

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-503207

(P2014-503207A)

(43) 公表日 平成26年2月13日(2014.2.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 6 3
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 37/00 1 O 2	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 81 頁)

(21) 出願番号	特願2013-544833 (P2013-544833)	(71) 出願人	502221282
(86) (22) 出願日	平成23年12月16日 (2011.12.16)		ライフ テクノロジーズ コーポレーショ ン
(85) 翻訳文提出日	平成25年8月12日 (2013.8.12)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 920 08, カールスバッド, バン アレン ウェイ 5791
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/065535	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02012/083189		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成24年6月21日 (2012.6.21)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	61/424, 599		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成22年12月17日 (2010.12.17)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
(31) 優先権主張番号	61/445, 324	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成23年2月22日 (2011.2.22)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/451, 919		
(32) 優先日	平成23年3月11日 (2011.3.11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸増幅のための方法、組成物、システム、装置およびキット

(57) 【要約】

支持体上に固定されたクローン性のアンプリコンの局所的集団を生成する新規な方法が提供される。

表面上のポリ(T)プライマーでのテンプレートウォーキング

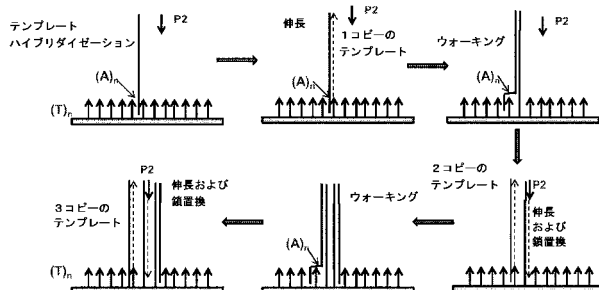
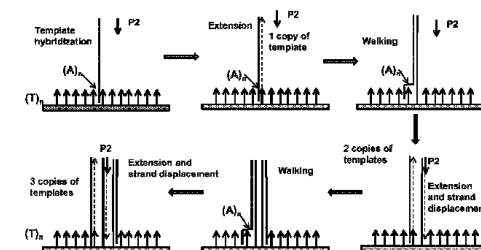


FIGURE 1 Template Walking with Poly(T) Primer on the Surface



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プライマー伸長の方法であって、

a) 第一のプライマー分子（「第一のフォワードプライマー」）を、核酸鎖（「リバー
ス鎖」）上の相補性プライマー結合配列（「リバーズ鎖 P B S」）に対してハイブリダイ
ズさせる工程であって、第一のフォワードプライマーのヌクレオチド塩基の少なくとも 6
0 % が、アデニン、チミンもしくはウラシルであるか、またはアデニン、チミンもしくは
ウラシルに対して相補性である、工程と、

b) 前記リバーズ鎖をテンプレートとして用いて、前記第一のフォワードプライマー分
子を伸長することによって、前記リバーズ鎖の全長相補体であり、それに対してハイブリ
ダイズされた伸長された第一のフォワード鎖を生成する工程と、

c) 第二のプライマー分子（「第二のフォワードプライマー」）を前記リバーズ鎖 P B
S に対してハイブリダイズさせる工程であって、前記リバーズ鎖もまた、前記第一のフォ
ワード鎖にハイブリダイズされている、工程と、
を含む、方法。

【請求項 2】

工程（b）および（c）を含む 1 以上の増幅サイクルによって、前記フォワード鎖を増
幅する工程を含み、第一の増幅サイクルの工程（c）の前記第二のフォワードプライマー
が、引き続き増幅サイクルの工程（b）の前記第一のフォワードプライマーであり、かつ
リバーズ鎖のかかなりの割合が、前記 1 以上の繰り返しの間中またはその間の全ての時点で
フォワード鎖にハイブリダイズされている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

リバーズ鎖の前記かなりの割合が、リバーズ鎖の少なくとも 30 %、40 %、50 %、
60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % または 99 % である
、請求項 1 ～ 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

a) 第一のリバーズプライマー分子を、伸長されたフォワード鎖上の相補性リバーズ
プライマー結合配列（「フォワード鎖 P B S」）に対してハイブリダイズさせる工程と；

b) 前記フォワード鎖をテンプレートとして用いてテンプレート依存性方式で前記第一
のリバーズプライマー分子を伸長することによって、前記フォワード鎖の全長相補体であ
り、それに対してハイブリダイズされた、伸長された第一のリバーズ鎖を、生成する工程
と；

c) 第二のプライマー（「第二のリバーズプライマー」）を、前記フォワード鎖 P B S
に対してハイブリダイズさせる工程であって、前記フォワード鎖はまた、前記第一のリバ
ース鎖に対してハイブリダイズされている、工程と、
によって前記リバーズ鎖を増幅することを含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方
法。

【請求項 5】

工程（b）～（c）の 1 以上の繰り返しによって前記リバーズ鎖を増幅することを含み
、工程（c）の前記第二のリバーズプライマーが、繰り返された工程（b）の前記第一の
リバーズプライマーであり、かつフォワード鎖のかかなりの割合が、前記 1 以上の繰り返
しの間中またはその間の全ての時点でリバーズ鎖に対してハイブリダイズされている、請
求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

リバーズ鎖の前記かなりの割合が、リバーズ鎖の少なくとも 30 %、40 %、50 %、
60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % または 99 % である
、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記第一のおよび／または第二のフォワードプライマーが、単一の支持体に対して固定
されるか、あるいは前記第一のおよび／または第二のリバーズプライマーが単一の支持体

10

20

30

40

50

に対して固定される、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

所望の数の増幅サイクルを行った後に、リバーズ鎖から前記伸長されたフォワード鎖を完全に分離する工程と、必要に応じて、分離されたリバーズ鎖の存在から分離されたフォワード鎖を取り除く工程、またはその逆の工程と、をさらに含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

1 以上の増幅サイクルの間に、全ての核酸試薬が、リコンビナーゼとも、逆転写酵素とも、ヘリカーゼとも、ニックング酵素とも、ポリメラーゼではない任意の他の酵素とも、いかなる時点でも接触しない、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 10】

リバーズ鎖をテンプレートとして用いるフォワードプライマーのテンプレート依存性伸長が、前記リバーズ鎖に対して既にハイブリダイズされた別のフォワード鎖の置換をもたらす、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

全てのフォワードプライマーの T_m が、 50°C 、 55°C 、 60°C または 65°C 以下であり、かつ前記リバーズ鎖の T_m が、 95°C 、 90°C 、 85°C 、 80°C または 75°C 以上である、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

増幅が、等温条件下で行われる、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 13】

前記等温条件が、全てのフォワードプライマーの T_m より高いが、リバーズ鎖の T_m より低い温度に調節され、前記リバーズ鎖の T_m は、同一のリバーズ鎖のクロン集団における前記リバーズ鎖の半分が、その全長にわたって前記リバーズ鎖に完全にハイブリダイズされる完全に相補性の鎖から完全に変性される温度である、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記第一および第二のフォワードプライマーが、同じ支持体に隣接して固定されており、それによって増幅が、伸長されたフォワード鎖の固定されたクロン集団を生成する、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 15】

前記第一および第二のフォワードプライマーが、同じ支持体に隣接して固定されており、それによって増幅が、伸長されたフォワード鎖の固定されたクロン集団を生成する、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

複数のテンプレート核酸が、空間的に隔てられた固定部位に対して個々にハイブリダイズされ、それによって増幅が、個々のテンプレート核酸に対応する空間的に隔てられたクロン集団を生成する、請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

変性が非酵素性である、請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 18】

少なくとも 1 つのリバーズ核酸鎖と、少なくとも 1 つの支持体上に必要に応じて固定された複数のフォワードプライマーと、必要に応じて溶液中の複数のリバーズプライマーと、ポリメラーゼと、のうちのいずれか 1 つまたはいずれかのサブセットまたは全てを含む組成物。

【請求項 19】

前記フォワードプライマーおよび／またはリバーズプライマーが、低融点であるか、または少なくとも 60 % のアデニン、チミンもしくはウラシル塩基、またはアデニン、チミンもしくはウラシルに対して相補性の塩基を有する、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

50

核酸鎖（「リバーズ鎖」）のクローン集団を含み、必要に応じて各々のクローン集団の個々のリバーズ鎖が低融点（例えば、ブリーザブル（breathable））プライマー結合配列を、3'末端に、および／または低融点プライマー配列を5'末端に含む、請求項18～19のいずれかに記載の組成物。

【請求項21】

前記リバーズ鎖の5'部分もしくは末端上の前記低融点プライマー配列に対して実質的に同一である、複数のリバーズプライマー、および／または前記リバーズ鎖の3'部分もしくは末端上の前記低融点プライマー結合配列に対して実質的に相補性である、複数のフォワードプライマーを含む、請求項18～20のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項22】

伸長されていないフォワードプライマーよりも長く、かつ必要に応じて1つ以上のリバーズ鎖の全長相補体である、1つ以上の伸長されたフォワード鎖をさらに含む、請求項18～21のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項23】

1つ以上の伸長されたフォワード鎖が、相補性リバーズ鎖にハイブリダイズされ、前記リバーズ鎖も必要に応じてまた、別の異なるフォワードプライマーに対して、または必要に応じて前記リバーズ鎖の全長未満の相補体である異なるフォワード鎖に対してハイブリダイズされる、請求項22に記載の組成物。

【請求項24】

一本鎖のテンプレート配列の固定されたクローンアンプリコンの局所的集団を生成する方法であって：

a) 前記一本鎖のテンプレート配列（「テンプレート1」）を固定部位（「IS1」）に結合する工程であって、IS1が、テンプレート1に対して実質的にハイブリダイズすることができる固定されたプライマー（「IS1プライマー」）の多重コピーを含み、テンプレート1が、IS1プライマーに対するハイブリダイゼーションによってIS1に対して結合される、工程と、

b) 溶液中で、IS1プライマーおよび非固定プライマー（「SP1プライマー」）を用いてテンプレート1を増幅する工程であって、前記一本鎖のテンプレート1に対して相補性である増幅された鎖が、一本鎖である場合、IS1上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできない工程と、を含み、
増幅によって、テンプレート1のIS1に対する最初のハイブリダイゼーションのポイントのまわりに固定されたクローンアンプリコンの局在化集団を生成する、方法。

【請求項25】

第一のテンプレート配列（「テンプレート1」）および第二のテンプレート配列（「テンプレート2」）の分離されかつ固定されたクローン集団を生成する方法であって、前記第一のおよび第二のテンプレート配列を増幅して、実質的に第一の固定部位（「IS1」）に対して結合され、第二の固定部位（「IS2」）には結合されないテンプレート1のクローンアンプリコンの集団、または実質的にIS2に結合されIS1には結合されないテンプレート2のクローンアンプリコンの集団を生成する工程を含み、

a) 両方のテンプレートおよび全てのアンプリコンは、同じ連続液相中に含まれ、前記連続液相が第一のおよび第二の固定部位（それぞれ、「IS1」および「IS2」）と接触し、かつIS1およびIS2が空間的に隔てられており、

b) テンプレート1は、一本鎖型である場合、第一のサブ配列（「T1-FOR」）を一端に含み、かつ第二のサブ配列（「T1-REV」）をその反対の端に含み、

c) テンプレート2は、一本鎖型である場合、第一のサブ配列（「T2-FOR」）を一端に含み、かつ第二のサブ配列（「T2-REV」）をその反対端に含み、

d) IS1は、T1およびT2が一本鎖である場合、T1-FORおよびT2-FORに対して実質的にハイブリダイズできる固定された核酸プライマー（「IS1プライマー」）の多重コピーを含み、

e) IS2は、T1およびT2が一本鎖である場合、T1-FORおよびT2-FOR

10

20

30

40

50

の両方に対して実質的にハイブリダイズできる固定されたプライマー（「I S 2 プライマー」）の多重コピーを含み、

f) T 1 - R E V のリバーズ相補体は、一本鎖である場合、I S 1 上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズすることができず、ただし、前記連続液相中の非固定プライマー（「S P 1」）に対して実質的にハイブリダイズでき、

g) T 2 - R E V のリバーズ相補体は、一本鎖である場合、I S 2 上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできず、ただし、前記連続液相中の非固定プライマー（「S P 2」）に対して実質的にハイブリダイズできる、方法。

【請求項 2 6】

第一のテンプレート配列（「テンプレート 1」）と第二のテンプレート配列（「テンプレート 2」）の分離されかつ固定されたクローン集団を生成する方法であって、前記第一のおよび第二のテンプレート配列を増幅する工程を含み、

a) 両方のテンプレートが、一本鎖型であり、かつ両方とも同じ連続液相中に含まれ、第一のおよび第二の固定部位（それぞれ、「I S 1」および「I S 2」）が前記連続液相と接触し、かつ I S 1 および I S 2 が空間的に隔てられており、

b) テンプレート 1 は、第一のサブ配列（「T 1 - F O R」）をその 3' 末端に、および T 1 - F O R と非重複性である第二のサブ配列（「T 1 - R E V」）をその 5' 末端に含み、

c) テンプレート 2 は、第一のサブ配列（「T 2 - F O R」）をその 3' 末端に、および T 2 - F O R と非重複性である第二のサブ配列（「T 2 - R E V」）をその 5' 末端に含み、

d) I S 1 は、T 1 - F O R および T 2 - F O R の両方に対してハイブリダイズできる、固定されたプライマー（「I S 1 プライマー」）を含み、

e) I S 2 は、T 1 - F O R および T 2 - F O R の両方に対してハイブリダイズできる、固定されたプライマー（「I S 2 プライマー」）を含み、

f) T 1 - R E V のリバーズ相補体は、I S 1 上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできず、かつ／または T 2 - R E V のリバーズ相補体は、I S 2 上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできないが、各々が、前記連続液相中の非固定プライマーに対して実質的にハイブリダイズでき、

それによって増幅が、実質的に I S 1 に対して結合するが I S 2 に対しては結合しないテンプレート 1 のクローンアンプリコンの集団、および／または実質的に I S 2 に対して結合するが I S 1 に対しては結合しないテンプレート 2 のクローンアンプリコンの集団をもたらす、方法。

【請求項 2 7】

増幅の間のいくつかの時点で、非固定核酸分子を混合することが、前記連続液相中で実質的に遅延されない、請求項 1 ～ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 8】

増幅の間に、混合することが一定期間実質的に遅延されず、かつ必要に応じて増幅の全期間の間実質的に遅延されない、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

1 つの固定部位から解離された任意の核酸が、両方の固定部位に対して実質的にハイブリダイズ可能であり、かつ別の固定部位に対する前記解離された核酸の任意の動き（例えば、拡散、対流による動き）が、前記連続液相中で実質的に遅延されない、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記連続液相が、I S 1 および I S 2 と同時に接触している、請求項 1 ～ 2 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 1】

固定されたプライマーによって結合されるテンプレートの第一の部分が、前記テンプレートの第二の部分と重複せず、その相補体为非固定プライマーによって結合されている、

10

20

30

40

50

請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

増幅されるべき少なくとも 1 つのテンプレートが、インプット核酸から、前記核酸が少なくとも 1 つの固定部位に接触して配置された後に、生成される、請求項 1～31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 33】

a) 固定されたプライマーを含んでいる支持体を一本鎖の核酸テンプレートと接触させる工程と、

b) 第一の固定されたプライマーを前記テンプレート上のプライマー結合配列 (PBS) に対してハイブリダイズさせる工程と、

c) テンプレート依存性伸長において前記ハイブリダイズされた第一のプライマーを伸長して、テンプレートに対して相補性であり、かつ前記テンプレートに対して少なくとも部分的にハイブリダイズされた伸長された鎖を形成する工程と、

d) 前記 PBS の少なくとも一部が一本鎖型 (「遊離部分」) であるように、前記伸長された相補鎖から前記テンプレートを部分的に変性させる工程と、

e) 前記遊離部分を、伸長されていない、固定された第二のプライマーに対してハイブリダイズさせる工程と、

f) テンプレート依存性伸長において前記第二のプライマーを伸長して、前記テンプレートに対して相補性である伸長された鎖を形成する工程と、

g) 必要に応じて、前記アニーリングされた伸長された固定された核酸鎖をお互いから分離する工程と、

を含む、請求項 1～32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

a) 増幅の間、開始テンプレートおよび／または増幅された鎖を含んでいる核酸二重鎖が形成され、

b) かなりの数の二重鎖の完全な変性を生じる条件に対して、増幅の間にこの二重鎖が供されない、

請求項 1～33 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】

前記一本鎖のテンプレートが、増幅される複数のインプット核酸配列 (この配列は既知であっても未知であってもよい) を採用すること、ならびに第一のユニバーサルアダプター配列および第二のユニバーサルアダプター配列を、少なくとも 1 つのインプット核酸の末端上に追加することによって生成され、前記第一のユニバーサルアダプター配列が、IS1 プライマーおよび／または IS2 プライマーに対してハイブリダイズし、かつ前記第二のユニバーサルアダプター配列のリバース相補体が少なくとも 1 つの非固定プライマーに対してハイブリダイズする、請求項 1～34 のいずれかに記載の方法。

【請求項 36】

前記第一および第二の核酸配列が、前記一本鎖のテンプレート配列の第一および第二の末端で提供される、請求項 1～35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 37】

タグもまた、所与の核酸配列に対して付加され、前記タグが、前記所与の核酸配列の増幅産物を特定することを可能にする、請求項 1～36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 38】

少なくとも 1 つの固定部位上の全てのプライマーが同じ配列を有する、請求項 1～37 のいずれかに記載の方法。

【請求項 39】

固定部位が、少なくとも 2 つの異なる配列を有する複数のプライマーを含む、請求項 1～38 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 40】

前記異なる種類のプライマーが、お互いに実質的に同じ濃度で存在する、請求項 16 に

10

20

30

40

50

記載の方法。

【請求項 4 1】

少なくとも 1 つの固定部位の前記プライマーが実質的に、固定部位にわたって均一に分散している、請求項 1 ～ 4 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 2】

2 つの異なる固定部位が、

a) 単一支持体の空間的に隔てられているサブコンポーネントであり、

b) 異なる接続されていない支持体上である、

請求項 1 ～ 4 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 3】

前記支持体が、三次元のマトリックスを形成し、かつ前記 2 つの異なる固定部位が、完全には重複しない前記支持体の 2 つの異なる三次元の部分である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記 2 つの異なる固定部位が、完全には重複しない支持体の表面上の 2 つの異なるエリアである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記 2 つの異なる固定部位が異なる支持体上である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記 2 つの異なる支持体がビーズ型である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 4 7】

少なくとも 1 つの固定部位が、前記支持体の表面全体または前記支持体の容積全体を含む、請求項 2 2 または 2 3 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記 2 つの異なる固定部位が、予め決定された割付で（例えば、グリッドパターンで）配置されている、請求項 1 ～ 4 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 9】

ヌクレオチドおよび核酸ポリメラーゼの供給を用いてプライマーを伸長する、請求項 1 ～ 4 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 0】

加熱することを用いて、アニーリングされた核酸鎖を部分的に分離する、請求項 1 ～ 4 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 1】

前記核酸ポリメラーゼが、アニーリングされた核酸鎖を部分的に分離するために用いられる加熱条件によって不活性にされることがない、請求項 2 6 に従属した場合の請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記核酸ポリメラーゼが、Taq ポリメラーゼであるか、好熱性生物由来である別のポリメラーゼであるか；またはそれらの熱安定性誘導体である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記プライマー伸長が、1 つ以上の検出可能標識（例えば、蛍光標識または放射性標識）の伸長された固定された核酸鎖への組み込みをもたらす、請求項 1 ～ 5 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 4】

1 つ以上の伸長された固定された核酸鎖を処理して、それによって核酸分子またはその一部を遊離する工程をさらに含む、請求項 1 ～ 5 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 5】

前記処理する工程が、制限エンドヌクレアーゼを用いるか、またはリボザイムを用いる切断からなる、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 5 6】

10

20

30

40

50

前記プライマーのうちの1つ以上が、制限エンドヌクレアーゼ認識部位もしくはリボザイム認識部位を有するか、またはこのような部位の一部を有し、この一部は、プライマー伸長が起きると、完全になる、請求項1～55のいずれかに記載の方法。

【請求項57】

核酸増幅の繰り返しサイクルを可能にするように自動化されている、請求項1～56のいずれかに記載の方法。

【請求項58】

複数の異なる核酸配列を増幅するよう用いられる、請求項1～57のいずれかに記載の方法。

【請求項59】

複数の異なる核酸配列を同時に増幅するよう用いられる、請求項35に記載の方法。

【請求項60】

前記異なる核酸配列が各々、請求項3～5のいずれかに記載のような第一のおよび第二の核酸配列を提供され、前記第一および第二の核酸配列が、前記各々の異なる核酸配列について同じである、請求項35または36に記載の方法。

【請求項61】

前記異なる核酸配列が各々、異なるタグを提供され、その結果前記異なる配列をお互いから識別することができる、請求項35～37のいずれかに記載の方法。

【請求項62】

請求項1～61のいずれかに記載の方法によって産生可能である、複数の固定された核酸。

【請求項63】

表面上の1つ以上の別個のエリアの形態における複数の固定された核酸であって、各々のエリアが、複数の同一の核酸鎖、および複数の同一のそれに対する相補鎖を含み、このようなエリア内の各々の核酸鎖は、その鎖の長さのある距離内の表面上に別の核酸鎖が配置されるように配置されている、核酸。

【請求項64】

前記核酸が固定される表面の1mm²あたりに少なくとも1つの別個のエリアが存在する、請求項39または請求項40に記載の複数の固定された核酸。

【請求項65】

前記核酸が固定される表面の1mm²あたりの別個のエリアの数が、1より大きい、10²より大きい、10³より大きい、または10⁴より大きい、請求項41に記載の複数の固定された核酸。

【請求項66】

配列決定のための核酸分子を提供することにおける、請求項1～65のいずれか1項に記載の方法の使用、または請求項39～42のいずれかに記載の複数の固定された核酸分子の使用。

【請求項67】

配列決定することは、一本鎖の核酸分子に対してハイブリダイズされた配列決定プライマーを伸長すること、およびプライマー伸長に用いられるヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを検出することによって行われる、請求項43に記載の使用。

【請求項68】

前記配列決定プライマーが、少なくとも1つの固定プライマーと同じ配列のうちの少なくとも1つに対してハイブリダイズする、請求項44に記載の使用。

【請求項69】

前記配列決定プライマーが、前記固定プライマーと同じ配列を有する、請求項44に記載の使用。

【請求項70】

前記ヌクレオチドの全てのまたは少なくともいくつか、標識されたヌクレオチドである、請求項43～46のいずれかに記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 7 1】

前記標識されたヌクレオチドの全てが、同じ標識を有する、請求項 4 7 に記載の使用。

【請求項 7 2】

前記標識されたヌクレオチドが蛍光標識されている、請求項 4 7 または請求項 4 8 に記載の使用。

【請求項 7 3】

標識されたおよび標識されていないヌクレオチドの混合物が用いられる、請求項 4 7 ～ 4 9 のいずれかに記載の使用。

【請求項 7 4】

配列決定が、前記配列決定プライマーに対して、隣接してハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドを連結することにより、一本鎖の核酸分子に対してハイブリダイズされた配列決定プライマーを伸長することによって、行われる、請求項 4 3 に記載の使用。

【請求項 7 5】

前記配列決定プライマーが、少なくとも 1 つの固定プライマーと同じ配列のうちの少なくとも 1 つに対してハイブリダイズする、請求項 5 1 に記載の使用。

【請求項 7 6】

前記配列決定プライマーが、前記固定プライマーと同じ配列を有する、請求項 5 1 に記載の使用。

【請求項 7 7】

前記オリゴヌクレオチドの全てまたは少なくともいくつかが標識されている、請求項 5 1 ～ 5 3 のいずれかに記載の使用。

【請求項 7 8】

前記標識されたオリゴヌクレオチドが全て同じ標識を有するわけではない、請求項 5 4 に記載の使用。

【請求項 7 9】

前記標識されたヌクレオチドが蛍光標識されている、請求項 5 4 または請求項 5 5 に記載の使用。

【請求項 8 0】

標識されたおよび標識されていないオリゴヌクレオチドの混合物が用いられる、請求項 5 4 ～ 5 6 のいずれかに記載の使用。

【請求項 8 1】

前記配列決定することが、少なくとも 2 つの異なる別個のエリアに存在する核酸分子の並行な配列決定である、請求項 1 ～ 8 0 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 8 2】

前記配列決定することが、10 を超える異なる別個のエリアに存在する核酸分子の並行な配列決定である、請求項 5 8 に記載の使用。

【請求項 8 3】

前記配列決定することが、100 を超える異なる別個のエリアに存在する核酸分子の並行な配列決定である、請求項 4 3 ～ 5 9 のいずれかに記載の使用。

【請求項 8 4】

前記配列決定することが、1000 を超える異なる別個のエリアに存在する核酸分子の並行な配列決定である、請求項 4 3 ～ 6 0 のいずれかに記載の使用。

【請求項 8 5】

前記配列決定することが、10000 を超える異なる別個のエリアに存在する核酸分子の並行な配列決定である、請求項 4 3 ～ 6 1 のいずれかに記載の使用。

【請求項 8 6】

複数の異なる配列が並行して決定される、請求項 4 3 ～ 6 2 のいずれかに記載の使用。

【請求項 8 7】

診断のための増幅された核酸分子の提供における、請求項 1 ～ 3 8 のいずれかに記載の方法の使用、または請求項 4 3 ～ 6 3 のいずれかに記載の複数の固定された核酸分子の使

10

20

30

40

50

用。

【請求項 88】

スクリーニングのための増幅された核酸分子の提供における、請求項 1～38 のいずれかに記載の方法の使用、または請求項 43～63 のいずれかに記載の複数の固定された核酸分子の使用。

【請求項 89】

他の構成要素のための支持体として用いられる増幅された核酸分子を提供することにおける、請求項 1～38 のいずれかに記載の方法の使用、または請求項 43～63 のいずれかに記載の複数の固定された核酸分子の使用。

【請求項 90】

追加の核酸分子を（固定型ではなく）遊離型で生成することにおける、請求項 1～38 のいずれかに記載の方法の使用、または請求項 43～63 のいずれかに記載の複数の固定された核酸分子の使用。

【請求項 91】

遺伝子発現をモニタリングすることにおける、請求項 1～38 のいずれかに記載の方法の使用、または請求項 43～63 のいずれかに記載の複数の固定された核酸分子の使用。

【請求項 92】

まれに発現される遺伝子産物を用いて核酸分子を特定することにおける、請求項 1～38 のいずれかに記載の方法の使用、または請求項 43～63 のいずれかに記載の複数の固定された核酸分子の使用。

【請求項 93】

ヘテロ接合性個体の特定における、請求項 1～38 のいずれかに記載の方法の使用、または請求項 43～63 のいずれかに記載の複数の固定された核酸分子の使用。

【請求項 94】

核酸のフィンガープリンティングにおける、請求項 1～38 のいずれかに記載の方法の使用、または請求項 43～63 のいずれかに記載の複数の固定された核酸分子の使用。

【請求項 95】

複数の固定されたプライマー、核酸ポリメラーゼ、複数のヌクレオチドおよびアニーリングされた核酸鎖を部分的に分離するための手段を含む、請求項 1～38 のいずれかに記載の方法を行うための装置。

【請求項 96】

前記アニーリングされた核酸鎖を分離するための手段が、制御された加熱手段を含む、請求項 72 に記載の装置。

【請求項 97】

反応物質の供給源と、前記反応物質が前記核酸分子に適用された後に生成された 1 つ以上のシグナルを検出するための検出手段とを含む、請求項 43～63 のいずれかの記載の複数の核酸分子を分析するための装置。

【請求項 98】

前記検出手段は、請求項 1～97 のいずれかに言及される前記別個のエリアの間で識別するために十分な分解能を有する、請求項 74 に記載の装置。

【請求項 99】

電荷結合素子（CCD）を含んでいる、請求項 72～75 のいずれかに記載の装置。

【請求項 100】

前記電荷結合素子（CCD）が画像形成デバイスと作動可能に接続されている、請求項 76 に記載の装置。

【請求項 101】

各々の固定部位が分離されたビーズであり、各々のビーズが、増幅後のアンプリコンのクローン集団を含み、各々のビーズが、アレイの分離されたウェルに分配され、かつ合成による配列が行われる、請求項 43～46 のいずれかに記載の使用。

【請求項 102】

前記アレイが大規模 F E T アレイである、請求項 7 8 に記載の使用。

【請求項 1 0 3】

伸長生成物へのヌクレオチドの組み込みが、p H またはイオンまたは電流の変化を測定することによって検出される、請求項 7 9 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 1 1 年 1 0 月 2 8 日出願の米国特許仮出願第 6 1 / 5 5 2 , 6 6 0 号 ; 2 0 1 1 年 8 月 2 3 日出願の米国特許仮出願第 6 1 / 5 2 6 , 4 7 8 号 ; 2 0 1 1 年 3 月 1 1 日出願の米国特許仮出願第 6 1 / 4 5 1 , 9 1 9 号 ; 2 0 1 0 年 2 月 2 2 日出願の米国特許仮出願第 6 1 / 4 4 5 , 3 2 4 号 ; および 2 0 1 0 年 1 2 月 1 7 日出願の米国特許仮出願第 6 1 / 4 2 4 , 5 9 9 号 (その各々は全体が参照によって援用される) に対する優先権を主張する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

背景

核酸増幅は、分子生物学において極めて有用であり、かつ生物学、治療、診断、法医学および研究の事実上あらゆる態様において広範な適用性を有する。概して、多重アンプリコンを、開始テンプレートから 1 つ以上のプライマーを用いて生成し、ここでこのアンプリコンは、テンプレートに対して相同であるかまたは相補性であり、このテンプレートからアンプリコンが生成された。多重の増幅はまた、プロセスを無駄なく行い得、かつ諸経費を低減し得る。単一セットのプライマーが、異なるテンプレートと混合されてもよいし、または単一のテンプレートが、多重の異なるプライマーと接触されてもよいし、または多重の異なるテンプレートが、多重の異なるプライマーと接触されてもよい。この適用は、核酸増幅および / または分析のための方法および試薬に関する。

【発明の概要】

【0 0 0 3】

要旨

核酸増幅および / または分析の方法、試薬および生成物が本明細書に示される。増幅は、固定されたプライマーおよび / または可溶性のプライマーを利用し得る。本明細書に提供される方法から生成されたアンプリコンは、さらなる分析、例えば、配列決定のために適切な基質である。

【図面の簡単な説明】

【0 0 0 4】

【図 1】テンプレートウォーキングの実施形態を示す模式図。別の実施形態では、この固定されたプライマーは、(A) _n、例えば、(A) _{3 0} と命名されたアデノシンリッチの配列を含み、このテンプレート上の固定されたプライマーについてのプライマー結合部位は、相補性 T-リッチ配列、例えば、(T) _{3 0} を含む。

【図 2】配列決定のためのテンプレートウォーキングおよび平面アレイ上へのビーズの沈着によるビーズ上の増幅の概要。

【図 3】合成による配列決定の半導体ベースの検出を用いる別の実施形態。テンプレートウォーキングを用いて、クロンアンプリコンの集団をビーズ上に、または反応チャンバの基部もしくは底部の上に生成してもよい。別の実施形態では、固定されたプライマーは、(A) _n、例えば、(A) _{3 0} と命名されるアデノシンリッチ配列を含み、テンプレート上の固定されたプライマーについてのプライマー結合部位は、相補性 T-リッチ配列、例えば、(T) _{3 0} を含む。

【図 4】平面基板上のプライマーローンの形態での固定部位の別の実施形態。別々の固定部位のアレイを用いてもよく、そうでなければプライマーの単一の連続ローンを固定部位のランダムアレイであるとみなすこともできる。必要に応じて、プライマーの連続ローンにおける 1 つ以上の固定部位の位置は、まだ未決定とすることができ、この位置は、ウォ

10

20

30

40

50

ーキングの前に最初のテンプレートの結合の時点で決定されるか、または増幅クラスターに占有されるスペースによって決定される。別の実施形態では、この固定されたプライマーは、 $(A)_n$ 、例えば、 $(A)_{30}$ と命名されるアデノシンーリッチ配列を含み、テンプレート上の固定されたプライマーについてのプライマー結合部位は、相補性Tーリッチ配列、例えば、 $(T)_{30}$ を含む。

【図5】テンプレートウォーキング反応に対する温度の影響。テンプレートウォーキング増幅の前後の ΔC_t のグラフによるプロットを算出して、反応温度に対してプロットした。

【図6】96の二重鎖TaqMan-qPCR反応の C_t 値の表。

【図7】ビーズ上のテンプレートウォーキングによる100, 000倍の増幅。テンプレートウォーキング反応の前後の ΔC_t 、ならびにテンプレートウォーキング反応の前後の増幅の倍数を、算出して反応時間に対してプロットした。

【図8A】例示的な鎖フリッピングおよびウォーキングのストラテジーの模式図。テンプレートウォーキング。

【図8B】例示的な鎖フリッピングおよびウォーキングのストラテジーの模式図。フリップした鎖を生成するための鎖フリッピング。

【図8C】例示的な鎖フリッピングおよびウォーキングのストラテジーの模式図。最終のフリップした鎖上の新規なプライマー結合配列P'g'の付加。

【発明を実施するための形態】

【0005】

定義

任意の能動態動詞（またはその動名詞）は、相当する行為が、特定の、有意なまたは実質的なレベルで（例えば、ランダムを超えるか、または適当な対照を超えて）生じることを示すことを意図する。例えば、「ハイブリダイズすること」という行為は、有意であるかまたは実質的なレベルの特定のハイブリダイゼーションが生じることを示す。例えば、増幅プロセスの間のテンプレートへのプライマーのハイブリダイゼーションの場合には、ハイブリダイズすることは必要に応じて、所望の倍数の増幅（例えば、単一のテンプレートから少なくとも 10^3 または 10^4 または 10^5 または 10^6 個のアンプリコン）を達成するために十分である。別の例では、特定のハイブリダイゼーションとは、有意な量の配列相同性を共有しない2つの核酸の間で生じるよりも特異的である。さらに別の例では、特定のハイブリダイゼーションとは、規定のストリンジェンシー条件下でハイブリダイゼーション混合物に存在する他のヌクレオチド配列に対する実質的な結合の非存在下における、標的ヌクレオチド配列に対する核酸の結合を含む。必要に応じて、サンプルは、診断または科学捜査の目的のための、生きているかまたは死亡した生物体（例えば、ヒト）から採取した組織または体液由来である。必要に応じて、これらには、ゲノムライブラリーまたはエクソーム（exome）ライブラリーを含む。

【0006】

2つの配列は、一方の配列が他の配列に対して、最適条件下で実質的かつ特異的にハイブリダイズする場合、相補性であるとみなされ得る。2つの配列は、一方の配列のリバーズ相補体が、他の配列に対して、最適条件下で実質的かつ特異的にハイブリダイズし得る場合、相同性であるとみなされ得る。実質的なハイブリダイゼーションとは例えば、核酸の一方のうちの5%、必要に応じて10%、30%、50%または80%を超える核酸が他の核酸に対してハイブリダイズされる場合である。2つの一本鎖核酸の間のハイブリダイゼーションは、最適条件下で安定である二本鎖構造の形成に関与するが多いが、必然ではない。最適条件とは、例えば、増幅サイクルのアニーリング工程の間の、例えば、ハイブリダイゼーションが意図される条件である。2つの一本鎖のポリヌクレオチドは、必要に応じて、それらがお互いに対して、2つ以上の隣り合う塩基対によって結合される場合、ハイブリダイズされるものとみなされる。必要に応じて、二本鎖構造の一方の鎖におけるヌクレオチドのかなりの割合が、もう一方の鎖上のヌクレオチドとのワトソン・クリック塩基対合を受ける。ハイブリダイゼーションはまた、ヌクレオチドアナログ、例え

10

20

30

40

50

ば、デオキシイノシン、ヌクレオシドと2-アミノプリン塩基など（プローブの縮重を低減するために使用され得る）との対合を含む（このような対合が水素結合の形成に関与するか否かにかかわらず）。

【0007】

核酸は、それが、少なくとも最適条件の間（例えば、増幅反応の間）、実質的に安定な方式で支持体に結合される場合、固定されているとみなされ得る。結合は、限定するものではないが、非共有結合、イオン相互作用、共有結合を含めて任意の機構によってもよい。第一の核酸が、支持体上に固定された第二の核酸にハイブリダイズされれば、第一および第二の核酸のかなりの量が、増幅の間の任意のまたは全ての時点で、お互いと会合されるかまたは接続されるような増幅条件の場合、この第一の核酸はまた、増幅の間に支持体上に固定されるものと考えられ得る。例えば、第一のおよび第二の核酸は、ワトソン・クリック塩基対合または水素結合に関与するハイブリダイゼーションによって一緒に会合されてもよい。ある例では、選択された増幅条件によって、第一の核酸のうち少なくとも50%、80%、90%、95%または99%が第二の核酸とハイブリダイズされたままであることが可能になり、逆もまた可能である。核酸は、支持体と直接的にもまたは間接的にも、結合も会合もされない場合、固定されていないか、または非固定とみなされ得る。

【0008】

媒体は、その媒体が、ある条件下で、少なくとも一時的に、固定されていない分子の移動も動きも実質的にまたは完全に抑えることも妨害することもない、液体媒体である場合、最適条件下で流動性であるとみなされ得る。固定されていない分子はそれ自体、固体支持体もしくは表面に固定されず、または別の固定された分子とも会合されない。ある実施形態では、この固定されていない分子は、流動性媒体を通じて溶質（例えば、核酸）である。媒体中の例示的な移行または動きは、連続相における任意の第一のポイントから、流体連通する任意の他のポイントまたは同じ連続相における任意の他のポイントへの、液体内の拡散、対流、乱流、攪拌、ブラウン運動、移流、電流、または他の分子運動によるものであり得る。例えば、流動性の媒体中で、有意な量の固定されていない核酸が、1つの固定部位から別の固定部位（流動性媒体の同じ連続相内であるか、または第一の固定部位と液体連通している）へ移行される。必要に応じて、媒体中の核酸の移行または動きの速度は、水中の核酸の移行または動きの速度に匹敵する。ある場合には、最適条件とは、その媒体が増幅の間に供される条件である。最適条件は、流動性の媒体が、実質的に不動のままにしておくことを可能にしてもしなくてもよい。この条件は、流動性媒体を混合、攪拌または振盪を活性化させてもさせなくてもよい。この媒体は必要に応じて、増幅の間、少なくとも一時的に流動性である。例えば、この媒体は、最適な少なくとも1つの予備増幅および／または増幅条件下では流動性である。必要に応じて、流動性の媒体は、異なる固定されていない核酸の混ぜ合わせも、流動性媒体の連続相の異なるゾーンの間、固定されていない核酸の移動も実質的に妨げない。核酸の動きまたは移行は例えば、拡散または対流によって生じ得る。ある媒体は、増幅の際に固定されていない核酸が、異なる固定部位の間もしくは連続相全体にわたって広がることも移動することもできない場合、必要に応じて非流動性であるとみなされる。概して、流動性の媒体は、反応容積の限られたゾーン内、または増幅の期間の間の固定位置で、固定されていない核酸（例えば、テンプレートまたはアンプリコン）を実質的に拘束しない。必要に応じて、流動性の媒体は、種々の手段によって、またはその状態を変化させることによって、非流動性にされ得る。必要に応じて、媒体が液体であるか、または半固体である場合、その媒体は流動性である。ある媒体は、その流動性が純水に匹敵する場合、流動性とみなされ得る。他の実施形態では、媒体は、それがポリマーを実質的に含まない流体である場合、またはその粘性率が純水と同様である場合、流動性であるとみなされ得る。

【0009】

ある実施形態では、支持体は、1つ以上の固定部位を含む。核酸（例えば、テンプレートまたはアンプリコン）は必要に応じて、支持体と、その対応する固定部位で会合する。固定部位は必要に応じて、支持体の特定の一部もしくはエリア、または支持体上の位置も

しくは場所を含む。固定部位は、支持体上に任意の特定のまたは予め決定された場所、位置、寸法、サイズ、エリアもしくは構造、または任意の他の識別性パラメーターもしくは特徴を有してもよいし、または必要に応じて欠いてもよい。必要に応じて、このようなパラメーターの1つ以上は、テンプレートと支持体との会合の時点で、および／または増幅の完了の間もしくはその時点で、固定部位に関して決定される。ある実施形態では、1つ以上のテンプレート結合部分（例えば、増幅プライマー）が支持体に結合され、この支持体は必要に応じて、予め決定されるかまたは規定された位置または角度または距離（既定のポイントの中心からの）で支持体上に配置されるか、または配置されない。必要に応じて、支持体上の1つ以上の固定部位にわたるテンプレート分子の割付は、個々の結合部分の意図的な設計または配置を通じて達成されるかまたは達成されない。結合部分（例えば、プライマー）のこのような「ランダムにパターン化された（randomly patterned）」または「ランダム」アレイは、核酸分子のプールを含んでいる溶液、エマルジョン、エアロゾル、蒸気または乾燥調製物を、支持体上に滴下するか、噴霧するか、プレーティングするか、または広げること、および核酸分子を支持体上に定着させることによって、それらをその上の特定の部位または予め決定された固定部位に指向する介入があってもなくても、達成することができる。

10

【0010】

支持体または固定部位は必要に応じて、支持体に結合された1つ以上のオリゴヌクレオチド（例えば、増幅プライマー）を含む。好ましくは、ただし必須ではないが、支持体または固定部位に対するオリゴヌクレオチドの結合は、引き続き増幅または他のアッセイの間、安定である（例えば、10%、30%、50%、70%または90%を超えるオリゴヌクレオチドが、最適な増幅条件に供された後に結合されたままである）。

20

【0011】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法では、少なくとも1つの支持体または固定部位上の全てのプライマーが、同じ配列を含む。この支持体または固定部位は必要に応じて、目的のテンプレートの一方の鎖またはその相補体に対してハイブリダイズしない他の核酸を含んでもよい。この支持体または固定部位は必要に応じて、目的のテンプレートの一方の鎖またはその相補体に対してハイブリダイズするあらゆる他の核酸を含まない（すなわち、この固定部位は必要に応じてあらゆる他のプライマーを欠く）。必要に応じて、支持体または固定部位は、少なくとも2つの異なる配列を有する複数のプライマーを含む。必要に応じて、この支持体または固定部位は、一本鎖テンプレートの第一の部分に対して相補性である一種の固定されたプライマーを含み、テンプレートの第二の非重複性部分に対して相同性である（またはテンプレート相補体に対してハイブリダイズし得る）固定されたプライマーを含まない。この2つの部分は、もしそれらが、お互いに対してまたは他の部分の相補体に対してハイブリダイズする小部分をなんら含まない場合、非重複性である。

30

【0012】

2つ以上の異なる種類のプライマー（例えば、配列が異なる）は、実質的にお互いと同じ濃度で存在してもよいし、あるいは異なる濃度で存在してもよい。必要に応じて、このプライマーは実質的に、支持体または固定部位にわたって均一に分散される。必要に応じて、本明細書に記載されるいずれの方法でも、2つの異なる固定部位は、単一の支持体および／または異なる（例えば、構造的に接続されていない）支持体の空間的に隔てられているサブコンポーネント（例えば、部分またはエリア）である。必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法で、少なくとも1つの固定部位は、支持体の表面全体、または支持体の容積全体を含む。固定されたプライマーは必要に応じて、1つ以上の支持体または固定部位にわたって均一に分布される。

40

【0013】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、2つの異なる固定部位は、共有される支持体の中のまたは上の予め決定された配列中の予め決定された割付に配置される（例えば、グリッドパターンで）。他の実施形態では、1つ以上の固定部位の割り当

50

て、結合または位置決めは、不明であるか、または支持体に対するテンプレートの固定の前に予め決定される。ある例では、この支持体は、多重の固定されたプライマーを含み、かつ開始テンプレートがハイブリダイズする（例えば、増幅が生じる前）プライマーは、そのテンプレートについて固定部位内（例えば、その中央ポイント）に含まれると考えられ得る。このような実施形態では、固定部位の位置決めは、テンプレートに対するプライマーのハイブリダイゼーションの間または後に決定される。固定部位の割り当ておよび結合はまた、伸長および／または増幅の間または後に決定されてもよい。

【0014】

ある核酸集団は、もしそのメンバーの実質的な部分が、実質的に同一（または実質的に相補性）の配列を有する場合、クローンであるとみなされる。ある集団のメンバーは、100%同一である必要も、相補性である必要もなく、例えば、特定の数の「エラー」が合成の経過の間に生じてもよいことが理解される。ある実施形態では、ある集団の少なくとも50%のメンバーがお互いに対して、または参照核酸分子（すなわち、配列比較の基準として用いられる既定の配列の分子）に対して実質的に同一（または相補性）である。さらに好ましくは、ある集団のメンバーのうち少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%またはそれ以上が、参照核酸分子に対して実質的に同一（または相補性）である。2つの分子は、もしその2つの分子の間の同一性パーセントが、最適に配列された場合、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.9%またはそれ以上である場合、実質的に同一とみなされ得る。2つの分子は、もしその2つの分子の間の相補性パーセントが、最適に配列されたときに、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.9%またはそれ以上である場合、実質的に相補性とみなされ得る。さらに、非相同性の核酸の混合の低いまたは不十分なレベルの混合が、本明細書に記載の方法の間に生じる場合があり、従って、クローン集団は、少数の多様な核酸を含む場合がある（例えば、30%未満、例えば、10%未満）。

【0015】

当業者によって理解されたとおり、テンプレート、初期化オリゴヌクレオチド、伸長プローブ、プライマーなどに対する言及は、単一分子ではなく、関連の部分内で実質的に同一である核酸分子の集団またはプールを指す場合がある。例えば、「テンプレート」とは、複数の実質的に同一のテンプレート分子を指す可能性があり、「プローブ」とは、複数の実質的に同一のプローブ分子を指す可能性がある、等々。1つ以上の位置で縮重性であるプローブの場合、特定のプローブを含むプローブ分子の配列は、縮重位置で異なる、すなわち特定のプローブを構成するプローブ分子の配列は、非縮重位置（単数または複数）でのみ実質的に同一であり得ることが理解される。本出願におけるこれらの用語は、集団または分子のいずれかについて支持体を提供することを意図する。単一の核酸分子（すなわち、一分子）について述べることを意図している場合、「テンプレート分子」、「プローブ分子」、「プライマー分子」などの用語を代わりに用いてもよい。特定の場、実質的に同一の核酸分子の集団の複数の性質が明白に示される。

【0016】

「テンプレート」、「オリゴヌクレオチド」、「プローブ」、「プライマー」、「テンプレート」、「核酸」などは、本明細書において交換可能な用語であることが意図される。これらの用語は、ポリヌクレオチドを指すが、いかなる長さまたは機能に限定される必要もない。同じ核酸が文脈次第で、「テンプレート」とみなされても、「プローブ」とみなされても、または「プライマー」とみなされてもよく、これらの役割の間で時間とともに切り替わってもよい。「ポリヌクレオチド」とはまた、「核酸」とも呼ばれ、共有結合のヌクレオシド間連結によって接続された2つ以上のヌクレオチドの直線ポリマー、またはその改変体もしくは機能的なフラグメントである。これらの天然に存在する例では、ヌクレオシド間連結は典型的には、ホスホジエステル結合である。しかし、他の例は必要に応じて他のヌクレオシド間連結、例えばホスホロチオエート（phosphorothioate）連結を含み、リン酸基は含んでもよいし、または含まなくてもよい。ポリヌ

クレオチドとしては、二本鎖および一本鎖のDNA、同様に二本鎖および一本鎖のRNA、DNA:RNAハイブリッド、ペプチド-核酸類(PNA類)およびPNA類とDNAまたはRNAとの間のハイブリッドが挙げられ、また公知の種類の改変も挙げられる。ポリヌクレオチドは、必要に応じて、1つ以上の非ヌクレオチド部分、例えば、標識および他の小分子、大分子、例えば、タンパク質、脂質、糖、および固体または半固体の支持体に対して、例えば5'末端または3'末端のいずれかを通じて結合され得る。標識としては、最適な検出方法を用いて検出可能であり、従って最適な検出方法を用いて結合したヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを同様に検出可能にさせる任意の部分が挙げられる。必要に応じて、標識は、光学的に検出可能であるかまたは可視である電磁放射線を放射する。いくつかの場合には、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、標識には結合されず、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの存在は、直接検出される。「ヌクレオチド」とは、ヌクレオチド、ヌクレオシドまたはそのアナログを指す。必要に応じて、ヌクレオチドは、プリンまたはピリミジン塩基のN-またはC-グリコシドである。(例えば、2-デオキシ-D-リボース含有のデオキシリボヌクレオシドまたはD-リボース含有のリボヌクレオシド)。他のアナログの例としては、限定するものではないが、ホスホロチオエート、ホスホラミデート、メチルホスホネート、キラル-メチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチドが挙げられる。これらの用語のいずれか1つによる核酸についての言及は、その核酸がなんらかの特定の活性、機能または特性を有することを意味するととられるべきではない。例えば、「テンプレート」という用語は、この「テンプレート」が、ポリメラーゼによってコピーされていることを示すのでもないし、このテンプレートが「プライマー」または「プローブ」として作用できないことも示さない。

【0017】

特定の場合に、テンプレート、プローブ、プライマーなどのような増幅に関与する核酸試薬は、同じ機能を果たさない別の部分をこれも含む、より大型の核酸分子の一部であってもよいことが理解される。必要に応じて、この他の部分は、なんらテンプレート、プローブ、またはプライマーの機能を果たさない。いくつかの場合には、必要に応じて固定されたプライマーに対して(例えば、固定部位上で)実質的にハイブリダイズする核酸は、「テンプレート」とであるとみなされる。テンプレートウォーキングに関与する任意の1つ以上の核酸試薬(テンプレート、固定された鎖、固定されるかまたは固定されていないプライマーなど)は、他の核酸鎖からの増幅の前または間に生成され得る。核酸試薬は、必要に応じて、テンプレートウォーキング媒体に最初に導入された核酸に対して1つ以上の改変を作成することによって、インプット核酸から生成される(そしてそれと同一である必要はない)。インプット核酸は、例えば、制限消化、ライゲーション、1つ以上の増幅サイクル、変性、変異などに供されて、増幅またはさらなる増幅の間に、テンプレート、プライマーなどとして作用する核酸を生成し得る。例えば、二本鎖のインプット核酸を変性させて、第一の一本鎖の核酸を生成してもよく、これは必要に応じて第二の相補鎖を生成するために用いられる。それが所望される場合、第一の一本鎖の核酸は、本明細書における本発明者らの目的に関して「テンプレート」とみなされ得る。あるいは、第一の一本鎖の核酸から生成される第二の相補鎖は、本明細書における本発明者らの目的に関する「テンプレート」とみなされ得る。別の例では、テンプレートは、インプット核酸由来であり、かつこのインプット核酸と同一である必要はない。例えば、テンプレートは、インプット核酸に存在しない追加の配列を含んでもよい。ある実施形態では、テンプレートは、インプット核酸に対して相補性でない5'オーバーハングを有する1つ以上のプライマーを用いてインプット核酸から生成されるアンプリコンであってもよい。

【0018】

「増幅すること」という用語は、例えば、繰り返し回数プライムされた酵素合成を介した、核酸分子のコピーの生成を指す。必要に応じて、このような増幅することは、固定されたテンプレート核酸分子および/または固定されている1つ以上のプライマーで起こる。アンプリコンは例えば、開始テンプレート核酸から増幅手順によって生成される、一本鎖のまたは二本鎖の核酸である。アンプリコンは、核酸鎖を含み、その少なくとも一部は

10

20

30

40

50

、開始テンプレートの少なくとも一部に対して実質的に同一であるかまたは実質的に相補性である。開始テンプレートが二本鎖である場合、アンプリコンは、核酸鎖を含み、この核酸鎖は、一方の鎖の少なくとも一部に対して実質的に同一であり、いずれかの鎖の少なくとも一部に対して実質的に相補性である。このアンプリコンは、最初のテンプレートが一本鎖であるかまたは二本鎖であるかに関わらず、一本鎖であっても、または二本鎖であってもよい。

【0019】

「支持体」という用語は、その上で核酸のような試薬が固定され得る、任意の固体または半固体物を含む。核酸は、任意の方法によって固体支持体上に固定されてもよく、この方法としては限定するものではないが、物理的吸着、イオン結合もしくは共有結合の形成、またはそれらの組み合わせが挙げられる。固体支持体は、高分子、ガラス、または金属材料を含んでもよい。固体支持体の例としては、膜、平面表面、マイクロタイタープレート、ビーズ、フィルター、試験紙、スライド、カバースリップおよび試験管が挙げられ、オリゴマーがその上に合成されるか、結合されるか、連結されるか、そうでなければ固定される任意の固相材料を意味する。支持体は必要に応じて、「樹脂」、「相」、「表面」および「支持体」を含んでもよい。支持体は、有機ポリマー、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリフルオロエチレン、ポリエチレンオキシ、およびポリアクリルアミド、ならびにそのコポリマーおよびグラフトから構成され得る。支持体はまた、無機、例えば、ガラス、シリカ、孔制御ガラス (controlled-pore-glass) (CPG) であっても、または逆相シリカであってもよい。支持体の構成は、ビーズ、球状、粒子、顆粒、ゲルまたは表面の形態であってもよい。表面とは、平面、実質的に平面、または非平面であってもよい。支持体は、多孔性であっても非多孔性であってもよく、膨潤または非膨潤の特徴を有してもよい。支持体は、1つ以上のウェル、へこみまたは他の容器、管、機構または位置を含むように成形されてもよい。複数の支持体が、アレイ中に種々の位置で構成されてもよい。またはレーザー照射および共焦点または偏向集光によるスキャニングを含む検出手段によって、支持体は必要に応じてアドレス可能である (例えば、試薬のロボット送達について)。増幅支持体 (例えば、ビーズ) は、別の支持体内に配置されてもまたは別の支持体上 (例えば、第二の支持体のウェル内) に配置されてもよい。

【0020】

ある実施形態では、固体支持体は、「微小粒子」、「ビーズ」、「マイクロビーズ」など (必要に応じて、ただし必須ではないが球状の形状) であり、50ミクロン未満、好ましくは10ミクロン未満、3ミクロン未満、約1ミクロン未満、約0.5ミクロン未満、例えば、約0.1、0.2、0.3もしくは0.4ミクロン、またはそれより小さい (例えば、1ナノメートル、約1~10ナノメートル、約10~100ナノメートル、または約100~500ナノメートル未満) という最小の断面長 (例えば、直径) を有する。微小粒子 (例えば、Dynal, Oslo, NorwayのDynabeads) は、限定するものではないが、ガラス (例えば、孔制御ガラス)、シリカ、ジルコニア、架橋ポリスチレン、ポリアクリレート、ポリメタクリル酸メチル (polymethylmethacrylate)、二酸化チタン、ラテックス、ポリスチレンなどを含めて種々の無機材料または有機材料からできていてもよい。磁化は、増幅後の微小粒子結合試薬 (例えば、ポリヌクレオチドまたはリガーゼ) の収集および濃縮を容易にし得、かつまた追加の工程 (例えば、洗浄、試薬除去など) を容易にし得る。本発明の特定の実施形態では、異なる形状のサイズおよび/または色を有する微小粒子の集団を用いてもよい。微小粒子は必要に応じて、量子ドットでコードされてもよく、その結果各々の微小粒子は、個々に特定されるか、または固有に特定され得る。

【0021】

詳細な説明

いくつかの実施形態では、本開示は概して、1つ以上の核酸テンプレートをクローン増幅して、核酸テンプレートのクローン増幅された集団を形成するための方法、組成物、シ

ステム、装置およびキットに関する。本明細書に記載される任意の増幅方法は、必要に応じて繰り返しサイクルの核酸増幅を含む。増幅の1サイクルは、必要に応じて（a）テンプレート鎖に対するプライマーのハイブリダイゼーションと、（b）第一の伸長された鎖を形成するためのプライマー伸長と、（c）テンプレート鎖からの伸長された鎖の部分的または不完全な変性とを含む。テンプレート鎖にハイブリダイズするプライマー（簡便性のため「フォワード」プライマーと命名する）は、必要に応じて、支持体上にまたは支持体に対して固定される。この支持体は、例えば、固体または半固体である。必要に応じて、工程（c）由来のテンプレート鎖の変性された部分は、次の増幅サイクルでは異なるフォワードプライマーとハイブリダイズすることができる。ある実施形態では、引き続き増幅サイクルにおけるプライマー伸長は、テンプレート鎖からの第一の伸長された鎖の置き換えを包含する。第一の伸長された鎖の3'末端にハイブリダイズする第二の「リバー

10

20

【0022】

ある実施形態では、テンプレートは、1つ以上の固体または半固体支持体の上／それに対して固定されたプライマーを用いて増幅される。必要に応じて、この支持体は、テンプレート鎖の第一の部分に対して相補的である固定されたプライマーを含む。必要に応じて、この支持体は、同じテンプレート鎖の第二の非重複性の部分に対して相同である固定されたプライマーを有意には含まない。この2つの部分は、それらがお互いに対して、またはその相補体に対してハイブリダイズするいかなる小部分も含まない場合、非重複性である。別の例では、この支持体は必要に応じて、テンプレート鎖の相補体にハイブリダイズし得る固定されたプライマーを有意には含まない。

【0023】

必要に応じて、複数の核酸テンプレートは、1つ以上の支持体の存在下で単一の連続液相中で同時に増幅され、ここで各々の支持体は、1つ以上の固定部位を含む。ある実施形態では、各々のテンプレートは、増幅されてアンプリコンのクローン集団を生成し、ここでは個々のクローン集団は、他の増幅された集団由来の異なる支持体または固定部位の中にまたは上に固定される。必要に応じて、この増幅された集団は、増幅後、実質的にクローンのままで残る。

【0024】

テンプレートを、例えば、増幅して、クローン集団を生成し、これは、テンプレートー相同性鎖（本明細書では、「テンプレート鎖」または「リバー

30

40

【0025】

いくつかの実施形態では、本開示は一般に、必要に応じて1つ以上の支持体の中／それに対して／その上に固定された、クローンアンプリコンの局在化クローン集団を生成する新規な方法に関する。この支持体は例えば、固体であっても、または半固体（例えば、ゲルまたはヒドロゲル）であってもよい。この増幅されたクローン集団は必要に応じて、支持体の外部表面に結合されるか、または支持体の内面であってもよい（例えば、この支持体が、多孔性またはマトリックス構造を有する場合）。

【0026】

いくつかの実施形態では、増幅は、目的のテンプレート鎖（「リバー

50

る)に沿った複数サイクルのプライマー伸長によって達成される。便宜上、目的のテンプレート鎖にハイブリダイズするプライマーは、「フォワード」プライマーと呼ばれ、必要に応じて、テンプレート依存性の方式で伸長されて、目的のテンプレート鎖と相補性である「フォワード」鎖を形成する。いくつかの方法では、このフォワード鎖は、それ自体が、「リバース」プライマーと名付けられた第二のプライマー(伸長されて新規なテンプレート鎖(リバース鎖とも呼ばれる)を形成する)によってハイブリダイズされる。必要に応じて、新規なテンプレート鎖の少なくとも一部は、目的のもともとのテンプレート(「リバース」)鎖に対して相同性である。

【0027】

述べたとおり、1つ以上のプライマーは、1つ以上の支持体の中／その上／それに対して固定され得る。必要に応じて、1つのプライマーは、支持体に対する結合によって固定される。第二のプライマーが存在してもよく、必要に応じて支持体に対して固定されず、結合されない。異なるテンプレートは例えば、単一の連続液相中で同時に異なる支持体または固定部位上に増幅されて、クローン核酸集団を形成し得る。液相は、もし液相の任意の部分が、液体の任意の他の部分と液体接触されるかまたは連絡される場合、連続とみなされ得る。別の例では、液相は、液体の残りから全体として細分されるかまたは区画化されるかそうでなければ完全に物理的に隔てられる部分が無い場合、連続とみなされ得る。必要に応じて、液相は流動性である。必要に応じて、この連続液相は、ゲル内でもマトリックス内でもない。他の実施形態では、連続液相は、ゲルまたはマトリックス内である。例えば、この連続液相は、細孔、空間、または固体もしくは半固体支持体の他の間隙を占有する。

【0028】

液相がゲルまたはマトリックス内である場合、1つ以上のプライマーを必要に応じて支持体上に固定する。必要に応じて、この支持体はそれ自体がゲルまたはマトリックスである。あるいは、この支持体は、それ自体ゲルでも、またはマトリックスでもない。ある実施例では、1つのプライマーは、ゲル内に含まれる固体支持体上に固定され、ゲル分子には固定されない。この支持体は、例えば、平面または1つ以上の微小粒子の形態である。必要に応じて、この平面または複数の微小粒子は、実質的に同一の配列を有するフォワードプライマーを含む。ある実施形態では、この支持体は、有意な量の第二の異なるプライマーを含まない。必要に応じて、第二の非固定プライマーは、ゲル内の溶液にある。この第二の非固定プライマーは、例えば、テンプレート鎖(すなわち、リバース鎖)に結合するが、固定されたプライマーは、フォワード鎖に結合する。

【0029】

便宜上、プライマーによってハイブリダイズされる核酸テンプレート鎖の部分は、「プライマー結合配列」またはPBSと呼ばれる。従って、フォワードプライマーは、リバース鎖上でフォワードプライマー結合配列(「フォワードPBS」)に結合するが、リバースプライマーは、フォワード鎖上のリバースPBSに結合する。

【0030】

ある実施形態は、プライマー伸長の方法を含み、この方法は、(a)プライマーハイブリダイゼーション工程と、(b)伸長工程と、(c)ウォーキング工程と、を包含する。必要に応じて、このプライマーハイブリダイゼーション工程は、第一のプライマー分子(「第一のフォワードプライマー」)を、核酸鎖(「リバース鎖」)上の相補性フォワードプライマー結合配列(「フォワードPBS」)にハイブリダイズすることを包含する。必要に応じて、この伸長工程は、リバース鎖の全長相補体であって、それにハイブリダイズされる伸長された第一のフォワード鎖を生成することを包含する。この伸長された第一のフォワード鎖は、例えば、第一のフォワードプライマー分子を、テンプレート依存性の方式で、リバース鎖をテンプレートとして用いて伸長することによって生成される。必要に応じて、ウォーキング工程は、第二のプライマー(「第二のフォワードプライマー」)をフォワードPBSに対してハイブリダイズすることを包含し、ここでこのリバース鎖もまた、第一のフォワード鎖にハイブリダイズされる。例えば、ウォーキング工程は、

フォワードPBSの少なくとも一部をフォワード鎖（「遊離部分」）から変性することを包含し、ここではリバース鎖の別の部分が、フォワード鎖にハイブリダイズされたまま残る。

【0031】

ある実施形態では、プライマー伸長方法は、増幅方法であり、ここでは、プライマーハイブリダイゼーション、伸長および／またはウォーキングのうち任意の1つ以上の工程を少なくとも1回繰り返す。例えば、この方法は、1つ以上の増幅サイクルによってフォワード鎖を増幅することを包含し得る。増幅サイクルは必要に応じて伸長およびウォーキングを包含する。例示的な増幅サイクルは、伸長に続いてウォーキングを包含するか、または本質的にそれらからなる。必要に応じて、第一の増幅サイクルの第二のフォワードプライマーは、引き続き増幅サイクルの第一のフォワードプライマーとして機能する。例えば、第一の増幅サイクルにおいてウォーキング工程の上記第二のフォワードプライマーは、引き続き増幅サイクルの伸長工程の第一のフォワードプライマーとして機能する。

【0032】

必要に応じて、プライマー伸長または増幅の方法は、（a）第一のリバースプライマー分子を、伸長されたフォワード鎖上の相補性リバースプライマー結合配列（「リバースPBS」）にハイブリダイズすることと、（b）フォワード鎖の全長相補体であり、かつそれにハイブリダイズされる伸長された第一のリバース鎖を、第一のリバースプライマー分子をテンプレート依存性の方式でフォワード鎖をテンプレートとして用いて伸長することにより生成することと、（c）第二のプライマー（「第二のリバースプライマー」）をリバースPBSに対してハイブリダイズして、ここでこのフォワード鎖もまた第一のリバース鎖にハイブリダイズされることと、によってリバース鎖を伸長または増幅することをさらに包含する。工程（b）～（c）の1回以上の繰り返しが必要に応じて行われ、工程（c）の第二のリバースプライマーは、繰り返された工程（b）の第一のリバースプライマーであり、かつフォワード鎖のかなりの割合が、リバース鎖に対して、前記1つ以上の繰り返しの間中またはその間の全ての時点でハイブリダイズされる。ある実施形態では、かなりの割合とは、必要に応じて、少なくとも30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%である。

【0033】

必要に応じて、増幅の間、リバース鎖および／またはフォワード鎖は、完全に変性性の条件（この条件は、大きい複数の鎖の有意な画分（例えば、10%、20%、30%、40%または50%を超える）の完全な分離を、それらの伸長された、および／または全長の相補体から生じる）には曝されない。

【0034】

ある実施形態では、フォワード鎖および／またはリバース鎖のかなりの部分が、1つ以上の増幅サイクル（例えば、1、5、10、20または全ての行われる増幅サイクル）の間中もしくはその間の全ての時点で伸長され、かつ／または全長の相補体に対して必要に応じてハイブリダイズされる。ある実施形態では、鎖のかなりの割合とは必要に応じて、鎖の少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%である。ある実施形態では、これは、伸長されてないプライマーの T_m よりも高いが、プライマー相補鎖の T_m よりも低い温度で増幅反応を維持することによって達成される。例えば、増幅条件は、伸長されてないフォワードプライマーの T_m よりも高いが、伸長されたかまたは全長のリバース鎖の T_m よりも低い温度に保持される。また、例えば、増幅条件は、伸長されてないリバースプライマーの T_m よりも高いが、伸長されるかまたは全長のフォワード鎖の T_m よりも低い温度に保持される。

【0035】

必要に応じて、1つ以上のフォワードプライマー、および／または1つ以上のリバースプライマーは、ブリーザブル（breathable）であり、例えば、低い T_m を有する。ある実施例では、ブリーザブルプライマーのヌクレオチド塩基のうち少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%は、アデニ

ン、チミンもしくはウラシルであるか、またはアデニン、チミンもしくはウラシルに対して相補性である。

【0036】

核酸鎖（例えば、プライマーまたはテンプレート鎖）の T_m とは、例えば、二重鎖のクロン集団の少なくとも所望の画分が、選択された試薬条件（ここでは、個々の二重鎖がその全长相補体にハイブリダイズされた目的の核酸鎖を含む）下で完全に一本鎖にされる温度である。初期設定（デフォルト）によれば、所望の画分は50%である。ある実施形態では、所望の画分は、必要に応じて少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%である。ある実施形態では、 T_m (N) は、例えば、本明細書に考察されるように、公知の方法を用いて理論的に予測される。別の実施形態では、 T_m は公知の方法によって経験的に測定される。（例えば、Spink, Methods Cell Biol. 2008; 84:115~41; Meunier-Prestら、Nucleic Acids Res. 2003 December 1; 31(23):e150; Brewoodら、Nucleic Acids Res. 2008年9月; 36(15):e98）。

【0037】

所望の画分についての T_m は、 T_m (N) と示され得、ここでNは、所望の画分をパーセンテージで示す。ある実施形態では、フォワードプライマーおよび／またはリバースプライマーの T_m (50)（全てのプライマー分子の50%がそれらの相補性のPBSから完全に解離される）は、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃または80℃以下である。必要に応じて、伸長されたかまたは全長のフォワードおよび／またはリバース鎖の T_m (50)（全ての鎖分子の50%がそれらの相補性配列から完全に解離される）は、80℃、75℃、70℃、65℃、60℃または55℃以上である。別の実施形態では、フォワードプライマーおよび／またはリバースプライマーの T_m (80) は、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃または80℃以下である。必要に応じて、伸長されたかまたは全長のフォワードおよび／またはリバース鎖の T_m (80) は、80℃、75℃、70℃、65℃、60℃または55℃以上である。別の実施形態では、フォワードプライマーおよび／またはリバースプライマーの T_m (90) は、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃または80℃以下である。必要に応じて、伸長されたかまたは全長のフォワードおよび／またはリバース鎖の T_m (90) は、80℃、75℃、70℃、65℃、60℃または55℃以上である。別の実施形態では、フォワードプライマーおよび／またはリバースプライマーの T_m (95) は、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃または80℃以下である。必要に応じて、伸長されるかまたは全長のフォワードおよび／またはリバース鎖の T_m (95) は、80℃、75℃、70℃、65℃、60℃または55℃以上である。必要に応じて、伸長されるかまたは全長のフォワードおよび／またはリバース鎖の T_m (99) は、80℃、75℃、70℃、65℃、60℃または55℃以上である。別の実施形態では、フォワードプライマーおよび／またはリバースプライマーの T_m (95) は、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃または80℃以下である。必要に応じて、伸長されたかまたは全長のフォワードおよび／またはリバース鎖の T_m (99) は、80℃、75℃、70℃、65℃、60℃または55℃以上である。

【0038】

必要に応じて、1つ以上の増幅サイクル（例えば、1、5、10、20、または実質的に全ての増幅サイクル）は、伸長されていないプライマーの T_m (70) より高く、かつ相補性の全長鎖の T_m (20) より低い温度で行われる。例えば、この温度は、伸長されていないプライマーの T_m (80) より高く、かつ相補性の全長鎖の T_m (20) または T_m (15) または T_m (10) または T_m (5) または T_m (1) より低い。また例えば、この温度は、伸長されていないプライマーの T_m (90) より高く、かつ相補性の全長鎖の T_m (20) または T_m (15) または T_m (10) または T_m (5) または T_m (1) より低い。また例えば、この温度は、伸長されていないプライマーの T_m (95)

より高く、かつ相補性の全長鎖の $T_m(20)$ または $T_m(15)$ または $T_m(10)$ または $T_m(5)$ または $T_m(1)$ より低い。また例えば、この温度は、伸長されていないプライマーの $T_m(98)$ より高く、かつ相補性の全長鎖の $T_m(20)$ または $T_m(15)$ または $T_m(10)$ または $T_m(5)$ または $T_m(1)$ より低い。また例えば、この温度は、伸長されていないプライマーの $T_m(99)$ より高く、かつ相補性の全長鎖の $T_m(20)$ または $T_m(15)$ または $T_m(10)$ または $T_m(5)$ または $T_m(1)$ より低い。必要に応じて、この1つ以上の増幅サイクルは、伸長されていないプライマーの $T_m(50)$ よりも少なくとも5、10、15、20、25、30、35、または45℃高い温度で行われる。必要に応じて、この温度は、全長プライマー相補鎖の $T_m(50)$ よりも少なくとも5、10、15、20、25、30、35、または45℃低い。ある実施形態では、この伸長されていないプライマーは、フォワードプライマーであり、かつ相補性全長鎖は、リバーズ鎖であるか、またはその逆もなりたつ。

10

【0039】

必要に応じて、伸長工程で、テンプレートとしてリバーズ鎖を用いる、フォワードプライマーのテンプレート依存性伸長は、リバーズ鎖に対して既にハイブリダイズされた別のフォワード鎖の置き換えを生じる。必要に応じて、伸長工程において、フォワード鎖をテンプレートとして用いるリバーズプライマーのテンプレート依存性伸長は、フォワード鎖に対して既にハイブリダイズされた別のリバーズ鎖の置き換えを生じる。

【0040】

ある実施形態では、この方法はさらに、プライマー伸長または所望の回数の増幅サイクルを行った後、伸長されたフォワード鎖をリバーズ鎖から完全に分離すること、および必要に応じて、分離されたフォワード鎖を分離された固定されたリバーズ鎖の存在から除去すること（またはその逆もなりたつ）を包含する。

20

【0041】

必要に応じて、1つ以上の核酸試薬は、リコンビナーゼおよび／または逆転写酵素および／またはヘリカーゼおよび／またはニッキング酵素および／またはポリメラーゼではない任意の他の酵素と、任意の1つ以上の工程の間に接触しない。例えば、プライマーおよび／またはテンプレートは、1つ以上のこのような酵素とはいずれの時点でも接触しない。

【0042】

変性は必要に応じて、非酵素的に、例えば、温度を上昇することによって達成される。ある実施形態では、増幅は、本明細書に記載のような実質的に等温条件で行われる。

30

【0043】

必要に応じて、任意の1つ以上の核酸、例えば、プライマーが支持体に結合される（例えば、共有結合される）。ある実施形態では、第一のおよび／または第二のフォワードプライマーは、単一の（同じ）支持体に固定される。

【0044】

ある実施形態では、第一および第二のフォワードプライマーは、同じ支持体に接近して固定され、それによって増幅は、伸長されたフォワード鎖の固定されたクロン集団を生成する。必要に応じて、第一と第二のフォワードプライマーの間の距離は、プライマーまたはPBSの長さの2倍以下である。

40

【0045】

必要に応じて、複数のテンプレート核酸が、空間的に隔てられた固定部位に対して個々にハイブリダイズされ、それによって増幅は、個々のテンプレート核酸に対応する空間的に隔てられたクロン集団を生成する。

【0046】

ある実施形態では、第一のフォワードプライマーは、「リバーズ」テンプレート鎖上のフォワードPBSに対してハイブリダイズされる。必要に応じて、第一のフォワードプライマーは、支持体上に固定される。この第一のフォワードプライマーは、リバーズ鎖に沿って伸長されて、（伸長された）第一のフォワード鎖を形成し得る。この伸長は必要に

50

じて、リバース鎖をテンプレートとして用いて、テンプレート依存性である。伸長後、第一のフォワード鎖およびリバース鎖を必要に応じて、二重鎖中でお互いに対してハイブリダイズする。必要に応じて、第一のリバース鎖のPBSの少なくとも一部、および第一のフォワード鎖のフォワードプライマー部分は、お互いから隔てられる（例えば、変性または融解を介して）が、第一のリバース鎖および第一のフォワード鎖は、別の部分にまたがってお互いと会合（例えば、ハイブリダイズ）したまま残る。次いで、フォワードPBSの少なくとも一部を含んでいるリバース鎖の分離された部分は、第二の異なるフォワードプライマーに対してアニーリングされ得る（例えば、ハイブリダイゼーションによって）。必要に応じて、この第二のフォワードプライマーは、支持体上に固定される。この第二のフォワードプライマーは例えば、同じ支持体上に、第一のフォワードプライマーとして固定されてもよく、必要に応じて第一のプライマーに対して十分近くに位置されて、その結果リバース鎖の一部は、第一のフォワード鎖に対してハイブリダイズし得るが、一方でリバース鎖の別の部分は、この第二のフォワードプライマーに対して同時にハイブリダイズされる。次いで、この第二のフォワードプライマーは、順次伸長されて、伸長された第二のフォワード鎖が形成され得る。必要に応じて、上記第二のフォワードプライマーは、テンプレート依存性の方式でリバース鎖に沿って伸長される。この第二のフォワードプライマーの伸長は、必要に応じて、第一のフォワード鎖をリバース鎖から置き換える。前のおり、リバース鎖のプライマー結合配列は、第二のフォワード鎖のプライマー部分とは分離されてもよく、ここではリバース鎖の別の部分が、第二のフォワード鎖と会合されたまま残る（例えば、ハイブリダイゼーションによって）。これらの工程は、さらなるフォワードプライマーを用いて繰り返されて、さらなる伸長されたフォワード鎖（例えば、伸長された第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、またはより高次の伸長された鎖）が形成され得る。このプロセスは、必要に応じて、所望の回数の増幅サイクルについて繰り返され、これによって、増幅された、固定された核酸分子の集団が得られ得る。この集団は、事実上、本質的にはクローンであり得る。例えば、増幅されたクローン集団の増幅された核酸分子は、お互いに対して実質的に同一のおよび／または実質的に相補性の複数の核酸を含み得る。

【0047】

必要に応じて、伸長されたフォワード鎖は、リバースプライマー結合配列（「リバースPBS」）（これに対してリバースプライマーがハイブリダイズする）を含む。フォワード鎖上のリバースPBSは必要に応じて、フォワード鎖の3'末端を含むか、またはそれに近い。いくつかの実施形態では、増幅は、リバース鎖上の配列のような、任意のハイブリダイズされるか、または会合した配列からリバースPBSのほとんどの部分を解離しないことを包含する。フォワード鎖上のリバースPBSは、必要に応じて、これにハイブリダイズするリバースプライマーと接触される。次いで、リバースプライマーは、フォワード鎖をテンプレートとして用いて伸長されて、伸長されたリバース鎖が形成される。必要に応じて、新規に生成されたリバース鎖は、フォワードプライマー伸長のためのテンプレートとして機能する。リバース鎖はまた、本明細書に記載の任意の方法を含む、別の反応において、テンプレート、プライマーまたはプローブとして関与し得る。

【0048】

増幅された核酸集団を、配列決定、スクリーニング、診断、インサイチュ核酸合成、遺伝子発現のモニタリング、核酸フィンガープリンティングなどを含む、多くの異なる目的に用いてもよい。

【0049】

必要に応じて、本明細書における任意の1つ以上のプライマー伸長および／または増幅方法は、1つ以上の固定された核酸伸長生成物を生成する。あるバリエーションでは、固体支持体は、全てが同一のまたは実質的に同一のプライマーを含む。固体支持体は、他の核酸を含んでもよい。必要に応じて、これらの他の核酸は、目的のテンプレート鎖またはその相補体に対してハイブリダイズしない。固体支持体は必要に応じて、目的のテンプレート鎖またはその相補体にハイブリダイズする任意の他の核酸を含まない。

【0050】

いくつかの実施形態では、本開示は概して、増幅反応溶液中の支持体上へ核酸テンプレートをクローン増幅するための方法、組成物、システム、装置およびキットに関連する。必要に応じて、核酸テンプレートは、連続液相を含んでいる溶液中の支持体と接触される。この支持体は、少なくとも第一のプライマーおよび第二のプライマーを含んでいるプライマーの集団を含んでもよい。プライマーの集団は、支持体上に、例えば、支持体に対する共有結合によって固定されてもよい。いくつかの実施形態では、この核酸テンプレートは、標的配列に隣接するプライマー結合配列を含む。プライマー結合配列は、第一のプライマーの配列および必要に応じて第二のプライマーの配列に対して相補性であり得る。この標的配列は、集団中のプライマーに対して非相補性であってもよい。いくつかの実施形態では、核酸テンプレートのプライマー結合配列は、第一のプライマーに対してハイブリダイズされる。この第一のプライマーは、ポリメラーゼを用いてテンプレートに沿って伸長され得、それによって伸長された第一のプライマーが形成される。テンプレートのプライマー結合配列の少なくとも一部は、伸長された第一のプライマーから分離され得る（例えば、変性されるかまたは融解される）。この分離することは、必要に応じて、テンプレートの一部と伸長された第一のプライマーとの間のハイブリダイゼーションを維持しながら行われる。プライマー結合配列の分離された部分は、第二のプライマーに対して引き続きハイブリダイズされ得る。必要に応じて、このようなハイブリダイゼーションは、テンプレートの他の部分と伸長された第一のプライマーとの間のハイブリダイゼーションを維持しながら行われる。第二のプライマーは、ポリメラーゼを用いてテンプレートに沿って伸長され得、それによって伸長された第一のプライマーおよび伸長された第二のプライマーを含む支持体が形成される。伸長された第一のプライマーおよび／または伸長された第二のプライマーの伸長された部分は、標的配列に相補的な配列を含んでもよい。

【0051】

いくつかの実施形態では、本開示は概して、増幅反応溶液中の支持体上に核酸テンプレートをクローン増幅するための方法に関しており、この方法は：核酸テンプレートと溶液中の支持体とを接触させることであって、この支持体が少なくとも第一のプライマーおよび第二のプライマーを含んでいる固定されたプライマーの集団を含み、この核酸テンプレートが、このプライマー結合配列が第一のプライマーの配列および第二のプライマーの配列に相補性である標的配列に隣接するプライマー結合配列を含み、この標的配列が集団中でプライマーに対して非相補性である、接触させることと；核酸テンプレートのプライマー結合配列を第一のプライマーにハイブリダイズすることと；第一のプライマーをテンプレートに沿って、ポリメラーゼを用いて伸長して、それによって伸長された第一のプライマーを形成することと；テンプレートのプライマー結合配列の少なくとも一部を、伸長された第一のプライマーから、テンプレートの別の部分と伸長された第一のプライマーとの間のハイブリダイゼーションを維持しながら変性することと；このプライマー結合配列の変性された部分を、テンプレートのもう一方の部分と伸長された第一のプライマーとの間のハイブリダイゼーションを維持しながら、第二のプライマーに対してハイブリダイズすることと；この第二のプライマーをテンプレートに沿って、ポリメラーゼを用いて伸長して、それによって伸長された第一のプライマーおよび伸長された第二のプライマーを含んでいる支持体を形成することであって、ここでこの伸長された第一のプライマーおよび伸長された第二のプライマーは各々が標的配列に対して相補性の配列を含む。プライマーのこの集団は、1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのヌクレオチド以下までが配列中で異なる実質的に同一のプライマーから構成され得る。いくつかの実施形態では、プライマー集団は、異なるプライマーから構成され、その少なくともいくつかは、テンプレートのプライマー結合配列に対して相補性である配列を含む。いくつかの実施形態では、集団のプライマーは、テンプレートの5'末端側の半分の配列に対して非相補性である。いくつかの実施形態では、集団のプライマーは、支持体の任意の伸長されたプライマーの3'末端側の半分の配列に対して非相補性である。いくつかの実施形態では、集団のプライマーは、プライマー結合配列以外のテンプレートのいずれの配列に対しても非相補性である。

【0052】

いくつかの実施形態では、本開示は概して、増幅反応溶液中の支持体の集団上に対して核酸テンプレートの集団をクローン増幅するための方法に関連し、この方法は：本明細書に開示の方法のいずれかによって第一の支持体上の第一の核酸テンプレート上に第一のテンプレートをクローン増幅することと、同じ方法によって第二の支持体上に第二の核酸テンプレートをクローン増幅することとを包含し、両方の支持体は、増幅の間に単一の連続液相内に含まれる。

【0053】

当業者によって理解されたとおり、テンプレート、オリゴヌクレオチド初期化、伸長プローブ、プライマーなどについての言及は、いくつかの実施形態では、単一の分子ではなく関連の領域内の実質的に同一である核酸分子の集団またはプールを指す。従って、例えば、「テンプレート」とは、いくつかの実施形態では、複数の実質的に同一のテンプレートを指し；「プローブ」とは、いくつかの実施形態では、複数の実質的に同一のプローブ分子などを指す可能性がある。1つ以上の位置で縮重性であるプローブの場合には、特定のプローブを含むプローブ分子の配列は、その縮重位置で異なる、すなわち、特定のプローブを構成するプローブ分子の配列は、非縮重位置でのみ実質的に同一であり得ることが理解される。説明の目的のために、単数形を用いて、単一分子を指すだけでなく、実質的に同一の分子の集団も指してもよい。特定の場合には、核酸分子の単一の性質、または実質的に同一の核酸分子の集団の複数の性質は、明確に示される。

【0054】

ある集団のメンバーは100%同一である必要はないことが理解される。例えば、核酸配列のクローン増幅された集団の全てのメンバーは、同一である必要はない。なぜなら、特定数の「エラー」が合成の経過中に生じ得るからである；同様に、プライマーのある集団内の全てのプライマーがお互いに同一であるとは限らない。いくつかの実施形態では、ある集団のメンバーの少なくとも50%が参照核酸分子（すなわち、配列比較の基礎として用いられる既定の配列の分子）と同一である。いくつかの実施形態では、ある集団のメンバーのうち少なくとも50%が、参照核酸分子に対して少なくとも70%、75%、85%、90%、もしくはそれ以上、又は好ましくは少なくとも95%の同一である。さらに好ましくは、集団のメンバーのうち少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、またはそれ以上が、参照核酸分子に対して、少なくとも85%、90%、またはそれ以上、好ましくは少なくとも95%同一であるか、またはそれよりさらに好ましくは少なくとも99%同一である。好ましくは、参照核酸分子に対する集団のメンバーの少なくとも95%以上またはより好ましくは少なくとも99%の同一性パーセントは、少なくとも98%、99%、99.9%またはそれ以上である。同一性パーセントは、2つの最適に整列された配列を比較し、同一の核酸塩基（例えば、A、T、C、G、UまたはI）が両方の配列に存在して、一致した位置の数を生じる位置の数を決定し、この一致した位置の数を位置の総数で割り、この結果に100を掛けて配列同一性のパーセントを得ることによって計算され得る。ある特定の場合には、テンプレート、プローブ、プライマーなどの核酸分子は、テンプレート、プローブまたはプライマーの機能を果たさない部分もまた含む、より大きい核酸分子の一部であってもよいことを理解されたい。その場合、集団の個々のメンバーは、その部分に関して実質的に同一である必要はない。

【0055】

核酸は必要に応じて、1つ以上のヌクレオチドを含む。ある実施形態では、ヌクレオチドは、核酸塩基（窒素含有塩基）、五炭糖（リボースまたは2'-デオキシリボースのいずれか）、およびリン酸基のうちのいずれか1つ以上を含む。必要に応じて、ヌクレオチドは、3つの成分全てまたはその誘導体を含む。必要に応じて、核酸塩基は、プリンまたはピリミジン塩基である。例示的なプリン塩基類としては、アデニンおよびグアニンが挙げられるが、例示的なピリミジン類は、チミン、ウラシルおよびシトシンである。

【0056】

本明細書において用いる場合、「相補性」という用語およびその変化型は、個々のヌクレオチドに関連して用いられる場合、生理学的条件下でDNA複製の間、お互いの反対の、DNAポリメラーゼによって効率的に組み込まれるヌクレオチドを包含する。典型的な実施形態では、相補性のヌクレオチドは、お互いと塩基対、例えば、A-T/UおよびG-C塩基対（ヌクレオチドの核酸塩基および／またはお互いに対して逆平行のポリヌクレオチド位置との間での特定のワトソン・クリック型水素結合を通じて形成される）を形成し得；他の種類の塩基対合もまた生じ得る。例えば、他の人工的な塩基対の相補性は、他の種類の水素結合および／または塩基の疎水性および／または塩基の間の形状の相補性に基づく場合がある。

【0057】

本明細書において用いる場合、「相補性」という用語およびその改変体は、核酸配列に対して用いる場合、ハイブリダイズされた二重鎖においてのように、逆平行の配向で、2つ以上の個々の対応する位置で、お互いと累積的な塩基対合を受ける可能性がある核酸配列を指す。必要に応じて、第一の核酸配列と第二の核酸配列との間に「完全な」または「全体的な」相補性が存在してもよく、ここで第一の核酸分子または配列における各々のヌクレオチドは、第二の核酸配列上の対応する逆平行の位置においてヌクレオチドとの安定な塩基対合の相互作用を受けることが可能で；あるいは、2つの核酸配列は、一方の核酸配列のヌクレオチド残基のうち少なくとも50%がもう一方の核酸配列におけるヌクレオチド酸基に対して相補性である場合、相補性であり得る。特定の相補性核酸配列内の相補性残基は、常にお互いと連続する必要はなく、相補性核酸配列内の1つ以上の非相補性残基によって中断され得る。いくつかの実施形態では、2つの相補性核酸配列の1つの残基の少なくとも50%、ただし100%未満が、他の核酸配列における残基に対して相補性である。いくつかの実施形態では、一方の核酸配列の残基のうち少なくとも70%、80%、90%、95%または99%が、他方の核酸配列における残基に対して相補性である。配列は、一方の核酸配列の残基のうち少なくとも85%がもう一方の核酸配列における残基に対して相補性である場合、「実質的に相補性」とであると言われる。

【0058】

本明細書において用いる場合、「相補性」とは、2つ以上の核酸分子に関して述べる場合、各々の分子が、その他の核酸分子中の配列に対して相補性である配列を含む任意の核酸分子を包含し得る。相補性核酸分子は、その全長にわたって相補性である必要はなく、各々の分子は、その他の分子に対して非相補性である1つ以上の領域を含んでもよい。例えば、テンプレートおよびプライマー分子は、それらが異なる長さである場合でさえ、「相補性」と呼ぶことができ；いくつかの実施形態では、テンプレートは、プライマーより長くてもよく、かつプライマーの任意の配列に対して相補性でない配列を含み、またはその逆も成り立つ。

【0059】

「非相補性」という用語およびその変化型は、本明細書において、2つの核酸分子または配列に関して用いる場合、典型的には、核酸分子または配列であって、一方の核酸分子または配列の残基の50%未満が、他方の核酸分子または配列における残基に対して相補性であることを指す。2つの対向するヌクレオチドが相補性ではない場合、「不一致」が核酸分子または配列におけるいずれかの位置に存在する。同様に2つのヌクレオチド配列またはその位置は、その配列または位置が、お互いに対して同一であるかまたは相補性である場合、お互いに対して一致するとみなされる。

【0060】

本明細書において用いる場合、「ハイブリダイゼーション」という用語は、1つ以上の位置で相補性ヌクレオチドを含んでいる任意の2つの核酸分子の間の塩基対合のプロセスを指す。典型的には、このような塩基対合は、確立されたパラダイム、例えば、ワトソン・クリックパラダイム（A-T/UおよびG-C塩基対が、ヌクレオチドの核酸塩基とおよび／またはお互いと逆平行のポリヌクレオチド位置との間での特定のワトソン・クリック型の水素結合を通じて形成される）に従って生じ得る。いくつかの実施形態では、ハイブ

リダイゼーションは、同様に非ワトソン・クリックパラダイムによって生じ得；例えば、人工的な塩基対は、他の種類の水素結合および／または塩基の疎水性および／または塩基間の形状相補性を通じて形成され得る。ハイブリダイズした核酸分子は、その全長にわたってハイブリダイズされる必要はなく、各々の分子は、他の分子にハイブリダイズされない1つ以上の領域を含んでもよい。例えば、テンプレートおよびプライマー分子は、テンプレート、プライマーまたは両者のかなりの領域がお互いに対してハイブリダイズしないまま残る場合でさえ、お互いに対してハイブリダイズされると記載することができる。さらに、ハイブリダイゼーションの領域は、お互いと塩基対合しない1つ以上の連続ヌクレオチドを含んでもよい。この方式でお互いと塩基対合される核酸分子（または核酸分子内の配列）は、「ハイブリダイズされた」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、単一の核酸分子は、それ自体との自己ハイブリダイゼーション（例えば、ヘアピン形成）を受ける場合がある。

【0061】

典型的には、核酸分子をハイブリダイズさせること（例えば、プライマーとテンプレートをハイブリダイズさせること）は、核酸分子を、各々の核酸分子内の1つ以上のヌクレオチド残基が、別の核酸分子の1つ以上のヌクレオチドと塩基対合する条件下で、お互いと接触させることを包含する。この接触は、所望の適用に応じて、任意の適切な条件を用いて行ってもよい。1つの例示的なアッセイでは、2つの核酸分子は、塩および／または界面活性剤を含む緩衝溶液、例えばSDS中で、所望の時間および所望の期間、接触される。例えば、ハイブリダイゼーションを、低ストリンジェンシー、中ストリンジェンシーまたは高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を用いて行ってもよい。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、例えば、温度、塩濃度、SDS濃度などを含む種々のハイブリダイゼーションパラメーターを変化することによって調節され得る。ハイブリダイゼーションの方法およびハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを制御する方法は、当該分野で周知である。

【0062】

多くの方法のうち、一本鎖のテンプレート配列の固定されたクローンのアンプリコンの局在化されたクローン集団を生成する方法が提供され、この方法は：（a）一本鎖のテンプレート配列（「テンプレート1」）を固定部位（「IS1」）に結合することであって、ここでIS1が、テンプレート1に対して実質的にハイブリダイズし得る固定されたプライマー（「IS1プライマー」）の多重コピーを含み、テンプレート1がIS1に対して、IS1プライマーに対するハイブリダイゼーションによって結合される、ことと、（b）溶液中で、IS1プライマーおよび非固定プライマー（「SP1プライマー」）を用いてテンプレート1を増幅することと、を包含し、一本鎖のテンプレート1に対して相補性である増幅された鎖が、IS1上のプライマーに対して一本鎖である場合実質的にハイブリダイズできず、増幅によって、テンプレート1のIS1に対する最初のハイブリダイゼーションのポイントまわりに、固定されたクローンアンプリコンの局在化集団が生成される。

【0063】

また、第一のテンプレート配列（「テンプレート1」）および第二のテンプレート配列（「テンプレート2」）の別でかつ固定されたクローン集団を生成する方法も提供され、この方法は、第一のおよび第二のテンプレート配列を増幅して、実質的に第一の固定部位（「IS1」）に対して結合され、第二の固定部位（「IS2」）には結合されないテンプレート1のクローンアンプリコンの集団、または実質的にIS2に結合されIS1には結合されないテンプレート2のクローンアンプリコンの集団を生成することを包含し、（a）両方のテンプレートおよび全てのアンプリコンは、連続の液相が第一および第二の固定部位（それぞれ、「IS1」および「IS2」）と接触され、かつIS1およびIS2が空間的に隔てられている同じ連続液相内に含まれ、（b）テンプレート1は、一本鎖型である場合、第一のサブ配列（「T1-FOR」）を一端で含み、かつ第二のサブ配列（「T1-REV」）をその反対の端で含み、（c）テンプレート2は、一本鎖型である場

合、第一のサブ配列（「T 2－F O R」）を一端で含み、かつ第二のサブ配列（「T 2－R E V」）をその反対端で含み、（d）I S 1は、T 1およびT 2が一本鎖である場合、T 1－F O RおよびT 2－F O Rに対して実質的にハイブリダイズできる固定された核酸プライマー（「I S 1プライマー」）の多重コピーを含み、（e）I S 2は、T 1およびT 2が一本鎖である場合、T 1－F O RおよびT 2－F O Rの両方に対して実質的にハイブリダイズできる固定されたプライマー（「I S 2プライマー」）の多重コピーを含み、（f）T 1－R E Vのリバース相補体は、一本鎖である場合、I S 1上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできず、ただし、連続液相中の非固定プライマー（「S P 1」）に対して実質的にハイブリダイズ可能であり、かつ（g）T 2－R E Vのリバース相補体は、一本鎖である場合、I S 2上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできず、ただし連続液相中の非固定プライマー（「S P 2」）に対して実質的にハイブリダイズ可能である。

10

【0064】

さらに、第一のテンプレート配列（「テンプレート1」）と第二のテンプレート配列（「テンプレート2」）の別々でかつ固定されたクローン集団を生成する方法が提供され、この方法は、第一のおよび第二のテンプレート配列を増幅することを包含し、（a）両方のテンプレートが、一本鎖型であり、かつ両方とも第一のおよび第二の固定部位（それぞれ、「I S 1」および「I S 2」）がこの連続液相と接触され、I S 1およびI S 2が空間的に隔てられた同じ連続液相中に含まれ、（b）テンプレート1が、第一のサブ配列（「T 1－F O R」）をその3'末端に、およびT 1－F O Rと非重複性である第二のサブ配列（「T 1－R E V」）をその5'末端に含み、（c）テンプレート2は、第一のサブ配列（「T 2－F O R」）をその3'末端に、およびT 2－F O Rと非重複性である第二のサブ配列（「T 2－R E V」）をその5'末端に含み、（d）I S 1は、T 1－F O RおよびT 2－F O Rの両方に対してハイブリダイズし得る、固定されたプライマー（「I S 1プライマー」）を含み、（e）I S 2は、T 1－F O RおよびT 2－F O Rの両方に対してハイブリダイズし得る、固定されたプライマー（「I S 2プライマー」）を含み、かつ（f）T 1－R E Vのリバース相補体は、I S 1上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできず、かつ／またはT 2－R E Vのリバース相補体は、I S 2上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできないが、各々が、連続液相中の非固定プライマーに対して実質的にハイブリダイズ可能であり；それによって増幅が、実質的にI S 1に対して結合するがI S 2に対しては結合しないテンプレート1のクローンアンプリコンの集団、および／または実質的にI S 2に対して結合するがI S 1に対しては結合しないテンプレート2のクローンアンプリコンの集団を生じる。

20

30

【0065】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、連続培地は流動性である。必要に応じて、非固定核酸分子の混合は、増幅プロセスの少なくとも一部の間、例えば、本明細書に記載の任意の1つ以上の工程またはサイクルの間に、連続液相中で実質的に遅延されない。

【0066】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、混合は、増幅の間に実質的に一定期間遅延されない。例えば、混合は、増幅の全体的な期間の間、実質的に遅延されない。

40

【0067】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、1つの固定部位から解離された任意の核酸が、両方の固定部位に対して実質的にハイブリダイズ可能であり、かつこのような前記解離された核酸の別の固定部位に対する任意の動き（例えば、拡散、対流による動き）は、実質的に連続液相中で遅延されない。

【0068】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、連続液相は、I S 1およびI S 2と同時に接触される。

50

【0069】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、固定されたプライマーによって結合されるテンプレートの第一の部分は、テンプレートの第二の部分と重複せず、そのテンプレートの第二の部分の相補体は非固定プライマーによって結合されている。

【0070】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、増幅されるべき少なくとも1つのテンプレートが、インプット核酸から、この核酸が少なくとも1つの固定部位と接触して配置された後に、生成される。

【0071】

必要に応じて、本明細書に記載の任意の方法は、(a) 固定されたプライマーを含んでいる支持体を一本鎖の核酸テンプレートと接触させる工程であって、第一の固定されたプライマーをテンプレート上のプライマー結合配列(PBS)に対してハイブリダイズさせる工程と、(b) テンプレート依存性伸長において上記ハイブリダイズされた第一のプライマーを伸長して、テンプレートに対して相補性であり、かつテンプレートに対して少なくとも部分的にハイブリダイズした伸長された鎖を形成する工程と；(c) 上記PBSの少なくとも一部が一本鎖型一本鎖型(「遊離部分」)であるように、上記伸長された相補鎖からテンプレートを部分的に変性する工程と；(d) この遊離部分を、伸長されていない、固定された第二のプライマーに対してハイブリダイズさせる工程と、(e) テンプレート依存性伸長においてこの第二のプライマーを伸長して、テンプレートに対して相補性である伸長された鎖を形成する工程と、(f) 必要に応じて、アニーリングされた伸長され固定された核酸鎖をお互いから分離する工程と、を包含する。

【0072】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、(a) 増幅の間、開始テンプレートおよび／または増幅された鎖を含んでいる核酸二重鎖が形成され；この二重鎖は、かなりの数の二重鎖の完全な変性を生じる条件に対して、増幅の間に供されない。

【0073】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、上記一本鎖のテンプレートは、増幅される複数のインプットの二重鎖または一本鎖の核酸配列(この配列は既知であっても未知であってもよい)を採用すること、ならびに第一のユニバーサルアダプター配列および第二のユニバーサルアダプター配列を、少なくとも1つのインプット核酸の末端上に追加または創出することによって生成され；前記第一のユニバーサルアダプター配列が、IS1プライマーおよび／またはIS2プライマーに対してハイブリダイズし、かつ前記第二のユニバーサルアダプター配列のリバース相補体が少なくとも1つの非固定プライマーに対してハイブリダイズする。このアダプターは、二本鎖であってもまたは一本鎖であってもよい。

【0074】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、第一および第二の核酸アダプター配列は、前記一本鎖のテンプレート配列の第一および第二の末端に提供される。

【0075】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、タグもまた、1つ以上の核酸配列(例えば、テンプレートまたはプライマーまたはアンプリコン)に対して付加され、前記タグは、タグを含む核酸の特定を可能にする。

【0076】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、少なくとも1つの固定部位または支持体上の全てのプライマーが同じ配列を有する。必要に応じて、固定部位または支持体は、少なくとも2つの異なる配列を有する複数のプライマーを含む。必要に応じて、2つ以上の異なる種類のプライマー(例えば、配列が異なる)は、実質的にお互いと同じ濃度で存在するか、あるいは異なる濃度で存在する。必要に応じて、少なくとも1つの固定部位または支持体のプライマーは、この固定部位または支持体にわたって実質的に均一に分散される。必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、2つの異な

る固定部位は、単一の支持体の空間的に隔てられているサブコンポーネントであるか、および／または異なる接続されていない支持体上である。

【0077】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、上記支持体は、三次元のマトリックスを形成し、かつ2つの異なる固定部位は、完全には重複しない支持体の2つの異なる三次元の部分である。必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、上記2つの異なる固定部位は、完全には重複しない支持体の表面上の2つの異なるエリアである。必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、この2つの異なる固定部位は異なる支持体上である。

【0078】

少なくとも1つの支持体は、ビーズ、例えば、マイクロビーズまたはナノビーズであってもよい。ある実施形態では、このビーズは、参照によって援用される米国特許公開出願第2010-0304982号に記載の「足場付きの核酸ポリマー粒子(scaffolded nucleic acid polymer particle)」すなわちSNAPPである。

【0079】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、少なくとも1つの固定部位は、支持体の表面全体または支持体の容積全体を含む。必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、2つの異なる固定部位が、予め決定された割付で(例えば、グリッドパターンで)配置されている。他の実施形態では、1つ以上の固定部位は、予め決定されておらず(例えば、支持体は、予め決定されていない位置に固定されたプライマーを含む)、そして開始テンプレートがハイブリダイズする(例えば、なんらかの増幅が生じる前)プライマーは、そのテンプレートについての固定部位であるとみなされ得る。

【0080】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、加熱することを用いて、アニリングされた核酸鎖を部分的に分離する。必要に応じて、プライマー伸長は、プライマーをテンプレートにハイブリダイズさせること、ならびにポリメラーゼおよびヌクレオチドと接触させることによって達成される。この接触およびハイブリダイズは、同時に達成されても、または逐次的に達成されてもよい。必要に応じて、1つ以上のヌクレオチドは検出可能に標識される。

【0081】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、この方法はさらに、1つ以上の伸長され固定された核酸鎖を処理して、それによって核酸分子またはその一部を遊離させる工程を包含する。この処理は、例えば、必要に応じて、例えば、制限エンドヌクレアーゼを用いるか、またはリボザイムを用いる核酸の切断からなってもよい。例えば、前記プライマーのうち1つ以上は、制限エンドヌクレアーゼ認識部位もしくはリボザイム認識部位を有するか、またはこのような部位の一部(この一部は、プライマー伸長が起きた場合、完全になる)を有する。

【0082】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、この方法を用いて、複数の異なる核酸配列を、例えば、逐次的にまたは同時に増幅する。この複数とは、例えば、 10^3 、 10^5 、 10^7 、 10^9 、 10^{11} 、 10^{14} 、または 10^{20} 個を超える標的核酸である。

【0083】

本明細書における任意の方法を用いて、診断のため、もしくはスクリーニングのため、もしくは遺伝子型決定のために増幅された核酸分子を提供してもよいし、または他の構成要素のための支持体として用いられる増幅された核酸分子を提供してもよいし、または追加の核酸分子を遊離型で(例えば、固定ではなく非固定型で)生成してもよい。例えば、任意の方法を用いて、遺伝子発現をモニターしてもよく、またはまれに発現される遺伝子産物、ヘテロ接合性の個体の特定、核酸フィンガープリンティングを用いて核酸分子を特

10

20

30

40

50

定してもよい。

【0084】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、前記異なる核酸配列は、本明細書のいずれかに記載されるような第一および第二の核酸「アダプター」配列を各々提供され、前記第一および第二の「アダプター」配列は、異なる核酸配列の各々に関して同じである。

【0085】

必要に応じて、本明細書に記載される任意の方法において、前記異なる核酸配列は各々が、異なるタグを提供され、その結果、異なる配列がお互いから識別され得る。

【0086】

ある実施形態では、増幅は、RPA、すなわち、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（例えば、参照によって本明細書に援用される、国際特許公報第WO2003072805号を参照のこと）を用いて達成される。RPAは必要に応じて、温度または試薬条件における実質的な変動なしに行われる。本明細書の実施形態では、部分的な変性および／または増幅（本明細書に記載の任意の1つ以上の工程または方法を含む）は、リコンビナーゼおよび／または一本鎖の結合タンパク質を用いて達成され得る。適切なリコンビナーゼとしては、必要に応じて一本鎖結合タンパク質（SSB）と組み合わせられた、RecAおよびその原核生物もしくは真核生物のホモログ、またはその機能的なフラグメントもしくは改変体が、挙げられる。ある実施形態では、リコンビナーゼ剤は必要に応じて、増幅プライマーなどの一本鎖のDNA（ssDNA）をコーティングして、テンプレート上で相同性の二本鎖領域を侵害する核タンパク質フィラメント鎖を形成する。これは必要に応じて、短いハイブリッドおよび置換された鎖バブル（D-ループとして公知）を創出する。ある実施形態では、このD-ループ中のフィラメント鎖の遊離の3'末端は、DNAポリメラーゼによって伸長されて、新規な相補鎖を合成する。この相補鎖は、テンプレートの元来対になっていたパートナー鎖を、それが伸長するにつれて置き換える。ある実施形態では、増幅プライマーの1つ以上の対が、1つ以上のリコンビナーゼと接触され、その後必要に応じて二本鎖であるテンプレートと接触される。

【0087】

本明細書に記載の任意の方法において、テンプレート（標的配列）の増幅は、リコンビナーゼ剤を、増幅プライマーの少なくとも1つの対のうちの1つ以上と接触させることであって、それによって1つ以上の「フォワード」および／または「リバース」RPAプライマーを形成することを包含する。1つ以上のプライマーと会合しなかった任意のリコンビナーゼ剤は、必要に応じて除去される。必要に応じて、1つ以上のフォワードRPAプライマーを次に、少なくとも1つのRPAプライマーに対して相補性の領域を必要に応じて有する、テンプレート鎖と接触させる。このテンプレート鎖は、RPAプライマーの、前記プライマーとテンプレートとの間のハイブリダイゼーションを必要に応じて生じる、相補性テンプレートとの接触に対してハイブリダイズされ得る。必要に応じてこのプライマーの3'末端は、テンプレートに沿って、1つ以上のポリメラーゼを用いて（例えば、dNTPの存在下で）伸長されて、二本鎖核酸および置換されたテンプレート鎖を生成する。この増幅反応は、所望の程度の増幅が達成可能になるまで、このような接触および伸長の繰り返しサイクルを含んでもよい。必要に応じて核酸の置換された鎖は、同時のRPA反応によって増幅される。必要に応じて、核酸の置き換えられた鎖は、これを順次、1つ以上の相補性プライマーと接触させることによって；および（b）相補性プライマーを、本明細書に記載の任意の戦略によって伸長することによって、増幅する。

【0088】

ある実施形態では、1つ以上のプライマーは、「フォワード」プライマーおよび「リバース」プライマーを含む。プライマーおよびテンプレートの両方を接触して配置することによって、必要に応じて、第一の二本鎖構造を、前記第一の鎖の第一の部分で、および二本鎖構造を前記第二の鎖の第二の部分で生じる。必要に応じて、フォワードプライマーおよび／またはリバースプライマーの3'末端は、1つ以上のポリメラーゼで伸長されて、

第一のおよび第二の二本鎖核酸ならびに第一のおよび第二の置き換えられた核酸の鎖を生成する。必要に応じてこの第二の置き換えられた鎖は、お互いに対して少なくとも部分的に相補性であり、かつハイブリダイズして、娘の二本鎖核酸（これは、引き続き増幅サイクルにおいて二本鎖テンプレート核酸として機能し得る）を形成し得る。

【0089】

必要に応じて、前記第一のおよび前記第二の置き換えられた鎖は、前記第一のプライマーまたは前記第二のプライマーに対して少なくとも部分的に相補性であり、かつ前記第一のプライマーまたは前記第二のプライマーに対してハイブリダイズし得る。

【0090】

本明細書に記載される任意の方法または工程または組成物またはアレイの別の実施形態では、この支持体は、必要に応じて、2つ以上の配列の固定されたプライマーを含む。テンプレート核酸鎖が、第一の相補性の固定されたプライマーにハイブリダイズした後、この第一のプライマーが次に、伸長され、かつこのテンプレートおよびプライマーが、お互いから部分的にまたは完全に分離され得る。次いで、伸長されたプライマーは、第一のプライマーとは異なる配列を有する第二の固定されたプライマーに対してアニーリングされてもよく、この第二のプライマーは伸長されてもよい。次いで、両方の伸長されたプライマーが分離され（例えば、完全にまたは部分的にお互いから変性され）、今度は、追加の固定されたプライマーの伸長のためのテンプレートとして用いられ得る。このプロセスを繰り返して、増幅された、固定された核酸分子を得てもよい。ある実施形態では、この増幅は、お互いに対して相補性である2つの異なる配列の固定されたプライマー伸長産物を生じる（ここでは、全てのプライマー伸長産物が支持体に対して5'末端に固定されている）。

【0091】

本明細書の任意の方法から生成された増幅された核酸は、配列決定、スクリーニング、診断、インサイチュ核酸合成、遺伝子発現モニタリング、核酸フィンガープリンティングなどを含めて多くの異なる目的に用いられ得る。

【0092】

必要に応じて、テンプレート濃度は調節され、その結果、固定されたテンプレートは一般に、お互いから十分な距離で隔てられて、個々のテンプレートから生成されたクローンクラスターは、お互いと重複をほとんどもしくは実質的に有さず、増幅もしくは複製の間もしくは後にお互いを汚染もしない。必要に応じて、本明細書に記載の任意の増幅方法は、テンプレート核酸の濃度を調節する工程を包含し、その後、固体支持体と接触され、その結果、個々のテンプレート分子は、 1 mm^2 あたり少なくとも10000、100000、400000、500000、1,000,000または 10^7 個の分子という密度で固体支持体上に固定されたプライマーに対してハイブリダイズする。必要に応じて、個々のテンプレート分子は、支持体上で、インサイチュで増幅されて、最初のテンプレートのハイブリダイゼーションのポイントを空間的に中心とした周囲にクローン集団を生じる。

【0093】

鎖のフリッピング

下に記載の「フリッピング」の実施形態では、2つ以上のプライマーを伸長して2つ以上の対応する伸長された鎖を形成する。必要に応じて、伸長される2つ以上のプライマーは、実質的に同一の配列を含むか、または本質的にそれらからなり、そして対応する伸長された鎖の伸長された部分は、少なくとも部分的に同一でないか、および／またはお互いに対して相補性である。

【0094】

フリッピングの1つの例示的な実施形態は以下のとおりである。開始テンプレートは、例えば、テンプレートウォーキングによって増幅されて、複数のプライマー伸長鎖（便宜上、「フォワード」鎖と命名される）を生成する。必要に応じて、フォワード鎖は、開始テンプレートに対して相補性である。必要に応じて、フォワード鎖は、支持体上に固定さ

れる。必要に応じて、このフォワード鎖は、実質的に同一の配列を含み、例えば、このフォワード鎖は、お互いに対して実質的に同一である。ある実施形態では、このフォワード鎖は、支持体上に固定された1つ以上のプライマーの伸長によって形成される（「フォワード」プライマー）。このフォワードプライマーおよび／またはフォワード鎖は必要に応じて、支持体に対して、それらの5'末端で、またはその付近で結合される。必要に応じて、1つ以上のプライマー伸長のフォワード鎖は、伸長されていないプライマーには存在せず、5'配列に対して最適条件下でハイブリダイズし得る（このプロセスは、「自己ハイブリダイゼーション」と命名される）3'配列（自己ハイブリダイズ性配列と呼ばれる）を含む。この5'配列は、必要に応じて、伸長されていないフォワードプライマーの一部である。ある例では、フォワード伸長生成物は、このようなハイブリダイゼーションの際に「ステムループ」構造を形成する。必要に応じて、この伸長されていないフォワードプライマーは、「切断可能な（cleavable）」ヌクレオチドを、切断に感受性であるその3'末端で、またはその付近で含む。ある実施形態では、この切断可能なヌクレオチドは、少なくとも1つの他のヌクレオチドに対して、「切断できる（scissile）」ヌクレオチド間連結（ホスホジエステル結合を実質的に切断しない条件下で切断され得る）によって連結される。

10

【0095】

伸長後、フォワードプライマー伸長生成物（すなわち、フォワード鎖）は、必要に応じて自己ハイブリダイズするようにされる。さらなる実施形態では、自己ハイブリダイゼーションを可能にした後、フォワード鎖は、切断可能なヌクレオチド（例えば、隣接するヌクレオチドとの切断できる連結を形成するヌクレオチド）の切断できる連結で切断される。この切断によって、プライマー伸長生成物（すなわち、伸長されたフォワード鎖）の2つのフラグメントが生じる。ある実施形態では、第一のフラグメントは、もとの伸長されていないフォワードプライマーの少なくとも一部を含む。必要に応じて、第一のフラグメントは、なんら伸長された配列を含まない。必要に応じて、第一のフラグメントは固定される（例えば、伸長されていないフォワードプライマーが既に固定されているので）。ある実施形態では、第二のフラグメントは、伸長された配列を含む。必要に応じてこの第二のフラグメントは、切断可能なヌクレオチドを超えて伸長されていないいずれかのプライマーの3'部分を含むか、または伸長されていないプライマーのいずれの部分も含まない。必要に応じて、この第二のフラグメントは、その自己ハイブリダイズ配列を通じて第一の部分にハイブリダイズされる。

20

30

【0096】

ある例では、切断可能なヌクレオチドは、1つ以上の酵素によって除去されるものである。この酵素は、例えば、グリコシラーゼであってもよい。このグリコシラーゼは必要に応じて、N-グリコシラーゼ活性を有し、これが二本鎖DNAから切断可能なヌクレオチドを遊離する。必要に応じて、切断可能なヌクレオチドの除去は、脱塩基部位、脱プリン部位、または脱ピリミジン部位を生成する。脱塩基部位は必要に応じて、例えば、別の酵素活性によってさらに改変されてもよい。必要に応じて、この脱塩基性部位は、リアーゼによって改変されて、塩基ギャップを生成する。リアーゼは例えば、3'および／または5'を脱塩基部位に切断する。切断は必要に応じて、リアーゼによって5'および3'末端の両方で生じ、これによって、脱塩基部位が除去され、および塩基ギャップが残される。例示的な切断可能なヌクレオチド、例えば、5-ヒドロキシウラシル、7, 8-ジヒドロ-8-オキソグアニン（8-オキソグアニン）、8-オキソアデニン、fapy-グアニン、メチル（methyl）-fapy-グアニン、fapy-アデニン、アフマトキシンB1-fapy-グアニン、5-ヒドロキシシトシンは、種々のグリコシラーゼ類によって認識し除去することができ、脱プリン部位が形成される。1つの適切な酵素は、ホルムアミドピリミジン[fapy]-DNAグリコシラーゼであり、8-オキソグアニンDNAグリコシラーゼまたはFPGとしても公知である。FPGは、両方ともN-グリコシラーゼおよびA-リアーゼとして機能する。N-グリコシラーゼ活性は必要に応じて、損傷されたプリンを二本鎖DNAから遊離して、脱プリン（AP部位）を生成し、ここ

40

50

では、ホスホジエステル骨格は必要に応じてインタクトである。A P-リナーゼ活性は、3'および5'の両方をA P部位に切断し、それによってA P部位を除去し、一塩基ギャップを残す。ある実施例では、切断可能なヌクレオチドは8-オキソアデニンであり、これは、グリコシラーゼおよびリナーゼ活性の両方を有するF P Gによって一塩基ギャップに変換される。

【0097】

別の実施形態では、切断可能なヌクレオチドは、ウリジンである。必要に応じて、このウリジンは、「ユーザー (USER)」試薬 (ウラシルDNAグリコシラーゼ (UDG) およびDNAグリコシラーゼ-リナーゼエンドヌクレアーゼ V I I Iを含む) によって切断され、ここでUDGは、ウラシル塩基の切除を触媒し、脱塩基 (脱ピリミジン) 部位を形成するが、一方でホスホジエステル骨格をインタクトなままに残し、ここではエンドヌクレアーゼ V I I Iのリナーゼ活性は、ホスホジエステル骨格を、脱塩基部位の3'および5'側で破壊し、その結果塩基を含まないデオキシリボースが遊離され; その後キナーゼが必要に応じて用いられて、切断生成物の3'末端上のリン酸基が-OH基に変換される)。

【0098】

少なくとも1つの切断されたフラグメントは必要に応じてポリメラーゼと接触される。必要に応じて第一の固定されたフラグメントが、ポリメラーゼによって伸長され得る。そのように所望されるならば、第二のハイブリダイズされたフラグメントは、第一のフラグメントの伸長のためのテンプレートとして機能し得る。ある実施形態では、「フリップした」二本鎖の伸長生成物が形成される。このフリップした生成物は必要に応じて、本明細書に記載される任意の方式でテンプレートテンプレートウォーキングに供され得る。フリップされたものおよびフリップされていないものの両方をテンプレートウォーキングに供するとき、2つの異なる伸長生成物のクラスターが形成され、ここで両方の伸長生成物は、同一の部分 (伸長されていないプライマーに対応する) およびお互いに対して相補性の部分 (伸長生成物の伸長された部分に相当する) を有する。

【0099】

ある実施形態では、目的の配列、例えば、自己ハイブリダイズする配列または新規なプライマー結合部位は必要に応じて、伸長されたフォワード鎖の3'末端に、伸長されたフォワード鎖を一本鎖の「スプライス」アダプター配列と、伸長試薬 (例えば、ポリメラーゼおよびd N T P) の存在下で接触させることによって付加され得る。このスプライス配列は必要に応じて、伸長されたフォワード鎖の3'末端部分に対して実質的に相補性である3'部分と、付加されるべき目的の配列に対して実質的に相補性である5'部分とを含む。伸長されたフォワード鎖の3'末端に対してスプライスアダプターをハイブリダイゼーションした後、フォワード鎖を、テンプレートとしてスプライスアダプターを用いて、テンプレート依存性ポリメラーゼ伸長に供する。このような伸長は、伸長されたフォワード鎖の3'末端に対する目的の配列の付加を生じる。

【0100】

従って、本明細書に記載されるプライマー伸長および/または増幅の任意の方法は、以下の工程:

a) 必要に応じて同一である、複数の伸長されたフォワード鎖を生成するための、テンプレートウォーキングによる固定されたフォワードプライマーの伸長する工程と、

b) 必要に応じて、スプライスアダプターを伸長されたフォワード鎖の3'末端にハイブリダイズさせ、このフォワード鎖を、スプライスアダプターをテンプレートとして用いてテンプレート依存性伸長に供して、それによってさらなる3'配列をさらに伸長されたフォワード鎖に付加する工程であって、この付加された3'配列の一部が伸長されていないフォワードプライマーの一部に相補性であり、かつそれに対してハイブリダイズして、ステムループ構造を形成する、工程と、

c) フォワード鎖を、伸長されていないフォワードプライマー配列および伸長したフォワード鎖配列の接合部に位置するかまたはその付近に位置する、切断可能なヌクレオチド

10

20

30

40

50

の切断できる連結で切断する工程であって、必要に応じて、切断可能なヌクレオチドを除去して、それによって2つの切断されたフラグメントを生成することであって、この第一のフラグメントは、第二のフラグメント上の3'プライマー相補性の配列に対してハイブリダイズされた伸長されていないフォワードプライマーの一部を含む、工程と、

d) 必要に応じて、第一のフラグメントを、第二のフラグメントをテンプレートとして用いるポリメラーゼ伸長に供して、フリップしたフォワード鎖を生成する工程と、

e) 必要に応じて、第二のスプライスアダプターをフリップしたフォワード鎖の3'末端に対してハイブリダイズさせ、このフォワード鎖を、スプライスアダプターをテンプレートとして用いるテンプレート依存性伸長に供して、それによってさらなる3'配列をフリップしたフォワード鎖に付加する工程であって、付加された3'配列の一部が、フリップした鎖に存在しない新規なプライマー結合配列である工程と、

f) 例えば、本明細書に記載のような、任意の方法によって、新規なプライマーと接触させること、および伸長または増幅することによって、新規なプライマー結合配列を含むフリップした鎖を選択的に伸長または増幅する工程と、
のうちのいずれか1つ以上を包含し得る。この新規なプライマーは、フリップされていない鎖にも、またはフリップした鎖（この鎖は工程（e）でさらに伸長されない）にも結合しない。

【0101】

図8は、例示的な鎖フリッピングおよびウォーキングのストラテジーの模式図を示す。(A) テンプレートウォーキング、(B) フリップした鎖を生成するための鎖フリッピング、(C) 最終のフリップした鎖上への新規なプライマー結合配列 P g' の付加。

【0102】

I. クローン増幅の方法

概説

核酸は、必要に応じて固定される、適切なプライマーと会合される（例えば、それに対してハイブリダイズされる）。このハイブリダイズされた核酸は、便宜上、「テンプレート」鎖または「リバーズ鎖」と呼ばれてもよい。この「テンプレート」という言葉は、溶液中にもともと導入されたインプット核酸との、または増幅プロセスによって生成される最終の核酸精製物との、なんら特定の機能的、構造的または配列の関係を意味することを意図しない。ある実施形態では、フォワードプライマーは、リバーズ鎖の第一部分にハイブリダイズし得る。リバーズ鎖の第二の非重複性の部分と実質的に同一である別の「リバーズ」プライマーが必要に応じて存在する。この2つの部分は例えば、それらがお互いに対して同一であるかまたは相補性であるいかなる小部分も含まない場合に非重複性である。

【0103】

ある実施形態では、テンプレート鎖は必要に応じて、フォワードプライマーに相補性である少なくとも一部（この部分は、フォワード「プライマー結合配列」またはフォワード P B S と命名される）にわたって一本鎖である。このフォワードプライマーは必要に応じて、テンプレートとしてリバーズ鎖を用いて伸長されて、伸長されたフォワード鎖が形成され、これが、ハイブリダイズしたテンプレート（リバーズ鎖）とフォワード鎖との間に二重鎖を生じる。フォワード鎖のプライマー部分の少なくとも一部は、ハイブリダイズしたリバーズ鎖から分離され得る。このフォワード鎖は、「リバーズ」プライマーにハイブリダイズし得るリバーズ P B S 部分を含み、このリバーズプライマーは、次に、伸長されて、伸長されたリバーズ鎖を形成し得る。次いで、フォワード鎖およびリバーズ鎖の両方とも、お互いから分離されてもよく、そのプロセスを繰り返して、増幅された、固定された核酸分子のクローン集団を得てもよい。

【0104】

必要に応じて、お互いからフォワードおよびリバーズ鎖を分離するという任意の1つ以上の工程は、部分的な分離を包含し、例えば、リバーズ鎖の一部からフォワード鎖の一部を解離するが、2つの鎖の間の全ての会合を廃さない分離を包含する。必要に応じて、フ

ォワード鎖の一部は、リバース鎖から解離されるが、一方で同じフォワード鎖の別の部分は、リバース鎖と（例えば、ハイブリダイゼーションによって）会合したまま残る。

【0105】

部分的分離の間、リバース鎖上のフォワードPBSの少なくとも一部は、第一のフォワード鎖から解離される。しかし、分離は、「部分的」である。なぜなら、フォワード鎖およびリバース鎖はお互いに全体的に会合したままであるからである。例えば、リバース鎖の別の部分は、フォワード鎖にハイブリダイズしたまま残る。必要に応じて、リバース鎖の変性された部分は、第二のフォワードプライマーと再ハイブリダイズする。従って、リバース鎖の一部は、第一のフォワード鎖に対してハイブリダイズされるが、一方で同じリバース鎖の別の部分は、上記の第二のフォワードプライマーに対してハイブリダイズされる。次いで、この第二のフォワードプライマーは、リバース鎖に沿って伸長され（リバース鎖をテンプレートとして用いて）、第二のフォワード鎖が生成される。増幅の繰り返しサイクル（ここで増幅サイクルは必要に応じてハイブリダイゼーション、＝伸長および（部分的な）分離を含む）は、核酸のクローン集団を生成する。

【0106】

必要に応じて、1つ以上のフォワードプライマーが、任意の固定されたリバースプライマーを欠く支持体上に固定されるか、またはその逆も成り立つ。ある実施形態では、第一のおよび第二のフォワードプライマーは、お互いに対して近接して一緒にまたは隣接して固定される。得られた核酸のクローン集団は、お互いに対して近接してまたは隣接して固定されるフォワード鎖を含む。ある実施形態では、少なくとも 10^6 、 10^8 、 10^{10} 、 10^{12} または 10^{14} 個のプライマーが、個々の支持体または固定部位の 1 cm^2 または 1 cm^3 に固定される。必要に応じて、全てのフォワードプライマーは配列が同一であるか、または同一の3'部分を有する。

【0107】

代替的な実施形態では、フォワードプライマーおよび／またはリバースプライマーの両方とも、必要に応じて支持体上に固定される。あるいは両方のプライマーとも非固定である。

【0108】

一般には、核酸は、プライマーの多数のコピーが固定されている支持体上でクローン増幅される。例示的な核酸とは、核酸のコレクションの1つである。コレクションの個々の核酸は例えば、1つ以上のアダプター配列を、それらの5'および／または3'末端に有してもよく、およびgDNAまたはcDNAのように可変配列を間に有してもよい。ある実施形態では、3'アダプターは、低 T_m 領域を有し（ここで T_m とはDNA分子の半分が非変性または二本鎖状態であり、半分が変性されている（例えば、ランダムコイル状態）温度である）、5'アダプターは必要に応じて、より高い T_m 領域を有し、またはその逆も成り立つ。低い T_m 領域とは、例えば、A-リッチ、T-リッチまたはピリミジナーリッチ領域、例えばAT（またはU）-リッチ配列、例えばポリT、ポリA、ポリU、ならびにA、TおよびU塩基の任意の組み合わせである。例示的な方法が本明細書に記載される。

【0109】

本明細書に記載の方法は、配列決定、スクリーニング、診断、インサイチュ核酸合成、遺伝子発現モニタリング、核酸フィンガープリンティングなどを含む多くの異なる目的について用いられ得る。

【0110】

支持体上のクローン核酸増幅の非限定的な例示の方法は以下のとおりである。

【0111】

A) 支持体上の増幅

いくつかの実施形態では、開示された方法、組成物、システム、装置およびキットは、支持体に固定される核酸（例えば、プライマー、テンプレートなど）を含む。この核酸は、任意の適切な方法を用いて結合され得る。いくつかの実施形態では、核酸分子と支持体

との間の結合は、共有結合によって、水素結合（例えば、支持体に共有結合される、別の核酸、例えばプライマーに対するテンプレートのハイブリダイゼーションによって媒介される支持体に対するテンプレート核酸の結合）、ファンデル・ワールス力、アフィニティ相互作用などによって媒介される。結合対（例えば、アビジン／ビオチン；抗原／抗体）の使用を含めて、支持体に対する核酸配列の結合のための任意の適切な方法が用いられ得る。いくつかの実施形態では、結合対の一方のメンバーは、支持体に結合され、結合対の他方のメンバーは、核酸に結合され、この核酸は、結合対の2つのメンバーの相互作用を介してこの支持体に結合される。

【0112】

支持体は、任意の材料から構成されてもよく、任意の寸法または形状を有してもよい。この支持体は、増幅プロセスを最小限にしか邪魔しない特性または反応性を有するように選択され得る。いくつかの実施形態では、この支持体は、固体材料から構成され；あるいは、この支持体は、少なくとも部分的に半固体、流体または液体の材料から構成されてもよい。いくつかの実施形態では、この支持体は、球状、楕円体状、管状、ペレット形状、棒状、八面体、六角形、正方形または台形の形状である。いくつかの実施形態では、支持体は多孔性である。いくつかの実施形態では、支持体は、ヒドロゲルのような親水性の多孔性マトリックスから構成されてもよい。例えば、米国特許出願公開第2010-0304982号、Hinzら；および米国特許出願公開第2010-0136544号、Agrestiら（前述の出願の全てが本明細書において参照によって援用される）を参照のこと。

【0113】

とりわけ、支持体中で、または支持体上で固定されたクローンアンプリコンの局在化クローン集団を生成する新規な方法が提供される。この支持体は、例えば、固体であっても、または半固体であってもよい。この増幅されたクローン集団は必要に応じて、支持体の外面に固定されるか、または支持体の内面内であってもよい（例えば、ここで支持体は半固体であり、例えば、ゲルまたはマトリックス構造を有する）。例示的な支持体は、固体であっても、または半固体であってもよい。必要に応じて、この半固体支持体は、ポリアクリルアミド、セルロース、ポリアミド（ナイロン）および架橋アガロース、デキストランおよびポリエチレングリコールを含む。

【0114】

必要に応じて、この開示された方法および組成物は、支持体のある集団のうちの1つ以上の支持体に対する、核酸のコレクション（例えば、あるコレクション）の1つ以上の個々のメンバーの結合を含む。例えば、このコレクションの異なる核酸は、異なる支持体に結合されてもよい。支持体の得られた集団は、各々が単一の核酸を含む複数の支持体を包含する。いくつかの実施形態では、このコレクションの核酸は二本鎖であり、このコレクションは変性されて、一本鎖の核酸の集団が形成される。いくつかの実施形態では、この支持体は、プライマーを含み、一本鎖の核酸のうちの1つ以上が、表面上のプライマーに対するハイブリダイゼーションを通じて支持体に結合され得る。

【0115】

必要に応じて、増幅の前に、核酸のコレクションは、適切に希釈されて、溶液中で支持体の集団と接触されてもよく、その結果、支持体（または支持体の集団が1つまたは数個の支持体からなる固定部位）のうち少なくとも40%、50%、60%、70%、80%、90%または95%が、1個以下の核酸に結合する。いくつかの実施形態では、支持体の総数に対する核酸の数の比は、例えば、単一の核酸のみを含む得られた支持体の数（または単一支持体上の固定部位の数）を最大にすること、またはより低い比もしくは高い比よりも多くのクローン支持体（例えば、ビーズ）を得ることが統計的に予測される比を選択することによって、単クローン形成を容易にするように設定され得る。

【0116】

必要に応じて、単一の支持体を、本明細書の任意の増幅方法で用い、ここでは単一の支持体が、テンプレートにハイブリダイズし得る複数のプライマーを有する。このような実

施形態では、テンプレートコレクションの濃度は、調節され、その後、これが固体支持体と接触されて、その結果、コレクション中の個々のテンプレート分子が、 1 mm^2 あたり少なくとも 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 8×10^5 、 10^6 、 5×10^6 または 10^7 個の分子という密度で、結合するかまたは会合する（例えば、固体支持体上に固定されたプライマーに対するハイブリダイゼーションによって）。

【0117】

必要に応じて、個々のテンプレート分子を、支持体上で、インサイチュで増幅して、最初のテンプレートのハイブリダイゼーションのポイントを空間的に中心とした周辺にクローン集団を生じた。必要に応じて、増幅によって、単一の増幅されたテンプレートからおよそ 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{15} 、または 10^{20} 個以下のアンプリコンを生成する。必要に応じて、クローンアンプリコンのクローンは、 1 mm^2 あたり少なくとも 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 8×10^5 、 10^6 、 5×10^6 または 10^7 個の分子という密度で固体支持体上に定着される。

【0118】

いくつかの実施形態では、この核酸コレクションは、複数の核酸が同じ支持体に結合する条件下で1つ以上の支持体と接触させられ得る。このような接触は、同じ支持体の異なる領域中の核酸の平行なクローン増幅を包含する方法で、特に有用であり得る。支持体の表面積に対する核酸の数の比は、例えば、異なるクローン集団の間の実質的な交差汚染なく、増幅された核酸のモノクローナル集団の形成を支持するために支持体中で核酸が適切に隔てられることを確実にすることによって単クローン形成を容易にするように調節され得る。例えば、本発明者らが単一支持体を用いる場合、増幅されるべき核酸のコレクションは、個々の核酸から生成される得られた増幅されたクローン集団が一般に、分離されているかまたは別個である、例えば、重複がないような希釈に調節される。例えば、増幅されたクローン集団のうち50%、70%、80%または90%以上に含まれる個々の核酸は散在されておらず、実質的に核酸は同一ではない。必要に応じて、異なる増幅された集団は、他の増幅された集団と接触することも、完全に重複することもなく、または最適な選択方法を用いてお互いから識別可能である。

【0119】

いくつかの実施形態では、核酸は、支持体の表面に結合される。いくつかの実施形態では、核酸は、支持体内に結合されてもよい。例えば、ヒドロゲルまたは他の多孔性マトリクスから構成される支持体については、核酸は、支持体の表面上および支持体内を含めてその支持体の容積全体にわたって結合され得る。

【0120】

いくつかの実施形態では、支持体（または支持体の集団における少なくとも1つの支持体）は、少なくとも1つのプライマーに対して、必要に応じてプライマーの集団に対して結合され得る。例えば、この支持体（または少なくとも1つの支持体）は、プライマーの集団を含んでもよい。この集団のプライマーは、お互いと実質的に同一であってもよく、または実質的に同一の配列を含んでもよい。プライマーのうち1つ、いくつか、または全てが、1つ以上の核酸テンプレート内の配列に対して相補性である配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、プライマーの集団は、少なくとも2つの非相補性プライマーを含んでもよい。

【0121】

プライマーは、その5'末端を通じて支持体に結合されてもよく、遊離の3'末端を有する。この支持体は、スライドの表面であっても、またはビーズの表面であってもよい。このプライマーは、低い融点、例えばオリゴ(dT)₂₀を有し、かつコレクションアダプターの低T_m領域に対してハイブリダイズし得る。プライマー間の距離は、テンプレートウォーキングを可能にするためにアダプター長よりも短い必要があるか、あるいは、5'末端の長いリンカーを有する長いプライマーは、ウォーキングの機会を増大する。

【0122】

いくつかの実施形態では、支持体は、プライマーおよびテンプレート（またはリバース鎖）と、このプライマーおよびテンプレートがお互いに対してハイブリダイズして、核酸二重鎖を形成する条件下で、結合および／または接触させられる。この二重鎖は、テンプレートおよびプライマーの相補性配列を含む二本鎖部分を含んでもよく、ここでは相補性配列の少なくとも1つのヌクレオチド残基がお互いと塩基対合される。いくつかの実施形態では、この二重鎖はまた、一本鎖の部分を含んでもよい。この二重鎖はまた、一本鎖の部分を含んでもよい。一本鎖の部分は、プライマー（またはテンプレート）中の任意の他の配列に対して相補性ではないテンプレート（またはプライマー）内の任意の配列を含んでもよい。

10

【0123】

支持体上のクローン核酸増幅の非限定的な例示的な方法は以下のとおりである。核酸（便宜上、リバース鎖と命名するものとする）は、支持体上でクローン増幅され、この支持体上に相補性フォワードプライマーの複数のコピーが結合される。例示的な核酸は、複数のDNAコレクション分子のうちの1つであり、これは、例えば、複数の核酸メンバーが1つ以上の共通の（「アダプター」）配列を、それらの5'および／または3'末端にまたはその付近に有し、ならびにgDNAまたはcDNAなどの可変配列をその間に有する。ある実施形態では、3'の共通の部分、例えば、アダプターは、ブリーザブル（例えば、低 T_m ）領域を有し、かつ5'の共通の配列（例えば、アダプター）は必要に応じて、低ブリーザブル（例えば、 T_m が高い）領域を有するか、またはその逆も成り立つ。別の実施形態では、5'および3'共通の配列の両方ともブリーザブルである。このブリーザブル（例えば、低 T_m ）領域は、例えば、A、Tおよび／またはUがリッチな領域、例えば、AT（またはU）ーリッチ配列、例えばポリT、ポリA、ポリUならびにA、TおよびU塩基の任意の組み合わせ、またはこのような塩基に対して相補性の塩基である。例示的な方法は本明細書に記載される。

20

【0124】

支持体上のクローン核酸増幅の1つの非限定的な例示的な方法は図1に示される。例示的な方法の非限定的な記載は以下のとおりである。

【0125】

二本鎖DNAライブラリー分子は、変性されて、一本鎖のDNAは、表面上のプライマーに対するハイブリダイゼーションを通じて支持体に結合される。支持体の面積またはビーズの数に対するDNA分子の数の比は、単クローン形成を容易にするように設定される。

30

【0126】

プライマーは、支持体上に、それらの5'を通じて結合され、遊離の3'を有する。この支持体は、スライドの表面であっても、またはビーズの表面であってもよい。このプライマーは、低い融点、例えばオリゴ(dT)₂₀、またはオリゴ(dA)₃₀を有し、かつライブラリーアダプターの低 T_m 領域に対してハイブリダイズし得る。プライマー間の距離は、テンプレートウォーキングを可能にするためにアダプター長よりも短くてもよく、あるいは、5'末端の長いリンカーを有する長いプライマーは、ウォーキングの機会を増大する。

40

【0127】

核酸は、支持体上でクローン増幅され、この支持体上にプライマーの複数のコピーが結合される。例示的な核酸は、複数のDNAライブラリー分子のうちの1つであり、これは、例えば、1つ以上の共通の（例えば「アダプター」）配列を、それらの5'および／または3'末端に有し、ならびにgDNAまたはcDNAなどのような可変配列をその間に有する。ある実施形態では、3'アダプターは、低 T_m 領域を有し、かつ5'アダプターは必要に応じて、高い T_m 領域を有するか、またはその逆も成り立つ。低 T_m 領域は、例えば、ピリミジンリッチ領域、例えば、AT（またはU）ーリッチ配列、例えばポリT、ポリA、ポリU、ならびにA、TおよびU塩基の任意の組み合わせ、またはこのような塩基

50

に対して相補性の塩基である。例示的な方法は本明細書に記載される。

【0128】

B) プライマー伸長

1つ以上のプライマー（可溶型であっても、または支持体に結合されていても）を、DNA重合化または伸長反応混合物（任意の1つ以上の試薬、例えば、酵素、dNTPおよび緩衝液を必要に応じて含む）を用いてインキュベートする。このプライマー（例えば、フォワードプライマー）は伸長される。必要に応じて、この伸長は、テンプレート上の連続的なヌクレオチドに対して個々に相補性であるヌクレオチドの連続的な組み込みを含む、テンプレートに沿ったプライマーのテンプレート依存性伸長であり、その結果この伸長されるかまたは伸長されていないフォワードプライマーは、リバーズ鎖（逆平行または相補性とも呼ばれる）に対して相補性である。必要に応じて、この伸長は、ポリメラーゼ活性または他の伸長活性を有する酵素、例えばポリメラーゼによって達成される。この酵素は必要に応じて、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性（プルーフリーディング活性）および/または5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を含む他の活性を有してもよい。あるいは、いくつかの実施形態では、この酵素は、これらの活性の1つ以上を欠いてもよい。ある実施形態では、ポリメラーゼは、鎖置換活性を有する。有用な鎖置換性のポリメラーゼの例としては、バクテリオファージΦ29 DNAポリメラーゼおよびBst DNAポリメラーゼが挙げられる。必要に応じて、酵素は、上昇した温度で、例えば、45℃でまたはそれより上で、50℃、60℃、65℃、70℃、75℃、または85℃より上で活性化される。

10

20

【0129】

例示的なポリメラーゼは、Bst DNAポリメラーゼ（エキソヌクレアーゼマイナス）であり、アクセッション番号2BDP__Aで例示される、67kDaのBacillus stearothermophilus DNAポリメラーゼタンパク質（大きいフラグメント）である（これは、5'-3'ポリメラーゼ活性および鎖置換活性を有するが、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は欠く）。他のポリメラーゼとしては、Thermusaquaticus由来のTaq DNAポリメラーゼI（アクセッション番号1TAQによって例示される）、Echerichia coli由来のEco DNAポリメラーゼI（アクセッション番号P00582）、Aquifex aeolicus由来のAea DNAポリメラーゼI（アクセッション番号067779）、または機能的なフラグメントもしくはその改変体（例えば、ヌクレオチドレベルで少なくとも80%、85%、90%、95%または99%の配列同一性を有する）が挙げられる。

30

【0130】

概して、伸長工程は、二本鎖の二重部分を含む核酸（ここで2つの相補鎖が互いにハイブリダイズされている）を生成する。一実施形態では、ウォーキングは、核酸を部分的に変性性の条件（これは、核酸鎖の一部を変性するが、核酸をその全長にわたって完全に変性するには不十分である）に供することを包含する。ある実施形態では、核酸は、ウォーキング手順の一部または期間全体の間完全変性条件には供されない。本明細書で意図されたとおり、核酸分子は、核酸の少なくとも1つの鎖の一部が、相補鎖にハイブリダイズしたままであるが、同時に別の部分が非ハイブリダイズ状態である（たとえ相補性配列の存在下でさえ）場合、部分的に変性されたとみなされ得る。このハイブリダイズされない部分は、必要に応じて少なくとも5、7、8、10、12、15、17、20、または50ヌクレオチド長である。このハイブリダイズした部分は必要に応じて少なくとも5、7、8、10、12、15、17、20、または50ヌクレオチド長である。

40

【0131】

必要に応じて、核酸は、核酸の個々の分子のかなりの画分（例えば、20%、30%、50%、または70%を超える）が部分的に変性された状態である場合、部分的に変性されているとみなされ得る。必要に応じて個々の分子の実質的な量未満、例えば、サンプル中の核酸分子の5%、10%、20%、30%または50%以下が完全に変性される。同様に、核酸は必要に応じて、これが、核酸の個々の分子の80%または90%より多くで

50

、何らかの二本鎖性を欠く（または相補鎖に対する何らかのハイブリダイゼーションを欠く）場合、完全に変性されたとみなされる。例示的な条件下では、核酸のうち少なくとも50%が部分的に変性されるが、20%または10%未満が完全に変性される。他の状況では、核酸のうち少なくとも30%が部分的に変性されるが、10%または5%未満が完全に変性されている。同様に、核酸は、核酸中の目的の「ブリーザブル」部分、例えば、PBSのうちの少数が変性される場合、非変性であるとみなされ得る。例示的なアニーリング条件では、サンプル中の核酸分子のPBSのうち少なくとも10%、30%、50%、60%、70%、80%または90%が対応するプライマーにハイブリダイズされる。

【0132】

ある実施形態では、部分的に変性性の条件は、二重鎖を適切な温度範囲に維持することによって達成される。例えば、核酸は、ある程度の熱変性を達成するように十分上昇された（例えば、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃または70℃より上）が、完全な熱変性を達成するのに十分高くはない（例えば、95℃または90℃または85℃または80℃または75℃より下）という温度で維持される。完全な熱変性条件は、例えば、多数の鎖の有意な画分（例えば、10%、20%、30%、40%または50%より多く）を、それらの伸長されるか、および／または全長の相補体から完全に分離をもたらすことになる条件である。ある実施形態では、核酸は、等温条件に供され、ここでは、温度変化が、増幅の少なくともある部分の間の限られた範囲内に制約される（例えば、温度の変動は、20℃以内、必要に応じて10℃以内、例えば、5℃、または2℃以内）である。必要に応じて、この温度は、50℃、55℃、60℃、65℃、または70℃で、もしくはその周囲で、少なくとも約10、15、20、30、45、60または120分間維持される。必要に応じて、1回以上の増幅サイクル（例えば、例えば、1、5、10、20回または行われる全ての増幅サイクル）の間、任意の温度変動は、20℃以下、必要に応じて10℃以内、例えば、5℃、または2℃以内である。必要に応じて、熱サイクリング（thermocycling）が行われてもよい（ここでは、温度の相違は、等温性または非等温性の範囲内である）。ある例では、温度の変動は、変性工程と別の工程（例えば、アニーリングおよび／または伸長）との間で制約される。ある例では、変性温度とアニーリングまたは伸長温度との間の相違は、1回以上の増幅サイクルについて、20℃以下、必要に応じて10℃以内、例えば、5℃、または2℃以内である。温度は、例えば、少なくとも5、10、15、20、30、35または実質的に全ての増幅サイクルについて制約される。

【0133】

部分的変性はまた、他の手段によって、例えば、化学的手段によって、化学的変性剤、例えば、尿素またはホルムアミドを、適切に調節された濃度で用いるか、または高もしくは低pH（例えば、4～6または8～9のpH）を用いて達成され得る。ある実施形態では、部分的な変性および増幅は、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）を用いて達成される。例示的なRPA方法は本明細書に記載される。

【0134】

ある実施形態では、ネガティブ鎖および／またはポジティブ鎖の配列は、プライマー結合配列またはその一部がブリーザブルである、すなわち、最適条件（例えば、増幅条件下で変性に感受性であるように設計された。このブリーザブル部分は必要に応じて、無作為の配列を有する同様の長さのほとんどの核酸よりも感受性であるか、またはブリーザブル配列を含む鎖の少なくとも別の部分よりも感受性がある。必要に応じて、このブリーザブル配列は、有意な量の変性（例えば、少なくとも10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%または95%の分子がブリーザブル配列にわたって完全に変性される）を、最適な増幅条件で示す。例えば、ブリーザブル配列は、最適条件（例えば、増幅条件下で、30、35、40、42、45、50、55、60、65または70℃で、鎖分子の50%が完全に変性されるように設計される。

【0135】

必要に応じて、核酸鎖（例えば、プライマーまたはテンプレート鎖）の T_m は、二重鎖

のクローン集団の少なくとも所望の画分が、選ばれた試薬条件下で完全に一本鎖にされる（ここで、個々の二重鎖は、その全長相補体にハイブリダイズした目的の核酸鎖を含む）温度である。初期設定では、所望の画分は、もしその画分が特定されないならば、50%である。代替的な実施形態では、所望の画分は必要に応じて、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%である。また、例えば、配列は、ブリーザブル配列の理論的に予測される融点が、予想の融点（ T_m ）について公知の理論的計算を用いて、最適な増幅条件下で20、30、35、40、45、50、55、60または65℃以下である場合、ブリーザブルであるとみなされ得る。ある例では、熱安定性、融解挙動および／または T_m は、Breslaueraら、Proc. Nat. Acad. Sci. 83, 3746-50 (1986)の教示による理論的に予測される温度である。例示的な計算では、 T_m は以下のように予想される：

$$T_m = \frac{\Delta H - \frac{\text{kcal}}{\text{C}^* \text{Mol}}}{\Delta S + R \ln([\text{プライマー}]/2)} - 273.15^\circ\text{C}$$

ここで ΔH は、らせん開始因子（helix initiation factors）について調節されたベーススタッキング相互作用のエンタルピーである； ΔS は、らせん開始因子について、およびシステムのエントロピーに対する塩の寄与について調節されたベーススタッキングのエントロピーであり、 R は一般気体定数である（1.987 Cal/℃*Mol）。さらなる詳細および仮定は、Santa Lucia, J. (1998) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95, 1460；Rychlik, W. および Rhoads, R. E. (1989) Nucleic Acids Res. 17, 8543；および Borer P. N. ら (1974) J. Mol. Biol. 86, 843に示される。

【0136】

別の実施形態では、 T_m は、公知の方法によって経験的に測定される。（例えば、Spink, Methods Cell Biol. 2008；84：115-41；Meunier-Prestら、Nucleic Acids Res. 2003 December 1；31(23)：e150；Brewoodら、Nucleic Acids Res. 2008 September；36(15)：e98.）。

【0137】

ある実施形態では、各々の鎖の上の少なくとも1つのPBSはブリーザブルであり例えば、フォワードPBSおよびリバースPBSは両方ともブリーザブルである。必要に応じて、核酸、例えば、フォワードまたはリバース鎖は、2つのブリーザブル配列を含む。例えば、5'部分および3'部分は、ブリーザブルであり得る。

【0138】

部分的な変性が、加熱または上昇した温度によって達成される場合、例示的なブリーザブルPBSは、ピリミジンリッチ（例えば、高含量のAおよび／またはTおよび／またはUを有する）であってもよい。PBSは、例えば、ポリ-A、ポリ-Tもしくはポリ-U配列、またはポリピリミジン域を含む。1つ以上の増幅または他のプライマー（例えば、固定されたプライマー）は必要に応じて、これらのプライマー結合配列に対して対応して相補的であるように設計される。核酸鎖の例示的なPBSは、ポリ-T配列、例えば、少なくとも10、15、20、25または30個のチミジンヌクレオチドのストレッチを含むが、対応するプライマーは、PBSに対して相補性の配列、例えば、少なくとも10、15、20、25または30個のアデノシンヌクレオチドのストレッチを有する。例示的な低融点プライマーは必要に応じて高い割合（例えば、少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%）の核酸塩基を有し、これが一般には（例えば、最適な増幅条件下で）、プライマーが相補性テンプレートにハイブリダイズするとき、相補性塩基と2つ以下の水素結合を形成する。このような

核酸塩基の例としては、A（アデニン）、T（チミン）およびU（ウラシル）が挙げられる。例示的な低融点プライマーは必要に応じて、A（アデニン）、T（チミン）および／またはU（ウラシル）ヌクレオチドまたはその誘導体のうちのいずれか1つ以上の高い割合を有する。ある実施形態では、この誘導体は、A（アデニン）、T（チミン）および／またはU（ウラシル）に対して相補性である核酸塩基を含む。PBSに対してハイブリダイズするプライマーの部分は、必要に応じて少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくは100%のA（アデニン）、T（チミン）またはU（ウラシル）ヌクレオチド、またはそれらの任意の組み合わせを有する。別の例では、PBSにハイブリダイズするプライマーの一部は、ポリA配列（例えば、少なくとも5、10、15、20、25または30ヌクレオチド長）を含む。他の例示的なプライマーは、 $(NA_x)_n$ リピートを含む。必要に応じて、n（小文字）は、2～30、例えば、3～10、例えば、4～8である。「N」（大文字）は、任意のヌクレオチドであり、かつ必要に応じて、NはCまたはGである。「A」は、アデニンの簡略表現であり、「x」は、リピート中のアデニン残基の数、例えば、2、3、4、5、6、10またはそれ以上を示す。例示的なプライマーは、 $(CAA)_n$ 、 $CA)_n$ 、 $(CAAA)_n$ さらには $(GAA)_n$ の多重リピートを含む。

【0139】

必要に応じて、一本の鎖だけ（例えば、フォワード鎖またはリバース鎖）はブリーザブルPBSを有する。別の実施形態では、フォワード鎖およびリバース鎖の両方とも、ブリーザブルPBSを有する。ブリーザブルPBSは、必要に応じて、支持体に固定されるかまたは固定されない（例えば、可溶型）のいずれかであるプライマーに対して相補性である。必要に応じて、ブリーザブルPBSを含んでいる鎖は、支持体に対して固定されているか、または固定されていない（例えば、可溶型）。必要に応じて、両方のプライマーとも固定されるか、または両方の鎖が固定される。必要に応じて、どちらのプライマーも固定されることがなく、どちらの鎖も固定されることがない。

【0140】

増幅サイクルは必要に応じて、ブリージング、アニーリングおよび伸長を備える。増幅される核酸は必要に応じて、これらの工程のうちの少なくとも1つに対して適切であるか、または最適化された条件に供される。ある実施形態では、この核酸は、これらの工程のうちの2つ以上（例えば、アニーリングおよび伸長、またはブリージングおよび伸長）に適切である条件に供される。いくつかの場合には、これらの工程の3つ全てが、同じ条件下で同時に行われ得る。

【0141】

例示的な方法では、核酸を、ブリージングを可能にするかまたは容易にする条件に供してもよい。ある実施形態では、「ブリージング」とは、二本鎖の二重鎖の2つの鎖が互いに対して実質的にハイブリダイズされているが、目的の局所部位（例えば、末端またはプライマー結合部位）にわたって変性される場合に生じると言われる。核酸の1つ以上のブリーザブル配列（例えば、低T_m部分を有するフォワードおよび／またはリバースPBS）は、これがハイブリダイズされている第一の相補鎖（例えば、フォワード鎖またはリバース鎖）から局所的に変性され（「ブリージングする」）、これは別の第二の鎖に対してハイブリダイズされ、従って、ハイブリダイズするために利用可能となる。例示的な第一の鎖は、第一のプライマーからのプライマー伸長生成物である。例示的な第二の鎖は、例えば、第二の伸長されていないプライマーである（例えば、例えば、dTまたはdA配列を含む、PBS-相補性オリゴヌクレオチド）。必要に応じて、第一のおよび第二の鎖は、支持体上に固定され、近接して定着され得る（例えば、ウォーキングを可能にするために十分近接して）。ブリージングの条件は、必要に応じて部分的に変性性の条件であって、その条件下では、PBSは一般には変性されるが、核酸の別の部分はハイブリダイズされているか、または二本鎖の状態に残る。必要に応じて、DNAヘリカーゼが、部分的変性を容易にするために反応混合物に含まれてもよい。

【0142】

必要に応じて、次いで核酸は、アニーリングを容易にする条件に供され、例えば、温度が低下されて、ブリーザブルPBSと第二の鎖との間のハイブリダイゼーションが可能になる。ある実施形態では、同じ条件を用いて、ブリージングおよび伸長の両方を容易にする。別の実施形態では、アニーリング条件は、ブリージング条件とは異なり、例えば、アニーリング条件は、非変性性の条件、またはブリージング条件よりは変性に好都合でない条件である。ある例では、アニーリング条件は、ブリージング条件よりも低い温度（例えば、37℃）を含み、ここではより高い温度（例えば、60～65℃）が用いられる。必要に応じて、完全に変性性の条件は、増幅の1回以上のサイクル（例えば、ほとんどの増幅サイクル、または実質的に全ての増幅サイクル）の間、回避される。

【0143】

伸長条件は一般には、プライマー伸長を許すか、または極めて適切である。ある実施形態では、最適な伸長条件とは、アニーリングおよび／またはブリージング条件と同じであるかまたは異なる。ある実施形態では、同じ設定の条件を、3つの工程全て（例えば、等温性増幅）に用い、その結果持続期間についての単一セットの条件にサンプルを供することで、ブリージング、アニーリングおよび伸長の複数回の増幅サイクルが生じることが可能になる。

【0144】

ある実施形態では、鎖伸長を、例えば、鎖置換DNAポリメラーゼ、例えば、Bst DNAポリメラーゼの大型フラグメント、Klenow DNAポリメラーゼ、phi29 DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼ、任意の機能的フラグメントおよび／もしくは改変体、またはこのような酵素の任意の組み合わせによって行う。鎖置換の能力は必要に応じて、部分的に変性された核酸の二重鎖部分を通じて伸長を容易にする。

【0145】

必要に応じて、1つ以上のPBSーブリージングおよびプライマー伸長工程を複数回繰り返して、最初の核酸を増幅する。1つ以上の核酸試薬（例えば、プライマー）が支持体に固定される場合、プライマー伸長生成物は、例えば、増幅の前の支持体に対する伸長されていない、伸長されたプライマーの結合のおかげで、またはこのようなプライマーに対するハイブリダイゼーションによって、支持体に対して実質的に結合されたままである。必要に応じて、クローンアンプリコンの局在化クローン集団は、支持体上の別個の部位の周囲に形成される。例示的な別個の部位は、支持体に対する最初の核酸鎖の結合のポイントであり、それからクローン集団内の他の核酸が、最初の核酸またはそのコピーをテンプレートとして用いて、プライマー伸長によって直接または間接的に生成される。

【0146】

必要に応じて、サンプルは、増幅されるべき1つ以上の核酸の集団から調製される。核酸の集団は、一本鎖型であっても、または二本鎖型であってもよく；必要に応じて1つ以上の核酸は個々に既知の3'末端配列および既知の5'末端配列を有する核酸鎖を含み、この鎖は実質的に、増幅に用いられる1つ以上のプライマーと同一であるかまたは相補性である。核酸鎖の3'部分は例えば、固定されたプライマーに対して相補性であってもよいが、5'部分は、可溶性のプライマーに対して同一であり得る。5'および／または3'部分は、共通（「ユニバーサル」）であってもよいし、または集団内の個々の核酸の間で不変であってもよい。必要に応じて、集団内の核酸は個々に、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、メイトペアフラグメント、エキソームなどのような共通の部分の間の改変体（例えば、未知）の配列を含む。このコレクションは例えば、対応する遺伝子源（例えば、ゲノムまたはエキソーム）の50%、70%、または90%を超えるカバーを保証するのに十分なメンバーを有し得る。

【0147】

II. 組成物、アレイおよびキット

また本明細書には、以下、すなわち、少なくとも1つのリバーズ核酸鎖、少なくとも1つの支持体上に固定された複数のフォワードプライマー、溶液中の複数のリバーズプライ

10

20

30

40

50

マー、およびポリメラーゼのうちいずれか1つまたは任意のサブセットまたは全てを含む組成物も提供される。このフォワードプライマーおよび／またはリバースプライマーは必要に応じて、本明細書に記載のように、低融点であるか、またはアデニン、チミンもしくはウラシルがリッチである。例示的な組成物は、クローン集団の核酸鎖（「リバース鎖」）を含み、ここで各々のクローン集団の個々のリバース鎖は、低融点（例えば、ブリーザブル）プライマー結合配列を、3'末端に、および／または低融点プライマー配列を5'末端に含む。この組成物は必要に応じて、リバース鎖の5'部分または末端上の低融点プライマー配列に対して実質的に同一である複数のリバースプライマーを含む。この組成物は必要に応じて複数のフォワードプライマーを含み、このプライマーは、リバース鎖の3'部分または末端上の低融点プライマー結合配列に対して実質的に相補性である。ある実施形態では、このフォワードプライマーおよび／またはリバースプライマーは、支持体に対する結合によって固定される。例えば、フォワードプライマーは固定され、そしてリバースプライマーは固定されないか、またはその逆もなりたつ。例示的な組成物は、（1）リバース核酸鎖、（2）支持体上に固定された複数の低融点フォワードプライマー、（3）溶液中の複数の低融点リバースプライマー、および（4）ポリメラーゼ、のうちのいずれか1つ以上を含む。

【0148】

必要に応じて、この組成物はさらに、伸長されていないフォワードプライマーよりも長く、かつ必要に応じて1つ以上のリバース鎖の全長相補体である、1つ以上の伸長されたフォワード鎖を含む。ある実施形態では、1つ以上の伸長されたフォワード鎖が、相補性のリバース鎖にハイブリダイズされ、ここでこのリバース鎖は必要に応じてまた別の異なるフォワードプライマーに対して、または異なるフォワード鎖に対してハイブリダイズされる。この異なるフォワード鎖は必要に応じてリバース鎖の全長未満の相補体である。この組成物は、本明細書に記載の任意の1つ以上の試薬を含んでもよく、および／または本明細書に記載の任意の1つ以上の手順または条件（例えば、温度）に供されてもよい。

【0149】

必要に応じて、この組成物は、1つ以上の固体支持体に結合された複数の空間的に隔てられたクローン集団を含む。例えば、複数の空間的に隔てられたクローン集団が、同じ支持体に結合される。この組成物は必要に応じて、ポリメラーゼではない別の酵素、例えば、リコンビナーゼまたは逆転写酵素またはヘリカーゼまたはニッキング酵素を含まない。

【0150】

必要に応じて、この組成物は、本明細書に記載の任意の1つ以上の方法によって生成できる核酸のコレクションを含む。例えば、このコレクションは、表面上の1つ以上の別個のエリアを占有する固定された核酸を含んでもよく、各々のエリアは、複数の同一の核酸鎖、および必要に応じて、それに対してハイブリダイズした複数の同一の相補鎖を含み、ここでこの相補鎖は、固定された核酸に対するハイブリダイゼーションによるものを除いて、固体支持体との結合も連結も会合も有さない。必要に応じて、このようなエリア内の個々の核酸鎖は、別の核酸鎖が、その鎖の長さの距離内に表面上に配置されるように、配置される。必要に応じて、核酸が固定される表面の 1 mm^2 あたりに少なくとも1つの別個のエリアが存在する。例えば、核酸が固定される表面の 1 mm^2 あたりの別個のエリアの数は、 10^2 より大きい、 10^3 より大きい、 10^4 より大きい、 10^5 より大きい、 10^6 より大きい、 10^7 より大きい、または 10^8 より大きい。

【0151】

増幅されたクローン集団のコレクションは、アレイを形成し得、これは、一次元（例えば、一般にはモノクロナルマイクロビーズの行列）であっても、または二次元（例えば、増幅されたクローン集団が平面支持体上に定着される）であっても、または三次元であってもよい。あるアレイの個々のクローン集団は、必要に応じて、ただし必須ではないが、それらがアドレスされるかまたはアドレス可能であるように、定着されるか、または配列される。必要に応じて、異なるクローン集団は、お互いから適切な距離を隔てられ、この距離は一般には、異なるクローン集団がお互いから識別されることを可能にするのに十

分である。ある実施形態では、局在化クローン集団は、秩序づけられるかまたは無秩序に（例えば、平面基板にわたるランダムパターン）散乱される。

【0152】

例示的なアレイの特徴は、核酸の個々の識別可能なクローン集団であり、ここで必要に応じて、この特徴は、1つ以上の支持体にわたって分布される。例示的なマイクロビーズの実施形態では、あるアレイは、複数のマイクロビーズを含み、ここでは個々のマイクロビーズは一般には、核酸のモノクローナル集団を含み、かつ異なるマイクロビーズは一般には、異なるクローン集団（例えば、配列が異なる）を含む。必要に応じて、マイクロビーズは、平面基板上にわたって単層で分布またはパッケージングされる。他の実施形態では、このアレイは、単一の（例えば、平面の）支持体を含み、この単一の支持体は、核酸の複数の空間的に別個のクローン集団を含んでおり、ここで異なるクローン集団は必要に応じて配列が異なる。

10

【0153】

必要に応じて、個々のクローン集団内の1つ以上の核酸は、平面基板に直接結合され得る。別の例では、個々のクローン集団の核酸は、例えば、本明細書に記載のように、マイクロビーズに結合される。このクローンのマイクロビーズは必要に応じて、ランダムまたは秩序付けられた形式で、平面基板上にわたって一緒に近接して充填される。必要に応じて、マイクロビーズのうち20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%または99%より多くが、少なくとも1つ、2つ、4つ、または6つの他のマイクロビーズと接触される。必要に応じて、マイクロビーズの10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%または99%未満が、1つ、2つ、4つ、または6つの他のマイクロビーズと接触される。

20

【0154】

必要に応じて、アレイ（例えば、固定部位または増幅されたDNAクローン集団）の特徴は、一般にはお互いとは別個または個別である。例えば、アレイの特徴のうち50%、70%、80%または90%または以上が、同じアレイ上の他の特徴と接触されることもなく、完全に重複されることもないか、または最適な検出方法を用いてお互いから識別される。必要に応じて、この特徴は、それらがお互いから識別可能なままである限り、部分的小互いに重複してもよい。

【0155】

また、本明細書では、本明細書に記載の任意の1つ以上の試薬（例えば、核酸または酵素または支持体）を含むキットが提供される。例えば、キットは、必要に応じて固定された1つ以上のプライマーを含んでもよい。例示的なキットは、2つのプライマーを含み、ここで1つのプライマーの変性温度は、必要に応じて他から少なくとも10、20、30または40℃である。必要に応じて、より低温融解性のプライマーは、アデニン／チミン／ウラシルリッチ部分、例えば、本明細書に記載のようなポリA領域、例えば、少なくとも10、15、20、25または30ヌクレオチド長である、ポリA、TまたはU配列を含む。低温融解性プライマーは、必要に応じて固定され、ここでこの高温融解性プライマーは必要に応じて非固定である。

30

【0156】

必要に応じて、このキットはさらに、固定されたプライマーを含んでいる、本明細書に記載の1つ以上の支持体を含む。例示的な支持体は、平面を含む。複数の支持体を用いられる場合、このキットは、同一のプライマーを保有するマイクロビーズを含み得る。

40

【0157】

このキットは必要に応じて、1つ以上のポリメラーゼ、例えば、鎖置換性ポリメラーゼ、および／または本明細書に記載の増幅試薬の任意の組み合わせを含む。

【0158】

このキットはまた、増幅されるテンプレートの最初の集団を希釈するための指示書、および／または希釈媒体を備えてもよい。

【0159】

50

III. 用途

本明細書の記載の方法から生成された増幅された核酸分子および／または固定された核酸分子は、配列決定、スクリーニング、診断、インサイチュ核酸合成、遺伝子発現モニタリング、核酸フィンガープリンティング、化学捜査、診断法などを含む、多くの異なる適用に供され得る。

【0160】

本明細書に記載の任意の方法または複数の核酸を、配列分析のための核酸分子を提供するのに用いてもよい。例えば、本明細書に記載の任意の方法によって生成される1つ以上の核酸分子（例えば、アンプリコン）は、少なくとも1つの配列決定分析プライマーおよび／または少なくとも1つのプローブと接触させられ得る。必要に応じて、少なくとも1つの配列決定分析プライマーは、オリゴヌクレオチドであるか、またはオリゴヌクレオチドを含む。ある実施形態では、少なくとも1つのプローブは、1つ以上のヌクレオチドまたは1つ以上のオリゴヌクレオチドを含む。例えば、配列分析プライマーまたはプローブとして用いられるオリゴヌクレオチドは、同じ配列の少なくとも1つに対してハイブリダイズし得る、なぜなら、少なくとも1つの固定プライマー、例えば、オリゴヌクレオチドは必要に応じて、固定プライマーと同じ配列を有するからである。

【0161】

ある実施形態では、配列分析は、分析される1つ以上の標的核酸分子と、1つ以上の配列分析プライマーおよび／またはプローブとを接触させること、いずれかのハイブリダイズされてないプローブを除去すること、およびライゲーションされたプローブの標識を決定することによって行われる。

【0162】

別の実施形態では、配列分析は、分析される1つ以上の標的核酸分子と、1つ以上の配列分析プライマーおよび／またはプローブとを接触させること、ならびに少なくとも1つの標的核酸と、少なくとも1つの標識された配列分析プライマーおよび／またはプローブとの間で得られるハイブリダイゼーションを検出することによって行われる。ある実施形態では、配列分析方法は、配列分析プライマーに対して任意の、隣接してハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブをライゲーションすることによって標的核酸分子にハイブリダイズされた1つ以上の配列分析プライマーを伸長すること、いずれかのライゲーションされていないプローブを除去すること、およびライゲーションされたプローブの標識を決定することを包含する。

【0163】

別の実施形態では、配列分析は、分析される1つ以上の標的核酸分子と、1つ以上の配列分析プライマーおよび標識されたヌクレオチドプローブおよびテンプレート依存性ポリメラーゼとを接触させること、ポリメラーゼが配列分析プライマーのポリメラーゼ伸長生成物中に標識されたヌクレオチドを組み込むことを可能にすること、任意の組み込まれていないヌクレオチドを除去すること、および組み込まれたヌクレオチドを同定することによって行われる。ヌクレオチドプローブは、例えば、蛍光的に標識されるか、および／または組み込まれたヌクレオチドがその標識から同定される。別の実施形態では、ヌクレオチドプローブは、標識されず、ポリメラーゼ伸長生成物へのヌクレオチドの存在または組み込みは、組み込みによって生成された副産物に基づいて測定される。例えば、伸長生成物へのヌクレオチドの組み込みは、必要に応じて、例えば、電界効果トランジスタを用いることによって、pHまたはイオンまたは電流の変化を測定することによって検出される。

【0164】

本明細書に記載の任意の方法では、プローブ（例えば、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド）は必要に応じてさらに、ポリメラーゼまたはリガーゼによって伸長可能である。あるいは、プローブは、必要に応じて、ポリメラーゼまたはリガーゼによって伸長可能でない。このような伸長不能なプローブは必要に応じて、配列分析プロセスの間に伸長可能にされる（例えば、それらが同定された後で）。必要に応じて、ヌクレオチドプローブは、A、G、C、T塩基を含み、ここでは、異なる塩基を有するヌクレオチドプローブが

プローブの問い合わせ位置で、異なる蛍光標識を有する。

【0165】

必要に応じて、全てのまたは全てではない（例えば、少なくとも1つの）配列決定分析プライマーまたは配列決定分析プローブは、標識されたヌクレオチド／オリゴヌクレオチドを含む。必要に応じて、標識されたヌクレオチド／オリゴヌクレオチドは全てが、同じ標識を有するか、または示差的に標識される。ある実施形態では、この標識されたヌクレオチド／オリゴヌクレオチドは、蛍光標識される。例えば、標識されたヌクレオチドおよび標識されていないヌクレオチドの混合物が用いられる。

【0166】

必要に応じて複数の異なる配列が、平行して決定される。例えば、配列分析は、少なくとも2つ、例えば、少なくとも10、1000、1000、106、109または1012個の異なる別個のエリアに存在する核酸分子の平行な配列分析である。この配列分析技術は、ポリメラーゼベースの配列分析、例えば、サンガー配列分析であってもよい。配列分析技術の例としては、合成による配列分析、または可逆性のターミネーターを用いる配列分析、またはライゲーションベースの配列分析、例えば、SOLiDを用いるツー・ベース・エンコーディング（two-base encoding）が挙げられる。

【0167】

また、本明細書に言及される任意の1つ以上の試薬またはデバイスを含む、本明細書に記載の任意の方法を行うための装置も提供される。例えば、この装置は、1つ以上の支持体を含んでもよく、各々の支持体は、複数の固定されたプライマー（これは必要に応じて同一である）を含む。例えば、この装置は、核酸ポリメラーゼもしくはリガーゼ、および／または複数のヌクレオチド（必要に応じて標識された）およびアニーリングされた核酸鎖を部分的に分離するための手段を備えてもよい。アニーリングされた核酸鎖を分離するための例示的な手段は、制御された加熱手段、例えば、試薬を一定温度に維持し得る加熱手段を備える。この装置は必要に応じて、本明細書に記載の1つ以上の反応物質の供給源と、このような反応物質のうちの1つ以上がこの核酸分子に加えられた後に生成された1つ以上のシグナルを検出するための検出手段とを備える。検出するための手段は必要に応じて、支持体の別個の固定部位の間、または複数の支持体の間（もしマイクロビーズの形態である場合）を識別する十分な分解能を有する。必要に応じて、この装置は、平面上に固定されたプライマーを有する支持体を備える。

【0168】

ある実施形態では、この装置は、電荷結合素子（CCD）を備え、これは必要に応じて、画像形成デバイスと作動可能に接続される。

【0169】

ある実施形態では、各々の固定部位は、別々のビーズであり、各々のビーズは増幅後にアンプリコンのクローン集団を含む。必要に応じて、各々のビーズは、増幅の前、間、または後にアレイ中にまたはアレイ上に分配され得る。このアレイは例えば、ウェルの任意のアレイであり、ここではアンプリコンを保有するビーズが別々のウェル中に個々に分配される。必要に応じて、アレイは大規模のFETアレイである。

【0170】

必要に応じて、本明細書における任意の方法で生成されるクローン集団の少なくともいくつかは、検出または分析されるか（例えば、光学的または電気化学的な検出によって）、および／または空間的に隔てられている場合、お互いに別々であるとみなされる。ヌクレオチドの組み込みが、H⁺イオンの生成によって検出される実施形態では、このようなイオンは、例えば、緩衝液中で100nm未満という短い距離しか拡散できない。拡散に関するこの限られた能力によって、1つのクローン集団中で生成されるH⁺は一般に、手近なクローン集団を妨害せず、クローン集団の直下のセンサーによってのみ有意に検出されることが保証される。

【0171】

以下の実施例は純粋に、例示的な目的に関して提供されるものであり、本開示または特

10

20

30

40

50

許請求の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0172】

実施例 1

5'-二重-ビオチン標識されたオリゴ (dT) 35 は、DynaBeads MyOne ストレプトアビジン C1 磁気ビーズに結合された。8 千万個のオリゴ (dT) 35-結合ビーズおよび 800 μ l の DNA テンプレート (0.01 pg/ μ l) をハイブリダイゼーション緩衝液中で混合した。DNA テンプレート配列は以下のとおりであった。

【0173】

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT CCACTACGCCTCCGCTTTC CTC TCT ATG GGC

10

AGT CGG TGA TTC GTG GAA GAC GGG GGC AGT CTA TAC CCC TGT GGC GAC

CAC TGC GCG GTG GTT TGC TAG GAG AGA ATG AGG AAC CCG GGG CAG

以下の増幅プロトコルを行って、DNA テンプレートをビーズに対してハイブリダイズした：95℃2分、50℃1分、40℃1分、30℃1分、25℃2分。ビーズは、洗浄緩衝液で洗浄し、プライマーは、Exo-Klenow を用いて、洗浄したビーズに対して 10 $\times$ NEB 緩衝液 2 (40 μ l)、25mM の dNTP、4 μ l、Exo-Klenow 40 u/ μ l、4 μ l、および水 352 μ l を添加すること、および室温で 10 分間インキュベートすることによって伸長した。ビーズを再度洗浄し、テンプレートウォーキング反応は以下のように行った。最初、以下の反応混合物を調製した：

20

500 万個のビーズ

10 $\times$ ThermoPol 緩衝液 10 μ l

25mM の dNTP 1 μ l

P2 プライマー

(CTG CCC CGG GTT CCT CAT TCT)

50 μ M 2 μ l

100 $\times$ BSA 10 μ l

Bst DNA ポリメラーゼ大フラグメント 8 u/ μ l 10 μ l

H₂O 67 μ l。

【0174】

30

この反応混合物を、60℃で 45 分間および振盪しながら 90 分間インキュベートした。ビーズを洗浄して、DNA をビーズ上で増幅し、以下の反応物質を用いて、TaqMan qPCR で定量した：

TaqMan フォワードプライマー：

AGTCGGTGATTCGTGGAAGAC

TaqMan リバースプライマー：

CTCATTCTCTCCTAGCAAACCAC

TaqMan プロブ：Fam-

CCCCTGTGGCGACCAC-NFQ

40

。

【0175】

テンプレートウォーキング反応の前後の増幅倍数を算出して、反応時間に対してプロットした。検出目的のための十分な増幅は、30 分未満でみられた。

【0176】

実施例 2

ビーズに対するテンプレートの結合は、以下のテンプレートを用いて、実施例 1 に記載のように行った：

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT CCACTACGCCTCCGCTTTC CTC TCT ATG GGC
AGT CGG TGA TTC GTG GAA GAC GGG GGC AGT CTA TAC CCC TGT GGC GAC
CAC TGC GCG GTG GTT TGC TAG GAG AGA ATG AGG AAC CCG GGG CAG

。

【0177】

テンプレートウォーキング反応は、5 μ l の 1 μ M P2プライマー
(CTG CCC CGG GTT CCT CAT TCT)

および5 μ l の 8 u / μ l の Bst DNAポリメラーゼ大フラグメントを反応物に添加した以外は、実施例1に記載のように行い、ビーズは、ある範囲の温度、具体的には46 10
°C、51°C、58°C、60°C、63°C、65°Cで45分間振盪しながらインキュベートした。

【0178】

ビーズ上でのDNAテンプレートは、実施例1に記載のようにTaqMan qPCR
で、以下の試薬を用いた：

TaqManフォワードプライマー：
AGTCGGTGATTCGTGGAAGAC

TaqManリバープライマー：
CTCATTCTCTCCTAGCAAACCAC

TaqManプローブ：Fam- 20
CCCCTGTGGCGACCAC-NFQ

。

【0179】

テンプレートウォーキング反応の前後の ΔC_t を算出して、図5に示されるように、反
応温度に対してプロットした。この図は、テンプレートウォーキング反応に対する温度の
影響を示す。

【0180】

実施例3

オリゴ(dT)35ビーズは、実施例1のとおり調製し、8千万個のオリゴ(dT)3
5-結合ビーズを、2つのDNAテンプレートの800 μ lの混合物とともに(等しいモ
ル比で)、0.04 pg / μ lで、ハイブリダイゼーション緩衝液中でインキュベートし
た。DNAテンプレート配列は以下のとおりである。 30

【0181】

DNAテンプレート1：
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT CCACTACGCCTCCGCTTTC CTC TCT ATG GGC
AGT CGG TGA TTC GTG GAA GAC GGG GGC AGT CTA TAC CCC TGT GGC GAC
CAC TGC GCG GTG GTT TGC TAG GAG AGA ATG AGG AAC CCG GGG CAG

。

【0182】

DNAテンプレート2：
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT CCACTACGCCTCCGCTTTCCTCTCTATGGGCAG
TCGGTGATGAAACAGTTGATCATGGACAACCATATTCTGCTGTACGGCCAAGGCGG
ATGTACGGTACAGCAGATACTAAGATGATGAAGAGAATGAGGAACCCGGGGCAG

。

【0183】

ビーズに対するテンプレートの結合およびテンプレートウォーキングは、20 μ l の
8 u / μ l Bst DNAポリメラーゼ大フラグメントを添加した以外は、実施例1に
記載のとおり行い、ビーズを60°Cで45分間振盪しながらインキュベートした。ビーズ 50

を洗浄して、96ウェルのqPCRプレート中に、1ウェルあたり約5ビーズまで希釈した。96の二重鎖TaqMan qPCR反応を、以下のプライマーおよびプローブを用いて行った。

TaqManフォワードプライマー1：
AGTCGGTGATTCGTGGAAGAC

TaqManリバースプライマー1：
CTCATTCTCTCCTAGCAAACCAC

TaqManプローブ1：Vic-
CCCCTGTGGCGACCAC-NFQ

TaqManフォワードプライマー2：
GAAACAGTTGATCATGGACAACCAT

TaqManリバースプライマー2：
TCATCTTAGTATCTGCTGTACCGTACAT

TaqManプローブ2：Fam-
CCGCCTTGGCCGTACAG-NFQ

【0184】

図6は、96の二重鎖TaqMan qPCR反応のCt値を示す。

【0185】

以下の表1は、Ct値をまとめている。ビーズ集団の実験のパーセンテージは、モノクロナルの増幅モデルおよびポイズン分離に基づいて算出した確率と一致する。

【0186】

【表1】

96ウェル100コピーカットオフ	ポジティブカウント	パーセンテージ (%)	確率 (%)
FAM Ct<37	7.00		
Vic Ct <34	8.00		
FAM Ct <37および Vic Ct <34	1.00		
空のウェルまたはビーズ	81.00	84.38	84.98
単一テンプレートビーズ	14.00	14.58	14.41
FAMおよび Vic	1.00	1.04	0.61

【0187】

実施例4

ビーズは、5'-二重-ビオチン標識オリゴ(dA)35をオリゴ(dt)35の代わりにビーズ-固定プライマーとして用いたこと以外は、実施例1のとおり調製した。

【0188】

以下のDNAテンプレートは、実施例1に記載のとおり調製したビーズに結合した：
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CCACTACGCCTCCGCTTTC CTC TCT ATG

GGC AGT CGG TGA TTC GTG GAA GAC GGG GGC AGT CTA TAC CCC TGT GGC

GAC CAC TGC GCG GTG GTT TGC TAG GAG AGA ATG AGG AAC CCG GGG CAG

。

【0189】

このプライマーは、Exo-Klenowでは伸長されなかった。テンプレートウォーキングは、20μlの120u/μlのBst DNAポリメラーゼ大フラグメントを添加し、ビーズを37℃で3分間、次いで60℃で45分間および振盪しながら90分間インキュベートした以外は、実施例1のとおり行った。ビーズ上の増幅されたDNAは、TaqMan qPCRおよび以下の試薬を用いて定量した：

TaqManフォワードプライマー：
AGTCGGTGATTCGTGGAAGAC

TaqManリバースプライマー：
CTCATTCTCTCCTAGCAAACCAC

TaqManプローブ：Fam-
CCCCTGTGGCGACCAC-NFQ

【0190】

テンプレートウォーキング反応の前後の増幅の倍数を算出して、図7に示されるように反応時間に対してプロットした。90分間のテンプレートウォーキング反応の後、ビーズ上のDNAテンプレートを約100,000倍増幅した。

【0191】

実施例5

5'-二重-ビオチン標識されたオリゴ(dA)35を、DynaBeads MyOneストレプトアビジンC1磁気ビーズに結合した。8千万個のオリゴ(dA)35結合ビーズを800μlのEcoLI DH10BゲノムDNAフラグメントライブラリーと、0.1pg/μlで、ハイブリダイゼーション緩衝液中で混合した。ハイブリダイゼーション緩衝液は、陰性のコントロールとして用いた。DH10Bフラグメントライブラリーは以下の構造を有した。

【0192】

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

——P1アダプター——150bp~200bpのDH10BゲノムDNAフラグメント——P2アダプター

【0193】

以下のプログラムを、サーモサイクラー上で駆動して、ビーズに対してDNAテンプレートをハイブリダイズした：95℃2分、50℃1分、40℃1分、30℃1分、25℃2分。ビーズを洗浄して、テンプレートウォーキング反応は以下のとおり行った：

500万個のビーズ(DH10Bライブラリーとハイブリダイズ)、または陰性コントロールのビーズ

10×ThermoPol緩衝液 10μl

25mM dNTP 1μl

P2プライマー

(CTG CCC CGG GTT CCT CAT TCT)

50μM 2μl

100×BSA 10μl

Bst DNAポリメラーゼ大フラグメント120u/μl 10μl

H2O 67μl

。

【0194】

ビーズを振盪しながら37℃で3分間、次に60℃で45分間インキュベートした。次いでビーズを洗浄して、DH10Bフラグメントライブラリー中のP1アダプター配列を標的するcy5標識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることによって蛍光標識で染色した。染色されたビーズを、顕微鏡スライド上に置いて、蛍光顕微鏡で画像化した。

【0195】

ビーズの白色光画像およびビーズのcy5蛍光画像のシフトされた重層によって、ビーズの白色光画像は黒いドットとして、cy5標識ビーズは赤いドットとして明らかになった。約15%のビーズがcy5でポジティブに染色されることが判明し、残りはネガティブであった。

【0196】

テンプレートウォーキングのための別の例示的なプロトコールを以下のとおり行った。

【0197】

ハイブリダイゼーションおよびプライマー伸長：テンプレートを、1×NEB緩衝液2中で100pMという最終濃度まで希釈した。テンプレートを95℃で3分間加熱し、次いで氷上に保持した。ハイブリダイゼーション/反応混合物は以下のように調製した：

10

20

30

40

50

100 pM 変性されたテンプレート:	48.5 μ l
100 mM dNTP:	0.5 μ l
5U/ μ l Klenow:	1 μ l
総容積:	50 μ l

【0198】

10 μ l の反応混合物を、StarLight フローセル (flow cell) の選択したレーンに添加し、このフローセルを 37℃ で 20 分間。各々のレーンは、1 ml の 1× の TMA X 緩衝液で 2 回洗浄した。

【0199】

テンプレートウォーキング：ウォーキング反応混合物は以下のとおり調製した：

10x NEB ThermoPol Buffer:	5 μ l
100 mM dNTP:	1 μ l
50 μ M プライマー Pe:	0.5 μ l
120 U/ μ l Bst (NEB 由来):	20 μ l
H ₂ O:	23.5 μ l
総容積:	50 μ l

【0200】

10 μ l の反応混合物を、各々のレーンに添加して、フローセルを 60℃ で 20 分間インキュベートした。各々のレーンを 1 ml の 1× TMA X 緩衝液で 2 回洗浄し、核酸を所望に応じて分析に供した。

【0201】

実施例 6

本実施例は、マトリックスの形態での支持体上の核酸のクローン増幅、続いて、化学感応性の電界効果トランジスタ (chemically sensitive field effect transistor (chemFET)) を用いるヌクレオチド組み込みの副産物を検出するイオンベースの配列決定システムである、Ion Torrent PGM (商標) シーケンサーを用いる、得られた増幅集団の配列決定を記載している。例示的な実施形態を図 3 に示す。ある実施形態では、テンプレートウォーキングのための少なくとも 1 つのプライマーを、個々のウェルの表面 (例えば、フロア) 上に固定し、ここでは個々のウェルが、対応するトランジスタに対して作動可能に接続される。

【0202】

テンプレート調製：ライブラリーは、Life Technologies SOLiD 4.0 User Manual に記載のように調製した。要するに、E. coli 株 DH10B から単離した 2 μ g のゲノム DNA を、Covaris S2 システムを用いて剪断した。剪断された DNA を、末端修復して、SOLiD Library Column Purification Kit で精製した。

【0203】

二本鎖のアダプター (「イオンアダプター (ION Adaptor 1) 」) を、SOLiD (商標) 4 System (Applied Biosystems, Life Technologies) のユーザーマニュアルの添付物 C の手順によって、お互いに対して一本鎖の相補性オリゴヌクレオチドイオンアダプターオリゴ 1 およびイオンアダプターオリゴ 1' をハイブリダイズすることによって調製した。イオンアダプターオリゴ 1 は、30 マー長 (すなわち、30 ヌクレオチド長) のプライミング配列を含み、かつイオンアダプターオリゴ 1' は、この 30 マーのプライミング配列の相補体を 5' 末端に、さらに追加の 2 つのチミジン残基 (「TT」) を 3' 末端に含んだ。イオンアダプターオリゴ 1 とイオンアダプターオリゴ 1' とのハイブリダイゼーションは、二本鎖のアダプター「イオンアダプター 1」を形成し、これは、30 マーの二本鎖のプライミング配列を備え、かつ 1 つの平滑末端および 1 つの「スティッキー」末端を有し、この末端が 2 つの追加の T

10

20

30

40

50

残基の3'オーバーハングを含んでいる。第三のプライマー、イオンアダプターA PCRプライマー（イオンアダプターオリゴ（ION Adaptor Oligo）1の最初の20ヌクレオチドのみを含む）を、下に記載のようにPCR工程で用いた。

【0204】

同様に、第二の二本鎖のアダプター（「イオンアダプター2」）は、SOLID4.0ユーザーマニュアルの添付物Cの手順を用いて、相補性の一本鎖オリゴヌクレオチドイオンTテールアダプターオリゴ2およびイオンAテールアダプターオリゴ2'をハイブリダイズすることによって調製した。イオンTテールアダプターオリゴ2は、52マー長であり、かつ30ヌクレオチドのプライミング配列を5'末端に、続いて22チミジン（「T」）残基のストレッチを3'末端に含んだ。イオンAテールアダプターオリゴ2'は、50マー長であって、20個のアデニン（「A」）のストレッチ残基を5'末端に、続いてイオンTテールアダプターオリゴ2のプライミング配列に相補的な30ヌクレオチドのストレッチを含んだ。イオンTテールのアダプターオリゴ2とイオンTテールアダプターオリゴ2'とのハイブリダイゼーションによって、二本鎖のアダプター「イオンアダプター2」が形成され、これは20マーのポリ-A／ポリ-T二重鎖に隣接する30マーの二本鎖プライミング配列を含み、1つの平滑末端および1つの「スティッキー」末端（2つの追加のT残基の3'オーバーハングを含む）を有する。

【0205】

二本鎖のアダプターであるイオンアダプター（Ion Adaptor）1およびイオンアダプター2を、末端修復されたDNAにライゲーションした。このライゲーション生成物をサイズ選択して、以下のプライマーを用いる8サイクルの増幅に供した：イオンアダプターA PCRプライマー（これは、イオンアダプターオリゴ1の最初の20ヌクレオチドのみを含んだ）およびイオンTテールのアダプターオリゴ2。増幅された反応生成物を、サイズ選択に供して、209bpのメジアン径を有する最終適合した二本鎖DNAライブラリーを生じる。

【0206】

核酸の等温性増幅：上記のように得た適合された二本鎖のライブラリーを、30マーのポリAプライマーを含むポリマーマトリクスと混合した（これらのマトリクスは、Scaffolded Nucleic Acid Polymer Particles（足場付きの核酸ポリマー粒子）の「SNAPP」として本明細書に言及され、これは本質的に、米国特許公開第20100304982号、Hinzらに記載のとおり調製された）。

【0207】

粒子に対するテンプレートのアニーリング：二本鎖ライブラリーを、SNAPP粒子に対してアニーリングした。要するに、一千万個のSNAPPを緩衝液中で2回洗浄した（各々の洗浄は、SNAPPに再懸濁するためにピペティングで上下すること、次いで遠心分離によってSNAPPをペレット化することによって行った）。

【0208】

ライブラリーが総容積100μl中で1つのSNAPPあたり1つの二本鎖のテンプレート分子という平均比で添加されるように、dsDNAアダプターライゲーションおよびサイズ選択のライブラリーを緩衝液中に希釈した。

【0209】

テンプレートライブラリーを、以下のサーモサイクリングプログラムを行うことによってSNAPPに対してハイブリダイズした：

- 95℃で3分間
- 50℃で1分間
- 40℃で1分間
- 30℃で1分間
- 25℃で2分間。

【0210】

テンプレート-アニーリングしたSNAPPを緩衝液中で2回洗浄した。

【0211】

等温性テンプレート反応および処理：アニーリングされかつ洗浄されたSNAPPを以下の増幅反応混合物に再懸濁した：

1X Phi29 DNA ポリメラーゼ反応緩衝液0.1mg/mL BSA、1μM イオンアダプターA PCRプライマー、1mM等モルdNTP混合物および100U Phi29酵素（NEB#M0269L）。

【0212】

SNAPPを含んでいる増幅反応混合物を次に、サーモミキサー（thermomixer）中で、1000RPMで振盪しながら以下のとおりインキュベートした：

30℃で6時間

65℃で30分間。

【0213】

SNAPPSを、ベレット化して、Life TEX緩衝液中で2回洗浄した。

【0214】

次いで、SNAPP上の二本鎖の増幅されたDNAを変性して、イオン変性溶液（125mMのNaOH、0.1%のTween-20）中での2回の洗浄であって、各々の洗浄について室温で5分のインキュベーションによる洗浄によって、SNAPPに共有結合されていない相補鎖を除去した。

【0215】

次いで、SNAPPSを、Life TEX緩衝液（10mMのTris、1mMのEDTA、0.01%のTritonX-100）中で2回洗浄した。次いで、SNAPPを、下記のように、Ion Torrent PGM（商標）シーケンサーを用いてイオンベースの配列決定反応に供した。

【0216】

Ion Torrent PGM（商標）シーケンサーを用いる配列決定

増幅されたDNAを含んでいるSNAPPを、GibcoブランドのPBS、pH 7.2（1.54mMのリン酸二水素カリウム、155.17mMの塩化ナトリウム、2.71mMの二塩基性リン酸ナトリウム）と0.2% Tween-20を含むアニーリング緩衝液中で2回洗浄した。

【0217】

5μlのイオン配列決定プライマー（品番602-1021-03（Nucleotides, Enzyme and Controls Kit中で提供されるような）、品番4462916（Ion PGM（商標）314 Sequencing Kitの）、品番4462909；Ion Torrent Systems（Life Technologies Corp., Carlsbad, CAの子会社）を、洗浄したSNAPPに添加して、以下のとおりサーモサイクラー中でハイブリダイズした：

95℃で2分間

37℃で2分間

【0218】

アニーリングされたSNAPPは、アニーリングされた緩衝液中で2回洗浄され、最終洗浄後、SNAPPベレット上に約7μlの緩衝液が残った。

【0219】

1μlのイオン配列決定（Ion Sequencing）ポリメラーゼ（品番602-1023-01（Nucleotides, Enzyme and Controls Kitで提供される）、品番4462916（Ion PGM（商標）314配列決定キットの）、品番4462909；Ion Torrent Systems（Life Technologies, Carlsbad, CAの子会社）を、SNAPPに添加して、その混合物を室温で5分間インキュベートした。

【0220】

S N A P Pを、水浴中で10秒間穏やかに超音波処理して、あらゆる凝集塊を分散させた。

【0221】

2 μ lの50%のグリセロール（アニーリング緩衝液中で希釈）を添加して、サンプルをイオン配列決定314キット（Ion Sequencing 314 Kit）（品番4462909、Ion Torrent Systems, Life Technologies）のIon Torrent PGM（商標）314配列決定チップ上にロードした。要するに、このチップを50 μ lのアニーリング緩衝液（品番603-1047-01（PGM試薬キット、品番4465455、Ion Torrent Systemsに含まれる））の添加によってプライムした。10 μ lのサンプルをチップのポートに注入し、そのチップを次に、10分間遠心分離した。PGM（商標）配列決定試行を、標準的なヌクレオチドフローオーダーを用いて55サイクル行った。

10

【0222】

この方法を用いて、最小でQ17のクオリティーを有する全部で21のアラインメント（最大で2%までのエラーを許容する）を生成し、これは、DH10b配列の1391個のマッピングされた塩基に相当する。これらの配列決定の読み取りに含まれるのは、Q20のクオリティーについての基準を満たす18のアラインメント（1%のエラーのみを許容する）であって、これは956個のマッピングされた塩基に相当する。得られた最長のアラインメントは、Q20のクオリティーを有する109塩基であった（1%のエラー、この場合、1塩基不一致）。最長の完全マッピングの読み取り（すなわち、エラーなしの読み取り）は95塩基長であった。

20

【0223】

実施例7

「二重」ウォーキング

本実施例では、フォワードおよびリバースプライマーの両方が、最適な等温性増幅条件で局所変性しやすいブリーザブルPBSを有する。従って、各々のPBSは、新規な伸長されていないプライマーと再会合するための対応する傾向を有する。フォワードプライマーは、支持体上に固定され、従ってフォワードPBSは、第一のフォワードプライマーからの解離後に、第一のフォワードプライマーの近くに固定される第二の異なるフォワードプライマーと再ハイブリダイズし得る。同様に、リバースPBSは、第一の可溶性のリバースプライマーから解離して、第二の可溶性のリバースプライマーに再ハイブリダイズし、これが次に伸長される傾向がある。

30

【0224】

以下の増幅反応を行った。

【0225】

ハイブリダイゼーション：テンプレート、1 $\times$ SSPEt 緩衝液中で総濃度100 pM、および熱によって事前変性（95 $^{\circ}$ Cで3分間）し、氷上に保持した。12 μ lを各々のレーンに添加した。混合物を75 $^{\circ}$ Cに2分間、50 $^{\circ}$ Cに1分間、40 $^{\circ}$ Cに1分間、30 $^{\circ}$ Cに1分間、25 $^{\circ}$ Cに2分間供した。レーンを、0.1 $\times$ SSPEt（2 $\times$ 1 ml）で洗浄した。

40

【0226】

プライマー伸長：以下のマスター混合物を調製した：5 μ lの10 $\times$ NEB 緩衝液2；0.5 μ lの100 mMのdNTP；1 μ lのKlenow（NEB 5 u / μ l、M0212L）；43.5 μ lのdH₂O（全部で50 μ l）。12 uLの反応混合物を、全てのレーンに添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。レーンを2 $\times$ SSC + 0.1%のSDS、1 $\times$ TMAX（1 ml）で洗浄して、1 $\times$ NEB ThermoPol 緩衝液とともに60 $^{\circ}$ Cで40分間インキュベートして、2 $\times$ SSC + 0.1% SDS、1 $\times$ TMAX（1 ml）を用いて再度洗浄した。

【0227】

テンプレートウォーキング：以下のマスター混合物を調製した：10 μ lの10 $\times$ NE

50

B T h e r m o P o l B u f f e r ; 2 μ l の 1 0 0 m M の d N T P ; 5 0 μ l の 可溶性のプライマー P E ; 4 0 μ l の B s t (N E B 1 2 0 u / μ l) ; 4 7 μ l の d H ₂ O (全部で 1 0 0 μ l) 。 1 2 μ l の マスター混合物を各々のレーンに添加して、6 0 $^{\circ}$ C で 3 0 分間インキュベートした。1 2 μ l の上清を取り出して、1 : 1 0 0 に希釈し、5 μ l を T a q m a n アッセイに用いた。レーンを 2 $\times$ S S C + 0 . 1 % S D S 、 1 $\times$ T M A X (1 m l) で洗浄した。H i D i 洗浄液 (2 $\times$ 1 2 μ L 5 分間) 中で、レーンを 1 $\times$ T M A X (2 $\times$ 1 m l) で洗浄した。

【0228】

T a q M a n 反応のために、反応混合物は、1 0 μ l の T a q M a n F a s t U n i v e r s a l M a s t e r M i x , N o U N G ; 1 μ l の 2 0 $\times$ プライマープロープ混合物 ; 4 μ l の H ₂ O ; 5 μ l のストック溶液 (S t o c k s o l u t i o n) (全体で 2 0 μ l) を用いて調製した。この混合物を 9 5 $^{\circ}$ C (2 0 秒間) および 4 0 サーマサイクル (9 5 $^{\circ}$ C 3 秒、6 0 $^{\circ}$ C 3 0 秒) に、続いて、データ収集に供した。

【0229】

2 つのブリーザブルプライマー (固定された「フォワード」プライマーおよび可溶性の遠位「リバース」プライマー (下の表 2 では P e または P d と命名)) を用いる増幅は、1 つのブリーザブルプライマー単独を用いるよりも効果的であった。

【0230】

【表 2】

	Cq	上清	遊離	平均 コピー/ μ m ²
Pc 濃度 (uM)	0.8	20.2	14.9	334
Pd 濃度 (uM)	0.8	20.0	14.3	517
Pe 濃度 (uM)	0.2	10.0	11.4	3357
	0.3	8.3	11.4	3413
	0.4	7.9	11.3	3601
	0.5	7.8	10.9	4526

【0231】

当業者は、慣用的な実験程度を用いて、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、または解明できる。本発明の範囲は、上記の説明に限定されることを意図しない。

【0232】

本文脈から別途明らかである場合を除いて、なんらかの特徴が任意の他のものと組み合わせさせて特許請求されてもよいし、または別の特徴と組み合わせでは存在しないものとして特許請求されてもよい。ある特徴は、本発明を特徴付け得る情報の任意の 1 つである可能

性があり、または特許請求の範囲、例えば、任意の変化、工程、特徴、特性、組成物、方法、工程、程度、レベル、構成要素、材料、物質、要素、方式、変数、態様、測定値、量、選択肢、実施形態、条項、記述用語、特許請求の範囲の要素または制限を限定する可能性もある。

【0233】

一般には、本明細書に記載の特徴は、本明細書で必要であるとして明示されない限り、任意選択的であるものとする。本明細書においてある特徴が任意選択的とみなされることを示している言葉の非限定的な例は、「変形 (variation)」、「そこで (where)」、「その間に (while)」、「そのとき (when)」、「必要に応じて (optionally)」、「含む (include)」、「好ましい (preferred)」、「特別な (especial)」、「推奨される (recommended)」、「望ましい (advisable)」、「特別な (particular)」、「すべきである (should)」、「別の (alternative)」、「典型的な (typical)」、「代表的な (representative)」、「種々の (various)」、「例えば (such as)」、「など (the like)」、「できる (can)」、「し得る (may)」、「例 (example)」、「実施形態 (embodiment)」または「態様 (aspect)」、「ある場合には (in some)」、「例 (example)」、「例示的な (exemplary)」、「事例 (instance)」、「もし (if)」などの用語、またはこのような用語の任意の組み合わせおよび／もしくは変化が挙げられる。

【0234】

ある特徴が随意的であるというなんらかの指示は、任意選択的な特徴に関して、閉鎖された言葉または排他的な言葉またはネガティブな言葉を含む、特許請求の範囲に対して適切な支持を提供することを意図する（例えば、米国特許法第112条または欧州特許条約の83条および84条のもとで）。排他的な言葉は特に、特定の言及された特徴がなんらかの追加的な主題を含むことを排除する。例えば、Aが薬物Xであり得るということが示されるならば、このような言葉は、AがX単独からなること、またはAがX以外になんらかの薬物を含まないことを明示的に特定する特許請求項に対する支持を提供することを意図する。「ネガティブ」な言葉は、特許請求の範囲からその任意選択的な特徴自体を明示的に除外する。例えば、Aという要素がXを含む可能性があることが示される場合、この

【0235】

排他的またはネガティブな用語の非限定的な例としては、「唯一 (only)」、「単に (solely)」、「～からなる (consisting of)」、「本質的に～からなる (consisting essentially of)」、「単独 (alone)」、「なしで (without)」、「～の非存在下で (in the absence of)」（例えば、同じ種類、構造および／または機能の他の物品）、「～を除いて (excluding)」、「～を含まない (not including)」、「～ではない (not)」、「しない (doesn't)」、「できない (cannot)」またはこのような言葉の任意の組み合わせおよび／もしくは変化が挙げられる。

【0236】

同様に、「a」、「an」、「said」または「the」のような言及は、その文脈が他を示すのでない限り、単数および／または複数の両方の存在を支持することを意図する。例えば、「一匹のイヌ (a dog)」とは、1匹のイヌ、1匹より多くないイヌ、少なくとも1匹のイヌ、複数のイヌなどについての支持を含むものとする。単一性を示す限定用語の非限定的な例としては、「単一 (a single)」、「1つ (one)」、「単独 (alone)」、「1つだけ (only one)」、「1以下 (not more than one)」などが挙げられる。（潜在的にまたは实际的に）複数性を示す限定用語の非限定的な例としては、「少なくとも1つ」、「1つ以上の」、「2つ以上

の (more than one)」、「2つ以上の (two or more)」、「多数の」、「複数の」、「～の任意の組み合わせ」、「～の任意の順序」、「～の任意の1つ以上の」などが挙げられる。ある群の1つ以上のメンバーの間の「または (or)」を含む請求項または記述は、その文脈から逆またはそうでない証拠が示されない限り、その群のメンバーのうち1つ、2つ以上または全てが存在するか、使用されるか、そうでなければ、所与の生成物またはプロセスに関連する場合に満たされるものと考えられる。

【0237】

さらに、本発明が、本明細書に記載の任意の1つ以上の特徴の全ての変形、組み合わせ、および順列を包含することが理解されるべきである。任意の1つ以上の特徴は、特定の除外が本明細書に明らかに示されない場合でさえ、クレームから明らかに除外され得る。ある方法での使用のための試薬の開示は、当業者がそうではないと理解するのでない限り、本明細書に開示される特定の方法、または当該分野で公知の他の方法のいずれかによって、その試薬の使用に関与する方法と同義である（およびその方法に支持を提供する）ものとするのもまた理解されるべきである。さらに、本明細書および／または特許請求の範囲がある方法を開示する場合、本明細書に開示される試薬のうちいずれか1つ以上が、当業者がそうではないと理解するのでない限り、この方法で用いられ得る。

10

【0238】

本明細書で引用される全ての刊行物および特許は、本明細書に、あたかも各々の個々の刊行物または特許が参照によって援用されるように具体的かつ個々に示されるかのように参照によって援用される。G I Dまたはアクセッション番号によって参照される G e n b a n k の記録、特に任意のポリペプチド配列、ポリヌクレオチド配列またはそれらのアノテーションは、参照によって本明細書に援用される。任意の刊行物の引用は、出願日前のその開示に関してであり、本発明が、先行発明によってこのような公開に先行すると権利はないという承認として解釈されるべきではない。

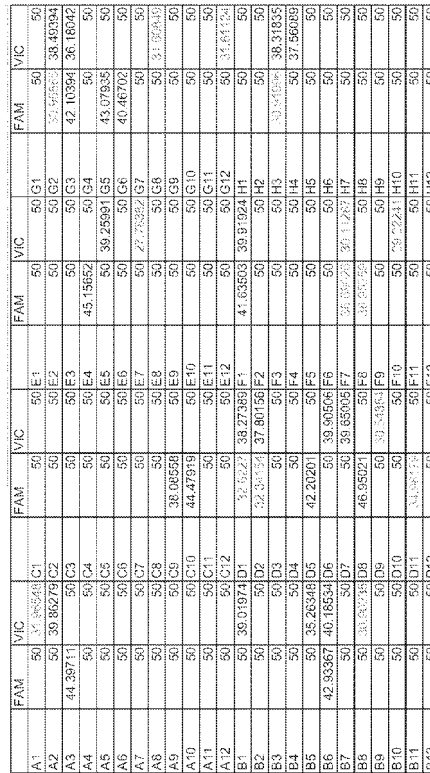
20

【0239】

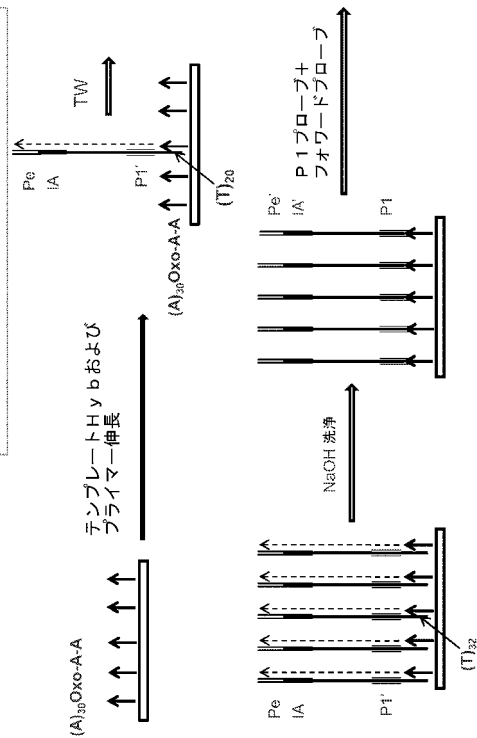
本明細書に範囲が示される場合、終末点は含まれる。さらに、他に示されず、文脈上および当業者の理解から他の証拠もない限り、範囲として表現される値は、文脈上明確に他を示すのでない限り、本発明の異なる実施形態における言及される範囲内の任意の特定の値または部分的な範囲を、その範囲の下限の単位の十分の一まで仮定し得ることが理解されるべきである。

30

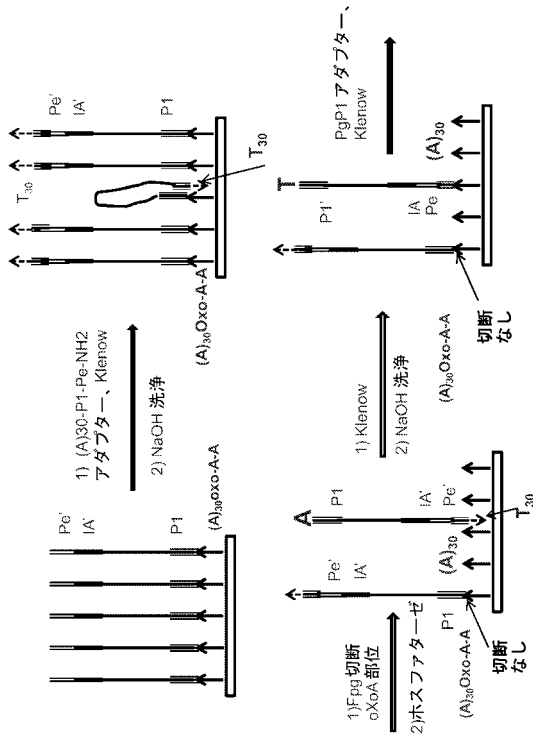
【 図 6 】



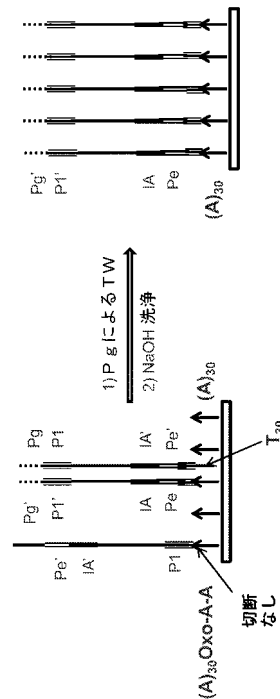
【图 8 A】



【図 8 B】



【図 8 C】



非切断鎖は、P g プライマーによる第二の TW では増幅されない。

【手続補正書】

【提出日】平成25年11月11日(2013.11.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プライマー伸長の方法であって、

a) 第一のプライマー分子（「第一のフォワードプライマー」）を、核酸鎖（「リバーズ鎖」）上の相補性プライマー結合配列（「リバーズ鎖 PBS」）に対してハイブリダイズさせる工程であって、第一のフォワードプライマーのヌクレオチド塩基の少なくとも 60% が、アデニン、チミンもしくはウラシルであるか、またはアデニン、チミンもしくはウラシルに対して相補性である、工程と、

b) 前記リバーズ鎖をテンプレートとして用いて、前記第一のフォワードプライマー分子を伸長することによって、前記リバーズ鎖の全長相補体であり、それに対してハイブリダイズされた伸長された第一のフォワード鎖を生成する工程と、

c) 第二のプライマー分子（「第二のフォワードプライマー」）を前記リバーズ鎖 PBS に対してハイブリダイズさせる工程であって、前記リバーズ鎖もまた、前記第一のフォワード鎖にハイブリダイズされている、工程と、

を含む、かつ

任意で、工程（b）および（c）を含む 1 以上の増幅サイクルによって、前記フォワード鎖を増幅する工程を含み、第一の増幅サイクルの工程（c）の前記第二のフォワードプライマーが、引き続く増幅サイクルの工程（b）の前記第一のフォワードプライマーであり

、かつリバース鎖のかなりの割合が、前記 1 以上の繰り返しの間中またはその間の全ての時点でフォワード鎖にハイブリダイズされている、方法。

【請求項 2】

a) 第一のリバースプライマー分子を、伸長されたフォワード鎖上の相補性リバースプライマー結合配列（「フォワード鎖 P B S」）に対してハイブリダイズさせる工程と；

b) 前記フォワード鎖をテンプレートとして用いてテンプレート依存性方式で前記第一のリバースプライマー分子を伸長することによって、前記フォワード鎖の全長相補体であり、それに対してハイブリダイズされた、伸長された第一のリバース鎖を、生成する工程と；

c) 第二のプライマー（「第二のリバースプライマー」）を、前記フォワード鎖 P B S に対してハイブリダイズさせる工程であって、前記フォワード鎖はまた、前記第一のリバース鎖に対してハイブリダイズされている、工程と、

によって前記リバース鎖を増幅することを含み、かつ

任意で、工程（b）～（c）の 1 以上の繰り返しによって前記リバース鎖を増幅することを含み、工程（c）の前記第二のリバースプライマーが、繰り返された工程（b）の前記第一のリバースプライマーであり、かつフォワード鎖のかなりの割合が、前記 1 以上の繰り返しの間中またはその間の全ての時点でリバース鎖に対してハイブリダイズされている

、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

全てのフォワードプライマーの T_m が、 50°C 、 55°C 、 60°C または 65°C 以下であり、かつ前記リバース鎖の T_m が、 95°C 、 90°C 、 85°C 、 80°C または 75°C 以上である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

増幅が、等温条件下で行われ、かつ

任意で、前記等温条件が、全てのフォワードプライマーの T_m より高いが、リバース鎖の T_m より低い温度に調節され、前記リバース鎖の T_m は、同一のリバース鎖のクローン集団における前記リバース鎖の半分が、その全長にわたって前記リバース鎖に完全にハイブリダイズされる完全に相補性の鎖から完全に変性される温度である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

一本鎖のテンプレート配列の固定されたクローンアンプリコンの局所的集団を生成する方法であって：

a) 前記一本鎖のテンプレート配列（「テンプレート 1」）を固定部位（「I S 1」）に結合する工程であって、I S 1 が、テンプレート 1 に対して実質的にハイブリダイズすることができる固定されたプライマー（「I S 1 プライマー」）の多重コピーを含み、テンプレート 1 が、I S 1 プライマーに対するハイブリダイゼーションによって I S 1 に対して結合される、工程と、

b) 溶液中で、I S 1 プライマーおよび非固定プライマー（「S P 1 プライマー」）を用いてテンプレート 1 を増幅する工程であって、前記一本鎖のテンプレート 1 に対して相補性である増幅された鎖が、一本鎖である場合、I S 1 上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできず、増幅によって、テンプレート 1 の I S 1 に対する最初のハイブリダイゼーションのポイントのまわりに固定されたクローンアンプリコンの局在化集団を生成する、工程とを含む、方法。

【請求項 6】

第一のテンプレート配列（「テンプレート 1」）および第二のテンプレート配列（「テンプレート 2」）の分離されかつ固定されたクローン集団を生成する方法であって、前記第一のおよび第二のテンプレート配列を増幅して、実質的に第一の固定部位（「I S 1」）に対して結合され、第二の固定部位（「I S 2」）には結合されないテンプレート 1 のクローンアンプリコンの集団、または実質的に I S 2 に結合され I S 1 には結合されないテンプレート 2 のクローンアンプリコンの集団を生成する工程を含み、

a) 両方のテンプレートおよび全てのアンプリコンは、同じ連続液相中に含まれ、前記連続液相が第一のおよび第二の固定部位（それぞれ、「I S 1」および「I S 2」）と接触し、かつ I S 1 および I S 2 が空間的に隔てられており、

b) テンプレート 1 は、一本鎖型である場合、第一のサブ配列（「T 1 - F O R」）を一端に含み、かつ第二のサブ配列（「T 1 - R E V」）をその反対の端に含み、

c) テンプレート 2 は、一本鎖型である場合、第一のサブ配列（「T 2 - F O R」）を一端に含み、かつ第二のサブ配列（「T 2 - R E V」）をその反対端に含み、

d) I S 1 は、T 1 および T 2 が一本鎖である場合、T 1 - F O R および T 2 - F O R に対して実質的にハイブリダイズできる固定された核酸プライマー（「I S 1 プライマー」）の多重コピーを含み、

e) I S 2 は、T 1 および T 2 が一本鎖である場合、T 1 - F O R および T 2 - F O R の両方に対して実質的にハイブリダイズできる固定されたプライマー（「I S 2 プライマー」）の多重コピーを含み、

f) T 1 - R E V のリバース相補体は、一本鎖である場合、I S 1 上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズすることができず、ただし、前記連続液相中の非固定プライマー（「S P 1」）に対して実質的にハイブリダイズでき、

g) T 2 - R E V のリバース相補体は、一本鎖である場合、I S 2 上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできず、ただし、前記連続液相中の非固定プライマー（「S P 2」）に対して実質的にハイブリダイズできる、方法。

【請求項 7】

第一のテンプレート配列（「テンプレート 1」）と第二のテンプレート配列（「テンプレート 2」）の分離されかつ固定されたクロン集団を生成する方法であって、前記第一のおよび第二のテンプレート配列を増幅する工程を含み、

a) 両方のテンプレートが、一本鎖型であり、かつ両方とも同じ連続液相中に含まれ、第一のおよび第二の固定部位（それぞれ、「I S 1」および「I S 2」）が前記連続液相と接触し、かつ I S 1 および I S 2 が空間的に隔てられており、

b) テンプレート 1 は、第一のサブ配列（「T 1 - F O R」）をその 3' 末端に、および T 1 - F O R と非重複性である第二のサブ配列（「T 1 - R E V」）をその 5' 末端に含み、

c) テンプレート 2 は、第一のサブ配列（「T 2 - F O R」）をその 3' 末端に、および T 2 - F O R と非重複性である第二のサブ配列（「T 2 - R E V」）をその 5' 末端に含み、

d) I S 1 は、T 1 - F O R および T 2 - F O R の両方に対してハイブリダイズできる、固定されたプライマー（「I S 1 プライマー」）を含み、

e) I S 2 は、T 1 - F O R および T 2 - F O R の両方に対してハイブリダイズできる、固定されたプライマー（「I S 2 プライマー」）を含み、

f) T 1 - R E V のリバース相補体は、I S 1 上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできず、かつ／または T 2 - R E V のリバース相補体は、I S 2 上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできないが、各々が、前記連続液相中の非固定プライマーに対して実質的にハイブリダイズでき、

それによって増幅が、実質的に I S 1 に対して結合するが I S 2 に対しては結合しないテンプレート 1 のクロンアンプリコンの集団、および／または実質的に I S 2 に対して結合するが I S 1 に対しては結合しないテンプレート 2 のクロンアンプリコンの集団をもたらす、方法。

【請求項 8】

前記一本鎖のテンプレートが、増幅される複数のインプット核酸配列（この配列は既知であっても未知であってもよい）を採用すること、ならびに第一のユニバーサルアダプター配列および第二のユニバーサルアダプター配列を、少なくとも 1 つのインプット核酸の末端上に追加することによって生成され、前記第一のユニバーサルアダプター配列が、I S 1 プライマーおよび／または I S 2 プライマーに対してハイブリダイズし、かつ前記第

二のユニバーサルアダプター配列のリバース相補体が少なくとも1つの非固定プライマーに対してハイブリダイズする、請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

2つの異なる固定部位が、

a) 単一支持体の空間的に隔てられているサブコンポーネントであり、

b) 異なる接続されていない支持体上であり、かつ

任意で、前記支持体が、三次元のマトリックスを形成し、かつ前記2つの異なる固定部位が完全には重複しない前記支持体の2つの異なる三次元の部分であるか、または前記2つの異なる固定部位が異なる支持体上である、

請求項1～8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

各々の固定部位が分離されたビーズであり、各々のビーズが、増幅後のアンプリコンのクローン集団を含み、各々のビーズが、アレイの分離されたウェルに分配され、かつ合成による配列が行われ、かつ

任意で、前記アレイが大規模FETアレイである、請求項1～9のいずれかに記載の使用。

【請求項11】

前記プライマー伸長が、1つ以上の検出可能標識（例えば、蛍光標識または放射性標識）の伸長された固定された核酸鎖への組み込みをもたらし、請求項1～10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】

核酸分子またはその一部を遊離するように1つ以上の伸長された固定された核酸鎖を処理する工程をさらに含み、任意で、前記処理する工程が、制限エンドヌクレアーゼを用いるか、またはリボザイムを用いる切断からなる、請求項1～11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】

前記プライマーのうちの1つ以上が、制限エンドヌクレアーゼ認識部位もしくはリボザイム認識部位を有するか、またはこのような部位の一部を有し、この一部は、プライマー伸長が起きると、完全になる、請求項1～12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】

複数の異なる核酸配列を増幅するための方法であって、

前記異なる核酸配列が各々、第一のおよび第二の核酸アダプター配列を備え、前記第一のおよび第二の核酸アダプター配列が、前記各々の異なる核酸配列について同じであるか、または前記異なる核酸配列が各々、異なるタグを備え、その結果前記異なる配列がお互いから識別され得る、請求項1～13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

表面上の1つ以上の別個のエリアの形態における複数の固定された核酸であって、各々のエリアが、複数の同一の核酸鎖、および複数の同一のそれに対してハイブリダイズした相補鎖を含み、このようなエリア内の各々の核酸鎖は、その鎖の長さのある距離内の表面上に別の核酸鎖が配置されるように配置されており、任意で、前記核酸が固定される表面の1mm²あたりに少なくとも1つの別個のエリアが存在する、核酸。

【請求項16】

少なくとも1つのリバース核酸鎖と、少なくとも1つの支持体上に必要に応じて固定された複数のフォワードプライマーと、必要に応じて溶液中の複数のリバースプライマーと、ポリメラーゼと、のうちのいずれか1つまたはいずれかのサブセットまたは全てを含み、かつ核酸鎖（「リバース鎖」）のクローン集団を含む、組成物であって、必要に応じて各々のクローン集団の個々のリバース鎖が、低融点（例えば、ブリーザブル（breathable））プライマー結合配列を3'末端に、および／または低融点プライマー配列を5'末端に含む、組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0003
【補正方法】変更
【補正の内容】
【0003】

要旨

核酸増幅および／または分析の方法、試薬および生成物が本明細書に示される。増幅は、固定されたプライマーおよび／または可溶性のプライマーを利用し得る。本明細書に提供される方法から生成されたアンプリコンは、さらなる分析、例えば、配列決定のために適切な基質である。

[本発明1001]

プライマー伸長の方法であって、

a) 第一のプライマー分子（「第一のフォワードプライマー」）を、核酸鎖（「リバー
ス鎖」）上の相補性プライマー結合配列（「リバーズ鎖 P B S」）に対してハイブリダイ
ズさせる工程であって、第一のフォワードプライマーのヌクレオチド塩基の少なくとも60
％が、アデニン、チミンもしくはウラシルであるか、またはアデニン、チミンもしくはウ
ラシルに対して相補性である、工程と、

b) 前記リバーズ鎖をテンプレートとして用いて、前記第一のフォワードプライマー分
子を伸長することによって、前記リバーズ鎖の全長相補体であり、それに対してハイブリ
ダイズされた伸長された第一のフォワード鎖を生成する工程と、

c) 第二のプライマー分子（「第二のフォワードプライマー」）を前記リバーズ鎖 P B
S に対してハイブリダイズさせる工程であって、前記リバーズ鎖もまた、前記第一のフォ
ワード鎖にハイブリダイズされている、工程と、

を含む、方法。

[本発明1002]

工程（b）および（c）を含む1以上の増幅サイクルによって、前記フォワード鎖を増
幅する工程を含み、第一の増幅サイクルの工程（c）の前記第二のフォワードプライマー
が、引き続き増幅サイクルの工程（b）の前記第一のフォワードプライマーであり、かつ
リバーズ鎖のかかなりの割合が、前記1以上の繰り返しの間中またはその間の全ての時点で
フォワード鎖にハイブリダイズされている、本発明1001の方法。

[本発明1003]

リバーズ鎖の前記かなりの割合が、リバーズ鎖の少なくとも30％、40％、50％、60％、
65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％または99％である、本発明1001～1002のい
ずれかの方法。

[本発明1004]

a) 第一のリバーズプライマー分子を、伸長されたフォワード鎖上の相補性リバー
スプライマー結合配列（「フォワード鎖 P B S」）に対してハイブリダイズさせる工程と；

b) 前記フォワード鎖をテンプレートとして用いてテンプレート依存性方式で前記第
一のリバーズプライマー分子を伸長することによって、前記フォワード鎖の全長相補体であ
り、それに対してハイブリダイズされた、伸長された第一のリバーズ鎖を、生成する工程
と；

c) 第二のプライマー（「第二のリバーズプライマー」）を、前記フォワード鎖 P B S
に対してハイブリダイズさせる工程であって、前記フォワード鎖はまた、前記第一のリバ
ース鎖に対してハイブリダイズされている、工程と、

によって前記リバーズ鎖を増幅することを含む、本発明1001～1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

工程（b）～（c）の1以上の繰り返しのことによって前記リバーズ鎖を増幅することを含
み、工程（c）の前記第二のリバーズプライマーが、繰り返された工程（b）の前記第一
のリバーズプライマーであり、かつフォワード鎖のかかなりの割合が、前記1以上の繰り返
しの間中またはその間の全ての時点でリバーズ鎖に対してハイブリダイズされている、本発

明1004の方法。

[本発明1006]

リバース鎖の前記かなりの割合が、リバース鎖の少なくとも30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%である、本発明1001~1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

前記第一のおよび／または第二のフォワードプライマーが、単一の支持体に対して固定されるか、あるいは前記第一のおよび／または第二のリバースプライマーが単一の支持体に対して固定される、本発明1001~1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

所望の数の増幅サイクルを行った後に、リバース鎖から前記伸長されたフォワード鎖を完全に分離する工程と、必要に応じて、分離されたリバース鎖の存在から分離されたフォワード鎖を取り除く工程、またはその逆の工程と、をさらに含む、本発明1001~1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

1以上の増幅サイクルの間に、全ての核酸試薬が、リコンビナーゼとも、逆転写酵素とも、ヘリカーゼとも、ニッキング酵素とも、ポリメラーゼではない任意の他の酵素とも、いかなる時点でも接触しない、本発明1001~1008のいずれかの方法。

[本発明1010]

リバース鎖をテンプレートとして用いるフォワードプライマーのテンプレート依存性伸長が、前記リバース鎖に対して既にハイブリダイズされた別のフォワード鎖の置換をもたらす、本発明1001~1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

全てのフォワードプライマーのT_mが、50℃、55℃、60℃または65℃以下であり、かつ前記リバース鎖のT_mが、95℃、90℃、85℃、80℃または75℃以上である、本発明1001~1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

増幅が、等温条件下で行われる、本発明1001~1011のいずれかの方法。

[本発明1013]

前記等温条件が、全てのフォワードプライマーのT_mより高いが、リバース鎖のT_mより低い温度に調節され、前記リバース鎖のT_mは、同一のリバース鎖のクロン集団における前記リバース鎖の半分が、その全長にわたって前記リバース鎖に完全にハイブリダイズされる完全に相補性の鎖から完全に変性される温度である、本発明1001~1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

前記第一および第二のフォワードプライマーが、同じ支持体に隣接して固定されており、それによって増幅が、伸長されたフォワード鎖の固定されたクロン集団を生成する、本発明1001~1013のいずれかの方法。

[本発明1015]

前記第一および第二のフォワードプライマーが、同じ支持体に隣接して固定されており、それによって増幅が、伸長されたフォワード鎖の固定されたクロン集団を生成する、本発明1001~1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

複数のテンプレート核酸が、空間的に隔てられた固定部位に対して個々にハイブリダイズされ、それによって増幅が、個々のテンプレート核酸に対応する空間的に隔てられたクロン集団を生成する、本発明1001~1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

変性が非酵素性である、本発明1001~1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

少なくとも1つのリバース核酸鎖と、少なくとも1つの支持体上に必要に応じて固定され

た複数のフォワードプライマーと、必要に応じて溶液中の複数のリバースプライマーと、ポリメラーゼと、のうちのいずれか1つまたはいずれかのサブセットまたは全てを含む組成物。

[本発明1019]

前記フォワードプライマーおよび／またはリバースプライマーが、低融点であるか、または少なくとも60%のアデニン、チミンもしくはウラシル塩基、またはアデニン、チミンもしくはウラシルに対して相補性の塩基を有する、本発明1018の組成物。

[本発明1020]

核酸鎖（「リバース鎖」）のクローン集団を含み、必要に応じて各々のクローン集団の個々のリバース鎖が低融点（例えば、ブリーザブル（breathable））プライマー結合配列を、3'末端に、および／または低融点プライマー配列を5'末端に含む、本発明1018～1019のいずれかの組成物。

[本発明1021]

前記リバース鎖の5'部分もしくは末端上の前記低融点プライマー配列に対して実質的に同一である、複数のリバースプライマー、および／または前記リバース鎖の3'部分もしくは末端上の前記低融点プライマー結合配列に対して実質的に相補性である、複数のフォワードプライマーを含む、本発明1018～1020のいずれかの組成物。

[本発明1022]

伸長されていないフォワードプライマーよりも長く、かつ必要に応じて1つ以上のリバース鎖の全長相補体である、1つ以上の伸長されたフォワード鎖をさらに含む、本発明1018～1021のいずれかの組成物。

[本発明1023]

1つ以上の伸長されたフォワード鎖が、相補性リバース鎖にハイブリダイズされ、前記リバース鎖も必要に応じてまた、別の異なるフォワードプライマーに対して、または必要に応じて前記リバース鎖の全長未満の相補体である異なるフォワード鎖に対してハイブリダイズされる、本発明1022の組成物。

[本発明1024]

一本鎖のテンプレート配列の固定されたクローンアンプリコンの局所的集団を生成する方法であって：

a) 前記一本鎖のテンプレート配列（「テンプレート1」）を固定部位（「IS1」）に結合する工程であって、IS1が、テンプレート1に対して実質的にハイブリダイズすることができる固定されたプライマー（「IS1プライマー」）の多重コピーを含み、テンプレート1が、IS1プライマーに対するハイブリダイゼーションによってIS1に対して結合される、工程と、

b) 溶液中で、IS1プライマーおよび非固定プライマー（「SP1プライマー」）を用いてテンプレート1を増幅する工程であって、前記一本鎖のテンプレート1に対して相補性である増幅された鎖が、一本鎖である場合、IS1上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできない工程と、を含み、増幅によって、テンプレート1のIS1に対する最初のハイブリダイゼーションのポイントのまわりに固定されたクローンアンプリコンの局在化集団を生成する、方法。

[本発明1025]

第一のテンプレート配列（「テンプレート1」）および第二のテンプレート配列（「テンプレート2」）の分離されかつ固定されたクローン集団を生成する方法であって、前記第一のおよび第二のテンプレート配列を増幅して、実質的に第一の固定部位（「IS1」）に対して結合され、第二の固定部位（「IS2」）には結合されないテンプレート1のクローンアンプリコンの集団、または実質的にIS2に結合されIS1には結合されないテンプレート2のクローンアンプリコンの集団を生成する工程を含み、

a) 両方のテンプレートおよび全てのアンプリコンは、同じ連続液相中に含まれ、前記連続液相が第一のおよび第二の固定部位（それぞれ、「IS1」および「IS2」）と接触し、かつIS1およびIS2が空間的に隔てられており、

b) テンプレート1は、一本鎖型である場合、第一のサブ配列（「T1-FOR」）を一端に含み、かつ第二のサブ配列（「T1-REV」）をその反対の端に含み、

c) テンプレート2は、一本鎖型である場合、第一のサブ配列（「T2-FOR」）を一端に含み、かつ第二のサブ配列（「T2-REV」）をその反対端に含み、

d) IS1は、T1およびT2が一本鎖である場合、T1-FORおよびT2-FORに対して実質的にハイブリダイズできる固定された核酸プライマー（「IS1プライマー」）の多重コピーを含み、

e) IS2は、T1およびT2が一本鎖である場合、T1-FORおよびT2-FORの両方に対して実質的にハイブリダイズできる固定されたプライマー（「IS2プライマー」）の多重コピーを含み、

f) T1-REVのリバース相補体は、一本鎖である場合、IS1上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズすることができず、ただし、前記連続液相中の非固定プライマー（「SP1」）に対して実質的にハイブリダイズでき、

g) T2-REVのリバース相補体は、一本鎖である場合、IS2上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできず、ただし、前記連続液相中の非固定プライマー（「SP2」）に対して実質的にハイブリダイズできる、方法。

[本発明1026]

第一のテンプレート配列（「テンプレート1」）と第二のテンプレート配列（「テンプレート2」）の分離されかつ固定されたクローン集団を生成する方法であって、前記第一のおよび第二のテンプレート配列を増幅する工程を含み、

a) 両方のテンプレートが、一本鎖型であり、かつ両方とも同じ連続液相中に含まれ、第一のおよび第二の固定部位（それぞれ、「IS1」および「IS2」）が前記連続液相と接触し、かつIS1およびIS2が空間的に隔てられており、

b) テンプレート1は、第一のサブ配列（「T1-FOR」）をその3'末端に、およびT1-FORと非重複性である第二のサブ配列（「T1-REV」）をその5'末端に含み、

c) テンプレート2は、第一のサブ配列（「T2-FOR」）をその3'末端に、およびT2-FORと非重複性である第二のサブ配列（「T2-REV」）をその5'末端に含み、

d) IS1は、T1-FORおよびT2-FORの両方に対してハイブリダイズできる、固定されたプライマー（「IS1プライマー」）を含み、

e) IS2は、T1-FORおよびT2-FORの両方に対してハイブリダイズできる、固定されたプライマー（「IS2プライマー」）を含み、

f) T1-REVのリバース相補体は、IS1上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできず、かつ／またはT2-REVのリバース相補体は、IS2上のプライマーに対して実質的にハイブリダイズできないが、各々が、前記連続液相中の非固定プライマーに対して実質的にハイブリダイズでき、

それによって増幅が、実質的にIS1に対して結合するがIS2に対しては結合しないテンプレート1のクローンアンプリコンの集団、および／または実質的にIS2に対して結合するがIS1に対しては結合しないテンプレート2のクローンアンプリコンの集団をもたらす、方法。

[本発明1027]

増幅の間のいくつかの時点で、非固定核酸分子を混合することが、前記連続液相中で実質的に遅延されない、本発明1001～1026のいずれかの方法。

[本発明1028]

増幅の間に、混合することが一定期間実質的に遅延されず、かつ必要に応じて増幅の全期間の間実質的に遅延されない、本発明1027の方法。

[本発明1029]

1つの固定部位から解離された任意の核酸が、両方の固定部位に対して実質的にハイブリダイズ可能であり、かつ別の固定部位に対する前記解離された核酸の任意の動き（例えば、拡散、対流による動き）が、前記連続液相中で実質的に遅延されない、本発明1027の方法。

[本発明1030]

前記連続液相が、I S1およびI S2と同時に接触している、本発明1001～1029のいずれかの方法。

[本発明1031]

固定されたプライマーによって結合されるテンプレートの第一の部分が、前記テンプレートの第二の部分と重複せず、その相補体が非固定プライマーによって結合されている、本発明1001～1030のいずれかの方法。

[本発明1032]

増幅されるべき少なくとも1つのテンプレートが、インプット核酸から、前記核酸が少なくとも1つの固定部位に接触して配置された後に、生成される、本発明1001～1031のいずれかの方法。

[本発明1033]

a) 固定されたプライマーを含んでいる支持体を一本鎖の核酸テンプレートと接触させる工程と、

b) 第一の固定されたプライマーを前記テンプレート上のプライマー結合配列 (P B S) に対してハイブリダイズさせる工程と、

c) テンプレート依存性伸長において前記ハイブリダイズされた第一のプライマーを伸長して、テンプレートに対して相補性であり、かつ前記テンプレートに対して少なくとも部分的にハイブリダイズされた伸長された鎖を形成する工程と、

d) 前記P B Sの少なくとも一部が一本鎖型 (「遊離部分」) であるように、前記伸長された相補鎖から前記テンプレートを部分的に変性させる工程と、

e) 前記遊離部分を、伸長されていない、固定された第二のプライマーに対してハイブリダイズさせる工程と、

f) テンプレート依存性伸長において前記第二のプライマーを伸長して、前記テンプレートに対して相補性である伸長された鎖を形成する工程と、

g) 必要に応じて、前記アニーリングされた伸長された固定された核酸鎖をお互いから分離する工程と、

を含む、本発明1001～1032のいずれかの方法。

[本発明1034]

a) 増幅の間、開始テンプレートおよび／または増幅された鎖を含んでいる核酸二重鎖が形成され、

b) かなりの数の二重鎖の完全な変性を生じる条件に対して、増幅の間にこの二重鎖が供されない、

本発明1001～1033のいずれかの方法。

[本発明1035]

前記一本鎖のテンプレートが、増幅される複数のインプット核酸配列 (この配列は既知であっても未知であってもよい) を採用すること、ならびに第一のユニバーサルアダプター配列および第二のユニバーサルアダプター配列を、少なくとも1つのインプット核酸の末端上に追加することによって生成され、前記第一のユニバーサルアダプター配列が、I S1プライマーおよび／またはI S2プライマーに対してハイブリダイズし、かつ前記第二のユニバーサルアダプター配列のリバース相補体が少なくとも1つの非固定プライマーに対してハイブリダイズする、本発明1001～1034のいずれかの方法。

[本発明1036]

前記第一および第二の核酸配列が、前記一本鎖のテンプレート配列の第一および第二の末端で提供される、本発明1001～1035のいずれかの方法。

[本発明1037]

タグもまた、所与の核酸配列に対して付加され、前記タグが、前記所与の核酸配列の増幅産物を特定することを可能にする、本発明1001～1036のいずれかの方法。

[本発明1038]

少なくとも1つの固定部位上の全てのプライマーが同じ配列を有する、本発明1001～103

7のいずれかの方法。

[本発明1039]

固定部位が、少なくとも2つの異なる配列を有する複数のプライマーを含む、本発明1001～1038のいずれかの方法。

[本発明1040]

前記異なる種類のプライマーが、お互いに実質的に同じ濃度で存在する、本発明1016の方法。

[本発明1041]

少なくとも1つの固定部位の前記プライマーが実質的に、固定部位にわたって均一に分散している、本発明1001～1040のいずれかの方法。

[本発明1042]

2つの異なる固定部位が、

a) 単一支持体の空間的に隔てられているサブコンポーネントであり、

b) 異なる接続されていない支持体上である、

本発明1001～1041のいずれかの方法。

[本発明1043]

前記支持体が、三次元のマトリックスを形成し、かつ前記2つの異なる固定部位が、完全には重複しない前記支持体の2つの異なる三次元の部分である、本発明1019の方法。

[本発明1044]

前記2つの異なる固定部位が、完全には重複しない支持体の表面上の2つの異なるエリアである、本発明1019の方法。

[本発明1045]

前記2つの異なる固定部位が異なる支持体上である、本発明1019の方法。

[本発明1046]

前記2つの異なる支持体がビーズ型である、本発明1022の方法。

[本発明1047]

少なくとも1つの固定部位が、前記支持体の表面全体または前記支持体の容積全体を含む、本発明1022または1023の方法。

[本発明1048]

前記2つの異なる固定部位が、予め決定された割付で（例えば、グリッドパターンで）配置されている、本発明1001～1047のいずれかの方法。

[本発明1049]

ヌクレオチドおよび核酸ポリメラーゼの供給を用いてプライマーを伸長する、本発明1001～1048のいずれかの方法。

[本発明1050]

加熱することを用いて、アニーリングされた核酸鎖を部分的に分離する、本発明1001～1049のいずれかの方法。

[本発明1051]

前記核酸ポリメラーゼが、アニーリングされた核酸鎖を部分的に分離するために用いられる加熱条件によって不活性にされることがない、本発明1026に従属した場合の本発明1027の方法。

[本発明1052]

前記核酸ポリメラーゼが、Taqポリメラーゼであるか、好熱性生物由来である別のポリメラーゼであるか；またはそれらの熱安定性誘導体である、本発明1028の方法。

[本発明1053]

前記プライマー伸長が、1つ以上の検出可能標識（例えば、蛍光標識または放射性標識）の伸長された固定された核酸鎖への組み込みをもたらす、本発明1001～1052のいずれかの方法。

[本発明1054]

1つ以上の伸長された固定された核酸鎖を処理して、それによって核酸分子またはその

一部を遊離する工程をさらに含む、本発明1001～1053のいずれかの方法。

[本発明1055]

前記処理する工程が、制限エンドヌクレアーゼを用いるか、またはリボザイムを用いる切断からなる、本発明1031の方法。

[本発明1056]

前記プライマーのうちの1つ以上が、制限エンドヌクレアーゼ認識部位もしくはリボザイム認識部位を有するか、またはこのような部位の一部を有し、この一部は、プライマー伸長が起きると、完全になる、本発明1001～1055のいずれかの方法。

[本発明1057]

核酸増幅の繰り返しサイクルを可能にするように自動化されている、本発明1001～1056のいずれかの方法。

[本発明1058]

複数の異なる核酸配列を増幅するよう用いられる、本発明1001～1057のいずれかの方法。

[本発明1059]

複数の異なる核酸配列を同時に増幅するよう用いられる、本発明1035の方法。

[本発明1060]

前記異なる核酸配列が各々、本発明1003～1005のいずれかのような第一のおよび第二の核酸配列を提供され、前記第一および第二の核酸配列が、前記各々の異なる核酸配列について同じである、本発明1035または1036の方法。

[本発明1061]

前記異なる核酸配列が各々、異なるタグを提供され、その結果前記異なる配列をお互いから識別することができる、本発明1035～1037のいずれかの方法。

[本発明1062]

本発明1001～1061のいずれかの方法によって産生可能である、複数の固定された核酸。

[本発明1063]

表面上の1つ以上の別個のエリアの形態における複数の固定された核酸であって、各々のエリアが、複数の同一の核酸鎖、および複数の同一のそれに対する相補鎖を含み、このようなエリア内の各々の核酸鎖は、その鎖の長さのある距離内の表面上に別の核酸鎖が配置されるように配置されている、核酸。

[本発明1064]

前記核酸が固定される表面の1mm²あたりに少なくとも1つの別個のエリアが存在する、本発明1039または本発明1040の複数の固定された核酸。

[本発明1065]

前記核酸が固定される表面の1mm²あたりの別個のエリアの数が、1より大きいか、10²より大きいか、10³より大きいか、または10⁴より大きい、本発明1041の複数の固定された核酸。

[本発明1066]

配列決定のための核酸分子を提供することにおける、本発明1001～1065のいずれかの方法の使用、または本発明1039～1042のいずれかの複数の固定された核酸分子の使用。

[本発明1067]

配列決定することは、一本鎖の核酸分子に対してハイブリダイズされた配列決定プライマーを伸長すること、およびプライマー伸長に用いられるヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを検出することによって行われる、本発明1043の使用。

[本発明1068]

前記配列決定プライマーが、少なくとも1つの固定プライマーと同じ配列のうちの少なくとも1つに対してハイブリダイズする、本発明1044の使用。

[本発明1069]

前記配列決定プライマーが、前記固定プライマーと同じ配列を有する、本発明1044の使用。

[本発明1070]

前記ヌクレオチドの全てのまたは少なくともいくつかは、標識されたヌクレオチドである、本発明1043～1046のいずれかの使用。

[本発明1071]

前記標識されたヌクレオチドの全てが、同じ標識を有する、本発明1047の使用。

[本発明1072]

前記標識されたヌクレオチドが蛍光標識されている、本発明1047または本発明1048の使用。

[本発明1073]

標識されたおよび標識されていないヌクレオチドの混合物が用いられる、本発明1047～1049のいずれかの使用。

[本発明1074]

配列決定が、前記配列決定プライマーに対して、隣接してハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドを連結することにより、一本鎖の核酸分子に対してハイブリダイズされた配列決定プライマーを伸長することによって、行われる、本発明1043の使用。

[本発明1075]

前記配列決定プライマーが、少なくとも1つの固定プライマーと同じ配列のうちの少なくとも1つに対してハイブリダイズする、本発明1051の使用。

[本発明1076]

前記配列決定プライマーが、前記固定プライマーと同じ配列を有する、本発明1051の使用。

[本発明1077]

前記オリゴヌクレオチドの全てまたは少なくともいくつかは標識されている、本発明1051～1053のいずれかの使用。

[本発明1078]

前記標識されたオリゴヌクレオチドが全て同じ標識を有するわけではない、本発明1054の使用。

[本発明1079]

前記標識されたヌクレオチドが蛍光標識されている、本発明1054または本発明1055の使用。

[本発明1080]

標識されたおよび標識されていないオリゴヌクレオチドの混合物が用いられる、本発明1054～1056のいずれかの使用。

[本発明1081]

前記配列決定することが、少なくとも2つの異なる別個のエリアに存在する核酸分子の並行な配列決定である、本発明1001～1080のいずれかの使用。

[本発明1082]

前記配列決定することが、10を超える異なる別個のエリアに存在する核酸分子の並行な配列決定である、本発明1058の使用。

[本発明1083]

前記配列決定することが、100を超える異なる別個のエリアに存在する核酸分子の並行な配列決定である、本発明1043～1059のいずれかの使用。

[本発明1084]

前記配列決定することが、1000を超える異なる別個のエリアに存在する核酸分子の並行な配列決定である、本発明1043～1060のいずれかの使用。

[本発明1085]

前記配列決定することが、1000000を超える異なる別個のエリアに存在する核酸分子の並行な配列決定である、本発明1043～1061のいずれかの使用。

[本発明1086]

複数の異なる配列が並行して決定される、本発明1043～1062のいずれかの使用。

[本発明1087]

診断のための増幅された核酸分子の提供における、本発明1001～1038のいずれかの方法の使用、または本発明1043～1063のいずれかの複数の固定された核酸分子の使用。

[本発明1088]

スクリーニングのための増幅された核酸分子の提供における、本発明1001～1038のいずれかの方法の使用、または本発明1043～1063のいずれかの複数の固定された核酸分子の使用。

[本発明1089]

他の構成要素のための支持体として用いられる増幅された核酸分子を提供することにおける、本発明1001～1038のいずれかの方法の使用、または本発明1043～1063のいずれかの複数の固定された核酸分子の使用。

[本発明1090]

追加の核酸分子を（固定型ではなく）遊離型で生成することにおける、本発明1001～1038のいずれかの方法の使用、または本発明1043～1063のいずれかの複数の固定された核酸分子の使用。

[本発明1091]

遺伝子発現をモニタリングすることにおける、本発明1001～1038のいずれかの方法の使用、または本発明1043～1063のいずれかの複数の固定された核酸分子の使用。

[本発明1092]

まれに発現される遺伝子産物を用いて核酸分子を特定することにおける、本発明1001～1038のいずれかの方法の使用、または本発明1043～1063のいずれかの複数の固定された核酸分子の使用。

[本発明1093]

ヘテロ接合性個体の特定における、本発明1001～1038のいずれかの方法の使用、または本発明1043～1063のいずれかの複数の固定された核酸分子の使用。

[本発明1094]

核酸のフィンガープリンティングにおける、本発明1001～1038のいずれかの方法の使用、または本発明1043～1063のいずれかの複数の固定された核酸分子の使用。

[本発明1095]

複数の固定されたプライマー、核酸ポリメラーゼ、複数のヌクレオチドおよびアニーリングされた核酸鎖を部分的に分離するための手段を含む、本発明1001～1038のいずれかの方法を行うための装置。

[本発明1096]

前記アニーリングされた核酸鎖を分離するための手段が、制御された加熱手段を含む、本発明1072の装置。

[本発明1097]

反応物質の供給源と、前記反応物質が前記核酸分子に適用された後に生成された1つ以上のシグナルを検出するための検出手段とを含む、本発明1043～1063のいずれかの複数の核酸分子を分析するための装置。

[本発明1098]

前記検出手段は、本発明1001～1097のいずれかに言及される前記別個のエリアの間で識別するために十分な分解能を有する、本発明1074の装置。

[本発明1099]

電荷結合素子（CCD）を含んでいる、本発明1072～1075のいずれかの装置。

[本発明1100]

前記電荷結合素子（CCD）が画像形成デバイスと作動可能に接続されている、本発明1076の装置。

[本発明1101]

各々の固定部位が分離されたビーズであり、各々のビーズが、増幅後のアンプリコンのクローン集団を含み、各々のビーズが、アレイの分離されたウェルに分配され、かつ合成

による配列が行われる、本発明1043～1046のいずれかの使用。

[本発明1102]

前記アレイが大規模 F E T アレイである、本発明1078の使用。

[本発明1103]

伸長生成物へのヌクレオチドの組み込みが、p Hまたはイオンまたは電流の変化を測定することによって検出される、本発明1079の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/065535

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68

ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/60919 A2 (NANOGEN BECTON DICKINSON PARTN [US]; NERENBERG MICHAEL I [US]; EDMAN C) 19 October 2000 (2000-10-19)	1-65, 95-100
Y	page 13, lines 21-28; page 17, lines 24-29; page 19, lines 25-32; pages 35-36; page 39, lines 7-17; figures	1-103
X	WO 02/46456 A1 (APPLIED RESEARCH SYSTEMS [NL]; MAYER PASCAL [FR]) 13 June 2002 (2002-06-13)	1,18, 24-26, 62,63, 95-100
Y	examples, claims and figures	1-103
	----- -/--	

☒ 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

22 June 2012

Date of mailing of the international search report

04/07/2012

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

Hennard, Christophe

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/065535

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/102878 A2 (NUGEN TECHNOLOGIES INC [US]; KURN NURITH [US]) 20 August 2009 (2009-08-20)	1-67, 70-72, 77,79, 81,82, 87, 89-92, 95-100 1-103
Y	page 3, [0009]; page 5, lines 15-17, 27-30; page 16, [0080]; examples, claims; figures -----	
X	WO 2006/099579 A2 (APPLERA CORP [US]; WOUDENBERG TIMOTHY M [US]; HEINER CHERYL [US]; NORD) 21 September 2006 (2006-09-21)	1,18-26, 62-66
Y	figures; claims; page 2, [0008]; page 6, [0022]; page 8, [0024]; page 12, [0030]; page 21, [0047] -----	1-103
X	WO 02/072772 A2 (NUGEN TECHNOLOGIES INC [US]; KURN NURITH [US]) 19 September 2002 (2002-09-19)	18-23, 62-66
Y	claims 1-7; figure 8b; pages 51-64 -----	1-103
X	EP 1 275 737 A2 (ENZO LIFE SCIENCES INC [US]) 15 January 2003 (2003-01-15)	1,18-23, 62-66
Y	figures 21-25; page 45; page 73 -----	1-103

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/065535

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0060919	A2	19-10-2000	AT 335848 T 15-09-2006 CA 2369148 A1 19-10-2000 DE 60029961 T2 01-03-2007 EP 1192720 A2 03-04-2002 JP 2003510012 A 18-03-2003 US 6531302 B1 11-03-2003 US 2003219804 A1 27-11-2003 WO 0060919 A2 19-10-2000
WO 0246456	A1	13-06-2002	AR 031640 A1 24-09-2003 AU 1916102 A 18-06-2002 BG 107861 A 30-07-2004 BR 0116033 A 07-10-2003 CA 2430369 A1 13-06-2002 CN 1489632 A 14-04-2004 CZ 20031582 A3 15-10-2003 EE 200300256 A 15-08-2003 EP 1339877 A1 03-09-2003 HU 0302803 A2 28-11-2003 JP 2004524012 A 12-08-2004 MX PA03005078 A 05-09-2003 NO 20032455 A 05-08-2003 PL 363742 A1 29-11-2004 SK 6952003 A3 11-09-2003 US 2004096853 A1 20-05-2004 US 2011008781 A1 13-01-2011 WO 0246456 A1 13-06-2002 ZA 200304102 A 23-06-2004
WO 2009102878	A2	20-08-2009	EP 2247727 A2 10-11-2010 EP 2250283 A2 17-11-2010 WO 2009102878 A2 20-08-2009 WO 2009102896 A2 20-08-2009
WO 2006099579	A2	21-09-2006	US 2006269934 A1 30-11-2006 US 2009325184 A1 31-12-2009 WO 2006099579 A2 21-09-2006
WO 02072772	A2	19-09-2002	AT 361996 T 15-06-2007 AU 2002252279 B2 12-05-2005 BR 0205268 A 30-11-2004 CA 2416963 A1 19-09-2002 CN 1473202 A 04-02-2004 DE 60220025 T2 17-01-2008 EP 1366197 A2 03-12-2003 HK 1059097 A1 04-04-2007 JP 4542312 B2 15-09-2010 JP 2004267201 A 30-09-2004 JP 2004535162 A 25-11-2004 JP 2008067709 A 27-03-2008 MX PA02012739 A 20-04-2004 NZ 523167 A 31-08-2006 US 2003087251 A1 08-05-2003 US 2005003441 A1 06-01-2005 US 2005014192 A1 20-01-2005 US 2009036663 A1 05-02-2009 US 2010167354 A1 01-07-2010 US 2012149068 A1 14-06-2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/065535

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 02072772 A2	19-09-2002
		ZA 200210369 A	08-07-2004
EP 1275737	A2	15-01-2003	
		CA 2390141 A1	30-12-2002
		CA 2714119 A1	30-12-2002
		EP 1275737 A2	15-01-2003
		EP 2360273 A1	24-08-2011
		EP 2360274 A1	24-08-2011
		EP 2361992 A1	31-08-2011
		EP 2366797 A1	21-09-2011
		IL 150226 A	28-02-2011
		IL 201151 A	29-02-2012
		IL 210619 A	29-02-2012
		IL 210620 A	29-02-2012
		IL 210621 A	29-02-2012
		IL 210622 A	29-02-2012
		IL 210623 A	29-02-2012
		IL 210624 A	29-02-2012
		IL 210625 A	29-02-2012
		IL 210626 A	29-03-2012
		IL 210627 A	29-03-2012
		IL 210628 A	29-03-2012
		IL 210629 A	29-03-2012
		IL 210630 A	29-03-2012
		IL 210631 A	29-03-2012
		IL 210632 A	29-03-2012
		IL 210633 A	29-03-2012
		IL 210634 A	29-03-2012
		IL 210635 A	29-03-2012
		IL 210636 A	29-03-2012
		IL 210637 A	29-03-2012
		JP 2003088390 A	25-03-2003
		JP 2008017853 A	31-01-2008
		JP 2009112317 A	28-05-2009
		US 2004161741 A1	19-08-2004
		US 2005009077 A1	13-01-2005
		US 2005170370 A1	04-08-2005
		US 2005202455 A1	15-09-2005
		US 2005202456 A1	15-09-2005
		US 2005214784 A1	29-09-2005
		US 2005233343 A1	20-10-2005
		US 2006014156 A1	19-01-2006
		US 2006035238 A1	16-02-2006
		US 2006040270 A1	23-02-2006
		US 2006040271 A1	23-02-2006
		US 2006040272 A1	23-02-2006
		US 2006057583 A1	16-03-2006
		US 2006099601 A1	11-05-2006
		US 2006172310 A1	03-08-2006
		US 2006257906 A1	16-11-2006
		US 2007196828 A1	23-08-2007
		US 2009042733 A1	12-02-2009

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/526,478

(32)優先日 平成23年8月23日(2011.8.23)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/552,660

(32)優先日 平成23年10月28日(2011.10.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 リ ビン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールスバッド バン アレン ウェイ 5791

(72)発明者 ラオ カイ シン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールスバッド バン アレン ウェイ 5791

(72)発明者 オニール ジェニファー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールスバッド バン アレン ウェイ 5791

(72)発明者 クンケル ジェニファー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールスバッド バン アレン ウェイ 5791

(72)発明者 ハレイ ケリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールスバッド バン アレン ウェイ 5791

(72)発明者 カシンスカス レイチェル

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールスバッド バン アレン ウェイ 5791

(72)発明者 マ シャオチュン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールスバッド バン アレン ウェイ 5791

(72)発明者 ブルゾスカ ピウス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールスバッド バン アレン ウェイ 5791

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA01 CA11 HA12

4B029	AA23	BB16	BB20	CC02	CC03	DG10				
4B063	QA01	QA05	QA11	QA18	QQ42	QQ52	QR08	QR32	QR42	QR55
	QR62	QS03	QS25	QS34	QX02					