LissamineローダミンBスルホニルクロリド、LissamineローダミンBスルホニルヒドラジン、Texas Redスルホニルクロリド、Texas Redヒドラジド、クマリン及びクマリン誘導体、例えば、AMCA、AMCA-NHS、AMCA-スルホ-NHS、AMCA-HPDP、DCIA、AMCE-ヒドラジド、BODIPY及び誘導体、例えば、BODIPY FL C3-SE、BODIPY 530/550 C3、BODIPY 530/550 C3-SE、BODIPY 530/550 C3ヒドラジド、BODIPY 493/503 C3ヒドラジド、BODIPY FL C3ヒドラジド、BODIPY FL IA、BODIPY 530/551 IA、Br-BODIPY 493/503、Cascade Blue及び誘導体、例えば、Cascade Blueアセチルアジド、Cascade Blueカダベリン、Cascade Blueエチレンジアミン、Cascade Blueヒドラジド、Lucifer Yellow及び誘導体、例えば、Lucifer Yellowヨードアセトアミド、Lucifer Yellow CH、シアニン及び誘導体、例えば、インドリウムベースのシアニン色素、ベンゾ-インドリウムベースのシアニン色素、ピリジウムベースのシアニン色素、チオゾリウムベースのシアニン色素、キノリニウムベースのシアニン色素、イミダゾリウムベースのシアニン色素、Cy3、Cy5、ランタニドキレート及び誘導体、例えば、BCPDA、TBP、TMT、BHHCT、BCOT、ユーロピウムキレート、テルビウムキレート、Alexa Fluor色素、DyLight色素、Atto色素、LightCycler Red色素、CAL Fluor色素、JOE及びその誘導体、Oregon Green色素、WellRED色素、IRD色素、フィコエリトリン及びフィコビル色素、マラカイトグリーン、スチルベン、DEG色素、NR色素、近赤外色素、並びに当該技術分野で既知の他のもの、例えば、Haugland, Molecular Probes Handbook, (Eugene, Oreg.) 6th Edition, Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Ed., Plenum Press New York (1999)、若しくはHermanson, Bioconjugate Techniques, 2nd Editionに記載されているもの又はそれらの誘導体、あるいはそれらのいずれかの組み合わせを含むが、これらに限定されない。シアニン色素は、スルホン化又は非スルホン化形態のいずれかで存在し得、2つの窒素原子間のポリメチン架橋によって分離された2つのインドレニン、ベンゾインドリウム、ピリジウム、チオゾリウム、及び／又はキノリニウム基からなる。市販のシアニンフルオロフォアは、例えば、Cy3（これは、1-[6-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イルオキシ)-6-オキソヘキシル]-2-(3-{1-[6-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イルオキシ)-6-オキソヘキシル]-3,3-ジメチル-1,3-ジヒドロ-2H-インドール-2-イリデン}プロプ-1-エン-1-イル)-3,3-ジメチル-3H-インドリウム、又は1-[6-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イルオキシ)-6-オキソヘキシル]-2-(3-{1-[6-(2,5-ジオキソピロリジン-1-イルオキシ)-6-オキソヘキシル]-3,3-ジメチル-

10

20

30

40

50

5-スルホ-1, 3-ジヒドロ-2H-インドール-2-イリデン} プロブ-1-エン-1-イル)-3, 3-ジメチル-3H-インドリウム-5-スルホネートを含み得る)、Cy 5 (これは、1-(6-(2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ)-6-オキソヘキシル)-2-(1E, 3E)-5-(E)-1-(6-(2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ)-6-オキソヘキシル)-3, 3-ジメチル-5-インドリン-2-イリデン)ペンタ-1, 3-ジエン-1-イル)-3, 3-ジメチル-3H-インドール-1-イウム、又は1-(6-(2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ)-6-オキソヘキシル)-2-(1E, 3E)-5-(E)-1-(6-(2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル)オキシ)-6-オキソヘキシル)-3, 3-ジメチル-5-スルホインドリン-2-イリデン)ペンタ-1, 3-ジエン-1-イル)-3, 3-ジメチル-3H-インドール-1-イウム-5-スルホネートを含み得る)、及びCy 7 (1-(5-カルボキシペンチル)-2-[(1E, 3E, 5E, 7Z)-7-(1-エチル-1, 3-ジヒドロ-2H-インドール-2-イリデン)ヘプタ-1, 3, 5-トリエン-1-イル]-3H-インドリウム、又は1-(5-カルボキシペンチル)-2-[(1E, 3E, 5E, 7Z)-7-(1-エチル-5-スルホ-1, 3-ジヒドロ-2H-インドール-2-イリデン)ヘプタ-1, 3, 5-トリエン-1-イル]-3H-インドリウム-5-スルホネートを含み得る)を含み、「Cy」は、「シアニン」を表し、最初の数字は、2つのインドレニン基の間の炭素原子の数を特定する。インドレニンではなくオキサゾール誘導体であるCy 2、並びにベンゾ誘導体化Cy 3、5、Cy 5.5、及びCy 7.5は、この規則に対する例外である。

10

20

【0136】

いくつかの実施形態において、レポーター部分は、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)対であることができ、これにより、複数の分類が、単一の励起及びイメージングステップ下で実行され得る。本明細書で使用される場合、FRETは、励起交換(Förster)移動、又は電子交換(Dexter)移動を含み得る。

【0137】

本明細書で使用される場合、「支持体」という用語は、アッセイ及び／又は分析のための生体分子又は生体試料の堆積のために設計された基質を指す。支持体上に堆積させる生体分子の例としては、核酸(例えば、DNA、RNA)、ポリペプチド、糖、脂質、単一の細胞、又は複数の細胞が挙げられる。生体試料の例としては、唾液、痰、粘液、血液、血漿、血清、尿、便、汗、涙、及び組織又は臓器からの流体が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0138】

いくつかの実施形態において、支持体は、固体、半固体、又は両方の組み合わせである。いくつかの実施形態において、支持体は、多孔質、半多孔質、非多孔質、又は多孔性のいずれかの組み合わせである。いくつかの実施形態において、支持体は、実質的に平面、凹面、凸面、又はそれらのいずれかの組み合わせであることができる。いくつかの実施形態において、支持体は、円柱状であることができ、例えば、キャピラリー又はキャピラリーの内側表面を含む。

【0139】

いくつかの実施形態において、支持体の表面は、実質的に平滑であることができる。いくつかの実施形態において、支持体は、規則的又は不規則なテクスチャであることができ、隆起、エッチング、細孔、三次元足場、又はそれらのいずれかの組み合わせを含む。

40

【0140】

いくつかの実施形態において、支持体は、いずれかの形状を有するビーズを含み、その形状は、球状、半球状、円柱状、バレル形状、トロイダル、ディスク形状、棒状、円錐状、三角形、立方形、多角形、管状、又はワイヤ状を含む。

【0141】

支持体は、いずれかの材料から製造され得、材料は、ガラス、溶融シリカ、シリコン、ポリマー(例えば、ポリスチレン(PS)、マクロ多孔質ポリスチレン(MPPS)、ポ

50

リメチルメタクリレート（PMMA）、ポリカーボネート（PC）、ポリプロピレン（PP）、ポリエチレン（PE）、高密度ポリエチレン（HDPE）、環状オレフィンポリマー（COP）、環状オレフィンコポリマー（COC）、ポリエチレンテレフタレート（PET））、又はそれらのいずれかの組み合わせを含むが、これらに限定されない。ガラス及びプラスチック基質の両方の様々な組成が企図される。

【0142】

本開示は、支持体に固定化された複数の（例えば、2つ以上の）核酸テンプレート分子を提供する。いくつかの実施形態において、固定化された複数の核酸テンプレート分子は、同じ配列又は異なる配列を有する。いくつかの実施形態において、複数の核酸テンプレート分子における個々の核酸テンプレート分子は、支持体上の異なる部位に固定化されている。いくつかの実施形態において、複数の核酸テンプレートにおける2つ以上の個々の核酸テンプレート分子は、支持体上の部位に固定化されている。

【0143】

「アレイ」という用語は、支持体上の所定の位置において位置する複数の部位を、部位のアレイを形成するように含む支持体を指す。部位は、分散し得、インタースティシャル領域によって分離され得る。いくつかの実施形態において、支持体上の所定の部位は、一次元で行又は列に配置されてもよく、又は二次元で行及び列に配置されてもよい。いくつかの実施形態において、複数の所定の部位は、支持体上に、組織化された様式で配置されている。いくつかの実施形態において、複数の所定の部位は、いずれかの組織化されたパターンで配置されており、パターンは、直線、六角形パターン、格子パターン、反射対称性を有するパターン、又は回転対称性を有するパターンなどを含む。異なる対の部位間のピッチは、同じであってもよく又は変動してもよい。いくつかの実施形態において、支持体は、少なくとも 10^2 個の部位、少なくとも 10^3 個の部位、少なくとも 10^4 個の部位、少なくとも 10^5 個の部位、少なくとも 10^6 個の部位、少なくとも 10^7 個の部位、少なくとも 10^8 個の部位、少なくとも 10^9 個の部位、少なくとも 10^{10} 個の部位、少なくとも 10^{11} 個の部位、少なくとも 10^{12} 個の部位、少なくとも 10^{13} 個の部位、少なくとも 10^{14} 個の部位、又は少なくとも 10^{15} 個の部位以上を含み、部位は、支持体上の所定の位置において位置する。いくつかの実施形態において、支持体上の複数の所定の部位（例えば、 $10^2 \sim 10^{15}$ 個又はそれ以上の部位）には、核酸テンプレート分子が、核酸テンプレートアレイを形成するように固定化されている。いくつかの実施形態において、固定化された表面キャプチャプライマーへのハイブリダイゼーションによって複数の所定の部位において固定化されている核酸テンプレート分子、又は核酸テンプレート分子は、表面キャプチャプライマーに共有結合的に付着している。いくつかの実施形態において、複数の所定の部位において固定化されており、例えば、 $10^2 \sim 10^{15}$ 個又はそれ以上の部位において固定化されている核酸テンプレート分子。いくつかの実施形態において、固定化された核酸テンプレート分子は、クローンの的に増幅されて、固定化された核酸クラスターを、複数の所定の部位において生成する。いくつかの実施形態において、個々の固定化された核酸クラスターは、直鎖クラスター、又は一本鎖若しくは二本鎖コンカテマーを含む。

【0144】

いくつかの実施形態において、支持体上のランダムな位置において位置する複数の部位を含む支持体は、ランダムに位置する部位を上にも有する支持体と本明細書で称される。支持体上のランダムに位置する部位の位置は、所定の位置でない。複数のランダムに位置する部位は、支持体上に、不整列にかつ／又は予測不可能な様式で配置されている。いくつかの実施形態において、支持体は、少なくとも 10^2 個の部位、少なくとも 10^3 個の部位、少なくとも 10^4 個の部位、少なくとも 10^5 個の部位、少なくとも 10^6 個の部位、少なくとも 10^7 個の部位、少なくとも 10^8 個の部位、少なくとも 10^9 個の部位、少なくとも 10^{10} 個の部位、少なくとも 10^{11} 個の部位、少なくとも 10^{12} 個の部位、少なくとも 10^{13} 個の部位、少なくとも 10^{14} 個の部位、又は少なくとも 10^{15} 個の部位以上を含み、部位は、支持体上にランダムに位置する。いくつかの実施形態に

において、支持体上の複数のランダムに位置する部位（例えば、 $10^2 \sim 10^{15}$ 個又はそれ以上の部位）は、核酸テンプレート分子が固定化されている。いくつかの実施形態において、核酸テンプレート分子は、固定化された表面キャプチャプライマーへのハイブリダイゼーションによって複数のランダムに位置する部位において固定化されているか、又は核酸テンプレート分子は、表面キャプチャプライマーに共有結合的に付着している。いくつかの実施形態において、複数のランダムに位置する部位において固定化されており、例えば、 $10^2 \sim 10^{15}$ 個又はそれ以上の部位において固定化されている核酸テンプレート。いくつかの実施形態において、固定化された核酸テンプレートは、クローン的に増幅されて、固定化された核酸クラスターを、複数のランダムに位置する部位において生成する。いくつかの実施形態において、個々の固定化された核酸クラスターは、直鎖クラスター、又は一本鎖若しくは二本鎖コンカテマーを含む。

10

【0145】

いくつかの実施形態において、支持体上の（例えば、支持体上の所定の又はランダムな位置において位置する）複数の固定化された表面キャプチャプライマーは、互いに流体連通しており、試薬の溶液（例えば、核酸テンプレート分子、可溶性プライマー、酵素、ヌクレオチド、二価カチオン、及び緩衝液など）が支持体上に流れることを可能にし、これにより、支持体上の複数の固定化された表面キャプチャプライマーは、試薬と本質的に同時に超並列様式で反応することができる。いくつかの実施形態において、複数の固定化された表面キャプチャプライマーの流体連通は、核酸増幅反応（例えば、RCA、MDA、PCR、及びブリッジ増幅）を、複数の固定化された表面キャプチャプライマーにおいて本質的に同時に行うために使用され得る。

20

【0146】

いくつかの実施形態において、支持体上の複数の固定化された核酸クラスターは、互いに流体連通しており、試薬の溶液（例えば、酵素、ヌクレオチド、及び二価カチオンなど）が支持体上に流れることを可能にし、これにより、支持体上の複数の固定化された核酸クラスターは、試薬と本質的に同時に超並列様式で反応することができる。いくつかの実施形態において、複数の固定化された核酸クラスターの流体連通は、ヌクレオチド結合アッセイを行うために、かつ／又はヌクレオチド重合反応（例えば、プライマー伸長又はシーケンシング）を、複数の固定化された核酸クラスター上で実質的に同時に行うために使用され得、任意選択で、超並列シーケンシングのための検出及びイメージングを行うこと

30

【0147】

いくつかの実施形態において、「固定化された」という用語及び関連用語は、共有結合若しくは非共有結合相互作用を介して支持体に付着しているか、又は支持体上のコーティングに付着しているか、又は支持体上のコーティングによって形成されたマトリックス内に埋め込まれている核酸分子であって、核酸分子が、表面キャプチャプライマー、核酸テンプレート分子、及びキャプチャプライマーの伸長産物を含む、核酸分子を指す。キャプチャプライマーの伸長産物は、核酸コンカテマー（例えば、核酸クラスター）を含む。核酸分子は、支持体上の所定の又はランダムな位置において固定化され得る。核酸分子は、支持体上の不動態化されたコーティング上又は内の所定の又はランダムな位置において固定化され得る。

40

【0148】

いくつかの実施形態において、「固定化された」という用語及び関連用語は、共有結合若しくは非共有結合相互作用を介して支持体に付着しているか、又は支持体上のコーティングに付着しているか、又は支持体上のコーティングによって形成されたマトリックス内に埋め込まれている酵素（例えば、ポリメラーゼ）を指す。酵素は、支持体上の所定の又はランダムな位置において固定化され得る。酵素は、支持体上の不動態化されたコーティング上又は内の所定の又はランダムな位置において固定化され得る。

【0149】

いくつかの実施形態において、1つ以上の核酸テンプレート分子は、支持体上に固定化

50

されており、例えば、支持体上の部位において固定化されている。いくつかの実施形態において、1つ以上の核酸テンプレート分子は、クローン的に増幅される。いくつかの実施形態において、1つ以上の核酸テンプレート分子は、支持体外で（例えば、溶液中で）クローン的に増幅され、次いで、支持体上に堆積し、支持体上に固定化される。いくつかの実施形態において、1つ以上の核酸テンプレート分子のクローン的な増幅反応は、支持体上で行われ、支持体上での固定化をもたらす。いくつかの実施形態において、1つ以上の核酸テンプレート分子は、核酸増幅反応を使用して（例えば、溶液中又は支持体上で）クローン的に増幅され、核酸増幅反応は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、多置換増幅（MDA）、転写媒介増幅（TMA）、核酸配列ベース増幅（NASBA）、鎖置換増幅（SDA）、リアルタイムSDA、ブリッジ増幅、等温ブリッジ増幅、ローリングサークル増幅（RCA）、サークルーサークル増幅、ヘリカーゼ依存性増幅、リコンビナーゼ依存性増幅、及び／又は一本鎖結合（SSB）タンパク質依存性増幅のうちのいずれか1つ又はそれらのいずれかの組み合わせを含む。

10

【0150】

「表面プライマー」という用語及び関連用語は、支持体に固定化されており、核酸テンプレート分子の少なくとも一部分にハイブリダイズすることができる配列を含む一本鎖オリゴヌクレオチドを指す。表面キャプチャープライマーは、テンプレート分子を、ハイブリダイゼーションを介して、支持体に固定化するために使用され得る。表面キャプチャープライマーは、流れ、洗浄、吸引、並びに温度、pH、塩、化学、及び／又は酵素条件における変化中のプライマー除去に抵抗する様式で、支持体に固定化され得る。典型的には、必ずしもそうではないが、表面キャプチャープライマーの5'末端は、支持体又は支持体上のコーティングに固定化され得る（又は支持体上のコーティング内に埋め込まれ得る）。代替として、表面キャプチャープライマーの内側部分又は3'末端は、支持体に固定化され得る。

20

【0151】

表面キャプチャープライマーの配列は、それらの長さに沿って、核酸テンプレート分子の少なくとも一部分と全体的に又は部分的に相補的であり得る。支持体は、同じ配列又は2つ以上の異なる配列を有する複数の固定化された表面キャプチャープライマーを含むことができる。表面キャプチャープライマーは、いずれかの長さ、例えば、4つ～50個のヌクレオチド、若しくは50～100個のヌクレオチド、若しくは100～150個のヌクレオチド、又はより長い長さであることができる。

30

【0152】

表面キャプチャープライマーは、ヌクレオチド重合（例えば、ポリメラーゼ触媒重合）のために伸長可能である糖3'OH部分を有する末端3'ヌクレオチドを有することができる。表面キャプチャープライマーは、ヌクレオチド重合を阻害する鎖終結部分に結合した3'糖位を有する末端3'ヌクレオチドを有することができる。3'鎖終結部分は、3'末端を伸長可能な3'OH末端に変換するために、デブロッキング剤を使用して除去（例えば、デブロック）され得る。鎖終結部分の例としては、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリル基、アリール基、ベンジル基、アジド基、アミン基、アミド基、ケト基、イソシアネート基、リン酸基、チオ基、ジスルフィド基、カーボネート基、尿素基、又はシリル基が挙げられる。アジド（azide）、アジド（azido）、及びアジドメチル基を含むアジドタイプ鎖終結部分。デブロッキング剤の例としては、鎖終結基であるアジド（azide）、アジド（azido）、及びアジドメチル基について、ホスフィン化合物、例えば、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCPEP）及びビススルホトリフェニルホスフィン（BS-TPP）が挙げられる。デブロッキング剤の例としては、鎖終結基であるアルキル、アルケニル、アルキニル、及びアリルについて、ピペリジン有する又は2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノン（DDQ）を有するテトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（0）（Pd(PPh₃)₄）が挙げられる。デブロッキング剤の例としては、鎖終結基であるアリール及びベンジルについて、Pd/Cが挙げられる。デブロッキング剤の例としては、鎖終結基である

40

50

アミン、アミド、ケト、イソシアネート、リン酸、チオ、及びジスルフィドについて、ホスフィン、ベータメルカプトエタノール、又はジチオトレイトール（DTT）が挙げられる。デブロッキング剤の例としては、カーボネート鎖終結基について、MeOH中の炭酸カリウム（ K_2CO_3 ）、ピリジン中のトリエチルアミン、又は酢酸中の $Zn(AcOH)$ が挙げられる。デブロッキング剤の例としては、鎖終結基である尿素及びシリルについて、テトラブチルアンモニウムフルオリド、ピリジン-HF、フッ化アンモニウムで、及びトリエチルアミントリヒドロフルオリドが挙げられる。

【0153】

「シーケンシング」という用語及び関連用語は、ヌクレオチド配列情報を核酸分子から得るための方法であって、典型的には、核酸分子内の少なくともいくつかのヌクレオチド（それらの核酸塩基構成要素を含む）の同一性を決定することによる、方法を指す。いくつかの実施形態において、核酸分子の所与の領域の配列情報は、シーケンシングされる領域内の各全てのヌクレオチドを特定することを含む。いくつかの実施形態において、シーケンシング情報は、領域ヌクレオチドのうちのいくつかのみを決定し、いくつかのヌクレオチドの同一性は、依然として、未決定であるか又は誤って決定されている。任意の好適なシーケンシング方法が、使用され得る。例示的な実施形態において、シーケンシングは、無標識又はイオンベースのシーケンシング方法を含むことができる。いくつかの実施形態において、シーケンシングは、標識された若しくは色素含有ヌクレオチド、又は蛍光ベースのヌクレオチドシーケンシング方法を含むことができる。いくつかの実施形態において、シーケンシングは、ポロニーベースのシーケンシング又はブリッジシーケンシング方法を含むことができる。いくつかの実施形態において、シーケンシングは、ポリメラーゼ及び多価分子を、少なくとも1つのアビディティ複合体を生成するために用い、個々の多価分子は、コアにテザーされた複数のヌクレオチド単位を含む。いくつかの実施形態において、シーケンシングは、ポリメラーゼ及び遊離ヌクレオチドを、合成によるシーケンシングを実行するために用いる。いくつかの実施形態において、シーケンシングは、リガーゼ酵素及び複数の配列特異的オリゴヌクレオチドを、ライゲーションによるシーケンシングを実行するために用いる。

【0154】

序文：二本鎖スプリントアダプター

本開示は、キットを含む、核酸二本鎖スプリントアダプターを含む組成物、及び二本鎖スプリントアダプターを用いる方法を提供する。

【0155】

二本鎖スプリントアダプター（200）は、1つ以上の新しいアダプター配列をライブラリ分子内に導入するために、ワンポット多酵素反応において使用され得る。二本鎖スプリントアダプター（200）は、第1のスプリント鎖（長スプリント鎖（300））及び第2のスプリント鎖（短スプリント鎖（400））を含み、第1及び第2のスプリント鎖は一緒にハイブリダイズして、二本鎖領域及び2つの隣接する一本鎖領域を有する二本鎖スプリントアダプター（200）を形成する（例えば、図1～7を参照されたい）。第2のスプリント鎖（400）は、導入される新しいアダプター配列（複数可）、例えば、新しいユニバーサル結合配列及び／又は新しいインデックス配列を保有する。第1のスプリント鎖は、第1の領域（320）、内部領域（310）、及び第2の領域（330）を含む。第1のスプリント鎖（310）の内部領域は、第2のスプリント鎖（400）にハイブリダイズしている。二本鎖スプリントアダプターの2つの隣接する一本鎖領域（例えば、（320）及び（330））は、目的の配列（110）を有する一本鎖直鎖ライブラリ分子（100）の末端におけるユニバーサルアダプター配列にハイブリダイズするように設計されている。例えば、第1のスプリント鎖（320）の第1の領域は、ライブラリ分子の一方の末端にハイブリダイズしており、第1のスプリント鎖（330）の第2の領域は、ライブラリ分子の他方の末端にハイブリダイズしており、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、2つのニックを含むライブラリースプリント複合体（500）を生成する（例えば、図1～7を参照されたい）。ニックは、酵素的にライゲーションされて

、共有結合性閉環状分子（600）を生成することができ、共有結合性閉環状分子（600）において、第2のスプリント鎖（400）は、ライブラリ分子に両方の末端において共有結合的に連結されており、それによって、新しいアダプター配列をライブラリ分子内に導入する。

【0156】

したがって、本明細書に記載される二本鎖スプリントアダプター及び方法は、いずれかの直鎖ライブラリ分子を共有結合性閉環状分子に変換するために使用され得、共有結合性閉環状分子は、異なるワークフロー、例えば、異なる超並列シーケンシングプラットフォームのために使用され得る。2つの隣接する一本鎖領域（例えば、（320）及び（330））及び第2のスプリント鎖（400）は、ユニバーサルアダプター配列のいずれかの組み合わせを含むように設計され得るため、二本鎖スプリントアダプターは、柔軟性を提供する。例えば、2つの隣接する一本鎖領域（例えば、（320）及び（330））は、支持体（例えば、フローセル）上に固定化された表面プライマーに結合するP5及びP7配列についてのユニバーサル結合配列（又はそれらの相補的配列）を含むことができ、P5及びP7配列は、典型的には、Illuminaシーケンシングプラットフォームのためのライブラリ分子を構築するために使用される。第2のスプリント鎖（400）は、Illuminaシーケンシングプラットフォームにおいて見出されない少なくとも1つの新しいユニバーサルアダプター配列（例えば、新しい表面プライマー配列）を含むことができ、それによって、非Illuminaシーケンシングプラットフォームにおける共有結合性閉環状分子（600）の使用を可能にする。

10

20

【0157】

本明細書に記載される方法はまた、ギャップ充填反応ではなくライゲーション反応を用いて、新しいアダプター配列を導入するという利点を提供する。ライゲーション反応は、わずか0.25 pmolのライブラリ分子での高効率環状化をもたらす。

【0158】

アニーリング及び多酵素反応は、いくつかの酵素反応（例えば、リン酸化及びライゲーション）を組み合わせることによって、かつアルコール沈殿又は有機物抽出を介することなく後続の酵素（例えば、エキソヌクレアーゼ）を添加することによって、単一の反応容器内（ワンポット）で行われ得るため、本明細書に記載される方法は、手動で実行されてもよく、又は自動化のために適合されてもよい。

30

【0159】

二本鎖スプリントアダプター

本開示は、（i）第1のスプリント鎖（長スプリント鎖（300））であって、（ii）第2のスプリント鎖（短スプリント鎖（400））にハイブリダイズした第1のスプリント鎖（長スプリント鎖（300））を含む、核酸二本鎖スプリントアダプター（200）を提供する（例えば、図1～7を参照されたい）。第1のスプリント鎖は、第1の領域（320）、内部領域（310）、及び第2の領域（330）を含む。第1のスプリント鎖（310）の内部領域は第2のスプリント鎖（400）にハイブリダイズして、二本鎖領域及び2つの隣接する一本鎖領域を有する二本鎖スプリントアダプター（200）を形成する。二本鎖スプリントアダプター（200）の2つの隣接する一本鎖領域は、直鎖核酸ライブラリ分子の末端配列にハイブリダイズするように設計されている。直鎖核酸ライブラリ分子の末端配列は、それぞれ、第1及び配列のユニバーサルアダプター配列を含む。いくつかの実施形態において、直鎖ライブラリ分子の第1及び第2のユニバーサルアダプター配列は、それぞれ、支持体上の固定化された第1及び第2のキャプチャープライマーについての結合配列を含む。

40

【0160】

第1のスプリント鎖（320）の第1の領域は、直鎖核酸ライブラリ分子の一方の末端における第1のユニバーサル結合配列にハイブリダイズすることができる第1のユニバーサルアダプター配列を含む（例えば、図1～7を参照されたい）。第1のスプリント鎖（330）の第2の領域は、直鎖核酸ライブラリ分子の他方の末端における第2のユニバー

50

サル結合配列にハイブリダイズすることができる第2のユニバーサルアダプター配列を含む（例えば、図1～7を参照されたい）。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（320）の第1の領域は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む第1のユニバーサルアダプター配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（330）の第2の領域は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む第2のユニバーサルアダプター配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）の5'末端は、リン酸化又は非リン酸化されている。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）の3'末端は、末端3'OH基又は末端3'ブロッキング基を含む。

10

20

30

40

50

【0161】

いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、第1及び第2のサブ領域を含む少なくとも2つのサブ領域を含む（例えば、図2及び3を参照されたい）。いくつかの実施形態において、第1のサブ領域は、第3又は第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第2のサブ領域は、第4又は第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第1及び第2のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）。いくつかの実施形態において、第1のサブ領域は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第2のサブ領域は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第1及び第2のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、任意選択の第3のサブ領域を更に含み、任意選択の第3のサブ領域は、5～20個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は2～10個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、NN）を含む（例えば、図3を参照されたい）。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、1つのサブ領域のみを含み、第2及び第3のサブ領域を欠き、第1のサブ領域は、5～20個の塩基を有する試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、試料インデックス配列は、マルチプレックスアッセイにおいて、異なる試料供給源から得られた目的の配列を区別するために使用され得る。いくつかの実施形態において、固有識別配列は、ランダム配列を含む。固有識別配列は、第1、第2、第3、及び第4の表面プライマーへの低減されたハイブリダイゼーションを示すように、又はそれらへのハイブリダイゼーションを示さないように設計され得る。5'から3'の向きでの第2のスプリント鎖（400）におけるサブ領域の例示的な配置は、5'－[第2のサブ領域]－[第1のサブ領域]－3'を含む。5'から3'の向きでの第2のスプリント鎖（400）におけるサブ領域の別の例示的な配置は、5'－[第3のサブ領域]－[第2のサブ領域]－[第1のサブ領域]－3'を含む（例えば、図2及び3を参照されたい）。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、20～100ヌクレオチド長、又は30～80ヌクレオチド長、又は40～60ヌクレオチド長であることができる。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）の5'末端は、リン酸化又は非リン酸化されている。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）の3'末端は、末端3'OH基又は末端3'ブロッキング基を含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、エキソヌクレアーゼ耐性を付与するために、1つ以上のホスホロチオエート結合を、5'及び／又は3'末端において含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、エンドヌクレアーゼ耐性を付与するために、1つ以上のホスホロチオエート結合を、内

部位置において含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)は、1つ以上の2'-O-メチルシトシン塩基を、5'及び/若しくは3'末端において、又は内部位置において含む。

【0162】

いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、第4及び第5のサブ領域を含む少なくとも2つのサブ領域を含む内部領域(310)を含む(例えば、図2及び3を参照されたい)。第4のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第1のサブ領域にハイブリダイズする。第5のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第2のサブ領域にハイブリダイズする。第4及び第5のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーハイブリダイズしない(又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す)。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖の内部領域(310)は、第2のスプリント鎖(400)の第3のサブ領域にハイブリダイズする任意選択の第6のサブ領域を更に含む(例えば、図3を参照されたい)。5'から3'の向きでの第1のスプリント鎖(300)のサブ領域の例示的な配置は、5'-[第4のサブ領域]-[第5のサブ領域]-3'を含む。5'から3'の向きでの第1のスプリント鎖(300)のサブ領域の別の例示的な配置は、5'-[第4のサブ領域]-[第5のサブ領域]-[第6のサブ領域]-3'を含む(例えば、図2及び3を参照されたい)。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、50~150ヌクレオチド長、又は60~100ヌクレオチド長、又は70~90ヌクレオチド長であることができる。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、エキソヌクレアーゼ耐性を付与するために、1つ以上のホスホロチオエート結合を、5'及び/又は3'末端において含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、エンドヌクレアーゼ耐性を付与するために、1つ以上のホスホロチオエート結合を、内部位置において含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、1つ以上の2'-O-メチルシトシン塩基を、5'及び/若しくは3'末端において、又は内部位置において含む。

【0163】

いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の第1のサブ領域は、配列5'-CATGTAATGCACGTA CTTTCAGGGT-3'(配列番号200)を含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の第2のサブ領域は、配列5'-AGTCGTCGCGAGCCCTCACCTGATC-3'(配列番号201)を含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)は、配列5'-AGTCGTCGCGAGCCCTCACCTGATCCATGTAATGCACGTA CTTTCAGGGT-3'(配列番号202)を含む第1及び第2のサブ領域を含む。図10を参照されたい。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の5'末端は、リン酸化又は非リン酸化され得る。

【0164】

いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列(又はその相補的配列)を含む第1のユニバーサルアダプター配列を含み、第1の領域(320)は、配列5'-TCGGTG GTCGCCGTATCA T T-3'(配列番号193)を含む。例えば、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、P5表面プライマー又はP5表面プライマーの相補的配列にハイブリダイズすることができる。例えば、P5表面プライマーは、配列5'-AATGATACGGCGACCA CCGA-3'(配列番号203;短P5)を含むか、又はP5表面プライマーは、配列5'-AATGATACGGCGACCA CCGAGATC-3'(配列番号194;長P5)を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列(又はその相補的配列)を含む第2のユニバーサルアダプター配列を含み、第2の領域(330)は、配列5'-CAAGCAGAA GACGGCATACGA-3'(配列番号195)を含む。例えば、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、P7表面プライマー又はP7表面プライマーの相補的配列にハイブリダイズすることができる。例え

ば、P7表面プライマーは、配列5' - C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A - 3' (配列番号195; 短P7)を含むか、又はP7表面プライマーは、配列5' - C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A G A T - 3' (配列番号196; 長P7)を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、配列5' - A C C C T G A A A G T A C G T G C A T T A C A T G - 3' (配列番号197)を有する第4のサブ領域を含む内部領域(310)を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、配列5' - G A T C A G G T G A G G C T G C G A C G A C T - 3' (配列番号198)を有する第5のサブ領域を含む内部領域(310)を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、第1の領域(320)、第4及び第5のサブ領域を有する内部領域(310)、並びに配列5' - T C G G T G G T C G C C G T A T C A T T A C C C T G A A A G T A C G T G C A T T A C A T G G A T C A G G T G A G G C T G C G A C G A C T C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A - 3' (配列番号199)を有する第2の領域(330)を含む。図10を参照されたい。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)の5'末端は、リン酸化又は非リン酸化され得る。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の第1のサブ領域は、第1のスプリント鎖(300)の第4のサブ領域にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の第2のサブ領域は、第1のスプリント鎖(300)の第5のサブ領域にハイブリダイズすることができる。

10

20

30

40

50

【0165】

ライブラリースプリント複合体

本開示は、(i)少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)に一方の側において隣接し、少なくとも第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)に他方の側において隣接する目的の配列(110)を含む一本鎖核酸ライブラリ分子(100)と、(ii)第1のスプリント鎖(長スプリント鎖(300))及び第2のスプリント鎖(短スプリント鎖(400))を含む二本鎖スプリントアダプター(200)であって、第1のスプリント鎖が、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含む、二本鎖スプリントアダプター(200)と、を含む、ライブラリースプリント複合体(500)であって、第1のスプリント鎖(310)の内部領域が第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズして、二本鎖領域及び2つの隣接する一本鎖領域を有する二本鎖スプリントアダプター(200)を形成する、ライブラリースプリント複合体(500)を提供する。ライブラリースプリント複合体(500)において、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、ライブラリ分子の少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)にハイブリダイズしており、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、ライブラリ分子の少なくとも第1の右ユニバーサル配列(130)にハイブリダイズしており、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体(500)を生成する(例えば、図1~7を参照されたい)。

【0166】

ライブラリースプリント複合体(500)において、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、直鎖核酸ライブラリ分子の一方の末端における第1のユニバーサル結合配列にハイブリダイズすることができる第1のユニバーサルアダプター配列を含む(例えば、図1~7を参照されたい)。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む第1のユニバーサルアダプター配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、50~150ヌクレオチド長、又は60~100ヌクレオチド長、又は70~90ヌクレオチド長であることができる。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、エキソヌクレアーゼ耐性を付与するために、1つ以上のホスホロチオ

エート結合を、5'及び／又は3'末端において含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、エンドヌクレアーゼ耐性を付与するために、1つ以上のホスホロチオエート結合を、内部位置において含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、1つ以上の2'-O-メチルシトシン塩基を、5'及び／若しくは3'末端において、又は内部位置において含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)の5'末端は、リン酸化されているか、又はリン酸基を欠く。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)の3'末端は、末端3'-OH基又は末端3'ブロック基を含む。

【0167】

第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、直鎖核酸ライブラリ分子の他方の末端における第2のユニバーサル結合配列にハイブリダイズすることができる第2のユニバーサルアダプター配列を含む(例えば、図1~7を参照されたい)。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む第2のユニバーサルアダプター配列を含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の5'末端は、リン酸化されているか、又はリン酸基を欠く。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の3'末端は、末端3'-OH基又は末端3'ブロック基を含む。

【0168】

ライブラリースプリント複合体(500)において、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、ライブラリ分子の少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)にハイブリダイズしており、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、ライブラリ分子の少なくとも第1の右ユニバーサル配列(130)にハイブリダイズしており、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体(500)を生成する。ライブラリースプリント複合体(500)は、ライブラリ分子の5'末端と第2のスプリント鎖の3'末端との間の第1のニックを含む。ライブラリースプリント複合体(500)はまた、第2のスプリント鎖の5'末端とライブラリ分子の3'末端との間の第2のニックを含む(例えば、図1~7を参照されたい)。いくつかの実施形態において、第1及び第2のニックは、酵素的にライゲーション可能である。

【0169】

ライブラリースプリント複合体(500)において、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、二本鎖核酸ライブラリ分子のセンス又はアンチセンス鎖にハイブリダイズすることができる。ライブラリースプリント複合体(500)において、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、二本鎖核酸ライブラリ分子のセンス又はアンチセンス鎖にハイブリダイズすることができる。二本鎖核酸ライブラリ分子は、変性して、一本鎖センス及びアンチセンスライブラリ鎖を生成することができる。

【0170】

ライブラリースプリント複合体(500)において、第2のスプリント鎖(400)は、目的の配列(110)にハイブリダイズせず、第1のスプリント鎖(310)の内部領域は、目的の配列(110)にハイブリダイズしない。

【0171】

ライブラリースプリント複合体(500)において、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、目的の配列(110)にハイブリダイズせず、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、目的の配列(110)にハイブリダイズしない。

【0172】

いくつかの実施形態において、ライブラリースプリント複合体(500)において、一本鎖ライブラリ分子(100)の5'末端は、リン酸化されているか、又はリン酸基を欠く。いくつかの実施形態において、一本鎖ライブラリ分子の3'末端は、末端3'-OH基又は

は末端 3' ブロッキング基を含む。

【0173】

いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子 (100) は、第 2 の左ユニバーサルアダプター配列 (140) を更にも含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子 (100) は、第 2 の右ユニバーサルアダプター配列 (150) を更にも含む。例示的なライブラリ分子 (100) は、図 4～7 に示される。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子 (100) は、追加の左及び／又は右ユニバーサルアダプター配列を更にも含むことができる。

【0174】

いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子 (100) は、第 1 の左インデックス配列 (160) を更にも含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子 (100) は、第 1 の右インデックス配列 (170) を更にも含む。いくつかの実施形態において、第 1 の左インデックス配列 (160) は、試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、第 1 の右インデックス配列 (170) は、別の試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子 (100) は、第 1 の左インデックス配列 (160) 及び／又は第 1 の右インデックス配列 (170) を含む。試料インデックス配列は、マルチプレックスアッセイにおいて、異なる試料供給源から得られた目的の配列を区別するために使用され得る。例示的なライブラリ分子 (100) は、図 4～7 に示される。例示的な第 1 の左インデックス配列 (160) 及び第 1 の右インデックス配列 (170) のリストは、図 23A～23F における表 1 で提供される。第 1 の左インデックス配列 (160) は、ランダム配列 (例えば、NNN) を含んでもよく、又はランダム配列を欠いてもよい。第 1 の右インデックス配列 (170) は、ランダム配列 (例えば、NNN) を含んでもよく、又はランダム配列を欠いてもよい。

【0175】

いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子 (100) は、本明細書に記載されるユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかの間に位置する少なくとも 1 つの接合部アダプター配列を更にも含む (例えば、図 7 を参照されたい)。例えば、第 1 の左接合部アダプター配列 (125) は、第 1 の左ユニバーサルアダプター配列 (120) と第 1 の左インデックス配列 (160) との間に位置することができる。第 2 の左接合部アダプター配列 (165) は、第 1 の左インデックス配列 (160) と第 2 の左ユニバーサルアダプター配列 (140) との間に位置することができる。第 3 の接合部アダプター配列 (145) は、第 2 の左ユニバーサルアダプター配列 (140) と目的の配列 (110) との間に位置することができる。第 1 の右接合部アダプター配列 (135) は、第 1 の右ユニバーサル配列 (130) と第 1 の右インデックス配列 (170) との間に位置することができる。第 2 の右接合部アダプター配列 (175) は、第 1 の右インデックス配列 (170) と第 2 の右ユニバーサルアダプター配列 (150) との間に位置することができる。第 3 の右接合部アダプター配列 (155) は、第 2 の右ユニバーサルアダプター配列 (150) と目的の配列 (110) との間に位置することができる。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子 (100) は、第 1 の左ユニバーサルアダプター配列 (120) に対して 5' (上流) に位置する少なくとも 1 つ～最大 10 個の付加されたユニバーサルアダプター配列を更にも含む (例えば、図 7 を参照されたい)。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子 (100) は、第 1 の右ユニバーサル配列 (130) に対して 3' (下流) に位置する少なくとも 1 つ～最大 10 個の付加されたユニバーサルアダプター配列を更にも含む (例えば、図 7 を参照されたい)。接合部アダプター配列のうちのいずれかは、いずれかの配列を含み、3～60 ヌクレオチド長及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列であることができる。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、ユニバーサル配列又は固有配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、増幅プライマー、シーケンシングプライマー、又はコンパクションオリゴヌクレオチドについての結合配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサル

アダプター配列のうちのいずれかは、固定化された表面プライマー（例えば、キャプチャープライマー）についての結合配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、試料インデックス配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、固有識別配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれか、特に、接合部アダプター配列（１４５）は、Tn5トランスポゾン末端配列 5' - A G A T G T G T A T A A G A G A C A G - 3'（配列番号 211）を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれか、特に、接合部アダプター配列（１５５）は、Tn5トランスポゾン末端配列 5' - C T G T C T C T T A T A C A C A T C T - 3'（配列番号 212）を含む。Tn5トランスポゾン末端配列は、ライブラリ分子（１００）内に、トランスポザーゼ媒介性反応を介して導入され得、トランスポザーゼ媒介性反応は、二本鎖入力DNA（例えば、ゲノムDNA）を、Tn5型トランスポザーゼ酵素、及びユニバーサルアダプター配列又は試料インデックス配列に結合したTnトランスポゾン末端配列（配列番号 211）を含む二本鎖オリゴヌクレオチドと、トランスポゾンシナプス複合体を形成するのに好適である条件下で接触させることを含む。二本鎖オリゴヌクレオチドにおいて、Tnトランスポゾン末端配列（配列番号 211）は、ユニバーサルアダプター配列又は試料インデックス配列に対して 5' 又は 3' に位置することができる。

【0176】

マルチプレックスワークフローは、１つ又は両方のインデックス配列（例えば、左及び／又は右インデックス配列）を使用して、試料インデックス付きライブラリを調製することによって可能にされる。第１の左インデックス配列（１６０）及び／又は第１の右インデックス配列（１７０）は、異なる供給源から単離された入力核酸を使用して、別個の試料インデックス付きライブラリを調製するために用いられ得る。試料インデックス付きライブラリは一緒に、プールされて、マルチプレックスライブラリ混合物を生成することができ、プールされたライブラリは、増幅及び／又はシーケンシングされ得る。挿入領域の配列は、第１の左インデックス配列（１６０）及び／又は第１の右インデックス配列（１７０）とともに、入力核酸の供給源を特定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、いずれかの数の試料インデックス付きライブラリと一緒に、プールされ得、例えば、２つ～１０個、又は１０～５０個、又は５０～１００個、又は１００～２００個、又は２００個超の試料インデックス付きライブラリが、プールされ得る。例示的な核酸供給源は、自然発生の供給源、組換え供給源、又は化学的に合成された供給源を含む。例示的な核酸供給源は、単一の細胞、複数の細胞、組織、生体液、環境試料、又は全生物を含む。例示的な核酸供給源は、新鮮な供給源、凍結した供給源、新鮮な凍結した供給源、又はアーカイブされた（例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋；FFPE）供給源を含む。核酸は、多くの他の供給源から単離され得ることが、当業者には認識されよう。核酸ライブラリ分子は、一本鎖又は二本鎖形態で調製され得る。

【0177】

いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子（１００）は、任意選択の第１の左固有識別配列（１８０）を更に含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子（１００）は、任意選択の第１の右固有識別配列（１９０）を更に含む。いくつかの実施形態において、第１の左固有識別配列（１８０）及び第１の右固有識別配列（１９０）は各々、固有アダプターが付加された個々の目的の配列（例えば、挿入配列）を、目的の分子の他の配列の集団において固有に特定するために使用される配列を含む。いくつかの実施形態において、第１の左固有識別配列（１８０）及び／又は第１の右固有識別配列（１９０）は、分子タグ付けのために使用され得る。例示的なライブラリ分子（１００）は、図４～７に示される。

【0178】

いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子（１００）は、第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）、第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）、第１の

左インデックス配列（１６０）、第１の左固有識別配列（１８０）、第１の右ユニバーサルアダプター配列（１３０）、第２の右ユニバーサルアダプター配列（１５０）、第１の右インデックス配列（１７０）、及び／又は第１の右固有識別配列（１９０）いずれか１つ又は２つ以上のいずれかの組み合わせを含む。例示的なライブラリ分子（１００）は、図４～７に示される。

【０１７９】

いくつかの実施形態において、第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）及び／又は第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第１若しくは第２の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子（１００）は、追加の左ユニバーサルアダプター配列を更に含むことができる。

10

【０１８０】

いくつかの実施形態において、第１の右ユニバーサルアダプター配列（１３０）及び／又は第２の右ユニバーサルアダプター配列（１５０）は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第１若しくは第２の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子（１００）は、追加の右ユニバーサルアダプター配列を更に含むことができる。

20

【０１８１】

いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）は、第１及び第２のサブ領域を含む少なくとも２つのサブ領域を含む（例えば、図２及び３を参照されたい）。第１のサブ領域は、第３の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第２のサブ領域は、第４の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第１及び第２のサブ領域は、第１及び第２の表面プライマーにハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）は、任意選択の第３のサブ領域を更に含み、任意選択の第３のサブ領域は、５～２０個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は２～１０個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、ＮＮ）を含む（例えば、図２及び３を参照されたい）。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）は、１つのサブ領域のみを含み、第２及び第３のサブ領域を欠き、第１のサブ領域は、５～２０個の塩基を有する試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、試料インデックス配列は、マルチプレックスアッセイにおいて、異なる試料供給源から得られた目的の配列を区別するために使用され得る。いくつかの実施形態において、固有識別配列は、ランダム配列を含む。固有識別配列は、第１、第２、第３、及び第４の表面プライマーへの低減されたハイブリダイゼーションを示すように、又はそれらへのハイブリダイゼーションを示さないように設計され得る。５'から３'の向きでの第２のスプリント鎖（４００）におけるサブ領域の例示的な配置は、５'－[第２のサブ領域]－[第１のサブ領域]－３'を含む。５'から３'の向きでの第２のスプリント鎖（４００）におけるサブ領域の別の例示的な配置は、５'－[第３のサブ領域]－[第２のサブ領域]－[第１のサブ領域]－３'を含む。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）は、２０～１００ヌクレオチド長、又は３０～８０ヌクレオチド長、又は４０～６０ヌクレオチド長であることができる。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）は、エキソヌクレアーゼ耐性を付与するために、１つ以上のホスホロチオエート結合を、５'及び／又は３'末端において含む。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）は、エンドヌクレアーゼ耐性を付与するために、１つ以上のホスホロチオエート結合を、内部位置において含む。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）は、１つ以上の２'－Ｏ－メチルシトシン塩基を、５'及び／若しくは

30

40

50

は3'末端において、又は内部位置において含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の5'末端は、リン酸化又は非リン酸化されている。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の3'末端は、末端3'OH基又は末端3'ブロック基を含む。

【0182】

いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、第4及び第5のサブ領域を含む少なくとも2つのサブ領域を含む内部領域(310)を含む(例えば、図2及び3を参照されたい)。第4のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第1のサブ領域にハイブリダイズする。第5のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第2のサブ領域にハイブリダイズする。第4及び第5のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーハイブリダイズしない(又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す)。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖の内部領域(310)は、第2のスプリント鎖(400)の第3のサブ領域にハイブリダイズする任意選択の第6のサブ領域を更に含む(例えば、図2及び3を参照されたい)。5'から3'の向きでの第1のスプリント鎖(300)のサブ領域の例示的な配置は、5' - [第4のサブ領域] - [第5のサブ領域] - 3'を含む。5'から3'の向きでの第1のスプリント鎖(300)のサブ領域の別の例示的な配置は、5' - [第4のサブ領域] - [第5のサブ領域] - [第6のサブ領域] - 3'を含む。

10

【0183】

いくつかの実施形態において、例示的なライブラリースプリント複合体(500)は、(a)一本鎖核酸ライブラリ分子(100)と、(b)第1のスプリント鎖(300)と、(c)第2のスプリント鎖(400)と、を含む。

20

【0184】

例示的なライブラリースプリント複合体(500)において、一本鎖核酸ライブラリ分子(100)は、5'から3'の順序で配置された構成要素である、(i)第1の表面プライマー(120)についての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、(ii)第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、(iii)目的の配列(110)、(iv)第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、及び(v)第2の表面プライマー(130)についての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)を含む。

30

【0185】

例示的なライブラリースプリント複合体(500)において、第1のスプリント鎖(300)は、5'から3'の順序で配置された構成要素である、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含む。

【0186】

例示的なライブラリースプリント複合体(500)において、第2のスプリント鎖(400)は、3'から5'の順序で配置されたサブ領域である、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第1のサブ領域、及び第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第2のサブ領域を含む。

40

【0187】

例示的なライブラリースプリント複合体(500)において、第1のスプリント鎖(300)の部分は、ライブラリ分子(100)の部分にハイブリダイズしており、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体(500)を生成し、これにより、第1のスプリント鎖の第1の領域(320)は、第1の表面プライマー(120)についての結合配列にハイブリダイズしており、第1のスプリント鎖の第3の領域(330)は、第2の表面プライマー(130)についての結合配列にハイブリダイズしている。追加として、第2のスプリント鎖(400)は、第1のスプリント鎖(300)の内部領域(310)にハイブリダイズしている。ライブラリースプリント複合体(500)は、ライブラリ分子の5'末端と第2のスプリント鎖の3'末端との間の第1の二

50

ック、及び第2のスプリント鎖の5'末端とライブラリ分子の3'末端との間の第2のニックを含み、第1及び第2のニックは、酵素的にライゲーション可能である。

【0188】

例示的なライブラリースプリント複合体(500)において、第2のスプリント鎖(400)は、目的の配列(110)にハイブリダイズせず、第1のスプリント鎖(310)の内部領域は、目的の配列(110)にハイブリダイズしない。

【0189】

例示的なライブラリースプリント複合体(500)において、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、目的の配列(110)にハイブリダイズせず、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、目的の配列(110)にハイブリダイズしない。

10

【0190】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体(500)のうちのいずれかは、複数のライブラリースプリント複合体(500)を含み、複数のライブラリースプリント複合体における個々のライブラリースプリント複合体の目的の配列(110)は、同じ目的の配列又は異なる目的の配列を含む。

【0191】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体(500)のうちのいずれかにおいて、第2のスプリント鎖(400)の第1のサブ領域は、配列5'-CATGTAATGCACGTA CTTTTCAGGGT-3' (配列番号200)を含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の第2のサブ領域は、配列5'-AGTCGTCGCGAGCCCTCACCTGATC-3' (配列番号201)を含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)は、配列5'-AGTCGTCGCGAGCCCTCACCTGATCCATGTAATGCACGTA CTTTTCAGGGT-3' (配列番号202)を含む第1及び第2のサブ領域を含む。図10を参照されたい。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の5'末端は、リン酸化又は非リン酸化され得る。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)は、1つのサブ領域のみを含み、第2及び第3のサブ領域を欠き、第1のサブ領域は、5~20個の塩基を有する試料インデックス配列を含む。

20

【0192】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体(500)のうちのいずれかにおいて、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列(又はその相補的配列)を含む第1のユニバーサルアダプター配列を含み、第1の領域(320)は、配列5'-TCGGTGGTCGCCGTATCATTT-3' (配列番号193)を含む。例えば、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、P5表面プライマー又はP5表面プライマーの相補的配列にハイブリダイズすることができる。例えば、P5表面プライマーは、配列5'-AATGATACGGCGACCAACCGA-3' (配列番号203;短P5)を含むか、又はP5表面プライマーは、配列5'-AATGATACGGCGACCAACCGAGATC-3' (配列番号194;長P5)を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列(又はその相補的配列)を含む第2のユニバーサルアダプター配列を含み、第2の領域(330)は、配列5'-CAAGCAGAAAGACGGGCATACGA-3' (配列番号195)を含む。例えば、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、P7表面プライマー又はP7表面プライマーの相補的配列にハイブリダイズすることができる。例えば、P7表面プライマーは、配列5'-CAAGCAGAAAGACGGGCATACGA-3' (配列番号195;短P7)を含むか、又はP7表面プライマーは、配列5'-CAAGCAGAAAGACGGGCATACGAGAT-3' (配列番号196;長P7)を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、配列5'-ACCTGAAAGTACGTGCATTACATG-3' (配列番号197)を有する第4のサブ領域を含む内部領域(310)を含む。いくつかの実施形態において、第1のス

30

40

50

プリント鎖（３００）は、配列 5' - G A T C A G G T G A G G C T G C G A C G A C T 3'（配列番号１９８）を有する第５のサブ領域を含む内部領域（３１０）を含む。いくつかの実施形態において、第１のスプリント鎖（３００）は、第１の領域（３２０）、第４及び第５のサブ領域を有する内部領域（３１０）、並びに配列 5' - T C G G T G G T C G C C G T A T C A T T A C C C T G A A A G T A C G T G C A T T A C A T G G A T C A G G T G A G G C T G C G A C G A C T C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A A - 3'（配列番号１９９）を有する第２の領域（３３０）を含む。図１０を参照されたい。いくつかの実施形態において、第１のスプリント鎖（３００）の５'末端は、リン酸化又は非リン酸化され得る。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）の第１のサブ領域は、第１のスプリント鎖（３００）の第４のサブ領域にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）の第２のサブ領域は、第１のスプリント鎖（３００）の第５のサブ領域にハイブリダイズすることができる。

10

【０１９３】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（５００）のうちのいずれかにおいて、第１のスプリント鎖（３２０）の第１の領域は、ライブラリ分子の第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）に結合することができる配列を含み、第１のスプリント鎖（３２０）の第１の領域は、配列 5' - A C C C T G A A A G T A C G T G C A T T A C A T G - 3'（配列番号１９７）又はその相補的配列を含む。

20

【０１９４】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（５００）のうちのいずれかにおいて、第１のスプリント鎖（３３０）の第２の領域は、ライブラリ分子の第１の右ユニバーサルアダプター配列（１３０）に結合することができる配列を含み、第１のスプリント鎖（３３０）の第２の領域は、配列 5' - G A T C A G G T G A G G C T G C G A C G A C T - 3'（配列番号１９８）又はその相補的配列を含む。

【０１９５】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（５００）のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、第１のスプリント鎖（３２０）の第１の領域に結合する左ユニバーサル結合配列（１２０）を含み、左ユニバーサル結合配列（１２０）は、配列 5' - A A T G A T A C G G C G A C C A C C G A - 3'（配列番号２０３）を含む。

30

【０１９６】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（５００）のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、第１のスプリント鎖（３２０）の第１の領域に結合する左ユニバーサル結合配列（１２０）を含み、左ユニバーサル結合配列（１２０）は、配列 5' - C A T G T A A T G C A C G T A C T T T C A G G G T - 3'（配列番号２００）又はその相補的配列を含む。

【０１９７】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（５００）のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列（１４０）を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列 5' - A C A C T C T T T C C C T A C A C G A C G C T C T T C C G A T C T - 3'（配列番号２０４）を含む。

40

【０１９８】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（５００）のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列（１４０）を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列 5' - T C G T C G G C A G C G T C A G A T G T G T A T A A G A G A C A G - 3'（配列番号２０７）を含む。

50

【0199】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（500）のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列（140）を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5' - C G T G C T G G A T T G G C T C A C C A G A C A C C T T C C G A C A T - 3'（配列番号208）を含む。

【0200】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（500）のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列（150）を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5' - A G A T C G G A A G A G C A C A C G T C T G A A C T C C A G T C A C - 3'（配列番号205）を含む。

10

【0201】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（500）のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列（150）を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5' - C T G T C T C T T A T A C A C A T C T C C G A G C C C A C G A G A C - 3'（配列番号209）を含む。

【0202】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（500）のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列（150）を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5' - A T G T C G G A A G G T G T G C A G G C T A C C G C T T G T C A A C T - 3'（配列番号210）を含む。

20

【0203】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（500）のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、第1のスプリント鎖（330）の第1の領域に結合する右ユニバーサル結合配列（130）を含み、右ユニバーサル結合配列（130）は、配列5' - T C G T A T G C C G T C T T C T G C T T G - 3'（配列番号206）を含む。

30

【0204】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（500）のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、第1のスプリント鎖（330）の第1の領域に結合する右ユニバーサル結合配列（130）を含み、右ユニバーサル結合配列（130）は、配列5' - A G T C G T C G C A G C C T C A C C T G A T C - 3'（配列番号201）又はその相補的配列を含む。

【0205】

本開示は、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（500）のうちのいずれかの複数を含む、反応混合物を提供する。いくつかの実施形態において、反応混合物は、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（500）のうちのいずれかの複数と、T4ポリヌクレオチドキナーゼと、を含む。いくつかの実施形態において、反応混合物は、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（500）のうちのいずれかの複数と、リガーゼ酵素と、を含む。いくつかの実施形態において、反応混合物は、本明細書に記載されるライブラリースプリント複合体（500）のうちのいずれかの複数と、T4ポリヌクレオチドキナーゼと、リガーゼ酵素と、を含む。いくつかの実施形態において、リガーゼ酵素は、T7 DNAリガーゼ、T3リガーゼ、T4リガーゼ、又はTaqリガーゼを含む。

40

【0206】

共有結合性閉環状分子

本開示は、目的の配列（110）と、少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列

50

(120)と、少なくとも第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)と、第2のスプリント鎖配列(400)と、を含む、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を提供する。例示的な共有結合性閉環状ライブラリ分子は、図8に示される。いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)は、第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)を更に含む。いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状分子(600)は、第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)を更に含む。いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状分子(600)は、追加の左及び／又は右ユニバーサルアダプター配列を更に含む。

【0207】

いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状分子(600)は、第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス配列(170)を更に含む。試料インデックス配列は、マルチプレックスアッセイにおいて、異なる試料供給源から得られた目的の配列を区別するために使用され得る。例示的な第1の左インデックス配列(160)及び第1の右インデックス配列(170)のリストは、図23A～23Fにおける表1で提供される。第1の左インデックス配列(160)は、ランダム配列(例えば、NNN)を含んでもよく、又はランダム配列を欠いてもよい。第1の右インデックス配列(170)は、ランダム配列(例えば、NNN)を含んでもよく、又はランダム配列を欠いてもよい。

10

【0208】

マルチプレックスワークフローは、1つ又は両方のインデックス配列(例えば、左及び／又は右インデックス配列)を使用して、試料インデックス付きライブラリを調製することによって可能にされる。第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス配列(170)は、異なる供給源から単離された入力核酸を使用して、別個の試料インデックス付きライブラリを調製するために用いられ得る。試料インデックス付きライブラリと一緒に、プールされて、マルチプレックスライブラリ混合物を生成することができ、プールされたライブラリは、増幅及び／又はシーケンシングされ得る。挿入領域の配列は、第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス配列(170)とともに、入力核酸の供給源を特定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、いずれかの数の試料インデックス付きライブラリと一緒に、プールされ得、例えば、2つ～10個、又は10～50個、又は50～100個、又は100～200個、又は200個超の試料インデックス付きライブラリが、プールされ得る。例示的な核酸供給源は、自然発生の供給源、組換え供給源、又は化学的に合成された供給源を含む。例示的な核酸供給源は、単一の細胞、複数の細胞、組織、生体液、環境試料、又は全生物を含む。例示的な核酸供給源は、新鮮な供給源、凍結した供給源、新鮮な凍結した供給源、又はアーカイブされた(例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋；FFPE)供給源を含む。核酸は、多くの他の供給源から単離され得ることが、当業者には認識されよう。核酸ライブラリ分子は、一本鎖又は二本鎖形態で調製され得る。

20

30

【0209】

いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状分子(600)は、任意選択の第1の左固有識別配列(180)及び／又は任意選択の第1の右固有識別配列(190)を更に含む。図8は、第1の左固有識別配列(180)を有する例示的な共有結合性閉環状分子(600)を示すが、直鎖ライブラリ分子(100)、例えば、図6に示されるものが、二本鎖スプリントアダプター(200)を使用して環状化して、第1の右固有識別配列(190)を有する共有結合性閉環状分子(600)を生成することができる。当業者には認識されよう。いくつかの実施形態において、第1の左固有識別配列(180)及び第1の右固有識別配列(190)は各々、固有アダプターが付加された個々の目的の配列(例えば、挿入配列)を、目的の分子の他の配列の集団において固有に特定するために使用される配列を含む。いくつかの実施形態において、第1の左固有識別配列(180)及び／又は第1の右固有識別配列(190)は、分子タグ付けのために使用され得る。

40

【0210】

50

いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状分子（600）は、第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）、第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）、第1の左インデックス配列（160）、第1の左固有識別配列（180）、第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）、第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）、第1の右インデックス配列（170）、及び／又は第1の右固有識別配列（190）いずれか1つ又は2つ以上のいずれかの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、第1の左インデックス配列（160）は、試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、第1の右インデックス配列（170）は、別の試料インデックス配列を含む。試料インデックス配列は、マルチプレックスアッセイにおいて、異なる試料供給源から得られた目的の配列を区別するために使用され得る。いくつかの実施形態において、第1の左固有識別配列（180）及び第1の右固有識別配列（190）は各々、固有アダプターが付加された個々の目的の配列（例えば、挿入配列）を、目的の分子の他の配列の集団において固有に特定するために使用される配列を含む。いくつかの実施形態において、第1の左固有識別配列（180）及び／又は第1の右固有識別配列（190）は、分子タグ付けのために使用され得る。

10

【0211】

いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状分子（600）において、第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）及び／又は第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状分子（600）は、追加の左ユニバーサルアダプター配列を更に含むことができる。

20

【0212】

いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状分子（600）において、第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）及び／又は第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状分子（600）は、追加の右ユニバーサルアダプター配列を更に含むことができる。

30

【0213】

いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状分子（600）は、本明細書に記載されるユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかの間に位置する少なくとも1つの接合部アダプター配列を更に含む（例えば、図7を参照されたい）。例えば、第1の左接合部アダプター配列（125）は、第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）と第1の左インデックス配列（160）との間に位置することができる。第2の左接合部アダプター配列（165）は、第1の左インデックス配列（160）と第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）との間に位置することができる。第3の接合部アダプター配列（145）は、第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）と目的の配列（110）との間に位置することができる。第1の右接合部アダプター配列（135）は、第1の右ユニバーサル配列（130）と第1の右インデックス配列（170）との間に位置することができる。第2の右接合部アダプター配列（175）は、第1の右インデックス配列（170）と第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）との間に位置することができる。第3の右接合部アダプター配列（155）は、第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）と目的の配列（110）との間に位置することができる。いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状分子（600）は、第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）に対して5'（上流）に位置する少なくとも1つ～最大10個の付加されたユニバー

40

50

サルアダプター配列を更に含む（例えば、図 7 を参照されたい）。いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状分子（600）は、第 1 の右ユニバーサル配列（130）に対して 3'（下流）に位置する少なくとも 1 つ～最大 10 個の付加されたユニバーサルアダプター配列を更に含む（例えば、図 7 を参照されたい）。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、いずれかの配列を含み、3～60ヌクレオチド長であることができる。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、ユニバーサル配列又は固有配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、増幅プライマー、シーケンシングプライマー、又はコンパクションオリゴヌクレオチドについての結合配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、固定化された表面プライマー（例えば、キャプチャープライマー）についての結合配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、試料インデックス配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、固有識別配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれか、特に、接合部アダプター配列（145）は、Tn5トランスポゾン末端配列 5'-AGATGTGTATAAGAGACAG-3'（配列番号 211）を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれか、特に、接合部アダプター配列（155）は、Tn5トランスポゾン末端配列 5'-CTGTCTCTTATACACATCT-3'（配列番号 212）を含む。Tn5トランスポゾン末端配列は、ライブラリ分子（100）内に、トランスポザーゼ媒介性反応を介して導入され得、トランスポザーゼ媒介性反応は、二本鎖入力 DNA（例えば、ゲノム DNA）を、Tn5 型トランスポザーゼ酵素、及びユニバーサルアダプター配列又は試料インデックス配列に結合した Tn トランスポゾン末端配列（配列番号 211）を含む二本鎖オリゴヌクレオチドと、トランスポゾンシナプス複合体を形成するのに好適である条件下で接触させることを含む。二本鎖オリゴヌクレオチドにおいて、Tn トランスポゾン末端配列（配列番号 211）は、ユニバーサルアダプター配列又は試料インデックス配列に対して 5'又は 3'に位置することができる。

10

20

【0214】

いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状分子の第 2 のスプリント鎖配列（400）は、第 1 及び第 2 のサブ領域を含む少なくとも 2 つのサブ領域を含む。第 1 のサブ領域は、第 3 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第 2 のサブ領域は、第 4 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第 1 及び第 2 のサブ領域は、第 1 及び第 2 の表面プライマーにハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）。いくつかの実施形態において、第 2 のスプリント鎖（400）は、任意選択の第 3 のサブ領域を更に含み、任意選択の第 3 のサブ領域は、5～20 個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は 2～10 個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、NN）を含む。いくつかの実施形態において、第 2 のスプリント鎖（400）は、1 つのサブ領域のみを含み、第 2 及び第 3 のサブ領域を欠き、第 1 のサブ領域は、5～20 個の塩基を有する試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、試料インデックス配列は、マルチプレックスアッセイにおいて、異なる試料供給源から得られた目的の配列を区別するために使用され得る。いくつかの実施形態において、固有識別配列は、ランダム配列を含む。固有識別配列は、第 1、第 2、第 3、及び第 4 の表面プライマーへの低減されたハイブリダイゼーションを示すように、又はそれらへのハイブリダイゼーションを示さないように設計され得る。5'から 3'の向きでの第 2 のスプリント鎖（400）におけるサブ領域の例示的な配置は、5'-[第 2 のサブ領域]-[第 1 のサブ領域]-3'を含む。5'から 3'の向きでの第 2 のスプリント鎖（400）におけるサブ領域の別の例示的な配置は、5'-[第 3 のサブ領域]-[第 2 のサブ領域]-[第 1 のサブ領域]-3'を含む。

30

40

【0215】

50

いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）の第2のスプリント鎖配列（400）は、第1のスプリント鎖（300）にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）は、第4及び第5のサブ領域を含む少なくとも2つのサブ領域を含む内部領域（310）を含む。第4のサブ領域は、第2のスプリント鎖（400）の第1のサブ領域にハイブリダイズする。第5のサブ領域は、第2のスプリント鎖（400）の第2のサブ領域にハイブリダイズする。第4及び第5のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖の内部領域（310）は、第2のスプリント鎖（400）の第3のサブ領域にハイブリダイズする任意選択の第6のサブ領域を更に含む。5'から3'の向きでの第1のスプリント鎖（300）のサブ領域の例示的な配置は、5' - [第4のサブ領域] - [第5のサブ領域] - 3'を含む。5'から3'の向きでの第1のスプリント鎖（300）のサブ領域の別の例示的な配置は、5' - [第4のサブ領域] - [第5のサブ領域] - [第6のサブ領域] - 3'を含む。

10

20

30

40

【0216】

いくつかの実施形態において、例示的な共有結合性閉環状分子（600）は、（i）第1の表面プライマー（120）についての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）と、（ii）第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）と、（iii）目的の配列（110）と、（iv）第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）と、（v）第2の表面プライマー（130）についての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）と、（vi）第2のスプリント鎖配列（400）と、を含み、共有結合性閉環状分子（600）は、任意選択で、第1のスプリント鎖（300）にハイブリダイズしている。

【0217】

例示的な共有結合性閉環状分子（600）において、第2のスプリント鎖領域（400）は、第1及び第2のサブ領域を含む少なくとも2つのサブ領域を含む。第1のサブ領域は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第2のサブ領域は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第1及び第2のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーにハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、任意選択の第3のサブ領域を更に含み、任意選択の第3のサブ領域は、5～20個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は2～10個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、NN）を含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、1つのサブ領域のみを含み、第2及び第3のサブ領域を欠き、第1のサブ領域は、5～20個の塩基を有する試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、試料インデックス配列は、マルチプレックスアッセイにおいて、異なる試料供給源から得られた目的の配列を区別するために使用され得る。いくつかの実施形態において、固有識別配列は、ランダム配列を含む。固有識別配列は、第1、第2、第3、及び第4の表面プライマーへの低減されたハイブリダイゼーションを示すように、又はそれらへのハイブリダイゼーションを示さないように設計され得る。5'から3'の向きでの第2のスプリント鎖（400）におけるサブ領域の例示的な配置は、5' - [第2のサブ領域] - [第1のサブ領域] - 3'を含む。5'から3'の向きでの第2のスプリント鎖（400）におけるサブ領域の別の例示的な配置は、5' - [第3のサブ領域] - [第2のサブ領域] - [第1のサブ領域] - 3'を含む。

【0218】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子（600）のうちのいずれかは、複数の共有結合性閉環状分子（600）を更に含み、複数の共有結合性閉環状分子（600）における個々の共有結合性閉環状分子（600）の目的の配列（110）は、同じ目的の配列又は異なる目的の配列を含む。

50

【0219】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子（600）のうちのいずれかにおいて、第2のスプリント鎖（400）の第1のサブ領域は、配列5' - C A T G T A A T G C A C G T A C T T T C A G G G T - 3'（配列番号200）を含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）の第2のサブ領域は、配列5' - A G T C G T C G C A G C C T C A C C T G A T C - 3'（配列番号201）を含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、配列5' - A G T C G T C G C A G C C T C A C C T G A T C C A T G T A A T G C A C G T A C T T T C A G G G T - 3'（配列番号202）を含む第1及び第2のサブ領域を含む。図10を参照されたい。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）の5'末端は、リン酸化又は非リン酸化され得る。

10

【0220】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子（600）のうちのいずれかにおいて、第1のスプリント鎖（320）の第1の領域は、第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列（又はその相補的配列）を含む第1のユニバーサルアダプター配列を含み、第1の領域（320）は、配列5' - T C G G T G G T C G C C G T A T C A T T - 3'（配列番号193）を含む。例えば、第1のスプリント鎖（320）の第1の領域は、P5表面プライマー又はP5表面プライマーの相補的配列にハイブリダイズすることができる。例えば、P5表面プライマーは、配列5' - A A T G A T A C G G C G A C C A C C G A - 3'（配列番号203；短P5）を含むか、又はP5表面プライマーは、配列5' - A A T G A T A C G G C G A C C A C C G A G A T C - 3'（配列番号194；長P5）を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（330）の第2の領域は、第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列（又はその相補的配列）を含む第2のユニバーサルアダプター配列を含み、第2の領域（330）は、配列5' - C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A - 3'（配列番号195）を含む。例えば、第1のスプリント鎖（330）の第2の領域は、P7表面プライマー又はP7表面プライマーの相補的配列にハイブリダイズすることができる。例えば、P7表面プライマーは、配列5' - C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A - 3'（配列番号195；短P7）を含むか、又はP7表面プライマーは、配列5' - C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A G A T - 3'（配列番号196；長P7）を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）は、配列5' - A C C C T G A A A G T A C G T G C A T T A C A T G - 3'（配列番号197）を有する第4のサブ領域を含む内部領域（310）を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）は、配列5' - G A T C A G G T G A G G C T G C G A C G A C T - 3'（配列番号198）を有する第5のサブ領域を含む内部領域（310）を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）は、第1の領域（320）、第4及び第5のサブ領域を有する内部領域（310）、並びに配列5' - T C G G T G G T C G C C G T A T C A T T A C C C T G A A A G T A C G T G C A T T A C A T G G A T C A G G T G A G G C T G C G A C G A C T C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A - 3'（配列番号199）を有する第2の領域（330）を含む。図10を参照されたい。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）の5'末端は、リン酸化又は非リン酸化され得る。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）の第1のサブ領域は、第1のスプリント鎖（300）の第4のサブ領域にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）の第2のサブ領域は、第1のスプリント鎖（300）の第5のサブ領域にハイブリダイズすることができる。

20

30

40

【0221】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子（600）のうちのいずれかにおいて、第1のスプリント鎖（320）の第1の領域は、ライブラリ分子の第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）に結合することができる配列を含

50

み、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、配列5'-ACCCCTGAAAGTACGTGCATTACATG-3'(配列番号197)又はその相補的配列を含む。

【0222】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子(600)のうちのいずれかにおいて、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、ライブラリ分子の第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)に結合することができる配列を含み、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、配列5'-GATCAGGTGAGGCTGCGACGACT-3'(配列番号198)又はその相補的配列を含む。

【0223】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子(600)のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、配列5'-AATGATACGGCGACCCACCGA-3'(配列番号203)を含む左ユニバーサル結合配列(120)を含む。

【0224】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子(600)のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域に結合する左ユニバーサル結合配列(120)を含み、左ユニバーサル結合配列(120)は、配列5'-CATGTAATGCACGTACTTTCAGGGT-3'(配列番号200)又はその相補的配列を含む。

【0225】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子(600)のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列(140)を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5'-ACACTCTTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'(配列番号204)を含む。

【0226】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子(600)のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列(140)を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5'-TCGTTCGGCAGCGTCAAGATGTGTATAAGAGACAG-3'(配列番号207)を含む。

【0227】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子(600)のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列(140)を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5'-CGTGTCTGGATTGCTCACCCAGACACCTTCCGACAT-3'(配列番号208)を含む。

【0228】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子(600)のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列(150)を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5'-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACCTCCAGTCAAC-3'(配列番号205)を含む。

【0229】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子(600)のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列(150)を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5'-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCAAGAGAC-3'(配列番号209)を含む。

【0230】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子（600）のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列（150）を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5' - A T G T C G G A A G G T G T G C A G G C T A C C G C T T G T C A A C T - 3'（配列番号210）を含む。

【0231】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子（600）のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、配列5' - T C G T A T G C C G T C T T C T G C T T G - 3'（配列番号206）を含む右ユニバーサル結合配列（130）を含む。

10

【0232】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子（600）のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、第1のスプリント鎖（330）の第1の領域に結合する右ユニバーサル結合配列（130）を含み、右ユニバーサル結合配列（130）は、配列5' - A G T C G T C G C A G C C T C A C C T G A T C - 3'（配列番号201）又はその相補的配列を含む。

【0233】

本開示は、本明細書に記載される共有結合性閉環状分子（600）のうちのいずれかの複数と、少なくとも1つのエキソヌクレアーゼ酵素と、を含む、反応混合物を提供する。いくつかの実施形態において、エキソヌクレアーゼ酵素は、エキソヌクレアーゼI、熱不安定性エキソヌクレアーゼI、及び／又はT7エキソヌクレアーゼのうちのいずれか1つ又は2つ以上のいずれかの組み合わせを含む。

20

【0234】

二本鎖スプリントアダプターを含むキット

本開示は、1つ以上の新しいアダプター配列を直鎖核酸ライブラリ分子内に導入する使用のためのキットを提供する。いくつかの実施形態において、キットは、少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）に一方の側において隣接し、少なくとも第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）に他方の側において隣接する目的の配列（110）を有する一本鎖核酸ライブラリ分子を環状化させるために使用され得る。いくつかの実施形態において、環状化ライブラリ分子は、共有結合性閉環状分子に変換され得、共有結合性閉環状分子は、ローリングサークル増幅（RCA）反応に供されて、核酸コンカテマーを生成することができる。コンカテマーは、超並列シーケンシングのために、支持体に固定化され得る。

30

【0235】

本開示は、核酸二本鎖スプリントアダプター（200）を含むキットであって、核酸二本鎖スプリントアダプター（200）が、（i）第1のスプリント鎖（長スプリント鎖（300））を含み、第1のスプリント鎖（長スプリント鎖（300））が（ii）第2のスプリント鎖（短スプリント鎖（400））にハイブリダイズしている、キットを提供する。第1のスプリント鎖は、第1の領域（320）、内部領域（310）、及び第2の領域（330）を含む。第1のスプリント鎖（310）の内部領域は第2のスプリント鎖（400）にハイブリダイズして、二本鎖領域及び2つの隣接する一本鎖領域を有する二本鎖スプリントアダプター（200）を形成する。第2のスプリント鎖（400）は、直鎖核酸ライブラリ分子導入され得る新しいアダプター配列を含む。例示的な二本鎖スプリントアダプターは、図1～7に示される。キットは、第2のスプリント鎖（400）にハイブリダイズした第1のスプリント鎖（300）を収容する容器を含むことができる。キットは、第1のスプリント鎖（300）を収容する第1の容器と、第2のスプリント鎖（400）を収容する第2の容器と、を含むことができる。

40

【0236】

いくつかの実施形態において、キットにおいて、第2のスプリント鎖（400）は、第1及び第2のサブ領域を含む少なくとも2つのサブ領域を含む（例えば、図2及び3を参

50

照されたい)。第1のサブ領域は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第2のサブ領域は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第1及び第2のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーにハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、任意選択の第3のサブ領域を更に含み、任意選択の第3のサブ領域は、5～20個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は2～10個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、NN）を含む（例えば、図3を参照されたい）。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、1つのサブ領域のみを含み、第2及び第3のサブ領域を欠き、第1のサブ領域は、5～20個の塩基を有する試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、試料インデックス配列は、マルチプレックスアッセイにおいて、異なる試料供給源から得られた目的の配列を区別するために使用され得る。いくつかの実施形態において、固有識別配列は、ランダム配列を含む。固有識別配列は、第1、第2、第3、及び第4の表面プライマーへの低減されたハイブリダイゼーションを示すように、又はそれらへのハイブリダイゼーションを示さないように設計され得る。5'から3'の向きでの第2のスプリント鎖（400）におけるサブ領域の例示的な配置は、5'－[第2のサブ領域]－[第1のサブ領域]－3'を含む。5'から3'の向きでの第2のスプリント鎖（400）におけるサブ領域の別の例示的な配置は、5'－[第3のサブ領域]－[第2のサブ領域]－[第1のサブ領域]－3'を含む。例示的な第1のスプリント鎖（300）及び第2のスプリント鎖（400）は、図2及び3に示される。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、20～100ヌクレオチド長、又は30～80ヌクレオチド長、又は40～60ヌクレオチド長であることができる。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、エキソヌクレアーゼ耐性を付与するために、1つ以上のホスホロチオエート結合を、5'及び／又は3'末端において含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、エンドヌクレアーゼ耐性を付与するために、1つ以上のホスホロチオエート結合を、内部位置において含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）は、1つ以上の2'-O-メチルシトシン塩基を、5'及び／若しくは3'末端において、又は内部位置において含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）の5'末端は、リン酸化又は非リン酸化されている。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）の3'末端は、末端3'OH基又は末端3'ブロック基を含む。

【0237】

いくつかの実施形態において、キットにおいて、第1のスプリント鎖（300）は、第1の領域（320）、第2の領域（330）、及び内部領域（310）を含む。第1の領域（320）は、直鎖核酸ライブラリ分子の一方の末端における第1のユニバーサル結合配列にハイブリダイズすることができる第1のユニバーサルアダプター配列を含む。第2の領域（330）は、直鎖核酸ライブラリ分子の他方の末端における第2のユニバーサル結合配列にハイブリダイズすることができる第2のユニバーサルアダプター配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（320）の第1の領域は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む第1のユニバーサルアダプター配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（330）の第2の領域は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む第2のユニバーサルアダプター配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）は、50～150ヌクレオチド長、又は60～100ヌクレオチド長、又は70～90ヌクレオチド長であるこ

とができる。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、エキソヌクレアーゼ耐性を付与するために、1つ以上のホスホロチオエート結合を、5'及び／又は3'末端において含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、エンドヌクレアーゼ耐性を付与するために、1つ以上のホスホロチオエート結合を、内部位置において含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、1つ以上の2'-O-メチルシトシン塩基を、5'及び／若しくは3'末端において、又は内部位置において含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)の5'末端は、リン酸化又は非リン酸化されている。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)の3'末端は、末端3'-OH基又は末端3'-ブロック基を含む。

10

【0238】

いくつかの実施形態において、キットにおいて、第1のスプリント鎖(300)は、第4及び第5のサブ領域を含む少なくとも2つのサブ領域を含む内部領域(310)を含む(例えば、図2及び3を参照されたい)。第4のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第1のサブ領域にハイブリダイズする。第5のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第2のサブ領域にハイブリダイズする。第4及び第5のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーハイブリダイズしない(又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す)。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖の内部領域(310)は、第2のスプリント鎖(400)の第3のサブ領域にハイブリダイズする任意選択の第6のサブ領域を更に含む。5'から3'の向きでの第1のスプリント鎖(300)のサブ領域の例示的な配置は、5'-[第4のサブ領域]-[第5のサブ領域]-3'を含む。5'から3'の向きでの第1のスプリント鎖(300)のサブ領域の別の例示的な配置は、5'-[第4のサブ領域]-[第5のサブ領域]-[第6のサブ領域]-3'を含む。例示的な第1のスプリント鎖(300)は、図2及び3に示される。

20

【0239】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるキットのうちのいずれかにおいて、第2のスプリント鎖(400)の第1のサブ領域は、配列5'-CATGTAATGCACGTACTTTCAGGGT-3'(配列番号200)を含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の第2のサブ領域は、配列5'-AGTCGTCGCAGCCTCACCCTGATC-3'(配列番号201)を含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)は、配列5'-AGTCGTCGCAGCCTCACCCTGATCCATGTAATGCACGTACTTTCAGGGT-3'(配列番号202)を含む第1及び第2のサブ領域を含む。図10を参照されたい。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の5'末端は、リン酸化又は非リン酸化され得る。

30

【0240】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるキットのうちのいずれかにおいて、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列(又はその相補的配列)を含む第1のユニバーサルアダプター配列を含み、第1の領域(320)は、配列5'-TCGGTG GTCGCCGTATCATTT-3'(配列番号193)を含む。例えば、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、P5表面プライマー又はP5表面プライマーの相補的配列にハイブリダイズすることができる。例えば、P5表面プライマーは、配列5'-AATGATACGGCGACCA CCGA-3'(配列番号203;短P5)を含むか、又はP5表面プライマーは、配列5'-AATGATACGGCGACCA CCGAGATC-3'(配列番号194;長P5)を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列(又はその相補的配列)を含む第2のユニバーサルアダプター配列を含み、第2の領域(330)は、配列5'-CAGCAGAA GACGGCATACGA-3'(配列番号195)を含む。例えば、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、P7表面プライマー又はP7表面プライマ

40

50

一の相補的配列にハイブリダイズすることができる。例えば、P7表面プライマーは、配列5'-CAAGCAGAAAGACGGGCATACGA-3'（配列番号195；短P7）を含むか、又はP7表面プライマーは、配列5'-CAAGCAGAAAGACGGGCATACGAGAT-3'（配列番号196；長P7）を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）は、配列5'-ACCCCTGAAAGTACGTGCATTACATG-3'（配列番号197）を有する第4のサブ領域を含む内部領域（310）を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）は、配列5'-GATCAGGTGAGGCTGCGACGACT-3'（配列番号198）を有する第5のサブ領域を含む内部領域（310）を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）は、第1の領域（320）、第4及び第5のサブ領域を有する内部領域（310）、並びに配列5'-TCGGTGGTGCGCCGTATCATTTACCCCTGAAAGTACGTGCATTACATGGATCAGGTGAGGCTGCGACGACTCAAGCAGAAAGACGGGCATACGA-3'（配列番号199）を有する第2の領域（330）を含む。図10を参照されたい。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖（300）の5'末端は、リン酸化又は非リン酸化され得る。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）の第1のサブ領域は、第1のスプリント鎖（300）の第4のサブ領域にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖（400）の第2のサブ領域は、第1のスプリント鎖（300）の第5のサブ領域にハイブリダイズすることができる。

10

20

30

40

50

【0241】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるキットのうちのいずれかにおいて、第1のスプリント鎖（320）の第1の領域は、ライブラリ分子の第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）に結合することができる配列を含み、第1のスプリント鎖（320）の第1の領域は、配列5'-ACCCCTGAAAGTACGTGCATTACATG-3'（配列番号197）又はその相補的配列を含む。

【0242】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるキットのうちのいずれかにおいて、第1のスプリント鎖（330）の第2の領域は、ライブラリ分子の第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）に結合することができる配列を含み、第1のスプリント鎖（330）の第2の領域は、配列5'-GATCAGGTGAGGCTGCGACGACT-3'（配列番号198）又はその相補的配列を含む。

【0243】

いくつかの実施形態において、キットは、複数のライブラリ分子の調製における使用のための、第1のスプリント鎖（320）の第1の領域に結合する左ユニバーサル結合配列（120）を有するアダプターを更に含み、ライブラリ分子は、配列5'-AATGATACGGCGACCAACCGA-3'（配列番号203）を含む。アダプターは、一本鎖アダプター（例えば、PCRプライマー）、二本鎖アダプター、バブルアダプター、又はY字形アダプターであることができる。

【0244】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるキットのうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、第1のスプリント鎖（320）の第1の領域に結合する左ユニバーサル結合配列（120）を含み、左ユニバーサル結合配列（120）は、配列5'-CATGTAATGCACGTACTTTTCAGGGT-3'（配列番号200）又はその相補的配列を含む。

【0245】

いくつかの実施形態において、キットは、複数のライブラリ分子の調製における使用のための、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列（140）を有するアダプターを更に含み、ライブラリ分子は、配列5'-ACACTCTTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'（配列番号204）を含む。いくつかの実施形態において、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列（14

0) を有するアダプターはまた、試料インデックス配列 (160) を含む。アダプターは、一本鎖アダプター (例えば、PCRプライマー)、二本鎖アダプター、バブルアダプター、又はY字形アダプターであることができる。

【0246】

いくつかの実施形態において、キットは、複数のライブラリ分子の調製における使用のための、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列 (140) を有するアダプターを更に含み、ライブラリ分子は、配列 5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG - 3' (配列番号207) を含む。いくつかの実施形態において、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列 (140) を有するアダプターはまた、試料インデックス配列 (160) を含む。アダプターは、一本鎖アダプター (例えば、PCRプライマー)、二本鎖アダプター、バブルアダプター、又はY字形アダプターであることができる。

10

【0247】

いくつかの実施形態において、キットは、複数のライブラリ分子の調製における使用のための、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列 (140) を有するアダプターを更に含み、ライブラリ分子は、配列 5' - CGTGTCTGGAATTGGCTCACCAAGACACCTTCCGACAT - 3' (配列番号208) を含む。いくつかの実施形態において、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列 (140) を有するアダプターはまた、試料インデックス配列 (160) を含む。アダプターは、一本鎖アダプター (例えば、PCRプライマー)、二本鎖アダプター、バブルアダプター、又はY字形アダプターであることができる。

20

【0248】

いくつかの実施形態において、キットは、複数のライブラリ分子の調製における使用のための、シーケンシングプライマーについての右ユニバーサル結合配列 (150) を有するアダプターを更に含み、ライブラリ分子は、配列 5' - AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC - 3' (配列番号205) を含む。いくつかの実施形態において、シーケンシングプライマーについての右ユニバーサル結合配列 (150) を有するアダプターはまた、試料インデックス配列 (170) を含む。アダプターは、一本鎖アダプター (例えば、PCRプライマー)、二本鎖アダプター、バブルアダプター、又はY字形アダプターであることができる。

30

【0249】

いくつかの実施形態において、キットは、複数のライブラリ分子の調製における使用のための、シーケンシングプライマーについての右ユニバーサル結合配列 (150) を有するアダプターを更に含み、ライブラリ分子は、配列 5' - CTGTCCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACTGAGAC - 3' (配列番号209) を含む。いくつかの実施形態において、シーケンシングプライマーについての右ユニバーサル結合配列 (150) を有するアダプターはまた、試料インデックス配列 (170) を含む。アダプターは、一本鎖アダプター (例えば、PCRプライマー)、二本鎖アダプター、バブルアダプター、又はY字形アダプターであることができる。

40

【0250】

いくつかの実施形態において、キットは、複数のライブラリ分子の調製における使用のための、シーケンシングプライマーについての右ユニバーサル結合配列 (150) を有するアダプターを更に含み、ライブラリ分子は、配列 5' - ATGTCGGGAAGGTGTGCAAGGCTACCGCTTGTCAACT - 3' (配列番号210) を含む。いくつかの実施形態において、シーケンシングプライマーについての右ユニバーサル結合配列 (150) を有するアダプターはまた、試料インデックス配列 (170) を含む。アダプターは、一本鎖アダプター (例えば、PCRプライマー)、二本鎖アダプター、バブルアダプター、又はY字形アダプターであることができる。

【0251】

いくつかの実施形態において、キットは、複数のライブラリ分子の調製における使用の

50

ための、第1のスプリント鎖(330)の第1の領域に結合する右ユニバーサル結合配列(130)を有するアダプターを更に含み、ライブラリ分子は、配列5'-TCGTATGCCGTCCTTCCTGCTTG-3'(配列番号206)を含む。アダプターは、一本鎖アダプター(例えば、PCRプライマー)、二本鎖アダプター、バブルアダプター、又はY字形アダプターであることができる。

【0252】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるキットのうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、第1のスプリント鎖(330)の第1の領域に結合する右ユニバーサル結合配列(130)を含み、右ユニバーサル結合配列(130)は、配列5'-AGTCGTCGCAGCCCTCACCTGATC-3'(配列番号201)又はその相補的配列を含む。

10

【0253】

いくつかの実施形態において、キットは、複数の第1の左インデックス(160)及び／又は複数の第1の右インデックス配列(170)を更に含む。いくつかの実施形態において、キットは、個々の第1の左インデックス(160)又は個々の第1の右インデックス(170)を保持する別個の容器を含むことができる。いくつかの実施形態において、キットは、個々の第1の左インデックス(160)及び個々の第1の右インデックス(170)の対を保持する別個の容器を含むことができる。いくつかの実施形態において、キットは、マルチウェルプレート(例えば、96ウェルプレート)内の第1の左インデックス(160)及び／又は複数の第1の右インデックス配列(170)を収容する。例示的な第1の左インデックス配列(160)及び第1の右インデックス配列(170)のリストは、図23A~23Fにおける表1で提供される。第1の左インデックス配列(160)は、ランダム配列(例えば、NNN)を含んでもよく、又はランダム配列を欠いてもよい。第1の右インデックス配列(170)は、ランダム若しくは配列(例えば、NNN)を含んでもよく、又はランダム配列を欠いてもよい。

20

【0254】

いくつかの実施形態において、キットは、核酸二本鎖スプリントアダプター(200)を含み、T4ポリヌクレオチドキナーゼを更に含む。いくつかの実施形態において、キットは、リガーゼ酵素を更に含み、リガーゼ酵素は、T7 DNAリガーゼ、T3リガーゼ、T4リガーゼ、又はTaqリガーゼを含む。いくつかの実施形態において、キットは、少なくとも1つのエンドヌクレアーゼを更に含み、少なくとも1つのエンドヌクレアーゼは、エキソヌクレアーゼI、熱不安定性エキソヌクレアーゼI、及び／又はT7エキソヌクレアーゼのうちのいずれか1つ又は2つ以上のいずれかの組み合わせを含む。

30

【0255】

いくつかの実施形態において、キットは、複数の二本鎖スプリントアダプター(200)と複数の核酸ライブラリ分子(100)とをハイブリダイズさせるための少なくとも1つの緩衝液を含む。いくつかの実施形態において、キットは、複数の酵素反応を単一の反応容器内で行うための1つの緩衝液を含み、複数の酵素反応は、(i)第1及び／若しくは第2のスプリント鎖(例えば、(300)及び／又は(400))の5'末端をリン酸化すること、(ii)ライブラリースプリント複合体(500)におけるニックをライゲーションすること、並びに／又は(iii)共有結合性閉環状分子(600)からの第1のスプリント鎖(300)のエキソヌクレアーゼ消化のいずれかの組み合わせを含む。代替として、キットは、2つ以上の別個の緩衝液を含み、第1の緩衝液は、リン酸化反応を行うために使用され得、第2の緩衝液は、ライゲーション反応を行うために使用され得、第3の緩衝液は、エキソヌクレアーゼ消化反応を行うために使用され得る。

40

【0256】

いくつかの実施形態において、キットは、本明細書に記載される二本鎖スプリントアダプター(200)のうちのいずれか、又は本明細書に記載される第1及び第2のスプリント鎖(300)及び(400)のうちのいずれかを収容する1つ以上の容器を含む。キットは、T4ポリヌクレオチドキナーゼ、少なくとも1つのリガーゼ、及び／又は少なくと

50

も1つのエキソヌクレアーゼを収容する1つ以上の容器を更に含むことができる。キットは、これらの構成要素のうちのいずれかを、いずれかの組み合わせで含むことができ、単一の容器内に収容されてもよく、又は別個の容器内に収容されてもよく、又はそれらのいずれかの組み合わせであってもよい。

【0257】

キットは、反応を行って、1つ以上の新しいアダプター配列を、直鎖核酸ライブラリ分子内に導入することについてのキットの使用説明書を含むことができる。

【0258】

複数のライブラリースプリント複合体を形成するための方法

本開示は、複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法であって、(a)複数の二本鎖スプリントアダプター(200)を提供することであって、複数の二本鎖スプリントアダプター(200)における個々の二本鎖スプリントアダプター(200)が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズした第1のスプリント鎖(300)を含み、二本鎖スプリントアダプターが、二本鎖領域及び2つの隣接する一本鎖領域を含み、第1のスプリント鎖が、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含み、第1のスプリント鎖(310)の内部領域が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズしている、提供することを含む、方法を提供する。例示的な二本鎖スプリントアダプター(200)は、図1~7に示される。

【0259】

複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法は、ステップ(b): 複数の二本鎖スプリントアダプターを、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)とハイブリダイズさせることであって、個々のライブラリ分子が、少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)に一方の側において隣接し、少なくとも第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)に他方の側において隣接する目的の配列(110)を含む、ハイブリダイズさせることを更に含む(例えば、図1~7)。ハイブリダイズさせることは、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域を、ライブラリ分子の少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で行われ、条件は、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域を、ライブラリ分子の少なくとも第1の右ユニバーサル配列(130)にハイブリダイズさせるのに好適であり、それによって、複数のライブラリ分子を環状化させて、複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成する。

【0260】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法において、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、直鎖核酸ライブラリ分子の一方の末端における第1のユニバーサル結合配列にハイブリダイズすることができる第1のユニバーサルアダプター配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む第1のユニバーサルアダプター配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)の5'末端は、リン酸化されているか、又はリン酸基を欠く。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)の3'末端は、末端3'OH基又は末端3'ブロック基を含む。

【0261】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法において、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、直鎖核酸ライブラリ分子の他方の末端における第2のユニバーサル結合配列にハイブリダイズすることができる第2のユニバーサルアダプター配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、フォワード若しくはリバースシーケンシング

プライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む第2のユニバーサルアダプター配列を含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の5'末端は、リン酸化されているか、又はリン酸基を欠く。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の3'末端は、末端3'OH基又は末端3'ブロック基を含む。

【0262】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法において、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、ライブラリ分子の少なくとも第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)にハイブリダイズしており、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、ライブラリ分子の少なくとも第1の右ユニバーサル配列(130)にハイブリダイズしており、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体(500)を生成する。ライブラリースプリント複合体(500)は、ライブラリ分子の5'末端と第2のスプリント鎖の3'末端との間の第1のニックを含む(例えば、図1~7)。ライブラリースプリント複合体(500)はまた、第2のスプリント鎖の5'末端とライブラリ分子の3'末端との間に第2のニックを含む(例えば、図1~7)。いくつかの実施形態において、第1及び第2のニックは、酵素的にライゲーション可能である。

【0263】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法において、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、二本鎖核酸ライブラリ分子のセンス又はアンチセンス鎖にハイブリダイズすることができる。ライブラリースプリント複合体(500)において、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、二本鎖核酸ライブラリ分子のセンス又はアンチセンス鎖にハイブリダイズすることができる。二本鎖核酸ライブラリ分子は、変性して、一本鎖センス及びアンチセンスライブラリ鎖を生成することができる。

【0264】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法において、第2のスプリント鎖(400)は、目的の配列(110)にハイブリダイズせず、第1のスプリント鎖(310)の内部領域は、目的の配列(110)にハイブリダイズしない。

【0265】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法において、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、目的の配列(110)にハイブリダイズせず、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、目的の配列(110)にハイブリダイズしない。

【0266】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法において、一本鎖ライブラリ分子(100)の5'末端は、リン酸化されているか、又はリン酸基を欠く。いくつかの実施形態において、一本鎖ライブラリ分子の3'末端は、末端3'OH基又は末端3'ブロック基を含む。

【0267】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法において、核酸ライブラリ分子(100)は、第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)を更に含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子(100)は、第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)を更に含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子(100)は、追加の左及び／又は右ユニバーサルアダプター配列を更に含むことができる。

【0268】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体（５００）を形成するための方法において、核酸ライブラリ分子（１００）は、第１の左インデックス配列（１６０）を更に含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子（１００）は、第１の右インデックス配列（１７０）を更に含む。いくつかの実施形態において、第１の左インデックス配列（１６０）は、試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、第１の右インデックス配列（１７０）は、別の試料インデックス配列を含む。試料インデックス配列は、マルチプレックスアッセイにおいて、異なる試料供給源から得られた目的の配列を区別するために使用され得る。例示的な第１の左インデックス配列（１６０）及び第１の右インデックス配列（１７０）のリストは、図２３Ａ～２３Ｆにおける表１で提供される。第１の左インデックス配列（１６０）は、ランダム配列（例えば、NNNN）を含んでもよく、又はランダム配列を欠いてもよい。第１の右インデックス配列（１７０）は、ランダム配列（例えば、NNNN）を含んでもよく、又はランダム配列を欠いてもよい。

10

20

30

40

50

【０２６９】

マルチプレックスワークフローは、１つ又は両方のインデックス配列（例えば、左及び／又は右インデックス配列）を使用して、試料インデックス付きライブラリを調製することによって可能にされる。第１の左インデックス配列（１６０）及び／又は第１の右インデックス配列（１７０）は、異なる供給源から単離された入力核酸を使用して、別個の試料インデックス付きライブラリを調製するために用いられ得る。試料インデックス付きライブラリと一緒に、プールされて、マルチプレックスライブラリ混合物を生成することができ、プールされたライブラリは、増幅及び／又はシーケンシングされ得る。挿入領域の配列は、第１の左インデックス配列（１６０）及び／又は第１の右インデックス配列（１７０）とともに、入力核酸の供給源を特定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、いずれかの数の試料インデックス付きライブラリと一緒に、プールされ得、例えば、２つ～１０個、又は１０～５０個、又は５０～１００個、又は１００～２００個、又は２００個超の試料インデックス付きライブラリが、プールされ得る。例示的な核酸供給源は、自然発生の供給源、組換え供給源、又は化学的に合成された供給源を含む。例示的な核酸供給源は、単一の細胞、複数の細胞、組織、生体液、環境試料、又は全生物を含む。例示的な核酸供給源は、新鮮な供給源、凍結した供給源、新鮮な凍結した供給源、又はアーカイブされた（例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋；FFPE）供給源を含む。核酸は、多くの他の供給源から単離され得ることが、当業者には認識されよう。核酸ライブラリ分子は、一本鎖又は二本鎖形態で調製され得る。

【０２７０】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体（５００）を形成するための方法において、核酸ライブラリ分子（１００）は、第１の左固有識別配列（１８０）を更に含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子（１００）は、第１の右固有識別配列（１９０）を更に含む。いくつかの実施形態において、第１の左固有識別配列（１８０）及び第１の右固有識別配列（１９０）は各々、固有アダプターが付加された個々の目的の配列（例えば、挿入配列）を、目的の分子の他の配列の集団において固有に特定するために使用される配列を含む。いくつかの実施形態において、第１の左固有識別配列（１８０）及び／又は第１の右固有識別配列（１９０）は、分子タグ付けのために使用され得る。

【０２７１】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体（５００）を形成するための方法において、核酸ライブラリ分子（１００）は、第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）、第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）、第１の左インデックス配列（１６０）、第１の左固有識別配列（１８０）、第１の右ユニバーサルアダプター配列（１３０）、第２の右ユニバーサルアダプター配列（１５０）、第１の右インデックス配列（１７０）、及び／又は第１の右固有識別配列（１９０）いずれか１つ又は２つ以上のいずれかの組み合わせを含む。

【0272】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体（500）を形成するための方法において、第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）及び／又は第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子（100）は、追加の左ユニバーサルアダプター配列を更に含むことができる。

【0273】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体（500）を形成するための方法において、第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）及び／又は第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子（100）は、追加の右ユニバーサルアダプター配列を更に含むことができる。

【0274】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体（500）を形成するための方法において、核酸ライブラリ分子（100）は、本明細書に記載されるユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかの間に位置する少なくとも1つの接合部アダプター配列を更に含む（例えば、図7を参照されたい）。例えば、第1の左接合部アダプター配列（125）は、第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）と第1の左インデックス配列（160）との間に位置することができる。第2の左接合部アダプター配列（165）は、第1の左インデックス配列（160）と第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）との間に位置することができる。第3の接合部アダプター配列（145）は、第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）と目的の配列（110）との間に位置することができる。第1の右接合部アダプター配列（135）は、第1の右ユニバーサル配列（130）と第1の右インデックス配列（170）との間に位置することができる。第2の右接合部アダプター配列（175）は、第1の右インデックス配列（170）と第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）との間に位置することができる。第3の右接合部アダプター配列（155）は、第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）と目的の配列（110）との間に位置することができる。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子（100）は、第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）に対して5'（上流）に位置する少なくとも1つ～最大10個の付加されたユニバーサルアダプター配列を更に含む（例えば、図7を参照されたい）。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリ分子（100）は、第1の右ユニバーサル配列（130）に対して3'（下流）に位置する少なくとも1つ～最大10個の付加されたユニバーサルアダプター配列を更に含む（例えば、図7を参照されたい）。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、いずれかの配列を含み、3～60ヌクレオチド長であることができる。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、ユニバーサル配列又は固有配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、増幅プライマー、シーケンシングプライマー、又はコンパクションオリゴヌクレオチドについての結合配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、固定化された表面プライマー（例えば、キャプチャープライマー）についての結合配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、試料インデックス配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれかは、固有識

10

20

30

40

50

別配列を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれか、特に、接合部アダプター配列（１４５）は、 $Tn5$ トランスポゾン末端配列 $5' - A G A T G T G T A T A A G A G A C A G - 3'$ （配列番号２１１）を含む。接合部アダプター配列及び／又は付加されたユニバーサルアダプター配列のうちのいずれか、特に、接合部アダプター配列（１５５）は、 $Tn5$ トランスポゾン末端配列 $5' - C T G T C T C T T A T A C A C A T C T - 3'$ （配列番号２１２）を含む。 $Tn5$ トランスポゾン末端配列は、ライブラリ分子（１００）内に、トランスポザーゼ媒介性反応を介して導入され得、トランスポザーゼ媒介性反応は、二本鎖入力DNA（例えば、ゲノムDNA）を、 $Tn5$ 型トランスポザーゼ酵素、及びユニバーサルアダプター配列又は試料インデックス配列に結合した Tn トランスポゾン末端配列（配列番号２１１）を含む二本鎖オリゴヌクレオチドと、トランスポゾンシナプス複合体を形成するのに好適である条件下で接触させることを含む。二本鎖オリゴヌクレオチドにおいて、 Tn トランスポゾン末端配列（配列番号２１１）は、ユニバーサルアダプター配列又は試料インデックス配列に対して $5'$ 又は $3'$ に位置することができる。

10

20

30

40

50

【０２７５】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体（５００）を形成するための方法において、第２のスプリント鎖（４００）は、第１及び第２のサブ領域を含む少なくとも２つのサブ領域を含む（例えば、図２及び３を参照されたい）。第１のサブ領域は、第３の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第２のサブ領域は、第４の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含み、第１及び第２のサブ領域は、第１及び第２の表面プライマーにハイブリダイズしない（又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す）。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）は、任意選択の第３のサブ領域を更に含み、任意選択の第３のサブ領域は、５～２０個の塩基を有する試料インデックス配列、及び／又は２～１０個若しくはそれ以上の塩基を有する固有識別配列（例えば、NN）を含む（例えば、図３を参照されたい）。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）は、１つのサブ領域のみを含み、第２及び第３のサブ領域を欠き、第１のサブ領域は、５～２０個の塩基を有する試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、試料インデックス配列は、マルチプレックスアッセイにおいて、異なる試料供給源から得られた目的の配列を区別するために使用され得る。いくつかの実施形態において、固有識別配列は、ランダム配列を含む。固有識別配列は、第１、第２、第３、及び第４の表面プライマーへの低減されたハイブリダイゼーションを示すように、又はそれらへのハイブリダイゼーションを示さないように設計され得る。 $5'$ から $3'$ の向きでの第２のスプリント鎖（４００）におけるサブ領域の例示的な配置は、 $5' -$ [第２のサブ領域] $-$ [第１のサブ領域] $- 3'$ を含む。 $5'$ から $3'$ の向きでの第２のスプリント鎖（４００）におけるサブ領域の別の例示的な配置は、 $5' -$ [第３のサブ領域] $-$ [第２のサブ領域] $-$ [第１のサブ領域] $- 3'$ を含む。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）は、２０～１００ヌクレオチド長、又は３０～８０ヌクレオチド長、又は４０～６０ヌクレオチド長であることができる。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）は、エキソヌクレアーゼ耐性を付与するために、１つ以上のホスホロチオエート結合を、 $5'$ 及び／又は $3'$ 末端において含む。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）は、エンドヌクレアーゼ耐性を付与するために、１つ以上のホスホロチオエート結合を、内部位置において含む。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）は、１つ以上の $2' - O -$ メチルシトシン塩基を、 $5'$ 及び／若しくは $3'$ 末端において、又は内部位置において含む。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）の $5'$ 末端は、リン酸化又は非リン酸化されている。いくつかの実施形態において、第２のスプリント鎖（４００）の $3'$ 末端は、末端 $3' OH$ 基又は末端 $3'$ ブロッキング基を含む。

【０２７６】

いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体（５００）を形成

するための方法において、第1のスプリント鎖(300)は、第4及び第5のサブ領域を含む少なくとも2つのサブ領域を含む内部領域(310)を含む(例えば、図2及び3を参照されたい)。第4のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第1のサブ領域にハイブリダイズする。第5のサブ領域は、第2のスプリント鎖(400)の第2のサブ領域にハイブリダイズする。第4及び第5のサブ領域は、第1及び第2の表面プライマーハイブリダイズしない(又はそれらへの非常に少ないハイブリダイゼーションを少なくとも示す)。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖の内部領域(310)は、第2のスプリント鎖(400)の第3のサブ領域にハイブリダイズする任意選択の第6のサブ領域を更に含む(例えば、図3を参照されたい)。5'から3'の向きでの第1のスプリント鎖(300)のサブ領域の例示的な配置は、5' - [第4のサブ領域] - [第5のサブ領域] - 3'を含む。5'から3'の向きでの第1のスプリント鎖(300)のサブ領域の別の例示的な配置は、5' - [第4のサブ領域] - [第5のサブ領域] - [第6のサブ領域] - 3'を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、50~150ヌクレオチド長、又は60~100ヌクレオチド長、又は70~90ヌクレオチド長であることができる。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、エキソヌクレアーゼ耐性を付与するために、1つ以上のホスホロチオエート結合を、5'及び/又は3'末端において含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、エンドヌクレアーゼ耐性を付与するために、1つ以上のホスホロチオエート結合を、内部位置において含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、1つ以上の2'-O-メチルシトシン塩基を、5'及び/若しくは3'末端において、又は内部位置において含む。

【0277】

本開示は、複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法であって、(a)複数の二本鎖スプリントアダプター(200)を提供することであって、個々の二本鎖スプリントアダプター(200)が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズした第1のスプリント鎖(300)を含み、第1のスプリント鎖(300)が、5'から3'の順序で配置された領域である、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含み、第1のスプリント鎖(310)の内部領域が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズしており、第2のスプリント鎖が、5'から3'の順序で配置された領域である、(i)第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第2のサブ領域、及び(ii)第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第1のサブ領域を含む、提供することを含む、方法を提供する。複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法は、ステップ(b)：複数の二本鎖スプリントアダプターを、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)とハイブリダイズさせることであって、個々のライブラリ分子が、5'から3'の順序で配置された領域である、(i)第1の表面プライマーについての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、(ii)第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、(iii)目的の配列(110)、(iv)第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、及び(v)第2の表面プライマー(130)についての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)を含み、ハイブリダイズさせることが、第1のスプリント鎖(300)を、ライブラリ分子(100)にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で行われ、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体(500)を生成し、これにより、第1のスプリント鎖の第1の領域(320)が、第1の表面プライマー(120)についての結合配列にハイブリダイズしており、第1のスプリント鎖の第3の領域(330)が、第2の表面プライマー(130)についての結合配列にハイブリダイズしており、ライブラリースプリント複合体(500)が、ライブラリ分子の5'末端と第2のスプリント鎖(300)の3'末端との間の第1のニックを含み、ライブラリースプリント複合体(500)が、第2のスプリント鎖(300)の5'末端とライブラリ分子(1

00)の3'末端との間の第2のニックを含み、第1及び第2のニックが、酵素的にライゲーション可能である、ハイブリダイズさせること、を更に含む。いくつかの実施形態において、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)は、第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス配列(170)を更に含む(例えば、図5を参照されたい)。例示的な第1の左インデックス配列(160)及び第1の右インデックス配列(170)のリストは、図23A～23Fにおける表1で提供される。いくつかの実施形態において、第1の左インデックス配列(160)は、短ランダム配列(例えば、NNN)を含むか、又はそれを欠く。いくつかの実施形態において、第1の右インデックス配列(170)は、短ランダム配列(例えば、NNN)を含むか、又はそれを欠く。いくつかの実施形態において、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)は、第1の左固有識別配列(180)及び／又は第1の右固有識別配列(190)を更に含む、第1の左固有識別配列(180)及び／又は第1の右固有識別配列(190)は各々、固有アダプターが付加された個々の目的の配列(例えば、挿入配列)を、目的の分子の他の配列の集団において固有に特定するために使用される配列を含む。いくつかの実施形態において、第1の左固有識別配列(180)及び／又は第1の右固有識別配列(190)は、分子タグ付けのために使用され得る。(例えば、図6を参照されたい)。

10

20

30

40

50

【0278】

マルチプレックスワークフローは、1つ又は両方のインデックス配列(例えば、左及び／又は右インデックス配列)を使用して、試料インデックス付きライブラリを調製することによって可能にされる。第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス配列(170)は、異なる供給源から単離された入力核酸を使用して、別個の試料インデックス付きライブラリを調製するために用いられ得る。試料インデックス付きライブラリと一緒に、プールされて、マルチプレックスライブラリ混合物を生成することができ、プールされたライブラリは、増幅及び／又はシーケンシングされ得る。挿入領域の配列は、第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス配列(170)とともに、入力核酸の供給源を特定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、いずれかの数の試料インデックス付きライブラリと一緒に、プールされ得、例えば、2つ～10個、又は10～50個、又は50～100個、又は100～200個、又は200個超の試料インデックス付きライブラリが、プールされ得る。例示的な核酸供給源は、自然発生の供給源、組換え供給源、又は化学的に合成された供給源を含む。例示的な核酸供給源は、単一の細胞、複数の細胞、組織、生体液、環境試料、又は全生物を含む。例示的な核酸供給源は、新鮮な供給源、凍結した供給源、新鮮な凍結した供給源、又はアーカイブされた(例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋；FFPE)供給源を含む。核酸は、多くの他の供給源から単離されることが、当業者には認識されよう。核酸ライブラリ分子は、一本鎖又は二本鎖形態で調製され得る。

【0279】

いくつかの実施形態において、複数の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)は、第1の左固有識別配列(180)及び／又は第1の右固有識別配列(190)を更に含む(例えば、図5及び6を参照されたい)。いくつかの実施形態において、第1の左固有識別配列(180)及び第1の右固有識別配列(190)は各々、固有アダプターが付加された個々の目的の配列(例えば、挿入配列)を、目的の分子の他の配列の集団において固有に特定するために使用される配列を含む。いくつかの実施形態において、第1の左固有識別配列(180)及び／又は第1の右固有識別配列(190)は、分子タグ付けのために使用され得る。

【0280】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法のうちのいずれかにおいて、第2のスプリント鎖(400)の第1のサブ領域は、配列5'-CATGTAATGCACGTACTTTTCAGGGT-3'(配列番号200)を含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の第2のサブ領域は、配列5'-AGTCGTCGCAGCCTTCAC

CTGATC-3' (配列番号201)を含む。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)は、配列5'-AGTCGTCGCGAGCCTTCACCTGATCCATGTAAATGCACGTACTTTTCAGGGT-3' (配列番号202)を含む第1及び第2のサブ領域を含む。図10を参照されたい。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の5'末端は、リン酸化又は非リン酸化され得る。

【0281】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法のうちいずれかにおいて、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列(又はその相補的配列)を含む第1のユニバーサルアダプター配列を含み、第1の領域(320)は、配列5'-TCGGTGGTCGCCGTATCATTT-3' (配列番号193)を含む。例えば、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、P5表面プライマー又はP5表面プライマーの相補的配列にハイブリダイズすることができる。例えば、P5表面プライマーは、配列5'-AATGATACGGCGAGCCACCGA-3' (配列番号203;短P5)を含むか、又はP5表面プライマーは、配列5'-AATGATACGGCGAGCCACCGAGATC-3' (配列番号194;長P5)を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列(又はその相補的配列)を含む第2のユニバーサルアダプター配列を含み、第2の領域(330)は、配列5'-CAAGCAGAAAGACGGCATACGA-3' (配列番号195)を含む。例えば、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、P7表面プライマー又はP7表面プライマーの相補的配列にハイブリダイズすることができる。例えば、P7表面プライマーは、配列5'-CAAGCAGAAAGACGGCATACGA-3' (配列番号195;短P7)を含むか、又はP7表面プライマーは、配列5'-CAAGCAGAAAGACGGCATACGAGAT-3' (配列番号196;長P7)を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、配列5'-ACCCCTGAAAGTACGTGCATTACATG-3' (配列番号197)を有する第4のサブ領域を含む内部領域(310)を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、配列5'-GATCAGGGTGAGGCTGCGACGACT'3' (配列番号198)を有する第5のサブ領域を含む内部領域(310)を含む。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)は、第1の領域(320)、第4及び第5のサブ領域を有する内部領域(310)、並びに配列5'-TCGGTGGTCGCCGTATCATTTACCCCTGAAAGTACGTGCATTACATGGATCAGGTGAGGCTGCGACGACTCAAGCAGAAAGACGGCATACGA-3' (配列番号199)を有する第2の領域(330)を含む。図10を参照されたい。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖(300)の5'末端は、リン酸化又は非リン酸化され得る。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の第1のサブ領域は、第1のスプリント鎖(300)の第4のサブ領域にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態において、第2のスプリント鎖(400)の第2のサブ領域は、第1のスプリント鎖(300)の第5のサブ領域にハイブリダイズすることができる。

【0282】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法のうちいずれかにおいて、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、ライブラリ分子の第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)に結合することができる配列を含み、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域は、配列5'-ACCCCTGAAAGTACGTGCATTACATG-3' (配列番号197)又はその相補的配列を含む。

【0283】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法のうちいずれかにおいて、第1のスプリント鎖(

330)の第2の領域は、ライブラリ分子の第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)に結合することができる配列を含み、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域は、配列5'-GATCAGGTGAGGCTGCGACGACT-3'(配列番号198)又はその相補的配列を含む。

【0284】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法のうちいずれかにおいて、ライブラリ分子は、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域に結合する左ユニバーサル結合配列(120)を含み、左ユニバーサル結合配列(120)は、配列5'-AATGATACGGCGACCAACCGA-3'(配列番号203)を含む。

10

【0285】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法のうちいずれかにおいて、ライブラリ分子は、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域に結合する左ユニバーサル結合配列(120)を含み、左ユニバーサル結合配列(120)は、配列5'-CATGTAAATGCACGTACTTTCAGGGT-3'(配列番号200)又はその相補的配列を含む。

【0286】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法のうちいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列(140)を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5'-ACACTCTTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'(配列番号204)を含む。

20

【0287】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法のうちいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列(140)を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'(配列番号207)を含む。

【0288】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法のうちいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列(140)を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5'-CGTGTCTGGAATTGGCTCACCCAGACACCTTCCGACAT-3'(配列番号208)を含む。

30

【0289】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法のうちいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列(150)を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5'-AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC-3'(配列番号205)を含む。

40

【0290】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法のうちいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列(150)を含み、左ユニバーサル結合配列は、配列5'-CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC-3'(配列番号209)を含む。

【0291】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体(500)を形成するための方法のうちいずれかにおいて、ライブラリ分子は、シーケンシングプライマーについての左ユニバーサル結合配列(150)を含み、左ユニバ

50

ーサル結合配列は、配列 5' - A T G T C G G A A G G T G T G C A G G C T A C C G C T T G T C A A C T - 3' (配列番号 210) を含む。

【0292】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体 (500) を形成するための方法のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、第 1 のスプリント鎖 (330) の第 1 の領域に結合する右ユニバーサル結合配列 (130) を含み、右ユニバーサル結合配列 (130) は、配列 5' - T C G T A T G C C G T C T T C T G C T T G - 3' (配列番号 206) を含む。

【0293】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体 (500) を形成するための方法のうちのいずれかにおいて、ライブラリ分子は、第 1 のスプリント鎖 (330) の第 1 の領域に結合する右ユニバーサル結合配列 (130) を含み、右ユニバーサル結合配列 (130) は、配列 5' - A G T C G T C G C A G C C T C A C C T G A T C - 3' (配列番号 201) 又はその相補的配列を含む。

【0294】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体 (500) を形成するための方法のうちのいずれかは、リン酸化反応、ライゲーション反応、及び／又はエキソヌクレアーゼ反応を含む少なくとも 1 つの酵素反応を更に含むことができる。酵素反応は、順次又は本質的に同時に行われ得る。酵素反応は、単一の反応容器内で行われ得る。代替として、第 1 の酵素反応が、第 1 の反応容器内で行われ得、次いで、第 2 の反応容器に移され得、第 2 の反応容器内で、第 2 の酵素反応が行われ、次いで、第 3 の反応容器に移され、第 3 の反応容器内で、第 3 の酵素反応が行われる。

【0295】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体 (500) を形成するための方法のうちのいずれかは、別個の及び順次のリン酸化及びライゲーション反応を行うことであって、別個の及び順次のリン酸化及びライゲーション反応が、別個の反応容器内で行われる、行うことを更に含む。いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体 (500) を形成するための方法は、ステップ (c1) : 第 1 の反応容器内で、複数の二本鎖スプリントアダプター (200) 及び複数の一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ酵素と、複数の二本鎖スプリントアダプター (200) 及び／又は複数の一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) の 5' 末端をリン酸化するのに好適である条件下で接触させることと、リン酸化反応を、第 2 の反応容器に移すことと、を更に含む。いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体 (500) を形成するための方法は、ステップ (d1) : 第 2 の反応容器内で、複数のリン酸化された二本鎖スプリントアダプター (200) 及び複数のリン酸化された一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) を、リガーゼと、第 1 及び第 2 のニックを酵素的にライゲーションするのに好適である条件下で接触させ、それによって、各々が第 1 のスプリント鎖 (300) にハイブリダイズした複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子 (600) を生成することを更に含む。いくつかの実施形態において、リガーゼ酵素は、T7 DNA リガーゼ、T3 リガーゼ、T4 リガーゼ、又は Taq リガーゼを含む。

【0296】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体 (500) を形成するための方法のうちのいずれかは、順次のリン酸化及びライゲーション反応を行うことであって、順次のリン酸化及びライゲーション反応が、同じ反応容器内で順次行われる、行うことを更に含む。いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体 (500) を形成するための方法は、ステップ (c2) : 第 1 の反応容器内で、複数の二本鎖スプリントアダプター (200) 及び複数の一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ酵素と、複数の二本鎖スプリントアダプター (200) 及び複数の一本鎖核酸ライブラリ分子 (100) の 5' 末端をリ

10

20

30

40

50

ン酸化するのに好適である条件下で接触させることを更に含む。いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体（５００）を形成するための方法は、ステップ（ｄ２）：同じ第１の反応容器内で、リン酸化された二本鎖スプリントアダプター（２００）及びリン酸化された一本鎖核酸ライブラリ分子（１００）を、リガーゼと、第１及び第２のニックを酵素的にライゲーションするのに好適である条件下で接触させ、それによって、各々が第１のスプリント鎖（３００）にハイブリダイズした複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を生成することを更に含む。いくつかの実施形態において、リガーゼ酵素は、Ｔ７ ＤＮＡリガーゼ、Ｔ３リガーゼ、Ｔ４リガーゼ、又はＴａｑリガーゼを含む。

【０２９７】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体（５００）を形成するための方法のうちのいずれかは、本質的に同時のリン酸化及びライゲーション反応を行うことであって、本質的に同時のリン酸化及びライゲーション反応と一緒に、同じ反応容器内で行われる、行うことを更に含む。いくつかの実施形態において、複数のライブラリースプリント複合体（５００）を形成するための方法は、ステップ（ｃ３）：第１の反応容器内で、複数の二本鎖スプリントアダプター（２００）及び複数の一本鎖核酸ライブラリ分子（１００）を、（ｉ）Ｔ４ポリヌクレオチドキナーゼ酵素及び（ｉｉ）リガーゼ酵素と、複数の二本鎖スプリントアダプター（２００）及び複数の一本鎖核酸ライブラリ分子（１００）の５'末端をリン酸化するのに好適である条件下で接触させることであって、条件が、第１及び第２のニックを酵素的にライゲーションするのに好適であり、それによって、各々が第１のスプリント鎖（３００）にハイブリダイズした複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を生成する、接触させることを更に含む。いくつかの実施形態において、リガーゼ酵素は、Ｔ７ ＤＮＡリガーゼ、Ｔ３リガーゼ、Ｔ４リガーゼ、又はＴａｑリガーゼを含む。

【０２９８】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される複数のライブラリースプリント複合体（５００）を形成するための方法のうちのいずれかは、複数の第１のスプリント鎖（３００）を、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）から酵素的に除去する任意選択のステップであって、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を、少なくとも１つのエキソヌクレアーゼ酵素と接触させて、複数の第１のスプリント鎖（３００）を除去し、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）を保持することを含む、任意選択のステップを更に含む。いくつかの実施形態において、エキソヌクレアーゼ反応は、リン酸化及び／若しくはライゲーション反応を行うために使用される同じ反応緩衝液中で、又は異なる反応緩衝液中で行われ得る。いくつかの実施形態において、リン酸化反応を、第１の反応容器内で行い（ｃ１）、ライゲーション反応を、第２の反応容器内で行った（ｄ１）後に、エキソヌクレアーゼ反応は、第３の反応容器内で行われ得る。いくつかの実施形態において、リン酸化反応を、第１の反応容器内で行い（ｃ２）、順次のライゲーション反応を、第１の反応容器内で行った（ｄ２）後に、エキソヌクレアーゼ反応は、第１の反応容器内で行われ得る。いくつかの実施形態において、本質的に同時のリン酸化及びライゲーション反応を、第１の反応容器内で行った（ｃ３）後に、エキソヌクレアーゼ反応は、第１の反応容器内で行われ得る。いくつかの実施形態において、少なくとも１つのエキソヌクレアーゼ酵素は、エキソヌクレアーゼⅠ、熱不安定性エキソヌクレアーゼⅠ、及び／又はＴ７エキソヌクレアーゼのうちの２つ以上のいずれかの組み合わせを含む。

【０２９９】

ローリングサークル増幅のための方法

本開示は、ローリングサークル増幅反応を共有結合性閉環状ライブラリ分子（６００）において行うための方法を提供する。ローリングサークル増幅反応は、リン酸化及びライゲーション反応後に、又はライゲーション反応後に行われ得る。いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応は、エキソヌクレアーゼ反応後に第１のスプリント鎖

(300) にもはやハイブリダイズしていない共有結合性閉環状ライブラリ分子(600) において行われ得る。いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応は、第1のスプリント鎖(300) にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子(600) において行われ得る。いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600) は、支持体上に分配され得、次いで、ローリングサークル増幅反応に供され得る。いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600) は、溶液中でのローリングサークル増幅反応に供され得、次いで、支持体上に分配され得る。いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応は、保持された第1のスプリント鎖(300) を、増幅プライマーとして用いてもよく、又は第1のスプリント鎖(300) は、(例えば、エキソヌクレアーゼ消化を介して) 除去され得、可溶性増幅プライマーで置き換えられてもよい。

10

【0300】

支持体上ローリングサークル増幅

いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応を、ハイブリダイズした第1のスプリント鎖(300) を欠く複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子において行うための方法において、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600) における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600) は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第2のスプリント鎖領域(400) を含み、方法は、(a) : 複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600) を、複数の第4の表面プライマーが支持体上に固定化された当該支持体上に、個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600) を、個々の固定化された第4の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600) を固定化することを含む。

20

【0301】

いくつかの実施形態において、支持体上に固定化された複数の第4の表面プライマーは、配列5' - G A T C A G G T G A G G C T G C G A C G A C T - 3' (配列番号198) を含む。個々の第4の表面プライマーは、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第2のスプリント鎖領域(400) を有する共有結合性閉環状ライブラリ分子(600) にハイブリダイズすることができ、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列は、配列5' - A G T C G T C G C A G C C T C A C C T G A T C - 3' (配列番号201) を含む第2のサブ領域を含む。

30

【0302】

いくつかの実施形態において、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600) は、不動態化された層を支持体上に産生するように1つ以上の化合物でコーティングされた支持体上に分配され得る(例えば、図11)。いくつかの実施形態において、不動態化された層は、多孔質又は半多孔質層を形成する。いくつかの実施形態において、表面プライマー、コンカテマーテンプレート分子、及び／又はポリメラーゼは、支持体への固定化のために、不動態化された層に付着することができる。いくつかの実施形態において、支持体は、支持体上での改善された核酸ハイブリダイゼーション及び増幅性能を可能にする低非特異的結合表面を含む。概して、支持体は、共有結合的に又は非共有結合的に付着した低結合化学修飾層、例えば、シラン層、ポリマーフィルムの1つ以上の層と、複数の核酸コンカテマー分子を支持体に固定化するために使用され得る1つ以上の共有結合的に又は非共有結合的に付着したオリゴヌクレオチドと、を含み得る。いくつかの実施形態において、支持体は、少なくとも支持体の一部分に、支持体上の化学基を介して共有結合的に結合した官能化ポリマーコーティング層と、官能化ポリマーコーティングにグラフトされたプライマーと、プライマー及び官能化ポリマーコーティング上の水溶性保護コーティングと、を含むことができる。いくつかの実施形態において、官能化ポリマーコーティングは、ポリ(N-(5-アジドアセトアミジルペンチル)アクリルアミド-コ-アクリルアミド(PAZAM)を含む。いくつかの実施形態において、支持体は、表面コーティングを含み、表面コーティングは、少なくとも1つの親水性ポリマーコーティング層、及び複数の

40

50

オリゴヌクレオチドの少なくとも1つの層を有する。親水性ポリマーコーティング層は、ポリエチレングリコール（PEG）を含むことができる。親水性ポリマーコーティング層は、少なくとも4つの分岐を有する分岐PEGを含むことができる。いくつかの実施形態において、低非特異的結合コーティングは、水接触角として測定され得るある程度の親水性を有し、水接触角は、45度以下である。いくつかの実施形態において、支持体に固定化された又は支持体上のコーティングに固定化された共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）の密度は、 1 mm^2 当たり約 $10^2 \sim 10^6$ 、又は 1 mm^2 当たり約 $10^6 \sim 10^9$ 、又は 1 mm^2 当たり約 $10^9 \sim 10^{12}$ である。いくつかの実施形態において、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）は、支持体に固定化されているか、支持体上のコーティングに、支持体（又は支持体上のコーティング）上の所定の部位において固定化されているか、又は支持体上のコーティングに、支持体（又は支持体上のコーティング）上のランダムな部位において固定化されている。

10

【0303】

いくつかの実施形態において、ステップ（a）の分配することは、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液の存在下で行われ得、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液は、（i）40以下である比誘電率を有し、4～9の極性指標を有する第1の極性非プロトン性溶媒、（ii）115以下である比誘電率を有し、ハイブリダイゼーション緩衝液配合物中に、二本鎖核酸を変性させるのに有効な量で存在する第2の極性非プロトン性溶媒、（iii）ハイブリダイゼーション緩衝液配合物のpHを約4～8の範囲に維持するpH緩衝液系、及び（iv）分子クラウディングを増強する又は容易にするのに十分な量でのクラウディング剤を含む。いくつかの実施形態において、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液は、（i）第1の極性非プロトン性溶媒が、アセトニトリルを、ハイブリダイゼーション緩衝液の25～50体積％で含むこと、（ii）第2の極性非プロトン性溶媒が、ホルムアミドを、ハイブリダイゼーション緩衝液の5～10体積％で含むこと、（iii）pH緩衝液系が、2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）を、5～6.5のpHで含むこと、及び（iv）クラウディング剤が、ポリエチレングリコール（PEG）を、ハイブリダイゼーション緩衝液の5～35体積％で含むことを含む。いくつかの実施形態において、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液は、ベタインを更に含む。

20

【0304】

いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応を行うための方法は、ステップ（b）：複数の固定化された共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の第4の表面プライマーを固定化された増幅プライマーとして使用し、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、第4の表面プライマーに固定化された複数の核酸コンカテマー分子を生成することを更に含む。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPのうちの2つ以上のいずれかの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、個々の固定化されたコンカテマーは、個々の第4の表面プライマーに共有結合的に連結されている。いくつかの実施形態において、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列も含む第2のスプリント鎖領域（400）を含み、これにより、ローリングサークル増幅反応は、第3及び第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列の複数のコピーを有するコンカテマー分子を生成する。いくつかの実施形態において、方法は、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を、複数の固定化された第3及び第4の表面プライマーを含む支持体上に分配すること、コンカテマー分子の少なくとも1つの第2のスプリント鎖領域（400）を、固定化された第3及び第4の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下で、ローリングサークル増幅反応を行って、コンカテマー分子を生成し、それによって、コンカテマー分子の少なくとも1つの部分を、支持体に押え付けることを含む。いくつかの実施形態において、固定化されたコ

30

40

50

ンカテマーは、シーケンシング反応に供され得る。

【0305】

いくつかの実施形態において、支持体上に固定化された複数の第4の表面プライマーは、配列5'-CATGTAATGCACGTACTTTTCAGGGT-3'（配列番号200）又はその相補的配列を含む。個々の第4の表面プライマーは、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列（又はその相補的配列）を含む第2のスプリント鎖領域（400）を有するコンカテマー分子の一部分にハイブリダイズすることができ、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列は、配列5'-CATGTAATGCACGTACTTTTCAGGGT-3'（配列番号200）又はその相補的配列を含む第1のサブ領域を含む。

10

【0306】

可溶性増幅プライマーを使用する溶液中ローリングサークル増幅

いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応を、ハイブリダイズした第1のスプリント鎖（300）を欠く複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子において行うための方法において、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）は、フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列の第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）又は第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）を含み、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第2のスプリント鎖領域（400）を含み、方法は、（a）複数の可溶性フォワード増幅プライマーを、フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第1又は第2の左ユニバーサルアダプター配列に溶液中でハイブリダイズさせることと、（b）第1のローリングサークル増幅反応を、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、溶液中でのローリングサークル増幅反応を、複数のフォワード増幅プライマー及び複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させることによって行い、それによって、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）に依然としてハイブリダイズした複数の核酸コンカテマー分子を生成することと、を含む。いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応を行うための方法は、ステップ（c）：複数のコンカテマー分子を、複数の第4の表面プライマーが支持体上に固定化された当該支持体上に、コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された第4の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、複数のコンカテマー分子を固定化することを更に含む。複数の固定化されたコンカテマー分子は、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）に依然としてハイブリダイズしている。いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応を行うための方法は、ステップ（d）：固定化された複数のコンカテマー分子を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上での第2のローリングサークル増幅反応を、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることを更に含む。いくつかの実施形態において、第1及び／又は第2のローリングサークル増幅反応は、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPのうちの2つ以上のいずれかの組み合わせを含む複数のヌクレオチドで行われ得る。いくつかの実施形態において、個々の固定化されたコンカテマーは、個々の第4の表面プライマーにハイブリダイズしている。いくつかの実施形態において、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列も含む第2のスプリント鎖領域（400）を含み、これにより、溶液中での第1のローリングサークル増幅反応は、第3及び第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列の複数のコピーを有するコンカテマー分子を生成する。いくつかの実施形態において、方法は、コンカテマー分子を、複数の固定化された第3及び第4の表面プライ

20

30

40

50

マーを含む支持体上に分配することと、コンカテマー分子を、コンカテマー分子の少なくとも1つの第2のスプリント鎖領域（400）を固定化された第3及び第4の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下でインキュベートし、それによって、コンカテマー分子の少なくとも1つの部分を、支持体に押え付けることと、を含む。いくつかの実施形態において、固定化されたコンカテマーは、シーケンシング反応に供され得る。

【0307】

いくつかの実施形態において、ステップ（c）の複数のコンカテマー分子は、複数の第4の表面プライマーが上に固定化された支持体上に分配され得、配列5' - G A T C A G G T G A G G C T G C G A C G A C T - 3'（配列番号198）を含む。個々の第4の表面プライマーは、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有するコンカテマー分子の一部分ハイブリダイズすることができ、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列は、配列5' - A G T C G T C G C A G C C T C A C C T G A T C - 3'（配列番号201又はその相補的配列）を含む。

10

【0308】

いくつかの実施形態において、ステップ（c）の複数のコンカテマー分子は、複数の第4の表面プライマーが上に固定化された支持体上に分配され得、配列5' - C A T G T A A T G C A C G T A C T T T C A G G G T - 3'（配列番号200又はその相補的配列）を含む。個々の第4の表面プライマーは、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列（又はその相補的配列）を有するコンカテマー分子の一部分にハイブリダイズすることができ、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列は、配列5' - C A T G T A A T G C A C G T A C T T T C A G G G T - 3'（配列番号200）又はその相補的配列を含む。

20

【0309】

いくつかの実施形態において、ステップ（c）の複数のコンカテマー分子は、不動態化された層を支持体上に産生するように1つ以上の化合物でコーティングされた支持体上に分配され得る（例えば、図11）。いくつかの実施形態において、不動態化された層は、多孔質又は半多孔質層を形成する。いくつかの実施形態において、表面プライマー、コンカテマーテンプレート分子、及び／又はポリメラーゼは、支持体への固定化のために、不動態化された層に付着することができる。いくつかの実施形態において、支持体は、支持体上での改善された核酸ハイブリダイゼーション及び増幅性能を可能にする低非特異的結合表面を含む。概して、支持体は、共有結合的に又は非共有結合的に付着した低結合化学修飾層、例えば、シラン層、ポリマーフィルムの1つ以上の層と、複数の核酸コンカテマー分子を支持体に固定化するために使用され得る1つ以上の共有結合的に又は非共有結合的に付着したオリゴヌクレオチドと、を含み得る。いくつかの実施形態において、支持体は、少なくとも支持体の一部分に、支持体上の化学基を介して共有結合的に結合した官能化ポリマーコーティング層と、官能化ポリマーコーティングにグラフトされたプライマーと、プライマー及び官能化ポリマーコーティング上の水溶性保護コーティングと、を含むことができる。いくつかの実施形態において、官能化ポリマーコーティングは、ポリ（N-（5-アジドアセトアミジルペンチル）アクリルアミド-コ-アクリルアミド（PAAZAM）を含む。いくつかの実施形態において、支持体は、表面コーティングを含み、表面コーティングは、少なくとも1つの親水性ポリマーコーティング層、及び複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも1つの層を有する。親水性ポリマーコーティング層は、ポリエチレングリコール（PEG）を含むことができる。親水性ポリマーコーティング層は、少なくとも4つの分岐を有する分岐PEGを含むことができる。いくつかの実施形態において、低非特異的結合コーティングは、水接触角として測定され得るある程度の親水性を有し、水接触角は、45度以下である。いくつかの実施形態において、支持体に固定化された又は支持体上のコーティングに固定化されたコンカテマー分子の密度は、 1 mm^2 当たり約 $10^2 \sim 10^6$ 、又は 1 mm^2 当たり約 $10^6 \sim 10^9$ 、又は 1 mm^2 当たり約 $10^9 \sim 10^{12}$ である。いくつかの実施形態において、複数のコンカテマー分子は、支持体に

30

40

50

固定化されているか、支持体上のコーティングに、支持体（又は支持体上のコーティング）上の所定の部位において固定化されているか、又は支持体上のコーティングに、支持体（又は支持体上のコーティング）上のランダムな部位において固定化されている。

【0310】

いくつかの実施形態において、ステップ（c）の分配することは、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液の存在下で行われ得、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液は、（i）40以下である比誘電率を有し、4～9の極性指標を有する第1の極性非プロトン性溶媒、（ii）115以下である比誘電率を有し、ハイブリダイゼーション緩衝液配合物中に、二本鎖核酸を変性させるのに有効な量で存在する第2の極性非プロトン性溶媒、（iii）ハイブリダイゼーション緩衝液配合物のpHを約4～8の範囲に維持するpH緩衝液系、及び（iv）分子クラウディングを増強する又は容易にするのに十分な量でのクラウディング剤を含む。いくつかの実施形態において、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液は、（i）第1の極性非プロトン性溶媒が、アセトニトリルを、ハイブリダイゼーション緩衝液の25～50体積%で含むこと、（ii）第2の極性非プロトン性溶媒が、ホルムアミドを、ハイブリダイゼーション緩衝液の5～10体積%で含むこと、（iii）pH緩衝液系が、2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）を、5～6.5のpHで含むこと、及び（iv）クラウディング剤が、ポリエチレングリコール（PEG）を、ハイブリダイゼーション緩衝液の5～35体積%で含むことを含む。いくつかの実施形態において、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液は、ベタインを更に含む。

【0311】

いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応を、ハイブリダイズした第1のスプリント鎖（300）を欠く複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子において行うための方法において、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）は、フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列の第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）又は第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）を含み、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第2のスプリント鎖領域（400）を含み、方法は、（a）複数の可溶性フォワード増幅プライマーを、フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第1又は第2の右ユニバーサルアダプター配列に溶液中でハイブリダイズさせることと、（b）第1のローリングサークル増幅反応を、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、溶液中でのローリングサークル増幅反応を、複数のフォワード増幅プライマー及び複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させることによって行い、それによって、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）に依然としてハイブリダイズした複数の核酸コンカテマー分子を生成することと、を含む。いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応を行うための方法は、ステップ（c）：複数のコンカテマー分子を、複数の第4の表面プライマーが支持体上に固定化された当該支持体上に、コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された第4の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、複数のコンカテマー分子を固定化することを更に含む。複数の固定化されたコンカテマー分子は、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）に依然としてハイブリダイズしている。いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応を行うための方法は、ステップ（d）：固定化された複数のコンカテマー分子を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上での第2のローリングサークル増幅反応を、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることを更に含む。いくつかの実施形態において、第1及び／又は第2のローリングサークル増幅反応は、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPのうちの2つ以上のいずれかの組み合わせを含

10

20

30

40

50

む複数のヌクレオチドで行われ得る。いくつかの実施形態において、個々の固定化されたコンカテマーは、個々の第4の表面プライマーにハイブリダイズしている。いくつかの実施形態において、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列も含む第2のスプリント鎖領域（400）を含み、これにより、溶液中での第1のローリングサークル増幅反応は、第3及び第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列の複数のコピーを有するコンカテマー分子を生成する。いくつかの実施形態において、方法は、コンカテマー分子を、複数の固定化された第3及び第4の表面プライマーを含む支持体上に分配することと、コンカテマー分子を、コンカテマー分子の少なくとも1つの第2のスプリント鎖領域（400）を固定化された第3及び第4の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下でインキュベートし、それによって、コンカテマー分子の少なくとも1つの部分を、支持体に押え付けることと、を含む。いくつかの実施形態において、固定化されたコンカテマーは、シーケンシング反応に供され得る。

10

20

30

40

50

【0312】

いくつかの実施形態において、ステップ（c）の複数のコンカテマー分子は、複数の第4の表面プライマーが上に固定化された支持体上に分配され得、配列5' - G A T C A G G T G A G G C T G C G A C G A C T - 3'（配列番号198）を含む。個々の第4の表面プライマーは、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有するコンカテマー分子の一部分ハイブリダイズすることができ、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列は、配列5' - A G T C G T C G C A G C C T C A C C T G A T C - 3'（配列番号201又はその相補的配列）を含む。

【0313】

いくつかの実施形態において、ステップ（c）の複数のコンカテマー分子は、複数の第3の表面プライマーが上に固定化された支持体上に分配され得、配列5' - C A T G T A A T G C A C G T A C T T T C A G G G T - 3'（配列番号200又はその相補的配列）を含む。個々の第3の表面プライマーは、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列（又はその相補的配列）を有するコンカテマー分子の一部分にハイブリダイズすることができ、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列は、配列5' - C A T G T A A T G C A C G T A C T T T C A G G G T - 3'（配列番号200）又はその相補的配列を含む。

【0314】

いくつかの実施形態において、ステップ（c）の複数のコンカテマー分子は、不動態化された層を支持体上に産生するように1つ以上の化合物でコーティングされた支持体上に分配され得る（例えば、図11）。いくつかの実施形態において、不動態化された層は、多孔質又は半多孔質層を形成する。いくつかの実施形態において、表面プライマー、コンカテマーテンプレート分子、及び／又はポリメラーゼは、支持体への固定化のために、不動態化された層に付着することができる。いくつかの実施形態において、支持体は、支持体上での改善された核酸ハイブリダイゼーション及び増幅性能を可能にする低非特異的結合表面を含む。概して、支持体は、共有結合的に又は非共有結合的に付着した低結合化学修飾層、例えば、シラン層、ポリマーフィルムの1つ以上の層と、複数の核酸コンカテマー分子を支持体に固定化するために使用され得る1つ以上の共有結合的に又は非共有結合的に付着したオリゴヌクレオチドと、を含み得る。いくつかの実施形態において、支持体は、少なくとも支持体の一部分に、支持体上の化学基を介して共有結合的に結合した官能化ポリマーコーティング層と、官能化ポリマーコーティングにグラフトされたプライマーと、プライマー及び官能化ポリマーコーティング上の水溶性保護コーティングと、を含むことができる。いくつかの実施形態において、官能化ポリマーコーティングは、ポリ（N-（5-アジドアセトアミジルペンチル）アクリルアミド-コ-アクリルアミド（PAZAM）を含む。いくつかの実施形態において、支持体は、表面コーティングを含み、表面コーティングは、少なくとも1つの親水性ポリマーコーティング層、及び複数のオリゴヌ

クレオチドの少なくとも1つの層を有する。親水性ポリマーコーティング層は、ポリエチレングリコール（PEG）を含むことができる。親水性ポリマーコーティング層は、少なくとも4つの分岐を有する分岐PEGを含むことができる。いくつかの実施形態において、低非特異的結合コーティングは、水接触角として測定され得るある程度の親水性を有し、水接触角は、45度以下である。いくつかの実施形態において、支持体に固定化された又は支持体上のコーティングに固定化されたコンカテマー分子の密度は、 1 mm^2 当たり約 $10^2 \sim 10^6$ 、又は 1 mm^2 当たり約 $10^6 \sim 10^9$ 、又は 1 mm^2 当たり約 $10^9 \sim 10^{12}$ である。いくつかの実施形態において、複数のコンカテマー分子は、支持体に固定化されているか、支持体上のコーティングに、支持体（又は支持体上のコーティング）上の所定の部位において固定化されているか、又は支持体上のコーティングに、支持体（又は支持体上のコーティング）上のランダムな部位において固定化されている。

10

【0315】

いくつかの実施形態において、ステップ（c）の分配することは、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液の存在下で行われ得、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液は、（i）40以下である比誘電率を有し、4～9の極性指標を有する第1の極性非プロトン性溶媒、（ii）115以下である比誘電率を有し、ハイブリダイゼーション緩衝液配合物中に、二本鎖核酸を変性させるのに有効な量で存在する第2の極性非プロトン性溶媒、（iii）ハイブリダイゼーション緩衝液配合物のpHを約4～8の範囲に維持するpH緩衝液系、及び（iv）分子クラウディングを増強する又は容易にするのに十分な量でのクラウディング剤を含む。いくつかの実施形態において、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液は、（i）第1の極性非プロトン性溶媒が、アセトニトリルを、ハイブリダイゼーション緩衝液の25～50体積％で含むこと、（ii）第2の極性非プロトン性溶媒が、ホルムアミドを、ハイブリダイゼーション緩衝液の5～10体積％で含むこと、（iii）pH緩衝液系が、2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）を、5～6.5のpHで含むこと、及び（iv）クラウディング剤が、ポリエチレングリコール（PEG）を、ハイブリダイゼーション緩衝液の5～35体積％で含むことを含む。いくつかの実施形態において、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液は、ベタインを更に含む。

20

【0316】

第1のスプリント鎖を使用する溶液中ローリングサークル増幅

いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応を、第1のスプリント鎖（300）にハイブリダイズした複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子において行うための方法において、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）は、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第2のスプリント鎖領域（400）を含み、方法は、（a）：第1のスプリント鎖（300）にハイブリダイズした複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、第1のローリングサークル増幅反応を、第1のスプリント鎖（300）を、増幅プライマーとして使用して行うのに好適である条件下で溶液中で接触させ、それによって、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）に依然としてハイブリダイズした複数のコンカテマー分子を生成することを含む。図10を参照されたい。

30

40

【0317】

いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応を行うための方法は、ステップ（b）：共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズした複数のコンカテマー分子を、複数の第4の表面プライマーが支持体上に固定化された当該支持体上に、コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された第4の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズした複数のコンカテマー分子を固定化することを更に含む。

【0318】

いくつかの実施形態において、ステップ（b）の複数のコンカテマー分子は、複数の第

50

4の表面プライマーが上に固定化された支持体上に分配され得、配列5'-GATCAGGTGAGGCTGCGACGACT-3' (配列番号198)を含む。個々の第4の表面プライマーは、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有するコンカテマー分子の一部分ハイブリダイズすることができ、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列は、配列5'-AGTCGTCTGCGAGCCCTCACCTGATC-3' (配列番号201又はその相補的配列)を含む。

【0319】

いくつかの実施形態において、ステップ(b)の複数のコンカテマー分子は、複数の第4の表面プライマーが上に固定化された支持体上に分配され得、配列5'-CATGTATAATGCACGTACTTTTCAGGGT-3' (配列番号200又はその相補的配列)を含む。個々の第4の表面プライマーは、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列 (又はその相補的配列) を有するコンカテマー分子の一部分にハイブリダイズすることができ、第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列は、配列5'-CATGTATAATGCACGTACTTTTCAGGGT-3' (配列番号200) 又はその相補的配列を含む。

【0320】

いくつかの実施形態において、ステップ(b)の複数のコンカテマー分子は、不動態化された層を支持体上に産生するように1つ以上の化合物でコーティングされた支持体上に分配され得る (例えば、図11)。いくつかの実施形態において、不動態化された層は、多孔質又は半多孔質層を形成する。いくつかの実施形態において、表面プライマー、コンカテマーテンプレート分子、及び/又はポリメラーゼは、支持体への固定化のために、不動態化された層に付着することができる。いくつかの実施形態において、支持体は、支持体上での改善された核酸ハイブリダイゼーション及び増幅性能を可能にする低非特異的結合表面を含む。概して、支持体は、共有結合的に又は非共有結合的に付着した低結合化学修飾層、例えば、シラン層、ポリマーフィルム、の1つ以上の層と、複数の核酸コンカテマー分子を支持体に固定化するために使用され得る1つ以上の共有結合的に又は非共有結合的に付着したオリゴヌクレオチドと、を含み得る。いくつかの実施形態において、支持体は、少なくとも支持体の一部分に、支持体上の化学基を介して共有結合的に結合した官能化ポリマーコーティング層と、官能化ポリマーコーティングにグラフトされたプライマーと、プライマー及び官能化ポリマーコーティング上の水溶性保護コーティングと、を含むことができる。いくつかの実施形態において、官能化ポリマーコーティングは、ポリ(N-(5-アジドアセトアミジルペンチル)アクリルアミド-コ-アクリルアミド(PAAZAM))を含む。いくつかの実施形態において、支持体は、表面コーティングを含み、表面コーティングは、少なくとも1つの親水性ポリマーコーティング層、及び複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも1つの層を有する。親水性ポリマーコーティング層は、ポリエチレングリコール(PEG)を含むことができる。親水性ポリマーコーティング層は、少なくとも4つの分岐を有する分岐PEGを含むことができる。いくつかの実施形態において、低非特異的結合コーティングは、水接触角として測定され得るある程度の親水性を有し、水接触角は、45度以下である。いくつかの実施形態において、支持体に固定化された又は支持体上のコーティングに固定化されたコンカテマー分子の密度は、 1 mm^2 当たり約 $10^2 \sim 10^6$ 、又は 1 mm^2 当たり約 $10^6 \sim 10^9$ 、又は 1 mm^2 当たり約 $10^9 \sim 10^{12}$ である。いくつかの実施形態において、複数のコンカテマー分子は、支持体に固定化されているか、支持体上のコーティングに、支持体 (又は支持体上のコーティング) 上の所定の部位において固定化されているか、又は支持体上のコーティングに、支持体 (又は支持体上のコーティング) 上のランダムな部位において固定化されている。

【0321】

いくつかの実施形態において、ステップ(b)の分配することは、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液の存在下で行われ得、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液は、(i) 40以下である比誘電率を有し、4~9の極性指標を有する第1の極性非プロトン性溶媒、(ii) 115以下である比誘電率を有し、ハイブリダイゼーション緩衝液配合物中に

、二本鎖核酸を変性させるのに有効な量で存在する第2の極性非プロトン性溶媒、(ii) ハイブリダイゼーション緩衝液配合物のpHを約4～8の範囲に維持するpH緩衝液系、及び(iv) 分子クラウディングを増強する又は容易にするのに十分な量でのクラウディング剤を含む。いくつかの実施形態において、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液は、(i) 第1の極性非プロトン性溶媒が、アセトニトリルを、ハイブリダイゼーション緩衝液の25～50体積%で含むこと、(ii) 第2の極性非プロトン性溶媒が、ホルムアミドを、ハイブリダイゼーション緩衝液の5～10体積%で含むこと、(iii) pH緩衝液系が、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)を、5～6.5のpHで含むこと、及び(v) クラウディング剤が、ポリエチレングリコール(PEG)を、ハイブリダイゼーション緩衝液の5～35体積%で含むことを含む。いくつかの実施形態において、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液は、ベタインを更に含む。

10

【0322】

いくつかの実施形態において、ローリングサークル増幅反応を行うための方法は、ステップ(c)：複数の固定化されたコンカテマー分子を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上での第2のローリングサークル増幅反応を、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることを更に含む。

【0323】

いくつかの実施形態において、第1及び／又は第2のローリングサークル増幅反応は、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPのうちの2つ以上のいずれかの組み合わせを含む複数のヌクレオチドで行われ得る。いくつかの実施形態において、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)における個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列も含む第2のスプリント鎖領域(400)を含み、これにより、溶液中での第1のローリングサークル増幅反応は、第3及び第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列の複数のコピーを有するコンカテマー分子を生成する。いくつかの実施形態において、方法は、コンカテマー分子を、複数の固定化された第3及び第4の表面プライマーを含む支持体上に分配することと、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を、コンカテマー分子の少なくとも1つの第2のスプリント鎖領域(400)を固定化された第3及び第4の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下でインキュベートし、それによって、コンカテマー分子の少なくとも1つの部分を、支持体に押え付けることと、を含む。いくつかの実施形態において、個々の固定化されたコンカテマーは、個々の第3及び第4の表面プライマーにハイブリダイズしている。いくつかの実施形態において、固定化されたコンカテマーは、シーケンシング反応に供され得る。

20

30

【0324】

シーケンシングのための方法

本開示は、本明細書に記載される固定化されたコンカテマー分子のうちのいずれかをシーケンシングするための方法を提供する。本明細書に記載されるローリングサークル増幅反応を行うための方法のうちのいずれかは、支持体に固定化された複数のコンカテマー分子を生成するために使用され得、固定化されたコンカテマーは、シーケンシング反応に供され得る。いくつかの実施形態において、シーケンシング反応は、検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を用いる。いくつかの実施形態において、シーケンシング反応は、2段階のシーケンシング反応を用い、2段階のシーケンシング反応は、検出可能に標識された多価分子に結合させることと、ヌクレオチド類似体を組み込むことと、を含む。コンカテマー分子及びテンプレート分子という用語は、互換的に使用される。

40

【0325】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるローリングサークル増幅反応(例えば、支持体上又は溶液中で行われるRCA)のうちのいずれかは、各々が目的の配列及び共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)内に存在するいずれかのアダプター配列の

50

タンデムリピート単位を含有する固定化されたコンカテマーを生成するために使用され得る。例えば、タンデムリピート単位は、(i) 第1の表面プライマーについての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、(ii) 第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、(iii) 目的の配列(110)、(iv) 第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、(v) 第2の表面プライマーについての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)、並びに(vii) 第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス配列(170)を含む(例えば、図5～7を参照されたい)。いくつかの実施形態において、タンデムリピート単位は、第1の左固有識別配列(180)及び／又は第1の右固有識別配列(190)を更に含む。

10

【0326】

固定化されたコンカテマーは、コンパクトな核酸ナノボールに自己崩壊することができ、RCA反応中に1つ以上のコンパクションオリゴヌクレオチドを含めることは、ナノボールのサイズ及び／又は形状を更にコンパクトにすることができる。所与のコンカテマーにおけるタンデムリピート単位の数における増加は、ポリメラーゼ触媒シーケンシング反応のための複数の開始部位として機能する複数のシーケンシングプライマー(例えば、ユニバーサル配列を有するシーケンシングプライマー)にハイブリダイズするためのコンカテマーに沿う部位の数を増加させる。シーケンシング反応が、検出可能に標識されたヌクレオチド及び／又は検出可能に標識された多価分子(例えば、ヌクレオチド単位を有するもの)を用いるときに、コンカテマーに沿う並列シーケンシング反応に関与するヌクレオチド又はヌクレオチド単位によって放出されるシグナルは、各コンカテマーについて増加したシグナル強度をもたらす。所与のコンカテマーの複数の部分が、同時にシーケンシングされ得る。更に、複数の結合複合体は、特定のコンカテマー分子に沿って形成することができ、各々の結合複合体は、多価分子に結合したシーケンシングポリメラーゼを含み、複数の結合複合体は、解離することなく依然として安定しており、増加した持続時間をもたらす、増加した持続時間は、シグナル強度を増加させ、イメージング時間を低減する。

20

【0327】

ヌクレオチド類似体を使用したシーケンシングのための方法

30

本開示は、シーケンシングのための方法であって、ステップ(a)：シーケンシングポリメラーゼを、(i) 核酸コンカテマー分子及び(ii) 核酸プライマーに接触させることであって、接触させることが、シーケンシングポリメラーゼを、核酸プライマーにハイブリダイズした核酸コンカテマー分子に結合させるのに好適である条件下で行われ、核酸プライマーにハイブリダイズした核酸コンカテマー分子が、核酸二重鎖を形成する、接触させることを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態において、シーケンシングポリメラーゼは、組換え変異型シーケンシングポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態において、プライマーは、3'伸長可能な末端を含む。

【0328】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ(b)：シーケンシングポリメラーゼを、複数のヌクレオチドと、少なくとも1つのヌクレオチドを、核酸二重鎖に結合したシーケンシングポリメラーゼに結合させるのに好適であり、ポリメラーゼ触媒ヌクレオチド組み込みに好適である条件下で接触させることを更に含む。いくつかの実施形態において、シーケンシングポリメラーゼは、複数のヌクレオチドと、マグネシウム及び／又はマンガンを含む少なくとも1つの触媒カチオンの存在下で接触する。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、鎖終結部分を糖2'又は3'位において有する少なくとも1つのヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、鎖終結部分を欠く少なくとも1つのヌクレオチドを含む。

40

【0329】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ(c)：少な

50

くとも1つのヌクレオチドを、伸長可能なプライマーの3'末端内に、少なくとも1つのヌクレオチドの組み込みに好適である条件下で組み込むことを更に含む。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼへのヌクレオチドの結合及びヌクレオチド組み込みに好適である条件は、同じであってもよく、又は異なってもよい。いくつかの実施形態において、ヌクレオチドの組み込みに好適である条件は、マグネシウム及び／又はマンガンを含む少なくとも1つの触媒カチオンを含めることを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのヌクレオチドは、シーケンシングポリメラーゼに結合し、伸長可能なプライマーの3'末端内に組み込まれる。いくつかの実施形態において、ステップ(c)におけるヌクレオチドをプライマーの3'末端内に組み込むことは、プライマー伸長反応を含む。

【0330】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ(d)：ステップ(c)の、少なくとも1つのヌクレオチドを伸長可能なプライマーの3'末端内に組み込むことを、少なくとも1回繰り返すことを更に含む。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、検出可能なレポーター部分で標識された複数のヌクレオチドを含む。検出可能なレポーター部分は、フルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、ヌクレオチド塩基に付着している。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、ヌクレオチド塩基にリンカーで付着しており、リンカーは、塩基から切断可能／除去可能である。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドにおけるヌクレオチドのうちの少なくとも1つは、検出可能なレポーター部分で標識されていない。いくつかの実施形態において、ヌクレオチドに付着した特定の検出可能なレポーター部分(例えば、フルオロフォア)は、ヌクレオチド塩基の検出及び特定を可能にするように、ヌクレオチド塩基(例えば、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、又はdUTP)に対応することができる。いくつかの実施形態において、方法は、ステップ(c)及び／又は(d)における少なくとも1つの組み込まれたヌクレオチドを検出することを更に含む。いくつかの実施形態において、方法は、ステップ(c)及び／又は(d)における少なくとも1つの組み込まれたヌクレオチドを特定することを更に含む。いくつかの実施形態において、核酸コンカテマー分子の配列は、シーケンシングポリメラーゼに結合したヌクレオチドを検出及び特定し、それによって、コンカテマー分子の配列を決定することによって決定され得る。いくつかの実施形態において、核酸コンカテマー分子の配列は、プライマーの3'末端内に組み込まれたヌクレオチドを検出及び特定し、それによって、コンカテマー分子の配列を決定することによって決定され得る。

【0331】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法において、核酸二重鎖に結合した複数のシーケンシングポリメラーゼは、少なくとも第1及び第2の複合型ポリメラーゼを有する複数の複合型ポリメラーゼを含み、(a)第1の複合型ポリメラーゼは、第1の核酸プライマーにハイブリダイズした第1の核酸テンプレート配列を含む第1の核酸二重鎖に結合した第1のシーケンシングポリメラーゼを含み、(b)第2の複合型ポリメラーゼは、第2の核酸プライマーにハイブリダイズした第2の核酸テンプレート配列を含む第2の核酸二重鎖に結合した第2のシーケンシングポリメラーゼを含み、(c)第1及び第2の核酸テンプレート配列は、同じ又は異なる配列を含み、(d)第1及び第2の核酸コンカテマーは、クローン的に増幅されており、(e)第1及び第2のプライマーは、伸長可能な3'末端又は伸長不可能な3'末端を含み、(f)複数の複合型ポリメラーゼは、支持体に固定化されている。いくつかの実施形態において、複数の複合型ポリメラーゼの密度は、 1 mm^2 当たり約 $10^2 \sim 10^{15}$ 個の、支持体に固定化された複合型ポリメラーゼである。

【0332】

核酸シーケンシングのための2段階方法

本開示は、核酸分子をシーケンシングするための2段階の方法を提供する。いくつかの実施形態において、第1の段階は、概して、多価分子を、複合型ポリメラーゼに結合させて、多価複合型ポリメラーゼを形成することと、多価複合型ポリメラーゼを検出すること

と、を含む。

【0333】

いくつかの実施形態において、第1の段階は、ステップ(a)複数の第1のシーケンシングポリメラーゼを、(i)複数の核酸コンカテマー分子及び(ii)複数の核酸プライマーに接触させることであって、接触させることが、複数の第1のシーケンシングポリメラーゼを、複数の核酸コンカテマー分子及び複数の核酸プライマーに結合させるのに好適である条件下で行われ、それによって、複数の第1の複合型ポリメラーゼを形成し、複数の第1の複合型ポリメラーゼが各々、核酸二重鎖に結合した第1のシーケンシングポリメラーゼを含み、核酸二重鎖が、核酸プライマーにハイブリダイズした核酸コンカテマー分子を含む、接触させることを含む。いくつかの実施形態において、第1のポリメラーゼは、組換え変異型シーケンシングポリメラーゼを含む。

10

【0334】

いくつかの実施形態において、コンカテマー分子をシーケンシングするための方法において、プライマーは、3'伸長可能な末端又は3'伸長不可能な末端を含む。いくつかの実施形態において、複数の核酸コンカテマー分子は、増幅されたテンプレート分子(例えば、クローン的に増幅されたテンプレート分子)を含む。いくつかの実施形態において、複数の核酸コンカテマー分子は、目的の標的配列の1つのコピーを含む。いくつかの実施形態において、複数の核酸分子は、目的の標的配列の2つ以上のタンデムコピー(例えば、コンカテマー)を含む。いくつかの実施形態において、複数の核酸コンカテマー分子における核酸コンカテマー分子は、同じ目的の標的配列又は異なる目的の標的配列を含む。いくつかの実施形態において、複数の核酸コンカテマー分子及び/又は複数の核酸プライマーは、溶液中にあるか、又は支持体に固定化されている。いくつかの実施形態において、複数の核酸コンカテマー分子及び/又は複数の核酸プライマーが、支持体に固定化されているときに、第1のシーケンシングポリメラーゼとの結合は、複数の固定化された第1の複合型ポリメラーゼを生成する。いくつかの実施形態において、複数の核酸コンカテマー分子及び/又は核酸プライマーは、支持体上の $10^2 \sim 10^{15}$ 個の異なる部位に固定化されている。いくつかの実施形態において、複数のコンカテマー分子及び核酸プライマーと複数の第1のシーケンシングポリメラーゼとの結合は、支持体上の $10^2 \sim 10^{15}$ 個の異なる部位に固定化された複数の第1の複合型ポリメラーゼを生成する。いくつかの実施形態において、支持体上の複数の固定化された第1の複合型ポリメラーゼは、支持体上の所定の又はランダムな部位に固定化されている。いくつかの実施形態において、複数の固定化された第1の複合型ポリメラーゼは、互いに流体連通しており、試薬の溶液(例えば、シーケンシングポリメラーゼを含む酵素、多価分子、ヌクレオチド、及び/又は二価カチオン)が支持体上に流れることを可能にし、これにより、支持体上の複数の固定化された複合型ポリメラーゼは、試薬の溶液と超並列様式で反応する。

20

30

【0335】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ(b):複数の第1の複合型ポリメラーゼを、複数の多価分子と接触させて、複数の多価複合型ポリメラーゼ(例えば、結合複合体)を形成することを更に含む。いくつかの実施形態において、複数の多価分子における個々の多価分子は、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、各ヌクレオチドアームは、ヌクレオチド(例えば、ヌクレオチド単位)に付着している(例えば、図12~16)。いくつかの実施形態において、ステップ(b)の接触させることは、多価分子の相補的ヌクレオチド単位を複数の第1の複合型ポリメラーゼのうちの少なくとも2つに結合させるのに好適である条件下で行われ、それによって、複数の多価複合型ポリメラーゼを形成する。いくつかの実施形態において、条件は、複数の多価複合型ポリメラーゼのプライマー内への相補的ヌクレオチド単位のポリメラーゼ触媒組み込みを阻害するのに好適である。いくつかの実施形態において、複数の多価分子は、複数のヌクレオチドアームを有する少なくとも1つの多価分子を含み(例えば、図15)、複数のヌクレオチドアームは各々、ヌクレオチド類似体(例えば、ヌクレオチド類似体単位)と付着しており、ヌクレオチド類似体は、鎖終結部分を糖2'及び/又は3'位におい

40

50

て含む。いくつかの実施形態において、複数の多価分子は、複数のヌクレオチドアームを含む少なくとも1つの多価分子を含み、複数のヌクレオチドアームは各々、鎖終結部分を欠くヌクレオチド単位と付着している。いくつかの実施形態において、複数の多価分子における多価分子のうちの少なくとも1つは、検出可能なレポーター部分で標識されている。コア、ヌクレオチドアーム、又は核酸塩基を含む、多価分子のいずれかの部分が、標識され得る。いくつかの実施形態において、検出可能なレポーター部分は、フルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、ステップ（b）の接触させることは、ストロンチウム、バリウム、及び／又はカルシウムを含む少なくとも1つの非触媒カチオンの存在下で行われる。

【0336】

10

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（c）：複数の多価複合型ポリメラーゼを検出することを更に含む。いくつかの実施形態において、検出することは、複合型ポリメラーゼに結合した多価分子を検出することであって、多価分子の相補的ヌクレオチド単位が、プライマーに結合しているが、相補的ヌクレオチド単位の組み込みが阻害される、検出することを含む。いくつかの実施形態において、多価分子は、検出を可能にするように、検出可能なレポーター部分で標識されている。いくつかの実施形態において、標識された多価分子は、多価分子のコア、リンカー、及び／又はヌクレオチド単位に付着したフルオロフォアを含む。

【0337】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（d）：複数の第1の複合型ポリメラーゼに結合した相補的ヌクレオチド単位の塩基を特定し、それによって、コンカテマー分子の配列を決定することを更に含む。いくつかの実施形態において、多価分子は、複数の第1の複合型ポリメラーゼに結合した相補的ヌクレオチド単位（例えば、ヌクレオチド塩基であるアデニン、グアニン、シトシン、チミン、又はウラシル）の特定を可能にするように、ヌクレオチドアームに付着した特定のヌクレオチド単位に対応する検出可能なレポーター部分で標識されている。

20

【0338】

いくつかの実施形態において、2段階のシーケンシング方法の第2の段階は、概して、ヌクレオチド組み込みを含む。いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（e）：複数の多価複合型ポリメラーゼを解離させ、複数の第1のシーケンシングポリメラーゼ及びそれらの結合した多価分子を除去し、複数の核酸二重鎖を保持することを更に含む。

30

【0339】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（f）：ステップ（e）の複数の保持された核酸二重鎖を、複数の第2のシーケンシングポリメラーゼと接触させることであって、接触させることが、複数の第2のシーケンシングポリメラーゼを、複数の保持された核酸二重鎖に結合させるのに好適である条件下で行われ、それによって、複数の第2の複合型ポリメラーゼを形成し、複数の第2の複合型ポリメラーゼが各々、核酸二重鎖に結合した第2のシーケンシングポリメラーゼを含む、接触させることを更に含む。いくつかの実施形態において、第2のシーケンシングポリメラーゼは、組換え変異型シーケンシングポリメラーゼを含む。

40

【0340】

いくつかの実施形態において、ステップ（a）の複数の第1のシーケンシングポリメラーゼは、ステップ（f）の複数の第2のシーケンシングポリメラーゼとしてアミノ酸配列と100%同一であるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、ステップ（a）の複数の第1のシーケンシングポリメラーゼは、ステップ（f）の複数の第2のシーケンシングポリメラーゼのアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を有する。

【0341】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（g）：複数の第2の複合型ポリメラーゼを、複数のヌクレオチドと接触させることであって、接触さ

50

せることが、複数のヌクレオチドからの相補的ヌクレオチドを、第2の複合型ポリメラーゼのうちの少なくとも2つに結合させるのに好適である条件下で行われ、それによって、複数のヌクレオチド複合型ポリメラーゼを形成する、接触させることを更に含む。いくつかの実施形態において、ステップ(g)の接触させることは、ヌクレオチド複合型ポリメラーゼのプライマー内への結合した相補的ヌクレオチドのポリメラーゼ触媒組み込みを促進するのに好適である条件下で行われ、それによって、複数のヌクレオチド複合型ポリメラーゼを形成する。いくつかの実施形態において、ステップ(g)におけるヌクレオチドをプライマーの3'末端内に組み込むことは、プライマー伸長反応を含む。いくつかの実施形態において、ステップ(g)の接触させることは、マグネシウム及び／又はマンガンを含む少なくとも1つの触媒カチオンの存在下で行われる。いくつかの実施形態において、ステップ(g)の接触させることは、マグネシウム及び／又はマンガンの存在下で行われる。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、天然ヌクレオチド(例えば、非類似体ヌクレオチド)又はヌクレオチド類似体を含む。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、除去可能であるか又は除去可能でない2'及び／又は3'鎖終結部分を含む。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、非標識の又は検出可能なレポーター部分で標識された複数のヌクレオチドを含む。検出可能なレポーター部分は、フルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、ヌクレオチド塩基に付着している。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、ヌクレオチド塩基にリンカーで付着しており、リンカーは、塩基から切断可能／除去可能であるか、又は塩基から除去可能でない。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドにおけるヌクレオチドのうちの少なくとも1つは、検出可能なレポーター部分で標識されていない。いくつかの実施形態において、ヌクレオチドに付着した特定の検出可能なレポーター部分(例えば、フルオロフォア)は、ヌクレオチド塩基の検出及び特定を可能にするように、ヌクレオチド塩基(例えば、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、又はdUTP)に対応することができる。

10

20

30

40

50

【0342】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ(h)：ヌクレオチド複合型ポリメラーゼのプライマー内に組み込まれた相補的ヌクレオチドを検出することを更に含む。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは、検出を可能にするように、検出可能なレポーター部分で標識されている。いくつかの実施形態において、コンカテマー分子をシーケンシングするための方法において、検出ステップは、省略される。

【0343】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ(i)：ヌクレオチド複合型ポリメラーゼのプライマー内に組み込まれた相補的ヌクレオチドの塩基を特定することを更に含む。いくつかの実施形態において、ステップ(i)における組み込まれた相補的ヌクレオチドの特定は、ステップ(d)における複数の第1の複合型ポリメラーゼに結合した多価分子の相補的ヌクレオチドの同一性を確認するために使用され得る。いくつかの実施形態において、ステップ(i)の特定することは、核酸コンカテマー分子の配列を決定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、コンカテマー分子をシーケンシングするための方法において、特定するステップは、省略される。

【0344】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ(j)：ステップ(g)が、複数の第2の複合型ポリメラーゼを、2'及び／又は3'鎖終結部分を有する少なくとも1つのヌクレオチドを含む複数のヌクレオチドと接触させることによって行われたときに、鎖終結部分を、組み込まれたヌクレオチドから除去することを更に含む。

【0345】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ(k)：ステップ(a)～(g)及び(j)を、少なくとも1回繰り返すことを更に含む。いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ(k)：ステップ(a)～

(j) を、少なくとも 1 回繰り返すことを更に含む。いくつかの実施形態において、核酸コンカテマー分子の配列は、ステップ (c) 及び (d) において、シーケンシングポリメラーゼに結合するが、プライマーの 3' 末端内に組み込まれない多価分子を検出及び特定することによって決定され得る。いくつかの実施形態において、核酸コンカテマー分子の配列は、ステップ (h) 及び (i) において、プライマーの 3' 末端内に組み込まれたヌクレオチドを検出及び特定することによって決定 (又は確認) され得る。

【0346】

いくつかの実施形態において、核酸分子をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、複数の第 1 の複合型ポリメラーゼと複数の多価分子との結合は、少なくとも 1 つのアビディティ複合体を形成し、方法は、以下のステップ、(a) 第 1 の核酸プライマー、第 1 のシーケンシングポリメラーゼ、及び第 1 の多価分子をコンカテマーテンプレート分子の第 1 の部分に結合し、それによって第 1 の結合複合体を形成することであって、第 1 の多価分子の第 1 のヌクレオチド単位が、第 1 のシーケンシングポリメラーゼに結合する、形成することと、(b) 第 2 の核酸プライマー、第 2 のシーケンシングポリメラーゼ、及び第 1 の多価分子を同じコンカテマーテンプレート分子の第 2 の部分に結合し、それによって第 2 の結合複合体を形成することであって、第 1 の多価分子の第 2 のヌクレオチド単位は、第 2 のシーケンシングポリメラーゼに結合し、同じ多価分子を含む第 1 及び第 2 の結合複合体は、アビディティ複合体を形成する、形成することと、を含む。いくつかの実施形態において、第 1 のシーケンシングポリメラーゼは、本明細書に記載されるいずれかの野生型又は変異型ポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態において、第 2 のシーケンシングポリメラーゼは、本明細書に記載されるいずれかの野生型又は変異型ポリメラーゼを含む。コンカテマーテンプレート分子は、目的の配列及び少なくとも 1 つのユニバーサルシーケンシングプライマー結合部位のタンデムリピート配列を含む。第 1 及び第 2 の核酸プライマーは、コンカテマーテンプレート分子に沿ってシーケンシングプライマー結合部位に結合することができる。例示的な多価分子は、図 12 ~ 15 に示される。

【0347】

いくつかの実施形態において、核酸分子をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、方法は、複数の第 1 の複合型ポリメラーゼを、複数の多価分子と結合させて、少なくとも 1 つのアビディティ複合体を形成することを含み、方法は、以下のステップ、(a) 複数のシーケンシングポリメラーゼ及び複数の核酸プライマーを、コンカテマー核酸コンカテマー分子の異なる部分と接触させて、少なくとも第 1 及び第 2 の複合型ポリメラーゼを、同じコンカテマーテンプレート分子上に形成することと、(b) 複数の検出可能に標識された多価分子を、同じコンカテマーテンプレート分子上の少なくとも第 1 及び第 2 の複合型ポリメラーゼに、複数の多価分子からの単一の多価分子を、第 1 及び第 2 の複合型ポリメラーゼに結合させるのに好適である条件下で接触させることであって、単一の多価分子の少なくとも第 1 のヌクレオチド単位が、コンカテマーテンプレート分子の第 1 の部分にハイブリダイズした第 1 のプライマーを含む第 1 の複合型ポリメラーゼに結合しており、それによって、第 1 の結合複合体 (例えば、第 1 の三元複合体) を形成し、単一の多価分子の少なくとも第 2 のヌクレオチド単位が、コンカテマーテンプレート分子の第 2 の部分にハイブリダイズした第 2 のプライマーを含む第 2 の複合型ポリメラーゼに結合しており、それによって、第 2 の結合複合体 (例えば、第 2 の三元複合体) を形成し、接触させることが、第 1 及び第 2 の結合複合体における結合した第 1 及び第 2 のヌクレオチド単位のポリメラーゼ触媒組み込みを阻害するのに好適である条件下で行われ、同じ多価分子に結合した第 1 及び第 2 の結合複合体が、アビディティ複合体を形成する、接触させることと、(c) 同じコンカテマーテンプレート分子上の第 1 及び第 2 の結合複合体を検出することと、(d) 第 1 の結合複合体における第 1 のヌクレオチド単位を特定し、それによって、コンカテマーテンプレート分子の第 1 の部分の配列を決定し、第 2 の結合複合体における第 2 のヌクレオチド単位を特定し、それによって、コンカテマーテンプレート分子の第 2 の部分の配列を決定することと、を含む。いくつかの実施形態において

、複数のシーケンシングポリメラーゼは、本明細書に記載されるいずれかの野生型又は変異型シーケンシングポリメラーゼを含む。コンカテマーテンプレート分子は、目的の配列及び少なくとも1つのユニバーサルシーケンシングプライマー結合部位のタンデムリピート配列を含む。複数の核酸プライマーは、コンカテマーテンプレート分子に沿ってシーケンシングプライマー結合部位に結合することができる。例示的な多価分子は、図12～15に示される。

【0348】

結合によるシーケンシング

本開示は、本明細書に記載される固定化されたコンカテマー分子のうちのいずれかをシーケンシングするための方法であって、シーケンシング方法が、非標識の鎖終結ヌクレオチドを用いる結合によるシーケンシング（SBB）手順を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態において、結合によるシーケンシング（SBB）方法は、以下のステップ、（a）プライミングされたテンプレート核酸を、少なくとも2つの別個の混合物と、三元複合体安定化条件下で順次接触させることであって、少なくとも2つの別個の混合物が各々、ポリメラーゼ及びヌクレオチドを含み、それによって、順次接触させることが、プライミングされたテンプレート核酸が、三元複合体安定化条件下で、テンプレートにおける第1、第2、及び第3の塩基タイプ塩基タイプについてのヌクレオチド同族体と接触することをもたらす、順次接触させることと、（b）少なくとも2つの別個の混合物を調査して、三元複合体が形成されたかを決定することと、（c）プライミングされたテンプレート核酸分子についての次の正しいヌクレオチドを特定することであって、三元複合体が、ステップ（b）において検出された場合、次の正しいヌクレオチドが、第1、第2、又は第3の塩基タイプの同族体として特定され、次の正しいヌクレオチドが、ステップ（b）における三元複合体の非存在に基づいて、第4の塩基タイプのヌクレオチド同族体であることに帰す、特定することと、（d）次の正しいヌクレオチドを、ステップ（b）後のプライミングされたテンプレート核酸のプライマーに添加し、それによって、伸長したプライマーを生成することと、（e）ステップ（a）～（d）を、伸長したプライマーを含むプライミングされたテンプレート核酸において少なくとも1回繰り返すことと、を含む。例示的な結合によるシーケンシング方法は、米国特許第10,246,744号及び同第10,731,141号に記載されている（両方の特許の内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【0349】

マルチプレックスワークフロー

本開示は、マルチプレックスワークフローを提供し、マルチプレックスワークフローは、概して、試料インデックス付き共有結合性閉環状ライブラリ分子の別個の集団を、二本鎖スプリントアダプター（200）と、1つ又は両方のインデックス配列（例えば、左試料インデックス配列（160）及び／又は右試料インデックス配列（170））を保有する試料インデックス付き核酸ライブラリとを使用して調製することを含む。第1の左インデックス配列（160）及び第1の右インデックス配列（170）は、既知の配列である。別個の試料インデックス付きライブラリは、異なる供給源から単離された入力核酸から調製され得、試料インデックス配列は、異なる供給源を区別するために使用される。プールするステップが、試料インデックス付き共有結合性閉環状ライブラリ分子を生成した後、又は試料インデックス付きライブラリースプリント複合体を生成する前のいずれかに行われ得る。プールされた分子は、下流マルチプレックス増幅及び／又はマルチプレックスシーケンシング反応に供され得る。

【0350】

マルチプレックス化のための従来のプールワークフロー

一実施形態において、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を調製するための方法は、（a）一本鎖核酸ライブラリ分子（100）の2つ以上の集団を提供することであって、ライブラリ分子（100）の各集団が、別個の区画内に収容されており、所与の集団における核酸ライブラリ分子が、（i）第1の表面プライマ

ーについての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、(ii)第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、(iii)試料供給源から単離された目的の配列(110)、(iv)第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、(v)第2の表面プライマーについての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)、並びに(vii)第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス配列(170)を含み、左インデックスの配列(160)及び／又は右インデックスの配列(170)が、別個に又は組み合わせで、目的の配列(110)が単離された試料供給源を特定する、提供することを含む(図5～7を参照されたい)。いくつかの実施形態において、一本鎖核酸ライブラリ分子(100)は、第1の左固有識別配列(180)及び／又は第1の右固有識別配列(190)を更に含む。

【0351】

いくつかの実施形態において、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を調製するための方法は、ステップ(b)：複数の二本鎖スプリントアダプター(200)を提供することであって、個々の二本鎖スプリントアダプター(200)が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズした第1のスプリント鎖(300)を含み、第1のスプリント鎖(300)が、5'から3'の順序で配置された領域である、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含み、第1のスプリント鎖(310)の内部領域が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズしており、第2のスプリント鎖が、5'から3'の順序で配置された領域である、(i)第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第2のサブ領域、及び(ii)第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第1のサブ領域を含む、提供することを更に含む。

【0352】

いくつかの実施形態において、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を調製するための方法は、ステップ(c)：別個の区画内で、一本鎖核酸ライブラリ分子(100)の集団を、複数の二本鎖スプリントアダプター(200)の集合と接触させることであって、接触させることが、第1のスプリント鎖(300)の部分を、ライブラリ分子(100)の部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で行われ、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体(500)の集団を生成し、これにより、個々の第1のスプリント鎖の第1の領域(320)が、個々のライブラリ分子(100)の第1の表面プライマー(120)についての結合配列にハイブリダイズしており、個々の第1のスプリント鎖の第3の領域(330)が、個々のライブラリ分子(100)の第2の表面プライマー(130)についての結合配列にハイブリダイズしており、ライブラリースプリント複合体(500)の各々が、ライブラリ分子の5'末端と第2のスプリント鎖(300)の3'末端との間の第1のニックを含み、ライブラリースプリント複合体(500)の各々が、第2のスプリント鎖(300)の5'末端とライブラリ分子(100)の3'末端との間の第2のニックを含み、第1及び第2のニックが、酵素的にライゲーション可能である、接触させることを更に含む(例えば、図5～7を参照されたい)。

【0353】

いくつかの実施形態において、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を調製する方法は、ステップ(d)：別個の区画内で、ライブラリースプリント複合体(500)の集団を、リガーゼと、第1及び第2のニックを酵素的にライゲーションするのに好適である条件下で接触させ、それによって、各々が第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の集団を生成することを更に含む(例えば、図7及び8を参照されたい)。

【0354】

いくつかの実施形態において、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプ

レックス混合物を調製するための方法は、ステップ（e）：別個の区画からの共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）の集団と一緒にプールして、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を含む、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）のマルチプレックス混合物を生成することを更に含む。

【0355】

いくつかの実施形態において、目的の配列は、2つ以上の異なる試料供給源（例えば、2つ～10個、又は10～50個、又は50～100個、又は100～250個、又は250個超の異なる試料供給源）から単離され得る。例示的な核酸供給源は、自然発生の供給源、組換え供給源、又は化学的に合成された供給源を含む。例示的な核酸供給源は、単一の細胞、複数の細胞、組織、生体液、環境試料、又は全生物を含む。例示的な核酸供給源は、新鮮な供給源、凍結した供給源、新鮮な凍結した供給源、又はアーカイブされた（例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋；FFPE）供給源を含む。核酸は、多くの他の供給源から単離され得ることが、当業者には認識されよう。所与の集団における目的の配列は、同じ又は異なる配列を有する。

10

【0356】

いくつかの実施形態において、ステップ（a）の一本鎖核酸ライブラリ分子（100）の集団の数は、一本鎖核酸ライブラリ分子（100）の2つ～10個、又は10～50個、又は50～100個、又は100～250個、又は250個超の異なる集団であることができる。いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）のいずれかの数の異なる集団と一緒に、ステップ（e）においてプールされ得、例えば、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）の2つ～10個、又は10～50個、又は50～100個、又は100～200個、又は200個超の異なる集団と一緒にプールされ得る。

20

【0357】

いずれかの数の別個の区画（例えば、2つ～10個、若しくは10～50個、若しくは50～100個、若しくは100～250個、又はそれ以上の別個の区画）（例えば、マルチウェルプレート、例えば、96ウェルプレート）が、ステップ（a）において使用され得ることが、当業者には認識されよう。

【0358】

いくつかの実施形態において、ステップ（d）又は（e）の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズした第1のスプリント鎖（300）の3'末端は、プライマー伸長反応（例えば、ローリングサークル増幅反応）のための開始点として機能することができる伸長可能な3'OH末端を含む。

30

【0359】

いくつかの実施形態において、ステップ（d）又は（e）において、第1のスプリント鎖（300）にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）の集団は、任意選択で、少なくとも1つのエキソヌクレアーゼ酵素と反応して、複数の第1のスプリント鎖（300）を除去し、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を保持することができる。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのエキソヌクレアーゼ酵素は、エキソヌクレアーゼI、熱不安定性エキソヌクレアーゼI、及び／又はT7エキソヌクレアーゼを含む。

40

【0360】

いくつかの実施形態において、ステップ（a）の一本鎖核酸ライブラリ分子（100）は、フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、リバーズ増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列のうちのいずれか1つ又は2つ以上のいずれかの組み合わせを更に含む。

【0361】

いくつかの実施形態において、ステップ（e）のマルチプレックス混合物中の個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）は、第3の表面プライマーについてのユニバー

50

サル結合配列を含む第2のスプリント鎖領域(400)を含む。

【0362】

マルチプレックス化のための非従来のプールワークフロー

一実施形態において、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を調製するための方法は、(a)一本鎖核酸ライブラリ分子(100)の2つ以上の集団を提供することであって、ライブラリ分子(100)の各集団、一本鎖核酸ライブラリ分子の各集団が、別個の区画内に收容されており、所与の集団における核酸ライブラリ分子が、(i)第1の表面プライマーについての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、(ii)第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、(iii)試料供給源から単離された目的の配列(110)、(iv)第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、(v)第2の表面プライマーについての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)、並びに(vii)第1の左インデックス配列(160)及び／又は第1の右インデックス配列(170)を含み、左インデックスの配列(160)及び／又は右インデックスの配列(170)が、別個に又は組み合わせで、目的の配列(110)が単離された試料供給源を特定する、提供することを含む(例えば、図5～7を参照されたい)。いくつかの実施形態において、一本鎖核酸ライブラリ分子(100)は、第1の左固有識別配列(180)及び／又は第1の右固有識別配列(190)を更に含む。

10

【0363】

20

いくつかの実施形態において、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を調製するための方法は、ステップ(b)：一本鎖核酸ライブラリ分子(100)の2つ以上の集団と一緒に、同じ区画内にプールすることを更に含む。

【0364】

いくつかの実施形態において、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を調製するための方法は、ステップ(c)：ステップ(b)の区画に、複数の二本鎖スプリントアダプター(200)を添加することであって、個々の二本鎖スプリントアダプター(200)が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズした第1のスプリント鎖(300)を含み、第1のスプリント鎖(300)が、5'から3'の順序で配置された領域である、第1の領域(320)、内部領域(310)、及び第2の領域(330)を含み、第1のスプリント鎖(310)の内部領域が、第2のスプリント鎖(400)にハイブリダイズしており、第2のスプリント鎖が、5'から3'の順序で配置された領域である、(i)第4の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第2のサブ領域、及び(ii)第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を有する第1のサブ領域を含む、添加することを更に含む。

30

【0365】

いくつかの実施形態において、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を調製するための方法は、ステップ(d)：ステップ(c)の同じ区画内にある一本鎖核酸ライブラリ分子(100)の集団及び複数の二本鎖スプリントアダプター(200)をインキュベートすることであって、インキュベートすることが、第1のスプリント鎖(300)の部分を、ライブラリ分子(100)の部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で行われ、それによって、ライブラリ分子を環状化させて、ライブラリースプリント複合体(500)の集団を生成し、これにより、個々の第1のスプリント鎖の第1の領域(320)が、個々のライブラリ分子(100)の第1の表面プライマー(120)についての結合配列にハイブリダイズしており、個々の第1のスプリント鎖の第3の領域(330)が、個々のライブラリ分子(100)の第2の表面プライマー(130)についての結合配列にハイブリダイズしており、ライブラリースプリント複合体(500)の各々が、ライブラリ分子の5'末端と第2のスプリント鎖(300)の3'末端との間の第1のニックを含み、ライブラリースプリント複合体(500)の各々が、第2のスプリント鎖(300)の5'末端とライブラリ分子(100)の3'末端との間の

40

50

第2のニックを含み、第1及び第2のニックが、酵素的にライゲーション可能である、インキュベートすることを更に含む。

【0366】

いくつかの実施形態において、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を調製するための方法は、ステップ(e)：ステップ(d)の区画内のライブラリースプリント複合体(500)の集団を、リガーゼと、第1及び第2のニックを酵素的にライゲーションするのに好適である条件下で接触させ、それによって、各々が第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の集団を生成し、それによって、複数の試料供給源から単離された目的の配列のマルチプレックス混合物を含む、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)のマルチプレックス混合物を生成することを更に含む(例えば、図7及び8を参照されたい)。

10

【0367】

いくつかの実施形態において、目的の配列は、2つ以上の異なる試料供給源(例えば、2つ~10個、又は10~50個、又は50~100個、又は100~250個、又は250個超の異なる試料供給源)から単離され得る。例示的な核酸供給源は、自然発生の供給源、組換え供給源、又は化学的に合成された供給源を含む。例示的な核酸供給源は、単一の細胞、複数の細胞、組織、生体液、環境試料、又は全生物を含む。例示的な核酸供給源は、新鮮な供給源、凍結した供給源、新鮮な凍結した供給源、又はアーカイブされた(例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋；FFPE)供給源を含む。核酸は、多くの他の供給源から単離され得ることが、当業者には認識されよう。所与の集団における目的の配列は、同じ又は異なる配列を有する。

20

【0368】

いくつかの実施形態において、ステップ(a)の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)の集団の数は、一本鎖核酸ライブラリ分子(100)の2つ~10個、又は10~50個、又は50~100個、又は100~250個、又は250個超の異なる集団であることができる。いくつかの実施形態において、一本鎖核酸ライブラリ分子のいずれかの数の異なる集団と一緒に、ステップ(b)においてプールされ得、例えば、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の2つ~10個、又は10~50個、又は50~100個、又は100~200個、又は200個超の異なる集団と一緒にプールされ得る。

【0369】

いずれかの数の別個の区画(例えば、2つ~10個、若しくは10~50個、若しくは50~100個、若しくは100~250個、又はそれ以上の別個の区画)(例えば、マルチウェルプレート、例えば、96ウェルプレート)が、ステップ(a)において使用され得ることが、当業者には認識されよう。

30

【0370】

いくつかの実施形態において、ステップ(e)の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)にハイブリダイズした第1のスプリント鎖(300)の3'末端は、プライマー伸長反応(例えば、ローリングサークル増幅反応)のための開始点として機能することができる伸長可能な3'OH末端を含む。

【0371】

いくつかの実施形態において、ステップ(e)において、第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の集団は、任意選択で、少なくとも1つのエキソヌクレアーゼ酵素と反応して、複数の第1のスプリント鎖(300)を除去し、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を保持することができる。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのエキソヌクレアーゼ酵素は、エキソヌクレアーゼI、熱不安定性エキソヌクレアーゼI、及び／又はT7エキソヌクレアーゼを含む。

40

【0372】

いくつかの実施形態において、ステップ(a)の一本鎖核酸ライブラリ分子(100)は、フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、リバーズ増幅プライマ

50

ーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列のうちのいずれか1つ又は2つ以上のいずれかの組み合わせを更に含む。

【0373】

いくつかの実施形態において、ステップ(e)のマルチプレックス混合物中の個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)は、第3の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む第2のスプリント鎖領域(400)を含む。

【0374】

支持体上マルチプレックスローリングサークル増幅反応

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の多価混合物のうちのいずれかは、支持体上に分配され得、方法は、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を、複数の第4の表面プライマーが支持体上に固定化された当該支持体上に、個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を、個々の固定化された第4の表面プライマーにハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を固定化することと、複数の固定化された共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の第4の表面プライマーを固定化された増幅プライマーとして使用し、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を生成することであって、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、生成することと、を含む。いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状ライブラリ分子の集団は、第1のスプリント鎖(300)に依然としてハイブリダイズしており、支持体上に分配されている。いくつかの実施形態において、第1のスプリント鎖は、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の集団から、少なくとも1つのエキソヌクレアーゼ酵素を使用して、複数の第1のスプリント鎖(300)を除去し共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の集団を保持するのに好適である条件下で除去されている。

【0375】

可溶性増幅プライマーを使用する溶液中マルチプレックスローリングサークル増幅反応、及び支持体上での固定化

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の多価混合物のうちのいずれかは、溶液中ローリングサークル増幅反応に供され得、方法は、第1のスプリント鎖(300)にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の集団を、少なくとも1つのエキソヌクレアーゼ酵素と、複数の第1のスプリント鎖(300)を除去するのに好適である条件下で接触させ、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の集団を保持することと、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)の保持された集団を、複数の可溶性増幅プライマー、複数の鎖置換ポリメラーゼ、及び複数のヌクレオチドと、ローリングサークル増幅反応を行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の核酸コンカテマー分子を生成することであって、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、生成することと、を含む。いくつかの実施形態において、共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)は、フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列及び／又はリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列を含む。いくつかの実施形態において、可溶性増幅プライマーは、フォワード増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列又はリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのエキソヌクレアーゼ酵素は、エキソヌクレアーゼI、熱不安定性エキソヌクレアーゼI、及び／又はT7エキソヌクレアーゼを含む。

【0376】

いくつかの実施形態において、複数の核酸コンカテマー分子は、支持体上に分配され得、方法は、複数のコンカテマー分子を、複数の第4の表面プライマーが支持体上に固定化された当該支持体上に、コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された第4の表面プライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、複数のコンカテマー分子を固定化することと、固定化された複数のコンカテマー分子（共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズしたもの）を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることであって、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、伸長させることと、を含む。

10

【0377】

第1のスプリント鎖を使用する溶液中マルチプレックスローリングサークル増幅反応、及び支持体上での固定化

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）の多価混合物のうちのいずれかは、溶液中ローリングサークル増幅反応に供され得、方法は、ローリングサークル増幅反応を、第1のスプリント鎖（300）にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）の集団を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、ローリングサークル増幅反応を行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数のコンカテマー分子を生成することであって、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、生成することによって行うことを含む。

20

【0378】

いくつかの実施形態において、複数のコンカテマー分子は、支持体上に分配され得、方法は、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズした複数のコンカテマー分子を、複数の第4の表面プライマーが支持体上に固定化された当該支持体上に、コンカテマーの少なくとも一部分を、複数の固定化された第4の表面プライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズさせるのに好適である条件下で分配し、それによって、共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）にハイブリダイズした複数のコンカテマー分子を固定化することと、複数の固定化されたコンカテマー分子を、複数の鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、支持体上でのローリングサークル増幅反応を、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）をテンプレート分子として使用して行うのに好適である条件下で接触させ、それによって、複数の固定化された核酸コンカテマー分子を伸長させることであって、複数のヌクレオチドが、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPを含む、伸長させることと、を含む。

30

【0379】

固定化されたコンカテマー分子のマルチプレックスシーケンシング

本明細書に記載されるマルチプレックス固定化されたコンカテマー分子のうちのいずれかは、シーケンシング反応に供され得、シーケンシング反応は、概して、複数の固定化された核酸コンカテマー分子の挿入領域（110）及び第1の左インデックス配列（160）及び／又は第1の右インデックス配列（170）をシーケンシングすることであって、挿入領域（110）の配列が、第1の左インデックス配列（160）及び／又は第1の右インデックス配列（170）とともに、所与の固定化されたコンカテマー分子の目的の配列の試料供給源を特定するために使用され得る、シーケンシングすることを含む。固定化された核酸コンカテマー分子は、挿入領域（110）、及び試料インデックス配列（例えば、第1の左インデックス配列（160）及び／又は第1の右インデックス配列（170））のうちの1つ又は両方を含む。挿入領域（110）、第1の左インデックス配列（160）、及び／又は第1の右インデックス配列（170）は、いずれかの順序でシーケンシングされ得る。いくつかの実施形態において、挿入領域（110）は、第1にシーケン

40

50

シングされ得、第1の左インデックス配列(160)は、第2にシーケンシングされ得、第1の右インデックス配列(170)は、固定化された核酸コンカテマー分子内に存在する場合、第3にシーケンシングされ得る。いくつかの実施形態において、第1の左インデックス配列(160)は、第1にシーケンシングされ得、挿入領域(110)は、第2にシーケンシングされ得、第1の右インデックス配列(170)は、固定化された核酸コンカテマー分子内に存在する場合、第3にシーケンシングされ得る。

【0380】

いくつかの実施形態において、第1の左インデックス(160)及び第1の右インデックス(170)のシーケンシングリードは、それらのそれぞれの既知の配列とアラインメントされ得、アラインメントスコアが割り当てられ得、アラインメントスコアは、既知のインデックス配列とこのインデックスのシーケンシングリードとの間の類似性を示す。第1の左インデックス(160)及び／又は第1の右インデックス(170)のアラインメントスコア(複数可)は、関連する挿入領域(110)の配列リードとともに、挿入領域の試料供給源を決定するために使用され得る。

【0381】

ヌクレオチド類似体を使用するマルチプレックスシーケンシング

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるマルチプレックス固定化されたコンカテマー分子のうちのいずれかは、シーケンシングされ得、シーケンシング方法は、(a)複数の固定化された核酸コンカテマー分子を、複数のシーケンシングプライマー、複数のシーケンシングポリメラーゼ、及び各々が2'又は3'鎖終結部分を含む複数の検出可能に標識されたヌクレオチド類似体と、検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を、シーケンシングプライマーの3'末端内に組み込むのに好適である条件下で結合させることと、(b)組み込まれた検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を検出することと、(c)組み込まれた検出可能に標識されたヌクレオチド類似体の核酸塩基を特定することとを含む。ヌクレオチド類似体を用いるシーケンシング方法は、上記で詳細に説明される。

【0382】

2段階のシーケンシング方法を使用するマルチプレックスシーケンシング

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるマルチプレックス固定化されたコンカテマー分子のうちのいずれかは、2段階のシーケンシング方法を使用してシーケンシングされ得、第1の段階は、(a)複数の固定化された核酸コンカテマー分子を、複数のシーケンシングプライマー、複数の第1のシーケンシングポリメラーゼ、及び複数の検出可能に標識された多価分子と、個々のコンカテマー分子を、シーケンシングプライマー、第1のシーケンシングポリメラーゼ、及び検出可能に標識された多価分子に結合させる(例えば、複数の多価複合型ポリメラーゼを形成する)のに好適である条件下で結合させることであって、好適な条件が、検出可能に標識された多価分子のヌクレオチド単位のポリメラーゼ触媒組み込みを阻害する、結合させることと、(b)結合した検出可能に標識された多価分子を検出することと、(c)検出可能に標識された多価分子の核酸塩基を特定することと、を含む。いくつかの実施形態において、個々の検出可能に標識された多価分子は、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、各ヌクレオチドアームは、ヌクレオチド(例えば、ヌクレオチド単位)に付着している(例えば、図12～16を参照されたい)。いくつかの実施形態において、複数の多価分子における多価分子のうちの少なくとも1つは、検出可能なレポーター部分で標識されている。コア、ヌクレオチドアーム、又は核酸塩基を含む、多価分子のいずれかの部分が、標識され得る。いくつかの実施形態において、検出可能なレポーター部分は、フルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、ステップ(a)の結合させることは、ストロンチウム、バリウム、及び／又はカルシウムを含む少なくとも1つの非触媒カチオンの存在下で行われる。いくつかの実施形態において、複数の固定化された核酸コンカテマー分子への検出可能に標識された多価分子の結合は、上記の少なくとも1つのアビディティ複合体を形成する。

【0383】

いくつかの実施形態において、２段階のシーケンシング方法の第２の段階は、（ｄ）複数の第１のシーケンシングポリメラーゼ及び複数の結合した多価分子を、複数の固定化された核酸コンカテマー分子から除去し、各々がシーケンシングプライマーにハイブリダイズした固定化されたコンカテマー分子（核酸二重鎖）を保持することと、（ｅ）保持された固定化されたコンカテマー分子及びハイブリダイズしたシーケンシングプライマーを、複数の第２のポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドと、ヌクレオチドを、シーケンシングプライマーの３'末端内に組み込むのに好適である条件下で接触させることと、を含む。２段階の方法を用いるシーケンシング方法は、上記で詳細に説明される。

【０３８４】

改善されたベースコーリングのための試料インデックス

10

概して、支持体（例えば、コーティングされたフローセル）上に分配される核酸ライブラリを調製することが望ましく、ライブラリ分子は、超並列シーケンシングのために、支持体に高密度で固定化されたテンプレート分子に変換される。支持体上のランダムな位置において高密度で固定化されたテンプレート分子について、高密度蛍光画像を、シーケンシング実行中の正確なベースコーリングのために解像するという課題は困難になる。

【０３８５】

固定化されたテンプレート分子の集団のヌクレオチド多様性とは、各シーケンシングサイクルにおいて存在するヌクレオチド A、G、C、及び T の相対的な割合を指す。最適な高多様性ライブラリは、概して、シーケンシング実行の各サイクルにおいて表される全ての４つのヌクレオチドをおよそ等しい割合で有する目的の配列（挿入）領域を含む。低多様性ライブラリは、概して、ある特定のヌクレオチドを高い割合で有し、他のヌクレオチドを低い割合で有する目的の配列（挿入）領域を含む。低多様性ライブラリの問題を克服するために、P h i X バクテリオファージから調製された少量の高多様性ライブラリが、典型的には、目的のライブラリと混合され（例えば、P h i X スパイクインライブラリ）、同じフローセル上で一緒にシーケンシングされる。P h i X ライブラリスパイクインライブラリは、ヌクレオチド多様性を提供しつつ、また、フローセル上の空間を占有し、それによって、目的の配列を保有する標的ライブラリに置き換わり、標的ライブラリから得ることが可能であるシーケンシングデータの量を低減する（例えば、シーケンシングスループットを低減する）。低多様性ライブラリの問題を克服する別の方法は、色バランスが保たれているように設計された少なくとも１つの試料インデックス配列を有する標的ライブラリ分子を調製することである。しかしながら、多数の試料インデックスセット、例えば、16-plex、24-plex、96-plex、又はより大きなplexyレベルのための単一のインデックス試料配列又は対のインデックス試料配列のセットを設計することが望ましい場合がある。試料インデックス配列の全ての色バランスが保たれている大きい試料インデックスセットについて、試料インデックス配列を、単一の又は対での試料インデックスとして設計することは困難である（例えば、図 26 を参照されたい）。

20

30

【０３８６】

低多様性ライブラリ分子（例えば、支持体上の高密度でのもの）をシーケンシングするという課題を克服する代替の方法は、ユニバーサル試料インデックス配列に直接結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を含む少なくとも１つの試料インデックス配列を有するライブラリを調製することであり、短ランダム配列は、ヌクレオチド多様性及び色バランスを提供する。図 23 A ~ 23 F における表 1 は、短ランダム配列（例えば、NNN）及びユニバーサル試料インデックス配列を有する例示的な右インデックス配列（170）のリストを提供する。試料インデックス付きライブラリ分子の集団において、試料インデックス（例えば、（170））の短ランダム配列は、シーケンシング実行の各サイクルにおいて表される全ての４つのヌクレオチド（例えば、A、G、C、T、及び／又は U）をおよそ等しい割合で含む高ヌクレオチド多様性を提供する（図 26 を参照されたい）。短ランダム配列の高ヌクレオチド多様性はまた、シーケンシング実行の各サイクル中に色バランスを提供する。試料インデックス（例えば、（160）及び／又は（170））を、短ランダム配列（例えば、NNN）を含むように設計する利点は、ライブラリ分子の低プ

40

50

レックス集団（例えば、2プレックス又は4プレックス）において、2又は4つの異なる試料を特定するユニバーサル試料インデックス配列が、ヌクレオチド多様性を示す必要がないことである（例えば、図27を参照されたい）。追加として、短ランダム配列（例えば、NNN）のヌクレオチド多様性は、Phixスパイクインライブラリを含むことを不必要にすることができるか、又はフローセル上に分配され、シーケンシングされるPhixスパイクインライブラリを、低減された量で使用することを可能にする。

【0387】

標的ライブラリ分子は、短ランダム配列及びユニバーサル試料インデックス配列を含む単一の試料インデックス配列（例えば、試料インデックス（170））を含むことができる。いくつかの実施形態において、短ランダム配列（例えば、NNN）は、十分なヌクレオチド多様性及び色バランスを提供するため、単一の試料インデックス配列（例えば、（170））のみからのシーケンシングデータは、ポロニーマッピング及びテンプレート登録のために使用される。ユニバーサル試料インデックス配列（例えば、（170））からのシーケンシングデータは、マルチプレックスアッセイにおいて、異なる試料供給源から得られた目的の配列を区別するために使用され得る。

【0388】

標的ライブラリ分子は、第2のユニバーサル試料インデックス配列（例えば、（160））を含む第2の試料インデックス配列（例えば、二重試料インデックス）を更に含むことができる。いくつかの実施形態において、短ランダム配列は、十分なヌクレオチド多様性及び色バランスを提供するため、単一の試料インデックス配列（例えば、（170））のみからのシーケンシングデータは、ポロニーマッピング及び／又はテンプレート登録のために使用される。第1のユニバーサル試料インデックス配列（170）及び第2のユニバーサル試料インデックス配列（160）からのシーケンシングデータは、マルチプレックスアッセイにおいて、異なる試料供給源から得られた目的の配列を区別するために、二重試料インデックスとして使用され得る。いくつかの実施形態において、第2の試料インデックス配列（例えば、（160））は、第2の短ランダム配列（例えば、NNN）を含んでもよく又は含まなくてもよい。

【0389】

また、配列領域及び試料インデックス領域（複数可）をシーケンシングする順序は、低多様性ライブラリ分子のシーケンシングの課題を改善するために使用され得る。例えば、試料インデックス領域は、第1にシーケンシングされ得、その後、目的の配列領域がシーケンシングされ、試料インデックス配列は、目的の配列領域と関連し得る。例えば、試料インデックス領域は、第1にシーケンシングされ得、シーケンシングは、短ランダム配列（例えば、NNN）をシーケンシングすることと、任意選択で、ユニバーサル試料インデックスの少なくとも一部分をシーケンシングすることと、次いで、目的の配列領域をシーケンシングすることと、を含む。試料インデックス付きライブラリ分子の集団において、短ランダム配列（例えば、NNN）は、ライブラリ分子の目的の配列領域提供されることがないヌクレオチド多様性を提供する。試料インデックスの配列は、ポロニーマッピング及びテンプレート登録のための改善されたヌクレオチド多様性及び色バランスを提供する。

【0390】

加えて、最初に試料インデックス領域をシーケンシングする場合、シーケンシングされた試料インデックス領域の長さは、シーケンシングされた試料インデックス領域の生成物の脱ハイブリダイゼーションがより完全であるように、比較的短い（例えば、長さが30ヌクレオチド未満）。穏やかな脱ハイブリダイゼーション条件を使用して、テンプレート分子にハイブリダイズされたままの任意のシーケンシング生成物からの残留シグナルのレベルを低減する、シーケンシングされた試料インデックス領域の生成物の大部分又は全てを除去することができる。対照的に、目的の配列領域は、典型的には、試料インデックス領域よりもはるかに長い（例えば、長さが100ヌクレオチドを超える）。目的の配列領域が試料インデックス領域の前にシーケンシングされる場合、シーケンシングされた目的

の配列領域の生成物は、テンプレート分子にハイブリダイズしたままの生成物を除去するために、テンプレート分子を損傷する可能性があるより厳しい脱ハイブリダイゼーション条件に供されなければならない。

【0391】

本開示は、各々が少なくとも1つの試料インデックス配列を含む核酸ライブラリ分子（100）であって、少なくとも1つの試料インデックス配列が、マルチプレックスアッセイにおいて、異なる試料供給源から得られた目的の配列を区別するために使用され得、ユニバーサル試料インデックス配列に結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を含む、核酸ライブラリ分子（100）を提供する。いくつかの実施形態において、左試料インデックス（160）は、ユニバーサル左試料インデックス配列に結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を含み、かつ／又は右試料インデックス（170）は、右ユニバーサル試料インデックス配列に結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を含む。少なくとも1つの試料インデックス配列は、改善されたベースコーリングのための配列多様性を含むことができる。少なくとも1つの試料インデックス配列は、ベースコーリング精度を改善するために使用され得る。

10

【0392】

いくつかの実施形態において、短ランダム配列（例えば、NNN）は、ユニバーサル試料インデックス配列（例えば、（170）及び／又は（160））の上流に位置し、これにより、シーケンシング実行中に、ランダム配列部分は、ユニバーサル試料インデックス配列前にシーケンシングされる。いくつかの実施形態において、短ランダム配列が、ユニバーサル試料インデックス配列の下流に位置し、これにより、シーケンシング実行中に、ランダム部分は、ユニバーサル試料インデックス配列後にシーケンシングされる。

20

【0393】

いくつかの実施形態において、ランダム配列において、所与の位置における各塩基「N」は、独立して、A、G、C、T、又はUから選択される。いくつかの実施形態において、ランダム配列は、同じ核酸塩基、例えば、AA、TT、CC、GG、UU、AAA、TTT、CCC、GGG、又はUUUのうちの2又は3つを有する連続したリピート配列を欠く。いくつかの実施形態において、ライブラリ分子の集団において、ユニバーサル試料インデックス配列（例えば、（170）及び／又は（160））は、シーケンシング実行の各サイクルにおいて表される全ての4つのヌクレオチド（例えば、A、G、C、T、及び／又はU）をおよそ等しい割合で含む高多様性配列を有する短ランダム配列を含む。

30

【0394】

いくつかの実施形態において、短ランダム配列（例えば、NNN）は、3つ～20個のヌクレオチド、又は3つ～10個のヌクレオチド、又は3～8つのヌクレオチド、又は3～6つのヌクレオチド、又は3～5つのヌクレオチド、又は3～4つのヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、短ランダム配列（例えば、NNN）は、3つのヌクレオチドを含む。

【0395】

いくつかの実施形態において、短ランダム配列（例えば、NNN）は、AGC、AGT、GAC、GAT、CAT、CAG、TAG、TACを含むが、これらに限定されない。より多くのランダム配列（例えば、64個の可能な組み合わせ）が調製され得、短ランダム配列内の所与の位置における各塩基「N」が、独立して、A、G、C、T、又はUから選択されることが、当業者には認識されよう。

40

【0396】

いくつかの実施形態において、ユニバーサル試料インデックス配列は、5つ～20個のヌクレオチド、又は7つ～18個のヌクレオチド、又は9つ～16個のヌクレオチドを含む。

【0397】

いくつかの実施形態において、右試料インデックス配列の集団における個々の右試料インデックス配列（例えば、（170））は、ユニバーサル試料インデックス配列及び短ラ

50

ンダム配列（例えば、NNN）を含む。いくつかの実施形態において、右試料インデックス配列の集団における短ランダム配列は、全ての4つのヌクレオチド塩基（例えば、A、G、C、及びT/U）の約25%又は約20～30%の全体的な塩基組成を有し、短ランダム配列（例えば、NNN）のシーケンシング中に、各シーケンシングサイクルにおいてヌクレオチド多様性を提供する。

【0398】

いくつかの実施形態において、右試料インデックス配列の集団において、短ランダム配列内のいずれかの所与の位置におけるアデニン（A）の割合は、約20～30%、又は約15～35%、又は約10～40%である。いくつかの実施形態において、右試料インデックス配列の集団において、短ランダム配列内のいずれかの所与の位置におけるグアニン（G）の割合は、約20～30%、又は約15～35%、又は約10～40%である。いくつかの実施形態において、右試料インデックス配列の集団において、短ランダム配列内のいずれかの所与の位置におけるシトシン（C）の割合は、約20～30%、又は約15～35%、又は約10～40%である。いくつかの実施形態において、右試料インデックス配列の集団において、短ランダム配列内のいずれかの所与の位置におけるチミン（T）又はウラシル（U）の割合は、約20～30%、又は約15～35%、又は約10～40%である。

【0399】

いくつかの実施形態において、右試料インデックス配列の集団において、短ランダム配列内のいずれかの所与の位置におけるアデニン（A）及びチミン（T）の割合、又はアデニン（A）及びウラシル（U）の割合は、約10～65%である。いくつかの実施形態において、右試料インデックス配列の集団において、短ランダム配列内のいずれかの所与の位置におけるグアニン（G）及びシトシン（C）の割合は、約10～65%である。

【0400】

いくつかの実施形態において、右試料インデックス配列の集団において、短ランダム配列の配列多様性は、シーケンシングサイクルが、少なくとも短ランダム配列（例えば、NNN）のシーケンシング中に、4つ未満の異なるヌクレオチド塩基で提示されないことを確実にする。

【0401】

ユニバーサル試料インデックス配列に直接結合した短ランダム配列NNNを含む例示的な試料インデックス配列は、NNNGTAGGAGCC（配列番号97）、NNNCCGCTGCTA（配列番号98）、NNNAACAACAAG（配列番号99）、NNNGGTGGTCTA（配列番号100）、NNNTTGGCCAAAC（配列番号101）、NNNCAGGAGTGTC（配列番号105）、及びNNNATCACACTA（配列番号106）を含むが、これらに限定されない。当業者は、ユニバーサル試料インデックスが任意の長さであり得、マルチプレックスアッセイにおいて異なる試料源から得られた目的の配列を区別するために使用され得る任意の配列を有することを認識するであろう。所与の試料インデックス、例えば、NNNGTAGGAGCC（配列番号97）の集団において、集団は、個々の試料インデックス分子の混合物を含有し、個々の試料インデックス分子は各々、同じユニバーサル試料インデックス配列（例えば、GTAGGAGCC）及び異なる短ランダム配列（例えば、NNN）を保有し、最大64個の異なる短ランダム配列が、所与の試料インデックスの集団内に存在し得る。

【0402】

短ランダム配列NNNを含む例示的な試料インデックス配列は、図23A～23Fにおける表1に列挙される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのライブラリ分子は、右ユニバーサル試料インデックス配列に直接結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を含む右試料インデックスを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのライブラリ分子は、右ユニバーサル試料インデックス配列と異なる左ユニバーサル試料インデックス配列を含む左試料インデックスを更に含む。

【0403】

いくつかの実施形態において、ランダム配列（例えば、NNN）は、核酸塩基アデニン、シトシン、グアニン、チミン、及び／又はウラシルのバランスが保たれた比を提供する（図26を参照されたい）。いくつかの実施形態において、試料インデックス付きライブラリ分子の集団において、ランダム配列（例えば、NNN）は、ユニバーサル試料インデックス配列の少なくとも一部分と一緒に、シーケンシング実行の各サイクルにおいて表される核酸塩基アデニン、シトシン、グアニン、チミン、及び／又はウラシルのバランスが保たれた比を提供する。

【0404】

いくつかの実施形態において、シーケンシング反応は、核酸塩基に対応する異なるフルオロフォアで標識されたポリメラーゼ及びヌクレオチド（例えば、ヌクレオチド類似体）の使用を含む。いくつかの実施形態において、ランダム配列（例えば、NNN）を、標識されたヌクレオチドを使用してシーケンシングすることは、シーケンシング実行の各サイクルにおいて、核酸塩基アデニン、シトシン、グアニン、チミン、及び／又はウラシルに対応する蛍光色のバランスが保たれた比を提供する。いくつかの実施形態において、ランダム配列（例えば、NNN）及びユニバーサル試料インデックス配列の少なくとも一部分を、標識されたヌクレオチドを使用してシーケンシングすることは、核酸塩基アデニン、シトシン、グアニン、チミン、及び／又はウラシルに対応する蛍光色のバランスが保たれた比を提供する（例えば、図26を参照されたい）。標識されたヌクレオチドは、シーケンシング反応中に蛍光シグナルを放出する。いくつかの実施形態において、シーケンシング反応は、固定化されたテンプレート分子におけるシーケンシング反応からの蛍光画像をキャプチャーする検出器を有するシーケンシング装置において行われる。シーケンシング装置は、検出器によってキャプチャーされた蛍光イメージングデータを、フローセル上の固定化されたテンプレート分子の位置を決定する（例えば、マッピングする）ようにプログラムされたコンピュータシステムに中継するように構成され得る。コンピュータシステムは、固定化されたテンプレート分子の位置のマッピングを、ランダム配列（例えば、NNN）のみの蛍光イメージングデータに基づいて、又はランダム配列（例えば、NNN）及びユニバーサル試料インデックス配列の少なくとも一部分に基づいて生成することができる。したがって、ランダム配列（例えば、NNN）、及び任意選択で、ユニバーサル試料インデックス配列の一部分をシーケンシングするために使用される少ない数のシーケンシングサイクルが、固定化されたテンプレート分子の位置のマッピングを生成するために使用され得る。コンピュータシステムは、ランダム配列（例えば、NNN）のみの蛍光色及び強度、又はランダム配列（例えば、NNN）及びユニバーサル試料インデックス配列の少なくとも一部分の蛍光色及び強度を抽出するように構成され得る。コンピュータシステムは、所与の固定化されたテンプレート分子の位置、並びに所与のテンプレート分子に関連する蛍光色及び強度（ランダム配列をシーケンシングしている間に確立されたもの）を、挿入領域（110）をシーケンシングしている間に、ベースコーリングのために使用するように構成され得る。コンピュータシステムは、ランダム配列（例えば、NNN）及びユニバーサル試料インデックス配列及び挿入領域（110）をシーケンシングしている間に、フェージング及び事前フェージングを検出するように構成され得る。いくつかの実施形態において、各シーケンシングサイクルにおいてランダム配列（例えば、NNN）によって提供された蛍光色のバランスが保たれた比は、検出器によってキャプチャーされた蛍光画像から処理されたデータの品質を改善することができ、次いで、フローセル上の固定化されたテンプレート分子の位置、並びに色及び強度を決定するコンピュータシステムによる能力を改善することができ、それらの全ては、シーケンシングされた挿入領域（110）のベースコーリング精度及び品質スコアを改善することができる。

【0405】

いくつかの実施形態において、シーケンシング反応は、所与の多価分子におけるヌクレオチドアームに付着したヌクレオチド単位の核酸塩基（例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、又はウラシル）に対応する異なるフルオロフォアで標識されたポリメラーゼ及び多価分子の使用を含む。いくつかの実施形態において、個々の多価分子のコアは

10

20

30

40

50

、所与の多価分子におけるヌクレオチドアームに付着したヌクレオチド単位（例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、又はウラシル）に対応するフルオロフォアに付着している（例えば、図26を参照されたい）。いくつかの実施形態において、多価分子のヌクレオチドアームのうちの少なくとも1つは、フルオロフォアに付着したリンカー及び／又はヌクレオチド塩基を含み、所与のリンカー又はヌクレオチド塩基に付着したフルオロフォアは、ヌクレオチドアームのヌクレオチド塩基（例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、又はウラシル）に対応する。いくつかの実施形態において、ランダム配列（例えば、NNN）を、標識された多価分子を使用してシーケンシングすることは、シーケンシング実行の各サイクルにおいて、核酸塩基アデニン、シトシン、グアニン、チミン、及び／又はウラシルに対応する蛍光色のバランスが保たれた比を提供する。いくつかの実施形態において、ランダム配列（例えば、NNN）及びユニバーサル試料インデックス配列の少なくとも一部分を、標識された多価分子を使用してシーケンシングすることは、核酸塩基アデニン、シトシン、グアニン、チミン、及び／又はウラシルに対応する蛍光色のバランスが保たれた比を提供する（例えば、図26を参照されたい）。標識された多価分子は、シーケンシング反応中に蛍光シグナルを放出する。いくつかの実施形態において、シーケンシング反応は、固定化されたテンプレート分子におけるシーケンシング反応からの蛍光画像をキャプチャーする検出器を有するシーケンシング装置において行われる。シーケンシング装置は、検出器によってキャプチャーされた蛍光イメージングデータを、フローセル上の固定化されたテンプレート分子（ポロニー）の位置を決定する（例えば、マッピングする）ようにプログラムされたコンピュータシステムに中継するように構成され得る。コンピュータシステムは、固定化されたテンプレート分子の位置のマッピングを、ランダム配列（例えば、NNN）のみの蛍光イメージングデータに基づいて、又はランダム配列（例えば、NNN）及びユニバーサル試料インデックス配列の少なくとも一部分に基づいて生成することができる。したがって、ランダム配列（例えば、NNN）、及び任意選択で、ユニバーサル試料インデックス配列の一部分をシーケンシングするために使用される少ない数のシーケンシングサイクルが、固定化されたテンプレート分子の位置のマッピングを生成するために使用され得る。コンピュータシステムは、ランダム配列（例えば、NNN）のみの蛍光色及び強度、又はランダム配列（例えば、NNN）及びユニバーサル試料インデックス配列の蛍光色及び強度を抽出するように構成され得る。コンピュータシステムは、所与の固定化されたテンプレート分子の位置、並びに所与のテンプレート分子に関連する蛍光色及び強度（ランダム配列をシーケンシングしている間に確立されたもの）を、挿入領域（110）をシーケンシングしている間に、ベースコーリングのために使用するように構成され得る。コンピュータシステムは、ランダム配列（例えば、NNN）及びユニバーサル試料インデックス配列及び挿入領域（110）をシーケンシングしている間に、フェージング及び事前フェージングを検出するように構成され得る。いくつかの実施形態において、各シーケンシングサイクルにおいてランダム配列（例えば、NNN）によって提供された蛍光色のバランスが保たれた比は、検出器によってキャプチャーされた蛍光画像から処理されたデータの品質を改善することができ、次いで、フローセル上の固定化されたテンプレート分子の位置、並びに色及び強度を決定するコンピュータシステムによる能力を改善することができ、それらの全ては、シーケンシングされた挿入領域（110）のベースコーリング精度及び品質スコアを改善することができる。

10

20

30

40

50

【0406】

第1の実施形態：試料インデックス配列をシーケンシングする順序

いくつかの実施形態において、シーケンシングの順序は、（1）右試料インデックス（170）をシーケンシングすることとあって、右インデックスが、第1のランダム配列（例えば、NNN）及び右ユニバーサル試料インデックス配列を含む、シーケンシングすることと、（2）左試料インデックス（160）をシーケンシングすることと、（3）挿入領域（110）をシーケンシングすることと、を含む。いくつかの実施形態において、左試料インデックス（160）は、左ユニバーサル試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、左試料インデックス（160）は、第2のランダム配列（例えば、

NNN) 及び左ユニバーサル試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のランダム配列(例えば、NNN) 及び右ユニバーサル試料インデックス配列を含む右試料インデックス領域(170)をシーケンシングすることは、十分なヌクレオチド多様性を提供し得、これにより、左試料インデックス(160)をシーケンシングすることは、省略され得る。

【0407】

いくつかの実施形態において、支持体に固定化されたテンプレート分子をシーケンシングするための方法において、個々のテンプレート分子は、(i) 第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列(120)、(ii) ユニバーサル左試料インデックス配列を有する左試料インデックス配列(160)、(iii) フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列(140)、(iv) 目的の配列(110)、(v) リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列(150)、(vi) 右ユニバーサル試料インデックス配列(170)に直接結合した短ランダム配列(例えば、NNN)を有する右試料インデックス配列、及び(vii) 第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列(130)を含み(例えば、図5及び6を参照されたい)、方法は、ステップ(a): テンプレート分子を、リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列(150)にハイブリダイズする第1の複数の可溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、右試料インデックス配列(170)をシーケンシングすることであって、右試料インデックス配列(170)をシーケンシングすることが、短ランダム配列(例えば、NNN) 及び右ユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることを含み、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした第1の複数の試料インデックス伸長産物を生成し、第1の複数の試料インデックス伸長産物が、右ユニバーサル試料インデックス配列(170)に直接結合した短ランダム配列(例えば、NNN)を有する右試料インデックス配列と相補的である、シーケンシングすることを含む。

【0408】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ(b): 第1の複数の試料インデックス伸長産物を除去し、固定化されたテンプレート分子を保持することを更に含む。

【0409】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ(c): 保持された固定化されたテンプレート分子を、第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列(120)にハイブリダイズする第2の複数の可溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、左試料インデックス配列(160)をシーケンシングし、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした第2の複数の試料インデックス伸長産物を生成することであって、第2の複数の試料インデックス伸長産物が、左ユニバーサル試料インデックス配列を有する左試料インデックス配列(160)と相補的である、生成することを更に含む。

【0410】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ(d): 第2の複数の試料インデックス伸長産物を除去し、固定化されたテンプレート分子を保持することを更に含む。

【0411】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ(e): 保持された固定化されたテンプレート分子を、フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列(140)にハイブリダイズする第3の複数の可溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、挿入領域(110)をシーケンシングし、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした複数の挿入伸長産物を生成することであって、複数の挿入伸長産物が、目的の配列(110)と相補的である、生成することを更に含む。

【0412】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（f1）：（i）挿入領域（110）の配列を、（ii）右ユニバーサル試料インデックス配列（170）に直接結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を有する右試料インデックス配列に割り当て、それによって、挿入領域を、第1の供給源から得られたものとして特定することを更に含む。

【0413】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（f2）：（i）挿入領域（110）の配列を、（ii）右ユニバーサル試料インデックス配列（170）に直接結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を有する右試料インデックス配列、及び（iii）左試料インデックス配列（160）に割り当て、それによって、挿入領域を、第1の供給源から得られたものとして特定することを更に含む。

10

【0414】

いくつかの実施形態において、ステップ（b）及び（d）の複数のシーケンシング伸長産物の除去は、ホルムアミドを有する又は有しないSSC（例えば、生理食塩水ークエン酸ナトリウム）緩衝液を含む変性試薬を使用して、核酸変性を促進する温度、例えば、50～90℃で行われ得る。

【0415】

いくつかの実施形態において、ステップ（a）、（c）、及び（e）のシーケンシングは、シーケンシングポリメラーゼ及び検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を用いる、本明細書に記載されるシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。いくつかの実施形態において、ステップ（a）、（c）、及び（e）のシーケンシングは、シーケンシングポリメラーゼ、検出可能に標識された多価分子、及びヌクレオチド類似体を用いる、本明細書に記載される2段階のシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。いくつかの実施形態において、ステップ（a）、（c）、及び（e）のシーケンシングは、本明細書に記載される結合によるシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。

20

【0416】

いくつかの実施形態において、支持体に固定化された複数のテンプレート分子の密度は、 1 mm^2 当たり約 $10^2 \sim 10^{15}$ である。いくつかの実施形態において、複数のテンプレート分子は、支持体上のランダムな位置において固定化されている。いくつかの実施形態において、複数のテンプレート分子は、支持体上に所定のパターンで固定化されている。

30

【0417】

第2の実施形態：試料インデックス配列をシーケンシングする順序

いくつかの実施形態において、シーケンシングの順序は、（1）右試料インデックス（170）をシーケンシングすることであって、右インデックスが、ランダム配列（例えば、NNN）及びユニバーサル試料インデックス配列を含む、シーケンシングすることと、（2）挿入領域（110）をシーケンシングすることと、（3）左試料インデックス（160）をシーケンシングすることと、を含む。いくつかの実施形態において、左試料インデックス（160）は、左ユニバーサル試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、左試料インデックス（160）は、第2のランダム配列（例えば、NNN）及び左ユニバーサル試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のランダム配列（例えば、NNN）及び右ユニバーサル試料インデックス配列を含む右試料インデックス領域（170）をシーケンシングすることは、十分なヌクレオチド多様性を提供し得、これにより、左試料インデックス（160）をシーケンシングすることは、省略され得る。

40

【0418】

いくつかの実施形態において、支持体に固定化されたテンプレート分子をシーケンシングするための方法において、個々のテンプレート分子は、（i）第1の表面プライマーに

50

ついでにユニバーサル結合配列（１２０）、（ｉｉ）左ユニバーサル試料インデックス配列を有する左試料インデックス配列（１６０）、（ｉｉｉ）フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（１４０）、（ｉｖ）目的の配列（１１０）、（ｖ）リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（１５０）、（ｖｉ）右ユニバーサル試料インデックス配列（１７０）に直接結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を有する右試料インデックス配列、及び（ｖｉｉ）第２の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列（１３０）を含み（例えば、図５及び６を参照されたい）、方法は、ステップ（ａ）：テンプレート分子を、リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（１５０）にハイブリダイズする第１の複数の可溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、右試料インデックス配列（１７０）をシーケンシングすることであって、右試料インデックス配列（１７０）をシーケンシングすることが、短ランダム配列（例えば、NNN）及び右ユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることを含み、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした第１の複数の試料インデックス伸長産物を生成し、第１の複数の試料インデックス伸長産物が、右ユニバーサル試料インデックス配列（１７０）に直接結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を有する右試料インデックス配列と相補的である、シーケンシングすることを含む。

10

【０４１９】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（ｂ）：第１の複数の試料インデックス伸長産物を除去し、固定化されたテンプレート分子を保持することを更に含む。

20

【０４２０】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（ｃ）：保持された固定化されたテンプレート分子を、フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（１４０）にハイブリダイズする第２の複数の可溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、挿入領域（１１０）をシーケンシングし、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした複数の挿入伸長産物を生成することであって、複数の挿入伸長産物が、目的の配列（１１０）と相補的である、生成することを更に含む。

【０４２１】

30

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（ｄ）：複数の挿入伸長産物を除去し、固定化されたテンプレート分子を保持することを更に含む。

【０４２２】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（ｅ）：保持された固定化されたテンプレート分子を、第１の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列（１２０）にハイブリダイズする第３の複数の可溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、左試料インデックス配列（１６０）をシーケンシングし、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした第２の複数の試料インデックス伸長産物を生成することであって、第２の複数の試料インデックス伸長産物が、左ユニバーサル試料インデックス配列を有する左試料インデックス配列（１６０）と相補的である、生成することを更に含む。

40

【０４２３】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（ｆ１）：（ｉ）挿入領域（１１０）の配列を、（ｉｉ）右ユニバーサル試料インデックス配列（１７０）に直接結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を有する右試料インデックス配列に割り当て、それによって、挿入領域を、第１の供給源から得られたものとして特定することを更に含む。

【０４２４】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（ｆ２）：（ｉ）挿入領域（１１０）の配列を、（ｉｉ）右ユニバーサル試料インデックス配列（１７

50

0) に直接結合した短ランダム配列 (例えば、NNN) を有する右試料インデックス配列、及び (i i i) 左試料インデックス配列 (1 6 0) に割り当て、それによって、挿入領域を、第 1 の供給源から得られたものとして特定することを更に含む。

【0 4 2 5】

いくつかの実施形態において、ステップ (b) 及び (d) の複数のシーケンシング伸長産物の除去は、ホルムアミドを有する又は有しない SSC (例えば、生理食塩水-クエン酸ナトリウム) 緩衝液を含む変性試薬を使用して、核酸変性を促進する温度、例えば、50 ~ 90 °C で行われ得る。

【0 4 2 6】

いくつかの実施形態において、ステップ (a)、(c)、及び (e) のシーケンシングは、シーケンシングポリメラーゼ及び検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を用いる、本明細書に記載されるシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。いくつかの実施形態において、ステップ (a)、(c)、及び (e) のシーケンシングは、シーケンシングポリメラーゼ、検出可能に標識された多価分子、及びヌクレオチド類似体を用いる、本明細書に記載される 2 段階のシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。いくつかの実施形態において、ステップ (a)、(c)、及び (e) のシーケンシングは、本明細書に記載される結合によるシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。

【0 4 2 7】

いくつかの実施形態において、支持体に固定化された複数のテンプレート分子の密度は、 1 mm^2 当たり約 $10^2 \sim 10^{15}$ である。いくつかの実施形態において、複数のテンプレート分子は、支持体上のランダムな位置において固定化されている。いくつかの実施形態において、複数のテンプレート分子は、支持体上に所定のパターンで固定化されている。

【0 4 2 8】

第 3 の実施形態：試料インデックス配列をシーケンシングする順序

いくつかの実施形態において、シーケンシングの順序は、(1) 挿入領域 (1 1 0) をシーケンシングすることと、(2) 右試料インデックス (1 7 0) をシーケンシングすることと、(3) 左試料インデックス (1 6 0) をシーケンシングすることと、を含む。いくつかの実施形態において、左試料インデックス (1 6 0) は、左ユニバーサル試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、左試料インデックス (1 6 0) は、第 2 のランダム配列 (例えば、NNN) 及び左ユニバーサル試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、第 1 のランダム配列 (例えば、NNN) 及び右ユニバーサル試料インデックス配列を含む右試料インデックス領域 (1 7 0) をシーケンシングすることは、十分なヌクレオチド多様性を提供し得、これにより、左試料インデックス (1 6 0) をシーケンシングすることは、省略され得る。

【0 4 2 9】

いくつかの実施形態において、支持体に固定化されたテンプレート分子をシーケンシングするための方法において、個々のテンプレート分子は、(i) 第 1 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列 (1 2 0)、(i i) 左ユニバーサル試料インデックス配列を有する左試料インデックス配列 (1 6 0)、(i i i) フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列 (1 4 0)、(i v) 目的の配列 (1 1 0)、(v) リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列 (1 5 0)、(v i) 右ユニバーサル試料インデックス配列 (1 7 0) に直接結合した短ランダム配列 (例えば、NNN) を有する右試料インデックス配列、及び (v i i) 第 2 の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列 (1 3 0) を含み (例えば、図 5 及び 6 を参照されたい)、方法は、ステップ (a) : テンプレート分子を、フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列 (1 4 0) にハイブリダイズする第 1 の複数の可

10

20

30

40

50

溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、挿入領域（１１０）をシーケンシングし、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした複数の挿入伸長産物を生成することであって、複数の挿入伸長産物が、目的の配列（１１０）と相補的である、生成することを含む。

【０４３０】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（ｂ）：複数の挿入伸長産物を除去し、固定化されたテンプレート分子を保持することを更に含む。

【０４３１】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（ｃ）：テンプレート分子を、リバーシブルシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（１５０）にハイブリダイズする第２の複数の可溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、右試料インデックス配列（１７０）をシーケンシングすることであって、右試料インデックス配列（１７０）をシーケンシングすることが、短ランダム配列（例えば、ＮＮＮ）及び右ユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることを含み、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした第１の複数の試料インデックス伸長産物を生成し、第１の複数の試料インデックス伸長産物が、右ユニバーサル試料インデックス配列（１７０）に直接結合した短ランダム配列（例えば、ＮＮＮ）を有する右試料インデックス配列と相補的である、シーケンシングすることを更に含む。

【０４３２】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（ｄ）：第１の複数の試料インデックス伸長産物を除去し、固定化されたテンプレート分子を保持することを更に含む。

【０４３３】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（ｅ）：保持された固定化されたテンプレート分子を、第１の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列（１２０）にハイブリダイズする第３の複数の可溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、左試料インデックス配列（１６０）をシーケンシングし、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした第２の複数の試料インデックス伸長産物を生成することであって、第２の複数の試料インデックス伸長産物が、左ユニバーサル試料インデックス配列を有する左試料インデックス配列（１６０）と相補的である、生成することを更に含む。

【０４３４】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（ｆ１）：（ｉ）挿入領域（１１０）の配列を、（ｉｉ）右ユニバーサル試料インデックス配列（１７０）に直接結合した短ランダム配列（例えば、ＮＮＮ）を有する右試料インデックス配列に割り当て、それによって、挿入領域を、第１の供給源から得られたものとして特定することを更に含む。

【０４３５】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（ｆ２）：（ｉ）挿入領域（１１０）の配列を、（ｉｉ）右ユニバーサル試料インデックス配列（１７０）に直接結合した短ランダム配列（例えば、ＮＮＮ）を有する右試料インデックス配列、及び（ｉｉｉ）左試料インデックス配列（１６０）に割り当て、それによって、挿入領域を、第１の供給源から得られたものとして特定することを更に含む。

【０４３６】

いくつかの実施形態において、ステップ（ｂ）及び（ｄ）の複数のシーケンシング伸長産物の除去は、ホルムアミドを有する又は有しないＳＳＣ（例えば、生理食塩水－クエン酸ナトリウム）緩衝液を含む変性試薬を使用して、核酸変性を促進する温度、例えば、５０～９０℃で行われ得る。

【０４３７】

いくつかの実施形態において、ステップ（ａ）、（ｃ）、及び（ｅ）のシーケンシング

10

20

30

40

50

は、シーケンシングポリメラーゼ及び検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を用いる、本明細書に記載されるシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。いくつかの実施形態において、ステップ（a）、（c）、及び（e）のシーケンシングは、シーケンシングポリメラーゼ、検出可能に標識された多価分子、及びヌクレオチド類似体を用いる、本明細書に記載される２段階のシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。いくつかの実施形態において、ステップ（a）、（c）、及び（e）のシーケンシングは、本明細書に記載される結合によるシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。

【0438】

いくつかの実施形態において、支持体に固定化された複数のテンプレート分子の密度は、 1 mm^2 当たり約 $10^2 \sim 10^{15}$ である。いくつかの実施形態において、複数のテンプレート分子は、支持体上のランダムな位置において固定化されている。いくつかの実施形態において、複数のテンプレート分子は、支持体上に所定のパターンで固定化されている。

【0439】

第４の実施形態：シーケンシングの順序

いくつかの実施形態において、シーケンシングの順序は、（１）挿入領域（１１０）の最初の３～５個の塩基をシーケンシングすることと、（２）右試料インデックス（１７０）をシーケンシングすることと、右インデックスが、任意選択のランダム配列（例えば、NNN）及びユニバーサル試料インデックス配列を含む、シーケンシングすることと、（３）左試料インデックス（１６０）をシーケンシングすることと、を含む。いくつかの実施形態において、左試料インデックス（１６０）は、左ユニバーサル試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、左試料インデックス（１６０）は、第２のランダム配列（例えば、NNN）及び左ユニバーサル試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、挿入領域（１１０）の最初の３～５個の塩基をシーケンシングすることは、十分な配列多様性を提供し得、これにより、右試料インデックス（１７０）及び左試料インデックス（１６０）は、短ランダム配列（例えば、NNN）を含まない。いくつかの実施形態において、第１のランダム配列（例えば、NNN）及び右ユニバーサル試料インデックス配列を含む右試料インデックス領域（１７０）をシーケンシングすることは、十分なヌクレオチド多様性を提供し得、これにより、左試料インデックス（１６０）をシーケンシングすることは、省略され得る。

【0440】

いくつかの実施形態において、支持体に固定化されたテンプレート分子をシーケンシングするための方法において、個々のテンプレート分子は、（i）第１の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列（１２０）、（ii）左ユニバーサル試料インデックス配列を有する左試料インデックス配列（１６０）、（iii）フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（１４０）、（iv）目的の配列（１１０）、（v）リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（１５０）、（vi）右ユニバーサル試料インデックス配列（１７０）に直接結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を有する右試料インデックス配列、及び（vii）第２の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列（１３０）を含み（例えば、図５及び６を参照されたい）、方法は、ステップ（a）：テンプレート分子を、フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（１４０）にハイブリダイズする第１の複数の可溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、挿入領域（１１０）の最初の３～５個の塩基をシーケンシングし、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした複数の挿入伸長産物を生成することと、複数の挿入伸長産物が、目的の配列（１１０）と相補的である、生成することを含む。挿入領域（１１０）の最初の３～５個の塩基の配列は、ポロニーマッピング及びテンプレートの位置合わせのための十分な配列多様性及び色バランスを提供し得る。

【0441】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（b）：複数の挿入伸長産物を除去し、固定化されたテンプレート分子を保持することを更に含む。

【0442】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（c）：テンプレート分子を、リバーシブルシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（150）にハイブリダイズする第2の複数の可溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、右試料インデックス配列（170）をシーケンシングすることであって、右試料インデックス配列（170）をシーケンシングすることが、存在する場合、短ランダム配列（例えば、NNN）、及び右ユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることを含み、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした第1の複数の試料インデックス伸長産物を生成し、第1の複数の試料インデックス伸長産物が、右試料インデックス配列（170）と相補的である、シーケンシングすることを更に含む。

10

【0443】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（d）：第1の複数の試料インデックス伸長産物を除去し、固定化されたテンプレート分子を保持することを更に含む。

【0444】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（e）：保持された固定化されたテンプレート分子を、第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列（120）にハイブリダイズする第3の複数の可溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、左試料インデックス配列（160）をシーケンシングし、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした第2の複数の試料インデックス伸長産物を生成することであって、第2の複数の試料インデックス伸長産物が、左ユニバーサル試料インデックス配列を有する左試料インデックス配列（160）と相補的である、生成することを更に含む。

20

【0445】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（f）：第2の複数の試料インデックス伸長産物を除去し、固定化されたテンプレート分子を保持することを更に含む。

30

【0446】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（g）：テンプレート分子を、フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（140）にハイブリダイズする第4の複数の可溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、挿入領域（110）の完全長をシーケンシングし、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした複数の完全長挿入伸長産物を生成することであって、複数の完全長挿入伸長産物が、目的の配列（110）と相補的である、生成することを更に含む。

【0447】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（h1）：（i）挿入領域（110）の完全長配列を、（ii）右試料インデックス配列（170）に割り当て、それによって、挿入領域を、第1の供給源から得られたものとして特定することを更に含む。

40

【0448】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（h2）：（i）挿入領域（110）の完全長配列を、（ii）右試料インデックス配列（170）及び（iii）左試料インデックス配列（160）に割り当て、それによって、挿入領域を、第1の供給源から得られたものとして特定することを更に含む。

【0449】

いくつかの実施形態において、ステップ（b）、（d）、及び（f）の複数のシーケン

50

シング伸長産物の除去は、ホルムアミドを有する又は有しないSSC（例えば、生理食塩水－クエン酸ナトリウム）緩衝液を含む変性試薬を使用して、核酸変性を促進する温度、例えば、50～90℃で行われ得る。

【0450】

いくつかの実施形態において、ステップ（a）、（c）、（e）、及び（g）のシーケンシングは、シーケンシングポリメラーゼ及び検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を用いる、本明細書に記載されるシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。いくつかの実施形態において、ステップ（a）、（c）、（e）、及び（g）のシーケンシングは、シーケンシングポリメラーゼ、検出可能に標識された多価分子、及びヌクレオチド類似体を用いる、本明細書に記載される２段階のシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。いくつかの実施形態において、ステップ（a）、（c）、（e）、及び（g）のシーケンシングは、本明細書に記載される結合によるシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。

10

【0451】

いくつかの実施形態において、支持体に固定化された複数のテンプレート分子の密度は、 1 mm^2 当たり約 $10^2 \sim 10^{15}$ である。いくつかの実施形態において、複数のテンプレート分子は、支持体上のランダムな位置において固定化されている。いくつかの実施形態において、複数のテンプレート分子は、支持体上に所定のパターンで固定化されている。

【0452】

20

第5の実施形態：シーケンシングの順序

いくつかの実施形態において、シーケンシングの順序は、（１）固定化されたテンプレート分子の挿入領域（110）の最初の3～5個の塩基をシーケンシングする（例えば、フォワード方向でシーケンシングすることと、（２）右試料インデックス（170）をシーケンシングすることとあって、右インデックスが、第1のランダム配列（例えば、NNN）及び右ユニバーサル試料インデックス配列を含む、シーケンシングすることと、（３）左試料インデックス（160）をシーケンシングすることと、（４）ペアワイズターン反応を行い、これにより、固定化されたテンプレート分子が、テンプレート分子と相補的である固定化された鎖で置き換えられることと、（５）固定化された相補鎖の挿入領域（110）の完全長をシーケンシングする（例えば、リバース方向でシーケンシングすることと、を含む。いくつかの実施形態において、ライブラリ分子の集団の挿入領域（110）の最初の3～5個の塩基の配列は、改善されたベースコーリング精度のために十分な配列多様性を提供し得る。いくつかの実施形態において、左試料インデックス（160）は、左ユニバーサル試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、左試料インデックス（160）は、第2のランダム配列（例えば、NNN）及び左ユニバーサル試料インデックス配列を含む。いくつかの実施形態において、第1のランダム配列（例えば、NNN）及び右ユニバーサル試料インデックス配列を含む右試料インデックス領域（170）をシーケンシングすることは、十分なヌクレオチド多様性を提供し得、これにより、左試料インデックス（160）をシーケンシングすることは、省略され得る。

30

【0453】

40

いくつかの実施形態において、支持体に固定化されたテンプレート分子をシーケンシングするための方法において、個々のテンプレート分子は、ウラシル塩基を欠く固定化されたキャプチャープライマーに共有結合的に結合しており、個々のテンプレート分子は、ランダムに分配されたウラシル塩基を含み、個々のテンプレート分子は、（i）第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列（120）、（ii）左ユニバーサル試料インデックス配列を有する左試料インデックス配列（160）、（iii）フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（140）、（iv）目的の配列（110）、（v）リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（150）、（vi）右ユニバーサル試料インデックス配列（170）に直接結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を有する右試料インデックス配列、及び（vii）第2

50

の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列（１３０）を含み（例えば、図５及び６を参照されたい）、方法は、ステップ（a）：テンプレート分子を、フォワードシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（１４０）にハイブリダイズする第１の複数の可溶性シーケンシングプライマー（例えば、フォワードシーケンシングプライマー）とハイブリダイズさせ、挿入領域（１１０）の最初の３～５個の塩基をシーケンシングし、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした複数の挿入伸長産物を生成することであって、複数の挿入伸長産物が、目的の配列（１１０）と相補的である、生成することを含む。

【０４５４】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（b）：複数の挿入伸長産物を除去し、固定化されたテンプレート分子を保持することを更に含む。

10

【０４５５】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（c）：テンプレート分子を、リバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（１５０）にハイブリダイズする第２の複数の可溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、右試料インデックス配列（１７０）をシーケンシングすることであって、右試料インデックス配列（１７０）をシーケンシングすることが、短ランダム配列（例えば、NNN）及び右ユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることを含み、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした第１の複数の試料インデックス伸長産物を生成し、第１の複数の試料インデックス伸長産物が、右ユニバーサル試料インデックス配列（１７０）に直接結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を有する右試料インデックス配列と相補的である、シーケンシングすることを更に含む。

20

【０４５６】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（d）：第１の複数の試料インデックス伸長産物を除去し、固定化されたテンプレート分子を保持することを更に含む。

【０４５７】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（e）：保持された固定化されたテンプレート分子を、第１の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列（１２０）にハイブリダイズする第３の複数の可溶性シーケンシングプライマーとハイブリダイズさせ、左試料インデックス配列（１６０）をシーケンシングし、それによって、固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした第２の複数の試料インデックス伸長産物を生成することであって、第２の複数の試料インデックス伸長産物が、左ユニバーサル試料インデックス配列を有する左試料インデックス配列（１６０）と相補的である、生成することを更に含む。

30

【０４５８】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（f）：固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした第２の複数の試料インデックス伸長産物を、プライマー伸長反応を、鎖置換ポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドを使用して行うことによって置き換えて、固定化されたキャプチャープライマーを含む固定化されたテンプレート分子にハイブリダイズした伸長産物を生成することを更に含む。

40

【０４５９】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（g）：ステップ（f）において生成された伸長産物を保持しつつ、非塩基性部位を、固定化されたテンプレート分子において、ウラシル部位において生成し、ギャップを、非塩基性部位において生成することによって、固定化されたテンプレート分子を除去し、それによって、ギャップ含有テンプレート分子を生成することであって、個々の伸長産物が、固定化されたキャプチャープライマーにハイブリダイズしていることによって保持されている、生成することを更に含む。いくつかの実施形態において、ペアワイズターンは、ステップ（g）及び（h）を行うことによって達成される。

50

【0460】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（h）：保持された伸長産物を、リバーシシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（150）にハイブリダイズする第4の複数の可溶性シーケンシングプライマー（例えば、リバーシシーケンシングプライマー）とハイブリダイズさせ、挿入領域（110）をシーケンシングする（例えば、挿入領域（110）の少なくとも一部分又は完全長をシーケンシングする）ことを更に含む。

【0461】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（i1）：（i）挿入領域（110）の配列を、（ii）右ユニバーサル試料インデックス配列（170）に直接結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を有する右試料インデックス配列に割り当て、それによって、挿入領域を、第1の供給源から得られたものとして特定することを更に含む。

10

【0462】

いくつかの実施形態において、シーケンシングのための方法は、ステップ（i2）：（i）挿入領域（110）の配列を、（ii）右ユニバーサル試料インデックス配列（170）に直接結合した短ランダム配列（例えば、NNN）を有する右試料インデックス配列、及び（iii）左試料インデックス配列（160）に割り当て、それによって、挿入領域を、第1の供給源から得られたものとして特定することを更に含む。

20

【0463】

いくつかの実施形態において、ステップ（b）及び（d）の複数のシーケンシング伸長産物の除去は、ホルムアミドを有する又は有しないSSC（例えば、生理食塩水ークエン酸ナトリウム）緩衝液を含む変性試薬を使用して、核酸変性を促進する温度、例えば、50～90℃で行われ得る。

【0464】

いくつかの実施形態において、ステップ（a）、（c）、（e）、及び（h）のシーケンシングは、シーケンシングポリメラーゼ及び検出可能に標識されたヌクレオチド類似体を用いる、本明細書に記載されるシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。いくつかの実施形態において、ステップ（a）、（c）、（e）、及び（h）のシーケンシングは、シーケンシングポリメラーゼ、検出可能に標識された多価分子、及びヌクレオチド類似体を用いる、本明細書に記載される2段階のシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。いくつかの実施形態において、ステップ（a）、（c）、（e）、及び（h）のシーケンシングは、本明細書に記載される結合によるシーケンシング方法のうちのいずれかを行うことを含む。

30

【0465】

いくつかの実施形態において、支持体に固定化された複数のテンプレート分子の密度は、 1 mm^2 当たり約 $10^2 \sim 10^{15}$ である。いくつかの実施形態において、複数のテンプレート分子は、支持体上のランダムな位置において固定化されている。いくつかの実施形態において、複数のテンプレート分子は、支持体上に所定のパターンで固定化されている。

40

【0466】

ポロニーマップを生成するための、3塩基長ランダム配列のシーケンシング

本開示は、核酸をシーケンシングするための方法であって、（a）支持体上に固定化された（例えば、ランダムな又は所定の位置において固定化された）複数の核酸テンプレート分子を提供することであって、個々の固定化されたテンプレート分子が、挿入配列領域及び1つの試料インデックスを含み、各試料インデックスが、挿入配列の試料供給源を特定するユニバーサル試料インデックス配列に連結された3塩基長ランダム配列を含み、異なる固定化されたテンプレート分子が、異なる3塩基長ランダム配列及び同じユニバーサル試料インデックス配列を有し、固定化されたテンプレート分子が、異なる挿入配列を有する、提供することと、（b）複数の固定化されたテンプレート分子の3塩基長ランダム

50

配列のポリメラーゼ媒介性シーケンシング反応の3つのサイクルを、異なるタイプの核酸塩基 A、G、C、及び T / U の混合物を含む複数の検出可能に標識されたヌクレオチド試薬を使用して行うことであって、ヌクレオチド試薬が、各異なるタイプの核酸塩基に対応する異なる検出可能な色標識を含み、シーケンシングの3つのサイクルが、固定化されたテンプレート分子に結合した検出可能に標識されたヌクレオチド試薬から放出された光学色シグナルを検出及びイメージングし、それによって、複数の固定化されたテンプレート分子の個々のテンプレート分子における3塩基長ランダム配列の配列を決定することを含み、A、G、C、及び T / U の核酸塩基のバランスが保たれた多様性が、複数の固定化されたテンプレート分子のうち、第1、第2、及び第3のシーケンシングサイクルの各々において検出及びイメージングされる、行うことと、(c) 複数の固定化されたテンプレート分子の位置のマッピングを、ステップ(b)において得られた画像を使用して生成することであって、挿入領域の配列が、マッピングを生成するために使用されない、生成することと、を含む、方法を提供する。

10

【0467】

いくつかの実施形態において、核酸をシーケンシングするための方法において、ステップ(b)のバランスが保たれた多様性は、第1、第2、及び第3のシーケンシングサイクルの各々において検出及びイメージングされた核酸塩基 A、G、C、及び T / U の各々の約5〜85%、又は約5〜60%、又は約10〜50%、又は約15〜55%、又は約25〜75%である。

【0468】

いくつかの実施形態において、核酸をシーケンシングするための方法において、方法は、(a) 複数の固定化されたテンプレート分子のユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることと、(b) 複数の固定化されたテンプレート分子の挿入配列領域をシーケンシングすることと、(c) ステップ(b)で得られた所与のテンプレート分子の挿入配列を、ステップ(a)で得られた同じ所与のテンプレート分子からのユニバーサル試料インデックス配列に割り当て、それによって、所与の挿入配列の試料源を識別することと、を更に含む。

20

【0469】

いくつかの実施形態において、核酸をシーケンシングするための方法において、複数の核酸テンプレート分子は、第2の試料インデックスを更に含み、第2の試料インデックスは、挿入配列の試料供給源を特定する第2のユニバーサル試料インデックス配列を含み、第2の試料インデックスは、ランダム配列を欠く。

30

【0470】

いくつかの実施形態において、核酸をシーケンシングするための方法において、方法は、(a) 複数の固定化されたテンプレート分子の3塩基長ランダム配列をシーケンシングして、第1、第2、及び第3のシーケンシングサイクルの各々において検出及びイメージングされた A、G、C、及び T / U の核酸塩基のバランスが保たれた多様性を得て、複数の固定化されたテンプレート分子の位置のマッピングを生成することと、(b) 複数の固定化されたテンプレート分子の第1のユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることと、(c) 複数の固定化されたテンプレート分子の第2のユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることと、(d) 複数の固定化されたテンプレート分子の挿入配列領域をシーケンシングすることと、(e) ステップ(c)において得られた所与のテンプレート分子の挿入配列を、ステップ(a)及び(b)において得られた同じ所与のテンプレート分子からの第1及び第2のユニバーサル試料インデックス配列に割り当て、それによって、所与の挿入配列の試料供給源を特定することと、を更に含む。

40

【0471】

本開示は、核酸をシーケンシングするための方法であって、(a) 支持体上に固定化された(例えば、ランダムな又は所定の位置において固定化された)複数の核酸テンプレート分子を提供することであって、個々の固定化されたテンプレート分子が、挿入配列領域及び1つの試料インデックスを含み、各試料インデックスが、挿入配列の試料供給源を特

50

定するユニバーサル試料インデックス配列に連結された3塩基長ランダム配列を含み、ユニバーサル試料インデックス配列が、3つ～20個のヌクレオチドを含み、異なる固定化されたテンプレート分子が、異なる3塩基長ランダム配列及び同じユニバーサル試料インデックス配列を有し、固定化されたテンプレート分子が、異なる挿入配列を有する、提供することと、(b)複数の固定化されたテンプレート分子の3塩基長ランダム配列及びユニバーサル試料インデックス配列の第1の塩基位置のポリメラーゼ媒介性シーケンシング反応の4つのサイクルを、異なるタイプの核酸塩基A、G、C、及びT/Uの混合物を含む複数の検出可能に標識されたヌクレオチド試薬を使用して行うことであって、ヌクレオチド試薬が、各異なるタイプの核酸塩基に対応する異なる検出可能な色標識を含み、シーケンシングの4つのサイクルが、固定化されたテンプレート分子に結合した検出可能に標識されたヌクレオチド試薬から放出された光学色シグナルを検出及びイメージングし、それによって、複数の固定化されたテンプレート分子の個々のテンプレート分子における3塩基長ランダム配列及びユニバーサル試料インデックス配列の第1の塩基位置の配列を決定することを含み、A、G、C、及びT/Uの核酸塩基のバランスが保たれた多様性が、複数の固定化されたテンプレート分子のうち、第1、第2、第3、及び第4のシーケンシングサイクルの各々において検出及びイメージングされる、行うことと、(c)複数の固定化されたテンプレート分子の位置のマップを、ステップ(b)において得られた、ポリメラーゼ媒介性シーケンシング反応の4つのサイクルの画像を使用して生成することであって、挿入領域の配列が、マップを生成するために使用されない、生成することと、を含む、方法を提供する。

10

20

【0472】

いくつかの実施形態において、核酸をシーケンシングするための方法において、ステップ(b)のバランスが保たれた多様性は、第1、第2、第3、及び第4のシーケンシングサイクルの各々において検出及びイメージングされた核酸塩基A、G、C、及びT/Uの各々の約5～85%、又は約5～60%、又は約10～50%、又は約15～55%、又は約25～75%である。

【0473】

いくつかの実施形態において、核酸をシーケンシングするための方法において、方法は、(a)複数の固定化されたテンプレート分子のユニバーサル試料インデックス配列の残りの塩基位置をシーケンシングすることと、(b)複数の固定化されたテンプレート分子の挿入配列領域をシーケンシングすることと、(c)ステップ(b)で得られた所与のテンプレート分子の挿入配列を、ステップ(a)で得られた同じ所与のテンプレート分子からのユニバーサル試料インデックス配列に割り当て、それによって、所与の挿入配列の試料源を識別することと、を更に含む。

30

【0474】

いくつかの実施形態において、核酸をシーケンシングするための方法において、複数の核酸テンプレート分子は、第2の試料インデックスを更に含み、第2の試料インデックスは、挿入配列の試料供給源を特定する第2のユニバーサル試料インデックス配列を含み、第2の試料インデックスは、ランダム配列を欠く。

【0475】

いくつかの実施形態において、核酸をシーケンシングするための方法において、方法は、(a)複数の固定化されたテンプレート分子の3塩基長ランダム配列及びユニバーサル試料インデックス配列の第1の塩基位置をシーケンシングして、第1、第2、第3、及び第4のシーケンシングサイクルの各々において検出及びイメージングされたA、G、C、及びT/Uの核酸塩基のバランスが保たれた多様性を得て、複数の固定化されたテンプレート分子の位置のマップを生成することと、(b)複数の固定化されたテンプレート分子の第1のユニバーサル試料インデックス配列の残りの塩基位置をシーケンシングすることと、(c)複数の固定化されたテンプレート分子の第2のユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることと、(d)複数の固定化されたテンプレート分子の挿入配列領域をシーケンシングすることと、(e)ステップ(c)において得られた所与のテン

40

50

プレート分子の挿入配列を、ステップ（a）及び（b）において得られた同じ所与のテンプレート分子からの第1及び第2のユニバーサル試料インデックス配列に割り当て、それによって、所与の挿入配列の試料供給源を特定することと、を更に含む。

【0476】

いくつかの実施形態において、核酸をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、支持体は、ガラス又はプラスチック基質を含む。いくつかの実施形態において、支持体は、フローセルチャネル、フローセル、又はキャピラリールーメン上で構成されている。いくつかの実施形態において、支持体は、45度以下の水接触角を有する少なくとも1つの親水性ポリマーコーティングで不動態化されている。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの親水性ポリマーコーティングは、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリ（ビニルアルコール）（PVA）、ポリ（ビニルピリジン）、ポリ（ビニルピロリドン）（PVP）、ポリ（アクリル酸）（PAA）、ポリアクリルアミド、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAM）、ポリ（メチルメタクリレート）（PMA）、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）（HEMA）、ポリ（オリゴ（エチレングリコール）メチルエーテルメタクリレート）（POEGMA）、ポリグルタミン酸（PGA）、ポリリジン、ポリグルコシド、ストレプトアビジン、及びデキストランからなる群から選択される分子を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの親水性ポリマーコーティングは、少なくとも4つの分岐を有する分岐親水性ポリマー分子を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの親水性ポリマーコーティングは、少なくとも1000ダルトンの分子量を有するポリマー分子を含む。

【0477】

いくつかの実施形態において、核酸をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、固定化されたテンプレート分子は、挿入配列及び1つの試料インデックスのタンデムリピート配列を有する複数の固定化されたコンカテマー分子を含む。いくつかの実施形態において、固定化されたテンプレート分子は、挿入配列の1つのコピー及び1つの試料インデックスの1つのコピーを有する複数の異なるクラスター化されたテンプレート分子を含み、クラスター化されたテンプレート分子は、ブリッジ増幅を介して生成される。いくつかの実施形態において、支持体上のランダムな又は所定の位置において位置する固定化された核酸テンプレート分子の密度は、 1 mm^2 当たり $10^4 \sim 10^8$ である。いくつかの実施形態において、挿入配列の試料供給源は、ゲノムDNA、二本鎖cDNA、又は無細胞循環DNAである。

【0478】

いくつかの実施形態において、核酸をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬は、ヌクレオチドを含み、ヌクレオチドは各々、芳香族核酸塩基、5炭素糖部分、1つ～10個のリン酸基、及びフルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬は、ヌクレオチドを含み、ヌクレオチドは各々、芳香族核酸塩基、鎖終結基を3'炭素糖位において有する5炭素糖部分、1つ～10個のリン酸基、及びフルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬は、多価分子を含み、多価分子は各々、（1）コア、（2）複数のヌクレオチドアーム、及び（3）少なくとも1つのフルオロフォアを含み、個々のヌクレオチドアームは、（i）コア付着部分、（ii）PEG部分を含むスペーサー、（iii）リンカー、及び（iv）ヌクレオチド単位を含み、コアは、複数のヌクレオチドアームに付着しており、スペーサーは、リンカーに付着しており、リンカーは、ヌクレオチド単位に付着している。

【0479】

いくつかの実施形態において、核酸をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、ステップ（b）における固定化されたテンプレート分子に結合した検出可能に標識されたヌクレオチド試薬は、個々の固定化されたテンプレート分子を含み、個々の固定化されたテンプレート分子は、シーケンシングプライマーにハイブリダイズしており、二重鎖を形成し、二重鎖は、ポリメラーゼに結合しており、複合型ポリメラーゼを形成し

、複合型ポリメラーゼは、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬に結合している。いくつかの実施形態において、複合型ポリメラーゼは、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬に、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬を、複合型ポリメラーゼに結合させ、検出可能に標識されたヌクレオチドを、ハイブリダイズしたシーケンシングプライマー内に組み込むのに好適である条件下で結合しており、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬は、芳香族核酸塩基、5炭素糖部分、1つ～10個のリン酸基、及びフルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、複合型ポリメラーゼは、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬に、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬を、複合型ポリメラーゼに結合させ、検出可能に標識されたヌクレオチドを、ハイブリダイズしたシーケンシングプライマー内に組み込むのに好適である条件下で結合しており、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬は、芳香族核酸塩基、鎖終結基を3'炭素糖位において有する5炭素糖部分、1つ～10個のリン酸基、及びフルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、複合型ポリメラーゼは、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬に、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬を、複合型ポリメラーゼに結合させるのに好適である条件下で結合しており、条件は、ヌクレオチド組み込みを阻害するのに好適であり、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬は、多価分子を含み、多価分子は、(1) コア、(2) 複数のヌクレオチドアーム、及び(3) 少なくとも1つのフルオロフォアを含み、個々のヌクレオチドアームは、(i) コア付着部分、(ii) PEG部分を含むスペーサー、(iii) リンカー、及び(iv) ヌクレオチド単位を含み、コアは、複数のヌクレオチドアームに付着しており、スペーサーは、リンカーに付着しており、リンカーは、ヌクレオチド単位に付着している。

10

20

【0480】

いくつかの実施形態において、核酸をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、固定化されたテンプレート分子は、固定化されたコンカテマー分子を含み、固定化されたコンカテマー分子は、複数のシーケンシングプライマーにハイブリダイズしており、少なくとも第1及び第2の二重鎖を、同じコンカテマー分子上に形成し、第1及び二重鎖は、第1のポリメラーゼに結合しており、第2の二重鎖は、第2のポリメラーゼに結合しており、第1及び第2の複合型ポリメラーゼを形成し、方法は、(a) 複数の多価分子を、同じコンカテマーテンプレート分子上の第1及び第2の複合型ポリメラーゼに接触させることであって、個々の多価分子が、(1) コア、(2) 複数のヌクレオチドアーム、及び(3) 少なくとも1つのフルオロフォアを含み、個々のヌクレオチドアームが、(i) コア付着部分、(ii) PEG部分を含むスペーサー、(iii) リンカー、及び(iv) ヌクレオチド単位を含み、コアが、複数のヌクレオチドアームに付着しており、スペーサーが、リンカーに付着しており、リンカーが、ヌクレオチド単位に付着しており、接触させることが、複数の多価分子からの単一の多価分子を、第1及び第2の複合型ポリメラーゼに結合させるのに好適である条件下で行われ、単一の多価分子の第1のヌクレオチド単位が、コンカテマーテンプレート分子の第1の部分にハイブリダイズした第1のシーケンシングプライマーを含む第1の複合型ポリメラーゼに結合しており、それによって、第1の結合複合体を形成し、単一の多価分子の第2のヌクレオチド単位が、コンカテマーテンプレート分子の第2の部分にハイブリダイズした第2のシーケンシングプライマーを含む第2の複合型ポリメラーゼに結合しており、それによって、第2の結合複合体を形成し、同じ多価分子に結合した第1及び第2の結合複合体が、アビディティ複合体を形成し、接触させることが、第1及び第2の結合複合体における結合した第1及び第2のヌクレオチド単位のポリメラーゼ触媒組み込みを阻害するのに好適である条件下で行われる、接触させることと、(b) 同じコンカテマーテンプレート分子上の第1及び第2の結合複合体を検出することと、(c) 同じコンカテマーテンプレート分子上の第1及び第2の結合複合体を形成する検出可能に標識された多価分子から放出された光学色シグナルをイメージングすることと、(d) 第1の結合複合体における第1のヌクレオチド単位を特定し、それによって、コンカテマーテンプレート分子の第1の部分の配列を決定し、第2の結合複合体における第2のヌクレオチド単位を特定し、それによって、コンカテマーテン

30

40

50

プレート分子の第2の部分の配列を決定することと、を含む。

【0481】

ポロニーマップを生成するための、3塩基長ランダム配列のマルチプレックスシーケンシング

本開示は、核酸をマルチプレックスシーケンシングするための方法であって、(a)複数の第1のライブラリ分子における第1の複数のライブラリ分子各分子を提供することであって、第1の複数のライブラリ分子が、(i)第1の試料供給源に由来する挿入配列領域、(ii)第1のユニバーサル試料インデックス配列に連結された3塩基長ランダム配列を有する第1の試料インデックス、及び(iii)ランダム配列を欠く第2のユニバーサル試料インデックス配列を有する第2の試料インデックスを含み、第1及び第2のユニバーサル試料インデックス配列の組み合わせが、挿入配列の第1の試料供給源を固有に特定し、異なる第1のライブラリ分子が、異なる3塩基長ランダム配列を有し、異なる挿入配列を有する、提供することと、(b)複数の第2のライブラリ分子における第2の複数のライブラリ分子各分子を提供することであって、第2の複数のライブラリ分子が、(i)第2の試料供給源に由来する挿入配列領域、(ii)第3のユニバーサル試料インデックス配列に連結された3塩基長ランダム配列を有する第3の試料インデックス、及び(iii)ランダム配列を欠く第4のユニバーサル試料インデックス配列を有する第4の試料インデックスを含み、第3及び第4のユニバーサル試料インデックス配列の組み合わせが、挿入配列の第2の試料供給源を固有に特定し、異なる第2のライブラリ分子が、異なる3塩基長ランダム配列を有し、異なる挿入配列を有する、提供することと、(c)第1及び第2の複数のライブラリ分子をプールすることと、(d)プールされたライブラリ分子を、支持体上に分配し、増幅反応を行って、支持体に固定化された(例えば、ランダムな又は所定の位置において固定化された)複数のクローン的に増幅されたテンプレート分子を生成することと、(e)第1及び第3の試料インデックスの3塩基長ランダム配列のポリメラーゼ媒介性シーケンシング反応の3つのサイクルを、異なるタイプの核酸塩基A、G、C、及びT/Uの混合物を含む複数の検出可能に標識されたヌクレオチド試薬を使用して行うことであって、ヌクレオチド試薬が、各異なるタイプの核酸塩基に対応する異なる検出可能な色標識を含み、シーケンシングの3つのサイクルが、固定化された増幅されたテンプレート分子に結合した検出可能に標識されたヌクレオチド試薬から放出された光学色シグナルを検出及びイメージングし、それによって、複数の固定化されたテンプレート分子の個々のテンプレート分子における3塩基長ランダム配列の配列を決定することを含み、A、G、C、及びT/Uの核酸塩基のバランスが保たれた多様性が、複数の固定化された増幅されたテンプレート分子のうち、第1、第2、及び第3のシーケンシングサイクルの各々において検出及びイメージングされる、行うことと、(f)複数の固定化されたテンプレート分子の位置のマップを、ステップ(e)において得られた画像を使用して生成することであって、挿入領域の配列が、マップを生成するために使用されない、生成することと、を含む、方法を提供する。

【0482】

いくつかの実施形態において、核酸をマルチプレックスシーケンシングするための方法において、ステップ(e)のバランスが保たれた多様性は、第1、第2、及び第3のシーケンシングサイクルの各々において検出及びイメージングされた核酸塩基A、G、C、及びT/Uの各々の約5~85%、又は約5~60%、又は約10~50%、又は約15~55%、又は約25~75%である。

【0483】

いくつかの実施形態において、核酸をマルチプレックスシーケンシングするための方法において、方法は、(a)複数の固定化されたテンプレート分子の第1のユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることと、(b)複数の固定化されたテンプレート分子の第2のユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることと、(c)第1のライブラリ分子に由来する複数の固定化されたテンプレート分子の挿入配列領域をシーケンシングすることと、(d)ステップ(c)で得られた所与のテンプレート分子の

挿入配列を、同じ所与のテンプレート分子からの第1及び第2のユニバーサル試料インデックス配列に割り当て、それによって、所与の挿入配列の第1の試料源を識別することと、を更に含む。

【0484】

いくつかの実施形態において、核酸をマルチプレックスシーケンシングするための方法において、方法は、(a)複数の固定化されたテンプレート分子の第3のユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることと、(b)複数の固定化されたテンプレート分子の第4のユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることと、(c)第2のライブラリ分子に由来する複数の固定化されたテンプレート分子の挿入配列領域をシーケンシングすることと、(d)ステップ(c)で得られた所与のテンプレート分子の挿入配列を、同じ所与のテンプレート分子からの第3及び第4のユニバーサル試料インデックス配列に割り当て、それによって、所与の挿入配列の第2の試料源を識別することと、を更に含む。

【0485】

本開示は、核酸をマルチプレックスシーケンシングするための方法であって、(a)複数の第1のライブラリ分子における第1の複数のライブラリ分子各分子を提供することであって、第1の複数のライブラリ分子が、(i)第1の試料供給源に由来する挿入配列領域、(ii)第1のユニバーサル試料インデックス配列に連結された3塩基長ランダム配列を有する第1の試料インデックス、及び(iii)ランダム配列を欠く第2のユニバーサル試料インデックス配列を有する第2の試料インデックスを含み、第1及び第2のユニバーサル試料インデックス配列の組み合わせが、挿入配列の第1の試料供給源を固有に特定し、第1のユニバーサル試料インデックス配列が、3つ〜20個のヌクレオチドを含み、異なる第1のライブラリ分子が、異なる3塩基長ランダム配列を有し、異なる挿入配列を有する、提供することと、(b)複数の第2のライブラリ分子における第2の複数のライブラリ分子各分子を提供することであって、第2の複数のライブラリ分子が、(i)第2の試料供給源に由来する挿入配列領域、(ii)第3のユニバーサル試料インデックス配列に連結された3塩基長ランダム配列を有する第3の試料インデックス、及び(iii)ランダム配列を欠く第4のユニバーサル試料インデックス配列を有する第4の試料インデックスを含み、第3及び第4のユニバーサル試料インデックス配列の組み合わせが、挿入配列の第2の試料供給源を固有に特定し、第3のユニバーサル試料インデックス配列が、3つ〜20個のヌクレオチドを含み、異なる第2のライブラリ分子が、異なる3塩基長ランダム配列を有し、異なる挿入配列を有する、提供することと、(c)第1及び第2の複数のライブラリ分子をプールすることと、(d)プールされたライブラリ分子を、支持体上に分配し、増幅反応を行って、支持体に固定化された(例えば、ランダムな又は所定の位置において固定化された)複数のクローン的に増幅されたテンプレート分子を生成することと、(e)第1及び第3の試料インデックスの3塩基長ランダム配列のポリメラーゼ媒介性シーケンシング反応の4つのサイクル、並びに第1及び第3のユニバーサル試料インデックス配列の第1の塩基位置のシーケンシングを、異なるタイプの核酸塩基A、G、C、及びT/Uの混合物を含む複数の検出可能に標識されたヌクレオチド試薬を使用し、行うことであって、ヌクレオチド試薬が、各異なるタイプの核酸塩基に対応する異なる検出可能な色標識を含み、シーケンシングの3つのサイクルが、固定化された増幅されたテンプレート分子に結合した検出可能に標識されたヌクレオチド試薬から放出された光学色シグナルを検出及びイメージングし、それによって、複数の固定化されたテンプレート分子の個々のテンプレート分子における3塩基長ランダム配列の配列を決定することを含み、A、G、C、及びT/Uの核酸塩基のバランスが保たれた多様性が、複数の固定化された増幅されたテンプレート分子のうち、第1、第2、第3、及び第4のシーケンシングサイクルの各々において検出及びイメージングされる、行うことと、(f)複数の固定化されたテンプレート分子の位置のマッピングを、ステップ(e)において得られた画像を使用して生成することであって、挿入領域の配列が、マッピングを生成するために使用されない、生成することと、を含む、方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0486】

いくつかの実施形態において、核酸をマルチプレックスシーケンシングするための方法において、ステップ（e）のバランスが保たれた多様性は、第1、第2、第3、及び第4のシーケンシングサイクルの各々において検出及びイメージングされた核酸塩基A、G、C、及びT／Uの各々の約5～85%、又は約5～60%、又は約10～50%、又は約15～55%、又は約25～75%である。

【0487】

いくつかの実施形態において、核酸をマルチプレックスシーケンシングするための方法において、方法は、（a）複数の固定化されたテンプレート分子の第1のユニバーサル試料インデックス配列の残りの塩基位置をシーケンシングすることと、（b）複数の固定化されたテンプレート分子の第2のユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることと、（c）第1のライブラリ分子に由来する複数の固定化されたテンプレート分子の挿入配列領域をシーケンシングすることと、（d）ステップ（c）で得られた所与のテンプレート分子の挿入配列を、同じ所与のテンプレート分子からの第1及び第2のユニバーサル試料インデックス配列に割り当て、それによって、所与の挿入配列の第1の試料源を識別することと、を更に含む。

10

【0488】

いくつかの実施形態において、核酸をマルチプレックスシーケンシングするための方法において、方法は、（a）複数の固定化されたテンプレート分子の第3のユニバーサル試料インデックス配列の残りの塩基位置をシーケンシングすることと、（b）複数の固定化されたテンプレート分子の第4のユニバーサル試料インデックス配列をシーケンシングすることと、（c）第2のライブラリ分子に由来する複数の固定化されたテンプレート分子の挿入配列領域をシーケンシングすることと、（d）ステップ（c）で得られた所与のテンプレート分子の挿入配列を、同じ所与のテンプレート分子からの第3及び第4のユニバーサル試料インデックス配列に割り当て、それによって、所与の挿入配列の第2の試料源を識別することと、を更に含む。

20

【0489】

いくつかの実施形態において、核酸をマルチプレックスシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、支持体は、ガラス又はプラスチック基質を含む。いくつかの実施形態において、支持体は、フローセルチャネル、フローセル、又はキャピラリールーメン上で構成されている。いくつかの実施形態において、支持体は、45度以下の水接触角を有する少なくとも1つの親水性ポリマーコーティングで不動態化されている。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの親水性ポリマーコーティングは、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリ（ビニルアルコール）（PVA）、ポリ（ビニルピリジン）、ポリ（ビニルピロリドン）（PVP）、ポリ（アクリル酸）（PAA）、ポリアクリルアミド、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAM）、ポリ（メチルメタクリレート）（PMA）、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）（HEMA）、ポリ（オリゴ（エチレングリコール）メチルエーテルメタクリレート）（POEGMA）、ポリグルタミン酸（PGA）、ポリリジン、ポリグルコシド、ストレプトアビジン、及びデキストランからなる群から選択される分子を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの親水性ポリマーコーティングは、少なくとも4つの分岐を有する分岐親水性ポリマー分子を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの親水性ポリマーコーティングは、少なくとも1000ダルトンの分子量を有するポリマー分子を含む。

30

40

【0490】

いくつかの実施形態において、核酸をマルチプレックスシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、固定化されたテンプレート分子は、挿入配列及び1つの試料インデックスのタンデムリピート配列を有する複数の固定化されたコンカテマー分子を含む。いくつかの実施形態において、固定化されたテンプレート分子は、挿入配列の1つのコピー及び1つの試料インデックスの1つのコピーを有する複数の異なるクラスター化さ

50

れたテンプレート分子を含み、クラスター化されたテンプレート分子は、ブリッジ増幅を介して生成される。いくつかの実施形態において、支持体上の固定化された（例えば、ランダムな又は所定の位置において固定化された）核酸テンプレート分子の密度は、 1 mm^2 当たり $10^4 \sim 10^8$ である。いくつかの実施形態において、挿入配列の試料供給源は、ゲノム DNA、二本鎖 cDNA、又は無細胞循環 DNA である。

【0491】

いくつかの実施形態において、核酸をマルチプレックスシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬は、ヌクレオチドを含み、ヌクレオチドは各々、芳香族核酸塩基、5 炭素糖部分、1 つ～10 個のリン酸基、及びフルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬は、ヌクレオチドを含み、ヌクレオチドは各々、芳香族核酸塩基、鎖終結基を 3' 炭素糖位において有する 5 炭素糖部分、1 つ～10 個のリン酸基、及びフルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬は、多価分子を含み、多価分子は各々、(1) コア、(2) 複数のヌクレオチドアーム、及び (3) 少なくとも 1 つのフルオロフォアを含み、個々のヌクレオチドアームは、(i) コア付着部分、(ii) PEG 部分を含むスペーサー、(iii) リンカー、及び (iv) ヌクレオチド単位を含み、コアは、複数のヌクレオチドアームに付着しており、スペーサーは、リンカーに付着しており、リンカーは、ヌクレオチド単位に付着している。

【0492】

いくつかの実施形態において、核酸をマルチプレックスシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、ステップ (e) における固定化されたテンプレート分子に結合した検出可能に標識されたヌクレオチド試薬は、個々の固定化されたテンプレート分子を含み、個々の固定化されたテンプレート分子は、シーケンシングプライマーにハイブリダイズしており、二重鎖を形成し、二重鎖は、ポリメラーゼに結合しており、複合型ポリメラーゼを形成し、複合型ポリメラーゼは、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬に結合している。いくつかの実施形態において、複合型ポリメラーゼは、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬に、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬を、複合型ポリメラーゼに結合させ、検出可能に標識されたヌクレオチドを、ハイブリダイズしたシーケンシングプライマー内に組み込むのに好適である条件下で結合しており、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬は、芳香族核酸塩基、5 炭素糖部分、1 つ～10 個のリン酸基、及びフルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、複合型ポリメラーゼは、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬に、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬を、複合型ポリメラーゼに結合させ、検出可能に標識されたヌクレオチドを、ハイブリダイズしたシーケンシングプライマー内に組み込むのに好適である条件下で結合しており、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬は、芳香族核酸塩基、鎖終結基を 3' 炭素糖位において有する 5 炭素糖部分、1 つ～10 個のリン酸基、及びフルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、複合型ポリメラーゼは、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬に、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬を、複合型ポリメラーゼに結合させるのに好適である条件下で結合しており、条件は、ヌクレオチド組み込みを阻害するのに好適であり、検出可能に標識されたヌクレオチド試薬は、多価分子を含み、多価分子は、(1) コア、(2) 複数のヌクレオチドアーム、及び (3) 少なくとも 1 つのフルオロフォアを含み、個々のヌクレオチドアームは、(i) コア付着部分、(ii) PEG 部分を含むスペーサー、(iii) リンカー、及び (iv) ヌクレオチド単位を含み、コアは、複数のヌクレオチドアームに付着しており、スペーサーは、リンカーに付着しており、リンカーは、ヌクレオチド単位に付着している。

【0493】

いくつかの実施形態において、核酸をマルチプレックスシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、固定化されたテンプレート分子は、固定化されたコンカテマー分子を含み、固定化されたコンカテマー分子は、複数のシーケンシングプライマーにハイブリダイズしており、少なくとも第 1 及び第 2 の二重鎖を、同じコンカテマー分子上に

形成し、第1及び二重鎖は、第1のポリメラーゼに結合しており、第2の二重鎖は、第2のポリメラーゼに結合しており、第1及び第2の複合型ポリメラーゼを形成し、方法は、
(a) 複数の多価分子を、同じコンカテマーテンプレート分子上の第1及び第2の複合型ポリメラーゼに接触させることであって、個々の多価分子が、(1) コア、(2) 複数のヌクレオチドアーム、及び(3) 少なくとも1つのフルオロフォアを含み、個々のヌクレオチドアームが、(i) コア付着部分、(ii) PEG部分を含むスペーサー、(iii) リンカー、及び(iv) ヌクレオチド単位を含み、コアが、複数のヌクレオチドアームに付着しており、スペーサーがリンカーに付着しており、リンカーがヌクレオチド単位に付着しており、接触させることが、複数からの単一の多価分子を第1及び第2の複合型ポリメラーゼに結合するのに好適な条件下で行われ、単一の多価分子の第1のヌクレオチド単位が、コンカテマーテンプレート分子の第1の部分にハイブリダイズした第1のシーケンシングプライマーを含む第1の複合型ポリメラーゼに結合し、それによって第1の結合複合体を形成し、単一の多価分子の第2のヌクレオチド単位が、コンカテマーテンプレート分子の第2の部分にハイブリダイズした第2のシーケンシングプライマーを含む第2の複合型ポリメラーゼに結合し、それによって第2の結合複合体を形成し、同じ多価分子に結合する第1及び第2の結合複合体が、アビディティ複合体を形成し、接触することが、第1及び第2の結合複合体における、結合した第1及び第2のヌクレオチド単位の、ポリメラーゼ触媒組み込みを阻害するのに好適な条件下で行われる、接触することと、(b) 同じコンカテマーテンプレート分子上で、第1及び第2の結合複合体を検出することと、(c) 同じコンカテマーテンプレート分子上で、第1及び第2の結合複合体を形成する検出可能に標識された多価分子から放出された光カラーシグナルをイメージングすることと、(d) 第1の結合複合体における第1のヌクレオチド単位を識別し、それによって、コンカテマーテンプレート分子の第1の部分の配列を判定し、第2の結合複合体における第2のヌクレオチド単位を識別し、それによって、コンカテマーテンプレート分子の第2の部分の配列を識別することと、を含む。

10

20

【0494】

ライブラリ分子

本開示は、核酸ライブラリ分子(100)、並びにライブラリースプリント複合体(500)及び共有結合性閉環状ライブラリ分子(600)を調製するための方法を提供する。核酸ライブラリ分子は、DNA、RNA、cDNA、又はキメラDNA/RNAを含む。核酸ライブラリ分子は、一本鎖又は二本鎖であってもよく、又は一本鎖又は二本鎖部分を含んでもよい。核酸ライブラリ分子は、直鎖、コンカテマー、共有結合性閉環状、ダンベル、ヘアピン、又は他の形態であることができる。

30

【0495】

本明細書に記載される核酸ライブラリ分子とは、典型的には、核酸分子の集団であって、核酸分子が各々、少なくとも1つのユニバーサルアダプター配列(例えば、(120)及び(130))に共有結合的に連結された目的の配列(例えば、挿入(100))を含む、核酸分子の集団を指す。集団における個々のライブラリ分子は、追加のユニバーサルアダプター配列を含むことができ、少なくとも1つのインデックス配列又は固有識別配列を更に含むことができる。集団における個々のライブラリ分子は、目的の配列を有することができ、目的の配列は、集団における他のライブラリ分子と同じである又は異なる。

40

【0496】

核酸ライブラリ分子の挿入領域は、いずれかの供給源から抽出される目的の配列を含み、供給源は、生体試料(例えば、新鮮又は生試料)、例えば、単一の細胞、複数の細胞、又は組織を含む。挿入領域は、健常な又は疾患細胞又は組織から単離され得る。挿入領域は、アーカイブされた試料、例えば、新鮮な凍結したパラフィン包埋(FFPE)試料から得られてもよく、又は針生検、循環腫瘍細胞、無細胞循環DNA(例えば、腫瘍細胞又は胎仔からのもの)から得られてもよい。細胞又は組織は、典型的には、溶解緩衝液で処理されて、それらのDNA及びRNAを遊離し、所望の核酸は、所望されない巨大分子、例えば、タンパク質から分離される。

50

【0497】

核酸ライブラリ分子の挿入領域は、いずれかの形態で単離され得、形態は、染色体、ゲノム（例えば、全ゲノム）、オルガネラ（例えば、ミトコンドリア、葉緑体、又はリボソーム）、組換え分子、クローニング、又は増幅の形態を含む。核酸ライブラリ分子の挿入領域は、メチル化又は非メチル化され得る。

【0498】

挿入領域は、ウイルス、真菌、原核生物、又は真核生物を含むいずれかの生物から単離され得る。挿入領域は、ヒト、サル、類人猿、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、マウス、ブタ、ヤギ、オオカミ、カエル、魚、植物、昆虫、又は細菌を含むいずれかの生物から単離され得る。挿入領域は、空気、水、土壌、又は食物由来の生物から単離され得る。

10

【0499】

挿入領域は、いずれかの生体液から単離され得、生体液は、血液、尿、血清、リンパ液、腫瘍、唾液、肛門分泌物、膣分泌物、羊水試料、汗、精液、環境試料、又は培養試料を含む。挿入領域は、いずれかの臓器から単離され得、臓器は、頭部、頸部、脳、乳房、卵巣、子宮頸部、結腸、直腸、子宮内膜、胆嚢、腸、膀胱、前立腺、精巣、肝臓、肺、腎臓、食道、脾臓、甲状腺、下垂体、胸腺、皮膚、心臓、喉頭、又は他の臓器を含む。

【0500】

挿入領域は、組換え核酸技術を使用して調製され得、組換え核酸技術は、ベクタークローニング、遺伝子導入宿主細胞調製、宿主細胞培養、及び／又はPCR増幅のいずれかの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

20

【0501】

挿入領域は、少なくとも1つのユニバーサルアダプター配列に一方又は両方の末端において付加されて、組換え核酸ライブラリ分子を形成することができる。ユニバーサルアダプター配列は、化学合成手順を使用して調製され得、化学合成手順は、酵素消化に対する耐性又は増加した熱安定性を含むある特性を付与するヌクレオチド類似体又は修飾ヌクレオチド結合を有する又は有しない天然ヌクレオチドを使用する。ヌクレアーゼ消化を阻害するヌクレオチド類似体及び修飾ヌクレオチド結合の例としては、ホスホロチオエート、2'-O-メチルRNA、逆位dT、及び2'3'ジデオキシ-dTが挙げられる。ロックド核酸(LNA)を含む挿入領域は、増加した熱安定性を有する。

【0502】

挿入領域は、断片化された又は断片化されていない形態であり得る。断片化された挿入領域は、機械的力、酵素又は化学断片化方法によって得られ得る。断片化された挿入領域は、オーバーラップ配列又は非オーバーラップ配列を有する断片の集団をもたらす手順を使用して生成され得る。

30

【0503】

機械的断片化は、典型的には、ランダムに断片化された核酸分子を生成する。機械的断片化方法は、機械的剪断、例えば、流体剪断、一定剪断、及びパルス剪断を含む。機械的断片化方法はまた、超音波処理、噴霧、及び音響キャビテーションを含む機械的応力を含む。

【0504】

酵素断片化手順は、ランダムに又は非ランダムに断片化された核酸分子を生成するのに好適である条件下で行われ得る。例えば、制限エンドヌクレアーゼ酵素消化が、完了まで行われて、非ランダムに断片化された核酸分子を生成することができる。代替として、部分的又は不完全制限酵素消化が、ランダムに断片化された核酸分子を生成するように行われ得る。制限エンドヌクレアーゼ酵素を使用する酵素断片化は、I型、II型、IIs型、IIB型、III型、又はIV型制限酵素からなる群から選択される制限酵素いずれか1つ又は2つ以上のいずれかの組み合わせを含む。酵素断片化は、希少な切断制限酵素での核酸の消化を含み、希少な切断制限酵素は、Not I、Asc I、Bae I、AspC I、Pac I、Fse I、Sap I、Sfi I、又はPsr Iを含む。酵素断片化は、ニッキング制限エンドヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、及び／又は

40

50

エキソヌクレアーゼのいずれかの組み合わせの使用を含む。酵素断片化は、ニック翻訳反応を行うことによって達成され得る。

【0505】

挿入領域の断片は、配列特異的プライマーを使用するPCRで生成され得、配列特異的プライマーは、ゲノムDNA試料における標的領域にハイブリダイズして、既知の断片長さ及び配列を有する挿入領域を生成する。

【0506】

CRISPR/Cas9を使用する標的ゲノム断片化方法が、断片化された挿入領域を生成するために使用され得る。

【0507】

挿入部分の断片はまた、NEXTERA (Epicentreから)を使用するトランスポザーゼベースのタグ化方法を使用して生成され得る。

【0508】

挿入領域は、一本鎖又は二本鎖であることができる。二本鎖挿入領域の末端は、平滑末端であってもよく、又は5'オーバーハング若しくは3'オーバーハング末端を有してもよく、又はそれらのいずれかの組み合わせを有してもよい。挿入領域の一方又は両方の末端は、末端トランスフェラーゼ反応を使用することによって非テンプレートポリAテールを生成するための酵素テール反応に供され得る。挿入領域の末端は、少なくとも1つのユニバーサルアダプター配列への連結に適合性であることができる。

【0509】

挿入領域は、いずれかの長さであることができ、例えば、挿入領域は、約50~250、又は約250~500、又は約500~750、又は約750~1000塩基又は塩基対長であることができる。

【0510】

挿入領域を含有する断片は、サイズ選択プロセスに供されてもよく、又は断片は、サイズ選択されない。例えば、断片は、ゲル電気泳動及びゲルスライス抽出によってサイズ選択され得る。断片は、固相接着／固定化方法を使用してサイズ選択され得、固相接着／固定化方法は、典型的には、微小常磁性ビーズを用い、微小常磁性ビーズは、核酸とある特定のイオン強度条件下で相互作用する化学官能基でコーティングされており、ポリエチレングリコール又はポリアルキレングリコールを有する又は有しない。市販の固相接着ビーズは、Beckman CoulterからのSPRI (固相可逆固定化) ビーズ (AMPUR XP常磁性ビーズ、カタログ番号B23318)、MAGNA PURE磁性ガラス粒子 (Roche Diagnostics、カタログ番号03003990001)、PromegaからのMAGNASIL常磁性ビーズ (カタログ番号MD1360)、Precision System ScienceからのMAGTRATION常磁性ビーズ及びシステム (カタログ番号A1120及びA1060)、Omega Bio-TekからのMAG-BIND (カタログ番号M1378-01)、MilliporeからのMAGPREPシリカ (カタログ番号101193)、Bangs LaboratoriesからのSNARE DNA精製システム (カタログ番号BP691、BP692、及びBP693)、並びにPerkin ElmerからのCHEMAGEN M-PVAビーズ (カタログ番号CMG-200) を含む。

【0511】

挿入領域は、リガーゼ酵素及び／又はプライマー伸長反応を使用して、少なくとも1つのユニバーサルアダプター配列に一方又は両方の末端において連結され得る。挿入領域とユニバーサルアダプター (複数可) との間の共有結合は、DNA又はRNAリガーゼで達成され得る。二本鎖DNA分子をライゲーションすることができる例示的なDNAリガーゼは、T4 DNAリガーゼ及びT7 DNAリガーゼを含む。ユニバーサルアダプター配列は、挿入配列に、プライマー伸長又はPCRによって、ユニバーサルアダプター配列を保有する5'領域、及び挿入配列の一部分と相補的である3'領域を有するテール付きプライマーを使用して付加され得る。ユニバーサルアダプター配列は、第1及び第2のユニ

10

20

30

40

50

バーサルアダプター配列と一方の側又は両方の側において隣接する挿入配列に、プライマー伸長又はPCRによって、第3のユニバーサルアダプター配列を保有する5'領域、及び第1又は第2のユニバーサルアダプター配列の一部分と相補的である3'領域を有するテール付きプライマーを使用して付加され得る。

【0512】

いくつかの実施形態において、ライブラリ分子(100)は、ライゲーション反応及び少なくとも1つのプライマー伸長反応を用いることによって生成され得る。ライブラリ分子は、(a) 目的の配列(例えば、二本鎖挿入領域(110))を含む二本鎖核酸断片を提供すること、(b) 二本鎖挿入領域(110)の第1の末端を、第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)を有する第1の二本鎖アダプターに連結し、二本鎖挿入領域(110)の第2の末端を、第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)を有する第2の二本鎖アダプターに連結することであって、連結が、DNAリガーゼ酵素を使用して行われて、二本鎖組換え分子を生成する、連結することによって生成され得る。いくつかの実施形態において、ステップ(b)の第1及び第2の二本鎖アダプターは、Y字形アダプターを含む。いくつかの実施形態において、Y字形アダプターは、一緒にハイブリダイズして二本鎖二重鎖領域及びミスマッチ一本鎖領域を形成する部分的に相補的な領域を有する第1及び第2のオリゴヌクレオチド鎖を含む。いくつかの実施形態において、第1のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも一部分は、第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)又はその相補的配列を含む。いくつかの実施形態において、第2のオリゴヌクレオチド鎖の少なくとも一部分は、第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)又はその相補的配列を含む。ライブラリ分子を生成するための方法は、(c) ステップ(b)の二本鎖組換え分子を変性させて、一本鎖組換え分子を生成することと、(d) 一本鎖組換え分子を、第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)を保有する5'領域、及び第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)の少なくとも一部分と相補的である3'領域を有する第1のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、プライマー伸長反応を行って、それによって、二本鎖テール付き分子を生成することと、を更に含む。いくつかの実施形態において、ステップ(d)の第1のテール付きプライマーは、第1の左インデックス配列(160)を含む。ライブラリ分子を生成するための方法は、(e) 二本鎖テール付き分子を、第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)を保有する5'領域、及び第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)の少なくとも一部分と相補的である3'領域を有する第2のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、プライマー伸長反応を行って、それによって、第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)、第2の左ユニバーサルアダプター配列(140)、挿入領域(110)、第2の右ユニバーサルアダプター配列(150)、及び第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)を含むライブラリ分子を生成することを更に含む。いくつかの実施形態において、ステップ(e)の第2のテール付きプライマーは、第1の右インデックス配列(170)を含む。いくつかの実施形態において、ライブラリ分子は、ライゲーション及びプライマー伸長反応を使用し、ステップ(a)～(e)を行い、PCR反応で生成され得る。いくつかの実施形態において、ライブラリ分子は、ライゲーション及びプライマー伸長反応を使用し、ステップ(a)～(e)を行い、非PCR反応で生成され得、これは、増幅バイアスを低減する。いくつかの実施形態において、ライブラリ分子を生成するための方法において、第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)は、第1の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列(又はその相補的配列)を含む。いくつかの実施形態において、ライブラリ分子における第1の左ユニバーサルアダプター配列(120)は、第1のスプリント鎖(320)の第1の領域に結合することができる。いくつかの実施形態において、ライブラリ分子を生成するための方法において、第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)は、第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列(又はその相補的配列)を含む。いくつかの実施形態において、ライブラリ分子における第1の右ユニバーサルアダプター配列(130)は、第1のスプリント鎖(330)の第2の領域に結合することができる。いくつかの実施形態において、ライブラリ分子を生成するための方法において、第2の左

10

20

30

40

50

ユニバーサルアダプター配列（１４０）は、第１のシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（又はその相補的配列）を含む。いくつかの実施形態において、ライブラリ分子を生成するための方法において、第２の右ユニバーサルアダプター配列（１５０）は、第２のシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列（又はその相補的配列）を含む。

【０５１３】

いくつかの実施形態において、ライブラリ分子を生成するための方法は、追加のユニバーサルアダプター配列を、ライブラリ分子（１００）に、少なくとも１つのプライマー伸長反応又はPCRを、追加のテール付きプライマーを使用して行うことによって付加することを更に含む（例えば、図４、５、６又は７）。いくつかの実施形態において、追加のテール付きプライマーを用いる付加方法は、追加のユニバーサルアダプター配列を、ライブラリ分子に付加するために使用されてもよく、又はライブラリ分子におけるユニバーサルアダプター配列の少なくとも一部分を置き換えるために使用されてもよい。いくつかの実施形態において、追加のテール付きプライマーは、第１の追加のユニバーサルアダプター配列を保有する５'領域、及び第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）の少なくとも一部と相補的である３'領域を含み、追加のテール付きプライマーにおける第１の追加のユニバーサルアダプター配列は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第１若しくは第２の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。いくつかの実施形態において、追加のテール付きプライマーは、第２の追加のユニバーサルアダプター配列を保有する５'領域、及び第１の右ユニバーサルアダプター配列（１３０）の少なくとも一部と相補的である３'領域を含み、追加のテール付きプライマーにおける第２の追加のユニバーサルアダプター配列は、フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、第１若しくは第２の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又はコンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む。

【０５１４】

いくつかの実施形態において、追加のユニバーサルアダプター配列を核酸ライブラリ分子に付加するための方法は、ステップ（a）複数の核酸ライブラリ分子（１００）を提供することであって、複数の核酸ライブラリ分子（１００）が各々、５'から３'の順序で配置された配列である、（i）第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）、（ii）第２の左ユニバーサルアダプター配列（１４０）、（iii）目的の配列（１１０）、（iv）第２の右ユニバーサルアダプター配列（１５０）、及び（v）第１の右ユニバーサルアダプター配列（１３０）を含む、提供することと、ステップ（b）ステップ（a）の個々のライブラリ分子を、第１のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第１のプライマー伸長反応（又は第１のPCR）を行うことであって、第１のテール付きプライマーが、第３の左ユニバーサルアダプター配列を保有する５'領域、及びライブラリ分子（１００）の第１の左ユニバーサルアダプター配列（１２０）の少なくとも一部分と相補的である３'領域を含み、第１のプライマー伸長反応（又は第１のPCR）が、複数の第１の修飾されたライブラリ分子を生成し、複数の第１の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、第３の左ユニバーサルアダプター配列が付加されており、第１のテール付きプライマーの第３の左ユニバーサルアダプター配列が、（i）フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、（ii）第１若しくは第２の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、（iii）フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は（iv）コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、ステップ（c）ステップ（a）の個々の第１の修飾されたライブラリ分子を、第２のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第２のプライマー伸長反応（又は第２のPCR

）を行うことであって、第2のテール付きプライマーが、第3の右ユニバーサルアダプター配列を保有する5'領域、及び第1の修飾されたライブラリ分子の第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）の少なくとも一部分と相補的である3'領域を含み、第2のプライマー伸長反応（又は第2のPCR）が、複数の第2の修飾されたライブラリ分子を生成し、複数の第2の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、第3の右ユニバーサルアダプター配列が付加されており、第2のテール付きプライマーの第3の右ユニバーサルアダプター配列が、（i）フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、（ii）第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、（iii）フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は（iv）コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、を含む。

10

【0515】

いくつかの実施形態において、ステップ（b）の第1のプライマー伸長反応（又は第1のPCR）は、第3の左ユニバーサルアダプター配列の完全長又は一部分を、第1の修飾されたライブラリ分子の一方の末端に付加する。いくつかの実施形態において、ステップ（c）の第2のプライマー伸長反応（又は第2のPCR）は、第3の右ユニバーサルアダプター配列の完全長又は一部分を、第2の修飾されたライブラリ分子の一方の末端に付加する。

【0516】

いくつかの実施形態において、ステップ（a）の核酸ライブラリ分子は各々、5'から3'の順序で配置された配列である、（i）第1の表面プライマーについての結合配列を有する第1の左ユニバーサルアダプター配列（120）、（ii）第1のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の左ユニバーサルアダプター配列（140）、（iii）目的の配列（110）、（iv）第2のシーケンシングプライマーについての結合配列を有する第2の右ユニバーサルアダプター配列（150）、及び（v）第2の表面プライマーについての結合配列を有する第1の右ユニバーサルアダプター配列（130）を含む。

20

【0517】

いくつかの実施形態において、更なる追加のユニバーサルアダプター配列を核酸ライブラリ分子に付加するための方法は、ステップ（d）ステップ（c）の個々の第2の修飾されたライブラリ分子を、第3のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第3のプライマー伸長反応（又は第3のPCR）を行うことであって、第3のテール付きプライマーが、第4の左ユニバーサルアダプター配列を保有する5'領域、及び第2の修飾されたライブラリ分子の第3の左ユニバーサルアダプター配列の少なくとも一部分と相補的である3'領域を含み、第3のプライマー伸長反応（又は第3のPCR）が、複数の第3の修飾されたライブラリ分子を生成し、複数の第3の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、第4の左ユニバーサルアダプター配列が付加されており、第3のテール付きプライマーの第4の左ユニバーサルアダプター配列が、（i）フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、（ii）第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、（iii）フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は（iv）コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、ステップ（e）ステップ（d）の個々の第3の修飾されたライブラリ分子を、第4のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第4のプライマー伸長反応（又は第4のPCR）を行うことであって、第4のテール付きプライマーが、第4の右ユニバーサルアダプター配列を保有する5'領域、及び第3の修飾されたライブラリ分子の第3の右ユニバーサルアダプター配列の少なくとも一部分と相補的である3'領域を含み、第4のプライマー伸長反応（又は第4のPCR）が、複数の第4の修飾されたライブラリ分子を生成し、複数の第4の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、第4の右ユニバーサルアダプター配列が付加されており、第4のテール付きプライマーの第4の右ユニバーサルアダ

30

40

50

プター配列が、(i) フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、(ii) 第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、(iii) フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は(iv) コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、を更に含む。

【0518】

いくつかの実施形態において、ステップ(d)の第3のプライマー伸長反応(又は第3のPCR)は、第4の左ユニバーサルアダプター配列の完全長又は一部分を、第3の修飾されたライブラリ分子の一方の末端に付加する。いくつかの実施形態において、ステップ(e)の第4のプライマー伸長反応(又は第4のPCR)は、第4の右ユニバーサルアダプター配列の完全長又は一部分を、第4の修飾されたライブラリ分子の一方の末端に付加する。

10

【0519】

いくつかの実施形態において、尚更なる追加のユニバーサルアダプター配列を核酸ライブラリ分子に付加するための方法は、ステップ(f)ステップ(e)の個々の第4の修飾されたライブラリ分子を、第5のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第5のプライマー伸長反応(又は第5のPCR)を行うことであって、第5のテール付きプライマーが、第5の左ユニバーサルアダプター配列を保有する5'領域、及び第4の修飾されたライブラリ分子の第4の左ユニバーサルアダプター配列の少なくとも一部分と相補的である3'領域を含み、第5のプライマー伸長反応(又は第5のPCR)が、複数の第5の修飾されたライブラリ分子を生成し、複数の第5の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、第5の左ユニバーサルアダプター配列が付加されており、第5のテール付きプライマーの第5の左ユニバーサルアダプター配列が、(i) フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、(ii) 第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、(iii) フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は(iv) コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、ステップ(g)ステップ(f)の個々の第5の修飾されたライブラリ分子を、第6のテール付きプライマーとハイブリダイズさせ、第6のプライマー伸長反応(又は第6のPCR)を行うことであって、第6のテール付きプライマーが、第6の右ユニバーサルアダプター配列を保有する5'領域、及び第5の修飾されたライブラリ分子の第4の右ユニバーサルアダプター配列の少なくとも一部分と相補的である3'領域を含み、第6のプライマー伸長反応(又は第6のPCR)が、複数の第6の修飾されたライブラリ分子を生成し、複数の第6の修飾されたライブラリ分子の各々に一方の末端において、第6の右ユニバーサルアダプター配列が付加されており、第6のテール付きプライマーの第6の右ユニバーサルアダプター配列が、(i) フォワード若しくはリバースシーケンシングプライマーについてのユニバーサル結合配列、(ii) 第1若しくは第2の表面プライマーについてのユニバーサル結合配列、(iii) フォワード若しくはリバース増幅プライマーについてのユニバーサル結合配列、及び／又は(iv) コンパクションオリゴヌクレオチドについてのユニバーサル結合配列を含む、行うことと、を更に含む。

20

30

40

【0520】

いくつかの実施形態において、ステップ(f)の第5のプライマー伸長反応(又は第5のPCR)は、第5の左ユニバーサルアダプター配列の完全長又は一部分を、第5の修飾されたライブラリ分子の一方の末端に付加する。いくつかの実施形態において、ステップ(g)の第6のプライマー伸長反応(又は第6のPCR)は、第5の右ユニバーサルアダプター配列の完全長又は一部分を、第6の修飾されたライブラリ分子の一方の末端に付加する。

【0521】

いくつかの実施形態において、ステップ(b)の第1のテール付きプライマー、ステップ(d)の第3のテール付きプライマー、及び／又はステップ(f)の第5のテール付き

50

プライマーは、左インデックス配列を更に含む。

【0522】

いくつかの実施形態において、ステップ（b）の第1のテール付きプライマー、ステップ（d）の第3のテール付きプライマー、及び／又はステップ（f）の第5のテール付きプライマーは、左固有識別配列を更に含む。

【0523】

いくつかの実施形態において、ステップ（c）の第2のテール付きプライマー、ステップ（e）の第4のテール付きプライマー、及び／又はステップ（g）の第6のテール付きプライマーは、右インデックス配列を更に含む。

【0524】

いくつかの実施形態において、ステップ（c）の第2のテール付きプライマー、ステップ（e）の第4のテール付きプライマー、及び／又はステップ（g）の第6のテール付きプライマーは、右固有識別配列を更に含む。

【0525】

いくつかの実施形態において、ステップ（b）の付加された第3の左ユニバーサルアダプター配列は、第1のスプリント鎖の第1の領域（320）に結合することができる。

【0526】

いくつかの実施形態において、ステップ（c）の付加された第3の右ユニバーサルアダプター配列は、第1のスプリント鎖の第2の領域（330）に結合することができる。

【0527】

いくつかの実施形態において、ステップ（d）の付加された第4の左ユニバーサルアダプター配列は、第1のスプリント鎖の第1の領域（320）に結合することができる。

【0528】

いくつかの実施形態において、ステップ（e）の付加された第4の右ユニバーサルアダプター配列は、第1のスプリント鎖の第2の領域（330）に結合することができる。

【0529】

いくつかの実施形態において、ステップ（f）の付加された第5の左ユニバーサルアダプター配列は、第1のスプリント鎖の第1の領域（320）に結合することができる。

【0530】

いくつかの実施形態において、ステップ（g）の付加された第6の右ユニバーサルアダプター配列は、第1のスプリント鎖の第2の領域（330）に結合することができる。

【0531】

追加のユニバーサルアダプター配列は、ライブラリ分子に、プライマー伸長反応又はPCRを繰り返すことによって付加され得ることが、当業者には理解されよう。いくつかの実施形態において、ライブラリ分子にライブラリ分子の一方又は両方の側において、10個以上の追加のユニバーサルアダプター配列が付加され得る。

【0532】

低非特異的結合コーティングを有する支持体

本開示は、複数の表面プライマーが上に固定化された支持体を用いる、シーケンシングのための組成物及び方法を提供する。いくつかの実施形態において、支持体は、低非特異的結合コーティングで不動化されている。本明細書に記載される表面コーティングは、核酸キャプチャー、増幅、及びシーケンシングワークフローのために典型的に使用される試薬、例えば、色素、ヌクレオチド、酵素、及び核酸プライマーへの非常に低い非特異的結合を示す。表面コーティングは、従来の表面コーティングと比較して、低いバックグラウンド蛍光シグナル又は高いコントラスト対ノイズ（CNR）比を示す。

【0533】

概して、支持体は、基質（又は支持体構造）と、共有結合的に又は非共有結合的に付着した低結合化学修飾層、例えば、シラン層、ポリマーフィルムの1つ以上の層と、一本鎖標的核酸（複数可）を支持体表面にテザーするために使用され得る1つ以上の共有結合的に又は非共有結合的に付着したプライマー配列と、を含む。いくつかの実施形態において

10

20

30

40

50

、表面の配合、例えば、1つ以上の層の化学組成、1つ以上の層を支持体及び／又は互いに架橋させるために使用されるカップリング化学、並びに層の総数は、支持体表面へのタンパク質、核酸分子、並びに他のハイブリダイゼーション及び増幅反応構成要素の非特異的結合が、同等の単層に対して最小化又は低減されるように変動し得る。しばしば、表面の配合は、支持体表面上での非特異的ハイブリダイゼーションが、同等の単層に対して最小化又は低減されるように変動し得る。表面の配合は、支持体表面上での非特異的増幅が、同等の単層に対して最小化又は低減されるように変動し得る。表面の配合は、支持体表面上での特異的増幅率及び／又は収率が最大化されるように変動し得る。検出に好適である増幅レベルは、本明細書に開示されるいくつかの場合において、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30回以下、又は30回超の増幅サイクルにおいて達成される。

10

【0534】

1つ以上の化学修飾層、例えば、低非特異的結合ポリマーの層を含む基質又は支持体構造は、独立したものであってもよく、又は別の構造若しくはアセンブリ内に統合されたものであってもよい。例えば、いくつかの実施形態において、基質又は支持体構造は、統合又はアセンブルされたマイクロ流体フローセル内の1つ以上の表面を含み得る。基質又は支持体構造は、マイクロプレートフォーマット内の1つ以上の表面、例えば、マイクロプレートにおけるウェルの底面を含み得る。上記のように、いくつかの好ましい実施形態において、基質又は支持体構造は、キャピラリーの内側表面（例えば、ルーメン表面）を含む。代替の好ましい実施形態において、基質又は支持体構造は、平面チップ内にエッチングされたキャピラリーの内側表面（例えば、ルーメン表面）を含む。

20

【0535】

第1の化学修飾層を表面にグラフトするために使用される付着化学は、概して、表面が製造される材料及び層の化学的性質の両方に依存する。いくつかの実施形態において、第1の層は、表面に共有結合的に付着し得る。いくつかの実施形態において、第1の層は、表面に、表面と第1の層の分子構成要素との間の非共有結合相互作用、例えば、静電相互作用、水素結合、又はファンデルワールス相互作用を介して非共有結合的に付着、例えば、吸着し得る。いずれの場合においても、基質表面は、第1の層の付着又は堆積前に処理され得る。当業者に既知の様々な表面調製技法のうちのいずれかが、表面を清浄化又は処理するために使用され得る。例えば、ガラス又はシリコン表面は、ピラニア溶液（硫酸（ H_2SO_4 ）及び過酸化水素（ H_2O_2 ）の混合物）、 KOH 及び NaOH 中の塩基処理を使用して酸洗浄され得、かつ／又は酸素プラズマ処理方法を使用して清浄化され得る。

30

【0536】

シラン化学は、ガラス又はシリコン表面上のシラノール基を共有結合的に修飾して、より反応性の官能基（例えば、アミン又はカルボキシル基）を付着させるための1つの非限定的な手法を構築し、次いで、これは、表面へのリンカー分子（例えば、様々な長さの直鎖炭化水素分子、例えば、 C_6 、 C_{12} 、 C_{18} 炭化水素、又は直鎖ポリエチレングリコール（PEG）分子）又は層分子（例えば、分岐PEG分子又は他のポリマー）のカップリングにおいて使用され得る。開示される低結合表面のうちのいずれかの作製において使用され得る好適なシランの例としては、（3-アミノプロピル）トリメトキシシラン（APTMS）、（3-アミノプロピル）トリエトキシシラン（APTES）、様々なPEGシラン（例えば、1K、2K、5K、10K、20Kなどの分子量を含むもの）のうちのいずれか、アミノ-PEGシラン（すなわち、遊離アミノ官能基を含むもの）、マレイミド-PEGシラン、及びビオチン-PEGシランなどが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0537】

アミノ酸、ペプチド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、他のモノマー若しくはポリマー、又はそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない、当業者に既知の様々な分子のうちのいずれかが、表面上の1つ以上の化学修飾層の作製において使用され得、使用される構成要素の選択は、表面の1つ以上の特性、例えば、官能基及び／若しくはテザ

50

ーされたオリゴヌクレオチドプライマーの表面密度、表面の親水性／疎水性、又は表面の三三次元性質（すなわち、「厚さ」）を改変するように変動し得る。開示される表面のいずれかにおける低非特異的結合材料の1つ以上の層を作製するために使用され得る好ましいポリマーの例としては、様々な分子量及び分岐構造のポリエチレングリコール（PEG）、ストレプトアビジン、ポリアクリルアミド、ポリエステル、デキストラン、ポリリジン、及びポリリジンコポリマー、又はそれらのいずれかの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。材料の1つ以上の層（例えば、ポリマー層）を表面にグラフトするために、かつ／又は層を互いに架橋させるために使用され得るコンジュゲーション化学の例としては、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用（又はそれらの変形形態）、his タグ-Ni²⁺/NTAコンジュゲーション化学、メトキシエーテルコンジュゲーション化学、カルボキシレートコンジュゲーション化学、アミンコンジュゲーション化学、NHSEステル、マレイミド、チオール、エポキシ、アジド、ヒドラジド、アルキン、イソシアネート、及びシランが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0538】

低非特異的結合表面コーティングは、基質にわたって均一に適用され得る。代替として、表面コーティングは、化学修飾層が基質の1つ以上の個別の領域に制限されるようにパターン化され得る。例えば、表面は、フォトリソグラフィ技法を使用して、化学修飾領域の整列したアレイ又はランダムなパターンを表面上で作製するようにパターン化され得る。代替として又は組み合わせで、基質表面は、例えば、コンタクトプリンティング及び／又はインクジェットプリンティング技法を使用してパターン化され得る。いくつかの実施形態において、化学修飾領域の整列したアレイ又はランダムなパターンは、少なくとも1つ、5つ、10個、20個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、200個、300個、400個、500個、600個、700個、800個、900個、1000個、2000個、3000個、4000個、5000個、6000個、7000個、8000個、9000個、若しくは10,000個、又はそれ以上の個別の領域を含み得る。

20

【0539】

低非特異性結合表面を達成するために、親水性ポリマーは、表面に非特異的に吸着してもよく、又は表面に共有結合的にグラフトされてもよい。典型的には、不動態化は、ポリ（エチレングリコール）（PEG、これは、ポリエチレンオキシド（PEO）又はポリオキシエチレンとしても既知である）、又は表面に、例えば、シラン化学を使用して結合した異なる分子量及び末端基を有する他の親水性ポリマーを使用して実行される。表面から遠位の末端基は、ビオチン、メトキシエーテル、カルボキシレート、アミン、NHSEステル、マレイミド、及びビス-シランを含むことができるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、親水性ポリマー、例えば、直鎖ポリマー、分岐ポリマー、又は多分岐ポリマーの2つ以上の層が、表面上に堆積し得る。いくつかの実施形態において、2つ以上の層は、得られた表面の安定性を改善するために、互いに共有結合的にカップリングしてもよく、又は内部的に架橋してもよい。いくつかの実施形態において、異なる塩基配列及び塩基修飾（又は他の生体分子、例えば、酵素若しくは抗体）を有するオリゴヌクレオチドプライマーは、得られた表面層に様々な表面密度でテザーされ得る。いくつかの実施形態において、例えば、表面官能基密度及びオリゴヌクレオチド濃度の両方が、ある特定のプライマー密度範囲を目標とするように変動し得る。追加として、プライマー密度は、オリゴヌクレオチドを、同じ官能基を保有する他の分子で希釈することによって制御され得る。例えば、最終プライマー密度を低減するために、アミン標識オリゴヌクレオチドが、NHSEステルコーティング表面との反応において、アミン標識ポリエチレングリコールで希釈され得る。また、ハイブリダイゼーション領域と表面付着官能基との間の異なる長さのリンカーを有するプライマーが、表面密度を制御するために適用され得る。好適なリンカーの例としては、プライマーの5'末端におけるポリT及びポリA鎖（例えば、0～20個の塩基）、PEGリンカー（例えば、3つ～20個のモノマー単位）、及び炭素鎖（例えば、C6、C12、C18など）が挙げられる。プライマー密度を測定

30

40

50

するために、蛍光標識プライマーが、表面にテザーされ得、次いで、蛍光リードが、既知の濃度の色素溶液についてのものと比較され得る。

【0540】

プライマー表面密度を調整し、追加の次元性を親水性又は両性表面に追加するために、PEG及び他の親水性ポリマーの多層コーティングを含む表面が開発されている。以下に記載されるポリマー／コポリマー材料を含むが、これらに限定されない親水性及び両性表面層化手法を使用することによって、表面上のプライマーロード密度を、顕著に増加させることが可能である。従来のPEGコーティング手法は、単層プライマー堆積を使用し、単層プライマー堆積は、概して、単一の分子の用途について報告されているが、核酸増幅用途について高いコピー数をもたらさない。本明細書に記載されるように、「層化」は、従来の架橋手法を使用して、2つ以上の高度に架橋した層を含む表面が順次構築され得るように、いずれかの適合性ポリマー又はモノマーサブユニットで達成され得る。好適なポリマーの例としては、ストレプトアビジン、ポリアクリルアミド、ポリエステル、デキストラン、ポリリジン、並びにポリリジン及びPEGのコポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、異なる層は、様々なコンジュゲーション反応のうちのいずれかを介して互いに付着し得、コンジュゲーション反応は、ビオチン-ストレプトアビジン結合、アジド-アルキンクリック反応、アミン-NHSエステル反応、チオール-マレイミド反応、及び正電荷を有するポリマーと負電荷を有するポリマーとの間のイオン相互作用を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、高プライマー密度材料は、溶液中で構築され得、その後、複数のステップにおいて、表面上に層化され得る。

10

20

【0541】

上記のように、本開示の低非特異的結合コーティングは、固相核酸増幅のために使用されるハイブリダイゼーション及び／又は増幅配合物のタンパク質、核酸、及び他の構成要素の低減された非特異的結合を示す。所与の支持体表面によって示される非特異的結合の程度は、定性的又は定量的のいずれかで評価され得る。例えば、いくつかの実施形態において、表面を、蛍光色素（例えば、シアニン色素、例えば、Cy3若しくはCy5など、フルオレセイン、クマリン、ローダミンなど、又は本明細書に開示される他の色素）、蛍光標識ヌクレオチド、蛍光標識オリゴヌクレオチド、及び／又は蛍光標識タンパク質（例えば、ポリメラーゼ）に、標準化された条件セット下で曝露し、続いて、指定のリンスプロトコル及び蛍光イメージングを行うことは、異なる表面配合を含む支持体上での非特異的結合の比較のための定性的ツールとして使用され得る。いくつかの実施形態において、表面を、蛍光色素、蛍光標識ヌクレオチド、蛍光標識オリゴヌクレオチド、及び／又は蛍光標識タンパク質（例えば、ポリメラーゼ）に、標準化された条件セット下で曝露し、続いて、指定のリンスプロトコル及び蛍光イメージングを行うことは、異なる表面配合を含む支持体上での非特異的結合の比較のための定量的ツールとして使用され得るが、但し、蛍光イメージングが、蛍光シグナルが支持体表面上のフルオロフォアの数に直線的に関係する（又は予測可能な様式で関係する）条件下（例えば、フルオロフォアのシグナル飽和及び／又は自己消光が問題でない条件下）で実行され、好適な較正基準が使用されることを確実にするように配慮されていることを条件とする。いくつかの実施形態において、当業者に既知の他の技法、例えば、放射性同位体標識及びカウント方法が、非特異的結合が本開示の異なる支持体表面配合物によって示される程度の定量的評価のために使用され得る。

30

40

【0542】

本明細書に開示されるいくつかの表面は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100、若しくは100超、又は本明細書に記載される範囲によって包含されるいずれかの中間値のCy3などのフルオロフォアの特異的対非特異的結合の比を示す。本明細書に開示されるいくつかの表面は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、

50

25、30、35、40、50、75、100、若しくは100超、又は本明細書に記載される範囲によって包含されるいずれかの中間値のCy3などのフルオロフォアの特異的対非特異的蛍光の比を示す。

【0543】

上記のように、いくつかの実施形態において、開示される低結合支持体によって示される非特異的結合の程度は、表面を、標識タンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン（BSA）、ストレプトアビジン、DNAポリメラーゼ、逆転写酵素、ヘリカーゼ、一本鎖結合タンパク質（SSB）など、又はそれらのいずれかの組み合わせ）、標識ヌクレオチド、標識オリゴヌクレオチドなどと、標準化されたインキュベーション及びリンス条件セット下で接触させ、続いて、表面上に残存する標識の量の検出、及びそれから得られたシグナルと適切な較正標準との比較が行われるための標準化されたプロトコルを使用して評価され得る。いくつかの実施形態において、標識は、蛍光標識を含み得る。いくつかの実施形態において、標識は、放射性同位体を含み得る。いくつかの実施形態において、標識は、当業者に既知のいずれかの他の検出可能な標識を含み得る。したがって、いくつかの実施形態において、所与の支持体表面配合によって示される非特異的結合の程度は、1単位面積当たりの非特異的結合タンパク質分子（又は他の分子）の数の観点から評価され得る。いくつかの実施形態において、本開示の低結合支持体は、1 μm^2 当たり0.001分子未満、1 μm^2 当たり0.01分子未満、1 μm^2 当たり0.1分子未満、1 μm^2 当たり0.25分子未満、1 μm^2 当たり0.5分子未満、1 μm^2 当たり1分子未満、1 μm^2 当たり10分子未満、1 μm^2 当たり100分子未満、又は1 μm^2 当たり1,000分子未満の非特異的タンパク質結合（又は他の指定の分子（例えば、シアニン色素、例えば、Cy3若しくはCy5など、フルオレセイン、クマリン、ローダミンなど、又は本明細書に開示される他の色素）の非特異的結合）を示し得る。本開示の所与の支持体表面は、この範囲内のいずれかの値である非特異的結合、例えば、1 μm^2 当たり86分子未満の非特異的結合を示し得ることが、当業者には認識されよう。例えば、本明細書に開示されるいくつかの修飾表面は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）緩衝液中のCy3標識ストレプトアビジン（GE Amersham）の1 μM の溶液と、15分間接触させ、続いて、脱イオン水で3回リンスした後に、0.5分子/ μm^2 未満の非特異的タンパク質結合を示す。本明細書に開示されるいくつかの修飾表面は、1 μm^2 当たり0.25分子未満のCy3色素分子の非特異的結合を示す。独立した非特異的結合アッセイにおいて、1 μM の標識Cy3 SA（ThermoFisher）、1 μM のCy5 SA色素（ThermoFisher）、10 μM のアミノアリル-dUTP-ATTO-647N（Jena Biosciences）、10 μM のアミノアリル-dUTP-ATTO-Rho11（Jena Biosciences）、10 μM のアミノアリル-dUTP-ATTO-Rho11（Jena Biosciences）、10 μM の7-プロパルギルアミノ-7-デアザ-dGTP-Cy5（Jena Biosciences、及び10 μM の7-プロパルギルアミノ-7-デアザ-dGTP-Cy3（Jena Biosciences）が、低結合基質上で、37℃で15分間、384ウェルプレートフォーマットにおいてインキュベートされた。各ウェルは、50 μl の脱イオンRNase/DNaseフリー水で2～3回リンスされ、pH7.4の25mMのACES緩衝液で2～3回リンスされた。384ウェルプレートは、GE Typhoon機器において、製造業者によって指定されるように（実行された色素試験に従って）Cy3、AF555、又はCy5フィルターセットを使用して、800のPMTゲイン設定及び50～100 μm の解像度でイメージングされた。より高い解像度のイメージングのために、画像は、全内部反射蛍光（TIRF）対物レンズ（100 $\times$ 、1.5NA、Olympus）、CCDカメラ（例えば、Olympus EM-CCDモノクロカメラ、Olympus XM-10モノクロカメラ、又はOlympus DP80カラー及びモノクロカメラ）、照明源（例えば、Olympus 100W Hgランプ、Olympus 75W Xeランプ、又はOlympus U-HGLGPS蛍光光源）、及び532nm又は635nmの励起波長を有するOlympus IX83顕微鏡（Olympus Cor

10

20

30

40

50

p.、Center Valley, PA)において収集された。ダイクロイックミラーは、Semrock (IDEX Health & Science, LLC, Rochester, New York) から購入され、例えば、405、488、532、又は633 nmのダイクロイックリフレクタ／ビームスプリッタであり、バンドパスフィルタは、適切な励起波長と一致する532 LP又は645 LPとして選択された。本明細書に開示されるいくつかの修飾表面は、 $1\mu\text{m}^2$ 当たり0.25分子未満の色素分子の非特異的結合を示す。

【0544】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される表面は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100、若しくは100超、又は本明細書に記載される範囲によって包含されるいずれかの中間値のCy3などのフルオロフォアの特異的対非特異的結合の比を示す。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される表面は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100、若しくは100超、又は本明細書に記載される範囲によって包含されるいずれかの中間値のCy3などのフルオロフォアについての特異的対非特異的蛍光シグナルの比を示す。

10

【0545】

本明細書の開示と一致する低バックグラウンド表面は、少なくとも4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、30:1、40:1、50:1の特異的色素付着（例えば、Cy3付着）対非特異的色素吸着（例えば、Cy3色素吸着）比、又は非特異的に吸着した1分子当たり50超の付着した特異的色素分子を示し得る。同様に、励起エネルギーに供されたときに、フルオロフォア、例えば、Cy3が付着した、本明細書の開示と一致する低バックグラウンド表面は、少なくとも4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、30:1、40:1、50:1、又は50:1超の（例えば、表面に付着したCy3標識オリゴヌクレオチドから生じる）特異的蛍光シグナル対非特異的吸着色素蛍光シグナルの比を示し得る。

20

【0546】

いくつかの実施形態において、開示される支持体表面の親水性の程度（又は水溶液との「濡れ性」）は、例えば、水接触角の測定を介して評価され得、この測定において、小さい水滴が、表面上に配置され、表面とのその接触角が、例えば、光学テンシオメータを使用して測定される。いくつかの実施形態において、静的接触角が決定され得る。いくつかの実施形態において、前進又は後退接触角が決定され得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される表面処理された親水性低結合支持体についての水接触角は、約0度～約30度の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される表面処理された親水性低結合支持体についての水接触角は、50度、40度、30度、25度、20度、18度、16度、14度、12度、10度、8度、6度、4度、2度、又は1度以下であり得る。多くの場合において、接触角は、40度以下である。本開示の所与の親水性低結合支持体表面は、この範囲内のいずれかにおける値を有する水接触角を示し得ることが、当業者には認識されよう。

30

40

【0547】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される親水性表面は、しばしば、低結合表面への生体分子の低減された非特異的結合に起因して、バイオアッセイのため低減された洗浄時間を容易にする。いくつかの実施形態において、適切な洗浄ステップは、60、50、40、30、20、15、10秒間未満、又は10秒間未満内で実行され得る。例えば、いくつかの実施形態において、適切な洗浄ステップは、30秒間未満内で実行され得る。

【0548】

本開示の低結合表面は、溶媒及び高温への長期曝露に対する、又は溶媒曝露若しくは温

50

度における変化の繰り返されるサイクルに対する安定性又は耐久性における顕著な改善を示す。例えば、いくつかの実施形態において、開示される表面の安定性は、表面上の官能基、又は表面上のテザーされた生体分子（例えば、オリゴヌクレオチドプライマー）を蛍光標識し、溶媒及び高温への長期曝露、又は溶媒曝露若しくは温度における変化の繰り返されるサイクルへの長期曝露前に、それ中に、かつその後に、蛍光シグナルを監視することによって試験され得る。いくつかの実施形態において、表面の品質を評価するために使用される蛍光における変化の程度は、溶媒及び／又は高温への曝露の1分間、2分間、3分間、4分間、5分間、10分間、20分間、30分間、40分間、50分間、60分間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、15時間、20時間、25時間、30時間、35時間、40時間、45時間、50時間、又は100時間の期間にわたって、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、又は25%未満（又はこれらの期間にわたって測定された場合のこれらの百分率のいずれかの組み合わせ）であり得る。いくつかの実施形態において、表面の品質を評価するために使用される蛍光における変化の程度は、5回のサイクル、10回のサイクル、20回のサイクル、30回のサイクル、40回のサイクル、50回のサイクル、60回のサイクル、70回のサイクル、80回のサイクル、90回のサイクル、100回のサイクル、200回のサイクル、300回のサイクル、400回のサイクル、500回のサイクル、600回のサイクル、700回のサイクル、800回のサイクル、900回のサイクル、又は1,000回のサイクルの溶媒変化及び／又は温度における変化への繰り返される曝露にわたって、1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、又は25%未満（又はサイクルのこの範囲にわたって測定された場合のこれらの百分率のいずれかの組み合わせ）であり得る。

10

20

30

40

50

【0549】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される表面は、特異的シグナル対非特異的シグナル又は他のバックグラウンドの高い比を示し得る。例えば、核酸増幅のために使用されるときに、いくつかの表面は、表面の隣接する非集合領域のシグナルよりも少なくとも4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、75、100、又は100倍超大きい増幅シグナルを示し得る。同様に、いくつかの表面は、表面の隣接する増幅された核酸集合領域のシグナルよりも少なくとも4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、75、100、又は100倍超大きい増幅シグナルを示す。

【0550】

いくつかの実施形態において、核酸ハイブリダイゼーション又は増幅用途において、（例えば、フルオロフォアで直接又は間接的に標識された）ハイブリダイズした又はクローニング的に増幅された核酸分子のクラスターを作製するために使用されるときの開示される低バックグラウンド表面の蛍光画像は、少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、又は250超のコントラスト対ノイズ比（CNR）を示す。

【0551】

1つ以上のタイプのプライマー（例えば、キャプチャーオリゴヌクレオチド及び／又は環状化オリゴヌクレオチド）が、支持体表面に付着してもよく又はテザーされてもよい。いくつかの実施形態において、1つ以上のタイプのアダプター又はプライマーは、スペーサー配列、アダプターライゲーションされた標的ライブラリ核酸配列へのハイブリダイゼーションのためのアダプター配列、フォワード増幅プライマー、リバーズ増幅プライマー、シーケンシングプライマー、及び／若しくは分子バーコード配列、又はそれらのいずれかの組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態において、1つのプライマー又はアダプター配列が、表面の少なくとも1つの層にテザーされ得る。いくつかの実施形態において、少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個、又は10個超の異なるプライマー又はアダプター配列が、表面の少なくとも1つの層にテザーされ得る

。

【0552】

いくつかの実施形態において、テザーされたアダプター及び／又はプライマー配列は、約10個のヌクレオチド～約100個のヌクレオチドの範囲の長さであり得る。いくつかの実施形態において、テザーされたアダプター及び／又はプライマー配列は、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、又は少なくとも100ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態において、テザーされたアダプター及び／又はプライマー配列は、最大100、最大90、最大80、最大70、最大60、最大50、最大40、最大30、最大20、又は最大10ヌクレオチド長であり得る。この段落に記載される下限及び上限値のうちのいずれかが、本開示内に含まれる範囲を形成するように組み合わせられ得、例えば、いくつかの実施形態において、テザーされたアダプター及び／又はプライマー配列の長さは、約20個のヌクレオチド～約80個のヌクレオチドの範囲であり得る。テザーされたアダプター及び／又はプライマー配列の長さは、この範囲内のいずれかの値、例えば、約24個のヌクレオチドを有し得ることが、当業者には認識されよう。

10

【0553】

いくつかの実施形態において、本開示の低結合支持体表面上のプライマーの得られる表面密度は、 $1\mu\text{m}^2$ 当たり約100プライマー分子～ $1\mu\text{m}^2$ 当たり約100,000プライマー分子の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、本開示の低結合支持体表面上のプライマーの得られる表面密度は、 $1\mu\text{m}^2$ 当たり約100,000プライマー分子～ $1\mu\text{m}^2$ 当たり約 10^{15} プライマー分子の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、プライマーの表面密度は、 $1\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも1,000、少なくとも10,000、少なくとも100,000、又は少なくとも 10^{15} プライマー分子であり得る。いくつかの実施形態において、プライマーの表面密度は、 $1\mu\text{m}^2$ 当たり最大10,000、最大100,000、最大1,000,000、又は最大 10^{15} プライマー分子であり得る。この段落に記載される下限及び上限値のうちのいずれかが、本開示内に含まれる範囲を形成するように組み合わせられ得、例えば、いくつかの実施形態において、プライマーの表面密度は、 $1\mu\text{m}^2$ 当たり約10,000分子～ $1\mu\text{m}^2$ 当たり約 10^{15} 分子の範囲であり得る。プライマー分子の表面密度は、この範囲内のいずれかの値、例えば、 $1\mu\text{m}^2$ 当たり約455,000分子を有し得ることが、当業者には認識されよう。いくつかの実施形態において、支持体表面上のアダプター又はプライマー配列に初期にハイブリダイズした標的ライブラリ核酸配列の表面密度は、テザーされたプライマーの表面密度について示されるもの以下であり得る。いくつかの実施形態において、支持体表面上のアダプター又はプライマー配列にハイブリダイズしたクローン的に増幅された標的ライブラリ核酸配列の表面密度は、テザーされたプライマーの表面密度について示されるものと同じ範囲を包含する。

20

30

【0554】

上記で列挙される局所密度は、表面にわたる密度における変動を排除せず、これにより、表面は、例えば、 $1\mu\text{m}^2$ 当たり500,000のオリゴ密度を有する領域を含み得、また、実質的に異なる局所密度を有する少なくとも第2の領域を含み得る。

40

【0555】

低非特異的結合コーティングは、多層表面コーティングの1つ以上の層を含み、分岐ポリマーを含んでもよく、又は直鎖であってもよい。好適な分岐ポリマーの例としては、分岐PEG、分岐ポリ(ビニルアルコール)(分岐PVA)、分岐ポリ(ビニルピリジン)、分岐ポリ(ビニルピロリドン)(分岐PVP)、分岐)、ポリ(アクリル酸)(分岐PAA)、分岐ポリアクリルアミド、分岐ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(分岐PNIPAM)、分岐ポリ(メチルメタクリレート)(分岐PMA)、分岐ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(分岐PHEMA)、分岐ポリ(オリゴ(エチレンジリコール)メチルエーテルメタクリレート)(分岐POEGMA)、分岐ポリグルタミン

50

酸（分岐PGA）、分岐ポリリジン、分岐ポリグルコシド、及びデキストランが挙げられるが、これらに限定されない。

【0556】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される多層表面のうちのいずれかの1つ以上の層を作製するために使用される分岐ポリマーは、少なくとも4つの分岐、少なくとも5つの分岐、少なくとも6つの分岐、少なくとも7つの分岐、少なくとも8つの分岐、少なくとも9つの分岐、少なくとも10個の分岐、少なくとも12個の分岐、少なくとも14個の分岐、少なくとも16個の分岐、少なくとも18個の分岐、少なくとも20個の分岐、少なくとも22個の分岐、少なくとも24個の分岐、少なくとも26個の分岐、少なくとも28個の分岐、少なくとも30個の分岐、少なくとも32個の分岐、少なくとも34個の分岐、少なくとも36個の分岐、少なくとも38個の分岐、又は少なくとも40個の分岐を含み得る。

10

【0557】

本明細書に開示される多層表面のうちのいずれかの1つ以上の層を作製するために使用される直鎖、分岐、又は多分岐ポリマーは、少なくとも500、少なくとも1,000、少なくとも2,000、少なくとも3,000、少なくとも4,000、少なくとも5,000、少なくとも10,000、少なくとも15,000、少なくとも20,000、少なくとも25,000、少なくとも30,000、少なくとも35,000、少なくとも40,000、少なくとも45,000、又は少なくとも50,000ダルトンの分子量を有し得る。

20

【0558】

いくつかの実施形態において、例えば、多層表面の少なくとも1つの層が、分岐ポリマーを含む場合、堆積させる層の分岐ポリマー分子と前の層の分子との間の共有結合の数は、1分子当たり約1つの共有結合～1分子当たり約32個の共有結合の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、新しい層の分岐ポリマー分子と前の層の分子との間の共有結合の数は、1分子当たり少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10個、少なくとも12個、少なくとも14個、少なくとも16個、少なくとも18個、少なくとも20個、少なくとも22個、少なくとも24個、少なくとも26個、少なくとも28個、少なくとも30個、又は少なくとも32個の共有結合であり得る。

30

【0559】

表面への材料層のカップリング後に残存するいずれもの反応性官能基が、任意選択で、高収率カップリング化学を使用して小さい不活性分子をカップリングさせることによってブロックされ得る。例えば、アミンカップリング化学が、新しい材料層を前のものに付着させるために使用される場合、いずれもの残留アミン基が、その後、グリシンなどの小さいアミノ酸とカップリングすることによってアセチル化又は不活性化され得る。

【0560】

表面上に堆積した低非特異的結合材料、例えば、親水性ポリマー材料の層の数は、1～約10の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、層の数は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、又は少なくとも10である。いくつかの実施形態において、層の数は、最大10、最大9、最大8、最大7、最大6、最大5、最大4、最大3、最大2、又は最大1であり得る。この段落に記載される下限及び上限値のうちのいずれかが、本開示内に含まれる範囲を形成するように組み合わせられ得、例えば、いくつかの実施形態において、層の数は、約2～約4の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、層の全てが、同じ材料を含み得る。いくつかの実施形態において、各々の層は、異なる材料を含み得る。いくつかの実施形態において、複数の層は、複数の材料を含み得る。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの層は、分岐ポリマーを含み得る。いくつかの実施形態において、層の全てが、分岐ポリマーを含み得る。

40

50

【0561】

低非特異的結合材料の1つ以上の層は、いくつかの場合において、極性プロトン性溶媒、極性若しくは極性非プロトン性溶媒、非極性溶媒、又はそれらのいずれかの組み合わせを使用して、基質表面上に堆積し得、かつ／又はそれにコンジュゲートし得る。いくつかの実施形態において、層堆積及び／又はカップリングのために使用される溶媒は、アルコール（例えば、メタノール、エタノール、プロパノールなど）、別の有機溶媒（例えば、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ジメチルホルムアミド（DMF）など）、水、緩衝水溶液（例えば、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、3-（N-モルホリノ）プロパンスルホン酸（MOPS）など）、又はそれらのいずれかの組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態において、使用される溶媒混合物の有機構成要素は、総計の少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%を含み得、バランスは、水又は緩衝水溶液からなされる。いくつかの実施形態において、使用される溶媒混合物の水性構成要素は、総計の少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%を含み得、バランスは、有機溶媒からなされる。使用される溶媒混合物のpHは、6未満、約6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、又はpH9超であり得る。

10

【0562】

蛍光イメージングは、当業者に既知の様々なフルオロフォア、蛍光イメージング技法、及び蛍光イメージング機器のうちのいずれかを使用して実行され得る。使用され得る好適な蛍光色素（例えば、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、又はタンパク質へのコンジュゲーションによるもの）の例としては、フルオレセイン、ローダミン、クマリン、シアニン、並びにシアニン誘導体であるシアニン色素3（Cy3）、シアニン色素5（Cy5）、シアニン色素7（Cy7）などを含むそれらの誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。使用され得る蛍光イメージング技法の例としては、蛍光顕微鏡イメージング、蛍光共焦点イメージング、及び2光子蛍光などが挙げられるが、これらに限定されない。使用され得る蛍光イメージング機器の例としては、画像センサ若しくはカメラを装備する蛍光顕微鏡、共焦点蛍光顕微鏡、2光子蛍光顕微鏡、又は光源、レンズ、ミラー、プリズム、ダイクロイックリフレクタ、アパーチャ、及び画像センサ若しくはカメラなどの好適な選択を備えるカスタム機器が挙げられるが、これらに限定されない。開示される低結合支持体表面及びその上にハイブリダイズしたテンプレート核酸配列のクローン的に増幅されたコロニー（ポロニー）の画像を取得するための装備を有する蛍光顕微鏡の非限定的な例は、20×、0.75NA、532nmの光源、532nm長パス励起及びCy3蛍光発光フィルタのために最適化されたバンドパス及びダイクロイックミラーフィルタセット、Semrock 532nmダイクロイックリフレクタ、並びにカメラ（Andor sCMOS, Zyla 4.2）を装備する）Olympus IX83倒立蛍光顕微鏡であって、励起光強度が、シグナル飽和を回避するように調整されている、Olympus IX83倒立蛍光顕微鏡である。しばしば、画像が取得されている間に、支持体表面は、緩衝液（例えば、pH7.4の25mMのACES緩衝液）中に浸漬され得る。

20

30

40

【0563】

いくつかの事例において、開示される反応配合物及び低非特異的結合支持体を使用する核酸ハイブリダイゼーション及び／又は増幅反応の性能は、蛍光イメージング技法を使用して評価され得、蛍光イメージング技法において、画像のコントラスト対ノイズ比（CNR）は、増幅特異性及び支持体上での非特異的結合の評価における重要なメトリックを提供する。CNRは、一般に、 $CNR = (\text{シグナル} - \text{バックグラウンド}) / \text{ノイズ}$ として定義される。バックグラウンド項は、一般に、特定の関心領域（ROI）における特定の特徴（回折限界スポット、DLS）を取り囲むインタースティシャル領域について測定されたシグナルであると考えられる。シグナル対ノイズ比（SNR）は、しばしば、全体的な信号品質のベンチマークであると考えられるが、以下の例に示されるように、改善された

50

CNRは、迅速な画像キャプチャーを必要とする用途（例えば、サイクル時間が最小化されなければならないシーケンシング用途）における信号品質についてのベンチマークとして、SNRよりも顕著な利点を提供できることが示され得る。本開示の表面はまた、同時係属中の国際特許出願第PCT/US2019/061556号で提供されており、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0564】

ほとんどのアンサンブルベースのシーケンシング手法において、バックグラウンド項は、典型的には、「インタースティシャル」領域に関連するシグナルとして測定される。「インタースティシャル」バックグラウンド（B_{inter}）に加えて、「イントラスティシャル」バックグラウンド（B_{intra}）は、増幅されたDNAコロニーによって占有された領域内に存在する。これらの2つのバックグラウンドシグナルの組み合わせは、達成可能なCNRを決定し、その後、光学機器要件、アーキテクチャコスト、試薬コスト、実行時間、コスト／ゲノムに直接影響し、最終的に、環状アレイベースのシーケンシング用途についての精度及びデータ品質に直接影響する。B_{inter}バックグラウンドシグナルは、様々な源から生じ、いくつかの例としては、消耗フローセルからの自己蛍光、ROIからのシグナルを不明瞭にし得るスプリアス蛍光シグナルをもたらす検出分子の非特異的吸着、非特異的DNA増幅産物（例えば、プライマー二量体から生じるもの）の存在が挙げられる。典型的な次世代シーケンシング（NGS）用途において、現在の視界（FOV）におけるこのバックグラウンドシグナルは、経時的に平均化され、減算される。個々のDNAコロニーから生じるシグナル（すなわち、FOVにおける（S）-B_{inter}）は、分類され得る識別可能な特徴をもたらす。いくつかの事例において、イントラスティシャルバックグラウンド（B_{intra}）は、目的の標的に特異的でないが、同じROI内に存在する交絡蛍光シグナルに寄与し得、したがって、平均化及び減算をはるかにより困難にする。

【0565】

本開示の低結合基質上での核酸増幅の実施は、B_{inter}バックグラウンドシグナルを、非特異的結合を低減することによって減少させ得、特異的核酸増幅における改善をもたらし得、インタースティシャル及びイントラスティシャル領域の両方から生じるバックグラウンドシグナルに影響し得る非特異的増幅における減少をもたらし得る。いくつかの事例において、任意選択で、開示されるハイブリダイゼーション緩衝液配合物との組み合わせで使用される、開示される低結合支持体表面は、CNRにおける改善を、従来の支持体、並びにハイブリダイゼーション、増幅、及び／又はシーケンシングプロトコルを使用して達成されるものよりも2、5、10、100、又は1000倍もたらし得る。蛍光イメージングをリードアウト又は検出モードとして使用するという文脈において本明細書に記載されるが、同じ原理が、光学及び非光学検出モードの両方を含む他の検出モードのための、開示される低非特異的結合支持体、並びに核酸ハイブリダイゼーション及び増幅配合物の使用にも適用される。

【0566】

任意選択で、開示されるハイブリダイゼーション及び／又は増幅プロトコルとの組み合わせで使用される、開示される低結合支持体は、（i）タンパク質及び他の反応構成要素のごくわずかな非特異的結合を示し（したがって、基質バックグラウンドを最小化し）、（ii）ごくわずかな非特異的核酸増幅産物を示し、（iii）調節可能な核酸増幅反応を提供する固相反応をもたらす。

【0567】

いくつかの実施形態において、核酸ハイブリダイゼーション又は増幅用途において、（例えば、フルオロフォアで直接又は間接的に標識された）ハイブリダイズした又はクローニング的に増幅された核酸分子のポロニーを作製するために使用されるときの開示される低バックグラウンド表面の蛍光画像は、少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、又は250超のコン

トラスト対ノイズ比 (CNR) を示す。

【0568】

いくつかの実施形態において、表面の蛍光画像は、試料核酸分子又はその相補的配列が、シアニン色素3 (Cy3) フルオロフォアで標識されているときに、かつ表面が、緩衝液 (例えば、pH 7.4 の 25 mM の ACES 緩衝液) 中に浸漬されている間に、蛍光画像が、 20×0.75 NA の対物レンズ、532 nm の光源、532 nm 励起及び Cy3 蛍光発光のために最適化されたバンドパス及びダイクロイックミラーフィルターセット、並びにカメラ (例えば、Andor sCMOS, Zyla 4.2) を有する倒立蛍光顕微鏡 (例えば、Olympus IX83) を使用して、非シグナル飽和条件下で取得されたときに、少なくとも 20 のコントラスト対ノイズ比 (CNR) を示す。

10

【0569】

ハイブリダイゼーション緩衝液

本開示は、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子 (600) を、複数の固定化された第4の表面プライマー、及び任意選択で、複数の第3の表面プライマーを有する支持体上に分配し、これにより、個々の共有結合性閉環状ライブラリ分子 (600) が、個々の固定化された第4及び第3の表面プライマーにハイブリダイズし、それによって、複数の共有結合性閉環状ライブラリ分子 (600) を固定化するための、ハイブリダイゼーション緩衝液 (例えば、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液) の使用のための組成物及び方法を提供する。

【0570】

ハイブリダイゼーション緩衝液 (例えば、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液) は、第1及び第2の極性非プロトン性溶媒、pH緩衝液系、及びクラウディング剤を含む。本明細書に記載されるハイブリダイゼーション組成物中に含まれる極性溶媒は、永続的な双極子モーメントの存在によって特徴付けられる1つ以上の分子、すなわち、電荷密度の空間的に不均等な分配を有する分子を含む溶媒又は溶媒系である。極性溶媒は、20、25、30、35、40、45、50、55、60の比誘電率によって、又はこれらの値のうちのいずれかを有する値若しくは値の範囲によって特徴付けられ得る。本明細書に記載される極性溶媒は、極性非プロトン性溶媒を含み得る。本明細書に記載される極性非プロトン性溶媒は、イオン化可能な水素を分子において更に含有しなくてもよい。加えて、極性溶媒又は極性非プロトン性溶媒は、本開示の組成物の文脈において、好ましくは、強い極性官能基、例えば、ニトリル、カルボニル、チオール、ラクトン、スルホン、サルファイト、及びカーボネート基で置換され得、これにより、基礎となる溶媒分子は、双極子モーメントを有する。極性溶媒及び極性非プロトン性溶媒は、脂肪族及び芳香族又は環状の両方の形態で存在することができる。いくつかの実施形態において、極性溶媒は、アセトニトリルである。

20

30

【0571】

本明細書に記載される極性又は極性非プロトン性溶媒は、アセトニトリルと同じである又はそれに近い比誘電率を有することができる。極性又は極性非プロトン性溶媒の比誘電率は、約20~60、約25~55、約25~50、約25~45、約25~40、約30~50、約30~45、又は約30~40の範囲であることができる。極性又は極性非プロトン性溶媒の比誘電率は、20、25、30、35、又は40超であることができる。極性又は極性非プロトン性溶媒の比誘電率は、30、40、45、50、55、又は60未満であることができる。極性又は極性非プロトン性溶媒の比誘電率は、約35、36、37、38、又は39であることができる。

40

【0572】

本明細書に記載される極性又は極性非プロトン性溶媒は、アセトニトリルと同じである又はそれに近い極性指標を有することができる。極性又は極性非プロトン性溶媒の極性指標は、約2~9、2~8、2~7、2~6、3~9、3~8、3~7、3~6、4~9、4~8、4~7、又は4~6の範囲であることができる。極性又は極性非プロトン性溶媒の極性指標は、約2、3、4、4.5、5、5.5、又は6超であることができる。極性

50

又は極性非プロトン性溶媒の極性指標は、約 4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、又は 10 未満であることができる。極性又は極性非プロトン性溶媒の極性指標は、約 5.5、5.6、5.7、又は 5.8 であることができる。

【0573】

極性又は極性非プロトン性溶媒のいくつかの例としては、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、アセトアニリド、N-アセチルピロリドン、4-アミノピリジン、ベンズアミド、ベンズイミダゾール、1,2,3-ベンゾトリアゾール、ブタジエンジオキシド、2,3-ブチレンカーボネート、γ-ブチロラクトン、カプロラクトン (ε-ピロリドン)、クロロマレイン酸無水物、2-クロロシクロヘキサノン、クロロエチレンカーボネート、クロロニトロメタン、シトラコン酸無水物、クロトンラクトン、5-シアノ-2-チオウラシル、シクロプロピルニトリル、ジメチルサルフェート、ジメチルスルホン、1,3-ジメチル-5-テトラゾール、1,5-ジメチルテトラゾール、1,2-ジニトロベンゼン、2,4-ジニトロトルエン、ジフェニルスルホン、1,2-ジニトロベンゼン、2,4-ジニトロトルエン、ジフェニルスルホン、ε-ピロリドン-カプロラクタム、エタンスルホニルクロリド、エチルエチルホスフィネート、N-エチルテトラゾール、エチレンカーボネート、エチレントリチオカーボネート、エチレングリコールサルフェート、エチレングリコールサルファイト、フルフラール、2-フロニトリル、2-イミダゾール、イサチン、イソキサゾール、マロニトリル、4-メトキシベンゾニトリル、1-メトキシ-2-ニトロベンゼン、メチルアルファブromoテトロネート、1-メチルイミダゾール、N-メチルイミダゾール、3-メチルイソキサゾール、N-メチルモルホリン-N-オキシド、メチルフェニルスルホン、N-メチルピロリジノン、メチルスルホラン、メチル-4-トルエンスルホネート、3-ニトロアニリン、ニトロベンズイミダゾール、2-ニトロフラン、1-ニトロソ-2-ピロリジノン、2-ニトロチオフエン、2-オキサゾリジノン、9,10-フェナントレンキノン、N-フェニルシドノン、無水フタル酸、ピコリロニトリル (2-シアノピリジン)、1,3-プロパンスルトン、β-プロピオラクトン、プロピレンカーボネート、4H-ピラン-4-チオン、4H-ピラン-4-オン (γ-ピロン)、ピリダジン、2-ピロリドン、サッカリン、スクシニトリル、スルファニルアミド、スルホラン、2,2,6,6-テトラクロロシクロヘキサノン、テトラヒドロチアピランオキシド、テトラメチレンスルホン (スルホラン)、チアゾール、2-チオウラシル、3,3,3-トリクロロプロペン、1,1,2-トリクロロプロペン、1,2,3-トリクロロプロペン、トリメチレンスルフィド-ジオキシド、及びトリメチレンサルファイトが挙げられるが、これらに限定されない。

【0574】

極性溶媒又は極性非プロトン性溶媒の量は、二本鎖核酸を変性させるのに有効な量で存在する。いくつかの実施形態において、極性又は極性非プロトン性溶媒の量は、配合物の総体積に基づいて、約 10 体積% 超である。極性又は極性非プロトン性溶媒の量は、配合物の総体積に基づいて、約 5 体積%、10 体積%、15 体積%、20 体積%、25 体積%、30 体積%、35 体積%、40 体積%、50 体積%、60 体積%、70 体積%、80 体積%、90 体積%、若しくは約 5 体積%、10 体積%、15 体積%、20 体積%、25 体積%、30 体積%、35 体積%、40 体積%、50 体積%、60 体積%、70 体積%、80 体積%、90 体積% 超、又はそれ以上である。極性又は極性非プロトン性溶媒の量は、配合物の総体積に基づいて、約 15 体積%、20 体積%、25 体積%、30 体積%、35 体積%、40 体積%、50 体積%、60 体積%、70 体積%、80 体積%、90 体積% 未満、又はそれ以上である。いくつかの実施形態において、極性又は極性非プロトン性溶媒の量は、配合物の総体積に基づいて、約 10 体積%~90 体積% の範囲である。いくつかの実施形態において、極性又は極性非プロトン性溶媒の量は、配合物の総体積に基づいて、約 25 体積%~75 体積% の範囲である。いくつかの実施形態において、極性又は極性非プロトン性溶媒の量は、配合物の総体積に基づいて、約 10 体積%~95 体積%、10 体積%~85 体積%、20 体積%~90 体積%、20 体積%~80 体積%、20 体積%~

75体積%、又は30体積%～60体積%の範囲である。

【0575】

いくつかの実施形態において、開示されるハイブリダイゼーション緩衝液配合物は、有機溶媒の添加を含み得る。好適な溶媒の例としては、様々な百分率（典型的には、5%超）でのアセトニトリル、エタノール、DMF、及びメタノール、又はそれらのいずれかの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ハイブリダイゼーション緩衝液中に含まれる有機溶媒の（体積による）百分率は、約1%～約20%の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、有機溶媒の体積による百分率は、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも6%、少なくとも7%、少なくとも8%、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも15%、又は少なくとも20%であり得る。いくつかの実施形態において、有機溶媒の体積による百分率は、最大20%、最大15%、最大10%、最大9%、最大8%、最大7%、最大6%、最大5%、最大4%、最大3%、最大2%、又は最大1%であり得る。この段落に記載される下限及び上限値のうちのいずれかが、本開示内に含まれる範囲を形成するように組み合わせられ得、例えば、有機溶媒の体積による百分率は、約4%～約15%の範囲であり得る。有機溶媒の体積による百分率は、この範囲内のいずれかの値、例えば、約7.5%を有し得ることが、当業者には認識されよう。

10

【0576】

ハイブリダイゼーション速度における改善：いくつかの実施形態において、本明細書に開示される最適化された緩衝液配合物の使用（任意選択で、低非特異的結合表面との組み合わせでの使用）は、従来のハイブリダイゼーションプロトコルについてのものよりも約2倍～約20倍の範囲の相対ハイブリダイゼーション速度をもたらす。いくつかの実施形態において、相対ハイブリダイゼーション速度は、従来のハイブリダイゼーションプロトコルについてのものの少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも12倍、少なくとも14倍、少なくとも16倍、少なくとも18倍、又は少なくとも20倍であり得る。

20

【0577】

ハイブリダイゼーション効率（又は収率）における改善は、相補的配列にハイブリダイズした総可用的な、固体表面上のテザーされたアダプター配列、プライマー配列、又はオリゴヌクレオチド配列の全般的な百分率の尺度である。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される最適化された緩衝液配合物の使用（任意選択で、低非特異的結合表面との組み合わせでの使用）は、従来のハイブリダイゼーションプロトコルについてのものと比較して、改善されたハイブリダイゼーション効率をもたらす。いくつかの実施形態において、達成され得るハイブリダイゼーション効率は、上記の特定のハイブリダイゼーション反応時間のうちのいずれかにおいて、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%よりも良好である。

30

【0578】

ハイブリダイゼーション特異性における改善は、完全に相補的な配列にのみ正しくハイブリダイズする、テザーされたアダプター配列、プライマー配列、又はオリゴヌクレオチド配列の全般的な能力の尺度である。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される最適化された緩衝液配合物の使用（任意選択で、低非特異的結合表面との組み合わせでの使用）は、従来のハイブリダイゼーションプロトコルについてのものと比較して、改善されたハイブリダイゼーション特異性をもたらす。いくつかの実施形態において、達成され得るハイブリダイゼーション特異性は、10個のハイブリダイゼーション事象において1塩基ミスマッチ、100個のハイブリダイゼーション事象において1塩基ミスマッチ、1,000個のハイブリダイゼーション事象において1塩基ミスマッチ、又は10,000個のハイブリダイゼーション事象において1塩基ミスマッチよりも良好である。

40

【0579】

「クラウディング剤」という用語及び関連用語は、溶液中の他の分子の特性を改変する

50

化合物を指す。クラウディング剤は、典型的には、高分子量及び／又は嵩高い構造を有する。溶液中のクラウディング剤は、溶液中の他の分子の濃度を増加させることができる。クラウディング剤は、分子クラウディング環境をもたらすことができる溶液中の他の分子のために可用である溶媒の体積を低減することができる。溶液中のクラウディング剤は、溶液中の分子についてのクラウディング環境を生成することができる。クラウディング剤は、反応の速度又は平衡定数を改変することができる。クラウディング剤の例としては、ポリエチレングリコール（例えば、PEG）、f i c o l l、デキストラン、グリコーゲン、ポリビニルアルコール、トリブロックポリマー（例えば、Pluronic（登録商標））、ポリスチレン、ポリビニルピロリドン（PVP）、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒドロキシエチルメチルセルロース（HEMC）、ヒドロキシブチルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチセルロース、及びヒドロキシルメチルセルロースが挙げられる。いくつかの実施形態において、クラウディング剤は、直鎖又は分岐PEGを含む。いくつかの実施形態において、クラウディング剤は、PEG 400、PEG 1500、PEG 2000、PEG 3400、PEG 3350、PEG 4000、PEG 6000、又はPEG 8000を含む。いくつかの実施形態において、溶液は、少なくとも1つのクラウディング剤を、溶液の体積に基づいて、約1%、2%、3%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、又はより高いパーセントで含むことができる。いくつかの実施形態において、溶液は、ローリングサークル増幅及び／又は多置換増幅反応を含む核酸増幅のために使用され得る。

10

20

【0580】

組成物中のクラウディング剤の好適な量は、分子クラウディングを可能にする、増強する、又は容易にする。クラウディング剤の量は、配合物の総体積に基づいて、約1体積%、2体積%、3体積%、5体積%、10体積%、15体積%、20体積%、25体積%、30体積%、35体積%、40体積%、50体積%、60体積%、若しくはそれ以上、又は約1体積%超、2体積%超、3体積%超、5体積%超、10体積%超、15体積%超、20体積%超、25体積%超、30体積%超、35体積%超、40体積%超、50体積%超、60体積%超、若しくはそれ以上である。いくつかの場合において、分子クラウディング剤の量は、配合物の総体積に基づいて、5体積%超である。クラウディング剤の量は、配合物の総体積に基づいて、約3体積%未満、5体積%未満、10体積%未満、12.5体積%、15体積%未満、20体積%未満、25体積%未満、30体積%未満、35体積%未満、40体積%未満、50体積%未満、60体積%未満、70体積%未満、80体積%未満、90体積%未満、又はそれ以上である。いくつかの場合において、分子クラウディング剤の量は、配合物の総体積に基づいて、30体積%未満であることができる。いくつかの実施形態において、極性又は極性非プロトン性溶媒の量は、配合物の総体積に基づいて、約25体積%～75体積%の範囲である。いくつかの実施形態において、極性又は極性非プロトン性溶媒の量は、配合物の総体積に基づいて、約1体積%～40体積%、1体積%～35体積%、2体積%～50体積%、2体積%～40体積%、2体積%～35体積%、2体積%～30体積%、2体積%～25体積%、2体積%～20体積%、2体積%～10体積%、5体積%～50体積%、5体積%～40体積%、5体積%～35体積%、5体積%～30体積%、5体積%～25体積%、5体積%～20体積%の範囲である。いくつかの場合において、分子クラウディング剤の量は、配合物の総体積に基づいて、約5体積%～約20体積%の範囲であることができる。いくつかの実施形態において、クラウディング剤の量は、配合物の総体積に基づいて、約1体積%～30体積%の範囲である。

30

40

【0581】

いくつかの実施形態において、開示されるハイブリダイゼーション緩衝液配合物は、分子クラウディング又は体積排除剤の添加を含み得る。分子クラウディング又は体積排除剤は、典型的には、巨大分子（例えば、タンパク質）であり、巨大分子は、溶液に高い濃度で添加されたときに、溶液中の他の分子の特性を、他の分子のために可用な溶媒の体積を

50

低減することによって改変し得る。いくつかの実施形態において、ハイブリダイゼーション緩衝液配合物中に含まれる分子クラウディング又は体積排除剤の体積による百分率は、約1%～約50%の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、分子クラウディング又は体積排除剤の体積による百分率は、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、又は少なくとも50%であり得る。いくつかの実施形態において、分子クラウディング又は体積排除剤の体積による百分率は、50%、最大45%、最大40%、最大35%、最大30%、最大25%、最大20%、最大15%、最大10%、最大5%、又は最大1%であり得る。この段落に記載される下限及び上限値のうちのいずれかが、本開示内に含まれる範囲を形成するように組み合わせられ得、例えば、分子クラウディング又は体積排除剤の体積による百分率は、約5%～約35%の範囲であり得る。分子クラウディング又は体積排除剤の体積による百分率は、この範囲内のいずれかの値、例えば、約12.5%を有し得ることが、当業者には認識されよう。

10

【0582】

本明細書に記載されるハイブリダイゼーション緩衝液は、pH緩衝液系を含み、pH緩衝液系は、組成物のpHを、ハイブリダイゼーションプロセスに好適である範囲に維持する。pH緩衝液系は、トリス、HEPES、TAPS、トリシン、ピシン、ビスートリス、NaOH、KOH、TES、EPPS、MES、及びMOPSからなる群から選択される1つ以上の緩衝剤を含むことができる。pH緩衝液系は、溶媒を更に含むことができる。好ましいpH緩衝液系は、MOPS；MES；TAPS；メタノール、アセトニトリル、エタノール、イソプロパノール、ブタノール、*t*-ブチルアルコール、DMF、DMSOと組み合わせられたリン酸緩衝液；又はそれらのいずれかの組み合わせを含む。

20

【0583】

ハイブリダイゼーション緩衝液は、配合物のpHをハイブリダイゼーションに好適である範囲に維持するのに有効である量のpH緩衝液系を含む。いくつかの実施形態において、pHは、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、又は少なくとも10であり得る。いくつかの実施形態において、pHは、最大10、最大9、最大8、最大7、最大6、最大5、最大4、又は最大3であり得る。この段落に記載される下限及び上限値のうちのいずれかが、本開示内に含まれる範囲を形成するように組み合わせられ得、例えば、ハイブリダイゼーション緩衝液のpHは、約4～約8の範囲であり得る。ハイブリダイゼーション緩衝液のpHは、この範囲内のいずれかの値、例えば、約pH7.8を有し得ることが、当業者には認識されよう。いくつかの場合において、pH範囲は、約3～約10である。いくつかの実施形態において、開示されるハイブリダイゼーション緩衝剤配合物は、約pH3～pH10の範囲にわたるpHの調整を含み得、好ましい緩衝剤範囲は、5～9である。

30

【0584】

本明細書に記載されるハイブリダイゼーション緩衝液は、核酸の融解温度を制御するための添加剤（例えば、極性非プロトン性溶媒）を含み、組成物中で使用される他の薬剤に依存して変動し得る。核酸の融解温度を制御するための添加剤の量は、配合物の総体積に基づいて、約1体積%、2体積%、3体積%、5体積%、10体積%、15体積%、20体積%、25体積%、30体積%、35体積%、40体積%、50体積%、60体積%、又は約1体積%、2体積%、3体積%、5体積%、10体積%、15体積%、20体積%、25体積%、30体積%、35体積%、40体積%、50体積%、60体積%超、又はそれ以上である。いくつかの場合において、核酸の融解温度を制御するための添加剤の量は、配合物の総体積に基づいて、約2体積%超である。いくつかの場合において、核酸の融解温度を制御するための添加剤の量は、配合物の総体積に基づいて、5体積%超である。いくつかの場合において、核酸の融解温度を制御するための添加剤の量は、配合物の総体積に基づいて、約3体積%、5体積%、10体積%、12.5体積%、15体積%、20体積%、25体積%、30体積%、35体積%、40体積%、50体積%、60体積%

40

50

、70体積%、80体積%、90体積%未満、又はそれ以上である。いくつかの実施形態において、核酸の融解温度を制御するための添加剤の量は、配合物の総体積に基づいて、約1体積%～40体積%、1体積%～35体積%、2体積%～50体積%、2体積%～40体積%、2体積%～35体積%、2体積%～30体積%、2体積%～25体積%、2体積%～20体積%、2体積%～10体積%、5体積%～50体積%、5体積%～40体積%、5体積%～35体積%、5体積%～30体積%、5体積%～25体積%、5体積%～20体積%の範囲である。いくつかの実施形態において、核酸の融解温度を制御するための添加剤の量は、配合物の総体積に基づいて、約2体積%～20体積%の範囲である。いくつかの場合において、核酸の融解温度を制御するための添加剤の量は、配合物の総体積に基づいて、約5体積%～10体積%の範囲である。

10

【0585】

いくつかの実施形態において、開示されるハイブリダイゼーション緩衝液配合物は、核酸二重鎖融解温度を改変する添加剤の添加を含み得る。核酸融解温度を改変するために使用され得る好適な添加剤の例としては、ホルムアミドが挙げられるが、これに限定されない。いくつかの実施形態において、ハイブリダイゼーション緩衝液配合物中に含まれる融解温度添加剤の体積による百分率は、約1%～約50%の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、融解温度添加剤の体積による百分率は、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、又は少なくとも50%であり得る。いくつかの実施形態において、融解温度添加剤の体積による百分率は、50%、最大45%、最大40%、最大35%、最大30%、最大25%、最大20%、最大15%、最大10%、最大5%、又は最大1%であり得る。この段落に記載される下限及び上限値のうちのいずれかが、本開示内に含まれる範囲を形成するように組み合わせられ得、例えば、融解温度添加剤の体積による百分率は、約10%～約25%の範囲であり得る。融解温度添加剤の体積による百分率は、この範囲内のいずれかの値、例えば、約22.5%を有し得ることが、当業者には認識されよう。

20

【0586】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるハイブリダイゼーション緩衝液は、DNA水和に影響する添加剤を含む：いくつかの実施形態において、開示されるハイブリダイゼーション緩衝液配合物は、核酸水和に影響する添加剤の添加を含み得る。例としては、ベタイン、尿素、グリシンベタイン、又はそれらのいずれかの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ハイブリダイゼーション緩衝液配合物中に含まれる水和添加剤の体積による百分率は、約1%～約50%の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、水和添加剤の体積による百分率は、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、又は少なくとも50%であり得る。いくつかの実施形態において、水和添加剤の体積による百分率は、50%、最大45%、最大40%、最大35%、最大30%、最大25%、最大20%、最大15%、最大10%、最大5%、又は最大1%であり得る。この段落に記載される下限及び上限値のうちのいずれかが、本開示内に含まれる範囲を形成するように組み合わせられ得、例えば、水和添加剤の体積による百分率は、約1%～約30%の範囲であり得る。融解温度添加剤の体積による百分率は、この範囲内のいずれかの値、例えば、約6.5%を有し得ることが、当業者には認識されよう。

30

40

【0587】

シーケンシングポリメラーゼ

本開示は、核酸分子をシーケンシングするための方法であって、本明細書に記載されるシーケンシング方法のうちのいずれかが、少なくとも1つのタイプのシーケンシングポリメラーゼ及び複数のヌクレオチドを用いるか、又は少なくとも1つのタイプのシーケンシングポリメラーゼ及び複数のヌクレオチド及び複数の多価分子を用いる、方法を提供する。いくつかの実施形態において、シーケンシングポリメラーゼ（複数可）は、コンカテマ

50

ーテンプレート分子におけるヌクレオチドの反対側の相補的ヌクレオチドを組み込むことが可能である。いくつかの実施形態において、シーケンシングポリメラーゼ（複数可）は、コンカテマーテンプレート分子におけるヌクレオチドの反対側の多価分子の相補的ヌクレオチド単位に結合することが可能である。いくつかの実施形態において、複数のシーケンシングポリメラーゼは、組換え変異型ポリメラーゼを含む。

【0588】

ヌクレオチド及び／又は多価分子でのシーケンシングにおける使用に好適であるポリメラーゼの例としては、クレノウDNAポリメラーゼ；*Thermus aquaticus* DNAポリメラーゼI（Taqポリメラーゼ）；*KlenTaq*ポリメラーゼ；*Candidatus altiaarchaeales* 古細菌；*Candidatus Hadarchaeum Yellowstoneense*；*Hadesarchaea* 古細菌；*Euryarchaeota* 古細菌；*Thermoplasma* 古細菌；*Thermococcus* ポリメラーゼ、例えば、*Thermococcus litoralis*、バクテリオファージT7 DNAポリメラーゼ；ヒトアルファ、デルタ、及びエプシロンDNAポリメラーゼ；バクテリオファージポリメラーゼ、例えば、T4、RB69、及びphi29バクテリオファージDNAポリメラーゼ；*Pyrococcus furiosus* DNAポリメラーゼ（Pfuポリメラーゼ）；*Bacillus subtilis* DNAポリメラーゼIII；*E. coli* DNAポリメラーゼIIIALファ及びエプシロン；9 degree Nポリメラーゼ；逆転写酵素、例えば、HIVタイプM若しくはO逆転写酵素；トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素；モロニー Maus 白血病ウイルス（MMLV）逆転写酵素；又はテロメラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。DNAポリメラーゼの更なる非限定的な例としては、様々な古細菌族、例えば、*Aeropyrum*、*Archaeoglobus*、*Desulfurococcus*、*Pyrobaculum*、*Pyrococcus*、*Pyrolobus*、*Pyrodictum*、*Staphylothermus*、*Stetteria*、*Sulfolobus*、*Thermococcus*、及び*Vulcanisaeta*などからのもの、又はそれらのバリエーションが挙げられ、これらは、当該技術分野で既知のこのようなポリメラーゼ、例えば、9 degrees N、VENT、DEEP VENT、THERMINATOR、Pfu、KOD、Pfx、Tgo、及びRB69ポリメラーゼを含む。

【0589】

ヌクレオチド

本開示は、核酸分子を、ヌクレオチドを使用してシーケンシングするための方法であって、複数のヌクレオチドにおける少なくとも1つのヌクレオチドが、塩基、糖、及び少なくとも1つのリン酸基を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドにおける少なくとも1つのヌクレオチドは、芳香族塩基、5炭素糖（例えば、リボース又はデオキシリボース）、及び1つ以上のリン酸基（例えば、1つ～10個のリン酸基）を含む。複数のヌクレオチドは、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及びdUTPからなる群から選択される少なくとも1つのタイプのヌクレオチドを含むことができる。複数のヌクレオチドは、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPからなる群から選択される2つ以上のタイプのヌクレオチドのいずれかの組み合わせの混合物において含むことができる。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドにおける少なくとも1つのヌクレオチドは、ヌクレオチド類似体でない。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドにおける少なくとも1つのヌクレオチドは、ヌクレオチド類似体を含む。

【0590】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される、核酸分子をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、複数のヌクレオチドにおける少なくとも1つのヌクレオチドは、1、2、又は3つのリン原子の鎖を含み、鎖は、典型的には、糖部分の5'炭素に、エステル又はホスホラミド結合を介して付着している。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドにおける少なくとも1つのヌクレオチドは、リン鎖を有する

類似体であり、リン鎖において、リン原子と一緒に、介在するO、S、NH、メチレン、又はエチレンと結合している。いくつかの実施形態において、鎖におけるリン原子は、O、S、又はBH₃を含む置換された側鎖基を含む。いくつかの実施形態において、鎖は、ホスホロアミデート、ホスホロチオエート、ホスホルジチオエート、及びO-メチルホスホロアミダイト基を含む類似体で置換されたリン酸基を含む。

【0591】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される、核酸分子をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、複数のヌクレオチドにおける少なくとも1つのヌクレオチドは、ターミネーターヌクレオチド類似体を含み、ターミネーターヌクレオチド類似体は、鎖終結部分（例えば、ブロッキング部分）を糖2'位、糖3'位、又は糖2'及び3'位において有する。いくつかの実施形態において、鎖終結部分は、プライマー伸長反応中の新生の鎖における後続のヌクレオチド単位又は遊離ヌクレオチドのポリメラーゼ触媒組み込みを阻害することができる。いくつかの実施形態において、鎖終結部分は、3'糖ヒドロキシル位に付着しており、3'糖ヒドロキシル位において、糖は、リボース又はデオキシリボース糖部分を含む。いくつかの実施形態において、鎖終結部分は、ポリメラーゼ触媒ヌクレオチド組み込み反応において後続のヌクレオチドで伸長可能である3'OH糖基を有するヌクレオチドを生成するように、3'糖ヒドロキシル位から除去可能／切断可能である。いくつかの実施形態において、鎖終結部分は、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリル基、アリール基、ベンジル基、アジド基、アミン基、アミド基、ケト基、イソシアネート基、リン酸基、チオ基、ジスルフィド基、カーボネート基、尿素基、又はシリル基を含む。いくつかの実施形態において、鎖終結部分は、例えば、鎖終結部分を化学剤、pH変化、光、又は熱と反応させることによって、ヌクレオチドから切断可能／除去可能である。いくつかの実施形態において、鎖終結部分であるアルキル、アルケニル、アルキニル、及びアリルは、ペペリジンを含む又は2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノン（DDQ）を有するテトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（0）（Pd（PPh₃）₄）で切断可能である。いくつかの実施形態において、鎖終結部分であるアリール及びベンジルは、H₂ Pd / Cで切断可能である。いくつかの実施形態において、鎖終結部分であるアミン、アミド、ケト、イソシアネート、ホスフェート、チオ、ジスルフィドは、ホスフィン、又はベータメルカプトエタノール若しくはジチオトリートル（DTT）を含むチオール基で切断可能である。いくつかの実施形態において、鎖終結部分であるカーボネートは、MeOH中の炭酸カリウム（K₂CO₃）、ピリジン中のトリエチルアミン、又は酢酸中のZn（AcOH）で切断可能である。いくつかの実施形態において、鎖終結部分である尿素及びシリルは、フッ化テトラブチルアンモニウム、ピリジン-HF、フッ化アンモニウム、又はトリエチルアミントリヒドロフルオリドで切断可能である。

【0592】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される、核酸分子をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、複数のヌクレオチドにおける少なくとも1つのヌクレオチドは、ターミネーターヌクレオチド類似体を含み、ターミネーターヌクレオチド類似体は、鎖終結部分（例えば、ブロッキング部分）を糖2'位、糖3'位、又は糖2'及び3'位において有する。いくつかの実施形態において、鎖終結部分は、アジド（azide）、アジド（azido）、及びアジドメチル基を含む。いくつかの実施形態において、鎖終結部分は、3'-O-アジド又は3'-O-アジドメチル基を含む。いくつかの実施形態において、鎖終結部分であるアジド（azide）、アジド（azido）、及びアジドメチル基は、ホスフィン化合物で切断可能／除去可能である。いくつかの実施形態において、ホスフィン化合物は、誘導体化トリアルキルホスフィン部分又は誘導体化トリアリールホスフィン部分を含む。いくつかの実施形態において、ホスフィン化合物は、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCPEP）、又はビス-スルホトリフェニルホスフィン（BS-TPP）、又はトリス（ヒドロキシプロピル）ホスフィン（THPP）を含む。いくつかの実施形態において、切断剤は、4-ジメチルアミノピリジン（4-

DMA P)を含む。

【0593】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される、核酸分子をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、ヌクレオチドは、3'-デオキシヌクレオチド、2', 3'-ジデオキシヌクレオチド、3'-メチル、3'-アジド、3'-アジドメチル、3'-O-アジドアルキル、3'-O-エチニル、3'-O-アミノアルキル、3'-O-フルオロアルキル、3'-フルオロメチル、3'-ジフルオロメチル、3'-トリフルオロメチル、3'-スルホニル、3'-マロニル、3'-アミノ、3'-O-アミノ、3'-スルフヒドラル、3'-アミノメチル、3'-エチル、3'-ブチル、3'-tertブチル、3'-フルオレニルメチルオキシカルボニル、3'-tertブチルオキシカルボニル、3'-O-アル 10
キルヒドロキシルアミノ基、3'-ホスホロチオエート、及び3'-O-ベンジル、又はそれらの誘導体からなる群から選択される鎖終結部分を含む。

【0594】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される、核酸分子をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、複数のヌクレオチドは、検出可能なレポーター部分で標識された複数のヌクレオチドを含む。検出可能なレポーター部分は、フルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、ヌクレオチド塩基に付着している。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、ヌクレオチド塩基にリンカーで付着しており、リンカーは、塩基から切断可能／除去可能である。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドにおけるヌクレオチドのうちの少なくとも1つは、検出可 20
可能なレポーター部分で標識されていない。いくつかの実施形態において、ヌクレオチドに付着した特定の検出可能なレポーター部分（例えば、フルオロフォア）は、ヌクレオチド塩基の検出及び特定を可能にするように、ヌクレオチド塩基（例えば、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、又はdUTP）に対応することができる。

【0595】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される、核酸分子をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、ヌクレオチド塩基上の切断可能なリンカーは、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリル基、アリール基、ベンジル基、アジド基、アミン基、アミド基、ケト基、イソシアネート基、リン酸基、チオ基、ジスルフィド基、カーボネート基、尿素基、又はシリル基を含む切断可能な部分を含む。いくつかの実施 30
形態において、塩基上の切断可能なリンカーは、切断可能な部分を化学剤、pH変化、光、又は熱と反応させることによって、塩基から切断可能／除去可能である。いくつかの実施形態において、切断可能な部分であるアルキル、アルケニル、アルキニル、及びアリルは、ピペリジンを有する又は2, 3-ジクロロ-5, 6-ジシアノ-1, 4-ベンゾキノン (DDQ) を有するテトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (0) (Pd (PPh₃)₄) で切断可能である。いくつかの実施形態において、切断可能な部分であるアリール及びベンジルは、H₂ Pd/Cで切断可能である。いくつかの実施形態において、切断可能な部分であるアミン、アミド、ケト、イソシアネート、ホスフェート、チオ、ジスルフィドは、ホスフィン、又はベータメルカプトエタノール若しくはジチオトリ 40
トール (DTT) を含むチオール基で切断可能である。いくつかの実施形態において、切断可能な部分であるカーボネートは、MeOH中の炭酸カリウム (K₂CO₃)、ピリジン中のトリエチルアミン、又は酢酸中のZn (AcOH) で切断可能である。いくつかの実施形態において、切断可能な部分である尿素及びシリルは、フッ化テトラブチルアンモニウム、ピリジン-HF、フッ化アンモニウム、又はトリエチルアミントリヒドロフルオリドで切断可能である。

【0596】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される、核酸分子をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、ヌクレオチド塩基上の切断可能なリンカーは、アジド (azide)、アジド (azido)、又はアジドメチル基を含む切断可能な部分を含む。いくつかの実施形態において、切断可能な部分であるアジド (azide)、ア 50

ジド (a z i d o)、及びアジドメチル基は、ホスフィン化合物で切断可能／除去可能である。いくつかの実施形態において、ホスフィン化合物は、誘導体化トリアルキルホスフィン部分又は誘導体化トリアリールホスフィン部分を含む。いくつかの実施形態において、ホスフィン化合物は、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、又はビススルホトリフェニルホスフィン(BS-TPP)、又はトリス(ヒドロキシプロピル)ホスフィン(THPP)を含む。いくつかの実施形態において、切断剤は、4-ジメチルアミノピリジン(4-DMAP)を含む。

【0597】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される、核酸分子をシーケンシングするための方法のうちのいずれかにおいて、鎖終結部分(例えば、糖2'及び／又は糖3'位におけるもの)、及びヌクレオチド塩基上の切断可能なリンカーは、同じ又は異なる切断可能な部分を有する。いくつかの実施形態において、(例えば、糖2'及び／又は糖3'位における)鎖終結部分、及び塩基に結合した検出可能なレポーター部分は、同じ化学剤で化学的に切断可能／除去可能である。いくつかの実施形態において、(例えば、糖2'及び／又は糖3'位における)鎖終結部分、及び塩基に結合した検出可能なレポーター部分は、異なる化学剤で化学的に切断可能／除去可能である。

【0598】

多価分子

本開示は、多価分子を用いる、核酸分子をシーケンシングするための方法を提供する。いくつかの実施形態において、多価分子は、複数のヌクレオチドアームを含み、複数のヌクレオチドアームは、コアに付着しており、スターバースト、ヘルタースケルター、又はボトルブラシ構成を含むいずれかの構成を有する(例えば、図12~15)。多価分子は、(1)コア及び(2)複数のヌクレオチドアームを含み、複数のヌクレオチドアームは、(i)コア付着部分、(ii)PEG部分を含むスペーサー、(iii)リンカー、及び(iv)ヌクレオチド単位を含み、コアは、複数のヌクレオチドアームに付着しており、スペーサーは、リンカーに付着しており、リンカーは、ヌクレオチド単位に付着している。いくつかの実施形態において、ヌクレオチド単位は、塩基、糖、及び少なくとも1つのリン酸基を含み、リンカーは、塩基を介して、ヌクレオチド単位に付着している。いくつかの実施形態において、リンカーは、脂肪族鎖又はオリゴエチレングリコール鎖を含み、両方のリンカー鎖は、2~6つのサブユニットを有する。いくつかの実施形態において、リンカーはまた、芳香族部分を含む。例示的なヌクレオチドアームは、図16に示される。例示的な多価分子は、図12~15に示される。例示的なスペーサーは、図17(上部)に示され、例示的なリンカーは、図17(下部)及び図18に示される。リンカーに付着した例示的なヌクレオチドは、図19~21に示される。例示的なビオチン化ヌクレオチドアームは、図22に示される。

【0599】

いくつかの実施形態において、多価分子は、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、複数のヌクレオチドアームは、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及びdUTPからなる群から選択される同じタイプのヌクレオチド単位を有する。

【0600】

いくつかの実施形態において、多価分子は、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、各アームは、ヌクレオチド単位を含む。いくつかの態様において、ヌクレオチド単位は、芳香族塩基、5炭素糖(例えば、リボース又はデオキシリボース)、及び1つ以上のリン酸基(例えば、1つ~10個のリン酸基)を含む。複数の多価分子は、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及びdUTPからなる群から選択される1つの種類のヌクレオチド単位を有する1つの種類の多価分子を含むことができる。複数の多価分子は、2つ以上のタイプの多価分子のいずれかの組み合わせの混合物において含むことができ、混合物中の個々の多価分子は、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、及び／又はdUTPからなる群から選択されるヌクレオチド単位を含む。

【0601】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド単位は、1、2、又は3つのリン原子の鎖を含み、鎖は、典型的には、糖部分の5'炭素に、エステル又はホスホラミド結合を介して付着している。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのヌクレオチド単位は、リン鎖を有するヌクレオチド類似体であり、リン鎖において、リン原子と一緒に、介在するO、S、NH、メチレン、又はエチレンと結合している。いくつかの実施形態において、鎖におけるリン原子は、O、S、又はBH₃を含む置換された側鎖基を含む。いくつかの実施形態において、鎖は、ホスホロアミデート、ホスホロチオエート、ホスホルジチオエート、及びO-メチルホスホロアミダイト基を含む類似体で置換されたリン酸基を含む。

【0602】

いくつかの実施形態において、多価分子は、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、個々のヌクレオチドアームは、ヌクレオチド単位を含み、ヌクレオチド単位は、鎖終結部分（例えば、ブロッキング部分）を糖2'位、糖3'位、又は糖2'及び3'位において有するヌクレオチド類似体である。いくつかの実施形態において、ヌクレオチド単位は、鎖終結部分（例えば、ブロッキング部分）を糖2'位、糖3'位、又は糖2'及び3'位において含む。いくつかの実施形態において、鎖終結部分は、プライマー伸長反応中の新生の鎖における後続のヌクレオチド単位又は遊離ヌクレオチドのポリメラーゼ触媒組み込みを阻害することができる。いくつかの実施形態において、鎖終結部分は、3'糖ヒドロキシル位に付着しており、3'糖ヒドロキシル位において、糖は、リボース又はデオキシリボース糖部分を含む。いくつかの実施形態において、鎖終結部分は、ポリメラーゼ触媒ヌクレオチド組み込み反応において後続のヌクレオチドで伸長可能である3'OH糖基を有するヌクレオチドを生成するように、3'糖ヒドロキシル位から除去可能／切断可能である。いくつかの実施形態において、鎖終結部分は、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アリル基、アリール基、ベンジル基、アジド基、アミン基、アミド基、ケト基、イソシアネート基、リン酸基、チオ基、ジスルフィド基、カーボネート基、尿素基、又はシリル基を含む。いくつかの実施形態において、鎖終結部分は、例えば、鎖終結部分を化学剤、pH変化、光、又は熱と反応させることによって、ヌクレオチド単位から切断可能／除去可能である。いくつかの実施形態において、鎖終結部分であるアルキル、アルケニル、アルキニル、及びアリルは、ピペリジンを含む又は2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノン（DDQ）を有するテトラキス（トリフェニルホスフィン）パラジウム（0）（Pd(PPh₃)₄）で切断可能である。いくつかの実施形態において、鎖終結部分であるアリール及びベンジルは、H₂Pd/Cで切断可能である。いくつかの実施形態において、鎖終結部分であるアミン、アミド、ケト、イソシアネート、ホスフェート、チオ、ジスルフィドは、ホスフィン、又はベータメルカプトエタノール若しくはジチオトリート（DTT）を含むチオール基で切断可能である。いくつかの実施形態において、鎖終結部分であるカーボネートは、MeOH中の炭酸カリウム（K₂CO₃）、ピリジン中のトリエチルアミン、又は酢酸中のZn（AcOH）で切断可能である。いくつかの実施形態において、鎖終結部分である尿素及びシリルは、フッ化テトラブチルアンモニウム、ピリジン-HF、フッ化アンモニウム、又はトリエチルアミントリヒドロフルオリドで切断可能である。

【0603】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド単位は、鎖終結部分（例えば、ブロッキング部分）を糖2'位、糖3'位、又は糖2'及び3'位において含む。いくつかの実施形態において、鎖終結部分は、アジド（azide）、アジド（azido）、及びアジドメチル基を含む。いくつかの実施形態において、鎖終結部分は、3'-O-アジド又は3'-O-アジドメチル基を含む。いくつかの実施形態において、鎖終結部分であるアジド（azide）、アジド（azido）、及びアジドメチル基は、ホスフィン化合物で切断可能／除去可能である。いくつかの実施形態において、ホスフィン化合物は、誘導体化トリアルキルホスフィン部分又は誘導体化トリアリールホスフィン部分を含む。いくつかの実施形態において、ホスフィン化合物は、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TC

EP)、又はビススルホトリフェニルホスフィン(BS-TPP)、又はトリス(ヒドロキシプロピル)ホスフィン(THPP)を含む。いくつかの実施形態において、切断剤は、4-ジメチルアミノピリジン(4-DMAP)を含む。

【0604】

いくつかの実施形態において、3'-デオキシヌクレオチド、2', 3'-ジデオキシヌクレオチド、3'-メチル、3'-アジド、3'-アジドメチル、3'-O-アジドアルキル、3'-O-エチニル、3'-O-アミノアルキル、3'-O-フルオロアルキル、3'-フルオロメチル、3'-ジフルオロメチル、3'-トリフルオロメチル、3'-スルホニル、3'-マロニル、3'-アミノ、3'-O-アミノ、3'-スルフヒドラル、3'-アミノメチル、3'-エチル、3'-ブチル、3'-tertブチル、3'-フルオレニルメチルオキシカルボニル、3'-tertブチルオキシカルボニル、3'-O-アルキルヒドロキシルアミノ基、3'-ホスホロチオエート、及び3-O-ベンジル、又はそれらの誘導体からなる群から選択される鎖終結部分を含むヌクレオチド単位。

【0605】

いくつかの実施形態において、多価分子は、複数のヌクレオチドアームに付着したコアを含み、ヌクレオチドアームは、スパーサー、リンカー、及びヌクレオチド単位を含み、コア、リンカー、及び／又はヌクレオチド単位は、検出可能なレポーター部分で標識されている。いくつかの実施形態において、検出可能なレポーター部分は、フルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、多価分子に付着した特定の検出可能なレポーター部分(例えば、フルオロフォア)は、ヌクレオチド塩基の検出及び特定を可能にするように、ヌクレオチド単位の塩基(例えば、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、又はdUTP)に対応することができる。

20

【0606】

いくつかの実施形態において、多価分子の少なくとも1つのヌクレオチドアームは、検出可能なレポーター部分に付着したヌクレオチド単位を有する。いくつかの実施形態において、検出可能なレポーター部分は、ヌクレオチド塩基に付着している。いくつかの実施形態において、検出可能なレポーター部分は、フルオロフォアを含む。いくつかの実施形態において、多価分子に付着した特定の検出可能なレポーター部分(例えば、フルオロフォア)は、ヌクレオチド塩基の検出及び特定を可能にするように、ヌクレオチド単位の塩基(例えば、dATP、dGTP、dCTP、dTTP、又はdUTP)に対応することができる。

30

【0607】

いくつかの実施形態において、多価分子のコアは、アビジン様又はストレプトアビジン様部分を含み、コア付着部分は、ビオチンを含む。いくつかの実施形態において、コアは、ストレプトアビジンタイプ又はアビジンタイプの部分を含み、ストレプトアビジンタイプ又はアビジンタイプの部分は、少なくとも1つのビオチン部分に結合することができる。アビジンタンパク質、並びにアビジンのいずれかの誘導体、類似体、及び他の非天然形態を含む。アビジン部分の他の形態は、天然及び組換えアビジン及びストレプトアビジン、並びに誘導体化分子、例えば、非グリコシル化アビジン及び切断型ストレプトアビジンを含む。例えば、アビジン部分は、アビジンの脱グリコシル化形態、Streptomyces(例えば、Streptomyces avidinii)によって産生される細菌ストレプトアビジン、並びに誘導体化形態、例えば、N-アシルアビジン、例えば、N-アセチル、N-フタリル、及びN-スクシニルアビジン、並びに市販の製品であるEXTRAVIDIN、CAPTAVIDIN、NEUTRAVIDIN、及びNEUTRALITE AVIDINを含む。

40

【0608】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される、核酸分子をシーケンシングするための方法のうちのいずれかは、結合複合体を形成することであって、結合複合体が、(i)ポリメラーゼ、プライマーと二重鎖化された核酸コンカテマー分子、及びヌクレオチドを含むか、又は結合複合体が、(ii)ポリメラーゼ、プライマーと二重鎖化された核

50

酸コンカテマー分子、及び多価分子のヌクレオチド単位を含む、形成することを含むことができる。いくつかの実施形態において、結合複合体は、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、又は1秒間超の持続時間を有する。結合複合体は、約0.1～0.25秒、若しくは約0.25～0.5秒、若しくは約0.5～0.75秒、若しくは約0.75～1秒、若しくは約1～2秒、若しくは約2～3秒、若しくは約3～4秒、若しくは約4～5秒を超える持続時間を有する、及び／又は本方法が15℃以上、20℃以上、25℃以上、35℃以上、37℃以上、42℃以上、55℃以上、60℃以上、若しくは72℃以上、若しくは80℃以上、又は前述のうちのいずれかによって定義される範囲内で実施されるか又は実施され得る。結合複合体（例えば、三元複合体）は、ポリメラーゼ、テンプレート分子、プライマー、及び／又はヌクレオチド単位若しくはヌクレオチドのうちのいずれかの間の相互作用の解離を引き起こす条件に供されるまで依然として安定している。例えば、解離条件は、結合複合体を、洗浄剤、EDTA、及び／若しくは水のうちのいずれか1つ、又はそれらのいずれかの組み合わせと接触させることを含む。いくつかの実施形態において、本開示は、結合複合体が、検出ステップにおいて20超のコントラスト対ノイズ比を示す表面上に堆積している、それに付着している、又はそれにハイブリダイズしている、当該方法を提供する。いくつかの実施形態において、本開示は、接触させることが、ヌクレオチド又はヌクレオチド単位が、テンプレート核酸の次の塩基と相補的であるときに、結合複合体を安定化し、ヌクレオチド又はヌクレオチド単位が、テンプレート核酸の次の塩基と相補的でないときに、結合複合体を不安定化する条件下で実行される、当該方法を提供する。

10

20

【実施例】

【0609】

以下の実施例は、例示的であることが意図されており、本開示の実施形態を更に理解するために使用され得、本教示の範囲を限定するとしてなんら解釈されるべきではない。

【0610】

実施例1：直鎖核酸ライブラリ

市販のキットを使用して、少なくとも1つのユニバーサルシーケンシングプライマーに付加された目的の配列（挿入）と、末端におけるユニバーサル結合配列P5（例えば、第1の表面プライマー）及びP7（例えば、第2の表面プライマー）と、を有する、直鎖核酸ライブラリを調製した。市販のキットは、次世代シーケンシングプラットフォーム、例えば、Illuminaのためのライブラリ分子を調製することが意図されている。目的の配列を含有する入力核酸は、様々な生物からのDNA及びRNAを含んだ。入力核酸を、Covarisを使用して剪断して、約200、250、350、及び400bpの挿入サイズを達成した。直鎖ライブラリ分子を調製するために使用された入力断片化核酸の量は、50ng、100ng、500ng、及び1ugを含んだ。

30

【0611】

入力核酸を、*Haemophilus influenzae*（38%のGC）、*E. coli*（51%のGC）、*Rhodopseudomonas palustris*（65%のGC）、*PhiX*、ヒト、ヒトエキソーム、及びヒトmRNAから得た。また、メタゲノムDNA試料を、直鎖ライブラリ分子を調製するために使用した。メタゲノム試料は、以下、*Bacillus cereus*（ATCC 10987）、*Bifidobacterium adolescentis*（ATCC 15703）、*Clostridium beijerinckii*（ATCC 35702）、*Deinococcus radiodurans*（ATCC BAA-816）、*Enterococcus faecalis*（ATCC 47077）、*Escherichia coli*（ATCC 700926）、*Lactobacillus gasseri*（ATCC 33323）、*Rhodobacter sphaeroides*（ATCC 17029）、*Staphylococcus epidermidis*（ATCC 12228）、及び*Streptococcus mutans*（ATCC 700610）の各々のおよそ10%のDNAを含有した。

40

50

【0612】

実施例2：ライブラリースプリント複合体の調製

直鎖ライブラリ調製物（例えば、0.25、0.5、又は1 pmol）を、サーマルサイクラー装置において、100 mMの酢酸カリウム及び30 mMのHEPES（pH 7.5）を含有するアニール緩衝液中の二本鎖スプリントアダプター（200）にアニールした。アニールプログラムは、95℃で5分、37℃で5分、及び37℃での保持を含んだ。

【0613】

二本鎖スプリントアダプターは、第2のスプリント鎖（400）にハイブリダイズした第1のスプリント鎖（300）を含んだ。例示的な二本鎖スプリントアダプターを、図2に示す。

10

【0614】

第2のスプリント鎖（400）は、第3の表面プライマーとハイブリダイズする第1のサブ領域、及び第4の表面プライマー（又はその相補的配列）とハイブリダイズする第2のサブ領域を含んだ。第2のスプリント鎖（400）の5'末端は、リン酸化された末端を保有した。第2のスプリント鎖（400）は、市販のライブラリ調製キットにおいて見出されないユニバーサル配列を保有するように設計されている。

【0615】

第1のスプリント鎖（300）は、直鎖ライブラリ分子の一方の末端におけるP5配列とハイブリダイズする第1の領域（320）、第2のスプリント鎖（400）とハイブリダイズした内部領域（310）、及び直鎖ライブラリ分子の他方の末端におけるP7配列とハイブリダイズする第2の領域（330）を含んだ。

20

【0616】

実施例3：共有結合性閉環状ライブラリ分子の調製

実施例2からのアニール混合物を、アニール混合物に、T7 DNAリガーゼ及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ及びT4 DNAリガーゼ反応緩衝液を添加することによって、酵素ライゲーション及びリン酸化反応に供した。酵素混合物を、75℃に設定された加熱された蓋を有するサーマルサイクリング装置においてインキュベートした。サーマルサイクリング装置プログラムは、37℃で10分、65℃で10分、及び4℃での保持を含んだ。ライゲーション及びリン酸化反応は、第1のスプリント鎖（300）にハイブリダイズした共有結合性閉環状ライブラリ分子（600）を生成した。

30

【0617】

酵素エキソヌクレアーゼ消化を、ライゲーション／リン酸化反応混合物に、T7エキソヌクレアーゼ及び熱不安定性エキソヌクレアーゼを添加することによって行った。エキソヌクレアーゼ反応混合物を、37℃で10分、80℃で2分、及び4℃での保持でプログラムされたサーマルサイクリング装置においてインキュベートした。

【0618】

エキソヌクレアーゼ反応混合物を、SPRI SELECTビーズ（Beckman Coulterからのもの）を使用して、清浄化の複数のサイクルに供した。

【0619】

共有結合性閉環状ライブラリ分子（例えば、一本鎖分子）の清浄化された調製物の収率を、Qubit又はqPCRを使用して定量化した。平均パーセント環状化回収率を、図24に示す。レーン1：Haemophilus influenzae（38%のGC）、レーン2：E. coli（51%のGC）、レーン3：Rhodospseudomonas palustris（65%のGC）、レーン4：PhiX、レーン5：ヒト、レーン6：ヒトエキソーム、レーン7：ヒトmRNA。

40

【0620】

実施例4：ローリングサークル増幅及びシーケンシング

実施例3からの共有結合性閉環状ライブラリ分子を、低非特異的結合コーティングで不動態化された支持体上に、高効率ハイブリダイゼーション緩衝液の存在下で分配し、支持

50

体上ローリングサークル増幅に供して、固定化されたコンカテマーを生成した。固定化されたコンカテマーの平均ポロニー密度を、図25に示す。レーン1：無細胞DNA、レーン2：E. coli、レーン3：ヒト、レーン4：メタゲノムDNA、及びレーン5：Phix。

【0621】

実施例5：多価分子及びヌクレオチドを使用するシーケンシング

コンカテマーを、再帰的な2段階のシーケンシング反応に、第1の段階において、蛍光標識多価分子を使用して供し、第2の段階において、非標識のヌクレオチド類似体（例えば、3'鎖ターミネーターブロッキング基）を使用して供した。

【0622】

2段階のシーケンシング反応を、複数のコンカテマーテンプレート分子が上に固定化された（例えば、ポロニーが固定化された）フローセル上で行った。

【0623】

第1段階のシーケンシング反応を、複数の可溶性シーケンシングプライマーを、フローセルに固定化されたコンカテマーテンプレート分子にハイブリダイズさせて、固定化されたプライマー-コンカテマー二重鎖を形成することによって行なった。複数の第1のシーケンシングポリメラーゼを、フローセル上に流し（例えば、固定化されたプライマー-コンカテマー二重鎖に接触させ）、シーケンシングポリメラーゼを、シーケンシングポリメラーゼを二重鎖に結合させるのに好適である条件下でインキュベートして、複合型ポリメラーゼを形成した。蛍光標識多価分子の混合物（例えば、約20~100nMの異なる濃度でのもの）を、フローセル上に、非触媒カチオン（例えば、ストロンチウム、バリウム、及び／又はカルシウム）を含んだ緩衝液の存在下で流し、多価分子の相補的ヌクレオチド単位を、複合型ポリメラーゼに結合させるのに好適である条件下でインキュベートして、ヌクレオチド単位のポリメラーゼ触媒組み込みを有しないアビディティ複合体を形成した。蛍光標識多価分子を、それらのコアにおいて標識した。複合型ポリメラーゼを洗浄した。複合型ポリメラーゼに依然として結合した蛍光標識多価分子の画像を得た。固定化されたコンカテマーにハイブリダイズしたシーケンシングプライマーを保持しつつ（保持された二重鎖）、第1のシーケンシングポリメラーゼ及び多価分子を、洗浄剤を含む緩衝液で洗浄することによって除去した。

【0624】

第1の段階のシーケンシング反応は、複数のアビディティ複合体を、コンカテマーテンプレート分子（例えば、ポロニー）上に形成するのに好適であった。例えば、第1の段階のシーケンシング反応は、（a）第1の核酸プライマー、第1のポリメラーゼ、及び第1の多価分子を、コンカテマーテンプレート分子の第1の部分に結合させ、それによって、第1の結合複合体を形成することであって、第1の多価分子の第1のヌクレオチド単位が、第1のポリメラーゼに結合していた、形成することと、（b）第2の核酸プライマー、第2のポリメラーゼ、及び第1の多価分子を、同じコンカテマーテンプレート分子の第2の部分に結合させ、それによって、第2の結合複合体を形成することであって、第1の多価分子の第2のヌクレオチド単位が、第2のポリメラーゼに結合しており、同じ多価分子を含んだ第1及び第2の結合複合体が、第1のアビディティ複合体を形成した、形成することと、を含んだ。

【0625】

第2の段階のシーケンシング反応を、保持された二本鎖を複数の第2のシーケンシングポリメラーゼと接触させることによって行って、複合型ポリメラーゼを形成した。非標識のヌクレオチド類似体（例えば、3' O-メチルアジドヌクレオチド）の混合物（例えば、約1~5uMの異なる濃度でのもの）を、複合型ポリメラーゼに、触媒カチオン（例えば、マグネシウム及び／又はマンガン）を含んだ緩衝液の存在下で添加し、相補的ヌクレオチドを、複合型ポリメラーゼに結合させるのに好適であり、ヌクレオチドのポリメラーゼ触媒組み込みを促進するのに好適である条件下でインキュベートして、新生の伸長したシーケンシングプライマーを生成した。複合型ポリメラーゼを洗浄した。画像を得なかつ

10

20

30

40

50

た。組み込まれた非標識のヌクレオチド類似体を、3' オーメチルアジド基を除去し伸長可能な3' OH基を生成する切断試薬と反応させた。

【0626】

代替の第2の段階のシーケンシング反応において、蛍光標識ヌクレオチド類似体（例えば、3' オーメチルアジドヌクレオチド）の混合物（例えば、約1～5 μM）を、複合型ポリメラーゼに、触媒カチオン（例えば、マグネシウム及び／又はマンガン）を含んだ緩衝液の存在下で添加し、相補的ヌクレオチドを、複合型ポリメラーゼに結合させるのに好適であり、ヌクレオチドのポリメラーゼ触媒組み込みを促進するのに好適である条件下でインキュベートして、新生の伸長したシーケンシングプライマーを生成した。複合型ポリメラーゼを洗浄した。複合型ポリメラーゼの一部としての組み込まれた蛍光標識ヌクレオチド類似体の画像を得た。組み込まれた蛍光標識ヌクレオチド類似体を、3' オーメチルアジド基を除去し伸長可能な3' OH基を生成する切断試薬と反応させた。

10

【0627】

コンカテマーにハイブリダイズした新生の伸長したシーケンシングプライマーを保持しつつ（保持された二重鎖）、第2のシーケンシングポリメラーゼを、洗浄剤を含む緩衝液で洗浄することによって除去した。反復シーケンシング反応を、第1段階及び第2段階のシーケンシング反応の複数のサイクルを実行することによって行って、伸長したフォワードシーケンシングプライマー鎖を生成した。

【図面】

【図1】

【図2】

20

図1

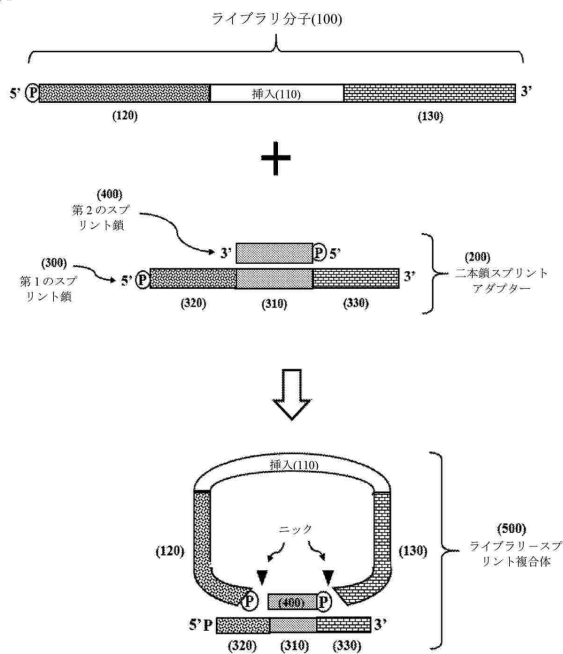
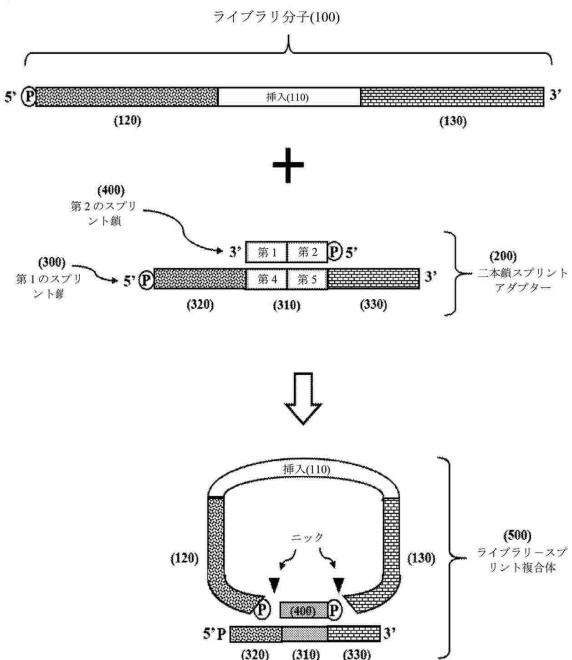


図2

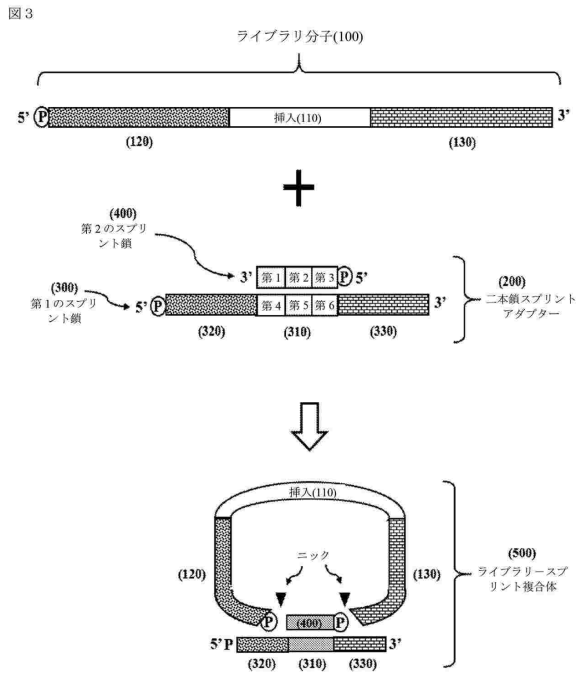


30

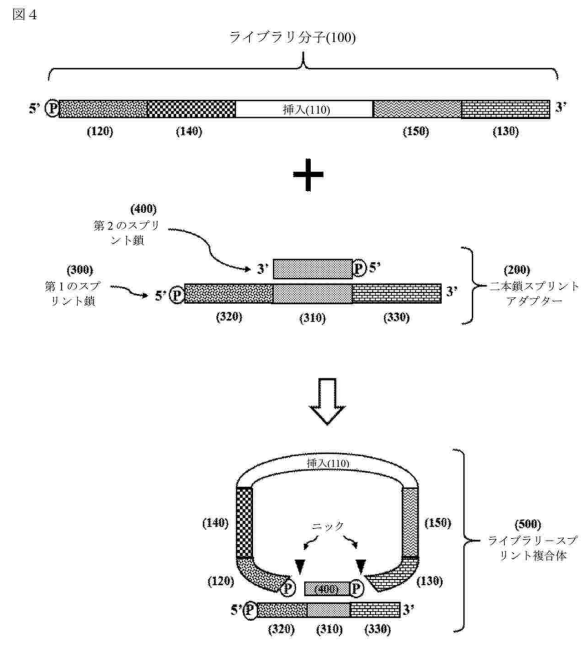
40

50

【図 3】



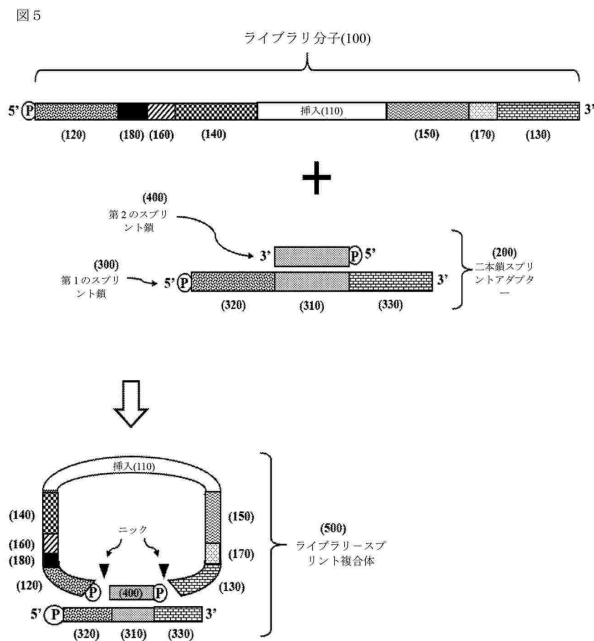
【図 4】



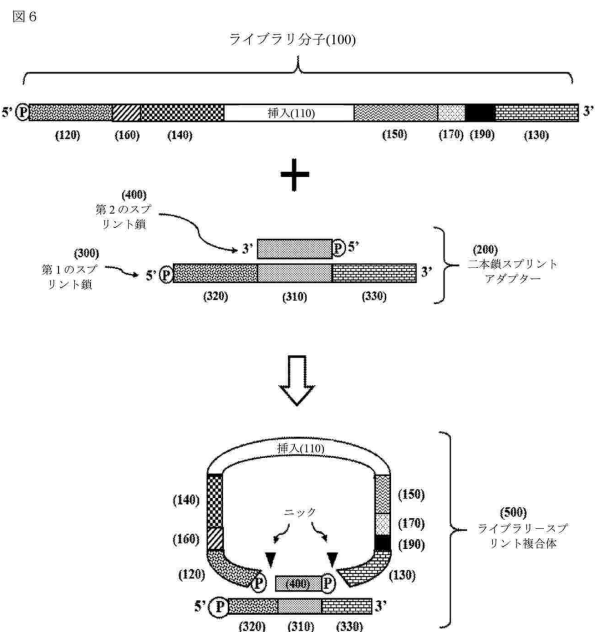
10

20

【図 5】



【図 6】

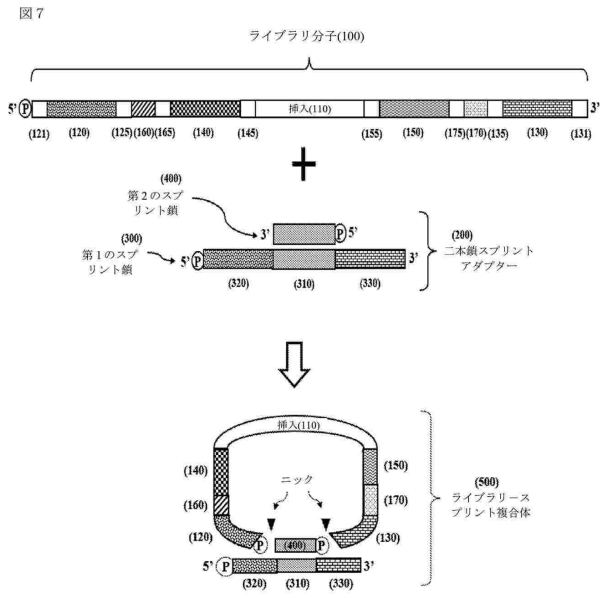


30

40

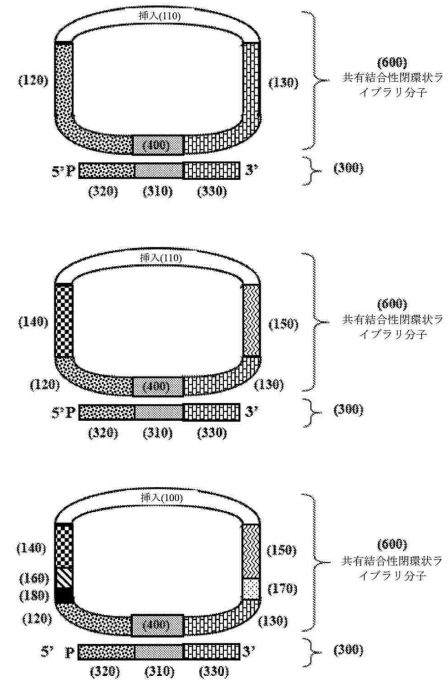
50

【図 7】



【図 8】

図 8

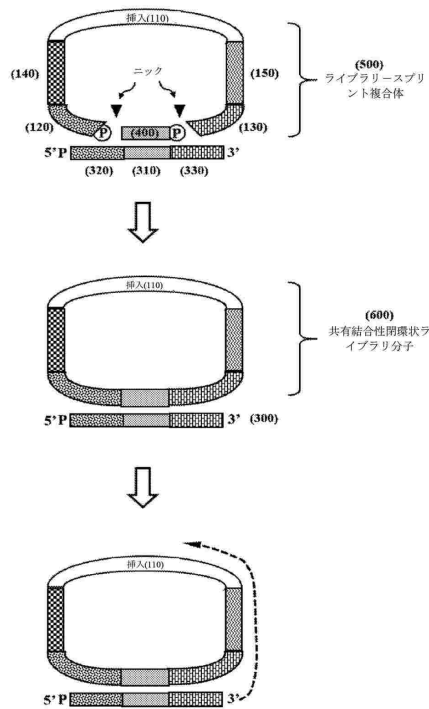


10

20

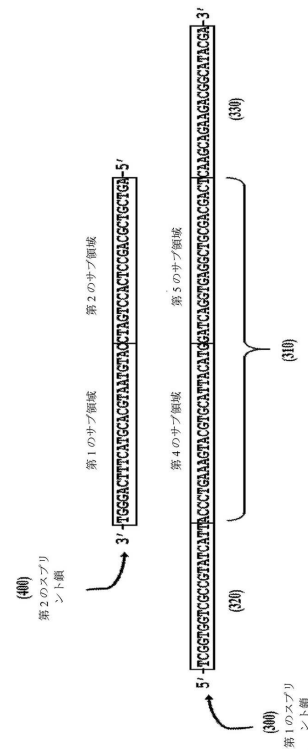
【図 9】

図 9



【図 10】

図 10



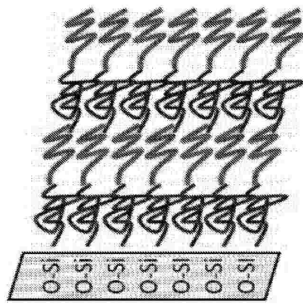
30

40

50

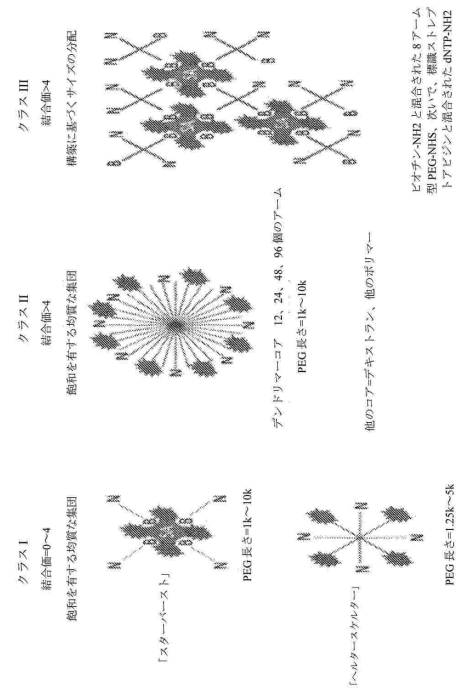
【図 1 1】

図 1 1



【図 1 2】

図 1 2

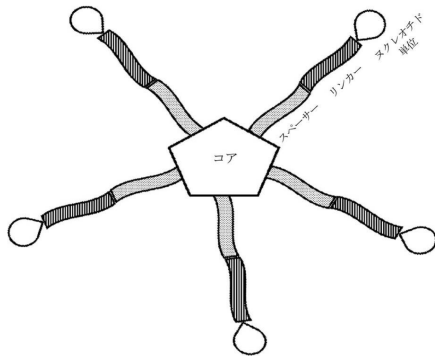


10

20

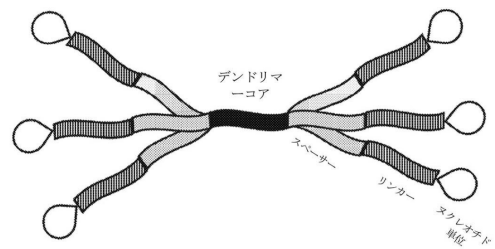
【図 1 3】

図 1 3



【図 1 4】

図 1 4



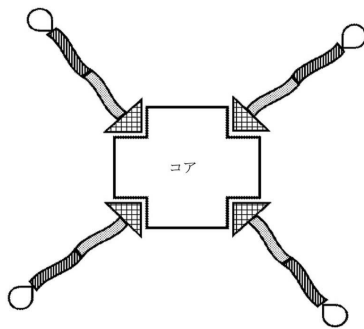
30

40

50

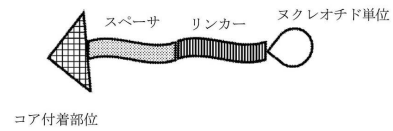
【図 15】

図 15



【図 16】

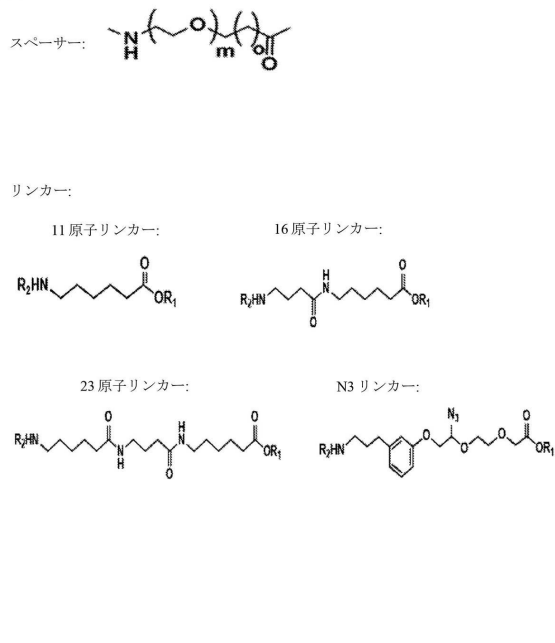
図 16



10

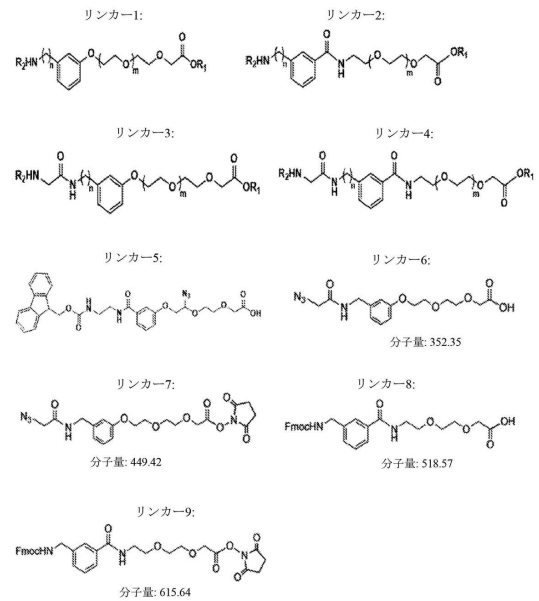
【図 17】

図 17



【図 18】

図 18



20

30

40

50

【図 2 3 A】

図 2 3 A

表 1 :

第 1 の左インデックス配列 (160)		
インデックス名称	配列 (向き: 5'から 3')	配列番号
007	CCACTCATT	1
008	AACTAACAC	2
037	TTATGGAGA	3
022	GAGTTCGCT	4
002	TTGTTGTTT	5
035	CCATATTCT	6
001	AATCATGCG	7
014	GGACAGCTC	8
004	CCAACACGA	9
034	TGTAAGCGG	10
012	ATAACTACC	11
019	CGCACTGTG	12
020	TTACACTCA	13
045	ATTGACCTG	14
011	CACCAGTGT	15
038	GGTGCTCCT	16
033	ATCCGCGTC	17
026	CGGTCTCAA	18
046	TGGTATGCC	19
036	AAGATAGAG	20
015	CCGGTATCG	21
042	GGTCCGAGA	22
023	CGTGATAGC	23
081	TATGTGGCC	24
024	GTACCAGAG	25
016	TACATCAGA	26
028	AGGCGACCT	27
039	CAGCACAAG	28
031	CTCTGTCCA	29
013	TCTTGTGAT	30
043	CCAGGAGTC	31
025	ACCGTTCGT	32
044	GACACTTAT	33

【図 2 3 B】

図 2 3 B

表 1 (続き) :

第 1 の左インデックス配列 (160)		
インデックス名称	配列 (向き: 5'から 3')	配列番号
005	TTGGCTGGA	34
017	ATTGCGTAT	35
080	CTCGAAGAT	36
094	TGAACGGAT	37
049	AATACCGGT	38
058	GGCCTTCAA	39
067	TGAGAACAA	40
079	AGATCTCTA	41
054	GGCAACGCA	42
086	CGAATGACA	43
051	CAAGTGCAG	44
059	CAAGCAACT	45
065	TTCAGGTCT	46
064	CAGTAGGTA	47
060	ACGAAGGCT	48
053	TTCTATTGG	49
062	GTGTCTCAC	50
077	GCTGAATGT	51
071	GAAGATGTT	52
088	ATTCTTTGA	53
095	TCGCATAGT	54
057	TCATGCTTG	55
050	TGGAGTATA	56
055	AAGGTGATT	57
063	AGAGGAAGG	58
069	GATCGCGAA	59
056	CTTCGACAC	60
066	GCTATTATG	61
082	GACTGATTA	62
085	ACGGCCAAC	63
075	CTTATCGCG	64
061	TCTCTCTGC	65
073	CAGCGTTCC	66

10

20

【図 2 3 C】

図 2 3 C

表 1 (続き) :

第 1 の左インデックス配列 (160)		
インデックス名称	配列 (向き: 5'から 3')	配列番号
092	GATTACCGG	67
074	TCCTCGCAA	68
072	ACCACAATT	69
097	CGTTGAATT	70
106	CAGTGACC	71
111	CCCGAACG	72
112	AGCACCTAG	73
113	TAGGCCGTC	74
114	GTTCTGTAA	75
115	CACTGACGT	76
116	TCCAATACC	77
117	ATATTGGTG	78
119	CCGACCACT	79
120	GAACAACGA	80
121	ATTGTAACC	81
123	TCCACCTGT	82
124	CTACATGAA	83
127	CCAATGTTG	84
132	GTTACCAAC	85
133	CAATTGTGA	86
134	AGGCGTAAG	87
135	ACAGCCGTT	88
136	CACCAACCG	89
137	TCTAGCCTC	90
138	GTGTTAGGA	91
139	CGCGAGACT	92
140	TCAACTTAG	93
141	AAGAGCGCC	94
143	CGACCTTGA	95
144	TAGTACTCT	96

【図 2 3 D】

図 2 3 D

表 1 (続き) :

第 1 の右インデックス配列 (170)		
インデックス名	配列 (向き: 5'から 3')	配列番号
001	NNNGTAGGAGCC	97
003	NNNCCGCTGCTA	98
004	NNNAACAACAAG	99
006	NNNGTGGTCTA	100
008	NNNTTGGCCAAC	101
011	NNNTCCATCGTT	102
013	NNNATTCTAGAG	103
014	NNNGGATGCAAT	104
015	NNNCAGGAGTGC	105
016	NNNATCACACTA	106
018	NNNGCGGATGAT	107
019	NNNCGAATCTGG	108
021	NNNATGCGTCTT	109
022	NNNGGTCTGAGC	110
023	NNNGCCTCATAG	111
024	NNNCTATACCTC	112
025	NNNAAGATTGGA	113
026	NNNTGCCAGCAT	114
027	NNNACTAGCTCA	115
028	NNNTAAGTACTG	116
029	NNNCGTGCAACG	117
030	NNNGTCCACGGA	118
034	NNNAGGTCCGTG	119
035	NNNCTCGTTAGT	120
036	NNNACACAATCC	121
037	NNNTCTTCGCAA	122
038	NNNGGTCACTTG	123
039	NNNCCGATATAT	124
040	NNNACAGGTCGC	125
042	NNNGTGCGGTTC	126
043	NNNCACGCACAT	127
044	NNNTGGATCACA	128
045	NNNATATTCGGT	129

30

40

50

【図 2 3 E】

図 2 3 E

表 1（続き）：

第 1 の右インデックス配列 (170)		
インデックス名称	配列 (向き: 5'から 3')	配列番号
047	NNNCCAGAGATG	130
048	NNNTACCGTTGA	131
049	NNNATTGATACC	132
051	NNNCCAAGACCG	133
052	NNNAAGCCGGAC	134
054	NNNGGATCTCCG	135
055	NNNCCTGGAGAA	136
056	NNNATCCTCATC	137
057	NNNTATGTCTCT	138
059	NNNACGTAGAGT	139
060	NNNGTACTTCAA	140
061	NNNCATTCAGC	141
062	NNNTGGCGTGAG	142
063	NNNTCAACGTCT	143
064	NNNAACGAAGTC	144
065	NNNCTTAATCGA	145
066	NNNGCGGCCTTA	146
068	NNNTTCGAACG	147
071	NNNCGCACCGAA	148
073	NNNTAGTGACCA	149
074	NNNGTTATGCTG	150
075	NNNCTCCGTAT	151
076	NNNTGAGATGGA	152
078	NNNGATAGATGT	153
079	NNNCCTCATGTC	154
081	NNNGACTTAACC	155
082	NNNCAAGGCGTT	156
083	NNNAGGAAGCCG	157
084	NNNTCACTCAAG	158
085	NNNTCCACTAGC	159
087	NNNCTGTCATGA	160
088	NNNAGCGTTCAG	161
089	NNNGCATAGGCA	162

【図 2 3 F】

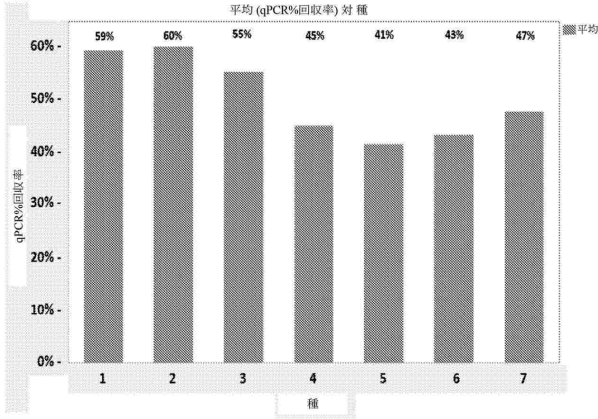
図 2 3 F

表 1（続き）：

第 1 の右インデックス配列 (170)		
インデックス名称	配列 (向き: 5'から 3')	配列番号
091	NNNTATCAACGC	163
092	NNNACAGTGTA	164
096	NNNTGCGGATAC	165
097	NNNGCTATTACT	166
106	NNNGCTCAATA	167
111	NNNCAGAGCTCC	168
112	NNNACGGCACGA	169
113	NNNTTCCTTGCC	170
114	NNNGGTTGGATG	171
115	NNNCCACACCAT	172
116	NNNTACATATCG	173
117	NNNATTGCCATA	174
119	NNNCCATCTTGC	175
120	NNNTGGAATGCT	176
121	NNNAATTCGTCT	177
123	NNNCACCGACTC	178
124	NNNACAATCAGC	179
127	NNNCCGCGAACA	180
132	NNNGAGCATCTA	181
133	NNNCTATTAGAC	182
134	NNNTGTGGCAGT	183
135	NNNCAACCGCAG	184
136	NNNACCTATTCT	185
137	NNNTGTAGGCCA	186
138	NNNGTGGTTATC	187
139	NNNCACCAATGG	188
140	NNNACAACCGAT	189
141	NNNTGTCTGTAA	190
143	NNNTCCGCACTC	191
144	NNNGAGAGCAGA	192

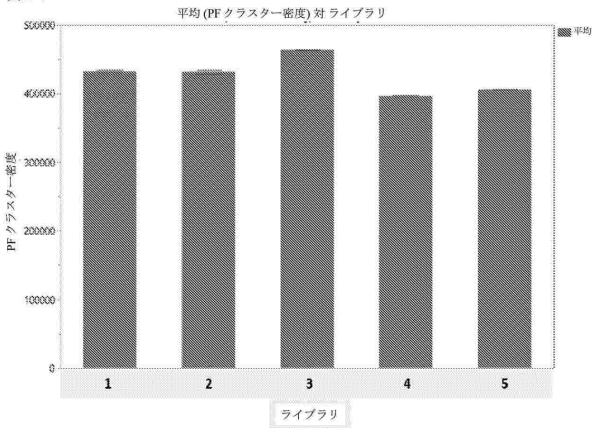
【図 2 4】

図 2 4



【図 2 5】

図 2 5



10

20

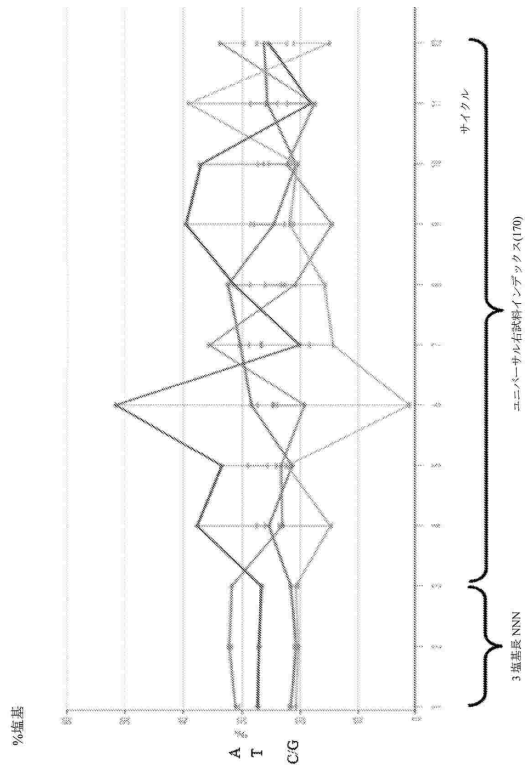
30

40

50

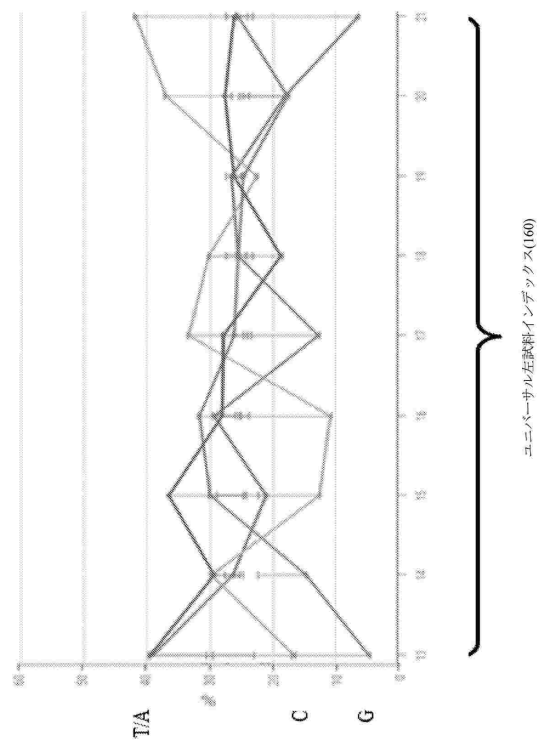
【図 2 6】

図 2 6



【図 2 7】

図 2 7



【配列表】

2025507898000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/063734

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6855
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014/196863 A1 (KEYGENE NV [NL]) 11 December 2014 (2014-12-11) paragraphs [0069], [0101]; claims 1, 49; figure 5 -----	1-14, 55-59
A	WO 2012/003374 A2 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; MYLLYKANGAS SAMUEL [FI] ET AL.) 5 January 2012 (2012-01-05) page 2, last paragraph; figure 15 -----	1-14, 55-59
A	WO 2019/068797 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE] ET AL.) 11 April 2019 (2019-04-11) claim 1; figure 4 -----	1-14, 55-59

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 July 2023

Date of mailing of the international search report

17/07/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Aslund, Fredrik

1

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/063734

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/063734

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014196863	A1	11-12-2014	CA 2913236 A1	11-12-2014
			EP 3004381 A1	13-04-2016
			JP 2016521557 A	25-07-2016
			US 2015284789 A1	08-10-2015
			US 2016083788 A1	24-03-2016
			WO 2014196863 A1	11-12-2014

WO 2012003374	A2	05-01-2012	US 2012003657 A1	05-01-2012
			WO 2012003374 A2	05-01-2012

WO 2019068797	A1	11-04-2019	CN 111164219 A	15-05-2020
			EP 3692166 A1	12-08-2020
			JP 7083393 B2	10-06-2022
			JP 2020537500 A	24-12-2020
			US 2020208208 A1	02-07-2020
			WO 2019068797 A1	11-04-2019

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 9/12 (2006.01)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)
C 1 2 Q 1/6876(2018.01)
C 1 2 N 9/16 (2006.01)

C 1 2 N 9/12
C 1 2 N 15/09 2 0 0
C 1 2 Q 1/6876 Z
C 1 2 N 9/16 Z

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

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 ウィリアム ライト

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, バーンズ キャニオン ロード 1
0 0 5 5, スイート 1 0 0, シー／オー エLEMENT バイオサイエンシズ, インコーポレイティド

(72)発明者 サマンサ スノー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, バーンズ キャニオン ロード 1
0 0 5 5, スイート 1 0 0, シー／オー ELEMENT バイオサイエンシズ, インコーポレイティド

(72)発明者 チュンホア チャオ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, バーンズ キャニオン ロード 1
0 0 5 5, スイート 1 0 0, シー／オー ELEMENT バイオサイエンシズ, インコーポレイティド

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA13 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR62 QS24 QS34